



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I557137 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：103111348

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 06 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P13/12 (2006.01)

(30)優先權：2007/06/07 美國

60/933,721

2008/05/21 美國

61/055,068

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：凡 魯克恩 迦配恩 曼諾 VAN L OOKEREN CAMPAGNE, MENNO (NL)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2006/0002944A1

WO 2006/012621A2

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：21 共 117 頁

(54)名稱

C 3 b 抗體及預防及治療補體相關疾病之方法

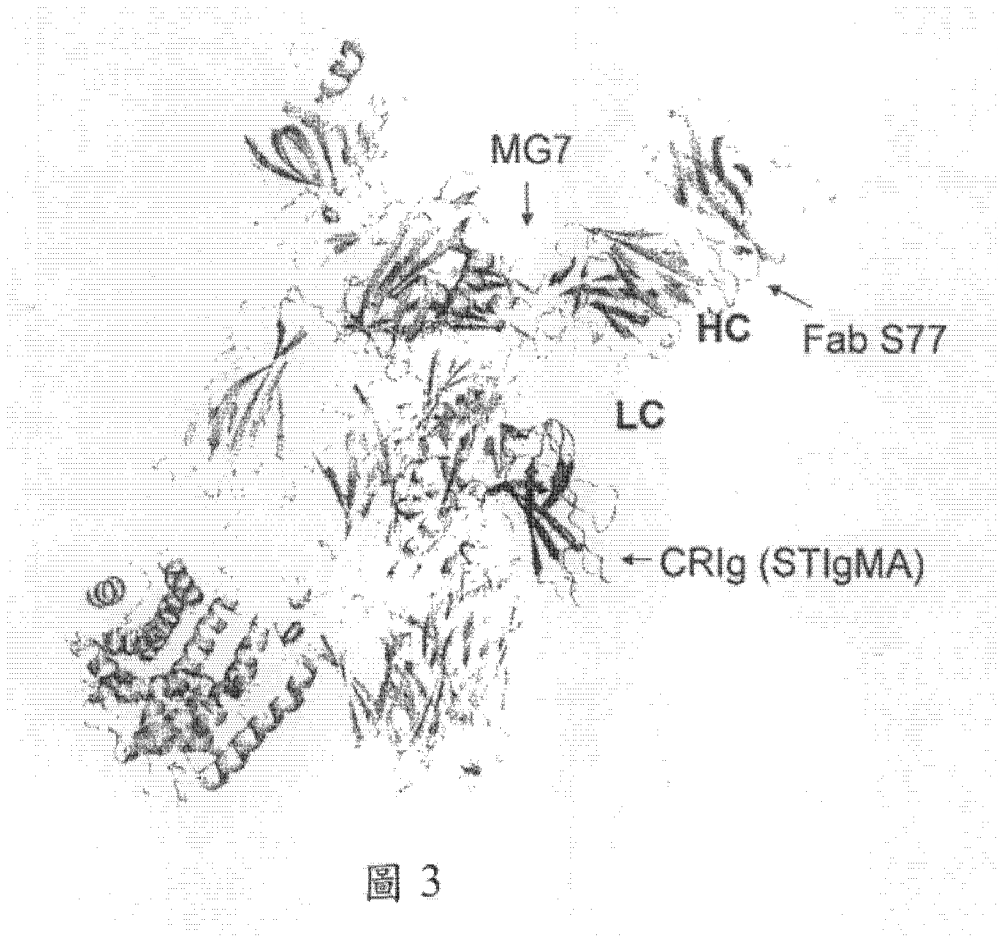
C3B ANTIBODIES AND METHODS FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF
COMPLEMENT-ASSOCIATED DISORDERS

(57)摘要

本發明係關於 C3b 之抗體及使用該等抗體預防及治療補體相關病症。

The present invention concerns antibodies to C3b and the prevention and treatment of complement-associated disorder using such antibodies.

指定代表圖：



發明摘要

公告本

※ 申請案號：103111348(由97121292分割)

※ 申請日：97.6.6

※IPC 分類：C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

C3b抗體及預防及治療補體相關疾病之方法

C3b ANTIBODIES AND METHODS FOR THE PREVENTION
AND TREATMENT OF COMPLEMENT-ASSOCIATED
DISORDERS

【中文】

本發明係關於C3b之抗體及使用該等抗體預防及治療補體相關病症。

【英文】

The present invention concerns antibodies to C3b and the prevention and treatment of complement-associated disorder using such antibodies.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 3 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無 元 件 符 號 說 明）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

C3b抗體及預防及治療補體相關疾病之方法

C3b ANTIBODIES AND METHODS FOR THE PREVENTION
AND TREATMENT OF COMPLEMENT-ASSOCIATED
DISORDERS

【技術領域】

● 本發明係關於針對C3b之抗體及使用該等抗體對補體相關病症實施之預防及治療。

【先前技術】

補體系統係由一系列通常以無活性酶原形式存在之血清糖蛋白組成之複合酶級聯。兩種主要途徑(即典型途徑及旁路途徑(alternative pathway))可活化補體，其在C3水平上合併，其中兩種相似的C3轉化酶將C3裂解成C3a及C3b。

● 巨噬細胞係已形成可識別表現鑑別標籤之細胞表面結構細微差異(所謂分子模式)之先天性能力的特殊細胞(Taylor等人，**Eur J Immunol** 33, 2090-2097 (2003)；Taylor等人，**Annu Rev Immunol** 23, 901-944 (2005))。儘管該等表面結構之直接識別係先天性免疫之基礎態樣，但調理作用容許普通巨噬細胞受體調介吞噬，此可提高吞噬細胞之效率及使吞噬細胞之識別範圍面向多個方面(Stuart及Ezekowitz, **Immunity** 22, 539-550 (2005))。吞噬過程涉及多種配體-受體交互作用，且現在已瞭解各種調理素(包括免疫球蛋白、凝集素、及補體組份)可引導經由與巨噬細胞細胞表面受體之交互作用進行病原體內在化所需之細胞活性(由Aderem及Underhill綜述，**Annu Rev Immunol**

17, 593-623 (1999)；Underhill及Ozinsky, **Annu Rev Immunol** 20, 825-852 (2002))。儘管由種系基因編碼之天然免疫球蛋白可識別眾多種病原體，但大多數調理IgG係由於獲得性免疫而產生，且因此不能直接經由Fc受體來有效清除(Carroll, **Nat Immunol** 5, 981-986 (2004))。另一方面，補體可快速識別病原體表面分子且藉由補體受體啟動吸收顆粒(Brown, **Infect Agents Dis** 1, 63-70 (1991))。

補體係由超過30種血清蛋白組成，該等蛋白可調理眾多種病原體以供補體受體識別。根據級聯之起始觸發，可區分三種途徑(由Walport綜述於**N Engl J Med** 344, 1058-1066 (2001)中)。所有三種途徑皆共享共同的活化核心組份C3之步驟，但其識別性質及導致C3活化之起始生化步驟不同。典型途徑係藉由與病原體表面結合之抗體來活化，其進而結合C1q補體組份，啟動絲胺酸蛋白酶級聯而最終將C3裂解為其活性形式C3b。凝集素途徑係在識別碳水化合物基元後藉由凝集素蛋白來活化。迄今為止，已鑒定出此途徑之三種成員：甘露糖結合凝集素(MBL)、凝集素之SIGN-R1家族及纖維膠凝蛋白(Pyz等人, **Ann Med** 38, 242-251 (2006))。MBL及纖維膠凝蛋白二者係與絲胺酸蛋白酶相關，其作用類似於典型途徑中之C1，可活化組份C2及C4而導致核心C3步驟。旁路途徑與典型路徑及凝集素途徑二者不同，因為其係由內部C3酯與病原體表面上之識別基元之直接反應來活化。最初與活化表面結合之C3可經由旁路途徑蛋白酶因子B及因子D之作用導致C3b沈積之快速擴增。重要的係，藉由典型途徑或凝集素途徑沈積之C3b亦可經由因子B及D之作用導致C3b沈積之擴增。在所有三種補體活化途徑中，調理作用中之關鍵步驟係組份C3向C3b轉化。藉由補體級聯之酶裂解C3可使硫代酸酯曝露於親核攻擊下，此使得C3b可經由硫代酸酯結構域共價結合至抗原表面。此係補體調理作用中之起始步驟。之後所結合C3b之蛋白酶解產生iC3b、C3c及

C3dg，其係可由不同受體識別之片段(Ross及Medof, **Adv Immunol** 37, 217-267 (1985))。此裂解使C3b喪失了進一步擴增C3b沈積及活化能直接造成膜損傷之補體級聯後期組份(包括膜攻擊複合體)之能力。然而，巨噬細胞吞噬性受體可優先識別C3b及其片段；由於酯鍵形成之多樣性，C3介導之調理作用對病原體識別具有關鍵作用(Holers等人, **Immunol Today** 13, 231-236 (1992))，且各種C3降解產物之受體由此可在宿主免疫響應中發揮重要作用。

C3自身係由13個不同結構域組成之複合彈性蛋白。分子之核心係由8個所謂巨球蛋白(MG)結構域構成，其構成C3之緊密封裝之 α 及 β 鏈。此結構中插入有CUB(C1r/C1s、Uegf及骨形態發生蛋白-1)及TED結構域，後者含有使C3b可與病原體表面共價結合之硫代酸酯鍵。其餘結構域含有C3a或可用作核心結構域之連接體及間隔區。C3b及C3c結構與C3之比較證實，伴隨著每次蛋白酶解，分子皆經歷重大構象重組，其不僅曝露TED，且曝露其他可與細胞受體交互作用之新分子表面(Janssen及Gros, **Mol Immunol** 44, 3-10 (2007))。

為預防不期望的補體活化，多數哺乳動物細胞配備有在宿主自身細胞上阻斷補體擴增之調節劑(Hourcade等人, **Adv Immunol** 45:381 (1989))。在缺少該等固有調節劑之情況下，曝露於血清中可導致生成補體分裂產物，其進而可促使發生炎症及組織損傷(Oglesby等人, **J Exp Med** 175:1547 (1992)及Oglesby等人, **Trans Assoc. Am. Physicians** 104:164 (1991))。因此缺少固有補體調節劑之非細胞表面尤其易受補體攻擊且完全依賴於血清中可溶性補體調節劑之保護。由於缺少適當補體調節導致之不受控補體活化係與各種慢性炎症疾病及變性疾病相關。此炎症級聯中之主導因素係補體分裂產物C3a及C5a，其可經由C3a及C5a受體用作嗜中性粒細胞及炎症性巨噬細胞之化學吸引劑及活化劑(Mollnes等人, **Trends Immunol.** 23:61 (2002))。

自嗜中性粒細胞釋放之備解素可經由穩定AP轉化酶來進一步擴大炎症級聯(Lutz及Jelezarova, **Mol. Immunol.** 43:2 (2006))。已顯示補體活化係在免疫複合物介導疾病中驅動炎症作用之重要組份，該等疾病例如膜性增生性腎小球腎炎、腎毒性腎炎及關節炎(Walport, **N. Engl. J. Med.** 344:1058 (2001)；Thurman及Holers, **J. Immunol.** 176:1305 (2006)；Banda等人，**J. Immunol.** 171:2109 (2003)；Weisman等人，**Science** 249:146 (1990)；Morgan及Harris, **Mol. Immunol.** 40:159 (2003))，以及年齡相關性黃斑變性(Anderson等人，**Am. J. Ophthalmol.** 134:411 (2002)；Donoso等人，**Surv. Ophthalmol.** 51:137 (2006)；Gold等人，**Natl. Genet.** 38:458 (2006)；Hageman等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102:7227 (2005)；Hageman等人，**Ann. Med.** 38:592 (2006)；Hageman等人，**Prog. Retin. Eye Res.** 20:705 (2001))。

多數補體調節劑係在C3b水平上作用，C3b係補體轉化酶之核心組份。該等補體活化之天然調節劑通常尺寸較大(>100 kDa)且難於研發為治療藥劑。因此，業內需要藉由阻斷C3b來預防及治療補體相關病症之治療藥劑。

【發明內容】

本發明係關於可特異性識別C3之斷裂片段而非天然C3之抗體之研發，由此避免天然C3作為抗體之「彙集池」。更具體而言，本發明係關於C3b特異性抗體及抗體片段及其在治療補體相關疾病中之應用。

在一態樣中，本發明係關於預防及治療補體相關病症之方法，其包括向有需要之個體投與有效量之C3b拮抗劑，其係旁路補體途徑之選擇性抑制劑。

在一實施例中，個體係哺乳動物。在另一實施例中，個體係

人。

在另一實施例中，C3b拮抗劑係可識別C3之活性降解產物而非C3上之表位(epitope)之抗體。

在另一實施例中，C3b拮抗劑係選擇性與C3b結合之抗體或抗體片段。

在一不同實施例中，抗體抑制C5與C3b之結合。

在另一實施例中，抗體與表位結合，包括由抗體S77識別之C3b表位之殘基。

在另一實施例中，該抗體及抗體S77實質上與相同表位結合。

在另一實施例中，抗體競爭性抑制抗體S77之結合。

在另一實施例中，抗體與C3b表位結合，該表位包含與抗體S77接觸之殘基。

在其他實施例中，抗體包含抗原結合位點，該位點包含抗體S77中與C3b接觸之殘基。

在較佳實施例中，抗體包含抗體S77之重(SEQ ID NOS 1-4)及/或輕(SEQ ID NOS 5-8)鏈CDR序列及/或係S77抗體或其片段。

在各實施例中，抗體可為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

在其他實施例中，抗體片段係選自由以下組成之群：自抗體片段形成之Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、互補決定區(CDR)片段、線性抗體、單鏈抗體分子、微抗體、雙特異性抗體、及多特異性抗體。

本發明方法包括預防及治療任何補體相關病症，包括炎症及自身免疫性疾病，例如類風濕性關節炎(RA)、急性呼吸窘迫症候群(ARDS)、缺血及再灌注後遠端組織損傷、心肺繞道(bypass)手術期間之補體活化、皮肌炎、天皰瘡、狼瘡性腎炎及所導致之腎小球腎炎及血管炎、心肺繞道、心臟麻痺誘導之冠狀動脈內皮功能障礙、II型膜

性增生性腎小球腎炎、IgA腎病、急性腎衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂症候群、黃斑變性疾病(例如年齡相關性黃斑變性(AMD))、脈絡膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血相關性視網膜病變、眼內炎、及其他眼內血管新生性疾病(例如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、希林二氏病(von Hippel-Lindau disease)、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜血管新生、視網膜血管新生)、以及異體移植、超急性排斥反應、血液透析、慢性栓塞性肺窘迫症候群(COPD)、哮喘、及吸入性肺炎。

在特定實施例中，補體相關病症係補體相關眼病，例如年齡相關性黃斑變性(AMD)或脈絡膜血管新生(CNV)。

在另一態樣中，本發明係關於與C3b而非C3選擇性結合且抑制C5與C3b結合之抗C3b抗體。

在一實施例中，抗體與表位結合，包括由抗體S77識別之C3b表位之殘基。

在另一實施例中，該抗體實質上與抗體S77結合相同表位。

在另一實施例中，抗體競爭性抑制抗體S77之結合。

在不同實施例中，抗體與C3b表位結合，該表位包含與抗體S77接觸之殘基。

在另一實施例中，抗體包含抗原結合位點，該位點包含與C3b接觸之抗體S77殘基。

在另一實施例中，抗體包含抗體S77之重(SEQ ID NOS 1-4)及/或輕(SEQ ID NOS 5-8)鏈CDR序列或係抗體S77或其片段。

在各實施例中，抗體係人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

抗體片段可係(例如)選自由以下組成之群：自抗體片段形成之Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、互補決定區(CDR)片段、線性抗體、單鏈抗體分子、微抗體、雙特異性抗體、及多特異性抗

104年7月30日修(更)正替換頁

體。

在另一態樣中，本發明係關於包含C3b拮抗劑(例如C3b抗體)及與其混合之醫藥上可接受載劑之醫藥組合物。

在特定實施例中，醫藥組合物係用於治療補體相關病症。

在另一態樣中，本發明係關於套組，其包含含有本發明C3b拮抗劑或C3b抗體之容器、或含有該拮抗劑或抗體之醫藥組合物、及投與該抗體或醫藥組合物以治療補體相關病症之說明書。

【圖式簡單說明】

圖1.在抗體噬菌體庫中之C3b淘選結果。

圖2.各種C3b抗體純系之噬菌體競爭結果。

圖3.與抗體YW144.2.43.S77(下文中簡稱為S77)Fab複合之C3b之晶體結構。C3b之 β 鏈係以綠色來顯示， α 鏈係以橙色來顯示。S77之重鏈(HC)及輕鏈(LC)分別係以深綠色及黃色來顯示。CRIg係停泊於以C3b:CRIg之共晶體結構為基礎之C3b:Fab複合物上且係以絳紅色顯示。

圖4.抗體S77與C3b之結合交互作用之近視圖。Fab對裂解C3具有特異性。C3b係以表面呈現形式來顯示，青色帶狀示意圖代表重疊於C3b結構上之C3。S77之HC及LC係以深綠色及黃色帶狀示意圖來顯示。C3b之表面係根據與S77之距離來著色。所有距離小於4.7 Å、4.0 Å及3.5 Å之原子皆分別著黃色、橙色及紅色。應注意，S77之LC與C3相反。然而C3之環能移動。

圖5.抗體S77 Fab片段之重(SEQ ID NOS 1-4)及輕(SEQ ID NOS 5-8)鏈之胺基酸序列。以紅色表示者係與C3b緊密接觸之殘基。

圖6.親代抗體YW144.2.43 Fab及其親和力成熟形式：144.2.43.S77 Fab(S77 Fab)對C3b之結合親和力。

圖7.SPR感應圖及S77 Fab與C3及C3b之結合親和力。

圖8.S77識別C3b，但不識別前驅分子C3。經純化C3b或C3係使用

多株C3抗體捕獲於微量滴定板中。S77 (A)或多株抗C3抗體(B)與所捕獲C3b或C3之結合係使用二級HRPO偶合抗體來測定。用TMB (KPL)顯影，在2N H₂SO₄中終止，且在450 nm處讀取吸光度。

圖9.IgG抗體S77選擇性抑制補體之旁路途徑而非典型途徑。在C1q-及因子B-缺失之血清中培養兔紅細胞及羊紅細胞且在高濃度抑制劑或對照蛋白存在下監測溶血作用。溶血表示為在無抑制劑情況下最大溶血作用之百分比。

圖10.親和力成熟之S77 Fab抑制補體之旁路途徑。

圖11.C3b Fab (S77)抑制C5轉化酶。C5轉化酶係根據先前所述進行處理(Rawal, N及Pangburn, M. *J Immunol.* 2001 Feb 15; 166(4):2635-42)。

圖12.IgG抗體S77及其Fab片段係藉由阻斷C5與C3b(轉化酶之非催化性亞單位)之結合來抑制C5轉化酶。在高濃度抑制劑存在下將C5添加至經C3b塗佈之板中。C5與C3b多聚體結合。

圖13.與因子H相反，S77不能使轉化酶衰變。藉由在高濃度S77或因子H存在下(陽性對照)生成板塗佈C3轉化酶來實施衰變分析。

圖14.S77抑制前驅因子B與C3b之結合，且抑制C3bBb轉化酶之形成。

圖15.在經結合fBb存在下S77可結合C3b且不能使C3轉化酶衰變。

圖16.S77抑制因子H與C3b之結合且抑制因子H之輔因子活性。

圖17.S77抑制CR1與C3b之結合。

圖18A及18B.抗HER2抗體rhuMAB 4D5-8輕(SEQ ID NO: 13)及重(SEQ ID NO: 14)鏈可變區之胺基酸序列。

圖19.C3b上與S77 Fab之HC及LC接觸之殘基(殘基833-839涵蓋SEQ ID NO: 15；殘基895-899涵蓋SEQ ID NO: 16)。

圖 20.S77 Fab 上與 C3b 接觸之殘基(殘基 1030-1033 涵蓋 SEQ ID NO: 17；殘基 1098-1107 涵蓋 SEQ ID NO: 18)。

圖 21. 人補體因子 C3 (SEQ ID NO: 9) 及小鼠補體因子 C3 (SEQ ID NO: 10) 之胺基酸序列。

【實施方式】

I. 定義

術語「C3」及「補體 C3」可互換使用且係指天然序列 C3 多肽。

「天然序列 C3」係不論其製備模式、與自自然界獲得之 C3 多肽具有相同胺基酸序列之多肽。因此，天然序列 C3 可係自自然界分離或可係藉由重組及/或合成方式來製造。術語「天然序列 C3」明確涵蓋天然存在之變體形式(例如替代性剪接形式)及天然存在之 C3 之等位基因變體，以及與自自然界獲得之 C3 多肽具有相同胺基酸序列之結構性構象變體。天然序列 C3 多肽明確包括天然序列人類 C3(圖 21，SEQ ID NO: 9；亦參見 De Bruijn 及 Fey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:708-712) 及非人動物之多肽，包括高等靈長類及其他非人哺乳動物，例如圖 21 之 SEQ ID NO: 10 中所示之小鼠 C3 序列。

本文所用術語「C3b」係指在藉由 C3 轉化酶裂解後自 C3b 產生之天然序列 C3b 多肽，該裂解自 C3 α -鏈之胺基末端釋放過敏毒素 C3a 片段且留下 C3b。術語「天然序列」與結合 C3 所定義者具有相同含義且明確包括 SEQ ID NO: 9 中之天然序列人 C3b。

所用術語「C3b 拮抗劑」具有最廣泛含義且包括能中和、阻斷、部分或完全抑制、廢除、降低或干擾 C3 生物活性之任何分子。C3b 拮抗劑包括(但不限於)抗 C3b 抗體及其抗原結合片段、與 C3b 結合且能中和、阻斷、部分或完全抑制、廢除、降低或干擾 C3b 活性(例如 C3b 參與補體相關病症之病理學之能力)之其他結合多肽、肽、及非肽小分

子。本文中諸如C3b抗體等C3b拮抗劑可特異性識別C3b而非其前體C3。

在本文中將「小分子」定義為分子量低於約600、較佳低於約1000道耳頓。

在諸如C3b抗體等本發明C3b拮抗劑之上下文中，「活性的」或「活性」或「生物活性」係拮抗(部分或完全抑制)C3b之生物活性之能力。C3b拮抗劑之較佳生物活性係在諸如補體相關病症等C3b相關疾病或病況之狀態(例如病理學)中獲得可量測改良之能力。可在體外或體內測試中測定活性，包括使用相關動物模型之結合分析或人類臨床實驗。

本文所用術語「補體相關病症」具有最廣泛含義且包括所有發病機制涉及諸如補體缺陷等補體系統活化異常之疾病及病理性病況。該術語明確包括可受益於C3轉化酶之抑制之疾病及病理性病況。該術語另外包括可受益於抑制(包括選擇性抑制)旁路補體途徑之疾病及病理性病況。補體相關病症包括(但不限於)炎症性疾病及自身免疫性疾病，例如類風濕性關節炎(RA)、急性呼吸窘迫症候群(ARDS)、缺血及再灌注後遠端組織損傷、心肺繞道手術期間之補體活化、皮膚炎、天皰瘡、狼瘡性腎炎及所導致之腎小球腎炎及血管炎、心肺繞道、心臟麻痺誘導之冠狀動脈內皮功能障礙、II型膜性增生性腎小球腎炎、IgA腎病、急性腎衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂症候群、黃斑變性疾病及其他補體相關眼病(例如年齡相關性黃斑變性(AMD)、脈絡膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血相關性視網膜病變、眼內炎、及其他眼內血管新生性疾病(例如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、希林二氏病、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜血管新生、視網膜血管新生))、以及異體移植、超急性排斥反應、血液透析、慢性栓塞性肺窘迫症候群(COPD)、哮喘、及

吸入性肺炎。

本文所用術語「補體相關眼病」具有最廣泛含義且包括所有其病理學涉及補體(包括典型途徑及旁路途徑，且尤其補體之旁路途徑)之眼部病況及疾病。此類別中明確包括所有與旁路途徑相關之眼部病況及疾病，其發生、發展、或加劇可藉由抑制旁路途徑來控制。補體相關眼病包括(但不限於)黃斑變性疾病(例如所有階段之年齡相關性黃斑變性(AMD)(包括幹性及濕性(非滲出性及滲出性)形式))、脈絡膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血相關性視網膜病變、眼內炎、及其他眼內血管新生性疾病(例如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、希林二氏病、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜血管新生、及視網膜血管新生)。較佳類別之補體相關眼病包括年齡相關性黃斑變性(AMD)(包括非滲出性(濕性)及滲出性(幹性或萎縮性)AMD)、脈絡膜血管新生(CNV)、糖尿病性視網膜病變(DR)、及眼內炎。

術語「炎症性疾病」及「炎症性病變」可互換使用且意指其中哺乳動物免疫系統之一部分引發、介導或造成可致使哺乳動物發病之炎症響應之疾病或病變。亦包括其中炎症響應之降低對疾病加劇具有改善效應之疾病。此術語內包括免疫介導之炎症性疾病，包括自身免疫性疾病。

術語「T細胞介導的」疾病意指其中T細胞在哺乳動物中直接或間接介導或致使發病之疾病。T細胞介導疾病可與細胞介導效應、淋巴因子介導效應等相關，且若B細胞受到(例如)由T細胞分泌之淋巴因子刺激，該疾病亦與B細胞相關效應相關。

免疫相關性及炎症性疾病(其中某些係T細胞介導疾病)之實例包括(但不限於)炎症性腸病(IBD)、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、幼年型慢性關節炎、脊椎關節病、全身性硬化症(硬皮症)、特發性炎

症性肌病(皮肌炎、多肌炎)、薛格連氏症候群(Sjögren's syndrome)、全身性血管炎、類肉瘤病、自身免疫性溶血性貧血(免疫全血細胞減少症、陣發性睡眠性血紅蛋白尿)、自身免疫性血小板減少症(特發性血小板減少性紫癜、免疫介導之血小板減少症)、甲狀腺炎(葛雷夫斯氏病(Grave's disease)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、幼年淋巴細胞性甲狀腺炎、萎縮性甲狀腺炎)、糖尿病、免疫介導之腎病(腎小球腎炎、腎小管間質性腎炎)、中樞及外周神經系統之脫髓鞘病(例如多發性硬化症、特發性多發性神經病)、肝膽疾病(例如傳染性肝炎(肝炎A、B、C、D、E及其他非嗜肝病毒)、自身免疫性慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、肉芽腫性肝炎、及硬化性膽管炎)、炎症性及纖維化肺病(例如囊性纖維化)、麩質敏感性腸病、惠普耳氏病(Whipple's disease)、自身免疫性或免疫介導之皮膚病(包括大疱性皮膚病、多形性紅斑及接觸性皮炎、乾癬)、過敏性肺病(例如嗜酸細胞性肺炎、特發性肺纖維化及過敏性肺炎)、移植相關疾病(包括移植排斥、移植物抗宿主疾病)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、及動脈粥樣硬化。

「治療」係指以預防病症發展或改變病症之病理學為目的來實施之干預。因此，「治療」係指治療性治療及預防性或防範性措施二者。需要治療之彼等包括已患有病症之彼等以及其中需預防病症之彼等。在免疫相關性疾病之治療中，治療藥劑可直接改變免疫響應組份之響應之強度，或使疾病對其他治療藥劑(例如抗生素、抗真菌劑、消炎劑、化學治療劑等)之治療更敏感。

諸如補體相關病症等疾病之「病理學」包括所有危害患者健康之現象。此包括(但不限於)異常或不受控細胞生長(嗜中性粒細胞、嗜酸細胞、單核細胞、淋巴細胞)、抗體產生、自體抗體產生、補體產生、對相鄰細胞正常功能之干擾、異常濃度之細胞因子或其他分泌產

物之釋放、任何炎症或免疫響應之抑制或加重、炎症細胞(嗜中性粒細胞、嗜酸細胞、單核細胞、淋巴細胞)向細胞空間中之浸潤等。

本文所用術語「哺乳動物」係指分類為哺乳動物之任何動物，其包括(但不限於)人類、高等靈長類、家畜或農畜、及動物園動物、運動動物或玩賞動物(例如馬、豬、牛、犬、貓及雪貂)等。在本發明較佳實施例中，哺乳動物為人類。

與一或多種其他治療藥劑「組合」投與包括同時(一起)投與及以任一順序連續投與。

「治療有效量」係指在諸如補體相關病症等目標疾病或病況之狀態(例如病理學)中達成可量測改良所需之諸如「C3b抗體」等「C3b拮抗劑」之量。

術語「控制序列」係指在特定宿主有機體內表現可操作地連接之編碼序列所需的DNA序列。舉例而言，適用於原核生物之控制序列包括啟動子、(視需要)操縱子序列、及核糖體結合位點。已知真核細胞可利用啟動子、聚腺苷酸化信號及增強子。

當使核酸與另一核酸序列具有功能關係時，該核酸「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則該DNA與編碼該多肽之DNA可操作地連接；若啟動子或增強子可影響編碼序列之轉錄，則該啟動子或增強子與該編碼序列可操作地連接；或若核糖體結合位點之定位可促進轉譯，則該核糖體結合位點與該編碼序列可操作地連接。一般而言，「可操作地連接」意指所連接DNA序列係鄰接序列且在分泌前導序列情況下係處於閱讀期之鄰接序列。然而，增強子不必係鄰接增強子。可藉由在便利的限制位點處之結合來完成連接。若不存在該等限制位點，則可根據習知慣例使用合成性寡核苷酸接合體或連接體。

雜交反應之「嚴格性」可由熟習此項技術者容易地確定，且一

般係基於探針長度、洗滌溫度、及鹽濃度之經驗計算。一般而言，較長探針需要較高溫度來達成適當退火，而較短探針需要較低溫度。當互補鏈所處環境之溫度低於其解鏈溫度時，雜交一般取決於變性DNA再退火之能力。探針與可雜交序列之間期望同源程度愈高，可使用之相對溫度愈高。因此可得知，較高相對溫度可傾向於使反應條件更嚴格，而較低溫度所需之反應條件嚴格性較低。關於雜交反應嚴格性之其他細節及闡釋參見Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

本文所定義之「嚴格條件」或「高嚴格性條件」可藉由使用以下方式之方法來鑒定：(1)洗滌中採用低離子強度及高溫，例如在50℃下採用0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉；(2)在雜交期間採用諸如甲醯胺等變性劑，例如在42℃下採用50% (v/v)甲醯胺及0.1%牛血清白蛋白/0.1%蔗糖聚糖(Ficoll)/0.1%聚乙炔基吡咯啉酮/具有750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉之50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)；或(3)在42℃下採用50%甲醯胺、5 x SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5 x Denhardt's溶液、經超音波處理之鮭魚精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS、及10%硫酸葡聚糖，且在42℃下於0.2 x SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)中洗滌且在55℃下於50%甲醯胺中洗滌，之後在55℃下於含有EDTA之0.1 x SSC中實施高嚴格性洗滌。

「中等嚴格性條件」可如Sambrook等人在*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989中所述來鑒定且包括使用嚴格性低於上述彼等之洗滌溶液及雜交條件(例如溫度、離子強度及%SDS)。中等嚴格性條件之實例係在37℃下於包含以下之溶液中培養過夜：20%甲醯胺、5 x SSC(150 mM NaCl、15 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5 x Denhardt's溶液、10%硫酸

葡聚糖、及20 mg/mL變性剪切鮭魚精子DNA，之後在約37-50°C下於1 x SSC中洗滌過濾器。熟習此項技術者可瞭解如何根據需要調節溫度、離子強度等以適應諸如探針長度及諸如此類等因素。

本文所用術語「經標記表位」係指包含與「標籤多肽」融合之本發明多肽之嵌合多肽。標籤多肽具有充足殘基以提供可針對其製造抗體之表位，且亦足夠短而不會干擾其欲融合之多肽之活性。標籤多肽較佳亦足夠獨特以使得抗體基本不與其它表位發生交叉反應。適宜標籤多肽一般具有至少6個胺基酸殘基且通常具有約8至50個胺基酸殘基之間(較佳具有約10至20個胺基酸殘基)。

所用術語「抗體」具有最廣泛含義且明確涵蓋(但不限於)可識別C3而非天然C3之裂解片段之單獨抗體，例如與C3b特異性結合之抗C3b單株抗體及具有多表位特異性之抗體組合物。本文所用術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群獲得之抗體，即除可能存在的極少量天然發生之突變外，構成該群體之各個抗體均相同。

本文所用術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群獲得之抗體，即除可能存在的極少量天然發生之突變外，構成該群體之各個抗體均相同。單株抗體具有高度特異性，其係針對單個抗原性位點。此外，與通常包括針對不同決定子(表位)之不同抗體之習用(多株)抗體製劑相反，每一單株抗體僅針對抗原上之單個決定子。修飾語「單株」顯示自實質上同源之抗體群獲得之抗體之特徵，且不應理解為該抗體之生產需要藉助任一特定方法。舉例而言，欲用於本發明中之單株抗體可藉由Kohler等人(1975)首先在*Nature* 256:495中闡述之雜交瘤方法來製備，或可藉由重組DNA方法來製備(參見例如美國專利第4,816,567號)。「單株抗體」亦可使用(例如)Clackson等人(1991) *Nature* 352:624-628及Marks等人(1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597中所述之技術自噬菌體抗體庫分離。

本文中單株抗體明確包括「嵌合」抗體(免疫球蛋白)以及該等抗體之片段，其中重鏈及/或輕鏈之部分與得自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體之對應序列相同或同源，而鏈之其餘部分與得自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體之對應序列相同或同源，但其必須表現出期望生物活性(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人(1984)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，81:6851-6855)。

「人類化」形式之非人(例如鼠類)抗體係含有最少量衍生自非人免疫球蛋白之序列之嵌合抗體。人類化抗體大部分係人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體超變區之殘基係由來自諸如小鼠、大鼠或非人靈長類等非人物種超變區(供體抗體)且具有期望特異性、親和力及容量之殘基替代。在某些情況下，人類免疫球蛋白之Fv框架區(FR)殘基係由對應非人殘基替代。此外，人類化抗體可包含未曾在受體抗體或供體抗體中發現之殘基。實施該等改變可進一步改良抗體性能。一般而言，人類化抗體可包含實質上所有至少一個、且通常兩個可變結構域，其中所有或實質上所有超變環皆對應於非人免疫球蛋白之彼等，且所有或實質上所有FR區皆係人類免疫球蛋白序列之FR區。視需要人類化抗體亦可包含至少部分免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白恆定區)。其他細節參見Jones等人(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323-329；及Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596。

「物種依賴性抗體」係一抗體，其與來自第一哺乳動物物種之抗原之結合親和力比與來自第二哺乳動物物種之該抗原之類似物之結合親和力更強。通常物種依賴性抗體與人類抗原「特異性結合」(即結合親和力(K_d)值不超過約 1×10^{-7} M，較佳不超過約 1×10^{-8} M且最佳不超過約 1×10^{-9} M)，但其與來自第二非人哺乳動物物種之抗原類似物之結合親和力比其與人類抗原之結合親和力弱至少約50倍，或至

少約500倍，或至少約1000倍。物種依賴性抗體可為上述各類抗體中之任一種，但較佳係人類化或人類抗體。

本文所用「抗體突變體」或「抗體變體」係指物種依賴性抗體之胺基酸序列變體，其中物種依賴性抗體之一或多個胺基酸殘基經改變。該等突變體與物種依賴性抗體之之序列一致性或相似性必然低於100%。在較佳實施例中，抗體突變體之胺基酸序列與物種依賴性抗體重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列之胺基酸序列一致性或相似性為至少75%，更佳至少80%，更佳至少85%，更佳至少90%，且最佳至少95%。在本文中，關於此序列之一致性或相似性定義為：在比對序列且(若需要)引入缺口以達成最大序列一致性百分比後，候選序列中與物種依賴性抗體殘基相同(即相同殘基)或相似(即根據一般側鏈特性來自相同種類之胺基酸殘基，參見下文)之胺基酸殘基之百分比。不應認為抗體序列中可變結構域外之N-末端、C-末端或內部延長、缺失或插入可影響序列一致性或相似性。

「經分離」抗體係已經鑒定並自其自然環境組份中分離及/或回收之抗體。其自然環境之污染組份係可干擾抗體之診斷或治療應用之物質，且可包括酶、激素、及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在較佳實施例中，可將抗體純化至(1)如藉由Lowry方法測定，含有95重量%以上之抗體，且最佳含有99重量%以上之抗體，(2)如藉由使用旋杯式序列分析儀測定，達成足以獲得至少15個N-末端殘基或內部胺基酸序列殘基之程度，或(3)如在還原或非還原條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或(較佳)銀染藉由SDS-PAGE量測，達成均一性。既然不應存在至少一種抗體自然環境組份，因此所分離抗體包括重組細胞內之原位抗體。然而，所分離抗體通常應藉由至少一個純化步驟來製備。

本文所用「抗體可變結構域」係指抗體分子之輕鏈及重鏈中包

括互補決定區(CDR；即CDR1、CDR2、及CDR3)、及框架區(FR)之胺基酸序列之部分。V_H係指重鏈之可變結構域。V_L係指輕鏈之可變結構域。根據本發明中所用方法，可根據Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987及1991))來定義分配於CDR及FR中之胺基酸位置。亦可根據Kabat之該文獻來對抗體或抗原結合片段之胺基酸實施編號。

本文所用術語「互補決定區」(CDR；即CDR1、CDR2、及CDR3)係指抗體可變結構域之胺基酸殘基，該等殘基之存在對抗原結合而言係必須的。每個可變結構域通常具有三個CDR區，其經鑒定為CDR1、CDR2及CDR3。每個互補決定區皆可包含來自由Kabat所定義之「互補決定區」之胺基酸殘基(即輕鏈可變結構域中之大約殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)及89-97 (L3)及重鏈可變結構域中之31-35 (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)；Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD. (1991))及/或來自「超變環」之彼等殘基(即輕鏈可變結構域中之大約殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)及91-96 (L3)及重鏈可變結構域中26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)；Chothia及Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917)。在某些情況下，互補決定區可包括來自由Kabat所定義之CDR區及超變環二者之胺基酸。舉例而言，抗體4D5之重鏈之CDRH1包括胺基酸26-35。

「框架區」(下文中稱為FR)係除CDR殘基外之彼等可變結構域殘基。通常每個可變結構域具有四個FR，其經鑒定為FR1、FR2、FR3及FR4。若根據Kabat來定義CDR，則輕鏈FR殘基大致定位於殘基1-23 (LCFR1)、35-49 (LCFR2)、57-88 (LCFR3)、及98-107 (LCFR4)處且重鏈FR殘基大致定位於重鏈殘基中之殘基1-30 (HCFR1)、36-49 (HCFR2)、66-94 (HCFR3)、及103-113 (HCFR4)處。若CDR包含來自

超變環之胺基酸殘基，則輕鏈FR殘基大致定位於輕鏈中之殘基1-25 (LCFR1)、33-49 (LCFR2)、53-90 (LCFR3)、及97-107 (LCFR4)處且重鏈FR殘基大致定位於重鏈殘基中之殘基1-25 (HCFR1)、33-52 (HCFR2)、56-95 (HCFR3)、及102-113 (HCFR4)處。在某些情況下，當CDR包含來自由Kabat定義之CDR及超變環二者之胺基酸時，可相應調整FR殘基。舉例而言，當CDRH1包括胺基酸H26-H35時，重鏈FR1殘基位於位置1-25處且FR2殘基位於位置36-49處。

本文所用「密碼子組」係指用於編碼期望變體胺基酸之不同核苷酸三聯體序列組。可藉由(例如)固相合成法來合成寡核苷酸組，其包括可代表由密碼子組提供之核苷酸三聯體之所有可能組合且可編碼期望胺基酸類別之序列。密碼子名稱之標準形式係IUB代碼形式，其係業內已知的且闡述於本文中。密碼子組通常由3個斜體大寫字母來表示，例如NNK、NNS、XYZ、DVK及諸如此類。因此本文所用「非隨機密碼子組」係指部分(較佳完全)滿足本文所述胺基酸選擇標準之編碼選擇胺基酸之密碼子組。在某些位置具有經選擇核苷酸簡並性之寡核苷酸之合成係該領域已知的，例如TRIM方法(Knappek等人，(1999) *J. Mol. Biol.* 296:57-86)；Garrard & Henner (1993) *Gene* 128:103)。該等具有特定密碼子組之寡核苷酸組可使用市售核苷酸合成器來合成(可自(例如)Applied Biosystems, Foster City, CA購得)或可在市場上獲得(例如自Life Technologies, Rockville, MD購得)。因此，所合成具有特定密碼子組之寡核苷酸組通常包括複數個具有不同序列之寡核苷酸，由密碼子組建立的差異位於整體序列中。本發明中所用寡核苷酸具有可與可變結構域核苷酸模板雜交之序列，且亦可(但不必)包括可用於(例如)選殖目的之限制酶切位點。

本文所用術語「抗體片段」具有最廣泛含義且包括(但不限於)自抗體片段形成之Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、及互補決

定區(CDR)片段、線性抗體、單鏈抗體分子、微抗體、雙特異性抗體、及多特異性抗體。

「Fv」片段係含有完整抗原識別及結合位點之抗體片段。此區域係由一重鏈可變結構域與一輕鏈可變結構域緊密結合之二聚體構成，在(例如)scFv中該結合實質上可為共價結合。在此組態中每一可變結構域之三個CDR交互作用以界定V_H-V_L二聚體表面上之抗原結合位點。六個CDR或其亞型共同賦予抗體以抗原結合特異性。然而，甚至單一可變結構域(或僅包含三個對抗原具有特異性之CDR之半個Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，但其親和力通常低於整個結合位點。

「Fab」片段含有輕鏈之可變及恆定結構域及重鏈之可變結構域及第一恆定結構域(CH1)。F(ab')₂抗體片段包含一對Fab片段，其一般藉由其間之鉸鏈半胱胺酸在其羧基末端附近共價連接。抗體片段之其它化學偶合亦為業內所知。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之V_H及V_L結構域，其中該等結構域存於單多肽鏈中。一般而言，Fv多肽進一步包含位於V_H與V_L結構域之間之多肽連接體，其使scFv可形成期望之抗原結合結構。關於scFv之綜述參見Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編輯, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)。

術語「雙特異性抗體」係指具有2個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含在同一多肽鏈(V_H及V_L)中與輕鏈可變結構域(V_L)連接之重鏈可變結構域(V_H)。藉由使用因長度過短而無法使同一鏈上之兩個結構域配對之連接體，來迫使結構域與另一鏈之互補結構域配對並形成兩個抗原結合位點。雙特異性抗體更全面地闡述於(例如)歐洲專利第404,097號；WO 93/11161；及Hollinger等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448中。

用語「線性抗體」係指Zapata等人(1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062)所述之抗體。簡言之，該等抗體包含一對串聯Fd區段(V_H - C_H1 - V_H - C_H1)，其與互補輕鏈多肽共同形成一對抗原結合區。線性抗體可具有雙特異性或單特異性。

本文所用「庫」係指複數種抗體或抗體片段序列(例如本發明多肽)或編碼該等序列之核酸，該等序列之不同之處在於根據本發明方法向其中引入的變體胺基酸之不同組合。

「噬菌體呈現(display)」係指藉由其以與噬菌體(例如絲狀噬菌體、顆粒)表面上之至少部分外殼蛋白組成之融合蛋白形式呈現變體多肽之技術。噬菌體呈現之應用係基於以下事實：在隨機化蛋白變體之大型庫中可快速有效地分類以高親和力與靶抗原結合之彼等序列。在噬菌體上呈現肽及蛋白庫已用於在上百萬種多肽中篩選具有特定結合特性者。多價噬菌體呈現法已用於經由與絲狀噬菌體之基因III或基因VIII融合來呈現隨機小肽及小蛋白。Wells及Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362，及其中所引用之參考文獻。在單價噬菌體呈現中，蛋白或肽庫係與基因III或其部分融合且在野生型基因III蛋白存在下以低程度表現，從而使噬菌體顆粒呈現一拷貝融合蛋白或不呈現融合蛋白。相對於多價噬菌體其親和力效應降低，從而使得分類係基於固有配體親和力來進行，且使用可簡化DNA處理之噬菌粒載體。Lowman及Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216。

「噬菌粒」係具有細菌性複製起點(例如ColE1)及噬菌體基因間隔區之拷貝之質粒載體。噬菌粒可用於任何已知噬菌體，包括絲狀噬菌體及 λ 形噬菌體。一般質粒亦含有針對抗生素抗性之可選擇標記。經選殖入該等載體中之DNA區段可作為質粒增殖。當向具有該等載體之細胞提供增殖噬菌體顆粒所需之所有基因時，質粒複製模式改變為

滾環式複製以生成質粒DNA一條鏈之拷貝且封裝噬菌體顆粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌體顆粒。此術語包括含有噬菌體外殼蛋白基因或其片段之噬菌粒，該基因或其片段與異源多肽基因連接作為基因融合以使異源多肽呈現於噬菌體顆粒表面上。

術語「噬菌體載體」意指含有異源基因且能複製之噬菌體之雙鏈複製形式。噬菌體載體具有容許噬菌體複製及噬菌體顆粒形成之噬菌體複製起點。噬菌體較佳係絲狀噬菌體(例如M13、f1、fd、Pf3噬菌體)或其衍生物、或 λ 形噬菌體(例如 λ 、21、phi80、phi81、82、424、434等)或其衍生物。

本文所用「溶劑可到達位置」係指根據抗體或抗原結合片段之結構(結構總體及/或建模結構)而確定為溶劑可到達及/或與諸如抗體特異性抗原等分子接觸之來源抗體或抗原結合片段之重鏈及輕鏈可變區中的胺基酸位置。該等位置通常存於CDR中及蛋白質外部。本文所定義抗體或抗原結合片段之溶劑接觸位置可使用業內已知多種算法中之任一種來確定。較佳地，溶劑接觸位置係藉由來自抗體3維模型之坐標(較佳)使用諸如InsightII程序(Accelrys, San Diego, CA)等電腦程序來確定。溶劑接觸位置亦可使用業內已知算法來確定(例如Lee及Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379及Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548)。溶劑接觸位置之確定可使用適用於蛋白建模之軟體及自抗體獲得之3維結構資訊來實施。可用於該等目的之軟體包括SYBYL Biopolymer Module軟體(Tripos Associates)。一般且較佳地，倘若算法(程序)需要用戶輸入尺寸參數，則將用於計算之探針之「尺寸」設定為約1.4埃或更小半徑。此外，使用個人電腦軟體確定溶劑可到達區域及區的方法闡述於Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18(4): 377-386中。

II. 詳細說明

補體系統

補體在身體防禦中具有關鍵作用，且其與免疫系統其他組份一起保護個體以免病原體侵襲身體。然而，若補體未經適當活化或控制，補體亦可引發宿主組織之損傷。補體之不當活化涉及稱為補體相關疾病或病症之多種疾病(例如免疫複合體及自身免疫疾病)及各種炎性病況(包括補體介導之炎性組織損傷)之發病機制。補體相關病症之病理學各不相同，且可能涉及長時間或短時間之補體活化、整個級聯之活化、僅一個級聯(例如典型或旁路途徑)之活化、僅級聯中某些組份之活化等。在某些疾病中，補體片段之補體生物活性導致組織損傷及疾病。因此，補體抑制劑具有高治療潛力。旁路途徑之選擇性抑制劑尤其有用，因為經由典型途徑自血液清除病原體及其他有機體之機能可完整保留。

C3b抗體及其在預防及治療補體相關病症中之用途

本發明(至少部分)係基於可特異性識別C3之裂解片段而非天然C3之抗體之研發。本發明特別關於使用人類組合抗體庫及噬菌體呈現所研發之識別且特異性結合C3b之抗體，其中C3b特異性噬菌體之增富係用飽和量之C3阻斷來達成。使用此方法能研發對於C3之活化形式具有特異性之抗體。此外，該等人類抗體再經親和力成熟，由此提高其在體外溶血分析中之效力。Fab片段係由選殖產生，顯示保留了抑制補體經由旁路途徑活化之高效力。解析Fab(稱為S77)與C3b複合之共結構，且對涉及C3b-S77交互作用之殘基定位。據吾等所知，此係第一噬菌體衍生之抗體，對C3片段具有選擇性，可抑制補體之旁路途徑。

本發明抗體及其他C3b特異性拮抗劑可用於預防及治療補體相關病症。補體相關疾病之特定實例包括(但不限於)類風濕性關節炎(RA)、急性呼吸窘迫症候群(ARDS)、缺血及再灌注後遠端組織損

傷、心肺繞道手術期間之補體活化、皮膚炎、天皰瘡、狼瘡性腎炎及所導致之腎小球腎炎及血管炎、心肺繞道、心臟麻痺誘導之冠狀動脈內皮功能障礙、II型膜性增生性腎小球腎炎、IgA腎病、急性腎衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂症候群、黃斑變性疾病及其他補體相關眼病(例如年齡相關性黃斑變性(AMD)、脈絡膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血相關性視網膜病變、眼內炎、及其他眼內血管新生性疾病(例如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、希林二氏病、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜血管新生、視網膜血管新生))、以及異體移植、超急性排斥反應、血液透析、慢性栓塞性肺窘迫症候群(COPD)、哮喘、及吸入性肺炎。

作為補體相關疾病之實例之炎症性病況之更廣泛列表包括(例如)炎症性腸病(IBD)、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、幼年型慢性關節炎、脊椎關節病、全身性硬化症(硬皮症)、特發性炎症性肌病(皮膚炎、多肌炎)、薛格連氏症候群、全身性血管炎、類肉瘤病、自身免疫性溶血性貧血(免疫全血細胞減少症、陣發性睡眠性血紅蛋白尿)、自身免疫性血小板減少症(特發性血小板減少性紫癜、免疫介導之血小板減少症)、甲狀腺炎(葛雷夫斯氏病、橋本氏甲狀腺炎、幼年淋巴細胞性甲狀腺炎、萎縮性甲狀腺炎)、糖尿病、免疫介導之腎病(腎小球腎炎、腎小管間質性腎炎)、中樞及外周神經系統之脫髓鞘病(例如多發性硬化症、特發性多發性神經病)、肝膽疾病(例如傳染性肝炎(肝炎A、B、C、D、E及其他非嗜肝病毒)、自身免疫性慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、肉芽腫性肝炎、及硬化性膽管炎)、炎症性及纖維化肺病(例如囊性纖維化)、麩質敏感性腸病、惠普耳氏病、自身免疫性或免疫介導之皮膚病(包括大皰性皮膚病、多形性紅斑及接觸性皮炎)、乾癬、過敏性肺病(例如嗜酸細胞性肺炎、特發性肺纖維化及過敏性肺炎)、移植相關疾病(包括移植排斥及移植物抗宿

主疾病)。

在全身性紅斑狼瘡中，疾病之中樞介質為針對自體蛋白質/組織之自體反應性抗體之產生及隨後之免疫介導炎症之發生。抗體直接或間接介導組織損傷。儘管在組織損傷中未顯示直接涉及T淋巴細胞，但自體反應性抗體之生成需要T淋巴細胞。因此疾病之發生依賴於T淋巴細胞。在臨床上多個器官及系統受到侵襲，包括腎、肺、肌肉骨骼系統、皮膚黏膜、眼、中樞神經系統、心血管系統、胃腸道、骨髓及血液。

類風濕性關節炎(RA)係慢性全身性自身免疫性炎症疾病，其主要涉及關節軟骨由此受損之多處關節之滑膜。發病機制係T淋巴細胞依賴性且係與類風濕因子(針對自體IgG之自體抗體)之產生相關，其導致在關節液及血液中形成高濃度免疫複合體。關節中之該等複合體可誘導淋巴細胞及單核細胞顯著浸潤至滑膜中及隨後滑液之顯著變化；關節間隙/關節液由類似細胞以及許多嗜中性粒細胞浸潤。受影響組織主要係關節，通常以對稱模式受到影響。然而，關節外疾病之發生亦具有兩種主要形式。一種形式係形成關節外損傷並伴隨進行性關節疾病及肺纖維化、血管炎、及皮膚潰瘍之典型損傷。關節外疾病之第二種形式係所謂費爾蒂氏症候群(Felty's syndrome)，其在RA病程後期發生，有時在關節疾病休眠後發生，且涉及嗜中性白細胞減少症、血小板減少症及脾腫大之存在。此可伴隨有多個器官中之血管炎以及梗塞、皮膚潰瘍及壞疽之形成。患者亦經常在覆蓋受侵襲關節之皮下組織中發生類風濕結節；結節後期具有由混合炎症性細胞浸潤圍繞之壞疽中心。在RA中發生之其他現象包括：心包炎、肋膜炎、冠狀動脈炎、伴隨肺纖維化之間質性肺炎、乾燥性角結膜炎、及類風濕結節。

幼年型慢性關節炎係慢性特發性炎症性疾病，其經常在小於16

歲之年齡開始發作。其表型與RA具有一定類似性；某些類風濕因子陽性患者可歸類為幼年型類風濕性關節炎。該疾病可再分為三種主要類別：少關節性、多關節性、及全身性。關節炎可為嚴重關節炎且通常具有破壞性並導致關節強直及生長阻滯。其他現象可包括慢性前葡萄膜炎及全身性澱粉樣變性。

脊椎關節病係具有某些共同臨床特徵且與HLA-B27基因產物之表現具有共同聯繫之病症類別。病症包括：強直性脊椎炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)(反應性關節炎)、與炎症性腸病相關之關節炎、與乾癬相關之脊椎炎、幼年發作之脊椎關節病及未分化脊椎關節病。區別性特徵包括伴隨或不伴隨脊椎炎之骶髋關節炎；炎症性不對稱關節炎；與HLA-B27(I類MHC之HLA-B基因座之血清學定義的等位基因)相關；眼部炎症；及不存在與其他類風濕性疾病相關之自體抗體。被視為對誘導疾病最關鍵的細胞係CD8+ T淋巴細胞，該細胞以I類MHC分子所呈遞之抗原為靶。CD8+ T細胞可針對I類MHC等位基因HLA-B27反應，如同該等位基因係由I類MHC分子所表現之外源肽。據假定，HLA-B27之表位可模擬細菌性或其他微生物性抗原表位且因此誘導CD8+ T細胞響應。

全身性硬化症(硬皮症)具有未知病源學。疾病之標誌係皮膚之硬結；此同樣係由活性炎症性過程所誘導。硬皮症可為局部性或全身性；血管性損傷普遍存在且微血管系統中之內皮細胞損傷在全身性硬化症發展中係早期重要事件；血管性損傷可係免疫介導的。免疫學基礎係由皮膚損傷中單核細胞浸潤之存在及許多患者中抗核抗體之存在來展示。在皮膚損傷中成纖維細胞之細胞表面上ICAM-1經常經增量調節，此表明T細胞與該等細胞之交互作用在疾病之發病機制中具有一定作用。所涉及其他器官包括：胃腸道：導致異常蠕動/運動性之平滑肌萎縮及纖維化；腎：侵襲小弓狀動脈及小葉間動脈且由此降低

腎皮質血流量之向心性內皮下血管內膜增生，其導致蛋白尿、氮質血症及高血壓；骨骼肌：萎縮、間質性纖維化；炎症；肺：間質性肺炎及間質性纖維化；及心臟：收縮帶壞死、結癥/纖維化。

特發性炎症性肌病(包括皮肌炎、多肌炎及其他病症)係導致肌無力之具有未知病源學之慢性肌肉炎症病症。肌肉損傷/炎症經常係全身性及進行性。自體抗體係與大多數形式相關。該等肌炎特異性自體抗體係針對且抑制蛋白質合成中所涉及組份、蛋白質及RNA之功能。

薛格連氏症候群之病因係免疫介導炎症及隨後對淚腺及唾液腺之功能性破壞。該疾病可與炎症性結締組織疾病相關或伴隨由炎症性結締組織疾病。該疾病係與針對Ro及La抗原之自體抗體之產生相關，該二抗原皆係小RNA蛋白複合體。損傷導致乾燥性角結膜炎、口腔乾燥症，以及其他現象或相關性，包括膽汁性肝硬化、外周神經病變或感覺神經病變、及可觸知紫癍。

全身性血管炎包括其中原發性損傷為炎症且隨後為血管損傷之疾病，其導致由受影響血管供血之組織發生缺血/壞死/變性且在某些情況下最後導致末端器官功能障礙。血管炎亦可作為其他免疫-炎症介導疾病(例如類風濕性關節炎、全身性硬化症等)之繼發性損傷或後遺症而發生，在亦與免疫複合體形成相關之疾病中尤其如此。屬於原發全身性血管炎類別之疾病包括：全身壞死性血管炎；結節性多動脈炎、過敏性脈管炎及肉芽腫病、多血管炎；韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)；淋巴瘤樣肉芽腫病；及巨細胞動脈炎。各種血管炎包括：黏膜皮膚淋巴結症候群(MLNS或川崎病(Kawasaki's disease))、孤立CNS血管炎、貝塞病(Behet's disease)、閉塞性血栓性脈管炎(伯格氏病(Buerger's disease))及皮膚性壞死性靜脈炎。據信所列血管炎大多數類型之致病機制主要係歸因於免疫球蛋白複合體在血管壁中之沈積及隨後經由ADCC、補體活化或二者之炎症性響應之誘

導。

類肉瘤病係病源未知之病況，其特徵為體內幾乎任一組織中皆存在上皮樣肉芽腫；最普遍的是涉及肺。發病機制涉及在疾病位點之活化巨噬細胞及淋巴樣細胞之持久性，及隨後由該等細胞類型釋放之活性產物之局部及全身性釋放導致之慢性後遺症。

自身免疫性溶血性貧血(包括自身免疫性溶血性貧血、免疫全血細胞減少症、及陣發性夜間血紅蛋白尿)係由抗體之產生而引發，該抗體可與在紅血細胞(及在某些情況下亦包括血小板之其他血細胞)表面上表現之抗原反應，且該自身免疫性溶血性貧血係經由補體介導溶胞及/或ADCC/Fc-受體介導機制去除彼等抗體覆蓋細胞之反映。

在自身免疫性血小板減少症(包括血小板減少性紫癜、及在其他臨床環境下的免疫介導之血小板減少症)中，血小板破壞/去除之發生係由以下事件引發：抗體或補體與血小板連接且隨後藉由補體溶胞、ADCC或FC受體介導機制去除。

甲狀腺炎(包括葛雷夫斯氏病、橋本氏甲狀腺炎、幼年淋巴細胞性甲狀腺炎、及萎縮性甲狀腺炎)係由以下事件所引發：針對甲狀腺抗原之自身免疫響應以及與存於甲狀腺中且通常對甲狀腺具有特異性之蛋白質反應之抗體之產生。現存實驗性模型包括自發性模型：大鼠(BUF及BB大鼠)及雞(肥胖雞品系)；可誘導模型：使用甲狀腺球蛋白、甲狀腺微粒體抗原(甲狀腺過氧化物酶)實施之動物免疫。

I型糖尿病或胰島素依賴性糖尿病係胰島 β 細胞之自身免疫性破壞；此破壞係藉由自體抗體及自體反應性T細胞介導。針對胰島素或胰島素受體之抗體亦可產生胰島素非反應性表型。

包括腎小球腎炎及腎小管間質性腎炎之免疫介導腎病係由抗體或T淋巴細胞介導之對腎臟組織的損傷所引發，該損傷係由針對腎抗原之自身反應性抗體或T細胞之產生直接引發，或係由腎臟中可針對

其他非腎抗原反應之抗體及/或免疫複合體之沈積間接引發。因此可導致免疫複合體形成之其他免疫介導疾病亦可誘導免疫介導腎病作為間接後遺症。直接及間接免疫機制二者皆導致炎症性響應，該響應可在腎臟組織中產生/誘導損傷發生並由此導致器官功能損傷且在某些情況下使腎衰竭加劇。損傷之發病機制中可涉及體液性及細胞性免疫機制二者。

中樞及外周神經系統之脫髓鞘病包括多發性硬化症；特發性脫髓鞘多發性神經病或格-巴二氏症候群(Guillain-Barr syndrome)；及慢性炎症性脫髓鞘多發性神經病，據信該等疾病具有自身免疫性基礎且由於直接引發之少突膠質細胞或髓磷脂之損傷而導致神經脫髓鞘。在MS中有證據表明疾病之誘導及加劇係依賴於T淋巴細胞。多發性硬化症係T淋巴細胞依賴性脫髓鞘病且具有復發-緩解型病程或慢性進行性病程。病源學係未知；然而，病毒感染、遺傳素質、環境、及自身免疫皆具有作用。損傷含有主要由T淋巴細胞介導之浸潤、小神經膠質細胞及浸潤巨噬細胞；CD4+T淋巴細胞係損傷中之主要細胞類型。少突膠質細胞死亡及隨後之脫髓鞘之機制係未知，但可能係由T淋巴細胞來驅動。

包括嗜酸細胞性肺炎、特發性肺纖維化及過敏性肺炎之炎症性及纖維化肺病可涉及失調免疫-炎症性響應。對該響應之抑制可能具有治療效益。

包括大皰性皮膚病、多形性紅斑及接觸性皮炎之自身免疫性或免疫介導皮膚病係由自體抗體來介導，該等自體抗體之生成具有T淋巴細胞依賴性。

乾癬係T淋巴細胞介導炎症性疾病。損傷含有T淋巴細胞、巨噬細胞及抗原呈遞細胞、及某些嗜中性粒細胞之浸潤。包括哮喘；過敏性鼻炎；特應性皮炎；食物超敏反應；及蕁麻疹之過敏性疾病具有T

淋巴細胞依賴性。該等疾病主要係由T淋巴細胞誘導炎症、IgE介導炎症或二者之組合來介導。

包括移植排斥及移植物抗宿主疾病(GVHD)之移植相關疾病具有T淋巴細胞依賴性；T淋巴細胞功能之抑制具有改善作用。

諸如C3b抗體等本發明C3b拮抗劑亦可用於預防及治療補體相關眼病(病理學涉及補體(包括典型途徑及旁路途徑，且尤其補體之旁路途徑)之所有眼部病況及疾病)，例如黃斑變性疾病(例如年齡相關性黃斑變性(AMD)之所有階段，包括幹性及濕性(非滲出性及滲出性)形式)、脈絡膜血管新生(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血相關性視網膜病變、眼內炎、及其他眼內血管新生性疾病(例如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、希林二氏病、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜血管新生、及視網膜血管新生)。補體相關眼病之較佳類別包括年齡相關性黃斑變性(AMD)，其包括非滲出性(濕性)及滲出性(幹性或萎縮性)AMD、脈絡膜血管新生(CNV)、糖尿病性視網膜病變(DR)、及眼內炎。

AMD係年齡相關性黃斑變性，在年齡超過60歲之個體中其係不可逆視覺功能障礙之主要病因。存在兩種類型之AMD，非滲出性(幹性)及滲出性(濕性)AMD。幹性或非滲出性形式涉及在中央視網膜(黃斑)下視網膜色素上皮(RPE)中之萎縮性及肥大性變化以及RPE上之沈積(脈絡膜疣)。患有非滲出性AMD之患者可發展為AMD之濕性或滲出性形式，其中稱為脈絡膜新生血管膜(CNVM)之異常血管在視網膜下發生，滲漏流體及血液，且最終在視網膜中及視網膜下引發致盲盤狀癥痕。非滲出性AMD更常見，其通常係滲出性AMD之前身。非滲出性AMD之呈現形式各異；可呈現硬性脈絡膜疣、軟性脈絡膜疣、RPE地圖狀萎縮、及色素凝集。在AMD早期補體組份沈積於RPE上且係脈絡膜疣之主要成份。

本發明尤其係關於治療高風險AMD，包括第3類及第4類AMD。第3類AMD之特徵在於兩隻眼中皆不存在晚期AMD，至少一隻眼之視敏度為20/32或更佳，其具有至少一個較大脈絡膜疣(例如125 μm)、廣泛性(如藉由脈絡膜疣面積所量測)中度脈絡膜疣、或不涉及黃斑中心之地圖狀萎縮(GA)、或該等之任一組合。第3類AMD(仍將其視為「幹性」AMD)具有轉化為脈絡膜血管新生(CNV)之高風險。

第4類高風險AMD(歸類為「濕性」AMD)之特徵在於屈光眼(index eye)之視敏度為20/32或更佳，且不存在晚期AMD(涉及黃斑中心之GA或脈絡膜血管新生之特徵)。對側眼之特徵在於晚期AMD、或由於AMD黃斑病變使視敏度低於20/32。若不治療，通常高風險AMD會快速加劇為脈絡膜血管新生(CNV)，其速度較第1類或第2類(無高風險)AMD之加劇速度高約10-30倍。

C3b拮抗劑亦可用於預防AMD(尤其第3類或第4類AMD)加劇為CNV，及/或在未受影響或受影響較弱之對側眼中預防AMD或CNV之發生/加劇。在本文中所用術語「預防」具有最廣泛含義，其包括完全或部分阻斷及減緩疾病之加劇以及延遲疾病之更嚴重形式之發生。發生或加劇為高風險(第4類)AMD或CNV之風險較高之患者可尤其受益於本發明之此態樣。

已知補體因子H (CFH)多態性係與個體發生AMD及/或CNV之風險相關。CFH之突變可活化補體，其進而可導致AMD/CNV。最近已報導補體因子H (CFH)多態性佔AMD之歸因風險度之50%(Klein等人，*Science* 308:385-9 (2005))。已發現CFH (HF1/CFH)之一般單倍型使個體易患年齡相關性黃斑變性(Hageman等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(2):7227-7232 (2005))。已將AMD分類為常染色體顯性性狀，其疾病基因座定位於染色體1q25-q31之標記D1S466與D1S413之間，且最大優勢對數分值为約3.20 (Klein等人，*Arch Ophthalmol.*

116(8):1082-9 (1998)；Majewski等人，*Am. J. Hum. Genet.* 73(3):540-50 (2003)；Seddon等人，*Am. J. Hum. Genet.* 73(4):780-90 (2003)；Weeks等人，*Am. J. Ophthalmol.* 132(5):682-92 (2001)；Iyengar等人，*Am. J. Hum. Genet.* 74(1):20-39 (2004))；染色體2q3/2q32之標記D12S1391與D2S1384之間，且最大優勢對數分值为2.32/2.03(Seddon等人，上述文獻)；染色體3p13之標記D12S1300與D12S1763之間，且最大優勢對數分值为2.19(Majewski等人，上述文獻；Schick等人，*Am. J. Hum. Genet.* 72(6):1412-24 (2003))；染色體6q14之標記D6S1056與DS249之間，且最大優勢對數分值为3.59/3.17 (Kniazeva等人，*Am. J. Ophthalmol.* 130(2):197-202 (2000))；染色體9q33之標記D9S934處，且最大優勢對數分值为2.06(Mejwski等人，上述文獻)；染色體10q26之標記D10S1230處，且最大優勢對數分值为3.06(Majewski等人，上述文獻；Iyengar等人，上述文獻；Kenealy等人，*Mol. Vis.* 10:57-61 (2004)；染色體17q25之標記D17S928處，且最大優勢對數分值为3.16(Weeks等人，上述文獻)；及染色體22q12之標記D22S1045處，且最大優勢對數分值为2.0(Seddon等人，上述文獻)。因此，遺傳篩選係鑒定可作為預防性治療之尤佳候選者之患者之重要部分，該預防性治療包括預防疾病加劇為更嚴重形式，例如自AMD加劇為CNV。

C3b抗體之製備及選擇

在本文中本發明包括可識別C3b而非其無活性前體C3之抗體之製造及應用。以下部分中更詳細地闡述產生抗體之實例性方法。

抗C3b抗體係使用得自哺乳動物物種之C3b多肽來選擇。多肽較佳為人類C3b。然而，來自其他物種之C3b多肽(例如鼠類C3b)亦可用作靶抗原。可自天然來源分離來自各哺乳動物物種之C3b抗原。在其他實施例中，抗原係以重組方式來製造或係使用業內已知之其他合成

方法來製造。

所選擇抗體通常對C3b抗原具有足夠強之結合親和力。舉例而言，抗體可結合人類C3b，其 K_d 值不超過約5 nM，較佳不超過約2 nM，且更佳不超過約500 pM。可藉由(例如)基於表面電漿共振之分析(例如實例中所述之BIAcore分析)；酶聯免疫吸附分析(ELISA)；及競爭性分析(例如RIA's)來測定抗體親和力。

同樣，可對抗體實施其他生物學活性分析，以(例如)評估其作為治療劑之效力。該等分析係業內已知的且取決於抗體之靶抗原及既定用途。實例包括HUVEC抑制分析(如以下實例中所述)及鑒定可選擇性阻斷旁路途徑並在至少一種補體相關病症之預防及/或治療中顯示活性之抗體的下述體外及體內分析。

為篩選可與目標抗原上特定表位結合之抗體，可實施常規交叉阻斷分析，例如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編輯(1988)中所述者。或者，可實施表位定位(例如Champe等人(1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394中所述者)以確定抗體是否與目標表位結合。

在較佳實施例中，本發明抗C3b抗體係使用獨特噬菌體呈現方法來選擇。該方法涉及基於單一框架模板產生合成人類抗體噬菌體庫、在可變結構域內設計充分多樣性、呈現具有多樣化可變結構域之多肽、及選擇對靶C3b抗原具有高親和力之候選抗體。如下文實例中所述，可藉由(例如)用飽和量之C3阻斷來達成編碼選擇性阻斷C3b而非C3之抗體之C3b特異性噬菌體之富集。

噬菌體呈現法之細節可參見(例如)於2003年12月11日公佈之WO 03/102157。

在一態樣中，抗體庫可藉由在抗體可變結構域之至少一個CDR中使溶劑接觸位置及/或高多樣性位置突變來生成。可使用本文所提供

方法使某些或所有CDR突變。在某些實施例中，較佳藉由以下方法來生成各種抗體庫：使CDRH1、CDRH2及CDRH3中之位置突變以形成單一庫，或使CDRL3及CDRH3中之位置突變以形成單一庫，或使CDRL3及CDRH1、CDRH2及CDRH3中之位置突變以形成單一庫。

舉例而言，可生成抗體可變結構域之庫，其在CDRH1、CDRH2及CDRH3之溶劑接觸位置及/或高多樣性位置中具有突變。可生成另一庫，其在CDRL1、CDRL2及CDRL3中具有突變。該等庫亦可彼此結合使用以生成具有期望親和力之結合體。舉例而言，在針對與靶抗原之結合對重鏈庫實施一或多輪選擇後，可將輕鏈庫重新置入重鏈結合體群體中以用於進一步實施數輪選擇來增強結合體之親和力。

較佳地，在重鏈序列可變區之CDRH3區中藉由用變體胺基酸取代原始胺基酸來創建庫。所得庫可含有複數個抗體序列，其中序列多樣性主要存於重鏈序列之CDRH3區中。

在一態樣中，在人類化抗體4D5序列、或人類化抗體4D5序列之框架胺基酸序列之背景下創建庫。較佳地，庫係藉由用以DVK密碼子組編碼之胺基酸取代重鏈之殘基至少95-100a來創建，其中DVK密碼子組係用於編碼針對每一該等位置之變體胺基酸組。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之實例包括序列(DVK)₇。在某些實施例中，庫係藉由用以DVK及NNK密碼子組二者編碼之胺基酸取代殘基95-100a來創建。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之實例包括序列(DVK)₆(NNK)。在另一實施例中，庫係藉由用以DVK及NNK密碼子組二者編碼之胺基酸取代至少殘基95-100a來創建。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之實例包括序列(DVK)₅(NNK)。可用於產生該等取代之寡核苷酸組之另一實例包括序列(NNK)₆。熟習此項技術者可根據本文所述標準來確定適宜寡核苷酸序列之其他實例。

在另一實施例中，採用不同CDRH3設計來分離高親和力結合體

及分離針對不同表位之結合體。在此庫中所生成CDRH3之長度範圍為11至13個胺基酸，但亦可生成長度不同於此範圍者。可藉由使用NNK、DVK及NVK密碼子組來擴大H3多樣性以及在N及/或C末端之限制程度更高之多樣性。

亦可在CDRH1及CDRH2中產生多樣性。CDR-H1及H2多樣性之設計遵循尋靶至所述模擬天然抗體全體之策略，與先前設計相比該策略之改進更密切關注與天然多樣性匹配之多樣性。

對於CDRH3中之多樣性而言，可分別構建具有不同H3長度之多個庫然後將其組合以選擇針對靶抗原之結合體。可將多個庫匯合且使用先前所述及本文中下述固體支撐選擇及溶液分類方法來分類。可採用多種分類策略。舉例而言，一變化形式涉及根據與固體結合之靶來分類，之後針對可能存於融合多肽上之標籤(例如抗gD標籤)來分類，且隨後根據與固體結合之靶再次實施分類。或者，可首先根據與固體表面結合之靶分類庫，然後使用與降低濃度之靶抗原結合之溶液相來分類經洗脫結合體。採用不同分類方法之組合可使僅高度表現序列之選擇最小化，且提供多種不同高親和力純系之選擇。

可自庫中分離靶C3b抗原之高親和力結合體。限制H1/H2區中之多樣性可將簡並性降低約 10^4 至 10^5 倍，且容許更大H3多樣性可提供具有更強親和力之結合體。採用具有不同CDRH3多樣性類型之庫(例如採用DVK或NVT)可達成可與靶抗原之不同表位結合之結合體之分離。

在另一實施例中，生成在CDRH1、CDRH2及CDRH3區中具有多樣性之庫。在此實施例中，使用各種長度之H3區及主要使用XYZ及NNK或NNS密碼子組來生成CDRH3中之多樣性。可使用個別寡核苷酸來形成庫且將其匯合，或可將寡核苷酸匯合以形成庫亞組。可針對與固體結合之靶來分類此實施例中之庫。可使用ELISA分析針對特異性

及親和力來篩選自多次分類分離之純系。對於特異性而言，可針對期望靶抗原以及其他非靶抗原來篩選純系。然後可在溶液結合競爭ELISA分析或點競爭分析中針對親和力篩選靶C3b抗原之彼等結合體。可使用XYZ密碼子組自如上所述製備之庫分離高親和力結合體。該等結合體可在細胞培養中作為抗體或抗原結合片段以高產率容易地製備。

在某些實施例中，可期望生成CDRH3區長度具有更大多樣性之庫。舉例而言，可期望生成CDRH3區介於約7至19個胺基酸之庫。

自該等實施例之庫分離之高親和力結合體係在細菌及真核細胞培養中以高產率容易地製備。可將載體設計為易於移除諸如gD標籤、病毒外殼蛋白組份序列等序列，及/或易於添加至恆定區序列中以便以高產率達成全長抗體或抗原結合片段之產生。

在CDRH3中具有突變之庫可與含有其他CDR變體形式(例如CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1及/或CDRH2)之庫組合。因此，舉例而言，在一實施例中，在位置28、29、30、31、及/或32具有變體胺基酸之人類化4D5抗體序列背景下使用預定密碼子組使CDRH3庫係與CDRL3庫組合。在另一實施例中，使具有CDRH3突變之庫與包含變體CDRH1及/或CDRH2重鏈可變結構域之庫組合。在一實施例中，CDRH1庫係用在位置28、30、31、32及33處具有變體胺基酸之人類化抗體4D5序列來創建。CDRH2庫可係使用預定密碼子組以在位置50、52、53、54、56及58處具有變體胺基酸之人類化抗體4D5序列來創建。

可進一步修飾自噬菌體庫生成之抗C3b抗體以生成具有超過親代抗體之改良物理、化學及/或生物學特性之抗體突變體。倘若所用分析為生物活性分析，則在所選分析中抗體突變體之生物活性較佳比親代抗體在該分析中之生物活性強至少約10倍，較佳強至少約20倍，更

佳強至少約50倍，且有時強至少約100倍或200倍。舉例而言，抗C3b抗體突變體與C3b之結合親和力較佳比親代抗C3b抗體(例如抗體S77)之結合親和力強至少約10倍，較佳強至少約20倍，更佳強至少約50倍，且有時強至少約100倍或200倍。

為生成抗體突變體，將一或多個胺基酸變化(例如取代)引入親代抗體之一或多個超變區中。或者，或另外，可將一或多個框架殘基之變化(例如取代)引入親代抗體中，其中該等變化導致抗體與來自第二哺乳動物物種之抗原的結合親和力增強。欲改變框架區殘基之實例包括與抗原直接非共價結合之彼等(Amit等人(1986) *Science* 233:747-753)；與CDR交互作用/影響CDR構象之彼等(Chothia等人，(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917)；及/或參與形成V_L-V_H界面之彼等(歐洲專利第239 400 B1號)。在某些實施例中，一或多個該等框架區殘基之改變可導致抗體對來自第二哺乳動物物種之抗原之結合親和力增強。舉例而言，在本發明此實施例中可改變約1至約5個框架殘基。有時，此足以產生適用於臨床前實驗之抗體突變體，即使超變區殘基無一發生改變。然而抗體突變體通常可包含其他超變區變化。

所改變超變區殘基可係隨機改變，尤其在親本抗體之起始結合親和力使得該等隨機制造的抗體突變體可易於篩選時。

生成該等抗體突變體之一可用程序稱為「丙胺酸掃描式誘變」(Cunningham及Wells (1989) *Science* 244:1081-1085)。此處，用丙胺酸或聚丙胺酸殘基替代一或多個超變區殘基以影響胺基酸與來自第二哺乳動物物種之抗原之交互作用。然後藉由在取代位點或針對取代位點引入另外或其他突變來改良彼等對取代顯示功能敏感性之超變區殘基。因此，儘管預先確定引入胺基酸序列變異之位點，但突變本身之性質卻不需預先確定。針對本文所述之藉由此方式製造之ala-突變體的生物活性對其實施篩選。

通常可以保守取代來起始，例如下文所示以「較佳取代」為標題之彼等。若此等取代會引起生物活性(例如結合親和力)之改變，則可引入更具實質性之變化(下表中命名為「實例性取代」或如下文參照胺基酸種類之進一步闡述)，且對產物加以篩選。較佳取代列於下表中。

原始殘基	實例性取代	較佳取代
Ala (A)	val ; leu ; ile	val
Arg (R)	lys ; gln ; asn	lys
Asn (N)	gln ; his ; lys ; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro ; ala	ala
His (H)	asn ; gln ; lys ; arg	arg
Ile (I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; 正白胺酸	leu
Leu (L)	正白胺酸 ; ile ; val ; met ; ala ; phe	ile
Lys (K)	arg ; gln ; asn	arg
Met (M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe (F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr ; phe	tyr
Tyr (Y)	trp ; phe ; thr ; ser	phe
Val (V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; 正白胺酸	leu

對抗體生物學特性之甚至更具實質性之改變係藉由選擇對維持下列特徵之效應顯著不同之取代來達成：(a)取代區中多肽主鏈之結構，例如，呈薄片或螺旋狀構象，(b)靶位點處分子之電荷或疏水性，或(c)側鏈大小。可根據一般側鏈特性將天然存在之殘基分為以

下各類：

疏水胺基酸：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；

中性親水胺基酸：cys、ser、thr、asn、gln；

酸性胺基酸：asp、glu；

鹼性胺基酸：his、lys、arg；

影響鏈取向之殘基：gly，pro；及

芳香族胺基酸：trp、tyr、phe。

非保守取代需要將該等種類之一之成員調換成另一種類。

在另一實施例中，使用噬菌體呈現使所選擇改變位點親和力成熟(參見上文)。

編碼胺基酸序列突變體之核酸分子係藉由各種業內已知方法來製備。該等方法包括(但不限於)親代抗體之早期製備突變體或非變體形式之寡核苷酸介導(或定位)誘變、PCR誘變及盒式誘變。製備突變體之較佳方法係定位誘變(參見(例如)Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488)。

在某些實施例中，抗體突變體中可僅有單一超變區殘基經取代。在其他實施例中，親代抗體之兩個或更多個超變區殘基可經取代，例如約2至約10個超變區取代。

具有改良生物學特性之抗體突變體之胺基酸序列與親代抗體重鏈或輕鏈可變結構域之胺基酸序列通常具有至少75%胺基酸序列一致性或相似性，更佳至少80%，更佳至少85%，更佳至少90%，且最佳至少95%。在本文中關於此序列之一致性或相似性定義為：在比對序列並(若需要)引入缺口以達成最大序列一致性百分比後，候選序列中與親代抗體殘基相同(即相同殘基)或相似(即根據一般側鏈特性來自相同類別之胺基酸，參見上文)之胺基酸殘基之百分比。不應認為抗體序列中之N-末端、C-末端或內部延長、缺失或插入可影響序列一致性

或相似性。

抗體突變體產生後，測定該分子相對於親代抗體之生物活性。如上所述，此可涉及測定抗體之結合親和力及/或其他生物活性。在本發明較佳實施例中，抗體突變體組係針對與諸如C3b或其片段等抗原之結合親和力來製備及篩選的。視需要對選自此初始篩選之一或多種抗體突變體進一步實施一或多種生物活性分析以證實具有增強結合親和力之抗體突變體確實可用於(例如)臨床前研究。

端視抗體之既定用途，經常可對如此選擇之抗體突變體實施進一步修飾。該等修飾可涉及進一步改變胺基酸序列、與異源多肽融合及/或共價修飾，例如下文中詳述之彼等。關於胺基酸序列改變，實例性改變詳述於上文中。舉例而言，一般亦可用絲胺酸取代任何不參與維持抗體突變體正確構象之半胱胺酸殘基，以改良分子之氧化穩定性且阻止異常交聯。相反地，可將半胱胺酸鍵結添加至抗體中以改良其穩定性(尤其在抗體係諸如Fv片段等抗體片段時)。另一類型之胺基酸突變體具有經改變糖基化模式。此可藉由刪除一或多個存於抗體中之碳水化合物部分，及/或增加一或多個在抗體中不存在之糖基化位點來達成。抗體之糖基化通常係經N-連接或O-連接。N-連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基側鏈連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X係除脯胺酸外之任何胺基酸)係碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈酶促連接之識別序列。因此，多肽中任一該等三肽序列之存在皆可產生潛在糖基化位點。O-連接糖基化係指糖(N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖)之一與羥基胺基酸(最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸)之連接。藉由改變胺基酸序列以使抗體中含有一或多個上述三肽序列(作為N-連接糖基化位點)而將糖基化位點輕易地加入抗體中。亦可藉由向原始抗體序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或藉由用一或多個絲胺酸

或蘇胺酸殘基取代(作為O-連接糖基化位點)來實現該改變。

藉由噬菌體呈現來製備、選擇、富集C3b抗體及使其親和力成熟之其他細節示於以下實例中。

以重組方式產生C3b抗體

本發明抗C3b抗體可使用易於獲得之技術及材料以重組方式來製造。

對於抗C3b抗體之重組製造而言，分離編碼其之核酸且將該核酸插入可複製載體中以供進一步選殖(擴增DNA)或表現。編碼該抗體之DNA係使用習用程序容易地分離或合成(例如，藉由使用能與編碼抗體重鏈及輕鏈之DNA特異性結合之寡核苷酸探針)。可使用多種載體。載體組份一般包括(但不限於)一或多種下列組份：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子、及轉錄終止序列。

(i) 信號序列組件

本發明抗體不僅可以重組方式直接製造，且亦可作為與異源多肽之融合多肽以重組方式來製造，該異源多肽較佳為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之N末端具有特異性切割位點之其他多肽。所選異源性信號序列較佳係由宿主細胞識別及加工(即藉由信號肽酶切割)者。對於不能識別及加工天然抗體信號序列之原核宿主細胞而言，可用選自(例如)鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp、或熱穩定腸毒素II前導序列之群之原核信號序列取代該信號序列。對於酵母分泌而言，天然信號序列可經以下來取代：例如酵母轉化酶前導序列、 α 因子前導序列(包括酵母菌屬(*Saccharomyces*)及克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)之 α -因子前導序列)、或酸性磷酸酯酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡萄糖澱粉酶前導序列、或WO 90/13646中所述信號。在哺乳動物細胞表現中，可使用哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導序列，例如單純皰疹

gD信號。在閱讀框中該前體區之DNA與編碼抗體之DNA連接。

(ii) 複製起點組份

表現及選殖載體二者皆含有使載體能在一或多個所選宿主細胞內複製之核酸序列。一般而言，在選殖載體中此序列係使載體能獨立於宿主染色體DNA複製者，且其包括複製起點或自主複製序列。對於各種細菌、酵母、及病毒而言，該等序列係眾所周知。來自質粒pBR322之複製起點適用於大多數革蘭氏(Gram)陰性細菌，2 μ 質粒起點適用於酵母，且各種病毒起點(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)可用於哺乳動物細胞中之選殖載體。一般而言，哺乳動物表現載體不需要複製起點組份(通常可使用SV40起點，僅係由於其含有早期啟動子)。

(iii) 選擇基因組份

表現及選殖載體可含有選擇基因，其亦稱為可選標記。典型選擇基因編碼具有以下性質之蛋白質：(a)賦予對抗生素或其他毒素(例如，胺苄西林(ampicillin)、新黴素、胺甲蝶呤或四環素)之抗性，(b)補足營養缺陷型不足，或(c)供給無法自複合培養基中獲得之關鍵營養素，例如編碼桿菌(*Bacilli*)之D-丙胺酸消旋酶之基因。

選擇方案之一實例採用藥物來阻止宿主細胞生長。彼等經異源基因成功轉化之細胞可產生賦予藥物抗性之蛋白且因此可在選擇方案中存活。該顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素。

哺乳動物細胞適宜可選標記之另一實例係能鑒定有能力吸收以下之細胞之彼等：抗體核酸(例如DHFR)、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及-II、較佳靈長類金屬硫蛋白基因、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

例如，首先藉由在含有胺甲蝶呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基中培養所有轉化體來鑒定經DHFR選擇基因轉化之細胞。當採用野生型DHFR時，適宜宿主細胞係DHFR活性缺陷之中國倉鼠卵巢

(CHO)細胞系。

或者，經編碼抗體、野生型DHFR蛋白、及另一可選標記(例如胺基葡萄糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))之DNA序列轉化或共轉化之宿主細胞(尤其含有內源性DHFR之野生型宿主細胞)可藉由在含有針對可選標記之選擇劑(例如胺基糖苷類抗生物素，例如卡那黴素(kanamycin)、新黴素或G418)之培養基中使細胞生長來進行選擇。參見美國專利第4,965,199號。

適用於酵母之選擇基因係存於酵母質粒 YRp7 中之 *trp1* 基因 (Stinchcomb 等人, *Nature* 282:39 (1979))。 *trp1* 基因可為缺乏在色胺酸中生長之能力之酵母突變體菌株(例如，ATCC 第44076號或 PEP4-1)提供選擇標記。 Jones (1977), *Genetics* 85:12。則酵母宿主細胞基因組中 *trp1* 損傷之存在可提供有效環境以檢測不存在色胺酸時由生長所導致的轉化。類似地，Leu2 缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)係藉由具有 Leu2 基因之已知質粒來補足。

此外，得自 1.6 μ m 環狀質粒 pKD1 之載體可用於克魯維酵母屬酵母之轉化。或者，對於乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)，已在 Van den Berg (1990) *Bio/Technology* 8:135 中報導大規模產生重組體牛凝乳酶之表現系統。亦已揭示藉由克魯維酵母屬之工業菌株分泌成熟重組體人血清白蛋白之穩定多拷貝表現載體。 Fler 等人 (1991) *Bio/Technology* 9:968-975。

(iv) 啟動子組份

表現及選殖載體通常含有可由宿主有機體識別且與抗體核酸可操作地連接之啟動子。適合與原核宿主一起使用之啟動子包括 *phoA* 啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼性磷酸酶、色胺酸(*trp*)啟動子系統、及雜合啟動子(例如 *tac* 啟動子)。然而，其他已知細菌啟動子亦適合。用於細菌系統之啟動子亦可含有與編碼抗體之 DNA 可操作地

連接之Shine-Dalgarno (S.D.)序列。

對於真核生物而言，啟動子序列係已知的。事實上，所有真核基因皆具有AT-富集區，其位於轉錄起始位點上游約25到30個鹼基處。在許多基因之轉錄開始點上游70至80個鹼基處發現的另一序列係CNCAAT區，其中N可為任一核苷酸。在大多數真核基因之3'端處為AATAAA序列，其可能係向編碼序列3'端添加聚A尾之信號。所有該等序列皆適當地插入真核生物表現載體中。

與酵母宿主一起使用之適宜啟動序列之實例包括3-磷酸甘油酸酯激酶或其他糖酵解酶(例如，烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸酯變位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶、及葡糖激酶)之啟動子。

其他酵母啟動子係具有藉由培養條件控制轉錄之額外優勢之可誘導啟動子，其為醇脫氫酶2、異構細胞色素C、酸性磷酸酯酶、與氮代謝相關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、及負責麥芽糖與半乳糖利用之酶之啟動子區。用於酵母表現中之適宜載體及啟動子進一步闡述於歐洲專利第73,657號中。有利地，酵母增強子可亦與酵母啟動子一起使用。

在哺乳動物細胞中自載體轉錄抗體係受(例如)以下啟動子控制：自病毒(例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如腺病毒2)、牛乳頭瘤病毒、鳥類肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、肝炎-B病毒及最佳猿猴病毒(Simian Virus)40(SV40))基因組獲得之啟動子、自異源哺乳動物啟動子(例如，肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)獲得之啟動子、自熱激啟動子獲得之啟動子，條件係該等啟動子皆與宿主細胞系統相容。

SV40病毒之早期及晚期啟動子可方便地以亦含有SV40病毒複製

起點之SV40限制性片段形式而獲得。人巨細胞病毒之立即早期啟動子係方便地以HindIII E限制性片段形式來獲得。使用牛乳頭瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主中表現DNA之系統揭示於美國專利第4,419,446號中。此系統之變化形式闡述於美國專利第4,601,978號中。關於在來自單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子控制下於小鼠細胞中人 β -干擾素cDNA之表現亦可參見Reyes等人(1982) Nature 297:598-601。或者，勞斯肉瘤病毒(rous sarcoma virus)長末端重複序列可用作啟動子。

(v) 增強子元件組份

藉由高等真核生物編碼本發明抗體之DNA之轉錄通常可藉由將增強子序列插入載體中來增強。當前已知許多增強子序列係來自哺乳動物基因(珠蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -甲胎蛋白、及胰島素)。然而，通常可使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括位於複製起點遲側上之SV40增強子(bp 100-270)、巨細胞病毒早期啟動子增強子、位於複製起點遲側上之多瘤病毒增強子、及腺病毒增強子。關於激活真核啟動子之增強元件亦可參見Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)。增強子可在抗體編碼序列之5'或3'位置剪接至載體中，但較佳係位於啟動子之5'位點。

(vi) 轉錄終止組份

用於真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類細胞或來自其他多細胞有機體之有核細胞)中之表現載體亦可含有終止轉錄及穩定mRNA所需之序列。該等序列通常可自真核生物或病毒DNA或cDNA之5'及(偶而)3'未轉譯區獲得。該等區域含有在編碼抗體之mRNA的未轉譯部分中轉錄為多腺苷酸化片段之核苷酸區段。一有用轉錄終止組份係牛生長激素多腺苷酸化區。參見WO 94/11026及本文所揭示之表現載體。

(vii) 宿主細胞之選擇及轉化

在本文中，選殖或表現載體中DNA之適宜宿主細胞係上述原核細胞、酵母細胞或高等真核細胞。用於此目的之適宜原核生物包括諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性有機體等真細菌，例如腸桿菌科(Enterobacteriaceae)，例如埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如大腸桿菌(*E. coli*))、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*) (例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷菌屬(*Serratia*)(例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))、及志賀氏菌屬(*Shigella*)、以及桿菌屬(*Bacilli*)(例如枯草桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*))(例如於1989年4月12日公開之前東德專利第266,710號中所揭示之地衣芽孢桿菌41P))、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)(例如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*))、及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。一較佳大腸桿菌純系宿主係大腸桿菌294(ATCC 31,446)，但其他菌株(例如大腸桿菌B、大腸桿菌X1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌W3110(ATCC 27,325))亦適合。該等實例係例示性而非限制性。

除原核生物外，真核微生物，諸如絲狀真菌或酵母，亦為抗體編碼載體之適宜選殖或表現宿主。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常見麵包酵母(baker's yeast)為最常使用之低等真核宿主微生物。然而，許多其他屬、種、及菌株通常可得且可用於本文中，例如裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母屬宿主，例如乳酸克魯維酵母、脆壁克魯維酵母(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克海姆克魯維酵母(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、瓦爾特克魯維酵母(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(*K. thermotolerans*)、及馬科斯克魯維酵母

(*K. marxianus*)；耶氏酵母屬(*yarrowia*)(歐洲專利第402,226號)；巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)(歐洲專利第183,070號)；念珠菌屬(*Candida*)；裏氏木黴菌(*Trichoderma reesia*)(歐洲專利第244,234號)；粗糙鏈孢黴菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，例如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，例如鏈孢黴屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)、及麴菌屬(*Aspergillus*)宿主(例如構巢麴菌(*A. nidulans*)及黑麴菌(*A. niger*)。

表現糖基化抗體之適宜宿主細胞係得自多細胞有機體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出許多桿狀病毒株及變體，及來自例如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)、及家蠶(*Bombyx mori*)宿主之對應許可昆蟲宿主細胞。多種轉染用病毒株公開可得，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*) NPV之L-1變體及家蠶NPV之Bm-5株，根據本發明該等病毒可用作本文中之病毒，尤其用於草地黏蟲細胞之轉染。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛(*petunia*)、番茄及煙草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

然而，最令人關注者係脊椎動物細胞，且脊椎動物細胞在培養(組織培養)中增殖已成為常規程序。有用哺乳動物宿主細胞系之實例為經SV40轉形之猴腎CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎系(在懸浮培養基中生長之293細胞或次選殖之293細胞，Graham等人(1977) *J. Gen Virol.* 36:59)；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216)；小鼠賽爾托利氏(*sertoli*)細胞(TM4, Mather (1980) *Biol. Reprod.* 23:243-251)；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細

胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人(1982) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68)；MRC 5細胞；FS4細胞；及人肝細胞瘤系(Hep G2)。

宿主細胞係經上述用於產生抗體之表現或選殖載體轉形，且在經修改適於誘導啟動子、選擇轉形體、或擴增編碼所欲序列之基因之習用營養培養基中培養。

(viii) 培養宿主細胞

可在多種培養基中培養用於產生本發明抗體之宿主細胞。市售培養基(例如 Ham's F10(Sigma)、最小必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、及達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), Sigma))適用於培養宿主細胞。另外，Ham等人(1979) *Meth. Enz.* 58:44、Barnes等人(1980) *Anal. Biochem.* 102:255、美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或美國專利第Re. 30,985號可用作宿主細胞之培養基。可根據需要向任一該等培養基中增補激素及/或其他生長因子(例如胰島素、鐵傳遞蛋白、或表皮生長因子)、鹽類(例如氯化鈉、鈣、鎂、及磷酸鹽)、緩衝液(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷及胸苷)、抗生素(例如GENTAMYCIN™藥物)、微量元素(界定為通常以微莫耳範圍之最終濃度存在之無機化合物)、及葡萄糖或等效能源。亦可以熟習此項技術者熟知之適當濃度引入任一其他所需補充物。培養條件(例如溫度、pH及諸如此類)係先前用於所選表現用宿主細胞之彼等，且對熟習此項技術者係顯而易見。

(ix) 抗體純化

使用重組技術時，抗體可在細胞內、在壁膜間隙中產生，或直接分泌至培養基中。若抗體係在細胞內產生，作為第一步驟，藉由(例如)離心或超濾去除微粒碎屑(宿主細胞或經溶解片段)。Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992)闡述分離分泌至大腸桿菌壁膜間隙中之抗體之程序。簡言之，在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA及苯甲磺醯基氟化物(PMSF)存在下經約30分鐘將胞漿解凍。可藉由離心去除細胞碎屑。倘若抗體係分泌至培養基中，則通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)濃縮來自該等表現系統之上清液。可在任一前述步驟中引入蛋白酶抑制劑(例如PMSF)以抑制蛋白質水解，且可引入抗生素以防止外來污染物生長。

自細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羧基磷灰石層析、凝膠電泳、透析、及親和層析來純化，其中親和層析係較佳純化技術。蛋白A作為親和配體之適合性取決於存於抗體中之任一免疫球蛋白Fc結構域之種類及同種型。蛋白A可用於純化基於人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13)。蛋白G被推薦用於所有小鼠同種型及用於人 $\gamma 3$ (Guss等人(1986) *EMBO J.* 5:1567-1575)。親和配體所附著之最常用基質為瓊脂糖，但亦可使用其他基質。機械上穩定之基質(例如受控孔隙玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)可達成較使用瓊脂糖更快之流速及更短之處理時間。倘若抗體包含C_H3結構域，則可使用Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)實施純化。端視欲回收抗體亦可使用其他蛋白質純化技術(例如在離子交換柱上分級分離、乙醇沉澱、反相HPLC、於二氧化矽上層析、於肝素SEPHAROSE™上層析、於陰離子或陽離子交換樹脂(例如聚天冬胺酸管柱)上層析、層析聚焦、SDS-PAGE、及硫酸銨沉澱)。

繼任何初步純化步驟後，可使用pH介於約2.5-4.5之洗脫緩衝劑對包含目標抗體及污染物之混合物實施低pH疏水作用層析，較佳在低鹽濃度(例如約0-0.25 M鹽)下實施。

鑒定C3b抗體及其他C3b拮抗劑之篩選分析及動物模型

可在多種體外及體內分析中評估C3b抗體及其他C3b拮抗劑選擇性抑制旁路補體途徑及預防及治療補體相關病症之能力。

諸如結合及競爭性結合分析、溶血分析等體外分析闡述於實例中。

本文可在相關動物模型中測試諸如C3b抗體等C3b拮抗劑之體內治療活性。因此，舉例而言，可使用製造轉基因動物之標準技術藉由將目標基因之編碼部分引入目標動物基因組中來設計重組體(轉基因)動物模型。可用作轉基因處理靶之動物包括(但不限於)小鼠、大鼠、兔、荷蘭豬、綿羊、山羊、豬、及非人靈長類(例如狒狒、黑猩猩及其他猴類)。將轉基因引入該等動物中之業內已知技術包括原核顯微注射(Hoppe及Wanger，美國專利第4,873,191號)；經由逆轉錄病毒介導向種系中轉移基因(例如Van der Putten等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985])；胚胎幹細胞中之基因尋靶(Thompson等人，*Cell* 56, 313-321 [1989])；胚胎電穿孔(Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3, 1803-1814 [1983])；精子介導之基因轉移(Lavitrano等人，*Cell* 57, 717-73 [1989])。綜述可參見(例如)美國專利第4,736,866號。

出於本發明目的，轉基因動物包括僅在其部分細胞中攜帶轉基因之彼等(「嵌合體動物」)。轉基因可作為單一轉基因或以串聯體(例如頭-頭或頭-尾串聯)來整合。亦可藉由遵循(例如)Lasko等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 623-636 (1992)中之技術向特定細胞類型中選擇性引入轉基因。

可藉由標準技術來監測轉基因動物中轉基因之表現。舉例而

言，可使用DNA印跡分析或PCR擴增來檢驗轉基因之整合。然後可使用諸如原位雜交、RNA印跡分析、PCR、或免疫細胞化學等技術來分析mRNA表現程度。

可進一步檢驗動物之免疫疾病病理學之跡象，例如藉由組織學檢驗來測定免疫細胞向特定組織中之浸潤。

可使用製造轉基因動物之標準技術藉由將目標基因之編碼部分引入目標動物基因組中來設計重組體(轉基因)動物模型。可用作轉基因處理靶之動物包括(但不限於)小鼠、大鼠、兔、荷蘭豬、綿羊、山羊、豬、及非人靈長類(例如狒狒、黑猩猩及其他猴類)。將轉基因引入該等動物中之業內已知技術包括原核顯微注射(Hoppe及Wanger，美國專利第4,873,191號)；經由逆轉錄病毒介導向種系中轉移基因(例如Van der Putten等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6148-615 [1985])；胚胎幹細胞中之基因尋靶(Thompson等人，*Cell* **56**, 313-321 [1989])；胚胎電穿孔(Lo, *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1803-1814 [1983])；精子介導之基因轉移(Lavitrano等人，*Cell* **57**, 717-73 [1989])。綜述可參見(例如)美國專利第4,736,866號。

可在(例如)膠原誘導關節炎模型中評估預防及/或治療關節炎之效力(Terato等人，*Brit. J. Rheum.* **35**:828-838 (1966))。如Terato等人，*J. Immunol.* **148**:2103-8 (1992)及Terato等人，*Autoimmunity* **22**:137-47 (1995)中所述，亦可在藉由靜脈內注射四種單株抗體之混合劑誘導之抗體介導關節炎模型中篩選有效關節炎預防藥/治療藥。亦可在轉基因動物模型(例如TNF- α 轉基因小鼠(Taconic))中研究預防及/或治療關節炎之候選藥物。該等動物表現人腫瘤壞死因子(TNF- α)，其係在人類風濕性關節炎之發病機制中所涉及之細胞因子。在該等小鼠中TNF- α 之表現導致前爪及後爪發生嚴重慢性關節炎，且可提供炎症性關節炎之簡單小鼠模型。

近幾年來，亦已研發出乾癬之動物模型。因此，Asebia (*ab*)、鱗狀皮膚(*fsn*)、及慢性增生性皮炎(*cpd*)皆係具有乾癬樣皮膚變化之小鼠自發突變。細胞因子(例如干擾素- γ 、白介素-1 α 、白介素生長因子、轉化生長因子- α 、干擾素-6、血管內皮生長因子、或骨形態發生蛋白-6)在皮膚中過度表現之轉基因小鼠亦可用於在體內研究乾癬及鑒定治療乾癬之治療藥物。據闡述乾癬樣損傷亦存於與PL/J株回交之 β_2 -整合素亞等位基因小鼠中及 β_1 -整合素轉基因小鼠中、經CD4⁺/CD45RB^{hi} T淋巴細胞重建之scid/scid小鼠中、以及HLA-B27/h β_2 m轉基因大鼠中。在免疫缺陷型小鼠上移植人類皮膚之異種移植模型亦係已知。因此，如Schon, M. P.等人在*Nat. Med.* (1997) 3:183中所述可在scid/scid小鼠模型中測試本發明抗體及其他C3b拮抗劑，其中小鼠顯示類似於乾癬之組織病理學皮膚損傷。另一適宜模型係如Nickoloff, B. J.等人在*Am. J. Path.* (1995) 146:580中所述製備之人類皮膚/scid小鼠嵌合體。關於其他細節參見(例如)Schon, M.P., *J Invest Dermatology* 112:405-410 (1999)。

已闡述哮喘模型，其中抗原誘導之氣道高反應性、肺嗜酸粒細胞增多及炎症係藉由用卵白蛋白使動物敏化然後用藉由氣溶膠遞送之相同蛋白激發動物來誘導。在用氣溶膠抗原激發後，若干動物模型(荷蘭豬、大鼠、非人靈長類)顯示與人類中特應性哮喘類似之症狀。鼠類模型具有多種人類哮喘之特徵。測試CRIg及CRIg激動劑在治療哮喘中之活性及效率之適宜程序由Wolyniec, W. W.等人闡述於*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998) 18:777及其所引用參考文獻中。

接觸超敏反應係細胞介導免疫功能之簡單體內分析。在此程序中，使表皮細胞曝露於外源性半抗原下而發生延遲型超敏反應，且對其實施量測及定量。接觸性過敏涉及起始敏化期及隨後的誘發期。當表皮細胞遇到其先前已接觸過之抗原時，誘發期開始。腫脹及炎症之

發生使得此成為人類過敏性接觸性皮炎之極佳模型。適宜程序詳細闡述於 *Current Protocols in Immunology* , J. E. Cologan 、 A. M. Kruisbeek 、 D. H. Margulies 、 E. M. Shevach 及 W. Strober 編輯 , John Wiley & Sons 公司 , 1994 , 4.2 單元中。亦參見 Grabbe, S. 及 Schwarz, T, *Immun. Today* **19**(1):37-44 (1998)。

當將免疫活性細胞移植至免疫抑制或可耐受患者中時，發生移植抗宿主疾病。供體細胞可識別宿主抗原並針對其響應。響應可包括威脅生命之嚴重炎症及輕度腹瀉和體重減輕。移植抗宿主疾病模型提供評價T細胞針對MHC抗原及次要移植抗原之反應性之方式。適宜程序詳細闡述於 *Current Protocols in Immunology* , 上述文獻，單元 4.3 中。

皮膚同種異體移植排斥之動物模型係測試T細胞調介體內組織破壞之能力之手段，其可指示T細胞在抗病毒及抗腫瘤免疫中之作用且係該作用之量度。最常見且公認之模型使用鼠尾皮膚移植。重複實驗顯示，皮膚同種異體移植排斥係由T細胞、輔助性T細胞及殺傷性-效應性T細胞而非抗體來介導的。Auchincloss, H. Jr. 及 Sachs, D. H., *Fundamental Immunology* , 第2版，W. E. Paul 編輯，Raven Press, NY, 1989, 889-992。適宜程序詳細闡述於 *Current Protocols in Immunology* , 上述文獻，單元 4.4 中。可用於測試CRIg及CRIg激動劑之其他移植排斥模型係異基因心臟移植模型，其闡述於 Tanabe, M. 等人，*Transplantation* (1994) **58**:23 及 Tinubu, S. A. 等人，*J. Immunol.* (1994) 4330-4338 中。

延遲形超敏反應動物模型亦提供對細胞介導免疫功能之分析。延遲性超敏反應係T細胞介導之體內免疫響應，其特徵在於在用抗原激發後經過一段時間才到達頂峰之炎症。該等反應亦發生於組織特異性自身免疫性疾病中，例如多發性硬化症(MS)及實驗性自身免疫性腦

脊髓炎(EAE，MS模型)。適宜程序詳細闡述於*Current Protocols in Immunology*，上述文獻，單元4.5中。

EAE係T細胞介導之自身免疫性疾病，其特徵在於T細胞及單核細胞炎症及隨後之中樞神經系統中軸突之脫髓鞘作用。一般將EAE視為人類MS之相關動物模型。Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1:143。已研發出急性及復發-緩解型模型。可使用*Current Protocols in Immunology*，上述文獻，單元15.1及15.2中所述方案來測試CRIg及其激動劑及拮抗劑針對免疫介導脫髓鞘病之T細胞刺激活性或抑制活性。亦可參見髓磷脂疾病模型，其中如Duncan, I. D.等人，*Molec. Med. Today* (1997) 554-561中所述將少突膠質細胞或許旺(Schwann)細胞移植至中樞神經系統中。

可在小鼠或大鼠中實施心肌缺血-再灌注模型。將動物氣管切開且用小動物通氣機實施通氣。將聚乙烯導管置於頸內動脈及頸外靜脈中以量測平均動脈血壓。心肌缺血再灌注係藉由用6-O縫線結紮左冠狀動脈前降支(LAD)來起始。缺血係藉由勒緊LAD周圍之可逆結紮線以完全封閉血管來產生。30 min後移除結紮線且對心臟灌注4小時。可藉由量測心臟梗塞尺寸、心臟肌酸激酶活性、髓過氧化物酶活性及使用抗C3抗體量測免疫組織化學來測試CRIg及CRIg激動劑之效力。

糖尿病性視網膜病變模型涉及用鏈尿黴素治療小鼠或大鼠。可測試CRIg及CRIg激動劑對微靜脈擴張、視網膜內微血管異常、及視網膜及玻璃體腔內新生血管形成之效應。

可如下所述建立膜性增生性腎小球腎炎之模型：用0.5 mg存於CFA中之對照兔IgG以腹腔腔內方式使雌性小鼠免疫(第-7天)。7天後(第0天)，經由尾靜脈以靜脈內方式注射1 mg兔抗小鼠腎小球基膜(GBM)抗體。藉由ELISA量測血清中抗兔IgG抗體之升高。自代謝籠中之小鼠收集24-h尿樣，且藉由量測除血尿素氮外之尿蛋白來評價小

鼠腎功能。

年齡相關性黃斑變性(AMD)之動物模型係由Ccl-2或Ccr-2基因中具有無效突變之小鼠構成。該等小鼠具有AMD之主要特徵，包括視網膜色素上皮(RPE)中之脂褐素之積累及視網膜色素上皮之脈絡膜疣之積累、光感受器萎縮及脈絡膜血管新生(CNV)。該等特徵在出生6個月後發生。可針對脈絡膜疣之形成、光感受器萎縮及脈絡膜血管新生來測試CRIg及CRIg激動劑。

可在各種雷射誘導之脈絡膜血管新生模型中測試CNV。因此舉例而言，可藉由強雷射光凝在大鼠及食蟹猴中誘導CNV，其導致脈絡膜血管新生。可在治療之前及之後以不同時間間隔藉由(例如)螢光素血管造影術、組織病理學及免疫組織化學評估、及藉由對自動物收集之血清實施藥代動力學分析、溶血分析、抗體篩選分析及補體活化分析來評估此病況之進展及治療。可藉由簡單方法來監測預防性投與之效力，包括藉由螢光素血管造影術監測血管滲漏、雷射燒傷位點處補體沈積之抑制、眼部檢查、眼部攝影術、玻璃質及視網膜組織之採集、及諸如此類。以下實例展示其他細節。

治療方法

對於預防、治療補體相關病症或降低其嚴重性而言，本發明化合物之適宜劑量可取決於上文所定義待治療病症之類型、病症之嚴重性及病程、藥劑投與目的係預防性抑或治療性、先前治療、患者之臨床病史及對化合物之響應、及主治醫師之慎重考慮。化合物係一次性或經一系列治療適當地投與患者。較佳地，可期望在人體測試前確定劑量反應曲線及本發明醫藥組合物，首先在體外確定，然後在可用動物模型中確定。

舉例而言，端視疾病之類型和嚴重性，無論係(例如)一次或多次分開投與抑或連續輸注投與，均向患者投與約1 µg/kg至約15

mg/kg(例如0.1-20 mg/kg)起始候選劑量之抗C3b抗體或其他C3b拮抗劑。端視上述因素，典型每日劑量可係約1 μ g/kg至100 μ g/kg或更大。對於在若干天或更長時間內重複投與而言，端視病況，治療應持續至出現疾病症狀之期望抑制。然而，亦可使用其它劑量方案。該治療之進展可藉由習用技術及分析容易地加以監測。

可藉由眼內疾病評估中常用之各種終點來量測治療補體相關眼病(例如AMD或CNV)之效力。舉例而言，可評價視力衰退。可藉由(但不限於)以下方法來評估視力衰退：例如自基線至期望時間點量測最佳矯正視敏度(BCVA)之平均改變(例如，其中BCVA係基於糖尿病性視網膜病變早期治療研究計劃(ETDRS)之視敏度表且在4米測試距離處評測)、量測與基線相比在期望時間點視敏度衰退小於15個字母之個體比例、量測與基線相比在期望時間點視敏度提高大於或等於15個字母之個體比例、量測在期望時間點視敏度斯內倫(Snellen)相當於20/2000或更低之個體比例、量測NEI視覺功能調查問卷、在期望時間點藉由(例如)螢光素血管造影術量測CNV尺寸及CNV滲漏量，等等。例如可實施眼部評價，其包括(但不限於)例如實施眼部檢查、量測眼內壓、評價視敏度、量測裂隙燈壓力、評價眼內炎症，等等。

醫藥組合物

可投與呈醫藥組合物形式之本發明C3b抗體及其他C3b拮抗劑以治療補體相關病症。

藉由將具有期望純度之活性分子與醫藥上可接受之可選載劑、賦形劑或穩定劑(*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第16版，Osol，A.編輯[1980])混合來製備本發明C3b抗體或其他拮抗劑之治療調配物，該等調配物呈凍乾調配物或水溶液形式。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受體無毒，且包括緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺

酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紫
 氯銨、苄索氯銨；酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥
 基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-
 戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血
 清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯啉
 酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或
 離胺酸；單糖、二糖、及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊
 精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨
 醇；鹽形成反荷離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合
 物)；及/或非離子型表面活性劑，例如TWEEN™、PLURONICS™或
 聚乙二醇(PEG)。

亦可使用脂轉染或脂質體來將多肽、抗體、或抗體片段遞送至
 細胞中。倘若使用抗體片段，則較佳使用與靶蛋白之結合結構域特異
 性結合之最小片段。舉例而言，根據抗體之可變區序列，可將肽分子
 設計為可保留與靶蛋白序列結合之能力。該等肽可以化學方式合成及
 /或藉由重組DNA技術來製造(參見例如Marasco等人，*Proc. Natl.*
Acad. Sci. USA **90**, 7889-7893 [1993])。

亦可將活性分子包埋於微膠囊中，該等微膠囊分別係(例如)藉由
 凝聚技術或藉由界面聚合製備，例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚
 (甲基丙烯酸甲酯)微膠囊，該等活性分子呈膠質藥物遞送系統(例如，
 脂質體、白蛋白微球體、微滴乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)形式或呈
 粗滴乳液形式。該等技術揭示於*Remington's Pharmaceutical*
Sciences，第16版，A. Osol編輯(1980)中。

用於體內投與之調配物必須係無菌。此可藉由經由無菌過濾膜
 過濾來容易地達成。

亦可製備緩釋製劑。緩釋製劑之適宜實例包括含有抗體之固態

疏水聚合物之半滲透性基質，該等基質係呈成形物件形式，例如薄膜或微膠囊。緩釋基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(甲基丙烯酸-2-羥乙基酯)、或聚(乙烯醇))、聚交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與L-麩胺酸 γ 乙酯之共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)組成之可注射微球體)等可降解乳酸-乙醇酸共聚物、及聚-D-(-)-3-羥丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸等聚合物使分子能在100天內持續釋放，但某些水凝膠僅在較短時間內釋放蛋白質。當膠囊化抗體長時間停留在體內時，在37°C 下曝露於潮濕環境中會使其變性或聚集，而導致生物活性損失且可能改變免疫原性。端視所涉及機制，可設計合理策略以保持穩定性。舉例而言，若發現聚集機制係經由硫代二硫化物互換形成分子間S-S鍵，則穩定作用可藉由修飾巯基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適宜添加劑、及形成特定聚合物基質組合物來達成。

通常經眼、經眼內、及/或玻璃體內注射來投與預防及治療眼部疾病或病況之本發明化合物。亦可使用其他投與方法，其包括(但不限於)局部、非經腸、皮下、腹膜腔內、肺內、鼻內、及病灶內投與。非經腸輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜腔內或皮下投與。

用於經眼、眼內或玻璃體內投與之調配物可使用業內已知成份藉由業內已知方法來製備。有效治療之主要需求係經由眼適當滲透。與可以局部方式遞送藥物之眼前段疾病不同，視網膜疾病需要位點特异性更強之手段。滴眼劑及眼膏很難滲透眼後段，且血-眼屏障妨礙以全身性方式投與之藥物向眼組織滲透。因此，通常所選用於治療視網膜疾病(例如AMD及CNV)之藥物遞送方法係直接玻璃體內注射。通常以一定時間間隔重複玻璃體內注射，該等時間間隔取決於患者之病況及所遞送藥物之特性及半衰期。對於眼內(例如玻璃體內)滲透而

言，通常尺寸較小之分子較佳。

僅出於闡釋目的提供以下實例，而非欲以任何方式限定本發明之範圍。

除非另外說明，否則應根據製造商說明書來使用實例中所提及之市售試劑。在以下實例中及在整個說明書中藉由ATCC登錄號標識之該等細胞之來源係美國典型菌株保存所(American Type Culture Collection)，10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209。

抗體胺基酸序列內之胺基酸殘基係根據Kabat(Kabat等人，*Sequences of proteins of immunological interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))來編號。使用單字母胺基酸縮寫。使用IUB密碼(N=A/C/G/T、D=A/G/T、V=A/C/G、B=C/G/T、H=A/C/T、K=G/T、M=A/C、R=A/G、S=G/C、W=A/T、Y=C/T)來代表DNA簡並性。

實例1

得自編碼起始抗體超變區之噬菌體之抗體

使用HERCEPTIN[®]抗HER2抗體rhuMAB 4D5-8(Genentech公司)之V_L及V_H結構域之核酸序列(圖18A及18B)作為起始序列來誘變HVR及針對與人類C3b之結合進行噬菌體選擇。抗體4D5係對稱為Her-2(erbB2)之癌症相關抗原具有特異性之人類化抗體。抗體包括具有共有框架區之可變結構域，其中在增強人類化抗體親和力之過程期間少數位置回復為小鼠序列。人類化抗體4D5之序列及晶體結構已闡述於美國專利第6,054,297號，Carter等人，PNAS 89:4285 (1992)中，晶體結構展示於Carter等人，*J. Mol. Biol.* 229:969 (1993)中且在線展示於www/ncbi/nih/gov/structure/mmdb(MMDB#s-990-992)中，其全部揭示內容皆係以引用方式明確併入本文中。

HERCEPTIN[®] V_L及V_H結構域包含共有人κ I V_L結構域及人類亞型

III共有V_H結構域之變體。與人類共有結構域相比，變體V_H結構域具有3處變化：R71A、N73T及L78A。

用於此變化之噬菌粒係單價Fab-g3呈現載體(pV0350- 2B)，其具有2個在phoA啟動子控制下之開放閱讀框，基本上如Lee等人，*J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93中所述。第一開放閱讀框係由與V_L融合之stII信號序列及受體輕鏈之CH1結構域組成，且第二開放閱讀框係由與V_H融合之stII信號序列及受體重鏈之CH1結構域以及其後經截短之次要噬菌體外殼蛋白P3組成。參見Lee等人，上述文獻。

藉由誘變重鏈HVR生成之抗體

Fab純系YW 144.2.43係藉由huMAb 4D5-8(HERCEPTIN®抗HER2抗體，Genentech公司)重鏈之HVR-H1、H2、及H3之誘變及針對人C3b融合蛋白之選擇來生成。在HVR-H1中，使Kabat位置26 (G)、27 (F)、28 (T)、29 (I)、34 (I)、及35 (H)保持恆定，且在位置30-33之胺基酸改變。在HVR-H2中，使Kabat位置51 (I)、52a (P)、55 (G)、57 (T)、59 (Y)、60 (A)、61 (D)、62 (S)、63 (V)、64 (K)、及65 (G)保持恆定，且位置49、50、52、53、54、56、及58改變。在HVR-H3中，使Kabat位置93 (A)及102 (Y)保持恆定，且位置94-100、100a-h、及101改變。YW 144.2.43之輕鏈係經修飾huMAb 4D5-8序列(在位置30、66及91經修飾)，在噬菌體選擇期間其HVR未改變。藉由使用標準誘變技術誘變所選胺基酸位置而將序列多樣性引入每個超變區中。

噬菌體庫之生成

分別在六個含有660 ng寡核苷酸、50 mM Tris pH 7.5、10 mM MgCl₂、1 mM ATP、20 mM DTT、及5 U聚核苷酸激酶且在37°C下進行1 h之20 µl反應中使設計用於每個超變區之隨機化寡核苷酸池磷酸化。然後以使寡核苷酸與模板之比為3之500 µl之終體積在50 mM Tris pH 7.5、10 mM MgCl₂中將六個經磷酸化寡核苷酸池與20 µg Kunkel

模板組合。在90℃下使混合物退火4 min，在50℃下退火5 min且然後在冰上冷卻。用QIAQUICK™ PCR純化套組(Qiagen套組28106)移除剩餘未退火寡核苷酸，其使用經修改方案以防止已退火DNA過度變性。向500 µl經退火混合物中添加150 µl PB，且在2個二氧化矽管柱之間使混合物分離。用750 µl PE將每根管柱洗滌一次且另外旋轉乾燥管柱後，以110 µl 10 mM Tris、1 mM EDTA(pH 8)洗脫每根管柱。然後藉由添加1 µl 100 mM ATP、10 µl 25 mM dNTP(dATP、dCTP、dGTP及dTTP各為25 mM)、15 µl 100 mM DTT、25 µl 10X TM緩衝液(0.5 M Tris pH 7.5, 0.1 M MgCl₂)、2400 U T4連接酶、及30 U T7聚合酶且在室溫下保持3 h來填充經退火及淨化模板(220 µl)。

在 Tris- 乙酸鹽 -EDTA/ 瓊脂糖凝膠 (Sidhu 等人，*Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000))上分析填充產物。通常可見三條區帶：底部區帶係經正確填充及連接之產物，中間區帶係經填充但未經連接之產物，且頂部區帶係鏈替代產物。頂部區帶係由T7聚合酶之固有副活性產生且其產生難以避免 (Lechner 等人，*J. Biol. Chem.* 258:11174-11184 (1983))；然而，此區帶之轉化效率比底部區帶低30倍且通常對庫幾乎無貢獻。中間區帶之產生係由於缺少用於最終連接反應之5'磷酸根；此區帶可有效轉化且主要產生野生型序列。

然後純化填充產物且將其電穿孔至SS320細胞中並在M13/KO7輔助性噬菌體存在下增殖，如 Sidhu 等人，*Methods in Enzymology* 328:333-363 (2000)中所述。庫大小為1-2 x 10⁹個獨立純系。對來自起始庫之隨機純系實施測序以評價庫品質。

噬菌體選擇

使用人C3b蛋白作為選擇抗原。將存於PBS中之10 µg/ml人C3b塗佈於MaxiSorp微量滴定板(Nunc)上且在4℃下培養過夜。在第一輪選擇中使用12個靶孔。在RT下使用噬菌體封阻緩衝液(1% BSA, .05%

Tween 20, PBS)將孔封阻1 h。噬菌體庫係來自冷凍甘油原液之PEG沉澱，使其懸浮於噬菌體封阻緩衝液中且在RT下培養1 hr。然後將噬菌體庫添加至在RT下培養過夜之經封阻抗原板中。結合過夜後，藉由用洗滌緩衝液(PBS, 0.5% Tween20)洗滌自抗原板移除未結合/非特異性噬菌體。藉由將孔與50 mM HCl、0.5 M KCl一起培養30 min來洗脫經結合噬菌體。使用XL-1蘭細胞及M13/KO7輔助性噬菌體使噬菌體擴增且在30℃下於2YT、50 µg/ml羧苄西林(carbanecillin)、50 µg/ml卡那黴素、10 µg/ml四環素中使其生長36 hr。然後使用經修改PEG沉澱方案回收經擴增噬菌體(Monaci, P., Cortese, R., Screening phage libraries with sera, **Phage display - A practical approach**, Clackson及Lowman編輯, 2004, 第193-215頁)。比較自經靶物塗佈孔洗脫之噬菌體之效價與自經非靶物塗佈之孔回收之噬菌體之效價來評價富集度。完成四輪噬菌體選擇，其中靶孔數減少至4個(第2輪)及2個(第3及4輪)。在第2及4輪中使用酪蛋白封阻緩衝液(Pierce)作為抗原板及噬菌體之封阻劑。第2-4輪選擇使用3-4小時之噬菌體-抗原結合期且增強洗滌嚴格性。在淘選人C3b之情況下，在第2-4輪選擇之噬菌體-抗原培養期間亦添加人C3 (>1 µM)作為針對亦可結合人C3之噬菌體抗體之相對選擇。選擇人噬菌體純系YW144.2.43。C3b淘選結果示於圖1中。如實例3中所揭示來確定C3b結合特徵。

實例2

藉由HVR H1、H2、H3及L3之變異產生抗體

純系YW144.2.43係藉由誘變huMAb 4D5-8(HERCEPTIN®抗HER2抗體，Genentech公司)重鏈可變結構域及huMAb 4D5-8經修飾輕鏈可變結構域之HVR-H1、H2、H3及L3來產生。在HVR-H1中，使Kabat位置26 (G)、28 (T)、29 (F)、30 (S)、31 (S)、及35 (S)保持不變，且位置27、32-34處之胺基酸改變。在HVR-H2中，使Kabat位置49 (S)、51

(I)、55 (G)、57 (T)、59 (Y)、60 (A)、61 (D)、62 (S)、63 (V)、64 (K)、及65 (G)保持不變，且位置50、52、52a、53、54、56、及58改變。在HVR-H3中，使Kabat位置93 (A)、94 (R)、100f-g(缺失)保持不變，且位置95-100、100a-e、100h、及102改變。在HVR-L3中，使Kabat位置89 (Q)、90 (Q)、95 (P)及97 (T)保持不變，且位置91-94及96改變。使HVR-L1之序列恆定保持為RASQSISSYLA (SEQ ID NO:11)，且使HVR-L2之序列恆定保持為GASSRAS (SEQ ID NO:12)。藉由使用標準誘變技術誘變所選胺基酸位置來將序列多樣性引入每個超變區中。對抗C3v抗體純系實施選擇及測序。

● YW144.2.43之親和力成熟

為改良抗C3b抗體YW144.2.43之親和力，在YW144.2.43背景下生成三個噬菌體呈現庫，其中每個庫皆以多個HVR為靶以達成軟隨機化誘變，如Lee等人，*J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93中所述。為避免自模板之潛在高背景重選擇YW144.2.43，在每個庫生成前將終止密碼子引入欲突變HVR中。使用溶液分類方法來增強基於親和力之噬菌體選擇方法之效率。藉由操縱生物素化靶濃度、縮短噬菌體捕獲時間以降低背景、及添加未經生物素化之靶以去除具有較快解離速率之純系，可熟練地選擇高親和力純系。Lee等人，*J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93。在第一輪選擇中觀察到富集(靶依賴性噬菌體捕獲)，此說明每個庫中皆存在大量對人C3b具有相當高親和力之純系。在隨後數輪中增強選擇嚴格性。5輪選擇後，分析來自每個庫之純系。在靶向六個HVR中之每一者之庫中觀察到新序列。所選純系係藉由噬菌體ELISA來篩選然後表現為IgG蛋白，且使用Biacore™結合分析對其親和力進行定性分析。

使用固體/溶液分類方法對親和力成熟純系之噬菌體庫實施分類。藉由將500 μ l存於PBS中之3.6 mg/ml人C3b及10 μ l 1 M磷酸鉀(pH

8)與20 μ l 4 mM硫代-NHS-LC-生物素(Pierce)混合來將人C3b生物素化。在第一輪選擇中，將存於PBS中之10 μ g/ml生物素化C3b塗佈於MaxiSorp微量滴定板(Nunc)上且在4°C下培養過夜。在第一輪選擇中，使用16個靶孔。在RT下使用SuperBlock (Pierce)將孔封阻1 h。在SuperBlock緩衝液中稀釋成熟噬菌體庫且在RT下將其培養1 hr。然後將噬菌體庫添加至在RT下培養2 hr之經封阻抗原板中。結合後，藉由用洗滌緩衝液洗滌(PBS, 0.5% Tween20)自抗原板移除未結合/非特異性噬菌體。藉由將孔與50 mM HCl、0.5 M KCl一起培養30 min來洗脫經結合噬菌體。使用XL-1蘭細胞及M13/KO7輔助性噬菌體使噬菌體擴增且在30°C下於2YT、50 μ g/ml羧苄西林、50 μ g/ml卡那黴素、10 μ g/ml四環素中使其生長36 hr。然後使用經修改PEG沉澱方案回收經擴增噬菌體(Monaci, P., Cortese, R., 上述文獻)。比較自經靶物塗佈孔洗脫之噬菌體之效價與自經非靶物塗佈之孔回收之噬菌體之效價以評價富集度。在第2-5輪選擇中，應用溶液分類方案。在4°C下用存於PBS中之10 μ g/ml中性鏈親和素將微量滴定孔塗佈過夜，且然後使用SuperBlock (Pierce)將其封阻1 h。使經回收噬菌體庫懸浮於SuperBlock中且將其與50 nM b-Robo4-His混合1 hr。在經中性鏈親和素塗佈之孔上捕獲與b-C3b結合之噬菌體並保持30 min且用洗滌緩衝液洗滌除去未經結合噬菌體。使用50 mM HCl、500 mM KCl將噬菌體洗脫30 min，將其中和，且在KO7輔助性噬菌體(New England Biolabs)存在下於XL1蘭細胞(Stratagene)中使其增殖。以類似方式實施隨後數輪分類，但其中具有以下差異：在第2輪中b-C3b最終濃度為50 nM，在第3輪中b-C3b最終濃度為25 nM，在第4輪中b-C3b最終濃度為5 nM且在第5輪中b-C3b最終濃度為.5 nM，且在於中性鏈親和素上捕獲之前將50 nM未經生物素化C3b添加至混合物中並保持1 h。

選擇若干親和力成熟純系以供與人C3b結合且對其實施測序。親

和力成熟抗體 YW 144.2.43.S77(簡稱為S77)重鏈及輕鏈Fab片段之胺基酸序列展示於圖5中。

實例3

所選擇抗C3b抗體純系之定性分析

噬菌體ELISA – 實施噬菌體競爭結合分析以確定噬菌體呈現Fab對C3b之適宜結合親和力(以噬菌體IC₅₀來確定)。如下所述實施分析。來自每一純系之經純化噬菌體上清液皆係使用上述經修改PEG沉澱方案來製造。在噬菌體封阻緩衝液中連續稀釋經純化噬菌體上清液，然後將其在經C3b (1 µg/ml)塗佈之板上培養15分鐘。用洗滌緩衝液洗滌板且將其與辣根過氧化物酶/抗M13抗體偶合物(以1:5000稀釋於PBS緩衝液中)(Amersham Pharmacia Biotech)一起培養30分鐘。將板洗滌，用四甲基聯苯胺(TMB)受質使其顯色(Kirkegaard及Perry Laboratories)且用.1 N H₂SO₄終止。在450 nm下以分光光度計方式量測吸光度以測定在飽和時產生約50%信號之噬菌體濃度。將亞飽和濃度之固定噬菌體稀釋於噬菌體封阻緩衝液中，其中含有自350 nM C3b經兩倍連續稀釋至5 nM C3b之C3b蛋白。在室溫下將混合物緩慢振盪培養1小時，將其轉移至經C3b (1 µg/ml)塗佈之板上且將板培養20分鐘。如上所述洗滌及處理板。以IC₅₀值(定義為封阻50%與固定抗原結合之噬菌體之抗原濃度)評估結合親和力。C3b噬菌體競爭結果展示於圖2中。

IgG製造及親和力測定 – 為表現IgG蛋白以供親和力定性分析，將終止密碼子引入噬菌體呈現載體之重鏈及g3之間。將純系轉化至大腸桿菌34B8細胞中且使其於30°C下在AP5培養基中生長(Presta等人，Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997))。藉由離心收集細胞，使其懸浮於10 mM Tris、1 mM EDTA pH 8中且使用微射流均質機使細胞破開。用蛋白G親和層析法將Fab純化。

噬菌體衍生抗C3b抗體 YW144.2.43 及其親和力成熟變體

YW144.2.43S77(Fab 片段)對人 C3b 及 C3 之結合親和力係使用 BIACORE® 3000系統(Biacore公司, Piscataway, NJ)藉由量測表面電漿共振來測定。所測試抗體Fab片段係YW144.2.43及YW144.2.43S7。簡言之,在羧甲基化右旋糖生物感應器芯片(CM5, Biacore公司)上之流動細胞1及2係經0.2 M N-甲基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)及0.05 M N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)以5 μ l/英吋之流速活化7 min。使流動細胞1保持未經塗佈作為陰性對照。該等經活化芯片係經抗C3b Fab(以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋至5 μ g/ml)塗佈,之後以5 μ l/分鐘之流速注射以獲得約50個響應單位(RU)之偶聯抗體。然後,注入1 M乙醇胺以封阻未反應基團。對於動力學量測而言,在25°C下以35 μ l/min之流速注射存於含有0.05% Tween 20之PBS中之人C3b或C3可溶性抗原之兩倍連續稀釋物(C3b係自約100 nM稀釋至約3 nM, C3係自約1 μ M稀釋至50 nM)。每次注射後使用20 mM HCl使芯片再生。藉由減去空白流動池之RU來修正結合響應。使用簡單的一對一Langmuir結合模型(BIAevaluation Software 3.2版)來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡離解常數(K_D)係以比率 $k_{解離}/k_{締合}$ 來計算。結合親和力展示於圖6及7中。

在另一實驗中,在微量滴定板中使用多株C3抗體捕獲經純化C3b或C3。S77 (A)或多株抗C3抗體(B)與經捕獲C3b或C3之結合係使用二級HRPO偶合抗體來確定。用TMB (KPL)顯色,在2N H₂SO₄中急製,且在450 nm下讀取吸光度。

測試抗C3b抗體S77特異性之C3b ELISA. 將稀釋於PBS中之25 μ L捕獲抗體(YW144.2.45.S77親和力成熟x C3/C3b (Genentech) 2 μ g/ml)添加至微量滴定板孔中且在4°C下培養過夜。用洗滌緩衝液(PBS/0.05% Tween 20(20x原液; Media Prep; Cat.A3355))將板洗滌3x。將50 μ L封阻緩衝液添加至孔中且將板緩慢振盪培養1-3小時(室

溫)且用洗滌緩衝液將其洗滌3x。標準原液(C3b, Complement Technology公司; Cat.A114, 以100x在約20°C下儲存)係在Magic緩衝液(1X PBS pH 7.4, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.2% BgG, 15 PPM Proclin (Media Prep; Cat.A3381) + 0.35 M NaCl)中製備。Magic緩衝液+0.35 M NaCl亦係用於製備分析樣品。將25 μ L標準品/樣品添加至指定孔中。在RT下將樣品緩慢振盪培養約2小時(+/- 0.5 hr)且用洗滌緩衝液洗滌3x。將板翻轉180度並重複實施洗滌步驟。在分析稀釋劑中以1:7K稀釋檢測抗體(過氧化物酶偶合山羊F(ab')₂抗人C3 (Protos Immunoresearch; Cat.765))且在RT下將其於板上緩慢振盪培養1-2小時。用洗滌緩衝液將板洗滌3x且將其翻轉180度並重複實施洗滌步驟。製備50/50 TMB溶液。用洗滌緩衝液將ELISA板洗滌3x。將板翻轉180度且重複實施洗滌步驟。將25 μ L TMB添加至孔中。在室溫下顯色。顯色時間：二板皆為10分鐘。藉由將25 μ L 1.0 M磷酸添加至孔中來終止顯色。對板實施OD讀取(450/630 nm)。結果展示於圖8之圖A中。

以與用於測試S77特異性之上述C3b ELISA分析類似之方式來處理用作C3檢測陽性對照之總C3，不同之處在於使用針對人C3 (Cappel 55033)之山羊IgG部分作為捕獲抗體。結果展示於圖8之圖B中。

如圖8中所示，S77可識別C3b而非前驅分子C3。

實例4

C3b抗體特異性抑制補體旁路途徑

溶血分析 - 為測定旁路途徑活性，在GVB中將兔紅細胞(Er, Colorado Serum)洗滌3x且使其再懸浮至 2×10^9 /ml之濃度。以1:1使抑制劑(50 μ l)及20 μ l Er懸浮液與GVB/0.1 M EGTA/0.1 M MgCl₂混合。補體活化係藉由添加C1q缺失之人類血清(Quidel; 以1:3稀釋於GVB中之30 μ l)來起始。在室溫下培養30分鐘後，添加200 μ l GVB/10 mM

EDTA以終止反應且以500 g將樣品離心5 min。藉由在412 nm下量測吸光度於200 μ l懸浮液中測定溶血作用。數據表現為不存在抑制劑時所誘導之溶血作用%。為測定CRIg對補體典型途徑之效應，實施類似程序，只是用經IgM塗佈之羊紅細胞(E-IgM, CompTech)來替代Er且分析係在GVB++中於缺少因子B之人類血清中實施。

如圖9及10中所示，親和力成熟C3b抗體S77特異性抑制旁路補體途徑而非典型途徑。

實例5

C3b抗體抑制C5與C5轉化酶之結合

C5競爭分析 - 藉由在4°C下與存於PBS中之3 μ g/ml C3b一起培養過夜而將C3b塗佈於微量滴定板上。用存於PBS中之1% BSA封阻板且將其與高濃度抗體(與存於20 mM Tris/20 mM Ca/20 mM Mg/150 mM NaCl/0.05% Tween/1% BSA中之0.4 μ M C5混合)一起培養。藉由在RT下與抗人C5抗體(純系7D12, Genentech)一起培養30 min及之後與1:5000驢抗小鼠HRP (Jackson)一起培養來檢測C5結合。

如圖11及12中所示，親和力成熟C3b抗體S77抑制C5轉化酶。

實例6

C3b抗體不展示衰變活性

衰變促進活性 - 用存於PBS中之3 μ g/ml C3b將微量滴定板塗佈過夜。用PBST (PBS/0.1%-Tween)將板洗滌2次，在37°C下用含有4% BSA之PBST將其封阻2 h。在室溫下於含有400 ng/ml因子B、25 ng/ml因子D、及2 mM NiCl₂、25 mM NaCl、0.05% Tween 20及4% BSA之維羅那(veronal)緩衝液中將板培養2 hr，之後將其與存於PBST中之因子H或S77一起培養15 min。藉由與存於PBST中之山羊抗人因子B多株抗體(Kent)之1:5,000稀釋物及存於PBST中之與HRPO (Caltag)偶合之驢抗山羊抗體之1:5,000稀釋物一起連續培養1 hr來檢測因子Bb。用

TMB (KPL)顯色，在2N H₂SO₄中急製，且在450 nm下讀取吸光度。藉由將0.8 μM C3b及80 nM因子I與80 nM因子H一起培養或改變存於30 ml GVB中之S77之濃度來量測針對因子I介導之C3b裂解之輔因子活性。在37°C下將混合物培養60 min且藉由所述用於C3轉化酶分析中之凝膠電泳來分析樣品。

如圖13中所示，S77不展示衰變促進活性。

實例7

C77抑制前驅因子B與C3b之結合及C3bBb轉化酶之形成

方案

在RT下用存於PBS(20 μl/孔)中之3 μg/ml C3b (PUR13420)將MaxiSorp板塗佈4 hr。用100 μl PBS 0.1% Tween (PBST)實施6X洗滌(BioTek EL405洗滌機)。在RT下用4% BSA/0.05% Tween/PBS將板封阻2 hr，之後將封阻液振盪去除至槽中。在RT下添加20 μl AP轉化酶緩衝液並保持2 hr，之後用PBST洗滌6x。在RT下添加20 μl抗體並保持45 min，且用PBST將孔洗滌6x。為檢測因子B/Bb，在RT下將孔與1:7000山羊抗fB (Kent Labs)一起培養30 min。為檢測S77及CR1，將PBST添加至孔中，然後用PBST將其洗滌6x，且與存於PBST++中之1:7,000驢抗山羊IgG-HRPO (Jackson)一起培養30 min。在RT下與存於PBST++中之1:100抗6x-His (SEQ ID NO: 19)(R&D)一起培養30 min，之後用PBST洗滌6x。用20 μl TMB受質顯色，且用10 μl 2N硫酸終止反應。在450 nm下對板實施讀數。

「AP轉化酶緩衝液」：4% BSA、0.1% Tween 20、2 mM NiCl₂、25 mM NaCl、25 ng/mL因子D、400 ng/ml因子B (CompTech)。

根據上述方案，將C3b塗佈於微量滴定板上。添加S77、對照Fab或CR1片段(LHRA-C)，1 hr後添加因子B。用與HRPO偶合之二級抗體來檢測因子B與C3b之結合且在450 nm下讀取吸光度。結果展示於圖

14之圖A中。

類似地，根據上述方案將C3b塗佈於微量滴定板上，之後添加S77、對照Fab或CR1片段(LHRA-C)。C3轉化酶係藉由添加因子D及因子B來生成。使用可識別因子Bb之一級抗體及二級HRPO偶合抗體來測定轉化酶形成。用TMB (KPL)顯色，在2N H₂SO₄中急製且在450 nm下讀取吸光度。結果展示於圖14之圖B中。

如圖14中所示，抗體S77抑制前驅因子B與C3B之結合，且抑制C3bBb轉化酶之形成。

實例8

在經結合fBb存在下S77結合C3b且不使C3轉化酶衰變

使用實例7中所述方案將C3b塗佈於微量滴定板上。C3轉化酶係藉由添加因子D及因子B來生成。將S77、對照Fab或CR1片段(LHRA-C)添加至板中，且藉由與HRPO偶合之二級抗體來測定該等分子之結合。結果展示於圖15之圖A中。

類似地，根據實例7中所述方案用3 µg/ml C3b塗佈微量滴定板。將板與因子B及因子D一起培養，之後與CR1 (LHRA-C)、S77或對照Fab一起培養。用山羊抗人因子B及與HRPO偶合之驢抗山羊抗體檢測因子Bb。用TMB (KPL)顯色，在2N H₂SO₄中急製，且在450 nm下讀取吸光度。結果展示於圖15之圖B中。

圖15中所示結果顯示，在經結合fBb存在下S77可與C3b結合且不使C3轉化酶衰變。

實例9

S77抑制因子H與C3b之結合且抑制因子H之輔因子活性

方案1(圖15，圖A) - 在RT下用存於PBS(20 µl/孔)中之3 µg/ml C3b (PUR13420)將MaxiSorp板塗佈3 hr。用100 µl PBS 0.1% Tween (PBST)將板洗滌6X(BioTek EL405洗滌機)，且在RT下用4%

BSA/0.05% Tween/PBS將其封阻2 hr。在RT下將板與20 μ l振盪封阻抗體一起培養30 min，之後在RT下與0.33 μ M fH (CompTech)一起培養1 hr且添加10 μ l 1 μ M fH。在板洗滌機(BioTek EL405)中用PBST將板洗滌6X，將其與1:7000驢抗小鼠IgG(H+L)-HRPO (Jackson)一起培養30 min，且在板洗滌機(BioTek EL405)中用PBST洗滌6X。用20 μ l TMB受質顯色。用10 μ l 2N硫酸終止反應，且在450 nm下對板實施讀數。

方案2(圖15，圖B) - 所有稀釋液皆係存於GVB++ (1 mM MgCl, 0.15 mM CaCl)中。添加存於艾本德(eppendorf)管中之10 μ l 1.6 μ M C3b(最終0.4 μ M C3b)。添加10 μ l抗C3b Fab、對照Fab或CR1。在RT下培養20 min。添加10 μ l 0.08 μ M fI(最終20 nM fI)。在37°C下培養60 min。添加40 μ l Laemmli's緩衝液+2-bME，將其煮沸3 min。在8% Invitrogen凝膠上(25 μ l/孔，125 mV)運行1.5小時。用H₂O將凝膠洗滌3 x 5 min。在RT下用Simply Blue (Invitrogen)振盪染色60 min。用ddH₂O洗滌3 x 5 min。在振盪器上於大型烤盤中用ddH₂O洗滌過夜，用塑料覆蓋。試劑：C3b PUR13240、來自Complement Technologies之fI、來自Complement Technologies之fH，來自BioWhittaker之GVB++。

如上所述，用C3b塗佈板。在高濃度對照Fab或S77存在下添加因子H。使用抗因子H抗體及二級HRPO偶合抗小鼠抗體來測定因子H與C3b之結合。用TMB (KPL)顯色，在2N H₂SO₄中急製，且在450 nm下讀取吸光度。結果展示於圖16之圖A中。

藉由將0.8 μ M C3b及80 nM因子I與80 nM因子H一起培養或改變存於30 ml GVB中之S77之濃度來量測針對因子I介導之C3b裂解之輔因子活性。在37°C下將混合物培養60 min且藉由所述用於C3轉化酶分析中之凝膠電泳來分析樣品。結果展示於圖16之圖B中。

如圖16中所示，抗體S77抑制因子H與C3b之結合且亦抑制因子H

之輔因子活性。

實例10

S77抑制CR1與C3b之結合

方案 - 在4℃下用存於PBS(100 μ l/孔)中之3 μ g/ml C3b (PUR13420)塗佈MaxiSorp板過夜。用100 μ l PBS 0.1% Tween (PBST)洗滌3X(BioTek EL405洗滌機)。在RT下用4% BSA/0.1% Tween/PBS封阻2 hr。在RT下與20 μ l振盪封阻抗體一起培養30 min。在RT下與50 nM CR1 LHR-AC一起培養1 hr。在板洗滌機(BioTek EL405)中用PBST洗滌3X。在RT下與存於PBST中之1:10 mIgG1抗hCD35-FITC (Pharmingen)一起培養45 min。在板洗滌機(BioTek EL405)中用PBST洗滌3X。與1:7000驢抗小鼠IgG-HRPO (Jackson)一起培養30 min。在板洗滌機中(BioTek EL405)用PBST洗滌6X。用20 μ l TMB受質顯色。用10 μ l 2N硫酸終止反應。在450 nm下讀取板。

如圖17中所示，抗體S77抑制CR1與C3b之結合。

實例11

結晶及數據精化

使用氣體擴散法以由蛋白質溶液及儲藏溶液以1:1之比組成之2 μ l液滴實施懸滴實驗。蛋白質溶液含有以10 mg/ml之濃度存於25 mM Tris、50 mM NaCl (pH7.5)中之C3b:S7714複合物且儲藏液中含有存於0.1 M Hepes (pH 7.2)中之10% PEG 4000、0.2 M $MgCl_2$ 。兩周後出現晶體。在補加有20%甘油之儲藏溶液中培養晶體，之後實施急驟冷凍。在先進光源(Advanced Light Source)(Berkeley)之光束線5.0.1下自單一冷凍晶體收集數據且使用程序DENZO及SCALEPACK處理數據。晶體屬於空間群C2，其具有以下晶胞參數： $a=216.4$ Å， $b=180.4$ Å， $c=154.6$ Å且 $\beta=115.73$ Å且其具有2個複合體，每個複合體係由一個C3b分子與一個Fab分子結合而構成且呈不對稱單元。使用程序Phaser

及Fab片段之C3b、恆定結構域、及可變結構域之坐標藉由分子置換來解析結構。使用程式O手動調整模型且以程式REFMAC使用嚴格的2倍非結晶學對稱性限制來實施精化。經精化模型之R及R_{自由}分別係22.5%及29.0%。

與抗體S77組成之複合物中C3b之晶體結構展示於圖3中。圖4I係抗體S77與C3b之結合交互作用之近視圖。使用晶體數據將C77 Fab重鏈序列內與C3b緊密接觸之殘基顯示為紅色。

此外，圖19列舉C3b上與S77接觸之殘基。圖20列舉與C3b接觸之Fab S77殘基。

靶向對補體活化最重要的組份C3b可在C3及C5轉化酶二者之水平上提供抑制補體級聯之強效方法。在上述實例中所述研究中，採用噬菌體技術來生成選擇性識別C3b而非其前驅分子C3之抗體。在與特定(S77)之Fab片段組成之複合物中C3b之晶體結構顯示，抗體可識別在C3裂解為C3b後所曝露之MG7結構域上之表位。S77封阻因子B及C5與C3b之結合，導致可在旁路補體途徑而非典型補體途徑中有效抑制C3及C5轉化酶。此外，S77可抑制fH之結合及輔因子活性以及CR1與C3b之結合，此表明S77對C3b MG7結構域之結合位點係調節補體活化之熱點。總而言之，此研究之結果在旁路途徑之C3及C5轉化酶水平上顯示補體活化及抑制之分子基礎，且顯示噬菌體呈現及其他呈現技術生成具有有前景之治療潛力的選擇性抗體之應用。

上述書面說明書被視為足以使熟習此項技術者能實踐本發明。除本文所展示及闡述之修改形式外，熟習此項技術者可根據上述說明瞭解本發明各種修改形式，該等修改形式皆係涵蓋於隨附申請專利範圍之範圍內。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商建南德克公司

<120> C3b抗體及預防及治療補體相關疾病之方法

<130> 39766-0250

<140> 097121292

<141> 2008-06-06

<150> 61/055,068

<151> 2008-05-21

<150> 60/933,721

<151> 2007-06-07

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列名稱：合成SS7重鍵區

<400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
35 40

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列名稱：合成SS7重鍵區

<400> 2

Gly Phe Ser Phe Thr Ser Ser Ser Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
1 5 10 15Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu
20 25

<210> 3

<211> 48

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列名稱：合成SS7重鍵區

<400> 3

Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Phe Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
20 25 30

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35 40 45

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列名稱：合成SS7重鏈區

<400> 4
 Asn Ala Leu Tyr Gly Ser Gly Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 1 5 10 15

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 20 25

<210> 5
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列名稱：合成SS7輕鏈區

<400> 5
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 35 40

<210> 6
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列名稱：合成SS7輕鏈區

<400> 6
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 1 5 10 15

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 20 25

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列名稱：合成SS7輕鏈區

<400> 7
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

20 25 30

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列名稱：合成SS7輕鏈區

<400> 8
Gln Gln Ser Tyr Ala Thr Leu Pro Thr Phe Glu Gln Gly Thr Lys Val
1 5 10 15
Glu Ile Lys

<210> 9
<211> 1641
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9
Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn Ile Leu Arg Leu Glu Ser
1 5 10 15
Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp Ala Gln Gly Asp Val Pro
20 25 30
Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly Lys Lys Leu Val Leu Ser
35 40 45
Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr Asn His Met Gly Asn Val
50 55 60
Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe Lys Ser Glu Lys Gly Arg
65 70 75 80
Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe Gly Thr Gln Val Val Glu
85 90 95
Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly Tyr Leu Phe Ile Gln Thr
100 105 110
Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr Val Leu Tyr Arg Ile Phe
115 120 125
Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly Arg Thr Val Met Val Asn
130 135 140
Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys Gln Asp Ser Leu Ser Ser
145 150 155 160
Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser Trp Asp Ile Pro Glu Leu
165 170 175
Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro
180 185 190
Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro
195 200 205
Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr
210 215 220
Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Phe Leu Tyr Gly
225 230 235 240
Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile Phe Gly Ile Gln Asp Gly

245	250	255
Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu Lys Arg Ile Pro Ile Glu 260 265 270		
Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg Lys Val Leu Leu Asp Gly 275 280 285		
Val Gln Asn Leu Arg Ala Glu Asp Leu Val Gly Lys Ser Leu Tyr Val 290 295 300		
Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser Asp Met Val Gln Ala Glu 305 310 315 320		
Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr 325 330 335		
Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met Pro Phe Asp Leu Met Val 340 345 350		
Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala Tyr Arg Val Pro Ala Val 355 360 365		
Ala Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu Thr Gln Gly Asp Gly 370 375 380		
Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser Gln Lys Pro Leu Ser 385 390 395 400		
Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser Glu Ala Glu Gln Ala 405 410 415		
Thr Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr Val Gly Asn Ser Asn 420 425 430		
Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu Leu Arg Pro Gly Glu 435 440 445		
Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp Arg Ala His Glu Ala 450 455 460		
Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn Lys Gly Arg Leu Leu 465 470 475 480		
Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln Asp Leu Val Val Leu 485 490 495		
Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser Phe Arg Leu Val Ala 500 505 510		
Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg Glu Val Val Ala Asp 515 520 525		
Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val Gly Ser Leu Val Val 530 535 540		
Lys Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val Pro Gly Gln Gln Met 545 550 555 560		
Thr Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg Val Val Leu Val Ala 565 570 575		
Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys Asn Lys Leu Thr Gln 580 585 590		
Ser Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp Ile Gly Cys Thr Pro 595 600 605		
Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Gly Val Phe Ser Asp Ala Gly Leu Thr 610 615 620		
Phe Thr Ser Ser Ser Gly Gln Gln Thr Ala Gln Arg Ala Glu Leu Gln 625 630 635 640		
Cys Pro Gln Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Leu Thr Glu		

	645		650		655
Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys Glu Leu Arg Lys Cys	660		665		670
Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg Phe Ser Cys Gln Arg	675		680		685
Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala Cys Lys Lys Val Phe Leu	690		695		700
Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg Gln His Ala Arg Ala	705		710		715
Ser His Leu Gly Leu Ala Arg Ser Asn Leu Asp Glu Asp Ile Ile Ala	725		730		735
Glu Glu Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp	740		745		750
Asn Val Glu Asp Leu Lys Glu Pro Pro Lys Asn Gly Ile Ser Thr Lys	755		760		765
Leu Asn Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr Thr Trp Glu Ile Leu	770		775		780
Ala Val Ser Met Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys Val Ala Asp Pro Phe	785		790		795
Glu Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp Leu Arg Leu Pro Tyr	805		810		815
Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg Ala Val Leu Tyr Asn	820		825		830
Tyr Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val Glu Leu Leu His Asn	835		840		845
Pro Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg Arg His Gln Gln Thr	850		855		860
Val Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val Pro Tyr Val Ile Val	865		870		875
Pro Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val Lys Ala Ala Val Tyr	885		890		895
His His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser Leu Lys Val Val Pro	900		905		910
Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val Arg Thr Leu Asp Pro	915		920		925
Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu Asp Ile Pro Pro Ala	930		935		940
Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser Glu Thr Arg Ile Leu	945		950		955
Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu Asp Ala Val Asp Ala	965		970		975
Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser Gly Cys Gly Glu Gln	980		985		990
Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp	995		1000		1005
Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala	1010		1015		1020
Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg Gln	1025		1030		1035
Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala Phe Val Lys Arg Ala Pro Ser Thr Trp					1040

1045	1050	1055
Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Val Asn Leu Ile		
1060	1065	1070
Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu		
1075	1080	1085
Glu Lys Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Ala Pro Val Ile		
1090	1095	1100
His Gln Glu Met Ile Gly Gly Leu Arg Asn Asn Asn Glu Lys Asp Met		
1105	1110	1115
Ala Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ser Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile		
1125	1130	1135
Cys Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Thr Lys Ala Gly		
1140	1145	1150
Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn Leu Gln Arg Ser Tyr Thr Val		
1155	1160	1165
Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Gln Met Gly Arg Leu Lys Gly Pro		
1170	1175	1180
Leu Leu Asn Lys Phe Leu Thr Thr Ala Lys Asp Lys Asn Arg Trp Glu		
1185	1190	1195
Asp Pro Gly Lys Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu		
1205	1210	1215
Leu Ala Leu Leu Gln Leu Lys Asp Phe Asp Phe Val Pro Pro Val Val		
1220	1225	1230
Arg Trp Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr		
1235	1240	1245
Gln Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Lys Asp		
1250	1255	1260
Ala Pro Asp His Gln Glu Leu Asn Leu Asp Val Ser Leu Gln Leu Pro		
1265	1270	1275
Ser Arg Ser Ser Lys Ile Thr His Arg Ile His Trp Glu Ser Ala Ser		
1285	1290	1295
Leu Leu Arg Ser Glu Glu Thr Lys Glu Asn Glu Gly Phe Thr Val Thr		
1300	1305	1310
Ala Glu Gly Lys Gly Gln Gly Thr Leu Ser Val Val Thr Met Tyr His		
1315	1320	1325
Ala Lys Ala Lys Asp Gln Leu Thr Cys Asn Lys Phe Asp Leu Lys Val		
1330	1335	1340
Thr Ile Lys Pro Ala Pro Glu Thr Glu Lys Arg Pro Gln Asp Ala Lys		
1345	1350	1355
Asn Thr Met Ile Leu Glu Ile Cys Thr Arg Tyr Arg Gly Asp Gln Asp		
1365	1370	1375
Ala Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro		
1380	1385	1390
Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln Leu Ala Asn Gly Val Asp Arg Tyr Ile		
1395	1400	1405
Ser Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Ala Phe Ser Asp Arg Asn Thr Leu Ile		
1410	1415	1420
Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser His Ser Glu Asp Asp Cys Leu Ala Phe		
1425	1430	1435
Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile Gln Pro Gly Ala Val		

<210> 10
<211> 1639
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10
Ile Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn Val Leu Arg Leu Glu Ser
1 5 10 15
Glu Glu Thr Ile Val Leu Glu Ala His Asp Ala Gln Gly Asp Ile Pro
20 25 30
Val Thr Val Thr Val Gln Asp Phe Leu Lys Arg Gln Val Leu Thr Ser
35 40 45
Glu Lys Thr Val Leu Thr Gly Ala Ser Gly His Leu Arg Ser Val Ser
50 55 60
Ile Lys Ile Pro Ala Ser Lys Glu Phe Asn Ser Asp Lys Glu Gly His
65 70 75 80
Lys Tyr Val Thr Val Val Ala Asn Phe Gly Glu Thr Val Val Glu Lys
85 90 95
Ala Val Met Val Ser Phe Gln Ser Gly Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp
100 105 110
Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr
115 120 125
Val Asp Asn Asn Leu Leu Pro Val Gly Lys Thr Val Val Ile Leu Ile
130 135 140
Glu Thr Pro Asp Gly Ile Pro Val Lys Arg Asp Ile Leu Ser Ser Asn
145 150 155 160

Asn Gln His Gly Ile Leu Pro Leu Ser Trp Asn Ile Pro Glu Leu Val
 165 170 175
 Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala Phe Tyr Glu His Ala Pro Lys
 180 185 190
 Gln Ile Phe Ser Ala Glu Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser
 195 200 205
 Phe Glu Val Arg Val Glu Pro Thr Glu Thr Phe Tyr Tyr Ile Asp Asp
 210 215 220
 Pro Asn Gly Leu Glu Val Ser Ile Ile Ala Lys Phe Leu Tyr Gly Lys
 225 230 235 240
 Asn Val Asp Gly Thr Ala Phe Val Ile Phe Gly Val Gln Asp Gly Asp
 245 250 255
 Lys Lys Ile Ser Leu Ala His Ser Leu Thr Arg Val Val Ile Glu Asp
 260 265 270
 Gly Val Gly Asp Ala Val Leu Thr Arg Lys Val Leu Met Glu Gly Val
 275 280 285
 Arg Pro Ser Asn Ala Asp Ala Leu Val Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser
 290 295 300
 Val Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser Asp Met Val Glu Ala Glu Arg
 305 310 315 320
 Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys
 325 330 335
 Thr Pro Lys Phe Phe Lys Pro Ala Met Pro Phe Asp Leu Met Val Phe
 340 345 350
 Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala Ser Lys Val Leu Val Val Thr
 355 360 365
 Gln Gly Ser Asn Ala Lys Ala Leu Thr Gln Asp Asp Gly Val Ala Lys
 370 375 380
 Leu Ser Ile Asn Thr Pro Asn Ser Arg Gln Pro Leu Thr Ile Thr Val
 385 390 395 400
 Arg Thr Lys Lys Asp Thr Leu Pro Glu Ser Arg Gln Ala Thr Lys Thr
 405 410 415
 Met Glu Ala His Pro Tyr Ser Thr Met His Asn Ser Asn Asn Tyr Leu
 420 425 430
 His Leu Ser Val Ser Arg Met Glu Leu Lys Pro Gly Asp Asn Leu Asn
 435 440 445
 Val Asn Phe His Leu Arg Thr Asp Pro Gly His Glu Ala Lys Ile Arg
 450 455 460
 Tyr Tyr Thr Tyr Leu Val Met Asn Lys Gly Lys Leu Leu Lys Ala Gly
 465 470 475 480
 Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln Asp Leu Val Val Leu Ser Leu Pro
 485 490 495
 Ile Thr Pro Glu Phe Ile Pro Ser Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr
 500 505 510
 Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp
 515 520 525
 Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Ile Gly Thr Leu Val Val Lys Gly Asp
 530 535 540
 Pro Arg Asp Asn His Leu Ala Pro Gly Gln Gln Thr Thr Leu Arg Ile
 545 550 555 560

Glu Gly Asn Gln Gly Ala Arg Val Gly Leu Val Ala Val Asp Lys Gly
 565 570 575
 Val Phe Val Leu Asn Lys Lys Asn Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp
 580 585 590
 Asp Val Val Glu Lys Ala Asp Ile Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys
 595 600 605
 Asn Tyr Ala Gly Val Phe Met Asp Ala Gly Leu Ala Phe Lys Thr Ser
 610 615 620
 Gln Gly Leu Gln Thr Glu Gln Arg Ala Asp Leu Glu Cys Thr Lys Pro
 625 630 635 640
 Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Leu Met Glu Arg Arg Met Asp
 645 650 655
 Lys Ala Gly Gln Tyr Thr Asp Lys Gly Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp
 660 665 670
 Gly Met Arg Asp Ile Pro Met Arg Tyr Ser Cys Gln Arg Arg Ala Arg
 675 680 685
 Leu Ile Thr Gln Gly Glu Asn Cys Ile Lys Ala Phe Ile Asp Cys Cys
 690 695 700
 Asn His Ile Thr Lys Leu Arg Glu Gln His Arg Arg Asp His Val Leu
 705 710 715 720
 Gly Leu Ala Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asp Ile Ile Pro Glu Glu Asp
 725 730 735
 Ile Ile Ser Arg Ser His Phe Pro Gln Ser Trp Leu Trp Thr Ile Glu
 740 745 750
 Glu Leu Lys Glu Pro Glu Lys Asn Gly Ile Ser Thr Lys Val Met Asn
 755 760 765
 Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser
 770 775 780
 Leu Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys Val Ala Asp Pro Tyr Glu Ile Arg
 785 790 795 800
 Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val
 805 810 815
 Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg Ala Val Leu Phe Asn Tyr Arg Glu
 820 825 830
 Gln Glu Glu Leu Lys Val Arg Val Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe
 835 840 845
 Cys Ser Met Ala Thr Ala Lys Asn Arg Tyr Phe Gln Thr Ile Lys Ile
 850 855 860
 Pro Pro Lys Ser Ser Val Ala Val Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys
 865 870 875 880
 Ile Gly Gln Gln Glu Val Glu Val Lys Ala Ala Val Phe Asn His Phe
 885 890 895
 Ile Ser Asp Gly Val Lys Lys Thr Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Met
 900 905 910
 Arg Ile Asn Lys Thr Val Ala Ile His Thr Leu Asp Pro Glu Lys Leu
 915 920 925
 Gly Gln Gly Gly Val Gln Lys Val Asp Val Pro Ala Ala Asp Leu Ser
 930 935 940
 Asp Gln Val Pro Asp Thr Asp Ser Glu Thr Arg Ile Ile Leu Gln Gly
 945 950 955 960

Ser Pro Val Val Gln Met Ala Glu Asp Ala Val Asp Gly Glu Arg Leu
965 970 975

Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ala Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile
980 985 990

Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp Gln Thr Glu
995 1000 1005

Gln Trp Glu Lys Phe Gly Ile Glu Lys Arg Gln Glu Ala Leu Glu Leu
1010 1015 1020

Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Lys Gln Pro Ser Ser
1025 1030 1035 1040

Ala Tyr Ala Ala Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala
1045 1050 1055

Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Ala Asn Leu Ile Ala Ile Asp
1060 1065 1070

Ser His Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln
1075 1080 1085

Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Gly Pro Val Ile His Gln Glu
1090 1095 1100

Met Ile Gly Gly Phe Arg Asn Ala Lys Glu Ala Asp Val Ser Leu Thr
1105 1110 1115 1120

Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu Gln Glu Ala Arg Asp Ile Cys Glu Gly
1125 1130 1135

Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Asn Lys Ala Gly Glu Tyr Ile
1140 1145 1150

Glu Ala Ser Tyr Met Asn Leu Gln Arg Pro Tyr Thr Val Ala Ile Ala
1155 1160 1165

Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Gly
1170 1175 1180

Lys Phe Leu Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn Arg Trp Glu Glu Pro Asp
1185 1190 1195 1200

Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu
1205 1210 1215

Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp Ser Val Pro Pro Val Val Arg Trp Leu
1220 1225 1230

Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala Thr
1235 1240 1245

Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Thr Asp Val Pro Asp
1250 1255 1260

His Lys Asp Leu Asn Met Asp Val Ser Phe His Leu Pro Ser Arg Ser
1265 1270 1275 1280

Ser Ala Thr Thr Phe Arg Leu Leu Trp Glu Asn Gly Asn Leu Leu Arg
1285 1290 1295

Ser Glu Glu Thr Lys Gln Asn Glu Ala Phe Ser Leu Thr Ala Lys Gly
1300 1305 1310

Lys Gly Arg Gly Thr Leu Ser Val Val Ala Val Tyr His Ala Lys Leu
1315 1320 1325

Lys Ser Lys Val Thr Cys Lys Lys Phe Asp Leu Arg Val Ser Ile Arg
1330 1335 1340

Pro Ala Pro Glu Thr Ala Lys Lys Pro Glu Glu Ala Lys Asn Thr Met
1345 1350 1355 1360

Phe Leu Glu Ile Cys Thr Lys Tyr Leu Gly Asp Val Asp Ala Thr Met
 1365 1370 1375
 Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro Asp Thr Lys
 1380 1385 1390
 Asp Leu Glu Leu Leu Ala Ser Gly Val Asp Arg Tyr Ile Ser Lys Tyr
 1395 1400 1405
 Glu Met Asn Lys Ala Phe Ser Asn Lys Asn Thr Leu Ile Ile Tyr Leu
 1410 1415 1420
 Glu Lys Ile Ser His Thr Glu Glu Asp Cys Leu Thr Phe Lys Val His
 1425 1430 1435 1440
 Gln Tyr Phe Asn Val Gly Leu Ile Gln Pro Gly Ser Val Lys Val Tyr
 1445 1450 1455
 Ser Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu
 1460 1465 1470
 Lys Asp Asp Gly Met Leu Ser Lys Leu Cys His Ser Glu Met Cys Arg
 1475 1480 1485
 Cys Ala Glu Glu Asn Cys Phe Met Gln Gln Ser Gln Glu Lys Ile Asn
 1490 1495 1500
 Leu Asn Val Arg Leu Asp Lys Ala Cys Glu Pro Gly Val Asp Tyr Val
 1505 1510 1515 1520
 Tyr Lys Thr Glu Leu Thr Asn Ile Lys Leu Leu Asp Asp Phe Asp Glu
 1525 1530 1535
 Tyr Thr Met Thr Ile Gln Gln Val Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val
 1540 1545 1550
 Gln Ala Gly Gln Gln Arg Lys Phe Ile Ser His Ile Lys Cys Arg Asn
 1555 1560 1565
 Ala Leu Lys Leu Gln Lys Gly Lys Lys Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser
 1570 1575 1580
 Ser Asp Leu Trp Gly Glu Lys Pro Asn Thr Ser Tyr Ile Ile Gly Lys
 1585 1590 1595 1600
 Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Ala Glu Glu Cys Gln Asp Gln
 1605 1610 1615
 Lys Tyr Gln Lys Gln Cys Glu Glu Leu Gly Ala Phe Thr Glu Ser Met
 1620 1625 1630
 Val Val Tyr Gly Cys Pro Asn
 1635

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之名稱：合成肽

<400> 11
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223>人工序列之名稱：合成肽

<400> 12

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
1 5

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14

<211> 449

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Asp
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之名稱：合成肽

<400> 15
 Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys
 1 5

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之名稱：合成肽

<400> 16
 Tyr His His Phe Ile
 1 5

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之名稱：合成肽

<400> 17
 Thr Ser Ser Ser
 1

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之名稱：合成肽

<400> 18
 Arg Asn Ala Leu Tyr Gly Ser Gly Gly Tyr
 1 5 10

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之名稱：合成6x His標籤

<400> 19
 His His His His His His
 1 5

公告本

申請專利範圍

105年5月27日修正本

1. 一種選擇性結合至C3b而非C3且抑制C5與C3b結合之經分離之抗-C3b抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備治療個體之腎疾病之藥物，其中該抗體包含分別為SEQ ID NO：2、3及4之重鏈互補決定區CDRH1、CDRH2及CDRH3之序列，及包含分別為SEQ ID NO：6、7及8之輕鏈互補決定區CDRL1、CDRL2及CDRL3之序列，其中該腎疾病係由補體活化所介導。
2. 如請求項1之用途，其中該個體係人類。
3. 如請求項1之用途，其中該腎疾病係免疫介導者。
4. 如請求項1之用途，其中該腎疾病係選自急性腎衰竭、II型膜性增生性腎小球腎炎、IgA腎病、狼瘡性腎炎及所導致之腎小球腎炎及腎小管間質性腎炎。
5. 如請求項1之用途，其中該腎疾病係腎小球腎炎。
6. 如請求項1之用途，其中該抗體與一種包括抗體S77所識別的C3b表位殘基之表位結合。
7. 如請求項1之用途，其中該抗體結合於與抗體S77相同的表位。
8. 如請求項1之用途，其中該抗體競爭性抑制抗體S77之結合。
9. 如請求項1之用途，其中該抗體結合於C3b表位，該表位包含與抗體S77接觸之殘基。
10. 如請求項1之用途，其中該抗體包含一個抗原結合位點，該抗原結合位點包含與C3b接觸之抗體S77殘基。
11. 如請求項1之用途，其中該抗體或抗原結合片段係人類的、人類化的或嵌合的。
12. 如請求項1之用途，其中該抗原結合片段係選自由以下組成之群：Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、線性抗體、單鏈

抗體分子、微抗體(minibodies)及雙特異性抗體(diabodies)。

13. 如請求項12之用途，其中該抗原結合片段係Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv或(scFv)₂片段。
14. 如請求項1之用途，其中該抗體或其抗原結合片段為抗體YW144.2.43S77或其Fab片段。

104年7月30日修(成)止替換頁

圖式

項目	庫	富集度	所篩選純系	獨特純系
YW136	VH	x 10,000	300 (P4&P3)	~ 37
YW144	VH/VL	x 37,000	300 (P4&P3)	~ 120

** 第 1 輪後用 C3 封阻

圖 1

104年7月30日修(更)正替換頁

純系	相對噬菌體 IC ₅₀
YW136.1.55	~50nM *
YW136.1.6	~50nM *
YW136.1.54	~100nM
YW144.1.15	~100nM
YW144.1.60	~50nM *
YW144.2.43	~50nM *
YW144.2.45	~50nM *
YW144.2.91	~100nM
YW144.P3.10	~100nM
YW144.P3.24	~10nM **
YW144.P3.39	~100nM
YW144.P3.49	~50nM *
YW144.P3.65	~100nM

圖 2



104年7月30日修(更)正替換頁

S77 HC

MGWSCIIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 <CDR H1>**GFSFTSS**VSWVRQAPGKGLEWVGL<CDR
 H2>IYPYNGFNYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 AR<CDR H3>**NALYGSGGYY**AMDYWGQGTLVTVSSA

<末端重新格式化序列>

S77 LC

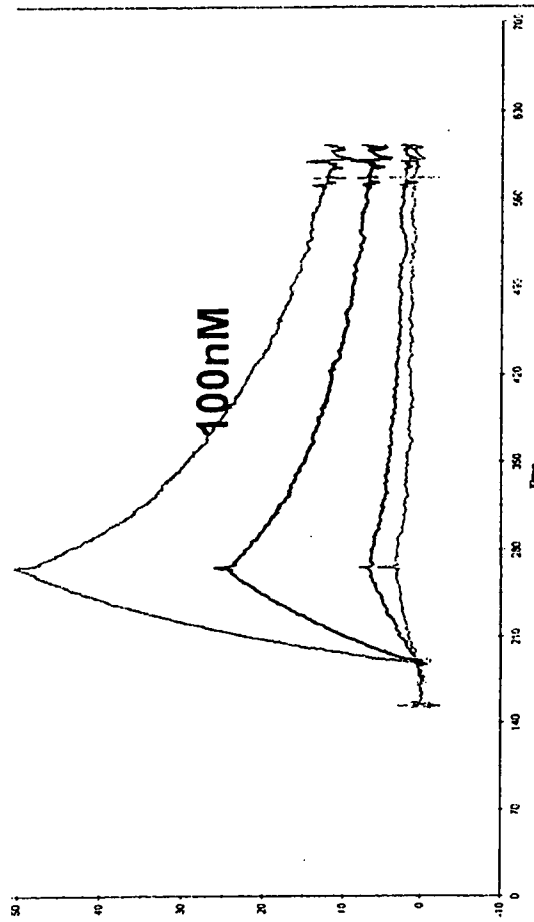
MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC<CDR
 L1>**RASQDVST**AVAWYQQKPGKAPKLLIY<CDR
 L2>**SASFLYSGVPSR**FSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<CDR
 L3>**QQSYATLPT**FEQGTKVEIK

<末端重新格式化序列>

圖 5

104年7月30日修(正)換頁

YW 144.2.43 (親代)



AM.S77

純系	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
YW 144.2.43	2.50E+04	4.49E-03	1.80E-07
YW 144.2.43.S77	7.61E+04	4.92E-04	6.47E-09

100nM

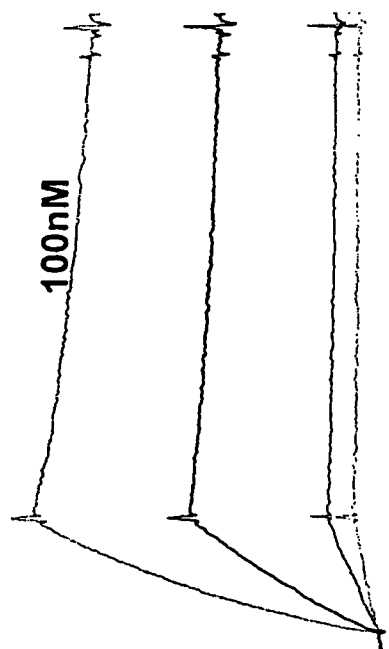


圖 6

104年7月30日修(更)止替換頁

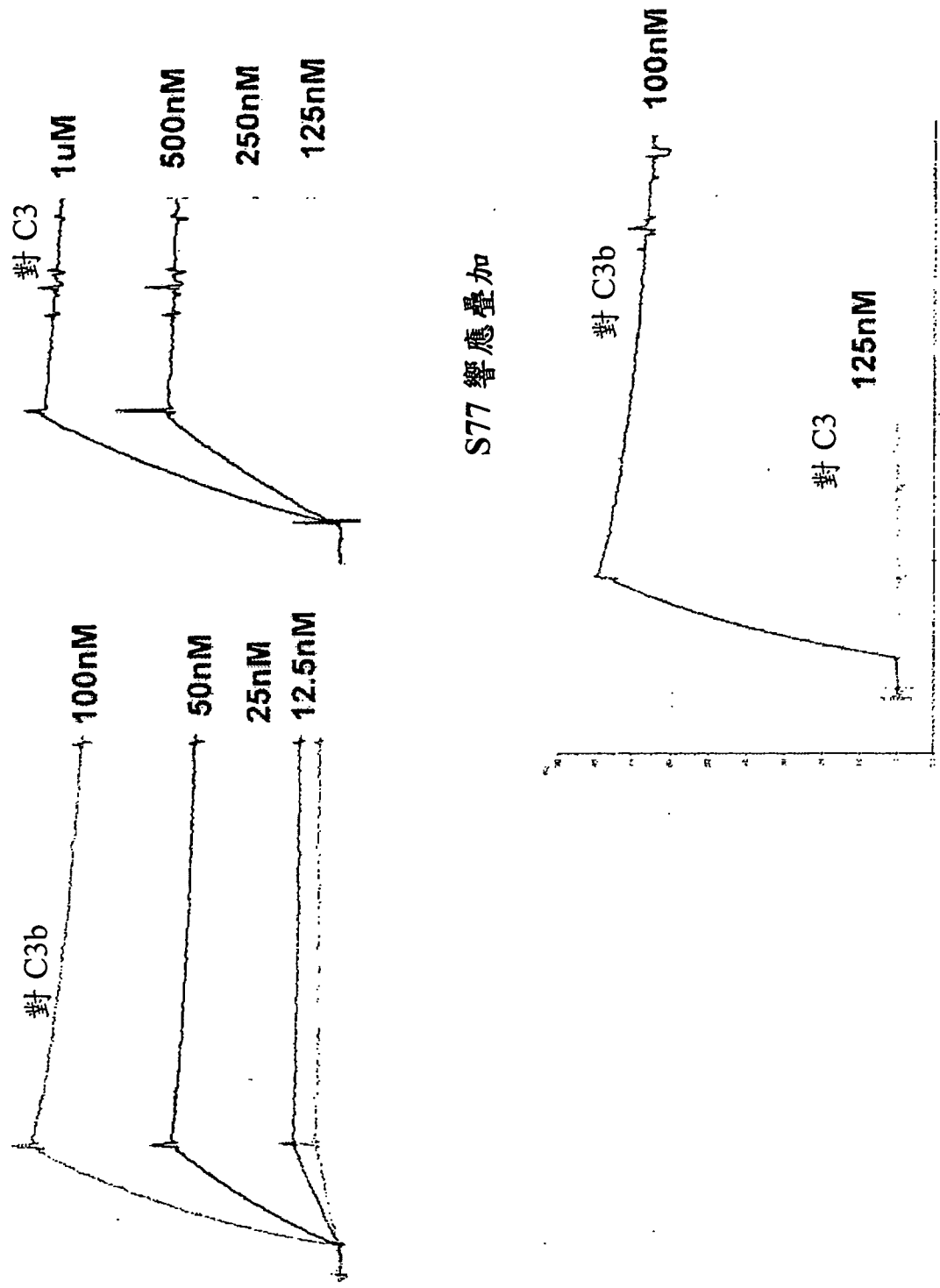


圖 7

104年7月30日修(正)替換頁

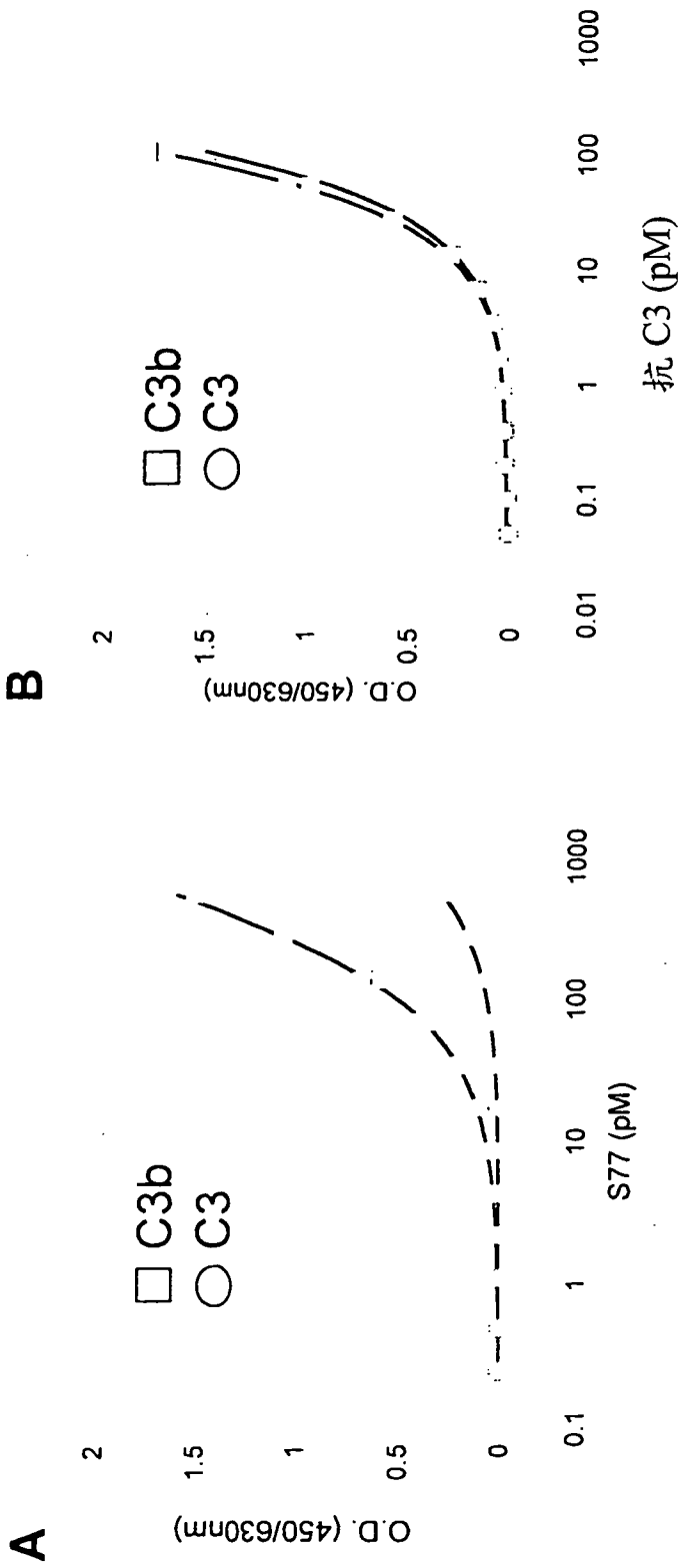


圖 8

104年7月30日修(正)替換頁

全長 IgG

純系編號	IC50 (nM)
2.43 S77	112

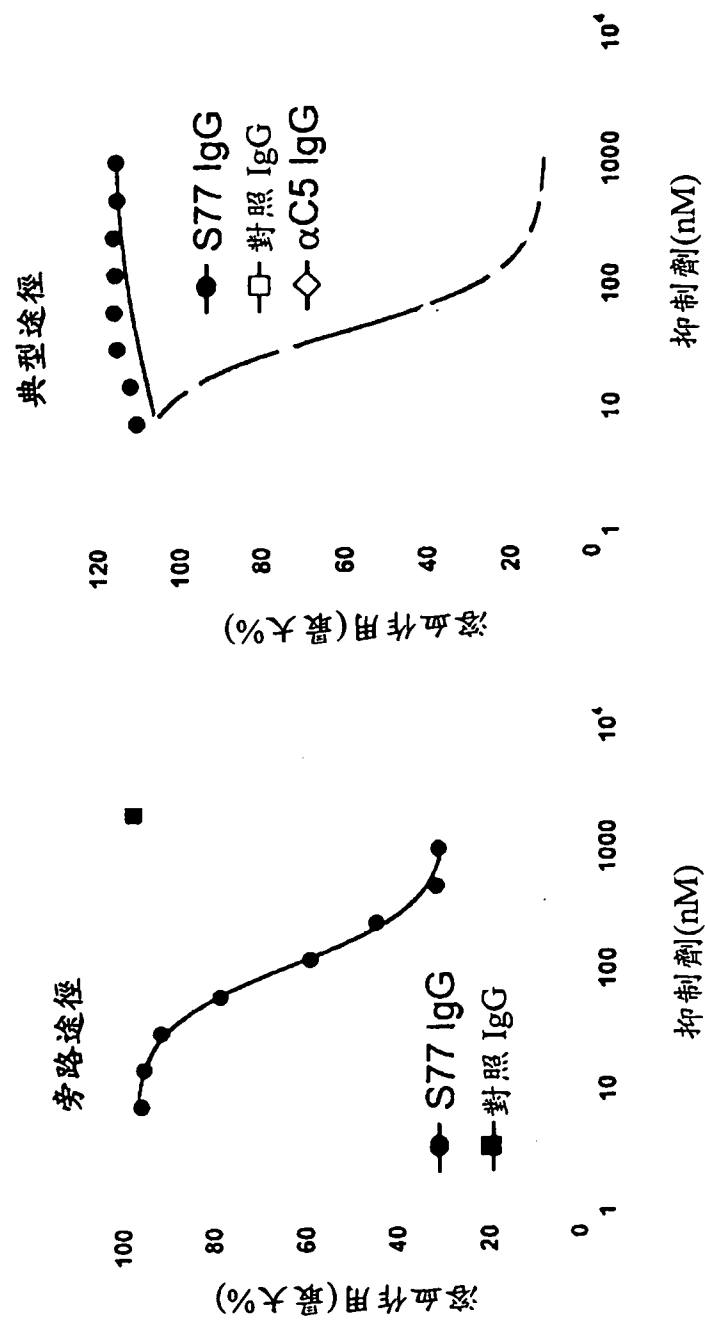


圖 9

104年7月30日修(更)正替換頁

Fab

純系編號	IC50 (nM)	IC90 (nM)
2.43 S77	100	632

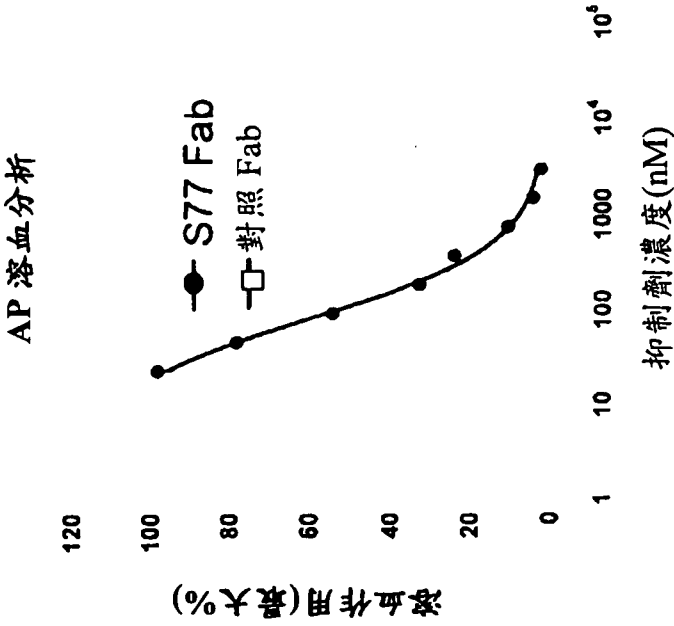


圖 10

104年7月30日修(成)止替換頁

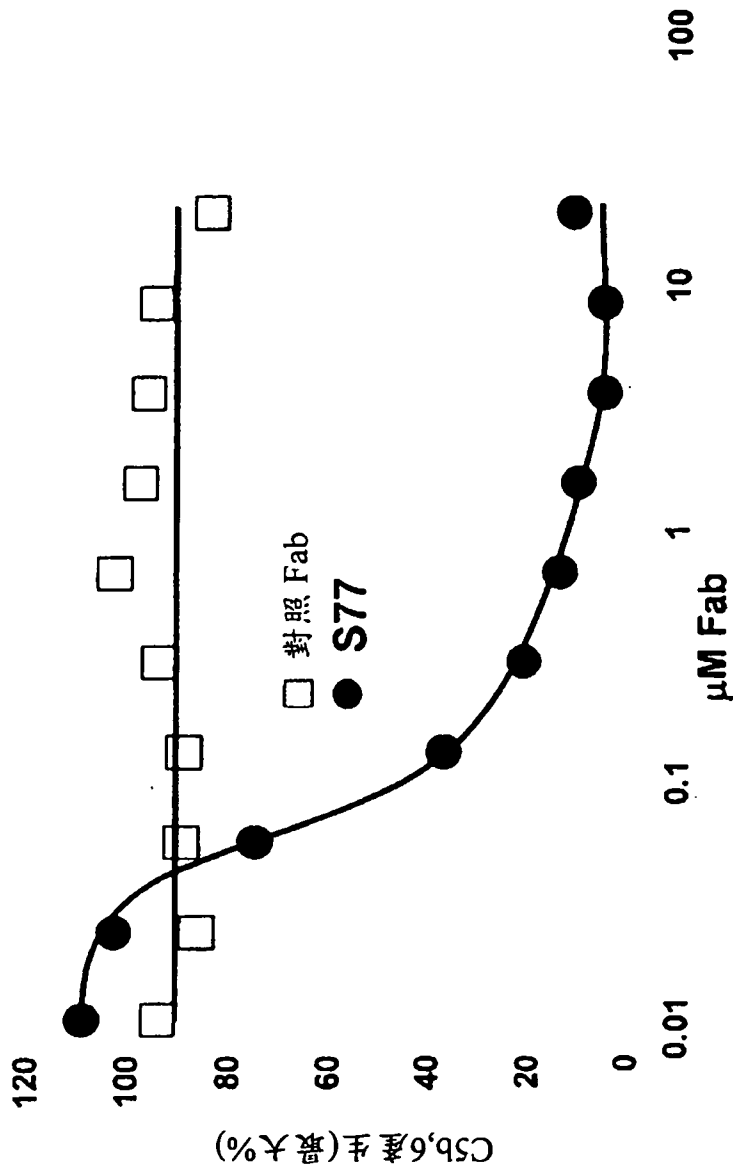


圖 11

104年7月30日修正替換頁

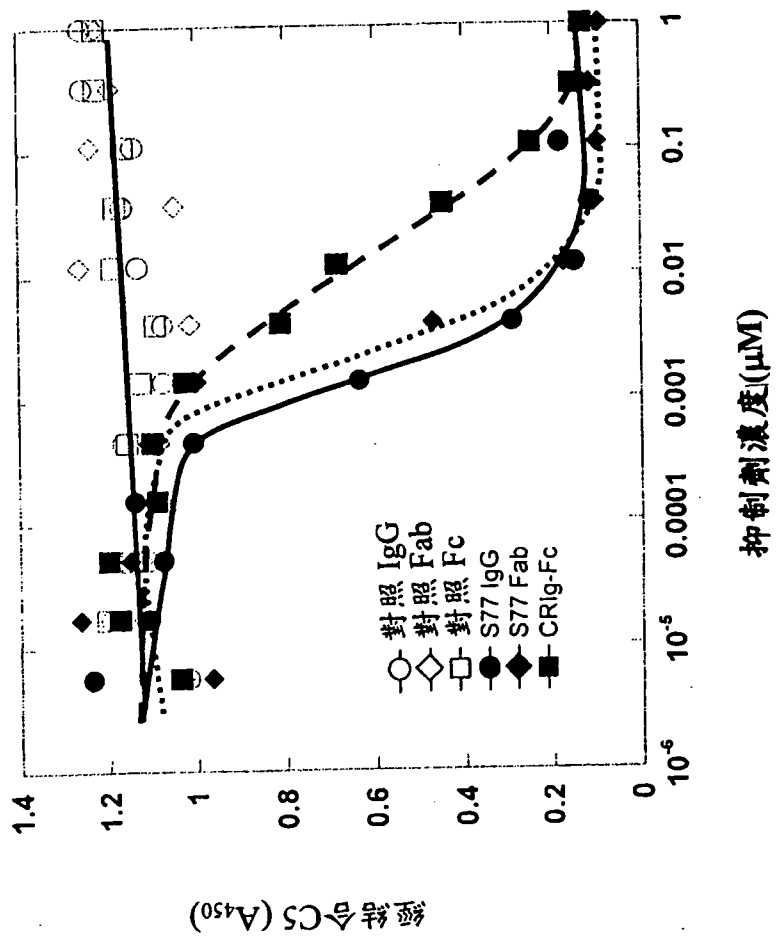


圖 12

104年7月30日修(更)正替換頁

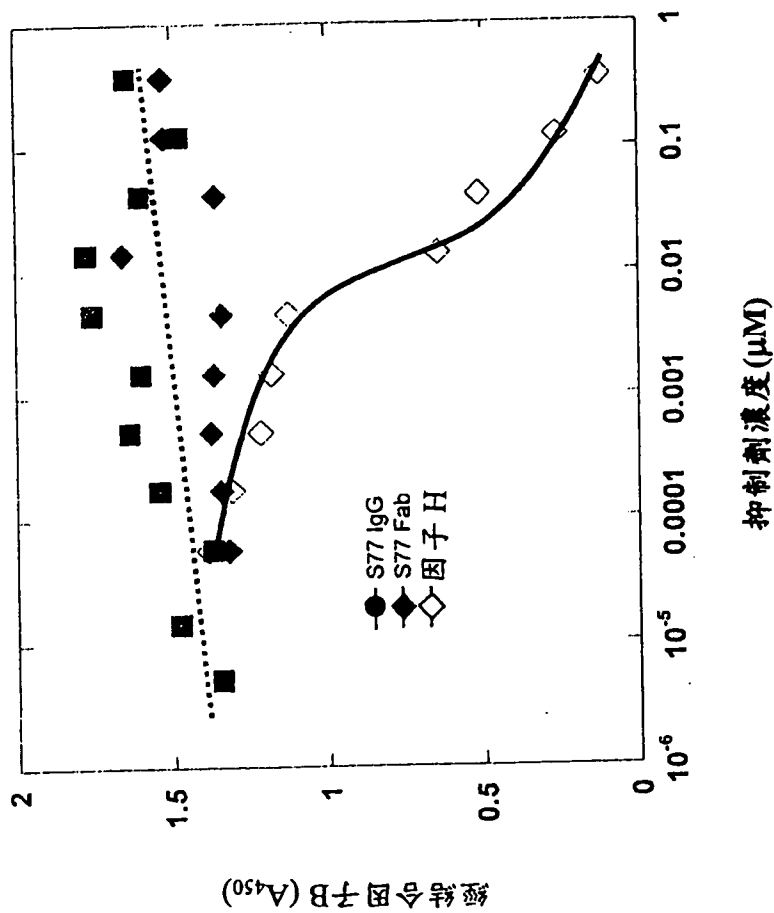


圖 13

104年7月30日修(正)替換頁

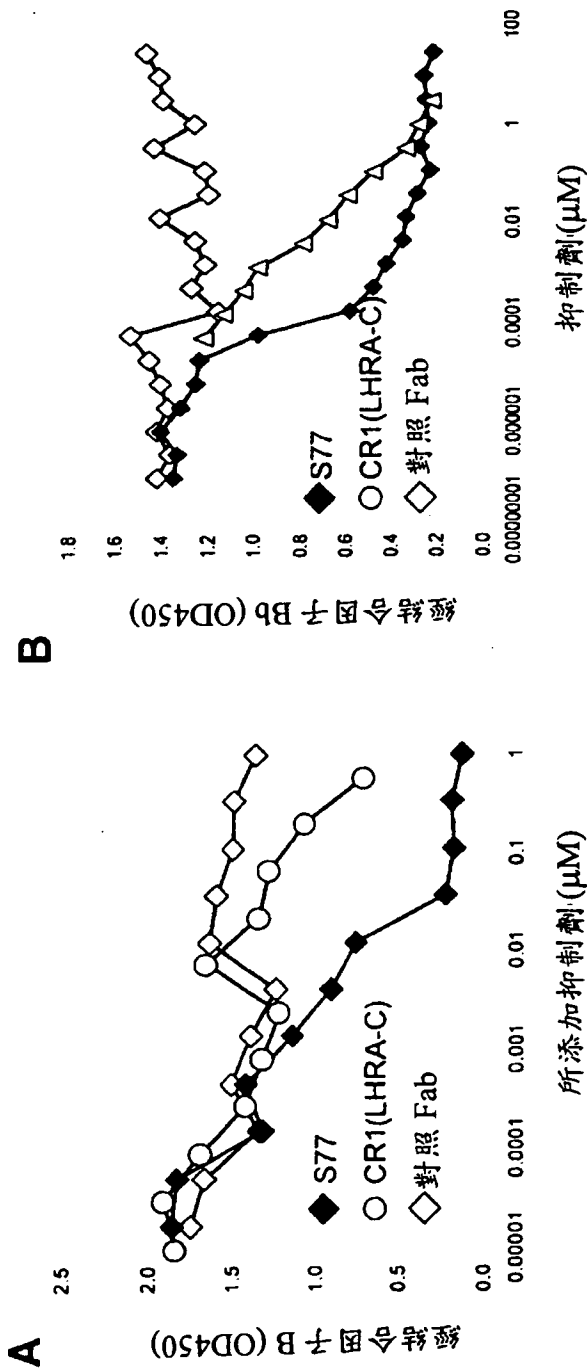


圖 14

104年7月30日修()正替換頁

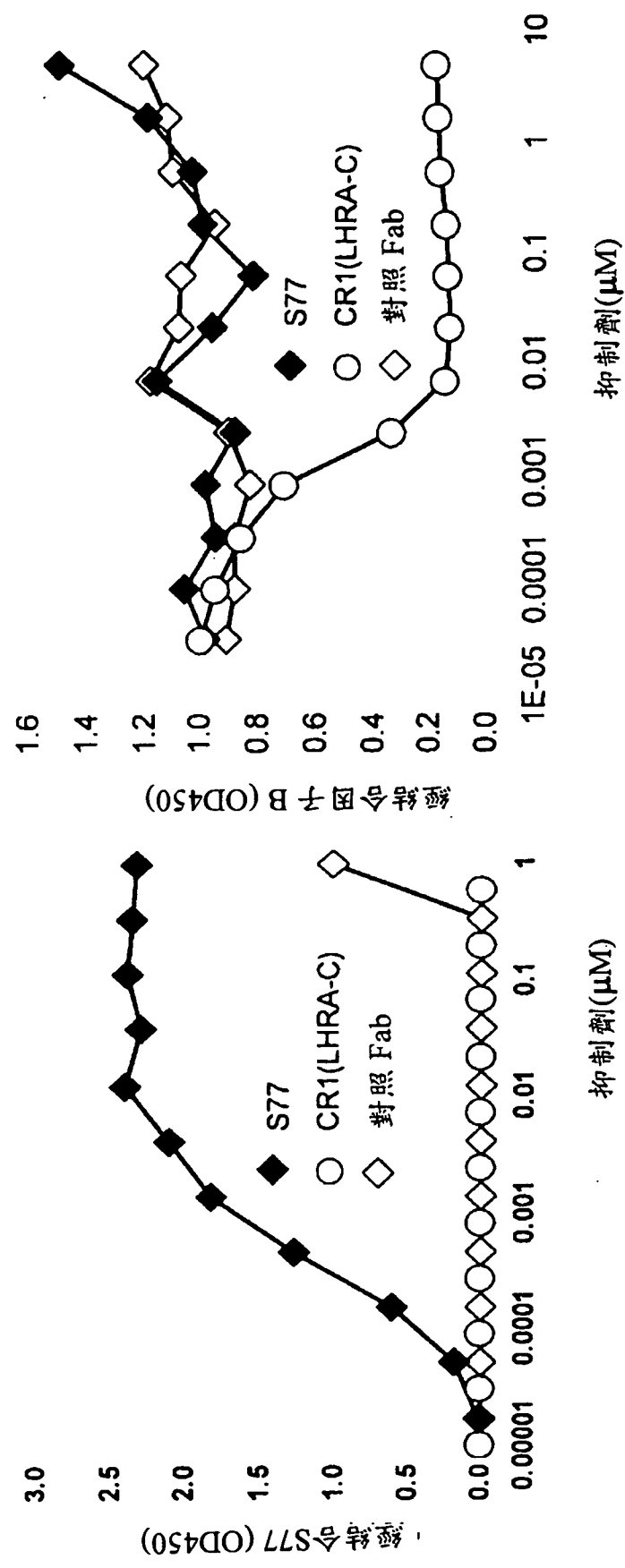


圖 15

104年7月30日修正替換頁

第 103111348 號專利申請案
中文圖式替換頁(104 年 7 月 30 日)

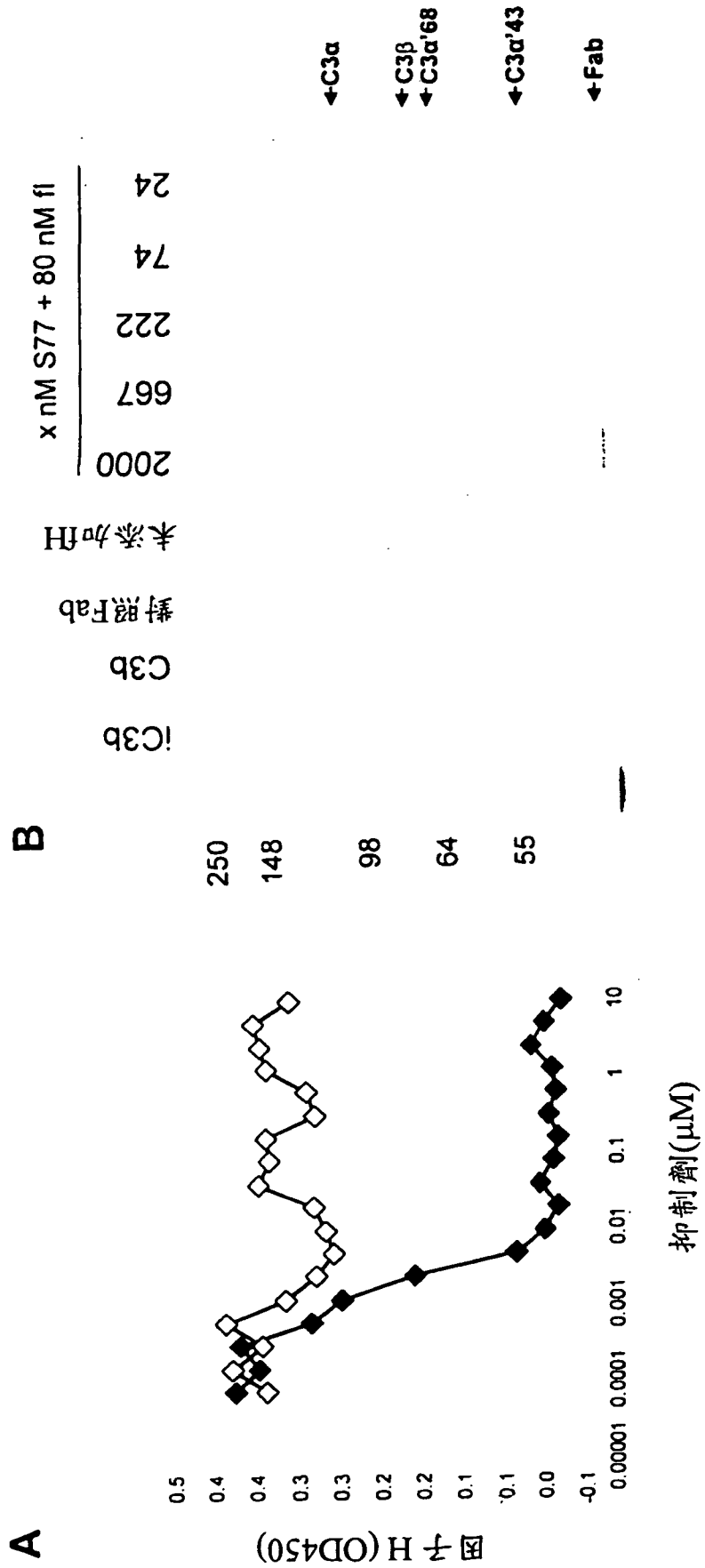


圖 16

5

104年7月30日修(正)替換頁

第 103111348 號專利申請案
中文圖式替換頁(104 年 7 月 30 日)

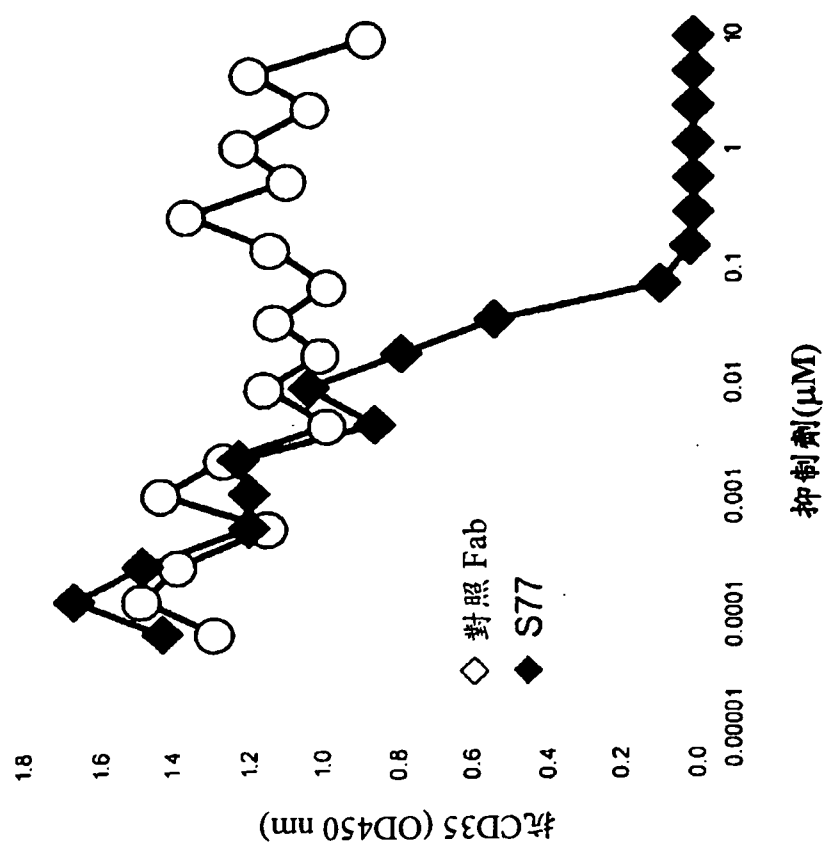


圖 17

10年7月3日修(成)止替換頁

輕鍵

1	DIQMTQSPSSL	15	ASVGD	30	RVTTICRASQ	45	DDVNTAVAWYQQKPGKAPK
46	LLIYSA	60	SFLYSGVPS	75	RRFS	90	SGTDFTLTIS
91	HYTTPPT	105	FGQGTKEIK	120	RTVAAPSVFI	135	FPSSDEQLKSGTASVVCL
136	LNNFY	150	PREAKVQWK	165	VDNALQSGNSQ	180	ESVTEQDSKDS
181	LSKADYE	195	KHXVYACEV	210	THQGLSSPVT	214	KSFNRGEC

圖 18A

重 鍵

1	E	15	V	30	Q	45
	Q		L		L	
	E		S		A	
	G		G		S	
	L		V		Q	
	P		I		K	
	D		T		I	
	H		W		V	
	R		Q		A	
	P		G		K	
	G		L			
46	E	60	W	75	V	90
	A		R		I	
	Y		P		T	
	N		G		Y	
	T		R		A	
	D		S		V	
	K		G		R	
	F		T		I	
	S		A		D	
	T		S		K	
	N		T		A	
	Y		L		Q	
	M		N		S	
	L		R		A	
	E		D			
91	T	105	A	120	V	135
	V		Y		C	
	S		R		W	
	G		G		D	
	G		F		Y	
	A		M		D	
	Y		W		G	
	Q		T		L	
	V		T		V	
	S		S		A	
	S		T		K	
	G		P		S	
	F		P		L	
	A		P		S	
136	K	150	S	165	T	180
	S		G		G	
	T		A		A	
	L		G		C	
	L		V		K	
	D		Y		F	
	P		P		V	
	T		S		W	
	N		S		G	
	A		L		T	
	S		G		V	
	H		T		F	
	P		A		V	
	L		Q		S	
181	G	195	L	210	Y	225
	S		S		S	
	S		S		L	
	G		T		Q	
	T		Y		I	
	C		N		V	
	H		K		P	
	S		N		T	
	K		V		D	
	K		K		V	
	E		P		K	
	S		C		D	
	X					
226	T	240	H	255	T	270
	C		P		P	
	P		C		P	
	P		A		P	
	E		L		G	
	G		P		S	
	V		F		L	
	F		P		K	
	P		K		P	
	K		D		T	
	L		M		I	
	S		R		T	
	P		E		V	
	T		C		V	
	V		D		V	
	S					
271	H	285	E	300	D	315
	P		P		E	
	V		K		F	
	N		W		Y	
	V		D		G	
	V		E		V	
	H		N		A	
	K		T		K	
	P		R		E	
	E		Q		Y	
	N		S		T	
	Y		R		V	
	V		S		V	
	L		T		V	
	L		H		Q	
	D					
316	W	330	L	345	N	360
	G		K		E	
	Y		K		C	
	V		S		N	
	K		A		L	
	P		A		P	
	I		E		K	
	T		I		S	
	K		A		K	
	Q		P		R	
	E		P		Q	
	V		Y		T	
	L		P		P	
	S		R		E	
	E					
361	M	375	T	390	K	405
	N		Q		V	
	S		L		T	
	C		L		V	
	K		G		F	
	Y		P		S	
	D		I		A	
	V		E		S	
	N		G		Q	
	P		E		N	
	N		Y		K	
	T		T		P	
	P		V		L	
	D		S		D	
	G					
406	S	420	F	435	F	449
	L		Y		S	
	K		L		T	
	V		D		K	
	S		R		W	
	Q		Q		G	
	N		V		F	
	S		C		S	
	V		M		H	
	E		A		L	
	H		N		Y	
	T		Q		K	
	S		L		S	
	L		S		P	
	G					

圖 18B

>自 C3b :

SER A 548 28.00 81.00 之 34.57%
ASP A 550 10.00 130.00 之 7.69%
ARG A 551 81.00 133.00 之 60.90%
VAL A 554 20.00 58.00 之 34.48%
ASP A 732 54.00 100.00 之 54.00%
MET A 804 1.00 17.00 之 5.88%
GLN A 805 11.00 36.00 之 30.56%
ASP A 806 48.00 77.00 之 62.34%
ARG A 833 66.00 91.00 之 72.53%
GLN A 834 3.00 104.00 之 2.88%
ASN A 835 121.00 140.00 之 86.43%
GLN A 836 56.00 57.00 之 98.25%
GLU A 837 80.00 114.00 之 70.18%
LEU A 838 4.00 5.00 之 80.00%
LYS A 839 25.00 88.00 之 28.41%
PRO A 867 8.00 36.00 之 22.22%
PRO A 868 26.00 43.00 之 60.47%
TYR A 895 1.00 23.00 之 4.35%
HIS A 896 101.00 115.00 之 87.83%
HIS A 897 67.00 73.00 之 91.78%
PHE A 898 166.00 205.00 之 80.98%
ILE A 899 49.00 70.00 之 70.00%鏈 A 差異面積(DIFF-AREA): 1026.0
(此鏈總面積 69629.0 之 1.47%)

圖 19

與 C3b 接觸之 S77 LC :

ASP B 28 41.00 93.00 之 44.09%
 SER B 30 15.00 40.00 之 37.50%
 LEU B 46 3.00 9.00 之 33.33%
 TYR B 49 36.00 65.00 之 55.38%
 TYR B 55 15.00 50.00 之 30.00%
 TYR B 92 38.00 94.00 之 40.43%

S77 HC 上與 C3b 接觸之殘基 :

VAL B1002 13.00 23.00 之 56.62%
 GLY B1026 8.00 60.00 之 13.33%
 PHE B1027 17.00 29.00 之 58.62%
 SER B1028 34.00 69.00 之 49.28%
 THR B1030 31.00 64.00 之 48.44%
 SER B1031 96.00 96.00 之 100.00%
 SER B1032 18.00 18.00 之 100.00%
 SER B1033 3.00 5.00 之 60.00%
 TYR B1052 65.00 75.00 之 86.67%
 TYR B1054 76.00 173.00 之 43.93%
 ASN B1055 22.00 106.00 之 20.75%
 PHE B1057 16.00 96.00 之 16.67%
 ARG B1098 41.00 41.00 之 100.00%
 ASN B1099 8.00 11.00 之 72.73%
 ALA B1100 30.00 30.00 之 100.00%
 LEU B1101 98.00 108.00 之 90.74%
 TYR B1102 37.00 49.00 之 75.51%
 GLY B1103 10.00 41.00 之 24.39%
 SER B1104 65.00 96.00 之 67.71%
 GLY B1105 27.00 93.00 之 29.03%
 GLY B1106 17.00 25.00 之 68.00%
 TYR B1107 2.00 34.00 之 5.88%
 ALA B1109 4.00 4.00 之 100.00%
 ASP B1111 12.00 26.00 之 46.15%
 TYR B1112 11.00 77.00 之 14.29%

圖 20

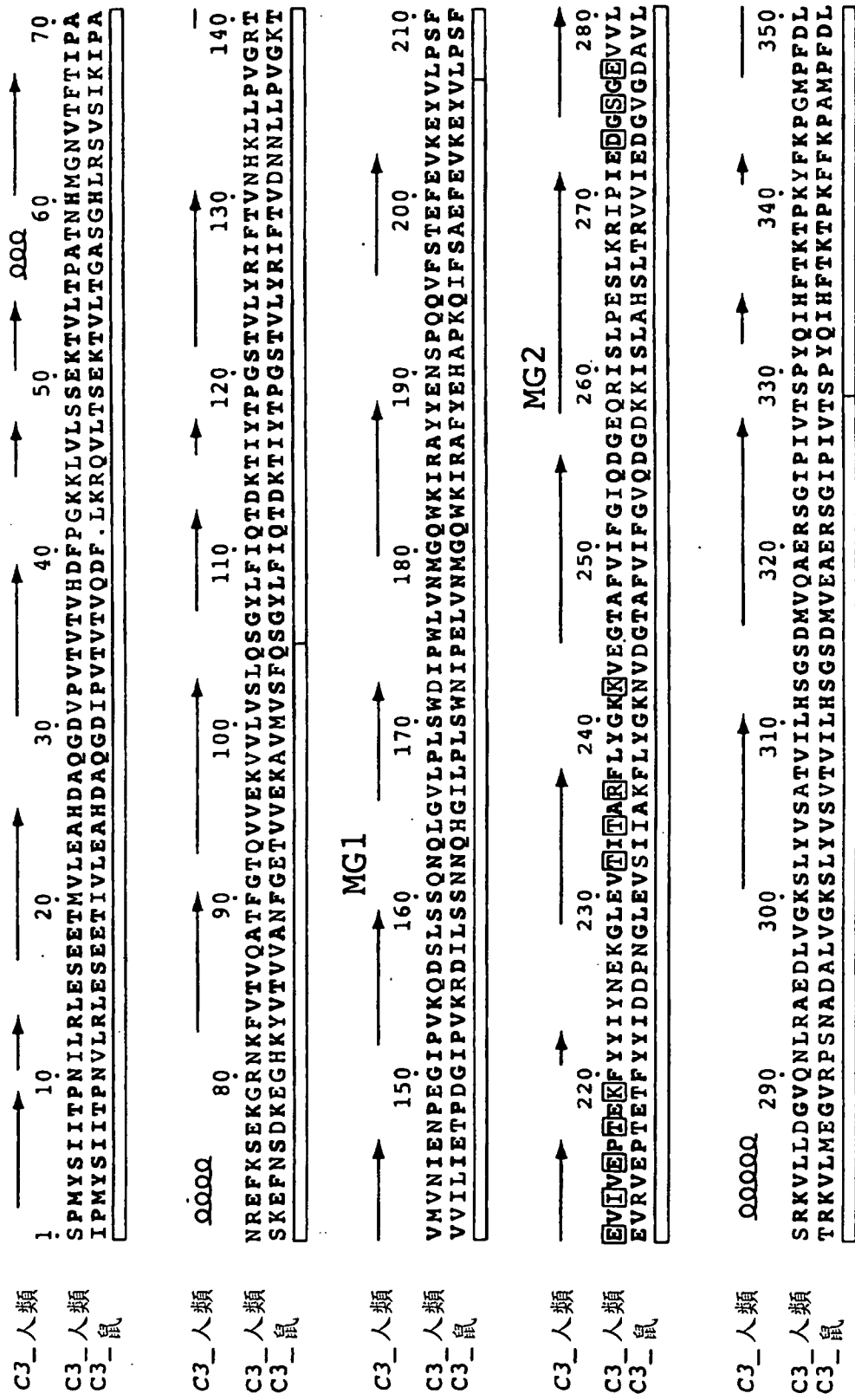


圖 21 (部分 1)

圖 21 (部分 2)

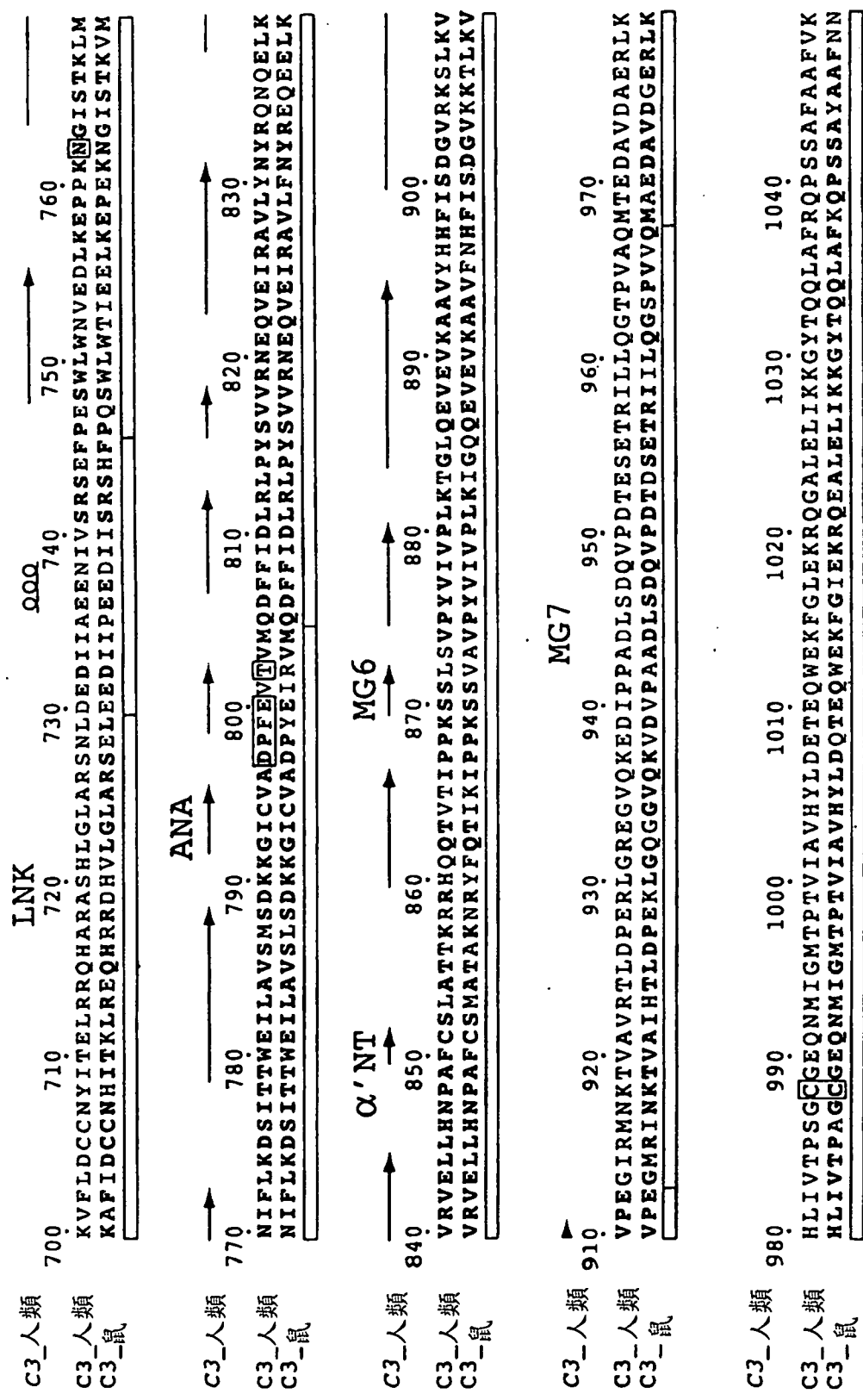


圖 21 (部分 3)

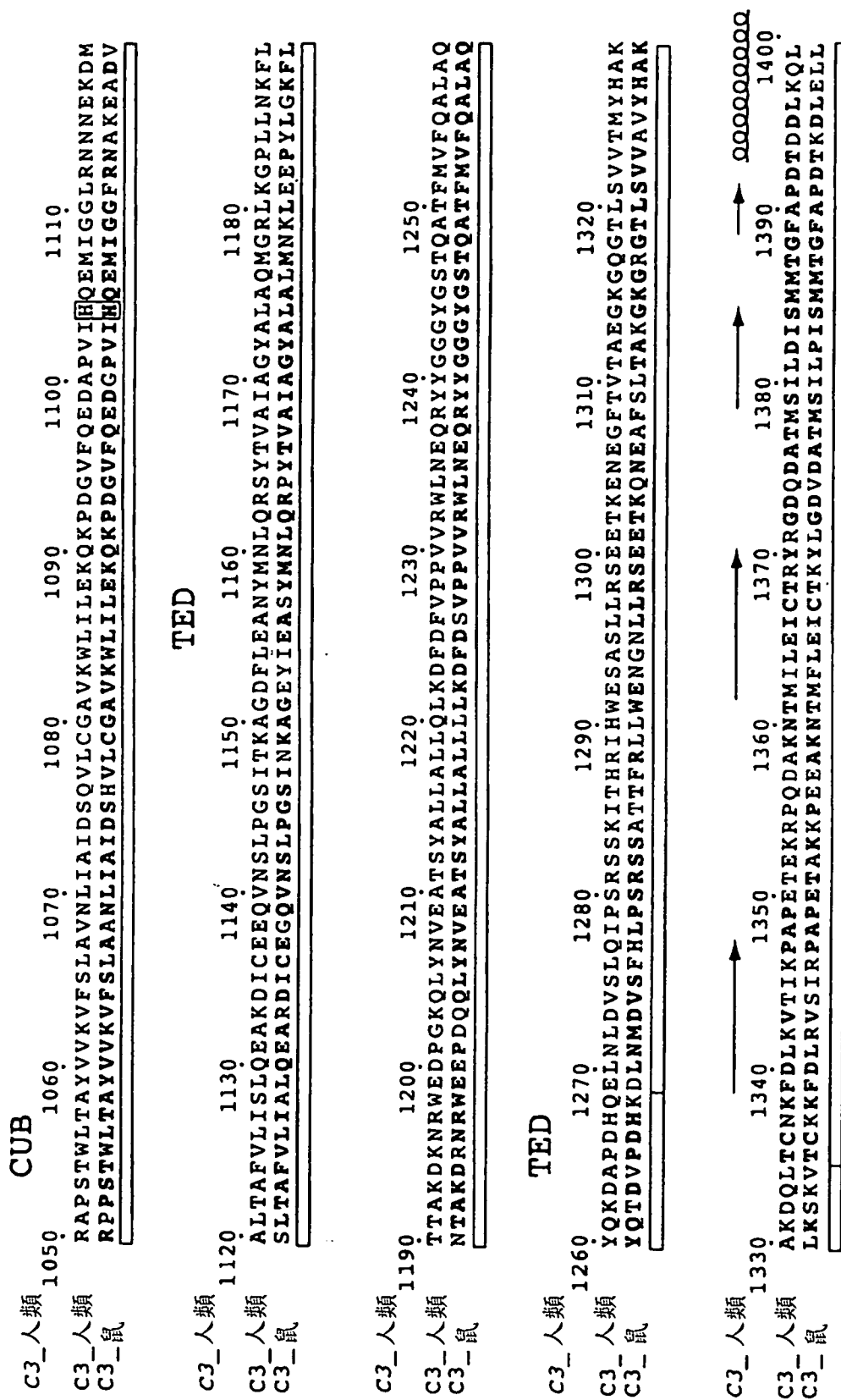


圖 21 (部分 4)

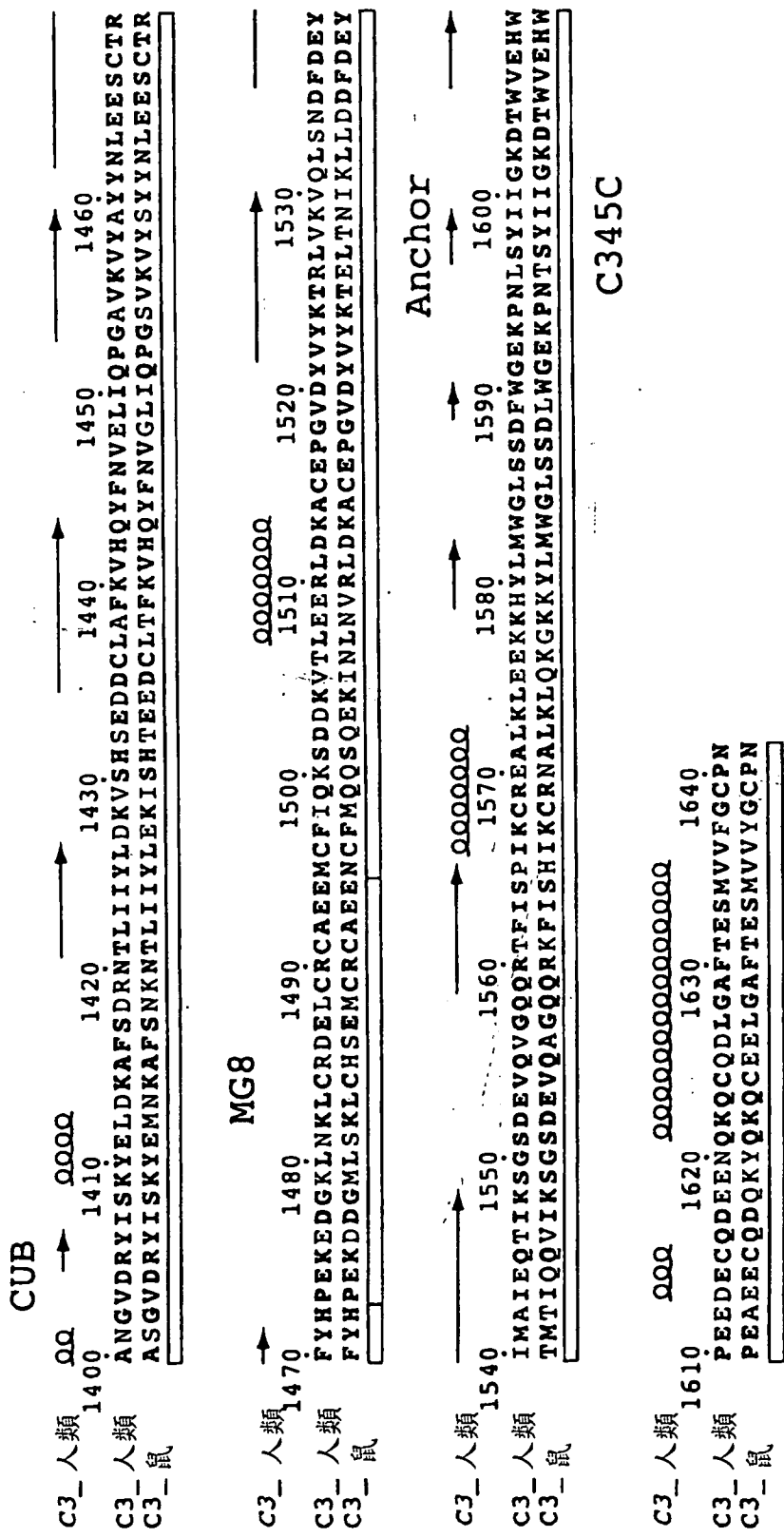


圖 21 (部分 5)