

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/28

C12N 5/20

A61K 39/395

A61P 37/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03806948.2

[43] 公开日 2005 年 7 月 20 日

[11] 公开号 CN 1642983A

[22] 申请日 2003.1.24 [21] 申请号 03806948.2

[30] 优先权

[32] 2002.1.25 [33] US [31] 60/350,961

[86] 国际申请 PCT/AU2003/000084 2003.1.24

[87] 国际公布 WO2003/062278 英 2003.7.31

[85] 进入国家阶段日期 2004.9.24

[71] 申请人 G2 治疗有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 查尔斯·雷伊·麦凯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 5 页 说明书 52 页 序列表 16 页
附图 15 页

[54] 发明名称 抗 C5aR 抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及与 C5aR 结合并可用于诊断和治疗方法中的抗体。本发明的抗体与 C5aR 的 N-末端结构域以外的细胞外环具有反应性并能够基本上减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合以及中性粒细胞化学引诱物受体激活的功能性结果。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种与 C5aR 的 N-末端结构域以外的细胞外环具有反应性的抗体, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。
2. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体与含有 C5aR 的第二个细胞外环(残基 175 到 206) 的表位具有反应性。
3. 一种抗体, 其和 MAb 7F3 与 C5aR 的同一个表位具有反应性, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。
4. 一种抗体, 其和 MAb 6C12 与 C5aR 的同一个表位具有反应性, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。
5. 一种抗体, 其和 MAb 12D4 与 C5aR 的同一个表位具有反应性, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。
6. 一种与 C5aR 结合的抗体, 其中所述抗体竞争性地抑制 MAb 7F3 与 C5aR 的结合。
7. 一种与 C5aR 结合的抗体, 其中所述抗体竞争性地抑制 MAb 6C12 与 C5aR 的结合。
8. 一种与 C5aR 结合的抗体, 其中所述抗体竞争性地抑制 MAb 12D4 与 C5aR 的结合。
9. 权利要求 6 到 8 中任一项的抗体, 其中在存在 C5aR 或含有 C5aR 的细胞外环的多肽的条件下通过抗体抗体竞争性检测测定相对的结合特异性。
10. 一种包含与分别由 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21 所示的序列基本相同的轻链和/或重链序列的抗体, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。
11. 一种包含至少一个 CDR 环序列的抗体, 所述 CDR 环序列与分别由 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的可变重

链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同，其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

12. 权利要求 11 的抗体，其中所述抗体包含至少两个与分别由 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列。

13. 权利要求 11 或 12 的抗体，其中所述抗体进一步包含至少一个基本上由 SEQ ID NO:19 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、或 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

14. 权利要求 13 的抗体，其中所述抗体包含至少两个基本上由 SEQ ID NO:19 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、和 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

15. 一种包含与分别由 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:17 所示的序列基本相同的轻链和/或重链序列的抗体，其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

16. 一种包含至少一个 CDR 环序列的抗体，所述 CDR 环序列与分别由 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同，其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

17. 权利要求 16 的抗体，其中所述抗体包含至少两个与分别由 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:31 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列。

18. 权利要求 16 或 17 的抗体，其中所述抗体进一步包含至少一个基本上由 SEQ ID NO:15 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、或 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

19. 权利要求 18 的抗体，其中所述抗体包含至少两个基本上由 SEQ ID NO:15 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、和 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

20. 一种包含与分别由 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:25 所示的序列基本相同的轻链和/或重链序列的抗体, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

21. 一种包含至少一个 CDR 环序列的抗体, 所述 CDR 环序列与分别由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:34 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同, 其中所述抗体减少或抑制 C5a 与 C5aR 的结合。

22. 权利要求 21 的抗体, 其中所述抗体包含至少两个与分别由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列。

23. 权利要求 21 或 22 的抗体, 其中所述抗体进一步包含至少一个基本上由 SEQ ID NO:23 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、或 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

24. 权利要求 23 的抗体, 其中所述抗体包含至少两个基本上由 SEQ ID NO:23 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、和 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

25. 权利要求 1 到 24 中任一项的抗体, 其中所述抗体也抑制由不同于 C5a 的其他化学引诱物配体引起的中性粒细胞的激活。

26. 权利要求 1 到 25 中任一项的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体或重组抗体。

27. 权利要求 1 到 25 中任一项的抗体, 其中所述抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

28. 权利要求 1 到 27 中任一项的抗体, 其中所述抗体是 IgG2a 型或 IgG3 型抗体。

29. 一种单克隆抗体, 选自由 MAb 7F3、MAb 6C12 和 MAb 12D4 组成的组。

30. 一种保藏于 ECACC、保藏号为 00110609 的杂交瘤。

31. 一种保藏于 ECACC、保藏号为 02090226 的杂交瘤。
32. 一种保藏于 ECACC、保藏号为 02090227 的杂交瘤。
33. 一种包含权利要求 1 到 29 中任一项的抗体和治疗剂的缀合物。
34. 权利要求 33 的缀合物，其中所述治疗剂为毒素。
35. 权利要求 33 的缀合物，其中所述毒素是假单胞菌外毒素或其衍生物。
36. 一种包括权利要求 1 到 29 中任一项的抗体和可测定的标记物的缀合物。
37. 权利要求 36 的缀合物，其中所述标记物选自由放射性标记物、荧光标记物、酶标记物 and 对比剂标记物组成的组。
38. 一种分离的核酸分子，所述核酸分子包含编码权利要求 1 到 29 中任一项的抗体的序列。
39. 一种包含权利要求 1 到 29 中任一项的抗体及药用可接受的载体的组合物。
40. 一种抑制带有 C5aR 的细胞与其配体相互作用的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于权利要求 1 到 29 中任一项的抗体。
41. 一种抑制细胞内 C5aR 活性的方法，所述方法包括将所述细胞暴露于权利要求 1 到 29 中任一项的抗体。
42. 一种治疗目标对象的涉及中性粒细胞迁移的疾病的方法，所述方法包括将权利要求 1 到 29 中任一项的抗体施用于所述目标对象。
43. 一种诊断目标对象的涉及中性粒细胞迁移的疾病的方法，所述方法包括将得自所述目标对象的样品与权利要求 36 或 37 的缀合物接触，并检测所述缀合物和所述样品之间的免疫特异性结合。
44. 权利要求 43 的方法，其中所述方法利用得自所述目标对象的组织学样品或组织碎片或体液在体外进行。
45. 权利要求 43 的方法，其中所述方法在体内进行。

46. 一种诊断目标对象的涉及中性粒细胞迁移的疾病的方法，所述方法包括在能在目标对象内形成抗体和呈递 C5aR 的细胞之间的复合物的条件下将带有成像物质的权利要求 1 到 19 中任一项的抗体施用于所述目标对象，并对该复合物进行成像。

47. 权利要求 42 到 46 中任一项的方法，其中所述疾病是一种免疫性疾病。

48. 一种将治疗剂输送到目标对象的炎症部位的方法，所述方法包括将权利要求 33 到 35 中任一项的缀合物施用于所述目标对象。

49. 一种将遗传物质引入到呈递 C5aR 的细胞中的方法，所述方法包括将所述细胞和权利要求 1 到 29 中任一项的抗体接触，其中所述抗体附着了或结合了遗传物质。

50. 权利要求 49 的方法，其中所述呈递 C5aR 的细胞选自由粒细胞、白细胞例如单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞、肥大细胞、和包括 T 细胞在内的淋巴细胞、树突状细胞、以及非髓系细胞例如内皮细胞和平滑肌细胞所组成的组。

51. 一种治疗目标对象的涉及中性粒细胞迁移的疾病的方法，所述方法包括将编码权利要求 1 到 29 中任一项的抗体的多核苷酸引入到所述目标对象的细胞中以使得所述抗体在体内表达。

抗 C5aR 抗体及其应用

技术领域

本发明涉及结合 C5aR 并可用于诊断和治疗方法中的抗体。

背景技术

每种补体蛋白 C3-C5 的蛋白裂解都生成了具有称为过敏毒素 (anaphylatoxins) 的信号分子的阳离子氨基末端片段 (6-9)。这些片段中最有效的片段 C5a 引发出最广泛的效应。C5a 是“完全的”促炎性介质,被认为是作为白细胞迁移和浸润、颗粒结合型蛋白水解酶 (granule-bound proteolytic enzymes) 的释放、活性氧和氮源自由基的生成、血流和毛细血管通透性改变的炎性反应的成分并具有收缩平滑肌的能力。C5a 在次纳摩尔到纳摩尔水平引发所有髓系细胞 (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) 的化学趋化作用以及引起血管通透性增加,前列腺素和循环白细胞显著地增强了血管通透性。更高纳摩尔浓度的 C5a 引发了 NADPH 氧化酶的脱颗粒和活化。这种生物活性的广度与其他的炎性介质形成了鲜明对比。在类风湿关节炎、银屑病、脓毒症、再灌注损伤以及成人呼吸窘迫综合征的发病机制中都已经涉及到 C5a [1, 2]。

C5aR 包括一段延伸的 N 末端细胞外结构域。该大型的 N 末端结构域是典型的与包括 IL-8 和 fMet-Leu-Phe (FMLP) 受体家族的肽结合的 G-蛋白结合受体, C5aR 的结构符合于七个跨膜受体家族,紧接于细胞外 N-末端之后的是七个被螺旋间结构域所连接的交互地作为细胞内和细胞外环的跨膜螺旋,以细胞内 C-末端结构域为终点。

用 C5aR 拮抗剂对 C5a 效应的抑制可以减轻 C5a 所介导的急性炎症反应且不影响其他的补体成分。至今为止, 先前已经描述了 C5aR 肽拮抗剂和抗 C5a 受体抗体。例如, WO95/00164 描述了直接对抗于 C5a 受体 N-末端肽 (残基 9-29) 的抗体。然而, 目前仍需要可供替代的和/或改良的 C5aR 拮抗剂。

发明内容

本发明者现在已经开发了一种与 C5aR 的 N-末端结构域以外的区域具有反应性的新的单克隆抗体, 它对抑制 C5a 与 C5aR 的结合是高度有效的。这些单克隆抗体已经被称为 7F3、6C12 和 12D4。

因此, 在一个方面, 本发明提供了一种与 C5aR 的 N-末端结构域以外的细胞外环具有反应性的抗体, 其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

我们的“细胞外环 (extracellular loop)”的意思是 C5aR 的第一个细胞外环 (残基 95 到 110)、或第二个细胞外环 (残基 175 到 206) 或第三个细胞外环 (残基 265-283)。

在一个优选的实施方案中, 抗体与包括 C5aR 的第二个细胞外环 (残基 175 到 206) 的表位具有反应性。

在另一个方面, 本发明提供了一种抗体, 所述抗体和 MAb7F3 与 C5aR 的同一个表位具有反应性, 其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

在另一个方面, 本发明提供了一种抗体, 所述抗体和 MAb6C12 与 C5aR 的同一个表位具有反应性, 其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

在另一个方面, 本发明提供了一种抗体, 所述抗体和 MAb12D4 与 C5aR 的同一个表位具有反应性, 其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

在另一个方面，本发明提供了一种与 C5aR 结合的抗体，其中抗体竞争性地抑制了 MA b 7F3 与 C5aR 的结合。

在另一个方面，本发明提供了一种与 C5aR 结合的抗体，其中抗体竞争性地抑制了 MA b 6C12 与 C5aR 的结合。

在另一个方面，本发明提供了一种与 C5aR 结合的抗体，其中抗体竞争性地抑制了 MA b 12D4 与 C5aR 的结合。

在本发明的这些方面的一个优选的具体实施方案中，在存在 C5aR 或一种含有 C5aR 的细胞外环的多肽的情况下，通过抗体-抗体竞争性分析测定了相对结合特异性 (comparative binding specificity)。

还在另一个方面，本发明提供了一种包含与分别由 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21 所示的序列基本相同的轻链和/或重链序列的抗体，其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

还在另一个方面，本发明提供了一种包含至少一个与分别由 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 或 SEQ ID NO:28 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列的抗体，其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

在一个优选的实施方案中，抗体包括至少两个，更优选的至少三个与分别由 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列。

在一个进一步优选的实施方案中，抗体包括至少一个基本上由 SEQ ID NO:19 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、或 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。优选地，抗体包括至少两个，更优选的至少三个基本上由 SEQ ID NO:19 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、和 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

还在另一个方面，本发明提供了一种包含分别与 SEQ ID NO:15 及 SEQ ID NO:17 所示序列基本相同的轻链和/或重链序列的抗体，其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

还在另一个方面，本发明提供了一种包含至少一个与分别由 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:31 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列的抗体，其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

在一个优选的实施方案中，抗体包括至少两个，更优选的至少三个与分别由 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30 和 SEQ ID NO:31 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列。

在一个进一步优选的实施方案中，抗体包括至少一个基本上由 SEQ ID NO:15 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、或 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。优选地，抗体包括至少两个，更优选的至少三个基本上由 SEQ ID NO:15 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、和 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

还在另一个方面，本发明提供了一种包含分别与 SEQ ID NO:23 及 SEQ ID NO:25 所示序列基本相同的轻链和/或重链序列的抗体，其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

还在另一个方面，本发明提供了一种包含至少一个与分别由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:34 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列的抗体，其中抗体减少或抑制了 C5a 与 C5aR 的结合。

在一个优选的实施方案中，抗体包括至少两个，更优选的至少三个与分别由 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 和 SEQ ID NO:34 所示的可变重链 CDR1、CDR2 或 CDR3 环序列基本相同的 CDR 环序列。

在一个进一步优选的实施方案中，抗体包括至少一个基本上由 SEQ ID NO:23 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、或 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。优选地，抗体包括至少两个，更优选的至少三个基本上由 SEQ ID NO:23 所示的可变轻链序列的 24 到 39、55 到 61、和 94 到 102 位氨基酸残基所确定的 CDR 环序列。

在本发明的一个优选的实施方案中，C5aR 是人 C5aR。

在本发明的一个实施方案中，抗体也通过其他的中性粒细胞化学引诱物 (chemoattractant)，特别是 CXCR1 和 CXCR2 配体例如 IL-8，抑制中性粒细胞的激活。

在本发明的一个优选的实施方案中，抗体为单克隆或重组抗体。优选地，单克隆或重组抗体是嵌合抗体或人源化抗体。

抗体可以是任何一种同型 (isotype)。然而在本发明的一个进一步优选的实施方案中，抗体是 IgG2a 型或 IgG3 型抗体。

在本发明的一个优选的实施方案中，抗体是一种选自由 MAbs 7F3、MAb 6C12 和 MAb 12D4 组成的组的单克隆抗体。

在另一个方面，本发明提供了一种保藏于 ECACC、保藏号为 00110609 的杂交瘤。

在另一个方面，本发明提供了一种保藏于 ECACC、保藏号为 02090226 的杂交瘤。

在另一个方面，本发明提供了一种保藏于 ECACC、保藏号为 02090227 的杂交瘤。

可以理解的是，也可以生成本发明的抗体的各种化学衍生物。例如，通过本领域已知的技术可以制得包含结合有一种标记物例如放射性同位素或其他示踪分子的本发明抗体的免疫缀合物。同样的，抗体可以结合于一种用于治疗的分子，由于抗体结合的特异性，该分子可以定向于所需的作用部位。

因此，在本发明的另一个方面，本发明提供了一种包含本发明的抗体和治疗剂的缀合物。

可以理解的是，一系列的治疗剂可以用于本发明。优选的药物包括介导细胞死亡或蛋白失活的药物。治疗剂可以是本领域已知的大量毒素的任一种毒素。毒素可以是假单胞菌外毒素或它的衍生物。在优选的实施方案中，毒素是 PE40。

还在本发明的另一个方面，本发明提供了一种包含本发明的抗体以及一种可测定的标记物的缀合物。

可测定的标记物可以是本领域已知的任何一种合适的标记物。例如，标记物可以是放射性标记物、荧光标记物、酶标记物或对比剂。

还在本发明的另一个方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，该核酸分子包含编码本发明抗体的序列。

还在本发明的另一个方面，本发明提供了一种包含本发明的抗体和药用可接受的载体的组合物。

还在本发明的另一个方面，本发明提供了一种抑制带有 C5aR 的细胞和它们的配体相互作用的方法，该方法包括将细胞暴露于本发明的抗体。

还在本发明的另一个方面，本发明提供了一种抑制细胞内 C5aR 活性的方法，该方法包括将细胞暴露于本发明的抗体。

还在本发明的另一个方面，本发明提供了一种治疗目标对象的涉及中性粒细胞迁移 (migration) 的疾病的方法，该方法包括给目标对象施用本发明的抗体。

本领域人员可以理解的是，本发明的抗体也可以用于测定、定量和/或定位表达 C5aR 的细胞。

因此，在本发明的另一个方面提供了一种诊断目标对象的涉及中性粒细胞迁移的疾病的方法，该方法包括将来自目标对象的样品和本发明的缀合物接触，并测定缀合物和样品之间的免疫特异性结合。

在诊断方法中可以使用各种免疫检测法。这样的免疫检测法包括使用例如放射免疫检测、ELISA、“三明治”免疫检测、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫扩散检测、凝集检测、补体固定检测、免疫放射量检测、荧光免疫检测等竞争性和非竞争性检测体系。体外和体内检测都可以被使用。

来自目标对象的样品可以包括任何体液，例如外周血、血浆、淋巴液、腹腔积液、脑脊液、或胸腔积液或任一身体组织。利用组织学样品或组织碎片或体液可以进行体外结合。利用本领域已知的任何方法（例如静脉内、腹腔内、动脉内等）通过注射缀合物可以完成体内结合，因此可以测定免疫特异的结合。

另外，可以使用成像技术，其中第一抗体被结合于适当的成像标记物。可以体内施用标记的抗体以确定 C5aR 在目标对象中的定位。

因此，在本发明的另一个方面提供了一种诊断目标对象的涉及中性粒细胞迁移的疾病的方法，该方法包括在能形成抗体和呈递 C5aR 的细胞之间的复合物的条件下将用成像试剂标记的本发明的抗体施用于目标对象，并将复合物成像。

在本发明的一个优选的实施方案中，涉及中性粒细胞迁移的疾病是 C5aR 所介导的疾病。优选地，疾病是一种免疫性疾病。

在进一步的方面，本发明提供了一种将治疗剂转运到目标对象中的炎症部位的方法，方法包括将本发明的缀合物施用于目标对象。

在本发明的进一步的方面提供了一种将遗传物质引入到呈递 C5aR 的细胞中的方法，方法包括将细胞和本发明的抗体接触，其中抗体连接或结合有遗传物质。

在优选的实施方案中，呈递 C5aR 的细胞选自粒细胞、白细胞例如单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞、肥大细胞和包括 T 细胞的淋巴细胞、树突状细胞、以及非髓系细胞例如内皮细胞和平滑肌细胞。

也被本发明所包含的是确定与 C5aR 结合的其他配体或其他物质的方法，包括哺乳动物 C5aR 功能的抑制剂和/或增强剂。例如，利用上述抗体或片段的竞争性检测法可以确定有着与本发明的抗体或它们的功能性片段一样的结合特异性的试剂。因此，本发明也包括确定与 C5aR 结合的配体或其他物质，包括受体功能的抑制剂（例如拮抗剂）或增强剂

(激动剂)。在一个实施方案中,将自然表达 C5aR 的细胞或已经被加工成表达引入到宿主细胞的核酸所编码的 C5aR 或变异体的宿主细胞用于确定及评价配体、受体功能的抑制剂或增强剂的有效性的检测中。这些细胞也用于测定表达的受体蛋白或多肽的功能。

附图说明

图 1 显示了对单克隆抗体 7F3 的流式细胞检测的结果。这些结果说明 7F3 特异地与转染了 C5aR 的 L1.2 细胞发生反应。

图 2 显示了包含一组包括 7F3 的单克隆抗体的 ^{125}I C5a 配体结合检测的结果。

图 3 显示了单克隆抗体 7F3 对 ^{125}I C5a 配体结合的剂量反应性抑制。

图 4 显示了用转染了 C5aR 的 L1.2 细胞和一组包括 7F3、6C12 和 12D4 的单克隆抗体所进行的化学趋化试验的结果。

图 5 显示了单克隆抗体 7F3 对转染了 C5aR 的 L1.2 细胞的化学趋化作用的完全抑制。

图 6 显示了单克隆抗体 7F3 对 C5a 介导的中性粒细胞化学趋化作用的完全抑制。

图 7 显示了单克隆抗体 7F3、6C12 和 12D4 对 C5a 介导的中性粒细胞化学趋化作用的抑制。

图 8 显示了单克隆抗体 7F3、6C12 和 12D4 对 IL-8 介导的中性粒细胞化学趋化作用的抑制。

图 9 显示了测定 C5aR N-末端肽 PEPI 对抗-C5aR MAb 与用人 C5aR 转染的 L1.2 细胞结合的竞争性抑制的试验的结果。

图 10 显示了存在或不存在 C5aR N-末端肽 PEPI 时测定 MAb 7F3 对纯化中性粒细胞的 FACS 染色的试验的结果。

图 11 显示了 MAbs 7F3、6C12 和 12D4 的可变轻链 DNA 序列的比对。

图 12 显示了 MAbs 7F3、6C12 和 12D4 的可变重链 DNA 序列的比对。

图 13 显示了 MAbs 7F3、6C12 和 12D4 的可变轻链蛋白质序列的比对。

图 14 显示了 MAbs 7F3、6C12 和 12D4 的可变重链蛋白质序列的比对。

序列表说明

SEQ ID NO:1	人 C5aR 蛋白序列
SEQ ID NO:2	6C12 可变轻链 PCR 引物
SEQ ID NO:3	6C12 可变轻链 PCR 引物
SEQ ID NO:4	6C12 可变重链 PCR 引物
SEQ ID NO:5	6C12 可变重链 PCR 引物
SEQ ID NO:6	7F3 可变轻链 PCR 引物
SEQ ID NO:7	7F3 可变轻链 PCR 引物
SEQ ID NO:8	7F3 可变重链 PCR 引物
SEQ ID NO:9	7F3 可变重链 PCR 引物
SEQ ID NO:10	12D4 可变轻链 PCR 引物
SEQ ID NO:11	12D4 可变轻链 PCR 引物
SEQ ID NO:12	12D4 可变重链 PCR 引物
SEQ ID NO:13	12D4 可变重链 PCR 引物
SEQ ID NO:14	6C12 可变轻链(DNA)序列
SEQ ID NO:15	6C12 可变轻链(蛋白质)序列
SEQ ID NO:16	6C12 可变重链(DNA)序列
SEQ ID NO:17	6C12 可变重链(蛋白质)序列

SEQ ID NO:18	7F3 可变轻链(DNA)序列
SEQ ID NO:19	7F3 可变轻链(蛋白质)序列
SEQ ID NO:20	7F3 可变重链(DNA)序列
SEQ ID NO:21	7F3 可变重链(蛋白质)序列
SEQ ID NO:22	12D4 可变轻链(DNA)序列
SEQ ID NO:23	12D4 可变轻链(蛋白质)序列
SEQ ID NO:24	12D4 可变重链(DNA)序列
SEQ ID NO:25	12D4 可变重链(蛋白质)序列
SEQ ID NO:26	7F3 可变重链 CDR1 环
SEQ ID NO:27	7F3 可变重链 CDR2 环
SEQ ID NO:28	7F3 可变重链 CDR3 环
SEQ ID NO:29	6C12 可变重链 CDR1 环
SEQ ID NO:30	6C12 可变重链 CDR2 环
SEQ ID NO:31	6C12 可变重链 CDR3 环
SEQ ID NO:32	12D4 可变重链 CDR1 环
SEQ ID NO:33	12D4 可变重链 CDR2 环
SEQ ID NO:34	12D4 可变重链 CDR3 环

具体实施方式

C5aR 结构

SEQ ID NO:1 提供了人 C5aR 的氨基酸序列。

人 C5aR 的各种结构域如下所示：

氨基酸 1 - 37	细胞外结构域 - N-末端
氨基酸 38 - 61	跨膜结构域
氨基酸 62 - 71	细胞内结构域

氨基酸 72 – 94	跨膜结构域
氨基酸 95 – 110	细胞外结构域- 细胞外环 1
氨基酸 111 – 132	跨膜结构域
氨基酸 133.-.149	细胞内结构域
氨基酸 150.-.174	跨膜结构域
氨基酸 175.-.206	细胞外结构域- 细胞外环 2
氨基酸 207.-.227	跨膜结构域
氨基酸 228.-.242	细胞内结构域
氨基酸 243.-.264	跨膜结构域
氨基酸 265.-.283	细胞外结构域- 细胞外环 3
氨基酸 284.-.307	跨膜结构域
氨基酸 308.-.350	细胞内结构域- C-末端

微生物保藏详情

产生称为 7F3 的单克隆抗体的杂交瘤在 2000 年 11 月 6 日保藏于 ECACC、保藏号为 00110609。

产生称为 6C12 (6C12 M12) 的单克隆抗体的杂交瘤在 2002 年 9 月 2 日保藏于 ECACC、保藏号为 02090226。

产生称为 12D4 (12D4-P9) 的单克隆抗体的杂交瘤在 2002 年 9 月 2 日保藏于 ECACC、保藏号为 02090227。

这些保藏是根据布达佩斯条约而进行的。这保证了从保藏日起可将存活的培养物保藏 30 年。这些生物体可依照布达佩斯条约的条款自 ECACC 获得，这可确保在得到授权后，公众可长期地且不受限制地获得培养物的子代。

本申请的受让人同意，假使保藏的培养物在适当的培养条件下失活或丢失或被破坏，其在接到通知后将立即以同样的培养物的存活标本对

其进行替换。获得保藏的培养物并不意味着得到如下许可，即可以违背任何政府的授权机构依据其专利法所授予的专利权而实施本发明。

单克隆和重组抗体

本发明者已经生成了如在此所描述的特异于 C5aR 并被称为 7F3、6C12 和 12D4 的鼠单克隆抗体。惊奇地，这些单克隆抗体 (MAb) 能基本上或完全阻断 C5a 与 C5aR 的结合。特别是，MAb 7F3 是完全的中和抗体。

与其他已知的抗 C5aR 抗体不同，7F3、6C12 和 12D4 是与 C5aR 的 N-末端结构域以外的区域发生反应。相信 7F3、6C12 和 12D4 是主要与 C5aR 的第二个细胞外环 (残基 175 到 206) 发生反应。例如，通过将第二个细胞外环的残基 181 和 192 从酪氨酸突变为苯丙氨酸几乎完全终止了 MAb 12D4 与 C5aR 的反应。在包含 C5aR 突变 L2-FF 的结合研究中观察到了这种抑制作用 (Farzan et al., J. Exp. Med., 193:1059-1065, 2001)。

因为细胞外环和 N-末端结构域有着相似的构象以及十分接近，这些 MAb 也可以同时结合于其他的细胞外环或 N-末端结构域的一个区域。

惊奇地，已经显示 MAb 7F3、6C12 和 12D4 也能抑制其他化学引诱物配体 (chemoattractant ligand) 对中性粒细胞的活化。这些其他化学引诱物配体的实例包括 CXCR1 和 CXCR2 配体 IL-8、ENA-78 和 GPC-2。这种抑制不同的化学引诱物受体 (chemoattractant receptor) 功能的能力提供了其他已知的抗 C5aR 分子所不具有的少见的和意想不到的好处。特别是能抑制多个中性粒细胞化学引诱物受体功能的抗 C5aR 分子是治疗免疫性疾病的极为有效的治疗剂。

在一个方面，本发明提供了单独地结合于 C5aR 的细胞外环，优选的为第二个细胞外环或联合结合于其他环或结构域的抗体。在一个优选

的方面，本发明提供了与 C5aR 结合并有着与 MAb 7F3、6C12 和 12D4 任何一个抗体一样或相似的抗原决定簇特异性的抗体。

本发明所用的“抗体”包括完整分子以及能与抗原决定簇结合的它们的片段，例如 Fab、F(ab')₂、和 Fv。这些抗体片段保持了一些与它们的抗原或受体选择性结合的能力并被如下所定义：

1. Fab，含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段，通过用酶木瓜蛋白酶将整个抗体降解生成一个完整的轻链和一个重链的一部分可以生成该片段。

2. Fab'，通过用胃肽酶处理整个抗体以及通过随后的还原可生成一个完整的轻链和重链的一部分可以获得的抗体分子的片段；每个抗体分子得到两个 Fab'片段。

3. (Fab')₂，通过用胃肽酶处理整个抗体但没有随后的还原可以获得的抗体的片段；(Fab')₂ 是用两个二硫键连接的两个 Fab'片段的二聚体；

4. Fv，定义为含有表示为两条链的轻链的可变区和重链的可变区的遗传加工的片段；以及

5. 单链抗体 (“SCA”)，定义为含有用适当的多肽连接物连接轻链的可变区和重链的可变区并作为遗传学融合的单链分子的遗传加工分子。

制作这些片段的方法是本领域已知的。(见例如，Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)，在此一起并入参考)。

在本发明中所使用的名词“表位”指的是抗原上与抗体的抗原结合部结合的任一抗原决定簇。抗原决定簇通常包括分子的化学活性的表面基团，例如氨基酸或糖侧链并通常有着特异的三维结构特性以及特异的电荷特性。

利用将表达 C5aR 的细胞、完整的 C5aR 或含有一个或多个细胞外环的片段用作为接种抗原可以制备本发明的抗体。如果需要，用于接种动物的肽可以来源于翻译的 cDNA 或化学合成，并将其纯化并连接到载体蛋白上。这些常用的化学结合于肽的载体包括锁眼形铜蓝蛋白 (KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白 (BSA)、破伤风类毒素。然后结合肽可以被用于接种动物 (例如鼠或兔)。

如果需要，多克隆抗体可以被进一步纯化，例如通过将抗体结合到结合于底物的肽并将其洗脱来提纯抗体。本领域人员知道各种免疫学技术中用于纯化和/或浓缩多克隆抗体和单克隆抗体的常用技术，见例如，Coligan, et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991，并入参考)。

利用任何通过连续培养的细胞系生产抗体分子的技术可以制备单克隆抗体，这些例如杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术、以及 EBV 杂交瘤技术(Kohler et al. *Nature* 256, 495-497, 1975; Kozbor et al., *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026-2030, 1983; Cole et al., *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984)。

本领域已知的方法可以从抗体表达库中识别并分离出与 C5aR 细胞外环结合的抗体。例如，一种用于识别和分离与 C5aR 细胞外环结合的抗体结合结构域的方法是噬菌体载体体系。该载体体系已经被用于表达来自大肠杆菌的鼠抗体库(Huse, et al., *Science*, 246:1275-1281, 1989)和来自人抗体库(Mullinax, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 87:8095-8099, 1990)的 Fab 片段的联合库。该方法也可以被应用于表达能与预先选择的配体结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。利用本领域一般人员熟知的技术按各种方法可以生成分泌所需的单克隆抗体的杂交瘤，在此不必重复。这些技术的细节被描述于参考文献中如 *Monoclonal Antibodies Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis*, Edited by Roger H. Kennett, et al., Plenum Press, 1980;和 U.S. 4,172,124，并入参考。

另外，生产具有“人源化”抗体的不同组合的嵌合抗体分子的方法是本领域已知的，并包括鼠可变区和人恒定区的组合(Cabily, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3273, 1984), or by grafting the murine-antibody complementarity determining regions (CDRs) onto the human framework (Riechmann, et al., Nature 332:323, 1988)。

本发明进一步提供了本发明的抗 C5aR 抗体或它们的生物活性片段的嵌合抗体。在此所使用的名词“嵌合抗体”指的是来自一种物种的抗体可变区与来自不同的物种的抗体恒定区组合成的一种抗体或同样指的是 CDR 移植抗体。利用重组 DNA 技术构建嵌合抗体已被描述于例如 Shaw, et al., J. Immun., 138:4534 (1987), Sun, LK., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218 (1987)。

任何一个上述的抗体或生物学活性的抗体片段都可以被用于生产 CDR 移植及嵌合抗体。“CDR”或“互补决定区”或“高变区”被定义为形成促成抗原结合位点形成的三维环结构的抗体的轻链和重链的氨基酸序列。

在此所用的名词“CDR 移植”抗体指的是至少轻链和/或可变结构域的一个或多个 CDR 序列的一部分已经被来自有着对给定抗原或受体有着不同的结合特异性的抗体的 CDR 序列的同源部分所取代的氨基酸序列的抗体。

该同源 CDR 序列被称为被“移植”到底物或受体抗体上。“供体”抗体是提供 CDR 序列的抗体，以及接受取代序列的抗体为“底物”抗体。本领域人员联合利用在此所提供的教义和本领域熟知的方法(见 Borrebaeck, C.A., Antibody Engineering: A Practical Guide, W.H. Freeman and Company, New York, 1992, 并入参考)可以容易地生成这些 CDR 移植抗体。

本发明也提供了生产本发明的单克隆抗体的细胞系。利用能识别相关单克隆抗体的基本反应模式的常规筛选技术可以完成对生产本发明的

单克隆抗体的细胞系的分离。因此，如果被测试的单克隆抗体能结合于 C5aR 并阻断 C5a 介导的生物学活性，那么被测定的单克隆抗体和本发明的细胞系所生产的单克隆抗体是等价的。

利用同与 C5aR (例如具有 C5aR 的细胞、例如带有 C5aR 的转染体、单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞和嗜碱性粒细胞) 结合的特异性 MAbs 相互竞争的能力可以识别具有与 MAbs 7F3、6C12 或 12D4 同样的或相似的表位特异性的抗体。利用受体嵌合(Rucker et al., Cell 87:437-446 (1996))或其他本领域已知的其他技术可以绘制 MAbs 7F3、6C12 或 12D4 的任何一个抗体的结合位点。

不需要过多的试验也可能确定单克隆抗体是否具有和本发明的单克隆抗体一样的特异性，这可通过是否前者抑制了后者对包含 C5aR 细胞外环的肽的结合来明确。如果被测试的单克隆抗体与本发明的单克隆抗体相互竞争，表现为本发明的单克隆抗体结合的减少，那么这两种单克隆抗体结合于同一个或紧密相关的表位。

确定单克隆抗体是否具有和本发明的单克隆抗体的特异性的另一个方法是将被测试的单克隆抗体与推测抗体与之发生反应的肽预先孵育，然后加入本发明的单克隆抗体以明确本发明的单克隆抗体是否被抑制了其与该肽结合的能力。如果本发明的单克隆抗体被抑制，那么所有的可能是被测试的单克隆抗体有着同样的或功能等价的本发明的单克隆抗体的抗原决定簇的特异性。利用适当的肽也可以进行本发明的单克隆抗体的筛选并确定单克隆抗体是否阻断了 C5a 与 C5aR 的结合。

通过利用本发明的单克隆抗体可以生成抗独特型抗体，它能用于筛选单克隆抗体以识别该抗体是否具有和本发明的单克隆抗体一样的结合特异性。这些抗体也可以被用于接种的目的(Herlyn, et al., Science, 232:100, 1986)。利用熟知的杂交瘤技术可以生产这些抗独特型抗体(Kohler and Milstein, Nature, 256:495, 1975)。抗独特型抗体是一种识别相关细胞系所生成的单克隆抗体上所存在的独特的决定簇的抗体。这些决

定簇定位于抗体的高变区。这是与给定的表位结合的区域 (抗原结合部), 因此它决定了抗体的特异性。通过用相关的单克隆抗体接种动物可以制备抗独特型抗体。被接种的动物将识别并应答于接种抗体的独特型决定簇, 以及生成抗这些独特型决定簇的抗体。通过使用特异于用于接种第二个动物的细胞系所产生的本发明的单克隆抗体的接种动物的抗独特型抗体, 可以识别具有与用于接种的杂交瘤抗体相同的抗原决定簇的其他克隆。两个细胞系的单克隆抗体的独特型同一性证明这两个单克隆抗体对同一个抗原决定簇有着相同的识别。因此, 通过使用抗独特型抗体, 可以识别其他的表达有着相同抗原决定簇特异性的单克隆抗体的杂交瘤。

利用抗独特型技术也可以生成模仿抗原决定簇的单克隆抗体。例如, 制得的抗第一个单克隆抗体的抗独特型单克隆抗体在高变区将有结合结构域, 它是第一个单克隆抗体所结合的抗原决定簇的“图像”。因此, 既然抗独特型单克隆抗体的结合结构域能有效地作用为一种抗原, 那么抗独特型单克隆抗体可以被用于免疫接种。

通过已知的技术可以生成包含本发明的任一 MAb 的抗原决定簇结合位点的抗体片段。例如, 首先通过从储存的杂交瘤中获得 MAb 7F3, 然后处理抗体 (例如通过蛋白水解消化) 获得它的高变区, 利用这些可以获得合适的抗体片段。

同样的, 利用例如在此描述的标准的重组 DNA 方法可以在适当的宿主中克隆出编码高变区的 DNA。

本发明优选的抗体包括与 MAb 7F3、6C12 或 12D4 的可变区或一个或多个 CDR 环基本相同的可变区或一个或多个 CDR 环。可以理解的是, 在序列列表中所示的可变区或 CDR 环可以修饰后用于本发明。通常的, 进行保持序列的结合特异性的修饰。可以进行保守取代, 例如, 不影响抗体的结合特异性。因此, 在一个实施方案中, 可以进行氨基酸取代, 例如从 1、2 或 3 到 10、20 或 30 的取代提供了保留有基本相同

的结合特异性的修饰序列。然而，在一个可选择的实施方案中，可以有意地进行本发明抗体的氨基酸序列的修饰以减少抗体的生物学活性。例如保持了能与 C5aR 结合但缺少功能性效应结构域的修饰抗体可以用作 C5aR 的生物学活性的抑制剂。

氨基酸取代也可以包括使用非天然发生的类似物，例如用于增加施用的治疗性抗体的血浆半衰期。

通常，比较于序列列表中所描述的相应的可变区或 CDR 环，优选的变异体或衍生物的少于 20%、10%或 5%的氨基酸被改变。

在本发明的全文中，和序列列表中所示的可变区的其中一个区域“基本相同”的序列可以包括与可变区至少 20 个，优选的至少 50 个氨基酸至少 80%、85%或 90%一致的，优选的在氨基酸水平至少 95 或 98%一致的氨基酸序列。对于那些已知的对结合特异性的关键序列的区域应当考虑同源性，而不是那些非关键的相邻序列。

可以用肉眼或更常见的，是在易得的序列比较程序的帮助下进行同源性比较。这些商品化可获得的计算机程序可以计算出两个或多个序列之间的同源百分比。

可以计算出相邻序列的同源百分比，也就是说将一个序列与其他序列排成一列，并将一个序列的氨基酸与其他序列的相应的氨基酸进行直接比较，逐个残基的比较。这被称为“无缺口”比对。通常的，这些无缺口比对只能在一个相当小数目的残基上进行（例如少于 50 个相邻的氨基酸）。

尽管这是个非常简单和一致的方法，但是它未能考虑到，例如当进行整体的比较时，在一个其他的完全一致的序列对中，一个残基的插入或缺失将造成其之后的氨基酸残基脱离出比对，因此显著地造成了同源%的减少。因此，绝大多数的比较方法都被设计为生成考虑到可能的插入和缺失而不极大地降低整体的同源性积分的最佳比对。通过在序列比对中插入“缺口”达到这一点，使得尽量地最大化局部的同源性。

大多数比对程序可以修改缺口补偿。然而，在使用序列比较软件时，优选的使用缺省值。例如，当使用 GCG Wisconsin Bestfit 程序包(见下)时，氨基酸序列的缺省补充值为缺口-12 以及每个延伸-4。

因此，对同源百分比最大值的计算首先要求考虑缺口补偿生成最佳比对。进行这些比对的适当的计算机程序是 GCG Wisconsin Bestfit 程序包(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387)。其他可以进行序列比较的软件实例包括，但不局限于 BLAST 软件包 (见 Ausubel et al., 1999 *ibid* – Chapter 18)、FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410)和 GENEWORKS 比较工具套组。BLAST 和 FASTA 都能用于离线或在线搜索 (见 Ausubel et al., 1999 *ibid*, 7-58 页至 7-60 页))。然而优选的使用 GCG Bestfit 软件包。

尽管最终的同源%能被以同源性的方式所测定，但是比对程序本身通常不是根据于非全有即全无的配对比较。取而代之的是，常使用一种标度相似的积分模型，它根据化学相似性或进化距离将积分分配到每个对比较中。常用的这种模型的实施例是 BLOSUM62 模型—BLAST 程序套组的缺省模型。GCG Wisconsin 程序常使用公共缺省值或如果提供的自定义符号比较表 (进一步详情见用户手册)。优选的使用 GCG 程序包的公共缺省值或在其他软件的缺省模型，例如 BLOSUM62。

一旦软件已经生成最佳比对，就可以计算出同源%，优选的序列一致性%。软件通常将这作为序列比较的一部分并生成一个用数字表示的结果。

抗体的人源化

将本发明的抗体人源化是优选的，也就是利用分子模型技术生成的抗体，其中抗体的人源部分被最大化同时很少或不丢失鼠抗体的可变区形成的结合亲和力。因此，在一个实施方案中，本发明提供了一个嵌合抗体，包括用于人源化或渲染来自鼠单克隆抗体例如 7F3、C612 或

12D4 的非免疫原性高变区的人框架区域的氨基酸序列以及来自人抗体的恒定区的氨基酸序列。

下面描述的方法被应用于人源化众多的各种动物抗体。可以使用的两步方法包括 (a) 选择用作为用于人源化的人框架的人抗体序列, 以及 (b) 确定出应当选择动物单克隆抗体的哪个可变区残基插入到所选择的人框架中。

第一步包括对可获得的序列信息的最佳的可获得的人框架序列的选择。这种选择方法是根据以下的选择标准。

(1) 同源性百分比

将要被人源化的动物单克隆抗体的重链和轻链可变区的序列最优化比对并优选地和所有已知的人抗体的重链和轻链可变区序列进行比较。

一旦序列被如此比较, 记录下残基的同源性并确定出同源性百分比。所有的其他因素都是相同的, 需要选择与动物抗体有着最高同源性百分比的人抗体。

(2) 序列的不确定性

然后评价已知的人抗体链序列中未识别残基和/或模糊序列的存在, 就是序列的不确定性。最常见的这种不确定性是在序列分析过程中因为氨的丢失将一种氨基酸错误地鉴别为另一种氨基酸, 例如不准确的鉴别谷氨酸残基, 而实际存在于蛋白中的残基是谷氨酰胺残基。所有的其他因素是相同的, 需要选择有着尽可能小的不确定性的人抗体链。

(3) 针区间隔 (Pin-region Spacing)

抗体链的可变区含有结构域内二硫键。构成这些二硫键的半胱氨酸残基之间的距离 (残基数目) 被称为针区间隔[Chothia et al, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]。所有的其他因素是相同的, 最需要的是所选择的人抗体的针区间隔是与动物抗体的针区间隔相似或完全一致。也要求人序列的针区间隔与已知抗体的 3 维结构的针区间隔相似, 以促进计算机模型设计。

根据前述的标准，选择具有所需特性的最佳的全部组合的人抗体(或抗体)作为动物抗体人源化的框架。所选择的重链和轻链可以来自相同的或不同的人抗体。

本发明的方法的第二步包括确定出应当选择哪个动物抗体的可变区序列用于移植到人框架中。选择方法根据以下的选择标准：

(1) 残基选择

在动物抗体序列中评价两类潜在的可变区残基，第一种被称为“最小化残基”。这些最小化残基包含 CDR 结构环加上所需的任何其他的残基，所述残基如计算机模型设计所示，支持和/或定位 CDR 结构环。

潜在的可变区残基的其他类型被称为“最大化残基”。它们包含最小化残基加上任何其他的残基，所述残基如计算机模型设计所示，落于约 10Å 的 CDR 结构环残基内并具有水溶液可进入的表面[Lee et al, J. Biol. Chem. 55:379 (1971)]

(2) 计算机模型设计

为了识别潜在的可变区残基，在 (a) 需被人源化的动物抗体的可变区序列；(b) 选择的人抗体框架序列，以及 (c) 所有可能的组合抗体包括移植有各种最小和最大化动物抗体残基的人抗体框架序列方面进行计算机模型设计。

利用适合于蛋白模型设计的软件进行计算机模型设计，以及从 (a) 有着与动物抗体的可变区氨基酸序列几乎完全一致的可变区氨基酸序列以及 (b) 有着已知的 3 维结构的抗体中获得结构信息。可以使用的软件实例是 SYBYL Biopolymer Module 软件 (Tripos Associates)。可以获得结构信息的抗体可以是但不必是人抗体。

根据在前述分析中得到的结果，选择含有计算机模型设计生成的与动物抗体的可变区最接近的动物可变区的重组链用于人源化。

抗体的同型 (isotypes)

在特定的条件下，对于它们的诊断或治疗作用，一种同型的单克隆抗体可能比另一种同型的单克隆抗体更为优选。例如，从抗体介导的细胞裂解的研究中已知伽玛-2a 和伽玛-3 同型的未修饰的鼠单克隆抗体在裂解靶细胞上通常比伽玛-1 同型的抗体更为有效。认为这种不同的作用是因为伽玛-2a 和伽玛-3 同型能更有效地参与靶细胞的裂解破坏的能力。通过利用子系选择技术分开转换变异体，从分泌不同同型的单克隆抗体的母系杂交瘤中继发地制备出单克隆抗体的特殊的同型(Steplewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:8653, 1985; Spira, et al., J. Immunol. Methods, 74:307, 1984)。因此，本发明的单克隆抗体将包括有着 MAbs 7F3、6C12 和 12D4 的任何一个抗体的特异性的型转换变异体。

体外检测

本发明的单克隆抗体适合于体外应用，例如它们在免疫检测中可以被应用于液体相或结合到固体相载体上。这些抗体可以用于监测样品中的 C5aR 水平。同样的，抗独特型抗体用于测定样品中的 C5a 水平。另外，在这些免疫测定中的单克隆抗体可以被以各种方式可测定地标记。能利用本发明的单克隆抗体的免疫检测类型的实施例是以直接或间接形式进行的竞争性和非竞争性免疫检测。这些免疫检测的实施例是放射性免疫检测 (RIA) 和三明治 (免疫测定) 检测。利用前向、反向或同步方式进行的免疫检测包括对生理样品的免疫组化检测可以用本发明的单克隆抗体进行对抗原的检测。本领域人员知道或可以轻易地明白不需要过度试验的其他免疫检测方式。

本发明的抗体可以结合于多种不同的载体并被用于测定 C5aR 的存在。熟知的载体的实例包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、天然的和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。根据本发明的目的这些抗体的性能可以是可溶性或不可溶性的。本领域人

员知道其他的用于结合单克隆抗体的合适载体，或能用常规试验明确这些载体。

在一个实施方案中，将自然表达 C5aR 的细胞或含有编码 C5aR 或它的变异体的重组核酸序列的细胞用于本发明的结合检测。细胞被保持在适合于受体表达的条件下。在适合于结合的条件下（例如在合适的结合缓冲液中）将这些细胞和抗体或片段接触，并用标准技术测定结合。为了测定结合，测定出相对于适宜的对照物的结合程度（例如比较于不存在抗体时测定的背景、比较于与第二种抗体的结合（也就是标准抗体）、比较于抗体对非转染细胞的结合）。含有受体或含有受体的脂质体的例如膜碎片的细胞碎片可用于替代整个细胞。

结合抑制检测也可以用于识别结合于 C5aR 以及抑制 C5a 和 C5aR 或功能性变异体结合的抗体或它们的片段。例如，可以进行结合检测，其中检测或测定了比较于不存在抗体时 C5a 结合，C5a 结合的减少（存在有抗体）。可以将包括单独的和/或重组的哺乳动物 C5aR 或它们的功能性变异体的组合物与 C5a 及抗体同时接触，或一个接一个的贯序接触。抗体存在时的配体结合程度的减少是抗体对结合抑制的提示。例如，配体的结合可以被减少或消除。

确定与 C5aR 结合的抗体存在的其他方法是可获得的，例如其他合适的结合检测，或监测受体结合所触发的事件，包括信号功能和/或对细胞反应（例如白细胞聚集）的刺激的方法。用这种方式所识别的抗体可以被进一步地评价以确定它们在结合后是否能作用为抑制 C5aR 的其他功能或评价它们的治疗性应用。

信号分析

配体或例如激动剂的增强剂与 C5aR 的结合可以形成通过 G 蛋白结合受体的信号，并刺激了 G 蛋白和其他细胞内信号分子的活性。利用任何适宜的方法可以监测化合物（例如抗体或它们的片段）对信号功能的诱

导。这样的检测可以被用于识别 C5aR 的抗体激动剂。在检测中利用配体或增强剂可以测定抗体或它们的功能性片段的抑制活性，并评价抗体抑制配体或增强剂所诱导的活性的能力。

本领域已知的方法或其他合适的方法 (见，例如 Neote, K. et al., *Cell*, 72: 415-425, 1993; Van Riper et al., *J. Exp. Med.*, 177: 851-856, 1993; Dahinden, C. A. et al., *J. Exp. Med.*, 179: 751-756, 1994) 可以检测 G 蛋白活性，例如将 GTP 水解为 GDP，或受体结合所触发的之后的信号事件，例如对细胞内 (细胞浆) 游离钙浓度的快速的和一过性增加的诱导。

例如，利用杂合 G 蛋白结合受体的 Sledziewski et al. 的功能性检测可以被用于检测配体或增强剂结合于受体并激活 G 蛋白的能力 (Sledziewski et al., U.S. Pat. No. 5,284,746)。

在存在被测定的抗体或它们的片段时可以进行这些检测，以及利用已知的方法和/或在此所描述的方法测定抗体或片段一致配体或增强剂所诱导的活性的能力。

化学趋化和细胞刺激的检测

化学趋化检测也可用于评价抗体或它们的功能性片段阻断配体与 C5aR 的结合和/或抑制与配体和受体结合所相关的功能的能力。这些检测以化合物细胞外或细胞内所诱导的细胞的功能性迁移为基础。可以用任何适当的方式评价化学趋化作用，例如，利用 96 孔化学趋化板的检测、或利用其他技术验证的方法来评价化学趋化作用。例如，Springer et al. (Springer et al., WO 94/20142, published Sep. 15, 1994; see also Berman et al., *Immunol. Invest.* 17: 625-677 (1988)) 描述了体外经内皮趋化检测的应用。也已经描述了跨内皮迁移到胶原质中 (Kavanaugh et al., *J. Immunol.*, 146: 4149-4156 (1991))。鼠 L1-2 前 B 细胞或其他能化学趋化的适宜的宿主细胞的稳定转染体可以被用于化学趋化检测。

通常，化学趋化检测监测适宜细胞 (例如白细胞 (例如淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)) 直接运动或迁移到或通过屏障 (例如内皮，或滤膜)，朝向增加水平的化合物，从屏障的第一个表面向相反的第二个表面。膜或滤膜提供了便利的屏障，因此可以监测适宜细胞直接运动或迁移到或通过滤膜，朝向增加水平的化合物，从滤膜的第一个表面向相反的第二个表面。在一些检测中，用例如 ICAM-1、纤维结合素或胶原的物质包被所述的膜以促进粘附。这些检测提供了体外近似的白细胞“归巢”。

例如，可以检测或测定对细胞在合适的容器 (一个容纳装置) 中迁移的抑制，细胞从第一个室迁移进或通过微孔膜进入到含有测试抗体的第二个室，该室与第一个室被膜分开。选择用于监测反应于化合物的特异性迁移的具有适宜孔径大小的膜，例如硝化纤维、聚碳酸酯。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合适的孔径大小范围内。

为了评价迁移和对迁移的抑制，利用标准技术 (例如显微镜) 可以测定迁移进滤膜的距离、跨过滤膜仍粘附于滤膜的第二个表面的细胞数目、和/或聚集于第二个室的细胞数目。在一个实施方案中，用可测定的标记物 (例如，放射性同位素、荧光标记物、抗原或抗原决定簇标记物) 标记细胞，并通过用适宜的方法 (例如通过测定放射活性、荧光、免疫监测) 测定粘附于膜和/或出现于第二个室的标记物可以测定在存在或不存在抗体或片段时的迁移。可以测定相对于一个合适对照物 (例如，比较于不存在抗体时测定的背景迁移、比较于第二种化合物 (也就是标准化合物) 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) 的抗体激动剂所诱导的迁移的程度。在一个实施方案中，特别是对于 T 细胞、单核细胞或表达 C5aR 的细胞，可以监测跨内皮迁移。在该实施方案中，测定了经内皮细胞层的迁移。为了制备细胞层，可以将内皮细胞培养在微孔滤膜或膜上，随意地用例如胶原、纤维结合素或其他细胞

外基质蛋白的物质包裹化,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。各种哺乳动物的内皮细胞可以被用于形成单层细胞,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 Corp, San Diego, Calif.)。为了评价应答于特殊哺乳动物受体的化学趋化作用,优选的是同种哺乳动物的内皮细胞。而且来自异源的哺乳动物物种或属的内皮细胞也可以被使用。

通常的,通过检测细胞定向地迁移进或通过膜或滤膜来进行检测,迁移方向朝向化合物的增加水平,从滤膜的第一个表面向滤膜的相反的第二个表面,其中滤膜在第一个表面含有内皮细胞层。定向迁移发生于从与第一个表面相邻的区域,进入或通过膜,朝向化合物位于的滤膜的相反侧。第二个表面的相邻区域中的化合物浓度要高于第一个表面的相邻区域的化合物浓度。

在一个用于测定抗体抑制剂的实施方案中,将包括能迁移和表达 C5aR 的细胞的组合物放置于第一个室中。将含有一个或多个能诱导第一个室内细胞的化学趋化的配体或增强剂的组合物(具有化学趋化功能)放置于第二个室中。优选的在将细胞放置于第一个室前不久,或和细胞同步,将包含测试抗体的组合物放置于,优选的第一个室内。

能与受体结合并抑制配体或增强剂所诱导的表达 C5aR 的细胞的化学趋化的抗体或它们的功能性片段在本检测中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增强剂诱导的迁移程度的减少是抑制活性的提示。可以进行单独的结合研究以确定抑制是否是抗体与受体结合的结果或通过不同的机制发生的。

下面描述了(见炎症模型)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外监测。这些体内归巢模型测定了细胞应答于配体或增强剂并通过移动和化学趋化到炎症部位的能力,以及测定抗体或它们的片段阻断这种移动的能力。

除了所述的方法，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反应测定抗体或片段对 C5aR 的刺激功能的作用。

C5aR 的其他配体、抑制剂或增强剂的鉴定

能用于测定本发明的抗体和片段的结合及功能的上述检测能用于鉴定与 C5aR 或它们的功能变异体结合的其他配体和其他物质，以及 C5aR 功能的抑制剂和/或增强剂。例如，利用所述的抗体或它们的部分的竞争性检测能鉴别与本发明的抗体或它们的功能性部分有着一样或相似的结合特异性的物质。因此，本发明也包括鉴别与 C5aR 结合的受体的配体或其他物质、以及受体功能的抑制剂 (拮抗剂) 或增强剂 (激动剂) 的方法。在一个实施方案中，将具有 C5aR 蛋白或它们的功能性变异体的细胞 (例如，白细胞、细胞系或已经被加工成表达引入到所述细胞的核酸所编码的哺乳动物的 C5aR 蛋白或功能变异体的合适的宿主细胞) 应用于鉴定并评价与受体结合的配体或其他物质，包括受体功能的抑制剂或增强剂的作用的方法中。这些细胞也用于评价表达的受体蛋白或多肽的功能。

根据本发明，在合适的检测中可以鉴定与受体结合的配体和其他物质、受体功能的抑制剂和增强剂，并进一步地评价治疗作用。受体功能的拮抗剂可以用于抑制 (减少或阻止) 受体活性，以及配体和/或激动剂可以用于诱导 (触发或增强) 其中所示的正常的受体功能。因此，本发明提供了一种治疗炎性疾病包括自身免疫疾病和移植排异的方法，包括将受体功能的拮抗剂施用于个体 (例如哺乳动物)。本发明进一步提供了一种通过将受体功能的新的配体或激动剂施用于个体刺激受体功能的方法，提供了一种选择性刺激白细胞功能的新措施，例如它在学习感染性疾病和癌症上是有用的。

在此所用的 C5aR 蛋白的“配体”指的是与哺乳动物 C5aR 蛋白结合的特殊类型的物质，包括天然配体和天然配体的合成和/或重组形式。在优选的实施方案中，与 C5aR 蛋白结合的配体具有高度的亲和力。

在此所用的“拮抗剂”是一种抑制(减少或阻止) C5aR 蛋白的至少一个功能特征例如结合活性(例如配体结合、增强剂结合、抗体结合)、信号活性(例如哺乳动物 G 蛋白的激活、对细胞浆游离钙浓度的快速和暂时增加的诱导)和/或细胞反应功能(例如，化学趋化的刺激、白细胞的细胞外分泌或炎性介质的释放)的物质。名词拮抗剂包括与受体结合的物质(例如，抗体、天然配体的突变体、小分子量的有机分子、配体结合的其他竞争性抑制剂)以及抑制受体功能而不结合于其上的物质(例如，抗独特型抗体)。

在此所用的“激动剂”是一种增强(诱导、引起、增强或增加) C5aR 蛋白的至少一个功能特征例如结合活性(例如配体、抑制剂和/或增强剂结合)、信号活性(例如哺乳动物 G 蛋白的激活、对细胞浆游离钙浓度的快速和暂时增加的诱导)和/或细胞反应功能(例如，化学趋化的刺激、白细胞的细胞外分泌或炎性介质的释放)的物质。名词激动剂包括与受体结合的物质(例如抗体、来自其他物种的天然配体的同源物)，以及促进受体功能而不结合于其上的物质(例如通过激活相关蛋白)。在优选的实施方案中，激动剂是天然配体的同源物。

因此，本发明也涉及一种检测或鉴定与 C5aR 或它们的结合配体的变异体结合的物质方法，包括配体、拮抗剂、激动剂和其他与 C5aR 或功能性变异体结合的其他物质。根据本方法，可以组合测试的物质、本发明的抗体或抗原结合片段(例如，有着和 7F3 一样或相似的抗原决定簇特异性的抗体，以及它们的抗原结合片段)以及含有 C5aR 或它们的配体结合变异体的组合物。在适合于抗体或抗原结合片段与 C5aR 结合的条件下混合上述的成分，并根据在此所描述的方法或其他合适的方法直接或间接地检测或测定抗体或片段与 C5aR 的结合。相对于合适的

对照物 (例如缺少测试的物质), 所形成的复合物量的减少提示该物质结合到上述的受体或变异体。包含 C5aR 的组合物可以是带有重组 C5aR 或它们的配体结合变异体的细胞的膜碎片。抗体或它们的片段可以被一种例如放射性同位素、旋转标记物、抗原或抗原决定簇标记物、酶标记物、荧光基团和化学发光基团的标记物所标记。

炎症模型

体内炎症模型是可获得的, 它可用于评价本发明的抗体和片段体内作为治疗剂的作用。例如, 将化学因子以及与 C5aR 发生反应的抗体或它们的片段皮内注射到合适的动物中, 例如兔、鼠、豚鼠或猕猴, 并监测白细胞的浸润 (见例如 Van Damme, J. et al., J. Exp. Med., 176: 59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., J. Exp. Med. 171: 2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., J. Exp. Med. 179: 881-887 (1994))。在一个实施方案中, 皮肤活检组织学评价白细胞的浸润 (例如嗜酸性粒细胞、粒细胞)。在另一个实施方案中, 将能化学趋化和外溢的标记的细胞 (例如, 表达 C5aR 的稳定转染的细胞) 施用于动物。在将标记的细胞施用于试验动物之前、同时或之后, 将测试的抗体或片段施用于测试动物。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。

诊断和治疗应用

本发明的抗体和片段在各种应用上都是有用的, 包括研究、诊断和治疗性应用。在一个实施方案中, 用合适的标记物 (例如荧光标记物、化学发光标记物、同位素标记物、抗原或表位标记物或酶标记物) 标记这些抗体。例如, 它们可以用于分离和/或纯化受体和它们的部分, 并研究受体的结构 (例如构象) 和功能。

另外, 可以将本发明的各种抗体用于检测 C5aR 或测定例如 T 细胞 (例如 CD8⁺ 细胞、CD45RO⁺细胞)、单核细胞和/或转染了受体基因的细

胞上的受体的表达。因此，它们也能用于诊断或研究目的的的应用，例如细胞分选 (例如流式细胞术、荧光活化细胞分选)。

本发明的抗 C5aR 抗体在诊断应用上是有用的。通常地，诊断性检测用于测定抗体或它们的片段与 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。可以使用各种标记物，包括但不限于，放射性核素、荧光剂、酶底物、酶共因子、酶抑制剂和配体 (例如生物素、半抗原)。本领域人员知道多种适合的免疫检测 (见，例如，U.S. Pat. Nos. 3,817,827; 3,850,752; 3,901,654 和 4,098,876)。组织样品的免疫组化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，利用例如凝集检测的合适的方法可以测定抗体或片段。未标记的抗体或片段也可以和另一种 (也就是一种或多种) 能用于检测例如与第一抗体 (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。

也可以制备用于检测生物样品中 C5aR 蛋白存在的试剂盒。这些试剂盒将包括与 C5aR 结合的抗体或它们的片段，以及一种或多种适合于检测抗体或片段与 C5aR 之间的复合物存在的辅助试剂。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其他的特异于其他抗原决定簇的抗体一起使用。标记的或未标记的抗体可以和辅助成分 (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。这些辅助材料通常要小于基于活性抗体量的 5%重量，以及总量至少是基于抗体浓度的 0.001%重量。采用第二抗体能结合于单克隆抗体的容器，例如单独的小瓶或罐，试剂盒可以提供这些抗体。如果

存在第二抗体，它通常是被标记的，并按和上述的抗体制备一样的方式进行制备。

同样，本发明也涉及一种检测和/或定量检测细胞表达的 C5aR 的方法，其中将包含细胞或它的片段 (例如膜碎片) 的组合物在适合于抗体或片段结合的条件下与同 C5aR 结合的抗体或它的功能性片段接触，并监测结合。对抗体的检测以及抗体和 C5aR 之间复合物形成的提示说明了受体的存在。例如，如同在标题“结合检测”所述的一样，可以测定抗体和细胞的结合。该方法可以用于检测来自个体 (例如一个样品，例如一种体液、例如血、唾液或其他合适的样品) 的细胞上 C5aR 的表达。例如，通过流式细胞仪也可以测定 T 细胞或单核细胞表面上 C5aR 的表达水平，并且表达的水平 (例如，染色强度) 可以与疾病易感性、进展或危险相关。

受体的作用为化学趋化白细胞在全身的迁移，特别是迁移到炎症部位。通过三步过程调节炎性细胞迁移出血管，该过程包括白细胞和内皮细胞粘附蛋白以及细胞特异性化学引诱物及活化因子的相互作用 (Springer, T. A., Cell, 76:301-314 (1994); Butcher, E. C., Cell, 67:1033-1036 (1991); Butcher, E. C. and Picker, L. J., Science (Wash. D.C.), 272:60-66 (1996))。它们是：(a) 白细胞选择素和内皮细胞糖之间的低亲和力的相互作用；(b) 白细胞化学引诱物受体和化学趋化/活化因子之间的高亲和力的相互作用；以及 (c) 白细胞整合素和免疫球蛋白超家族的内皮细胞粘附蛋白之间的紧密结合。不同的白细胞亚群表达不同的选择素、化学引诱物和整合素群。另外，炎症改变了内皮粘附蛋白的表达以及化学引诱物和白细胞活化因子的表达。因此，在调节白细胞循环到血管外部位的选择性上有着很大的差异。第二个步骤是关键，其中对白细胞化学引诱物受体的激活被认为是引起了从选择素介导的细胞翻转为整合素介导的紧密结合的过渡。这使得白细胞准备迁移到血管周围部位。化学引诱物/化学引诱物受体的相互作用对于经内皮迁移和组织内定位也是关键

的(Campbell, J. J., et al., J. Cell Biol., 134:255-266 (1996); Carr, M. W., et al., Immunity, 4:179 187 (1996)). 这种迁移是被化学引诱物的浓度梯度所指导的并朝向炎性病灶。

C5aR 对于白细胞聚集有着重要作用。C5aR 可能是一种作用于中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、T 细胞或 T 细胞亚群或单核细胞迁移到特定的炎症部位的关键的化学引诱物受体, 所以可以将抗 C5aR MAbs 用于抑制(减少或阻止) 白细胞迁移, 特别是和中性粒细胞阻止损伤所相关的迁移, 例如再灌注损伤和卒中、T 细胞功能不全, 例如自身免疫病、或过敏反应或单核细胞所介导的疾病, 例如粥样硬化症。

因此, 在研究和治疗性应用中也可以将本发明的抗体和它们的片段用于调节受体功能。例如, 在此所描述的抗体和功能性片段可以作为抑制(减少或阻止) (a) 与受体的结合(例如配体、抑制剂或增强剂), (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) 阻断配体或增强剂的结合。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。与受体结合的抗体也可以作为受体功能的激动剂, 触发或刺激受体功能, 例如结合于受体引发的受体的信号或刺激功能(例如白细胞聚集)。

因此, 本发明提供了一种抑制哺乳动物(例如人患者) 内白细胞聚集的方法, 包括给哺乳动物施用有效量的本发明的抗体或功能性片段。本发明也提供了一种抑制与 C5aR 活性相关的其他作用的方法, 例如嗜碱性粒细胞释放组胺以及嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和中性粒细胞释放颗粒。施用本发明的抗体或片段可以造成病态的改善或消除。

单克隆抗体也可以用于免疫治疗免疫相关疾病。结合于本发明的单克隆抗体, 在此所用的名词“免疫治疗地”或“免疫治疗”指的是预防性和治疗性给药。因此, 可以将单克隆抗体施用于高危患者以减少免疫

性疾病的可能性和/或严重性，以及施用于已经证实有活动性疾病的患者，例如革兰氏染色阴性细菌感染引起的脓毒症。

抗体或它们的功能性片段可以用于治疗过敏、粥样斑块形成、过敏反应、恶性肿瘤、慢性和急性炎症、组胺和 IgE 介导的过敏反应、休克、和类风湿关节炎、粥样硬化、多发硬化、异体移植排异、纤维化疾病、哮喘、炎性肾小球疾病或任何免疫复合物相关性疾病。

用 C5aR 受体功能的抑制剂 (包括抗体或它们的合适片段) 可以治疗的人或其他物种的疾病或病变包括但不限于：

(a) 炎性或过敏性疾病及病变，包括呼吸道过敏性疾病，例如哮喘、过敏性鼻炎、高敏性肺病、高敏性肺炎、间质性肺病 (ILD) (例如，特发性肺纤维化，或与类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化症、干燥综合征、多发性肌炎或皮炎相关的 ILD)；过敏性或高敏性反应，药物过敏 (例如对青霉素、头孢菌素)、昆虫刺咬过敏；炎性肠病，例如克隆病和溃疡性结肠炎；脊柱关节病；硬皮病；银屑病和炎性皮肤病变例如皮炎、湿疹、遗传性过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、荨麻疹；血管炎 (例如，坏死性、皮肤性和高敏性血管炎)；

(b) 自身免疫病，例如关节炎 (例如类风湿关节炎、银屑病关节炎)、多发性硬化、系统性红斑狼疮、重症肌无力、幼年发病糖尿病、肾病例如肾小球肾炎、自身免疫性甲状腺炎、白塞病；

(c) 移植物排异 (例如在移植中)，包括同种异体排异或移植物抗宿主病；

(d) 动脉粥样硬化；

(e) 具有白细胞皮肤或器官浸润的肿瘤；

(f) 可以治疗的其他疾病或病变 (包括 C5aR 介导的疾病或病变)，其中非所需的炎症反应被抑制，这包括当不局限于再灌注损伤、卒中、成人呼吸窘迫综合征、某些血液肿瘤、细胞因子相关的毒性 (例如，感染

性休克、内毒素休克)、多发性肌炎、皮炎、类天疱疮、Alzheimers 病以及包括结节病的肉芽肿疾病。

本发明的抗 C5aR 抗体可以阻断一个或多个配体的结合，因此阻断了导致上述疾病的下游的一个或多个事件的连锁反应。

在一个优选的实施方案中，本发明的抗体用于治疗脓毒症、卒中或成人呼吸窘迫综合征。

可以用 C5aR 功能的增强剂治疗的人或其他物种的疾病或病变包括，但不局限于免疫抑制，例如那些免疫缺陷综合征的个体，例如 AIDS、进行放疗或化疗的个体、自身免疫病的治疗或其他药物治疗 (例如糖皮质激素的治疗)，这些都造成免疫抑制；以及因为受体功能的先天性缺陷或其他病因造成的免疫抑制。

给药方式

根据本发明的一个免疫治疗的方法需要在免疫性疾病发病之前 (预防) 或之后 (治疗) 将本发明的治疗剂通过注射或输注给药。

本发明的一个或多个抗体或片段可以通过合适的途径施用于个体，可以单独施用或联合 (之前、同步或之后) 其他药物或试剂施用。例如本发明的抗体可以和其他的单克隆或多克隆抗体 (例如，联合了与化学因子受体结合的抗体，包括但不限于 CCR2 和 CCR3) 或和抗 TNF 或其他抗炎症药物或和血浆制品例如商品化可获得伽玛球蛋白和免疫球蛋白制品联合用于预防或治疗性治疗。本发明的抗体或片段可以用作为单独给药的组合物，并与抗生素和/或抗微生物药物一起联合施用。

施用有效量的抗体或片段 (也就是一个或多个抗体或片段)。优选剂量为在给药的条件下能获得所需的治疗 (包括预防) 作用的有效量，例如有效地抑制 C5aR 功能并因此抑制炎症反应的剂量。

各种给药途径是可能的，它包括但不必局限于：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 (例如经气

管、经眼、经鼻或经口吸入、经鼻滴入), 这依赖于所治疗的疾病或病变。其他合适的给药方法也可以包括可充电的或可生物降解的装置以及缓释多聚体装置。也可以将本发明的药物组合物作为与其他药物的联合治疗的一部分施用。

根据给药途径以及所选择的形式 (例如溶液、乳剂、胶囊), 施用的抗体或片段的形式是不同的。一种包含抗体或它们的功能性片段的适宜的药物组合物可以被制备于生理可接受的媒介或载体中。也可以使用抗体和/或片段的混合物。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。肠外媒介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合适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、丙烯乙二醇、液态的聚乙烯乙二醇)、葡萄糖溶液和糖胶。静脉内媒介可以包括各种添加剂、防腐剂、或液体、营养物或电解质补充物 (常见于 Remington's Pharmaceutical Science, 16th Edition, Mack, Ed. 1980)。组合物可以按需随意地包含有药用可接受的辅助物质使得其接近于生理状态, 例如 pH 调节和缓冲药物、毒性调整药物、例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙和乳酸钠。根据已知技术的冻干和再生技术可以将本发明的抗体和片段冻干用于保存以及在合适的载体中再生。根据本领域熟知的方法可以经验地确定活性成份在所选的媒介中的最佳浓度, 并且这将依赖于所需的最终的药用形式。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)。

施用本发明的单克隆抗体的剂量范围是大到足够产生所需作用的剂量, 其中改善了免疫性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。剂量不应当大到引起相反的副作用, 例如高粘滞综合征、肺水肿、充血性心衰等。通常地, 剂量随着患者的年龄、一般条件、性别和疾病的程度而变化, 并由本领域人员所确定。个人的家庭医生可以

因为任何的并发症而调整剂量。剂量的变化可以从约 0.1mg/kg 到约 300mg/kg，优选的从约 0.2mg/kg 到约 200mg/kg，最优选的从约 0.5mg/kg 到约 20mg/kg，每天施用一个或多个剂量，持续一天或几天。

本领域人员可以理解，通过施用含有编码抗体的核酸分子可以将本发明的抗体引入到目标对象中。核酸分子可以是 DNA 或 RNA 或含有 DNA 或 RNA 的嵌合分子的形式。可以将编码抗体的核苷酸序列克隆进表达载体中，其中将编码药物的序列和表达调节元件可操纵地连接。表达调节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。

多种方法可以用于将编码抗体的核酸分子体内引入到靶细胞中。例如，可以在靶点注射裸核酸、可以将裸核酸包囊化成脂质体，或可以通过病毒载体引入。

单独的核酸分子或包囊化于例如阳离子脂质体的核酸分子的直接注射可以被用于体内将编码 TSP-1 的核酸稳定基因转移进非分裂的或分裂的细胞 (Ulmer et al., Science 259:1745-1748 (1993))。另外，利用粒子轰击方法可以将核酸转移进各种组织中 (Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991))。

病毒载体可用于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。病毒是特异的感染物质，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是特别适合于体内将抗体定向到所选择的细胞中。对病毒载体的选择部分依赖于所定向的细胞类型。

能定向到特殊的细胞类型的特殊的病毒载体在本领域是熟知的。这些载体包括，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 (Lebkowski et al. U.S Pat. No. 5,354,678)。重组腺相关病毒载体所具有的附加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体中 (Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 (1988))。

通过将组织特异性启动子或增强子结合进载体可以构建病毒载体,使得能进一步地控制表达编码抗体的细胞类型(Dai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10892 -10895 (1992))。

逆转录病毒载体也适合于进行体内转送编码抗体的核酸分子的方法。这些载体可以被构建成作用为感染粒子或作用为只进行单次首轮感染的非感染粒子。

利用组织特异性的配体或通过桥分子 (bridging molecule) 非共价地连接于核酸分子的抗体,受体所介导的 DNA 转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转送到细胞内(Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154 (1992); Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987))。

例如,通过体外对同源细胞的转染也可以进行在目标对象中获得抗体表达的基因转移。对于这种体外转染所适合的细胞包括血细胞,因为利用本领域所熟知的方法容易操纵这些细胞并将它们重新导入到目标对象中。

多种方法可以进行通过体外转染细胞的基因转移,例如,磷酸钙沉淀、二乙氨基乙基葡聚糖、电穿孔、脂染或病毒感染。这些方法是本领域所熟知的(见,例如, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbour Laboratory Press (1989))。一旦这些细胞被转染,然后将它们移植或迁移回所治疗的目标对象中。一旦这些引入体内的细胞能产生抗体,这些抗体可以进入循环并在疾病或病变部位抑制血小板的聚集。

在整个申请中名词“包括”或“含有”或“包含”应当被理解为意思是包括所述的元素、整体或步骤,或者是元素、整体或步骤的组,但不排除任何其他的元素、整体或步骤,或者是元素、整体或步骤的组。

本申请就收入的文献、文件、材料、方案、文章等等所作的任何讨论,其目的仅仅是用作本申请的背景,不能视为这等于认可这些内容的

部分或全部构成了在本申请各项权利要求的优先权日之前已经存在于澳大利亚的现有技术的一部分或者是本发明相关领域的公知常识。

现在下面的实施例将举例说明本发明，它不会以任何方式进行限制。在此所引用的所有的参考文献的内容将一起并入参考。

实施例

材料和方法

1. 单克隆抗体的生成和流式细胞检测

用 10^7 L1.2 C5aR 转染的细胞[8]每隔 2 周腹腔内接种 C57BL/6 鼠五到六次，生成与 C5aR 发生反应的单克隆抗体(MAb)。静脉内注射末次接种物。四天后，取出脾并如所述的用 SP2/0 细胞系融合细胞[9]。利用 C5aR 转染的 L1.2 细胞、未转染的 L1.2 细胞、或例如 CXCR2 或 CX3CR1 (V28) 的无关受体转染的 L1.2 细胞，利用荧光染色以及用 FACScan® (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA)的分析来鉴别与 C5aR 发生反应的 MAb。如同先前所描述的[10]，利用标准操作进行细胞的 MAb 染色。

2. 配体结合检测

重组人 C5a 来自 Sigma 化学公司(St. Louis, MO)。 ^{125}I -Bolton-Hunter-标记的补体 C5a 购自 NEN-Dupont (Boston, MA)，其具有 2200 Ci/mM 的特异性活性。如先前所述的[9, 11]进行 C5a 与 L1.2 C5aR 转染体的结合。简要的，在 PBS 中洗涤细胞一次并将细胞按 $10^7/\text{ml}$ 浓度重悬于结合缓冲液(50mM Hepes, pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 0.5% BSA 和 0.05% 叠氮化物)。将 50ml (5×10^5 细胞) 水溶液分散到微离心管中，随后加入冷的竞争剂以及 1nM 放射性标记的 C5a。最终的反应容积为 200 μl 。在室温下孵育 60 分钟后，用 1ml 含有 0.5 M NaCl 的结合缓冲液洗涤细胞三次。然后将细胞计数。通过细胞与放射性标记的 C5a 的孵育

能得到背景结合，并且它至少比未结合 C5a 高 400 倍。在整个试验中使用复孔以及标准差始终是<平均值的 10%。

3. 转染体的化学趋化检测

刮取下 C5aR 转染的 L1.2 细胞并在迁移培养基中洗涤，及按 10^7 细胞/ml 重悬。在 24 孔组织培养板的每个孔中放入组织培养插入物(Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA)，这形成了具有 3mm 直径孔的聚对苯二酸乙二醇酯膜 (polyethylene terephthalate membrane) 所分隔的上室和下室。往 24 孔组织培养板的 600 μ l 检测培养基中加入化学趋化的 C5a (稀释于检测培养基)，使得其终浓度为 1nM。将 100T1 中的 100 万个细胞和来自含有抗体的杂交瘤的上清预先培养 30 分钟。将细胞-上清混合物或纯化的 mAb 加入到孔的上室中，并容许细胞在 5% CO₂、37°C 培养箱中迁移 18 个小时到下室。迁移后取出插入物并用 FACScan®将细胞计数。通过获取为期 30 秒的事件得到相对细胞计数。发现这个方法有着极高的可重复性，并可对白细胞设门和除外碎片。

4. 中性粒细胞化学趋化检测

细胞制备：首先通过在室温下 40 分钟的葡聚糖沉淀步骤获得白细胞部分，然后将细胞分层加入到 Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) 中，在室温 2500rpm 下进行密度梯度离心，这样从外周血中分离到中性粒细胞。在低渗裂解残余的红细胞后，将中性粒细胞重悬于同样体积的 RPMI 1640 (Invitrogen Inc.)、M199 (Invitrogen Inc.) 和 2% FCS (HyClone) 中。

化学趋化检测：将浓度范围从 0.5 到 10 μ g /ml 的抗 C5aR MAb 6C12、7F3 和 12D4 加入到中性粒细胞(1×10^7 /ml)中。然后将细胞放入到带有 3.0 μ m 孔径的聚碳酸酯膜的 24 孔插入物(Corning Inc., NY)的上室，并在室温下孵育 10 分钟。然后将插入物放置到含有例如 C5a (0.1 到 100nM) 和 IL-8 (1.12ng/ml 到 11.2ng/ml) 的人中性粒细胞化学引诱物的

下室。然后在 37°C 孵育中性粒细胞 30 分钟。流式细胞仪定量通过膜迁移到下室的中性粒细胞数目。

5. 竞争性抑制检测

将 50µg /ml 的抗 C5aR MAbs 加入到浓度范围从 1 到 100µM 被称为“PEPI”的 C5aR N-末端的合成生成的肽(Biosource; Eldridge)中。然后加入 C5a 受体转染的并重悬于 1%牛血清白蛋白 (BSA; GibcoBRL) (1x 10⁷/ml) 的鼠 L1.2 细胞使得总体积为 100µl。将细胞在 4°C 孵育 30 分钟并用 0.1%BSA 洗涤一次。将荧光素结合的绵羊抗鼠 IgG, F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.)用作为第二抗体 (1: 200) 并在 4°C 孵育 15 分钟, 随后是用 0.1%BSA 的附加的洗涤步骤。将细胞重悬于 0.1% BSA 中并用流式细胞仪分析。

6. ELISA 检测

按免疫学通用方案(Unit 2.1) (Edited by J.F. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.B. Margulies, E.M. Shevach and W. Strober), John Wiley and Sons, New York 所描述的进行 ELISA。简要的, 用 1Tg/ml 蛋白 PBS 溶液在 37°C 包被 96 孔平底 ELISA 板(Maxisorp; Nunc) 1 个小时, 然后用 BSA 在 4°C 阻断过夜。然后洗涤板, 和抗体孵育、洗涤及和过氧化物酶结合的绵羊抗鼠 IgG 抗体孵育。所使用的底物是 TMB 底物试剂 (PharMingen)。

实施例 1: MAbs 的生成和流式细胞检测

将表达高水平 C5aR 的转染体[8]用于接种鼠, 然后通过流式细胞仪鉴别十种与 C5aR 转染的 L1.2 细胞特异反应, 但不与 CX3CR1 (V28)或 CXCR2 转染的 L1.2 细胞特异性反应的 MAbs。这十种 MAbs 被称为 12D4、10G1、5H11、6C12、10D4、5F3、7F3、8D6、11B9 和 1D12。

图 1 是一组直方图, 显示了 MAbs 7F3 与 C5aR 转染体 (L1.2 C5aR) 和人中性粒细胞反应, 但不与 CX3CR1 转染的细胞(L1.2 V28)或 CXCR2

转染的细胞(L1.2 CXCR2)反应。这些 MAbs 7F3 结果是鉴别的十种抗体的代表。

实施例 2：对 C5a 与 C5aR 转染的细胞的结合的抑制

测试了 MAbs 抑制 ^{125}I -标记的 C5a 与 C5aR 转染体的结合的能力。图 2 显示 MAbs 7F3 完全抑制了 ^{125}I -标记的 C5a 与转染体的结合，并且这种抑制要强于用 400nM C5a 所获得的抑制。这说明 MAbs 7F3 能完全阻断 C5a 与 C5aR 的结合。MAbs 6C12 和 12D4 也显示了对 ^{125}I -标记的 C5a 与 C5aR 转染体的结合的根本性抑制。图 3 显示了 MAbs 7F3 对 C5a 与 C5aR 的结合的剂量依赖性抑制。

实施例 3：MAbs 7F3 对人 C5a 介导的 C5aR 转染体迁移的抑制

利用 C5aR 转染的 L1.2 细胞如上描述的进行化学趋化试验。图 4 显示 7F3、6C12 和 12D4 完全地或根本性抑制了 C5a 对 C5aR-L1.2 细胞的化学趋化作用。图 5 显示 mAb 7F3 对 C5a 对 C5aR-L1.2 细胞的化学趋化作用的剂量依赖性抑制。

实施例 4：MAbs 7F3 对人 C5a 介导的中性粒细胞迁移的抑制

在 1xPBS(GibcoBRL)中透析抗 C5aR MAbs，以及将 5 $\mu\text{g/ml}$ 透析的和非透析的 7F3 MAbs 都加入到中性粒细胞($1 \times 10^7/\text{ml}$)中。包括有阴性对照 (无 Ab 加入，和加入 1x PBS)。然后将细胞放入到带有 3.0 μm 孔径的聚碳酸酯膜的 24 孔插入物(Corning Inc., NY)的上室，并在室温下孵育 10 分钟。然后将插入物放置到含有人中性粒细胞化学引诱物 C5a (0.1 到 100nM) 的下室。然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育中性粒细胞 30 分钟。流式细胞仪 (FACSCalibur; BD Biosciences)定量通过膜迁移到下室的中性粒细胞数目。

图 6 显示了比较于两个阴性对照, MAb 7F3 (无论透析的或未透析的) 的加入造成了中性粒细胞迁移的抑制。

实施例 5: MAb 7F3、6C12 和 12D4 对人 C5a 介导的中性粒细胞迁移的抑制

将三种 5 μ g /ml 的抗 C5aR MAb 7F3、6C12 和 12D4 加入到中性粒细胞(1×10^7 /ml)中。包括有阴性对照 (无 Ab 加入, 和加入 1x PBS)。然后将细胞放入到带有 3.0 μ m 孔径的聚碳酸酯膜的 24 孔插入物(Corning Inc., NY)的上室, 并在室温下孵育 10 分钟。然后将插入物放置到含有人中性粒细胞化学引诱物 C5a (1.12 到 1120ng/ml) 的下室。然后在 37°C 孵育中性粒细胞 30 分钟。流式细胞仪(FACSCalibur; BD Biosciences)定量通过膜迁移到下室的中性粒细胞数目。

图 7 的结果显示比较于两种阴性对照, 所有的三种 MAb 表现出对中性粒细胞朝向 C5a 迁移的抑制。特别是, 7F3 MAb 表现出最有效的抑制, 造成中性粒细胞迁移数目比背景水平减少了 140 倍。

实施例 6: MAb 7F3、6C12 和 12D4 对人 IL-8 介导的中性粒细胞迁移的抑制

将三种 5 μ g /ml 的抗 C5aR MAb 7F3、6C12 和 12D4; 以及 7F3 的透析样品加入到中性粒细胞(1×10^7 /ml)中, 并放置于 24 孔插入物的上室中。也包括有阴性对照 (无 Ab 加入, 和加入 1x PBS)。在室温下孵育 10 分钟后。然后将插入物放置到含有 IL-8 (1.12 到 1120ng/ml) 的下室中, IL-8 是一种与中性粒细胞表面上所表达的 CXCR1 和 CXCR2 受体结合的人中性粒细胞化学引诱物。然后在 37°C 孵育中性粒细胞 30 分钟。流式细胞仪(FACSCalibur; BD Biosciences)定量通过膜迁移到下室的中性粒细胞数目。

图 8(a) 果显示所有的三种 MAb 表现出对中性粒细胞朝向 IL-8 迁移的抑制。7F3 MAb (透析的和为透析的) 都是最有效的抑制剂, 造成了中性粒细胞迁移数目减少了 5 倍。

也测定了 MAB 7F3 抑制其他中性粒细胞化学引诱物, 特别是 CXCR1 和 CXCR2 配体的能力。表 1 显示在中性粒细胞化学趋化检测中, 对中性粒细胞迁移向大量的中性粒细胞化学引诱物, 特别是 CXCR1 和 CXCR2 配体的真实抑制。

表 1

化学引诱物 (112 ng/ml)	% 抑制
C5a	98
IL-8	81
GCP-2	91
ENA-78	83

实施例 7: C5aR N 末端肽 (9-29) 对 MAb 7F3、6C12 和 12D4 与 C5aR 转染体结合的竞争性抑制。

通过用荧光素 (FITC) 结合的绵羊抗鼠 IgG 染色测定 MAb 7F3、6C12 和 12D4 与 C5aR 转染细胞的结合。然后根据上述的方法测定 C5aR N 末端肽 (9-29) 抑制这种结合的能力。该 C5aR N 末端肽 (9-29) 具有序列 PDYGHYDDKDTLNLTPVDKT 以及在此被称为“PEPI”。

图 9 (a) 显示增加浓度的 PEPI 没有抑制三种抗 C5aR MAb 的荧光染色。甚至在 100TM 浓度的 PEPI, 荧光染色仍是稳定的。

图 9(b)显示了 PEPI (50TM 浓度) 不能抑制 MAb 7F3 对纯化的中性粒细胞的 FACS 染色。

实施例 8: MAb 7F3、6C12 和 12D4 与 C5aR N 末端肽 (9-29) (“PEPI”) 及 OPG 的反应性

按上述的进行 ELISA 检测测定 MAb 7F3、6C12、12D4 和 PEPI 及 OPG 的反应性。OPG 是 TNF 受体超家族的一个成员, 它特异性地结合于它的配体 TNFSF11/OPGL。更特异的, OPG 是成骨细胞分泌的诱饵受体, 它作用为对骨吸收的负性调节子

将 1 µg/ml 浓度的 MAb 7F3、6C12 和 12D4 作为纯化蛋白用于 ELISA。将 MAb 9C1 (特异于 OPG) 和 MAb 11B9 (识别 PEPI) 用作为阳性对照。以未稀释的组织培养上清的形式使用这些对照 MAb。

图 10 显示 MAb 7F3、6C12 和 12D4 和 PEPI 无反应, MAb 7F3 和 OPG 有弱的交叉反应。

实施例 9: 抗 C5aR MAb 7F3、6C12 和 12D4 的序列测定

从表达抗体的杂交瘤细胞中提取的 RNA 中测定抗 C5aR 抗体 7F3、6C12 和 12D4 的核苷酸序列。为了确定用于扩增重链和轻链可变区的引物, 通过 Biogen Inc.测定三种抗体的可变区的蛋白序列, 并用鼠单克隆抗体同型试剂盒-IsoStrip (Roche Cat. No. 1 493 027)测定抗体的同型。因此, 5'框架 1 引物来自 Biogen Inc.蛋白序列, 而 3'引物是根据于抗体的同型。

每种抗 C5aR 抗体的同型如下:

6C12: 轻链	Kappa
6C12: 重链	IgG3
7F3: 轻链	Kappa
7F3: 重链	IgG2a
12D4: 轻链	Kappa
12D4: 重链	IgG3

利用 Trizol 试剂(Invitrogen, Cat. No. 15596-018)从杂交瘤细胞分离到总 RNA。按生产商所描述的分离 RNA。简要的, 将近 5×10^6 细胞裂解于 1ml Trizol 试剂中。用 200Tl 氯仿清除细胞碎片并离心。取出含有 RNA 的水溶液层并用 250Tl 异丙醇沉淀 RNA。

利用 AMV 逆转录酶(Promega Cat. No. M5101)用总 RNA (2Tg) 制备 cDNA。然后利用下面的引物用 cDNA 作为模板扩增编码可变区的序列
6C12 轻链可变区引物:

mIgkapFR15': GATGTTTTGATGACCCAAACTCC (SEQ ID NO:2)

mIgkapcon3': AACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTG (SEQ ID NO:3)

6C12 重链可变区引物:

mIgVh2 5' SAGGTCCAGCTGCARCAGTC (SEQ ID NO:4) FR1 VhIIA 家族

mIgG3con3' TGGGCATGAAGAACCTGG (SEQ ID NO:5) 铰链区

7F3 轻链可变区引物:

mIgkapFR15': GATGTTTTGATGACCCAAACTCC (SEQ ID NO:6)

mIgkapcon3': AACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTG (SEQ ID NO:7)

7F3 重链可变区引物:

mIgVh2 5': SAGGTCCAGCTGCARCAGTC (SEQ ID NO:8) FR1 VhIIA 家族

mIgG2acon3': TTTGCATGGAGGACAGGG (SEQ ID NO:9)

12D4 轻链可变区引物:

mIgkapFR15': GATGTTTTGATGACCCAAACTCC (SEQ ID NO:10)

mIgkapcon3': AACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTG (SEQ ID NO:11)

12D4 重链可变区引物:

mIgVh1 5': CAGGTGCAGCTGAAGSAGTC (SEQ ID NO:12) FR1 VhIB 家族

mIgG3con3': TGGGCATGAAGAACCTGG (SEQ ID NO:13) 铰链区

用高保真的 Pfu 聚合酶(Promega Cat. No. M7741)进行聚合酶链反应(PCR)，退火温度 60°C，以及在 72°C 延伸引物 3 分钟。将所得到的近 700bp 的 PCR 片段克隆进 pGEM-Teasy (Promega Cat. No. A1360)中。分离单个克隆并用商品化的测序工具测序。

在此所提供的结果序列如下：

6C12 轻链可变区(DNA) 序列:	SEQ ID NO:14
6C12 轻链可变区(蛋白) 序列:	SEQ ID NO:15
6C12 重链可变区(DNA) 序列:	SEQ ID NO:16
6C12 重链可变区(蛋白) 序列:	SEQ ID NO:17
7F3 轻链可变区(DNA) 序列:	SEQ ID NO:18
7F3 轻链可变区(蛋白) 序列:	SEQ ID NO:19
7F3 重链可变区(DNA) 序列:	SEQ ID NO:20
7F3 重链可变区(蛋白) 序列:	SEQ ID NO:21
12D4 轻链可变区(DNA) 序列:	SEQ ID NO:22
12D4 轻链可变区(蛋白) 序列:	SEQ ID NO:23
12D4 重链可变区(DNA) 序列:	SEQ ID NO:24
12D4 重链可变区(蛋白) 序列:	SEQ ID NO:25

实施例 10：对 MAbs 7F3、6C12 和 12D4 的 DNA 和蛋白序列的一致性及相似性的分析。

利用 MacVector 6.5.3 比较三种抗 C5aR 抗体 (7F3、6C12 和 12D4) 的 DNA 及蛋白序列。将 ClustalW(1.4)多比对程序用于该分析。

(i) 轻链可变区 DNA 序列的分析

图 11 显示了 7F3、6C12 和 12D4 的轻链可变区 DNA 序列的比对。

ClustalW(1.4)多序列比对分析得到了以下结果：

3 Sequences Aligned. Alignment Score = 6612

Gaps Inserted = 0 Conserved Identities = 315

Pairwise Alignment Mode: Slow

Pairwise Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 5.0

Multiple Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 5.0

Delay Divergent = 40% Transitions: Weighted

Processing time: 0.4 seconds

1. 7F3 Vk vs. 6c12 Vk

Aligned Length = 336 Gaps = 0

Identities = 320 (95%)

2. 7F3 Vk vs. 12d4 Vk

Aligned Length = 336 Gaps = 0

Identities = 320 (95%)

3. 6c12 Vk vs. 12d4 Vk

Aligned Length = 336 Gaps = 0

Identities = 326 (97%)

(ii) 重链可变区 DNA 序列的分析

图 12 显示了 7F3、6C12 和 12D4 的重链可变区 DNA 序列的比对。

ClustalW(1.4)多序列比对分析得到了以下结果：

3 Sequences Aligned. Alignment Score = 5346

Gaps Inserted = 3 Conserved Identities = 200

Pairwise Alignment Mode: Slow

Pairwise Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 5.0

Multiple Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 5.0

Delay Divergent = 40% Transitions: Weighted

Processing time: 0.5 seconds

1. 7F3 Vh vs. 6c12 Vh

Aligned Length = 363 Gaps = 0

Identities = 333 (91%)

2. 7F3 Vh vs. 12d4 Vh

Aligned Length = 363 Gaps = 3

Identities = 210 (57%)

3. 6c12 Vh vs. 12d4 Vh

Aligned Length = 363 Gaps = 3

Identities = 210 (57%)

(iii) 轻链可变区蛋白序列的分析

图 13 显示了 7F3、6C12 和 12D4 的轻链可变区蛋白序列的比对。

ClustalW(1.4)多序列比对分析得到了以下结果：

3 Sequences Aligned. Alignment Score = 1902

Gaps Inserted = 0 Conserved Identities = 99

Pairwise Alignment Mode: Slow

Pairwise Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 0.1

Similarity Matrix: blosum

Multiple Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 0.1

Delay Divergent = 40% Gap Distance = 8

Similarity Matrix: blosum

Processing time: 0.1 seconds

1. 7F3 Vk vs. 6c12 Vk

Aligned Length = 112 Gaps = 0

Identities = 102 (91%) Similarities = 5 (4%)

2. 7F3 Vk vs. 12d4 Vk

Aligned Length = 112 Gaps = 0

Identities = 103 (91%) Similarities = 4 (3%)

3. 6c12 Vk vs. 12d4 Vk

Aligned Length = 112 Gaps = 0

Identities = 104 (92%) Similarities = 4 (3%)

(iv) 重链可变区蛋白序列的分析

图 14 显示了 7F3、6C12 和 12D4 的重链可变区蛋白序列的比对。

ClustalW(1.4)多序列比对分析得到了以下结果：

3 Sequences Aligned. Alignment Score = 1432

Gaps Inserted = 2 Conserved Identities = 51

Pairwise Alignment Mode: Slow

Pairwise Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 0.1

Similarity Matrix: blosum

Multiple Alignment Parameters:

Open Gap Penalty = 10.0 Extend Gap Penalty = 0.1

Delay Divergent = 40% Gap Distance = 8

Similarity Matrix: blosum

Processing time: 0.1 seconds

1. 7F3 Vh vs. 6c12 Vh

Aligned Length = 121 Gaps = 0

Identities = 107 (88%) Similarities = 6 (4%)

2. 7F3 Vh vs. 12d4 Vh

Aligned Length = 121 Gaps = 2

Identities = 52 (42%) Similarities = 25 (20%)

3. 6c12 Vh vs. 12d4 Vh

Aligned Length = 121 Gaps = 2

Identities = 54 (44%) Similarities = 25 (20%)

本领域人员了解，只要不脱离于广泛描述的本发明的精神或范围，可以如特殊实施方案所示的对本发明进行无数的变更和/或修改。因此，本实施方案的所有部分只被认为是作为举例说明而不是限制性的。

参考文献:

1. Gerard, C. and N.P. Gerard, C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annual Review of Immunology*, 1994. 12: p. 775-808.
2. Murdoch, C. and A. Finn, Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 2000. 95(10): p. 3032-43.
3. Watanabe, H., et al., Analysis of C5a receptor by monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods*, 1995. 185(1): p. 19-29.
4. Pellas, T.C., et al., Novel C5a receptor antagonists regulate neutrophil functions in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 1998. 160(11): p. 5616-21.
5. Konteatis, Z.D., et al., Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses. *Journal of Immunology*, 1994. 153(9): p. 4200-5.
6. Kaneko, Y., et al., Antagonistic peptides against human anaphylatoxin C5a. *Immunology*, 1995. 86(1): p. 149-54.
7. Morgan, E.L., et al., Anti-C5a receptor antibodies. Characterization of neutralizing antibodies specific for a peptide, C5aR-(9-29), derived from the predicted amino-terminal sequence of the human C5a receptor. *Journal of Immunology*, 1993. 151(1): p. 377-88.
8. Campbell, J.J., et al., Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol*, 1996. 134(1): p. 255-66.
9. Heath, H., et al., Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest*, 1997. 99(2): p. 178-84.

10. Ponath, P.D., et al., Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils [see comments]. *J Exp Med*, 1996. 183(6): p. 2437-48.

11. Ponath, P.D., et al., Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest*, 1996. 97(3): p. 604-12.

<110> G2 治疗有限公司

<120> 抗 C5aR 抗体及其应用

<130> 501129

<150> USSN 60/350,961

<151> 2002-01-25

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile
 85 90 95

Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu
 100 105 110

Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala
 115 120 125

Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys
 130 135 140

Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala
 145 150 155 160

Trp Gly Leu Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val
 165 170 175

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
 180 185 190

Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg Leu Val
 195 200 205

Leu Gly Phe Leu Trp Pro Leu Leu Thr Leu Thr Ile Cys Tyr Thr Phe
 210 215 220

Ile Leu Leu Arg Thr Trp Ser Arg Arg Ala Thr Arg Ser Thr Lys Thr
 225 230 235 240

Leu Lys Val Val Val Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Phe Trp Leu
 245 250 255

Pro Tyr Gln Val Thr Gly Ile Met Met Ser Phe Leu Glu Pro Ser Ser
 260 265 270

Pro Thr Phe Leu Leu Leu Asn Lys Leu Asp Ser Leu Cys Val Ser Phe
 275 280 285

Ala Tyr Ile Asn Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Val Val Ala Gly

290	295	300
Gln Gly Phe Gln Gly Arg Leu Arg Lys Ser Leu Pro Ser Leu Leu Arg		
305	310	315 320
Asn Val Leu Thr Glu Glu Ser Val Val Arg Glu Ser Lys Ser Phe Thr		
	325	330 335
Arg Ser Thr Val Asp Thr Met Ala Gln Lys Thr Gln Ala Val		
	340	345 350

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

gatgttttga tgacccaaac tcc

23

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

acactcattc ctgttgaagc tcttg

25

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

saggtccagc tgcarcagtc

20

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

tgggcatgaa gaacctgg

18

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

gatgttttga tgacccaaac tcc

23

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

acactcattc ctgttgaagc tcttg

25

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

saggtccagc tgcarcagtc

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

tttgcatgga ggacaggg

18

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

gatgttttga tgacccaaac tcc

23

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

acactcattc ctgttgaagc tcttg

25

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

caggtgcagc tgaagsagtc

20

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13
tgggcatgaa gaacctgg 18

<210> 14

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14
gatgttgatga tgaccctaat tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaaacctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttata cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tatgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

Asp Gln Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile 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 Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

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

<210> 16

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

```
caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag gtggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt      60
tcttgcaagg cttctggcta cgcattcagt aggtcctgga tgaactgggt gaagcagagg      120
cctggaaagg gtcttgagtg gattggacgg attgatgctg gagatggaga tactaaatac      180
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct acttctgtgc aagccttctc      300
attactacgg tagtgggagc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc      360
tca                                                                    363
```

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg 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 Asp Ala Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18
gatgttgtaga tgaccaaatc tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaat tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttctc actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttggtccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggaa ctgaaa 336

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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> 20

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc 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> 21

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

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

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> 22

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

gatgttgatga tgaccctaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60

```

atctcttgta gatctagtca gagccttgta cacagtagtg gaaacaccta ttacattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cacatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tatttctgct ctcaaagtac acttgttcct      300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa                                336

```

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

```

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

```

```

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

```

```

Ser 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 His Phe Thr Leu Lys Ile
65              70              75              80

```

```

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

```

```

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

```

<210> 24

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

```

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctgggtggcgc cctcacagag cctgtccatc      60
acatgcactg tctctggggt ctcattaacc agctatggtg tagactgggt tcgccagtct      120
ccaggaaagg gtctgggagt gctggggagta atatgggggtg ttggaagcac aaattataat      180
tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacgca gccatgtact actgtgccag ccactatgggt      300
tacgacggtc tggggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgta      357

```

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

```

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

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

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

Gly Val Ile Trp Gly Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
          50          55          60

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

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

Ser His Tyr Gly Tyr Asp Gly Leu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

```

100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Val 115		
<210> 26		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 26		
Asn Ser Trp Asn Asn 1 5		
<210> 27		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 27		
Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys 1 5 10 15		
Gly		
<210> 28		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> Mus musculus		
<400> 28		
Phe Leu Leu Ile Ser Thr Val Thr Ala Val Asp Tyr 1 5 10		

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Arg Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Arg Ile Asp Ala Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Leu Leu Ile Thr Thr Val Val Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 32

Ser Tyr Gly Val Asp
1 5

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 33

Val Ile Trp Gly Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 34

His Tyr Gly Tyr Asp Gly Leu Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

C5aR特异性 mAb的典型反应性

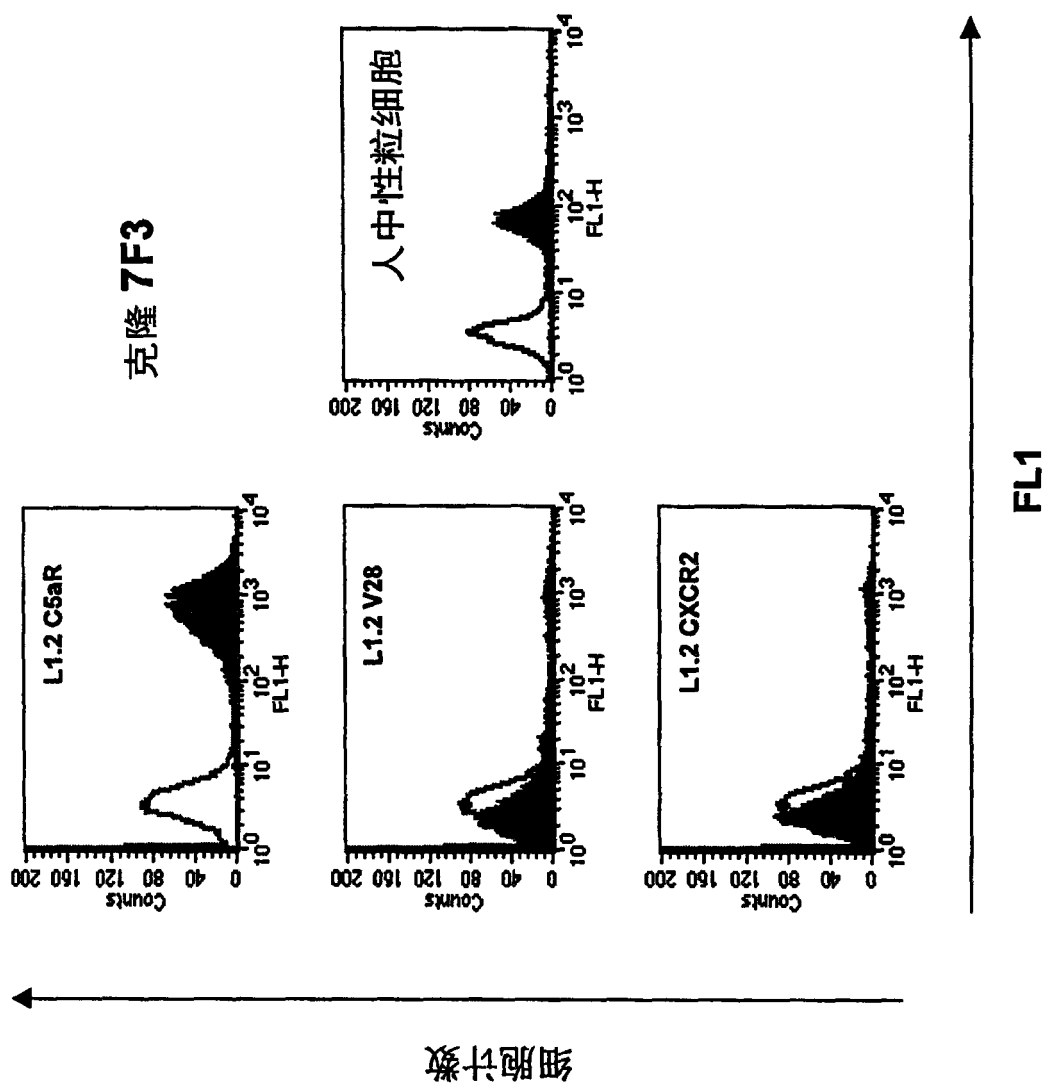


图1

C5aR的特定的mAb抑制配体结合

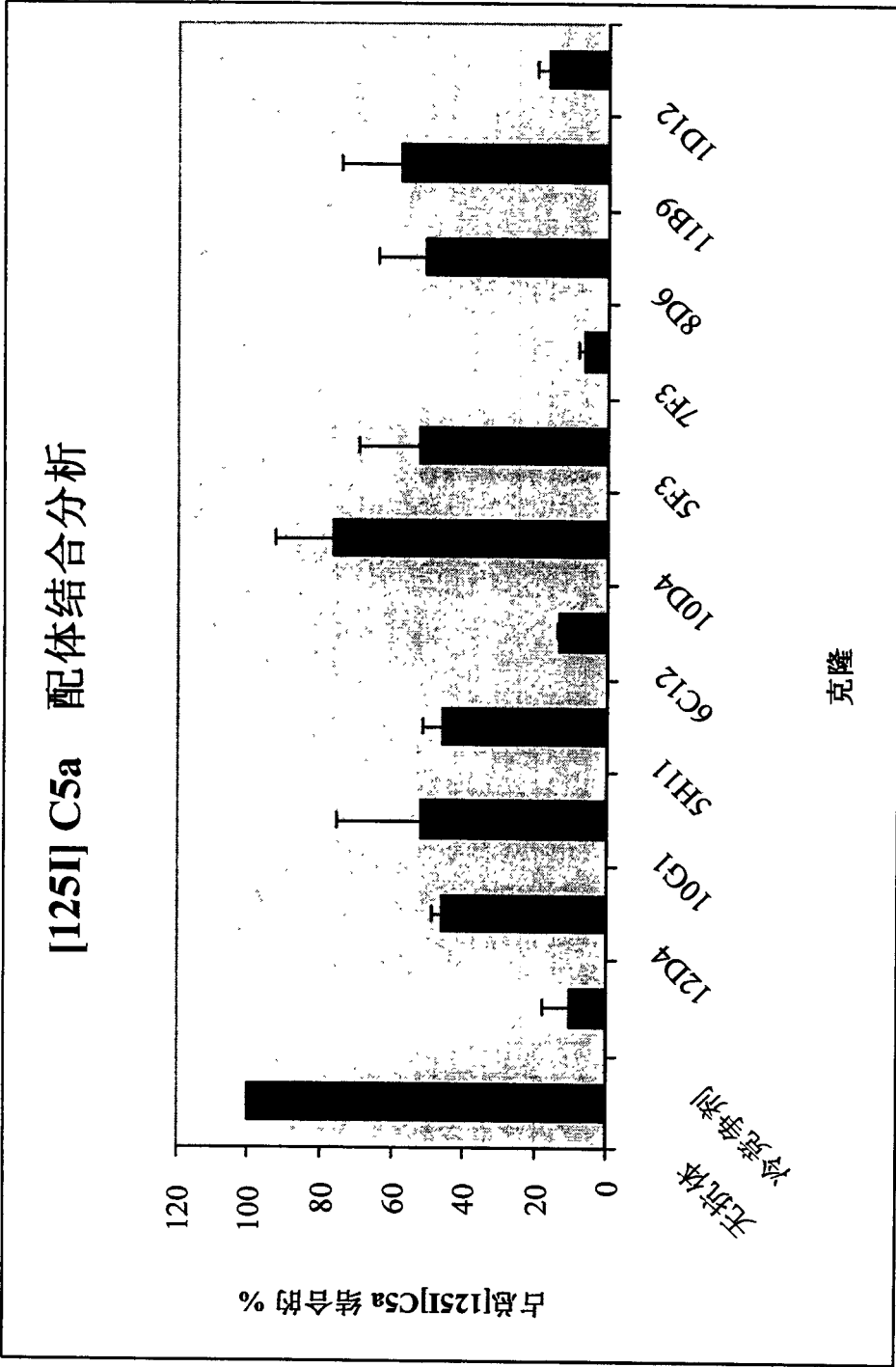


图2

MAb 7F3 对配体结合的抑制—剂量反应

抑制放射性标记的 C5a

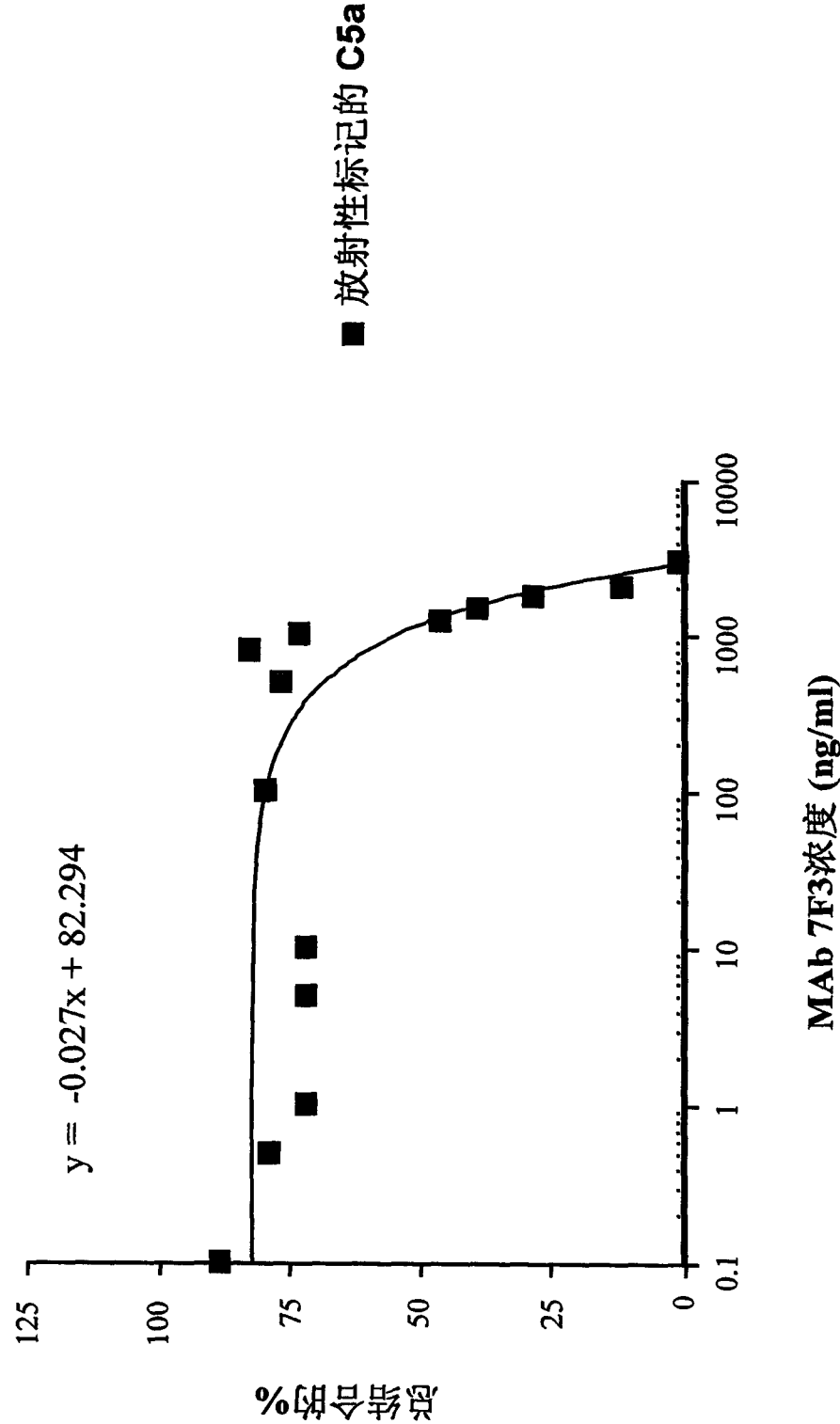


图3

选定的抗体完全抑制C5aR转染体的趋化性

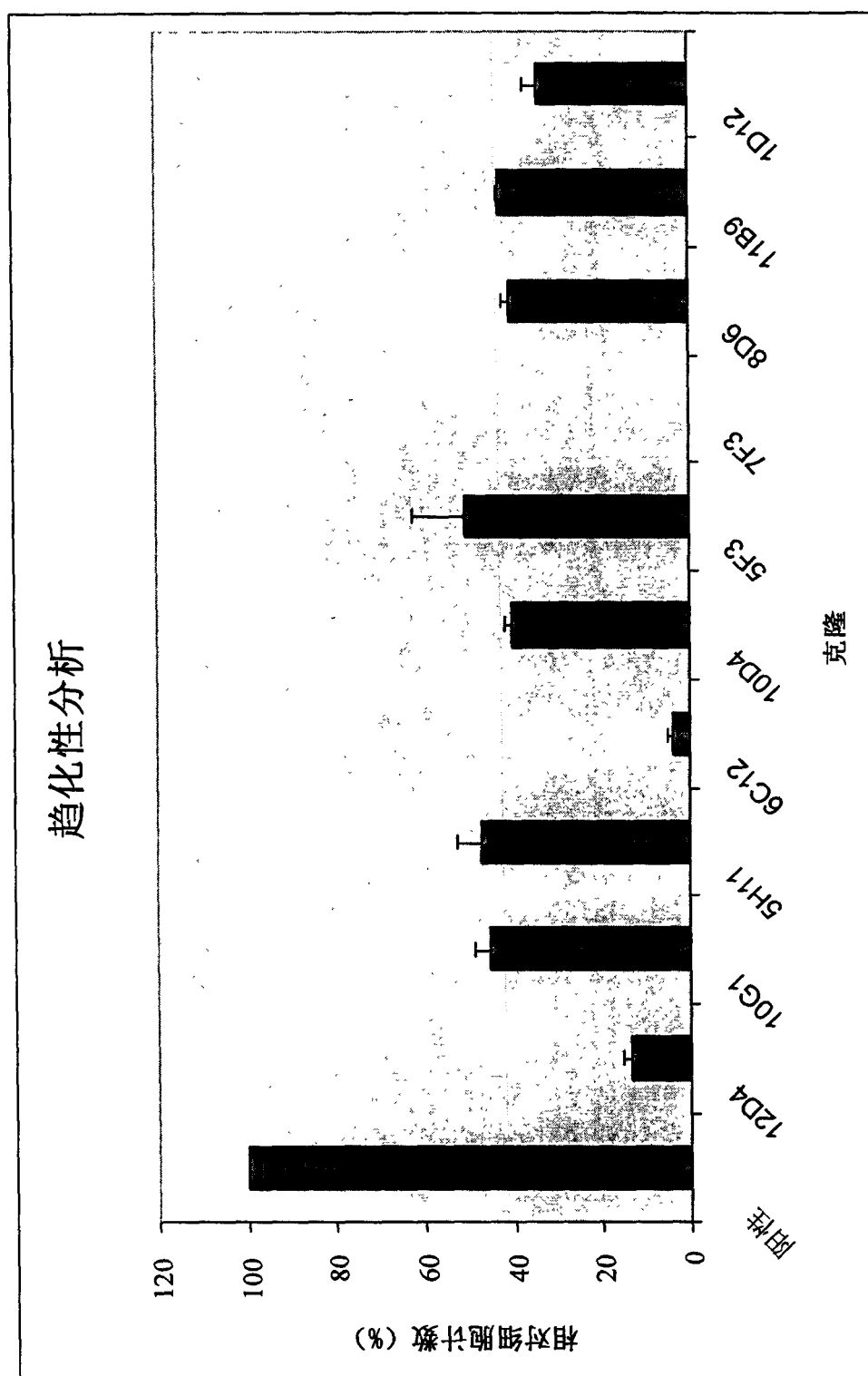


图4

完全抑制 L1.2 C5aR 转化体的趋化性

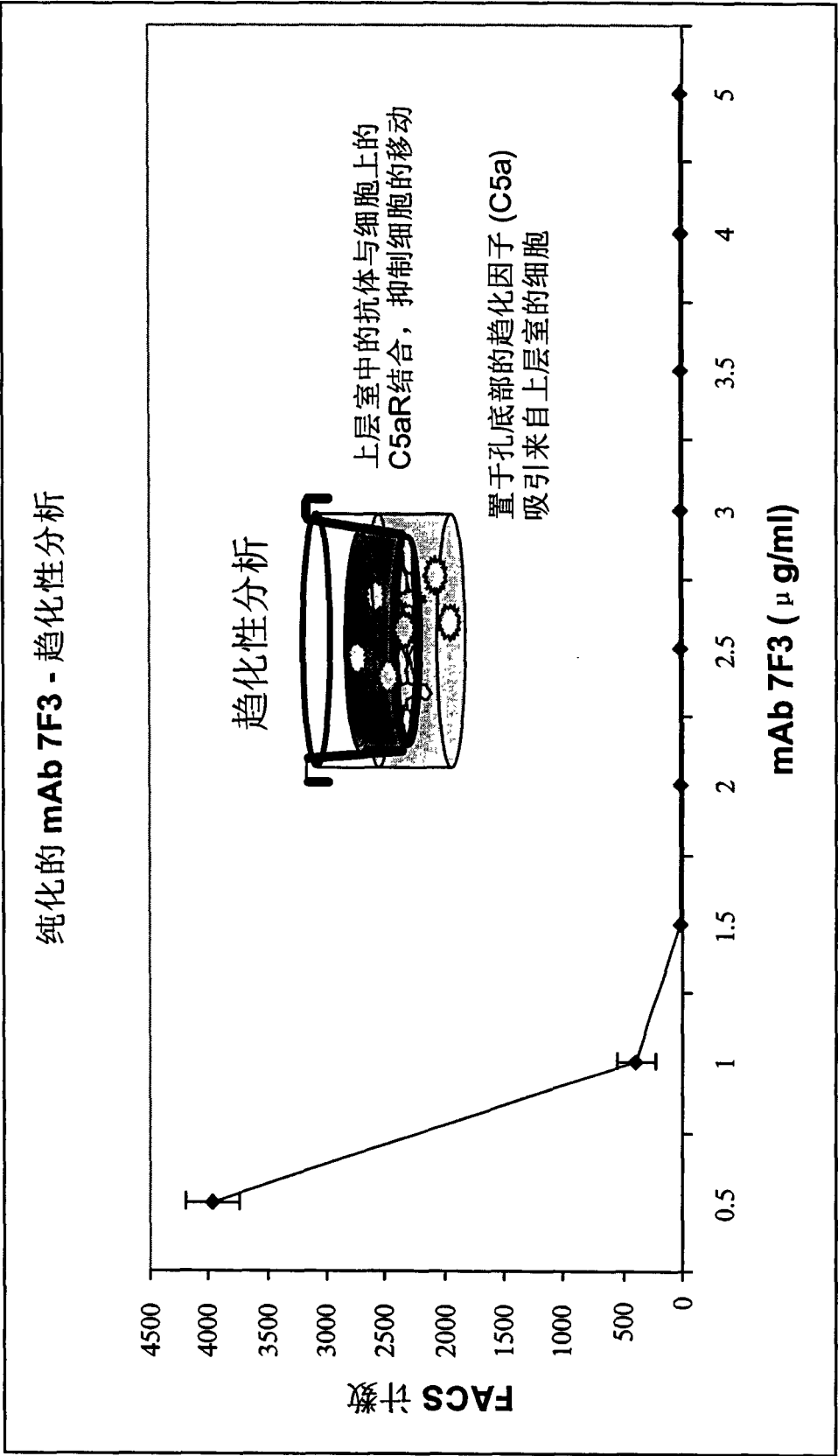


图5

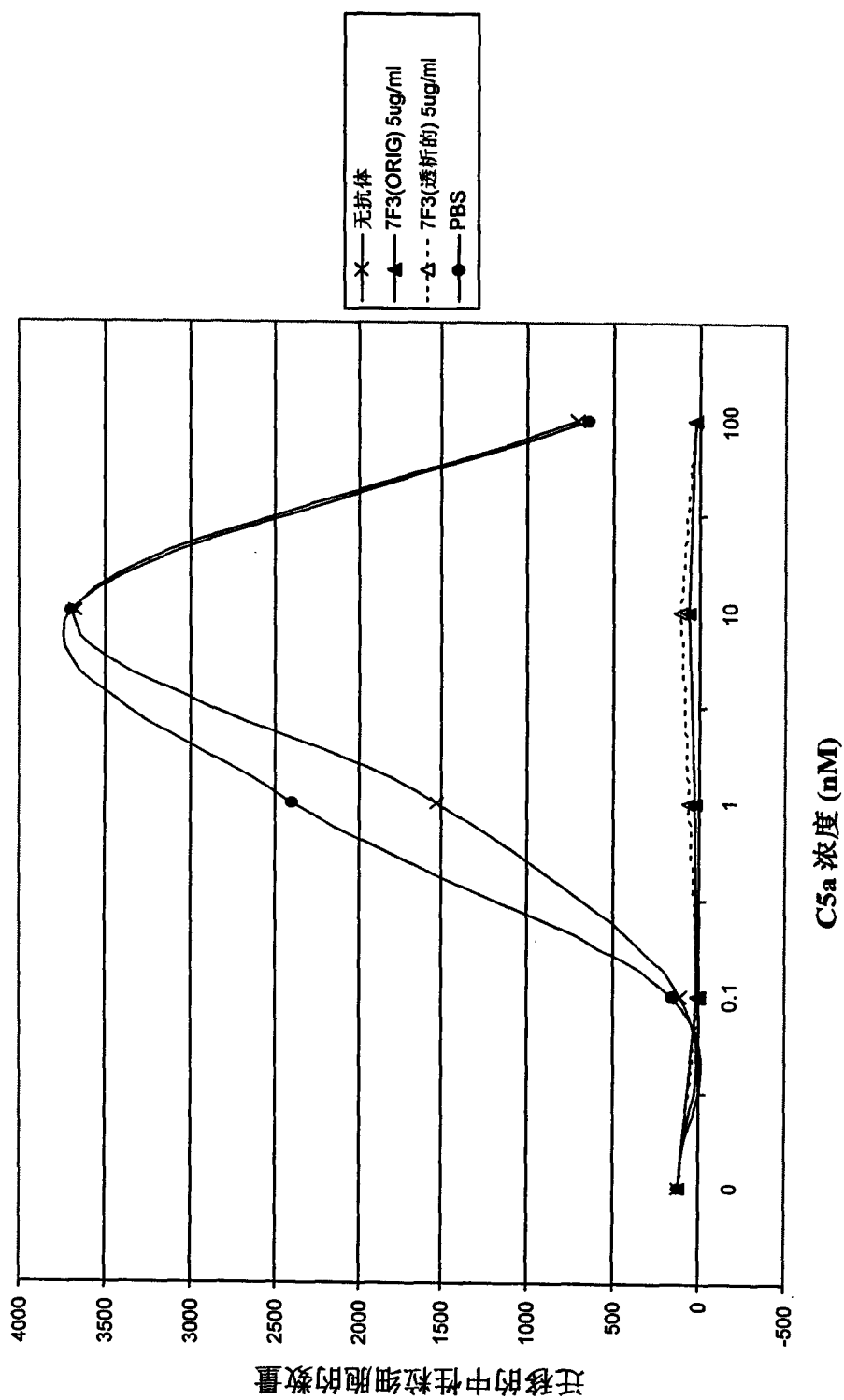


图 6

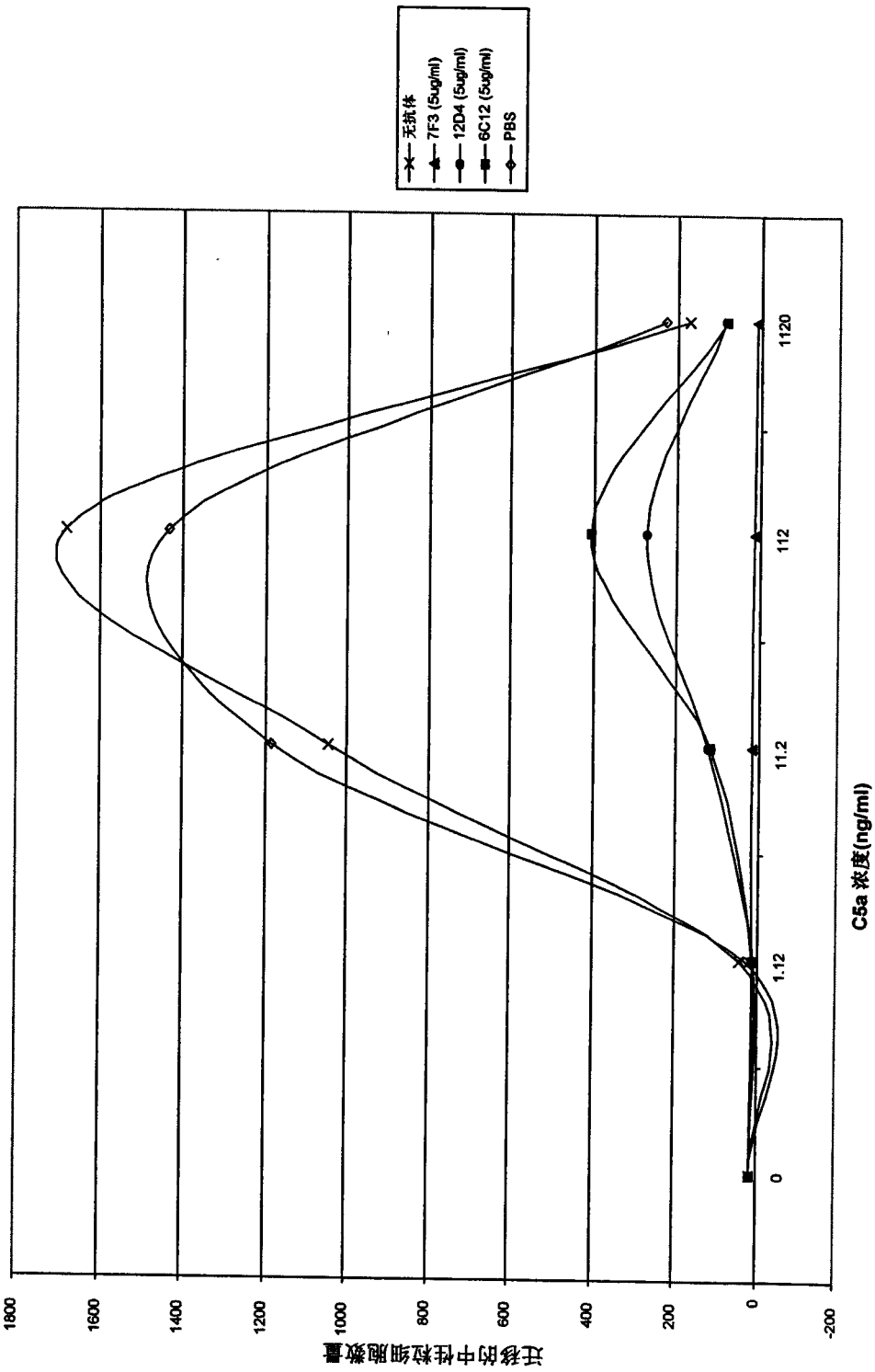


图 7

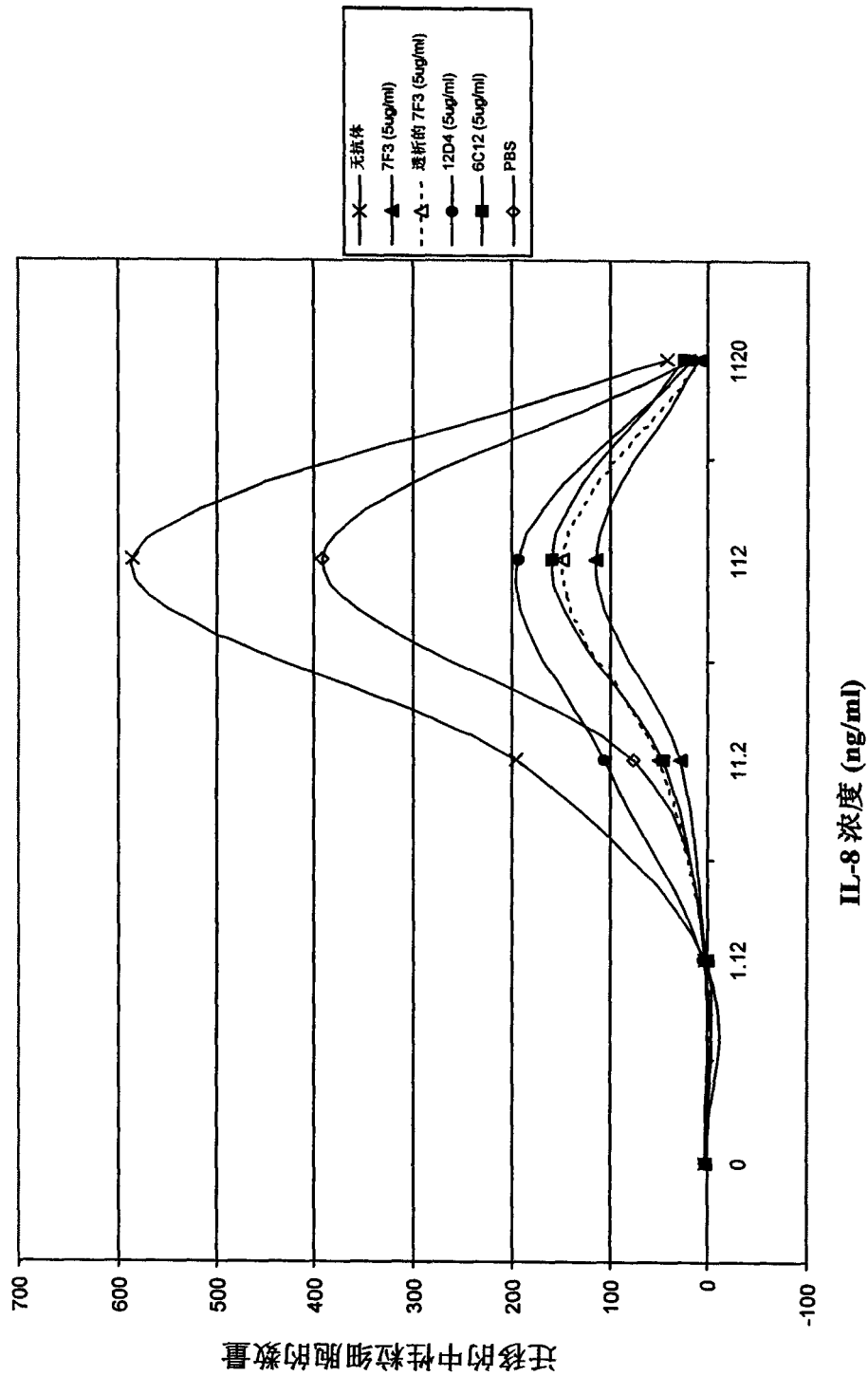


图 8

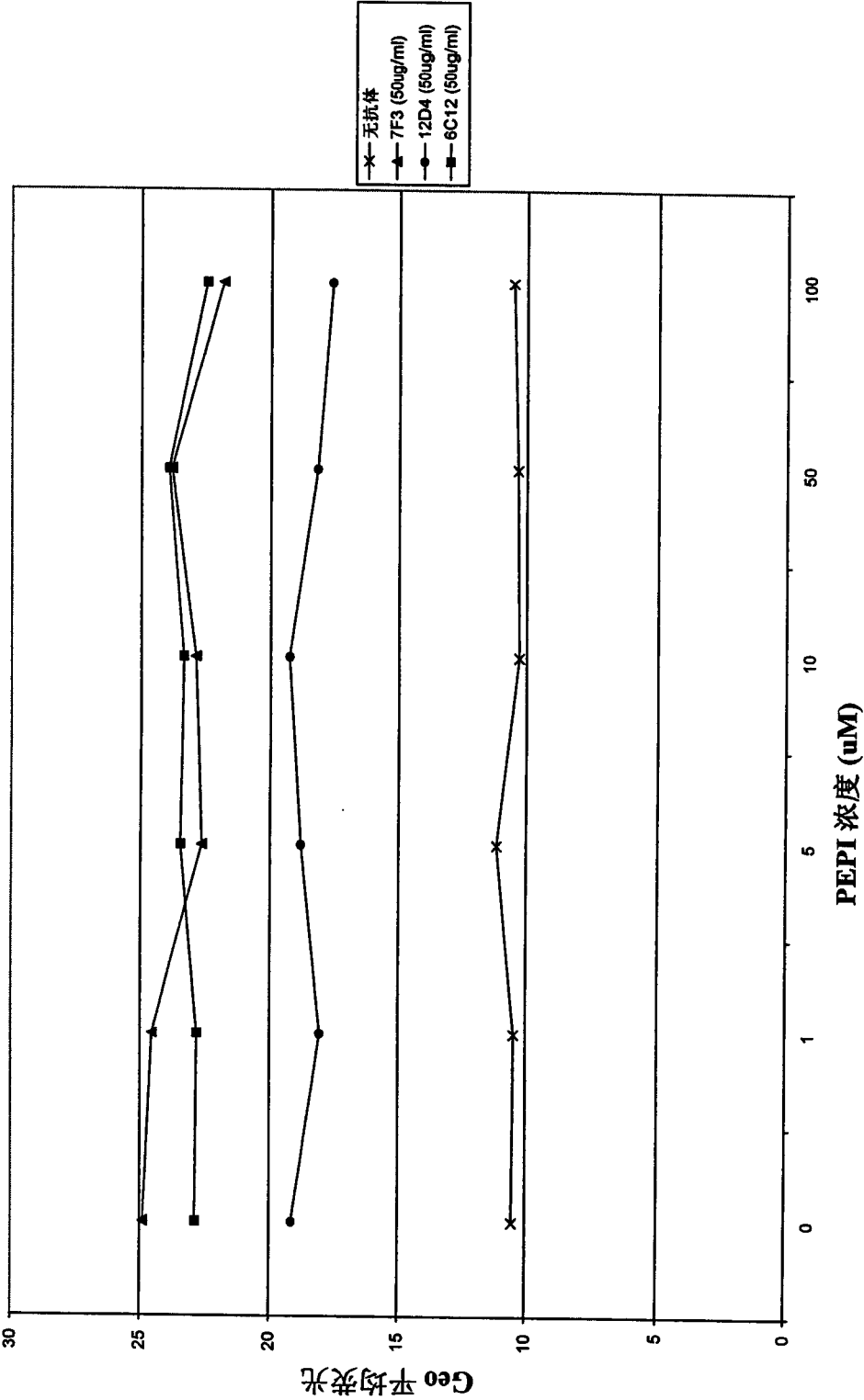


图 9a

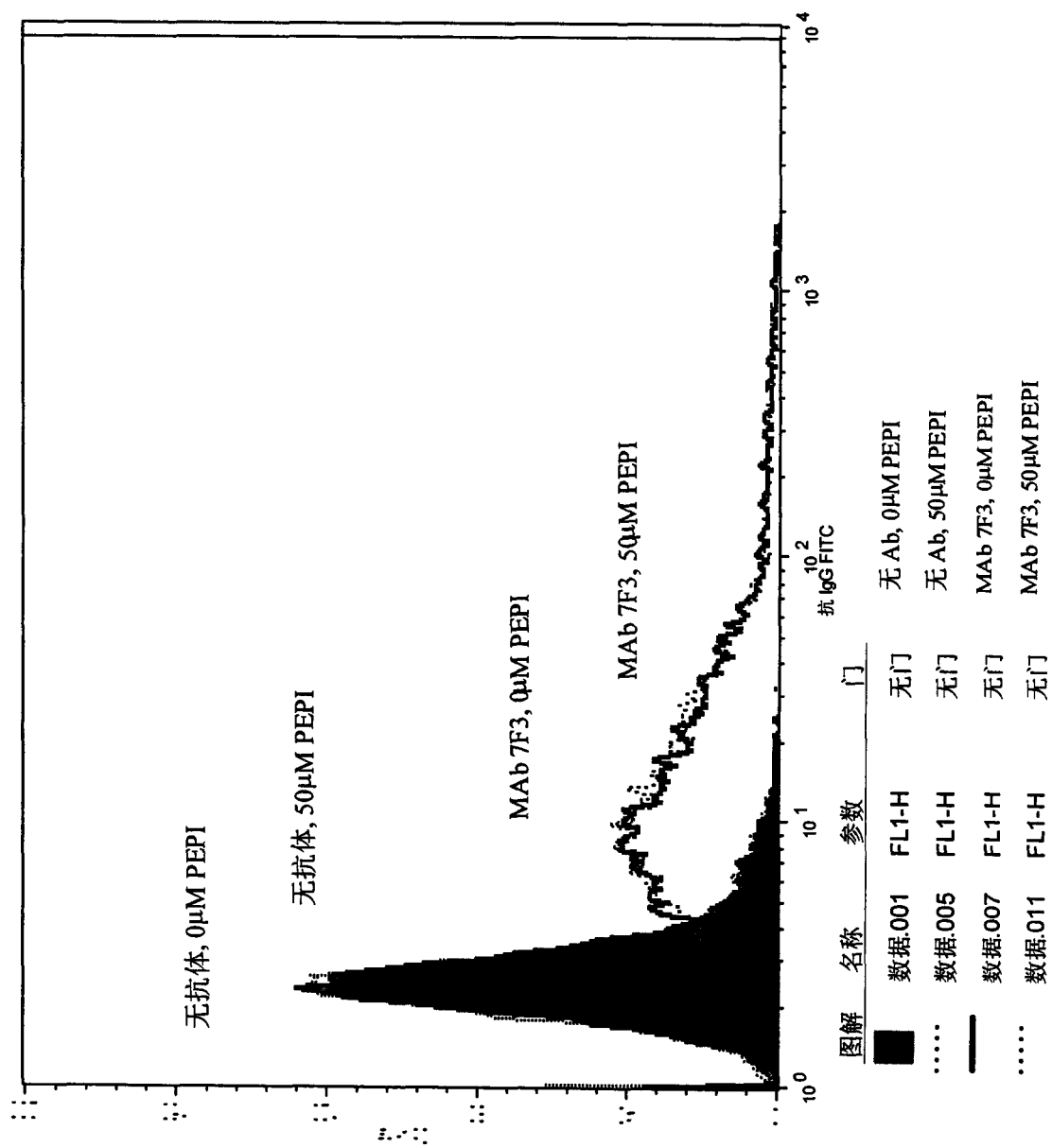


图 9b

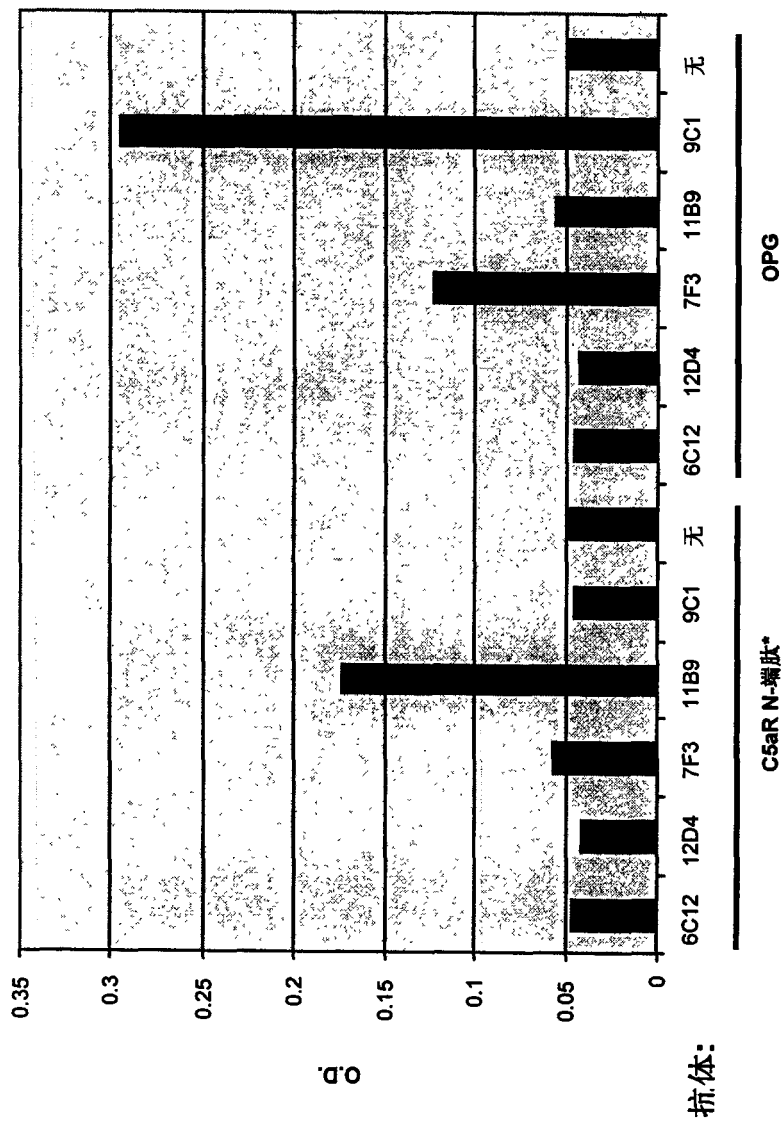


图 10

抗 C5aR MAb 可变区轻链 DNA 序列

	10	20	30	40	50
7F3 Vk	GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAAA				
6c12 Vk	GATGTTGTGATGACCCAAATTCCTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGA				
12d4 Vk	GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGA				

	60	70	80	90	100
7F3 Vk	TCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATG				
6c12 Vk	TCAAACCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTATACACAGTAATG				
12d4 Vk	TCAAGCCTCCATCTCTTGTAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAGTG				
	**** *****				
	110	120	130	140	150
7F3 Vk	GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG				
6c12 Vk	GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG				
12d4 Vk	GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG				

	160	170	180	190	200
7F3 Vk	CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT				
6c12 Vk	CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT				
12d4 Vk	CTCCTGATCTACAAAGTCTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT				

	210	220	230	240	250
7F3 Vk	CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG				
6c12 Vk	CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG				
12d4 Vk	CAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG				

	260	270	280	290	300
7F3 Vk	AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACTTGTTCCG				
6c12 Vk	AGGCTGAGGATATGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTT				
12d4 Vk	AGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACTTGTTCTT				

	310	320	330		
7F3 Vk	CTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA				
6c12 Vk	CCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA				
12d4 Vk	CCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA				
	* *****				

图 11

抗 C5aR MAb 可变区重链 DNA 序列

	10	20	30	40	50
7F3 Vh	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTC				
6c12 Vh	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGGGCCTC				
12d4 Vh	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAG				
	*****	*****	**	*****	*****
	60	70	80	90	100
7F3 Vh	AGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACGCATTTCAGTAACTCCTGGA				
6c12 Vh	AGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACGCATTTCAGTAGGTCCCTGGA				
12d4 Vh	CCTGTCCATCACATGCAGTGTCTCTGGGTTCTCATTAAACCAGCTATGGTG				
	**	**	*	*****	*
	110	120	130	140	150
7F3 Vh	TGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGAAAGGGTCTTGAGTGGATTGGACGG				
6c12 Vh	TGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGAAAGGGTCTTGAGTGGATTGGACGG				
12d4 Vh	TAGACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTA				
	*	*****	***	**	*****
	160	170	180	190	200
7F3 Vh	ATTTATCCTGGAGATGGAGATACTAAGTACAATGGGAAGTTCAAGGGCAA				
6c12 Vh	ATTGATGCTGGAGATGGAGATACTAAATACAATGGGAAGTTCAAGGGCAA				
12d4 Vh	ATATG---GGGTGTTGGAAGCACAAATTATAATTTCAGCTCTCAAATCCAG				
	**	**	*	*****	**
	210	220	230	240	250
7F3 Vh	GGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCA				
6c12 Vh	GGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCA				
12d4 Vh	ACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGA				
	*	*	*	*****	*
	260	270	280	290	300
7F3 Vh	GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATTCTTA				
6c12 Vh	GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTACTTCTGTGCAAGCCTTCTTC				
12d4 Vh	ACAGTCTGCAAACTGATGACGCAGCCATGTACTACTGTGCCAGCCACT--				
	***	***	*	*****	**
	310	320	330	340	350
7F3 Vh	CTTATTAGTACGGTAACAGCCGTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCT				
6c12 Vh	ATTACTACGGTAGTGGGAGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT				
12d4 Vh	ATGGTTACGACGGTCTGGGGT-TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT				
	*	**	**	*	*
	360				
7F3 Vh	CACAGTCTCCTCA				
6c12 Vh	CACCGTCTCCTCA				
12d4 Vh	CACTGTCTCTGTA				
	***	*****	*		

图 12

抗 C5aR MAb 可变区轻链蛋白序列

		FR1		CDR1	FR2	
		10	20	30	40	50
7F3 Vk		DVVM	TQSP	SLPVS	LG	NQASISC
6c12 Vk		DVVM	TQIP	SLPVS	LG	DQTSISC
12d4 Vk		DVVM	TQTP	SLPVS	LG	DQASISC
		*****	*****	*****	*****	*****
		CDR2		FR3		CDR3
		60		70	80	90
7F3 Vk	LLIY	KVSN	RFS	GVPDR	FSGSG	SGTDFSLKISRVEAEDLG
6c12 Vk	LLIY	KVSN	RFS	GVPDR	FSGSG	SGTDFTLKISRVEAEDMG
12d4 Vk	LLIY	KVSN	RFS	GVPDR	FSGSG	SGTDFTLKISRVEAEDLG
		****	*****	*****	*****	*****
		FR4				
		110				
7F3 Vk	LT	FGAG	TKLELK			
6c12 Vk	PT	FGGG	TKLEIK			
12d4 Vk	PT	FGGG	TKLEIK			
		*	***	*****	*	

图 13

抗 C5aR MAb 可变区重链蛋白序列

	FR1			CDR1	FR2	
	10	20	30		40	50
7F3 Vh	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFS		NSWMN	WVKQRP	GKGLEWIG	R
6c12 Vh	QVQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYAFS		RSWMN	WVKQRP	GKGLEWIG	R
12d4 Vh	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLT		SYGVD	WVRQSP	GKGLEWLG	V
	****.*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*		.		***.*****.*	
	CDR2		FR3			
	60	70	80	90	100	
7F3 Vh	IYPGDGDTKYNGKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS	SAVYFCAR		FL	
6c12 Vh	IDAGDGDTKYNGKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS	SAVYFCAS		LL	
12d4 Vh	IW-GVGSTNYNSALKS	RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDA	AMYCAS		HY	
	* * * * *	 *	* * * *	* * *		
	CDR3	FR4				
	110	120				
7F3 Vh	LISTVTAVDY	WGQGTTLTVSS				
6c12 Vh	ITTVVGAMDY	WGQGTSTVTSS				
12d4 Vh	GYDGLG-FAY	WGQGTTLTVSV				
	.	* ***** .***				

图 14

专利名称(译)	抗C5aR抗体及其应用		
公开(公告)号	CN1642983A	公开(公告)日	2005-07-20
申请号	CN03806948.2	申请日	2003-01-24
[标]发明人	查尔斯雷伊麦凯		
发明人	查尔斯·雷伊·麦凯		
IPC分类号	G01N33/48 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/104 A61K39/395 A61K48/00 A61K49/00 A61K49/04 A61K51/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/28 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2896 A61K2039/505 C07K2317/56 A61P1/04 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P35/00 C07K2317/34		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/350961 2002-01-25 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及与C5aR结合并可用于诊断和治疗方法中的抗体。本发明的抗体与C5aR的N - 末端结构域以外的细胞外环具有反应性并能够基本上减少或抑制C5a与C5aR的结合以及中性粒细胞化学引诱物受体激活的功能性结果。

C5aR特异性 mAb的典型反应性

