

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02816102.5

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100391537C

[22] 申请日 2002.8.17 [21] 申请号 02816102.5

[30] 优先权

[32] 2001.8.17 [33] US [31] 60/313,137

[86] 国际申请 PCT/US2002/026074 2002.8.17

[87] 国际公布 WO2003/015819 英 2003.2.27

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.17

[73] 专利权人 建南德克公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 M·S·C·冯 C·孙 M·陆

W·孙

[56] 参考文献

US6074642A 2000.6.13

EP0245993A 1987.11.19

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 戈泊程伟

权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 11 页

[54] 发明名称

结合至 C5 和 C5A 但不阻止 C5B 形成的补体
途径抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及一种结合至 C5 和 C5a 的抑制剂，但其并不抑制 C5 的活化且不会阻止 C5b 的形成或抑制 C5b 的活性。此抑制剂分子的一个实例是由 MAb137-26 指定的单克隆抗体，其结合至人 C5 与 C5a 所共享的表位 (epitope)。可将这些抑制剂用以在治疗由于过量的或不受控制的 C5a 生产而介导的疾病及疾患中抑制 C5a 的活性。也可将这些抑制剂分子用于诊断检测 C5 或 C5a 的存在/不存在或 C5 或 C5a 的量。

1. 一种结合至 C5 和 C5a 的抑制剂，但是其并不抑制 C5 的活化且不会阻止 C5b 的形成或抑制 C5b 的活性，其中抑制剂结合到与单克隆抗体 137-26 相同的 C5 表位。
2. 根据权利要求 1 所述的抑制剂，其中抑制剂是抗体。
3. 根据权利要求 2 所述的抑制剂，其中抑制剂是单克隆抗体。
4. 一种结合到 C5 和 C5a 的抗体或抗原结合片段，但是其并不抑制 C5 的活化且不会阻止 C5b 的形成或抑制 C5b 的活性，其中所述的抗体结合到与单克隆抗体 137-26 相同的 C5 表位。
5. 根据权利要求 4 所述的抗体，其中所述抗体以与 C5 相同或更好的亲和性结合至游离的 C5a。
6. 根据权利要求 4 所述的抗体，其中所述抗体抑制 C5a 结合到 C5aR。
7. 根据权利要求 4 所述的抗体，其中抗体片段是选自由 Fab、F(ab')₂、Fv、和单链 Fv 所组成的组。
8. 根据权利要求 4 所述的抗体，其中所述抗体是单克隆的。
9. 根据权利要求 4 所述的抗体，其中所述抗体是嵌合的、去免疫的、人化的或人抗体。

-
10. 一种从由 ATCC 保管并被命名为 PTA-3650 的杂交瘤中产生的单克隆抗体 137-26。
 11. 权利要求 10 所述的杂交瘤细胞系。
 12. 一种包含根据权利要求 1 所述的抑制剂或权利要求 4 所述的抗体、和医药上可接受的载剂、赋形剂、稳定剂或稀释剂的医药组合物。
 13. 一种含有投药根据权利要求 1 或权利要求 4 所述的抑制剂的抑制 C5a 的活性的体外方法。
 14. 根据权利要求 12 所述的方法，其中在活体外测定 C5a 的抑制。
 15. 权利要求 1 的抑制剂或权利要求 4 的抗体在制备用于治疗由过量的或不受控制的 C5a 生产而介导的疾病及疾患的药物中的应用。
 16. 权利要求 1 的抑制剂或权利要求 4 的抗体在制备用于治疗急性呼吸窘迫综合征（ARDS）、哮喘和 COPD 的药物中的应用。
 17. 权利要求 1 的抑制剂或权利要求 4 的抗体在制备用于治疗缺血-再灌注损伤的药物中的应用。
 18. 权利要求 1 的抑制剂或权利要求 4 的抗体在制备用于治疗败血症和其他感染性疾病的药物中的应用。
 19. 权利要求 1 的抑制剂或权利要求 4 的抗体在制备用于治疗自身免疫性疾病的药物中的应用。

20. 根据权利要求 19 的应用，其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮或牛皮癣。

21. 权利要求 1 的抑制剂或权利要求 4 的抗体在制备用于治疗免疫复合物病症的药物中的应用。

结合至 C5 和 C5A 但不阻止 C5B 形成的补体途径抑制剂

相关申请案的交互参考

本申请案主张 2001 年 8 月 17 日申请的美国临时专利申请案第 60/313,137 号的优先权，该案全文以引用的方式并入本文中。

技术领域

本发明涉及一种炎症抑制剂，其结合至补体 C5 和 C5a，但不会抑制 C5b 和 CSb-9 膜攻击复合物（MAC）的形成。

背景技术

补体系统在免疫复合物之清除中及在对于传染因子、外来抗原、病毒感染细胞及肿瘤细胞的免疫反应中起着主要作用。然而，补体系统的不恰当或过量的活化由于严重的炎症和引起的组织破坏，而可导致有害的且甚至可能危急生命的后果。这些后果临床表现为各种病症，包括败血症休克、心肌以及肠缺血/再灌注损伤(reperfusion injury)、移植排斥、器官衰竭、肾炎、病理炎症和自身免疫性疾病。举例而言，败血症是引起死亡率的一个主要原因，仅在美国每年可导致超过 200,000 人死亡。虽然过去几年在严重感染中的治疗中取得了重大进步，但是由败血症引起的发病率及死亡率仍在增长。因此，抑制补体级联过量或不受控制的活化可为具有此等疾病和疾患的病人提供临床受益。

补体系统由一组蛋白质组成，这些蛋白质通常以不活动状态存在于血清中。此补体系统的活化主要包含两条截然不同的途径，分别指定为经典途径及替代途径（V.M. Holers, 在 *Clinical Immunology: Principles and Practice* 中，由 R.R. Rich 编辑，Mosby Press 出版；1996, 363-391）。此经典途径是依赖碳/镁的级联，其通常是通过形成抗原-抗体复合物而被激活。其也可以通过使复合有配位基的 C-反应蛋白质相结合，并通过包括革兰氏阴性细菌的诸多病原体，而以不依赖抗体的方式被激活。此替代途径是依赖镁的级联，其通过 C3 在特定易

感表面（例如酵母及细菌的细胞壁多糖类、以及特定的生物聚合材料）上的沉积和活化而被激活。

最新研究显示，补体也可以通过植物凝血素途径而被激活，其涉及甘露糖结合植物凝血素的初始结合以及随后的 C2 和 C4 的活化，这与经典途径是共同的（Matsushita, M. 等人着, *J. Exp. Med.* 176:1497-1502 (1992); Suankratay, C. 等人着, *J. Immunol.* 160:3006-3013 (1998)）。积累的迹象表明这种替代途径参与了经典途径和植物凝血素途径两者的活性的扩大(Suankratay, C, *ibid*; Parries, T.C. 等人着, *Mol. Immunol.* 27:1155-1161(1990)）。补体途径的活化生成了补体蛋白质的生物活性片段，例如 C3a、C4a 及 C5a 过敏毒素以及 C5b-9 膜攻击复合物(MAC)，其通过白血球趋化作用的涉及、巨噬细胞、嗜中性细胞、血小板细胞、肥大细胞和内皮细胞的活化、增大了的血管通透性、细胞溶解作用以及组织损伤来介导炎症反应。

补体 C5 是补体系统最有效的促炎调节因子之一。C5a 是 C5 的活化形态。补体 C5 (190 kD, 分子量) 以大约 80 μ g/ml 存在于人体血清中(Kohler, P.F. 等人着, *J. Immunol.* 99:1211-1216 (1967))。它是由两条多肽链 α 和 β 组成，这两条多肽链分别具有大约 115 kD 和 75 kD 的分子量(Tack, B.F. 等人着, *Biochemistry* 18:1490-1497 (1979))。经生物合成作为单链前分子(single-chain pro-molecule)，C5 在处理和分泌过程中经过酶化作用被分裂成双链结构。在分裂之后，这两种链通过至少一个二硫键以及非共价相互作用而结合在一起(Ooi, Y.M. 等人着, *J. Immunol.* 124:2494-2498(1980))。

从 cDNA 定序数据可获得人及鼠 C5 的一级氨基酸结构(Wetsel, R.A. 等人着, *Biochemistry* 27:1474-1482(1988); Haviland, D.L. 等人着, *J. Immunol.* 146: 362-368(1991); Wetsel, R.A. 等人着, *Biochemistry* 26: 737-743(1987)）。所推断出的前体人的前 C5(pre-pro-C5)的氨基酸序列具有 1676 种氨基酸。成熟 C5 的 α 和 β 链分别具有 999 和 655 种氨基酸。C5 在 C5 的 α 链（尤其在残基 64 处的天门冬酰胺）中被糖基化。

C5 在补体途径的活化过程中被分裂成 C5a 和 C5b 片段。负责 C5

活化的转化酶是具有用于经典途径的 C4b、C2a 以及 C3b 和用于替代途径的 (C3b)₂、Bb 以及 P 的多子单元复合物 (multi-subunit complex) (Goldlust, M.B. 等人着, J. Immunol. 113: 998-1007 (1974); Schreiber, R.D. 等人着, Proc. Waff. Acad. Sci. 75: 3948-3952 (1978))。C5 通过在 α 链中的位置 74-75(Arg-Leu) 处分裂而被激活。在活化之后, 11.2 kD 的 74 氨基酸肽 C5a 被从 α 链的氨基末端部分释放。此 C5a 肽的过敏毒素特性与由 C3a 所展示的过敏毒素特性相类似, 但是在摩尔基础上其在引发炎症反应中比 C3a 更有效 100 倍。C5a 和 C3a 两者都是嗜中性细胞及单核细胞的激活剂 (stimulator) (Schindler, R. 等人着, Blood 76:1631-1638 (1990); Haeffner-Cavaillon, N. 等人着, J. Immunol. 138:794-700 (1987); Cavaillon, J.M. 等人着, Eur. J. Immunol. 20:253-257 (1990))。此外, 最新在小鼠模型中显示, C3a 受体对于防止由内毒素诱发的休克十分重要 (Kildsgaard, J. 等人着, J. Immunol. 165:5406-5409 (2000))。

除了其过敏毒性特性之外, C5a 会诱发以下细胞的趋化迁移 (chemotactic migration): 嗜中性细胞 (Ward, P.A. 等人着, J. Immunol. 102: 93-99 (1969))、嗜曙红细胞 (eosinophil) (Kay, A.B. 等人着, Immunol. 24:969-976 (1973))、嗜碱细胞 (Lett-Brown, M.A. 等人着, J. Immunol. 117:246-252 1976))、及单核细胞 (Snyderman, R. 等人着, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138: 387-390 1971))。C5a 的活性经血浆羧肽酶 (plasma enzyme carboxypeptidase) N (E.C. 3.4.12.7) 调理, 血浆羧肽酶 N 从 C5a 移除羟基末端精氨酸形成 C5a des Arg 衍生物 (Goetzl, E.J. 等人着, J. Clin. Invest. 53:591-599 (1974))。在摩尔基础上, 人 C5a des Arg 展示了仅如未改质的 C5a 的 1 % 的过敏性活性 (Gerard, C. 等人着, Proc. Natl. Acad. Sci. 78:1833-1837 (1981)) 及多形核趋化活性 (Chenoweth, D.E. 等人着, Mo/. Immunol. 17:151-161 (1980))。C5a 和 C5b-9 两者均激活内皮细胞, 以表达用于分隔已激活的白血球所必需的粘附分子, 其会介导组织炎症及损伤 (Foreman, K.E. 等人着, J. Clin. Invest. 94:1147-1155 (1994); Foreman, K.E. 等人着, Intammation 20:1-9 (1996); Rollins,

S. A. 等人着, *Transplantation* 69:1959-1967 (2000))。通过引起平滑肌收缩、增加血管通透性、诱发嗜碱细胞和肥大细胞的脱粒并诱发溶酶体蛋白酶和氧化游离基的释放, C5a 也会介导炎症反应(Gerard, C. 等人着, *Ann. Rev. Immunol.* 12:775-808 (1994))。此外, C5a 可调整肝的急性相基因表达 (acute-phase gene expression) 并通过增加 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 以及 IL-8 的生产来扩大整体的免疫反应(Lambris, J. D. 等人着, 在: *The Human Complement System in Health and Disease* 中, Volanakis, J. E. 编, Marcel Dekker, 纽约, 第 83-118 页)。

人 C5a 受体 (C5aR) 已经被克隆(Gerard, N. P. 等人着, *Nature* 349:614-617(1991); Boulay, F. 等人着, *Biochemistry* 30:2993-2999 (1991))。它属于七跨膜区 (seven-transmembrane-domain) G 蛋白偶联受体超家族。C5aR 被表达在嗜中性细胞、单核细胞、嗜碱细胞、嗜曙红细胞、肝细胞、肺平滑肌和内皮细胞、以及肾小球组织上 (Van-Epps, D. E. 等人着, *J. Immunol.* 132:2862-2867 (1984); Havliland, D. L. 等人着, *J. Immunol.* 154:1861-1869 (1995); Wetsel, R. A., *Immunol. Lett.* 44:183-187 (1995); Buchner, R. R. 等人着, *J. Immunol.* 155:308-315 (1995); Chenoweth, D. E. 等人着, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:3943-3947 (1978); Zwirner, J. 等人着, *Mol. Immunol.* 36:877-884 (1999))。C5aR 结合了配位基的部位是复杂的且由至少两个在物理上可分离的结合区组成。一个结合了 C5a 氨基末端 (氨基酸 1-20) 和由二硫键连接的核心 (氨基酸 21-61), 而另一个结合了 C5a 羟基末端 (氨基酸 62-74) (Wetsel, R. A., *Curr. Opin. Immunol.* 7:48-53 (1995))。

C5a 在炎症及组织损伤中起重要作用。在心肺分流术 (cardiopulmonary bypass) 和血液透析中, 当人体血液与人工心肺机或人工肾脏透析机的表面接触时, 由于替代补体途径的活化而产生 C5a (Howard, R. J. 等人着, *Arch. Surg.* 123:1496-1501 (1988); Kirklin, J. K. 等人着, *J. Cardiovasc. Surg.* 86:845-857 (1983); Craddock, P. R. 等人着, *N. Engl. J. Med.* 296: 769-774 (1977))。C5a 导致增加的毛细血管通透性和浮肿、支气管收缩、肺血管收缩、白血球和血小板活化以及组织 (尤其肺部) 的浸润 (infiltration) (Czermak, B. J. 等人着, *J. Leukoc. Biol.* 64:40-48 (1998))。已显示了抗 C5a

单克隆抗体的投药，以减少由心肺分流术及心麻痹诱发的冠状内皮细胞异常 (coronary endothelial dysfunction) (Tofukuji, M. 等人着, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 116:1060-1068 (1998))。

C5a 又涉及急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 以及多器官衰竭 (MOF) (Hack, C.E. 等人着, Am. J. Med. 1989:86:20-26; Hammerschmidt DE 等人着, Lancet 1980; 1:947-949; Heideman M. 等人着, J. Trauma 1984; 4:1038-1043)。C5a 扩大了两种重要的前炎症细胞因子 (pro-inflammatory cytokine) $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-1 的单核细胞生产。而且在败血症休克的动物模型中已经显示了 C5a 在发展组织损伤, 且尤其肺损伤中起重要作用。(Smedegard G 等人着 Am. J. Pathol. 1989; 135:489-497)。在使用大鼠、猪以及非人类灵长类的败血症模型中, 在利用内毒素或大肠杆菌 (*E. coli*) 治疗之前向这些动物所施的抗 C5a 抗体会导致减少的组织损伤, 以及减少的 IL-6 之生产 (Smedegard, G. 等人着, Am. J. Pathol. 135: 489-497 (1989); Hopken, U. 等人着, Eur. J. Immunol. 26:1103-1109 (1996); Stevens, J.H. 等人着, J. Clin. Invest. 77:1812-1816 (1986))。更重要的是, 利用抗 C5a 抗体来阻断 C5a 已经显示出显著提高了大鼠中具有败血症的盲肠绑扎/穿刺模型的存活率 (Czermak, B. J. 等人着, Wat Med. 5:788-792 (1999))。此模型与人的败血症临床表现的许多方面具有共同之处。(Parker, S. J. 等人着, fir. J. Surg. 88:22-30 (2001))。在相同的败血症模型中, 显示了抗 C5a 抗体可抑制胸腺细胞的凋亡 (Guo, R. F. 等人着, J. Clin. Invest. 106:1271-1280 2000), 并防止 MOF (Huber-Lang, M. 等人着, J. Immunol. 166:1193-1199 (2001))。抗 C5a 抗体也在大鼠中具有肺损伤的眼镜蛇毒因子模型中以及在免疫复合物诱发的肺损伤中有保护作用 (Mulligan, M. S. 等人着, J. Clin. Invest. 98:503-512 (1996))。C5a 在免疫复合物介导的肺损伤中的重要性后来在小鼠身上得到肯定 (Bozic, C. R. 等人着, Science 26:1103-1109 (1996))。

我们发现, C5a 在心肌缺血-再灌注损伤中为主要调节因子。补体消耗 (complement depletion) 减小了小鼠中的心肌梗塞面积 (Weisman, H. F. 等人着, Science 249:146-151 (1990)), 且利用抗 C5a 抗体治疗减小了具有下肢缺血-再灌注的大鼠模型中的损伤 (Bless, N. M. 等人

着, *Am. J. Physiol.* 276: L57-L63 (1999))。也显著减小了接受单克隆抗 C5a IgG 再治疗的猪在心肌梗塞中的再灌注损伤 (Amsterdam, E. A. 等人着, *Am. J. Physiol.* 26B: H448-H457 (1995))。一种重组体人 C5aR 对抗剂减小了外科再血管化的猪科模型中的梗塞面积 (Riley, R. D. 等人着, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120: 350-358 (2000))。

在具有类风湿性关节炎及系统性红斑狼疮的病人身上增加补体的含量。C5a 含量关系到疾病状态的严重程度 (Jose, P. J. 等人着, *Ann. Rheum. Dis.* 49: 747-752 (1989); Porcel, J. M. 等人着, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74: 283-288 (1995))。因此, 抑制 C5a 和/或 C5a 受体 (C5aR) 可有利于治疗这些慢性疾病。

C5aR 表达被上调到发炎的人体中枢神经系统中的反应性星形细胞、小胶质细胞以及内皮细胞上 (Gasque, P. 等人着, *Am. J. Pathol.* 150: 31-41 (1997))。C5a 可能与神经退化病 (如 Alzheimer 病) 有关 (Mukherjee, P. 等人着, *J. Neuroimmunol.* 105: 124-130 (2000))。神经元 (neuronal) C5aR 的活化可诱发细胞凋亡 (Farkas I 等人着, *J. Physiol.* 1998; 507: 679-687)。因此, 抑制 C5a 和/或 C5aR 也可有利于治疗神经退化病。

现已知牛皮癣 (psoriasis) 是 T 细胞介导的疾病 (Gottlieb, E. L. 等人着, *Nat. Med.* 1: 442-447 (1995))。然而, 嗜中性细胞及肥大细胞也可能与疾病的发病机理有关 (Terui, T. 等人着, *Exp. Dermatol.* 9: 1-10; 2000); Werfel, T. 等人着, *Arch. Dermatol. Res.* 289: 83-86 (1997))。在牛皮癣鳞片 (psoriatic scale) 中发现有高含量的 C5a des Arg, 表明与补体活化有关。T 细胞及嗜中性细胞被 C5a 化学吸引 (Nataf, S. 等人着, *J. Immunol.* 162: 4018-4023 (1999); Tsuji, R. F. 等人着, *J. Immunol.* 165: 1588-1598 (2000); Cavaillon, J. M. 等人着, *Eur. J. Immunol.* 20: 253-257 (1990))。因此 C5a 可为治疗牛皮癣的重要医疗目标。

含免疫球蛋白 G 的免疫复合物 (IC) 有助于数种自身免疫性疾病 (如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、古德帕斯丘综合征 (Goodpasture's syndrome)、以及过敏性肺炎) 中的生理病理学 (Madaio, M. P. 着, *Semin. Nephrol.* 19: 48-56 (1999); Korganow, A. S.

等人着, *Immunity* 10: 451-459 (1999); Bolten, W.K. 着, *Kidney Int.* 50:1754-1760 (1996); Ando, M. 等人着, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 3:391-399 (1997)。经典动物模型在这些 IC 疾病中的炎症反应是阿图斯氏反应 (Arthus reaction), 其特点是多形核细胞的浸润、出血以及血浆渗出 (Arthus, M. 着, *C.R. Soc. Biol.* 55:817-824 (1903))。最新研究显示 C5aR 不足的小鼠可免于由 IC 诱发的组织损伤 (Kohl, J. 等人着, *Mol. Immunol.* 36:893-903 (1999); Baumann, U. 等人着, *J. Immunol.* 164:1065-1070 (2000))。结果符合以下的发现: 小分子肽抗 C5aR 对抗剂可抑制由 IC 沉积所引起的炎症反应 (Strachan, A.J. 等人着, *J. Immunol.* 164:6560-6565 (2000))。C5a 连同其受体在 IC 疾病的发病机理中起重要作用。C5a 和 C5aR 的抑制剂可有用于治疗这些疾病。

W001/15731A1 讨论对 C5a 使用抗体来治疗败血症的组合物及方法。这些抗体仅与 C5a 肽的 N 末端区域反应, 而不与 C5 交叉反应。

W086/05692 讨论利用特别用于 C5a 的抗体或其 des Arg 衍生物来治疗成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)。它还揭示通过投药此抗体来治疗败血症。此抗体应 C5a des Arg 衍生物而产生, 因为它更容易产生免疫性, 但是将引出可与 C5a 交叉反应的抗体。美国专利第 5,853,722 号讨论了可阻断 C5 活化并因此阻断 C5a 和 C5b 形成的抗 C5 抗体。

美国专利第 6,074,642 号讨论了将抗 C5 抗体用于治疗肾小球肾炎。这些抗体也阻断 C5a 和 C5b 的生成, 抑制 C5a 和 C5b-9 之形成的效应。美国专利第 5,562,904 号讨论了可完全阻断 MAC 形成的抗 C5 抗体。

在抗 C5 抗体的其它讨论中, 所揭示的抗体可阻断 C5 的活化并阻断其分裂成 C5a 和 C5b (Vakeva, A.P. 等人着, *Circulation* 97:2259-2267 (1998); Thomas, T.C. 等人着, *Mol. Immunol.* 33:1389-1401 (1996); Wang, Y. 等人着, *Proc Natl Acad Sci.* 93:8563-8568 (1996); Kroshus, T. 等人着, *Transplantation* 60:1194-1202 (1995); Frei, Y. 等人着, *Mol. Cell Probes* 1:141-149 (1987))。

已经报导有可与 C5、C5a 或 C5a des Arg 交叉反应的单克隆抗体

(Schulze, M. 等人着, Complement 3:25-39 (1986); Takeda, J. 等人着, J. Immunol. Meth. 101:265-270 (1987); Inoue, K., Complement Inflamm. 6: 219-222 (1989)). 也已有报导: 可与 C5 和 C5a 交叉反应的单克隆抗体抑制了 C5a 介导的 ATP 从豚鼠血小板的释放(Klos, A. 等人着, J. Immunol. Meth. 111:241-252(1988); Oppermann, M. 等人着, Complement Inflamm. 8: 13-24(1991))。

发明内容

C5 活化通常会导致 C5 分裂成 C5a 和 C5b。本发明的抑制剂分子以高亲和力 (affinity) 与 C5 和 C5a 结合, 不会抑制 C5 的活化作用, 且不会防止 C5b 的形成或抑制 C5b 的活性。这种抑制剂的一个实例是被称为 MA b 137-26 的单克隆抗体, 其结合至人 C5 和 C5a 上的共同表位。会产生单克隆抗体 137-26 的杂交瘤已在 2001 年 8 月 17 号, 以 Accession No. PTA-3650 被储存在美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection), 10801 University Blvd., 马纳萨斯, VA 20110-2209。

本发明的抑制剂分子还包括: (i) 以高亲和力结合至 C5 和 C5a, 但是不会抑制 C5 的活化且不会防止 C5b 的形成或抑制 C5b 活性的其它抗体或其片段、肽、低核苷酸、或拟肽, 或者 (ii) 可结合至与单克隆抗体 137-26 相同的表位的任何抗体。抗体片段包括 Fab、F(ab')₂、Fv、或单链 Fv₁, 且本发明的单克隆抗体及片段包括嵌合的 Deimmunized₁、被人化的或人的抗体及片段, 以及其它可被接受来用于人的其它形式。可将这些抑制剂分子包括作医药组合物的一部分。

本发明的抑制剂分子有利于治疗涉及过量的或不受控制的 C5a 生产的疾病和疾患, 或具有侦测 C5a 的存在或其定量的诊断用途。

附图说明

图 1 显示了在 ELISA 中, MA b 137-26 (抗 C5a, 实心方块) 及 MA b 137-76 (抗 C5 β 链, 空心圆) 与纯化的人 C5a 的结合。一种同种型匹配的不相关的单克隆抗体被用作阴性控制 (negative control)。Y 轴代表被表达成在 450nm 的光密度 (OD) 的 MA b 与 C5a 的反应性, 且 X

轴代表 MAb 的浓度。MAb 137-26 与人 C5a 反应, 而 MAb 137-76 及不相关的控制抗体未与人 C5a 反应。

图 2 显示了在 ELISA 中, Mab 137-26 (实心方块) 及 Mab 137-76 (空心圆) 与纯化的人 C5 的结合。一种同种型匹配的不相关的单克隆抗体被用作阴性控制。Y 轴代表被表达成在 450nm 的光密度 (OD) 的 MAb 与 C5 的反应性, 且 X 轴代表单克隆抗体的浓度。MAb 137-26 和 Mab 137-76 两者均与人 C5 反应, 而不相关的抗体未与人 C5 反应。

图 3 显示了抗 C5a MAb 137-26 不能抑制补体介导的敏化的鸡红细胞通过经典途径 (CP) 的溶血。抗 C2 MAb 175-62 有效地抑制了溶血作用。一种同种型匹配的不相关的单克隆抗体不起作用。Y 轴代表溶血抑制的百分比, 此在文章中将进行进一步描述。X 轴代表单克隆抗体的浓度。

图 4 显示了抗 C5a MAb 137-26 不能通过替代途径 (AP) 来抑制补体介导的敏化的兔红细胞的溶血作用。对抗因子 D MAb 166-32 有效地抑制了溶血作用。一种同种型匹配的不相关的单克隆抗体不起作用。Y 轴代表溶血抑制的百分比, 此在文章中将进行进一步描述。X 轴代表单克隆抗体的浓度。

图 5 显示了抑制放射性碘标记的 (^{125}I) 人 C5a 与纯化的人嗜中性细胞的结合。阳性控制 (纯化的重组体人体 C5a (rHuC5a)) 抑制了此结合。一种同种型匹配的不相关的单克隆抗体未显示任何作用。Y 轴代表 ^{125}I -C5a 结合的抑制百分比, 此在文章中将进行进一步描述。X 轴代表竞争剂 (competing agent) 的浓度。

图 6 显示了通过将合成肽重迭在纤维素膜上而绘出的在人体 C5a 上的抗原 MAb 137-26 的结合表位。

图 7A 显示了在重组水蛭素防止凝血的全血模型中, 在经调理过的大肠杆菌刺激的人嗜中性细胞上的 CD11b 表达。抗 C5/C5a Mab137-26 (实心圆) 比抗 C5a MAb561 (Dr. Jurg Kohl, 实心方块) 和抗 C5 MAb137-30 (实心三角) 更有效地抑制了 CD11b 表达。后者抗体抑制了 C5 活化。不相关的 MAb (实心倒三角) 未起到任何作用。Y 轴代表由免疫荧光血细胞计数法 (Immunofluorocytometry) 测量到的平均荧光强度 (MFI)。X 轴代表抗体浓度 ($\mu\text{g/ml}$)。T-0=在时间 0 分钟的基线全

血样本。T-10=仅利用 PBS 培养 10 分钟而不具有大肠杆菌的全血。其它样本，无论是否具有抑制剂，都添加了大肠杆菌。

图 7B 显示了在重组水蛭素防止凝血的全血模型中，在经调理过的大肠杆菌刺激的人体嗜中性细胞上的 CD11b 表达。抗 C5/C5a MAb137-26（实心圆）比肽 C5aR 对抗剂（Dr. Stephen Taylor）（实心方块）更有效地抑制了 CD11b 表达。不相关的肽未起到任何作用（实心倒三角）。Y 轴代表由免疫荧光血细胞计数法（Immunofluorocytometry）测量到的平均荧光强度（MFI）。X 轴代表抗体/肽的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）。T-0=在时间 0 分钟的基线全血样本。T-10=仅利用 PBS 培养 10 分钟而不具有大肠杆菌的全血。其它样本，无论是否具有抑制剂，都添加了大肠杆菌。

图 7C 显示了在重组水蛭素防止凝血的全血模型中，经调理过的大肠杆菌刺激的人体嗜中性细胞的氧化爆发（oxidative burst）。抗 C5/C5a MAb137-26（实心圆）和抗 C5 MAb137-30（实心三角）两者都比抗 C5a Mab561（实心方块）更有效地抑制了氧化爆发。不相关的抗体（实心倒三角）未起到任何作用。Y 轴代表由免疫荧光血细胞计数法（Immunofluorocytometry）测量到的平均荧光强度（MFI）。X 轴代表抗体的浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）。T-0=在时间 0 分钟的基线全血样本。T-10=仅利用 PBS 培养 10 分钟而不具有大肠杆菌的全血。其它样本，无论是否具有抑制剂，都添加了大肠杆菌。

图 7D 显示了在重组水蛭素防止凝血的全血模型中，经调理过的大肠杆菌刺激的人体嗜中性细胞的氧化爆发（oxidative burst）。抗 C5/C5a MAb137-26（实心圆）比肽 C5aR 对抗剂（实心方块）更有效地抑制了氧化爆发。不相关的肽未起到任何作用。Y 轴代表由免疫荧光血细胞计数法（Immunofluorocytometry）测量到的平均荧光强度（MFI）。X 轴代表以 nM 表示的抗体浓度。T-0=在时间 0 分钟的基线全血样本。T-10=仅利用 PBS 培养 10 分钟而不具有大肠杆菌的全血。其它样本，无论是否具有抑制剂，都添加了大肠杆菌。

图 8 显示了在重组水蛭素防止凝血的全血模型中，MAC 介导的奈瑟氏脑膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）的杀死。通过人全血在存在抗 C5/C5a MAb137-26（实心圆）、不相关的 MAb（实心三角）、或 PBS（空

心圆)的情况下的培养来有效地杀死细菌。相反,当以会抑制 C5 活化且因此抑制 MAC 形成的抗 C5 MAbl37-30(空心菱形)来处理全血时,细菌不会被杀死。Y 轴代表在血琼脂上,经 37° C 下 24 小时培养的每 100 μ l 的全血的集落形成单位(colony forming unit, CFU)。X 轴代表从全血培养实验中血样采集的不同时点。

具体实施方式

1. 本发明的优势

本发明的抑制剂(包括单克隆抗体 MAbl37-26)优于已知的用于治疗补体介导的炎症及组织损坏的单克隆抗体抑制剂。MAb 137-26 能在其被激活之前与 C5 结合。在 C5 被激活以形成 C5a 之后,抗体可中和 C5a, C5a 是过敏毒素。通常,一旦 C5a 已经形成,其就会迅速与细胞上的 C5aR 结合,由此触发会导致炎症的信号传导级联(signal transduction cascade)。MAb 137-26 并不抑制 C5 分裂以形成 C5a 和 C5b,但是 C5a 在其产生之后保持与 MAbl37-26 结合,并抑制 C5a 结合至 C5aR。然而, C5b-9 的形成并未受到影响,且由于 MAC 的形成需要 C5b-9(其与杀死细菌有关)的缘故,因而保持 C5b-9 的产生对于保护性免疫反应来说是重要的。

MAb 137-26 可有效地中和 C5a 的发炎效应,但是仍允许补体级联的其它组份(包括 C3 和 C5b-9)来介导抗菌作用。此药理特性对于治疗细菌性败血症、慢性 IC 疾病以及牛皮癣而言格外重要。

2. 制造并使用本发明

A. 单克隆抗体

可利用由 Kohler 等人在 Nature, 256:495 (1975)首次描述的杂交瘤方法来制造单克隆抗体,或者可通过重组 DNA 方法(美国专利第 4,816,567 号)来制造单克隆抗体。

在杂交瘤方法中,使小鼠或其它合适的动物宿主受到如上文所述的免疫,以引出可产生或能产生抗体的淋巴细胞,所述抗体将特定结合至为免疫所用的蛋白质。还可利用 DNA 构造(DNA construct)来使动物免疫,以表达活体内用于诱发特异抗体(specific antibody)的编码蛋白质(encoding protein)。或者,可在活体外使淋巴细胞免疫。

然后, 利用合适的熔合剂(如聚乙二醇), 让淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 以形成杂交瘤细胞(Goding 着, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

如此制得的杂交瘤细胞被播种且在合适的培养介质中生长, 所述培养介质较佳包含一种或多种可抑制未熔合的亲本骨髓瘤细胞的生长或成活的物质。例如, 如果母本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT 或 HPRT), 那么用于这些杂交瘤的培养介质通常将包括次黄嘌呤、氨蝶呤、及胸腺嘧啶核苷(HAT 介质), 这些物质防止了缺乏 HGPRT 的细胞的生长。

较佳的骨髓瘤细胞是那些有效熔合的、支持由所选择的抗体产生细胞的稳定且高产量的抗体生产、且对例如 HAT 介质的介质敏感的骨髓瘤细胞。在这些骨髓瘤细胞系(Myeloma Cell Line)中的是鼠科骨髓瘤系, 如从可自美国加利福尼亚州圣地亚哥市 Salk Institute Cell Distribution Center 获得的 MOPC-21 及 MPC-11 鼠科肿瘤、以及可自美国马里兰州罗克维尔市 American Type Culture Collection 获得的 SP2/0 或 X63-Ag8-653 细胞衍生出来的那些骨髓瘤系。我们也已经描述了将人骨髓瘤和鼠-人的杂骨髓瘤细胞系用于产生人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur 等人着, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63页(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987年))。也可以使用所述的小鼠骨髓瘤细胞系 NS0(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire UK)。

分析在其中杂交瘤细胞得以生长的培养介质来用于生产针对抗原的单克隆抗体。可通过免疫沉淀反应或通过活体外结合分析(如反射性免疫分析(radioimmunoassay, RIA)或酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunoabsorbent assay, ELISA))来测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

在鉴定出杂交瘤细胞产生了具有所要的特异性、亲和力和/或活性的抗体之后, 这些克隆可通过限制稀释过程被亚克隆(subclone)并通过标准方法生长(Goding 着, Monoclonal Antibodies: Principles

and Practice, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。适用于此目的的培养介质包括(例如) D-MEM 或 RPMI-1640 介质。此外, 这些杂交瘤细胞也可在活体内生长, 如动物体内的腹水肿瘤。

通过惯用的免疫球蛋白纯化过程, 将由这些亚克隆体所分泌的单克隆抗体从培养介质、腹水流体、或血清中分离开来, 所述的免疫球蛋白纯化过程诸如(例如) 蛋白质 A-琼脂糖 (protein A-Sepharose)、羟磷灰石层析法 (hydroxylapatite chromatography)、凝胶电泳、透析法、或亲和力层析法 (affinity chromatography)。

利用惯用的过程容易将编码单克隆抗体的 DNA 进行单离及排序 (Innis M. 等人着, In PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic, San Diego, CA (1990), Sanger, F.S, 等人着, Proc. Nat. Acad Sci. 74:5463-5467 (1977))。这些杂交瘤细胞用作这种 DNA 的源。一经单离, 这种 DNA 就可被置于表达载体 (expression vector) 中, 这些表达载体接着被转染到宿主细胞 (如不会另外产生免疫球蛋白蛋白质的大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵槽 (CHO) 细胞 (Chinese hamster ovary cell)、或者骨髓瘤细胞) 中, 以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。下面将更加详细地描述抗体的重组生产。

在另一实施例中, 可将抗体或抗体片段从利用在 McCafferty 等人所着的 Nature 348:552-554(1990)中所描述的技术而生成的抗体噬菌体库 (antibody phage library) 单离出来。Clackson 等人所着的 Nature 352:624-628 (1991) 和 Marks 等人所着的 J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 分别描述了利用噬菌体库的鼠和人抗体的单离。后来的出版物描述了通过链改组 (chain shuffling) (Marks, 等人着, Bio/Technology 10:779-783 (1992)) 的高亲和力 (nM 范围) 人抗体的产生, 以及组合感染 (combinatorial Infection) 和活体内重组, 作为用于构造非常大的噬菌体库的策略 (Waterhouse, 等人着, Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993))。因此, 这些技术是用来单离单克隆抗体的传统的单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代选择。

举例而言, 也可通过用编码序列 (coding sequence) 替代人的重链和轻链恒定域 (constant domain) 而不是同源鼠类序列 (homologous

murine sequence) (美国专利第 4,816,567 号; Morrison, 等人着, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984)), 或者通过将全部或部分的非免疫球蛋白多肽的编码序列共价结合到免疫球蛋白编码序列, 来让 DNA 改质。

通常, 用这些非免疫球蛋白多肽来替代抗体的恒定域, 或用它们来替代抗体的一个抗原组合位点的可变域 (variable domain) 以形成一种嵌合二价抗体 (chimeric bivalent antibody), 其包含一个具有用于一种抗原的特异性的抗原结合位点和另一个具有用于不同的抗原的抗原结合位点。

另一个替代选择是, 使用电熔合 (electrical fusion) 而非化学熔合来形成杂交瘤。此技术是非常确实的。除了熔合, 我们还可以利用 (例如) Epstein Barr Virus、或变形基因来让 B 细胞变形以使其永生 (immortal)。(参见例如 "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki, V. R. 等人着, 在 Monoclonal Antibodies 书中, 由 Kennett R. H. 等人编, Plenum Press, N.Y. 1980, 第 19-33 页。)

B. 人化及人抗体

一种人化抗体具有由一非人源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人体氨基酸残基通常被称作“输入”残基, 其通常是取自一“输入”可变域。基本上可按照 Winter 及其共事者的方法 (Jones 等人着, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann 等人着, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen, 等人着, Science, 239:1534-1536 (1988)), 通过用啮齿动物的 CDR 或 CDR 序列来替代人抗体的对应序列, 来执行人化过程。因此, 在这些“人化”抗体中, 大体上毫不受损 (less than intact) 的人类可变域 (human variable domain) 已经被来自非人物种的对应序列所取代。实际上, 人化抗体通常是其中某些 CDR 残基或有可能某些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中的同源位点所取代的人抗体。

将用于制造人化抗体的人可变域 (轻的和重的) 的选择对于减小抗原性十分重要。根据所谓的“最适合的”方法, 相对于已知的人类可变域序列的整个库来筛选啮齿动物抗体的可变域的序列。然后将最

接近于啮齿动物序列的人类序列视作人化抗体的人类 (human) 骨架 (FR) (Sims 等人着, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia 等人着, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一方法使用了从轻或重链的特定亚群的所有的人抗体的交感序列衍生出的特定骨架。相同的骨架可用于几种不同的人化抗体 (Carter 等人着, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta 等人着, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

更重要的是抗体应被人化成保持抗原的高亲和力和其它有利的生物特性。为达成此目的, 根据一较佳方法, 利用母体和人化序列的三维模型, 通过分析亲本序列 (parental sequence) 和各种概念的人化产物的过程, 来制备人化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可获得的, 且为所属技术领域的技术人员所熟悉。可获得说明并展示所选择的候选免疫球蛋白序列 (candidate immunoglobulin sequence) 的可能的三维构造结构 (conformational structure) 的计算机程序。对这些显示的检测允许对残基在候选免疫球蛋白序列的作用中的可能的角色分析, 意即, 对可能影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基的分析。以此方式, 可从接受和输入序列中选择并组合 FR 残基, 以达成所要的抗体特征, 如 (多个) 目标抗原的增加的亲和力。一般而言, 这些 CDR 残基可直接且最实质地卷入到影响抗原结合中。

或者, 所属技术领域的研究者可生产出转基因动物 (例如小鼠), 它们在免疫时, 能够在没有内源免疫球蛋白生产的情况下产出抗体所有组成部分 (full repertoire)。可从加利福尼亚州弗里蒙特市的 Abgenix, Inc.、以及新泽西州安南达尔市的 Medarex, Inc. 获得这样的转基因小鼠。已经描述了在嵌合且种系突变的小鼠中的抗体重链结合区 (joining region, JH) 基因的纯合缺失 (homozygous deletion) 会导致内源抗体产生的完全抑制。在这样的种系突变小鼠中的人类种系免疫球蛋白基因阵列的转移将会导致在抗原激发 (antigen challenge) 时产生人抗体。参见例如 Jakobovits 等人所着, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits 等人所着, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann 等人所着, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 及 Duchosal 等人所着, *Nature* 355:258 (1992)。还可从噬菌

体展示库中衍生出人抗体 (Hoogenboom 等人着, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks 等人着, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan 等人着, Nature Biotech 14:309 (1996))。

C. Delmmunised 抗体

Delmmunised 抗体是其中潜在的 T 细胞表位已经被排除的抗体, 如国际专利申请案 PCT/GB98/01473 中所述。因此, 当将它们施用于活体内时, 我们期望能消除或大体上减小人体中的免疫原性。

此外, 例如, 可通过共价共轭作用于聚合物来化学地改质抗体, 以增加其循环半衰期 (circulating half-life)。在美国专利第 4,766,106、4,179,337、4,495,285 以及 4,609,546 中显示了较佳的聚合物和将其粘着到肽的方法, 该等专利的全部内容以引用的方式并入本文中。较佳聚合物是聚氧乙烯多元醇 (polyoxyethyhtated polyol) 和聚乙二醇 (PEG)。PEG 在室温下可溶于水, 且其平均分子量较佳在 1000 到 40,000 之间, 更佳在 2000 到 20,000 之间, 最佳在 3000 到 12,000 之间。

D. 抗 C5/C5a MAbs 的生成

可通过在本技术领域内所熟知的传统的杂交瘤技术来生成本发明的抗体。简言之, 用从人体血清提纯的 C5 作为免疫原, 在完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant) 中乳化, 并进行皮下地或腹膜内地注射 10-100 μ g 范围的量, 来使小鼠免疫。十到十五天之后, 利用在不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant) 中乳化的额外的 C5 来增强动物免疫。此后以每周到每两周的免疫进程来周期性地增强小鼠免疫。

为每次熔合, 从免疫过的小鼠的脾中制备单细胞悬浮液 (single cell suspension), 并将其用来与 SP2/0 骨髓瘤细胞熔合。使 SP2/0 细胞 (1×10^8) 和脾细胞 (1×10^8) 在含有 50% 的聚乙二醇 (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, NY) 和 5% 的二甲亚砜 (dimethylsulfoxide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 的介质中熔合。然后将这些细胞调整成在 DMEM 介质 (Gibco, Grand Island, NY) 中每毫升的悬浮液含有 1.7×10^5 的脾细胞的浓度, 补充有 5% 的牛胎儿血清和 HAT (10mM 的次黄嘌呤钠, 40 μ M 的氨蝶呤, 以及 1.6mM 的胸腺嘧啶核苷)。将两

百五十微升的细胞悬浮液添加到大约 50 个 96 孔微量培养板 (microtest plate) 的每个孔中。在大约十天之后, 抽取上层培养液 (culture supernatant) 以用来筛选 (screen for) 与由 ELISA 纯化的人 C5 的反应性。

用 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (50 μl /孔) 的人体 C5 来隔夜涂铺 Immulon II (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) 微量培养板的孔。然后, 通过以 200 μl 的含 5% BLOTTO (无脂干奶) 在磷酸盐缓冲盐水 (phosphate-buffered saline, PBS) 进行培养 1 个小时, 使这些孔中的非特异性结合位点饱和。然后用 PBST 缓冲液 (含 0.05% 的 TWEEN 20 的 PBS) 对这些孔进行冲洗。在室温下, 将来自每个融合孔的五十微升的上层培养液与 50 μl 的 BLOTTO 一起添加到涂铺过的孔 1 个小时。用 PBST 对这些孔进行冲洗。然后, 通过与稀释的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 共轭的羊抗鼠 IgG (Fc 特异) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 在室温下反应一小時, 来检测所结合的抗体。然后, 用 PBST 对这些孔进行冲洗。将含有 0.1% 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (Sigma, St Louis, MO) 和 0.003% 过氧化氢 (Sigma, St. Louis, MO) 的 0.1M 乙酸钠 pH 6.0 的过氧化物酶底物溶液添加到这些孔中, 用来彩色显影 30 分钟。通过向每个孔添加 50 μl 的 2M H_2SO_4 来终止此反应。利用 ELISA 读取器 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) 在 450nm 下读取光密度 (OD)。

通过极限稀释法来单细胞克隆孔中对 C5 反应性呈阳性的杂交瘤。然后, 扩大单克隆杂交瘤并收集上层培养液用来通过蛋白质 A 层析法进行纯化。然后, 经纯化的抗体的特征在于能通过 ELISA 与人 C5 和 C5a 反应, 能通过 BIAcore 来测定亲和力及动力结合常数, 能通过经典和替代途径对补体介导的溶血作用起作用, 并能抑制 ^{125}I -C5a 与纯化的人嗜中性细胞结合。

也可以通过淘洗 (panning) 那些结合 C5 的人 scFv 库来选择抗体 (Griffiths 等人着, EMBO J. 12:725-734 (1993))。可通过使用已知的分析法 (Griffiths 等人、Clarkson 等人着, Nature, 352: 642-648 (1991)) 来评估特定克隆体的特异性和活性。在第一淘洗步骤之后, 我们获得了含有多种不同的展示在更好的结合了 C5 的噬菌体上的单链抗

体的噬菌体库。接下来的淘洗步骤提供了具有更高结合亲和力（binding affinity）的额外库。当亲合力（avidity）效应成为问题时，可使用单价噬菌体展示库，其中小于 20%、小于 10%或小于 1% 的噬菌体将抗体的不止一个复本展示在噬菌体表面上。可通过使用噬粒（phagemid）和辅助噬菌体（helper phage）来完成单价显示。合适的噬粒包括 M13、f1 和 fd 丝状噬菌体。具有病毒外壳蛋白的融合蛋白质显示也已为我们所知，并可用于本发明中。

进一步说明以可比的亲和力结合了 C5 和 C5a 的 MAb 137-26 的特征。MAb 137-26 并不抑制 C5 活化作用，但是可以非常高效能地抑制在纯化的人体嗜中性细胞上 C5a 与 C5aR 的结合。在下面的实例中将进一步解释证明这些特性的实验。

为筛选结合到相关抗原（例如，阻断本文所揭示的任何抗体与 C5 结合的那些表位）上的特定表位的抗体，可执行例行交叉阻断分析（routine cross-blocking assay）（例如在 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 由 Harlow 和 David Lane 编辑(1988)中所述）。或者，可进行表位作图（epitope mapping）（例如，如在 Champe 等人所著的 J. Biol. Chem. 270:1388-1394（1995）中所述）以测定抗体是否结合了相关的表位。

E. 制造本发明的其它抑制剂

可通过惯用的手段将适用于本发明的其它分子从化合物库中单离或筛选出来，例如通过测定它们是否结合至 C5/C5a，并接着进行功能筛选（functional screen）以测定它们是否抑制 C5b 的活性。一种用于生成并筛选化合物库的自动系统在美国专利第 5,901,069 及 5,463,564 中有描述。更引人注意的方法涉及相对于 Mab 137-26 的竞争性筛选，或制造结合位点的三维模型，且然后制造适合于此模型的分子家族。然后，从中筛选出那些具有最理想的结合特征的分子。此外，通过对与 MAb137-26 具有相同特性的抑制剂的竞争分析或功能筛选，可鉴别出其它分子。

F. 使用本发明的抑制剂

本发明的分子可通过数个路线中的任何一个来投药，并按所指示或为所寻求的目的在治疗上有效的浓度来投药。为达成此目的，可利

用所述技术领域内已知的各种可接受的赋形剂而让抗体成形。通常，通过注射来投药抗体。所述技术领域内的技术人员已知用以完成此投药的方法。也可能获得可局部投药或口服、或可能够穿过黏膜传输的组合物。

投药的剂量和方式将取决于个体和将被投药的药剂。可通过临床试验中的例行式实验或从抗体奏效的动物模型中外推来确定剂量。

可将本发明的抗体用于治疗由过量或不受控制的 C5a 生产而介导的疾病和疾患。下面陈述本发明的抑制剂在治疗这些疾病和疾患中的用途的证据。

实例 1: MAb137-26 与人 C5 和 C5a 的反应性

测试 MAb137-26 与纯化的人体 C5 和重组 C5a 的反应性 (Sigma, St Louis, MO)。上文已描述 ELISA 的过程。MAb137-26 以剂量依赖的方式高效能地与 C5 结合 (图 1)。另一种特别用于人体 C5 的 β 链的抗 C5 MAb137-76 不会结合 C5a, 因为 C5a 在 C5 的 α 链上。一种被用作阴性控制的同种型匹配的不相关的抗体也不会与 C5a 反应。另一方面, MAb137-26 和 137-76 都会与 C5 结合 (图 2)。

也通过 BIAcore 设备 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden) 来测定 MAb 137-26 与 C5a 和 C5 的亲合力平衡常数和结合动力学常数 (缔合或离解)。所有的结合测量都在 25° C 下在 HEPES 缓冲盐水 (HBS) (10mM 的 HEPES, pH 7.4, 150 mM 的 NaCl, 3.4 mM 的 EDTA, 0.005% 的表面活性剂 P20) 中进行。为测量 C5 和 C5a 与 MAb137-26 的结合率常数, 通过利用 N-羟基丁二酰亚胺 (N-hydroxysuccinimide) 和 N-乙基-N'-(3-二乙基胺基丙基) 阳基环二酰亚胺 (N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide) 进行胺偶合, 将兔抗鼠 IgG (Fc) 抗体固定到 CM5 传感器芯片上不动, MAb137-26 然后就在注射不同浓度的 C5 之前被捕获到涂铺过的传感器芯片上。表 1 中总结了这些数据。MAb137-26 具有对液相 C5a 和 C5 的较高结合亲合力。结果还表明了 MAb137-29 与 C5a 和 C5 所共享的表位相结合。

表 1 结合至 MAb137-26 的 C5 和 C5a 的动力学常数

	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (M)$
C5	1.42×10^5	6.97×10^{-5}	4.92×10^{-10}

C5a	3.7×10^6	2.25×10^{-4}	6.09×10^{-4}
-----	-------------------	-----------------------	-----------------------

K_{on} , 动力缔合常数

k_{off} , 动力离解常数

k_D , 平衡离解常数 = k_{off} / K_{on}

实例 2 补体介导的溶血

为研究 MAb 137-26 在人体血清中 C5 的活化上的作用, 测试抗体对由经典和替代补体途径介导的溶血的抑制作用。

为经典途径实验, 在 4°C 利用 $8\ \mu\text{g/ml}$ 的纯化的兔抗鸡 RBC (Inter-Cell Technologies, Hoperwell, NJ) 免疫球蛋白, 来激活在含有 $0.5\ \text{mM}$ 的 MgCl_2 和 $0.15\ \text{mM}$ 的 CaCl_2 的凝胶体/佛罗那缓冲盐水 (GVB⁺⁺) 中的鸡 RBC (5×10^7 个细胞/ ml) 15 分钟。然后利用 GVB⁺⁺ 对细胞进行冲洗。让冲洗过的细胞重新悬浮在 1.7×10^8 个细胞/ ml 的相同缓冲液中。在圆底 96 孔微量培养板的每个孔中, 将 $50\ \mu\text{l}$ 的正常人血清 (5.2%) 与连续稀释的 MAb137-26 或抗 C2 MAb 175-62 的 $50\ \mu\text{l}$ 的 GVB⁺⁺ 混合, 作为阳性控制。然后, 将 $30\ \mu\text{l}$ 的冲洗过的激活的鸡 RBC 悬浮液添加到含有这些混合物的孔。使五十微升的正常人血清 (5.2%) 与 $80\ \mu\text{l}$ 的 GVB⁺⁺ 混合, 以提供血清色彩背景 (serum color background)。将一种同种型匹配抗 HIV-1gp120MAb 用作阴性控制。所使用的最终人血清浓度为 2%。在 37°C 下培养混合物 30 分钟。在微量培养板摇动器上将板摇动 15 秒。然后, 在 $300 \times g$ 下对板进行离心作用 3 分钟。收集上层液 ($80\ \mu\text{l}$) 并将之转移到圆底 96 孔微量培养板中的孔, 以利用 ELISA 板读取器在 405nm 下进行测量。溶血抑制的百分比定义如下:

$$100 \times [(\text{OD}_{\text{无 MAb}} - \text{OD}_{\text{血清色彩背景}}) - (\text{OD}_{\text{有 MAb}} - \text{OD}_{\text{血清色彩背景}})] / (\text{OD}_{\text{无 MAb}} - \text{OD}_{\text{血清色彩背景}})。$$

图 3 显示了 MAb137-26 和不相关的控制 MAb G3-519 未抑制激活的鸡 RBC 的经典途径溶血, 而阳性控制抗 C2MAb175-62 有效地抑制了溶血。C2 特别涉及经典补体途径。

为此替代途径, 未激活的兔 RBC 被用含有 2nM 的 MgCl_2 和 1.6mM 的 EGTA 凝胶体/佛罗那缓冲盐水 (GVB/Mg-EGTA) 冲洗三次。 $10\ \text{mM}$ 浓度

的 EGTA 被用以抑制经典途径 (K. Whaley 等人着, 在 A.W. Dodds (编), Complement A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, 1997, 第 19-47 页)。分析过程类似于上述的经典途径溶血分析的过程。在此分析中所使用的人血清的最终浓度是 10%。将抗因子 D MAb166-32 用作阳性控制。将上述的相同的同种型匹配不相关的抗 HIV-1gp120Mab 用作阴性控制。

图 4 显示了 MAb137-26 不抑制未激活的兔 RBS 的替代途径溶血, 而抗因子 D MAb166-32 强烈地抑制了溶血作用。因子 D 特别用于替代补体途径。阴性控制抗体不起作用。

总之, 这些结果证实了 MAb 137-26 未抑制 C5 活化作用, 且因此不会抑制 C5a 和 C5b-9 的形成。MAb137-26 不会抑制替代和经典补体途径的活化。

实例 3: 通过 MAb 137-26 抑制 ^{125}I -C5a 结合至纯化的人体嗜中性细胞

从人全血中提纯人体嗜中性细胞并用 Dextran T-500/盐水溶液进行稀释。在室温下培养混合物约 20 分钟或直到出现清楚界定的表面层。将此表面层转移到 50ml 的聚丙烯离心管。在离心作用之后, 让细胞颗粒 (cell pellet) 悬浮于 30ml 的冷 PBSB (在 PBS 中 1% 的 BSA) 中。使细胞悬浮液在 50-ml 的聚丙烯离心管中 10ml 的 Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO) 上成层。在又一次离心作用之后, 则让细胞颗粒再次悬浮于 20 ml 的冷 0.2 % NaCl 中 30 秒, 以溶解 (lyse) RBC。然后, 向细胞悬浮液中添加 20ml 的冷 1.6 % NaCl, 再次离心, 并让嗜中性细胞再次悬浮于 PBSB 中。在冰上保持这些嗜中性细胞, 直到用于 ^{125}I -C5a 结合。

用结合缓冲液 (1% BSA 于 RPMI1640 介质中) 在 1.5ml Eppendorf 离心管中连续稀释 MAb137-26, 以获得在 640nM 到 0.04nM 范围内的最终浓度。将 4 微升的 4nM ^{125}I -C5a (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA) 添加到 36 μl 的稀释 MAb137-26, 以用于在室温下培养 15 分钟。将纯化的重组人 C5a (Sigma, St. Louis, MO) 用作阳性控制, 而将同种型匹配的不相关的单克隆抗体用作阴性控制。为达成 ^{125}I -C5a 的最大结合, 取而代之使用 36 μl 的不含抗体或 C5a 的结合

缓冲液。向每只管添加五十微升的嗜中性细胞悬浮液，用来在冰上进行培养。在 40 分钟的培养期间结束时，将来自每只管的混合物转移到另一 Eppendorf 管中的 800 μ l 的分离缓冲液(6% BSA 于 PBS 中)中。然后，在室温下以 2000 $\times$ g 对这些管进行离心作用 3 分钟。在吸出上层液之后，让细胞颗粒再次悬浮于 0.5ml 的去离子水(de-ionized water)中，以溶解细胞。接着，让细胞溶解产物 (cell lysate) 与 3ml 的用于放射性计数的 Ultima Gold 闪烁液 (scintillation fluid) (Packard Instrument, Meriden, CT) 混合。

125 I-C5a 结合的百分比抑制定义如下：

$$[\text{Cpm}_{\text{max}} - \text{Cpm}_{\text{bkg}}] - [\text{Cpm}_{\text{cit}} - \text{Cpm}_{\text{bkg}}] / [\text{Cpm}_{\text{max}} - \text{Cpm}_{\text{bkg}}] \times 100$$

其中：

Cpm_{max} = 无竞争剂时每分钟的最大计数；

Cpm_{bkg} = 未添加 125 I-C5a 时的背景 cpm；以及

Cpm_{cit} = 有竞争剂时的 cpm。

图 5 显示了放射性碘标记 (125 I) 人 C5a 与纯化的人体嗜中性细胞的结合的抑制。在对 125 I-C5a 与纯化的人体嗜中性细胞的结合的抑制中，MAb137-26 比未标记的 C5a 更有效。用于的 50%抑制(ID50)的 MAb 137-26 的剂量是 0.45nM，与之相比的是 30nM 的 C5a。

实例 4： 通过在纤维膜上的 SPOT 肽来绘制 MAb137-26 在人体 C5a 上的结合表位

通过利用由 Sigma Genosys (the Woodlands, TX) 合成的 SPOT 肽技术，来绘制 MAb137-26 在人体 C5a 上的结合表位。包围整个人体 C5a 的重迭肽 (12-mer) 被合成于纤维膜上。在分析法中，首先在室温下利用阻断溶液 (blocking solution) TBSTB (10 mM 的三氯化物 (Tris chloride), 250 mM 的氯化钠, 1 %牛血清蛋白和 0.05%的 TWEEN 20) 来对膜进行处理 1 个小时，以使所有非特异性结合位点饱和。接着在室温下向膜添加 1 μ g/ml 的 MAb 136-26 阻断溶液 1 个小时。然后用冲洗缓冲液 TBST (10 mM 的三氯化物, 250 mM 的氯化钠和 0.05%的 TWEEN 20) 来对膜进行彻底地冲洗。然后用 HRP 共轭的羊抗鼠 IgG (Fc) 抗体 (以 1:5,000 稀释于阻断缓冲液中) (Jackson immunoresearch, West Grove, PA) 对膜进行处理。然后，再次冲洗此膜。通过利用 Supersignal

West Pico 化学发光底物 (chemilluminescent substrate) (Pierce, Rockford, IL) 进行培养, 来检测 MAb137-26 与 C5a 的个体 SPOTs 肽的结合。接着, 通过曝光于 Kodak X-OMAT AR 胶卷 (Rochester, NY) 来检测化学发光的强度。图 6 显示了由 MAb137-26 所结合的表位序列。

实例 5: 用于研究补体介导的炎症的体外 (ex vivo) 人全血模型: MAb137-26 在由大肠杆菌引起的嗜中性细胞活化上和杀死奈瑟氏脑膜炎菌上的效果

为调查补体在复杂炎症网络中的作用, 必需存在所有潜在的细胞和流体相 (fluid-phase) 介质并因此能同时相互作用。为在活体外设计此一实验, 则应使用人全血。在此模型中, 使用凝血酶特异性的水蛭素模拟物 leplrudin (REFLUDAN) 替代肝素来作为抗凝剂。与肝素不同, 重组水蛭素不会干扰补体活化作用。

在此模型系统中, MAb137-26 阻断了由于通过大肠杆菌引起的补体活化而形成的 C5a 的发炎效应。抗体未抑制 MAC 介导的奈瑟氏脑膜炎菌死亡。因此, MAb137-26 中和 C5a 而不会抑制 C5 活化和随后 MAC 的形成。这是本发明的单克隆抗体的一个重要特点。

在含有重组水蛭素 (50ug/ml) 的聚丙烯试管中收集全血。在 37° C 下用 PBS 或抗 C5 抑制剂来预先培养抗凝血的全血 4 分钟。为了研究在嗜中性细胞上的 CD11b 表达和氧化爆发, 在 37° C 下将调理过的大肠杆菌菌株 LE392 (ATCC 33572) 加入全血样本 10 分钟。大肠杆菌浓度在 CD11b 实验中是 1×10^7 /ml 血, 而在氧化爆发实验中是 1×10^8 /ml。立即处理 T-0 基线样本。在培养之后, 100 μ l 的样本被用来通过免疫荧光血细胞计数法测量在嗜中性细胞上的 CD11b 表达。利用底物二氢罗得明 123 (dihydrorhodamine 123) 来测量激活的嗜中性细胞的氧化爆发, 并按在爆发测试过程 (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Germany) 中的描述来执行。

图 7A-7D 描绘了对嗜中性细胞活化进行的 CD11b 表达和氧化爆发的流式细胞计数分析 (flow cytometric assay) 的结果。抗 C5/C5aMAb137-26 有效地抑制了在具有炎症的人全血模型内由大肠杆菌诱发的嗜中性细胞活化。在这些分析中, MAb137-26 比抗 C5a MAb561 (Dr. Jurg Kohl) 和肽 C5aR 对抗剂 (Dr. Stephen Taylor) 更

加有效。

在杀菌试验中,奈瑟氏脑膜炎菌 H44/76-1 隔夜生长于 BHI 琼脂上,继代培养 (subculture) 并经 4 小时成长进入对数期 (log-phase)。将 5000 - 10000 个集落形成单位 (CFU) 添加到 1.1ml 的利用 PBS 或抗体预先培养了 5 分钟的重组水蛭素抗凝血的全血样本中。在每个时期,将 100 μ l 的全血播种在含有血琼脂的微生物培养皿 (Petri dish) 上并在 37° C 培养 24 小时。细菌生长被表达成所添加的 CFU/100 μ l 的全血。在添加细菌之后立即获得 T-0 样本。

图 8 显示了 MAb137-26 未抑制 MAC 介导的奈瑟氏脑膜炎菌的死亡。相反, MAb137-30 通过人全血抑制了奈瑟氏脑膜炎菌的死亡。此抗体抑制了 C5 活化。

应该了解,在上述部分中所使用的术语和表达式只是例示性的而非限制性的,而且本发明的范围仅由随后的权利要求书来界定,并包括这些权利要求的标的物的所有均等物。

序列表

<110> 唐诚公司

〈120〉 结合至 C5 和 C5A 但不阻止 C5B 形成的补体途径抑制剂

<130> TNX01-06

<140> PCT/US02/26074

<141> 2002-08-17

<150> US60313137

<151> 2001-08-17

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 74

<212> PRT

〈213〉 类人

<220>

〈221〉 肽

<222> (1).. (74)

〈223〉 人类 C5a

<400> 1

Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
1 5 10 15

Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Asn Asn Asp Glu
20 25 30

Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
35 40 45

Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Asn
50 55 60

Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
65 70

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> 类人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(12)
<223> 人类 C5a 片段 从 aa 29 至 aa 40

<400> 2

Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> 类人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(12)
<223> 人类 C5a 片段从 aa 32 至 aa 43

<400> 3

Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 类人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(12)
<223> 人类 C5a 片段从 aa 35 至 aa 46

<400> 4
Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> 类人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(12)
<223> 人类 C5a 片段从 aa 38 至 49

<400> 5

Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 类人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(12)
<223> 人类 C5a 片段从 aa 41 至 aa 52

<400> 6

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

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 类人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(12)
<223> 人类 C5a 片段从 aa 44 至 aa 55

<400> 7

Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys
1 5 10

图1 ELIS 中 MAb137-26 与 C5a 的反应性

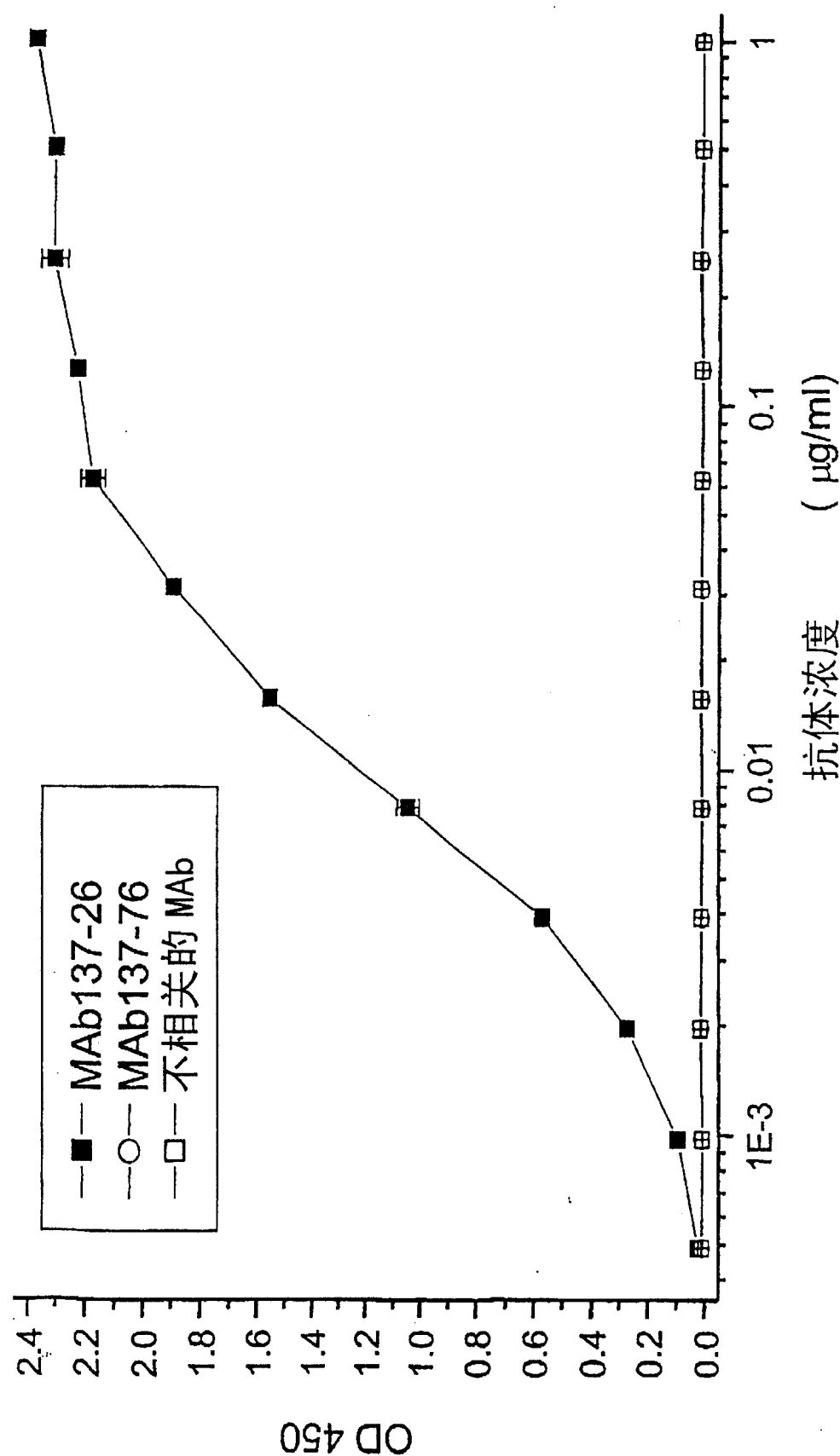


图 2 ELIS 中 MAb137-26 与 C5 的反应性

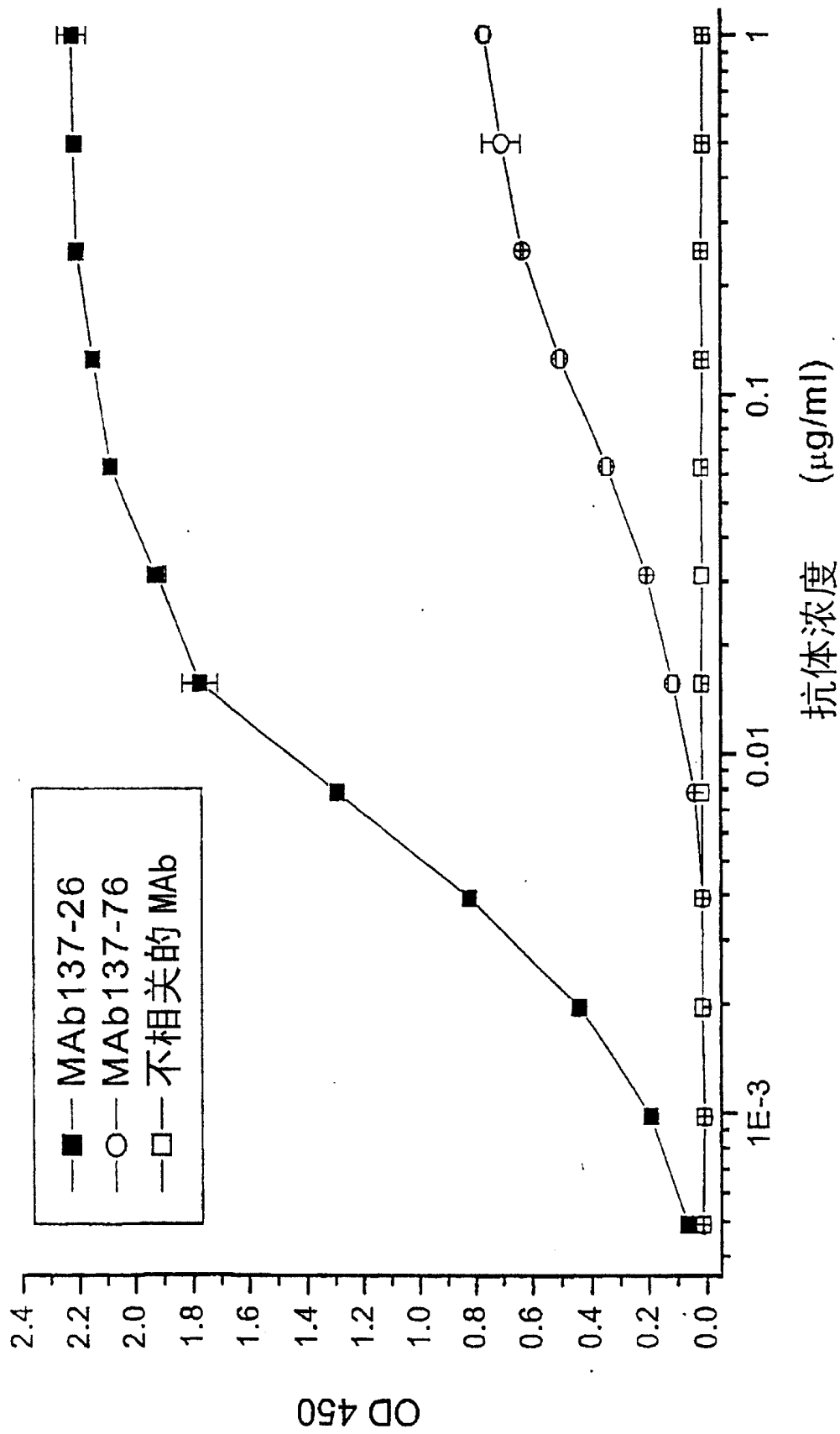


图 3 MAb137-26 对补体 CP 溶血无抑制

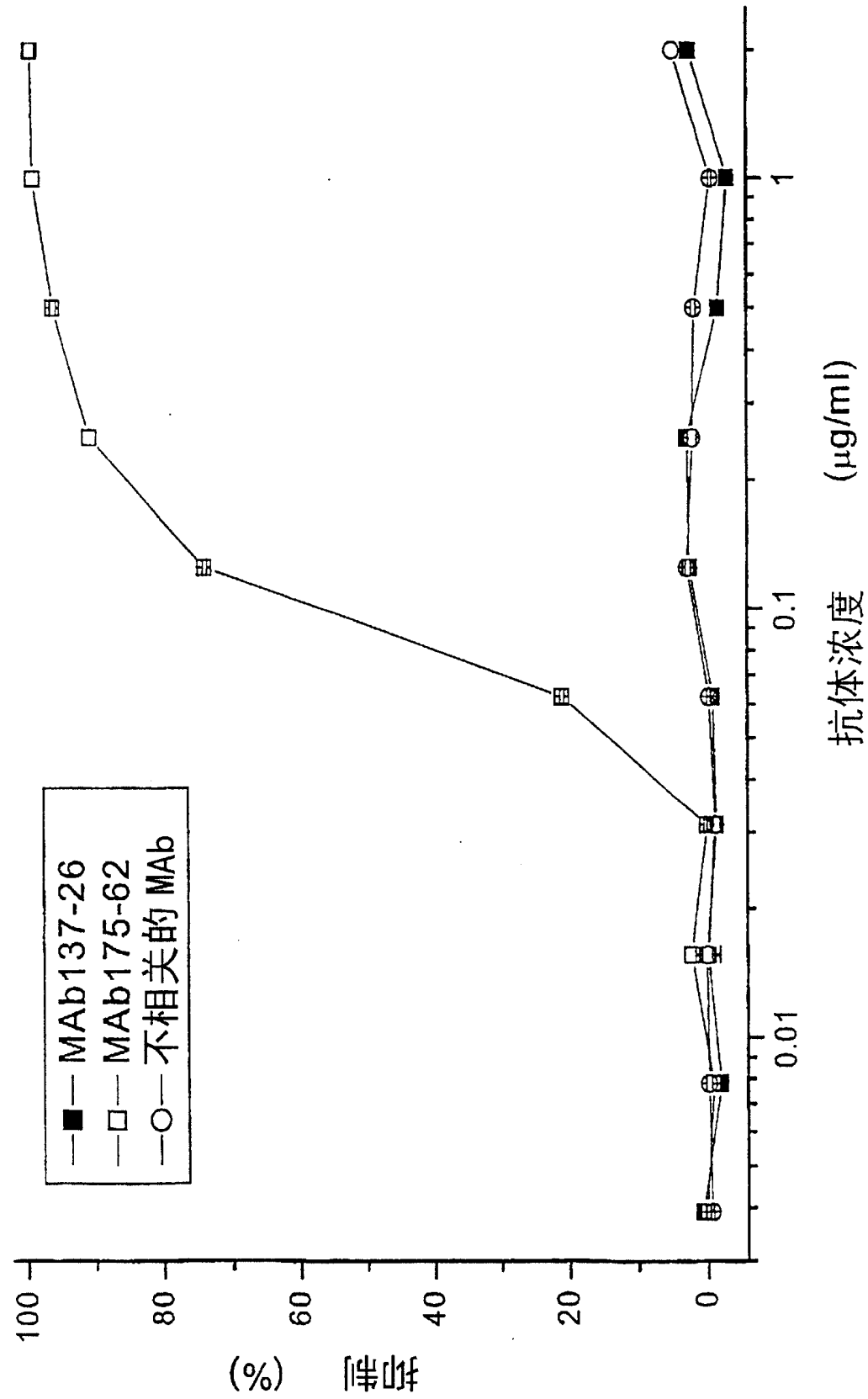


图 4 MAb137-26 对补体 AP 溶血无抑制

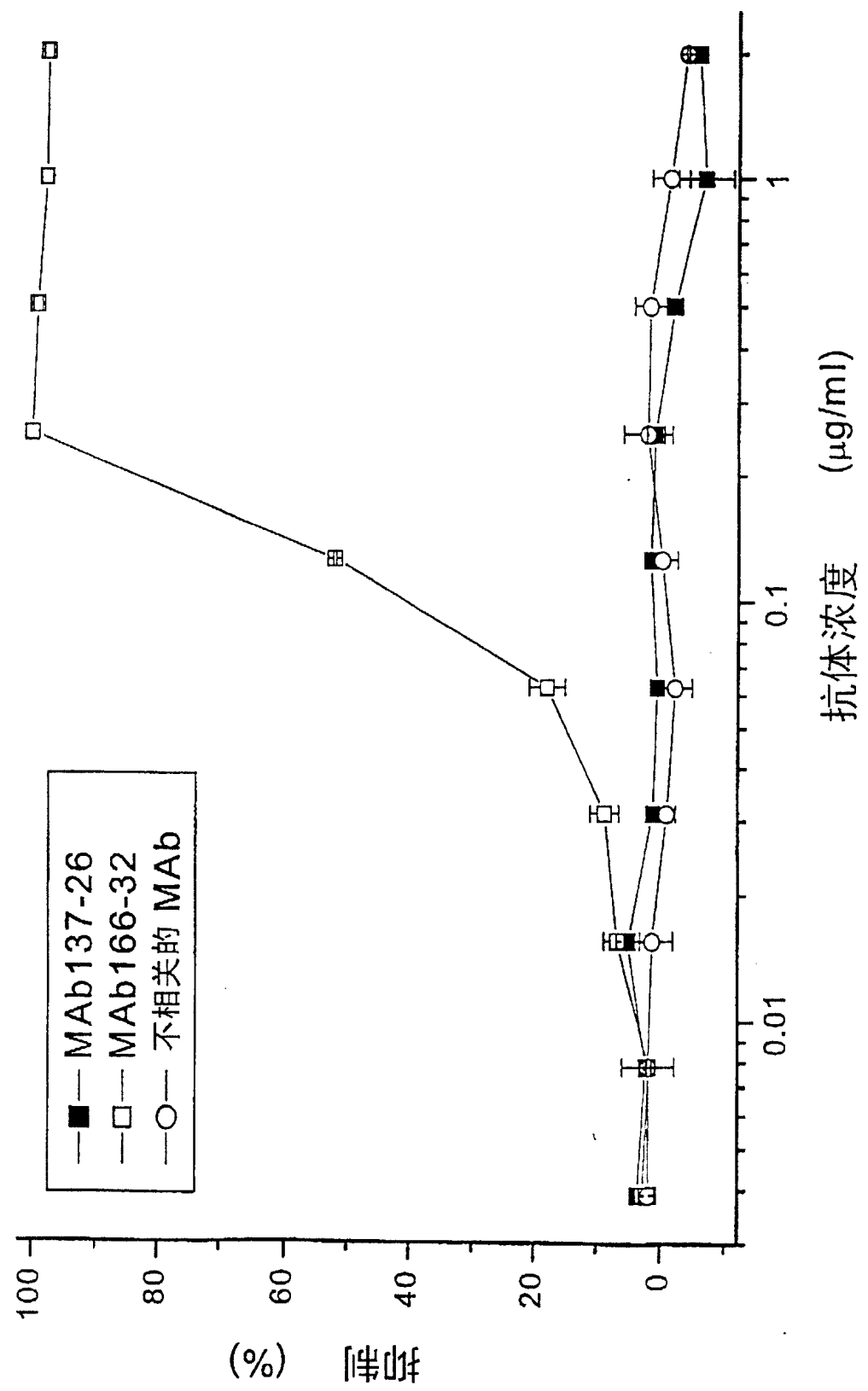


图 5 MAb137-26对¹²⁵I-C5a 到人体嗜中性细胞的抑制

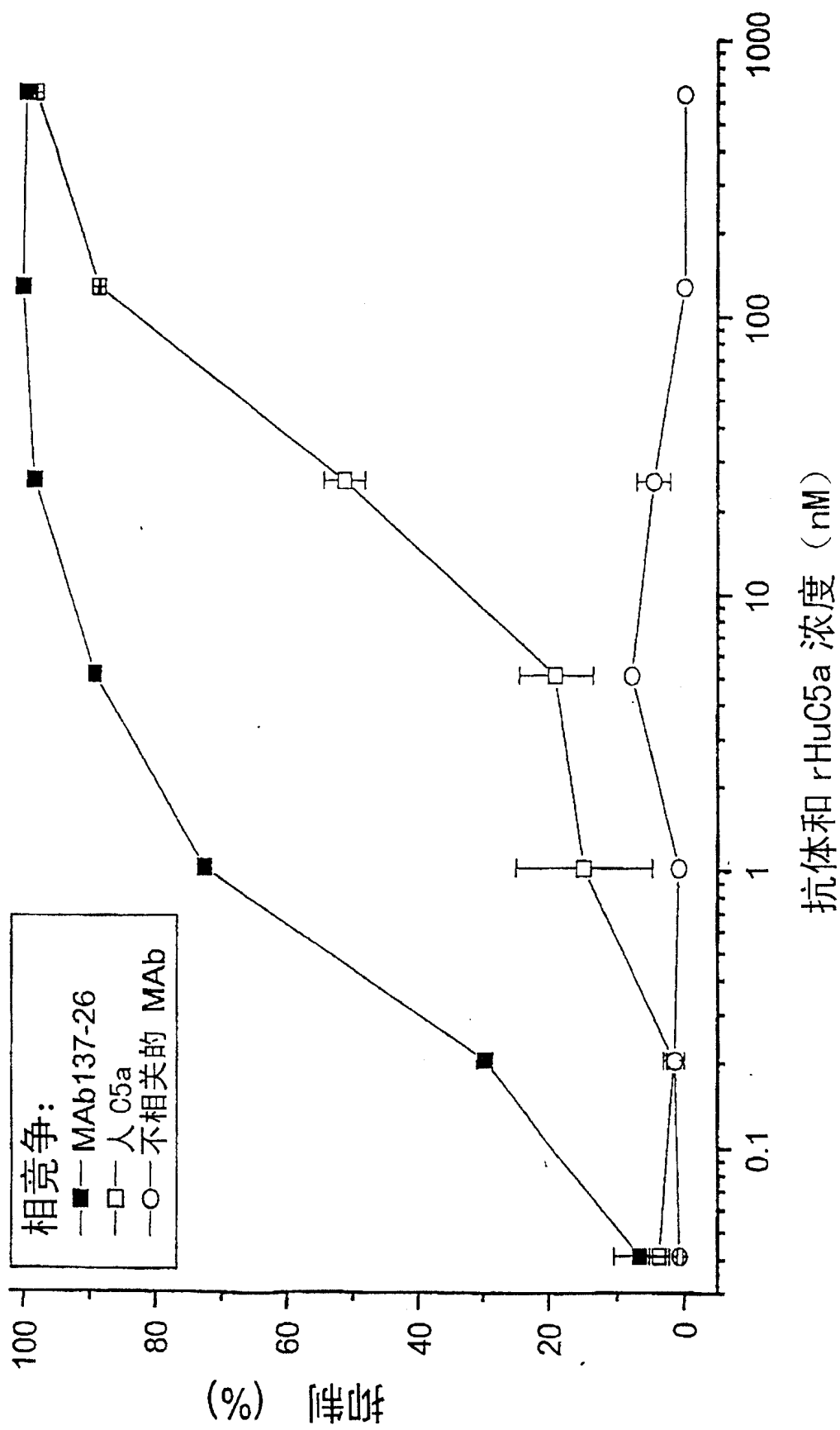


图6 在人C5a上MAb137-26 的结合表位

N-TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDETCEQRAARISLGPRC**IKAFTECC**VVASQ

LRANISHKDMQLGR –C SEQ ID NO 1

肽 MAb137-26的反应活性

SEQ ID NO 2	NNDETCEQRAAR	-
SEQ ID NO 3	ETCEQRAARISL	+
SEQ ID NO 4	EQRAARISLGPR	++++
SEQ ID NO 5	AARISLGPRC IK	+++
SEQ ID NO 6	ISLGPRC IKAFTE	++
SEQ ID NO 7	GPC IKAFTECC	-

图 7A 抗 C5/C5a MAb137-26 抑制全血模型中由大肠杆菌刺激的人体嗜中性细胞上的 CD11b 表述

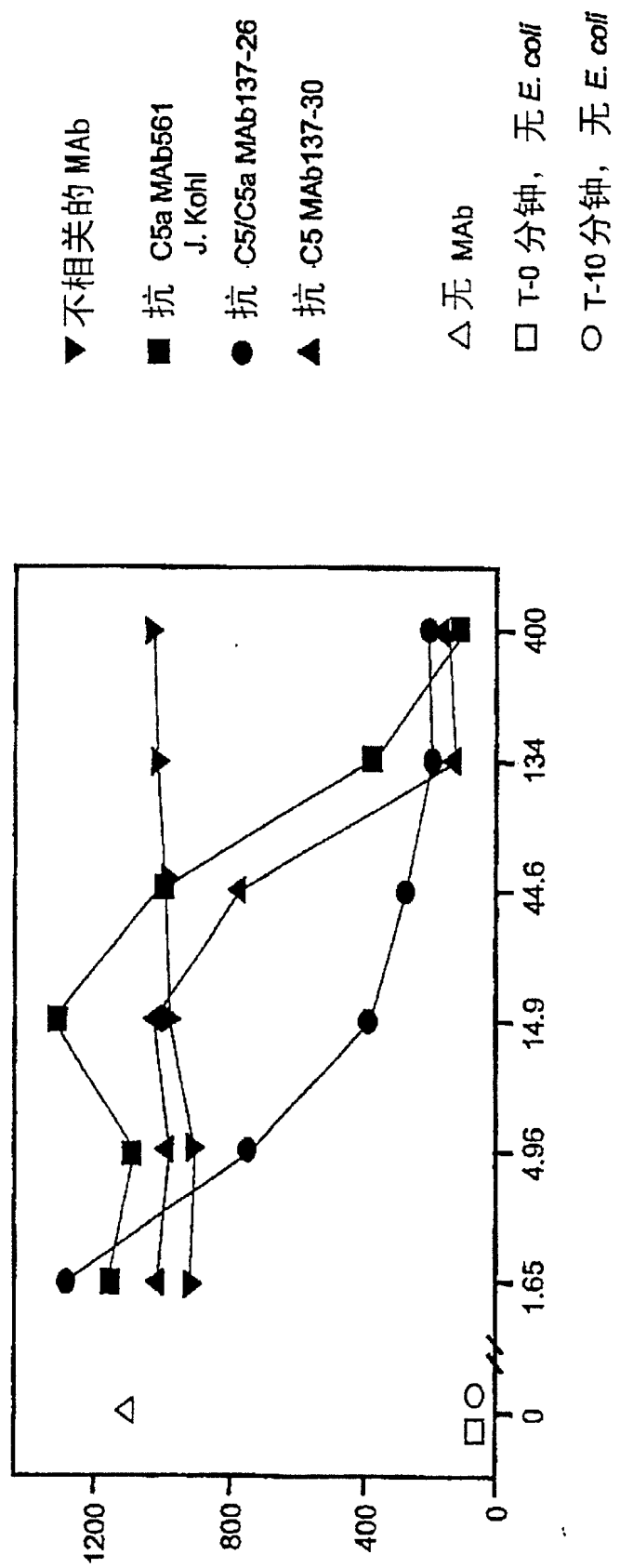


图 7B 抗 C5/C5a MAb137-26 抑制全血模型中由大肠杆菌刺激的人体嗜中性细胞上的 CD11b 表述

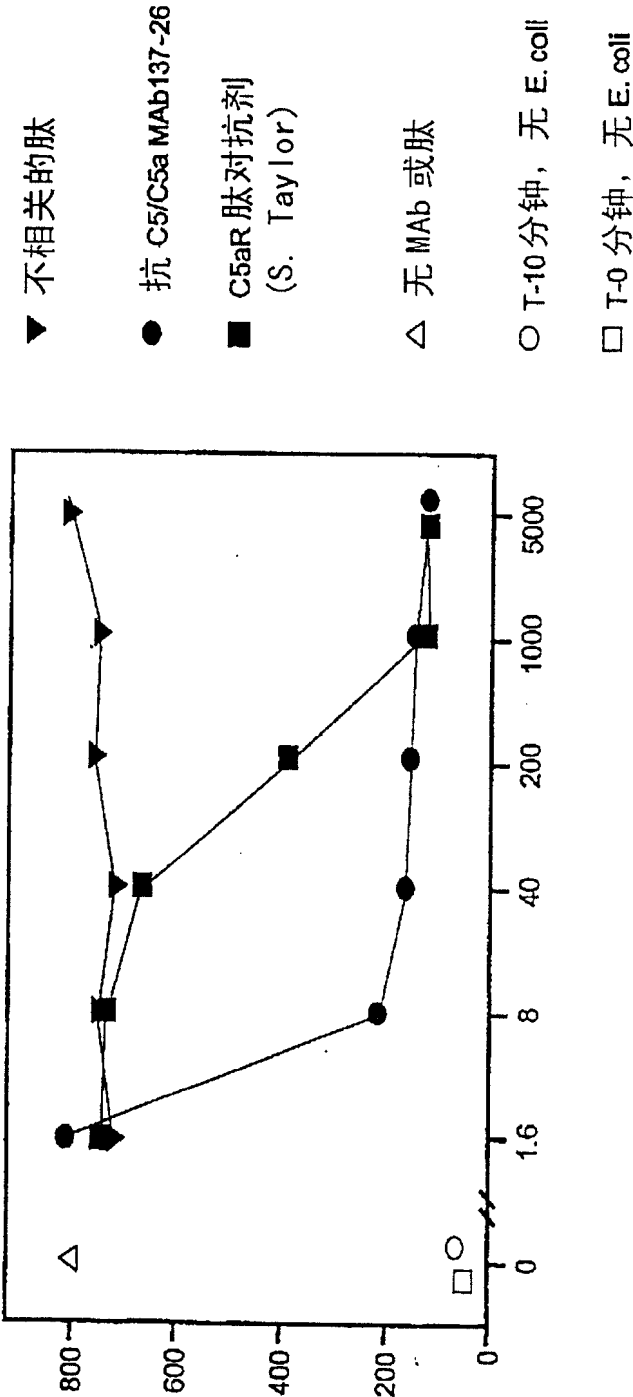


图 7C 抗 C5/C5a 抑制全血模型中大肠杆菌刺激的
人体嗜中性细胞的氧化爆发

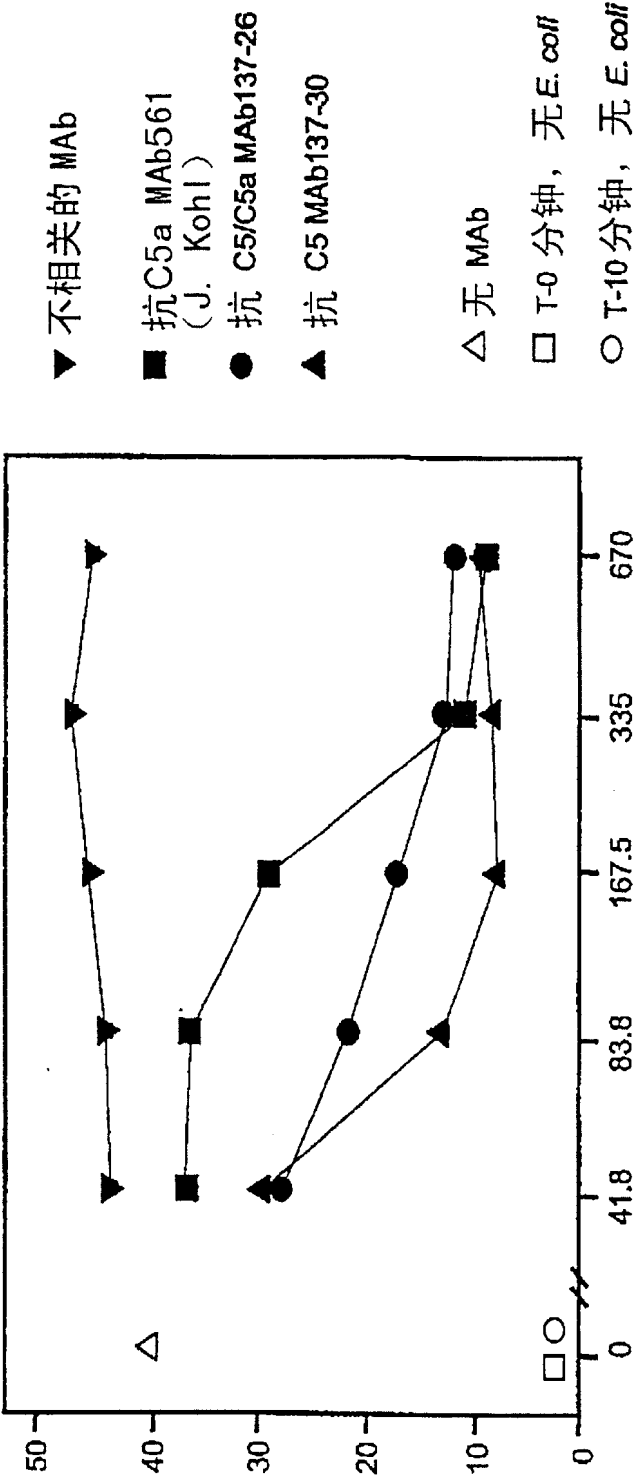
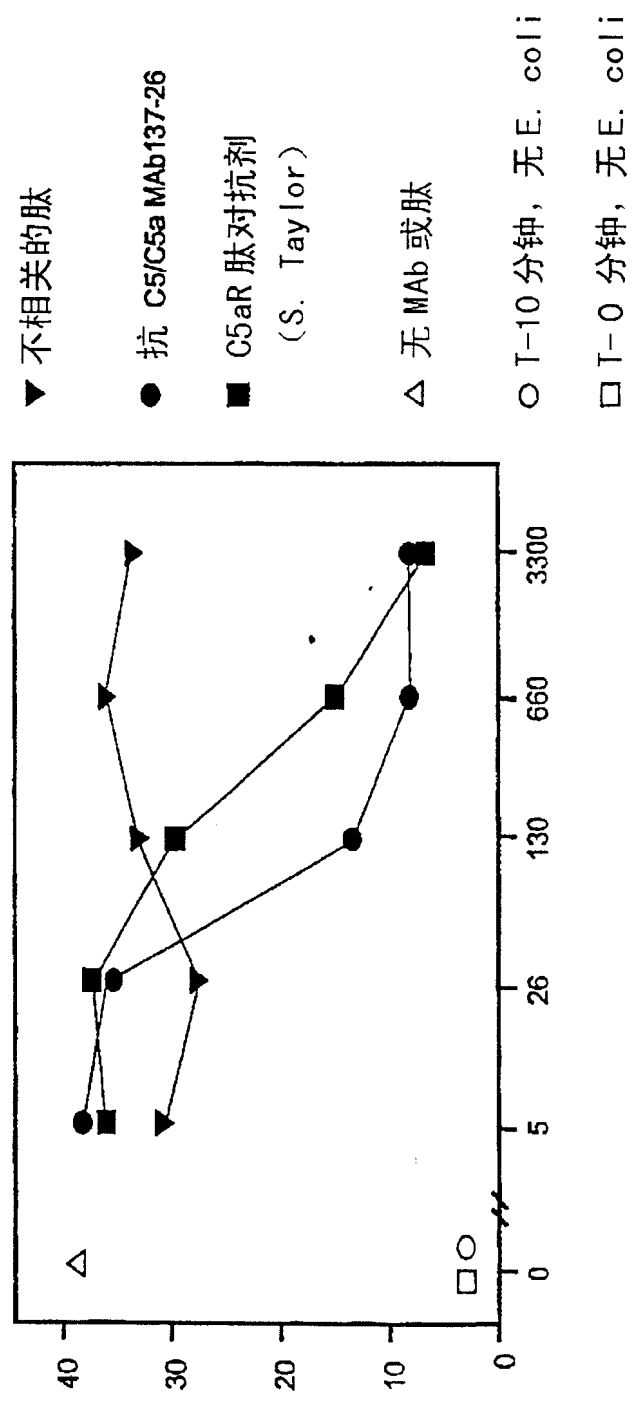
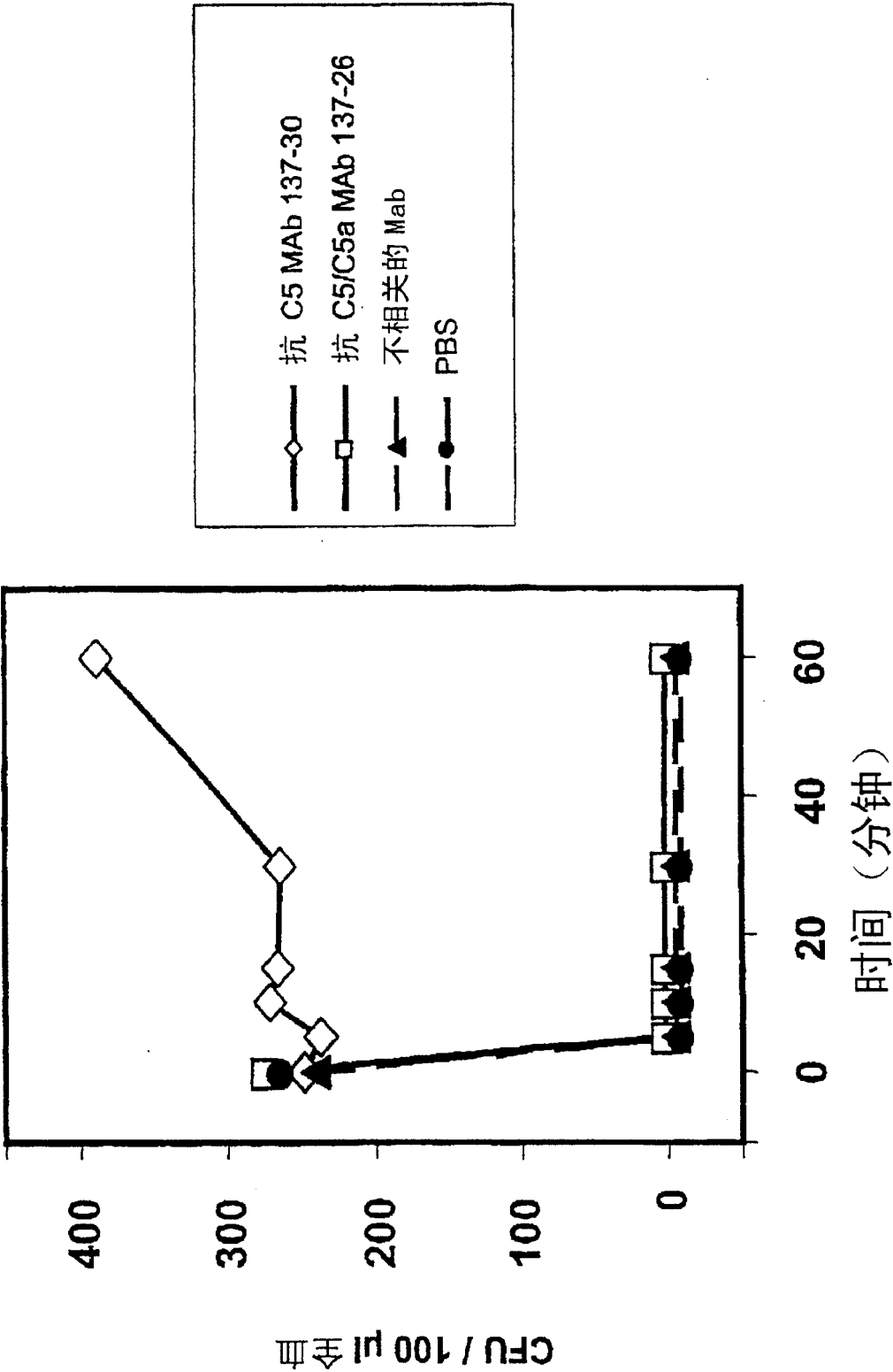


图 7D 抗 C5/C5a MAb137-26 全血模型中由大肠杆菌刺激的
人体嗜中性细胞的氧化爆发





专利名称(译)	结合至C5和C5A但不阻止C5B形成的补体途径抑制剂		
公开(公告)号	CN100391537C	公开(公告)日	2008-06-04
申请号	CN02816102.5	申请日	2002-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	唐诚		
申请(专利权)人(译)	唐诚公司		
当前申请(专利权)人(译)	建南德克公司		
[标]发明人	MSC冯 C孙 M陆 W孙		
发明人	M·S·C·冯 C·孙 M·陆 W·孙		
IPC分类号	A61K39/395 C07K16/36 C12N5/12 A61P35/00 G01N33/53 A61K45/00 A61P9/10 A61P13/12 A61P29/00 A61P31/04 A61P37/00 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/3955 A61K2039/505 C07K16/18 G01N33/6863 A61P7/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/00 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/569 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/6893		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/313137 2001-08-17 US		
其他公开文献	CN1553813A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种结合至C5和C5a的抑制剂，但其并不抑制C5的活化且不会阻止C5b的形成或抑制C5b的活性。此抑制剂分子的一个实例是由MAb137-26指定的单克隆抗体，其结合至人C5与C5a所共享的表位(epitope)。可将这些抑制剂用以在治疗由于过量的或不受控制的C5a生产而介导的疾病及疾患中抑制C5a的活性。也可将这些抑制剂分子用于诊断检测C5或C5a的存在/不存在或C5或C5a的量。

