



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102597005 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080037352. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 22

C07K 16/46 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 31/00 (2006. 01)

61/219, 644 2009. 06. 23 US

C07K 16/18 (2006. 01)

61/228, 001 2009. 07. 23 US

A61K 39/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/039448 2010. 06. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02010/151526 EN 2010. 12. 29

(71) 申请人 阿雷克森制药公司

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 P. P. 坦布里尼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军 郭文洁

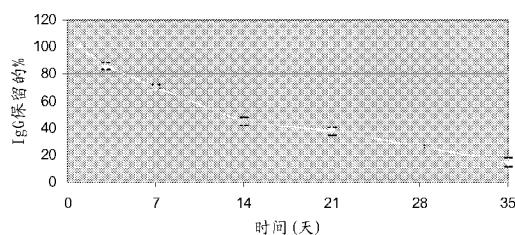
权利要求书 5 页 说明书 39 页
序列表 26 页 附图 3 页

(54) 发明名称

与补体蛋白质结合的双特异性抗体

(57) 摘要

本公开内容涉及可以结合 2 个或更多个不同表位的双特异性抗体。例如, 本文所述的双特异性抗体可以结合 2 种或更多种不同蛋白质, 其中蛋白质中的至少 2 种选自 C5a, C5b, 关于 C5a 的细胞受体(例如 C5aR1 或 C5L2), C5b-9 复合物, 和末端补体的组分或中间体例如 C5b-6、C5b-7 或 C5b-8。本文所述的双特异性抗体用于例如抑制末端补体(例如 C5b-9 复合物的装配和 / 或活性)和 / 或 C5a 过敏毒素介导的炎症(例如 C5a 介导的炎症免疫细胞的趋化性)。因此, 双特异性抗体可以在用于治疗多种补体途径相关障碍的方法中使用。



1. 一种双特异性抗体,其结合:(a) C5a 和 C5aR1 ;(b) C5a 和 C5b ;(c) C5b 和 C5aR1 ;(d) C5a 和 C5L2 ;(e) C5b 和 C5L2 ;(f) C5aR1 和 C5L2 ;(g) C5b-6 和 C5a ;(h) C5b-6 和 C5b ;(i) C5b-6 和 C5aR1 ;或(j) C5b-6 和 C5L2。

2. 一种包含至少 2 个不同抗原结合部位的双特异性抗体,其中至少一个抗原结合部位结合 C5a,并且至少一个抗原结合部位结合 C5b 或 C5aR。

3. 一种包含至少 2 个不同抗原结合部位的双特异性抗体,其中至少一个抗原结合部位结合 C5b,并且至少一个抗原结合部位结合 C5aR。

4. 一种包含至少 2 个不同抗原结合部位的双特异性抗体,其中

(i) 至少一个抗原结合部位结合 C5a 或 C5b ;和

(ii) 至少一个抗原结合部位结合关于 C5a 的细胞受体。

5. 一种包含至少 2 个不同抗原结合部位的双特异性抗体,其中

(i) 至少一个抗原结合部位结合 C5a、C5b 或关于 C5a 的细胞受体 ;和

(ii) 至少一个抗原结合部位结合 C5b-6。

6. 权利要求 4 或 5 的双特异性抗体,其中所述细胞受体是 C5aR1。

7. 权利要求 4 或 5 的双特异性抗体,其中所述细胞受体是 C5L2。

8. 一种对于下述中的至少 2 种具有结合特异性的双特异性抗体 :C5a、C5aR1、C5b、C5L2、C5b-6、C5b-7、C5b-8 和 C5b-9。

9. 权利要求 1-8 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体不结合全长 C5。

10. 权利要求 1 或 5-9 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体不结合非复合的 C5b 或非复合的 C6。

11. 一种双特异性抗体,其包含 :

(i) 结合 C5a 的第一个抗原结合部位 ;和

(ii) 结合关于 C5a 的细胞受体的第二个抗原结合部位。

12. 权利要求 11 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合脱精氨酸的 C5a。

13. 权利要求 11 或 12 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合哺乳动物 C5a。

14. 权利要求 13 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5a 是人 C5a。

15. 权利要求 11 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合具有这样的氨基酸序列的 C5a 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同。

16. 权利要求 11 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NOs:2-14 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5a 蛋白质的片段。

17. 权利要求 11 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:1-14 中任一个所示的至少 4 个连续氨基酸。

18. 权利要求 11-17 中任一项的双特异性抗体,其中所述细胞受体是 C5aR1。

19. 权利要求 18 的双特异性抗体,其中 C5aR1 是哺乳动物 C5aR1。

20. 权利要求 19 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5aR1 是人 C5aR1。

21. 权利要求 18 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含这样的氨基酸序列的 C5aR1 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同。

22. 权利要求 18 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NOs:18-22 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5aR1 蛋白质的片段。

23. 权利要求 18 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:17-22 中任一个所示的至少 4 个连续氨基酸。

24. 权利要求 11-17 中任一项的双特异性抗体,其中所述细胞受体是 C5L2。

25. 权利要求 24 中任一项的双特异性抗体,其中 C5L2 是哺乳动物 C5L2。

26. 权利要求 25 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5L2 是人 C5L2。

27. 权利要求 24 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含这样的氨基酸序列的 C5L2 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:23 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同。

28. 一种双特异性抗体,其包含:

(i) 结合 C5a 的第一个抗原结合部位;和

(ii) 结合 C5b 的第二个抗原结合部位。

29. 权利要求 28 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合脱精氨酸的 C5a。

30. 权利要求 28 或 29 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合哺乳动物 C5a。

31. 权利要求 30 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5a 是人 C5a。

32. 权利要求 28 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合包含这样的氨基酸序列的 C5a 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同。

33. 权利要求 28 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NOs:2-14 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5a 蛋白质的片段。

34. 权利要求 28 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:1-14 中任一个所示的至少 4 个连续氨基酸。

35. 权利要求 28-34 中任一项的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合哺乳动物 C5b。

36. 权利要求 35 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5b 是人 C5b。

37. 权利要求 28 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含这样的氨基酸序列的 C5b 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同。

38. 权利要求 28 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的至少 4 个连续氨基酸的表位。

39. 权利要求 28-38 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体不结合全长 C5。

40. 一种双特异性抗体,其包含:

(i) 结合 C5b 的第一个抗原结合部位;和

(ii) 结合关于 C5a 的细胞受体的第二个抗原结合部位。

41. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合哺乳动物 C5b。

42. 权利要求 41 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5b 是人 C5b。

43. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合与 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同的氨基酸序列。

44. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第一个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的至少 4 个连续氨基酸的表位。

45. 权利要求 40-44 中任一项的双特异性抗体,其中所述细胞受体是 C5aR1。

46. 权利要求 45 的双特异性抗体,其中所述 C5aR1 是哺乳动物 C5aR1。

47. 权利要求 46 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5aR1 是人 C5aR1。

48. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合与 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同的氨基酸序列。

49. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NOs:18-22 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5aR1 蛋白质的片段。

50. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:17-22 中任一个所示的至少 4 个连续氨基酸。

51. 权利要求 40-44 中任一项的双特异性抗体,其中所述细胞受体是 C5L2。

52. 权利要求 51 中任一项的双特异性抗体,其中 C5L2 是哺乳动物 C5L2。

53. 权利要求 52 的双特异性抗体,其中所述哺乳动物 C5L2 是人 C5L2。

54. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合与 SEQ ID NO:23 中所示的氨基酸序列至少 90% 等同的氨基酸序列。

55. 权利要求 40 的双特异性抗体,其中所述第二个抗原结合部位结合包含 SEQ ID NO:23 的至少 4 个连续氨基酸的表位。

56. 权利要求 1-55 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体抑制 C5a 和关于 C5a 的细胞受体之间的相互作用。

57. 权利要求 1-10 或 28-55 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体抑制 C5b-9 复合物的装配或活性。

58. 权利要求 1-57 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体抑制 C5a 依赖性趋化性。

59. 权利要求 1-10 或 28-57 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体抑制 C5b 和 C6 之间的相互作用。

60. 权利要求 1-10 或 28-59 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体抑制在体外的补体依赖性裂解。

61. 权利要求 1-39 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体以至少 10^8 M^{-1} 的 K_a 结合 C5a。

62. 权利要求 1-6、8、18-23 或 45-50 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体以至少 10^8 M^{-1} 的 K_a 结合 C5aR1。

63. 权利要求 1-10 或 28-56 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体以至少 10^8 M^{-1} 的 K_a 结合 C5b。

64. 权利要求 1-63 中任一项的双特异性抗体,其进一步含有第三个抗原结合部位,其结合全长 C5 或选自 C6、C7、C8 和 C9 的末端补体蛋白质中存在的抗原。

65. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

66. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体是单链抗体。

67. 权利要求 1-66 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

68. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体包含彼此结合的 2 种不同

单特异性抗体。

69. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体选自重组抗体、双抗体、胞内抗体、嵌合化或嵌合抗体、去免疫化人抗体、全人抗体和 F(ab')₂ 片段。

70. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体是单链双抗体、串联单链 Fv 片段、串联单链双抗体、或包含单链双抗体和至少部分免疫球蛋白重链恒定区的融合蛋白。

71. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体是双重可变结构域免疫球蛋白。

72. 权利要求 1-64 中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体含有异源部分。

73. 权利要求 72 的双特异性抗体,其中所述异源部分是糖。

74. 权利要求 73 的双特异性抗体,其中所述抗体是糖基化的。

75. 权利要求 74 的双特异性抗体,其中所述异源部分是可检测标记。

76. 权利要求 75 的双特异性抗体,其中所述可检测标记是荧光标记、发光标记、重金属标记、放射性标记或酶促标记。

77. 权利要求 76 的双特异性抗体,其中所述荧光标记选自荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、DyLight 488、藻红蛋白(PE)、碘化丙啶(PI)、PerCP、PE-Alexa Fluor® 700、Cy5、别藻蓝蛋白和 Cy7。

78. 权利要求 76 的双特异性抗体,其中所述酶促标记是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或萤光素酶。

79. 权利要求 76 的双特异性抗体,其中所述放射性标记选自 ³²P、³³P、¹⁴C、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S 和 ³H。

80. 一种组合物,其包含权利要求 1-79 中任一项的双特异性抗体和药学可接受的载体。

81. 权利要求 80 的组合物,其中所述组合物包含权利要求 11 的双特异性抗体。

82. 权利要求 80 的组合物,其中所述组合物包含权利要求 28 的双特异性抗体。

83. 权利要求 80 的组合物,其中所述组合物包含权利要求 40 的双特异性抗体。

84. 一种用于抑制受试者中的末端补体的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效抑制所述受试者中的末端补体的量的抗体,其中所述抗体是权利要求 1、3、4、5、8-10 或 28-79 中任一项的双特异性抗体。

85. 一种用于治疗受试者中的补体相关障碍的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效治疗所述受试者中的补体相关障碍的量的抗体,其中所述抗体是权利要求 1-79 中任一项的双特异性抗体。

86. 权利要求 85 的方法,其中所述补体相关障碍是旁路补体途径相关障碍。

87. 权利要求 86 的方法,其中所述旁路补体途径相关障碍选自类风湿性关节炎、哮喘、缺血再灌注损伤、非典型溶血性尿毒症综合征、血栓形成性血小板减少性紫癜、阵发性睡眠性血红蛋白尿、致密沉积物病、年龄相关性黄斑变性、自发性胎儿丢失、微量免疫血管炎、大疱性表皮松解症、复发性胎儿丢失、多发性硬化和外伤性脑损伤。

88. 权利要求 85 的方法,其中所述补体相关障碍是经典补体途径相关障碍。

89. 权利要求 88 的方法,其中所述经典补体途径相关障碍选自重症肌无力、冷凝集素

疾病、皮炎、Graves 氏病、Hashimoto 氏甲状腺炎、I 型糖尿病、银屑病、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、Goodpasture 综合征、抗磷脂综合征和灾难性抗磷脂综合征。

90. 权利要求 85-89 中任一项的方法,其进一步包括将所述受试者鉴定为具有补体相关障碍、怀疑具有补体相关障碍、或处于发展补体相关障碍的危险中。

91. 权利要求 85-90 中任一项的方法,其进一步包括在所述施用后就所述补体相关障碍的一种或多种症状中的改善监控所述受试者。

92. 权利要求 84-91 中任一项的方法,其中所述抗体静脉内施用于所述受试者。

93. 权利要求 84-91 中任一项的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

94. 权利要求 93 的方法,其中所述哺乳动物是人。

与补体蛋白质结合的双特异性抗体

[0001] 与相关申请的交叉引用

本申请要求下述美国临时专利申请系列号的利益：2009 年 6 月 23 日提交的 61/219,644 和 2009 年 7 月 23 日提交的 61/228,001，它们各自的内容整体引入本文作为参考。

[0002] 序列表

本申请含有已经由 EFS-Web 提交且在此整体引入作为参考的序列表。2010 年 6 月 22 日创建的所述 ASCII 拷贝命名为 ALXN149W01.txt，并且大小为 25,951 字节。

技术领域

[0003] 本发明的领域是医学、免疫学、分子生物学和蛋白化学。

背景技术

[0004] 补体系统与身体的其它免疫系统联合地起作用，以防御细胞和病毒病原体的侵入。至少有 25 种补体蛋白被发现是血浆蛋白和膜辅因子的复合物集合。血浆蛋白占脊椎动物血清中的球蛋白的约 10%。通过在一系列复杂但精确的酶促切割和膜结合事件中相互作用，补体成分实现它们的免疫防御功能。所产生的补体级联系统导致产生具有调理、免疫调节和裂解功能的产物。例如，在 The Merck Manual 第 16 版中提供了与补体活化相关的生物学活性的简要概述。

[0005] 补体级联系统可以通过经典途径 (CP)、凝集素途径或旁路途径 (AP) 进行。凝集素途径一般通过甘露糖 - 结合凝集素 (MBL) 与高甘露糖底物的结合来启动。AP 可以是独立于抗体的，且可以被病原体表面上的某些分子启动。CP 一般被靶细胞上的抗原位点的抗体识别和与其结合来启动。这些途径会聚于 C3 转化酶——在该点，补体成分 C3 被有活性的蛋白酶切割，以生成 C3a 和 C3b。

[0006] 通过在血液的血浆级分中富含的补体成分 C3 的自发水解，启动 AP C3 转化酶。该过程 (也称作“空转 (tickover)”) 通过 C3 中的硫酯键的自发切割而发生，以形成 C3i 或 C3 (H₂O)。表面的存在促进空转，所述表面支持活化的 C3 的结合，和 / 或具有中性或正电荷特征 (例如，细菌细胞表面)。C3 (H₂O) 的这种形成允许血浆蛋白因子 B 的结合，这又允许因子 D 把因子 B 切割成 Ba 和 Bb。Bb 片段保持结合 C3，以形成含有 C3 (H₂O) Bb 的复合物——“流体相”或“启动” C3 转化酶。尽管仅以少量产生，流体相 C3 转化酶可以将多种 C3 蛋白切割成 C3a 和 C3b，并导致 C3b 的产生和它随后与表面的共价结合 (例如，细菌表面)。结合到表面 - 结合的 C3b 上的因子 B 被因子 D 切割，从而形成表面 - 结合的含有 C3b、Bb 的 AP C3 转化酶复合物 (参见，例如，Müller-Eberhard (1988) *Ann Rev Biochem* 57:321-347.)。

[0007] 在将第二种 C3b 单体添加到 AP C3 转化酶时，形成 AP C5 转化酶 - (C3b)₂ Bb (参见，例如，Medicus 等人 (1976) *J Exp Med* 144:1076-1093 和 Fearon 等人 (1975) *J Exp Med* 142:856-863.)。第二种 C3b 分子的作用是结合 C5，并呈递它用于被 Bb 切割 (参见，例如，Isenman 等人 (1980) *J Immunol* 124:326-331.)。通过添加三聚蛋白备解素来稳定 AP C3 和

C5 转化酶,所述备解素描述在,例如,Medicus 等人(1976),同上。但是,形成功能性旁路途径 C3 或 C5 转化酶不需要备解素结合(参见,例如,Schreiber 等人(1978)*Proc Natl Acad Sci USA* 75:3948-3952 和 Sissons 等人(1980)*Proc Natl Acad Sci USA* 77:559-562.)。

[0008] 在补体成分 C1 (它是 C1q、C1r 和 C1s 的复合物)与抗体相互作用时,形成 CP C3 转化酶,所述抗体结合在靶抗原(例如,微生物抗原)上。C1 的 C1q 部分与抗体-抗原复合物的结合造成 C1 的构象变化,其活化 C1r。有活性的 C1r 然后切割 C1-相关的 C1s,由此产生有活性的丝氨酸蛋白酶。有活性的 C1s 把补体成分 C4 切割成 C4b 和 C4a。象 C3b 一样,新产生的 C4b 片段含有高度反应性的硫醇,其容易地与靶表面(例如,微生物细胞表面)上的合适分子形成酰胺或酯键。C1s 也把补体成分 C2 切割成 C2b 和 C2a。由 C4b 和 C2a 形成的复合物是 CP C3 转化酶,其能把 C3 加工成 C3a 和 C3b。在将 C3b 单体添加到 CP C3 转化酶时,形成 CP C5 转化酶 - C4b, C2a, C3b (参见,例如,Müller-Eberhard (1988),同上和 Cooper 等人(1970)*J Exp Med* 132:775-793.)。

[0009] 除了它在 C3 和 C5 转化酶中的作用以外,C3b 还起调理素的作用,这通过它与在抗原呈递细胞(诸如巨噬细胞和树突细胞)的表面上存在的补体受体的相互作用来实现。通常认为 C3b 的调理功能是补体系统的最重要的抗感染功能之一。具有阻断 C3b 功能的遗传损害的患者倾向于被多种病原性生物感染,而具有在补体级联系统序列后期的损害的患者(即,具有阻断 C5 功能的损害的患者)被发现仅更倾向于奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)感染,然后仅稍微更有倾向性。

[0010] AP 和 CP C5 转化酶将 C5 切割成 C5a 和 C5b。C5 的切割释放 C5a,即一种有效的过敏毒素和趋化因子,和 C5b,其允许裂解末端补体复合物 C5b-9 的形成。C5b 与 C6、C7 和 C8 组合,以在靶细胞表面处形成 C5b-8 复合物。在与几个 C9 分子结合时,形成膜攻击复合物(MAC、C5b-9、末端补体复合物 - TCC)。当足够数目的 MACs 插入靶细胞膜中时,它们产生的开口(MAC 孔)介导靶细胞的快速渗透裂解。

[0011] 尽管正确地起作用的补体系统提供对抗感染微生物的稳健防御,补体途径的不正确调节或活化已经牵涉于多种障碍的发病机理,所述障碍包括,例如,类风湿性关节炎(RA);狼疮肾炎;哮喘;缺血再灌注损伤;非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS);致密沉积物病(DDD);阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH);黄斑变性(例如,年龄相关性黄斑变性(AMD));溶血、肝酶升高和低血小板(HELLP)综合征;血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP);自发性胎儿丢失;微量免疫血管炎;大疱性表皮松解症;复发性胎儿丢失;多发性硬化(MS);外伤性脑损伤;和由心肌梗死、心肺转流术和血液透析导致的损伤(参见,例如,Holers 等人(2008)*Immunological Reviews* 223:300-316)。补体活化的下调已证实在治疗多种动物模型中的几种疾病适应症中是有效的。参见,例如,Rother 等人(2007)*Nature Biotechnology* 25 (11):1256-1264;Wang 等人(1996)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8563-8568;Wang 等人(1995)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8955-8959;Rinder 等人(1995)*J. Clin. Invest.* 96:1564-1572;Kroshus 等人(1995)*Transplantation* 60:1194-1202;Homeister 等人(1993)*J. Immunol.* 150:1055-1064;Weisman 等人(1990)*Science* 249:146-151;Amsterdam 等人(1995)*Am. J. Physiol.* 268:H448-H457;和 Rabinovici 等人(1992)*J Immunol* 149:1744-1750。

[0012] 发明概述

本公开内容涉及结合人补体成分蛋白质的双特异性抗体。本文所述的双特异性抗体可以结合 2 个或更多个(例如 2、3、4、5 或 6 个或更多个)不同表位。例如,本文所述的双特异性抗体可以结合 2 种或更多种(例如 2、3、4、5 或 6 种或更多种)不同蛋白质,其中蛋白质中的至少 2 种选自 C5a, C5b, 关于 C5a 的细胞受体(例如 C5aR1 或 C5L2), 和末端补体复合物的组分或中间体例如 C5b-6、C5b-7、C5b-8 或 C5b-9。例如,在一些实施方案中,双特异性抗体可以结合选自 C5a、C5aR、C5b、C5L2、C5b-6、C5b-7、C5b-8 和 C5b-9 的 2 种不同蛋白质。双特异性抗体用于抑制末端补体(例如 C5b-9 TCC 的装配和 / 或活性)和 / 或 C5a 过敏毒素介导的炎症。因此,双特异性抗体可以在用于治疗多种补体途径相关障碍的方法中使用,例如但不限于非典型溶血性尿毒性综合征(aHUS);血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP);致密沉积物病(DDD);类风湿性关节炎(RA);溶血、肝酶升高和低血小板(HELLP);年龄相关性黄斑变性(AMD);重症肌无力(MG)、冷凝集素疾病(CAD)、皮炎、Graves 氏病、Hashimoto 氏甲状腺炎、I 型糖尿病、银屑病、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、原发性血小板减少性紫癜(ITP)、或本文描述和 / 或本领域已知的任何其它补体相关障碍。

[0013] 本文所述的双特异性抗体特征在于许多优点,例如超过结合全长或成熟 C5 且抑制全长或成熟 C5 的切割的抗体的优点。如同此种抗 C5 抗体,本文所述的双特异性抗体能够抑制 C5 活化的一个或两个臂的下游效应。即,在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以抑制 C5a 介导的炎症应答和起因于 C5 切割的 C5b (MAC) 依赖性细胞裂解。然而,因为人血浆中 C5 的浓度是约 0.37 μ M (Rawal 和 Pangburn (2001) *J Immunol* 166 (4):2635-2642),所以经常必须使用抗 C5 抗体的高浓度和 / 或频繁施用,以有效抑制人中的 C5。与 C5 不同,片段 C5a 和 C5b 以低得多的浓度存在于血液中,且经常局限于局部补体活化的特定区域,例如哮喘患者中的肺、RA 患者的关节、或具有 AMD 的患者的眼中的玻璃疣。

[0014] 此外,工作实例实验数据中所示的公开内容证明虽然抗 C5 抗体在体外和体内抑制补体方面高度有效(参见,例如,Hillmen 等人(2004) *N Engl J Med* 350 (6):552),但该抗体对靶介导的清除特别易感,这是由于血液中 C5 的高浓度。这个发现指出与抗 C5 抗体相比较,双特异性抗体(例如结合 C5a 和 MAC 的组分例如 C5b 的双特异性抗体)非常可能在血液中具有更长的半衰期,这是由于抗原介导的抗体清除的贡献减少。如上所述,片段 C5a 和 C5b 各自以比 C5 低得多的浓度存在,并且经常在补体活化的特定区域产生。因此,考虑到其更长的半衰期,本文所述的双特异性抗体可以以比抗 C5 抗体低得多的剂量和 / 或更不频繁地施用于人,并且有效提供在人中 C5 的相同或更大抑制。与抗 C5 抗体的剂量相比较,施用更低剂量的双特异性抗体的能力也允许另外的递送途径,例如皮下施用、肌肉施用、肺内递送和经由使用生物可降解的小球体的施用。

[0015] 本文所述的双特异性抗体还提供了超过使用 2 种不同抗体组合的许多优点。例如,与需要产生分开的抗 C5a 抗体和抗 C5b 抗体的 2 个不同过程相比较,结合 C5a 和 C5b 的双特异性抗体是一个分子,仅需要一个过程开发。此外,2 种不同抗体(例如抗 C5a 抗体和抗 C5b 抗体)的混合物(cocktail)的施用还将可能需要明显更复杂的临床评价。例如,将需要评价用于每种分开抗体的安全研究和药物代谢动力学(PK)和药物动力学(PD)参数,以不仅确保 2 种抗体之间的等价,还确保 2 种抗体的预期靶(例如 C5a 和 C5b)的中和随着时间过去得到维持。另外,仅靶向活性 C5 片段(C5a 和 C5b)或其受体意指双特异性抗体的清除不太可能受天然、高度丰富的血浆 C5 蛋白质的正常清除或周转显著影响。

[0016] 在一个方面,本公开内容的特征在于结合下述中的至少 2 种的双特异性抗体:C5a,C5b,关于 C5a 的细胞受体(例如 C5aR1 或 C5L2),TCC 的组分或中间体;或 TCC (C5b-9) 自身。TCC 的组分可以是例如 C5b、C6、C7、C8、C9 或其生物学活性片段。TCC 的中间体可以是例如 C5b-6、C5b-7 或 C5b-8。在一些实施方案中,抗体结合 C5b-9。

[0017] 在另一个方面,本公开内容的特征在于结合下述的双特异性抗体:(a) C5a 和 C5aR1;(b) C5a 和 C5b;(c) C5b 和 C5aR1;(d) C5a 和 C5L2;(e) C5b 和 C5L2;(f) C5aR1 和 C5L2;(g) C5b-6 和 C5a;(h) C5b-6 和 C5b;(i) C5b-6 和 C5aR1;或(j) C5b-6 和 C5L2。

[0018] 在另一个方面,本公开内容的特征在于含有至少 2 个不同抗原结合部位(或由 2 个不同抗原结合部位组成)的双特异性抗体,其中至少一个抗原结合部位结合 C5a,并且至少一个抗原结合部位结合 C5b 或 C5aR。本公开内容的特征还在于含有至少 2 个不同抗原结合部位(或由 2 个不同抗原结合部位组成)的抗体,其中至少一个抗原结合部位结合 C5b,并且至少一个抗原结合部位结合 C5aR。本公开内容的进一步特征在于含有至少 2 个不同抗原结合部位的抗体,其中(i)至少一个抗原结合部位结合 C5a 或 C5b;和(ii)至少一个抗原结合部位结合关于 C5a 的细胞受体例如 C5aR1 或 C5L2。本公开内容的特征还在于含有至少 2 个不同抗原结合部位(或由 2 个不同抗原结合部位组成)的抗体,其中(i)至少一个抗原结合部位结合 C5a、C5b 或关于 C5a 的细胞受体;和(ii)至少一个抗原结合部位结合 C5b-6。在一些实施方案中,这些抗体中的任何一种可以含有 2 个或超过 2 个(例如 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个)抗原结合部位。

[0019] 在另一个方面,本公开内容的特征在于对于下述中的至少 2 种具有结合特异性的双特异性抗体:C5a、C5aR1、C5b、C5L2、C6、C7、C8、C9、C5b-6、C5b-7、C5b-8 和 C5b-9。在一些实施方案中,抗体对于 C5a、C5b、C5aR1 和 C5b-6 中的至少 2 种具有结合特异性。

[0020] 在本文所述的任何抗体的一些实施方案中,抗体不结合全长或成熟 C5。在一些实施方案中,抗体不结合非复合的 C5b、C6、C7、C8 或 C9。

[0021] 在另外一个方面,本公开内容的特征在于含有下述或由下述组成的双特异性抗体:(i)结合 C5a 的第一个抗原结合部位;和(ii)结合关于 C5a 的细胞受体的第二个抗原结合部位。第一个抗原结合部位可以结合脱精氨酸的(desarginated)C5a。第一个抗原结合部位可以结合哺乳动物 C5a(例如人 C5a)。第一个抗原结合部位可以结合含有氨基酸序列或由氨基酸序列组成的人 C5a 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO. 1 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100)%等同。第一个抗原结合部位可以结合含有 SEQ ID NOs:2-14 中任一个所示的氨基酸序列或由 SEQ ID NOs:2-14 中任一个所示的氨基酸序列组成的人 C5a 蛋白质的片段。第一个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:1-14 中任一个所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。在一些实施方案中,关于 C5a 的细胞受体是 C5aR1。C5aR1 可以是哺乳动物(例如人)形式的 C5aR1。第二个抗原结合部位可以结合包含氨基酸序列的人 C5aR1 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100)%等同。第二个抗原结合部位可以结合包含 SEQ ID NOs:18-22 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5aR1 蛋白质的片段。第二

个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:17-22 中任一所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。在一些实施方案中,关于 C5a 的细胞受体是 C5L2。C5L2 可以是哺乳动物(例如人)形式的 C5L2。第二个抗原结合部位可以结合包含氨基酸序列的人 C5L2 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:23 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100)% 等同。在一些实施方案中,第二个抗原结合部位可以在表位处结合人 C5L2 的片段,所述表位含有 SEQ ID NO:23 的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。第二个抗原结合部位可以结合包含 SEQ ID NOs:24-27 中任一所示的氨基酸序列的人 C5L2 蛋白质的片段。第二个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:24-27 中任一所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。在一些实施方案中,抗体不结合全长或成熟 C5。

[0022] 在另一个方面,本公开内容的特征在于含有下述或由下述组成的双特异性抗体:(i) 结合 C5a 的第一个抗原结合部位;和(ii) 结合 C5b 的第二个抗原结合部位。第一个抗原结合部位可以结合脱精氨酸的 C5a。第一个抗原结合部位可以结合哺乳动物 C5a(例如人 C5a)。第一个抗原结合部位可以结合含有氨基酸序列或由氨基酸序列组成的人 C5a 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO. 1 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100)% 等同。第一个抗原结合部位可以结合含有 SEQ ID NOs:2-14 中任一所示的氨基酸序列或由 SEQ ID NOs:2-14 中任一所示的氨基酸序列组成的人 C5a 蛋白质的片段。第一个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:1-14 中任一所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。在一些实施方案中,第二个抗原结合部位结合哺乳动物(例如人)形式的 C5b。人 C5b 可以含有氨基酸序列或由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100)% 等同。第二个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸,或由 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸组成。在一些实施方案中,抗体不结合全长或成熟 C5。

[0023] 在另外一个方面,本公开内容的特征在于含有下述或由下述组成的双特异性抗体:(i) 结合 C5b 的第一个抗原结合部位;和(ii) 结合关于 C5a 的细胞受体的第二个抗原结合部位。在一些实施方案中,第二个抗原结合部位结合哺乳动物(例如人)形式的 C5b。人 C5b 可以含有氨基酸序列或由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:15 或 16 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100)% 等同。第一个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NO:15 或 16 中任一所示的至少 4 个(例如至少 5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸,或由 SEQ ID NO:15 或 16 中任一个所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸组成。在一些实施方案中,抗体不结合全长或成熟 C5。在一些实施方案中,关于 C5a 的细胞受体是 C5aR1。C5aR1 可以是哺乳动物(例如人)形式的 C5aR1。第二个抗原结合部位可以结合包含氨基酸序列的人 C5aR1 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:17 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100) % 等同。第二个抗原结合部位可以结合包含 SEQ ID NOs:18-22 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5aR1 蛋白质的片段。第二个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:17-22 中任一个所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。在一些实施方案中,关于 C5a 的细胞受体是 C5L2。C5L2 可以是哺乳动物(例如人)形式的 C5L2。第二个抗原结合部位可以结合包含氨基酸序列的人 C5L2 蛋白质,所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:23 中所示的氨基酸序列至少 70(例如至少 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或甚至 100) % 等同。在一些实施方案中,第二个抗原结合部位可以在表位处结合人 C5L2 的片段,所述表位含有 SEQ ID NO:23 的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。第二个抗原结合部位可以结合包含 SEQ ID NOs:24-27 中任一个所示的氨基酸序列的人 C5L2 蛋白质的片段。第二个抗原结合部位可以结合表位,所述表位包含 SEQ ID NOs:24-27 中任一个所示的至少 4 个(例如至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个或更多个)连续氨基酸。

[0024] 在另一个方面,本公开内容提供了含有下述或由下述组成的双特异性抗体:(i)结合 C5a、C5b 或关于 C5a 的细胞受体的第一个抗原结合部位;和(ii)结合 TCC 的组分、TCC 的中间体或 C5b-9 的第二个抗原结合部位。第一个或第二个抗原结合部位可以结合的 TCC 组分、TCC 中间体和合适表位在本文中描述。在一些实施方案中,当第一个抗原结合部位结合 C5b 时,第二个抗原结合部位结合的 TCC 的组分不是 C5b。在一些实施方案中,第一个抗原结合部位结合 C5b 的第一个表位,并且第二个抗原结合部位结合 C5b 的第二个表位,其中所述第一个和第二个表位不是等同的。例如, C5b 的第一个和第二个表位可以是非重叠的或可以由 2 个不同氨基酸序列组成。

[0025] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以含有各自结合相同靶(例如 C5a、C5b、C5aR1、C5L2、C5b-6、C5b-7、C5b-8、C5b-9、C6、C7、C8 或 C9)的第一个和第二个抗原结合部位,其中每个抗原结合部位结合靶的不同表位。例如,在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以含有结合 C5a 的第一个抗原结合部位,和在这样的表位处结合 C5a 的第二个抗原结合部位,所述表位与第一个抗原结合部位结合的表位不等同或重叠。

[0026] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体结合关于 C5a 的细胞受体的细胞外部分。例如,本文所述的双特异性抗体可以结合 C5aR1 和 / 或 C5L2 的细胞外区域。

[0027] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以抑制 C5a 和关于 C5a 的细胞受体(例如 C5aR1 或 C5L2)之间的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以抑制 TCC 的装配或活性。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以抑制表达关

于 C5a 的受体的细胞的 C5a 依赖性趋化性。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以抑制 C5b 和 C6 ;C5b-6 和 C7 ;C5b-7 和 C8 ;或 C5b-8 和 C9 之间的相互作用。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以抑制在体外的补体依赖性的细胞裂解。

[0028] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以以至少 10^8 (例如,至少 10^9 、 10^{10} 或 10^{11}) M^{-1} 的 K_a 结合关联抗原。例如,本文所述的双特异性抗体可以以至少 $10^8 M^{-1}$ 的 K_a 结合 C5a。在另一个例子中,双特异性抗体可以以至少 $10^8 M^{-1}$ 的 K_a 结合 C5aR1 或 C5L2。在另外一个例子中,本文所述的双特异性抗体可以以至少 $10^8 M^{-1}$ 的 K_a 结合 C5b。在另外一个例子中,本文所述的双特异性抗体可以以至少 $10^8 M^{-1}$ 的 K_a 结合 C5b-6。

[0029] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以进一步含有第三个抗原结合部位,其结合选自 C6、C7、C8、C9 的末端补体蛋白质中存在的抗原。在一些实施方案中,双特异性抗体可以含有结合全长或成熟 C5 的抗原结合部位。

[0030] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以是单克隆、单链、人源化、重组、嵌合、嵌合化、去免疫化(deimmunized)、全人、双抗体、胞内抗体(intrabody)或 F(ab')₂ 片段。双特异性抗体可以是单链双抗体、串联单链 Fv 片段、串联单链双抗体、或包含单链双抗体和至少部分免疫球蛋白重链恒定区的融合蛋白。双特异性抗体可以是双重可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig)分子。双特异性抗体可以含有或可以是彼此结合的(例如共价或非共价连接在一起的)2 种不同的单特异性抗体。

[0031] 在一些实施方案中,本文所述的任何双特异性抗体可以含有异源部分,例如糖(例如抗体是糖基化的)或可检测标记。可检测标记包括例如荧光标记、发光标记、重金属标记、放射性标记和酶促标记。荧光标记可以例如选自荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、DyLight 488、藻红蛋白(PE)、碘化丙啶(PI)、PerCP、PE-Alexa Fluor® 700、Cy5、别藻蓝蛋白和 Cy7。酶促标记可以是例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或萤光素酶。放射性标记可以是例如选自 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 和 ^3H 的一种。

[0032] 在另一个方面,本公开内容的特征在于包含本文所述的任何双特异性抗体和药学可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物。

[0033] 在另外一个方面,本公开内容的特征在于用于抑制或预防受试者中的末端补体的方法。该方法包括给有此需要的受试者施用有效抑制受试者中的末端补体的量的抗体的步骤,其中所述抗体是能够抑制末端补体的本文所述的任何双特异性抗体。例如,双特异性抗体可以是结合 TCC 的组分(例如, C5b、C6、C7、C8 或 C9)、TCC 的中间体(例如 C5b-6、C5b-7 或 C5b-8)或 C5b-9 的那种。

[0034] 在另一个方面,本公开内容的特征在于用于抑制或预防受试者中的 C5a 依赖性趋化性的方法。该方法包括给有此需要的受试者施用有效抑制受试者中的 C5a 依赖性趋化性的量的抗体的步骤。抗体可以是能够抑制 C5a 依赖性趋化性的本文所述的任何双特异性抗体。例如,双特异性抗体可以是结合 C5a 或 C5aR1 的那种。抗体可以作为药物组合物施用。

[0035] 在另一个方面,本公开内容提供了用于治疗或预防受试者中的补体相关障碍的方法,所述方法包括给有此需要的受试者施用有效治疗受试者中的补体相关障碍的量的抗体。抗体可以是例如本文所述的双特异性抗体。例如,抗体可以是结合下述的那种:(i) C5a 和 C5b ;(ii) C5b 和关于 C5a 的受体 ;(iii) C5a 和 TCC 的组分或中间体(或 C5b-9) ;(iv) 关于 C5a 的受体和 TCC 的组分或中间体(或 C5b-9) ;或(v) C5b 和 TCC 的组分或中间体(或

C5b-9)。抗体可以作为药物组合物施用。

[0036] 在本文所述的任何方法的一些实施方案中,受试者可以是具有补体相关障碍、怀疑具有补体相关障碍、或处于发展补体相关障碍危险中的那种。补体相关障碍可以是例如旁路补体途径相关障碍,例如类风湿性关节炎、哮喘、缺血再灌注损伤、非典型溶血性尿毒症综合征、血栓形成性血小板减少性紫癜、阵发性睡眠性血红蛋白尿、致密沉积物病、年龄相关性黄斑变性、自发性胎儿丢失、微量免疫血管炎、大疱性表皮松解症、复发性胎儿丢失、多发性硬化、外伤性脑损伤、或本文描述或本领域已知的任何其它 AP 相关障碍。

[0037] 在一些实施方案中,受试者具有经典补体途径相关障碍、怀疑具有经典补体途径相关障碍、或处于发展经典补体途径相关障碍危险中,例如重症肌无力、冷凝集素疾病、皮炎、Graves 氏病、Hashimoto 氏甲状腺炎、I 型糖尿病、银屑病、天疱疮、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少性紫癜、Goodpasture 综合征、抗磷脂综合征、灾变性抗磷脂综合征、或本文描述或医学领域已知的任何其它 CP 相关障碍。

[0038] 本文所述的任何方法可以进一步包括将受试者鉴定为具有补体相关障碍、怀疑具有补体相关障碍、或处于发展具有补体相关障碍危险中的步骤。任何方法可以包括在施用抗体后,就补体相关障碍的一种或多种症状中的改善监控受试者。

[0039] 在本文所述的方法的一些实施方案中,抗体可以静脉内施用于受试者。在一些实施方案中(例如在其中待治疗呼吸状况的实施方案中),抗体可以通过肺施用于受试者。在一些实施方案中,抗体可以皮下或肌肉内施用。

[0040] 在本文所述的方法的一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是人。

[0041] 在另外一个方面,本公开内容的特征还在于用于产生本文所述的任何双特异性抗体的方法。该方法可以包括例如在允许抗体由细胞表达的条件下,培养表达双特异性抗体的细胞。该方法还可以包括从细胞中或从细胞在其中培养的培养基中分离双特异性抗体。培养的细胞可以含有核酸表达载体,其含有编码双特异性抗体的核苷酸序列。载体可以整合到细胞基因组内或可以是附加型的。细胞可以是例如细菌细胞、真菌细胞(例如酵母细胞)、昆虫细胞或哺乳动物细胞。细胞可以是人细胞。在一些实施方案中,用于产生本文所述的双特异性抗体的方法涉及化学合成抗体。

[0042] 在另一个方面,本公开内容的特征在于培养的细胞群体,其中多数表达本文所述的双特异性抗体。群体可以包括细胞中的 2 个或更多个较大数(plurality),每个较大数包括表达不同双特异性抗体的细胞。

[0043] 如本文使用的,在 2 个或更多个原子或分子单位之间(例如在 2 个不同的单特异性抗体或单特异性抗体的抗原结合片段之间)的相互作用的背景中的“与之结合”,包括 2 个或更多个原子或分子单位的任何共价或非共价键合或物理混合物。共价键(共享一对或多对价电子的 2 个原子)的化学性质是本领域已知的,并且包括例如二硫键或肽键。非共价键是在不涉及价电子对共享的原子或分子之间的化学键。例如,非共价相互作用包括例如疏水作用、氢键合相互作用、离子键合、范德瓦尔斯键合(Van der Waals bonding)或偶极-偶极相互作用。此种非共价相互作用的例子包括例如结合对相互作用(结合对的第一个和第二个成员的相互作用,例如链霉抗生物素蛋白和生物素之间的相互作用)。例如,双特异性抗体可以含有或是通过抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白结合对非共价连接在一起的第

一种单特异性抗体和第二种单特异性抗体。

[0044] 除非另有定义,在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。在下文描述了优选的方法和材料,尽管与本文所述的那些相似或等价的方法和材料也可以用于实践或测试本文公开的方法和组合物。在本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献整体引入作为参考。

[0045] 从下文的描述、实施例和权利要求书中,将明白本公开内容的其它特征和优点,例如,用于治疗受试者中的补体相关障碍的方法。

[0046] 附图简述

图 1 是描述在人新生 Fc 受体(FcRn)小鼠模型中人源化抗人 C5 抗体的时间依赖性 β 期清除的线图。Y 轴代表在小鼠的血清中保留的人源化抗体的最初施用量的百分比。X 轴代表以天表示的时间。

[0047] 图 2 是描述关于人源化抗人 C5 抗体及其靶抗原 C5 在患者中的清除的基本途径的示意图。游离抗体“A”指游离(非复合的)抗体,并且“C”指非复合的或游离 C5。抗体:C5 复合物由“CA”表示。关于抗体和 C5 结合的速率常数由“ k_3 ”表示,并且关于复合物解离的速率常数由“ k_4 ”表示。抗体:C5 复合物可以通过具有由“ k_6 ”表示的速率常数的免疫复合物清除来消除。游离抗体也如由不同速率常数“ k_5 ”表示的那样消除。C5 由速率常数 k_1 组成型表达,并且它由“ k_2 ”的速率常数消除。

[0048] 图 3 是描述关于患者中人源化抗人 C5 抗体的清除的简化系列途径的示意图。“mAb”指人源化抗体。“C”指游离 C5。在这个简化途径中,免疫复合物清除具有“ k_7 ”的速率常数。游离抗体清除由一阶方程 $A = A_0 \times e^{(-k_8t)}$ (等式 2;参见下文)决定,其中“t”表示时间,并且“ k_8 ”是速率常数。免疫复合物清除由零阶方程式 $A = A_0 - k_7t$ (等式 3;参见下文)决定,其中 A_0 是在时间 0 时游离抗体的浓度。关于并发过程的综合速率方程式阐述为 $A = A_0 \times e^{(-k_8t)} - k_7t$ (等式 4;参见下文)。

[0049] 发明详述

本公开内容提供了对于抑制末端补体中(例如 C5b-9 TCC 的装配和 / 或活性)和 C5a 过敏毒素介导的炎症的一种或两种有用的双特异性抗体。虽然决不预期是限制性的,但在下文详细阐述且在工作实施例中例示了示例性双特异性抗体、缀合物、药物组合物和制剂、和关于使用前述任何一种的方法。

[0050] 抗体

本文所述的双特异性抗体分子是结合 2 个或更多个(例如 2、3、4、5 或 6 个或更多个)不同表位的那种。例如,双特异性抗体可以结合 2 种或更多种(例如 2、3、4、5 或 6 种或更多种)不同蛋白质,其中蛋白质中的至少 2 种选自 C5a, C5b, 关于 C5a 的受体(例如 C5aR1 或 C5L2), 和 TCC 的组分或中间体例如 C5b-6、C5b-7、C5b-8 或 C5b-9。例如,双特异性抗体可以是结合 C5a 和 C5b 的那种。双特异性抗体可以是结合 C5aR 和 C5a 的那种。在另一个例子中,双特异性抗体可以是结合 C5aR1 和 C5b 的那种。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体结合选自 C5a、C5aR1、C5L2、C5b、C5b-6、C5b-7、C5b-8 和 C5b-9 的 2 种不同蛋白质。在一些实施方案中,双特异性抗体不结合全长或成熟 C5。

[0051] 本文所述的抗体可以用于许多诊断和 / 或治疗应用中。例如,结合 C5b、C5b-6、

C5b-7、C5b-8 和 / 或 C5b-9 的本文所述的双特异性抗体对于在体外或在体内抑制末端补体有用。在一些实施方案中,结合 C5a 和 C5aR1 中的一种或两种的抗体对于抑制 C5a 过敏毒素相关的炎症应答有用。因此,本文所述的抗体对于预防、治疗或改善受试者中的多种补体相关状况的一种或多种症状有用,例如但不限于:PNH、溶血性尿毒性综合征(HUS)、AMD、哮喘和脓毒病。

[0052] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合 C5a,但不结合全长、天然 C5。全长 C5 (例如 C5 的氨基酸序列)在例如 Haviland 等人(1991)/*J Immunol* 146 (1):362-8 中描述。(还参见 Genbank 登记号 AAA51925。)。C5 原是 1676 个氨基酸残基的前体蛋白。前 18 肽(编号 -18 至 -1)构成从前体蛋白切割的信号肽。剩余的 1658 个氨基酸的蛋白在 2 个位置被切割,以形成 α 和 β 链。第一个切割事件发生在氨基酸残基 655 和 656 之间。第二个切割发生在氨基酸残基 659 至 660 之间。2 个切割事件导致 3 个不同的多肽片段的形成:(i) 包含氨基酸 1-655 的片段,它被称作 β 链;(ii) 包含氨基酸 660-1658 的片段,它被称作 α 链;和(iii)由氨基酸 656-659 组成的四肽片段。 α 链和 β 链多肽片段经由二硫键彼此相连,并构成成熟的 C5 蛋白。通过在残基 733 和 734 之间切割 α 链,这导致 C5a 片段(氨基酸 660-733)的释放,CP 或 AP C5 转化酶活化成熟的 C5。成熟的 C5 的剩余部分是片段 C5b,其含有与 β 链二硫键连接的 α 链的残基 734 - 1658。

[0053] 在体内,C5a 被血清酶(羧肽酶 B)快速地代谢成 73 氨基酸形式,称作“C5a des-Arg”,其已经丧失羧基端精氨酸残基。因此,在一些实施方案中,结合 C5a 的抗原结合部位也结合脱精氨酸的 C5a。在一些实施方案中,结合 C5a 的抗原结合部位不结合脱精氨酸的 C5a。

[0054] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位可以结合在 C5a 中存在的新表位(neoepitope),即在从成熟 C5 的 α 链片段释放出 C5a 时变得暴露的表位。结合 C5a (例如,在 C5a 中存在的新表位)的抗体是本领域已知的,生成这样的抗体的方法也是本领域已知的。例如,结合 C5a 的抗体可以具有在下述任一篇参考文献中所述的 C5a 新表位特异性抗体的结合特异性:例如,PCT 公开号 WO 01/15731;Ames 等人(1994)/*J Immunol* 152(9):4572-4581;Inoue(1989)*Complement Inflamm* 6(3):219-222;和美国专利号 6,866,845。在另一个实例中,结合 C5a 的双特异性抗体可以具有商业的 C5a 新表位-特异性抗体的结合特异性,所述抗体例如,但不限于,sc-52633 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California)、I52-1486 (BD Pharmingen/BD Biosciences)、ab11877 (Abcam, Cambridge, Massachusetts)和 HM2079 (克隆 2952;HyCult Biotechnology, 荷兰)。在一些实施方案中,结合 C5a 的双特异性抗体可以交叉阻断(crossblock)任一种前述 C5a 新表位-特异性抗体的结合。

[0055] 如本文使用的,术语“交叉阻断抗体”指相对于在不存在主题抗体的情况下参考抗体与表位的结合量,降低参考抗体与表位的结合量的主题双特异性抗体。用于测定主题双特异性抗体是否交叉阻断参考抗体与表位的结合的合适方法是本领域已知的。

[0056] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位可以结合哺乳动物(例如,人)形式的 C5a。例如,抗原结合部位可以结合具有下述氨基酸序列的人 C5a 蛋白:

TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDCEQRAARISLGPRCIKAFTECCVVASQLRANISHKDMQLGR (SEQ ID NO:1)。抗原结合部位可以在下述氨基酸序列内的或与其重叠的表位处结合人 C5a:CCYDGACVNNDCEQRAAR (SEQ ID NO:2);KCCYDGACVNNDCEQ (SEQ ID NO:3);VNNDCEQ (SEQ ID NO:4);VNND (SEQ ID NO:5);AARISLGPR (SEQ ID NO:6);CCYDGACVNNDCEQRAA (SEQ ID NO:7);CCYDGACVNNDCEQRA (SEQ ID NO:8);CCYDGACVNNDCEQ (SEQ ID NO:9);CCYDGACVNNDCEQ (SEQ ID NO:10);CCYDGACVNNDCE (SEQ ID NO:11);CYDGACVNNDCEQRAAR (SEQ ID NO:12);YDGACVNNDCEQRAAR (SEQ ID NO:13);或 CYDGACVNNDCEQRAAR (SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,抗原结合部位可以结合含有这样的氨基酸序列的人 C5a 蛋白或其片段,所述氨基酸序列含有在 SEQ ID NO:1-14 中任一个所述的至少 4 个(例如,至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 或更多个)连续氨基酸,或由其组成。本文所述的抗体可以结合的其它 C5a 蛋白片段和用于生成合适的 C5a-特异性的抗原结合部位的方法阐述在例如美国专利号 4,686,100 中,其公开内容整体引入本文作为参考。

[0057] 如本文使用的,抗体的“抗原结合部位”指与抗原做出特异性、物理接触的抗体分子的表面。抗原结合部位一般由在免疫球蛋白的高变区内的 6 个高变环或互补性决定区(CDRs)组成,3 个 CDRs 来自免疫球蛋白分子的轻链,并且 3 个 CDRs 来自免疫球蛋白分子的重链。在轻和重链多肽的高变区内 CDRs 的确切边界已根据不同方法进行不同定义。在一些实施方案中,在轻或重链可变结构域内 CDRs 的位置可以如由 Kabat 等人(1991)“Sequences of Proteins of Immunological Interest.” NIH 公开号 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD 定义的。在此种情况下,CDRs 可以称为“Kabat CDRs (例如,“Kabat LCDR2”或“Kabat HCDR1”)”。在一些实施方案中,轻或重链可变区的 CDRs 的位置可以如由 Chothia 等人(1989) *Nature* 342:877-883 定义的。因此,这些区域可以分别称为“Chothia CDRs” (例如,“Chothia LCDR2”或“Chothia HCDR3”)。

[0058] 在一些实施方案中,双特异性抗体与 C5a 的结合可以抑制 C5a 的生物活性。用于测量 C5a 活性的方法包括,例如,趋化性测定、RIAs 或 ELISAs (参见,例如, Ward 和 Zvaifler (1971) *J Clin Invest* 50 (3):606-16 和 Wurzner 等人(1991) *Complement Inflamm* 8:328-340)。在一些实施方案中,抗体与 C5a 的结合可以抑制 C5a 和 C5aR1 之间的相互作用。适用于检测和 / 或测量 C5a 和 C5aR1 之间的相互作用(在有和没有抗体存在下)的方法是本领域已知的,且描述在例如 Mary 和 Boulay (1993) *Eur J Haematol* 51 (5):282-287; Kaneko 等人(1995) *Immunology* 86 (1):149-154; Giannini 等人(1995) *J Biol Chem* 270 (32):19166-19172 和美国专利号 20060160726 中。例如,在有和没有抗体存在下,可以评价可检测地标记的(例如,放射性标记的)C5a 与表达 C5aR1 的外周血单核细胞的结合。与在没有抗体存在下结合的量相比,在有抗体存在下结合 C5aR1 的可检测地标记的 C5a 的量的减少指示所述抗体抑制 C5a 和 C5aR1 之间的相互作用。在一些实施方案中,抗体与 C5a 的结合可以抑制 C5a 和 C5L2 之间的相互作用(参见下文)。用于检测和 / 或测量 C5a 和 C5L2 之间的相互作用的方法是本领域已知的,且描述在例如 Ward (2009) *J Mol Med* 87 (4):375-378 和 Chen 等人(2007) *Nature* 446 (7132):203-207 (参见下文)中。

[0059] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合 C5b,但是不结合全长、天然 C5。C5b 的结构如上所述,且也详述在例如, Müller-Eberhard(1985)

Biochem Soc Symp 50:235-246 ; Yamamoto 和 Gewurz (1978) *J Immunol* 120 (6):2008-2015 ; 和 Haviland 等人(1991), 同上。C5b 与 C6、C7 和 C8 组合, 以在靶细胞表面处形成 C5b-8 复合物。在系列组合过程中形成的蛋白复合物中间体包括 C5b-6 (包括 C5b 和 C6)、C5b-7 (包括 C5b、C6 和 C7) 和 C5b-8 (包括 C5b、C6、C7 和 C8)。在结合几个 C9 分子时, 形成膜攻击复合物 (MAC、C5b-9 末端补体复合物 (TCC))。当足够数目的 MACs 插入靶细胞膜中时, 它们产生的开口 (MAC 孔) 介导靶细胞的快速渗透裂解。

[0060] 在一些实施方案中, 本文所述的双特异性抗体与 C5b 的结合可以抑制 C5b 和 C6 之间的相互作用。在一些实施方案中, 抗体与 C5b 的结合可以抑制 C5b-9 MAC-TCC 的装配或活性。在一些实施方案中, 双特异性抗体与 C5b 的结合可以抑制补体 - 依赖性的细胞裂解 (例如, 体外和 / 或体内)。适用于评价抗体是否抑制补体 - 依赖性的裂解的方法包括, 例如, 溶血测定或用于检测可溶性 C5b-9 的活性的其它功能测定。例如, 通过 Kabat 和 Mayer (编), “Experimental Immunochimistry, 第 2 版,” 135-240, Springfield, IL, CC Thomas (1961), 第 135-139 页所述的溶血测定, 或该测定的常规变体, 诸如在例如 Hillmen 等人 (2004) *N Engl J Med* 350 (6):552 中所述的鸡红细胞溶血方法, 可以测量在有抗体存在下补体的细胞裂解能力的降低。

[0061] 结合 C5b 的抗体以及制备这样的抗体的方法是本领域已知的。参见, 例如, 美国专利号 6, 355, 245。可商业得到的抗 -C5b 抗体可从许多销售商得到, 包括, 例如, Hycult Biotechnology (目录号: HM2080 ; 克隆 568) 和 Abcam™ (ab46151 或 ab46168)。

[0062] 在一些实施方案中, 本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位可以结合哺乳动物 (例如, 人) 形式的 C5b。例如, 抗原结合部位可以结合具有下述氨基酸序列的人 C5b 蛋白的一部分:

QEQT YVISAPKIFRVGASENIVIQVYGYTEAFDATISIKSYDPKKFSYSSGHVHL
SSENKFQNSAILTIQPKQLPGGQNPVS YVYLEVVSKHFSSKRMPITYDNGFLF
IHTDKPVYTPDQSVKVRVYSLNDDLKPAKRETVLTFIDPEGSEVDMVEEIDHI
GIISFPDFKIPSNPRYGMWTIKAKYKEDFSTTGTA YFEVKEYVLP HFSVSIEPEY
NFIGYKNFKNFEITIKARYFY NKVVTEADVYITFGIREDLKDDQKEMMQTAM
QNTMLINGIAQVTFDSETAVKELSYYSLEDLNNKYLYIAVTVIESTGGFSEEAE
IPGIKYVLSPYKLNLVATPLFLKPGIPYPIKVQVKDSL DQLVGGVPVILNAQTID
VNQETSDLDPSKSVTRVDDGVASFVLNLP SGVTVLEFNVKTDAPDLPEENQA
REGYRAIAYSSLSQSYLYIDWTDNHKALLVGEHLNII VTPKSPYIDKITHYNYL
ILSKGKIIHFGTREKFSDASYQSINIPVTQNMVPSSRLLVYYIVTGEQTAELVSD
SVWLNIEEKCGNQLQVHLSPDADAYSPGQTVSLN MATGMDSWVALAAVDS
AVYGVQRGAKKPLERV FQFLEKSDLGCGAGGGLNNANVFHLAGL TFLTAN

ADDSQENDEPCKEIL (SEQ ID NO:15)。抗原结合部位可以结合具有下述氨基酸序列的人 C5b 蛋白的一部分:

LHMKTL LPVSKPEIRSYFPESWLWEVHLVPRRKQLQFALPDSLTTWEIQGIGIS
NTGICVADTVKAKVFKDVFLEMNIPYSVVRGEQIQKGTVYNYRTSGMQFCV
KMSAVEGICTSESPVIDHQGTKSSKCVRQKVEGSSSHLVTFTVLPLEIGLHNIN
FSLETWFGKEILVKTLRVVPEGVKRESYSGVTLDPRGIYGTISRRKEFPYRIPL
DLVPKTEIKRILSVKGLLVGEILSAVLSQEGINILTHLPKGSAAEELMSVVPVVFY
VFHYLETGNHWNIFHSDPLIEKQKLKKKLKEGMLSIMSYRNADYSYSVWKG
GSASTWLTAFAALRVLGQVNKYVEQNQNSICNSLLWLVENYQLDNGSFKENS
QYQPIKLQGTLPVEARENSLYLTAFTVIGIRKAFFDICPLVKIDTALIKADNFLLE
NTLPAQSTFTLAISAYALSLGDKTHPQFRSIVSALKREALVKGNPPIYRFWKD
NLQHKDSSVPNTGTARMVETTAYALLTSLNLKDINYVNPVIKWLSEEQRYGG
GFYSTQDTINAIEGLTEYSLLVKQLRLSMDIDVSYKHKGALHNYKMTDKNFL
GRPVEVLLNDDLIVSTGFGSGLATVHVTTVVHKTSTSEEVCSFYLKIDTQDIEA
SHYRGYGNSDYKRIVACASYKPSREESSSGSSHAVMDISLPTGISANEEDLKA
LVEGVDQLFTDYQIKDGHVILQLNSIPSS
DFLCVRFRI FELFEVGFLSPATFTVY EYHRPDKQCTMFYSTSNIKI QKVCEGAA
CKCVEADCGQM QEELDTISAETR KQTACKPEIAYAYKVSITSITVENVFKY
KATLLDIYKTGEAVA EKDSEITFIKKVTCTNAELVKGRQYLIMGKEALQIKYN
FSFRYIYPLDSL TWIEYWPRDTTCSSCQAFLANLDEFAEDIFLNGC (SEQ ID NO:16)

。在一些实施方案中,抗原结合部位可以结合含有这样的氨基酸序列的人 C5b 蛋白或其片段,所述氨基酸序列含有在 SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 中所述的至少 4 个(例如,至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个或更多个)连续氨基酸,或由其组成。

[0063] 本文所述的双特异性抗体可以结合的人 C5b 或 C5a 的其它示例性的亚片段公开在例如美国专利号 6,355,245 中,其公开内容引入本文作为参考。

[0064] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合关于人 C5a 的受体。例如,抗体的至少一个抗原结合部位可以结合 C5aR(C5aR1 或 CD88)或 C5L2(GPR77)。

[0065] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合 C5aR1(例如 C5aR1 的细胞外区域)。C5aR1 已详述在例如 Gerard 和 Gerard (1991) *Nature* 349 (6310):614-617; Bao 等人(1992) *Genomics* 13:437-440; 和美国专利申请公开号 20050244406 中。例如,C5aR1 属于 7 跨膜 G 蛋白偶联受体家族,并且以高亲和力结合 C5a。C5a/C5aR1 相互作用具有约 1 nM 的 K_d 。C5aR1 含有延长的 N 末端细胞外结构域;C5aR1 结构与 7 跨膜受体家族一致,其中细胞外 N 末端随后为通过作为细胞内和细胞外环交替的螺旋间结构域连接的 7 跨膜螺旋,并且以细胞内 C 末端结构域结束。C5aR1 可以在多种细胞类型上发现,包括例如平滑肌细胞、内皮细胞和多种淋巴细胞,包括但不限于嗜中性粒细胞和巨噬细胞。(参见,例如, Soruri 等人(2003) *Immunol Lett* 88 (1):47-52; Zwirner 等

人(1999)*Mol Immunol* 36 (13-14):877-884;和 Kiafard 等人(2007)*Immunobiology* 212 (2):129-139。C5a 与 C5aR (C5aR1 或 CD88)的结合触发许多促炎作用,包括例如几种髓样谱系细胞(例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞)的趋化性和增加的血管通透性。C5aR1 的高水平活化导致淋巴细胞脱粒和 NADPH 氧化酶的活化。C5a/C5aR1 已牵涉于多种障碍的发病机理,所述障碍包括例如脓毒病、脓毒性休克、SIRS(全身性/严重炎症应答综合征)、MOF(多器官衰竭)、ARDS(急性呼吸窘迫综合征)、类风湿性关节炎和复发性妊娠丢失。(参见,例如, Rittirsch 等人(2008)*Nature Med* 14:551-557; Girardi 等人(2003)*J Clin Invest* 112:1644-1654;Atkinson(2003)*J Clin Invest* 112:1639-1641;美国专利号 7,455,837;美国专利申请公开号 20070065433、20070274989 和 20070123466,它们各自的公开内容整体引入本文作为参考。)关于人 C5aR1 的示例性氨基酸序列在本文中提供且在例如 Genbank 登记号 NP_001727 中阐述。

[0066] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位可以结合哺乳动物(例如人)C5aR1。人 C5aR1 可以具有例如下述氨基酸序列:

MNSFNYYTPDYGHYDDKDTLNLNTPVDKTSNTLRVPDILALVIFAVVFLVGV
LGNALVVWVTAFEAKRTINAIWFLNLAVADFLSCLALPILFTSIVQHHHPFG
GAACSLPSLILLNMYASILLLATISADRFLLVFKPIWCQNFRGAGLAWIACAV
AWGLALLLTIPSFLYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIVRLVLGFL
WPLLTLTICYTFILLRTWSRRATRSTKTLKVVVAVVASFFIFWLPYQVTGIMM
SFLEPSSPTFLLLNLKLDLCVSFAYINCCINPIIYVVAGQGFGRLRKSLPSLLR

NVLTEESVVRESKSFTRSTVDTMAQKTQAV (SEQ ID NO:17)。在一些实施方案中,抗原结合部位可以在其在下述氨基酸序列内或与下述氨基酸序列重叠的表位处结合人 C5aR1 :SIVQHHHPFGGAACS (SEQ ID NO:18);RVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIVR (SEQ ID NO:19);或 MSFLEPSSPTFLLLNLKLD (SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中,抗原结合部位可以结合人 C5aR1 蛋白质或其片段,其含有 SEQ ID NOs:17-20 中任一个所述的至少 4 个(例如,至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个或更多个)连续氨基酸,或由其组成。

[0067] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合人 C5aR1 的氨基末端。例如,抗原结合部位可以结合其在下述氨基酸序列内或与下述氨基酸序列重叠的表位:MNSFNYYTPDYGHYDDKDTLNLNTPVDKT (SEQ ID NO:21) 或 DYGHYDDKDTLNLNTPVDKT (SEQ ID NO:22)。在一些实施方案中,抗原结合部位结合人 C5aR1 蛋白质,其含有 SEQ ID NO:21 或 22 中任一个所述的至少 4 个(例如,至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个或更多个)连续氨基酸,或由其组成。在一些实施方案中,抗原结合部位在其在下述氨基酸序列内或与下述氨基酸序列重叠的表位处结合人 C5aR1 蛋白质,所述氨基酸序列含有 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列 24-30。

[0068] 在一些实施方案中,抗体与 C5aR1 的结合可以拮抗 C5aR1 的活性。在一些实施方案中,双特异性抗体与 C5aR1 的结合可以抑制 C5a 和 C5aR1 之间的相互作用。用于检测和/或测量 C5a 和 C5aR1 之间的相互作用的方法在本文中得到描述。用于测量 C5aR1 的活性(或其抑制)的方法是本领域已知的,并且包括例如如在例如美国专利申请公开号 20050244406 中描述的 C5a 指导的体外嗜中性粒细胞趋化性测定。

[0069] 示例性 C5aR1 抗体以及用于制备该抗体的方法在例如美国专利申请公开号 20050244406 和美国专利号 7,455,837 中描述,它们各自的公开内容整体引入本文作为参考。

[0070] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合 C5a 受体 C5L2。C5L2 是关于 C5a 的高亲和力受体,并且在例如粒细胞和未成熟树突细胞上表达。与 C5aR 不同,C5L2 不与 G 蛋白偶联。(参见,例如,Monk 等人(2007)*Br J Pharm* 152:429-448 和 Huber-Lang 等人(2005)*J Immunol* 174:1104-1110。)在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位可以结合哺乳动物(例如人) C5L2。人 C5L2 可以具有例如下述氨基酸序列:

MGNDSVSYEYGDYSDLSDRPVDCLDGACLAIDPLRVAPLPLYAAIFLVGVPG
NAMVAWVAGKVARRRVGATWLLHLAVADLLCCLSLPILAVPIARGGHWPY
GAVGCRALPSIILLTMYASVLLLAALSADLCFLALGPAWWSTVQRACGVQVA
CGAAWTLALLLTVP SAIYRRLHQEHF PARLQCVVDYGGSSSTENAVTAIRFLF
GFLGPLVAVASCHSALLCWAARRCRPLGTAIVVGFFVCWAPYHLLGLVLTV
AAPNSALLARALRAEPLIVGLALAHSCLNPMFLYFGRAQLRRSLPAACHWA

LRESQGQDESVD SKKSTSHDLVSEMEV (SEQ ID NO:23)。在一些实施方案中,抗原结合部位可以结合人 C5L2 蛋白质或其片段,其含有 SEQ ID NO:23 中所述的至少 4 个(例如,至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个或更多个)连续氨基酸,或由其组成。在一些实施方案中,抗原结合部位可以在其在下述氨基酸序列内或与下述氨基酸序列重叠的表位处结合人 C5L2:PIARGGHWPYGAVGCR (SEQ ID NO:24); RRLHQEHF PARLQCVVDYGGSSSTENAVTAIR (SEQ ID NO:25); LTVAAPNSALLARALRAE (SEQ ID NO:26)或 MGNDSVSYEYGDYSDLSDRPVDCLDGACLAIDPLR (SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,抗原结合部位可以结合人 C5L2 蛋白质或其片段,其含有 SEQ ID NOs:24-27 中任一个所述的至少 4 个(例如,至少 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个或更多个)连续氨基酸,或由其组成。

[0071] 在一些实施方案中,双特异性抗体与 C5L2 的结合可以抑制 C5a 和 C5L2 之间的相互作用。用于检测和 / 或测量 C5a 和 C5L2 之间的相互作用的方法在本文以及例如 Scola 等人(2007)*J Biol Chem* 282 (6):3664-3671 以及 Cain 和 Monk (2002)*J Biol Chem* 277 (9):7165-7169 中得到描述。

[0072] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合末端 C5b-9 补体复合物(TCC)的组分,例如 C5b、C6、C7、C8 或 C9。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体的至少一个抗原结合部位结合 TCC 的中间体或 TCC 自身中存在的新表位,即在 TCC 的中间体或 TCC 自身形成时呈递给溶剂的新表位。如上所述,TCC 的中间体包括例如 C5b-6、C5b-7、C5b-8 和 C5b-9。因此,在一些实施方案中,抗原结合部位可以结合 C5b-6 中间体,但不结合非复合的 C5b 或非复合的 C6。在一些实施方案中,抗原结合部位结合 C5b-6 中间体,但不结合 C5b-7、C5b-8、C5b-9、或前述的任何组合。在一些实施方案中,抗体与 C5b-6 的结合抑制 C5b-6 和 C7 之间的相互作用。在一些实施方案中,抗体与 C5b-6 的结合抑制 TCC 的形成。用于检测 TCC 的各个成员和 / 或其中间体(例如 C5b-6 和 C7)之间的相互作

用的合适方法在例如 DiScipio (1992) *J Biol Chem* 267 (24):17087-17094 ;Podack 等人 (1980) *J Exp Med* 151:301-303 ;Podack 等人 (1978) *J Immunol* 120:1841-1848 ;DiScipio 等人 (1988) *J Biol Chem* 263:549-560 中描述。用于检测 TCC 的形成或活性的方法是本领域众所周知的,并且包括例如溶血测定和 C5b-9 新表位特异性抗体的使用。

[0073] 结合 C5b-6 中间体上存在的新表位的抗体以及用于生成和鉴定此种抗体的方法已在例如 Podack 等人 (1978), 同上和 Mollnes 等人 (1989) *Complement Inflamm* 6 (3):223-235 中描述。

[0074] 在一些实施方案中,双特异性抗体的抗原结合部位结合 C5b-7 中存在的新表位,所述 C5b-7 是含有 C5b、C6 和 C7 的复合物。在一些实施方案中,双特异性抗体的抗原结合部位结合 C5b-8 中存在的新表位,所述 C5b-8 是含有 C5b、C6、C7 和 C8 的复合物。前述抗体以及用于产生抗体的方法在例如 Mollnes 等人 (1989), 同上中描述。该抗体可以用于抑制 TCC 的装配和 / 或活性。

[0075] 在一些实施方案中,本文所述的任何双特异性抗体可以含有第三个抗原结合部位,其结合选自 C6、C7、C8、C9 和全长、天然 C5 的末端补体蛋白质。在一些实施方案中,本文所述的任何双特异性抗体可以含有第三个抗原结合部位,其结合:(i)C5a 和 C5 或(ii)C5b 和 C5。换言之,结合 C5a 的抗原结合部位还可以结合全长或成熟 C5,并且结合 C5b 的抗原结合部位还可以结合全长或成熟 C5。

[0076] 在一些实施方案中,双特异性抗体特异性结合 C5a、C5b 和 / 或 C5aR。术语“特异性结合”或“特异地结合”指 2 个分子形成在生理条件下相对稳定的复合物(例如在双特异性抗体和 C5a、C5b 或 C5aR 之间的复合物)。一般地,当结合常数(K_a)高于 10^6 M^{-1} 时,结合视为特异性的。因此,双特异性抗体可以以至少(或大于) 10^6 (例如,至少或大于 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 或更高) M^{-1} 的 K_a 特异性结合蛋白质(例如 C5a、C5b 或 C5aR)。

[0077] 用于测定抗体(例如本文所述的双特异性抗体)是否结合蛋白质抗原和 / 或抗体对于蛋白质抗原的亲力的方法是本领域已知的。例如,抗体与蛋白质抗原的结合可以使用多种技术进行检测和 / 或定量,所述技术例如,但不限于蛋白质印迹、斑点印迹、表面等离子共振法(例如 BIAcore system;Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, N. J., Octet)、或酶联免疫吸附测定(ELISA)测定。参见,例如,Harlow 和 Lane (1988) “Antibodies :A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. ;Benny K. C. Lo (2004) “Antibody Engineering: Methods and Protocols,” Humana Press (ISBN:1588290921);Borrebaek (1992) “Antibody Engineering, A Practical Guide,” W. H. Freeman and Co., NY ;Borrebaek (1995) “Antibody Engineering,” 第 2 版, Oxford University Press, NY, Oxford ; Johne 等人 (1993) *J. Immunol. Meth* 160:191-198 ;Jonsson 等人 (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 ;和 Jonsson 等人 (1991) *Biotechniques* 11:620-627。还参见美国专利号 6, 355, 245。

[0078] 如本文使用的,术语“双特异性抗体”指整个或完整抗体分子(例如 IgM、IgG (包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4)、IgA、IgD 或 IgE) 及其任何片段,其结合 2 种或更多种不同蛋白质,其中至少 2 种是 C5a、C5b 或 C5aR (参见上文)。术语双特异性抗体包括例如嵌合化或嵌合抗体、人源化抗体、去免疫化人抗体和全人抗体。双特异性抗体还包括例如 $F(ab')_2$ 片

段或 2 个或更多个单特异性抗体片段(例如, 2 个或更多个 scFv、Fab、Fab' 或 Fd 免疫球蛋白片段)的缀合物。另外, 双特异性胞内抗体、微抗体(minibodies)、三抗体(triabodies)和双抗体(参见, 例如, Todorovska 等人(2001)*J Immunol Methods* 248 (1):47-66 ;Hudson 和 Kortt (1999)*J Immunol Methods* 231 (1):177-189 ;Poljak (1994)*Structure* 2 (12):1121-1123 ;Rondon 和 Marasco(1997)*Annual Review of Microbiology* 51:257-283, 它们各自的公开内容整体引入本文作为参考)也包括在双特异性抗体的定义中, 并且对于在本文所述的方法中的使用是相容的。还由术语双特异性抗体包含的是串联单链抗体、单链双抗体、串联单链双抗体、和含有单链双抗体和至少部分免疫球蛋白重链恒定区(例如重链多肽的 CH1 或 CH3 区)的融合蛋白, 如例如 Kontermann (2005)*Acta Pharmacologica Sinica* 26 (1):1-9 ;Kufer 等人(2004)*Trends Biotechnol* 22:238-244 ;和 Kriangkum 等人(2001)*Biomol Eng* 18:31-40 中描述的。

[0079] 还由术语“双特异性抗体”包含的是含有包含少于 6 个规范 CDRs 的至少一个抗原结合部位的抗体, 例如其中一个抗原结合部位的结合特异性由 3、4 或 5 个 CDRs 而不是 6 个决定的双特异性抗体。其中结合亲和力和特异性主要由一个或另一个可变结构域促成的抗体的例子是本领域已知的。Jeffrey 等人 [(1993)*Proc Natl Acad Sci USA* 90:10310-10314] 公开了主要通过抗体重链结合地高辛的抗地高辛抗体。因此, 技术人员可以鉴定含有单个可变结构域且依照本公开内容结合例如 C5a、C5b 或 C5aR 的抗体。

[0080] 在一些实施方案中, 本文所述的双特异性抗体可以含有来自“骆驼科动物(camelid)”抗体的至少一个抗原结合部位。骆驼科动物抗体包含重链但缺乏轻链。参见, 例如, Muyldermans (2001)*J Biotechnol* 74:277-302。像这样, 来自骆驼科动物抗体的可变重链区含有特异性结合目的抗原所需的最低限度结构元件。已发现骆驼科动物可变重链区以高亲和力结合关连抗原。参见, 例如, Desmyter 等人(2001)*J Biol Chem* 276:26285-90 ;Dumoulin 等人(2003)*Nature* 424:783-788 ;Chan 等人(2008)*Biochemistry* (2008) 47 (42):11041-54 ;和美国专利号 7, 371, 849。

[0081] 广泛多样的双特异性抗体形式是抗体工程改造领域已知的, 并且用于制备双特异性抗体的方法完全在本领域技术人员的能力范围内。传统地, 双特异性抗体的重组生产基于两个免疫球蛋白重链 / 轻链对的共表达, 其中两条重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello (1983)*Nature*305:537-539)。可以使具有所需结合特异性(抗体 - 抗原结合部位)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合物可以包括免疫球蛋白重链恒定结构域, 例如至少部分铰链、CH2 和 CH3 区。可以将编码免疫球蛋白重链融合物和免疫球蛋白轻链(如果需要的话)的 DNA 插入单独的表达载体中, 并且共转染到合适的宿主生物中。对于用于产生双特异性抗体的示例性的当前已知的方法的其它细节, 参见, 例如, Suresh 等人(1986)*Methods in Enzymology*121:210 ;PCT 公开号 WO 96/27011 ;Brennan 等人(1985)*Science*229:81 ;Shalaby 等人, *J. Exp. Med.* (1992) 175:217-225 ;Kostelny 等人(1992)*J. Immunol.* 148 (5):1547-1553 ;Hollinger 等人(1993)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90:6444-6448 ;Gruber 等人(1994)*J. Immunol.* 152:5368 ;和 Tutt 等人(1991)*J. Immunol.* 147:60。双特异性抗体也包括交联的或异源缀合(heteroconjugate)抗体。使用任何方便的交联方法, 可以制备异源缀合抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的, 并且在美国专利号 4, 676, 980 中与许多交联技术一起公开。

[0082] 美国专利号 5, 534, 254 描述了几种不同类型的双特异性抗体, 包括例如通过肽偶合剂、螯合剂或化学或二硫键偶合连接在一起的单链 Fv 片段。在另一个例子中, Segal 和 Bast [(1995) *Curr Protocols Immunol Suppl.* 14:2. 13. 1-2. 13. 16] 描述了用于化学交联 2 种单特异性抗体以从而形成双特异性抗体的方法。如上所述, 本文所述的双特异性抗体可以例如通过缀合 2 种单链抗体形成, 所述单链抗体选自例如: (a) 对于 C5a 特异性的抗体; (b) 对于 C5b 特异性的抗体; (c) 对于 C5aR1 特异性的抗体; (d) 对于 C5L2 特异性的抗体; (e) 对于 C5b-6 特异性的抗体; (f) 对于 C5b-7 特异性的抗体; (g) 对于 C5b-8 特异性的抗体; 和 (h) 对于 C5b-9 特异性的抗体。在一些实施方案中, 双特异性抗体可以是含有针对 C5a 或 C5b 的单克隆抗体(或其抗原结合片段)和对于 C5aR1 特异性的抗体或其抗原结合片段的融合蛋白。在一些实施方案中, 双特异性抗体是含有对于 C5a 特异性的单克隆抗体或其片段和对于 C5b 特异性的第二种单克隆抗体或其片段的融合蛋白。在一些实施方案中, 双特异性抗体是含有对于 TCC 的组分或中间体特异性的单克隆抗体或其片段和对于 C5a 或关于 C5a 的受体(例如 C5aR1 或 C5L2) 特异性的单克隆抗体的融合蛋白。

[0083] 也已经描述了用于制备和从重组细胞培养物直接分离双特异性抗体片段的各种技术。例如, 已经使用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体(参见, 例如, Kostelny 等人(1992) *J Immunol* 148 (5):1547-1553 以及 de Kruif 和 Logtenberg (1996) *J Biol Chem* 271 (13):7630-7634.)。通过基因融合, 可以将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连接到两种不同抗体的 Fab' 部分上。可以在铰链区还原抗体同二聚体, 以形成单体, 且然后再次氧化以形成抗体异二聚体。

[0084] 在一些实施方案中, 双特异性抗体可以是串联单链(sc) Fv 片段, 其含有通过接头(例如多肽接头) 共价栓系在一起的 2 个不同 scFv 片段。参见, 例如, Ren-Heidenreich 等人(2004) *Cancer* 100:1095-1103 和 Korn 等人(2004) *J Gene Med* 6:642-651。在一些实施方案中, 接头可以含有或是全部或部分重链多肽恒定区, 例如 CH1 结构域, 如例如 Grosse-Hovest 等人(2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6858-6863 中描述的。在一些实施方案中, 2 个抗体片段可以通过聚甘氨酸-丝氨酸或聚丝氨酸-甘氨酸接头共价栓系在一起, 如分别在例如美国专利号 7, 112, 324 和 5, 525, 491 中描述的。还参见美国专利号 5, 258, 498, 就抗体工程改造和接头而言的公开内容整体引入本文作为参考。用于生成双特异性串联 scFv 抗体的方法在例如 Maletz 等人(2001) *Int J Cancer* 93:409-416; Hayden 等人(1994) *Ther Immunol* 1:3-15; 和 Honemann 等人(2004) *Leukemia* 18:636-644 中描述。可替代地, 抗体可以是如例如 Zapata 等人(1995) *Protein Eng.* 8 (10):1057-1062 中描述的“线性抗体”。简而言之, 这些抗体包含一对串联的 Fd 区段($V_H-C_H1-V_H-C_H1$), 其形成一对抗原结合区。

[0085] 双特异性抗体还可以是双抗体。由例如 Hollinger 等人(1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448 描述的双抗体技术已提供了用于制备双特异性抗体片段的可替代机制。所述片段包含通过接头连接到轻链可变结构域(VL)上的重链可变结构域(VH), 所述接头太短, 以致于不允许同一链上的两个结构域之间配对。因此, 一个片段的 VH 和 VL 结构域被迫与另一片段的互补 VL 和 VH 结构域配对, 从而形成两个抗原结合部位。(还参见, 例如, Zhu 等人(1996) *Biotechnology* 14:192-196 和 Helfrich 等人(1998) *Int J Cancer* 76:232-239.) 双特异性单链双抗体(scDb) 以及用于生成 scDb 的方法在例如 Brüsselbach

等人(1999)*Tumor Targeting* 4:115-123;Kipriyanov 等人(1999)*J Mol Biol* 293:41-56; 和 Nettlebeck 等人(2001)*Mol Ther* 3:882-891 中描述。

[0086] 本公开内容也包括双特异性抗体的变体形式,诸如在 Wu 等人(2007)*Nat Biotechnol* 25 (11):1290-1297 中描述的四价双重可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig)分子。将 DVD-Ig 分子这样设计,从而使得来自 2 个不同亲本抗体的 2 个不同轻链可变结构域(VL)通过重组 DNA 技术直接地串联相连,或经由短接头相连,随后为轻链恒定结构域。例如, DVD-Ig 轻链多肽可以串联含有:(a)来自结合 C5a 的抗体的 VL;和(b)来自结合 C5b 的抗体的 VL。类似地,重链包含串联连接的 2 个不同重链可变结构域(VH),随后为恒定结构域 CH1 和 Fc 区。例如, DVD-Ig 重链多肽可以串联含有:(a)来自结合 C5a 的抗体的 VH;和(b)来自结合 C5b 的抗体的 VH。在这种情况下,2 条链在细胞中的表达导致含有 4 个抗原结合部位的异四聚体,2 个特异性结合 C5a 并且 2 个特异性结合 C5b。应当理解来自结合关于 C5a 的受体(例如 C5aR1 或 C5L2)或 TCC 的组分或中间体(例如 C5b-6、C5b-7、C5b-8 或 C5b-9)的抗体的 VL 或 VH 也可以用于依照本公开内容制备 DVD-Ig 分子。从 2 个亲本抗体产生 DVD-Ig 分子的方法进一步描述在例如 PCT 公开号 WO 08/024188 和 WO 07/024715 中,它们各自的公开内容整体引入本文作为参考。还包含的是在例如美国专利申请公开号 20070004909 中描述的双特异性形式,它的公开内容整体引入作为参考。

[0087] 用于形成本文所述的双特异性抗体分子的抗体(例如单克隆抗体)或其片段可以是例如嵌合抗体、人源化抗体、再人源化(rehumanized)抗体、去免疫化抗体、全人抗体及其抗原结合片段。嵌合抗体通过抗体工程改造领域众所周知的重组过程产生,且具有非人哺乳动物可变区和人恒定区。人源化抗体比嵌合抗体更紧密地对应于人抗体的序列。构建人源化可变结构域,其中非人起源的一个或多个 CDRs 的氨基酸序列嫁接至人构架区(FRs),如例如 Jones 等人(1996)*Nature* 321:522-525;Riechman 等人(1988)*Nature* 332:323-327 和美国专利号 5,530,101 中描述的。人源化抗体可以是含有并非种系的一个或多个个人构架区的抗体。例如,人源化抗体可以含有实施体细胞高变且本身不再是种系的一个或多个构架区。(参见,例如,Abbas, Lichtman 和 Pober (2000)“Cellular and Molecular Immunology,”第 4 版, W.B. Saunders Company (ISBN:0721682332))。在一些实施方案中,人源化抗体含有人种系构架区,例如人种系 V_H 区、人种系 D 区和人种系 J 区(例如人种系 J_H 区)。MRC Center for Protein Engineering 维持在线 VBase 数据库系统,其包括关于大量人种系构架区的氨基酸序列。参见,例如, Welschof 等人(1995)*J Immunol Methods* 179:203-214;Chothia 等人(1992)*J Mol Biol* 227:776-798;Williams 等人(1996)*J Mol Biol* 264:220-232;Marks 等人(1991)*Eur J Immunol* 21:985-991;和 Tomlinson 等人(1995)*EMBO J.* 14:4628-4638。关于合适人种系构架区谱(repertoire)的氨基酸序列也可以得自部分由 U.S. Department of Health and Human Services 及 National Institutes of Health 维持的 JOINSOLVER® Germline Databases (例如 JOINSOLVER® Kabat 数据库或 JOINSOLVER® IMGT 数据库)。参见,例如, Souto-Carneiro 等人(2004)*J Immunol.* 172:6790-6802。

[0088] 全人抗体是具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在的话)的抗体。人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机的或位点特异性的诱变或通过体内体细胞突变而导入的突变)。然而,术语“人抗

体”不包括这样的抗体,其中衍生自另一哺乳动物物种(如小鼠)的种系的 CDR 序列已经被嫁接到人构架序列上(即,人源化抗体)。全人或人抗体可以衍生自携带人抗体基因的转基因小鼠(携带可变(V)、多样性(D)、连接(J)和恒定(C)外显子)或来自人细胞。例如,可能产生转基因动物(例如小鼠),其在免疫接种时能够在不存在内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全部谱(参见,例如, Jakobovits 等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551; Jakobovits 等人(1993) *Nature* 362:255-258; Bruggemann 等人(1993) *Year in Immunol.* 7:33; 和 Duchosal 等人(1992) *Nature* 355:258.)。可以工程改造转基因小鼠品系,以含有来自未重排的人免疫球蛋白基因的基因序列。人序列可以编码人抗体的重和轻链并且将在小鼠中正确起作用,经历重排以提供类似于在人中的那种的广泛抗体谱。转基因小鼠可以用靶蛋白质(例如 C5a、C5b 或 C5aR) 进行免疫接种。

[0089] 上述完整和部分人抗体比其完全鼠或非人衍生的抗体配对物更少免疫原性。所有这些分子(或其衍生物)因此更不太可能引起免疫或变应性应答。因此,它们更适合于在人中的体内施用,尤其是当需要反复或长期施用时,如对于用本文所述的双特异性抗体的治疗可能需要的。

[0090] 用于产生双特异性抗体的方法

如上所述,双特异性抗体可以使用分子生物学和蛋白质化学领域已知的多种技术产生。例如,编码双特异性抗体的重和轻链多肽中的一个或两个的核酸可以插入表达载体内,所述表达载体含有转录和翻译调节序列,其包括例如启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、转录终止子信号、多腺苷酸化信号和增强子或激活子序列。调节序列包括启动子和转录起始和终止序列。此外,表达载体可以包括超过一个复制系统,从而使得它可以在 2 种不同生物中维持,例如在用于表达的哺乳动物或昆虫细胞中以及在用于克隆和扩增的原核宿主中。

[0091] 几种可能的载体系统可用于在哺乳动物细胞中表达来自核酸的克隆的重链和轻链多肽。一类载体依赖于所需基因序列向宿主细胞基因组中的整合。通过同时导入抗药基因诸如大肠杆菌(*E. coli*) gpt (Mulligan 和 Berg (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072) 或 Tn5 neo (Southern 和 Berg (1982) *Mol. Appl. Genet.* 1:327), 可以选择具有稳定整合的 DNA 的细胞。可以将选择标记基因连接到待表达的 DNA 基因序列上,或者通过共转染导入相同的细胞中(Wigler 等人(1979) *Cell* 16:77)。第二类载体利用对染色体外质粒赋予自主复制能力的 DNA 元件。这些载体可以源自动物病毒,诸如牛乳头瘤病毒(Sarver 等人(1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:7147)、多瘤病毒(Deans 等人(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1292) 或 SV40 病毒(Lusky 和 Botchan (1981) *Nature* 293:79)。

[0092] 表达载体可以以适合于核酸的后续表达的方式引入细胞内。引入方法在很大程度上由下文讨论的靶向的细胞类型指定。示例性方法包括 CaPO₄ 沉淀、脂质体融合、lipofectin、电穿孔、病毒感染、葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、原生质体融合和直接显微注射。

[0093] 用于表达双特异性抗体的合适宿主细胞包括酵母、细菌、昆虫、植物和哺乳动物细胞。特别有价值的是细菌例如大肠杆菌(*E. coli*), 真菌例如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 和巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*), 昆虫细胞例如 SF9, 哺乳动物细胞系(例如人细胞系), 以及原代细胞系例如(原代哺乳动物细胞)。

[0094] 在一些实施方案中,双特异性抗体可以在转基因动物(例如转基因哺乳动物)中表达且由其纯化。例如,结合 C5a 和 C5b 的双特异性抗体可以在转基因非人哺乳动物(例如啮齿类动物、绵羊或山羊)中产生且从乳中分离,如在例如 Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13 (6):625-629;van Kuik-Romeijn 等人(2000) *Transgenic Res* 9 (2):155-159;和 Pollock 等人(1999) *J Immunol Methods* 231 (1-2):147-157 中描述的。

[0095] 本文所述的双特异性抗体可以通过下述由细胞产生:在足以允许蛋白质表达的条件和时间量下,培养由含有编码抗体的核酸的表达载体转化的宿主细胞。用于蛋白质表达的此种条件将随着表达载体和宿主细胞的选择而改变,并且将由本领域技术人员通过常规实验容易地确定。例如,在大肠杆菌中表达的抗体可以由内含体重折叠(参见,例如,Hou 等人(1998) *Cytokine* 10:319-30)。细菌表达系统和关于其使用的方法是本领域众所周知的(参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, and *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* - 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001))。密码子、合适的表达载体和合适的宿主细胞的选择将依赖于许多因素而改变,并且可以根据需要容易地最佳化。本文所述的双特异性抗体可以在哺乳动物细胞或其它表达系统中表达,包括但不限于酵母、杆状病毒和体外表达系统(参见,例如, Kaszubska 等人(2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220)。

[0096] 在表达后,可以分离双特异性抗体。当应用于本文所述的任何蛋白质(例如双特异性抗体)时,术语“纯化的”或“分离的”指多肽,其已与天然伴随其的组分(例如蛋白质或其它天然存在的生物学或有机分子)分离或由其纯化,例如在表达蛋白质的原核生物中的其它蛋白质、脂质和核酸。一般地,当多肽构成样品中总蛋白质的按重量计至少 60(例如至少 65、70、75、80、85、90、92、95、97 或 99) % 时,它是纯化的。

[0097] 双特异性抗体可以以本领域技术人员已知的多种方法进行分离或纯化,这取决于样品中存在的何种其它组分。标准纯化法包括电泳、分子、免疫学和层析技术,包括离子交换、疏水、亲和和反相 HPLC 层析。例如,结合 C5a 和 C5aR 的双特异性抗体可以使用标准抗体柱或例如 A 蛋白或 G 蛋白柱进行纯化。与蛋白质浓缩结合的超滤和渗滤技术也是有用的。参见,例如,Scopes (1994) “Protein Purification, 第 3 版,” Springer-Verlag, New York City, New York。所需纯化程度将取决于所需用途而改变。在一些情况下,将不需要其表达的抗体的纯化。

[0098] 用于测定纯化的抗体的得率或纯度的方法是本领域已知的,并且包括例如 Bradford 测定、UV 光谱学、双缩脲(Biuret)蛋白质测定、Lowry 蛋白质测定、酰胺黑蛋白质测定、高压液相层析(HPLC)、质谱分析法(MS)和凝胶电泳法(例如使用蛋白质染料例如考马斯蓝或胶体银染料)。

[0099] 在一些实施方案中,内毒素可以从双特异性抗体制剂中去除。用于从蛋白质样品中去除内毒素的方法是本领域已知的且在工作实施例中例示。例如,内毒素可以使用多种商购可得的试剂从蛋白质样品中去除,所述试剂包括但不限于 ProteoSpin™ Endotoxin Removal Kits (Norgen Biotek Corporation)、Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel (Thermo Scientific;Pierce Protein Research Products)、MiraCLEAN® Endotoxin Removal Kit (Mirus)或 Acrodisc™ - Mustang® E 膜(Pall Corporation)。

[0100] 用于检测和 / 或测量样品中存在的内毒素的量(在纯化前和后)的方法是本

领域已知的,并且商业试剂盒是可获得的。例如,使用 QCL-1000 Chromogenic 试剂盒 (BioWhittaker),基于鲎变形细胞溶解物(LAL)的试剂盒例如 Pyrotell®、Pyrotell®-T、Pyrochrome®、Chromo-LAL,和可从 Associates of Cape Cod Incorporated 获得的 CSE 试剂盒,可以测定蛋白质样品中内毒素的浓度。

[0101] 双特异性抗体的修饰

在其表达和纯化后双特异性抗体可以进行修饰。修饰可以是共价或非共价修饰。此种修饰可以通过例如使多肽的靶向的氨基酸残基与有机衍生剂反应而引入双特异性抗体内,所述有机衍生剂能够与所选侧链或末端残基反应。用于修饰的合适位点可以使用多种标准中的任何一种加以选择,包括例如双特异性抗体的结构分析或氨基酸序列分析。

[0102] 在一些实施方案中,双特异性抗体可以与异源部分缀合。异源部分可以是例如异源多肽,治疗剂(例如毒素或药物),或可检测标记,例如但不限于放射性标记、酶促标记、荧光标记或发光标记。合适的异源多肽包括例如用于在纯化抗体中使用的抗原标签(例如 FLAG、聚组氨酸、血凝素(HA)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或麦芽糖结合蛋白(MBP))。异源多肽还包括作为诊断或可检测标记有用的多肽,例如萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。当异源部分是多肽时,该部分可以掺入本文所述的双特异性抗体内作为融合蛋白。

[0103] 合适的放射性标记包括例如 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 和 ^3H 。合适的荧光标记包括但不限于荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、绿色荧光蛋白(GFP)、DyLight 488、藻红蛋白(PE)、碘化丙啶(PI)、PerCP、PE-Alexa Fluor® 700、Cy5、别藻蓝蛋白和 Cy7。发光标记包括例如多种发光镧系元素(例如铈或铽)螯合物中的任何一种。例如,合适的铈螯合物包括二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)的铈螯合物。酶促标记包括例如碱性磷酸酶、CAT、萤光素酶和辣根过氧化物酶。

[0104] 2种蛋白质(例如双特异性抗体和异源部分)可以使用许多已知化学交联剂中的任何一种进行交联。此种交联剂的例子是经由包括“受阻”二硫键的键合使2个氨基酸残基相连的那些。在这些键合中,在交联单位内的二硫键被保护(通过在二硫键任一侧上的阻碍基团)免于通过例如还原型谷胱甘肽或二硫化物还原酶的作用的还原。一种合适的试剂4-琥珀酰亚胺氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶二硫基)甲苯(SMPT),形成在2种蛋白质之间的此种键合,其中利用在蛋白质之一上的末端赖氨酸和在另一上的末端半胱氨酸。还可以使用通过在每种蛋白质上的不同偶联部分交联的异双功能试剂。其它有用的交联剂包括但不限于这样的试剂,其连接2个氨基(例如N-5-叠氨基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺)、2个巯基(例如1,4-双-马来酰亚胺丁烷)、氨基和巯基(例如m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、氨基和羧基(例如4-[对叠氨基水杨酰氨基]丁胺)、以及氨基和精氨酸的侧链中存在的胍基(例如对叠氮苯基乙二醛一水合物)。

[0105] 在一些实施方案中,放射性标记可以与双特异性抗体的氨基酸主链直接缀合。可替代地,可以包括放射性标记作为更大分子的部分(例如结合游离氨基以形成相关蛋白质的间碘苯基(mIP)衍生物的间- ^{125}I 碘苯基-N-羟基琥珀酰亚胺(^{125}I mIPNHS)中的 ^{125}I (参见,例如,Rogers等人(1997).*J. Nucl. Med.* 38:1221-1229)或本身又结合蛋白质主链的螯合物(例如DOTA或DTPA)。使放射性标记或含有其的更大分子/螯合物与本文所述的双特异性抗体缀合的方法是本领域已知的。此种方法涉及在促进放射性标记或螯合物与蛋

白质结合的条件下(例如 pH、盐浓度和 / 或温度),使蛋白质与放射性标记温育(参见,例如,美国专利号 6,001,329)。

[0106] 用于使荧光标记(有时称为“荧光团”)与蛋白质(例如双特异性抗体)缀合的方法是蛋白质化学领域已知的。例如,荧光团可以与蛋白质的游离氨基(例如赖氨酸的)或巯基(例如半胱氨酸)缀合,其中使用与荧光团附着的琥珀酰亚胺(NHS)酯或四氟苯基(TFP)酯部分。在一些实施方案中,荧光团可以与异双功能的交联剂部分例如磺基-SMCC 缀合。合适的缀合方法涉及在促进荧光团与蛋白质结合的条件下,使双特异性抗体蛋白质与荧光团温育。参见,例如, Welch 和 Redvanly (2003) “Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications,” John Wiley and Sons (ISBN 0471495603)。

[0107] 在一些实施方案中,双特异性抗体可以例如用部分进行修饰,所述部分改善抗体在循环例如血液、血清或其它组织中的稳定化和 / 或保留。例如,双特异性抗体可以如在例如 Lee 等人(1999) *Bioconjug. Chem* 10 (6):973-8; Kinstler 等人(2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485; 和 Roberts 等人(2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476 中所述加入聚乙二醇。所述稳定化部分可以使抗体的稳定性或保留提高至少 1.5 (例如,至少 2、5、10、15、20、25、30、40 或 50 或更多) 倍。

[0108] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以是糖基化的。在一些实施方案中,可以对本文所述的双特异性抗体实施酶促或化学处理,或由细胞产生,从而使得抗体具有减少或不存在的糖基化。用于产生具有减少的糖基化的抗体的方法是本领域已知的,并且在例如美国专利号 6,933,368; Wright 等人(1991) *EMBO J* 10 (10):2717-2723; 和 Co 等人(1993) *Mol Immunol* 30:1361 中描述。

[0109] 药物组合物

可以将含有本文所述的双特异性抗体的组合物配制成药物组合物,例如,用于施用给受试者用于治疗或预防补体相关障碍。所述药物组合物将通常包括药学上可接受的载体。如本文使用的,“药学上可接受的载体”表示且包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。所述组合物可以包含药学上可接受的盐,例如,酸加成盐或碱加成盐(参见例如, Berge 等人(1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19)。

[0110] 所述组合物可以按标准方法配制。药物配制是本领域非常确定的技术,且进一步描述在例如, Gennaro (2000) “Remington: The Science and Practice of Pharmacy,” 第 20 版, Lippincott, Williams & Wilkins (ISBN:0683306472); Ansel 等人(1999) “Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,” 第 7 版, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (ISBN:0683305727); 和 Kibbe (2000) “Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association,” 第 3 版 (ISBN: 091733096X) 中。在一些实施方案中,可以将组合物配制成例如适当浓度且适合在 2-8°C (例如 4°C) 储存的缓冲的溶液。在一些实施方案中,可以将组合物配制成在低于 0°C 的温度(例如, -20°C 或 -80°C) 储存。在一些实施方案中,可以将组合物配制成在 2-8°C (例如 4°C) 储存最高达 2 年(例如 1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、7 个月、8 个月、9 个月、10 个月、11 个月、1 年、1½ 年或 2 年)。因此,在一些实施方案中,本文所述的组合物在 2-8°C (例如 4°C) 至少 1 年的储存中是稳定的。

[0111] 所述药物组合物可以是多种形式。这些形式包括,例如,液体、半固体及固体剂型,诸如液体溶液(如注射液和输注液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选形式部分地取决于预期的施用模式和治疗应用。例如,预期用于全身性或局部递送的含有双特异性抗体的组合物可以是注射液或输注液的形式。因此,所述组合物可以配制成用于通过肠胃外模式施用(如静脉内、皮下、腹膜内、或肌内注射)。本文使用的“肠胃外施用”、“肠胃外地施用”和其它语法上等价的短语表示除了肠和局部施用以外的施用模式,通常经注射,且包括但不限于:静脉内的、鼻内的、眼内的、肺的、肌内的、动脉内的、鞘内的、囊内的、眶内的、心内的、真皮内的、肺内的、腹膜内的、经气管的、皮下的、表皮下的、关节内的、囊下的、蛛网膜下的、脊柱内的、硬膜外的、大脑内的、颅内的、颈动脉内的和胸骨内的注射和输注(参见下文)。

[0112] 可以将组合物配制成溶液、微乳、分散体、脂质体或其它适合在高浓度稳定储存的有序结构。可以如下制备无菌注射液:通过将需要量的本文所述的抗体,与所需的一种上文所列的成分或其组合一起,掺入合适的溶剂中,然后过滤除菌。通常,如下制备分散体:将本文所述抗体掺入无菌载体中,所述载体含有基础的分散介质和来自上文所列那些的所需的其它成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,它们产生来自其先前过滤除菌的溶液的本文所述抗体加上任何另外所需成分(参见下文)的粉末。可以维持溶液的正确流动性,例如,通过利用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散体的情况下维持所需的粒度,和通过利用表面活性剂。通过在组合物中包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸盐和明胶,可以实现注射组合物的延长的吸收。

[0113] 在某些实施方案中,可以与将保护该化合物免于快速释放的载体一起制备本文所述的抗体,诸如控释制剂包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用生物可降解的生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此种制剂的多种方法是本领域已知的。参见,例如, J. R. Robinson (1978) “Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,” Marcel Dekker, Inc., New York。

[0114] 在一些实施方案中,可以将本文所述的抗体配制在适合肺内施用(例如,通过喷雾器施用)给诸如人的哺乳动物的组合物中。用于制备此种组合物的方法是本领域众所周知的,且描述在例如美国专利申请公开号 20080202513 ;美国专利号 7,112,341 和 6,019,968 ;和 PCT 公开号 WO 00/061178 和 WO 06/122257 中,它们各自的公开内容整体引入本文作为参考。干粉吸入剂制剂和用于施用所述制剂的合适系统描述在例如美国专利申请公开号 20070235029、PCT 公开号 WO 00/69887 和美国专利号 5,997,848 中。

[0115] 可以将编码抗体的核酸掺入要用作基因疗法规程的一部分的基因构建体中,以递送可以用于在细胞内表达和生产试剂的核酸(参见下文)。可以在任何治疗上有效的载体中施用这种组分的表达构建体,所述载体例如能在体内有效地给细胞递送组分基因的任何制剂或组合物。所述方法包括将主题基因插入病毒载体中,包括重组逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、慢病毒和单纯疱疹病毒-1 (HSV-1)或重组细菌或真核质粒。病毒载体可以直接转染细胞;在例如,阳离子脂质体(lipofectin)或衍生的(例如,抗体缀合的)、聚赖氨酸缀合物、短杆菌肽 S、人工病毒包膜或其它这样的细胞内载体的辅助下,可以递送质粒 DNA,以及在体内进行直接注射基因构建体或 CaPO_4 沉淀(参见,例如, W004/060407)(也参见下面的“先体外后体内方法”)。合适的逆转录病毒的实例包括本领域技术人员已知的 pLJ、pZIP、

pWE 和 pEM (参见,例如,Eglitis 等人(1985)*Science* 230:1395-1398 ;Danos 和 Mulligan (1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464 ;Wilson 等人(1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018 ;Armentano 等人(1990)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145 ;Huber 等人(1991)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043 ;Ferry 等人(1991)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381 ;Chowdhury 等人(1991)*Science* 254:1802-1805 ;van Beusechem 等人(1992)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644 ;Kay 等人(1992)*Human Gene Therapy* 3:641-647 ;Dai 等人(1992)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895 ;Hwu 等人(1993)*J. Immunol.* 150:4104-4115 ;美国专利号 4,868,116 和 4,980,286 ;PCT 公开号 W089/07136、W089/02468、W089/05345 和 W092/07573)。另一个病毒基因递送系统利用腺病毒-衍生的载体(参见,例如,Berkner 等人(1988)*BioTechniques* 6:616 ;Rosenfeld 等人(1991)*Science* 252:431-434 ;和 Rosenfeld 等人(1992)*Cell* 68:143-155)。从腺病毒株 Ad 5 型 d1324 或其它腺病毒株(例如,Ad2、Ad3、Ad7 等)衍生出的合适的腺病毒载体是本领域技术人员已知的。可用于递送主题基因的另一个病毒载体系统是腺伴随病毒(AAV)。参见,例如,Flotte 等人(1992)*Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356 ;Samulski 等人(1989)*J. Virol.* 63:3822-3828 ;和 McLaughlin 等人(1989)*J. Virol* 62:1963-1973。

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以与一种或多种用于治疗或预防受试者中的补体相关障碍(例如,AP 相关障碍或 CP 相关障碍)的另外的活性剂一起配制。用于治疗受试者中的补体相关障碍的另外试剂将取决于待治疗的具体障碍而改变,但可以包括但不限于抗高血压药(例如血管紧张肽转变酶抑制剂)[用于治疗例如 HELLP 综合征中使用]、抗凝血剂、皮质类固醇(例如强的松)或免疫抑制剂(例如长春新碱或环孢菌素 A)。抗凝血剂的实例包括,例如,华法林(华法林钠)、肝素、苯茚二酮、磺达肝素(fondaparinux)、依达肝素(idraparinux)和凝血酶抑制剂(例如,阿加曲班、来匹卢定、比伐卢定或达比加群(dabigatran))。本文所述的双特异性抗体还可以与用于治疗补体相关障碍的纤维蛋白溶解剂(例如,安克洛酶、 ϵ -氨基己酸、抗纤溶酶 α_1 、前列环素和去纤苷)一起配制。在一些实施方案中,双特异性抗体可以与脂质降低试剂例如羟甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶的抑制剂一起配制。在一些实施方案中,双特异性抗体可以与诸如利妥希玛(Rituxan[™];Biogen Idec, Cambridge, MA)的抗-CD20 剂一起配制或与其一起使用。在一些实施方案中,例如对于 RA 的治疗,双特异性抗体可以与英夫单抗(Remicade[®];Centocor, Inc.)和氨甲蝶呤(Rheumatrex[®], Trexall[®])中的一种或两种一起配制。在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以与非类固醇抗炎药(NSAID)一起配制。许多不同 NSAIDS 是可获得的,一些非处方药包括布洛芬(Advil[®], Motrin[®], Nuprin[®])和萘普生(Alleve[®]),并且许多其它可通过处方获得,包括美洛昔康(Mobic[®])、依托度酸(Lodine[®])、萘丁美酮(Relafen[®])、舒林酸(Clinoril[®])、tolementin (Tolectin[®])、水杨酸胆碱镁(Trilasate[®])、双氯芬酸钠(Cataflam[®], Voltaren[®], Arthrotec[®])、二氟尼柳(Diflusal) (Dolobid[®])、吲哚美辛(Indocin[®])、酮洛芬(Orudis[®], Oruvail[®])、奥沙普嗪(Daypro[®])和吡罗昔康(Feldene[®])。在一些实施方案中,双特异性抗体可以与抗高血压药、抗癫痫发作剂(例如硫酸镁)或抗凝剂一起配制用于使用。抗高血压药包括例如拉贝洛尔、肼屈嗪、硝苯地平、钙通道拮抗剂、硝酸甘油或硝普钠。(参见,例如,Mihu 等人(2007)*J Gastrointest Liver Dis* 16

(4):419-424.) 抗凝剂包括例如肝素、抗凝血酶、前列环素或低剂量阿司匹林。

[0117] 在一些实施方案中,本文所述的双特异性抗体可以配制用于施用给人,连同静脉内的丙种球蛋白疗法(IVIG)、血浆去除术、血浆置换或血浆交换一起。在一些实施方案中,双特异性抗体可以配制用于在肾移植之前、过程中或之后使用。

[0118] 当双特异性抗体要与第二种活性剂组合使用时,所述试剂可以单独地或一起配制。例如,可以混合各自的药物组合物,例如,恰好在施用之前,并一起施用,或可以分别施用,例如,在同时或不同时(参见下文)。

[0119] 如上所述,可以这样配制组合物,从而使得它包括治疗有效量的本文所述的双特异性抗体。在一些实施方案中,可以将组合物配制成包括亚治疗量的双特异性抗体和亚治疗量的一种或多种另外的活性剂,从而使得组分整个地对于治疗或预防补体相关障碍(例如旁路补体途径相关补体障碍或经典补体途径相关障碍)是治疗上有效的。在一些实施方案中,可以将组合物配制成包括例如依照本公开内容的结合 C5aR 和 C5a 的第一种双特异性抗体以及结合 C5b 和 C5a 的第二种双特异性抗体,各自处于亚治疗剂量,从而使得抗体整个地在对于治疗补体相关障碍是治疗上有效的浓度。用于测定试剂例如治疗用抗体的治疗上有效剂量的方法是本领域已知的,且在本文中描述。

[0120] 用于治疗的方法

上述的组合物(例如,任一种本文所述的双特异性抗体或其药物组合物)可以尤其用于治疗或预防受试者的多种补体相关障碍(例如,AP- 相关的障碍或 CP- 相关的障碍)的方法中。使用多种方法(其部分地取决于施用途径),可以将所述组合物施用给受试者,例如,人受试者。所述途径可以是,例如,静脉内注射或输注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜内(IP)、肺内、眼内或肌内注射。

[0121] 通过例如局部输注、注射或借助于植入物,可以实现施用。所述植入物可以是有孔的、无孔的或胶状的材料,包括膜,诸如硅橡胶(silastic)膜或纤维。所述植入物可以构造成向受试者持续或定期释放组合物(参见,例如,美国专利申请公开号 20080241223 ;美国专利号 5,501,856 ;4,863,457 ;和 3,710,795 ;EP488401 ;和 EP 430539,它们各自的公开内容整体引入本文作为参考)。借助于可植入设备,可以将组合物递送给受试者,所述可植入设备基于例如扩散的、可侵蚀的或对流系统,例如,渗透泵、可生物降解的植入物、电扩散系统、电渗系统、蒸汽压泵、电解泵、泡腾泵、压电泵、基于侵蚀的系统或电机系统。

[0122] 本文所述的双特异性抗体的适当剂量(该剂量能治疗或预防受试者的补体相关障碍)可以取决于多种因素,包括,例如,要治疗的受试者的年龄、性别和体重,和使用的具体抑制剂化合物。例如,与治疗相同受试者所需的结合 C5a 和 C5aR1 的抗体的剂量相比,治疗具有 RA 的受试者可能需要不同剂量的结合 C5a 和 C5b 的抗体。影响施用给受试者的剂量的其它因素包括,例如,补体相关障碍的类型或严重程度。例如,与具有 AMD 的受试者相比,具有 RA 的受试者可能需要施用不同剂量的结合 C5a 和 C5b 的抗体。其它因素可以包括,例如,并发地或以前影响受试者的其它医学障碍、受试者的一般健康、受试者的遗传倾向、饮食、施用时间、排泄速率、药物组合、和给受试者施用的任何其它额外治疗剂。还应当理解,任何特定受试者的具体剂量和治疗方案将取决于治疗医学从业人员(例如,医生或护士)的判断。

[0123] 本文所述的抗体可以作为固定剂量施用,或以毫克/千克(mg/kg)剂量施用。在一

些实施方案中,也可以选择剂量,以减少或避免针对组合物中的一种或多种活性抗体的抗体或其它宿主免疫应答的产生。尽管绝非有意进行限制,但抗体的示例性剂量包括,例如, 1-100 $\mu\text{g/kg}$ 、0.5-50 $\mu\text{g/kg}$ 、0.1-100 $\mu\text{g/kg}$ 、0.5-25 $\mu\text{g/kg}$ 、1-20 $\mu\text{g/kg}$ 和 1-10 $\mu\text{g/kg}$ 、1-100 mg/kg 、0.5-50 mg/kg 、0.1-100 mg/kg 、0.5-25 mg/kg 、1-20 mg/kg 和 1-10 mg/kg 。本文所述的抗体的示例性剂量包括但不限于: 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 、1.0 $\mu\text{g/kg}$ 、2.0 $\mu\text{g/kg}$ 、4 $\mu\text{g/kg}$ 和 8 $\mu\text{g/kg}$ 、0.1 mg/kg 、0.5 mg/kg 、1.0 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4 mg/kg 和 8 mg/kg 。

[0124] 药物组合物可以包含治疗有效量的本文所述的抗体。本领域普通技术人员部分地基于施用的抗体的作用、或所述抗体和一种或多种另外的活性剂(如果使用超过一种试剂的话)的组合作用,可以容易地确定这样的有效量。本文所述的抗体的治疗有效量也可以根据诸如下述因素而变化: 个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及所述抗体(和一种或多种另外的活性剂)在该个体体内引起所需的反应的能力,例如改善至少一个状况参数,例如改善补体相关障碍的至少一种症状。例如,治疗有效量的结合 C5a 和 C5b 的抗体可以抑制(减轻其严重程度或消除其发生)和 / 或预防本领域已知的或本文所述的特定障碍和 / 或特定障碍的任一种症状。治疗有效量也是治疗有益效果超过该组合物的任何有毒或有害作用的量。

[0125] 在例如 I 期剂量逐步上升研究中,可以进一步评价任何本文所述的双特异性抗体的合适的人剂量。参见,例如, van Gurp 等人(2008) *Am J Transplantation* 8 (8):1711-1718; Hanouska 等人(2007) *Clin Cancer Res* 13 (2, part 1):523-531 和 Hetherington 等人(2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10):3499-3500。

[0126] 本文使用的术语“治疗有效量”或“治疗有效剂量”或类似的术语意在表示将引起所需的生物学或医学应答(例如,补体相关障碍的一种或多种症状的改善)的试剂的量。在一些实施方案中,本文所述的组合物含有治疗有效量的抗体,所述抗体特异性结合 C5a 和 C5b。在一些实施方案中,本文所述的组合物含有治疗有效量的抗体,所述抗体特异性结合 C5a 和 C5aR1。在一些实施方案中,本文所述的组合物含有治疗有效量的抗体,所述抗体特异性结合 C5b 和 C5aR。在一些实施方案中,本文所述的组合物含有治疗有效量的抗体,所述抗体特异性结合: (i) C5a 或关于 C5a 的细胞受体,和 (ii) TCC 的组分或中间体,包括例如 C5b-6、C5b-7、C5b-8 或 C5b-9。在一些实施方案中,所述组合物含有任一种本文所述的抗体和一种或多种(例如,3、4、5、6、7、8、9、10 或 11 或更多种)其它治疗剂,从而使得组合物作为整体是治疗上有效的。例如,组合物可以含有本文所述的双特异性抗体和一种免疫抑制剂,其中所述抗体和试剂各自处于当组合时可以在治疗上有效地治疗或预防受试者的补体相关障碍的浓度。

[0127] 通过已知的药学程序,在细胞培养物或实验动物(例如,任一种本文所述的补体相关障碍的动物模型)中,可以测定此种组合物的毒性和疗效。这些程序可以用于例如测定 LD_{50} (使群体的 50% 致死的剂量) 和 ED_{50} (在群体的 50% 中治疗有效的剂量)。毒性效应和治疗效果的之间的剂量比是治疗指数,且它可以表示为 $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$ 之比。优选表现出高治疗指数的双特异性抗体(例如,结合 C5a 和 C5b 的抗体、结合 C5a 和 C5aR 的抗体、结合 C5b 和 C5aR 的抗体、结合 C5a 和 TCC 的组分或中间体的抗体)。虽然可以使用表现出毒副作用的组合物,但应该注意设计将此种化合物靶向受累组织的部位的递送系统,且使对正常细胞的

潜在损害最小化,从而减小副作用。

[0128] 从细胞培养物测定和动物研究获得的数据,可以用来制订用于人类的剂量范围。此种抗体的剂量通常在所述双特异性抗体的循环浓度范围内,包括具有很小毒性或无毒性的 ED_{50} 。所述剂量可以在该范围内变动,这取决于所用的剂型和所用的施用途径。对于本文所述(例如,用于治疗或预防补体相关障碍)使用的双特异性抗体,最初可以从细胞培养物测定来估计治疗有效剂量。可以在动物模型中制订剂量,以获得循环血浆浓度范围,其包括在细胞培养物中测定的 IC_{50} (即达到症状的半数最大抑制的测试化合物浓度)。此种信息可以用来更准确地确定在人类中有用的剂量。例如通过高效液相层析或通过 ELISA,可以测量在血浆中的水平。

[0129] 在一些实施方案中,所述方法可以与补体相关障碍的其它治疗联合进行。例如,可以在血浆去除术、IVIG 疗法、血浆置换或血浆交换的同时、之前或之后,将所述组合物施用给受试者。参见,例如,Appel 等人(2005)*J Am. Soc Nephrol.* 16:1392-1404。在一些实施方案中,不与 IVIG 联合施用本文所述的双特异性抗体。在一些实施方案中,在肾移植的同时、之前或之后,将所述组合物施用给受试者。

[0130] 本文使用的“受试者”可以是任何哺乳动物。例如,受试者可以是人、非人灵长类动物(例如,猴、狒狒或黑猩猩)、马、牛、猪、绵羊、山羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠或小鼠。在一些实施方案中,受试者是婴儿(例如,人婴儿)。

[0131] 本文使用的“需要预防”、“需要治疗”或“有此需要”的受试者表示这样的受试者,按照适当的医学从业人员(例如,在人的情况下,医生、护士或开业护士;在非人哺乳动物的情况下,兽医)的判断,其会适当从给定的治疗获益(诸如使用组合物治疗,所述组合物包含结合 C5a 和 C5b 的抗体、结合 C5a 和 C5aR 的抗体、或结合 C5b 和 C5aR 的抗体)。

[0132] 如上所述,本文所述的双特异性抗体可以用于治疗多种补体相关障碍,例如,AP- 相关的障碍和 / 或 CP- 相关的障碍。这样的障碍包括但不限于:类风湿性关节炎(RA);抗磷脂抗体综合征;狼疮肾炎;哮喘;缺血再灌注损伤;非典型溶血性尿毒性综合征(aHUS);典型或传染性溶血性尿毒性综合征(tHUS);致密沉积物病(DDD);阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH);视神经脊髓炎(NMO);多病灶的运动神经病(MMN);多发性硬化(MS);Degos 氏病;黄斑变性(例如,年龄相关性黄斑变性(AMD));溶血、肝酶升高和低血小板(HELLP)综合征;血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP);自发性胎儿丢失;微量免疫血管炎;大疱性表皮松解症;复发性胎儿丢失;和外伤性脑损伤(参见,例如,Holers (2008)*Immunological Reviews*223:300-316 和 Holers 和 Thurman (2004)*Molecular Immunology*41:147-152.)。在一些实施方案中,所述补体相关障碍是补体 - 相关的血管障碍例如但不限于心血管障碍、心肌炎、脑血管障碍、外周(例如,肌肉骨骼)血管障碍、肾血管障碍、肠系膜 / 肠血管障碍、对于移植和 / 或再植的血管重建、血管炎、过敏性紫癜肾炎、全身性红斑狼疮 - 相关的血管炎、与类风湿性关节炎有关的血管炎、免疫复合物血管炎、Takayasu 氏病、扩张型心肌病、糖尿病性血管病、Kawasaki 氏病(动脉炎)、静脉气泡栓塞(VGE)和在支架放置、旋转动脉粥样硬化斑切除术和经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)之后的再狭窄(参见,例如,美国专利申请公开号 20070172483.)。其它补体相关障碍包括但不限于:MG、CAD、皮炎、Graves 氏病、动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病、Guillain-Barré 综合征、移植物排斥(例如移植排斥,例如肾、肝、心脏、骨髓或皮肤移植排斥)、全身性炎症应答脓毒病、脓毒性休克、脊髓损伤、肾小

球肾炎、Hashimoto 氏甲状腺炎、I 型糖尿病、银屑病、天疱疮、AIHA、ITP、Goodpasture 综合征、抗磷脂综合征 (APS) 和灾变性 APS (CAPS)。

[0133] 本文使用的“处于发展补体相关障碍危险中”(例如, AP- 相关的障碍或 CP- 相关的障碍)的受试者是这样的受试者,其具有一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、或8或更多个)发展所述障碍的危险因素。危险因素依赖于具体补体相关障碍而变化,但是是医学领域众所周知的。例如,发展 DDD 的危险因素包括,例如,发展所述状况的素因,即所述状况的家族史,或发展所述状况的遗传素因,例如,编码补体因子 H (CFH)、补体因子 H- 相关的 5 (CFHR5) 和 / 或补体成分 C3 (C3) 的基因中的一个或多个突变。这样的 DDD- 相关突变以及用于测定受试者是否携带一个或多个突变的方法是本领域已知的,且描述在例如 Licht 等人(2006) *Kidney Int.* 70:42-50 ;Zipfel 等人(2006) “The role of complement in membranoproliferative glomerulonephritis,” 见: *Complement and Kidney Disease*, Springer, Berlin, pages 199-221 ;Ault 等人(1997) *J Biol. Chem.* 272:25168-75 ;Abrera-Abeleda 等人(2006) *J Med. Genet* 43:582-589 ;Poznansky 等人(1989) *J Immunol.* 143:1254-1258 ;Jansen 等人(1998) *Kidney Int.* 53:331-349 ;和 Hegasy 等人(2002) *Am J Pathol* 161:2027-2034。因而,处于发展 DDD 危险中的人可以是,例如,在编码 CFH 的基因中具有一个或多个 DDD- 相关突变的人,或具有发展该疾病的家族史的人。

[0134] TTP 的危险因素是医学领域众所周知的,且包括,例如,发展所述状况的素因,即所述状况的家族史,或发展所述状况的遗传素因,例如, ADAMTS13 基因中的一个或多个突变。与 TTP 有关的 ADAMTS13 突变详细地综述在,例如, Levy 等人(2001) *Nature* 413:488-494 ;Kokame 等人(2004) *Semin. Hematol.* 41:34-40 ;Licht 等人(2004) *Kidney Int.* 66:955-958 ;和 Noris 等人(2005) *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:1177-1183。TTP 的危险因素也包括已知促成 TTP 或 TTP 复发的那些状况或试剂,例如,但不限于,癌症、细菌感染(例如,巴尔通氏体属物种 (*Bartonella sp.*) 感染)、病毒感染(例如, HIV 和卡波西肉瘤病毒)、妊娠或外科手术。参见,例如, Avery 等人(1998) *American Journal of Hematology* 58:148-149 和 Tsai, 同上)。TTP 或 TTP 复发还已经与某些治疗剂(药物)的使用相关联,包括,例如,噻氯匹定、FK506、皮质类固醇、他莫昔芬或环孢菌素 A (参见,例如, Gordon 等人(1997) *Seminars in Hematology* 34 (2):140-147)。在下文中, TTP 的此种表现在适当时称作例如“感染 - 相关的 TTP”、“妊娠 - 相关的 TTP”或“药物 - 相关的 TTP”。因而,处于发展 TTP 危险中的人可以是,例如,在 ADAMTS13 基因中具有一个或多个 TTP- 相关突变的人。处于发展 TTP 复发形式危险中的人可以是,例如,已经具有 TTP 和具有感染、正在妊娠、或正在接受外科手术的人。

[0135] aHUS 的危险因素是医学领域众所周知的,且包括,例如,发展所述状况的素因,即所述状况的家族史,或发展所述状况的遗传素因,例如,补体因子 H (CFH)、膜辅因子蛋白 (MCP ;CD46)、C4b- 结合蛋白、补体因子 B (CFB) 或补体因子 I (CFI) 中的一个或多个突变(参见,例如, Warwicker 等人(1998) *Kidney Int.* 53:836-844 ;Richards 等人(2001) *Am J Hum Genet* 68:485-490 ;Caprioli 等人(2001) *Am Soc Nephrol* 12:297-307 ;Neuman 等人(2003) *J Med Genet* 40:676-681 ;Richards 等人(2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12966-12971 ;Fremaux-Bacchi 等人(2005) *J Am Soc Nephrol* 17:2017-2025 ;Esparza-Gordillo 等人(2005) *Hum Mol Genet* 14:703-712 ;Goicoechea de Jorge 等人

(2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (1):240-245 ;Blom 等人(2008) *J Immunol.* 180 (9):6385-91 ;和Fremaux-Bacchi 等人(2004) *J Medical Genet* 41:e84)(也参见Kavanagh 等人(2006) 同上)。危险因素也包括,例如,肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*) 感染、妊娠、癌症、暴露于抗癌剂(例如,奎宁、丝裂霉素 C、顺铂或博来霉素)、暴露于免疫治疗剂(例如,环孢菌素、OKT3 或干扰素)、暴露于抗血小板剂(例如,噻氯匹定或氯吡格雷)、HIV 感染、移植、自身免疫病和合并的甲基丙二酸尿和同型胱氨酸尿症(cb1C)。参见,例如,Constantinescu 等人(2004) *Am J Kidney Dis* 43:976-982 ;George (2003) *Curr Opin Hematol* 10:339-344 ;Gottschall 等人(1994) *Am J Hematol* 47:283-289 ;Valavaara 等人(1985) *Cancer* 55:47-50 ;Miralbell 等人(1996) *J Clin Oncol* 14:579-585 ;Dragon-Durey 等人(2005) *J Am Soc Nephrol* 16:555-63 ; 和 Becker 等人(2004) *Clin Infect Dis* 39:S267-S275。

[0136] HELLP 的危险因素是医学领域众所周知的,且包括,例如,多胎产妊娠、超过 25 岁的母亲年龄、高加索人种、在先前妊娠中发生先兆子痫或 HELLP 和差妊娠结局史(参见,例如,Sahin 等人(2001) *Nagoya Med J* 44 (3):145-152 ;Sullivan 等人(1994) *Am J Obstet Gynecol* 171:940-943 ;和 Padden 等人(1999) *Am Fam Physician* 60 (3):829-836.)。例如,在第一次妊娠期间发展先兆子痫的妊娠的高加索妇女可能是在第二次妊娠期间或之后处于发展 HELLP 综合征的危险中的人。

[0137] CAD 的危险因素是医学领域众所周知的,且包括,例如,已知促成 CAD 或 CAD 复发的状况或试剂,例如,但不限于,肿瘤或感染(例如,细菌和病毒感染)。已知与 CAD 的发展有关的状况包括,例如,HIV 感染(和 AIDS)、丙型肝炎感染、肺炎枝原体(*Mycoplasma pneumonia*) 感染、EB 病毒(EBV) 感染、巨细胞病毒(CMV) 感染、风疹或传染性单核细胞增多症。与 CAD 有关的肿瘤包括但不限于:非何杰金淋巴瘤。在下文中,CAD 的这些表现在适当时可以称作例如“感染-相关的 CAD”或“肿瘤-相关的 CAD”。因而,处于发展 CAD 危险中的人可以是,例如,具有 HIV 感染、风疹或淋巴瘤的人。也参见,例如,Gertz(2006) *Hematology* 1:19-23 ;Horwitz 等人(1977) *Blood* 50:195-202 ;Finland 和 Barnes (1958) *AMA Arch Intern Med* 191:462-466 ;Wang 等人(2004) *Acta Paediatr Taiwan* 45:293-295 ;Michaux 等人(1998) *Ann Hematol* 76:201-204 ;和 Chang 等人(2004) *Cancer Genet Cytogenet* 152:66-69。

[0138] MG 的危险因素是医学领域众所周知的,且包括,例如,发展所述状况的素因,即所述状况的家族史,或发展诸如家族性 MG 的状况的遗传素因。例如,一些 HLA 类型与增加的发展 MG 的危险有关。MG 的危险因素包括摄入或暴露于某些诱发 MG 的药物,例如,但不限于,D- 青霉胺。参见,例如,Drosos 等人(1993) *Clin Exp Rheumatol.* 11 (4):387-91 和 Kaeser 等人(1984) *Acta Neurol Scand Suppl.* 100:39-47。由于 MG 可以是偶发的,所以以前已经经历一种或多种具有 MG 的症状的受试者可能处于复发危险中。因而,处于发展 MG 危险中的人可以是,例如,具有 MG 家族史的人,和 / 或已经摄入或被施用诱发 MG 的药物(诸如 D- 青霉胺)的人。

[0139] 本文使用的“处于发展 CAPS 危险中”的受试者是具有一个或多个(例如,2、3、4、5、6、7、或 8 或更多个)发展所述障碍的危险因素的受试者。大约 60% 的 CAPS 发病率之前存在诸如感染的促成事件。因而, CAPS 的危险因素包括已知促成 CAPS 的那些状况,例如,但

不限于,某些癌症(例如,胃癌、卵巢癌、淋巴瘤、白血病、子宫内膜癌、腺癌和肺癌)、妊娠、产褥期、移植、原发性 APS、类风湿性关节炎(RA)、全身性红斑狼疮(SLE)、外科手术(例如,眼外科手术)和某些感染。感染包括,例如,细小病毒 B19 感染和丙型肝炎感染。在下文中, CAPS 的此种表现可以称作例如,“癌症-相关的 CAPS”、“移植-相关的 CAPS”、“RA-相关的 CAPS”、“感染-相关的 CAPS”或“SLE-相关的 CAPS”。参见,例如, Soltész 等人(2000) *Haematologia (Budep)* 30 (4):303-311; Ideguchi 等人(2007) *Lupus* 16 (1):59-64; Manner 等人(2008) *Am J Med. Sci.* 335 (5):394-7; Miesbach 等人(2006) *Autoimmune Rev.* 6 (2):94-7; Gómez-Puerta 等人(2006) *Autoimmune Rev.* 6 (2):85-8; Gómez-Puerta 等人(2006) *Semin. Arthritis Rheum.* 35 (5):322-32; Kasamon 等人(2005) *Haematologia* 90 (3):50-53; Atherson 等人(1998) *Medicine* 77 (3):195-207; 和 Canpolat 等人(2008) *Clin Pediatr* 47 (6):593-7。因而,处于发展 CAPS 危险中的人可以是,例如,具有原发性 CAPS 和 / 或已知与 CAPS 有关的癌症的人。

[0140] 从上文显然可以看出,“处于发展补体相关障碍危险中”(例如, AP- 相关的障碍或 CP- 相关的障碍)的受试者不是在目的物种中的所有受试者。

[0141] “怀疑具有补体相关障碍”(例如,旁路补体途径-相关的障碍)的受试者是具有所述疾病的一种或多种(例如,2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 或更多种)症状的受试者。这些障碍的症状将依赖于具体障碍而变化,但是是医学领域技术人员已知的。例如,DDD 的症状包括,例如:血尿和蛋白尿中的一种或两种;急性肾炎综合征;玻璃疣发展和 / 或视力缺损;获得性部分脂肪营养不良和其并发症;和血清 C3 肾炎因子(C3NeF),一种针对 C3bBb 的自身抗体,旁路补体途径的 C3 转化酶的存在(参见,例如, Appel 等人(2005),同上)。aHUS 的症状包括,例如,严重高血压、蛋白尿、尿毒症、嗜睡 / 疲劳、应激性、血小板减少症、微血管病性溶血性贫血和肾功能损害(例如,急性肾衰竭)。TTP 的症状包括,例如,微血栓、血小板减少症、发热、低 ADAMTS13 金属蛋白酶表达或活性、波动性中枢神经系统异常、肾衰竭、微血管病性溶血性贫血、擦伤、紫癜、恶心和呕吐(例如,由胃肠道缺血或中枢神经系统累及产生)、由心脏缺血导致的胸痛、癫痫发作和肌肉和关节痛。RA 的症状可以包括,例如,僵硬、肿胀、疲劳、贫血、体重减轻、发热和经常的致残性(crippling)痛。类风湿性关节炎的一些常见的症状包括:在醒来时持续一个小时或更长时间的关节僵硬;在特定手指或腕关节处的肿胀;在关节周围的软组织中的肿胀;以及在关节双侧的肿胀。可能伴有或没有疼痛地发生膨胀,并可以逐渐恶化,或在进展之前保持数年不变。HELLP 的症状是医学领域已知的,且包括,例如,不适、上腹部痛、恶心、呕吐、头痛、右上部疼痛、高血压、蛋白尿、视力模糊、胃肠道出血、低血糖、感觉异常、肝酶升高 / 肝损伤、贫血(溶血性贫血)、和低血小板计数,它们中的任一种与妊娠或近期妊娠相组合(参见,例如, Tomsen (1995) *Am J Obstet Gynecol* 172:1876-1890; Sibai (1986) *Am J Obstet Gynecol* 162:311-316; 和 Padden (1999),同上)。PNH 的症状包括例如溶血性贫血(减少数目的红细胞)、血红蛋白尿(在睡眠后特别显而易见的在尿中血红蛋白的存在)和血红蛋白血症(hemoglobinemia)(在血流中血红蛋白的存在)。已知受 PNH 折磨的受试者具有阵发性,其在本文中定义为深色尿、吞咽困难、疲劳、勃起功能障碍、血栓形成和复发性腹痛的发病率。

[0142] CAPS 的症状是医学领域众所周知的,且包括,例如,多个小血管闭塞的组织病理学证据;抗磷脂抗体的存在(通常是在高滴度)、血管形成血栓、严重的多器官功能障碍、恶性

高血压、急性呼吸窘迫综合症、弥散性血管内凝血、微血管病性溶血性贫血、裂红细胞和血小板减少症。CAPS 可与 APS 差别在于,具有 CAPS 的患者通常呈现严重的多器官功能障碍或衰竭,其特征在于快速的弥散性小血管缺血和主要影响实质器官的血栓形成。相反,APS 与单一静脉或动脉的中到大血管闭塞有关。MG 的症状包括,例如,易疲劳性和和一定范围的肌无力相关的状况,包括:上睑下垂(一只或两只眼)、复视、不稳定步态、抑郁或变形的面部表情、和咀嚼、说话或吞咽困难。在一些情况下,受试者可以呈现部分或完全的呼吸肌麻痹。CAD 的症状包括,例如,疼痛、发热、苍白、贫血、向肢体的血流量减少(例如,伴有坏疽)和肾脏疾病或急性肾衰竭。在一些实施方案中,在暴露于寒冷温度后可能出现所述症状。

[0143] 从上文显然可以看出,“怀疑具有补体相关障碍”的受试者不是在目的物种内的所有受试者。

[0144] 在一些实施方案中,方法可以包括鉴定受试者为具有补体相关障碍、怀疑具有补体相关障碍或处于发展补体相关障碍危险中的受试者。适用于鉴定受试者的方法是本领域已知的。例如,适用于测定人受试者是否在 CFH、CFHR5 或 C3 基因中具有 DDD- 相关突变的方法(例如,测序技术或使用微阵列)描述在,例如, Licht 等人(2006) *Kidney Int.* 70:42-50; Zipfel 等人(2006), 同上; Ault 等人(1997) *J Biol. Chem.* 272:25168-75; Abrera-Abeleda 等人(2006) *J Med Genet* 43:582-589; Poznansky 等人(1989) *J Immunol.* 143:1254-1258; Jansen 等人(1998) *Kidney Int.* 53:331-349; 和 Hegasy 等人(2002) *Am J Pathol* 161:2027-2034。用于检测特征性 DDD- 相关的电子致密沉积物的存在的方法也是本领域众所周知的。例如,医学从业人员可以从患者的肾获得组织活组织检查,并对该组织进行电子显微镜术检查。医学从业人员也可以使用抗 -C3 抗体通过免疫荧光检查组织,以检测 C3 的存在,和 / 或进行光学显微镜术检查,以确定是否存在膜性增生性肾小球肾炎。参见,例如, Walker 等人(2007) *Mod. Pathol.* 20:605-616 和 Habib 等人(1975) *Kidney Int.* 7:204-215。在一些实施方案中,将受试者鉴定为具有 DDD 的受试者可以包括,测定血液样品中 C3NeF 的存在。用于检测血液中 C3NeF 的存在的方法描述在,例如, Schwertz 等人(2001) *Pediatr Allergy Immunol.* 12:166-172。

[0145] 在一些实施方案中,医学从业人员可以测定受试者的血清中是否存在增加的补体活化。增加的补体活化的标记包括,例如,CH50 减少、C3 减少、和 C3dg/C3d 增加。参见,例如, Appel 等人(2005), 同上。在一些实施方案中,医学从业人员可以针对玻璃疣和 / 或诸如 AMD 的其它视力病理学的发展的证据,检查受试者的眼。例如,医学从业人员可以使用视黄醛功能测试,例如,但不限于,暗适应、视网膜电描记术和眼电描记术(参见,例如, Colville 等人(2003) *Am J Kidney Dis.* 42:E2-5)。

[0146] 将受试者鉴定为具有 TTP、怀疑具有 TTP 或处于发展 TTP 危险中的方法也是本领域已知的。例如, Miyata 等人描述了多个用于测量从受试者得到的生物样品中的 ADAMTS13 活性的测定(*Curr Opin Hematol* (2007) 14 (3):277-283)。合适的 ADAMTS13 活性测定以及人受试者中的 ADAMTS13 活性的表型正常范围描述在,例如, Tsai (2003) *J. Am. Soc. Nephrol* 14:1072-1081; Furlan 等人(1998) *New Engl J Med.* 339:1578-1584; Matsumoto 等人(2004) *Blood* 103:1305-1310; 和 Mori 等人(2002) *Transfusion* 42:572-580。用于检测 ADAMTS13 的抑制剂(例如,结合 ADAMTS13 的自身抗体)在从受试者得到的生物样品中的存在的方法是本领域已知的。例如,可以使来自患者的血清样品与来自没有 TTP 的受试者

的血清样品相混合,以检测抗-ADAMTS13 抗体的存在。在另一个实例中,可以从患者血清分离免疫球蛋白蛋白,并用于体外 ADAMTS13 活性测定中,以测定是否存在抗-ADAMTS13 抗体。参见,例如,Dong 等人(2008)*Am J Hematol*. 83 (10):815-817。在一些实施方案中,通过评估患者是否携带在 ADAMTS13 基因中的一个或多个突变,可以测定发展 TTP 的风险。适用于检测 ADAMTS13 基因中的突变的方法(例如,核酸阵列或 DNA 测序)是本领域已知的,且描述在例如 Levy 等人,同上;Kokame 等人,同上;Licht 等人,同上;和 Noris 等人,同上。

[0147] 另外,将受试者鉴定为具有 aHUS、怀疑具有 aHUS 或处于发展 aHUS 危险中的方法是本领域已知的。例如,可以进行实验室测试,以测定人受试者是否具有血小板减少症、微血管病性溶血性贫血或急性肾机能不全。通过下述一种或多种,医学专业人员可以诊断出血小板减少症:(i) 血小板计数小于 150,000/mm³ (例如,小于 60,000/mm³);(ii) 血小板存活时间减少,这反映了循环中增加的血小板破坏;和(iii) 在外周涂片中观察到巨血小板,这与血小板生成的继发活化相一致。通过下述一种或多种,医学专业人员可以诊断出微血管病性溶血性贫血:(i) 血红蛋白浓度小于 10 mg/dL (例如,小于 6.5 mg/dL);(ii) 增加的血清乳酸脱氢酶(LDH) 浓度(>460 U/L);(iii) 高胆红素血、网状细胞增多、循环游离血红蛋白和低或不可检出的触珠蛋白浓度;和(iv) 在外周涂片以及阴性 Coombs 试验中检测到具有盔细胞或盔状细胞的典型方面的断裂的红细胞(裂红细胞)(参见,例如,Kaplan 等人(1992) “Hemolytic Uremic Syndrome and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura,” Informa Health Care (ISBN 0824786637) 和 Zipfel (2005) “Complement and Kidney Disease,” Springer (ISBN 3764371668).)。

[0148] 通过评价 C3 和 C4 的血液浓度,作为补体活化或调节异常的度量,也可以将受试者鉴定为具有 aHUS。另外,从前面的公开内容显然可以看出,通过将受试者鉴定为携带在与 aHUS 有关的基因(诸如 CFI、CFB、CFH 或 MCP) 中的一个或多个突变,可以将受试者鉴定为具有遗传性 aHUS (同上)。适用于检测基因中的突变的方法包括,例如, DNA 测序和核酸阵列技术(参见,例如, Breslin 等人(2006) *Clin Am Soc Nephrol* 1:88-99 和 Goicoechea de Jorge 等人(2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:240-245.)

用于将受试者诊断为具有 RA、怀疑具有 RA 或处于发展 RA 危险中的方法也是医学领域已知的。例如,医学从业人员可以检查手、腕、脚和膝的小关节,以鉴定对称分布的炎症。从业人员也可以进行许多测试,以排除其它类型的关节炎,包括由感染或痛风造成的关节炎。另外,类风湿性关节炎与累及的患者的血液循环中的异常抗体有关。例如,称作“类风湿因子”的抗体存在于大约 80% 的患者中。在另一个实例中,抗-瓜氨酸抗体存在于许多具有类风湿性关节炎的患者中,且因而当评价具有不可解释的关节炎的患者时,它用于诊断类风湿性关节炎。参见,例如, van Venrooij 等人(2008) *Ann NY Acad Sci* 1143:268-285 和 Habib 等人(2007) *Immunol Invest* 37 (8):849-857。另一种称作“抗核抗体”(ANA) 的抗体也常见于具有类风湿性关节炎的患者中。参见,例如, Benucci 等人(2008) *Clin Rheumatol* 27 (1):91-95; Julkunen 等人(2005) *Scan J Rheumatol* 34 (2):122-124; 和 Miyawaki 等人(2005) *J Rheumatol* 32 (8):1488-1494。

[0149] 医学从业人员也可以检查红细胞沉降速率,以辅助诊断受试者的 RA。沉降速率可以用作关节炎的粗度量,且通常在疾病突发(flare) 期间更快,且在缓和过程中更慢。可以用于测量在身体中存在的炎症的程度的另一种血液测试是 C- 反应蛋白。

[0150] 此外,关节 x-射线也可以用于诊断受试者为具有类风湿性关节炎。随着 RA 进展,x-射线可以显示出关节中的类风湿性关节炎的典型骨质侵蚀。关节 x-射线也可以辅助监控随时间过去的疾病进展和关节损害。骨扫描(一种放射性测试程序)可以证实炎症关节。

[0151] 将受试者鉴定为具有 HELLP、怀疑具有 HELLP 或处于发展 HELLP 危险中的方法是医学领域已知的。HELLP 综合征的标志症状包括溶血,肝酶升高和低血小板计数。因而,可以对来自受试者的血液进行多种测试,以测定溶血水平、多种肝酶中的任一种的浓度、和血液中的血小板水平。例如,裂红细胞的存在和 / 或升高的游离血红蛋白、胆红素或血清 LDH 水平是血管内溶血的指示。常规实验室测试可以用于测定血小板计数以及血液的肝酶水平,所述肝酶例如,但不限于,谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)。适用于将受试者鉴定为具有 HELLP 综合征的方法也描述在,例如, Sibai 等人(1993),同上;Martin 等人(1990),同上;Padden (1999),同上;和 Gleicher 和 Buttino (1998)“Principles & Practice of Medical Therapy in Pregnancy,”第 3 版,Appleton & Lange (ISBN 083857677X)。

[0152] 用于将受试者鉴定为具有 PNH、怀疑具有 PNH、或处于发展 PNH 危险中的方法是医学领域已知的。溶血的实验室评价正常包括血液学、血清学和尿测试。血液学测试包括关于红细胞(RBC)形态异常的血涂片检查、和在全血中网织红细胞计数的测量(以测定关于 RBC 丢失的骨髓补偿)。血清学测试包括乳酸脱氢酶(LDH;广泛执行的)和游离血红蛋白(并非广泛执行的)作为溶血的直接量度。在不存在其它器官中的组织损害的情况下,LDH 水平可以用于具有溶血的患者的诊断和监控中。其它血清学测试包括胆红素或触珠蛋白,分别作为分解产物或清除保存的量度。尿测试包括胆红素、血铁黄素和游离血红蛋白,并且一般用于测量溶血的总严重程度和用于区分溶血的血管内与血管外病因学比较,而不是溶血的常规监控。进一步地,一般执行 RBC 数目、RBC 血红蛋白和血细胞比容,以测定任何伴随贫血的程度。

[0153] 适用于鉴定受试者为具有 MG 的方法可以是定性的或定量的。例如,医学从业人员可以使用体检来检查受试者的运动功能的状态。其它定性测试包括,例如,冰袋测试,其中将冰袋施用于受试者的眼(在眼睛 MG 的情况下),以确定冷是否会改善一种或多种症状(例如,上睑下垂)(参见,例如, Sethi 等人(1987)*Neurology*37 (8):1383-1385)。其它测试包括,例如,“睡眠测试”,它是基于在休息后 MG 症状有改善的倾向。在一些实施方案中,医学从业人员可以采用定量或半定量测试,以确定受试者是否具有 MG、怀疑具有 MG 或处于发展 MG 危险中。例如,医学从业人员可以进行测试,以检测在从受试者得到的血清样品中的 MG- 相关的自身抗体的存在或量。MG- 相关的自身抗体包括,例如,结合和调节乙酰胆碱受体(AChR)、肌肉-特异性的受体酪氨酸激酶(MuSK)和 / 或纹蛋白(striational protein)的活性的抗体(参见,例如,Conti-Fine 等人(2006),同上)。适用于检测生物样品中 MG- 相关的抗体的存在或量的试验是本领域已知的,且描述在例如 Hoch 等人(2001)*Nat Med* 7:365-368;Vincent 等人(2004)*Semin Neurol.* 24:125-133;McConville 等人(2004)*Ann. Neurol.* 55:580-584;Boneva 等人(2006)*J Neuroimmunol.* 177:119-131;和 Romi 等人(2005)*Arch Neurol.* 62:442-446。

[0154] 用于诊断 MG 的其它方法包括,例如,电诊断测试(例如,单纤维肌电图学)和腾喜龙(Tensilon)(或滕喜隆)测试,其包括给受试者注射乙酰胆碱酯酶抑制剂滕喜隆,并监控受试者的一种或多种症状的改善。参见,例如, Pascuzzi (2003)*Semin*

Neurol 23 (1):83-88 ;Katirji 等人(2002)*Neurol Clin* 20:557-586 ;和“Guidelines in Electrodiagnostic Medicine. American Association of Electrodiagnostic Medicine,” *Muscle Nerve* 15:229-253。

[0155] 使用测定以检测结合红细胞上的 I 抗原的凝集自身抗体的存在或量(滴度), 可以将受试者鉴定为具有 CAD。抗体可以是单克隆的(例如, 单克隆 IgM 或 IgA) 或多克隆的。适用于检测这些抗体的方法描述在, 例如, Christenson 和 Dacie (1957)*Br J Haematol* 3:153-164 和 Christenson 等人(1957)*Br J Haematol* 3:262-275。使用全部血细胞计数(CBC)、尿分析、生化研究和 Coombs 测试中的一种或多种来测试血液的溶血, 也可以将受试者诊断为具有 CAD。例如, 生化研究可以用于检测升高的乳糖酶脱氢酶水平、升高的未缀合的胆红素水平、低触珠蛋白水平和 / 或游离血浆血红蛋白的存在, 它们都可以指示急性溶血。可以用于检测 CAD 的其它测试包括, 检测血清中的补体水平。例如, 由于溶血的急性期过程中的消耗, 测得的 CAD 中的血浆补体水平(例如, C2、C3 和 C4) 降低。

[0156] 不同于 aHUS, 经常通过腹泻(经常在性质上是带血的, 源自产生志贺菌毒素的微生物的感染)的前驱症状, 可以鉴定出典型的(或传染性的)HUS。当在个体的粪便中检测到志贺菌毒素和 / 或针对志贺菌毒素的血清抗体或 LPS 时, 可以将受试者鉴定为具有典型 HUS。适用于检验抗-志贺菌毒素抗体或 LPS 的方法是本领域已知的。例如, 用于检测人类中的结合志贺菌毒素 Stx1 和 Stx2 或 LPS 的抗体的方法描述在, 例如, Ludwig 等人(2001)*J Clin Microbiol* 39 (6):2272-2279。

[0157] 在一些实施方案中, 可以将本文所述的双特异性抗体施用给受试者, 作为单一疗法。或者, 如上所述, 可以将所述抗体施用给受试者, 作为与另一种治疗(例如, DDD、TTP、aHUS、PNH、RA、HELLP、MG、CAD、CAPS、tHUS 或本领域已知或本文所述的任何其它补体相关障碍的另一种治疗)的联合治疗。例如, 联合治疗可以包括给受试者(例如, 人患者)施用一种或多种其它试剂(例如, 抗凝血剂、抗高血压药或皮质类固醇), 其为具有 DDD 或处于发展 DDD 的危险中的受试者提供治疗益处。在一些实施方案中, 所述联合治疗可以包括给受试者(例如, 人患者)施用双特异性抗体和免疫抑制剂诸如 Remicade®, 用于治疗 RA。在一些实施方案中, 双特异性抗体和一种或多种另外的活性剂同时施用。在其它实施方案中, 双特异性抗体在时间上首先施用, 且一种或多种另外的活性剂在时间上其次施用。在一些实施方案中, 一种或多种另外的活性剂时间上首先施用, 且双特异性抗体在时间上其次施用。

[0158] 本文所述的双特异性抗体可以替代或增进以前或当前施用的疗法。例如, 在用结合 C5a 和 C5b 的抗体治疗时, 一种或多种另外的活性剂的施用可以停止或减少, 例如, 在更低的水平施用。在一些实施方案中, 可以维持先前治疗的施用。在一些实施方案中, 先前治疗将维持至双特异性抗体的水平达到足以提供治疗效果的水平。2 种治疗可以联合施用。

[0159] 监控受试者(例如, 人患者)中本文定义的补体相关障碍的改善, 是指评价受试者的疾病参数的变化, 例如, 疾病的一种或多种症状的改善。这样的症状包括本领域已知和 / 或本文所述的补体相关障碍的任一种症状。在一些实施方案中, 在施用后进行评价至少 1 小时, 例如, 至少 2、4、6、8、12、24 或 48 小时或至少 1 天、2 天、4 天、10 天、13 天、20 天或更久或至少 1 周、2 周、4 周、10 周、13 周、20 周或更久。可以在下述时间段中的一个或多个中, 评价受试者: 在开始治疗之前; 在治疗过程中; 或在已经施用一种或多种治疗部分之后。评价可以包括, 评价对进一步治疗的需求, 例如, 评价剂量、施用频率、或治疗持续时间是否应

当改变。还可以包括,评价添加或放弃选择的治疗模式的需求,例如,添加或放弃任一种本文所述的补体相关障碍的任何治疗。

[0160] 先体外后体内方法。用于治疗或预防补体相关障碍(例如,AP- 相关的障碍或CP- 相关的障碍)的先体外后体内策略可以包括,用编码本文所述的双特异性抗体的多核苷酸转染或转导从受试者得到的一个或多个细胞。例如,可以用编码结合 C5a 和 C5b 的抗体的重链和轻链的单个载体转染细胞,或可以用编码抗体的重链的第一种载体和编码抗体的轻链的第二种载体转染细胞。

[0161] 然后使转染的或转导的细胞返回受试者。所述细胞可以是多种类型中的任一种,包括,但不限于,造血细胞(例如,骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、T 细胞或 B 细胞)、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、角质形成细胞或肌细胞。这样的细胞可以充当双特异性抗体的来源(例如,持久的或定期的来源),只要它们在受试者中存活。在一些实施方案中,所述载体和 / 或细胞可以构造成用于双特异性抗体的诱导型或阻遏型表达(参见,例如, Schockett 等人(1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93 :5173-5176 和美国专利号 7,056,897)。

[0162] 优选地,从受试者得到细胞(自体的),但是可能从除受试者以外的相同物种的受试者得到(同种异基因的)。

[0163] 适用于从受试者得到细胞、并转导或转染细胞的方法是分子生物学领域已知的。例如,通过用于先体外后体内基因疗法的任何标准方法,包括磷酸钙、脂转染、电穿孔、病毒感染(参见上文)和生物射弹基因转移,可以完成转导步骤(参见,例如, Sambrook 等人(同上)和 Ausubel 等人(1992) “Current Protocols in Molecular Biology,” Greene Publishing Associates.)。或者,可以使用脂质体或聚合的微粒。可以选择已经成功地转导的细胞,例如,用于表达编码序列或抗药基因。

[0164] 试剂盒

本公开内容也表征了制品或试剂盒,其包括:具有标签的容器;和含有一种或多种双特异性抗体的组合物。例如,所述试剂盒可以含有本文所述的任何双特异性抗体中的一种或多种。所述标签指示,所述组合物要施用给具有补体相关障碍(例如,AP- 或 CP- 相关的障碍)、怀疑具有补体相关障碍(例如,AP- 或 CP- 相关的障碍)或处于发展其的危险中的受试者(例如,人),所述补体相关障碍(例如,AP- 或 CP- 相关的障碍)例如但不限于 DDD、aHUS、TTP、HELLP、RA、PNH、AMD、tHUS、MG、CAD、CAPS 或本领域已知和 / 或本文所述的任何其它补体途径 - 相关的障碍。所述试剂盒可以任选地包括用于将组合物施用给受试者的装置。例如,所述试剂盒可以包括一个或多个注射器。

[0165] 在一些实施方案中,所述试剂盒可以另外包括一种或多种另外的活性剂,诸如本文所述那些中的任一种。例如,所述试剂盒可以包括一种或多种皮质类固醇、抗高血压药、免疫抑制剂和抗癫痫发作剂。

[0166] 下述实施例意在例证而不是限制本发明。

[0167] 实施例 1. 使用双特异性抗体治疗血栓形成性血小板减少性紫癜

医学从业人员将人患者鉴定为具有遗传形式的 TTP。每周 1 次,持续 4 周,通过静脉内输注给患者施用含有结合 C5a 和 C5b 的双特异性抗体的组合物。在初始治疗期间,患者和医学从业人员观察到 TTP 的至少 2 种已知症状的相当大改善。在最初 4 周治疗后 1 周,患

者每 2 周接受静脉内施用的“维持剂量”的抗体,直至医学从业人员确定 TTP 处于缓和中。

[0168] 实施例 2. 使用双特异性抗体治疗致密沉积物病

呈现 DDD 的人患者每 2 周静脉内施用含有结合 C5aR1 和 C5b 的双特异性抗体的组合物。在初始治疗期间,患者和医学从业人员观察到患者的 DDD 症状的总体严重程度中的相当大减少。患者维持在相同治疗方案上,直至医学从业人员确定 DDD 处于缓和中。

[0169] 实施例 3. 人 C5 对小鼠中人源化抗 C5 抗体的清除的作用

执行下述实验,以测定人 C5 对人源化新生 Fc 受体(hFcRn)的小鼠模型中人源化抗人 C5 抗体的清除的作用,所述小鼠模型缺乏内源 FcRn,并且对于 hFcRn 是转基因的(mFcRn^{-/-}/hFcRn^{+/+};Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)。人源化的 FcRn 模型已在例如 Petkova 等人(2006)*Int Immunology* 18 (12):1759-1769 和 Oiao 等人(2008)*Proc Natl Acad Sci USA* 105 (27):9337-9342 中描述。通过静脉内(i.v.)注射将在 200 μL 磷酸缓冲盐水(PBS)中的 100 μg 人源化抗 C5 抗体施用于八(8)只 hFcRn 转基因小鼠各自。在施用后第 1、3、7、14、21、28 和 35 天时,从各小鼠中收集血清。通过 ELISA 测量在血清中人源化抗体的浓度。简言之,用抗人 κ 轻链捕获抗体包被测定板,随后洗涤以去除未结合的捕获抗体。随后在允许人源化抗 C5 抗体(如果存在于血清中的话)结合捕获抗体的条件下,使板的孔与血清样品接触。使用可检测标记的抗人 IgG 抗体检测与每个孔结合的人源化抗体的相对量。

[0170] 使用 ELISA 测量和下述方程式计算在小鼠中抗体的半衰期(其中 T 是评价的时间, A₀ 是抗体的起始浓度,并且 A_t 是在时间 T 时测定的在血清中抗体的浓度)。

[0171] 半衰期(T_{1/2}) = T x [(ln 2) / ln (A₀/A_t)] (方程式 1)

实验的结果在图 1 中描述。在 hFcRn 小鼠模型中人源化抗 C5 抗体的半衰期是 12.56 ± 1.73 天。

[0172] 为了使用 hFcRn 模型测定人 C5 对人源化抗体的半衰期的作用,给小鼠施用在 250 μL PBS 中的下述之一:(i) 以抗体与人 C5 的 1:4 摩尔比复合的 50 μg 人源化抗体(6 只小鼠);(ii) 通过 i.v. 注射以抗体与人 C5 的 1:4 摩尔比复合的 50 μg 人源化抗体和另外 200 μg 人 C5 (在 200 μL PBS 中)(6 只小鼠);(iii) 以抗体与人 C5 的 1:2 摩尔比复合的 50 μg 人源化抗体(6 只小鼠);或(iv) 单独的 50 μg 人源化抗体(6 只小鼠)。如上所述,在施用后第 1、3、7、14、21、28 和 35 天时,从小鼠中收集血清,并且如上所述测定在每种条件下人源化抗体的半衰期。

[0173] 在这个实验中在不存在人 C5 的情况下人源化抗人 C5 抗体的半衰期测定为 13.49 ± 0.93 天。相比之下,与人 C5 以 1:2 比施用于小鼠的人源化抗体的半衰期测量为 9.58 ± 1.24 天。与人 C5 以 1:4 比施用于小鼠的人源化抗体的半衰期测定为 5.77 ± 1.86 天。人 C5 连同 1:4 抗体-C5 复合物对于小鼠的另外施用导致对于抗体 4.55 ± 1.02 天的半衰期。

[0174] 这些结果指出在这种小鼠模型中人源化抗 C5 抗体的清除受其抗原浓度极大影响。换言之,在这个模型中抗体的半衰期取决于非复合抗体的量。人 C5 是组成型表达的且以约 0.37 μM 的浓度存在于血清中。与 C5 不同,片段 C5a 和 C5b 以低得多的浓度存在于血液中,且经常局限于局部补体活化的特定区域。本文呈现的数据指示与 C5 相比较,更低浓度的片段 C5a 和 C5b 将有利于双特异性抗体(例如抗 C5a/C5b 抗体)在血液中超过抗 C5 抗体的更长半衰期,这是由于靶介导的抗体清除的贡献减少。数据还指示与抗 C5 抗体相比

较,抗 C5a/C5b 双特异性抗体的更低剂量和 / 或更低频率施用可以提供在具有补体相关障碍例如 PNH 或 aHUS 的人中 C5 的相同或更大抑制。

[0175] 实施例 4. 人源化抗 C5 抗体的清除的数学建模

实施例 3 证实超过抗体的 C5 过量的存在导致抗 C5 单克隆抗体的半衰期中的约 3 倍减少。表征靶(C5)介导的清除的简单数学建模得到开发且用于探究在这种作用后的潜在机制。调用患者中人源化抗体的基本清除途径的模型显示于图 2 中。游离抗体(A)及其抗原 C5 (C) 以其关联、复合形式处于平衡中。关于抗体和 C5 结合的速率常数由 k_3 表示,并且关于复合物解离的速率常数由 k_4 表示。抗体:C5 复合物(CA)可以通过具有由 k_6 表示的速率常数的免疫复合物清除来消除。游离抗体也如由不同速率常数 k_5 表示的消除。C5 由 k_1 的速率常数组成型表达,并且它由 k_2 的速率常数消除。

[0176] 该模型还基于一系列假定。首先,C5 合成的速率(速率常数 k_1)是恒定的,并且因此是零阶的,并且在过量抗体的存在下,游离 C5 经由速率常数 k_2 的清除是可忽略不计的,这是因为游离 C5 的浓度是可忽略不计的。另外,游离抗体的清除假定受一阶 β -消除控制。还假定的是因为抗体:C5 复合物不累积,所以 C5 的合成速率对于复合物消除的速率(经由速率常数 k_6)是限制性的。最后,该模型假定没有游离抗体由免疫复合物再循环。换言之,复合物是解离或消除的一假定免疫复合物介导的清除(速率常数 k_6)是不可逆的。

[0177] 基于这些假定,构建了抗体清除的简化途径(图 3)。如同图 2 中所述的途径,简化途径由抗体清除的 2 个模型组成:(i) 具有速率常数 k_8 的游离抗体清除和(ii) 具有速率常数 k_7 的免疫复合物清除。支配游离抗体清除的一阶方程式如下(其中 A 是在测量的时间 t 时抗体的浓度, A_0 是抗体的起始浓度,并且 t 是在测量 A 时的时间)。

$$[0178] \quad A = A_0 \times e^{(-k_8 t)} \quad (\text{方程式 2})$$

支配免疫复合物清除的零阶方程式由下述方程式表示。

$$[0179] \quad A = A_0 - k_7 t \quad (\text{方程式 3})$$

关于并发过程的综合速率方程式测定为

$$A = A_0 \times e^{(-k_8 t)} - k_7 t. \quad (\text{方程式 4})$$

假定 A_0 起始抗体浓度对于 150 kDa 抗体是 400 $\mu\text{g/mL}$ 或 2.67 μM 。人 C5 的生理学浓度对于 190 kDa 抗体是 0.37 μM 。一个抗体具有 2 个抗原结合部位,并且因此结合 2 个 C5 分子。当游离抗体的浓度是零时,获得突破点。参见,例如, Brodsky 等人(2008) *Blood* 111(4):1840-1847 和 Hillmen 等人(2004) *N Engl J Med* 350(6):552-559。

[0180] 因为 C5 是组成型表达的且以恒定浓度维持在血液中,所以 C5 蛋白质的合成速率等于其清除速率。在血液中人 C5 的半衰期是约 63 小时(参见,例如, Sissons 等人(1977) *J Clin Invest* 59:704-715)。因此,关于 C5 清除或产生的速率常数 k_7 是约 0.185 $\mu\text{M}/(63 \div 24) \text{天}^{-1}$ 或 0.07 $\mu\text{M天}^{-1}$ 。

[0181] 为了测定关于一阶抗体清除的速率常数 k_8 (方程式 2),在速率常数和半衰期之间的关系可以由下述方程式表示:

$$T_{1/2} = \ln 2 / k_8. \quad (\text{方程式 5})$$

假定在不存在 C5 的情况下抗 C5 单克隆抗体的半衰期与在 FcRn 小鼠中获得的值(12.56 天)相同(参见实施例 3)。因此,解答对于 k_8 的方程式 5, k_8 等于 $\ln 2 / T_{1/2}$ 或 $(0.693) / (12.56 \text{ 天})$ 或 0.055 天^{-1} 。免疫复合物清除对人源化抗 C5 抗体的半衰期的计算的影响在

表 1 中阐述。

[0182] 表 1.

抗体	时间 (天)	$A_0 \times e^{(-k_8t)}$	$-k_7t$	A
抗 -C5 Ab	0	2.67	0	2.67
	5	2.03	-0.35	1.68
	10	1.54	-0.7	0.84
	15	1.17	-1.05	0.12
	16	1.11	1.12	0

根据表 1, 突破点到 16 天时达到。换言之, 具有 12.56 天的半衰期的抗体水平通过 C5 介导的清除组分的作用到 16 天时减少至零, 而在理论上在没有靶 (C5) 介导的清除组分的作用的情况下, 这种抗体约 40% 的起始浓度将得到保持。事实上, 由上述模型预测的清除速率与在体内观察到的速率紧密重叠。基于上述模型和计算, 靶介导的清除 (免疫复合物清除) 对人中人源化抗体的半衰期的贡献是相当大的。这个模型以及体内数据强烈指示与 C5 相比较, 更低浓度的片段 C5a 和 C5b 将有利于双特异性抗体 (例如抗 C5a/C5b 抗体) 在血液中超过抗 C5 抗体的更长半衰期, 这是由于靶介导的抗体清除的贡献减少。因此, 与抗 C5 抗体相比较, 抗 C5a/C5b 双特异性抗体的更低剂量和 / 或更低频率施用可能提供在具有补体相关障碍的人中 C5 的相同或更大抑制。

[0183] 尽管已经参照其具体实施方案描述了本公开内容, 但本领域技术人员应当理解, 可以在不脱离本公开内容的真实精神和范围的情况下做出各种变化, 且可以替换等同方案。另外, 可以做出许多修饰, 以使特定情形、材料、物质组成、方法、一个或多个方法步骤适应本公开内容的主题、精神和范围。所有这样的修饰都意图被包括在本公开内容的范围内。

序列表

<110> Alexion Pharmaceuticals, Inc.

<120> 与补体蛋白质结合的双特异性抗体

<130> ALXN-149-W01

<140> To be determined

<141> Concurrently Herewith

<150> 61/219,644

<151> 2009-06-23

<150> 61/228,001

<151> 2009-07-23

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
1 5 10 15

Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
20 25 30

Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
35 40 45

Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
50 55 60

Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
65 70

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln
1 5 10 15

Arg Ala Ala Arg
20

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3

Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Arg

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4

Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

Val Asn Asn Asp Glu Thr

1	5
---	---

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 6

Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg

1	5
---	---

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln
1				5				10					15		

Arg Ala Ala

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8

Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln
1				5				10					15		

Arg Ala

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9

Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln
1				5				10					15		

Arg

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10

Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu	Gln
1				5				10					15		

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11

Cys	Cys	Tyr	Asp	Gly	Ala	Cys	Val	Asn	Asn	Asp	Glu	Thr	Cys	Glu
1				5				10					15	

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
1 5 10 15

Ala Ala Arg

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13

Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala
1 5 10 15

Ala Arg

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 14

Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg
1 5 10 15

Ala Ala Arg

<210> 15

<211> 655

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15

Gln Glu Gln Thr Tyr Val Ile Ser Ala Pro Lys Ile Phe Arg Val Gly
1 5 10 15

Ala Ser Glu Asn Ile Val Ile Gln Val Tyr Gly Tyr Thr Glu Ala Phe
20 25 30

Asp Ala Thr Ile Ser Ile Lys Ser Tyr Pro Asp Lys Lys Phe Ser Tyr
35 40 45

Ser Ser Gly His Val His Leu Ser Ser Glu Asn Lys Phe Gln Asn Ser
50 55 60

Ala Ile Leu Thr Ile Gln Pro Lys Gln Leu Pro Gly Gly Gln Asn Pro
65 70 75 80

Val Ser Tyr Val Tyr Leu Glu Val Val Ser Lys His Phe Ser Lys Ser
85 90 95

Lys Arg Met Pro Ile Thr Tyr Asp Asn Gly Phe Leu Phe Ile His Thr

100	105	110
Asp Lys Pro Val Tyr Thr Pro Asp Gln Ser Val Lys Val Arg Val Tyr		
115	120	125
Ser Leu Asn Asp Asp Leu Lys Pro Ala Lys Arg Glu Thr Val Leu Thr		
130	135	140
Phe Ile Asp Pro Glu Gly Ser Glu Val Asp Met Val Glu Glu Ile Asp		
145	150	155 160
His Ile Gly Ile Ile Ser Phe Pro Asp Phe Lys Ile Pro Ser Asn Pro		
165	170	175
Arg Tyr Gly Met Trp Thr Ile Lys Ala Lys Tyr Lys Glu Asp Phe Ser		
180	185	190
Thr Thr Gly Thr Ala Tyr Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro His		
195	200	205
Phe Ser Val Ser Ile Glu Pro Glu Tyr Asn Phe Ile Gly Tyr Lys Asn		
210	215	220
Phe Lys Asn Phe Glu Ile Thr Ile Lys Ala Arg Tyr Phe Tyr Asn Lys		
225	230	235 240
Val Val Thr Glu Ala Asp Val Tyr Ile Thr Phe Gly Ile Arg Glu Asp		
245	250	255

Leu Lys Asp Asp Gln Lys Glu Met Met Gln Thr Ala Met Gln Asn Thr
260 265 270

Met Leu Ile Asn Gly Ile Ala Gln Val Thr Phe Asp Ser Glu Thr Ala
275 280 285

Val Lys Glu Leu Ser Tyr Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Asn Asn Lys Tyr
290 295 300

Leu Tyr Ile Ala Val Thr Val Ile Glu Ser Thr Gly Gly Phe Ser Glu
305 310 315 320

Glu Ala Glu Ile Pro Gly Ile Lys Tyr Val Leu Ser Pro Tyr Lys Leu
325 330 335

Asn Leu Val Ala Thr Pro Leu Phe Leu Lys Pro Gly Ile Pro Tyr Pro
340 345 350

Ile Lys Val Gln Val Lys Asp Ser Leu Asp Gln Leu Val Gly Gly Val
355 360 365

Pro Val Ile Leu Asn Ala Gln Thr Ile Asp Val Asn Gln Glu Thr Ser
370 375 380

Asp Leu Asp Pro Ser Lys Ser Val Thr Arg Val Asp Asp Gly Val Ala
385 390 395 400

Ser Phe Val Leu Asn Leu Pro Ser Gly Val Thr Val Leu Glu Phe Asn
405 410 415

Val Lys Thr Asp Ala Pro Asp Leu Pro Glu Glu Asn Gln Ala Arg Glu
420 425 430

Gly Tyr Arg Ala Ile Ala Tyr Ser Ser Leu Ser Gln Ser Tyr Leu Tyr
435 440 445

Ile Asp Trp Thr Asp Asn His Lys Ala Leu Leu Val Gly Glu His Leu
450 455 460

Asn Ile Ile Val Thr Pro Lys Ser Pro Tyr Ile Asp Lys Ile Thr His
465 470 475 480

Tyr Asn Tyr Leu Ile Leu Ser Lys Gly Lys Ile Ile His Phe Gly Thr
485 490 495

Arg Glu Lys Phe Ser Asp Ala Ser Tyr Gln Ser Ile Asn Ile Pro Val
500 505 510

Thr Gln Asn Met Val Pro Ser Ser Arg Leu Leu Val Tyr Tyr Ile Val
515 520 525

Thr Gly Glu Gln Thr Ala Glu Leu Val Ser Asp Ser Val Trp Leu Asn
530 535 540

Ile Glu Glu Lys Cys Gly Asn Gln Leu Gln Val His Leu Ser Pro Asp
545 550 555 560

Ala Asp Ala Tyr Ser Pro Gly Gln Thr Val Ser Leu Asn Met Ala Thr
565 570 575

Gly Met Asp Ser Trp Val Ala Leu Ala Ala Val Asp Ser Ala Val Tyr
580 585 590

Gly Val Gln Arg Gly Ala Lys Lys Pro Leu Glu Arg Val Phe Gln Phe
595 600 605

Leu Glu Lys Ser Asp Leu Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Leu Asn Asn
610 615 620

Ala Asn Val Phe His Leu Ala Gly Leu Thr Phe Leu Thr Asn Ala Asn
625 630 635 640

Ala Asp Asp Ser Gln Glu Asn Asp Glu Pro Cys Lys Glu Ile Leu
645 650 655

<210> 16

<211> 925

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16

Leu His Met Lys Thr Leu Leu Pro Val Ser Lys Pro Glu Ile Arg Ser
1 5 10 15

Tyr Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Glu Val His Leu Val Pro Arg Arg
20 25 30

Lys Gln Leu Gln Phe Ala Leu Pro Asp Ser Leu Thr Thr Trp Glu Ile
35 40 45

Gln Gly Ile Gly Ile Ser Asn Thr Gly Ile Cys Val Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Ala Lys Val Phe Lys Asp Val Phe Leu Glu Met Asn Ile Pro Tyr
65 70 75 80

Ser Val Val Arg Gly Glu Gln Ile Gln Leu Lys Gly Thr Val Tyr Asn
85 90 95

Tyr Arg Thr Ser Gly Met Gln Phe Cys Val Lys Met Ser Ala Val Glu
100 105 110

Gly Ile Cys Thr Ser Glu Ser Pro Val Ile Asp His Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Ser Ser Lys Cys Val Arg Gln Lys Val Glu Gly Ser Ser Ser His Leu
130 135 140

Val Thr Phe Thr Val Leu Pro Leu Glu Ile Gly Leu His Asn Ile Asn
145 150 155 160

Phe Ser Leu Glu Thr Trp Phe Gly Lys Glu Ile Leu Val Lys Thr Leu
165 170 175

Arg Val Val Pro Glu Gly Val Lys Arg Glu Ser Tyr Ser Gly Val Thr
180 185 190

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Gly Thr Ile Ser Arg Arg Lys Glu Phe

195	200	205
Pro Tyr Arg Ile Pro Leu Asp Leu Val Pro Lys Thr Glu Ile Lys Arg		
210	215	220
Ile Leu Ser Val Lys Gly Leu Leu Val Gly Glu Ile Leu Ser Ala Val		
225	230	235 240
Leu Ser Gln Glu Gly Ile Asn Ile Leu Thr His Leu Pro Lys Gly Ser		
245	250	255
Ala Glu Ala Glu Leu Met Ser Val Val Pro Val Phe Tyr Val Phe His		
260	265	270
Tyr Leu Glu Thr Gly Asn His Trp Asn Ile Phe His Ser Asp Pro Leu		
275	280	285
Ile Glu Lys Gln Lys Leu Lys Lys Lys Leu Lys Glu Gly Met Leu Ser		
290	295	300
Ile Met Ser Tyr Arg Asn Ala Asp Tyr Ser Tyr Ser Val Trp Lys Gly		
305	310	315 320
Gly Ser Ala Ser Thr Trp Leu Thr Ala Phe Ala Leu Arg Val Leu Gly		
325	330	335
Gln Val Asn Lys Tyr Val Glu Gln Asn Gln Asn Ser Ile Cys Asn Ser		
340	345	350

Leu Leu Trp Leu Val Glu Asn Tyr Gln Leu Asp Asn Gly Ser Phe Lys
355 360 365

Glu Asn Ser Gln Tyr Gln Pro Ile Lys Leu Gln Gly Thr Leu Pro Val
370 375 380

Glu Ala Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Phe Thr Val Ile Gly
385 390 395 400

Ile Arg Lys Ala Phe Asp Ile Cys Pro Leu Val Lys Ile Asp Thr Ala
405 410 415

Leu Ile Lys Ala Asp Asn Phe Leu Leu Glu Asn Thr Leu Pro Ala Gln
420 425 430

Ser Thr Phe Thr Leu Ala Ile Ser Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Gly Asp
435 440 445

Lys Thr His Pro Gln Phe Arg Ser Ile Val Ser Ala Leu Lys Arg Glu
450 455 460

Ala Leu Val Lys Gly Asn Pro Pro Ile Tyr Arg Phe Trp Lys Asp Asn
465 470 475 480

Leu Gln His Lys Asp Ser Ser Val Pro Asn Thr Gly Thr Ala Arg Met
485 490 495

Val Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu Thr Ser Leu Asn Leu Lys Asp
500 505 510

Ile Asn Tyr Val Asn Pro Val Ile Lys Trp Leu Ser Glu Glu Gln Arg
515 520 525

Tyr Gly Gly Gly Phe Tyr Ser Thr Gln Asp Thr Ile Asn Ala Ile Glu
530 535 540

Gly Leu Thr Glu Tyr Ser Leu Leu Val Lys Gln Leu Arg Leu Ser Met
545 550 555 560

Asp Ile Asp Val Ser Tyr Lys His Lys Gly Ala Leu His Asn Tyr Lys
565 570 575

Met Thr Asp Lys Asn Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Leu Leu Asn
580 585 590

Asp Asp Leu Ile Val Ser Thr Gly Phe Gly Ser Gly Leu Ala Thr Val
595 600 605

His Val Thr Thr Val Val His Lys Thr Ser Thr Ser Glu Glu Val Cys
610 615 620

Ser Phe Tyr Leu Lys Ile Asp Thr Gln Asp Ile Glu Ala Ser His Tyr
625 630 635 640

Arg Gly Tyr Gly Asn Ser Asp Tyr Lys Arg Ile Val Ala Cys Ala Ser
645 650 655

Tyr Lys Pro Ser Arg Glu Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ser His Ala Val
660 665 670

Met Asp Ile Ser Leu Pro Thr Gly Ile Ser Ala Asn Glu Glu Asp Leu
675 680 685

Lys Ala Leu Val Glu Gly Val Asp Gln Leu Phe Thr Asp Tyr Gln Ile
690 695 700

Lys Asp Gly His Val Ile Leu Gln Leu Asn Ser Ile Pro Ser Ser Asp
705 710 715 720

Phe Leu Cys Val Arg Phe Arg Ile Phe Glu Leu Phe Glu Val Gly Phe
725 730 735

Leu Ser Pro Ala Thr Phe Thr Val Tyr Glu Tyr His Arg Pro Asp Lys
740 745 750

Gln Cys Thr Met Phe Tyr Ser Thr Ser Asn Ile Lys Ile Gln Lys Val
755 760 765

Cys Glu Gly Ala Ala Cys Lys Cys Val Glu Ala Asp Cys Gly Gln Met
770 775 780

Gln Glu Glu Leu Asp Leu Thr Ile Ser Ala Glu Thr Arg Lys Gln Thr
785 790 795 800

Ala Cys Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Ile Thr Ser
805 810 815

Ile Thr Val Glu Asn Val Phe Val Lys Tyr Lys Ala Thr Leu Leu Asp

820	825	830
Ile Tyr Lys Thr Gly Glu Ala Val Ala Glu Lys Asp Ser Glu Ile Thr		
835	840	845
Phe Ile Lys Lys Val Thr Cys Thr Asn Ala Glu Leu Val Lys Gly Arg		
850	855	860
Gln Tyr Leu Ile Met Gly Lys Glu Ala Leu Gln Ile Lys Tyr Asn Phe		
865	870	875 880
Ser Phe Arg Tyr Ile Tyr Pro Leu Asp Ser Leu Thr Trp Ile Glu Tyr		
885	890	895
Trp Pro Arg Asp Thr Thr Cys Ser Ser Cys Gln Ala Phe Leu Ala Asn		
900	905	910
Leu Asp Glu Phe Ala Glu Asp Ile Phe Leu Asn Gly Cys		
915	920	925
<210> 17		
<211> 350		
<212> PRT		
<213> 智人(Homo sapiens)		
<400> 17		
Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp		
1 5 10 15		

Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr
20 25 30

Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe
35 40 45

Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp Val Thr Ala Phe
50 55 60

Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val
65 70 75 80

Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile
85 90 95

Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu
100 105 110

Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala
115 120 125

Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys
130 135 140

Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala
145 150 155 160

Trp Gly Leu Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val
165 170 175

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
180 185 190

Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg Leu Val
195 200 205

Leu Gly Phe Leu Trp Pro Leu Leu Thr Leu Thr Ile Cys Tyr Thr Phe
210 215 220

Ile Leu Leu Arg Thr Trp Ser Arg Arg Ala Thr Arg Ser Thr Lys Thr
225 230 235 240

Leu Lys Val Val Val Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Phe Trp Leu
245 250 255

Pro Tyr Gln Val Thr Gly Ile Met Met Ser Phe Leu Glu Pro Ser Ser
260 265 270

Pro Thr Phe Leu Leu Leu Asn Lys Leu Asp Ser Leu Cys Val Ser Phe
275 280 285

Ala Tyr Ile Asn Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Val Val Ala Gly
290 295 300

Gln Gly Phe Gln Gly Arg Leu Arg Lys Ser Leu Pro Ser Leu Leu Arg
305 310 315 320

Asn Val Leu Thr Glu Glu Ser Val Val Arg Glu Ser Lys Ser Phe Thr
325 330 335

Arg Ser Thr Val Asp Thr Met Ala Gln Lys Thr Gln Ala Val
340 345 350

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18

Ser Ile Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser
1 5 10 15

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19

Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val
1 5 10 15

Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg
20 25 30

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20

Met Ser Phe Leu Glu Pro Ser Ser Pro Thr Phe Leu Leu Leu Asn Lys
1 5 10 15

Leu Asp Ser

<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21

Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr
20 25

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 22

Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro

1 5 10 15

Val Asp Lys Thr
20

<210> 23

<211> 337

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23

Met Gly Asn Asp Ser Val Ser Tyr Glu Tyr Gly Asp Tyr Ser Asp Leu
1 5 10 15

Ser Asp Arg Pro Val Asp Cys Leu Asp Gly Ala Cys Leu Ala Ile Asp
20 25 30

Pro Leu Arg Val Ala Pro Leu Pro Leu Tyr Ala Ala Ile Phe Leu Val
35 40 45

Gly Val Pro Gly Asn Ala Met Val Ala Trp Val Ala Gly Lys Val Ala
50 55 60

Arg Arg Arg Val Gly Ala Thr Trp Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp
65 70 75 80

Leu Leu Cys Cys Leu Ser Leu Pro Ile Leu Ala Val Pro Ile Ala Arg
85 90 95

Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg Ala Leu Pro Ser

100	105	110
Ile Ile Leu Leu Thr Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Leu Ala Ala Leu		
115	120	125
Ser Ala Asp Leu Cys Phe Leu Ala Leu Gly Pro Ala Trp Trp Ser Thr		
130	135	140
Val Gln Arg Ala Cys Gly Val Gln Val Ala Cys Gly Ala Ala Trp Thr		
145	150	155 160
Leu Ala Leu Leu Leu Thr Val Pro Ser Ala Ile Tyr Arg Arg Leu His		
165	170	175
Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val Asp Tyr Gly Gly		
180	185	190
Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg Phe Leu Phe Gly		
195	200	205
Phe Leu Gly Pro Leu Val Ala Val Ala Ser Cys His Ser Ala Leu Leu		
210	215	220
Cys Trp Ala Ala Arg Arg Cys Arg Pro Leu Gly Thr Ala Ile Val Val		
225	230	235 240
Gly Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr His Leu Leu Gly Leu Val Leu		
245	250	255

Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg Ala
260 265 270

Glu Pro Leu Ile Val Gly Leu Ala Leu Ala His Ser Cys Leu Asn Pro
275 280 285

Met Leu Phe Leu Tyr Phe Gly Arg Ala Gln Leu Arg Arg Ser Leu Pro
290 295 300

Ala Ala Cys His Trp Ala Leu Arg Glu Ser Gln Gly Gln Asp Glu Ser
305 310 315 320

Val Asp Ser Lys Lys Ser Thr Ser His Asp Leu Val Ser Glu Met Glu
325 330 335

Val

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24

Pro Ile Ala Arg Gly Gly His Trp Pro Tyr Gly Ala Val Gly Cys Arg
1 5 10 15

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25

Arg Arg Leu His Gln Glu His Phe Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val
1 5 10 15

Asp Tyr Gly Gly Ser Ser Ser Thr Glu Asn Ala Val Thr Ala Ile Arg
20 25 30

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 26

Leu Thr Val Ala Ala Pro Asn Ser Ala Leu Leu Ala Arg Ala Leu Arg
1 5 10 15

Ala Glu

<210> 27

<211> 35

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 27

Met	Gly	Asn	Asp	Ser	Val	Ser	Tyr	Glu	Tyr	Gly	Asp	Tyr	Ser	Asp	Leu
1				5				10					15		

Ser	Asp	Arg	Pro	Val	Asp	Cys	Leu	Asp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Ile	Asp
				20				25					30		

Pro	Leu	Arg
		35

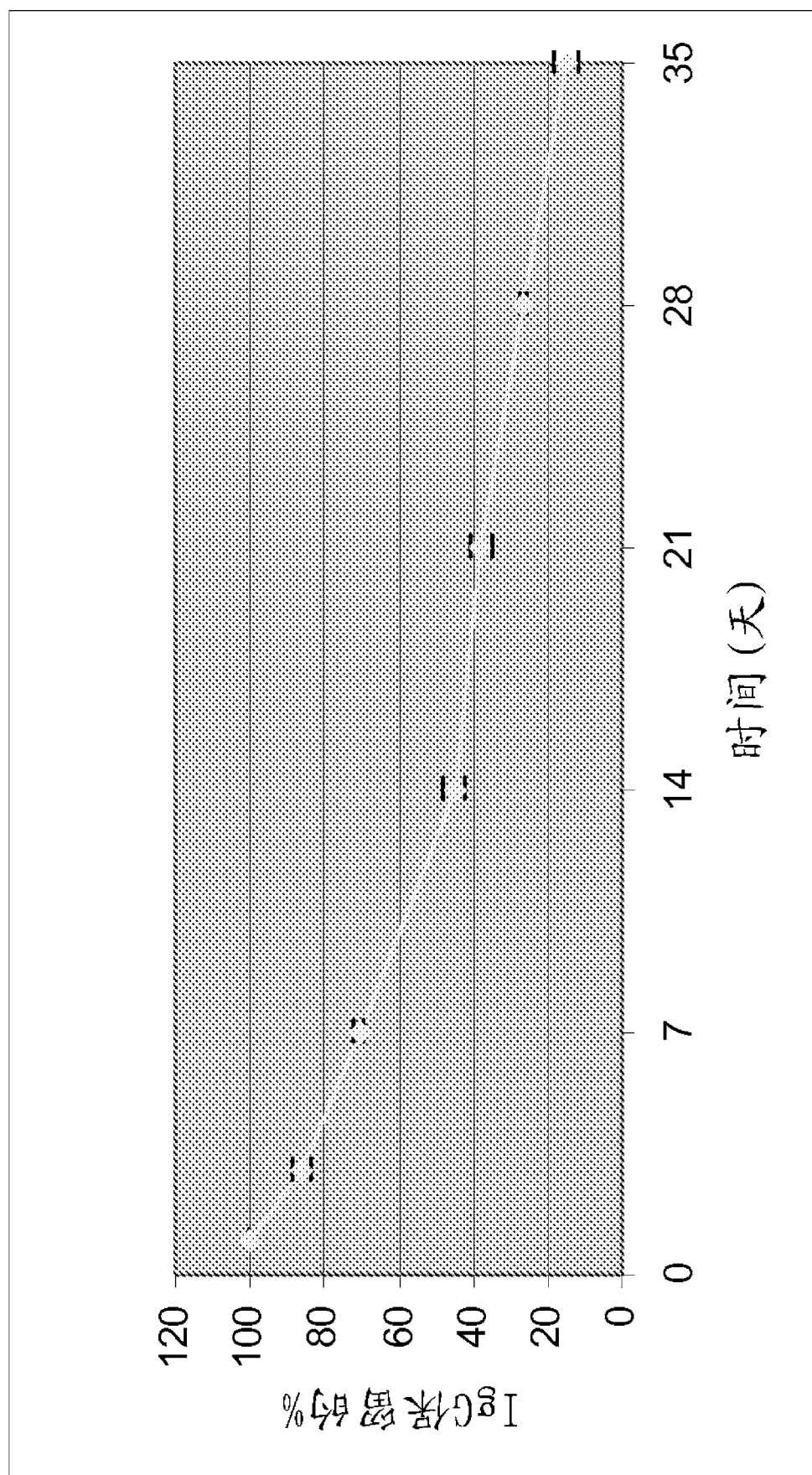


图 1

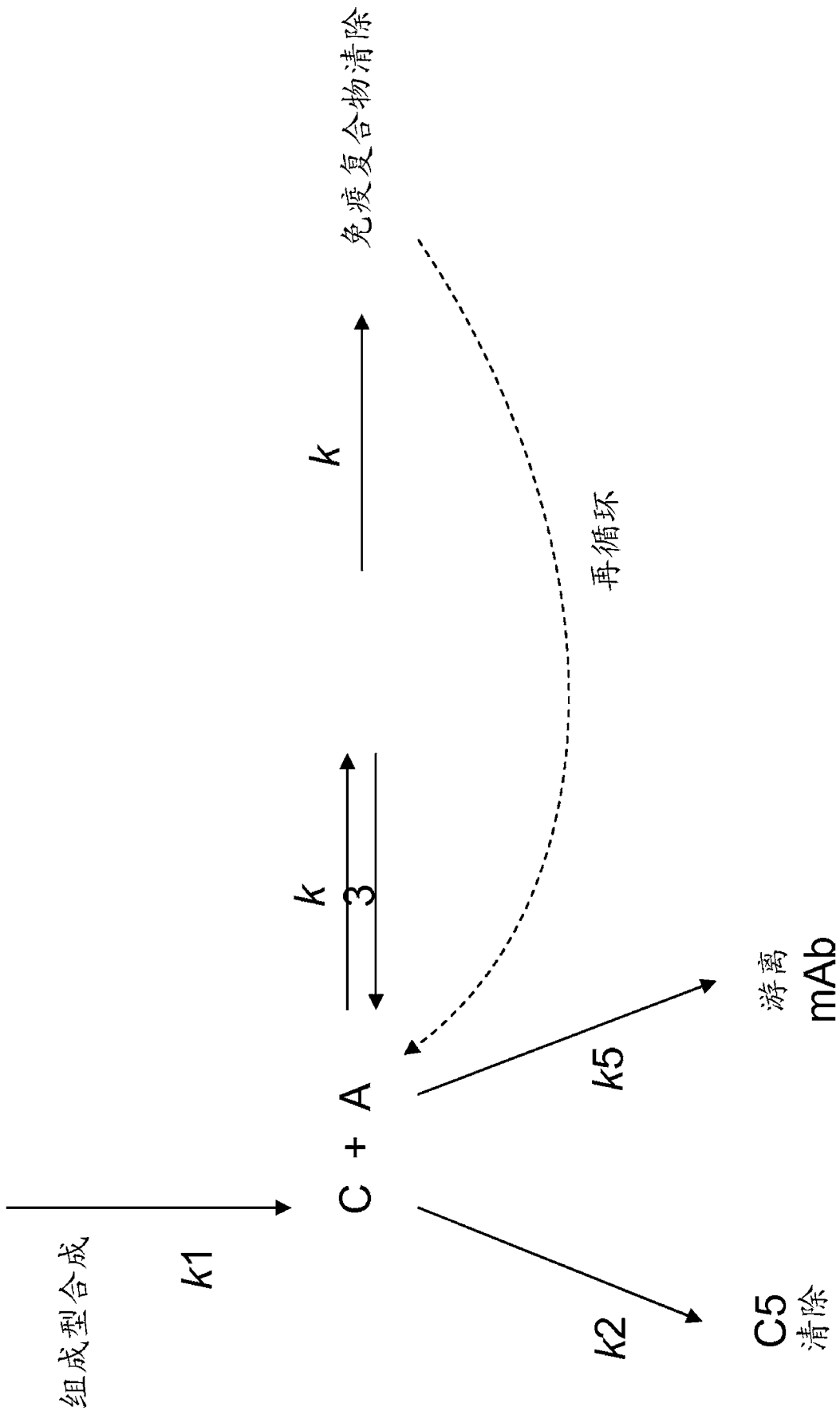


图 2

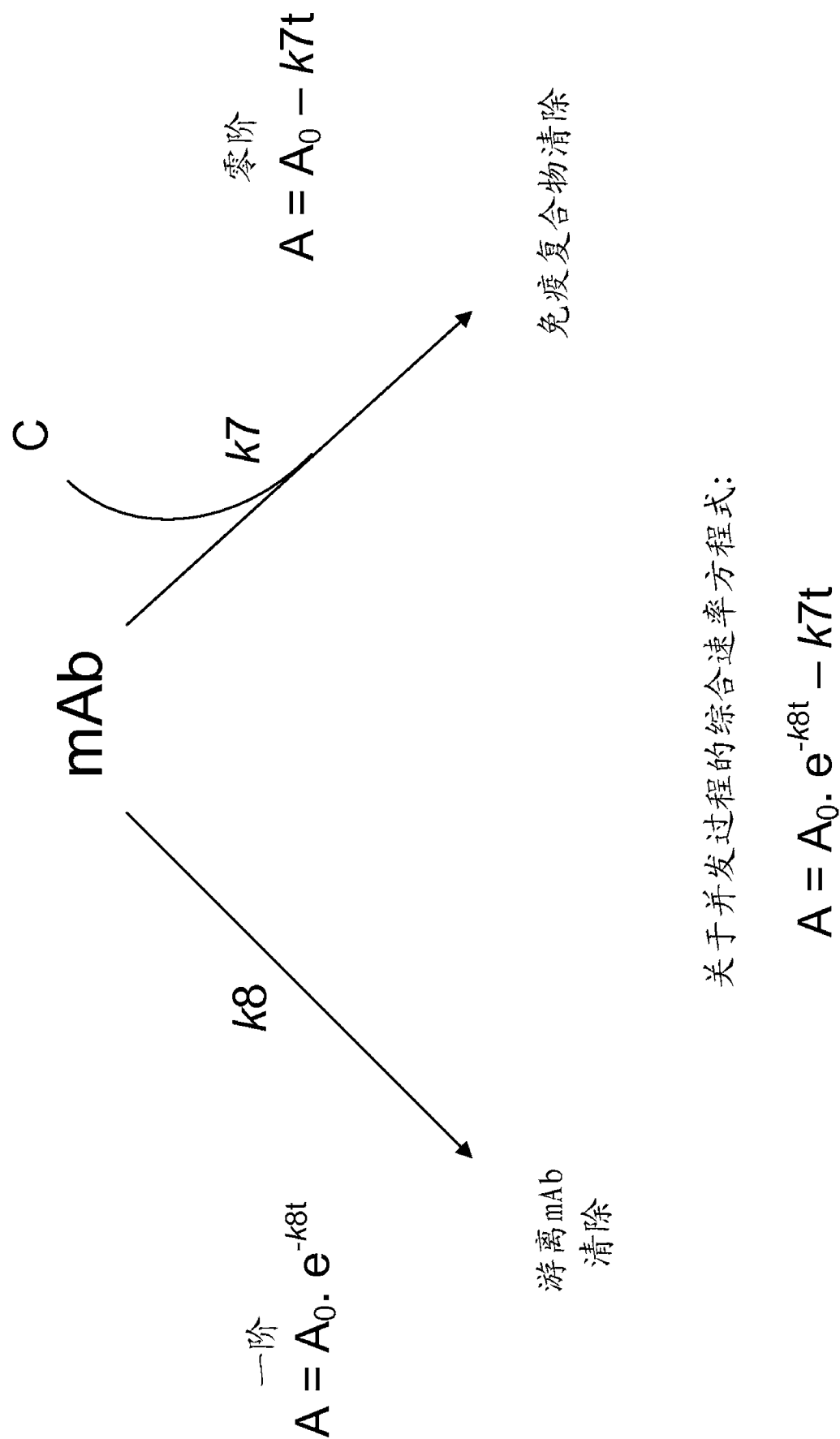


图 3