



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201311724 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 16 日

---

(21)申請案號：101120198 (22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 06 日

(51)Int. Cl. :                    **C07K16/28 (2006.01)**                    **A61K39/395 (2006.01)**  
                                  **A61P19/02 (2006.01)**                    **A61P37/00 (2006.01)**

(30)優先權：2011/06/06        歐洲專利局                    11168787.7  
                  2011/07/07        美國                                61/505,137  
                  2012/03/13        歐洲專利局                    12159172.1

(71)申請人：諾佛 農迪克股份有限公司 (丹麥) NOVO NORDISK A/S (DK)  
                  丹麥

(72)發明人：蒼 史戴方 ZAHN, STEFAN (DE)；卓森 路易斯 海傑瑞德 ZEUTHEN, LOUISE  
                  HJERRILD (DK)；漢森 安克 瓊 HANSEN, ANKER JON (DK)；克潔賈德 克  
                  里斯堤恩 (DK)；朗德 斯倫 (DK)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：6 共 133 頁

---

(54)名稱

治療性抗體

THERAPEUTIC ANTIBODIES

(57)摘要

本發明係關於識別人類 C5a 受體之人類抗體。該等抗體藉由結合 C5aR 而抑制 C5a 信號傳導，藉此抑制促炎信號。基於 C5a 及其受體在刺激發炎中之作用，本發明進一步關於該等人類抗 C5aR 抗體之治療性用途，尤其關於治療免疫病症之治療性用途。





(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201311724 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 16 日

---

(21) 申請案號：101120198 (22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 06 日

(51) Int. Cl. :                    *C07K16/28 (2006.01)*                    *A61K39/395 (2006.01)*  
   *A61P19/02 (2006.01)*                    *A61P37/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2011/06/06            歐洲專利局                    11168787.7  
   2011/07/07            美國                                61/505,137  
   2012/03/13            歐洲專利局                    12159172.1

(71) 申請人：諾佛 農迪克股份有限公司 (丹麥) NOVO NORDISK A/S (DK)  
   丹麥

(72) 發明人：蒼 史戴方 ZAHN, STEFAN (DE)；卓森 路易斯 海傑瑞德 ZEUTHEN, LOUISE  
   HJERRILD (DK)；漢森 安克 瓊 HANSEN, ANKER JON (DK)；克潔賈德 克  
   里斯堤恩 (DK)；朗德 斯倫 (DK)

(74) 代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無    申請專利範圍項數：15 項    圖式數：6            共 133 頁

---

(54) 名稱

治療性抗體

THERAPEUTIC ANTIBODIES

(57) 摘要

本發明係關於識別人類 C5a 受體之人類抗體。該等抗體藉由結合 C5aR 而抑制 C5a 信號傳導，藉此抑制促炎信號。基於 C5a 及其受體在刺激發炎中之作用，本發明進一步關於該等人類抗 C5aR 抗體之治療性用途，尤其關於治療免疫病症之治療性用途。

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101120198

※申請日：101.6.6

※IPC 分類：C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P19/02 (2006.01)

治療性抗體

A61P37/00 (2006.01)

Therapeutic Antibodies

## 二、中文發明摘要：

本發明係關於識別人類 C5a 受體之人類抗體。該等抗體藉由結合 C5aR 而抑制 C5a 信號傳導，藉此抑制促炎信號。基於 C5a 及其受體在刺激發炎中之作用，本發明進一步關於該等人類抗 C5aR 抗體之治療性用途，尤其關於治療免疫病症之治療性用途。

## 三、英文發明摘要：

The present invention concerns human antibodies recognising the human C5a receptor. By binding to C5aR the antibodies inhibit C5a signalling, whereby the pro-inflammatory signal is inhibited. Based on the role of C5a and its receptor in stimulation of inflammation the invention further relates to therapeutic use of said human anti-C5aR antibodies and in particular in relation to treatment of immunological disorders.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於治療性抗體領域。

### 【先前技術】

補體蛋白 C3-C5 各自之蛋白質水解產生具有稱作過敏毒素之信號傳導分子之胺基末端陽離子片段。其中最有效的 C5a 引起最廣泛之反應。考慮到發炎反應之組分為白血球之著邊(margination)及浸潤、顆粒結合蛋白水解酶之釋放、活性氧及氮衍生基團之產生、血流及毛細管滲漏方面的變化以及收縮平滑肌之能力，C5a 分子為「完全」促炎性介體。在亞奈莫耳至奈莫耳含量下，C5a 分子引起全部骨髓譜系(嗜中性白血球、嗜伊紅血球及嗜鹼性血球、巨噬細胞及單核細胞)之趨化性，且造成由前列腺素及循環白血球顯著增強之血管滲透性。較高奈莫耳濃度引起 NADPH 氧化酶之脫粒及活化。此生物活性寬度與其他發炎性介體形成對照。C5a 涉及於包括類風濕性關節炎、牛皮癬、敗血症、再灌注損傷及成人呼吸窘迫症候群在內之多種病症的發病機制中(Gerard 及 Gerard, 1994; Murdoch 及 Finn, 2000)。

C5a 之活性由 C5a 與其受體(C5aR)之結合來介導。C5aR 屬於七跨膜 G 蛋白偶合受體之家族。C5aR 為 C5a 之高親和力受體，Kd 為約 1 nM，且位於包括白血球在內之多種不同細胞類型上。每個細胞之受體數目極高，每個白血球高達 200,000 個位點。受體之生物活化在使結合飽和之範圍上發生。

C5aR 結構符合七跨膜受體家族，其中細胞外 N 端後為由以細胞內環及細胞外環形式交替之螺旋間結構域連接的七個跨膜螺旋，且以細胞內 C 端結構域結束。C5aR 含有延伸之 N 端細胞外結構域。此大型 N 端結構域為 G 蛋白偶合受體的典型特徵，其結合包括 IL-8 及 fMet-Leu-Phe (FMLP) 受體家族在內之肽。

用 C5aR 拮抗劑抑制 C5a 反應可減少經由 C5a 介導之急性發炎反應，而不影響其他補體組分。為此，先前已描述 C5aR 肽拮抗劑及抗 C5a 受體抗體 (Watanabe 等人, 1995; Pellas 等人, 1998; Konteatis 等人, 1994; Kaneko 等人, 1995; Morgan 等人, 1993)。舉例而言，WO 95/00164 描述針對 C5aR 之 N 端肽(殘基 9-29)的抗體。WO 03/062278 亦描述針對 C5aR 之抗體。此等小鼠抗體中之三種稱作 7F3、6C12 及 12D4。此等抗體經展示具有優良特性，諸如可極有效地阻斷 C5a 與其受體之結合，阻止試管內 C5a 引導之嗜中性白血球遷移，且預防動物模型中之發炎。為控制慢性疾病，可能需要在數月或數年內連續投予該抗體。然而，投予小鼠抗體所產生之一個缺陷在於人類免疫系統可產生其針對小鼠抗體之自身抗體(HAMA 反應)。HAMA 反應可藉由自血液中快速清除小鼠抗體來中和該等小鼠抗體，因此阻止小鼠抗體結合於其目標。為避免形成 HAMA 反應，已採用之一種策略為藉由用人類序列置換非抗原決定基結合區中同樣數目的「外來」殘基而將小鼠抗體「人類化」。

人類化程序之主要問題為對抗原之親和力損失(Jones

等人, 1986), 在有些情況下多達 10 倍或 10 倍以上, 當抗原為蛋白質時尤其如此 (Verhoeyen 等人, 1988)。當然, 任何親和力損失皆為極不希望的。至少, 其意謂著將必須注射更多人類化抗體至患者中, 成本更高且不良反應風險更大。甚至更關鍵地, 親和力降低之抗體可能具有較差之生物功能, 諸如補體溶解、抗體依賴性細胞毒性或病毒中和。儘管面對此等困難, 但 WO 2009/103113 中已描述抗人類 C5aR 抗體之成功人類化。

多年來已開發出複數種策略來進一步減小向患者投予抗體所產生的任何不期望之副反應的風險, 其包括藉由產生「完全」人類抗體而降低在患者中形成抗藥物抗體的可能性。

直至今日, 適用於治療性應用之抗體的鑑別仍為一項具挑戰性的任務。因此, 可用於診斷及/或治療方法之替代性及/或改良 C5aR 拮抗劑仍備受關注。

#### 【發明內容】

本發明係關於抗 C5aR 抗體及其用於診斷性及/或治療性方法之用途。本發明之發明人已鑑別出一系列結合人類 C5aR 之抗體, 其在若干態樣中在功能上優於先前所述之抗 C5aR 抗體。

如本文所說明, 本發明之發明人已鑑別出一系列人類抗體, 其結合人類 C5aR (hC5aR) 且可置換結合於 hC5aR 之 hC5a 並抑制 hC5a 介導之嗜中性白血球遷移。另外, 本發明之發明人已成功地將此等抗 hC5aR 抗體之一之構架區中所

存在的非人類殘基轉化為人類生殖系殘基，而不影響抗體效能。

此外，藉由改變 Fc 區，本發明之發明人已建立不誘導試管內吞噬作用、ADCC 或 CDC 之抗 hC5aR 抗體。根據例示性具體實例之揭示內容將顯而易知本發明之細節。

本發明之一態樣係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含下列序列群組之一：SEQ ID 1、2 及 3；SEQ ID 9、10 及 11；SEQ ID 17、18 及 19；SEQ ID 25、26 及 27；或該等序列各自之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同之胺基酸殘基取代。

本發明之一態樣係關於一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含下列序列群組之一：SEQ ID 5、6 及 7；SEQ ID 13、14 及 15；SEQ ID 21、22 及 23；SEQ ID 29、30 及 31；或該等序列各自之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同之胺基酸殘基取代。

本發明之一態樣係關於一種特異性結合 hC5aR 之人類抗體，其中該抗體較佳結合 hC5aR 之第二細胞外環。

本發明之一態樣係關於一種特異性結合 hC5aR 之抗體，其中抗體 Fc 區已相較於 IgG1、IgG2、IgG4 及 IgG4/G2 參考序列經修飾，從而降低該等抗體經由 Fc $\gamma$  受體 (Fc $\gamma$  R) 相互作用誘導吞噬作用、ADCC 及/或 CDC 之能力。在一特定具體實例中抗體 Fc 區為 IgG1，且在其他特定具體實例

中，Fc 區包含下列點突變群組中之一或多者：

I) N297Q 及 / 或

II) L234A 及 L235E 及 / 或

III) G236R 及 L328R 及 / 或

IV) N297Q、L234A 及 L235E 及 / 或

V) N297Q、L234A、L235E 及 G237A 及 / 或

VI) L234A、L235E、G237A、A330S 及 P331S。

在另一態樣中，本發明係關於本發明抗體用於治療免疫疾病或病症之用途。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療疾病或病症之方法，其包含向有需要之個體投予治療量之如本文所述之抗體。

在另一態樣中，本發明提供一種治療或預防個體之病症的方法，該方法包含向該個體投予本發明抗體。在一個具體實例中，病症為免疫病理學病症，諸如自體免疫疾病。

根據本文之揭示內容(包括例示性具體實例)，本發明之其他態樣及具體實例將顯而易知。由該等揭示內容得出，本發明已提供具有如本文中所特性化之各種益處及優點的新穎治療性抗體。

### 【實施方式】

#### 定義

除非另外說明，否則本發明中所利用之重組蛋白、細胞培養物及免疫學技術為熟習此項技術者所熟知之標準程序。該等技術在諸如以下來源之文獻中描述並說明：J.

Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984); J. Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); T.A. Brown (編), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, 第 1 卷及第 2 卷, IRL Press (1991); D.M. Glover 及 B.D. Hames (編), DNA Cloning: A Practical Approach, 第 1-4 卷, IRL Press (1995 及 1996); 及 F.M. Ausubel 等人 (編), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 包括直至目前之所有更新), Ed Harlow 及 David Lane (編) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988); 及 J.E. Coligan 等人 (編) Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons (包括直至目前之所有更新)。

如本文所用, 「C5a 受體 (C5a receptor)」、 「C5aR」、 「C5aR1」或「人類 C5aR(human C5aR)」及其變化形式指人類補體組分 5 受體 1, 其在此項技術中亦稱作 C5a 過敏毒素受體及 CD88 抗原。C5aR 屬於七跨膜 G 蛋白偶合受體家族, 且結合 C5a (Gerard 及 Gerard, 1991)。人類 C5aR 之胺基酸序列之一實例提供於 SEQ ID NO:41 中, 然而, 熟習此項技術者將意識到存在此分子之天然產生之對偶基因變異體, 其亦為術語「C5aR」所涵蓋。人類 C5aR 之各種結構域定義如下:

胺基酸 1-37: 細胞外域 N 端,

- 胺基酸 38-61：跨膜域，
- 胺基酸 62-71：細胞內域，
- 胺基酸 72-94：跨膜域，
- 胺基酸 95-110：細胞外域-細胞外環 1，
- 胺基酸 111-132：跨膜域，
- 胺基酸 133-149：細胞內域，
- 胺基酸 150-174：跨膜域，
- 胺基酸 175-206：細胞外域-細胞外環 2，
- 胺基酸 207-227：跨膜域，
- 胺基酸 228-242：細胞內域，
- 胺基酸 243-264：跨膜域，
- 胺基酸 265-283：細胞外域-細胞外環 3，
- 胺基酸 284-307：跨膜域，
- 胺基酸 308-350：細胞內域-C 端。

如本文所用，術語「治療(treatment)」指對於任何有需要之人類或其他動物個體的醫學療法。該個體預期已由醫學或獸醫學專業人員進行身體檢查，該專業人員已給出暫定或確定診斷，該診斷將指示使用該特定治療有益於該人類或其他動物個體之健康。該治療之時序及目的可根據個體健康現狀隨不同個體而改變。因此，該治療可為預防性、舒減性、症狀性及/或治癒性。就本發明而言，預防性、舒減性、症狀性及/或治癒性治療可表示本發明之各別態樣。

關於醫學治療，如本文所用之術語「個體(subject)」意欲意謂任何動物，尤其是哺乳動物，諸如人類、馬、牛、

貓及狗，且適當時可與術語「患者(patient)」互換使用。個體較佳為人類。如本文所用，術語「治療」及其變化形式包括投予足以降低或消除病症之至少一種症狀的治療有效量之本發明抗體。

如本文所用，術語「預防(preventing/prevent/prevention)」或其變化形式指保護個體免於產生疾病之至少一種症狀，或降低病症之症狀之嚴重程度。

如本文所用，術語「暴露細胞(exposing the cell)」指提供抗體以使得其在人類 C5aR 存在於細胞上的情況下能夠接觸/結合 C5aR。

術語「50%有效濃度(effective concentration 50 percent)」(縮寫為「EC50」)表示抗體所靶向分子之既定作用(例如抑制/置換人類 C5a 與人類 C5aR 之結合)之 50%所需的本發明抗體之濃度。熟習此項技術者應瞭解，較低 EC50 值對應於較有效抗體。

如本文所用，術語「抑制(inhibiting)」指規定活性顯著降低及可能完全消除。較佳規定活性降低或抑制至少 50%、更佳至少 75%且甚至更佳至少 90%。

在本說明書中，詞語「包含(comprise)」或諸如「包含(comprises)」或「包含(comprising)」之變化形式應理解為暗示包括所述元素、整體或步驟，或元素、整體或步驟之群組，但不排除任何其他元素、整體或步驟，或元素、整體或步驟之群組。

在一個具體實例中，分子基本上由規定序列組成。

在另一具體實例中，分子由規定序列組成。

在一個具體實例中，諸如抗體或 DNA 序列之分子為經分離分子。術語「經分離抗體(isolated antibody)」指已自抗體之天然環境之另一/其他組分分離及/或回收及/或自抗體之天然環境中之組分混合物純化之抗體。

本文之術語「組成物(composition)」指該分子關於其所屬分子類別為其所存在之組成物中之主要物質的具體實例(亦即，其構成組成物中分子類型之至少約 50%，且典型地將構成組成物中分子種類(例如核酸/肽/抗體)的至少約 70%、至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95% 或至少約 95%以上)。通常，抗體分子之組成物在組成物中所存在之所有抗體物質之情形下對於抗體分子或在所建議用途之情形下至少關於實質上活性抗體物質將展現 98%、98%或 99%同源性。關於此之例外為包括其他活性組分之組合產品。如本文所提及之術語「抗體(antibody)」包括完整抗體及其任何抗原結合片段(亦即「抗原結合部分(antigen-binding portion)」)或單鏈。全長抗體(或完整抗體)包含四條多肽鏈，即兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈，由二硫鍵相互連接。各重鏈由重鏈可變區(VH)及重鏈恆定區(CH)構成。各輕鏈由輕鏈可變區(VL)及輕鏈恆定區(CL)構成。重鏈恆定區由三個結構域 CH1、CH2 及 CH3 構成。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。各輕鏈由輕鏈可變區(本文中縮寫為 LCVR 或 VL)及輕鏈恆定區構成。輕鏈恆定區由一個結構域 CL 構成。VH 區及 VL 區可進一步細

分為高變區，稱作互補決定區(CDR)，其間交替存在較保守之區域，稱作構架區(FR)。

各 VH 及 VL 由三個 CDR 及四個 FR 構成，自胺基端至羧基端按以下次序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q))之結合。

如本文所用，術語「抗體」用於描述特異性結合相應抗原之完整抗體及其任何抗原結合片段(亦即「抗原結合部分」)或單鏈。抗原結合片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、F(ab)S、Fv (典型地為抗體單臂之 VL 域及 VH 域)、單鏈 Fv (scFv；參見例如 Bird 等人，Science 1988; 242:42S-426；及 Huston 等人，PNAS 1988; 85:5879-5883)、dsFv、Fd (典型地為 VH 域及 CHI 域)及 dAb (典型地為 VH 域)片段；VH、VL、VhH 及 V-NAR 域；包含單一 VH 鏈及單一 VL 鏈之單價分子；微型抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及  $\kappa$  抗體(參見例如 Ill 等人，Protein Eng 1997;10:949-57)；駱駝 IgG；IgNAR；以及一或多種經分離 CDR 或功能互補位，其中經分離 CDR 或抗原結合殘基或多肽可締合或連接在一起以形成功能抗體片段。各種類型之抗體片段已描述或評述於例如 Holliger 及 Hudson, Nat Biotechnol 2005;2S:1126-1136；WO2005040219；及已公開美國專利申請案 20050238646 及 20020161201 中。

術語「互補決定區 (complementarity-determining

region)」（「CDR」）或「高變區(hypervariable region)」在本文中使用时指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。CDR一般在輕鏈可變域中由胺基酸殘基 24-34 (L1)、50-56 (L2)及 89-97 (L3)構成且在重鏈可變域中由 31-35 (H1)、50-65 (H2)及 95-102 (H3)構成；(Kabat 等人, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公開號 91-3242)及/或來自「高變環(hypervariable loop)」之彼等殘基(在輕鏈可變域中為殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)及 91-96 (L3), 且在重鏈可變域中為殘基 26-32 (H1)、53-55 (H2)及 96-101 (H3) ; Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917)。典型地, 此區域中胺基酸殘基之編號由 Kabat 等人, 同上所述之方法進行。本文中諸如「Kabat 位置(Kabat position)」、「Kabat 殘基(Kabat residue)」及「根據 Kabat(according to Kabat)」之短語指對於重鏈可變域或輕鏈可變域之此編號系統。使用 Kabat 編號系統, 肽之實際線性胺基酸序列可含有對應於可變域之構架(FR)或 CDR 縮短或插入可變域之構架(FR)或 CDR 中的較少或另外胺基酸。舉例而言, 重鏈可變域可在 CDR H2 之殘基 52 後包括胺基酸插入(殘基 52a、52b 及 52c, 根據 Kabat), 且在重鏈 FR 殘基 82 後包括插入之殘基(例如殘基 82a、82b 及 82c 等, 根據 Kabat)。對於既定抗體, 可藉由使抗體序列與「標準」Kabat 編號序列在同源區域比對來確定殘基之 Kabat 編號。

術語「構架區(framework region)」或「FR」殘基指不

在如本文所定義之 CDR 內的彼等 VH 或 VL 胺基酸殘基。

抗體之片段可結晶區(「Fc 區(Fc region)」/「Fc 域(Fc domain)」)為抗體中與稱作 Fc 受體之細胞表面受體相互作用之「尾(tail)」區，以及補體系統之一些蛋白質。

單株抗體典型地藉由使骨髓瘤細胞與來自己用所需抗原免疫接種之小鼠之脾細胞融合而製得。人類單株抗體可獲自編碼人類抗體之轉殖基因動物(例如小鼠或其他適合物種)。或者，可用稱作譜系選殖或噬菌體呈現/酵母呈現之技術製造重組單株抗體。重組抗體工程改造涉及使用病毒或酵母來產生抗體而非小鼠。

如本文所用，術語「人類化抗體(humanized antibody)」指含有來源於非人類生殖系免疫球蛋白序列之序列，通常至少最小互補決定區(CDR 序列)的人類/非人類嵌合抗體。因而，人類化抗體為如下人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者之高變區之殘基經來自非人類物種(供者抗體)之高變區之殘基(諸如來自小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物，其具有所需特異性、親和力及能力)置換。

若抗體輕鏈及重鏈基因已典型地藉由遺傳工程改造由來源於不同物種之免疫球蛋白可變區及恆定區基因構造，則至少包含並非來源於人類生殖系序列之 CDR 區的人類化抗體亦可稱作「嵌合抗體(chimeric antibody)」。舉例而言，來自小鼠單株抗體之基因之可變區段可接合於人類恆定區段。

如本文所用，術語「人類抗體(human antibody)」意欲

包括可變區中之構架區與 CDR 區皆來源於人類生殖系免疫球蛋白序列的抗體。應注意，該等抗體依然可包含人類生殖系序列中不存在之胺基酸殘基，該等胺基酸殘基由因活體內或試管內突變而發生之突變產生。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦主要來源於人類生殖系免疫球蛋白序列。本發明之人類抗體依然可包括並非由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，藉由試管內隨機或定點突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。另一方面，如本文所用，術語「人類抗體」不欲包括其中 CDR 序列來源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系隨後移植於人類構架序列上之抗體或者抗原結合區(參見上文之人類化抗體)。人類抗體可為人類單株抗體。該人類單株抗體可由包括獲自轉殖基因非人類動物(例如轉殖基因小鼠)之 B 細胞之融合瘤製造，該轉殖基因非人類動物具有包含人類重鏈轉殖基因及融合於永生化細胞之輕鏈轉殖基因的基因組。人類抗體亦可自關於所選人類生殖系序列所建立之序列庫中分離，用天然及合成序列多樣性進一步多樣化。人類抗體可藉由使人類淋巴細胞進行試管內免疫接著用愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)使淋巴細胞轉型來製備。可鑑別允許藉由重組方法製造抗體之人類抗體之序列。

此外，人類化抗體、人類抗體及完全人類抗體可包含接受者抗體中或供者抗體中不存在之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。

術語「抗體衍生物(antibody derivatives)」指抗體之任

何修飾形式，諸如抗體與另一藥劑或抗體之結合物。

術語「抗原(antigen)」指用於對免疫勝任脊椎動物進行免疫接種以產生可識別抗原之抗體的分子實體。本文中術語抗原更廣泛地使用且一般意欲包括由抗體特異性識別之目標分子，因而包括在免疫接種過程中用於形成抗體之分子的片段或模擬物或在免疫接種時用於篩選之該等分子以及在藉由諸如噬菌體呈現篩選之替代方法獲得抗體之情況下用於篩選之分子。

如本文所用，術語「抗原決定基(epitope)」在「抗原結合多肽(antigen binding polypeptide)」(諸如抗體)與其相應「抗原」之間的分分子相互作用的情形下定義。一般而言，「抗原決定基」指抗體所特異性結合之抗原上的面積或區域，亦即與抗體實體接觸之面積或區域。蛋白質抗原決定基可包含直接參與抗體結合之抗原中的胺基酸殘基(亦稱作抗原決定基之免疫優勢組分)及不直接參與結合之其他胺基酸殘基，諸如由抗體有效阻斷之抗原之胺基酸殘基(換言之，胺基酸殘基在抗體之「溶劑排斥表面」及/或「佔據面積」內)。既定抗原可包含多個不同抗原決定基，其可包括(不限於):線性肽抗原決定子;構形抗原決定子，其由在天然(成熟)構形中彼此鄰近定位之一或多個非連續胺基酸組成;及轉譯後抗原決定子，其完全或部分地由共價連接至抗原之分子結構(諸如碳水化合物基團)組成。

根據隨所用抗原決定基定位方法而變之抗原決定基之描述及定義在不同細節層面上獲得的事實，由此斷定：可

類似地在不同細節層面上進行同一抗原上對於不同抗體之抗原決定基的比較。

術語「結合(binding)」、「特異性結合(specifically binding)」及「結合特異性(binding specificity)」在本文中用於描述抗體或其抗原結合片段之選擇性。

本發明之抗體可特異性結合 C5aR，表明該抗體對於其他抗原具有顯著較低親和力，其中顯著較低可為諸如至少 1/2、或 1/5 或 1/10 之親和力。抗體可進一步具物種特異性，諸如抗體以高親和力特異性結合人類 C5aR 而非小鼠 C5aR。

術語「結合親和力(binding affinity)」在本文中用作兩種分子(例如抗體或其片段與抗原)之間非共價相互作用之強度的量度。術語「結合親和力」用於描述單價相互作用(固有活性)。兩種分子(例如抗體或其片段與抗原)之間經由單價相互作用之結合親和力可藉由測定解離常數( $K_D$ )來定量。 $K_D$ 又可例如藉由 SPR 方法量測複合物形成及解離之動力學來測定。對應於單價複合物之締合及解離之速率常數分別稱作締合速率常數  $k_a$  (或  $k_{on}$ )及解離速率常數  $k_d$  (或  $k_{off}$ )。 $K_D$  經由方程式  $K_D = k_d / k_a$  與  $k_a$  及  $k_d$  相關。

此外，「親和力(affinity)」涉及分子(例如抗體)之單一結合位點與配體(例如抗原)之間的結合強度。分子 X 對於配體 Y 之親和力由解離常數( $K_d$ )表示，其為佔據溶液中所存在之半數 X 分子之結合位點所需之 Y 的濃度。較小  $K_d$  指示較強或較高親和力相互作用，且佔據位點需要較低濃度之配體。類似地，可藉由測定及比較相關相互作用(諸如抗體與

抗原之間的特定相互作用)之  $K_D$  值與非相關相互作用之  $K_D$  值來評估相互作用之特異性。

典型地，抗體關於目標之  $K_D$  將為抗體關於其他非目標分子(諸如環境或對照組中之無關物質或伴隨物質)之  $K_D$  的 1/2、較佳 1/5、更佳 1/10。更佳地， $K_D$  將為 1/50，諸如為 1/100 或為 1/200；甚至更佳為 1/500，諸如為 1/1,000 或為 1/10,000。

此解離常數之值可直接藉由熟知方法測定，且甚至對於複雜混合物可藉由諸如 Caceci 等人 (Byte 9:340-362, 1984)中闡述之方法進行計算。舉例而言， $K_D$  可使用諸如由 Wong 及 Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993)揭示之雙過濾器硝基纖維素過濾器結合檢定(double-filter nitrocellulose filter binding assay)來確定。此項技術中已知評估配體(諸如抗體對目標)之結合能力的其他標準檢定，包括例如 ELISA、西方墨點法(Western blots)、RIA 及流動式細胞量測分析。抗體之結合動力學及結合親和力亦可藉由此項技術中已知之標準檢定(諸如 SPR)評估。

可進行競爭性結合檢定，其中抗體與目標之結合與該目標之另一配體(諸如另一抗體)與該目標之結合進行比較。發生 50%抑制之濃度稱作  $K_i$ 。在理想條件下， $K_i$  等於  $K_D$ 。 $K_i$  值永遠不會小於  $K_D$ ，因此宜替代地量測  $K_i$  來提供  $K_D$  之上限。

熟習此項技術者應瞭解，「親合力(avidity)」涉及兩種分子(諸如抗體與抗原)之間相互作用的總強度。親合力取決

於相互作用之親和力與價態兩者。

用於測定既定抗體之功能性的其他檢定可包括基於細胞之檢定，其對既定抗原及抗體結合作用具特異性。

如此項技術中已知之術語「一致性(identity)」指如藉由比較序列所測定之兩個或兩個以上多肽之序列之間的關係。在此項技術中，「一致性」亦意謂如藉由兩個或兩個以上胺基酸殘基之鏈之間的匹配數所測定之多肽之間的序列相關程度。「一致性」度量由特定數學模型或電腦程式(亦即「演算法」)處理之含空隙比對(若存在)下兩個或兩個以上序列中之較小者與其他序列之間的一致性匹配百分比。可容易地藉由已知方法計算相關多肽之一致性。該等方法包括(但不限於)以下文獻中所述之方法：Computational Molecular Biology, Lesk, A. M.編, Oxford University Press, New York, 1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W.編, Academic Press, New York, 1993；Computer Analysis of Sequence Data, 第1部分, Griffin, A. M.及 Griffin, H. G.編, Humana Press, New Jersey, 1994；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987；Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.及 Devereux, J.編, M. Stockton Press, New York, 1991；及 Carillo 等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)。

用於測定一致性之較佳方法經設計以使得所測試序列之間的匹配最大。測定一致性之方法描述於公開可用之電

腦程式中。測定兩個序列之間之一致性的較佳電腦程式方法包括 GCG 套裝程式，包括 GAP (Devereux 等人, Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN 及 FASTA (Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))。BLASTX 程式自國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 及其他來源 (BLAST 手冊, Altschul 等人, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul 等人, 同上) 公開可用。熟知之史密斯-沃特曼演算法 (Smith Waterman algorithm) 亦可用於測定一致性。

舉例而言，使用電腦演算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)，欲測定序列一致性百分比之兩種多肽經比對以使其各別胺基酸最佳匹配(「匹配跨距(matched span)」，如藉由演算法所測定)。結合演算法使用空隙開放罰分(其經計算為平均對角線之 3 倍；「平均對角線(average diagonal)」為所用比較矩陣之對角線之平均值；「對角線(diagonal)」為特定比較矩陣賦予各完全胺基酸匹配之分數或數目)及空隙擴展罰分(其通常為 {分數 (1/10)} × 空隙開放罰分) 以及諸如 PAM 250 或 BLOSUM 62 之比較矩陣。演算法亦使用標準比較矩陣(關於 PAM 250 比較矩陣，參見 Dayhoff 等人, Atlas of Protein Sequence and Structure, 第 5 卷, 增刊 3 (1978)；關於 BLOSUM 62 比較矩陣，參見 Henikoff 等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 10915-10919 (1992))。

肽序列比較之較佳參數包括以下：演算法：Needleman 等人, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970)；比較矩陣：BLOSUM 62，來自 Henikoff 等人, PNAS USA 89, 10915-10919 (1992)；空隙罰分：12，空隙長度罰分：4，相似度臨限值：0。

GAP 程式使用上述參數有效。前述參數為使用 GAP 演算法進行肽比較(以及末端空隙無罰分)之預設參數。

「保守胺基酸取代 (conservative amino acid substitution)」可涉及一個胺基酸殘基經另一殘基取代以使得對該位置處之胺基酸殘基之極性或電荷影響很小或無影響。此由以下胺基酸群組例示，藉以將一個胺基酸經同一群組內之不同胺基酸取代視為保守取代：親水性：Ala、Pro、Gly、Glu、Asp、Gln、Asn、Ser、Thr。脂族：Val、Ile、Leu、Met。鹼性：Lys、Arg、His。芳族：Phe、Tyr、Trp。此外，任何殘基均可頻繁地經丙胺酸取代。

此外，必要時，非天然胺基酸或化學胺基酸類似物可以取代或添加形式引入本發明之抗體及/或免疫球蛋白鏈中。該等胺基酸包括(但不限於)常見胺基酸之 D-異構體、2,4-二胺基丁酸、 $\alpha$ -胺基異丁酸、4-胺基丁酸、2-胺基丁酸、6-胺基己酸、2-胺基異丁酸、3-胺基丙酸、鳥胺酸、正白胺酸、正纈胺酸、羥基麩胺酸、肌胺酸、瓜胺酸、高瓜胺酸、氧化半胱胺酸、第三丁基甘胺酸、第三丁基丙胺酸、苯基甘胺酸、環己基丙胺酸、 $\beta$ -丙胺酸、氟-胺基酸、諸如  $\beta$ -甲基胺基酸、Ca-甲基胺基酸、Na-甲基胺基酸之由設計師設

計之胺基酸 (designer amino acid)，及一般胺基酸類似物。

本發明之抗體及/或免疫球蛋白鏈之胺基酸序列突變體可藉由在本發明核酸中引入適當核苷酸變化或藉由試管內合成所需多肽來製備。該等突變體包括例如胺基酸序列內殘基之缺失、插入或取代。可進行缺失、插入及取代之組合以得到最終構築體，其限制條件為最終多肽產物具有所需特性。可使用此項技術中已知之任何技術來製備突變(變異)多肽。舉例而言，本發明之聚核苷酸可進行試管內突變誘發。該等試管內突變誘發技術包括將聚核苷酸次選殖至適合載體中，將載體轉化至諸如大腸桿菌 (*E. coli*) XL-1 red (Stratagene) 之「突變基因」株中，且使經轉型細菌繁殖適合代數。可容易地使用本文中描述之技術篩選來源於突變/變異 DNA 的產物以確定其是否具有受體結合活性及/或受體抑制活性。

在設計胺基酸序列突變體時，突變位點之位置及突變性質應取決於欲修飾之特徵。突變位點可個別地或連續地經修飾，例如藉由(1)首先用保守胺基酸選擇取代，隨後用較激進的選擇取代，視所達成之結果而定，(2)缺失目標殘基，或(3)鄰近定位位點插入其他殘基。

胺基酸序列缺失一般在約 1 至 15 個殘基、更佳約 1 至 10 個殘基且典型地約 1 至 5 個連續殘基之範圍內。

### 描述

本發明之發明人已鑑別關於生物治療劑及特定抗體之功能性及功效的若干態樣，且本發明之主要領域為藉由抑

制 C5a 結合於 C5aR 來治療發炎疾病之抗體。

本發明之一態樣係關於一系列抗體中之一或多者，其特徵為其功能性及/或 CDR 之胺基酸序列、重鏈及輕鏈之可變區及/或 Fc 域之序列。

在一個具體實例中，抗體為包括標準抗體結構域及區域之全長抗體。

在一個具體實例中，抗體為抗體片段，該等片段可使用習知重組或蛋白質工程改造技術獲得。本發明之抗體片段可藉由截短製得，例如藉由自多肽之 N 末端及/或 C 末端移除一或多個胺基酸。亦可藉由一或多個內部缺失產生片段。本發明之抗體可為或可包含本發明基礎抗體中之任一者之片段。本發明之抗體可為或可包含此等抗體或其變異體中之一者之抗原結合部分。舉例而言，本發明之抗體可為此等抗體或其變異體中之一者之 Fab 片段，或其可為來源於此等抗體或其變異體中之一者之單鏈抗體。

本發明之抗體可來自不同物種，包括哺乳動物物種，諸如小鼠、大鼠、兔、豬或非人類靈長類動物。抗體可為齧齒動物抗體且更特定言之為小鼠抗體。或者，抗體可來自非哺乳動物物種，諸如雞。抗體可進一步為人類化抗體或人類抗體。

本發明之抗體能夠與本發明之另一抗體競爭結合於如本文所述之 C5aR。該等交叉競爭抗體可在標準結合檢定中基於其與本發明之已知抗體交叉競爭之能力來鑑別。該交叉競爭可表明兩種抗體結合於相同、重疊或類似之抗原決

定基。

#### 人類抗體

如本文實施例中所述，本發明之發明人已鑑別一系列來源於包括人類免疫球蛋白生殖系基因座之轉殖基因小鼠之抗 C5aR 抗體。抗體以單株融合瘤抗體形式分離且評估結合特性。如所述，C5aR 為七跨膜 GPCR 且不可能產生保留天然構形之可溶形式。為產生阻斷 hC5a 與 hC5aR 之結合之人類抗體，用表現天然 hC5aR 之細胞對轉殖基因小鼠進行免疫接種。然而，阻斷性抗體極難獲得，且在鑑別出具有所需阻斷特性之人類抗體之前，本發明之發明人已進行 32 次融合。自超過 100,000 種融合瘤上清液之 35 次融合及篩選，獲得總共 11 種阻斷性抗體。

此外，由於 hC5aR 之性質，不可能藉由標準 Biacore 分析測定抗體之親和力，且因此基於功能 hC5aR 依賴性讀出建立檢定，從而如實施例 2 及實施例 7 中所述測定 IC50 及 EC50 值。

在一個態樣中，本發明係關於一種結合 C5aR 之人類抗體且進一步較佳抗體特異性結合 hC5aR，因此與 hC5aR 之結合強於與來自其他物種之 C5aR(諸如特定言之小鼠 C5aR)之結合。在一個具體實例中，較佳抗體結合 C5aR 之第二細胞外環且更佳結合人類 C5aR 之第二環。在一個具體實例中，抗體結合人類 C5aR 之第二細胞外環而非鼠類 C5aR 之第二細胞外環。在本發明抗體之其他具體實例中，抗體可僅結合天然構形之 C5aR 之第二細胞外環。

抗 C5aR 抗體之功能性取決於該抗體顯著抑制或降低 C5a 與 C5aR 之結合之能力。

在一個具體實例中，本發明係關於結合 C5aR 之人類抗體或如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體，其中該抗體能夠顯著抑制或降低 C5a 與 C5aR 之結合。此可藉由如本文實施例 2 中所述之置換檢定(displacement assay, SPA)測定，自該檢定可測定 IC<sub>50</sub> 值。自表 1 中顯而易知，經分離且描述之 11 種抗體具有低於 50 nM 之 IC<sub>50</sub> 濃度。在本發明之另一具體實例中，在 SPA 檢定中抗體能夠置換 hC5a，IC<sub>50</sub> 低於 50 nM，諸如低於 40 nM，諸如低於 30 nM，諸如低於 20 nM，諸如低於 10 nM，諸如低於 5 nM 或甚至低於 4 nM，或 IC<sub>50</sub> 低於 3 nM 或甚至低於 2.5 低於 nM 或 2.0 nM。

在其他檢定中，評估抗 C5aR 抗體抑制人類嗜中性白血球之 C5a 依賴性遷移的能力，且發現所鑑別之一些人類抗體為比先前所述 C5aR 抗體(來自 WO 2009/103113 之 Q)更有效之 C5a 介導性嗜中性白血球遷移的抑制劑。在一個具體實例中，本發明因此係關於如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體或結合 C5aR 之人類抗體，其中該抗體能夠顯著抑制人類嗜中性白血球之遷移。在一個具體實例中，相較於在 10 nM C5a 存在下但無抗 C5aR 抗體存在下所觀測之遷移程度，抗體抑制遷移至小於 50%、小於 40%、小於 30%、小於 20% 或小於 10%。在一個此類具體實例中，相較於在 10 nM C5a 存在下且無抗體存在下 30 分鐘後所觀測之遷移程度，在 10 nM C5a 及抗體存在下 30 分鐘後量測遷移。

或者，可使用基於相同設置之 IC50 值表現抗體抑制嗜中性白血球遷移的能力。在一個此類具體實例中，IC50 低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 1.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 1.2  $\mu\text{g/ml}$  或甚至低於 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

作為標準 Biacore 分析之替代方案，可如實施例 7 中所述藉由競爭結合檢定關於嗜中性白血球測定 hC5aR 抗體之功能性。此功能性稱作藉由競爭配體結合檢定所量測之抗體之親和力，但亦可視為相互作用之親合力之量測。在一個具體實例中，本發明係關於如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體或結合 C5aR 之人類抗體，其中如藉由競爭配體結合檢定關於嗜中性白血球所量測之抗體之親和力或親合力低於 0.80 nM、0.70 nM、0.60 nM，諸如低於 0.50 nM、0.45 nM、0.40 nM 或 0.35 nM。

用於特性化抗體之另一選項使用鈣通量檢定 (calcium-flux assay) 研究，鈣通量檢定量測抗體活體外抑制 C5a 誘導之嗜中性白血球活化的能力，同樣描述於實施例 7 中。在另一具體實例中，本發明係關於如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體或結合 C5aR 之人類抗體，其中如在鈣通量檢定中所測定之 IC50 低於 7.0  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 5.0  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 。

可使用其他活體外檢定基於諸如 CD11b 及 CD62L 表現之二級作用測定抗體抑制或中和 C5a 誘導之嗜中性白血球成熟之能力。CD11b 及 CD62L 為嗜中性白血球之成熟標記物，因為其在藉由 C5a/C5aR 相互作用活化時分別上調及下

調。

測定 CD11b 上調檢定中之作用。在一個具體實例中，本發明係關於如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體或結合 C5aR 之人類抗體，其中如在 CD11b 上調檢定中所測定之 IC50 低於 3.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如 3.0  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 2.0  $\mu\text{g/ml}$  或諸如 1.5  $\mu\text{g/ml}$  或甚至低於 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

同樣，測定抗體在 CD62L 下調檢定中之作用。在一個具體實例中，本發明係關於如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體或結合 C5aR 之人類抗體，其中如在 CD62L 下調檢定中所測定之 IC50 低於 1.8  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 1.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 1.2  $\mu\text{g/ml}$  或甚至低於 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

選擇四種單株抗體用於測序以測定可變區序列且特定言之 CDR 序列。序列比對提供於圖 1 中且序列同樣包括於隨附序列表中。

序列表包括關於經分離抗體之以下序列：

SEQ ID 1-3：Vh 35F32A3 CDR 1-3

SEQ ID 4：Vh 35F32A3

SEQ ID 5-7：Vl 35F32A3 CDR 1-3

SEQ ID 8：Vl 35F32A3

以類似方式，SEQ ID 9-16 描述 32F3A6

以類似方式，SEQ ID 17-24 描述 35F12A2

以類似方式，SEQ ID 25-32 描述 35F24A3

由可變區或 CDR 序列限定之抗體

本發明抗體因此可基於 CDR 序列、重鏈及輕鏈之可變區序列及可由熟習此項技術者在不改變抗體功能性之情況下對抗體進行之輕微修飾來限定。此包括各 CDR 序列內一或多個，諸如一個、兩個或三個胺基酸殘基之胺基酸取代、缺失或插入。

在一個態樣中，本發明係關於由 CDR 區域之序列限定的結合 C5aR 之抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含選自以下群組之 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列：

a) SEQ ID 1、2 及 3，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸；及

b) SEQ ID 9、10 及 11，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸；及

c) SEQ ID 17、18 及 19，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸；及

d) SEQ ID 25、26 及 27，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸。

在一個具體實例中，本發明係關於由 CDR 區域之序列限定的結合 C5aR 之抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列；

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 1、9、17、25 或其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代之該等序列中之一者；及

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 2、10、18、26 或其中

1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代之該等序列中之一者；及

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 3、11、19、27 或其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代之該等序列中之一者。

在一個具體實例中，本發明係關於由 CDR 區域之序列限定的結合 C5aR 之抗體，其中該抗體之輕鏈可變區包含選自以下群組之 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列：

a) SEQ ID 5、6 及 7，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸；及

b) SEQ ID 13、14 及 15，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸；及

c) SEQ ID 21、22 及 23，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸；及

d) SEQ ID 29、30 及 31，其中該等序列中之 0、1、2 或 3 者包含 1、2 或 3 個經不同胺基酸殘基取代之胺基酸。

在一個態樣中，本發明係關於由 CDR 區域之序列限定的結合 C5aR 之抗體，其中該抗體之輕鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列；

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 5、13、21、29 或其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代之該等序列中之一者；及

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 6、14、22、30 或其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代之該等序列中之一者；及

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 7、15、23、31 或其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代之該等序列中之一者。

在一個具體實例中，本發明係關於一種抗體，其中重鏈可變區之 CDR 包含 SEQ ID 1、2 及 3 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列，且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 5、6 及 7 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列。

在一個具體實例中，本發明係關於一種抗體，其中重鏈可變區之 CDR 包含 SEQ ID 9、10 及 11 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列，且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 13、14 及 15 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列。

在一個具體實例中，本發明係關於一種抗體，其中重鏈可變區之 CDR 包含 SEQ ID 17、18 及 19 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列，且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 21、22 及 23 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列。

在一個具體實例中，本發明係關於一種抗體，其中重鏈可變區之 CDR 包含 SEQ ID 25、26 及 27 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列，且其中可變輕

鏈之 CDR 包含 SEQ ID 29、30 及 31 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該序列。

因此，本發明之一具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含以下序列群組之一：SEQ ID 1、2 及 3，SEQ ID 9、10 及 11，SEQ ID 17、18 及 19，SEQ ID 25、26 及 27，或每一序列具有至多兩個取代、缺失及/或插入之該等序列；且其中該抗體之輕鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含以下序列群組之一：SEQ ID 5、6 及 7，SEQ ID 13、14 及 15，SEQ ID 21、22 及 23，SEQ ID 29、30 及 31，或每一序列具有至多兩個取代、缺失及/或插入之該等序列。

因此，本發明之一具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含以下序列群組之一：SEQ ID 1、2 及 3，SEQ ID 9、10 及 11，SEQ ID 17、18 及 19，SEQ ID 25、26 及 27，或每一序列具有至多一個取代、缺失及/或插入之該等序列；且其中該抗體之輕鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含以下序列群組之一：SEQ ID 5、6 及 7，SEQ ID 13、14 及 15，SEQ ID 21、22 及 23，SEQ ID 29、30 及 31，或每一序列具有至多一個取代、缺失及/或插入之該等序列。

因此，本發明之一具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中

該等 CDR 序列包含以下序列群組之一：SEQ ID 1、2 及 3，SEQ ID 9、10 及 11，SEQ ID 17、18 及 19，SEQ ID 25、26 及 27；且其中該抗體之輕鏈可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含以下序列群組之一：SEQ ID 5、6 及 7，SEQ ID 13、14 及 15，SEQ ID 21、22 及 23，SEQ ID 29、30 及 31。

本發明之一具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性之序列。

在一個具體實例中，本發明係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 96%、97%、98% 或 99% 一致性之序列。

本發明之一態樣係關於一種抗體，其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性之序列。

本發明之一個具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 96%、97%、98% 或 99% 一致性之序列。

因此，本發明之一具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性之序列，及/或其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性之序列。

本發明之一個具體實例係關於一種抗體，其中該抗體

之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 4 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列，及/或其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 8 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列。

本發明之一個具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 12 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列，及/或其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 16 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列。

因此，本發明之一個具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 20 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列，及/或其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 24 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列。

因此，本發明之一個具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 28 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列，及/或其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 32 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列。

本發明之一個具體實例係關於一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 39 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列，及/或其中該抗體之輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 40 具有至少 96%、97%、98%或 99%一致性之序列。

本發明之一個具體實例為一種抗體，其中該抗體之重鏈可變區由 SEQ ID NO 39 鑑別，及/或其中該抗體之輕鏈可變區由 SEQ ID NO 40 鑑別。

在抗體成熟期間，構架區中可發生自發突變，如本文實施例 6 及實施例 7 中所述，一種經分離單株抗體之可變區與人類抗體生殖系序列進行比較以鑑別可變重鏈與輕鏈之最接近人類生殖系序列。為使免疫反應風險降至最低，因此決定藉由在構架區中引入點突變以建構在構架區中具有人類生殖系序列之抗體而進一步最佳化抗體，自實驗可見，此不會影響抗體之功能性。在一個具體實例中，本發明係關於由與如上文所述之參考抗體之可變區的序列一致性所限定之抗體，其中該抗體之重鏈及/或輕鏈之可變區在構架區中包含一或多個突變。根據本發明，引入一或多個突變以增加與最接近人類生殖系序列之一致性可具有吸引力，但亦可考慮其他突變。在一個具體實例中，該(等)突變為保守突變。

#### 由 Fc 區限定之抗體

Fc 區使得抗體能夠活化免疫系統且抗體可經工程改造以在 Fc 區內包括修飾，從而典型地改變其一或多種功能性質，諸如血清半衰期、補體固定、Fc 受體結合、蛋白質穩定性及/或抗原依賴性細胞毒性，或使其缺乏一或多種功能性質。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如，一或多個化學部分可連接至抗體)或經修飾以改變其糖基化，再次改變抗體之一或多種功能性質。

本發明之一個態樣係關於結合 C5aR 之抗體或如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體，其中 Fc 區對一或多種 Fc $\gamma$ R 之結合親和力降低或消除。

在一個具體實例中，本發明係關於如上文所述結合 C5aR、較佳人類 C5aR 之抗體或如本文藉由序列定義(參見下文)所述之抗體，其中 Fc 區對一或多種 Fc $\gamma$ R 之結合親和力降低。

在一個具體實例中，本發明之抗體相較於分別由 SEQ ID NO 33、34、35 及 36 定義之 IgG1、IgG2、IgG2/4 或 IgG4 Fc 參考序列對一或多種 Fc $\gamma$ R 呈現降低之結合親和力。因為特定胺基酸殘基可能負責 Fc $\gamma$ R 相互作用及由其介導之作用，故宜應用其中 Fc 區之該等特定胺基酸殘基已經不同胺基酸取代之抗體。

在一個具體實例中，相較於分別由 SEQ ID NO 33、34、35 及 36 定義之 IgG1、IgG2、IgG4/G2 或 IgG4Fc 參考序列，該 Fc 區包括一或多個點突變，從而降低對一或多種 Fc $\gamma$  受體或補體組分之親和力。

為評估在 Fc 區中引入點突變之結果，如實施例 4 中所述評估一系列抗 C5aR 抗體之效應功能。建立吞噬作用檢定以量測 Fc 區在抗 hC5aR 抗體誘導嗜中性白血球(表現 hC5aR)經人類單核細胞吞噬之能力中的作用。自表 2 可見，在所述檢定中若干種 Fc 變異體降低由抗 C5aR 抗體誘導之吞噬作用之程度。

在本發明抗體之一個具體實例中，抗體不會顯著誘導

試管內嗜中性白血球之吞噬作用，意謂吞噬作用程度並不顯著高於如在抗 C5aR 抗體不存在下所量測之背景值。在一個具體實例中，抗體不會產生對吞噬作用之任何可偵測誘導作用。可如實施例 4 中所述使用人類嗜中性白血球進行用於評估吞噬作用程度之檢定。

在替代檢定中，評估抗 hC5aR 抗體誘導 ADCC (抗體依賴性細胞毒性)及 CDC (補體依賴性細胞毒性)之能力。建立檢定以測試 Fc 變異體經由 ADCC 或 CDC 依賴性機制介導細胞去除之能力，且假定能夠模擬活體內情形下之活性。

如實施例 4 中所述，該等檢定應用表現 hC5aR 之細胞作為目標細胞及效應細胞(經去除單核細胞之 PMBC)或應用含有補體之血清來引發反應。

在本發明抗體之一個具體實例中，抗體不會顯著誘導 ADCC，意謂 ADCC 程度不會顯著高於如在抗 C5aR 抗體不存在下所量測之背景值。在一個具體實例中，抗體不會產生對 ADCC 之任何可偵測誘導作用，亦即，ADCC 程度不高於背景值。

在本發明抗體之一個具體實例中，抗體不會顯著誘導 CDC。在一個具體實例中，抗體不會產生對 CDC 之任何可偵測誘導作用，亦即，CDC 程度不高於背景值。

在一個具體實例中，本發明抗體包含序列已經修飾以改變一或多種效應細胞功能之 Fc 區。可藉由胺基酸序列中之點突變來獲得 Fc 序列之修飾。重鏈 Fc 區可為 IgG1、IgG2、IgG4 或 IgG2/4 嵌合序列。參考序列於序列表中定義

如下：IgG1 由 SEQ ID NO: 33 定義，IgG2 由 SEQ ID NO: 34 定義，IgG2/4 由 SEQ ID NO: 35 定義且 IgG4 由 SEQ ID NO: 36 定義。

在一個具體實例中，Fc 區為 IgG1 (SEQ ID NO: 33)、IgG2 (SEQ ID NO: 34)、IgG2/4 (SEQ ID NO: 35) 或 IgG4 (SEQ ID NO: 36)，具有以下點突變中之一或多者：

- a. E233P
- b. L234A 或 V234A 或 F234L 或 F234V
- c. L235E 或 L235A
- d. G236R 或 G236A
- e. G237A
- f. S239D
- g. S254W
- h. N297Q
- i. L328R
- j. A330S
- k. P331S
- l. I332E。

Fc 變異體之間的差異在於其與 Fc $\gamma$ R 或如上文所述之補體系統之組分相互作用的能力。Fc 區中之序列差異進一步影響抗體之結構及可撓性，其亦可影響抗體功能。如實施例 5 及表 3 中所述，本發明之發明人進一步說明，Fc 區為具有或不具有另外點突變之 IgG1 型的抗 hC5aR 抗體相較於具有 IgG4 型 Fc 區之相應抗體為更有效之 hC5aR 介導之

作用的抑制劑。因此，本發明之一具體實例係關於任何具有 IgG1 同型 Fc 區或至少 IgG1 同型 Fc 鉸鏈區的本文所定義抗體。

在一個具體實例中，相較於如 SEQ ID NO.33 所定義之 IgG1 Fc 參考序列，IgG1 Fc 區包含 1 至 10 個胺基酸取代。較佳 Fc 區包含較少突變，諸如 AA 231 至 240 內 1 至 8 個胺基酸取代，或諸如 AA 328 至 334 內 1 至 5 個胺基酸取代。胺基酸取代較佳選自如上文所述降低抗體顯著誘導試管內嗜中性白血球之吞噬作用、ADCC 及/或 CDC 之能力的取代。

在一個具體實例中，抗體 Fc 區為包含一或多個以下點突變之 IgG1：

- a) N297Q 及/或
- b) L234A 及/或
- c) L235E 或 L235A 及/或
- d) G236R 或 G236A 及/或
- e) G237A 及/或
- f) L328R 及/或
- g) A330S 及/或
- h) P331S。

在一個具體實例中，抗體 Fc 區為包含一或多個以下點突變群組之 IgG1：

- a) N297Q 及/或
- b) L234A 及 L235E 及/或
- c) L234A 及 G236R 及/或

- d) L235E 及 G236R 及 /或
- e) L234A、L235E 及 G236R 及 /或
- f) G236R 及 L328R 及 /或
- g) N297Q、L234A 及 L235E 及 /或
- h) N297Q、L234A、L235E 及 G236R 及 /或
- i) N297Q、L234A、L235E 及 G237A 及 /或
- j) L234A、L235E、G237A、A330S 及 P331S，
- k) N297Q、L234A、L235E、G237A、A330S 及 P331S。

在一個具體實例中，抗體 Fc 區為包含一或多個以下點突變群組之 IgG1：

- a) N297Q 及 /或
- b) L234A 及 L235E 及 /或
- c) G236R 及 L328R 及 /或
- d) N297Q、L234A 及 L235E 及 /或
- e) N297Q、L234A、L235E 及 G237A 及 /或
- f) L234A、L235E、G237A、A330S 及 P331S。

熟習此項技術者應明瞭，可基於取代胺基酸殘基之標準準則在重鏈與輕鏈之構架區內引入點突變在本發明之範疇內。如本文所述之功能檢定可用於確定該等突變不會影響抗體之功能性。

自上文顯而易知，所鑑別抗體之結合特異性由可變區或 CDR 提供，且應明瞭，本發明涵蓋不同類型之具有類似抗原結合區之抗體。

在本發明之一個具體實例中，抗體為全長抗體。在本

發明之一個具體實例中，抗體為抗體片段或單鏈抗體。在一個具體實例中，抗體為單株抗體。在一個具體實例中，抗體為人類、小鼠、大鼠、兔、豬或非人類靈長類動物抗體。在一個具體實例中，抗體為小鼠或人類抗體。在一個具體實例中，抗體為人類抗體。在一個具體實例中，抗體為人類化抗體。如本申請案之定義部分中所述，人類化抗體至少包括並非來源於人類生殖系序列之 CDR 區域。自上文進一步顯而易知，人類抗體相較於生殖系序列可包含一或多個點突變，但一般認為序列應至少在構架區或 Fc 區中與人類生殖系序列具有至少 95% 一致性。

#### 醫藥調配物

本發明進一步包括醫藥組成物/調配物，其包含醫藥學上可接受之載劑及本發明之多肽或抗體；以及包含該等組成物之套組。

在本發明之一態樣中，本發明之抗體可調配於醫藥組成物中。該醫藥組成物可基於領域中（諸如藥典 (Pharmacopeia) 或雷明頓 (Remington) 中）之一般知識製備。

在一個具體實例中，本發明之醫藥組成物包含如本文所述之抗體與醫藥學上可接受之載劑。調配物可呈水性調配物或乾燥調配物形式，該乾燥調配物在投藥前於水或水性緩衝組成物中復原。

本發明抗體之醫藥組成物可包含鹽及/或緩衝液，諸如 WO2011/104381 中所述之組成物。

在其他具體實例中，本發明抗體之醫藥組成物可適於

多種用途，諸如 WO2011/147921 中所述之組成物。

### 治療方法

本發明之一態樣係關於一種治療或預防個體之病症的方法，該方法包含向有需要之個體投予治療量之如本文所述之抗體。如諸如 WO 2009/103113 之先前公開案中所述，抗 C5aR 抗體可用於/適於治療多種疾病及病症。因此，本發明之一具體實例係關於治療免疫疾病或病症、特定言之發炎疾病之方法。本文實施例 8 藉由在小鼠關節炎模型中證實本發明抗 C5aR 抗體之功能性而進一步支持此觀點。實施例 9-11 證實在來自牛皮癬性關節炎、克羅恩氏病 (Crohn's disease) 及潰瘍性結腸炎患者之組織樣品中 C5aR 上調。進一步證實，抗 C5aR 抗體可抑制由來自牛皮癬性關節炎患者之滑液誘導的 PMN 之細胞遷移。

治療方法可旨在治癒疾病或病症，但關於包括免疫疾病及發炎疾病在內之一些疾病(諸如慢性疾病或病症)，一或多種症狀之減輕亦視為治療，其可為對個體之顯著改善，即使僅獲得症狀之部分減輕或作用僅為暫時或局部的。

本發明之方法包括一或多種疾病之治療，包括(但不限於)類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、I 型糖尿病、格雷夫氏病(Grave's disease)、發炎性腸病(IBD)、克羅恩氏病(CD)、潰瘍性結腸炎(UC)、大腸急躁症候群、多發性硬化(MS)、自體免疫心肌炎、川崎氏病(Kawasaki disease)、冠狀動脈病、慢性阻塞性肺病(COPD)、間質性肺病、自體免疫甲狀腺炎、

硬皮病、全身性硬化、骨關節炎、異位性皮炎、白斑病、移植物抗宿主疾病、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、自體免疫腎炎、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、慢性炎症、髓鞘脫失多發性神經病、ANCA 相關血管炎、葡萄膜炎、硬皮病、大皰性類天疱瘡、阿茲海默氏病(Alzheimer's Disease)、肌萎縮性側索硬化、亨爾頓氏舞蹈病(Huntington's Chorea)、囊腫性纖維化、痛風、年齡相關黃斑變性、過敏症、哮喘及由急性或慢性炎症引起之其他自體免疫疾病。在另一具體實例中，疾病或病症為急性或慢性炎症，其中該病症可為自體免疫疾病。在一個具體實例中，病症為類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性腸病(IBD)(包括克羅恩氏病(CD)或潰瘍性結腸炎(UC)或大腸急躁症候群)。在其他具體實例中，病症為 RA 或 SLE。除慢性疾病以外，抗 C5aR 抗體關於急性適應症可為恰當的，諸如移植、局部缺血/再灌注損傷(例如急性心肌梗塞、中風)、敗血症(例如 SIRS、MODS、ALI)、動脈粥樣硬化及腦內出血(ICH)。

在另一態樣中，本發明係關於如本文所述之抗體、經分離抗體或抗體組成物，用於治療疾病或病症。在其他具體實例中，該抗體、經分離抗體或抗體組成物用於治療上文關於治療方法所述之一或多種疾病及病症。

本發明之一態樣係關於如本文所述之抗體、經分離抗體或抗體組成物之用途，其用於製備供治療疾病或病症之藥物，其中該疾病或病症可如上文關於治療方法所述。

### 投藥模式

本發明之抗體可非經腸投予，諸如經靜脈內，諸如經肌肉內，諸如經皮下。或者，本發明之抗體可經由經腸途徑投予，諸如經口或經局部。本發明之抗體可預防性投予。在一較佳具體實例中，抗體經靜脈內或經皮下投予。

投藥之劑量及時程最有可能取決於包括以下之多種因素：疾病/病症或相關症狀以及所討論之個體。一般而言，預期抗體以 0.010 mg/kg 至 4-6 mg/kg 之劑量投予。同樣，抗體之給藥方案亦將取決於個別個體及該個體之疾病狀況，但根據本發明希望使用如下治療，其中每週一次或每兩週一次或甚至以更長時間間隔(諸如每月一次)向個體投予抗體(或抗體組成物)。

本發明之抗體可按需要投予，亦即基於患者經歷，例如當出現特定症狀時或當特定生物標記之量達到預定水準時，可投予抗體。

### 特定組合治療

本發明之抗體可與一或多種其他治療劑或調配物共同投予。其他藥劑可為增強本發明抗體之作用的藥劑。其他藥劑可意欲治療患者之其他症狀或病狀。舉例而言，其他藥劑可為止痛劑、免疫抑制劑或消炎劑。其他藥劑可為另一種單株抗體，諸如國際專利申請案 WO 2008/022390 及 WO 2009/103113 中所述單株抗體之一。

兩種或兩種以上藥劑之組合投予可以多種不同方式達成。在一個具體實例中，抗體及其他藥劑可於單一組成物

中一起投予。在另一具體實例中，抗體及其他藥劑可於各別組成物中作為組合療法之一部分投予。舉例而言，調節劑可在其他藥劑之前、之後或同時投予。

本發明之抗體可與其他藥物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、地塞米松(dexamethasone)及潑尼松(prednisone))及/或其他生物藥物一起投予。在根據本發明之一個具體實例中，抗體可與一或多種治療劑共同投予，該一或多種治療劑選自如 WO 2009/103113 中所述之 ATC 代碼 M01C 類別之抗風濕藥物及 ATC 代碼 L04 之免疫抑制劑，包括(但不限於)硫唑嘌呤(azathioprine)、氯喹(chloroquine)、羥氯喹(hydroxychloroquine)、環孢靈(cyclosporine)、D-青黴胺(D-penicillamine)、金鹽(硫金蘋果酸鈉(sodium aurothiomalate)、金諾芬(auranofin)、來氟米特(leflunomide)、甲胺喋呤、二甲胺四環素(minocycline)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)及環磷醯胺(cyclophosphamide)、糖皮類固醇(glucocorticosteroid)、黴酚酸(mycophenolic acid)或黴酚酸酯(mycophenolate)及他克莫司(tacrolimus)及在各別具體實例中硫酸羥氯喹(Plaquenil)、磺胺塞拉金(Azulfidine)及甲胺喋呤、地塞米松及/或潑尼松中之一或多者。

在另一實例中，本發明之抗體亦可與其他抗體(例如與結合趨化因子受體(包括但不限於 CCR2 及 CCR3)之抗體組合)或與抗 TNF 或其他消炎劑或與現有血漿產品(諸如用於預防性或治療性治療之市售  $\gamma$  球蛋白及免疫球蛋白產品)組

合使用。本發明之抗體可以結合抗生素及/或抗微生物劑給予之各別投予之組成物形式使用。

因此抗體可與如下藥劑組合投予，諸如已用於自體免疫中之藥劑，包括(但不限於)免疫調節劑，諸如 IFN- $\beta$ 、Orencia™ (CTLA4-Ig)、Humira™ (抗 TNF)、Cimzia™ (抗 TNF、PEG Fab)、Tysabri™ (a4-整合素 mAb)、Simponi™、Rituxan/MabThera™、Actemra/RoActemra™、Kineret™、瑞體膚(Raptiva)、優特克單抗(Ustekimumab)、非類固醇消炎藥(NSAIDS)(如 Aspirin™、Ibuprofen™等)、皮質類固醇、改善疾病之抗風濕藥物(DMARDS)(如 Plaquenil™、Azulfidine™、Methotrexate™等)、Copaxone™ (乙酸格拉默(glatirimer acetate))、Gilneya™ (芬戈莫德(fingolimod))、抗生素(如 Flagyl™、Cipro™)、局部(皮膚施用)藥物(包括局部皮質類固醇、維生素 D 類似物乳膏(Dovonex™)、局部類視黃素(Tazorac™)、保濕劑、局部免疫調節劑(他克莫司及吡美莫司(pimecrolimus))、煤焦油、蔥三酚(anthralin)及其他)，且另外如 PUVA、UVB 之光療法及 CellCept™ (黴酚酸嗎啉乙酯(mycophenolate mofetil))亦可與使用本發明抗體之治療組合。

在本發明抗體可添加至該治療方案中之情況下，待治療之個體可能已用一或多種其他藥物治療。

### 抗體製備方法

抗體可藉由此項技術中已知之主要依賴於用於製備抗體之融合瘤純系或抗體於重組宿主中表現之多種方法來製

備，其中抗體於重組宿主中表現描述於 WO2010/000864 中。基於此項技術中之知識，可建構編碼所需抗體鏈之核苷酸序列且用於抗體之重組表現，其中重鏈及輕鏈可自一種或兩種各別聚核苷酸表現。

在另一態樣中，本發明係關於一或多種編碼本文所述抗體之抗體鏈之多肽序列的經分離聚核苷酸。

另一具體實例係關於宿主細胞，其包含一或多種編碼本文所述抗體之抗體鏈之多肽序列的聚核苷酸。

本發明進一步關於製備本發明抗體之方法，其包含在支持抗體鏈之一或多種多肽序列之表現的條件下培養上文所述之宿主細胞。該方法可進一步包括抗體鏈由一個連續聚核苷酸上之兩個各別開放閱讀框架編碼及視情況自該宿主細胞培養物回收抗體。

本發明可(但不限於)由以下具體實例描述。

### 具體實例

1. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 1 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 2 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 3 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

2. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、

CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 1、2 及 3 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

3. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 1、2 及 3 一致。

4. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 5 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 6 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 7 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

5. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 5、6 及 7 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

6. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 5、6 及 7 一致。

7. 一種抗體，其中該重鏈之可變區如具體實例 1、2 或 3 中任一項所定義且其中該輕鏈之可變區如具體實例 4、5 或 6 中任一項所定義。

8. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 9 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 10 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 11 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

9. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 9、10 及 11 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

10. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 9、10 及 11 一致。

11. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 13 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 14 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 15 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

12. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含

CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 13、14 及 15 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

13. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 13、14 及 15 一致。

14. 一種抗體，其中該重鏈之可變區如具體實例 8、9 或 10 中任一項所定義且其中該輕鏈之可變區如具體實例 11、12 或 13 中任一項所定義。

15. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 17 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 18 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 19 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

16. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 17、18 及 19 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

17. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 17、18 及 19 一致。

18. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 21 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 22 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 23 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

19. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 21、22 及 23 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

20. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 21、22 及 23 一致。

21. 一種抗體，其中該重鏈之可變區如具體實例 15、16 或 17 中任一項所定義且其中該輕鏈之可變區如具體實例 18、19 或 20 中任一項所定義。

22. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 25 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 26 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 27 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

23. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 25、26 及 27 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

24. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 25、26 及 27 一致。

25. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 29 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 30 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 31 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該序列。

26. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列包含 SEQ ID 29、30 及 31 或該等序列之變異體，其中 1、2 或 3 個胺基酸經不同胺基酸殘基取代。

27. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，其中該等 CDR 序列與 SEQ ID 29、30 及 31 一致。

28. 一種抗體，其中該重鏈之可變區如具體實例 22、23 或 24 中任一項所定義且其中該輕鏈之可變區如具體實例 25、26 或 27 中任一項所定義。

29. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性的序列。

30. 如具體實例 29 之抗體，其中該抗體之重鏈之可變區在構架區中包含一或多個突變。

31. 如具體實例 29 之抗體，其中該(等)突變為保守突變。

32. 如具體實例 29 之抗體，其中該(等)突變增加與最接近人類生殖系序列之一致性。

33. 如具體實例 32 之抗體，其中該抗體之重鏈之可變區由 SEQ ID NO 39 鑑別。

34. 一種抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性的序列。

35. 如具體實例 34 之抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區在構架區中包含一或多個突變。

36. 如具體實例 35 之抗體，其中該(等)突變為保守突變。

37. 如具體實例 35 之抗體，其中該(等)突變增加與最接近人類生殖系序列之一致性。

38. 如具體實例 34 之抗體，其中該抗體之輕鏈之可變

區由 SEQ ID NO 40 鑑別。

39. 一種抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性的序列，且其中其中該抗體之輕鏈之可變區包含與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 80%、85%、90% 或 94% 一致性的序列。

40. 如具體實例 39 之抗體，其中該等重鏈可變區之序列與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 96%、諸如 97%、諸如 98% 或諸如 99% 一致性，且其中該輕鏈可變區之序列與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 96%、諸如 97%、諸如 98% 或諸如 99% 一致性。

41. 如具體實例 39 或 40 之抗體，其中該抗體之重鏈之可變區在構架區中包含一或多個突變，及/或其中該抗體之輕鏈之可變區在構架區中包含一或多個突變。

42. 如具體實例 41 之抗體，其中該(等)突變為保守突變。

43. 如具體實例 41 之抗體，其中該(等)突變增加與最接近人類生殖系序列之一致性。

44. 如具體實例 41 之抗體，其中該抗體之重鏈之可變區由 SEQ ID NO 39 鑑別，及/或其中該抗體之輕鏈之可變區由 SEQ ID NO 40 鑑別。

45. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體結合 C5aR。

46. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為全

長抗體或抗體片段或單鏈抗體。

47. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為單株抗體。

48. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為人類、小鼠、大鼠、兔、豬或非人類靈長類動物抗體。

49. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為小鼠或人類抗體。

50. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為人類抗體或人類化抗體。

51. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為人類抗體。

52. 一種結合 C5aR 之人類抗體。

53. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體結合人類 C5aR。

54. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體結合 C5aR 之第二細胞外環。

55. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體結合人類 C5aR 之第二細胞外環。

56. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體結合人類 C5aR 而非鼠類 C5aR。

57. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體結合人類 C5aR 之第二細胞外環而非鼠類 C5aR 之第二細胞外環。

58. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體僅結合天然構形之人類 C5aR 之第二細胞外環。

59. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體顯著抑制或降低 C5a 與人類 C5aR 之結合。

60. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體能夠在 SPA 檢定中置換 C5a，IC50 低於 10 nM 或低於 5 nM 或較佳低於 3 nM。

61. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體顯著抑制試管內人類嗜中性白血球之遷移。

62. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中當在 10 nM C5a 存在下 30 分鐘後量測時，相較於在 10 nM C5a 存在下但無抗體存在下 30 分鐘後所觀測之遷移程度，該抗體將遷移降低至小於 50%、小於 40%、小於 30%、小於 20%、小於 15% 或小於 10%，或其中相同設置中之 IC50 低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 1.5  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 1.2  $\mu\text{g/ml}$  或甚至低於 1.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

63. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中如藉由競爭配體結合檢定關於嗜中性白血球所量測之抗體之親和力低於 0.80 nM，諸如低於 0.50 nM 或 0.35 nM。

64. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體中和活體外 C5a 誘導之嗜中性白血球活化，其中如鈣通量檢定中所測定之 IC50 低於 7.0  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 5.0  $\mu\text{g/ml}$ ，諸如低於 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 。

65. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體抑制活體外 C5a 誘導之嗜中性白血球成熟，其中

a. 如在 CD11b 上調檢定中所測定之 IC50 低於 3.5

μg/ml，諸如低於 2.5 μg/ml，諸如低於 1.5 μg/ml 或甚至低於 1.0 μg/ml，或

b. 如在 CD62L 下調檢定中所測定之 IC50 低於 1.8 μg/ml，諸如低於 1.5 μg/ml，諸如低於 1.2 μg/ml 或甚至低於 1.0 μg/ml。

66. 一種結合 C5aR 之抗體，其中 Fc 區相較於分別由 SEQ ID NO 33、34、35 及 36 定義之 IgG1、IgG2、IgG4 或 IgG4/G2 Fc 參考序列對一或多種 Fc $\gamma$  受體之親和力降低/結合降低。

67. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該 Fc 區相較於分別由 SEQ ID NO 33、34、35 及 36 定義之 IgG1、IgG2、IgG4 或 IgG4/G2 Fc 參考序列包括一或多個點突變，從而降低對一或多種 Fc $\gamma$  受體之親和力。

68. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體不會顯著誘導試管內嗜中性白血球之吞噬作用。

69. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體不會顯著誘導試管內 ADCC。

70. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體不會顯著誘導試管內 CDC。

71. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該 Fc 區為 IgG1 (SEQ ID NO: 33)、IgG2 (SEQ ID NO: 34)、IgG2/4 (SEQ ID NO: 35) 或 IgG4 (SEQ ID NO: 36)，具有以下點突變中之一或多者：

a. E233P

- b. L234A 或 V234A 或 F234L 或 F234V
- c. L235E 或 L235A
- d. G236R 或 G236A
- e. G237A
- f. N297Q
- g. L328R
- h. A330S
- i. P331S。

72. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該 Fc 區為 IgG1 或 IgG1 突變體。

73. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該 Fc 區為相較於如 SEQ ID NO. 33 中所定義之 IgG1 Fc 參考序列包含 1 至 10 個胺基酸取代的 IgG1 Fc 突變體。

74. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該 Fc 區為在 AA 231 至 240 中包含 1 至 8 個胺基酸取代的 IgG1 Fc 突變體，其中 IgG1 Fc 參考序列如 SEQ ID NO. 33 所定義。

75. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該 Fc 區為在 AA 328 至 334 中包含 1 至 5 個胺基酸取代的 IgG1 Fc 突變體，其中 IgG1 Fc 參考序列如 SEQ ID NO. 33 所定義。

76. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體 Fc 區為 IgG1，具有以下點突變群組中之一或多者：

- a. N297Q 及 / 或
- b. L234A 及 L235E 及 / 或
- c. G236R 及 L328R 及 / 或

d. N297Q、L234A 及 L235E 及 /或

e. N297Q、L234A、L235E 及 G237A 及 /或

f. L234A、L235E、G237A、A330S 及 P331S。

77. 如前述具體實例 52 至 76 中任一項之抗體，其中該抗體為全長抗體或抗體片段或單鏈抗體。

78. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為單株抗體。

79. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為人類、小鼠、大鼠、兔、豬或非人類靈長類動物抗體。

80. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為小鼠或人類抗體。

81. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為人類抗體或人類化抗體。

82. 如前述具體實例中任一項之抗體，其中該抗體為人類抗體。

83. 如前述具體實例中任一項之抗體，其用於治療免疫疾病或病症。

84. 如具體實例 83 之抗體，其中該病症為發炎疾病。

85. 如具體實例 83 之抗體，其中該病症為急性或慢性炎症。

86. 如具體實例 83 之抗體，其中該病症為自體免疫疾病。

87. 如具體實例 83 至 86 中任一項之抗體，其中該抗體經靜脈內或皮下投予。

88. 如前述具體實例 83 至 87 中任一項之抗體，其中該抗體以 0.010 mg/kg 至 6 mg/kg 之劑量投予。

89. 如前述具體實例 83 至 88 中任一項之抗體，其中該抗體每週一次或每兩週一次投予。

90. 如前述具體實例 83 至 89 中任一項之抗體，其中該抗體與另一藥物組合投予。

91. 如前述具體實例 83 至 90 中任一項之抗體，其中該疾病或病症為類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性腸病(IBD)、克羅恩氏病(CD)、潰瘍性結腸炎(UC)或大腸急躁症候群。

92. 如前述具體實例 83 至 91 中任一項之抗體，其中該患者正用諸如甲胺喋呤之另一藥物治療。

93. 一種治療或預防個體之病症之方法，該方法包含向有需要之個體投予治療量之如具體實例 1 至 82 中任一項之抗體。

94. 如具體實例 93 之方法，其中該病症為免疫疾病或病症。

95. 如具體實例 93 或 94 之方法，其中該抗體經靜脈內或皮下投予。

96. 如具體實例 93 至 95 中任一項之方法，其中該抗體以 0.010 mg/kg 至 6 mg/kg 之劑量投予。

97. 如具體實例 93 至 96 中任一項之方法，其中該抗體每週一次或每兩週一次投予。

98. 如具體實例 93 至 97 中任一項之方法，其中該抗體

與至少一種其他藥物組合投予。

99. 如具體實例 93 至 98 中任一項之方法，其中該病症為免疫病理學病症，諸如自體免疫疾病。

100. 如具體實例 93 至 99 中任一項之方法，其中該個體為罹患類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性腸病(IBD)、克羅恩氏病(CD)、潰瘍性結腸炎(UC)或大腸急躁症候群之患者。

101. 如具體實例 93 至 101 中任一項之方法，其中該患者正用另一藥物治療。

102. 一種醫藥組成物，其包含如具體實例 1 至 82 中任一項之抗體視情況以及醫藥學上可接受之載劑。

103. 如具體實例 102 之醫藥組成物，其呈水性調配物或乾燥調配物形式，該乾燥調配物在投藥前於水/水性緩衝液中復原。

104. 一種經分離聚核苷酸，其編碼如具體實例 1 至 82 中任一項之抗體之多肽序列。

105. 一種宿主細胞，其包含一或多種如具體實例 104 之聚核苷酸。

106. 一種製備如具體實例 1 至 82 中任一項之抗體的方法，其包含在支持該抗體之一或多種多肽序列之表現的條件下培養如具體實例 105 之宿主細胞。

107. 如具體實例 106 之方法，其中重鏈及輕鏈由一個連續聚核苷酸上之兩個各別開放閱讀框架編碼。

108. 如具體實例 106 或 107 之方法，其進一步包含自

該宿主細胞培養物回收該抗體。

109. 一種如具體實例 1 至 82 中任一項之抗體的用途，其用於製造藥物。

110. 一種如具體實例 1 至 82 中任一項之抗體的用途，其用於製造供治療諸如類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性腸病(IBD)或大腸急躁症候群之免疫疾病或病症的藥物。

### 實施例

#### 實施例 1：人類抗 hC5aR 抗體之產生

##### 免疫接種及篩選

一般而言，產生針對 GPCR 之抗體為困難的，此係因為具有恰當天然蛋白質構形之可溶性蛋白質極難(若非可能)產生。傳統上，過度表現 GPCR 之細胞已用於免疫接種，但所產生之抗體反應趨向於極具非特異性，使得難以鑑別具有所需特徵(亦即能夠阻斷配體結合及 GPCR 信號傳導)之抗體。實際上，本發明之發明人發現開發可阻斷 C5a 與 C5aR 之結合之人類抗 hC5aR 抗體極具挑戰性，且在鑑別此等抗體之前應用多種免疫接種策略。

用具有人類 C5aR 高表現(每個細胞約 80,000 個複本)之 L1.2 小鼠細胞(小鼠 B 細胞淋巴瘤株)對 HumAb 小鼠(Medarex)進行免疫接種(Lee 等人, Nat. Biotechnol, 2006; 10:1279-1284)，且使用標準程序將來自經免疫接種之小鼠之脾細胞用於細胞融合。由於缺乏可溶性 hC5aR，故在標準 ELISA 檢定中無法篩選上清液，且因此建立基於細胞之結

合檢定。藉由如 WO2008/022390 中所述之 FACS 分析，測試所得融合瘤上清液與穩定表現高數目(每個細胞約 1,000,000 個複本)天然 hC5aR 之經轉染大鼠細胞株(RBL)的結合。一般而言，將融合瘤上清液與未經轉染細胞(經 CellTracker 標記)與經 hC5aR 轉染之細胞或來自 hC5aR 基因剔除/基因嵌入(KOKI)小鼠(WO 2005/060739)之嗜中性白血球之混合物一起培育，且與結合 APC 之 F(ab')<sub>2</sub> 山羊抗人類 IgG (IgG-APC)一起培育。鑑別出結合於經 hC5aR 轉染之細胞但不結合於未經轉染之細胞的上清液，且次選殖產生抗 hC5aR 之融合瘤並測試其與人類嗜中性白血球及自 KOKI 小鼠分離之骨髓源嗜中性白血球的結合(數據未示)。使用蛋白質 A 瓊脂糖及標準方案自融合瘤上清液純化抗 hC5aR 抗體。

### 實施例 2：抗 hC5aR 抗體之鑑別及特性化

如所述，獲得人類抗 hC5aR 抗體之方法有難度，且在鑑別 hC5a/hC5aR 阻斷性抗體之前必須進行 32 次融合。自超過 100,000 種融合瘤上清液之 35 次融合及篩選，僅鑑別出 11 種可阻斷 hC5a 與 hC5aR 之結合之純系。下文描述在抗體特性化中所應用之檢定。WO2009/103113 中描述參考抗體(參考抗體 Q)。另外，其他適於測定鈣通量檢定及 CD11b 上調中之親和力及功能性的檢定描述於實施例 7 中。

### 置換檢定

應用閃爍近接檢定(Scintillation Proximity Assay, SPA)來測定抗 hC5aR 抗體置換結合於 hC5aR 之 hC5a 之效能。

關於 SPA 之詳細描述提供於美國專利 4568649 及由製造商 (Amersham Biosciences) 提供之方案中。簡言之，自 RBL-hC5aR 細胞純化之載有受體之膜片段結合於塗有麥芽凝集素 (wheat germ agglutinin, WGA) 之閃爍微粒。添加經放射性標記之 hC5a ( $^{125}\text{I}$ ) 示蹤劑後，結合於受體將引起粒子發光。SPA 原理所特有之情況為：僅有彼此緊接之放射性同位素及粒子才會發光。亦即，僅有結合於受體之經放射性標記之 hC5a 足夠接近 WGA 粒子從而產生光。因此所發射光之量表示結合受體之  $^{125}\text{I}$ -hC5a 之量。該檢定為競爭檢定，其中抗 hC5aR/未經標記之 hC5a 與示蹤劑競爭結合於受體。在檢定中，添加固定量之經  $^{125}\text{I}$  標記之 C5a 至 WGA 粒子及 C5aR 受體中，使得發射以每分鐘計數 (cpm) 量測之特定量之光。若添加未經標記之 C5a 或抗 C5aR，則其與受體之結合將由於  $^{125}\text{I}$  C5a 置換而造成較低 cpm。置換 % 計算如下：

$$\frac{S - S_{\max}}{S_0 - S_{\max}} \cdot 100\%$$

S：樣品

$S_{\max}$ ：非特異性結合。藉由以足以替代特異性結合之  $^{125}\text{I}$ -hC5a 之量添加未經標記之 hC5a 來量測。

$S_0$ ：最大結合。未添加未經標記之 hC5a。IC50 值定義為置換 50% C5a 之濃度。不同實驗之間的 cpm 保持恆定，因此 IC50 值為隨著示蹤劑隨時間衰減的相對值。測定人類抗 hC5aR 抗體置換  $^{125}\text{I}$ -hC5a 之效能 (IC50) 且數據提供於表 1 中。

### 嗜中性白血球遷移(趨化性)檢定

在 Boyden 腔室中分析抗體抑制 hC5a (或 mC5a) 依賴性嗜中性白血球遷移之效能。自人類或動物血液分離之嗜中性白血球以鈣黃綠素(calcein)染色且添加至 Boyden 腔室中之上隔室中且與抗體混合。將 hC5a 或 mC5a 施加至 Boyden 腔室中之下隔室且充當嗜中性白血球之化學引誘劑。藉由計數穿過 3 或 5  $\mu\text{m}$  fluoroblok 膜之經鈣黃綠素染色之嗜中性白血球的數目來確定嗜中性白血球遷移至下腔室之能力。

自引至含有 EDTA 之小瓶中的人類血液樣品獲得人類 PMN (多型核白血球; 粒細胞)。藉由在室溫下經由 Ficoll-Paque PLUS (GE Health Care) 梯度(3 份)離心血液(4 份)30 分鐘(400 $\times$ g)來分離血細胞。將含有 PMN 之層懸浮於含有聚葡萄糖-500 (Sigma)之 PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)中持續 1 小時來移除污染性紅血球。上清液在室溫下離心 5 分鐘(250 $\times$ g)且使用 0.2% NaCl 滲透性溶解剩餘紅血球 55 秒。藉用 1.2% NaCl + PBS 使溶液等滲且在 250 $\times$ g 下離心 5 分鐘, 隨後重複滲透性溶解。離心後, 將 PMN 再懸浮於反應混合物(RM): HBSS (目錄號 14175 Gibco)含有 NaCl 137 mM、KCl 5.3 mM、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.33 mM、 $\text{NaHCO}_3$  4 mM、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.44 mM、葡萄糖 5 mM; 補充有  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 mM、 $\text{MgCl}_2$  0.5 mM、 $\text{CaCl}_2$  0.5 mM、HEPES 20 mM。藉由 NucleoCounter (Chemometec)測定細胞密度。如藉由經 Giemsa 染色之樣品的顯微法所評估, PMN 懸浮液含有 >95% 嗜中性白血球。

裝載 PMN：將鈣黃綠素 AM (Fluka) 溶解於 DMSO (二甲亞砜) 中且與細胞(每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞) 一起於 RM 中稀釋 1000 倍，得到  $10 \mu\text{M}$  之濃度。懸浮液在  $37^\circ\text{C}$  下在培育箱中培育 30 分鐘，隨後用 RM 洗滌 3 次以移除過量鈣黃綠素。最終將細胞再懸浮於 RM 中(每毫升  $4 \times 10^6$  個細胞)。

藉由 Boyden 腔室技術使用 FluoroBlok<sup>®</sup> 3  $\mu\text{m}$  孔徑 96 孔(目錄號 351161.BD Falcon (VWR)) 評估遷移。上腔室(亦即含有 Fluoroblok 膜之插入物) 在  $37^\circ\text{C}$  下於  $1 \text{ mg/ml}$  PBS 中塗佈人類血纖維蛋白原(目錄號 F3879-1G, Sigma) 持續 2 小時。洗滌後，膜以於 PBS 中含有 2% 牛血清白蛋白(BSA) 之溶液阻斷。使用 RM 再次洗滌後，將含或不含 hC5aR-抗體之  $10^5$  個裝載鈣黃綠素之 PMN 添加至各孔中且置於含有對照溶液或化學引誘劑 hC5a (Sigma, C5788) 之接受盤(下腔室) 中。各組包含至少 6 個孔。隨後於盤讀取器(SpectraMax, Molecular devices 或 Fluoroscan, Thermo LabSystems) 中在  $37^\circ\text{C}$  下在  $485/538 \text{ nm}$  下每 5 分鐘量測盤持續 60 分鐘。30 分鐘時之值(相對螢光單位) 用作遷移之量度。

曲線擬合。由使用 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) 所測定之  $\text{IC}_{50}$  表示抗體抑制遷移之能力。

表 1 包括來自置換檢定及趨化性檢定之數據，其測試  $10 \mu\text{g/ml}$  人類單株抗體抑制人類嗜中性白血球之 hC5a 依賴性 ( $10 \text{ nM}$ ) 遷移的能力。在抗體不存在下獲得之值設定為 100。彙集來自 3 名供者之數據。平均值包括於表 1 中。三種單株抗體 32F3A6、35F12A2 及 35F32A3 在兩種檢定中展

示最強效能，其等於或略高於 WO2009/103113 中所述之對照抗體參考抗體 Q 的效能。

抗體	hC5a 置換(SPA) IC50 (nM)	人類嗜中性白血球之遷移(相較於抗體不存在下之遷移的%)
35F32A3	0.95	11
32F3A6	1.90	2
35F12A2	2.04	19
35F24A3	2.97	30
35F16A2	3.90	22
35F3A1	10.7	38
35F34A1	18.6	35
35F6A1	22.9	ND
34F12A5	32.1	> 70
35F33A1	33.4	> 70
34F12A3	46.6	> 70
hC5a	4.1	100
參考抗體 Q	3.7	20-21

表 1. 抗 hC5aR 抗體之功能特徵

#### 抗 hC5aR 單株抗體 CDR 序列之特性化

重組選殖來自抗 hC5aR 抗體 35F32A3、32F3A6、35F12A2 及 35F24A3 之可變區且使用標準方法特性化核苷酸及胺基酸序列。胺基酸序列包括於圖 1 及隨附序列表中。

#### 結合特異性之特性化

使用人類-小鼠 C5aR 嵌合構築體來測定 C5aR 之結合區。嵌合受體短暫表現於 HEK 細胞中且藉由如 WO 2008/022390 中先前所述，但改變細胞株之 FACS 來測定個別抗體之結合。32F3A6、35F32A3 及 35F12A2 之結合取決於細胞外環 2 之人類序列，而人類 N 端並非必要(圖 2)。

### 實施例 3. Fc 變異體之產生

四種人類 IgG 子類(IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)在 Fc 區中共有超過 95%同源性，但在鉸鏈區中展現重大差異。Fc 區介導效應功能，諸如抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及補體依賴性細胞毒性(CDC)。在 ADCC 中，抗體之 Fc 區結合於免疫效應細胞(諸如自然殺手細胞及單核細胞)表面上之活化 Fc 受體( $Fc\gamma R$ )，引起所靶向細胞吞噬或溶解。在 CDC 中，Fc 區在不同於  $Fc\gamma R$  結合位點之位點結合於補體，且抗體藉由在細胞表面觸發補體級聯而殺死所靶向細胞。各種 IgG 同功異型物發揮不同程度之效應功能，按以下次序遞增：IgG4 < IgG2 < IgG1 < IgG3。使用 QuickChange<sup>®</sup>定點突變誘發套組(目錄號 200518, Stratagene)藉由定點突變誘發產生多種 IgG Fc 變異體(其皆包含參考抗體 Q 之可變區)，且如實施例 4 中所述進行特性化。

### 實施例 4：Fc 變異體之效應功能之特性化

#### *Fc 變異體與 $Fc\gamma R$ 之結合親和力*

藉由表面電漿子共振(surface plasmon resonance, SPR)量測法測定 Fc 變異體對  $Fc\gamma R$  之親和力，該量測法於 BIAcore T100 儀器上使用 CM5 感測晶片(GE)進行。使用胺偶合化學將 Fc 變異體固定於流動細胞上。關於量測  $Fc\gamma R$  與 Fc 變異體之親和力的動力學 SPR，His- $Fc\gamma R$  用作分析物且於 HBS-EP 緩衝液中注入流動細胞中。注入高親和力受體  $Fc\gamma RI$ ，流動速率為 40  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，接觸時間為 180 秒且解離時間為 300 秒。注入其他  $Fc\gamma R$ ，流動速率為 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ ，

接觸時間為 30 秒，且解離時間為 120 秒。用含有 10 mM NaOH 及 500 mM NaCl 之溶液使晶片表面再生。親和力 (Kd 值) 列於表 2A 中。

IgG	抗體 Fc 區	Fc $\gamma$ RI	Fc $\gamma$ RIIA (131R)	Fc $\gamma$ RIIA (131H)	Fc $\gamma$ RIIB	Fc $\gamma$ RIII (158F)	Fc $\gamma$ RIII (158V)
IgG1	L234A、L235E、G237A、A330S 及 P331S	-	-	-	2.10E-6	-	-
	N297Q、L234A、L235E、G237A	-	-	-	-	-	-
	N297Q、L234A、L235E	-	-	-	-	-	-
	G236R、L328R	-	-	-	-	-	-
	L234A、L235E	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	0.96E-6
	N297Q	0.36E-6	-	-	-	-	-
	IgG1 參考	6.64E-10	0.95E-6	0.64E-6	0.42E-6	0.33E-6	0.07E-6
IgG2	N297Q	-	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>	-	-	-
	IgG2 參考	-	2.79E-6	0.22E-6	1.54E-6	-	1.50E-6
IgG2/4 <sup>(1)</sup>	N297Q	-	-	-	-	-	-
	V234A、G236A	-	-	-	5.34E-6	-	-
	IgG2/IgG4 參考	-	nd <sup>a</sup>	1.03E-6	1.83E-6	-	-
IgG4 <sup>(2)</sup>	N297Q、F234L、L235A	nd <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
	N297Q、E233P、F234V、L235A	-	-	-	-	-	-
	E233P、F234V、L235A	0.38E-6	-	-	nd <sup>a</sup>	-	nd <sup>a</sup>
	N297Q	0.13E-6	-	-	-	-	-
	IgG4 <sup>(2)</sup> 參考	2.71E-9	0.80E-6	3.52E-6	1.08E-6	-	nd <sup>a</sup>

表 2A. 自 Fc 變異體對 Fc  $\gamma$  R 之親和力分析所得結果的概述 (Kd 以 M 計)。(- = 無結合；0 = 結合無變化；nd<sup>a</sup> = 由於結合過弱而未計算 Kd)。(1) 包含 IgG2 之 CH1 及下部鉸鏈區且其餘為 IgG4 之 CH2-CH3 的 IgG2/IgG4 Fc 變異體；(2) 包括點突變 S228P 之 IgG4 突變體。

### 吞噬作用檢定

為鑑別介導嗜中性白血球之吞噬作用之能力降低或消除的 Fc 變異體，建立試管內吞噬作用檢定。下文描述之吞噬作用檢定涉及用螢光染料 CMFDA 標記自外周人類血液分離之人類嗜中性白血球(吞噬作用之目標細胞)，且將其添加至亦自人類外周血液分離之人類單核細胞之培養物中。經 CMFDA 標記之嗜中性白血球用測試單株抗體(或 PBS)預塗佈，且在與人類單核細胞一起培育後，藉由 FACS 測定 CD14/CMFDA 雙陽性單核細胞之數目。來自多種 Fc 變異體之結果呈現於表 2B 中。

所測試之所有抗體均包括 WO2009/103113 中所述且用作上文參考抗體之 Q 抗體的可變區。

發現單核細胞與巨噬細胞皆能夠介導嗜中性白血球之抗體依賴性吞噬作用，且建立使用該兩種細胞類型之吞噬作用檢定。兩種檢定中之結果性質上類似，但因為巨噬細胞檢定更易變，故主要使用單核細胞進行分析。

### 人類單核細胞的製備

使用 percoll 梯度離心在含有 EDTA 作為抗凝劑之管(K2E, BD Biosciences, 目錄號 367525)中自採集自健康人類志願者之外周靜脈血中分離人類單核細胞及淋巴細胞。100 ml 血液一般得到約  $8-20 \times 10^7$  個外周血液單核細胞(PBMC)。添加至少 3 體積之 dPBS 至經分離細胞中，隨後在室溫(RT)下在  $100 \times g$  下離心 10 分鐘。棄去上清液後，將淋巴細胞/單核細胞層再懸浮於與先前步驟相同體積的

dPBS:培養基 50:50 混合物中，且再在室溫下在  $100\times g$  下離心 10 分鐘。棄去上清液且將淋巴細胞/單核細胞層以每毫升  $1-2\times 10^6$  個細胞之密度再懸浮於培養基中。經再懸浮之細胞在 2 毫升/孔下以每孔  $4\times 10^6$  個細胞之密度塗於 6 孔組織培養盤(Corning, Costar, 目錄號 3516)中且在  $37^\circ\text{C}$  下於 5%  $\text{CO}_2$  中培育 2 小時。藉由抽吸移除非黏著細胞(淋巴細胞及死亡細胞)且黏著細胞(單核細胞)在輕輕渦旋下於 1 ml 培養基(RPMI 1640 (Invitrogen-GIBCO, 目錄號 11875) + 在  $56^\circ\text{C}$  下熱活化 30 分鐘之 10% FCS (Invitrogen-GIBCO, 目錄號 16000) + 25 mM HEPES (Invitrogen-GIBCO, 目錄號 15630) + 1% 青黴素/鏈黴素(Invitrogen-GIBCO, 目錄號 15070))中洗滌四次，隨後抽吸洗滌介質。在洗滌血液源單核細胞後，添加 1 ml 新鮮培養基至各孔中。自一個孔中刮落細胞且懸浮於培養基中以評估每孔的單核細胞數目。

#### 人類嗜中性白血球的製備

使用 percoll 梯度離心自採集自健康志願者之外周靜脈血分離人類嗜中性白血球且用 CellTracker™ Green(二乙酸 5-氯甲基螢光素, CMFDA)染色。100 ml 血液一般得到約  $10-20\times 10^7$  個嗜中性白血球。藉由將 CellTracker™ Green CMFDA 溶解於 DMSO 中至 10 mM 最終濃度來進行染色。嗜中性白血球以每毫升  $1\times 10^7$  個細胞之密度再懸浮於 dPBS 中且添加 CMFDA 至 2  $\mu\text{M}$  之最終濃度。細胞及染料在  $37^\circ\text{C}$  下培育 15 分鐘。藉由用 10 ml dPBS 洗滌細胞 3 次(藉由在室溫下在  $300\times g$  下離心 5 分鐘)來移除過量染料。最終洗

滌步驟後進行細胞計數。經 CMFDA 標記之嗜中性白血球以每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞之密度再懸浮於 dPBS 中且與抗體(最終濃度 0.001、0.01、0.1、1、10 或 100  $\mu\text{g/ml}$ )或 PBS (無抗體對照組)一起培育。在一些檢定(如所示)中，嗜中性白血球+抗體培育步驟亦含有 4 mg/ml 人類 IgG。細胞+抗體在  $37^\circ\text{C}$  下培育 30 分鐘。在室溫下在  $300 \times g$  下離心 5 分鐘後，嗜中性白血球用 dPBS 洗滌兩次且以每毫升  $1 \times 10^7$  個細胞之密度再懸浮於培養基中。

### FACS 分析

預塗有抗體的經 CMFDA 標記之嗜中性白血球(如上所述製備)以於 1 ml 培養基中之所需濃度添加至單核細胞(如上所述)中。6 孔盤之各孔之總體積為 2 ml。在一些檢定(如所示)中，培養基亦含有 4 mg/ml 人類 IgG。一般使用 5:1 (嗜中性白血球:單核細胞)之比率。若黏著單核細胞之數目小於每孔  $4 \times 10^5$  個，則添加  $2 \times 10^6$  個嗜中性白血球(亦即嗜中性白血球:單核細胞比率超過 5:1)。若單核細胞數目超過每孔  $4 \times 10^5$  個，則添加 5 倍數目之嗜中性白血球以保持嗜中性白血球:單核細胞比率為 5:1。培養物在  $37^\circ\text{C}$  下於 5%  $\text{CO}_2$  培育箱中培育 1 小時。

在培育後，抽吸培養基以移除非黏著且非攝取之嗜中性白血球。用每孔 1 ml 培養基將黏著單核細胞洗滌(在輕輕渦旋下)三次。藉由用細胞刮刀(Corning, 目錄號 CP3010)自孔刮落培養基中之細胞而將單核細胞採集於 15 ml 管中。細胞在室溫下在  $300 \times g$  下離心 5 分鐘且移除上清液。

將細胞集結粒再懸浮於 160  $\mu$ l 1% (w/v) 三聚甲醛之 PBS 溶液中以固定，隨後進行 FACS。

利用 FACSCalibur 流式細胞儀 (BD Biosciences) 分析樣品。使用異硫氰酸螢光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 於 FL-1 (螢光通道 1) 中鑑別並量測標記有 CMFDA 之嗜中性白血球，且藉由用經藻紅素 (Phycoerythrin) 標記之抗 CD14 染色僅單核細胞樣品來鑑別單核細胞，該等單核細胞於 FL-2 (螢光通道 2) 中量測。使用僅單核細胞樣品之 FSC (正向散佈) 對 SSC (側面散佈) 特徵來定義單核細胞閘且加寬 (沿 FSC 及 SSC 軸) 以包括尺寸在培育期間增大之單核細胞。此閘不包括如在僅嗜中性白血球樣品之 FSC 對 SSC 特徵中所定義的含 FSC 對 SSC 特徵之嗜中性白血球的區域。吞噬作用程度計算為總單核細胞閘中 FL-1<sup>+ve</sup> 單核細胞之百分比。

非特異性吞噬作用之背景值為含有未塗有抗體之經 CMFDA 標記之嗜中性白血球的樣品 (「無抗體」樣品) 中 FL-1<sup>+ve</sup> 單核細胞的百分比。自含抗體之各樣品減去背景，隨後將數據 (% FL-1<sup>+ve</sup> 單核細胞對抗體濃度) 輸入 Prism (4.0c 版, GraphPad Software Inc) 中以進行作圖。適當時使用 S 型劑量反應 (可變斜率)，亦即四參數邏輯方程式對數據進行非線性回歸以測定 EC50 值。

數據呈現於表 2B 中。「-」表示無可偵測吞噬作用且「+」至「++++」表示如檢定中所量測之低程度至高程度之吞噬作用。

ADCC (抗體依賴性細胞毒性)及 CDC (補體依賴性細胞毒性)檢定

建立以下試管內檢定以測試 Fc 變異體經由 ADCC 或 CDC 依賴性機制介導細胞去除之能力。

#### 目標細胞

在此等檢定中，目標細胞為表現 hC5aR 之 Ramos 純系 E2 或人類嗜中性白血球。表現 hC5aR 之 Ramos 純系 E2 藉由使用標準程序用編碼 hC5aR 之哺乳動物表現載體穩定轉染 Ramos 純系 E2 細胞而形成。所得細胞株表現高含量之人類 C5aR (為人類嗜中性白血球上之人類 C5aR 表現的 5-7 倍) 及 CD20。如上文關於吞噬作用檢定所述獲得人類嗜中性白血球。

目標細胞以螢光細胞膜染料 PKH-26 染色。將所需數目之目標細胞 ( $5 \times 10^4$ /樣品/孔  $\times 4$ ) 於 dPBS 中稀釋至 15 ml 且在室溫下在 1,200 rpm 下離心 5 分鐘。隨後將細胞再懸浮於 2  $\mu$ M PKH-26 (每  $1 \times 10^6$  個目標細胞 100  $\mu$ l 溶液) 中。允許在室溫下進行標記恰好 3 分鐘，隨後添加等體積之熱滅活 FCS (或熱滅活人類血清 (Millipore)) 以終止標記反應。恰好 1 分鐘後，添加 RPMI 至總體積為 15 ml。細胞如上述離心且以每孔  $2 \times 10^6$  個細胞之密度再懸浮於檢定培養基中。對於以抗體塗佈，將經 PKH-26 標記之目標細胞之等分試樣 (25  $\mu$ l，亦即  $5 \times 10^4$ ) 分配於含有 25  $\mu$ l 於檢定培養基中稀釋之 200  $\mu$ g/ml 抗體 (最終濃度 100  $\mu$ g/ml) 的無菌 U 型底 96 孔盤之孔中且在 37°C 下於 5% CO<sub>2</sub> 中培育 30 分鐘。

### 效應細胞

效應細胞為來自健康供者之經去除單核細胞的 PMBC。如上所述獲得 PMBC。將再懸浮細胞(淋巴細胞/單核細胞)在 2 毫升/孔下以約每孔  $4 \times 10^6$  個細胞之密度塗於 6 孔組織培養盤(Corning)中或以每個燒瓶 20 mL 塗於 T75 燒瓶(Corning)中且在  $37^\circ\text{C}$  下於 5%  $\text{CO}_2$  中培育 2 小時。藉由抽吸移除非黏著細胞(包括淋巴細胞及 NK 細胞)且在室溫下在  $100 \times g$  下離心 10 分鐘。將細胞再懸浮於 20 mL 含有 100 ng/ml 重組人類 IL-2 之培養基中以增加淋巴細胞及自然殺手細胞之數目。細胞在  $37^\circ\text{C}$  下於 5%  $\text{CO}_2$  中培育隔夜。第二天，細胞在室溫下以 1,400 rpm 離心 10 分鐘，隨後以每毫升  $2.5 \times 10^7$  個細胞之密度再懸浮於檢定培養基中以用作 ADCC 檢定中之效應細胞。

### ADCC 檢定

在用 PKH-26 標記目標細胞且塗佈抗體後，直接添加 100  $\mu\text{l}$  效應細胞或 100  $\mu\text{l}$  檢定培養基(對照組，僅目標細胞)至 50  $\mu\text{l}$  目標細胞中。樣品在  $37^\circ\text{C}$  下於 5%  $\text{CO}_2$  中再培育 3 小時。將樣品轉移至含有 10  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  To-Pro-3 活力染料(TP-3)之 1.2 ml 微量滴定 FACS 管中，最終濃度為約 625 nM，且藉由 FACS 分析樣品。在 FSC 對 SSC 圖上，閘選所有不包括碎片之細胞。在 FL-2 對 FSC 上分析經閘選細胞且閘選 FL-2 陽性細胞(亦即經 PKH-26 標記之目標細胞)。使用 FlowJo 軟體(Tree Star, Inc., 6.3.4 版)分析 FACS 數據。

藉由自相應樣品之平均 % TP3<sup>+ve</sup>『目標細胞+效應細胞』

(B)減去平均% TP3<sup>+ve</sup>『僅目標細胞』(A)來計算特異性 ADCC，該相應樣品之平均% TP3<sup>+ve</sup>『目標細胞+效應細胞』(B)及該平均% TP3<sup>+ve</sup>『僅目標細胞』(A)先前已分別減去平均% TP3<sup>+ve</sup>『無抗體目標細胞+效應細胞』(D)及平均% TP3<sup>+ve</sup>『僅無抗體目標細胞』(C)；亦即

$$\text{特異性 ADCC} = (B-D)-(A-C) \text{ 或 } = (B-A)-(D-C) \text{ 方程式 1}$$

表 2B 中所呈現之結果使用經去除單核細胞且經 IL-2 刺激之人類 PBMC 作為效應細胞群體獲得，該等 PBMC 主要為 NK 細胞，但包括 B 細胞、T 細胞及樹突狀細胞。目標細胞為表現 hC5aR 與 CD20 兩者之經轉染細胞株 Ramos E2，其能夠使用抗 CD20 抗體利妥昔單抗(rituximab)作為陽性對照。結果包括以下：「+++」指示 Fc 變異體誘導 ADCC 之效能與利妥昔單抗相等，「+/-」指示對於 Fc 變異體觀測到高程度供者變化，及「-」指示對於 Fc 變異體未偵測到 ADCC 之顯著誘導。包括介導增加的 ADCC 之 Fc 變異體 (IgG1\_S239D, I332E) (Chu SY, Vostiar I, Karki S 等人; *Mol Immunol*, 2008, 45(15):3926-3933)作為檢定之陽性對照。

#### CDC 檢定

亦分析 Fc 變異體誘導 CDC 之效能。實驗設置基本上如關於 ADCC 檢定所述，其中例外為用人類血清替代效應細胞。

將於含 3%兔補體血清之培養基中之目標細胞(諸如 Ramos E2 細胞)(每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞)與相等體積之含 3%兔補體血清之 2x 抗體溶液(200  $\mu\text{g/ml}$ )混合於 96 孔 U 型底組

織培養盤中。一組一式兩份的孔含有於不含補體之培養基中的 25  $\mu$ l Ramos E2 細胞(每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞)與 25  $\mu$ l 2 $\times$  抗體溶液(200  $\mu$ g/ml)的混合物。一組 3 個孔含有於 3% 兔補體血清中之 25  $\mu$ l Ramos E2 細胞(每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞)+25  $\mu$ l 檢定培養基(『無抗體』樣品)。另一組 3 個孔含有 25  $\mu$ l Ramos E2 細胞(每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞)+25  $\mu$ l 不含補體之檢定培養基(『無抗體』樣品)。在培育前，將適當時含或不含 3% 兔補體血清之 100  $\mu$ l 檢定培養基添加至各孔中。樣品在 37°C 下於 5% CO<sub>2</sub> 中培育 3 小時。

#### 測定目標細胞活力

在即將藉由流動式細胞量測術分析之前，將螢光活力染料 To-Pro-3 (Molecular Probes) 添加至各樣品中。各管中 To-Pro-3 之最終濃度為約 62.5 nM。將 To-Pro-3 陽性(TP3+) 細胞定義為無活力或已溶解。

#### 流動式細胞量測術及數據分析

利用 FACSCalibur (BD Biosciences) 分析樣品且使用 FlowJo 軟體(6.3.4 版, TreeStar Inc.) 分析所得數據。在 FSC 對 SSC 散佈圖中，閘選所有不包括碎片之細胞，每一樣品採集 5,000 個目標細胞事件。產生 FL-4 通道中經閘選目標細胞之直方圖，其展示細胞所攝取之 To-Pro-3 的含量。測定各樣品中 TP3+ 細胞(亦即無活力細胞)之數目，其定義為主峰右側之細胞，且此數目以樣品中總目標細胞之百分比表示。

一式三份檢定之樣品可歸類為以下 4 類之一：A、B、C

及 D，如下文類別概述中所示。

### 類別概述

目標細胞與以下各物一起培育：	100 µg/ml 抗體	無抗體
無補體	A	B
兔補體血清	C	D

### 所分析樣品之類別

對於含有抗體之各樣品，在具有或不具有補體下進行反應。不具有補體之含抗體樣品得到抗體特異性背景溶解量。類別 B 及 D 中之樣品在任一抗體或抗體與補體兩者不存在下得到非特異性背景溶解。

對含 3%補體之各樣品及不含補體之各樣品計算 TP3+ 無活力目標細胞的百分比(溶解%)。對於各抗體及『無抗體』對照組，將來自一式三份樣品之數據取平均值。

為計算各抗體之特異性 CDC 活性，自含補體之抗體樣品(『C<sub>1/2/3</sub>』樣品)之溶解%減去補體不存在下之抗體特異性溶解(『A』樣品中之平均溶解%)，隨後減去非特異性背景溶解。非特異性背景溶解為含補體之『無抗體』樣品中之溶解(『D』樣品中之平均溶解%)減去不含補體之『無抗體』樣品中之溶解(『B』樣品中之平均溶解%)。包括介導增加的 CDC 之 Fc 變異體 (IgG1\_S254W) (WO08030564)作為檢定之陽性對照。

$$\text{特異性 CDC (溶解\%)} = (C-A)-(D-B) \text{ [或} = (C-D)-(A-B)\text{]}$$

### 方程式 2

於 GraphPad Prism (4.0 版) 中進行統計分析以確定任何群組之間的差異是否顯著。將來自所有 4 項檢定之各樣品之特異性 CDC 活性輸入根據所用抗體之試算表 (spreadsheet) 中。使用以下參數檢驗比較各群組：單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, ANOVA)，繼之以圖基氏多比較後檢驗 (Tukey's multiple comparison post test)。

結果包括於表 2B 中。結果包括以下：「+++」指示 Fc 變異體誘導 CDC 之效能與 IgG1 S254W 突變體相等，「+/-」指示對於 Fc 變異體觀測到高程度變化，及「-」指示對於 Fc 變異體未偵測到 CDC 之顯著誘導。

IgG	抗體 Fc 區	吞噬作用	ADCC	CDC
IgG1	L234A L235E G237A A330S P331S	-	-/+	-
	N297Q L234A L235E G237A	-	++	-
	N297Q L234A L235E	-	++	-
	G236R L328R	-	+++	-
	L234A L235E	+	+++	-
	N297Q	++	+	-
	IgG1 參考	+++	+++	-
	S239D I332E	+++	+++	-
	S254W	++++	+++	+++
IgG2	N297Q	-	++	-
	IgG2 參考	++	-	-
IgG2/4 <sup>(1)</sup>	N297Q	-	-	-
	V234A G236A	-	-	-
	IgG2/IgG4 參考	+	-	-
IgG4 (S228P) <sup>(2)</sup>	N297Q F234L L235A	-	-/+	-
	N297Q E233P F234V L235A	-	-	-
	E233P F234V L235A	+	-	-
	N297Q	+	-/+	-
	L235A	++	+	-/+
	F234L L235A	++	+	/+
	IgG4 參考	+++	+	/+

表 2B. 基於細胞之效應功能檢定中 Fc 變異體之活性。

在吞噬作用、ADCC 及 CDC 檢定中分析 Fc 變異體所獲得結果之概述。(- = 無效應功能；+ = 效應功能)。(1)包含 IgG2 之 CH1 及下部鉸鏈區且其餘為 IgG4 之 CH2-CH3 的 IgG2/IgG4 Fc 變異體；(2)在 IgG4 Fc 區中引入 S228P 突變以消除半抗體之形成。

#### 實施例 5：抗 hC5aR 抗體 Fc 變異體之效能的特性化

為測試 Fc 區中之突變是否影響抗體抑制 hC5a 結合於 hC5aR 的效能及抗體抑制 hC5a 介導之嗜中性白血球遷移的效能，在上文所述之置換及遷移檢定中測試不同 Fc 變異體。如上文所述進行嗜中性白血球遷移檢定，其中例外為所用 PMN 為自 hC5aR-KO/KI 小鼠(mC5a-受體基因剔除/人類 C5aR 基因嵌入，WO 2005 060739)分離之小鼠 PMN。如下獲得細胞。自兩隻 hC5aR-KO/KI 小鼠之股骨及脛骨分離出骨髓 PMN。使用 PBS 自骨骼沖洗骨髓細胞，隨後將細胞懸浮液經由細胞濾器(BD Falcon, 352350; 70 微米耐綸篩孔)過濾至 50 ml 管中且離心(10 分鐘，1600 rpm)。將細胞再懸浮於培養基中且小心地層鋪於無菌 15 ml 管中之 3 ml Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)之上。在室溫下在 600x g 下離心 20 分鐘後，分離出嗜中性白血球/紅血球集結粒。使用溶解緩衝液(Sigma, R7757; 8.3 g/L 氯化銨於 10 mM Tris-HCl pH 7.5 中)溶解紅血球 1 分鐘。離心及洗滌兩個回合後，將細胞集結粒再懸浮於反應混合物中。懸浮液含有 >95%嗜中性白血球，如由經 Giemsa 染色之樣品之顯微法所

評估。所測試抗體之可變區與參考抗體 Q 之可變區一致。數據提供於表 3 中。

在 SPA 分析中對於 Fc 變異體觀測到抑制 hC5a 結合於 hC5aR 之效能的顯著差異(表 3, 第 1 欄)。IgG1 形式之參考抗體 Q 與其他 IgG Fc 變異體一起進行分析, 且數據顯示 IgG1 Fc 變異體一般比 IgG4 與 IgG2/IgG4 Fc 變異體更有效地抑制 hC5a 結合。分析中亦包括參考抗體 Q 之 F(ab')<sub>2</sub> 片段且發現其抑制 hC5a 結合之程度與全長參考抗體 Q (IgG4) 相同。此等發現表明鉸鏈區對於抗體抑制 hC5a 結合之能力為重要的, 且此觀點受以下事實支持: F(ab')<sub>2</sub> 片段能夠與參考抗體 Q 相同程度地抑制嗜中性白血球遷移(表 3)。亦發現 IgG1 變異體在抑制嗜中性白血球遷移方面比包含 IgG2 或 IgG4 鉸鏈區之 IgG 更有效(表 3, 第 2 欄)。

IgG1 形式之參考抗體之效能高於 IgG4 形式之參考抗體可能與由於 IgG 鉸鏈區可撓性增加所致之親合力增大有關。為研究此觀點, 藉由 FACS 分析 IgG1 形式之參考抗體及 IgG4 形式之參考抗體與人類嗜中性白血球的結合。數據顯示 IgG1 形式與嗜中性白血球結合之親合力高於 IgG4 形式與嗜中性白血球結合之親合力。數據未示。

總之, 此等發現支持以下觀點: IgG1 鉸鏈區之可撓性增加促成與 hC5aR 的結合增加, 從而使得效能增加。

抗體 Fc 區	hC5a 置換 (SPA)	對人類嗜中性白血球遷移的抑制
IgG4	++	++
IgG1	+++	ND
IgG1(L234A_L235E_G237A_A330S_P331S)	+++	+++
IgG1 (S239D, I332E)	+++	++++
IgG2/4	+	ND
IgG2/4 (V234A, G236A)	+	+
F(ab) <sub>2</sub> 形式之參考抗體 Q	++	++

表 3. Fc 變異體對 hC5a 結合 (SPA) 及嗜中性白血球向 hC5a 遷移之影響。(+= 低活性, ++= 中等活性, +++/+高活性)。

### 實施例 6. 「完全」人類抗 hC5aR 抗體之產生及特性化

根據實施例 2 中所述之分析，選擇抗體 32F3A6 進行進一步研究。在此抗體之重組選殖期間，鑑別出 VH 構架區中不同於人類生殖系序列的 7 個突變，而 LC 中未見構架突變 (圖 3)。藉由將來自 32F3A6 之 VH 及 VL 序列與所有可用人類生殖系序列比對來找出突變。

為使抗體更進一步類似人類，使 32F3A6 之 VH 區中的 7 個點突變回復突變為人類生殖系殘基，且移植於包含五個突變 L234A\_L235E\_G237A\_A330S\_P331S 之 IgG1 Fc 區中，該等突變經顯示消除如上所述對吞噬作用、ADCC 及 CDC 的誘導。該化合物稱作 32F3A6 GL。

回復突變抗體之效能與原始抗體進行比較，且在 32F3A6 或 32F3A6 GL 之間在抑制 hC5a 結合於 hC5aR 之效

能(於 SPA 中檢定)中或在抑制 hC5a 介導之嗜中性白血球遷移之效能中未觀測到差異(數據未示)。

如實施例 4 中所述評估上文所述完全人類抗體誘導嗜中性白血球吞噬作用、ADCC 或 CDC 之能力，且結果概述於表 4 中。

使用經去除單核細胞之人類 PBMC 作為效應細胞且使用人類嗜中性白血球作為目標細胞，獲得表 4 中所包括之關於特異性 ADCC 之結果。

化合物		吞噬作用	特異性 ADCC	特異性 CDC
PBS 作為對照		-	ND	-
可變區	Fc 區			
3G12 (無關抗原)	IgG1	-	+	-
32F3A6 GL	IgG1AEASS	-	+	-
32F3A6 GL	IgG1	+	+++	ND
Sigma	IgG4	ND	+	ND

表 4. 抗 C5aR 抗體之 Fc 介導之細胞效應功能。「-」表示無可偵測效應功能且「+」至「+++」表示如實施例 4 中所述檢定所量測之低程度至高程度之效應功能。ND (未測定)。

如先前所觀測，IgG1 之 Fc 區中之 5 個點突變相較於野生型 IgG1 Fc 區消除吞噬作用、ADCC 及 CDC。

**實施例 7. 人類抗 hC5aR 抗體(32F3A6 GL)之進一步特性化**

為進一步闡明所鑑別抗體之功能性及測定親和力及效能，使用一種抗 C5aR 抗體相較於參考抗體 Q 進行另外檢

定。藉由對人類嗜中性白血球進行競爭配體結合檢定來測定親和力。此功能性稱作藉由競爭配體結合檢定所量測之抗體之親和力，但亦可視為相互作用之親合力之量測。活體外檢定量測抗體在試管內情形下中和 C5a 介導之作用的能力。效能檢定分別關於人類嗜中性白血球量測 C5a 誘導之鈣通量之中和、CD11b 受體上調及 CD62L 下調。關於 32F3A6GL 所獲得之數據提供於表 5 中。

### 親和力量測

自新鮮人類血液分離嗜中性白血球

血液用 PBS + 2% FBS 以 1:1 稀釋且以 3 份 Ficoll 及 4 份血液之比率 (15 ml Ficoll 及 20 ml 血液於 50 ml 管中) 層鋪於 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare #17-1440-03) 上，隨後藉由在室溫下在 400×g 下離心 30 分鐘而分層。藉由抽吸，輕輕地移除中間的 PBMC 帶。用塑膠 Pasteur 吸管抽吸於壓緊紅細胞上形成層之粒細胞。轉移粒細胞及紅細胞且於 50 ml 新管中形成集結粒。用 1×PBS 將集結粒稀釋至 40 ml 且添加 10 ml 4% 聚葡萄糖 500 (sigma, 31392) 之 PBS 溶液 (比率 1:5) 且藉由倒置輕輕混合。20-30 分鐘後，將所得富含粒細胞之上清液轉移至新管中且在室溫下在 250×g 下短暫離心 5 分鐘。藉由將細胞集結粒再懸浮於 7.5 ml 0.2% NaCl 中且輕輕混合 55-60 秒而利用滲透性溶解移除污染性紅細胞。隨後添加 17.5 ml 1.2% NaCl，接著用 PBS 稀釋至 50 ml 且在 250×g 下短暫離心 5 分鐘。將此步驟重複一次。隨後將細胞集結粒再懸浮於 1 ml 反應混合物 (dPBS/RPMI) 中。

使用 NucleoCounter® 監測活力及細胞計數。

關於嗜中性白血球之競爭配體結合檢定

將人類嗜中性白血球純化、洗滌且以每毫升約  $5 \times 10^6$  個細胞之密度再懸浮於結合緩衝液 (50 mM HEPES pH 7.5、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、5 mM  $\text{MgCl}_2$  及 0.5% 牛血清白蛋白 (組份 V (Fraction V), 無 IgG)) 中。對於各樣品, 將 40  $\mu\text{l}$  細胞懸浮液 (每孔  $1 \times 10^5$  個細胞) 接種於 96 孔 V 型盤 (Greiner, 目錄號 651101) 中。使用 12 種濃度的未經標記之競爭配體之半對數稀釋液 (以 1  $\mu\text{M}$  起始作為最高濃度) 進行競爭研究。考慮最終檢定體積為 120  $\mu\text{l}$ , 添加 40  $\mu\text{l}$  抗體。向除背景對照以外之所有樣品中添加 40  $\mu\text{l}$  放射性配體 [ $^{125}\text{I}$ ]-hC5a (Perkin Elmer, 目錄號 NEX250)。檢定中放射性配體之最終濃度為 1 nM 且最終體積為 120  $\mu\text{L}$ 。一式三份地操作所有樣品且在 4°C 下培育 4 小時。隨後藉由在 4°C 下在 1200 rpm 下離心 2 分鐘來收集細胞且用 100  $\mu\text{l}$  洗滌緩衝液 (50 mM HEPES pH 7.5、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、150 mM NaCl 及 0.5% 牛血清白蛋白 (組份 V, 無 IgG)) 洗滌三次。最後, 將細胞再懸浮於 30  $\mu\text{l}$  洗滌緩衝液中且轉移至 OptiPlate (Perkin Elmer, 目錄號 6005290) 且向各孔中添加 150  $\mu\text{l}$  MicroScint 20 (Perkin Elmer, 目錄號 6013621)。將盤封蓋, 充分混合, 利用經校準之 Top 計數器在 1 小時延遲下計數。利用另一盤測定添加至檢定中之放射性配體的總量。各樣品中計數數目以正規化值 (以百分比計) 表示, 100% 為添加有 1 nM [ $^{125}\text{I}$ ]-hC5a 且未添加冷抗體之情況下的最大計數量, 且 0%

為在  $1 \mu\text{M}$  冷 hC5a 存在下測定之非特異性結合。使用 PRISM (GraphPad) 藉由非線性回歸分析數據。

#### 鈣通量檢定

用 Fluo-4 AM 細胞染料對人類嗜中性白血球進行染色。將嗜中性白血球離心且以 PBS 洗滌，隨後以每毫升  $1 \times 10^7$  個細胞之密度再懸浮於細胞染料中且在室溫下於黑暗中培育 40 分鐘。將細胞離心並洗滌(以移除過量染料)，再次離心且以每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞之密度再懸浮於細胞緩衝液中。將細胞 (0.5 ml) 等分至無菌 FACS 玻璃管中，每個樣品一個管，儲存在室溫下且在兩小時內使用。各樣品使用  $1 \times 10^6$  個嗜中性白血球。

#### 檢定

如下進行鈣通量檢定。簡言之，利用 FACSCalibur 流式細胞儀 (BD Biosciences) 分析 0.5 ml 細胞緩衝液中裝載有 Fluo-4 AM 之  $1 \times 10^6$  個嗜中性白血球，其中使用 x 軸 FSC 對 y 軸 SSC 閘選嗜中性白血球。向管中添加各種試劑(例如抗體、C5a、離子黴素 (ionomycin)，以  $10 \times$  最終濃度溶解於細胞緩衝液而非 I-MGB 或 C-MGB 中)後，使用 FL-1 (FITC) 通道量測嗜中性白血球螢光。連續量測樣品螢光，每 1 秒獲得平均螢光強度 (MFI) 值。將此數據保存在 CellQuest (BD Biosciences) 檔案中且轉移至 Excel (Microsoft) 及 Prism (4.0c 版，GraphPad Software Inc.) 以進一步處理並分析。向嗜中性白血球中添加試劑之次序及培育時間根據所進行檢定之類型而變化。

### C5a 中和檢定

製備抗體之 10× 3 倍連續稀釋液，濃度範圍為 1000  $\mu\text{g/ml}$  至 1.37  $\mu\text{g/ml}$ 。裝載有 Fluo-4 AM 之嗜中性白血球 ( $1 \times 10^6$ ，於 0.5 ml 細胞緩衝液中) 與 50  $\mu\text{l}$  10× 抗體溶液 (管中最終抗體濃度：100-0.137  $\mu\text{g/ml}$ ) 一起在室溫下培育 10 分鐘。藉由 FACS 分析細胞+抗體持續約 60 秒以確定基線螢光。隨後添加 50  $\mu\text{l}$  10 nM C5a 以得到約 1 nM 之最終濃度且再繼續螢光量測約 60 秒。若抗體阻斷 C5a 誘導之  $\text{Ca}^{2+}$  釋放，則不存在螢光尖峰。若抗體不中和 C5a，則存在螢光尖峰。最後，添加 50  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{g/ml}$  離子黴素至最終濃度為 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ，且再繼續螢光量測約 60 秒以確保細胞仍具反應性。

### CD11b 受體上調

#### 檢定設置

設計以下設置以藉由量測 CD11b 表現之變化來測定所鑑別抗體中和 C5a 誘導之嗜中性白血球活化的能力。

抗 C5aR 及同型對照抗體以 3 倍連續稀釋於 PBS 中稀釋至 2× 最終濃度 (600  $\mu\text{g/ml}$  至 0.003387  $\mu\text{g/ml}$ ) 且將 50  $\mu\text{l}$  一式兩份地分配於 96 孔 U 型底盤之孔中。向各孔中添加肝素化全血之 50  $\mu\text{l}$  等分試樣。四組對照孔 (一式兩份) 僅含有 50  $\mu\text{l}$  PBS+50  $\mu\text{l}$  血液。盤在 37°C 下於 5%  $\text{CO}_2$  培育箱中培育 20 分鐘。為活化嗜中性白血球，將如所示最終濃度為 10 nM 或 100 nM 之 50  $\mu\text{l}$  人類 C5a 添加至含有抗體之孔及一組不含抗體之對照孔中。添加 PBS (50  $\mu\text{l}$ ) 至第二組不含抗體之對照孔。將最終濃度為 5  $\mu\text{g/ml}$  之乙酸肉豆蔻佛波醇

(Phorbol myristate acetate, PMA)添加至第三組不含抗體之對照孔中。盤再在 37°C 下於 5% CO<sub>2</sub> 培育箱中培育 20 分鐘。最後將 50 µl 的抗 CD11b-PE (BD Biosciences, 目錄號 555388)於 PBS 中以 1/50 稀釋的混合物(最終濃度 1/200)添加至所有孔中(除第 4 組 2 個不含抗體且不含 C5a 或 PMA 之對照孔以外, 此等樣品提供基線 MFI 值)。盤在 37°C 下於 5% CO<sub>2</sub> 培育箱中再培育 20 分鐘, 隨後在 2,000 rpm 下離心 3 分鐘以使血細胞形成集結粒。移除上清液(150 µl)且將集結粒再懸浮於 200 µl 1×FACS 溶解溶液中以溶解紅血細胞。在室溫下 5 分鐘後, 將盤再次離心, 移除 200-225 µl 上清液且將集結粒再懸浮於 160 µl 1×FACS 溶解溶液中。將細胞轉移至微量滴定管中以藉由流動式細胞量測術分析。

#### FACS 及數據分析

對 FACSCalibur 流式細胞儀(BD Biosciences)設置關於通道 FL-2 建立的補償參數。對樣品進行閘選以排除死亡細胞及碎片。嗜中性白血球經鑑別為具有高 FSC 及 SSC 且經閘選。計算 FL-2 (CD11b-PE)通道中經閘選嗜中性白血球之平均螢光強度(MFI)。

結果以佔減去背景之最大 CD11b 表現之百分比表示。最大 CD11b 表現(MaxCD11b)為在 C5a 存在下但無抗體存在下培育之嗜中性白血球的平均 MFI。最小(背景)CD11b 表現(MinCD11b)為在無 C5a 存在下且無抗體存在下培育之嗜中性白血球的平均 MFI。用於計算各樣品之佔最大 CD11b 表現的百分比之式子為：

$$\% \text{ Max 樣品} = (\text{MFI}_{\text{樣品}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) / (\text{MFI}_{\text{Max}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) \times 100$$

將數據輸入 GraphPad Prism (4.0 版) 中且使用非線性回歸擬合至 S 型劑量-反應曲線(可變斜率)，亦即四參數邏輯方程式以計算 EC50。

### CD62L 受體下調

#### 檢定設置

設計以下設置以藉由量測 CD62L 表現之變化來測定所鑑別抗體中和 C5a 誘導之嗜中性白血球活化的能力。

上述 *CD11b* 檢定適於藉由使用識別 CD62L 之結合抗體 (BD Biosciences, 目錄號 559772) 來偵測 CD62L。下文提供關於 CD62L 特定之實驗細節。

#### FACS 及數據分析

對 FACSCalibur 流式細胞儀 (BD Biosciences) 設置關於通道 FL-4 建立的補償參數。對樣品進行閘選以排除死亡細胞及碎片。嗜中性白血球經鑑別為具有高 FSC 及 SSC 且經閘選。計算 FL-4 (CD62L-APC) 通道中經閘選嗜中性白血球之平均螢光強度 (MFI)。

結果以佔減去背景之最大 CD62L 表現之百分比表示。最大 CD62L 表現 (MaxCD62L) 為在無 C5a 存在下且無抗體存在下培育之嗜中性白血球的平均 MFI。最小 (背景) CD62L 表現 (MinCD62L) 為在 C5a 存在下但無抗體存在下培育之嗜中性白血球的平均 MFI。用於計算各樣品之佔最大 CD62L 表現的百分比之式子為：

$$\% \text{ Max 樣品} = (\text{MFI}_{\text{樣品}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) / (\text{MFI}_{\text{Max}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) \times 100$$

將數據輸入 GraphPad Prism (4.0 版) 中且使用非線性回歸擬合至 S 型劑量-反應曲線(可變斜率)，亦即四參數邏輯方程式以計算 EC50。

來自上述檢定之結果概述於下表 5 中。

	親和力競爭配體結合檢定	IC50 鈣通量檢定	IC50 CD11b 上調	IC50 CD62L 下調
32F3A6 GL	0.34 nM	1.8 µg/ml	0.7 µg/ml	0.5 µg/ml
參考抗體 Q	0.84 nM	7.3 µg/ml	3.6 µg/ml	1.9 µg/ml

表 5. 親和力檢定、鈣通量檢定、CD11b 及 CD62L 檢定中獲得之數據

數據證實 32F3A6 GL 以劑量依賴性方式抑制 C5a 之作用。對於嗜中性白血球  $Ca^{2+}$  釋放之抑制隨 32F3A6 GL 濃度增加而增加，且如較低 IC50 值可見功效高於參考抗體 Q。

類似地，在 CD11b 及 CD62L 調節檢定中 32F3A6 GL 亦比參考抗體 Q 有效，顯示效能為參考抗體 Q 的 4-5 倍。

32F3A6 GL 在嗜中性白血球遷移(趨化性)檢定中之其他測試亦展示劑量依賴性，IC50 為 1.0 µg/ml。

#### 實施例 8. 活體內小鼠關節炎模型

在 hC5aR KO/KI 小鼠中之 K/BxN 模型中測試活體內作用 (WO 2009/103113 及 Lee 等人, Nat Biotechnol. 2006 年 10 月;24(10):1279-84)。K/BxN 小鼠自發形成由針對 GPI (自體抗原葡萄糖 6-磷酸異構酶) 之抗體循環所介導之類自體免疫疾病。來自關節炎 K/BxN 小鼠之血清在其他小鼠品系中誘發具有人類 RA (包括伴有關節損壞之慢性進行性疾病) 之許

多標誌性特徵的疾病。

#### 動物

人類 C5aR KO/KI 轉殖基因小鼠 (C57BL/6; H-2b; 人類 C5aR+/+ /小鼠 C5aR-/-; 品系縮寫: H5Rtg) 為 8-27 週齡。

#### K/BxN 血清

為產生實驗用血清，使 KRNtg 雄性小鼠與 NOD 雌性小鼠雜交。帶有 KRN 轉殖基因之 F1 後代 (8-10 週齡) 形成發炎關節，將其處死且藉由心臟穿刺採集血液。在 37°C 下培育 2 小時且在 4,000 rpm 下離心 10 分鐘後，收集血清。彙集來自多隻小鼠之血清，等分且儲存在 -80°C 下。所有小鼠均注射同一批次之 K/BxN 血清。

#### 關節炎誘發及評分

藉由在第 0 天與第 2 天經腹膜內注射 150  $\mu$ l K/BxN 血清從而在接受者 H5Rtg 小鼠中誘發發炎性關節炎。每天藉由量測爪尺寸且基於前爪及後爪及踝關節之發炎程度測定臨床評分來監測疾病進程。如下計算與第 0 天相比之平均爪尺寸變化。每天使用測徑規量測各後爪上踝之厚度 (mm)。各後爪之一或兩個讀數之平均值為平均每日爪尺寸 (PS)。自平均每日爪尺寸減去第 0 天之平均爪尺寸得到實驗各天之平均爪尺寸變化 ( $\Delta$ PS)。基於表 6 中所示之評分系統對各小鼠之各爪計算臨床評分。將 4 隻爪之評分加和，得到實驗各天各小鼠之總臨床評分 (CS)。

評分	外觀
0	正常關節
1	踝輕度/中度腫脹及/或一個趾腫脹
2	踝腫脹或兩個或兩個以上趾腫脹
3	沿爪之所有方向或所有五個趾嚴重腫脹

表 6. 關節炎臨床評分系統

為了確定哪些小鼠在第 5 天進入治療階段，藉由將臨床評分乘以與第 0 天相比之爪尺寸變化(mm)來計算各小鼠之「RA 評分」。一般而言，僅有 RA 評分  $> 0.7$  之小鼠方可進入研究之治療階段。

用 32F3A6 GL 進行治療性治療

疾病發作(第 0 天)後，在第 5 天給予 KO/KI hC5aR 小鼠以起始劑量之 32F3A6 GL，隨後給予 9 次日劑量。起始劑量為 10 mg/kg、1.5 mg/kg 及 0.5 mg/kg 且日劑量為 2 mg/kg、0.5 mg/kg 及 0.25 mg/kg。各治療組之臨床評分(平均值 $\pm$ SD)展示於圖 4 中。相較於用無關對照抗體治療之小鼠，用 NNC0215-0384 治療使得發炎隨劑量變化而減弱。基於平均爪尺寸變化(未示)觀測到類似作用。

#### 實施例 9. 牛皮癬性關節炎患者中之 C5a 表現量

在來自 11 名牛皮癬性關節炎及 12 名骨關節炎患者(作為對照)之滑液樣品中量測 C5a。遵循商業 C5a ELISA 套組之方案(BD OptEIA™，人類 C5a ELISA 套組 II (BD Biosciences; 目錄號 557965))。數據提供於圖 5 中且概述於下表 7 中。牛皮癬性關節炎患者組中 C5a 含量顯著升高( $p =$

0.001; Mann-Whitney), 表明 C5a 可能為牛皮癬性關節炎中滑膜發炎之驅動子。

	對照組(骨關節炎患者)	牛皮癬性關節炎患者
平均 C5a 含量( $\pm$ SEM)	7.989 $\pm$ 0.6999	64.17 $\pm$ 34.53

表 7. 來自對照組及牛皮癬性關節炎患者之滑液中 C5a 的偵測含量

#### 實施例 10. 來自牛皮癬性關節炎患者之滑膜中的 C5aR 表現

含有經福馬林(formalin)固定且用石蠟包埋之來自 PsA 患者之滑膜活組織切片(n=9)及在正常限度內之滑膜活組織切片(n=5)的組織微陣列(Tissue microarray, TMA)載片獲自 Biochain Institute Inc. /BioCat GmbH, Heidelberg, Germany。一個 PsA 樣品來自 Dr. Bliddal (Frederiksberg Hospital, Denmark)與 Dr. S e (Gentofte Hospital, Denmark)之合作。所有人類物質均在知情同意下自供者/或近親獲得，且經有關地方倫理委員會 BioCat Ge, personal communication; Cambridge BioSciences, Supplier information: Tissue Supply Network ([www.bioscience.co.uk](http://www.bioscience.co.uk)) 批准。來自 Drs Bliddal/S e 之樣品在倫理許可編號 H-4-2009-117 下獲得。使用以下抗體：小鼠單株抗人類 C5aR (R&D Systems, MAB3648 純系 347214 (IgG2a))。小鼠 IgG2a 同型特定對照(Dako, X0943, 純系 DAK-GO5)。生物素結合之驢抗小鼠 Jackson ImmunoResearch (715-065-150)。

如下進行免疫組織化學。切片於二甲苯中去除石蠟且於遞減濃度之醇中再水合。於微波爐中在 Tris-EGTA 緩衝液(10 mM; 0.5 mM)(pH 9.0)中進行抗原修復持續 15 分鐘。根據製造商，內源性過氧化酶活性以 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻斷，且內源性生物素藉由與抗生物素蛋白及生物素阻斷溶液一起培育 10 分鐘而阻斷。藉由與含有 3% 脫脂牛乳、7% 驢血清、3% 人類血清及 3.2 mg/ml 聚-L-離胺酸(PLL)之 TBS 一起培育 30 分鐘來阻斷非特異性結合。將一次抗體及二次抗體於含有 0.5% 脫脂牛乳、7% 驢血清及 3% 人類血清之 Tris 緩衝液中稀釋，且分別在 4°C 下培育隔夜且在室溫下培育 60 分鐘。藉由與 Vectastain ABC 過氧化酶套組一起培育來進行第一擴增步驟，於含有 0.5% 杜邦阻斷試劑(TNB)之 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)中稀釋 30 分鐘，接著於生物素標記酪胺中培育 6 分鐘來進行第二擴增步驟。藉由另外與 Vectastain ABC 過氧化酶套組一起培育來進行最終擴增，如上所述稀釋 30 分鐘。用二胺基聯苯胺達成顯色反應。用蘇木素(haematoxylin)對核對比染色且使切片再水合，於二甲苯中清除且以 Eukitt 固定。在觀測者不知情之情況下對 RA、OA 及正常滑膜中的 C5aR 蛋白表現進行 TMA 評估。使用配備有 DP70 數位攝影機(Olympus Denmark A/S; Ballerup, Denmark)之 Olympus BX51 顯微鏡來評估切片。

### 結果

在 8/10 牛皮癬性關節炎患者之滑膜襯裡下層(synovial sublining layer)中之淋巴樣聚集體中及在 10/10 牛皮癬性關

節炎患者之基質中發現 C5aR 免疫陽性細胞纏結。對照組在此等滑液隔室中不顯示任何 C5aR 染色(0/5)。在 4/5 對照組樣品以及 10/10 牛皮癬性關節炎患者之襯裡層細胞中偵測到 C5aR 免疫陽性滑膜細胞。結果概述於下表 8 中。

滑液隔室	正常	牛皮癬性關節炎患者
在滑膜襯裡下層組織中之淋巴樣聚集體中之浸潤性 C5aR+細胞	0/5	8/10
基質中之 C5aR+細胞	0/5	10/10
襯裡層中之 C5aR+滑膜細胞	4/5	10/10

表 8. 偵測正常滑膜及來自牛皮癬性關節炎患者之滑膜中的 C5aR<sup>+</sup>細胞。牛皮癬性關節炎患者中之 C5aR 表現相較於正常滑膜的差異之 P 值(費雪氏精確檢驗(Fischer's exact test))：0.007 (淋巴樣聚集體)及 0.0003 (基質)。

**實施例 11. 抗 C5aR 對由來自牛皮癬性關節炎患者之滑液誘導之嗜中性白血球遷移的抑制作用**

嗜中性白血球粒細胞遷移(趨化性)檢定

在 Boyden 腔室檢定中使用 BD FluoroBlok 96 多孔插入系統分析抗體抑制人類嗜中性白血球粒細胞(人類 PMN (多型核白血球))之 hC5a 依賴性遷移的效能。

自引至含有 EDTA 之小瓶中的人類血液樣品獲得人類 PMN。藉由在室溫下經由 Ficoll-Paque PLUS (GE Health Care)梯度(3 份)離心血液(4 份)30 分鐘(400×g)來分離血細胞。將含有 PMN 之層懸浮於含有聚葡萄糖-500 (Sigma)之 PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)中持續 1 小時來移除污染性紅血球。

上清液在室溫下離心 5 分鐘 (250×g) 且使用 0.2% NaCl 滲透性溶解剩餘紅血球 55 秒。用 1.2% NaCl + PBS 使溶液等滲且在 250×g 下離心 5 分鐘，隨後重複滲透性溶解。離心後，將 PMN 再懸浮於反應混合物 (RM)：HBSS (目錄號 14175 Gibco) 含有 NaCl 137 mM、KCl 5.3 mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.33 mM、NaHCO<sub>3</sub> 4 mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM、葡萄糖 5 mM；補充有 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 mM、MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM、CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM、HEPES 20 mM。藉由 NucleoCounter (Chemometec) 測定細胞密度。如藉由經 Giemsa 染色之樣品的顯微法所評估，PMN 懸浮液含有 >95% 嗜中性白血球。

裝載 PMN：將鈣黃綠素 AM (Fluka) 溶解於 DMSO (二甲亞砜) 中且用細胞 (每毫升  $2 \times 10^6$  個細胞) 於 RM 中稀釋 1000 倍，得到 10 μM 之濃度。懸浮液在 37°C 下在培育箱中培育 30 分鐘，隨後用 RM 洗滌 3 次以移除過量鈣黃綠素。最終將細胞再懸浮於 RM 中 (每毫升  $4 \times 10^6$  個細胞)。

人類滑液 (SF) 藉由膝穿刺自 2 名牛皮癬性關節炎患者獲得。藉由離心移除細胞後，將樣品冷凍且儲存於 -80°C 下。為進行遷移實驗，將樣品解凍且使用含有 0.2% EDTA 之 RM 稀釋 2 倍。

藉由 Boyden 腔室技術使用 Fluoroblok<sup>®</sup> 3 μm 孔徑 96 孔 (目錄號 351161, BD Falcon (VWR)) 評估遷移。上腔室 (亦即含有 Fluoroblok 膜之插入物) 在 37°C 下於 1 mg/ml PBS 中塗佈人類血纖維蛋白原 (目錄號 F3879-1G, Sigma) 持續 2 小時。洗滌後，膜以於 PBS 中含有 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 之

溶液阻斷。使用 RM 再次洗滌後，將含或不含 hC5aR-抗體 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) 之  $10^5$  個裝載鈣黃綠素之 PMN 添加至各孔中且置於含有對照溶液或化學引誘劑溶液 (hC5a (Sigma, 或滑液樣品)) 之接受盤 (下腔室) 中。各組包含 4-6 個孔。藉由量測下腔室中細胞之螢光來定量細胞遷移。因為 FluoroBlok 膜可有效阻止 490-700 nm 之光通過，所以在 485/530 nm 下未偵測到來自未進入下腔室之細胞的螢光。在具有底部讀取能力之螢光盤讀取器 (SpectraMax, Molecular devices; 或 Fluoroscanner, Thermo Labsystems) 中，在 37°C 下每 5 分鐘在 485/538 nm 激發/發射波長下讀取盤，持續 60 分鐘。

用表示為相對螢光值之 60 分鐘時的螢光值來評估遷移。在表 9 中，將同型抗體存在下之遷移設定為 100% 且計算抗 C5aR 抗體抑制遷移之能力。hC5aR 抗體明顯削弱遷移。由 10 nM hC5a 引起之遷移受到 83% 抑制。三個 SF 樣品之值為：15%、70% 及 48%。結果表明 C5aR-抗體抑制來自牛皮癬性關節炎患者之 SF 的化學引誘作用。

	hC5a (10 nM C5a)	SF 樣品供者 1	SF 樣品供者 1	SF 樣品供者 1
同型抗體	100	100	100	100
抗 C5aR	17	85	30	52

表 9. PMN 回應於 hC5a 或來自三名牛皮癬性關節炎患者之滑液的遷移及 hC5aR 抗體 (參考抗體 Q) 對其之抑制作用。所有值均針對在與同型抗體一起培育時偵測到之遷移正規化。

## 實施例 12. 於克羅恩氏病患者及潰瘍性結腸炎患者之腸中表現之 C5aR

正常限度內之腸組織樣品 (n=14)、潰瘍性結腸炎患者之腸組織樣品 (n=21) 及克羅恩氏病患者之腸組織樣品 (n=25) 獲自 Cambridge Bioscience (Cambridge, UK)。所有人類物質均在知情同意下自供者/或近親獲得，且經有關地方倫理委員會 Cambridge BioSciences, Supplier information: Tissue Supply Network ([www.bioscience.co.uk](http://www.bioscience.co.uk)) 批准。所用抗體及免疫組織化學方案如實施例 9 中所述。

### 半定量評分

C5aR 免疫陽性 (C5aR<sup>+</sup>) 細胞經如下半定量評分：

對黏膜相關淋巴隔室個別評分：黏膜 (M)：上皮內淋巴細胞 (IEL) 隔室 (表面上皮)、固有層 (lamina propria) 及濾泡相關上皮 (follicle-associated epithelium, FAE)。黏膜下層 (SM)：孤立淋巴濾泡 (ILF)、派爾氏斑 (Peyer's patches) (迴腸)/結腸 IEL (結腸) 及孤立浸潤性淋巴細胞。外肌層 (Muscularis Externa, ME)：IEL 及孤立浸潤性淋巴細胞。以 0-4 之尺度對各隔室評分：0，無 C5aR<sup>+</sup> 細胞；1，少許 C5aR<sup>+</sup> 細胞；2，中等數目之 C5aR<sup>+</sup> 細胞；3，許多 C5aR<sup>+</sup> 細胞；及 4，極大量之 C5aR<sup>+</sup> 細胞。計算各腸層 (M、SM、ME) 及整個腸總計 (M+SM+ME) 之累積評分。最大評分：M=12，SM=12，ME=8，且整個腸為 32。藉由克魯斯卡爾-沃利斯檢驗 (Kruskal-Wallis test) 在 GraphPad Prism 5 中用多恩氏多比較後檢驗 (Dunn's multiple comparison post-test) 分析 C5aR 蛋

白表現之免疫組織化學數據之半定量評分。P<0.05 視為顯著。

### 結果

在 23/25 克羅恩氏病患者、19/21 潰瘍性結腸炎患者及 7/14 正常腸樣品中，在上皮內淋巴細胞隔室中、濾泡相關上皮中及作為孤立細胞在黏膜之固有層中發現 C5aR 陽性嗜中性白血球及骨髓樣細胞 (P 值 (費雪氏精確檢驗) 分別為 0.005 及 0.015)。另外，在 21/25 克羅恩氏病患者及 18/21 潰瘍性結腸炎患者中相較於 7/14 正常腸樣品，在派爾氏斑/結腸淋巴濾泡；孤立淋巴濾泡及作為孤立細胞之黏膜下層中發現 C5aR 陽性細胞 (P 值 (費雪氏精確檢驗) 分別為 0.03 及不顯著)。最後，在克羅恩氏病患者及潰瘍性結腸炎患者以及正常腸中之浸潤性外肌層中發現 C5aR 陽性細胞。結果呈現於圖 6 中且概述於表 10 中。基於半定量分析，發現相較於正常腸，克羅恩氏病患者之腸中 (P<0.01) 及潰瘍性結腸炎患者之腸中 (P<0.05)，整個腸壁中之 C5aR 表現顯著更高，例如三個腸層 (黏膜、黏膜下層及外肌層) 之累積評分。

診斷	以下各層中之 C5aR 表現		
	黏膜	黏膜下層	外肌層
正常	7/14	7/14	8/14
克羅恩氏病	23/25	21/25	19/25
潰瘍性結腸炎	19/21	18/21	11/21

表 10. 克羅恩氏病患者及潰瘍性結腸炎患者之腸中相較於正常腸中 C5aR 表現之概述。

儘管本文已說明並描述本發明之某些特徵，但一般技術者現將想到許多修改、取代、變化及等效物。因此，應瞭解，隨附具體實例意欲涵蓋處於本發明之真實精神範疇內的所有該等修改及變化。

#### 【圖式簡單說明】

圖 1 展示本申請案中分離且特性化之所選單株抗體之可變區的比對。

圖 2 展示所選抗體對小鼠與人類 C5aR 嵌合體之結合特异性。32F3A6、35F12A2 及 35F32A3 與嵌合人類/小鼠 C5aR 之結合與參考抗體 Q 之結合進行比較。以示意圖展示嵌合受體。來源於人類及小鼠 C5aR 之區域分別用細線及粗線展示。

圖 3 展示來自一種抗體之可變區與最接近之生殖系人類抗體可變重鏈及輕鏈序列的比對。「/」指示「序列之中斷」，諸如介於 V、D 或 J 區段之間。

圖 4 為在 K/BxN-hC5aR-KO/KI 血清轉移模型中形成發炎後 5 天分別經腹膜內給予 0.5、1.5 或 10 mg/kg 之單一起始劑量(箭頭)，接著分別給予 9 次 0.25、0.5 或 2 mg/kg 之日劑量的三個治療組的臨床評分，其中誤差條表示  $\pm$ SD。對照組接受 IgG1 3G12。

圖 5 為牛皮癬性關節炎及骨關節炎患者(對照組)之滑液中之 C5a 蛋白表現。在牛皮癬性關節炎患者組中 C5a 含量顯著升高( $p = 0.001$ ; Mann-Whitney)。

圖 6 為克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎中 C5aR 蛋白表現之

半定量分析。C5aR 蛋白表現藉由免疫組織化學研究且藉由克魯斯卡爾-沃利斯檢驗在 GraphPad Prism 5 中用多恩氏多比較後檢驗分析，且  $P < 0.05$  視為顯著。\*  $P < 0.05$ ；\*\*  $P < 0.01$ ；\*\*\*  $P < 0.001$ 。

**【主要元件符號說明】**

無

## 序列表

<110> 諾佛 儂迪克股份有限公司 (Novo Nordisk A/S)

<120> 治療性抗體

<130> 8318.200-TW

<160> 41

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

Asp Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 3

Thr Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Glu Phe Phe Gln His  
1 5 10

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Arg

1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr  
                   20                    25                    30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Val Gly Thr Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Glu Phe Phe Gln His Trp  
                   100                    105                    110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
1                    5                    10

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 6

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1                    5

<210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

201311724

<223> 合成序列

<400> 7

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr  
1 5

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
100 105

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 9

Ser Tyr Val Met His  
1 5

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;400&gt; 10

Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;400&gt; 11

Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成序列

&lt;400&gt; 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Ala Phe Asp  
 100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

201311724

<210> 13  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 14  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 14

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 15

Gln Gln Tyr Gly Ser Pro Leu Thr  
1 5

<210> 16  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
第 5 頁

50

55

60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 17  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 17

Asn Tyr Gly Met His  
1 5

<210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 18

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

<210> 19  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 19

Thr Tyr Tyr Thr Ser Gly Ser Ser Lys His Phe Gln Pro  
1 5 10

<210> 20  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

201311724

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Gly Ser Ser Lys His Phe Gln Pro Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ser  
1 5 10

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 23

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr  
1 5

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg  
100 105

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 25

Asn Tyr Asp Met Ser  
1 5

<210> 26

<211> 15

<212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 26

Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Leu Lys  
 1 5 10 15

<210> 27  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 27

His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 28  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 28

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Leu Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Cys Cys Ala  
 85 90 95

Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser



115

120

<210> 29  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 31

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 32  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成序列

<400> 32

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg  
85 90 95

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

<210> 33

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 34  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 35  
<211> 326  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 36  
<211> 327  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
第 15 頁

85

90

95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 37

<211> 120

201311724

<212> PRT  
<213> 智人

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser  
115 120

<210> 38  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Thr Phe  
第 17 頁

85

90

95

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 39  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 39

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Ala Phe Asp  
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 40  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成序列

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg  
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 41  
 <211> 350  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 41

Met Asp 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 Lys 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

七、申請專利範圍：

1.一種結合 C5aR 之抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 1、9、17 或 25 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該等序列中之任一者，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 2、10、18 或 26 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該等序列中之任一者，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 3、11、19 或 27 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該等序列中之任一者。

2.一種結合 C5aR 之抗體，其中該抗體之輕鏈之可變區包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列，

其中該 CDR1 序列包含 SEQ ID 5、13、21 或 29 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該等序列中之任一者，及/或

其中該 CDR2 序列包含 SEQ ID 6、14、22 或 30 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該等序列中之任一者，及/或

其中該 CDR3 序列包含 SEQ ID 7、15、23 或 31 或具有 1、2 或 3 個胺基酸取代、缺失或插入之該等序列中之任一者。

3.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之抗體，其中該抗體

選自：

a. 其中重鏈之可變區之 CDR 包含 SEQ ID 1、2 及 3 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 5、6 及 7 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列的抗體，

b. 其中重鏈之可變區之 CDR 包含 SEQ ID 9、10 及 11 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 13、14 及 15 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列的抗體，

c. 其中重鏈之可變區之 CDR 包含 SEQ ID 17、18 及 19 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 21、22 及 23 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列的抗體，

d. 其中重鏈之可變區之 CDR 包含 SEQ ID 25、26 及 27 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列且其中可變輕鏈之 CDR 包含 SEQ ID 29、30 及 31 或具有 1 個胺基酸取代、缺失及/或插入之該等序列的抗體。

4.如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該抗體之重鏈之可變區包含與 SEQ ID NO: 4、12、20 或 28 具有至少 80%、85%、90%或 94%一致性的序列及/或其中該抗體之輕鏈之可變區包含與 SEQ ID NO: 8、16、24 或 32 具有至少 80%、85%、90%或 94%一致性的序列。

5.如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該抗體為人類抗體。

6. 一種人類抗體，其結合 C5aR 之第二細胞外環。

7. 如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該抗體結合人類 C5aR 且較佳結合人類 C5aR 之第二細胞外環。

8. 如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中如藉由競爭配體結合檢定關於嗜中性白血球所量測之抗體的親和力低於 0.80 nM。

9. 如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該抗體顯著抑制或降低 C5a 與 C5aR 之結合。

10. 如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該抗體顯著抑制試管內人類嗜中性白血球之遷移。

11. 一種結合人類 C5aR 之抗體，其中 Fc 區相較於分別由 SEQ ID NO 33、34、35 及 36 定義之 IgG1、IgG2、IgG4 或 IgG4/G2 Fc 參考序列對一或多種 Fc $\gamma$  受體之結合親和力降低。

12. 如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該抗體不會顯著誘導試管內嗜中性白血球之 ADCC、CDC 及/或吞噬作用。

13. 如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其中該 Fc 區為 IgG1 (SEQ ID NO: 33)、IgG2 (SEQ ID NO: 34)、IgG2/4 (SEQ ID NO: 35) 或 IgG4 (SEQ ID NO: 36)，具有以下點突變中之一或多者：

a. E233P

b. L234A 或 V234A 或 F234L 或 F234V

c. L235E 或 L235A

d. G236R 或 G236A

e. G237A

f. N297Q

g. L328R

h. A330S

i. P331S。

14.如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其用於治療。

15.如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其用於治療免疫疾病或病症，諸如類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性腸病(IBD)或大腸急躁症候群。

## 八、圖式：

如次頁

d. G236R 或 G236A

e. G237A

f. N297Q

g. L328R

h. A330S

i. P331S。

14.如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其用於治療。

15.如前述申請專利範圍中任一項之抗體，其用於治療免疫疾病或病症，諸如類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬性關節炎、全身性紅斑狼瘡(SLE)、狼瘡腎炎、發炎性腸病(IBD)或大腸急躁症候群。

## 八、圖式：

如次頁

可變重鏈區

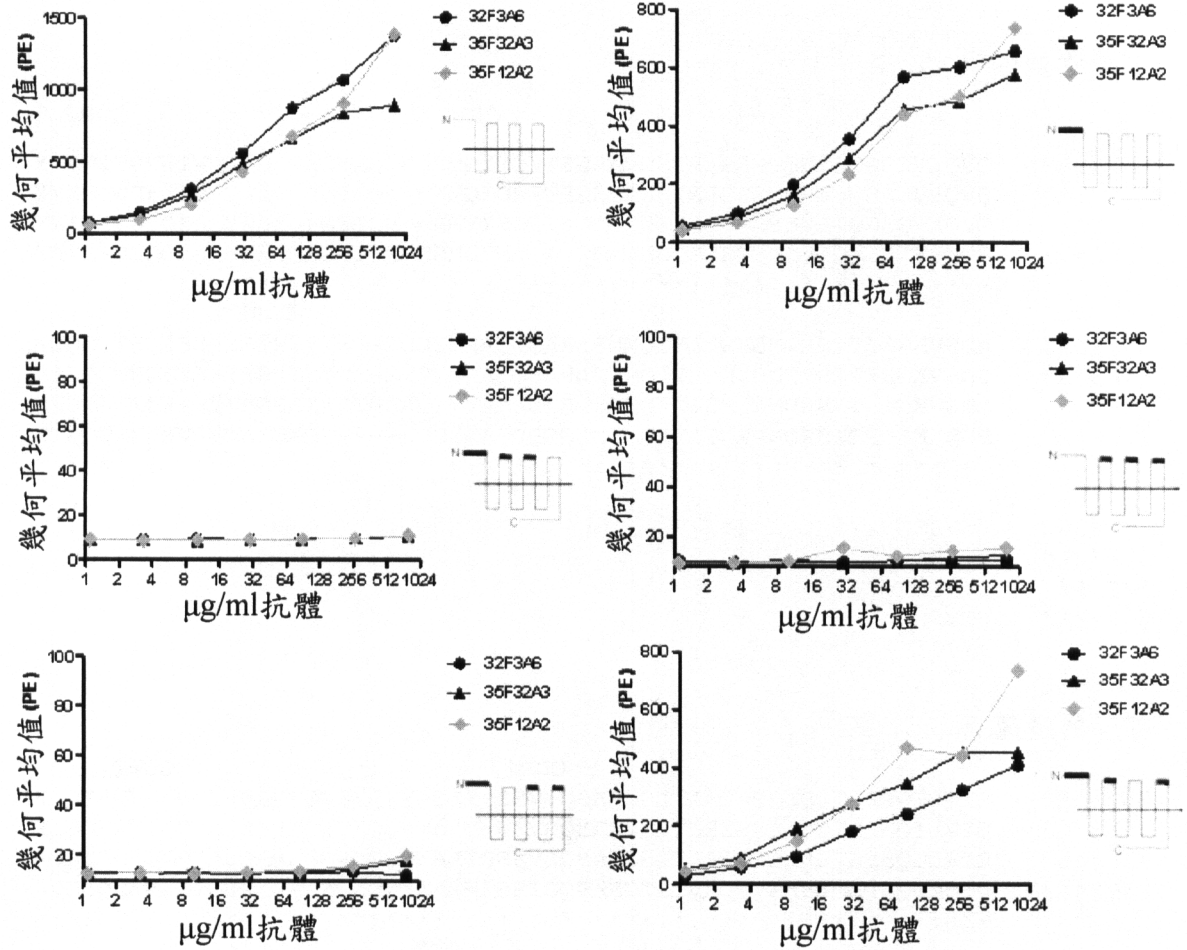
	CDR1	CDR2
35F12A2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFS <b>NYGM</b> HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGINKYY	
35F32A3	QVQLVESGGGLVRPGRSLRLSCAASGFTFR <b>DYGM</b> HWVRQAPGKSLEWVAVIWFDGINKYY	
32F3A6	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFS <b>SYVM</b> HWVRQAPGKGLEWVSAIDTGG-GTYY	
35F24A3	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSASGFAFS <b>NYDMS</b> WVRQTPEKRLEWVA <b>AFSSDG-YTFY</b> :*:***:***:*** **:* ** .***:* . * * ***: * * ***:..: . * .:*	
	<b>CDR3</b>	
35F12A2	<b>ADSVK</b> GRFTISRDNKSTLYLQMN <b>SLRAEDTAVYYCAG--TYTSGSS-KHFQ</b> PWGQ <b>GT</b> L	
35F32A3	<b>GDSVK</b> GRFTISRDNKNTLYLQMN <b>SLRAEDTAMYYCVG--TYFGPGTT-EFFQ</b> HWGQ <b>GT</b> L	
32F3A6	<b>ADSVK</b> GRFTISRDNKNSLYLQMN <b>SLRAEDMAVYYCARDY</b> YYY <b>ASGSYYKAFDI</b> WGQ <b>GT</b> M	
35F24A3	<b>PDSLK</b> GRFTISRDNARNTLYLQMS <b>SLGSEDTALYCCAR----</b> HADY <b>ANYPVMDY</b> WGQ <b>GT</b> S **:*****:..:*****.* * : * * * * . . . : : *****	
35F12A2	VTVSS	
35F32A3	VTVSS	
32F3A6	VTVSS	
35F24A3	VTVSS *****	

可變輕鏈區

	CDR1	CDR2
35F12A2	EIVLTQSPATLSLSPGERATL <b>SCRASQSVSS-YLSWY</b> QQKPGQAPRLLIY <b>DASN</b> RATGIP	
35F32A3	EIVLTQSPATLSLSPGERATL <b>SCRASQSVSS-YLAWY</b> QQKPGQAPRLLIY <b>DASN</b> RATGIP	
32F3A6	EIVLTQSPGTL <b>SLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWY</b> QQKPGQAPRLLIY <b>GASS</b> RATGIP	
35F24A3	DIQMTQSPSSLSASV <b>DRVTITCRASQGISS-WLAWY</b> QQKPEKAPKSLIY <b>AASSLQ</b> SGVP :* :*****:*** * *:*.*:*****:*** :*:***** :** : * * * * . :*:*	
	<b>CDR3</b>	
35F12A2	ARFSGSGSGTDFTLT <b>ISSLEPEDFAVYYCQQR</b> SNWP- <b>TFGPGTKV</b> DIKR	
35F32A3	ARFSGSGSGTDFTLT <b>ISSLEPEDFAVYYCQQR</b> SNWP- <b>TFGPGTKV</b> DIKR	
32F3A6	DRFSGSGSGTDFTLT <b>ISRLEPEDFAVYYCQQYGSPL-TFGQ</b> GTKLEIKR	
35F24A3	SRFSGSGSGTDFTLT <b>ISSLPEDFATYYCQQYNSYPRT</b> FGQGTKVEIKR ***** * :*****.* ***** .. *** ***: :***	

圖 1

**A**



**B**

嵌合受體						
參考抗體	+	+	+	-	-	-
32F3A6	+	+	+	-	-	-
35F12A2	+	+	+	-	-	-
35F32A3	+	+	+	-	-	-

圖2



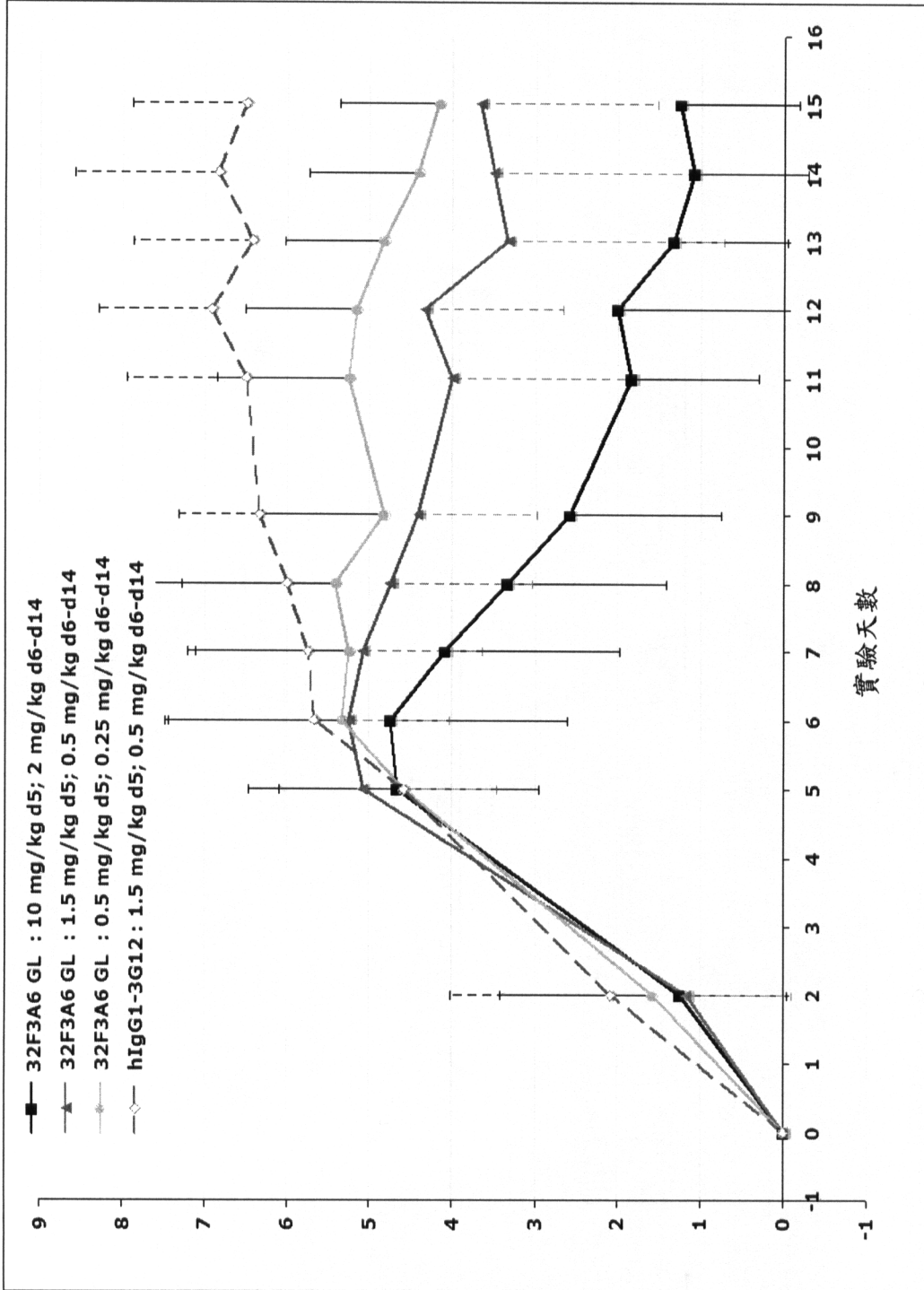


圖4

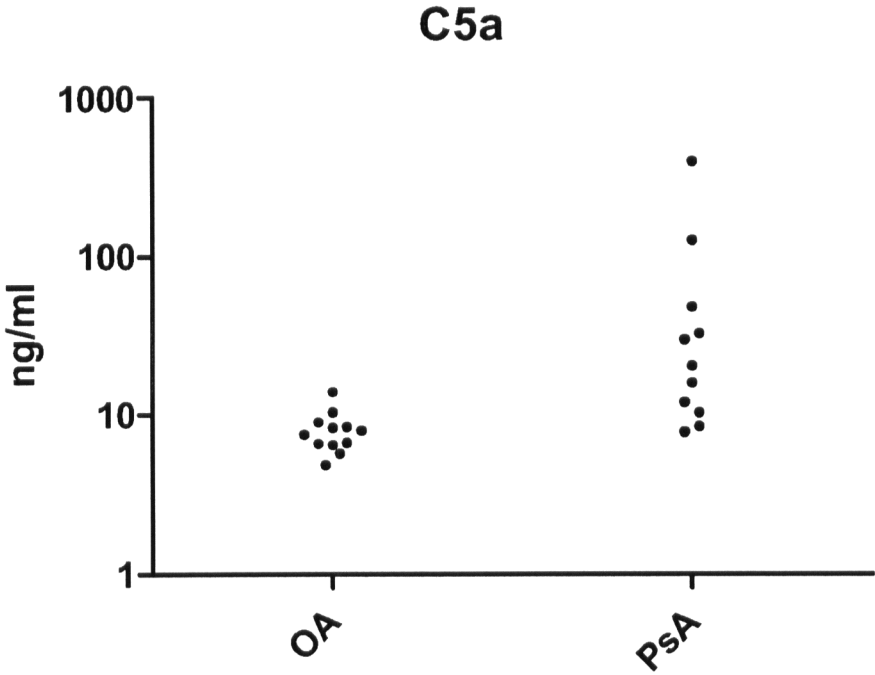
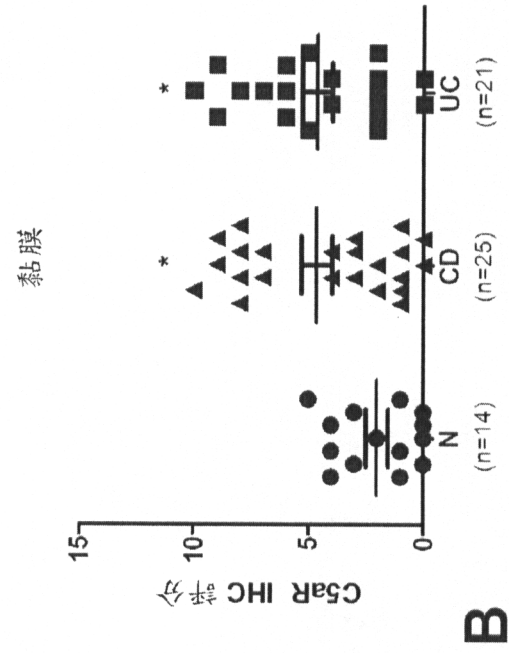
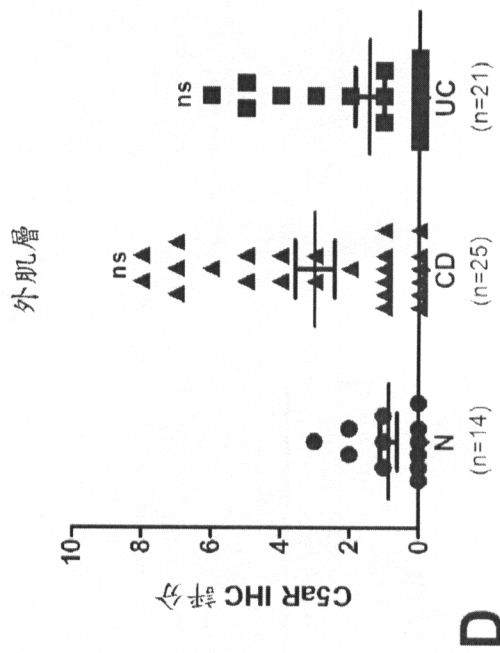


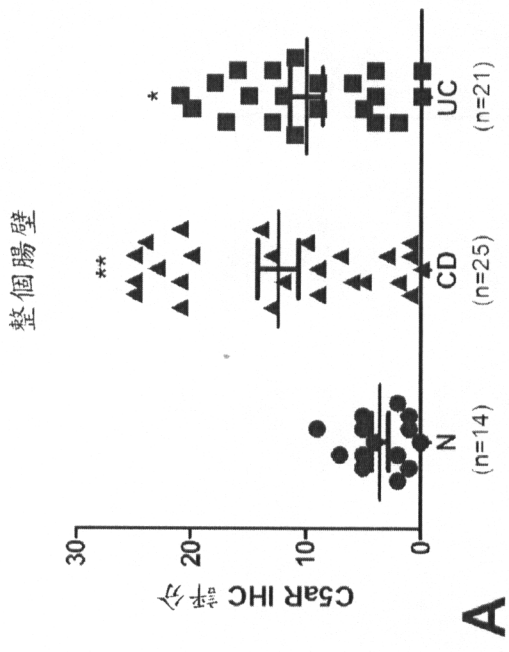
圖5



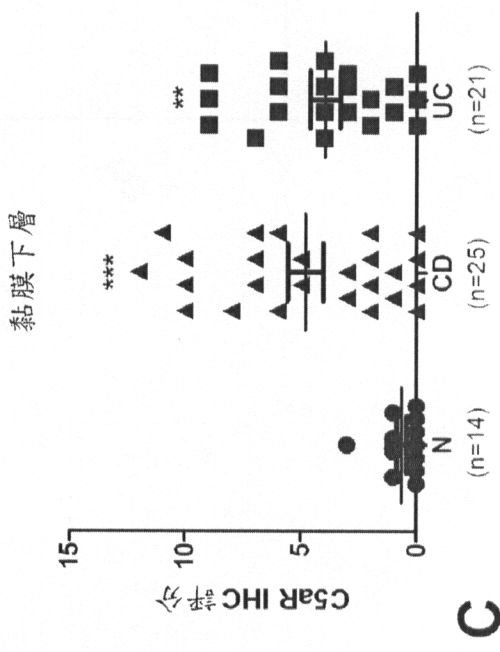
B



D



A



C

圖6