

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107278206 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 201580076589.6

(73) 专利权人 雷根尼桑斯公司

(22) 申请日 2015.12.18

地址 荷兰比尔特霍芬

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 F·巴斯 M·A·万戴克

申请公布号 CN 107278206 A

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(43) 申请公布日 2017.10.20

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

62/094,649 2014.12.19 US

C07K 16/18 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/13 (2006.01)

2017.08.18

A61K 39/395 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 25/00 (2006.01)

PCT/IB2015/002504 2015.12.18

A61P 21/04 (2006.01)

审查员 薛旸

(87) PCT国际申请的公布数据

权利要求书2页 说明书56页

W02016/097865 EN 2016.06.23

序列表27页 附图14页

(54) 发明名称

结合人C6的抗体及其用途

(57) 摘要

公开了结合人补体组分C6的分离的单克隆抗体和基于抗体的相关组合物和分子。还描述了用于使用抗体的治疗方法。

1. 一种结合人C6的分离的抗体,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO: 6、7和8中显示的重链CDR1、2和3序列,并且包含分别在SEQ ID NO: 11、12和13中显示的轻链CDR1、2和3序列。

2. 权利要求1的分离的抗体,其展现出以下特性的至少三种:

- (a) 在溶血测定法中具有0.5 μg/ml或更小的IC₅₀;
- (b) 具有1 × 10⁻⁸ M或更小的K_D,如通过表面等离振子共振确定;
- (c) 具有40小时或更大的抗体-C6结合半衰期,如通过表面等离振子共振确定;和
- (d) 与猕猴C6起交叉反应。

3. 权利要求1或2的分离的抗体,其是人源化抗体。

4. 权利要求1-3中任一项的分离的抗体,其选自下组:

- (a) 包含SEQ ID NO: 30的重链可变区和SEQ ID NO: 31的轻链可变区的抗体;
- (b) 包含SEQ ID NO: 32的重链可变区和SEQ ID NO: 33的轻链可变区的抗体;
- (c) 包含SEQ ID NO: 34的重链可变区和SEQ ID NO: 35的轻链可变区的抗体;
- (d) 包含SEQ ID NO: 36的重链可变区和SEQ ID NO: 37的轻链可变区的抗体;
- (e) 包含SEQ ID NO: 38的重链可变区和SEQ ID NO: 39的轻链可变区的抗体;
- (f) 包含SEQ ID NO: 40的重链可变区和SEQ ID NO: 41的轻链可变区的抗体;
- (g) 包含SEQ ID NO: 42的重链可变区和SEQ ID NO: 43的轻链可变区的抗体;和
- (h) 包含SEQ ID NO: 44的重链可变区和SEQ ID NO: 45的轻链可变区的抗体。

5. 权利要求1-3中任一项的分离的抗体,其中:

- (a) 所述重链可变区包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44和46;和
- (b) 所述轻链可变区包含选自下组的氨基酸序列: SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45和47。

6. 权利要求5的分离的抗体,其中所述抗体包含在SEQ ID NO: 32中显示的重链可变区序列和在SEQ ID NO: 33中显示的轻链可变区序列。

7. 权利要求1-6中任一项的分离的抗体,其中所述抗体在溶血测定法中以0.5 μg/ml或更小的IC₅₀抑制C6活性。

8. 一种分离的抗体,其结合人C6并在溶血测定法中以0.5 μg/ml或更小的IC₅₀抑制C6活性,其中所述抗体包含分别在SEQ ID NO: 6、7和8中显示的重链CDR1、2和3序列,并且包含分别在SEQ ID NO: 11、12和13中显示的轻链CDR1、2和3序列。

9. 一种表达载体,其包含编码如权利要求1-8中任一项要求保护的结合人C6的抗体的轻链、重链、或轻链和重链两者的可变区的核苷酸序列。

10. 一种细胞,所述细胞用权利要求9的表达载体转化。

11. 一种组合物,其包含权利要求1-8中任一项的抗体和载剂。

12. 权利要求1-8中任一项的抗体用于制备促进受试者中受损伤或变性的神经的恢复的药物的用途,其中所述促进包括对所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-8中任一项的抗体。

13. 权利要求1-8中任一项的抗体用于制备降低或延迟受试者中的神经变性的药物的用途,其中所述降低或延迟包括对所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-8中任一项的

抗体。

14. 权利要求12或13的用途,其中所述受试者遭受神经的物理损伤。
15. 权利要求14的用途,其中所述物理损伤是创伤性损伤、手术损伤或非创伤性损伤。
16. 权利要求15的用途,其中所述损伤是对于周围神经系统(PNS)的。
17. 权利要求15的用途,其中所述损伤是对于中枢神经系统(CNS)的。
18. 权利要求14的用途,其中在损伤部位处或附近施用所述抗体。
19. 权利要求12或13的用途,其中所述受试者患有免疫介导的炎性病症或进行性神经变性性病症。
20. 权利要求19的用途,其中所述病症是获得性的。
21. 权利要求19的用途,其中所述病症是遗传性的。
22. 权利要求19的用途,其中所述病症是慢性脱髓鞘性神经病。
23. 权利要求19的用途,其中所述病症是神经变性性病症。
24. 权利要求12或13的用途,其中所述病症是陷夹综合征、格-巴二氏综合征(GBS)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病(CIDP)、多发性硬化症(MS)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、夏科-马里-图思病(遗传性运动和感觉神经病,HMSN)或亨廷顿病(HD)。
25. 权利要求12或13的用途,其中所述病症是腕管综合征。

结合人C6的抗体及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年12月19日提交的美国临时申请流水号62/094,649的优先权，其在此内容通过提及并入。

[0003] 发明背景

[0004] 补体系统是先天免疫系统的一部分，其发挥功能以在从生物体中清除病原体中帮助或“补充”抗体和吞噬细胞。在系统激活后，发生一组催化的反应和相互作用，导致靶向激活细胞、生物体或颗粒进行破坏。补体系统包含一组超过30种血浆和膜蛋白，其在调节的级联系统中一起起作用以攻击病原体(例如细菌)的胞外形式。补体系统包括两种独特的酶促激活级联，即经典和旁路途径，其在称为膜攻击途径的共同末端非酶促途径中会聚。

[0005] 称为经典途径的第一种酶促激活级联包含若干组分，即C1、C4、C2、C3和C5(按路径中的顺序列出)。在免疫和非免疫激活剂结合和激活第一补体成分(C1)后发生补体系统的经典途径的启动。C1包含组分C1q、C1r和C1s的钙依赖性复合物，并且经由C1q组分的结合而激活。C1q含有六个相同的亚基，并且每个亚基包含三条链(A、B和C链)。每条链具有与胶原样尾部连接的球形头部区域。抗原-抗体复合物对C1q的结合和激活经由C1q头部基团区域发生。许多非抗体C1q激活剂(包括蛋白质、脂质和核酸)经由胶原样茎区上的独特位点结合并且激活C1q。然后，C1qrs复合物催化补体成分C4和C2的激活，形成C4b2a复合物，其发挥C3转化酶的功能。

[0006] 称为旁路途径的第二种酶促激活级联是用于补体系统激活和放大的快速的不依赖于抗体的途径。旁路途径包括几种组分，即C3、因子B和因子D(按途径中的顺序列出)。当C3b(C3的蛋白水解切割形式)与激活表面剂如细菌结合时，发生旁路途径的激活。然后，因子B与C3b结合，并且被因子D切割以产生活性酶Ba。然后，酶Ba切割更多的C3以产生更多的C3b，在激活表面上产生C3b-Ba复合物的广泛沉积。

[0007] 因此，经典和旁路补体途径两者都产生将C3因子分成C3a和C3b的C3转化酶。在此时，这两种C3转化酶进一步组装成C5转化酶(C4b2a3b和C3b3bBb)。这些复合物随后将补体成分C5切割成两种成分：C5a多肽(9kDa)和C5b多肽(170kDa)。C5a多肽结合7跨膜G蛋白偶联受体，其最初与白细胞相关，并且现在已知在多种组织(包括肝细胞和神经元)上表达。C5a分子是人补体系统的主要趋化性成分，并且可以触发多种生物应答，包括白细胞趋化性、平滑肌收缩、细胞内信号转导途径的激活、嗜中性粒细胞-内皮粘附、细胞因子和脂质介质释放和氧化剂形成。

[0008] 较大的C5b片段序贯结合补体级联的后续组分，即C6、C7、C8和C9，以形成C5b-9膜攻击复合物(“MAC”)。亲脂性C5b-9MAC可直接溶解红细胞，并且在更大量中，它对白细胞是溶解性的并且对组织如肌肉、上皮细胞和内皮细胞是损伤性的。在亚溶解量中，C5b-9MAC可刺激粘附分子的上调、胞内钙增加和细胞因子释放。此外，在亚溶解浓度下，C5b-9MAC可以刺激细胞如内皮细胞和血小板而不引起细胞裂解。C5a和C5b-9MAC的非溶解效应是相当且可互换的。

[0009] 虽然补体系统在维持健康方面具有重要的作用，但它具有引起或促成疾病的潜

力。例如,研究已经显示了对补体级联的抑制或补体成分的消减减少中枢神经系统的神经变性性疾病中或实验性脑损伤中的损害(参见例如Feasby,T.E.等(1987)Brain Res.419:97-103;Vriesendorp,F.J.等(1995)J.Neuroimmunol.58:157-165;Jung,S.等(1995)Neurosci.Lett.200:167-170;Dailey,A.T.等(1998)J.Neurosci.18:6713-6722;Woodruff,T.M.等(2006)FASEB J.20:1407-1417;Leinhase,I.等(2006)BMS Neurosci.14:7:55)。特别地,C6缺陷型并且因此不能形成膜攻击复合物(MAC)的大鼠既未表现出脱髓鞘也没有轴突损伤,并且在与匹配的C6足够的大鼠相比时显著降低多发性硬化的抗体介导的实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型中的临床评分(Mead,R.J.等(2002)J.Immunol.168:458-465)。然而,单核细胞浸润水平与C6足够的大鼠中看到的单核细胞浸润水平相当。Mead等(2002)推断,脱髓鞘和轴突损伤在存在抗体的情况下发生,并且需要激活整个补体级联,包括MAC沉积,其可通过C6的消减抑制。

[0010] 因而,需要用于抑制C6的试剂,并且对于多种治疗目的是理想的。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了抗C6抗体,其具有对治疗目的期望的功能特性,包括有效抑制C6的功能活性,使得在体外和在体内抑制膜攻击复合物(MAC)的能力,以及非常低的 K_D (例如 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 或更小)和非常长的半衰期(例如40小时或更多)。通过用纯化的人C6蛋白免疫大鼠产生一组38种抗人C6抗体。在这38种中,2种显示出抑制膜攻击复合物(MAC)形成。生成了一种具有这些期望的功能特性的特定大鼠抗人C6抗体(在本文中称为7E5),并且制备了保留7E5的CDR的一组人源化抗体,包括人源化单抗8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02。在所有81种可能的“混合和匹配”组合中表达这8种人源化单抗的重链和轻链可变区,以及人源化单抗7C02的重链可变区和人源化单抗7G08的轻链可变区,并且证明了所有81种配对有效抑制C6功能活性。此外,已经在人C6内定位7E5的表位。

[0013] 因而,在一方面,本发明涉及结合人C6的分离的抗体,其中所述抗体展现出以下特性的至少三种:

[0014] (a) 在溶血测定法中具有 $0.5 \mu g/ml$ 或更小的 IC_{50} ;

[0015] (b) 具有 $1 \times 10^{-8} M$ 或更小的 K_D ,如通过表面等离振子共振确定;

[0016] (c) 具有40小时或更大的抗体-C6结合半衰期,如通过表面等离振子共振确定;和

[0017] (d) 与猕猴C6起交叉反应。

[0018] 涵盖了至少三种上述特性的任何组合。在一个实施方案中,抗体表现出特性(a)、(b)和(c)。在另一个实施方案中,抗体表现出特性(a)、(b)、(c)和(d)。在其它实施方案中,抗体具有 $1 \times 10^{-9} M$ 或更小或 $5 \times 10^{-10} M$ 或更小的 K_D ,如通过表面等离振子共振确定。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明涉及分离的抗体,其结合人C6中含有SEQ ID NO:52的残基835-854的全部或部分的区域(即,抗体结合残基835-854内的一个或多个残基)。在另一个实施方案中,抗体结合选自下组的氨基酸序列的全部或部分的表位:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3(即,抗体结合SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3内的一个或多个氨基酸残基)。在某些实施方案中,表位是由抗体识别的不连续表位的部分。例如,在一个实施方案中,抗体结合包含选自下组的氨基酸序列的全部或部分的表位:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3,其中表位是不连续的。

[0020] 在又一个实施方案中,本发明提供了抗体,其与包含SEQ ID NO:5中显示的重链可

变区和SEQ ID N0:10中显示的轻链可变区(即,单抗7E5的重链和轻链可变区)的抗体交叉竞争对人C6的结合。在其它实施方案中,本发明提供了与选自下组的单抗交叉竞争对人C6的结合的抗体:8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02。

[0021] 在多个实施方案中,本发明的抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合的抗体。

[0022] 在多个实施方案中,本发明的抗体包含分别在SEQ ID N0:6、7和8中显示的重链CDR1、2和3序列,并且包含分别在SEQ ID N0:11、12和13中显示的轻链CDR1、2和3序列。例如,抗体可为包含前述CDR的人源化抗体。

[0023] 在另一个方面,本发明提供了结合人C6的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID N0:8中显示的重链CDR3;和SEQ ID N0:13中显示的轻链CDR3。抗体可进一步包含SEQ ID N0:7中显示的重链CDR2;和SEQ ID N0:12中显示的轻链CDR2。抗体可进一步包含SEQ ID N0:6中显示的重链CDR1;和SEQ ID N0:11中显示的轻链CDR1。包含前述CDR的抗体的代表性例子包括下列各项:

[0024] (a) 包含SEQ ID N0:30的重链可变区和SEQ ID N0:31的轻链可变区的抗体;

[0025] (b) 包含SEQ ID N0:32的重链可变区和SEQ ID N0:33的轻链可变区的抗体;

[0026] (c) 包含SEQ ID N0:34的重链可变区和SEQ ID N0:35的轻链可变区的抗体;

[0027] (d) 包含SEQ ID N0:36的重链可变区和SEQ ID N0:37的轻链可变区的抗体;

[0028] (e) 包含SEQ ID N0:38的重链可变区和SEQ ID N0:39的轻链可变区的抗体;

[0029] (f) 包含SEQ ID N0:40的重链可变区和SEQ ID N0:41的轻链可变区的抗体;

[0030] (g) 包含SEQ ID N0:42的重链可变区和SEQ ID N0:43的轻链可变区的抗体;和

[0031] (h) 包含SEQ ID N0:44的重链可变区和SEQ ID N0:45的轻链可变区的抗体。

[0032] 在又一个方面,本发明提供了结合人C6的分离的抗体,其包含:

[0033] (a) 重链可变区,所述重链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID N0:30,32,34,36,38,40,42,44和46;和

[0034] (b) 轻链可变区,所述轻链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列:SEQ ID N0:31,33,35,37,39,41,43,45和47。

[0035] 在其它实施方案中,重链和轻链可变区与前述氨基酸序列是95%、96%、97%、98%或99%相同的。在另一个实施方案中,分离的抗体是抗体,其中:

[0036] (a) 所述重链可变区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID N0:30,32,34,36,38,40,42,44和46;和

[0037] (b) 所述轻链可变区包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID N0:31,33,35,37,39,41,43,45和47。

[0038] 本发明还涵盖包含核苷酸序列的表达载体,及通过此类表达载体转化的宿主细胞,和使用经转化的宿主细胞重组表达抗体的方法,所述核苷酸序列编码本发明的抗体的轻链、重链、或轻链和重链两者的可变区。在一个实施方案中,本发明的抗体以Fab片段表达。在另一个实施方案中,本发明的抗体以全长抗体表达,如IgG4同种型抗体,如具有IgG4(S228P)恒定区。

[0039] 还涵盖包含本发明的抗体和药学可接受载剂的组合物,如包含本发明的抗体的药物组合物。

[0040] 在另一个方面,本发明涉及使用本发明的抗体的方法。在一个实施方案中,本发明

提供了抑制受试者中膜攻击复合物(MAC)形成或活性的方法,所述方法包括以有效抑制所述受试者中的MAC形成或活性的量对所述受试者施用本发明的抗体。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗、预防受试者中由补体系统的不想要的活性介导的病症或降低受试者中由补体系统的不想要的活性介导的病症的症状的方法,所述方法包括对所述受试者施用有效量的本发明的抗体。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明提供了再生受试者中的神经的方法,包括对受试者施用治疗有效量的本发明的抗体。在又一个实施方案中,本发明提供了促进受试者中受损伤或变性的神经的恢复的方法,其包括对所述受试者施用治疗有效量的本发明的抗体。在又一个实施方案中,本发明提供了降低或延迟受试者中的神经变性的方法,其包括对所述受试者施用治疗有效量的本发明的抗体。

[0042] 在一个实施方案中,所述受试者遭受神经的物理损伤,如创伤性损伤(例如来自事故)、手术损伤或非创伤性损伤(例如神经压迫)。在一个实施方案中,损伤是对于周围神经系统(PNS)的。在另一个实施方案中,损伤是对于中枢神经系统(CNS)的。在一个实施方案中,在损伤处或附近施用抗体。

[0043] 在另一个实施方案中,受试者患有免疫介导的炎性病症或进行性神经变性性病症。在一个实施方案中,病症是获得性的。在另一个实施方案中,病症是遗传性的。在一个实施方案中,病症是慢性脱髓鞘性神经病,如多发性硬化(MS)。在另一个实施方案中,病症是神经变性性病症,如重症肌无力或肌萎缩侧索硬化(ALS)。

[0044] 附图简述

[0045] 图1A是柱状图,其显示了使用来自用人C6免疫的两只不同大鼠的38个杂交瘤的上清液的溶血测定法的结果,证明上清液11(其产生7E5单抗)具有最强的抑制效果。

[0046] 图1B是柱状图,其显示了使用来自用人C6免疫的两只不同大鼠的38个杂交瘤的上清液的甘露聚糖激活的补体ELISA的结果,证明了上清液11(其产生7E5单抗)具有最强的抑制效果。

[0047] 图2是显示重组大鼠7E5与人C6结合的Biacore动力学的图。

[0048] 图3A-D的图显示了27B1单抗和7E5单抗之间的表位交叉阻断实验的结果,指示7E5占据与27B1不同的表位。

[0049] 图4A是人C6部分氨基酸序列(SEQ ID NO:50)和大鼠C6部分氨基酸序列(SEQ ID NO:51)的比对,显示了肽418的位置。

[0050] 图4B是显示肽418位置的人C6蛋白的示意图。

[0051] 图5的柱状图显示了7E5在补充有人C6的C6缺陷型大鼠中体内阻断C6,如通过溶血测定法测量。大鼠接受指定量的人C6和抗体7E5。在Y轴上绘制补体活性,其中O.D.1.0指示致敏红细胞的最大溶解,而O.D.0指示溶解的缺乏。

[0052] 图6A是大鼠抗C5 7E5单抗(SEQ ID NO:5)和人VH3_1种系(SEQ ID NO:48)的重链可变区的氨基酸序列的比对,其中标示差异。在比对下方标示了靶向用于人源化的氨基酸交换。

[0053] 图6B是大鼠抗C5 7E5单抗(SEQ ID NO:10)和人Vκ2_5种系(SEQ ID NO:49)的轻链可变区的氨基酸序列的比对,其中标示差异。在比对下方标示了靶向用于人源化的氨基酸交换。

[0054] 图7A是显示溶血测定法的结果的柱状图,其证明了9种人源化7E5变体VH链和9种人源化7E5变体VL链的所有81种可能组合的抑制活性(分别示于图7A和7B中)。

[0055] 图7B是显示MAC ELISA测定法的结果的柱状图,其证明了9种人源化7E5变体VH链和9种人源化7E5变体VL链的所有81种可能的组合的抑制活性(分别示于图7A和7B中)。

[0056] 图8A是7E5重链可变区(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列与人源化7E5变体7C02(SEQ ID NO:46),7E11(SEQ ID NO:42),7E12(SEQ ID NO:32),7F02(SEQ ID NO:44),7F06(SEQ ID NO:38),7F11(SEQ ID NO:40),7G09(SEQ ID NO:34),8F07(SEQ ID NO:36)和8G09(SEQ ID NO:30)的重链氨基酸序列的比对。标示了保守的CDR1、2和3区。

[0057] 图8B是7E5轻链可变区(SEQ ID NO:10)的氨基酸序列与人源化7E5变体7E11(SEQ ID NO:43),7E12(SEQ ID NO:33),7F02(SEQ ID NO:45),7F06(SEQ ID NO:39),7F11(SEQ ID NO:41),7G08(SEQ ID NO:47),7G09(SEQ ID NO:35),8F07(SEQ ID NO:37)和8G09(SEQ ID NO:31)的轻链氨基酸序列的比对。标示了保守的CDR1、2和3区。

[0058] 图9显示了与野生型7E5大鼠F' Ab的亲和力相比,8种人源化F' Ab对人C6的亲和力(Biacore)。

[0059] 图10显示了体内神经挤压实验的结果。

[0060] 发明详述

[0061] 本发明提供了表现出有益功能特性的抗C6抗体。这些功能特征包括例如:(a)在溶血测定法中 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更小的 IC_{50} ;(b) $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小的 K_{D} ,如通过表面等离振子共振确定;(c)40小时或更大的抗体-C6结合半衰期,如通过表面等离振子共振确定;和/或(d)与猕猴C6的交叉反应。在其它实施方案中,抗体包含特定的重链和轻链可变区和/或CDR序列。例如,提供9种人源化重链和9种人源化轻链可变区,其在链的所有81种可能的“混合和匹配”组合中表现出有效的C6抑制活性。在其它实施方案中,抗C6抗体与本文中公开的特定抗C6抗体如7E5,8G09,7E12,7G09,8F07,7F06,7F11,7E11或7F02结合相同的表位,或竞争结合C6。

[0062] 为了可以更容易理解本发明,首先定义某些术语。在整个详细描述中阐述了其它定义。

[0063] 术语“C6”(也称为“补体C6”或“补体组分C6”)是指与组分C5b、C7、C8和C9结合以形成C5b-C9膜攻击复合物(MAC)的补体级联组分。术语“C6”包括天然表达的C6的任何变体或同种型。本发明的抗体可对人CD6是特异性的,并且可不表现出与其它物种的任何交叉反应性。或者,本发明的抗体可与来自除人以外的物种,如猕猴的C6起交叉反应。或者,本发明的抗体可与来自灵长类,如猕猴的C6起交叉反应,但不与非灵长类C6,如小鼠或大鼠C6起交叉反应。C6或其任何变体和同种型可从天然表达它们的细胞或组织分离或使用本领域公知的技术重组产生。Genbank®(登录号NP_00110860.3)报告如下的人C6的氨基酸序列(SEQ ID NO:52):

1 marrsvlyfi llnalinkgq acfcdfhyawt qwtscsktcn sgtqsrhrqi vvdkyyqenf
 61 ceqicskqet recnwqrcpi ncllgdfgpw sdcdpciekq skvrsvlrps qfggqpctap
 121 lvafqpcips klckieeadc knkfrcdsgr ciarklecn endcgdnsde rdcgrtkavc
 181 trkyntpipsv qlmgngfhfl ageprgevld nsftggickt vkssrtsnpy rvpanlenvg
 241 fevqtaedd1 ktdfykdlts lghnenqqgs fssqggssfs vpifysskrs eninhnsafk
 301 qaiqashkkd ssfirihkvm kvlnfttkak dlhlsdvflk alnhlpleyn salysrifdd
 361 fgthyftsgs lggvyd1lyq fsseelknsg lteeeakhcv rietkkrvlf akktkvehrc
 421 ttnklsekhe gsfiqgaeks islirggrse ygaalawekg ssgleektfs ewlesvkenp
 [0064] 481 avidfelapi vdlvrnipca vtkrnnlrka lqeyaakfdp cqcacpnng rptlsgtecl
 541 cvcqsgtyge ncekqspdyk snavdgqwgc wsswstcdat ykrssrtreecn npapqrggkr
 601 cegekrqeed ctfsimennq qpcinddeem kevdlpeiae dsgcpqpvp pp engfirnekq
 661 lylvgedvei scltgfetvg yqyfrclpdg twrqgdvecq rtecikpvvq evltitpfqr
 721 lyrigesiel tcpkgfvvag psrytcqgns wtppisnslt cekdtltklk ghcqlgqkqs
 781 gsecicmspe edcshhsed1 cvfdtdsndy ftspackfla ekclnnqqlh flhigscqdq
 841 rqlewglert rlssnstkke scgydtydw ekcsastskc vcl1ppqcfk ggnqlycvkm
 901 gsstsektln icevgtirca nrkmeilhpg kcla

[0065] 如本文中提及,术语“抗体”包括全抗体和其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。在一个优选的实施方案中,“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每个重链由重链可变区(本文缩写为V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个域CH1、CH2和CH3组成。每个轻链由轻链可变区(本文缩写为V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个域CL组成。V_H和V_L区可进一步细分为高变性区域,称作互补决定区(CDR),穿插有更保守的区域,称作框架区(FR)。每个V_H和V_L由以下顺序从氨基末端到羧基末端排列的三个CDR和四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞))和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。

[0066] 如本文中使用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留特异性结合抗原(例如人C6)的能力的一种或多种抗体片段。此类“片段”的长度为例如约8至约1500个氨基酸,合适地长度为约8至约745个氨基酸,合适地长度为约8至约300个,例如约8至约200个氨基酸,或约10至约50或100个氨基酸。已经显示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段进行。在术语抗体的“抗原结合部分”内涵盖的结合片段的实例包括(i)Fab片段,即由V_L、V_H、C_L和CH1域组成的单价片段;(ii)F(ab')₂片段,即包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由V_H和CH1域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的V_L和V_H域组成的Fv片段,(v)由V_H域组成的dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546);和

(vi) 分离的互补决定区(CDR)或(vii)可以任选地通过合成接头连接的两个或更多个分离的CDR的组合。此外,尽管Fv片段两个域V_L和V_H由不同的基因编码,但是它们可以通过合成接头使用重组方法连接,所述合成接头使它们能够以单个蛋白质链生成,其中V_L和V_H区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv));参见例如Bird等(1988)Science 242:423-426;以及Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意图涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。可以通过重组DNA技术或对完整的免疫球蛋白的酶促或化学切割产生抗原结合部分。

[0067] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同重/轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体。可通过多种方法产生双特异性抗体,所述方法包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如Songivilai&Lachmann,Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990);Kostelny等,J.Immunol.148,1547-1553(1992)。

[0068] 如本文中使用,术语“单克隆抗体”是指对特定表位展示单一结合特异性和亲和力的抗体。因而,术语“人单克隆抗体”是指展示单一结合特异性并且具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变和任选恒定区的抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体由包含与永生化细胞融合的从转基因非人动物,例如转基因小鼠获得的B细胞的杂交瘤产生,所述转基因非人动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0069] 如本文中使用,术语“重组抗体”包括通过重组手段制备、表达、创建或分离的所有嵌合抗体、人源化抗体和人抗体,如(a)从动物(例如小鼠)或自其制备的杂交瘤分离的抗体,所述动物对于人免疫球蛋白基因是转基因或转染色体的,(b)从经转化以表达抗体的宿主细胞,例如从转染瘤分离的抗体,(c)从重组组合人或人源化抗体文库分离的抗体,和(d)通过牵涉将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列的任何其它手段制备、表达、创建或分离的抗体。

[0070] 术语“人源化抗体”是指具有来自人种系序列的框架区和来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔)的CDR的抗体,并且包括例如其中的人框架区和/或CDR已进行特异性位点定向诱变以优化结合。实施例8中描述了人源化抗C6抗体的制备的示例性描述。

[0071] 术语“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区(如果存在的话)的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变)(参见Lonberg,N.等(1994)Nature 368 (6474) :856-859);Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65-93,以及Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546)。然而,术语“人抗体”不包括其中源自另一种哺乳动物物种,如小鼠的种系的CDR序列已经被嫁接到人框架序列上的抗体(即人源化抗体)。

[0072] 如本文中使用,“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原性特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性结合人C6的分离的抗体基本上不含特异性结合与人C6不同的抗原的抗体)。然而,特异性结合表位的分离的抗体可与来自不同物种的其它C6蛋白具有交叉反应性。然而,抗体优选总是结合人C6。另外,分离的抗体通常基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。在本发明的一个实施方案中,将具有不同C6特异性的“分离的”抗体的组合组合成

明确定义的组合物。

[0073] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指免疫球蛋白或抗体特异性结合的抗原上的位点。可从连续的氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的不连续氨基酸形成表位。从连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包含独特的空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。用于确定何种表位被给定抗体结合的方法(即,表位定位)是本领域中公知的,且包括例如免疫印迹和免疫沉淀测定法,其中测试来自C6的重叠或连续肽与给定抗C6抗体的反应性。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文中所述的技术,例如,x射线晶体学和二维核磁共振(参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编(1996))。

[0074] 术语“不连续表位”是指由不连续氨基酸构成的表位。例如,表位可以包括来自人C6的多个区域的残基,其在构象折叠时被带到一起(接近),使得抗体结合每个区域内的一或多个残基。

[0075] 术语“表位定位”是指鉴定抗体-抗原识别的分子决定簇的过程。

[0076] 术语“结合相同表位”在提及两种或更多种抗体的情况下意指抗体竞争与抗原的结合并且结合相同、重叠或涵盖的连续或不连续的氨基酸区段。本领域技术人员理解,短语“结合相同表位”并不一定意味着抗体结合完全相同的氨基酸。抗体结合的精确氨基酸可以不同。例如,第一抗体可以结合由第二抗体结合的氨基酸区段完全涵盖的氨基酸区段。在另一个实例中,第一抗体结合与由第二抗体结合的一个或多个区段显著重叠的一个或多个氨基酸区段。为了本文的目的,认为是此类抗体“结合相同的表位”。

[0077] 如本文中使用,术语“特异性结合”和“选择性结合”是指结合预定抗原上的表位的抗体。通常,使用重组人C6作为分析物和抗体作为配体,在通过BIACORE 2000仪中的表面等离振子共振(SPR)技术确定时,抗体以约小于 10^{-7} M,如约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的平衡解离常数(K_D)结合,并且以下述亲和力结合预先确定的抗原,所述亲和力是其对除预先确定的抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原(例如BSA,酪蛋白)的结合亲和力的至少2倍。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”在本文中与“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0078] 如本文中使用,术语“ K_D ”意图指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,使用重组人C6作为分析物和抗体作为配体,在通过BIACORE2000仪中的表面等离振子共振(SPR)技术确定时,本发明的抗体以约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低的平衡解离常数(K_D)结合C6。

[0079] 如本文中使用,术语“ k_d ”意图指抗体与抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。

[0080] 如本文中使用,术语“ k_a ”意图指抗体与抗原结合的结合速率常数。

[0081] 如本文中使用,术语“ IC_{50} ”是指在体外或体内测定法中将给定的生物应答抑制一半需要的抗体或其抗原结合部分的浓度。也就是说,它是抗体或其抗原结合部分的半最小(50%)抑制浓度(IC)。

[0082] 如本文中使用,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类(例如IgM或IgG1)。在一个实施方案中,本发明的人单克隆抗体是IgG1同种型的。在另一个实施方案中,本发明的人单克隆抗体是IgG2同种型的。在另一个实施方案中,本发明的人单克隆抗体是IgG4同

种型的。在另一个实施方案中,本发明的人单克隆抗体是IgG4(S228P)同种型的(即,在氨基酸位置228处具有野生型丝氨酸残基的脯氨酸取代的IgG4同种型)。

[0083] 术语“结合固定化的C6”是指本发明的人抗体结合例如在细胞表面上表达或附着到固体支持物的C6的能力。

[0084] 如本文中使用,术语“起交叉反应”是指本发明的抗体结合来自不同物种的C6的能力。例如,结合人C6的本发明的抗体也可结合另一种C6,如猕猴。如本文中使用,通过检测结合测定法(例如SPR,ELISA)中与纯化的抗原的特异性反应性或与生理性表达C6的细胞的结合或以其它方式功能性相互作用测量交叉反应性。用于测定交叉反应性的方法包括如本文中所述的标准结合测定法,例如通过使用BiacoreTM 2000 SPR仪(Biacore AB,Uppsala,Sweden)的BiacoreTM表面等离振子共振(SPR)分析或流式细胞技术。

[0085] 如本文中使用,“糖基化模式”定义为共价附着到蛋白质,更具体地免疫球蛋白蛋白质的糖单元的模式。当本领域普通技术人员会将异源抗体的糖基化模式识别为比衍生转基因的CH基因的物种更类似于非人转基因动物物种中的所述糖基化模式时,可将异源抗体的糖基化模式表征为基本上类似于在由非人转基因动物物种产生的抗体上天然存在的糖基化模式。

[0086] 如本文中使用,术语“天然存在”在应用于对象时是指在自然界中可以找到对象的事实。例如,存在于生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的,其可从天然来源分离并且尚未在实验室中人为有意修饰。

[0087] 如本文中使用,术语“重排”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构造,其中V区段紧邻分别编码基本上完整的V_H或V_L域的构造中的D-J或J区段定位。可通过与种系DNA比较来鉴定重排的免疫球蛋白基因座;重排的基因座会具有至少一个重组七聚体/九聚体同源性元件。

[0088] 如本文中使用,术语“未重排”或“种系构造”在提及V区段时是指其中未重组V区段以便紧邻D或J区段的构型。

[0089] 如本文中使用,术语“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链,但优选是双链DNA。

[0090] 如本文中使用,术语“分离的核酸分子”在提及编码结合C6的抗体或抗体部分(例如V_H、V_L、CDR3)的核酸时意图指下述核酸分子,其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码结合除C6以外的抗原的抗体或抗体部分的其它核苷酸序列,所述其它序列在人基因组DNA中可天然地在所述核酸侧翼。例如,SEQ ID NO:14、16、18、20、22、24、26和28分别对应于编码抗C6单克隆抗体8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02的重链(VH)可变区的核苷酸序列。SEQ ID NO:15、17、19、21、23、25、27和29分别对应于编码抗C6单克隆抗体8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02的轻链(VH)可变区的核苷酸序列。

[0091] 本发明还涵盖SEQ ID NO:4-47中列出的序列的“保守序列修饰”,即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体对抗原的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。此类保守序列修饰包括保守核苷酸和氨基酸取代,以及核苷酸和氨基酸的添加和缺失。例如,可以通过本领域已知的标准技术(如定点诱变和PCR介导的诱变)将修饰引入到SEQ ID NO:4-47中。保守氨基酸取代包括氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基替换的取代。已经在本领域中定义具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例

如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸,谷氨酸)、不带电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,人抗C6抗体中预测的非必需氨基酸残基优选用来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替换。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域中公知的(参见例如Brumme11等,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等Protein Eng.12(10):879-884(1999);以及Burks等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0092] 或者,在另一个实施方案中,可如通过饱和诱变沿着整个或部分抗-C6抗体编码序列随机引入突变,并且可筛选所得的修饰的抗C6抗体的结合活性。

[0093] 对于核酸,术语“实质性同源性”指两个核酸或其指定序列当在最佳比对和比较时在适当的核苷酸插入或缺失的情况下在至少约80%的核苷酸,通常至少约90%至95%,更优选至少约98%至99.5%的核苷酸中是相同的。或者,当区段在选择性杂交条件下与链的互补物杂交时存在实质性同源性。

[0094] 两个序列之间的百分比同一性是由序列共享的相同位置的数目的函数(即,%同源性=相同位置的数目/位置的总数×100),当需要引入以实现两个序列的最佳比对时考虑缺口的数目和每个缺口的长度。可使用如下面非限制性实例中所述的数学算法来完成序列的比较和两个序列之间的百分比同一性的测定。

[0095] 可使用GCG软件包(在<http://www.gcg.com>可获得)中的GAP程序使用NWSgapdna.CMP矩阵和缺口权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6确定两个核苷酸序列之间的百分比同一性。可使用已经并入ALIGN程序(第2.0版)中的E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))的算法,使用PAM120权重残基表、缺口长度罚分12和缺口罚分4确定两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性。另外,可使用已经并入GCG软件包(在<http://www.gcg.com>可获得)中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,以及缺口权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性。

[0096] 本发明的核酸和蛋白质序列还可用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索,以例如鉴定相关序列。可使用Altschul,等(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(第2.0版)进行此类搜索。可用NBLAST程序,得分=100,字长=12进行BLAST核苷酸搜索以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可用XBLAST程序,得分=50,字长=3进行BLAST蛋白质搜索以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的缺口比对,可如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所述利用缺口BLAST。当利用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0097] 本发明的核酸或蛋白质可存在于全细胞、细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术(包括碱/SDS处理、CsCl分带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其它技术)从其它细胞组分或其它污染物(例如其它细胞核酸或蛋白质)纯化时,核酸或蛋白质是“分离的”或“变得基本上纯”。参见F.Ausubel等编Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0098] 可根据标准技术突变来自cDNA、基因组或其混合物的本发明的核酸组合物(虽然经常为天然序列(除了经修饰的限制性位点等外))以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可根据需要影响氨基酸序列。特别地,涵盖与本文中所述的天然V、D、J、恒定、转换和其它此类序列基本上同源或从它们衍生的DNA序列(其中“衍生”指示序列与另一序列相同或从另一序列修饰)。

[0099] 当将核酸与另一种核酸序列置于功能关系中时,它是“可操作连接的”。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列可操作连接。就转录调节序列而言,可操作连接意味着连接的DNA序列是连续的,并且在必需连接两个蛋白质编码区时是连续的且符合读码框。对于转换序列,可操作连接指示序列能够实现转换重组。

[0100] 如本文中使用,术语“载体”意图指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”,其是指可以连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一类载体是病毒载体,其中可以将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)。可在导入宿主细胞中后将其它载体(例如非附加体哺乳动物载体)整合到宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。而且,某些载体能够指导与它们可操作连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。通常,在重组DNA技术中效用的表达载体通常为质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明意图包括表达载体的此类其它形式,例如发挥等同功能的病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0101] 如本文中使用,术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)意图指已经导入有重组表达载体的细胞。应当理解,此类术语不仅意图指特定的受试细胞,而是指此类细胞的后代。由于某些修饰可以由于突变或环境影响而在后代中发生,此类后代实际上可以不与亲本细胞相同,但仍包括在如本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0102] 如本文中使用,术语“连接”是指两个或更多个分子的结合。连接可以是共价或非共价的。连接也可以是遗传的(即重组融合的)。可使用极其多种公认的技术,如化学缀合和重组蛋白质生成来实现此类连接。

[0103] 如本文中使用,术语“抑制”或“阻断”(例如,指通过抗C6抗体抑制/阻断MAC形成)可互换使用,并且涵盖部分和完全抑制/阻断。C6的抑制/阻断优选降低或改变当C6不被阻断或抑制时发生的正常活性水平或类型。抑制和阻断也意图包括与未与抗C6抗体接触的C6相比,与抗C6抗体接触时C6的结合或活性的任何可测量的降低,例如将C6的结合或活性抑制至少约10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或100%。在一个实施方案中,抗C6抗体将C6的结合或活性抑制至少约70%。在另一个实施方案中,抗C6抗体将C6的结合或活性抑制至少80%。

[0104] 如本文中使用,术语“治疗”和“处理”是指本文所述的治疗或预防措施。“治疗”的方法采用对需要此类治疗,本发明的抗体的受试者施用,例如需要此类治疗的受试者。

[0105] 术语“有效剂量”或“有效剂”定义为足以实现或至少部分实现期望效果的量。术语“治疗有效剂量”定义为足以治愈或至少部分阻止已经患有该疾病的患者中的疾病及其并发症的量。对此用途有效的量将取决于所治疗的病症的严重性和患者自身的免疫系统的一

般状态。

[0106] 术语“患者”包括接受预防性或治疗性处理的人和其它哺乳动物受试者。

[0107] 如本文中使用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可用于治疗患有免疫病症的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。

[0108] 将在以下小节中进一步详细描述本发明的各个方面。

[0109] I. 针对C6的抗体的生成

[0110] 本发明涵盖结合C6,例如人C6的抗体,例如人源化抗体。结合C6的示例性单克隆抗体包括7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02,其重链可变区分别在SEQ ID N0:5、30、32、34、36、38、40、42和44中显示,并且其轻链可变区分别在SEQ ID N0:10、31、33、35、37、39、41、43和45中显示。这些抗体的重链CDR1、2和3分别在SEQ ID N0:6、7和8中显示,而这些抗体的轻链CDR1、2和3分别在SEQ ID N0:11、12和13中显示。

[0111] 可使用多种已知技术,如由Kohler和Milstein,Nature 256:495 (1975) 描述的标准体细胞杂交技术制备本发明的单克隆抗体。尽管体细胞杂交程序是优选的,但是原则上也可以采用用于生成单克隆抗体的其它技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化、使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术和人源化技术,如实施例6中描述的技术。

[0112] 因而,在一个实施方案中,杂交瘤方法用于产生结合人C6的抗体。在此方法中,可用合适的抗原免疫大鼠、小鼠或其它合适的宿主动物,以引发产生或能够产生将特异性结合用于免疫的抗原的抗体的淋巴细胞。如实施例1中所述,特别适合于生成抗人C6抗体的宿主动物是C6缺陷型大鼠(C6-/-大鼠),使得认为用人C6的免疫是完全“外来的”。可在合适的测定法中测试来自经免疫的宿主动物的上清液以检测抗C6活性,如实施例1中详细描述的溶血测定法或MAC ELISA,以鉴定表达具有C6抑制活性的抗体的宿主动物。

[0113] 然后,使用合适的融合剂(如聚乙二醇)将来自所选择的宿主动物的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,第59-103页(Academic Press,1986))。示例性融合配偶体是Y3-Ag1.2.3细胞,尽管本领域中已知的其它骨髓瘤细胞,如SP2/0-Ag8.653细胞(ATCC,CRL 1580)也是合适的。对杂交瘤细胞生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的产生,如用溶血测定法和/或MAC ELISA。在鉴定产生期望特异性、亲和性和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,通过有限稀释程序将克隆亚克隆并通过标准方法(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,pp.59-103 (Academic Press,1986))培养。用于此目的的合适的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,可在动物中在体内以腹水肿瘤培养杂交瘤细胞。可通过常规的免疫球蛋白纯化方法,如例如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水或血清中分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。在实施例1中详细描述了分泌抗C6抗体的杂交瘤的制备的示例性非限制性实例。

[0114] 可使用本领域中已知的方法将非人单克隆抗体,如大鼠或小鼠抗体进行人源化。例如,如实施例6中详细描述,可使用Hwang,W.Y等(2205)Methods 36:35-42中描述的方法对大鼠抗人C6单抗进行人源化。此方法基于以下原则:如果非人和人抗体具有相似结构的CDR,则人框架也将支持非人CDR,亲和力得到良好保留。因此,在此方法中,基于人CDR与待人源化的抗体的CDR的结构相似性(相同Chothia规范结构),从人种系基因的组选择人框架

序列。产生含有偏离的FR残基的Fab变体序列的噬菌体展示文库。在亲和力驱动的选择之后,筛选单个克隆的结合和解离速率,并且确定序列人同一性和同源性。本领域中完善建立的用于CDR嫁接和人源化的其它办法和方法也可用于产生本发明的人源化抗C6抗体。

[0115] 在另一个实施方案中,可从使用例如McCafferty等,Nature,348:552-554(1990).Clackson等,Nature,352:624-628(1991),Marks等,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)和Hoet等(2005)Nature Biotechnology 23,344-348;Ladner等的美国专利号5,223,409;5,403,484;和5,571,698;Dower等的美国专利号5,427,908和5,580,717;McCafferty等的美国专利号5,969,108和6,172,197;以及Griffiths等的美国专利号5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081中所述的技术产生的抗体噬菌体文库分离结合人C6的抗体和抗体部分。另外,也可使用通过链改组(Marks等,Bio/Technology,10:779-783(1992))生成高亲和力(nM范围)人抗体,以及组合感染和体内重组作为用于构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse等,Nuc.Acids.Res.,21:2265-2266(1993))。

[0116] 在一个实施方案中,使用由Hoet等,同上所述的噬菌体展示技术产生结合人C6的抗体。此技术牵涉产生人Fab文库,其具有从人供体分离的免疫球蛋白序列的独特组合并且在重链CDR中具有合成多样性。然后,对文库筛选结合人C6的Fab。

[0117] 在一个实施方案中,使用携带人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠产生针对C6的抗体。在一个实施方案中,本发明采用转基因小鼠,本文称为“HuMAb小鼠”,其含有编码未重排的人重(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座,以及使内源性 μ 和 κ 链基因座失活的靶向突变(Lonberg,N.等(1994)Nature 368 (6474):856-859)。因而,小鼠表现出降低的小鼠IgM或 κ 表达,并且响应免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变以产生高亲和力的人IgG κ 1单克隆抗体(Lonberg,N.等(1994),同上;综述于Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.第13卷:65-93,和Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546)。HuMAb小鼠的制备记载于Taylor,L.等(1992)Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen,J.等(1993)International Immunology 5:647-656;Tuailion等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:3720-3724;Choi等(1993)Nature Genetics 4:117-123;Chen,J.等(1993)EMBO J.12:821-830;Tuailion等(1994)J.Immunol.152:2912-2920;Lonberg等,(1994)Nature 368 (6474):856-859;Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Taylor,L.等(1994)International Immunology 6:579-591;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65-93;Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536-546;Fishwild,D.等(1996)Nature Biotechnology 14:845-851。进一步参见美国专利号5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;和5,770,429;均属Lonberg和Kay,以及GenPharm International;Surani等的美国专利号5,545,807;1998年6月11日公布的国际公开号WO 98/24884;1994年11月10日公布的WO 94/25585;1993年6月24日公布的WO 93/1227;1992年12月23日公布的WO 92/22645;1992年3月19日公布的WO 92/03918。

[0118] 在另一个实施方案中,可使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠(如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)生成本发明的人抗体。在Ishida等的

PCT公开文本WO 02/43478中详细描述了本领域中称为“KM小鼠”的此类小鼠。

[0119] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统是本领域中可用的,并且可用于生成本发明的抗C6抗体。例如,可使用称为Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的备选转基因系统;此类小鼠记载于例如Kucherlapati等的美国专利号5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963。

[0120] 此外,表达人免疫球蛋白基因的备选转染色体动物系统是本领域中可用的,并且可用于生成本发明的抗C6抗体。例如,可使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠,在本领域中称为“TC 小鼠”;此类小鼠记载于 Tomizuka 等 (2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727。此外,本领域中已经描述了携带人重链和轻链转染色体的牛 (Kuroiwa 等 (2002) Nature Biotechnology 20:889-894),并且可用于生成本发明的抗C6抗体。

[0121] 也可应用用于生成人抗体的本领域中描述的另外的小鼠系统以生成本发明的抗C6抗体,包括但不限于 (i) VelocImmune® 小鼠 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), 其中已经由同源重组用可操作连接到内源小鼠恒定区的人重链和轻链可变区替换内源性小鼠重链和轻链可变区,使得在小鼠中生成嵌合抗体(人V/小鼠C),然后随后使用标准重组DNA技术转化为完全人抗体;和 (ii) MeMo® 小鼠 (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), 其中小鼠含有未重排的人重链可变区,但是单个重排的人共同轻链可变区。此类小鼠及其生成抗体的用途记载于例如WO 2009/15777,US 2010/0069614,WO 2011/072204,WO 2011/097603,WO 2011/163311,WO 2011/163314,WO 2012/148873,US 2012/0070861和US 2012/0073004。

[0122] 也可使用SCID小鼠制备本发明的人单克隆抗体,已经对所述SCID小鼠中重建人免疫细胞,使得可在免疫后产生人抗体应答。此类小鼠记载于例如Wilson等的美国专利号5,476,996和5,698,767。

[0123] 生成针对C6的单克隆抗体的转染瘤的产生

[0124] 也可使用例如本领域中公知的重组DNA技术和基因转染方法的组合 (Morrison, S. (1985) Science 229:1202) 在宿主细胞转染瘤中生成本发明的抗体。在实施例5(其中在 HEK-293宿主细胞中使用pMQR表达载体)、实施例6(在大肠杆菌宿主细胞中使用pCB4表达载体表达Fab) 和实施例7 (CHO细胞表达) 中进一步描述了用于重组表达抗C6抗体的示例性实施方案。

[0125] 此外,在一个实施方案中,可将感兴趣的基因(例如,抗体基因)连接到表达载体如真核表达质粒中,如WO 87/04462,WO 89/01036和EP 338 841中公开的GS基因表达系统或本领域中公知的其它表达系统使用的。可以在真核宿主细胞如CHO细胞或NS0细胞或者备选其它真核细胞,如植物衍生的细胞、真菌或酵母细胞中导入具有克隆的抗体基因的纯化质粒。用于导入这些基因的方法可为本领域中描述的方法,如电穿孔、Lipofectine、Lipofectamine等。在宿主细胞中导入这些抗体基因后,可鉴定和选择表达抗体的细胞。这些细胞代表转染瘤,然后可扩增所述转染瘤实现其表达水平并放大以产生抗体。可从这些培养上清液和/或细胞中分离和纯化重组抗体。

[0126] 或者,这些克隆的抗体基因可在其它表达系统如大肠杆菌中或在完整的生物体中表达,或可合成表达。

[0127] 交叉竞争和相同表位结合抗体

[0128] 如实施例3中详细描述,已经通过丙氨酸扫描诱变将7E5抗体结合的表位定位到对应于SEQ ID N0:52(人C6)的氨基酸835-854的人C6的区域内的残基。还显示了SEQ ID N0:1、2和3中所示的特定肽含有形成7E5结合的表位部分的残基。因而,在一个实施方案中,本发明提供了结合人C6的表位的抗体,所述表位包含SEQ ID N0:52的残基835-854的全部或部分。在另一个实施方案中,本发明提供了结合人C6的表位的抗体,所述表位包含SEQ ID N0:52的残基835-854的全部或部分,其中所述表位是不连续的。在另一个实施方案中,本发明提供了结合人C6表位的抗体,所述表位包含选自SEQ ID N0:1、2和3的氨基酸序列的全部或部分。在另一个实施方案中,本发明提供了结合人C6表位的抗体,所述表位包括选自SEQ ID N0:1、2和3的氨基酸序列的全部或部分,其中所述表位是不连续的。在另一个实施方案中,本发明提供了与包含SEQ ID N0:5中显示的重链可变区和SEQ ID N0:10中显示的轻链可变区(7E5的VH和VL序列)的抗体交叉竞争对人C6的结合的抗体。在其它实施方案中,本发明的抗体与本文中所述的其它抗C6抗体如8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11或7F02交叉竞争对C6的结合。

[0129] 此类竞争性抗体可基于其在标准C6结合测定法中竞争性抑制单抗7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11、7F02中的一种或多种结合C6的能力来鉴定。用于检查交叉竞争对C6的结合的示例性测定法是实施例3中详细描述的表位夹心ELISA。此外,可使用其它常规技术鉴定识别相同表位或竞争结合的抗体。此类技术包括例如免疫测定法,其显示一种抗体阻断另一抗体与靶抗原的结合的能力,即竞争性结合测定法。在测定法中测定竞争性结合,其中所测试的免疫球蛋白抑制参照抗体对共同抗原如C6的特异性结合。许多类型的竞争性结合测定法是已知的,例如:固相直接或间接放射免疫测定法(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定法(EIA)、夹心竞争测定法(参见Stahli等,Methods in Enzymology 9:242 (1983)) ;固相直接生物素-亲合素EIA(参见Kirkland等,J. Immunol. 137:3614 (1986)) ;固相直接标记测定法、固相直接标记夹心测定法(参见Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press (1988)) ;使用I-125标记物的固相直接标记物RIA(参见Morel等,Mol. Immunol. 25 (1):7 (1988)) ;固相直接生物素-亲合素EIA(Cheung等,Virology 176:546 (1990)) ;和直接标记的RIA(Moldenhauer等,Scand. J. Immunol. 32:77 (1990))。通常,此类测定法牵涉使用与固体表面结合的纯化抗原或携带这些之任一种,即未标记的测试免疫球蛋白和经标记的参照免疫球蛋白的细胞。通过测定在存在测试免疫球蛋白的情况下与固体表面或细胞结合的标记物的量来测量竞争性抑制。通常测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争性抗体过量存在时,它将抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合达至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。

[0130] 因而,本发明还涵盖与C6上的表位结合的抗体,所述表位包含由本文所述的特定抗体识别的表位的全部或部分(例如,相同或重叠区域或区域之间或跨越区域的区域)。

[0131] 在一个实施方案中,竞争对C6的结合和/或结合人C6上的相同表位的抗体是人源化抗体。可制备和分离此类人源化单克隆抗体,例如,如实施例6中所述。

[0132] 用于测定抗体结合的表位的其它技术包括例如表位定位方法,如提供表位的原子分辨率的抗原:抗体复合物晶体的x射线分析。其它方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变异的结合,其中由于抗原序列内的氨基酸残基的修饰导致的结合丧失通常认为是表位成

分的指示。另外,还可使用用于表位定位的计算组合方法。这些方法依赖于感兴趣的抗体从组合噬菌体展示肽文库亲和分离特异性短肽的能力。然后,将肽视为用于限定与用于筛选肽文库的抗体对应的表位的前导物。对于表位定位,还已经开发出已经显示定位构象不连续表位的计算算法。

[0133] 一旦已经分离出具有本文中所述的期望特性的单一原型抗C6单抗,直接的是通过使用本领域已知的方法产生具有相似性质,例如具有相同表位的其它单抗。例如,可用如本文中所述的C6免疫小鼠或大鼠,产生杂交瘤,并且对所得的单抗筛选与原型单抗竞争结合C6的能力。也可用含有原型单抗结合的表位的C6的较小片段免疫大鼠或小鼠。可通过例如筛选与一系列跨越C6的重叠肽的结合来定位表位。或者,Jespers等,Biotechnology 12: 899,1994的方法可用于引导与原型单抗具有相同表位并且因此具有相似特性的单抗的选择。使用噬菌体展示,首先将原型抗体的重链与(优选人)轻链的全集配对以选择C6结合性单抗,然后将新的轻链与(优选人)重链的全集配对以选择具有与原型单抗具有相同表位的(优选人)C6结合性单抗。或者,通过诱变编码抗体的重链和轻链的cDNA可获得原型单抗的变体。

[0134] 可进行表位定位(例如,如Champe等(1995) J.Biol.Chem. 270:1388-1394描述)以确定抗体是否结合感兴趣的表位。如由Cunningham和Wells(1989) Science 244:1081-1085所述的“丙氨酸扫描诱变”,或人C6中氨基酸残基的点诱变的某些其它形式也可用于确定本发明的抗C6抗体的功能性表位。然而,诱变研究也可揭示对C6的总体三维结构至关重要,但不直接参与抗体-抗原接触的氨基酸残基,因此其它方法可以是必需的以确认使用此方法确定的功能性表位。

[0135] 也可通过评估抗体与包含人C6片段的肽的结合而确定由特异性抗体结合的表位。可合成涵盖C6序列的一系列重叠肽并筛选结合,例如在直接ELISA、竞争性ELISA(其中对肽评估其防止抗体结合到与微量滴定板的孔结合的C6的能力)中或在芯片上。此类肽筛选方法可以不能检测一些不连续的功能性表位,即牵涉沿着C6多肽链的一级序列不连续的氨基酸残基的功能性表位。

[0136] 也可通过结构方法测定由本发明的抗体结合的表位,如X射线晶体结构测定(例如,WO2005/044853)、分子建模和核磁共振(NMR)光谱学,包括当游离时和当在复合物中与感兴趣的抗体结合时C6中的不稳定酰胺氢的H-D交换速率的NMR测定(Zinn-Justin等(1992) Biochemistry 31,11335-11347; Zinn-Justin等(1993) Biochemistry 32,6884-6891)。

[0137] 就X射线晶体学而言,可使用本领域中任何已知的方法完成结晶(例如,Giege等(1994) Acta Crystallogr.D50:339-350; McPherson(1990) Eur.J.Biochem.189:1-23),包括微批次(microbatch)(例如Chayen(1997) Structure 5:1269-1274)、悬滴蒸气扩散(例如McPherson(1976) J.Biol.Chem.251:6300-6303)、接晶种和透析。期望使用具有浓度至少约1mg/mL,优选约10mg/mL至约20mg/mL的蛋白质制备物。结晶可在含有聚乙二醇1000-20,000(PEG;范围为约1000至约20,000Da的平均分子量),优选约5000至约7000Da,更优选约6000Da的沉淀剂溶液中最佳地实现,浓度范围为约10%至约30%(w/v)。还可期望包含蛋白质稳定剂,例如,浓度范围为约0.5%至约20%的甘油。在沉淀剂溶液中,合适的盐,如氯化钠、氯化锂或柠檬酸钠也可为期望的,优选地浓度范围为约1mM至约1000mM。沉淀剂优选缓

冲至约3.0至约5.0,优选约4.0的pH。可用于沉淀剂溶液的特定缓冲液可变化,并且是本领域中公知的(Scopes, Protein Purification:Principles and Practice,第三版,(1994)Springer-Verlag, New York)。有用的缓冲剂的实例包括但不限于HEPES、Tris、MES和乙酸盐。晶体可在宽的温度范围生长,包括2°C、4°C、8°C和26°C。

[0138] 可使用公知的X射线衍射技术研究抗体:抗原晶体,并且可使用计算机软件如X-PLOR(Yale University,1992,由Molecular Simulations, Inc.销售;参见例如Blundell & Johnson(1985)Meth. Enzymol. 114&115, H.W. Wyckoff等编, Academic Press;美国专利申请公开文本No. 2004/0014194),以及BUSTER(Bricogne(1993)Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne(1997)Meth. Enzymol. 276A:361-423,Carter & Sweet编; Roversi等(2000)Acta Cryst. D56:1313-1323)精细化(refine),其公开内容通过引用整体并入本文。

[0139] 使用部分抗体序列表达完整的抗体

[0140] 在某些实施方案中,本发明的抗C6抗体包含SEQ ID NO:8中显示的重链CDR3;和SEQ ID NO:13中显示的轻链CDR3。抗体可进一步包含SEQ ID NO:7中显示的重链CDR2;和SEQ ID NO:12中显示的轻链CDR2。抗体还可进一步包含SEQ ID NO:6中显示的重链CDR1;和SEQ ID NO:11中显示的轻链CDR1。利用前述CDR的本发明的示例性抗体包括以下各项:

- [0141] (a) 包含SEQ ID NO:30的重链可变区和SEQ ID NO:31的轻链可变区的抗体;
- [0142] (b) 包含SEQ ID NO:32的重链可变区和SEQ ID NO:33的轻链可变区的抗体;
- [0143] (c) 包含SEQ ID NO:34的重链可变区和SEQ ID NO:35的轻链可变区的抗体;
- [0144] (d) 包含SEQ ID NO:36的重链可变区和SEQ ID NO:37的轻链可变区的抗体;
- [0145] (e) 包含SEQ ID NO:38的重链可变区和SEQ ID NO:39的轻链可变区的抗体;
- [0146] (f) 包含SEQ ID NO:40的重链可变区和SEQ ID NO:41的轻链可变区的抗体;
- [0147] (g) 包含SEQ ID NO:42的重链可变区和SEQ ID NO:43的轻链可变区的抗体;和
- [0148] (h) 包含SEQ ID NO:44的重链可变区和SEQ ID NO:45的轻链可变区的抗体。

[0149] 抗体主要通过位于6个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。出于此原因,CDR内的氨基酸序列比CDR外部的序列在个别的抗体之间更加多样。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,有可能通过构建表达载体来表达模拟天然存在的抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包含嫁接到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上的来自特定天然存在的抗体的CDR序列(参见例如Riechmann,L.等,1998,Nature 332:323-327; Jones,P.等,1986, Nature 321:522-525;以及Queen,C.等,1989, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:10029-10033)。此类框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些种系序列将不同于成熟抗体基因序列,因为它们将不包括由B细胞成熟期间的V(D)J连接形成的完全组装的可变基因。种系基因序列也将不同于个别均匀地在可变区间的高亲和力二级全集抗体的序列。例如,体细胞突变在框架区的氨基末端部分中相对不频繁。例如,体细胞突变在框架区1的氨基末端部分和框架区4的羧基末端部分中相对不频繁。此外,许多体细胞突变不显著改变抗体的结合特性。出于此原因,不必需获得特定抗体的整个DNA序列以再创建具有与初始抗体的结合特性相似的结合特性的完整重组抗体(参见PCT/US99/05535)。跨越CDR区的部分重链和轻链序列通常足以用于此目的。使用部分序列确定哪些种系变异和连接基因区段促成重组抗体可变基因。然后,使用种系序列填充可变区的缺少部分。在蛋白质成熟期间切割重链和轻链前导序列,并且不促成最

终抗体的特性。为了添加缺少的序列,可通过连接或PCR扩增将克隆的cDNA序列与合成的寡核苷酸组合。或者,整个可变区可作为一组短的、重叠的寡核苷酸合成,并通过PCR扩增组合以创建完全合成的可变区克隆。该方法具有某些优点,如消除或纳入特定的限制性位点,或优化特定的密码子。

[0150] 使用来自杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列设计重叠的合成寡核苷酸组,以创建具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成V序列。合成的重链和κ链序列可以以三种方式与天然序列不同:中断重复核苷酸碱基串以促进寡核苷酸合成和PCR扩增;根据Kozak的规则(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)掺入最佳翻译起始位点;和在翻译起始位点的上游工程化改造HindIII位点。

[0151] 对于重链和轻链可变区两者,将优化的编码和相应的非编码链序列分解成30-50个核苷酸,大致在相应的非编码寡核苷酸的中点。因此,对于每个链,可以将寡核苷酸组装成跨越150-400个核苷酸的区段的重叠双链组。然后,使用合并物作为模板以产生150-400个核苷酸的PCR扩增产物。通常,会将单个可变区寡核苷酸组分解成两个合并物,其分开扩增以产生两个重叠的PCR产物。然后,通过PCR扩增将这些重叠产物组合以形成完整的可变区。还可以期望在PCR扩增中包括重链或轻链恒定区(包括κ轻链的BbsI位点,或者若γ重链,则为AgeI位点)的重叠片段,以产生可容易地克隆到表达载体构建体中的片段。

[0152] 然后,将重建的重链和轻链可变区与克隆启动子、前导序列、翻译起始、前导序列、恒定区、3'非翻译、多聚腺苷酸化和转录终止序列组合以形成表达载体构建体。可将重链和轻链表达构建体组合成单个载体,共转染,连续转染,或分别转染到宿主细胞中,然后将其融合以形成表达这两条链的宿主细胞。

[0153] 用于表达载体构建的质粒构建为使得PCR扩增的V重和Vκ轻链cDNA序列可用于重构建完整的重链和轻链微型基因。这些质粒可用于表达完全人IgG₁κ或IgG₄κ抗体。本发明的完全人和嵌合抗体还包括IgG2、IgG3、IgE、IgA、IgM和IgD抗体。可构建类似的质粒用于表达其它重链同种型,或用于表达包含λ轻链的抗体。

[0154] 因此,在本发明的另一方面,本发明的抗C6抗体的结构特征用于创建保留本发明抗体的至少一个功能特性的结构相关的抗C6抗体,如例如,

[0155] (a) 与本发明的抗C6抗体,如7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11或7F02结合相同的表位;

[0156] (b) 在溶血测定法中具有0.5μg/ml或更小的IC₅₀;

[0157] (c) 具有1x 10⁻⁸M或更小(或备选5x 10⁻⁸M或更小、1x 10⁻⁹M或更小、5x 10⁻⁹M或更小或5x 10⁻¹⁰M或更小)的K_D,如通过表面等离振子共振确定;

[0158] (d) 具有40小时或更大的抗体C6结合半衰期,如通过表面等离振子共振确定;或者

[0159] (e) 与猕猴C6起交叉反应。

[0160] 在一个实施方案中,本发明的抗体的一个或多个CDR区可以与已知的框架区和CDR重组组合以创建本发明的另外的、重组工程化的抗C6抗体。重链和轻链可变框架区可以源自相同或不同的抗体序列。抗体序列可以是天然存在的抗体的序列,或者可以是几种抗体的共有序列。参见Kettleborough等, Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger等, Protein Engineering 6:971 (1993) 和Carter等, WO 92/22653。

[0161] 因而,在另一个实施方案中,本发明提供了用于制备抗C6抗体的方法,包括:制备

抗体,其包括(1)重链框架区和重链CDR,其中至少一个重链CDR包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID N0:6、7和8中所示的CDR的氨基酸序列;和(2)轻链框架区和轻链CDR,其中至少一个轻链CDR包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID N0:11、12和13中所示的CDR的氨基酸序列;其中抗体保留结合C6的能力。可使用标准结合和/或功能测定法(如实施例中阐述的那些)来确定抗体结合C6的能力。优选地,抗体表现出上文以(a)到(e)中列出的至少一种、或至少两种或至少三种或至少四种或全部五种功能特性。如本文中公开,此类抗体的实例包括7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02的抗体(如实施例6中所述)。

[0162] 在本领域中公知的是,抗体重链和轻链CDR3域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中起特别重要的作用(参见Hall等,J. Immunol.,149:1605-1612(1992);Polymenis等,J. Immunol.,152:5318-5329(1994);Jahn等,Immunobiol.,193:400-419(1995);Klimka等,Brit. J. Cancer,83:252-260(2000);Beboer等,J. Mol. Biol.,296:833-849(2000);Rader等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,95:8910-8915(1998);Barbas等,J. Am. Chem. Soc.,116:2161-2162(1994);Ditzel等,J. Immunol.,157:739-749(1996)),因而,如上阐述的那样制备的本发明的重组抗体优选包含7E5抗体的重链和/或轻链CDR3,如分别在SEQ ID N0:8和13中列出。如本文中公开,此类抗体的实例包括7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02抗体(如实施例6中所述)。

[0163] 此外,在另一个实施方案中,本发明还提供抗C6抗体,其包含:(1)重链框架区、重链CDR1区、重链CDR2区和重链CDR3区,其中重链CDR3区包含SEQ ID N0:8的序列和(2)轻链框架区、轻链CDR1区、轻链CDR2区和轻链CDR3区,其中轻链CDR3区包含SEQ ID N0:13的序列,其中所述抗体结合C6。抗体可进一步包括7E5抗体的重链CDR2和/或轻链CDR2,如分别在SEQ ID N0:7和12中列出。抗体可进一步包含7E5抗体的重链CDR1和/或轻链CDR1,如分别在SEQ ID N0:6和11中列出。如本文中公开,此类抗体的实例包括7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02抗体(如实施例6中所述)。

[0164] 产生具有经修饰的序列的抗体

[0165] 在另一个实施方案中,修饰本发明的抗C6抗体的可变区序列或其部分,以创建结构相关的抗C6抗体,其保留结合(即,与未修饰的抗体结合相同的表位),因此在功能上等同。用于鉴定可以在不除去抗原结合的情况下修饰的残基的方法是本领域中公知的(参见例如Marks等(Biotechnology(1992)10(7):779-83(通过改组轻链可变区,然后是具有固定CDR3序列变化的重链可变区的单克隆抗体多样化),Jespers等(1994)Biotechnology 12(9):899-903(从针对抗体的单一表位的噬菌体展示全集选择人抗体),Sharon等(1986)PNAS USA 83(8):2628-31(在抗体的可变多样性区段连接处的不变氨基酸残基的定点诱变);Casson等(1995)J. Immunol. 155(12):5647-54(源自抗体重链可变区的随机诱变的特异性的丧失和变化的演变))。

[0166] 因而,在本发明的一个方面,上文描述的工程化抗体的CDR1、2和/或3区可包含如SEQ ID N0:6-7和11-13中所示的确切的氨基酸序列(7E5 CDR),如本文中公开。然而,在本发明的其它方面,抗体包括来自7E5的确切的CDR序列的衍生物,但仍然保留有效结合C6的能力。此类序列修饰可包括一个或多个氨基酸添加、缺失或取代,例如如上文所述的保守序列修饰。序列修饰也可基于上文关于7E5抗体的特定CDR1、CDR2和CDR3序列所述的共有序列。

[0167] 因而,在另一个实施方案中,工程化抗体可由一个或多个CDR组成,所述CDR与7E5抗体的一个或多个CDR(SEQ ID N0:6-8和11-13中显示)为例如90%、95%、98%或99.5%相同的。本发明也意图涵盖上文叙述的数值中间的范围,例如与一个或多个上述序列90-95%、95-98%或98-100%相同同一性的CDR。

[0168] 在另一个实施方案中,本发明提供了结合人C6的分离的抗体,其包含

[0169] (a) 重链可变区,其包含与选自下组的氨基酸序列至少90% (或90-95%、95%-98%、98%-100%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的氨基酸序列:SEQ ID N0:30、32、34、36、38、40、42、44和46; 和

[0170] (b) 轻链可变区,其包含与选自下组的氨基酸序列至少90% (或90-95%、95%-98%、98%-100%、95%、96%、97%、98%或99%) 相同的氨基酸序列:SEQ ID N0:31、33、35、37、39、41、43、45和47。

[0171] 在另一个实施方案中,分离的抗体是下述抗体,其中

[0172] (a) 重链可变区包含选自SEQ ID N0:30、32、34、36、38、40、42、44和46的氨基酸序列; 和

[0173] (b) 轻链可变区包含选自SEQ ID N0:31、33、35、37、39、41、43、45和47的氨基酸序列。

[0174] 实施例7详细描述了“混合和匹配”实验,其中这些重链和轻链可变区中的每一个在所有81种可能的组合中彼此配对,并且证明了所有81种组合在抑制C6活性中的功能活性。

[0175] 此外,在另一个实施方案中,可以改变CDR的一个或多个残基以修饰结合,从而实现结合的更有利的结合速率、结合的更有利的解离速率或两者,使得实现理想化的结合常数。使用该策略,可实现具有例如 $10^{10} M^{-1}$ 或更多的超高结合亲和力的抗体。本领域中公知的亲和力成熟技术和本文所述的亲和成熟技术可用于改变CDR区,随后对所得的结合分子筛选期望的结合变化。因而,由于改变CDR,可监测结合亲和力以及免疫原性的变化并且评分,使得实现针对最佳组合结合和低免疫原性优化的抗体。

[0176] 因此,对于VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的可变区修饰,可进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变和对抗体结合的影响或,或者可以在如本文中所述并且在实施例中提供的体外或体内测定法中评估感兴趣的其它功能特性。优选地,引入了保守的修饰(如本文所讨论的)。突变可为氨基酸取代、添加或缺失,但优选是取代。此外,通常改变CDR区内不超过1、2、3、4或5个残基。

[0177] 因而,在另一个实施方案中,本发明提供了分离的抗C6单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:(a) VH CDR1区,其包含SEQ ID N0:6中显示的氨基酸序列或与SEQ ID N0:6相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(b) VH CDR2区,其包含SEQ ID N0:7中显示的氨基酸序列或与SEQ ID N0:7相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(c) VH CDR3区,其包含SEQ ID N0:8中显示的氨基酸序列或与SEQ ID N0:8相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(d) VL CDR1区,其包含SEQ ID N0:11中显示的氨基酸序列或与SEQ ID N0:11相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(e) VL CDR2区,其包含SEQ ID N0:12中显示的氨基酸序列或与SEQ ID N0:12相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;和(f) VL CDR3区,

其包含SEQ ID NO:13中显示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

[0178] 在另一个实施方案中,本发明提供了分离的抗C6单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:(a)重链可变区,其包含选自SEQ ID NO:30、32、34、36、38、40、42、44和46的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30、32、34、36、38、40、42、44和46相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、8或10个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列;和(b)轻链可变区,其包含选自SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45和47的氨基酸序列或与SEQ ID NO:31、33、35、37、39、41、43、45和47相比具有1、2、3、4、5、6、7、8、8或10个氨基酸取代,缺失或添加的氨基酸序列。

[0179] 在CDR内的修饰外或代替CDR内的修饰,还可在抗体的重链和/或轻链可变区的框架区FR1、FR2、FR3和FR4的一个或多个内进行修饰,只要这些修饰不消除抗体的结合亲和力。例如,本发明的抗体的重链和/或轻链可变区的框架区中的一个或多个非种系氨基酸残基用种系氨基酸残基,即在重链或轻链可变区的人种系序列(抗体与该序列具有显著的序列同一性)中的相应的氨基酸残基取代。例如,可将抗体链与种系抗体链比对,它与所述种系抗体链共享显著的序列同一性,并且在抗体框架序列和种系链框架之间不匹配的氨基酸残基可使用来自种系序列的相应的残基取代。当氨基酸在抗体可变框架区和等同的人种系序列可变框架区之间不同时,若合理预期氨基酸落入以下分类之一内,则抗体框架氨基酸通常应当被等同的人种系序列氨基酸取代:

[0180] (1)直接非共价结合抗原的氨基酸残基,

[0181] (2)与CDR区相邻的氨基酸残基,

[0182] (3)以其它方式与CDR区相互作用的氨基酸残基(例如在CDR区的约3-6Å范围内,如通过计算机建模确定),或

[0183] (4)参与VL-VH界面的氨基酸残基。

[0184] “直接非共价结合抗原”的残基包括在框架区中的位置中的氨基酸,其根据建立的化学力(例如通过氢键键合、范德华力、疏水相互作用,等等)具有直接与抗原上的氨基酸直接相互作用的良好可能性。因而,在一个实施方案中,本发明的抗体的框架区中的氨基酸残基用直接非共价结合抗原的相应的种系氨基酸残基取代。

[0185] “与CDR区相邻”的残基包括在抗体的一级序列中与一个或多个CDR紧邻的位置中的氨基酸残基,例如与由Kabat限定的CDR,或如由Chothia限定的CDR(参见例如Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901(1987))紧邻的位置中。因而,在一个实施方案中,本发明的抗体的框架区内的氨基酸残基用与CDR区相邻的相应种系氨基酸残基取代。

[0186] “以其它方式与CDR区相互作用”的残基包括通过二级结构分析确定为足以影响CDR区的空间取向的那些残基。此类氨基酸通常会具有在CDR中的一些原子的约3埃单位(Å)内的侧链原子,并且必须含有可以根据建立的化学力(如上文列出的那些)与CDR原子相互作用的原子。因而,在一个实施方案中,本发明的抗体的框架区内的氨基酸残基用以其它方式与CDR区相互作用的相应的种系氨基酸残基取代。

[0187] 已知框架中几个位置处的氨基酸对于确定许多抗体中的CDR构象(例如,能够与CDR相互作用)是重要的(Chothia和Lesk,同上,Chothia等,同上和Tramontano等,J.Mol.Biol.215:175(1990),它们全部通过引用并入本文)。这些作者通过分析几种已知抗体的结构来鉴定对CDR构象重要的保守框架残基。基于CDR的构象,所分析的抗体落入有限

数目的结构或“规范”类别中。规范类别的成员内的保守框架残基称为“规范”残基。标准残基包括轻链的残基2,25,29,30,33,48,64,71,90,94和95和重链的残基24,26,29,34,54,55,71和94。可根据Martin和Thorton(1996)J.Mol.Biol.263:800的方法鉴定别的残基(例如,CDR结构决定残基)。值得注意的是,已知轻链的2,48,64和71位和重链的26-30,71和94位(根据Kabat编号)的氨基酸能够与许多抗体中的CDR相互作用。轻链中35位和重链中的93和103位的氨基酸也可能与CDR相互作用。可根据Foote和Winter(1992)J.Mol.Biol.224:487的方法来鉴定可实现CDR构象的其它残基。此类残基称作“游标”残基,并且是在框架区中紧密地在CDR下面(即形成CDR下的“平台”)的那些残基。

[0188] “参与VL-VH界面”的残基或“包装残基”包括VL和VH之间界面处的那些残基,如例如Novotny和Haber,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:4592-66(1985)或Chothia等,同上限定。

[0189] 有时,特定的氨基酸是否落入上文提及的一个或多个类别内有些含糊不清。在此类情况下,产生备选的变体抗体,其中之一具有所述特定取代,其中另一种不然。可在本文所述的任何测定法中测试如此产生的备选变体抗体的期望活性,并且选择优选的抗体。

[0190] 框架区内取代的其它候选者是在该位置处对于抗体而言不常见或“罕见”的氨基酸。这些氨基酸可以用来自人种系序列的等同位置或来自更典型的抗体的等同位置的氨基酸取代。例如,当抗体的框架区中的氨基酸对于该位置是罕见的并且种系序列中相应的氨基酸对免疫球蛋白序列中该位置是常见的时;或者当抗体中的氨基酸对于该位置是罕见的,并且相对于其它序列,种系序列中的相应氨基酸也是罕见的,取代可以是期望的。涵盖了通过用来自碰巧对于抗体典型的种系序列的氨基酸替换不常见的氨基酸,可以使抗体具有较小的免疫原性。

[0191] 如本文中使用,术语“罕见”指在序列的代表性样品中在小于约20%,优选小于约10%,更优选小于约5%,甚至更优选小于约3%,甚至更优选小于约2%,甚至更优选小于约1%的序列中存在于上所述位置处的氨基酸。并且如本文中使用,术语“常见”指在代表性样品中在超过约25%但通常超过约50%的序列中存在的氨基酸。例如,所有轻链和重链可变区序列分别分组成彼此特别同源且在某些关键位置具有相同氨基酸的序列的“亚组”(Kabat等,同上)。当确定抗体序列中的氨基酸是否在序列间是“罕见的”还是“常见的”时,经常会优选仅考虑与抗体序列在相同的亚组中的那些序列。

[0192] 通常,抗体的框架区通常是基本相同的,更通常地与衍生它们的人种系序列的框架区相同。当然,框架区中的许多氨基酸对抗体的特异性或亲和力几乎没有或没有直接的贡献。因此,可以容许框架残基的许多个别的保守取代,而没有所得免疫球蛋白的特异性或亲和力的明显变化。因此,在一个实施方案中,抗体的可变框架区与人种系可变框架区序列或此类序列的共有区共享至少85%序列同一性。在另一个实施方案中,抗体的可变框架区与人种系可变框架区序列或此类序列的共有区共享至少90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0193] 还可以进行框架修饰以降低抗体的免疫原性或减少或除去其中驻留的T细胞表位,如例如Carr等在US2003/0153043中所述。

[0194] 本发明的工程抗体包括下述抗体,其中已经对V_H和/或V_L内的框架残基做出修饰,例如以改善抗体的特性。通常,做出此类框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地,已经历体细胞突变

的抗体可以含有不同于衍生抗体的种系序列的框架残基。可通过将抗体框架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定此类残基。

[0195] 框架修饰的另一种类型涉及突变框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基以除去T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。这种方法也称为“去免疫化”,并且在美国专利公开文本号20030153043中更详细描述。

[0196] 除了仅结合C6外,可对抗体选择其对本发明抗体的其它功能特性的保留,如例如:

[0197] (a) 与本发明的抗C6抗体,如7E5、8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11或7F02结合相同的表位;

[0198] (b) 在溶血测定法中具有 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更小的 IC_{50} ;

[0199] (c) 具有 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小的 K_{D} ,如通过表面等离振子共振确定;

[0200] (d) 具有40小时或更大的抗体-C6结合半衰期,如通过表面等离振子共振确定;或

[0201] (e) 与猕猴C6起交叉反应。

[0202] 其他的抗体修饰

[0203] 本公开的抗体可以在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。此类糖基化位点可以由于改变的抗原结合而导致抗体的增加的免疫原性或抗体的pK变化(Marshall等(1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala和Morrison(2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick等(1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro(2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh等(1985) *Nature* 316:452-7; Mimura等(2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。已知糖基化在含有N-X-S/T序列的基序处发生。在一些情况下,优选具有不含可变区糖基化的抗C6抗体。这可以通过选择不含可变区中的糖基化基序的抗体或通过突变糖基化区域内的残基来实现。

[0204] 例如,在一个实施方案中,修饰抗体的糖基化,例如改变可变区以消除驻留在可变区中的一个或多个糖基化位点。更具体地,期望在本抗体的序列中消除易于糖基化的位点。这通过改变在亲本可变区中存在的一个或多个N-X-(S/T)(其中X是任何氨基酸残基)序列的出现,特别是通过取代N残基和/或S或T残基实现。在一个实施方案中,将T95突变为K95。在另一个实施方案中,将N47突变为R47。

[0205] 例如,可以生成无糖基化抗体(即,其缺少糖基化)。可以改变糖基化,例如以增加抗体对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点处的糖基化。此类无糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。参见例如美国专利号5,714,350和6,350,861。

[0206] 另外/或者,抗体可以具有改变的糖基化类型,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二分型GlcNAc结构的抗体。已经证明此类改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞已经在本领域中描述,并且可以用作宿主细胞,其中表达本发明的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因FUT8($\alpha(1,6)$ -岩藻糖基转移酶),使得在Ms704、Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在其碳水化合物上缺乏岩藻糖。通过使用两个替换载体在CHO/DG44细胞中靶向破坏FUT8基因创建Ms704、Ms705和Ms709FUT8^{-/-}细胞系(参见美国专利公开文本号20040110704和Yamane-Ohnuki等(2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-

22)。作为另一个实例,EP 1,176,195描述了具有功能性破坏的FUT8基因的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,使得在此类细胞系中表达的抗体通过减少或消除 α -1,6键相关酶表现出低岩藻糖基化。EP 1,176,195还描述了具有用于将岩藻糖添加到N-乙酰葡萄糖胺的低酶活性的细胞系,其结合抗体的Fc区或不具有酶活性,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。PCT公开文本WO 03/035835描述了变体CHO细胞系Lec13细胞,其具有降低的将岩藻糖附着至Asn(297)连接的碳水化合物的能力,还导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740)。也可在鸡蛋中产生具有修饰的糖基化概貌的抗体,如PCT公开文本WO 06/089231中所述。或者,可在植物细胞如浮萍(Lemna)中产生具有修饰的糖基化概貌的抗体。用于在植物系统中产生抗体的方法公开于对应于2006年8月11日提交的Alston&Bird LLP代理人档案号040989/314911的美国专利申请中。PCT公开文本W099/54342描述了细胞系,其工程化改造以表达糖蛋白修饰性糖基转移酶(例如, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII)),使得在工程化细胞系中表达的抗体表现出增加的二分型GlcNAc结构,其导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等(1999)Nat.Biotech.17:176-180)。或者,可使用岩藻糖苷酶切割抗体的岩藻糖残基;例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶从抗体中除去岩藻糖基残基(Tarentino等(1975)Biochem.14:5516-23)。

[0207] 可在可变区中改变本发明的抗体以消除一个或多个糖基化位点,和/或改善抗体的物理稳定性。例如,在一个实施方案中,可通过用脯氨酸残基取代可变区的第228位的丝氨酸(即抗体具有包含S228P突变的可变区)改善抗体的物理稳定性。S228P改变显著稳定抗体结构,防止链内二硫键的形成。在一个实施方案中,本发明的全长抗体是具有S228P改变的IgG4同种型(IgG4 S228P)。

[0208] 在另一个实施方案中,改变可变区以消除驻留在可变区中的一个或多个糖基化位点。更具体地,在本抗体的序列中期望消除易于糖基化的位点。如上所述,这可以通过改变在亲本可变区中存在的一个或多个N-X-(S/T)(其中X是任何氨基酸残基)序列的出现,特别是通过取代N残基和/或S或T残基来实现。在一个实施方案中,T95突变为K95。在另一个实施方案中,N47突变为R47。

[0209] 除了在框架或CDR区内做出的修饰之外或者作为在框架或CDR区内做出的修饰的备选,本发明的抗体可以工程化改造为包含Fc区内的修饰,通常改变抗体的一种或多种功能性质,如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。抗体也可以经化学修饰(例如,可以将一个或多个化学部分附着到抗体)或修饰为改变其糖基化,再次改变抗体的一种或多种功能性质。在下文更为详细描述了这些实施方案的每种。Fc区中残基的编号是Kabat的EU索引的编号。

[0210] 在某些实施方案中,本发明涵盖拥有一些但非全部效应器功能的抗体变体,这使得其成为下述应用的期望候选物,其中抗体的体内半衰期是重要的,但某些效应器功能(如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认CDC和/或ADCC活性的减少/消减。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺乏Fc_gR结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc_gRIII,而单核细胞表达Fc_gRI、Fc_gRII和Fc_gRIII。Ravetch, J.V. 和 Kinet, J.P., Annu Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492的第464页的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。用于评估

感兴趣的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性实例记载于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA83(1986)7059-7063;以及Hellstrom,I.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82(1985)1499-1502);美国专利号5,821,337(参见Bruggemann,M.等,J.Exp.Med.166(1987)1351-1361)。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTI.TM.非放射性细胞毒性测定法(Cel1Technology,Inc.Mountain View,Calif.;和CytoTox 96.RTM.非放射性细胞毒性测定法(Promega,Madison,Wis.)。用于此类测定法的有用的效果细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外,可以在体内评估感兴趣的分子的ADCC活性,例如,在动物模型,如Clynes,R.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(1998)652-656中所公开的动物模型中。还可以进行C1q结合测定法以确认抗体不能结合C1q并因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定法(参见例如Gazzano-Santoro,H.等,J.Immunol.Methods 202(1996)163-171;Cragg,M.S.等,Blood 101(2003)1045-1052;以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103(2004)2738-2743)。也可使用本领域中已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova,S.B.等,Int.Immunol.18(2006)1759-1769)。

[0211] 在一个具体实施方案中,抗体包含经突变以改善抗体的物理稳定性的可变区。在一个实施方案中,抗体是在对应于重链恒定区的铰链区中位置228的位置处包含丝氨酸至脯氨酸突变(S228P;EU指数)的IgG4同种型抗体。已经报道了此突变消除铰链区域中重链间二硫桥的异质性(Angal等,同上;位置241基于Kabat编号系统)。例如,在各种实施方案中,本发明的抗C6抗体可以包含与人IgG4恒定区连接的本文所述的任何抗体的重链可变区,其中如Angal等,同上中所述的对应于位置241的位置处的丝氨酸已经突变为脯氨酸。因此,对于与人IgG4恒定区连接的重链可变区,此突变对应于EU索引的S228P突变。

[0212] 在另一个实施方案中,CH1的铰链区修饰为使得改变(例如增加或减少)铰链区中半胱氨酸残基的数目。在美国专利号5,677,425中进一步描述了这种方法。CH1铰链区中的半胱氨酸残基的数目改变为例如促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

[0213] 在另一个实施方案中,抗体的Fc铰链区经突变以降低抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入到Fc-铰链片段的CH2-CH3域界面区中,使得相对于天然Fc-铰链域SpA结合,抗体具有受损的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合。在美国专利No.6,165,745中更详细描述了此方法。

[0214] 在另一个实施方案中,修饰抗体以增加其生物半衰期。各种方法是可能的。例如,如美国专利号6,277,375中所述,可引入以下一个或多个突变:T252L、T254S、T256F。或者,为了增加生物半衰期,可在CH1或CL区内改变抗体以含有取自IgG Fc区的CH2域的两个环的补救受体结合表位,如美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。在另一种方法中,通过引入两个突变,一个在434位的丝氨酸处和选自下组的第二个突变来修饰抗体以增加其生物半衰期:第311位的异亮氨酸、311位的缬氨酸、第436位的异亮氨酸和第436位的缬氨酸。此方法记载于美国专利公开文本号2012/6128663中。

[0215] 在其它实施方案中,通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基改变Fc区,以改变抗体的效应器功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基234,235,236,237,297,318,320和322的一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲

和力,但是保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。在美国专利号5,624,821和5,648,260中更详细描述了此方法。

[0216] 在另一个实施方案中,可以用不同的氨基酸残基替换选自氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸,使得抗体具有改变的C1q结合和/或减少或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。在美国专利号6,194,551中更详细描述了此方法。

[0217] 在另一个实施方案中,改变氨基酸位置231和239内的一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。在PCT公开文本WO 94/29351中进一步描述了此方法。

[0218] 在另一个实施方案中,通过在修饰下列位置处一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力:238,239,248,249,252,254,255,256,258,265,267,268,269,270,272,276,278,280,283,285,286,289,290,292,293,294,295,296,298,301,303,305,307,309,312,315,320,322,324,326,327,329,330,331,333,334,335,337,338,340,360,373,376,378,382,388,389,398,414,416,419,430,434,435,437,438或439。在PCT公开文本WO 00/42072中进一步描述了此方法。此外,已定位了针对Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的人IgG1上的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields等(2001)J.Biol.Chem.276:6591-6604)。显示了在第256,290,298,333,334和339位的特定突变改善对Fc γ RIII的结合。另外,显示以下组合突变体改善Fc γ RIII结合:T256A/S298A,S298A/E333A,S298A/K224A和S298A/E333A/K334A。

[0219] 在另一个实施方案中,通过引入在位置Pro329处的氨基酸取代和至少一个另外的氨基酸取代,优选选自S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D和P331S修饰Fc区以降低抗体介导抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)的能力和/或降低抗体对Fc γ 受体的亲和力。在美国专利公开文本No.2002/2551531中描述了此方法。

[0220] 具有降低的效应器功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中一个或多个的取代的抗体(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297取代为丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0221] 描述了改善或降低的对FcR的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,以及Shields,R.L.等,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604)。

[0222] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸取代的Fc区,例如Fc区的第298、333和/或334位的取代(残基的EU编号)。

[0223] 在一些实施方案中,在Fc区中做出改变,其导致改变(即,改善或降低)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如记载于美国专利号6,194,551,WO 99/51642,以及Idusogie,E.E.等,J.Immunol.164(2000)4178-4184。

[0224] 具有增加的半衰期和改善的对新生儿Fc受体(FcRn)(其负责将母体IgG转移到胎儿(Guyer,R.L.等,J.Immunol.117(1976)587-593,和Kim,J.K.等,J.Immunol.24(1994)2429-2434))的结合的抗体记载于US 2005/0014934中。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,其改善Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在下述Fc区残基中的一个或多个处具有取代的:238,256,265,272,286,303,305,307,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,413,424或434,例如,Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。还参见

Duncan, A.R. 和 Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; 美国专利号 5,648,260; 美国专利号 5,624,821; 及 WO 94/29351, 其关注 Fc 区变体的其它实例。

[0225] 另外, 抗体可以是 PEG 化的, 例如以增加抗体的生物学(例如血清)半衰期。为了使抗体进行 PEG 化, 抗体或其片段通常在一个或多个 PEG 基团被附接于抗体或抗体片段的条件下与聚乙二醇(PEG), 如 PEG 的反应性酯或醛衍生物起反应。优选地, 通过与反应性 PEG 分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行 PEG 化。如本文中使用, 术语“聚乙二醇”意图涵盖已经用于衍生其它蛋白质的任何形式的 PEG, 例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中, 待 PEG 化的抗体是无糖基化抗体。用于使蛋白质 PEG 化的方法是本领域已知的, 并且可应用于本发明的抗体。参见例如 EP 0 154 316 和 EP 0 401 384。

[0226] C6 单克隆抗体的表征

[0227] 可使用多种已知技术对本发明的单克隆抗体表征对 C6 的结合和/或对 C6 的功能抑制。通常, 最初通过 ELISA 来表征抗体与其靶抗原的结合。简言之, 可以用 PBS 中的纯化的 C6 包覆微量滴定板, 然后用无关蛋白质(如在 PBS 中稀释的牛血清白蛋白(BSA))封闭。将来自 C6 免疫小鼠的血浆稀释液添加到每个孔中, 并且在 37°C 温育 1-2 小时。用 PBS/Tween 20 清洗板, 然后在 37°C 与缀合于碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂温育 1 小时。清洗后, 将板用 ABTS 底物显影, 并在 OD 405 分析。优选地, 使用形成表现出最高结合和/或功能抑制活性的抗体的最高滴度的小鼠用于融合。

[0228] 可使用如上所述的 ELISA 测定法筛选抗体, 从而筛选产生与 C6 免疫原显示阳性反应性的抗体的杂交瘤。可以将优选以高亲和力结合 C6 的杂交瘤亚克隆并进一步表征。然后, 可以选择保留亲代细胞反应性(通过 ELISA)的每个杂交瘤的一个克隆, 用于制备细胞库, 并进行抗体纯化。

[0229] 另外/或者, 确定抗体抑制或阻断 C6 活性的能力的功能测定法可用于筛选和选择感兴趣的抗体。合适的体外功能测定法包括溶血测定法和 MAC ELISA 测定, 如实施例 1 中详细描述的。在实施例 4 中详细描述了用于测定体内功能活性的合适的测定法。

[0230] 为了纯化抗 C6 抗体, 可以在滚瓶、2 升旋转瓶或其它培养系统中培养选择的杂交瘤。可以在用蛋白 A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和层析之前过滤和浓缩上清液以纯化蛋白质。与 PBS 进行缓冲液交换后, 可以通过 OD₂₈₀ 使用 1.43 消光系数或优选通过浊度分析确定浓度。可以通过凝胶电泳和抗原特异性方法检测 IgG。

[0231] 为了确定所选择的抗 C6 单克隆抗体是否结合独特的表位, 可使用市售试剂(Pierce, Rockford, IL) 将每种抗体生物素化。可以用链霉亲合素标记的探针检测生物素化的 MAbs 结合。为了确定纯化抗体的同种型, 可使用本领域公认的技术进行同种型 ELISA。例如, 微孔板的孔可以在 10°C 用 10 μg/ml 抗 Ig 在 4°C 包覆过夜。用 5% BSA 封闭后, 平板与 10 μg/ml 单克隆抗体或纯化的同种型对照在环境温度反应 2 小时。然后可以将孔与 IgG1 或其它同种型特异性缀合的探针起反应。如上所述显现和分析板。

[0232] 用于分析各种抗 C6 抗体的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域已知的标准测定法, 例如使用 Biacore™ 2000 SPR 仪(Biacore AB, Uppsala, Sweden) 的 Biacore™ 表面等离振子共振(SPR), 如本文中实施例 2 中所述。

[0233] 优选地, 本发明的抗体以 5×10^{-8} M 或更小的 K_D 结合 C6, 以 2×10^{-8} M 或更小的 K_D 结合

C6,以 5×10^{-9} 或更小的K_D结合C6,以 4×10^{-9} 或更小的K_D结合C6,以 $3 \times 10^{-9} M$ 或更小的K_D结合C6,以 $2 \times 10^{-9} M$ 或更小的K_D结合C6,以 $1 \times 10^{-9} M$ 或更小的K_D结合C6,以 $5 \times 10^{-10} M$ 或更小的K_D结合C6,或以 $2.5 \times 10^{-10} M$ 或更小的K_D结合C6。

[0234] 优选地,本发明的抗体具有至少24小时、或至少30小时、或至少36小时、或至少40小时或至少45小时的T_{1/2}(如通过表面等离振子共振确定)。

[0235] 抗体物理性质

[0236] 本公开的抗体可通过其各种物理性质表征,以检测和/或区分其不同类别。

[0237] 在优选的实施方案中,本公开的抗体不含有天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺可以发生在N-G或D-G序列上,并导致创建异天冬氨酸残基,其引入了多肽链中的扭结并降低其稳定性(异天冬氨酸效应)。

[0238] 每个抗体将具有独特的等电点(pI),其通常落在6-9.5的pH范围内。IgG1抗体的pI通常落在7-9.5的pH范围内,并且IgG4抗体的pI通常落在6-8的pH范围内。推测在体内条件下,pI在正常范围外的抗体可以具有一些解折叠和不稳定性。因此,优选具有含有落在正常范围内的pI值的抗C6抗体。这可以通过选择具有正常范围内的pI的抗体或通过使带电表面残基突变来实现。

[0239] 在优选的实施方案中,选择不快速降解的抗体。可使用毛细管电泳(CE)和MALDI-MS(Alexander AJ和Hughes DE(1995)Anal Chem 67:3626-32)测量抗体的降解。

[0240] 在另一个优选的实施方案中,选择具有最小聚集效应的抗体,其可导致不想要的免疫应答的触发和/或改变或不利的药代动力学性质。通常,抗体在25%以下,优选为20%以下,甚至更优选为15%以下,甚至更优选为10%以下,甚至更优选为5%以下的凝集的情况下可接受。可以通过几种技术测量,包括大小排阻柱(SEC)、高效液相层析(HPLC)和光散射测量聚集。

[0241] 每个抗体将具有特征的熔解温度,较高的熔解温度指示较好的体内总体稳定性(Krishnamurthy R和Manning MC(2002)Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。通常,优选T_{M1}(初始展开的温度)大于60°C,优选大于65°C,甚至更优选大于70°C。可使用差示扫描量热法(Chen等(2003)Pharm Res 20:1952-60;Ghirlando等(1999)Immunol Lett 68:47-52)或圆二色性(Murray等(2002)J.Chromatogr Sci 40:343-9)测量抗体的熔点。

[0242] 在一个实施方案中,本发明的抗体具有高熔解温度。在一个实施方案中,抗体具有至少65°C,更优选至少66°C,甚至更优选至少67°C,甚至更优选至少68°C的熔点。优选地,本发明的抗体具有在67°C至72°C,更优选68°至72°C,或69°C至72°C,或70°C至72°C或69°C至71.43°C的范围内的熔点。

[0243] II. 免疫毒素、免疫缀合物和抗体衍生物

[0244] 在另一个实施方案中,本发明的抗体与治疗性部分,如细胞毒素、药物或放射性同位素连接。当与细胞毒素缀合时,这些抗体缀合物称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如杀死细胞)的任何药剂。例如紫杉醇、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽环二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氨基咪唑)、烷化剂(例

如,氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(如柔红霉素(以前为道诺霉素)和多柔比星))、抗生素(更生霉素(以前为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春碱)。本发明的抗体可与放射性同位素(例如放射性碘)缀合以产生细胞毒性放射性药物。

[0245] 本发明的抗体缀合物可用于改变给定的生物学应答,并且药物部分不应解释为限于经典的化疗剂。例如,药物部分可以是具有期望生物活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括例如酶活性毒素或其活性片段,例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物反应修饰剂,如例如淋巴因子、白细胞介素-1("IL-1")、白细胞介素-2("IL-2")、白细胞介素-6("IL-6")、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")、粒细胞集落刺激因子("G-CSF")或其它生长因子。

[0246] 将此类治疗部分与抗体缀合的技术是公知的,参见例如Arnon等,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy",于Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Reisfeld等(编),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等,"Antibodies For Drug Delivery",于Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等(编),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review",于Monoclonal Antibodies'84: Biological and Clinical Applications,Pinchera等(编),第475-506页(1985);"Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy",于Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy,Baldwin等(编),第303-16页(Academic Press 1985),以及Thorpe等,"The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",Immunol.Rev.,62:119-58(1982)。

[0247] 抗体和细胞毒素的缀合物可使用各种双官能蛋白偶联剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯、亚氨基硫烷、亚氨酸酯的双官能衍生物如二甲基己二亚酰胺化物HCL、活性酯如二琥珀酰亚胺辛二酸酯、醛如戊二醛、双叠氮基化合物如双(对重氮基苯甲酰基)-乙二胺、二异氰酸酯如甲苯2,6-二异氰酸酯、和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。 C^{14} -标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是适合于将放射性核素与抗体缀合的螯合剂。

[0248] 免疫毒素的毒素组分可以是例如化疗剂、毒素如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段,或小分子毒素或放射性同位素,如 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0249] 可用于产生此类免疫缀合物的化疗剂包括美登木素生物碱,包括DM-1和DM-4,奥利他汀类(auristatins)、阿霉素、多柔比星、表柔比星、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷("Ara-C")、环磷酰胺、噻替派、白消安、细胞毒素、紫杉烷类如帕里他赛和多西他赛、泰索帝、甲氨喋呤、顺铂、美法仑、长春碱、博来霉素、依托泊苷、异环酰胺、丝裂霉素C、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、卡铂、替尼泊苷、道诺霉素、洋红霉素、氨基喋呤、更生霉素、丝裂霉素、埃斯波霉素、5-FU、6-硫鸟嘌呤、6-巯基嘌呤、放线菌素D、VP-16、苯丁酸氮芥、美法仑和其它相关氮芥。还包括作用为调节或抑制激素对肿瘤的作用的激素剂,如他莫昔芬和奥那司酮(onapristone)。可使用的毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、霍乱毒

素、肉毒毒素、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 α -帚曲霉蛋白(α -sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白质、石竹素蛋白、美洲商陆(*phytolaca Americana*)蛋白(PAPI、PAPII、PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Sapaponaria officinalis*)抑制剂、白树毒素、皂草素、米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(trichothecenes)。小分子毒素包括例如加利车霉素、美登木素生物碱、海葵毒素和CC1065。

[0250] 可与抗体缀合以形成免疫毒素的其它治疗剂包括抗代谢物、烷化剂,DNA小沟结合剂、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在缀合物中,抗体和治疗剂优选通过可切割的接头如肽基、二硫化物或腙接头缀合。更优选地,接头是肽基接头如Val-Cit,Ala-Val,Val-Ala-Val,Lys-Lys,Pro-Val-Gly-Val-Val(SEQ ID NO:15),Ala-Asn-Val,Val-Leu-Lys,Ala-Ala-Asn,Cit-Cit,Val-Lys,Lys,Cit,Ser,或Glu。可如美国专利号7,087,600;6,989,452;和7,129,261;PCT Publications WO 02/096910;WO 07/038658;WO 07/051081;WO 07/059404;WO 08/083312;和WO 08/103693;美国专利公开文本20060024317;20060004081;和20060247295(其公开内容通过引用并入本文)所述的那样制备缀合物。

[0251] 本发明的抗体也可以用于诊断目的,包括样品测试和体内成像,并且为此目的,抗体(或其结合片段)可以与适当的可检测剂缀合以形成免疫缀合物。为了诊断目的,合适的试剂是可检测的标记物,其包括用于全身成像的放射性同位素、放射性同位素、酶、荧光标记物和用于样品测试的其它合适的抗体标签。

[0252] 对于C6检测,可检测标记物可以是目前在体外诊断领域中使用的各种类型中的任何一种,包括颗粒标记物,包括金属溶胶如胶体金,同位素如I¹²⁵或Tc⁹⁹,例如呈现有N₂S₂、N₃S或N₄型的肽螯合剂,生色团,包括荧光标志物、发光标志物、磷光标志物等,以及将给定底物转化为可检测标志物的酶标记物,以及如通过聚合酶链式反应扩增后揭示的多聚核苷酸标签。合适的酶标记物包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。例如,标记物可为酶碱性磷酸酶,其通过测量转化1,2-二氧杂环丁烷(1,2dioxetane)底物如金刚烷基甲氧基磷酰氧基苯基二氧杂环丁烷(AMPPD)、3-(4-(甲氧基螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-5'-氯]三环{3.3.1.13,7}癸)-4-基)苯基磷酸二钠(CSPD),以及CDP和CDP-star®或本领域技术人员公知的其它发光底物,例如合适的镧系元素如铽(III)和铕(III)的螯合物后化学发光的存在或形成检测。检测手段由所选择的标记物确定。可使用肉眼(在标记物是颗粒并且以合适的水平积累的情况下),或者使用仪器,如分光光度计、发光计、荧光计等实现标记物或其反应产物的出现,均根据标准实践。

[0253] 在某些实施方案中,本文提供的抗体可以进一步修饰以含有本领域已知并且易于获得的其它非蛋白质部分。适用于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖酐、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和右旋糖酐或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯

醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而具有制造优点。聚合物可以是任何分子量，并且可以是支链或非支链的。附着到抗体上的聚合物的数目可以变化，并且如果附着多于一个聚合物，则它们可为相同或不同的分子。通常，用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于包括但不限于待改进的抗体的特定性质或功能，抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等的考虑来确定。

[0254] 在另一个实施方案中，提供可通过暴露于辐射而选择性加热的抗体和非蛋白质性部分的缀合物。在一个实施方案中，非蛋白质性部分是碳纳米管 (Kam, N.W. 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102 (2005) 11600-11605)。辐射可以是任何波长，并且包括但不限于不损害普通细胞但是将非蛋白质性部分加热到抗体非蛋白质性部分附近的细胞被杀死的温度的波长。

[0255] 导致基本(或几乎)非免疫原性的连接的缀合方法是特别适合的。因此，肽-(即酰胺-)、硫化物-、(空间位阻)、二硫化物、腙或醚连接是特别合适的。这些连接基本上是非免疫原性的并且在血清中显示合理的稳定性(参见例如 Senter, P. D. , Curr.Opin.Chem.Biol.13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886)。

[0256] 根据部分和抗体的生物化学性质，不同的缀合策略在手。在部分是50至500个氨基酸的天然存在或重组的部分的情况下，在描述蛋白质缀合物的合成化学的教科书中有关标准程序，其是本领域技术人员可以容易遵循的(参见例如 Hackenberger, C.P.R. , 和 Schwarzer, D. , Angew.Chem.Int.Ed.Engl.47 (2008) 10030-10074)。在一个实施方案中，使用马来酰亚氨基部分与抗体或部分内的半胱氨酸残基的反应。这在例如使用抗体的Fab或Fab'片段的情况下是特别适合的偶联化学。或者，在一个实施方案中，进行与抗体或部分的C末端的偶联。例如，可以进行蛋白质(例如Fab片段)的C末端修饰，如描述(Sunbul, M. 和 Yin, J. , Org.Biomol.Chem.7 (2009) 3361-3371)。

[0257] 通常，位点特异性反应和共价偶联是基于将天然氨基酸转化成具有与存在的其它官能团的反应性正交的反应性的氨基酸。例如，可以在醛中酶促转化罕见序列背景内的特定半胱氨酸(参见Frese, M.A. , 和Dierks, T. , ChemBioChem.10 (2009) 425-427)。也有可能通过利用在给定的序列背景中具有天然氨基酸的某些酶的特异性酶反应性来获得期望的氨基酸修饰(参见，例如，Taki, M. 等, Prot. Eng. Des. Sel.17 (2004) 119-126; Gautier, A. 等 Chem.Biol.15 (2008) 128-136; 和Protease-catalyzed formation of C-N bonds is used by Bordusa, F. , Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389-403)。

[0258] 位点特异性反应和共价偶联也可通过末端氨基酸与合适的修饰试剂的选择性反应来实现。

[0259] N-末端半胱氨酸与苯基氯的反应性(参见Ren, H. 等, Angew.Chem.Int.Ed. Engl.48 (2009) 9658-9662)可以用于实现位点特异性共价偶联。

[0260] 天然化学连接也可依赖于C-末端半胱氨酸残基(Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, Nucleic Acids and Molecular Biology (2009) , 22 (Protein Engineering) , 65-96)。

[0261] EP 1 074 563描述了一种缀合方法，其基于在带负电荷的氨基酸的区段内的半胱氨酸与位于带正电荷的氨基酸的区段中的半胱氨酸的更快的反应。

[0262] 部分也可以是合成肽或肽模拟物。在化学合成多肽的情况下，可以在此类合成期间引入具有正交化学反应性的氨基酸(参见例如, de Graaf, A.J. 等, Bioconjug.Chem.20

(2009) 1281-1295)。由于极其多种正交官能团受到威胁并且可被引入到合成肽中,此类肽与接头的缀合是标准化学。

[0263] 为了获得单标记的多肽,可以通过层析从其它缀合副产物分离具有1:1化学计量的缀合物。可以通过使用染料标记的结合对成员和带电荷的接头促进该程序。通过使用这种标记的且高度带负电荷的结合对成员,由于电荷和分子量的差异可以用于分离,单缀合的多肽容易与未标记的多肽和携带多于一个接头的多肽分离。荧光染料可用于从未结合的组分,如标记的一价结合剂纯化复合物。

[0264] 在一个实施方案中,效应部分选自结合部分、标记部分和生物活性部分

[0265] III. 组合物

[0266] 在另一个实施方案中,本发明提供组合物,例如组合物,其含有与载剂(例如药学上可接受的载剂)一起配制的本发明的单克隆抗体之一或组合。还提供了含有包含本发明抗体的双特异性分子的组合物。在一个实施方案中,组合物包括本发明的多个(例如,两个或更多个)分离的抗体的组合。优选地,组合物的每种抗体结合到C6的不同的预先选择的表位。

[0267] 本发明的药物组合物也可以在联合疗法中施用,即与其它药物组合施用。例如,联合疗法可以包括本发明的组合物与至少一种或多种另外的治疗剂,如抗炎剂、DMARD(疾病缓解性抗风湿性药物)、免疫抑制剂和化疗剂。本发明的药物组合物也可以与放射治疗一起施用。本发明也涵盖与其它抗体的共施用。

[0268] 如本文中使用,术语“载剂”和“药学上可接受的载剂”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层材料、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂等。优选地,载剂适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。取决于给药途径,活性化合物,即抗体、双特异性和多特异性分子可以在材料中包覆以保护化合物免受可使化合物失活的酸和其它天然条件的作用。

[0269] 可与本发明的抗体和构建体一起使用的佐剂的实例包括:弗氏不完全佐剂和完全佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Mich.) ;Merck佐剂65(Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) ;AS-2(SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.) ;铝盐如氢氧化铝凝胶(明矾)或磷酸铝;钙、铁或锌的盐;酰化酪氨酸的不溶性悬浮液;酰化糖;阳离子或阴离子衍生的多糖;聚磷腈(polyphosphazenes);可生物降解微球;细胞因子,如GM-CSF,白细胞介素-2,-7,-12和其它类似因子;3D-MPL;CpG寡核苷酸;和单磷酰脂质A,例如3-脱-O-酰化单磷酰脂质A。

[0270] MPL佐剂可从Corixa Corporation(Seattle, Wash;参见例如美国专利号4,436,727;4,877,611;4,866,034和4,912,094)获得。含有CpG的寡核苷酸(其中CpG二核苷酸是未甲基化的)是公知的,并且记载于例如WO 96/02555、WO 99/33488和美国专利号6,008,200和5,856,462。免疫刺激性DNA序列也例如由Sato等,Science 273:352,1996描述。

[0271] 另外的替代佐剂包括例如皂昔,如Quil A或其衍生物,包括QS21和QS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.) ;七叶素;洋地黄皂昔;或石头花(Gypsophila)或昆诺阿藜(Chenopodium quinoa)皂昔;Montanide ISA 720(Seppic, France) ;SAF(Chiron, California, United States) ;ISCOMS(CSL) ,MF-59(Chiron) ;SBAS系列佐剂(例如SBAS-2或SBAS-4,可得自SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium) ;Detox

(EnhantynTM) (Corixa, Hamilton, Mont.) ; RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) 和其它氨基烷基葡萄糖胺-4-磷酸酯(AGP)；聚氧乙烯醚佐剂,如在WO 99/52549A1中描述的那些;合成咪唑并喹啉如咪喹莫德(imiquimod) [S-26308, R-837], (Harrison, 等, Vaccine 19:1820-1826, 2001; 和瑞喹莫德(resiquimod) [S-28463, R-848] (Vasilakos, 等, Cellular immunology 204:64-74, 2000; 在抗原呈递细胞和T细胞表面上组成型表达的羧基和胺的希夫碱,如妥卡雷琐(tucaresol) (Rhodes, J. 等, Nature 377:71-75, 1995); 作为蛋白质或肽的细胞因子、趋化因子和共刺激分子,包括例如促炎性细胞因子如干扰素、GM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、TGF- α 和TGF- β 、Th1诱导物如干扰素 γ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21, Th2诱导剂如IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13和其它趋化因子和共刺激基因如MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TCA-3、CD80、CD86和CD40L; 靶向配体的免疫刺激剂,如CTLA-4和L-选择蛋白,凋亡刺激蛋白质和肽,如Fas; 基于合成脂质的佐剂,如Vaxfectin, (Reyes等, Vaccine 19: 3778-3786, 2001) 角鲨烯, α -生育酚, 聚山梨醇酯80, DOPC和胆固醇; 内毒素, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3:23-30, 2000); 触发Toll受体产生Th1诱导细胞因子的配体,如合成分枝杆菌脂蛋白、分枝杆菌蛋白p19、肽聚糖、磷壁酸和脂质A; 和CT(霍乱毒素, 亚基A和B) 和LT(来自大肠杆菌的热不稳定肠毒素, 亚基A和B)、热休克蛋白家族(HSP) 和LL0(李斯特菌溶血素O; WO 01/72329)。这些和各种其它Toll样受体(TLR) 激动剂记载于例如Kanzler等, Nature Medicine, May 2007, Vol 13, No 5。

[0272] “药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的期望生物活性并且不赋予任何不期望的毒理作用的盐(参见例如Berge, S.M., 等(1977) J.Pharm.Sci. 66:1-19)。这些盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括源自无毒无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的那些,以及源自无毒性有机酸如脂肪族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸,芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等的那些。碱加成盐包括源自碱土金属如钠、钾、镁、钙等的那些,以及源自无毒性有机胺如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺,普鲁卡因等的那些。

[0273] 可通过本领域已知的多种方法来施用本发明的组合物。如熟练技术人员将理解, 施用途径和/或模式将根据期望的结果而变化。活性化合物可以用保护化合物免受快速释放的载剂制备,如控制释放制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的许多方法是有专利的或者本领域技术人员通常已知的。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0274] 为了通过某些施用途径施用本发明的化合物,可以必需用材料包覆化合物或者共施用化合物与材料以防止其失活。例如,可以在合适的载剂例如脂质体或稀释剂中将化合物施用于受试者。可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。脂质体包括水包油包水CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan等(1984) J.Neuroimmunol. 7:27)。

[0275] 载剂包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。使用此类介质和试剂用于药物活性物质是本领域已知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容之外,涵盖其在本发明的药物组合物中的用途。补充的活性化合物也可以并入组合物中。

[0276] 治疗组合物通常在制造和贮存条件下必须是无菌和稳定的。该组合物可以配制适合高药物浓度的溶液、微乳液、脂质体或其它有序结构。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质及其合适的混合物。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的涂层,通过在分散体的情况下维持所需的粒度和通过使用表面活性剂维持合适的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等张剂,例如糖、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇或氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸盐和明胶来实现可注射组合物的延长吸收。

[0277] 可以通过在根据需要具有上文例举的成分之一或组合的适当的溶剂中掺入所需量的活性化合物,接着灭菌微过滤来制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和来自上面列举的成分的所需的其它成分的无菌媒剂来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其从其预先无菌过滤的溶液中产生活性成分加上任何另外的期望成分的粉末。

[0278] 调整剂量方案以提供最佳期望的应答(例如治疗应答)。例如,可以施用单次推注,可以随着时间施用几个分开的剂量,或者剂量可按比例减少或增加,如治疗情况的紧急程度所指示。例如,本发明的抗体可以通过皮下或肌内注射每周施用一次或两次,或通过皮下或肌内注射每月一次或两次。

[0279] 以剂量单位形式配制肠胃外组合物以便于施用和剂量一致性是特别有利的。如本文中所用的剂量单位形式是指适合于待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有计算为与所需药物载剂结合产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的剂量单位形式的规则由下列各项规定并且直接依赖于下列各项:(a)活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗效果,和(b)复合此类化合物用于治疗个体中敏感性的本领域中固有的局限。

[0280] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸,磷酸等。

[0281] 对于治疗组合物,本发明的制剂包括适用于静脉内、腹膜内、口服、鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。制剂可方便地以单位剂量形式呈现,并且可通过药学领域中已知的任何方法制备。可与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者和具体的施用方式而变化。可与载剂材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的组合物的量。一般地,在100%中,此量的范围会为约0.001%至约90%活性成分,优选约0.005%至约70%,最优选约0.01%至约30%。

[0282] 适用于阴道施用的本发明的制剂还包括含有如本领域中已知为合适的载剂的子宫套、棉塞、乳膏、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂。用于本发明组合物的局部或透皮施用的剂型包括粉末、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载剂,并且与任何可能需要的防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0283] 如本文中使用,短语“肠胃外施用”和“肠胃外施用的”是指通常通过注射的除了肠和局部施用以外的施用模式,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心

内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0284] 可用于本发明的药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油如橄榄油,和可注射的有机酯,如油酸乙酯。可以例如通过使用涂层材料,如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂保持适当的流动性。

[0285] 这些组合物还可以含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过灭菌程序,同上和通过包括各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、山梨酸等来确保防止微生物的存在。还可以期望将等张剂,如糖、氯化钠等纳入组合物中。此外,可注射药物形式的延长吸收可以通过包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0286] 当以药物对人和动物施用本发明的化合物时,可以单独或作为药物组合物给予它们,所述药物组合物含有例如0.001至90% (更优选为0.005至70%,如0.01至30%)与药学上可接受的载体组合的活性成分。

[0287] 不管选择的施用途径,可以以适合的水合形式使用的本发明化合物和/或本发明的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0288] 可改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以获得一定量的活性成分,其对于特定患者、组合物和施用模式有效实现期望的治疗应答,而对患者无毒。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括所采用的本发明的特定组合物,或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、采用的具体化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所采用的具体组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康和先前病史以及医学领域中公知的类似因素。具有本领域普通技术的内科医生或兽医可以容易地确定和规定所需药物组合物的有效量。例如,内科医生或兽医可以以比为实现期望治疗效果而要求的水平低的水平开始药物组合物中使用的本发明化合物的剂量,并逐渐增加剂量直到实现期望的效果。通常,本发明的组合物的合适的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。此类有效剂量通常将取决于上文描述的因素。优选施用是静脉内、肌内、腹膜内或皮下,优选在目标部位附近施用。如果想要的话,治疗组合物的有效日剂量可以以在贯穿整天的合适间隔分开施用(任选以单位剂型)的2、3、4、5、6或更多个亚剂量施用。尽管有可能单独施用本发明的化合物,但是优选以药物制剂(组合物)施用化合物。

[0289] 可以用本领域中已知的医学装置施用治疗组合物。例如,在优选的实施方案中,可以用无针刺的皮下注射装置施用本发明的治疗组合物,例如美国专利号5,399,163,5,383,851,5,312,335,5,064,413,4,941,880,4,790,824或4,596,556中公开的装置。用于本发明的公知的植入物和模块的实例包括:美国专利No.4,487,603,其公开了一种用于以受控速率分配药物的可植入微输注泵;美国专利号4.,486,194,其公开了一种用于通过皮肤施用药物的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开了一种用于以精确的输液速率递送药物的药物输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了一种用于连续药物递送的可变流动可植入输注装置;美国专利号4,439,196,其公开了一种具有多腔区室的渗透药物递送系统;和美国专利号4,475,196,其公开了渗透药物递送系统。许多其它此类植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0290] 在某些实施方案中,可以配制本发明的抗体以确保在体内适当分布。例如,血脑屏障(BBB)排除许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过BBB(如果想要的话),它们可以在例如脂质体中配制。关于制备脂质体的方法,参见例如美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性转运到特定细胞或器官中的部分,从而增强靶向药物递送(参见例如V.V.Ranade(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如Low等的美国专利5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等,(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038);抗体(P.G.Bloeman等(1995)FEBS Lett.357:140;M.Owais等(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性蛋白A受体(Briscoe等(1995)Am.J.Physiol.1233:134),其不同种类可以包含本发明的制剂以及本发明分子的组分;p120(Schreier等(1994)J.Biol.Chem.269:9090);还可见K.Keinanen;M.L.Laukkonen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods 4:273。在本发明的一个实施方案中,在脂质体中配制本发明的治疗化合物;在更优选的实施方案中,脂质体包含靶向部分。组合物必须是流体,以至于存在易于注射的程度。它在制造和储存的条件下必须是稳定的,并且必须防止诸如细菌和真菌等微生物的污染作用。

[0291] 组合物必须是无菌的并且是流体的,以至于可通过注射器递送组合物。除了水之外,载剂可以是等张缓冲盐溶液、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的涂层材料,在分散体的情况下通过维持所需的粒径和通过使用表面活性剂保持适当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等张剂,例如糖、多元醇如甘露糖醇或山梨糖醇、和氯化钠。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝或明胶来实现。

[0292] 当适当保护活性化合物时,如上所述,化合物可以例如用惰性稀释剂或可同化的可食用载剂口服施用。

[0293] IV. 本发明的用途和方法

[0294] 本发明的抗C6抗体能够在体外和体内功能上抑制C6,使得需要C6的膜攻击复合物的形成受到抑制。因此,在另一方面,本发明涉及在受试者中抑制膜攻击复合物(MAC)形成或活性的方法,所述方法包括以有效抑制受试者中的MAC形成或活性的量对受试者施用本发明的抗体。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗、预防或减少由受试者中补体系统的不期望活性介导的病症症状的方法,所述方法包括对受试者施用有效量的本发明的抗体。在下面进一步描述这种疾病的实例。

[0295] 如美国专利8,703,136(其全部内容通过引用明确并入本文)中详细描述,已经建立了可以通过抑制补体系统来增强轴突再生。因此,抗C6抗体用于抑制补体系统,特别是抑制MAC形成的用途可用于治疗需要轴突再生的状况,例如,在受到中央或周围神经系统的损伤或疾病影响的哺乳动物中。可以根据本发明治疗的需要轴突再生的状况包括身体损伤以及周围或中枢神经系统的神经变性疾病。

[0296] 在一个实施方案中,本发明的抗体促进轴突再生。如本文中使用,术语“促进轴突再生”或“促进神经再生”与减少或预防轴突或神经变性区分。轴突或神经再生的促成(或促进)在本文中理解为意味着与未治疗的受试者相比,治疗的受试者中的轴突或神经的再生得到改善。优选地,改善的轴突再生是与未治疗的受试者相比在治疗的受试者中较早的

时间点(在轴突或神经损伤之后或治疗开始之后)发生的再生。改善的轴突或神经再生还可以包括与未治疗的受试者相比在治疗的受试者中以较高的速率和/或更大的程度发生的再生。因此,根据本发明的抗体优选产生感觉或运动功能的增益。

[0297] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了在受试者中再生神经的方法,包括对受试者施用治疗有效量的本发明的抗体。在另一个实施方案中,本发明提供了在受试者中促进受损伤或变性的神经的恢复的方法,包括对受试者施用治疗有效量的本发明的抗体。在另一个实施方案中,本发明提供减少或延缓受试者中的神经变性的方法,包括对受试者施用治疗有效量的本发明的抗体。

[0298] 受试者可以患有神经的身体损伤,如周围神经系统(PNS)或中枢神经系统(CNS)的损伤,例如来自身体损伤的神经创伤(下文进一步讨论)。身体损伤可以是例如创伤性损伤(例如事故)、手术损伤或非创伤性损伤(例如神经压迫)。在一个实施方案中,在损伤部位处或附近施用抗体。或者,受试者可患有可为获得性和/或遗传性的疾病,如免疫介导的炎性病症和/或进行性神经变性性病症,如慢性脱髓鞘性神经病,如多发性硬化症(MS)或其它神经变性性病症,如重症肌无力或肌萎缩侧索硬化(ALS)(下文进一步讨论)。

[0299] 轴突再生的改善优选通过在人受试者中相对容易进行的功能测试来确定,例如,感觉或运动功能的恢复优选如在本领域可用的标准化测试中确定(参见例如K.H等(2006)Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.Hand Surg.40:219-224;Jerosch-Herold(2005)Hand Surg.30:252-264。合适的测试优选是定量的,标准化的,并且更优选地对其心理测量特性进行评估和量化。此类测试包括例如Weinstein增强感觉测试(WEST)或Semmes-Weinstein单丝测试(SWMT)和用于触觉感知的形状纹理鉴定(STI)测试。可以在测试动物中通过用于恢复感觉或运动功能的功能测试凭实验测定改进的轴突再生,如由Hare,G.M.T等(1992)Plastic和Reconstr.Surg.89:251-258和De Koning,P.等(1986)J.Neurol.Sci.74:237-246描述。抗体优选产生感觉或运动功能的增益,如可以在例如上文指定的测试中测定。

[0300] 实施例8详细描述了可用于测试本发明的抗C6抗体对感觉功能的影响的动物模型。这种神经挤压模型(坐骨神经挤压)用于测试抗人C6单克隆抗体对补充有人C6的C6敲除大鼠(PVC)中的感觉功能的恢复的影响。神经挤压是周围神经损伤的一种模型。参见WO 2010/005310 (PCT/NL2009/050418);以及de Jonge等(2004)Hum Mol Genet.13 (3):295-302。

[0301] 改善的轴突再生也可以通过组织学检查在测试动物中凭实验测定,例如可以通过比较经处理的动物与未处理动物中的轴突周围的髓鞘测量来确定改善的再髓鞘形成,由此较厚的髓鞘指示改善的再髓鞘形成。与未处理的动物中的较小轴突的簇相比,可将更有效的轴突再生确定为处理的动物中单一、大直径轴突芽的产生。

[0302] 抗体的合适剂量是有效促进轴突再生的量,如通过如上所述的感觉或运动功能的改善可以看出的。“有效量”、“治疗量”或“有效剂量”是指足以引起期望药理学或治疗效果,因此导致对损伤或病症的有效治疗的量。

[0303] 为了最小化神经损伤和/或尽可能促进轴突再生,在本发明的方法中,抗体优选在神经损伤发生后不久施用,即在发生神经损伤后24、12、6、3、2或1小时内,更优选在45、30、20或10分钟内。在本发明的一个实施方案中,可以在具有神经损伤的风险的手术(见下文)前施用抗体(例如作为预防措施),以便最小化神经损伤和/或在神经的手术损伤后立即促

进轴突再生。

[0304] 可以用本发明的抗体治疗需要轴突再生的多种状况。状况包括PNS的损伤以及CNS的损伤。此类状况包括由于身体损伤所致或源自疾病的神经创伤。此类疾病包括免疫介导的炎性病症或损伤和/或可以是获得性和/或遗传性的进行性神经变性性病症。

[0305] PNS和CNS的身体损伤可以是创伤性损伤,包括手术损伤或非创伤性损伤。可用本发明的方法和/或药物治疗的创伤性PNS和CNS损伤包括脊髓损伤,以及对周围神经的创伤性伤口,包括来自碰撞、电动车辆事故、枪伤、骨折、脱位、撕裂或穿透性创伤的一些其它形式的损伤。经由可以治疗的创伤损伤的外周神经包括指神经、正中神经、尺骨神经、桡骨神经、面神经、脊髓副神经和臂丛神经。

[0306] 本文中将手术PNS损伤理解为当它对于在手术程序期间除去或解剖神经变得临床必需时出现的对外周神经的损伤。这发生在每年数以千计的外科程序中。可用本发明的方法和/或药物治疗的手术损伤的外周神经的一个实例包括例如支持勃起功能和膀胱控制的海绵状神经;这些神经在手术除去前列腺肿瘤及其周围的组织期间经常受损。可以根据本发明治疗的手术损伤的外周神经的另一个例子是冠状动脉旁路移植术(CABG)后的膈神经。

[0307] 可用本发明的抗体治疗的非创伤性物理PNS损伤包括外周神经的压迫和/或粘附,也称为陷夹综合征。最常见的陷夹综合征是腕管综合征。

[0308] 此外,可用本发明的抗体治疗免疫介导的炎性病症或损伤。这些包括中枢和周围神经系统的脱髓鞘疾病,其被认为具有自身免疫基础,并且由于直接对少突胶质细胞或髓磷脂引起的损伤而导致神经脱髓鞘。此类脱髓鞘疾病包括例如格-巴二氏综合征(GBS;也称为炎性脱髓鞘性多神经病、急性特发性多神经根神经炎、急性特发性多神经炎、法国小儿麻痹和兰德里上行性麻痹)。优选地,本发明的抗体应用于促进GBS中的急性期后的轴突再生。类似地,认为是GBS的慢性对应物的慢性炎性脱髓鞘性多神经病(CIDP)可用本发明的抗体治疗。多发性硬化症(MS)是可用本发明的抗体治疗的另一种脱髓鞘疾病。

[0309] 具有可用本发明抗体治疗的遗传成分的进一步的神经变性性CNS和/或PNS病症包括肌萎缩侧索硬化症(ALS,有时称为Lou Gehrig氏病)、夏科-马里-图思病(遗传性运动和感觉神经病,HMSN)和亨廷顿病(HD)。

[0310] 通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例不应解释为进一步限制。贯穿本申请引用的序列表、数字和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用明确并入本文。

实施例

[0311] 实施例1:产生大鼠抗人C6单克隆抗体

[0312] 通过用人C6蛋白免疫5只PVG C6-/-株大鼠产生大鼠抗人C6单克隆抗体。选择C6缺陷型大鼠,因为根据目前在该领域中的理解,在正常啮齿类中产生功能性C6抗体是非常困难的。假设由于人和啮齿类之间C6蛋白的高度同源性,针对C6的免疫在野生型动物中不是有效的。C6缺陷型动物中的抗体应答是更稳健的,因为这些动物在循环中没有功能性C6蛋白,因此可能认为C6是完全“外来的”。使用与Sepharose(GE Healthcare Cat No.17-0717-01)偶联的23D1小鼠单克隆抗体23D1(详细记载于L.Clayton(2005)博士论文,Cardiff University)通过亲和层析从全人血清纯化人C6。

[0313] 抗原和免疫: 免疫前一周, 通过从尾静脉收集100 μ l血液对大鼠进行免疫前出血。在免疫的第1天, 在四个位置处给大鼠皮下(s.c.)注射每次注射的体积250 μ l中在完全弗氏佐剂(CFA)中的100 μ g C6抗原。再次在四个s.c.位置处用每次注射的体积250 μ l中在不完全弗氏佐剂(CFA)中的50 μ g C6抗原在第14天和第21天进行加强注射。在第36天通过从尾静脉收集100 μ l血液进行测试出血, 用于体外测试。在C6 ELISA、C6 Western印迹和溶血测定法(下文进一步描述)中分析这些测试出血, 其显示所有五只大鼠对人C6具有阳性免疫应答: 所有五只大鼠具有在溶血测定法中阻断溶血的抗体并且所有五只大鼠均具有识别Western印迹(变性条件)上纯化的C6的抗体。在第62天通过腹膜内注射250 μ l PBS中的100 μ g抗原进行融合前加强。最后, 在第64天通过静脉内(尾静脉)注射250 μ l PBS中的100 μ g抗原进行融合前加强。在第66天收获来自两只大鼠的脾脏(其它三只大鼠作为备用), 并且使用分离的脾细胞制备杂交瘤。

[0314] 杂交瘤制备: 使用标准聚乙二醇(PEG)介导的融合基本上如Luk, J.M.等(1990)J. Immunol. Methods 129:243-250中所述, 通过将来自人C6免疫的大鼠的脾细胞与Y3-Ag1.2.3融合伴侣细胞融合来制备杂交瘤。收获上清液, 并且用于使用用人C6抗原包覆的96孔板经由ELISA初步筛选抗人C6抗体。选择阳性克隆并进行亚克隆。选择38个阳性克隆进行进一步分析。

[0315] 溶血测定法: 使用人血清作为补体来源, 以1:50稀释度在溶血测定法中进一步测试这38种上清液和对照上清液。在该测定法中, 在血清存在下温育用补体激活抗原包覆的红细胞。血清含有补体系统的组分, 当遇到包覆的红细胞时, 它们通过经典途径激活。膜攻击复合物(MAC)作为末端补体系统的一部分形成, 并且MAC启动红细胞裂解。可以通过测量上清液中405nm或415nm处的OD来量化红细胞裂解, 并且是对MAC的活性的直接测量。可以在此系统中测试补体抑制剂, 因为如果它们是有效的, 则它们将以定量的方式防止红细胞裂解。

[0316] 为了进行测定法, 商业上获得即用的溶血系统(Virion/Serion GmbH, Wurzburg, Germany)以及CFT缓冲液(Virion/Serion GmbH, Wurzburg, Germany)。根据制造商的说明书制备CFT缓冲液。将溶血系统置于冷室中的滚筒库上以充分混合红细胞。为了制备CFT血清混合物, 将100 μ l人血清添加到5ml CFT缓冲液。将体积50 μ l中的测试抑制剂的稀释液添加到圆底96孔板, 向每孔间50 μ g CFT血清混合物, 并在移液时小心混合, 并将板在37°C温育30分钟。阳性对照为EDTA。阴性对照为无血清或C6缺乏血清。温育后, 将板以2000rpm向下旋转5分钟(Hettich台式离心机), 并将80 μ l上清液转移到平底板上以在405或415nm测量。在转移的10分钟内测量OD。

[0317] 在溶血测定法中将测试上清液以稀释液添加, 以测定它们是否防止红细胞裂解。在图1A中显示示例性结果, 其证明了某些上清液表现出比其它上清液更强的抑制活性。特别地, 上清液#6-12表现出比其它上清液更强的抑制效果, 上清液#11和#12显示出最强的抑制效果。也使用大鼠血清作为补体来源在溶血测定法中测试上清液(1:50稀释), 并且没有观察到抑制效果, 证明了抗体的抑制活性对人C6是特异性的。

[0318] MAC ELISA测定法: 使用第二种测定法来测定上清液是否能够阻断MAC形成。在该测定法中, 在血清存在下, 分别用甘露聚糖或IgG作为用于补体的凝集素或经典途径的触发剂包覆板中的ELISA孔。血清含有补体系统的组分, 当它们暴露于包覆的板时, 它们通过任

一途径倍激活。膜攻击复合物(MAC)作为末端补体系统的一部分形成，并且MAC将沉积在ELISA板上。在板上的MAC沉积可以通过缀合有HRP的抗体检测，并通过在色原体和底物存在的酶反应显现。该反应产生可以通过测量450或655nm的OD量化的颜色。OD是对MAC形成量的直接测量。可以在该系统中测试补体抑制剂，因为如果它们有效，则它们将防止或抑制MAC在板上的沉积。

[0319] 在用于测试杂交瘤上清液的第二种测定法中，进行了甘露聚糖激活的补体ELISA测定法。简言之，用甘露聚糖和稀释的杂交瘤上清液包覆ELISA平板，并且添加人血清。可使用抗体检测在甘露聚糖包覆的平板上形成复合物的补体成分。在此特定的测定法中，检测C9作为MAC形成的指标。如果相对于缺乏上清液，在上清液的存在下检测到较少的C9，则这指示MAC抑制。使用的阳性对照是EDTA(因为反应依赖于钙)。

[0320] 为了进行测定法，制备涂覆缓冲液(15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, 15mM NaN₃, pH 9.6)，封闭缓冲液(1mg/ml BSA/HAS, 10mM Tris/HCl, pH 7.4, 145mM NaCl, 15nM NaN₃, pH 7.4)清洗缓冲液(1x TBS, 0.05% Tween 20, 5mM CaCl₂)和稀释缓冲液(4mM巴比妥, 145mM NaCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.3% BSA, 0.02% Tween 20)。用100μl含有10μg/μl甘露聚糖(Sigma, 目录号M7504)的包覆缓冲液包覆平底高结合96孔板的孔，并在4℃温育过夜。在室温下用200μl封闭缓冲液将板封闭1小时。将稀释缓冲液中的人血清(1:100)用圆底板中的上清液(1:50)稀释，并将50μl每孔添加到平底高结合板中。将板在37℃温育1小时，然后用清洗缓冲液清洗3次。将抗C5b-9neo(克隆aE11; DAKO, 目录号M0777)在稀释缓冲液中以1:100稀释，每孔添加50μl，并且将板在室温下温育1小时，然后用清洗缓冲液清洗3次。将抗小鼠HRP(DAKO, 目录号P0447)在稀释缓冲液中以1:2000稀释，每孔添加50μl，并且将板在室温温育30分钟，然后用清洗缓冲液清洗3次。为了显现，将50μl TMB色原体(TMB: Sigma T2885; 在DMSO中制备10mg/ml TMB的储备溶液)和10μl 3% H₂O₂添加到5ml NaAc缓冲液(在1升H₂O中的8.2gm乙酸钠, 21gm柠檬酸一水合物)并分配到96孔板。用25μl 1M H₂SO₄终止反应，并且用分光光度计在450nm/655nm测量OD。

[0321] 在图1B中显示该测定法的示例性结果，其证明了两种上清液#11和#17具有比其它36种上清液显著更好的抑制能力，上清液#11具有迄今为止所有分析的克隆的最优异的抑制能力。

[0322] 由于上清液#11在溶血测定法和MAC ELISA测定法两者中都表现出最强的抑制效果，选择该杂交瘤用于进一步表征。由该杂交瘤产生的单克隆抗体在本文中称为7E5。

[0323] 实施例2: 7E5单克隆抗体的表征

[0324] 在该实施例中，进行另外的实验以进一步检查大鼠抗人C6单克隆抗体7E5的结合和功能特征。

[0325] 交叉反应性: 使用人血清和来自猕猴(Cyno)的血清进行Western印迹。人和Cyno血清用于PAGE(10%凝胶)和标准Western印迹法。将抗体以1:500稀释在印迹上温育1小时。在LAS3000(Fuji)暗盒成像系统中，使用抗大鼠辣根过氧化物酶(HRP)(DAKO, 1:1000)和Lumilight(Roche)进行检测。结果指示7E5能识别人和猕猴C6两者。

[0326] 结合动力学: 为了研究7E5与C6结合的动力学，使用了配备有研究级CM5传感器芯片的BIACORE 2000(GE Healthcare)中的表面等离振子共振测量。使用胺偶联化学固定配体(C6, 113kDa)。流动池2的表面用0.1M NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和0.4M EDC(3-(N,N-二甲

基氨基)丙基-N-乙基碳二亚胺)的1:1混合物以流速5 μ l/分钟活化7分钟。将10mM乙酸钠(pH5.0)中浓度10 μ g/ml的配体以955RU的密度固定。用7分钟注射1M乙醇胺(pH8.0)将表面封闭。

[0327] 用来自较早实验(α vWWF;987UU)的抗体固定流动池1并充当参考表面。

[0328] 为了收集动力学结合数据,将10mM HEPES,150mM NaCl,0.005%P20,pH 7.4中的分析物(抗C6抗体,150kDa)以30 μ l/分钟的流速和于温度25°C在两个流动池上注射。注射的浓度随抗体不同。以1Hz的速率收集数据。允许复合物分别结合和解离90和300秒。用0.1M HC1的10秒注射再生表面。每个样品和缓冲液空白的重复注射(以随机顺序)流过两个表面。

[0329] 使用BiaEvaluation 4.1软件中可用的全局数据分析选项将数据拟合到简单的1:1交互模型。在图2中显示Biacore动力学结果。代表性实验的结果也总结在下表1-4中。

[0330] 表1:通过表面等离振子共振测定的7E5结合的动力学

[0331]

ka	$1.69 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$
kd	$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$
K_D	$2.53 \times 10^{-10} \text{ M}$
Rmax	36RU
Rmax	95%

[0332]

表2:对于7E5结合的复合物半衰期

[0333]

kd (s ⁻¹)	t _{1/2} (秒)	t _{1/2} (分钟)	t _{1/2} (小时)
$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	162330	2705.5	45.1

[0334]

表3:对于7E5结合至5%解离的时间

[0335]

kd (s ⁻¹)	时间 (分钟)	时间 (小时)	R (RU)
$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	200.2	3.3	34

[0336]

表4:对于7E5结合至95%解离的时间

[0337]

kd (s ⁻¹)	时间 (分钟)	时间 (小时)	R (RU)
$4.27 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	11692.9	194.9	2

[0338]

7E5的K_D计算为 $2.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 。这种高亲和力主要是由高抗体-抗原复合物半衰期(45小时)引起的。因此,7E5结合非常稳定,7E5-C6复合物的半衰期估计为超过40小时。

[0339] 为了测定抗原-抗体复合物是否可以在由Fc γ 受体结合和细胞摄取后在内体和溶酶体中释放,在低pH值下测试了7E5-C6复合物的灵敏度。由于在溶酶体中pH约为4.8,测试复合物的稳定性直至pH=4。在此BIACORE实验中,用具有降低的pH的缓冲液清洗芯片上的7E5-C6复合物。Hepes缓冲盐水((HBS)用于pH 7.4、7.0和6.5。10mM乙酸钠用于pH 6.0、5.5、5.0、4.5和4.0。观察到复合物的稳定性对于低pH不敏感。

[0340] 预温育对溶血测定法的影响:由于BIACORE实验揭示了7E5从C6的缓慢释放是7E5的主要决定因素,研究了添加红细胞前7E5与补体来源(人血清)的预温育是否增加了溶血测定法中的抑制效力。在室温(20°C)将7E5与人血清预温育30分钟、90分钟或180分钟,之后添加红细胞,并且在37°C开始反应。结果显示了将预温育时间增加直至3小时不导致溶

血抑制的进一步增强。这意味着在该反应中由7E5结合C6的动力学使得C6在数分钟内被有效复合并完全中和。

[0341] 实施例3:7E5单克隆抗体的表位定位

[0342] 使用肽阵列测定人C6中7E5的表位。合成来自C6蛋白序列的连续重叠的16聚体肽(16个氨基酸长的肽,重叠14个氨基酸),并且以网格模式在膜上点样。然后,将膜与7E5抗体一起温育以检测抗体识别哪个肽。由7E5识别的主要肽序列是GSCQDGRLQLEWGLERT(肽418)(SEQ ID NO:1)。

[0343] 随后,进行对所选择的肽的丙氨酸扫描(其中丙氨酸用于逐个替换氨基酸)以帮助准确定位表位。在本研究中,除了肽418的修饰之外,具有4个氨基酸的肽相对于418移位,肽420(DGRQLEWGLERTRLSS)(SEQ ID NO:2)及其几种丙氨酸修饰显示7E5的结合。因此,推断形成7E5主要表位的一部分的氨基酸预期在组合肽418和420的该肽序列内:GSCQDGRLQLEWGLERTRLSS(SEQ ID NO:3)。

[0344] 图4A显示了人(SEQ ID NO:50)和大鼠C6(SEQ ID NO:51)中肽418和周围区域的序列。如图4B中示意性显示,肽418部分位于C6的第一FIM域的末端。

[0345] 为了确定其它抗体是否与7E5抗体结合相同的表位,进行了Biacore交叉阻断实验,其中C6抗原与芯片偶联,随后流动分析物,其是单独的单一抗C6抗体(作为对照)或第一抗C6抗体(抗体1),然后是第二抗C6抗体(抗体2)以确定交叉阻断。用于确定小鼠单抗27B1是否与大鼠单抗7E5结合相同的表位的交叉阻断实验的结果示于图3A-D中,其中图3A显示了用27B1作为抗体1和7E5作为抗体2的结果,图3B显示了用7E5作为抗体1和用27B1作为抗体2的结果。图3C显示了单独的27B1的结果,并且图3D显示了单独的7E5的结果。

[0346] 实施例4:7E5单克隆抗体的体内效力

[0347] 为了测试7E5是否能够在活体动物中阻断C6,使用补充有人C6的C6缺陷型PGR大鼠。使用这种方法,因为7E5对人C6是特异性的,并且不能阻断大鼠C6。在C6缺乏型大鼠中,可以注射人C6以恢复完全互补系统功能和MAC活性,并且可以测量7E5的效果,而不混淆由C6引起的效应。

[0348] 首先,通过测定注射有人C6的两只大鼠的溶血活性来测试该方法。通过在注射C6后按时间采集几份血液样品,估计大鼠中人C6的半衰期约为48小时。给两只C6缺陷型大鼠IV注射4mg/kg的人C6。在注射C6后10分钟、24小时和48小时抽取血液样品。在所有血液样品凝结后,通过将凝结物向下旋转(Eppendorf桌面离心机中的13,000rpm在室温持续10分钟)分离血清。将血清用于实施例1中所述的溶血测定法中以测定MAC活性。使用来自野生型PVG大鼠和未处理的C6缺陷型大鼠的血清作为最大和最小溶血活性的参照。使用溶血测定法,大鼠中人C6的半衰期估计为约48小时。

[0349] 在引导实验中,给一只雌性C6缺陷型PVG大鼠(220克体重)腹腔内注射高剂量12mg 7E5,并且补充2mg人C6(静脉内注射)。使用用经C6抗体包覆的柱的亲和纯化从人血清中分离人C6。在7E5推注之前24小时给药1mg C6并且在之后5分钟给药1mg C6。对照大鼠(与7E5处理的大鼠相同的体重)仅接受C6注射。在注射7E5后60分钟抽取用于溶血测定法的血液。结果显示在图5中。结果显示溶血活性在7E5给药后60分钟被7E5阻断,因此证明7E5可以在体内阻断MAC形成。

[0350] 在随后的实验中,给两只C6缺陷型雌性大鼠(PVG株)注射1mg C6。在C6注射之前和

C6注射之后(IV 1mg)采集血液样品以建立正常和补充的溶血活性。C6注射后10分钟,7E5以8mg IP(腹腔注射)或2mg IV(静脉注射)给药。7E5给药后60分钟,采集血液样品以评估7E5对溶血活性的影响。这两种给药策略都阻止了血液中的MAC活性。然后,在同一只大鼠中IV注射另一份1mg C6。新C6补充后15分钟内的血液采样仅显示溶血活性的适度增加,推测溶血活性在两只大鼠中仍然被游离的循环7E5抑制。

[0351] 这些上述实验证明7E5能够在活的动物中阻断C6。

[0352] 实施例5:7E5单克隆抗体的测序和重组表达

[0353] 通过标准程序测定7E5单抗的重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列。

[0354] VH区的核苷酸序列如下:

[0355] gaggtgcagctggaggactgatggaggcttagtgcagcctggaggccctgaaacttcctgtgt
agcctcaggattctttcagtgactattacatggcctgggtccgcagggtccaacgaaggggctggagtgggtc
gcaaccattaattatgtatggtagtagtactactatcgagagtccgtgaaggccgattcactatctccagagata
atgcgaaacgcaccctatacctgcaaattggacagtctgaggtctgaggacacggccacttattactgttcaagacc
ttctacggaggccctgtttgcttactggggcacggcactctggtcactgtcctca (SEQ ID NO:4)

[0356] VH区的氨基酸序列如下:

[0357] EVQLVESDGGLVQPGGSLKLSCVASGFSFSDYYMAWVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKRTLYLQMDSLRS
EDTATYYCSRSTEALFAYWGHGTLTVSS (SEQ ID NO:5)

[0358] VH CDR1、CDR和CDR3的氨基酸序列如下:

[0359] CDR1:DYYMA (SEQ ID NO:6)

[0360] CDR2:TINYDGSSTYYRESVKG (SEQ ID NO:7)

[0361] CDR3:PSTEALFAY (SEQ ID NO:8)

[0362] VL区的核苷酸序列如下:

[0363] gatgttgtgctgaccaggactccatccacattatcggttaccattggacaatcggtctccatcttt
caggtcaagtcaagtgactcttaaatgatgttgaaacacacctatttatattgttatctacagaggcctggcaatct
ccacagcttctaatttatttggctccgaccctggatctgggtccccaaacaggttcatggcagtggcaggaa
cagatttacacactcaaaatcagtgagtgaggctgaggatttggaaatttattactgcatgcaagctagtc
tccgtacacgtttggagctggaccacacttggaaactgaaa (SEQ ID NO:9)

[0364] VL区的氨基酸序列如下:

[0365] DVVLQTPTLSATIGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQRPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTLKISGV
EAEDLGIVYYCMQASHAPYTGFAGTNLELK (SEQ ID NO:10)

[0366] VL CDR1、CDR和CDR3的氨基酸序列如下:

[0367] CDR1:RSSQSSLNDVGNTYLY (SEQ ID NO:11)

[0368] CDR2:LVSDLGS (SEQ ID NO:12)

[0369] CDR3:MQASHAPYT (SEQ ID NO:13)

[0370] 在引入用于克隆和优化编码序列以在生产细胞系(Hek-293细胞)中表达的适当限制性位点之后,制备表达盒。将7E5的合成的重链和轻链可变域克隆到pMQR真核表达载体组(pMQR-hIgG1和pMQR-hIgK)中,从而产生人-大鼠嵌合重组抗体。所得的克隆的序列分析指示者两个序列都是正确克隆的。将携带7E5可变域的pMQR真核表达载体转染到Hek-293细胞中,并使这些细胞产生重组抗体。生成后,通过捕获ELISA在用过的上清液中检测到hIgG1/

hIgK抗体。显示转染上清液含有0.019mg/ml的重组7E5。

[0371] 实施例6:7E5单克隆抗体的人源化

[0372] 作为基于定点诱变循环的抗体人源化方法的备选,使用基于如由Hwang及其同事(Methods.2005.36:35-42)所描述的人和鼠抗体之间的CDR-同源性的人源化方法将大鼠7E5单抗人源化。此方法基于以下原理:如果非人和人抗体具有相似结构的CDR,则人框架也将支持非人CDR,具有良好的亲和力保留。在该方法中,基于人CDR与待人源化的抗体的CDR(相同的Chothia规范结构)的结构相似性,从人种系基因的组中选择人框架序列。产生含有偏离的FR残基的Fab变体序列的噬菌体展示文库。在亲和力驱动的选择之后,筛选单个克隆的结合和解离速率,并且确定序列人同一性和同源性。

[0373] 在本工作中应用的将7E5大鼠抗体人源化的方法由以下步骤组成:

[0374] 1-人源化文库的设计:鉴定最接近的人种系并且鉴定与这些人种系偏离的大鼠VH和VK FR残基。

[0375] 2-组装7E5基因文库(使用重叠寡核苷酸通过PCR合成产生可变重(VH)和轻(VL)链编码基因)。

[0376] 3-将这些基因文库克隆到含有人恒定重(CH1)和轻(C κ)链(文库构建)的噬菌粒(pCB13-CK1/3)中。

[0377] 4-使用噬菌体和亲和力选择来选择功能性Fab。

[0378] 5-筛选解离速率(Biacore)和测序。

[0379] 6-选择在没有对hC6的结合损失的情况下具有最高人同一性和同源性的Fab。

[0380] 7-生成和纯化8种人源化前导物以用于进一步的亲和力测定和功能测定法。

[0381] 人源化文库设计:使用大鼠7E5抗体可变域的核苷酸和氨基酸序列和公共数据库ant工具,确认7E5使用IGHV5S45*01,IGHD1-6*01,IGHJ3*01和IGKV2S27*01,IGKJ2-3*01作为种系区段。还推断7E5的CDR H1和CDR H2的典型折叠组合为1-3,并且对于7E5的CDR L1和CDR L2为4-1。

[0382] 7E5 VH序列与具有CDR1和CDR2的相同的规范折叠组合1-3的人种系的比较揭示了人种系VH3家族成员1作为最接近的匹配。最接近人JH种系是IGHJ4。针对这些种系区段的比对示于图6A中。7E5重链氨基酸序列也显示在SEQ ID NO:5中。人种系VH3_1氨基酸序列也显示在SEQ ID NO:48中。指示FR和CDR,其能够鉴定偏离人种系的FR残基。

[0383] 使用类似的分析,确定对于7E5 V κ 序列,最接近的人种系是人VK2家族成员5。最接近的人JH种系是IGKJ2和IGKJ5。针对这些种系区段的比对示于图6B中。7E5轻链氨基酸序列也显示在SEQ ID NO:10中。人种系VK2_5氨基酸序列也显示在SEQ ID NO:49中。指示FR和CDR,其能够鉴定偏离人种系的FR残基。

[0384] 如图6A和6B中所示,对于7E5 VH序列有13个位置并且对于7E5 V κ 有16个位置,对于所述位置,对于人源化文库掺入人残基,而且还有大鼠残基(在变化对于抗原结合会是有害的情况下)。考虑到突变位置的数目和每个位置的变体数目,覆盖引入的多样性的文库大小对于人源化VH和V κ 文库分别会是 8.2×10^3 和 9.8×10^4 。

[0385] 人源化7E5 Fab文库构建:为了构建最终的人源化7E5 Fab噬菌体展示文库,最初构建了两个不同的亚文库:

[0386] 1-VH人源化Fab亚文库,其中将人源化7E5 VH基因与野生型7E5 V κ 一起克隆到

pCB13-CK3噬菌粒中,所述噬菌粒含有编码人恒定域CH1和C κ 的基因。

[0387] 2-VL人源化Fab亚文库,其中将人源化的7E5 V κ 基因与野生型7E5VH一起克隆到噬菌粒载体pBB-CK1和pCB13-CK3中,所述噬菌粒载体pBB-CK1和pCB13-CK3含有编码人恒定域CH1和C κ 的基因。

[0388] 由于使用的两种不同噬菌粒的克隆策略和序列,从pCB13-CK1产生的克隆的轻链V域的位置104至107中的残基将对应于LEIK(人源化7E5序列),而在pCB13-CK3中产生的克隆的V域轻链将在相同位置中显示氨基酸LELK(7E5野生型V κ 序列)。

[0389] 将两个所得的亚文库针对人C6淘选,并回收结合克隆以继续最终Fab文库构建,其中重链和轻链两者都是人源化的。

[0390] 合成基因组装:为了构建不同的人源化重链和轻链亚文库,通过基因组装产生人源化的7E5VH和V κ 基因(Cherry,J.等(2008)J Biochem Biophys Methods,70:820-2; Stemmer,W.P.等(1995)Gene,164:49-53)。

[0391] 人源化7E5 VH和V κ 亚文库构建:为了构建7E5 VH Fab亚文库,通过基因组装产生的约400bp的合成VH基因和编码7E5 V κ 野生型的DNA片段克隆到噬菌粒pCB13-CK3(含有人恒重和 κ 轻链编码基因)。

[0392] 为了构建7E5 V κ Fab亚文库,分别经由ApaLI/XhoI位点和NcoI/NheI将通过基因组装产生的约400bp的合成V κ 基因和编码7E5VH野生型的DNA片段克隆到噬菌体pCB13-CK1和pCB13-CK3(含有人恒重和 κ 轻链编码基因)的等摩尔混合物中。

[0393] 通过电穿孔源自克隆过程的新载体转化到大肠杆菌TG1细胞中。通过LBA羧苄青霉素(100 μ g/ml),葡萄糖2%上的TG1转化细胞的5 μ l斑点(spot)计算文库的大小,并通过菌落PCR测定Fab插入物的百分比。亚文库的大小和插入物百分比总结在表5中。

[0394] 表5:人源化7E5亚文库获取的大小和插入物百分比

[0395]	亚文库	文库大小	插入物%	最终文库大小	最大理论多样性	多样性覆盖(相对于理论多样性过量)
	人源化7E5 VH	2.4 x 10 ⁸	95%	2.3 x 10 ⁸	8.2 x 10 ³	-28,000倍
	人源化7E5 V κ	1.7 x 10 ⁸	91%	1.5 x 10 ⁸	9.8 x 10 ⁴	-1,500倍

[0396] 还通过每个文库的48个克隆的DNA序列分析对亚文库进行QC。使用CLC主要工作台软件提取氨基酸序列。分析有效的VH和V κ 序列以及每个位置的野生型或突变残基的频率揭示了成功设计和构建了亚文库,野生型/突变比率约为50/50(对于V κ 基因中的位置103为33/33/33),并且如设计的那样获得FR突变的平均数目。

[0397] 人源化7E5 VH和V κ 亚文库的淘选选择:从两个亚文库制备噬菌体,并用于在包覆的人C6上的第一轮选择。这轮选择的目的是清除来自非结合Fab的亚文库,因此不应用严格的条件。

[0398] 对于淘选选择,将5和0 μ g/ml的人C6在96孔Maxisorp板(Nunc)中包覆,并用低脂奶粉(PBS中的Marvell 4%)封闭。在与亚文库噬菌体温育2小时和随后清洗后,在室温进行胰蛋白酶洗脱(10mg/ml)。通过应用16mM蛋白酶抑制剂ABSF立即中和蛋白酶活性。

[0399] 将所有噬菌体输出感染到对数生长的大肠杆菌TG1细胞中,并且将5 μ l感染的细菌在琼脂平板(LBAGluc 2%Carb 100 μ g/ml)上铺板,用于分析输出和富集测定。计算富集为从

人C6洗脱的噬菌体数对从无蛋白条件洗脱的噬菌体数之间的比率。观察到与人源化7E5 V_k和VH Fab亚文库两者的背景 (PBS) 相比非常好的富集。

[0400] 最终人源化7E5 Fab噬菌体展示文库的构建:通过将从选自7E5 VH Fab亚文库的克隆回收的人源化重链(VHCH)与选自7E5 V_kFab亚文库的回收的人源化轻链(V_kC_k)组合构建最终的人源化7E5 Fab文库。所得文库的大小由LBA羧苄青霉素(100μg/ml),葡萄糖2%上的TG1转化细胞的5μl斑点计算,并通过菌落PCR测定Fab插入物的百分比。

[0401] 人源化7E5 Fab文库的选择:为了选择没有亲和力丧失或甚至具有改善的亲和力的人源化变体,当与大鼠野生型7E5抗体相比时,使用生物素化的hC6抗原进行用人源化7E5 Fab文库的溶液中噬菌体展示选择。将人C6生物素化,并通过SDS-PAGE、Western印迹和ELISA使用抗人C6抗体7E5进行QC,以检测在Neutravidin包覆的平板上捕获的生物素化的C6。进行三个连续轮次的亲和力驱动的选择,其中抗原浓度在各轮次间减少,以及噬菌体输入也从第1轮到第2轮减少。在第二和第三轮选择中,也在存在过量的非生物素化的C6的情况下温育用Neutravidin捕获的人C6温育的噬菌体达2小时或过夜(解离速率选择)以在几次清洗后,除去高解离速率结合克隆。作为对照,平行地进行类似的选择,其中将噬菌体与Neutravidin捕获的人C6和PBS而不是非生物素化的hC6(无解离速率选择)一起温育。

[0402] 将所有噬菌体选择输出感染到对数生长的大肠杆菌TG1细胞中,并且将5μl感染的细菌在琼脂平板(LBAGluc2%Carb100μg/ml)上铺板,用于分析产物和富集测定。计算富集为从人C6洗脱的噬菌体数与从无蛋白条件洗脱的噬菌体数之间的比率。与背景(PBS)相比,获得了非常好的富集。

[0403] 从人源化7E5 Fab文库中选择的克隆的结合筛选:将用在第二和第三轮解离速率选择后获得的洗脱的噬菌体合并物感染的大肠杆菌TG1的单个菌落在37°C在含有100μl 2TY葡萄糖2%羧苄青霉素100μg/ml的两个96孔板(主板)中培养8小时,在-80°C在20%甘油中贮存并用于后续测序和周质提取物产生。用来自第二轮选择和第三轮选择的克隆产生总共两个主板(MP)。从这些MP产生含有可溶性单克隆Fab(周质提取物)的细菌提取物。通过添加异丙基-β-D-硫代毗喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1mM,在OD₆₀₀ 0.8时诱导单克隆细菌小规模培养物。然后,通过在PBS中冻融细菌团粒并随后离心以除去细胞碎片来制备含有Fab的周质提取物(P.E.)。

[0404] 为了确定所选择的克隆的靶物结合能力,测试1:5稀释的P.E.结合到Neutravidin包覆的Maxisorp板上捕获的10nM生物素化hC6。从大鼠7E5野生型Fab制备的P.E.用作阳性对照。空白P.E.(从MP中未接种的孔制备)用作阴性对照。用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗c-myc小鼠抗体检测P.E.与靶物的结合。对于两种MP获得了40%的结合命中率,并且阳性克隆的结合信号(O.D.450nm值)与用亲本大鼠7E5 Fab获得的信号相当。

[0405] 结合人C6的所选克隆的解离速率筛选和人同一性和同源性的分析:对于阳性结合克隆,使用SPR方法测定hC6的解离速率,并且平行地对编码重链和轻链可变域的DNA测序。

[0406] 为了测试解离速率,使用了Biacore 3000(GE Healthcare)。为此目的,在CM5传感器芯片(GE Healthcare BR-1000-12)上固定乙酸缓冲液pH 4.5中50μg/ml hC6至约2000RU。测试再生条件,并使用2x 10μl的10mM NaOH和1M NaCl进行样品注射之间的再生。将30μl如上所述制备的P.E.在120μl HBS-EP缓冲液中稀释,并且自此以30μl/min的流速注射60μl。在400秒期间测量解离,并通过应用1:1Langmuir解离拟合模型测定解离速率。

[0407] 平行地,为了分析人同一性和同源性,对编码显示与hC6特异性结合的克隆的可变重链和轻链的DNA进行测序。使用CLC主要工作台软件提取氨基酸序列。将V_k和VH序列相对于参考序列(7E5野生型)分开比对。使用Abligner软件分析所有序列以测定人同一性(在最接近的匹配种系中找到的主链残基的分数)和人同源性(在最接近的匹配种系或相同亚类的其它种系中找到的主链残基的分数)的百分比。

[0408] 总体上,ELISA和Biacore数据之间观察到良好的相关性,以及还有从88-99%变化的良好的人同一性和同源性百分比值。

[0409] 选择了具有良好结合、解离速率和人同一性以及同源性数据的8个克隆的前导组,称为8G09、7E12、7G09、8F07、7F06、7F11、7E11和7F02。下文显示了8个人源化克隆的前导组的重链和轻链可变域的完整核苷酸和氨基酸序列:

[0410] 8G09 VH和VL核苷酸序列:

[0411] 8G09 VH

[0412] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGT AGCCTCAGGATTCACTTCAGTGAATTCAGTATTACATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGGTC GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATA ATGCGAACCGCACCCATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTATTACTGTGCAAGACC TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGGCCAAGGCACACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:14)

[0413] 8G09 V_k

[0414] GATATTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTG CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAACGCTGGCCAATCT CCACAGCTTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGTCCCCAACAGGTTCAGTGGCAGTGGTCAGGAA CAGATTTCACACTCAAATCACTAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC TCCGTACACGTTGGAGCGGGGACCAACTCGAGATCAA (SEQ ID NO:15)

[0415] 7E12 VH和VL核苷酸序列:

[0416] 7E12 VH

[0417] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGC AGCCTCAGGATTCACTTCAGTGAATTCAGTATTACATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCTGGAGTGGGTC GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATA ATGCGAAAAACACCCATACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGACC TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGGCACGGACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:16)

[0418] 7E12 V_k

[0419] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGCCTCCATCTCTTG CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAACGCTGGCCAATCT CCACAGCTTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGGATCTGGGTCCCCAACAGGTTCAGTGGCAGTGGTCAGGAA CAGATTTCACACTCAAATCACTAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAATTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC TCCGTACACGTTGGACAGGGACCAACCTCGAGATCAA (SEQ ID NO:17)

[0420] 7G09 VH和VL核苷酸序列:

[0421] 7G09 VH

[0422] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC

AGCCTCAGGATTCACTTCAGTGACTATTACATGGCCTGGTCCGCCAGGGCCAACGAAGGGCTGGAGTGGTC
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCGATTCACTATCTCCAGAGATA
ATGCGAAAAACACCCCTACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGCCGTTATTACTGTGCAAGACC
TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:18)

[0423] 7G09 V_k

[0424] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGCCTCCATCTCTTG
CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCT
CCACAGCTTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGATCTGGGTCCCCGACAGGTCAGTGGCAGTGGTCAGGAA
CAGATTCACACTCAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAAATTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC
TCCGTACACGTTGGACAGGGACCAAACCTCGAGCTGAAA (SEQ ID NO:19)

[0425] 8F07 VH和VL核苷酸序列:

[0426] 8F07 VH

[0427] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCCTCAGGATTCTCTTCACTGACTATTACATGGCCTGGTCCGCCAGGGCCAGGGAGGGCTGGAGTGGTC
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCGATTCACTATCTCCAGAGATA
ATGCGAAAAACACCCCTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGCCACTTATTACTGTGCAAGACC
TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:20)

[0428] 8F07 V_k

[0429] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTG
CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCT
CCACAGCTTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGATCTGGGTCCCCGACAGGTCAGTGGCAGTGGTCAGGAA
CAGATTCACACTCAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC
TCCGTACACGTTGGAGCGGGACCAAACCTCGAGATCAA (SEQ ID NO:21)

[0430] 7F06 VH和VL核苷酸序列:

[0431] 7F06 VH

[0432] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGC
AGCCTCAGGATTCACTTCAGGGACTATTACATGGCCTGGTCCGCCAGGGCCAGGGAGGGCTGGAGTGGTC
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCGATTCACTATCTCCAGAGATA
ATGCGAAAAACAGCCTACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGCCGTTATTACTGTGCAAGACC
TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:22)

[0433] 7F06 V_k

[0434] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATTGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGTCTCCATCTCTTG
CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCT
CCACAGCTTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGATCTGGGTCCCCAACAGGTCAGTGGCAGTGGTCAGGAA
CAGATTCACACTCAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC
TCCGTACACGTTGGAGCGGGACCAACCTCGAGCTGAAA (SEQ ID NO:23)

[0435] 7F11 VH和VL核苷酸序列:

[0436] 7F11 VH

[0437] GAGGTGTAGCTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCA

GCCTCAGGATTCACTTCAGTGACTATTACATGGCCTGGTCCGCCAGGGTCCAACGAAGGGCTGGAGTGGTCGC
AACCATTAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATAATG
CGAAAAACACCCCTACCTGCAAATGAACAGTCTGAG

[0438] GGCTGAGGACACGGCCGTTATTACTGTTCAAGACCTTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGCC
ACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:24)

[0439] 7F11 V κ

[0440] GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGTTACCCCTGGACAACCGGTCTCCATCTCTTG
CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCT
CCACAGCTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGATCTGGGTCCCCAACAGGTTCACTGGCAGTGGTCAGGAA
CAGATTCACACTCAAATCAGTGGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC
TCCGTACACGTTGGAGCGGGGACCAGACTCGAGATCAA (SEQ ID NO:25)

[0441] 7E11 VH和VL核苷酸序列：

[0442] 7E11 VH

[0443] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG
AGCCTCAGGATTCACTTCAGTGACTIONTACATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTC
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATA
ATGCGAAAAACACCCCTACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTTATTACTGTGCAAGACC
TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:26)

[0444] 7E11 V κ

[0445] GATATTGTGCTGACCCAGACTCCATTGTCATTATCGGCTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTG
CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAGGCTGGCCAATCT
CCACAGCTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGATCTGGGTCCCCAACAGGTTCACTGGCAGTGGTCAGGAA
CAGATTCACACTCAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGAGTTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC
TCCGTACACGTTGGAGCGGGGACCAACCTCGAGATCAA (SEQ ID NO:27)

[0446] 7F02 VH和VL核苷酸序列：

[0447] 7F02 VH

[0448] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTG
AGCCTCAGGATTCACTTCAGTGACTIONTACATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGTC
GCAACCATTAAATTATGATGGTAGTAGTACTACTATCGAGAGTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATA
ATGCGAAAAACACGCTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTTATTACTGTGCAAGACC
TTCTACGGAGGCCCTGTTGCTTACTGGGCCACGGCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA (SEQ ID NO:28)

[0449] 7F02 V κ

[0450] GATGTTGTGATGACCCAGACTCCATCGACATTATCGGCTACCCCTGGACAATCGGTCTCCATCTCTTG
CAGGTCAAGTCAGAGTCTCTAAATGATGTTGAAACACCTATTATATTGGTATCTACAGAAGCCTGGCCAATCT
CCACAGCTCTAATTATTGGTCTCCGACCTGGATCTGGGTCCCCAACAGGTTCACTGGCAGTGGTCAGGAA
CAGATTCACACTCAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAATTATTACTGCATGCAAGCTAGTCATGC
TCCGTACACGTTGGAGCGGGGACCAACACTCGAGCTGAAA (SEQ ID NO:29)

[0451] 8G09 VH和VL氨基酸序列：

[0452] 8G09 VH

[0453] EVQLVESDGGLVQPGGSLRLSCASGFTFSYMAWVRQAPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKRTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:30)

[0454] 8G09 V κ

[0455] DIVLTQTPLTLSVTPGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTLKRISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (SEQ ID NO:31)

[0456] 7E12 VH和VL氨基酸序列:

[0457] 7E12 VH

[0458] EVQLVESDGGLVQPGGSLKLSCASGFTFSYMAWVRQGPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARPSTEALFAYWGHTLVTVSS (SEQ ID NO:32)

[0459] 7E12 V κ

[0460] DVVLQTPLTLSVTPGQPASISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTLKRISRVEAEDVGIVYYCMQASHAPYTFGQGTNLEIK (SEQ ID NO:33)

[0461] 7G09 VH和VL氨基酸序列:

[0462] 7G09 VH

[0463] EVQLVESDGGLVQPGGSLRLSCASGFTFSYMAWVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGHTLVTVSS (SEQ ID NO:34)

[0464] 7G09 V κ

[0465] DIVLTQTPLTLSVTPGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTLKRISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (SEQ ID NO:35)

[0466] 8F07 VH和VL氨基酸序列:

[0467] 8F07 VH

[0468] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCASGFSFSYMAWVRQGPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTATYYCARPSTEALFAYWGHTLVTVSS (SEQ ID NO:36)

[0469] 8F07 V κ

[0470] DVVLQTPLTLSVTPGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPDRFGSGSGTDFTLKRISGVVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:37)

[0471] 7F06 VH和VL氨基酸序列:

[0472] 7F06 VH

[0473] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCASGFTFRDYYMAWVRQGPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNSTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGHTLVTVSS (SEQ ID NO:38)

[0474] 7F06 V κ

[0475] DVVLQTPLTLSVTPGQPVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTLKRISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTRLELK (SEQ ID NO:39)

[0476] 7F11 VH和VL氨基酸序列:

[0477] 7F11 VH

[0478] EVQLVESDGGLVQPGGSLKLSCASGFTFSYMAWVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRSTEALFAYWGHTLVTVSS (SEQ ID NO:40)

[0479] 7F11 V κ

[0480] DVVLQTPLTLSVTPGQPVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSDLGSGVPNRFS

GSGSGTDFTLKISGVVAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTRLEIK (SEQ ID NO:41)

[0481] 7E11 VH和VL氨基酸序列:

[0482] 7E11 VH

[0483] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDDYYMAWVRQAPGKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARPSTEALFAYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:42)

[0484] 7E11 V_k

[0485] DIVLTQTPLSLSATPGQSVSISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQRPGQSPQQLIYLVSDLGSGVPDRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQASHAPYTFGAGTNLEIK (SEQ ID NO:43)

[0486] 7F02 VH和VL氨基酸序列:

[0487] 7F02 VH

[0488] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAACASGFTFSDDYYMAWVRQGPQKGLEWVATINYDGSSTYYRESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRSEDTAVYYCARPSTEALFAYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:44)

[0489] 7F02 V_k

[0490] DVVMTQTPSTLSATPGQSASISCRSSQSLLNDVGNTYLYWYLQKPGQSPQQLIYLVSDLGSGVPNRFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQASHAPYTFGAGTRLELK (SEQ ID NO:45)

[0491] 图8A中显示了大鼠7E5重链可变区的氨基酸序列与人源化7E5变体8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11和7F02的重链可变区的氨基酸序列的比对, 其中标示了CDR1、2和3。图8B中显示了大鼠7E5轻链可变区的氨基酸序列与人源化7E5变体8G09, 7E12, 7G09, 8F07, 7F06, 7F11, 7E11和7F02的轻链可变区的氨基酸序列的比对, 其中标示了CDR1、2和3。大鼠7E5抗体的8种人源化变体的重链CDR1、2和3序列与大鼠7E5单抗中的重链CDR1、2和3序列(其氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:6、7和8中)相同。同样地, 大鼠7E5抗体的8种人源化变体的轻链CDR1、2和3序列与大鼠7E5单抗中的轻链CDR1、2和3序列(其氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO:11、12和13中)相同。

[0492] Fab表达、纯化和QC:为了在进一步测定法(即, 补体介导的预致敏红细胞裂解测定法、亲和力测定、熔解温度和聚集行为测定法)中表征一些7E5人源化变体, 生成可溶性Fab, 并且从上文描述的8个克隆的前导组中纯化。将所有8个人源化克隆加7E5野生型对照的Fab基因通过Sfi I/Not I消化克隆到pCB4表达载体(非常类似于pCB13但不具有基因3编码序列), 并通过热休克转化到TG1大肠杆菌菌株中。使用CLC主要工作台软件确认序列。

[0493] 在补充有0.1%葡萄糖和100μg/ml羧苄青霉素的800ml 2xYT中进行含有来自pCB4-克隆的7E5人源化变体以及7E5野生型的可溶性Fab的P.E.生成。在OD₆₀₀ 0.5-0.8时用至终浓度1mM的IPTG诱导后, 将培养物在24℃温育至少20小时。用TALON金属亲和树脂纯化可溶性Fab。

[0494] 当在SDS-PAGE上运行500ng所得纯化产物时, 观察到除了Fab特异性条带(在非还原和还原条件下分别为50kDa和约25kDa)之外的几个额外条带。为了进一步纯化这些样品, 根据制造商的说明书使用了来自Life Technologies的树脂(CaptureSelect™亲和树脂IgG-CH1, 目录#194320005), 其含有特异性结合人CH1域的VHH。通过使用微体积分光光度计测量OD280nm并假定ε=1.53的摩尔消光系数来估计所得到的纯化蛋白质的浓度。纯化样品的SDS-PAGE分析显示高水平的纯度。在ELISA中证实了纯化的Fab的功能性, 其中检查了这些Fab的连续稀释液对在Neutravidin包覆的Maxisorp板上捕获的10nM生物素化hC6的结

合。所有8种纯化的Fab表现出对hC6的有效结合。

[0495] Biacore分析:为了测定7E5的人源化是否改变所得人源化抗体的结合特异性或活性,与野生型大鼠7E5单抗和小鼠27B1单抗相比对8种选择的人源化Fab(7E12,7E11,7F2,7F6,7F11,7G9,8F7和8F9)进行Biacore亲和力分析。在图9中显示了结果。结果指示7E5的人源化不改变抗体的特异性或活性。

[0496] 实施例7:人源化的抗C6抗体的“混合和匹配”表征

[0497] 在此实验中,将来自所选择的人源化抗C6抗体的一组人源化VH链和人源化VL链以各种组合在哺乳动物细胞中以全长抗体表达,并且评估其功能活性。

[0498] 使用的人源化VH链是实施例6中描述的8种VH链(8G09,7E12,7G09,8F07,7F06,7F11,7E11和7F02),以及第9链7C02,其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:46。图8A中显示了这9条链的比对。

[0499] 使用的人源化VL链是实施例6中描述的8种VH链(8G09,7E12,7G09,8F07,7F06,7F11,7E11和7F02),以及第9链7G08,其氨基酸序列显示于SEQ ID NO:47。图8B中显示了这9条链的比对。

[0500] 将重链和轻链核苷酸序列克隆到表达载体中以创建具有稳定的IgG4(S228P)恒定区的全长链的编码序列。在CHO宿主细胞中以每种可能的组合成对共表达9种重链和9条轻链。因此,评估了9种重链和9种轻链的所有81种可能的“混合和匹配”组合。在溶血测定法和MAC ELISA中各种测试了81对。对于每个测定法,使用4μg来自CHO上清液的人源化7E5单抗。溶血测定法的结果示于图7A中。MAC ELISA的结果示于图7B。结果证明了9种VH和9VL链的所有81种可能的“混合和配对”组合在这两种测定法中都表现出强烈的抑制活性。

[0501] 实施例8:用于测试C6抗体对神经再生的影响的动物模型

[0502] 使用神经挤压模型(坐骨神经挤压)测试抗人C6单克隆抗体(如大鼠7E5或人源化7E5)对补充有人C6的C6敲除大鼠(PVC)中感觉功能恢复的影响。神经挤压是周围神经损伤的一种模型。参见WO 2010/005310 (PCT/NL2009/050418);和de Jonge等(2004) Hum Mol Genet. 13 (3):295-302。

[0503] 为了治疗,用人C6或对照(PBS)补充C6-/大鼠(PVG,6-8周)。在挤压损伤前一天(第-1天)以及在第0-6天每天一次在PBS中以4mg/kg的剂量在C6-/大鼠中静脉内施用C6。在挤压前10分钟(第0天)(4mg/大鼠腹膜内注射)开始,用抗人C6单抗处理补充有C6的大鼠和对照组。在神经挤压前5分钟再次用抗人C6单抗(4mg/大鼠IP(腹腔注射))处理PVG大鼠。在第1-6天(4mg/大鼠腹腔注射)给予随后的抗人C6单抗剂量。对照动物接受相同的神经挤压,但未用抗体处理。在挤压后72小时处死动物的亚组以研究神经组织学。选择72小时,因为Wallerian变性在野生型动物中此时是最大的,并且该时间点对于评估治疗效力是信息量非常大的。

[0504] 如下进行神经挤压。所有手术程序均在深度异氟烷麻醉(2.5体积%异氟烷,1L/分钟O₂和1L/分钟N₂O)下无菌进行。将左大腿剃光,并且通过大腿上部中的切口暴露坐骨神经。使用光滑的弯曲镊子(No.7)将神经在坐骨切口的水平上挤压三个10秒时段,导致神经上的挤压区域的完全半透明的外观。使用右腿作为内部对照。然后,用缝合线闭合肌肉和皮肤。

[0505] 下文在表6中显示了用重组抗人C6单抗7E5(12mg/kg)处理的实验设置:

[0506] 表6:用于神经挤压实验的实验设置

大鼠号	丁丙 诺啡	重建 (4mg/kg)	出血前	处理 (12mg/Kg)	挤压损伤	出血后
1	是	C6	是	7E5	是	是
2	是	C6	是	7E5	是	是
3	是	C6	是	7E5	是	是
4	是	C6	是	7E5	是	是
5	是	C6	是	7E5	是	是
[0507]	6	是	C6	是	PBS	是
	7	是	C6	是	PBS	是
	8	是	C6	是	PBS	是
[0508]	9	是	无一	是	PBS	是
	10	是	无一	是	PBS	是

[0508] 在损伤后3天时,对所有动物心脏内灌注哌嗪-N-N'-双(2-乙磺酸) (PIPES) 缓冲液 (pH7.6) 中的4%多聚甲醛。从每只动物中取出左和右坐骨神经,并且距挤压部位以远端收集一段5mm长度。将每个区段常规加工成石蜡,用于免疫组织化学。

[0509] 将7微米厚的石蜡切片安装在Superfrost Plus玻璃载玻片 (Knittel Glass, Germany) 上。将切片脱蜡并再水合。在10mM柠檬酸钠缓冲液 (pH6.0) 中通过热诱导的抗原恢复暴露表位。使用PBS中的10%正常山羊血清 (DAKO, Glostrup, Denmark) 将抗体的非特异性结合在室温下封闭20分钟。将一抗在正常抗体稀释剂 (Immunologic, Duiven, the Netherlands) 中稀释,并在室温温育1小时。通过在1%牛血清白蛋白中以1:200稀释的来自Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) 的山羊抗兔荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 缀合的或绵羊抗小鼠 Cy3缀合的IgG温育切片进行检测。当指定时,将载玻片用4,6-二氨基-2-苯基吲哚 (DAPI) (Sigma-Aldrich) 复染色,并安装有Vectashield安装介质 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)。用附接到荧光显微镜 (Vanox, AHBT3; Olympus, The Netherlands) 的数码相机 (DP12; Olympus, Zoeterwoude, The Netherlands) 捕捉图像。

[0510] 图10中显示了结果。使用用于检测MAC的抗C9、用于检测轴突的抗泛神经丝 (SMI312)、用于检测髓磷脂的抗髓磷脂碱性蛋白 (MBP) 和用于检测吞噬细胞 (巨噬细胞) 的抗溶酶体膜 (CD68) 染色细胞。小图A显示未受损伤的坐骨神经的结果,显示缺乏MAC、强轴突染色、环形髓磷脂染色和无活化的巨噬细胞。小图B显示损伤后的结果,其中具有正常补体活性的大鼠显示MAC沉积、轴突和髓磷脂的损失以及巨噬细胞的流入。小图C显示用抗C6处理C6重建大鼠后的结果,证明了抗体完全阻断MAC形成,抑制轴突和髓磷脂破坏并抑制巨噬细胞的流入。小图D显示未重构的C6/-大鼠的结果,显示缺乏MAC沉积和快速神经变性。

[0511] 因此,神经挤压实验的结果证明了用7E5抗C6抗体的体内处理成功阻断MAC形成,并且抑制了轴突和髓磷脂破坏并减少了巨噬细胞流入,从而证明了周围神经损伤的动物模型中抗体的体内有效性。

[0512] 等同方案

[0513] 本领域技术人员将认识到或仅仅使用常规实验便确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。此类等同方案意图由所附权利要求书涵盖。

[0514] 序列表概述

SEQ ID NO:	描述
1	GSCQDGRQLEWGLERT (肽418)
2	DGRQLEWGLERTRLSS (肽420)
3	
4	
	7E5 VH核苷酸序列(实施例5)

SEQ ID NO:	描述
5	7E5 VH氨基酸序列(实施例5)
6	7E5 VH CDR1氨基酸序列(实施例5)
7	7E5 VH CDR2氨基酸序列(实施例5)
8	7E5 VH CDR3氨基酸序列(实施例5)
9	7E5 VL核苷酸序列(实施例5)
10	7E5 VL氨基酸序列(实施例5)
11	7E5 VL CDR1氨基酸序列(实施例5)
12	7E5 VL CDR2氨基酸序列(实施例5)
13	7E5 VL CDR3氨基酸序列(实施例5)
14	8G09 VH核苷酸序列(实施例6)
15	8G09 VL核苷酸序列(实施例6)
16	7E12 VH核苷酸序列(实施例6)
17	7E12 VL核苷酸序列(实施例6)
18	7G09 VH核苷酸序列(实施例6)
19	7G09 VL核苷酸序列(实施例6)
20	8F07 VH核苷酸序列(实施例6)
21	8F07 VL核苷酸序列(实施例6)
22	7F06 VH核苷酸序列(实施例6)
23	7F06 VL核苷酸序列(实施例6)
24	7F11 VH核苷酸序列(实施例6)
25	7F11 VL核苷酸序列(实施例6)
26	7E11 VH核苷酸序列(实施例6)
27	7E11 VL核苷酸序列(实施例6)
28	7F02 VH核苷酸序列(实施例6)
29	7F02 VL核苷酸序列(实施例6)
30	8G09 VH氨基酸序列(实施例6)
31	8G09 VL氨基酸序列(实施例6)
32	7E12 VH氨基酸序列(实施例6)
33	7E12 VL氨基酸序列(实施例6)
34	7G09 VH氨基酸序列(实施例6)
35	7G09 VL氨基酸序列(实施例6)
36	8F07 VH氨基酸序列(实施例6)
37	8F07 VL氨基酸序列(实施例6)
38	7F06 VH氨基酸序列(实施例6)
39	7F06 VL氨基酸序列(实施例6)
40	7F11 VH氨基酸序列(实施例6)
41	7F11 VL氨基酸序列(实施例6)

[0517]

SEQ ID NO:	描述
42	7E11 VH氨基酸序列(实施例6)
43	7E11 VL氨基酸序列(实施例6)
44	7F02 VH氨基酸序列(实施例6)
45	7F02 VL氨基酸序列(实施例6)
46	7C02 VH氨基酸序列(图8A)
47	7G08 VL氨基酸序列(图8B)
48	人VH3_1序列(图6A)
49	人VK2_5氨基酸序列(图6B)
50	人C6部分氨基酸序列(图4A)
51	大鼠C6部分氨基酸序列(图4A)
52	人C6全长氨基酸序列(说明书中的C6定义)

- [0001] 序列表
[0002] <110> F·巴斯 (BAAS, Frank)
[0003] M·A·万戴克 (VAN DIJK, Marc A.)
[0004] <120> 结合人C6的抗体及其用途
[0005] <130> RGJ-005PC
[0006] <150> US 62/094,649
[0007] <151> 2014-12-19
[0008] <160> 53
[0009] <170> PatentIn version 3.5
[0010] <210> 1
[0011] <211> 16
[0012] <212> PRT
[0013] <213> 人工序列
[0014] <220>
[0015] <223> 合成的:肽418
[0016] <400> 1
[0017] Gly Ser Cys Gln Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr
[0018] 1 5 10 15
[0019] <210> 2
[0020] <211> 16
[0021] <212> PRT
[0022] <213> 人工序列
[0023] <220>
[0024] <223> 合成的:肽420
[0025] <400> 2
[0026] Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr Arg Leu Ser Ser
[0027] 1 5 10 15
[0028] <210> 3
[0029] <211> 20
[0030] <212> PRT
[0031] <213> 人工序列
[0032] <220>
[0033] <223> 合成的:肽418/420
[0034] <400> 3
[0035] Gly Ser Cys Gln Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Thr
[0036] 1 5 10 15
[0037] Arg Leu Ser Ser
[0038] 20

- [0039] <210> 4
- [0040] <211> 354
- [0041] <212> DNA
- [0042] <213> 人工序列
- [0043] <220>
- [0044] <223> 合成的：7E5 VH核苷酸序列
- [0045] <400> 4
- [0046] gaggtgcagc tgggtggagtc tgatggaggc ttatgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
- [0047] tcctgttag cctcaggatt ctctttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
- [0048] ccaacgaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
- [0049] cgagagtccg tgaaggccg attcaactatc tccagagata atgcgaaacg caccctatac 240
- [0050] ctgcaaatgg acagtcgtgag gtctgaggac acggccactt attactgttc aagaccttct 300
- [0051] acggaggccc tgttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
- [0052] <210> 5
- [0053] <211> 118
- [0054] <212> PRT
- [0055] <213> 人工序列
- [0056] <220>
- [0057] <223> 合成的：7E5 VH氨基酸序列
- [0058] <400> 5
- [0059] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0060] 1 5 10 15
- [0061] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr
- [0062] 20 25 30
- [0063] Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0064] 35 40 45
- [0065] Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
- [0066] 50 55 60
- [0067] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Leu Tyr
- [0068] 65 70 75 80
- [0069] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
- [0070] 85 90 95
- [0071] Ser Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
- [0072] 100 105 110
- [0073] Leu Val Thr Val Ser Ser
- [0074] 115
- [0075] <210> 6
- [0076] <211> 5
- [0077] <212> PRT

- [0078] <213> 人工序列
- [0079] <220>
- [0080] <223> 合成的：7E5 VH CDR1氨基酸序列
- [0081] <400> 6
- [0082] Asp Tyr Tyr Met Ala
- [0083] 1 5
- [0084] <210> 7
- [0085] <211> 17
- [0086] <212> PRT
- [0087] <213> 人工序列
- [0088] <220>
- [0089] <223> 合成的：7E5 VH CDR2氨基酸序列
- [0090] <400> 7
- [0091] Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val Lys
- [0092] 1 5 10 15
- [0093] Gly
- [0094] <210> 8
- [0095] <211> 9
- [0096] <212> PRT
- [0097] <213> 人工序列
- [0098] <220>
- [0099] <223> 合成的：7E5 VH CDR3氨基酸序列
- [0100] <400> 8
- [0101] Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr
- [0102] 1 5
- [0103] <210> 9
- [0104] <211> 336
- [0105] <212> DNA
- [0106] <213> 人工序列
- [0107] <220>
- [0108] <223> 合成的：7E5 VL核苷酸序列
- [0109] <400> 9
- [0110] gatgttgtgc tgaccagac tccatccaca ttatcggtca ccattggaca atcggtctcc 60
- [0111] atctcttgca ggtcaagtca gagtctctta aatgatgttg gaaacaccta ttttatattgg 120
- [0112] tatctacaga ggcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
- [0113] tctggggtcc ccaacagggtt cagtgccagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaaatc 240
- [0114] agtggagtgg aggctgagga ttggaaatt tattactgca tgcaagctag tcatacgctccg 300
- [0115] tacacgtttg gagctggac caacctggaa ctgaaa 336
- [0116] <210> 10

- [0117] <211> 112
[0118] <212> PRT
[0119] <213> 人工序列
[0120] <220>
[0121] <223> 合成的：7E5 VL氨基酸序列
[0122] <400> 10
[0123] Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Ile Gly
[0124] 1 5 10 15
[0125] Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
[0126] 20 25 30
[0127] Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
[0128] 35 40 45
[0129] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro
[0130] 50 55 60
[0131] Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0132] 65 70 75 80
[0133] Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
[0134] 85 90 95
[0135] Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Leu Lys
[0136] 100 105 110
[0137] <210> 11
[0138] <211> 16
[0139] <212> PRT
[0140] <213> 人工序列
[0141] <220>
[0142] <223> 合成的：7E5 VL CDR1氨基酸序列
[0143] <400> 11
[0144] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
[0145] 1 5 10 15
[0146] <210> 12
[0147] <211> 7
[0148] <212> PRT
[0149] <213> 人工序列
[0150] <220>
[0151] <223> 合成的：7E5 VL CDR2氨基酸序列
[0152] <400> 12
[0153] Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser
[0154] 1 5
[0155] <210> 13

- [0156] <211> 9
[0157] <212> PRT
[0158] <213> 人工序列
[0159] <220>
[0160] <223> 合成的：7E5 VL CDR3氨基酸序列
[0161] <400> 13
[0162] Met Gln Ala Ser His Ala Pro Tyr Thr
[0163] 1 5
[0164] <210> 14
[0165] <211> 354
[0166] <212> DNA
[0167] <213> 人工序列
[0168] <220>
[0169] <223> 合成的：8G09 VH核苷酸序列
[0170] <400> 14
[0171] gaggtgttagc tggtggagtc ttagtgcaggc ctggagggtc cctgagactc 60
[0172] tcctgtgttag cctcaggatt cactttca gactattaca tggcctgggt ccgccaggct 120
[0173] ccagggaaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0174] cgagagtccg tgaaggccg attcactatac tccagagata atgcgaaacg caccctatac 240
[0175] ctgcaaattgg acagtctgag ggctgaggac acggccgtt attactgtgc aagaccttct 300
[0176] acggaggccc tgttgctta ctggggccaa ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0177] <210> 15
[0178] <211> 336
[0179] <212> DNA
[0180] <213> 人工序列
[0181] <220>
[0182] <223> 合成的：8G09 VL核苷酸序列
[0183] <400> 15
[0184] gatattgtgc tgaccagac tccattgaca ttatcggtta cccctggaca atcggctcc 60
[0185] atctcttgca ggtcaagtca gagtctctta aatgatgtt gaaacaccta ttttatattgg 120
[0186] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggctc cgacctggga 180
[0187] tctgggtcc ccaacaggtt cagtgccagt gggtcagggaa cagattcac actcaaaaatc 240
[0188] agtagagtggtt aggctgagga tgtggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300
[0189] tacacgtttg gagcggggac cagactcgag atcaaa 336
[0190] <210> 16
[0191] <211> 354
[0192] <212> DNA
[0193] <213> 人工序列
[0194] <220>

- [0195] <223> 合成的：7E12 VH核苷酸序列
[0196] <400> 16
[0197] gaggtgttagc tggtggagtc ttagtgaggc ttgcggcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
[0198] tcctgtgcag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
[0199] ccagggagg ggctggagtg ggctcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0200] cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa caccctatac 240
[0201] ctgcaaataa acagtcgtgg ggctgaggac acggccactt attactgtgc aagacattct 300
[0202] acggaggccc tggttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0203] <210> 17
[0204] <211> 336
[0205] <212> DNA
[0206] <213> 人工序列
[0207] <220>
[0208] <223> 合成的：7E12 VL核苷酸序列
[0209] <400> 17
[0210] gatgttgtgc tgaccagac tccatcgaca ttatcggtta cccctggaca accggcctcc 60
[0211] atctcttgcg ggtcaagtca gaggctctta aatgtatgtt gaaacaccta ttttatattgg 120
[0212] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
[0213] tctgggtcc ccaacagggtt cagttggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaaatc 240
[0214] agtagagtggtt aggctgagga tgtggaaatt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300
[0215] tacacgtttt gacaggggac caacctcgag atcaaa 336
[0216] <210> 18
[0217] <211> 354
[0218] <212> DNA
[0219] <213> 人工序列
[0220] <220>
[0221] <223> 合成的：7G09 VH核苷酸序列
[0222] <400> 18
[0223] gaggtgttagc tggtggagtc ttagtgaggc ttgcggcagc ctggagggtc cctgagactc 60
[0224] tcctgtgcag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
[0225] ccaacgaagg ggctggagtg ggctcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0226] cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa caccctatac 240
[0227] ctgcaaataa acagtcgtgg ggctgaggac acggccgtt attactgtgc aagacattct 300
[0228] acggaggccc tggttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0229] <210> 19
[0230] <211> 336
[0231] <212> DNA
[0232] <213> 人工序列
[0233] <220>

- [0234] <223> 合成的：7G09 VL核苷酸序列
[0235] <400> 19
[0236] gatgttgtgc tgaccagac tccatcgta ttatcggtt cccctggaca atcggcctcc 60
[0237] atctcttgca ggtcaagtca gagtctctt aatgatgtt gaaacaccta tttatattgg 120
[0238] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
[0239] tctgggtcc ccgacagggtt cagtcgcagt gggtcaggaa cagattcac actcaaaaatc 240
[0240] agtagagtgg aggctgagga tttggaaatt tattactgca tgcaagctag tcatagtccg 300
[0241] tacacgttg gacaggggac caaactcgag ctgaaa 336
[0242] <210> 20
[0243] <211> 354
[0244] <212> DNA
[0245] <213> 人工序列
[0246] <220>
[0247] <223> 合成的：8F07 VH核苷酸序列
[0248] <400> 20
[0249] gaggtgttagc tggtgagtc tggtgaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
[0250] tcctgtgcag cctcaggatt ctcttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
[0251] ccagggaaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0252] cgagagtccg tgaagggccg attcaactatc tccagagata atgcgaaaaa caccctatac 240
[0253] ctgcaaataatga acagtcgttag gtctgaggac acggccactt attactgtgc aagaccttct 300
[0254] acggaggccc tggggctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0255] <210> 21
[0256] <211> 336
[0257] <212> DNA
[0258] <213> 人工序列
[0259] <220>
[0260] <223> 合成的：8F07 VL核苷酸序列
[0261] <400> 21
[0262] gatgttgtgc tgaccagac tccattgaca ttatcggtt cccctggaca atcggtctcc 60
[0263] atctcttgca ggtcaagtca gagtctctt aatgatgtt gaaacaccta tttatattgg 120
[0264] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
[0265] tctgggtcc ccgacagggtt cagtcgcagt gggtcaggaa cagattcac actcaaaaatc 240
[0266] agtggagtgg aggctgagga tgtggagtt tattactgca tgcaagctag tcatagtccg 300
[0267] tacacgttg gagcggggac caaactcgag atcaaa 336
[0268] <210> 22
[0269] <211> 354
[0270] <212> DNA
[0271] <213> 人工序列
[0272] <220>

- [0273] <223> 合成的：7F06 VH核苷酸序列
[0274] <400> 22
[0275] gaggtgttagc tggtggagtc tggtggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
[0276] tcctgtcagc cctcaggatt cactttcagg gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
[0277] ccagggagg ggctggagtg ggctcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0278] cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa cagcctatac 240
[0279] ctgcaaattgg acagtcgtgg acgtggaggac acggccgtt attactgtgc aagacattct 300
[0280] acggaggccc tggttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0281] <210> 23
[0282] <211> 336
[0283] <212> DNA
[0284] <213> 人工序列
[0285] <220>
[0286] <223> 合成的：7F06 VL核苷酸序列
[0287] <400> 23
[0288] gatgttgtgc tgaccagac tccattgaca ttatcggtta cccctggaca accggcttcc 60
[0289] atctcttgcg ggtcaagtca gagtcttta aatgatgtt gaaacaccta ttttatattgg 120
[0290] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
[0291] tctgggtcc ccaacagggtt cagttggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaaatc 240
[0292] agtagagtgg aggctgagga tgtggagtt tattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300
[0293] tacacgtttg gagcggggac cagactcgag ctgaaa 336
[0294] <210> 24
[0295] <211> 354
[0296] <212> DNA
[0297] <213> 人工序列
[0298] <220>
[0299] <223> 合成的：7F11 VH核苷酸序列
[0300] <400> 24
[0301] gaggtgttagc tggtggagtc tgatggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
[0302] tcctgtcagc cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
[0303] ccaacgaagg ggctggagtg ggctcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0304] cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa caccctatac 240
[0305] ctgcaaattgg acagtcgtgg acgtggaggac acggccgtt attactgttc aagacattct 300
[0306] acggaggccc tggttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0307] <210> 25
[0308] <211> 336
[0309] <212> DNA
[0310] <213> 人工序列
[0311] <220>

- [0312] <223> 合成的：7F11 VL核苷酸序列
[0313] <400> 25
[0314] gatgttgtgc tgaccagac tccatcgaca ttatcggtta cccctggaca accggctc 60
[0315] atctcttgcgca ggtcaagtca gagtctctta aatgatgtt gaaacaccta tttatattgg 120
[0316] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
[0317] tctgggtcc ccaacagggtt cagtgccagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaaatc 240
[0318] agtggagtgg aggctgagga tgtggagtt tattactgca tgcaagctag tcatagtccg 300
[0319] tacacgtttg gagcggggac cagactcgag atcaaa 336
[0320] <210> 26
[0321] <211> 354
[0322] <212> DNA
[0323] <213> 人工序列
[0324] <220>
[0325] <223> 合成的：7E11 VH核苷酸序列
[0326] <400> 26
[0327] gaggtgcagc tggtgagtc tggtgaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc 60
[0328] tcctgtgttag cctcaggatt cactttcagt gactattaca tggcctgggt ccgccaggct 120
[0329] ccagggaaagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
[0330] cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa caccctatac 240
[0331] ctgcaaattgg acagtcgttag ggctgaggac acggccgttt attactgtgc aagaccttct 300
[0332] acggaggccc tggggctta ctggggccaa ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
[0333] <210> 27
[0334] <211> 336
[0335] <212> DNA
[0336] <213> 人工序列
[0337] <220>
[0338] <223> 合成的：7E11 VL核苷酸序列
[0339] <400> 27
[0340] gatattgtgc tgaccagac tccattgtca ttatcggtca cccctggaca atcggtctcc 60
[0341] atctcttgcgca ggtcaagtca gagtctctta aatgatgtt gaaacaccta tttatattgg 120
[0342] tatctacaga ggcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
[0343] tctgggtcc cgcacagggtt cagtgccagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaaatc 240
[0344] agtagagtggttgg aggctgagga tgtggagtt tattactgca tgcaagctag tcatagtccg 300
[0345] tacacgtttg gagcggggac caacctcgag atcaaa 336
[0346] <210> 28
[0347] <211> 354
[0348] <212> DNA
[0349] <213> 人工序列
[0350] <220>

- [0351] <223> 合成的：7F02 VH核苷酸序列
- [0352] <400> 28
- [0353] gaggtgcagc tggtggagtc tggtggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
- [0354] tcctgtcagc cctcaggatt cactttca gactattaca tggcctgggt ccgccagggt 120
- [0355] ccagggagg ggctggagtg ggtcgcaacc attaattatg atggtagtag tacttactat 180
- [0356] cgagagtccg tgaaggccg attcactatc tccagagata atgcgaaaaa cagcctatac 240
- [0357] ctgcaaata gacagtcgag gtctgaggac acggccgtt attactgtgc aagacattct 300
- [0358] acggaggccc tgttgctta ctggggccac ggcactctgg tcactgtctc ctca 354
- [0359] <210> 29
- [0360] <211> 336
- [0361] <212> DNA
- [0362] <213> 人工序列
- [0363] <220>
- [0364] <223> 合成的：7F02 VL核苷酸序列
- [0365] <400> 29
- [0366] gatgttgtga tgaccagac tccatcgaca ttatcgcta cccctggaca atggcctcc 60
- [0367] atctcttgcg ggtcaagtca gagtcttta aatgatgtt gaaacaccta ttttatattgg 120
- [0368] tatctacaga agcctggcca atctccacag cttctaattt atttggtctc cgacctggga 180
- [0369] tctgggtcc ccaacagggtt cagttggcagt gggtcaggaa cagatttcac actcaaaatc 240
- [0370] agtagagtgg aggctgagga tgtggatttattactgca tgcaagctag tcatgctccg 300
- [0371] tacacgttg gagcggggac cagactcgag ctgaaa 336
- [0372] <210> 30
- [0373] <211> 118
- [0374] <212> PRT
- [0375] <213> 人工序列
- [0376] <220>
- [0377] <223> 合成的：8G09 VH氨基酸序列
- [0378] <400> 30
- [0379] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0380] 1 5 10 15
- [0381] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0382] 20 25 30
- [0383] Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0384] 35 40 45
- [0385] Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
[0386] 50 55 60
- [0387] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Thr Leu Tyr
[0388] 65 70 75 80
- [0389] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0390]	85	90	95
[0391]	Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[0392]	100	105	110
[0393]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0394]	115		
[0395]	<210> 31		
[0396]	<211> 112		
[0397]	<212> PRT		
[0398]	<213> 人工序列		
[0399]	<220>		
[0400]	<223> 合成的：8G09 VL氨基酸序列		
[0401]	<400> 31		
[0402]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly		
[0403]	1 5 10 15		
[0404]	Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp		
[0405]	20 25 30		
[0406]	Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
[0407]	35 40 45		
[0408]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro		
[0409]	50 55 60		
[0410]	Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0411]	65 70 75 80		
[0412]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala		
[0413]	85 90 95		
[0414]	Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
[0415]	100 105 110		
[0416]	<210> 32		
[0417]	<211> 118		
[0418]	<212> PRT		
[0419]	<213> 人工序列		
[0420]	<220>		
[0421]	<223> 合成的：7E12 VH氨基酸序列		
[0422]	<400> 32		
[0423]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0424]	1 5 10 15		
[0425]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr		
[0426]	20 25 30		
[0427]	Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0428]	35 40 45		

[0429]	Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val			
[0430]	50	55	60	
[0431]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0432]	65	70	75	80
[0433]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys			
[0434]	85	90	95	
[0435]	Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr			
[0436]	100	105	110	
[0437]	Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0438]	115			
[0439]	<210> 33			
[0440]	<211> 112			
[0441]	<212> PRT			
[0442]	<213> 人工序列			
[0443]	<220>			
[0444]	<223> 合成的：7E12 VL氨基酸序列			
[0445]	<400> 33			
[0446]	Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly			
[0447]	1	5	10	15
[0448]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp			
[0449]	20	25	30	
[0450]	Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
[0451]	35	40	45	
[0452]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro			
[0453]	50	55	60	
[0454]	Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[0455]	65	70	75	80
[0456]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala			
[0457]	85	90	95	
[0458]	Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys			
[0459]	100	105	110	
[0460]	<210> 34			
[0461]	<211> 118			
[0462]	<212> PRT			
[0463]	<213> 人工序列			
[0464]	<220>			
[0465]	<223> 合成的：7G09 VH氨基酸序列			
[0466]	<400> 34			
[0467]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			

[0468]	1	5	10	15
[0469]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr			
[0470]		20	25	30
[0471]	Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0472]		35	40	45
[0473]	Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val			
[0474]		50	55	60
[0475]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0476]		65	70	75
[0477]	Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0478]		85	90	95
[0479]	Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr			
[0480]		100	105	110
[0481]	Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0482]		115		
[0483]	<210> 35			
[0484]	<211> 112			
[0485]	<212> PRT			
[0486]	<213> 人工序列			
[0487]	<220>			
[0488]	<223> 合成的：7G09 VL氨基酸序列			
[0489]	<400> 35			
[0490]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly			
[0491]		1	5	10
[0492]				15
[0493]	Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp			
[0494]		20	25	30
[0495]	Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
[0496]		35	40	45
[0497]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro			
[0498]		50	55	60
[0499]	Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[0500]		65	70	75
[0501]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala			80
[0502]		85	90	95
[0503]	Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
[0504]		100	105	110
[0505]	<210> 36			
[0506]	<211> 118			
[0507]	<212> PRT			

- [0507] <213> 人工序列
- [0508] <220>
- [0509] <223> 合成的：8F07 VH氨基酸序列
- [0510] <400> 36
- [0511] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0512] 1 5 10 15
- [0513] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr
- [0514] 20 25 30
- [0515] Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0516] 35 40 45
- [0517] Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
- [0518] 50 55 60
- [0519] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
- [0520] 65 70 75 80
- [0521] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
- [0522] 85 90 95
- [0523] Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
- [0524] 100 105 110
- [0525] Leu Val Thr Val Ser Ser
- [0526] 115
- [0527] <210> 37
- [0528] <211> 112
- [0529] <212> PRT
- [0530] <213> 人工序列
- [0531] <220>
- [0532] <223> 合成的：8F07 VL氨基酸序列
- [0533] <400> 37
- [0534] Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
- [0535] 1 5 10 15
- [0536] Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
- [0537] 20 25 30
- [0538] Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
- [0539] 35 40 45
- [0540] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro
- [0541] 50 55 60
- [0542] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
- [0543] 65 70 75 80
- [0544] Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
- [0545] 85 90 95

[0546] Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0547] 100 105 110
[0548] <210> 38
[0549] <211> 118
[0550] <212> PRT
[0551] <213> 人工序列
[0552] <220>
[0553] <223> 合成的：7F06 VH氨基酸序列
[0554] <400> 38
[0555] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0556] 1 5 10 15
[0557] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr
[0558] 20 25 30
[0559] Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0560] 35 40 45
[0561] Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
[0562] 50 55 60
[0563] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0564] 65 70 75 80
[0565] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0566] 85 90 95
[0567] Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
[0568] 100 105 110
[0569] Leu Val Thr Val Ser Ser
[0570] 115
[0571] <210> 39
[0572] <211> 112
[0573] <212> PRT
[0574] <213> 人工序列
[0575] <220>
[0576] <223> 合成的：7F06 VL氨基酸序列
[0577] <400> 39
[0578] Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
[0579] 1 5 10 15
[0580] Gln Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
[0581] 20 25 30
[0582] Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0583] 35 40 45
[0584] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro

[0585]	50	55	60
[0586]	Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0587]	65	70	75
[0588]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala		80
[0589]	85	90	95
[0590]	Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys		
[0591]	100	105	110
[0592]	<210> 40		
[0593]	<211> 118		
[0594]	<212> PRT		
[0595]	<213> 人工序列		
[0596]	<220>		
[0597]	<223> 合成的：7F11 VH氨基酸序列		
[0598]	<400> 40		
[0599]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Asp Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0600]	1	5	10
[0601]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr		15
[0602]	20	25	30
[0603]	Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0604]	35	40	45
[0605]	Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val		
[0606]	50	55	60
[0607]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0608]	65	70	75
[0609]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0610]	85	90	95
[0611]	Ser Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr		
[0612]	100	105	110
[0613]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0614]	115		
[0615]	<210> 41		
[0616]	<211> 112		
[0617]	<212> PRT		
[0618]	<213> 人工序列		
[0619]	<220>		
[0620]	<223> 合成的：7F11 VL氨基酸序列		
[0621]	<400> 41		
[0622]	Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly		
[0623]	1	5	10
			15

[0624] Gln Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
[0625] 20 25 30
[0626] Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0627] 35 40 45
[0628] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro
[0629] 50 55 60
[0630] Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0631] 65 70 75 80
[0632] Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
[0633] 85 90 95
[0634] Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0635] 100 105 110
[0636] <210> 42
[0637] <211> 118
[0638] <212> PRT
[0639] <213> 人工序列
[0640] <220>
[0641] <223> 合成的：7E11 VH氨基酸序列
[0642] <400> 42
[0643] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0644] 1 5 10 15
[0645] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0646] 20 25 30
[0647] Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0648] 35 40 45
[0649] Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
[0650] 50 55 60
[0651] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
[0652] 65 70 75 80
[0653] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0654] 85 90 95
[0655] Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0656] 100 105 110
[0657] Leu Val Thr Val Ser Ser
[0658] 115
[0659] <210> 43
[0660] <211> 112
[0661] <212> PRT
[0662] <213> 人工序列

- [0663] <220>
- [0664] <223> 合成的：7E11 VL氨基酸序列
- [0665] <400> 43
- [0666] Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ala Thr Pro Gly
- [0667] 1 5 10 15
- [0668] Gln Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
- [0669] 20 25 30
- [0670] Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
- [0671] 35 40 45
- [0672] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro
- [0673] 50 55 60
- [0674] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
- [0675] 65 70 75 80
- [0676] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
- [0677] 85 90 95
- [0678] Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
- [0679] 100 105 110
- [0680] <210> 44
- [0681] <211> 118
- [0682] <212> PRT
- [0683] <213> 人工序列
- [0684] <220>
- [0685] <223> 合成的：7F02 VH氨基酸序列
- [0686] <400> 44
- [0687] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0688] 1 5 10 15
- [0689] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
- [0690] 20 25 30
- [0691] Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0692] 35 40 45
- [0693] Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
- [0694] 50 55 60
- [0695] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
- [0696] 65 70 75 80
- [0697] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0698] 85 90 95
- [0699] Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr
- [0700] 100 105 110
- [0701] Leu Val Thr Val Ser Ser

[0702]	115
[0703]	<210> 45
[0704]	<211> 112
[0705]	<212> PRT
[0706]	<213> 人工序列
[0707]	<220>
[0708]	<223> 合成的：7F02 VL氨基酸序列
[0709]	<400> 45
[0710]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Pro Gly
[0711]	1 5 10 15
[0712]	Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp
[0713]	20 25 30
[0714]	Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0715]	35 40 45
[0716]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro
[0717]	50 55 60
[0718]	Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0719]	65 70 75 80
[0720]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
[0721]	85 90 95
[0722]	Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys
[0723]	100 105 110
[0724]	<210> 46
[0725]	<211> 118
[0726]	<212> PRT
[0727]	<213> 人工序列
[0728]	<220>
[0729]	<223> 合成的：7C02 VH氨基酸序列
[0730]	<400> 46
[0731]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0732]	1 5 10 15
[0733]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0734]	20 25 30
[0735]	Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0736]	35 40 45
[0737]	Ala Thr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Glu Ser Val
[0738]	50 55 60
[0739]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0740]	65 70 75 80

[0741]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0742]	85	90	95
[0743]	Ala Arg Pro Ser Thr Glu Ala Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr		
[0744]	100	105	110
[0745]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0746]	115		
[0747]	<210> 47		
[0748]	<211> 112		
[0749]	<212> PRT		
[0750]	<213> 人工序列		
[0751]	<220>		
[0752]	<223> 合成的：7G08 VL氨基酸序列		
[0753]	<400> 47		
[0754]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Ala Thr Pro Gly		
[0755]	1 5 10 15		
[0756]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asp		
[0757]	20 25 30		
[0758]	Val Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
[0759]	35 40 45		
[0760]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asp Leu Gly Ser Gly Val Pro		
[0761]	50 55 60		
[0762]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0763]	65 70 75 80		
[0764]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala		
[0765]	85 90 95		
[0766]	Ser His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0767]	100 105 110		
[0768]	<210> 48		
[0769]	<211> 113		
[0770]	<212> PRT		
[0771]	<213> 人 (Homo sapiens)		
[0772]	<220>		
[0773]	<221> misc_feature		
[0774]	<223> 人 VH3_1 序列		
[0775]	<400> 48		
[0776]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0777]	1 5 10 15		
[0778]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0779]	20 25 30		

[0780] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0781] 35 40 45
[0782] Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[0783] 50 55 60
[0784] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0785] 65 70 75 80
[0786] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0787] 85 90 95
[0788] Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
[0789] 100 105 110
[0790] Ser
[0791] <210> 49
[0792] <211> 112
[0793] <212> PRT
[0794] <213> 人 (Homo sapiens)
[0795] <220>
[0796] <221> misc_feature
[0797] <223> 人 VK2_5 氨基酸序列
[0798] <400> 49
[0799] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
[0800] 1 5 10 15
[0801] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
[0802] 20 25 30
[0803] Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0804] 35 40 45
[0805] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0806] 50 55 60
[0807] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0808] 65 70 75 80
[0809] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
[0810] 85 90 95
[0811] Ile His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0812] 100 105 110
[0813] <210> 50
[0814] <211> 333
[0815] <212> PRT
[0816] <213> 人 (Homo sapiens)
[0817] <220>
[0818] <221> misc_feature

[0819]	<223> 人C6部分氨基酸序列			
[0820]	<400> 50			
[0821]	Cys	Glu	Gly	Glu
[0822]	Lys	Arg	Gln	Glu
[0823]	Glu	Asn	Asn	Gly
[0824]	Gln	Pro	Cys	Ile
[0825]	Ile	Asn	Asp	Asp
[0826]	Asp	Leu	Pro	Glu
[0827]	Ile	Glu	Ala	Asp
[0828]	Ser	Gly	Cys	Pro
[0829]	Pro	Val	Gln	Pro
[0830]	Glu	Asp	Pro	Val
[0831]	Val	Gly	Glu	Asp
[0832]	Ile	Phe	Ile	Tyr
[0833]	Arg	Asn	Arg	Asn
[0834]	Gly	Gly	Gly	Gly
[0835]	Leu	Thr	Ile	Thr
[0836]	Thr	Pro	Phe	Gln
[0837]	Ile	Gly	Gly	Gly
[0838]	Arg	Leu	Leu	Leu
[0839]	Gly	Leu	Thr	Thr
[0840]	Asn	Asn	Pro	Pro
[0841]	Ser	Trp	Pro	Pro
[0842]	Trp	Thr	Ile	Ser
[0843]	Thr	Pro	Ser	Asn
[0844]	Ile	Val	Asn	Ser
[0845]	Ser	Val	Asn	Ser
[0846]	Asp	Phe	Asp	Asp
[0847]	Thr	Asp	Thr	Asp
[0848]	Pro	Tyr	Asp	Ser
[0849]	Ala	Phe	Leu	Asn
[0850]	Cys	Leu	His	Gly
[0851]	Leu	Gly	Asn	Gly
[0852]	Glu	Leu	Gly	Asn
[0853]	Trp	Glu	Asn	Ser
[0854]	Gly	Leu	Asn	Ser
[0855]	Arg	Asn	Asn	Ser
[0856]	Gly	Gly	Asn	Ser
[0857]	Asn	Gly	Gly	Ser
[0858]	Gln	Leu	Asn	Thr
[0859]	Leu	Tyr	Gly	Asn
[0860]	Tyr	Cys	Val	Gly
[0861]	Cys	Val	Cys	Leu
[0862]	Leu	Cys	Leu	Asn
[0863]	Pro	Leu	Leu	Asn
[0864]	Pro	Pro	Gln	Cys
[0865]	Gln	Cys	Cys	Leu
[0866]	Asn	Leu	Leu	Asn
[0867]	Leu	Asn	Asn	Ser
[0868]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0869]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0870]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0871]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0872]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0873]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0874]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0875]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0876]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0877]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0878]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0879]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0880]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0881]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0882]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0883]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0884]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0885]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0886]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0887]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0888]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0889]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0890]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0891]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0892]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0893]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0894]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0895]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0896]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0897]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0898]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0899]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0900]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0901]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0902]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0903]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0904]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0905]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0906]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0907]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0908]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0909]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0910]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0911]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0912]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0913]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0914]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0915]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0916]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0917]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0918]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0919]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0920]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0921]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0922]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0923]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0924]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0925]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0926]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0927]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0928]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0929]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0930]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0931]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0932]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0933]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0934]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0935]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0936]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0937]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0938]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0939]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0940]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0941]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0942]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0943]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0944]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0945]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0946]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0947]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0948]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0949]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0950]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0951]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0952]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0953]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0954]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0955]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0956]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0957]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0958]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0959]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0960]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0961]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0962]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0963]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0964]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0965]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0966]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0967]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0968]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0969]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0970]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0971]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0972]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0973]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0974]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0975]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0976]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0977]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0978]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0979]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0980]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0981]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0982]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0983]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0984]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0985]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0986]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0987]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0988]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0989]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0990]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0991]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0992]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0993]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0994]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0995]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0996]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0997]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0998]	Asn	Asn	Asn	Ser
[0999]	Asn	Asn	Asn	Ser
[1000]	Asn	Asn	Asn	Ser

[0858]	290	295	300
[0859]	Ser Glu Lys Thr Leu Asn Ile Cys Glu Val Gly Thr Ile Arg Cys Ala		
[0860]	305	310	315
[0861]	Asn Arg Lys Met Glu Ile Leu His Pro Gly Lys Cys Leu		320
[0862]	325	330	
[0863]	<210> 51		
[0864]	<211> 333		
[0865]	<212> PRT		
[0866]	<213> 大鼠		
[0867]	<220>		
[0868]	<221> misc_feature		
[0869]	<223> 大鼠C6部分氨基酸序列		
[0870]	<400> 51		
[0871]	Cys Glu Gly Lys His Trp Gln Glu Glu Asp Cys Thr Phe Ser Ile Met		
[0872]	1 5 10 15		
[0873]	Glu Lys Val Gly Gln Pro Cys Ile Ser Asp Asp Glu Glu Ile Lys Glu		
[0874]	20 25 30		
[0875]	Val Asp Leu Ala Glu Pro Glu Ala Asp Ser Gly Cys Pro Gln Pro Pro		
[0876]	35 40 45		
[0877]	Leu Pro Glu Asn Ala Phe Val Trp Asn Glu Lys Lys Leu Tyr Ser Val		
[0878]	50 55 60		
[0879]	Gly Glu Glu Val Glu Ile Ser Cys Leu Thr Gly Phe Lys Ala Val Gly		
[0880]	65 70 75 80		
[0881]	Tyr Gln Tyr Phe Arg Cys Leu Pro Asp Arg Thr Trp Arg Gln Gly Asp		
[0882]	85 90 95		
[0883]	Val Glu Cys Gln Arg Thr Glu Cys Leu Lys Pro Val Val Gln Asp Val		
[0884]	100 105 110		
[0885]	Leu Thr Ile Ser Pro Phe Gln Ser Val Tyr Lys Ile Gly Glu Ser Ile		
[0886]	115 120 125		
[0887]	Glu Leu Thr Cys Pro Arg Gly Phe Val Val Ala Gly Pro Ser Arg Tyr		
[0888]	130 135 140		
[0889]	Thr Cys Lys Gly Asp Ser Trp Thr Pro Pro Ile Pro Asn Ser Leu Ser		
[0890]	145 150 155 160		
[0891]	Cys Glu Lys Asp Ile Leu Thr Lys Ser Lys Gly Leu Cys Gln Pro Gly		
[0892]	165 170 175		
[0893]	Gln Lys Gln Ser Gly Ser Glu Cys Val Cys Met Ser Pro Glu Glu Asp		
[0894]	180 185 190		
[0895]	Cys Ser Ser Tyr Ser Glu Asp Leu Cys Ile Phe Asp Glu Gly Ser Ser		
[0896]	195 200 205		

[0897]	Gln Tyr Phe Thr Ser Ser Ala Cys Lys Phe Leu Ala Glu Lys Cys Leu			
[0898]	210	215	220	
[0899]	Asn Ser Asn Gln Phe His Phe Val His Ala Gly Ser Cys Gln Glu Gly			
[0900]	225	230	235	240
[0901]	Pro Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu Arg Leu Lys Leu Ala Met Lys Ser			
[0902]	245	250	255	
[0903]	Thr Lys Arg Val Pro Cys Gly Tyr Asp Thr Cys Tyr Asp Trp Glu Lys			
[0904]	260	265	270	
[0905]	Cys Ser Ala His Thr Ser Asn Cys Val Cys Leu Leu Pro Pro Gln Cys			
[0906]	275	280	285	
[0907]	Pro Lys Asp Glu Asn Gln Leu His Cys Val Lys Met Gly Ser Ser Met			
[0908]	290	295	300	
[0909]	Arg Gly Lys Thr Val Asn Ile Cys Thr Leu Gly Ala Val Arg Cys Ala			
[0910]	305	310	315	320
[0911]	Asn Arg Lys Val Glu Ile Leu Asn Pro Gly Arg Cys Leu			
[0912]	325	330		
[0913]	<210> 52			
[0914]	<211> 934			
[0915]	<212> PRT			
[0916]	<213> 人 (Homo sapiens)			
[0917]	<220>			
[0918]	<221> misc_feature			
[0919]	<223> 人C6的氨基酸序列			
[0920]	<400> 52			
[0921]	Met Ala Arg Arg Ser Val Leu Tyr Phe Ile Leu Leu Asn Ala Leu Ile			
[0922]	1	5	10	15
[0923]	Asn Lys Gly Gln Ala Cys Phe Cys Asp His Tyr Ala Trp Thr Gln Trp			
[0924]	20	25	30	
[0925]	Thr Ser Cys Ser Lys Thr Cys Asn Ser Gly Thr Gln Ser Arg His Arg			
[0926]	35	40	45	
[0927]	Gln Ile Val Val Asp Lys Tyr Tyr Gln Glu Asn Phe Cys Glu Gln Ile			
[0928]	50	55	60	
[0929]	Cys Ser Lys Gln Glu Thr Arg Glu Cys Asn Trp Gln Arg Cys Pro Ile			
[0930]	65	70	75	80
[0931]	Asn Cys Leu Leu Gly Asp Phe Gly Pro Trp Ser Asp Cys Asp Pro Cys			
[0932]	85	90	95	
[0933]	Ile Glu Lys Gln Ser Lys Val Arg Ser Val Leu Arg Pro Ser Gln Phe			
[0934]	100	105	110	
[0935]	Gly Gly Gln Pro Cys Thr Ala Pro Leu Val Ala Phe Gln Pro Cys Ile			

[0936]	115	120	125
[0937]	Pro Ser Lys Leu Cys Lys Ile Glu Glu Ala Asp Cys Lys Asn Lys Phe		
[0938]	130	135	140
[0939]	Arg Cys Asp Ser Gly Arg Cys Ile Ala Arg Lys Leu Glu Cys Asn Gly		
[0940]	145	150	155
[0941]	Glu Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Arg Asp Cys Gly Arg Thr		
[0942]	165	170	175
[0943]	Lys Ala Val Cys Thr Arg Lys Tyr Asn Pro Ile Pro Ser Val Gln Leu		
[0944]	180	185	190
[0945]	Met Gly Asn Gly Phe His Phe Leu Ala Gly Glu Pro Arg Gly Glu Val		
[0946]	195	200	205
[0947]	Leu Asp Asn Ser Phe Thr Gly Gly Ile Cys Lys Thr Val Lys Ser Ser		
[0948]	210	215	220
[0949]	Arg Thr Ser Asn Pro Tyr Arg Val Pro Ala Asn Leu Glu Asn Val Gly		
[0950]	225	230	235
[0951]	Phe Glu Val Gln Thr Ala Glu Asp Asp Leu Lys Thr Asp Phe Tyr Lys		
[0952]	245	250	255
[0953]	Asp Leu Thr Ser Leu Gly His Asn Glu Asn Gln Gln Gly Ser Phe Ser		
[0954]	260	265	270
[0955]	Ser Gln Gly Gly Ser Ser Phe Ser Val Pro Ile Phe Tyr Ser Ser Lys		
[0956]	275	280	285
[0957]	Arg Ser Glu Asn Ile Asn His Asn Ser Ala Phe Lys Gln Ala Ile Gln		
[0958]	290	295	300
[0959]	Ala Ser His Lys Lys Asp Ser Ser Phe Ile Arg Ile His Lys Val Met		
[0960]	305	310	315
[0961]	Lys Val Leu Asn Phe Thr Thr Lys Ala Lys Asp Leu His Leu Ser Asp		
[0962]	325	330	335
[0963]	Val Phe Leu Lys Ala Leu Asn His Leu Pro Leu Glu Tyr Asn Ser Ala		
[0964]	340	345	350
[0965]	Leu Tyr Ser Arg Ile Phe Asp Asp Phe Gly Thr His Tyr Phe Thr Ser		
[0966]	355	360	365
[0967]	Gly Ser Leu Gly Gly Val Tyr Asp Leu Leu Tyr Gln Phe Ser Ser Glu		
[0968]	370	375	380
[0969]	Glu Leu Lys Asn Ser Gly Leu Thr Glu Glu Ala Lys His Cys Val		
[0970]	385	390	395
[0971]	Arg Ile Glu Thr Lys Lys Arg Val Leu Phe Ala Lys Lys Thr Lys Val		
[0972]	405	410	415
[0973]	Glu His Arg Cys Thr Thr Asn Lys Leu Ser Glu Lys His Glu Gly Ser		
[0974]	420	425	430

[0975]	Phe Ile Gln Gly Ala Glu Lys Ser Ile Ser Leu Ile Arg Gly Gly Arg		
[0976]	435	440	445
[0977]	Ser Glu Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Trp Glu Lys Gly Ser Ser Gly Leu		
[0978]	450	455	460
[0979]	Glu Glu Lys Thr Phe Ser Glu Trp Leu Glu Ser Val Lys Glu Asn Pro		
[0980]	465	470	475
[0981]	Ala Val Ile Asp Phe Glu Leu Ala Pro Ile Val Asp Leu Val Arg Asn		
[0982]	485	490	495
[0983]	Ile Pro Cys Ala Val Thr Lys Arg Asn Asn Leu Arg Lys Ala Leu Gln		
[0984]	500	505	510
[0985]	Glu Tyr Ala Ala Lys Phe Asp Pro Cys Gln Cys Ala Pro Cys Pro Asn		
[0986]	515	520	525
[0987]	Asn Gly Arg Pro Thr Leu Ser Gly Thr Glu Cys Leu Cys Val Cys Gln		
[0988]	530	535	540
[0989]	Ser Gly Thr Tyr Gly Glu Asn Cys Glu Lys Gln Ser Pro Asp Tyr Lys		
[0990]	545	550	555
[0991]	Ser Asn Ala Val Asp Gly Gln Trp Gly Cys Trp Ser Ser Trp Ser Thr		
[0992]	565	570	575
[0993]	Cys Asp Ala Thr Tyr Lys Arg Ser Arg Thr Arg Glu Cys Asn Asn Pro		
[0994]	580	585	590
[0995]	Ala Pro Gln Arg Gly Gly Lys Arg Cys Glu Gly Glu Lys Arg Gln Glu		
[0996]	595	600	605
[0997]	Glu Asp Cys Thr Phe Ser Ile Met Glu Asn Asn Gly Gln Pro Cys Ile		
[0998]	610	615	620
[0999]	Asn Asp Asp Glu Glu Met Lys Glu Val Asp Leu Pro Glu Ile Glu Ala		
[1000]	625	630	635
[1001]	Asp Ser Gly Cys Pro Gln Pro Val Pro Pro Glu Asn Gly Phe Ile Arg		
[1002]	645	650	655
[1003]	Asn Glu Lys Gln Leu Tyr Leu Val Gly Glu Asp Val Glu Ile Ser Cys		
[1004]	660	665	670
[1005]	Leu Thr Gly Phe Glu Thr Val Gly Tyr Gln Tyr Phe Arg Cys Leu Pro		
[1006]	675	680	685
[1007]	Asp Gly Thr Trp Arg Gln Gly Asp Val Glu Cys Gln Arg Thr Glu Cys		
[1008]	690	695	700
[1009]	Ile Lys Pro Val Val Gln Glu Val Leu Thr Ile Thr Pro Phe Gln Arg		
[1010]	705	710	715
[1011]	Leu Tyr Arg Ile Gly Glu Ser Ile Glu Leu Thr Cys Pro Lys Gly Phe		
[1012]	725	730	735
[1013]	Val Val Ala Gly Pro Ser Arg Tyr Thr Cys Gln Gly Asn Ser Trp Thr		

[1014]	740	745	750
[1015]	Pro Pro Ile Ser Asn Ser Leu Thr Cys Glu Lys Asp Thr Leu Thr Lys		
[1016]	755	760	765
[1017]	Leu Lys Gly His Cys Gln Leu Gly Gln Lys Gln Ser Gly Ser Glu Cys		
[1018]	770	775	780
[1019]	Ile Cys Met Ser Pro Glu Glu Asp Cys Ser His His Ser Glu Asp Leu		
[1020]	785	790	795
[1021]	Cys Val Phe Asp Thr Asp Ser Asn Asp Tyr Phe Thr Ser Pro Ala Cys		
[1022]	805	810	815
[1023]	Lys Phe Leu Ala Glu Lys Cys Leu Asn Asn Gln Gln Leu His Phe Leu		
[1024]	820	825	830
[1025]	His Ile Gly Ser Cys Gln Asp Gly Arg Gln Leu Glu Trp Gly Leu Glu		
[1026]	835	840	845
[1027]	Arg Thr Arg Leu Ser Ser Asn Ser Thr Lys Lys Glu Ser Cys Gly Tyr		
[1028]	850	855	860
[1029]	Asp Thr Cys Tyr Asp Trp Glu Lys Cys Ser Ala Ser Thr Ser Lys Cys		
[1030]	865	870	875
[1031]	Val Cys Leu Leu Pro Pro Gln Cys Phe Lys Gly Gly Asn Gln Leu Tyr		
[1032]	885	890	895
[1033]	Cys Val Lys Met Gly Ser Ser Thr Ser Glu Lys Thr Leu Asn Ile Cys		
[1034]	900	905	910
[1035]	Glu Val Gly Thr Ile Arg Cys Ala Asn Arg Lys Met Glu Ile Leu His		
[1036]	915	920	925
[1037]	Pro Gly Lys Cys Leu Ala		
[1038]	930		
[1039]	<210> 53		
[1040]	<211> 5		
[1041]	<212> PRT		
[1042]	<213> 人工序列		
[1043]	<220>		
[1044]	<223> 合成的:肽接头		
[1045]	<400> 53		
[1046]	Pro Val Gly Val Val		
[1047]	1	5	

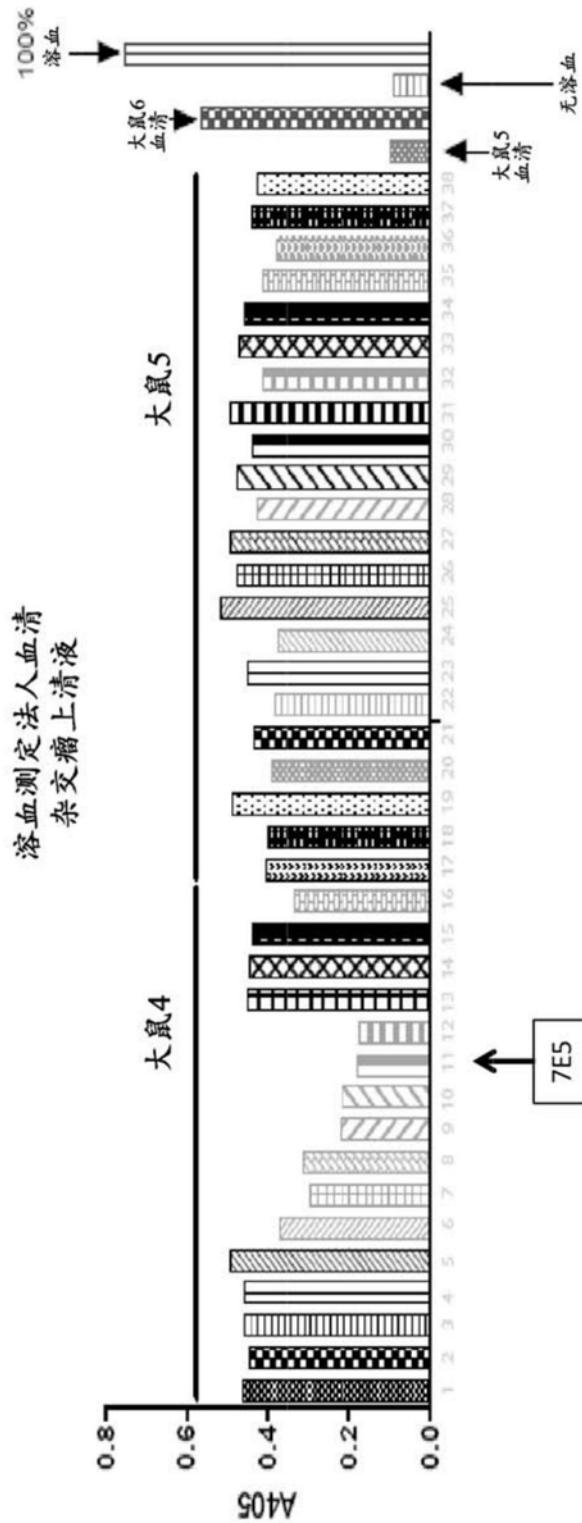


图1A

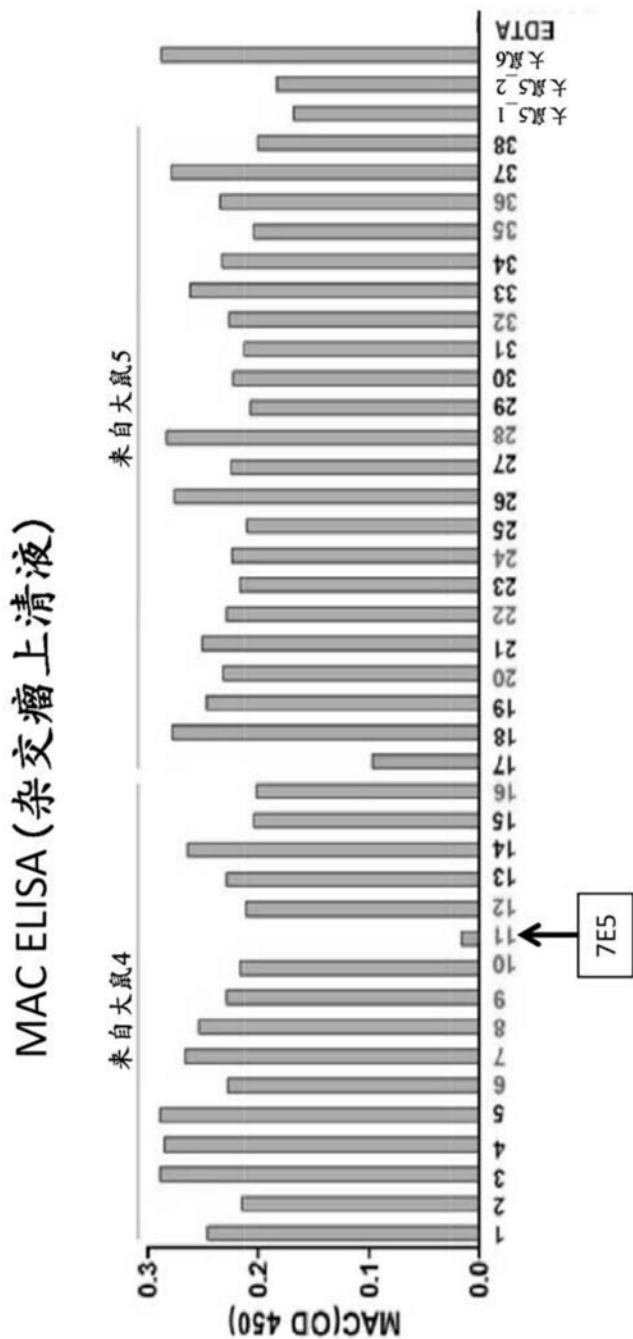


图1B

Biacore 动力学

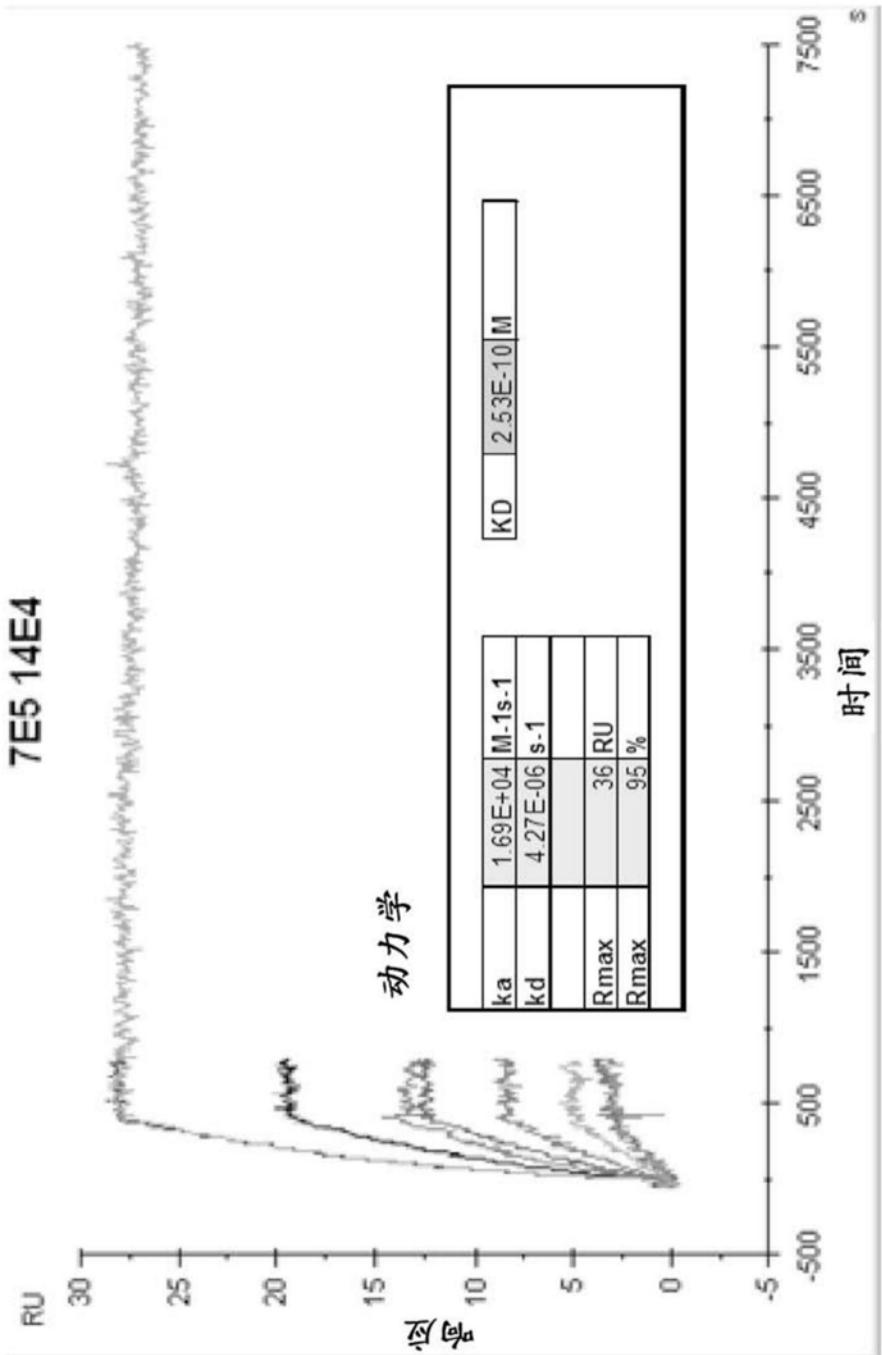


图2

7E5和27D1之间的表位交叉阻断

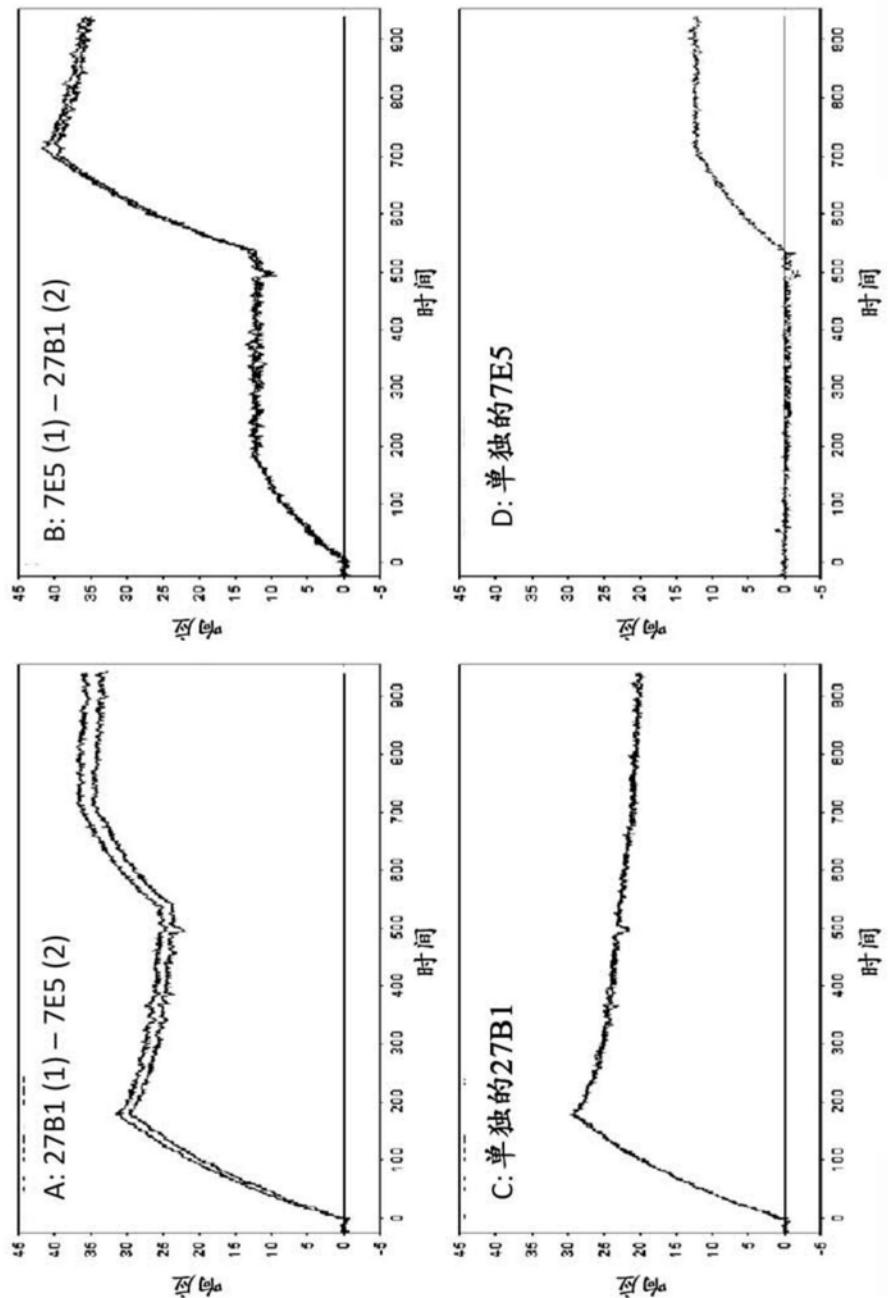


图3

人	601	CEGEKRQEEEDCTFSIMENNGQPCINDEEMKEVDLPEIEADSGCPQPVPPIENGFIRNEKQ	660
大鼠		CEG+ QEEDCTFSIME GQPCI+DDEE+KEVDL E EADSGCPQP QPPLPENA F+ NEK+	
人	661	LYLVGEDVEISCLTGFETVGYQYFRCLPDGTWQRQDVECQRT ECIKPVVQEVLTITPFQR	720
大鼠		LY VGE+VEISCLTGF+ VGYQYFRCLPD TWQRQDVECQRT ECIKPVVQ+VLTI+PFO	
人	661	LYSVGEEVEISCLTGFKA VGYQYFRCLPDRTWQRQDVECQRT ECLKPVVQDVLTISPFQS	720
		Peptide 360	
人	721	LYRIGESTIELTCPKGFVVAGPSRYTCQGNS +Y+IGESTIELTCP+GFVVAGPSRYTC+G+SWTPPI NSL+CEKD LTK KG CQ GOKQS	780
大鼠	721	VYKIGESTIELTCPRGFVVAGPSRYTC KGDSTPPNLSCEKDILTKSKGLCQPGQKQS	780
		Peptides 373, 376 & 377	
人	781	GSECICMSPEEDCSHHSEDLCVFDTDSNDYFTSPACKFLAEKCLNNQQLHFLHTIGSCQDG	840
大鼠	781	GSEC+CMSPEEDCS +SEDLIC+FD S+ YFTS ACKFLAEKCLN+ Q HF+H GSCCQ+G	
人	841	RQLEWGLERTRLSSN STKKEESCGYDTCYDWEKCSASTSKCVCLLPPQCFKGGNQLYCVKM	900
大鼠	841	QLEWGLER +L+ STK+ CGYDTCYDWEKCSA TS CVCLLPPQC K NQL+CVKM	
人	901	GSSTSEKTLNICEVGTTIRCANRKMEILHPGKCL	933
大鼠	901	GSS KT+NIC +G +RCANRK+EIL+PG+CL	
		图4A	

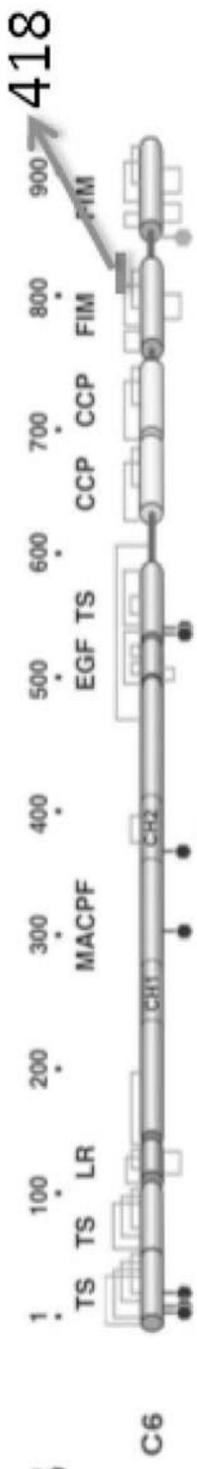


图4B

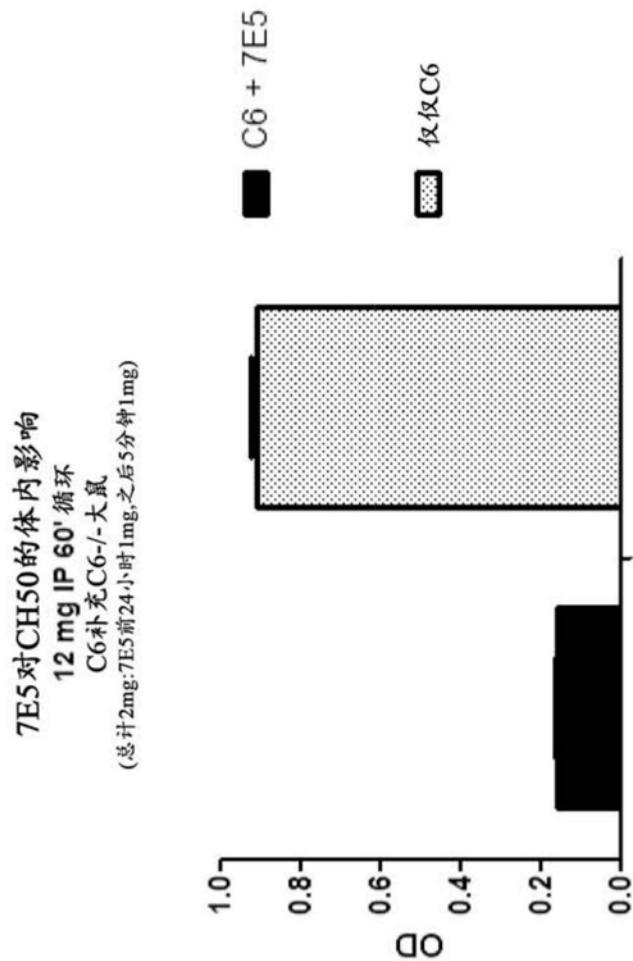


图5

		HFR1												CDR H1												HFR2																									
		H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49		
		K	V	R	D	G	S	E	S	D	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	K	L	S	C	V	A	S	G	F	S	D	Y	M	A	W	V	R	Q	G	P	T	K	G	L	E	W	V	A	W	V	A	
		V	Q	L	V	E	S	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	G	G	G	T	F	S	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	L	E	W	V	A	W	V	A
		V	Q	L	V	E	S	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	G	G	G	T	F	S	S	Y	W	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	L	E	W	V	A	W	V	A

	HFR3																																														
	CDR H2																																														
	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H83	H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94								
I	N	Y	D	G	S	S	T	Y	R	E	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	R	T	L	Y	L	R	S	E	D	T	A	T	Y	C	S	R							
I	I	K	Q	D	G	S	E	K	Y	Y	V	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R

WT H α
Mut

图6A

规范断点4-1		LFR1		CDR1		LFR2	
Kabat	L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L11 L12 L13 L14 L15 L16 L17 L18 L19 L20	L21	L22 L23 L24 L25 L26 L27 L28 L29 L30 L30A L30B L30C L30D L30E L31 L32 L33 L34 L35 L36 L37 L38 L39 L40 L41 L42 L43 L44 L45 L46 L47 L48 L49	I	S C R S Q S L L N D V G N T Y L Y W Y L Q R P G Q S P Q S P Q L L I Y		
7E5-14E4-YK	D V V L T Q T P S T L S A T I G Q S V P A S I S C K S S Q S L L H S D G K T Y L Y W Y L Q K R K						
ΔVK2_5	D I V M T Q T P L S L S V T P G Q						
WT	V L S T A I S V L S M P A					R	K
Mut							

规范断点4-1		LFR2		CDR2		LFR3	
Kabat	L50 L51 L52 L53 L54 L55 L56 L57 L58 L59 L60 L61 L62 L63 L64 L65 L66 L67 L68 L69 L70 L71 L72 L73 L74 L75 L76 L77 L78 L79 L80 L81 L82 L83 L84 L85 L86 L87 L88						
7E5-14E4-YK	L V S D L G S G V P N R F S G S G T D F T L K I S G V E A E D L G I Y Y C						
ΔVK2_5	E V S S R F S G V P D R F S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C						
WT	N	I	G	R	V		
Mut	D						

规范断点4-1		LFR3		CDR3		LFR4	
Kabat	189 L90 L91 L92 L93 L94 L95 L96 L97 L98 L99 L100 L101 L102 L103 L104 L105 L106 L107						
7E5-14E4-YK	M Q A S H A P Y T F G A G T N L E I K						
ΔVK2_5	M Q G I H L P Y T F G Q G T K L E I K					IGK2	IGM5
WT	I T F G Q G T R L E I K	A	N	Q	K/R	I	
Mut							

图6B

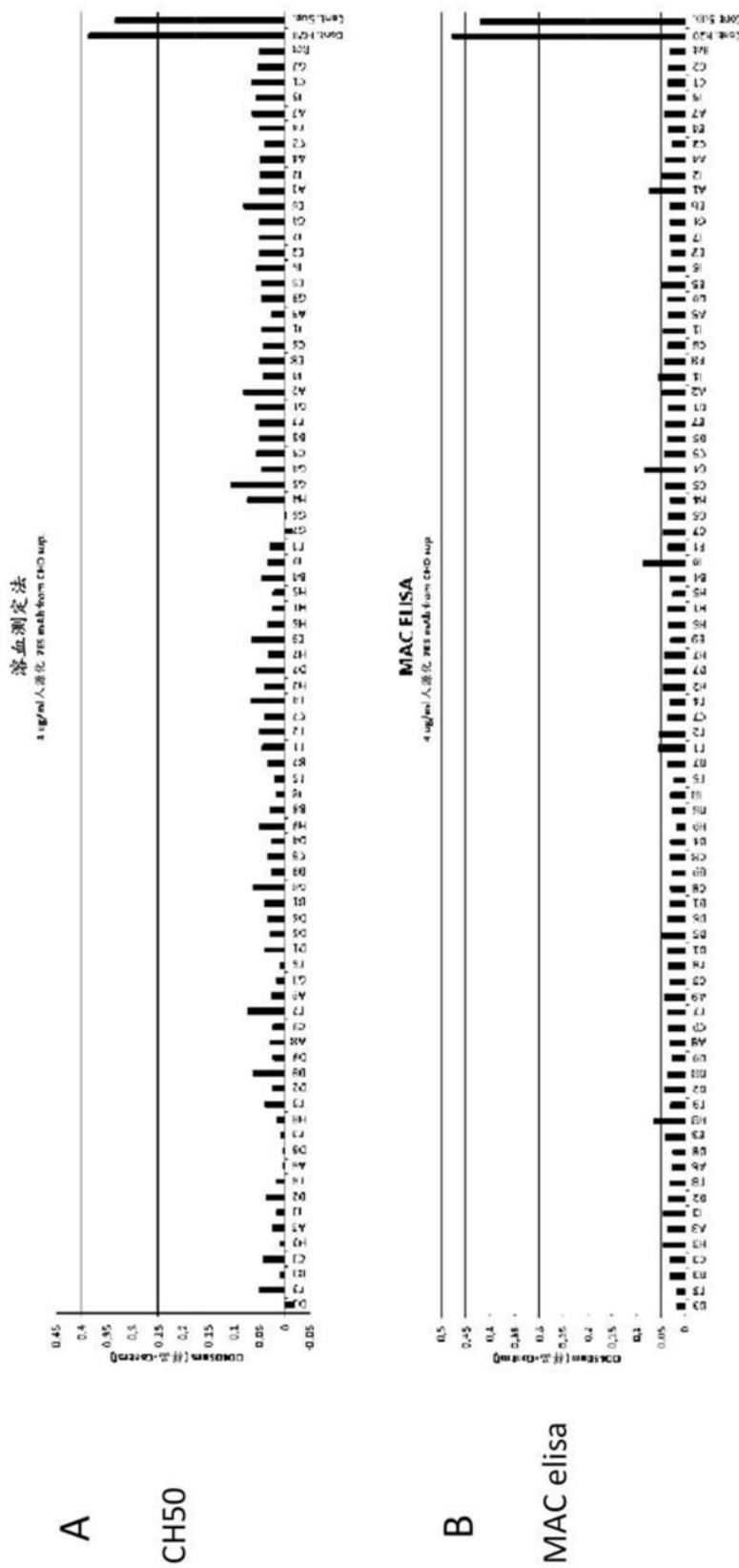


图7

		CDR1		CDR2		CDR3	
TE5	wt	VH		EVQLVESDGGLVQPGGSLKLSCVASGFSFSDYMAVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKRTLYLQMDSLRSEDTATYCSRPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7C02	VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYMAVRQAPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7E11	VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYMAVRQAPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7E12	VH			EVQLVESDGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYMAVRQGPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7F02	VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYMAVRQGPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRSEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7F06	VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYMAVRQGPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7F11	VH			EVQLVESDGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYMAVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLRAEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
7G09	VH			EVQLVESDGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMAVRQGPTKGLEWVATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTATYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
8F07	VH			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDYMAVRQGPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKRTLYLQMDSLRSEDTATYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			
8G09	VH			EVQLVESDGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYMAVRQAPGKGLRWATINYDGSSTTYRESVKGRFTISRDNAKRTLYLQMDSLRAEDTAVYCAFPSTEALFYAWGHGTLLVTVSS			

重链

图8A

轻链

图8B

与野生型大鼠7E5相比人源化F'Ab的Biocore亲和力

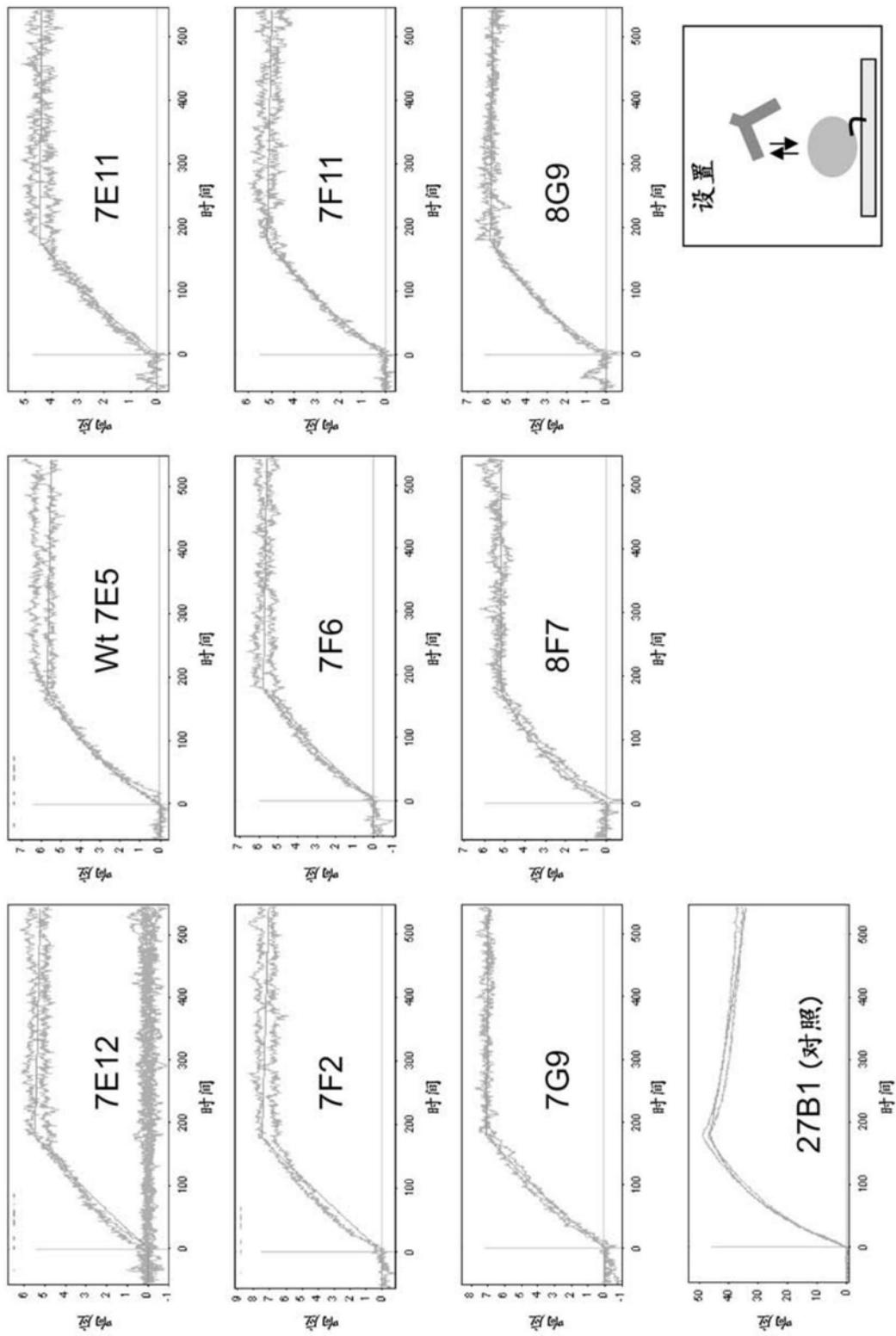
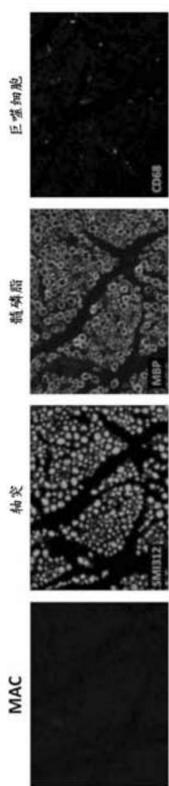


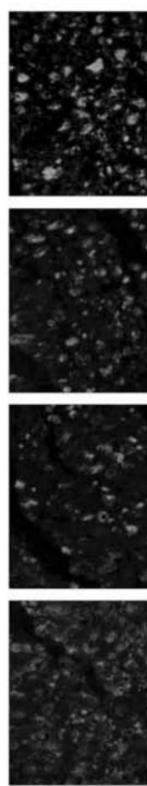
图9

从左到右：未损伤的坐骨神经显示了缺乏膜攻击复合物(MAC)、强烈轴突染色(神经丝，SMI12)、环形髓磷脂染色(髓磷脂碱性蛋白，MBP)和无活化巨噬细胞(CD68标志物)。

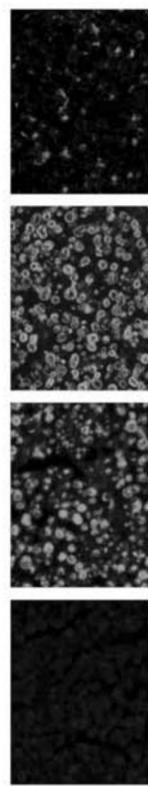


小图A：未损伤的坐骨神经

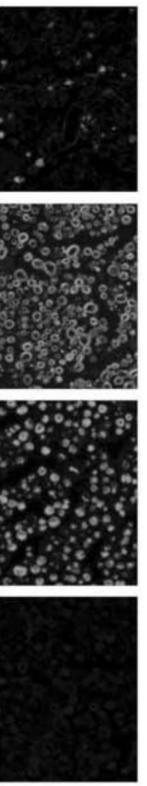
在损伤后，具有正常补体活性的大鼠显示MAC消减、丧失轴突和髓磷脂及巨噬细胞流入。



小图B：用人C6和正常补体活性重建的C6-/-大鼠中观察到的受损伤的坐骨神经
用Regenemab处理完全阻断MAC形成、轴突和髓磷脂破坏和巨噬细胞流入



小图C：用人C6重建并且用7E5大鼠处理的C6-/-大鼠没有MAC沉积和没有变性
此结果类似于当未重建C6-/-大鼠时观察到的。



小图D：C6缺陷型(-/-)大鼠中缺乏MAC沉积和快速的神经变性。

图 10