



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118184777 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202410325026.7

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2018.01.30

C07K 16/18 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/452,187 2017.01.30 US

(62) 分案原申请数据

201880008892.6 2018.01.30

(71) 申请人 亚力兄制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 道格拉斯·L·谢里登

保罗·P·腾博尼

塔妮莎·安-塔纳拉·麦克

沃尔特·C·韦格特里

(74) 专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限

公司 44658

专利代理师 王怡瑾 黄幸兒

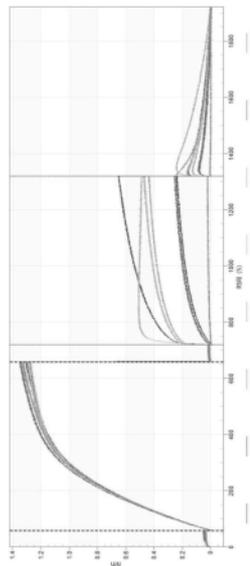
权利要求书1页 说明书35页
序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

单价抗备解素抗体及抗体片段

(57) 摘要

本文描述了结合人备解素的分离的单价抗体或其抗体片段。此类抗体可用于治疗由替代补体途径失调介导的疾病的方法。



1. 一种分离的单价抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段结合人备解素。
2. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中抗体或片段是骆驼科动物抗体。
3. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段是单结构域抗体。
4. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段结合人备解素的TSR0和/或TSR1。
5. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段结合氨基酸序列LCQPCRSPRWSLWSTWAPCSVTCSEGSQRLRYRRCVWNGQ (SEQ ID NO:8) 内的表位。
6. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段以小于50nM的亲和力结合小鼠备解素。
7. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段是人源化的。
8. 如权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段与第二单价抗体或抗体片段连接。
9. 如权利要求8所述的抗体或其片段,其中第二单价抗体或抗体片段是人源化的。
10. 如权利要求8所述的抗体或其片段,其中所述抗体或片段通过接头与第二抗体或片段连接。

单价抗备解素抗体及抗体片段

背景技术

[0001] 补体系统在清除免疫复合物和对感染因子、外来抗原、病毒感染细胞和肿瘤细胞的免疫应答中起重要作用。补体激活主要通过三种途径发生：经典途径(classical pathway)、凝集素途径(lectin pathway)和替代途径(alternative pathway)。不受控制的激活或对替代补体途径的不充分调节可导致全身性炎症、细胞损伤和组织损伤。替代补体途径涉及越来越多的多种疾病的发病机理。备解素(Properdin)通过结合和稳定C3和C5转化酶复合物(C3bBb和C3bnBb)积极调节替代补体途径激活。对备解素活性的抑制或调节是减轻症状和减缓与替代补体途径失调相关的疾病进展的重要治疗策略。对于有效调节备解素活性仍存在未满足的需求。

发明内容

[0002] 本文描述了分离的单价抗体及其抗体片段,其特异性或基本上特异性结合备解素并选择性地阻断替代补体途径激活。通过抑制备解素的功能活性,本文所述的单价抗体抑制膜攻击复合物的替代补体途径诱导的组装。此外,单个备解素分子与单价抗体的选择性结合可以减少由聚集引起的不期望的免疫复合物。因此,单个备解素单体或多聚体的选择性靶向可以反过来改善由替代补体途径失调介导的疾病患者的临床益处。

[0003] 在一个实施方案中,本发明内容涉及分离的单价抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段结合人备解素。在一个具体实施方案中,抗体或片段是骆驼科动物抗体。在特定实施方案中,抗体或片段是单结构域抗体(single-domain antibody)。在一个具体实施方案中,抗体或片段结合人备解素的TSR0和/或TSR1。在一个具体实施方案中,抗体或片段结合氨基酸序列LCQPCRSRWSLWSTWAPCSVTCSEGSQLRYYRCVGVNGQ(SEQ ID NO:8)内的表位。在一个具体实施方案中,抗体或片段以小于50nM的亲和力结合小鼠备解素。在一个具体实施方案中,所述抗体或片段包含选自以下的至少一个或所有三个CDR:a)包含氨基酸序列GRIFEVNMA(SEQ ID NO:9)的CDR-H1;b)包含氨基酸序列RVGTTX₁YADSVKG(SEQ ID NO:10)的CDR-H2,其中X₁是极性或非极性氨基酸;和c)包含氨基酸序列LQYX₂RYGGAEY(SEQ ID NO:11)的CDR-H3,其中X₂极性氨基酸。在一个具体实施方案中,CDR-H2包括氨基酸序列RVGTTVYADSVKG(SEQ ID NO:12)。在一个具体实施方案中,CDR-H3包括氨基酸序列LQYDRYGGAEY(SEQ ID NO:12)。在一个具体实施方案中,CDR-H2包括氨基酸序列RVGTTTYADSVKG(SEQ ID NO:15)。在一个具体实施方案中,CDR-H3具有氨基酸序列LQYSRYGGAEY(SEQ ID NO:14)。在一个具体实施方案中,CDR-H3具有氨基酸序列LQYDRYGGAEY(SEQ ID NO:13)。在一个具体实施方案中,CDR-H3具有氨基酸序列LQYDRYGGAEY(SEQ ID NO:13)。在一个具体实施方案中,CDR-H3具有氨基酸序列LQYSRYGGAEY(SEQ ID NO:14)。在一个具体实施方案中,所述抗体或片段包括具有以下序列的3个CDR:a)具有氨基酸序列GRISSIIHMA(SEQ ID NO:16)的CDR-H1;b)具有氨基酸序列RVGTTVYADSVKG(SEQ ID NO:12)的CDR-H2;和c)具有氨基酸序列LQYKHHGGADY(SEQ ID NO:17)的CDR-H3。在一个具体实施方案中,所述抗体包括具有以下序列的6个CDR:a)具有氨基

酸序列GYIFTNYPIH(SEQ ID NO:18)的CDR-H1;b)具有氨基酸序列FIDPGGGYDEPDERFRD(SEQ ID NO:19)的CDR-H2;c)具有氨基酸序列RGGGYLDY(SEQ ID NO:20)的CDR-H3;d)具有氨基酸序列RASQDISFFLN(SEQ ID NO:21)的CDR-L1;e)具有氨基酸序列YTSRYHS(SEQ ID NO:22)的CDR-L2;和f)具有氨基酸序列QHGTLPWT(SEQ ID NO:23)的CDR-L3。在一个具体实施方案中,所述抗体包括具有以下序列的6个CDR:a)具有氨基酸序列GFSLTTYGVH(SEQ ID NO:24)的CDR-H1;b)具有氨基酸序列VIWGGTDYNASFIS(SEQ ID NO:25)的CDR-H2;c)具有氨基酸序列NKDYTYNYDFTMDY(SEQ ID NO:26)的CDR-H3;d)具有氨基酸序列KSSQSVLYSSNQKNFLA(SEQ ID NO:27)的CDR-L1;e)具有氨基酸序列WASTRES(SEQ ID NO:28)的CDR-L2;和f)具有氨基酸序列HQYLSSYT(SEQ ID NO:29)的CDR-L3。在一个具体实施方案中,所述抗体包括具有以下序列的6个CDR:a)具有氨基酸序列GYTFIDYWIE(SEQ ID NO:30)的CDR-H1;b)具有氨基酸序列EIFPGSGTINHNEKFKD(SEQ ID NO:31)的CDR-H2;c)具有氨基酸序列EGLDY(SEQ ID NO:32)的CDR-H3;d)具有氨基酸序列SASSVSYYIY(SEQ ID NO:33)的CDR-L1;e)具有氨基酸序列DTSTLAS(SEQ ID NO:34)的CDR-L2;和f)具有氨基酸序列QQWSRNPF(TSEQ ID NO:35)的CDR-L3。在一个具体实施方案中,所述抗体包括具有以下序列的6个CDR:a)具有氨基酸序列GFSLTSYGVH(SEQ ID NO:36)的CDR-H1;b)具有氨基酸序列VIWGGSTDYNAAFIS(SEQ ID NO:37)的CDR-H2;c)具有氨基酸序列NKDFYSNYDYTMDY(SEQ ID NO:38)的CDR-H3;d)具有氨基酸序列KSSQSVLYSSNQKNFLA(SEQ ID NO:27)的CDR-L1;e)具有氨基酸序列WASTRES(SEQ ID NO:28)的CDR-L2;和f)具有氨基酸序列HQYLSSYT(SEQ ID NO:29)的CDR-L3。在一个具体实施方案中,所述抗体包括具有以下序列的6个CDR:a)具有氨基酸序列GYTXTAYGIN(SEQ ID NO:39)的CDR-H1;b)具有氨基酸序列YIYIGNGYTDYNEKFKG(SEQ ID NO:40)的CDR-H2;c)具有氨基酸序列SGWDEDYAMDF(SEQ ID NO:41)的CDR-H3;d)具有氨基酸序列RASENIYSYLA(SEQ ID NO:42)的CDR-L1;e)具有氨基酸序列HAKTLAE(SEQ ID NO:43)的CDR-L2;和f)具有氨基酸序列QHHYGPPPT(SEQ ID NO:44)的CDR-L3。在一个具体实施方案中,抗体或片段抑制人备解素的活性。

[0004] 在一个实施方案中,本公开内容涉及结合人备解素的分离的单价抗体或其抗体片段在治疗由替代补体途径失调介导的疾病的方法中,或在制备用于治疗由替代补体途径失调介导的疾病的药物中的用途。

[0005] 在一个实施方案中,本公开内容涉及治疗由替代补体途径失调介导的疾病的方法。该方法包括给予有效量的分离的单价抗体或其抗体片段的抗体,其中抗体或抗体片段将人备解素结合至有此需要的患者。在一个具体实施方案中,所述疾病是自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、IgA肾病(贝格尔病)、哮喘、C3肾小球病(C3G)、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、严重烧伤、早期败血症、皮炎、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析诱导血栓形成、大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)血管炎、视网膜变性、广泛血栓性微血管病变(TMA)、广泛TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT) TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP)综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、

急性冠状动脉综合征、失血性休克、类风湿性关节炎、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、抗磷脂综合征(APS)妊娠丢失、膜增生性(MP)肾小球肾炎、膜性肾炎、脑炎、脑损伤、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体抗体脑炎、疟疾溶血危象、腹主动脉瘤(AAA)或胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0006] 在一个实施方案中,本公开内容涉及抑制替代补体途径膜攻击复合物组装的方法。该方法包括向有此需要的患者施用有效量的抗体,抗体衍生物或其片段。在一个具体实施方案中,该方法抑制替代补体途径依赖性溶血。

[0007] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA PKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSLEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:45)。

[0008] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA PKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWFRQAPGKERELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:46)。

[0009] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA PKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGDGGGGDGGGGEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:47)。

[0010] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA PKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGEGGGGEGGGGEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:48)。

[0011] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA PKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWVRQAPGKQRELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:49)。

[0012] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA PKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGDGGGGDGGGGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWFRQAPGKERELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:50)。

[0013] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVA

APKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGEGGGEGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRISSI IHMAWFRQAP
GKERELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNALQY EKHHGADYWGQGLTVTV
SS (SEQ ID NO:51)。

[0014] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASG
RPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRV
VAPKTQYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGEGVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRISSI IHMAWVRQAP
GKQRELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNALQY EKHHGADYWGQGLTVTV
SS (SEQ ID NO:52)。

[0015] 在一些实施方案中,抗体或其片段包括以下序列:LEVQLVESGGGLV QAGGSLRLS CAAS
GRISSI IHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYE
KHGGADYWGQGTQVTVSSRKCCEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHE
ALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:53)。

[0016] 在一些实施方案中,抗体或其片段是与没有C1q结合结构域的hG1连接的LVP058抗
备解素单价抗体 V_{HH} ,并且包括以下序列:LEVQLVESGGGLV QAGGSLRLS CAASGRISSI IHMAWYRQAP
GKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQY EKHHGADYWGQGTQVTV
SSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO:54)。

[0017] 在一些实施方案中,抗体或其片段是通过(G4S)₃接头与抗白蛋白 V_{HH} 连接的LVP058
抗备解素单价抗体 V_{HH} ,并且包括以下序列:LEVQLVESGGGLV QAGGSLRLS CAASGRISSI IHMAWYRQ
APGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQY EKHHGADYWGQGTQV
TVSSGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGRVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTA
TYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRV VAPKTQYDYDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:
55)。

[0018] 定义

[0019] 如本文所用,术语“单价抗体或其抗体片段”是指抗体或其抗原结合片段,其包含
抗原的单个结合结构域,例如 V_H 或 V_{HH} ,例如单个备解素分子。在一个实施方案中,结合的抗
原分子是多聚体的一部分,例如,备解素单体的三聚体或更高级多聚体。通常,抗体,包括单
价抗体或其抗体片段,以特异性抗原的高度特异性结合。

[0020] 如本文所用,术语“单结构域抗体”定义其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白
结构域上并由其形成的分子。通常,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由不超过三
个CDR形成。单可变结构域可以例如包括轻链可变结构域序列(V_L 序列)或其合适的片段;或
重链可变域序列(例如, V_H 序列或 V_{HH} 序列)或其合适片段;只要它能够形成单个抗原结合单
位(即,基本上是单可变结构域的功能性抗原结合单位,使得单个抗原结合结构域不需要与
另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原约束单位)。

[0021] 如本文所用,术语“骆驼科动物抗体”是指衍生自骆驼科动物的抗体,例如,在骆

驼、单峰骆驼、美洲驼、羊驼或原驼中。骆驼科动物抗体与大多数其他哺乳动物的抗体不同之处在于它们缺乏轻链,因此仅包括具有完整和多样的抗原结合能力的重链(Hamers-Casterman, C. et al., Nature, 363:446-8, 1993)。

[0022] 如本文所用,术语“V_{HH}”是指缺乏轻链的单个重链可变结构域抗体。例如,V_{HH}链可以是可以在天然缺乏轻链的骆驼科或软骨鱼中发现的类型,或者是可以相应构建的合成和非免疫V_{HH}中发现的类型。每条重链包括由V-、D-和J外显子编码的可变区。V_{HH}可以是天然V_{HH}抗体,例如骆驼科动物抗体,或包含重链可变结构域的重组蛋白。

[0023] 如本文所用,术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与备解素结合的分离的抗体基本上不含污染物,例如,不结合备解素的抗体)。另外,“分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是可能干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。

[0024] 如本文所用,术语抗体或其片段,多肽或肽模拟物的“特异性结合”是与靶分子结合,所述靶分子与不是靶分子的分子的结合可测量地不同。如本文所用,特异性结合是指结合特定抗原相对于背景(“非特异性”)结合的优先级(preference)大于95%。“基本上特异性”结合是指结合特定抗原相对于背景结合的优先级大于约80%。结合可以使用多种方法测量,包括但不限于蛋白质印迹(Western blot)、免疫印迹(immunoblot)、酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay) (“ELISA”)、放射免疫测定(radioimmunoassay) (“RIA”)、免疫沉淀(immunoprecipitation)、表面等离子体共振(surface plasmon resonance)、生物层干涉测量(bio-layer interferometry)、化学发光(chemiluminescence)、荧光偏振(fluorescent polarization)、磷光(phosphorescence)、免疫组织化学分析(immunohistochemical analysis)、基质辅助激光解吸/电离飞行时间 (“MALDI-TOF”) 质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)、微量测定(microcytometry)、微阵列(microarray)、显微镜(microscopy)、荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting) (“FACS”)和流式细胞术(flow cytometry)。

[0025] 如本文所用,术语“人备解素”是指在血浆中发现的469个氨基酸的可溶性糖蛋白,其具有7个血小板反应蛋白I型重复序列(thrombospondin type I repeat) (TSR),其中N-末端结构域TSR0是截短的结构域。人备解素,53kDa蛋白质,包括信号肽(氨基酸1-28)和六个不相同的TSR重复序列,每个约60个氨基酸,如下:氨基酸80-134 (TSR1),氨基酸139-191 (TSR2),氨基酸196-255 (TSR3),氨基酸260-313 (TSR4),氨基酸318-377 (TSR5)和氨基酸382-462 (TSR6)。通过将棒状单体寡聚化(oligomerization)成环状二聚体、三聚体和四聚体形成备解素。人备解素的氨基酸序列在GenBank数据库中以下列登录号找到:对于人备解素,参见例如GenBank登录号AAA36489、NP-002612、AAH15756、AAP43692、S29126和CAA40914。备解素是替代补体激活级联(activation cascade)的正调节剂。用于备解素的已知结合配体包括C3b、C3bB和C3bBb(Blatt, A. et al., Immunol. Rev., 274:172-90, 2016)。

[0026] 如本文所用,术语“小鼠备解素(mouse properdin)”是指在血浆中发现的457个氨基酸可溶性糖蛋白,其具有7个TSR,其中N-末端结构域TSR0被截短。小鼠备解素,50kDa蛋白质,包括信号肽(氨基酸1-24)和6个不同的TSR,每个约60个氨基酸,如下:氨基酸73-130

(TSR1)、氨基酸132-187 (TSR2)、氨基酸189-251 (TSR3)、氨基酸253-309 (TSR4)、氨基酸311-372 (TSR5) 和氨基酸374-457 (TSR6)。小鼠备解素通过棒状单体的寡聚化形成环状二聚体、三聚体和四聚体。小鼠备解素的氨基酸序列例如在GenBank数据库 (GenBank登录号P11680和S05478) 中找到。

[0027] 如本文所用,术语“TSR0结构域”是指备解素的截短结构域,其在备解素的TSR1结构域之前。例如,人备解素的TSR0结构域包括氨基酸28-76。

[0028] 如本文所用,术语“TSR1结构域”是指与备解素的TSR0结构域相邻的备解素结构域。例如,人备解素的TSR0结构域包括氨基酸77-134。

[0029] 如本文所用,术语“备解素的活性”是指备解素的生物活性,包括但不限于导致C3/C5转化酶稳定性的结合相互作用。备解素最强烈地结合C3b,Bb-替代途径C3/C5转化酶,但也与C3b、C3b,B和C3b,Bb结合。一个功能是稳定C3b,Bb复合物,以允许增加的替代途径激活 (Pangburn, M., *Methods Enzymol.*, 162:639-53, 1988; Nolan, K. & Reid, K., *Methods Enzymol.*, 223:35-46, 1993)。备解素通过增加因子B与P、C3b复合物的结合来增强替代途径C3转化酶的形成。因此,备解素是补体激活的加速剂(正调节剂)。备解素还涉及通过结合靶表面并启动C3/C5转化酶形成来启动替代途径的激活 (Kemper C. & Hourcade, D., *Mol. Immunol.*, 45:4048-56, 2008)。

[0030] 如本文所用,术语“替代补体途径”是指补体激活的三种途径之一(其他途径是经典途径和凝集素途径)。替代补体途径通常由细菌、寄生虫、病毒或真菌激活,尽管据报道IgA抗体和某些IgL链也激活该途径。

[0031] 如本文所用,术语“替代补体途径失调”是指替代补体途径提供针对病原体和清除免疫复合物和受损细胞的宿主防御以及用于免疫调节的能力的任何异常。替代补体途径失调可以在液相和细胞表面发生,并且可以导致过度的补体激活或不充分的调节,两者都引起组织损伤。

[0032] 如本文所用,术语“由替代补体途径失调介导的疾病”是指由替代补体途径失调引起的身体功能、系统或器官的中断、停止或紊乱。这些疾病将受益于用本文所述的组合物或制剂治疗。在一些实施方案中,所述疾病由替代补体途径提供针对病原体和清除免疫复合物和受损细胞的宿主防御以及用于免疫调节的能力的任何异常引起。本文还包括直接或间接通过替代补体途径的一种或多种组分的失调或由替代补体途径产生的产物介导的疾病。

[0033] 如本文所用,术语“替代补体途径依赖性膜攻击复合物组装”是指由于替代补体途径活化而形成的末端复合物,并且包括补体成分C5、C6、C7、C8和C9。膜攻击复合物(MAC)的组装导致细胞裂解(lysis)。

[0034] 如本文所用,术语“替代补体途径依赖性溶血”是指通过增加的替代补体途径依赖性MAC组装和/或在红细胞上沉积介导的红细胞裂解。

[0035] 如本文所用,术语“接头”是指两个元件(例如蛋白质结构域)之间的连接。接头可以是共价键或间隔(spacer)。术语“键”是指化学键,例如酰胺键或二硫键,或由化学反应产生的任何种类的键,例如化学共轭。接头可以指两个多肽或多肽结构域之间发生的部分(例如,聚乙二醇(PEG)聚合物)或氨基酸序列(例如,3-200个氨基酸、3-150个氨基酸或3-100个氨基酸序列),用于在两个多肽或多肽结构域之间提供空间和/或灵活性。氨基酸间隔可以是多肽一级序列(primary sequence)的一部分(例如,通过多肽主链与间隔的多肽或多肽

结构域连接)。接头可包含一个或多个甘氨酸和丝氨酸残基。

附图说明

[0036] 图1描绘了使用具有模型系统的Octet™生物传感器获得的生物层干涉测量数据,其中所选择的抗备解素抗体特异性结合人备解素。该图显示了随时间的平衡解离。

[0037] 图2描绘了使用具有模型系统的Octet™生物传感器获得的生物层干涉测量数据,其中所选择的抗备解素抗体显示与小鼠备解素结合弱或不结合。该图显示了随时间的平衡解离。

[0038] 图3描绘了使用具有模型系统的Octet™生物传感器获得的生物层干涉测量数据,其中所选择的抗备解素抗体显示出与食蟹猴备解素的特异性但弱结合。该图显示了随时间的平衡解离。

[0039] 图4显示所选择的抗备解素抗体在替代补体途径溶血测定中抑制人备解素的活性。

[0040] 图5A至图5C显示通过质谱法鉴定所选择的抗备解素抗体。

[0041] 图6A和图6B显示使用备解素捕获方法结合所选择的抗备解素抗体与生物素化的备解素的结合亲和力。

[0042] 图7显示使用备解素捕获方法结合所选择的抗备解素双特异性抗体与生物素化的备解素的结合亲和力。

[0043] 图8A和图8B显示所选择的抗备解素双特异性抗体在替代补体途径溶血测定中抑制人和食蟹猴备解素的活性。抗备解素抗体用作对照。

[0044] 图9A和图9B显示选择的抗备解素双特异性抗体在替代补体途径溶血测定中抑制人和食蟹猴备解素的活性。

[0045] 图10A和图10B显示使用备解素捕获方法结合所选择的抗备解素双特异性抗体与生物素化的备解素的结合亲和力。

[0046] 图11A和图11B显示使用备解素捕获方法结合所选择的抗备解素双特异性抗体与生物素化的备解素的结合亲和力。

[0047] 图12A和图12B显示使用备解素捕获方法结合所选择的抗备解素双特异性抗体与生物素化的备解素的结合亲和力。

具体实施方式

[0048] 备解素是替代补体途径的正调节剂。本文描述了新的单价抗体,其结合单个备解素分子并且可用于治疗由替代补体途径的失调介导的疾病。本文描述的发现是,由结合一种以上备解素多聚体的二价抗体产生的免疫复合物显示出作为抑制替代补体途径的异常活化的治疗剂的毒性。本文所述的单价抗体与备解素具有1:1的结合比,并且通过设计,不能形成含有多于一种备解素多聚体的抗体/备解素聚集体,提供优于二价和多价抗体的优势。

[0049] 以下部分提供了单价抗体或抗体片段的描述,其可以施用于患有由替代补体途径失调介导的疾病的患者。

[0050] 抗备解素抗体

[0051] 本文描述了单价抗备解素抗体,抗体衍生物(例如,工程化抗体、人工程化抗体、嵌合抗体、取代抗体、人源化抗体等)及其抗体片段,其抑制备解素,替代途径的正调节剂,并且随后使C3-和C5转化酶复合物不稳定。本文描述的抗体可以抑制例如备解素结合C3b、C3Bb和C3bBb。备解素的抑制导致替代途径补体激活减少,表明患有替代途径失调疾病的患者的治疗益处,其中替代途径是超活化的。

[0052] 本文所述的抗备解素抗体可通过使用全长备解素、备解素多肽和/或使用带有抗原备解素表位的肽(例如备解素多肽的片段)来产生。可以分离备解素肽和多肽并用于产生抗体作为天然多肽、重组或合成重组多肽。用于产生抗备解素抗体的所有抗原均可用于产生单价抗体。合适的单价抗体形式及其制备方法是本领域已知的(例如,WO 2007/048037和WO 2007/059782,其全部内容通过引用并入本文)。

[0053] 抗备解素抗体可以是单克隆抗体或衍生自单克隆抗体。可通过已知技术(“Monoclonal Antibodies:A manual of techniques”Zola(CRC Press,1988);“Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications”Hurrell(CRC Press,1982),其全部内容通过引用并入本文)制备适合于所选择的抗原的单克隆抗体。

[0054] 在其他实施方案中,抗体可以是单结构域抗体,例如V_{H1}。此类抗体天然存在于骆驼科动物和鲨鱼中(Saerens,D.et al.,Curr.Opin.Pharmacol.,8:600-8,2008)。骆驼科动物抗体描述于,例如,美国专利5,759,808、5,800,988、5,840,526、5,874,541、6,005,079和6,015,695,其中的每一个的全部内容通过引用并入本文。克隆和分离的V_{H1}结构域是稳定的多肽,其特征在于原始重链抗体的完整抗原结合能力。V_{H1}结构域具有独特的结构和功能特性,结合了常规抗体(高靶特异性、高靶标亲和力和低固有毒性)的优点与小分子药物的重要特征(抑制酶和接受受体裂缝的能力)。此外,它们是稳定的,具有通过注射以外的方式施用的潜力,更容易制造,并且可以人源化(US5,840,526、US5,874,541、US6,005,079、US6,765,087、EP 1589107、WO 97/34103、WO 97/49805、US5,800,988、US5,874,541和US6,015,695,其全部内容通过引用并入本文)。

[0055] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0056] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAP GKEREFVAAIGWNGEGIYYADSVKGR FTISRDNKNTGYLQMNS LKPEDTAVYYCAADSEGVVPGFPIAYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:71)。

[0057] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0058] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPLNSYAIGWFRQAPGKEREGVSCISVSDSTYYTDSVKGRF TISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAVDSAPLYGDYVCKPLENEYDFWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:72)。

[0059] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0060] QVQLVESGGGLVQAGGSLXLSCAASGSDRRINGMGWYRHPG GKQRELVAAITSGGSTNYADSVKGRF TISTNNANMMYLLQMNSL KPEDTAVYYCAIDFEGTGWLDYCGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:73)。

[0061] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0062] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGWFRQAP GKEREIVAGLSWGGNVYYADSVKGR FTISRDNKNTGDLQMNS LKPEDTAVYYCAIGPKLTTGPTAYRYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:74)。

[0063] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0064] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGGTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGSNRYADSVKGRF TISRDNKSTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAAHSTRYSGFYYTRGETYHYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:75)。

- [0065] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0066] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSTLGMGWFRRQAPGKERQFVAAINWGSSTYYANSVKGRF
TISRDNASTMYLQMNLSKPEDTAVYYCAADLDSRYSAAYYYSDSESYDYWGQGTTLVTVSG (SEQ ID NO:76)。
- [0067] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0068] QVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWDGANIYYADSVKGRF
TLSRDNAENTVWLQLNSLKPEDTAVYYCAAAESGRYSGRDYYSAPGVVLYWGQGTTLVTVSG (SEQ ID NO:77)。
- [0069] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0070] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFDINAMGWYRQAPGKQRELVADITSSGSTNYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYTCAAESIRESQNRHQLGYMGPLYDYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:78)。
- [0071] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0072] QVQLIESGGGLVQAGDSLRLSCAASEGTFSRFAMGWFRQAPGKEREFVAAINWGGITYYADSVKGRF
TISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTADYYCAAETTTTRYSGYYYEDNKSYYDYWGQGTTLVTVSG (SEQ ID NO:79)。
- [0073] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0074] QVQVVESGGGLRQTGGSLRLSCTASGRIFEVNMAWYRQAP GKQRELVAEISRVTTVYADSVKGRF
TISRDSAKNTVTLQMNLSK SEDTAVYYCNALQYDRYGGAEYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:58)。
- [0075] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0076] QVLLVESGGGLERTGGSLRLSCAASGSIFSNSMTWYRQAPG KRREFLGTITEEGRTNYADSVKGRF
TISRDNKNTMYLQMNLSKP EDTAVYYCYANLISSEDRTFGVWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:80)。
- [0077] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0078] QVHLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTVGDYAVGWFRQAP GKERELIGVVSRLGARTGYADSVLGR
FTISRDDVKNTVFLQMDSV KPEDTAVYYCAARRDYSFEVVPYDYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:81)。
- [0079] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0080] QVQMVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTNRIRIMGWYRQAP GKLRELVATITNDGSTHYADSVKGRF
TISTDNAKNTVFLQMNLSK PEDTAVYICNVGENWGPAYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:82)。
- [0081] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0082] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPLNSYAIGWFRQAPGKEREGVSCISVSDDSTYYTDSVKGRF
TISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAVDSAPLYGDYVCKPLENEYDFWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:72)。
- [0083] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0084] QVRLTESGGGLVQYGTNLTLCVASGLISTRNKMWFRRRSG GQREFVASSTVLSDDVIQDDIAETV
KGRFAVARNDYKNILYLQMTA VKPEDTGFYWCASGTSFLFGASRREDDFNAWVGTVTVSA (SEQ ID NO:83)。
- [0085] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0086] QVQLAESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRIFEVNMAWYRQAP GKDRELVAEISRVTTTYADSVKGRF
TISRDSAKNTVTLQMNLSKS EDTAVYYCNALQYSRYGGAEYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:59)。
- [0087] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0088] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSADMSWVRQAP GKGPEWVSAINSNGGSTYYAASVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNLS LKPEDTAVYYCAQGNWYTEEYHYWGQGTTLVTVSG (SEQ ID NO:84)。
- [0089] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:
[0090] QVRLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRITLSSYAMGWFRQAPGKEREFVAATTWRDTSTYYADSVKGRF
TISRDNKNTVYLQMNLSKPEDTAAYYCAAEEPSKYSGRDYMMGDSYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:85)。

[0091] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0092] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSADMSWVRQAP GKGPEWVSAINSGGSTYYAASVKGR FTISRDNAKNTLYLQMNS LKPEDTAVYYCAQGNWYTEEYHYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:86)。

[0093] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0094] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSNYAMAWFRQAPGKEREFVASISGSGDSRYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQTNPKPEDTAVYYCAAVLPTRYSGFYYSDDGTQYHYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:87)。

[0095] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0096] QVNLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASENINVINDMGWYRQAP GKQRELVAVITGHDNINYADSATGRF TISTYTWNTENLQMNMLKP EDTAVYYCNADITYANGRFNDWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:88)。

[0097] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0098] QVHLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQPPGKEREFVAAITWGSIIYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCAAEEETSKYSGSYMMGDSYDYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:89)。

[0099] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0100] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAVPWTYGSKYADSVKGRF TISRDDAKNTVYLLQMNMLKPEDTAVYYCAADSSAGYSGFDYSAATPYDLWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:90)。

[0101] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0102] QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDYYAIGWFRQAPGK EREGVSCMSRTDGSTYYADSVKDRFT ISRDIYAKNTVYLLQMNSLK PEDTAVYYCGLDRSYPTGGISCLFGDFGWSWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:91)。

[0103] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0104] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQRH GNREFVATISWGRSTYYADSVKGR FAISRDNANTVYLLQMNSL KPEDSAVYYCAASTRGWYGTQEDDYNFWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:92)。

[0105] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0106] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPG KQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRF TISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:60)。

[0107] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0108] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVAAITWNGVSTYYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPTDTAVYYCAAEEITTRYSGFYEDNKSVDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:93)。

[0109] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0110] QVQLVESGGGLRQTGESLRLSCTASGRIFEVNMMAWYRQAP GKQRELVAEISRVGTTTYADSVKGRF TISRDSAKNTVTLQMNSLKS EDTAVYYCNALQYDRYGGAEYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:61)。

[0111] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0112] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPG KEREVSCISRTDGSTYYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLLQMNSLK PEDTAVYYCAVDDSYPTGGISCLFGHFGSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:94)。

[0113] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0114] QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGFTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVAAITWGSVSTYYADSVKGRF TISRDNAKNRVYLLQMNSLKPEDTAVYSCAADGSGRYSGMEYYNRDWWYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:95)。

[0115] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0116] QVHMLVESGGGLVQAGGSLRFSCAASGNIFTISTLDWYRQAPG EQRELVATLTPDGITDYAGSVKGRF TISRDNAKNTVYLLQMNSLKPE DTAVYYCNAWRYSDDYRGRVDYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:96)。

[0117] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0118] QVQLIESGGGLVQEGASLRLSCAGSGPMFSRLAVGWFRQAPG KEREVAVINWSGSADFYTNSVKGR FTISRDNKNTVYLEMNTLK PEDSAVYYCAADQNPLTLRTGVRDVGQRWGGTEVTVSS (SEQ ID NO:97)。

[0119] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0120] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVAAITWRGASTYYADPVKGRF TISRDNKNTVYLMQSSLPEDTAVYYCAAEEPSYSGSYMMGDSYNYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO:98)。

[0121] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列作为其重链可变结构域:

[0122] QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTFSSNYAMGWFRQAP GKEREFLAAISRSGESTNYATFVKGR FTIARDNAKNTVSLQMNSL KPEDTAVYFCAAKVAVLVSTTYNSQYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:99)。

[0123] 本文公开的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部的那些:

[0124] a. 具有氨基酸序列GRIFEVNMMA (SEQ ID NO:9)的CDR-H1;

[0125] b. 具有氨基酸序列RVGTTVYADSVKG (SEQ ID NO:12)的CDR-H2;

[0126] c. 具有氨基酸序列LQYDRYGGAEY (SEQ ID NO:13)的CDR-H3。

[0127] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部的那些:

[0128] a. 具有氨基酸序列GRIFEVNMMA (SEQ ID NO:9)的CDR-H1;

[0129] b. 具有氨基酸序列RVGTTTYADSVKG (SEQ ID NO:15)的CDR-H2;和

[0130] c. 具有氨基酸序列LQYSRYGGAEY (SEQ ID NO:14)的CDR-H3。

[0131] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部的那些:

[0132] a. 具有氨基酸序列GRIFEVNMMA (SEQ ID NO:9)的CDR-H1;

[0133] b. 具有氨基酸序列RVGTTTYADSVKG (SEQ ID NO:15)的CDR-H2;和

[0134] c. 具有氨基酸序列LQYDRYGGAEY (SEQ ID NO:13)的CDR-H3。

[0135] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部的那些:

[0136] a. 具有氨基酸序列GRISSIIHMA (SEQ ID NO:16)的CDR-H1;

[0137] b. 具有氨基酸序列RVGTTVYADSVKG (SEQ ID NO:12)的CDR-H2;和

[0138] c. 具有氨基酸序列LQYEKHGGADY (SEQ ID NO:17)的CDR-H3。

[0139] 例如在W004/041862中教导了人源化骆驼科动物V_H多肽,其教导以其整体并入本文。本领域技术人员将理解,可以修饰天然存在的骆驼科动物抗体单可变结构域多肽(例如,第45和103位的氨基酸取代(W004/041862))以产生人源化骆驼科动物V_H多肽。本文还包括作为护士鲨(nurse shark)V_H的抗体单可变结构域多肽(Greenberg, A. et al., Nature, 374:168-73, 1995;美国专利公开号20050043519)。

[0140] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部(例如,产生scFv或dAb)的那些:

[0141] a) 具有氨基酸序列GYIFTNYPIH (SEQ ID NO:18)的CDR-H1;

[0142] b) 具有氨基酸序列FIDPGGGYDEPDERFRD (SEQ ID NO:19)的CDR-H2;

[0143] c) 具有氨基酸序列RGGGYLDY (SEQ ID NO:20)的CDR-H3;

- [0144] d) 具有氨基酸序列RASQDISFFLN (SEQ ID NO:21) 的CDR-L1;
- [0145] e) 具有氨基酸序列YTSRYHS (SEQ ID NO:22) 的CDR-L2;和
- [0146] f) 具有氨基酸序列QHGNLTPWT (SEQ ID NO:23) 的CDR-L3。
- [0147] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部(例如,产生scFv)的那些:
- [0148] a) 具有氨基酸序列GFSLTTYGVH (SEQ ID NO:24) 的CDR-H1;
- [0149] b) 具有氨基酸序列VIWSGGDTDYNASFIS (SEQ ID NO:25) 的CDR-H2;
- [0150] c) 具有氨基酸序列NKDYTYNYDFTMDY (SEQ ID NO:26) 的CDR-H3;
- [0151] d) 具有氨基酸序列KSSQSVLYSSNQKNFLA (SEQ ID NO:27) 的CDR-L1;
- [0152] e) 具有氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:28) 的CDR-L2;和
- [0153] f) 具有氨基酸序列HQYLSSYT (SEQ ID NO:29) 的CDR-L3。
- [0154] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部(例如,产生scFv)的那些:
- [0155] a) 具有氨基酸序列GYTFIDYWIE (SEQ ID NO:30) 的CDR-H1;
- [0156] b) 具有氨基酸序列EIFPGSGTINHNEKFKD (SEQ ID NO:31) 的CDR-H2;
- [0157] c) 具有氨基酸序列EGLDY (SEQ ID NO:32) 的CDR-H3;
- [0158] d) 具有氨基酸序列SASSSVSYIY (SEQ ID NO:33) 的CDR-L1;
- [0159] e) 具有氨基酸序列DTSTLAS (SEQ ID NO:34) 的CDR-L2;和
- [0160] f) 具有氨基酸序列QQWSRNPFT (SEQ ID NO:35) 的CDR-L3。
- [0161] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部(例如,产生scFv)的那些:
- [0162] a) 具有氨基酸序列GFSLTSYGVH (SEQ ID NO:36) 的CDR-H1;
- [0163] b) 具有氨基酸序列VIWSGGSTDYNAAFIS (SEQ ID NO:37) 的CDR-H2;
- [0164] c) 具有氨基酸序列NKDFYSNYDYTMDY (SEQ ID NO:38) 的CDR-H3;
- [0165] d) 具有氨基酸序列KSSQSVLYSSNQKNFLA (SEQ ID NO:27) 的CDR-L1;
- [0166] e) 具有氨基酸序列WASTRES (SEQ ID NO:28) 的CDR-L2;和
- [0167] f) 具有氨基酸序列HQYLSSYT (SEQ ID NO:29) 的CDR-L3。
- [0168] 本文公开的另外的抗备解素抗体、抗体衍生物及其片段包括具有以下CDR中的一个或多个或全部(例如,产生scFv)的那些:
- [0169] a) 具有氨基酸序列GYTXTAYGIN (SEQ ID NO:39) 的CDR-H1;
- [0170] b) 具有氨基酸序列YIYIGNGYTDYNEKFKG (SEQ ID NO:40) 的CDR-H2;
- [0171] c) 具有氨基酸序列SGWDEDYAMDF (SEQ ID NO:41) 的CDR-H3;
- [0172] d) 具有氨基酸序列RASENIYSYLA (SEQ ID NO:42) 的CDR-L1;
- [0173] e) 具有氨基酸序列HAKTLAE (SEQ ID NO:43) 的CDR-L2;和
- [0174] f) 具有氨基酸序列QHHYGPPPT (SEQ ID NO:44) 的CDR-L3。
- [0175] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列:
- [0176] LEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRF
TISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSSRKCCVECPAPPVAGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

CKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:53)。

[0177] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列:

[0178] LEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVTGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:54)。

[0179] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下轻链和重链序列:

[0180] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISFFLNWFYQQKPKGKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQHGNTLPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:56);和

[0181] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYPIDHWVRQAPGQGLEWMGFIIDPGGGYDEPDERFRDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRGGGYLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLRTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:57)。

[0182] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列:

[0183] LEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVTGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:55)。

[0184] 在一些实施方案中,抗体或其抗体片段包括以下序列:

[0185] EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSLEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRVTGTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:45)。

[0186] 抗备解素抗体片段和衍生物

[0187] 一些天然存在的抗体包括两个抗原结合结构域,因此是二价的。在蛋白酶消化后已经鉴定了许多天然存在的抗体的较小抗原结合片段。这些包括,例如,“Fab片段”(V_L-C_L-C_{H1}-V_H),“Fab’片段”(具有重链铰链区的Fab)和“F(ab’)₂片段”(由重链铰链区连接的Fab’片段的二聚体)。已经使用重组方法产生这样的片段并产生甚至更小的抗体片段,例如被称为“单链Fv”(可变片段)或“scFv”的那些,其由通过合成肽接头(V_L-接头-V_H)连接的V_L和V_H组成。Fab片段、Fab’片段和scFv片段对于抗原结合是单价的,因为它们各自仅包括一个包含一个V_H/V_L二聚体的抗原结合结构域。甚至更小的单价抗体片段是dAb,其仅包括单独的免疫球蛋白可变结构域,例如V_H或V_L,其单独特异性结合抗原,即分别不需要互补的V_L或V_H结

构域。dAb独立于其他V结构域结合抗原；然而，dAb可以存在于具有其他V_H或V_L结构域的同源或异源多聚体中，其中dAb不需要其他结构域用于抗原结合，即dAb独立于另外的V_H或V_L结构域结合抗原。

[0188] 接头

[0189] 在本发明中，接头用于描述多肽或蛋白质结构域和/或相关的非蛋白质部分之间的连接或连接。在一些实施方案中，接头是至少两种多肽构建体之间的连接或连接，例如使得两种多肽构建体以串联系列彼此连接（例如，与第二多肽或单价抗体连接的单价抗体）。接头可以将一个抗体构建体的N-末端或C-末端连接到第二多肽构建体的N-末端或C-末端。

[0190] 接头可以是简单的共价键，例如肽键，合成聚合物，例如聚乙二醇（PEG）聚合物，或由化学反应产生的任何种类的键，例如化学共轭。在接头是肽键的情况下，一个蛋白质结构域的C-末端的羧酸基团可以在缩合反应中与另一个蛋白质结构域的N-末端的氨基反应以形成肽键。具体地，肽键可以通过本领域公知的常规有机化学反应由合成方法形成，或通过宿主细胞的天然产生形成，其中串联系列中编码两种蛋白质的DNA序列的多核苷酸序列（例如两种抗体构建体）可以通过宿主细胞中必需的分子机器，例如DNA聚合酶和核糖体，直接转录并翻译成编码两种蛋白质的连续多肽。

[0191] 在接头是合成聚合物例如PEG聚合物的情况下，聚合物可以在每个末端用反应性化学官能团官能化，以与两个蛋白质的连接末端的末端氨基酸反应。

[0192] 在通过化学反应制备接头（除了上述肽键之外）的情况下，化学官能团，例如胺、羧酸、酯、叠氮化物或本领域常用的其他官能团，可以合成地连接到分别是一种蛋白质的C末端和另一种蛋白质的N-末端。然后，两个官能团可以通过合成化学方法反应形成化学键，从而将两种蛋白质连接在一起。这种化学共轭方法对于本领域技术人员来说是常规的。

[0193] 在本发明中，两个肽构建体之间的接头可以是氨基酸接头，包括1-200（例如，1-4、1-10、1-20、1-30、1-40、2-10、2-12、2-16、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200）氨基酸。合适的肽接头是本领域已知的，并且包括例如含有柔性氨基酸残基的肽接头，例如甘氨酸和丝氨酸。在某些实施方案中，接头可含有GS、GGS、GGGGS（SEQ ID NO:1）、GGSG（SEQ ID NO:2）或SGGG（SEQ ID NO:3）的单个基序（motif）或多个不同或重复基序。示例性基序具有（G4S）_n、（G4D）_n、（G4E）_n、（G4A）_n的序列，其中n=1、2、3、4、5或更多，以及它们的组合。其他接头包括序列GGGGD（SEQ ID NO:63）、GGGGE（SEQ ID NO:64）和GGGGA（SEQ ID NO:100）。可以通过组合这些不同的基序来设计接头。此类接头包括GGGGSGGGSGGGGS（SEQ ID NO:4）、GGGGDGGGGDGGGG（SEQ ID NO:5）、GGGEGGGEGGGG（SEQ ID NO:6）和GGGGAGGGAGGGGS（SEQ ID NO:101）。

[0194] 双特异性构建体

[0195] 本发明的特征还在于双特异性构建体，其中两个抗原结合多肽连接（例如，通过如SEQ ID NO:1-6、63-64和100-101中任一个的接头）。此类双特异性构建体可包括通过接头与第二多肽（例如，第二单价抗体）连接的抗备解素结合多肽（例如，单价抗体）。第二多肽可以增强双特异性构建体的体内稳定性。在一些实施方案中，第二多肽是白蛋白结合分子、白蛋白结合肽或抗白蛋白抗体（例如，单价抗体），或其修饰形式。白蛋白结合肽是本领域已知的，并且描述于例如WO 2007/106120（参见表1至9）和Dennis等，2002，J Biol.Chem.277:

35035-35043,其公开内容在此引入作为参考。

[0196] 在一些实施方案中,第二多肽是Fc结构域,其增强构建体的体内稳定性。

[0197] 示例性双特异性构建体如下文实施例5中所示。

[0198] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体与单价抗白蛋白抗体连接。单价抗备解素抗体可以通过其N-末端或C-末端与单价抗白蛋白抗体的N-末端或C-末端连接。

[0199] 单价抗备解素抗体可以利用具有SEQ ID NO:1-6、63-64和100-101中任一个的氨基酸序列的接头,通过其N-末端或C-末端与单价抗白蛋白抗体的N-末端或C-末端连接。

[0200] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的单价抗备解素抗体与单价抗白蛋白抗体连接。包含SEQ ID NO:58的序列的单价抗备解素抗体可以利用具有SEQ ID NO:1-6、63-64和100-101中任一个的氨基酸序列的接头,通过其N-末端或C-末端与单价抗白蛋白抗体的N-末端或C-末端连接。

[0201] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的单价抗备解素抗体与单价抗白蛋白抗体连接。包含SEQ ID NO:59的序列的单价抗备解素抗体可以利用具有SEQ ID NO:1-6、63-64和100-101中任一个的氨基酸序列的接头,通过其N-末端或C-末端与单价抗白蛋白抗体的N-末端或C-末端连接。

[0202] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的单价抗备解素抗体与单价抗白蛋白抗体连接。包含SEQ ID NO:60的序列的单价抗备解素抗体可以利用具有SEQ ID NO:1-6、63-64和100-101中任一个的氨基酸序列的接头,通过其N-末端或C-末端与单价抗白蛋白抗体的N-末端或C-末端连接。

[0203] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的单价抗备解素抗体与单价抗白蛋白抗体连接。包含SEQ ID NO:61的序列的单价抗备解素抗体可以利用具有SEQ ID NO:1-6、63-64和100-101中任一个的氨基酸序列的接头,通过其N-末端或C-末端与单价抗白蛋白抗体的N-末端或C-末端连接。

[0204] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:4的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0205] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:5的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0206] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:6的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0207] 在一些实施方案中,双特异性构建体包括SEQ ID NO:45-55和62中任一个的氨基酸序列。

[0208] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:1的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0209] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:2的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0210] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:3的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0211] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:4的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0212] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:5的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0213] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:6的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0214] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:63的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0215] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:64的序列的接头,在其N-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0216] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:1的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0217] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:2的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0218] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:3的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0219] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:4的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0220] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:5的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0221] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:6的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0222] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:63的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0223] 在一些实施方案中,单价抗备解素抗体利用包含SEQ ID NO:64的序列的接头,在其C-末端与单价抗白蛋白抗体连接。

[0224] 单结构域抗体的产生

[0225] 在一个实施方案中,组合物和方法使用单结构域抗体,其是重链可变结构域(V_H ,例如 V_{HH})或轻链结构域(V_L)。因此,产生对备解素特异的单价单结构域抗体的一种方法是扩增和表达重链和轻链基因序列的 V_H 和 V_L 区,例如,从表达抗备解素单克隆抗体的杂交瘤(例如,小鼠杂交瘤)中分离的基因序列。例如,Kabat等人提出了 V_H 和 V_L 结构域的边界(Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。关于重链和轻链基因的 V_H 和 V_L 结构域的边界的信息用于设计PCR引物,其从编码已知结合备解素的抗体的重链或轻链编码序列扩增V结构域。将扩增的V结构域插入合适的表达载体,例如pHEN1(Hoogenboom,H.et al.,Nucleic Acids Res.,19:4133-7,1991),以及表达例如scFv或其他合适的单价形式的 V_H 和 V_L 的融合体。然后可以筛选与备解素高亲和力单价结合的结果多肽。结合筛选可以通过已知的方法进行。可以使用本领域已知的方法产生单结构域抗体(WO2005118642;Ward,E.等,Nature,341:544-6,1989;Holt,L.等,Trends Biotechnol.,21:484-90,2003)。每个轻链结构域可以是 κ 或 λ 亚组。分离 V_H 和 V_L 结构域的方法已经在现有技术(EP0368684)中被描述。

[0226] 在一个实施方案中,单结构域抗体获自人、人源化啮齿动物、骆驼科动物或鲨鱼。

任何此类单结构域抗体可任选地人源化。骆驼科动物单结构域抗体的人源化需要在单一多肽链中引入和诱变有限数量的氨基酸。这与scFv、Fab、F(ab')₂和IgG的人源化形成对比,其需要在两条链即轻链和重链中引入氨基酸变化,以及保持两条链的组装。在一些实施方案中,单结构域抗体包括V_H结构域。在一些实施方案中,V_H结构域对应于针对备解素的天然存在的重链抗体的V_H结构域。例如,通过用备解素适当地免疫一种骆驼科动物(即,以便产生针对备解素的免疫应答和/或重链抗体),通过从所述骆驼科动物获得合适的生物样品(例如,血液样品、血清样品或B细胞样品),并且通过使用本领域已知的任何合适技术从所述样品开始产生针对备解素的V_H序列(例如,编码单结构域抗体的基因可以通过单细胞PCR克隆,或者编码单结构域抗体的B细胞可以通过EBV转化永生,或通过永生细胞系融合),可以产生这样的V_H序列。

[0227] 或者,这种天然存在的针对备解素的V_H结构域可以从骆驼科动物V_H序列的天然文库(naive library)获得,例如使用本领域已知的一种或多种筛选技术使用备解素或至少一部分片段、抗原决定簇或其表位筛选这样的文库(WO 99/37681,WO 01/90190,WO 03/025020和WO 03/035694)。或者,可以使用来自天然V_H文库的改进的合成或半合成文库,例如通过诸如随机诱变和/或CDR改组(shuffling)(WO 00/43507)的技术从天然V_H文库获得的V_H文库。在某个实施方案中,构建V_H文库并在用辅助噬菌体感染后在噬菌体上表达。在几轮生物淘选(bio-panning)后,可以分离并有效表达针对人备解素的单结构域抗体。

[0228] 可以在噬菌体、噬菌粒、核糖体或合适的微生物(例如酵母)上展示包括V_H或V_H片段的融合蛋白文库,以促进筛选。用于展示和筛选(组、集合或文库)融合蛋白(包括V_H或V_H片段)的合适方法、技术和宿主生物是本领域已知的(WO 03/054016;Hoogenboom,H.,Nat.Biotechnol.,23:1105-16,2005)。

[0229] 在另一个实施方案中,产生包括V_H或V_H片段序列的融合蛋白的方法至少包括以下步骤:a)提供源自表达免疫球蛋白序列的一种骆驼科动物的细胞的集合或样品;b)筛选细胞的集合或样品,用于(i)表达可结合和/或对备解素具有亲和力的免疫球蛋白序列的细胞;(ii)表达重链抗体的细胞,其中子步骤(i)和(ii)可以基本上作为单个筛选步骤或以任何合适的顺序作为两个单独的筛选步骤进行,以提供至少一种表达重链抗体的细胞,所述重链抗体可以与备解素结合和/或具有对备解素的亲和力;以及c)任选(i)从细胞中分离重链抗体中存在的V_H序列;或(ii)从细胞中分离编码重链抗体中存在的V_H序列的核酸序列,然后表达V_H结构域。

[0230] 产生针对备解素的氨基酸序列的方法可以包括至少以下步骤:a)提供编码重链抗体或V_H序列的核酸序列的组、集合或文库;b)筛选编码重链抗体或融合蛋白的核酸序列的组、集合或文库,所述融合蛋白包括可结合和/或具有对备解素的亲和力的V_H序列;以及c)分离核酸序列,然后分别表达重链抗体中存在的V_H序列或表达包含V_H序列的融合蛋白。

[0231] 从天然存在的V_H序列或V_H序列开始用于获得单结构域抗体和/或编码其的核酸的其他合适方法和技术可以例如包括组合一种或多种天然存在的V_H序列的一个或多个部分(例如作为一个或多个框架区(FR)序列和/或CDR序列),一个或多个天然存在的V_H序列的一个或多个部分(例如一个或多个框架区序列或CDR序列),和/或一个或多个合成的或半合成的序列,以合适的方式,以提供单价抗备解素单结构域抗体或编码其的核苷酸序列或核酸。

编码 V_{HH} 框架序列或单结构域抗体的核苷酸序列是本领域已知的,并且可替代地从使用本文所述方法获得的核苷酸序列开始获得聚合酶链式反应(PCR)。此类组合物可以适当地与编码所需CDR的核苷酸序列组合(例如,通过使用重叠引物的PCR组装),以提供单结构域抗体,或与替代补体途径或其片段的调节剂融合的抗体片段。

[0232] 抗体片段的产生

[0233] 可以通过已知技术产生识别与亲本抗体(parent antibody)相同的表位的抗体片段。例如,抗体片段可以通过抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌中表达编码片段的DNA来制备。抗体片段是抗体的抗原结合部分,例如Fab、 $F(ab')_2$,并且scFV可以通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶通过常规方法或通过基因工程技术消化完整抗体来获得。

[0234] 可以通过用胃蛋白酶酶促切割(enzymatic cleavage)抗体来产生抗体片段,以提供表示为 $F(ab')_2$ 的100kDa片段。可以使用硫醇还原剂和任选的由二硫键断裂产生的巯基的保护基(blocking group)进一步裂解该片段,以产生50kDa的Fab'单价片段。或者,使用木瓜蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价Fab片段和Fc片段(美国专利号:4,036,945和4,331,647;Nisonoff,A.等人,Arch.Biochem.Biophys.,89:230-44,1960;Porter,R.,Biochem.J.,73:119-26,1959;Edelman等,in Methods in Enzymology Vol.I,第422页(Academic Press 1967),和Coligan等,Current Protocols in Immunology,Vol.1,第2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4页(John Wiley&Sons 1991))。

[0235] 也可以使用其他切割抗体的方法,例如分离重链以形成单价轻链重链片段,进一步切割片段,或其他酶、化学或遗传技术,只要片段与识别的抗原结合即可,所述抗原被完整的抗体识别。

[0236] 另一种形式的抗体片段是编码单个互补决定区(CDR)的肽。可以通过构建编码目标抗体的CDR的基因来获得CDR肽。例如,通过使用聚合酶链式反应从抗体产生细胞的RNA合成可变区来制备这样的基因(Larrick,J&Fry,K.METHODS-a companion to Methods in Enzymology Volume:New Techniques in Antibody Generation,2:106-110,1991);Courtenay Luck,“Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”,在Monoclonal Antibodies:Production,Engineering and Clinical Application中,Ritter等(编辑),第166-179页(剑桥大学出版社,1995年);和Ward等人,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,”在Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等(编辑),第137-185页(Wiley-Liss,Inc.1995))。

[0237] 其他抗体片段,例如单结构域抗体片段,是本领域已知的,并且可以用于要求保护的构建体中(Muyldermans,S.等,Trends Biochem.Sci.,26:230-5,2001;Yau,K.等,J.Immunol.Methods,281:161-75,2003;Maass,D.等,J.Immunol.Methods,324:13-25,2007)。 V_{HH} 可能具有有效的抗原结合能力,并且可以与常规 V_H-V_L 对不可接近的新表位相互作用。骆驼科动物可以用已知的抗原(例如备解素)免疫,并且可以分离结合并中和靶抗原的 V_{HH} 。

[0238] 筛选用于抗原结合的单价抗体

[0239] 文库筛选方法可用于鉴定单价备解素特异性结合抗体或片段。噬菌体展示技术提供了从大量不同的抗体库中选择结合所需靶标(例如人备解素)的抗体的方法(Smith,G.,Science,228:1315-7,1985;Scott,J.&Smith,G.,Science,249:386-90,1990;McCafferty,

J. et al., Nature, 348:552-4, 1990)。这些噬菌体抗体文库可以分为两类：使用从人B细胞收获的重排V基因的天然文库 (Marks, J. et al., J. Mol. Biol., 222:581-97, 1991; Vaughan, T. et al., Nat. Biotechnol., 14:309-14, 1996) 或合成文库, 其中种系V基因区段或其他抗体多肽编码序列在体外“重排” (Hoogenboom, H. & Winter, G., J. Mol. Biol., 227:381-8, 1992; Nissim, A. et al., EMBO J., 13:692-8, 1994; Griffiths, A. et al., EMBO J., 13:3245-60, 1994; de Kruif, J. et al., J. Mol. Biol., 248:97-105, 1995) 或其中合成的CDR被整合到单个重排的V基因中 (Barbas, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-61, 1992)。涉及遗传展示包装 (例如噬菌体展示、多核糖体展示) 的方法适合于选择单价解素特异性抗体构建体, 因为它们通常仅在展示包装上表达单价片段而不是整个二价抗体。用于制备展示各种抗体片段的噬菌体展示文库的方法描述于前述参考文献中, 并且例如, 描述于美国专利No. 6,696,245, 其全部内容通过引用并入本文。

[0240] 在噬菌体表面上表达单结构域抗体库之后, 通过使噬菌体库与固定的靶抗原 (例如, 备解素) 接触, 洗涤以除去未结合的噬菌体和繁殖 (propagate) 结合的噬菌体来进行选择, 整个过程经常进行被称为“淘选” (panning)。该过程适用于筛选可在展示文库 (例如 scFv、Fab、(Fab')₂ 和 V_H, Harrison, J. et al., Meth. Enzymol., 267:83-109, 1996) 上表达的单价单结构域抗体和抗体片段。或者, 通过淘选仅被折叠成员结合的固定化通用配体 (例如, 蛋白A或蛋白L), 预先选择噬菌体以表达正确折叠的成员变体 (WO 99/20749)。这具有降低非功能性成员的比例的优点, 从而增加了可能结合靶抗原的成员的比例。噬菌体抗体文库的筛选通常描述于例如。

[0241] 筛选通常使用固定在固体支持物 (例如塑料管或孔) 上的纯化抗原或色谱基质 (例如 Sepharose™ (Pharmacia)) 进行。筛选或选择也可以在复杂的抗原上进行, 例如细胞表面 (Marks, J. et al., Biotechnology (NY), 11:1145-9, 1993; de Kruif, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:3938-42, 1995)。另一种选择涉及通过在溶液中结合生物素化抗原进行选择, 然后在链霉亲和素包被的珠子上捕获。V_H 编码序列是本领域已知的并且可以用于构建骆驼科动物 V_H 噬菌体展示文库, 其可以通过本领域已知的生物淘选技术用于抗体片段分离。

[0242] 抗备解素抗体的表达

[0243] 核酸的操作可以在重组载体中进行。如本文所用, “载体”是指用于将异源DNA引入细胞以进行其表达和/或复制的离散元件。选择或构建并随后使用此类载体的方法是本领域技术人员已知的。许多载体是公众可获得的, 包括细菌质粒、噬菌体、人工染色体和附加型载体。这些载体可用于简单克隆和诱变。选择载体以适应所需大小的多肽编码序列。在体外克隆操作后, 用载体转化合适的宿主细胞。每个载体含有各种功能组分, 其通常包括克隆 (或“多位点人工接头” (polylinker)) 位点和复制起点。表达载体可以进一步包含以下一种或多种: 增强子元件、启动子、转录终止和信号序列——各自位于克隆位点附近, 使得它们与编码多肽的基因可操作地连接。

[0244] 克隆和表达载体通常都含有使载体能够在一种或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。通常, 克隆载体包含使载体能够独立于宿主染色体DNA复制的序列元件, 并包括复制起点或自主复制序列。已知这些序列可用于多种细菌、酵母和病毒。

[0245] 对于本文所述的筛选文库, 载体可以是能够表达多肽文库成员的表达载体。通过

单独繁殖和表达表达多肽文库成员的单个克隆或通过使用任何选择展示系统进行选择。对于噬菌体展示,可以使用噬菌体或噬菌粒载体。噬菌粒载体具有大肠杆菌复制起点(用于双链复制)以及噬菌体复制起点(用于产生单链DNA)。

[0246] 单价抗体的纯化和浓缩

[0247] 根据已知方法收获并纯化分泌到周质空间或细菌培养基中的单价抗体(Skerra, A.&Plückthun, A. (Science, 240:1038-41, 1988)和Breitling, F.等人(Gene, 104:147-53, 1991)描述了来自周质的抗体多肽的收获;Better, M.等人(Science, 240:1041-3, 1988)描述了从培养物上清液中收获。对于一些抗体多肽,通过与通用配体(例如蛋白A或蛋白L)结合也可以实现纯化。或者,可变结构域可以用肽标签表达,例如Myc、HA或6×His标签,其促进通过亲和色谱法的纯化。如果需要,可以通过本领域熟知的几种方法中的任何一种浓缩单价抗备解素抗体,包括例如超滤、渗滤和切向流过滤。超滤过程使用半透膜和压力基于大小和形状分离分子种类。通过气体压力或通过离心提供压力。通过选择小于目标抗体的分子量截止值(通常为目标多肽的分子量的1/3至1/6),当溶剂和较小的溶质通过膜时,保留抗备解素抗体。

[0248] 药物组合物、剂量和给药

[0249] 本文描述的抗体可以掺入适合施用于受试者的药物组合物中。通常,药物组合物包括单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段和药学上可接受的载体。如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。术语“药学上可接受的载体”不包括含有牛或马血清的组织培养基。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等中的一种或多种,以及它们的组合。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。药学上可接受的物质包括少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强抗体的保质期或有效性。

[0250] 如本文所述的组合物可以具有多种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如可注射和可输注溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。最终形式取决于预期的给药方式和治疗应用。典型的组合物是可注射或可输注溶液的形式,例如与用于用其他抗体被动免疫人的组合物相似的组合物。组合物可通过例如肠胃外注射(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)递送。

[0251] 治疗组合物通常必须在制造和储存条件下是无菌和稳定的。该组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或适于高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液可以通过将所需量的单价抗备解素拮抗剂与上面列举的成分中的一种或组合(如果需要)掺入适当的溶剂中,然后过滤除菌来制备。通常,通过将单价抗备解素拮抗剂掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基础分散介质和来自上面列举的那些的所需其他成分。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,其产生活性成分的粉末加上来自其先前无菌过滤溶液的任何其他所需成分。例如,通过使用诸如卵磷脂的涂层,通过在分散的情况下保持所需的粒度和通过使用表面活性剂,可以保持溶液的适当流动性。

[0252] 本文所述的抗体可通过本领域已知的多种方法施用,但对于许多治疗应用,优选的施途径/方式是静脉内注射或输注。多肽也可以通过肌肉或皮下注射给药。

[0253] 如本领域技术人员所理解的,给药途径和/或方式将根据所需结果而变化。在某些实施方案中,抗体可以用载体制备,所述载体将保护抗体免于快速释放,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。单价单结构域抗体适于作为延长释放制剂配制,部分原因在于它们的小尺寸——每剂量的摩尔数可显著高于例如全尺寸抗体的剂量。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。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,可以实现可注射组合物的延长吸收。用于制备此类制剂的许多方法是本领域技术人员已知的(例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978)。适用于抗体(例如本文公开的单价单结构域抗体)的受控或延长释放的方法是已知的(美国专利号:6,306,406和6,346,274;美国专利申请号:US20020182254和US20020051808,其各自的全部教导通过引用并入本文)。

[0254] 在某些实施方案中,单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段可以口服给药,例如,用惰性稀释剂或可同化的食用载体。为了通过除肠胃外给药之外的方法给予本文所述的组合物,可能需要用化合物包被化合物或与化合物共同给药以防止其失活。

[0255] 另外的活性化合物也可以掺入组合物中。在某些实施方案中,单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段与一种或多种另外的治疗剂共同配制和/或共同施用。例如,单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段可以与一种或多种结合其他靶标的其他抗体(例如,结合替代补体途径的调节剂的抗体)共同配制和/或共同施用。这种组合疗法可以使用较低剂量的所施用的治疗剂,从而避免与各种单一疗法相关的可能的毒性或并发症。另外,本文所述的组合物可与其他治疗剂共同配制或共同施用,以改善施用本文所述组合物的副作用(例如,使免疫受损环境中感染风险最小化的治疗剂,例如抗细菌剂、抗真菌剂和抗病毒剂)。

[0256] 药物组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的单价抗备解素拮抗剂(例如,抗体或其衍生物或片段)。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量的抗体可以根据诸如疾病状态、年龄、性别和个体体重等因素以及单价抗备解素拮抗剂在个体中引发所需反应的能力而变化。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现所需预防结果的量。在一些实施方案中,预防剂量在疾病之前或疾病的早期阶段用于受试者,其中预防有效量将小于治疗有效量。

[0257] 可以调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如,治疗或预防反应)。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用几个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物是有利的,以便于给药和剂量均匀。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单元含有预定量的活性化合物,经计算可产生与所需药物载体相关的所需治疗效果。应注意,剂量值可随待缓解的病症的类型和严重程度而变化。应进一步理解,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用临床医师的专业判断随时间调整特定剂量方案。

[0258] 治疗或预防有效量的单价抗备解素抗体,抗体衍生物或其片段的非限制性范围是0.1-20mg/kg,更优选1-10mg/kg。应注意,剂量值可随待缓解的病症的类型和严重程度而变化。应进一步理解,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用临床医师的专业判断随时间调整特定剂量方案。

[0259] 本领域技术人员基于所治疗的疾病状态或病症的一种或多种症状或指标的改善

来判断用本文所述的单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段治疗的功效。在一个或多个临床指标中,至少10% (增加或减少,取决于所测量的指标) 的改善被认为是“有效治疗”,尽管更好的改善是优选的,例如20%,30%,40%,50%,75%,90%,甚至100%,或者,取决于所测量的指标,超过100% (例如,两倍、三倍、十倍等,直至并包括达到无疾病状态)。

[0260] 单价抗备解素抗体的使用

[0261] 本文所述的组合物可用于治疗需要这种治疗的个体中由替代补体途径功能障碍介导的疾病或病症的方法,该方法包括向个体施用治疗有效量的包含单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段的组合物,优选包含结合人备解素的单个人免疫球蛋白可变结构域的组合物。在一个实施方案中,本文所述的单价抗备解素抗体、抗体衍生物或其片段可用于通过抑制哺乳动物(例如人)中的替代补体途径激活来治疗由替代补体途径失调介导的疾病。此类病症包括但不限于系统性红斑狼疮和狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、抗磷脂(aPL) Ab综合征、肾小球肾炎、阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH) 综合征、炎症、器官移植、肠和肾I/R损伤、哮喘(例如重症哮喘)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、自发性胎儿丢失、DDD、黄斑变性、TTP、IgA肾病(贝格尔病)、C3肾小球病(C3G)、戈谢病、化脓性汗腺炎、白塞病、皮炎、严重烧伤、早期败血症、肺炎球菌性脑膜炎、阿尔茨海默病、癌症转移、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ACI)、输血相关性肺损伤(TRALI)、血液透析诱导血栓形成、大疱性表皮松解症(EBA)、葡萄膜炎、帕金森病、原发性胆道闭锁、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA) 血管炎、视网膜变性、广泛血栓性微血管病变(TMA)、广泛TMA(APS)、造血干细胞疗法(HSCT) TMA、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先兆子痫、溶血、肝酶升高、低血小板(HELLP) 综合征、多发性硬化症、抗磷脂综合征(APS)、复发性多软骨炎、缺血性损伤、中风、移植物抗宿主病(GvHD)、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺气肿、动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、失血性休克、透析(心血管风险)、心血管疾病、胎盘疟疾、APS妊娠丢失、膜增生性(MP) 肾小球肾炎、膜性肾炎、脑炎、脑损伤、NMDA受体抗体脑炎、疟疾溶血危象、腹主动脉瘤(AAA) 和胸腹主动脉瘤(TAA)。

[0262] 实施例

[0263] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何进行,制备本文要求保护的方法和化合物的公开内容和描述。它们旨在纯粹是示例性的,并不旨在限制本公开的范围。

[0264] 实施例1. V_H-His融合克隆(in-fusion cloning) 载体的产生

[0265] 用限制酶BstEII和EcoRI消化pBNJ391载体以除去铰链和Fc。将载体凝胶纯化,产生1000bp的释放产物。将退火的寡核苷酸UDEC6629/6630用BstEII/EcoRI克隆到pBNJ391载体中。退火的寡核苷酸含有以下序列:

[0266] UDEC 6629正向引物:

[0267] GTCACCGTGTGCGCCATCATCACCATCATCACTGATGAG (SEQ ID NO:65)

[0268] UDEC 6630反向引物:

[0269] AATTCTCATATTTGTCATCATCATCCTTATAGTCGCTCGACACG (SEQ ID NO:66)

[0270] 最终的载体含有BstEII-6×His-EcoRI位点。

[0271] 接下来,用XhoI/BstEII (产生13bp释放产物) 消化pNGH0320载体并进行柱纯化。接下来,使用V_H噬菌体克隆模板PCR扩增插入物。使用正向引物UDEC 6438 (GTCCACTCCCTCGAG GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG; SEQ IDNO:67) 和反向引物UDEC 6442 (GCTCGACACGGTGACCTGGGTC CCCTGGCCCA; SEQ ID NO:68)。纯化PCR产物,随后以In-Fusion方案用于克隆。

[0272] 用BstEII/EcoRI (50ng/ μ L) 消化pBNJ391载体。使用TE缓冲液将两种互补寡核苷酸以相同的摩尔浓度重悬。将等体积的两种互补寡核苷酸(等摩尔浓度)在1.5mL管中混合。将管置于90-95 $^{\circ}$ C的标准加热块中3-5分钟。将管从设备中取出并冷却至室温(或至少低于30 $^{\circ}$ C)。将管储存在冰上或4 $^{\circ}$ C下直至进一步使用。

[0273] 混合1 μ L插入DNA(来自用于连接的上述核苷酸至pBNJ391)、2 μ L的pBNJ391(EcoRI/BstEII,100ng)、1 μ L的10 \times 连接酶缓冲液(NEB B0202S批号:1091410)、1 μ L的T4 DNA连接酶(NEB M0202L批号:0671502)以及5 μ L水形成连接反应。将连接反应在室温下温育30分钟。将1 μ L连接反应物转化到30 μ L的DH10化学感受态细胞(InVitrogen 18297Lot#1552241)中,并加入750 μ L的SOC(NEBB9020S Lot#2971403)。将管在37 $^{\circ}$ C下振荡1小时,并将10 μ L和100 μ L接种在LB碳水化合物/葡萄糖平板上。将板在室温下周末温育。

[0274] 挑取菌落用于PCR以将6x His插入pNGH0320中。筛选8个菌落,并将pBNJ391用作阴性对照。将300 μ L的TB/Carb/葡萄糖培养基加入到分离的菌落中并在37 $^{\circ}$ C下生长。使用正向引物UDEC5276(CATAATAGCTGACAGACTAACAGACTG;SEQ ID NO:69)和反向引物UDEC1977(CGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGT;SEQ ID NO:70)。对于20 μ LPCR反应,将来自单个菌落的DNA加入10 μ L的GoTaq Green PCR Mix、0.2 μ L正向引物(100 μ M)、0.2 μ L反向引物(100 μ M)和9.6 μ L的H₂O中,总计20 μ L。PCR条件如下:95 $^{\circ}$ C3分钟,95 $^{\circ}$ C20秒,50 $^{\circ}$ C20秒和72 $^{\circ}$ C1分15秒。将该循环重复30次,然后在72 $^{\circ}$ C下孵育5分钟,并在4 $^{\circ}$ C下孵育直至进一步使用。将5 μ L的PCR产物与15 μ L水混合并在2%E-凝胶上电泳。两个克隆与预测的大小匹配。使用具有Promega maxi制备试剂盒的过夜培养基进行Plasmid maxi制备。

[0275] 为了使用V_{HH}融合连接到pNGH0320中以V_{HH}-His标签形式克隆抗备解素V_{HH}抗体,使用PCR产生具有UDEC 6438-融合正向引物和UDEC 6442-融合反向引物的V_{HH}插入物,用于扩增V_H噬菌粒来自具有XhoI位点的Llama抗备解素文库pLNJ通过融合克隆到pNGH0317中。对于60 μ L的PCR反应,30 μ L2 \times phusion PCR混合物(NEB M0531s批号:0211412),1 μ L细菌培养物,0.1 μ L正向引物UDEC 6438(100 μ M),0.1 μ L反向引物UDEC 6442(100 μ M)和28.8 μ L H₂O,总计20 μ L。PCR条件如下:98 $^{\circ}$ C3分钟,98 $^{\circ}$ C10秒,52 $^{\circ}$ C15秒,72 $^{\circ}$ C30-60秒,然后72 $^{\circ}$ C5分钟。将该循环重复30次并保持在4 $^{\circ}$ C直至进一步使用。将5 μ LPCR产物与15 μ L水混合,并在2%E-凝胶上电泳。所有克隆都与预测的大小相匹配。根据制造商的说明,将克隆合并并在8个反应中并使用Promega Wizard[®]SV Gel和PCR Clean-Up System进行柱纯化。使用具有Promega maxi制备试剂盒的过夜培养基进行Plasmid maxi制备。

[0276] 对于插入物的连接,2 μ L的5 \times In-Fusion HD酶预混物(Clontech 639650批次:1501713A),2.5 μ L的载体pNGH0320(XhoI/BstEII)39.1ng/ μ L(100ng),1 μ L纯化的PCR片段(10-200ng),4.5 μ L水形成连接反应。将连接反应在50 $^{\circ}$ C温育15分钟。

[0277] 为了转化,在使用前将Stellar[™]感受态细胞(Clontech)在冰浴中解冻。解冻后,将细胞轻轻混合以确保均匀分布,然后将50 μ L感受态细胞移入14mL圆底管(falcon管)中。向细胞中加入1 μ L(小于5ng DNA)。将管置于冰上30分钟。接下来,在42 $^{\circ}$ C下将细胞热激45秒。然后将管置于冰上1-2分钟。添加SOC培养基以使最终体积达到500 μ L(使用前将SOC培养基温热至37 $^{\circ}$ C)。将管在37 $^{\circ}$ C下振荡(160 \pm 225rpm)的同时温育1小时。然后将10 μ L溶液置于含有羧苄青霉素的LB平板上。将平板在37 $^{\circ}$ C温育过夜。

[0278] 进行菌落PCR筛选以插入每个库的24个V_{HH}菌落。每个库共挑选48个克隆。载体

pNGH0320.1用作阳性对照。使用正向引物UDEC5276和反向引物UDEC1977。对于20 μ L的PCR反应,将来自单个菌落的DNA添加至10 μ L的GoTaq Green PCR Mix、0.2 μ L正向引物(100 μ M)、0.2 μ L反向引物(100 μ M)和9.6 μ L的H₂O,总计20 μ L。PCR条件如下:95 $^{\circ}$ C3分钟,95 $^{\circ}$ C20秒,50 $^{\circ}$ C20秒和72 $^{\circ}$ C1分15秒。重复30个循环,然后在72 $^{\circ}$ C下保持5分钟,并保持4 $^{\circ}$ C直至进一步使用。将5 μ L的PCR产物与15 μ L水混合,并在2%E-凝胶上电泳。对所有48个克隆进行序列分析。

[0279] 初步筛选免疫偏倚的美洲驼V_{HH}噬菌体展示文库结果鉴定出结合备解素的ELISA阳性的192个V_{HH}。克隆了57个V_{HH}并用6 \times 组氨酸标签表达。其中,34个V_{HH}是Octet阳性的结合备解素。总结如下表1所示。

[0280] 表1. 筛选试验总结

	h-fP 筛选		小鼠和人 fP 的交叉反应筛选		猴子和人 fP 的交叉反应筛选	
	标准程序	NGS	标准程序	NGS	标准程序	NGS
ELISA 阳性	193		233		284	
[0281] 单一序列(在 CDR-H3 中>3个不同的氨基酸)	72	NA	134	NA	90	NA
克隆和表达(用 6 \times 组氨酸)	57	NA	NA	NA	NA	NA
Octet 阳性	34	NA	NA	NA	NA	NA
溶血阳性(通过使用纯化的	4	NA	NA	NA	NA	NA
[0282] V _{HH})						

[0283] 发现四种功能性V_{HH}有效抑制替代补体途径介导的溶血,如下表2所示。

[0284] 表2. 抗备解素V_{HH}序列

克隆 ID	V _{HH} 序列
AB005	QVQVVESGGGLRQTGGSLRLSCTASGRIFEVNMMAWYRQAPGKQRELVAEIS RVGTTVYADSVKGRFTISRDSAKNTVTLQMNSLKSEDTAVYYCNALQYDRYG GAEYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 58)
AB006	QVQLAESGGGLVQAGDSLKLSCTASGRIFEVNMMAWYRQAPGKDRELVAEIS RVGTTTYADSVKGRFTISRDSAKNTVTLQMNSLKSEDTAVYYCNALQYSRYG GAEYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 59)
AB007	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYRQAPGKQRELVAEISRV GTTVYADSVKGRFTISRDDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGA DYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 60)
AB008	QVQLVESGGGLRQTGESLRLSCTASGRIFEVNMMAWYRQAPGKQRELVAEISR VGTTTYADSVKGRFTISRDSAKNTVTLQMNSLKSEDTAVYYCNALQYDRYGG AEYWGQGTQVTVSG (SEQ ID NO: 61)

[0286] 实施例2. 抗备解素V_{HH}抗体与人备解素的结合

[0287] 图1显示动力学结合测量可以在Octet仪器 (FortéBio Inc.) 上进行。所有洗涤、稀释和测量均在动力学缓冲液 (FortéBio cat 185032) 中进行, 平板以1000rpm振荡。将链霉亲和素生物传感器 (Forté Bio Cat:18-5019lot:1405301) 在动力学缓冲液中平衡10分钟, 然后加载50nm生物素化的人备解素。对于结合期, 将10 μ g/mL的选择的抗备解素抗体或动力学缓冲液空白分别加入预装有生物素化的人备解素的生物传感器中。结果显示AB005、AB006、AB007和AB008与人备解素结合。

[0288] 图2显示可以在Octet仪器 (FortéBio Inc) 上进行动力学结合测量。所有洗涤、稀释和测量均在动力学缓冲液 (FortéBiocat185032) 中进行, 平板以1000rpm振荡。将链霉亲和素生物传感器 (FortéBio cat 185032lot:1405301) 在动力学缓冲液中平衡10分钟, 然后加载50nm生物素化的小鼠备解素。对于结合期, 将10 μ g/mL的选择的抗备解素抗体或动力学缓冲液空白分别加入预装有生物素化的人备解素的生物传感器中。结果显示AB005、AB006、AB007和AB008的结合很弱或没有结合。

[0289] 图3显示可以在Octet仪器 (FortéBio Inc.) 上进行动力学结合测量。所有洗涤、稀释和测量均在动力学缓冲液 (FortéBio cat 185032) 中进行, 平板以1000rpm振荡。将链霉亲和素生物传感器 (Forté Bio Cat:18-5019lot:1405301) 在动力学缓冲液中平衡10分钟, 然后加载50nm生物素化的食蟹猴备解素。对于结合期, 将10 μ g/mL的所选抗备解素抗体或动力学缓冲液空白分别加入预装有生物素化的人备解素的生物传感器中。结果显示AB005、AB006、AB007和AB008与食蟹猴备解素弱结合。

[0290] 实施例3替代补体溶血测定

[0291] 图4显示了基于在兔红细胞 (rRBC) 表面上形成末端补体复合物的替代补体途径介

导的溶血测定。由于该复合物的形成，rRBC被裂解。预期抑制补体复合物形成的药剂会抑制细胞裂解。测试各种抗备解素抗原结合片段以评估由替代补体激活介导的对细胞裂解的影响。通过用补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的明胶佛罗那缓冲液(gelatin veronal buffer) (GVB) (例如,1600μL正常人血清)将40%正常人血清稀释到补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的2400μLGVB中来制备“测定板”)。将50μL该溶液分配到测定板(聚苯乙烯)的每个孔中。接下来,通过将50μL/孔的2×mAb(例如,抗备解素Fab)在补充有10mM EGTA和0-10mM MgCl₂的GVB中以100nM的浓度添加到合适的孔中来制备稀释板(聚丙烯)。作为阳性对照,将兔红细胞在蒸馏水中孵育(100%裂解细胞),对于阴性对照,将红细胞分别在GVB中与10mM EDTA和10mM MgCl₂孵育(0%裂解细胞)。

[0292] 将50μL/孔从稀释板转移至测定板。将测定板置于室温下,同时进行下一步骤。将400μL的rRBC洗涤4次,每次用1mL补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的GVB。每次洗涤后,rRBC以2600rpm旋转1分钟。在最后一次洗涤后,通过添加补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的300μL GVB将rRBC重悬至400μL的体积。用补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的GVB将50μL经洗涤的rRBC重悬浮至1mL。将30μL该稀释溶液加入到测定板中的100μL制备的样品中,得到1.5×10⁶个细胞/孔。将板在37°C下孵育30分钟。然后将板以1000×g离心5分钟,并将85μL上清液转移至平底96孔板。通过测量415nm处的OD来确定溶血。在415nm处测量光散射的逐渐减少(由于完整细胞的裂解)作为浓度的函数。为了计算,在抗备解素V_{HH}的每个浓度下计算总抑制,并且结果表示为未列出对照的百分比。

[0293] 实施例4单价抗备解素V_{HH}抗体与备解素的结合动力学

[0294] 在图6中,抗备解素V_{HH}抗体AB007和AB008分别以已知浓度在固定的传感器表面上运行。响应水平(RU)在传感图中对时间作图。

[0295] 测定抗备解素V_{HH}抗体的结合亲和力。结果总结在下表3中。

[0296] 表3.结合动力学

样品	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	Chi ²
AB007	1.04e6	3.59e-4	3.44e-10	0.36
AB008	2.11e6	1.69e-3	8.03e-10	5.29

[0297]

样品	抗原	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi^2	评论
[0298] AB009	人备解素	1.69E+06	4.33E-05	2.55E-11	0.18	良好
AB010	人备解素	1.09E+07	7.17E-05	6.59E-12	0.11	良好

[0299] 实施例5. 双特异性抗备解素抗体与备解素和替代补体溶血测定的结合动力学

[0300] 基于上述以接头连接至抗白蛋白构建体的抗备解素构建体, 产生双特异性构建体。在如上所述的类似测定中测量与备解素和替代补体溶血的结合。构建体的序列显示在下表4中。

[0301] 表4. 抗备解素构建体序列

分子	描述	氨基酸序列
[0302] TPP-2225	抗白蛋白 LVP058 (G4S) ₃ 接头	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREVVSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSLE VQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWY RQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDD AKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGAD YWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 45)

分子	描述	氨基酸序列
TPP-2951	人源化抗 白蛋白 LVP058 (G4S) ₃ 接 头 (7-回复突 变)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWFR QAPGKERELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 46)
TPP-3071	抗白蛋白 LVP058 (G4D) ₂ (G4) 接 头	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGDGGGGDGGGGGEV QLVES GGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYR QAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDA KNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 47)
TPP-3072	抗白蛋白 LVP058 (G4E) ₂ (G4) 接 头	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGEGGGGEGGGGEV QLVES GGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMAWYR QAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDDA KNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 48)

[0303]

[0304]

分子	描述	氨基酸序列
TPP-3261	人源化抗 白蛋白 LVP058 (G4S) ₃ 接 头 (3-回复突 变)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWVR QAPGKQRELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49)
TPP-3341	人源化抗 白蛋白 LVP058 (G4D) ₂ (G4) 接 头 (7-回复突 变)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGDGGGGDGGGGEV QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWFR QAPGKERELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)

[0305]

分子	描述	氨基酸序列
TPP-3342	人源化抗 白蛋白 LVP058 (G4E) ₂ (G4) 接 头 (7-回复突 变)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGEGGGGGEGGGGEV QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWFR QAPGKERELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 51)
TPP-3343	人源化抗 白蛋白 LVP058 (G4D) ₂ (G4) 接 头 (3-回复突 变)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGTLVTVSSGGGGDGGGGDGGGGGEV QLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWVR QAPGKQRELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)

[0306]

分子	描述	氨基酸序列
TPP-3344	人源化抗 白蛋白 -LVP058 (G4E) ₂ (G4) 接 头 (3-回复突 变)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAA WFRQAPGKEREFVSAINWQKTATYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVAPKT QYDYDYWGQGLTVTVSSGGGGEGGGGEGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRISIIHMAWVR QAPGKQRELVSEISRVGTTVYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNALQYEKHGGADY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 62)
TP-2221	LVP058_h G2-G4 - 沉默人 Fc 的 V _{HH}	LEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMA WYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISR DDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGG ADYWGQGTQVTVSSRKCCVECPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 53)

[0307]

分子	描述	氨基酸序列
TP-2222	LVP058_ hG1_noC 1q -没有 C1q 结合 的人 Fc 的 V _{HH}	LEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMA WYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISR DDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGG ADYWGQGTQVTVSSPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54)
TPP-2224	LVP058 (G4S) ₃ - 抗-Alb-串 联 V _{HH}	LEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRISIIHMA WYRQAPGKQRELVAEISRVGTTVYADSVKGRFTISR DDAKNTVTLQMNSLKPEDTAVYYCNALQYEKHGG ADYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGSEVQLV ESGGGLVKPGGSLRLSCAASGRPVSNYAAAWFRQA PGKEREFSAINWQKTATYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVFRVVPKTQYDYD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 55)

分子	描述	氨基酸序列
TPP-2223	抗备解素对照抗体，不含C1q结合结构域	<p>轻链序列：</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISFFLNWY QKPGKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQHGNTLPWTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 56)</p> <p>重链序列：</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTNYPIH WVRQAPGQGLEWMGFIDPGGGYDEPDERFRDRVT MTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARRGGGY LDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 57)</p>

[0308]

[0309] 图7显示在Octet仪器 (FortéBio Inc.) 上进行的动力学结合测量。所有洗涤、稀释和测量均在Kinetic缓冲液 (FortéBio cat 185032) 中进行, 平板以1000rpm振荡。将链霉亲和素生物传感器 (Forte Bio Cat:18-5019lot:1405301) 在动力学缓冲液中平衡10分钟, 然后加载50nm生物素化的人备解素。对于结合期, 将10 μ g/mL的选择的抗备解素抗体或动力学缓冲液空白分别加入预装有生物素化的人备解素的生物传感器中。结果显示TPP-2225、

TPP-2591、TPP-3071、TPP-3072、TPP-3261与人备解素结合。结果显示所有构建体与人备解素的强结合。

[0310] 图8A至图8B显示了基于在兔红细胞 (rRBC) 表面上形成末端补体复合物的替代补体途径介导的溶血测定的结果。由于该复合物的形成, rRBC被裂解。预期抑制补体复合物形成的药剂会抑制细胞裂解。测试各种双特异性抗备解素抗原结合构建体以评估由替代补体激活介导的对细胞裂解的影响。通过用补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的明胶佛罗那缓冲液 (GVB) (例如, 1600μL正常人血清) 将40%正常人血清稀释到补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的2400μL的GVB中来制备“测定板”。将50μL该溶液分配到测定板 (聚苯乙烯) 的每个孔中。接下来, 通过将50μL/孔的2×mAb (例如, 抗备解素Fab) 在补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的GVB中以100nM的浓度添加到合适的孔中来制备稀释板 (聚丙烯)。作为阳性对照, 将兔红细胞在蒸馏水中孵育 (100%裂解细胞), 对于阴性对照, 将红细胞分别在GVB中与10mM EDTA和10mM MgCl₂孵育 (0%裂解细胞)。

[0311] 将50μL/孔从稀释板转移至测定板。将测定板置于室温下, 同时进行下一步骤。将400μL的rRBC洗涤4次, 每次用1mL补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的GVB。每次洗涤后, rRBC以2600rpm旋转1分钟。在最后一次洗涤后, 通过添加补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的300μL GVB将rRBC重悬至400μL的体积。用补充有10mM EGTA和10mM MgCl₂的GVB将50μL经洗涤的rRBC重悬浮至1mL。将30μL该稀释溶液加入到测定板中的100μL制备的样品中, 得到1.5×10⁶个细胞/孔。将板在37°C下孵育30分钟。然后将板以1000×g离心5分钟, 并将85μL上清液转移至平底96孔板。通过测量415nm处的OD来确定溶血。在415nm处测量光散射的逐渐减少 (由于完整细胞的裂解) 作为浓度的函数。为了计算, 在抗备解素抗体构建体的每个浓度下计算总抑制, 并且结果表示为未列出对照的百分比。图8A至图8B显示TPP-2221、TP-2222、TP-2223、TP-2224和TP-2225在人 (图8A) 和食蟹猴 (图8B) 血清中介导的溶血作用。对照抗体是抗备解素抗体。图9A到图9B显示TPP-2225、TPP-2951、TPP-3261、TPP-3071和TPP-3072在人 (图9A) 和食蟹猴 (图9B) 血清中介导的溶血作用。

[0312] 图10A-10B、图11A-11B和图12A-12B显示TPP-3261、TPP-2951和TPP-2225与人和食蟹猴备解素的结合动力学。

[0313] 在下表5-9中显示了每种构建体的结合亲和力和IC₅₀值。

[0314] 表5. 双特异性构建体的结合动力学

分子	IC ₅₀ (nM)	描述
抗备解素对照	14.6-15.4	抗备解素
TPP-2221	7.1-8.4	LVP058_hG2-G4
TPP-2222	5.1-5.8	LVP058_hG1_noC1q
TPP-2223	8.4-13.4	抗备解素hG1_noC1q
TPP-2224	13.9-15.8	LVP058-抗-A1b
TPP-2225	11.6-12.9	抗-A1b-LVP058

[0316] 表6. 双特异性构建体的结合动力学

分子	亲和pH7.4 (nM)	人IC ₅₀ (nM)	食蟹猴IC ₅₀ (nM)	描述
TPP-2225	1.72E-10	20.04到64.49	11.19到12.3	非人源化 (G4S) 3接头
TPP-2951	3.01E-10	----	13.76到15.89	人源化 (7回复突变)

TPP-3261	4.85E-10	28.82到30.96	14.8到23.83	人源化(3回复突变)
TPP-3071	-----	22.28到29.36	10.66到14.58	非人源化(G4D)2G4接头
TPP-3072	-----	----	13.06到18.65	非人源化(G4E)2G4接头

[0318] 表7. 双特异性构建体的结合动力学

分子	人备解素		食蟹猴备解素		人白蛋白		食蟹猴白蛋白	
	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0	pH 7.4	pH 6.0
TPP-2225	1.72E-10	2.571E-9	1.979E-9	不结合	7.74e-10	6.46e-10	7.07e-9	2.30e-9
TPP-2951	3.01E-10		2.33E-9					
TPP-3261	4.85E-10		3.08E-9					

[0320] 表8. 双特异性构建体的结合动力学

分子	备解素类型	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²	评论
TPP3261	人	1.72e6	8.34e-4	4.85e-10	0.07	良好
TPP3261	食蟹猴	1.91e6	5.87e-3	3.08e-9	0.24	良好
TPP2951	人	1.78e6	5.74e-4	3.22e-10	0.06	良好
TPP2951	食蟹猴	1.82e6	4.26e-3	2.33e-9	0.17	良好

[0322] 表9. 双特异性构建体的结合动力学

分子	备解素类型	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Chi ²	评论
TPP2225	人	2.03e6	3.49e-4	1.72e-10	0.04	良好
TPP2951	人	1.88e6	5.67e-4	3.01e-10	0.05	良好

[0324] 其他实施例

[0325] 本说明书中提及的所有出版物,专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个独立的出版物或专利申请被具体和单独地指出通过引用并入。

[0326] 应当理解,本文描述的组合物和方法能够进一步修改,并且该描述旨在包括通常在本文公开的原理之后的任何变化、用途或改编-包括与本公开的这些偏离。在本领域的已知或惯常实践中,这些实践可以应用于上文提出的基本特征,并且在权利要求的范围内。

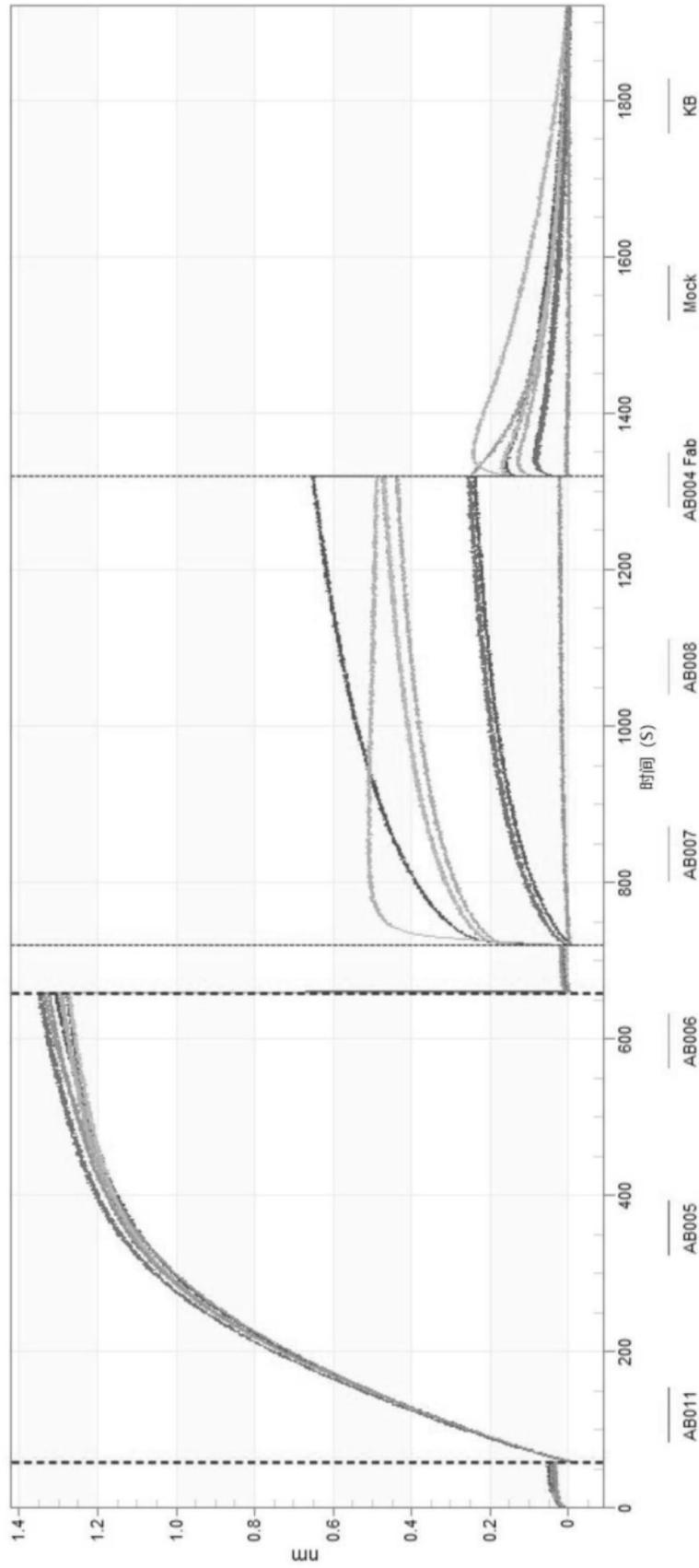


图1

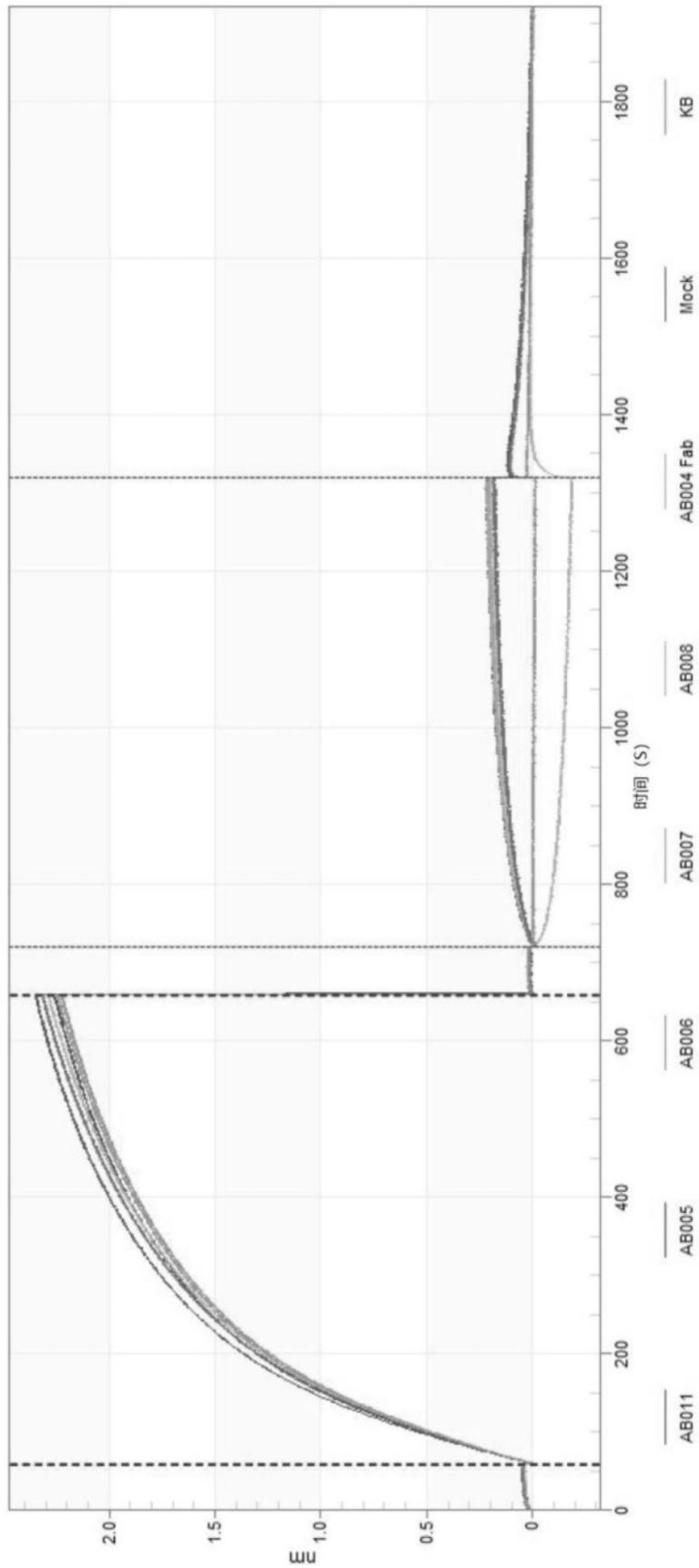


图2

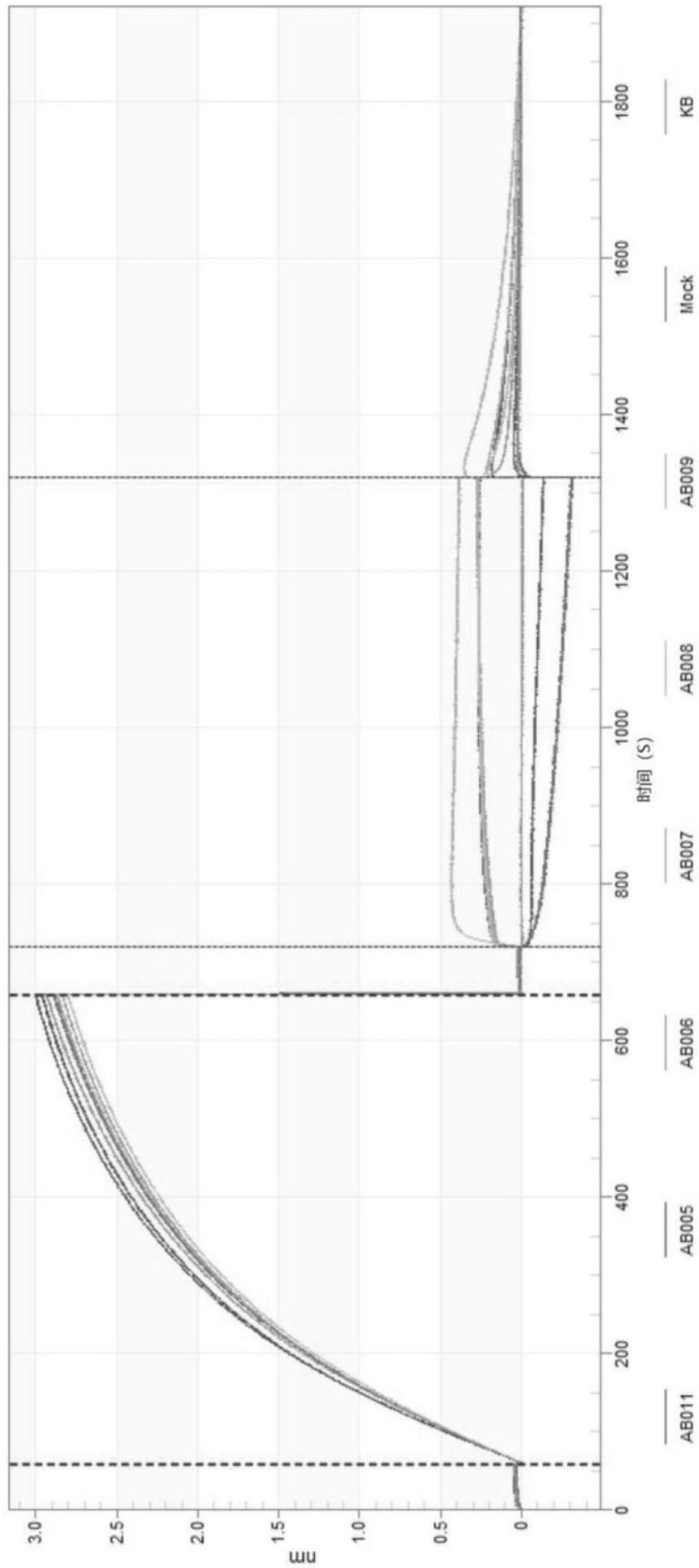


图3

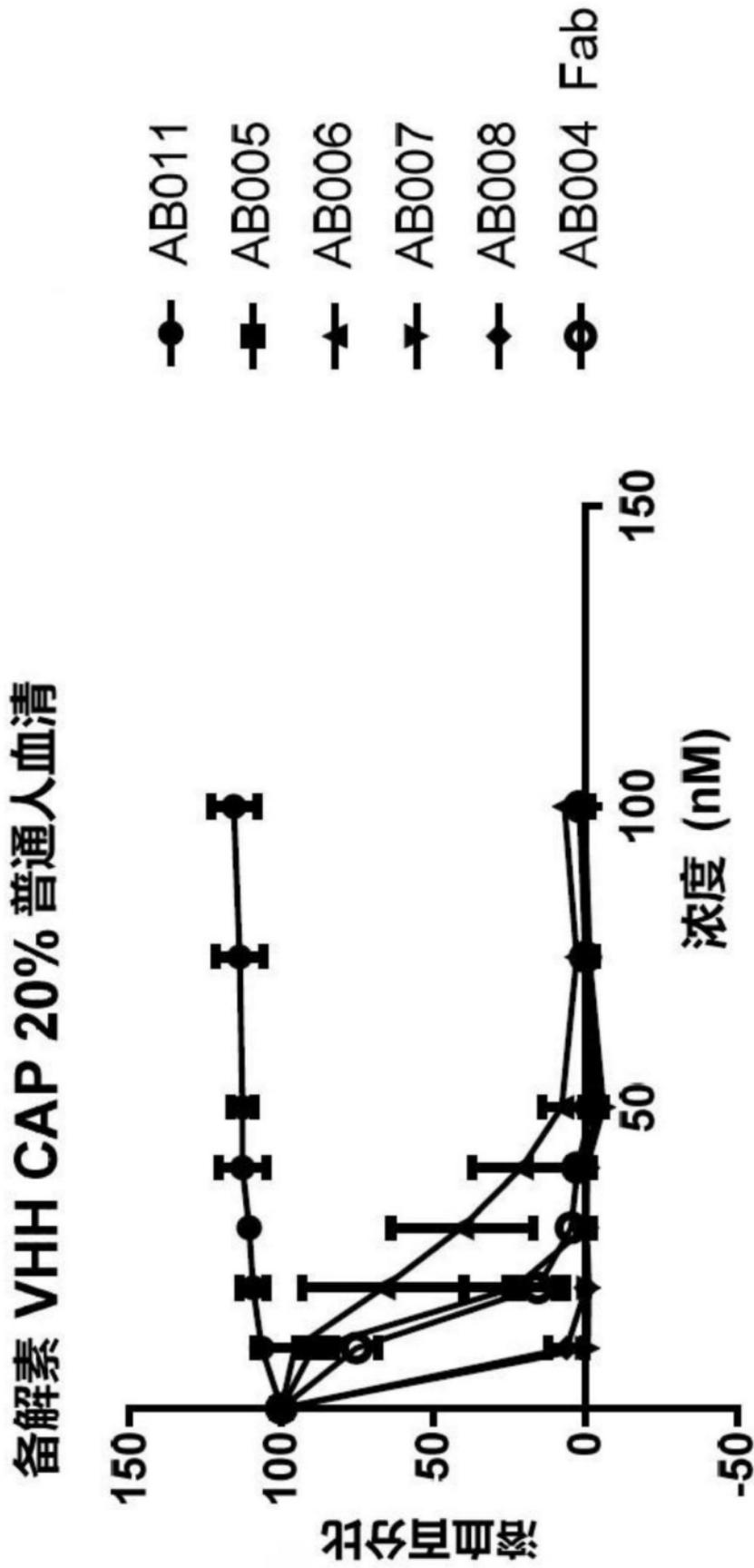


图4

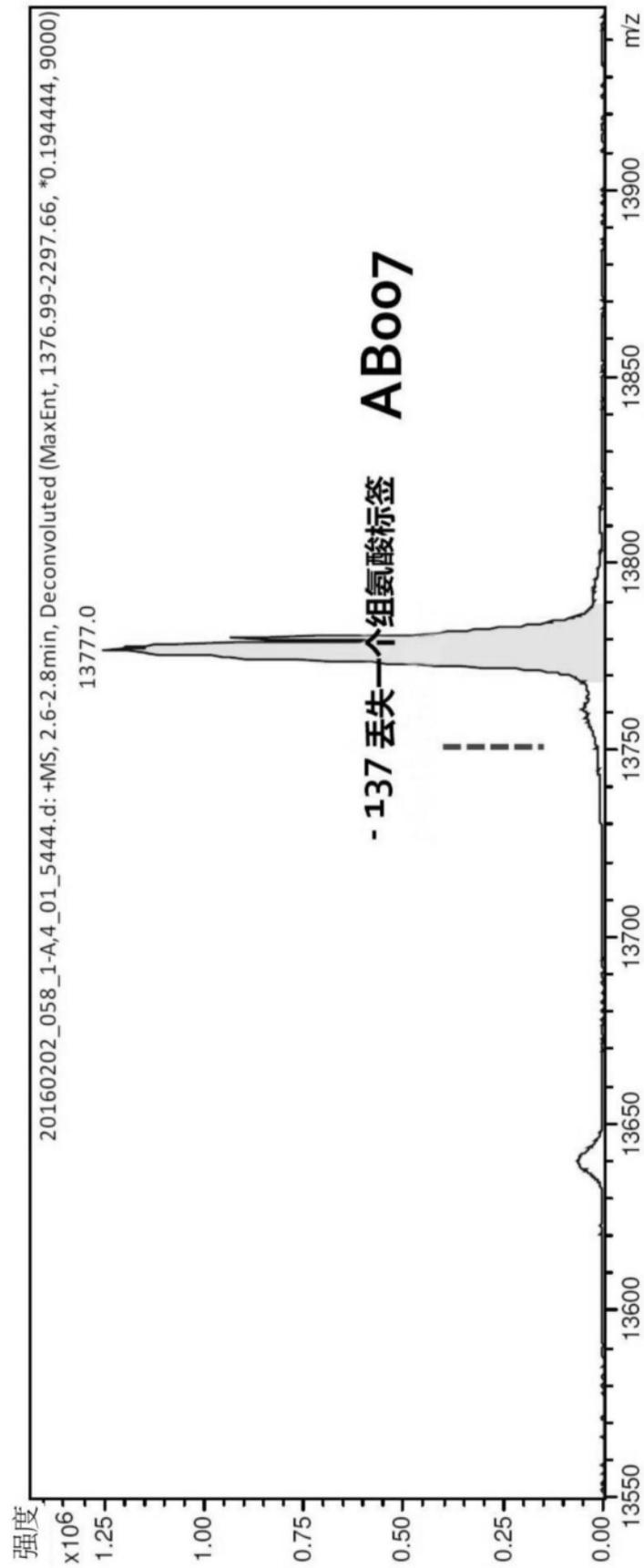


图5A

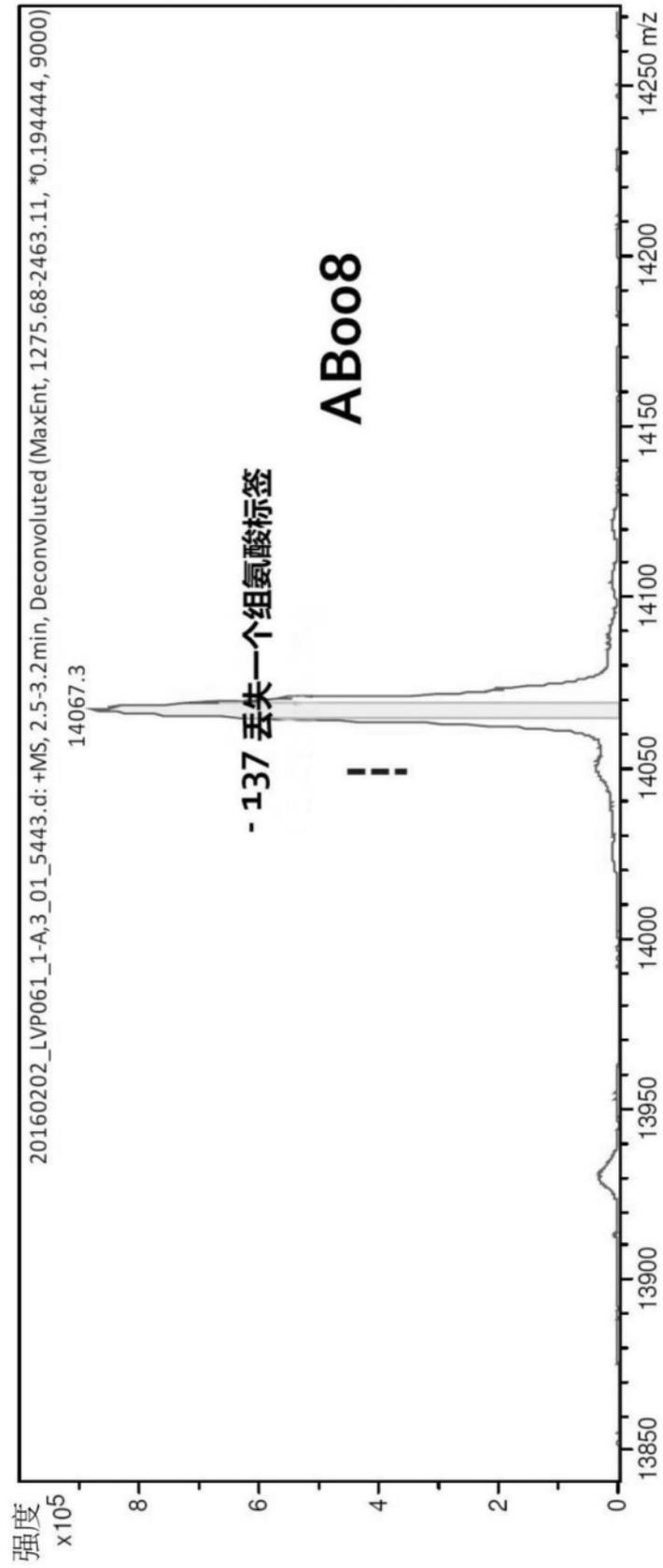


图5B

分子	理论	实验	
	MW (Da)	MW (Da)	ppm
AB007	13778.3	13777.0	-94.4
AB008	14068.6	14067.3	-92.4

图5C

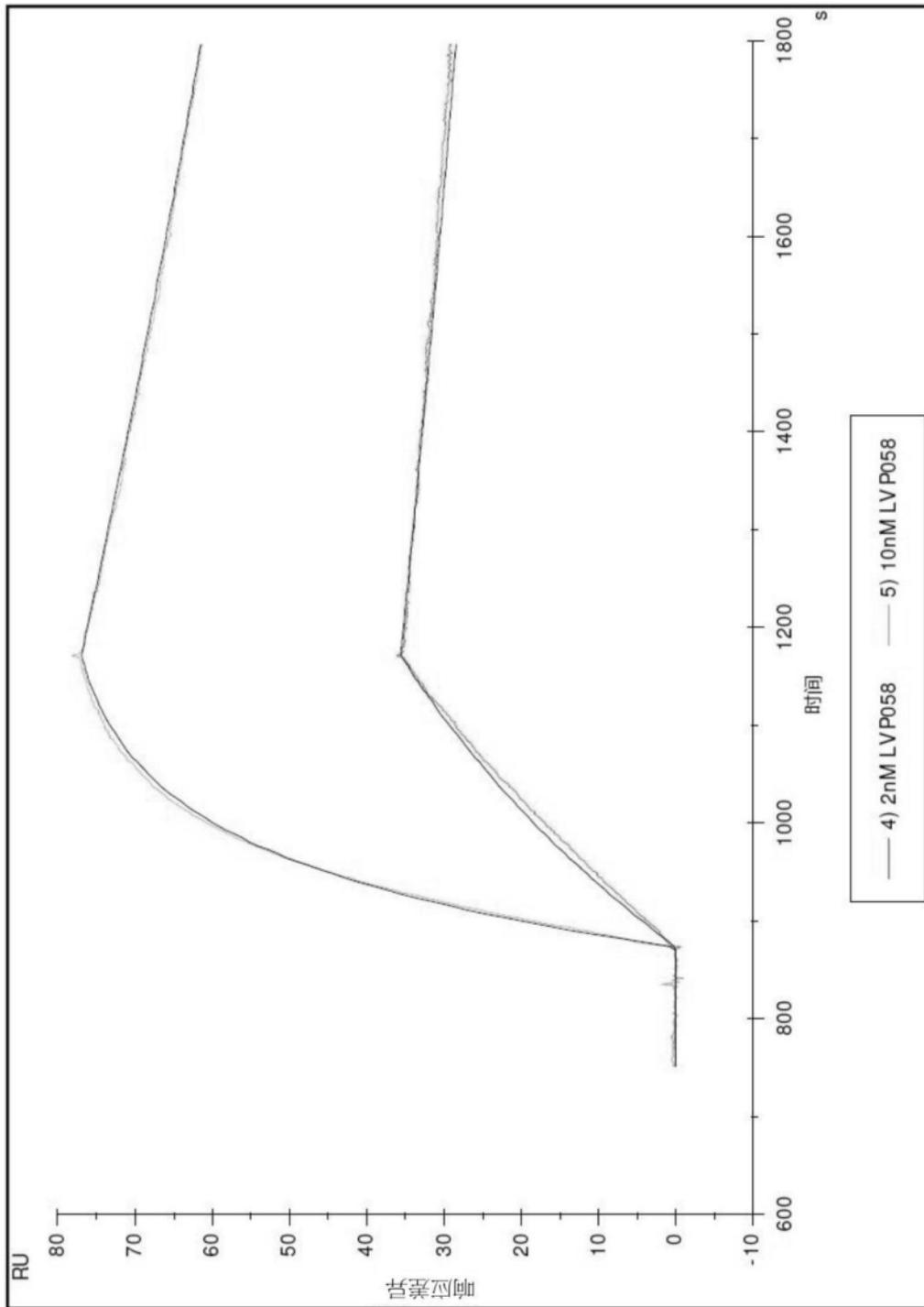


图6A

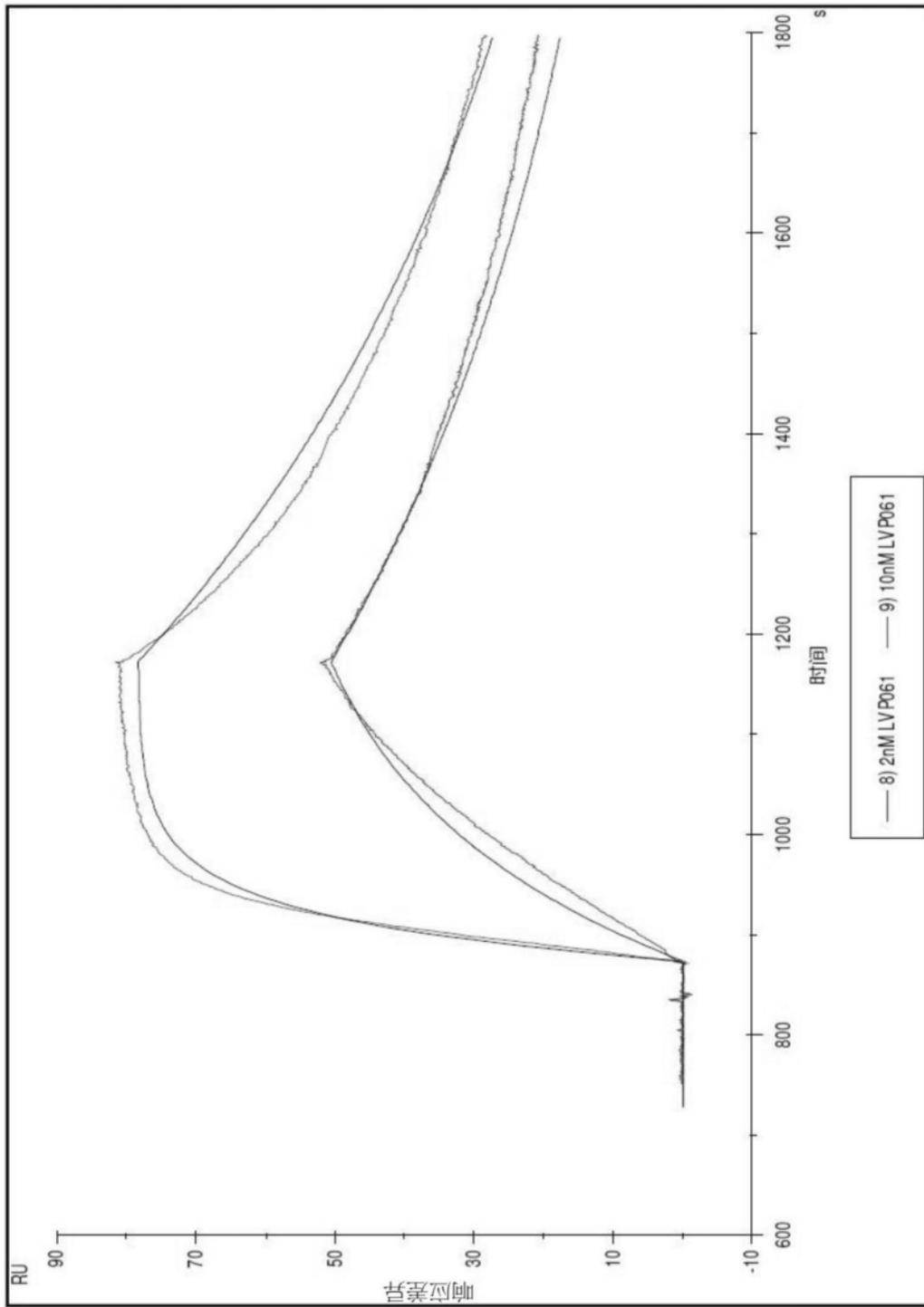


图6B

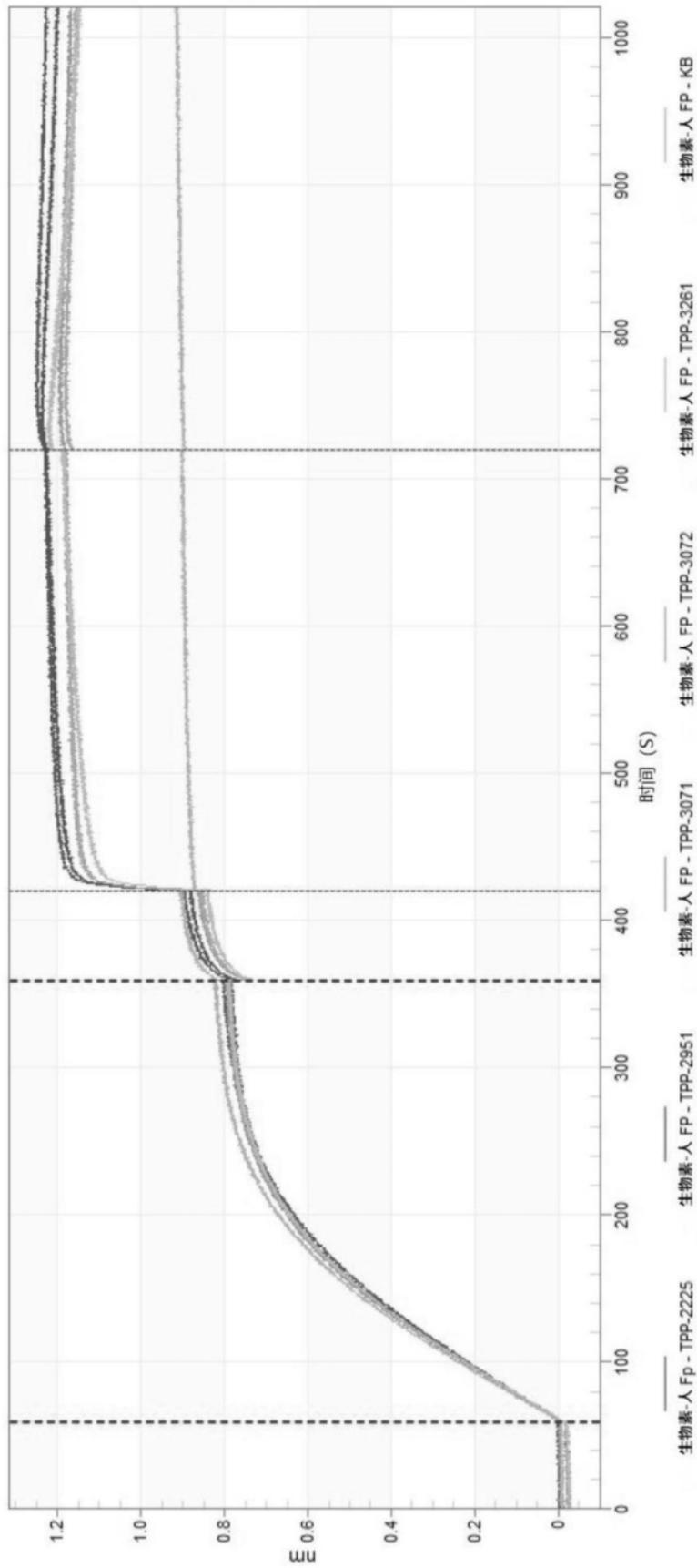


图7

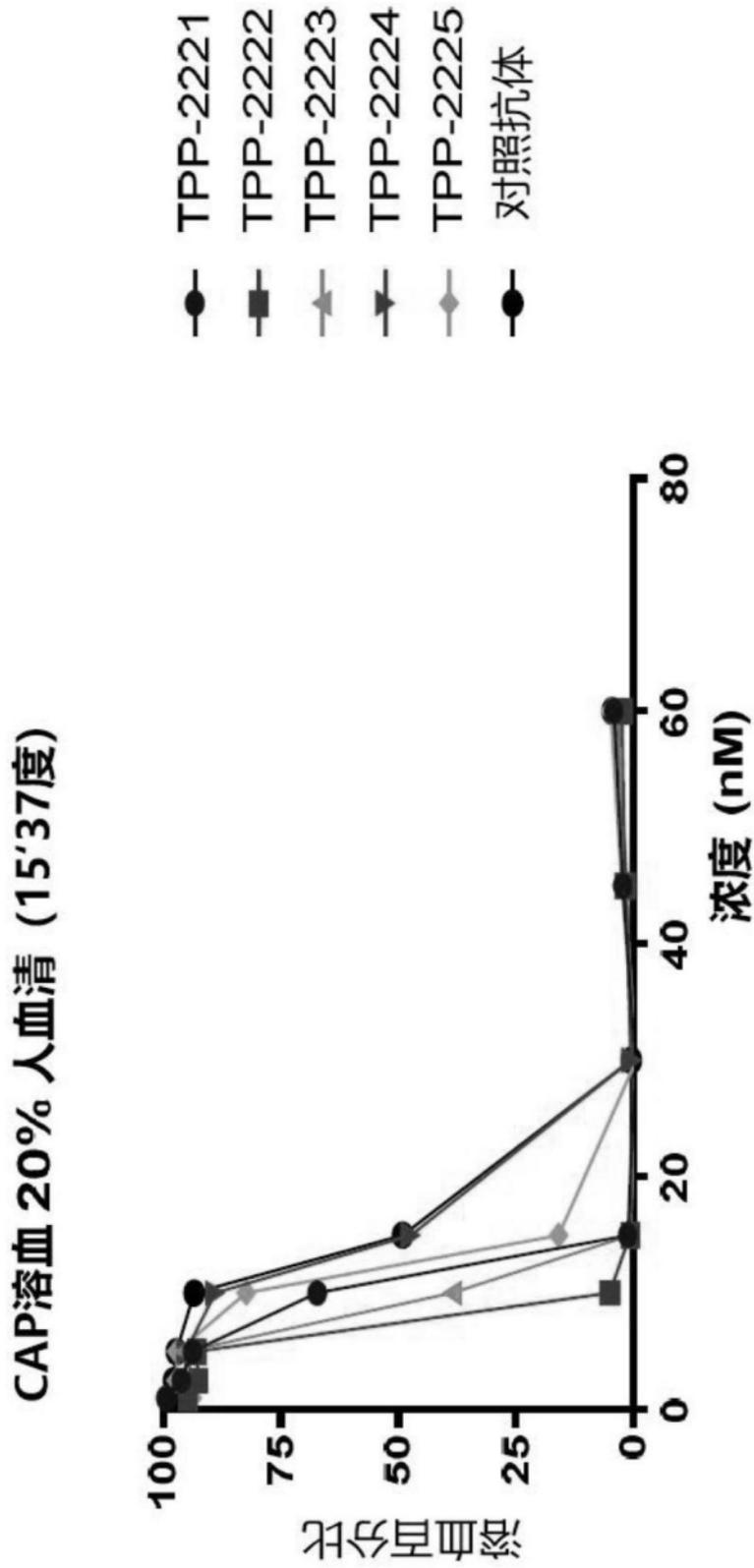


图8A

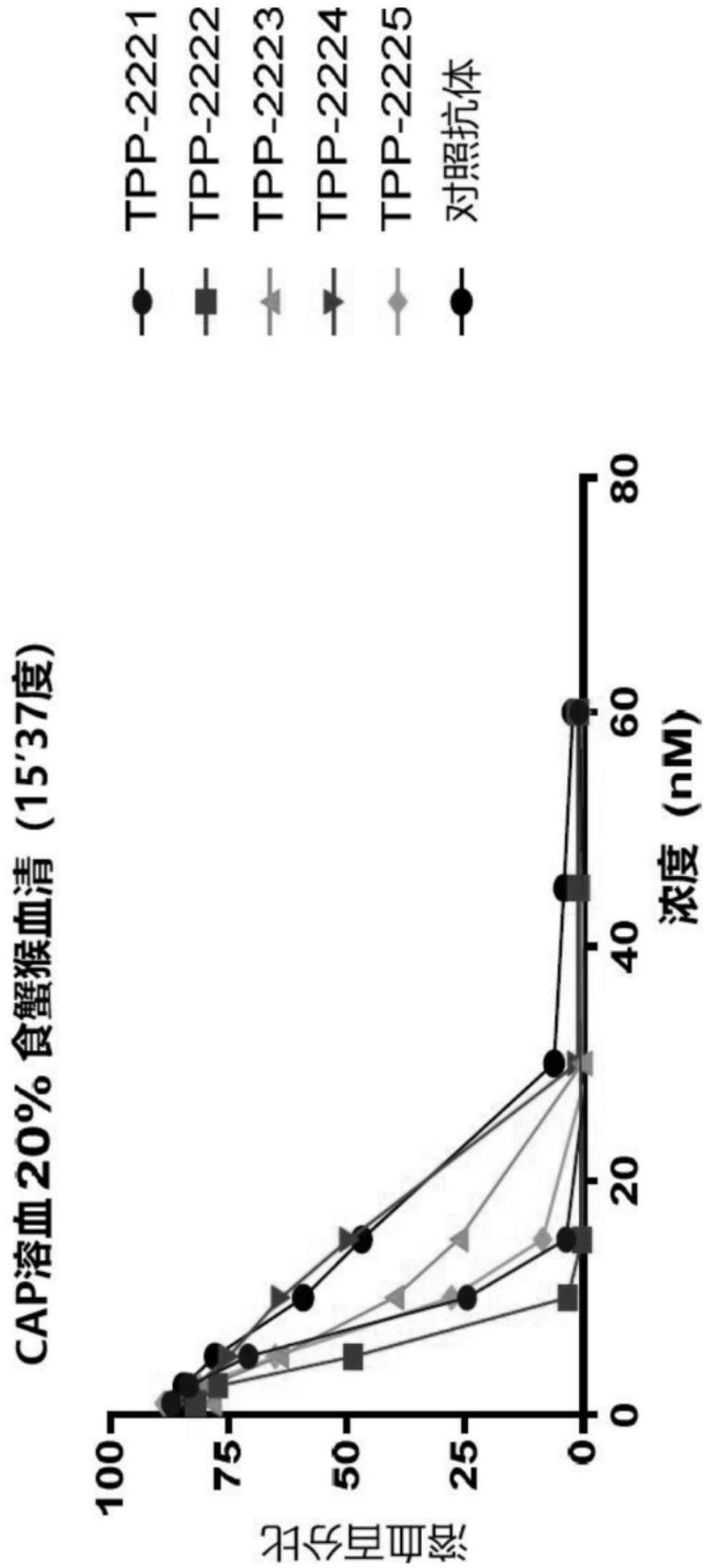


图8B

CAP溶血 20%人血清 (15'37度)

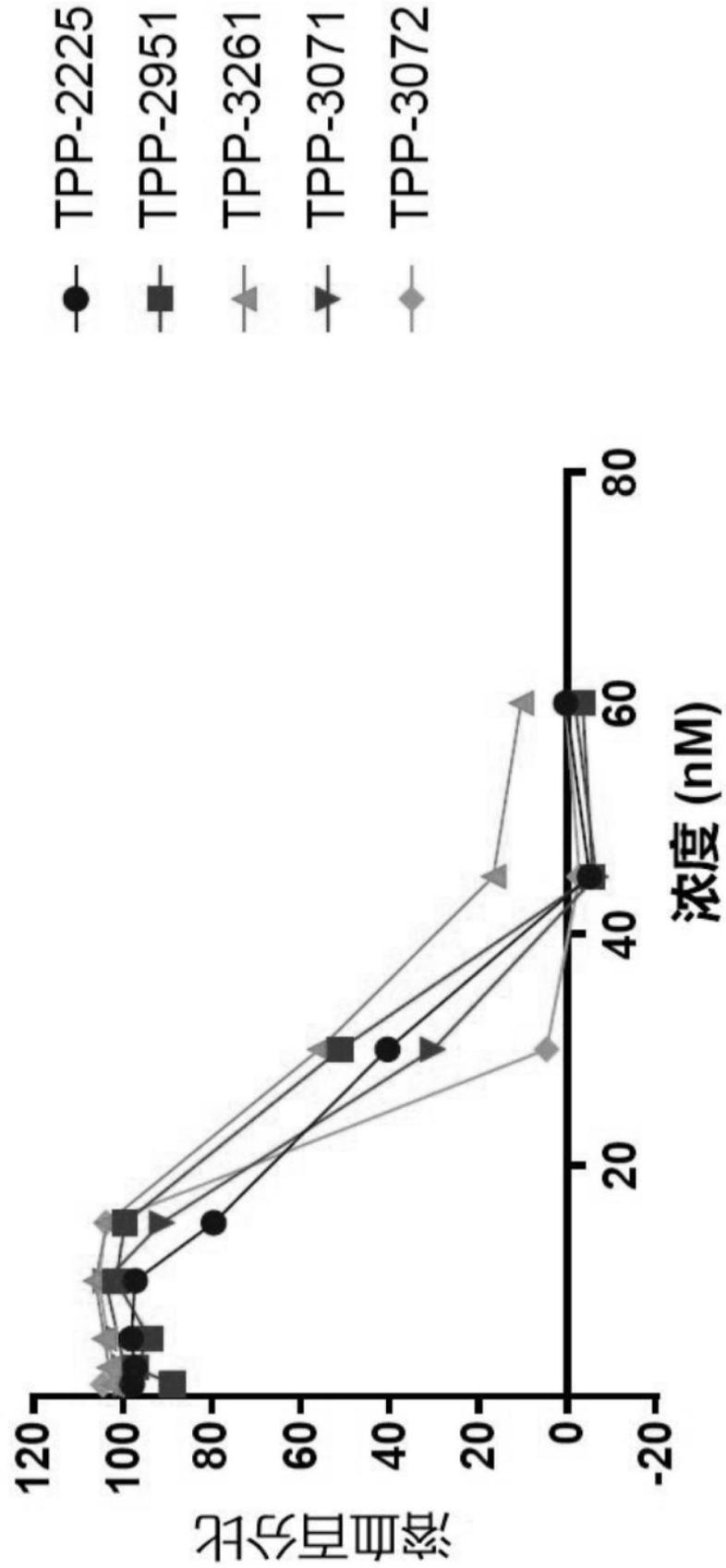


图9A

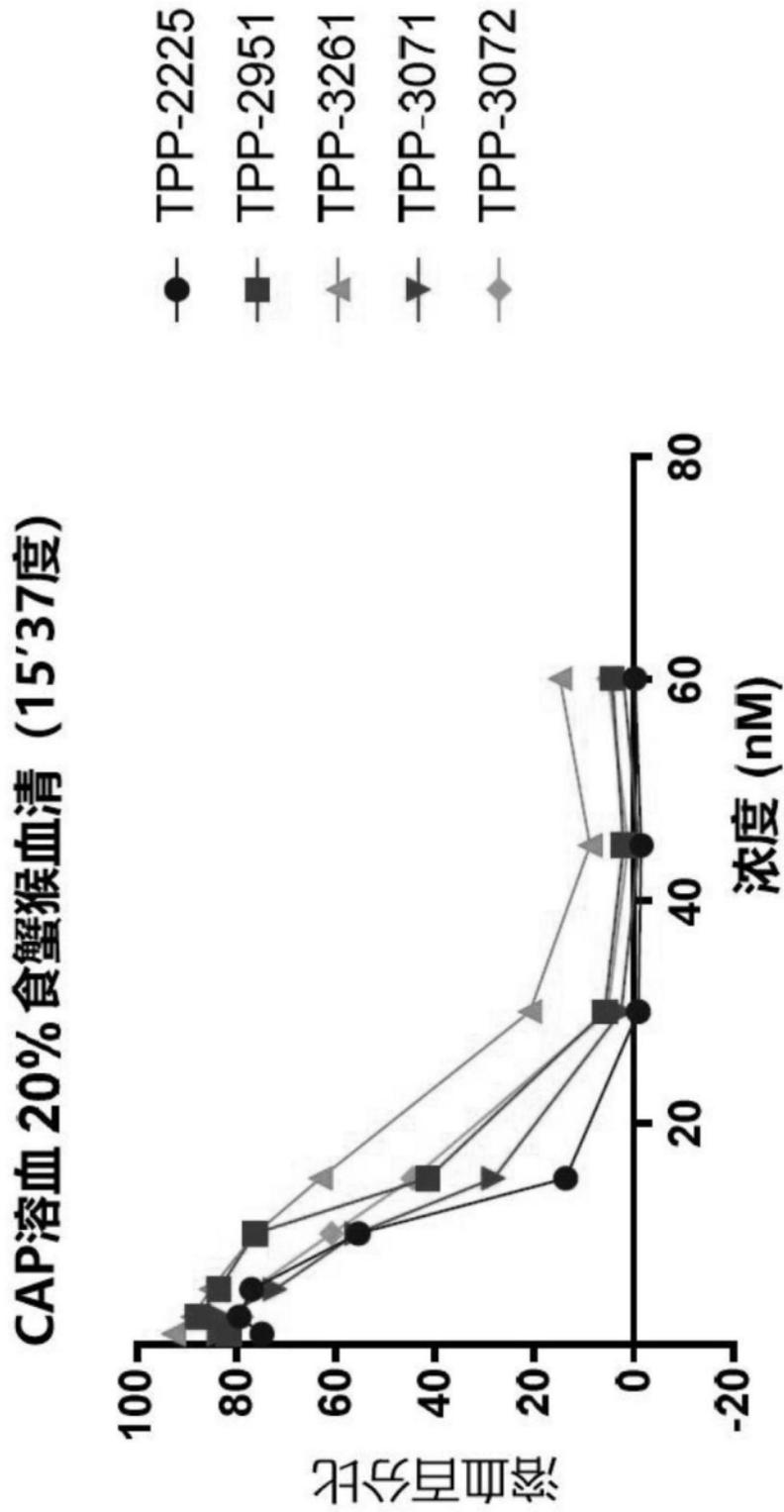


图9B

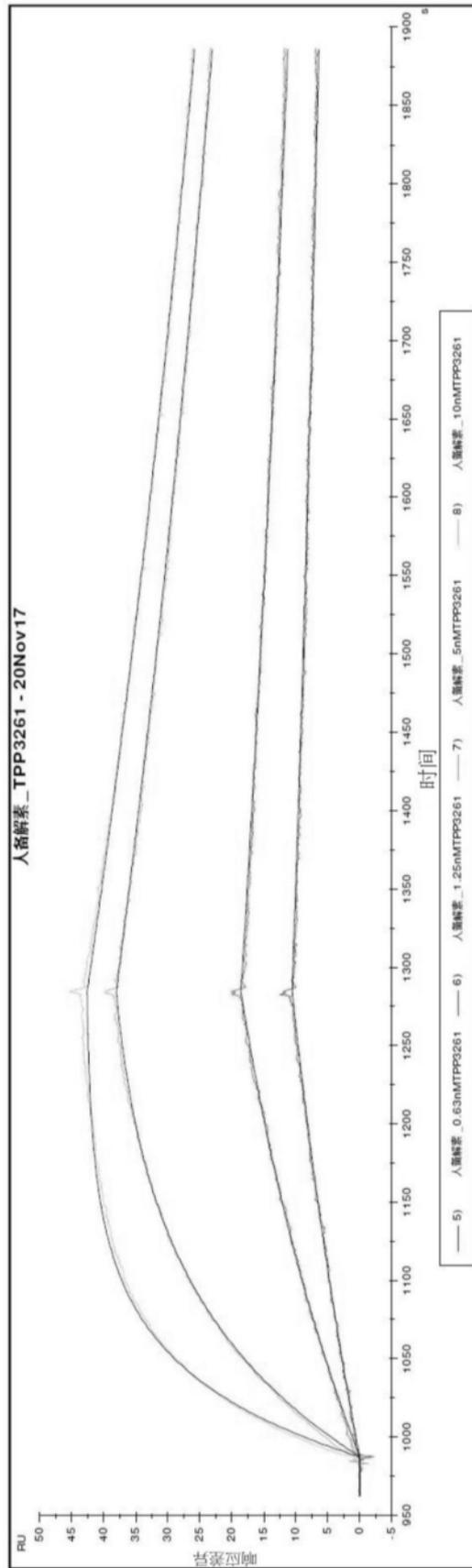


图10A

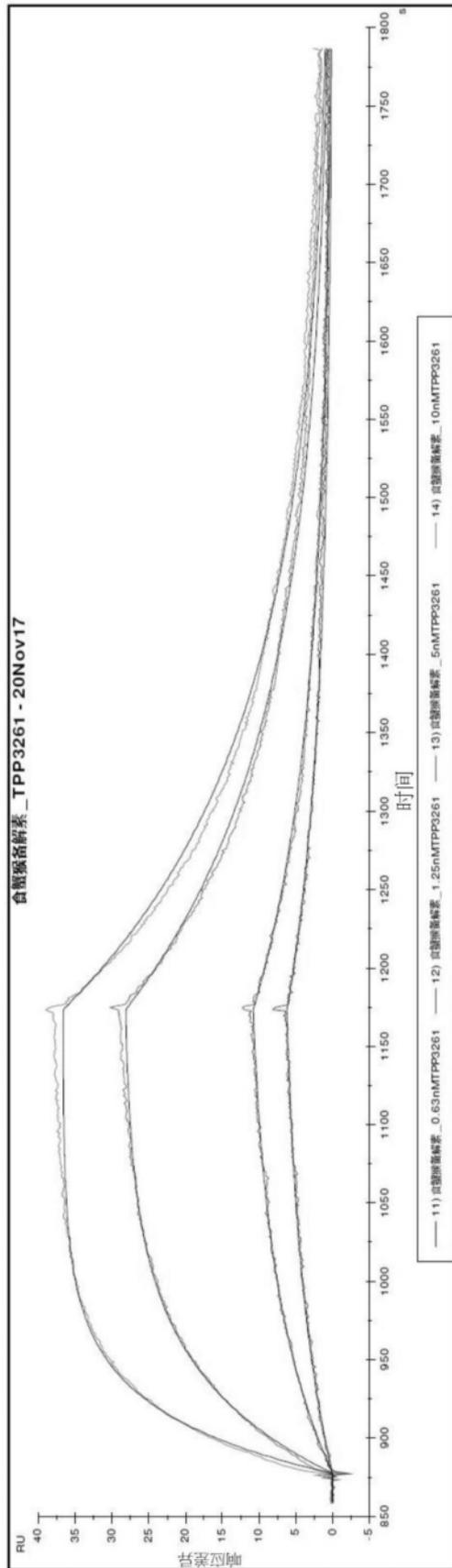


图10B

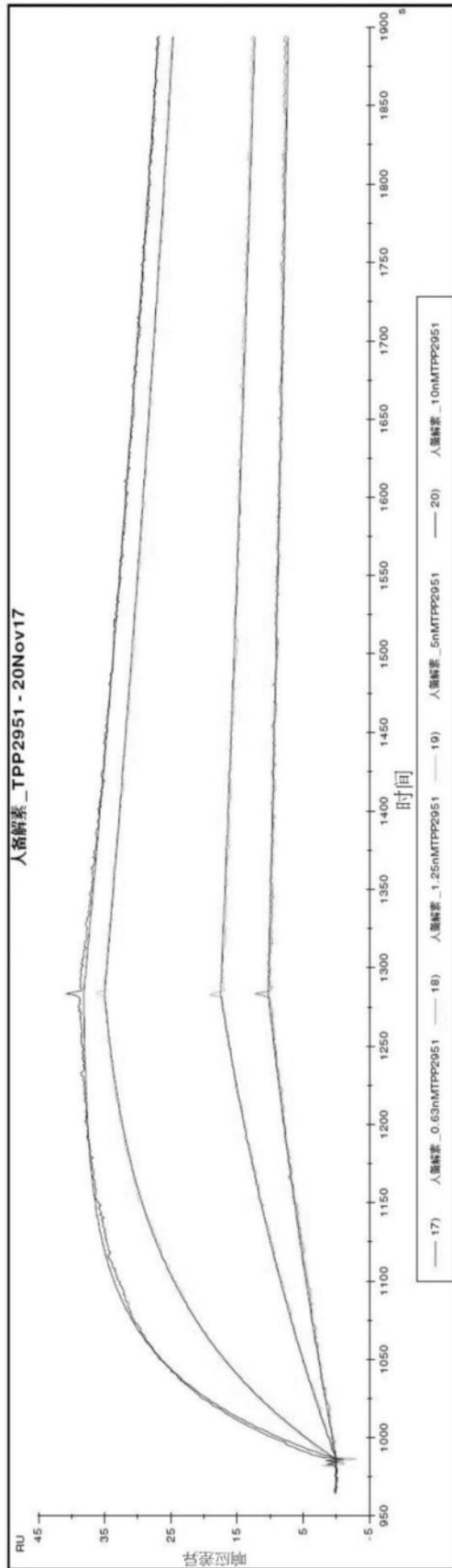


图11A

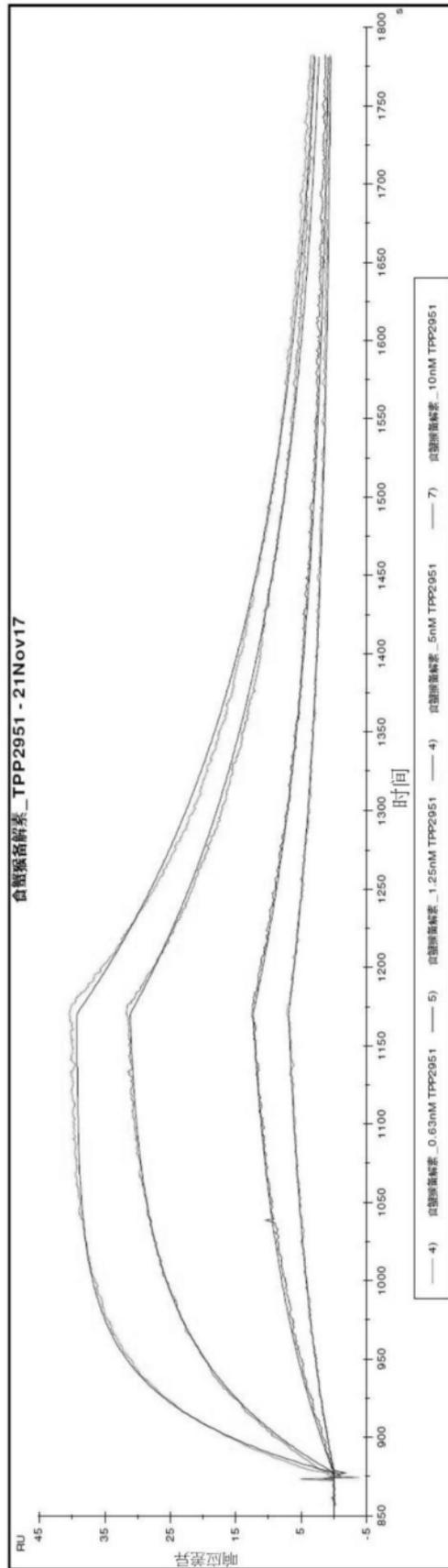


图11B

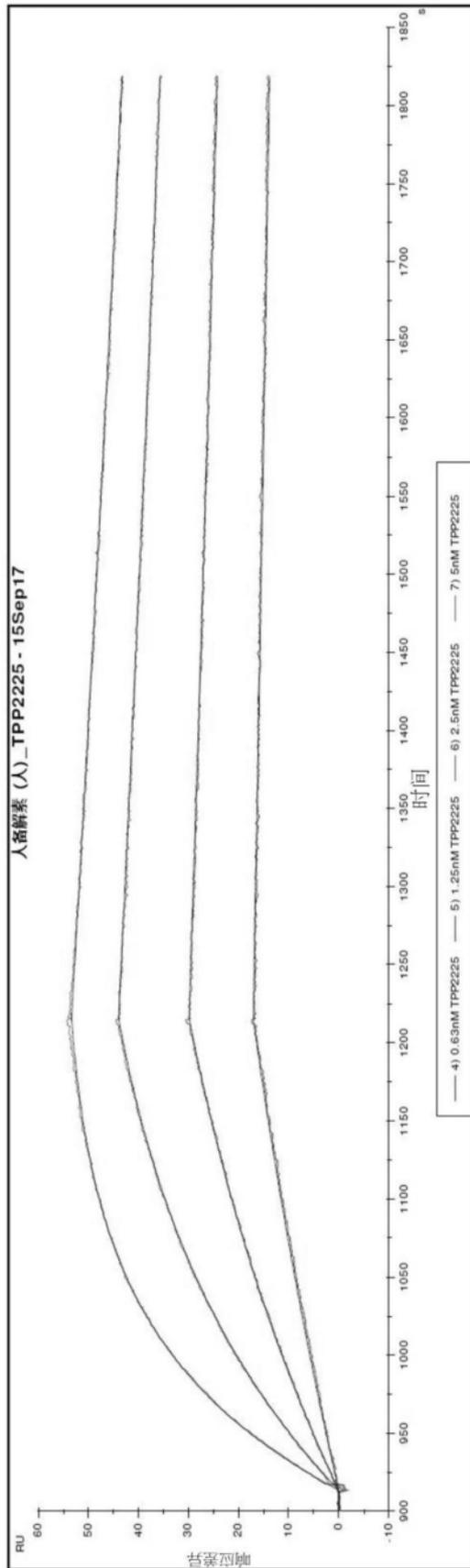


图12A

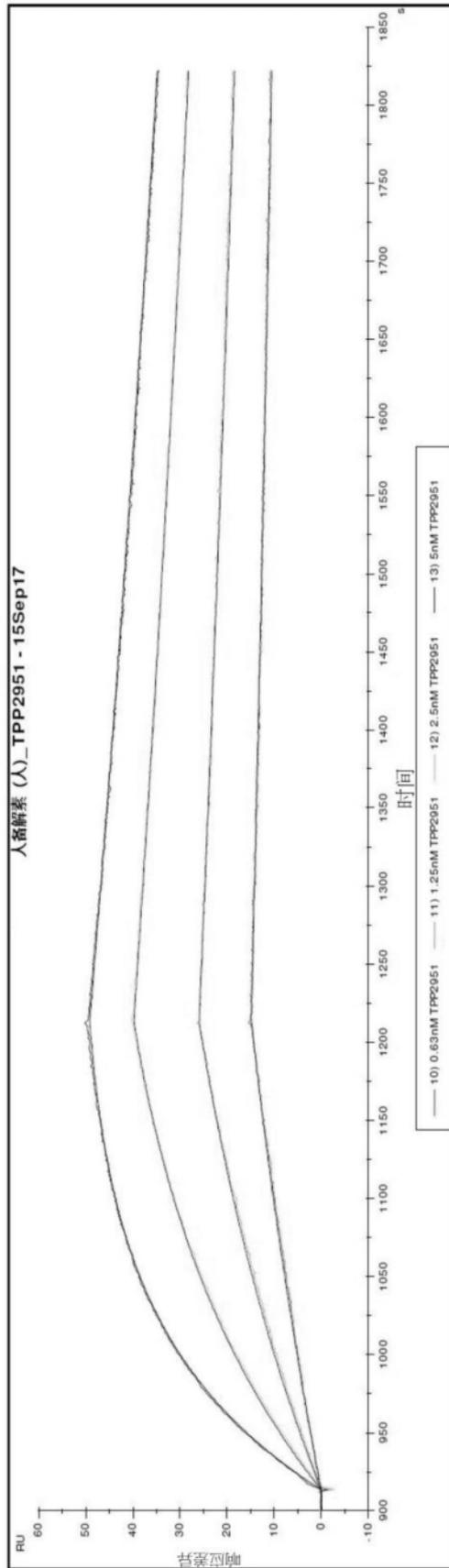


图12B