



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103003302 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201180023582. X

(22) 申请日 2011. 03. 10

(30) 优先权数据
61/312, 469 2010. 03. 10 US
12/920, 997 2010. 09. 03 US
PCT/2011/026841 2011. 03. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2012. 11. 12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/027964 2011. 03. 10

(87) PCT国际申请的公布数据
W02011/112850 EN 2011. 09. 15

(73) 专利权人 诺沃姆德治疗公司
地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 R·班萨尔

(74) 专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所
(普通合伙) 33239
代理人 戚秋鹏

C07K 16/28(2006. 01)
A61K 39/395(2006. 01)
A61P 29/00(2006. 01)
A61P 31/00(2006. 01)

(56) 对比文件
US 2006/0093599 A1, 2006. 05. 04,
US 2003198636 A1, 2003. 10. 23,
CN 1787741 A, 2006. 06. 14,

审查员 黎舒婷

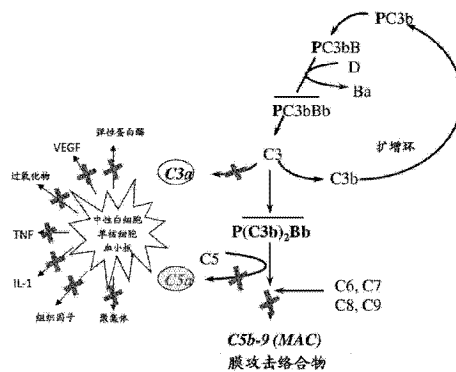
(51) Int. Cl.
C07K 16/18(2006. 01)
C07K 16/46(2006. 01)

权利要求书1页 说明书18页
序列表34页 附图29页

(54) 发明名称
人源化和嵌合抗-备解素抗体

(57) 摘要
分离的抗-备解素抗体或其抗原结合部分, 包括: 重链可变结构域, 包括 SEQ ID NO: 1 中的三种 CDR; 和轻链可变结构域, 包括 SEQ ID NO: 9 中的三种 CDR。

补体级联



1. 分离的抗 - 备解素抗体或其抗原结合部分, 包含: 重链可变结构域, 包括 SEQ ID NO:1 中的三种 CDR H1、H2 和 H3 ; 和轻链可变结构域, 包括 SEQ ID NO:9 中的三种 CDR L1、L2 和 L3, 其中

CDR-H1 由 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列组成 ;

CDR-H2 由 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列组成 ;

CDR-H3 由 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列组成 ;

CDR-L1 由 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列组成 ;

CDR-L2 由 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列组成 ; 和

CDR-L3 由 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列组成。

2. 权利要求 1 所述的抗 - 备解素抗体或其抗原结合部分, 包含重链可变结构域, 选自 : SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50。

3. 权利要求 1 所述的抗 - 备解素抗体或其抗原结合部分, 包含轻链可变结构域, 选自 : SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:33。

4. 药物组合物, 包含: 有效量的权利要求 1 所述的嵌合或人源化抗 - 备解素抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

人源化和嵌合抗 - 备解素抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2010 年 9 月 3 日提交的美国申请 No. 12/920, 997、2010 年 3 月 10 日提交的美国临时申请 No. 61/312, 469、2011 年 3 月 2 日提交的 PCT 申请 No. PCT/US2011/26841 的优先权, 其主旨通过引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及人源化和嵌合抗体及其抗原结合片段, 其可以在其中交替途径有助于疾病病理学的疾病病症中结合备解素并选择性地抑制交替补体途径。这些抗体可以用于在人中治疗炎症疾病和病患。

背景技术

[0004] 补体系统对于病原体清除和针对病原体的宿主防御来说是重要的。交替补体途径 (AP) 在多种病原体炎症病况和自身免疫疾病中活化。因此, 抑制疾病诱导的 AP 活化是临床上有益的。

[0005] 补体系统通过三种不同补体途径来活化: 经典、凝集素和交替途径。经典途径通过抗原 - 抗体络合物活化。凝集素途径是经典途径的变体。交替途径由外源材料、人工表面、死亡组织、细菌和死亡酵母细胞所活化。在疾病病况中, AP 活化产生 C3a, C5a 和 C5b-9 (也称为 MAC 络合物)。已经发现升高水平的 C3a, C5a 和 C5b-9 相关于多种急性和慢性疾病病况。这些炎症分子活化嗜中性粒细胞、单核细胞和血小板。因此, 抑制疾病诱导的 AP 活化在其中补体活化在疾病病理中发挥作用的疾病中对于临床益处是重要的。

[0006] 这些炎症分子通过活化白细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、血小板、肥大细胞和内皮细胞、血管渗透性、胞溶和组织损伤的活化来介导炎症。活化的细胞释放炎症介导因子, 例如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、VEGF、嗜中性粒细胞、弹性蛋白酶和过氧化物。

[0007] 交替补体途径的抑制要求备解素结合 C3b, 这高亲和性地发生。备解素 - 结合的 C3b (PC3b) 缔合因子 B 以形成 PC3bB 络合物, 然后其被因子 D 切除以形成 PC3bBb 和 Ba, 其中 Ba 释放。备解素 - 耗尽的血清完全缺少 AP 活化活性, 这显示备解素对于发生该引发过程是必需的。血液中的备解素浓度接近为 5ug/ml, 因此, 和其他非蛋白酶分子相比, 其仅仅是以更低浓度存在的非蛋白酶分子。

[0008] 抑制 AP 活化将是减轻症状和延缓或预防疾病进展的重要治疗策略。耗尽备解素、中和备解素或失活备解素可以阻断 AP 活化而不会抑制经典补体途径, 因此, 其是可行和有希望的治疗策略。使典型途径完整有益于增加防止感染。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及分离的嵌合和人源化单克隆抗体, 其特异地结合备解素并选择性地阻断交替补体途径。通过任何方法以产生 Fab, Fab', Fab2' 和 IgG 的嵌合, 人源化和全人抗体可以中和备解素功能活性, 并且防止 C3a, C5a 和 C5b-9 的 AP 诱导的产生。结果, 还可以防止细胞活化, 炎症和炎症介导因子的释放。由于 AP 活化相关于多种急性和慢性人类疾

病,因此使用嵌合,人源化和全人抗体产生的封锁还可以阻断炎症过程,从而为使用本发明的抗-备解素单克隆抗体治疗的人提供临床益处。

[0011] 因此,本发明的一个方面涉及分离的抗-备解素抗体或其抗原结合部分,包含:重链可变结构域,包括 SEQ ID NO:1 中的 3 种 CDR;和轻链可变结构域,包括 SEQ ID NO:9 中的 3 种 CDR。

[0012] 在一些方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包含:重链,选自:SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49 和 SEQ ID NO:50。

[0013] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包含:轻链,选自:SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32 和 SEQ ID NO:33。

[0014] 本申请的另一方面涉及分离的抗-备解素抗体或其抗原结合部分,包括至少一种 CDR,选自:CDR-H1,包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;CDR-H2,包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;CDR-H3,包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;CDR-L1,包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列;CDR-L2,包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列;以及 CDR-L3,包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列。

[0015] 在一些方面中,分离的抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括:SEQ ID NO:14 的 CDR-L1 区多肽和 SEQ ID NO:6 的 CDR-H1 区多肽。

[0016] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括:SEQ ID NO:15 的 CDR-L2 区多肽和 SEQ ID NO:7 的 CDR-H2- 区多肽。

[0017] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括:SEQ ID NO:16 的 CDR-L3 区多肽和 SEQ ID NO:8 的 CDR-H3- 区多肽。

[0018] 在甚至其他方面中,轻链 CDR-L1 包括 SEQ ID NO:14,轻链 CDR-L2 包括 SEQ ID NO:15;以及轻链 CDR-L3 包括 SEQ ID NO:16。

[0019] 在又一方面中,重链 CDR-H1 包括 SEQ ID NO:6;重链 CDR-H2 包括 SEQ ID NO:7,以及重链 CDR-H3 包括 SEQ ID NO:8。

[0020] 在另一方面中,轻链 CDR-L2 包括 SEQ ID NO:14,轻链 CDR-L2 包括 SEQ ID NO:15;轻链 CDR-L3 包括 SEQ ID NO:16;重链 CDR-H1 包括 SEQ ID NO:6;重链 CDR-H2 包括 SEQ ID NO:7;以及重链 CDR-H3 包括 SEQ ID NO:8。

[0021] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括至少两个 CDR,选自:CDR-H1,包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;CDR-H2,包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;CDR-H3,包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;CDR-L1 包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列;CDR-L2,包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列;以及 CDR-L3,包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列。

[0022] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括至少三个 CDR,选自:CDR-H1,包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列;CDR-H2,包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列;CDR-H3,包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列;CDR-L1,包含 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列;CDR-L2,包含 SEQ ID NO:15 的氨基酸序列;以及 CDR-L3,包含 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列。

[0023] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括至少四种 CDR,选自: CDR-H1,包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列;CDR-H2,包含 SEQ IDNO :7 的氨基酸序列;CDR-H3,包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列;CDR-L1, SEQ ID NO :14 的氨基酸序列;CDR-L2,包含 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列;以及 CDR-L3,包含 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。

[0024] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分,包括至少五种 CDR,选自: CDR-H1,包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列;CDR-H2,包含 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列;CDR-H3,包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列;CDR-L1,包含 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列;CDR-L2,包含 SEQ ID NO :15 的氨基酸序列;以及 CDR-L3,包含 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。

[0025] 在其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括和 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列具有至少 90%序列一致性的重链可变结构域。

[0026] 在甚至其他方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括和 SEQ IDNO :9 的氨基酸序列具有至少 90%序列一致性的轻链可变结构域。

[0027] 在又一方面中,抗-备解素抗体,包含:和选自 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列具有至少 90%序列一致性的重链可变结构域;和选自 SEQ ID NO :9 的氨基酸序列具有至少 90%序列一致性的轻链可变结构域。

[0028] 在又一方面中,抗-备解素抗体或其抗原结合部分包括:重链可变结构域,选自: SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, SEQ ID NO :40, SEQ ID NO :41, SEQ IDNO :42, SEQ ID NO :43, SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46SEQ ID NO :47SEQ ID NO :48SEQ ID NO :49 和 SEQ ID NO :50。

[0029] 在进一步方面中,抗-备解素抗体或抗原结合部分包括:轻链可变结构域,选自: SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ IDNO :26, SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :28, SEQ ID NO :29, SEQ ID NO :30, SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32 和 SEQ ID NO :33。

[0030] 本发明的另一方面涉及在哺乳动物中抑制交替补体途径活化的方法。该方法包括下列步骤:向人或其他哺乳动物施用分离的抗-备解素抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分特异性地结合备解素并抑制交替补体途径活化。分离的抗-备解素抗体或其抗原结合部分,包括:重链可变结构域,包括 SEQ ID NO :1 中的三种 CDR;和轻链可变结构域,包括 SEQ ID NO :9 中的三种 CDR。

[0031] 在另一方面中,该方法包括下列步骤:治疗其中交替补体途径的活化发挥作用的疾病或病患,包括向具有所述疾病或病患或者处于发展所述疾病或病患风险的个体施用嵌合或人源化抗-备解素抗体或其抗原结合片段。

[0032] 在又一方面中,该方法包括下列步骤:治疗疾病或病患,选自炎症疾病和炎症病患。

[0033] 在另一方面中,该方法包括下列步骤:治疗疾病或病患,选自自身免疫疾病和自身免疫病患。

[0034] 在又一方面中,该方法包括下列步骤:治疗自身免疫疾病或自身免疫病患,选自系统性红斑狼疮,重症肌无力,关节炎病症,阿耳茨海默氏病和多发性硬化。

[0035] 在另一方面中,该方法包括下列步骤:治疗关节炎病症。关节炎病症可以选自类风

湿性关节炎,骨关节炎和青年类风湿性关节炎。

[0036] 在又一方面中,该方法包括下列步骤:治疗补体相关的疾病或病患,选自眼部疾病和眼部病患。眼部疾病或眼部病患可以选自:糖尿病视网膜病,眼睛胞浆菌病,年龄相关的黄斑变性,糖尿病视网膜病,脉络膜新生血管(CNV),葡萄膜炎,糖尿病视网膜水肿,病理性近视,希-林二氏病,眼睛胞浆菌病,视网膜中央静脉阻塞(CRVO),角膜新生血管形成和视网膜新生血管形成。年龄相关的黄斑变性可以选自中间干性AMD和地图状萎缩。

[0037] 在另一方面中,治疗选自哮喘病和气道炎症病患的补体相关的病患的步骤。气道炎症病患可以选自:哮喘,慢性阻塞性肺病("COPD"),过敏性支气管肺曲菌病,过敏性肺炎,嗜酸细胞性肺炎,气肿,支气管炎,过敏性支气管炎支气管扩张,囊肿性纤维化,肺结核,过敏性肺炎,职业性哮喘,类肉瘤,反应性气道病综合征,间质性肺炎,高嗜酸细胞综合征,鼻炎,鼻窦炎,运动引起的哮喘,污染引起的哮喘,感冒变体哮喘,肺寄生虫病,呼吸道合胞病毒("RSV")感染,副流感病毒("PIV")感染,鼻病毒("RV")感染和腺病毒感染。

[0038] 附图简述

[0039] 图1示出包括靶蛋白备解素的交替补体途径的图表。

[0040] 图2显示抗-备解素抗体IgG, Fab2和Fab结合备解素。

[0041] 图3示出抗-备解素单克隆抗体抑制AP活化,这通过兔红细胞胞溶的抑制来测量。

[0042] 图4示出抗-备解素单克隆抗体在缓冲液的1%和10%的正常人血清中不抑制经典途径活化。

[0043] 图5示出抗-备解素抗体IgG, Fab2和Fab抑制备解素高亲和性地结合C3b。

[0044] 图6示出抗-备解素抗体IgG和NM4540不竞争结合备解素。

[0045] 图7示出抗-备解素抗体IgG, Fab2和Fab在测定中抑制C3b的形成。

[0046] 图8示出抗-备解素抗体IgG, Fab2和Fab在如图7中所示相同的测定中抑制PC3b的形成。

[0047] 图9示出抗-备解素抗体IgG, Fab2和Fab在如图7中所示相同的测定中抑制PC3bBb的形成。

[0048] 图10示出抗-备解素抗体在心肺分流术的全血模型的猪中抑制血小板功能异常。

[0049] 图11示出抗-备解素抗体在经历心肺分流术的猪中体内抑制AP活化。

[0050] 图12示出在经历心肺分流术的猪中抗-备解素抗体抑制血小板功能异常。

[0051] 图13示出抗-备解素抗体在兔中抑制局部缺血再灌注损伤。

[0052] 图14示出在经历黄斑变性的兔中抗-备解素抗体抑制CNV。

[0053] 图15示出在类风湿性关节炎的兔模型中抗-备解素抗体抑制关节炎症。

[0054] 图16示出SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:8的重链氨基酸序列。

[0055] 图17示出SEQ ID NO:9至SEQ ID NO:16的轻链氨基酸序列。

[0056] 图18示出抗-备解素IgG抗体和抗-备解素抗体嵌合IgG抗体与备解素的结合亲和性。

[0057] 图19示出人源化抗-备解素抗体和嵌合抗-备解素抗体抑制备解素结合C3b。

[0058] 图20示出人源化IgG抗体和嵌合抗-备解素IgG在10%正常人血清中抑制rRBC的溶血。

- [0059] 图 21 示出 SEQ ID NO :17 至 SEQ ID NO :21 的轻链氨基酸序列。
- [0060] 图 22 示出 SEQ ID NO :22 至 SEQ ID NO :27 的轻链氨基酸序列。
- [0061] 图 23 示出 SEQ ID NO :28 至 SEQ ID NO :33 的轻链氨基酸序列。
- [0062] 图 24 示出 SEQ ID NO :34 至 SEQ ID NO :39 的重链氨基酸序列。
- [0063] 图 25 示出 SEQ ID NO :40 至 SEQ ID NO :45 的重链氨基酸序列。
- [0064] 图 26 示出 SEQ ID NO :46 至 SEQ ID NO :50 的重链氨基酸序列。
- [0065] 图 27 示出三种选择的人源化单克隆抗体 SEQ ID NO :36,37 和 44 的结合亲和性。
- [0066] 图 28 示出三种选择的人源化单克隆抗体抑制交替补体途径活化,这通过在 AP 缓冲液中抑制溶血活性来示出。
- [0067] 图 29 示出作为该抗体的抗原表位的备解素序列。
- [0068] 发明详述
- [0069] 如本文使用的,术语“受体人框架”是指包括衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的 VL 或 VH 框架的氨基酸序列的框架。
- [0070] 如本文使用的,术语“抗体”覆盖全长单克隆抗体,多克隆抗体,纳米体和多特异性抗体。生物抗体通常是约 150,000 道尔顿的杂-四聚体糖蛋白,其包含两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链。两个重链通过二硫键连接,并且各重链通过二硫键连接轻链。各全长 IgG 分子含有特异靶或抗原的至少两个结合位点。轻链是 kappa 或 lambda。轻链都含有可变氨基酸序列的结构域,称为可变区(还称为“ V_L ,”“ V_{kappa} ,”或“ V_{lambda} -区”)和相对保守的氨基酸序列的结构域,称为恒定区(“CL-区”)。类似地,各重链含有可变区(“ V_H -区”)和三个恒定结构域(“ C_{H1} ,”“ C_{H2} ”和“ C_{H3} -区”)以及较链区。
- [0071] 如本文使用的,术语“抗体片段”是指全长抗体的段,通常称为靶结合或可变区。例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段。“Fv”片段是含有完整靶识别和结合位点的最小抗体片段。
- [0072] 如本文使用的,术语“抗原结合片段”是指抗体分子的一种或多种片段,所述抗体分子含有负责抗原结合的抗体可变区。Fab, Fab' 和 F(ab)₂ 缺少 Fc 区。抗原结合片段可以通过蛋白酶消化从全长抗体制备。抗原结合片段可以由本领域技术人员使用标准的重组 DNA 方法来制备。
- [0073] 如本文使用的,补体-决定区(“CDR”)是指重链和轻链的可变区内的特定区。通常,可变区包括以下列方式布置的四个框架区(FR1, FR2, FR3, FR4)和三个 CDR: NH₂-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-COOH。术语“框架区”是指除了本文所述的 CDR 残基之外的那些可变结构域残基。
- [0074] 如本文使用的,术语“抗原表位”是指抗体及其片段结合和实施功能活性的备解素上的位点。术语“抗原表位”和“抗原位点”和“抗体结合位点”相同。鼠源单克隆 mAb71-110 和本发明的嵌合和人源化抗体及其结合片段享有相同的结合位点。鼠源 mAb 描述于 PCT 申请 No. PCT/US2008/068530。本领域技术人员可以将人备解素的序列比对另一动物物种的备解素的序列,并且确定抗原表位的位置。
- [0075] 如本文使用的,“Fab 片段”是指轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域。Fab' 片段和 Fab 片段的不同在于重链 CH1 结构域的羧基末端处的数个特别残基,包括来自抗体较链区的一个或多个半胱氨酸。F(ab')₂ 片段是通过在 F(ab')₂ 胃蛋白酶消化产物

的铰链半胱氨酸处切除二硫键而制备的。

[0076] 如本文使用的,术语抗体的“功能片段”是指和一样的全长抗体具有定性的生物活性的抗体片段。例如,功能抗体片段是这样的物质,其可以以这样的方式结合备解素,以防止或基本上降低交替补体活化。

[0077] 如本文使用的,术语“人共有框架”是指框架,其表示在人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列的选择中最通常存在的氨基酸残基。通常,人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的选择来自可变结构域序列的亚组。

[0078] 如本文使用的,“人源化抗体”是指由大部分人类序列构成的抗体,除了 CDR1, CDR2 和 CDR3。所有框架区也都是人源化。嵌合抗体包含鼠源 CDR,鼠源框架区和人恒定区。总的来说,嵌合抗体含有鼠源可变区和人恒定区。

[0079] 如本文使用的,术语涉及抗体链肽序列的“一致”或“基本上一致”可以理解为抗体链和抗原结合片段的可变区存在的参照多肽序列表现出至少 65%,70%,80%,90%或 95%序列一致性。涉及核酸序列的术语可以理解为核苷酸序列和参照核酸序列表现出至少约 65%,75%,85%,90%,95%或 97%序列一致性。

[0080] 如本文使用的,术语“个体”是指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。适于治疗的个体包括目前无症状但是处于发展系统性病患的风险的那些人,其中交替补体途径发挥作用或其中交替补体途径活化发挥作用。

[0081] 如本文使用的,术语“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、高级灵长类动物、家畜、马、猪、牛、犬、猫和雪貂等。在本发明的一个实施方案中,哺乳动物是人。

[0082] 如本文使用的,“单克隆抗体”是指同源的抗体群。这些抗体是高度特异性的,并且针对单靶抗原导向。这些单克隆抗体由未被其他免疫球蛋白污染的杂交瘤培养物均匀产生。单克隆抗体还可以通过其他工序例如相展示法由熟知的方法来制备。

[0083] 如本文使用的,术语“天然序列备解素”是指备解素的天然存在的前体形式、天然存在的变体形式和备解素的天然存在的等位变体、以及和衍生自天然的备解素多肽具有相同氨基酸序列的备解素分子的结构构型变体。非人动物包括高级灵长类动物和非人哺乳动物的备解素多肽包括在该定义内。

[0084] 如本文使用的,术语“备解素”是指天然序列和变体备解素多肽。

[0085] 如本文使用的,术语“SDR”是指 IgG 或其片段的第三补体决定区(“CDR3”)和第四框架区(“FR4”)的氨基酸序列的全部或一部分。

[0086] 如本文使用的,术语“选择性抑制交替补体途径”是指优选和专门地抑制交替补体途径,但不抑制其他补体活化途径,包括经典补体途径。例如,人源化和嵌合抗体以及它们抗原结合片段选择性地抑制交替补体途径。该定义适用于其中交替补体途径被选择性抑制的本文所述的其他方法。

[0087] 如本文使用的,术语“治疗有效量”是指“备解素拮抗剂”的量,所述“备解素拮抗剂”需要用来在状态(例如病理)中实现靶疾病或病症(例如补体相关的眼睛病症)的可测量的进展。

[0088] 如本文使用的,术语“治疗”是指治疗性疗法和预防性或预防措施。

[0089] 本发明可以提供用于预防和/或治疗补体相关的病症的抗-备解素剂。这些抗-备解素剂可以包括但不限于,抗-备解素抗体及其抗体变体,其抗原结合片段,其他结合多肽,

肽,非肽小分子,适体以及 DNA 和 RNA 片段。这些抗-备解素剂可以结合备解素,并且可以能够中和、阻断、部分或全部抑制、撤销、降低或干扰备解素功能活性,例如备解素涉及任何补体相关的炎症疾病或病患的病理学的能力。

[0090] 本发明的抗-备解素剂可以防止备解素结合 C3b 以通过选择性地结合备解素形成 PC3b 络合物。结果,不形成 PC3b 络合物和 PC3bBb 络合物。由于 PC3bBb 络合物将 C5 切除为 C5a 和 C5b,因此也不形成 MAC 络合物 (C5b-9)。因此,通过抑制备解素结合 C3b,本发明的抗-备解素剂将抑制形成 MAC 络合物。已经发现升高水平的 MAC 络合物相关于多种急性和慢性疾病。因此,通过本发明的抗-备解素剂抑制 MAC 络合物对于其中补体活化在疾病病理学中发挥作用的疾病中的临床益处是重要的。

[0091] PC3b 络合物、PC3bB 络合物和 PC3bBb 络合物可以全部聚合。已知抑制这些络合物中的各种和抗-备解素剂的聚合,其中备解素与 C3b,因子 B 或因子 Bb 中每种的摩尔比为 1 : 1。本发明的抗-备解素剂可以抑制这些络合物中的各种和抗-备解素剂的聚合,其中这些络合物中的各种分别包含比各络合物中 C3b,因子 B 和因子 Bb 多至少 1 摩尔的备解素。在一个例子中,对于 PC3b 络合物,备解素和 C3b 的摩尔比可以表示为 $(P)_x(C3b)_y$,其中 $X = Y+1$ 。在另一例子中,对于 PC3bB 络合物,备解素, C, C3b 和因子 B 的摩尔比可以表示为 $(P)_x(C3b)_y(B)_z$,其中 $X = Y+Z$ 。该例子还可以表示 PC3bBb 络合物中备解素与 C3b 和因子 Bb 的摩尔比。

[0092] 本发明的抗-备解素剂可以具有抑制备解素的任何生物活性的能力。这种能力可以在备解素-相关的疾病或病症(例如补体相关的炎症疾病或病患)的病理状态中带来可测量的改善。该活性可以体外或体内试验来评价,包括但不限于结合测定、使用相关动物模型的交替途径溶血测定或人临床试验。

[0093] 在本发明的另一实施方案中,抗-备解素剂可以结合备解素上的特定抗原表位以抑制 AP 活化。在一个例子中,抗-备解素剂可以结合备解素的 N-端结构域以抑制备解素结合 C3b。用于本发明的抗-备解素剂的抗原表位映射序列表征为 SEQ ID NO :51。

[0094] 本发明的抗-备解素剂可以包括人源化单克隆抗-备解素抗体或其抗原结合片段,其选择性地结合备解素并选择性地抑制交替补体途径活化,其可以用于在人或其他哺乳动物中治疗任何交替途径相关的炎症疾病或病患。疾病和病患的综合列表包括在本文中。

[0095] 人抗-备解素抗体可以包括抗体,该抗体以这样的方式特异性地结合人备解素,以在人中抑制或基本上降低补体活化。本发明还可以涉及这样的方法:降低由补体介导的炎症疾病或病患引起的炎症,以为人提供临床益处。

[0096] 本发明可以包括人源化抗-备解素抗体及其片段的制备和使用的方法。本领域熟知制备人源化非人抗体的方法。通过取代啮齿动物 CDR 或人抗体的对应序列的 CDR 序列来基本上进行人源化。人可变结构域(轻和重)的选择用于制备人源化抗体在一些情况下可以用于降低抗原和/或人抗-小鼠抗体(HAMA)应答是重要的。本发明可以提供抗体,该抗体被人源化,使得 HAMA 应答降低或消除。任何抗体,无论嵌合,人源化或人抗体,可以结合备解素并抑制兔红细胞的 AP-依赖性溶血。

[0097] 通常,备解素可以和成熟人氨基酸序列具有下列范围的氨基酸序列一致性百分率:从至少约 60%,至至少约 70%,至至少约 80%,至至少约 85%,至至少约 90%,至至少

约 95%，至至少约 98%，至至少约 99%。

[0098] 抗体的可变结构域是指可变结构域的某些部分，其序列和抗体不同。本发明的抗体的变化可集中于位于轻链和重链可变结构域中的三个 CDR 段。可变结构域的高度保守部分称为框架 (FR) 区。在本发明的抗-备解素抗体中，存在四个 FR 区，它们有三个 CDR 连接，它们可包含可变链。各轻链和重链中的 CDR 通过 FR 区最接近地保持在一起，并且来自其他链的 CDR 可以有助于形成抗体的靶结合位点。

[0099] 抗体人源化是这样的过程，其可以产生具有可变区 ("V-区") 序列的工程化人抗体，所述可变区 ("V-区") 序列基本上类似于实际人基因种系序列，同时保持参照抗体的结合特异性和亲和性，例如 ATCC 保藏号 PTA-9019 或 ATCC 保藏号 PTA-10649。例如，该过程可以将重链和轻链序列的 CDR1, CDR2 和 CDR3 区移植到人源化人框架 (其在开始该移植过程之前优化和之前鉴定) 中。含有人源化框架的可变区可以产生 Fab, Fab' 或 Fab2 单链抗原-结合抗体片段。所得工程化人源化抗体片段可以保持亲本鼠源抗体对于抗原备解素的结合特异性，并且和亲本抗体相比可以对于特定抗原具有相等或更高的结合亲和性。相比于最接近的人基因种系抗体基因，工程化抗原结合片段可以具有高程度的氨基酸序列一致性的重链和轻链 V-区。例如，在构建过程中，另外的成熟改变可以引入各链的 CDR3 区，以鉴定具有最佳结合动力学的抗体。

[0100] 抗-备解素单克隆抗体或其抗原结合片段的嵌合和人源化变体可以联合其他分子 (其具有药理效果，例如治疗剂) 施用至个体。抗-备解素单克隆抗体联合至少一种治疗剂的施用可以通过同时或依次施用抗-备解素单克隆抗体和至少一种治疗剂来进行。

[0101] 涉及本发明的实施方案的制剂或组合物

[0102] 本发明可包括制剂或组合物，包含：交替补体途径的抑制剂和选择性抑制剂，包括但不限于在哺乳动物中抑制交替途径活化的鼠源，嵌合或人抗体。制剂包含：(a) 本文所述的交替补体途径的抑制剂；和 (b) 药学上可接受的载体。在本发明的一个实施方案中，制剂或组合物可以包含一种或多种另外的试剂，例如适于在具有或处于发展炎症病患风险的哺乳动物中降低炎症的消炎剂。在本发明的另一实施方案中，制剂或组合物可以包含一种或多种另外的试剂，例如适于在哺乳动物中预防或降低局部缺血-再灌注损伤的另外的试剂。在本发明的又一实施方案中，制剂或组合物可以包含一种或多种另外的试剂，例如适于治疗和交替补体途径活化相关的另外疾病或病症的另外的试剂。

[0103] 在另一实施方案中，抗体可以是双抗体，其中分子中的 Fab 源自两种不同的抗原，包括来自抗-备解素的一种和来自任何其他抗原的另一种。

[0104] 抗-备解素剂可以联合药学上可接受的载体，包括但不限于药学上可接受的赋形剂和 / 或药学上可接受的递送媒介物，其适用于将制剂或组合物施用至合适的体内位点。

[0105] 一种类型的药学上可接受的载体可包括控制释放制剂，其能够缓慢地释放本发明的组合物至哺乳动物中。如本文使用的，控制释放制剂包含在控制释放媒介物中的本发明的药剂。合适的控制释放媒介物可以包括但不限于生物相容性聚合物，其他聚合物基质，胶囊，微囊，微粒，团块制剂，渗透泵，扩散装置，脂质体，脂质体球和透皮递送系统。其他合适的载体可包括任何载体，该载体可以结合或并入抗-备解素剂，该载体延长抗-备解素剂递送的半衰期。这种载体可包括当体内递送时延长蛋白的半衰期的任何合适的蛋白载体或融合片段。合适的递送媒介物可以包括但不限于脂质体，病毒载体或其他递送媒介物，包括核

酶和含有天然脂质的递送媒介物例如细胞和细胞膜。

[0106] 静脉内,腹膜内,肌内和肌肉内施用可以使用本领域标准的方法来进行。气溶胶递送可以使用本领域标准的方法来进行。递送气溶胶化制剂的装置可以包括但不限于加压计量的剂量吸入器("MDI"),干粉吸入器("DPI")和计量的溶液装置("MSI"),并且包括是雾化器和吸入器的装置。

[0107] 本发明的抗体的剂量的另外类型、特别是抗体制剂通过雾化递送时包含下列范围的集合:约200ng/kg至约600 μ g/kg哺乳动物的体重,约200ng/kg至约500g/kg,约200ng/kg至约400g/kg,约200ng/kg至约300g/kg,约200ng/kg至约200 μ g/kg,约200ng/kg至约100 μ g/kg,并且优选约200ng/kg至约50 μ g/kg哺乳动物的体重。

[0108] 本发明的抗体可以在-SH基团或不干涉结合的任何其他位置处缀合合成或生物实体。本发明还可以覆盖这些缀合物。

[0109] 疾病病症

[0110] 在本发明的另一方面中,本发明的抗体可以用于在患有急性或慢性病理损伤的受试者(包括人)中通过体内交替途径抑制补体活化。本发明可以联合使用下列疾病、病患、损伤和治疗,包括但不限于:

[0111] 体外循环疾病和病患:心肺分流术后炎症,手术后肺部障碍,心肺分流术,血液透析,白细胞清除术,血浆除去法,血小板除去法,肝素-引起的离体LDL沉降(HELP),灌注后综合征,体外膜式人工氧合法(ECMO),心肺分流术(CPB),灌注后综合征,系统炎症应答以及多种器官失效。

[0112] 心血管疾病和病患:急性冠状动脉综合征,Kawaski病(动脉炎),高安氏动脉炎,过敏性紫癜肾炎,血管渗漏综合征,经皮冠状动脉干预(PCI),心肌梗塞形成,急性心肌梗塞后缺血-再灌注损伤,动脉粥样硬化,血管炎,免疫复合体血管炎,和类风湿关节炎相关的血管炎(也称为恶性类风湿关节炎),系统性红斑狼疮-相关的血管炎,败血症,动脉炎,动脉瘤,心肌病,扩张性心肌病,心脏手术,外周血管病症,肾血管性病症,心血管病症,脑血管病症,肠系膜/肠道血管病症,糖尿病血管病,静脉性气栓(VGE),韦格内氏肉芽肿症,肝素-引起的体外膜式人工氧合法以及白塞氏综合征。

[0113] 骨/肌与骨骼的疾病和病患:关节炎,炎性关节病,非-炎性关节病,类风湿关节炎,青年类风湿性关节炎,系统性青年类风湿性关节炎,骨关节炎,骨质疏松症,全身性红斑狼疮(SLE),白塞氏综合征以及斯耶格伦氏综合征。

[0114] 移植疾病和病患:移植排斥,异种移植,移植物抗宿主病,器官或移植物的异种移植,器官或移植物的异体移植以及超急性排斥。

[0115] 眼睛/眼部疾病和病患:湿和干年龄相关的黄斑变性(AMD),脉络膜新生血管(CNV),视网膜损伤,糖尿病视网膜病,糖尿病视网膜毛细血管病,眼睛的网状内皮细胞真菌病,葡萄膜炎,糖尿病视网膜水肿,糖尿病视网膜病,糖尿病视多膜微动脉瘤,病理性近视,视网膜中央静脉阻塞(CRVO),角膜新生血管形成,视网膜新生血管形成,视网膜色素上皮细胞(RPE),眼睛的网状内皮细胞真菌病和普尔夏氏视网膜病。

[0116] 血/血液疾病和病患:脓毒症,系统性炎症应答综合征(SIRS),失血性休克,急性呼吸窘迫综合征(ARDS),灾难性抗-磷脂综合征(CAPS),冷凝集素病(CAD),自身免疫性血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP),内毒血症,溶血性尿毒症(HUS),非典型溶血性尿毒症

综合征 (aHUS), 阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH), 败血症, 败血病性休克, 镰状细胞血症, 溶血性贫血, 嗜酸性白细胞增多综合征和抗 - 磷脂综合征 (APLS)。

[0117] 呼吸 / 肺疾病和病患: 哮喘, 韦格内氏肉芽肿症, 输血 - 相关的急性肺部损伤 (TRALI), 抗肾小球基底膜抗体 (古德帕斯彻氏病), 嗜酸细胞性肺炎, 过敏性肺炎, 过敏性支气管炎, 支气管扩张, 反应性气道病综合征, 呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染, 副流感病毒感染, 鼻病毒感染, 腺病毒感染, 变应性支气管肺曲菌病 (ABPA), 肺结核, 肺寄生虫病, 成人型呼吸窘迫综合征, 慢性阻塞性肺病 (COPD), 类肉瘤病, 气肿, 支气管炎, 囊性纤维变性, 间质性肺炎, 急性呼吸窘迫综合征 (ARDS), 输血 - 相关的急性肺部损伤, 局部缺血 / 再灌注急性肺部损伤, 棉屑沉着病, 肝素 - 引起的体外膜式人工氧合法, 过敏性休克和石棉 - 引起的炎症。

[0118] 中枢和周围神经系统 / 神经疾病和病患: 多发性硬化 (MS), 重症肌无力 (MG), 假麻痹性重症肌无力, 多发性硬化, 格 - 巴二氏综合征, Miller-Fisher 综合征, 中风, 中风后再灌注, 阿耳茨海默氏病, 变集运动神经病 (MMN), 脱髓鞘, 亨廷顿氏舞蹈病, 夏科氏综合征 (ALS), 帕金森氏病, 视乳头变性疾病 (DDD), 脑膜炎, 来自脑膜炎的脑神经损害, 变异克雅氏病 (vCJD), 特发性多神经炎, 脑 / 脑创伤 (包括但不限于出血, 炎症和水肿) 和神经性疼痛。

[0119] 创伤 - 引起的损伤和疾患: 失血性休克, 低血容量性休克, 脊髓损伤, 脑损伤, 脑创伤, 脑缺血再灌注, 挫伤, 伤愈, 重度烧伤和冻伤。

[0120] 肾部疾病和病患: 肾再灌注损伤, 链球菌感染后肾小球性肾炎 (PSGN), 古德帕斯彻氏病, 膜性肾炎, 贝格尔氏病 / IgA 肾病, 膜增生性肾小球性肾炎, 膜状肾小球性肾炎, 膜增殖性肾小球性肾炎 (肾小球膜毛细血管肾小球性肾炎), 急性感染后肾小球性肾炎, 冷球蛋白性肾小球性肾炎, 狼疮肾炎, 埃诺克 - 多恩莱因炎和肾皮质坏死 (RCN)。

[0121] 器官的再灌注损伤和疾患: 包括但不限于心脏、脑部、肾脏和肝脏。

[0122] 生殖和泌尿生殖疾病和病患: 痛性膀胱疾病和病患, 感官膀胱疾病和病患, 自发流产, 男性和女性不孕不育病, 孕期疾病, 胎儿母体耐性, 子痫前期, 泌尿生殖炎症, 胎盘功能障碍的疾病和病患, 流产慢性非细菌性膀胱炎和间质性膀胱炎的疾病和病患。

[0123] 皮肤 / 皮疾病和病患: 烧伤, 牛皮癣, 特应性皮炎 (AD), 嗜酸细胞性海绵层水肿, 荨麻疹, 热损伤, 类天疱疮, 后天性表皮松解大疱性皮肤棘层松解, 自身免疫大疱性皮肤病, 大疱性类天疱疮, 硬皮病, 血管性水肿, 遗传性血管神经水肿 (HAE), 猫眼疮, 妊娠疱疹, 斯耶格伦氏综合征, 皮炎以及疱疹样皮炎。

[0124] 胃肠道疾病和病患: 克罗恩氏病, 腹腔疾病 / 谷朊 - 敏感性肠病, 惠普耳氏病, 肠缺血, 炎症性肠病和溃疡性结肠炎。

[0125] 内分泌疾病和病患: 淋巴瘤性甲状腺肿, 幼稚淋巴细胞性甲状腺炎, 压力焦虑, 和影响泌乳刺激素的其他疾病, 生长或胰岛素 - 样生长因子, 促肾上腺皮质激素释放, 胰腺炎, 艾迪生氏病, 糖尿病包括但不限于 1 型和 2 型糖尿病, 1 型糖尿症, 类肉瘤病, 糖尿病视多膜毛细血管病, 非 - 肥胖糖尿病 (IDDM), 血管病, IDDM 或 2 型糖尿病的神经病或视网膜病并发症以及胰岛素耐性。

[0126] 恶性肿瘤的治疗: 源自化疗和放射疗法的疾病和病患。

实施例

[0127] 根据制定的工序来培养小鼠杂交瘤细胞。收集细胞,并且通过本领域技术人员已知的标准工序将信使 RNA(“ mRNA ”)从细胞小球中分离。根据本领域技术人员已知的标准方法通过使用 oligoDT 引物进行引物延伸,从纯化的 mRNA 产生第一链互补 DNA(“ cDNA ”)。根据标准的工序使用简并引物,将 cDNA 用作模版以用于抗体 V- 区序列的扩增。使用 BioAtla 拥有的小鼠特异性 kappa 引物组从 cDNA 扩增 Kappa 轻链可变结构域。正向引物被设计联合 kappa 特异性反向引物来扩增小鼠轻链可变结构域。七种不同的引物组合(mK2, mK3, mK7, mK8, mK9, mk10, mK11)导致预期尺寸的 PCR 产物。将 PCR 产物凝胶纯化, TOPO-TA 克隆和测序。序列分析揭示引物组合 mK2, mK3, mK7, mK8, mK9 和 mK11 扩增相同的轻链序列(基于引物模糊性仅有微小的变化)。这些克隆在 CDR3/ 框架 4 区中具有终止密码子,从而产生非生产性 V-J 重排。该序列通常发现于使用源自初始 MOPC-21 瘤的融合配体制备的杂交瘤。该转录体的量可以超过生产性轻链 mRNA 的量。源自引物组合 mk10 的克隆的序列分析表明单一轻链扩增。为了验证获得的序列的 N- 端,使用退火至分泌信号的正向引物和对于克隆 mK10 中 CDR3 具有特异性的反向引物进行另外的 PCR 反应。使用第二引物组获得完全相同的 DNA 序列。使用 BioAtla 拥有的小鼠特异性重链引物组从 cDNA 扩增重链可变结构域。正向引物被设计联合 IgG1/2 特异性反向引物来扩增小鼠重链可变结构域。五种不同的引物组合(mH1, mH2, mH4, mH5 和 mH6)导致预期尺寸的 PCR 产物。将 PCR 产物凝胶纯化, TOPO-TA 克隆和测序。序列分析揭示引物 mH2 仅仅扩增非 - 抗体特异性小鼠转录体。

[0128] 引物组合 mH4 和 mH5 扩增相同的转录体。其是非生产性重排的重链,这描述于文献例如 Genbank entry FJ147352 中。引物组合 mH1 和 mH6 导致具有轻微氨基酸变化的三种克隆。框架 1(7 至 9 的 aa 位置)中的三种氨基酸差别由于引物序列。64 位的氨基酸改变可能由 PCR 错误引起。进行针对小鼠基因组的 BLAST 检索,以鉴别对应的基因种系 V 区基因。小鼠基因种系基因 IgH1-4 鉴别为最接近的匹配(89%一致性)。使用对于基因种系基因 IgH1-4 的 N- 端具有特异性的正向引物和对于在前面步骤中鉴别的 CDR3 具有特异性的反向引物进行另外的 PCR 反应。所得 PCR 产物是 TOPO-TA 克隆,并且将 10 种克隆测序。所有克隆具有完全相同的序列。

[0129] 重链和轻链可变结构域克隆到哺乳动物表达体系中。之前鉴别的可变结构域(轻链克隆 mK10,重链克隆 mH6-3g)克隆到 BioAtla 拥有的哺乳动物表达体系中。轻链可变结构域框内融合人 kappa 恒定区;重链可变结构域框内融合人 IgG1 恒定区。两种基因前面加上引导肽以使全长 IgG1 抗体分泌到基质中。五种克隆被测序以证实 LC 和 HC 阅读框的完整性和序列转移到表达载体中。所有克隆含有正确的序列(数据未显示)。选择一种克隆用于表达试验:克隆 BAP010_1。制备克隆 BAP010_1 的甘油储液,并且制备不含内毒素的质粒 DNA 以在 CHO 细胞中进行表达试验。重组 BAP010_1 进行表达和功能表征。

[0130] 克隆 BAP010_1 转移到 CHO-S 细胞中,并且在转染后 48 小时,72 小时,96 小时和 120 小时收集细胞培养物上清。只有并行载体转染到 CHO-S 细胞中。将阴性对照按照和克隆 BAP010_1 相同的方式处理,并且在相同的时间点收集上清。

[0131] 定量 ELISA:使用方法中描述的 ELISA 测定来确定细胞培养物上清中 IgG 的量。在嵌合抗体中证实功能活性时引发 BAP010_001 的人源化。用于来自克隆 BAP010_1 的轻链和重链 CDR 序列编码的双链 DNA 片段联合 BioAtla 拥有的人框架池。然后全长可变结构域克

隆到 BioAtla 的哺乳动物表达载体中。分析 48 种轻链和 48 种重链序列以证实 CDR 和框架片段的正确装配和文库的多样性（数据未示出）。

[0132] 将克隆集合并冷冻以用作后面使用的甘油储液。将人源化文库的等分部分接种，并且单一菌落转移至 96 孔板。各板还含有具有阳性对照（BAP010_1）和阴性对照（只有载体）的三个孔。使培养物生长过夜，并且制备质粒 DNA 用于转染。将 CHO 细胞种于 96 孔板中，并且使用人源化克隆的小量制备 DNA 来转染。在转染后 48 小时收集细胞培养物上清，并且使用用于人 IgG 的定量的 BioAtla 的 ELISA 方案来测定 IgG 浓度。使用 NovelMed 提供的抗原和方案来平行测试人源化克隆与抗原 NM9401 的结合。

[0133] 计算各克隆的特定活性（亲和性 / 量），并且和相同板上的阳性对照（BAP010_1）的平均特定活性进行比较。然后，滤出具有低表达水平（低于 BAP010_1）的克隆以用于选择初始打击。低表达水平人工放大特定活性，并且当选择打击时需要避免。选择来自各板的顶级打击以用于证实。

[0134] 纯化：使用蛋白 G 柱从 400ml 无血清细胞培养物上清中纯化抗体。基于 ELISA 数据，集合部分 4-6（峰 1, 1.5ml）和部分 3, 7-18（峰 2, 6.5ml）。使用 Milipore 旋转柱（MWC0 50, 000Da）浓缩各集合部分的一半。

[0135] 人源化构建体的初级筛选：将人源化文库的等分部分接种，并且将单一菌落转移至 96 孔板。各板还含有具有阳性对照（BAP010_1）和阴性对照（只有载体）的三个孔。使培养物生长过夜，并且制备质粒 DNA 用于转染。将 CHO 细胞种于 96 孔板中，并且使用人源化克隆的小量制备 DNA 来转染。

[0136] 计算各克隆的特定活性（亲和性 / 量），并且和相同板上的阳性对照（BAP010_1）的平均特定活性进行比较。然后，滤出具有低表达水平（低于 BAP010_1）的克隆以用于选择初始打击。低表达水平人工放大特定活性，并且当选择打击时需要避免。选择来自各板的顶级打击以用于证实。

[0137] 实施例 1

[0138] 抗 - 备解素 IgG and F(ab')₂ 高亲和性地结合人备解素

[0139] 抗 - 备解素 IgG 和 F(ab')₂ 与人备解素的亲和性在低 pM 范围。抗体及其片段以类似的亲和性结合备解素。

[0140] 将聚苯乙烯微量滴定板覆盖磷酸盐缓冲的盐水（PBS）中的人备解素在 4℃ 下过夜。在吸气备解素溶液后，所述孔使用含有牛血清清蛋白（BSA）的 PBS 在室温下阻断 1 小时。没有备解素覆盖的孔作为背景对照。将单克隆抗 - 备解素抗体 IgG, F(ab')₂ 和 Fab 的等分部分加入备解素覆盖的孔中，并且使孵育 1 小时以允许抗体及其片段的结合。在室温下孵育 1 小时后，将板使用 PBS 洗涤五次，并且和 1 : 2000 稀释的检测过氧化物酶 - 缀合的山羊抗 - 小鼠单克隆抗体孵育。在该孵育后，将板冲洗，并且使用 TMB 试剂来鉴定结合的过氧化物酶。如图 2 中所示，NM9401-IgG, NM9401-F(ab')₂ 和 NM9401-Fab 高亲和性地结合备解素。

[0141] 实施例 2

[0142] 抗 - 备解素 IgG, F(ab')₂ 和 Fab 抑制交替途径（AP）依赖性兔红细胞（rRBC）胞溶

[0143] 该红细胞胞溶测定基于 rRBC 表面上末端补体络合物的形成。由于形成该络合物，

rRBC 胞溶。在 700nm 处光散射的进展性降低是红细胞胞溶的直接量度。rRBC 在含有 5mM $MgCl_2$ 的明胶佛罗拿缓冲液 (AP 缓冲液) 中、在正常人血清中孵育。在这些条件下, rRBC 的表面在正常人血清中引发交替途径的活化。交替途径活化导致在 rRBC 的表面上形成 C5b-9 络合物。期望抑制 C5b-9 络合物形成的药剂抑制细胞胞溶。为了评价抗-备解素抗体及其片段的效果, 各种浓度的 IgG, $F(ab')_2$ 和 Fab 和正常人血清 (10% NHS) 在 AP 缓冲液中在 37°C 下和固定浓度的兔红细胞孵育。使用能够在 700nm 处读取的温度控制的 ELISA 板读数器评价 rRBC 胞溶。在 700nm 处测量的光散射的进展性降低 (由于完整细胞的胞溶) 是时间的函数。记录数据, 并且使用 SpectraMax 190 板读数器和 SoftMax 软件分析。为了评价, 在各浓度的 IgG, $F(ab')_2$ 和 Fab 处计算总抑制, 并且结果表示为未胞溶对照的百分比。各浓度处的数据使用 MicroCal Origin 软件在 S 形图中绘制。如图 3 中所示, IgG 和 IgG 片段在正常人血清中抑制 rRBC 的 AP 依赖性溶血, IC_{50} 为约 5.8 和 17.2nM。

[0144] 实施例 3

[0145] 抗-备解素单克隆抗体不抑制经典途径活化

[0146] 本发明的单克隆抗体不抑制宿主防御所需要的经典途径。抗体增敏的绵羊红细胞和 1% 或 10% 正常人血清在含有钙 (5mM $CaCl_2/MgCl_2$) 缓冲液的明胶佛罗拿缓冲液 (CP 缓冲液) 中孵育。抗体增敏的绵羊细胞活化经典途径。结果, C5b-9 形成在红细胞表面上并引起细胞胞溶。我们检测 1% 和 10% 正常人血清。在两种条件下, NM9401 抑制红细胞胞溶。在典型测定中, 红细胞在 CP 缓冲液中的 1/10 正常人血清中孵育以允许发生补体活化。由于 CP 活化, C5b-9 形成在红细胞表面上, 从而引起细胞胞溶。在 700nm 处测量的光散射的进展性降低 (由于细胞胞溶) 是时间的函数。如图 4 中所示, 在两种血清浓度下 NM9401 IgG 不抑制抗体增敏的绵羊细胞的胞溶。没有血清对照显示可忽略的效果。这些结果表明抗-备解素抗体能够选择性抑制交替补体途径而不影响经典途径活化。

[0147] 实施例 4

[0148] 本发明的抗-备解素抗体抑制备解素结合 C3b

[0149] 备解素高亲和性地结合 C3b。本发明的抗-备解素抗体, 在含有固定浓度的备解素 (50nM) 的溶液中具有各种浓度, 在已经包覆 C3b 的孔中孵育。建立该实验以评价是否抗-备解素抗体将抑制备解素结合 C3b。如图 5 中所示, 对于 Fab2 在 29nM 下 NM9401 抑制备解素结合 C3b, 对于 Fab 在 72nM 下抑制备解素结合 C3b, 从而表明抗体和备解素的摩尔比在 0.5 至约 1.2 的范围内。

[0150] 实施例 5

[0151] 结合相同抗原表位的抗体竞争和抗原表位的结合

[0152] 使聚苯乙烯微量滴定孔板包覆备解素。将孔和 50nM 浓度的抗-备解素生物素酰化的完整抗体孵育以产生饱和曲线。将固定浓度的生物素酰化的抗体和改变浓度的未标记的指定为 ATCC 号 (PT A-10649) 的抗体孵育。使用 HRP0-neutavidin 缀合物通过检测生物素酰化的抗体来产生抑制曲线。这些研究表明, 结合备解素上的特定抗原表位的抗体不竞争备解素上的相同结合位点。数据示于图 6。

[0153] 实施例 6

[0154] 抗-备解素 IgG, $Fab' 2$ 和 Fab 抑制 C3b 的形成和沉积

[0155] 由于交替补体途径的 C3 转化酶切除 C3, AP 活化产生 C3a 和 C3b。在这样的条件下

交替补体途径在正常人血清中被来自 *Salmonella Typhosa* 的脂多糖活化, 该条件允许交替补体途径的活化。我们利用该测定来证实是否本发明的抗-备解素抗体将抑制 C3b 的形成和沉积。C3b 的沉积引发交替补体途径的开始。作为机理, 活化和沉积的 C3b 提供结合备解素的高亲和性。备解素-C3b 络合物结合因子 B, 并且络合物被因子 D 切除以产生 PC3bBb, 交替途径 C3 转化酶。随着交替途径进行, C5b-9 络合物形成和沉积。如图 7, 8 和 9 中所示, 抑制 C3b 的形成和沉积。因为抑制 C3b 的形成和沉积, 所以也抑制其他组分例如备解素、因子 Bb 和 C5b-9 的沉积。

[0156] 在典型测定中, 聚苯乙烯微量滴定板孔以 $2 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ 在 PBS 中包覆 LPS (来自 *Salmonella Typhosa* 的脂多糖) 过夜。将孔和 PBS 中的 BSA 孵育以阻断孔中的未占据的位点。在室温下进行 2 小时阻断并且使用 PBS 冲洗后, AP 缓冲液中的正常人血清 (10%) 混合各种浓度的抗-备解素抗体和衍生的片段。将混合物孵育到 LPS 包覆的孔上去。使板在 37°C 下孵育 2 小时以允许发生补体 AP 活化。在孵育后, 将板使用 PBS 彻底洗涤, 并且使用合适抗体来检测 C3 转化酶组分。我们使用在阻断溶液中 1 : 2000 的兔抗-人 C3c 检测 C3b, 使用山羊抗-人 P 检测备解素, 使用在阻断溶液中 1 : 500 的山羊抗-人因子 Bb 检测 Bb, 以及使用在阻断溶液中 1 : 2000 的 HRP0 缀合的抗-人 C5b-9 检测 C5b-9。板和它们各自抗体一起在室温下孵育 1 小时。在孵育后, 将板使用 PBS 冲洗, 并且使用在阻断溶液中 1 : 2000 (对于 C3b) 过氧化物酶标记的山羊抗-兔和 1 : 2000 (对于 P 检测) 过氧化物酶标记的兔抗-山羊检测结合的抗体。将所有板使用 TMB 显色, 之后使用 PBS 彻底洗涤。使用 1M 亚磷酸淬灭蓝色。C3b, P 和 Bb 以及 MAC 一起存在指示 AP C3 转化酶形成。本发明的抗体显示抑制 C3b 形成并因此抑制沉积 (图 7), PC3b 沉积 (图 8) 和 PC3bBb 沉积 (图 9)。该数据提供下列的直接证据: 抗-备解素单克隆抗体预防 C3 转化酶形成, 并因此预防 AP 活化。

[0157] 实施例 7

[0158] NM9405 在猪全血管回路模型中抑制血小板功能异常

[0159] 当血小板活化时发生血小板功能的损失。活化的血小板往往和白细胞聚集, 并且从血液循环中除去, 从而引起血小板减少。血小板功能异常源自血小板活化。封闭时间的测量良好地指示血小板功能。封闭时间定义为使血小板聚集并且阻断膜中的孔的时间。将全血 (0.8ml) 转移到试验柱的储库中。将血液加热至 37°C , 并且在真空下通过 $200 \mu\text{m}$ 不锈钢毛细管和包覆胶原蛋白的硝基纤维素膜中 $150 \mu\text{m}$ 的孔。在血液移动通过毛细管时, 其接触胶原蛋白包覆的膜。胶原蛋白引起形成血小板阻塞, 这阻断血流通过孔。闭塞孔的时间记录为封闭时间。在该过程中, 血小板初始粘附膜中的胶原蛋白覆层, 从而导致聚集。延长的封闭时间指示血小板功能异常。沿着离体血液循环的管道回路模型, 评价猪血的 AP 活性 (未示出) 和血小板功能。将全猪血的等分部分 (0.8ml) 转移自 Dade Behring 的一次性试验柱的储库中。将血液加热至 37°C , 并且在真空下通过 $200 \mu\text{m}$ 不锈钢毛细管和包覆胶原蛋白的硝基纤维素膜中 $150 \mu\text{m}$ 的孔。记录各样品的封闭时间并绘图。因为实验需要大量的血液, 因此仅测试少量回路。如图 10 中所示, 旋转的样品展示在 2h 循环期间中封闭时间增加 3 倍。NM9401-F(ab')₂-处理的血样显示抑制血小板功能异常。

[0160] 实施例 8

[0161] NM9401-F(ab')₂ 在经历心肺分流术的猪中抑制 AP 活化

[0162] 尽管 NM9401-F(ab')₂抑制 AP 活化,全血中的细胞活化,TNF- α 和弹性蛋白酶以及血小板功能异常,但是确定是否这样的研究将体内适用于经历心肺分流术的猪。在 IACUC 批准的方案下进行该猪研究。在该非存活性开胸 CPB 研究中,使两只雌性猪 (30Kg 重量) 进行开胸 CPB,其中一只处理并且一只作为对照。在手术步骤之前将两只动物镇静和插管。两只动物都接受和标准 CPB 手术步骤一致的临床剂量的肝素。在整个试验中监控生命指标例如温度, pCO₂, pO₂, pH, 血钙和 EKG, 以确保猪是稳定的。根据需要给猪施用白蛋白。也监控提间、血压和心率以及脉搏速率。使用 400ml 容量的 CPB 回路以及 plasmalyte 用于引发回路。在手术和分支的过程中,在手术前、劈开胸骨术后、以及分支术的过程中在各时间点收集血样 (3.0ml) :0, 15, 30, 75, 90, 105, 120, 135, 150 和 165 分钟。一只猪接受 NM9401-F(ab')₂, 另一只猪接受媒介物 (盐水)。以 3mg/Kg 体重 i. v. 施用快速灌注剂量的 NM9401-F(ab')₂, 并且评价对于 AP 活化, 备解素水平, 血小板功能异常和血液损失的作用。以规则时间间隔测量血浆样品中的 AP 补体活性。我们利用红细胞溶测定来测量 C5b-9。

[0163] NM9401-F(ab')₂ 处理的猪显示在整个 CPB 过程中抑制交替途径活化。NM9401-F(ab')₂ 在经历分支术的猪中中和备解素-备解素结合 C3b 和 C5, 并且通过转化酶装配来引发 AP 活化。NM9401-F(ab')₂ 在其活性位点结合备解素并阻断其功能。结果, AP 活化不会发生。如图 11 中所示, NM9401-F(ab')₂ 抑制 AP 活化, 这通过总备解素保留在血清中来测量。血小板功能异常是流血并发症的主要标志之一。在 CPB 过程中, 血小板活化, 活化的血小板聚集, 白细胞-血小板聚集物从血液循环中除去, 从而引起血小板减少。血小板表示 C3a 受体, 当被补体活化过程中产生的 C3a 占据时, 使血小板变得功能异常。功能异常的血小板显示封闭时间增加, 因为它们失去对应于胶原蛋白凝结的能力。因此, 血小板功能异常由 PFA-100 测量。盐水处理的猪证实封闭时间远多于 NM9401-F(ab')₂ 处理的猪。这些数据和我们上面列出的数据一致, 其中 NM9401-F(ab')₂ 在经历离体血液循环的分离血液中防止血小板功能异常。通过在 CPB 过程中在抽吸体系储库中收集的全部体积的血液测量的血液损失在 NM9401-F(ab')₂ 处理的猪中明显地降低。这些数据表明, NM9401-F(ab')₂ 对于降低 CPB 并发症是重要的。血液损失降低是有意义的发现, 因为其具有临床意义和临床环境中每位患者的手术成本的意义。在经历分支术的患者中记录过多的血液损失。我们测量在经历 CPB 的猪中总血液损失。和未处理的对照相比, 使用 NM9401-F(ab')₂ 处理的猪证实血液损失总共降低 67%。还防止血小板功能异常, 如图 12 中所示。

[0164] 实施例 9

[0165] NM9405 在兔中抑制心肌局部缺血再灌注损伤

[0166] 该研究评价快速灌注剂量的 NM9401-F(ab')₂ 在十二只兔中的效果, 其中六只处理并且六只作为对照。该研究使用 30 分钟的局部缺血、之后进行 2 小时的再灌注。如图 13 中所示, 处理组表示和对照组 (左组) 相比, 在六只动物 (右组) 中梗塞尺寸减小。使用产生梗塞的工序和四唑染色的方法和工序。这些初始数据显示 NM9401-F(ab')₂ 处理的动物具有比对照动物小的梗塞。从对照内曲的心脏和 NM9401-F(ab')₂ 处理的心脏制作着色的两组图。在加工后心脏部分切片, 并且使用四唑 (TTC) 染色。在实验中, 在再灌注结束时, 冠状动脉再次闭塞, 并且将荧光聚合物微球注入灌注液中以将局部缺血区 (危险区域) 划分为没有荧光的组织区域。将心脏称重, 冷冻, 并且切成 2mm 厚切片。将切片和 1% TTC (四唑染色) 在 PBS 中在 37°C 下孵育 10-12 分钟。TTC 使非梗塞的心肌层染色为砖红色。然后

使切片在 10% 福尔马林中固定以保存染色的（存活）和未染色的（坏死）组织。通过使用 UV 光照射切片来鉴定危险区域。通过各切片的测面法来确定梗塞和危险区域的面积，并且通过使各心脏的各面积乘以切片厚度、然后使它们求和来计算体积。

[0167] 实施例 10

[0168] NM9401-F(ab)₂ 在兔中抑制脉络膜新生血管

[0169] 脉络膜新生血管 (CNV) 可以在兔眼中通过激光来引起。该模型以多种方式模拟湿 AMD 模型。12 只健康兔（平均体重，约 2.5-4.0kg）用于该研究。根据 Care and Use of Laboratory Animals of the National Research Council (National Academy Press, 1996 修订) 的指南，所有动物接受人文关怀。使用盐酸氯胺酮 (24mg/kg) 和盐酸赛拉嗪 (6mg/kg) 的混合物 (4 : 1) 麻醉兔。使用 1% 托品酰胺和 2.5% 盐酸苯肾上腺素滴眼液放大瞳孔。通过使用手持盖片作为隐形眼镜，Krypton 红色激光器光凝固术 (50- μ m 斑点尺寸, 0.05-s 持续时间, 250mW) 用于在围绕视神经的各眼中产生多种激光斑点。在激光斑点处形成的气泡指示 Bruch 膜的破裂。在激光处理后，使用共聚焦显微镜术来评价激光斑点用于在 28 天存在 CNV。在麻醉和瞳孔放大后，使用 28- 口径注射针通过角膜缘进入前房，以使眼睛减压。在运行显微镜下，其允许视网膜的可视化，32- 口径（无峰）注射针通过巩膜切开部（仅在角膜缘后面），进入玻璃体房或视网膜下空间。Hamilton 注射器用于注射 NM9401-F(ab')₂。在安乐死时，使用过剂量的氯胺酮 / 赛拉嗪混合物 (4 : 1) 来麻醉兔，并且使用含有 50mg/ml 荧光素 - 标记的右旋糖酐 (FITC- 右旋糖酐, 2 百万平均分子量, Sigma) 的 1ml PBS 灌注通过心脏。将眼睛除去，并且在 10% 磷酸盐缓冲的福尔马林中固定 1h。将角膜和水晶体除去，并且从眼窝中仔细地切割感觉神经的视网膜。从眼窝边缘至中纬线制备 5 个径向切片；使巩膜 - 脉络膜 - 视网膜色素上皮组织 (RPE) 络合物平坦支架，其中巩膜朝下，在 aquamount 中的载玻片上。将平坦支架染色，并且使用共聚焦显微镜 (Zeiss LSM510) 检查。CNV 染为绿色而 Bruch 膜中的弹性蛋白染为红色。具有绿色血管的激光斑点记录为 CNV- 阳性，缺少绿色血管的激光斑点记录为 CNV- 阴性。在激光处理后 28 天，使所有动物灌注含有 50mg/ml 荧光素 - 标记的右旋糖酐 (FITC- 右旋糖酐；平均分子质量, 2×10^6 ; Sigma-Aldrich) 的 1ml 的 PBS，并处死。收集眼睛，并且在 10% 磷酸盐缓冲的福尔马林中固定，并且如上所示制备视网膜色素上皮组织 (RPE) - 脉络膜 - 巩膜瓣支架。激光斑点中的绿色是 CNV 络合物。如果发现 CNV < 3% 的总激光斑点面积，则其评级为阴性，而 CNV > 3% 认为是阳性。如图 14 中所示，在 28 天的时间内快速灌注预防剂量的 NM9401 降低兔中的 CNV。

[0170] 实施例 11

[0171] NM9401-Fab₂ 在使用单预防剂量处理的兔中抑制类风湿性关节炎中的关节损害

[0172] 使用文献中已知的公开的方法在兔中诱导关节炎。通过关节内、静脉内、腹膜内或皮下工序来给予动物快速灌注剂量。在 28 天处死动物。使四肢经历放射照相、CT 扫描和组织评价。在 200 μ g/ 膝关节下 NM9401-Fab₂ 处理的动物防止关节损伤。如图 15 中所示，这些数据显示 NM9401-Fab₂ 提供组织、软骨和骨骼避免关节损伤。

[0173] 实施例 12

[0174] 鼠源单克隆抗体的测序

[0175] 将杂交瘤筛选 NM9401-IgG1 小球化，并且将总 RNA 分离。oligo dT 引物和逆转录酶合成 cDNA。使用一组小鼠特异性 kappa 引物从 cDNA 扩增 Kappa 轻链可变结构域。正向

引物被设计联合 kappa 特异性反向引物来扩增小鼠轻链可变结构域。七种不同的引物组合 (mK2, mK3, mK7, mK8, mK9, mk10, mK11) 导致预期尺寸的 PCR 产物。将 PCR 产物凝胶纯化, TOPO-TA 克隆和测序 (各 4 个克隆)。序列分析揭示引物组合 mK2, mK3, mK7, mK8, mK9 和 mK11 扩增相同的轻链序列 (基于引物模糊性仅有微小的变化)。这些克隆在 CDR3/ 框架 4 区中具有终止密码子, 从而产生非生产性 V-J 重排。源自引物组合 mk10 的克隆的序列分析表明单一轻链扩增。为了验证获得的序列的 N- 端, 使用退火至分泌信号的正向引物和对于克隆 mK10 中 CDR3 具有特异性的反向引物进行另外的 PCR 反应。使用第二引物组获得完全相同的 DNA 序列。还使用特定组的小鼠特异性重链引物以类似的方式从 cDNA 扩增重链可变结构域。正向引物被设计联合 IgG1/2 特异性反向引物来扩增小鼠重链可变结构域。五种不同的引物组合 (mH1, mH2, mH4, mH5 和 mH6) 导致预期尺寸的 PCR 产物。将 PCR 产物凝胶纯化, TOPO-TA 克隆和测序 (各 4 个克隆)。序列分析揭示引物 mH2 仅仅扩增非 - 抗体特异性小鼠转录体。引物组合 mH4 和 mH5 扩增相同的转录体。

[0176] 引物组合 mH1 和 mH6 导致具有轻微氨基酸变化的三种克隆。框架 1 (7 至 9 的 aa 位置) 中的三种氨基酸差别由于引物序列。64 位的氨基酸改变可能由 PCR 错误引起。进行针对小鼠基因组的 BLAST 检索, 以鉴别对应的基因种系 V 区基因。小鼠基因种系基因 IgH1-4 鉴别为最接近的匹配 (89% 一致性)。使用对于基因种系基因 IgH1-4 的 N- 端具有特异性的正向引物和对于在前面步骤中鉴别的 CDR3 具有特异性的反向引物进行另外的 PCR 反应。所得 PCR 产物是 TOPO-TA 克隆, 并且将 10 种克隆测序。所有克隆具有完全相同的序列。CDR-H1, CDR-H2 和 CDR-H3 是抗体的可变区内的三种 CDR 序列。重链序列示于图 16, 24, 25 和 26。相应地, 轻链序列示于图 17, 21, 22 和 23。抗原表位映射序列示于图 29。

[0177] 实施例 13

[0178] 测试纯化的重组抗体 BAP0101 与抗原备解素的结合

[0179] 计算的 Kd 值和初始小鼠抗体的 Kd 具有良好的相关性。也在溶血测定中测试重组抗体。在该测定中, 不能检测到活性。从 400ml 无血清细胞培养物上清中纯化嵌合抗体。将细胞培养物上清上柱到蛋白 G 柱 (在 10mMNa₂HPO₄/Na H₂PO₄, pH 7.0 中平衡) 上。将柱使用 20CV 的结合缓冲液来洗涤。使用不连续梯度 (洗脱缓冲液: 12.5mM 柠檬酸, pH 2.7) 来洗脱结合的蛋白。收集 0.5ml 馏分并且立即中和 (50ul, 0.5M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 8.0)。使用标准 ELISA 方案测定来自蛋白 G 柱的各个馏分中的重组 IgG 的量, 其中抗 - 人 IgG 缀合 HR 作为第二抗体和纯化的人 IgG。

[0180] 嵌合抗 - 备解素单克隆抗体和 NM9401-IgG 的结合亲和性如所预期的那样显示为相当的。这示于图 18。

[0181] 通过鼠源和嵌合抗 - 备解素单克隆抗体抑制备解素结合 C3b 显示为相当的, 这由图 19 指示。

[0182] 此外, 使用兔红细胞作为用于 MAC 胞溶的靶细胞在红细胞胞溶测定中评价两种单克隆抗体。NM9401-IgG 和嵌合单克隆 BAP010_1 都显示为相当的, 抑制的 IC₅₀ 值为约 20-30nM, 这由图 20 所示。

[0183] 实施例 14

[0184] 人源化抗 - 备解素单克隆抗体的结合和功能活性

[0185] 将来自 16 个鉴定的克隆中的每个的上清浓缩, 定量, 和在备解素 ELISA 中评价, 以

确定结合常数,如图 40 中所示。13pM 至 57pM 的结合亲和性和嵌合金标准 BAP010_1 的 54pM 的亲和性进行比较。各种克隆的亲和性显示高于初始金标准 $K_d = 255\text{pM}$ 。在给定浓度下评价各克隆的功能活性。如图 41 中所示,所有克隆以变化的效果来抑制交替途径活化。基于结合亲和性和 AP 活化选择三种克隆。选择这些三种克隆以用于进一步表征。如下面所示:

[0186] SEQ ID NO 19 > BAP010hum02_LC

[0187] SEQ ID NO 36 > BAP010hum02_HC

[0188] SEQ ID NO 20 > BAP010hum03_LC

[0189] SEQ ID NO 37 > BAP010hum03_HC

[0190] SEQ ID NO 27 > BAP010hum10_LC

[0191] SEQ ID NO 44 > BAP010hum10_HC

[0192] 图 27 示出三种选择的人源化单克隆抗体的结合亲和性。而且,图 28 示出红细胞溶测定的结果,其证实所有三种能够在正常人血清中抑制交替途径活化。

[0193] 从本发明的上述描述,本领域技术人员将意识到改善、改变和修改。本领域内的这些改善、改变和修改旨在被所附权利要求书覆盖。本申请中引用的所有引用文献、公开文献和专利通过引用的方式全部并入本文。

[0001]

序列表

<110> R•班萨尔

<120> 人源化和嵌合抗-备解素抗体

<130> NMT-019687WO ORD

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 实验室老鼠

<400> 1

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[0002]

100

105

110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr

115

120

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Thr Ala Ser

20

25

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1

5

10

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln

1

5

10

15

[0003]

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr Pro Ile His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe Arg
 1 5 10 15

Asp

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT

[0004]

<213> 智人

<400> 8

Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr

1 5

<210> 9

<211> 138

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Phe Phe

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala

100 105 110

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

[0005]

115

120

125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn

130

135

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser

1

5

10

15

[0006]

Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe
 20 25 30

<210> 13
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 13

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 20 25 30

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
 35 40

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 14

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Phe Phe Leu Asn
 1 5 10

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 15

Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser
 1 5

[0007]

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly

[0008]

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 21

<211> 101

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

[0011]

65	70	75	80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly			
	100		
<210> 22			
<211> 101			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 22			
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Phe Phe			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly			
	100		

[0012]

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

- <210> 27
- <211> 101
- <212> PRT
- <213> 智人

- <400> 27

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

[0016]

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Phe Phe			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly			
	100		
<210>	30		
<211>	101		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	30		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Phe Phe			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45

[0018]

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 31
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

[0019]

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 32
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Phe Phe
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

[0020]

<210> 33
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Tyr His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly
 100

<210> 34
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 34

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

[0021]

Ser Val Lys Met Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

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

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

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

[0022]

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

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

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

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

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

[0023]

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

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

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

Pro Ile His Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

<210> 38

[0024]

<211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38

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

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

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

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 39
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39

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

[0025]

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

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

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 40

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

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

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

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

[0026]

Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 41
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 41

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

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

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

Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0027]

	85	90	95
Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
<210> 42			
<211> 111			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 42			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr			
	20	25	30
Pro Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe			
	50	55	60
Arg Asp Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
<210> 43			
<211> 111			

[0028]

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

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

Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 45

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

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

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

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

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe

[0030]

	50	55	60	
Arg Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val				
65		70	75	80
Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys				
	85		90	95
Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly				
	100		105	110
<210> 46				
<211> 111				
<212> PRT				
<213> 智人				
<400> 46				
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala				
1	5		10	15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr				
	20		25	30
Pro Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
	35		40	45
Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe				
	50		55	60
Arg Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr				
65		70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85		90	95

[0031]

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 47
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 47

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 48
 <211> 111
 <212> PRT

[0032]

<213> 智人

<400> 48

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

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

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

Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

<210> 49

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 49

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr

[0033]

	20	25	30	
Pro Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val				
	35	40	45	
Ser Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe				
	50	55	60	
Arg Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr				
65	70	75	80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
Ala Arg Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly				
	100	105	110	
<210>	50			
<211>	111			
<212>	PRT			
<213>	智人			
<400>	50			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu				
1	5	10	15	
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr				
	20	25	30	
Pro Ile His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met				
	35	40	45	
Gly Phe Ile Asp Pro Gly Gly Gly Tyr Asp Glu Pro Asp Glu Arg Phe				
	50	55	60	

[0034]

补体级联

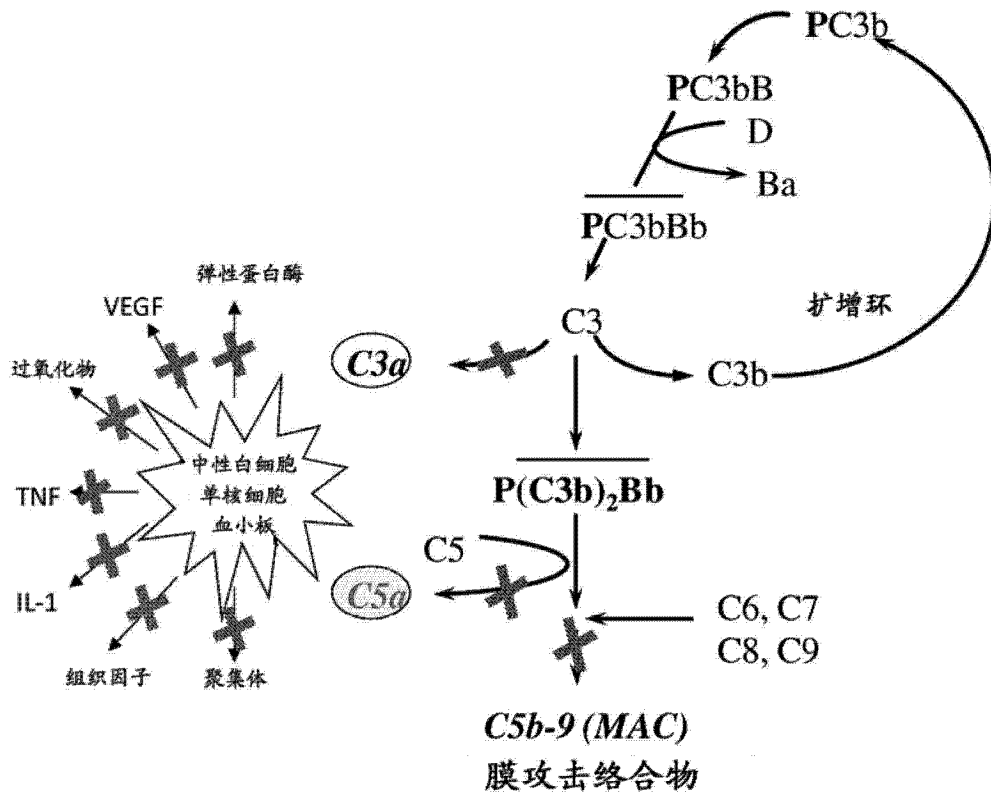


图 1

抗-备解素结合备解素

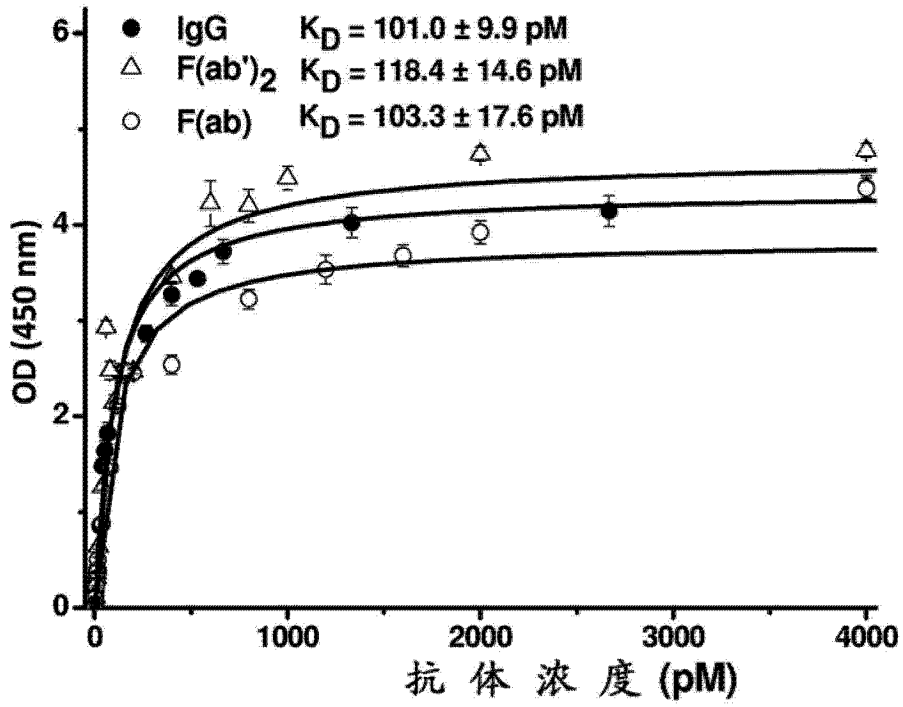


图 2

抗-备解素抑制 rRBC 的溶血

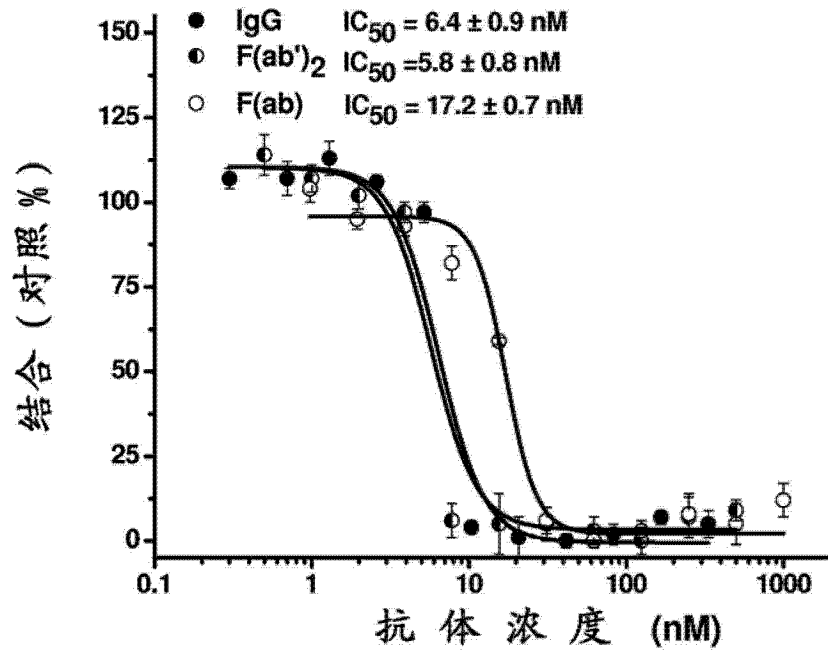


图 3

抗-备解素抗体不抑制经典途径

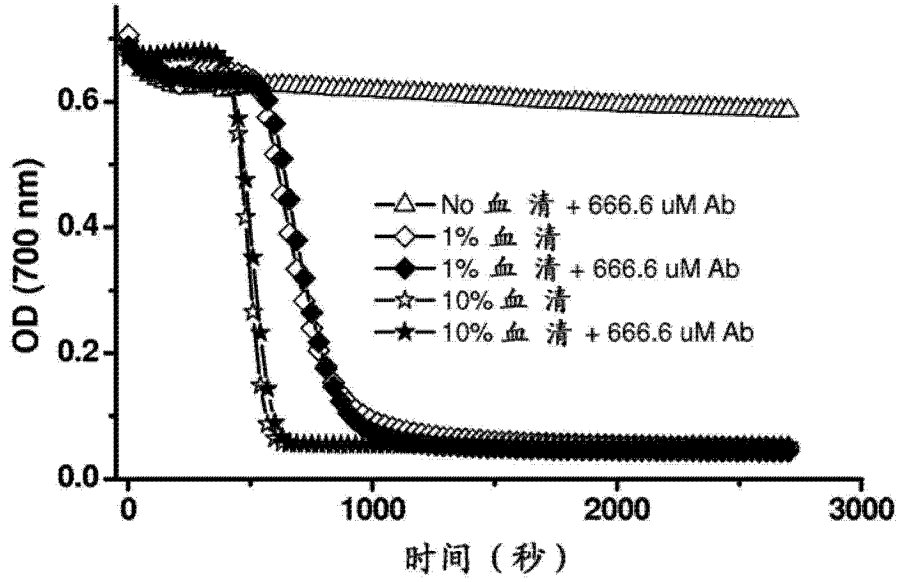


图 4

抗-备解素抑制备解素与 C3b 的结合

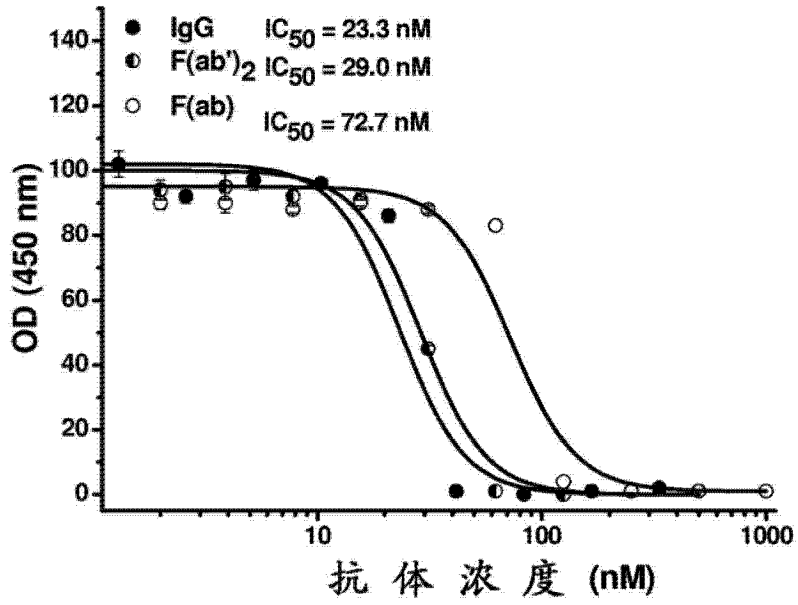


图 5

抗-备解素抗体不竞争其他抗-P 抗体

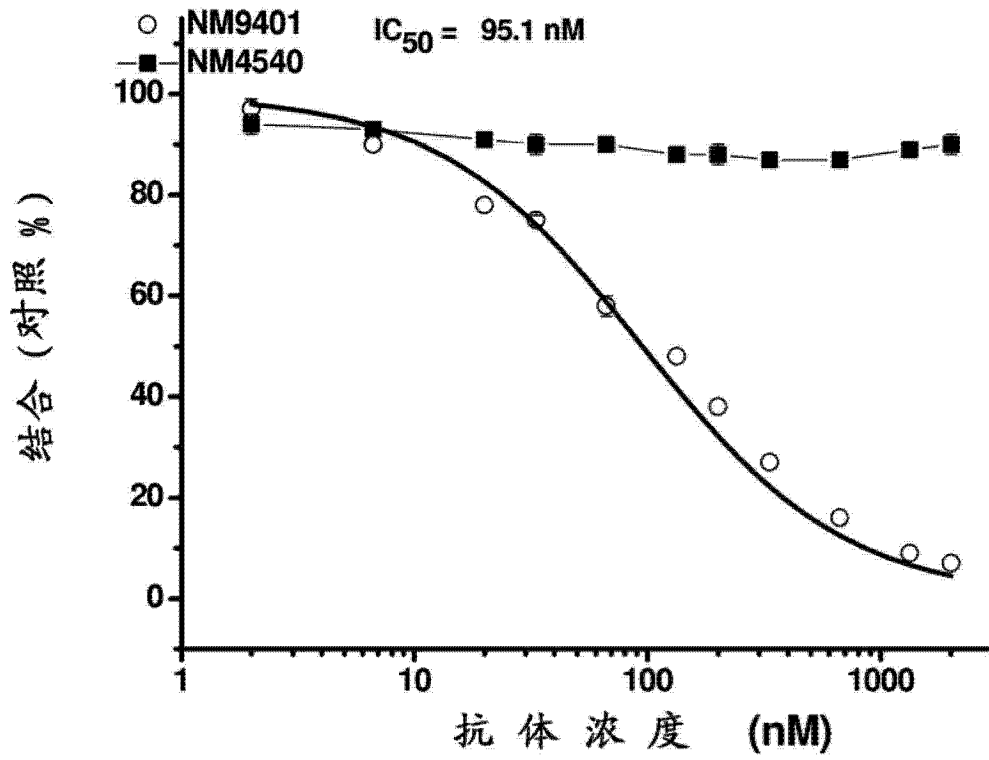


图 6

抗-备解素抑制通过 AP 活化形成新 C3b

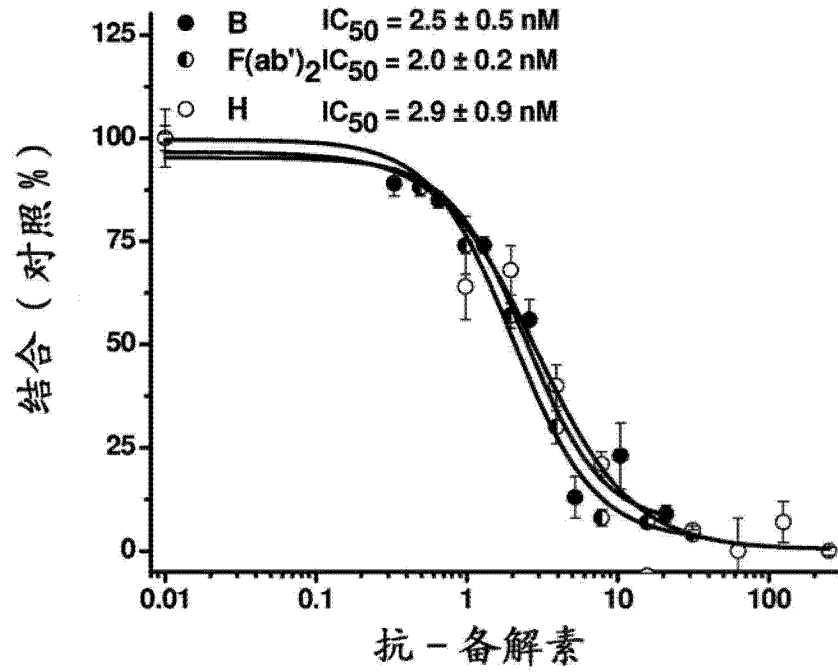


图 7

抗-备解素抑制通过 AP 活化形成新 PC3b

NM9401 抑制 P 沉积到 LPS 上

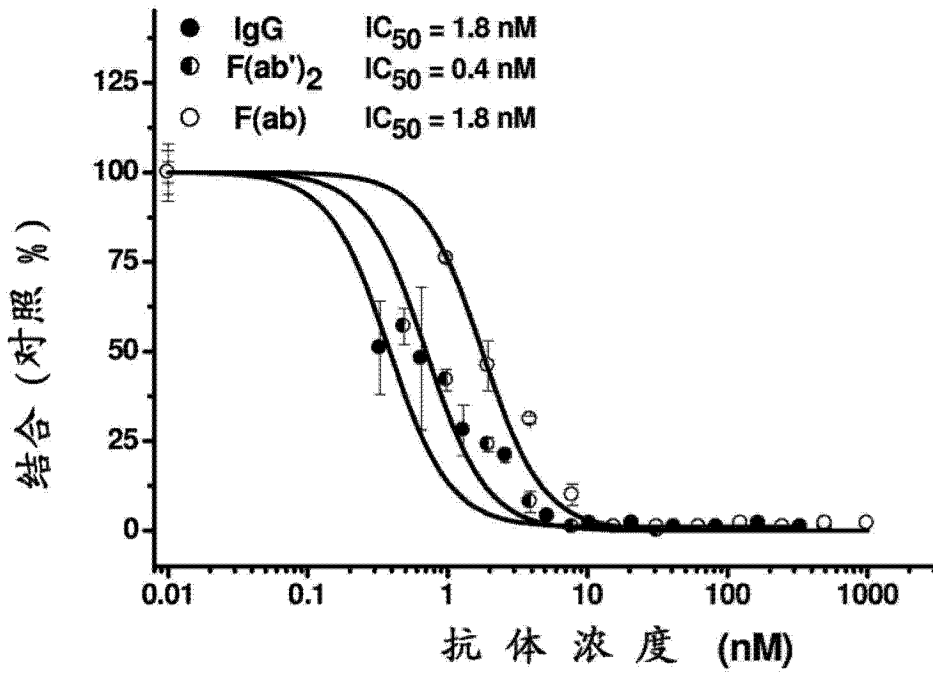


图 8

抗-备解素抗体抑制通过 AP 活化形成 PC3bBb

NM9401 抑制 B 沉积到 LPS 上

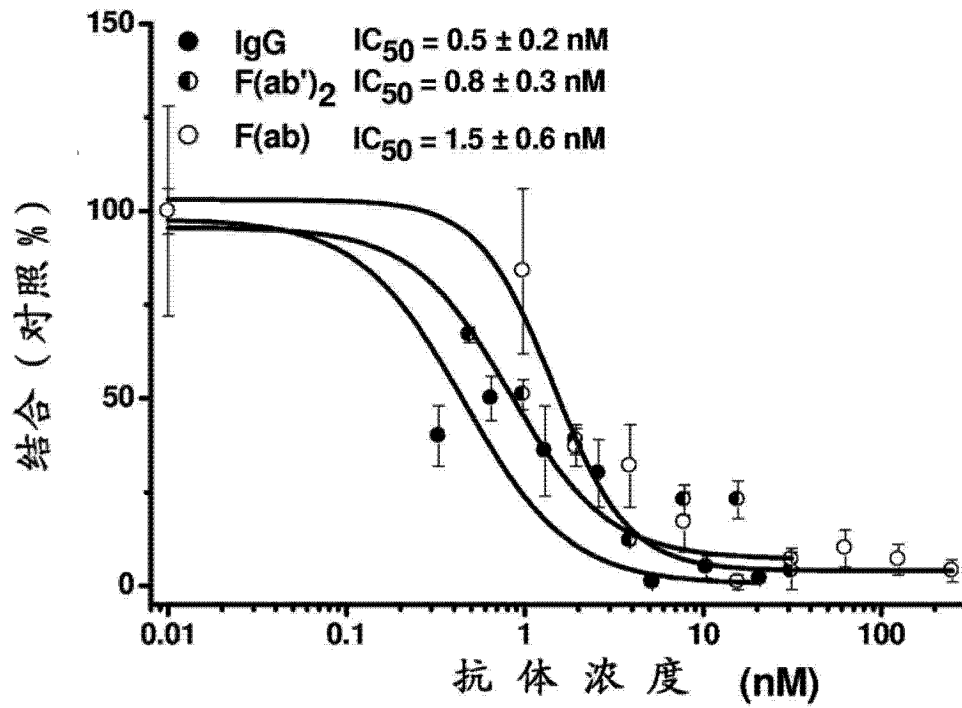


图 9

抗-备解素在全血中抑制血小板功能异常

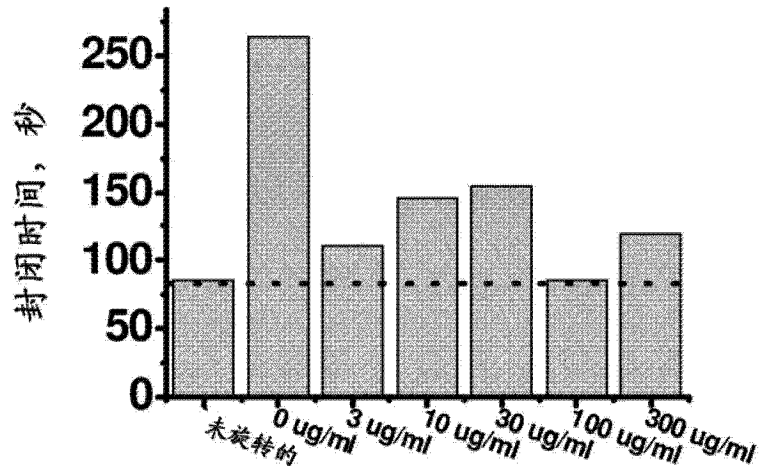


图 10

抗-备解素在进行分流术的猪中抑制 AP 活化

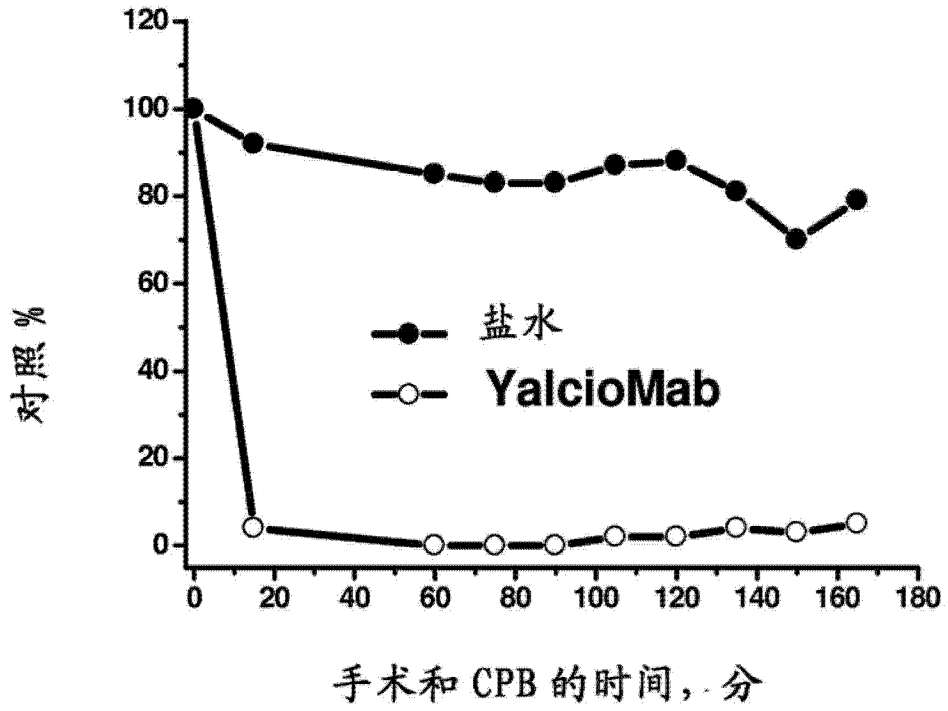


图 11

抗-备解素在进行分流术的猪
中抑制血小板功能异常

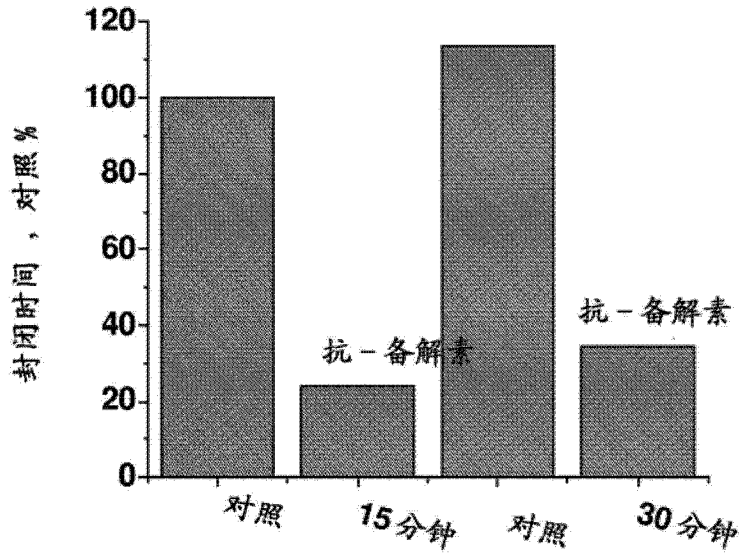
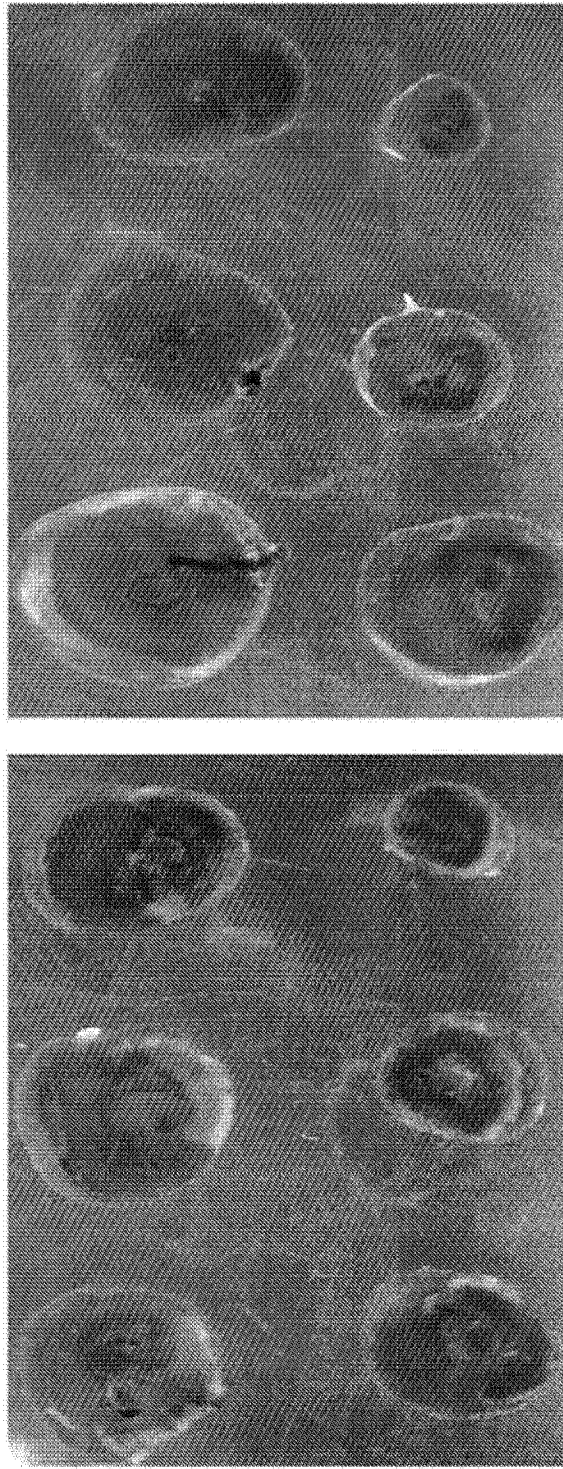


图 12

抗-备解素抑制心肌局部缺血再灌注



处理的兔心脏

对照兔心脏

图 13

抗-备解素抑制脉络膜新生血管

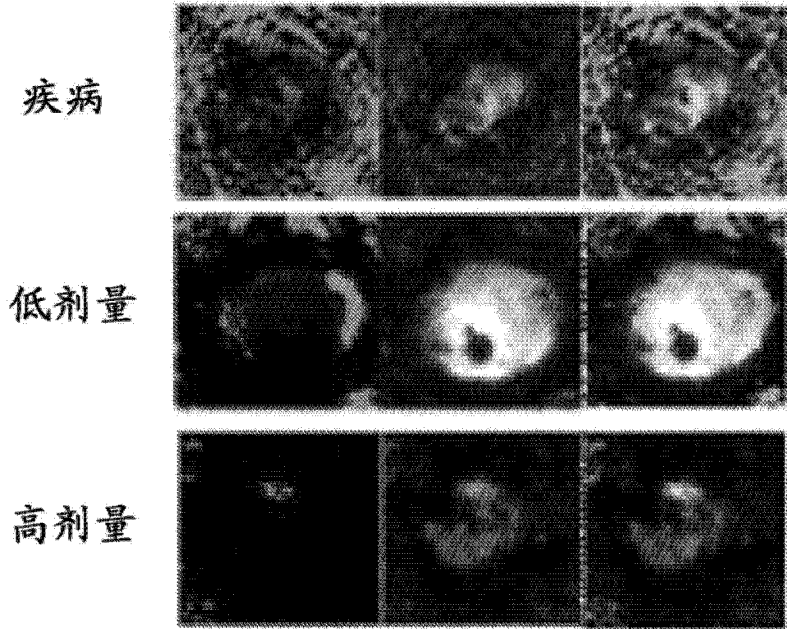


图 14

抗-备解素抑制风湿性关节炎

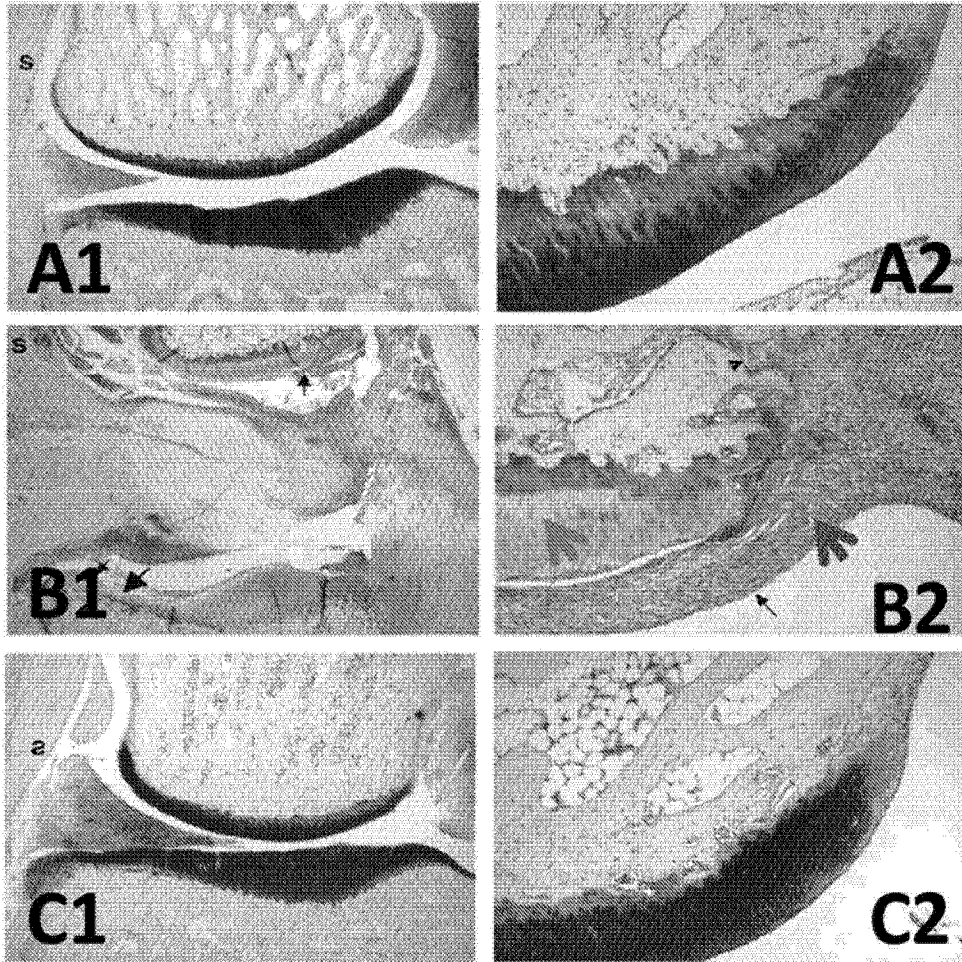


图 15

SEQ ID NO 1: 重链的可变区
 QVQLQQSAPELARPGASVKMSCTASGYIFTNYPPIHWVK
 QRPQQGLEWIGFIDPGGYDERFRDRAITLTADKSS
 STAYMQLSSLTSEDSAIYCARGGGYLDYWGQGTTLT
 VSSAKTT

SEQ ID NO 2: 重链框架 #1
 QVQLQQSAPELARPGASVKMSCTAS

SEQ ID NO 3: 重链框架 #2
 WVKQRPQQGLEWIG

SEQ ID NO 4: 重链框架 #3
 RATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYCAR

SEQ ID NO 5: 重链框架 #4
 WGGGTTTLTVSSAKTT

SEQ ID NO 6: 重链 CDR-H1
 GYIFTNYPPIH

SEQ ID NO 7: 重链 CDR-H2
 FIDPGGYDEPDERFRD

SEQ ID NO 8: 重链 CDR-H3
 RGGGYLDY

图 16

SEQ ID NO 9: 轻链的可变区
 DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISFLNWYQQ
 KPDGTVKLLIYTSRYHSGVPSRFSGSGTDFSLTIN
 NLEQEDFATYFCQHGNLTPWTFGGTKLEIKRADAAPT
 VSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLNN

SEQ ID NO 10: 轻链框架 #1
 DIQMTQTTSLSASLGDRVTISO

SEQ ID NO 11: 轻链框架 #2
 WYQQQKPDGTVKLLIY

SEQ ID NO 12: 轻链框架 #3
 GVPSSRFSGSGSGTDFTSLTINLEQEDFATYF

SEQ ID NO 13: 轻链框架 #4
 FGGGTKLEIKRADAAPTVSIFFPPSSSEQLTSGGASVVCFL
 NN

SEQ ID NO 14: 轻链 CDR-L1
 RASQDISFFLN

SEQ ID NO 15: 轻链 CDR-L2
 YTSRYHS

SEQ ID NO 16: 轻链 CDR-L3
 QHGNLTPWT

图 17

抗-备解素抗体高亲和性地结合人备解素

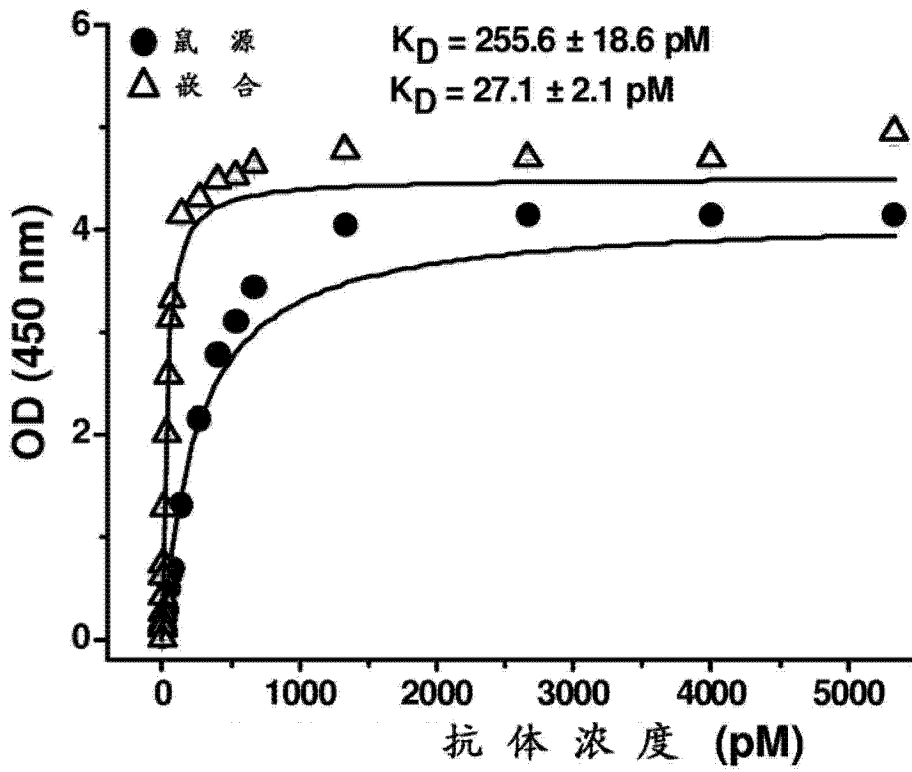


图 18

抗-备解素抗体抑制备解素结合 C3b

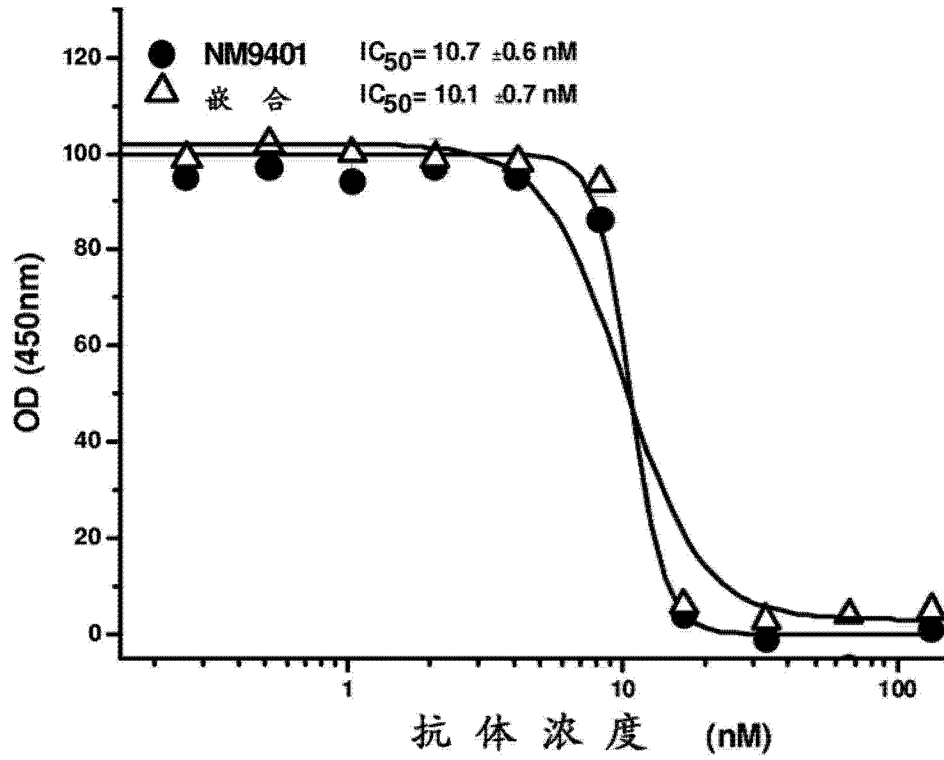


图 19

抗-备解素抗体在正常人血清中抑制 AP 活化

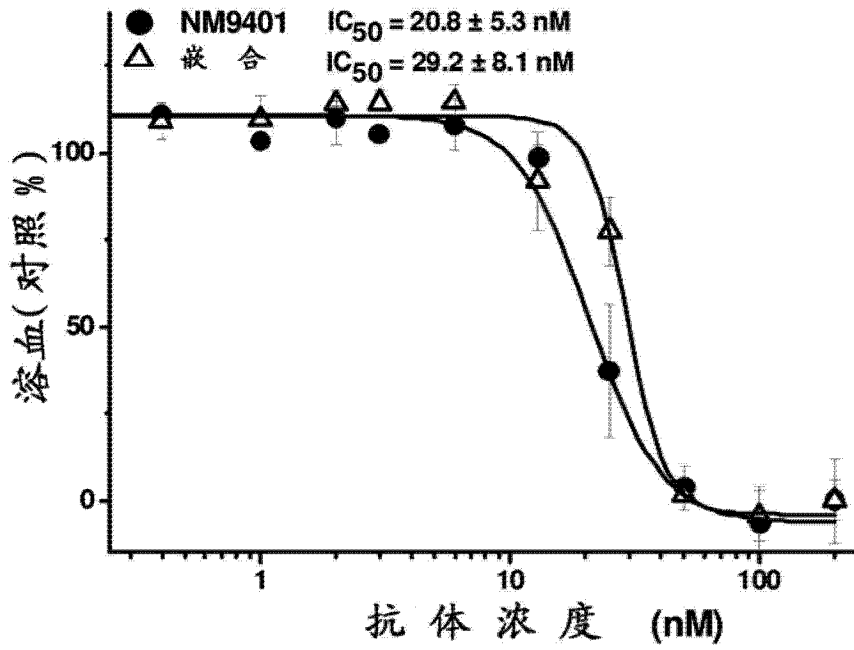


图 20

嵌合和人源化抗体 - 轻链序列

嵌合

```

SEQ ID NO 17
>BAP010_ILC
DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISFFLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGGSGGT
DFSLTINLEQEDFATYFCQHGNTLPWTFGGG

```

人源化

```

SEQ ID NO 18
>BAP010hum01_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISFFLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGGSGGT
EFTLTSSLSQSEDFAVYYCQHGNTLPWTFGGG

```

```

SEQ ID NO 19
>BAP010hum02_LC
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISFFLNWFQQRPGQSPRRLIYYTSRYHSGIPPSRFSGGSGYGT
FTLTINIESEDAAYFCQHGNTLPWTFGGG

```

```

SEQ ID NO 20
>BAP010hum03_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISFFLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGGSGGT
EFTLTSSLSQSEDFAVYYCQHGNTLPWTFGGG

```

```

SEQ ID NO 21
>BAP010hum04_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISFFLNWYQQKPSQLLIYYTSRYHSGVPSRFSGGSGGT
EFTLTSSLPDDFATYFCQHGNTLPWTFGGG

```

图 21

人源化抗体 - 轻链序列

```

SEQ ID NO 22
>BAP010hum05_LC
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSG
SGTDFFTISSLSQPEDVATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 23
>BAP010hum06_LC
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSG
SGTDFFTISSLSQPEDVATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 24
>BAP010hum07_LC
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSG
SGTDFFTISSLSQPEDVATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 25
>BAP010hum08_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYLQKPGQSPQLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISSLSQPEDVATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 26
>BAP010hum09_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRYHSGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISSLSQSEDFAVYCCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 27
>BAP010hum10_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRYHSGIPPRFSGSG
YGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQHGNTLPWTFGQG

```

图 22

嵌合和人源化抗体 - 轻链序列

```

SEQ ID NO 28
>BAP010hum11_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSRYHSGVPSRFSGS
GSGTEFTLTISSLSQSEDFAVYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 29
>BAP010hum12_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSRYHSGVPSRFSGS
GSGTEFTLTISSLSQPDDFATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 30
>BAP010hum13_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSRYHSGVPSRFSGS
GSGTEFTLTISSLSQSEDFAVYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 31
>BAP010hum14_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSRYHSGIPPRFSGS
GYGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 32
>BAP010hum15_LC
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSRYHSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLPEDIAATYYCQHGNTLPWTFGQG

SEQ ID NO 33
>BAP010hum16_LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISFFLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSRYHSGVPSRFSGS
GSGTEFTLTISSLSQSEDFAVYYCQHGNTLPWTFGQG

```

图 23

嵌合和人源化抗体 - 重链序列

嵌合

SEQ ID NO 34
 >BAP010_1_HC
 QVQLQSQAPELARPGASVKMSCTASGYIFTNYPHIVKRPQGQGLEWIGFIDPGGGYDEPDERFRDR
 ATLTAADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARRGGYYLDYWGQG

人源化

SEQ ID NO 35
 >BAP010hum01_HC
 QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGYIFTNYPHIVRQAPGKGLWVWVDFIDPGGGYDEPDERFRDRV
 TISVDTSKNOFSLKLSVTAADTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 36
 >BAP010hum02_HC
 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHIVRQPPGKGLWIGFIDPGGGYDEPDERFRDRFV
 FSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 37
 >BAP010hum03_HC
 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHIVRQSPRGLWLGWVDFIDPGGGYDEPDERFRDRV
 TISADKSISTAYLQWSSSLKASDTAMYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 38
 >BAP010hum04_HC
 QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGYIFTNYPHIVRQAPGKGLWVWVDFIDPGGGYDEPDERFRDRV
 TISVDTSKNOFSLKLSVTAADTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 39
 >BAP010hum05_HC
 QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGYIFTNYPHIVRQAPGKGLWVWVDFIDPGGGYDEPDERFRDRV
 TISVDTSKNOFSLKLSVTAADTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

图 24

嵌合和人源化抗体 - 重链序列

```

SEQ ID NO 40
>BAP010hum06_HC
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHWRIRQPPGKGLEWIGFIDPGGGYDEPDERFRDRFVFS
LDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYVCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 41
>BAP010hum07_HC
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHWRIRQAPGQGLEWMGFIDPGGGYDEPDERFRDRFV
FSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYVCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 42
>BAP010hum08_HC
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHWRIRQPPGKGLEWIGFIDPGGGYDEPDERFRDRFVFS
LDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYVCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 43
>BAP010hum09_HC
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHWRIRQPPGKGLEWIGFIDPGGGYDEPDERFRDRFVFS
LDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYVCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 44
>BAP010hum10_HC
GVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYIFTNYPHWRIRQATGQGLEWMGFIDPGGGYDEPDERFRDRVTI
TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYVCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 45
>BAP010hum11_HC
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYIFTNYPHWRIRQAPGKGLEWVWFIDPGGGYDEPDERFRDRLTIS
KDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYVCARRGGYYLDYWGQG

```

图 25

嵌合和人源化抗体 - 重链序列

```

SEQ ID NO 46
>BAP010hum12_HC
EVQLVQSGAEVKKPKGATVKISKVSGYIFTNYPHWRQAPGKGLEWVSFIDPGGGYDEPDERFRDRFTISR
NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 47
>BAP010hum13_HC
EVQLVQSGAEVKKPKGATVKISKVSGYIFTNYPHWRQAPGKGLEWVSFIDPGGGYDEPDERFRDRFTISR
NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 48
>BAP010hum14_HC
EVQLVQSGAEVKKPKGESLRISKVSGYIFTNYPHWRQAPGKGLEWVSFIDPGGGYDEPDERFRDRVTISVD
TSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 49
>BAP010hum15_HC
EVQLVQSGAEVKKPKGATVKISKVSGYIFTNYPHWRQAPGKGLEWVSFIDPGGGYDEPDERFRDRFTISR
NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGYYLDYWGQG

SEQ ID NO 50
>BAP010hum16_HC
EVQLVQSGAEVKKPKGESLRISKVSGYIFTNYPHWRQATGQGLEWVMGFIDPGGGYDEPDERFRDRFTISR
DDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRGGYYLDYWGQG

```

图 26

人源化抗-备解素抗体 结合人备解素

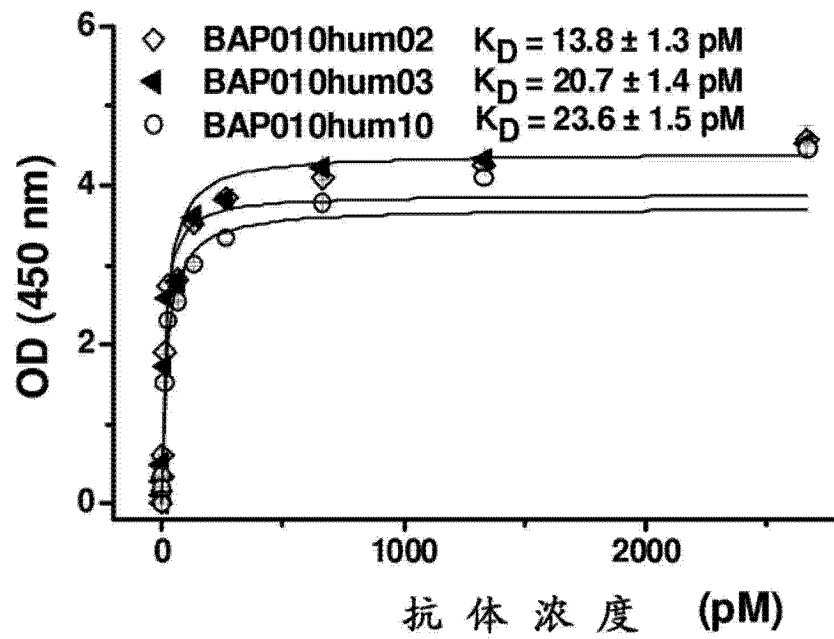


图 27

人源化抗-备解素抑制红细胞溶血

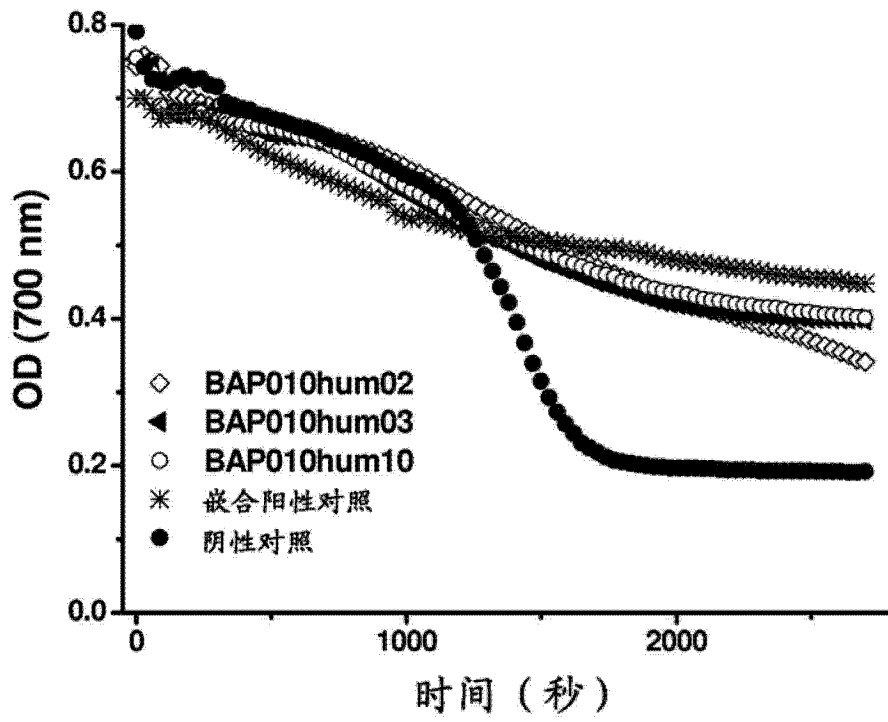


图 28

抗-备解素抗体结合人备解素的抗原表位映射

SEQ ID 51: SPRWSLWSTWAPCSVTCSEGSQRLRYRRCVGVWNG

图 29