



(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 200948377 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：098115004

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 06 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/16 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/06 美國 61/050,888

2008/08/20 美國 61/189,653

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

美國

(72)發明人：席德赫 薩迪夫 S SIDHU, SACHDEV S. (CA)；李賓 LI, BING (US)；凡 魯克恩

迦配恩 曼諾 VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO (NL)；溫斯曼 克利斯

堤恩 WIESMANN, CHRISTIAN (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：9 共 113 頁

(54)名稱

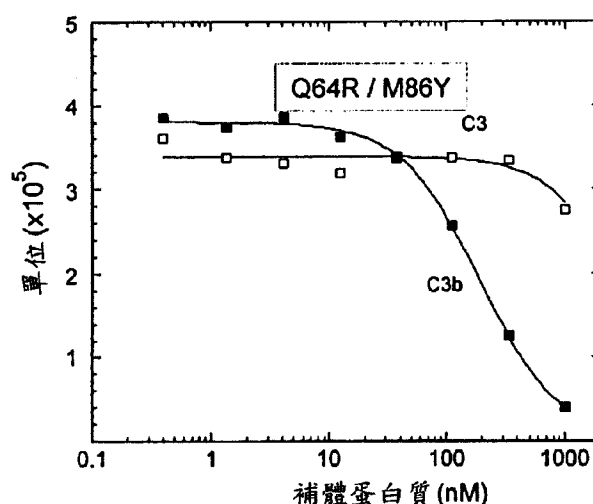
親和力成熟之 C R I g 變體

AFFINITY MATURED CRIG VARIANTS

(57)摘要

本發明係關於親和力成熟之 CRi g 變體。特定言之，本發明係關於相較於對 C3，對 C3b 之結合親和力增強且保持對 C3b 之選擇性結合的 CRi g 變體。

親和力改良之 CRi g 保持對 C3b 之選擇性





(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 200948377 A1

(43)公開日：中華民國 98 (2009) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：098115004

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 06 日

(51)Int. Cl.：

A61K38/16 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/06 美國 61/050,888

2008/08/20 美國 61/189,653

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

美國

(72)發明人：席德赫 薩迪夫 S SIDHU, SACHDEV S. (CA)；李賓 LI, BING (US)；凡 魯克恩

迦配恩 曼諾 VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO (NL)；溫斯曼 克利斯

堤恩 WIESMANN, CHRISTIAN (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：9 共 113 頁

(54)名稱

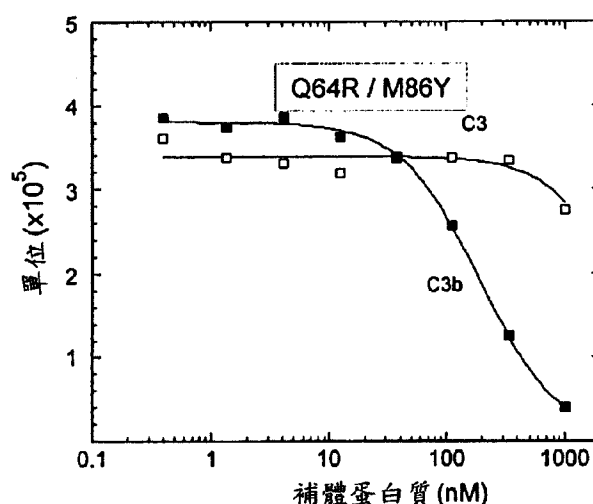
親和力成熟之 C R I g 變體

AFFINITY MATURED CRIG VARIANTS

(57)摘要

本發明係關於親和力成熟之 CRi g 變體。特定言之，本發明係關於相較於對 C3，對 C3b 之結合親和力增強且保持對 C3b 之選擇性結合的 CRi g 變體。

親和力改良之 CRi g 保持對 C3b 之選擇性



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於親和力成熟之CRIg變體。特定言之，本發明係關於相較於C3而言對C3b之結合親和力有所增強且保持對C3b之選擇性結合的CRIg變體。

本申請案主張2008年8月20日申請之美國臨時專利申請案第61/189,653號及2008年5月6日申請之美國臨時專利申請案第61/050,888號之權利，該等專利申請案之揭示內容係以全文引用之方式併入本文中。

【先前技術】

補體系統

補體系統為由通常以非活性酶原形式存在之一系列血清糖蛋白組成的複雜酶級聯系統。三種主要路徑(亦即經典路徑、替代路徑及甘露糖結合凝集素路徑)可活化補體，三者於C3之層面上可合併至一起，其中兩種類似之C3轉化酶使C3分裂成C3a及C3b。

巨噬細胞為已顯現能識別細胞表面表現之鑑別標記(所謂分子模式)的細微結構差異之先天能力的專門細胞(Taylor等人，*Eur J Immunol* 33, 2090-1097 (2003)；Taylor等人，*Annu Rev Immunol* 23, 901-944 (2005))。雖然此等表面結構之直接識別為先天免疫之一基本態樣，但調理作用允許一般巨噬細胞受體可介導吞噬(engulfment)，此使吞噬細胞之功效增加且使吞噬細胞之識別譜系多樣化(Stuart及Ezekowitz, *Immunity* 22, 539-550

(2005))。吞噬作用之過程涉及多種配體-受體相互作用，且現已清楚，各種調理素(opsonin)(包括免疫球蛋白、膠凝素(collectin)及補體組分)經由與巨噬細胞表面受體相互作用而引導為病原體內化所需之細胞活性(綜述於Aderem及Underhill, *Annu Rev Immunol* 17, 593-623 (1999); Underhill及Ozinsky, *Annu Rev Immunol* 20, 825-852 (2002))。雖然由生殖系基因編碼之天然免疫球蛋白可識別多種病原體，但大部分調理IgG係經由適應性免疫而形成，且因此經由Fc受體達成之有效清除並非立即的(Carroll, *Nat Immunol* 5, 981-986 (2004))。另一方面，補體可快速識別病原體表面分子且使粒子致敏以便由補體受體吸收(Brown, *Infect Agents Dis* 1, 63-70 (1991))。

補體由超過30種可調理多種病原體以便由補體受體識別之血清蛋白組成。視級聯之初始觸發而定，可辨別出三種路徑(綜述於(Walport, *N Engl J Med* 344, 1058-1066 (2001))。所有三種路徑皆具有活化中心組分C3之共同步驟，但其根據識別性質及引起C3活化之初始生物化學步驟而有所不同。經典路徑係由與病原體表面結合、又與C1q補體組分結合之抗體活化，從而引發絲胺酸蛋白酶級聯，最終使C3分裂為其活性形式C3b。凝集素路徑係在由凝集素蛋白識別碳水化合物基元之後活化。此路徑之三個成員迄今已被鑑別：甘露糖結合凝集素(MBL)、凝集素之SIGN-R1家族及纖維膠凝蛋白(Pyz等人, *Ann Med* 38, 242-251 (2006))。MBL與纖維膠凝蛋白均與絲胺酸蛋白酶

有關，其如同經典路徑中之C1般起作用，活化組分C2及C4，產生中心C3步驟。替代路徑與經典路徑及凝集素路徑之區別在於替代路徑係由於內部C3酯與病原體表面上之識別基元直接反應而活化。經由替代路徑蛋白酶因子B及因子D之作用，最初C3結合至活化表面引起C3b沈積之快速擴增。重要的是，經由因子B及D之作用，藉由經典路徑或凝集素路徑所沈積之C3b亦會引起C3b沈積之擴增。在補體活化之所有三種路徑中，關鍵性調理步驟為使組分C3轉化為C3b。補體級聯中之酶使C3分裂可使硫酯暴露於親核攻擊，從而允許C3b經由硫酯域共價連接於抗原表面上。在補體調理作用中，此為初始步驟。所結合之C3b隨後發生蛋白質水解反應，產生可由不同受體識別之iC3b、C3c及C3dg片段(Ross及Medof, *Adv Immunol* 37, 217-267 (1985))。此裂解會消除C3b進一步擴增C3b沈積及活化補體級聯之後期組分(包括能夠直接損害膜之膜攻擊複合物)的能力。然而，巨噬細胞吞噬受體優先識別C3b及其片段；由於酯鍵形成之方式多種多樣，因此C3介導之調理作用對於病原體識別而言係重要的(Holers等人, *Immunol Today* 13, 231-236 (1992))，且因此不同C3降解產物之受體在宿主免疫反應中起重要作用。

C3本身為一種由13個不同結構域組成之複雜撓性蛋白質。分子核心係由8個所謂巨球蛋白(MG)結構域組成，此等結構域構成C3之緊密堆積之 α 鏈及 β 鏈。此結構中插有CUB(C1r/C1s、Uegf及骨形成蛋白-1)及TED域，後者含有

允許C3b與病原體表面共價結合之硫酯鍵。剩餘結構域含有C3a或充當核心結構域之連接子及間隔基。C3b及C3c結構與C3之比較展示，在各自蛋白質水解作用下分子經歷較大之構型重排，此不僅暴露TED，而且使可與細胞受體相互作用之分子之其他新表面暴露(Janssen及Gros, *Mol Immunol* 44, 3-10 (2007))。

吞噬細胞上之補體C3受體

存在三個已知之補體受體基因超家族：編碼CR1及CR2、 β -2整合素家族成員CR3及CR4以及免疫球蛋白Ig-超家族成員CRIg之短一致重複序列(SCR)模組。

CR1為由30個短一致重複序列(SCR)組成之180-210 kDa糖蛋白且在免疫複合物清除中起重要作用。SCR為具有約60個胺基酸之模組結構，各自具有兩對二硫鍵，從而提供結構剛度。經由兩個各自由3個SCR組成之獨特位點發生與C3b及C4b之高親和力結合(綜述於Krych-Goldberg及Atkinson, *Immunol Rev* 180, 112-122 (2001))。CR1之SCR 15-17(位點2)內所含的C3b結合位點之結構已藉由MRI測定(Smith等人, *Cell* 108, 769-780 (2002))，該MRI揭示出三個模組呈延長之頭尾排列形式，其在16-17接合點處具有撓性。結構引導性突變誘發可確定模組15上對C4b結合而言關鍵之帶正電荷表面區域。此小片區域以及在CR1之同一面上所暴露的模組16之鹼基側鏈係C3b結合所必需的。最初描述為免疫黏附受體(Rothman等人, *J Immunol* 115, 1312-1315 (1975))之CR1之主要功能係捕獲紅血球上之IC

以便藉由肝轉運並清除 (Taylor 等人, **Clin Immunol Immunopathol** 82, 49-59 (1997))。對於嗜中性白血球上而非組織巨噬細胞中之CR1而言, 在吞噬中起著一定作用 (Sengelov等人, **J Immunol** 153, 804-810 (1994))。除在免疫複合物清除中之作用外, CR1經由其與相應轉化酶之相互作用亦為經典路徑與替代路徑活化之強抑制劑 (Krych-Goldberg及Atkinson, 2001, 同上; Krych-Goldberg等人, **J Biol Chem** 274, 31160-31168 (1999))。在小鼠中, CR1及CR2為藉由替代性剪接所形成之同一基因之兩種產物且主要與B-淋巴細胞及濾泡性樹突狀細胞相關且主要發揮調節B細胞反應之功能 (Molina等人, 1996)。CR1之小鼠功能等效物Crry可使經典路徑及替代路徑酶失活且充當補體活化之內在調節劑而非充當吞噬細胞受體 (Molina等人, **Proc Natl Acad Sci USA** 93, 3357-3361 (1992))。

CR2(CD21)結合iC3b及C3dg且為可增強B細胞免疫力之主要補體受體 (Carroll, **Nat Immunol** 5, 981-986 (2004); Weis等人, **Proc Natl Acad Sci USA** 81, 881-885 (1984))。由同源B細胞經由B細胞抗原受體吸收塗有C3d之抗原引起信號增強。因此, CD21-CD19-CD81共受體(coreceptor)與B細胞抗原受體之共接合使B細胞活化之臨限值降低且提供重要的存活信號 (Matsumoto等人, **J Exp Med** 173, 55-64 (1991))。iC3b上之CR2結合位點已部分地定位於TED與MG1域之間的界面上 (Clemenza及Isenman, **J Immunol** 165, 3839-3848 (2000))。

CR3及CR4為由 α 亞單位(分別為CD11b或 α_M 及CD11c或 α_X)及共同 β 鏈(CD18或 β_2)組成之跨膜異二聚體，且涉及黏著至細胞外基質及其他細胞以及識別iC3b。其屬於整合素家族且不僅在吞噬作用中、而且在白血球運輸及遷移、突觸形成及共刺激中發揮功能(綜述於(Ross, *Adv Immunol* 37, 217-267 (2000))。整合素黏著性係經由稱為內向外信號轉導之過程調節，從而使整合素由低親和力結合狀態轉化為高親和力結合狀態(Liddington及Ginsberg, *J Cell Biol* 158, 833-839 (2002))。此外，配體結合使信號自胞外域轉導至細胞質。iC3b之結合位點已定位於CR3及CR4之 α 鏈上之若干結構域(Diamond等人, *J Cell Biol* 120, 1031-1043 (1993)；Li及Zhang, *J Biol Chem* 278, 34395-34402 (2003)；Xiong及Zhang, *J Biol Chem* 278, 34395-34402 (2001))。CR3之多種配體(iC3b、 β -葡聚糖及ICAM-1)似乎結合至CD11b之I域內所含的部分重疊位點(Balsam等人, 1998；Diamond等人, 1990；Zhang及Plow, 1996)。基於針對在C3b之CUB域展開後變得暴露(藉由補體調節性蛋白酶因子I使 α' 鏈分裂後發生)之殘基定位CR3結合位點的結構性研究(Nishida等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 19737-19742 (2006))，預測其特異性識別C3b、iC3b之蛋白質裂解失活形式。

CRIg為與A33抗原及JAM1同源且為自血流中清除病原體所需之巨噬細胞相關受體。人類CRIg蛋白最初係使用識別人類JAM1之保守Ig域之簡併引子自人類胎兒cDNA文庫中

選殖。若干純系之測序顯示具有400個胺基酸之開放閱讀框架。Blast搜尋證實與Z39Ig(1型跨膜蛋白)類似(Langnaese等人, Biochim Biophys Acta 1492 (2000) 522-525)。已發現此分子之胞外區係由兩個Ig樣域(包含N-末端V-set域及C-末端C2-set域)組成。其新穎之人類蛋白質最初係命名為「與巨噬細胞相關之單跨膜Ig超家族成員」(huSTIgMA)。隨後, 使用3'及5'引子選殖huSTIgMA之剪接變體, 此變體缺乏膜近側IgC域且短了50個胺基酸。因此, 將此人類蛋白質之較短剪接變體命名為huSTIgMAshort。huSTIgMA(稱作PRO362)之胺基酸序列及編碼聚核苷酸序列揭示於2002年6月25日頒布之美國專利第6,410,708號中。此外, huSTIgMA與huSTIgMAshort以及鼠類STIgMA(muSTIgMA)蛋白及核酸序列揭示於2004年4月15日公開之PCT公開案WO 2004031105中。

CRIg及C3b:CRIg複合物之晶體結構揭示於2008年2月21日公開之美國申請公開案第2008/0045697號中。

駐留於肝竇狀隙之內腔內的庫弗氏細胞(Kupffer cell; KC)形成體內之最大巨噬細胞群體。儘管KC具有與其他組織駐留的巨噬細胞一樣之標記, 但其發揮特定功能, 此等功能適於有效清除自消化道之微血管系統排出之存在於門靜脈血液中的腸源性細菌、微生物碎屑、細菌內毒素、免疫複合物及死細胞(Bilzer等人, Liver Int 26, 1175-1186 (2006))。病原體有效結合至KC表面為第一線免疫防禦病原體之關鍵步驟(Benacerraf等人, J Exp Med 110, 27-48

(1959))。KC使病原體自循環系統中快速清除之中心作用可由缺乏KC之小鼠之死亡率的明顯增加來說明(Hirakata等人, **Infect Immun** 59, 289-294 (1991))。CRIg之鑑別進一步突出補體及KC在第一線免疫防禦循環病原體中之關鍵作用。

於小鼠KC上鑑別出之僅有的補體C3受體為CRIg及CR3(Helmy等人, **Cell** 124, 915-927 (2006)), 而人類KC顯示CR1及CR4之額外表現(Hinglais等人, 1989)。KC上之CRIg與CR3促進活體外結合至iC3b調理粒子(Helmy等人, **Lab Invest** 61, 509-514 (2006))。KC表現之CR3在活體內結合至塗有iC3b之病原體中的作用尚未清楚。已提出CR3經由嗜中性白血球之募集及與嗜中性白血球表現之ICAM1之相互作用間接地促進病原體之清除(Conlan及North, **Exp Med** 179, 259-268 (1994); Ebe等人, **Pathol Int** 49, 519-532 (1999); Gregory等人, **J Immunol** 157, 2514-2520 (1996); Gregory及Wing, **J Leukoc Biol** 72, 239-248 (2002); Rogers及Unanue, **Infect Immun** 61, 5090-5096 (1993))。相比之下, CRIg藉由捕獲通過肝竇狀隙內腔之病原體而發揮直接作用(Helmy等人, 2006, 同上)。CRIg與CR3之生物學差異可部分地由此等兩種受體之結合特性之差異來反應。KC上所表現之CRIg組成性地結合至單體C3片段, 而CR3僅結合至iC3b調理粒子(Helmy等人, 2006, 同上)。CRIg有效捕獲單體C3b及iC3b以及塗有C3b/iC3b之粒子的能力反映出由在巨噬細胞之膜突起部分之頂端處所

集中之CRIg分子(Helmy等人, 2006, 同上)與病原體表面上所存在之C3b及iC3b之多聚體之間的多價相互作用所產生之增強之親和力。CR3僅結合塗有iC3b之粒子, 而CRIg另外結合至C3b(其為血清調理病原體上所形成之最初的C3分裂產物)(Croize等人, *Infect Immun* 61, 5134-5139 (1993))。因為結合至病原體表面之大量C3b分子經因子H及I保護而免於分裂(Gordon等人, *J Infect Dis* 157, 697-704 (1988)), 所以由CRIg識別C3b配體可確保快速結合及清除。因此, 雖然CRIg與CR3均表現於KC上, 但其展示不同的配體特異性、不同的結合特性及不同的病原體清除動力學概況。

利用細胞表面受體進入細胞之病原體的實例為病毒, 如人類免疫缺乏病毒(HIV); 及細胞內細菌, 如結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、麻瘋分枝桿菌 (*Mycobacterium leprae*)、假結核耶爾森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、鼠傷寒沙氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 及單核球增多性李氏菌 (*Listeria Monocytogenes*); 及寄生蟲, 如類前氣門亞目 (prostigmatoid)碩大利什曼原蟲 (*Leishmania major*)(Cossart 及 Sansonetti, *Science* 304:242-248 (2004); Galan, *Cell* 103:363-366 (2000); Hornef等人, *Nat. Immunol.* 3:1033-1040 (2002); Stoiber等人, *Mol. Immunol.* 42:153-160 (2005))。

如上所論述, CRIg為最近發現之表現於組織駐留巨噬細

胞亞群體上的補體C3受體。除作為C3蛋白之補體受體起作用以外，CRIg之細胞外IgV域亦藉由結合至C3b且抑制C3及C5之蛋白質水解活化來選擇性地抑制補體之替代路徑。然而，轉化酶亞單位C3b之CRIg結合親和力低($IC_{50} > 1 \mu M$)，因此需要蛋白質濃度相對較高以達成接近完全之補體抑制。因此，需要具有改良之治療功效的CRIg多肽。本發明提供此等多肽。

【發明內容】

本發明至少部分係基於具有增強之結合親和力的CRIg變體之構建。具有組合之胺基酸取代Q64R與M86Y的CRIg-ECD蛋白相較於野生型CRIg變體而言展示強30倍之結合親和力及高7倍之補體抑制活性。此外，在小鼠關節炎模型中用親和力提高之CRIg融合蛋白處理與用野生型CRIg蛋白處理相比使得臨床評分顯著減小。

因此，本發明係關於CRIg變體。

在一態樣中，本發明係關於一種在選自由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之E8-K15、R41-T47、S54-Q64、E85-Q99及Q105-K111組成之群的區域中包含胺基酸取代之CRIg變體。

在一項實施例中，該變體結合C3b或其片段之選擇性超過C3。

在另一項實施例中，相較於SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg而言，該變體對C3b具有增強之結合親和力，其中結合親和力可(例如)增強至少2倍，或至少3倍，或至少4

倍，或至少5倍，或至少6倍，或至少7倍，或至少9倍，或至少10倍，或至少15倍，或至少20倍，或至少30倍，或至少40倍，或至少50倍，或至少70倍，或至少80倍，或至少90倍，或至少100倍。

在另一項實施例中，該變體為比SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg更強的替代補體路徑抑制劑。

在另一項實施例中，該變體在選自由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列中之位置8、14、18、42、44、45、60、64、86、99、105及110組成之群之一或多個胺基酸位置處包含胺基酸取代。

在另一項實施例中，該變體在SEQ ID NO: 2之胺基酸序列中之胺基酸位置60、64、86、99、105及110的一或多者處包含胺基酸取代。

在另一項實施例中，該變體包含選自由以下者組成之群之一或多個取代：E8W、W14F、E84Y/W14F；P45F；G42D/D44H/P45F；Q60I；Q64R；Q60I/Q64R；M86Y；M86W、M86F、M86W/Q9R；M86F/Q99R；K110D、K11N；Q105R/K110N；Q105R/K110Q；及Q105K/K110D。

在另一項實施例中，該變體包含選自由以下者組成之群之一或多個取代：Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/E8Y；Q60I/Q64R/G42D；Q60I/Q64R/P45F；Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F；Q60I/Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/Q105R；Q60I/Q64R/Q105K；Q60I/Q64R/K110N；Q60I/Q105R/K110N；M86Y/E8Y；M86Y/G42D/D44H/P45F；M86Y/P45F；

M86Y/G42D/D44H/P45F ; 及 M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/
M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N。

在另一項實施例中，該變體包含選自由以下者組成之群之一或多個取代：Q60I；Q64R；Q60I/Q64R；M86Y；Q99L；Q105K/K110D；E8W/Q105R/K110N；Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/E8Y；Q60I/Q64R/G42D；Q60I/Q64R/P45F；Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F；Q60I/Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/Q105R；Q60I/Q64R/Q105K；Q60I/Q64R/K110N；M86Y/P45F；及M86Y/Q105K。

在一項更特定之實施例中，該變體包含Q60I/Q64R/M86Y或Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F取代。

在另一態樣中，本發明係關於一種包含如本文中定義之CRIg變體的嵌合體。

在一項實施例中，該嵌合分子為免疫黏附素。

在另一項實施例中，該免疫黏附素包含比SEQ ID NO: 2之全長CRIg短的CRIg變體。

在另一項實施例中，該嵌合分子包含CRIg胞外域。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥組合物，其包含CRIg變體或嵌合分子(例如本發明之免疫黏附素)與醫藥學上可接受之賦形劑的混合物。

在另一態樣中，本發明係關於一種預防或治療補體相關性疾病或病狀之方法，該方法包含向需要此治療之個體投與預防性或治療性有效量之CRIg變體或包含此變體之嵌合分子(諸如免疫黏附素)。

在一項實施例中，補體相關性疾病為發炎性疾病或自體免疫性疾病。

在另一項實施例中，補體相關性疾病係選自由以下者組成之群：類風濕性關節炎(RA)、成人呼吸窘迫症候群(ARDS)、缺血及再灌注後之遠端組織損傷、心肺繞道手術期間之補體活化、皮膚炎、天疱瘡、狼瘡腎炎以及所致之絲球體腎炎及血管炎、心肺繞道術、心臟麻痺誘導之冠脈內皮功能障礙、II型膜增生性絲球體腎炎、IgA腎病、急性腎衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂症候群、年齡相關性黃斑變性、葡萄膜炎、糖尿病性視網膜病變、同種異體移植、超急性排斥反應、血液透析、慢性阻塞性肺病症候群(COPD)、哮喘、吸入性肺炎、蕁麻疹、慢性特發性蕁麻疹、溶血性尿毒癥症候群、子宮內膜異位、心因性休克、缺血再灌注損傷及多發性硬化(MS)。

在另一實施例中，補體相關性疾病係選自由以下者組成之群：發炎性腸病(IBD)、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、青少年慢性關節炎、脊椎關節病、全身性硬化症(硬皮症)、特發性發炎性肌病(皮膚炎、多發性肌炎)、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、全身性血管炎、肉狀瘤病、自體免疫性溶血性貧血(免疫性全血球減少症、陣發性夜間血紅素尿症)、自體免疫性血小板減少症(特發性血小板減少性紫癍、免疫介導性血小板減少症)、甲狀腺炎(格雷氏病(Grave's disease)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、青少年淋巴球性甲狀腺炎、萎

縮性甲狀腺炎)、糖尿病、免疫介導性腎病(絲球體腎炎、腎小管間質腎炎)、中樞及周邊神經系統之脫髓鞘疾病(諸如多發性硬化症)、特發性多發性神經病、肝膽疾病(諸如傳染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎及其他非嗜肝病毒)、自體免疫性慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、肉芽腫性肝炎及硬化性膽管炎)、發炎性及纖維化肺疾病(例如囊腫性纖維化)、麩質敏感性腸病變、惠普爾氏病(Whipple's disease)、自體免疫性或免疫介導性皮膚病(包括大皰性皮膚病、多形性紅斑及接觸性皮炎)、牛皮癬、肺之過敏性疾病(諸如嗜伊紅性肺炎、特發性肺纖維化及過敏性肺炎)、移植相關疾病(包括移植物排斥反應、移植物抗宿主疾病)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、陣發性夜間血紅素尿症、遺傳性血管水腫、動脈粥樣硬化症及II型膜增生性絲球體腎炎。

在一項較佳實施例中，補體相關性疾病為類風濕性關節炎(RA)。

在另一項較佳實施例中，補體相關性疾病為補體相關性眼睛病狀。

在另一項實施例中，補體相關性眼睛病狀係選自由以下者組成之群：年齡相關性黃斑變性(AMD)之所有階段、葡萄膜炎、糖尿病性及其他缺血相關性視網膜病、眼內炎及其他眼內新生血管性疾病。

在另一項實施例中，眼內新生血管性疾病係選自由以下者組成之群：糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、逢希伯-

林道疾病(von Hippel-Lindau disease)、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜新生血管及視網膜新生血管。

在另一項實施例中，補體相關性眼睛病狀係選自由年齡相關性黃斑變性(AMD)、脈絡膜新生血管(CNV)、糖尿病性視網膜病變(DR)及眼內炎組成之群，其中AMD包括濕性與乾性或萎縮性AMD。

在一項實施例中，患者為哺乳動物，較佳為人類。

在另一態樣中，本發明係關於一種抑制哺乳動物中C3b補體片段之產生的方法，該方法包含將有效量之本發明之CRIg變體或包含此變體之免疫黏附素投與該哺乳動物。

在另一態樣中，本發明係關於一種選擇性抑制哺乳動物體內之替代補體路徑的方法，該方法包含將有效量之本發明之CRIg變體或包含此變體之免疫黏附素投與該哺乳動物。

【實施方式】

I. 定義

術語「CRIg」、「PRO362」、「JAM4」與「STIgMA」可互換使用且係指天然序列及變體CRIg多肽。

「天然序列」CRIg為無論製備模式如何均具有與來源於自然界之CRIg多肽相同之胺基酸序列的多肽。因此，天然序列CRIg可自自然界中分離或可藉由重組及/或合成方法製備。術語「天然序列CRIg」特定言之涵蓋天然存在之截短型或分泌型CRIg(例如胞外域序列)、天然存在之變體型

CRlg(例如，替代剪接型)及天然存在之CRlg對偶基因變體。天然序列CRlg多肽特定言之包括具有或不具有N-末端信號序列、在SEQ ID NO: 2之位置1處具有或不具有起始甲硫胺酸及在SEQ ID NO: 2之大致胺基酸位置277至307處具有或不具有任何或全部跨膜域的SEQ ID NO: 2之全長399個胺基酸長的人類CRlg多肽(huCRlg，圖1A及1B中所示)。在另一項實施例中，天然序列CRlg多肽為具有或不具有N-末端信號序列、在SEQ ID NO: 4之位置1處具有或不具有起始甲硫胺酸及在SEQ ID NO: 4之大致位置183至213處具有或不具有任何或全部跨膜域的人類CRlg之305個胺基酸的短形式(huCRlg-短，SEQ ID NO: 4，圖2A及2B中所示)。在一項不同的實施例中，天然序列CRlg多肽為具有或不具有N-末端信號序列、在SEQ ID NO: 6之位置1處具有或不具有起始甲硫胺酸及在SEQ ID NO: 6之大致胺基酸位置181至211處具有或不具有任何或全部跨膜域的SEQ ID NO: 6之280個胺基酸長的全長鼠類CRlg多肽(muCRlg，圖3A-3C中所示)。在此定義內特定言之包括其他非人類動物(包括高級靈長類動物及哺乳動物)之CRlg多肽。

CRlg「胞外域」或「ECD」係指CRlg多肽之一種形式，其基本上不含相應全長分子之跨膜域及細胞質域。通常，CRlg ECD具有不及1%之此等跨膜域及/或細胞質域且較佳具有不及0.5%之此等域。CRlg ECD可包含SEQ ID NO: 2、4或6之胺基酸殘基1或約21至X，其中X為SEQ ID NO: 2中之約271至281之任何胺基酸、SEQ ID NO: 4中之約178

至186之任何胺基酸及SEQ ID NO: 6中之約176至184之任何胺基酸。

如本文中所使用之術語「CRIg變體」意謂與天然序列CRIg多肽具有至少約80%胺基酸序列一致性且如下文所定義之活性CRIg多肽，其包括(但不限於)各自具有或不具有N-末端起始甲硫胺酸、具有或不具有N-末端信號序列、具有或不具有跨膜域之全部或部分及具有或不具有胞內域的全長huCRIg(SEQ ID NO: 2)、huCRIg-短(SEQ ID NO: 4)及muCRIg(SEQ ID NO: 6)。在一項特別實施例中，CRIg變體與SEQ ID NO: 2之序列範圍內之成熟全長多肽具有至少約80%胺基酸序列同源性。在另一項實施例中，CRIg變體與SEQ ID NO: 4之序列範圍內之成熟全長多肽具有至少約80%胺基酸序列同源性。在另一項實施例中，CRIg變體與SEQ ID NO: 6之序列範圍內之成熟全長多肽具有至少約80%胺基酸序列同源性。通常，CRIg變體與SEQ ID NO: 2、4或6內之成熟胺基酸序列具有至少約80%胺基酸序列一致性，或至少約85%胺基酸序列一致性，或至少約90%胺基酸序列一致性，或至少約95%胺基酸序列一致性，或至少約98%胺基酸序列一致性，或至少約99%胺基酸序列一致性。在整個說明書(包括實例)中，術語「野生型」或「WT」係指人類CRIg之成熟全長短形式(CRIg(S))(SEQ ID NO: 4)，且CRIg變體中之胺基酸殘基之編號係指SEQ ID NO: 4之序列。

本發明之CRIg變體為如下文所定義之CRIg激動劑。特

定而言，相較於對C3，本文中之CRIg變體維持選擇性結合於C3b，其中「選擇性結合」係用於指與C3b結合，但不與C3結合。此外，在一個較佳實施例中，本發明之CRIg變體相對於天然序列CRIg多肽(諸如CRIg之人類長形式(SEQ ID NO: 2))對C3b具有增強之結合親和力。在多個實施例中，相對於SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg多肽，結合親和力增強至少約2倍，或至少約3倍，或至少約4倍，或至少約5倍，或至少約6倍，或至少約7倍，或至少約8倍，或至少約9倍，或至少約10倍，或至少約15倍，或至少約20倍，或至少約25倍，或至少約30倍，或至少約35倍，或至少約40倍，或至少約45倍，或至少約50倍，或至少約55倍，或至少約60倍，或至少約65倍，或至少約70倍，或至少約75倍，或至少約80倍，或至少約85倍，或至少約90倍，或至少約95倍，或至少約100倍。在其他實施例中，相對於SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg多肽，對C3b之結合親和力增強約5-10倍，或約5-15倍，或約5-20倍，或約5-25倍，或約5-25倍，或約5-30倍，或約5-35倍，或約5-40倍，或約5-45倍，或約5-50倍，或約5-55倍，或約5-60倍，或約5-65倍，或約5-70倍，或約5-75倍，或約5-80倍，或約5-85倍，或約5-90倍，或約5-95倍，或約5-100倍。

本文中關於CRIg變體之「胺基酸序列一致性百分比(%)」係定義為在比對序列且必要時引入缺口(gaps)以達成最大序列一致性百分比且不將任何保守性取代視作序列一

致性之一部分後，CRIG變體序列中之胺基酸殘基與其所對比之天然CRIG序列中之胺基酸殘基一致之百分比。對於長度不同之序列而言，序列一致性百分比係相對於較長序列沿著較長序列之全長測定。為測定胺基酸序列一致性百分比之目的，比對可以此項技術內之各種方法，例如使用公開可得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體達成。熟習此項技術者可確定適用於測量比對之參數，包括在所比較序列之全長上達成最大比對所需的任何演算法。接著相對於較長序列計算序列一致性，亦即，即使較短序列顯示與較長序列之一部分100%序列一致，但總序列一致性仍小於100%。

本文中關於經鑑別之CRIG變體編碼序列的「核酸序列一致性百分比(%)」係定義為在比對序列且必要時引入缺口以達成最大序列一致性百分比之後候選序列中相應地與CRIG變體編碼序列中之核苷酸一致的核苷酸之百分比。出於測定核酸序列一致性百分比之目的，比對可以屬於此項技術技能範圍內之多種方法(例如使用公開可獲得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體)達成。熟習此項技術者可確定適用於量測比對之參數，包括在所比較之序列之全長上達成最大比對所需的任何演算法。接著相對於較長序列計算序列一致性，亦即，即使較短序列顯示與較長序列之一部分100%序列一致，但總的序列一致性仍小於100%。

無論鑑別模式或製備模式如何，在CRIG變體之定義中皆

包括如上文中所定義之所有胺基酸序列變體。特定言之，本文中包括已藉由取代、化學方式、酶促方式或其他適當方式修飾、具有不同於天然存在之胺基酸之部分的變體，只要其保持天然序列CRIg之定性生物學性質即可。例示性非天然存在之胺基酸取代包括下文所述之彼等取代。

胺基酸殘基可分為四大類：

酸性：殘基在生理性pH值下因失去H離子而具有負電荷且殘基被水溶液吸引以便當含有其之肽處於水溶液中時找出其在該肽之構形中的表面位置。

鹼性：殘基在生理性pH值下因與H離子結合而具有正電荷且殘基被水溶液吸引以便當含有其之肽處於生理性pH值之水性介質中時找出其在該肽之構形中的表面位置。

中性/非極性：殘基在生理性pH值下不帶電荷且殘基被水溶液排斥以便當含有其之肽處於水性介質中時找出其在該肽之構形中的內部位置。此等殘基亦被稱為「疏水性殘基」。

中性/極性：殘基在生理性pH值下不帶電荷，但殘基被水溶液吸引以便當含有其之肽處於水性介質中時找出其在該肽之構形中的外部位置。

胺基酸殘基就其側鏈基團而言可進一步分類為環狀或非環狀、芳族或非芳族殘基，此等名稱為熟習此項技術者所共知。

並非由遺傳密碼編碼之常見胺基酸包括：2-胺基己二酸(Aad)(對於Glu及Asp而言)；2-胺基庚二酸(Apm)(對於Glu

及 Asp 而言)；2-胺基丁酸(Abu)(對於 Met、Leu 及其他脂族胺基酸而言)；2-胺基庚酸(Ahe)(對於 Met、Leu 及其他脂族胺基酸而言)；2-胺基異丁酸(Aib)(對於 Gly 而言)；環己基丙胺酸(Cha)(對於 Val 及 Leu 及 Ile 而言)；高精胺酸(Har)(對於 Arg 及 Lys 而言)；2,3-二胺基丙酸(Dpr)(對於 Lys、Arg 及 His 而言)；N-乙基甘胺酸(EtGly)(對於 Gly、Pro 及 Ala 而言)；N-乙基甘胺酸(EtGly)(對於 Gly、Pro 及 Ala 而言)；N-乙基天冬醯胺(EtAsn)(對於 Asn 及 Gln 而言)；羥基離胺酸(Hyl)(對於 Lys 而言)；別羥基離胺酸(AHyl)(對於 Lys 而言)；3-羥基脯胺酸及 4-羥基脯胺酸(3Hyp、4Hyp)(對於 Pro、Ser 及 Thr 而言)；別異白胺酸(AIle)(對於 Ile、Leu 及 Val 而言)； ρ -甲脛基苯丙胺酸(對於 Ala 而言)；N-甲基甘胺酸(MeGly，肌胺酸)(對於 Gly、Pro 及 Ala 而言)；N-甲基異白胺酸(MeIle)(對於 Ile 而言)；正纈胺酸(Nva)(對於 Met 及其他脂族胺基酸而言)；正白胺酸(Nle)(對於 Met 及其他脂族胺基酸而言)；鳥胺酸(Orn)(對於 Lys、Arg 及 His 而言)；瓜胺酸(Cit)及甲硫胺酸亞砷(MSO)(對於 Thr、Asn 及 Gln 而言)；N-甲基苯丙胺酸(MePhe)、三甲基苯丙胺酸、鹵代(F、Cl、Br 及 I)苯丙胺酸、三氟苯丙胺酸(對於 Phe 而言)。

如本文中所使用之術語「免疫黏附素」指示兼有異源蛋白(一種「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應功能的抗體樣分子。在結構上，免疫黏附素包含具有所要結合特異性之胺基酸序列(其並非抗體之抗原識別及結合位點，亦即為「異源」的)與免疫球蛋白恆定域序列

的融合體。免疫黏附素分子之黏附素部分通常為至少包含受體或配體之結合位點的毗連胺基酸序列。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可獲自任何免疫球蛋白，諸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亞型、IgA(包括IgA-1及IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

「治療」為出於防止病症病理之發展或改變病症病理之目的而執行的一種干預。因此，「治療」係指治療性治療與防治性或預防性措施。需治療者包括患病者及待預防病症者。

如本文中所使用之「改善」在本文中係定義為使得變好或改良。

如本文中所使用之術語「哺乳動物」係指歸類為哺乳動物之任何動物，包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物、家畜及農畜以及動物園、運動型或寵物型動物，諸如馬、豬、牛、犬、貓及雪貂等。在本發明之一項較佳實施例中，哺乳動物為高級靈長類動物，最佳為人類。

術語「補體相關性疾病」在本文中係以最廣泛之含義使用且包括發病機制涉及補體系統活化之異常(諸如補體缺乏)的所有疾病及病理性病狀。該術語特定言之包括可受益於C3轉化酶之抑制的疾病及病理性病狀。該術語另外包括可受益於替代補體路徑之抑制(包括選擇性抑制)的疾病及病理性病狀。補體相關性疾病包括(但不限於)發炎性疾病及自體免疫性疾病，諸如類風濕性關節炎(RA)、急性呼吸窘迫症候群(ARDS)、缺血及再灌注後之遠端組織損

傷、心肺繞道手術期間之補體活化、皮膚炎、天疱瘡、狼瘡腎炎以及所致之絲球體腎炎及血管炎、心肺繞道術、心臟麻痺誘導之冠脈內皮功能障礙、II型膜增生性絲球體腎炎、IgA腎病、急性腎衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂症候群、年齡相關性黃斑變性、葡萄膜炎、糖尿病性視網膜病變、同種異體移植、超急性排斥反應、血液透析、慢性阻塞性肺病症候群(COPD)、哮喘及吸入性肺炎。在一項較佳實施例中，「補體相關性疾病」為補體之替代路徑起著顯著作用的疾病，包括類風濕性關節炎(RA)、補體相關性眼睛病狀(諸如年齡相關性黃斑變性)、抗磷脂症候群、腸及腎之缺血再灌注損傷及II型膜增生性絲球體腎炎。

術語「補體相關性眼睛病狀」在本文中係以最廣泛之含義使用且包括病理涉及補體(包括經典路徑及替代路徑)且尤其為涉及補體之替代路徑的所有眼睛病狀及疾病。此群組內特定言之包括與替代路徑相關之所有眼睛病狀及疾病，其發生、發展或進展可藉由抑制替代路徑來控制。補體相關性眼睛病狀包括(但不限於)黃斑變性疾病(諸如年齡相關性黃斑變性(AMD)之所有階段，包括乾性及濕性(非滲出性及滲出性)形式)、脈絡膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性及其他缺血相關性視網膜病、眼內炎及其他眼內新生血管性疾病(諸如糖尿病性黃斑水腫)、病理性近視、逢希伯-林道疾病、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜新生血管及視網膜新生血管。補體相關性眼睛病狀之一較佳群組包括年齡相關性黃斑變性

(AMD)(包括非滲出性(濕性)及滲出性(乾性或萎縮性)AMD)、脈絡膜新生血管(CNV)、糖尿病性視網膜病變(DR)及眼內炎。

術語「發炎性疾病」與「發炎性病症」可互換使用且意謂哺乳動物之免疫系統之組分引起、介導或以其他方式促成導致哺乳動物發病之發炎反應的疾病或病症。亦包括減輕發炎反應對疾病之進展具有改良效應的疾病。在此術語內包括免疫介導性發炎性疾病，包括自體免疫性疾病。

術語「T-細胞介導性」疾病意謂T細胞直接或間接地介導或以其他方式導致哺乳動物之發病的疾病。T細胞介導性疾病可能與細胞介導性效應、淋巴因子介導性效應等相關，且若刺激B細胞(例如藉由T細胞所分泌之淋巴因子刺激B細胞)，則甚至與B細胞相關之效應相關。

免疫相關性疾病及發炎性疾病(其中一些為T細胞介導性疾病)之實例包括(但不限於)發炎性腸病(IBD)、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、青少年慢性關節炎、脊椎關節病、全身性硬化症(硬皮症)、特發性發炎性肌病(皮肌炎、多發性肌炎)、休格連氏症候群、全身性血管炎、肉狀瘤病、自體免疫性溶血性貧血(免疫性全血球減少症、陣發性夜間血紅素尿症)、自體免疫性血小板減少症(特發性血小板減少性紫癍、免疫介導性血小板減少症)、甲狀腺炎(格雷氏病、橋本氏甲狀腺炎、青少年淋巴球性甲狀腺炎、萎縮性甲狀腺炎)、糖尿病、免疫介導性腎病(絲球體腎炎、腎小管間質腎炎)、中樞及周邊神經系統之脫髓鞘

疾病(諸如多發性硬化症)、特發性多發性神經病、肝膽疾病(諸如傳染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎及其他非嗜肝病毒)、自體免疫性慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、肉芽腫性肝炎及硬化性膽管炎)、發炎性及纖維化肺疾病(例如囊腫性纖維化)、麩質敏感性腸病變、惠普爾氏病、自體免疫性或免疫介導性皮膚病(包括大皰性皮膚病、多形性紅斑及接觸性皮炎)、牛皮癬、肺之過敏性疾病(諸如嗜伊紅性肺炎、特發性肺纖維化及過敏性肺炎)、移植相關疾病(包括移植物排斥反應、移植物抗宿主疾病)、阿茲海默氏症及動脈粥樣硬化症。

「與一或多種其他治療劑組合」投藥包括同時(並行)投藥及依任何次序之連續投藥。

「活性」在本發明之CRlg多肽之變體的情況下係指保持本發明之天然或天然存在的多肽之生物活性及/或免疫活性的此等多肽之形式。較佳生物活性為能夠結合C3b及/或影響補體或補體活化、尤其為抑制替代補體路徑及/或C3轉化酶之能力。C3轉化酶之抑制可(例如)藉由在膠原或抗體誘導性關節炎期間量測正常血清中C3轉換之抑制或藉由量測關節炎關節中C3沈積之抑制來量測。

「生物活性」在可模擬CRlg生物活性之多肽的情況下在某種程度上係指此等分子能夠結合C3b及/或影響補體或補體活化、尤其為抑制替代補體路徑及/或C3轉化酶之能力。

術語CRlg「激動劑」係以最廣泛之含義使用，且包括可

模擬天然序列CRIg多肽之定性生物活性(如上文中所定義)的任何分子。

「可操作地連接」係指使得可執行組分之正常功能的併接(juxtaposition)。因此，「可操作地連接」至控制序列之編碼序列係指一種構型，其中可在此等控制序列之控制下表現該編碼序列且其中所連接之DNA序列係毗連的且在分泌性前導序列(secretory leader)之情況下係毗連的且處於閱讀相(reading phase)中。舉例而言，若前序列(presequence)或分泌性前導序列之DNA被表現為參與分泌多肽之前體蛋白(preprotein)，則其可操作地連接至多肽之DNA；若啟動子或強化子影響編碼序列之轉錄，則將其可操作地連接至編碼序列；或若核糖體結合位點經定位成有助於轉譯，則將其可操作地連接至編碼序列。藉由在適宜的限制性位點處接合來實現連接。若此等位點不存在，則根據習知操作使用合成寡核苷酸接頭或連接子。

「控制序列」係指在特定宿主有機體中表現可操作地連接之編碼序列所必需的DNA序列。適用於原核生物之控制序列(例如)包括啟動子、視需要使用之操縱序列(operator sequence)及核糖體結合位點。已知真核細胞可使用啟動子、聚腺苷酸化信號及強化子。

「表現系統」係指含有可操作地鍵聯之所要編碼序列及控制序列的DNA序列，以使得經此等序列轉型之宿主能夠產生經編碼之蛋白質。為實現轉型，表現系統可包括於載體上；然而，有關DNA可接著亦整合於宿主染色體內。

如本文中所使用之「細胞」、「細胞株」與「細胞培養物」可互換使用且所有此等名稱均包括子代。因此，「轉化體」或「轉型細胞」包括來源於其之原代個體細胞及培養物，而不考慮轉移次數。亦應瞭解，所有子代因可能存在有意突變或偶然突變而在DNA含量方面不完全一致。包括具有與在最初轉型之細胞中所篩檢出之功能相同之功能的突變子代。在預期不同名稱之情況下，其根據上下文應為清楚的。

「質體」係以位於大寫字母及/或編號之前及/或之後的小寫字母「p」指定。本文中之起始質體在市面上有售，可在不受限制之基礎上公開獲得，或可根據公開程序由此等可獲得之質體建構。此外，其他等效質體於此項技術中係已知的且應為一般技術者所顯而易見。

「噬菌體呈現文庫」為一種表現與噬菌體外殼蛋白融合之經選殖蛋白質序列之集合的蛋白質表現文庫。因此，片語「噬菌體呈現文庫」在本文中係指噬菌體(例如絲狀噬菌體)之集合，其中噬菌體表現外來(通常為異源)蛋白質。外來蛋白質能夠自由地與噬菌體所接觸之其他部分相互作用(結合至噬菌體所接觸之其他部分)。呈現外來蛋白質之各種噬菌體為噬菌體呈現文庫之「成員」。

術語「絲狀噬菌體」係指一種能夠在表面上呈現異源多肽之病毒顆粒且包括(但不限於)f1、fd、Pf1及M13。絲狀噬菌體可含有可選擇標記，諸如四環素(tetracycline)(例如「fd-tet」)。各種絲狀噬菌體呈現系統已為熟習此項技術

者所熟知(參見例如 Zacher 等人, *Gene*, 9:127-140 (1980); Smith 等人, *Science*, 228:1315-1317 (1985); 及 Parmley 及 Smith, *Gene*, 73:305-318 (1988))。

術語「淘選」係用於指在含有對標靶具有高親和力及特异性之化合物(諸如抗體)之噬菌體的鑑別及分離中進行多輪篩檢過程。

片語「保守胺基酸殘基」係用於指互相對準之兩種或兩種以上胺基酸序列之間一致的胺基酸殘基。

II. 詳細說明

補體為先天性及適應性免疫反應之重要組分，然而經由三種補體路徑(經典路徑、替代路徑及凝集素路徑)中之每一者之活化所形成的補體裂解產物會引起發炎及組織損壞。因此，因缺乏適當補體調節所致之補體活化失控與多種慢性發炎性疾病相關。在此發炎級聯反應中佔優勢的是補體裂解產物 C3a 及 C5a，其經由 C3a 及 C5a 受體起嗜中性白血球及發炎性巨噬細胞之化學引誘劑及活化劑之作用 (Mollnes, T.E., W.C. Song 及 J.D. Lambris. 2002. *Complement in inflammatory tissue damage and disease. Trends Immunol.* 23:61-64)。

CR1g 為最近發現之補體受體，其係表現於組織駐留巨噬細胞之亞群體上。作為功能性受體，CR1g 之胞外 IgV 域為一種補體之替代路徑的選擇性抑制劑 (Wiesmann 等人, *Nature*, 444(7116):217-20, 2006)。已顯示 CR1g 之可溶形式可在關節炎之實驗模型中藉由抑制關節中補體之替代路徑

來逆轉發炎及骨質流失。亦已顯示補體之替代路徑不僅為疾病誘導所需要，而且為疾病進展所需要。因此，藉由CRIg抑制替代路徑構成一種用於預防及治療發病機制涉及補體之替代路徑之疾病及病症的有前景之治療方法。欲知詳情，請參見(例如)Helmy等人，Cell, 125(1):29-32 (2006)及Katschke等人，J. Exp Med 204(6):1319-1325 (2007)。

然而，CRIg對轉化酶亞單位C3b之親和力低(微莫耳範圍)。為產生更強之抑制劑以開發治療試劑，使用與C3b複合之CRIg之晶體結構作為指南且使用噬菌體呈現技術來產生對C3b具有改良之結合親和力的CRIg變體。

因此，本發明係關於具有改良之特性(諸如具有改良之針對C3b之結合親和力及增強之抑制功效)之CRIg變體。

親和力成熟之CRIg變體的鑑別

如實例中更詳細描述，蛋白質或肽文庫之噬菌體呈現為選擇具有改良之針對C3b之結合親和力及/或其他改良之特性(諸如增強之生物活性)的CRIg變體提供一種有用的方法(Smith, G. P., (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2:668-673)。作為與M13基因III外殼蛋白之融合體以單價方式呈現的高親和力蛋白(Clackson, T.等人，(1994), Trends Biotechnol. 12:173-183)可藉由在數輪結合選擇之後將封裝於噬菌粒顆粒中之相應DNA選殖並測序來鑑別。

使用噬菌體呈現之親和力成熟法已(例如)描述於Lowman等人，Biochemistry 30 (45): 10832-10838 (1991)中，亦參見Hawkins等人，J. Mol Biol.254:889-896 (1992)，以及以

下實例。雖然不嚴格受限於以下說明，但此方法可簡述為：使預定區域內之若干位點突變以在各位點處產生所有可能的胺基酸取代。由此產生之抗體突變體係以單價方式自絲狀噬菌體顆粒作為與各顆粒內所封裝之M13之基因III產物的融合體呈現。表現各種突變體之噬菌體可經由多輪結合選擇、隨後對呈現高親和力之彼等突變體進行分離並測序來循環使用。該方法亦描述於1998年5月12日頒布之美國專利第5,750,373號中。

涉及混合親和力呈現之經修改程序描述於Cunningham, B. C.等人，EMBO J. 13 (11), 2508-2515(1994)中。該方法提供一種用於選擇新穎結合多肽之方法，該方法包含：a) 建構一種可複製表現載體，該表現載體包含編碼多肽之第一基因、編碼天然或野生型噬菌體外殼蛋白之至少一部分的第二基因(其中該第一基因與該第二基因為異源的)及與該第一基因及該第二基因可操作地連接之轉錄調控元件，進而形成編碼融合蛋白之基因融合體；b)使該載體在該第一基因內之一或多個選定位置處突變，進而形成相關質體之家族；c)用該等質體使適當宿主細胞轉型；d)用具有編碼噬菌體外殼蛋白之基因之輔助噬菌體感染經轉型宿主細胞；e)在適於形成含有質體之至少一部分之重組噬菌粒顆粒且能夠使宿主轉型的條件下培養經轉型之受感染宿主細胞，該等條件經調整成使得僅僅少量噬菌粒顆粒呈現顆粒表面上之融合蛋白的一個以上之複本；f)使噬菌粒顆粒與靶分子接觸以使得該等噬菌粒顆粒之至少一部分結合至靶

分子；及g)使結合之噬菌粒顆粒與未結合之噬菌粒顆粒分離。較佳地，該方法進一步包含用結合至靶分子之重組噬菌粒顆粒使適當宿主細胞轉型且重複步驟d)至g)一或多次。

應注意，雖然已使用噬菌體呈現技術鑑別出本發明之CRIg變體，但亦可使用其他技術及其他呈現技術來鑑別具有改良特性之CRIg變體，包括親和力成熟之CRIg變體。

將本發明之親和力成熟之CRIg變體設計成可覆蓋CRIg與C3b之間的接觸區域，此接觸區域係使用美國申請公開案第20080045697號中所揭示之CRIg及C3b:CRIg複合物之晶體結構來鑑別。特定而言，如表1中所示，文庫1-5被設計成可分別覆蓋SEQ ID NO: 2之天然序列全長CRIg分子之殘基E8-K15、R41-T47、S54-Q64、E85-Q99及Q105-K111。

在一項實施例中，本文中之CRIg變體在選自由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列中之位置8、14、18、42、44、45、60、64、86、99、105及110組成之群的一或多個胺基酸位置處含有胺基酸取代。

本文中之代表性CRIg變體列於表3中。

該取代較佳係處於SEQ ID NO: 2之全長天然CRIg的胺基酸序列之胺基酸位置60、64、86、99、105及110的一或多處。

在不受限制之情況下，親和力成熟之CRIg變體特定言之包括SEQ ID NO: 2內之以下取代中之一或多者：E8W、

W14F、E84Y/W14F；P45F；G42D/D44H/P45F；Q60I；
Q64R；Q60I/Q64R；M86Y；M86W、M86F、M86W/
Q9R；M86F/Q99R；K110D、K11N；Q105R/K110N；
Q105R/K110Q；Q105K/K110D。

具有兩個或兩個以上胺基酸取代之SEQ ID NO: 2之天然
序列CRIg的其他變體展示於表3中。此群組內特定言之包
括：Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/E8Y；Q60I/Q64R/G42D；
Q60I/Q64R/P45F；Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F；Q60I/
Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/Q105R；Q60I/Q64R/Q105K；
Q60I/Q64R/K110N；Q60I/Q105R/K110N；M86Y/E8Y；
M86Y/G42D/D44H/P45F；M86Y/P45F；M86Y/G42D/
D44H/P45F；M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/
Q105K/M86Y/Q105R/K110N。

本文中之較佳CRIg變體包含選自由以下者組成之群之突
變：Q60I；Q64R；Q60I/Q64R；M86Y；Q99L；Q105K/
K110D；E8W/Q105R/K110N；Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/
E8Y；Q60I/Q64R/G42D；Q60I/Q64R/P45F；Q60I/Q64R/
G42D/D44H/P45F；Q60I/Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/
Q105R；Q60I/Q64R/Q105K；Q60I/Q64R/K110N；M86Y/
P45F；M86Y/Q105K。

尤其較佳之變體包含突變Q60I/Q64R/M86Y或Q60I/
Q64R/G42D/D44H/P45F。

本文中特定言之包括含有以上所列或表3及表4中所列之
一或多個突變、但是卻保持SEQ ID NO: 2之天然CRIg序列

的變體。此等變體在本文中將藉由列出特定突變後跟「CRIg」來命名。因此，舉例而言，與SEQ ID NO: 2之天然序列CRIg不同之處僅在於突變E8W的變體係命名為「E8W CRIg」，與SEQ ID NO: 2之天然序列CRIg不同之處僅在於突變Q60I/Q64R/M86Y的變體係命名為「Q60I/Q64R/M86Y CRIg」等。

CRIg變體之製備

可利用可用以製備能夠編碼用於重組成本發明之CRIg變體的蛋白質之DNA的各種技術。舉例而言，有可能基於天然存在之DNA序列獲得編碼所得蛋白質之胺基酸序列之變化的DNA。此等突變DNA可用於獲得本發明之CRIg變體。此等技術以簡化形式涵蓋：獲得編碼天然CRIg多肽之基因；藉由重組技術(諸如下文所述之技術)修飾基因；將基因插入適當表現載體中；將載體插入適當宿主細胞中；培養宿主細胞以促成所要CRIg變體之表現；及純化由此所產生之分子。

在某種程度上，更特定而言，編碼本發明之CRIg變體的DNA序列係如標準教科書(諸如 Sambrook, J. 等人，Molecular Cloning(第二版)，Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1989))中所述藉由DNA序列之合成建構來獲得。

a. 寡核苷酸介導之突變誘發

寡核苷酸介導之突變誘發為用於製備天然CRIg多肽或其片段之取代變體、缺失變體及插入變體的較佳方法。此技

術於此項技術中係熟知的，其如 Zoller 等人，Nucleic Acids Res. 10: 6487-6504(1987)所述。簡而言之，藉由使編碼所要突變之寡核苷酸與DNA模板雜交來改變編碼起始多肽序列之核酸，其中該模板為含有編碼核酸之未改變或天然DNA序列的質體之單股形式。在雜交之後，將DNA聚合酶用於合成模板之整個第二互補股，此互補股因此合併寡核苷酸引子且將對起始核酸之選定改變進行編碼。

通常，使用長度為至少25個核苷酸之寡核苷酸。最佳寡核苷酸在編碼突變之核苷酸之任一側上具有與模板完全互補之12至15個核苷酸。此確保寡核苷酸可與單股DNA模板分子正確地雜交。該等寡核苷酸係容易地使用此項技術中已知之技術(諸如 Crea 等人，Proc. Natl. Acad Sci. USA 75: 5765(1978)中所述之技術)來合成。

若使用噬菌體呈現技術，則DNA模板可僅由源自噬菌體M13載體之彼等載體(通常可獲得之M13mp18及M13mp19載體為合適的)或含有單股噬菌體起點或複製之彼等載體產生，此如 Viera 等人，Meth. Enzymol. 153: 3(1987)中所述。因此，必須將待突變之DNA插入此等載體中之一者中以產生單股模板。單股模板之產生描述於 Sambrook 等人之同上文獻之章節4.21-4.41中。

為改變天然DNA序列，在適當之雜交條件下使寡核苷酸與單股模板雜交。接著添加DNA聚合酶(一般為DNA聚合酶I之克列諾片段(Klenow fragment))以使用寡核苷酸作為合成引子來合成模板之互補股。如此形成異源雙鏈分子，

以使得DNA中之一股編碼CRIg之突變形式，而另一股(原始模板)編碼CRIg之天然、未改變之序列。接著使此異源雙鏈分子轉型於合適宿主細胞(一般為原核生物，諸如大腸桿菌JM-101)中。在使細胞生長之後，將其塗於瓊脂糖板上且使用經³²磷酸鹽放射性標記之寡核苷酸引子篩檢以鑑別含有突變DNA之菌落。

可修改以上剛剛所述之方法，以便產生同源雙鏈分子，其中質體之兩股均含有突變。修改係如下：將單股寡核苷酸與如上所述之單股模板黏接。將三種脫氧核糖核苷酸(脫氧核糖腺苷(dATP)、脫氧核糖鳥苷(dGTP)及脫氧核糖胸苷(dTTP))之混合物與經修飾之硫代脫氧核糖胞苷(稱為dCTP-(aS)(Amersham))組合。將此混合物添加至模板-寡核苷酸複合物中。向此混合物中添加DNA聚合酶後，產生除突變鹼基外與模板一致之一股DNA。此外，此股新的DNA可含有用於保護其以防限制性核酸內切酶消化之dCTP-(aS)而非dCTP。雙股異源雙鏈體之模板股經適當限制酶切割之後，可將模板股用ExoIII核酸酶或另一種適當核酸酶穿過含有待誘變之位點之區域而消化。接著使反應停止以保留僅部分為單股之分子。接著使用DNA聚合酶在所有四種三磷酸脫氧核糖核苷酸、ATP及DNA連接酶存在下形成完整的雙股DNA同源雙鏈體。接著可如上所述將此同源雙鏈分子轉型於適當宿主細胞(諸如大腸桿菌JM101)中。

一個以上胺基酸有待取代之突變體可以若干方式中之一種來產生。若該等胺基酸緊密靠攏地位於多肽鏈中，則可

使用一種編碼全部所要胺基酸取代之寡核苷酸使其同時突變。然而，若該等胺基酸彼此所處位置相隔一定距離(被超過約十個胺基酸隔開)，則較為難以產生編碼全部所要變化之單個寡核苷酸。反之，可使用一或兩種替代方法。

在第一方法中，針對有待取代之各胺基酸產生單獨的寡核苷酸。接著使寡核苷酸與單股模板DNA同時黏接，且由模板合成之第二股DNA將編碼全部的所要胺基酸取代。替代方法涉及兩輪或兩輪以上之突變誘發以產生所要突變體。第一輪係如針對單一突變體所述：對於模板使用野生型DNA，且將編碼第一所要的胺基酸取代之寡核苷酸與此模板黏接，且接著產生異源雙鏈DNA分子。第二輪之突變誘發利用第一輪突變誘發中所產生之突變DNA作為模板。因此，此模板已含有一或多個突變。接著將編碼其他所要的胺基酸取代之寡核苷酸與此模板黏接，且所得之DNA股現編碼來自第一輪與第二輪突變誘發之突變。此所得DNA可在第三輪等突變誘發中用作模板。

b. 卡匣突變誘發

此方法亦為用於製備CRIG之取代變體、缺失變體及插入變體的較佳方法。此方法係基於Wells等人，Gene 34: 315(1985)中所述之內容。起始物質為包含基因1(待突變之基因)之質體(或其他載體)。鑑別出編碼起始CRIG分子之核酸中待突變的密碼子。在經鑑別之突變位點之各側上須存在獨特的限制性核酸內切酶位點。若無此等限制性位點存在，則其可使用上述寡核苷酸介導之突變誘發方法將其引

入基因1中之適當位置處來產生。在已將限制性位點引入質體中之後，在此等位點處將質體切割以使其線性化。使用標準程序合成編碼限制性位點之間的DNA之序列、但含有所要突變的雙股寡核苷酸。此兩股係分開地加以合成且接著使用標準技術雜交在一起。此雙股寡核苷酸被稱為卡匣。將此卡匣設計成可具有與線性化質體之末端相容以便可與此質體直接連接的3'端及5'端。此質體現含有CRIG之突變DNA序列。

c. CRIG變體之重組產生

接著將DNA編碼變體插入適當質體或載體中。使用載體使宿主細胞轉型。通常，將含有源自與宿主細胞相容之物種之複製及控制序列的質體載體與彼等宿主聯合使用。此載體通常攜有複製位點以及編碼能夠在經轉型細胞中提供表型選擇之蛋白質的序列。

舉例而言，大腸桿菌可使用pBR322(一種源自大腸桿菌種類之質體)而轉型(Mandel, M.等人，(1970) J. Mol. Biol. 53:154)。質體pBR322含有安比西林(ampicillin)及四環素抗性基因，且因此提供簡易的選擇方法。其他載體包括不同的特徵，諸如不同的啟動子，其在表現中通常為重要的。舉例而言，質體pKK223-3、pDR720及pPL- λ 為目前可利用之具有tac、trp或P_L啟動子的表現載體(Pharmacia Biotechnology)。

其他較佳載體可使用標準技術藉由將本文中所述之載體之相關特徵組合來建構。載體之相關特徵包括啟動子、核

糖體結合位點、變體基因或基因融合體、信號序列、抗生素抗性標記、複本數及適當的複製起點。

適用於選殖或表現本文載體中DNA的宿主細胞包括原核生物、酵母或高級真核生物細胞。適用於此目的之原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)，諸如埃希氏桿菌屬(*Escherichia*)，例如大腸桿菌；腸桿菌屬(*Enterobacter*)；歐文氏菌屬(*Erwinia*)；克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)；變形桿菌屬(*Proteus*)；沙門氏菌屬(*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)；沙雷氏菌屬(*Serratia*)，例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)；及志賀桿菌屬(*Shigella*)；以及芽孢桿菌屬(*Bacilli*)，諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽胞桿菌(*B. licheniformis*)(例如1989年4月12日公開之DD 266,710中所揭示之地衣芽胞桿菌41P)；假單胞菌屬(*Pseudomonas*)，諸如銅綠假單胞菌(*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。一種較佳之大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌294(ATCC 31,446)，不過其他菌株(諸如大腸桿菌B、大腸桿菌X 1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌W3110(ATCC 27,325))亦適用。此等實例為說明性而非限制性。

除原核生物外，真核微生物(諸如絲狀真菌或酵母)為適用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主。在低級真核宿主微生物中最常使用釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或

普通麵包酵母(baker's yeast)。然而，許多其他屬、種及株通常可得且適用於本文中，諸如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；刻魯維拉菌(*Kluyveromyces*)宿主，諸如乳酸刻魯維拉菌(*K. lactis*)、脆壁刻魯維拉菌(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞刻魯維拉菌(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、魏氏刻魯維拉菌(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、瓦爾特刻魯維拉菌(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅刻魯維拉菌(*K. drosophilae*)(ATCC 36,906)、耐熱刻魯維拉菌(*K. thermotolerans*)及馬克斯刻魯維拉菌(*K. marxianus*)；耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；念珠菌屬(*Candida*)；里氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌屬(*Neurospora*)、青黴屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)及麴菌屬(*Aspergillus*)宿主，諸如構巢麴菌(*A. nidulans*)及黑麴菌(*A. niger*)。

適用於表現糖基化抗體之宿主細胞係源自多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別多種桿狀病毒株及變體以及諸如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)宿主的相應許可

昆蟲宿主細胞。用於轉染之多種病毒株公開可得，例如加州苜蓿夜蛾NPV(*Autographa californica* NPV)之L-1變體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，此等病毒可根據本發明用作本文之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛花(*petunia*)、番茄及菸草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

然而，脊椎動物細胞最受關注，且脊椎動物細胞於培養物(組織培養物)中之繁殖已成為一種常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚腎株(經次選殖而生長於懸浮培養物中之293或293細胞，Graham等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977))；幼小倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；小鼠足細胞(*sertoli cell*)(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝癌細胞株(Hep G2)。

用上述用於產生本文中之CRIg變體的表現或選殖載體將

宿主細胞轉型且培養於酌情改良之習知營養培養基中以誘導啟動子、選擇轉化體或擴增編碼所要序列之基因。

用於產生本發明之CRIg變體的宿主細胞可培養於多種培養基中。市售培養基(諸如漢姆氏F10(Ham's F10)(Sigma)、最低必需培養基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Sigma))適用於培養該等宿主細胞。此外,以下文獻中所述之任一種培養基可用作該等宿主細胞之培養基:Ham等人,Meth. Enz. 58:44 (1979); Barnes等人,Anal. Biochem. 102:255 (1980);美國專利第4,767,704號;第4,657,866號;第4,927,762號;第4,560,655號;或第5,122,469號;WO 90/03430;WO 87/00195;或美國專利第Re.30,985號。此等培養基中之任一者可視需要補充有激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝劑(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™)、痕量元素(係定義為一般以微莫耳範圍內之最終濃度存在的無機化合物)及葡萄糖或等效能源。亦可包括將會為熟習此項技術者所知之適當濃度的任何其他必要補充物。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為先前針對選用於表現之宿主細胞所用的彼等條件,且對於一般技術者而言將為顯而易見的。

當使用重組技術時,CRIg變體可產生於細胞內、周質間隙中,或直接分泌於培養基中。若CRIg變體產生於細胞

內，則作為第一步驟，(例如)藉由離心或超濾來移除宿主細胞或溶解細胞之微粒碎屑。若CRIg變體分泌於培養基中，則通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如，Amicon或Millipore Pellicon超濾裝置)來濃縮來自此等表現系統之上層清液。在上述步驟中之任一者中可包括蛋白酶抑制劑(諸如PMSF)以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物之生長。

由細胞製備之CRIg變體可藉由已知技術使用(例如)羧基磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析及/或親和性層析法來純化。

CRIg變體之進一步修飾

本發明之CRIg變體亦可以形成嵌合分子之方式來修飾，其中該嵌合分子包含與另一種異源多肽或胺基酸序列融合之CRIg變體(包括其片段)。在一項實施例中，此類嵌合分子包含CRIg變體或其片段與提供抗標記抗體可選擇性結合於之抗原決定基之標記多肽的融合體。抗原決定基標記一般被置於變體CRIg多肽之胺基末端或羧基末端處。可使用針對標記多肽之抗體來偵測CRIg變體之此等抗原決定基標記形式之存在。又，抗原決定基標記之提供使CRIg多肽能夠容易地藉由親和純化法使用結合於抗原決定基標記之抗標記抗體或另一類型之親和基質來純化。各種標記多肽及其各自抗體在此項技術中係熟知的。實例包括聚-組胺酸(poly-his)或聚-組胺酸-甘胺酸(poly-his-gly)標記；flu HA標記多肽及其抗體12CA5 [Field等人，Mol. Cell. Biol.,

8:2159-2165 (1988)]；c-myc標記及其8F9、3C7、6E10、G4、B7及9E10抗體(Evan等人，Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985))；及單純性疱疹病毒醣蛋白D(gD)標記及其抗體(Paborsky等人，Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990))。其他標記多肽包括Flag-肽(Hopp等人，BioTechnology, 6:1204-1210 (1988))；KT3抗原決定基肽(Martin等人，Science, 255:192-194 (1992))； α -微管蛋白抗原決定基肽[Skinner等人，J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]；及T7基因10蛋白肽標記(Lutz-Freyermuth等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990))。

在另一項實施例中，嵌合分子可包含CRIg變體或其片段與免疫球蛋白或免疫球蛋白之特定區域之融合體。對於嵌合分子之二價形式而言，此類融合體可為與IgG分子之Fc區域之融合體。此等融合多肽為抗體樣分子，其兼有異源蛋白(「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應功能且通常被稱作免疫黏附素。在結構上，免疫黏附素包含具有所要結合特異性之胺基酸序列(其並非抗體之抗原識別及結合位點，亦即為「異源」的)與免疫球蛋白恆定域序列的融合體。免疫黏附素分子之黏附素部分通常為至少包含受體或配體之結合位點的毗連胺基酸序列。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可獲自任何免疫球蛋白，諸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亞型、IgA(包括IgA-1及IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

最簡單且最直接之免疫黏附素設計係將「黏附素」蛋白

之結合區域與免疫球蛋白重鏈之鉸鏈區及Fc區域組合。通常，當製備本發明之CRlg-免疫球蛋白嵌合體時，使編碼CRlg之胞外域的核酸在C-末端與編碼免疫球蛋白恆定域序列之N-末端的核酸融合，然而N-末端融合亦為有可能的。

通常，在此等融合體中，所編碼之嵌合多肽將保留免疫球蛋白重鏈之恆定區的至少具功能活性之鉸鏈及CH₂及CH₃域。亦可與恆定域之Fc部分之C-末端融合，或直接在N-末端與重鏈之CH₁或輕鏈之相應區域融合。

融合所在之準確位點並非關鍵；特定位點為熟知的且可對其加以選擇以便優化CRlg-免疫球蛋白嵌合體之生物活性、分泌或結合特性。

在一些實施例中，基本上如WO 91/08298中所說明，將CRlg-免疫球蛋白嵌合體組裝成單體或異源多聚體或同源多聚體且尤其組裝為二聚體或四聚體。

在一項較佳實施例中，CRlg胞外域序列與含有免疫球蛋白(例如免疫球蛋白G.sub.1(IgG 1))之效應功能之抗體的C-末端部分(詳言之，Fc域)之N-末端融合。有可能使整個重鏈恆定區與CRlg胞外域序列融合。然而，更佳地，在融合中利用始於鉸鏈區、剛好位於木瓜蛋白酶裂解位點(其在化學上界定IgG Fc；殘基216(重鏈恆定區之第一殘基視為114)，或其他免疫球蛋白之類似位點)上游的序列。在一項特別較佳的實施例中，CRlg胺基酸序列與IgG1、IgG2或IgG3重鏈之鉸鏈區及CH₂及CH₃融合，或與IgG1、IgG2或IgG3重鏈之CH₁、鉸鏈區、CH₂及CH₃域融合。融合所處

之準確位點並非關鍵，且最佳位點可藉由常規實驗來確定。

在一些實施例中，將CRIg-免疫球蛋白嵌合體組裝成多聚體，且尤其組裝成同源二聚體或同源四聚體。通常，此等組裝之免疫球蛋白具有已知的單元結構。基本4鏈結構單元為存在IgG、IgD及IgE之形式。4單元在較高分子量之免疫球蛋白中重複出現；IgM一般以藉由二硫鍵固持在一起之基本4單元之五聚體形式存在。IgA球蛋白及偶爾有之IgG球蛋白亦可以多聚體形式存在於血清中。在多聚體之情況下，各4單元可相同或不同。

或者，可將CRIg胞外域序列插入免疫球蛋白重鏈與輕鏈序列之間，以便獲得包含嵌合重鏈之免疫球蛋白。在此項實施例中，CRIg序列係於鉸鏈區與CH2域之間或於CH2與CH3域之間與免疫球蛋白之各臂中之免疫球蛋白重鏈的3'端融合。類似構築體已由Hoogenboom等人，Mol. Immunol., 28:1027-1037(1991)中所報導。

雖然在本發明之免疫黏附素中無需存在免疫球蛋白輕鏈，但可能存在與CRIg-免疫球蛋白重鏈融合多肽共價結合或與CRIg胞外域直接融合之免疫球蛋白輕鏈。在前者情況下，通常使編碼免疫球蛋白輕鏈之DNA與編碼CRIg-免疫球蛋白重鏈融合蛋白之DNA共表現。在分泌後，雜合重鏈與輕鏈共價結合以提供包含兩個由二硫鍵連接之免疫球蛋白重鏈-輕鏈對的免疫球蛋白樣結構。適用於製備此等結構之方法(例如)揭示於1989年3月28日頒布之美國專利第

4,816,567號中。

醫藥組合物

本發明之CRIg變體可為了治療病理涉及替代補體路徑之疾病而投與。

治療調配物係藉由將具有所要純度之活性分子與視情況使用之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A.編[1980])混合以凍乾調配物或水溶液之形式來製備以便儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒性, 且包括: 緩衝劑, 諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸; 抗氧化劑, 包括抗壞血酸與甲硫胺酸; 防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨; 氯化六羥季銨; 氯化苯甲烴銨、苜索氯銨; 苯酚、丁醇或苜醇; 對羥基苯甲酸烷基酯, 諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯; 兒茶酚; 間苯二酚; 環己醇; 3-戊醇及間甲酚); 低分子量(少於約10個殘基)多肽; 蛋白質, 諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白; 親水性聚合物, 諸如聚乙烯吡咯啶酮; 胺基酸, 諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸; 單醣、二醣及其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合劑, 諸如EDTA; 糖, 諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨醇糖; 形成鹽之平衡離子, 諸如鈉; 金屬錯合物(例如, 鋅蛋白錯合物); 及/或非離子型界面活性劑, 諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

亦可使用脂質轉染或脂質體將多肽、抗體或抗體片段傳遞至細胞中。若使用抗體片段，則特異性結合至靶蛋白之結合域的最小片段係較佳的。舉例而言，可基於抗體之可變區序列設計保留能結合靶蛋白序列之能力的肽分子。此等肽可以化學方式合成得之及/或藉由DNA重組技術來產生(參見例如 Marasco 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 [1993])。

當為所治療之特定適應症所需要時，本文中之調配物亦可含有一種以上的活性化合物，較佳為具有互補活性且彼此間無不利影響之彼等化合物。此等分子適宜以可有效達成預定目的之量組合存在。

活性分子亦可包埋於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微膠囊(分別例如為羥甲基纖維素或明膠-微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中；包埋於膠態藥物傳遞系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中；或包埋於巨乳液中。此等技術揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版，Osol, A. 編(1980)中。

待用於活體內投藥之調配物必須為無菌的。此容易藉由經由無菌過濾膜過濾來實現。

可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之合適實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半透性基質，此等基質呈成形物品(例如薄膜或微膠囊)之形式。持續釋放型基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸

酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ 乙基-L-麩胺酸鹽之共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物與醋酸亮丙立德(leuprolide acetate)組成之可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。雖然諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物使分子能夠釋放歷時超過100天,但某些水凝膠釋放蛋白質歷時較短時間。當囊封之抗體長時間保留於體內時,其可能由於暴露於37°C下之水分而變性或聚集,從而導致生物活性之損失及免疫原性可能之變化。視所涉及之機制而定,可設計合理的穩定化策略。舉例而言,若發現聚集機制為經由硫基-二硫鍵互換形成分子間S--S鍵,則可藉由修飾硫氫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物來達成穩定化。

治療方法

本發明之CRIg變體因其能夠抑制補體活化、尤其為抑制替代補體路徑而可用於預防及/或治療補體相關性疾病及病理性病狀。此等疾病及病狀包括(但不限於)補體相關性疾病、發炎性疾病及自體免疫性疾病。

本文中之CRIg變體可靶向的補體相關性疾病、發炎性疾病及免疫相關性疾病與病症之特定實例已於上文中列出。

本發明之更多細節係藉由以下非限制性實例來說明。

實例1

親和力成熟之CRIg變體的製備

材料及方法

材料：

材料-酶及M13-KO7輔助噬菌體(New England Biolabs)；Maxisorp免疫板(Nunc. Roskilde, Denmark)；96孔U形底聚丙烯板(COSTAR；目錄號#3365)；96孔平底非結合板(NUNC；目錄號#269620)；辣根過氧化酶/抗-M13抗體接合物(Pharmacia)；3,3',5,5'-四甲基-聯苯胺-H₂O₂過氧化酶受質(TEB)(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc)；大腸埃希氏菌XL1-藍及大腸桿菌BL21(DE3)(Stratagene)；牛血清白蛋白(BSA)及Tween 20(Sigma)；Ni-NTA瓊脂糖(Qiagen)；兔RBC(Colorado Serum Company；目錄號#CS1081)；明膠佛羅那緩衝液(Gelatin Veronal Buffer; GVB)[100 mL佛羅那緩衝液(BioWhittaker；目錄號#12-624E)；明膠(B型牛皮；SIGMA；目錄號#G9391-100G)]；缺乏C1q之血清(CompTech；目錄號#A300)；fH蛋白(Complement Technology；目錄號#A137)；抗-FLAG-HRP(50%甘油中之mAb)(Sigma目錄號Cat#A-8592)1.1 mg/mL

噬菌體呈現CRlg文庫之建構

將編碼CRlg之DNA片段接合於經XhoI及SpeI消化之噬菌粒載體(p3DvlzPDZ-gD)(Kunkel等人，Methods Enzymol. 154:367-382 (1987))作為野生型對照物及設計CRlg變體之模板。接著，由CJ239大腸桿菌細胞製備在為了隨機化而靶向之各殘基處具有TAA終止密碼子的模板(Kunkel等人，1987，同上)。對於CRlg變體選擇而言，使用軟隨機化策

略，其中藉由使用利用偏向於野生型核苷酸之70-10-10-10鹼基混合物之中毒寡核苷酸策略將約50%之突變率引入選定位置。在文庫設計中：5=50% A、10% G、10% C及10% T；6=50% G、10% A、10% C及10% T；7=50% C、10% A、10% G及10% T；8=50% T、10% A、10% G及10% C。已設計五個文庫。

文庫1：BCR1, ATC CTG GAA GTG CAA 656 (SEQ ID NO: 7) AGT GTA ACA GGA CCT 866 (SEQ ID NO: 8) 555 GGG GAT GTG AAT CTT (SEQ ID NO: 9)；

文庫2：BCR2, AAG TGG CTG GTA CAA 768 (SEQ ID NO: 10) 668 TCA 657 775 688 577 ATC TTT (SEQ ID NO: 11) 786 CGT 657 TCT TCT GGA GAC CAT (SEQ ID NO: 12)；

文庫3：BCR3, TTT CTA CGT GAC TCT (SEQ ID NO: 13) 877 668 657 757 588 756 756 678 555 TAC 756 GGC CGC CTG CAT GTVG (SEQ ID NO: 14)；

文庫4：BCR4, CAA TTG AGC ACC CTG (SEQ ID NO: 15) 656 586 657 GAC 768 AGC CAC TAC ACG TGT 656 (SEQ ID NO: 16) GTC ACC TGG 756 (SEQ ID NO: 17) ACT CCT GAT GGC AAC (SEQ ID NO: 18)；

文庫5：BCR5, ACT CCT GAT GGC AAC 756 (SEQ ID NO: 19) GTC 688 768 657 555 ATT ACT GAG CTC CGT (SEQ ID NO: 20)。

藉由使用適當密碼子如上進行點突變之定點突變誘發以產生相應突變，且由序列證實正確純系。

旨在選擇CRIg變體之文庫分選及篩檢

將Maxisorp免疫板在4°C下用C3b(5 µg/ml)塗佈隔夜且在室溫下用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)及0.05%(w/v)牛血清白蛋白(BSA)阻斷1小時。將噬菌體文庫添加至塗有C3b之板中且在室溫下培育3小時。將板洗滌十次且將所結合之噬菌體用50 mM HCl溶離且用等體積之1.0 M Tris鹼(pH 7.5)中和。將所回收之噬菌體藉由經由大腸桿菌XL1-藍繼代來擴增且用於其他輪之結合選擇。在5輪之後，自各文庫中選擇12個獨立純系且使其以96孔格式生長在500 µl補充有羧苄西林(carbenicillin)及M13-KO7輔助噬菌體之2YT肉湯中。將兩倍連續稀釋之培養物上層清液直接添加於在設計位置塗有C3b、抗-gD、BSA及無關蛋白質之384孔板中。量測結合親和力以估算噬菌體濃度，從而得知C3b明顯高於抗-gD，但不高於BSA及無關蛋白質。將噬菌體濃度固定，以相同格式自各文庫中篩檢約200個純系且自各文庫中選擇24-48個明顯展示與C3b之結合力超過抗-gD的純系，接著對其測序以供分析。

競爭性噬菌體ELISA

為了估算結合親和力，使用經修改之噬菌體ELISA。將96孔微量滴定板在4°C下用50 mM碳酸鹽緩衝液(pH 9.6)中之2 µg/ml C3b塗佈隔夜。接著將板在室溫下用PBS、0.5% BSA阻斷1小時。將呈現CRIg變體之噬菌體連續稀釋於PBT緩衝液中且量測結合以估算噬菌體濃度，從而得知為在飽和時之信號的50%。將噬菌體之亞飽和濃度

(Subsaturating concentration)固定且與連續稀釋之C3b一起預培育2小時，接著將混合物轉移至塗有C3b之檢定板中。培育15分鐘之後，將板用PBS、0.05% Tween 20洗滌且與辣根過氧化酶/抗-M13抗體接合物(1:5000稀釋於PBT緩衝液中)一起培育30分鐘。將板洗滌，用TMB受質顯色，用1.0 M H_3PO_4 中止且在450 nm下用分光光度法讀取。以導致半數最大噬菌粒結合之競爭C3b之濃度計算親和力(Ic_{50})。

蛋白質純化

將含有表現質體之大腸桿菌BL21(DE3)之單個菌落接種於30 mL補充有50 $\mu\text{g/mL}$ 羧苄西林之LB培養基(LB/carb培養基)中且使其在37°C下生長隔夜。將細菌收穫，加以洗滌，使其再懸浮且接種於500 mL之LB/carb培養基中。使培養物在37°C下生長至對數中期($A_{600}=0.8$)。用0.4 mM異丙基1-硫基--D-吡喃半乳糖苷誘導蛋白質表現，且使培養物在30°C下生長24小時。將細菌藉由以4000 g離心15分鐘而粒化，用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌兩次，且在-80°C下冷凍8小時。將離心塊再懸浮於50 mL PBS中，且藉由通過微射流器處理設備或超音處理設備來溶解細菌。將CRIg變體蛋白質經由2 ml NI-NTA瓊脂糖及凝膠過濾法純化。

*mutCRIg-huFc*流體相競爭性結合ELISA：

將huCRIg(L)-LFH於PBS(pH 7.4)中稀釋至2 $\mu\text{g/mL}$ ，且塗佈於Maxisorp 384孔平底板(Nunc, Neptune, NJ)(25微升/孔)上，在4°C下培育隔夜(16-18小時)。將板用洗滌緩衝液

(PBS, pH 7.4, 0.05% Tween 20)洗滌3次, 且向各孔中添加50微升/孔阻斷緩衝液(PBS, pH 7.4, 0.5% BSA)。將板阻斷1-3小時; 此培育及所有隨後之培育皆在室溫下在迴轉式震盪器上執行。在阻斷步驟期間, 將C3b(經純化, Genentech)於檢定緩衝液(PBS pH 7.4、0.5% BSA、0.05% Tween-20)中稀釋至20 nM, 且將mutCRIg-huFc分子在20,000-0.34 nM之濃度範圍內連續稀釋於檢定緩衝液中。接著將C3b與mutCRIg-huFc分子1:1混合且預培育0.5-1小時。將經阻斷之板洗滌三次(如上所述), 且將C3b:mutCRIg-huFc複合物添加至反應板(25微升/孔)中。培育1-2小時之後, 將ELISA板洗滌三次(如上所述)且藉由添加抗人類C3b抗體(純系5F202, US Biological, Swampscott, MA; 600 ng/mL, 25微升/孔)來偵測結合板之C3b。將板培育1-2小時且如上所述加以洗滌。接著添加1:2,000稀釋之接合HRP之抗鼠類Fc IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)(25微升/孔), 且將板培育1-2小時。最後洗滌之後, 將25微升/孔之TMB受質(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)添加至ELISA板中。約8分鐘後, 藉由添加25微升/孔之1.0 M磷酸來中止顯色。使用SpectraMax 250微量滴定板讀取器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)測定450 nm及650 nm下之吸光度。

補體活化檢定：

使用 Wieslab™ 補體系統替代路徑套組 (Alpco Diagnostics, Salem, NH) 評估 mutCRIg-Fc 抑制補體活化之

能力。分兩次製備最終所要濃度的經連續稀釋之 mutCRIg-Fc(400 至 0.2 nM)及缺乏 C1q 之人類血清 (5%)(Complement Technology, Tyler, TX), 1:1 混合且在 300 RPM 之迴轉式震盪器上預培育 5 分鐘, 然後添加至塗有 LPS 之 ELISA 板 (100 微升/孔) 中。檢定之其餘部分係遵循製造商說明書。簡而言之, 將 ELISA 板中之樣本在 37°C 下培育 60-70 分鐘且接著於洗滌緩衝液 (PBS pH 7.4、0.05% Tween 20) 中洗滌三次。向 ELISA 板中每孔添加 100 微升之抗-C5b-9 接合物。在室溫下培育 30 分鐘之後, 如上所述洗滌 ELISA 板, 且每孔添加 100 微升受質, 且再將板在室溫下培育 30 分鐘。藉由每孔添加 50 微升 5 mM EDTA 來中止顯色。使用 MultiSkan Ascent 微量滴定板讀取器 (Thermo Fisher Scientific, Milford, MA) 測定 405 nm 下之吸光度。

溶血抑制檢定：

將兔紅血球 (Colorado Serum Company, Denver, CO) 用含有 0.1% 牛皮明膠 (Sigma)(GVB) 之佛羅那緩衝液 (Sigma, St. Louis, MO) 洗滌三次, 每次洗滌後在 4°C 下以 1500 rpm 離心 10 分鐘。在最後離心步驟之後, 將細胞以 2×10^9 個細胞/毫升之最終濃度再懸浮於 GVB 中。將連續稀釋於 GVB 中之補體抑制劑以 50 微升/孔添加至 96 孔 U 形底聚丙烯板 (Costar, Cambridge, MA) 中, 隨後每孔添加 20 微升 1:2 稀釋於 0.1 M MgCl_2 /0.1 M EGTA/GVB 中之兔紅血球。藉由每孔添加 30 微升經 GVB 1:3 預稀釋之缺乏 C1q 之血清 (Complement Technology, Tyler, TX) 來觸發板內補體級聯。在輕柔攪拌

下，將板在室溫下培育30分鐘，再用每孔100微升10mM EDTA/GVB中止反應。以1500 rpm將板離心5分鐘之後，將上層清液轉移至透明平底、未結合之96孔板(Nunc, Neptune, NJ)，且使用微板讀取器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)、在412 nm下讀取光學密度。

α 篩檢競爭性檢定：

使用 AlphaScreen® 組胺酸(鎳螯合物)偵測套組(PerkinElmer, Waltham, MA)評估突變型CRIg分子與C3之潛在交叉反應性。分三次製備最終所要濃度的經連續稀釋之人類C3及C3b(3,000至0.7 nM)以及固定濃度之經生物素標記之iC3b(30 nM)以及突變型CRIg(mutCRIg)與野生型CRIg分子(15-60 nM)，1:1:1混合，且環境溫度下，在迴轉式震盪器上以3000 TPM預培育30分鐘。分四次製備最終所要濃度的抗生蛋白鏈菌素供體珠粒與鎳螯合物受體珠粒(各自為0.1 mg/ml)之1:1混合物且添加至反應物中。將反應板在環境溫度下，在避光之迴轉式震盪器上以3000 rpm培育60分鐘。將板用 AlphaQuest®-HTS 微板分析器(PerkinElmer, Waltham, MA)分析。

表面電漿共振

藉由在Biacore® A100儀器(GE healthcare)上使用表面電漿共振量測法來測定C3b對於突變型CRIg及野生型CRIg之親和力。使用抗-Fc捕獲格式且根據平衡結合量測計算 K_D 。使用抗-muFc捕獲套組(BR-1008-38)依據製造商所提供之說明書製備感測器晶片。將突變型或野生型CRIg於運

行緩衝液(10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、0.01% Tween-20)中稀釋至1 $\mu\text{g/mL}$ ，且進行60 μL 之注射以便使約100 RU之融合蛋白捕獲於晶片表面之一個點上。針對CRIg點上不同C3b濃度之溶液的10 min注射，記錄感測圖，其中扣除含有捕獲抗體、但不含CRIg之參考點的信號。在10 $\mu\text{L/min}$ 之流速下及在25°C之溫度下，獲得濃度在4 μM 至15.6 nM範圍內之一系列2倍稀釋之C3b的資料。在結合循環之間，藉由30秒注射10 mM Gly-HCl pH 1.7來使表面再生。使用Biacore A100評估軟體v1.1之親和算法(Safsten等人，(2006) Anal. Biochem. 353:181)，使用每次C3b注射結束時獲得之平穩值來計算 K_D 。

結果

噬菌體文庫設計

使用與C3b複合之CRIg之晶體結構來設計靶文庫。設計五個文庫以覆蓋CRIg與C3b之間的接觸區域(圖4)。CRIg文庫係以與g3p次要外殼蛋白之融合體形式於單價噬菌體呈現載體中建構(Zhang等人，*J Biol Chem* 281(31): 22299-311 (2006))。在待隨機化之各殘基處，藉由突變誘發將終止密碼子引入噬菌體質體之CRIg編碼部分中。接著使用含有終止密碼子之各構築體來產生噬菌體呈現文庫(參見材料及方法)。使用「軟隨機化」策略來選擇黏合劑以維持野生型序列偏向(bias)以便使選定位置當時僅50%突變。以每個文庫 $>10^{10}$ 個獨立序列之平均多樣性獲得所有五個文庫(表1)。

*CRIg*噬菌體文庫之選擇

在四輪結合選擇之後，自該等五個文庫中獲得38個獨特純系(表2)。在文庫1中，保留位置15之離胺酸。在位置8處，芳族殘基(酪胺酸及色胺酸)置換麩胺酸。位置14為親代色胺酸或同源苯丙胺酸所佔據。在文庫2中，對24個純系測序且其均顯示一致。位置42、46及47保留為野生型。在位置43、44及45處，天冬醯胺、組胺酸及苯丙胺酸置換野生型序列。在文庫3中，將10個位置隨機化且該等序列在位置54、55、56、57、58、61、62及63處呈現完全的保守性。異白胺酸或離胺酸佔據位置60。在位置64處，麩醯胺酸經精胺酸置換或被保留。在文庫4中，芳族殘基佔據位置86且同源鹼性殘基精胺酸及離胺酸佔據位置99。位置85、87及95亦經軟隨機化，但顯現高度保守性。在文庫5中，在位置105處，較佳為兩個明顯同源之鹼性殘基離胺酸及精胺酸而非麩醯胺酸。帶負電之殘基天冬胺酸或酸性殘基天冬醯胺酸佔據位置110。

藉由競爭性噬菌體ELISA估算一些突變體之親和力(資料未展示)，且發現文庫3中存在作為比野生型CRIg好約八倍之C3b黏合劑的純系。

活體外結合親和力及活體內生物效力之測定

為了在溶血抑制檢定中鑑別對於增大與C3b之結合親和力及效力起關鍵作用之殘基，緊接著的步驟係如下設計第二代CRIg變體：合併顯性單突變且使其他位置保留為野生型，或自藉由噬菌體ELISA所確定之第一代噬菌體文庫中

選擇2-3個高親和力純系。為了準確地量測本發明突變體之親和力及效力，使所有變體表現為分離蛋白。溶血抑制檢定之結果(表3)展示，在溶血檢定中，與野生型相比，文庫1之L12、文庫3之L33及文庫4之L41使效力明顯增大4至10倍。文庫3之L32展示比野生型CRIg改良10倍之IC50。資料亦展示細胞基檢定中之結合親和力與效力並不相關。

突變體之組合

基於第二代文庫之結果，設計第三代突變體以便進一步改良溶血檢定中之效力及結合親和力。選擇三種生物學上最有效之突變體(L12-8W、L33-Q60I/L32-Q64R及L41-M86Y)及一種結合親和力最高之突變體(L32-Q64R)作為模板。接著將此等突變體與獲自第二代文庫中之其他生物學有效純系組合以確定可在溶血檢定中增大效力及結合親和力之一組最佳的突變。使CRIg變體表現並加以純化以供詳細分析。資料展示(表4)，與親代突變體相比，儘管WL41及WL59突變體之結合親和力高3-6倍，但L12之結合突變體並未改良抑制效力且甚至呈現較低活性。在溶血檢定中，於L32之突變體內，RL41展示比野生型好1.8倍之結合親和力及好6倍之效力。L33群組之所有突變體展示明顯增大之結合親和力(與野生型相比增大約27-226倍)，不過溶血檢定中之效力並未明顯增大。亦注意到，60I-64R及86Y與大部分親和力改良之結合純系有關。

*CRIg Q64R M86Y*突變體之改良結合親和力及補體抑制活性

選擇在競爭性ELISA中具有最高親和力之突變體Q64R

M86Y(參見圖4及表3)以供進一步分析。為了測定CRIg wt及CRIg Q64R M86Y對於C3b之結合親和力，對CRIg wt及CRIg Q64R M86Y進行Biacore分析。CRIg Q64R M86Y之親和力比野生型CRIg改良5倍(圖6)。先前研究已顯示CRIg wt選擇性結合至C3b而非結合至天然C3(Wiesman等人，Nature, 444(7116):217-20, 2006)。因為突變誘發會改變此選擇性，所以在 α 篩檢流體相競爭性檢定中比較CRIg Q64R M86Y相對於C3與C3b之親和力。CRIg Q64R M86Y與可溶性C3b競爭，但不與可溶性C3競爭，此表明突變誘發並不影響CRIg對活性組分C3b之選擇性(圖7)。藉由對與C3b複合之CRIg Q64R M86Y之結構中的此等殘基之分析進一步證實此選擇性(資料未展示)。

為測試改良之親和力及對C3b保持之選擇性是否轉化為改良之功效，在對補體之替代路徑具有選擇性的基於紅血球之溶血檢定中對CRIg Q64R M86Y與CRIg wt進行測試。與CRIg wt相比，CRIg Q64R M86Y展示IC50有了4倍的改良(圖8A)。為進一步證實針對補體替代路徑抑制之效力的改良，在對補體之替代路徑具有選擇性的基於LPS之檢定中對CRIg Q64R M86Y與CRIg wt之抑制活性進行比較。此處，與野生型重組蛋白質相比，CRIg展示IC50有了180倍之改良。CRIg wt及CRIg Q64R M86Y不影響補體經由經典路徑之活化。因此，在對補體之替代路徑具有選擇性的兩種不同檢定中，CRIg-C3b結合界面中之兩個胺基酸取代產生具有改良之結合親和力及優良之補體抑制活性的分子。

為進一步測定增大之結合親和力及效力是否轉化為改良之治療功效，在血清轉移關節炎模型中對CRIg之野生型及Q64R M86Y型之保護作用進行比較。先前研究已顯示CRIg在膠原蛋白誘導之關節炎及抗體誘導之關節炎中有效地抑制發炎及骨組織破壞(Katschke 等人，J. Exp Med 204(6):1319-1325 (2007))。

此處，在免疫複合物介導性關節炎之第三臨床前模型中測試CRIg功效。類風濕性關節炎之自發鼠類模型K/BxN模擬人類關節炎疾病之諸多臨床及組織學特徵。第0日將獲自K/BxN小鼠之50微升血清注入小鼠。每日檢查動物且藉由目測法對疾病程度評分。第6日處死所有小鼠。

在第1日開始每日將指定量之於100 μ l無菌鹽水中之同型對照物或hCRIg-mIgG1或hCRIg-RL41-mIgG1重組蛋白質皮下注入小鼠。

監測及評分：

各爪之評分。

0=無紅斑及腫脹跡象

1=限於中足(跗骨)或踝之紅斑及輕度腫脹

2=自踝擴展至中足之紅斑及輕度腫脹

3=自踝擴展至蹠骨關節之紅斑及中度腫脹

4=包括踝、足及趾之紅斑及嚴重腫脹

平均評分=4個爪評分之總和。

疾病階段：輕度(平均分數1-3)、中度(平均分數4-8)及嚴重疾病(平均分數9以上)。平均分數可反映所涉及之關節數

目。

第6日，藉由在麻醉下心內穿刺來收集血樣，然後處死。使用血清來量測hCRIg-Fc融合蛋白之量。收集關節用於組織學評估。

將來自KRN小鼠之血清轉移至Balb/c接受者體內會產生特徵為對稱性關節發炎之快速且強的免疫反應。關節炎誘導係由在關節內形成促炎性免疫複合物之抗葡萄糖-6-磷酸酯異構酶自體抗體所介導(Kouskoff, V., Korganow, A.S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C.及Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811-822)。如由在缺乏替代路徑補體組分之小鼠及缺乏共同Fc-受體 γ 重鏈之小鼠中不存在疾病所證明，關節炎之形成完全取決於整個替代補體路徑及Fc受體功能(Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D.M., Hofhuis, F.M., Boackle, S.A., Takahashi, K., Holers, V.M., Walport, M., Gerard, C.等人(2002)。Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157-168)。由於疾病之發作快且程度嚴重，因此用CRIg wt-Fc融合蛋白處理使關節炎評分降低僅22%(圖9A、9B)。用CRIg Q64R M86Y處理展示關節炎評分降低66%。組織學檢查顯示，相對於經CRIg wt或對照融合蛋白處理之小鼠，在經CRIg Q64R M86Y處理之小鼠中主要由嗜中性白血球及巨噬細胞組成之免疫細胞之浸潤明顯減少(圖9C、9D)。CRIg wt與CRIg Q64R M86Y之血清濃度相似，此表

明關節炎評分之差異並非歸因於CRIg wt與CRIg Q64R M86Y蛋白之半衰期之差異。因此證明，CRIg與其靶C3b之增強之結合親和力轉化為明顯改善之療效。

本說明書中所引用之全部專利及參考文獻係明確地以全文引用之方式併入本文中。

雖然已參考被認為是特定實施例之內容描述了本發明，但應瞭解本發明不限於此等實施例。相反，本發明意欲涵蓋隨附申請專利範圍之精神及範疇內所包括的各種變體及等效體。

【圖式簡單說明】

圖1A-1B展示天然人類CRIg之399個胺基酸的全長長形式之核苷酸及胺基酸序列(huCRIg，分別為SEQ ID NO: 1及2)；

圖2A-2B展示天然人類CRIg之305個胺基酸的短形式之核苷酸及胺基酸序列(huCRIg-短，分別為SEQ ID NO: 3及4)；

圖3A-3C展示280個胺基酸的天然鼠類CRIg之核苷酸及胺基酸序列(muCRIg，分別為SEQ ID NO: 5及6)；

圖4：CRIg突變體在結合檢定及抑制檢定中之活性。CRIg之結合親和力係根據C3b之競爭性置換(A)來量測，且生物活性係藉由溶血抑制檢定來量測。PUR10680為野生型對照物(紅)，且RIL 41(藍)及RL41(綠)為兩種突變體(B)。(C)CRIg結合界面之逐步優化；

圖5：競爭性ELISA與溶血檢定之間的相關性；

圖 6：藉由 Biacore 分析得知，CRIg 突變體 Q64R/M86Y 顯示改良之結合親和力。(A) 藉由注射漸增濃度之 C3b 所產生的關於經塗佈之 CRIg wt 及 CRIg Q64R M86Y 蛋白之 SPR 感測圖。B. 對結合資料之穩態分析指示 Q64R/M86Y 突變體之 K_d 為 0.2 微莫耳且野生型 CRIg 之 K_d 為 1.1 微莫耳；

圖 7：親和力改良之 CRIg 保持對 C3b 之選擇性。將 α 篩檢競爭性檢定用於經純化之 C3 及 C3b；

圖 8：CRIg Q64R M86Y 與野生型 CRIg 相比補體抑制效力有了改良。(A) 使用替代路徑選擇性溶血檢定，使用兔紅血球及缺乏 C1q 之人類血清對野生型 CRIg 與 CRIg Q46R M86Y 之補體抑制進行比較。(B) 使用基於 ELISA 之替代路徑檢定，利用微孔板所塗之 LPS 及缺乏 C1q 之人類血清對野生型 CRIg 與 CRIg Q46R M86Y 之補體抑制進行比較；及

圖 9：CRIg Q64R M86Y 相對於 CRIg WT 展示改良之活體內功效。

(A) 經 KRN 血清注射且經不同濃度及不同型式之野生型及親和力成熟之重組人類及小鼠 CRIg 蛋白處理的小鼠之臨床評分。資料為每組 4-7 隻小鼠之平均值。(B) 在血清轉移後第 6 日之個別小鼠之臨床評分之散布圖。(C) 在血清轉移後第 6 日經 CRIg wt 或 CRIg Q64R M86Y 處理之小鼠的經蘇木素及伊紅染色之切片。(D) 在血清轉移後第 6 日經 CRIg wt 或 CRIg Q64R M86Y 處理之小鼠的組織學評分之散布圖。

表 1：噬菌體文庫。設計五個軟隨機化文庫以覆蓋 CRIg

與 C3b 之間的接觸區域。

表 2：藉由噬菌體呈現技術達成之較高親和力 CRlg 的逐步產生。自五個軟隨機化文庫中選擇 CRlg 抗-C3b 之突變體。各圖展示基於與 C3b 之結合親和力自各文庫中選出的純系。序列係以單字母胺基酸碼表示。各圖將個別突變體與一致及親代野生型 (WT) 序列比較。如下相應地將殘基著色：藍色-軟隨機化位置；灰色-未隨機化；黃色-不同於野生型 (WT) 之選定殘基。依出現順序，表 2 分別揭示 SEQ ID NO: 21-63 及 63-67。

表 3：針對選定突變體藉由競爭性 ELISA 及活體內溶血抑制檢定所測定之結合親和力之比較。結合親和力或活體內效力增大 5 倍以上之突變體係以黃色陰影標出。

表 4：第二代突變體之結合親和力及活體內溶血抑制之比較 (親代序列以灰色展示)。結合親和力比親代突變體增大 5 倍以上之突變體以藍色突出顯示，結合親和力增大 90 倍以上之突變體以黃色突出顯示。類似地，活體內效力比親代序列大之突變體以橙色突出顯示。

表1

表1：噬菌體文庫

文庫	位置	多樣性
文庫1	E8-K15	1.2×10^{10}
文庫2	R41-T47	1.4×10^{10}
文庫3	S54-Q64	1.6×10^{10}
文庫4	E85-Q99	1.2×10^{10}
文庫5	Q105-K111	1.9×10^{10}

藉由噬菌體呈現技術達成之較高親和力CRIg的逐步產生

		文庫1																	
位置	WT	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16					☐	軟隨機化		
一致序列		P	E	S	V	T	G	P	W	K	G					☒	選定之未隨機化		
		P	Y	S	V	T	G	P	W	K	G					☐			
		P	W	S	V	T	G	P	F	K	G								
		P	Y	S	V	T	G	P	F	K	G								
		P	Y	S	V	T	G	P	W	K	G								
		文庫2																	
位置	WT	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53				
一致序列		Q	R	G	S	D	P	V	T	I	F	L	R	D	S				
		Q	R	D	S	H	F	V	T	I	F	L	R	D	S				
		Q	R	D	S	H	F	V	T	I	F	L	R	D	S				
		文庫3																	
位置	WT	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65					
一致序列		S	S	G	D	H	I	Q	Q	A	K	Y	Q	G					
		S	S	G	D	H	I	Q	I	A	K	Y	R	G					
		S	S	G	D	H	I	Q	K	A	K	Y	Q	G					
		S	S	G	D	H	I	Q	I	A	K	Y	Q	G					
		S	S	G	D	H	I	Q	I	A	K	Y	R	G					
		文庫4																	
位置	WT	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	
一致序列		L	E	M	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T	
		L	E	C	D	D	Q	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Y	T	
		L	E	C	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T	
		L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T	
		L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T	
		L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T	
		L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	L	T	
		L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T	
		L	E	Y	D	D	K	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T	
		L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	F	T	
		L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Y	T	
		L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T	
		L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T	
		L	E	W	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	Q	T	
		L	E	F	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T	
		L	E	F	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	R	T	
		L	E	Y	D	D	R	S	H	Y	T	C	E	V	T	W	K	T	
			文庫5																
位置	WT	104	105	106	107	108	109	110	111										
一致序列		N	Q	V	V	R	D	K	I										
		N	R	V	V	R	D	N	I										
		N	R	V	V	R	D	D	I										
		N	R	V	V	R	D	Q	I										
		N	R	V	I	R	D	Q	I										
		N	R	V	I	R	D	H	I										
		N	K	V	I	R	D	Q	I										
		N	K	V	I	A	D	N	I										
		N	K	V	I	S	D	N	I										
		N	Q	V	I	R	S	D	I										
		N	K	V	T	R	D	N	I										
		N	K	V	V	R	D	Q	I										
		N	K	V	V	R	D	N	I										
		N	K	V	V	R	D	N	I										
		N	K	V	V	R	D	D	I										
		N	K	V	V	R	S	D	I										
		N	K	V	V	S	D	D	I										
		N	K	V	V	R	D	Q	I										

各圖展示基於與C3b之結合親和力自各文庫中選出的純系。序列係以單字母胺基酸碼表示。

各圖展示基於與C3b之結合親和力自各文庫中選出的純系。序列係以單字母胺基酸碼表示。

表2

表3

	名稱	突變體	競爭性ELISA			溶血抑制		
			Mu Ic50 (nM)	WT-P10680 (nM)	WT/Mu	Mu Ic50	WT-P10680	WT/Mu
文庫1	L11	E8Y	384	332	0.9X	439	591	1X
	L12	E8W	142	332	2X	176	657	4X
	L13	W14F	882	332	0.4X	293	596	2X
	L15	E8Y/W14F	1274	332	0.3X	310	528	2X
	L21	G42D	453	332	0.7X	378	416	1X
文庫2	L22	D44H	338	332	1X	1207	591	0.5X
	L23	P45F	1266	332	0.3X	358	528	1.5X
	L24	G42D/D44H/P45F	238	332	1X	227	498	2X
	L31	Q60I	388	332	0.9X	78	416	5X
文庫3	L32	Q64R	34	332	10X	293	549	2X
	L33	Q60I/Q64R	255	332	1X	51	492	10X
	L41	M86Y	123	332	3X	124	657	5X
文庫4	L42	M86W	80	332	4X	226	635	3X
	L43	M86F	604	332	0.5X	185	794	4X
	L44	Q99K	268	332	1X	588	520	1X
	L45	Q99R	1397	331	0.2X	818	682	0.8X
	L46	Q99Y	468	332	0.7X	1715	663	0.4X
	L47	Q99F	296	332	1X	570	520	0.9X
	L48	Q99L	1376	332	0.2X	828	682	0.8X
	L49	M86W/Q99R	55	332	6X	201	635	3X
	L410	M86F/Q99R	121	332	3X	273	746	3X
	L411	M86W/Q99K	1594	298	0.2X	1980	747	0.4X
	L51	Q105R	599	298	0.5X	901	794	0.9X
	L52	Q105K	491	298	0.6X	696	663	1X
	L55	K110D	128	298	2X	196	525	3X
	L56	K110N	132	298	2X	376	746	1.2X
	L58	K110H	1105	298	0.3X	1393	686	0.5X
文庫5	L59	Q105R/K110N	127	298	2X	180	525	3X
	L510	Q105R/K110D	1011	298	0.3X	954	686	0.7X
	L511	Q105R/K110Q	166	298	2X	234	592	3X
	L512	Q105K/K110Q	937	298	0.3X	814	596	0.7X
	L514	Q105K/K110D	46	298	6X	167	549	3X

表4

名稱	突變體	競爭性ELISA		溶血抑制	
		Mu Ic50 (mM) WT-P10680	Mu WT/Mu	Mu Ic50 WT-P10680	WT/Mu
L12	ERW	142	332	176	657
WL21	ERW/G42D	400	457	1601	506
WL23	ERW/P45F	376	457	2063	506
WL42	ERW/M86W	71	457	416	506
WL51	ERW/Q105R/K110N	312	457	475	506
WL55	ERW/K110N	374	457	492	506
WL59	ERW/Q105R/K110N	276	457	2340	506
L32	Q64R	34	332	293	549
RL11	Q64R/E8Y	303	712	390	506
RL21	Q64R/G42D	490	712	217	506
RL23	Q64R/P45F	293	712	375	506
RL41	Q64R/M86Y	40	712	85	506
RL42	Q64R/M86W	56	712	170	506
RL46	Q64R/Q99Y	682	712	473	506
RL47	Q64R/Q99F	725	712	669	506
RL49	Q64R/Q99R	64	712	177	506
RL51	Q64R/Q105R/K110N	286	712	227	506
RL52	Q64R/Q105K	290	712	222	506
RL59	Q64R/Q105R/K110N	65	712	208	506
L33	Q60I/Q64R	255	332	51	492
IRL11	Q60I-Q64R/E8Y	34	903	327	1052
IRL21	Q60I-Q64R/G42D	29	903	386	1052
IRL23	Q60I-Q64R/P45F	31	903	338	1052
IRL24	Q60I-Q64R/G42D/D44H/P45F	4	903	235	1052
IRL41	Q60I-Q64R/M86Y	10	903	358	1052
IRL51	Q60I-Q64R/Q105R	24	903	313	1052
IRL52	Q60I-Q64R/Q105K	22	903	143	1052
IRL55	Q60I-Q64R/K110N	33	903	292	1052
IRL59	Q60I/Q105R/K110N	15	903	277	506
L41	M86Y	123	332	124	657
YL11	M86Y/E8Y	75	457	562	962
YL21	M86Y/G42D/D44H/P45F	71	457	220	962
YL23	M86Y/P45F	7	457	202	962
YL24	M86Y/G42D/D44H/P45F	31	457	248	962
YL44	M86Y/Q99K	91	457	250	962
YL49	M86Y/Q99R	175	457	392	962
YL51	M86Y/Q105R	39	457	417	962
YL52	M86Y/Q105K	49	457	224	962
YL59	M86Y/Q105R/K110N	18	457	515	962

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 親和力成熟之CRIG變體

<130> GNE-0322

<140> 098115004

<141> 2009-05-06

<150> 61/189,653

<151> 2008-08-20

<150> 61/050,888

<151> 2008-05-06

<160> 67

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1372

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (65)..(1261)

<400> 1

ccaactgcac ctcgggttcta tccataggag gctggaagaa aggacagaag tagctctggc 60

tgig atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctc ctg ggg cac cta aca gtg 109
 Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val
 1 5 10 15

gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtc cca gag agt gta aca gga 157
 Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly
 20 25 30

ccg tgg aaa ggg gat gtc aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg caa 205
 Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln
 35 40 45

ggc tac acc caa gtc ttg gtc aag tgg ctg gta caa cgt ggc tca gac 253
 Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp
 50 55 60

ccg gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag cag 301
 Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln
 65 70 75

gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtc agc cac aag gtt cca gga gat 349
 Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp
 80 85 90 95

gta tcc ctg caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac tac 397
 Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr
 100 105 110

acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtc aga 445
 Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg
 115 120 125

gat aag att act gag ctg cgt gtc cag aaa ctg tct gtc tcc aag ccc 493
 Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro
 130 135 140

aca gtc aca act ggc agc ggt tat ggc ttc acg gtc ccc cag gga atg 541
 Thr Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met
 145 150 155

agg att agc ctt caa tgc cag gct cgg ggt tct cct ccc atc agt tat 589

Arg 160	Ile	Ser	Leu	Gln	Cys 165	Gln	Ala	Arg	Gly	Ser 170	Pro	Pro	Ile	Ser	Tyr 175	
att	igg	tat	aag	caa	cag	act	aat	aac	cag	gaa	ccc	atc	aaa	gta	gca	637
Ile	Trp	Tyr	Lys	Gln	Gln	Thr	Asn	Asn	Gln	Glu	Pro	Ile	Lys	Val	Ala	
			180						185					190		
acc	cta	agt	acc	tta	ctc	ttc	aag	ccg	gag	gta	gcc	gac	tca	ggc		685
Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Phe	Lys	Pro	Ala	Val	Ile	Ala	Asp	Ser	Gly	
			195					200				205				
tcc	tat	ttc	tgc	act	gcc	aag	ggc	cag	gtt	ggc	tct	gag	cag	cac	agc	733
Ser	Tyr	Phe	Cys	Thr	Ala	Lys	Gly	Gln	Val	Gly	Ser	Glu	Gln	His	Ser	
		210					215					220				
gac	att	gtg	aag	ttt	gtg	gtc	aaa	gac	tcc	tca	aag	cta	ctc	aag	acc	781
Asp	Ile	Val	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys	Leu	Leu	Lys	Thr	
	225					230					235					
aag	act	gag	gca	ccg	aca	acc	atg	aca	tac	ccc	tig	aaa	gca	aca	tct	829
Lys	Thr	Glu	Ala	Pro	Thr	Met	Thr	Tyr	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser		
	240				245				250					255		
aca	gtg	aag	cag	tcc	tgg	gac	tgg	acc	act	gac	atg	gat	ggc	tac	ctt	877
Thr	Val	Lys	Gln	Ser	Trp	Asp	Trp	Thr	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Tyr	Leu	
			260					265						270		
gga	gag	acc	agt	gct	ggg	cca	gga	aag	agc	ctg	ccg	gtc	ttt	gcc	atc	925
Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Phe	Ala	Ile	
		275					280						285			
atc	ctc	atc	atc	tcc	tig	tgc	tgt	atg	gtg	gtt	ttt	acc	atg	gcc	tat	973
Ile	Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Cys	Cys	Met	Val	Val	Phe	Thr	Met	Ala	Tyr	
	290						295					300				
atc	atg	ctc	tgt	egg	aag	aca	tcc	caa	caa	gag	cat	gtc	tac	gaa	gca	1021
Ile	Met	Leu	Cys	Arg	Lys	Thr	Ser	Gln	Gln	Glu	His	Val	Tyr	Glu	Ala	
	305					310					315					
gcc	agg	gca	cat	gcc	aga	gag	gcc	aac	gac	tct	gga	gaa	acc	atg	agg	1069
Ala	Arg	Ala	His	Ala	Arg	Glu	Ala	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Thr	Met	Arg	
	320				325				330					335		
gtg	gcc	atc	ttc	gca	agt	ggc	tgc	tcc	agt	gat	gag	cca	act	tcc	cag	1117
Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ser	Gly	Cys	Ser	Ser	Asp	Glu	Pro	Thr	Ser	Gln	
			340					345						350		
aat	ctg	ggc	aac	aac	tac	tct	gat	gag	ccc	tgc	ata	gga	cag	gag	tac	1165
Asn	Leu	Gly	Asn	Asn	Tyr	Ser	Asp	Glu	Pro	Cys	Ile	Gly	Gln	Glu	Tyr	
			355					360					365			
cag	atc	atc	gcc	cag	atc	aat	ggc	aac	tac	gcc	cgc	ctg	ctg	gac	aca	1213
Gln	Ile	Ile	Ala	Gln	Ile	Asn	Gly	Asn	Tyr	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp	Thr	
		370				375						380				
gtt	ccg	ctg	gat	tat	gag	ttt	ctg	gcc	act	gag	ggc	aaa	agt	gtc	tgt	1261
Val	Pro	Leu	Asp	Tyr	Glu	Phe	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Cys	
		385				390				395						
taaaaatgcc ccattaggcc aggatctgct gacataatct agagtcgacc tgcagaagct																1321
tgcccgccat ggcccaactt gtttattgca gttataatg gttacaaata a																1372

<210> 2
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro

20

25

30

Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln Gly
35 40 45

Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp Pro
50 55 60

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
65 70 75 80

Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
85 90 95

Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
100 105 110

Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
115 120 125

Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr
130 135 140

Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg
145 150 155 160

Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile
165 170 175

Trp Tyr Lys Gln Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
180 185 190

Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
195 200 205

Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp
210 215 220

Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
225 230 235 240

Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
245 250 255

Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
260 265 270

Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
275 280 285

Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
290 295 300

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

Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg Val
325 330 335

Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gln Asn
340 345 350

Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu Tyr Gln
355 360 365

Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val
370 375 380

Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys
385 390 395

<210> 3
<211> 1090
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(981)

<400> 3
gtccaactgc accicgggtc tategatagg aggcctggaag aaaggacaga agtagctctg 60
gcctg atg ggg atc tta ctg ggc ctg cta ctg ctg ggg cac cta aca 108
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr
1 5 10
gtg gac act tat ggc cgt ccc atc ctg gaa gtg cca gag agt gta aca 156
Val Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr
15 20 25 30
gga cct tgg aaa ggg gat gtg aat ctt ccc tgc acc tat gac ccc ctg 204
Gly Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu
35 40 45
caa ggc tac acc caa gtc ttg gtg aag tgg ctg gla caa cgt ggc tca 252
Gln Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser
50 55 60
gac cct gtc acc atc ttt cta cgt gac tct tct gga gac cat atc cag 300
Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln
65 70 75
cag gca aag tac cag ggc cgc ctg cat gtg agc cac aag gtt cca gga 348
Gln Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly
80 85 90
gat gla tcc ctg caa ttg agc acc ctg gag atg gat gac cgg agc cac 396
Asp Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His
95 100 105 110
tac acg tgt gaa gtc acc tgg cag act cct gat ggc aac caa gtc gtg 444
Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val
115 120 125
aga gat aag att act gag ctg cgt gtc cag aaa cac tcc tca aag cta 492
Arg Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu
130 135 140
ctc aag acc aag act gag gca cct aca acc atg aca tac ccc ttg aaa 540
Leu Lys Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys
145 150 155
gca aca tct aca gtg aag cag tcc tgg gac tgg acc act gac atg gat 588
Ala Thr Ser Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp

160	165	170	
ggc tac ctt gga gag acc agt gct ggg cca gga aag agc ctg cct glc Gly Tyr Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val 175 180 185 190			636
ttt gcc atc atc ctc atc atc tcc ttg tgc tgt atg gtg gtt ttt acc Phe Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr 195 200 205			684
atg gcc tat atc atg ctc tgt cgg aag aca tcc caa caa gag cat glc Met Ala Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val 210 215 220			732
tac gaa gca gcc agg gca cat gcc aga gag gcc aac gac tct gga gaa Tyr Glu Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu 225 230 235			780
acc atg agg gtg gcc atc ttc gca agt ggc tgc tcc agt gat gag cca Thr Met Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro 240 245 250			828
act tcc cag aat ctg ggc aac aac tac tct gat gag ccc tgc ata gga Thr Ser Gln Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly 255 260 265 270			876
cag gag tac cag atc atc gcc cag atc aat ggc aac tac gcc cgc ctg Gln Glu Tyr Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu 275 280 285			924
ctg gac aca gtt cct ctg gat tat gag ttt ctg gcc act gag ggc aaa Leu Asp Thr Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys 290 295 300			972
agt gtc tgt taataatgcc ccattagccc aggatctgct gacataatct Ser Val Cys 305			1021
agagtcgacc tgcagaagct tggccgccat ggcccaactt gtttatigca gcttataatg gttacaata			1081 1090
<210> 4			
<211> 305			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 4			
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp 1 5 10 15			
Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro 20 25 30			
Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln Gly 35 40 45			
Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp Pro 50 55 60			
Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala 65 70 75 80			
Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val 85 90 95			
Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr 100 105 110			

Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
115 120 125

Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys His Ser Ser Lys Leu Leu Lys
130 135 140

Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr
145 150 155 160

Ser Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr
165 170 175

Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala
180 185 190

Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala
195 200 205

Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu
210 215 220

Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met
225 230 235 240

Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser
245 250 255

Gln Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gln Glu
260 265 270

Tyr Gln Ile Ile Ala Gln Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp
275 280 285

Thr Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val
290 295 300

Cys
305

<210> 5
<211> 1590
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> CDS
<222> (134)..(973)

<400> 5
gtccaactgc accctgggttc tatcgattcg aattcggcca cactggccgg atcctctaga 60
gatccctcga cctcgacca cgcgtccgag cagcaagagg atggaaggat gaatagaagt 120
agcttcaaatt agg atg gag atc tca tca ggc ttg ctg ttc ctg ggc cac 169
Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His
1 5 10
cta ata gtg ctg acc tat ggc cac ccc acc cta aaa aca cct gag agt 217
Leu Ile Val Leu Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser

15	20	25	
gig aca ggg acc tgg aaa gga gat gtg aag att cag tgc atc tat gat Val Thr Gly Thr Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp 30 35 40			265
ccc ctg aga ggc tac agg caa gtt ttg gtg aaa tgg ctg gla aga cac Pro Leu Arg Gly Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His 45 50 55 60			313
ggc tct gac tcc gtc acc atc ttc cta cgt gac tcc act gga gac cat Gly Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His 65 70 75			361
alc cag cag gca aag tac aga ggc cgc ctg aaa gtg agc cac aaa gtt Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val 80 85 90			409
cca gga gat gtg tcc ctc caa ata aat acc ctg cag atg gat gac agg Pro Gly Asp Val Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg 95 100 105			457
aat cac tal aca tgt gag gtc acc tgg cag act cct gat gga aac caa Asn His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln 110 115 120			505
gla ata aga gat aag atc att gag ctc cgt gtt cgg aaa tat aat cca Val Ile Arg Asp Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro 125 130 135 140			553
cct aga atc aat act gaa gca cct aca acc ctg cac tcc tct ttg gaa Pro Arg Ile Asn Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu 145 150 155			601
gca aca act ata atg agt tca acc tct gac ttg acc act aat ggg act Ala Thr Thr Ile Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr 160 165 170			649
gga aaa ctt gag gag acc att gct ggt tca ggg agg aac ctg cca atc Gly Lys Leu Glu Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile 175 180 185			697
ttt gcc ata atc ttc atc atc tcc ctt tgc tgc ata gla gct gtc acc Phe Ala Ile Ile Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr 190 195 200			745
ata cct tat atc ttg ttc cgc tgc agg aca ttc caa caa gag tat gtc Ile Pro Tyr Ile Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val 205 210 215 220			793
tat gga gtg agc agg gtg ttt gcc agg aag aca agc aac tct gaa gaa Tyr Gly Val Ser Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu 225 230 235			841
acc aca agg gtg act acc atc gca act gat gaa cca gat tcc cag gct Thr Thr Arg Val Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala 240 245 250			889
ctg att agt gac tac tct gat gat cct tgc ctc agc cag gag tac caa Leu Ile Ser Asp Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln 255 260 265			937
ata acc atc aga tca aca atg tct att cct gcc tgc tgaacacagt Ile Thr Ile Arg Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys 270 275 280			983
ttccagaaac taagaagttc ttgctactga agaaaataac atctgctaaa atgccccctac			1043
taagltcaagg tctactggcg taattacctg ttacttattt actacttgcc ttcaacatag			1103
ctttctccct ggcttccctt ctctcttagac aacctaaagt atctatctag tctgccaatt			1163
ctgggggccaat tgagaaaacc tgggtttggc taagaatata ctacatgcac ctcaagaaat			1223
ctagcttctg ggcttcaccc agaacaattt tcttcttagg gccttcacaa ctcttctcca			1283

aacagcagag aaattccata gcagtagagg ttctttatca tgcctccaga cagcgtgagt 1343
 ctccagtccta caaactcaga caagcacatg ggcttaggat tactctcttt tctctagggc 1403
 cagatgactt ttaattgata ttactattgc tacattatga atctaatagca catgtattct 1463
 ttgttgitta ataaatgttt aatcatgaca tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaag ggcgggccgcg 1523
 actctagagt cgacctgcag tagggataac agggtaataa gcttggccgc catggcccaa 1583
 ctgttt 1590

<210> 6
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 6
 Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His Leu Ile Val Leu
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser Val Thr Gly Thr
 20 25 30

Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gln Cys Ile Tyr Asp Pro Leu Arg Gly
 35 40 45

Tyr Arg Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His Gly Ser Asp Ser
 50 55 60

Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
 65 70 75 80

Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95

Ser Leu Gln Ile Asn Thr Leu Gln Met Asp Asp Arg Asn His Tyr Thr
 100 105 110

Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Ile Arg Asp
 115 120 125

Lys Ile Ile Glu Leu Arg Val Arg Lys Tyr Asn Pro Pro Arg Ile Asn
 130 135 140

Thr Glu Ala Pro Thr Thr Leu His Ser Ser Leu Glu Ala Thr Thr Ile
 145 150 155 160

Met Ser Ser Thr Ser Asp Leu Thr Thr Asn Gly Thr Gly Lys Leu Glu
 165 170 175

Glu Thr Ile Ala Gly Ser Gly Arg Asn Leu Pro Ile Phe Ala Ile Ile
 180 185 190

Phe Ile Ile Ser Leu Cys Cys Ile Val Ala Val Thr Ile Pro Tyr Ile
 195 200 205

Leu Phe Arg Cys Arg Thr Phe Gln Gln Glu Tyr Val Tyr Gly Val Ser
 210 215 220

Arg Val Phe Ala Arg Lys Thr Ser Asn Ser Glu Glu Thr Thr Arg Val
225 230 235 240

Thr Thr Ile Ala Thr Asp Glu Pro Asp Ser Gln Ala Leu Ile Ser Asp
245 250 255

Tyr Ser Asp Asp Pro Cys Leu Ser Gln Glu Tyr Gln Ile Thr Ile Arg
260 265 270

Ser Thr Met Ser Ile Pro Ala Cys
275 280

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(18)
<223> a、c、g或t

<220>
<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 7
atcctggaag tgcaannn

18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (16)..(18)
<223> a、c、g或t

<220>
<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 8
agtgtaacag gacctnnn

18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> a、c、g或t

<220>

<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 9

nnnggggaig lgaatctt

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (16)..(18)

<223> a、c、g或t

<220>

<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 10

aagtggcigc tacaannn

18

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> a、c、g或t

<220>

<221> modified_base

<222> (7)..(18)

<223> a、c、g或t

<220>

<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 11

nnntcannnn nnnnnnnnat ctlt

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> a、c、g或t

<220>

<221> modified_base

<222> (7)..(9)

<223> a、c、g或t

<220>

<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 12

nnncglnnnt ctctcggaga ccat

24

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<400> 13

ttctacgag actct

15

<210> 14

<211> 49

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(27)

<223> a、c、g或t

<220>

<221> modified_base

<222> (31)..(33)

<223> a、c、g或t

<220>

<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 14

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntac nnnggccgcc tgcattgtg

49

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<400> 15

caattgagca cccag

15

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(9)

<223> a、c、g或t

<220>

<221> modified_base
 <222> (13)..(15)
 <223> a、c、g或t

<220>
 <221> modified_base
 <222> (31)..(33)
 <223> a、c、g或t

<220>
 <223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 16
 nnnnnnnng acnnnagcca ctacacgtgt nnn

33

<210> 17
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)..(12)
 <223> a、c、g或t

<220>
 <223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 17
 gtcacctggn nn

12

<210> 18
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<400> 18
 actcctgatg gcaac

15

<210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>
 <221> modified_base
 <222> (16)..(18)
 <223> a、c、g或t

<220>
 <223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 19
 actcctgatg gcaacnnn

18

<210> 20
 <211> 30

<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成寡核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (4)..(15)
<223> a、c、g或t

<220>
<223> 關於取代及較佳實施例之詳細說明，請參見所申請之專利說明書

<400> 20
gtcnnnnnnn nnnnnattac tgagctccgt

30

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 未知之說明：未知野生型序列

<400> 21
Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro Trp Lys Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 22
Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Trp Lys Gly
1 5 10

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 23
Pro Trp Ser Val Thr Gly Pro Phe Lys Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 24
Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Phe Lys Gly
1 5 10

<210> 25
<211> 10
<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成一致序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Trp或Phe

<400> 25

Pro Tyr Ser Val Thr Gly Pro Xaa Lys Gly
1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知之說明：未知野生型序列

<400> 26

Gln Arg Gly Ser Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 27

Gln Arg Asp Ser His Phe Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成一致序列

<400> 28

Gln Arg Asp Ser His Phe Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser
1 5 10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知之說明：未知野生型序列

<400> 29

Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Gln Gly
1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 30

Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ile	Gln	Ile	Ala	Lys	Tyr	Arg	Gly
1				5					10			

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 31

Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ile	Gln	Lys	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly
1				5					10			

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 32

Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ile	Gln	Ile	Ala	Lys	Tyr	Gln	Gly
1				5					10			

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成一致序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Arg或Gln

<400> 33

Ser	Ser	Gly	Asp	His	Ile	Gln	Ile	Ala	Lys	Tyr	Xaa	Gly
1				5					10			

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 未知之說明：未知野生型序列

<400> 34

Leu	Glu	Met	Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Gln
1				5					10					15	

Thr

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 35

Leu	Glu	Cys	Asp	Asp	Gln	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Tyr
1				5					10					15	

Thr

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 36

Leu	Glu	Cys	Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Arg
1				5					10					15	

Thr

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 37

Leu	Glu	Tyr	Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Lys
1				5					10					15	

Thr

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 38

Leu	Glu	Tyr	Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Lys
1				5					10					15	

Thr

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 39

Leu	Glu	Tyr	Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Arg
1				5					10					15	

Thr

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 40
Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 41
Leu Glu Tyr Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
1 5 10 15

Thr

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 42
Leu Glu Tyr Asp Asp Lys Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
1 5 10 15

Thr

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 43
Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Phe
1 5 10 15

Thr

<210> 44

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 44
 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Tyr
 1 5 10 15

Thr

<210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 45
 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
 1 5 10 15

Thr

<210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 46
 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
 1 5 10 15

Thr

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 47
 Leu Glu Trp Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln
 1 5 10 15

Thr

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 48
 Leu Glu Phe Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Lys
 1 5 10 15

Thr

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 49
 Leu Glu Phe Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Arg
 1 5 10 15

Thr

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成一致序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr、Trp或Phe

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Lys或Arg

<400> 50
 Leu Glu Xaa Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Xaa
 1 5 10 15

Thr

<210> 51
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> 未知之說明：未知野生型序列

<400> 51
 Asn Gln Val Val Arg Asp Lys Ile
 1 5

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 52
Asn Arg Val Val Arg Asp Asn Ile
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 53
Asn Arg Val Val Arg Asp Asp Ile
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 54
Asn Arg Val Val Arg Asp Gln Ile
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 55
Asn Arg Val Ile Arg Asp Gln Ile
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 56
Asn Arg Val Ile Arg Asp His Ile
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 57
Asn Lys Val Ile Arg Asp Gln Ile
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 58

Asn Lys Val Ile Ala Asp Asn Ile
1 5

<210> 59

<211> 8

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 59

Asn Lys Val Ile Ser Asp Asn Ile
1 5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 60

Asn Gln Val Ile Arg Ser Asp Ile
1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 61

Asn Lys Val Thr Arg Asp Asn Ile
1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 62

Asn Lys Val Val Arg Asp Gln Ile
1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 63

Asn Lys Val Val Arg Asp Asn Ile
1 5

<210> 64

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 64
 Asn Lys Val Val Arg Asp Asp Ile
 1 5

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 65
 Asn Lys Val Val Arg Ser Asp Ile
 1 5

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成肽

<400> 66
 Asn Lys Val Val Ser Asp Asp Ile
 1 5

<210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 人造序列之說明：合成一致序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Lys或Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Val或Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gln、Asp或Asn

<400> 67
 Asn Xaa Val Xaa Arg Asp Xaa Ile
 1 5

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98115004

※申請日：98.5.6

※IPC 分類：~~C07K~~ A61K^{38/16} (2006.01)

A61P^{37/00} (2006.01)

A61P^{27/02} (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

親和力成熟之CRIg變體

AFFINITY MATURED CRIg VARIANTS

二、中文發明摘要：

本發明係關於親和力成熟之CRIg變體。特定言之，本發明係關於相較於對C3，對C3b之結合親和力增強且保持對C3b之選擇性結合的CRIg變體。

三、英文發明摘要：

The present invention concerns affinity matured CRIg variants. In particular, the invention concerns CRIg variants having increased binding affinity to C3b and retaining selective binding to C3b over C3.

七、申請專利範圍：

1. 一種CRIg變體，其在選自由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之E8-K15、R41-T47、S54-Q64、E85-Q99及Q105-K111組成之群的區域中包含胺基酸取代。
2. 如請求項1之變體，其結合C3b或其片段之選擇性超過C3。
3. 如請求項1之變體，其相較於SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg而言對C3b具有增強之結合親和力。
4. 如請求項3之變體，其中該結合親和力增強至少2倍。
5. 如請求項3之變體，其中該結合親和力增強至少5倍。
6. 如請求項3之變體，其中該結合親和力增強至少10倍。
7. 如請求項3之變體，其中該結合親和力增強至少90倍。
8. 如請求項1之變體，其為比SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg更強的替代補體路徑抑制劑。
9. 如請求項8之變體，其比SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg強至少2倍。
10. 如請求項8之變體，其比SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg強至少5倍。
11. 如請求項8之變體，其比SEQ ID NO: 2之天然序列人類CRIg強至少10倍。
12. 如請求項1之變體，其在選自由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之位置8、14、18、42、44、45、60、64、86、99、105及110組成之群的一或多個胺基酸位置包含胺基酸取代。

13. 如請求項1之變體，其在SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之胺基酸位置60、64、86、99、105及110的一或多者包含胺基酸取代。
14. 如請求項1之變體，其包含一或多個選自由以下組成之群之取代：E8W、W14F、E84Y/W14F；P45F；G42D/D44H/P45F；Q60I；Q64R；Q60I/Q64R；M86Y；M86W、M86F、M86W/Q9R；M86F/Q99R；K110D、K11N；Q105R/K110N；Q105R/K110Q；及Q105K/K110D。
15. 如請求項1之變體，其包含一或多個選自由以下組成之群之取代：Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/E8Y；Q60I/Q64R/G42D；Q60I/Q64R/P45F；Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F；Q60I/Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/Q105R；Q60I/Q64R/Q105K；Q60I/Q64R/K110N；Q60I/Q105R/K110N；M86Y/E8Y；M86Y/G42D/D44H/P45F；M86Y/P45F；M86Y/G42D/D44H/P45F；及M86Y/Q99K/M86Y/Q99R/M86Y/Q105R/M86Y/Q105K/M86Y/Q105R/K110N。
16. 如請求項1之變體，其包含一或多個選自由以下組成之群之取代：Q60I；Q64R；Q60I/Q64R；M86Y；Q99L；Q105K/K110D；E8W/Q105R/K110N；Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/E8Y；Q60I/Q64R/G42D；Q60I/Q64R/P45F；Q60I/Q64R/G42D/D44H/P45F；Q60I/Q64R/M86Y；Q60I/Q64R/Q105R；Q60I/Q64R/Q105K；Q60I/Q64R/K110N；M86Y/P45F；及M86Y/Q105K。
17. 如請求項1之變體，其包含Q60I/Q64R/M86Y或Q60I/

Q64R/G42D/D44H/P45F取代。

18. 一種嵌合分子，其包含如請求項1至17中任一項之變體。
19. 如請求項18之嵌合分子，其為免疫黏附素。
20. 如請求項19之嵌合分子，其中該CRIg變體比SEQ ID NO: 2之全長CRIg短。
21. 如請求項20之嵌合分子，其包含CRIg胞外域。
22. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至17中任一項之CRIg變體與醫藥學上可接受之賦形劑混合。
23. 一種醫藥組合物，其包含如請求項19之免疫黏附素與醫藥學上可接受之賦形劑混合。
24. 一種如請求項1至17中任一項之CRIg變體或包含該變體之免疫黏附素的用途，其係用於製備用以預防或治療需要該治療之個體之補體相關疾病或病狀的藥劑。
25. 如請求項24之用途，其中該補體相關疾病為發炎疾病或自體免疫疾病。
26. 如請求項25之用途，其中該補體相關疾病係選自由以下組成之群：類風濕性關節炎(RA)、成人呼吸窘迫症候群(ARDS)、缺血及再灌注後之遠端組織損傷、心肺繞道手術期間之補體活化、皮膚炎、天疱瘡、狼瘡腎炎以及所致之絲球體腎炎及血管炎、心肺繞道術、心臟麻痺誘發之冠脈內皮功能障礙、II型膜增生性絲球體腎炎、IgA腎病、急性腎衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂症候群、年齡相關性黃斑變性、葡萄膜炎、糖尿病性視網膜病變、同

種異體移植、超急性排斥反應、血液透析、慢性阻塞性肺病症候群(COPD)、哮喘、吸入性肺炎、蕁麻疹、慢性特發性蕁麻疹、溶血性尿毒症候群、子宮內膜異位、心因性休克、缺血再灌注損傷及多發性硬化(MS)。

27. 如請求項25之用途，其中該補體相關疾病係選自由以下組成之群：發炎性腸病(IBD)、全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎、青少年慢性關節炎、脊椎關節病、全身性硬化症(硬皮症)、特發性發炎性肌病(皮肌炎、多發性肌炎)、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、全身性血管炎、肉狀瘤病、自體免疫溶血性貧血(免疫性全血球減少症、陣發性夜間血紅素尿症)、自體免疫血小板減少症(特發性血小板減少性紫癍、免疫介導性血小板減少症)、甲狀腺炎(格雷氏病(Grave's disease)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、青少年淋巴球性甲狀腺炎、萎縮性甲狀腺炎)、糖尿病、免疫介導性腎病(絲球體腎炎、腎小管間質腎炎)、中樞及周邊神經系統之脫髓鞘疾病(諸如多發性硬化症)、特發性多發性神經病、肝膽疾病(諸如傳染性肝炎(A、B、C、D、E型肝炎及其他非嗜肝病毒)、自體免疫慢性活動性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、肉芽腫性肝炎及硬化性膽管炎)、發炎及纖維化肺疾病(例如囊腫性纖維化)、麩質敏感性腸病變、惠普爾氏病(Whipple's disease)、自體免疫或免疫介導性皮膚病(包括大皰性皮膚病、多形性紅斑及接觸性皮炎)、牛皮癬、肺之過敏性疾病(諸如嗜伊紅性肺炎、特發性肺纖

維化及過敏性肺炎)、移植相關疾病(包括移植物排斥反應、移植物抗宿主疾病)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)、陣發性夜間血紅素尿症、遺傳性血管水腫、動脈粥樣硬化症及II型膜增生性絲球體腎炎。

28. 如請求項25之用途，其中該補體相關疾病為類風濕性關節炎(RA)。

29. 如請求項25之用途，其中該補體相關疾病為補體相關眼睛病狀。

30. 如請求項29之用途，其中該補體相關眼睛病狀係選自由以下組成之群：年齡相關性黃斑變性(AMD)之所有階段、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血相關視網膜病、眼內炎及其他眼內新生血管疾病。

31. 如請求項30之用途，其中該眼內新生血管疾病係選自由以下組成之群：糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、逢希伯-林道疾病(von Hippel-Lindau disease)、眼組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜新生血管及視網膜新生血管。

32. 如請求項29之用途，其中該補體相關眼睛病狀係選自由以下組成之群：年齡相關性黃斑變性(AMD)、脈絡膜新生血管(CNV)、糖尿病性視網膜病變(DR)及眼內炎。

33. 如請求項32之用途，其中該AMD為濕性AMD。

34. 如請求項32之用途，其中該AMD為乾性或萎縮性AMD。

35. 如請求項24之用途，其中該個體為哺乳動物。

36. 如請求項35之用途，其中該哺乳動物為人類。

37. 一種如請求項1至17中任一項之CRIg變體或包含該變體之免疫黏附素的用途，其係用於製備用以抑制哺乳動物中C3b補體片段產生的藥劑。
38. 一種如請求項1至17中任一項之CRIg變體或包含該變體之免疫黏附素的用途，其係用於製備用以選擇性抑制哺乳動物體內之替代補體路徑的藥劑。

八、圖式：

```

1  CCAACTGCAC CTGGTTCTA TGGATAGGAG GCTGGAAGAA AGCAGAGAAG TAGCTCTGCC TGTGATGEGG ATCTTACTEG GCCTGCTACT CCTGGGGCAC
   GGTGAGGTG GAGCCAAAGAT AGCTATCCTC CGAOCCTTCT TCGTGTCTTC ATGAGAGACG ACACTACCCC TAGAATGACC CCGAAGATGA GGAACCCCGTC
   1
      M G I L L G L L L L G H
      *MET

101 CTAAACAGTGG ACACTTATGG CCGTCCCATC CTGGAAGTGC CAGAGAGTGT AACAGGACCT TGGAAAGGGG ATGTGAATCT TCCCTGCCACC TATGACCCCC
   GATTGTCAAC TGTGAATACC GGCAGGGTAG GACCTTCACG GTCTCTACA TTGTCCTGGA ACCTTTCCCC TACACTAGA AGGAGGTGG ATACTGEGGG
   13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P L

201 TCAAGGCTA CACCAAGTC TTGGTGAAGT GGCTGGTACA AGTGGCTCA GACCTGTGCA CCATCTTTCT AGGTACTCT TCTGGAGACC ATATCCAGCA
   ACGTTCGAT GTGGTTTCAG AACCACTTCA CCGACCATGT TGCACGAGT CTGGGACAGT GGTAGAAGA TGCACCTGGA AGACCTCTGG TATAGGTGCT
   47 Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q

301 GGCAAAGTAC CAGGCCCCGC TGCATGTGAG CCACAAGGTT CCAGGAGATG TATCCCTCCA ATTGAGCACC CTGGAGATGG ATGACCGGAG CCACTACAAG
   CGTTTCATG GTCCCGGGCG AGGTACACTC GGTGTTCCAA GGTCTCTAC ATAGGAGGT TAACTCGTGG GACCTTACC TACTGGCCTC GGTGATGTGC
   80 A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T

401 TGTGAAGTCA CTTGGCAGAC TCGTGATGGC AACCAAGTGG TGAGAGATAA GATTACTGAG CTCGGTGTCC AGAACTCTC TGTCTCCAAG CCCACAGTGA
   ACATTTCAG GGACCGTCTG AGGACTACCG TTGGTTCAGC ACTCTCTATT CTATGACTC GAGGCACAGG TCTTTGAGAG ACAGAGGTTT CCGTGTCACT
   113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V T

501 CAACTGGCAG CGGTTATGGC TTCAOAGTGC CCAAGGAAAT GAGGATTAGC CTTCAATGCC AGGCTCGGGG TTCTCCTCCC ATCAGTTATA TTGGTATAA
   GTTGACCGTC GCCAATACCG AAGTCCACCG GGGTCCGTTA CTCCTAATGG GAAGTTACGG TCGAGCCCCC AAGAGGAGGG TAGTCAATAT AAACCATATT
   147 T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K

```

圖1A

601 GCAACAGACT AATAACCAGG ACCCATCAA AGTAGCAACC CTAAGTACCT TACTCTTCAA GCGTGGGTG ATAGCGACT CAGGCTCCTA TTTCTGCACI
 CGTTGCTGA TTATTGGTCC TTGGGTAGTT TCATCGTTGG GATTTCATGGA ATGAGAAGTT CCGAAGCCAC TATCGGCTGA GTGAGGAT AAAGACGTGA
 180 Q Q T N N Q E P I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T

 701 GCCAAGGCCC AGTTGGCTC TGACGACAC AGGACATTTG TGAAGTTTGT GGTCAAAGAC TCCTCAAAGC TACTCAAAGC CAAGACTGAG GCACCTACAA
 CCGTTCCCGG TCCAACGAG ACTGTGTG TGCTGTAAAC ACTTCAAACA CCAGTTTCTG AGGAGTTTCG ATGAGTTCTG GTTCTGACTC CGTGGATGTT
 213 A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E A P T T

 801 CCATGACATA CCGTTGAAA GCAACATCTA CAGTGAAGCA GTCTGGGAC TGGACCACTG ACATGATGG CTACCTTGGG GAGACCAGTG CTGGCCAGG
 GGTACTGTAT GGGAACTTT CGTTGTAGAT GTCACTTGGT CAGGACCTG ACCTGGTGAC TGTAAGTACC GATGGAACCT CTCTGGTCAC GACCGGTCC
 247 M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G

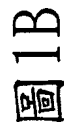
 901 AAAGAGCCTG CCTGCTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGCTGTA TGGTGTGTTT TACCATGGCC TATATCATGC TCTGTGGAA GACATCCCAA
 TTTCTGGAC GGACAGAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAG AACAGACAT ACCACCAAAA ATGGTACCGG ATATAGTAGS AGACAGCCTT CTGTAGGGTT
 280 K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q

 1001 CAAGAGCATG TCTAGGAGC AGCCAGGCA CATGCCAGAG AGCCAAAGCA CTCTGGAGAA ACCATGAGGG TGGCATCTT CGCAAGTGCC TGCTCCAGTG
 GTTCTGTAC AGATGCTTOS TCGGTCCGT GTAGGCTCTC TCGGTGCT GAGACCTCTT TGGTACTCC ACCGGTAGAA GGGTTCAAGG ACGAGGTAC
 313 Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F A S G C S S D

 1101 ATAGCCCAAC TTCCAGAA CTGGCCAACT ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGCCCCAG ATCAATGGCA ACTAGCCCG
 TACTGGTTG AAGGTCTTA GACCGTTGT TGATGAGACT ACTCGGAGG TATCCTGTCC TCATGGTCTA GTAGCGGTG TAGTTACCGT TGATGGCGGC
 347 E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q I N G N Y A R

 1201 CCTGCTGGAC ACAGTTCTC TGGATTATGA GTTCTGGCC ACTGAGGCA AAGTGCTG TTAANAATCC CCAATTAGCC CAGGATGTC TGACATAATC
 GGACGACTG TGTCAAGGAG ACCTAATACT CAAGACCGG TGACTCCGT TTTCACAGAC AATTTTAAOS GGGTAATCCS GTCTAGAGG ACTGTATTAG
 380 L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

 1301 TAGAGTGGAC CTGCAGAGC TTGGCCGCA TGGCCAACT TGTTATTGC AGCTTAAAT GGTACAAAT AA
 ATCTAGCTG GAGTCTTOS AACCGCGGT ACCGGTTGA ACAATAAGC TCGAATATTA CCAATGTTTA TT



1 GTCCAACITGC ACCTCGGTTC TATCGATAGG AGCGCTGGAG AAAGGACAGA AGTAGCTCTG GCTGTGATGG GGATCTTACT GGGCCCTGCTA CTCCTGGGCG
 CAGGTIGACG IGGAGCCAAG ATAGCTATCC TCGGACCTTC TTCCCTGCTC TCATOGAGAC CGACACTACC CCTAGAAATGA CCGCGACCAT GAGGACCCCG
 1 M G I L L G L L L L G H
 101 ACCTAACAGT GGACACTTAT GCGCGTCCCA TCTTGGAGT GCGAGAGAGT GTACAGGAC CTTCGAAAGG GGATGTGAAT CTTCCTTCCA CCTATGACCC
 TGGATTGTCA CCTGTGAATA CCGGCAGGGT AGGACCTTCA CGGTCTCTCA CATTTGCCIG GAACCTTTCC CCTACACTTA GAAGGAGCGT GGATACTGGG
 13 L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P C T Y D P
 201 CCTGCAAGGC TACACCAAG TCTTGGTGAA GTGCTGGTA CAAGTGGCT CAGACCTGT CACCATCTTT CTAGTGACT CTCTGGAGA CCATATCCAG
 GGAGCTCCG ATGTGGTTC AGAACCACTT CACCGACCAT GTTCGACAGA GTCTGGGACA GTGTAGAAA GATGCACTGA GAAGACCTCT GGTATAGGTC
 46 L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V I I F L R D S S G D H I Q
 301 CAGGCAAGT ACCAGGCGG CCTGCATGTG AGCCACAAGG TTCCAGGAGA TGTATCCCTC CAATTGAGCA CCGTGAGAT GGATGACGG AGCCACTACA
 GTCCGTTTCA TGGTCCCGC GGAAGTACAC TCGTGTTC AGGTCTCT ACATAGGAG GTTAACCTGT GGGACCTCTA CCTACTGCGC TCGGTGATGT
 79 Q A K Y Q G R L H V S H K V P G D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T
 401 CGTGTGAAGT CACCTGGCAG ACTCCTGATG GCAACCAAGT CGTGAGAGT AAGATTACIG AGCTCGTGT CCAGAACAC TCCTCAAGC TACTCAAGAC
 GCACACTTCA GTGACCGTC TGAGGACTAC CGTTGGTTCA GCACCTCTA TTCTAATGAC TCGAGGACA GGTCTTTGTG AGGAGTTTG ATGAGTTCTG
 113 C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K H S S K L L K T
 501 CAAGACTGAG GCACCTACAA CCATGACATA CCGCTTGAAA GCAACATCTA CAGTGAACA GTCCTGGGAC TGGACCACTG ACATGGATGG CTACCTTGG
 GTTCTGACTC CGTGGATGTT GGTACTGTAT GGGGAACCTT CGTTGTAGAT GTCACTTGT GTCACTTGT CAGGACCCCTG ACCTGGTGAC TGTACCTACC GATGGAACCT
 146 K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G

▲此處開始插入

圖2A

601 GAGACCAGTG CTGGCCAGG AAGAGCCTG CCTGTCTTTG CCATCATCCT CATCATCTCC TTGTGTGTA TGGTGGTTT TACCATGGCC TATATCATGC
 CTCTGGTCAC GACCGGGTCC TTCTCGGAC GGACAGAAC GGTAGTAGGA GTAGTAGAGG AACACGACAT ACCACCAGAA ATGGTACCGG ATATAGTAGC
 179 E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L

 701 TCTGTGGAA GACATGCCAA CAAGAGCATG TCTACGAGC AGCCAGGCA CATGCCAGAG AGGCCAAGCA CTCTGGAGAA ACCATGAGGG TGGCCATCTT
 AGACAGCCIT CTGTAGGGTT GTTCTGGTAC AGATGCTTGG TGGTGGTGC GTAGGGTCTC TCCGGTTGCT GAGACCTCTT TGGTACTGCC ACCGGTAGAA
 213 C R K T S Q Q E H V Y E A A R A H A R E A N D S G E T M R V A I F

 801 GCGAAGTGGC TGGTCCAGTG ATGAGCCAAC TTCCAGAAAT CTGGCAACA ACTACTCTGA TGAGCCCTGC ATAGGACAGG AGTACCAGAT CATGCCCCAG
 GGGTTCAACG ACGAGGTCAC TACTGGGTTG AAGGGTCTTA GACCGTTGT TGATGAGACT ACTGGGAGG TATCTGTCTC TCATGGTCTA GTAGCGGGTC
 245 A S G C S S D E P T S Q N L G N N Y S D E P C I G Q E Y Q I I A Q

 901 ATCAATGGCA ACTAGCCCG CCTGCTGGAC ACAGTTCTC TGGATTATGA GTTCTGGCC ACTGAGGGCA AAGTGTCTG TTAAAAATGC OCCATTAGGC
 YAGTTACGGT TGATGGGGC GGACGACCTG TGTCAGGAG ACCTAATACT CAAGACCGG TGACTCCGGT TTTCACAGAC AATTTTACG GGGTAATCCG
 279 I N G N Y A R L L D T V P L D Y E F L A T E G K S V C O

 1001 CAGGATCTGC TGACATAATC TAGAGTGAC CTGCAGAGC TTGGCCGCA TGGCCCAACT TGTTATTGC AGCTTATAAT GGTACAATA
 GTCTAGACG ACTGTATTAG ATCTCAGCTG GAGGTCTTGG AAGCGGGGT ACCGGGTTGA ACAATAAGG TCGAATATTA CCAATGTTAT

*此處插入結束

圖2B

1 GTCCAACTGC ACCTCGTTC TATGATTGG AATTGSCCA CACTGGCCG ATCTCTAGA GATCCCTGA CCTCGAOCOA CGGCTOCGAG CAGCAAGAGG
 CAGGTTGAOG TGGAGCCAAG ATAGCTAAGC TTAAGCCGG GTGACCGCG TAGGAGATCT CTAGGAGCT GGAGCTGGGT GGCAGGCTC GTGTTCTCC

101 ATGGAAGGAT GAATAGAAGT AGCTTCAAT AGGATGGAGA ICTATCAGG CTTCCTGTC CTGGGCCACC TAATAGTCT CACCTATGSC CACCCCACCC
 TACCTTCCCTA CTTATCTTCA TCGAAGTTTA TCGTACCTCT AGAGTAGTCC GAAGGACAAG GACCCGCTGG ATTATCAOGA GTGGATACCG GTGGGTGGG

1 M E I S S G L L F L G H L I V L T Y G H P T L
 *MET

201 TAAAAACACC TGAGAGTGTG ACAGGACCT GGAAGGAGA TGTGAAGATT CAGTGCATCT ATGATCCCT GAGAGCTAC AGGCAAGTTT TGGTGAATG
 ATTTTGTGG ACTCTCACAC TGTCCCTGGA CCTTTCCTCT ACACCTCTAA GTCAAGTAGA TACTAGGGA CTCTCCGATG TCGTTCAAA ACCACTTTAC

24 K T P E S V T G T W K G D V K I Q C I Y D P L R G Y R Q V L V K W

301 GCTGTAAGA CACGGCTCTG ACTCGGTCAC CATCTTCTTA CGTGACTCCA CTGGAGACCA TATCCAGCAG GCAAAGTACA GAGGCCGCT GAAAGTGAGC
 CGACCATCT GTGCGAGAC TGAGGAGTG GTAGAAGGAT GCACCTGAGT GACCTCTGCT ATAGGCTGT GGTTCATGT CTCGCGGGA CTTTCACTGG

57 L V R H G S D S V T I F L R D S T G D H I Q Q A K Y R G R L K V S

401 CACAAAGTTC CAGGAGATGT GTCCCTCAA ATAAATACC TGCAGATGA TGACAGGAAT CACTATACAT GTGAGGTAC CTGCAGACT CCTGATGGAA
 GTGTTTCAAG GTCTCTACA CAGGAGGTT TATTTATGG ACGTGTACCT ACTGTCTTA GTGATATGTA CACTCCAGTG GACGCTGTA GCACTACCTT

90 H K V P G D V S L Q I N T L Q M D D R N H Y T C E V T W Q T P D G N

圖3A

501 ACCAAGTAAT AAGACATAAG ATCATTTGAGC TCGTGTGTGG GAAATATAAT CCACCTAGAA TCAATACTGA ACCACCTACA AOCCTGCACT CCTCTTTGGA
TGGTTCAATTA TTCTCTATTC TAGTAACCTGG AGGCACAAGC CTTTATATTA GGTGGATCTT AGTTATGACT TCGTGGATGT TGGGACGTGA GCAGAAACCT
124 Q V I R D K I I E L R V R K Y N P P R I N T E A P T T L H S S L E

601 AGCAACAACCT ATAATGAGTT CAACCTCTGA CTTGACCACT AATGGAGCTG GAAACTTGA GGAGACCACTT GCTGGTTTCAG GGAGGAACCT GCCAATCTTT
TOGTTGTTGA TATTACTCAA GTTGGAGACT GAACTGGTGA TTACCCTGAC CTTTGAACCT CCTCTGGTAA OGACCAAGTC CCTCCTTGGGA CGGTTAGAAA
157 A T T I M S S T S D L T T N G T G K L E E T I A G S G R N L P I F

701 GCCATAATCT TCATCATCTC CCTTTGCTGC ATAGTAGCTG TCACCATACC TTATATCTTG TTCGCTGCA GGACATTCCA ACAAGAGTAT GTCTATGGAG
CGGTATTAGA AGTAGTAGAG GGAACGAGG TATCATGAG AGTGATATGG AATATAGAAC AAGGCGAGCT CCTGTAAGGT TGTCTTCATA CAGATACCTC
190 A I I F I I S L C C I V A V T I P Y I L F R C R T F Q Q E Y V Y G V

801 TGACGAGGT GTTGGCCAGG AAGACAAGCA ACTCTGAAGA AACACAAGG GTGACTACCA TCGCAACTGA TGAACGAGAT TCCGAGGCTC TGATTAGTGA
ACTGCTCCA CAAAGGCTCC TTCTGTGTGT TGAGACTTCT TTGGTGTCC CACTGATGCT AGCGTTGACT ACTTGGTCTA AGCGTCCGAG ACTAATCACT
224 S R V F A R K T S N S E E T T R V T T I A T D E P D S Q A L I S D

901 CTACTCTGAT GATCCTTGCC TCAGCCAGGA GTACCAATA ACCATCAGAT CAACAATGTC TATTCCTGCC TGCTGAACAC AGTTTCCAGA AACTAGAAG
GATGAGACTA CTAGGAACGG AGTGGTCTCT CATGGTTTAT TGGTAGTCTA GTTGTACAG ATAAGGAGGG AGGACTTGTG TCAAAGGTCT TTGATTCTTC
257 Y S D D P C L S Q E Y Q I T I R S T M S I P A C O

1001 TTCTTGCTAC TGAAGAAAAT AACATCTGCT AAAATGCCCC TACTAGTCA AGGTCTACTG GCGTAATTAC CTGTTACTTA TTTACTACTT GCCTTCAACA
AAGAACGATG ACTTCTTTTA TTGTAGACGA TTTTACGGGG ATGATTTCAGT TCCAGATGAC CGCATTAAATG GACAATGAAT AAATGATGAA CGGAAGTTGT

圖3B

1101 TAGCTTTCTC CCTGGCTTCC TTCTTCTTA GACAACCTAA AGTATCTATC TASTCTGCCA ATTCTGSECC CATTGAGAAA TCTTGGSTTT GCCTAAGAAAT
ATCGAAAGAG GGACCGAAGG AAAGAAGAAT CTGTTGGATT TCATAGATAG ATCAGACGGT TAAGACCCCG GTAACCTTTT AGGACCCAAA CCGATTCTTA

1201 ATACTACATG CACCTCAAGA AATCTAGCTT CTGSECTTCA CCCAGAACAA TTTTCTTCTT AGGEOCTTCA CACTCTTCT CCAAACAGCA GAGAAATTCC
TATGATGTAC GTGAGTTCT TTAGATCGAA GACCGGAAGT GGGTCTTGT AAAGAAGGA TCCCGGAAGT GTTGAGAAGA GGTTTGTGCT CTCCTTAAGG

1301 ATACAGTAG AGGTTCTTTA TCATGCTTCC AGACAGGCTG AGTCTCAGT CTACAACTC AGACAAGCAC ATGGTCTAG GATTACTCCT CTTTCTCTAG
TATGCTCATC TCCAAGAAAT AGTAAGGAGG TCTGTGCEAC TCAGATCAG GATGTTTGAG TCTGTGCTG TACCCAGATC CTAATGAGGA GAAAGAGATC

1401 GGCCAGATGA CTTTAAATTG ATATTACTAT TGCTACATTA TGAATCTAAT GCACATGTAT TCCTTTGTG TTAATAAATG TTTAATCATG ACATCAAAAA
CCGCTCTACT GAAMATTAC TATAATGATA AGCATGTAAT ACTTAGATTA CGTGACATA AGAAACAAC AATTATTTAC AAATTAGTAC TGTAGTTTTT

1501 AAAAAAAAAA AAGGGGGGC GGACTCTAG AGTGGACTG CAGTAGGAT AACAGGTAA TAAGCTTGGC CGCCATGGCC CAACTTGTTT
TTTTTTTTTT TTCCGGCGCG CCGTGAGATC TCAGCTGGAC GTCATCCCTA TTGTCCCAT ATTGGAACCG GGCTACCGG GTTGAACAAA
*此處接續pRK5

圖3C

旨在產生更強之抑制劑的CRIg之基於結構之親和力成熟

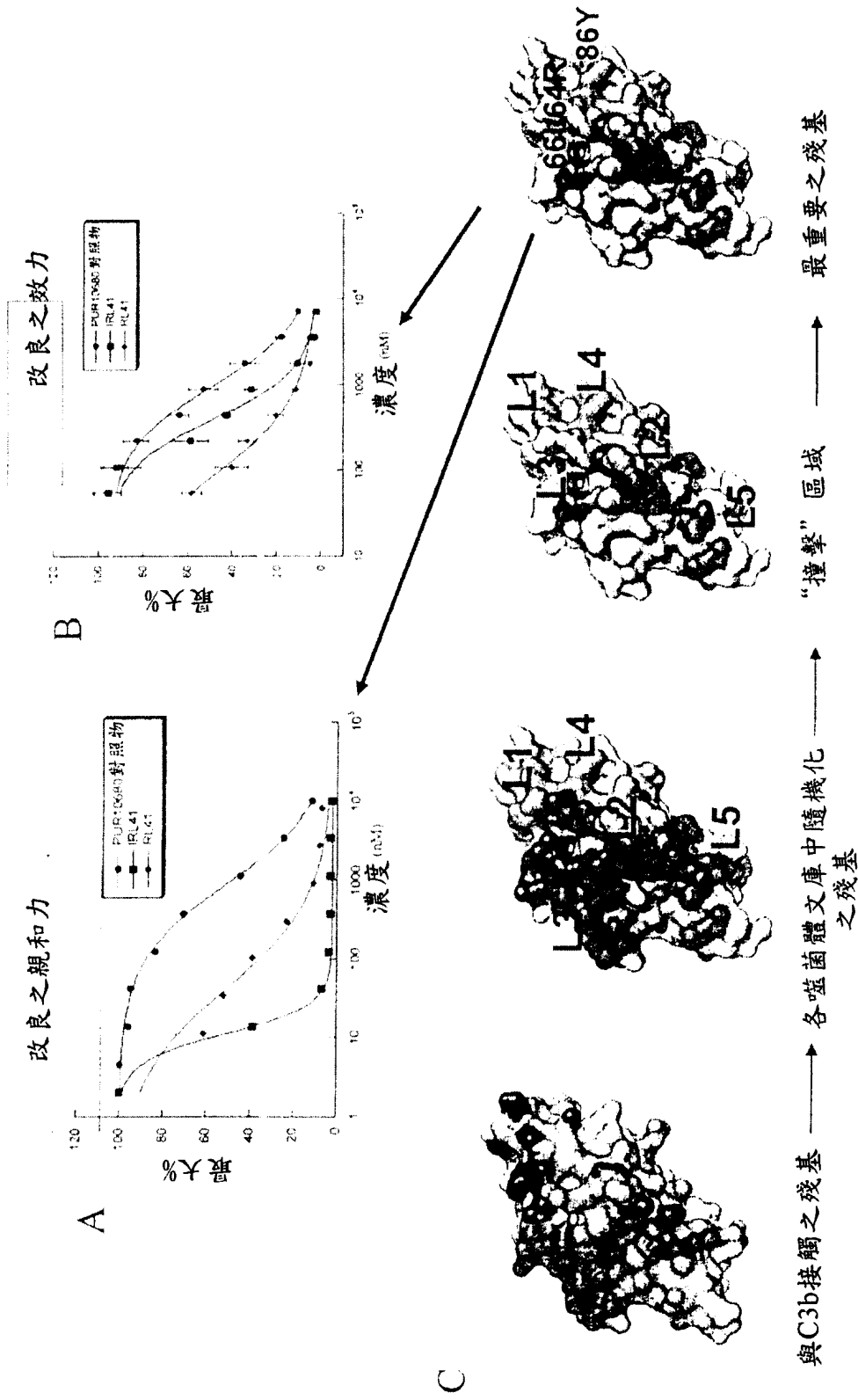
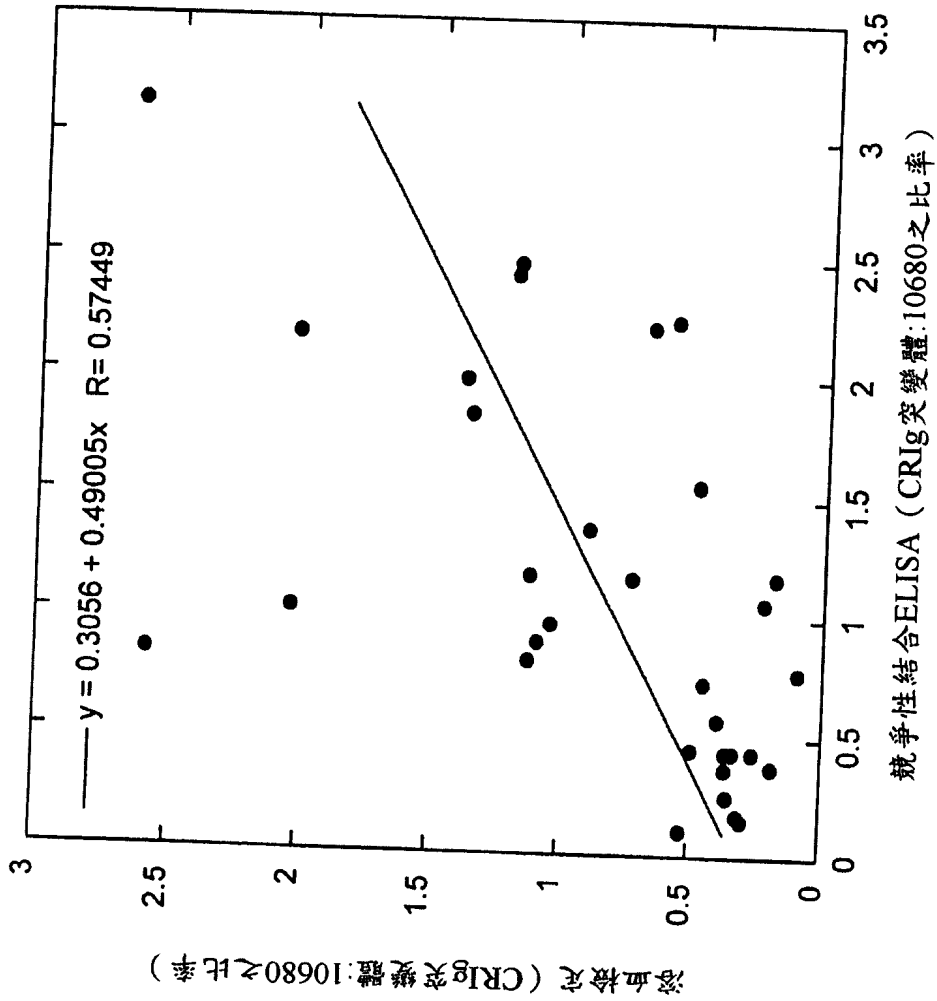


圖4



競爭性ELISA與溶血檢定之間的相關性

圖5

Q64R/M86Y CRIg突變體之改良之親和力

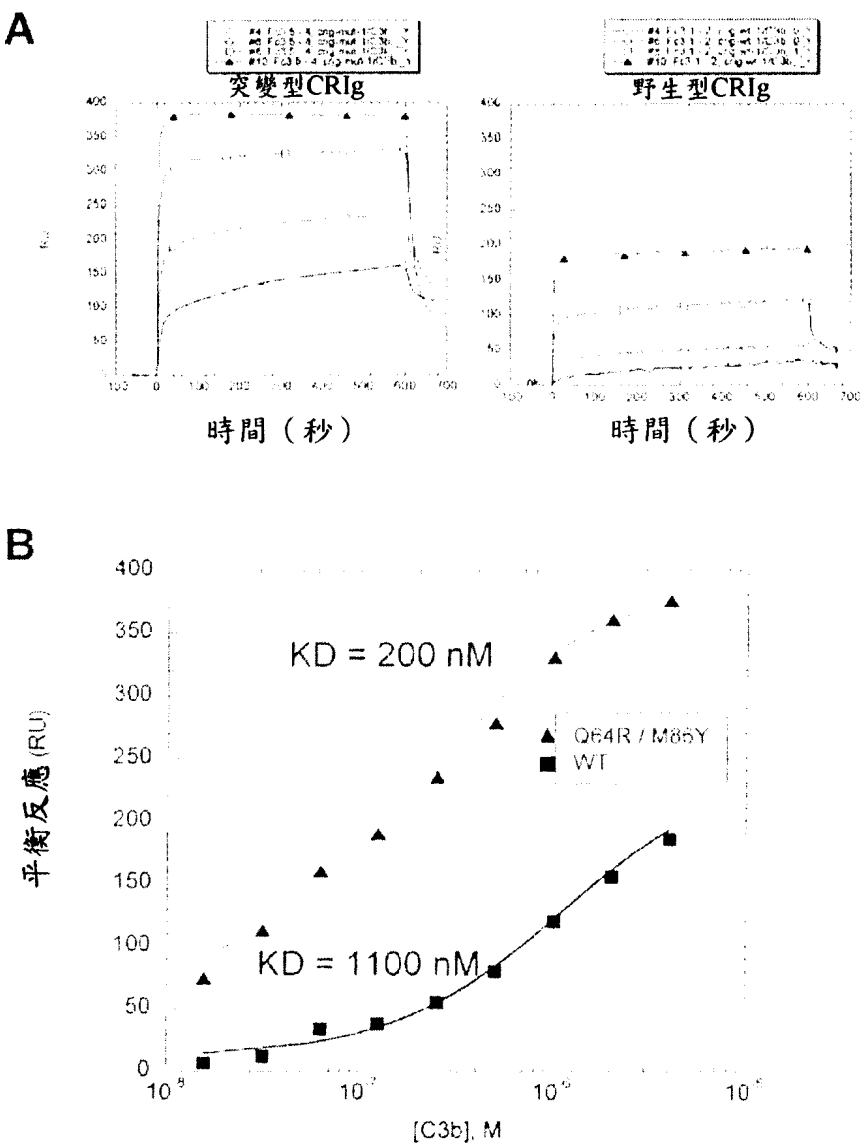


圖 6

親和力改良之CRIg保持對C3b之選擇性

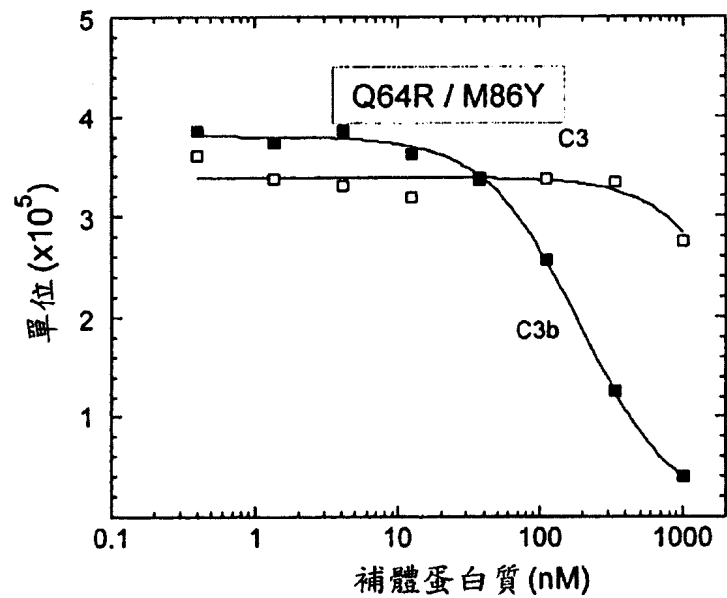


圖 7

CRIg Q64R/M86Y與野生型CRIg相比活體外補體
抑制效力有了改良

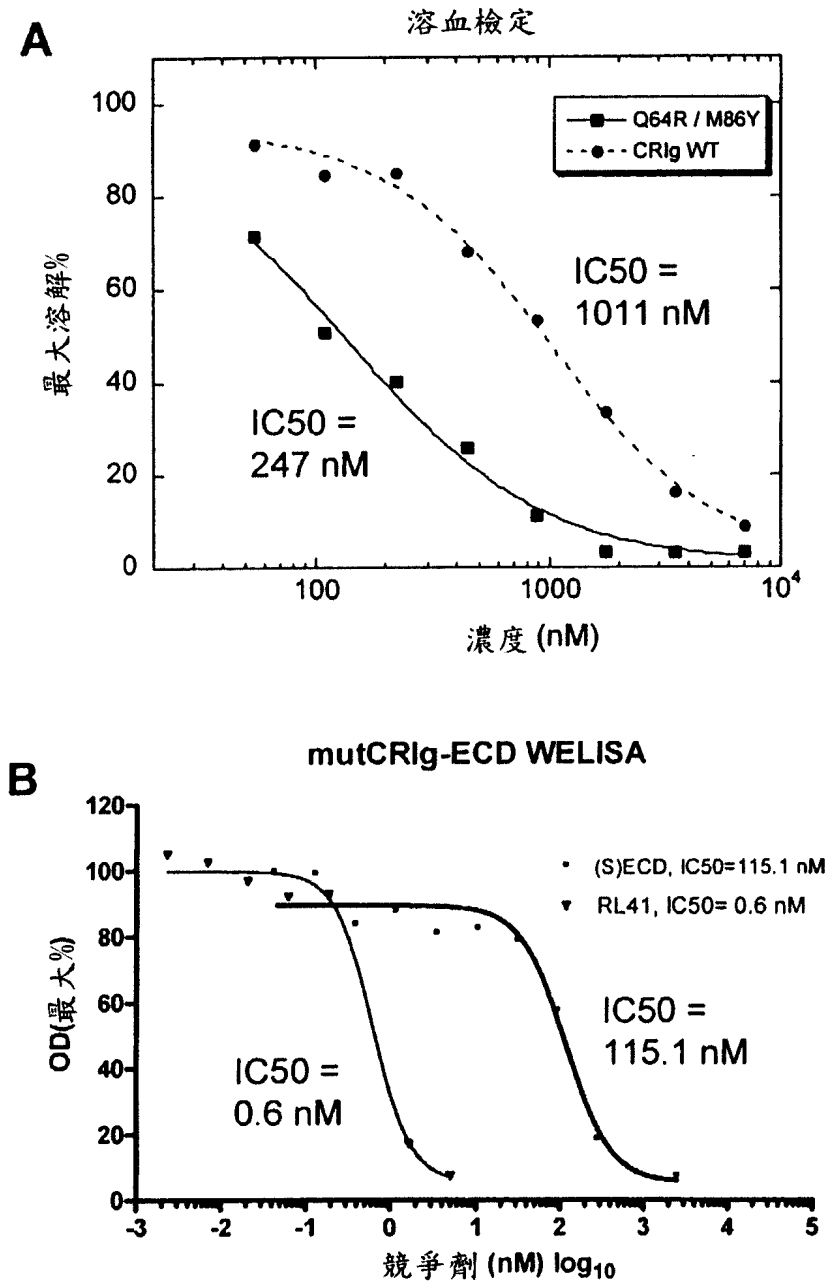


圖 8

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (7) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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)