



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101809034 B

(45) 授权公告日 2015.07.08

(21) 申请号 200880102282.9

(22) 申请日 2008.06.04

(30) 优先权数据

60/933,721 2007.06.07 US

60/055,068 2008.05.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.02.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/065771 2008.06.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/154251 EN 2008.12.18

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 门诺·范卢克伦坎帕格尼

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 2006002944 A1, 2006.01.05,

W0 2006012621 A2, 2006.02.02,

CN 1298308 A, 2001.06.06,

CN 1214733 A, 1999.04.21,

Mastellos Dimitrios et al. Novel

monoclonal antibodies against mouse

C3 interfering with complement

activation: Description of fine specificity

and applications to various immunoassays. 《MOLECULAR IMMUNOLOGY》. 2004, 第 40 卷 (第 16 期), 第 1213-1221 页.

Becherer J. D. et al. Segment spanning

residues 727-768 of the complement C3

sequence contains a neoantigenic site and

accommodates the binding of CR1 factor H

and factor B. 《BIOCHEMISTRY》. 1992, 第 31 卷

(第 6 期), 第 1787-1794 页.

Dilillo et al. Selective and efficient

inhibition of the alternative pathway of

complement by a mAb that recognizes C3b/

iC3b. 《MOLECULAR IMMUNOLOGY》. 2006, 第 43 卷

(第 7 期), 第 1010-1019 页.

Hack C. E. et al. Disruption of the

internal thioester bond in the third

complement C3 result in the exposure of

neodeterminants also present on activation

products of C3 an analysis with monoclonal

antibodies. 《JOURNAL OF IMMUNOLOGY》. 1988,

第 141 卷 (第 5 期), 第 1602-1609 页.

审查员 李宁

权利要求书4页 说明书40页

序列表19页 附图26页

(54) 发明名称

C3b 抗体及用于预防和治疗补体相关病症的

方法

(57) 摘要

本发明关注针对 C3b 的抗体及使用此类抗体

进行的对补体相关病症的预防和治疗。

Fab S77 的重链和轻链序列及 S77 上与 C3b 接触的残基

S77 HC  
MGWSCIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPQGSRLSCAAS  
<CDR H1>GFSFTSSSVSWVRQAPGKGLEWVGL<CDR  
H2>IYPYNGFNYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYC  
AR<CDR H3>NALYGSAGGYAMDYWGQGLTLTVSSA  
<末端重定格式的序列>

S77 LC  
MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC<CDR  
L1>RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIY<CDR  
L2>SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<CDR  
L3>QQSYATLPTFEQGTKEIK  
<末端重定格式的序列>

1. 一种 C3b 抗体或其抗原结合片段,其是旁路补体途径的选择性抑制剂,抑制 C5 与 C3b 的结合,其中所述抗体包含顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列中的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 及顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列中的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,其可用于预防或治疗受试者的补体相关病症,其中所述受试者是人。

2. 权利要求 1 的抗体,其中所述 C3b 抗体识别 C3 活性降解产物上的而非 C3 上的表位。

3. 权利要求 2 的抗体,其中所述 C3b 抗体选择性结合 C3b。

4. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体结合包括具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体所识别的 C3b 表位的残基的表位。

5. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体与具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体结合相同表位。

6. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体竞争性抑制具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体的结合。

7. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体结合包含与具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体接触的残基的 C3b 表位。

8. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体包含抗原结合位点,该抗原结合位点包含具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体与 C3b 接触的残基。

9. 权利要求 3 的抗体,其中所述抗体包含顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列。

10. 权利要求 3 的抗体,其是人源化抗体或嵌合抗体。

11. 权利要求 1 的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自下组:双抗体和自抗体片段形成的多特异性抗体。

12. 权利要求 1 的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自下组:线性抗体和单链抗体分子。

13. 权利要求 1 的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、或 (scFv)<sub>2</sub>。

14. 权利要求 1 的抗体,其中所述补体相关病症是炎症性疾病或自身免疫性疾病。

15. 权利要求 1 的抗体,其中所述补体相关病症选自下组:类风湿性关节炎(RA)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、缺血和再灌注后的远距离组织损伤、由心肺旁路手术期间的补体活化引起的补体相关病症、皮炎、天疱疮、狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎、心肺旁路、心脏停搏诱发的冠状内皮功能障碍、II 型膜性增生性肾小球肾炎、IgA 肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合征、黄斑变性性疾病、其它眼内新血管疾病、由同种异基因移植引起的补体相关病症、超急性排斥反应、由血液透析引起的补体相关病症、慢性阻塞性肺病综合征(COPD)、哮喘、和吸入性肺炎。

16. 权利要求 1 的抗体,其中所述补体相关病症是补体相关眼疾。

17. 权利要求 16 的抗体,其中所述补体相关眼疾是糖尿病性黄斑水肿、年龄相关黄斑变性 (AMD)、葡萄膜炎、糖尿病性或其它缺血相关视网膜病变、眼内炎、或脉络膜新血管形成 (CNV)。

18. 权利要求 16 的抗体,其中所述补体相关眼疾是病理性近视、von Hippel-Lindau 病、眼的组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜新血管形成、或视网膜新血管形成。

19. 一种抗 C3b 抗体或其抗原结合片段,其选择性结合 C3b 而非 C3 且抑制 C5 结合 C3b,其中所述抗体包含顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列中的 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 及顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列中的 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3。

20. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体结合包括具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体所识别的 C3b 表位的残基的表位。

21. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体与具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体结合相同表位。

22. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体竞争性抑制具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体的结合。

23. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体结合包含与具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体接触的残基的 C3b 表位。

24. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体包含抗原结合位点,该抗原结合位点包含具有顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体与 C3b 接触的残基。

25. 权利要求 19 的抗体,其中所述抗体包含顺序连接的 SEQ ID NO:1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO:5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列。

26. 权利要求 19 的抗体,其是人源化抗体或嵌合抗体。

27. 权利要求 19 的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自下组:双抗体和自抗体片段形成的多特异性抗体。

28. 权利要求 19 的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自下组:线性抗体和单链抗体分子。

29. 权利要求 19 的抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、或 (scFv)<sub>2</sub>。

30. 一种药物组合物,其包含与药学可接受载体混和的权利要求 19-29 任一项所述的抗体或抗原结合片段。

31. 权利要求 30 的药物组合物,其可用于治疗补体相关病症。

32. 权利要求 31 的药物组合物,其中所述补体相关病症选自下组:类风湿性关节炎

(RA)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、缺血和再灌注后的远距离组织损伤、由心肺旁路手术期间的补体活化引起的补体相关病症、皮炎、天疱疮、狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎、心肺旁路、心脏停搏诱发的冠状内皮功能障碍、II 型膜性增生性肾小球肾炎、IgA 肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合征、黄斑变性性疾病、其它眼内新血管疾病、由同种异基因移植引起的补体相关病症、超急性排斥反应、由血液透析引起的补体相关病症、慢性阻塞性肺病综合征 (COPD)、哮喘、和吸入性肺炎。

33. 权利要求 31 的药物组合物, 其中所述补体相关病症是糖尿病性黄斑水肿、年龄相关黄斑变性 (AMD)、葡萄膜炎、糖尿病性或其它缺血相关视网膜病变、眼内炎、或脉络膜新血管形成 (CNV)。

34. 权利要求 31 的药物组合物, 其中所述补体相关病症是病理性近视、von Hippel-Lindau 病、眼的组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜新血管形成、或视网膜新血管形成。

35. 一种试剂盒, 其包含容器和说明书, 所述容器中装有权利要求 19 的抗体或抗原结合片段, 或权利要求 31 的药物组合物, 所述说明书指示施用所述抗体或药物组合物来治疗补体相关病症。

36. 权利要求 19 的抗体或抗原结合片段在制备用于预防或治疗受试者的补体相关病症的药物中的用途, 其中所述受试者是人。

37. 权利要求 36 的用途, 其中所述 C3b 抗体识别 C3 活性降解产物上的而非 C3 上的表位。

38. 权利要求 37 的用途, 其中所述 C3b 抗体选择性结合 C3b。

39. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体结合包括具有顺序连接的 SEQ ID NO :1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO :5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体所识别的 C3b 表位的残基的表位。

40. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体与具有顺序连接的 SEQ ID NO :1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO :5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体结合相同表位。

41. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体竞争性抑制具有顺序连接的 SEQ ID NO :1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO :5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体的结合。

42. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体结合包含与具有顺序连接的 SEQ ID NO :1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO :5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体接触的残基的 C3b 表位。

43. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体包含抗原结合位点, 该抗原结合位点包含具有顺序连接的 SEQ ID NO :1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO :5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列的抗体与 C3b 接触的残基。

44. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体包含顺序连接的 SEQ ID NO :1-4 的氨基酸序列的重链可变域序列和顺序连接的 SEQ ID NO :5-8 的氨基酸序列的轻链可变域序列。

45. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗体是人源化抗体或嵌合抗体。

46. 权利要求 38 的用途, 其中所述抗原结合片段选自下组: 双抗体和自抗体片段形成

的多特异性抗体。

47. 权利要求 38 的用途,其中所述抗原结合片段选自下组:线性抗体和单链抗体分子。

48. 权利要求 38 的用途,其中所述抗原结合片段是 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、或(scFv)<sub>2</sub>。

49. 权利要求 36 的用途,其中所述补体相关病症是炎性疾病或自身免疫性疾病。

50. 权利要求 36 的用途,其中所述补体相关病症选自下组:类风湿性关节炎(RA)、缺血和再灌注后的远距离组织损伤、由心肺旁路手术期间的补体活化引起的补体相关病症、狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎、II 型膜性增生性肾小球肾炎、抗磷脂综合征、黄斑变性性疾病、由同种异基因移植引起的补体相关病症、超急性排斥反应、和哮喘。

51. 权利要求 36 的用途,其中所述补体相关病症是补体相关眼疾。

52. 权利要求 51 的用途,其中所述补体相关眼疾是年龄相关黄斑变性(AMD)或脉络膜新血管形成(CNV)。

## C3b 抗体及用于预防和治疗补体相关病症的方法

### 发明领域

[0001] 本发明关注针对 C3b 的抗体及使用此类抗体进行的对补体相关病症的预防和治疗。

### [0002] 发明背景

[0003] 补体系统是由正常情况下以无活性的酶原形式存在的一系列血清糖蛋白构成的复杂酶级联。两种主要途径,即经典途径和旁路途径,能活化补体,它们在 C3 水平合并,其中两种类似的 C3 转化酶将 C3 切割成 C3a 和 C3b。

[0004] 巨噬细胞是已经发展出如下先天能力的专门细胞,即识别细胞表面表达的鉴定标签的结构中的微小差异,所谓的分子样式(Taylor 等, Eur J Immunol 33, 2090-2097 (2003); Taylor 等, Annu Rev Immunol 23, 901-944 (2005))。虽然这些表面结构的直接识别是先天免疫的一个基础方面,但是调理容许通用巨噬细胞受体介导吞食,提高效率和使吞噬细胞的识别全集多样化(Stuart 和 Ezekowitz, Immunity 22, 539-550 (2005))。吞食过程涉及多种配体-受体相互作用,而且现在清楚了多种调理素(包括免疫球蛋白、胶原凝集素、和补体成分)经由与巨噬细胞表面受体的相互作用来引导病原体内在化所需要的细胞活性(综述见 Aderem 和 Underhill, Annu Rev Immunol 17, 593-623 (1999); Underhill 和 Ozinsky, Annu Rev Immunol 20, 825-852 (2002))。虽然由种系基因编码的天然免疫球蛋白能识别极其多种病原体,但是大多数调理性 IgG 是经由适应性免疫生成的,因此经由 Fc 受体的高效清除不是立即的(Carroll, Nat Immunol 5, 981-986 (2004))。另一方面,补体快速识别病原体表面分子并使微粒准备好由补体受体来摄取(Brown, Infect Agents Dis 1, 63-70 (1991))。

[0005] 补体由 30 种以上的血清蛋白质组成,它们调理极其多种病原体,用以被补体受体所识别。取决于级联的初始触发,可区别三种途径(综述见 Walport, N Engl J Med 344, 1058-1066 (2001))。所有这三种途径共享活化中枢成分 C3 的共同步骤,但是它们依据识别的本质和导致 C3 活化的初始生化步骤而不同。经典途径如下活化,抗体结合至病原体表面,其继而结合 C1q 补体成分,引起一系列蛋白酶级联,最终将 C3 切割成其活性形式 C3b。凝集素途径在碳水化合物基序受到凝集素蛋白质识别后被活化。至今,已经鉴定了此途径的三个成员:甘露糖结合凝集素(MBL), SIGN-R1 凝集素家族和 ficolin(Pyz 等, Ann Med 38, 242-251 (2006))。MBL 和 ficolin 都与丝氨酸蛋白酶有关,其像经典途径中的 C1 那样起作用,活化成分 C2 和 C4, 导致中枢 C3 步骤。旁路条件与经典途径和凝集素途径二者形成对照,即它是由于内部 C3 酯与病原体表面上的识别基序的直接反应而被活化的。经由旁路途径蛋白酶因子 B 和因子 D 的作用,初始 C3 结合活化性表面导致 C3b 沉积的快速扩大。重要的是,经由因子 B 和 D 的作用,通过经典途径或凝集素途径任一沉积的 C3b 也能导致 C3b 沉积的扩大。在补体活化的所有三种途径中,调理作用中的关键步骤是成分 C3 转化成 C3b。补体级联的酶对 C3 的切割将硫酯暴露于亲核攻击,容许 C3b 经由硫酯结构域共价附着到抗原表面上。这是补体调理中的初始步骤。对所结合的 C3b 的后续蛋白水解生成 iC3b、C3c 和 C3dg,即受到不同受体识别的片段(Ross 和 Medof, Adv Immunol 37, 217-267 (1985))。

此切割消除了 C3b 进一步扩大 C3b 沉积和活化补体级联晚期成分（包括能够指导膜破坏的膜攻击复合物）的能力。然而，巨噬细胞吞噬细胞受体优先识别 C3b 及其片段；由于酯键形成的通用性，C3 介导的调理对于病原体识别是重要的（Holers 等，*Immunol Today* 13, 231-236(1992)），而且各种 C3 降解产物的受体因此在宿主免疫应答中发挥重要作用。

[0006] C3 自身是由 13 个独特结构域组成的复杂的且柔性的蛋白质。该分子的核心由 8 个所谓的巨球蛋白 (MG) 结构域构成，它们构成了 C3 的紧密压缩的  $\alpha$  和  $\beta$  链。插入此结构的是 CUB (C1r/C1s、Uegf 和骨形态生成蛋白 -1) 和 TED 结构域，后者含有容许 C3b 与病原体表面共价结合的硫酯键。剩余结构域含有 C3a，或者作为核心结构域的接头和间隔物起作用。C3b 和 C3c 结构与 C3 的比较证明了该分子在每次蛋白水解时经历重大构象重排，不仅暴露 TED，而且暴露了该分子的能与细胞受体相互作用的别的新的表面（Janssen 和 Gros，*Mol Immunol* 44, 3-10(2007)）。

[0007] 为了阻止不想要的补体活化，大多数哺乳动物细胞配备有在宿主自身细胞上阻断补体扩增的调节物（Hourcade 等，*Adv Immunol* 45, 381(1989)）。在这些内在调节物缺失的情况下，血清暴露导致补体拆分产物的生成，其继而促进炎症和组织损伤（Oglesby 等，*J Exp Med* 175, 1547(1992) 及 Oglesby 等，*Trans Assoc Am Physicians* 104, 164(1991)）。因此，缺少内在补体调节物的非细胞表面尤其倾向于补体攻击，而且完全依赖于血清中可溶性补体调节物的保护。

[0008] 已经由于缺少适宜的补体调控而发生的不受控制的补体活化与多种慢性炎症疾病和变性性疾病联系起来。此炎症级联中占支配地位的是补体拆分产物 C3a 和 C5a，它们经 C3a 和 C5a 受体发挥嗜中性粒细胞和炎症巨噬细胞的化学引诱物和活化物的功能（Mollnes 等，*Trends Immunol* 23, 61(2002)）。自嗜中性粒细胞释放的备解素经由 AP 转化酶的稳定作用进一步放大炎症级联（Lutz 和 Jelezarova，*Mol Immunol* 43, 2(2006)）。补体活化已经显示出是在免疫复合物介导的疾病中驱动炎症的重要成分，诸如膜性增生性肾小球肾炎、肾毒性肾炎和关节炎（Walport，*N Engl J Med* 344, 1058(2001)；Thurman 和 Holers，*J Immunol* 176, 1305(2006)；Banda 等，*J Immunol* 171, 2109(2003)；Weisman 等，*Science* 249, 146(1990)；Morgan 和 Harris，*Mol Immunol* 40, 159(2003)）、以及年龄相关黄斑变性（Anderson 等，*Am J Ophthalmol* 134, 411(2002)；Donoso 等，*Surv Ophthalmol* 51, 137(2006)；Gold 等，*Natl Genet* 38, 458(2006)；Hageman 等，*Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7227(2005)；Hageman 等，*Ann Med* 38, 592(2006)；Hageman 等，*Prog Retin Eye Res* 20, 705(2001)）。

[0009] 补体活化的大多数调节物在 C3b（补体转化酶的中心成分）水平起作用。补体活化的这些天然调节物通常尺寸较大（大于 100kDa），而且难以开发成治疗性试剂。因而，需要治疗剂，通过阻断 C3b 来预防和治疗补体相关病症。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明关注如下抗体的开发，该抗体特异性识别 C3 分解片段而非天然 C3，如此避免天然 C3 起抗体的“接收器”（sink）的作用。更具体的说，本发明关注 C3b 特异性抗体和抗体片段及其在治疗补体相关疾病中的用途。在一个方面，本发明关注用于预防或治疗补体相关病症的方法，包括对有需要的受试者施用有效量的 C3b 拮抗剂，该 C3b 拮抗剂是旁路补体途径的选择性抑制剂。

[0012] 在一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在另一个实施方案中,所述受试者是人。

[0013] 在又一个实施方案中,所述 C3b 拮抗剂是如下抗体,该抗体识别 C3 活性 降解产物上的而非 C3 上的表位。

[0014] 在还有一个实施方案中,所述 C3b 拮抗剂是选择性结合 C3b 的抗体或抗体片段。

[0015] 在一个不同的实施方案中,所述抗体抑制 C5 结合 C3b。在另一个实施方案中,所述抗体结合如下表位,该表位包括抗体 S77 所识别的 C3b 表位的残基。在还有一个实施方案中,所述抗体基本上 (essentially) 与抗体 S77 结合相同表位。

[0016] 在又一个实施方案中,所述抗体竞争性抑制抗体 S77 的结合。

[0017] 在还有一个实施方案中,所述抗体结合如下 C3b 表位,该 C3b 表位包含与抗体 S77 接触的残基。

[0018] 在另一个实施方案中,所述抗体包含如下抗原结合位点,该抗原结合位点包含与 C3b 接触的抗体 S77 残基。

[0019] 在一个优选的实施方案中,所述抗体包含抗体 S77 的重链 CDR 序列 (SEQID NO 1-4) 和 / 或轻链 CDR 序列 (SEQ ID NO 5-8) 和 / 或所述抗体是 S77 抗体或其片段。

[0020] 在各种实施方案中,所述抗体可以是人的、人源化的或嵌合的。

[0021] 在其它实施方案中,所述抗体片段选自下组: Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、dAb、互补决定区 (CDR) 片段、线性抗体、单链抗体分子、微型抗体 (minibodies)、双抗体、和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0022] 本发明的方法包括预防或治疗任何补体相关病症,包括炎性和自身免疫性疾病,诸如例如类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis) (RA)、急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome) (ARDS)、缺血和再灌注后的远距离组织损伤 (remote tissue injury after ischemia and reperfusion)、心肺旁路手术期间的补体活化 (complement activation during cardiopulmonary bypass surgery)、皮炎 (dermatomyositis)、天疱疮 (pemphigus)、狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎 (lupus nephritis and resultant glomerulonephritis and vasculitis)、心肺旁路 (cardiopulmonary bypass)、心脏停搏诱发的冠状内皮功能障碍 (cardioplegia-induced coronary endothelial dysfunction)、II 型膜性增生性肾小球肾炎 (type II membranoproliferative glomerulonephritis)、IgA 肾病 (IgA nephropathy)、急性肾衰竭 (acute renal failure)、冷球蛋白血症 (cryoglobulemia)、抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome)、黄斑变性性疾病 (macular degenerative diseases) 诸如年龄相关黄斑变性 (age-related macular degeneration) (AMD)、脉络膜新血管形成 (choroidal neovascularization) (CNV)、葡萄膜炎 (uveitis)、糖尿病性和其它缺血相关视网膜病变 (diabetic and other ischemia-related retinopathies)、眼内炎 (endophthalmitis)、和其它眼内新血管疾病 (other intraocular neovascular diseases) 诸如糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema)、病理性近视 (pathological myopia)、von Hippel-Lindau 病、眼的组织胞浆菌病 (histoplasmosis of the eye)、视网膜中央静脉阻塞 (Central Retinal Vein Occlusion) (CRVO)、角膜新血管形成 (corneal neovascularization)、视网膜新血管形成 (retinal neovascularization)、以

及同种异基因移植 (allotransplantation)、超急性排斥反应 (hyperacute rejection)、血液透析 (hemodialysis)、慢性阻塞性肺病综合征 (chronic occlusive pulmonary distresssyndrome) (COPD)、哮喘 (asthma)、和吸入性肺炎 (aspiration pneumonia)。在一个具体的实施方案中,所述补体相关病症是补体相关眼疾 (complement-associated eye condition),诸如年龄相关黄斑变性 (age-relatedmacular degeneration) (AMD) 或脉络膜新血管形成 (choroidalneovascularization) (CNV)。

[0023] 在另一个方面,本发明关注抗 C3b 抗体,其选择性结合 C3b 而非 C3 且抑制 C5 结合 C3b。

[0024] 在一个实施方案中,所述抗体结合如下表位,该表位包括抗体 S77 所识别的 C3b 表位的残基。

[0025] 在另一个实施方案中,所述抗体基本上与抗体 S77 结合相同表位。在还有一个实施方案中,所述抗体竞争性抑制抗体 S77 的结合。

[0026] 在一个不同的实施方案中,所述抗体结合如下 C3b 表位,该 C3b 表位包含与抗体 S77 接触的残基。

[0027] 在又一个实施方案中,所述抗体包含如下抗原结合位点,该抗原结合位点包含与 C3b 接触的抗体 S77 残基。

[0028] 在还有一个实施方案中,所述抗体包含抗体 S77 的重链 CDR 序列 (SEQID NO 1-4) 和 / 或轻链 CDR 序列 (SEQ ID NO 5-8),或者该抗体是 S77 抗体或其片段。

[0029] 在各种实施方案中,所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。所述抗体片段可以例如选自下组: Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、dAb、互补决定区 (CDR) 片段、线性抗体、单链抗体分子、微型抗体 (minibody)、双抗体、和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0030] 在另一个方面,本发明关注药物组合物,其包含与药学可接受载体混和的本发明的 C3b 拮抗剂,诸如 C3b 抗体。

[0031] 在一个具体的实施方案中,所述药物组合物用于治疗补体相关病症。

[0032] 在又一个方面,本发明关注试剂盒,其包含容器和说明书,所述容器中装有本发明的 C3b 拮抗剂或 C3b 抗体或包含此类拮抗剂或抗体的药物组合物,所述说明书指示施用所述抗体或药物组合物来治疗补体相关病症。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1. 抗体噬菌体文库中的 C3b 淘选结果。

[0035] 图 2. 用各种 C3b 抗体克隆得到的噬菌体竞争结果。

[0036] 图 3. 与抗体 YW1 44. 2. 43. S77 (以下简称 S77) Fab 形成的复合物中 C3b 的晶体结构。C3b 的  $\beta$  链以绿色标示,  $\alpha$  链以橙色标示。S77 的重链 (HC) 和轻链 (LC) 分别以暗绿色和黄色标示。根据 C3b: CRIg 共晶体结构, CRIg 已经停靠到 C3b: Fab 复合物上, 而且以品红显示。

[0037] 图 4. 抗体 S77 与 C3b 的结合相互作用的特写。C3b 以表面图显示, 青色飘带图代表在 C3b 结构上重叠的 C3。S77 的 HC 和 LC 以暗绿色和黄色的飘带图显示。C3b 的表面依照与 S77 的距离着色。所有比 4.7 Å、4.0 Å 和 3.5 Å 更靠近的原子分别着黄色、橙色和红色。注意, S77 的 LC 与 C3 冲突。然而, C3 的环可能能够移动。

[0038] 图 5. 抗体 S77 Fab 片段的重链 (SEQ ID NO 1-4) 和轻链 (SEQ ID NO 5-8) 的氨

氨基酸序列。以红色标示的是与 C3b 密切接触的残基。

[0039] 图 6A 和 6B。亲本抗体 YW1 44.2.43 Fab 及其亲和力成熟形式 144.2.43. S77Fab(S77 Fab) 的结合亲和力。

[0040] 图 7A、7B 和 7C。SPR 传感图及 S77 对 C3 和 C3b 的结合亲和力。

[0041] 图 8A 和 8B。S77 识别 C3b 而非原分子 C3。使用多克隆 C3 抗体在微量滴定板中捕捉纯化的 C3b 或 C3。使用 HRP0 偶联抗体测定 S77(A) 或多克隆抗 C3 抗体(B) 对捕捉到的 C3b 或 C3 的结合情况。用 TMB(KPL) 显色,在 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中终止,并读取 450nm 吸光度。

[0042] 图 9A、9B 和 9C。IgG 抗体 S77 选择性抑制补体的旁路途径而非经典途径。在消灭了 C1q 和因子 B 的血清中温育家兔红细胞和绵羊红细胞,并在存在浓度渐增的抑制剂或对照蛋白质的情况中监测溶血情况。溶血情况表述成相对于抑制剂缺失的情况中的最大限度溶血的百分比。

[0043] 图 10。亲和力成熟的 S77Fab 抑制补体旁路途径。

[0044] 图 11。C3b Fab(S77) 抑制 C5 转化酶。C5 转化酶如文献所述实施(Rawal N 和 Pangbun M, J Immunol 2001Feb 15 ;166(4) :2635-42)。

[0045] 图 12。IgG 抗体 S77 及其 Fab 片段通过阻断 C5 结合 C3b(转化酶的非催化性亚基)来抑制 C5 转化酶。在存在浓度渐增的抑制剂的情况中,将 C5 添加至用 C3b 包被的板。C5 结合 C3b 多聚体。

[0046] 图 13。与因子 H 不同, S77 不分解转化酶。分解测定法是通过在存在浓度渐增的 S77 或因子 H(阳性对照)的情况中生成板包被的 C3 转化酶而实施的。

[0047] 图 14。S77 抑制原因子 B(pro-factor B) 结合 C3b,而且抑制 C3bBb 转化酶的形成。

[0048] 图 15。S77 能在存在结合的 fBb 的情况中结合 C3b 且不分解 C3 转化酶。

[0049] 图 16。S77 抑制因子 H 结合 C3b 且抑制因子 H 辅因子活性。

[0050] 图 17。S77 抑制 CR1 结合 C3b。

[0051] 图 18A 和 18B。抗 HER2 抗体 rhuMAB 4D5-8 轻链可变区(SEQ ID NO:13) 和重链可变区(SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列。

[0052] 增图 1。C3b 上与 S77Fab 的 HC 和 LC 接触的残基(残基 833-839 涵盖 SEQ ID NO:15;残基 895-899 涵盖 SEQ ID NO:16)。

[0053] 增图 2。S77Fab 上与 C3b 接触的残基(残基 1030-1033 涵盖 SEQ ID NO:17;残基 1098-1107 涵盖 SEQ ID NO:18)。

[0054] 增图 3。人补体因子 C3(SEQ ID NO:9) 和小鼠补体因子 C3(SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列。

[0055] 发明详述

[0056] I. 定义

[0057] 术语“C3”和“补体 C3”可互换使用,指天然序列 C3 多肽。

[0058] “天然序列 C3”指与自自然界衍生的 C3 多肽具有相同氨基酸序列的多肽,无论其制备模式。如此,天然序列 C3 可以从自然界分离,或者可以通过重组和/或合成手段生成。术语“天然序列 C3”明确涵盖 C3 的天然存在变体形式(例如可变剪接形式)和天然存在等位变体,以及 C3 分子的与自自然界衍生的 C3 多肽具有相同氨基酸序列的结构构象变体。

天然序列 C3 多肽明确包括天然序列人 C3 ( 增图 3, SEQ ID NO :9 ;还可参见 De Bruijn and Fey, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :708-712) 和非人动物 ( 包括高等灵长类和其它非人哺乳类 ) 的多肽, 诸如小鼠 C3 序列 ( 增图 3, SEQ ID NO :10) 。

[0059] 术语“C3b”在本文中用于指 C3 转化酶切割 ( 自 C3  $\alpha$  链的氨基末端释放过敏毒素 C3a 片段并留下 C3b ) 后自 C3 生成的天然序列 C3b 多肽。术语“天然序列”与关于 C3 所定义的具有相同含义, 而且明确包括 SEQ ID NO :9 的天然序列人 C3b。

[0060] 术语“C3b 拮抗剂”以最广义使用, 包括能够中和、阻断、部分或完全抑制、消除、降低或干扰 C3 生物学活性的任何分子。C3b 拮抗剂包括但不限于抗 C3b 抗体及其抗原结合片段, 结合 C3b 且能够中和、阻断、部分或完全抑制、消除、降低或干扰 C3b 活性 ( 诸如 C3b 参与补体相关病症的病理性能力 ) 的其它结合性多肽、肽、和非肽小分子。本文中的 C3b 拮抗剂 ( 诸如 C3b 抗体 ) 特异性识别 C3b 而不识别前体 C3。

[0061] “小分子”在本文中定义为具有低于约 600, 优选低于约 1000 道尔顿的分子量。

[0062] “有活性的”或“活性”或“生物学活性”在本发明 C3b 拮抗剂 ( 诸如 C3b 抗体 ) 的语境中指拮抗 ( 部分或完全抑制 ) C3b 生物学活性的能力。C3b 拮抗剂的一种优选生物学活性是在 C3b 相关疾病或疾患 ( 诸如例如补体相关病症 ) 的状态 ( 例如病理学 ) 中实现可测量的改善的能力。所述活性可在体外或在体内测试中测定, 包括结合测定法, 使用有关动物模型, 或人体临床试验。

[0063] 术语“补体相关病症”在本文中以最广义使用, 包括其发病机制牵涉补体系统激活异常的所有疾病和病理性状况, 诸如例如补体缺陷。该术语明确包括受益于 C3 转变酶抑制的疾病和病理性状况。该术语另外包括受益于补体旁路抑制, 包括选择性抑制的疾病和病理性状况。补体相关病症包括但不限于炎症性疾病和自身免疫性疾病, 诸如例如类风湿性关节炎 (RA)、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、缺血和再灌注后的远距离组织损伤、心肺旁路手术期间的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎、心肺旁路、心脏停搏诱发的冠状内皮功能障碍、II 型膜性增生性肾小球肾炎、IgA 肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合征、黄斑变性性疾病和其它补体相关眼疾, 诸如年龄相关黄斑变性 (AMD)、脉络膜新血管形成 (CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性和其它缺血相关视网膜病变、眼内炎、和其它眼内新血管疾病, 诸如糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau 病、眼的组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜新血管形成、视网膜新血管形成、以及同种异基因移植、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病综合征 (COPD)、哮喘、和吸入性肺炎。

[0064] 术语“补体相关眼疾”在本文中以最广义使用, 包括病理学涉及补体 ( 包括经典途径和旁路途径, 特别是补体旁路途径 ) 的所有眼部疾患和疾病。此组内明确包括所有与旁路途径有关的, 其发生、形成、或进展能通过抑制旁路途径来控制的眼部疾患和疾病。补体相关眼疾包括但不限于黄斑变性性疾病, 诸如所有阶段的年龄相关黄斑变性 (AMD) ( 包括干性和湿性 ( 非渗出性和渗出性 ) ) 形式, 脉络膜新血管形成 (CNV), 葡萄膜炎, 糖尿病性视网膜病变和其它缺血相关视网膜病变, 眼内炎, 和其它眼内新血管疾病, 诸如糖尿病性黄斑水肿, 病理性近视, von Hippel-Lindau 病, 眼的组织胞浆菌病, 视网膜中央静脉阻塞 (CRVO), 角膜新血管形成, 和视网膜新血管形成。一组优选的补体相关眼疾包括年龄相关黄斑变性 (AMD) ( 包括非渗出性 ( 湿性 ) 和渗出性 ( 干性或萎缩性 ) AMD)、脉络膜新血管形成

(CNV)、糖尿病性视网膜病变 (DR)、和眼内炎。

[0065] 术语“炎性疾病”和“炎症病症”可互换使用,指其中哺乳动物免疫系统的成分引起、介导或以其它方式促成炎症应答(其促成在该哺乳动物中发病)的疾病和病症。还包括其中炎症应答的降低对疾病的进展具有改善效果的疾病。此定义内包括免疫介导的炎性疾病,包括自身免疫性疾病。

[0066] 术语“T 细胞介导的”疾病指其中 T 细胞直接或间接介导或以其它方式促成哺乳动物发病的疾病。T 细胞介导的疾病可能与细胞介导的效应、淋巴因子介导的效应等有关,甚至与 B 细胞有关的效应有关(如果 B 细胞得到刺激的话,例如受到由 T 细胞分泌的淋巴因子的刺激)。

[0067] 免疫相关和炎症疾病的例子(其中有些是 T 细胞介导的)包括但不限于炎症肠病 (IBD)、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、幼年型慢性关节炎、脊椎关节病、系统性硬化(硬皮病)、特发性炎性肌病(皮肌炎、多肌炎)、斯耶格伦氏 (Sjogren) 综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血(免疫性全血细胞减少症、阵发性夜间血红蛋白尿)、自身免疫性血小板减少症(特发性血小板减少性紫癜、免疫介导的血小板减少症)、甲状腺炎(格雷夫斯氏 (Graves) 病、桥本氏 (Hashimoto) 甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎)、糖尿病、免疫介导的肾病(肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎)、中枢和周围神经系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化、特发性多神经病、肝胆病诸如传染性肝炎(甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和其它非嗜肝病毒肝炎)、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎、和硬化性胆管炎、炎性和纤维化肺病(例如囊性纤维化病)、麸胶敏感性肠病、惠普尔氏 (Whipple) 病、自身免疫性或免疫介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病、肺的变应性疾病诸如嗜嗜红细胞性肺炎、特发性肺纤维化和超敏感性肺炎、移植相关疾病包括移植物排斥、移植物抗宿主疾病、阿耳茨海默氏 (Alzheimer) 病、和动脉粥样硬化。

[0068] “治疗”或“处理”指旨在预防病症发展或改变病症病理而实施的干预。因而,“治疗”或“处理”指治疗性处理及预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。在免疫相关疾病的治疗中,治疗剂可直接改变免疫应答的成分的应答程度,或者使得疾病对其它治疗剂(例如抗生素、抗真菌剂、抗炎剂、化疗剂等)的治疗更敏感。

[0069] 疾病(诸如补体相关病症)的“病理”或“病理学”包括所有危及患者康乐的现象。这包括但不限于异常的或不可控的细胞生长(嗜中性细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、淋巴细胞)、抗体生成、自身抗体生成、补体生成、对邻近细胞正常机能的干扰、细胞因子或其它分泌产物的异常水平释放、任何炎性或免疫学应答的抑制或恶化、炎症细胞(嗜中性细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、淋巴细胞)浸润入细胞间隙 (cellular spaces) 等。

[0070] 如本文中所使用的,术语“哺乳动物”指归为哺乳类的任何动物,包括但不限于人,高等灵长类,家畜和牲畜,及动物园、运动或宠物动物,诸如马、猪、牛、犬、猫和雪貂等。在一个优选的实施方案中,哺乳动物指人。

[0071] 与一种或多种其它治疗剂“联合/组合”施用包括同时(共同)施用和任何次序的序贯施用。

[0072] “治疗有效量”指在目标疾病或疾患(诸如例如补体相关病症)的状态(例如病理

学)中实现可测量的改善所需要的“C3b拮抗剂”诸如“C3b抗体”量。

[0073] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0074] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接的”。例如,若前序列(presequence)或分泌前导(secretory leader)的DNA表达成参与多肽分泌的前蛋白质(preprotein),则它与该多肽的DNA可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。一般而言,“可操作连接的”意味着相连的DNA序列是相邻的,而且在分泌前导的情况下意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若没有此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸接头或接头。

[0075] 杂交反应的“严格性”可以由本领域普通技术人员容易地确定,而且通常根据探针长度、洗涤温度、和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性DNA重新退火的能力。探针和可杂交序列之间的期望同源性程度越高,可使用的相对温度也越高。结果是,推断出较高相对温度会趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释,参见Ausubel等,《Current Protocols in Molecular Biology》,Wiley Interscience Publishers,1995。

[0076] “严格条件”或“高严格性条件”,如本文中所定义的,可如下鉴定:(1)采用低离子强度和高温进行清洗,例如0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠,于50℃;(2)在杂交过程中采用变性剂,诸如甲酰胺,例如50%(v/v)甲酰胺及0.1%牛血清清蛋白/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液pH 6.5及750mM氯化钠,75mM柠檬酸钠,于42℃;或(3)采用50%甲酰胺,5x SSC(0.75M NaCl,0.075M柠檬酸钠),50mM磷酸钠(pH 6.8),0.1%焦磷酸钠,5x Denhardt氏溶液,超声处理的鲑鱼精DNA(50 μg/ml),0.1% SDS,和10%硫酸右旋糖苷,于42℃,及于42℃在0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)和50%甲酰胺中清洗,于55℃,接着于55℃在含EDTA的0.1x SSC中进行高严格性清洗。

[0077] “中等严格条件”可以如Sambrook等,《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》,New York, Cold Spring Harbor Press,1989中所述鉴定,包括使用比上文所述较不严格的清洗溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和% SDS)。中等严格条件的一个例子是于37℃在含20%甲酰胺,5x SSC(150mM NaCl,15mM柠檬酸三钠),50mM磷酸钠(pH 7.6),5x Denhardt氏溶液,10%硫酸右旋糖苷,和20mg/ml变性的经剪切的鲑鱼精DNA的溶液中温育过夜,接着于约37-50℃在1x SSC中清洗滤膜。技术人员会认识到如何在必要时调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0078] 术语“表位标记的”或“带表位标签的”在用于本文时指包含本发明多肽且其与“标签多肽”融合的嵌合多肽。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体,但又足够短使得其不干扰与其融合的多肽的活性。标签多肽还优选是相当独特的,使得其抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少6个氨基酸残基,通常

在约 8 个和约 50 个氨基酸残基之间（优选在约 10 个和约 20 个氨基酸残基之间）。

[0079] 术语“抗体”以最广义使用，明确覆盖但不限于识别 C3 分解片段而非天然 C3 的单一抗体诸如特异性结合 C3b 的抗 C3b 单克隆抗体，和具有多表位特异性的抗体组合物。术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。

[0080] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原性位点。此外，与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制备物不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如，有待依照本发明使用的单克隆抗体可以通过首次由 Kohler 等 (1975) *Nature* 256 :495 记载的杂交瘤方法来制备，或者可以通过重组 DNA 方法来制备（参见例如美国专利 No. 4, 816, 567）。“单克隆抗体”也可以使用例如 Clackson 等 (1991) *Nature* 352 : 624-628 及 Marks 等 (1991) *J. Mol. Biol.* 222 :581-597 中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0081] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望的生物学活性（美国专利 No. 4, 816, 567；及 Morrison 等 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :6851-6855）。

[0082] 非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常，人源化抗体会包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域，其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等 (1986) *Nature* 321 :522-525；Riechmann 等 (1988) *Nature* 332 :323-329；及 Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2 :593-596。

[0083] “物种依赖性抗体”指对来自第一哺乳动物物种的抗原具有强于对该抗原来自第二哺乳动物物种的同系物的结合亲和力的抗体。通常，物种依赖性抗体“特异性结合”人类抗原（即具有不超过约  $1 \times 10^{-7}$  M、优选不超过约  $1 \times 10^{-8}$  M、和最优选不超过约  $1 \times 10^{-9}$  M 的结合亲和力 ( $K_d$ )），但是对该抗原来自第二非人哺乳动物物种的同系物具有比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约 50 倍、或至少约 500 倍、或至少约 1000 倍的结合亲和力。物种依赖性抗体可以是上文定义的各种类型抗体，但是优选人源化抗体或人抗体。

[0084] 在用于本文时，“抗体突变体”或“抗体变体”指物种依赖性抗体的氨基酸序列变体，其中物种依赖性抗体的一个或多个氨基酸残基发生了修饰。此类突变体与物种依赖性抗体必然具有小于 100% 的序列同一性或相似性。在一个优选的实施方案中，抗体突变体所

具有的氨基酸序列与物种依赖性抗体的重链或轻链可变域的氨基酸序列具有至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的氨基酸序列同一性或相似性。关于此序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后, 候选序列中与物种依赖性抗体残基相同(即相同残基)或相似(即根据共同侧链特性来自同一组的氨基酸残基, 见下文)的氨基酸残基的百分比。N-末端、C-末端、或内部的延伸、删除、或插入可变域以外的抗体序列都不应视为影响序列同一性或相似性。

[0085] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质, 可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中, 将抗体纯化至(1)根据 Lowry 法的测定, 抗体重量超过 95%, 最优选重量超过 99%, (2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度, 或(3)根据还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE 及使用考马斯蓝或优选的银染色, 达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在, 那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而, 分离的抗体通常会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0086] 在用于本文时, “抗体可变域”指抗体分子的轻链和重链中包含互补决定区(CDR; 即 CDR1、CDR2、和 CDR3)和框架区(FR)氨基酸序列的那部分。 $V_H$ 指重链可变域。 $V_L$ 指轻链可变域。依照本发明所使用的方法, 归为 CDR 和 FR 的氨基酸位置可以依照 Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 和 1991)) 来限定。抗体或抗原结合片段的氨基酸编号方式也依照 Kabat。

[0087] 在用于本文时, 术语“互补决定区(CDR; 即 CDR1、CDR2、和 CDR3)指抗体可变域中其存在是抗原结合所必需的氨基酸残基。每个可变域通常具有三个 CDR, 鉴定为 CDR1、CDR2 和 CDR3。每个互补决定区可以包含来自如 Kabat 定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即大约是轻链可变域的残基 24-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)及重链可变域的残基 31-35(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3); Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))和/或来自“高变环”的残基(即大约是轻链可变域的残基 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)及重链可变域的残基 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3); Chothia 和 Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196 :901-917)。在有些情况中, 互补决定区可以包含来自依照 Kabat 定义的 CDR 和来自高变环二者的氨基酸。例如, 抗体 4D5 重链的 CDRH1 包含氨基酸 26-35。

[0088] “框架区”(以下的 FR)指可变域中 CDR 残基以外的残基。每个可变域通常具有四个 FR, 鉴定为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。如果 CDR 是依照 Kabat 定义的, 那么轻链 FR 残基位于大约轻链残基 1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)、和 98-107(LCFR4), 而重链 FR 残基位于大约重链残基 1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)、和 103-113(HCFR4)。如果 CDR 包含来自高变环的氨基酸残基, 那么轻链 FR 残基位于大约轻链残基 1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)、和 97-107(LCFR4), 而重链 FR 残基位于大约重链残基 1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)、和 102-113(HCFR4)。在有些情况中, 在 CDR 包含来自依照 Kabat 定义的 CDR 和来自高变环二者的氨基酸时, FR 残基会做相应的调整。例

如,当CDRH1包含氨基酸H26-H35时,重链FR1残基位于第1-25位,而FR2残基位于第36-49位。

[0089] 在用于本文时,“密码子集”指用于编码期望变异氨基酸的一套不同核苷酸三联体序列。可以通过例如固相合成来合成一套寡核苷酸,其包括呈现由密码子集提供的核苷酸三联体的所有可能组合并编码期望氨基酸组的序列。一种标准形式的密码子命名是IUB代码,其是本领域已知的且在本文中有记载。密码子集通常以3个斜体大写字母表示,例如NNK、NNS、XYZ、DVK等等。如此,“非随机密码子集”在用于本文时指编码部分、优选完全满足本文所述氨基酸选择标准的选定氨基酸的密码子集。在某些位置具有选定核苷酸“简并性”的寡核苷酸的合成是本领域众所周知的,例如TRIM法(Knappek等(1999)J. Mol. Biol. 296: 57-86; Garrard和Henner(1993)Gene 128:103)。此类具有某些密码子集的寡核苷酸集可以使用商品化核酸合成仪来合成(可购自例如Applied Biosystems, Foster City, CA),或者可以通过商业途径获得(例如购自Life Technologies, Rockville, MD)。因此,一套具有特定密码子集的合成寡核苷酸通常会包括具有不同序列(在整个序列中由密码子集建立的差异)的多种寡核苷酸。寡核苷酸,在依照本发明使用时,具有容许与可变域核酸模板杂交的序列,而且还可以但非必须包含可用于例如克隆目的的限制酶位点。

[0090] 术语“抗体片段”在本文中以最广义使用,包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、dAb、和互补决定区(CDR)片段、线性抗体、单链抗体分子、微型抗体、双抗体、和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0091] “Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密结合(该结合的本质可以是共价的,例如在scFv中)的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中,每个可变域的三个CDR相互作用而在V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二聚体表面上限定了抗原结合位点。六个CDR或其子集一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是通常亲和力低于完整结合位点。

[0092] “Fab”片段包含轻链的可变域和恒定域及重链的可变域和第一恒定域(CH1)。F(ab')<sub>2</sub>抗体片段包含一对Fab片段,它们一般在它们羧基末端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸共价连接。本领域还知道抗体片段的其它化学偶联形式。

[0093] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。一般而言,Fv多肽在V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>结构域之间进一步包含多肽接头,其使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见Pluckthun,于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag, New York, 第269-315页,1994。

[0094] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链(V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>)中包含相连接的重链可变域(V<sub>H</sub>)和轻链可变域(V<sub>L</sub>)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如EP 404,097; WO 93/11161; 及Hollinger等(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448。

[0095] 表述“线性抗体”指Zapata等(1995)Protein Eng, 8(10):1057-1062中所描述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1),该区段与互补的轻链多

肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的,或者是单特异性的。

[0096] 在用于本文时,“文库”或“库”指众多抗体或抗体片段序列(例如本发明的多肽),或者编码这些序列的核酸,即根据本发明方法导入这些序列中的、变异氨基酸组合方面不同的序列。

[0097] “噬菌体展示”是一种将变异多肽作为与外壳蛋白至少一部分的融合蛋白展示在噬菌体(例如丝状噬菌体)颗粒表面上的技术。噬菌体展示的效用在于能对随机化蛋白质变体的大型文库快速且高效分选那些以高亲和力与靶抗原结合的序列的实情。肽和蛋白质文库在噬菌体上的展示已经用于对数以百万计的多肽筛选那些具有特异性结合特性的多肽。多价噬菌体展示法已经用于展示小随机肽和小蛋白质,其通过与丝状噬菌体的基因 III 或基因 VIII 融合来实现。Wells 和 Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 :355-362, 及其中引用的参考文献。在单价噬菌体展示中,将蛋白质或肽文库与基因 III 或其一部分融合,并在存在野生型基因 III 蛋白时以低水平表达,使得噬菌体颗粒展示一个拷贝的融合蛋白或者不展示融合蛋白。亲合效应 (avidity effect) 相对于多价噬菌体得到了降低,使得分选基于内在的配体亲和力,而且使用噬菌粒载体,这简化了 DNA 操作。Lowman 和 Wells (1991) *Methods :A companion to Methods in Enzymology* 3 :205-0216。

[0098] “噬菌粒”是具有细菌复制起点(例如 CoIE1)和噬菌体基因间区的质粒载体拷贝。噬菌粒可利用任何已知噬菌体,包括丝状噬菌体和  $\lambda$  类噬菌体。质粒一般也会包含抗生素抗性的选择标志。克隆入这些载体的 DNA 区段可以像质粒一起而扩增。在给携带这些载体的细胞提供生成噬菌体颗粒所必需的所有基因时,质粒的复制模式变成滚环复制,以生成质粒 DNA 的一条链的拷贝,并包装噬菌体颗粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌体颗粒。此术语包括如下的噬菌粒,它们包含与异源多肽基因连接成基因融合物的噬菌体外壳蛋白基因或其片段,使得异源多肽展示在噬菌体颗粒的表面上。

[0099] 术语“噬菌体载体”指包含异源基因且能够复制的双链复制型噬菌体。噬菌体载体具有容许噬菌体复制和噬菌体颗粒形成的噬菌体复制起点。噬菌体优选是丝状噬菌体,诸如 M13、f1、fd、Pf3 噬菌体或其衍生物,或者是  $\lambda$  类噬菌体,诸如  $\lambda$ 、21、 $\phi$ 80、 $\phi$ 81、82、424、434 等或其衍生物。

[0100] 在用于本文时,“溶剂可及位置”指源抗体或抗原结合片段重链和轻链可变区中根据抗体或抗原结合片段的结构、结构系综 (ensemble) 和 / 或建模结构确定为潜在地可被溶剂触及和 / 或与分子(诸如抗体特异性抗原)接触的氨基酸残基位置。这些位置通常发现于 CDR 中和蛋白质外部上。如本文所定义的抗体或抗原结合片段的溶剂可及位置可使用本领域已知的多种算法之任一种来确定。优选的是,溶剂可及位置是使用来自抗体三维模型的坐标而确定的,优选使用计算法程序,诸如 InsightII 程序 (Accelrys, San Diego, CA)。溶剂可及位置还可以使用本领域已知的算法来确定(例如 Lee 和 Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379 及 Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548)。溶剂可及位置的确定可使用适于蛋白质建模的软件和自抗体得到的三维结构信息来进行。可用于这些目的的软件包括 SYBYL Biopolymer Module 软件 (Tripos Associates)。一般和优选的是,若算法(程序)要求用户输入大小参数,计算中所使用的探针的“大小”设为半径大约 1.4 埃或更小。另外, Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18 (4) :377-386 记载了使用供个人计算机用的软件确定溶剂可及区域和面积的方法。

[0101] II. 详述

[0102] 补体系统

[0103] 补体在身体的防御中发挥至关重要的作用,而且与免疫系统的其它成分一起保护个体免于病原体侵入身体。然而,如果没有受到正确的活化或控制,那么补体也能引起对宿主组织的损伤。补体的不当活化涉及多种疾病(称作补体相关疾病或病症,诸如免疫复合物和自身免疫性疾病)和多种炎症状况(包括补体介导的炎性组织损伤)的发病机理。各种补体相关病症的病理有所不同,而且可涉及时间或长或短的补体活化,整个级联、只有级联之一(例如经典途径或旁路途径)、只有级联的一些成分、等的活化。在有些疾病中,补体片段的补体生物学活性导致组织损伤和疾病。因而,补体的抑制剂具有高度的治疗潜力。旁路途径的选择性抑制剂会是特别有用的,因为经由经典路径自血液中清除病原体和其它生物体会保持完整。

[0104] C3b抗体及其在预防和治疗补体相关病症中的用途

[0105] 本发明(至少部分)基于特异性识别 C3 分解片段而非天然 C3 的抗体的开发。具体而言,本发明关注使用人组合抗体文库和噬菌体展示开发得到的识别且特异性结合 C3b 的抗体,其中对 C3b 特异性噬菌体的富集是通过用饱和量的 C3 进行封闭而实现的。使用此方法学,我们能够开发出对活化形式的 C3 特异性的抗体。另外,这些人抗体进行了进一步的亲和力成熟,如此提高它们在体外溶血测定法中的效力。通过克隆生成了 Fab 片段并显示出保留抑制经由旁路途径的补体活化的高效力。解析出了与 C3b 的复合物中 Fab(称作 S77)的共结构,并定位了参与 C3b-S77 相互作用的残基。就我们所知,这是第一种具有对 C3 片段的选择性、抑制补体旁路途径的噬菌体衍生抗体。

[0106] 本发明的抗体和其它 C3b 特异性拮抗剂在补体相关病症的预防和治疗中是有用的。补体相关疾病的具体例子包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、缺血和再灌注后的远距离组织损伤、心肺旁路手术期间的补体活化、皮炎、天疱疮、狼疮肾炎及所致肾小球肾炎和血管炎、心肺旁路、心脏停搏诱发的冠状内皮功能障碍、II 型膜性增生性肾小球肾炎、IgA 肾病、急性肾衰竭、冷球蛋白血症、抗磷脂综合征、黄斑变性性疾病和其它补体相关眼疾,诸如年龄相关黄斑变性(AMD)、脉络膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性和其它缺血相关视网膜病变、眼内炎、和其它眼内新血管疾病诸如糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau 病、眼的组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新血管形成、视网膜新血管形成、以及同种异基因移植、超急性排斥反应、血液透析、慢性阻塞性肺病综合征(COPD)、哮喘、和吸入性肺炎。

[0107] 作为补体相关疾病的例子的炎性病症的一个更加广泛的列表包括例如炎症肠病(IBD)、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、幼年型慢性关节炎、脊椎关节病、系统性硬化(硬皮病)、特发性炎性肌病(皮炎、多肌炎)、斯耶格伦氏(Sjögren)综合征、系统性血管炎、结节病、自身免疫性溶血性贫血(免疫性全血细胞减少症、阵发性夜间血红蛋白尿)、自身免疫性血小板减少症(特发性血小板减少性紫癜、免疫介导的血小板减少症)、甲状腺炎(格雷夫斯氏(Graves)病、桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎)、糖尿病、免疫介导的肾病(肾小球肾炎、肾小管间质性肾炎)、中枢和周围神经系统的脱髓鞘病诸如多发性硬化、特发性多神经病、肝胆病诸如传染性肝炎(甲型、乙型、丙型、丁型、戊型和其它非嗜肝病毒肝炎)、自身免疫性慢性活动性肝炎、原发性胆汁性

肝硬化、肉芽肿性肝炎和硬化性胆管炎、炎性和纤维化肺病（例如囊性纤维化病）、麸胶敏感性肠病、惠普尔氏（Whipple）病、自身免疫或免疫介导的皮肤病包括大疱性皮肤病、多形红斑和接触性皮炎、银屑病、肺的变应性疾病诸如嗜曙红细胞性肺炎、特发性肺纤维化和超敏感性肺炎、移植相关疾病包括移植物排斥和移植物抗宿主病。

[0108] 在系统性红斑狼疮中，疾病的主要介质是生成针对自身蛋白质 / 组织的自身反应性抗体及随后产生免疫介导的炎症。抗体或是直接或是间接介导组织损伤。尽管 T 淋巴细胞未显示出直接参与组织损伤，然而 T 淋巴细胞是产生自身反应性抗体所要求的。疾病的发生因此依赖 T 淋巴细胞。多个器官和系统在临床上受到影响，包括肾、肺、肌肉骨骼系统、粘膜皮肤、眼、中枢神经系统、心血管系统、胃肠道、骨髓和血液。

[0109] 类风湿性关节炎（RA）是一种慢性系统性自身免疫性炎性疾病，主要涉及多个关节的滑膜，由此导致对关节软骨的损伤。发病机制依赖 T 淋巴细胞，而且与类风湿因子，针对自身 IgG 的自身抗体的生成有关，由此导致免疫复合物的形成，其在关节液和血液中达到高水平。关节中的这些复合物可诱发显著的淋巴细胞和单核细胞浸润到滑膜中及随后显著的滑膜变化；关节腔 / 液受到类似细胞的浸润及添加许多嗜中性粒细胞。受影响的组织主要是关节，常常是对称样式。然而，关节外疾病也存在两种主要形式。一种形式是形成关节外损伤，伴有正在进行的渐进性关节病和肺纤维化、血管炎和皮肤溃疡的典型损伤。关节外疾病的第二种形式是所谓的费尔提氏（Felty）综合征，它发生在 RA 病程晚期，有时在关节病已经沉寂后，且涉及出现嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症和脾肿大。这可伴随着多个器官中的血管炎及梗塞、皮肤溃疡和坏疽的形成。患者还常常在受影响关节上面的皮下组织中形成类风湿性结节；晚期的结节具有由混合的炎性细胞浸润物包围的坏死中心。可在 RA 中出现的其它表现包括：心包炎、胸膜炎、冠状动脉炎、伴有肺纤维化的间质性肺炎、干燥性角膜结膜炎和类风湿性结节。

[0110] 幼年型慢性关节炎是一种慢性特发性炎性疾病，常常开始于 16 岁之前。其表型与 RA 有些相似；类风湿因子阳性的一些患者归入幼年型类风湿性关节炎。疾病细分为三种主要类别：少数关节的、多关节的和系统性的。关节炎可以是严重的，通常是破坏性的，并导致关节僵硬和生长迟缓。其它表现可包括慢性前葡萄膜炎和系统性淀粉样变。

[0111] 脊椎关节病是具有有一些普遍临床特征且普遍与 HLA-B27 基因产物表达有关的一组病症。这些病症包括：强直性脊柱炎、莱特尔氏（Reiter）综合征（反应性关节炎）、与炎性肠病有关的关节炎、与银屑病相关的脊椎炎、幼发型脊椎关节病及无差别（undifferentiated）脊椎关节病。区别性特征包括具有或没有脊椎炎的骶髂关节炎；炎性不对称关节炎；与 HLA-B27 有关（血清学上定义的 MHC I 型 HLA-B 基因座的等位基因）；眼的炎症；及与其它类风湿性疾病有关的自身抗体的缺乏。对于诱发疾病来说关键的最相关细胞是 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞，靶向由 MHC I 型分子呈递的抗原的细胞。CD8<sup>+</sup>T 细胞可与 MHC I 型等位基因 HLA-B27 反应，就像它是由 MHC I 型分子表达的外来肽。已有假设，HLA-B27 的表位可能模拟细菌或其它微生物的抗原性表位，如此诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞应答。

[0112] 系统性硬化（硬皮病）的病因学未知。疾病的特点是皮肤硬化；这可能是由活动性炎性过程诱导的。硬皮病可以是局部的或系统性的；血管损伤是普遍的，而且微血管系统中的内皮细胞损伤是系统性硬化形成中的早期且重要的事件；血管损伤可能由免疫介导。皮肤损伤中存在单个核细胞浸润物及在许多患者中存在抗核抗体暗示免疫学基础。ICAM-1

常常在皮肤损伤中成纤维细胞的细胞表面上调,提示 T 细胞与这些细胞相互作用可能在疾病的发病机理中起作用。牵涉的其它器官包括:胃肠道:平滑肌萎缩和纤维化,导致异常蠕动/运动;肾:同中心内皮下内膜增生,影响小弓形和叶间动脉,从而降低肾皮质血流,导致蛋白尿、氮血症和高血压;骨骼肌:萎缩、间质性纤维化;炎症;肺:间质性肺炎和间质性纤维化;及心:收缩带坏死、疤痕化/纤维化。

[0113] 特发性炎症肌病,包括皮肌炎、多肌炎和其它,是导致肌肉软弱的未知病因的慢性肌肉炎性病症。肌肉损伤/炎症常常是对称的和渐进的。自身抗体与大多数形式有关。这些肌炎特异性自身抗体针对并抑制参与蛋白质合成的成分、蛋白质和 RNA 的功能。

[0114] 斯耶格伦氏 (Sjögren) 综合征是由免疫介导的炎症及随后泪腺和唾液腺功能破坏引起的。该病可能与炎症结缔组织疾病有关或伴随着炎症结缔组织疾病。该病与针对 Ro 和 La 抗原的自身抗体生成有关,这两种抗原都是小 RNA-蛋白质复合物。损害导致干燥性角膜结膜炎、口干燥、及其它表现或关联,包括胆汁性肝硬化、外周或感觉神经病、和可触知的紫癜。

[0115] 系统性血管炎包括这样的疾病,其中原发性损伤是炎症,后续对血管的损伤导致由受影响血管供应的组织缺血/坏死/变性,且在有些情况中最终导致终端器官功能障碍。血管炎病还可作为其它免疫-炎症介导疾病诸如类风湿性关节炎、系统性硬化等的继发损伤或后遗症发生,特别是在也与免疫复合物形成有关的疾病中。原发性系统性血管炎组中的疾病包括:系统性坏死性血管炎:结节性多动脉炎、过敏性血管炎和肉芽肿病、多脉管炎;韦格纳氏 (Wegener) 肉芽肿病;淋巴瘤样肉芽肿病;和巨细胞性动脉炎。各种各样的血管炎病包括:粘膜与皮肤淋巴结综合征 (MLNS 或川崎氏 (Kawasaki) 病)、分离的 CNS 血管炎、贝切特氏 (Behet) 病、血栓闭塞性血管炎 (伯格氏 (Buerger) 病) 和皮肤坏死性小静脉炎。所列大多数类型的血管炎的发病机理认为主要是由于免疫球蛋白复合物在血管壁中沉积及随后经 ADCC、补体活化或者两者诱导的炎症应答。

[0116] 结节病是病因学未知,特征在于几乎机体任何组织中都存在上皮样肉芽肿的疾患;最常见的是牵涉肺。发病机理牵涉患病部位持续存在活化的巨噬细胞和淋巴样细胞及随后由这些细胞类型释放局部和系统性活性产物而导致的慢性后遗症。

[0117] 自身免疫性溶血性贫血,包括自身免疫性溶血性贫血、免疫性全血细胞减少症和阵发性夜间血红蛋白尿,是由于生成与红细胞 (在有些情况中还有其它血细胞,包括血小板) 表面表达的抗原反应的抗体的结果,是经补体介导的溶解和/或 ADCC/Fc 受体介导的机制清除那些抗体包被细胞的反映。

[0118] 在自身免疫性血小板减少症,包括血小板减少性紫癜,和其它临床背景中免疫介导的血小板减少症中,由于抗体或补体附着于血小板及随后经补体溶解、ADCC 或 Fc 受体介导的机制进行消除而发生血小板破坏/消除。

[0119] 甲状腺炎,包括格雷夫斯氏 (Graves) 病、桥本氏 (Hashimoto) 甲状腺炎、幼年型淋巴细胞性甲状腺炎和萎缩性甲状腺炎,是由于针对甲状腺抗原的自身免疫应答及产生与存在于甲状腺中且通常对甲状腺特异的蛋白质反应的抗体。现有的实验模型包括自发性模型:大鼠 (BUF 和 BB 大鼠) 和鸡 (肥胖鸡品系);诱导型模型:用甲状腺球蛋白、甲状腺微粒体抗原 (甲状腺过氧化物酶) 免疫动物。

[0120] I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病是胰岛  $\beta$  细胞的自身免疫性破坏;该破坏由自

身抗体和自身反应性 T 细胞介导。针对胰岛素或胰岛素受体的抗体也可产生胰岛素不响应的表型。

[0121] 免疫介导的肾病,包括肾小球肾炎和肾小管间质性肾炎,是由于抗体或 T 淋巴细胞介导的对肾组织的损伤,或是直接由于生成针对肾抗原的自身反应性抗体或 T 细胞,或是间接由于针对其它非肾抗原有反应性的抗体和 / 或免疫复合物在肾中沉积。如此,导致免疫复合物形成的其它免疫介导的疾病也可诱导免疫介导的肾病作为间接后遗症。直接和间接的免疫机制都导致炎症 应答,该应答在肾组织中产生 / 诱导损伤形成,导致器官功能受损,在有些情况中发展成肾衰竭。体液和细胞两种免疫机制都可参与损伤的发病机理。

[0122] 中枢和周围神经系统的脱髓鞘病,包括多发性硬化 ;特发性脱髓鞘多神经病或格 - 巴二氏 (Guillain-Barré) 综合征 ;和慢性炎性脱髓鞘多神经病,认为具有自身免疫基础,而且由于对少突胶质细胞或对髓磷脂直接造成损害而导致神经脱髓鞘。在 MS 中,有证据提示该病的诱导和进展依赖 T 淋巴细胞。多发性硬化是依赖 T 淋巴细胞的脱髓鞘病,而且具有复发 - 缓和过程或漫长的渐进过程。病因未知 ;然而,病毒感染、遗传素因、环境和自身免疫性都会起作用。损伤含有主要由 T 淋巴细胞介导的浸润物、小胶质细胞和浸润的巨噬细胞 ;CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞是损伤处的主要细胞类型。少突胶质细胞死亡和随后脱髓鞘的机理未知,但是可能是由 T 淋巴细胞驱动的。

[0123] 炎性和纤维化肺病,包括嗜曙红细胞性肺炎 ;特发性肺纤维化和超敏感性肺炎,可能涉及不受调控的免疫 - 炎症应答。抑制该应答会具有治疗益处。

[0124] 自身免疫或免疫介导的皮肤病,包括大疱性皮肤病、多形性红斑和接触性皮炎,由自身抗体介导,其发生依赖 T 淋巴细胞。

[0125] 银屑病是 T 淋巴细胞介导的炎症疾病。损伤含有 T 淋巴细胞、巨噬细胞和抗原加工细胞,及一些嗜中性粒细胞的浸润物。

[0126] 变应性疾病,包括哮喘 ;变应性鼻炎 ;特应性皮炎 ;食物超敏感性 ;和荨麻疹,依赖 T 淋巴细胞。这些疾病主要由 T 淋巴细胞诱导的炎症、IgE 介导的炎症或二者组合介导。

[0127] 移植相关疾病,包括移植物排斥和移植物抗宿主病 (GVHD),依赖 T 淋巴细胞 ;抑制 T 淋巴细胞功能具有改善作用。

[0128] 本发明的 C3b 拮抗剂诸如 C3b 抗体对于补体相关眼疾 (病理牵涉补体 (包括经典途径和旁路途径,特别是补体旁路途径)的所有眼疾和眼病)的预防和治疗也是有用的,诸如例如黄斑变性性疾病,诸如所有阶段的年龄相关黄斑变性 (AMD) (包括干性和湿性 (非渗出性和渗出性)形式),脉络膜新血管形成 (CNV),葡萄膜炎,糖尿病性和其它缺血相关视网膜病变,眼内炎,和其它眼内新血管疾病,诸如糖尿病性黄斑水肿,病理性近视, vonHippel-Lindau 病,眼的组织胞浆菌病,视网膜中央静脉阻塞 (CRVO),角膜新血管形成,和视网膜新血管形成。一组优选的补体相关眼疾包括年龄相关黄斑变性 (AMD) (包括渗出性 (湿性)和非渗出性 (干性或萎缩性)AMD)、脉络膜新血管形成 (CNV)、糖尿病性视网膜病变 (DR)、和眼内炎。

[0129] AMD,即年龄相关黄斑变性,是 60 岁以上个体中不可逆的视功能障碍的首要原因。有两类 AMD,即非渗出性 (干性)和渗出性 (湿性)AMD。干性或渗出性形式涉及中央视网膜 (黄斑)下面的视网膜色素上皮 (RPE) 的萎缩性和肥大性变化,以及 RPE 上的沉积物 (玻璃疣)。非渗出性 AMD 患者可发展成湿性或渗出性 AMD,其中称作脉络膜新血管膜 (CNVM) 的

异常血管在视网膜下面形成,渗漏液体和血液,并最终在视网膜中和在视网膜下引起失明性盘状瘢痕。非渗出性 AMD(通常是渗出性 AMD 的前身)更加常见。非渗出性 AMD 的表现有所不同;可存在硬玻璃疣、软玻璃疣、RPE 地理性萎缩、和色素聚团。补体成分在 AMD 早期在 RPE 上沉积,而且是玻璃疣的主要组分。

[0130] 本发明具体关注高危 (high risk)AMD 的治疗,包括第 3 类和第 4 类 AMD。第 3 类 AMD 的特征在于双眼都不存在晚期 AMD,至少一只眼具有 20/32 或更好的视力及至少一粒大的玻璃疣(例如 125  $\mu$ m)、广泛的(通过玻璃疣面积来测量)中间体玻璃疣、或不牵涉黄斑中心的地理性萎缩(GA)、或这些的任意组合。第 3 类 AMD(仍视为“干性”AMD)有高风险转化成脉络膜新血管形成(CNV)。

[0131] 第 4 类高危 AMD(分类为“湿性”AMD)的特征在于视力为 20/32 或更好及指标眼(index eye)中没有晚期 AMD(牵涉黄斑中心的 GA 或脉络膜新血管形成的特征)。对侧眼的特征在于晚期 AMD,或视力低于 20/32,这可归于 AMD 黄斑病变。典型的是,如果不治疗的话,高危 AMD 迅速进展成脉络膜新血管形成(CNV),其速率比第 1 类或第 2 类(非高危)AMD 的进展速率高大约 10-30 倍。

[0132] C3b 拮抗剂还可用于预防 AMD(特别是第 3 类或第 4 类 AMD)进展成 CNV,和/或在未受影响的或受影响较小的对侧眼中预防 AMD 或 CNV 的发生/进展。在此语境中,术语“预防”以最广义使用,包括完全或部分阻断和减缓疾病的进展,以及延迟疾病更严重形式的发作。处于发生或进展成高危(第 4 类)AMD 或 CMV 高风险的患者尤其受益于本发明的这个方面。

[0133] 已知补体因子 H(CFH)多态性与个体发生 AMD 和/或 CNV 的风险有关。CFH 中的突变能活化补体,继而可导致 AMD/CNV。最近有报告,补体因子 H(CFH)多态性占到 AMD 可归因风险的 50%(Klein et al., Science 308:385-9 (2005))。已经发现,CFH 中的一种常见单体型(HF1/CFH)使个体易患年龄相关黄斑变性(Hageman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(2):7227-7232 (2005))。已经将 AMD 分离成常染色体显性性状,疾病基因座定位至染色体 1q25-q31,在标志物 D1S466 与 D1S413 之间,最大优势对数计分(maximum lode score)为约 3.20(Klein et al., Arch Ophthalmol. 116(8):1082-9(1998);Majewski et al., Am. J. Hum. Genet. 73(3):540-50(2003);Seddon et al., Am. J. Hum. Genet. 73(4):780-90(2003);Weeks et al., Am. J. Ophthalmol. 132(5):682-92(2001);Iyengar et al., Am. J. Hum. Genet. 74(1):20-39(2004));染色体 2q3/2q32,在标志物 D12S1391 与 D2S1384 之间,最大优势对数计分为 2.32/2.03(Seddon et al., supra);3p13,在标志物 D12S1300 与 D12S1763 之间,最大优势对数计分为 2.19(Majewski et al., supra;Schick et al., Am. J. Hum. Genet. 72(6):1412-24(2003));6q14,在标志物 D6S1056 与 DS249 之间,最大优势对数计分为 3.59/3.17(Kniazeva et al., Am. J. Ophthalmol. 130(2):197-202(2000));9q33,在标志物 D9S934 处,最大优势对数计分为 2.06(Mejwski et al., supra);10q26,在标志物 D10S1230 处,最大优势对数计分为 3.06(Majewski et al., supra;Iyengar et al., supra;Kenealy et al., Mol. Vis. 10:57-61(2004));17q25,在标志物 D17S928 处,最大优势对数计分为 3.16(Weeks et al., supra);和 22q12,在标志物 D22S1045 处,最大优势对数计分为 2.0(Seddon et al., supra)。因而,遗传筛选是鉴定对于预防性治疗(包括预防疾病进展成更严重的形式,诸如从 AMD 进展成 CNV)而言是特别好的候选者的患者的一个重要

部分。

**[0134] C3b抗体的制备和选择**

**[0135]** 本发明包括识别 C3b 而非其无活性前体 C3 的抗体的生产和应用。产生抗体的示例性方法在以下章节中有更详细的描述。

**[0136]** 用衍生自哺乳动物物种的 C3b 多肽选出抗 C3b 抗体。所述多肽优选是人 C3b。然而,来自其它物种的 C3b 多肽,诸如小鼠 C3b,也可用作靶抗原。来自各种哺乳动物物种的 C3b 抗原可分离自天然来源。在其它实施方案中,抗原是重组生产的或者是利用本领域已知的其它合成方法而制备的。

**[0137]** 所选的抗体通常会具有足够强的针对 C3b 抗原的结合亲和力。例如,所述抗体结合人 C3b 的 Kd 值可不超过约 5nM,优选不超过约 2nM,而更优选不超过约 500pM。例如,抗体亲和力可由基于表面等离子共振的测定法(如 实施例所述的 BIAcore 测定法);酶联免疫吸附测定法(ELISA);和竞争测定法(如 RIA 的)来测定。

**[0138]** 而且,抗体可进行其它生物学活性测定法,如,用以评估其作为治疗剂的有效性。此类测定法是本领域已知的,而且依赖于靶抗原和抗体的预定用途。实例包括 HUVEC 抑制测定法(如下文实施例所述的);及下文关于鉴定选择性阻断旁路途径并在至少一种补体相关病症的预防和/或治疗中显示活性的抗体描述的体外和体内测定法。

**[0139]** 为了筛选结合感兴趣抗原上的特定表位的抗体,可进行常规的交叉阻断测定法,诸如如 Antibodis, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988)所述的。另外,可进行表位作图,例如如 Champe 等(1995) J. Biol. Chem. 270 :1388-1394 所述的,来确定抗体是否结合感兴趣表位。

**[0140]** 在一个优选的实施方案中,利用独特的噬菌体展示法来选择抗 C3b 抗体。该方法包括产生基于单个框架模板的合成抗体噬菌体文库,设计可变域内的足够的多样性,展示具有多样化可变域的多肽,并选择对靶 C3b 抗原具有高亲和力的候选抗体。对编码选择性阻断 C3b 而非 C3 的 C3b 特异性噬菌体的富集可通过例如用饱和量的 C3 封闭来实现,如下文实施例中所描述的。

**[0141]** 噬菌体展示方法的详情可在例如 2003 年 12 月 11 日公布的 W003/102157 中找到。

**[0142]** 在一个方面,抗体文库可通过在抗体可变域的至少一个 CDR 中突变溶剂可及的和/或高度多变的位置来产生。一些或所有 CDR 可用本文提供的方法来突变。在一些实施方案中,优选突变 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中的位置以形成单个文库或突变 CDRL3 和 CDRH3 中的位置以形成单个文库或突变 CDRL3 和 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中的位置以形成单个文库,由此产生多样的抗体文库。

**[0143]** 例如,可产生这样的抗体可变域文库,其在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 中溶剂可及的和/或高度多变的位置上有突变。可产生这样的另一种文库,其在 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3 中有突变。这些文库也可互相组合使用以产生具有期望亲和力的结合物。例如,在对重链文库进行一轮或多轮对靶抗原结合的选择后,可将轻链文库替换入重链结合物群中,用以在进一步轮次的选择中提高结合物的亲和力。

**[0144]** 文库优选通过用重链序列可变区 CDRH3 区中的变异氨基酸替代原始氨基酸来产生。所得文库可包含多种抗体序列,其中序列多样性主要位于重链序列的 CDRH3 区中。

**[0145]** 在一个方面,所述文库在人源化抗体 4D5 序列、或人源化抗体 4D5 序列的框架氨基

酸序列的背景中产生。所述文库优选通过用 DVK 密码子集编码的氨基酸至少替代重链残基 95-100a 来产生,其中 DVK 密码子集用于编码这些位置中每一个位置的变异氨基酸集。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的一个例子包含序列 (DVK)<sub>7</sub>。在一些实施方案中,文库通过用 DVK 和 NNK 两种密码子集编码的氨基酸替代残基 95-100a 来产生。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的一个例子包含序列 (DVK)<sub>6</sub>(NNK)。在另一个实施方案中,文库通过用 DVK 和 NNK 两种密码子集编码的氨基酸替代残基 95-100a 来产生。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的一个例子包含序列 (DVK)<sub>5</sub>(NNK)。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的另一个例子包含序列 (NNK)<sub>6</sub>。根据本文所述标准,本领域技术人员能确定合适寡核苷酸序列的其它例子。

[0146] 在另一个实施方案中,利用不同的 CDRH3 设计来分离高亲和力结合物和分离针对各种表位的结合物。该文库中产生的 CDRH3 的长度范围是 11 至 13 个氨基酸,尽管也可产生不同于此的长度。通过使用 NNK、DVK 和 NVK 密码子集能拓展 H3 多样性,以及在 N 和 / 或 C- 末端处的较有限的多样性。

[0147] CDRH1 和 CDRH2 中也可产生多样性。CDR-H1 和 H2 多样性的设计遵循目标为模拟所述带有如下修饰的天然抗体全集的策略,所述修饰使多样性较前述设计更紧密地与天然多样性相匹配。

[0148] 对于 CDRH3 中的样性,可分开构建多个文库,它们具有不同长度的 H3,然后组合起来以选择针对靶抗原的结合物。合并多个文库并用前述和本文下述的固体支持物选择和溶液分选法来选择。可采用多种分选策略。例如,一种变化涉及在结合至固相的靶物上分选,接着分选可能在融合多肽上存在的标签(例如抗 gD 标签),接着再一次在结合至固相的靶物上分选。或者,文库可首先在结合至固相表面的靶物上选择,然后用靶抗原浓度逐渐减低的溶液相结合来分选所洗脱的结合物。利用不同分选方法的组合能实现最低限度地只选择高度表达的序列并能实现选择许多不同的高亲和力克隆。

[0149] 针对靶 C3b 抗原的高亲和力结合物可自文库分离。限制 H1/H2 区中的多样性将简并性降低约  $10^4$  至  $10^5$  倍,而且允许更多 H3 多样性能得到更多高亲和力结合物。利用在 CDRH3 中具有不同类型多样性(例如利用 DVK 或 NVT)的文库能实现分离可与靶抗原的不同表位结合的结合物。

[0150] 在另一个实施方案中,产生在 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3 区中具有多样性的一个或多个文库。在该实施方案中,用各种长度的 H3 区并主要用密码子集 XYZ 和 NNK 或 NNS 来产生 CDRH3 中的多样性。用各寡核苷酸形成文库并合并,或者合并寡核苷酸来形成文库子集。该实施方案的文库可针对结合至固相的靶物进行分选。分离自多次分选的克隆可利用 ELISA 测定法来筛选特异性和亲和力。对于特异性,克隆可以针对期望靶抗原以及其它非靶抗原进行筛选。然后,在溶液结合竞争 ELISA 测定法或点竞争测定法中对那些针对靶 C3b 抗原的结合物筛选亲和力。可以用如上所述制备的 XYZ 密码子集自文库分离高亲和力结合物。可容易地在细胞培养中以高产率将这些结合物制备成抗体或抗原结合片段。

[0151] 在一些实施方案中,可能希望产生在 CDRH3 区长度方面具有更大多样性的文库。例如,可能希望产生 CDRH3 区的范围为约 7 至 19 个氨基酸的文库。

[0152] 自这些实施方案的文库分离的高亲和力结合物可容易地在细菌和真核细胞培养中以高产率产生。可设计载体以容易地去除如下序列诸如 gD 标签、病毒外壳蛋白成分序

列,和 / 或添加恒定区序列来实现高产率地产生全长抗体或抗原结合片段。

[0153] 可以将 CDRH3 中有突变的文库与包含变异型式的其它 CDR (例如 CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1 和 / 或 CDRH2) 的文库组合。如此,例如,在一个实施方案中,将 CDRH3 文库与 CDRL3 文库组合,所述 CDRL3 文库用预先确定的密码子集在第 28、29、30、31、和 / 或 32 位有变异氨基酸的人源化 4D5 抗体序列的背景中产生。在另一个实施方案中,将 CDRH3 有突变的文库与包含变异 CDRH1 和 / 或 CDRH2 重链可变域的文库组合。在一个实施方案中,CDRH1 文库用第 28、30、31、32 和 33 位有变异氨基酸的人源化抗体 4D5 序列产生。CDRH2 文库可用预先确定的密码子集用第 50、52、53、54、56 和 58 位有变异氨基酸的人源化抗体 4D5 序列产生。

[0154] 可进一步修饰自噬菌体文库产生的抗 C3b 抗体以产生抗体突变体,所述突变体具有比亲本抗体改善了的物理、化学和 / 或生物学特性。若所使用的测定法是生物学活性测定法,则优选抗体突变体在所选测定法中的生物学活性比亲本抗体在该测定法中的生物学活性好至少约 10 倍,优选好至少约 20 倍,更优选好至少约 50 倍,有时好至少约 100 倍或 200 倍。例如,优选抗 C3b 抗体突变体针对 C3b 的结合亲和力比亲本抗 C3b 抗体 (诸如抗体 S77) 的结合亲和力强至少约 10 倍,优选强至少约 20 倍,更优选强至少约 50 倍,有时强至少约 100 倍或 200 倍。

[0155] 为了产生抗体突变体,将一处或多处氨基酸改变 (例如替代) 引入亲本抗体的一个或多个高变区。或者 / 另外,可将框架区残基的一处或多处改变 (例如替代) 引入亲本抗体,这些改变导致抗体突变体针对来自第二哺乳动物物种的抗原的结合亲和力有所改善。要修饰的框架区残基的实例包括那些直接非共价结合抗原的 (Amit 等 (1986) Science 233 :747-753) ;与 CDR 相互作用的 / 影响 CDR 构象的 (Chothia 等 (1987) J. Mol. Biol. 196 :901-917) ;和 / 或参与  $V_L$ - $V_H$  界面的 (EP 239 400B1)。在某些实施方案中,对一个或多个此类框架区残基的修饰导致抗体针对来自第二哺乳动物物种的抗原的结合亲和力有所增强。例如,在本发明的该实施方案中,可改变约 1 个至约 5 个框架残基。有时,这足以产生适合在临床前试验中使用的抗体突变体,甚至其中没有高变区残基被改变。然而,通常,抗体突变体会包含别的高变区改变。

[0156] 所改变的高变区残基可以是随机改变的,尤其是在亲本抗体的起始结合亲和力使得此类随机产生的抗体突变体能被容易地筛选出来的情况中。

[0157] 用于生成此类抗体突变体的一种有用方法称作“丙氨酸扫描诱变” (Cunningham and Wells (1989) Science 244 :1081-1085)。这里,一个或多个高变区残基用丙氨酸或多丙氨酸残基替代,以影响氨基酸与来自第二哺乳动物物种的抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它突变,推敲那些对替代展现出功能敏感性的高变区残基。如此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。如本文所述对如此生成的丙氨酸突变体筛选它们的生物学活性。

[0158] 通常,从保守替代诸如下文显示在标题“优选替代”下的那些开始。如果此类替代导致生物学活性 (例如结合亲和力) 的改变,那么可以引入下表中称为“例示替代”的更实质性改变,或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述,并筛选产物。下表中列出了优选的替代。

[0159]

| 原始残基    | 例示替代          | 优选替代 |
|---------|---------------|------|
| Ala (A) | val; leu; ile | val  |
| Arg (R) | lys; gln; asn | lys  |

[0160]

|         |                               |     |
|---------|-------------------------------|-----|
| Asn (N) | gln; his; lys; arg            | gln |
| Asp (D) | glu                           | glu |
| Cys (C) | ser                           | ser |
| Gln (Q) | asn                           | asn |
| Glu (E) | asp                           | asp |
| Gly (G) | pro; ala                      | ala |
| His (H) | asn; gln; lys; arg            | arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸 | leu |
| Leu (L) | 正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn                 | arg |
| Met (M) | leu; phe; ile                 | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr       | leu |
| Pro (P) | ala                           | ala |
| Ser (S) | thr                           | thr |
| Thr (T) | ser                           | ser |
| Trp (W) | tyr; phe                      | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser            | phe |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸 | leu |

[0161] 对抗体生物学特性的甚至更实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来实现：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。基于共同的侧链特性，将天然存在残基如下分组：

[0162] (1) 疏水性的：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；

[0163] (2) 中性、亲水性的：cys、ser、thr、asn、gln；

[0164] (3) 酸性的：asp、glu；

[0165] (4) 碱性的：his、lys、arg；

[0166] (5) 影响链取向的残基：gly、pro；及

[0167] (6) 芳香族的 :trp、tyr、phe。

[0168] 非保守替代会需要用这些类别之一的一个成员替换另一个类别的。

[0169] 在另一个实施方案中,利用噬菌体展示(见上),对为修饰而选择的位点进行亲和力和成熟。

[0170] 编码氨基酸序列突变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于对早先制备的突变或非突变型式的亲本抗体的寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变、和盒式诱变。制备突变体的优选方法是定点诱变(参见例如 Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :488)。

[0171] 在某些实施方案中,抗体突变体仅有单个高变区残基被替代。在其它实施方案中,有亲本抗体的两个或更多个高变区残基被替代,例如约 2 个至约 10 个高变区替代。

[0172] 通常,生物学特性得到改善的抗体突变体所具有的氨基酸序列与亲本抗体重链或轻链任一可变域的氨基酸序列有至少 75%,更优选至少 80%,更优选至少 85%,更优选至少 90%,和最优选至少 95%的氨基酸序列同一性或相似性。关于此序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,候选序列中与亲本抗体残基相同(即相同残基)或相似(即根据共同侧链特性来自同一组的氨基酸残基,见上文)的氨基酸残基的百分比。N-末端、C-末端、或内部的延伸、删除、或插入可变量以外的抗体序列都不应视为影响序列同一性或相似性。

[0173] 产生抗体突变体后,测定该分子相对于亲本抗体的生物学活性。如上所示,这可包括测定抗体的结合亲和力和/或其它生物学活性。在本发明的一个优选实施方案中,制备一组抗体突变体并筛选针对抗原(诸如 C3b 或其片段)的结合亲和力。任选将该初始筛选中选出的一个或多个抗体突变体进行一种或多种其它生物学活性测定法以确证结合亲和力增强的抗体突变体是真正有用的,例如可用于临床前研究。

[0174] 这样选出的抗体突变体可进一步修饰,这常常取决于抗体的预期用途。此类修饰可包括进一步改变氨基酸序列,融合异源多肽和/或共价修饰,诸如下文所详述的那些。对于氨基酸序列改变,示例性的修饰上文有详述。例如,也可替代任何不涉及保持抗体突变体正确构象的半胱氨酸残基,一般替代为丝氨酸,用以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是在抗体是抗体片段,诸如 Fv 片段时)。另一类氨基酸突变体具有改变的糖基化样式。这可通过删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块和/或增加不存在于抗体中的一个或多个糖基化位点来实现。抗体糖基化通常是 N-连接的或 O-连接的。N-连接的指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中 X 是除了脯氨酸之外的任何氨基酸,是碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中存在这些三肽序列之任一产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖之一附着于羟基氨基酸(最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸)。在抗体上增加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使之包含一个或多个上述的三肽序列来方便地实现(用于 N-连接的糖基化位点)。也可在原始抗体序列中通过添加、或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来产生改变(用于 O-连接的糖基化位点)。

[0175] 下文实施例中提供了通过噬菌体展示进行的 C3b 抗体制备、选择、富集和亲和力成熟的进一步详情。

### [0176] C3b抗体的重组生产

[0177] 本发明的抗 C3b 抗体可使用易于得到的技术和材料而重组生产。

[0178] 为了重组生产抗 C3b 抗体,分离编码它的核酸,并插入可复制载体,用于进一步克隆(DNA 扩增)或表达。编码抗体的 DNA 易于使用常规规程分离或合成(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的 DNA 特异性结合的寡核苷酸探针)。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一项或多项:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

#### [0179] (1) 信号序列构件

[0180] 本发明的抗体不仅可以直接重组生产,而且可以作为与异源多肽的融合多肽而重组生产,所述异源多肽优选是成熟蛋白质或多肽的 N-末端处的信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。所选择的异源信号序列优选是受到宿主细胞识别并加工(即受到信号肽酶切割)的。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,所述信号序列用例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定肠毒素 II 前导序列的原核信号序列取代。为了酵母分泌,天然信号序列可以用例如酵母转化酶前导序列、 $\alpha$  因子前导序列(包括糖酵母属和克鲁维氏酵母属  $\alpha$  因子前导序列)、酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列、或 WO 90/13646 中记载的信号取代。在哺乳动物细胞表达中,可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导,例如单纯疱疹 gD 信号。将此类前体区(precursor region)的 DNA 以符合读码框的方式与编码抗体的 DNA 连接。

#### [0181] (2) 复制起点构件

[0182] 表达和克隆载体都包含使载体能够在一种或多种所选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,这种序列是使载体能够不依赖于宿主染色体 DNA 而复制的序列,包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母和病毒的此类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2  $\mu$  质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件(SV40 起点的使用通常可能只是因为它包含早期启动子)。

#### [0183] (3) 选择基因构件

[0184] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其它毒素的抗性,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素;(b) 补足营养缺陷型的缺陷;或(c) 提供不能自复合培养基获得的必需营养物,例如用于芽孢杆菌的编码 D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0185] 选择方案的一个例子利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,如此幸免于选择方案。此类显性选择的例子使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0186] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是那些能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志,诸如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 -I 和 -II(优选灵长类金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0187] 例如,首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR 的一种竞争性拮抗剂)的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时,适宜的

宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0188] 或者,可以通过细胞在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素或 G418 的培养基中的生长来选择经编码抗体、野生型 DHFR 蛋白质、和另一种选择标志诸如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 (APH) 的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞 (特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主)。参阅美国专利 No. 4, 965, 199。

[0189] 适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因 (Stinchcomb et al. (1979) Nature 282 :39)。trp1 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如 ATCC No. 44076 或 PEP4-1 提供了选择标志。Jones (1977) Genetics 85 :12。酵母宿主细胞基因组中存在 trp1 损伤随之提供了用于通过在缺少色氨酸时的生长来检测转化的有效环境。类似的,用携带 Leu2 基因的已知质粒补足 Leu2 缺陷型酵母菌株 (ATCC 20, 622 或 38, 626)。

[0190] 此外,衍生自 1.6  $\mu$ m 环状质粒 pKD1 的载体可用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者,报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg (1990) Bio/Technology 8 :135。还披露了用于由克鲁维氏酵母属的工业用菌株分泌成熟重组人血清清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer et al. (1991) Bio/Technology 9 : 968-975。

[0191] (4) 启动子构件

[0192] 表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子,而且它与抗体核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括 phoA 启动子、 $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸 (trp) 启动子系统、和杂合启动子诸如 tac 启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还会包含与编码抗体的 DNA 可操作连接的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0193] 已知真核细胞的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含 AT 区,它位于起始转录的位点上游大约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处找到的另一种序列是 CNCAAT 区,其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 端是 AATAAA 序列,它可能是向编码序列的 3' 端添加聚腺苷酸尾的信号。将所有这些序列合适的插入真核表达载体。

[0194] 适用于酵母宿主的启动序列的例子包括 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0195] 作为具有通过生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于 EP 73, 657。酵母增强子也可以有利的与酵母启动子一起使用。

[0196] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗体受到例如从病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒 (诸如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最优选的猿病毒 40 (SV40) 基因组,从异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,及从热休克启动子获得的启动子的控制,倘若此类启动子与宿主细胞

系统相容的话。

[0197] 方便的以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含 SV40 病毒复制起点。方便的以 HindIII 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利 No. 4, 419, 446 中披露了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 No. 4, 601, 978 中记载了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人  $\beta$ -干扰素 cDNA 还可参见 Reyes et al. (1982) Nature 297 :598-601。或者,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0198] (5) 增强子元件构件

[0199] 常常通过将增强子序列插入载体来提高高等真核细胞对编码本发明抗体的 DNA 的转录。现在知道来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常会使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括 SV40 复制起点晚期一侧的增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见 Yaniv (1982) Nature 297 :17-18。可以将增强子剪接到载体中,位于抗体编码序列的 5' 或 3' 位置,但是优选位于启动子的 5' 位点。

[0200] (6) 转录终止构件

[0201] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还会包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' 端和偶尔的 3' 端非翻译区获得。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见 WO 94/11026 及其中披露的表达载体。

[0202] (7) 宿主细胞的选择和转化

[0203] 适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核生物细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属(*Escherichia*)例如大肠埃希氏菌/大肠杆菌(*E. coli*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)诸如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)(例如 1989 年 4 月 12 日公布的 DD 266, 710 中披露的地衣芽孢杆菌 41P)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)诸如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC31, 446),尽管其它菌株诸如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 W3110(ATCC 27, 325)也是合适的。这些例子是例示性的,而不是限制性的。

[0204] 在原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。啤酒糖酵母/酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常用的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而,通常可获得许多其它属、种和菌株且可用于本发明,诸如粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵

母属 (*Kluyveromyces*) 宿主, 诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*) ; 亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402, 226) ; 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP183, 070) ; 假丝酵母属 (*Candida*) ; 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244, 234) ; 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) ; 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*), 诸如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) ; 和丝状真菌, 诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0205] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞, 它们来自诸如草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (毛虫)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (蚊子)、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (蚊子)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (果蝇) 和家蚕 *Bombyx mori* 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染, 例如苜蓿尺蠖 *Autographa californica* NPV 的 L-1 变体和家蚕 *Bombyx mori* NPV 的 Bm-5 株, 而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒, 特别是用于转染草地夜蛾细胞。还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0206] 然而, 脊椎动物细胞得到最多关注, 而且培养 (组织培养) 中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规规程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; 人胚肾系 (293 或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的 293 细胞, Graham et al. (1977) J. Gen Virol. 36 :59) ; 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10) ; 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216) ; 小鼠塞托利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23 :243-251) ; 猴肾细胞 (CV1, ATCC CCL 70) ; 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ; 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ; 牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75) ; 人肝细胞 (Hep G2, HB8065) ; 小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51) ; TRI 细胞 (Mather et al. (1982) Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68 ; MRC5 细胞 ; FS4 细胞 ; 和人肝瘤系 (Hep G2)。

[0207] 用上文所述用于生产抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0208] (8) 培养宿主细胞

[0209] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏改良的 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外, 可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基 : Ham et al. (1979) Meth. Enz. 58 :44 ; Barnes et al. (1980) Anal. Biochem. 102 :255 ; 美国专利 No. 4, 767, 704 ; 4, 657, 866 ; 4, 927, 762 ; 4, 560, 655 ; 或 5, 122, 469 ; WO 90/03430 ; WO 87/00195 ; 或美国专利 Re. 30, 985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和 / 或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因

子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如 HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适宜浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件,诸如温度、pH 等,就是先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显而易见的。

#### [0210] (9) 抗体的纯化

[0211] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤除去宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167 记载了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的规程。简单的说,在存在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 时使细胞糊融化约 30 分钟。可通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么一般首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0212] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化自细胞制备的抗体组合物,优选的纯化技术是亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$  或  $\gamma 4$  重链的抗体 (Lindmark et al. (1983), J. Immunol. Meth. 62:1-13)。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人  $\gamma 3$  (Guss et al. (1986) EMB J. 5:1567-1575)。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含 CH3 结构域,则可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0213] 在任何预备性纯化步骤后,包含感兴趣抗体和污染物的混合物可进行低 pH 疏水相互作用层析,使用 pH 大约 2.5-4.5 之间的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度进行(例如大约 0-0.25M 盐)。

#### [0214] 用于鉴定 C3b 抗体和其它 C3b 拮抗剂的筛选测定法和动物模型

[0215] 可以在多种基于体外和体内测定法中对 C3b 抗体和其它 C3b 拮抗剂评估它们选择性抑制旁路补体途径及预防和治疗补体相关病症的能力。

[0216] 实施例描述了体外测定法,诸如结合测定法和竞争性结合测定法、溶血测定法。

[0217] 可以在有关动物模型中测试本文中 C3b 拮抗剂诸如 C3b 抗体的体内治疗活性。如此,例如,重组(转基因)动物模型可使用用于生成转基因动物的标准技术通过将感兴趣基因的编码部分导入感兴趣动物的基因组来改造。可充当转基因操作对象的动物包括但不限于小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、绵羊、山羊、猪和非人灵长类,例如狒狒、黑猩猩和其它猴。本领域已知的用于将转基因导入此类动物中的技术包括原核显微注射 (pronucleic microinjection) (Hoppe 和 Wanger, 美国专利 No. 4,873,191); 逆转录病毒介导的基因转移进入种系中(例如 Van der Putten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 (1985));

胚胎干细胞中的基因寻靶 (Thompson 等, Cell, 56 :313-321(1989)) ; 胚胎电穿孔 (Lo, Mol. Cel. Biol., 3 :1803-1814(1983)) ; 精子介导的基因转移 (Lavitrano 等, Cell, 57 :717-73(1989))。综述参见例如美国专利 No. 4, 736, 866。

[0218] 为了本发明的目的, 转基因动物包括那些只在其部分细胞中携带转基因的动物 (“镶嵌动物”)。转基因可作为单一转基因或者串联物例如头-头或头-尾串联物整合。通过遵循例如 Lasko 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :6232-636(1992) 的技术, 还可能将转基因选择性导入特定细胞类型中。

[0219] 转基因在转基因动物中的表达可通过标准技术来监测。例如, Southern 印迹分析或 PCR 扩增可用于验证转基因的整合。然后可使用诸如原位杂交、Northern 印迹分析、PCR、或免疫细胞化学的技术分析 mRNA 表达水平。

[0220] 动物可进一步检验免疫病病理学的征候, 例如通过组织学检验以测定免疫细胞进入特定组织中的浸润。

[0221] 重组 (转基因) 动物模型可使用用于生成转基因动物的标准技术通过将感兴趣基因的编码部分导入感兴趣动物的基因组来改造。可充当转基因操作对象的动物包括但不限于小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、绵羊、山羊、猪和非人灵长类, 例如狒狒、黑猩猩和其它猴。本领域已知的用于将转基因导入此类动物中的技术包括原核显微注射 (pronucleic microinjection) (Hoppe 和 Wanger, 美国专利 No. 4, 873, 191) ; 逆转录病毒介导的基因转移进入种系中 (例如 Vander Putten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :6148-615(1985)) ; 胚胎干细胞中的基因寻靶 (Thompson 等, Cell, 56 :313-321(1989)) ; 胚胎电穿孔 (Lo, Mol. Cel. Biol., 3 :1803-1814(1983)) ; 精子介导的基因转移 (Lavitrano 等, Cell, 57 :717-73(1989))。综述参见例如美国专利 No. 4, 736, 866。

[0222] 在预防和 / 或治疗关节炎中的功效可在例如胶原诱发的关节炎模型 (Terato et al. Brit. J. Rheum. 35 :828-838(1966)) 中评估。潜在的关节炎预防剂 / 治疗剂还可在通过静脉内注射四种单克隆抗体的混合物诱发的抗体介导的关节炎模型中筛选, 如 Terato et al., J. Immunol. 148 :2103-8(1992) ; 及 Terato et al., Autoimmunity 22 :137-47(1995) 所述。用于预防和 / 或治疗关节炎的候选物还可在转基因动物模型中研究, 诸如例如 TNF- $\alpha$  转基因小鼠 (Taconic)。这些动物表达人肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ), 一种已经与人的类风湿性关节炎发病机制联系起来的细胞因子。TNF- $\alpha$  在这些小鼠中的表达导致前爪和后爪的严重慢性关节炎, 提供了简单的炎性关节炎小鼠模型。

[0223] 最近几年, 还已开发出银屑病动物模型。如此, 无皮脂 (Asebia) (ab)、皮肤薄且易剥落 (fsn)、和慢性增殖性皮炎 (cpd) 是具有银屑病样皮肤改变的自发性小鼠突变。皮肤过表达细胞因子, 诸如干扰素- $\gamma$ 、白介素-1 $\alpha$ 、角质形成细胞生长因子、转化生长因子- $\alpha$ 、干扰素-6、血管内皮生长因子或骨形态发生蛋白-6 的转基因小鼠也可用于在体内研究银屑病和鉴定治疗银屑病的治疗剂。银屑病样损伤还描述于与 PL/J 品系回交的  $\beta$ 2- 整联蛋白亚效等位基因小鼠和  $\beta$ 1- 整联蛋白转基因小鼠、用 CD4<sup>+</sup>/CD45RB<sup>hi</sup>T 淋巴细胞重建的 scid/scid 小鼠、以及 HLA-B27/h $\beta$ 2m 转基因大鼠。还知道使用人皮肤移植到免疫缺陷小鼠上的异种移植模型。如此, 本发明的抗体和其它 C3b 拮抗剂可在 Schon, M. P. et al., Nat. Med. 3 :183(1997) 所述 scid/scid 小鼠模型中测试, 其中小鼠展示与银屑病类似的组织病理学皮肤损伤。另一种合适的模型是如 Nickoloff, B. J. et al., Am. J. Path. 146 :

580(1995) 所述制备的人皮肤/scid小鼠嵌合物。更多详情参见例如 Schon, M. P., J Invest Dermatology 112:405-410(1999)。

[0224] 已经记载了一种哮喘模型,其中通过用卵清蛋白使动物致敏,然后用通过气雾剂投递的相同蛋白质攻击动物而诱导抗原诱发的气道高反应性、肺嗜 曙红细胞增多和炎症。数种动物模型(豚鼠、大鼠、非人灵长类)在用气雾剂抗原攻击后显示与人的特应性哮喘相似的症状。小鼠模型具有人哮喘的许多特征。测试 CRIg 和 CRIg 激动剂在治疗哮喘中的活性和效力的合适规程记载于 Wolyniec, W. W. 等, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 18: 777(1998) 及其引用的参考文献。

[0225] 接触超敏感性是细胞介导的免疫功能的一种简单的体内测定法。在此规程中,使表皮细胞暴露于外源半抗原,它引起迟发型超敏感性反应,对此测量和定量。接触敏感性牵涉初始敏化阶段,随后是引发阶段。引发阶段在表皮细胞遭遇它们先前已经接触过的抗原时发生。发生肿胀和炎症,使之成为人过敏性接触性皮炎的卓越模型。一种合适的规程详细记载于《Current Protocols in Immunology》, J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, 和 W. Strober 编, John Wiley & Sons, Inc., 单元 4.2(1994)。还可参见 Grabbe, S. 和 Schwarz, T, Immun. Today, 19(1):37-44(1998)。

[0226] 移植物抗宿主病在将有免疫能力的细胞移植到免疫抑制或耐受患者中时发生。供体细胞识别并应答宿主抗原。应答可从危及生命的严重炎症至腹泻和体重减轻的轻微病例变化。移植物抗宿主病模型提供了评估针对 MHC 抗原和次要移植物抗原的 T 细胞反应性的手段。一种合适的规程详细记载于《Current Protocols in Immunology》, 见上文, 单元 4.3。

[0227] 皮肤同种异体移植物排斥的动物模型是测试 T 细胞介导体内组织破坏的手段,这是 T 细胞在抗病毒和抗肿瘤免疫中的作用的指标和测量方法。最常用的和公认的模型使用鼠尾部皮肤移植物。重复实验显示了皮肤同种异体移植物排斥是由 T 细胞、辅助 T 细胞和杀伤-效应 T 细胞而非抗体介导的。Auchincloss, H. Jr. 和 Sachs, D. H., 《Fundamental Immunology》, 第 2 版, W. E. Paul 编, Raven Press, NY, 1989, 889-992。一种合适的规程详细记载于《Current Protocols in Immunology》, 见上文, 单元 4.4。可用于测试 CRIg 和 CRIg 激动剂的其它移植物排斥模型有同种异基因心脏移植物模型, 记载于 Tanabe, M. 等, Transplantation, 58:23(1994) 及 Tinubu, S. A. 等, J. Immunol., 4330-4338(1994)。

[0228] 迟发型超敏感性的动物模型同样提供了细胞介导的免疫功能的测定法。迟发型超敏感性反应是 T 细胞介导的体内免疫应答,特征为在抗原攻击后一段时间流逝后才达到峰值的炎症。这些反应也在组织特异性自身免疫病中发生,诸如多发性硬化(MS)和实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE, MS 的一种模型)。一种合适的规程详细记载于《Current Protocols in Immunology》, 见上文, 单元 4.5。

[0229] EAE 是 T 细胞介导的自身免疫病,特征为 T 细胞和单个核细胞炎症和随后中枢神经系统中轴突的脱髓鞘。EAE 通常认为是人 MS 的相关动物模型。Bolton, C., Multiple Sclerosis, 1:143(1995)。急性的和复发-缓和型的这两种模型都已开发。CRIg 及其激动剂和拮抗剂可针对免疫介导的脱髓鞘病测试 T 细胞刺激性或抑制性活性,使用《Current Protocols in Immunology》, 见上文, 单元 15.1 和 15.2 中所述方案。还可参见髓磷脂疾病的模型,其中将少突胶质细胞或施旺(Schwann)细胞移植到中枢神经系统中,如 Duncan,

I. D. 等, *Molec. Med. Today*, 554-561 (1997) 所述。

[0230] 心肌缺血-再灌注的模型可在小鼠或大鼠中进行。将动物切开气管并用小型动物通风机换气。将聚乙烯导管置于颈内动脉和颈外静脉中供测量平均动脉血压。通过用 6-0 缝合线结扎左前降支动脉 (LAD) 来启动心肌缺血再灌注。缺血是通过扎紧围绕 LAD 的可逆结扎以完全闭塞血管而产生的。30 分钟后除去结扎, 并对心灌注 4 小时。CRIg 和 CRIg 激动剂的功效可通过测量心脏梗塞大小、心肌氨基酸激酶活性、髓过氧化物酶活性和使用抗 C3 抗体的免疫组织化学来测试。

[0231] 糖尿病性视网膜病变的一种模型牵涉用链唑霉素 (streptozotocin) 处理小鼠或大鼠。可对 CRIg 和 CRIg 激动剂测试它们对视网膜和玻璃体腔微静脉膨胀 (venule dilatation)、视网膜内微血管异常和新血管形成的影响。

[0232] 膜性增生性肾小球肾炎的一种模型可如下确立: 将雌性小鼠 i. p. 免疫 CFA 中的 0.5mg 对照家兔 IgG (第 -7 天)。七天后 (第 0 天), 经尾静脉 i. v. 注射 1mg 家兔抗小鼠肾小球基底膜 (GBM) 抗体。通过 ELISA 测量抗家兔 IgG 抗体在血清中的升高。自代谢笼中的小鼠收集 24 小时尿样, 并通过在血液尿素氮之外测量尿蛋白来评估小鼠肾功能。

[0233] 年龄相关黄斑变性 (AMD) 的动物模型由在 Ccl-2 或 Ccr-2 基因中具有无效突变的小鼠组成。这些小鼠形成 AMD 的主要特征, 包括视网膜色素上皮 (RPE) 中脂褐素的积累和视网膜色素上皮 (RPE) 下玻璃疣、光感受器萎缩和脉络膜新血管形成 (CNV)。这些特征在 6 月龄后形成。可以对 CRIg 和 CRIg 拮抗剂测试玻璃疣形成、光感受器萎缩和脉络膜新血管形成。

[0234] CNV 可在激光诱发的脉络膜新血管形成的多种模型中测试。如此, 例如, 可在大鼠和猕猴中通过导致脉络膜新血管形成的强烈激光光凝固而诱导 CNV。此状况的进展和治疗可例如通过荧光素血管造影术, 组织病理学和免疫组织化学评估, 及治疗前和治疗后以不同时间间隔自动物采集的血清的药动学、溶血、抗体筛选和补体活化测定法来评估。预防性施用的功效可通过类似方法来监测, 包括通过荧光素血管造影术监测血管渗漏、激光烧伤部位对补体沉积的抑制、眼检查、眼摄影术、收集玻璃体和视网膜组织、等等。下文实施例提供了更多详情。

#### [0235] 治疗方法

[0236] 为了预防、治疗或降低补体相关病症的严重程度, 本发明化合物的适宜剂量会取决于如上定义的待治疗病症的类型、病症的严重程度和进程、药剂是为了预防还是治疗目的施用的、先前的疗法、患者的临床史和对化合物的响应、及主治医师的判断。一次性或通过一系列治疗将化合物合适地施用于患者。优选的是, 希望在人体测试前首先在体外, 然后在有用的动物模型中测定本发明药物组合物的剂量-响应曲线。

[0237] 例如, 根据疾病的类型和严重程度, 施用于患者的初始候选剂量是约  $1 \mu\text{g/kg}$  至  $15\text{mg/kg}$  (例如  $0.1\text{--}20\text{mg/kg}$ ) 抗 C3b 抗体或其它 C3b 拮抗剂, 例如或是通过一次或多次分开施药或是通过连续输注。根据上述因素, 典型日剂量的范围可以是约  $1 \mu\text{g/kg}$  至  $100\text{mg/kg}$  或更多。对于持续数天或更长的重复施药, 根据状况, 持续治疗直至疾病症状发生期望的抑制。然而, 其它剂量方案也可能是有用的。这种疗法的进程易于通过常规技术和测定法来监测。

[0238] 补体相关眼疾, 诸如 AMD 或 CNV 的治疗功效可以通过评估眼内疾病时常用的多种

终点来测量。例如,可评估视觉损失。视觉损失可通过但不限于例如下述各项来测量:测量最好矫正视力/视敏度(BCVA)自基线到预期时间点的均值变化(例如其中 BCVA 基于早期治疗糖尿病性视网膜病变研究(ETDRS)视力表和测试距离 4 米的评估);测量在预期时间点与基线相比视力损失小于 15 个字母的受试者比例;测量在预期时间点与基线相比视力获得超过或等于 15 个字母的受试者比例;测量在预期时间点 Snellen 视力相当于 20/2000 或更差的受试者比例;测量 NEI 视觉功能问卷(Visual Functioning Questionnaire);测量预期时间点 CNV 的大小和 CNV 渗漏的量,例如通过荧光素血管造影术评估;等。眼部评估可通过下述各项来进行,例如包括但不限于例如实施眼部检查,测量眼内压,评估视力(visual acuity),测量裂隙灯压,评估眼内炎症,等。

**[0239] 药物组合物**

**[0240]** 可以以药物组合物的形式施用本发明的 C3b 抗体和其它 C3b 拮抗剂来治疗补体相关病症。

**[0241]** 通过将具有期望纯度的活性分子与任选的药学可接受载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版,Osol, A. 编,1980)混合来制备本发明 C3b 抗体或其它拮抗剂的治疗用配制剂,供贮存,以冻干剂型或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖、二糖、和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物(例如 Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

**[0242]** 脂转染或脂质体也可用于将多肽、抗体、或抗体片段投递入细胞中。在使用抗体片段的情况中,优选特异性结合靶蛋白质的结合域的最小片段。例如,基于抗体的可变区序列,可设计保留结合靶蛋白质序列的能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组 DNA 技术生成(参见例如 Marasco 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893(1993))。

**[0243]** 活性分子还可包载入例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶状药物投递系统(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗滴乳状液。此类技术披露于《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版,Osol, A. 编,1980。

**[0244]** 要用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易地通过使用无菌滤膜过滤来实现。

**[0245]** 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 No. 3,773,919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸  $\gamma$ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可

降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子 100 天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时,它们可能由于暴露于 37℃ 的潮湿环境而变性或聚集,导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如,如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间 S-S 键,那么可通过修饰巯基、自酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0246] 用于预防或治疗眼病或眼疾的本发明化合物通常通过眼部、眼内、和/或玻璃体内注射来施用。也可使用其它施用方法,包括但不限于表面、胃肠外、皮下、腹膜内、肺内、鼻内、和病变内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。

[0247] 用于眼部、眼内或玻璃体内施用的配制剂可通过本领域已知方法和使用本领域已知成分来制备。有效治疗的一项主要要求是适当渗透穿过眼。与眼前部的疾病(在这种情况下药物可以表面投递)不同,视网膜疾病要求更加位点特异性的办法。滴眼剂和软膏剂很少渗透眼后部,而且血眼屏障妨碍系统性施用的药物渗透到眼组织中。因而,为了治疗视网膜疾病,诸如 AMD 和 CNV 而选择的药物投递方法通常是直接玻璃体内注射。玻璃体内注射通常要重复进行,时间间隔取决于患者的状况及所投递药物的特性和半衰期。为了眼内(例如玻璃体内)渗透,通常优选较小的分子。

[0248] 提供下文实施例仅仅为了例示目的,而非意图以任何方式限制本发明的范围。

[0249] 除非另有说明,实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和整篇说明书中以 ATCC 编号鉴别的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)。

[0250] 抗体氨基酸序列内的氨基酸残基是依照 Kabat 编号的(Kabat 等, Sequences of proteins of immunological interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。使用的是单字母氨基酸缩写。使用 IUB 代码来代表 DNA 简并性(N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T)。

[0251] 实施例 1: 自编码起始抗体高变区的噬菌体衍生的抗体

[0252] 使用 **HERCEPTIN®** 抗 HER2 抗体 rhuMAB 4D5-8(Genentech, Inc.) VL 和 VH 域的核酸序列(图 18A 和 18B) 作为起始序列来进行对 HVR 的诱变和对结合人 C3b 的结合的噬菌体选择。抗体 4D5 是对称作 Her-2(erbB2) 的癌症相关抗原特异性的人源化抗体。该抗体包括具有共有框架区的可变域,其中少数位置在提高人源化抗体亲和力的过程期间恢复成小鼠序列。人源化抗体 4D5 的序列和晶体结构已经记载于美国专利 No. 6, 054, 297, Carter et al., PNAS89:4285(1992), 晶体结构显示于 Carter 等, J. Mol. Biol. 229:969(1993) 并在 [www.ncbi.nih.gov/structure/mmdb](http://www.ncbi.nih.gov/structure/mmdb) (MMDB#s-990-992), 通过述及明确将其完整内容收入本文。

[0253] **HERCEPTIN®** VL 和 VH 域包含共有人  $\kappa$  I VL 域和人亚组 III 共有 VH 域变体。该变异 VH 域具有 3 处相对于人共有序列的变化: R71A, N73T 和 L78A。

[0254] 用于此项工作的噬菌粒是单价 Fab-g3 展示载体(pV0350-2B), 其具有 2 个在 phoA

启动子控制下的可读框,基本上如 Lee 等, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5) :1073-93 所记载的。第一可读框由 stII 信号序列融合至受体轻链 VL 和 CH1 域组成,而第二可读框由 stII 信号序列融合至受体重链 VH 和 CH1 域接着是截短的次要噬菌体外壳蛋白 P3 组成。参见 Lee 等, 见上文。

#### [0255] 通过重链 HVR 诱变生成的抗体

[0256] 通过对 huMAb 4D5-8 ( **HERCEPTIN®** 抗 HER2 抗体, Genentech, Inc.) 重链 HVR-H1、H2、和 H3 的诱变和针对人 C3b 融合蛋白的选择,生成 Fab 克隆 YW144. 2. 43。在 HVR-H1, Kabat 位置 26 (G)、27 (F)、28 (T)、29 (I)、34 (I)、和 35 (H) 保持不变,而改变位置 30-33 的氨基酸。在 HVR-H2 中, Kabat 位置 51 (I)、52a (P)、55 (G)、57 (T)、59 (Y)、60 (A)、61 (D)、62 (S)、63 (V)、64 (K)、和 65 (G) 保持不变,而改变位置 49、50、52、53、54、56、和 58。在 HVR-H3 中, Kabat 位置 93 (A) 和 102 (Y) 保持不变,而改变位置 94-100、100a-h、和 101。YW144. 2. 43 的轻链是改良的 huMAb 4D5-8 序列 (在位置 30、66 和 91 处有修改),其 HVR 在噬菌体选择期间没有改变。使用标准诱变技术,通过选定氨基酸位置的诱变,将序列多样性引入每个高变区。

#### [0257] 噬菌体文库的生成

[0258] 将为每个高变区设计的随机化寡核苷酸集合在六个 20  $\mu$  l 反应体系中分别磷酸化,所述 20  $\mu$  l 反应体系含有 660ng 寡核苷酸、50mM Tris pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM ATP、20mM DTT、和 5U 多核苷酸激酶,于 37°C 温育 1 小时。然后将六个磷酸化寡核苷酸集合与 20  $\mu$  g Kunkel 模板在 50mM Tris pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub> 中组合,终体积 500  $\mu$  l,导致多核苷酸对模板的比率为 3。将混合物退火,90°C 4 分钟,50°C 5 分钟,然后在冰上冷却。用 QIAQUICK™ PCR 纯化试剂盒 (Qiagen 试剂盒 28106) 除去过量的、未退火的寡核苷酸,其中使用改良的方案以防止退火 DNA 的过度变性。向 500  $\mu$  l 退火混合物中添加 150  $\mu$  l PB,并在 2 个硅土柱之间拆分混合物。用 750  $\mu$  l PE 清洗每个柱并额外旋转以干燥柱后,用 110  $\mu$  l 10mM Tris、1mM EDTA pH8 洗脱每个柱。然后通过添加 1  $\mu$  l 100mM ATP、10  $\mu$  l 25mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 每种 25mM)、15  $\mu$  l 100mM DTT、25  $\mu$  l 10X TM 缓冲液 (0.5M Tris pH7.5、0.1M MgCl<sub>2</sub>)、2400U T4 连接酶、和 30U T7 聚合酶于室温 3 小时来补平经退火和清洁的模板 (220  $\mu$  l)。

[0259] 在 Tris-乙酸盐-EDTA/琼脂糖凝胶 (Sidhu et al., Methods in Enzymology 328 : 333-363 (2000)) 上分析补平产物。通常可见三条带:底部的带是正确补平和连接的产物,中间的带是补平但未连接的产物,而顶部的带是链置换产物。顶部的带是由 T7 聚合酶的内源副活性生成的,而且难以避免 (Lechner et al., J. Biol. Chem. 258 :11174-11184 (1983)); 然而,此带的转化效率比底部的带低 30 倍,通常对文库贡献很小。中间的带是由于缺乏最终连接反应所需要的 5' 磷酸根;此带高效转化,而且主要给出野生型序列。

[0260] 然后纯化补平产物并电穿孔入 SS320 细胞并在存在 M13/K07 辅助噬菌体的情况中扩增,如 Sidhu et al., Methods in Enzymology 328 :333-363 (2000) 所记载的。库容量范围为  $1-2 \times 10^9$  个独立克隆。对来自初始文库的随机克隆测序以评估文库质量。

#### [0261] 噬菌体选择

[0262] 使用人 C3b 蛋白质作为选择抗原。将人 C3b 以 PBS 中的 10  $\mu$  g/ml 包被到 MaxiSorp 微量滴定板 (Nunc) 上并于 4°C 温育过夜。对于第 1 轮选择,使用 12 个孔的靶物。将孔用

噬菌体封闭缓冲液 (1% BSA、.05% Tween 20、PBS) 于室温封闭 1 小时。自冷冻的甘油原种 PEG 沉淀噬菌体文库, 重悬于噬菌体封闭缓冲液, 并于室温温育 1 小时。然后将噬菌体文库添加至经封闭的抗原板, 于室温温育过夜。结合过夜后, 通过用清洗缓冲液 (PBS、0.5% Tween 20) 清洗, 自抗原板洗去未结合的 / 非特异性的噬菌体。通过将孔与 50mM HCl、0.5M KCl 一起温育 30 分钟, 洗脱结合的噬菌体。使用 XL-1Blue 细胞和 M13/K07 辅助噬菌体扩增噬菌体, 并在 2YT、50  $\mu$ g/ml 羧苄青霉素、50  $\mu$ g/ml 卡那霉素、10  $\mu$ g/ml 四环素中于 30°C 培养 36 小时。然后使用改良的 PEG 沉淀方案 (Monaci, P., Cortese, R., Screening phage libraries with sera, 于 Phagedisplay-A practical approach, Clackson 和 Lowman 编, 2004, 第 193-215 页) 回收扩增的噬菌体。比较自靶物包被孔洗脱的噬菌体的滴度与自非靶物包被孔回收的噬菌体的滴度以评估富集情况。进行了四轮噬菌体选择, 其中靶物孔的数目在第 2 轮降至 4 个, 在第 3 轮和第 4 轮降至 2 个。使用酪蛋白封闭缓冲液 (Pierce) 作为第 2 轮和第 4 轮中抗原板和噬菌体的封闭剂。第 2-4 轮选择使用 3-4 小时的噬菌体-抗原结合期并提高清洗严格性。在人 C3b 淘选的情况中, 还在第 2-4 轮选择中在噬菌体-抗原温育期间添加人 C3 (大于 1  $\mu$ M) 作为针对也能结合人 C3 的噬菌体抗体的反选择 (counter select)。选择了人噬菌体克隆 YW144. 2. 43。C3b 淘选显示于图 1。C3b 结合特征是如实施例 3 中所述测定的。

[0263] 实施例 2 : 通过 HVR H1、H2、H3 和 L3 变异生成的抗体

[0264] 通过 huMAb 4D5-8 ( **HERCEPTIN®** 抗 HER2 抗体, Genentech, Inc. ) 重链可变域和 huMAb 4D5-8 改良轻链可变域的 HVR-H1、H2、H3 和 L3 诱变, 生成了克隆 YW144. 2. 43。在 HVR-H1 中, Kabat 位置 26 (G)、28 (T)、29 (F)、30 (S)、31 (S)、和 35 (S) 保持不变, 而改变位置 27 和 32-34 的氨基酸。在 HVR-H2 中, Kabat 位置 49 (S)、51 (I)、55 (G)、57 (T)、59 (Y)、60 (A)、61 (D)、62 (S)、63 (V)、64 (K)、和 65 (G) 保持不变, 而改变位置 50、52、52a、53、54、56、和 58。在 HVR-H3 中, Kabat 位置 93 (A)、94 (R)、100f-g (删除) 保持不变, 而改变位置 95-100、100a-e、100h、和 102。在 HVR-L3 中, Kabat 位置 89 (Q)、90 (Q)、95 (P) 和 97 (T) 保持不变, 而改变位置 91-94 和 96。HVR-L1 的序列保持不变, 为 RASQSISSYLA (SEQ ID NO : 11), 而 HVR-L2 的序列保持不变, 为 GASSRAS (SEQ ID NO : 12)。使用标准诱变技术, 通过选定氨基酸位置的诱变, 将序列多样性引入每个高变区。抗 C3v 抗体克隆被选择并测序。

[0265] YW144. 2. 43 的亲合力成熟

[0266] 为了改进抗 C3b 抗体 YW144. 2. 43 的亲合力, 在 YW144. 2. 43 的背景中生成了三个噬菌体展示文库, 每个靶向多个 HVR 进行软随机化突变, 如 Lee 等, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5) : 1073-93 所记载的。为了避免来自模板的潜在高背景重新选择 YW144. 2. 43, 在生成每个文库之前将终止密码子引入要突变的 HVR。使用溶液分选法来增强基于亲和力的噬菌体选择过程的效率。通过操作生物素化靶物浓度、降低噬菌体捕捉时间以降低背景、及添加未生物素化靶物以消除具有较快解离速率的克隆, 能熟练地选择高亲和力克隆 (Lee 等, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5) : 1073-93)。自第一轮选择, 观察到富集 (靶物依赖性噬菌体捕捉), 提示每个文库中存在具有对人 C3b 的合理高亲和力的大量克隆。在后续轮次中提高选择严格性。5 轮选择后, 分析来自每个文库的克隆。在靶向六个 HVR 中每一个的文库中都观察到新的序列。通过噬菌体 ELISA 筛选选定克隆, 然后表达成 IgG 蛋白质, 并使用 Biacore™ 结合分析来表征它们的亲合力。

[0267] 使用固体 / 溶液分选法分选亲和力成熟抗体的噬菌体文库。通过混和 500  $\mu$  l PBS 中的 3.6mg/ml 人 C3b 和 10  $\mu$  l 1M 磷酸钾 pH 8 与 20  $\mu$  l 4mMSulfo-NHS-LC- 生物素 (Pierce), 将人 C3b 生物素化。对于第 1 轮选择, 将生物素化 C3b 以 PBS 中的 10  $\mu$  g/ml 包被到 MaxiSorp 微量滴定板 (Nunc) 上并于 4°C 温育过夜。对于第 1 轮选择, 使用 16 孔靶物。将孔用 SuperBlock (Pierce) 于室温封闭 1 小时。将成熟噬菌体文库在 SuperBlock 缓冲液中稀释, 并于室温温育 1 小时。然后将噬菌体文库添加至经过封闭的抗原板, 并于室温温育 2 小时。结合后, 通过用清洗缓冲液 (PBS, 0.5% Tween20) 清洗, 自抗原板除去未结合的 / 非特异性结合的噬菌体。通过将孔与 50mM HCl、0.5M KCl 一起温育 30 分钟, 洗脱结合的噬菌体。使用 XL-1Blue 细胞和 M13/K07 辅助噬菌体扩增噬菌体, 并在 2YT、50  $\mu$  g/ml 羧苄青霉素、50  $\mu$  g/ml 卡那霉素、10  $\mu$  g/ml 四环素中于 30°C 培养 36 小时。然后使用改良的 PEG 沉淀方案 (Monaci, P., Cortese, R., 见上文) 回收扩增的噬菌体。比较自靶物包被孔洗脱的噬菌体的滴度与自非靶物包被孔回收的噬菌体的滴度以评估富集情况。对于第 2-5 轮选择, 执行溶液分选方案。将微量滴定孔用 PBS 中的 10  $\mu$  g/ml 中性亲合素于 4°C 包被过夜, 然后用 SuperBlock (Pierce) 封闭 1 小时。将回收的噬菌体文库重悬在 SuperBlock 中, 并与 50nM b-Robo4-His 混和 1 小时。在中性亲合素包被孔上捕捉结合至 b-C3b 的噬菌体 30 分钟, 并用清洗缓冲液洗去未结合的噬菌体。用 50mM HCl、500mM KCl 洗脱噬菌体 30 分钟, 中和, 并在 XL1 Blue 细胞 (Stratagene) 中在存在 K07 辅助噬菌体 (New England Biolabs) 的情况下扩增。类似地实施后续轮次的分选, 只是有如下例外: 在第 2 轮中, b-C3b 终浓度为 50nM; 在第 3 轮中, b-C3b 终浓度为 25nM; 在第 4 轮中, b-C3b 终浓度为 5nM; 而在第 5 轮中, b-C3b 终浓度为 .5nM, 而且在中性亲合素捕捉前向混合物添加 50nM 未生物素化 C3b 达 1 小时。

[0268] 选择了数个亲和力成熟的克隆来进行对人 C3b 的结合和测序。亲和力成熟抗体 YW144. 2. 43. S77 (简称 S77) 的重链和轻链 Fab 片段的氨基酸序列显示于图 5。

[0269] 实施例 3: 选定抗 C3b 抗体克隆的表征

[0270] 噬菌体 ELISA- 实施噬菌体竞争结合测定法来测定噬菌体展示 Fab 对 C3b 的大致结合亲和力 (作为噬菌体 IC<sub>50</sub> 来测定)。如下实施测定法。如上所述使用改良的 PEG 沉淀方案自每个克隆生成纯化的噬菌体上清液。将纯化的噬菌体上清液在噬菌体封闭缓冲液中连续稀释, 然后在经 C3b (1  $\mu$  g/ml) 包被的板上温育 15 分钟。将板用清洗缓冲液清洗并与辣根过氧化物酶 / 抗 M13 抗体偶联物 (在 PBS 缓冲液中 1 : 5000 稀释) (Amersham Pharmacia Biotech) 一起温育 30 分钟。将板清洗, 用四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Kirkegaard and Perry Laboratories) 显色, 并用 .1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 淬灭。以分光光度法于 450nm 测量吸光度以测定给出饱和信号大约 50% 的噬菌体浓度。在含有两倍连续稀释的 C3b 蛋白质 (自 350nM C3b 至 5nM C3b) 的噬菌体封闭缓冲液中稀释固定的、亚饱和浓度的噬菌体。将混合物在温和摇动中于室温温育 1 小时, 转移至经 C3b (1  $\mu$  g/ml) 包被的板, 并将板温育 20 分钟。将板清洗并如上所述处理。作为 IC<sub>50</sub> 值 (定义为阻断 50% 的噬菌体结合至固定化抗原的抗原浓度) 来评估结合亲和力。C3b 噬菌体竞争结果显示于图 2。

[0271] IgG 生成和亲和力测定 - 为了表达 IgG 蛋白质来进行亲和力表征, 在噬菌体展示载体中在重链与 g3 之间引入终止密码子。将克隆转化入大肠杆菌 34B8 细胞并在 AP5 培养基中于 30°C 培养 (Presta 等, Cancer Res. 57 :4593-4599 (1997))。通过离心收获细胞, 重悬于 10mM Tris, 1mM EDTA pH8, 并用微量流化仪破碎。用蛋白 G 亲和测序纯化 Fab。

[0272] 使用 **BIACORE®3000** 系统 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ), 通过表面等离子共振测量, 测定噬菌体衍生的抗 C3b 抗体 YW144.2.43 及其亲和力成熟变体 YW144.2.43S77 (Fab 片段) 对人 C3b 和 C3 的结合亲和力。所测试的抗体 Fab 片段是 YW144.2.43 和 YW144.2.43S7。简言之, 将羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, Biacore Inc.) 的流动室 1 和 2 用 0.2M N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸化物 (EDC) 和 0.05M N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 以流速 5  $\mu$ l/in 活化 7 分钟。流动室 1 不进行包被, 作为阴性对照。将这些活化的芯片用抗 C3b Fab 包被, 即用 10mM 乙酸钠 pH4.8 稀释至 5  $\mu$ g/ml, 之后以 5  $\mu$ l/min 的流速注射, 以实现大约 50 个响应单位 (RU) 的偶联抗体。接着, 注射 1M 乙醇胺以封闭未反应的基团。为了动力学测量, 于 25°C 以 35  $\mu$ l/min 的流速注射在含 0.05% Tween 20 的 PBS 中两倍连续稀释的人 C3b 或 C3 可溶性抗原 (C3b 为大约 100nM 至大约 3nM, C3 为约 1  $\mu$ M 至 50nM)。每次注射后, 使用 20mM HCl 再生芯片。通过减去来自空白流动室的 RU 来校准结合响应。使用简单一对一 Langmuir 结合模型 (BIAevaluation 软件, 3.2 版) 计算结合速率 ( $k_{on}$ ) 和解离速率 ( $k_{off}$ )。平衡解离常数 ( $K_D$ ) 作为比率  $k_{解离}/k_{结合}$  来计算。结合亲和力显示于图 6 和 7。

[0273] 在另一项实验中, 在微量滴定板中使用多克隆 C3 抗体捕捉纯化的 C3b 或 C3。使用偶联有 HRP0 的二抗测定 S77 (A) 或多克隆抗 C3 抗体 (B) 对被捕捉的 C3b 或 C3 的结合。用 TMB (KPL) 显色, 在 2N  $H_2SO_4$  中终止, 并于 450nm 读取吸光度。

[0274] 用于测试抗 C3b 抗体 S77 的特异性的 C3b ELISA。将 25  $\mu$ l 在 PBS 中稀释的捕捉抗体 (YW144.2.45.S77 亲和力成熟的 xC3/C3b (Genentech) 2  $\mu$ g/ml) 添加至微量滴定板的孔, 并于 4°C 温育过夜。将板用清洗缓冲液 (PBS/0.05% Tween20 (20 倍原液; Media Prep; 产品目录 A3355)) 清洗 3 次。将 50  $\mu$ l 封闭缓冲液添加至孔, 将板在温和摇动中于室温温育 1-3 小时, 并用清洗缓冲液清洗 3 次。在 Magic 缓冲液 (1X PBS pH7.4、0.5% BSA、0.05% Tween 20、0.2% BgG、15PPM Proclin (Media Prep; 产品目录 A3381)) + 0.35M NaCl 中制备标准品原液 (C3b, Complement Technology Inc.; 产品目录 A114, 以 100 倍保存于 -20°C)。Magic 缓冲液 + 0.35M NaCl 还用于制备供分析用的样品。将 25  $\mu$ l 标准品 / 样品添加至指定的孔。将样品在温和摇动中于室温温育约 2 小时 (+/-0.5 小时), 并用清洗缓冲液清洗 3 次。将板翻转 180 度, 并重复清洗步骤。将检测抗体 (过氧化物酶偶联的山羊 F(ab')<sub>2</sub> 抗人 C3 (Protos Immunoresearch; 产品目录 765)) 在测定稀释剂中 1 : 7000 稀释, 并在板上在温和摇动中于室温温育 1-2 小时。将板用清洗缓冲液清洗 3 次, 并翻转 180 度, 重复清洗步骤。制备 50/50 TMB 溶液。将 ELISA 板用清洗缓冲液清洗 3 次。将板翻转 180 度, 并重复清洗步骤。将 25  $\mu$ l TMB 添加至孔。于室温显色。显色时间: 两种板都是 10 分钟。通过添加 25  $\mu$ l 1.0M 磷酸至孔来终止显色。对板读取 OD 读数 (450/630nm)。结果显示于图 8 小图 A。

[0275] 与上文所述用于测试 S77 的特异性的 C3b ELISA 测定法类似地实施作为 C3 检测的阳性对照使用的总 C3, 只是使用针对人 C3 (Cappel 55033) 的山羊 IgG 级分作为捕捉抗体。结果显示于图 8 小图 B。

[0276] 如图 8 所示, S77 识别 C3b, 但不识别原分子 (pro-molecule) C3。

[0277] 实施例 4 : C3b 抗体特异性抑制补体旁途径

[0278] 溶血测定法 - 为了测定旁途径活性, 将家兔红细胞 (Er, Colorado Scrum) 在 GVB

中清洗3次并重悬至 $2 \times 10^9/\text{ml}$ 。将 $50 \mu\text{l}$ 抑制剂和 $20 \mu\text{l}$  Er悬浮液与GVB/0.1M EGTA/0.1M  $\text{MgCl}_2$  1 : 1混和。通过添加经C1q消减的人血清(Quidel ; $30 \mu\text{l}$ ,在GVB中1 : 3稀释)来启动补体活化。于室温温育30分钟后,添加 $200 \mu\text{l}$  GVB/10mM EDTA以终止反应并将样品以500g离心5分钟。通过测量412nm吸光度来测定 $200 \mu\text{l}$ 上清液中的溶血情况。数据表述成相对于在缺乏抑制剂的情况中诱发的溶血的%。为了测定CRIg对经典补体途径的影响,遵循相似的规程,只是用经IgM包被的绵羊红细胞(E-IgM, CompTech)代替Er,而且在GVB++中在因子B缺陷的人血清中实施测定法。

[0279] 如图9和10所示,亲和力成熟的C3b抗体S77特异性抑制旁路补体途径,不抑制经典途径。

[0280] 实施例5 :C3b抗体抑制C5结合C5转化酶

[0281] C5竞争测定法 - 通过与PBS中的 $3 \mu\text{g/ml}$  C3b一起于 $4^\circ\text{C}$ 温育过夜,将C3b包被到微量滴定板上。将板用PBS中的1% BSA封闭,并与渐增浓度的抗体一起温育,所述抗体在20mM Tris/20mM Ca/20mM Mg/150mM NaCl/0.05% Tween/1% BSA中与 $0.4 \mu\text{M}$  C5混和。如下检测C5结合,即与抗人C5抗体(克隆7D12, Genentech)一起于室温温育30分钟,接着与1 : 5000驴抗小鼠HRP(Jackson)一起温育。

[0282] 如图11和12所示,亲和力成熟的C3b抗体S77抑制C5转化酶。

[0283] 实施例6 :C3b抗体不展示分解活性

[0284] 分解加速活性 - 将微量滴定板用PBS中的 $3 \mu\text{g/ml}$  C3b包被过夜。将板在PBST(PBS/0.1% -Tween)中清洗2次,用含有4% BSA的PBST于 $37^\circ\text{C}$ 封闭2小时。将板在含有400ng/ml 因子B、25ng/ml 因子D、和2mM  $\text{NiCl}_2$ 、25mM NaCl、0.05% Tween 20和4% BSA的Veronal缓冲液中于室温温育2小时,接着与PBST中的因子H或S77一起温育15分钟。如下检测因子Bb,即顺序地与PBST中1 : 5,000稀释的山羊抗人因子B多克隆抗体(Kent)一起及与PBST中1 : 5,000稀释的偶联有HRP0(Caltag)驴抗山羊抗体一起温育1小时。用TMB(KPL)显色,在2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 中终止,并于450nm读取吸光度。如下测量关于因子I介导的C3b切割的辅因子活性,将 $0.8 \mu\text{M}$  C3b和80nM因子I与80nM因子H或不同浓度的S77一起在30ml GVB中温育。将混合物于 $37^\circ\text{C}$ 温育60分钟,并通过凝胶电泳分析样品,如关于C3转化酶测定法所描述的。

[0285] 如图13所示,S77不展示分解加速活性。

[0286] 实施例7 :C77抑制原因子B结合C3b和C3bBb转化酶形成

[0287] 方案

[0288] 将MaxiSorp板用PBS中的 $3 \mu\text{g/ml}$  C3b(PUR13420)于室温包被4小时( $20 \mu\text{l}$ /孔)。用 $100 \mu\text{l}$  PBS 0.1% Tween(PBST)(BioTek EL405洗板仪)实施6次清洗。将板用4% BSA/0.05% Tween/PBS于室温封闭2小时,接着将封闭液倒到水槽中。添加 $20 \mu\text{l}$  AP转化酶缓冲液,室温2小时,接着用PBST清洗6次。添加 $20 \mu\text{l}$  抗体,室温45分钟,并将孔用PBST清洗6次。为了检测因子B/Bb,将孔与1 : 7000山羊抗fB(Kent Labs)一起于室温温育30分钟。为了检测S77和CR1,将PBST添加至孔,然后用PBST清洗6次,与PBST++中的1 : 7,000驴抗山羊IgG-HRP0(Jackson)一起温育30分钟。与PBST++中的1 : 100抗6x-His(SEQ ID NO:19)(R&D)一起温育30分钟后,用PBST清洗6次。用 $20 \mu\text{l}$  TMB底物实施显色,并用 $10 \mu\text{l}$  2N硫酸终止反应。于450nm读板。

[0289] “AP 转化酶缓冲液”:4% BSA,0.1% Tween 20,2mM  $\text{NiCl}_2$ ,25mM NaCl,25ng/mL 因子 D,400ng/ml 因子 B(CompTech)。

[0290] 遵循上述方案,将 C3b 包被到微量滴定板上。添加 S77、对照 Fab 或 CR1 片段 (LHRA-C),接着在 1 小时后添加因子 B。用 HRP0 偶联的二抗检测因子 B 对 C3b 的结合,并于 450nm 读取吸光度。结果显示于图 14 小图 A。

[0291] 类似地,遵循上述方案,将 C3b 包被微量滴定板上,接着添加 S77、对照 Fab 或 CR1 片段 (LHRA-C)。通过添加因子 D 和因子 B 来生成 C3 转化酶。使用识别因子 Bb 的一抗和偶联有 HRP0 的二抗来检测转化酶形成。用 TMB(KPL) 显色,在 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中终止,并于 450nm 读取吸光度。结果显示于图 14 小图 B。

[0292] 如图 14 所示,抗体 S77 抑制原因子 B 结合 C3B,而且抑制 C3bBb 转化酶形成。

[0293] 实施例 8 :S77 在存在所结合的 fBb 的情况中结合 C3b 且不分解 C3 转化酶

[0294] 使用实施例 7 中所描述的方案,在微量滴定板上包被 C3b。通过添加因子 D 和因子 B 来生成 C3 转化酶。将 S77、对照 Fab 或 CR1 片段 (LHRA-C) 添加至板,并用偶联有 HRP0 的二抗测定这些分子的结合。结果显示于图 15 小图 A。

[0295] 类似地,遵循实施例 7 中所描述的方案,用 3  $\mu\text{g/ml}$  C3b 包被微量滴定板。将板与因子 B 和因子 D 一起温育,接着与 CR1 (LHRA-C)、S77 或对照 Fab 一起温育。用山羊抗人因子 B 和偶联有 HRP0 的驴抗山羊抗体检测因子 Bb。用 TMB(KPL) 显色,在 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中终止,并于 450nm 读取吸光度。结果显示于图 15 小图 B。

[0296] 图 15 所示结果显示了 S77 能在存在所结合的 fBb 的情况中结合 C3b 且不分解 C3 转化酶。

[0297] 实施例 9 :S77 抑制因子 H 结合 C3b 且抑制因子 H 辅因子活性

[0298] 方案 1(图 15 小图 1)-将 MaxiSorp 板用 PBS 中的 3  $\mu\text{g/ml}$  C3b(PUR13420) 于室温包被 3 小时 (20  $\mu\text{l}$ /孔)。将板用 100  $\mu\text{l}$  PBS 0.1% Tween(PBST) 清洗 6 次 (BioTek EL405 洗板仪),并用 4% BSA/0.05% Tween/PBS 于室温封闭 2 小时。将板与封闭抗体 20  $\mu\text{l}$  一起于室温在摇动中温育 30 分钟,接着与 0.33  $\mu\text{M}$  fH(CompTech) 一起于室温温育 1 小时并添加 10  $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{M}$  fH。将板在洗板仪 (BioTekEL405) 中用 PBST 清洗 6 次,与 1 : 7000 驴抗小鼠 IgG (H+L)-HRP0(Jackson) 一起温育 30 分钟,并在洗板仪 (BioTek EL405) 中用 PBST 清洗 6 次。用 20  $\mu\text{l}$  TMB 底物进行显色。用 10  $\mu\text{l}$  2N 硫酸终止反应,并于 450nm 读板。

[0299] 方案 2(图 15 小图 B)-所有稀释在 GVB++(1mM  $\text{MgCl}$ ,0.15mM  $\text{CaCl}$ ) 中进行。在 Eppendorf 管中添加 10  $\mu\text{l}$  1.6  $\mu\text{M}$  C3b(最终 0.4  $\mu\text{M}$  C3b)。添加 10  $\mu\text{l}$  抗 C3b Fab、对照 Fab 或 CR1。于室温温育 20 分钟。添加 10  $\mu\text{l}$  0.08  $\mu\text{M}$  fI(最终 20nM fI)。于 37°C 温育 60 分钟。添加 40  $\mu\text{l}$  Laemmli 氏缓冲液 +2-bME,煮沸 3 分钟。在 8% Invitrogen 胶上运行,25  $\mu\text{l}$ /孔,125mV,1.5 小时。用  $\text{H}_2\text{O}$  清洗凝胶,3 次,每次 5 分钟。于室温在摇动中用 Simply Blue(Invitrogen) 染色 60 分钟。用 dd $\text{H}_2\text{O}$  清洗 3 次,每次 5 分钟。在摇床上在剧烈摇动中用 dd $\text{H}_2\text{O}$  清洗过夜,盖上塑料。试剂 :C3b PUR13240,fI 来自 Complement Technologies,fH 来自 Complement Technologies,GVB++ 来自 BioWhittaker。

[0300] 如上所述,将板用 C3b 包被。在存在浓度渐增的对照 Fab 或 S77 的情况中添加因子 H。使用抗因子 H 抗体和偶联有 HRP0 的抗小鼠二抗测定因子 H 对 C3b 的结合。用 TMB(KPL) 显色,在 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  中终止,并于 450nm 读取吸光度。结果显示于图 16 小图 A。

[0301] 如下测量关于因子 I 介导的 C3b 切割的辅因子活性,即将 0.8  $\mu$ M C3b 和 80nM 因子 I 与 80nM 因子 H 或不同浓度的 S77 在 30ml GVB 中一起温育。将混合物于 37℃ 温育 60 分钟,并通过凝胶电泳分析样品,如关于 C3 转化酶测定法所描述的。结果显示于图 16 小图 B。

[0302] 如图 16 所示,抗体 S77 抑制因子 H 结合 C3b,而且还抑制因子 H 的辅因子活性。

[0303] 实施例 10 :S77 抑制 CR1 结合 C3b

[0304] 方案 - 将 MaxiSorp 板用 PBS 中的 3  $\mu$ g/ml C3b(PUR13420) 于 4℃ 包被过夜 (100  $\mu$ l/孔)。用 100  $\mu$ l PBS 0.1% Tween(PBST) 清洗 3 次 (BioTek EL405 洗板仪)。用 4% BSA/0.1% Tween/PBS 于室温封闭 2 小时。与 20  $\mu$ l 封闭抗体一起于室温在摇动中温育 30 分钟。与 50nM CR1LHR-AC 一起于室温温育 1 小时。在洗板仪 (BioTek EL405) 中用 PBST 清洗 3 次。与 PBST 中的 1 : 10mIgG1 抗 hCD35-FITC(Pharmingen) 一起于室温温育 45 分钟。在洗板仪 (BioTek EL405) 中用 PBST 清洗 3 次。与 1 : 7000 驴抗小鼠 IgG-HRP0(Jackson) 一起温育 30 分钟。在洗板仪 (BioTek EL405) 中用 PBST 清洗 6 次。用 20  $\mu$ l TMB 底物显色。用 10  $\mu$ l 2N 硫酸终止反应。于 450nm 读板。

[0305] 如图 17 所示,抗体 S77 抑制 CR1 结合 C3b。

[0306] 实施例 11 :结晶和数据细化

[0307] 使用蒸气扩散法实施悬滴实验,其中使用由 1 : 1 比率的蛋白质溶液和储水池溶液组成的 2  $\mu$ l 液滴。蛋白质溶液在 25mM Tris、50mM NaCl pH7.5 中含有浓度为 10mg/ml 的 C3b:S7714 复合物,储水池为 0.1M Hepes pH7.2 中的 10% PEG 4000、0.2M MgCl<sub>2</sub>。两周后出现晶体。在闪冻前在补充有 20% 甘油的储水池溶液中温育晶体。以高级光源 (Advanced Light Source, Berkeley) 的梁线 (beam line)5.0.1 自单一冷冻晶体收集数据,并使用程序 DENZO 和 SCALEPACK 加工数据。晶体属于空间群 C2,晶胞参数为  $a = 216.4 \text{ \AA}$ ,  $b = 180.4 \text{ \AA}$ ,  $c = 154.6 \text{ \AA}$  而  $\beta = 115.73^\circ$  及 2 个复合物,每个复合物由不对称单元中一个 C3b 分子结合至一个 Fab 分子而构成。使用程序 Phaser 及 C3b、Fab 片段恒定域、和可变域的座标,通过分子替换来解析结构。使用程序 O 手工调整模型,并用程序 REFMAC 实施细化,其中使用严格的 2 倍非晶体学对称限制。细化模型的 R 和  $R_{\text{free}}$  分别为 22.5% 和 29.0%。

[0308] C3b 在与抗体 S77 的复合物中的晶体结构显示于图 3。图 4I 是抗体 S77 与 C3b 的结合相互作用的特写。利用结晶数据,C77Fab 重链序列内与 C3b 密切接触的残基以红色显示。

[0309] 另外,增图 1 列出了 C3b 上与 S77 接触的残基。增图 2 列出了与 C3b 接触的 Fab S77 残基。

[0310] 靶向 C3b (一种对补体活化而言重要的成分) 提供了有力的办法,在 C3 和 C5 转化酶两个水平抑制补体级联。在上文实施例中所描述的研究中,采用噬菌体技术来生成选择性识别 C3b 而非其原分子 C3 的抗体。C3b 在与特异性抗体 (S77) 的复合物中的晶体结构指示该抗体识别 C3 被切割成 C3b 后暴露的 MG7 域上的表位。S77 阻断因子 B 和 C5 结合 C3b,导致对旁路而非经典补体途径 C3 和 C5 转化酶的有力抑制。另外,S77 抑制 fH 结合和辅因子活性,以及 CR1 结合 C3b,指示 S77 对 C3b MG7 域的结合位点是调控补体活化的热点。总之,此项研究的结果阐明了补体活化的分子基础和旁路途径 C3 和 C5 转化酶水平的抑制的分子基础,而且证明了噬菌体展示和其它展示技术用于生成具有有希望的治疗潜力的选择

性抗体的效用。

[0311] 认为前述书面说明足以使本领域技术人员能够实践本发明。根据上面的描述,除了本文所显示和描述的,本发明的多种修饰对于本领域技术人员是显而易见的,而且在所附权利要求的范围内。

## 序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)

<120> C3b 抗体及用于预防和治疗补体相关病症的方法

<130> 39766-0250PCT

<140> 未指定

<141> 附随

<150> 61/055, 068

<151> 2008-05-21

<150> 60/933, 721

<151> 2007-06-07

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 : 合成的 SS7

重链区

<400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala Tyr Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

35 40

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 : 合成的 SS7

重链区

<400> 2

Gly Phe Ser Phe Thr Ser Ser Ser Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro

1 5 10 15

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu

20 25

<210>3

<211>48

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 SS7

重链区

<400>3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Tyr | Pro | Tyr | Asn | Gly | Phe | Asn | Tyr | Tyr | Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Ala | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |

<210>4

<211>26

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 SS7

重链区

<400>4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Ala | Leu | Tyr | Gly | Ser | Gly | Gly | Tyr | Tyr | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     |     |     |

<210>5

<211>42

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 S77

轻链区

<400>5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Trp | Ser | Cys | Ile | Ile | Leu | Phe | Leu | Val | Ala | Thr | Ala | Thr | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Val | His | Ser | Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys |     |     |     |     |     |     |

35

40

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;26

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述 :合成的 S77

轻链区

&lt;400&gt;6

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

1

5

10

15

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

20

25

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;39

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述 :合成的 S77

轻链区

&lt;400&gt;7

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

1

5

10

15

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

20

25

30

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

35

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;19

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述 :合成的 S77

轻链区

&lt;400&gt;8

Gln Gln Ser Tyr Ala Thr Leu Pro Thr Phe Glu Gln Gly Thr Lys Val

1

5

10

15

Glu Ile Lys

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;1641

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人 (Homo sapiens)

&lt;400&gt;9

Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn Ile Leu Arg Leu Glu Ser

1

5

10

15

Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp Ala Gln Gly Asp Val Pro

20

25

30

Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly Lys Lys Leu Val Leu Ser

35

40

45

Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr Asn His Met Gly Asn Val

50

55

60

Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe Lys Ser Glu Lys Gly Arg

65

70

75

80

Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe Gly Thr Gln Val Val Glu

85

90

95

Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly Tyr Leu Phe Ile Gln Thr

100

105

110

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

115

120

125

Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly Arg Thr Val Met Val Asn

130

135

140

Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys Gln Asp Ser Leu Ser Ser

145

150

155

160

Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser Trp Asp Ile Pro Glu Leu

165

170

175

Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro

180

185

190

Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro

195

200

205

Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr

210

215

220

Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Phe Leu Tyr Gly

225

230

235

240

Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile Phe Gly Ile Gln Asp Gly

245

250

255

Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu Lys Arg Ile Pro Ile Glu

260

265

270

Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg Lys Val Leu Leu Asp Gly

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Val Gln Asn Leu Arg Ala Glu Asp Leu Val Gly Lys Ser Leu Tyr Val |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser Asp Met Val Gln Ala Glu |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met Pro Phe Asp Leu Met Val |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala Tyr Arg Val Pro Ala Val |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Ala Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu Thr Gln Gly Asp Gly |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser Gln Lys Pro Leu Ser |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser Glu Ala Glu Gln Ala |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Thr Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr Val Gly Asn Ser Asn |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu Leu Arg Pro Gly Glu |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp Arg Ala His Glu Ala |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn Lys Gly Arg Leu Leu |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
| Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln Asp Leu Val Val Leu |     |     |
| 485                                                             | 490 | 495 |
| Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser Phe Arg Leu Val Ala |     |     |
| 500                                                             | 505 | 510 |
| Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg Glu Val Val Ala Asp |     |     |
| 515                                                             | 520 | 525 |
| Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val Gly Ser Leu Val Val |     |     |
| 530                                                             | 535 | 540 |
| Lys Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val Pro Gly Gln Gln Met |     |     |
| 545                                                             | 550 | 555 |
| Thr Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg Val Val Leu Val Ala |     |     |
| 565                                                             | 570 | 575 |
| Val Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys Asn Lys Leu Thr Gln |     |     |
| 580                                                             | 585 | 590 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Lys | Ile | Trp | Asp | Val | Val | Glu | Lys | Ala | Asp | Ile | Gly | Cys | Thr | Pro |
| 595 |     |     |     | 600 |     |     |     | 605 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Lys | Asp | Tyr | Ala | Gly | Val | Phe | Ser | Asp | Ala | Gly | Leu | Thr |
| 610 |     |     |     | 615 |     |     |     | 620 |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Ser | Ser | Ser | Gly | Gln | Gln | Thr | Ala | Gln | Arg | Ala | Glu | Leu | Gln |
| 625 |     |     |     | 630 |     |     |     | 635 |     |     |     | 640 |     |     |     |
| Cys | Pro | Gln | Pro | Ala | Ala | Arg | Arg | Arg | Arg | Ser | Val | Gln | Leu | Thr | Glu |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     | 650 |     |     |     | 655 |     |     |     |
| Lys | Arg | Met | Asp | Lys | Val | Gly | Lys | Tyr | Pro | Lys | Glu | Leu | Arg | Lys | Cys |
|     |     |     |     | 660 |     |     |     | 665 |     |     |     | 670 |     |     |     |
| Cys | Glu | Asp | Gly | Met | Arg | Glu | Asn | Pro | Met | Arg | Phe | Ser | Cys | Gln | Arg |
| 675 |     |     |     | 680 |     |     |     | 685 |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Thr | Arg | Phe | Ile | Ser | Leu | Gly | Glu | Ala | Cys | Lys | Lys | Val | Phe | Leu |
| 690 |     |     |     | 695 |     |     |     | 700 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Cys | Cys | Asn | Tyr | Ile | Thr | Glu | Leu | Arg | Arg | Gln | His | Ala | Arg | Ala |
| 705 |     |     |     | 710 |     |     |     | 715 |     |     |     | 720 |     |     |     |
| Ser | His | Leu | Gly | Leu | Ala | Arg | Ser | Asn | Leu | Asp | Glu | Asp | Ile | Ile | Ala |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     | 730 |     |     |     | 735 |     |     |     |
| Glu | Glu | Asn | Ile | Val | Ser | Arg | Ser | Glu | Phe | Pro | Glu | Ser | Trp | Leu | Trp |
| 740 |     |     |     | 745 |     |     |     | 750 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Val | Glu | Asp | Leu | Lys | Glu | Pro | Pro | Lys | Asn | Gly | Ile | Ser | Thr | Lys |
| 755 |     |     |     | 760 |     |     |     | 765 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Asn | Asn | Ile | Phe | Leu | Lys | Asp | Ser | Ile | Thr | Thr | Trp | Glu | Ile | Leu |
| 770 |     |     |     | 775 |     |     |     | 780 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Val | Ser | Met | Ser | Asp | Lys | Lys | Gly | Ile | Cys | Val | Ala | Asp | Pro | Phe |
| 785 |     |     |     | 790 |     |     |     | 795 |     |     |     | 800 |     |     |     |
| Glu | Val | Thr | Val | Met | Gln | Asp | Phe | Phe | Ile | Asp | Leu | Arg | Leu | Pro | Tyr |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     | 810 |     |     |     | 815 |     |     |     |
| Ser | Val | Val | Arg | Asn | Glu | Gln | Val | Glu | Ile | Arg | Ala | Val | Leu | Tyr | Asn |
| 820 |     |     |     | 825 |     |     |     | 830 |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Arg | Gln | Asn | Gln | Glu | Leu | Lys | Val | Arg | Val | Glu | Leu | Leu | His | Asn |
| 835 |     |     |     | 840 |     |     |     | 845 |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro | Ala | Phe | Cys | Ser | Leu | Ala | Thr | Thr | Lys | Arg | Arg | His | Gln | Gln | Thr |
| 850 |     |     |     | 855 |     |     |     | 860 |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Thr | Ile | Pro | Pro | Lys | Ser | Ser | Leu | Ser | Val | Pro | Tyr | Val | Ile | Val |
| 865 |     |     |     | 870 |     |     |     | 875 |     |     |     | 880 |     |     |     |
| Pro | Leu | Lys | Thr | Gly | Leu | Gln | Glu | Val | Glu | Val | Lys | Ala | Ala | Val | Tyr |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     | 890 |     |     |     | 895 |     |     |     |
| His | His | Phe | Ile | Ser | Asp | Gly | Val | Arg | Lys | Ser | Leu | Lys | Val | Val | Pro |

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 900                                                             | 905  | 910  |
| Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val Arg Thr Leu Asp Pro |      |      |
| 915                                                             | 920  | 925  |
| Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu Asp Ile Pro Pro Ala |      |      |
| 930                                                             | 935  | 940  |
| Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser Glu Thr Arg Ile Leu |      |      |
| 945                                                             | 950  | 955  |
| Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu Asp Ala Val Asp Ala |      |      |
| 965                                                             | 970  | 975  |
| Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser Gly Cys Gly Glu Gln |      |      |
| 980                                                             | 985  | 990  |
| Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp |      |      |
| 995                                                             | 1000 | 1005 |
| Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala |      |      |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |
| Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg Gln |      |      |
| 1025                                                            | 1030 | 1035 |
| Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala Phe Val Lys Arg Ala Pro Ser Thr Trp |      |      |
| 1045                                                            | 1050 | 1055 |
| Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Val Asn Leu Ile |      |      |
| 1060                                                            | 1065 | 1070 |
| Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu |      |      |
| 1075                                                            | 1080 | 1085 |
| Glu Lys Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Ala Pro Val Ile |      |      |
| 1090                                                            | 1095 | 1100 |
| His Gln Glu Met Ile Gly Gly Leu Arg Asn Asn Asn Glu Lys Asp Met |      |      |
| 1105                                                            | 1110 | 1115 |
| Ala Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ser Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile |      |      |
| 1125                                                            | 1130 | 1135 |
| Cys Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Thr Lys Ala Gly |      |      |
| 1140                                                            | 1145 | 1150 |
| Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr Met Asn Leu Gln Arg Ser Tyr Thr Val |      |      |
| 1155                                                            | 1160 | 1165 |
| Ala Ile Ala Gly Tyr Ala Leu Ala Gln Met Gly Arg Leu Lys Gly Pro |      |      |
| 1170                                                            | 1175 | 1180 |
| Leu Leu Asn Lys Phe Leu Thr Thr Ala Lys Asp Lys Asn Arg Trp Glu |      |      |
| 1185                                                            | 1190 | 1195 |
| Asp Pro Gly Lys Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu |      |      |
| 1205                                                            | 1210 | 1215 |

|                                                                 |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|
| Leu Ala Leu Leu Gln Leu Lys Asp Phe Asp Phe Val Pro Pro Val Val |      |      |      |
| 1220                                                            | 1225 | 1230 |      |
| Arg Trp Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr |      |      |      |
| 1235                                                            | 1240 | 1245 |      |
| Gln Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Lys Asp |      |      |      |
| 1250                                                            | 1255 | 1260 |      |
| Ala Pro Asp His Gln Glu Leu Asn Leu Asp Val Ser Leu Gln Leu Pro |      |      |      |
| 1265                                                            | 1270 | 1275 | 1280 |
| Ser Arg Ser Ser Lys Ile Thr His Arg Ile His Trp Glu Ser Ala Ser |      |      |      |
| 1285                                                            | 1290 | 1295 |      |
| Leu Leu Arg Ser Glu Glu Thr Lys Glu Asn Glu Gly Phe Thr Val Thr |      |      |      |
| 1300                                                            | 1305 | 1310 |      |
| Ala Glu Gly Lys Gly Gln Gly Thr Leu Ser Val Val Thr Met Tyr His |      |      |      |
| 1315                                                            | 1320 | 1325 |      |
| Ala Lys Ala Lys Asp Gln Leu Thr Cys Asn Lys Phe Asp Leu Lys Val |      |      |      |
| 1330                                                            | 1335 | 1340 |      |
| Thr Ile Lys Pro Ala Pro Glu Thr Glu Lys Arg Pro Gln Asp Ala Lys |      |      |      |
| 1345                                                            | 1350 | 1355 | 1360 |
| Asn Thr Met Ile Leu Glu Ile Cys Thr Arg Tyr Arg Gly Asp Gln Asp |      |      |      |
| 1365                                                            | 1370 | 1375 |      |
| Ala Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro |      |      |      |
| 1380                                                            | 1385 | 1390 |      |
| Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln Leu Ala Asn Gly Val Asp Arg Tyr Ile |      |      |      |
| 1395                                                            | 1400 | 1405 |      |
| Ser Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Ala Phe Ser Asp Arg Asn Thr Leu Ile |      |      |      |
| 1410                                                            | 1415 | 1420 |      |
| Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser His Ser Glu Asp Asp Cys Leu Ala Phe |      |      |      |
| 1425                                                            | 1430 | 1435 | 1440 |
| Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile Gln Pro Gly Ala Val |      |      |      |
| 1445                                                            | 1450 | 1455 |      |
| Lys Val Tyr Ala Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser Cys Thr Arg Phe Tyr |      |      |      |
| 1460                                                            | 1465 | 1470 |      |
| His Pro Glu Lys Glu Asp Gly Lys Leu Asn Lys Leu Cys Arg Asp Glu |      |      |      |
| 1475                                                            | 1480 | 1485 |      |
| Leu Cys Arg Cys Ala Glu Glu Cys Phe Ile Gln Lys Ser Asp Asp Lys |      |      |      |
| 1490                                                            | 1495 | 1500 |      |
| Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys Ala Cys Glu Pro Gly Val Asp |      |      |      |
| 1505                                                            | 1510 | 1515 | 1520 |
| Tyr Val Tyr Lys Thr Arg Leu Val Lys Val Gln Leu Ser Asn Asp Phe |      |      |      |

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 1525                                                            | 1530 | 1535 |
| Asp Glu Tyr Ile Met Ala Ile Glu Gln Thr Ile Lys Ser Gly Ser Asp |      |      |
| 1540                                                            | 1545 | 1550 |
| Glu Val Gln Val Gly Gln Gln Arg Thr Phe Ile Ser Pro Ile Lys Cys |      |      |
| 1555                                                            | 1560 | 1565 |
| Arg Glu Ala Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys His Tyr Leu Met Trp Gly |      |      |
| 1570                                                            | 1575 | 1580 |
| Leu Ser Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys Pro Asn Leu Ser Tyr Ile Ile |      |      |
| 1585                                                            | 1590 | 1595 |
| Gly Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Glu Asp Glu Cys Gln |      |      |
| 1605                                                            | 1610 | 1615 |
| Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln Cys Gln Asp Leu Gly Ala Phe Thr Glu |      |      |
| 1620                                                            | 1625 | 1630 |
| Ser Met Val Val Phe Gly Cys Pro Asn                             |      |      |
| 1635                                                            | 1640 |      |
| <210>10                                                         |      |      |
| <211>1639                                                       |      |      |
| <212>PRT                                                        |      |      |
| <213> 小鼠 (Mus musculus)                                         |      |      |
| <400>10                                                         |      |      |
| Ile Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn Val Leu Arg Leu Glu Ser |      |      |
| 1                                                               | 5    | 10   |
| Glu Glu Thr Ile Val Leu Glu Ala His Asp Ala Gln Gly Asp Ile Pro |      |      |
| 20                                                              | 25   | 30   |
| Val Thr Val Thr Val Gln Asp Phe Leu Lys Arg Gln Val Leu Thr Ser |      |      |
| 35                                                              | 40   | 45   |
| Glu Lys Thr Val Leu Thr Gly Ala Ser Gly His Leu Arg Ser Val Ser |      |      |
| 50                                                              | 55   | 60   |
| Ile Lys Ile Pro Ala Ser Lys Glu Phe Asn Ser Asp Lys Glu Gly His |      |      |
| 65                                                              | 70   | 75   |
| Lys Tyr Val Thr Val Val Ala Asn Phe Gly Glu Thr Val Val Glu Lys |      |      |
| 85                                                              | 90   | 95   |
| Ala Val Met Val Ser Phe Gln Ser Gly Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp |      |      |
| 100                                                             | 105  | 110  |
| Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr |      |      |
| 115                                                             | 120  | 125  |
| Val Asp Asn Asn Leu Leu Pro Val Gly Lys Thr Val Val Ile Leu Ile |      |      |
| 130                                                             | 135  | 140  |
| Glu Thr Pro Asp Gly Ile Pro Val Lys Arg Asp Ile Leu Ser Ser Asn |      |      |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Asn Gln His Gly Ile Leu Pro Leu Ser Trp Asn Ile Pro Glu Leu Val |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala Phe Tyr Glu His Ala Pro Lys |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Gln Ile Phe Ser Ala Glu Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Phe Glu Val Arg Val Glu Pro Thr Glu Thr Phe Tyr Tyr Ile Asp Asp |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Pro Asn Gly Leu Glu Val Ser Ile Ile Ala Lys Phe Leu Tyr Gly Lys |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Asn Val Asp Gly Thr Ala Phe Val Ile Phe Gly Val Gln Asp Gly Asp |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Lys Lys Ile Ser Leu Ala His Ser Leu Thr Arg Val Val Ile Glu Asp |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Gly Val Gly Asp Ala Val Leu Thr Arg Lys Val Leu Met Glu Gly Val |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Arg Pro Ser Asn Ala Asp Ala Leu Val Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Val Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser Asp Met Val Glu Ala Glu Arg |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Thr Pro Lys Phe Phe Lys Pro Ala Met Pro Phe Asp Leu Met Val Phe |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala Ser Lys Val Leu Val Val Thr |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Gln Gly Ser Asn Ala Lys Ala Leu Thr Gln Asp Asp Gly Val Ala Lys |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Leu Ser Ile Asn Thr Pro Asn Ser Arg Gln Pro Leu Thr Ile Thr Val |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Arg Thr Lys Lys Asp Thr Leu Pro Glu Ser Arg Gln Ala Thr Lys Thr |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Met Glu Ala His Pro Tyr Ser Thr Met His Asn Ser Asn Asn Tyr Leu |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| His Leu Ser Val Ser Arg Met Glu Leu Lys Pro Gly Asp Asn Leu Asn |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Val Asn Phe His Leu Arg Thr Asp Pro Gly His Glu Ala Lys Ile Arg |     |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Tyr Tyr Thr Tyr Leu Val Met Asn Lys Gly Lys Leu Leu Lys Ala Gly |     |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln Asp Leu Val Val Leu Ser Leu Pro |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |
| Ile Thr Pro Glu Phe Ile Pro Ser Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr |     |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |
| Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp |     |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Ile Gly Thr Leu Val Val Lys Gly Asp |     |     |     |
|                                                                 | 530 | 535 | 540 |
| Pro Arg Asp Asn His Leu Ala Pro Gly Gln Gln Thr Thr Leu Arg Ile |     |     |     |
| 545                                                             | 550 | 555 | 560 |
| Glu Gly Asn Gln Gly Ala Arg Val Gly Leu Val Ala Val Asp Lys Gly |     |     |     |
|                                                                 | 565 | 570 | 575 |
| Val Phe Val Leu Asn Lys Lys Asn Lys Leu Thr Gln Ser Lys Ile Trp |     |     |     |
|                                                                 | 580 | 585 | 590 |
| Asp Val Val Glu Lys Ala Asp Ile Gly Cys Thr Pro Gly Ser Gly Lys |     |     |     |
|                                                                 | 595 | 600 | 605 |
| Asn Tyr Ala Gly Val Phe Met Asp Ala Gly Leu Ala Phe Lys Thr Ser |     |     |     |
|                                                                 | 610 | 615 | 620 |
| Gln Gly Leu Gln Thr Glu Gln Arg Ala Asp Leu Glu Cys Thr Lys Pro |     |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
| Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Leu Met Glu Arg Arg Met Asp |     |     |     |
|                                                                 | 645 | 650 | 655 |
| Lys Ala Gly Gln Tyr Thr Asp Lys Gly Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp |     |     |     |
|                                                                 | 660 | 665 | 670 |
| Gly Met Arg Asp Ile Pro Met Arg Tyr Ser Cys Gln Arg Arg Ala Arg |     |     |     |
|                                                                 | 675 | 680 | 685 |
| Leu Ile Thr Gln Gly Glu Asn Cys Ile Lys Ala Phe Ile Asp Cys Cys |     |     |     |
|                                                                 | 690 | 695 | 700 |
| Asn His Ile Thr Lys Leu Arg Glu Gln His Arg Arg Asp His Val Leu |     |     |     |
| 705                                                             | 710 | 715 | 720 |
| Gly Leu Ala Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asp Ile Ile Pro Glu Glu Asp |     |     |     |
|                                                                 | 725 | 730 | 735 |
| Ile Ile Ser Arg Ser His Phe Pro Gln Ser Trp Leu Trp Thr Ile Glu |     |     |     |
|                                                                 | 740 | 745 | 750 |
| Glu Leu Lys Glu Pro Glu Lys Asn Gly Ile Ser Thr Lys Val Met Asn |     |     |     |
|                                                                 | 755 | 760 | 765 |
| Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr Thr Trp Glu Ile Leu Ala Val Ser |     |     |     |

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 770                                                             | 775  | 780  |
| Leu Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys Val Ala Asp Pro Tyr Glu Ile Arg |      |      |
| 785                                                             | 790  | 795  |
| Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val |      | 800  |
|                                                                 | 805  | 810  |
| Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg Ala Val Leu Phe Asn Tyr Arg Glu |      | 815  |
|                                                                 | 820  | 825  |
| Gln Glu Glu Leu Lys Val Arg Val Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe |      | 830  |
|                                                                 | 835  | 840  |
| Cys Ser Met Ala Thr Ala Lys Asn Arg Tyr Phe Gln Thr Ile Lys Ile |      | 845  |
|                                                                 | 850  | 860  |
| Pro Pro Lys Ser Ser Val Ala Val Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys |      |      |
| 865                                                             | 870  | 875  |
| Ile Gly Gln Gln Glu Val Glu Val Lys Ala Ala Val Phe Asn His Phe |      | 880  |
|                                                                 | 885  | 890  |
| Ile Ser Asp Gly Val Lys Lys Thr Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Met |      | 895  |
|                                                                 | 900  | 905  |
| Arg Ile Asn Lys Thr Val Ala Ile His Thr Leu Asp Pro Glu Lys Leu |      | 910  |
|                                                                 | 915  | 920  |
| Gly Gln Gly Gly Val Gln Lys Val Asp Val Pro Ala Ala Asp Leu Ser |      | 925  |
|                                                                 | 930  | 935  |
| Asp Gln Val Pro Asp Thr Asp Ser Glu Thr Arg Ile Ile Leu Gln Gly |      | 940  |
| 945                                                             | 950  | 955  |
| Ser Pro Val Val Gln Met Ala Glu Asp Ala Val Asp Gly Glu Arg Leu |      | 960  |
|                                                                 | 965  | 970  |
| Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ala Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile |      | 975  |
|                                                                 | 980  | 985  |
| Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp Gln Thr Glu |      | 990  |
|                                                                 | 995  | 1000 |
| Gln Trp Glu Lys Phe Gly Ile Glu Lys Arg Gln Glu Ala Leu Glu Leu |      | 1005 |
| 1010                                                            | 1015 | 1020 |
| Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Lys Gln Pro Ser Ser |      |      |
| 1025                                                            | 1030 | 1035 |
| Ala Tyr Ala Ala Phe Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr Trp Leu Thr Ala |      | 1040 |
|                                                                 | 1045 | 1050 |
| Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Ala Asn Leu Ile Ala Ile Asp |      | 1055 |
|                                                                 | 1060 | 1065 |
| Ser His Val Leu Cys Gly Ala Val Lys Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln |      | 1070 |
|                                                                 | 1075 | 1080 |
|                                                                 |      | 1085 |

|                                                                 |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|
| Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu Asp Gly Pro Val Ile His Gln Glu |      |      |      |
| 1090                                                            | 1095 | 1100 |      |
| Met Ile Gly Gly Phe Arg Asn Ala Lys Glu Ala Asp Val Ser Leu Thr |      |      |      |
| 1105                                                            | 1110 | 1115 | 1120 |
| Ala Phe Val Leu Ile Ala Leu Gln Glu Ala Arg Asp Ile Cys Glu Gly |      |      |      |
|                                                                 | 1125 | 1130 | 1135 |
| Gln Val Asn Ser Leu Pro Gly Ser Ile Asn Lys Ala Gly Glu Tyr Ile |      |      |      |
|                                                                 | 1140 | 1145 | 1150 |
| Glu Ala Ser Tyr Met Asn Leu Gln Arg Pro Tyr Thr Val Ala Ile Ala |      |      |      |
|                                                                 | 1155 | 1160 | 1165 |
| Gly Tyr Ala Leu Ala Leu Met Asn Lys Leu Glu Glu Pro Tyr Leu Gly |      |      |      |
|                                                                 | 1170 | 1175 | 1180 |
| Lys Phe Leu Asn Thr Ala Lys Asp Arg Asn Arg Trp Glu Glu Pro Asp |      |      |      |
| 1185                                                            | 1190 | 1195 | 1200 |
| Gln Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu |      |      |      |
|                                                                 | 1205 | 1210 | 1215 |
| Leu Leu Leu Lys Asp Phe Asp Ser Val Pro Pro Val Val Arg Trp Leu |      |      |      |
|                                                                 | 1220 | 1225 | 1230 |
| Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Ala Thr |      |      |      |
|                                                                 | 1235 | 1240 | 1245 |
| Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Thr Asp Val Pro Asp |      |      |      |
|                                                                 | 1250 | 1255 | 1260 |
| His Lys Asp Leu Asn Met Asp Val Ser Phe His Leu Pro Ser Arg Ser |      |      |      |
| 1265                                                            | 1270 | 1275 | 1280 |
| Ser Ala Thr Thr Phe Arg Leu Leu Trp Glu Asn Gly Asn Leu Leu Arg |      |      |      |
|                                                                 | 1285 | 1290 | 1295 |
| Ser Glu Glu Thr Lys Gln Asn Glu Ala Phe Ser Leu Thr Ala Lys Gly |      |      |      |
|                                                                 | 1300 | 1305 | 1310 |
| Lys Gly Arg Gly Thr Leu Ser Val Val Ala Val Tyr His Ala Lys Leu |      |      |      |
|                                                                 | 1315 | 1320 | 1325 |
| Lys Ser Lys Val Thr Cys Lys Lys Phe Asp Leu Arg Val Ser Ile Arg |      |      |      |
|                                                                 | 1330 | 1335 | 1340 |
| Pro Ala Pro Glu Thr Ala Lys Lys Pro Glu Glu Ala Lys Asn Thr Met |      |      |      |
| 1345                                                            | 1350 | 1355 | 1360 |
| Phe Leu Glu Ile Cys Thr Lys Tyr Leu Gly Asp Val Asp Ala Thr Met |      |      |      |
|                                                                 | 1365 | 1370 | 1375 |
| Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro Asp Thr Lys |      |      |      |
|                                                                 | 1380 | 1385 | 1390 |
| Asp Leu Glu Leu Leu Ala Ser Gly Val Asp Arg Tyr Ile Ser Lys Tyr |      |      |      |

|                                                                 |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|
| 1395                                                            | 1400 | 1405 |
| Glu Met Asn Lys Ala Phe Ser Asn Lys Asn Thr Leu Ile Ile Tyr Leu |      |      |
| 1410                                                            | 1415 | 1420 |
| Glu Lys Ile Ser His Thr Glu Glu Asp Cys Leu Thr Phe Lys Val His |      |      |
| 1425                                                            | 1430 | 1435 |
| Gln Tyr Phe Asn Val Gly Leu Ile Gln Pro Gly Ser Val Lys Val Tyr |      |      |
| 1445                                                            | 1450 | 1455 |
| Ser Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu |      |      |
| 1460                                                            | 1465 | 1470 |
| Lys Asp Asp Gly Met Leu Ser Lys Leu Cys His Ser Glu Met Cys Arg |      |      |
| 1475                                                            | 1480 | 1485 |
| Cys Ala Glu Glu Asn Cys Phe Met Gln Gln Ser Gln Glu Lys Ile Asn |      |      |
| 1490                                                            | 1495 | 1500 |
| Leu Asn Val Arg Leu Asp Lys Ala Cys Glu Pro Gly Val Asp Tyr Val |      |      |
| 1505                                                            | 1510 | 1515 |
| Tyr Lys Thr Glu Leu Thr Asn Ile Lys Leu Leu Asp Asp Phe Asp Glu |      |      |
| 1525                                                            | 1530 | 1535 |
| Tyr Thr Met Thr Ile Gln Gln Val Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val |      |      |
| 1540                                                            | 1545 | 1550 |
| Gln Ala Gly Gln Gln Arg Lys Phe Ile Ser His Ile Lys Cys Arg Asn |      |      |
| 1555                                                            | 1560 | 1565 |
| Ala Leu Lys Leu Gln Lys Gly Lys Lys Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser |      |      |
| 1570                                                            | 1575 | 1580 |
| Ser Asp Leu Trp Gly Glu Lys Pro Asn Thr Ser Tyr Ile Ile Gly Lys |      |      |
| 1585                                                            | 1590 | 1595 |
| Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Ala Glu Glu Cys Gln Asp Gln |      |      |
| 1605                                                            | 1610 | 1615 |
| Lys Tyr Gln Lys Gln Cys Glu Glu Leu Gly Ala Phe Thr Glu Ser Met |      |      |
| 1620                                                            | 1625 | 1630 |
| Val Val Tyr Gly Cys Pro Asn                                     |      |      |

1635

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt;11

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述 :合成的

肽

&lt;400&gt;11

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210>12

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的

肽

<400>12

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser

1 5

<210>13

<211>214

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>13

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 Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210>14  
 <211>449  
 <212>PRT  
 <213> 人 (Homo sapiens)  
 <400>14  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Asp  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |

Gly

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;7

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述 :合成的  
肽

&lt;400&gt;15

Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys

1

5

<210>16

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的  
肽

<400>16

Tyr His His Phe Ile

1

5

<210>17

<211>4

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的  
肽

<400>17

Thr Ser Ser Ser

1

<210>18

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的  
肽

<400>18

Arg Asn Ala Leu Tyr Gly Ser Gly Gly Tyr

1

5

10

<210>19

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述 :合成的 6x  
His 标签

<400>19

His His His His His His

1

5

| C3b 淘选结果 |       |          |             | C3b 噬菌体竞争结果 |                        |
|----------|-------|----------|-------------|-------------|------------------------|
| 项目       | 文库    | 富集       | 筛选的克隆       | 独特的克隆       |                        |
| YW136    | VH    | x 10,000 | 300 (P4&P3) | ~37         |                        |
| YW144    | VH/VL | x 37,000 | 300 (P4&P3) | ~120        |                        |
|          |       |          |             |             | 克隆                     |
|          |       |          |             |             | 相对噬菌体 IC <sub>50</sub> |
|          |       |          |             |             | YW136.1.55 ~50nM *     |
|          |       |          |             |             | YW136.1.6 ~50nM *      |
|          |       |          |             |             | YW136.1.54 ~100nM      |
|          |       |          |             |             | YW144.1.15 ~100nM      |
|          |       |          |             |             | YW144.1.60 ~50nM *     |
|          |       |          |             |             | YW144.2.43 ~50nM *     |
|          |       |          |             |             | YW144.2.45 ~50nM *     |
|          |       |          |             |             | YW144.2.91 ~100nM      |
|          |       |          |             |             | YW144.P3.10 ~100nM     |
|          |       |          |             |             | YW144.P3.24 ~10nM **   |
|          |       |          |             |             | YW144.P3.39 ~100nM     |
|          |       |          |             |             | YW144.P3.49 ~50nM *    |
|          |       |          |             |             | YW144.P3.65 ~100nM     |

\*\* 第 1 轮后用 C3 封闭

图 2

图 1

### C3b 在与 S77 Fab 的复合物中的结构

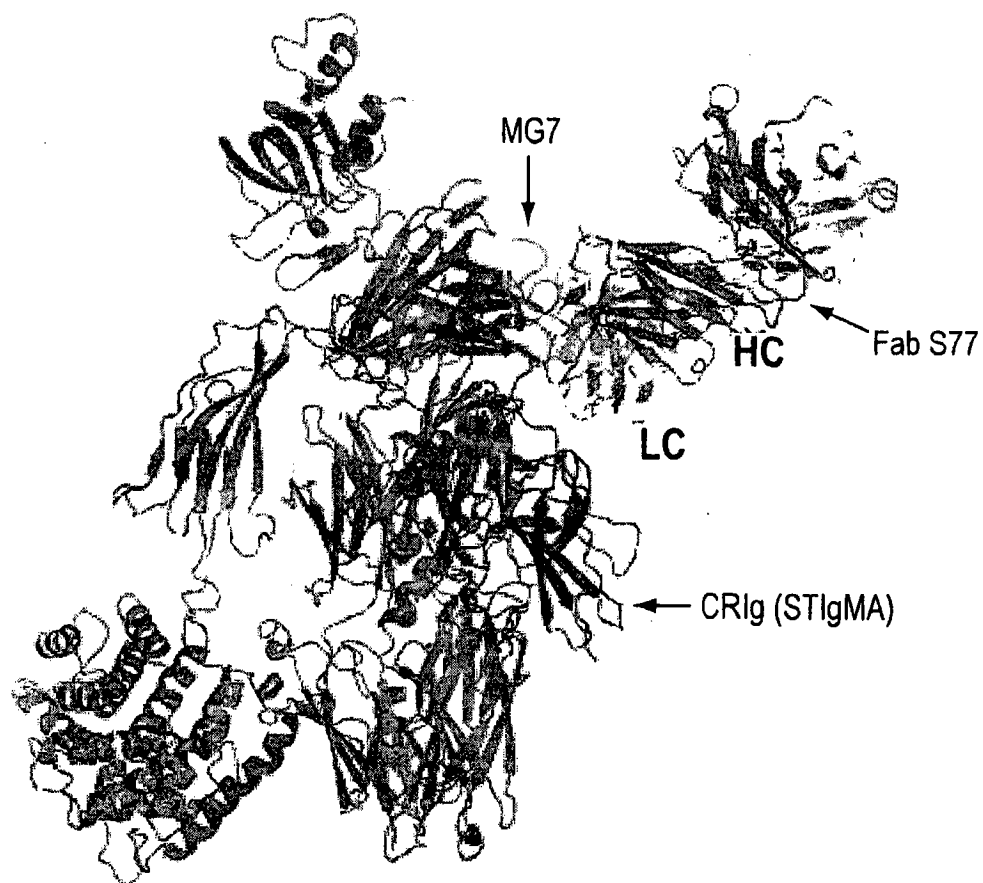


图 3



图 4

Fab S77 的重链和轻链序列及 S77 上与 C3b 接触的残基

### S77 HC

MGWSCIILFLVATATGAYAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS  
<CDR H1>**GFSFTSSSVSWVRQAPGKGLEWVGL**<CDR  
H2>**IYPYNGFNYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC**  
**AR**<CDR H3>**NALYGSGGYAMDYWGQGTLVTVSSA**  
<终末重定格式的序列>

### S77 LC

MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC<CDR  
L1>**RASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIY**<CDR  
L2>**SASFLYSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYC**<CDR  
L3>**QQSYATLPTFEQGTKVEIK**  
<终末重定格式的序列>

图 5

## YW144.2.43 Fab 对 C3b 的亲和力

YW 144.2.43 (亲本)

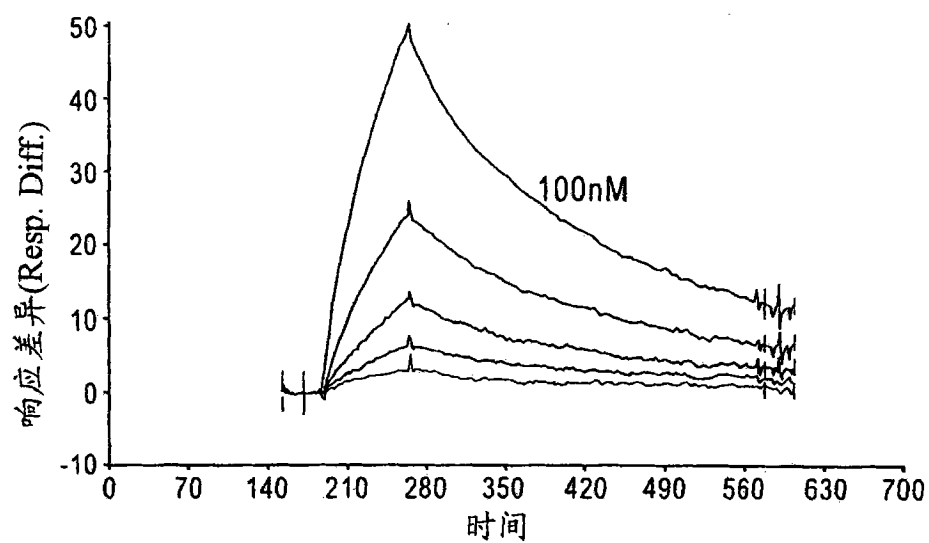


图 6A

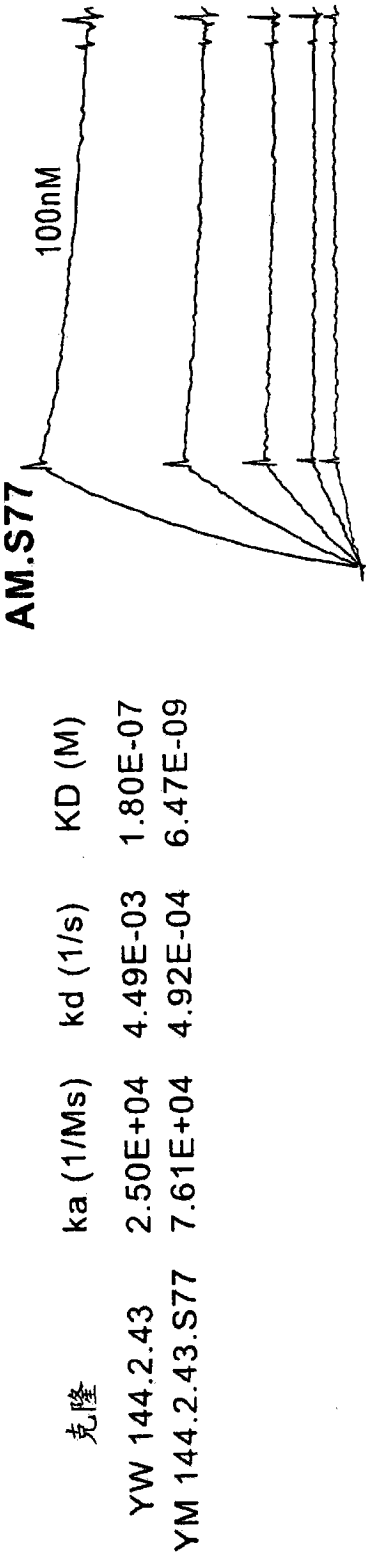


图 6B

## YW 144.2.43.S77 Fab 对 C3b 和 C3

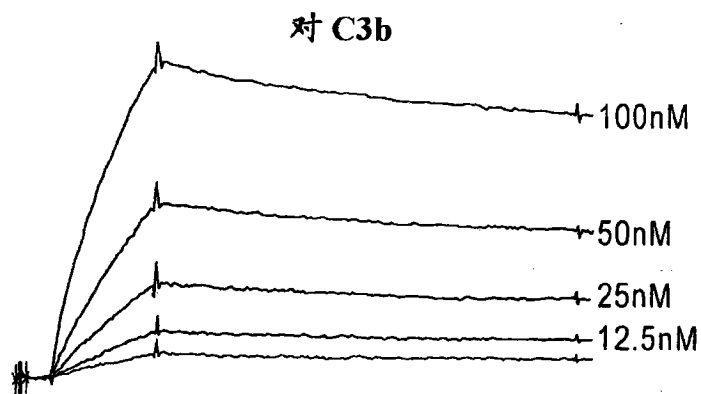


图 7A

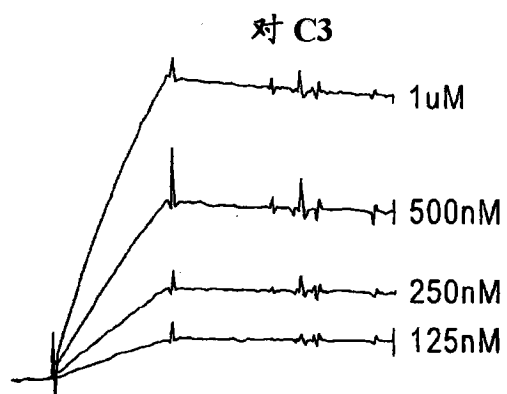


图 7B

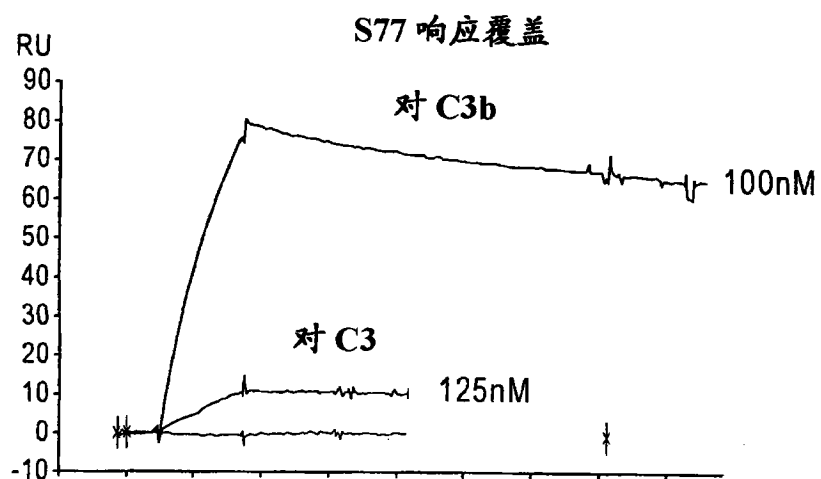


图 7C

S77 识别 C3b, 但是不识别原分子 C3

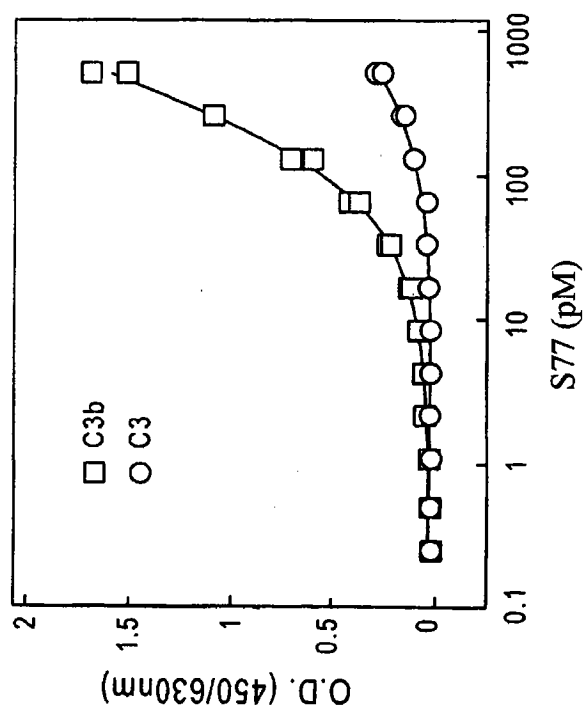


图 8A

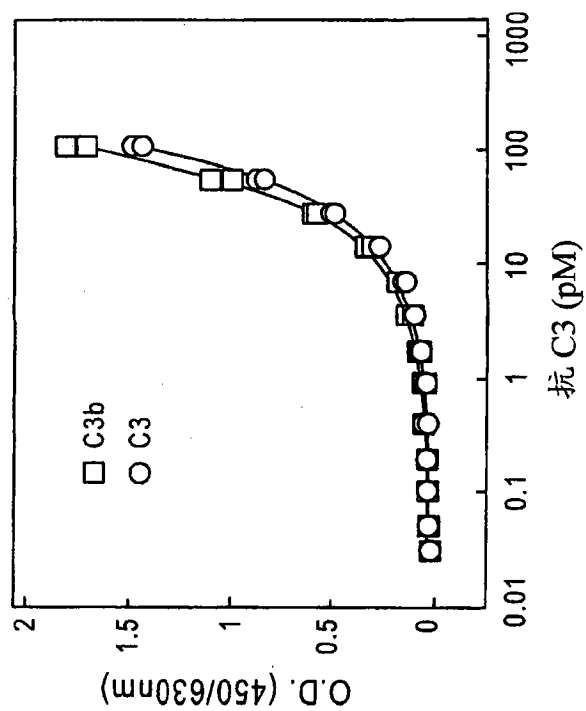


图 8B

## C3b 抗体特异性抑制补体旁路途径

| 全长 IgG   |           |
|----------|-----------|
| 克隆编号     | IC50 (nM) |
| 2.43 S77 | 112       |

图 9A

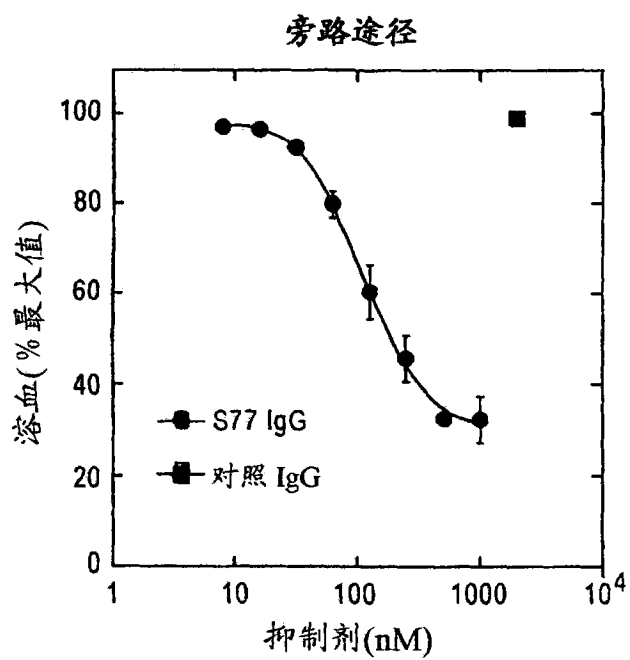


图 9B

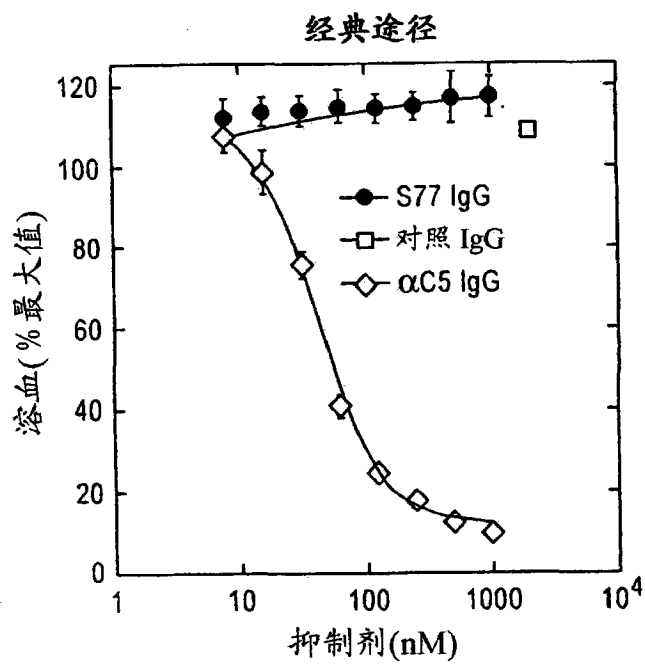
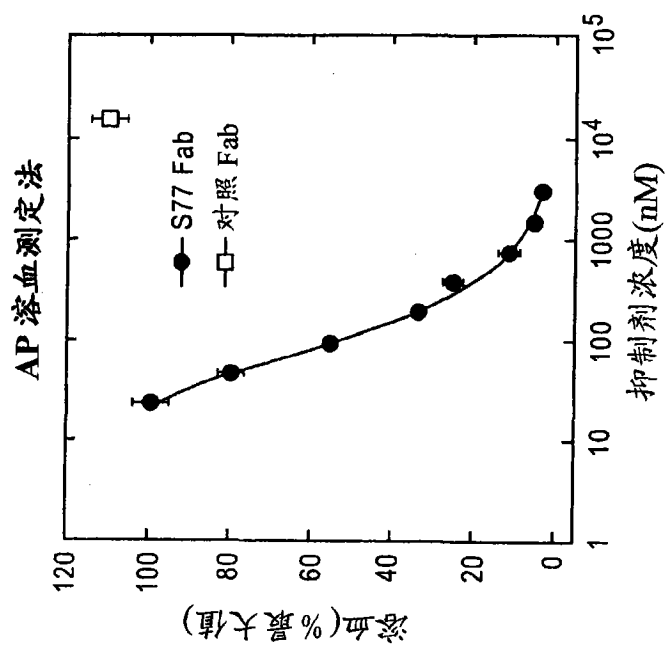


图 9C

亲和力和成熟的 S77 Fab 抑制补体旁路途径



| Fab      |           |           |
|----------|-----------|-----------|
| 克隆编号     | IC50 (nM) | IC90 (nM) |
| 2.43 S77 | 100       | 632       |

图 10

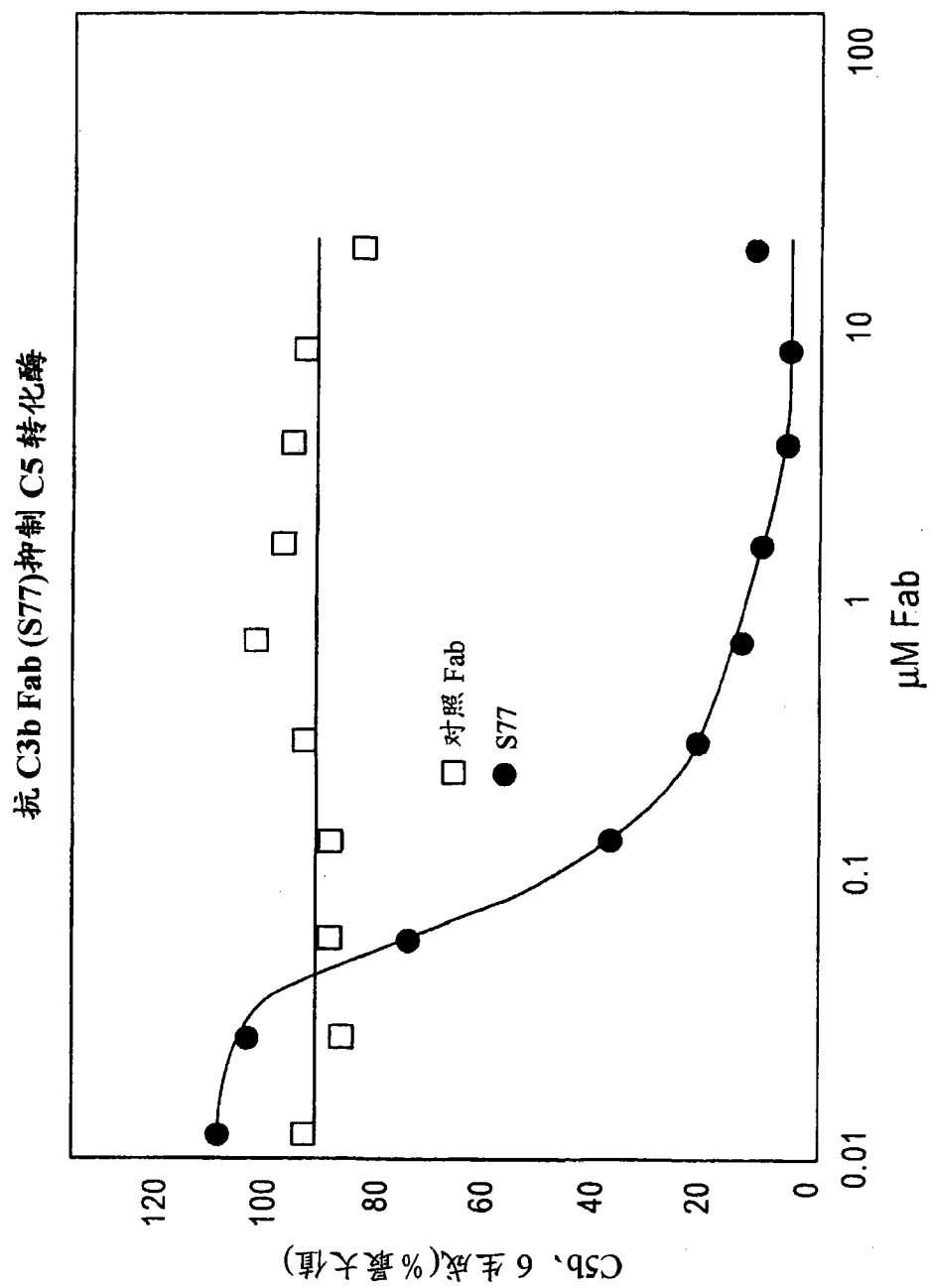


图 11

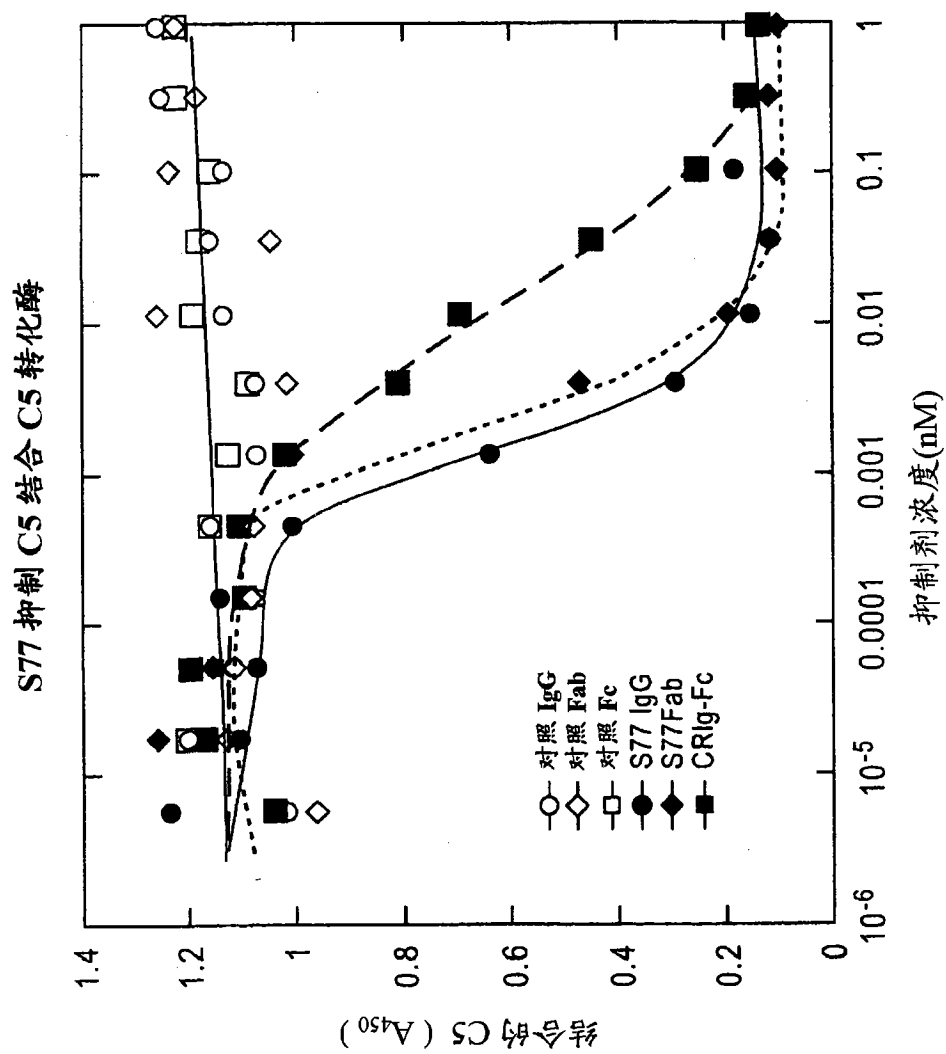


图 12

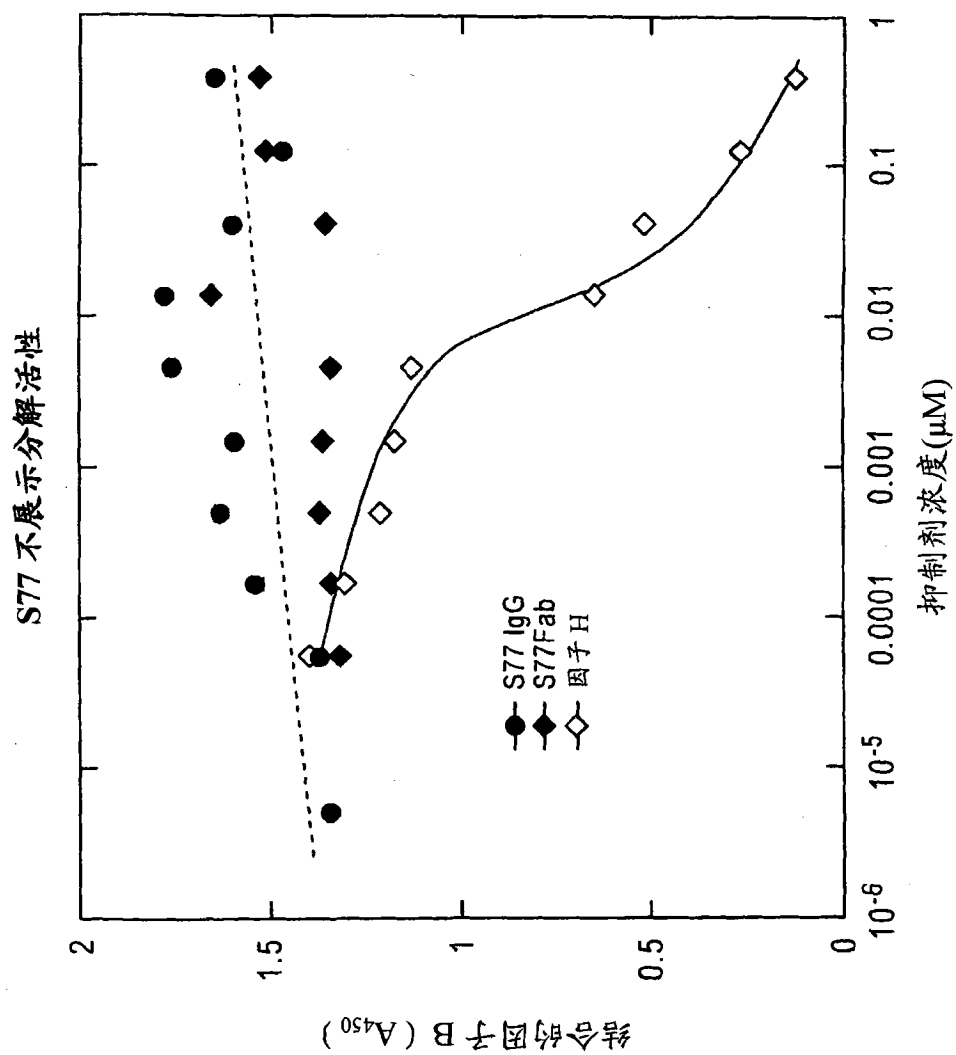


图 13

S77 抑制因子 B 结合 C3b, 而且抑制 C3bBb 转化酶形成

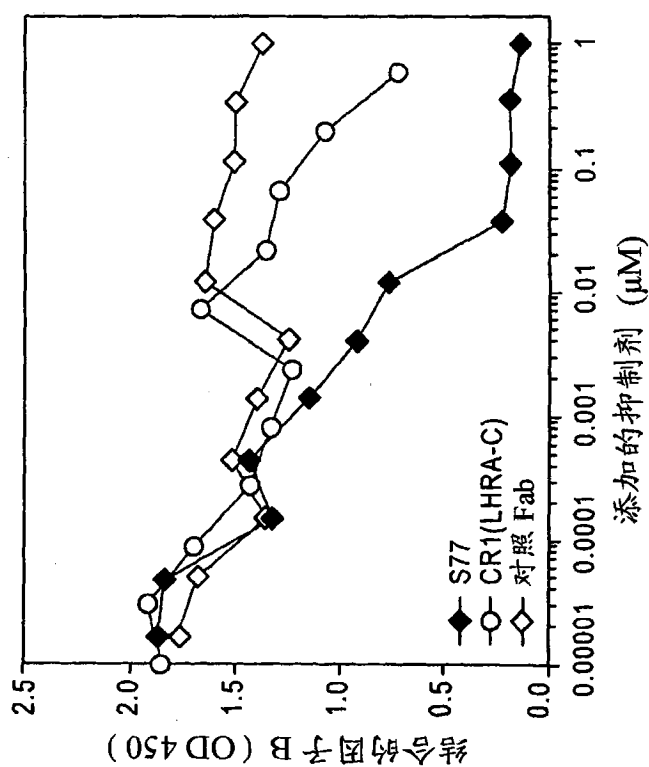


图 14A

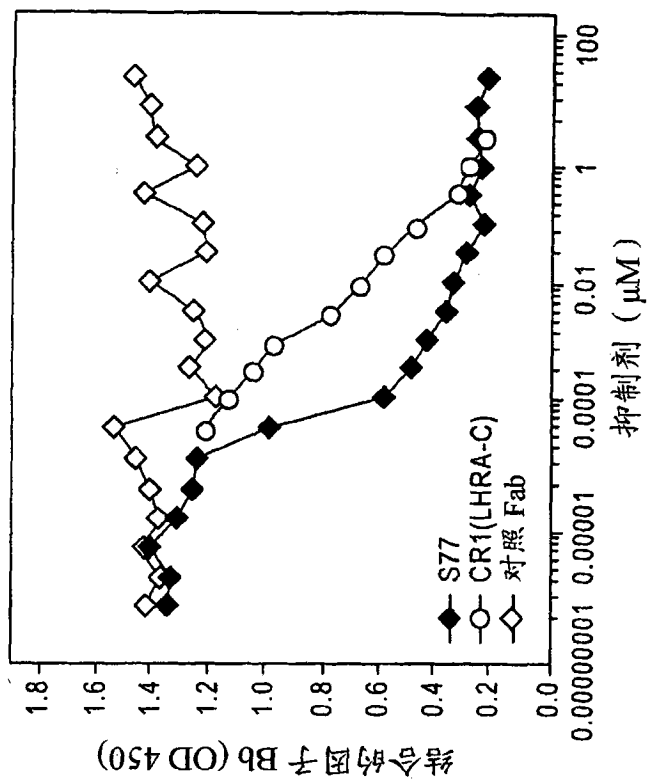


图 14B

S77 能在存在结合有 iBb 的情况下结合 C3b 且分解 C3 转化酶

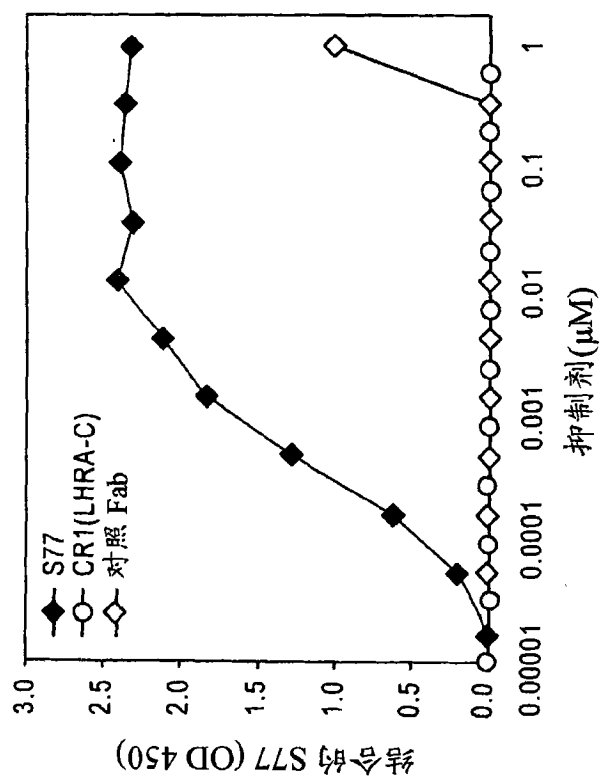


图 15A

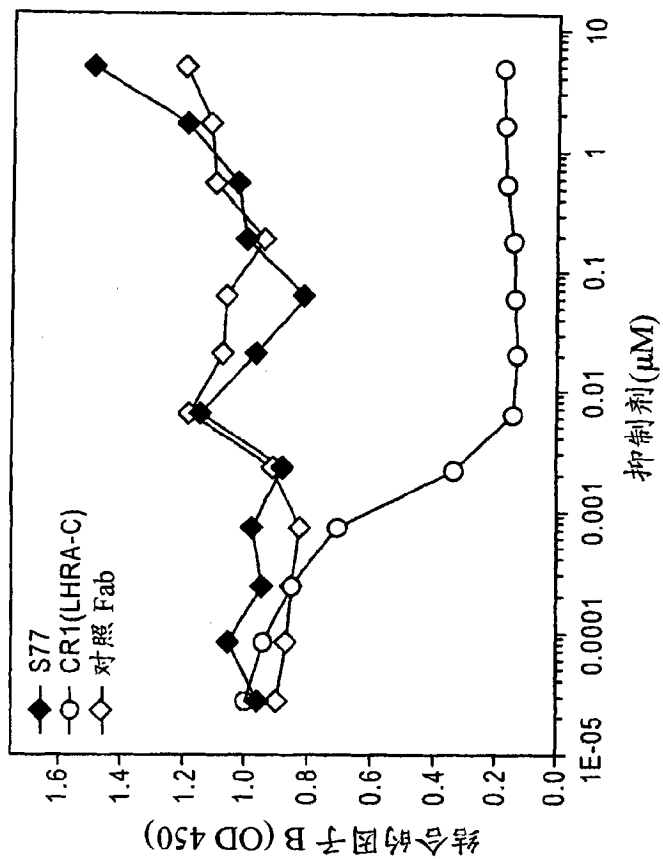


图 15B

S77 抑制因子 H 结合 C3b 且抑制因子 H 辅助因子活性

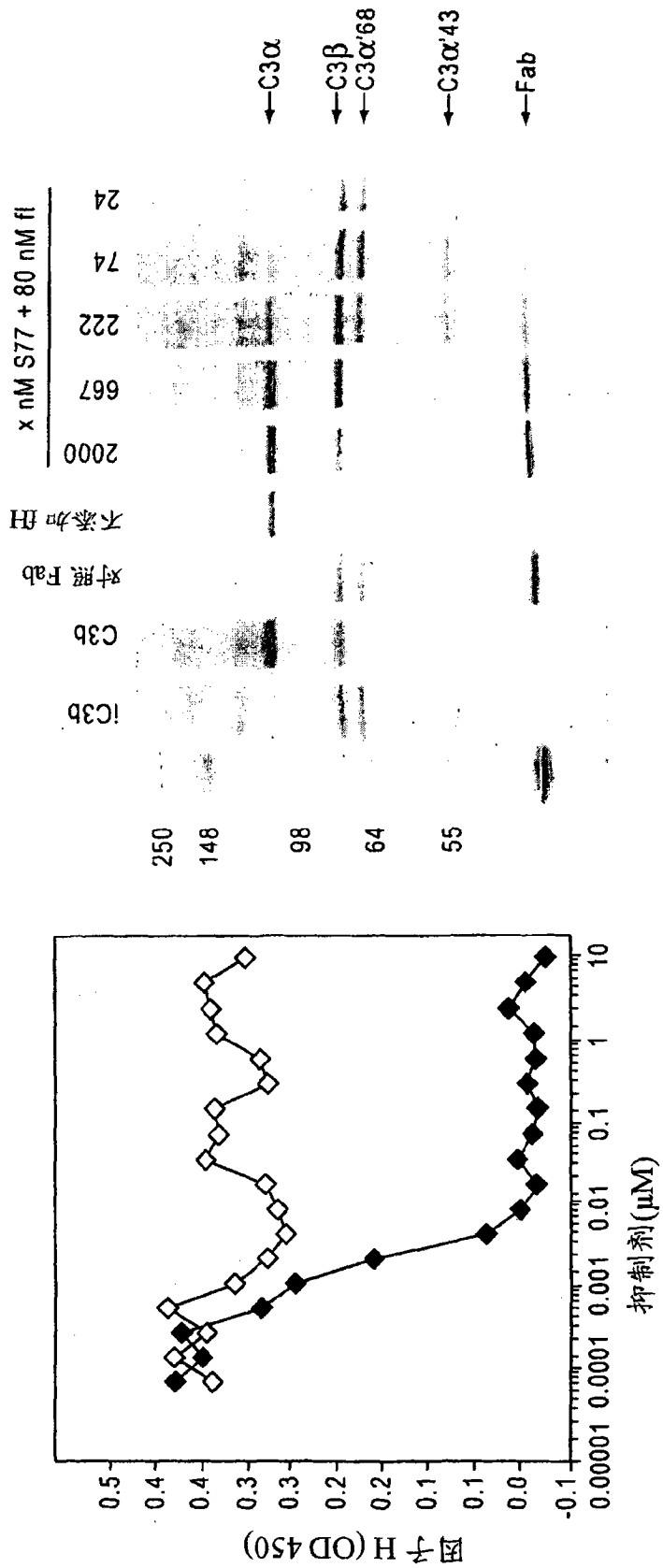


图 16B

图 16A

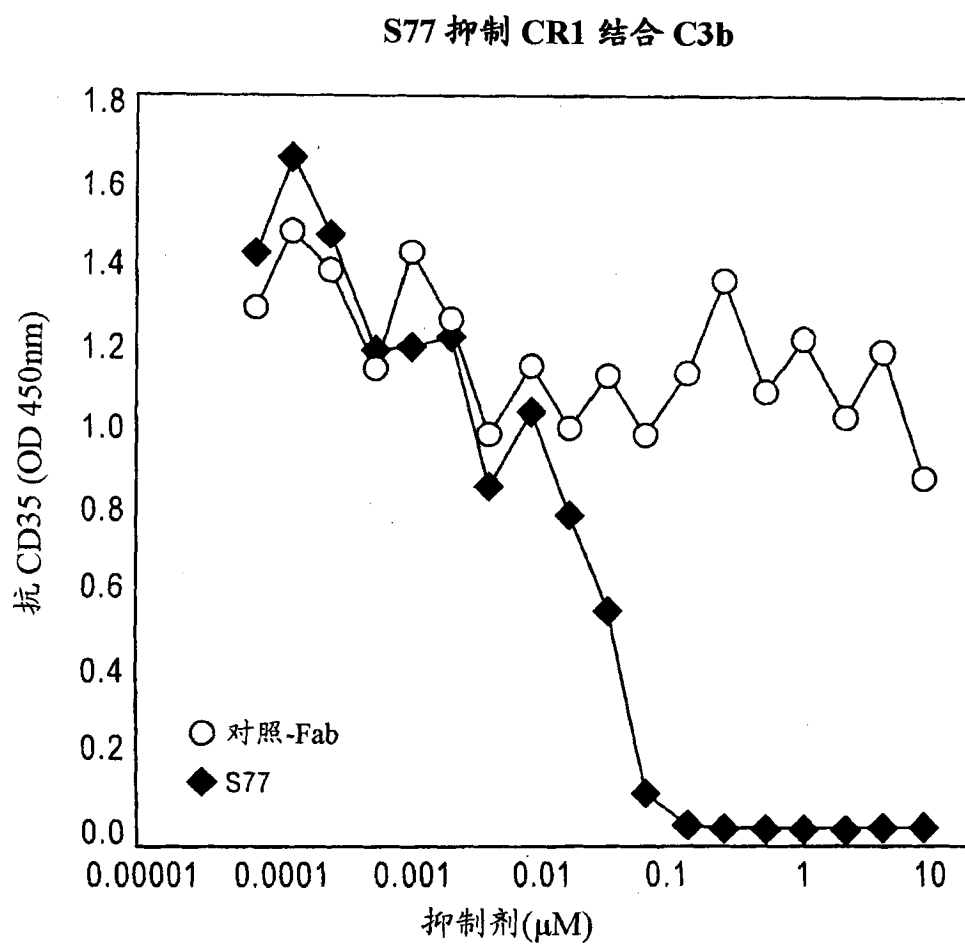


图 17

轻链

```

1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPK 45
15
30
46  LLISASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQ 90
60
75
91  HYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL 135
105
120
136  LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSLT 180
150
165
181  LSKADYEKKHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 210 214
195

```

图 18A

## 重链

```

1  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL45
15
46  EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED90
60
91  TAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS135
105
136  KSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS180
150
181  GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK225
195
226  THTCPPCPAPELLGGPSVFFLPKPKD255TLMSRTPETCVVDVS270
240
271  HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY300NS315TYRVSVLTVLHQD330
285
316  WLN330GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPRREPQVYTLPPSREE360
330
361  MTKNQVSLTCLVKGFYPPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPPVLDSDG405
375
406  SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV420FS435CSVMH449EALHNHYTQKSLSLSPG
420

```

图 18B

**C3b 上接触 S77 的残基**

>来自 C3b:

SER A 548 28.00 81.00 的 34.57%

ASP A 550 10.00 130.00 的 7.69%

ARG A 551 81.00 133.00 的 60.90%

VAL A 554 20.00 58.00 的 34.48%

ASP A 732 54.00 100.00 的 54.00%

MET A 804 1.00 17.00 的 5.88%

GLN A 805 11.00 36.00 的 30.56%

ASP A 806 48.00 77.00 的 62.34%

ARG A 833 66.00 91.00 的 72.53%

GLN A 834 3.00 104.00 的 2.88%

ASN A 835 121.00 140.00 的 86.43%

GLN A 836 56.00 57.00 的 98.25%

GLU A 837 80.00 114.00 的 70.18%

LEU A 838 4.00 5.00 的 80.00%

LYS A 839 25.00 88.00 的 28.41%

PRO A 867 8.00 36.00 的 22.22%

PRO A 868 26.00 43.00 的 60.47%

TYR A 895 1.00 23.00 的 4.35%

HIS A 896 101.00 115.00 的 87.83%

HIS A 897 67.00 73.00 的 91.78%

PHE A 898 166.00 205.00 的 80.98%

ILE A 899 49.00 70.00 的 70.00%，A 链微分面积: 1026.0  
(此链总面积 69629.0 的 1.47%)

增图 1

### 与 C3b 接触的 Fab S77 残基

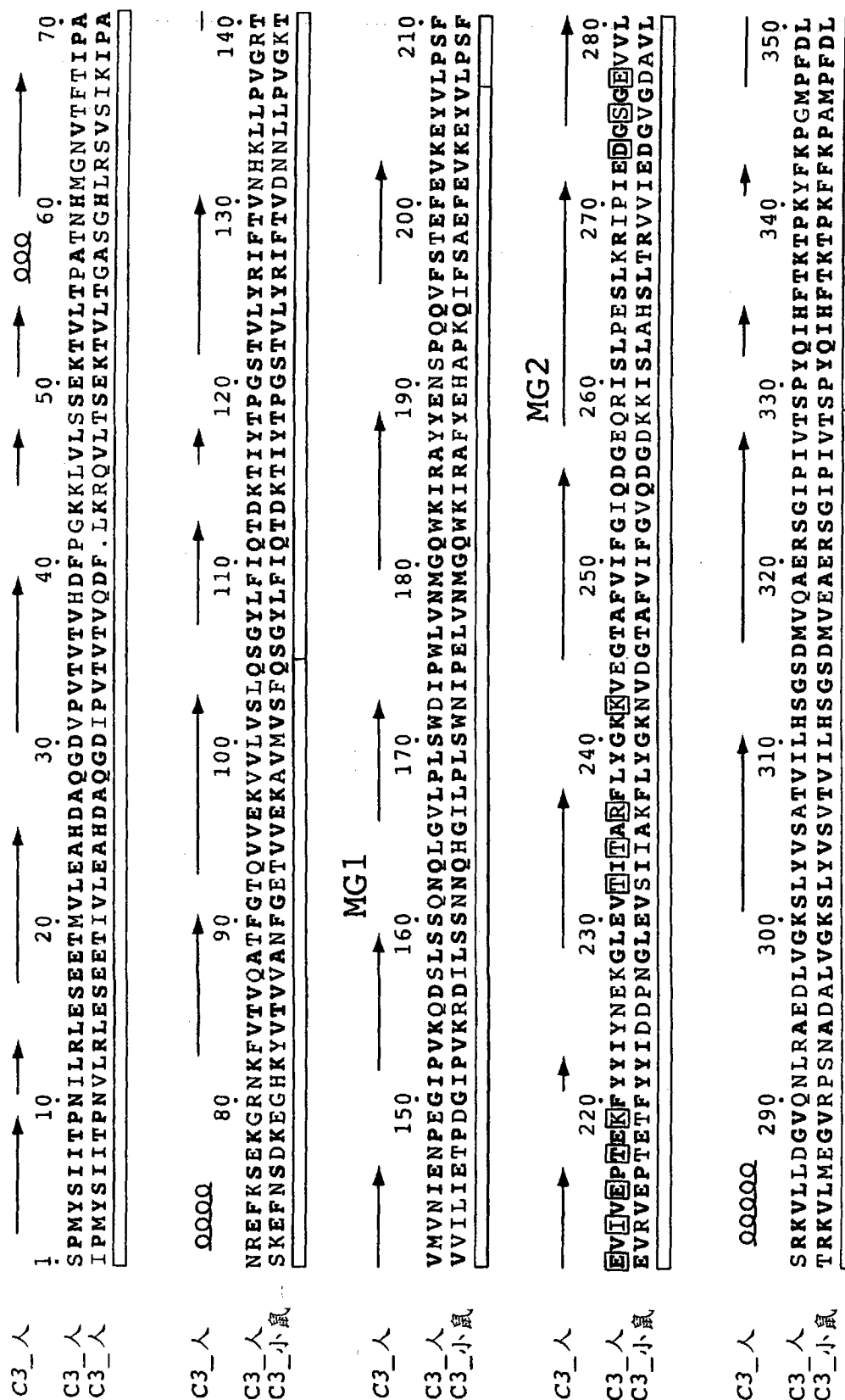
#### 与 C3b 接触的 S77LC:

ASP B 28 41.00 93.00 的 44.09%  
SER B 30 15.00 40.00 的 37.50%  
LEU B 46 3.00 9.00 的 33.33%  
TYR B 49 36.00 65.00 的 55.38%  
TYR B 55 15.00 50.00 的 30.00%  
TYR B 92 38.00 94.00 的 40.43%

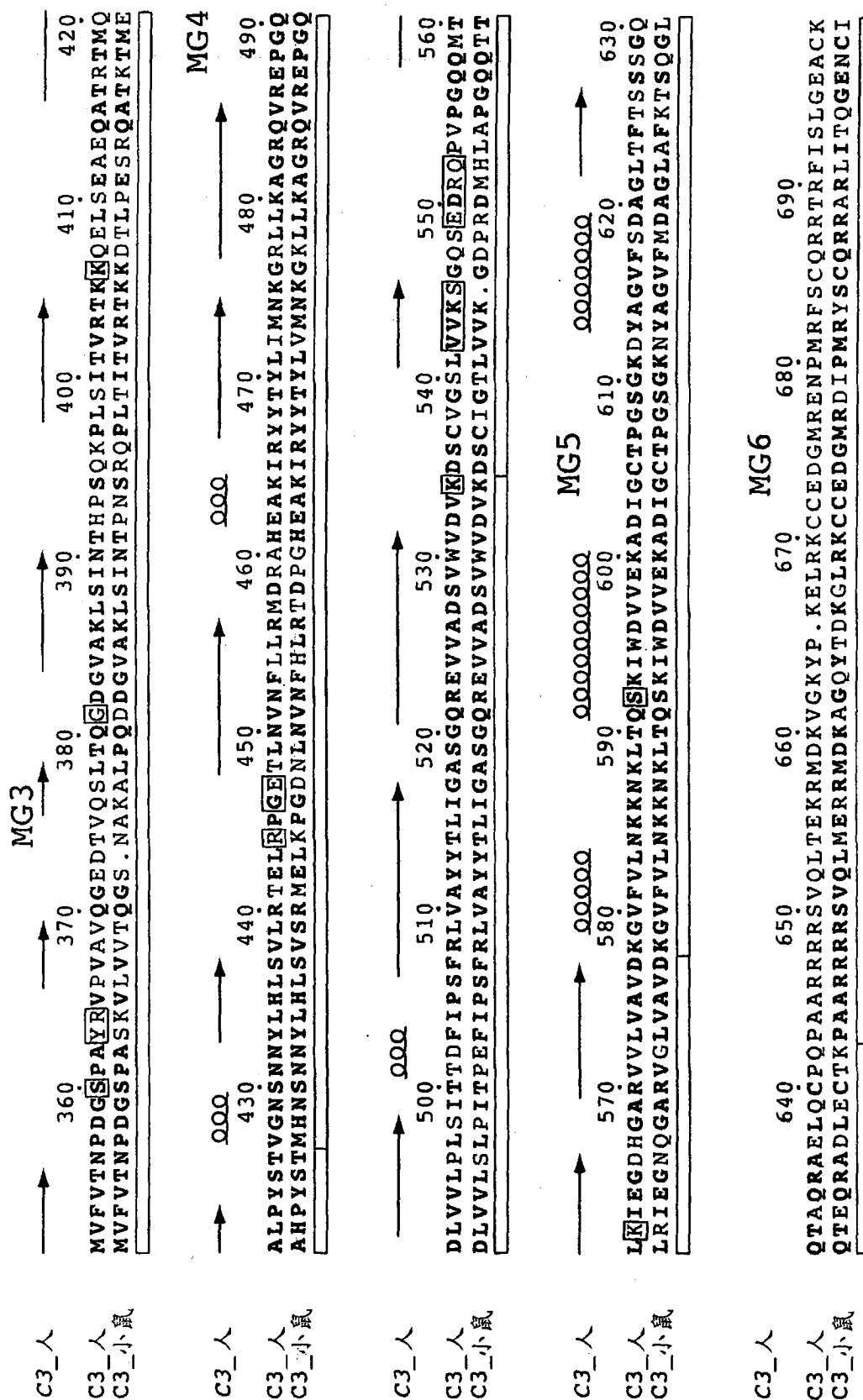
#### S77 HC 上与 C3b 接触的残基:

VAL B1002 13.00 23.00 的 56.52%  
GLY B1026 8.00 60.00 的 13.33%  
PHE B1027 17.00 29.00 的 58.62%  
SER B1028 34.00 69.00 的 49.28%  
THR B1030 31.00 64.00 的 48.44%  
SER B1031 96.00 96.00 的 100.00%  
SER B1032 18.00 18.00 的 100.00%  
SER B1033 3.00 5.00 的 60.00%  
TYR B1052 65.00 75.00 的 86.67%  
TYR B1054 76.00 173.00 的 43.93%  
ASN B1055 22.00 106.00 的 20.75%  
PHE B1057 16.00 96.00 的 16.67%  
ARG B1098 41.00 41.00 的 100.00%  
ASN B1099 8.00 11.00 的 72.73%  
ALA B1100 30.00 30.00 的 100.00%  
LEU B1101 98.00 108.00 的 90.74%  
TYR B1102 37.00 49.00 的 75.51%  
GLY B1103 10.00 41.00 的 24.39%  
SER B1104 65.00 96.00 的 67.71%  
GLY B1105 27.00 93.00 的 29.03%  
GLY B1106 17.00 25.00 的 68.00%  
TYR B1107 2.00 34.00 的 5.88%  
ALA B1109 4.00 4.00 的 100.00%  
ASP B1111 12.00 26.00 的 46.15%  
TYR B1112 11.00 77.00 的 14.29%

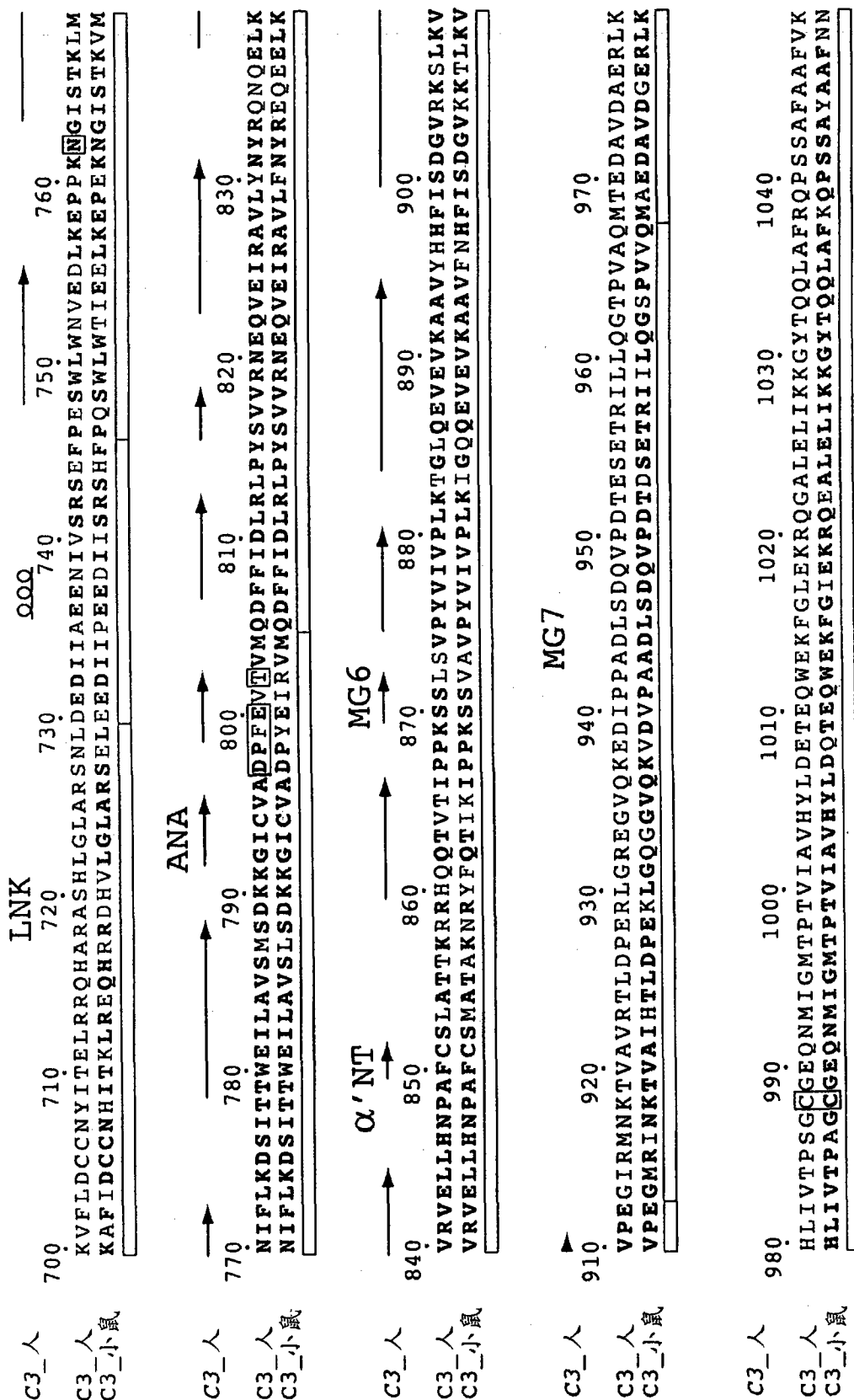
增图 2



增图 3(第 1 部分)



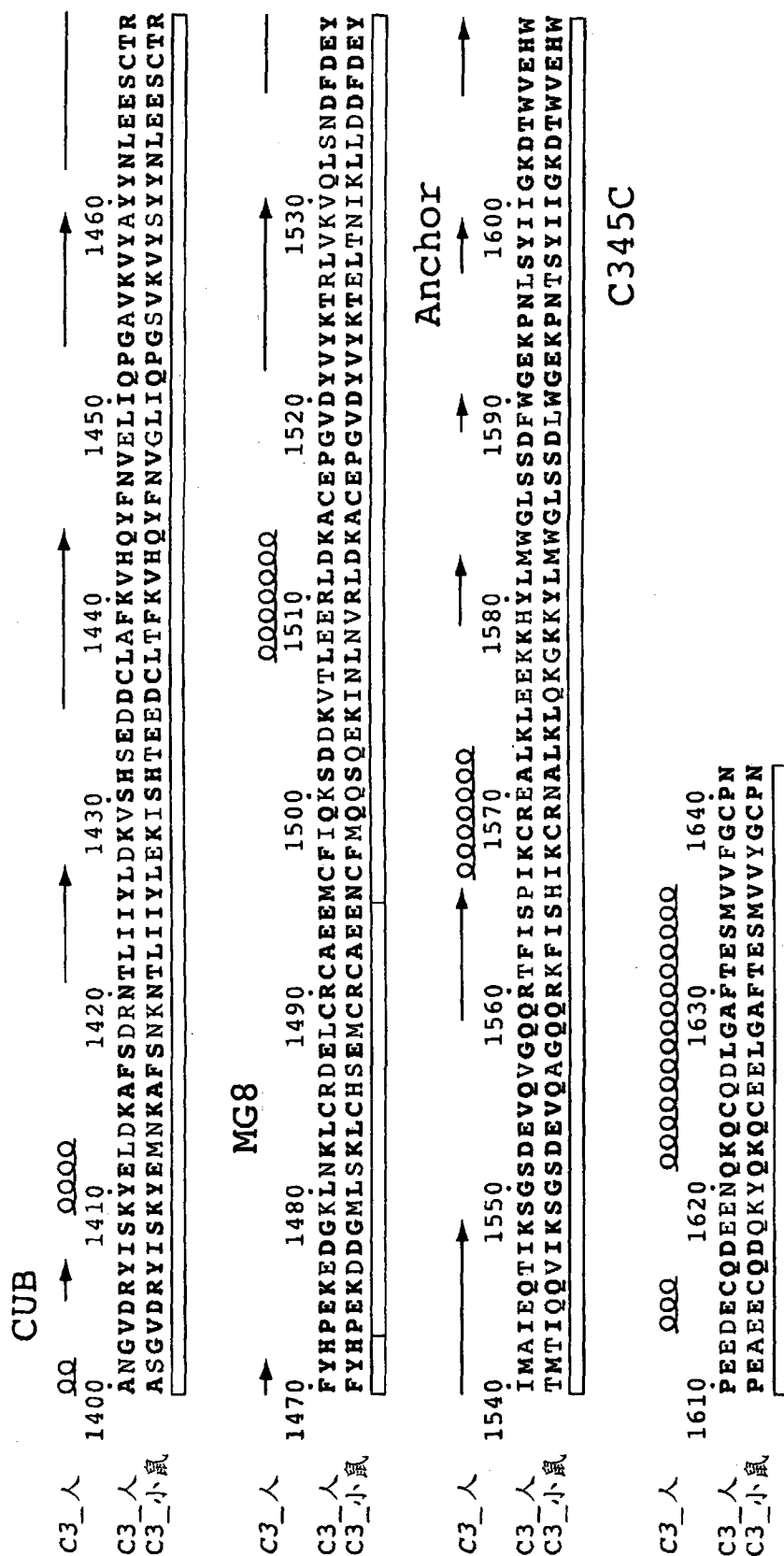
增图 3(第 2 部分)



增图 3(第 3 部分)

|       |                                                                           |      |      |      |      |      |      |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| C3_人  | 1050                                                                      | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 |
| C3_人  | CUB                                                                       |      |      |      |      |      |      |
| C3_小鼠 | RAPSTWLTAYVVKVFSLAVNLI AIDSQVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQEDAPVIHQEMIGGLRNNNEKDM   |      |      |      |      |      |      |
|       | RPPSTWLTAYVVKVFSLAANLI AIDSHVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQEDGPVIHQEMIGGFRNAKEADV   |      |      |      |      |      |      |
| C3_人  | 1120                                                                      | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 |
| C3_人  | TED                                                                       |      |      |      |      |      |      |
| C3_小鼠 | ALTAFVLISLQEAKDICEEQVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQORSYTVAIAGYALAQMGRLKGPLLNNKFL  |      |      |      |      |      |      |
|       | SLTAFVLIALQEAARDICEGQVNSLPGSINKAGEYIEASYMNLQRPYTVAIAGYALALMKNKLEEPYLGKFL  |      |      |      |      |      |      |
| C3_人  | 1190                                                                      | 1200 | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| C3_人  | TTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYALLALLQKDFDFVPPVVRWLNEQRYGGYGSTQATFMVFQALAQ       |      |      |      |      |      |      |
| C3_小鼠 | NTAKDRNRWEEPQQLYNVEATSYALLALLLKKDFDSVPPVVRWLNEQRYGGYGSTQATFMVFQALAQ       |      |      |      |      |      |      |
| C3_人  | 1260                                                                      | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 |
| C3_人  | TED                                                                       |      |      |      |      |      |      |
| C3_小鼠 | YQKDAPDHQELNLDVSLQIPSRSSKI THRIHWESASLLRSEETKENEGFTVTAEGKGQGTLSVVVTMYHAK  |      |      |      |      |      |      |
|       | YQTDVDPDHKDLNMDVSFHLPSRSSATTFRLWENGNNLRSEETKQNEAFSLTAKGKRGCTLSVAVVYHAK    |      |      |      |      |      |      |
| C3_人  | 1330                                                                      | 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 |
| C3_人  | AKDQLTCNKFDLKVTIKPAPETEKRRPQDAKNTMILEICTRIRGDDQDATMSILDISMMTGFAPD TDDLKQL |      |      |      |      |      |      |
| C3_小鼠 | LKSQVTCKKFDLRSIRPAPETAKKPEEAKNTMFLEICTKYLGDVDATMSILPISMMTGFAPD TDKDLELL   |      |      |      |      |      |      |
|       | → OOOOOOOOQ                                                               |      |      |      |      |      |      |

增图 3(第 4 部分)



增图 3(第 5 部分)