



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101970494 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 200980105691. 9

(22) 申请日 2009. 02. 19

(30) 优先权数据

61/066, 539 2008. 02. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2009/000184 2009. 02. 19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/103113 EN 2009. 08. 27

(83) 生物保藏信息

00110609 2000. 11. 06

(73) 专利权人 G2 炎症私人有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72) 发明人 彼得·惠特菲尔德 戴维·扎赫拉
查尔斯·麦凯

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1642983 A, 2005. 07. 20, 全文.

CN 1997384 A, 2007. 07. 11, 全文.

W0 2003062278 A1, 2007. 07. 31, 全文.

Wu H. Simultaneous humanization

and affinity optimization of monoclonal
antibodies. 《Methods In Molecular
Biology》. 2003, 第 207 卷 197-212.

Robinson M 等. Improving monoclonal
antibodies for cancer therapy. 《Drug
Development Research》. 2004, 第 61 卷 (第 3
期), 172-187.

Lee H 等. Human C5aR knock-in mice
facilitate the productin and assessment of
anti-inflammatory monoclonal antibodies.
《Nature Biotechnology》. 2006, 第 24 卷 (第 10
期), 1279-1284.

审查员 尹军团

权利要求书2页 说明书71页

序列表29页 附图33页

(54) 发明名称

人源化抗 -C5aR 抗体

(57) 摘要

本发明涉及与人 C5a 受体结合的人源化抗体
及其作为治疗和诊断药剂的用途。本发明进一步
涉及编码所述人源化抗体的核酸序列, 及其在重
组宿主细胞中的表达。特别地, 本发明涉及来源于
与人 C5a 受体特异性结合的小鼠抗体 7F3 的人源
化抗体。

1. 一种纯化的和 / 或重组的人源化抗体, 包括:
 - i) 包括了由 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列组成的可变区的免疫球蛋白轻链, 和
 - ii) 包括了由 SEQ ID NO:36 的氨基酸序列组成的可变区的免疫球蛋白重链, 其中所述抗体结合人 C5aR。
2. 根据权利要求 1 所述的人源化抗体, 其中:
 - i) 所述免疫球蛋白轻链包括了由与 SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:41 中的一个或多个至少 98% 相同的氨基酸序列组成的恒定区, 和
 - ii) 所述免疫球蛋白重链包括了由与 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44 和 SEQ ID NO:45 中的一个或多个至少 98% 相同的氨基酸序列组成的恒定区。
3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的人源化抗体, 所述人源化抗体为由两条重链和两条轻链组成的四多肽链结构、单链抗体、双链抗体、三链抗体或四链抗体。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的人源化抗体, 所述人源化抗体为结合人 C5aR 的抗体片段。
5. 根据权利要求 4 所述的人源化抗体, 其中所述片段为 Fab 片段。
6. 一种结合物, 包含根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体和直接或间接结合到所述抗体的治疗剂。
7. 根据权利要求 6 所述的结合物, 其中所述治疗剂选自由下列物质组成的组: 细胞毒素、放射性同位素、免疫调节药剂、抗血管新生药剂、毒素、抗增殖药剂、促凋亡药剂、化疗剂、和治疗核酸。
8. 根据权利要求 7 所述的结合物, 其中所述毒素是假单胞杆菌 (*Pseudomonas*) 外毒素或其衍生物。
9. 根据权利要求 6 至 8 中任一项所述的结合物, 其中所述治疗剂通过接头间接结合到所述抗体。
10. 根据权利要求 9 所述的结合物, 其中所述接头选自由下列物质组成的组: 4-(4'-乙酰基苯氧基) 丁酸 (AcBut)、3-乙酰基苯基羧酸 (AcPac)、4-巯基-4-甲基-戊酸 (酰胺)、及其衍生物。
11. 一种结合物, 包含根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体和直接或间接结合到所述抗体的可检测标签。
12. 根据权利要求 11 所述的结合物, 其中所述标签选自由下列物质组成的组: 放射性标签、荧光标签、酶标签和显像剂。
13. 一种分离的和 / 或外源的多核苷酸, 其编码权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其链。
14. 一种包含权利要求 13 所述的多核苷酸的载体。
15. 一种包含权利要求 13 所述的多核苷酸和 / 或权利要求 14 所述的载体的宿主细胞。
16. 根据权利要求 15 所述的宿主细胞, 其为细菌、酵母或植物细胞。
17. 一种组合物, 包含根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体、权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物、权利要求 13 所述的多核苷酸、权利要求 14 所述的载体和 / 或权利要求 15 或 16 所述的宿主细胞, 以及药用载体。
18. 一种生产抗体的方法, 所述方法包含培养权利要求 15 或 16 所述的宿主细胞, 以表

达所述多核苷酸并生产所述抗体,其中所述宿主细胞包含至少一种权利要求 13 所述的多核苷酸。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述免疫球蛋白轻链和所述免疫球蛋白重链被一个连续多核苷酸上的两个分开的开放阅读框编码。

20. 根据权利要求 18 或权利要求 19 所述的方法,进一步包含从所述宿主细胞培养物中回收所述抗体。

21. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物在制备用于抑制人 C5aR 与其配体相互作用的药物中的应用。

22. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物在制备用于抑制细胞中人 C5aR 活性的药物中的应用。

23. 一种抑制人 C5aR 与其配体相互作用的体外方法,所述方法包括使人 C5aR 暴露于根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物。

24. 一种抑制细胞中人 C5aR 活性的体外方法,所述方法包含使细胞暴露于根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物。

25. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体、根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物、权利要求 13 所述的多核苷酸、权利要求 14 所述的载体、权利要求 15 或 16 所述的宿主细胞和 / 或权利要求 17 所述的组合物在制备用于治疗或预防对象中的病症的药物中的应用。

26. 根据权利要求 25 所述的应用,其中所述病症是免疫病态病症。

27. 根据权利要求 26 所述的应用,其中所述免疫病态病症是自身免疫疾病。

28. 根据权利要求 25 所述的应用,其中所述病症是炎性疾病。

29. 根据权利要求 28 所述的应用,其中所述炎性疾病是急性炎症或慢性炎症。

30. 根据权利要求 25 至 29 中任一项所述的应用,其中所述免疫病态病症或炎性疾病涉及白细胞迁移和 / 或白细胞活化。

31. 一种根据权利要求 25 至 29 中任一项所述的应用,其中所述免疫病态病症或炎性疾病涉及补体活化。

32. 根据权利要求 6 至 10 中任一项所述的结合物、或编码其的多核苷酸在制备用于递送治疗剂到对象的炎症部位的药物中的应用。

33. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体、或根据权利要求 4 至 12 中任一项所述的结合物在制备用于将遗传物质引入到呈递 C5aR 的细胞中的药物中的应用,其中所述抗体或结合物结合于遗传物质或与遗传物质联合。

34. 一种试剂盒,包含根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体、根据权利要求 6 至 12 中任一项所述的结合物、权利要求 13 所述的多核苷酸、权利要求 14 所述的载体、权利要求 15 或 16 所述的宿主细胞和 / 或权利要求 17 所述的组合物。

人源化抗 -C5aR 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及与人 C5a 受体结合的人源化抗体及其作为治疗和诊断药剂的用途。本研究中进一步涉及编码所述人源化抗体的核酸序列,及其在重组宿主细胞中的表达。特别地,本发明涉及来源于与人 C5a 受体特异性结合的小鼠抗体 7F3 的人源化抗体。

背景技术

[0002] 每种补体蛋白 C3-C5 的蛋白水解都会产生称为过敏毒素的含有信号分子的氨基末端阳离子片段。这些片段中最有效的片段 C5a 引发了最广泛的反应。认为炎症反应的组成部分是白细胞边集 (margination) 和浸润、颗粒结合型蛋白水解酶 (granule-bound proteolytic enzyme) 的释放、活性氧和氮源自由基的产生、血流和毛细血管渗透性改变以及具有收缩平滑肌的能力, C5a 分子是“完全的”促炎性介质。C5a 分子在次纳摩尔到纳摩尔水平上引发的所有髓系细胞 (中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞) 的化学趋化作用,并引起血管通透,前列腺素和循环白细胞显著地增强了血管通透性。较高的纳摩尔浓度可以引发 NADPH 氧化酶的脱粒和活化。这种生物活性的广度与其他炎性介质形成鲜明对比。C5a 参与包括风湿性关节炎、牛皮癣、败血症、再灌注损伤和成年呼吸窘迫综合症在内的各种疾病的发病机制 (Gerard and Gerard, 1994 ;Murdoch and Finn, 2000)。

[0003] C5a 通过与其受体 (C5aR) 的结合介导 C5a 的活性。C5aR 属于七次跨膜的 G- 蛋白偶联受体家族。C5aR 是对 C5a 具有高亲和力的受体,其中 Kd 为 ~ 1nM,其位于包括白细胞在内的一些不同细胞类型上。每个细胞的受体数量都非常高,每个白细胞可高达 200,000 个位点。受体的生物活化发生在使结合饱和的范围内。

[0004] C5aR 结构符合七次跨膜受体家族,紧接于细胞外 N- 末端之后的是七个跨膜螺旋,七个跨膜螺旋通过螺旋间结构域连接,螺旋间结构域交互地作为细胞内和细胞外环,以细胞内 C- 末端结构域为终点。C5aR 含有延伸的 N- 末端细胞外结构域。这种大型的 N- 末端结构域是典型的结合包括 IL-8 和 fMet-Leu-Phe (FMLP) 受体家族的肽的 G- 蛋白偶联受体。

[0005] 用 C5aR 拮抗剂抑制 C5a 反应可减少由 C5a 介导的急性炎性反应,而不影响其他补体成分。为了这个目的,先前已经描述了 C5aR 肽拮抗剂和抗 -C5a 受体抗体 (Watanabe 等人, 1995 ;Pellas 等人, 1998 ;Kontetis 等人, 1994 ;Kaneko 等人, 1995 ;Morgan 等人, 1993)。例如, WO 95/00164 描述了针对 C5aR 的 N- 末端肽 (残基 9-29) 的抗体。

[0006] WO 03/062278 也描述了针对 C5aR 的抗体。这些小鼠抗体中的三个称为 7F3、6C12 和 12D4。这些抗体显示出优异的性质,例如可非常有效地阻断 C5a 结合到它的受体,中止体外中性粒细胞的 C5a- 定向迁移,并阻止动物模型中的炎症。为了控制慢性疾病,有必要在数月或数年内连续几次给予小鼠抗体。然而,给予小鼠抗体的一个缺点是人免疫系统可产生针对小鼠抗体 (HAMA 反应) 其自身的抗体。HAMA 反应通过从血液迅速清除小鼠抗体使它们无效,从而阻止小鼠抗体与它的靶结合。

[0007] 为了避免形成 HAMA 反应,已采取的一个方法是通过用人序列取代非表位结合区

中的许多“外来”残基而“人源化”小鼠抗体。然而,这个过程通常导致抗原性的丧失。而且,人源化抗体领域的研究人员一直在努力确定能可靠生产具有人治疗中使用的所有必需要求的人源化抗体的合适方法。

[0008] 人源化步骤的主要问题在于对抗原的亲合力的丧失 (Jones 等人,1986),在一些情况下,损失到十分之一或更少,尤其当抗原是蛋白质时 (Verhoeyen 等人,1988)。当然,任何亲合力的丧失都是及其不愿意看到的。至少,它意味着必需将更多人源化抗体以更高代价和更大副作用的风险注射到病人中。更严重地,亲和力减小的抗体的生物功能如补体裂解、抗体依赖的细胞毒性或病毒中和作用较差。因而,对基于人源化的治疗或诊断应用有用的任何最后抗体的结构都是当前不可预知的,通常需要数个技术的多次重复和应用从而获得有用的人源化抗体。

[0009] 需要可用于诊断和 / 或治疗方法中的可替换的和 / 或改进的 C5aR 拮抗剂。特别地,需要开发用于所述人的诊断和 / 或治疗方法的适宜的人源化抗 -C5aR 抗体。

发明内容

[0010] 已生产了大量结合 C5aR 的人源化抗体,但具有结合特异性差和 / 或其他不期望的特性。然而,本发明的发明人生产了几种相关的人源化抗体,其具有用于人的诊断和 / 或治疗方法的合适活性。

[0011] 第一方面,本发明提供了基本上纯化的和 / 或重组的人源化抗体,其包含

[0012] i) 包含可变区的免疫球蛋白轻链,该可变区包含与 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33 和 SEQ ID NO :48 中的一个或多个序列至少 93% 相同的氨基酸序列,和 / 或

[0013] ii) 包含可变区的免疫球蛋白重链,该可变区包含与 SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 和 SEQ ID NO :39 中的一个或多个序列至少 90% 相同的氨基酸序列,

[0014] 其中该抗体结合人 C5aR。

[0015] 在优选的实施例中,免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含选自由 SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35 和 SEQ ID NO :36 组成的组的氨基酸序列。更优选地,免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO :36 提供的氨基酸序列。

[0016] 在另一个优选的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含选自由 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32 和 SEQ ID NO :33 组成的组的氨基酸序列。更优选地,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO :31 提供的氨基酸序列。

[0017] 在特别优选的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO :31 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO :36 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO :41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44 或 SEQ ID NO :45 提供的氨基酸序列。更优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO :41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO :43 或 SEQ ID NO :45 提供的氨基酸序列,更优选 SEQ ID NO :45。

[0018] 在一个实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO :31 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO :34 提供的氨

氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:42 或 SEQ ID NO:43 提供的氨基酸序列。

[0019] 在另一个实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:32 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:34 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:42 或 SEQ ID NO:43 提供的氨基酸序列。

[0020] 在进一步的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:33 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:34 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:44 提供的氨基酸序列。

[0021] 在又一个实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:31 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:35 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:45 提供的氨基酸序列。

[0022] 在另一个实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:32 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:35 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:43 提供的氨基酸序列。

[0023] 在进一步的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:33 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:35 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:43 提供的氨基酸序列。

[0024] 在另一个的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:32 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:36 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:43 提供的氨基酸序列。

[0025] 在进一步的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:33 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含由 SEQ ID NO:36 提供的氨基酸序列。优选地,免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:41 提供的氨基酸序列,而免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含由 SEQ ID NO:43 提供的氨基酸序列。

[0026] 在优选的实施例中,该抗体可在人 C5aR 的第二细胞外环上结合抗原表位

EEYFPP (SEQ ID NO :38)。在进一步的实施例中,该抗体没有在人 C5aR 的 N-末端上可检测地结合抗原表位 PDYGHYDDKDTLDLNTVPDKT (SEQ ID NO :59)。

[0027] 在优选的实施例中,抗体结合人 C5aR,该抗体的亲和力至少在 7F3 的 8 倍以内,更优选至少在 7F3 的 4 倍以内,甚至更优选在 7F3 的 3 倍以内。

[0028] 在优选的实施例中,对于表达人 C5aR 的人中性粒细胞而言,本发明抗体的 EC_{50} 小于 4.5nM。在可替换的实施例中,本发明抗体的 EC_{50} 小于 3nM,小于 2nM,或小于 1nM。用于表达 C5aR 的人中性粒细胞抗体的 EC_{50} 可按实施例 3 中描述的方法确定。

[0029] 在另一个实施例中,本发明抗体能够使人中性粒细胞迁移降低至少 40%,更优选至少 50%,更优选至少 60%,更优选至少 70%,以及甚至更优选 80%。在进一步的实施例中,本发明抗体阻断 C5aR 诱导的人中性粒细胞迁移的能力比 7F3 强,至少强 2 倍,甚至更优选强 5 倍。人中性粒细胞迁移的降低可按实施例 5 中描述的方法确定。

[0030] 在进一步的实施例中,本发明抗体没有可检测地活化人中性粒细胞。中性粒细胞活化可通过分析 CD62L 和 CD11b 表达,和 / 或超氧化物产生确定,如实施例 7 中所述。

[0031] 在又一个实施例中,本发明抗体没有可检测地消耗 (deplete) 回体法中来自血液的中性粒细胞或单核细胞。回体法中 (ex vivo) 中性粒细胞或单核细胞的消耗可按实施例 8 和 9 中描述的方法确定。

[0032] 在进一步的实施例中,本发明抗体能够阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 向人中性粒细胞的流入,抗体的浓度小于 30 μ g/mL,更优选小于 10 μ g/mL,更优选小于 5 μ g/mL,更优选小于 1 μ g/mL。阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 流入人中性粒细胞可按实施例 6 中描述的方法确定。

[0033] 在一个实施例中,本发明抗体是非消耗性 (non-depleting) 和非活化性 (non-activating) 的。此处描述的此种抗体的实施例是 hAb-Q。在可替换的实施例中,本发明的抗体是消耗性的和非活化性的。此处描述的此种抗体的实施例是 hAb-N。

[0034] 在优选的实施例中,

[0035] i) 免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含与 SEQ ID NO :40 和 SEQ ID NO :41 中的一个或多个序列至少 90% 相同的氨基酸序列,和

[0036] ii) 免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含与 SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44 和 SEQ ID NO :45 中的一个或多个序列至少 90% 相同的氨基酸序列,更优选地,

[0037] i) 免疫球蛋白轻链包含恒定区,该恒定区包含与 SEQ ID :41 至少 90% 相同的氨基酸序列,和

[0038] ii) 免疫球蛋白重链包含恒定区,该恒定区包含与 SEQ ID NO :45 至少 90% 相同的氨基酸序列。

[0039] 人源化抗体可以是本领域中已知的任何适宜的结构。实施例包括,但不限于,由两条重链和两条轻链组成的四多肽链结构、单链抗体、双链抗体 (diabody)、三链抗体 (triabody) 或四链抗体 (tetrabody),以及抗体片段,例如,但不限于 Fab 片段或单域抗体。

[0040] 另一方面,本发明提供了包含可变区的基本上纯化的和 / 或重组的免疫球蛋白轻链,该可变区包含与 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33 和 SEQ ID NO :48 中的一个或多个序列至少 93% 相同的氨基酸序列。

[0041] 在优选的实施例中,免疫球蛋白轻链包含可变区,该可变区包含与 SEQ ID NO :31

至少 93% 相同的氨基酸序列。

[0042] 在进一步的实施例中,本发明提供了包含可变区的基本上纯化的和 / 或重组的免疫球蛋白重链,该可变区包含与 SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 和 SEQ ID NO :39 中一个或多个序列至少 90% 相同的氨基酸序列。

[0043] 在优选的实施例中,免疫球蛋白重链包含可变区,该可变区包含与 SEQ ID NO :36 至少 90% 相同的氨基酸序列。

[0044] 另一方面,本发明提供了包含本发明免疫球蛋白轻链和 / 或本发明免疫球蛋白重链的基本上纯化的和 / 或重组的抗体,其中该抗体可结合人 C5aR。

[0045] 也提供了包含本发明抗体和直接或间接结合到抗体的治疗剂的结合物。治疗剂的实施例包括,但不限于,细胞毒素、放射性同位素(例如,碘-131、钇-90 或铟-111)、免疫调节药剂、抗血管新生(angiotogenic)药剂、抗-新血管形成和 / 或其他血管形成药剂、毒素、抗-增殖药剂、促凋亡(Pro-apoptotic)药剂、化疗剂,和治疗核酸。

[0046] 在一个实施例中,毒素是假单胞杆菌(绿脓杆菌, Pseudomonas) 外毒素或其衍生物。

[0047] 在进一步的实施例中,治疗剂经由接头(linker)间接结合到抗体。实施例包括,但不限于 4-(4'-乙酰基苯氧基)丁酸(AcBut)、3-乙酰基苯基酸性酸(AcPac)、4-巯基-4-甲基-戊酸(酰胺)和其衍生物。

[0048] 另一方面,本发明提供了包含本发明抗体和直接或间接结合到抗体的可检测标签的结合物。适宜的标签的实施例包括,但不限于,放射性标签、荧光标签、酶标签和显像剂(成像剂)。

[0049] 在进一步的方面,本发明提供了编码本发明抗体或其链、本发明的免疫球蛋白轻链、本发明的免疫球蛋白重链和 / 或本发明的结合物的分离的和 / 或外源的多核苷酸。

[0050] 优选地,该多核苷酸包含由 SEQ ID NO 52 ~ 57 中任一个提供的序列。

[0051] 另一方面,本发明提供了包含本发明多核苷酸的载体。优选地,该载体是表达载体。更优选地,该多核苷酸可操作地连接到启动子。

[0052] 另一方面,本发明提供了包含本发明多核苷酸和 / 或本发明载体的宿主细胞。该宿主细胞可以是任何细胞类型,例如细菌、酵母、植物或动物细胞。

[0053] 也提供了包含本发明细胞的非人转基因生物。

[0054] 也提供了组合物,该组合物包含本发明抗体、本发明免疫球蛋白轻链、本发明的免疫球蛋白重链、本发明结合物、本发明多核苷酸、本发明载体和 / 或本发明宿主细胞,以及药用载体(carrier)。

[0055] 另一方面,本发明提供了生产抗体的方法,该方法包含培养本发明宿主细胞以表达多核苷酸和生产该抗体,其中宿主细胞包含至少一种本发明的多核苷酸。

[0056] 在一个实施例中,免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链被一个连续多核苷酸上的两个分开的开放阅读框编码。

[0057] 优选地,该方法进一步包含从宿主细胞培养物中回收(recover)抗体。

[0058] 在进一步的方面,本发明提供了抑制人 C5aR 与其配体相互作用的方法,该方法包含使该细胞暴露到本发明抗体或本发明结合物中。

[0059] 优选地,该配体是人 C5a。

[0060] 优选地,该抗体或结合物可阻止至少一些配体结合到该细胞。

[0061] 另一方面,本发明提供了抑制细胞中人 C5aR 活性的方法,该方法包含使细胞暴露到本发明抗体或本发明结合物中。

[0062] 关于前述两个方面,该方法可在体外或体内执行。

[0063] 另一方面,本发明提供了治疗或预防对象中病症的方法,该方法包含给予所述对象本发明的抗体、本发明的结合物、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞和 / 或本发明的组合物。

[0064] 在一个实施例中,该病症是免疫病态病症,例如自身免疫疾病。

[0065] 在另一个实施例中,该病症是炎性疾病,例如急性炎症或慢性炎症。

[0066] 在另一个实施例中,免疫病态病症或炎性疾病涉及白细胞迁移和 / 或白细胞活化。

[0067] 在进一步的实施例中,免疫病态病症或炎性疾病涉及补体活化。

[0068] 可被治疗或预防的病症实例包括,但不限于,过敏性鼻炎、肺过敏、超敏感性肺炎、间质性肺病、过敏性反应、超敏感性反应、药物过敏、昆虫叮咬过敏、炎性肠病、脊柱关节病、硬皮病、牛皮癣、皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、风疹、血管炎、关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、重症肌无力、青少年型糖尿病、肾炎、自身免疫性甲状腺炎、白塞氏病 (Behcet's disease)、移植排斥、动脉硬化症、具有皮肤或器官的白细胞浸润的癌症、再灌注损伤、中风、成人型呼吸窘迫综合征、恶性血液病、细胞因子诱导毒性、多肌炎、皮肌炎、类天疱疮、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、肉芽肿性疾病、血友病滑膜炎、痛风、与感染有关的不良炎性反应、SAR、败血症、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、类风湿性关节炎、抗磷脂综合征、年龄相关性黄斑变性、膜性增生性肾小球肾炎和致密沉积物病。

[0069] 本发明的方法可与其他已知治疗联合进行。因而,在实施例中,该方法进一步包括给予至少一种其他化合物,用以治疗或预防病症。此种其他治疗可同时提供或相继提供。

[0070] 技术人员 (addressee) 应当理解,当给予对象本发明的多核苷酸、本发明的载体和 / 或宿主细胞时,将在适当条件下,使得抗体或结合物在体内被表达。

[0071] 优选地,该抗体、结合物、多核苷酸、载体和 / 或宿主细胞以本发明的组合物的形式给予。

[0072] 另一方面,本发明提供了递送治疗剂到对象的炎症部位的方法,该方法包括给予所述对象本发明的结合物,或为此编码的多核苷酸。

[0073] 在进一步的方面,本发明提供了将遗传物质引入到呈递 (present) C5aR 细胞中的方法,该方法包含使该细胞与根据本发明的抗体或本发明的结合物接触,其中该抗体或结合物结合到遗传物质或与遗传物质联合。

[0074] 遗传物质的实例包括 DNA、RNA 或其组合。在优选的实施例中,遗传物质是至少部分双链的 DNA 或至少部分双链的 RNA。

[0075] 在优选的实施例中,呈递 C5aR 的细胞选自由下列细胞组成的组:白细胞,例如粒细胞 (例如,中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞)、单核细胞、肥大细胞和浆细胞样树突状细胞,以及组织中的免疫细胞,例如巨噬细胞 (例如,小胶质细胞、肝库普弗细胞 (hepatic_Kupffer_cell)、肾小球系膜细胞)、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、血管内皮细胞、心肌细胞、星形胶质细胞、神经干细胞、少突胶质细胞、滑膜细胞、关节软骨细胞 (articular_

chondocytes)、刺激肝细胞、支气管上皮细胞、角质形成细胞及胸腺细胞。在特别优选的实施例中,呈递 C5aR 的细胞选自由下列细胞组成的组,即白细胞,例如粒细胞(例如,中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞)、单核细胞、肥大细胞和浆细胞样树突状细胞,及组织中的免疫细胞,例如巨噬细胞(例如,小胶质细胞、肝库普弗细胞、肾小球系膜细胞)。

[0076] 又一方面,本发明提供了检测样品中人 C5aR 存在与否的方法,该方法包含使样品与本发明的抗体,和/或本发明的结合物接触,并分析样品中人 C5aR 与抗体或结合物的结合。

[0077] 可被测试的适宜样品的实例包括,但不一定局限于,血液、血清、血浆,及细胞或组织活检(tissue biopsy)。

[0078] 另一方面,本发明提供了诊断对象的病症的方法,该方法包含使对象,或从其获得的样品与本发明的抗体,或本发明的结合物接触,并分析对象或样品中人 C5aR 与抗体或结合物的结合。

[0079] 因而,该方法可在体外或体内进行。

[0080] 在一个实施例中,使用组织学标本或从对象获得的组织或流体的亚组分在体外执行该方法。

[0081] 在另一个实施例中,该方法包含在可使抗体与对象中呈递 C5aR 的细胞之间形成复合物的条件下给予对象用显像剂标记的本发明抗体,并使该复合物显像。

[0082] 优选地,该病症是免疫病态病症。

[0083] 也提供了本发明的抗体、本发明的结合物、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞和/或本发明的组合物在制备用于治疗或预防对象中的病症的药物方面的用途。

[0084] 也提供了本发明的结合物或为此编码的多核苷酸在制备用于将治疗剂递送到对象的炎症部位的药物方面的用途。

[0085] 也提供了本发明的抗体、本发明的结合物、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞和/或本发明的组合物作为治疗或预防对象中的病症的药物的用途。

[0086] 也提供了本发明的结合物或为此编码的多核苷酸作为将治疗剂递送到对象的炎症部位的药物的用途。

[0087] 在进一步的方面,本发明提供了试剂盒,该试剂盒包含本发明的抗体、本发明的结合物、本发明的多核苷酸、本发明的载体、本发明的宿主细胞和/或本发明的组合物。

[0088] 显而易见地,本发明一方面的优选特征和特性也适用于本发明的许多其他方面。

[0089] 技术人员应当理解,在本发明的许多方面,优选定义的分子(抗体或免疫球蛋白等)基本上由,或与包含所述序列相比,更优选由指定的 SEQ ID NO 序列组成。

[0090] 下文通过下面非限制性实施例并参考附图描述本发明。

附图说明

[0091] 图 1. 与小鼠 7F3 轻链 Vk 区的同源性最高的人 Ig 轻链序列的 ClustalW 比对。框出了 7F3 定义的 CDR。示出了共有框架序列(consensus framework 序列),hVkFW Cons。

[0092] 图 2. 与小鼠 7F3 重链 Vh 序列同源性最高的人 Ig 重链 V 区序列(A)和 J 区序列(B)的 ClustalW 比对。框出了定义为 7F3 的 CDR。示出的 V 区的共有框架序列(hVhFW

Cons) 和 J 区的共有框架序列 (hVhJFW Cons) 相连, 从而创建共有序列 (hVhFW Cons), 用于移植 7F3 CDR (注意: D 区包含在 CDR-H3 内)。

[0093] 图 3. 图 1 中的共有 V_k 框架序列与小鼠 7F3V_k 序列的比对用于创建人源化 7F3V_k 轻链序列, h7V_k。小鼠 7F3CDR (框出的) 被移植到 hV_kFW 共有框架序列中。星号标记的三个氨基酸回复突变为小鼠 7F3 框架序列。

[0094] 图 4. 人 RNOK203VL 序列与小鼠 7F3V_k 序列的比对用于创建人源化的 7F3V_k 轻链序列, h7aV_k。小鼠 7F3CDR (框出的) 被移植到 RNOK203VL 框架序列中。

[0095] 图 5. KV2F- 人源的 VLCD18-Q 序列与小鼠 7F3V_k 序列的比对用于创建人源化的 7F3V_k 轻链序列, h7bV_k。小鼠 7F3CDR (框出的) 被移植到 VLCD18-Q 框架序列中。

[0096] 图 6. 人源化 7F3V_k 序列与小鼠 7F3V_k 序列的比对。共有序列 h7F3V_kCons 是三个人源化序列的共有序列。框出了 CDR。人源化 7F3V_k 序列之间的差异由黑色背景上的白色字体表示。

[0097] 图 7. 图 2A 和 2B 中共有的人 V_h 框架序列与小鼠 7F3V_h 序列的比对用于创建人源化 7F3V_h 重链序列, h7V_h。小鼠 7F3CDR (框出的) 被移植到 hV_hFW 共有的框架序列中。星号 (*) 标记的氨基酸回复突变为小鼠 7F3 框架序列。用 # 标记的氨基酸突变成替代残基 (alternate residue), 如文中讨论的。

[0098] 图 8. 人 SGI-VH 序列与小鼠 7F3V_h 序列的比对用于创建人源化 7F3V_h 重链序列, h7aV_h。小鼠 7F3CDR (框出的) 被移植到 SGI-VH 框架序列中。星号 (*) 标记的氨基酸回复突变为小鼠 7F3 框架序列。

[0099] 图 9. 人 HG3 序列与小鼠 7F3V_h 序列的比对用于创建人源化的 7F3V_h 重链序列, h7bV_h。小鼠 7F3CDR (框出的) 被移植到 HG3 框架序列中。星号 (*) 标记的氨基酸回复突变为小鼠 7F3 框架序列。

[0100] 图 10. 人源化 7F3V_h 序列与小鼠 7F3V_h 序列的比对。共有序列 h7F3V_hCons 是三个人源化序列的共有序列。框出了 CDR。人源化 7F3V_h 序列之间的差异由黑色背景上的白色字体表示。

[0101] 图 11. 竞争性配体结合试验, 该试验比较了人源化 7F3 抗体和小鼠 7F3 从人中性粒细胞上 hC5aR 中取代 ¹²⁵I-C5a 的能力。

[0102] 图 12. 竞争性配体结合试验, 该试验比较了人源化 7F3 抗体和小鼠 7F3 从 L1. 2/hC5aR 转染子上 hC5aR 中取代 ¹²⁵I-C5a 的能力。

[0103] 图 13. 在 4°C 下抗 -C5aR 抗体对人中性粒细胞的饱和结合, 用 log₁₀ (上方图 (top panel)) 和线性 (下方图 (bottom panel)) 比例对 x- 轴作图。

[0104] 图 14. 肽 ELISA: 人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-J (图 A) 和 hAb-Q (图 B) 对一系列重叠肽 (no. 1-22) 的结合, 该重叠肽包含来自人 C5aR 的第二个细胞外环的 12mer 序列 (每个被一个偏移), 和包含来自 SEQ ID NO: 37 (no. 23) 的残基 173-205 的 33mer。hAb-J (图 C) 和 hAb-Q (图 D) 与来自人 C5aR (no. A1) 的第二个细胞外环的 12mer 序列的结合, 一系列突变肽 (no. A2-A13) 包含带有单个 Ala 突变和杂乱 (scrambled) 肽 (no. A14) 的 12mer。

[0105] 图 15. 在不同稀释度下, 人源化抗 -C5aR mAb hAb-J 和 Q 或抗 -C5aR mAb S5/1 (在 5 μg/ml) 与包被在 ELISA 板上的肽 PEP1 (SEQ ID NO: 37 的残基 9-29) 的结合。

[0106] 图 16. 化学趋化试验: 在 5 μg/ml 7F3 和各种人源化 7F3 抗体的存在下人中性粒

细胞向 1nM C5a 的迁移。

[0107] 图 17. 抗 -C5aR 抗体 hAb-Q (闭合菱形, closed diamond) 和 7F3 (开放方形) 对 C5a 诱导的人中性粒细胞的化学趋化的抑制。4 个单独实验的平均 ($\pm$ sem) 结果表示为无抗体对照样本 (上图) 的最大迁移的百分比, 或表示为迁移细胞 (下图) 的平均数目。X 轴上的单位是 $\log_{10} \mu\text{g/ml}$ 的 Ab 浓度,。

[0108] 图 18. 亲本小鼠抗体 7F3 和人源化抗体 J 和 Q 对 C5a 定向的 hC5aR/L1.2 转染子细胞迁移的抑制。

[0109] 图 19. 在与高浓度的人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 一起孵育之后 C5a 诱导的人中性粒细胞的化学趋化被抑制。

[0110] 图 20. 在 C5a 诱导的与各种浓度的人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 预孵育细胞的化学趋化之前和之后, 在游离 C5aR 和中性粒细胞上结合的抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 水平之间观测到的反比关系。

[0111] 图 21. 中性粒细胞上结合的抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 水平 (C5a 诱导的化学趋化之前和之后) 与各种浓度的人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 预孵育的细胞迁移的抑制之间观测到的关系。

[0112] 图 22. C5a 诱导的 CD11b 在与各种浓度的人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 预孵育的人中性粒细胞上的表达的抑制。

[0113] 图 23. C5a 诱导的 CD62L 在与各种浓度的人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 预孵育的人中性粒细胞上的下调的抑制。

[0114] 图 24. 在人全血与人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 和 hAb-J、PBS 或粒细胞活化剂 fMLP 一起孵育 1 小时之后, 中性粒细胞上 CD11b (图 A) 和 CD62L (图 B) 的表达。

[0115] 图 25. 在人全血与人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-G 或 hAb-J 或 C5a 一起孵育 20 分钟之后, 相对 PBS 对照, 中性粒细胞上 CD11b (图 A) 和 CD62L (图 B) 的表达。

[0116] 图 26. 在与 hAb-Q、单独的 hIgG 同种型对照抗体, 或 hIgG 抗体加 100nM 人 C5a 一起孵育的人全血中, 以相对 CD11b 表达 (图 A) 和 CD62L 表达 (图 B) 中的变化表示的中性粒细胞的活化。

[0117] 图 27. hAb-Q (称为抗 -C5aR ab) 自身没有刺激结合在固体载体上的人中性粒细胞从而生产超氧化物, 但可阻碍 C5a 引起的生产。

[0118] 图 28. 与人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 或对照 (利妥昔, 不相关的人 IgG4, PBS) 回体法中孵育 4 小时之后, 每毫升人血液中 B 细胞、单核细胞和中性粒细胞的平均数目 ($\pm$ sd)。

[0119] 图 29. 与人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 或对照 (利妥昔, 不相关的人 IgG4) 回体法中孵育 4 小时之后, 相对每毫升人血液中 B 细胞、单核细胞和中性粒细胞的 PBS 对照的平均消耗 ($\pm$ sd) 百分数。

[0120] 图 30. 在存在 1 % 兔补体的情况下, 与 100 $\mu\text{g/ml}$ hAb-Q、利妥昔和 hIgG4 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 多克隆抗 -C5aR 抗体孵育之后, 特异性 CDC (% ToPro3+ve (lysed) Ramos E2 细胞)。

[0121] 图 31. 在存在 10 % 人血清的情况下, 与 1-100 $\mu\text{g/ml}$ hAb-Q、利妥昔和 hIgG4 孵育之后, 特异性 CDC (不可存活的 Ramos E2 细胞 %)。与 10 % 热灭活的牛血清的每个样品的非特异性裂解已被扣除。

[0122] 图 32. 特异性 ADCC (在扣除‘仅有介质’和‘仅有靶’背景之后,‘靶+效应子’样品中的靶细胞裂解%);与人 PBMC 效应细胞及 100 μ g/ml 抗体在带有 10% 热灭活的胎牛血清的介质中孵育之后,不可存活的 (TP3+ve) Ramos E2 靶细胞%。

[0123] 图 33. 特异性 ADCC (在扣除‘仅有介质’和‘仅有靶’背景之后,‘靶+效应子’样品中的靶细胞裂解%);与人供体 PBMC 效应细胞及 1-100 μ g/ml 抗体在带有 10% 人供体血清的介质中孵育之后,不可存活的 (TP3+ve) Ramos E2 靶细胞%。

[0124] 图 34. 在炎性关节炎模型中的疾病进展。在腹腔给药 10mg/kg 抗 -hC5aR 抗体 G、M 和 N 之后第 5 天,组中平均临床得分的变化表明 K/BxN 血清诱导的 hC5aR 敲入 (knock-in) 小鼠 (每组 n = 6) 中炎症逆转。

[0125] 图 35. 在炎性关节炎模型中的疾病进展。在腹腔给药 1-10mg/kg 抗 -hC5aR 抗体 C 和 J 之后第 5 天,组中平均临床得分的变化表明 K/BxN 血清诱导的 hC5aR 敲入小鼠 (每组 n = 4-5) 中炎症逆转。

[0126] 图 36. 在炎性关节炎模型中的疾病进展。在腹腔给药 1-10mg/kg hAb-Q 之后第 5 天,组中爪尺寸平均变化 (A) 和平均临床得分 (B) 的平均变化表明 K/BxN 血清诱导的 hC5aR 敲入小鼠 (每组 n = 10+) 中炎症逆转。

[0127] 图 37. 体内给予各种剂量的人源化抗 -C5aR 抗体、对照抗体或 PBS 之后,随着时间的推移占位 (occupied) 的 C5aR 的水平。

[0128] 图 38. 体内给予各种剂量的人源化抗 -C5aR 抗体、对照抗体或 PBS 之后,随着时间的推移游离的 C5aR 水平。

[0129] 图 39. 在治疗性地给予带有关节炎症的小鼠后第 5 天, hAb-Q 随时间推移的血清浓度。

[0130] 图 40. 临床得分 (爪和关节炎症水平)、在第 0 和 2 天用 K/BxN 血清注射,和在第 5 天用 10mg/kg 人源化抗 -C5aR 抗体注射的小鼠中占位的 C5a 受体水平和 hAb-Q 的血清浓度之间的关系。

[0131] 图 41. 临床得分 (爪和关节炎症水平)、在第 0 和 2 天用 K/BxN 血清注射,和在第 5 天用 3mg/kg 人源化抗 -C5aR 抗体注射的小鼠中占位的 C5a 受体水平和 hAb-Q 的血清浓度之间的关系。

[0132] 图 42. 临床得分 (爪和关节炎症水平)、在第 0 和 2 天用 K/BxN 血清注射,和在第 5 天用 1mg/kg 人源化抗 -C5aR 抗体注射的小鼠中占位的 C5a 受体水平和 hAb-Q 的血清浓度之间的关系。

[0133] 图 43. 在转基因小鼠的毒理研究和药理研究中, hAb-Q 的整合 PK/PD 模型的图解表示。

[0134] 图 44. 在毒理研究 (图中以 Tox 表示) 和药理研究 (图中以 KRN 表示) 中,对于 hAb-Q (称为抗 -C5aR ab) 的各种静脉给药、皮下给药,和腹腔给药剂量,相对时间预测的和观测到的浓度 (左) 和占位 (右)。对于毒理研究,在第 1 天给药之后和在第 43 天给药之后取 PK 样品。第 43 天的数据假定处于平稳状态,并持续到第六次之后。平均组值:菱形,单个小鼠:开放圆圈,通过靶隔室 (target compartment) 的模型拟合:粗线。

[0135] 图 45. 在药理研究中,用于 hAb-Q 对实验诱导的关节炎的抑制效果的 PK/PD 模型的图解表示。这个模型并入了图 43 中示出的 PK/PD 模型中计算的占位率。

[0136] 图 46. 在转基因小鼠中在第 0 天发炎, 在第 5 天以不同的剂量 hAb-Q 腹腔给药之后, 相对时间, 占位率 (左) 和爪尺寸变化 (右)。平均组测量: 彩色的实线菱形, 单个小鼠值: 彩色的开放圆圈。每组中的模型拟合: 彩线。

[0137] 图 47. 应用于人预测的 PK/PD 模型的图解表示。该模型由利用靶介导的处理扩大的典型 IgG 参数的两区室模型组成。V1 = 中间体积。V2 = 周边体积。CL = 清除率。Q = 分配清除率。kof/kon = 缔合 / 解离的速率常数。逆转 (turnover) = 更新靶和除去结合抗体所需的时间。两个靶区室用于反映被认为在血液内部分配和在血液外部分配的靶。

[0138] 图 48. 在抗 -C5aR(hAb-Q) 的静脉给药之后, 用于药物动力学 (左) 和占位率 (右) 的模型预测。最低量化限由水平线表示。

[0139] 图 49. 在抗 -C5aR(hAb-Q) 的皮下给药之后, 用于药物动力学 (左) 和占位率 (右) 的模型预测。最低量化限由水平线表示。

[0140] 序列表说明

[0141] SEQ ID NO:1-7F3 可变轻链蛋白序列。

[0142] SEQ ID NO:2-7F3 可变重链蛋白序列。

[0143] SEQ ID NO:3-7F3 可变轻链编码序列。

[0144] SEQ ID NO:4-7F3 可变重链编码序列。

[0145] SEQ ID NO:5-KV2F_ 人的人轻链可变区。

[0146] SEQ ID NO:6-KV2E_ 人的人轻链可变区。

[0147] SEQ ID NO:7-KV2D_ 人的人轻链可变区。

[0148] SEQ ID NO:8-KV2B_ 人的人轻链可变区。

[0149] SEQ ID NO:9-KV2A_ 人的人轻链可变区。

[0150] SEQ ID NO:10-X12691 的人轻链可变区。

[0151] SEQ ID NO:11-U41645 的人轻链可变区。

[0152] SEQ ID NO:12-U41644 的人轻链可变区。

[0153] SEQ ID NO:13-M31952 的人轻链可变区。

[0154] SEQ ID NO:14- 人轻链可变序列的 hVkJFW Cons 共有序列, 如图 1 中提供的。

[0155] SEQ ID NO:15-Hv1Av_ 人的人重链可变区。

[0156] SEQ ID NO:16-Hv1Bv_ 人的人重链可变区。

[0157] SEQ ID NO:17-Hv1Cv_ 人的人重链可变区。

[0158] SEQ ID NO:18-Hv1Gv_ 人的人重链可变区。

[0159] SEQ ID NO:19-M99641. aa 的人重链可变区。

[0160] SEQ ID NO:20-M99642. aa 的人重链可变区。

[0161] SEQ ID NO:21-X62109. aa 的人重链可变区。

[0162] SEQ ID NO:22-X92343. aa 的人重链可变区。

[0163] SEQ ID NO:23-Z12305. aa 的人重链可变区。

[0164] SEQ ID NO:24- 人重链可变 (V) 区序列的 hVhVFW Cons 共有序列, 如图 2A 中提供的。

[0165] SEQ ID NO:25-Hv1 Cj_ 人的人重链连接区。

[0166] SEQ ID NO:26-Hv2Ij_ 人的人重链连接区。

- [0167] SEQ ID NO :27-Hv3Hj_ 人的人重链连接区。
- [0168] SEQ ID NO :28-Hv3Kj_ 人的人重链连接区。
- [0169] SEQ ID NO :29-Hv3Tj_ 人的人重链连接区。
- [0170] SEQ ID NO :30- 人重链连接 (J) 区序列的 hVhJFW Cons 共有序列,如图 2B 中提供的。
- [0171] SEQ ID NO :31- 人源化 7F3 V 区轻链 h7Vk 氨基酸序列。
- [0172] SEQ ID NO :32- 人源化 7F3 V 区轻链 h7aVk 氨基酸序列。
- [0173] SEQ ID NO :33- 人源化 7F3 V 区轻链 h7bVk 氨基酸序列。
- [0174] SEQ ID NO :34- 人源化 7F3 V 区重链 h7Vh 氨基酸序列。
- [0175] SEQ ID NO :35- 人源化 7F3 V 区重链 h7aVh 氨基酸序列。
- [0176] SEQ ID NO :36- 人源化 7F3 V 区重链 h7bVh 氨基酸序列。
- [0177] SEQ ID NO :37- 人 C5aR。
- [0178] SEQ ID NO :38- 人 C5aR 的第二细胞外环上的抗原表位。
- [0179] SEQ ID NO :39- 本发明人源化 7F3 重链可变区的 h7F3VhCons 共有序列,如图 10 所提供的。
- [0180] SEQ ID NO :40- 人轻链恒定区 hC κ -R。
- [0181] SEQ ID NO :41- 人轻链恒定区 hC κ 。
- [0182] SEQ ID NO :42- 人重链恒定区 hC γ 4。
- [0183] SEQ ID NO :43- 人重链恒定区 hC γ 4_{PE}。
- [0184] SEQ ID NO :44- 人重链恒定区 hC γ 1。
- [0185] SEQ ID NO :45- 人重链恒定区 hC γ 4_p。
- [0186] SEQ ID NO :46- 人源化 RNOK203VL 序列。
- [0187] SEQ ID NO :47-KV2F- 人源的 VLCD18-Q 序列。
- [0188] SEQ ID NO :48- 本发明人源化 7F3 轻链可变区的 h7F3VkCons 共有序列,如图 6 中所提供的。
- [0189] SEQ ID NO :49-hVhFW Cons 共有的人重链 VJ 框架序列
- [0190] SEQ ID NO :50- 人 SGI-VH 序列。
- [0191] SEQ ID NO :51- 人种系 (germline)HG3 序列。
- [0192] SEQ ID NO :52- 编码人源化 7F3V 区轻链 h7Vk 氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0193] SEQ ID NO :53- 编码人源化 7F3V 区轻链 h7aVk 氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0194] SEQ ID NO :54- 编码人源化 7F3V 区轻链 h7bVk 氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0195] SEQ ID NO :55- 编码人源化 7F3V 区重链 h7Vh 氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0196] SEQ ID NO :56- 编码人源化 7F3V 区重链 h7aVh 氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0197] SEQ ID NO :57- 编码人源化 7F3V 区重链 h7bVh 氨基酸序列的多核苷酸序列。
- [0198] SEQ ID NO :58- 人 C5aR 的第二细胞外环的片段。
- [0199] SEQ ID NO :59- 人 C5aR 的 N- 末端细胞外结构域的片段。

具体实施方式

[0200] 一般技术

[0201] 除非另外具体限定,在本文中使用的所有科技术语应当理解为与本领域中(即细胞培养技术,分子遗传学、抗体技术、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学中)普通技术人员通常理解的含义相同。

[0202] 除非另外指明,本发明中采用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术均是标准操作,是本领域中技术人员众所周知的。此种技术描述和解释在下面来源的文献中,这些来源为,例如, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984), J. Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989), T. A. Brown(editor), Essential Molecular Biology :A Practical Approach, volumes 1 and 2, IRL Press(1991), D. M. Glover and B. D. Hames(editor), DNA Cloning :A Practical Approach, volumes 1-4, IRL Press(1995 和 1996), and F. M. Ausubel 等人. (editor), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience(1988, 包括至今的所有更新), Ed Harlow and David Lane(editor) Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 以及 J. E. Coligan 等人. (editor) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(包括至今的所有更新)。

[0203] 选择的定义

[0204] 如本文中使用的,“C5a 受体”、“C5aR”、“C5aR1”或“人 C5aR”和其变化形式是指人补体成分 5 受体 1,其在本领域中也叫做 C5a 过敏毒素受体和 CD88 抗原。C5aR 属于七次跨膜 G- 蛋白 - 偶联受体家族,并结合 C5a(Gerard 和 Gerard, 1991)。人 C5a 氨基酸序列的实例提供在 SEQ ID NO :37 中,然而,技术人员将意识到还存在这些分子的天然存在的等位基因变体,这些变体也包括在术语“C5aR”中。人 C5aR 的各种结构域定义如下:

- | | | | |
|--------|-----|---------|-----------------|
| [0205] | 氨基酸 | 1-37 | 细胞外结构域 -N- 末端 |
| [0206] | 氨基酸 | 38-61 | 跨膜结构域 |
| [0207] | 氨基酸 | 62-71 | 细胞内结构域 |
| [0208] | 氨基酸 | 72-94 | 跨膜结构域 |
| [0209] | 氨基酸 | 95-110 | 细胞外结构域 - 细胞外环 1 |
| [0210] | 氨基酸 | 111-132 | 跨膜结构域 |
| [0211] | 氨基酸 | 133-149 | 细胞内结构域 |
| [0212] | 氨基酸 | 150-174 | 跨膜结构域 |
| [0213] | 氨基酸 | 175-206 | 细胞外结构域 - 细胞外环 2 |
| [0214] | 氨基酸 | 207-227 | 跨膜结构域 |
| [0215] | 氨基酸 | 228-242 | 细胞内结构域 |
| [0216] | 氨基酸 | 243-264 | 跨膜结构域 |
| [0217] | 氨基酸 | 265-283 | 细胞外结构域 - 细胞外环 3 |
| [0218] | 氨基酸 | 284-307 | 跨膜结构域 |
| [0219] | 氨基酸 | 308-350 | 细胞内结构域 -C- 末端 |

[0220] 术语“对象”,如在本文中使用的,是指任何动物,特别是哺乳动物,例如人、马、牛、猫和狗,并在适当时,可以与术语“病人”交换使用。优选地,对象是人。

[0221] 如在本文中使用的术语“治疗”及其变化形式包括给予治疗有效量的本发明抗体,

该有效量足以减轻或消除病症的至少一个症状。

[0222] 如在本文中使用的术语“预防”或其变化形式是指保护对象不患疾病的至少一个症状,或减轻病症症状的严重性。

[0223] 如在本文中使用的,术语“暴露细胞”是指提供抗体,以便能够接触 / 结合人 C5aR,条件是 C5aR 存在于细胞上。

[0224] 术语“有效浓度 50%”(缩写为“EC₅₀”)表示抗体靶向的分子特定效果(例如,抑制 / 取代(displace)人 C5a 与人 C5aR 的结合)的 50%所需的本发明抗体浓度。本领域人员应当理解较低的 EC₅₀ 值相当于更有效的抗体。

[0225] 如这里使用的,术语“抑制”是指降低,和可能彻底破坏确定的活性。优选地,确定的活性被降低至少 50%,更优选至少 75%,甚至更优选至少 90%。

[0226] 如在本文中使用的,术语“约”是指具体值的 +/ -5% 的范围。

[0227] 整个本说明书中,术语“包含”,或其变化形式应当理解为包括陈述的成分、整体或步骤,或成分、整体或步骤的组,但不包括任何其他成分、整体或步骤,或成分、整体或步骤的组。在一个实施例中,分子“基本上由”定义的序列“组成”。在其它实施例中,分子“由”定义的序列“组成”。

[0228] 人源化抗 -C5aR 抗体

[0229] 术语免疫球蛋白是指一类结构上相关的糖蛋白,该糖蛋白由两对多肽链组成,一对低分子量的轻(L)链和一对重(H)链,所有四条链通过二硫键互相连接。免疫球蛋白的结构已定性清楚,参见例如 Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))。简言之,每条重链典型地由重链可变区(在本文中缩写为 V_H)和重链恒定区(在本文中缩写为 C_H)组成。每条轻链典型地由轻链可变区(在本文中缩写为 V_L)和轻链恒定区(在本文中缩写为 C_L)组成。轻链恒定区典型地由一个结构域 C_L 组成。V_H 和 V_L 区可进一步细分成高变的区(或序列上高变的高变区和 / 或结构确定的环的形式),也称为互补决定区(CDR),中间穿插着较其保守的区,称为框架区(FR)。在优选的实施例中,本发明抗体至少包含 V_L 结构域和 V_H 结构域。

[0230] 每个 V_H 和 V_L 典型地由三个 CDR 和四个 FR 组成,从氨基末端到羧基末端按下面顺序排布,FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(也参见 Chothia 和 Lesk, 1987)。典型地,在这区中氨基酸残基的编号可通过 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)(短语可变结构域残基编号,如 Kabat 中或根据 Kabat,在本文中指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的这种编号系统)中描述的方法执行。使用这个编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可含有较少或另外的氨基酸,对应于可变结构域 FR 或 CDR 的缩短,或插入可变结构域 FR 或 CDR。

[0231] 术语“人源化抗体”,如在本文中使用的,在本文中指来源于非人抗体,典型地鼠科动物的抗体,该抗体保留或基本保留亲本抗体(parent antibody)的抗原结合的性质但它在人中的免疫性低。由于本发明抗体由结构和功能特征限定,因此术语“人源化抗体”可与“抗体”交换使用。

[0232] 术语互补决定区(CDR),如在本文中使用的,是指多种氨基酸序列,该多种氨基酸序列共同限定免疫球蛋白结合位点的可变片段(Fv)区的结合亲和力和特异性。

[0233] 术语框架区 (FR), 如在本文中使用的, 是指插入在 CDR 之间的氨基酸序列。抗体的这些部分用来将 CDR 保持在适当的位置 (允许 CDR 结合抗原)。可变区, 轻的或重的, 均包含框架区和典型地三个 CDR。

[0234] 术语恒定区 (CR), 如在本文中使用的, 是指赋予效应子功能的抗体分子的部分。题述人源化抗体的恒定区来源于人免疫球蛋白。重链恒定区可选自五种同种型: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。进一步地, 各种亚类的重链 (例如, 重链的 IgG 亚类) 可引起不同效应子功能, 并因而, 通过选择期望的重链恒定区, 可生产具有期望的效应子功能的抗体。优选的重链恒定区是 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3) 和 $\gamma 4$ (IgG4), 更优选 $\gamma 4$ (IgG4)。更优选的是 $\gamma 4$ (IgG4) 同种型的可结晶片段 (Fc) 区, 带有突变 Ser228Pro (称为“P”突变) 和 / 或 Leu235Glu (称为“E”突变)。特别优选的重链恒定区序列由 SEQ ID NO 42 ~ 45 提供。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 型, 优选为 κ 型。特别优选的轻链恒定区序列由 SEQ ID NO 40 和 41 提供。

[0235] 在优选的实施例中, 在本文中描述的免疫球蛋白轻链可变区直接连接到在本文中描述的免疫球蛋白轻链恒定区。类似地, 在进一步优选的实施例中, 在本文中描述的免疫球蛋白重链可变区直接连接到在本文中描述的免疫球蛋白重链恒定区。因而, 在优选的实施例中, 由 SEQ ID NO :31 提供的氨基酸序列的 C-末端直接连接到由 SEQ ID NO :41 提供的氨基酸序列 N-末端, 由 SEQ ID NO :36 提供的氨基酸序列的 C-末端直接连接到 SEQ ID NO :45 的氨基酸序列 N-末端。

[0236] 技术人员应当理解免疫球蛋白重链或轻链的可变区或恒定区可按照描述的通过使用标准的重组 DNA 技术连接, 从而创建可在适宜的宿主中被表达 (从而产生所述免疫球蛋白链 (一种或多种)) 的多核苷酸, 或可通过使用肽化学合成连接的可变区和恒定区。

[0237] 本发明的人源化抗体保存了亲本抗体的结合性质的重要部分, 即单克隆抗体, 该亲本抗体也就是称为 7F3 的单克隆抗体, 由杂交瘤产生, 该杂交瘤于 2000 年 11 月 6 日保藏在 ECACC, 编号为 00110609。特别地, 本发明的人源化抗体保留了特异性结合亲本抗体识别抗原的能力, 该亲本抗体用于生产此种人源化抗体。优选地, 人源化抗体展现出与亲本抗体相同或基本相同的抗体结合亲和力 (affinity) 和亲合力 (avidity)。理想地, 抗体的亲和力 (K_D) 将不大于亲本抗体亲和力的 10 倍, 更优选不大于 5 倍, 更优选不大于亲本抗体亲和力的 3 倍。分析抗原结合亲和力的方法是本领域中众所周知的, 并包括半最大结合试验、竞争试验和 Scatchard 分析。适宜的抗原结合试验描述在本申请中 (参见, 例如, 实施例 3)。

[0238] 技术人员应当理解, “亲合力 (avidity)” 是指两个分子之间, 例如抗体和抗原之间相互作用的总强度。亲合力取决于相互作用的亲和力和价态。而且, “亲和力” 是指分子 (例如, 抗体) 的单个结合位点与配体 (例如, 抗原) 之间结合的强度。分子 X 对配体 Y 的亲和力可由解离常数 (K_d) 表示, 解离常数是占据溶液中存在的一半的 X 分子的结合部位所需的 Y 浓度。更小的 K_d 表示更强或更高的亲和力相互作用, 和需要更低的配体浓度来占据该部位。

[0239] 术语“人源化抗体”或“抗体”, 如本发明中使用的, 包括完整分子以及能与表位决定簇结合的它们的片段, 例如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv。这些抗体片段保留了选择性结合到人 C5aR 的一些能力, 这些片段的实施例包括, 但不限于下面:

[0240] (1) Fab, 含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段, 该片段可通过酶木瓜蛋白酶

将全抗体 (whole antibody) 降解生成完整的轻链和一个重链的一部分；

[0241] (2) Fab', 可通过以下方式获得抗体分子片段, 用胃蛋白酶处理全抗体, 接着还原, 从而生成完整的轻链和重链的一部分; 每个抗体分子可得到两个 Fab' 片段;

[0242] (3) (Fab')₂, 可通过用酶胃蛋白酶处理但没有随后还原以获得抗体片段; (Fab)₂ 是通过两个二硫键结合在一起的两个 Fab' 片段的二聚体;

[0243] (4) Fv, 定义为含有表示为两条链的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段;

[0244] (5) 单链抗体 (“SCA”), 定义为基因工程分子, 其含有通过适宜的多肽接头连接成基因融合的单链分子的轻链可变区和重链可变区, 此种单链抗体可以是多聚体形式, 例如, 双链抗体、三链抗体, 和四链抗体等, 这些抗体可以是或不可以是多特异性的 (参见, 例如, WO 94/07921 和 WO 98/44001) 和

[0245] (6) 单链结构域抗体, 典型地无轻链的可变重链结构域。

[0246] 人源化抗体片段包括独立的重链、轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、无任何重链的可变轻结构域、无轻链的可变重结构域和 Fv。多种片段可通过重组 DNA 技术, 或通过完整的免疫球蛋白的酶分离或化学分离生产。

[0247] “人源化抗体”或本发明抗体也可以是异源结合抗体 (heteroconjugate antibody)。异源结合抗体由两个共价连接的抗体组成。已提出, 例如, 此种抗体可使得免疫系统细胞靶向不需要的细胞 (US 4,676,980), 和用于治疗 HIV 感染 (WO 91/00360、WO 92/200373、EP 586505)。考虑了, 该抗体可通过使用合成蛋白质化学中包括涉及交联剂的那些方法在内的已知方法在体外制备。

[0248] 关于效应子功能, 理想的是修饰本发明抗体, 以便增强, 例如, 该抗体治疗在本文中描述的病症, 例如关节炎的效力。例如, 可将半胱氨酸残基 (一种或多种) 引入 Fc 区中, 从而允许这个区中链间二硫键的形成。因而产生的同种型二聚体人源化抗体可改进内化能力和 / 或增大补体 - 介导的细胞杀伤和抗体 - 依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) (Caron 等人, 1992; Shopes, 1992)。活性增强的同种型二聚体抗体也可使用异型双功能交联剂制备, 如 Wolff 等人 (1993) 描述的。可替换地, 可改造具有双 Fc 区的抗体并可从而增强补体裂解和 ADCC 能力 (Stevenson 等人, 1989)。

[0249] 如在本文中使用的, “非消耗性抗体”是指可结合到其靶, 但不募集 (recruit) 影响靶细胞裂解的免疫系统效应子功能的抗体。免疫系统效应子功能依赖于 Fc- 结构域与 C1q- 补体级联的第一成分, 和 / 或受体 (FcR) 的相互作用。补体依赖的细胞毒性 (CDC) 可被与 C1q 相互作用的多 Fc- 结构域启动, 该多 Fc- 结构域可最终导致靶细胞通过形成膜攻击复合物 (MAC) 裂解。另外, 免疫系统细胞, 例如粒细胞、巨噬细胞和 NK 细胞, 可通过 FcR 与结合到靶细胞的 mAb 相互作用。靶细胞的裂解可通过抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或吞噬作用引发。非消耗性抗体包括无 Fc 结构域的抗体片段, 该抗体片段包括例如, 单价 (例如, Fab、scFv、纳米抗体和 dAbs)、二价 (例如, F(ab')₂ 和双链抗体) 和多价 (例如, 三链抗体和五链抗体) 形式。另外, 非消耗性抗体包括被修饰从而除去效应子功能而不影响药物动力学 (pharmokinetic) 的抗体, 例如, 可修饰在与 C1q 和 FcR 的相互作用中发挥着主导作用的 Fc- 结构域中的氨基酸残基, 或可除去 CH2 结构域中的 N- 连接的糖基化位点。技术人员应当了解, 改造非消耗性抗体的可能性与用于生产抗体的恒定区相联系。IgG3 恒定区比 IgG1 恒定区更有可能生产消耗性抗体, IgG1 恒定区又比 IgG2 恒定区更有可能生产

消耗性抗体,而 IgG4 恒定区一般表示抗体是非消耗性的。技术人员也应当理解对恒定区的修饰可使消耗性抗体转化成非消耗性抗体,反之亦然。

[0250] 如在本文中使用的,“非活化抗体”是指结合细胞表面受体,和否定 (negate) 或阻断内源配体作用的抗体。

[0251] 本发明人源化抗体可通过人的介入生产。因而,并不期望它们是天然存在的。但是,在优选的实施例中,本发明抗体或免疫球蛋白链是“基本上纯化的”或“纯化的”。“基本上纯化的”或“纯化的”,表示从在天然状态上与其关联的一种或多种脂质、核酸、其他多肽,或其他污染分子分离的抗体。优选基本上纯化的多肽的至少 60%,更优选至少 75%,更优选至少 90% 不包含与其天然关联的其他成分。在另一个实施例中,“基本上纯化的”或“纯化的”表示在组合物中为优势种类 (predominant species) 的分子,其中,它所属的该类分子即在该种组合物中发现 (即,它构成组合物中该类分子的至少约 50%,典型地构成组合物中该种类的分子,例如肽的至少约 70%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 95%,或更多)。

[0252] 在抗体或免疫球蛋白链上下文中的术语“重组”是指细胞或在无细胞表达系统中生产的,与天然状态相比,量或比率改变的抗体或免疫球蛋白链。在一个实施例中,该细胞是不能天然生产抗体或免疫球蛋白链的细胞。然而,该细胞可以是包含非内源基因的细胞,该非内源基因可改变,优选增大待生产的多肽量。本发明的重组抗体或免疫球蛋白链包括未与生产它的转基因 (重组) 细胞,或无细胞表达的其他成分系统分离的多肽,和在本文中细胞或无细胞系统中生产,随后从至少其他一些成分中纯化出来的抗体或免疫球蛋白链。

[0253] 多肽 (免疫球蛋白链) 的同一性 % 可通过 GAP (Needleman 和 Wunsch, 1970) 分析 (GCG 程序) 确定,其中缺口生成罚分 (gap creation penalty) = 5,而缺口延伸罚分 (gap extension penalty) = 0.3。查询序列为至少 50 个氨基酸长度, GAP 分析在至少 50 个氨基酸的区上排列该两个序列。甚至更优选地,查询序列为至少 100 个氨基酸长度, GAP 分析在至少 100 个氨基酸的区中排列该两个序列。更优选地,将该两个序列在它们的全长上排列。

[0254] 关于定义的免疫球蛋白链,应当理解,高于上面提供的那些的同一性 % 数字将包括优选的实施例。因而,适当时,根据最小的同一性 % 数字,优选免疫球蛋白链包含这种氨基酸序列,即,与指定的有关序列 SEQ ID NO 至少 94%,更优选至少 95%,更优选至少 96%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%,更优选至少 99.1%,更优选至少 99.2%,更优选至少 99.3%,更优选至少 99.4%,更优选至少 99.5%,更优选至少 99.6%,更优选至少 99.7%,更优选至少 99.8%,和甚至更优选至少 99.9% 的同一性的氨基酸序列。

[0255] 在另一个实施例中,指定的 SEQ ID NO 中添加了一个残基,指定的 SEQ ID NO 中删除了一个残基,与指定的 SEQ ID NO 相比,添加了一个残基并删除了一个残基,指定的 SEQ ID NO 中添加了二个残基,指定的 SEQ ID NO 中删除了二个残基,指定的 SEQ ID NO 中改变了一个残基,指定的 SEQ ID NO 中改变了两个残基,指定的 SEQ ID NO 中一个残基改变且删除了一个残基,或者指定的 SEQ ID NO 中改变了一个残基且添加了一个残基,或者其任何组合。

[0256] 在优选的实施例中,该序列比对中没有缺口。更具体地,该算法不需在氨基酸的毗

邻延伸 (contiguous stretch) 中创建缺口,从而获得理想的 (最高的同一性%) 序列比对。

[0257] 本发明的抗体和 / 或免疫球蛋白链的氨基酸序列突变可通过引入适当的核苷酸改变到本发明核酸中制备,或通过体外合成期望的多肽制备。此种突变包括,例如,氨基酸序列内残基的缺失、插入或置换。可组合使用缺失、插入和置换,从而到达最后的构建体,条件是最后的多肽产物具有期望的特性。

[0258] 突变的 (改变的) 多肽可使用本领域中已知的任何技术制备。例如,本发明多核苷酸可经体外诱变。此种体外诱变技术包括将多核苷酸子克隆成适宜的载体,将载体转换成“增变”菌株,例如 E. coli XL-1 red (Stratagene),并繁殖该转化的细菌,以获得合适数目的代数。可使用在本文中描述的技术快捷地 (readily) 筛选从突变 / 改变 DNA 获得的产物,从而确定它们是否具有受体结合和 / 或受体抑制活性。

[0259] 在设计氨基酸序列突变时,突变位点的位置和突变的性质取决于待修饰的特性 (一种或多种)。用于突变的位点可单独修饰或成批地 (in series) 修饰,例如,通过 (1) 首先用保守氨基酸选择物置换,然后根据获得的结果用更激进的选择置换, (2) 删除靶残基,或 (3) 插入与定位位点 (located site) 相邻的其他残基。

[0260] 氨基酸序列缺失范围一般为约 1 ~ 15 个残基,更优选为约 1 ~ 10 个残基,以及典型地为约 1 ~ 5 个连续的残基。

[0261] 置换突变 (substitution mutants) 去除了抗体和 / 或免疫球蛋白链分子中的至少一个氨基酸残基,并在该位置插入了不同的残基。对于置换突变,最感兴趣的位点包括被鉴定为对抗原结合重要的位点。这些位点,尤其是属于人抗体和 / 或免疫球蛋白链中至少三个其他相同的保守位点的序列的那些位点,优选以相对保守的方式被置换。此种保守置换在标题为“示例性置换”的表 1 中给出。置换的具体实施例提供在图 6 和 10 中,其中在给定位点处的氨基酸可被存于其他人源化链中相同位点处的另外的氨基酸置换。

[0262] 表 1. 示例性置换

[0263]

原残基	示例性置换
Ala(A)	val ;leu ;ile ;gly
Arg(R)	lys
Asn(N)	gln ;his
Asp(D)	glu
Cys(C)	ser
Gln(Q)	asn ;his
Glu(E)	asp
Gly(G)	pro, ala

His (H)	asn ;gln
Ile (I)	leu ;val ;ala
Leu (L)	ile ;val ;met ;ala ;phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu ;phe
Phe (F)	leu ;val ;ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr

[0264]

Tyr (Y)	trp ;phe
Val (V)	ile ;leu ;met ;phe ;ala

[0265] 而且,如果需要的话,非天然氨基酸或氨基酸化学类似物可以置换或添加的形式引入到本发明抗体和/或免疫球蛋白链中。此种氨基酸包括,但不限于,通用氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、2-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、半胱磺酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟代-氨基酸、设计的 (designer) 氨基酸,例如 β -甲基氨基酸、C α -甲基氨基酸、N α -甲基氨基酸,和一般的氨基酸类似物。

[0266] 本发明多肽可以多种方式生产,包括重组多肽的生产和回收,及多肽的化学合成。在一个实施例中,本发明分离的多肽可通过培养能够在有效生产多肽的条件下表达多肽和能够回收多肽的细胞来生产。优选培养的细胞是本发明的重组细胞。有效培养条件包括,但不限于,允许多肽生产的有效介质、生物反应器、温度、pH 和氧条件。有效介质指的是在其中培养细胞生产本发明多肽的任何介质。此种介质典型地包含具有可吸收的碳、氮和磷酸盐源,及适当的盐、矿物、金属和其他营养物,例如维生素的水介质。本发明的细胞可在传统的发酵生物反应器、摇瓶、试管、微量滴定盘 (microtiter dish) 和培替氏平皿 (petri plates) 中培养。培养可在适合重组细胞的温度、pH 和氧含量下进行。此种培养条件在本领域普通技术人员的专业知识范围内。

[0267] 多核苷酸及其表达

[0268] “分离的多核苷酸”,包括正向或反向或二者结合的单链或双链 DNA、RNA 或这些的

组合、dsRNA 或其他,其是表示从在天然状态下与其关联或联系的多核苷酸序列至少部分分离的多核苷酸。优选地,该分离的核苷酸的至少 60%,优选至少 70%,更优选至少 90% 不包含与其天然关联的其他成分。而且,术语“多核苷酸”在本文中术语“核酸”和“遗传物质”交换使用。

[0269] 在多核苷酸上下文中,术语“外源的”是指细胞,或无细胞表达系统中存在的,与其天然状态相比,量改变的多核苷酸。在一个实施例中,该细胞是天然不包含该核苷酸的细胞。然而,该细胞可以是包含非内源核苷酸的细胞,该非内源核苷酸可改变,优选增大编码的多肽的产生量。本发明多核苷酸包括未与包含它的转基因(重组)细胞,或无细胞表达系统中其他成分分离的多核苷酸,和在本文中细胞或无细胞系统中生产,随后从至少一些其他成分中纯化出来的多核苷酸。外源核苷酸(核酸)可以是天然存在的核苷酸的毗邻延伸,或可包含来自不同来源(天然存在和/或合成),连接从而形成同一多核苷酸(single polynucleotide)的核苷酸的两种或多种毗邻延伸。典型地,此种嵌合的多核苷酸包含至少一个开放阅读框,该阅读框编码可操作地连接到启动子的本发明的多肽,该启动子为适合驱动感兴趣的细胞中开放阅读框的转录。

[0270] 本发明涉及编码 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 和 SEQ ID NO :39 中一个或多个的多核苷酸,和/或与编码 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 和 SEQ ID NO :39 中一个或多个的多核苷酸至少 67% 同一性的多核苷酸。此种多核苷酸的实例包括,但不限于,包含由 SEQ ID 52 ~ 57 的任何一个中提供的序列的那些多核苷酸。

[0271] 核苷酸的同一性%可通过 GAP(Needleman 和 Wunsch,1970)分析(GCG 程序)确定,其中缺口生成罚分(gap creation penalty) = 5,而缺口延伸罚分(gap extension penalty) = 0.3。除非另有说明,查询序列为至少 45 个氨基酸长度,GAP 分析在至少 45 个氨基酸的区上排列该两个序列。更优选地,查询序列为至少 100 个氨基酸长度,GAP 分析在至少 100 个氨基酸的区中排列该两个序列。更优选地,将该两个序列在它们的全长上排列。

[0272] 关于定义的多核苷酸,应当理解,高于上面提供的那些的同一性%数字将包括优选的实施例。因而,适当时,根据最小的同一性%数字,优选本发明多核苷酸包含这种氨基酸序列,即,与指定的有关序列 SEQ ID NO 至少 91%,更优选至少 92%,更优选至少 93%,更优选至少 94%,更优选至少 95%,更优选至少 96%,更优选至少 97%,更优选至少 98%,更优选至少 99%,更优选至少 99.1%,更优选至少 99.2%,更优选至少 99.3%,更优选至少 99.4%,更优选至少 99.5%,更优选至少 99.6%,更优选至少 99.7%,更优选至少 99.8%,和甚至更优选至少 99.9%的同一性的氨基酸序列。

[0273] 本发明也涉及与编码 SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :48、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36 和 SEQ ID NO :39 中一个或多个的多核苷酸在严格条件下杂交的多核苷酸。术语“严格杂交条件”或“严格条件”及其类似术语,如在本文中使用的,是指该领域熟悉的参数,该参数包括杂交温度随着多核苷酸或寡聚核苷酸长度的变化。核酸杂交参数可在编写此种方法的参考文献,Sambrook 等人(上文),和 Ausubel 等人(上文)中找到。例如,严格杂交条件,如在本文中使用的,可以指在 65℃下在杂交缓冲液(3.5xSSC、0.02%聚蔗糖、0.02%聚乙烯基吡咯烷酮、0.02%牛血清白蛋白、

2.5mM NaH₂PO₄(pH7)、0.5% SDS、2mM EDTA) 中杂交,并在 65℃下在 0.2xSSC,0.1% SDS 中洗涤两次,其中每个洗涤步骤约 30 分钟。

[0274] 本发明抗体和免疫球蛋白链典型地可通过重组表达生成。编码轻链和重链可变区的核酸,插入在表达载体中,其中该可变区可选地连接到恒定区。该轻链和重链可在相同或不同的表达载体中克隆。编码免疫球蛋白链的 DNA 片段可操作地连接到表达载体(一种或多种)中的控制序列(control sequence),该表达载体可确保免疫球蛋白多肽的表达。表达控制序列包括,但不限于,启动子(例如,天然关联的或异源性启动子)、信号序列、增强子元件,和转录终止序列。优选地,该表达控制序列是在能够转换或转染真核宿主细胞的载体中的真核生物启动子系统。该载体并入在适当的宿主中后,该宿主将在适合核苷酸序列高水平表达,和适合抗体和/或免疫球蛋白链的采集和纯化的条件下保存。

[0275] 典型地,这些表达载体在宿主细胞中是可复制的,或者作为游离基因,或者作为宿主染色体 DNA 中完整的一部分。一般地,表达载体含有选择标记(例如,氨苄青霉素抗性(ampicillin-resistance)、潮霉素抗性(hygromycin-resistance)、四环素抗性(tetracycline resistance)、新霉素抗性(neomycin resistance)、G418-抗性、DHFR(二氢叶酸还原酶)、ADA(腺苷脱氨酶)、GS(谷氨酰胺(gluatamine)合成酶),从而得以检测用期望的 DNA 序列转化的那些细胞(参见,例如,U. S. 4, 704, 362)。

[0276] 大肠杆菌是对克隆本发明多核苷酸(例如, DNA 序列)特别有用的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌属(bacilli),例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis),和其他肠杆菌科(enterobacteriaceae),例如沙门氏菌(Salmonella)、沙雷氏菌(Serratia),和各种假单胞菌(Pseudomonas)种。在这些原核宿主中,也可以得到表达载体,该表达载体将典型地含有与宿主细胞(复制起点)相容(compatible)的表达控制序列。另外,存在任何数量的多种众所周知的启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(Trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统、来自 λ 噬菌体的 T7 启动子或启动子系统。该启动子典型地可选地用操纵子序列控制表达,并具有用于启动和结束转录和翻译的核糖体结合位点序列等。

[0277] 其他微生物,例如酵母,也对表达有用。酵母菌属(Saccharomyces)是优选的酵母宿主,适宜的载体具有表达控制序列(例如,启动子)、复制起点、终止序列及所需的类似物。典型的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶和其他糖解酶。可诱导的酵母启动子包括,其中,来自醇脱氢酶、异细胞色素 C(isocytochrome C),及引起麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。对表达有用的酵母的另一个实施例是毕赤酵母(Pichia pastoris)。

[0278] 除了微生物之外,哺乳动物组织细胞培养物也可用于表达和生产本发明抗体和/或免疫球蛋白链(例如,编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸)(参见, Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N. Y., N. Y. (1987))。实际上优选真核细胞,因为本领域中已经开发能够分泌异源蛋白(例如,完整的免疫球蛋白)的许多适宜的宿主细胞系,且该宿主细胞系包括 CHO 细胞系、各种 Cos 细胞系、NS0 细胞、HEK293 细胞、PerC6 细胞、HeLa 细胞,优选地,骨髓瘤细胞系,或转化的 B-细胞或杂交瘤。优选地,该细胞是非人细胞。用于这些细胞的表达载体可包括表达控制序列,例如复制起点、启动子及增强子(Queen 等人, 1986),和必要的处理信息位点,例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点及转录终止子序列。优选的表达控制序列是来源于免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病

毒、巨细胞病毒及类似病毒的启动子（参见 Co 等人，1992）。

[0279] 可替换地，抗体编码序列可并入转基因中，用以引入到转基因动物的基因组中和转基因动物的乳汁随后的表达中（参加，例如，U. S. 5, 741, 957、U. S. 5, 304, 489 和 U. S. 5, 849, 992）。适宜的转基因包括与启动子可操作地连接的轻链和 / 或重链的编码序列，和来自乳腺特异性基因的增强子，例如酪蛋白或 β -乳球蛋白。

[0280] 含有感兴趣的多核苷酸序列（例如，重链和轻链编码序列和表达控制序列）的载体可通过众所周知的方法转移到宿主细胞中，该方法根据细胞宿主的类型改变。例如，氯化钙转染通常用于原核细胞，而磷酸钙处理、电穿孔、脂质转染、基因枪 (biolistics) 或基于病毒的转染可用于其他的细胞宿主（一般参见，Sambrook 等人，上文）。用于转化哺乳动物细胞的其他方法包括使用聚凝胺、原生质体融合、脂质体、电穿孔法和显微注射。对于转基因动物的生产，可将转基因显微注射到受精的卵母细胞中，或可将其并入到胚胎干细胞的基因组中，和转染到去核卵母细胞中的此种细胞的细胞核中。

[0281] 当在单独的表达载体上克隆重链和轻链时，该载体被共转染，从而获得完整的免疫球蛋白的表达和组装。被表达后，全抗体、它们的二聚体、各个重链和轻链，或本发明的其他免疫球蛋白形式可根据本领域的标准步骤纯化，该步骤包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱色谱、HPLC 纯化、凝胶电泳及类似方法（一般参见 Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N. Y., (1982))）。

[0282] 结合物

[0283] 本发明也提供了结合物（免疫结合物），其包含结合到直接和间接结合抗体的治疗剂上的本发明抗体。治疗剂的实例包括，但不限于，细胞毒素、放射性同位素（例如，碘-131、钇-90 或铟-111）、免疫调节剂、抗血管新生剂、抗新血管形成和 / 或其他血管形成剂、毒素、抗增殖药剂、促凋亡 (Pro-apoptotic) 药剂、化疗剂，和治疗核酸。

[0284] 细胞毒素包括损害（例如，杀伤）细胞的任何药剂。对于本领域中众所周知的这类药物的描述及其作用机制，参见 Goodman 等人，Goodman and Oilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edition, Macmillan Publisher, 1990。有关抗体免疫毒素制备的另外技术提供在，例如 Vitetta (1993) 和 US 5, 194, 594 中。

[0285] 用于形成本发明免疫结合物的适宜的治疗剂包括

[0286] 紫杉酚 (taxol)、细胞松弛素 (cytochalasin)B、短杆菌肽 (gramicidin)D、溴化乙锭 (ethidium bromide)、吐根碱 (emetine)、丝裂霉素 (mitomycin)、表鬼臼毒 (etoposide)、tenoposide、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、秋水仙碱 (colchicin)、阿霉素 (doxorubicin)、道诺红菌素 (daunorubicin)、二羟基蒽醌 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光神霉素 (mithramycin)、放线菌素 (actinomycin)D、1-去氢睾酮 (1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素 (glucocorticoids)、普鲁卡因 (procaine)、丁卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、心得安 (propranolol)，和嘌呤霉素 (puromycin)、抗代谢药物 (antimetabolites)（例如甲氨蝶呤 (methotrexate)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、氟达拉滨 (fludarabine)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、氨烯咪胺 (decarbazine)、羟基脲 (hydroxyurea)、天冬酰胺酶 (asparaginase)、吉西他滨 (gemcitabine)、克拉屈滨 (cladribine)、烷化剂（例如二

氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、thioepa、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、苯丙氨酸氮芥 (melphalan)、亚硝脲氮芥 (carmustine) (BSNU)、环己亚硝脲 (lomustine) (CCNU)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、白消安 (busulfan)、二溴甘露醇 (dibromomannitol)、链脲佐菌素 (streptozotocin)、氮烯唑胺 (dacarbazine) (DTIC)、甲基苄肼 (procarbazine)、丝裂霉素 (mitomycin) C、顺铂 (cisplatin) 和其他的铂衍生物, 例如卡铂 (carboplatin)), 抗生素 (antibiotics) (例如更生霉素 (dactinomycin) (原放线菌素)、博来霉素 (bleomycin)、道诺红菌素 daunorubicin (原道诺霉素 (daunomycin))、阿霉素 (doxorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、光神霉素 (mithramycin)、丝裂霉素 (mitomycin)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光神霉素 (plicamycin)、氨茴霉素 (anthramycin) (AMC))、白喉毒素 (diphtheria toxin) 和相关分子 (例如白喉 (diphtheria) A 链和其活性片段和杂交分子)、蓖麻毒素 (ricin toxin) (例如蓖麻毒蛋白 (ricin) A 或 deglycosylated ricin A chain toxin)、霍乱毒素 (cholera toxin)、志贺样毒素 (Shiga-like toxin) (SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV)、LT 毒素、C3 毒素、志贺毒素 (Shiga toxin)、百日咳毒素 (pertussis toxin)、破伤风毒素 (tetanus toxin)、大豆鲍曼 - 比尔克蛋白酶抑制剂 (soybean Bowman-Birk protease inhibitor)、假单胞菌外毒素 (Pseudomonas exotoxin)、alorin、皂草素 (saporin)、蒴莲根毒素 (modeccin)、gelatin、相思豆毒蛋白 A 链 (abrin A chain)、蒴莲根毒素 (modeccin) A 链、 α -八叠球菌 (α -sarcin)、油桐蛋白 (Aleurites fordii proteins)、石竹素蛋白 (dianthin protein)、美洲商陆蛋白 (Phytolacca americana proteins) (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂 (momordica charantia inhibitor)、麻风树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (croton)、sapaonaria officinalis inhibitor、白树因 (gelonin)、mitogellin、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin), 和伊诺霉素毒素 (enomycin toxins)。

[0287] 适宜的血管新生抑制剂的实施例 (抗血管新生药剂) 包括, 但不限于, 尿激酶抑制剂, 基质金属蛋白酶抑制剂 (例如马马司他 (marimastat)、新伐司他 (neovastat)、BAY12-9566、AG3340、BMS-275291 和类似药剂)、内皮细胞迁移和增殖的抑制剂 (例如 TNP-470、角鲨胺 (squalamine)、2-甲氧雌甾二醇 (2-methoxyestradiol)、考布他汀 (combretastatins)、内皮他丁 (endostatin)、血管稳定蛋白 (angiostatin)、青霉胺 (penicillamine)、SCH66336 (Schering-Plough 公司, Madison, NJ)、R115777 (JanssenPharmaceutica 有限公司, Titusville, NJ) 及类似药剂)、血管新生生长因子的拮抗剂 (例如 ZD6474、SU6668、对抗血管新生药剂的抗体和 / 或它们的受体 (例如 VEGF、bFGF 和血管生成素 -1)、沙利度胺 (thalidomide)、沙利度胺类似物 (例如 CC-5013)、Sugen5416、SU5402、抗血管新生核酶 (例如 angiozyme)、干扰素 α (例如干扰素 α 2a)、苏拉明 (suramin) 和类似药剂)、VEGF-R 激酶抑制剂和其他抗血管新生的酪氨酸激酶抑制剂 (例如 SU011248)、内皮特异性整联蛋白 / 生存信号的抑制剂 (例如 vitaxin 和类似药剂)、铜拮抗剂 / 螯合剂 (例如, 四硫钼酸盐、卡托普利 (captopril) 和类似药剂)、羧胺三唑 (CAI)、ABT-627、CM101、白介素 -12 (IL-12)、IM862、PNU145156E 及抑制血管新生的核苷酸分子 (例如反义 -VEGF-cDNA、为血管稳定蛋白编码的 cDNA、为 p53 编码的 cDNA 和为缺陷 VEGF 受体 -2 编码的 cDNA) 和类似药剂。血管新生、心血管形成, 和 / 或其他血管形成的抑制剂的其他实施例为抗 - 血管新生的肝素衍生物和相关分子 (例如, heparinase

III), 替莫唑胺 (temozolomide)、NK4、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、环氧合酶-2 抑制剂、低氧诱导因子 1 的抑制剂、抗血管新生的大豆异黄酮、奥替普拉 (oltipraz)、烟曲霉素及其类似物、抑生长素类似物、pentosan polysulfate, tecogalan sodium, dalteparin, 肿瘤抑素 (tumstatin)、血小板反应蛋白 (thrombospondin)、NM-3、combrestatin, 血管能抑制素 (canstatin)、avastatin、抗其他相关靶的抗体 (例如抗- α -v/ β -3 整合蛋白和抗-kininostatin mAbs) 和类似药剂。

[0288] 有多种放射性核素可用于生产放射性结合的 (radioconjugated) 抗体, 实例包括, 但不限于 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0289] 抗体和治疗剂的结合物可使用多种双功能的蛋白质偶联剂制备, 这些蛋白质偶联剂为, 例如, 但不限于, 4-(4'-乙酰基苯氧基) 丁酸 (AcBut)、3-乙酰基苯基酸性酸 (AcPac)、4-巯基-4-甲基-戊酸 (酰胺)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二巯基) 丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、酰亚胺酯的双功能衍生物 (例如, 二甲基己二亚酰胺化物 HCL)、活化酯 (例如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛 (例如戊二醛)、双偶氮化合物 (例如双(p-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物 (例如双-(p-二重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯 (例如甲苯-2,6-二异氰酸酯)、和双-活性氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯), 及其衍生物。例如, 蓖麻免疫毒素可按 Vitetta 等人 (1987) 描述的方法制备。碳-14-标记 1-异硫氰基苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是示例性螯合剂, 用于放射性核苷酸与抗体的结合 (W094/11026)。

[0290] 在另一个实施例中, 该抗体可以结合到“受体”(例如链霉亲和素)上, 以便应用于 C5a-表达细胞预靶向中, 其中向病人给予抗体-受体结合物, 接着使用清除剂从循环中除去未结合的结合物, 然后给予结合到治疗剂 (例如放射性核苷酸) 上的“配体” (例如亲和素)。

[0291] 在一个实施例中, 本发明抗体可用于递送遗传物质。该遗传物质可通过本领域中已知的任何技术结合到抗体上。实例包括, 但不限于, 利用生物素-亲和素相互作用、二硫桥键的形成、胺偶联 (参见, 例如 Hendrickson 等人, 1995)、硫醇偶联 (参见, 例如 Niemeyer 等人, 2003), 或醛-肼相互作用 (参见, 例如 Kozlov 等人, 2004)。其他偶联剂在本领域是已知的, 包括 m-马来酰亚胺基苯甲酰基 N-羟基琥珀酰亚胺酯或相关化合物、碳二亚胺, 例如 1-乙基-3-(3-二乙基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC)、琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC), 和戊二醛交联剂。

[0292] 信号分析

[0293] 配体, 例如激动剂或 C5a, 与 C5aR 的结合可以形成通过这个 G 蛋白偶联受体的信号转导, 和 G 蛋白的活化或刺激其他细胞内信号分子。在适宜的试验中利用配体, 并评估抗体抑制配体诱导的活性的能力, 可以确定本发明抗体的抑制活性。

[0294] G 蛋白活性, 例如 GTP 水解为 GDP, 或后来受体结合触发的信号事件, 例如对细胞内 (细胞浆) 游离钙浓度的快速和暂时增大的诱导可通过本领域中已知方法或其他适宜的方法分析 (参见, 例如 Neote 等人, 1993; Van Riper 等人, 1993; 和 Dahinden 等人, 1994)。

[0295] US 5, 284, 746 中描述了利用杂交 G 蛋白偶联受体的功能试验可用于监测配体结合到受体和活化 G 蛋白的能力。

[0296] 此种试验可在存在待分析的抗体的情况下执行, 抗体抑制配体诱导的活性的能力

可使用已知方法和 / 或在本文中描述的方法确定。

[0297] 化学趋化和细胞刺激的试验

[0298] 化学趋化试验可用于评估本发明抗体阻断配体与 C5aR 的结合的能力,和 / 或抑制与配体和受体的结合相关联的功能的能力。这些试验以化合物(化学引诱物)体外或体内诱导的细胞的功能迁移为基础。化学趋化可通过任何适宜的方式分析,例如利用 96 孔化学趋化板分析,或利用其他技术验证的方法来评估化学趋化。例如, Springer 等人(WO 94/20142) 和 Berman 等人(1988) 描述了体外经内皮趋化试验的应用。也描述了跨内皮迁移到胶原凝胶(Kavanaugh 等人,1991)。小鼠 LI. 2 前 B 细胞或其他能够化学趋化的适宜的宿主细胞的稳定转染子可用于化学趋化试验。

[0299] 一般地,化学趋化试验可监测适宜细胞(例如白细胞(例如淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱粒细胞、中性粒细胞))定向移动或迁移进入或通过屏障(例如内皮或滤膜(filter)),朝向化合物水平增大方向,从屏障的第一表面向相反的第二表面。膜或滤膜提供了便利的屏障,因此可以监测适宜细胞定向运动或迁移进入或通过滤膜,朝向化合物水平增大方向,从滤膜的第一表面向相反的第二表面。在一些试验中,用物质,例如 ICAM-1、纤连蛋白或胶原包被该膜,以促进粘附。此种试验提供了体外近似的白细胞“归巢(homing)”。

[0300] 例如,可以检测或确定对细胞在适宜的容器(容纳装置)中迁移的抑制,细胞从第一室迁移进入或通过微孔膜进入到含有化学引诱物和抗体的第二室,该室与第一室被膜分开。选择具有适宜孔径大小的,可用于监测对包括诸如消化纤维、聚碳酸酯的化合物的特异性迁移反应的膜。例如可以使用约 3-8 微米,以及优选的约 5-8 微米的孔径大小。滤膜上的孔径大小可以是统一的或在适宜的孔径大小范围内。

[0301] 为了评估迁移和迁移的抑制,迁移到滤膜中的距离、跨过滤膜仍粘附于滤膜的第二表面的细胞数目,和 / 或聚集于第二室的细胞数目可使用标准技术(例如,显微术和流式细胞术)确定。在一个实施例中,用可检出的标记物(例如,放射性同位素、荧光标记物、抗原或抗原表位标记物)标记细胞,并通过用适当的方法(例如通过检测放射性、荧光、免疫分析)确定粘附于膜和 / 或出现于第二室中的标记物,可以在存在或不存在抗体时评估迁移。可以确定相对于一个适宜的对照物(例如,比较于不存在抗体时确定的背景迁移、比较于第二化合物(即,标准的)所诱导的迁移程度、比较于抗体所诱导的未转染细胞的迁移)的抗体拮抗剂所诱导的迁移程度。在一个实施例中,特别是对于 T 细胞、单核细胞或表达 C5aR 的细胞,可以监测经内皮的迁移。在这个实施例中,评估了经过内皮细胞层的移行(transmigration)。为了制备细胞层,可以将内皮细胞培养在微孔滤膜或膜上,可选地用例如胶原、纤连蛋白或其他细胞外基质蛋白等物质包被,以促进内皮细胞的连接。优选地,培养内皮细胞直到形成了融合的单层细胞。有多种哺乳动物的内皮细胞可以用于形成单层细胞,包括,例如静脉、动脉或微血管内皮细胞,例如人脐静脉内皮细胞(Clonetics 公司, San Diego, Calif)。为了评估应答于特殊哺乳动物受体的化学趋化作用,优选同种哺乳动物的内皮细胞;但也可使用来自异源的哺乳动物物种或属的内皮细胞。

[0302] 在一个用于测试 C5a 信号的抗体抑制剂的实施例中,将包含能够迁移和表达 C5aR 的细胞的组合物放置于第一室中。将包含一种或多种能够诱导第一室中细胞化学趋化的配体或启动子的组合物(具有化学趋化功能)放置于第二室中。优选地,在将细胞放置于第一室前不久,或和细胞同步,将包含待测试抗体的组合物优选放置于第一室内。本实验中可

结合受体并通过表达 C5aR 的细胞的配体或启动子抑制化学趋化的诱导,是受体功能的抑制剂(例如刺激功能的抑制剂)。存在抗体时的配体或启动子诱导的迁移程度的减少是抑制活性的提示。可以执行单独的结合研究,从而确定抑制是否是抗体与受体结合的结果或经由不同的机制发生的。

[0303] 下面描述了监测应答于组织内注射化合物(例如化学因子或抗体)的组织内白细胞浸润的体内试验(见炎症模型)。这些体内归巢模型可测量细胞通过游走化学趋化到炎症部位,应答于配体或启动子的能力,以及评估抗体或其片段阻断这种游走的能力。

[0304] 除了所述方法之外,还可利用含有受体的合适的宿主细胞,通过监测活性受体所诱导的细胞应答,评估抗体对 C5aR 的刺激功能的影响。

[0305] 化学趋化分析的其他实施例描述在本文中,参见,例如实施例 4。

[0306] 炎症模型

[0307] 体内炎症模型是可获得的,它可用于评估体内抗体作为治疗剂的作用。例如,将化学因子以及与 C5aR 发生反应的抗体皮内注射到合适的动物,例如兔、小鼠、豚鼠或猕猴中之后,监测白细胞的浸润(参见,例如, Van Damme 等人,1992 ;Zachariae 等人,1990 ;Jose 等人,1994)。

[0308] 在一个实施例中,组织学评估了浸润白细胞(例如嗜酸性粒细胞、粒细胞)的皮肤活体组织检查。在另一个实施例中,将能够化学趋化和外渗(extravasation)的标记的细胞(例如,表达 C5aR 的稳定转染的细胞)给予动物。在将标记的细胞给予测试动物之前、同时或之后,将抗体给予测试动物。比较于无抑制剂时的浸润程度,抗体存在时浸润程度的减少是抑制的提示。

[0309] 用途

[0310] 本发明抗体在各种应用中都是有用的,包括研究、诊断和治疗应用。

[0311] C5aR 对于白细胞聚集有着重要作用。C5aR 是用于天然免疫系统细胞的化学引诱物受体,该细胞包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞和小胶质细胞,因此 C5aR 抗体可用于抑制(减少或阻止)白细胞迁移,特别是和中性粒细胞组织损伤相关的迁移,例如再灌注损伤和中风,或与单核细胞介导的病症相关的迁移,例如动脉粥样硬化症。

[0312] 在本文中描述的抗体可以作为抑制(减少或阻止)(a)与受体的结合(例如,配体、抑制剂),(b)受体信号功能,和/或(c)刺激功能的抑制剂。作为受体功能抑制剂的抗体可以直接或间接地(例如通过引起构象改变)阻断配体的结合。例如,抗体可以通过抑制配体的结合或通过脱敏作用(有或没有对配体结合的抑制)抑制受体功能。

[0313] 在一方面,本发明提供了治疗或阻止对象的病症的方法。如在本文中使用的,“病症”是对正常功能的破坏或干扰。

[0314] 在一个实施例中,该病症是免疫病态病症。

[0315] 免疫病态是对具有免疫原因的疾病的研究,免疫疾病是由抗体对抗原反应导致的任何病况。因而“免疫学病症”可定义为抗体对抗原反应引起的病症—这包括自身免疫学疾病和超敏感性反应(例如,I型:过敏、荨麻疹、食物变应性、哮喘;II型:自身免疫性溶血性贫血、输血反应;III型:血清病、坏死性血管炎、肾小球肾炎、风湿性关节炎、狼疮;IV型:接触性皮炎、移植排斥)。

[0316] 自身免疫疾病的出现,其中免疫系统未能清除发育期间的自反应性淋巴细胞(self-reacting lymphocyte),和随后的调节故障,导致自反应性 T 或 B 细胞克隆的活化,产生对抗自身抗原的可严重损害细胞和器官的体液或细胞介导的反应。

[0317] 在另一个实施例中,该病症是炎性疾病。

[0318] 炎症是机体组织对刺激或损伤的保护性反应,其可以是急性的或慢性的。因而,炎性疾病包括涉及中性粒细胞、单核细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞的疾病,其中发生了细胞因子释放、组胺释放、氧爆发、吞噬作用、其他颗粒酶的释放和化学趋化作用。超敏感性反应(上面定义的在免疫病态病症下)也可视为炎性疾病(急性或慢性),因而它们通常涉及补体活化和诸如中性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞等各种白细胞的募集/浸润。

[0319] 因此,可利用本发明治疗或预防的人或其他物种的病症包括,但不限于:

[0320] i) 涉及白细胞迁移和/或白细胞活化的病症,例如缺血/再灌注损伤、再灌注损伤、中风、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、哮喘、慢性障碍性肺病(COPD)、动脉硬化症、风湿性关节炎、牛皮癣、移植排斥、皮肤或器官的白细胞浸润的癌症、大疱性类天疱疮、抗磷脂综合征(APS);

[0321] ii) 急性炎症,例如系统炎症反应综合征(SIRS)、败血症休克、内毒素性休克、过敏性休克、过敏反应、药物过敏、超敏感性反应、急性肺损伤;

[0322] iii) 慢性炎症,例如牛皮癣、炎性肠病、克罗恩氏病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、慢性障碍性肺病(COPD)

[0323] iv) 自身免疫疾病,例如系统性红斑狼疮(SLE)、风湿性关节炎(RA)、多发性硬化(MS)、斯耶格伦综合征(Sjogren's syndrome)、强直性脊柱炎、硬皮病、肾小球性肾炎、自身免疫性甲状腺炎(桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis))、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、牛皮癣关节炎、大疱性类天疱疮、重症肌无力、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、型 I/幼年发病/胰岛素依赖性糖尿病、自身免疫性贫血(例如,恶性贫血、自身免疫性溶血性贫血)(它包括其中存在与 i) 重叠的实施例);

[0324] v) 炎性疾病,包括 i) 或 ii) 中没有涵盖的病症,以及间质炎性疾病、强直性脊柱炎、脊椎炎,血管炎(例如,坏死性、皮肤的、超敏感性、过敏性)、皮炎、皮炎(例如,过敏性接触,特应性,湿疹)、过敏性鼻炎;

[0325] vi) 免疫病态病症,包括 i)-iii) 中未涵盖的病症,例如移植排斥(移植之后,例如同种异体移植、异种移植)、移植物抗宿主疾病(GVHD);

[0326] vii) 上面未提及的其他类型的病症,包括年龄相关性黄斑变性、败血症、膜增生性肾小球肾炎、致密物沉积病和阿尔茨海默氏病。

[0327] 典型地,给予治疗有效量的抗体。短语“治疗有效量”是指足以促进、诱导,和/或增强对象的治疗或其他治疗效果的量。如在实施例部分中描述的,“治疗有效量”的实例是 10mg/kg。

[0328] 在另一个实施例中,本发明的各种抗体可用于检测 C5aR 或可用于测量受体,例如,在中性粒细胞、单核细胞上和/或在用受体基因转染的细胞上的表达。因此,它们也可用于诊断或研究目的的应用,例如细胞分选(例如,流式细胞术、荧光激活细胞分选术)。

[0329] 本发明的抗-C5aR 抗体对检测 C5aR 的存在与否有用,特别是对于诊断应用。典

型地, 诊断性试验需要检测抗体或其片段 C5aR 结合所形成的复合物的形成。对于诊断目的, 将抗体或抗原结合片段标记或未标记。抗体或片段可以被直接标记。可以采用各种标记物, 包括但不限于, 放射性核素、荧光剂、酶、酶底物、酶共因子、酶抑制剂和配体 (例如生物素、半抗原)。本领域技术人员知道多种适合的免疫分析 (参见, 例如, US3, 817, 827、3, 850, 752、3, 901, 654 和 4, 098, 876)。组织样品的免疫组化学也可以用于本发明的诊断性方法中。当抗体或片段未被标记时, 利用诸如凝集反应分析 (agglutination assay) 的合适的方法可以检测抗体或片段。未标记的抗体或片段也可以和另一种 (即, 一种或多种) 可用于检测的抗体, 例如与第一抗体 (例如, 抗独特型抗体或其他特异于未标记免疫球蛋白的抗体) 发生反应的标记抗体 (例如第二抗体) 的合适的试剂, 或其他合适的试剂 (例如, 标记的蛋白 A) 联合使用。

[0330] 关于显像剂,可使用的任何合适的药剂包括,但不限于,MRI 剂、CT 显像剂、光学显像剂、超声显像剂、paraCEST 显像剂,和其组合。在实施例,该药剂是基于包含顺磁性金属螯合物的 MRI 或 paraCEST 剂的质子 (proton),其中该顺磁性金属选自下列物质组成的组,即钆、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜、钼、钨、铈、镧、铪、铌、钽、钷、钐、铕、钇、锆、铉、和铋。在进一步的实施例中,该药剂可以是包含碘化的油纳米颗粒 (iodinated oil nanoparticles) 或包埋的 (entrapped) 固体金属颗粒的 CT 显像剂。用于本发明的显像剂的进一步实施例是基于卤代烃的纳米颗粒,例如 PFOB。

[0331] 也可以制备用于检测生物样品中 C5aR 蛋白存在的试剂盒。此种试剂盒可包括与 C5aR 结合的本发明抗体,以及一种或多种适合检测抗体或片段与 C5aR 之间的复合物存在的辅助试剂。可以以冻干的形式提供本发明的抗体组合物,它可以单独地或联合另外的特异的抗原表位的抗体一起使用。标记的或未标记的抗体可以和辅助成份(例如缓冲剂,例如 Tris、磷酸和碳酸、稳定剂、赋形剂、生物杀灭剂和 / 或惰性蛋白,例如牛血清白蛋白)一起包含于试剂盒中。例如,可以提供抗体和辅助成份的冻干混合物,或者辅助成份可以被单独提供给用户联合使用。这些辅助材料存在的量以活性抗体量为基准一般小于约 5 重量%,以及存在的总量以抗体浓度为基准至少是约 0.001 重量%。采用能够结合到抗体的第二抗体,此种抗体通常提供在试剂盒中,例如单独的小瓶或罐。如果存在第二抗体,它通常是被标记的,并按和在本文中的抗体剂型一样的方式进行配制。

[0332] 组合物和给药模式

[0333] 根据给药途径以及所选择组合物的性质（例如，溶液、乳剂、胶囊），给予的本发明抗体的剂型是不同的。待给予的包含本发明抗体的适当的药物组合物可以制备于生理可接受的药用载体中。也可以使用抗体的混合物。对于溶液或乳剂，合适的载体包括，例如水溶液或乙醇 / 水溶液，对于乳剂或悬浮液，合适的载体包括盐水和缓冲介质。肠外介质可以包括氯化钠溶液、Ringer 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化 Ringer 溶液或不挥发油。本领域人员所熟知的各种适当的水溶液载体包括水、缓冲水、缓冲盐、多羟基化合物（例如甘油、丙二醇、液态的聚乙烯乙二醇）、葡萄糖溶液和甘氨酸。静脉内媒介可包括各种添加剂、防腐剂、或液体、营养物或电解质补充物（参见，一般地，Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980）。组合物可以按需任选地包含药物可接受的辅助物质，从而接近于生理状态，例如 pH 调节和缓冲药剂和毒性调整药剂、例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙和乳酸钠。

[0334] 根据已知技术的冻干和重溶技术,在使用之前可将本发明的抗体冻干用于保存以及在合适的载体中再新溶解。根据本领域熟知的步骤可以凭经验确定活性成份(一种或多种)在所选的介质中的最佳浓度,并且这将取决于期望的最终药物剂型。对于吸入,可以将抗体或片段溶解并装入合适的分散器中进行给药(例如,喷雾器、雾化器或加压气雾分散器)。

[0335] 各种给药途径均是可能的,包括但不必局限于:口服、饮食、局部、肠外(例如,静脉内、动脉内、肌肉内、皮下注射)、吸入(经气管、经眼、经鼻或经口吸入、经鼻滴入),这取决于待治疗的疾病或病况。其他合适的给药方法也可以包括可再填装的或可生物降解的装置和缓释多聚物装置。

[0336] 也可以将本发明的药物组合物作为与其他药剂的联合治疗的一部分给予。此种其他治疗/药剂对本领域中技术人员是众所周知的。在一个实施例中,该病症是风湿性关节炎,其他的治疗剂选自 ATC code M01C 类别的抗风湿药和 ATC code L04 类别的免疫抑制剂,包括,但不限于硫唑嘌呤(azathioprine)、氯喹(chloroquine)、羟氯喹(hydroxychloroquine)、环孢素(cyclosporine)、D-青霉胺(D--penicillamine)、金盐(金硫丁二钠(sodium aurothiomalate),金诺芬(auranofin)、来氟米特(leflunomide)、甲氨蝶呤(methotrexate)、米诺环素(minocycline)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)和环磷酰胺(cyclophosphamide)和糖皮质激素类固醇(glucocorticosteroids)。在另一个实施例中,该病症是系统性红斑狼疮和其他的选自 ATC code M01C 类别的抗风湿药和 ATC code L04 类别的免疫抑制剂,包括,但不限于硫唑嘌呤、氯喹、羟氯喹、环孢素、D-青霉胺、金盐(金硫丁二钠,金诺芬)、来氟米特、甲氨蝶呤、米诺环素、柳氮磺胺吡啶和环磷酰胺和糖皮质激素类固醇、霉酚酸(mycophenolic acid)或麦考酚酯(mycophenolate)和他克莫司(tacrolimus)。在另一个实施例中,本发明抗体也可与其他抗体(例如,结合趋化因子受体的抗体,该抗体包括,但不限于 CCR2 和 CCR3)联合,或与抗-TNF 或其他抗炎症药剂或与已存的血浆制品联合使用,例如可商购获得的 γ 球蛋白及预防和治疗处理中使用的免疫球蛋白制品。本发明抗体可用作独立给予的组合物,连同抗体和/或抗微生物剂供给。

[0337] 给予本发明抗体的剂量范围是大到足够产生期望效果的剂量,其中改善了免疫病态疾病的症状或减少了感染的可能性或对免疫系统的过度刺激。该剂量不应当大到引起不良副作用,例如高粘滞综合征、肺水肿、充血性心力衰竭等。一般地,该剂量随着患者的年龄、病况、性别和疾病的程度而变化,并由本领域技术人员确定。如果发生任何并发症,个人医师可以调整剂量。剂量的变化范围为约 0.1mg/kg ~ 约 300mg/kg,优选为约 0.2mg/kg ~ 约 200mg/kg,更优选为约 0.5mg/kg ~ 约 20mg/kg。每日、每周或每两周或以确定需要的任何其他频率,以及每日一次或多次给予,在慢性病的情况下,服药可持续许多月(或甚至多年)。

[0338] 本领域技术人员应当理解,通过给予包含编码抗体的核酸分子可以将本发明的抗体引入到对象中。核酸分子可以是 DNA 或 RNA 或包含 DNA 和 RNA 的嵌合分子的形式。可以将编码抗体的核苷酸序列(一种或多种)克隆到表达载体中,其中编码药剂的序列与表达调控元件可操纵地连接。表达调控元件在本领域是熟知的并包括例如,启动子、增强子和合适的起始及终止密码子。

[0339] 多种方法可用于将编码抗体的核酸引入到体内靶细胞中。例如裸核酸可注射在靶

点处,可包裹化成脂质体,或可通过病毒载体引入。

[0340] 单独的核酸分子或,例如在阳离子脂质体中包裹化的核酸分子的直接注射可用于在体内将编码 TSP-1 的核酸稳定基因转移到非分裂的或分裂的细胞中 (Ulmer 等人,1993)。另外,利用粒子轰击方法可在体内将核酸转移到各种组织中 (Williams 等人,1991)。

[0341] 病毒载体可用于在体内将编码抗体的核酸分子基因转移到特定的细胞类型中。病毒是特异的感染药剂,它能感染特定的细胞类型并在其中繁殖。这种对感染特定细胞类型的特异性特别适合于在体内使抗体靶向到所选择的细胞中。对病毒载体的选择部分取决于要靶向的细胞类型。

[0342] 可靶向特定细胞类型的具体的病毒载体在本领域是众所周知的。此种载体包括,例如,具有通用的或组织特异性启动子的重组腺相关病毒载体 (US 5,354,678)。重组腺相关病毒载体具有的其它优点是重组病毒可以稳定地整合到甚至静止的非增殖细胞的染色质中 (Lebkowski 等人,1988)。

[0343] 通过将组织特异性启动子或增强子并入到载体中,可以构建病毒载体,从而进一步控制表达编码抗体的细胞类型 (Dai 等人,1992)。

[0344] 逆转录病毒载体也适合于在体内递送编码抗体的核酸分子的方法。此种载体可被构建成作为感染粒子或作为只进行单次首轮感染的非感染粒子。

[0345] 利用组织特异性配体或经桥分子与核酸分子非共价络合的抗体,受体介导的 DNA 递送方法也可以用于以组织特异性的方式将编码抗体的核酸分子递送到细胞中 (Curiel 等人,1992;Wu 和 Wu,1987)。

[0346] 在对象中获得抗体表达的基因转移,也可通过例如,对自体细胞的回体法中 (ex vivo) 转染执行。对于此种回体法中转染适合的细胞包括血细胞,因为利用本领域众所周知的方法容易操纵这些细胞并将它们重新导入到对象中。

[0347] 通过细胞的回体法中转染的基因转移可通过多种方法执行,这些方法包括,例如磷酸钙沉淀、二乙氨基葡聚糖、电穿孔、脂质体转染或病毒感染。此种方法在本领域中是众所周知的 (参见,例如,Sambrook 等人,Molecular Cloning :A Laboratory Manual,Cold Springs Harbour Laboratory Press(1989))。这些细胞被转染后,然后将它们移植或迁移回所治疗的对象中,一旦这些引入体内的细胞可以产生抗体,这些抗体可以进入循环并在疾病或病况部位抑制血小板的聚集。

[0348] 实施例

[0349] 实施例 1- 人源化方法

[0350] 限定 CDR 和框架残基

[0351] 通常根据多种编号方案,例如 Kabat、Chothia 或 IMGT (免疫遗传学信息系统® <http://imgt.cines.fr>),定义抗体的 CDR 和框架区。Kabat 定义基于序列变异性,它是最常用的。然而,对于给定的抗体,Kabat 定义的 CDR 不必与其他编号系统定义的完全相同。两个编号系统定义的 CDR 可交叠,或可以在另一方的任一侧延伸 (extend) 几个残基。

[0352] 本发明人结合使用了 Kabat 和 IMGT 编号系统,从而在可变 (V) 结构域中定义 CDR 和框架区。本发明人希望尽量增大移植到人框架中的小鼠 CDR 序列的范围,以便维持抗原结合口袋的结构。因此,C5aR 抗体 CDR 包括 Kabat 和 IMGT 编号系统归类为 CDR 的所有残基。其余序列包含 V 结构域框架。

[0353] 挑选合适的人抗体框架序列

[0354] 为了挑选合适的小鼠 CDR 移植在其上的人抗体框架序列, 本发明人采用了一些策略:

[0355] i) Blast 检索序列数据库, 鉴定与小鼠 C5aR 抗体同源性最高的人 IgV 区轻链和重链序列。比对同源性最高的序列, 并产生轻链和重链的共有框架序列。

[0356] ii) 鉴定与小鼠 C5aR 抗体重链或轻链具有高同源性的已知人抗体, 并使用 V 区框架 (或修饰形式) 移植小鼠 C5aR 抗体 CDR。

[0357] iii) 利用与小鼠 C5aR 抗体相似的框架序列, 鉴定其他成功的人源化的抗体, 将小鼠 CDR 移植到这些框架上。

[0358] 从序列数据库挑选同源抗体

[0359] 在 Blastp 检索 SWISSPROT 和 Genbank 数据库中的人免疫球蛋白序列时, 小鼠 C5aR 抗体、7F3 可变区氨基酸序列 (重链和轻链, 见 SEQ ID NO 1 和 2) 单独用作查询序列。

[0360] 在 Blast 检索人免疫球蛋白基因的 IMGT 数据库时, 小鼠 7F3 可变区 DNA 序列 (编码重链和轻链, 见 SEQ ID NO 3 和 4) 单独用作查询序列。

[0361] 从每次检索中, 产生了与查询序列同源性最高的序列列表 (表 2 和 3)。

[0362] 表 2: 与小鼠 C5aR mAb 可变轻链同源的人序列

[0363]

查询	数据库	序列 ID	描述	得分
----	-----	-------	----	----

[0364]

小鼠 7F3 Vk 氨基酸	SWISS_PROT	KV2F 人	Ig kappa 链 V-II: RPMI6410	181.0
		KV2D 人	Ig kappa 链 V-II: TEW	181.0
		KV2E 人	Ig kappa 链 V-II: GM607	176.0
		KV2B 人	Ig kappa 链 V-II: FR	173.0
		KV2A 人	Ig kappa 链 V-II: CUM	169.0
		KV2C 人	Ig kappa 链 V-II: MIL	166.0
		KV4C 人	Ig kappa 链 V-IV: B17	150.0
		KV4A 人	Ig kappa 链 V-IV: LEN	150.0
		KV4B 人	Ig kappa 链 V-IV: JI	148.0
		KV3D 人	Ig kappa 链 V-III: TI	138.0
小鼠 7F3 Vk DNA	IMGT 人 Ig V 基因	U416644	IGKV2D-29*02	993
		M31952	IGKV2D-29*01	984
		X63396	IGKV2-29*01	984
		U41645	IGKV2-29*02	975
		X12691	IGKV2D-28*02	975

[0365] 共有框架序列—轻链 7F3

[0366] 通过比对来自表 2 的下列序列:KV2F_人、KV2D_人、KV2E_人、KV2B_人、KV2A_人,和 DNA 序列 X12691、U41645、U41644、M31952 的氨基酸翻译,使用 ClustalW,产生了用于移植 7F3 轻链 CDR 的轻链人框架共有序列。该比对和共有序列示出在图 1 中。人共有框架与小鼠 C5aR 抗体 7F3 轻链框架序列有 86% 相同。

[0367] 表 3:与小鼠 C5aR mAb 可变重链同源的人序列

[0368]

查询	数据库	序列 ID	描述	得分
小鼠 7F3 Vh 氨基酸 (V 基 因区)	SWSS_PROT	HV1C 人	Ig 重链 V-I: ND	142.0
		HV1B 人	Ig 重链 V-I: HG3	138.0
		HV1G 人	Ig 重链 V-I: V35	134.0
		HV3J 人	Ig 重链 V-III: HIL	130.0
		HV1A 人	Ig 重链 V-I: EU	127.0
		HV3G 人	Ig 重链 V-III: CAM	123.0
		HV3K 人	Ig 重链 V-III: KOL	122.0

[0369]

		HV3H 人	Ig 重链 V-III: GA	122.0
		HV1H 人	Ig 重链 V-I: DOT	120.0
		HV1F 人	Ig 重链 V-I: MOT	120.0
小鼠 7F3 Vh 氨基酸 (J 基 因区)	SWISS_PRO T	HV3K 人	Ig 重链 V-III: KOL	29.0
		HV2I 人	Ig 重链 V-II: ARH-77	28.2
		HV1C 人	Ig 重链 V-I: ND	28.2
		HV3T 人	Ig 重链 V-III: GAL	27.8
		HV3H 人	Ig 重链 V-III: GA	27.8
小鼠 7F3 Vh DNA (V 基因区)	IMGT 人 Ig V 基因	Z12305	IGHV1-f*01	777
		M99642	IGHV 1-24*01	768
		L06612	IGHV1-46*03	750
		J00240	IGHV1-46*02	750
		X92343	IGHV1-46*01	750

[0370] 共有框架序列—重链 7F3

[0371] 产生的用于移植 7F3 重链 CDR 的共有人框架序列如下:

[0372] a) 使用 CLUSTALW, 比对 V 区氨基酸序列 HV1C_人、HV1B_人、HV1G_人和 HV1A_人 和 V 基因序列 X92343、X62109、M99641、M99642 和 Z12305 的氨基酸翻译, 从而产生共有 V 区框架序列。

[0373] b) 使用 CLUSTALW, 比对 J 区氨基酸序列 HV3K_人、HV2I_人、HV1C_人、HV3H_人 和 HV3T_人, 从而产生共有 J 区框架序列。

[0374] 这些比对和共有序列示出在图 2 中。

[0375] 挑选同源的人源化抗体

[0376] 通过检索与鼠科动物抗体序列匹配最紧密的成功人源化的抗体的文献,挑选其他合适的框架序列。

[0377] 鉴定出用于移植 7F3 轻链 CDR 的两条轻链框架序列:

[0378] 基于 KV2F 的序列,描述在 Caldas 等人 (2003) 中。

[0379] 基于 HuVL-19 的序列,描述在 Nisihara 等人 (2001) 中。

[0380] 鉴定出用于移植 7F3 重链 CDR 的重链框架序列:

[0381] 基于 HG3 的序列,描述在 Caldas 等人 (2003) 中。

[0382] 基于 SGI-VH 的序列,描述在 Nisihara 等人 (2001) 中。

[0383] 将 CDR 移植到框架序列中并创建人源化的轻链和重链序列

[0384] 人源化 7F3 轻链

[0385] 创建了三种形式的人源化 7F3 轻链可变区。

[0386] 第一种是通过下面设计的,即从图 1 中取共有的人框架序列,将这个序列与小鼠 7F3 框架序列进行比较,将在人框架中选取的氨基酸换成小鼠残基并然后移植于小鼠 7F3 轻链 CDR 上(图 3)。选作换成小鼠序列的人框架中的残基为: #2 Ile ~ Val、#15 Pro ~ Leu 和 #92 Tyr ~ Phe。作出前两个变换的原因是因为在小鼠中发现的残基和与小鼠 7F3 最同源的人序列,即 KV2F_ 人中的氨基酸匹配。作出第三个变换的原因是因为它与 CDR3 的接近性,且需要最小化对抗体结合区的结构的变换。小鼠 7F3 轻链 CDR 被移植到修饰的共有框架序列中,从而创建序列 h7Vk(图 3)(SEQ ID NO:31)。

[0387] 第二种人源化的 7F3 轻链可变区是通过将小鼠 7F3 轻链 CDR 移植到上述人源化 HuVL-19 框架序列 -RNOK203VL 上(图 4)创建的。这产生了序列 h7aVk(图 4)(SEQ ID NO:32)。

[0388] 第三种人源化的 7F3 轻链可变区是通过将小鼠 7F3 轻链 CDR 移植到上述 KV2F 源的框架序列 VLCD18-Q 上创建的(图 5)。与 KV2F_ 人框架序列相比(见图 1 和 SEQ ID NO:5),2 个氨基酸换成小鼠 7F3 序列: #51 Arg ~ Leu,从而除去第二个带电荷的残基,其中在小鼠中仅有一个,和 #109 Val ~ Leu。一个进一步的差异是在残基 #105 Gln ~ Gly 处的变换,从而除去庞大的侧链。这产生了序列 h7bVk(图 5)(SEQ ID NO:33)。

[0389] 图 6 示出所创建的这 3 个人源化 7F3Vk 序列的比较。这些序列与框架区中 2 ~ 5 位置上的共有序列 h7F3VkCons 是不同的,意味着所有序列彼此之间都超过 93% 相同。下面示出的数据表明含有某些轻链的人源化 7F3 抗体优于其他抗体。特别地,CDR 环 L1 和 L2 之间的残基是关键的(critical),在这个区中某些变换具有有害影响(例如,在残基 #41 处引入 Cys)。其他变换,例如引入另外的带电荷的残基的影响相对较小。对人源化 7F3Vk 序列作出的其他变换可能对含有这些变换的抗体性质是无害的。

[0390] 人源化 7F3 重链

[0391] 创建了 3 种形式的人源化 7F3 重链。

[0392] 第一种是通过下面设计的,即,从图 2 中取共有的人框架序列,将这个序列与小鼠 7F3 框架序列进行比较,变换在人框架中选取的氨基酸并然后移植于小鼠 7F3 重链 CDR 上(图 7)。被改变的人共有框架中的残基为: #20 变成 Ile、#43 变成 Lys(从而保留带电荷的残基)、#72 变成 Ala(从而除去带电荷的残基)、#91 变成 Ser,和 #95 变成 Phe。这些残

基与小鼠框架相同,但也可在至少一种人 Ig 序列中找到。另外,通过在这时挑选 HVIAv 序列,解决 F3 中的相对灰区 (ambiguous region),从而并入在残基 #70 处的 Ile 和在 #74 处的 Glu。将小鼠 7F3 重链 CDR 移植到修饰的共有框架序列中,创建序列 h7Vh (图 7) (SEQ ID NO :34)。

[0393] 第二种人源化 7F3 重链可变区是通过将小鼠 7F3 重链 CDR 移植到上述 SGI-VH 源的框架序列上创建的 (图 8)。将位于六个位置处的 SGI-VH 框架中的人残基变换成小鼠 7F3 残基。这些变换是在残基 #38 (Arg ~ Lys)、#48 (Val ~ Ile)、#67 (Arg ~ Lys)、#68 (Val ~ Ala)、#72 (Leu ~ Ala) 和 #77 (Asn ~ Ser) 上作出的。作出这些变换是因为该残基与 CDR H1 或 H2 靠得很近,并认为对结合口袋的形成重要。例如,创建序列 RNOK203VH 的 SGI-VH 中这些位置处的回复突变,已显示可改进人源化的抗 -FasL 抗体的中和活性 (Nisihara 等人, 2001)。这产生了序列 h7aVh (图 8) (SEQ ID NO :35)。

[0394] 第三种人源化的 7F3 重链可变区是通过将小鼠 7F3 轻链 CDR 移植到上述 HG3 源的框架序列上创建的 (图 9)。HG3 框架上的一个位置,残基 #71 (Arg) 回复突变成小鼠 7F3 残基 (Ala),从而除去带正电荷的残基。这产生了序列 h7bVh (图 9) (SEQ ID NO :36)。

[0395] 图 10 示出所创建的这 3 个人源化 7F3Vk 序列的比较。这些序列与框架区中位于 1 ~ 8 位置上的共有序列 h7F3VkCons 是不同的,意味着所有序列彼此之间都超过 90% 相同。序列之间的一些显著差异包括在残基 43 处的 Lys 与 Gln 和在 #74 处的 Glu 与 Thr。然而,下面示出的数据表明含有 3 条重链中任一条的人源化 7F3 抗体可有效阻断 C5a 与人 C5aR 的结合。因此,Vh 序列之间的差异似乎不是关键的,对人源化 7F3 Vh 序列作出的其他变换可能对含有此种经修饰的序列的抗体性质是无害的。但是,对人源化 7F3 Vh 序列作出的某些置换有可能改进了抗体性质,而其他的置换可能是有害的。

[0396] 分子建模

[0397] 背景

[0398] 抗体结合位点的建模是蛋白质同源建模和从头 (ab initio) 建模的组合,其中蛋白质同源建模中大量抗体结构可用作已知数据库,而从头建模必须用于太易变而不能运用同源方法的抗体的那些部分。在不同的抗体之间,大部分可变片段 (Fv) 框架区 (FW) 的结构都是很保守的。在考虑了特定 β -链中确实发生了的这些变化形式之后,可通过选择序列中与待建模的 Fv 最接近的已知结构,给框架建模。

[0399] 抗体中大多序列和结构可变性限制于结合抗原的高变区 (CDR)。这六个环 (L1、L2、L3、H1、H2 和 H3) 位于抗体表面上,且这是对 CDR 的建模的最大挑战。除了 H3,所有 CDR 通常落入 2 和 6 结构 (标准) 类之间的一个 (Chothia 和 Lesk, 1987 ;Chothia 等人, 1989)。标准类的成员都具有近乎相同的骨架构象。因此,为了给未知 CDR 建模,检查序列,分配适当的标准类,并使用序列同源性最高的已知 CDR。H3 环更难建模,因为它的构象在多种结构之间显著变化。

[0400] 抗体建模的当前方法通常采取同源方法 (见,例如,Pulito 等人, 1996 ;Eigenbrot 等人, 1993 ;Barry 等人, 1994)。WAM (Web Antibody Modelling, 见 <http://antibody.bath.ac.uk>) 采用的算法使用了序列同源性最高的框架和待构建序列的标准 CDR 环,该序列选自已知抗体结构的数据库。

[0401] 对于非标准环,使用不同方法。这是 Martin 等人 (1989) 的 CAMAL (Combined

Antibody Modelling Algorithm),并由结合的数据库/构象检索组成。

[0402] 模型产生

[0403] WAM 用于产生小鼠 7F3 Fv 区的模型(带有重链和轻链)和人源化 7F3 Fv 区的模型。

[0404] 产生许多人源化 Fv 区模型(各自含有一个 V 区轻链和一个 V 区重链),因为本发明人已为人源化 7F3 重链和轻链中的每个生产数个序列变体,将每个人源化 Fv 模型与小鼠 7F3 Fv 结构进行比较,其中使用 DeepView/SWISS-PdbViewer 详细比较 CDR 结构。例如,当将 h7Vk-h7Vh 结构与 7F3 Fv 结构比较时,h7Vk 轻链可以非常好的配合 7F3 Vk,几乎是完全相同的,但重链 CDR H2 和 H3 没有紧密比对。相反,在另一个模型中,包含 h7aVk-h7aVh 序列,重链与 7F3 Vh 的对比与 h7Vh 好,但是轻链比对在 CDR 中大大不同。从这个分析,可以推测 h7Vk 和 h7aVh 的结合可产生与 7F3 最相似的抗体。包含显露 CDR LI、HI、H2 和 H3 的 h7bVk-h7bVh 序列的抗体分析与等价的 7F3 CDR 之间的不同比与其他的 h7F3 重链和轻链之间的不同要大,揭示含有 h7bVk 或 h7bVh 序列的抗体没有 7F3 或未含有这些序列的人源化 7F3 抗体。鉴于此,令人吃惊的和出乎意料的,含有 h7bVh 序列的一个抗体显示出比 F3 较高的活性(见实施例 15,图 17)。

[0405] 接下来的步骤是将上述人源化的 7F3 重链和轻链序列转换成用于体外和体内测试的抗体。

[0406] 实施例 2—人源化抗体的表达和生产

[0407] 将抗体可变区基因克隆到含有恒定区基因的载体中

[0408] 按如上所述设计重链和轻链可变氨基酸序列。为了生产含有这些结构域的抗体,合成了编码每个可变区的 DNA 序列(Genescript 公司)。EcoR1 和 Hind111 位点添加在 5' 或 3' 端,从而促进到载体 PUC18 中的克隆。另外,轻链可变基因在每个端点均具有仅有的 BsmB1 限制位点。重链基因具有位于 5' 的 BsmB1 位点和位于 3' 端的 Nhe1 位点。

[0409] 为了构建全长抗体基因,可变区基因被亚克隆到编码分泌信号和恒定结构域的载体中。对于轻链,这个载体含有被两个独特 BsmB1 位点分开的分泌信号序列和人恒定 kappa(C γ) 区基因。重链载体含有被 BsmB1 和 Nhe1 位点分开的分泌信号和人恒定 γ (C γ) 区基因。重链载体含有 γ 1(C γ 1)、 γ 2(C γ 2)、 γ 3(C γ 3)、 γ 4(C γ 4)、 γ 4_{PE} 突变(C γ 4_{PE}) 或 γ 4_p 突变(C γ 4_p) 基因。

[0410] 该克隆过程涉及通过标准方法制备质粒 DNA,按制造商(新英格兰 Biolabs 和 Promega)推荐的,用 BsmB1(轻链载体和 Vk 区基因)或 BsmB1 和 Nhe1(重链载体和 Vh 区基因)消化质粒 DNA,通过琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段,使用凝胶提取试剂盒(JetQuick、Genomed)从凝胶中回收 DNA 片段,将可变基因片段连接到载体片段(T4 DNA 连接酶, Promega),将 DNA 转化成感受态 E. coli 细胞(前 10 名, Invitrogen)。通过限制性内切酶消化以分析来自转化细胞的质粒 DNA,对质粒中的抗体基因测序,从而证实已在正确的阅读框中克隆可变区。

[0411] 将抗体基因亚克隆到表达载体中

[0412] 在证实全长抗体基因具有正确的序列之后,将其亚克隆到表达载体中。可使用的表达载体的实例包括 pcDNA-、pLENTI-、pT-REX-、pAd-、pREP- 或 pCEP- 哺乳动物表达载体(Invitrogen)、pTriEx1 或 pBac 载体(Novagen)、ZAP 和 pCMV 表达载体(Stratagene)、GS

表达系统载体,例如 pEE12.4 和 pEE6.4(Lonza)、pCMV5 cumate 表达系统载体 (Qbiogene)、UCOE 表达系统质粒 (ML 实验室) 或 MARtech 表达质粒 (Selexis)。在这种情况下,重链基因(含有位于 5' 端的 HindIII 位点和位于 3' 端的 EcoRI 位点)被亚克隆到 pcDNA3 源的载体 (Invitrogen) 中 CMV 启动子的 HindIII-EcoRI 位点下游,和 / 或 GS 表达载体 (Lonza) 中,其中该 pcDNA3 源的载体含有小鼠 DHFR 基因。轻链基因(含有位于 5' 端的 SpeI 位点和位于 3' 端的 EcoRI 位点) (Invitrogen) 被亚克隆到 pTracer-CMV/BSD (Invitrogen) 的 NheI-EcoRI 位点中。含有位于 5' 端的 HindIII 位点和位于 3' 端的 EcoRI 位点的轻链基因也被亚克隆到 GC 表达载体 (Lonza) 的 HindIII-EcoRI 位点中。在一些情况下,重链表达盒(启动子、轻链编码序列和多聚腺嘌呤信号)被亚克隆到轻链载体中,从而创建表达重链和轻链的单个载体。

[0413] 在哺乳动物细胞中表达人源化抗体

[0414] 为了表达人源化抗体,使用脂质体 (Invitrogen) 将重链和轻链载体共转染到 CHO 细胞中,或者,可通过电穿孔、磷酸钙沉淀、直接注射、基因枪或本领域技术人员已知的其他方法转染载体 DNA。或者可将载体 DNA 转染到任何数目的哺乳动物细胞系中,例如 CHOK1SV、HEK293、PerC6 或 NS0。在一些情况下,编码重链和轻链的单个载体可通过电穿孔或使用脂质体转染到细胞中。

[0415] 在转染的前一天,将 15ml 非选择性培养基(含有核苷 (Invitrogen) 的 α -MEM, 2mM L-谷氨酰胺, 10% FBS) 中 4×10^5 CHOdhr⁻ 细胞 (ATCC) 接种到 T175 烧瓶中,并在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育。在转染之前将 800 μ l 生长培养基中的质粒 DNA (15 μ g) 加入到 800 μ l 生长培养基中的 100 μ l 脂质体 (Invitrogen) 中,并在室温下孵育 20 分钟。用 PBS 漂洗该细胞单层,并将 DNA/脂质体混合物添加到含有 5ml 生长培养基的烧瓶中。在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育 16 小时之后,加入另一个 10ml 生长培养基。一天之后,用 PBS 清洗该细胞,并添加 15ml 选择性培养基(α -MEM 不加核苷和 5% 的透析 FBS)。2 天之后,以每孔 2 ~ 5 个细胞的平均密度将粘附性细胞再植入 (replate) 到 96 孔的组织培养板中。在接下来的 2-3 周之后,使用人 IgG- 特异性 ELISA 测量生长抗体生产。细胞表达抗体扩增到 T- 烧瓶中,用以生产。收获培养基并按如下方法纯化抗体。将 GS 系统表达载体转染到 CHOK1SV 细胞和分离的分泌细胞系的抗体中,并按制造商 (Lonza) 的推荐扩增该载体用于生产。

[0416] 人源化抗体的纯化

[0417] 转染细胞将抗体分泌到生长培养基中。通过蛋白质 A 或蛋白质 G 亲和色谱纯化抗体。收集通过 SDS-PAGE 或通过人 IgG- 特异性 ELISA 鉴定的含有抗体的组分。人 IgG- 特异性 ELISA 用于确定回收的抗体量及其浓度。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳评价抗体纯化。

[0418] 生产和分析的人源化抗体列表

[0419] 表 4 列出了生产的不同抗体,示出抗体中出现的重链和轻链序列。

[0420] 表 4 :生产的人源化抗体

[0421]

抗体 hAb	轻链		重链	
	可变 (V)	恒定	可变 (V)	恒定
A	7Vk	hCκ-R	7Vh	hCγ4
B	7aVk	hCκ-R	7Vh	hCγ4
C	7b Vk	hCκ-R	7Vh	hCγ4
D	7Vk	hCκ-R	7Vh	hCγ4 _{PE}
E	7aVk	hCκ-R	7Vh	hCγ4 _{PE}
F	7b Vk	hCκ-R	7Vh	hCγ4 _{PE}
G	7Vk	hCκ-R	7aVh	hCγ4 _{PE}
H	7aVk	hCκ-R	7aVh	hCγ4 _{PE}
I	7b Vk	hCκ-R	7aVh	hCγ4 _{PE}
J	7Vk	hCκ-R	7b Vh	hCγ4 _{PE}
K	7aVk	hCκ-R	7bVh	hCγ4 _{PE}
L	7b Vk	hCκ-R	7bVh	hCγ4 _{PE}
M	7Vk	hCκ-R	7aVh	hCγ4
N	7Vk	hCκ-R	7aVh	hCγ1
O	7b Vk	hCκ-R	7Vh	hCγ1
P	7Vk	hCκ	7bVh	hCγ1
Q	7Vk	hCκ	7bVh	hCγ4 _p
R	7Vk	hCκ	7aVh	hCγ4 _p
S	7Vk	hCκ	7bVh	hCγ4 _{PE}
T	7Vk	hCκ	7aVh	hCγ4 _{PE}
U	7Vk	hCκ	7aVh	hCγ1
V	7Vk	hCκ	7aVh	hCγ4 _p

[0422] 实施例 3- 人源化抗 -C5aR 抗体的结合研究

[0423] 为了表征人源化抗 -C5aR 抗体与人 C5a 受体 (hC5aR) 的结合动力学,在这个实施例中描述了两类型的结合研究。第一种在竞争性配体结合试验中比较了抗体和 C5a 与人 C5aR 的结合。第二种涉及表达人 C5aR 的细胞中的饱和结合。

[0424] A. 人源化抗 -C5aR 取代 C5a 与 C5aR 结合,竞争性配体结合试验

[0425] 按下面描述的,测试了人源化 Ab 抑制 ¹²⁵I- 标记的 C5a 与用 hC5aR 基因转染的 L1.2 细胞或人中性粒细胞结合的能力。重组人 C5aR 从 Sigma 化学公司 (St. Louis, MO) 获得。¹²⁵I-Bolton-Hunter- 标记的补体 C5a 从 NEN-Dupont (Boston, MA) 处购买,其中比活性 (specific activity) 为 2200Ci/mM。简言之,在实验之前,让 L1.2/hC5aR 稳定转染子生长数天,然后在结合试验之前用 5mM 丁酸处理过夜,从而刺激 hC5aR 表达。从采集于健康志愿者的静脉血液中纯化出中性粒细胞。通过 Percoll 密度离心,和随后的红血细胞裂解步骤,从白细胞分离出中性粒细胞。两种细胞类型都用 PBS 清洗一次,并使其重悬于浓度为 1×10^7 /ml 的结合缓冲剂 (50mM Hepes, pH 7.5, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 0.5% BSA) 中。将等份的 40μ l (4×10^5 细胞) 分配 (diapense) 到 96 孔微孔板中,接着添加冷的竞争剂 (抗体或人 C5a)。在将放射性标记的 C5a 添加到最后浓度为 0.4nM 中之前,在室温下孵育细胞和冷

的竞争剂 15 分钟。最终的反应体积是 120 μ l。在室温下孵育 60 分钟之后,用 150 μ l 含有 0.15M NaCl 的结合缓冲剂清洗细胞三次。然后在 TopCount 闪烁计数器 (Packard) 上对细胞颗粒进行计数。样品分为一式三份进行分析,每个为 6 ~ 8 浓度。在至少 3 个独立的试验中测试每个抗体。每个样品中计算数目 (number of counts) 表示最大 125 I-C5a 结合百分比,该最大 125 I-C5a 结合百分数是在扣除背景之后没有添加冷竞争剂的情况下在孔中观测的。

[0426] 通过与入中性粒细胞中的小鼠抗体 7F3 和 L1.2/hC5aR 转染子比较,对人源化抗体中每个抗体的这个分析的结果 (取代曲线) 分别在图 11 和 12 中给出。表 5 示出每个抗体的 EC_{50} 值。可使用 Graphpad Prism 软件,以数据拟合对于一个结合位点的非线性方程,获得这些值。数据显示不是所有人源化抗体都等同有效地从受体中取代放射性标记的 C5a。人源化抗体 O 和 N 与入中性粒细胞中的小鼠 7F3 同样有效,而抗体 C、J、M、N、O 和 Q 与 L1.2/hC5aR 转染子中的 7F3 没有显著差异。

[0427] 表 5 :图 11 和 12 中示出的每个抗体的 EC_{50} 值。

[0428]

抗体或配体	EC_{50} (入中性粒细胞)	95% CI	EC_{50} (L1.2/hC5aR 转	95% CI
-------	--------------------	--------	-------------------------	--------

[0429]

	nM		染子)nM	
人 C5a	0.5	0.37-0.88		
m7F3	0.54	0.39-0.75	0.51	0.35-0.75
A	nd		2.78	1.81-4.27
C	2.48	1.49-4.12	0.90	0.56-1.47
F	2.55	1.51-4.31	1.26	0.88-1.80
G	3.52	1.95-6.35	1.53	0.92-2.52
J	4.11	2.14-7.91	0.93	0.63-1.31
M	4.05	2.53-6.49	0.95	0.60-1.48
N	0.65	0.45-0.94	1.03	0.56-1.90
O	0.48	0.32-0.70	0.68	0.39-1.17
Q	3.50	2.42-5.05	0.86	0.52-1.46
S	2.69	1.46-4.96	nd	

[0430] B. 抗 -C5aR 抗体与纯化的人中性粒细胞的饱和结合

[0431] 将按如上所述分离的人中性粒细胞重悬在 dPBS 中,并将 1×10^5 细胞 (在 $25 \mu\text{l}$) 分配到 96 孔板中。在每个孔中添加等体积 ($25 \mu\text{l}$) 的 $2 \times$ 抗体 (稀释在 PBS 中)。使用 2 倍连续稀释,将最终的抗体浓度稀释到 $40 \sim 0 \mu\text{g/ml}$ (使用未标记的 hAb-Q、hAb-J 和 7F3)。在 4°C 下孵育细胞和抗体 20 分钟。孵育之后,在每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ PBS+1% BCS 中并在 2,000rpm 下离心该板 3 分钟。在 PBS+1% BCS 中清洗细胞 3 次,并将其重悬于在 PBS 中稀释 1/300 的抗人 IgG-FITC (Sigma F1641) 或抗小鼠 IgG-FITC (Jackson 195-115-003) 中,并在冰上孵育 20 分钟。按上面清洗细胞一次,并将其重悬于 PBS+1% FCS 中,以通过流式细胞仪分析。FSC 与 SSC 分散剂 (scatter) 用于鉴定中性粒细胞,确定每个样品的中位荧光强度 (MFI)。通过使用 GraphPad Prism (v4.0) 软件以数据 (MFI-背景与 $\log_{10}$ [抗体浓度]) 拟合 S 形剂量反应曲线 (sigmoidal dose-response) (可变斜率),即,4-参数 logistic 方程,确定 EC_{50} 值。通过以数据拟合一位点结合 (one-site binding) 双曲线方程可确定 $B_{\max}$ 和 K_D 。

[0432] 图 13 示出两个饱和结合图表,其中 x-轴为 $\log_{10}$ (从而计算 EC_{50}) 和线性 (从而计算 $B_{\max}$ 和 K_D) 标度。该数据显示与人中性粒细胞在 4°C 下结合的人源化抗 -C5aR 抗体 N 和 Q 的 K_D 和 EC_{50} 约为 7F3 的 2-3 倍。人源化抗体的 K_D 和 EC_{50} 是相似的,每个大约为 $20 \sim 25\text{nM}$ ($\sim 3 \mu\text{g/ml}$),而在这个试验的条件下 7F3 的 K_D 和 EC_{50} 范围为 $\sim 8-10\text{nM}$ 。

[0433] 实施例 4-人源化抗 -C5aR 抗体在人 C5aR 的第二细胞外环中结合抗原表位 EEYFPP (SEQ ID NO:38) 的方法

[0434] 结合到嵌合受体的抗体

[0435] 包含小鼠和人 C5aR 节段的系列嵌合受体被构建,从而鉴定抗体结合的 C5a 受体区。使用标准分子技术 (Lee 等人,2006) 制得这些抗体。使用脂质体 2000 (Invitrogen),将编码不同嵌合受体的每个重组载体 (在 DMEM 中稀释的 $5 \mu\text{g}$) 转染到 5×10^5 小鼠 L1.2 细胞中。细胞在 DMEM 或 RPMI (Invitrogen) 和 10% 的胎儿牛血清 (Hyclone) 中生长。24 小时或 48 小时之后,通过在 1,500rpm 下离心 5 分钟收获细胞,并将其重悬于 FACS 缓冲剂中 (磷酸盐缓冲盐水加 2% 牛血清白蛋白)。为了用 hAb-Q 染色, 0.5×10^5 转染的细胞与每孔体积为 $50 \mu\text{l}$ 的 5 或 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗体在 4°C 下孵育 20 分钟。在添加稀释 1 : 200 或 1 : 300 的 $50 \mu\text{l}$ FITC-结合的抗人 IgG (Sigma, F1641) 之前,按如上使细胞成颗粒状并用 $150 \mu\text{l}$ FACS 缓冲剂漂洗细胞 3 次。在使细胞成颗粒之前,在 4°C 下孵育这个混合物 20 分钟,用 FACS 缓冲剂清洗 3 次,最后将其重悬于 $150-200 \mu\text{l}$ FACS 缓冲剂中。在 FACS Calibur (BD Bioscience) 上分析样品。

[0436] 结合到来自第二细胞外环的肽的抗体

[0437] 合成了 22 个重叠肽 (12mer) 组,每个被 1 个下一个残基偏移 (offset),并跨越人 C5aR 的第二细胞外环 (第三个细胞外结构域) (Mimotopes, Melbourne)。每个肽都是由生物素组和位于 N-末端的 4-氨基酸接头 (SGSG) 制成。合成的一个肽, no. 23, 为 33mer, 该 33mer 表示 hC5aR 的第二个细胞外环 (来自 SEQ ID NO:37 的残基 173-205) 的全长,该肽也在 N-末端具有生物素-SGSG。在这个实验中使用的肽描述在 Lee 等人 (2006) 中。

[0438] 该实验是这样进行的,即,通过使肽结合到 384-孔链霉亲和素包被的板,然后孵育抗体和该肽并用结合到如下辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗人 IgG 检测结合肽。在 $200 \mu\text{l}$

60%的DMSO中溶解每个肽,使其浓度为10mg/ml。进一步用PBS/Tween 20/叠氮化物溶液(PBS/0.05% Tween 20中的0.1% w/v的叠氮化钠),1:1000稀释肽,使其工作浓度为10 μg/ml。

[0439] 每孔用20 μl阻断缓冲剂(PBS中的1% w/v BSA),阻断384-孔链霉亲和素包被的板(Nunc)。用PBS/Tween 20(PBS中的0.1% v/v Tween 20)清洗该板4次。将20 μl稀释的肽溶液转移到孔中,并在室温下孵育该板1小时。在清洗该板4次(如上)之后,向孔中加入20 μl抗体(0.5、1、1.25、2.5或5 μg/ml),并在20℃下孵育1小时。如上清洗该板4次,然后向每孔中添加20 μl HRP-结合的抗小鼠IgG(在PBS/Tween 20中1:5000稀释)。在室温下孵育1小时之后,清洗该板3次(如上),然后用PBS清洗两次,从而除去痕量Tween。通过向每孔中添加20 μl新近制备的TMB底物试剂(BD Opt EIA)和在室温下孵育20分钟,检测过氧化物酶的出现。最后在650nm/450nm处读板。

[0440] 第二个细胞外环内的关键氨基酸的鉴定:丙氨酸扫描突变肽

[0441] 为进一步限定抗原表位EEYFPP(来自SEQ ID NO:37的残基179-184)(SEQ ID NO:38)中的关键结合残基,如上合成了系列多肽(12mers),该多肽包含人C5aR第二个细胞外环序列VREEYFPPKVL(来自SEQ ID NO:37的残基177-178)(SEQ ID NO:38),在结合基序(binding motif)中的不同位置被丙氨酸置换,且在N-末端有生物素基团和4氨基酸接头(SGSG)(Lee等人,2006)。肽A1没有Ala置换,肽A14是肽A1的杂乱形式。肽A2-A13分别含有位于从12-1的氨基酸位置上的单个丙氨酸置换。按如上所述,进行抗体与包被在ELISA板上的肽的结合。

[0442] N-末端肽(PEP1)ELISA

[0443] 用在PBS/0.01% Tween-20中浓度为1-15 μg/ml,对应于人C5aR的残基9-29的多肽(PEP1)在37℃下包被384-孔Maxisorp板(Nunc),持续1.5小时,然后清洗3次。用每孔20 μl阻断缓冲剂(PBS中的1% w/v BSA)在4℃下阻断该板过夜。用PBS/Tween缓冲剂(PBS中的0.05% v/v Tween-20)清洗该板3次。向每孔添加20 μl抗体(最终浓度为5 μg/ml),并在37℃下孵育该板2小时。如上清洗该板3次,然后向每孔中添加20 μl HRP结合的抗人IgG kappa(在PBS/Tween中1:8000稀释)或HRP结合的抗小鼠IgG(1:7500稀释)。在室温下孵育2小时之后,清洗该板4次(如上)。通过向每孔中添加20 μl新近制备的TMB底物试剂(BD Opt EIA)和在室温下孵育20分钟,可检测过氧化物酶的出现。最终,在用每孔20 μl 1M H₂SO₄终止反应之后,在酶标仪(plate Reader)中在450nm(参考620nm)处阅读该板。

[0444] 结果

[0445] 为了证实人源化抗-C5aR抗体,在人C5aR中与在亲本抗体7F3中识别的结合位点相同,进行了四个试验。首先,使用hAb-Q给表达各种嵌合的人/小鼠C5aR的细胞染色。其次,hAb-J和Q与系列重叠肽(12mers)一起孵育,该重叠肽包含hC5aR的第二个细胞外环。第三,hAb-J和Q与系列突变肽一起孵育,该突变肽包含位于每个位置的Ala取代、来自人C5aR的第二个细胞外环的12个氨基酸基序。第四,hAb-J和Q与肽一起孵育,该肽包含来自人C5aR的N-末端细胞外结构域的9-29个残基。

[0446] 人源化抗-C5aR抗体结合到含有人C5aR第二个细胞外环的嵌合受体

[0447] 系列嵌合受体,包含细胞外结构域的每个中的人或小鼠C5aR序列,该结构域为:

N-末端结构域,且按如上所述的构建第一个、第二个和第三个细胞外环(ECL)。每个细胞外结构域的起源、以及跨膜和膜内节段的详述在表6中。在每个构建体中,细胞外结构域的起源由4-字母编码限定,例如mHHH定义了含有小鼠C5aR N-末端和人C5aR第一个、第二个和第三个ECL的嵌合受体。

[0448] 表6:嵌合受体构建体:通过hAb-Q染色

[0449]

EC 结构域代 码*	嵌合受体残基	序列起源	通过 hAb-Q 染 色
1.HHHH	1-350	人 C5aR ^a 1-350	+++
	351-360	GTETSQVAPA (牛视 紫红质标签)	
2. mHHH	1-39	小鼠 C5aR ^b 1-39	+++

[0450]

	40-350	人 C5aR ^a 40-350	
	351-360	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
3. mmHH	1-111	小鼠 C5aR ^b 1-111	+++
	112-350	人 C5aR ^a 112-350	
	351-360	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
4. mmmH	1-206	小鼠 C5aR ^b 1-206	-
	207-351	人 C5aR ^a 206-350	
	352-361	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
5. mmmm	1-351	小鼠 C5aR ^b 1-351	-
	352-361	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
6. HmHH	1-92	人 C5aR ^a 1-92	+++
	93-111	小鼠 C5aR ^b 93-111	
	112-350	人 C5aR ^a 112-350	
	351-360	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
7. HHmH	1-172	人 C5aR ^a 1-172	-
	173-206	小鼠 C5aR ^b 173-206	
	207-351	人 C5aR ^a 206-350	
	352-361	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
8. HHHm	1-262	人 C5aR ^a 1-262	+++
	263-282	小鼠 C5aR ^b 264-283	
	283-350	人 C5aR ^a 283-350	
	351-360	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
9. Hmram	1-92	人 C5aR ^a 1-92	
	93-283	小鼠 C5aR ^b 93-283	
	284-351	人 C5aR ^a 283-350	
	352-361	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
10. mHmm	1-90	小鼠 C5aR ^b 1-90	
	91-111	人 C5aR ^a 91-111	

[0451]

	112-351	小鼠 C5aR ^b 112-351	
	352-361	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	
11. mmHm	1-111	小鼠 C5aR ^b 1-111	+++
	112-262	人 C5aR ^a 112-262	
	263-350	小鼠 C5aR ^b 264-351	
	351-360	GTETSQVAPA (牛视紫红质标签)	

[0452] * 嵌合受体由它们的细胞外 (EC) 结构域命名 :HHHH 是人 C5aR, Hmmm 表示嵌合体, 该嵌合体含有人 C5aR 的 N 末端和小鼠 C5aR 的第一、第二和第三细胞外环等。

[0453] a : 人 C5aR :SEQ ID NO :37

[0454] b : 小鼠 C5aR :GenPept 编号 NP_031603

[0455] 亲本抗 -C5aR mAb 7F3 显示出表达嵌合 C5aR 的染色细胞的模式, 该模式暗示它识别出人 C5aR 的第二个细胞外环 (3rd 细胞外结构域) 中的抗原表位。为了证实人源化抗体 hAb-Q 与 7F3 具有相同的染色模式, 用 hAb-Q 给表达不同嵌合的人 / 小鼠 C5aR 的暂时转染的细胞染色, 并通过流式细胞仪分析, 其中人源化抗体 hAb-Q 通过 CDR 移植来源于小鼠 mAb 7F3, 并因此应当含有相同的抗原结合位点。染色阳性的嵌合受体在表 6 中给出。通过 hAb-Q 染色的模式与用 7F3 观测到的模式完全相同。没有通过单独的第二抗体 (secondary antibody) (抗 -hIgG-FITC) 染色。用 hAb-Q 给嵌合受体 1、2、3、6、8 和 11 染色, 表示这个抗体可识别人 C5aR 第二个细胞外环中的抗原表位。

[0456] 结合来自第二细胞外环的肽的抗体

[0457] 为了进一步限定人源化抗 -C5aR 抗体结合的第二个细胞外环中的抗原表位, 合成了一组 22 个重叠多肽 (12mers), 每个重叠肽被下一个重叠肽的 1 个残基偏移, 并跨越人 C5aR 的第二细胞外环。通过肽 ELISA 分析抗体与这些肽的结合。

[0458] 通过 7F3 的肽结合模式与通过人源化 7F3 抗体 hAb-Q 和 hAb-J 的结合模式相似。人源化抗体最强烈地结合到肽 4 和 5 和肽 23 (图 14A 和 14B)。肽 23 是人 C5aR 全整的第二个细胞外环 (来自 SEQ ID NO :37 的残基 173-205)。与肽 1-3 和 6-7 的结合较弱。相比之下, 7F3 强烈地结合到肽 1-7。肽 1-7 含有公共元素 :6 个氨基酸基序 :EEYFPP。抗体没有结合到缺少这个基序的肽 13-22, 或含有截断 (truncated) 形式的基序的肽 8-12。抗 C5aR 抗体识别并结合到人 C5a 受体的第二个细胞外环上的线性抗原表位 (EEYFPP ; 来自 SEQ ID NO :37 的残基 179-184)。人源化抗体没有结合到含有接近一个或另一个端点的 EEYFPP 的肽, 而是结合到其中基序位于中央的肽。

[0459] 在第二个细胞外环的 EEYFPP 基序内的关键结合残基

[0460] 为了进一步限定人源化抗 -C5aR 抗体结合的抗原表位 EEYFPP 中的关键结合残基, 合成了系列短肽 (12mers), 该短肽包含人 C5aR 第二个细胞外环序列 VREEYFPPKVL (来

自 SEQ ID NO:37 的残基 177-188), 其中结合基序中的不同位置上取代有丙氨酸。通过肽 ELISA 分析了抗体与这些肽的结合。

[0461] 在这个实验中, 发现了用于结合鼠科动物抗 -C5aR mAb 7F3 的关键氨基酸是 Y3, 和抗原表位 E1E2Y3F4P5P6 (Lee 等人, 2006) 中的 F4。如同 7F3, 人源化抗体 hAb-J 和 Q (分别为 Figure 14C 和 D) 没能结合在位置 Y3 或 F4 上有 Ala 取代的肽。另外, 在 E1、E2 和 P5 上的取代也减少了通过 hAb-J 和 Q 的结合。

[0462] 主导抗体 (lead antibody) hAb-Q 未结合 N- 末端 9-29 肽 (PEP1)

[0463] 本实施例示出了人源化抗 -C5aR 抗体结合 C5aR 的第二个细胞外环中的抗原表位。而且, 它们没有结合包含人 N- 末端结构域和小鼠第二个细胞外环的嵌合的小鼠 / 人 C5aR 构建体 #7 和 #9 (见表 6)。

[0464] 为了证实抗 -C5aR 抗体没有结合来自人 C5aR 的 N- 末端结构域的线性多肽, 合成了具有序列 PDYGHYDDKDTLDLNTVPDKT (来自 SEQ ID NO:37 的残基 9-29) (SEQ ID NO:59) 的肽 PEP1, 并通过 ELISA 分析了抗体与肽的结合。

[0465] 早期研究表明抗 -C5aR 抗体 mAbs 7F3、12D4 和 6C12 没有与 PEP1 竞争结合转染子上的人 C5aR, 这些 mAbs 也没有结合包被在 ELISA 板上的 PEP1 (WO 03/062278)。图 15 显示人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-J 和 Q (在 $5 \mu\text{g/ml}$) 没有结合 PEP1, 该 PEP1 以 3 种不同浓度 (1/100、1/500 和 1/1000, 即分别为 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $2 \mu\text{g/ml}$ 和 $1 \mu\text{g/ml}$) 结合在 ELISA 板上。然而, 针对人 C5aR N- 末端肽 1-31 的抗 -C5aR (CD88) mAb S5/1 (AbD Serotec, Cat No. MCA1283), 确实如期望地在 $5 \mu\text{g/ml}$ 下结合 PEP1。

[0466] 实施例 5- 阻断表达人 C5aR 的细胞的迁移

[0467] A. 人源化抗体阻断人中性粒细胞的迁移

[0468] 从外周血液中分离出中性粒细胞, 首先通过在室温下 40 分钟的葡聚糖沉积步骤, 获得白细胞部分。然后将细胞分层加入到 Ficoll-Paque (GE Healthcare) 中, 在室温下在 2500rpm 下密度梯度离心 15 分钟。在低渗 (hypotonic) 裂解剩余的红血细胞之后, 将中性粒细胞重悬在趋化缓冲剂 (49% RPMI 1640 (Invitrogen)、49% 的介质 (Invitrogen)、2% 透析的 FBS (Invitrogen)) 中。将浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 的抗 -C5aR 抗体添加到中性粒细胞 ($1 \times 10^7/\text{ml}$) 中。包括了阴性对照 (没有添加 Ab, 但是添加了 $1 \times \text{PBS}$)。

[0469] 然后将该细胞放入到带有 $3.0 \mu\text{m}$ 孔径的聚碳酸酯膜的 24 孔组织培养板 (Corning 公司) 的插入物 (insert) 的上室, 并在室温下孵育 10 分钟。然后将插入物放置到含有浓度为 $0.1 \sim 100\text{nM}$ 的人中性粒细胞化学引诱物重组人 C5a (sigma) 的下室中。中性粒细胞的迁移发生在当下室中 C5a 为 $1 \sim 10\text{nM}$ 时。然后在 37°C 下孵育中性粒细胞 30 分钟。用流式细胞仪 (FACSCalibur, BD Biosciences) 量化通过膜迁移到下室的中性粒细胞数目。通过获取长 30 秒的结果, 获得相对细胞数目。发现这个方法有着极高的可重复性, 并可对活细胞选择并排除碎片。

[0470] 图 16 中示出的结果显示, 相比阴性 (无抗体) 对照, 人源化抗体抑制了人中性粒细胞朝向 C5a 的迁移。浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 的小鼠抗体 7F3, 阻断了 97% 人中性粒细胞的迁移。浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 的人源化抗体 G 和 J, 分别阻断 84% 和 82% 的迁移, 而抗体 C 和 K 效果较小, 仅分别抑制 75% 和 55% 的中性粒细胞迁移。

[0471] B. 人源化抗 -C5aR 抗体在体外以药剂依赖的方式阻止 C5a- 诱导的表达人 C5aR 的

细胞迁移

[0472] 方法

[0473] 人中性粒细胞迁移

[0474] 将健康志愿者人静脉血液采集到含有作为抗凝结剂的 EDTA (anti-coagulant) (BD Vacutainer #366457) 的管子中。通过 percoll 密度离心, 接着红血细胞裂解步骤, 从血液中纯化出中性粒细胞 (Lee 等人, 2006)。在 1, 200rpm 下离心纯化的中性粒细胞 5 分钟, 并将其重悬在浓度为 2×10^7 细胞 / ml 趋化缓冲剂的趋化缓冲剂 (49% RPMI 1640、49% 介质 199、2% 透析的 FBS、GIBCO) 中。于 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育总体积为 200 μ l 的抗体 (在趋化缓冲剂中稀释, 最终浓度为 0.003–10 μ g/ml) 和细胞 (2×10^6 细胞 / 孔) 20 分钟。然后将这分成 $2 \times 100 \mu$ l 样品, 并将其添加到 24-孔 transwell 板上室中的 2 孔中 (HTS Transwell, 3.0 微米孔径; Corning)。将含有 C5a 的趋化缓冲剂 (总共 600 μ l) (最终浓度为 0–100nM) 置入下室中。于 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育该板 ~ 1 小时, 从而允许细胞迁移。对照孔含有不带抗体的细胞, 或不带 C5a 的缓冲剂。这个试验的标准曲线建立在带有如下所述的 CyQUANT 染料的 96 孔板上。

[0475] L1.2/hC5aR 转染子细胞迁移

[0476] 将生长在 RPMI 1640、10% FBS、0.5mg/ml G418 (Invitrogen) 中, 并用 5mM 丁酸刺激过夜的 L1.2/hC5aR 细胞在 1, 200rpm 下离心 5 分钟并在趋化缓冲剂 (49% RPMI 1640、49% 介质 199、2% 透析的 FBS、Gibco) 中清洗, 然后再次离心, 最后将其重悬于 2×10^6 细胞 / ml 趋化缓冲剂中。将总体积为 200 μ l 的, 与细胞 (1×10^5 细胞 / 孔) 混合的抗体 (稀释在趋化缓冲剂中, 最终浓度为 0.005–5 μ g/ml) 添加到 96 孔板中并于 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育到 20 分钟。将这分成 $2 \times 100 \mu$ l 样品, 并将其添加到 96-孔 transwell 板 (HTS Transwell-96 系统、5.0 微米孔径、Corning) 的上室中的 2 孔中。将含有重组人 C5a (Sigma)、最终浓度为 0.1–100nM 的趋化缓冲剂 (总共 150 μ l) 置入下室。于 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育该板 1 小时, 从而允许细胞迁移。对照孔含有不带抗体的细胞, 或不带 C5a 的缓冲剂。配制 hC5aR/L1.2 细胞在趋化缓冲剂中的连续稀释, 从而创建用于 CyQUANT[®] 检测试验的标准曲线。在 1hr 孵育步骤之前, 将含有固定数目的细胞 (每孔 0、150、450、1350、4050、12150) 的缓冲剂 (150 μ l) 直接添加到下室中的两孔中的每个孔中。

[0477] 使用 CyQUANT[®] 染色量化

[0478] 孵育之后, 将 transwell 下室中的缓冲剂和迁移的细胞转移到 96 孔平底板 (Nunc) 中并在 $200 \times g$ (~ 1,500rpm) 下离心 5 分钟。用 150 μ l PBS 清洗细胞颗粒, 从而除去微量酚红, 酚红可干扰 CyQUANT 荧光。在第二离心步骤之后, 小心地除去上清液并在 -80°C 下过夜冷冻该板, 从而裂解细胞。在室温下使该板解冻, 并将在裂解缓冲剂中稀释的 200 μ l CyQUANTGR 染料 (CyQUANT[®] 细胞增殖试验试剂盒, Invitrogen) 添加到每孔中。

[0479] 对于使用 L1.2/hC5aR 细胞的试验, 如上面描述的首先在 transwell 板上确立标准曲线, 并将该细胞转移到 96-孔板中, 以用 CyQUANT 染料标记。对于使用中性粒细胞的试验, 在带有 CyQUANT 染料的 96-孔板中如下直接建立标准曲线: 将含有 1×10^6 中性粒细胞的颗粒在 -80°C 冷冻过夜, 然后使其解冻, 并将其重悬于 1ml CyQUANT 染料中, 然后将 200 μ l 中的 2×10^5 细胞添加到含有 200 μ l CyQUANT 染料的 96-孔中两孔中的每孔中, 并将 1 份连续稀释在 2 份中, 从而确立标准曲线 (一式两份), 范围为 100,000 ~ 48.8 细胞 / 孔。

[0480] 将包裹在铝箔中（从而保护不受光的影响）的该板在室温下孵育 2-5 分钟，然后置入荧光剂（FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies）中，并在最大激发（A1）设置在 485nm 的情况下和将最大发射（B1）设置在 520nm 的情况下读板。使用 FLUOstar 控制软件记录荧光强度和处理数据。使用标准曲线将荧光强度转换成细胞数目，使用线性回归或非线性 4- 参数 log 方程（GraphPad Prism v4.0）分析数据。

[0481] 结果

[0482] 研究了浓度范围内的人源化 7F3 抗体阻断 C5a 诱导的人中性粒细胞和 hC5aR/L1.2 细胞转染子迁移的能力。

[0483] 在 transwell 试验中，在暴露到 10nM C5a 之前，将来自 4 个健康的不同志愿者供体的中性粒细胞和各种浓度的抗 -C5a 抗体 hAb-Q 或 7F3 或同种型对照抗体一起预孵育。将样品分为一式两份进行。使用回归分析从标准曲线扣除背景荧光强度之后计算迁移细胞的数目。对于每个实验，标准曲线拟合方程 r^2 值都 > 0.99。

[0484] 抗 -C5a 抗体表现出剂量反应关系。浓度为 10 μ g/ml 的 hAb-Q 和 7F3 彻底阻断了 10nM C5a 诱导的人中性粒细胞迁移。迁移细胞的数目随着抗体浓度的减少而增大。中性粒细胞与 hAb-Q 或 7F3 在浓度低于 0.1 μ g/ml 下的预孵育不能有效阻止迁移。同工型对照抗体没有阻断 C5a 诱导的中性粒细胞的化学趋化作用。图 17 示出来自 hAb-Q 和 7F3 所示的最佳拟合的非线性回归线作图的 4 个实验的平均数据。人源化抗 -C5a 抗体比 7F3 更有效地阻断 C5a 诱导的人中性粒细胞的迁移，且 IC_{50} 低至少 6-8 倍。

[0485] 在与各种浓度的抗 -C5aR 抗体 hAb-Q、hAb-J 或 7F3 或同种型对照抗体预孵育之后，也对表达人 C5aR 的转染细胞进行了迁移试验。图 18 示出在 5 μ g/ml 下，hC5aR/L1.2 转染子迁移被人源化抗 -C5aR 抗体 J 和 Q，及 7F3 彻底抑制。使用非线性回归与 S 形剂量反应方程（GraphPad Prism software）进行数据分析，得出 7F3、J 和 Q 的 IC_{50} 值分别为 0.5、0.6 和 0.7 μ g/ml，暗示着该抗体每个都非常有效地阻止中和的 C5a 诱导的 hC5aR/L1.2 细胞的迁移。

[0486] C. 在受体占位率 (receptor occupancy) 的低水平下，人源化抗 -C5aR 抗体高效阻断人中性粒细胞的体外迁移

[0487] 上面显示人源化抗 -C5aR 抗体抑制了 C5a 诱导的表达人 C5aR 的细胞的迁移（化学趋化作用）。为了进一步表征这个抑制，按如下确定了抑制人中性粒细胞体外迁移所需的通过人源化抗 -C5aR 抗体的 C5a 受体占位率的水平。

[0488] 方法

[0489] hAb-Q 的 FITC 标记

[0490] 异硫氰酸荧光素 (FITC) 共价结合到上。简言之，将 ~ 2.2mg hAb-Q 加入到“反应缓冲剂”（160mM Na_2CO_3 、340mM $NaHCO_3$ ，pH 9.5）中，并将回收的 1.8mg 添加到溶解在 DMSO 中的 144 μ g FITC（分子探针，Cat. No. F1906）中。于室温下（~ 21 $^{\circ}C$ ）在黑暗中反应 1 小时。使用 PD-10 柱除去未结合的 FITC，用“储存的缓冲剂”（10mM Tris，150mM NaCl，pH8.2）预平衡和洗脱未结合的 FITC。使用微量离心浓缩器 YM-30 旋转过滤器（Amicon，Cat. No. 4208），浓缩结合的 hAb-Q-FITC，从而达到 5.7mg/ml 的最终浓度，并于 4 $^{\circ}C$ 下在黑暗中储存。

[0491] 使 hAb-Q 结合到人中性粒细胞上的 C5aR 上

[0492] 将按上述制备但无红血细胞裂解步骤的人中性粒细胞在 1,200rpm 下离心 5 分

钟,并将其重悬在趋化缓冲剂(49% RPMI1640,49%介质 199,2%透析的 FBS ;Gibco) 的 2×10^7 细胞 /ml 中。在趋化缓冲剂中将抗体 hAb-Q 稀释到 $2 \times$ 所需的最终浓度。配制了 0.002、0.006、0.02、0.06、0.2、0.6、2、6、20、60、200 和 600 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度。混合等体积的细胞 (125 μl) 和抗体 (125 μl) 并在 37°C 下孵育 10 分钟,从而允许 hAb-Q 结合到 C5aR。

[0493] 人中性粒细胞化学趋化试验

[0494] 简言之,在孵育中性粒细胞和 hAb-Q 之后,将每个含有 2×10^6 细胞和 $0 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ hAb-Q 的混合物的 100 μl 等份置入(一式两份)24 孔 transwell 板(6.5mm 插入物,3.0 微米聚碳酸酯膜 ;Corning Costar,Cat.No. 3415)中。将含有重组人 C5a 的趋化缓冲剂(总共 600 μl)(最终浓度为 0、0.1、1、10 或 100nM)置入下室中。于 37°C 下在 5% CO_2 中孵育板 30 分钟,从而允许细胞迁移。对照孔含有不带抗体的细胞或不带 C5a 的缓冲剂。孵育之后,通过在 FACSCalibur(BD Bioscience)上的流式细胞仪,给下室中的细胞计数。

[0495] 结合 hAb-Q 的测量

[0496] 人中性粒细胞上结合的 hAb-Q 的量在 2 个样品中进行计算:化学趋化作用之前的细胞和抗体的混合物样品(样品 A)和来自化学趋化作用之后 transwell 板的下室中的细胞样品(样品 BL)。这是为了确定迁移的细胞的受体占位率是否不同,或受体占位率在化学趋化作用开始和结束之间是否改变。通过孵育细胞和抗 -hIgG-FITC,检测结合的 hAb-Q。在一些试验中,结合抗体量在第三样品进行测量 - 来自化学趋化作用之后的 transwell 板上室的细胞和抗体的混合物样品(BU)。

[0497] 将样品 A(趋化之前的 10 μl 细胞和抗体)添加到 96 孔 U- 圆底板的孔中(一式两份),并于室温下在台式离心机(Beckmann Coulter Allegra X-15R)中在 1,200rpm 下离心 2 分钟。在将其重悬在 50 μl 的抗 -hIgG-FITC(1/300,在 dPBS 中稀释)中之前,用 200 μl PBS 清洗细胞颗粒 2 次,并在室温下孵育 30 分钟。在 2,000rpm 下离心样品 2 分钟,除去上清液并将细胞颗粒重悬在 150 μl FACS 缓冲剂(PBS,1% BCS)中,用以通过流式细胞仪(FACSCalibur,BDBiosciences)分析。

[0498] 将样品 BL(来自化学趋化作用之后的 transwell 板下室的 200 μl 细胞)和 BU(来自化学趋化作用之后的 transwell 板上室的 50 μl 细胞 + 抗体混合物)置于 96 孔 U- 圆底板的孔中(一式两份)并按为样品 A 描述的方法处理。

[0499] ‘游离的’ C5a 受体的测量

[0500] 人中性粒细胞上的游离受体量在 2 个样品中进行计算:化学趋化作用之前的细胞和抗体的混合物样品(样品 C)和来自化学趋化作用之后 transwell 板的下室中的细胞样品(样品 D)。通过孵育细胞和 FITC- 标记的 hAb-Q(hAb-Q-FITC)检测了游离受体。

[0501] 将样品 C(趋化之前的 10 μl 细胞和抗体)添加到 96 孔 U- 圆底板的孔中(一式两份),并于室温下在 2,000rpm 下离心 2 分钟。在将其重悬在 50 μl 的 hAb-Q-FITC(100 $\mu\text{g/ml}$,在 dPBS 中稀释)中之前,用 200 μl PBS 清洗细胞颗粒 2 次,并在室温下孵育 30 分钟。在 2,000rpm 下离心样品 2 分钟,除去上清液并将细胞颗粒重悬在 FACS 缓冲剂(PBS,1% BCS)中,用以通过流式细胞仪(FACSCalibur,BD Biosciences)分析。

[0502] 将样品 D(来自化学趋化作用之后的 transwell 板下室的 200 μl 细胞)置于 96 孔 U- 圆底板的孔中(一式两份)并按为样品 C 描述的方法处理。

[0503] 中性粒细胞 C5a 受体占位率的流式细胞分析

[0504] FACSCalibur 流式细胞仪设有为通道 FL-1 确立的补偿参数。获得的样品要排除死细胞和碎片。基于 FSC 和 SSC 鉴定中性粒细胞。通过确定样品中中性粒细胞的 FITC (FL-1) 的平均荧光强度 (MFI), 确定结合的 hAb-Q (抗-hIgG-FITC) 或游离 C5aR (hAb-Q-FITC) 的水平。

[0505] 根据下面方程, 通过确定每个样品 A 和 B 的 MFI 占与 300 μ g/ml hAb-Q 一起孵育的样品的 MFI 的百分比 (在扣除非特异性背景 (NSB) 之后, 非特异性背景 (NSB) 是无 hAb-Q 的样品的 MFI), 量化结合的 hAb-Q 百分数:

[0506] % 占位的受体 = $[MFI(\text{样品}) - MFI(\text{NSB})] / [\text{最大 MFI}(300 \mu\text{g/ml hAb-Q 样品}) - MFI(\text{NSB})] \times 100$

[0507] 根据下面方程, 通过确定每个样品 C 和 D 的 MFI 占未与 hAb-Q 一起孵育的样品的最大 MFI 的百分比 (扣除非特异性背景 (NSB) 之后, 非特异性背景是与 300 μ g/ml 未标记的 hAb-Q 一起孵育的样品的 MFI), 量化游离的 C5a 受体百分数:

[0508] % 游离受体 = $[MFI(\text{样品}) - MFI(\text{NSB})] / [\text{最大 MFI}(\text{无未标记的 hAb-Q 样品}) - MFI(\text{NSB})] \times 100$

[0509] 结果

[0510] 进行了 4 个实验。简言之, 从健康志愿者的静脉血液中分离的纯化的中性粒细胞与浓度范围为 0.001 ~ 100 μ g/ml 的 hAb-Q 预孵育 10 分钟。选取小等份的这种混合物, 从而确定结合受体的抗体量 (% 受体占位率), 并将剩余物置入 transwell 板的上室中。将 C5a (10nM) 置入下室中。孵育 30 分钟之后, 使用 FACS 确定已迁移到下室中的细胞数目。使用 FITC- 标记的抗-hIgG 和流式细胞仪, 也确定了在迁移终点下室和上室中的中性粒细胞上结合的抗体量。通过在迁移之前和迁移之后将 FITC- 标记的 hAb-Q 和中性粒细胞一起孵育, 在一个实验中确定游离受体 (没有结合的抗体) 的水平。

[0511] 中性粒细胞的迁移被 hAb-Q 阻断

[0512] 图 19 示出 hAb-Q 浓度与这四个实验的组合数据产生的迁移细胞总数目的图表。hAb-Q 浓度与迁移之间存在剂量反应关系。浓度 $\geq 0.1 \mu$ g/ml 的 hAb-Q 彻底阻断 10nM C5a 诱导的人中性粒细胞的迁移。迁移细胞数目随着抗体浓度的减少而增大。这个结果与上面描述的相似 (图 17)。

[0513] 受体占位率随着抗体浓度的增大而增大

[0514] 组合这四个实验的受体占位率数据。在化学趋化作用前和化学趋化作用后的 transwell 下室样品中, 在每个浓度的 hAb-Q 下, 中性粒细胞上结合的抗体 (占位的受体) 平均量通过图表示出在图 20 中。来自 transwell 下室的化学趋化作用前样品和迁移后样品之间存在占位的受体的水平差异 (EC_{50} 值分别为 0.3 和 1.1 μ g/ml)。在任何给定浓度的 hAb-Q, 结合到化学趋化作用后的细胞比结合到化学趋化作用前的细胞的抗体少。这种差异可能是因为优选迁移的细胞比不迁移的细胞平均具有更少的阻断受体的 hAb-Q。对于该差异, 另一个解释可以是当置于下室中含有 600 μ l 缓冲剂的 transwell 板中时, 预混合的细胞和抗体溶液 (100 μ l) 实质上被稀释 ~ 7 倍。因为抗体可自由跨过 transwell 3 μ m 膜, 被稀释, 结合反应的平衡将会改变。

[0515] 在未标记的 hAb-Q 结合之后, 在一个实验中测量了游离受体量。这个数据也通过图表在图 20 中示出。观测到在化学趋化作用前和化学趋化作用后的样品中结合和游离受

体之间存在反比关系。

[0516] 受体占位率和化学趋化作用的抑制之间的关系

[0517] 通过表达迁移细胞数目占迁移到不含抗体的样品中的 10nMC5a 的细胞的平均数目的百分比,转化图 19 中示出的中性粒细胞迁移数据。这个百分比然后扣除 100%,从而获得迁移抑制的百分比。因而在无抗体样品中迁移细胞数目变成 0%抑制,0 迁移细胞变成 100%抑制。然后使用 GraphPad Prism,采用非线性回归(S 形剂量反应(可变斜率)方程)分析这个数据。然后用图 20 的受体占位率数据对这个分析之后获得的曲线作图表,从而产生图 21。

[0518] 图 21 示出与中性粒细胞迁移抑制增加相关的增大的受体占位率。对于抑制迁移的 EC_{50} 值是 $0.03 \mu\text{g/ml}$,而对于受体占位率,对于化学趋化作用前的样品,它是 $0.3 \mu\text{g/ml}$,而对于来自 transwell 下室的化学趋化作用后的样品,它是 $1.1 \mu\text{g/ml}$ 。该数据暗示非常低的受体占位率与迁移的显著抑制相关。在 $0.03 \mu\text{g/ml}$ hAb-Q 时,仅 10%受体结合了抗体,但这个剂量导致迁移下降 50%。当受体占位率为 ~15-45%时,在浓度为 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 时彻底阻断迁移。总之,在低水平的受体占位率时,hAb-Q 非常有效地阻断 C5a 介导的人中性粒细胞体外迁移。

[0519] 实施例 6- 人源化抗体阻断 C5a 诱导的钙离子从人中性粒细胞释放

[0520] 钙动员 (calcium mobilization) 是在 C5a 结合到它的受体之后发生的第一事件之一。C5a 结合导致从内部储存释放的细胞浆游离 Ca^{2+} 的立即增加(几秒内),接着通过因细胞外介质流量造成的更持久的影响(过几分钟)。游离 Ca^{2+} 的暂时增大,作为在 C5a 结合到 C5aR 之后在中性粒细胞中观测到的各种生物反应的第二信使。

[0521] 为了确定人源化 7F3 抗体是否有效阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放,如下进行了“钙流量”试验。简言之,从健康对象分离的人中性粒细胞并按如上描述纯化。对于每个样品,需要 1×10^6 中性粒细胞。离心中性粒细胞并在 PBS 中清洗,然后将其重悬在细胞染料(完全 MGB[5mM KCl,140mM NaCl,300 μM MgSO_4 ,1mM MgCl_2 ,220 μM K_2HPO_4 ,1.1mM NaHPO_4 ,10mM HEPES,5.5mM 葡萄糖])中的 1×10^7 细胞/ml 中,该染料带有 250 μM 磺吡酮(sulfinpyrazone)和 1.7 μM 氟 3-AM(Calbiochem, Cat. No. 343242)或氟 4-AM(Invitrogen),并在室温下在黑暗中孵育 40 分钟。离心细胞并用完全 MGB+250 μM 磺吡酮清洗,从而除去过多的染料,再次离心并将其再悬在带有完全 MGB+250 μM 磺吡酮的 2×10^6 细胞/ml 中。将细胞(0.5ml)等分放入到未经灭菌的玻璃 FACS 管中—用于此种样品的一个管子—并在 1 小时内使用。制备 $10 \times$ 在不完全 MGB 中的最终浓度的各种试剂(C5a,离子霉素,抗体)。设立 FACSCalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson),并使用 x-轴正向散射,y-轴侧向散射设门(gating)。y-轴 FL-1(FITC)通道用于检查中性粒细胞反应。连续测量样品荧光并在 CellQuest 文件中保持数据。各种对照测试在其他样品之前进行—未经处理的细胞用于确立基线荧光。向细胞(50 μl 的 10nM 重组人 C5a(Sigma)中加入 C5a:最终浓度为 1nM),从而测试反应。没有抗体预处理,如果有功能则该细胞立即对 hC5a 作出反应;如果没有获得反应,则细胞不合适。离子霉素(在管中最终浓度为 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$)用于确定细胞是否装有染料。

[0522] 为了确定人源化 7F3 抗体是否有效阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放,将载有染料的中性粒细胞与抗 C5aR 抗体(在管子中最终浓度 0.1-50 $\mu\text{g/ml}$)一起孵育,持续 10-25 分钟。然

后细胞和抗体运行通过流式细胞仪,从而获得基线读数,接着加入 1nM hC5a(最终浓度)。如果 hC5a 在荧光中没有产生峰值,则加入离子霉素 (Sigma, 0.1-1 μ g/ml 最终浓度),从而检查能够反应的细胞(可存活)。

[0523] 研究了原始小鼠抗人 hC5a mAb 7F3 阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放的能力。浓度为 10 μ g/ml 7F3 彻底阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 流量,1 μ g/ml 是部分有效的,而较低浓度 (0.01 和 0.1 μ g/ml) 没有阻断 Ca^{2+} 释放。当加入 C5a 之后 ~ 30 秒加入 1 μ g/ml 离子霉素时(数据未显示)中位荧光强度 (MFI) 的增大,表明与 10 μ g/ml 7F3 一起孵育的细胞液能释放 Ca^{2+} 。

[0524] 测试了当在加入 1nM C5a 之前与中性粒细胞一起孵育约 10 分钟时,人源化 7F3 抗体 (F、G、J、M、N 和 O) 中和浓度为 10 μ g/ml 的人中性粒细胞中 C5a 诱导的钙释放的能力。与没有与抗体预孵育的对照细胞比较,如观测的较低的平均荧光值所暗示的抗体 N 和 O 彻底阻断 Ca^{2+} 流量,而抗体 F、G、J 和 M 部分阻断了 Ca^{2+} 释放。当离子霉素加入到与抗体 N 或 O 一起预孵育的细胞中时, MFI 立即增大表明中性粒细胞仍然可以在阻断抗体的情况下释放 Ca^{2+} (数据未显示)。

[0525] 通过在加入 C5a 和测量 Ca^{2+} 释放之前,将人中性粒细胞与各种浓度的抗体一起预孵育,检验抗体 G、J、M、N 和 Q 的剂量 - 反应关系。浓度为 30 μ g/ml 的抗体 G 彻底阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放,而低浓度 (0.1、1、10 μ g/ml) 是无效的。对于抗体 M,结果是相同的。在两种情况下,当在 C5a 之后 90 秒加入约 1 μ g/ml 的离子霉素时,用 30 μ g/ml 的抗体处理的细胞仍可以释放 Ca^{2+} ,如同所示的。示出的抗体 J 在浓度为 30 μ g/ml 和 10 μ g/ml 时彻底阻断 Ca^{2+} 流量,尽管在之前的实验中,10 μ g/ml 的抗体 J 仅部分有效地阻断 Ca^{2+} 流量。抗体 N 是最有效的抗体,在 10 μ g/ml 和 1 μ g/ml 时在 2 个单独的实验中彻底阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 流量。在所有情况下,当 C5a 未能引起 Ca^{2+} 流量时,加入 1 μ g/ml 的离子霉素,产生 MFI 大幅增加,表示该细胞仍可以作出反应。对于抗体 Q,当该细胞与 5 或 50 μ g/ml 的抗体 Q 一起预孵育时,C5a 诱导的人中性粒细胞的 Ca^{2+} 释放被阻止,如加入 1nM C5a 之后荧光中缺少峰值所表明的。向这些样品中加入离子霉素的短时间之后,荧光中产生常见的增大,表示该中性粒细胞仍可以作出反应。与 0.5 μ g/ml 的抗体 Q 一起预孵育是无效的,且在将 1nM C5a 添加到样品中之后观测到荧光的大幅增大,类似于当仅用 1nM C5a (未添加抗体) 处理细胞时观察到的效果一样。这些结果概括在表 7 中。

[0526] 表 7:钙流量试验结果,该结果示出有效阻断 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放的每个抗体浓度
[0527]

抗体	有效阻断 C5a-诱导的 Ca^{2+} -流量的 Ab 浓度	测试的但是未有效阻断 Ca^{2+} -流量的 Ab 浓度
F [^]	—	10 $\mu\text{g/ml}$
G	30 $\mu\text{g/ml}$	0.1, 1 和 10 $\mu\text{g/ml}$
J	10 [#] 和 30 $\mu\text{g/ml}$	0.1 和 1 $\mu\text{g/ml}$
M	30 $\mu\text{g/ml}$	1 和 10 $\mu\text{g/ml}$
N	1 和 10 $\mu\text{g/ml}$	0.01 和 .01 $\mu\text{g/ml}$
O [^]	10 $\mu\text{g/ml}$	-
Q	5 和 50 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$
7F3	1 [#] 和 10 $\mu\text{g/ml}$	0.01 和 0.1 $\mu\text{g/ml}$

[0528] # 这个浓度在一个实验中是部分中和的,但在另一个实验中是彻底中和的。

[0529] ^ 表示仅测试了单一的 Ab 浓度。

[0530] 图 7 示出对抑制人源化 7F3 抗体最有效的是抗体 N 和 Q。感兴趣地是,抗体 N 是同种型 IgG1,且由于结合到中性粒细胞上的 Fc γ 受体 (Fc γ R),比带有同种型 IgG4 的抗体更有效。人 IgG1 对 Fc γ R 的亲和力比 hIgG4 高。为了确定通过抗体 N 或 O 结合的 Fc γ R 是否有助于 C5a 介导的 Ca^{2+} 释放,将预载有氟 3-AM 的人中性粒细胞与单独的抗体 O 或抗体 N,或抗体 N 加 50 μl Fc 阻断 [从与分离中性粒细胞相同的血液样品制备人血清],或抗体 O 加 Fc 阻断,或单独的 Fc 阻断一起预孵育 10 分钟。在流式细胞仪上测量应答 C5a (必要时和离子霉素) 的细胞内 Ca^{2+} 水平的改变。抗体 N 或 O 中和 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放的能力在存在或不存在 Fc 阻断的情况下没有差异。这些细胞仍能够释放 Ca^{2+} ,如同通过添加离子霉素所示出的。将中性粒细胞与单独的 Fc 阻断一起预孵育没有阻止 C5a 诱导的 Ca^{2+} 释放。这些数据暗示抗体 N 和 O 通过结合到 C5aR 和阻断 C5a 信号发挥它们的保护效果,没有通过与 Fc γ R 相互作用。

[0531] 实施例 7—人源化抗 -C5aR 抗体对中性粒细胞活化的影响

[0532] A. 人源化抗 -C5aR 抗体阻止 C5a 诱导的人中性粒细胞的体外活化

[0533] C5a 是人中性粒细胞的潜在活化剂,诱导表面抗原 CD11b (MAC-1 整合蛋白的 α 链,介导化学趋化作用和与内皮的相互作用) 的上调,和粘附分子 CD62L (L- 选择蛋白) 的衰减。在全血活化试验中研究了人源化抗 -C5aR 抗体阻止 C5a 介导的中性粒细胞活化的能力。

[0534] 方法

[0535] 将健康的人志愿者 (2 个供体) 的血液采集到含有抗凝剂酸式柠檬酸盐葡聚糖 (ACD) 的管子中,并在室温下 (23 $^{\circ}\text{C}$),用 10 分钟将其添加到含有 H_2DCFDA (最终 50 μM) 的孔中,接着添加 0.3–300 $\mu\text{g/ml}$ hAb-Q、0.3–300 $\mu\text{g/ml}$ IgG4 同种型对照组,或单独的 dPBS。将样品在室温 (23 $^{\circ}\text{C}$) 下孵育 20 分钟。将 C5a (最终为 100nM)、PMA (0.2–400ng/ml) 或 dPBS 添加到每个样品中并在室温 (23 $^{\circ}\text{C}$) 下再孵育 20 分钟。用 15 分钟将抗 -CD11b 和抗 -CD62L 抗体 (最终为 1/400) 添加到所有样品中。使用 RBC 裂解缓冲剂除去红细胞,并将白细胞重悬在 dPBS+1% FCS 中。

[0536] CD11b 和 CD62L 在中性粒细胞上的表达水平的测量如下。FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Bioscience) 设有为通道 FL-2 和 FL-4 确立的补偿参数。获得的样品要排除死细胞和

碎片。中性粒细胞鉴定为具有高 FSC 和 SSC,并测量了这些细胞的 PE (FL-2) 和 APC (FL-4) 的中位荧光强度 (median fluorescence intensity) (MFI)。

[0537] 使用下式,将 CD11b 和 CD62L 表达水平 (MFI) 表示为最大表达的百分比:

[0538] $\% \text{最大表达} = [(\text{样品} - \text{最小表达}) / (\text{最大表达} - \text{最小表达})] \times 100$

[0539] 注意. 最大表达是无抗体 (单独的 dPBS)+CD11b 的 100nM C5a 样品,和无抗体 (dPBS)+CD62L 的 0nM C5a(dPBS) 样品 (CD62L 在活化的中性粒细胞上减少)。

[0540] 使用 GraphPad Prism(v4.0) 软件,计算 C5a 介导的 CD11b 和 CD62L 表达的变化的 hAb-Q 中和的 IC_{50} 值。为每个实验和该两个实验的平均值,使用非线性回归,以数据拟合 S 形剂量反应 (可变斜率) 方程。

[0541] 结果

[0542] 利用 2 个供体,在全血试验中评估了 hAb-Q 对 C5a 诱导的中性粒细胞活化的阻断效果。在用 C5a 活化的样品中,在不存在 hAb-Q 时 CD11b 表达水平增大。但如果存在 hAb-Q,则 CD11b 表达水平的这种增大将以剂量反应方式被阻止,其中 IC_{50} 值为 $\sim 10.7 \mu\text{g/ml}$ (图 22)。同种型对照抗体,甚至在 $> 100 \mu\text{g/ml}$ (数据未示出) 时都没有阻止 C5a 诱导的 CD11b 表达的上调。

[0543] 人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 以剂量依赖方式也阻止了 C5a 诱导的 CD62L 的衰减,其中 IC_{50} 值为 $\sim 5.4 \mu\text{g/ml}$ (图 23)。同种型对照抗体,甚至在 $> 100 \mu\text{g/ml}$ 时都没有阻止 C5a 诱导的 CD62L 的衰减 (数据未示出)。

[0544] B. 人源化抗 -C5aR 抗体在溶液中体外不活化人中性粒细胞

[0545] 上面描述了人源化抗 -C5aR 抗体中和 C5a 诱导的中性粒细胞的活化能力。在下面的实验中,在不存在 C5a 时将人源化抗 -C5aR 抗体与纯化的人中性粒细胞一起孵育,该 C5a 没有改变细胞表面标记物,CD11b 和 CD62L 的表达。这些实验表明抗 -C5aR 抗体本质上没有在溶液中活化细胞。

[0546] 方法

[0547] 人中性粒细胞活化试验和 CD11b 和 CD62L 表达的测量

[0548] 在系列实验中,将人外周静脉全血和人源化抗 -hC5aR 抗体 hAb-Q、hAb-J 或 bAb-G 在回体法中孵育。通过如下面所述的确定 CD11b 和 CD62L 表达水平,测量中性粒细胞活化。CD62L 水平的降低或 CD11b 水平的增大是中性粒细胞活化的标记物。

[0549] 实验 1

[0550] 简言之,将健康供体的肝素化 (heparinised) 全血添加到 1、10 或 $100 \mu\text{g/ml}$ hAb-J 或 hAb-Q、 $10 \mu\text{M}$ fMLP (甲酰 Met-Leu-Phe 肽),或单独的 dPBS 中。在最终 1/100 稀释中添加抗 -CD 11b-PE 和抗 -CD62L-APC 抗体之前,于 37°C 下在 5% CO_2 中孵育样品 1 小时。使用 RBC 裂解缓冲剂除去红细胞,并将白细胞重悬在 dPBS+1% FCS 中。

[0551] FACSCalibur (BD) 流式细胞仪设有为通道 FL-2 和 FL-4 确立的补偿参数。获得的样品要排除死细胞和碎片。中性粒细胞鉴定为具有高 FSC 和 SSC。计算了这些细胞在 FL-2 (CD11b-PE) 和 FL-4 (CD62L-APC) 通道中的中位荧光强度 (MFI)。每个样品的 CD11b (PE) 和 CD62L (APC) 被确定并表示为相对于 dPBS 对照的表达倍数。

[0552] 实验 2

[0553] 将 4 个健康供体的肝素化血液添加到含有 0.1、1、10 或 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 hAb-G、

hAb-J、10nM 或 100nM 人 C5a 或单独的 dPBS 的管子中。于 37℃ 下将 6% 葡聚糖（最终 conc. 1%）添加到每个管子中并允许放置 30 分钟，从而沉积红细胞。将上面富含白细胞的血浆层转移到 96 孔板中，在冷的 dPBS 中清洗细胞。离心之后，除去上清液并将细胞重悬在含有抗-CD11b-PE (1/50) 和抗-CD62L-APC (1/50) 的 dPBS 中，然后在冰上孵育 30 分钟。再次清洗细胞并将其重悬在 dPBS+1% FCS 中。CD11b 和 CD62L 在中性粒细胞上的表达水平按如下描述的测量。

[0554] 实验 3

[0555] 将健康人志愿者（2 个供体）的血液采集到含有抗-凝剂酸式柠檬酸盐葡聚糖 (ACD) 的管子中，并按实施例 7A 中描述的处理，除了没有向样品中添加 C5a。CD11b 和 CD62L 在中性粒细胞上的水平通过 FACS 按实施例 7A 中描述的测量。

[0556] 结果

[0557] 在用人源化抗-C5aR 抗体的全血试验中，CD11b 和 CD62L 在人中性粒细胞上的表达没有被改变。

[0558] 在第一个实验中，于 37℃ 下将人全血与 1、10 或 100 μ g/ml hAb-Q 或 hAb-J、10 μ M fMLP 或 dPBS 一起孵育 1 小时，并通过流式细胞仪测量 CD11b 和 CD62L 的表达。在含有 1-100 μ g/ml 的任何浓度的 hAb-Q 或 hAb-J 的样品中，CD11b 表达没有增大或 CD62L 表达没有减小（图 24A 和 24B）。相比，已知可活化粒细胞的肽 fMLP，使 CD11b 表达的大幅增大，CD62L 的减少。

[0559] 在第二个实验中，于 37℃ 下将 4 个供体的人全血与 0.1-100 μ g/ml 人源化抗-C5aR 抗体 hAb-G 或 hAb-J，10-100nM 人 C5a，或 dPBS 孵育 20 分钟。处理之后，CD11b 和 CD62L 在中性粒细胞上的表达相对 dPBS 对照组上的表达分别在图 25A 和 25B 中示出。在测试的样品中的任何一个中，hAb-G 或 hAb-J 都没有诱导中性粒细胞 CD11b 的上调或 CD62L 表达的减少。相比之下，10nM 和 100nM C5a 分别致使 CD11b 表达相对 dPBS 增大 2.5 和 3.0 倍，而在 dPBS 对照组中 CD62L 表达分别降到 0.33 和 0.14 的水平。如同 fMLP，已知 C5a 可活化粒细胞。

[0560] 在第三个实验中，将 2 个供体的人全血添加到 0.3-300 μ g/ml hAb-Q 或同种型对照抗体中，然后将 100nM C5a 或 dPBS 添加到每个样品中。中性粒细胞 CD11b 和 CD62L 表达通过流式细胞仪测量，且结果示出在图 26a 和 26b 中。在含有 hAb-Q 或 PBS 的同种型对照抗体的样品中，CD11b 表达水平没有改变（增大），表示在任何抗体浓度高达 300 μ g/ml 时没有活化（图 26）。然而，当将 100nM C5a 添加到含有同种型对照抗体的样品中时，CD11b 表达增大到最大水平，如在含有 100nM C5a 和无抗体的样品中测得的。在没有 C5a 的样品中 CD62L 表达最多（没有活化）。hAb-Q 的添加或同种型对照抗体在浓度高达 300 μ g/ml 时没有降低 CD62L 表达水平，即没有活化中性粒细胞（图 26b）。相比之下，含有同种型对照抗体和 100nM C5a 的样品失去了 CD62L 表达并被最大活化。

[0561] 总之，该结果表示人源化抗-C5aR 抗体没有活化人中性粒细胞，如在回体法中用人全血孵育之后，CD62L 和 CD11b 表达水平所表示的。

[0562] C. 当结合到固体载体上时 hAb-Q 没有在体外活化人中性粒细胞

[0563] 超氧化物是其中一种反应性氧种类，它活化中性粒细胞生产从而与病原体作斗争。然而，超氧化物也可以对正常组织具有不利影响。抗-C5aR 抗体本身可以通过中性粒细

胞刺激超氧化物生产的可能性已研究。下述实验示出人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 没有刺激人中性粒细胞去产生超氧化物,但是当人中性粒细胞被 C5a 刺激时可以阻碍它的产生。

[0564] 方法

[0565] 测量通过分离的人中性粒细胞在体外产生的超氧化物

[0566] 超氧化物 (O_2^-) 是当中性粒细胞被炎性中介,例如 C5a 活化时 NADPH 氧化酶产生的第一种含氧的物质。有些“ O_2^- ”被细胞外分泌。不可渗透膜的细胞色素 C (Fe^{3+}) 被超氧化物还原成细胞色素 C (Fe^{2+}),细胞色素 C (Fe^{2+}) 可通过分光光度法在 550nm 处检出。在本研究中,利用 Wallac Victor² (Mayo and Curnutte, 1990), 使用 96 孔板分光光度法测定细胞色素 C 的还原。

[0567] 人中性粒细胞的制备

[0568] 人中性粒细胞按上面实施例 5B 描述的纯化。用人血纤蛋白原 (1mg/ml) 包被 96 孔微量滴定板过夜。向每孔中添加 100 μ l 细胞色素 C (150 μ M) 和在 50 μ l RM (含有 HBSS 的反应混合物 (Cat#14175 Gibco)) 及 0.4mM $MgSO_4$ 、0.5mM $MgCl_2$ 、0.5mM $CaCl_2$ 和 20mM HEPES 中的 200,000 中性粒细胞, pH 设定在 7.4。于 37°C 将该板插入在 Wallac Victor² (Perkin-Elmer) 中,并在 4 分钟期间每分钟测量未被刺激的 O_2^- 。接下来将抗体添加到 15 μ l RM 中,并每 2 分钟测量孔,持续 10 分钟。最后添加 C5a 并每 2 分钟测量该板,持续 30 分钟,接着每 10 分钟测量一次,持续 60 分钟。1.5 小时之后测得的值用作结果。每组使用四孔。

[0569] 结果

[0570] 这个研究中使用了 2-6 个健康供体的中性粒细胞。图 27 示出在 37°C 下孵育 1.5 小时之后超氧化物的生产。反应混合物 (RM) 用作对照 (6 个供体)。炎性中介 C5a 诱导加强的 O_2^- 生产 (6 个供体),该生产被抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 抑制 (5 个供体)。在这个研究中,高浓度的抗体用于确保任何刺激效应不被忽视。明显地, hAb-Q 在 1000 μ g/ml (4 个供体)、250 μ g/ml (3 个供体) 和 100 μ g/ml (2 个供体) 时,及对照的不相关的 IgG₄ 抗体 HzATNP (2 个供体) 没有刺激效应,其中该 IgG₄ 抗体 HzATNP 是鼠科动物抗体 A-TNP 的人源化形式。

[0571] 总之,上述结果表明人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 没有刺激人中性粒细胞从而生产自由基 O_2^- 。相反,它可以阻碍 C5a 引发的生产。

[0572] 实施例 8—在回体法中人全血试验中人源化抗 -C5aR 抗体没有消耗血液白细胞

[0573] 为了确定 hAb-Q 是否可以杀伤或消耗表达 C5aR 的其他人细胞,特别是血液中的中性粒细胞和单核细胞,进行了数个回体法中全血消耗试验。全血消耗研究使用了抗 -凝剂,来匹卢定 (lepirudin) (Refludan[®]),来匹卢定没有灭活补体或抗体介导的杀伤机制 (CDC、ADCC)。来匹卢定是高特异性的直接凝血酶抑制剂。它是从水蛭提取的抗凝剂水蛭素的重组类似物。

[0574] 方法

[0575] 血液采集

[0576] 将健康志愿者的外周静脉血液采集到无菌的 15ml 聚丙烯管子中,该管子中含有最终浓度为 50 或 500 μ g/ml 的来匹卢定 (Refludan[®], Pharmion 有限公司,墨尔本,澳大利亚)。

[0577] 与抗体一起孵育

[0578] 将等份 (50 μ l) 的抗凝结血液分配到 96 孔板中,并一式两份与在 dPBS 中稀释的最终浓度为 100 μ g/ml 的 25 μ l 抗体一起在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育 3.5 小时。对照样品包含 50 μ l 血液及 25 μ l dPBS。将包含抗 -hCD66b-FITC (最终为 1/100)、抗 -hCD19-APC (最终为 1/300) 和抗 -hCD14-PE (最终为 1/300) 的染色混合液 (25 μ l) 添加到每个样品中,并于 37°C 下在 5% CO₂ 中继续孵育 30 分钟。然后将校准珠 (calibration bead) (50ul, 980 珠/ μ l; Flow-Count Fluorosphere; Beckman Coulter, USA; Cat. No. 7547053) 添加到每个样品中。通过添加 100 μ l 1×FACS 裂解溶液 (10x FACS 裂解溶液; BD Bioscience; Cat. No. 349202) 裂解红细胞。将整个样品转移到 1.5ml 管子中,并再添加 500 μ l 1×FACS 裂解溶液。在 4,000rpm 下离心管子 3 分钟并除去上清液。将细胞和珠重悬在 150 μ l FACS 缓冲剂 (dPBS+1% BCS) 中。

[0579] FACS 分析

[0580] 在 FACSalibur (Becton Dickinson) 流式细胞仪上分析细胞。使用正向和侧向散射,从而包括所有细胞,但排除碎片。设门控以计数 CD66b-FITC (FL-1) 阳性细胞 (中性粒细胞)、CD19-APC (FL-4) 阳性细胞 (B 淋巴细胞) 或 CD14-PE (FL-2) 阳性细胞 (单核细胞)。测定了每 5000 珠的细胞数目。

[0581] 每毫升血液中每种细胞类型的总数目计算如下:

[0582] # 细胞数 /ml = #5000 珠中的细胞数 $\times$ (50 $\times$ 980) / 5000 $\times$ 1000 / 50

[0583] 消耗百分数计算如下:

[0584] %消耗 = 100 $\times$ (1 - (# 细胞数 /ml Ab 处理的样品 / # 细胞数 /ml PBS 处理的样品))

[0585] 结果

[0586] 使用采集到含有来匹卢定的无菌管子中的 3 个不同健康志愿者的全外周静脉血进行三个单独的实验。该血液与人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q、利妥昔 (rituximab) (阳性对照抗 -CD20 抗体)、hIgG4 (阴性同种型对照抗体) 或 PBS (缓冲对照、基线从而测量细胞消耗程度) 一起孵育。在孵育的终点,使用标记了针对 CD66b、CD14 和 CD19 的抗体的混合液将细胞染色,从而鉴定粒细胞 (中性粒细胞; CD66b+ve)、单核细胞 (CD66b-ve、CD14+ve) 和 B 细胞 (CD19+ve)。为了测定每种细胞类型的绝对数目,将已知浓度的固体体积的校准珠添加到每个样品中。因此,可以测定每个样品 (如细胞 /ml) 中的中性粒细胞 (粒细胞)、单核细胞和 B 细胞的绝对数目,以及用抗体处理之后每种细胞类型的相对消耗,该相对消耗表示为与 PBS 一起孵育的样品中细胞总数目的百分比。

[0587] 3 个实验数据进行平均,结果示出在图 28 和 29 中。图 28 示出从 3 组数据计算的平均细胞数目 ($\pm$ 标准偏差)。图 29 示出相对于 PBS 处理的样品中细胞数目,每种细胞类型消耗的平均百分比 ($\pm$ sd)。该数据示出在与 hAb-Q 一起孵育 4 小时之后中性粒细胞或单核细胞没有被消耗。相比之下,利妥昔导致 B 细胞 (表达 CD20, 利妥昔的靶) 的 $\sim$ 70% 消耗,但是没有降低不表达 CD20 的细胞类型,单核细胞或中性粒细胞的数目。

[0588] 实施例 9—人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 没有经过补体介导的裂解杀伤 C5aR- 表达细胞

[0589] 开发不杀伤 C5aR- 表达细胞 (中性粒细胞、单核细胞等) 的人源化抗 -C5aR 抗体是理想的。抗体可以通过一些机制启动对表达靶抗原的细胞的杀伤。hAb-Q 作为 IgG4 同种型被生产,从而避免 / 降低补体依赖的细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖细胞介导的细胞毒性

(ADCC)。当抗原-抗体复合物通过抗体的 Fc 结构域结合补体蛋白 C1q,从而启动蛋白水解事件 (proteolytic event) 的级联活化时,补体介导的杀伤被诱导,其中该蛋白水解导致 C5a 的释放和裂解靶向细胞的膜攻击复合物 (membrane attack complex) 的形成。

[0590] 为了证明 hAb-Q 没有诱导 CDC 活性,进行了下面实验。

[0591] 方法

[0592] 表达高水平 C5aR 的 Ramos E2 克隆的产生

[0593] 根据制造商的方案,利用脂质体 TM LEX 试剂 (Invitrogen),用人 C5aR 表达质粒 (pcDNA3.1-C5aR;4 μg DNA/3x10⁶ 细胞) 稳定转染表达 CD20 的人 B 淋巴细胞细胞系 (伯基特氏肿瘤源 (Burkitt's lymphoma-derived)), Ramos。转染 40 小时后,将 2mg/ml 遗传霉素 (G418 硫酸盐, Gibco) 添加到生长培养基中。细胞 (非克隆系) 在选择性培养基中生长近 3 周,此段时间中,使用抗-C5aR 抗体通过流式细胞仪证实了 C5aR 表达和转染的百分数。将细胞以生产 ~ 30-40 阳性克隆 / 板的密度转移到 384 孔板中。挑选单个克隆系集落并将其转移到 96 孔板中用于扩增。充分生长之后,每个克隆中 C5aR 的表达可使用抗-C5aR 抗体通过流式细胞仪测定。挑选并扩增表达最高的克隆, E2。将 Ramos E2 细胞维持在 RPMI, 10% FCS, 2mg/ml G418 中。

[0594] 用兔补体进行的 CDC 试验

[0595] 将靶细胞 (Ramos E2 细胞) 与抗体或单独的介质 (RPMI+10% 热灭活的 BCS) 在 37°C 下在 5% CO₂ 中孵育 30 分钟。孵育之后,将稀释在 RPMI 中的兔补体 (Cedarlane) 添加到样品中,使其最终浓度为 1% v/v。在 37°C 下在 5% CO₂ 中进一步孵育样品 2 小时。

[0596] 向每个样品中添加荧光活性染料 (fluorescent viability dye), To-Pro-3 (分子探针), 之后通过流式细胞仪测量定义为 To-Pro-3 阳性的不可存活的 (non-viable) 靶细胞, 并以全体靶细胞的百分比表示。

[0597] 通过从相应 '靶和补体' (B) 样品中减去不可存活的 '仅有靶' (A) 的平均%, 计算每个样品的特异性 CDC。然后从每个样品中减去 '靶和补体' (C) '仅有介质' 的样品的, 从而得出特异性 CDC 的最终值:

[0598] 特异性 CDC (%裂解) = (B-A) - C

[0599] 上面公式也可表示如下:

[0600] 特异性 CDC (%裂解) = (T+CS-T+CMO) - (TOS-TOMO)。

[0601] 其中: T+CS 是靶 + 带有抗体的补体样品中不可存活的细胞的平均%

[0602] T+CMO 是靶 + 仅有补体介质 (无 Ab) 中不可存活的细胞的平均%

[0603] TOS 是带有抗体的仅有靶的样品中不可存活的细胞的平均%

[0604] TOMO 是仅有靶仅有介质 (无 Ab) 中不可存活的细胞的平均%

[0605] 用人血清进行的 CDC 试验

[0606] 按下面实施例 10 中描述的, 使用人血清进行 ADCC 试验。通过从含有人血清的 '仅有靶 + 抗体' 的样品 (B) 中减去 '仅有靶 / 仅有介质' 的样品 (A) 的不可存活细胞的平均%, 确定抗体的 CDC 活性。然后减去 '仅有靶 + 抗体' 样品 (C) 与热灭活的牛血清反应中的 '仅有靶 / 仅有介质' 的样品 (D) 的不可存活的 % 之差, 从而得出特异性 CDC 的最终值:

[0607] 特异性 CDC (%裂解) = (B-A) - (C-D)

[0608] 结果

[0609] 使用 Ramos E2 靶细胞进行 CDC 试验

[0610] 通过在兔补体存在时将人中性粒细胞与抗体一起孵育,初步研究了 hAb-Q 诱导补体依赖的细胞毒性 (CDC) 的可能性。在这个试验 (数据未示出) 中,本质上没有中性粒细胞的特异性杀伤 ($< 0.5\%$ 细胞死亡)。

[0611] 开发了表达高水平的人 C5aR 及 CD20 的 Ramos E2 细胞系之后,再次面临 hAb-Q 是否可以诱导 CDC 的问题。使用 Ramos E2 细胞系作为靶,进行了两个系列的实验。第一系列使用 1% 兔补体,其中利妥昔用作阳性对照。第二系列比较了与 10% 人血清一起孵育的样品中的细胞死亡和与热灭活的牛血清一起孵育的样品中的细胞死亡。

[0612] 在存在 1% 兔血清时抗体 hAb-Q 没有诱导 Ramos E2 细胞的 CDC。

[0613] 进行了三个试验。第一个涉及将最终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 的抗体 hAb-Q、利妥昔 (Roche) 和 hIgG4 同种型对照 (Sigma) 与 Ramos E2 细胞和 1% 兔补体一起孵育。第二个和第三个试验使用浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$ 的抗体进行的并包括另外的阳性对照 - 兔多克隆的抗 -C5aR (US Biological)。

[0614] 在第一个实验中,与 $10 \mu\text{g/ml}$ hAb-Q、利妥昔和 hIgG4 一起孵育的样品中特异性 CDC 的水平分别为 0%、96% 和 0%。在第二个和第三个实验中,与 $100 \mu\text{g/ml}$ hAb-Q、利妥昔和 hIgG4 一起孵育之后平均特异性 CDC 分别为 1.5%、98% 和 1%。将 Ramos E2 与 $20 \mu\text{g/ml}$ 多克隆和 1% 兔补体一起孵育产生了 82% 特异性 CDC (图 30)。据报道,利妥昔可通过 CDC 杀伤表达 CD20 的细胞。多克隆抗体也是补体活化和 CDC 的有效诱导物。这些阳性对照示出 CDC 试验是可行的并表明人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 没有通过 CDC 杀伤细胞。

[0615] 在存在 10% 人血清时抗体 hAb-Q 没有诱导 Ramos E2 细胞的 CDC

[0616] 使用从人血液中分离的效应细胞 (PBMC),靶向与人源化抗 -C5aR 或对照抗体一起孵育的 Ramos E2 细胞,进行一系列 ADCC 试验 (见下面的实施例 10)。以平行方式进行了一组对照反应,该反应涉及在存在热灭活的牛血清或 10% 人血清的情况下孵育 Ramos E2 细胞 (‘仅有靶’) 及抗体,该 10% 人血清与提供的 PBMC 来自相同的供体。

[0617] 含有人血清的对照反应被认为代表 CDC 试验,因为它们模拟了上述 CDC 试验,除了是人血清,而不是兔血清之外。然而,一个差异是没有靶 + 未与人血清一起孵育的抗体样品。因此,在使用人血清的试验中,通过从靶 + 与人血清一起孵育的抗体样品中“靶细胞不可存活%”减去靶 + 与热灭活的牛血清一起孵育的抗体中“靶细胞的不可存活%”,计算特异性 CDC。

[0618] 使用人血清进行了七个试验。在存在 10% 热灭活的牛血清或 10% 人血清时,1、10 或 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 Ramos E2 细胞与 hAb-Q、利妥昔或 hIgG4 同种型对照抗体一起孵育。Ramos E2 细胞在孵育之前载有染料 PKH-26,并在孵育之后载有活性染料 ToPr03,从而使得不可存活和可存活细胞得以区分。按如上描述的,用从试验中每个样品减去背景的仅有介质计算特异性 CDC。对于用在热灭活的牛血清样品中观测到较少的非特异性死亡的人血清的每个处理,不可存活的靶 (Ramos E2) 细胞的平均% 与特异性 CDC 相等,结果示出在图 31 中。

[0619] 图 31 表明在含有 hAb-Q 的样品中,多种剂量之间无差异的特异性 CDC 的水平非常低 ($\sim 1-2\%$)。Ramos E2 裂解水平对于热灭活的牛血清和含有 hAb-Q 的人血清样品是相似的。在与同种型对照抗体一起孵育的样品中观测到相似水平的特异性 CDC ($\sim 0-4\%$)。重要地,与 hAb-Q 一起孵育和与 hIgG4 同种型抗体一起孵育的样品中观测到的裂解平均量在

统计学上没有显著差异 ($p > 0.05$)。这个数据暗示 hAb-Q 没有特异性介导 CDC。相比之下, 特异性 CDC, 在含有利妥昔的样品中, 特异性 CDC 是剂量依赖性的, 且其范围为带有 $1 \mu\text{g/ml}$ 利妥昔的 72% 到带有 $100 \mu\text{g/ml}$ 利妥昔的 91%。在存在人血清的情况下, 对利妥昔观测到的高水平杀伤表明该试验是可行的, 并因此推论出 hAb-Q 没有特异性介导 CDC。若 hAb-Q 特异性介导 CDC, 考虑与 Ramos E2 克隆表达相似的高水平的 CD20 和 hC5aR, 可以预期利妥昔相似水平的杀伤。

[0620] 实施例 10—人源化抗 -C5aR 抗体诱导的抗体依赖的细胞毒性依赖于重链同种型

[0621] 开发不杀伤表达 C5aR 的细胞 (中性粒细胞、单核细胞等) 的人源化抗 -C5aR 抗体是理想的。抗体可以通过一些机制启动表达靶抗原的细胞的杀伤。用 IgG4 同种型生产了一些人源化抗 -C5aR 抗体 (例如, hAb-Q、hAb-J、hAb-G), 从而避免 / 降低补体依赖的细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。用 IgG1 同种型生产了其他人源化抗 -C5aR 抗体 (例如, hAb-N、hAb-O), 已知 IgG1 同种型可以结合 C1q 和 Fc γ R 并因而更可能诱导 CDC 和 ADCC。当结合到抗原的抗体的 Fc 结构域—例如“靶细胞上的受体”—与带有细胞毒可能性的细胞 (“效应细胞”) 上 Fc 受体交联时, ADCC 被介导, 带有细胞毒可能性的细胞包括自然杀伤 (NK) 细胞、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0622] 为了测定人源化抗 -C5aR 抗体体外诱导的 ADCC 活性水平, 进行了下面实验。

[0623] 方法

[0624] ADCC 试验方案

[0625] 简言之, 通过使用聚蔗糖或 Percoll (Healthcare) 密度梯度分离, 从健康供体分离的外周血单核细胞 (PBMC) 制备效应细胞组分。然后通过附着于烧瓶 (1hr, 37°C , 5% CO_2) 耗竭了 PBMC 群体的单核细胞, 剩余的非粘附性细胞 (含有 NK 细胞) 在含有 100ng/ml 重组人 IL-2 (Peprotech) 的介质中在 37°C 下在 5% CO_2 中孵育过夜。第二天, 用荧光细胞膜染料, PKH26 (Sigma) 给靶细胞 (表达 hC5aR 的 Ramos E2 细胞—见上面) 染色, 并将 5×10^4 细胞 / 样品与抗体或单独的介质一起在 37°C 下在 5% CO_2 中孵育 30 分钟。孵育之后, 将效应细胞按 50 : 1 的比例, 或仅有介质添加到靶细胞中并在 37°C 在 5% CO_2 中进一步孵育 3 小时。将荧光活性染料, To-Pro-3 (分子探针) 添加到每个样品中, 之后通过流式细胞仪测量定义为 To-Pro-3 阳性的不可存活的靶细胞, 并表示为全体靶细胞 (PKH-26 阳性细胞) 的百分比。该介质含有 10% 人血清, 或 10% 热灭活的牛血清, 其中该 10% 人血清与分离出的 PDMC “效应” 细胞来自相同的供体。

[0626] 通过从相应样品的 ‘靶和效应子’ (B) 中减去平均 % 不可存活的 ‘仅有靶’ (A), 计算每个样品的特异性 ADCC。然后从每个样品中减去 ‘靶和效应子’ (C) 的 ‘仅有介质’ 的样品, 从而得出特异性 ADCC 的最终值:

[0627] 特异性 ADCC (% 裂解) = (B-A) - C

[0628] 上面公式也可表示如下:

[0629] 特异性 ADCC (% 裂解) = (T+CS-T+EMO) - (TOS-TOMO)。

[0630] 其中: T+ES 是靶 + 带有抗体的效应子样品中不可存活的细胞的平均 %

[0631] T+EMO 是靶 + 仅有效应子介质 (无 Ab) 中不可存活的细胞的平均 %

[0632] TOS 是带有抗体的仅有靶的样品中不可存活的细胞的平均 %

[0633] TOMO 是仅有靶仅有介质 (无 Ab) 中不可存活的细胞的平均 %

[0634] 结果

[0635] 在系列试验中使用 Ramos E2 细胞作为靶,检查了人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 通过 ADCC 机制诱导细胞杀伤的可能性。Ramos E2 可表达 CD20 和 C5aR,允许靶向 CD20 和被 ADCC 杀伤的利妥昔用作阳性对照。C5aR 在 Ramos E2 上的表达比在人中性粒细胞上的表达高~7 倍。已报道在细胞表面上被表达的靶受体水平可影响抗体诱导的 ADCC 和 CDC 的程度 (Preithener 等人,2006 ;van Meerten 等人,2006 ;Lowenstein 等人,2006)。

[0636] 效应细胞是从健康志愿者的静脉血中纯化出的人 PBMC,然后耗竭单核细胞,并与 IL-2 孵育过夜,从而刺激 (“激活 (prime)”)NK 细胞。发现这个步骤是最大化效应子细胞毒性所必需的。

[0637] 用染料 PKH-26 标记靶细胞,因此在流式细胞术期间它们可以不同于效应细胞。对于每个靶 + 抗体样品,设立 2 个管子 (每个一式两份)。一个含有靶细胞和介质,另一个含有比例为 50 : 1 的效应子和靶。在试验开展期间,已显示效应子 : 靶的最佳比例为 50 : 1 可产生最大杀伤。在所有孵育步骤之后通过向样品中添加染料 To-Pro-3 (TP3) 测量活力 (viability),并通过流式细胞仪分析。靶细胞消耗是在扣除背景之后 (无抗体样品),不可存活的靶细胞数目 (TP3+ve/PKH+ve) 占全体靶细胞 (PKH+ve) 百分比。

[0638] 使用 Ramos E2 作为靶细胞,比较 hAb-Q 和 hAb-N 诱导的 ADCC 活性

[0639] 在第一系列的实验中,比较了人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q (重链同种型 hIgG4) 和 hAb-N (hIgG1) 诱导 Ramos E2 细胞 ADCC 的可能性与利妥昔 (hIgG1) 和同种型对照抗体 (hIgG4) 诱导的 ADCC。人 IgG1 比 hIgG4 对 Fc γ R 的亲和力高,并预期可更高效地诱导 ADCC。

[0640] 在存在 10% 热灭活的胎牛血清 (FCS) 的情况下,将靶细胞与 100 μ g/ml 的 hAb-Q、hAb-N、利妥昔 (Roche)、hIgG4 抗体 (Sigma) 或单独介质 (RPMI) 一起孵育。30 分钟之后,IL-2 刺激 PBMC (比例为 50 : 1 (E : T)),或者将单独介质添加到靶细胞中并继续孵育 3 小时。通过流式细胞仪测得的不可存活的细胞数目表示 ADCC 活性。从每个样品中扣除仅有介质的背景和仅有靶的背景,从而测定特异性 ADCC 活性。进行了 3 个完全相同的实验。结果 (三个实验的组合数据 $\pm$ sd) 示出在图 32 中。

[0641] IgG1 抗体、利妥昔和抗 -C5aR hAb-N 有效介导 Ramos E2 细胞的高水平杀伤 (> 65%)。相比之下,hAb-Q (IgG4) 和同种型对照 hIgG4 介导的特异性 ADCC 的水平明显降低,在与 PBMC 和 hAb-Q 一起孵育之后,仅 23% 的 Ramos E2 细胞不可存活。与同种型对照抗体一起孵育的 Ramos E2 细胞没有死亡。这些结果暗示抗体同种型是 ADCC 活性的重要决定因素,并暗示如果不需要抗体依赖的细胞杀伤,则 hIgG4 同种型的人源化抗 -C5aR 抗体优选用于体内处理。

[0642] 用 Ramos E2 细胞作为靶,比较血清对 hAb-Q 介导的 ADCC 活性的影响

[0643] 其它系列的 ADCC 试验按如上进行,其中一组在介质中孵育的样品含有从 PBMC 效应细胞的供体中分离的 10% 人血清,备份组样品中含有 10% 热灭活的牛血清。血清的热灭活被认为破坏补体活性。因此预期 CDC 活性可在与人血清一起孵育的样品中观测到。从 ‘仅有靶’ 的样品中测定 CDC 水平。确实,在含有利妥昔的 ‘仅有靶’ 的样品中,不可存活的 (TP3+ve) 细胞的数目通常 > 90%。因此,不能在含有人血清的样品中检测利妥昔诱导的特异性 ADCC 活性。然而,在含有 10% 热灭活的牛血清和 100 μ g/ml 利妥昔的平行样品中,平均 60% 的靶 (Ramos E2) 细胞被效应细胞特异性杀伤。这与图 32 中示出的结果相似,并表

示效应细胞和 ADCC 试验是可行的。

[0644] 而且,如上面图 31 中所示,人源化抗-C5aR(hAb-Q)和 hIgG4 同种型对照抗体在本实验中没有诱导 CDC 活性。因此对于含有人血清的样品,因 hAb-Q 和同种型对照抗体引起的特异性 ADCC 可按如上所述计算。该结果示出在图 33 中。hAb-Q 和同种型对照在浓度为 1-100 μ g/ml 时都没有通过 ADCC 显著地引起细胞死亡。对于 hAb-Q,这个结果与在含有热灭活牛血清的样品中观测到的 ADCC 活性形成对比(图 32)。

[0645] 实施例 11—小鼠研究

[0646] KRN 转基因小鼠系含有 T 细胞受体,该细胞受体可识别 C57BL/6 背景上的自身抗原 6-磷酸葡萄糖异构酶(GPI)。当这些小鼠与 NOD 小鼠交配(cross)时,转基因阳性 F1 子代(K/BxN)自发患上对抗 GPI 的循环抗体介导的自身免疫样(autoimmune-like)疾病(Kouskoff 等人,1996)。可将关节炎 K/BxN 小鼠的血清转移到其中自身抗原免疫复合物可活化可替换的补体途径的其他品系(strain)中,接着活化 C5aR 和 Fc γ RIII 介导的细胞和生产炎性细胞因子(Ji 等人,2002)。中性粒细胞、肥大细胞和巨噬细胞在这种模型病症的形成中发挥着重要作用(Wipke 和 Allen,2001;Lee 等人,2002;Solomon 等人,2005)。观测到的炎性表型以包括关节破裂的慢性进行性疾病在内的人风湿性关节炎的许多标志为特征(Kyburz 和 Corr,2003)。

[0647] A. 在炎性关节炎的小鼠模型中,C5aR 逆转炎症的人源化抗体

[0648] 方法

[0649] 动物

[0650] 在 C57BL/6 背景上(Lee 等人,2006)~6-12 周龄的敲入人 C5aR 的转基因小鼠,来源于悉尼的 Garvan Institute 的繁殖种群。实验中优选雄性小鼠,但也可使用雌性小鼠。

[0651] 制备 K/BxN 血清

[0652] 为了生产用于实验的血清,让 KRN 雄性与 NOD 雌性交配。处死携带发展成发炎关节的 KRN 转基因的 F1 子代,并通过心脏穿刺采集血液。在 37℃ 下孵育 2 小时之后分离血清,并在 4000rpm 下离心 10 分钟。对多个小鼠的血清进行集合、再等分并储存在 80℃。

[0653] 实验关节炎的诱导和测量

[0654] 通过在腹腔给药第 0 天和 2 天注射 100-150 μ l 血清,在受者小鼠中诱导实验关节炎。通过使用卡尺测量踝最小厚度的变化和临床得分,每日监控疾病进展。通过平均后爪(rear paw)的每个读数,确定每日踝最小厚度。通过总计四只爪的得分,计算每只小鼠的临床得分:0,正常关节;1,踝的轻微/中等肿胀和/或一个趾(digit)肿胀;2,踝肿胀或者两个或多个趾肿胀;3,爪的所有方向都严重肿胀或 5 个趾都肿胀。监控小鼠的研究人员对每只小鼠已接受的处理是不知道的。

[0655] 处理

[0656] 在腹腔给药第 5 天(治疗处理方式)注射纯化的抗 C5aR 或同种型对照抗体(PBS 中 1-10mg/kg)。在一些实验中,对照组接受 PBS,而不是同种型对照抗体。

[0657] 统计分析

[0658] 使用曼肯德尔检验(Mann-Kendall test)或使用克鲁斯凯-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test)和用邓恩的多重比较检验(Dunn's Multiple Comparison Test)完成的事后分析(post hoc analysis),确定独立对照和 K/BxN 模型中处理组之间差异的统

计显著性。

[0659] 结果

[0660] 研究了在 K/BxN 模型中人源化 7F3 抗体逆转确认的炎症的能力,结果描述在下面。表 8 列出在这个模型中测试的抗体和给予的剂量。通过在 K/BxN 血清注射诱导关节炎之后在腹腔注射“治疗”的第 5 天,给予所有抗体。

[0661] 表 8 :测试的抗体和给予的剂量

[0662]

抗体	测试剂量	组尺寸	结果数据
G	10mg/kg	6	34
M	10mg/kg	6	34
N	10mg/kg	6	34
J	1mg/kg	4	35
J	3mg/kg	5	35
J	10mg/kg	5	35
C	3mg/kg	5	35
C	10mg/kg	4	35

[0663] 图 34 和 35 中示出的结果表明当在诱导炎性关节炎之后在腹腔给药第 5 天给予 10mg/kg 时,人源化抗体有效逆转了炎症的临床迹象。抗体 J 和 G 的较少剂量比 10mg/kg 剂量效果小,但在大部分情况下都可以阻止炎症的任何进一步进展,如在对照组中观察到的(给予 PBS 的小鼠,或人 IgG4- 针对不相关的人抗原的同种型对照抗体)。

[0664] B. 人源化抗 -C5aR 抗体减轻风湿性关节炎的小鼠模型中关节炎的迹象和症状:抗体剂量、抗体血清浓度、受体占位率和功效之间的关系。

[0665] 在治疗给予人源化抗 -C5aR 抗体之前,在小鼠中诱导实验关节炎。研究了抗体剂量、血清中抗体浓度、通过抗体的 C5aR 占位率水平和对小鼠中关节炎功效之间的关系。

[0666] 方法

[0667] 动物

[0668] 在 C57BL/6 背景上 (Lee 等人,2006) ~ 8-16 周龄 (平均 ~ 12) 的雄性和雌性敲入人 C5aR 的转基因小鼠,来源于繁殖种群,该繁殖种群在悉尼的 Garvan Institute,或 Perth 的 Animal Resource Centre。

[0669] 制备 K/BxN 血清

[0670] 本研究中所有小鼠都注射了同一批的按上面描述制备的 K/BxN 血清。

[0671] hAb-Q 的 FITC 标记

[0672] 异硫氰酸荧光素 (FITC) 如下共价结合到 hAb-Q 抗体。简言之,将 ~ 1.5mg hAb-Q

放入“反应缓冲剂”((160mM Na_2CO_3 , 340mM NaHCO_3 , pH 9.5))中,并将其添加到溶解在 DMSO 中的 120 μg FITC(分子探针)中,每 mg 抗体。于室温(23 $^\circ\text{C}$)下在黑暗中进行该反应 1 小时。使用 PD-10 柱除去未结合的 FITC,用“储存的缓冲剂”(10mM Tris, 150mM NaCl, pH8.2)预平衡和洗脱未结合的 FITC。使用微量离心浓缩器(YM-30)旋转过滤器浓缩结合的 hAb-Q-FITC,从而达到 1.036mg/ml 的最终浓度,并于 4 $^\circ\text{C}$ 下在黑暗中储存。

[0673] 实验关节炎的诱导和测量

[0674] 如上所述,通过在第 0 天和 2 天腹腔注射 150 μl K/BxN,在受者小鼠中诱导实验关节炎。在第 5 天,通过将临床得分乘以从 0 天起爪尺寸的变化(mm),计算每只小鼠的“RA 得分”。只有 RA 得分 > 0.5 的小鼠才进入该研究的治疗阶段。~ 90% 的雄性小鼠和 50% 的雌性小鼠患上性关节炎。

[0675] 研究设计—概述和组尺寸

[0676] 该研究设计用于测量在用抗 -C5aR 开始处理之前和之后不同时期的炎症,体内受体占位率和 K/BxN 疾病模型中血清抗体浓度。通常在~ 3 周内解决这个模型中的病程。炎症迹象和症状在用 K/BxN 小鼠血清免疫的一天或两天内是明显的。在 10-14 天附近,炎症达到峰值,并在之后慢慢衰退。

[0677] 考虑到这些情况,采取下面时间表进行分析:

[0678] 炎症:在第 0 天(第一血清注射之前)、d2(第二血清注射之前)、5(开始处理之前),然后 d6、d7、d8、d9、d10、d11、d12、d14 和 d16 测量爪尺寸和临床得分。在每组至少 10 只小鼠中测定炎症。

[0679] 血清抗体浓度:在第 5 天(处理之后 30 分钟和 12 小时)、d6(处理之后 24 小时)、d7(48 小时)、d8(72 小时)、d9(96 小时)、10 d10(120 小时)、d11(144 小时)、d12(168 小时)、d14(192 小时)和 d16(264 小时)抽取血样样品。从通过心脏穿刺在第 5.5 天(处理之后 12 小时)、6、8、10、12 和 16 天抽取的血液制备血清,和从第 5 天(处理之后 30 分钟)和第 7、9、11 和 14 天的尾静脉血制备血清。2-4 组小鼠在每个时间为每个处理提供血液,但是每个小鼠的抽血不能超过 3 次。将约 100 μl 血液采集到 1.5ml 管子(无抗凝剂)中,并在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 30 分钟,从而促进凝血,接着在 13,000rpm 下离心 10 分钟。将该血清分配到新管(fresh tube)子中(每个小鼠样品 2 个)并储存在 -80 $^\circ\text{C}$,之后使用 ELISA 测定抗体浓度。

[0680] 受体饱和:在第 5.5(处理之后 12 小时)、6、8、10、12 和 16 天处死小鼠=(每组 n = 4),并通过心脏穿刺抽取血液。用 FITC 标记的 hAb-Q 给白细胞染色,从而测定游离 C5a 受体量,或用 FITC 标记的抗人 IgG 给白细胞染色,从而测定与 PBS 对照组比较的结合 hAb-Q 的量。用 CD11b 和 Ly6G 共同给细胞染色,从而区分中性粒细胞和单核细胞。见下面的进一步详述。

[0681] 处理

[0682] 将挑选用于进入该研究的小鼠随机分为 5 组,从而在第 5 天接受 5 个处理中的一个。

[0683] 1. PBS 腹腔给药

[0684] 2. huIgG 对照抗体腹腔给药 @8mg/kg

[0685] 3. hAb-Q 腹腔给药 @1mg/kg

[0686] 4. hAb-Q 腹腔给药 @3mg/kg

[0687] 5. hAb-Q 腹腔给药 @10mg/kg

[0688] 将抗体溶解在 PBS 中,以便注射的总体积为每只小鼠~100 μ l。监测小鼠的研究人员对每只小鼠接受的处理是不知道的。直到数据收集和分析之后才揭示处理组,除了鉴定用于受体占位率研究的药 PBS 的动物。

[0689] 未用抗体处理的组 1(PBS 对照)用于确立受体饱和、活化和 PK 分析的基线。组 2 是用不相关的人 IgG 抗体处理的阴性对照组。组 3-5 接受抗 -C5aR 处理。

[0690] 统计分析

[0691] 按上面描述的测定独立对照组和处理组之间差异的统计显著性。

[0692] 测量结合的 hAb-Q

[0693] 为每个测试样品设立含有 hAb-Q(200 μ g/ml, [最终])或 dPBS 的板。将来自每只小鼠的 25 μ l 肝素化血液添加到含有 hAb-Q 和 dPBS 孔中,并在 37°C 下孵育 1.5 小时。用 dPBS 清洗细胞 3 次,从而除去未结合的 hAb-Q,并在室温下将其重悬在含有抗 -hIgG-FITC(1/50)、抗 -Ly-6G-PE 和抗 -CD11b-PerCP/Cy5.5 抗体 (1/400) 的 dPBS 中,持续 45 分钟。通过添加 BD FACS 裂解溶液 (BD, 349202) 除去红细胞。在 2,000rpm 下离心样品板 3 分钟,除去上清液并再次将细胞重悬在 BD FACS 裂解溶液中,用以通过流式细胞术 (BD FACSanto) 分析。

[0694] 测量‘游离’C5a 受体

[0695] 设立含有 hAb-Q(200 μ g/ml, [最终]),对于最少的游离 C5aR)或 dPBS(对于最多的游离 C5aR 和所有测试样品)的板。将来自每只小鼠的 25 μ l 肝素化血液添加到相应孔中(即,将用仅有的 dPBS 注射的小鼠,添加到含有 hAb-Q 和 dPBS 的孔中(对于最少和最多的游离 C5aR)。将所有其他的测试血液样品添加到含有仅有的 dPBS 的孔中,并在 37°C 下孵育 1.5 小时。用 dPBS 清洗细胞 3 次,从而除去过多的 hAb-Q,并于 37°C 下将细胞重悬在含有 25 μ g/ml hAb-Q-FITC、抗 -Ly-6G-PE 和抗 -CD11b-PerCP/Cy5.5 抗体 (1/400) 的 dPBS 中,持续 45 分钟。通过添加 BD FACS 裂解溶液 (BD, 349202) 除去红细胞。在 2,000rpm 下离心样品板 3 分钟,除去上清液并再次将细胞重悬在 BD FACS 裂解溶液中,用以通过流式细胞术 (BD FACSanto) 分析。

[0696] 流式细胞术分析中性粒细胞 C5a 受体饱和

[0697] BD FACSCalibur 流式细胞仪设有为通道 FL-1、FL-2 和 FL-3 确立的补偿参数。获得的样品要排除死细胞和碎片。中性粒细胞被鉴定为 Ly-6G-PE 高、CD11b-PerCP/Cy5.5 低-高。单核细胞被鉴定为 Ly-6G-PE 阴性、CD11b-PerCP/Cy5.5 高。通过测量每个样品的 FITC(FI-1)的中位荧光强度 (MFI),测定结合的 hAb-Q(a-IgG-FITC)和游离的 C5aR(hAb-Q-FITC)。

[0698] 根据下面方程,通过测定在 dPBS 中孵育的每个样品的 MFI,占与 200 μ g/ml hAb-Q 一起孵育的相同样品 MFI 的百分比,量化结合的 hAb-Q 的百分数(在扣除背景之后,该背景是从经 PBS 处理的小鼠样品计算的,该小鼠样品与 PBS 一起孵育,然后与 FITC-抗 -hIgG 孵育的):

[0699]
$$\frac{[\text{MFI}(\text{样品} + \text{dPBS}) - \text{MFI}(\text{背景, 即, PBS 对照小鼠} + \text{dPBS})]}{[\text{Max_MFI}(\text{样品} + \text{冷 hAb-Q}) - \text{MFI}(\text{背景})]} \times 100$$

[0700] 通过测定在 dPBS 中孵育的每个样品的 MFI,占最多的游离受体样品,即给予仅有

dPBS 的小鼠的百分比, 量化游离的 C5aR 受体的百分数。最多游离的 C5aR, 即在回体法中与过量的 hAb-Q 一起孵育的样品, 未用在这个计算中, 而用于比较目的。

[0701] 测量抗体血清浓度

[0702] 用证实可检测小鼠血清中 hAb-Q 的 ELISA 方法, 按照 GLP, 分析 hAb-Q 的血清浓度。最低量化限 (lowest limit of quantification) (LLOQ) 是 4ng/ml。对于体外失踪研究, 量化小鼠试验, 用于检测人 EDTA 血浆中的 hAb-Q。当该试验应用在血浆中时, LLOQ 是 10ng/ml。

[0703] 结果

[0704] 免疫一些 200hC5aR KO/KI 小鼠两次, 用来自 K/BxN 小鼠的血清分 2 天 (第 0 天和第 2 天) 进行, 以便诱导炎性关节炎, 该炎性关节炎自身表现为受者小鼠的爪中关节和趾肿胀。在 5 天的时候, 约 70% 小鼠 (~85 雄性和 ~60 雌性) 的一些爪和关节已肿胀和变红。将 “RA 得分” > 0.5 的小鼠随机分成 5 个处理组, 每组 11-12 只小鼠。给每组给予 5 个处理中的一个—PBS 中的 hAb-Q, 剂量为 1、3 和 10mg/kg, PBS 中的对照抗体 (无关抗原的人 IgG), 剂量为 8mg/kg 和仅有的 PBS。接下来的 11 天, 定期监测小鼠, 给定临床得分并测量爪尺寸 (踝最小厚度)。血液样品采集于尾静脉或通过心脏穿刺在第 5、5、6、7、8、9、10、12、14 和 16 天采集, 用于测定受体占位率和抗体血清浓度。

[0705] 人源化抗 -C5aR 抗体以剂量依赖方式逆转炎性关节炎的 K/BxN 模型中的炎症

[0706] 图 36 中示出从 0 天之后每个处理组的平均临床得分和爪尺寸的变化。该数据表示 hAb-Q 在体内有效减轻了炎症的迹象和症状。10mg/kg 剂量明显比 3mg/kg 和 1mg/kg 更有效, 观测得剂量反应关系。与 2 个对照组相比, 10mg/kg hAb-Q 减轻并控制了炎症和给药一周之后的临床得分, 3mg/kg hAb-Q 阻止了炎症的任何进一步进展约 5 天, 但是不能减轻已存在的炎症, 而 1mg/kg hAb-Q 无效。在最后的 3-5 天, 10mg/kg 和 3mg/kg 组的炎症得分都呈现上升的趋势。在第 5 天, 只给予单次剂量的 hAb-Q。如下所示, 炎症的减轻或平稳 (没有进一步增加) 与高的受体饱和和血清抗体浓度相关。当这些下降时, 炎症复发。

[0707] 通过人源化抗 -C5aR 抗体的 C5a 受体占位率的水平和程度是剂量依赖的

[0708] 用两种不同的方式测量受体占位率。用 hAb-Q-FITC 给白细胞染色, 从而测定 “游离的” 受体量, 或用抗 hIgG-FITC 给白细胞染色, 从而测定体内结合的 hAb-Q (“占位的” 受体) 量, 和用 CD11b 和 Ly6G 共同给白细胞染色, 从而区分中性粒细胞和单核细胞。结合到中性粒细胞上 C5aR 的抗体量和游离的 (空的) 受体量之间应当存在反比关系。当计算结合的抗体时, 校正了受体数目中小鼠与小鼠的变异。测定游离受体时没有进行该校正。结果示出在图 37 和 38 中。

[0709] 图 37 示出给予的抗体剂量和中性粒细胞中结合的抗 -C5aR 抗体之间的关系。在最高剂量 10mg/kg 时, 结合的抗体仍然处于饱和水平, 直至给予 ~120 小时之后 (10 天), 然后经过 264 小时 (16 天) 下降到 ~20% 的占位率。在 3mg/kg 时, 结合的抗体持续 24 小时处于饱和水平, 然后经过 72 小时下降到 50%, 经过 120 小时下降到 15%。1mg/kg 剂量不足以产生抗体的饱和结合, 给药 24 小时后受体占位率仅为 75%。到 72 小时时, 实际上已没有结合到中性粒细胞的 hAb-Q。在单核细胞中观测到了相似的结果 (未示出)。

[0710] 图 38 表明 “游离的” 受体水平与 “占位的” 受体 (图 37 中示出的结合抗体) 百分数呈现反比关系。在用 10mg/kg hAb-Q 处理的小鼠中, 中性粒细胞上的游离受体非常少, 直

至给药一周后。在 3mg/kg 组中,游离受体少,直至 72 小时之后,在 1mg/kg 组中,在给药 24 小时之后游离受体显著增多。对于单核细胞观测到了相似的结果(未示出)。

[0711] 血清中人源化抗 -C5aR 抗体浓度的水平和程度是剂量依赖的

[0712] 给药之后,每隔 30 分钟到 11 天的时间间隔,测定动物血清中人源化抗 -C5aR 抗体的浓度。结果示出在图 39 中。给药之后,血清中 hAb-Q 浓度迅速增大。给药之后,测得的最大浓度在 30 分钟和 12 小时之间达到,且该最大浓度是剂量依赖的。给予 1mg/kg 之后,血清中抗体浓度在 30 分钟之后达到峰值 $1.9 \mu\text{g/ml}$,持续 12 小时仍然超过 $1.5 \mu\text{g/ml}$,然后在第 7 天(给予 48 小时之后)下降到 $< 0.1 \mu\text{g/ml}$ 。在 3mg/kg 组中,血清抗体峰值浓度是给予 12 小时之后的 $13.3 \mu\text{g/ml}$ 。在 10mg/kg 组中,血清抗体浓度在给予 12 小时之后到达峰值 $69.5 \mu\text{g/ml}$,接下来的 7 天逐渐下降到 $5.5 \mu\text{g/ml}$,然后到 14 天时下降到 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。

[0713] 炎症的减轻或稳定与高的受体占位率和高的血清抗体浓度相关

[0714] 上面图 36a(临床得分)、37(hAb-Q 占位的 hC5aR%) 和 39(血清中 hAb-Q 浓度)的数据已组合在图 40、41 和 42 中,从而证明抗体剂量、受体占位率和血清抗体浓度之间的关系。

[0715] 当通过在小鼠中注射 K/BxN 血清诱发实验关节炎时,关节和爪肿胀和变红均增加,按上面描述的使用“关节炎指数”量化该增加(表示为临床得分)。当治疗给予人源化抗 -C5aR 抗体 hAb-Q 时,即在炎症已在小鼠中形成之后的第 5 天,其中在第 0 和 2 天给予该小鼠 K/BxN 血清,接受最高剂量(10mg/kg)的小鼠组中炎症大幅度持续降低。图 40 表明在受体占位率高($> 40\%$)的同时,在第 5 和 12 天之间,该组中炎症水平(临床得分)下降,该 hAb-Q 的高水平($> 5 \mu\text{g/ml}$)是在血清中测得的。炎症中记录的给予 3mg/kg hAb-Q 的小鼠在接下来三天内稍微有所减少,接下去的 4 天将开始呈现上升趋势。图 41 表明在给予 3mg/kg hAb-Q 的小鼠中,血清抗体浓度 $> 5 \mu\text{g/ml}$ 的同时受体占位率 $\geq 50\%$ 。8 天之后,血清抗体浓度和受体占位率都迅速下降,这对应于炎症开始再次呈现上升趋势的时期。当给小鼠给予最低剂量 1mg/kg hAb-Q 时,炎症稳定进展水平中有约 1 天的暂停,如临床得分所表明的(图 42)。同时,在注射之后血清中抗体水平从 $1.8 \mu\text{g/ml}$ 的峰值迅速下降,并在 12 小时时到达 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 。仅在迅速下降的 1 天前,C5aR 占位率仍然 $> 50\%$ 。

[0716] 支持高的受体占位率依赖于血清中高的 Ab 浓度,和如在组织切片中观测的和通过抓尺寸减小测得的关节中白细胞减少,和临床得分依赖于受体占位率的高水平(低“游离的”受体)的提议的这些数据。在没有游离受体的情况下,C5a 不能结合 C5aR 从而引起活化和白细胞从血液到炎症部位的迁移及组织中补体活化。

[0717] C. 在 K/BxN 小鼠模型中 hAb-Q 的 PK/PD 关系

[0718] 在这个实施例中,我们提供了似乎真实的药物动力学/药效学(PK/PD)模型,该模型描述了抗 -C5aR mAb 的药物动力学、靶受体占位率,和炎性关节炎的 K/BxN 小鼠模型中效果之间的量化关系。建模数据产生于两个研究:药理研究(描述在上面实施例 11B 中)和毒理研究。这个模型构成了解释数据的方法,从而探测浓度反应关系,并可用于帮助选择人的安全启动剂量。

[0719] 方法

[0720] 药理研究

[0721] 上面实施例 11B 中给出了药理研究方法的充分详述。简言之,本研究的目的是为了确定,首先用人源化抗 -C5aR 抗体、hAb-Q 的治疗处理是否有效逆转 K/BxN 模型中炎症关节炎的迹象和病症 ;和其次,为了将剂量和抗炎性效果、受体占位率水平 (以游离 hC5aR 和结合的 hAb-Q 测量)、中性粒细胞活化状态和循环血清抗体浓度关联。在每组至少 10 只小鼠中测定炎症。用每组 4 只小鼠,除了给予 PBS 的对照组包括 2 只小鼠,完成了受体饱和研究。给药组 (1、3、10mg/kg,腹腔给药,和对照动物)。

[0722] 毒理研究

[0723] 通过向转基因小鼠皮下和静脉内 (丸剂) 给予 hAb-Q 进行毒理研究,其中剂量是隔日给予的。毒理动力学数据获得于四个 hAb-Q 给药组 (5、50、500mg/kg, i. v. ,和 100mg/kg 皮下 (s. c.)) 中每组中的 18-21 雄性和 18-21 雌性。

[0724] 药物动力学

[0725] 按上面描述的,分析 hAb-Q 的血清浓度。

[0726] 受体占位率

[0727] 按如上描述的,测定通过给予的 hAb-Q mAb,中性粒细胞和单核细胞上 hC5aR 的结合。对于药理研究,占位率计算如下,

[0728]

$$\text{占位率} = \text{结合}\% = 100\% \frac{MFI_{\text{结合}} - MFI_{\text{预结合}}}{MFI_{\text{最大结合}} - MFI_{\text{预结合}}}$$

[0729] 扣除了预 (pre) 值,因为这些值被认为提供了背景 MFI。

[0730] 模型建立

[0731] 带有一级条件预测 (first order conditional estimation) (FOCE) 的 NONMEM VI (非线性混合效果建模软件, non-linear mixed effects modelling software) 用于建模, S-PLUS® 8.0 (Insigthful) 用于制图和数据处理。中间模型之间的评价和判别以目标函数值和标准的图解评价方法为基础。对于目标函数值,该值的变化假定为 χ^2 (chi-squared) 分布的 (对于嵌套模型, nested model), 用于扩张模型的准则被限定并据此使用。

[0732] 结果

[0733] 用于占位率的 PK/PD 关系

[0734] 结合来自转基因小鼠中药理研究的药理动力学和来自药理研究的 PK/PD 数据,从而评定药物动力学和占位率之间的关系。用靶介导处理的一区室 PK 模型完整地显示了这些数据,如图 43 中所示。对于每个给药组,PK 和占位率模型拟合示出在图 44 中,而参数值在表 9 中给出。还注意到在毒理研究中,估计 500mg/kg 组比较低剂量水平的组的清除率 (clearance) 高。这与其他研究一致,高剂量观测到较高的清除率,这是由 FcRN 受体的饱和造成的 (Hansen 和 Balthasar, 2002)。

[0735] 表 9 :在毒理研究和药理研究中,转基因中 hAb-Q 的药物动力学参数

[0736]

	单位	药理	毒理
V1	mL/kg	74.3	74.3
CL	mL/h/kg	0.182	1.37-2.52*
ka.sc	1/h	-	0.0935
ka.ip	1/h	4.26	-
F.sc	l	-	0.438
F.ip	l	0.411	-
Kd	ng/mL	175	175
koff	1/h	0.1	0.1
Bmax.Targ g	μg/kg	196	196
回转	h	14.2	14.2

[0737] * 来自毒性研究中的 KO/KI hC5aR 小鼠, 在 500mg/kg 组中发现较高的清除率。V1 = 中间体积, CL = 清除率, ka. sc/ka. ip 是用于 s. c. 或 i. p. 施用的吸收率常数。F. sc/F. ip 是用于 s. c. 或 i. p. 施用的生物利用率。Kd = 特异性结合的亲和力。koff = 解离速率常数。Bmax. Targ = 用于 hAb-Q 的最大靶结合能力。回转 (turnover) = 更新靶和除去结合的抗体所需时间 (koff 固定为 0.11/h)。

[0738] 对炎症产生影响的 PK/PD 关系

[0739] 建立了 PK/PD 模型, 从而描述在使用转基因小鼠药理研究 (K/BxN 模型) 中的炎性进攻之后, 药物动力学和爪尺寸变化之间的关系。K/BxN 模型的自然进程是因实验关节炎诱导造成的爪尺寸逐渐增大, 在约 12 天之后, 爪尺寸随后朝向炎症消失 (wane off) 的正常爪尺寸逐渐恢复 (return)。图 45 中示出的 PK/PD 模型描述了 hAb-Q 通过抑制诱导的炎症的效果。最大抑制百分数被设为从占位的 PK/PD 模型获得的占位率水平。如在图 46 中所见, 测得的和作模型用的爪尺寸之间的合理一致性可通过这个途径获得, 该途径示出中性粒细胞 C5a- 受体和对炎症影响之间的非常紧密的关系。

[0740] 使 KO/KI hC5aR 小鼠 ($n \geq 10$ / 时间点 / 组) 在第 0 天经受实验关节炎的诱导, 并在第 5 天用 1、3、10 或 0mg/kg 抗 -C5aR(hAb-Q) 对其注射。在约 12 天之后, 爪尺寸开始减小, 因为诱导的炎症消失。同样地, 在占位率接近 100% 的情况下, 诱导炎症的进展被抑制, 且对于 10mg/kg 组, 可见到爪尺寸的减小。在该模型中, 这些过程是相关的, 都被描述为朝向正常爪尺寸的自然恢复。

[0741] 可预测 hAb-Q 影响的主要部分的模型在某一浓度获得, 导致循环中性粒细胞上受体的完全占位。在 1mg/kg 时, 仅对于给药后 1-2 天占位率高, 且此后爪尺寸开始再次增大, 见图 46。相似地, 3mg/kg 约导致 72 小时的高占位率, 其中在爪尺寸开始再次增大之后。在 10mg/kg 时, 获得约 10 天的占位率, 导致抑制爪炎症的约相同的时间间隔。

[0742] 使用示出的似乎真实的模型, 我们观测到当占位率超过 50% 时, 爪尺寸的增长被抑制, 且当占位率降到 50% 以下时, 例如, 在 3mg/kg 组中在 8 天之后, 爪尺寸重新开始炎症驱使的增大。因为模型使得 50% 的抑制与 50% 的占位率之间有联系, 良好拟合给出量化证实 1) 占位率和对炎症的影响是紧密联系的, 和 2) 在 50% 的峰值占位率预期对炎症的影响最小。

[0743] 结论

[0744] 该模型表明在 mAb 浓度、占位率,和对炎症的影响,及良好一致性之间发现测量和预测值之间的紧密关系。模型描述了该数据中最重要的特征:1) 对小鼠爪激发的进一步临床进展的明显有利影响。2) 靶介导的处置体现的高饱和和消除组分,其中该靶介导的处置可导致用于长期治疗效果所需的高剂量水平,和 3) 与体内受体的相对强的结合,这可能与二价结合相关,该二价结合可导致低剂量时的高峰值占位率。

[0745] 这个模型用作构建人刺激模型的一套的一部分。该刺激模型以所有相关前临床数据为基础,从而在人的初次试验中选择安全启动剂量。

[0746] 实施例 12—人类数据更新的 PK/PD 模型

[0747] 使用药物动力学和 C5aR 占位率数据,带有 hAb-Q 的正在进行的临床试验数据用于证实和更新实施例 11 中描述的潜伏期 PK/PD 模型。这个模型的刺激可用于在较高剂量水平时描述 PK/PD 的当前预测。这个模型构成解释关于在将来研究中作出剂量水平和治疗方案选择 (regimen selection) 的早期决策的数据的方法。

[0748] 方法**[0749] 临床数据**

[0750] NN8209-1940 是随机化的双盲的空白对照的单个静脉给药和分别在 8 和 7 剂量水平的平行皮下给药的剂量递增试验。对象被随机分布到抗 -C5aR(hAb-Q) 的单个静脉给药或皮下给药剂量。对象以 3 : 1 比例随机分布,其中 3 个对象将被分派到在每个剂量水平和给药路径的活性治疗中,且一个经受空白对照例处理。以计划的剂量水平,给予抗 -C5aR(hAb-Q),剂量比前面剂量水平实际增大了 3 或 3.3 倍。包括在 PK/PD 模型中的当前剂量水平更新为:静脉给药剂量水平:0.003、0.01、0.03、0.1、0.2、0.6mg/kg;皮下给药剂量水平:0.01、0.03、0.1、0.3mg/kg。

[0751] 没有包括在建模、未结束试验完成中的数据,包括计划的剂量水平:2 和 7mg/kg 静脉给药和 1 和 3mg/kg 皮下给药。

[0752] 取样时间

[0753] 在 0 小时(给药之前最多 60 分钟)和在 5 分钟(在仅静脉给药之后),15 分钟(在仅静脉给药之后),和 30 分钟,和在药物给予后 1、2、4、6、8、12、24 和 48 小时和 3、7、14、21、28、42、56、和 70 天,计划用于测量抗 -C5aR(hAb-Q) 的 PK 取样。时间点是指在 0 分钟开始注射或开始输液。对于随机分派到静脉给药的对象,输液时间是 15 分钟,因此 15 分钟的时间点是指输液终点。

[0754] 对于中性粒细胞和单核细胞上的 C5aR 占位率的取样,在 0 小时(给药前最多 60 分钟)和在药物给予后 4、24 和 48 小时和 3、7、14、21、42 和 70 天进行设计。

[0755] 占位率计算

[0756] 使用三种不同方法,测定通过给予的 hAb-Q 与中性粒细胞和单核细胞上 hC5aR 的结合。通过 FACS 分析之后,这些测量中的每个都产生校正的中位荧光强度 (MEF)。三种方法是:1) 直接方法,使用 FITC 标记的抗 - 人 IgG4 第二抗体,从而评定已体内结合 hAb-Q 的占位的受体 (MEF_{结合});2) 间接方法,测量由体内 hAb-Q 给药,接着回体法中添加 hAb-Q-FITC 产生的游离 hC5a 受体 (MEF_{游离});和 3) 测量总受体数目,回体法中与过量的 hAb-Q 孵育从而填充所有受体,然后添加抗人第二抗体 (MEF_{最大结合})。占位率随后如下所得:

[0757]

$$\%结合 = 100\% \frac{MEF_{结合} - MEF_{背景结合}}{MEF_{最大结合} - MEF_{背景结合}}$$

[0758]

$$\%游离 = 100\% \frac{MEF_{游离} - MEF_{游离背景}}{MEF_{预游离} - MEF_{游离背景}}$$

[0759]

$$\text{占位率} = 100\% \frac{\text{结合}\%}{\text{游离}\% + \text{结合}\%}$$

[0760] 模型建立

[0761] 带有一级条件预估 (first order conditional estimation) (FOCE) 的 NONMEM VI 用于建模, S-PLUS® 8.0 (Insightful) 用于制图和数据处理。中间模型之间的评价和判别以目标函数值和标准的图解评价方法为基础。对于目标函数值, 该值的变化假定为 χ^2 分布 (对于嵌套模型), 用于扩张模型的准则被限定并据此使用。

[0762] 从数据估计更新模型。然而, 当前数据不足以加强所有参数的估计。在这种情况下, 将一些参数固定为典型 IgG 参数的参数值。

[0763] 结果

[0764] 用于人 PK 和占位率的当前更新模型描述在图 47 中。总的来说, 发现模型预测与到目前为止在实验中观测到的药物动力学和占位率具有非常好的一致性。给予抗 -C5aR (hAb-Q) 之后 PK/PD 的这些模型预测对于静脉给药在图 48 中给出, 对于皮下给药在图 49 中给出。注意这些预测可能在数据累积之后改变。

[0765] 该模型是高度非线性的, 这使得比线性药物动力学预测更困难。基于当前数据, 只有少的信息有助于在高剂量水平时消除半衰期, 暗示应当考虑一些不确定性, 尤其对于预测高剂量水平。对于皮下给药, 可获得的药物动力学数据也接近最低量化限, 这意味着主要占位率数据有助于生物利用率的估计。

[0766] 结论

[0767] 总的来说, 发现观测到的和预测的 PK 和占位率之间存在良好的一致性。从临床前数据预测的主要特征也在临床数据中观测到。这些特征包括高饱和和消除组分, 这可能是因靶和在低浓度时的相对高的占位率造成的。

[0768] 技术人员应当理解, 可在不背离概括描述的本发明精神和范围的情况下, 如具体实施例所示, 对本发明作出许多变化和 / 或修饰。因此, 本事实例的各个方面的理解应理解为示例性而非限制性的。

[0769] 本申请要求于 2008 年 2 月提交的 US 61/066, 539 的优先权, 该申请完整地合并在本文中, 以供参考。

[0770] 上面讨论的所有出版物都完整地合并在本文中。

[0771] 包括在本说明书中的文献、文件、材料、设备、文章等所作的任何讨论, 其目的仅仅为了提供本发明的背景。不能视为因它在本申请每个权利要求的优先权日期之前已经存在, 这等于认可这些内容的部分或全部构成现有技术基础的一部分或是本发明相关领域的

公知常识。

[0772] 参考文献

- [0773] Barry et al. (1994) J. Biol. Chem. 269 :3623-32.
- [0774] Berman et al. (1998) Immunol. Invest. 17 :625-677.
- [0775] Caldas et al. (2000) Protein Eng. 13 :353-360.
- [0776] Caldas et al. (2003) Mol. Immunol. 39 :941-952.
- [0777] Caron et al. (1992) J. Exp. Med. 176 :1191-1195.
- [0778] Chothia and Lesk(1987) J. Mol. Biol. 196 :901-17.
- [0779] Chothia et al. (1989) Nature 342 :877-883.
- [0780] Co et al. (1992) J. Immunol. 148 :1149-54.
- [0781] Curiel et al. (1992) Hum. Gene Ther. 3 :147-154.
- [0782] Dahinden et al. (1994) J. Exp. Med. 179 :751-756.
- [0783] Dai et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10892-10895.
- [0784] Eigenbrot et al. (1993) J. Mol. Biol. 229 :969-95.
- [0785] Gerard and Gerard(1991) Nature 349 :614-617.
- [0786] Gerard and Gerard(1994) Ann. Rev. Immunol. 12 :775-808.
- [0787] Hansen and Balthasar(2002) Thromb. Haemost. 88 :898-899.
- [0788] Hendrickson et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23 :522-529.
- [0789] Ji et al. (2002) Immunity 16 :157-168.
- [0790] Jones et al. (1986) Nature 321 :522-525.
- [0791] Jose et al. (1994) J. Exp. Med. 179 :881-887.
- [0792] Kaneko et al. (1995) Immunology 86 :149-154.
- [0793] Kavanaugh et al. (1991) J. Immunol. 146 :4149-4156.
- [0794] Konteatis et al. (1994) Journal of Immunology 153 :4200-4205.
- [0795] Kouskoff et al. (1996) Cell 87 :811-822.
- [0796] Kozlov et al. (2004) Biopolymers 73 :621-630.
- [0797] Kyburg and Corr (2003) Springer Semin Immunopathol. 25 :79-90.
- [0798] Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8 :3988-3996.
- [0799] Lee et al. (2002) Science 297 :1689-1692.
- [0800] Lee et al. (2006) Nat. Biotech. 24 :1279-1284.
- [0801] Lowenstein et al. (2006) Transplant International 19 :927-936
- [0802] Martin et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :9268-72.
- [0803] Mayo and Curnutte(1990) Methods Enzymol. 186 :567-75.
- [0804] Morgan et al. (1993) Journal of Immunology 151 :377-388.
- [0805] Murdoch and Finn(2000) Blood 95 :3032-3043.
- [0806] Needleman and Wunch(1970) J. Mol Biol. 48 :444-453.
- [0807] Neote et al. (1993) Cell 72 :415-425.
- [0808] Niemeyer et al. (2003) Nucl. Acids Res. 31 :e90.
- [0809] Nisihara et al. (2001) J. Immunol. 167 :3266-3275.

- [0810] Pellas et al. (1998) J. Immunology 160 :5616-5621.
- [0811] Preithener et al. (2006) Mol Immunol 43 :1183-1189.
- [0812] Pulito et al. (1996) J. Immunol. 156 :2840-50.
- [0813] Queen et al. (1986) Immunol. Rev. 89 :49-68.
- [0814] Shopes (1992) J. Immunol. 148 :2918-2922.
- [0815] Solomon et al. (2005) Eur J Immunol. 35 :3064-3073.
- [0816] Stevenson et al. (1989) Anti-Cancer Drug Design 3 :219-230.
- [0817] Ulmer et al. (1993) Science 259 :1745-1748.
- [0818] Van Damme et al. (1992) J. Exp. Med. 176 :59-65.
- [0819] Van Meerten et al. (2006) Clin Cancer Res 12 :4027-4035.
- [0820] Van Riper et al. (1993) J. Exp. Med. 177 :851-856.
- [0821] Verhoeyen et al. (1988) Science 239 :1534-1536.
- [0822] Vitetta (1993) Immunol. Today 14 :252.
- [0823] Vitetta et al. (1987) Science 238 :1098-1104.
- [0824] Watanabe et al. (1995) J. Immunol. Meth. 185 :19-29.
- [0825] Williams et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :2726-2730.
- [0826] Wipke and Allen (2001) J Immunol. 167 :1601-1608.
- [0827] Wolff et al. (1993) Cancer Research, 53 :2560-2565.
- [0828] Wu and Wu (1987) J. Biol. Chem. 262 :4429-4432.
- [0829] Zachariae et al. (1990) J. Exp. Med. 171 :2177-2182.

[0001]

序列表

<110> G2炎症私人有限公司 (G2 Inflammation Pty Limited)
 <120> 人源化抗-C5aR抗体
 <130> P35420FRAC2
 <140> PCT/AU2009/000184
 <141> 2009-02-19
 <150> US 61/066,539
 <151> 2008-02-20
 <160> 59
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 1
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asn Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 <210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

[0002]

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 3
gatgttgatga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaaa tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttctc actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttgttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggaa ctgaaa 336

<210> 4
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 4
caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggigaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggaaagg gtcttgagtg gattggacgg atttatcctg gagatggaga tactaagtac 180
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagattccta 300
cttattagta cggtaacagc cgttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360
tca 363

<210> 5
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

[0003]

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Trp Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Glx Leu Leu Ile Tyr Ala Leu Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

[0004]

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Glx Ala
 85 90 95
 Leu Gln Ala Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 8
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Phe Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Gln Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Arg
 20 25 30
 Asx Gly Asx Thr Tyr Leu Asx Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Leu Ser Ser Tyr Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Asp Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Thr Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Thr Glx Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glx Ile Lys
 100 105 110
 <210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 9
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Gly Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln

[0005]

	85	90	95
Arg Leu Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	100	105	110
Arg			
<210>	10		
<211>	100		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	10		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	1	5	10
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser	20	25	30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala	85	90	95
Leu Gln Thr Pro	100		
<210>	11		
<211>	100		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	11		
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly	1	5	10
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser	20	25	30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly	85	90	95

[0006]

Ile His Leu Pro
100

<210> 12
<211> 100
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ile Gln Leu Pro
100

<210> 13
<211> 100
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ile Gln Leu Pro
100

[0007]

<210> 14
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人轻链可变序列的共有序列

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)
 <223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 20 25 30
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 50 55 60
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys

<210> 15
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Ser
 20 25 30
 Ala Ile Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Val Pro Met Phe Gly Pro Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

[0008]

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly

<210> 16
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 17
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

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

Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asp Ser
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Ala Ser Phe Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys

[0009]

	85	90	95
Ala Lys			
<210>	18		
<211>	98		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	18		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
	20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ser Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95

Ala Arg

<210>	19
<211>	98
<212>	PRT
<213>	智人
<400>	19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1	5
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
	20
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35
Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu	
	50
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65	70
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85

Ala Arg

[0010]

<210> 20
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 20

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

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

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Thr

<210> 21
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 22
 <211> 98
 <212> PRT

[0011]

<213> 智人

<400> 22

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 23

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

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

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

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr

<210> 24

<211> 71

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人重链可变序列的共有序列

[0012]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(70)
<223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<400> 24

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
50 55 60

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
65 70

<210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Asp Tyr Trp Gly Glx Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
1 5 10

<210> 28
<211> 13

[0013]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
1 5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人重链结合序列的共有序列
<400> 30

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 31
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗体片段

<400> 31

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

[0014]

<220>
 <223> 人源化抗体片段
 <400> 32
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗体片段
 <400> 33
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 34
 <211> 121
 <212> PRT

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体片段

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体片段

<400> 35

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

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

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

[0016]

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗体片段

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 350
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr
20 25 30

Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe
35 40 45

Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp Val Thr Ala Phe
50 55 60

Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val
65 70 75 80

[0017]

Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile
 85 90 95
 Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu
 100 105 110
 Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala
 115 120 125
 Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys
 130 135 140
 Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Trp Gly Leu Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val
 165 170 175
 Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
 180 185 190
 Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg Leu Val
 195 200 205
 Leu Gly Phe Leu Trp Pro Leu Leu Thr Leu Thr Ile Cys Tyr Thr Phe
 210 215 220
 Ile Leu Leu Arg Thr Trp Ser Arg Arg Ala Thr Arg Ser Thr Lys Thr
 225 230 235 240
 Leu Lys Val Val Val Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Phe Trp Leu
 245 250 255
 Pro Tyr Gln Val Thr Gly Ile Met Met Ser Phe Leu Glu Pro Ser Ser
 260 265 270
 Pro Thr Phe Leu Leu Leu Asn Lys Leu Asp Ser Leu Cys Val Ser Phe
 275 280 285
 Ala Tyr Ile Asn Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Val Val Ala Gly
 290 295 300
 Gln Gly Phe Gln Gly Arg Leu Arg Lys Ser Leu Pro Ser Leu Leu Arg
 305 310 315 320
 Asn Val Leu Thr Glu Glu Ser Val Val Arg Glu Ser Lys Ser Phe Thr
 325 330 335
 Arg Ser Thr Val Asp Thr Met Ala Gln Lys Thr Gln Ala Val
 340 345 350
 <210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 本发明的抗体结合的C5aR表位

[0018]

<400> 38

Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
1 5

<210> 39

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 本发明人重链可变区的共有序列

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

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

[0019]

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 42
<211> 327
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

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

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

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

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

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

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

[0020]

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

94

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	65	70	75
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110
Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	115	120	125
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	130	135	140
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	145	150	155
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	165	170	175
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	180	185	190
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	195	200	205
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	210	215	220
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	225	230	235
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	245	250	255
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	260	265	270
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	275	280	285
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	290	295	300
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	305	310	315
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										325		

[0022]

<210> 44
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0023]

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 45
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 45
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

[0024]

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 46
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化RNOK203VL序列

<400> 46

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

[0025]

<220>
<223> KV2F-人来源的VLCD18-Q序列

<400> 47

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Thr
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Phe Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 48
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 共有序列h7F3VkCons

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (41)..(41)
<223> Xaa = Tyr, Cys 或 Phe

<400> 48

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Xaa Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

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

[0026]

100 105 110

<210> 49
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hVhFW 共有框架序列

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (41)..(41)
 <223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa = 对应于不同CDR的不同氨基酸的变化数量

<400> 49

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro
 20 25 30

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 35 40 45

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 50 55 60

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 65 70 75 80

Val Ser Ser

<210> 50
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人SGI-VH序列

<400> 50

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser His Trp
 20 25 30

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

[0027]

Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
50 55 60

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

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

Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人生殖细胞系HG3序列

<400> 51

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 52
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化抗体片段的核酸

<400> 52
gatgttgatga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggaga gccagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgct cacagtaatg gaaacaccta ttgcattgg 120

[0028]

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgcttt	180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttgttcct	300
ctcaccttcg gtcaggggac caagctggaa atcaaa	336

<210> 53
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化抗体片段的核酸

<400> 53	
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca ctcttgaca gccagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagccttgtc cacagtaatg gaaacaccta tttgcattgg	120
tgcctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgcttt	180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttgttcct	300
ctcaccttcg gtcaggggac caagctggaa atcaaa	336

<210> 54
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化抗体片段的核酸

<400> 54	
gatgttgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttgaca gccagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagccttgtc cacagtaatg gaaacaccta tttgcattgg	120
ttccagcagc ggccaggcca gtctccacgg ctctgatct acaaagtttc caaccgcttt	180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttgttcct	300
ctcaccttcg gtggagggac caagctggaa atcaaa	336

<210> 55
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 编码人源化抗体片段的核酸

<400> 55	
caggttcagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagatt	60
tcctgcaagg ctcttgcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaggcaggct	120
cctggaaagg gtctagagtg gatgggacgg atttatcctg gagatggaga tactaagtac	180
aatgggaagt tcaagggcag ggtcacaatc actgcagacg aatccaccag cacagcctac	240
atggaactca gcagcctgag atctgaggac tctgccgtct atttctgtgc aagattcctg	300
cttattagta ctgtgacagc cgtcgactac tggggccaag gcaccactgt cacagtctcc	360
tca	363

[0029]

<210> 56
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化抗体片段的核酸

<400> 56
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcttgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaagcaggct 120
cctggacagg gtctagagtg gataggacgg atttattcctg gagatggaga tactaagtac 180
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacaatg actgcagaca catccaccag cacagcctac 240
atggaactca gcagcctgag atctgaggac actgccgtct attactgtgc aagattcctg 300
cttattagta ctgtgacagc cgtcgactac tggggccaag gcacccttgt cacagtctcc 360
tca 363

<210> 57
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码人源化抗体片段的核酸

<400> 57
caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcttgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaggcaggct 120
cctggacagg gtctagagtg gatgggacgg atttattcctg gagatggaga tactaagtac 180
aatgggaagt tcaagggcag ggtcacaatg actgcagaca catccaccag cacagtctac 240
atggaactca gcagcctgag atctgaggac actgccgtct attactgtgc aagattcctg 300
cttattagta ctgtgacagc cgtcgactac tggggccaag gcacccttgt cacagtctcc 360
tca 363

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C5aR的第二个细胞外环

<400> 58

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

<210> 59
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人C5aR的N-端部分

<400> 59

Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr
1 5 10 15

[0030]

Pro Val Asp Lys Thr
20

	10	20	30	40	50	60
KV2F_human	DVMTQSPSLSPVTLGQPASISC	RSSQSILVYS-DGNTYLN	WFQQRPGQSPRLIY	KVSNRDS		
KV2E_human	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC	RSSQSILLHS-NGYNYLD	WYLQKPPQSPQLLIY	LGSNRAS		
KV2D_human	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC	RSSQSILLHS-DGFDYLN	WYLQKPGQSPZLLIY	ALSNRAS		
KV2B_human	DVMTQSPFLPLPVTLGEPASIQ	RSSQSLVYR-BGBTYLB	WYLQKPGQSPPELLIY	LSSYRDS		
KV2A_human	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISC	RSSQSILLDSGDGNTYLN	WYLQKAGQSPQLLIY	TLSYRAS		
X12691	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC	RSSQSILLHS-NGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LGSNRAS		
U41644	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	KSSQSILLHS-DGKTYLY	WYLQKPGQSPQLLIY	EVS NRFS		
U41645	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	KSSQSILLHS-DGKTYLY	WYLQKPGQSPQLLIY	EVSSRFS		
M31952	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	KSSQSILLHS-DGKTYLY	WYLQKPGQPPQLLIY	EVS NRFS		
hvkFW Cons	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC	-----	WYLQKPGQSPQLLIY	-----		
		CDR-L1		CDR-L2		

	70	80	90	100	112
KV2F_human	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MQGTHWSWT	FGQGTKVEIK	112	
KV2E_human	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MQGLQTPQT	FGQGTKVEIK		
KV2D_human	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MZALOAPIT	FGQGTREIK		
KV2B_human	GVPDRFSDSGGTDTTLKITRVAEDVGVIYC	MQATZSPYT	FGQGTKLZIK		
KV2A_human	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVAEDVGVIYC	MORLEIPYT	FGQGTKLEIR		
X12691	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MQALQTP			
U41644	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MQSIQLP			
U41645	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MQGIHLF			
M31952	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	MQSIQLP			
hvkFW Cons	GVPDRFSGSGGTDTTLKISRVEAEDVGVIYC	-----	FGQGTKLEIK		
		CDR-L3			

图 1

	10	20	30	40	49
HV1A _v _HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKAS	GGTFSRSAI I	WVRQAPGQGLEWMG		
HV1B _v _HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFNSYYMH	WVRQAPGQGLEWMG		
HV1C _v _HUMAN	QTQLVQSGAEVRKPGASVRVSKAS	GYTFIDSYIH	WIRQAPGHGLEWVG		
HV1G _v _HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTGYIMH	WVRQAPGQGLEWMG		
M99641	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG		
M99642	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVS	GYTLTSLSMH	WVRQAPGKGLEWMG		
X62109	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTSYAMH	WVRQAPGQRLWMG		
X92343	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTSYIMH	WVRQAPGQGLEWMG		
Z12305	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVS	GYTFTDYIMH	WVQAPGKGLEWMG		
hVh _v FW Cons	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	-----	WVRQAPGQGLEWMG		
		CDR-H1			
	60	70	80	90	98
HV1A _v _HUMAN	GIVPMFGPPNYAQKFQG	RVTITADESTNTAYMELSSLRSED	TAFYFC	AG	
HV1B _v _HUMAN	I IINPSGGSTSYAQKFQG	RVTMTTRDTSTSTVIMELSSLRSED	TAVIYC	AR	
HV1C _v _HUMAN	WINPNSGGTNYAPRFQG	RVTMTRDASFSTAYMDLRLSLRSD	DSAVFYC	AK	
HV1G _v _HUMAN	RINPNSGGTNYAQKFQG	RVTSTRDTSISTAYMELSLRLSRSD	DTVVIYC	AR	
M99641	WISAYNGTNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELSLRLSRSD	DTAVIYC	AR	
M99642	GFDPEDEGETIY AQKFQG	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSED	TAVIYC	AT	
X62109	WINAGNGNTKYSQKFQG	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSED	TAVIYC	AR	
X92343	I IINPSGGSTSYAQKFQG	RVTMTTRDTSTSTVIMELSSLRSED	TAVIYC	AR	
Z12305	LVDPEDGETIYAEKFQG	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSED	TAVIYC	AT	
hVh _v FW Cons	-----	RVTMTTRDTSTSTAYMELSSLRSED	TAVIYC	--	
		CDR-H2			CDR-H3>

图 2a

	10
HV3T _j _HUMAN	DY WGQGT LVT VST
HV3K _j _HUMAN	DY WGQGT PVT VSS
HV3H _j _HUMAN	DY WGZGT LVT ISS
HV2I _j _HUMAN	DV WGQGT TTV VSS
HV1C _j _HUMAN	DV WGQGT TTV VSS
hVh _j FW Cons	-- WGQGT TTV VSS
<CDR-H3	

图 2b

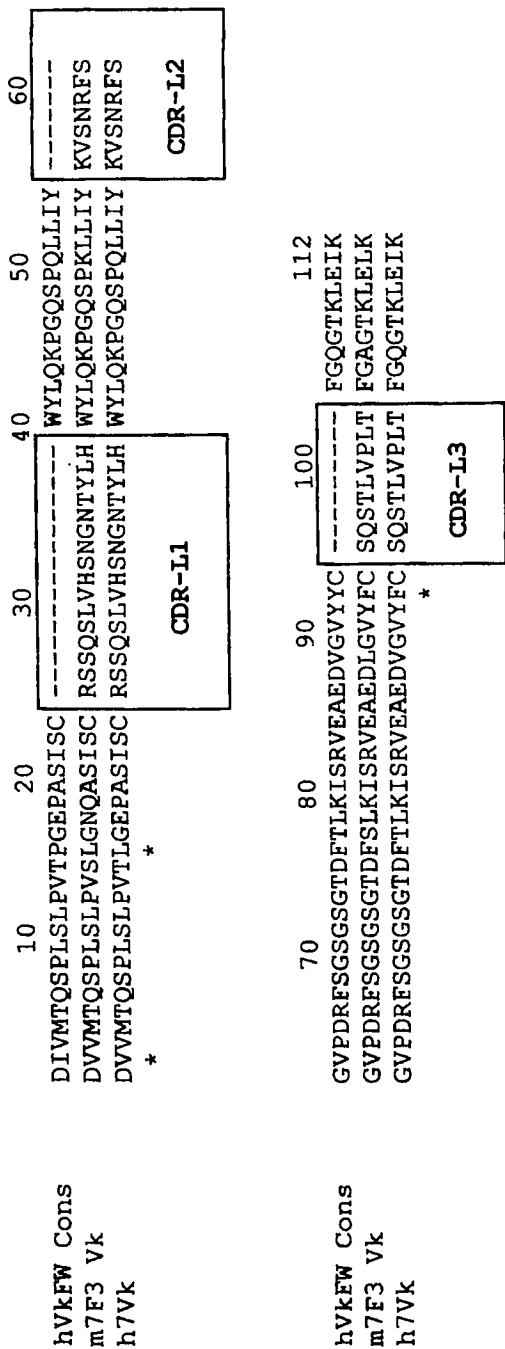


图 3

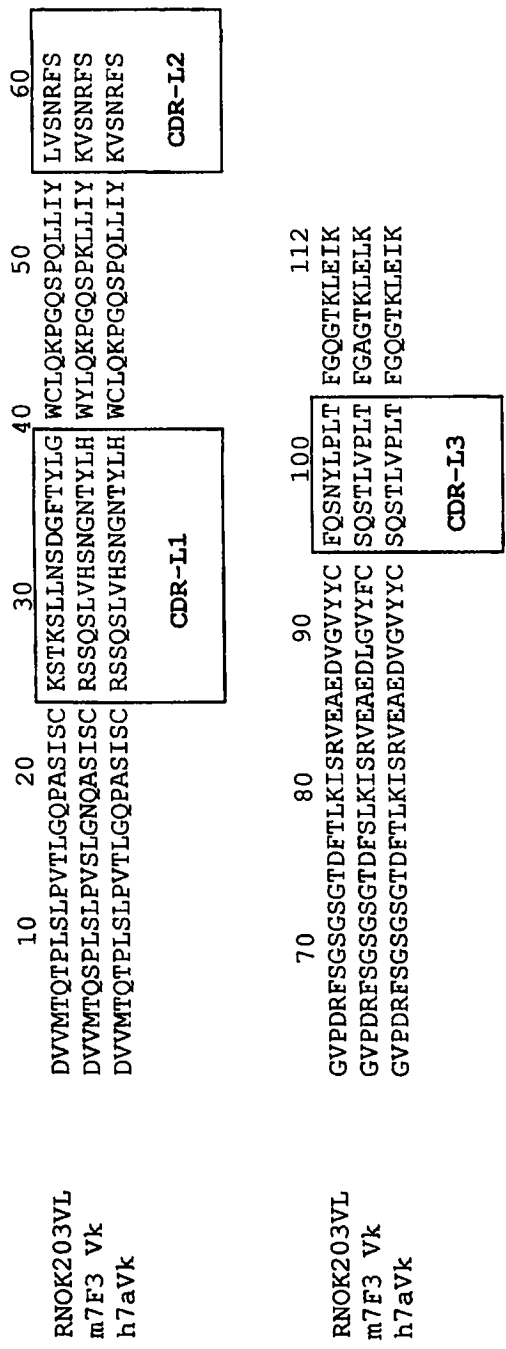


图 4

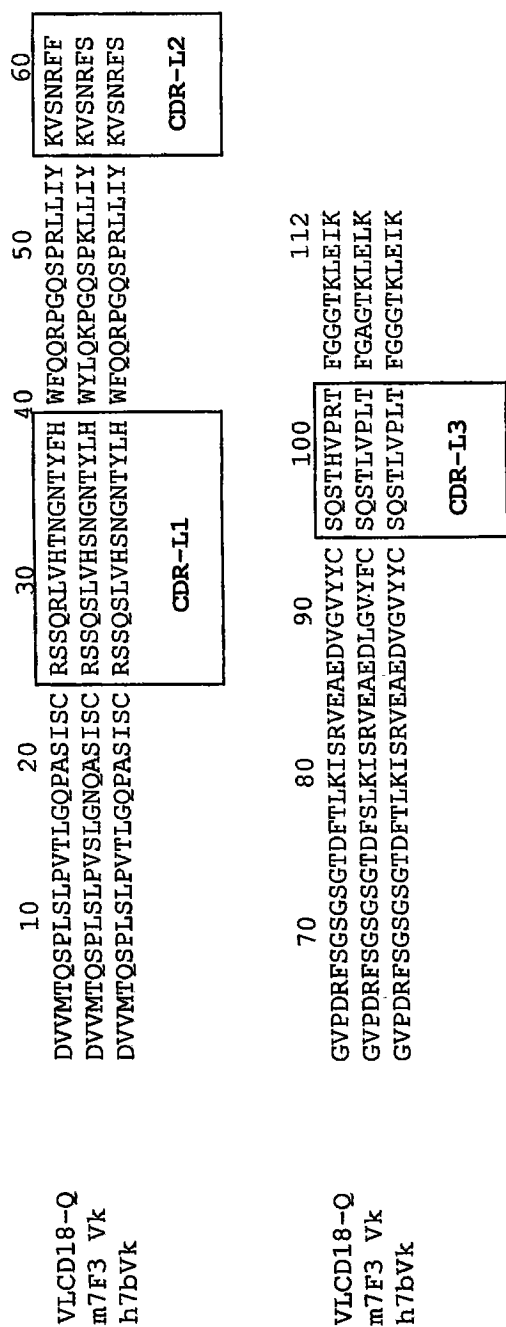


图 5

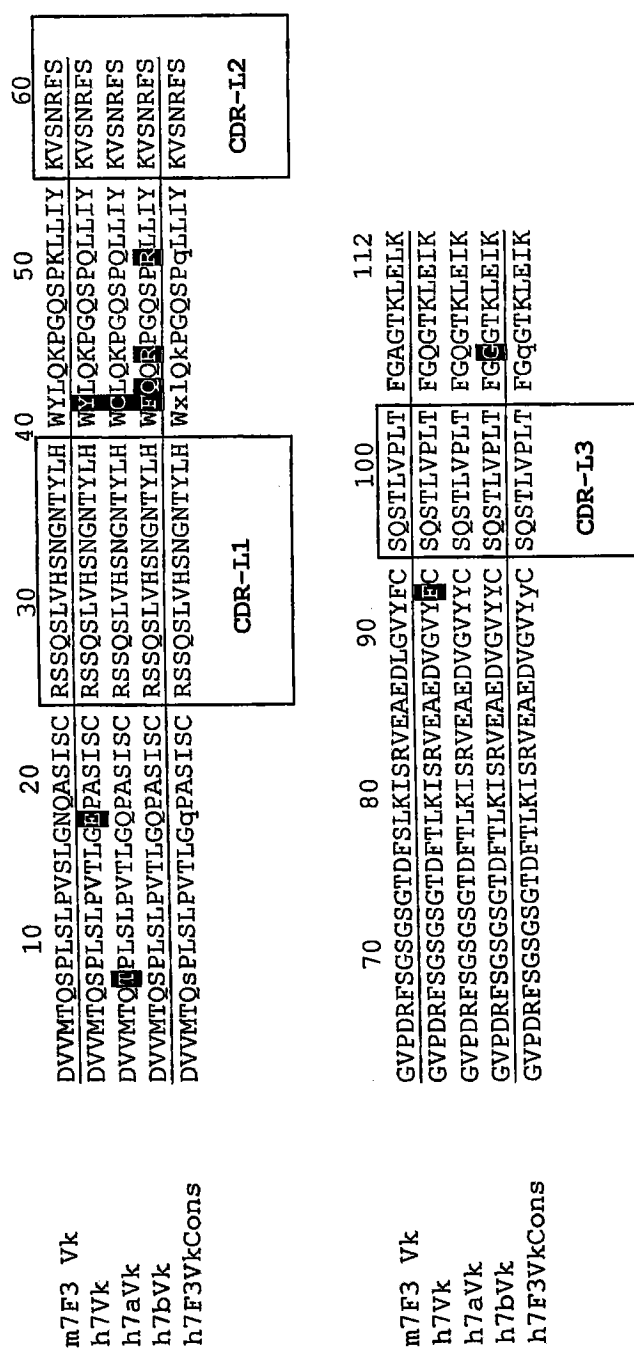


图 6

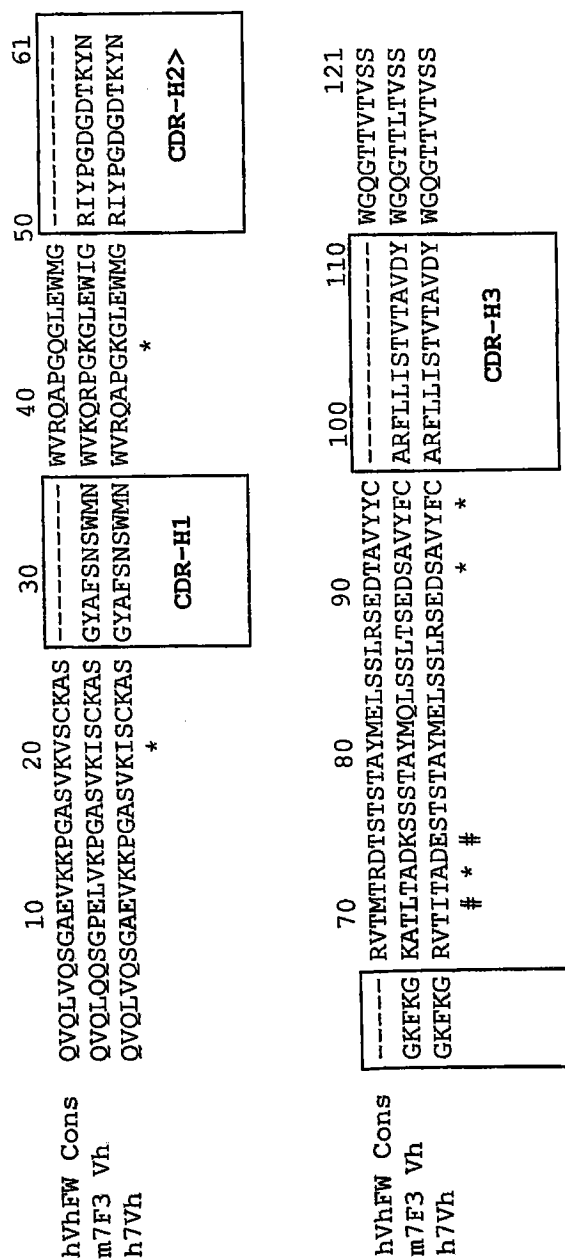


图 7

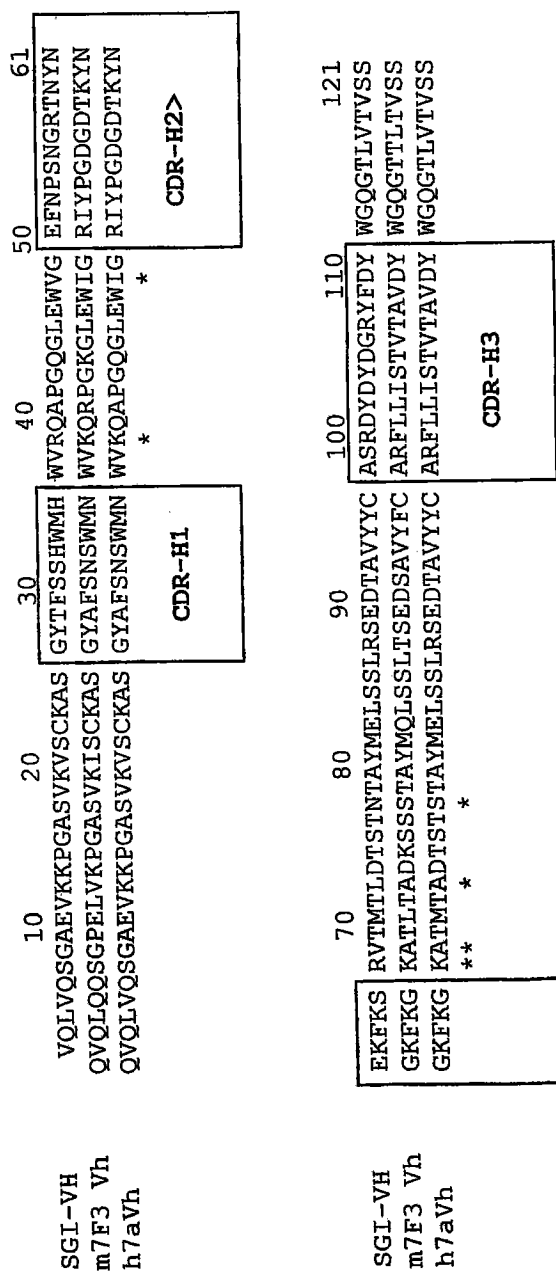


图 8

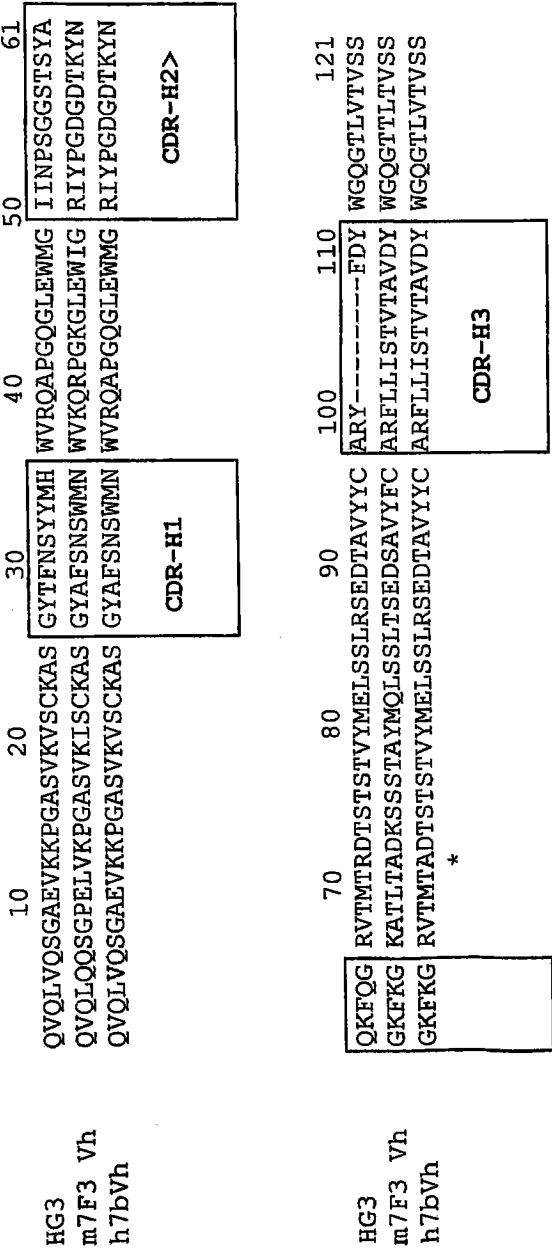


图 9

m7F3 Vh	10	20	30	40	50	61
h7Vh	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS	GYAFSNSWMN	WVKQRPKGKLEWIG	RIYPGDGDTKYN		
h7aVh	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS	GYAFSNSWMN	WVRQAPGKLEWmG	RIYPGDGDTKYN		
h7bVh	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKAS	GYAFSNSWMN	WVRQAPGQGLEWmG	RIYPGDGDTKYN		
h7F3VhCons	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKAS	GYAFSNSWMN	WVRQAPGQGLEWmG	RIYPGDGDTKYN		
		CDR-H1			CDR-H2>	

m7F3 Vh	70	80	90	100	110	121
h7Vh	GKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARFLLISTVTAVDY	WGQGTTLTVSS		
h7aVh	GKFKG	RVTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARFLLISTVTAVDY	WGQGTTLTVSS		
h7bVh	GKFKG	RAFTMTADTSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARFLLISTVTAVDY	WGQGTTLTVSS		
h7F3VhCons	GKFKG	RVTMTADTSTSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC	ARFLLISTVTAVDY	WGQGTTLTVSS		
			CDR-H3			

图 10

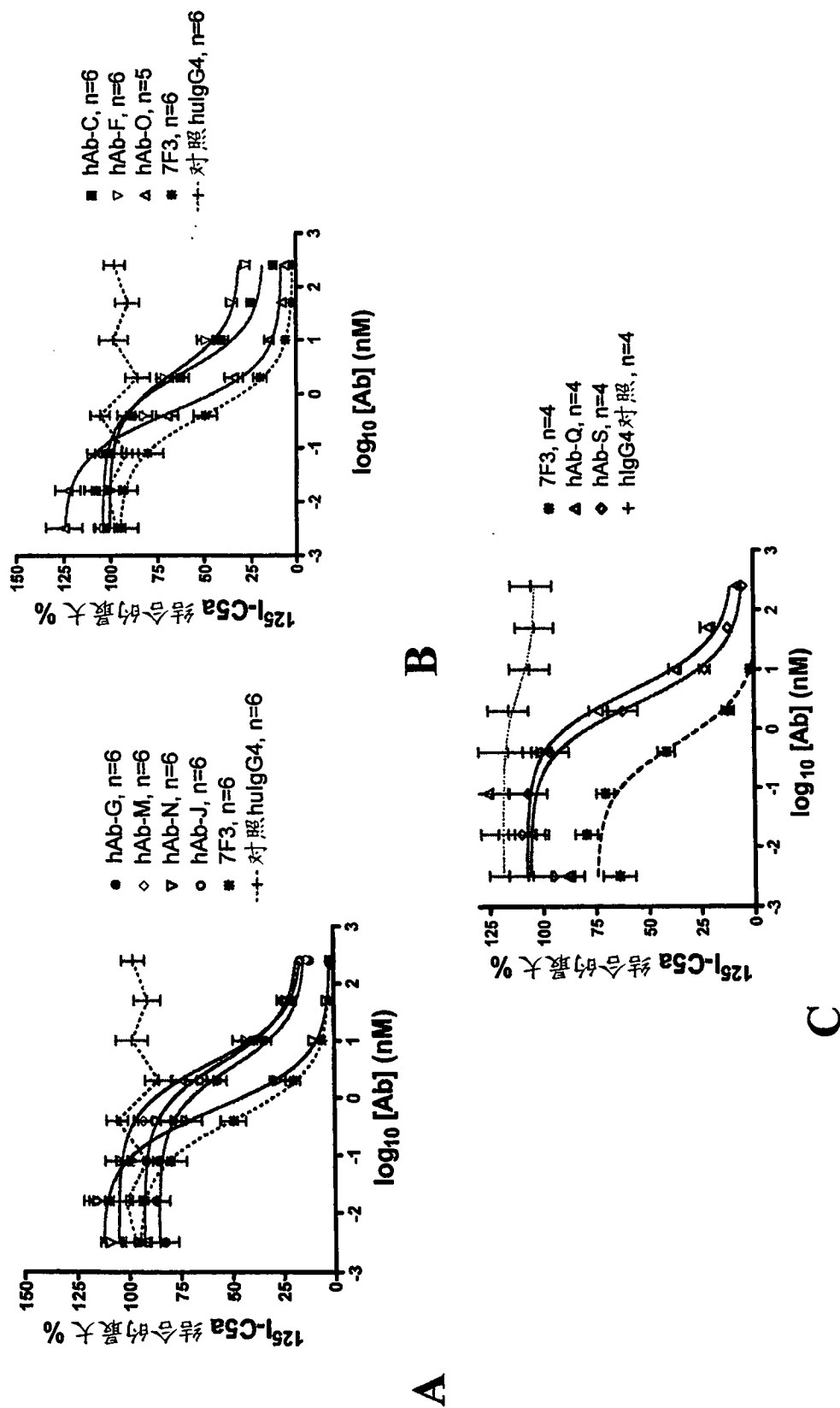


图 11

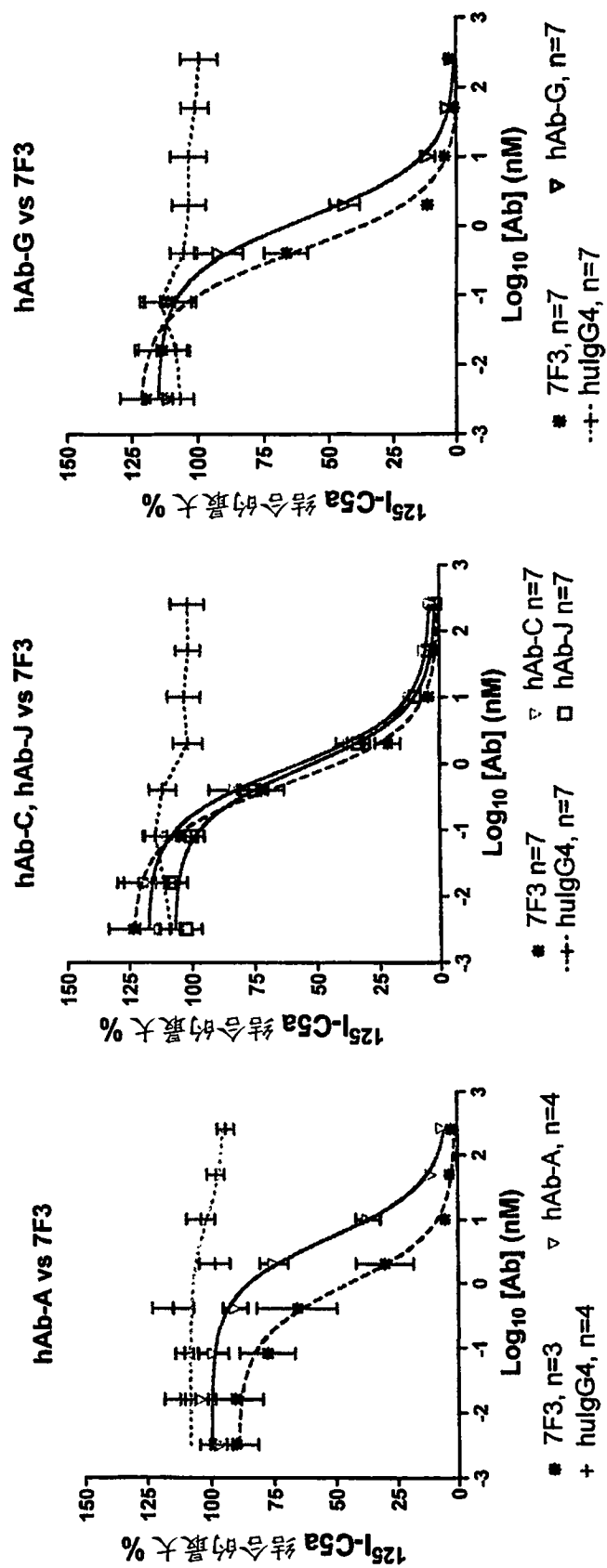


图 12a

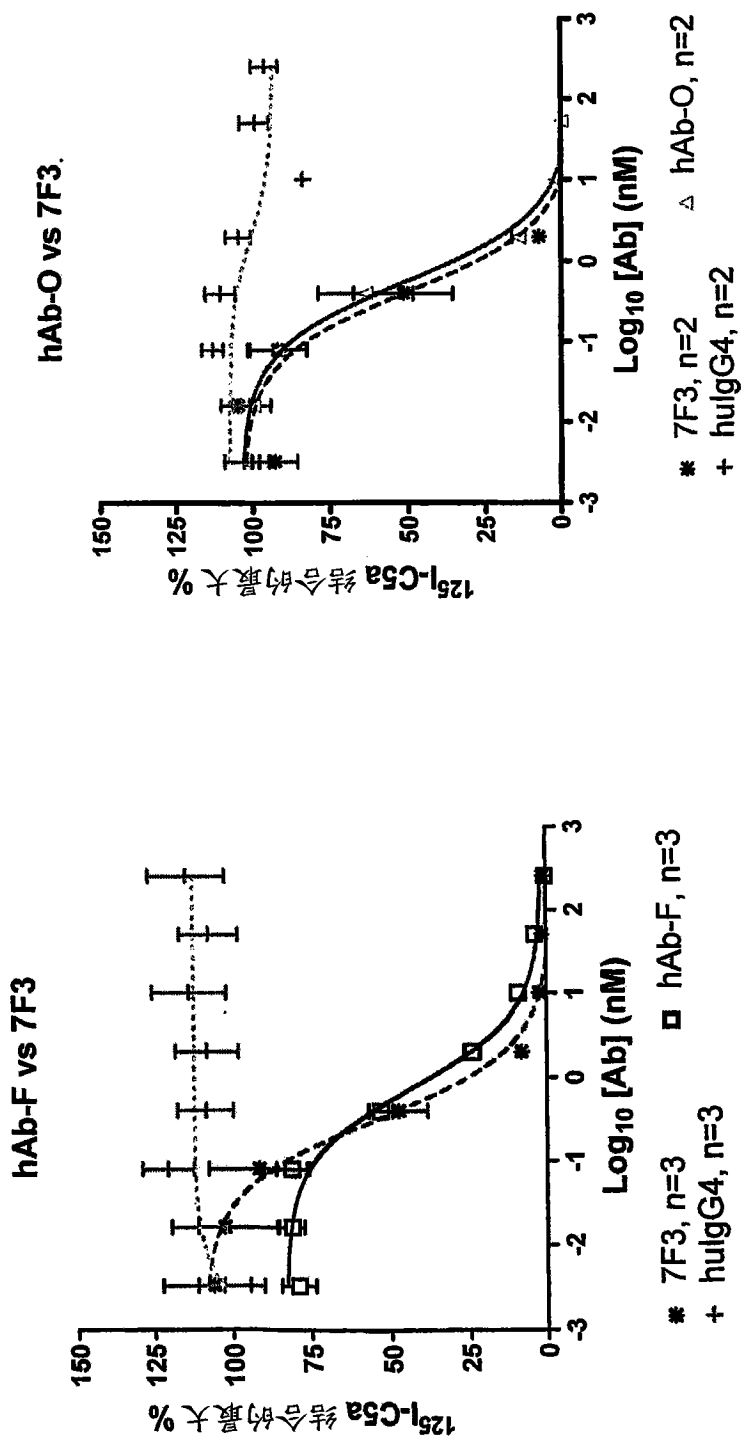


图 12b

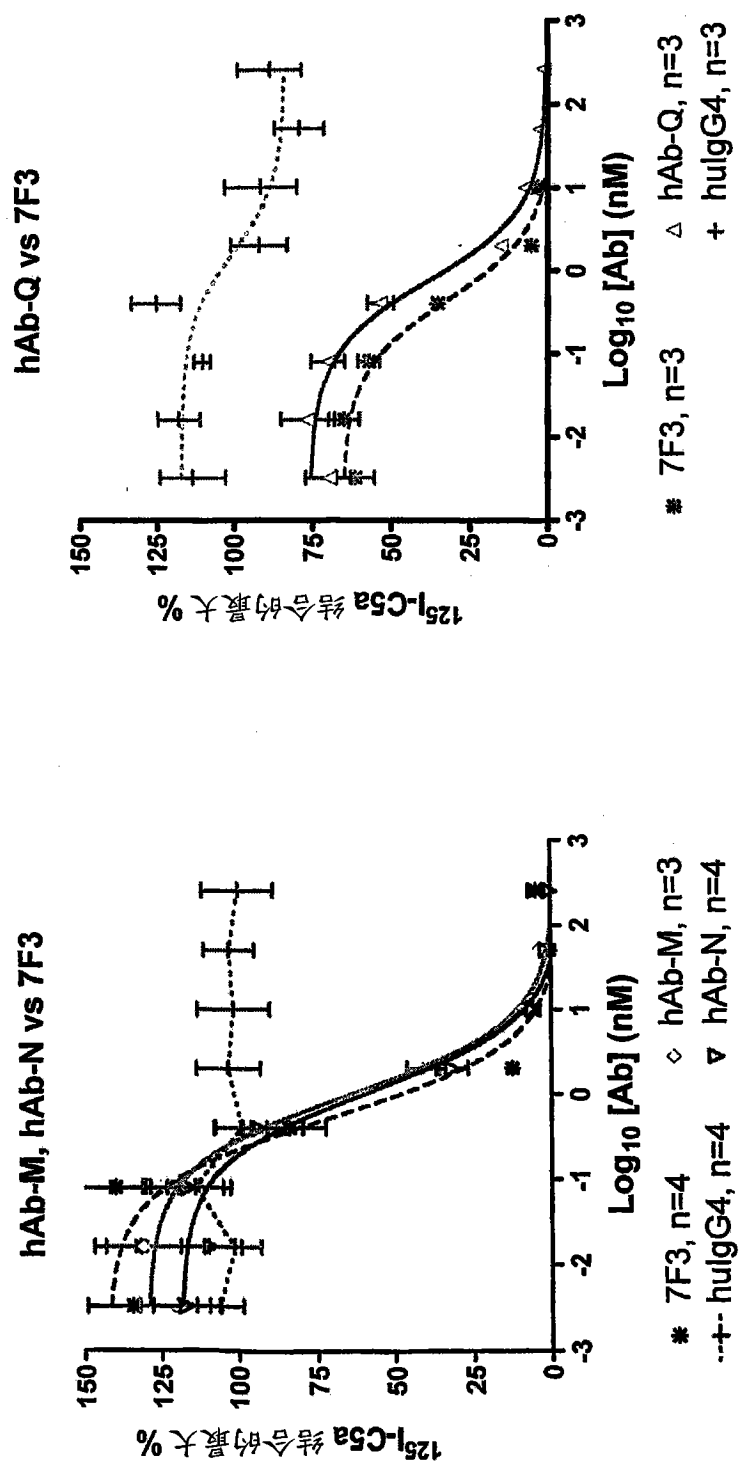


图 12c

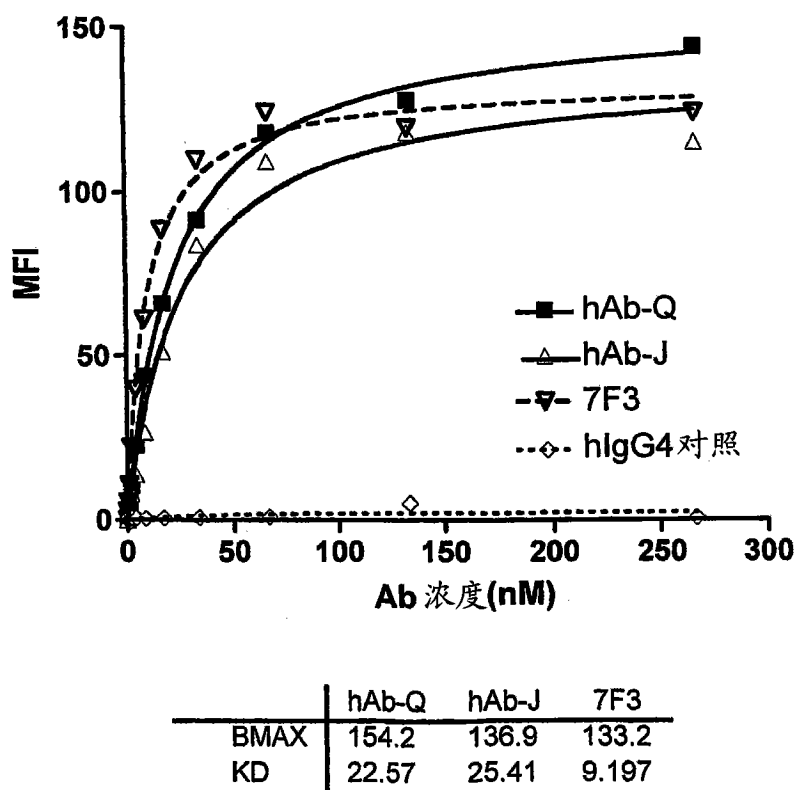
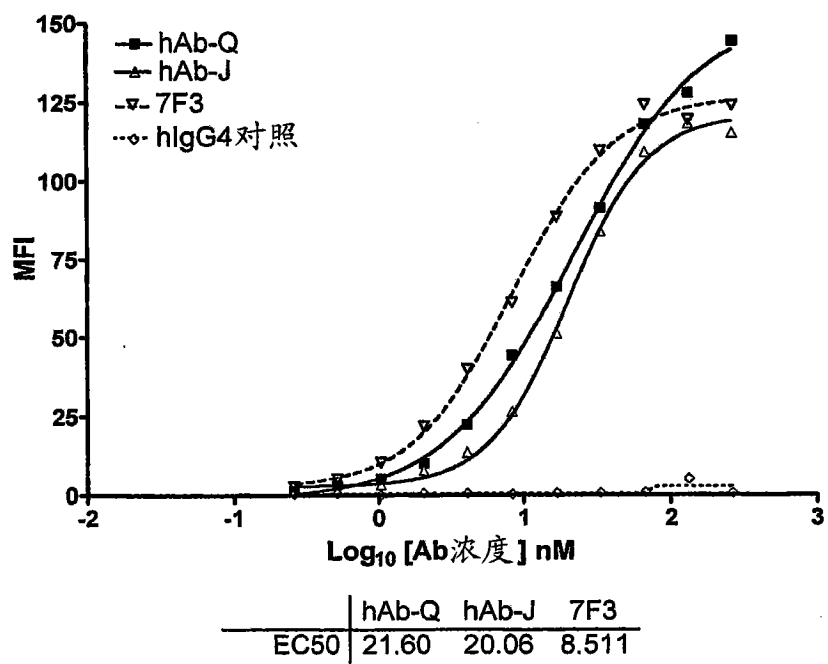


图 13

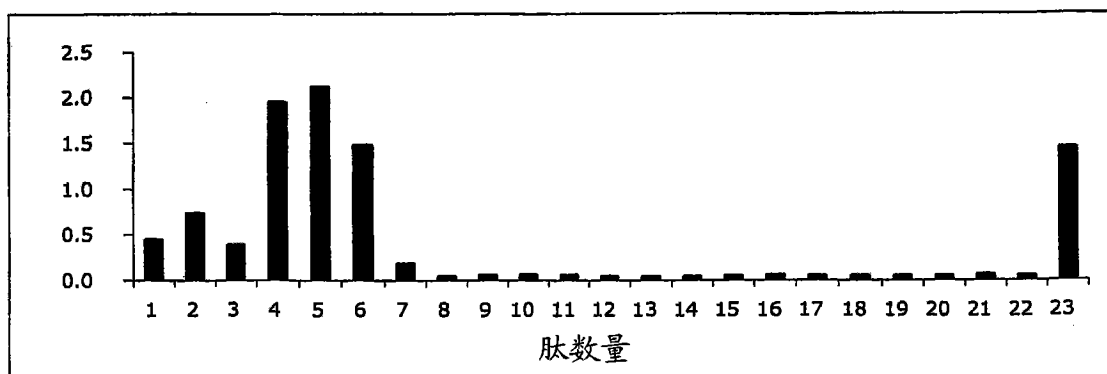
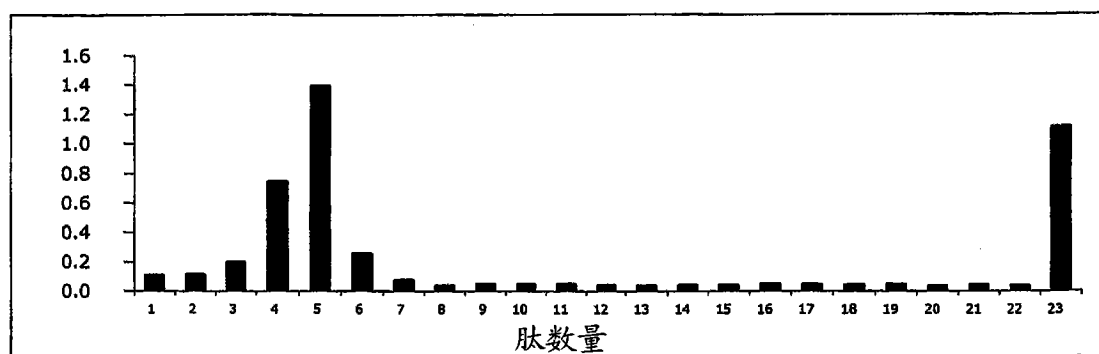
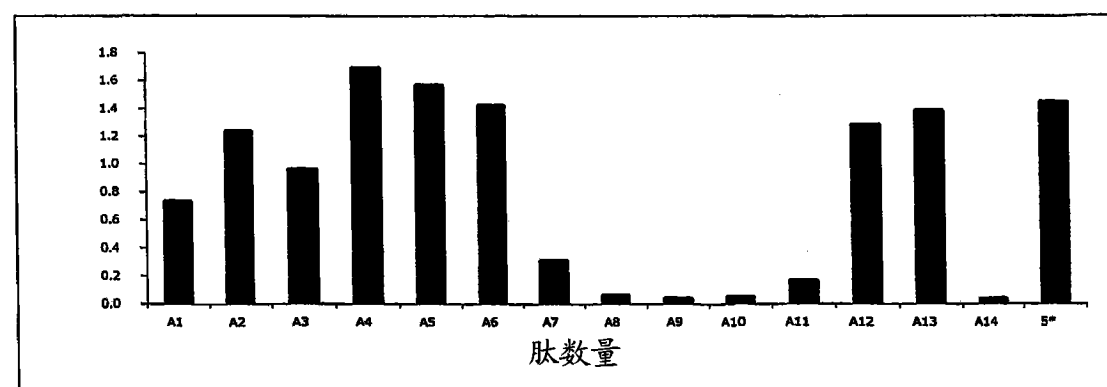
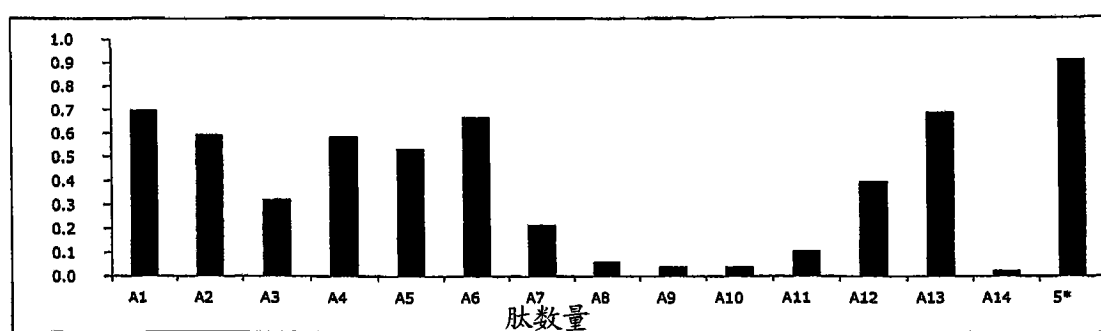
A**B****C****D**

图 14

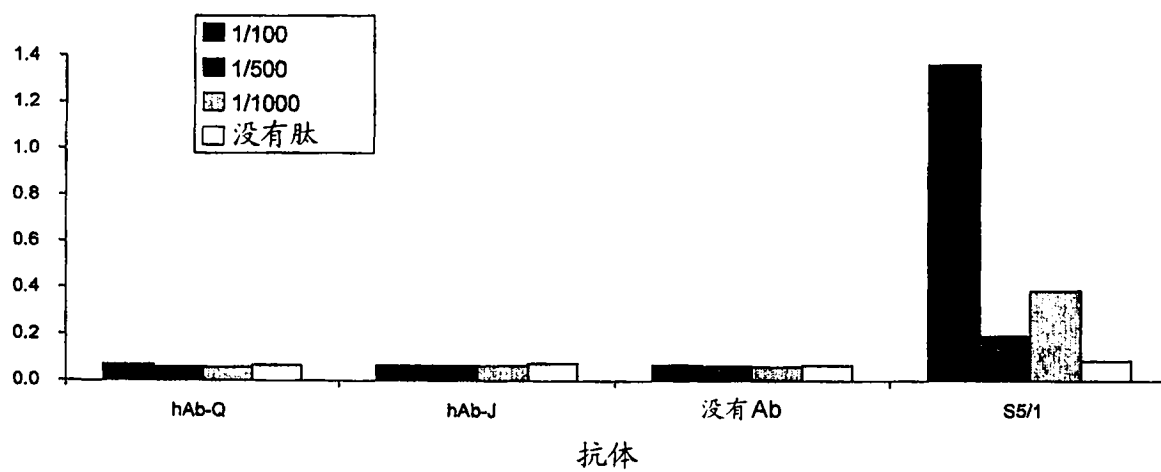


图 15

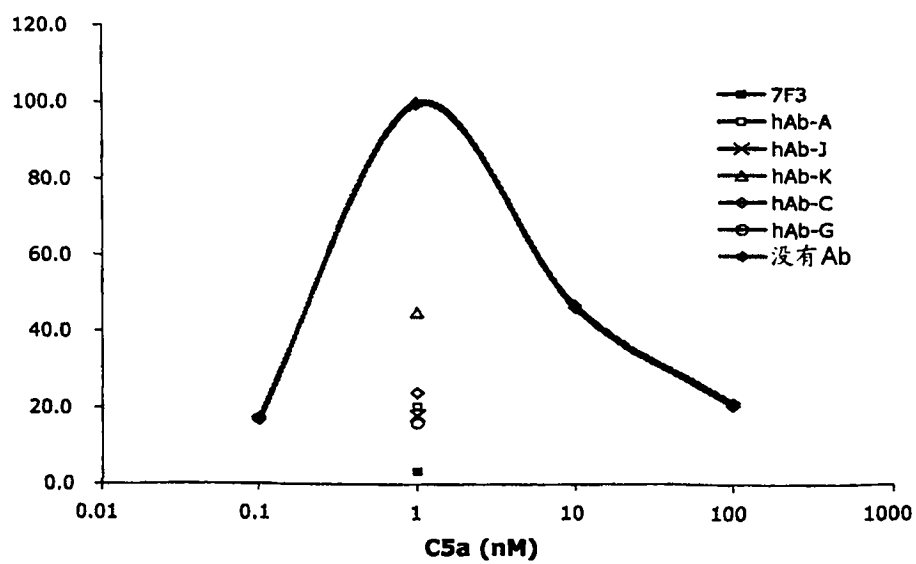


图 16

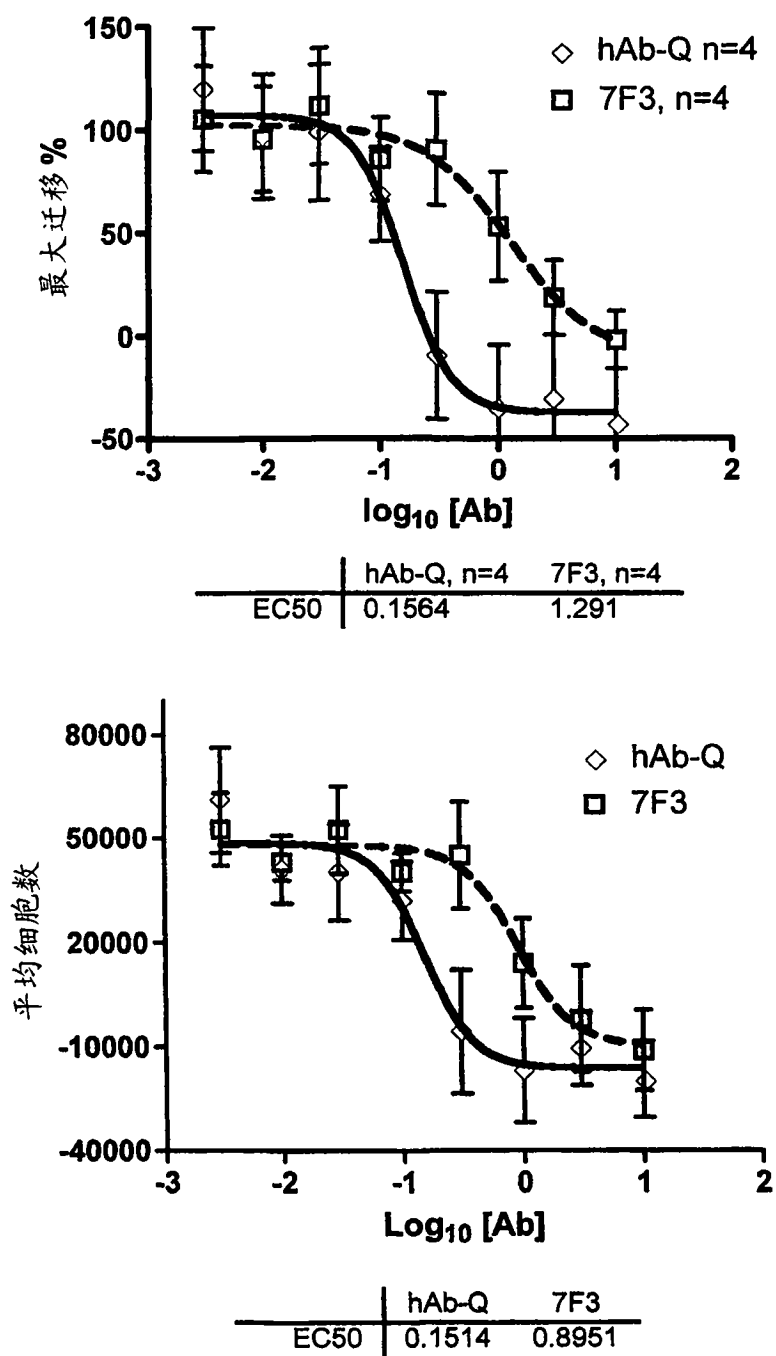


图 17

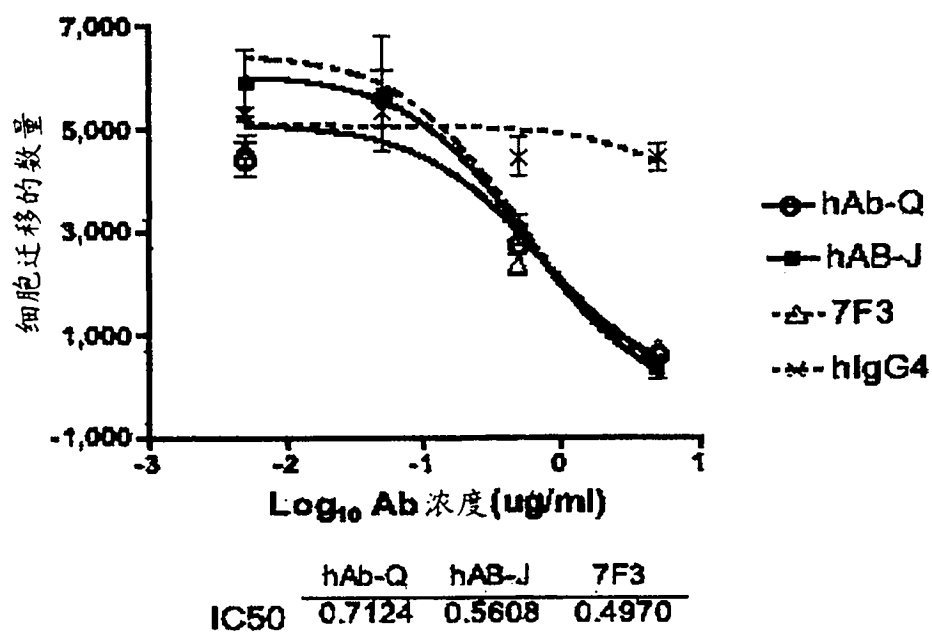


图 18

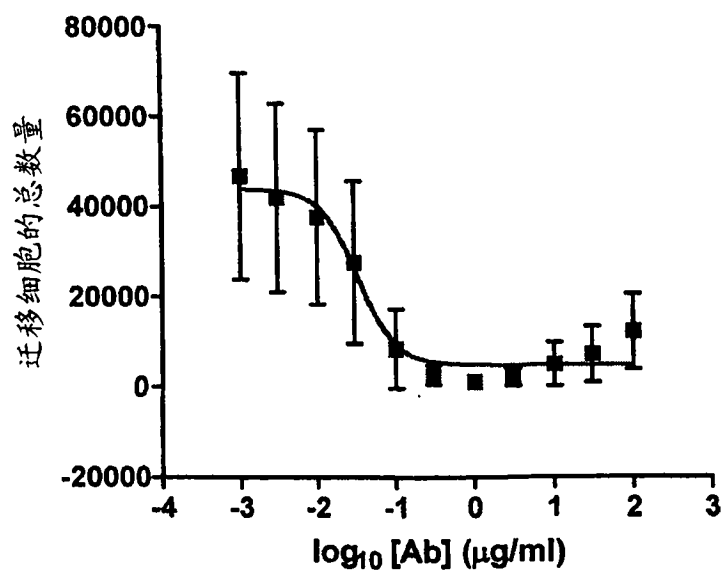


图 19

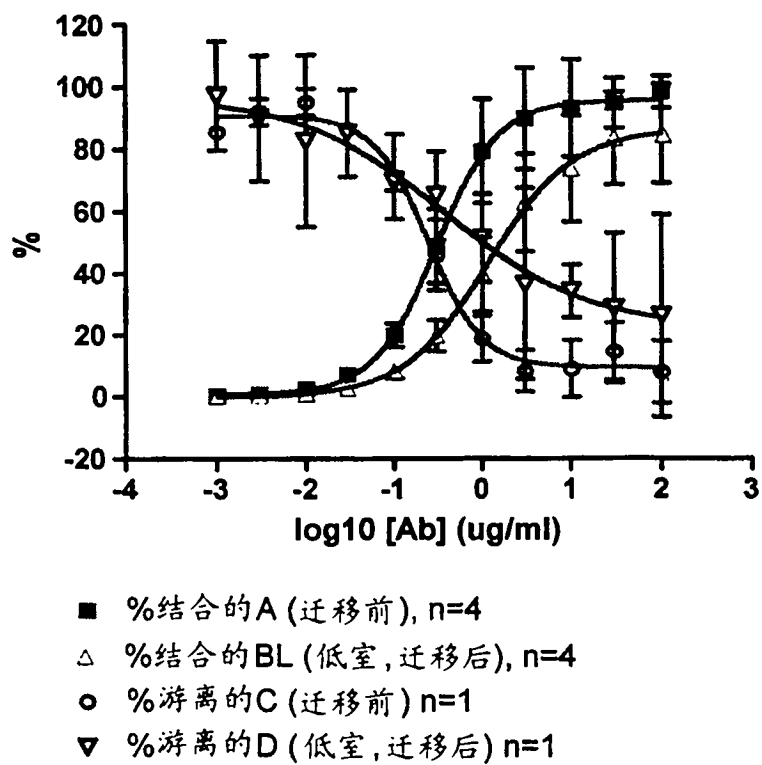


图 20

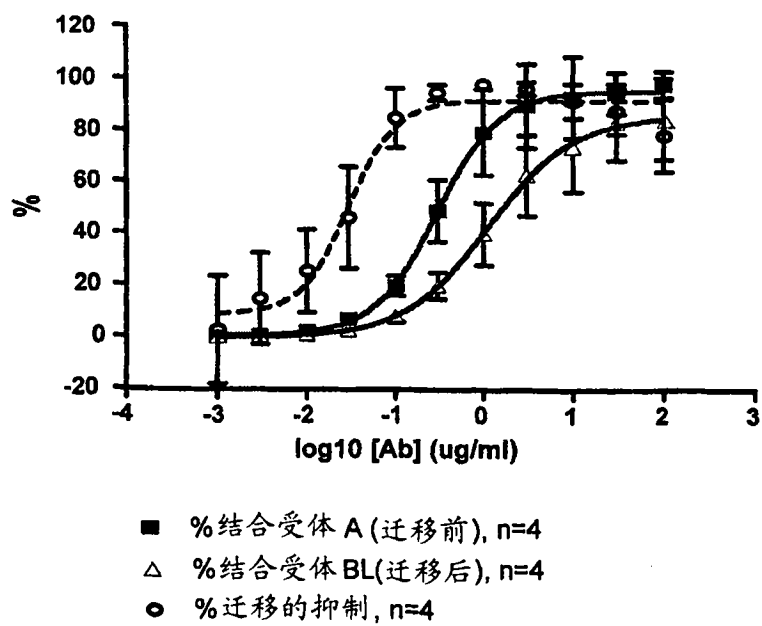


图 21

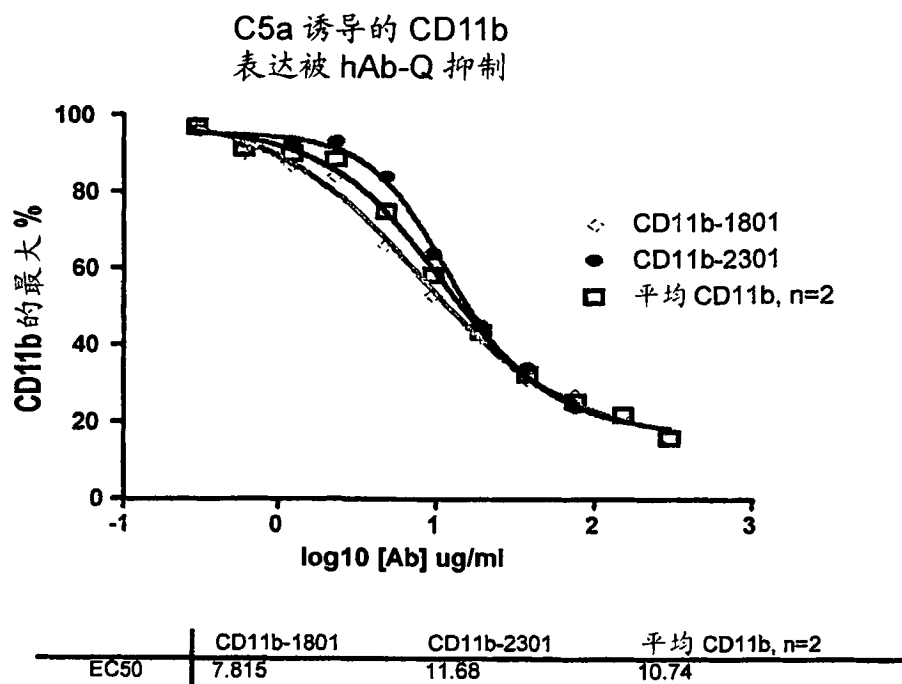


图 22

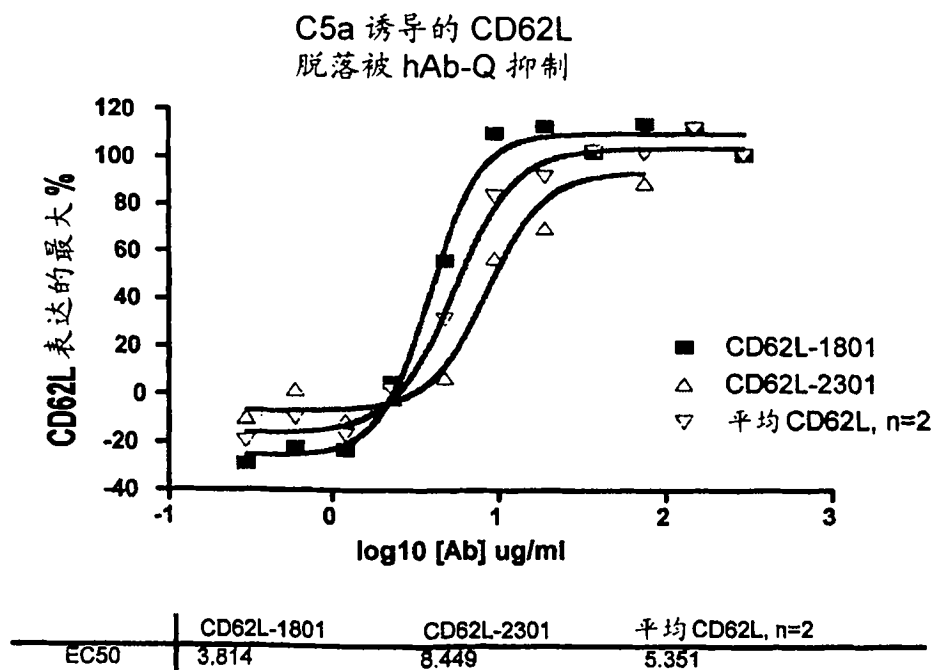


图 23

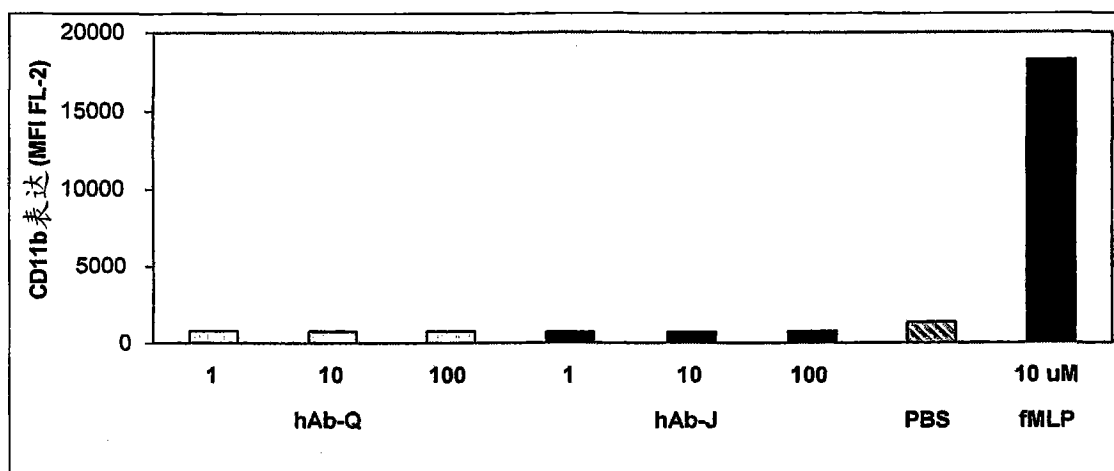
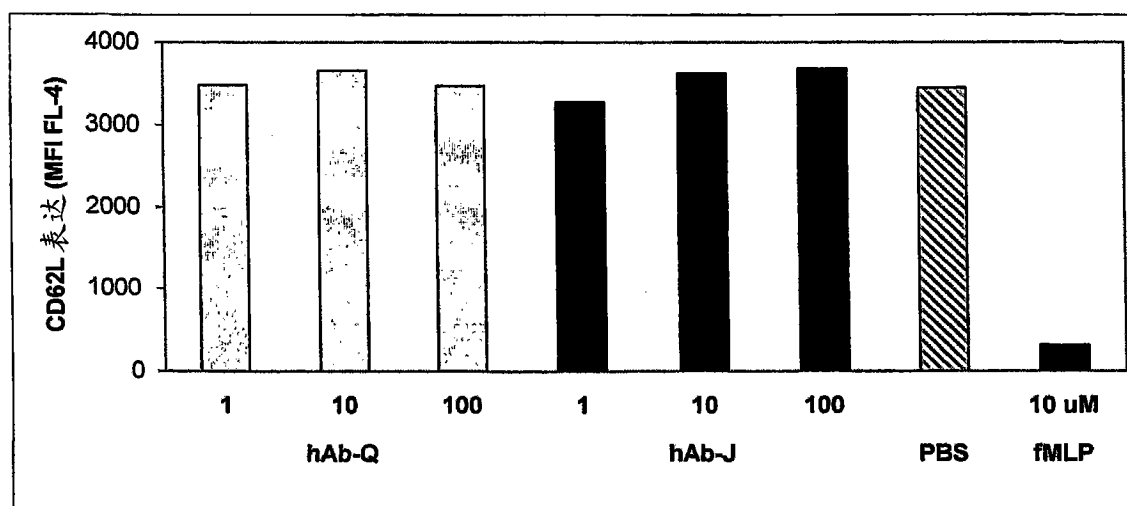
A**B**

图 24

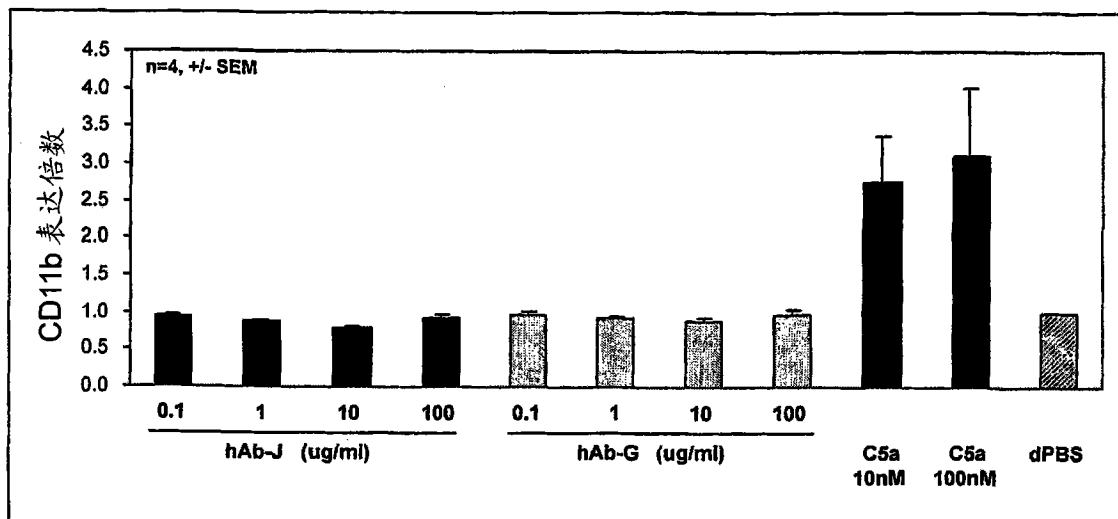
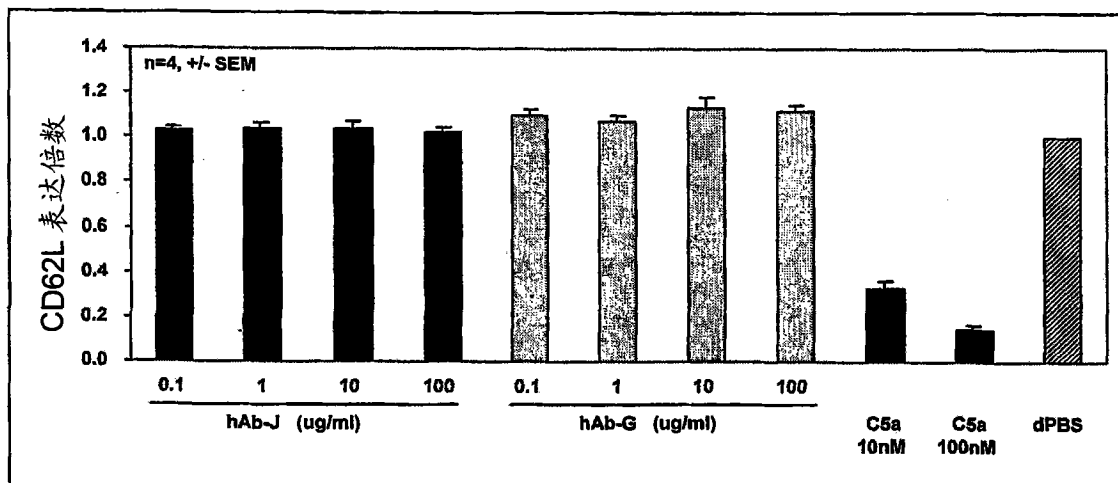
A**B**

图 25

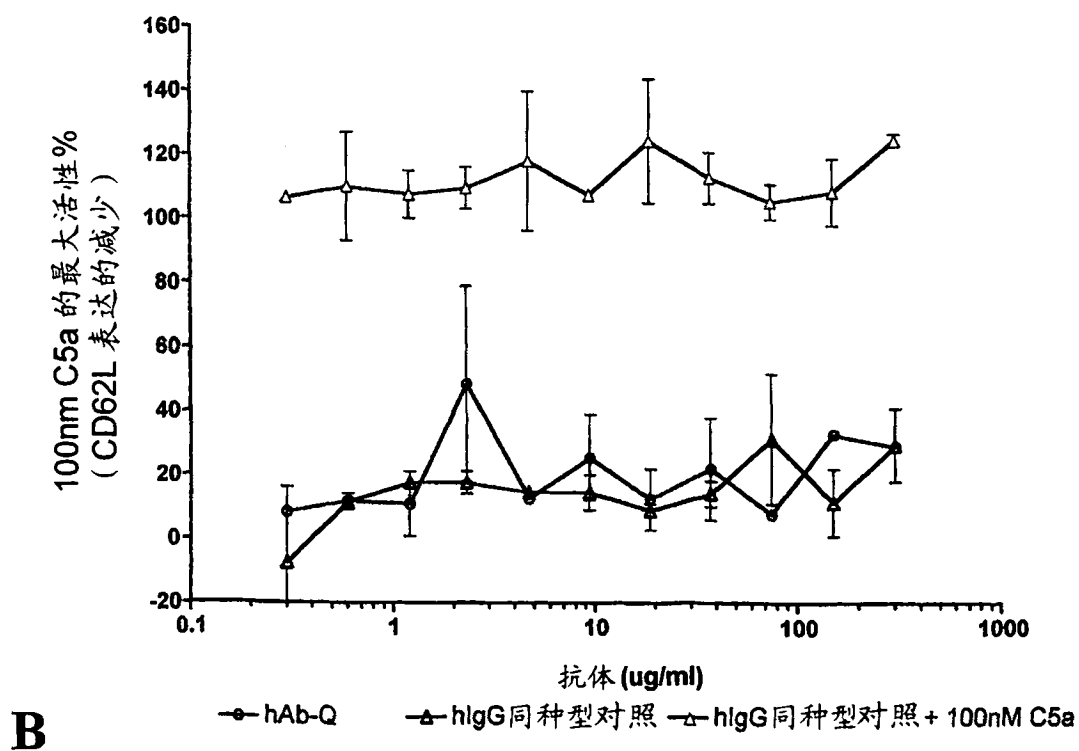
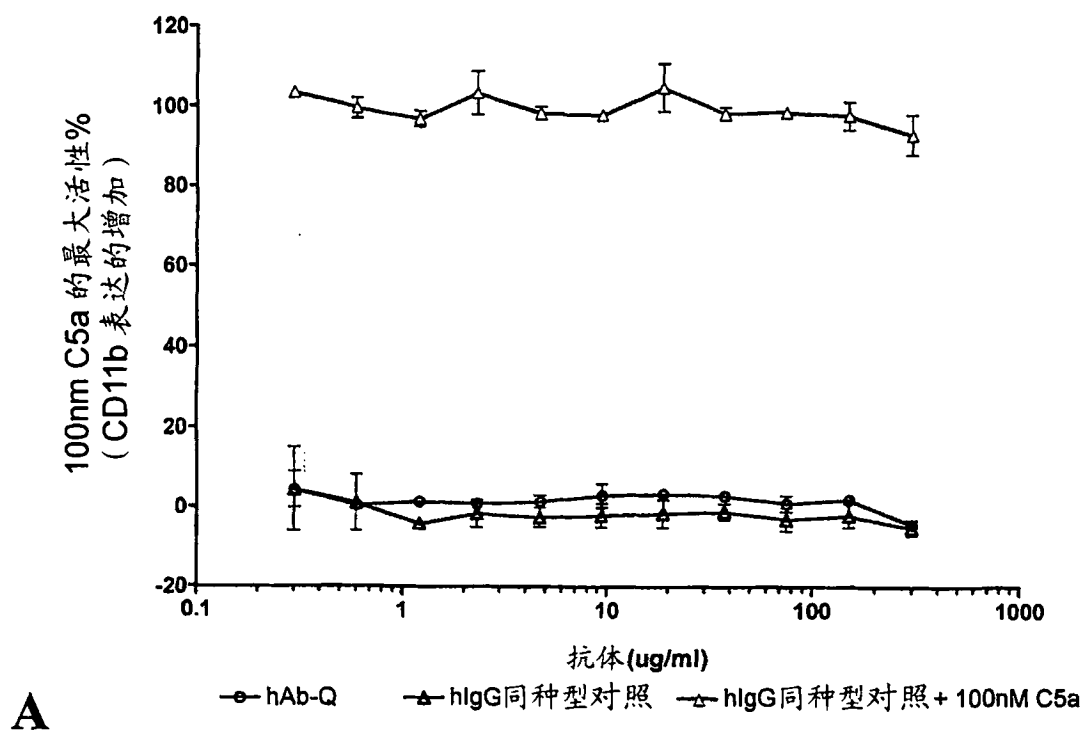


图 26

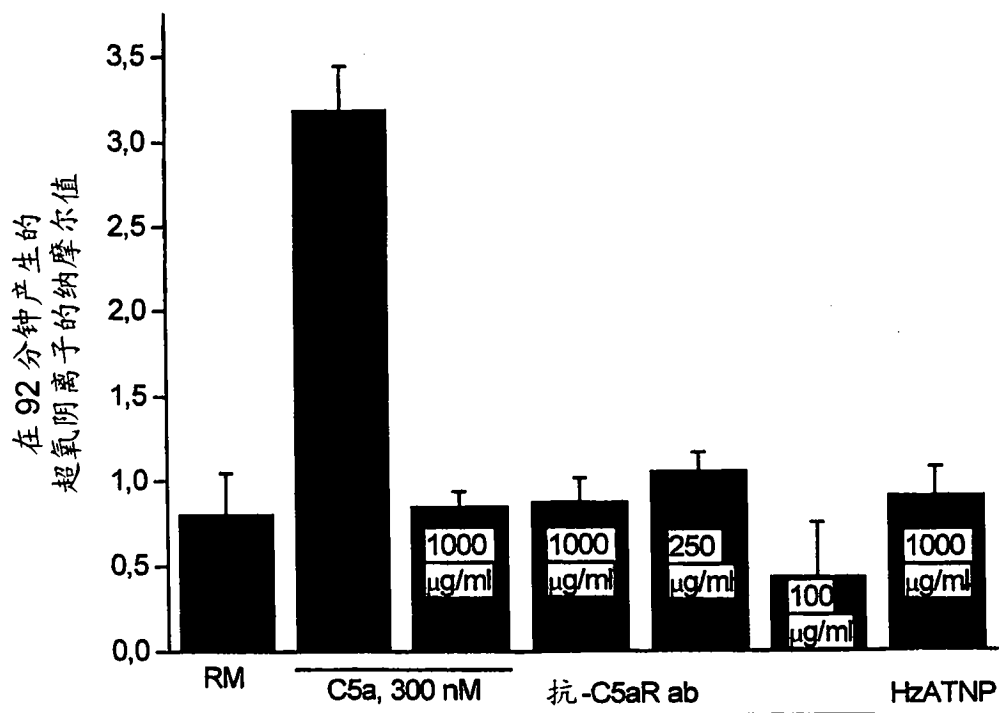


图 27

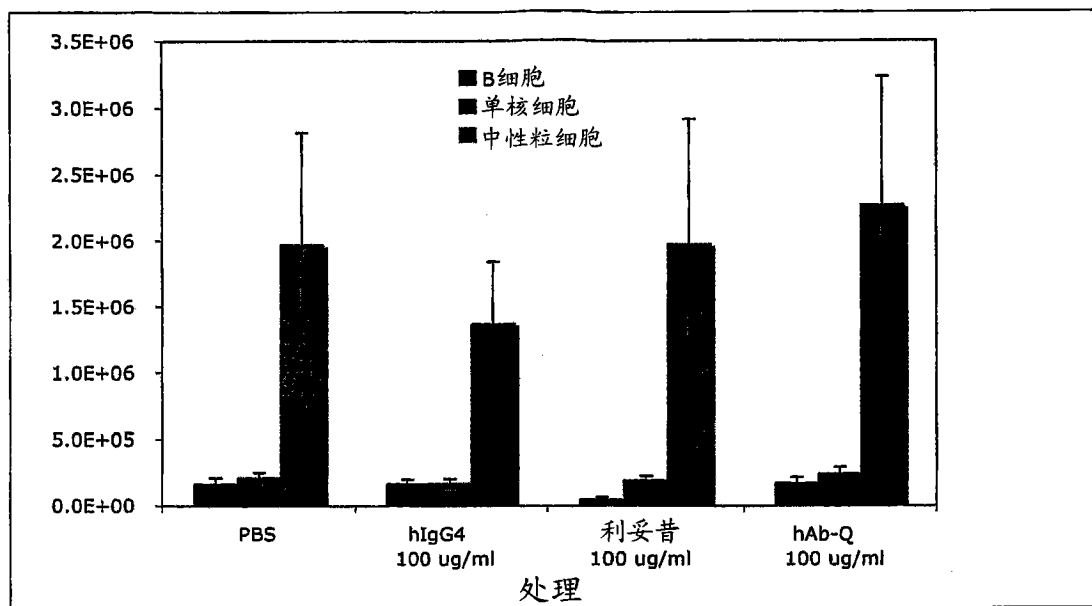


图 28

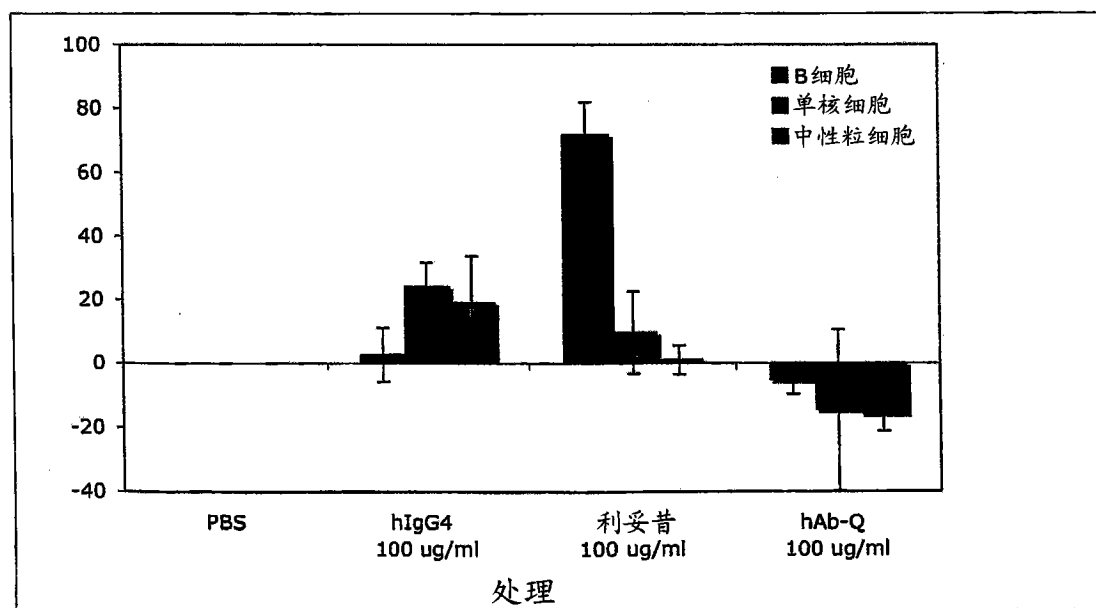


图 29

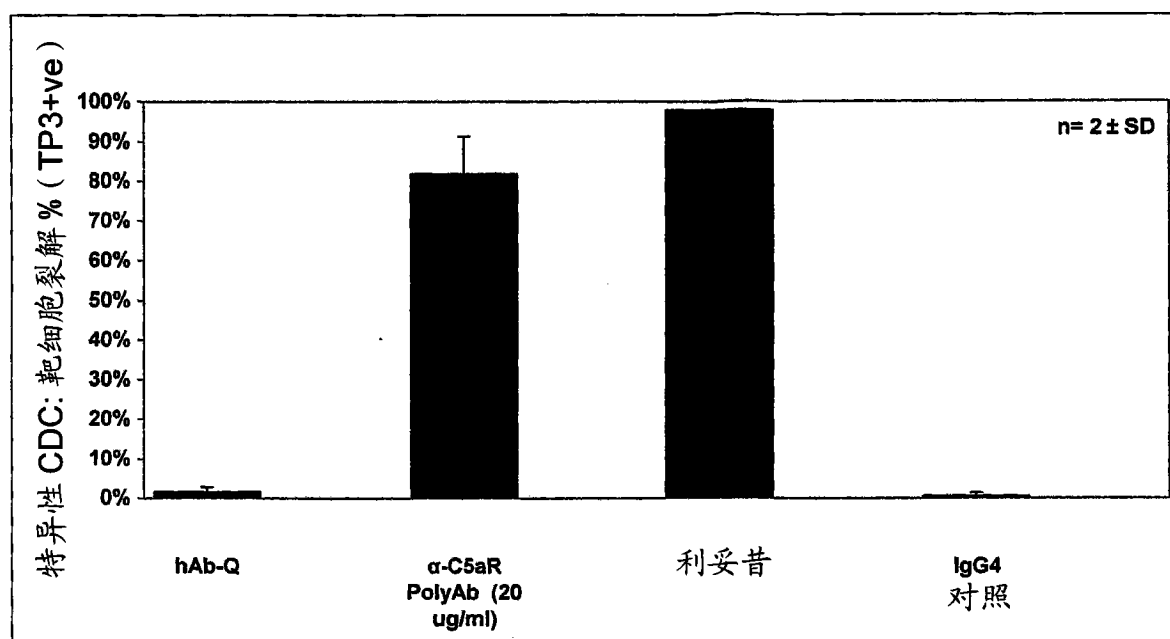


图 30

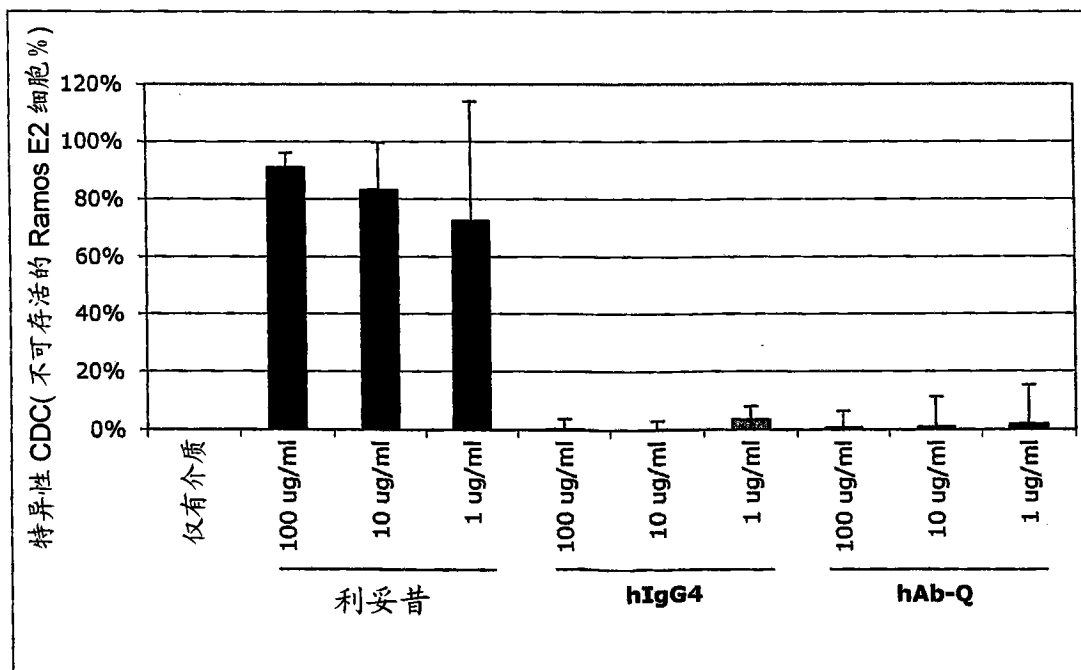


图 31

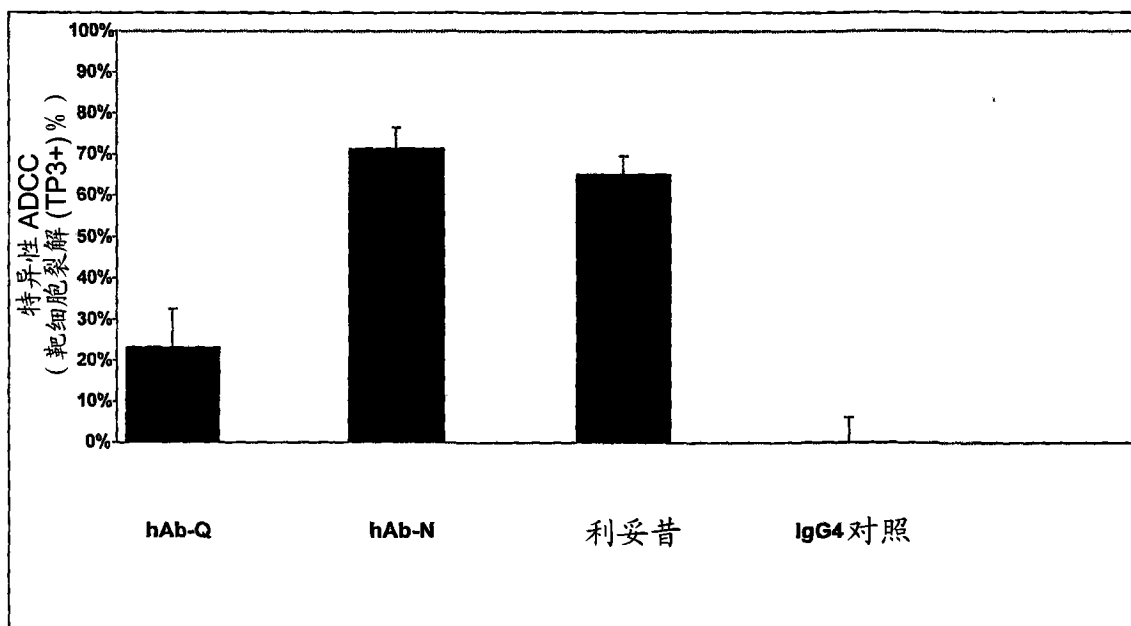


图 32

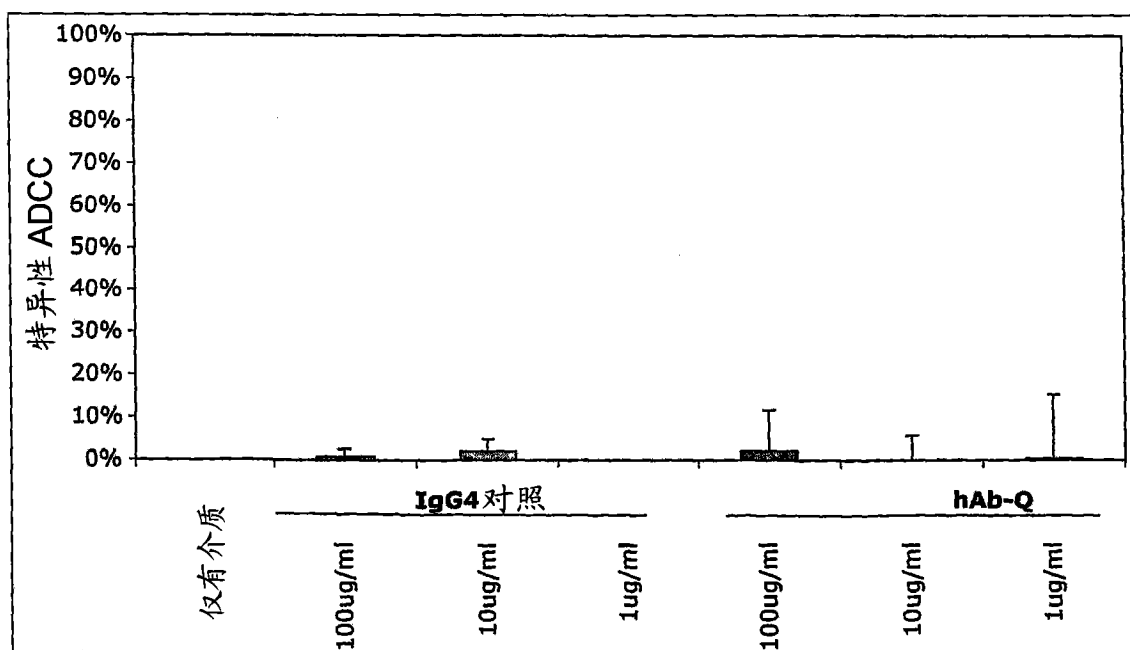


图 33

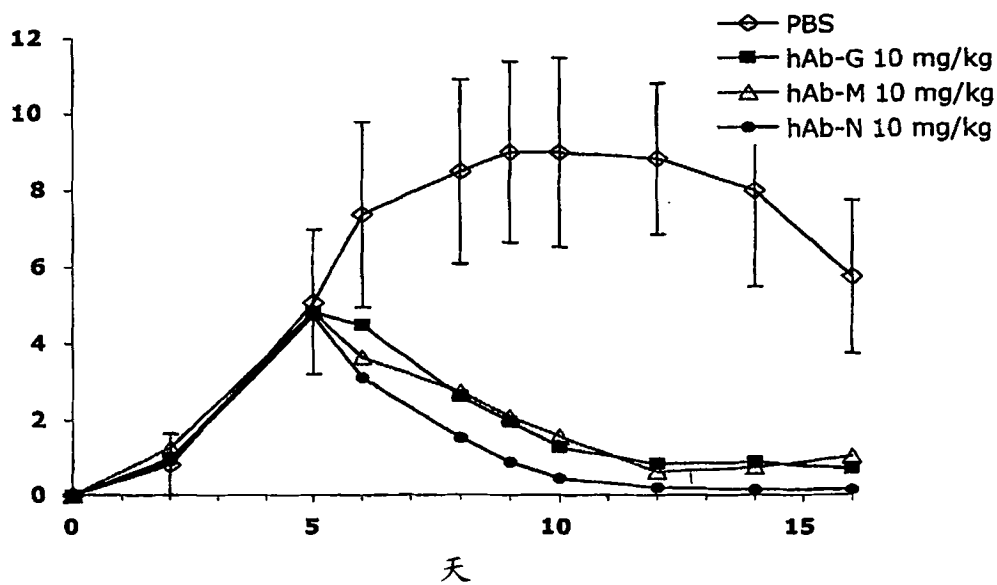


图 34

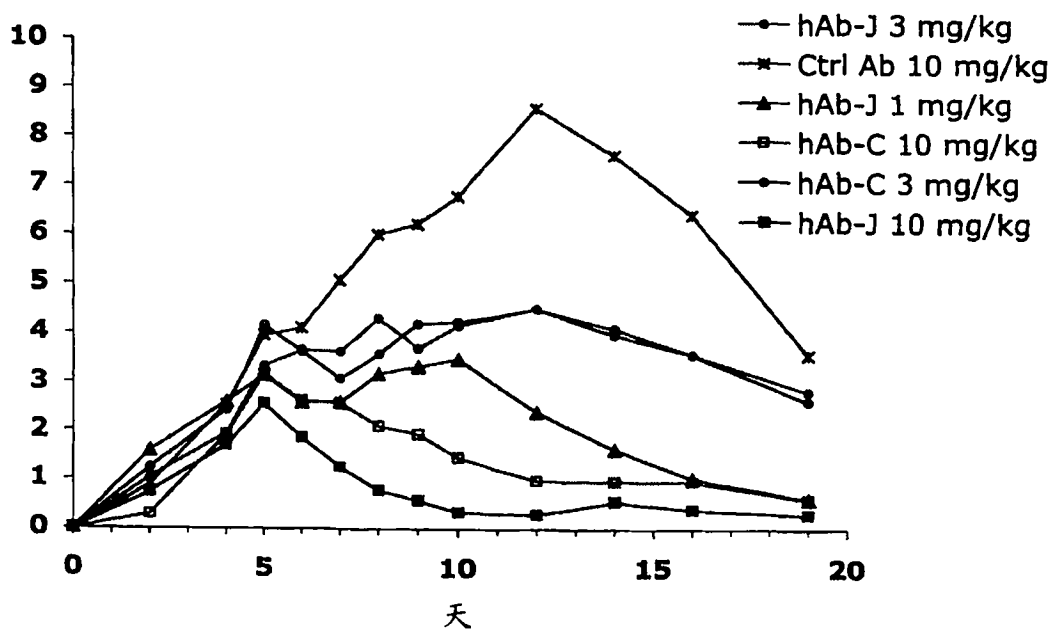


图 35

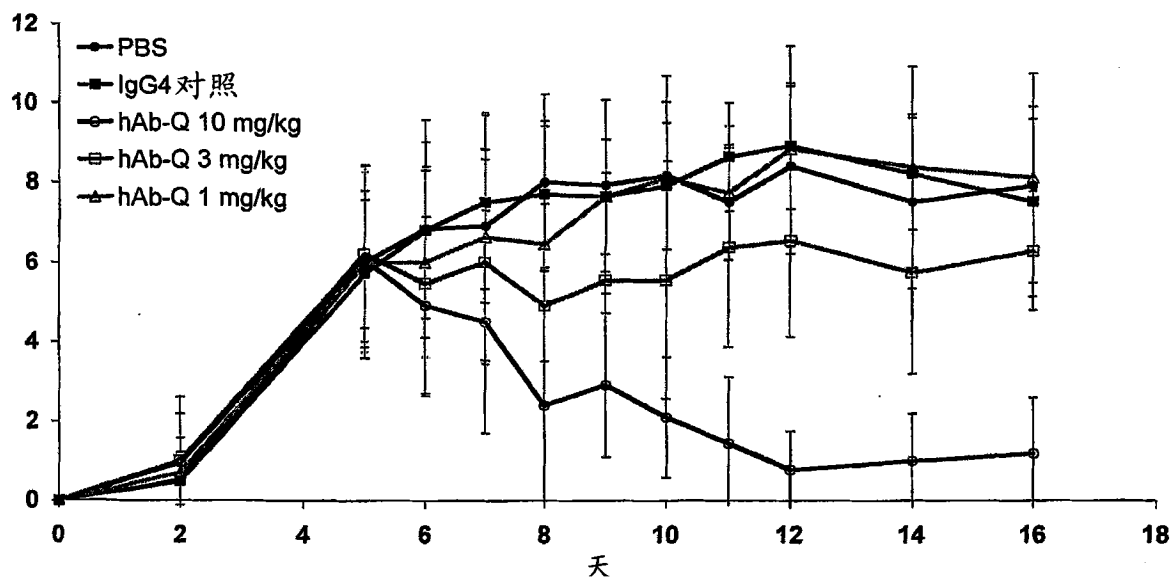


图 36a

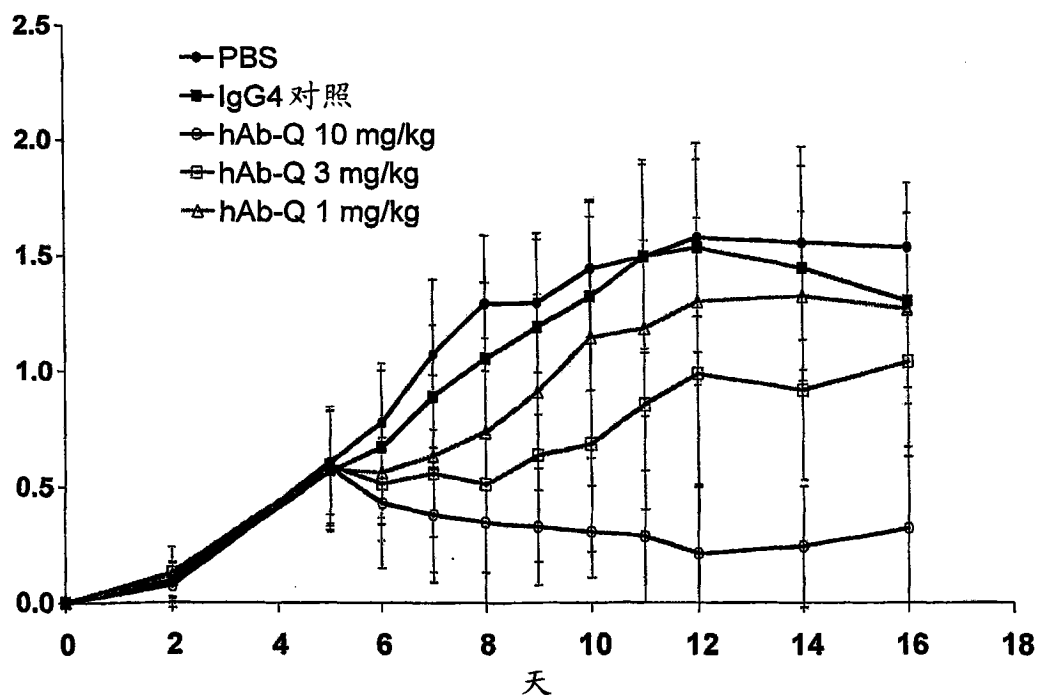


图 36b

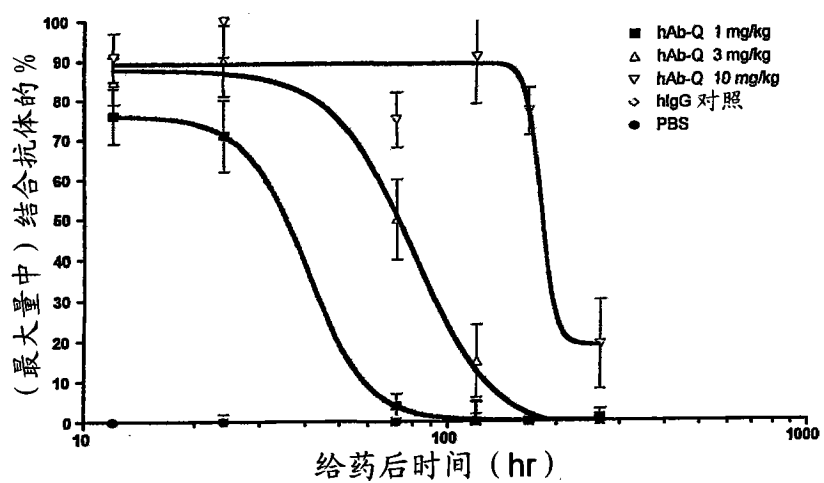


图 37

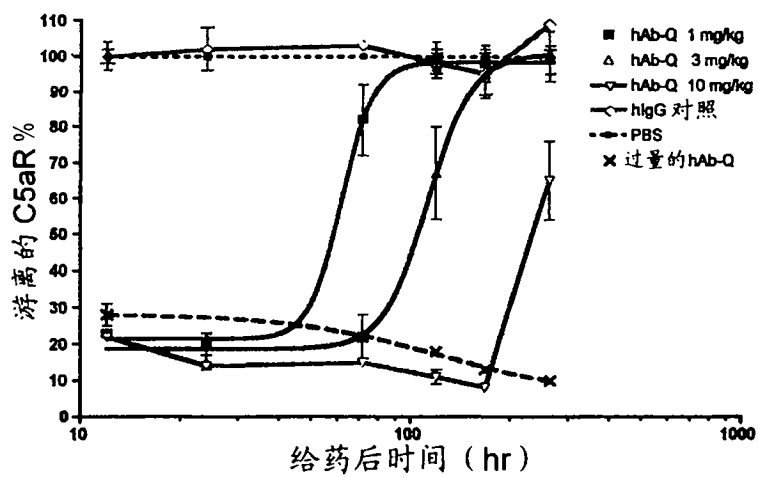


图 38

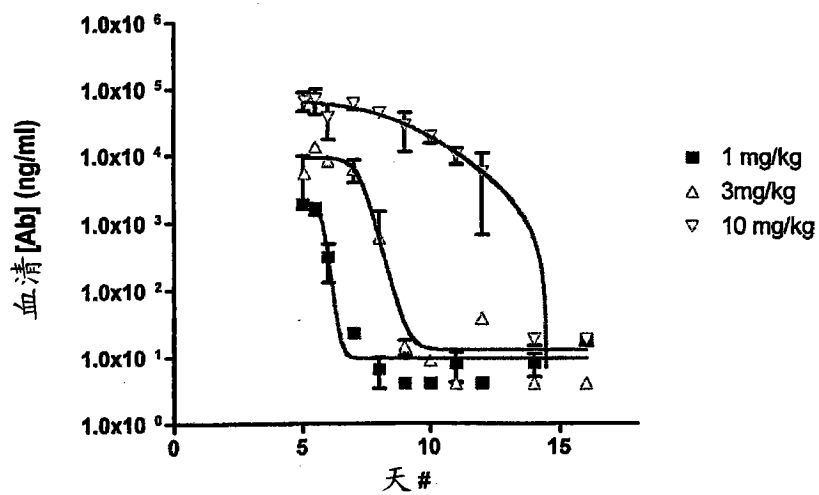


图 39

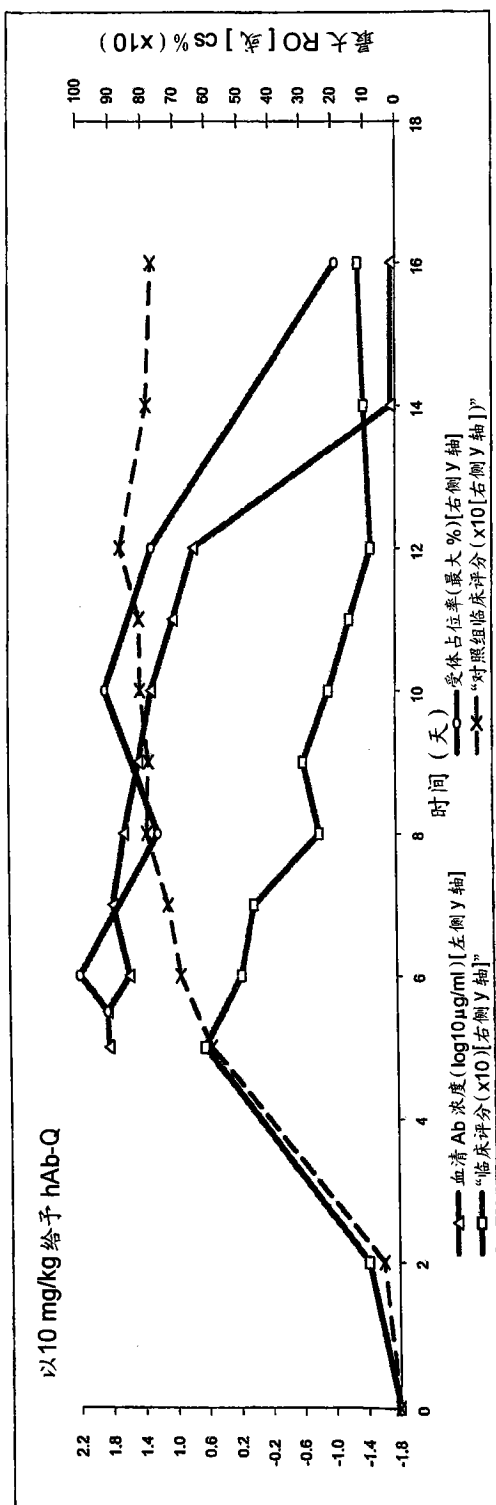


图 40

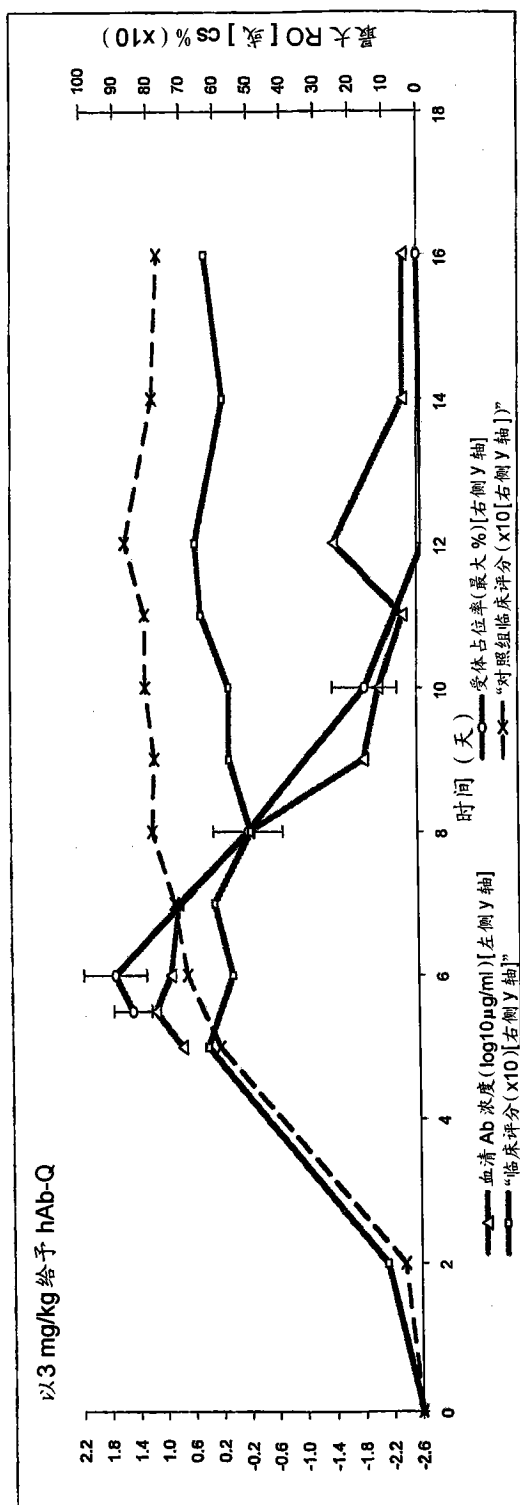


图 41

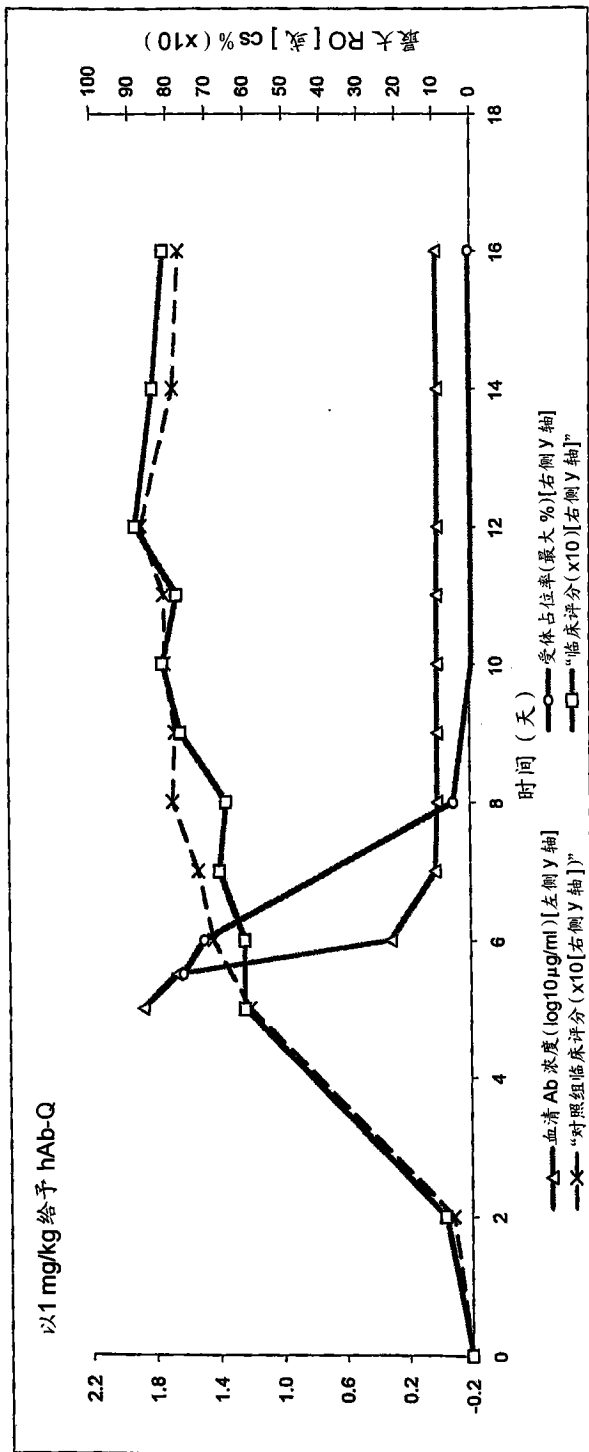


图 42

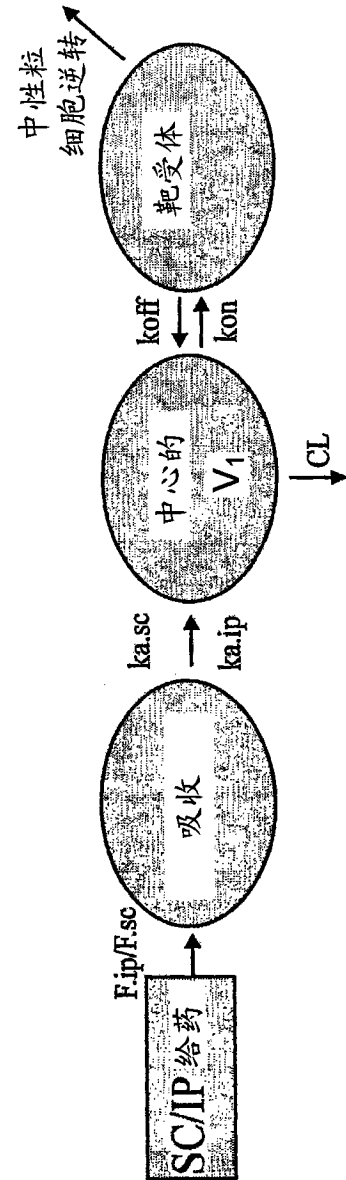


图 43

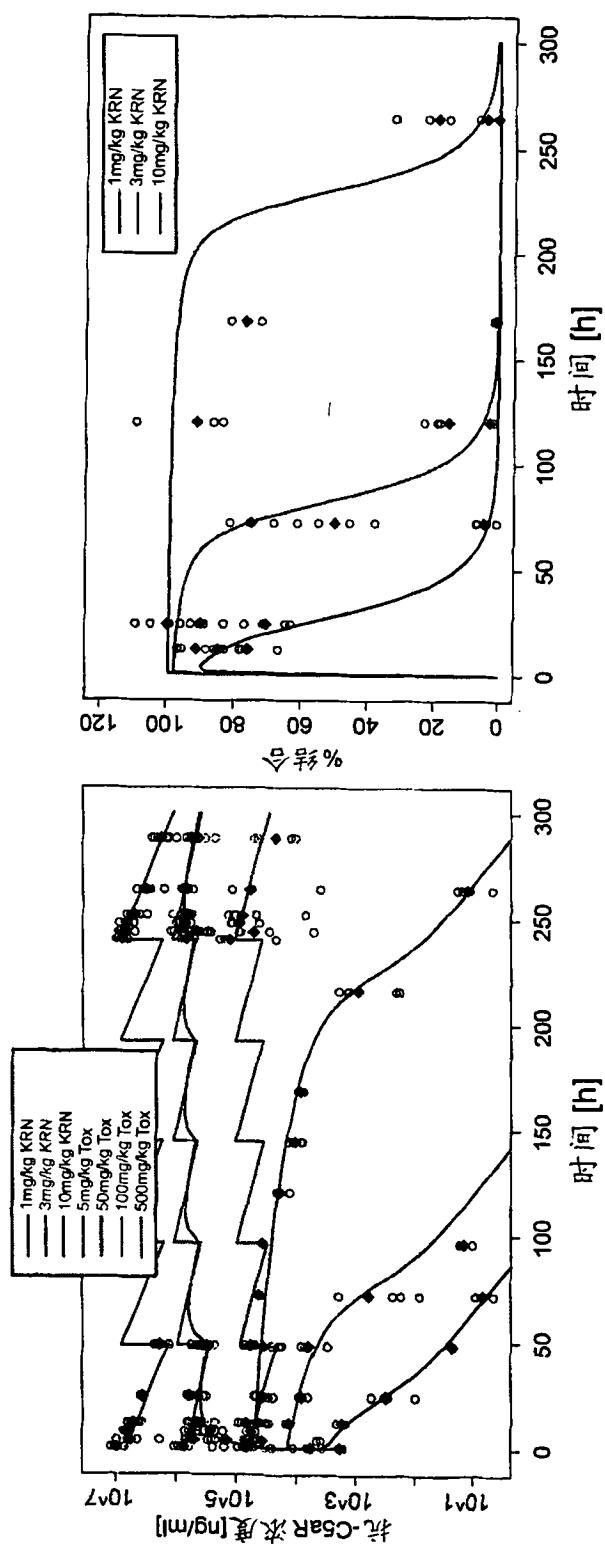


图 44

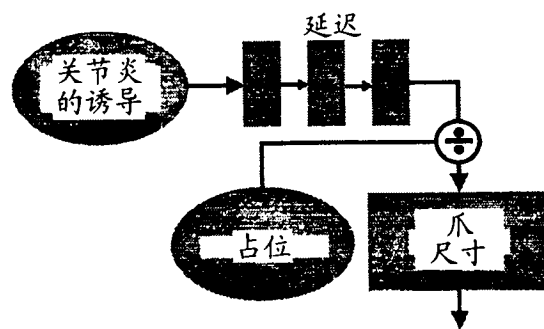


图 45

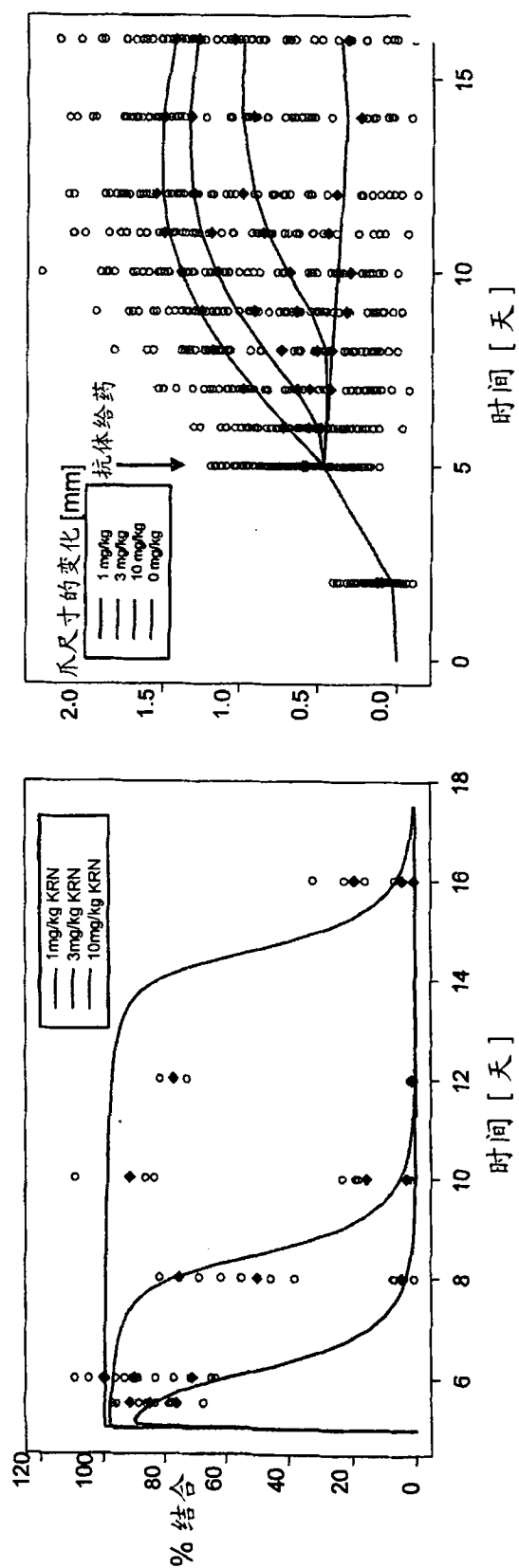


图 46

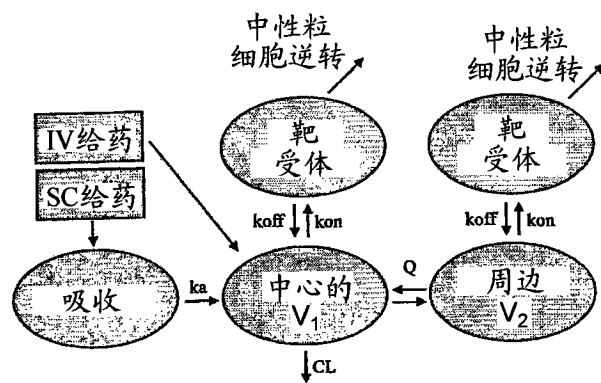


图 47

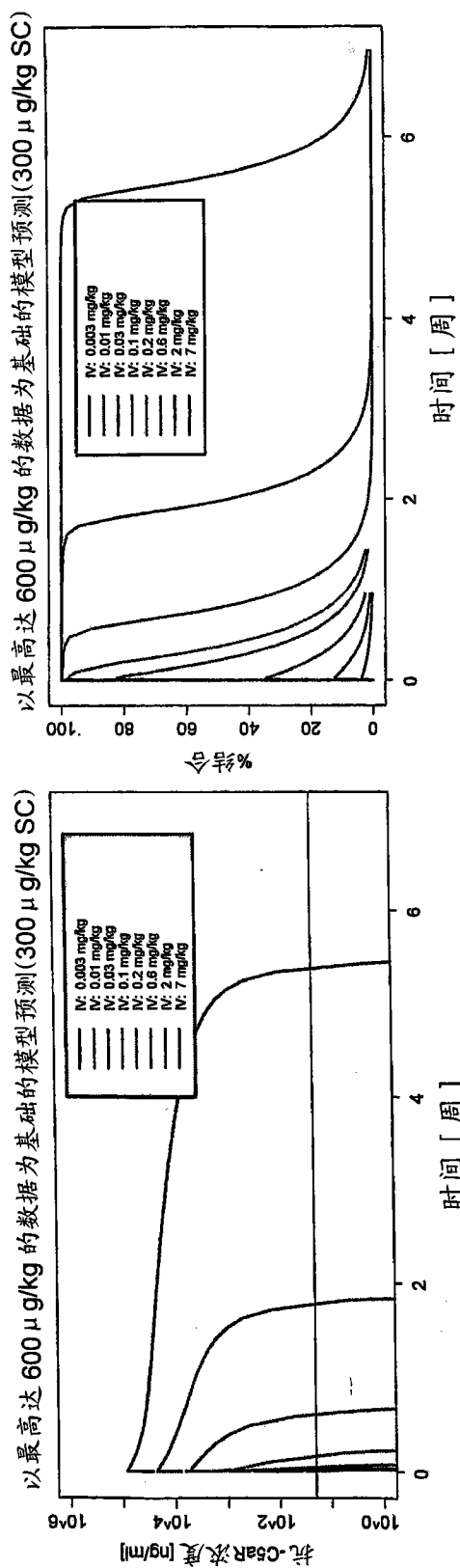


图 48

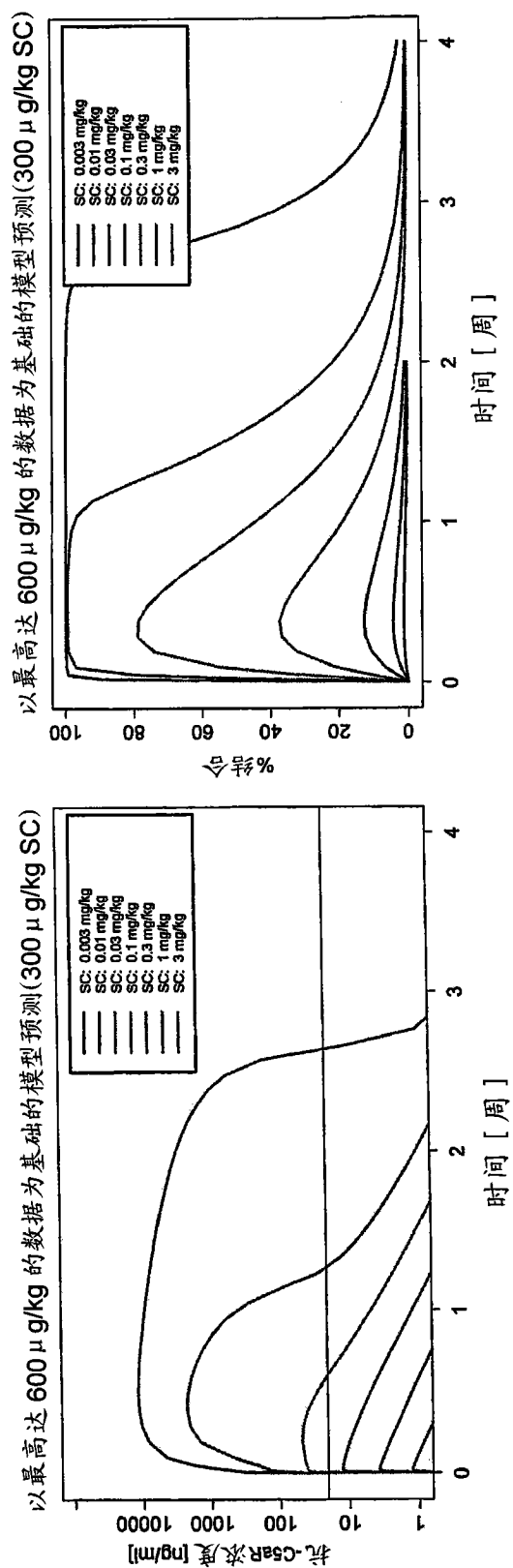


图 49