



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101506237 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200780031002. 5

C12N 5/20 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 08. 22

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/839, 634 2006. 08. 22 US

US 20030113798 A1, 2003. 06. 19, 全文.

WO 2003062278 A1, 2003. 07. 31, 全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 02. 20

审查员 肖晶

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2007/001207 2007. 08. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/022390 EN 2008. 02. 28

(73) 专利权人 G2 炎症私人有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72) 发明人 查尔斯·雷伊·麦凯

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 章社杲 张英

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书33页

序列表24页 附图13页

(54) 发明名称

具有改进性能的抗 -C5aR 抗体

(57) 摘要

本发明涉及改进的抗体, 其结合至 C5aR 并且用于诊断和治疗方法中。

1. 一种抗体, 包含:
 - (i) SEQ ID NO:3 中示出的可变重链和 SEQ ID NO:4 中示出的可变轻链;或
 - (ii) 包含 SEQ ID NO:3 中示出的可变重链序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 环序列的可变重链和包含 SEQ ID NO:4 中示出的可变轻链序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 环序列的可变轻链。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体, 所述抗体结合至人类 C5aR, 其中
 - (i) 当在相同条件下测定时, 其 IC_{50} 值比 MAb7F3 低至少 1.5 倍;或
 - (ii) 当在相同条件下测定时, 其缔合常数 (K_{on}) 比 MAb7F3 高至少 1.5 倍;或
 - (iii) 当在相同条件下测定时, 其 K_d 亲和常数比 MAb7F3 低至少 1.3 倍。
3. 根据权利要求 1 所述的抗体, 所述抗体结合至人类 C5aR, 其中
 - (i) 其 IC_{50} 值小于 500pM;或
 - (ii) 其缔合常数 (K_{on}) 为至少 $6.8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$;或
 - (iii) 其 K_d 亲和常数小于 1.4nM。
4. 根据权利要求 1 所述的抗体, 所述抗体结合至人类 C5aR, 其中, 其 IC_{50} 值小于 300pM。
5. 根据权利要求 1 所述的抗体, 所述抗体结合至人类 C5aR, 其中, 其 IC_{50} 值小于 200pM。
6. 根据权利要求 2 所述的抗体, 其中, 所述抗体结合至包含序列 LYRVVREEYFPPKVLGVD YSHDKRRERAVAIV 的 C5aR 的片段。
7. 根据权利要求 1 所述的抗体, 其中, 所述抗体是单克隆、重组抗体, 嵌合或人源化抗体。
8. 一种单克隆抗体, 为 MAb3C5, 由在 ECACC 以登录号 06081801 保藏的杂交瘤细胞生产。
9. 根据权利要求 1 所述的抗体, 其中, 所述抗体与人类 C5aR 包含残基 175 ~ 206 的第二胞外环是反应性的。
10. 根据权利要求 1 所述的抗体, 其中, 所述抗体与包含人类 C5aR 的序列 EEEYFPP 即残基 179-184 的表位是反应性的。
11. 一种以登录号 06081801 保藏在 ECACC 的杂交瘤。
12. 一种结合物, 包含根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体和治疗剂。
13. 一种结合物, 包含根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体和可检测标签。
14. 一种分离的核酸分子, 所述核酸分子包含编码根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体的序列。
15. 一种组合物, 包含根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体和药用载体。
16. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体在制备药剂中的应用。
17. 根据权利要求 13 所述的结合物在制备用于检测 C5aR 的试剂中的用途, 所述检测包括使从受试者获得的样品与所述结合物在体外接触, 以及检测所述结合物与所述样品之间的免疫特异性结合。
18. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的抗体在制备用于治疗涉及白细胞或嗜中性粒细胞移行的紊乱的药剂中的应用。

具有改进性能的抗-C5aR 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及改进的抗体,其结合于 C5aR 并且在诊断和治疗方法中很有用。

背景技术

[0002] 补体蛋白 C3-C5 中的每一个的蛋白分解产生具有称为过敏毒素 (6-9) 的信号分子的氨基末端阳离子片段。这些氨基末端阳离子片段中最有效的 C5a 引起最宽的响应。考虑到作为白细胞的着边 (即炎症初期白细胞附集于血管壁, margination) 和渗透的炎症响应的成分, 颗粒结合的蛋白水解酶的释放、活化氧和氮衍生的自由基的产生改变了血流和毛细血管渗漏以及收缩平滑肌的能力, C5a 分子是“完全”促炎介质。在亚纳摩尔至纳摩尔水平, C5a 分子引发所有髓系 (嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞) 的趋化性, 并引起血管通透性 (通过前列腺素和循环粒细胞使其可能性显著加强)。更高的纳摩尔浓度引发 NADPH 氧化酶的脱粒和活化。这种宽度的生物活性与其他炎症介质形成对比。C5a 牵涉到类风湿性关节炎、银屑病、败血症、再灌注损伤和成人呼吸窘迫综合征的发病机制 (Gerard 和 Gerard, 1994 ; Murdoch 和 Finn, 2000)。

[0003] C5a 的活性由 C5a 与其受体 (C5aR) 的结合介导。C5aR 属于七次跨膜 G- 蛋白偶联受体的家族。C5aR 是 C5a 的高亲和力受体, 具有 ~ 1nM 的 Kd, 并且位于大量不同的细胞型, 包括白细胞上。每个细胞的受体的数量极高, 高达每个白细胞 200, 000 个位点。受体的生物学活化发生在整个使结合饱和的范围内。

[0004] C5aR 结构与该七次跨膜受体家族一致, 其中胞外 N- 末端后是通过作为胞内和胞外环交替的螺旋间结构域连接的七次跨膜螺旋, 并以胞内 C- 末端结构域终止。C5aR 包含扩展的 N- 末端胞外结构域。这种大的 N- 末端结构域是典型的 G- 蛋白偶联受体, 其结合包括 IL-8 和 fMet-Leu-Phe (FMLP) 受体家族的肽。

[0005] 利用 C5aR 拮抗剂对 C5a 响应的抑制应减少经由 C5a 介导的急性炎症应答, 而不影响其他补体成分。为此, 在之前已经描述过 C5aR 肽拮抗剂和抗-C5a 受体抗体 (Watanabe et al., 1995 ; Pellas et al., 1998 ; Konteatis et al., 1994 ; Kaneko et al., 1995 ; Morgan et al., 1993)。例如, W095/00164 (Scripps Research Inst.) 描述了针对 C5a 受体的 N- 末端肽 (残基 9-29) 的抗体。

[0006] WO 03/062278 (G2 疗法) 描述了针对 C5aR 的胞外环而不是 N- 末端结构域的抗体, 这在抑制 C5a 与 C5aR 结合中是有效的。在该申请中披露的具体单克隆抗体是 MA b 7F3、MA b 12D4 和 MA b 6C12。在这些单克隆抗体中, MA b 7F3 对 C5aR 具有最高的结合亲和力。

发明内容

[0007] 现在, 本发明的发明人开发了新型单克隆抗体, 当相比于 MA b 7F3 时, 其对 C5aR 具有实质性改进的结合亲和力并且在小鼠关节炎模型中逆转炎症是高度有效的。

[0008] 因此, 本发明提供了一种抗体, 包含与 SEQ ID NO : 3 [3C5 Vh] 中示出的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80% 同一性的至少一个 CDR 环序列, 其中该抗体减少或

抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

[0009] 在一种优选的实施方式中,该抗体包含与 SEQ ID NO :3[3C5Vh] 中示出的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少两个 CDR 环序列。

[0010] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体进一步包含与 SEQ ID NO :4[3C5 V1] 中示出的可变轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少一个 CDR 环序列。

[0011] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含与 SEQ ID NO :4[3C5 V1] 中示出的可变轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少两个 CDR 环序列。

[0012] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含分别与 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 中示出的重链和 / 或轻链序列共有至少 80%同一性的序列,其中该抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

[0013] 在一种优选的实施方式中,该抗体结合于人类 C5aR 或其片段,其中

[0014] (i) 当在相同条件下确定时,其 IC_{50} 值比 MAb7F3 低至少 1.5 倍 ;或

[0015] (ii) 当在相同条件下确定时,其缔合常数 (K_{on}) 比 MAb7F3 高至少 1.5 倍 ;或

[0016] (iii) 当在相同条件下确定时,其 K_D 亲和常数比 MAb7F3 低至少 1.3 倍。

[0017] 优选地,当在相同条件下确定时,该抗体以比 MAb7F3 低至少 1.4 倍的 K_D 亲和常数与人类 C5aR 或其片段结合。

[0018] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体结合至人类 C5aR 或其片段,其中

[0019] (i) IC_{50} 值小于 500pM,优选小于 300pM,并且更优选小于 200pM ;或

[0020] (ii) 缔合常数 (K_{on}) 为至少 $6.8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$;或

[0021] (iii) K_D 亲和常数小于 1.4nM。

[0022] 优选地,该抗体结合于人类 C5aR 或其片段,其中

[0023] (ii) 缔合常数 (K_{on}) 为至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$;或

[0024] (iii) K_D 亲和常数小于 0.5nM。

[0025] 优选地, C5aR 的片段是包含序列 LYRVVREEYFPPKVLGVDYSHDKRRERAVAIV (SEQ ID NO :2) 的肽。

[0026] 本发明还提供了一种抗体,包含与 SEQ ID NO :5[7H3 Vh] 中示出的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少一个 CDR 环序列,其中该抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

[0027] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含与 SEQ ID NO :5[7H3 Vh] 中示出的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少两个 CDR 环序列。

[0028] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体进一步包含与 SEQ ID NO :6[7H3 V1] 中示出的可变轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少一个 CDR 环序列。

[0029] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含与 SEQ ID NO :6[7H3 V1] 中示出的可变轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少两个 CDR 环序列。

[0030] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含分别与 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 中示出的重链和 / 或轻链序列共有至少 80%同一性的序列,其中该抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

[0031] 本发明进一步提供了一种抗体,包含与 SEQ ID NO :7[8G7 Vh] 中示出的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少一个 CDR 环序列,其中该抗体减少或

抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

[0032] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含与 SEQ ID NO:7[8G7 Vh] 中示出的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少两个 CDR 环序列。

[0033] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体进一步包含与 SEQ ID NO:8[8G7 V1] 中示出的可变轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少一个 CDR 环序列。

[0034] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含与 SEQ ID NO:8[8G7 V1] 中示出的可变轻链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列共有至少 80%同一性的至少两个 CDR 环序列。

[0035] 在一种进一步优选的实施方式中,该抗体包含分别与 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 中示出的重和 / 或轻链序列共有至少 80%同一性的序列,其中该抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

[0036] 在本发明的优选实施方式中,该抗体与人类 C5aR 的第二胞外环(残基 175 ~ 206)是反应性的。

[0037] 在进一步优选的实施方式中,该抗体与包含人类 C5aR 的残基 179-184 的表位(EEYFPP)是反应性的。

[0038] 在本发明的一种进一步优选的实施方式中,该抗体是单克隆、重组抗体,嵌合或人源化抗体。

[0039] 该抗体可以是任何同种型。然而,在本发明的一种进一步优选的实施方式中,该抗体是 IgG2a 类或 IgG3 类抗体。

[0040] 在本发明另一优选的实施方式中,该抗体是选自由 MA b 3C5、MA b 8G7 和 MA b 7H3 构成的组中的单克隆抗体。

[0041] 本发明还提供了一种杂交瘤,以登录号 06081801 保藏在 ECACC。

[0042] 本发明还提供了一种杂交瘤,以登录号 06081802 保藏在 ECACC。

[0043] 本发明还提供了一种杂交瘤,以登录号 06081803 保藏在 ECACC。

[0044] 应当理解,也可以生产本发明这些抗体的各种化学衍生物。例如,由本发明的抗体结合到标签如放射性同位素或其他示踪剂分子构成的免疫交联物(免疫共轭物, immunoconjugate)可以通过本领域已知的技术制备。可替换地,所述抗体可以结合于治疗有用的分子,该分子借助于抗体的结合特异性而靶向其期望的作用部位。

[0045] 因此,本发明还提供了一种包含本发明的抗体和治疗剂的结合物(conjugate)。

[0046] 应当理解,在本发明的内容中可以使用一个范围的治疗剂。优选的治疗剂包括介导细胞死亡或蛋白失活的试剂。治疗剂可以是本领域已知的大量毒素中的任一种。该毒素可以是假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin)或其衍生物。在一种优选的实施方式中,该毒素是 PE40。

[0047] 本发明还提供了一种包含本发明的抗体和可检测标签的结合物。

[0048] 该可检测标签可以是本领域已知的任何合适标签。例如,该标签可以是放射性标签、荧光标签、酶促标签或造影剂。

[0049] 本发明还提供了一种分离的核酸分子,该核酸分子包含编码本发明的抗体的序列。

[0050] 本发明还提供了一种组合物,包含根据本发明的抗体和药用载体。

[0051] 本发明还提供了本发明的抗体作为药剂的应用。

[0052] 本发明还提供了一种用于诊断受试者体内涉及白细胞或嗜中性粒细胞移行的紊乱的方法,该方法包括使从受试者获得的样品与本发明的结合物在体外接触,以及检测该结合物与样品之间的免疫特异性结合。

[0053] 本发明还提供了本发明的抗体在制备用于治疗涉及白细胞或中性白细胞移行的紊乱的药剂中的应用。

[0054] 本发明还提供了本发明的抗体在制备用于治疗免疫病理学疾病的药剂中的应用。

[0055] 在本发明的一个优选实施方式中,C5aR 是人类 C5aR。

[0056] 本发明还提供了一种用于抑制带有 C5aR 的细胞与其配体的相互作用的方法,该方法包括使该细胞暴露于本发明的抗体。

[0057] 本发明还提供了一种用于抑制细胞中 C5aR 活性的方法,该方法包括使该细胞暴露于本发明的抗体。

[0058] 本发明还提供了一种治疗受试者体内涉及中性白细胞移行的紊乱的方法,该方法包括给予该受试者本发明的抗体。

[0059] 本领域技术人员应当理解,本发明的这些抗体也可以用来检测、定量和 / 或局部化 (localise) 表达 C5aR 的细胞。

[0060] 因此,本发明还提供了一种用于诊断受试者体内涉及中性白细胞移行的紊乱的方法,该方法包括使从该受试者获得的样品与本发明的结合物接触,以及检测该结合物与样品之间的免疫特异性结合。

[0061] 许多种免疫测定可以用于这些诊断方法中。这样的免疫测定包括利用如放射免疫测定、ELISA、“夹心”免疫测定、沉淀素反应、凝胶分散沉淀素反应、免疫分散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定等技术的竞争性和非竞争性测定系统。可利用体外和体内测定。

[0062] 从受试者获得的样品可以包括任何体液,如外周血、血浆、淋巴液、腹膜液、脑脊液、或胸膜液,或者任何身体组织。体外测定可以利用组织或流体的组织学样本或亚部分来实施。体内结合可以通过借助于本领域已知的任何方式(如静脉内、腹膜内、动脉内等)给予所述结合物以便可以检测免疫特异性结合而实现。

[0063] 另外,可以使用成像技术,其中将本发明的抗体结合至合适的成像标签。标记的抗体可以体内给予以确定 C5aR 在受试者体内的定位。

[0064] 因此,本发明还提供了一种用于诊断受试者体内涉及中性白细胞移行的紊乱的方法,该方法包括在一定条件下向该受试者给予用成像剂(显像剂)标记的本发明的抗体以便在受试者体内在抗体和表现 C5aR 的细胞之间形成复合体(复合物),以及使该复合体成像。

[0065] 在本发明的一种优选实施方式中,涉及中性白细胞移行的紊乱是 C5aR 介导的紊乱。优选地,该紊乱是免疫病理学紊乱。

[0066] 本发明还提供了一种用于将治疗剂递送到受试者体内的炎症部位的方法,该方法包括向受试者给予本发明的结合物。

[0067] 本发明还提供了一种用于将遗传物质引入到表现 C5aR 的细胞内的方法,该方法包括使这些细胞与本发明的抗体接触,其中所述抗体附着于遗传物质或与其相关。

[0068] 在一种优选的实施方式中,表现 C5aR 的细胞选自粒细胞、白细胞(如单核细胞、

巨噬细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞)、肥大细胞以及淋巴细胞,淋巴细胞包括 T 细胞、树突细胞、以及非髓系细胞(如内皮细胞和平滑肌细胞)。

[0069] 本发明还涵盖鉴定结合 C5aR 的其他配体或其他物质的方法,所述结合 C5aR 的其他配体或其他物质包括哺乳动物 C5aR 功能的抑制剂和/或促进剂。例如,与本发明抗体或其功能片段具有相同或类似结合特异性的试剂可通过利用所述抗体或片段的竞争性测定加以鉴定。因此,本发明还涵盖鉴定结合 C5aR 的配体或其他物质的方法,该结合 C5aR 的配体或其他物质包括受体功能的抑制剂(例如拮抗剂)或促进剂(例如激动剂)。在一种实施方式中,在测定中使用天然表达 C5aR 的细胞或已被遗传改造成表达 C5aR 的合适宿主细胞或由引入到所述细胞内的核酸编码的变体,来鉴定和评估受体功能的配体、抑制剂或促进剂的效能。这样的细胞在评估表达的受体蛋白或多肽的功能中也是有用的。

附图说明

[0070] 图 1:由用 L1.2/hC5aR 细胞免疫的小鼠产生的抗-人类 C5aRmAb 不同程度地抑制 ^{125}I -C5a 与人嗜中性粒细胞的结合。误差棒指示 SD。

[0071] 图 2:用于构建 hC5aR 敲入(knock-in)小鼠的野生型小鼠的 C5aR 基因座和靶向载体的图。用靶向载体中的人类 C5aR 基因外显子 3 CDS 精确地替代小鼠 C5aR 基因外显子 3 CDS。小鼠 C5aR 基因侧翼序列允许同源重组。利用 Cre 将由 loxP 位点侧挂的选择标记物 PGKneo 从第一敲入小鼠中删除。用 3' 和 5' 探针来确认已正确地重组到小鼠 C5aR 基因座中的靶向载体。X, XbaI ;V, EcoRV。

[0072] 图 3:来自杂合 hC5aR 敲入小鼠(hC5R1^{+/+})之间的杂交(cross)的小鼠尾部的 EcoRV 消化的基因组 DNA 的 DNA 印迹(Southernblot)。该印迹与 3' 探针杂交,其将小鼠 C5aR 等位基因(10.0kb)和 hC5aR 敲入等位基因(8.1kb)相区别。

[0073] 图 4:C5aR 在 hC5R1^{+/+}、hC5R1^{+/+} 和野生型小鼠嗜中性粒细胞上的表达。中性白细胞用 FITC 结合的抗-人类 C5aR mAb(7F3)或抗-小鼠 C5aR mAb 20/70 染色。

[0074] 图 5:由 hC5R1^{+/+} 小鼠的嗜中性粒细胞产生的抗体表明广谱的 ^{125}I -C5a 结合抑制,范围从完全抑制到部分或很少的抑制,这取决于 mAb 克隆。结果代表对于每一个抗体的至少两个独立实验的结果,并且误差棒指示 s. e. m.。

[0075] 图 6:抗-C5aR mAb 具有亚纳摩尔 IC₅₀ 值。利用 hC5R1^{+/+} 小鼠嗜中性粒细胞(3C5、7H3 和 8G7)产生的抗体表现出比利用 L1.2/hC5aR 转染子(7F3)产生的最佳 mAb 低 5-10 倍。IC₅₀ 值由 3 或 4 个独立的竞争性 ^{125}I -C5a 配体结合实验来确定。

[0076] 图 7:竞争性配体结合测定表明从具有 7F3 或 3C5 的 hC5aR 转染的 L1.2 细胞上的 hC5aR 的 ^{125}I -C5a 替代。EC₅₀ 值由 2 或 3 个独立实验确定。

[0077] 图 8:C5aR 特异性 mAb 与嵌合人/小鼠 C5aR 受体的相对结合。示意性示出了嵌合体受体(来源于 hC5aR 的区域以红色示出,而来源于 mC5aR 的区域以黑色示出)。四个胞外结构域的起源由 4-字母代码指代(HHHH 是野生型人类 C5aR, mHHH 具有小鼠 N-末端胞外结构域和人类第一、第二、以及第三胞外环等)。表达嵌合受体的瞬时转染 L1.2 细胞用不同的抗-C5aR mAb 染色。所有抗-hC5aRmAb 表现出不同的、结构域限制的结合外形,结合至包含人类 C5aRN-末端的受体或第二胞外环。抗-小鼠 C5aR mAb 20/70 结合至包含小鼠 C5aR 第二胞外环的嵌合受体。

[0078] 图 9 :表示每一单个抗 -hC5aR mAb 抑制 C5a 与人嗜中性粒细胞结合的程度点阵图。根据 mAb 识别的受体结构域对其进行分组。所有最有效的阻遏 (阻断)mAb (抑制 C5a 结合 > 90% 的那些) 对 hC5aR 的第二胞外环作图。

[0079] 图 10 :通过肽 ELISA 对 hC5aR 第二胞外环上的抗体结合位点作图。mAb 7F3 和 3C5 结合至来自包含序列 ¹⁷⁹EEYFPP¹⁸⁴ 的 hC5aR 第二胞外环的所有重叠肽。

[0080] 图 11 : (a) 利用鉴定由 mAb 7F3 和 3C5 识别的 hC5aR 上的关键残基的 12 肽的丙氨酸突变体对抗体接触残基的作图。 (b) 利用鉴定由 mAb 8G7 和 7H3 识别的 hC5aR 上的关键残基的 12 肽的丙氨酸突变体对抗体接触残基的作图。

[0081] 图 12 :在 Biacore 测定中, mAb 7F3、3C5、8G7 和 7H3 对于肽 23 的缔合和解离速率以及结合亲和力。

[0082] 图 13 :抗 -hC5aR mAb 的治疗效果的比较。在炎症发展后的第 5 天, hC5R1^{+/+} 小鼠用 7F3、3C5 或 8G7 (以在 PBS 中的 1mg/kg 或 3mg/kg) 腹腔内 (i.p.) 注射一次。对照组接受 PBS。图示出了从第 0 天的脚爪 (踝部) 大小的变化。组平均值 (n = 5-7/ 组)。

[0083] 图 14 :抗 -hC5aR mAb 的治疗效果的比较。hC5R1^{+/+} 小鼠用 7F3、3C5 或 8G7 (以在 PBS 中的 1mg/kg 或 3mg/kg) 腹腔内 (i.p.) 注射一次。对照组接受 PBS。图示出了临床评分。组平均值 (n = 5-7/ 组)。

[0084] 序列表说明

[0085] SEQ ID NO :1 人类 C5aR 蛋白序列

[0086] SEQ ID NO :2 人类 C5aR 肽

[0087] SEQ ID NO :3 3C5 可变重链 (蛋白) 序列

[0088] SEQ ID NO :4 3C5 可变轻链 (蛋白) 序列

[0089] SEQ ID NO :5 7H3 可变重链 (蛋白) 序列

[0090] SEQ ID NO :6 7H3 可变轻链 (蛋白) 序列

[0091] SEQ ID NO :7 8G7 可变重链 (蛋白) 序列

[0092] SEQ ID NO :8 8G7 可变轻链 (蛋白) 序列

[0093] SEQ ID NO :9 经修饰的人类 C5aR 肽

[0094] SEQ ID NO :10-25 用于构建嵌合小鼠 / 人类 C5aR 的引物

[0095] SEQ ID NO :26 生物素化的人类 C5aR 肽 (第二胞外环)

[0096] SEQ ID NO :27 人类 C5aR 第二胞外环的残基 179 ~ 184

[0097] SEQ ID NO :28-50 来自包含序列 EEYFPP 的人类 C5aR 第二胞外环的重叠 12 肽

[0098] SEQ ID NO :51-62 肽序列 VREEYFPPKVLK 的丙氨酸突变体

[0099] SEQ ID NO :63 乱序的 VREEYFPPKVLK 肽

具体实施方式

[0100] C5aR 结构

[0101] 人类 C5aR 的氨基酸序列在 SEQ ID NO :1 中提供。

[0102] 人类 C5aR 的不同结构域限定如下 :

[0103] 氨基酸 1-37 胞外结构域 -N 末端

[0104] 氨基酸 38-61 跨膜结构域

- [0105] 氨基酸 62-71 胞内结构域
- [0106] 氨基酸 72-94 跨膜结构域
- [0107] 氨基酸 95-110 胞外结构域 - 胞外环 1
- [0108] 氨基酸 111-132 跨膜结构域
- [0109] 氨基酸 133-149 胞内结构域
- [0110] 氨基酸 150-174 跨膜结构域
- [0111] 氨基酸 175-206 胞外结构域 - 胞外环 2
- [0112] 氨基酸 207-227 跨膜结构域
- [0113] 氨基酸 228-242 胞内结构域
- [0114] 氨基酸 243-264 跨膜结构域
- [0115] 氨基酸 265-283 胞外结构域 - 胞外环 3
- [0116] 氨基酸 284-307 跨膜结构域
- [0117] 氨基酸 308-350 胞内结构域 -C 末端

[0118] 微生物保藏详情

[0119] 产生名为 3C5 的单克隆抗体的杂交瘤保藏在 ECACC, 登记号为 06081801。

[0120] 产生名为 7H3 的单克隆抗体的杂交瘤保藏在 ECACC, 登记号为 06081802。

[0121] 产生名为 8G7 的单克隆抗体的杂交瘤保藏在 ECACC, 登记号为 06081803。

[0122] 这些保藏是根据《国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约》的规定进行的。这保证从保藏日起保持培养物存活 30 年。有机体可以根据布达佩斯条约通过 ECACC 获得, 该条约保证在相关专利公布后, 公众可持久且不受限制地获得该培养物。

[0123] 本专利申请的受让人同意, 当在合适条件下进行培养时, 如果培养物保藏死亡或丧失或损坏, 则将根据通知用相同培养物的存活样本及时进行替换。保藏的菌株的可获得性并不被解释为违反任何政府管理机构依据其专利法授予的权利而实施本发明的许可。

[0124] 抗体

[0125] 本发明的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、双特异性抗体、以及异源偶联抗体 (heteroconjugate antibody)。

[0126] 如在本发明中所使用的, 术语“抗体”包括完整分子及其片段, 如能够结合表位决定子的 Fab、F(ab')₂ 和 Fv。这些抗体片段保留一些选择性地与其抗原或受体结合的能力, 并限定如下:

[0127] (1) Fab, 包含抗体分子的一价抗原结合片段的片段, 可通过用木瓜蛋白酶消化整个抗体以生成完整轻链和一个重链的一部分而产生;

[0128] (2) Fab', 抗体分子的片段, 可通过用胃蛋白酶处理完全抗体, 接着还原, 以生成完整轻链和重链的一部分而获得; 每个抗体分子获得两个 Fab' 片段;

[0129] (3) (Fab')₂, 抗体的片段, 可通过用胃蛋白酶处理完全抗体 (没有随后的还原) 而获得; F(ab)₂ 是通过两个二硫键保持在一起的两个 Fab' 片段的二聚体;

[0130] (4) Fv, 限定为包含轻链的可变区和重链的可变区的遗传设计片段, 以两个链表示;

[0131] (5) 单链抗体 (“SCA”), 限定为包含轻链可变区、重链可变区的遗传设计分子, 由合适的多肽连结子连接成遗传融合的单链分子; 以及

[0132] (6) 单域抗体,通常是缺少轻链的可变重(链)结构域。

[0133] 本发明的优选抗体包含基本上与 MA b 3C5、7H3 或 8G7 相同的可变区或者一个或多个 CDR 环。

[0134] MA b 3C5、7H3 或 8G7 的可变区的序列在 SEQ ID NO 3 ~ 8 中列出。这些可变区中的每一个的 CDR 环限定如下:

[0135] MA b 3C5

[0136] CDR H1:SEQ ID NO:3 的残基 26-36(包括端值);

[0137] CDR H2:SEQ ID NO:3 的残基 51-66(包括端值);

[0138] CDR H3:SEQ ID NO:3 的残基 97-108(包括端值);

[0139] CDR L1:SEQ ID NO:4 的残基 24-39(包括端值);

[0140] CDR L2:SEQ ID NO:4 的残基 55-61(包括端值);

[0141] CDR L3:SEQ ID NO:4 的残基 94-102(包括端值)。

[0142] MA b 7H3

[0143] CDR H1:SEQ ID NO:5 的残基 26-35(包括端值);

[0144] CDR H2:SEQ ID NO:5 的残基 50-68(包括端值);

[0145] CDR H3:SEQ ID NO:5 的残基 99-108(包括端值);

[0146] CDR L1:SEQ ID NO:6 的残基 24-39(包括端值);

[0147] CDR L2:SEQ ID NO:6 的残基 55-61(包括端值);

[0148] CDR L3:SEQ ID NO:6 的残基 94-102(包括端值)。

[0149] MA b 8G7

[0150] CDR H1:SEQ ID NO:7 的残基 26-36(包括端值);

[0151] CDR H2:SEQ ID NO:7 的残基 51-66(包括端值);

[0152] CDR H3:SEQ ID NO:7 的残基 97-108(包括端值);

[0153] CDR L1:SEQ ID NO:8 的残基 24-39(包括端值);

[0154] CDR L2:SEQ ID NO:8 的残基 55-61(包括端值);

[0155] CDR L3:SEQ ID NO:8 的残基 94-102(包括端值)。

[0156] L1、L2、L3 和 H2 CDR 由 Kabat 定义。H1 和 H3 CDR 的限定修改自 Kabat 定义并在它们的 N-末端处包括另外的残基。扩展 CDRH1 以包括由 Chothia 定义为 CDR-H1 的一部分的残基。扩展 CDR H3 以包括 2 个“接触(contact)”残基。关于 Kabat 标号、定义 Ab 和抗原之间的 CDR 和接触残基的信息参见 <http://www.bioinfo.org.uk/abs>。

[0157] 感兴趣地注意到,MA b 3C5 和 8G7 的 CDR 环共有以下水平的序列同一性:

[0158]

%同一性	CDR1	CDR2	CDR3
3C5 对 8G7	10/11 91%	13/16 81%	10/12 83%

[0159] 应当理解,可将序列表中示出的可变区或 CDR 环加以修饰以用于本发明。通常,进行修饰以保持序列的结合特异性。例如可以在不影响抗体结合特异性的情况下进行保守置换。本发明涵盖这样的抗体,其包含与 SEQ ID NO:3 ~ 8 中的任一个中的 CDR 环具有至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,更优选至少 95%,更优选至少 98% 同一性的至少

一个 CDR 环。例如,为了使修饰的序列保持基本上相同的结合特异性,可以在该 CDR 环内进行 1、2、3 或 4 个氨基酸置换。

[0160] 在一种可替换的实施方式中,可以有意地对本发明抗体的氨基酸序列进行修饰,以降低该抗体的生物学活性。例如,保持能够结合至 C5aR 但缺少功能效应子结构域的修饰抗体可以用作 C5aR 的生物学活性的抑制剂。

[0161] 氨基酸置换也可以包括使用非天然存在的类似物,例如,增加治疗给予的抗体的血浆半衰期。

[0162] 一般地,相比于序列表中所示的相应可变区或 CDR 环,优选少于 20%、10% 或 5% 的变异体或衍生物的氨基酸残基被改变。

[0163] 在本发明的内容中,与序列表所示的可变区之一“基本上相同”的序列可以包含这样的氨基酸序列,其与该可变区在超过至少 20,优选至少 50 个氨基酸的氨基酸水平上至少 80%、85% 或 90% 是相同的,优选至少 95% 或 98% 是相同的。同源性通常是相对于已知的对于结合特异性必需的序列而不是非必需相邻序列的那些区域加以考虑的。

[0164] 同源性比对可通过肉眼,或更通常地利用易于获得的序列比对程序来进行。这些商业上可获得的计算机程序可计算两个或多个序列之间的 % 同源性。

[0165] 百分比同源性可在连续序列上计算,即,一个序列与其他序列对准并将一个序列中的每一个氨基酸直接与另一序列中的相应氨基酸进行比对,一次一个残基。这称为“无空位”对准。通常,这样的无空位对准仅对相对较少数量的残基(例如,少于 50 个连续氨基酸)实施。

[0166] 尽管这是非常简单并且一致的方法,但是它没有考虑到,例如,在其他方面相同的一对序列中,一个插入或缺失将使得后续氨基酸残基的比对失效,因此当进行全局比对时,可能导致 % 同源性的较大减少。因此,大多数序列比对方法被设计成产生考虑到可能的插入和缺失的最佳对准,同时没有过度地对全部同源性评分罚分。这通过在序列比对中插入“空位”以试图使局部同源性最大化而实现。

[0167] 大多数比对程序允许修改空位罚分。然而,当利用这样的软件进行序列比对时,优选使用缺省值。例如,当使用 GCG WisconsinBestfit 软件包(参见以下)时,氨基酸序列的缺省空位罚分对于一个空位为 -12 而对与每一个延伸为 -4。

[0168] 因此,考虑到空位罚分,最大 % 同源性的计算首先需要产生最佳对准。用于实施这样的对准的合适计算机程序是 GCG WisconsinBestfit 软件包(University of Wisconsin, U. S. A. ;Devereux 等,1984, Nucleic Acids Research 12 :387)。可实施序列比对的其他软件的实例包括但不限于 BLAST 软件包(参见, Ausubel 等,1999 同上 -Chapter18)、FASTA (Atschul 等,1990, J. Mol. Biol. , 403-410) 和比对工具的 GENEWORKS 套装。BLAST 和 FASTA 可用于离线和在线检索(参见 Ausubel 等,1999 同上,第 7-58 至 7-60 页)。然而,优选使用 GCG Bestfit 程序。

[0169] 尽管最终 % 同源性可依照同一性进行测量,但比对过程本身通常不是基于全有或全无(all-or-nothing)的成对比对。相反,通常使用成比例的类似性评分矩阵,基于化学类似性或进化距离(evolutionary distance),将评分分配给每一对比对。通常使用的这样的矩阵的实例是 BLOSUM62 矩阵-BLAST 程序套装的缺省矩阵。GCG Wisconsin 程序通常利用公共缺省值或定制符号比对表(如果提供的话)(进一步的细节参见用户手册)。对于 GCG

软件包优选使用公共缺省值,或在使用其他软件的情况下,优选使用缺省矩阵如 BLOSUM62。
[0170] 一旦所述软件已经产生了最佳比对,就可以计算%同源性,优选计算%序列同一性。软件通常完成这作为序列比对的一部分并产生数字结果。

[0171] 多克隆抗体

[0172] 本发明的抗体可以是多克隆抗体。制备多克隆抗体的方法对于本领域技术人员是已知的。多克隆抗体可在哺乳动物中建立,例如,通过一次或多次注射表达来源于转基因哺乳动物的第一物种的多肽的细胞和如果需要的佐剂。通常,通过多次皮下或腹腔内注射将这些细胞和/或佐剂注入到哺乳动物中。可以采用的佐剂的实例包括弗氏完全佐剂和 MPL-TDM 佐剂(单磷酸类脂 A,合成的海藻糖二霉菌酸脂)。免疫方案可以通过本领域技术人员在无需过度实验的情况下进行选择。

[0173] 单克隆抗体

[0174] 通过本发明方法生产的抗体可以可替换地是单克隆抗体。单克隆抗体可以利用杂交瘤方法,如由 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256 :495 (1975) 描述的那些方法来制备。在一种杂交瘤方法中,通常利用表达来源于转基因哺乳动物的第一物种的多肽的细胞对小鼠、仓鼠、或其他适当的宿主动物进行免疫,以引发产生或能够产生将特异性地结合至该第一物种的多肽的抗体的淋巴细胞。

[0175] 一般地,如果期望得到人源的细胞,则使用外周血淋巴细胞(“PBL”),或者如果期望得到非人哺乳动物源的细胞,则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后利用合适的融合剂(如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生化细胞系进行融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies :Principles and Practice*, Academic Press, (1986)pp. 59-103)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人源的骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可以在合适的培养基中进行培养,该培养基优选包含一种或多种抑制未融合的、永生化细胞的生长或存活物质。例如,如果亲代细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常会包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷(“HAT 培养基”),该物质阻止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

[0176] 优选的永生化细胞系是有效地融合、支持通过所选抗体产生细胞的抗体的高水平表达的那些,并且对如 HAT 培养基之类的培养基敏感。更优选的永生化细胞系是鼠类杂交瘤系,其可从例如加利福尼亚州圣地亚哥的索尔克研究院细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif.)以及弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养中心(American Type Culture Collection, Manassas, Va.)获得。也已经有关于人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系用于生产人类单克隆抗体的描述(Kozbor, *J. Immunol.*, 133 :3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987)pp. 51-63)。

[0177] 然后可以测定在其中培养杂交瘤细胞的培养基是否存在针对第一物种的多肽的单克隆抗体。优选地,通过杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)加以确定。这样的技术和测定在本领域是已知的。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson 和 Pollard, *Anal. Biochem.*, 107 :220 (1980) 的 Scatchard 分析法来确定。

[0178] 在鉴定了需要的杂交瘤细胞之后,克隆体可以通过有限稀释程序进行亚克隆并

通过标准方法生长。用于此目的合适培养基包括例如杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 和 RPMI-1640 培养基。可替换地, 杂交瘤细胞可以在哺乳动物内作为腹水在体内生长。

[0179] 由亚克隆体分泌的单克隆抗体可以通过常规的免疫球蛋白纯化程序例如蛋白质 A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、渗析或亲和色谱, 从培养基或腹水流体分离或纯化。

[0180] 单克隆抗体也可以通过重组 DNA 方法, 如在美国专利第 4,816,567 号中描述的那些方法制备。编码本发明的单克隆抗体的 DNA 可以利用常规程序 (例如, 通过利用能够特异性地结合至编码鼠类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针) 而容易地分离和测序。本发明的杂交瘤细胞用作这样的 DNA 的优选来源。一旦分离, 可将该 DNA 置入表达载体, 然后将其转染到宿主细胞内, 如猿猴 COS 细胞、中华仓鼠卵 (CHO) 细胞、或不会另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞, 以获得在重组宿主细胞中的单克隆抗体的合成。也可以通过例如用于人类重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源性鼠类序列 (美国专利第 4,816,567 号) 或通过将免疫球蛋白的编码序列共价结合至全部或部分非免疫球蛋白多肽的编码序列对 DNA 进行修饰。可以用本发明的抗体的恒定结构域, 或者本发明抗体的一个抗原组合位点的可变结构域替代这样的非免疫球蛋白多肽, 以生成嵌合双价抗体。

[0181] 这些抗体可以是单价抗体。用于制备单价抗体的方法是本领域已知的。例如, 一种方法涉及免疫球蛋白轻链和经修饰的重链的重组表达。通常在 Fc 区中的任意点处将该重链截断以防止该重链交联。可替换地, 用另一氨基酸残基替代相关半胱氨酸残基或删除相关半胱氨酸残基以防止交联。

[0182] 体外方法也适合于制备单价抗体。抗体消化产生其片段, 尤其是 Fab 片段, 可利用本领域已知的常规技术完成。

[0183] 人类和人源化抗体

[0184] 本发明的抗体可以是人源化抗体或人类抗体。非人类 (例如鼠类) 抗体的人源化形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其他抗原结合序列), 其包含来源于非人类免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括人类免疫球蛋白 (受体抗体), 其中来自受体的互补决定区 (CDR) 的残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人类物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基替代。在一些情况下, 人类免疫球蛋白的 Fv 框架残基被相应的非人类残基替代。人源化抗体也可以包含在受体抗体以及输入 (import) CDR 或框架序列中均未发现的残基。一般地, 人源化抗体将包括基本上所有的至少一个、并且通常是两个可变结构域, 其中所有或基本上所有对应于非人类免疫球蛋白的 CDR 区域以及所有或者基本上所有的 FR 区域都是人类免疫球蛋白共有序列。人源化抗体最优地还将包括免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常是人类免疫球蛋白的至少一部分 (Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329(1988); 以及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992))。

[0185] 使非人类抗体人源化的方法是本领域公知的。通常, 人源化抗体具有从非人类来源引入到其内的一个或多个氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常称为“输入 (import)”残基, 其通常取自“输入”可变结构域。人源化可实质上依照 Winter 和其同事的方法实施 (Jones 等, Nature, 321:522-525(1986); Riechmann 等, Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen 等, Science, 239:1534-1536(1988)), 通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列代替人类

抗体的相应序列。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利第 4,816,567 号),其中显著小于完整人类可变结构域已被来自非人物种的相应序列替代。在实践,人源化抗体通常是人类抗体,其中一些 CDR 残基以及可能的一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体的同源位点的残基替代。

[0186] 人类抗体也可利用本领域已知的各种技术生产,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227 :381(1991); Markset al., *J. Mol. Biol.*, 222 :581(1991))。也可利用 Cole 等人和 Boerner 等人的技术制备人单克隆抗体(Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985) 以及 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1) :86-95(1991))。类似地,人类抗体可以通过将人免疫球蛋白基因座引入到内源性免疫球蛋白基因已部分地或全部失活的例如小鼠的转基因动物中而制得。经激发后,观察到产生人类抗体,其所有方面都非常类似于在人类中观察到的,包括基因重排、组合、以及抗体谱。这种方法在例如美国专利第 5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016 号以及以下科学出版物: Marks 等, *Bio/Technology* 10,779-783(1992); Lonberg 等, *Nature* 368 856-859(1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13(1994); Fishwild 等, *Nature Biotechnology* 14,845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14,826(1996); Lonberg 和 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93(1995) 中有描述。

[0187] 这些抗体也可以是利用已知的选择和 / 或如本领域已知的诱变方法亲和力成熟的。优选的亲和力成熟抗体具有比制备该成熟抗体的起始抗体(通常是鼠类、人源化或人类)大 5 倍,更优选大 10 倍,甚至更优选大 20 或 30 倍的亲和力。

[0188] 双特异性抗体

[0189] 双特异性抗体是对于至少两个不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体,优选人类或人源化抗体。例如,这些结合特异性之一可以是对 C5aR 的结合特异性,而另一个可以是对于任何其他抗原的结合特异性,并且优选地是对于细胞表面蛋白或受体或受体亚单位的结合特异性。

[0190] 用于制备双特异性抗体的方法在本领域是熟知的。传统地,双特异性抗体的重组生产基于两个免疫球蛋白重链 / 轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello, *Nature*, 305 :537-539(1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,所以这些细胞杂交瘤(quadroma)产生十种不同抗体分子的可能的混合物(potential mixture),其中只有一种具有正确的双特异性结构。该正确分子的纯化通常通过亲和层析步骤来完成。1993 年 5 月 13 日公开的 WO 93/08829 以及 Traunecker et al., *EMBO J.*, 10 :3655-3659(1991) 中披露了类似的程序。

[0191] 可将具有期望的结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合部位)融合于免疫球蛋白恒定结构域序列。该融合优选与免疫球蛋白重链恒定结构域,包括铰链、CH2 和 CH3 区域的至少一部分融合。优选具有第一重链恒定区(CH1),其包含对于在所述融合的至少一种中存在的轻链结合所必需的部位。将编码免疫球蛋白重链融合的 DNA,以及如果期望的话,将免疫球蛋白轻链插入到分离的表达载体中,并共转染进合适宿主有机体中。对于产生双特异性抗体的进一步的细节,参见,例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121 :210(1986)。

[0192] 根据 WO 96/27011 中描述的另一种方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行改造以使从重组细胞培养物回收的杂二聚体的百分比最大化。优选的界面包括抗体恒定结构域的 CH3 区的至少一部分。在这种方法中,用较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替代来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链而在第二抗体分子的界面上形成与该较大侧链相同或类似大小的互补“空腔”。这提供了一种增大杂二聚体的产率超过其他不需要的最终产物(例如同二聚体)的机制。

[0193] 双特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段(例如, $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。在文献中已经描述过由抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,双特异性抗体可利用化学键合来制备。Brennan 等, *Science* 229 :81(1985) 描述了一种程序,其中完整的抗体被蛋白水解地切割以产生 $F(ab')_2$ 片段。这些片段在二硫醇复合试剂亚砷酸钠的存在下被还原,以稳定邻位的二硫醇并防止分子间二硫化物形成。然后,所产生的 Fab' 片段转化成硫代硝基苯甲酸盐(thionitrobenzoate, TNB) 衍生物。然后 Fab' -TNB 衍生物之一通过用巯基乙醇还原而再转化成 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一 Fab' -TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。生产的该双特异性抗体可用于作用于酶的选择性固定的试剂。

[0194] Fab' 片段可以直接从大肠杆菌 (*E. coli*) 回收并化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.* 175 :217-225(1992) 描述了完全人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的生产。每一个 Fab' 片段分别由大肠杆菌分泌并经受体外直接化学偶联以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够结合至过表达 ErbB2 受体的细胞和正常人类 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞对人乳腺肿瘤靶标的溶胞活性。

[0195] 用于直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已被描述过。例如,已利用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(Kostelny 等, *J. Immunol.* 148(5) : 1547-1553(1992))。通过基因融合将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连接至两个不同抗体的 Fab' 部分。抗体同二聚体在铰链区被还原形成单体,然后被再氧化形成抗体杂二聚体。这种方法也可用于生产抗体同二聚体。由 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 6444-6448(1993) 描述的“双特异抗体”技术提供了一种用于制备双特异性抗体片段的可替换机制。这些片段包含通过连接子连接至轻链可变结构域 (V_L) 的重链可变结构域 (V_H),该连接子太短以致于不允许相同链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一个片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合部位。也已经报道了通过利用单链 Fv (sFv) 二聚体来制备双特异性抗体片段的另一种策略,参见 Gruber 等, *J. Immunol.* 152 :5368(1994)。

[0196] 考虑了具有多于两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体(Tutt 等, *J. Immunol.* 147 :60(1991))。

[0197] 异源偶联抗体(Heteroconjugate Antibody)

[0198] 异源偶联抗体也属于本发明的范围。异源偶联抗体由两个共价结合的抗体构成。例如,已使这样的抗体使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利第 4,676,980 号),并用于治疗 HIV 感染(WO91/00360 ;WO 92/200373 ;EP 03089)。考虑了这些抗体可以利用合成蛋白质化学中的已知方法进行体外制备,包括涉及交联剂的那些方法。例如,可以利用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于该目的合适试剂

的实例包括亚氨基硫醇盐（或亚氨基硫羟酸盐，iminothiolate）和 4-巯基丁亚氨酸甲酯（methyl-4-mercaptobutyrimidate）以及在例如美国专利第 4,676,980 号中披露的那些。

[0199] 效应子功能改造

[0200] 可能需要就效应子功能而修饰本发明的抗体，以增强例如抗体在治疗癌症中的效力。例如，可将半胱氨酸残基引入到 Fc 区域中，从而允许在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚抗体可以具有改进的内在化能力和 / 或增大的补体介导的细胞杀伤以及抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)，参见 Caron 等, J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) 和 Shopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚抗体也可以利用如在 Wolff et al. Cancer Research, 53:2560-2565 (1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。可替换地，可以对抗体进行改造（具有两个 Fc 区域）并且由此可以具有增强的补体溶解和 ADCC 能力，参见 Stevenson 等, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。

[0201] 免疫交联物

[0202] 本发明还涉及包含结合至细胞毒性剂如化疗剂、毒素（例如，细菌、真菌、植物或动物源的酶促活性毒素或它们的片段）、或放射性同位素（即，放射性结合物）的抗体的免疫交联物。

[0203] 以上已经描述了用于产生这样的免疫交联物的化疗剂。可以使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链（来自绿脓假单胞菌）、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 (modeccin) A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂 (momordica charantia inhibitor)、泻果素、巴豆毒蛋白、皂草黄抑制剂 (sapaonaria officinalis inhibitor)、白树毒素、米托洁林 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素以及单端孢霉烯类毒素。可使用各种放射性核素来生产放射性结合物抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒性剂的结合物利用各种双功能蛋白偶联剂制成，所述偶联剂例如 3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷 (iminothiolane) (IT)，亚氨酸酯（如己二亚胺酸二甲酯盐酸盐）、活性酯（如辛二酸二琥珀酰亚胺酯）、醛（如戊二醛）的双官能团衍生物，双-叠氮基化合物（如双（对叠氮基苯甲酰基）己二胺）、双-二偶氮衍生物（如双-（对二偶氮苯甲酰基）-乙二胺）、二异氰酸酯（如 2,6-二异氰酸亚苄酯）、以及双-活性含氟化合物（如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。例如，蓖麻毒蛋白免疫毒素可如在 Vitetta 等, Science, 238:1098 (1987) 中所述进行制备。碳-14 标记的 1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于放射性核素与抗体结合的示例性螯合剂，参见 W094/11026。

[0204] 在另一种实施方式中，可将抗体结合至“受体”（如抗生蛋白链菌素）以用于肿瘤预定位 (tumor pretargeting)，其中抗体-受体结合物给予患者，接着利用清洁剂从血液循环除去未结合的结合物，然后给予结合至细胞毒性剂（例如放射性核素）的“配体”（例如，抗生物素蛋白）。

[0205] 抗体同种型

[0206] 在某些情况下，依据它们的诊断或治疗效力，一个同种型的单克隆抗体可能比另一同种型的单克隆抗体是更加优选的。例如，根据关于抗体介导的溶胞作用的研究，已知同种型 γ -2a 和 γ -3 的未修饰小鼠单克隆抗体在溶解靶细胞中通常比 γ -1 同种型的抗体更

有效。这种差异性效力被认为是由于 γ -2a 和 γ -3 同种型更积极参与靶细胞的溶胞破坏的能力。单克隆抗体的特定同种型可二次地由分泌不同同种型的单克隆抗体的亲代杂交瘤来制备,通过使用同胞选择 (sib selection) 技术来分离类别转换变异体 (class-switch variant) (Steplewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82 :8653, 1985 ;Spira, et al., J. Immunol. Methods, 74 :307, 1984)。

[0207] 结合特性

[0208] 在本发明的一种实施方式中,所述抗体依据其抑制浓度 50 值来定义。

[0209] 术语“抑制浓度 50%”(简称为“ IC_{50} ”)表示一种抑制剂对于该抑制剂所靶向分子的给定活性(例如,C5a 与 C5aR 或其片段的结合)的 50%抑制所需的浓度。本领域技术人员应理解,更低的 IC_{50} 值对应于更有效的抑制剂。

[0210] 在一种实施方式中,本发明的抗体抑制 C5a 与 C5aR 的结合,其中当在相同条件下测定时,其 IC_{50} 值比 MAb7F3 低至少 1.5 倍。

[0211] 在另一实施方式中,本发明的抗体抑制 C5a 与 C5aR 的结合,其中 IC_{50} 低于 500pM,更优选低于 400pM,更优选低于 300pM,并且更优选低于 200pM。优选地,这些 IC_{50} 值是如本文的实施例中所述通过利用人嗜中性粒细胞实施的结合测定来确定的。

[0212] 本发明的另一实施方式涉及结合 C5aR 或其片段的抗体,其中当在相同条件下测定时,其 K_D (亲和常数)比 MAb7F3 低至少 1.3 倍,优选低 1.4 倍。

[0213] 在另一实施方式中,本发明的抗体结合至 C5aR 或其片段,其中 K_D 小于 1.4nM,更优选小于 0.7nM,更优选小于 0.5nM,更优选小于 0.3nM。

[0214] 本发明的另一实施方式涉及结合 C5aR 或其片段的抗体,其中当在相同条件下测定时,其缔合常数或 k_a 速率比 MAb7F3 高至少 1.5 倍。

[0215] 在另一实施方式中,本发明的抗体结合至 C5aR 或其片段,其缔合常数或 k_a 速率为至少 $6.8 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$,更优选为至少 $10^6 M^{-1} s^{-1}$,优选为至少 $3 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 。

[0216] 在一种优选的实施方式中,结合亲和力是通过抗体与来源于人 C5aR 的肽的结合的 BIAcore 分析来确定的。优选地,来源于人 C5aR 的肽包含序列 LYRVVREEYFPPKVLGVDYS HDKRRERAVAIV(SEQ ID NO :2)。更优选地,该结合分析在本文实施例中所述的条件下通过 BIAcore 结合分析来实施。

[0217] 体外测定

[0218] 本发明的单克隆抗体适合体外利用,例如,在免疫测定中它们以液相利用或结合至固相载体利用。这些抗体可以用于监测样品中的 C5aR 水平。类似地,抗-独特型抗体用于测量样品中 C5a 水平。另外,在这些免疫测定中,可以各种方式可检测地标记这些单克隆抗体。可利用本发明的单克隆抗体的免疫测定类型的实例是直接形式或间接形式的竞争性和非竞争性免疫测定。这样的免疫测定的实例是放射性免疫测定 (RIA) 和夹心(免疫)测定。使用本发明的单克隆抗体的抗原检测可利用以正向、反向或同步模式运行的免疫测定,包括在生理学样品上的免疫组织化学测定来完成。本领域技术人员将知晓或者可以易于理解其他免疫测定形式而无需过度实验。

[0219] 本发明的抗体可结合至许多不同载体并用来检测 C5aR 的存在。熟知的载体的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿 (magnetite)。对于本发明目的而言,载体的性质可以是可溶性的

或不溶性的。本领域技术人员将知晓用于结合单克隆抗体的其他合适载体,或者能够利用常规实验确定。

[0220] 在一种实施方式中,天然表达 C5aR 的细胞或包含编码 C5aR 或其变体的重组核酸序列的细胞用于本发明的结合测定。在适于受体表达的条件下保持这些细胞。在适合于结合的条件下(例如,在合适结合缓冲液中)使这些细胞与抗体或片段接触,并通过标准技术检测结合。为了确定结合,结合的程度可相对于合适对照加以确定(例如,与在没有抗体下确定的背景对比,与第二抗体(即一个标准)的结合对比,与抗体和未转染细胞的结合对比)。包含受体或脂质体(包含受体)的细胞部分,如膜部分可代替完整细胞使用。

[0221] 结合抑制测定也可用来鉴定结合 C5aR 和抑制 C5a 与 C5aR 或功能变异体的结合的抗体或其片段。例如,可实施一个结合测定,其中相比于在没有抗体下的 C5a 的结合,检测或测量 C5a 的结合(在存在该抗体的情况下)的减少。包含分离和/或重组哺乳动物 C5aR 或其功能变异体的组合物可以与 C5a 和抗体同时接触或以一个接一个的顺序接触。在抗体存在的情况下配体结合程度的降低表明通过该抗体使结合受到抑制。例如,配体的结合可被降低或消除。

[0222] 可获得鉴定结合 C5aR 的抗体的存在的其他方法,如其他合适的结合测定,或监测由受体结合触发的事件的方法,包括信号转导功能和/或细胞应答(例如白细胞运输)的刺激。以这种方式鉴定的抗体可进一步评估以确定在结合后它们是否起到抑制 C5aR 的其他功能和/或评定它们的治疗应用的作用。

[0223] 信号转导分析

[0224] 配体或促进剂(如激动剂)与 C5aR 的结合可导致通过这种 G 蛋白偶联受体的信号转导,并且刺激 G 蛋白的活性以及其他胞内信号分子。通过一种化合物(例如抗体或其片段)对信号转导功能的诱导可利用任何合适的方法加以监测。这样的测定可用来鉴定 C5aR 的抗体激动剂。抗体或其功能片段的抑制活性可在测定中利用配体或促进剂,并评估抗体抑制由配体或促进剂诱导的活性的能力而加以确定。

[0225] G 蛋白活性,如 GTP 水解为 GDP,或之后的由受体结合触发的信号转导事件,如胞内(细胞溶质)游离钙浓度快速和瞬间增大的诱导可通过本领域已知的方法或其他合适方法进行测定(参见,例如,Neote, K. et al., Cell, 72:415-425, 1993; Van Riper et al., J. Exp. Med., 177:851-856, 1993; Dahinden, C. A. et al., J. Exp. Med., 179:751-756, 1994)。

[0226] 例如, Sledziewski 等人利用杂合 G 蛋白偶联受体的功能测定可用来监测配体或促进剂结合受体和激活 G 蛋白的能力(Sledziewski 等,美国专利第 5,284,746 号)。

[0227] 这样的测定可在待评估的抗体或其片段存在下实施,并利用已知方法和/或本文描述的方法来确定抗体或片段抑制由配体或促进剂诱导的活性的能力。

[0228] 趋化性和细胞刺激的测定

[0229] 趋化性测定也可用来评估抗体或其功能片段阻遏配体与 C5aR 的结合和/或抑制与配体和受体的结合相关的功能的能力。这些测定基于由化合物诱导的细胞体外或体内的功能迁移。趋化性可通过任何合适的手段进行评估,例如在利用 96 孔趋化性板的测定中,或利用其他本领域已知的用于评估趋化性的方法。例如, Springer 等人描述过体外跨内皮趋化性测定法(transendothelial chemotaxis assay)的使用(Springer 等, WO 94/20142,

1994 年 9 月 15 公开 ;还参见 Berman 等, Immunol. Invest. 17 :625-677(1988))。也已描述过越过内皮进入胶原凝胶的迁移 (Kavanaugh 等, J. Immunol. , 146 :4149-4156(1991))。小鼠 L1-2 pre-B 细胞或具有趋化能力的其他合适宿主细胞的稳定转染子可以用于趋化性测定中。

[0230] 通常,趋化性分析监测合适细胞(如白细胞(例如淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞))进入或通过屏障(例如,内皮、滤器),朝向化合物的增高水平,从该屏障的第一表面朝相对的第二表面的定向运动或移动。膜或滤器提供便利的屏障,以使合适细胞进入或通过滤器朝向化合物的增高水平,从该滤器的第一表面朝该滤器的相对第二表面的定向运动或移动被监测。在一些测定中,膜用物质涂覆以促进粘附,如 ICAM-1、纤连蛋白或胶原。这样的测定提供白细胞“寻靶(homing)”的体外近似。

[0231] 例如,可以检测或测量合适容器(一种容纳装置)中细胞从第一室迁移进入或通过微孔膜迁移进入第二室(其包含待测试抗体,并且其通过所述膜与第一室分开)的抑制。选择合适的膜,该膜具有用于监测响应于化合物的特定移动的合适孔大小,包括例如硝化纤维素、聚碳酸酯。例如,可使用大小为约 3-8 微米,并优选为约 5-8 微米的孔。孔的尺寸可以是在滤器上均匀的或者在合适的孔的尺寸的一个范围内。

[0232] 为了评估迁移和迁移的抑制,可利用标准技术(例如显微镜)确定迁移到滤器中的距离、越过保持粘附于滤器的第二表面的细胞数量、和/或在第二室中累积的细胞数量。在一种实施方式中,将细胞用可检测标签(例如,放射性同位素,荧光标签,抗原或表位标签)加以标记,并且可在抗体或片段存在和不存在的条件下,通过利用适当方法(例如,通过检测放射活性,荧光,免疫测定)而确定粘附于所述膜和/或在第二室中存在的标签的存在来评估迁移。由抗体激动剂诱导的迁移程度可相对于适当对照来确定(例如,由所述抗体诱导的未转染细胞的移动相比,相比于在没有抗体下确定的背景移动,相比于由第二化合物(即,一个标准)诱导的移动程度)。在一种实施方式中,尤其是对于 T 细胞、单核细胞或表达 C5aR 的细胞,可监测跨内皮迁移。在该实施方式中,评估通过内皮细胞层的移行(transmigration)。为了制备细胞层,可以在微孔滤器或膜(可选地涂覆有诸如胶原、纤连蛋白或其他胞外基质蛋白的物质)上培养内皮细胞,以促进内皮细胞的附着。优选地,培养内皮细胞直至形成汇合(融合)的单层。各种哺乳动物内皮细胞可用于单层形成,包括例如静脉、动脉或微血管内皮,如人脐静脉内皮细胞(CloneticsCorp, 圣地亚哥,加利福尼亚州)。为了测定响应于特定哺乳动物受体的趋化性,优选相同的哺乳动物的内皮细胞;然而,也可以使用来自异源哺乳动物种或属的内皮细胞。

[0233] 通常,通过检测在朝向化合物水平增大的方向上,从滤器的第一表面朝向滤器的相对第二表面进入或穿过膜或滤器的细胞的定向移动而实施测定,其中该滤器包含在第一表面上的内皮细胞层。定向移动从邻近第一表面的区域发生,进入或穿过所述膜,朝向位于滤器的相对侧上的化合物。在邻近第二表面的区域中存在的化合物的浓度大于邻近第一表面的区域中的化合物浓度。

[0234] 在用来测试抗体抑制剂的一种实施方式中,可将包含能够迁移并表达 C5aR 的细胞的组合物置于第一室中。将包含能够诱导第一室中细胞的趋化性(具有化学引诱功能)的一种或多种配体或者促进剂的组合物置于第二室中。优选地,在细胞置于第一室之前不久,或与这些细胞同时,放置包含待测试抗体的组合物,优选地在第一室中。在该测定

中,可结合受体并抑制表达 C5aR 的细胞趋化性诱导(通过配体或促进剂)的抗体或其功能片段是受体功能的抑制剂(例如,刺激功能的抑制剂)。在抗体或片段存在下由配体或促进剂诱导的迁移程度的降低指示抑制活性。可实施单独的结合研究以确定抑制是否是抗体与受体结合的结果或者经由不同机制发生。

[0235] 下文描述了监测组织的白细胞渗透(响应于该组织中注入的化合物(例如,趋化因子或抗体))的体内测定(参见炎症模式)。这些体内寻靶的模式测量细胞响应于配体或促进剂通过迁移和趋化至炎症部位的能力以及评估抗体或其片段阻遏这种迁移的能力。

[0236] 除了上述方法,抗体或片段对 C5aR 的刺激功能的作用可通过利用包含受体的合适宿主细胞,监测由活性受体诱导的细胞应答而进行评估。

[0237] C5aR 的其他配体、抑制剂和 / 或促进剂的鉴定

[0238] 上述的测定,其可用来评估本发明的抗体和片段的结合以及功能,可适于鉴定其他配体或结合 C5aR 或其功能变异体的其他物质,以及 C5aR 功能的抑制剂和 / 或促进剂。例如,具有与本发明的抗体或其功能部分相同或类似结合特异性的试剂可通过利用所述抗体或其部分的竞争测定进行鉴定。因此,本发明还涵盖鉴定该受体的配体或结合 C5aR 的其他物质、以及受体功能的抑制剂(例如拮抗剂)或促进剂(例如激动剂)的方法。在一种实施方式中,在测定中使用带有 C5aR 蛋白或其功能变异体的细胞(例如,白细胞,被改造成表达哺乳动物 C5aR 蛋白或功能变异体(由引入所述细胞内的核酸编码)的细胞系或合适的宿主细胞),以鉴定和评估配体或结合受体的其他物质的效力,包括受体功能的抑制剂或促进剂。这样的细胞也可用于评估表达的受体蛋白或多肽的功能。

[0239] 根据本发明,结合受体的配体和其他物质、受体功能的抑制剂和促进剂可在合适测定中鉴定,并且进一步评估治疗作用。受体功能的拮抗剂可用来抑制(降低或阻止)受体活性,而配体和 / 或激动剂可用来诱导(触发或增强)其中指定的正常受体功能。因此,本发明提供了一种治疗炎性疾病,包括自身免疫性疾病和移植物排斥的方法,包括向个体(例如,哺乳动物)给予受体功能的拮抗剂。本发明进一步提供了一种通过向个体给予受体功能的新型配体或激动剂来刺激受体功能的方法,提供了选择性刺激白细胞功能的一种新途径,其例如在治疗传染性疾病和癌症中是有用的。

[0240] 如本文中所使用的,C5aR 蛋白的“配体”是指一种特定种类的物质,其结合于哺乳动物 C5aR 蛋白,包括天然配体以及天然配体的合成和 / 或重组形式。在一种优选的实施方式中,C5aR 蛋白的配体以高亲和力发生结合。

[0241] 如本文中所使用的,“拮抗剂”是一种抑制(降低或阻止)C5aR 蛋白的至少一种功能特性的物质,如结合活性(例如,配体结合、促进剂结合、抗体结合)、信号转导活性(例如,哺乳动物 G 蛋白的活化、细胞溶质游离钙浓度的快速和瞬间增大的诱导)和 / 或细胞应答功能(例如,趋化性、胞吐作用或通过白细胞的炎性介质释放的刺激)。术语拮抗剂涵盖结合受体的物质(例如,抗体、天然配体的突变体、小分子量有机分子、配体结合的其他竞争性抑制剂)、以及抑制受体功能而不与其结合的物质(例如,抗-独特型抗体)。

[0242] 如本文中所使用的,“激动剂”是一种促进(诱导,引发,增强或增加)C5aR 蛋白的至少一种功能特性的物质,如结合活性(例如,配体、抑制剂和 / 或促进剂结合)、信号转导活性(例如,哺乳动物 G 蛋白的活化、细胞溶质游离钙浓度的快速和瞬间增大的诱导)和 / 或细胞应答功能(例如,趋化性、胞吐作用或通过白细胞的炎性介质释放的刺激)。术语激

动剂涵盖结合受体的物质（例如，抗体，来自另一物种的天然配体的同系物）、以及促进受体功能而不与其结合的物质（例如，通过激活相关蛋白）。在一种优选的实施方式中，激动剂不同于天然配体的类似物。

[0243] 因此，本发明还涉及一种检测或鉴定结合 C5aR 或结合其变异体的配体的试剂（包括配体、拮抗剂、激动剂和结合 C5aR 或功能变体的其他物质）的方法。根据该方法，可将待测试的试剂、本发明的抗体或抗原结合片段（例如，具有与 7F3 相同或类似的表位特异性的抗体，以及其抗原结合片段）以及包含 C5aR 或其配体结合变异体的组合物进行组合。将前述组分在适合于抗体或抗原结合片段与 C5aR 结合的条件下进行组合，并且根据本文所述的方法或其他合适方法直接或间接地检测或测量抗体或片段与 C5aR 的结合。相对于合适对照（例如，在没有待测试的试剂下）形成的复合体的量的减少是该试剂结合所述受体或变体的指征。包含 C5aR 的组合物可以是带有重组 C5aR 蛋白或结合其变异体的配体的细胞的膜部分。抗体或其片段可用标签加以标记，如放射性同位素、自旋标签、抗原或表位标签、酶标签、荧光基团以及化学发光基团。

[0244] 抗 -C5aR mAb 的置换可以更易于鉴定 C5a 受体拮抗剂是有原因的。C5a 与 C5aR 的结合是涉及 C5aR 的不同区域的两步过程（参见 Klco et al., 2005），且抗 -C5aR 单克隆抗体，即 7F3 或 3C5 识别第二胞外环中的用于抑制的单个关键区域。

[0245] 炎症模型

[0246] 可用来评估本发明的抗体和片段作为治疗剂在体内的作用的炎症的体内模型是可获得的。例如，可监测经过与 C5aR 反应性的趋化因子和抗体或其片段皮内注入到合适动物，如兔、小鼠、大鼠、豚鼠或猕猴中的白细胞渗入（参见，例如，Van Damme, J. J. Exp. Med., 176 :59-65 (1992) ; Zachariae, C. O. C. et al., J. Exp. Med. 171 :2177-2182 (1990) ; Jose, P. J. 等, J. Exp. Med. 179 :881-887 (1994)）。在一种实施方式中，皮肤活组织检查组织学地评估白细胞（例如，嗜酸性粒细胞，粒性白细胞）的渗入。在另一实施方式中，将能够趋化且外渗的标记细胞（例如，稳定转染的表达 C5aR 的细胞）给予该动物。待评估的抗体或片段可在标记细胞给予试验动物之前、同时或之后给予。与没有抑制剂下的渗入程度相比，抗体存在下渗入程度的降低是抑制的指征。

[0247] 应用

[0248] 本发明的抗体可应用于在各种应用，包括研究、诊断和治疗应用。

[0249] C5aR 在白细胞运输中具有重要的作用。因此，C5aR 是嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、T 细胞或 T 细胞亚组或单核细胞迁移到某些炎性部位的化学引诱物受体，所以抗 -C5aR 抗体可以用来抑制（减少或阻止）白细胞迁移，尤其是与嗜中性粒细胞组织损伤，如再灌注损伤和休克、T 细胞机能障碍如自身免疫性疾病，或过敏反应或单核细胞介导的紊乱如动脉粥样硬化相关。

[0250] 本文描述的抗体可用作抑制（减少或阻止）(a) 与受体的结合（例如配体、抑制剂或促进剂的结合），(b) 受体信号转导功能，和 / 或 (c) 刺激功能的抑制剂。用作受体功能的抑制剂的抗体可直接或间接地阻遏配体或促进剂结合（例如，通过引起构象变化）。例如，抗体可通过抑制配体的结合或通过脱敏（有或没有抑制配体的结合）而抑制受体功能。

[0251] 因此，本发明提供了一种抑制哺乳动物（例如人类患者）体内白细胞运输的方法，包括向该哺乳动物给予有效量的本发明的抗体。本发明还提供了一种抑制与 C5aR 活性相

关的其他作用如从嗜碱性粒细胞释放组胺和从嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜中性粒细胞释放颗粒的方法。给予本发明的抗体可导致疾病状态的改善或消除。

[0252] 单克隆抗体也可免疫治疗地用于免疫病理学相关疾病。如本文联合本发明的抗体使用的,术语“免疫治疗地”或“免疫疗法”表示预防性以及治疗性给药。因此,这些抗体可给予高风险患者以便减轻免疫病理学疾病的可能性和/或严重性,或者给予已显示活动性疾病的迹象,例如由于革兰氏阴性菌感染导致的败血症的患者。

[0253] 这些抗体可用来治疗变态反应、动脉粥样化形成、过敏反应、恶性肿瘤、慢性和急性炎症、组胺和 IgE 介导的变态反应、休克、以及类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、多发性硬化症、同种异体移植物排斥、纤维变性疾病、哮喘、炎性肾小球病或任何免疫复合物相关紊乱。

[0254] 可利用本发明的抗体治疗的人类或其他物种的疾病或症状包括但不限于:

[0255] (a) 炎性或变态疾病和症状,包括呼吸性变态疾病,例如哮喘、变应性鼻炎、超敏性肺病、过敏性肺炎、间质性肺疾病 (ILD) (例如,特发性肺纤维化、或与类风湿性关节炎相关的 ILD、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化症、斯耶格伦综合征 (Sjogren' s syndrome)、多肌炎或皮炎);过敏反应或超敏反应、药物变态反应 (例如,对青霉素,头孢菌素)、昆虫叮咬过敏;炎性肠疾病,如克罗恩氏病 (Crohn' s disease) 和溃疡性结肠炎;脊椎关节炎;硬皮病;银屑病和炎性皮肤病,如皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、荨麻疹、血管炎 (例如,引起坏死的、影响皮肤的和超敏性血管炎);

[0256] (b) 自身免疫性疾病,如关节炎 (例如,类风湿性关节炎,牛皮癣性关节炎)、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、重症肌无力、青少年型糖尿病、肾炎 (如肾小球肾炎)、自身免疫性甲状腺炎、贝切特病 (Behcet' s disease);

[0257] (c) 移植物排斥 (例如在移植中),包括同种异体移植物排斥或移植物抗宿主病;

[0258] (d) 动脉粥样硬化;

[0259] (e) 具有白细胞 (白血球) 渗入皮肤或器官的癌症;

[0260] (f) 可由其中不期望的炎性应答受到抑制而得到治疗的其他疾病或症状 (包括 C5aR 介导的疾病或症状),包括但不限于再灌注损伤、休克、成人呼吸窘迫综合征、某些恶性血液病、细胞因子诱导的毒性 (例如感染性休克、内毒素性休克)、多肌炎、皮炎、类天疱疮、阿尔茨海默病和肉芽肿病包括肉芽瘤病、血友病滑膜炎和与年龄相关的黄斑退行性病变。

[0261] 本发明的抗 -C5aR 抗体可阻遏一种或多种配体的结合,从而阻遏导致以上紊乱的一种或多种事件的下游级联反应。

[0262] 在一种优选的实施方式中,本发明的抗体用于治疗败血症、休克和成人呼吸窘迫综合征。

[0263] 在另一实施方式中,本发明的不同抗体可用来检测 C5aR 以测量受体的表达,例如在白细胞 (例如嗜中性粒细胞、单核细胞、B 细胞)、内皮细胞上和/或在用受体基因转染的细胞上。因此,它们可用于诊断或研究目的的诸如细胞分选 (例如,流式细胞仪,荧光活化细胞分选) 的应用中。

[0264] 本发明的抗 -C5aR 抗体在诊断应用中具有价值。通常,诊断测定需要检测由抗体或其片段与 C5aR 结合得到的复合体的形成。对于诊断目的,抗体或抗原结合片段可被标记

或未标记。抗体或片段可直接标记。可采用各种标签,包括但不限于放射性核素、荧光剂、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂和配体(例如,生物素,半抗原)。本领域技术人员知晓大量适合的免疫测定(参见,例如美国专利第 3,817,827 ;3,850,752 ;3,901,654 和 4,098,876 号)。组织样品的免疫组织化学也可以用于本发明的诊断方法中。当未标记时,可利用合适方式检测抗体或片段,例如在凝集测定中。未标记抗体或片段也可与另一(即一种或多种)可用来检测抗体的合适试剂的组合使用,如与第一抗体(例如,抗-独特型抗体或对于未标记免疫球蛋白是特异性的其他抗体)或其他合适试剂(例如,标记蛋白 A)是反应性的标记抗体(例如,第二抗体)。

[0265] 也可制备用于检测生物学样品中存在 C5aR 蛋白的试剂盒。这样的试剂盒包括结合至 C5aR 的抗体或其功能片段,以及一种或多种适合于检测抗体或片段与 C5aR 之间的复合物的存在的辅助试剂。本发明的抗体组合物可以冻干形式提供(单独或与另外的对其他表位特异性的抗体的组合)。抗体可以是标记或未标记的,其可与佐剂成分(adjunct ingredient)(例如,缓冲剂,如 Tris、磷酸盐和碳酸盐、稳定剂、赋形剂、杀菌剂和/或无活力蛋白例如牛血清白蛋白)一起包括在所述试剂盒中。例如,抗体可作为与佐剂成分的冻干混合物提供,或者佐剂成分可单独提供以由使用者进行组合。通常,基于活性抗体的量,这些佐剂材料(adjunct materials)以低于约 5% 重量存在,并且基于抗体浓度,通常以至少约 0.001% 重量的总量存在。在采用能够结合至单克隆抗体的第二抗体的情况下,可在试剂盒中提供这样的抗体,例如在单独的小瓶或容器中。如果存在第二抗体,则其通常被标记,并且可以与上述抗体制剂类似的方式进行配制。

[0266] 类似地,本发明还涉及一种通过细胞的 C5aR 检测和/或定量表达的方法,其中,包含细胞或其部分(例如膜部分)的组合物在适于抗体或片段与其结合的条件下与本发明的抗体接触,并监测该结合。抗体的检测是抗体和 C5aR 之间的复合物形成的指征,表明存在受体。抗体与细胞的结合可利用诸如在 WO 03/062278 中描述的那些技术进行确定。该方法可用来检测在来自个体(例如,在样品,如体液,如血液、唾液或其他合适样品)的细胞上的 C5aR 的表达。在 T 细胞或单核细胞表面上的 C5aR 表达水平也可例如通过流式细胞仪来确定,而且表达水平(例如,染色强度)可与疾病易感性、进展或危险相关联。

[0267] 给药模式

[0268] 各种给药途径是可能的,包括但不必限于口服、饮食、局部、非肠道(例如,静脉内、动脉内、肌内、皮下注射)、吸入(例如,支气管内、眼内、鼻内或口腔吸入、鼻内滴剂),取决于待治疗的疾病或症状。其他合适的给药方法还可包括可再加载或可生物降解装置以及缓慢释放聚合物装置。本发明的药物组合物也可作为与其他试剂联合疗法的一部分而给予。

[0269] 待给予的抗体的剂型将根据选择的给药途径和剂型(例如,溶液、乳液、胶囊)而不同。包含待给予的抗体的适合的药物组合物可在生理学可接受赋形剂或载体中制备。也可使用抗体的混合物。对于溶液或乳液,合适的载体包括例如,含水或含醇/含水溶液、乳液或混悬液,包括盐水和缓冲介质。非肠道载体可包括氯化钠溶液、林格式葡聚糖(Ringer's dextrose)、葡聚糖和氯化钠、乳酸化林格或非挥发油。各种适当的含水载体对于本领域技术人员是已知的,包括水、缓冲水、缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)、葡聚糖溶液和甘氨酸。静脉内载体可包括各种添加剂、防腐剂、或流体、营养

剂或电解质补充剂（通常，参见，Remington's Pharmaceutical Science, 第 16 版, Mack, Ed. 1980）。组合物可以可选地根据需要包含药用辅助物质至适当的生理条件，如 pH 调节和缓冲剂以及毒性调节剂，例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙和乳酸钠。本发明的抗体和片段可在根据本领域已知冻干和重建技术使用之前被冻干以用于在合适载体中储存和重建。所选介质中活性成分的最佳浓度可根据经验、根据本领域技术人员熟知的程序进行确定，并取决于期望的最终药物制剂。对于吸入，抗体或片段可溶解并加载到合适的分配器（例如，雾化器、喷雾器或压缩气溶胶分配器）中以用于给药。

[0270] 本发明抗体给药的剂量范围为足够大以产生期望的效果，其中免疫病理学疾病的症状减轻或者感染的可能性或对于免疫系统的刺激降低。该剂量不应太大而引起有害副作用，如高粘滞综合征、肺水肿、充血性心力衰竭等。通常，剂量将随着患者的年龄、症状、性别和疾病程度而不同并且可由本领域技术人员确定。剂量可由任何并发症事件中的单个医生调节。剂量可以在一天或多天中以每天一个或多个剂量给药，从约 0.1mg/kg 至约 300mg/kg，优选从约 0.2mg/kg 至约 200mg/kg，最优选从约 0.5mg/kg 至约 20mg/kg 变化。

[0271] 本发明的一种或多种抗体可通过适当途径，单独地或与另一药物或药剂组合（之前、同时或之后）给予个体。例如，本发明的抗体也可与其他单克隆或多克隆抗体（例如，联合结合趋化因子受体的抗体，该趋化因子受体包括但不限于 CCR2 和 CCR3）联合使用，或与抗-TNF 或其他抗炎性药剂或与现有的血浆产品联合使用，如商业上可获得的在预防或治疗中使用的 γ 球蛋白和免疫球蛋白产品。本发明的抗体可以作为与抗生素和 / 或抗菌剂结合的单给药剂组合物使用。

[0272] 本领域技术人员将理解，本发明的抗体可以通过给予包含编码该抗体的序列的核酸分子而引入到受试者体内。该核酸分子的形式可以是 DNA 或 RNA 或包含 DNA 或 RNA 的嵌合分子。编码该抗体的核苷酸序列可以被克隆进入表达载体中，其中编码该试剂的序列操作性地与表达控制元件连接。表达控制元件在本领域是熟知的，并且包括例如启动子、增强子以及适当的起始和终止密码子。

[0273] 可采用各种方法将编码抗体的核酸引入到体内靶细胞中。例如，可在靶部位注射裸露核酸、可以囊化入脂质体、或者可以借助于病毒载体引入。

[0274] 单独或例如在阳离子脂质体中囊化的核酸分子的直接注射可以用于将编码 TSP-1 的核酸的稳定基因转移到体内未分化或分化细胞中 (Ulmer 等, 1993)。另外，可以利用粒子轰击方法将核酸转移到体内各组织中 (Williams 等, 1991)。

[0275] 病毒载体可用于将编码抗体的核酸分子基因转移到体内特定细胞类型中。病毒是特化的感染剂，其可在特定细胞类型中感染并繁殖。这种对于感染特定细胞型的特异性特别适合于将抗体靶向于所选定的体内细胞。病毒载体的选择将部分取决于待靶向的细胞类型。

[0276] 特化病毒载体在本领域是熟知的，其可靶向特定细胞类型。这样的载体包括，例如，具有一般或组织特异性启动子的重组腺相关病毒载体 (US 5, 354, 678)。重组腺相关病毒载体具有额外的优点，即重组病毒可稳定地整合到甚至是休眠非增殖性细胞的染色质中 (Lebkowski 等, 1988)。

[0277] 病毒载体可被构建成通过将组织特异性启动子或增强子并入到该载体中而进一步控制表达所编码抗体的细胞类型 (Dai 等, 1992)。

[0278] 逆转录病毒也适合用于体内递送编码该抗体的核酸分子的方法。这样的载体可被构建成充当感染性颗粒或非感染性颗粒（其仅经过单次初始一轮的感染）。

[0279] 也可以以组织特异性方式，利用组织特异性配体或经由桥接分子与该核酸分子非共价复合的抗体，利用受体介导的 DNA 递送方法将编码抗体的核酸分子递送到细胞中（Curiel 等, 1992 ; Wu 和 Wu, 1987）。

[0280] 为了获得受试者体内抗体表达的基因转移，也可通过例如自体同源细胞的体外转染而实施。用于这样的体外转染的合适细胞包括血细胞，因为这些细胞易于通过本领域熟知的方法进行操作并再次回引到受试者体内。

[0281] 通过体外细胞转染的基因转移可通过各种方法实施，包括例如磷酸钙沉淀、二乙氨基乙基葡聚糖、电穿孔、脂转染或病毒感染。这样的方法在本领域是熟知的（参见，例如，Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Springs Harbour Laboratory Press (1989)）。一旦细胞被转染，然后就将它们移植或嫁接回到待治疗的受试者体内。一旦引入到体内，这些细胞可产生抗体，其可进入循环并抑制疾病或病症部位处的血小板聚集。

[0282] 在说明书全文中，术语“包含”，或变形如“包含”应理解为包含所述元件、整体或步骤，或多个元件、整体或步骤的组，但不排除任何其他元件、整体或步骤，或多个元件、整体或步骤的组。

[0283] 已包含在本说明书中的文献、条例、材料、装置、论文等的任何论述仅用于提供用于本发明内容的目的。不应视为这些内容的任何或全部形成现有技术基础的一部分或者与本发明相关领域中的公知常识，如在本申请每一个权利要求的优先权日之前在澳大利亚存在的。

[0284] 本发明现在将通过以下实施例进行举例说明，这些实施例并不用于以任何方式限制本发明。本文引述的所有参考文献的教导通过引用并入本文。

[0285] 实施例

[0286] 实验详述

[0287] 人类 C5aR 敲入小鼠的产生

[0288] 在小鼠 C5aR 基因启动子的控制下，采用敲除 / 敲入策略以构建表达人类 C5aR 但不表达小鼠 C5aR 的转基因小鼠。靶载体包含 C5aR 基因外显子 3 的小鼠 C57BL/6 基因组 DNA 上游的 3.5kb 区域、人类 C5aR 基因外显子 3 编码序列、小鼠 C5aR 基因 3' 未翻译区域、磷酸葡萄糖激酶启动子和由 loxP 部位侧悬的新霉素抗性基因以及载体 pL0z 中的 C5aR 基因的小鼠基因组 DNA 下游的 3kb 区域 (Ozgene, Perth, Australia)。基因组 DNA 片段利用 PCR 扩增产生。将该载体转染到 C57BL/6 胚胎干细胞中，并将来自 G418 抗性克隆的 DNA 通过 DNA 印迹进行筛选。Xba I 和 EcoR V 消化的 DNA 分别与 5' 和 3' 探针杂交以鉴定在 5' 和 3' 端都具有正确同源性重组事件的克隆体。从用正确靶向 ES 克隆体注射的胚泡产生的嵌合体与 C57BL/6 雌性交配。通过小鼠尾部基因组 DNA 的 DNA 印迹来证实人类 C5aR 基因的种系传递。产生了人类 C5aR 基因 (hC5aR^{+/+}) 的小鼠纯合子，并且 PCR、DNA 印迹和 FACS 染色证实缺少 mC5aR。

[0289] 嗜中性粒细胞分离

[0290] 改进的如先前所述从健康志愿者的外周静脉血分离人嗜中性粒细胞 (Haslett et

al., (1985))。简而言之,收集到 EDTA 涂覆的真空采血管 (vacutainer) 内的血样以 400xg 离心 15min,然后将血浆和血沉棕黄层 (buffy coat) 去除。随后 1%葡聚糖沉淀 30 分钟,白血细胞通过 300xg 离心 5 分钟而成片状沉淀 (pellet) 并用 PBS 清洗。然后将这些细胞在 65%帕可尔 (percoll) (密度:1.093g/ml, Amersham Bioscience) 的垫层上以 500xg 离心 30 分钟。离心后,将嗜中性粒细胞再悬浮在 PBS 中。利用注射器穿过骨头通过强制注射具有 10%胎牛血清的 5ml DMEM(GIBCO) 介质而将小鼠嗜中性粒细胞从后腿股骨分离出来。嗜中性粒细胞在菲科帕克 (Ficoll-Paque(Amersham Bioscience)) 上通过密度离心而分离。红血细胞用低渗缓冲液 (155mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mMEDTA) 溶解。通过台盼蓝排斥确定细胞存活性并且将嗜中性粒细胞片状沉淀再悬浮在 PBS 中。

[0291] 单克隆抗体增殖

[0292] 将 C57BL/6 小鼠用 $\sim 2 \times 10^7$ 表达高水平的 hC5aR 的 L 1.2 转染子免疫化 (Campbell et al. (1996)), 以 2 周间隔腹膜内 5 次然后静脉内一次。在最后一次静脉内免疫之后 4 天,取出脾并利用标准程序将细胞与 SP2/0 细胞系融合。用 $\sim 1 \times 10^7$ 从 hC5R1^{+/+} 小鼠股骨分离的嗜中性粒细胞以类似方式对 C57BL/6 小鼠免疫化,静脉内两次,腹膜内一次以及最后进行静脉内免疫。杂交瘤在含有 10% Fetalclone (HyClone) 和 HAT 补体 (SIGMA) 的 DMEM(GIBCO) 中生长,并取培养物上清用于初始筛选。所选抗体的生产按比例增大并通过蛋白 A 或 G 色谱纯化 mAb,浓缩,缓冲交换,并除去内毒素。MAb 浓度利用小鼠 IgG ELISA 试剂盒 (Roche) 确定。

[0293] 流式细胞计量

[0294] 为了评估 mAb 对转染细胞或白细胞的反应性,我们使用了间接免疫荧光染色和流式细胞计量法。细胞用 PBS 清洗一次,并再悬浮在 100 μ l 含有 2%人血清和 0.1%叠氮化钠 (染色缓冲液)、纯化抗体或 50 μ l 杂交瘤培养物上清液的 PBS 中。在 4°C 下 20 分钟之后,细胞用染色缓冲液清洗两次,并再悬浮在 50 μ l FITC-结合的亲和纯化的 F(ab')₂ 羊抗-小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) (在染色缓冲液中以 1:200 稀释) 中。在 4°C 下孵育 20 分钟后,细胞用染色缓冲液清洗两次并在 FACSCalibur (Becton-Dickinson) 上进行分析,以确定表面表达的水平。碘化丙啶染色用来排除死细胞。

[0295] 结合测定

[0296] 清洗人嗜中性粒细胞并以 1×10^7 /ml 再悬浮在结合缓冲液 (50mM HEPES, pH7.5, 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 以及 0.5% BSA) 中。对于每一个结合反应 (终体积为 120 μ l), 将 40 μ l 具有适当量的抗-hC5aR mAb、同种型匹配的对照 mAb 或未标记的人类 C5a (SIGMA) 的细胞悬浮液 (4×10^5 个细胞) 在室温下孵育 15 分钟。以 0.4nM 的终浓度加入 ¹²⁵I 标记的人类 C5a (Perkin Elmer), 并且使反应在室温下孵育 60 分钟。然后收集细胞并用含有 150mM NaCl 的结合缓冲液清洗 3 次。然后将细胞转移到具有 MicroScint 20 闪烁液的 Opti 板 (Perkin Elmer) 并在 TopCount (Packard) 上计算放射活性。每一个样品一式三份地进行测定。

[0297] BIACore 分析

[0298] 1. 仪器试剂:

[0299] 1.1 硬件 / 软件: BIACore 2000/BIACore 2000 控制软件

[0300] 运行缓冲液: HBS-EP (BIACore, #BR-1001-88)

- [0301] 再生缓冲液 :100mM HCl
- [0302] 传感器芯片 :传感器芯片 SA(链霉亲和素);BIACore #BR-1003-98)
- [0303] 生物素化人类 C5aR 肽(第二个环):生物素-SGSGLYRVVREEYFPPKVLGVDYSHDKRRE RAVAIV-OH(SEQ ID NO:26)。
- [0304] 2. 测定程序 / 仪器设置 :
- [0305] 2.1 测定的流速 :30 μ l/min
- [0306] 2.2 条件 :3 $\times$ 1- 分钟注射在 50mM NaOH 中的 1M NaCl 的 SA 芯片 (Fc1 和 Fc2)。
- [0307] 2.3 样品制备 :
- [0308] 在 HBS-EP(BIACore, #BR-12001-88) 中的稀释抗体样品对每一抗体使用以下浓度 :
- [0309] i) 100nM
- [0310] ii) 50nM
- [0311] iii) 25nM
- [0312] iv) 12.5nM
- [0313] v) 6.25nM
- [0314] vi) 3.125nM。
- [0315] 2.4 对照测定 :
- [0316] 在继续进行动力学研究之前测试用于与链霉亲和素 (Fc1) 非特异性结合的抗体。使用最高浓度的待在动力学测定中使用的抗体(在 HBS-EP 中的 100nM)。
- [0317] 2.5 生物素化-肽 23(C5aR 肽)与 SA 传感器芯片 Fc2 的固定 :
- [0318] 在 HBS-EP 中制备 1 μ g/mL 的 Biot- 肽。以手动注射 $\sim$ 1000 RU 固定至 Fc2。
- [0319] 2.6 抗体动力学测定 :
- [0320] 利用动力学分析向导 (Kinetic Analysis Wizard), 依照提示并输入如以下概括的分析参数 :
- [0321] 2.6.1 输入要运行的浓度系列 :
- [0322] 即, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100nM。一式两份地运行样品。
- [0323] 2.6.2 选择“直接结合测定”
- [0324] 2.6.3 选择:“浓度系列”
- [0325] 2.6.4 在对话框中输入以下参数 :
- [0326] 使用 Fc2, 其中 Fc1 作为参照
- [0327] 流速 :30 μ l/ 分钟
- [0328] 注射时间 :2 分钟
- [0329] 稳定时间 :10 分钟
- [0330] 离解时间 :20 分钟
- [0331] 选择:“运行如所输入的样品”
- [0332] 选择:“下一步”。
- [0333] 2.6.5 再生方法 :
- [0334] 单次注射
- [0335] 流速 :30 μ l/ 分钟

[0336] 再生缓冲液 :100mM HCl

[0337] 注射时间 :2 分钟

[0338] 再生后的稳定时间 :2 分钟。

[0339] 2.6.6 将抗体和再生缓冲液置于指定台架位置 (rack position)

[0340] 2.6.7 运行向导 (Wizard)。

[0341] 钙通量测定

[0342] 将新鲜分离的人嗜中性粒细胞如前所述 (Ponath 等 (1996)) 在 37 °C 下用 Fluo-3AM (分子探针) 加载 30 分钟。样品在 FACSCalibur 流式细胞仪上运行并随时间测量线性荧光强度。

[0343] 趋化性测定

[0344] 将悬浮在趋化性缓冲液 (具有 50 % M199 (SIGMA) 和 2 % 胎牛血清 (HyClone) 的 RPMI 1640) 中的人类或小鼠嗜中性粒细胞 ($1-2 \times 10^5$ 个细胞 / 孔) 置于 12 孔转移孔板 (12-well transwell plate) (Corning Costar Co.) 的上室中, 并允许在 30 分钟内越过 $3 \mu\text{m}$ 滤器移动到含有人类或小鼠 C5a 的下室中。通过 60 秒计数在 FACSCalibur 上计算迁移细胞的数量。正前方角度和侧面散射口设置成排除碎片或不相关细胞。

[0345] 表达嵌合人类 / 小鼠 C5aR 的细胞系的构建

[0346] 利用改进的 PCR 基重叠延伸技术 (Wurch 等 1998) 构建嵌合人类 / 小鼠 C5a 受体。简而言之, 人类或小鼠 C5aR 基因的不同片段通过 PCR 扩增。将重叠片段进行组合、变性和再退火并进行第二轮 PCR 扩增。具有适当限制性酶部位的全长嵌合受体序列在第三个 PCR 步骤中扩增, 并克隆入 pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) 以用于表达。根据人类 C5aR 和小鼠 C5aR 基因序列 (基因文库 (Genebank) 登录号分别为 M62505 和 S46665) 设计 PCR 引物。该引物包含相邻人类和小鼠 C5aR 序列 (表 1)。

[0347] 表 1

[0348] 示出了用来构建嵌合小鼠 / 人类 C5a 受体的 PCR 引物序列。红颜色的序列来自人类 C5aR 基因, 而蓝色序列对应于小鼠 C5aR。C5aR 基因 5' 端正向引物并入了 ATG 的 Kozak 序列 (下划线) 上游和 HindIII 部位 (黑体)。3' 反向引物并入了 XbaI 位点 (黑体) 以促进克隆入表达载体。

[0349]

引物	引物序列 (5' > 3')
HuC5aREX1.f	CGTTTAAACTTAAGCTT <u>GCCACCATGGACCCCATAGATAACAGCAG</u> (SEQ ID NO:10)
HuC5aRIC1.f	GGCAACCTGGGGATGTTGCAGCCTTGGTCATCTTTGCAGTC (SEQ ID NO:11)
HuC5aRIC1.r	CCAGTAGTTATGATTTAAACGGTCGTGAACAAGATGGGCAGCG (SEQ ID NO:12)
HuC5aRIC2.f	ATGCCACCGCCTGTATAGTCCTGCCCTCCCTCATCTGCTC (SEQ ID NO:13)
HuC5aRIC2.r	CCTTATATGCCTCCCGGTACACGAAGGAGGGTATGGTCAGCAG (SEQ ID NO:14)
HuC5aRIC3.f	AGAAGGCTGTGGCCATCCTGCGGCTGGTCCTGGGCTTCC (SEQ ID NO:15)
HuC5aRIC3.r	GGCAGCCACGCTATCATCACCCCGTCACCTGGTAGGGC (SEQ ID NO:16)
HuC5aRIC4.f	AAGAGGGTGGAGAAGCTGAACTCCCTGTGTGTCTCCTTTGCC (SEQ ID NO:17)
HuC5aRIC4.r	CCTCTAGAGTTAGGCCGGGGCCAC (SEQ ID NO:18)
MuC5aREX1.r	GACTGCAAAGATGACCAAGGCTGCAACATCCCCAGGTTGCC (SEQ ID NO:19)
MuC5aREX2.f	CGCTGCCCATCTTGTTACGACCGTTTTAAATCATAACTACTGG (SEQ ID NO:20)
Muc5aREX2.r	AGCAGGATGAGGGAGGGCAGGACTATACAGGCGGTGGCATC (SEQ ID NO:21)
MuC5aREX3.f	CTGCTGACCATACCCTCCTTCGTGTACCGGGAGGCATATAAG (SEQ ID NO:22)
MuC5aREX3.r	AGGAAGCCCAGGACCAGCCGAGGATGGCCACAGCCTTC (SEQ ID NO:23)
MuC5aREX4.f	GCCCTACCAGGTGACGGGGGTGATGATAGCGTGGCTGCC (SEQ ID NO:24)
Muc5aREX4.r	GGCAAAGGAGACACACAGGGAGTTCAGCTTCTCCACCCTCTTC (SEQ ID NO:25)

[0350] 利用合成肽的表位分析

[0351] 在塑钉 (Mimotopes Pty Ltd, Melbourne, 澳大利亚) 上以固定形式合成两组具有 N-端生物素和间隔子 GSGS 的肽。第一组含有所有可能的来自人类 C5aR 第二胞外环的 12 个氨基酸 (mers), 每一个偏移一个氨基酸。第二组是序列 VREEYFPPKVL C 的 12 个氨基酸, 每一个具有由丙氨酸代替的一个残基。这些肽在 200 μ l 60% DMSO 开始进行重建, 随后在 PBS 中稀释以获得用于直接 ELISA 的 10 μ g/ml 的最终浓度。

[0352] 肽 ELISA

[0353] 链亲和素涂覆的微量滴定板 (NUNC) 用在 200 μ l 体积中的 10 μ g/ml 的肽 / 孔涂覆, 并在 4°C 下孵育过夜。板用 ELISA 清洗缓冲液 (在 PBS 中的 0.05% 吐温 20) 清洗 3 次。以 2.5 μ g/ml 加入 Mab, 并将板在室温下孵育 3h。将在 ELISA 清洗缓冲液中 1 : 1000 稀释

的 HRP- 结合的兔抗 - 小鼠 IgG 抗体用于检测。板利用 TMB (3,3',5,5' - 四甲基联苯胺, SIGMA) 显影并在 A_{540nm} 处读数。

[0354] 表达载体转染入 L1.2 细胞

[0355] 小鼠 L1.2 细胞在补充有 10% 胎牛血清 (HyClone) 的 RPMI 1640 (GIBCO) 中生长, 并根据制造商的指示利用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 转染。

[0356] K/BxN 类风湿性关节炎模型

[0357] 如先前所述 (Korganow et al. (1999)) 从 K/BxN 关节炎小鼠收集血清。通过在第 0 天和第 2 天腹膜内注射 150 μ l 血清而在受体小鼠体内诱导实验性关节炎, 并如所述 (Lee et al. (2002)) 监测疾病发展。每天测定踝厚度和临床评分。临床评分通过加合四个爪的评分对每一小鼠进行计算: 0- 正常, 1- 稍微发红, 2- 发红且有些肿胀, 3- 发红且肿胀严重。在第 -1 天和第 1 天 (预防性治疗) 或第 5 天 (治疗性治疗) 腹膜内注射抗 -hC5aR 或同种型对照 mAb (在 PBS 中的 1-10mg/kg)。

[0358] 统计分析

[0359] KxB/N 模型中独立对照和治疗组之间的差异的统计显著性利用 Kruskal-Wallis 试验, 接着通过在此之后的利用 Dunn's 多次比较检验的分析而确定。

[0360] 实施例 1: 利用转染 L1.2 细胞产生 mAb 至 C5aR (比较例)

[0361] 我们首先通过利用用于化学诱导物受体的已知方法将 mAb 产生至 hC5aR (Heath et al. (1997); Qin et al. (1998); Wu et al. (1997); Qin, et al. (1996))。用表达极高水平的 hC5aR (~80,000 受体/细胞) 的 L1.2 细胞 (小鼠 B 细胞淋巴瘤系) 免疫小鼠。实施 5 次融合, 并且超过 40 个不同的 mAb 鉴定为与 hC5aR 转染子特异性反应, 但不与表达其他紧密相关化学诱导物受体如 CXCR1、CXCR2 或其他 C5a 结合受体 C5L2 特异性反应 (Gerard et al. (2005))。大量这些 mAb 抑制 ¹²⁵I 标记的人类 C5a 与 hC5aR 转染子的结合。前导 mAb 鉴定了, 7F3, 表明 C5a 结合的有效抑制 (图 1), 在趋化性测定中抑制人嗜中性粒细胞到 C5a 的趋化性并且阻遏人嗜中性粒细胞中的 C5a 诱导的钙通量 (数据未示出)。

[0362] 实施例 2: 利用来自敲入小鼠的 hC5aR 的嗜中性粒细胞产生 mAb 至 C5aR

[0363] 在发展有效抗 -C5aR mAb 的第二方法中, 人类 C5aR 敲入小鼠在小鼠 C5aR 基因 (C5R1) 处由靶向同源性重组产生。内源性 C5aR 编码序列的同时缺失及其用 hC5aR 编码序列的替代通过用靶向构建体转染小鼠胚胎干细胞 (ES) 细胞实现 (图 2)。从 672 个中筛选出的两个 ES 克隆体被鉴定为包含正确靶向的 hC5aR 序列。实现了 hC5aR 转基因的种系传递 (Germline transmission), 并且由这些 ES 细胞产生 5 只嵌合小鼠, 从而建立了 hC5aR 敲入系。利用 BL/6Cre 删除品系 (deleter strain) 从敲入基因座删除由 loxP 部位侧悬的 PGK-neo 基因。通过 DNA 印迹鉴定用于人类 C5aR 转基因 (hC5R1^{+/+}) 的小鼠纯合子 (图 3)。来自这些小鼠的嗜中性粒细胞表示出表达极高水平的 hC5aR, 如通过 FACS 染色的抗 -hC5aR mAb 所判断的 (图 4)。来自野生型小鼠的嗜中性粒细胞未由抗 - 人类 C5aRmAb 7F3 染色, 但由抗 - 小鼠 C5aR mAb, 20/70 强烈染色 (Soruri et al. (2003)) (图 4)。人类和小鼠 C5aR 仅共有 65% 的同源性, 但对于发展 hC5aR 敲入小鼠重要, 小鼠和人类 C5a 以类似亲和力结合至人类 C5aR (Gerard et al. (1992)) (我们未公开的观察结果)。来自 hC5R1^{+/+} 小鼠的嗜中性粒细胞以类似方式迁移至人类和小鼠 C5a。

[0364] 我们从一个融合体产生了大量 hC5aR 特异性 mAb。用来自 hC5R1^{+/+} 小鼠的嗜中性

粒细胞免疫野生型小鼠产生的抗 -C5aR mAb 都是不同的,因为重链可变区的氨基酸序列都是不同的,表明它们起源于单独的克隆体。

[0365] 配体结合测定表明,这些mAb中的许多表现出¹²⁵I标记的C5a与人嗜中性粒细胞的结合抑制优于mAb 7F3。由hC5aR^{+/+}小鼠产生的抗体表现出对¹²⁵I-C5a与嗜中性粒细胞的结合的广谱抑制,范围为基本上完全抑制(例如,3C5、8G7、7H3)至部分或很少抑制,这取决于mAb克隆体(图5)。与mAb 7F3的503pM的IC₅₀相比,最有效的抑制剂(mAb 3C5)的IC₅₀为171pM(图6)。进一步进行竞争性配体结合研究以测量从hC5aR-转染的L1.2细胞上的hC5aR用7F3或3C5替代¹²⁵I-C5a。而且,3C5(EC50:0.021nM)对C5aR表现出比7F3(EC50:0.48nM)显著更高的亲和力(图7)。

[0366] 实施例3:由mAb结合的C5aR表位的表征

[0367] hC5aR转染子和表达hC5aR的小鼠嗜中性粒细胞的使用允许产生有效地识别任何胞外结构域以及依赖于三级结构的表位的mAb。因此,我们确定了hC5aR上的关键表位,由我们已产生的阻遏mAb识别。由于这些抗体识别人类C5aR但不识别小鼠C5aR,所以我们构建了一组人类/小鼠C5aR嵌合受体(图8)。利用重叠延伸PCR方法(Shevchuk et al. (2004)),用来自小鼠C5aR的同源性区域顺序替代人类C5aR的单个或多个胞外结构域。嵌合受体在小鼠L1.2细胞中表达并且通过FACS染色确定mAb反应性。具有最有效阻遏活性的所有抗体,包括mAb 7F3、3C5、7H3和8G7,结合至hC5aR的第二胞外环(图9)。为了限定在C5aR第二胞外环上的最有效阻遏抗体的精确接触残基,我们利用一组12肽实施了肽扫描分析以及ELISA,每一个有11个氨基酸重叠,覆盖hC5aR的第二胞外环。mAb 3C5和7F3表现出与no. 1至no. 7的7个肽(包含共有六肽序列¹⁷⁹EEYFPP¹⁸⁴)的强烈结合(图10)。利用跨越该肽区域的每一个氨基酸的丙氨酸取代对表位¹⁷⁹EEYFPP¹⁸⁴进行进一步研究。图11A和图11B示出了,氨基酸E¹⁷⁹、E¹⁸⁰、Y¹⁸¹和F¹⁸²对于通过mAb 7F3、3C5、8G7和7H3的肽识别是关键。因此,在由我们针对hC5aR产生的许多mAb中,使C5a结合或功能的最有效抑制剂都对在C5aR的第二胞外环中的非常特异性区域作图。

[0368] 实施例4:Mab结合亲和力

[0369] BIACore分析用来确定抗体7F3、3C5、8G7和7H3与肽23(第二胞外环,人类C5aR的残基173~205-LYRVVREEYFPPKVLGVDYSHDKRRERAVAIV)的结合亲和力。结果示于图12中并总结在表2中。

[0370] 表2:对于抗-C5aR mAb的范围的BIACore数据的总结

[0371]		缔合(on)速	离解(off)速	结合亲和力	结合亲和力
[0372]		率 ka (1/Ms)	率 kd (1/s)	KA (1/M)	KD (nM)
[0373]	7H3-N9	5.95E+05	9.95E-03	5.97E+07	16.7
[0374]	3C5	3.30E+06	1.60E-03	2.10E+09	0.48
[0375]	8G7-M6	3.70E+06	5.90E-03	6.30E+08	1.6
[0376]	7F3	6.40E+05	4.50E-04	1.40E+09	0.7
[0377]	2D7(mIgG2a	4.60E+03	1.90E-04	2.50E+07	40
[0378]	对照)				
[0379]	6G7(mIgG3	1.90E+04	2.60E-04	7.20E+07	14
[0380]	对照)				

[0381] 实施另外的 BIACore 分析以比较抗体 7F3 和 3C5 与肽 23 在不同条件下的结合亲和力。这些另外的分析的结果示于表 3 中。这些另外的 BIACore 实验的条件如在上面“实验详述”部分所述,其中有以下改变:

[0382] 实验 2:在动力学分析中包含的抗体浓度-100nM-0.78nM;离解 20 分钟。

[0383] 实验 3:在动力学分析中包含的抗体浓度-7F3:25nM-0.78nM;3C5:6.25nM-0.78nM;离解 5 分钟。

[0384] 实验 4:在动力学分析中包含的抗体浓度-7F3:25nM-1.56nM;3C5:6.25nM-0.4nM;缔合 1 分钟,离解 3 分钟。

[0385] 表 3:对于 7F3 和 3C5 的另外的 BIACore 数据的总结

[0386]	实验	mAb	缔合 (on) 速 率 k_a (1/Ms)	离解 (off) 速 率 k_d (1/s)	结合亲和力 K_A (1/M)	结合亲和力 K_D (nM)
[0387]						
[0388]	1	7F3	2.10E+05	3.80E-04	5.40E+08	1.80
[0389]		3C5	6.80E+05	5.20E-04	1.30E+09	0.76
[0390]	2	7F3	2.90E+05	3.50E-04	8.10E+08	1.20
[0391]		3C5	1.50E+06	7.00E-04	2.20E+09	0.45
[0392]	3	7F3	3.32E+05	4.62E-04	7.19E+08	1.39
[0393]		3C5	1.06E+06	1.11E-03	9.60E+08	1.04
[0394]	4	7F3	2.86E+05	5.98E-04	4.79E+08	2.09
[0395]		3C5	1.03E+06	1.44E-03	7.16E+08	1.40

[0396] 这些结果表明,3C5 对于 C5aR 肽具有比 7F3 大约 1.5 倍提高的亲和力。

[0397] 实施例 5:小鼠类风湿性关节炎模型中的抗-hC5aR mAb 的测试

[0398] 表达人类分子的转基因小鼠的开发是一种在适当动物模型中测试新型人类疗法(设计用于人类)的方便的方式。C5aR 在小鼠炎性关节炎的病理学中起着重要作用。例如,保护 C5aR 缺陷型小鼠免患由抗-葡萄糖 6-磷酸酯异构酶自身抗体(Ji et al. (2002))或 II 型胶原 mAb(Grant et al. (2002))诱导的关节炎。对抗-hC5aR mAb 测试它们保护或逆转 hC5R1^{+/+}小鼠中的实验性关节炎的发展。将来自关节炎 K/BxN 小鼠的血清转移到健康小鼠诱导模拟 K/BxN 病的关节特异性炎症反应(Kouskoff et al. (1996);Korganow et al. (1999))。用抗-hC5aR mAb 或同种型匹配对照 mAb 在第-1 天和第 1 天对 hC5R1^{+/+}小鼠进行预处理,并在第 0 天和第 2 天腹腔内(i.p.)注射 K/BxN 血清。在血清转移后,用对照抗体处理的小鼠表现出具有关节肿胀和炎症渗入的典型临床关节炎,而用抗-hC5aR mAb 处理的小鼠表现出完全没有炎症(临床或组织学上)。在 hC5R1^{+/+}小鼠和对照同窝出生的小鼠之间在发展疾病方面没有可观察到的不同(数据未示出),表明人类 C5aR 是完全功能性的,因为在 KxB/N 模型中的疾病依赖于 C5aR(Ji et al. (2002);Grant et al. (2002))。更重要地,在疾病诱导后给予抗体 5 天,我们观察到建立的炎症的显著逆转。mAb 对表达 hC5aR 的小鼠嗜中性粒细胞(3C5 和 8G7)的作用比 mAb 7F3 持续更长时间(图 13 和图 14)。少至 1mg/kg 的 mAb 3C5 能够逆转炎症并提供持续的抑制。

[0399] 本领域技术人员应当理解,在不背离如广泛描述的本发明的精神或范围的情况下,可以对如在具体实施方式中示出的本发明进行许多变形和/或改变。因此,本发明的实施方式在所有方面应视为是举例说明性的而不是限制性的。

[0400] 参考文献

- [0401] Allegretti, M. et al. Targeting C5a: recent advances in drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 12, 217-236 (2005)。
- [0402] Campbell, J. J., Qin, S., Bacon, K. B., Mackay, C. R. & Butcher, E. C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J. Cell Biol.* 134, 255-266 (1996)。
- [0403] Gerard, C. & Gerard, N. P. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 775-808 (1994)。
- [0404] Grant, E. P. et al. Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J. Exp. Med.* 196, 1461-1471 (2002)。
- [0405] Guo, R. F. & Ward, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 821-852 (2005)。
- [0406] Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B., Jr. & Henson, P. M. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 119, 101-110 (1985)。
- [0407] Heath, H. et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J. Clin. Invest.* 99, 178-184 (1997)。
- [0408] Ji, H. et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157-168 (2002)。
- [0409] Kaneko, Y., et al., Antagonistic peptides against human anaphylatoxin C5a. *Immunology*, 1995. 86(1) : p. 149-54。
- [0410] Klco, J. M. et al. *Nat Struct Mol Biol.* 12 : 320-326 (2005)。
- [0411] Konteatis, Z. D., et al., Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses. *Journal of Immunology*, 1994. 153(9) : p. 4200-5。
- [0412] Korganow, A. S. et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 10, 451-461 (1999)。
- [0413] Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 87, 811-822 (1996)。
- [0414] Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* 6, 1182-1190 (2005). Mackay, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* 2, 95-101 (2001)。
- [0415] Morgan, E. X., et al., Anti-C5a receptor antibodies. Characterization

of neutralizing antibodies specific for a peptide, C5aR-(9-29), derived from the predicted amino-terminal sequence of the human C5a receptor. *Journal of Immunology*, 1993. 151(1) :p. 377-88.

[0416] Murdoch, C. and A. Finn, Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 2000. 95(10) :p. 3032-43.

[0417] Murphy, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 593-633 (1994).

[0418] Pellas, T.C., et al., Novel C5a receptor antagonists regulate neutrophil functions in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 1998. 160(11) : p. 5616-21.

[0419] Ponath, P.D. et al. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* 91, 604-612 (1996).

[0420] Qin, S. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. *Eur. J. Immunol.* 26, 640-647 (1996).

[0421] Qin, S. et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* 101, 746-754 (1998).

[0422] Riedemann, N.C., Guo, R.F. & Ward, P.A. The enigma of sepsis. *J. Clin. Invest.* 112, 460-467 (2003).

[0423] Shevchuk, N.A. et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res* 32, e19 (2004).

[0424] Sumichika, H. C5a receptor antagonists for the treatment of inflammation. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 505-510 (2004). von Andrian, U.H. & Mackay, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343, 1020-1034 (2000).

[0425] Wang, Y., Rollins, S.A., Madri, J.A. & Matis, L.A. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8955-8959 (1995). Watanabe, H., et al., Analysis of C5a receptor by monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*, 1995. 185(1) :p. 19-29.

[0426] Wu, L. et al. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *J. Exp. Med.* 186, 1373-1381 (1997).

[0427] Wurch, T., Colpaert, F.C. & Pauwels, P.J. Chimeric receptor analysis of the ketanserin binding site in the human 5-Hydroxytryptamine 1D receptor:

importance of the second extracellular loop and fifth transmembrane domain in antagonist binding. *Mol Pharmacol* 54,1088-1096(1998)。

序列表

<110>G2 炎症私人有限公司

<120> 具有改进性能的抗 -C5aR 抗体

<130>P24418FRAC

<140>PCT/AU2007/001207

<141>2007-08-22

<150>US 60/839,634

<151>2006-08-22

<160>63

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>350

<212>PRT

<213> 人类

<400>1

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

100				105				110							
Pro	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Asn	Met	Tyr	Ala	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala
115				120				125							
Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Arg	Phe	Leu	Leu	Val	Phe	Lys	Pro	Ile	Trp	Cys
130				135				140							
Gln	Asn	Phe	Arg	Gly	Ala	Gly	Leu	Ala	Trp	Ile	Ala	Cys	Ala	Val	Ala
145				150				155				160			
Trp	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Ile	Pro	Ser	Phe	Leu	Tyr	Arg	Val
165				170				175							
Val	Arg	Glu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Val	Leu	Cys	Gly	Val	Asp	Tyr
180				185				190							
Ser	His	Asp	Lys	Arg	Arg	Glu	Arg	Ala	Val	Ala	Ile	Val	Arg	Leu	Val
195				200				205							
Leu	Gly	Phe	Leu	Trp	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Thr	Ile	Cys	Tyr	Thr	Phe
210				215				220							
Ile	Leu	Leu	Arg	Thr	Trp	Ser	Arg	Arg	Ala	Thr	Arg	Ser	Thr	Lys	Thr
225				230				235				240			
Leu	Lys	Val	Val	Val	Ala	Val	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Ile	Phe	Trp	Leu
245				250				255							
Pro	Tyr	Gln	Val	Thr	Gly	Ile	Met	Met	Ser	Phe	Leu	Glu	Pro	Ser	Ser
260				265				270							
Pro	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Asn	Lys	Leu	Asp	Ser	Leu	Cys	Val	Ser	Phe
275				280				285							
Ala	Tyr	Ile	Asn	Cys	Cys	Ile	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Val	Val	Ala	Gly
290				295				300							
Gln	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Arg	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg
305				310				315				320			
Asn	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Arg	Glu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr
325				330				335							
Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Thr	Met	Ala	Gln	Lys	Thr	Gln	Ala	Val		
340				345				350							

<210>2

<211>33

<212>PRT

<213> 人类

<400>2

Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile
 20 25 30
 Val

<210>3

<211>119

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>3

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

<210>4

<211>112

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>4

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

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

<210>5

<211>119

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>5

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

<210>6

<211>112

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>6

```

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

```

<210>7

<211>119

<212>PRT

<213> 小鼠

<400>7

```

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

```

	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
115			
<210>8			
<211>112			
<212>PRT			
<213> 小鼠			
<400>8			
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly			
1 5 10 15			
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
20 25 30			
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35 40 45			
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50 55 60			
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Gln Ile			
65 70 75 80			
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Leu Cys Ser Gln Ser			
85 90 95			
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Thr			
100 105 110			

<210>9
 <211>37
 <212>PRT
 <213> 人类

<400>9

Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro			
1 5 10 15			
Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg			
20 25 30			
Ala Val Ala Ile Val			
35			

<210>10

<211>46

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>10

cgtttaaact taagcttgcc accatggacc ccatagataa cagcag

46

<210>11

<211>41

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>11

ggcaacctgg ggatgttgca gccttgggtca tctttgcagt c

41

<210>12

<211>44

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>12

ccagtagtta tgatttaaaa cggtcgtgaa caagatgggc agcg

44

<210>13

<211>41

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>13

atgccaccgc ctgtatagtc ctgccctccc tcatacctgct c
41

<210>14

<211>43

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>14

ccttatatgc ctcccggtag acgaaggagg gtatgggtcag cag
43

<210>15

<211>39

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>15

agaaggctgt ggccatcctg cggctgggtcc tgggcttcc
39

<210>16

<211>39

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>16

ggcagccacg ctatcatcac ccccgtcacc tggtagggc

39

<210>17

<211>42

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>17

aagagggtgg agaagctgaa ctccctgtgt gtctcctttg cc

42

<210>18

<211>24

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>18

cctctagagt taggccgggg ccac

24

<210>19

<211>41

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>19

gactgcaaag atgaccaagg ctgcaacatc cccaggttgc c

41

<210>20

<211>44

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>20

cgctgcccat cttgttcacg accgttttaa atcataacta ctgg

44

<210>21

<211>41

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>21

agcaggatga gggagggcag gactatacag gcggtggcat c

41

<210>22

<211>42

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>22

ctgctgacca taccctcctt cgtgtaccgg gaggcatata ag

42

<210>23

<211>39

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>23

aggaagccca ggaccagccg caggatggcc acagccttc

39

<210>24

<211>39

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>24

gccctaccag gtgacggggg tgatgatagc gtggctgcc

39

<210>25

<211>43

<212>DNA

<213> 人造的

<220>

<223> 寡核苷酸

<400>25

ggcaaaggag acacacaggg agttcagctt ctccaccctc ttc

43

<210>26

<211>37

<212>PRT

<213> 人类

<400>26

Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg
 20 25 30
Ala Val Ala Ile Val
 35

<210>27

<211>6

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>27

Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
1 5

<210>28

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>28

Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
1 5 10

<210>29

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>29

Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys

1 5 10

<210>30

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>30

Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val

1 5 10

<210>31

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>31

Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu

1 5 10

<210>32

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>32

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>33

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>33

Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly

1 5 10

<210>34

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>34

Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val

1 5 10

<210>35

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>35

Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp

1 5 10

<210>36

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>36

Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr

1 5 10

<210>37

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽 e

<400>37

Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser

1 5 10

<210>38

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>38

Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His

1 5 10

<210>39

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>39

Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp

1 5 10

<210>40

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>40

Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys

1 5 10

<210>41

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>41

Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg

1 5 10

<210>42

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>42

Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg

1 5 10

<210>43

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>43

Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu

1 5 10

<210>44

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>44

Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg

1 5 10

<210>45

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>45

Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala

1 5 10

<210>46

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>46

Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val

1 5 10

<210>47

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>47

Tyr	Ser	His	Asp	Lys	Arg	Arg	Glu	Arg	Ala	Val	Ala
1				5					10		

<210>48

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>48

Ser	His	Asp	Lys	Arg	Arg	Glu	Arg	Ala	Val	Ala	Ile
1				5					10		

<210>49

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>49

His	Asp	Lys	Arg	Arg	Glu	Arg	Ala	Val	Ala	Ile	Val
1				5					10		

<210>50

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>50

Leu	Tyr	Arg	Val	Val	Arg	Glu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Pro
1				5					10		

<210>51

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>51

Val	Arg	Glu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Val	Leu	Ala
1				5					10		

<210>52

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>52

Val	Arg	Glu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Pro	Lys	Val	Ala	Cys
1				5					10		

<210>53

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>53

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Ala Leu Cys

1 5 10

<210>54

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>54

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Ala Val Leu Cys

1 5 10

<210>55

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>55

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Ala Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>56

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>56

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Ala Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>57

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>57

Val Arg Glu Glu Tyr Ala Pro Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>58

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>58

Val Arg Glu Glu Ala Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>59

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>59

Val Arg Glu Ala Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>60

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>60

Val Arg Ala Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>61

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>61

Val Ala Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys

1 5 10

<210>62

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>62

Ala Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys

1

5

10

<210>63

<211>12

<212>PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 肽

<400>63

Pro Cys Tyr Val Leu Glu Lys Pro Glu Phe Val Arg

1

5

10

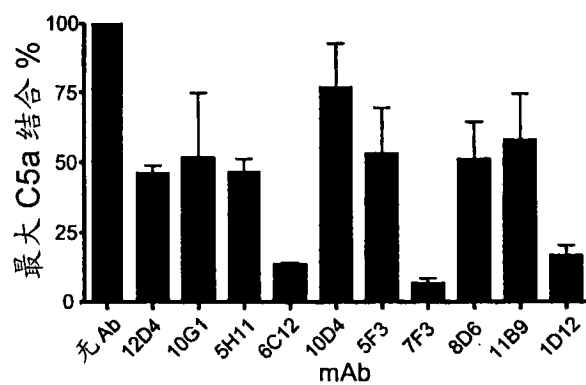


图 1

小鼠 C5aR 基因座

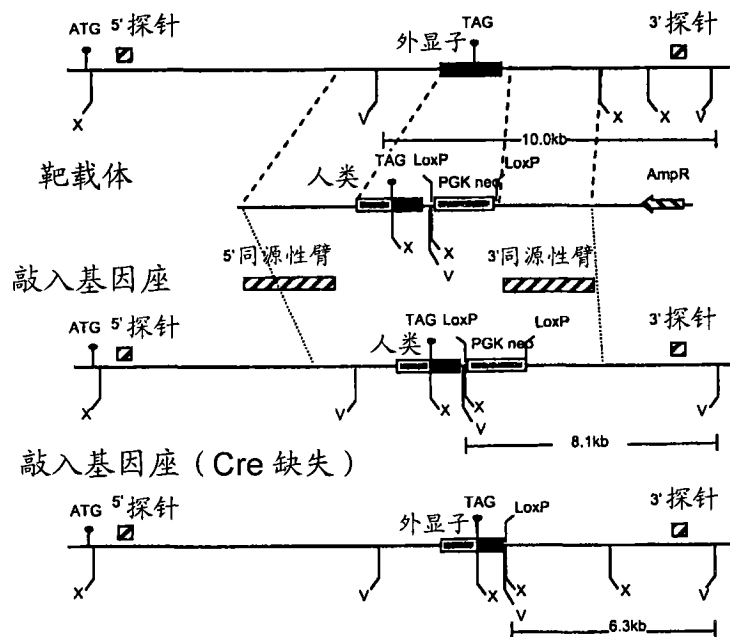


图 2

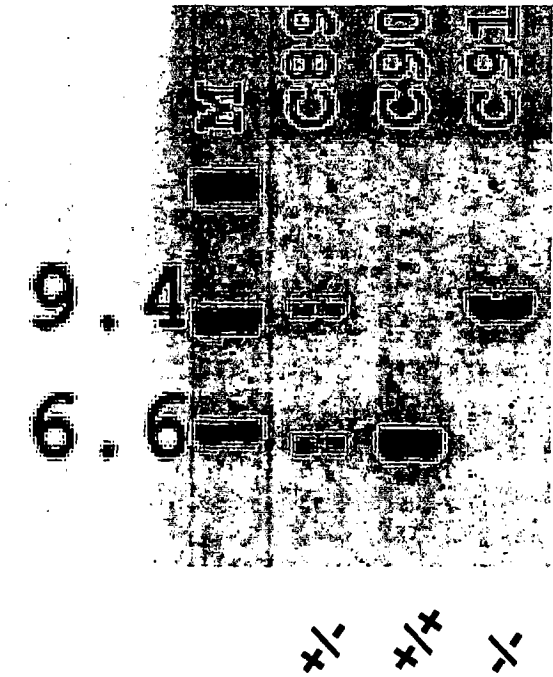


图 3

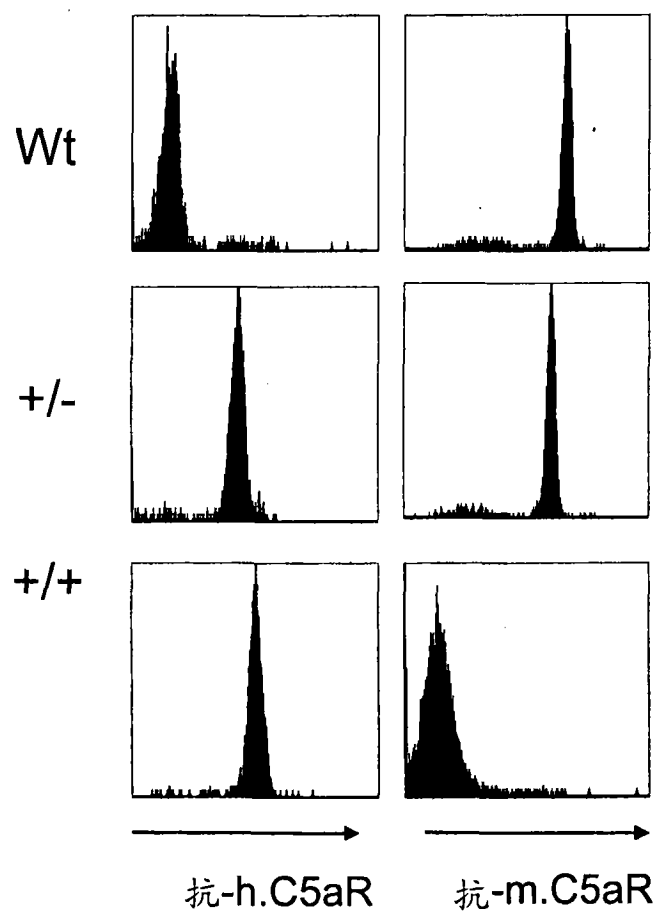


图 4

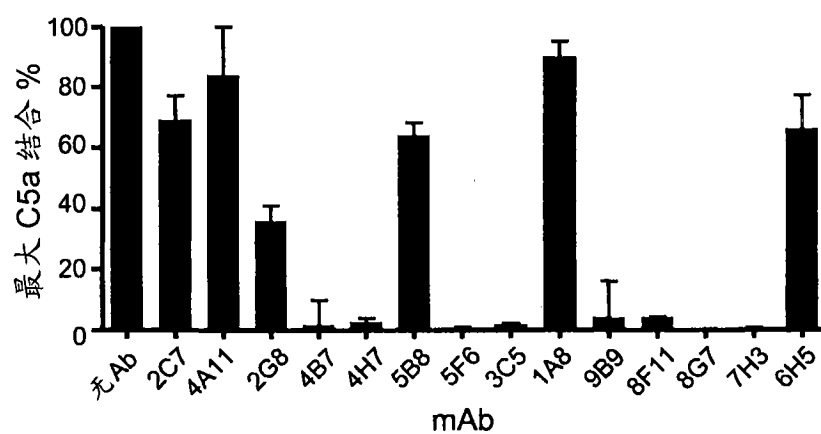


图 5

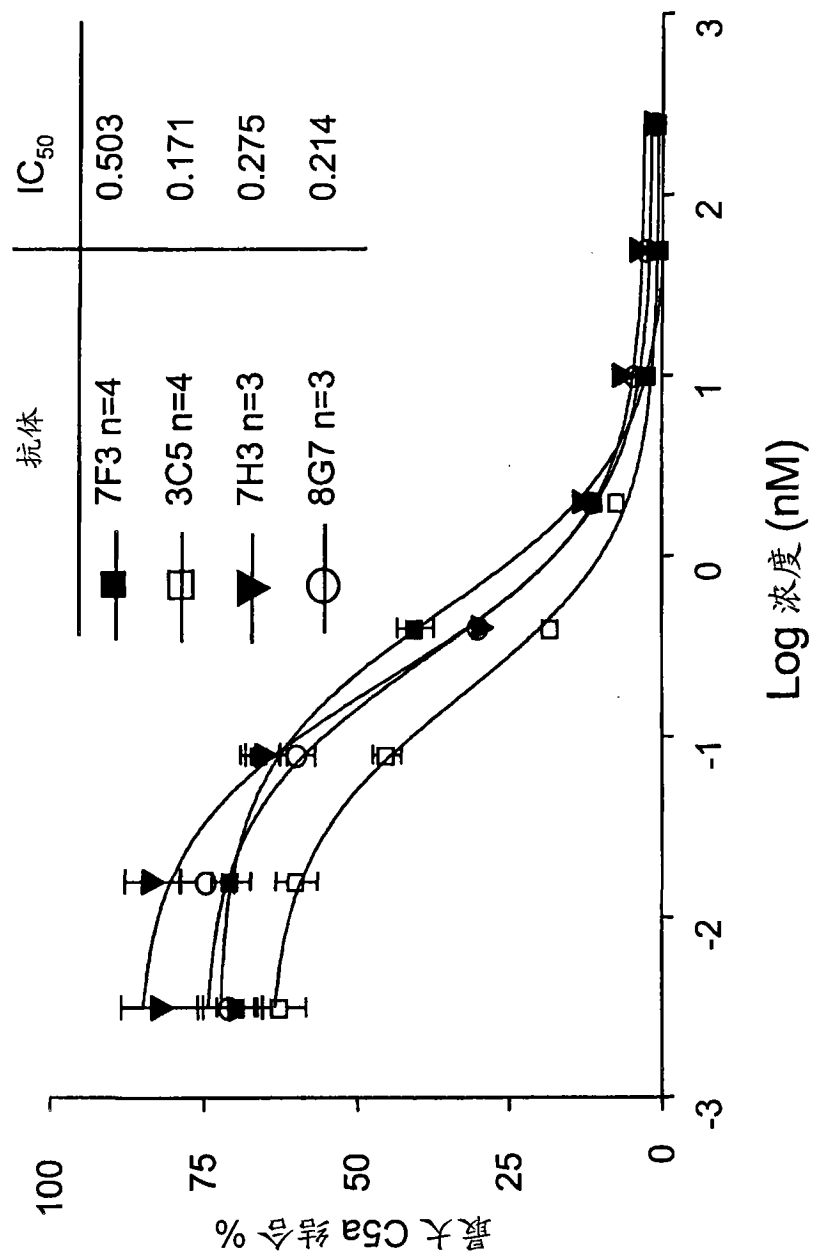


图 6

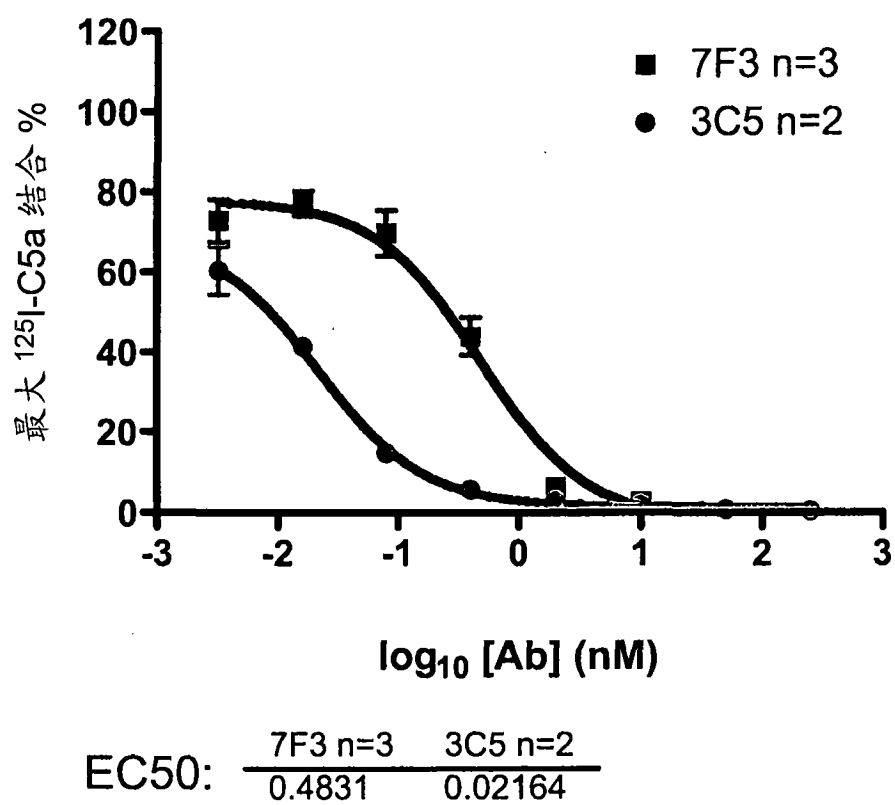


图 7

嵌合受体	结合 mAb 的第二个 ECL	结合 mAb 的 N-末端	抗 - 小鼠 C5aR mAb (20/70)
 HHHH	+++	+++	-
 mHHH	+++	-	-
 mmHH	+++	-	-
 mmmH	-	-	+++
 mmmm	-	-	+++
 HmHH	+	-	-
 HHmH	-	+++	+++
 HHHm	+	+++	-
 Hmmm	-	+	+++
 mHmm	-	-	+++
 mmHm	++	-	-

图 8

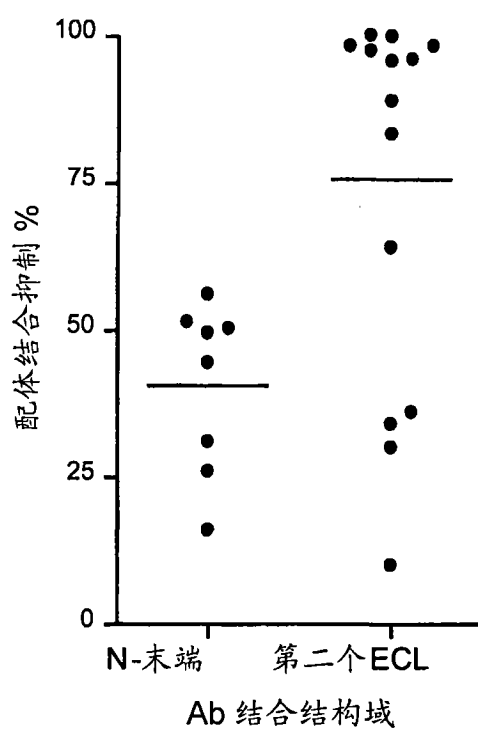


图 9

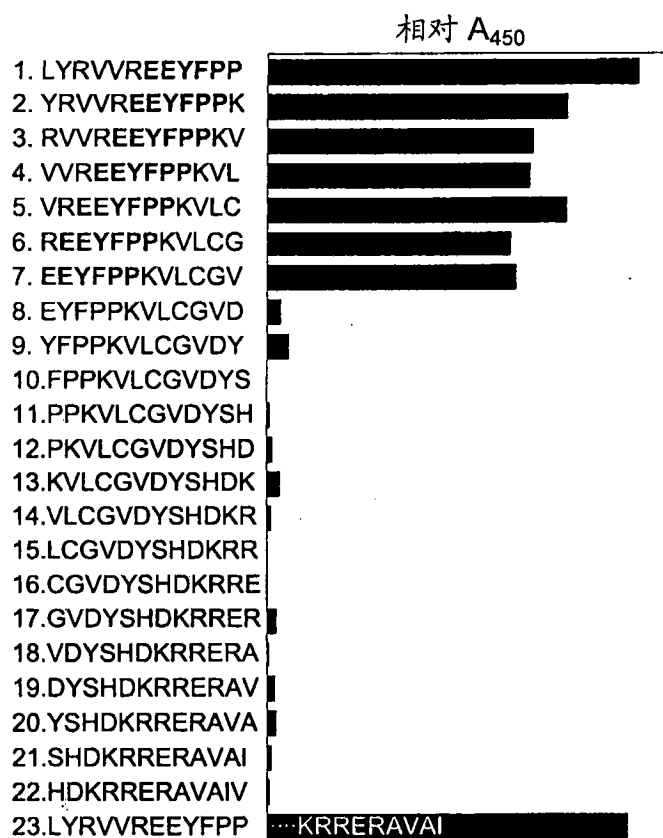


图 10

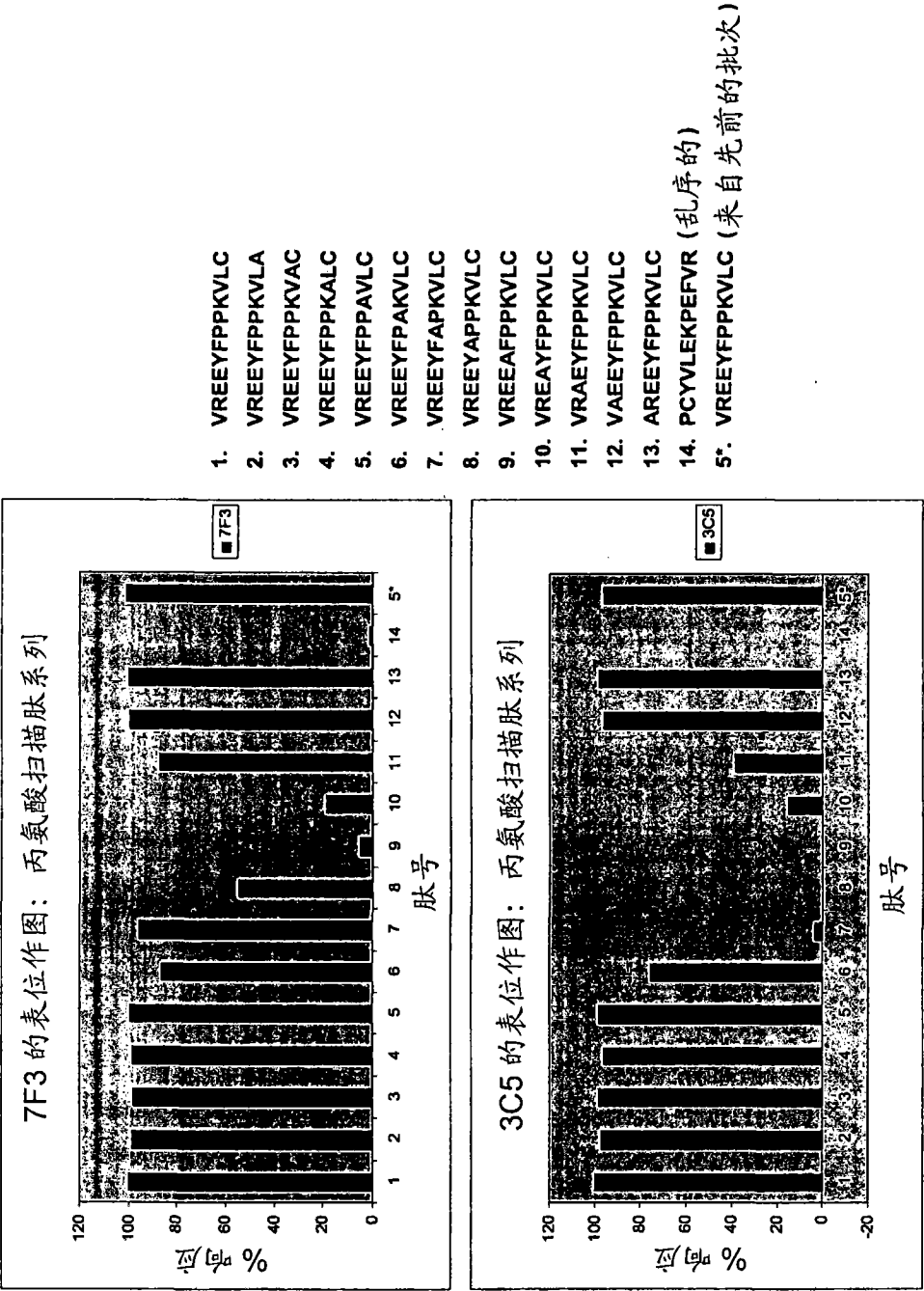


图 11(a)

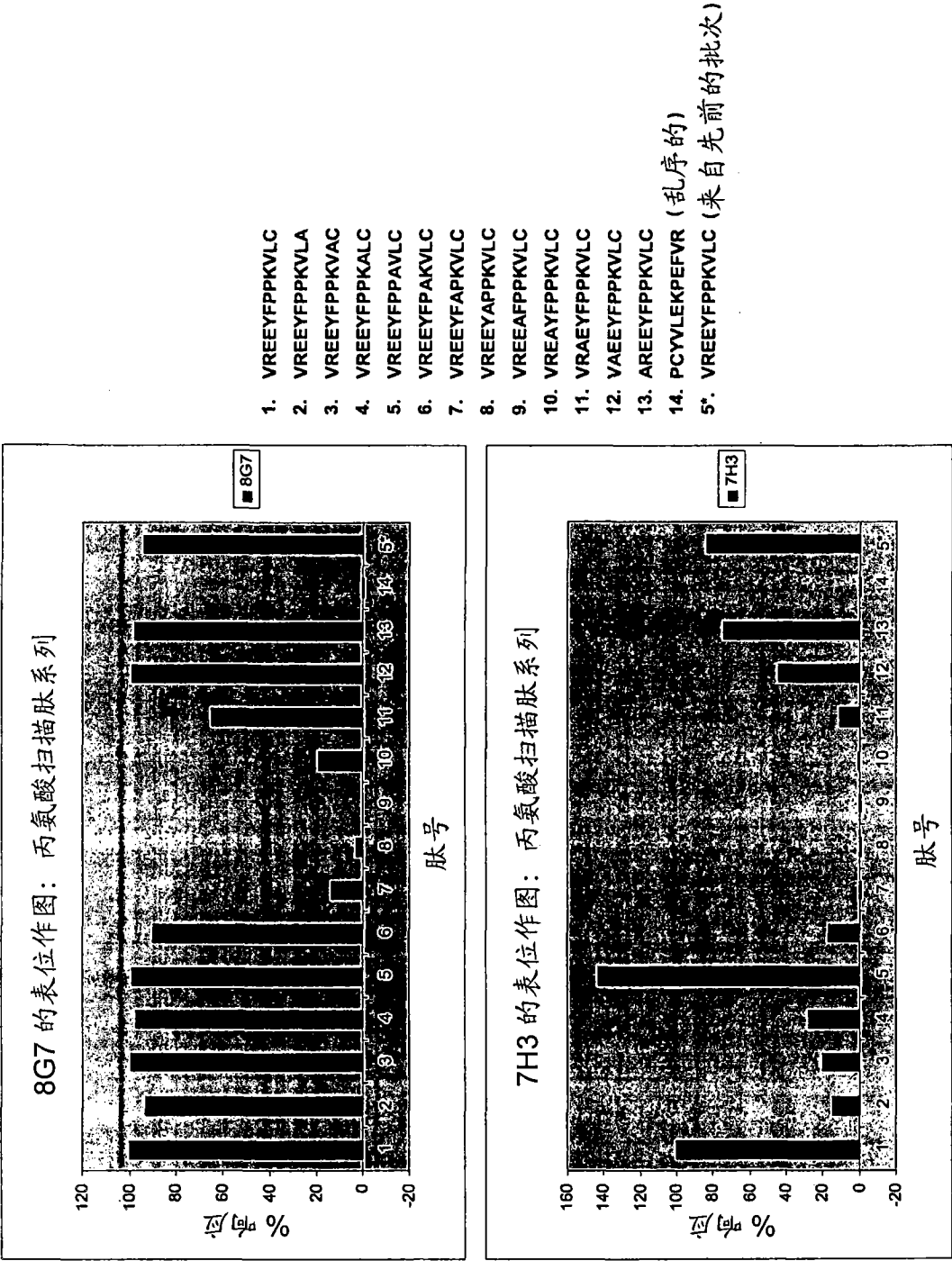


图 11(b)

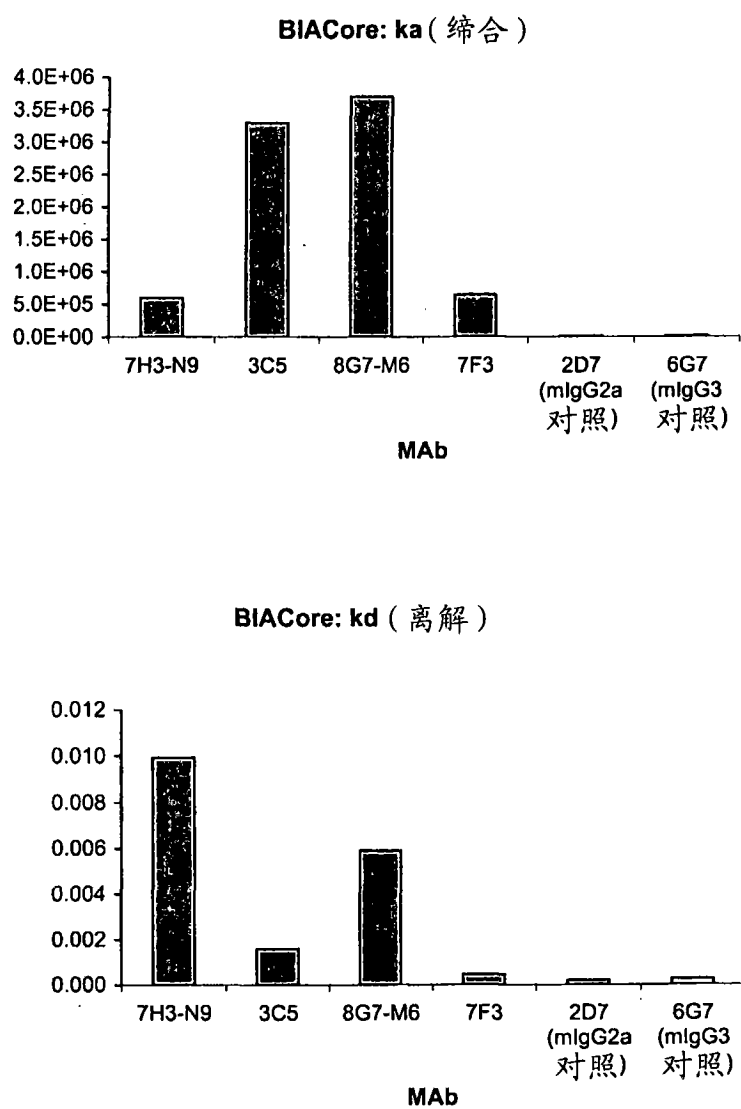
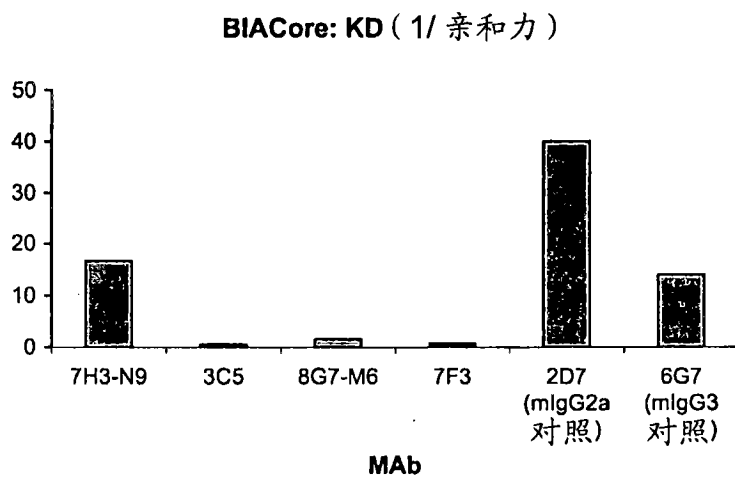


图 12



续图 12

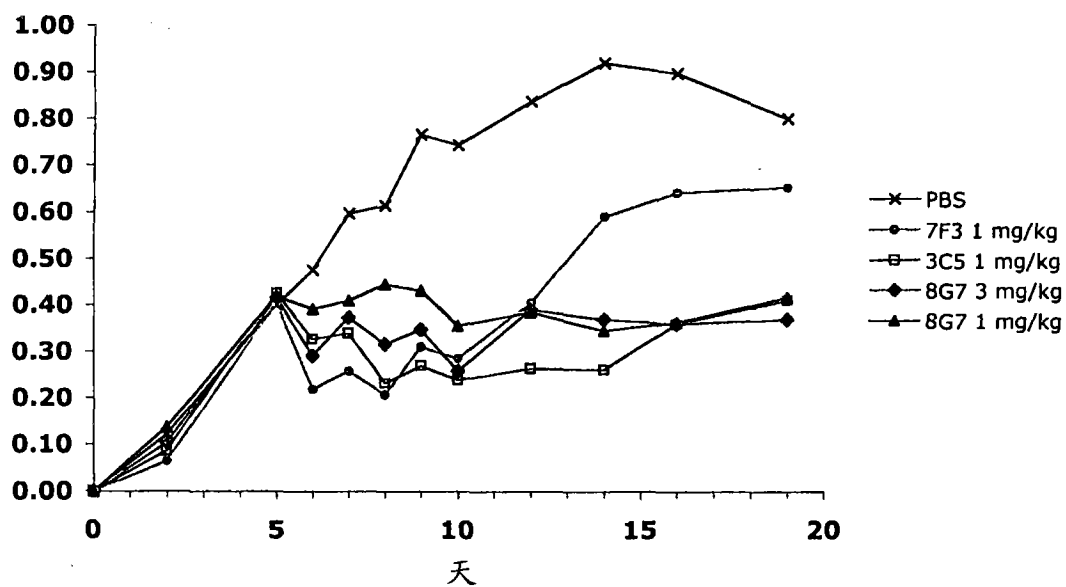


图 13

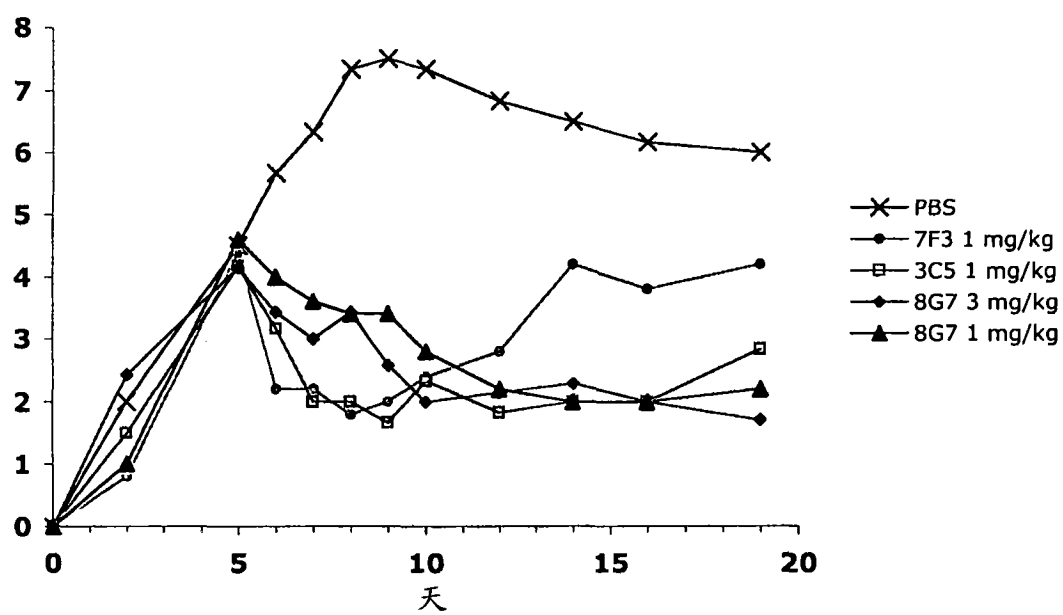


图 14