



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101387646 B

(45)授权公告日 2016.08.10

(21)申请号 200810091622.4

(22)申请日 2002.08.17

(30)优先权数据

60/313,137 2001.08.17 US

(62)分案原申请数据

02816102.5 2002.08.17

(83)生物保藏信息

PTA-3650 2001.08.17

(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

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶 郑霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

(56)对比文件

US 6074642 A,2000.06.13,

EP 0245993 A,1987.11.19,

kroshus TJ.Complement inhibition with an anti-c5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation.《Transplantation》.1995,1194-1202.

审查员 黄蕊

权利要求书1页 说明书17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. 抗体或其抗原结合片段在制备用于体外检测C5和C5a存在或用于体外定量C5和C5a的组合物中的用途,其中所述的抗体或其抗原结合片段结合到与保藏在ATCC且编号为PTA-3650的杂交瘤生成的单克隆抗体137-26相同的C5和C5a的表位,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。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中在体外存在C5和C5a两者。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中在体外仅存在C5或C5a。

4. 根据权利要求1、2或3所述的用途,其中该抗体或其抗原结合片段以与C5相同或更好的亲和性结合至游离的C5a。

5. 根据权利要求1、2或3所述的用途,其中该抗原结合片段是选自由Fab、F(ab')₂、Fv和单链Fv所组成的组。

6. 根据权利要求1、2或3所述的用途,其中该抗体是单克隆的、嵌合的、去免疫的、人化的或人抗体。

7. 根据权利要求1、2或3所述的用途,其中该抗体是从由ATCC保藏并被命名为PTA-3650的杂交瘤中产生的单克隆抗体137-26。

8. 根据权利要求1、2或3所述的用途,其中该C5a是重组C5a。

结合至C5和C5A但不阻止C5B形成的补体途径抑制剂

[0001] 本申请是申请号为02816102.5,申请日为2002年8月17日,发明名称为“结合至C5和C5A但不阻止C5B形成的补体途径抑制剂”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请案的交互参考

[0003] 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

[0004] 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C5b-9膜攻击复合物(MAC)的形成。

背景技术

[0005] 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及生命的后果。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。

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] 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(190kD,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115kD和75kD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 and 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))。

[0009] 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。

[0010] 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,11.2kD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);Haeflner-Cavallion,N.等人着,J.Immunol.138:794-700(1987);Cavallion,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))。

[0011] 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 desArg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,Mol.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,Inflammation 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 、1L-6以及1L-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)。

[0012] 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); Haylland, 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, *Mo/. 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))。

[0013] 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))。

[0014] 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)TNF α 和1L-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1L-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已经显示出显着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))。

[0015] 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))。

[0016] 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。

[0017] 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 1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。

[0018] 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 desArg, 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。

[0019] 含免疫球蛋白G的免疫复合物(1C)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1C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1C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1C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1C疾病的发病机理中起重要作用。C5a和C5aR的抑制剂可有利于治疗这些疾病。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 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))。

[0024] 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

[0025] 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MAb 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。

[0026] 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DeimmunizedTM₁、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。

[0027] 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

[0028] 图1显示了在ELISA中,MAb 137-26(抗C5a,实心方块)及MAb 137-76(抗C5β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MAb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。

[0029] 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。Y轴代表被表达成在450nm的光密度(OD)的MAb与C5a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C5a反应,而不相关的抗体未与人C5a反应。

[0030] 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C2MAb 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。

[0031] 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。

[0032] 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。

[0033] 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。

[0034] 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/C5aMAb137-26(实心圆)比抗C5a MAb561(Dr. Jurg Kohl, 实心方块)和抗C5MAb137-30(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($\mu\text{g}/\text{ml}$)。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。

[0035] 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嗜中性细胞上的CD11b表达。抗C5/C5aMAb137-26(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($\mu\text{g}/\text{ml}$)。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。

[0036] 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嗜中性细胞的氧化爆发(oxidative burst)。抗C5/C5aMAb137-26(实心圆)和抗C5MAb137-30(实心三角)两者都比抗C5aMAb561(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($\mu\text{g}/\text{ml}$)。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。

[0037] 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/C5aMAb137-26(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。

[0038] 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 MAb137-30(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℃下24小时培养的每100 μl 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

[0039] 1. 本发明的优势

[0040] 本发明的抑制剂(包括单克隆抗体MAb137-26)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(signaltransduction 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MAb137-26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。

[0041] 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。

[0042] 2. 制造并使用本发明

[0043] A. 单克隆抗体

[0044] 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。

[0045] 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熔合,以形成杂交瘤细胞(Goding 着, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press,

1986))。

[0046] 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。

[0047] 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)。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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、或血清中分离出来,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)。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 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。

[0055] 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。)

[0056] B.人化及人抗体

[0057] 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该序列所取代。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。

[0058] 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))。

[0059] 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。

[0060] 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))。

[0061] C. Delimmunised™ 抗体

[0062] Delimmunised™ 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。

[0063] 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(polyoxyethylenated 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。

[0064] D. 抗C5/C5a MAbs的生成

[0065] 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,并进行皮下或腹腔内注射10-100μg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。

[0066] 为每次融合,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骨髓瘤细胞融合。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)的介质中融合。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,40μM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致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。

[0067] 用0.1μg/ml(50μl/孔)的人体C5来隔夜涂铺Immulon11(Dynatech Laboratories, Chantilly, VA)微量培养板的孔。然后,通过以200μl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50μl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)在室温下反应一小时,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50μl的2M H₂SO₄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)。

[0068] 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学结合常数,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¹²⁵I-C5a与纯化的人体嗜中性粒细胞结合。

[0069] 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。当亲和力(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。

[0070] 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。

[0071] 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等人所着的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。

[0072] E. 制造本发明的其它抑制剂

[0073] 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分离或筛选出来,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。

[0074] F. 使用本发明的抑制剂

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 实例1:MAb137-26与人C5和C5a的反应性

[0079] 测试MAb137-26与纯化的人体C5和重组C5a的反应性(Sigma, StLouis, 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C5MAb137-76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,MAbs137-26和137-76都会与C5结合(图2)。

[0080] 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常数(缔合或离解)。所有的结合测量都在25℃下在HEPES缓冲盐水(HBS)(10mM的HEPES, pH 7.4, 150mM的NaCl, 3.4mM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的较高结合亲和力。结果还表明了MAb137-29与C5a和C5所共享的表位相结合。

[0081] 表1结合至MAb137-26的C5和C5a的动力常数

[0082]

	$k_{on}(M^{-1} s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
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^{-11}

[0083] K_{on} , 动力缔合常数

[0084] k_{off} , 动力离解常数

[0085] K_D , 平衡离解常数 = k_{off}/K_{on}

[0086] 实例2补体介导的溶血

[0087] 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。

[0088] 为经典途径实验,在4℃利用8μg/ml的纯化的兔抗鸡RBC(Inter-Cell Technologies,Hopewell,NJ)免疫球蛋白,来激活在含有0.5mM的MgCl₂和0.15mM的CaCl₂的凝胶体/佛罗那缓冲盐水(GVB⁺⁺)中的鸡RBC(5×10⁷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1.7×10⁸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50μl的正常人血清(5.2%)与连续稀释的MAb137-26或抗C2MAb175-62的50μl的GVB⁺⁺混合,作为阳性控制。然后,将30μl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80μl的GVB⁺⁺混合,以提供血清色彩背景(serum colorbackground)。将一种同种型匹配抗H1V-1gp120MAb用作阴性控制。所使用的最终人血清浓度为2%。在37℃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300xg下对板进行离心作用3分钟。收集上层液(80μl)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:

[0089] $100 \times [(OD_{\text{无MAb}} - OD_{\text{血清色彩背景}}) - (OD_{\text{有MAb}} - OD_{\text{血清色彩背景}})] / (OD_{\text{无MAb}} - OD_{\text{血清色彩背景}})$ 。

[0090] 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。

[0091] 为此替代途径,未激活的兔RBC被用含有2nM的MgCl₂和1.6mM的EGTA凝胶体/佛罗那缓冲盐水(GVB/Mg-EGTA)冲洗三次。10mM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DMAb166-32用作阳性控制。将上述的相同的同种型匹配不相关的抗H1V-1gp120MAb用作阴性控制。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 实例3:通过MAb 137-26抑制¹²⁵I-C5a结合至纯化的人体嗜中性细胞

[0095] 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20ml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¹²⁵I-C5a结合。

[0096] 用结合缓冲液(1%BSA于RPM11640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4nM¹²⁵I-C5a(NEN Life Science Products,Inc.,Boston,MA)添加到36μl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 μl 的分离缓冲液(6% BSA于PBS中)中。然后, 在室温下以2000xg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。

[0097] ^{125}I -C5a结合的百分比抑制定义如下:

[0098]
$$[\text{Cpm}_{\text{max}} - \text{Cpm}_{\text{bkg}}] - [\text{Cpm}_{\text{ca}} - \text{Cpm}_{\text{bkg}}] / [\text{Cpm}_{\text{max}} - \text{Cpm}_{\text{bkg}}] \times 100$$

[0099] 其中:

[0100] Cpm_{max} = 无竞争剂时每分钟的最大计数;

[0101] Cpm_{bkg} = 未添加 ^{125}I -C5a时的背景cpm; 以及

[0102] Cpm_{ca} = 有竞争剂时的cpm。

[0103] 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(1D50)的MAb137-26的剂量是0.45nM, 与之相比的是30nM的C5a。

[0104] 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

[0105] 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(10mM的三氯化物(Trischloride), 250mM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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的MAb 136-26阻断溶液1个小时。然后用冲洗缓冲液TBST(10mM的三氯化物, 250mM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, WestGrove, PA)对膜进行处理。然后, 再次冲洗此膜。通过利用SupersignalWest Pico化学发光底物(chemilluminent 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。

[0106] 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

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 在含有重组水蛭素(50ug/ml)的聚丙烯试管中收集全血。在37℃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℃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,100μl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。

[0110] 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C5aMAB561(Dr. Jurg Kohl)和肽C5aR对抗剂(Dr. Stephen Taylor)更加有效。

[0111] 在杀菌试验中,奈瑟氏脑膜炎菌H44/76-1隔夜生长于BH1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100μl的全血播种在含有血琼脂的微生物培养皿(Petri dish)上并在37℃培养24小时。细菌生长被表达成所添加的CFU/100μl的全血。在添加细菌之后立即获得T-0样本。

[0112] 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。

[0113] 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。

[0114] 序列表

[0115] <110>建南德克公司

[0116] <120>结合至C5和C5A但不阻止C5B形成的补体途径抑制剂

[0117] <130>TNX01-06

[0118] <140>PCT/US02/26074

[0119] <141>2002-08-17

[0120] <150>US60313137

[0121] <151>2001-08-17

[0122] <160>7

[0123] <170>Patentln version 3.2

[0124] <210>1

[0125] <211>74

[0126] <212>PRT

[0127] <213>类人

[0128] <220>

[0129] <221>肽

[0130] <222>(1)..(74)

[0131] <223>人类C5a
 [0132] <400>1
 [0133] Thr Leu Gln Lys Lys Ile Glu Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Lys His Ser
 [0134] 1 5 10 15
 [0135] Val Val Lys Lys Cys Cys Tyr Asp Gly Ala Cys Val Ash Asn Asp Glu
 [0136] 20 25 30
 [0137] Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile
 [0138] 35 40 45
 [0139] Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys Val Val Ala Ser Gln Leu Arg Ala Ash
 [0140] 50 55 60
 [0141] Ile Ser His Lys Asp Met Gln Leu Gly Arg
 [0142] 65 70
 [0143] <210>2
 [0144] <211>12
 [0145] <212>PRT
 [0146] <213>类人
 [0147] <220>
 [0148] <221>肽
 [0149] <222>(1)..(12)
 [0150] <223>人类C5a片段从aa 29至aa 40
 [0151] <400>2
 [0152] Asn Asn Asp Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg
 [0153] 1 5 10
 [0154] <210>3
 [0155] <211>12
 [0156] <212>PRT
 [0157] <213>类人
 [0158] <220>
 [0159] <221>肽
 [0160] <222>(1)..(12)
 [0161] <223>人类C5a片段从aa 32至aa 43
 [0162] <400>3
 [0163] Glu Thr Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu
 [0164] 1 5 10
 [0165] <210>4
 [0166] <211>12
 [0167] <212>PRT
 [0168] <213>类人
 [0169] <220>

[0170] <221>肽
[0171] <222>(1)..(12)
[0172] <223>人类C5a片段从aa 35至aa 46
[0173] <400>4
[0174] Glu Gln Arg Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg
[0175] 1 5 10
[0176] <210>5
[0177] <211>12
[0178] <212>PRT
[0179] <213>类人
[0180] <220>
[0181] <221>肽
[0182] <222>(1)..(12)
[0183] <223>人类C5a片段从aa 38至49
[0184] <400>5
[0185] Ala Ala Arg Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile Lys
[0186] 1 5 10
[0187] <210>6
[0188] <211>12
[0189] <212>PRT
[0190] <213>类人
[0191] <220>
[0192] <221>肽
[0193] <222>(1)..(12)
[0194] <223>人类C5a片段从aa 41至aa 52
[0195] <400>6
[0196] Ile Ser Leu Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr
[0197] 1 5 10
[0198] <210>7
[0199] <211>12
[0200] <212>PRT
[0201] <213>类人
[0202] <220>
[0203] <221>肽
[0204] <222>(1)..(12)
[0205] <223>人类C5a片段从aa 44至aa 55
[0206] <400>7
[0207] Gly Pro Arg Cys Ile Lys Ala Phe Thr Glu Cys Cys
[0208] 1 5 10

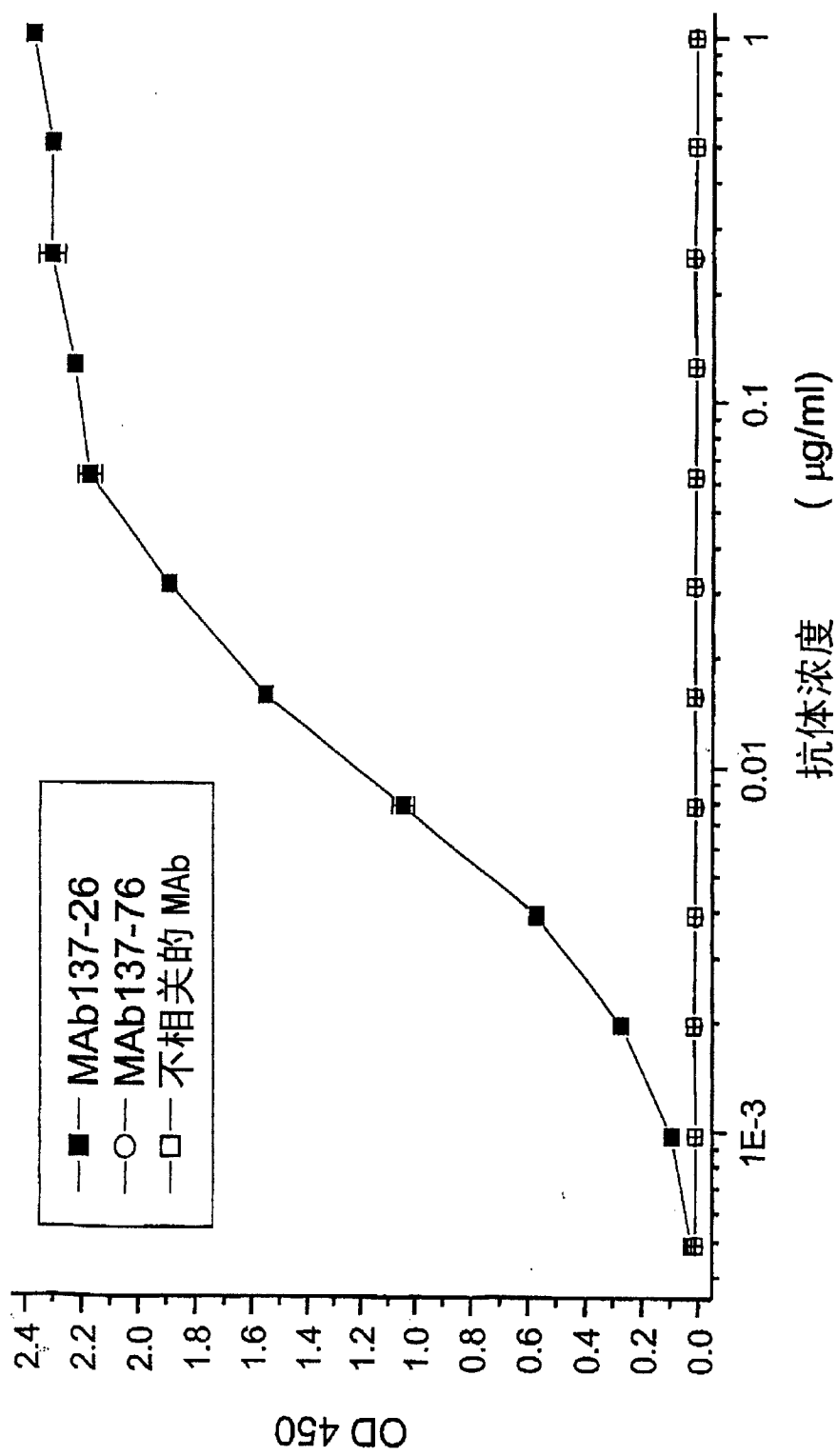


图 1

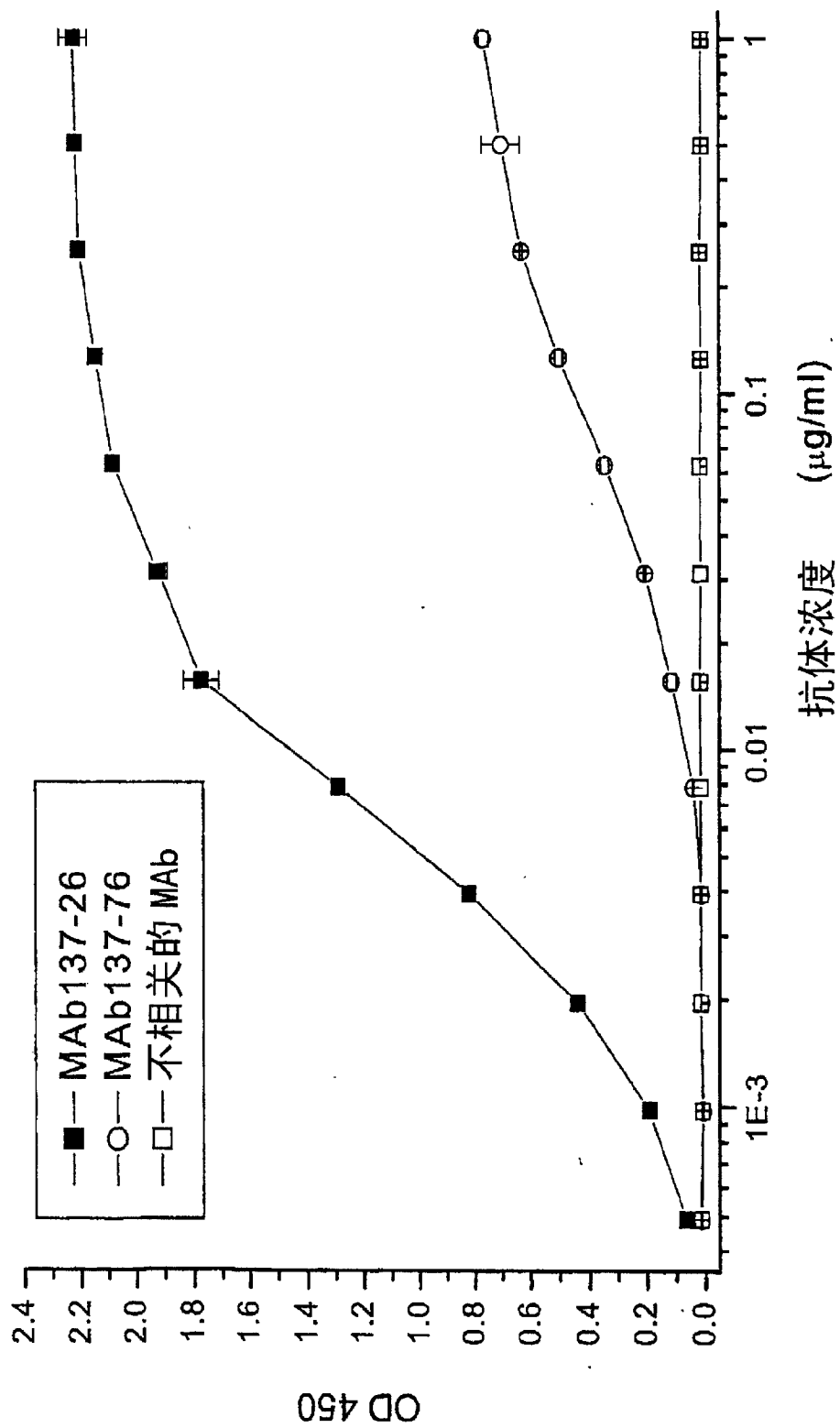


图 2

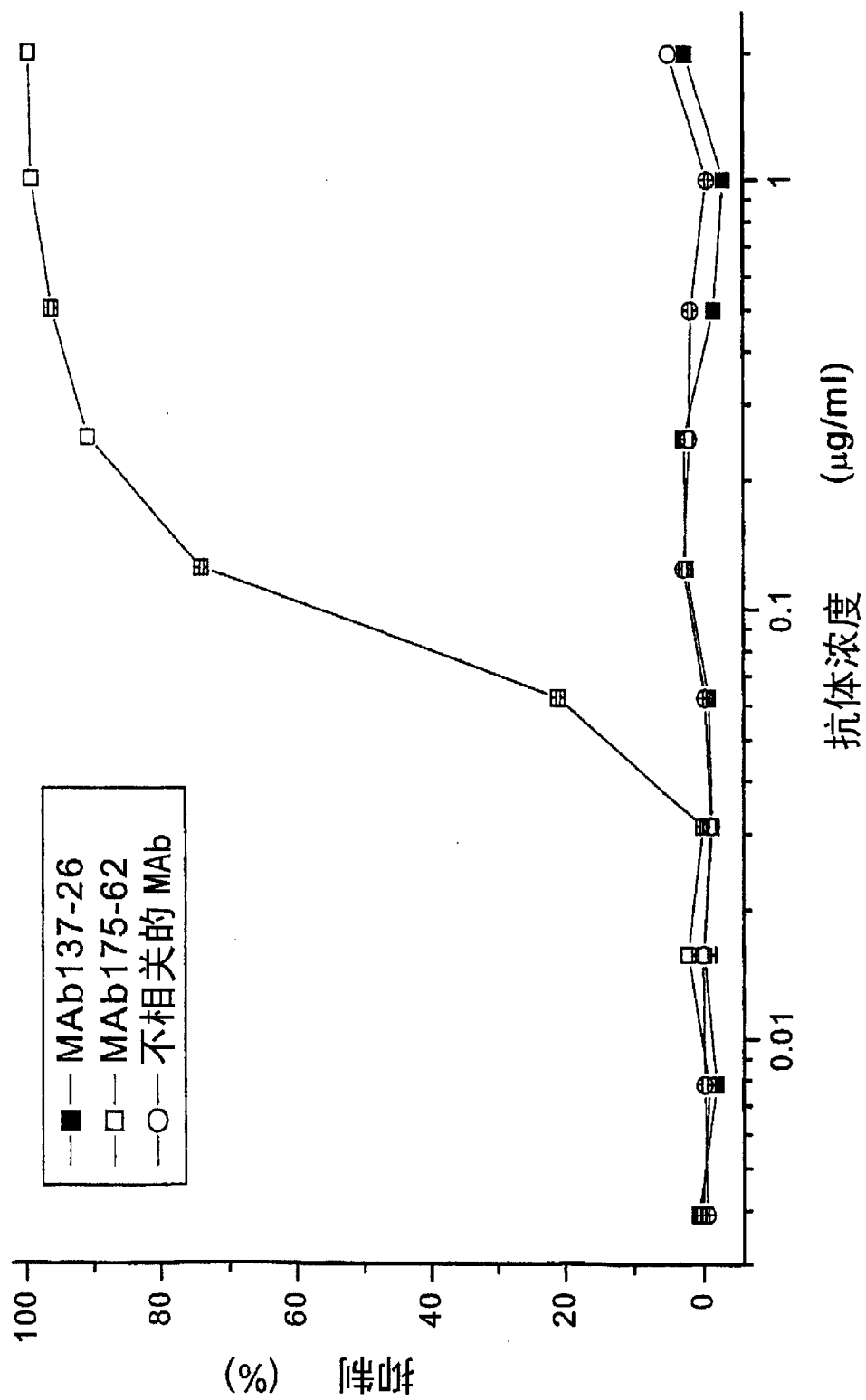


图 3

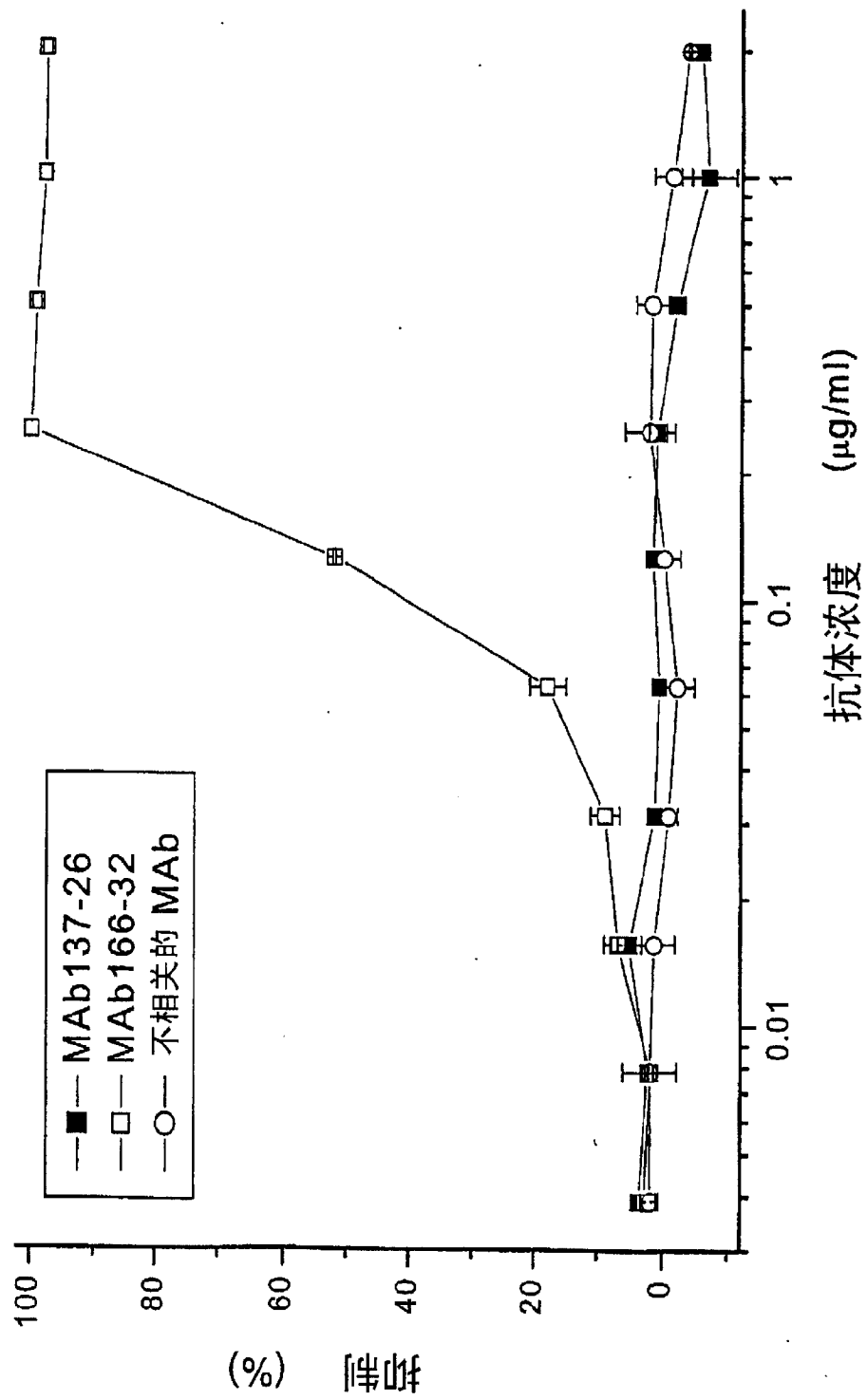


图 4

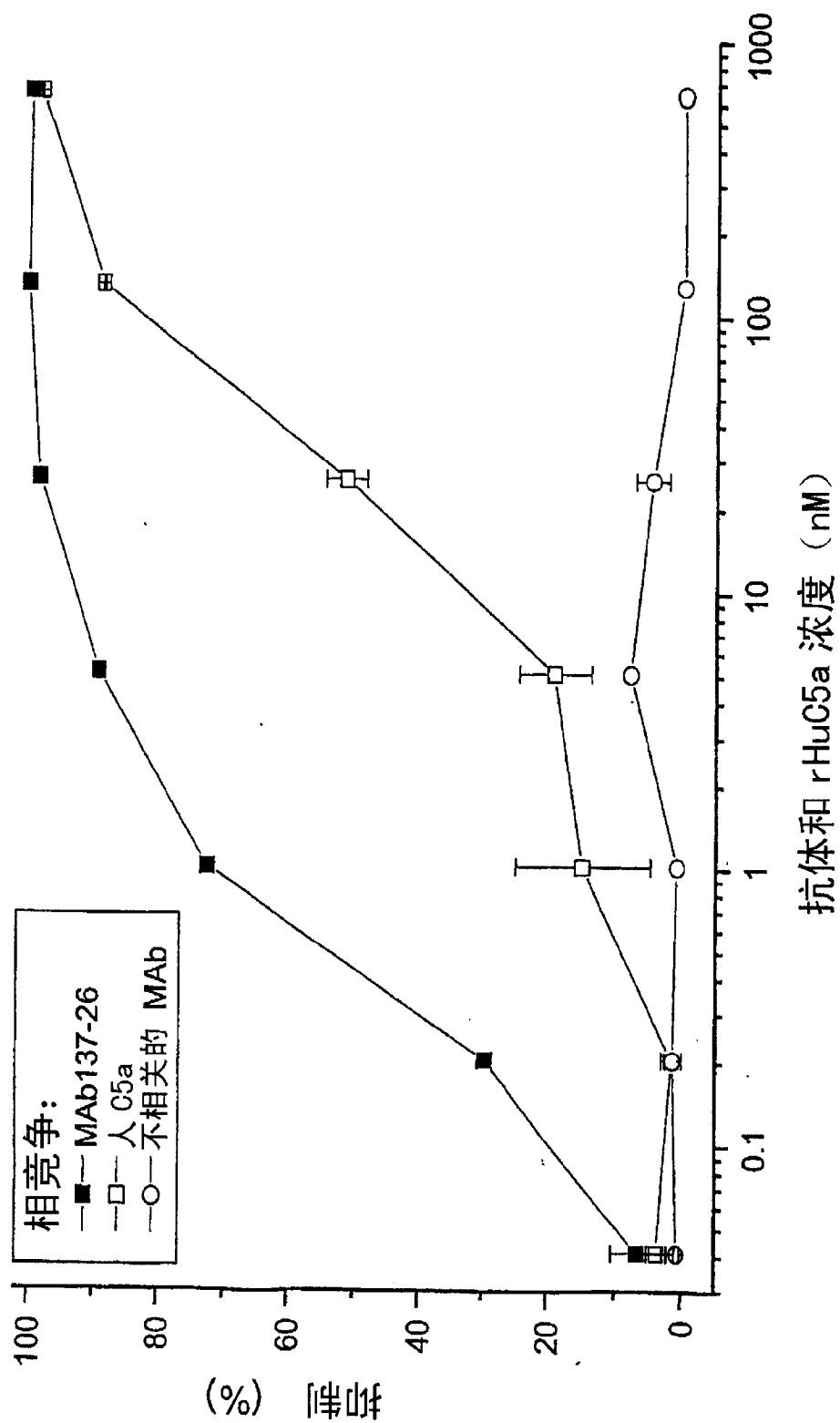


图 5

N-TLQKKIEEIAAKYKHSVVKCCYDGACVNNDETCEQRAARISLGPCRIKAFTECCECVVASQ

LRANISHKDMQLGR -C

肽	MAb 137-26 的反应性
NNDTCEQRAAR	-
ETCEQRAARISL	+
EQRAARISL	+++
AARISL	+++
ISL	++
GPCRIKAFT	-

图 6

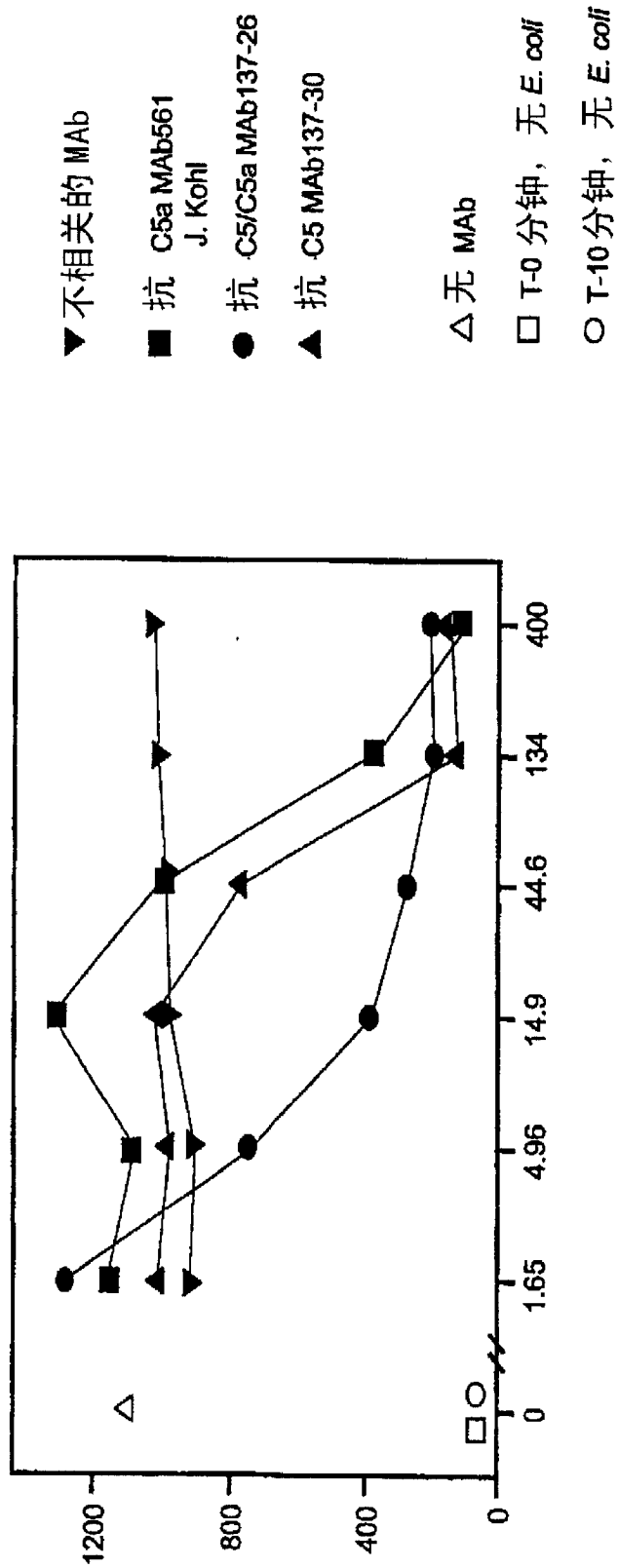


图 7A

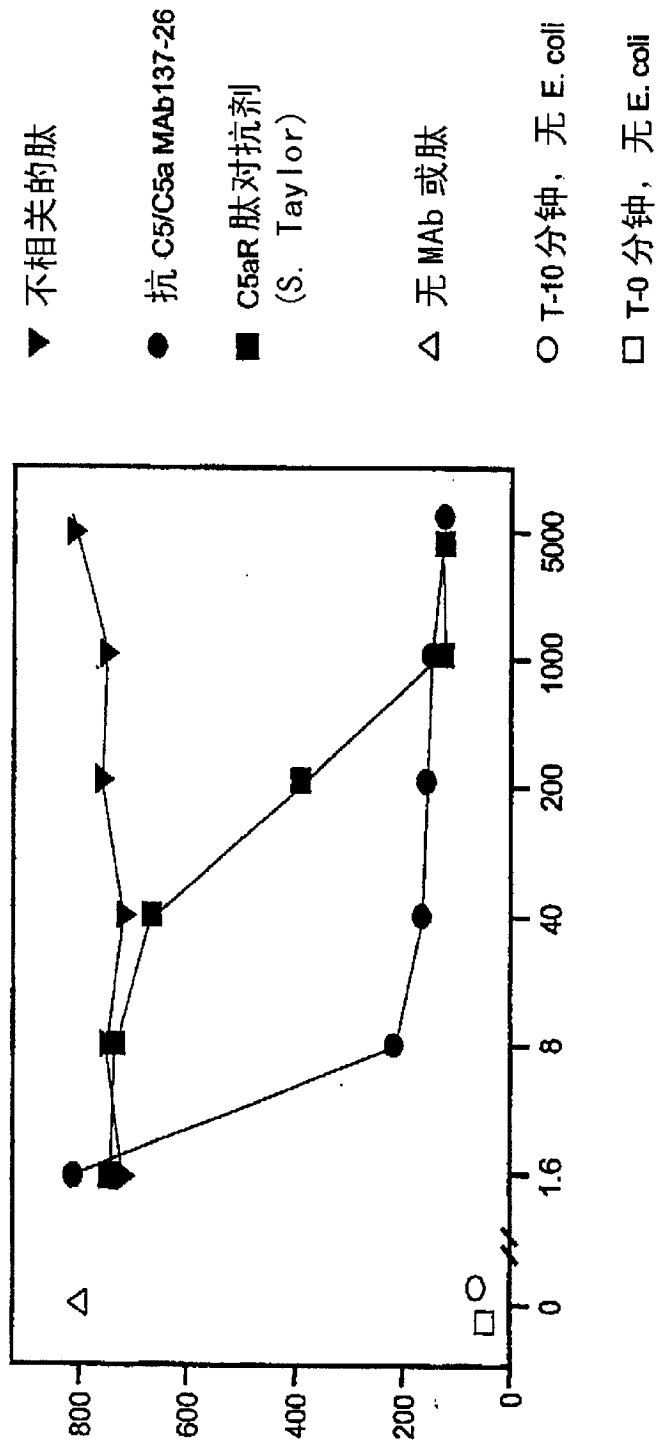


图 7B

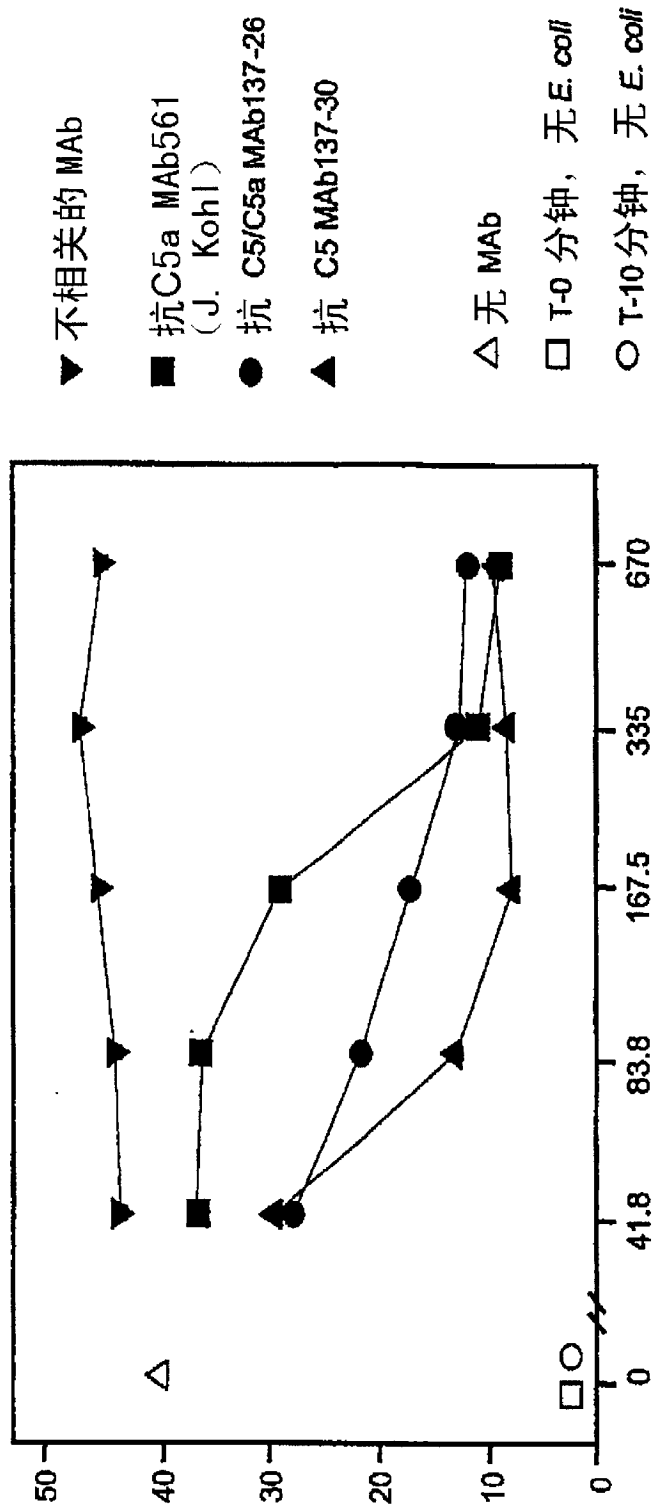


图 7C

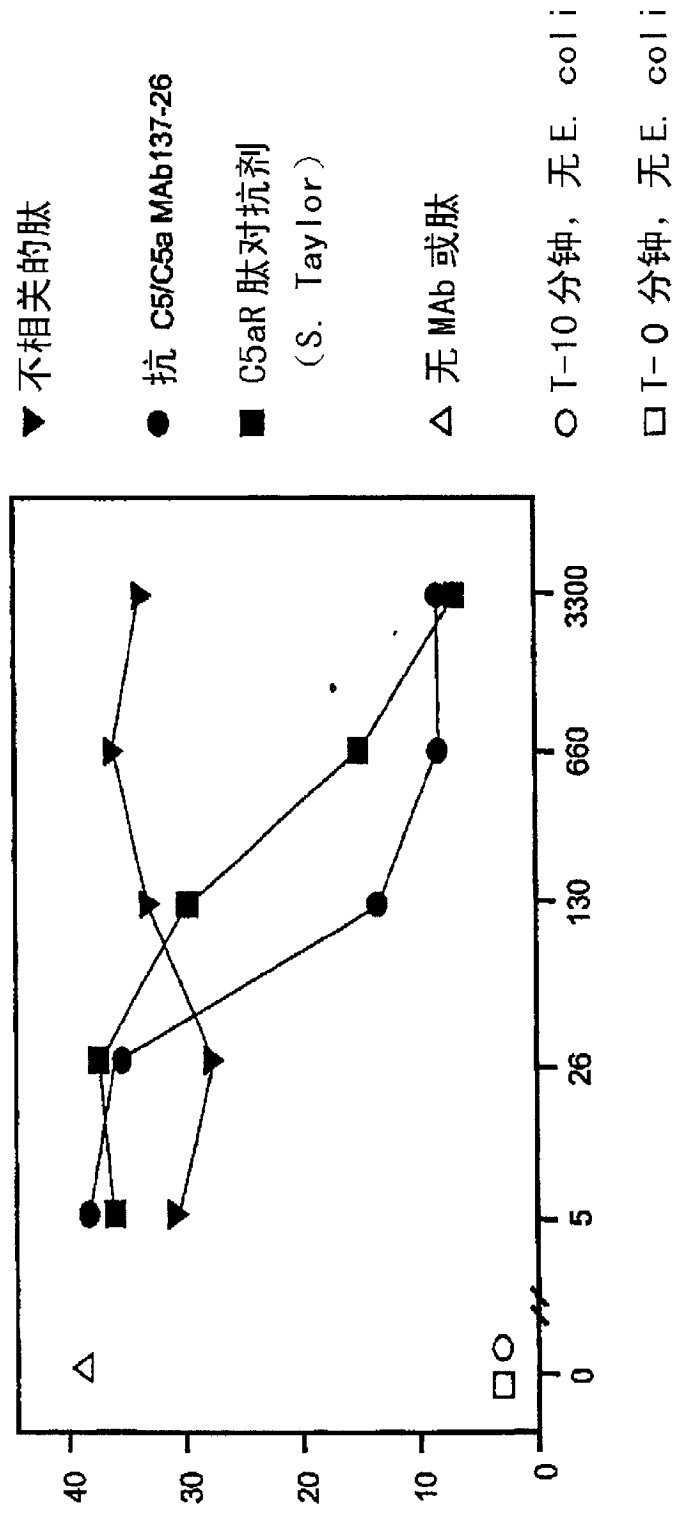


图 7D

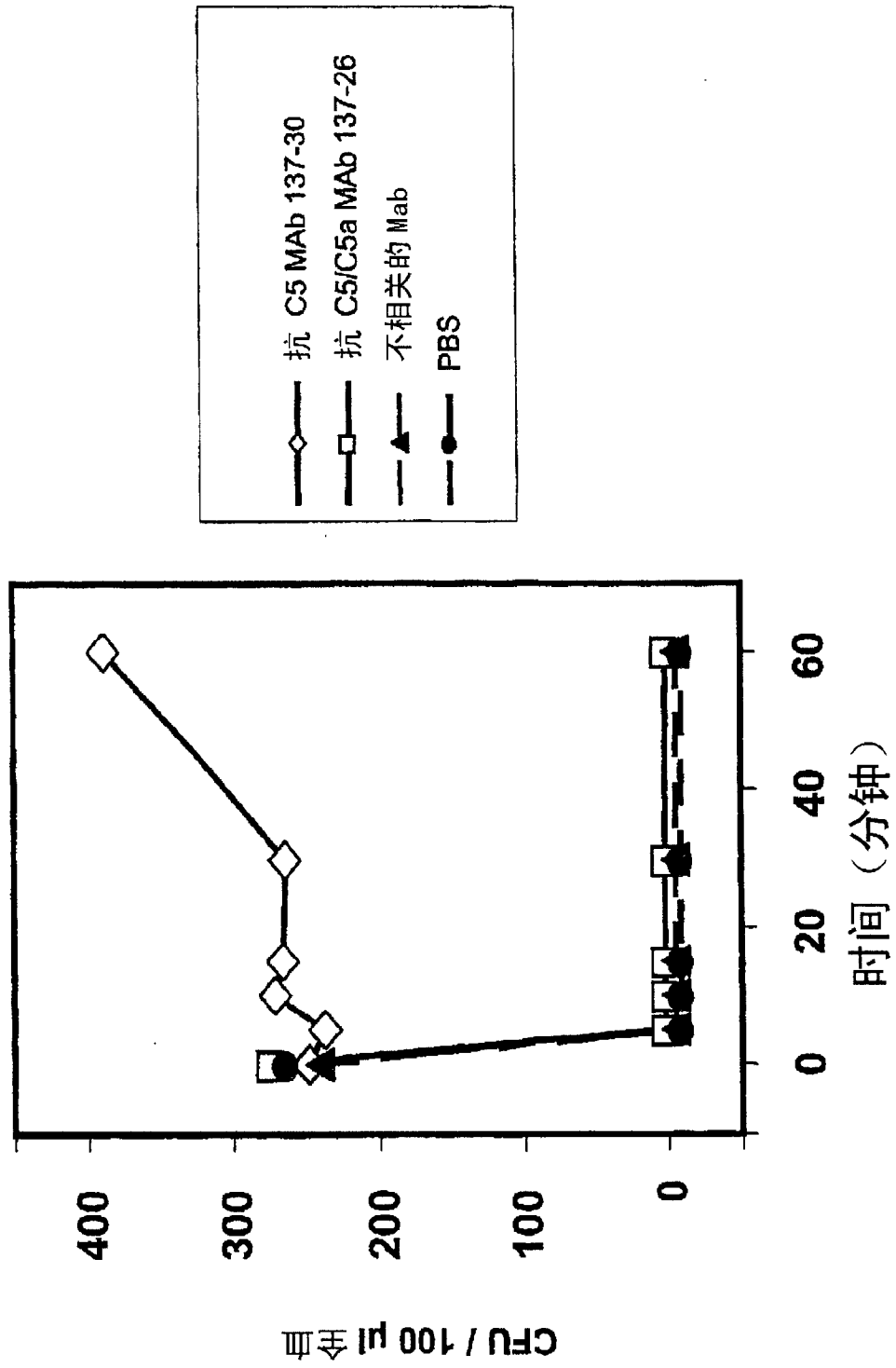


图 8

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	CN101387646B	公开(公告)日	2016-08-10
申请号	CN200810091622.4	申请日	2002-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	建南德克公司		
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	G01N33/577 C07K16/18 G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/10 A61P13/12 A61P29/00 A61P31/04 A61P37/00 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/3955 A61K2039/505 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/569 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/6863 G01N33/6893		
代理人(译)	武晶晶 郑霞		
审查员(译)	黄蕊		
优先权	60/313137 2001-08-17 US		
其他公开文献	CN101387646A		
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。

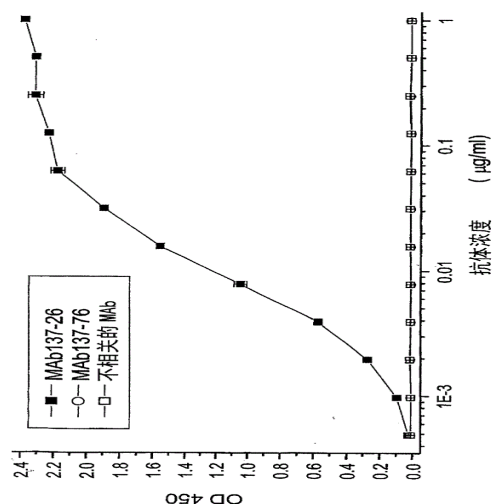


图1