



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970002 A

(43) 申请公布日 2011.02.09

(21) 申请号 200880110034.9

C07K 16/00 (2006.01)

(22) 申请日 2008.08.27

(30) 优先权数据

60/968,146 2007.08.27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/074489 2008.08.27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/029669 EN 2009.03.05

(71) 申请人 诺福麦德治疗学股份有限公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 R·班塞尔

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东 张静

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 23 页 序列表 8 页
附图 34 页

(54) 发明名称

用因子 Bb 特异性抗体抑制补体活化的方法

(57) 摘要

一种抑制对象体内补体旁路活化产物不良作用的方法,该方法包括给予对象有效量的抗因子 Bb 抗体以选择性抑制补体旁路活化产物 C3a、C5a 和 C5b-9 的形成,和抑制中性粒细胞、单核细胞和血小板的活化。

1. 一种抑制对象体内补体旁路活化产物不良作用的方法,该方法包括给予所述对象有效量的抗因子 Bb 抗体以选择性抑制补体旁路活化产物 C3a、C5a 和 C5b-9 的形成,并抑制中性粒细胞、单核细胞和血小板的活化。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体能选择性结合因子 B 的 Bb 基序。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体可结合以下融合蛋白中的基序,所述融合蛋白包含因子 B 的因子 D 切割位点、因子 B 的 VWF 结构域,或因子 B 的丝氨酸蛋白酶结构域中至少一个。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体不结合因子 B 的 Ba 基序。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体不会阻止因子 B 或 Bb 结合 C3b/PC3b。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体是完全抗体或抗因子 Bb 抗体的抗原结合片段。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、去免疫原性抗体、人源化抗体、完全的人抗体或截短的抗体。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体是片段化抗体,包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、或截短的 F(ab)₂ 或 F(ab')₂ 片段。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量能有效选择性抑制补体旁路 C3 转化酶 C3bBb 或 PC3bBb 的活化。

10. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量不抑制补体经典通路。

11. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量能降低催化活性 PC3bBb/C3bBb 复合物的水平,和提高无催化活性 PC3bBb/C3bBb 复合物的水平。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量能防止形成更多的 C3b 和 PC3b。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量能提高 C3bBb- 抗因子 Bb 抗体复合物通过红细胞上的 CR1 受体而清除。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量能结合 C3bBb/PC3bBb 复合物中 Bb 的蛋白酶活性位点。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述蛋白酶活性位点位于 Bb 的丝氨酸蛋白酶结构域中。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体的用量能有效选择性抑制过敏毒素 C3a 和 C5a 以及膜攻击复合物 C5b-9 或 sC5b-9 的形成。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 Bb 抗体能防止中性粒细胞、单核细胞和血小板的激活。

18. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述补体激活的不良作用包括选自以下的疾病或病症:动脉粥样硬化、急性心肌梗塞缺血后重灌输、过敏性紫癜肾炎、免疫复合物血管炎、类风湿关节炎、动脉炎、动脉瘤、中风、心肌病、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭症、低

血容量休克和肠缺血、移植物排斥、心脏手术、PTCA、自发性流产、神经元损伤、脊髓损伤、重症肌无力、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、急性感染性多神经炎、帕金森病、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综合征、哮喘、慢性阻塞性肺病、输液相关急性肺损伤、急性肺损伤、古德帕斯彻病、心肌梗塞、心肺分流术后炎症、心肺分流术、败血性休克、移植物排斥、活体外移植、烧伤、全身性红斑狼疮、膜性肾炎、贝惹病、牛皮癣、类天疱疮、皮炎、抗磷脂综合征、炎性肠病、血液透析、白细胞清除术、血浆置换术、肝素诱导的体外膜式人工氧合 LDL 沉淀术、体外膜式人工氧合术、黄斑变性、自发性流产以及它们的组合。

19. 一种抑制哺乳动物补体旁路活化的方法，该方法包括：

给予哺乳动物有效量的能特异性结合因子 B 的 Bb 区段的表位的抗体和 / 或其片段来抑制哺乳动物的补体旁路。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。

22. 如权利要求 19 所述的抗体，其特征在于，所述抗体是 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

23. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，抗体与因子 B 结合的比例是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。

24. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，给予哺乳动物所述抗体导致以下至少一种结果：不会抑制因子 B 结合 C3b；减少了 C3bB 的形成；减少了 C3bBb 的形成；减少了 C3a 和 C5a 的产生；减少了 C5b-9 复合物的形成；减少了中性粒细胞的活化；减少了单核细胞的活化；减少了血小板的活化；减少了白细胞-血小板偶联物的形成；或减少了 Ba 的产生。

25. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述抗体可抑制补体旁路依赖的兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解。

26. 如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，可体内或离体给予所述抗体。

27. 一种抑制哺乳动物宿主补体旁路激活的方法，所述方法包括：给予哺乳动物治疗有效量的能特异性结合 Bb 丝氨酸蛋白酶结构域中的表位的抗因子 Bb 抗体。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述抗体是单克隆抗体。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。

30. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述抗体是 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

31. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。

32. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，给予哺乳动物所述抗体可导致以下至少一种结果：不会抑制因子 B 结合 C3b；减少了 C3bB 的形成；减少了 C3bBb 的形成；减少了 C3a 和 C5a 的产生；减少了 C5b-9 复合物的形成；减少了中性粒细胞的活化；减少了单核细胞的活化；减少了血小板的活化；减少了白细胞-血小板偶联物的形成；或减少了 Ba 的产生。

33. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述抗体可抑制补体旁路依赖的兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解。

34. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,可体内或离体给予所述抗体。
35. 一种抑制哺乳动物中补体旁路激活的方法,所述方法包括:给予哺乳动物治疗有效量的能特异性结合因子 B 及其 Bb 片段丝氨酸蛋白酶结构域中的催化性 Asp-His-Ser 三联体的所述抗因子 Bb 抗体。
36. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。
37. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。
38. 如权利要求 35 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。
39. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,抗体与因子 B 结合的比例是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。
40. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,给予哺乳动物所述抗体可导致以下至少一种结果:因 C3b 形成减少而减少了 C3bB 的形成;减少了 C3 转化酶的形成;减少了 C3a 和 C5a 的产生;减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成;减少了中性粒细胞的活化;减少了单核细胞的活化;减少了血小板的活化;减少了白细胞-血小板偶联物的形成。
41. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述抗体能抑制补体旁路依赖的兔红细胞在人血清/血浆中的裂解。
42. 一种抑制哺乳动物对象中补体旁路激活的方法,所述方法包括:给予所述对象治疗有效量的能特异性结合 Bb 丝氨酸蛋白酶结构域中的表位的所述抗因子 Bb 抗体。
43. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。
44. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。
45. 如权利要求 42 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。
46. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,抗体与因子 B 结合的比例是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。
47. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,给予哺乳动物所述抗体可导致以下至少一种结果:不会抑制因子 B 结合 C3b;减少了 C3bB 的形成;减少了 C3bBb 的形成;减少了 C3a 和 C5a 的产生;减少了 C5b-9 复合物的形成;减少了中性粒细胞的活化;减少了单核细胞的活化;减少了血小板的活化;减少了白细胞-血小板偶联物的形成;或减少了 Ba 的产生。
48. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,所述抗体能抑制补体旁路依赖的兔红细胞在人血清/血浆中的裂解。
49. 如权利要求 42 所述的方法,其特征在于,可体内或离体给予所述抗体。
50. 一种抑制哺乳动物中补体旁路激活的方法,所述方法包括:给予所述哺乳动物一定量的抗体或其片段,所述抗体或其片段能特异性结合 Bb 并通过防止更多的 C3b 分子形成来抑制 C3b 寡聚物形成,否则这些 C3b 分子将与已存在的 C3b 结合形成寡聚物。
51. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在于,所述 C3b 寡聚物可含有二个或更多个 C3b 单体。
52. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。

53. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在于,所述抗体能特异性结合 Bb 序列上的表位,所述表位包含丝氨酸蛋白酶结构域或 VWA 结构域氨基酸序列的至少一部分。

54. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在于,所述抗因子 B 抗体结合 Bb 可防止产生更多的 C3b 单体。

55. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。

56. 如权利要求 50 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

57. 如权利要求 50 所述的方法,其特征在于,抗体与因子 B 结合的比例是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。

58. 一种抑制哺乳动物中补体旁路激活但不抑制经典通路激活的方法,所述方法包括:给予所述哺乳动物治疗有效量的能特异性结合 Bb 表位的抗体或其片段,以阻断旁路活化但不影响补体经典通路的活化。

59. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。

60. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述抗体能特异性结合 Bb 序列上的表位,所述表位包含 VWA 或丝氨酸蛋白酶结构域氨基酸序列的至少一部分。

61. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述抗体结合 Bb 可防止产生更多的 C3b 单体。

62. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。

63. 如权利要求 58 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

64. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,抗体与因子 B 结合的比例是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。

65. 如权利要求 58 所述的方法,其特征在于,给予哺乳动物所述抗体可导致以下至少一种结果:减少了 C3b 的形成;减少了 Bb;减少了 C3 转化酶的形成;减少了 C3a 和 C5a 的产生;减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成;减少了中性粒细胞的活化;减少了单核细胞的活化;减少了血小板的活化;减少了白细胞-血小板偶联物的形成。

66. 一种治疗疾病相关或病理状况导致的补体旁路活化方法,所述方法包括:

给予所述哺乳动物治疗有效量的能特异性结合 Bb 表位的抗体或其片段,以阻断旁路活化但不影响补体经典通路的活化。

67. 如权利要求 66 所述的方法,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。

68. 如权利要求 66 所述的方法,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体。

69. 如权利要求 66 所述的方法,其特征在于,所述疾病或病症选自:动脉粥样硬化、急性心肌梗塞缺血后重灌流、过敏性紫癜肾炎、免疫复合物血管炎、类风湿关节炎、动脉炎、动脉瘤、中风、心肌病、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭症、低血容量休克和肠缺血、移植排斥、心脏手术、PTCA、自发性流产、神经元损伤、脊髓损伤、重症肌无力、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、急性感染性多神经炎、帕金森病、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综

合征、哮喘、慢性阻塞性肺病、输液相关急性肺损伤、急性肺损伤、古德帕斯彻病、心肌梗塞、心肺分流术后炎症、心肺分流术、败血性休克、移植物排斥、活体外移植、烧伤、全身性红斑狼疮、膜性肾炎、贝惹病、牛皮癣、类天疱疮、皮炎、抗磷脂综合征、炎性肠病、血液透析、白细胞清除术、血浆置换术、肝素诱导的体外膜式人工氧合 LDL 沉淀术、体外膜式人工氧合术、黄斑变性以及它们的组合。

70. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其包含:

由 ATCC 登录号 PTA-8543 保存的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变区和轻链可变区。

71. 如权利要求 70 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是单克隆抗体。

72. 如权利要求 71 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、或完全的人抗体。

73. 如权利要求 70 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是单链抗体、IgG、F(ab)₂、F(ab')₂、F(ab)、F(ab') 片段或截短的抗体。

74. 如权利要求 53 所述的抗体,其特征在于,抗体与备解素结合的比例是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。

用因子 Bb 特异性抗体抑制补体活化的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 27 日提交的美国临时专利申请号 60/968, 146 的优先权, 其主题内容通过引用纳入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及补体活化。具体说, 本发明涉及抑制补体经旁路活化的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 补体系统负责引发和放大对微生物感染和其它急性损伤的炎症应答反应。补体活化不适当意味可能致病。例如, 补体系统可促成一些急性和慢性疾病的发病, 包括动脉粥样硬化、急性心肌梗塞缺血后重灌输、过敏性紫癜肾炎、免疫复合物血管炎、类风湿关节炎、动脉炎、动脉瘤、中风、心肌病、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭症、低血容量休克和肠缺血、移植排斥、心脏手术、PTCA(经皮冠状动脉成型术)、自发性流产、神经元损伤、脊髓损伤、重症肌无力、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、急性感染性多神经炎、帕金森病、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综合征、哮喘、慢性阻塞性肺病、输液相关急性肺损伤、急性肺损伤、古德帕斯彻病、心肌梗塞、心肺分流术后炎症、心肺分流术、败血性休克、移植物排斥、活体外移植、烧伤、全身性红斑狼疮、膜性肾炎、贝惹病 (berger's disease)、牛皮癣、类天疱疮、皮炎、抗磷脂综合征、炎性肠病、血液透析、白细胞清除术、血浆置换术、肝素诱导的体外膜式人工氧合 LDL 沉淀术、体外膜式人工氧合术和黄斑变性。

[0006] 激活补体可通过三条不同的酶促级联反应活化, 称为“经典通路”、“凝集素 /MBL”通路和“旁路”(分别为 CP, MBL 和 AP)。图 1 显示了这三条通路图。AP 负责补体总活性的 80-95%。经典和旁路能产生 C3a 和 C5a。然而, 这些过敏毒素产生的水平根据激活的通路而有所不同。凝集素通路是经典通路的变化形式。许多疾病征候中旁路被激活。在 AP 的引发和扩大中有三种蛋白因子 B、D 和 P 起着主要作用。称为 MAC 的终末复合物负责裂解细胞。C3a 和 C5a 均是强效过敏毒素, 负责激活血小板、中性粒细胞和单核细胞及释放炎性分子, 例如弹性蛋白酶、TNF、IL-1、VEGF 和过氧化物酶。

[0007] 因子 B 由二个分开的结构域 Ba(分子量 33kDa) 和 Bb(分子量 60kDa) 组成。Ba 结构域包含三个短的重复共有序列, 称为 SCR1、SCR2 和 SCR3(图 3)。采用突变分析和特异性 Ba 单克隆抗体显示因子 B 的功能结构域位于 SCR3 区中。用 SCR 区产生的抗体在几种疾病的动物模型中证明有临床效益。因子 B 的 Bb 结构域除了含丝氨酸蛋白酶功能域外还含沃威洛布兰德 (VonWillowbrand, VWF) 结构域。各种研究显示 Ba 结构域对因子 B 的功能至关重要, 抑制补体被活化需要抑制因子 B 与 C3b 结合。

[0008] 一种小而重要的分子备解素能结合 C3b 形成 P-C3b 复合物。因子 B 可结合游离的 C3b 和 P-C3 形成 C3bB 与 PC3bB 的复合物。因子 D 可切割这些复合物形成 C3bBb 和 PC3bBb, 二者具有 C3-转化酶活性。产生的转化酶能切割 C3 产生 C3b 和 C3a。新产生的 C3b 片段共价结合靶分子然后与因子 B 和 D 相互作用形成补体旁路更多的 C3 转化酶分子。

[0009] 参见图 2, 此图说明了 AP 的活化, 已知与 C-3b 结合的备解素能稳定旁路的 C3-转

化酶。由于旁路 C3- 转化酶的底物是 C3, 因此 C3 既是该反应的组分也是其产物。

[0010] 随着 C3 转化酶产生越来越多量的 C3b, 放大环路得以建立。此外, 经典通路也产生能结合因子 B 的 C3b, 从而衔接补体旁路, 即使触发是由 CP 介导的。所有这三条经典、凝集素和旁路均会聚于 C3, 而 C3 被 C3 转化酶切割形成 C3b 和 C3a。C3a 是一种强效过敏毒素, 意味可能导致各种临床疾病。C3a 能激活中性粒细胞、单核细胞、血小板、肥大细胞和 T 细胞。在佐剂诱导的关节炎模型中已证明 C3a 对诱导脚爪浮肿至关重要。

[0011] 新形成的 C3b 加入已产生的 C3 转化酶可形成 C5 转化酶, 后者可切割 C5 产生 C5b 和 C5a。C5a 与 C3a 相似也是强效过敏毒素, 能引起平滑肌、血管紧张度和血管渗透性的改变。它还是中性粒细胞、单核细胞、血小板、内皮细胞和 T 细胞的强效趋化因子和激活剂。C5a- 介导的细胞激活通过诱导释放其它炎症介质, 包括细胞因子、水解酶、花生四烯酸代谢产物和活性氧可显著放大炎症应答反应。

[0012] 切断 C5 可产生 C5b 和 C5a。释放过敏毒素 C5a 而 C5b 自身则插入靶细胞表面的脂质双层中成为 C6、C7、C8 和 C9 沉积的核心, 形成 C5b-9 复合物。C5b-9 也称为膜攻击复合物 (MAC)。现有强力证据显示在炎症中 MAC 可能起着重要作用, 此外它还起着裂解细胞的孔形成复合物的作用。除了已证明 C3a、C5a 在血小板激活中的作用, 也已知 C5b-9 介导了血小板的激活。因此, 有重要的证据提示, C3a、C5a 和 MAC 参与了血小板活化。不论激活血小板是什么途径, 活化的血小板可表达 CD62P, 也称为 P- 选择蛋白。P- 选择蛋白也能介导血小板-单核细胞偶联, 这种偶联可触发单核细胞释放组织因子。形成这种偶联的一种结果是去除了循环中的血小板, 可能诱发血小板产生减少现象。

[0013] 虽然补体活化为抵抗潜在病原体提供了有价值的 frontline 防御力, 但促进保护性炎症应答反应的补体激活也可能表现为对宿主的潜在威胁。例如, 可将 C3a 和 C5a 过敏毒素招募到患病部位并激活中性粒细胞、单核细胞和血小板。这些激活的细胞不加选择地释放破坏性酶, 可能引起器官损伤。目前尚不存在能够抑制补体通路不适当活化所致损伤的得到批准的药物。根据可得到的临床资料, 看来大多数急性损伤疾病中, 补体活化主要是通过旁路介导的。因此, 很需要开发只抑制此通路而不完全消除免疫防御力的适合方法。这要求保留完整的经典通路来应对复杂的免疫过程并帮助宿主防卫抵抗感染。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及抑制对象体内补体旁路活化产物不良作用的方法。该方法包括给予对象有效量的抗因子 Bb 抗体以选择性抑制补体旁路活化产物 C3a、C5a 和 C5b-9 的形成以及中性粒细胞、单核细胞和血小板的激活。所述抗因子 Bb 抗体能选择性结合因子 B 的 Bb 区。

[0016] 本发明一方面, 所述抗因子 Bb 抗体可结合以下融合蛋白中的某基序, 此融合蛋白至少包含因子 B 的因子 D 切割位点、因子 B 的 VWF 结构域或因子 B 的丝氨酸蛋白酶结构域之一。所述抗因子 Bb 抗体不结合因子 B 的 Ba 基序。而且所述抗因子 Bb 抗体不能防止因子 B 或 Bb 结合 C3b/PC3b。

[0017] 所述抗因子 Bb 抗体可以是完全抗体或是抗因子 Bb 抗体的抗原结合片段。所述抗体可以是嵌合抗体、去免疫原性抗体、人源化抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述片段化抗体可包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段或截短的 F(ab)₂ 或 F(ab')₂ 片段。

[0018] 给予对象的所述抗因子 Bb 抗体能有效地选择性抑制旁路补体 C3 转化酶 C3bBb 或

PC3bBb 的活化但不抑制补体经典通路,能降低催化活性 PC3bBb/C3bBb 复合物的水平,提高无催化活性 PC3bBb/C3bBb 复合物的水平,防止形成更多的 C3b 和 PC3b,提高通过红细胞上的 CR1 受体对 C3bBb- 抗因子 B 抗体复合物的清除,抑制过敏毒素 C3a 和 C5a 以及膜攻击复合物 C5b-9 或 sC5b-9 的形成,并防止中性粒细胞、单核细胞和血小板被激活。

[0019] 可用抗因子 B 抗体治疗的补体激活不良作用所致疾病或病症包括:动脉粥样硬化、急性心肌梗塞缺血后重灌输、过敏性紫癜肾炎、免疫复合物血管炎、类风湿关节炎、动脉炎、动脉瘤、中风、心肌病、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭症、低血容量休克和肠缺血、移植物排斥、心脏手术、PTCA(经皮冠状动脉成型术)、自发性流产、神经元损伤、脊髓损伤、重症肌无力、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、急性感染性多神经炎、帕金森病、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综合征、哮喘、慢性阻塞性肺病、输液相关急性肺损伤、急性肺损伤、古德帕斯彻病、心肌梗塞、心肺分流术后炎症、心肺分流术、败血性休克、移植物排斥、活体外移植、烧伤、全身性红斑狼疮、膜性肾炎、贝惹病、牛皮癣、类天疱疮、皮炎、抗磷脂综合征、炎性肠病、血液透析、白细胞清除术、血浆置换术、肝素诱导的体外膜式人工氧合 LDL 沉淀术、体外膜式人工氧合术、黄斑变性、自发性流产和它们的组合。

[0020] 本发明也涉及抑制哺乳动物补体旁路激活的方法。该方法包括给予哺乳动物一定量的能特异性结合因子 B 的 Bb 区段某抗原表位的抗体或其片段来抑制哺乳动物的补体旁路。所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0021] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果:不能抑制因子 B 结合 C3b;减少了 C3bB 的形成;减少了 C3bBb 的形成;减少了 C3a 和 C5a 的产生;减少了 C5b-9 复合物的形成;减少了中性粒细胞的活化;减少了单核细胞的活化;减少了血小板的活化;减少了白细胞-血小板偶联物的形成;或减少了 Ba 的产生。所述抗体也能抑制家补体旁路依赖的兔红细胞在人血清/血浆中的裂解,可体内或离体给予此抗体。

[0022] 本发明还涉及给予宿主治疗有效量的抗因子 B 抗体来抑制哺乳动物宿主补体旁路激活的方法,所述抗因子 B 抗体能特异性结合 Bb 丝氨酸蛋白酶结构域中的某抗原表位。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0023] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果:不能抑制因子 B 结合 C3b;减少了 C3bB 的形成;减少了 C3bBb 的形成;减少了 C3a 和 C5a 的产生;减少了 C5b-9 复合物的形成;减少了中性粒细胞的活化;减少了单核细胞的活化;减少了血小板的活化;减少了白细胞-血小板偶联物的形成;或减少了 Ba 的产生。所述抗体也能抑制补体旁路依赖的家兔红细胞在人血清/血浆中的裂解,可体内或离体给予此抗体。

[0024] 本发明还涉及给予哺乳动物治疗有效量的抗因子 B 抗体来抑制哺乳动物补体旁路激活的方法,所述抗因子 B 抗体能特异性结合因子 B 及其 Bb 片段丝氨酸蛋白酶结构域中催化性 Asp-His-Ser 三联表位。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去

免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0025] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果 : 因 C3b 形成减少而减少了 C3bB 的形成 ; 减少了 C3 转化酶的形成 ; 减少了 C3a 和 C5a 的产生 ; 减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成 ; 减少了中性粒细胞的活化 ; 减少了单核细胞的活化 ; 减少了血小板的活化 ; 减少了白细胞 - 血小板偶联物的形成。所述抗体也能抑制补体旁路依赖的家兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解, 可体内或离体给予此抗体。

[0026] 本发明还涉及给予哺乳动物对象治疗有效量的抗因子 B 抗体来抑制哺乳动物对象补体旁路激活的方法, 所述抗因子 B 抗体能特异性结合 Bb 丝氨酸蛋白酶结构域中的某抗原表位。所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0027] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果 : 因 C3b 形成减少而减少了 C3bB 的形成 ; 减少了 C3 转化酶的形成 ; 减少了 C3a 和 C5a 的产生 ; 减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成 ; 减少了中性粒细胞的活化 ; 减少了单核细胞的活化 ; 减少了血小板的活化 ; 减少了白细胞 - 血小板偶联物的形成。所述抗体也能抑制补体旁路依赖的家兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解, 可体内或离体给予此抗体。

[0028] 本发明还有一方面涉及给予哺乳动物一定量的能特异性结合 Bb 和抑制 C3b 寡聚物形成的抗体或其片段, 通过防止更多的 C3b 分子形成, 否则这些分子将与已存在的 C3b 结合形成寡聚物, 从而抑制哺乳动物补体旁路激活的方法。所述 C3b 寡聚物可含有二个或多个 C3b 单体。

[0029] 本发明一个方面, 所述抗体能特异性结合 Bb 序列上的某抗原表位。所述表位包含丝氨酸蛋白酶结构域或 VWA 结构域氨基酸序列的至少一部分。所述抗因子 B 抗体结合 Bb 后可防止产生更多的 C3b 单体。

[0030] 所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0031] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果 : 因 C3b 形成减少而减少了 C3bB 的形成 ; 减少了 C3 转化酶的形成 ; 减少了 C3a 和 C5a 的产生 ; 减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成 ; 减少了中性粒细胞的活化 ; 减少了单核细胞的活化 ; 减少了血小板的活化 ; 减少了白细胞 - 血小板偶联物的形成。所述抗体也能抑制补体旁路依赖的家兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解, 可体内或离体给予此抗体。

[0032] 本发明另一方面涉及治疗疾病相关的或病理状况导致的补体旁路活化的方法。所述方法包括给予哺乳动物治疗有效量的能特异性结合 Bb 某抗原表位的抗体或其片段, 以阻断旁路活化但不影响补体经典通路的活化。所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述

抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0033] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果：因 C3b 形成减少而减少了 C3bB 的形成；减少了 C3 转化酶的形成；减少了 C3a 和 C5a 的产生；减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成；减少了中性粒细胞的活化；减少了单核细胞的活化；减少了血小板的活化；减少了白细胞-血小板偶联物的形成。所述抗体也能抑制补体旁路依赖的家兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解，可体内或离体给予此抗体。

[0034] 可治疗的疾病或病症选自：动脉粥样硬化、急性心肌梗塞缺血后重灌输、过敏性紫癜肾炎、免疫复合物血管炎、类风湿关节炎、动脉炎、动脉瘤、中风、心肌病、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭症、低血容量休克和肠缺血、移植物排斥、心脏手术、PTCA（经皮冠状动脉成型术）、自发性流产、神经元损伤、脊髓损伤、重症肌无力、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、急性感染性多神经炎、帕金森病、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综合征、哮喘、慢性阻塞性肺病、输液相关急性肺损伤、急性肺损伤、古德帕斯彻病、心肌梗塞、心肺分流术后炎症、心肺分流术、败血性休克、移植物排斥、活体外移植、烧伤、全身性红斑狼疮、膜性肾炎、贝惹病、牛皮癣、类天疱疮、皮炎、抗磷脂综合征、炎性肠病、血液透析、白细胞清除术、血浆置换术、肝素诱导的体外膜式人工氧合 LDL 沉淀术、体外膜式人工氧合术、黄斑变性和它们的组合。

[0035] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合部分，其包括以 ATCC 登录号 PTA-8543 保存的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0036] 所述抗体可以是单克隆抗体。所述抗体也可以是嵌合抗体、重组抗体、人源化抗体、去免疫原性抗体、完全的人抗体或截短的抗体。所述抗体片段包括 F(ab)、F(ab')、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv、单链片段、截短的 F(ab)₂、IgG 或截短的 IgG。

[0037] 抗体与因子 B 结合的比例可以是约 0.5 : 1 到约 2 : 1。给予哺乳动物该抗体可能导致以下至少一种结果：因 C3b 形成减少而减少了 C3bB 的形成；减少了 C3 转化酶的形成；减少了 C3a 和 C5a 的产生；减少了 C5b-9/C5b-9 复合物的形成；减少了中性粒细胞的活化；减少了单核细胞的活化；减少了血小板的活化；减少了白细胞-血小板偶联物的形成。所述抗体也能抑制补体旁路依赖的家兔红细胞在人血清 / 血浆中的裂解，可体内或离体给予此抗体。

[0038] 附图的简要说明

[0039] 图 1 是补体通路的图解说明。

[0040] 图 2 是补体旁路激活的图解说明

[0041] 图 3 是因子 B 的说明图。

[0042] 图 4A 是抗因子 B 单克隆抗体与因子 B 及其片段 Bb 相互作用机制的图解说明。图 4B 是现有技术的单克隆抗体与因子 B 及其片段 Ba 相互作用机制的图解说明。

[0043] 图 5 说明本发明的单克隆抗体可灭活 PC3bBb。

[0044] 图 6 显示因子 B 与 C3b 和 PC3b 结合。备解素以高亲和力结合 C3b；因子 B 对备解素结合的 C3b 的亲和力更高。将不同浓度的因子 B 加入 C3b 和备解素-C3b 包被的板中。备解素结合的 C3b 将因子 B 结合 C3b 提高约 20 倍。此试验中，结合 C3b 的 Kd 是约 19.4nM；

结合备解素结合的 C3b 是 1.11nM。

[0045] 图 7 显示因子 B 与 PC3b 的结合亲和力高于结合 C3b 不是由于备解素直接支持结合因子 B。相反,任何测试浓度的备解素均不结合因子 B。

[0046] 图 8 显示在存在或缺乏备解素时,因子 B 不结合 C3b 亚型。此图中,将递增浓度的因子 B 与基材结合的 iC3b、C3c 和 C3dg 一起培育。如图所示,因子 B 结合 C3b 亚型缺乏高亲和力。

[0047] 图 9 说明在小鼠中制备单克隆抗体。用标准方法制备抗 Bb 单克隆抗体。所有 6 只小鼠接受同样处理。评价了 6 只小鼠各自血清与因子 B 的结合。此图显示了小鼠血清与人因子 B 的结合亲和力。培育包被因子 B 的板与最高达 1 : 20,000 稀释度的小鼠血清来评价血清抗体滴度。用双曲线拟合评价半数最大滴度。

[0048] 图 10 说明小鼠血清抑制了 AP 依赖的溶血。如图所示,所用的 6 只小鼠中只有一只抑制了 AP 依赖的溶血。此图证明只有一只小鼠 (A3) 的血清能抑制家兔红细胞溶血。此试验中,37°C 将含正常人血清的 AP 缓冲液与家兔红细胞在控温 ELISA 平板读数仪中一起培育。AP 活化的结果,红细胞表面形成了导致红细胞裂解的 C5b-9。干扰 AP 活化的单克隆抗体应能防止这种裂解。小鼠 #A3 血清防止了红细胞裂解。此试验中用 700nm 检测裂解。

[0049] 图 11 说明筛选能结合因子 B 的杂交瘤上清液。取得所选小鼠的脾细胞进行克隆培养以鉴定能抑制 AP 激活的克隆。检测这些克隆能否结合与基材结合的人因子 B。在一典型安排中,将不同克隆细胞的培养上清液加入包被因子 B 的孔中培育。用 HRP-偶联山羊抗小鼠二抗检测能结合因子 B 的单克隆抗体。选择显示 OD 值为 1 或更高的克隆细胞为阳性细胞。

[0050] 图 12 说明通过 C3b 形成筛选抑制 AP 激活的杂交瘤克隆。对图 11 筛选的所有克隆作 AP 依赖性 C3b 形成试验。将图 11 所示克隆的上清液与含 10% 人血清 (混合液中的最终浓度) 的 AP 缓冲液混合后加入固定 LPS 的孔中 37°C 培育。结果,LPS 活化人血清中的 AP 并导致 C3b 沉积。缺乏 C3b 沉积视为直接测到对 AP 的抑制。发现只有称为 1D3 的一个克隆能抑制 AP 激活。将此克隆亚克隆几次直到鉴定为单一细胞群。最终的克隆也称为 1D3。

[0051] 图 13 说明 1D3 上清液抑制了 AP 依赖的溶血。也用以前描述的溶血试验评价 1D3 的 AP 抑制。如图所示,与对照血清相比,1D3 上清液显著抑制了溶血。用此克隆细胞产生抗 -Bb 特异性单克隆抗体。此克隆细胞以专利保存号 PTA-8543 保存于 ATCC。

[0052] 图 14 说明小鼠 1D3 细胞产生的腹水抑制了 AP 依赖的溶血。将克隆 1D3 细胞注射入小鼠大量产生这种单克隆抗体。产生腹水并检测以确定腹水单克隆抗体是否保留了其 AP 抑制活性。如图所示稀释腹水并按本文所述与家兔红细胞混合。粗制腹水保留了 AP 阻断活性。

[0053] 图 15 图解说明纯化单克隆抗体的 SDS-PAGE。用标准方法纯化腹水抗体。如图所示,抗体 (泳道 1) 看来没有外源性蛋白质。

[0054] 图 16 图解说明称为 NM001 的纯化单克隆抗体抑制了 AP 依赖的溶血。此单克隆抗体抑制溶血为剂量依赖方式,在 100 μ g/ml 浓度时几乎 100% 抑制。

[0055] 图 17 图解说明 NM001 以高亲和力结合人因子 B。将递增浓度的 NM001 与包被因子 B 的 ELISA 板孔一起培育。用 HRP-偶联山羊抗小鼠抗体 (Sigma) 检测 NM001 的结合总量。此试验的光密度 (O. D.) 读数显示 NM001 以高亲和力结合因子 B。提供的数据为代表性实验

重复 3 次一式 3 孔的 O. D. 平均值 \pm 标准差。在一典型实验中,采用 0-70nM 范围的 12 种 NM001 浓度。发现其结合亲和力的范围是 295pM。

[0056] 图 18 图解说明纯化的 NM001 抑制了 AP 依赖的溶血。检测了 NM001 在含正常人血清的 AP 缓冲液中能否抑制补体旁路依赖的家兔红细胞溶血。按本文所述进行溶血试验。产生各浓度 NM001 的动力学曲线,将各曲线的终点计数制图产生此图所示曲线。利用此信息确定 NM001 阻断活性的 IC₅₀ 值。我们发现 NM001 的 IC₅₀ 约为 152nM。

[0057] 图 19 图解说明用纯化的 NM001 蛋白在 AP 缓冲液中不能抑制因子 B 结合 C3b 或 PC3b。如图所示,在存在或缺乏备解素时,任何浓度的 NM001 均不抑制因子 B 结合 C3b。将不同浓度的 NM001 与因子 B(固定浓度)加或不加备解素一起培育。将此溶液与包被 C3b 的平板在 AP 缓冲液中培育。

[0058] 图 20 图解说明在含正常人血清的 AP 缓冲液中因子 B 结合 C3b 或结合备解素结合的 C3b 不受抑制。将不同浓度的 NM001 与稀释的人血清混合并与包被 C3b 的平板培育。此试验证明 NM001 不抑制因子 B 结合 C3b(PC3b)。

[0059] 图 21 图解说明 NM001 抑制通过 AP 形成 C3b。在该试验中,将正常人血清加或不加 NM001 与基材结合的 LPS 一起培育。AP 活化的结果形成了 C3b。NM001 以剂量依赖方式抑制 C3b 形成,IC₅₀ 约为 20nM。

[0060] 图 22 图解说明 NM001 抑制人血清的 C5b-9 形成。C5b-9 是补体级联反应的终末组分,负责裂解细胞。将不同浓度的 NM001 加入正常人血清,在 LPS 包被平板上培育该混合物。LPS 激活了人血清中的补体旁路。预计 NM001 对 C3bBb 活化的抑制应抑制下游反应,因而防止 C5b-9 形成。如图所示,NM001 以剂量依赖方式抑制 C5b-9 形成,20nM 浓度时发生最高抑制,IC₅₀ 接近 12-13nM。

[0061] 图 23 图解说明 NM001 通过消耗备解素沉积抑制 C3b 形成。人血清补体活化的结果形成了 C3b。新形成的 C3b 可与因子 P 结合形成寡聚 C3b。用特异性抗体检测 C3b 和备解素证明抑制了备解素沉积。抑制备解素沉积确证伴有 C3b 沉积。NM001 不抑制备解素结合 C3b 或备解素结合因子 B。如图所示,NM001 有效抑制了 PC3b 复合物的形成。IC₅₀ 抑制在皮摩尔范围。

[0062] 图 24 图解说明拜卡西奥单抗 (Bikaciomab) 以高亲和力结合人因子 B。拜卡西奥单抗是 NM001 的 F(ab')₂ 片段。与 NM001 相似,拜卡西奥单抗以高亲和力结合因子 B。将不同浓度的拜卡西奥单抗与结合于基材的因子 B 一起培育。用 HRP0- 偶联山羊抗小鼠单克隆抗体检测结合的因子 B。如图所示,结合亲和力在皮摩尔范围。

[0063] 图 25 图解说明拜卡西奥单抗抑制细胞溶血。按图 10 和 16 所述实施此试验。将不同浓度的拜卡西奥单抗与正常人血清混合后与兔红细胞培育以激活 AP。拜卡西奥单抗抑制了 AP 缓冲液中的红细胞溶血。

[0064] 图 26 图解说明拜卡西奥单抗不抑制明胶佛罗那缓冲液 (Gelatin Veronal Buffer) 中的经典补体通路活性。将 1% 正常人血清与抗体致敏的绵羊细胞在试验条件下培育以激活 CP。不含拜卡西奥单抗的对照样品细胞完全裂解。EDTA 对照可防止裂解。在 1% 人血清中加入 1-100 μ g/ml 浓度范围的拜卡西奥单抗不抑制 CP 介导的细胞裂解。对动力学分析后的终点作图产生了图中所示的曲线。

[0065] 图 27 图解说明拜卡西奥单抗对人血清中 C3b 形成的影响。与图 21 相似,将不同

浓度的拜卡西奥单抗加入正常人血清,在LPS包被平板上培育混合物。LPS能刺激正常人血清并激活补体旁路。结果形成的C3转化酶切割其它C3分子产生C3b。如图所示,拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制C3b形成,完全抑制发生在约80nM浓度。

[0066] 图28图解说明拜卡西奥单抗对人血清中C5b-9形成的影响。类似于图22所示的试验,拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制C5b-9的形成,IC₅₀为36nM。C5b-9是补体级联反应的终末组分,不适当激活时可导致许多有害作用。

[0067] 图29图解说明拜卡西奥单抗抑制了C3a的形成。将不同浓度的拜卡西奥单抗与人全血一起培育并通过管道环路循环。分离循环后的血浆用库德尔(Quidel)ELISA评价是否存在C3a。拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制了C3a形成。

[0068] 图30图解说明拜卡西奥单抗抑制了人全血体外循环期间C5a的形成。拜卡西奥单抗的作用是剂量依赖的。

[0069] 图31图解说明拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制了C5b-9形成。这些资料与体外循环模型的C3a和C5a形成抑制相符。

[0070] 图32图解说明拜卡西奥单抗抑制了中性粒细胞的活化。用流式细胞计数法测量中性粒细胞的活化。在体外循环2小时循环结束时,取各浓度的等份血样用FITC-CD15和PE-CD11b单克隆抗体染色。CD15是一种机体标志,CD11b可测量活化中性粒细胞上表达的CD11b作为炎症的量度。如图所示,拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制了CD11b,完全抑制发生在100 μg/ml浓度。

[0071] 图33图解说明拜卡西奥单抗抑制单核细胞活化。激活时活化的单核细胞也表达CD11b。此机体标志不同于中性粒细胞所用的标志。FITC-CD14可标记单核细胞。拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制单核细胞活化。全血浓度约100 μg/ml时接近完全抑制。

[0072] 图34图解说明拜卡西奥单抗抑制血小板活化。完全抑制血小板活化表明补体是血小板活化的唯一机制。如图所示,约20 μg/ml的拜卡西奥单抗完全阻止了血小板活化。我们用PE-CD62抗体标记的CD62P检测血小板活化,用CD61作为机体标志鉴定血小板。抑制细胞活化与抑制补体活化相一致。

[0073] 图35图解说明拜卡西奥单抗阻止了TNF产生。用BD生物科学公司(BDBiosciences)的试验评价流经管道环路后血浆样品的TNF含量。

[0074] 图36图解说明拜卡西奥单抗阻止了弹性蛋白酶的产生。

[0075] 发明详述

[0076] “抗体”或“抗体肽”指完整的抗体,或其能与完整抗体竞争特异性结合的结合片段。可通过重组DNA技术或酶切割或化学切割完整的抗体来产生结合片段。所述结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链抗体、截短的抗体和F(ab)₂截短的抗体。应理解除“双特异性”或“双功能”抗体外的抗体各自均具有相同的结合位点。

[0077] 术语“单克隆”指只结合其靶抗原上一条氨基酸序列和一个特异性表位的抗体。例如NM001是因子B的Bb结构域的特异性单克隆抗体。因为该抗体是单克隆抗体,它识别的结构域/基序含有Bb所包含的序列(SEQ ID NO:3)。

[0078] 术语“多克隆”指识别一种抗原上多个表位的抗体。例如,抗Bb多克隆抗体表示该抗体可结合Bb的几个位点。

[0079] 术语“表位”包括能特异性结合免疫球蛋白的蛋白决定簇。表位决定簇通常由分

子中的化学活性表面基团,如氨基酸或糖侧链基团组成,通常具有特异性的三维结构特征以及特异性的电荷特征。

[0080] 术语“寡聚物”和“聚合物”可互换使用。术语“寡聚物”和“聚合物”指特定蛋白质、肽或肽片段的一个以上单体的缔合物。本发明中术语“寡聚物”和“聚合物”具体涉及备解素蛋白单体与其自身或与其它蛋白质形成蛋白复合物的能力。

[0081] 术语“试剂”本文用于指化学化合物,化学化合物的混合物,从生物材料制备的生物大分子或提取物。

[0082] 术语“患者”,“哺乳动物宿主”,“哺乳动物对象”,“对象”等本文可互换使用,指哺乳动物,包括人和兽对象。

[0083] 本文所用的术语“治疗”、“处理”等指获得所需的药理学效果和 / 或生理学效果。这种效果可以是预防效果,即完全或部分防止了发病或其症状,和 / 或可以是治疗效果,即部分或完全治愈疾病和 / 或疾病引起的不良影响。本文所用的“治疗”包括治疗哺乳动物,特别是人的疾病,包括:(a) 预防易患疾病或有得病风险但尚没有诊断已得病的对象产生疾病;(b) 抑制疾病,即停止疾病的发展;(c) 减轻疾病,即使疾病消退。

[0084] 术语“补体旁路相关疾病或疾患”本文用于指补体旁路激活所直接或间接引起的疾病或疾患,补体旁路的一种或多种组分或补体旁路产生的产物直接或间接介导的疾病或疾患。该术语也指因补体旁路一种或多种组分或补体旁路产生的产物而恶化的疾病或疾患。

[0085] 术语“敲除”指去除靶动物中特定基因的技术。此技术常用于啮齿动物,通过空载体与动物的天然染色体同源重组去除动物感兴趣的基因。通过使动物含该基因的染色体与含标记序列或随机 DNA 序列的空载体交换实施此技术。此法将导致动物缺失感兴趣的基因。本发明利用此技术来产生针对从动物基因组中去除的抗原的抗体,以增加抗体的产生。

[0086] 应理解本文所用的术语只是为了描述具体实施方式,不意味限制本发明,因为本发明的范围只受权利要求书的限制。

[0087] 当提供数值的范围时,除非文中另有说明,应理解所述范围上限与下限之间、以下限单位的十分之一为间隔的各个中间值,以及所述范围的任何其它标称或间插数值均包括在本发明范围内。所述较小范围内可独立地包含这些较小范围的上下限,它们也属于本发明范围,除非明确地排除所述范围的上下限。当所述范围包含一个或两个限值时,排除这一个或两个限值以外的范围也包括在本发明范围内。

[0088] 本发明是关于抑制哺乳动物补体旁路活化,抑制补体旁路活化产物的不良作用,和 / 或治疗疾病相关或病理状态介导的补体旁路活化的方法。所述方法包括给予哺乳动物抗因子 Bb 试剂,所述试剂能够在疾病病理是补体介导的情况下抑制 C3b/PC3b 结合 Bb 的功能,通过阻断 PC3Bb 的蛋白水解活性抑制其功能,抑制因子 B 对因子 D 的切割,抑制 C3a、C3b、C5a、C5b-9 和 sC5b-9 的形成,抑制 C3bBb 和 PC3bBb 的形成,抑制 Ba 的形成,抑制 Bb 的形成,抑制备解素诱导的 C3b 寡聚化,抑制临床病症中中性粒细胞、单核细胞和血小板的活化。

[0089] 因子 B 是一种 90kDa 的蛋白质,具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。因子 B 有三个结构域(图 3):三模块补体调控蛋白(CCP1、CCP2 和 CCP3),一个血管假性血友病(von Willebrand)因子 A 结构域(例如 SEQ ID NO :5)以及采取无活性(酶原)构象的 C-末端

丝氨酸蛋白酶 (SP) 结构域 (例如 SEQ ID NO :6)。因子 B 与表面结合的 C3b 之间的相互作用可触发因子 B 构象改变,最终产生补体旁路的“C3 转化酶 (PC3bBb)”。补体旁路 (AP) 活化的关键在于镁离子增强因子 B 与 C3b 之间的相互作用。一旦结合,使因子 B 易受因子 D 的蛋白酶水解切割形成 Ba (30kDa) (例如 SEQ ID NO :2) 和 Bb (60kDa) (例如 SEQ ID NO :3) 片段。Bb 与 C3b 缔合形成 AP C3 转化酶。此复合物具有丝氨酸蛋白酶活性和切割天然 C3 成为 C3a 和 C3b 的功能。

[0090] 因子 B 的活化通过以下装配过程:先结合表面结合的 C3b 然后被因子 D 切割形成片段 Ba (残基 26-234 ;SEQ ID NO :2) 和 Bb (残基 235-739 ;SEQ IDNO :3)。片段 Ba 从复合物中分离出来后留下旁路 C3 转化酶复合物 C3b-Bb,它可切割 C3 形成 C3a 和 C3b。此蛋白酶复合物先天不稳定。Bb 一旦从复合物中分离出来就不能与 C3b 再聚合。酶原因子 B 包含三个 N-末端补体调控蛋白 (CCP :1、2 和 3) 结构域,通过一条 45 个残基的接头 (SEQ ID NO :4) 连接于 VWA 结构域以及 C-末端丝氨酸蛋白酶 (SP) 结构域,C-末端丝氨酸蛋白酶 (SP) 结构域含有三联催化中心 (ASP-HIS-SER)。VWA 和 SP 结构域形成片段 Bb,而 CCP1 到 CCP3 和接头形成 Ba。因子 B 与 C3b 的结合依赖于片段 Ba 中的元件和片段 Bb 的 VWA 结构域中 Mg²⁺ 金属离子依赖的附着位点 (MIDAS) 基序。

[0091] 在完整的因子 B 和 Bb 中,丝氨酸蛋白酶结构域是暴露的,小分子底物可自由接近该催化位点。这两种结构在 VWA-SP 区的取向上明显差异。在活化状态时,Bb 被切断进一步暴露出的催化位点具有完全功能,能将 C3 分子进一步切割形成 C3a 和 C3b。用抗因子 Bb 试剂抑制 Bb 的活性可防止形成 C3a 和 C3b。

[0092] 本发明的一方面,所述抗因子 Bb 试剂可包括针对因子 B 的 Bb 结构域或能特异性结合该结构域的抗因子 Bb 抗体。本发明的抗因子 Bb 抗体能结合 Bb 片段而不结合 Ba 片段,因此不抑制因子 B 结合 C3b ;能抑制 C3b 产生,抑制 C3a、C5a 和 C5b-9 形成,抑制兔红细胞裂解。图 4A 说明了抗因子 Bb 抗体作用的机制。图 4A 显示抗因子 Bb 抗体抑制补体旁路是通过结合天然因子 B 中的 Bb 结构域而阻断因子 D 的切割,结合丝氨酸蛋白酶结构中的三联体催化位点防止其切割 C3 因此制止了 C3b 的产生,或者结合三联催化位点锁定其构象使其不能切割因子 B。相反,如图 4B 说明,现有技术的抗 -Ba 抗体不结合 Bb 片段只参与因子 B 与 C3b 的结合。而本发明的抗因子 Bb 抗体不抑制因子 B 与 C3b 的结合。

[0093] 本发明的抗因子 Bb 抗体也能抑制 C3b 寡聚化。天然 C3 的分子量为 190kDa,被转化酶切割后,C3 转化形成 C3a (10kDa) 和 C3b (180kDa)。C3b 分子对寡聚备解素有高亲和力,结果形成含 3 个 C3b 分子附着于备解素三聚体的复合物。本发明的抗因子 Bb 单克隆抗体能防止形成更多的 C3b 分子,因此所产生的复合物中不会形成 C3b 寡聚体。如果 C3b 形成被完全阻止,备解素将单独漂浮而无 C3b 附着。备解素不结合 C3 或 C3b 亚型。

[0094] 另一方面,本发明的抗因子 Bb 抗体能结合丝氨酸蛋白酶结构域,具体是 Bb 区丝氨酸蛋白酶的催化三联体。一旦结合丝氨酸蛋白酶结构域该抗因子 Bb 抗体的作用机制可见图 5。丝氨酸蛋白酶结构域是完整因子 B 的第三个和最后一个结构域。丝氨酸蛋白酶结构域携带的催化位点只负责切割 C3。虽然该催化位点在因子 B 和 Bb 片段中是暴露的,但只是在被因子 D 切去 Ba 后才能激活。

[0095] 本发明的抗因子 Bb 抗体可结合所述催化三联体,通过原位锁定其无活性构象,或结合因子 D 切割因子 B 的区域而防止其活化。本发明能特异性识别所述催化三联体的抗因

子 Bb 抗体的开发是一项令人惊奇的发现,因为已发现的高度靶向特异性蛋白酶的抑制性抗体数目有限。该抗因子 Bb 抗体的高度靶向特异性在于,它只与人因子 B 起交叉反应,不与大鼠、兔、豚鼠、狗、狒狒、猕猴和食蟹猴的起交叉反应。这些发现特别重要,提示该抗因子 Bb 抗体是一种高度靶向特异性的抗体。对于这类抗体,不需要将动物实验数据移送给临床进行安全有效评价。

[0096] 本发明另一方面,所述抗因子 Bb 抗体可以特异性抑制补体旁路而不抑制经典通路,而后者通常是宿主抗感染防御所需要的。此抗因子 Bb 抗体也能抑制 C3a、C5a 和 C5b-9 及细胞活化。C3a 和 C5a 都是 AP 活化时产生的强效过敏毒素。不管 AP 活化的触发剂 / 引发剂是什么,如果 C3a、C5a 和 C5b-9 形成的量超过可控水平,就会发生细胞系统损害。中性粒细胞载有 C5a 受体,因而能对阻止 C5a 产生的化合物,或中和 C5a 的抗体,或阻止受体被 C5a 攻击的受体拮抗剂起反应。类似地,血小板有 C3a 受体,因此能阻止 / 中和 C3a 活化的制剂应能防止血小板活化。单核细胞有 C3a 受体,活化时释放“TNF”和“IL-1”,此二因子参与炎症疾病如关节炎。业已确定,例如中性粒细胞的弹性蛋白酶、TNF 和 IL-1 等分泌组分是炎症的标志。除了激活的中性粒细胞外,还有单核细胞、血小板与形成的白细胞-血小板偶联物一起组成了炎症反应的系统。在许多疾病中所有这些细胞类型都是已知的。

[0097] 本发明的抗因子 Bb 抗体可包括鼠人抗因子 Bb 单克隆抗体和含该抗体的组合物。可用能产生抗体的杂交瘤来生产此抗体。本领域技术人员知道可产生抗因子 Bb 抗体的嵌合型、去免疫原型、单链、截短的、完全人的和人源化的版本。人的 / 人源化 / 嵌合的抗因子 Bb 抗体可避免啮齿动物抗体有关的问题,即在人体中产生有害副作用,如超敏反应,包括荨麻疹、呼吸困难、低血压、过敏反应等等。

[0098] 分离能特异性结合 Bb 区的本发明抗因子 Bb 抗体的一个实例见本文实施例。本发明应用的实施例公开了鉴定为 NM001 的抗因子 Bb 抗体,由保存在 ATCC 的登录号 PTA-8543An 的杂交瘤细胞系 1D3 所产生。NM001 及其 F(ab)₂ 片段(拜卡西奥单抗)令人惊奇地只结合因子 B 分子的 Bb 区而不与肽 Ba 反应。如实施例中所示, NM001 及其 F(ab)₂ 片段不与大鼠、小鼠、兔、狗、狒狒血清交叉反应。然而 NM001 和 F(ab)₂ 片段排他性地与食蟹猴和人血清交叉反应,使之对人有高度特异性。发现 NM001 和 F(ab)₂ 片段能抑制 C3b 产生,抑制 C3a 产生,抑制 C5a 产生,抑制 C5b-9 产生,抑制 sC5b-9 产生,抑制 TNF 产生,抑制弹性蛋白酶产生,抑制中性粒细胞活化,抑制单核细胞活化和抑制血小板活化。

[0099] 本发明另一方面涉及能结合 Bb 上与 NM001 结合的相同表位的抗体。根据在标准的 Bb 结合试验中能否与 NM001 单抗交叉竞争可鉴定这类抗体。测试抗体若能抑制 NM001 与 Bb 的结合,表明该测试抗体能与 NM001 竞争结合 Bb,因而其结合 Bb 上的表位与 NM001 相同。本发明一方面,所述能结合 Bb 上与 NM001 结合的相同表位的抗体是人单克隆抗体。

[0100] 还有一方面,本发明的抗因子 Bb 抗体的重链和轻链可变区所含的氨基酸序列与本文所述优选抗体的氨基酸序列同源,同时保留了本发明的抗因子 Bb 抗体所需的功能特性。例如,本发明提供分离的单克隆抗体,或其包括重链可变区和轻链可变区的抗原结合部分,其中:(a) 重链可变区包含的氨基酸序列至少与 NM001 的重链氨基酸序列 80% 同源 (b) 轻链可变区包含的氨基酸序列至少与 NM001 的轻链氨基酸序列 80% 同源;和 (c) 该抗体能特异结合因子 B 的 Bb 区。

[0101] 在各种方面,所述抗体可以是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在其它方面,VH 和

/或 VL 氨基酸序列与上述序列的同源性为 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%。通过诱变（如定点或 PCR 介导的诱变）NM001 单抗的重链和轻链的核酸分子可获得 VH 和 VL 区的序列与上述序列的 VH 和 VL 区高度同源（即等于或大于 80%）的抗体，然后采用本文所述的功能试验检测该编码改变的抗体是否保留了功能（即以上 (c) 和 (d) 所述的功能）。

[0102] 本文采用的二条氨基酸序列之间的同源性百分比与二条序列之间相同性百分比等价。二条序列之间相同性百分比是考虑到二条序列最佳排列对比时需要引入的空格数和每个空格的长度后，二条序列所含相同位置数目的函数（即： $\% \text{同源性} = \text{相同位置数} / \text{总位置数} \times 100$ ）。可采用数学算法，如下文非限制性实施例所述的算法，进行二条序列之间的比较确定相同性百分比。

[0103] 在某些方面，本发明的抗体包含的重链可变区含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，轻链可变区含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列，在本文所述的优选抗体（如 NM001）或其保守性序列修饰中的这些 CDR 序列的一个或多个含有特定的氨基酸序列。本文所用术语“保守性序列修饰”意指不会显著影响或改变含该氨基酸序列的抗体结合特性的氨基酸修饰。这种保守性修饰包氨基酸取代、添加和缺失。可利用本领域已知的标准技术，例如定点诱变或 PCR 介导的诱变，将修饰引入本发明抗体中。保守性氨基酸取代是用含相似侧链的氨基酸残基取代所述氨基酸残基。本领域已明确了含有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括：含碱性侧链（如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），酸性侧链（如天冬氨酸、谷氨酸），不带电极性侧链（如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸），无极性侧链（如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）， β -分枝侧链（如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳族侧链（如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸家族。因此，本发明抗体的 CDR 区中一个或多个氨基酸残基可用同一侧链家族的其它氨基酸取代，并用本文所述的功能试验（即以上 (c)-(j) 所述的功能试验）检测改变的抗体。

[0104] 也可利用含有本文所述一个或多个 VH 和 / 或 VL 序列的抗体作为原料制备本发明的抗体，经工程改造成为修饰的抗体，该修饰的抗体可具有与原始抗体不同的改变了的特性。可修饰一个或二个可变区（即 VH 和 VL）中，例如一个或几个 CDR 区和 / 或一个或多个框架区内的一个或多个残基，工程改造抗体。此外或可选地，可修饰恒定区的残基工程改造抗体，例如改变抗体的效应器功能。

[0105] 可施行工程改造的一类可变区是 CDR 移植区。抗体与靶抗原反应主要通过位于 6 个重链和轻链互补决定簇区（CDR）中的氨基酸残基。为此，各个抗体之间 CDR 中的氨基酸序列比 CDR 以外的序列多样性更高。因为 CDR 序列负责大多数的抗体-抗原相互作用，有可能通过构建包含特异性天然抗体的 CDR 序列移植到具有不同特性的不同抗体框架序列上的表达载体，表达的重组抗体可模拟该特异性天然抗体的特性。因此，这种含 NM001 的 VH 和 VL CDR 序列的抗体可含有不同于这些抗体的框架序列。

[0106] 另一种类型的可变区修饰是突变 VH 和 / 或 VK CDR1，CDR2 和 / 或 CDR3 区中的氨基酸残基，从而改进本发明抗体的一种或多种结合特性（如亲和力）。可施行定点诱变或 PCR-介导的诱变引入突变或影响抗体结合特性，或可用本文所述和实施例提供的体外或体内试验评价其它感兴趣的功能特性。可引入保守性（如上所述）修饰。突变可以是氨基酸取代、添加或缺失，但优选取代。而且，通常可改变 CDR 区中不超过一个、二个、三个、四个或五个残基。

[0107] 可用本领域熟知的标准方法制备抗 - 因子 B 单克隆抗体。例如,可用从人血浆或尿液纯化的因子 B 或因子 Bb,或用真核或原核系统表达的重组因子 B 或其片段免疫啮齿动物(如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)。通过选择不结合 Ba 的那些抗体鉴定因子 B 的特异性抗体。本发明产生的抗体不结合该蛋白的 Ba 区。免疫也可采用其它动物,如非人灵长类动物,表达人免疫球蛋白的转基因小鼠,和移植了人 B- 淋巴细胞的严重联合型免疫缺陷小鼠。可采用本领域熟知的常规技术,使免疫动物的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞(如 Sp2/0 和 NS0)融合,制备杂交瘤。此外,可通过在噬菌体展示系统中筛选人 B 细胞的重组单链 F_v 或 F_{ab} 库制备抗因子 B 抗体。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗人因子 Bb 单克隆抗体的特异性。

[0108] 该抗体分子有四条链。各链氨基末端部分包含负责识别抗原的 100-110 个氨基酸的可变区。各链羧基末端部分限定的恒定区主要负责效应器功能。因此,一个完整的抗体有二个结合位点。除了双功能或双特异性抗体外,这二个结合位点相同。双功能或双特异性抗体是人造的杂交抗体,含有二个不同的重 / 轻链对和二个不同的结合位点。可用各种方法,包括杂交瘤融合或 Fab' 片段连接来产生双特异性抗体。与制备常规抗体相比,制备双特异性抗体是相对费力的强劳动,双特异性抗体的产量、纯度一般较低。双特异性抗体不存在含一个结合位点的片段形式(如 Fab, Fab' 和 Fv)。

[0109] 可制备人抗体以避免含小鼠或大鼠可变区和 / 或恒定区抗体相关的某些问题。这种策略的重要具体实施是“人源化”小鼠的体液免疫系统。将人免疫球蛋白(Ig)基因座引入内源 IgG 基因已被灭活的小鼠,而得以有机会研究抗体的程序表达和装配机制及其在 B- 细胞发育中的作用。此外,这种方法可提供产生完全的人单克隆抗体(MoAb)的理想来源,成为向实现人类疾病抗体治疗前进的重要里程碑。预计完全的人抗体所引起的免疫原性应答和过敏反应(这是小鼠抗体或小鼠产生的 MoAb 固有的)可降至最小,从而提高了所给予抗体的效果和安全性。预计使用完全的人抗体可为治疗需要反复给予抗体的慢性和复发性人类疾病,例如炎症、自身免疫病和癌症提供重大效益。

[0110] 达到此目的的一种方法是用人 IgG 基因座大片段工程改造鼠抗体产生有缺陷的小鼠品系,预计这种小鼠将产生大量人抗体但缺乏鼠抗体。人 IgG 大片段将保存大量可变基因多样性以及能适当调控抗体的产生和表达。通过探索用于抗体多样性和选择的小鼠机器以及对人蛋白质免疫耐受的缺乏,在这些品系小鼠中复制人抗体库应能产生针对感兴趣抗原(包括人抗原)的高亲力的抗体。采用杂交瘤技术,不难制备和选出具有所需特异性的抗原特异性人 MoAb。

[0111] 人抗小鼠抗体(HAMA)应答反应:虽然嵌合抗体含有人恒定区和鼠可变区,但预计将观察到某些人抗 - 嵌合抗体(HACA)应答反应,特别在长期或多剂量使用抗体时。因此,需要提供抗 Bb 的完全人抗体以消除引起 HAMA 或 HACA 应答反应的忧虑和 / 或影响。

[0112] 人源化和展示技术

[0113] 如上所述结合人抗体的制备,优选制备免疫原性降低的抗体。一定程度地说,可结合人源化和展示技术利用合适的抗体库实现此目的。应明白可采用本领域熟知的技术,人源化或灵长动物化鼠抗体或其它动物的抗体。

[0114] 可通过,例如用蛋白酶或化学方法切割完整抗体蛋白来产生抗体片段,如 F_v、F(ab')₂ 和 Fab 片段。或者,可设计截短的基因。例如,编码 F(ab')₂ 片段部分的嵌合基因应包括编码 CH1 区和轻链绞链区,然后是翻译终止密码子的 DNA 序列来产生这种截短分

子。

[0115] 此外,可用本领域熟知的技术,通过展示技术,包括但不限于:噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其它技术制备人抗体或其它动物抗体,使得到的抗体进一步成熟,如亲和力成熟,这类技术是本领域熟知的。

[0116] 抗体治疗的其它规范

[0117] 就本文所述,看来所述抗因子 B 抗体的功能至少对于其操作模式部分而言至关重要。就功能而言,例如我们的抗因子 B 抗体抑制补体旁路的活性,例如,所述抗体显示具有以下一种或多种特性:(a) 抑制 C3b/PC3b 结合 Bb 的功能;(b) 阻断 PC3bBb 蛋白水解活性而抑制其功能;(c) 抑制因子 B 切割因子 D;(d) 抑制 C3a、C3b、C5a、C5b-9 和 sC5b-9 形成;(e) 抑制 C3bBb 和 PC3bBb 形成;(f) 抑制 Ba 形成;(g) 抑制 Bb 形成;(h) 抑制备解素诱导 C3b 寡聚化,和 (i) 抑制中性粒细胞、单核细胞和血小板活化。

[0118] 其它疗法的设计和产生

[0119] 可利用本发明的抗因子 B 抗体设计除抗体部分外的其它治疗形式。这类形式包括但不限于:高级抗体治疗法,如双特异性抗体、免疫毒素和放射标记治疗,肽治疗,基因治疗,尤其是细胞内抗体治疗,反义核酸治疗和小分子药物治疗。例如产生采用双特异性抗体、免疫毒素或放射标记的高级抗体治疗,其中补体固定是一种理想的属性,可能避免了细胞杀伤对补体的依赖。

[0120] 可制备双特异性抗体,其包括 (i) 偶联在一起的二种抗体,一种对 Bb 特异,另一种对第二分子特异, (ii) 一种抗体,其一条链对 Bb 特异,另一条链对第二分子特异,或 (iii) 对 Bb 和另一分子特异的单链抗体。对于 (i) 和 (ii) 以及对于 (iii),这类双特异性抗体可用本领域熟知的技术制备。

[0121] 对于治疗肽的产生,可通过利用与 Bb 及其抗体,例如本发明的抗体(见下文对于小分子的结构信息,或筛选肽库来制备针对 Bb 的治疗肽。

[0122] 假定 Bb 分子(或例如其剪接变体形式或交替形式)在疾病过程中有功能活性,也可通过常规技术设计基因疗法和反义疗法。可利用这种形式来调节 Bb 的功能。

[0123] 治疗给药和制剂

[0124] 应能理解,本发明的治疗性抗因子 B 抗体的给药可将合适的载体、赋形剂和其它药物掺入制剂中,以改善运输、递送、耐受等。这些制剂包括例如粉剂、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡制剂、油脂、含脂质(阳离子或阴离子)囊泡(如脂转染剂)、DNA 偶联物、无水吸收糊剂、水包油或油包水乳剂、聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)乳剂、半固体凝胶和含聚乙二醇的半固体混合物。如果制剂中的活性成分不因配制而失活及制剂与给药途径生理相容并耐受,任何上述混合物均适合本发明的治疗和疗法。

[0125] 治疗应用

[0126] 可用抗因子 B 抗体治疗 AP 参与发病病理的疾病。也可用抗因子 B 抗体直接治疗许多免疫疾病,例如过敏性休克、类风湿关节炎等,或治疗由原发性临床疾病导致的继发病,如心肺分流术炎症、烧伤等。抗因子 B 抗体可治疗的疾病包括但不限于:心肌梗塞、缺血/重灌注损伤、血管狭窄或血管成形术后狭窄、中风、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、败血症、烧伤、心肺分流术炎症、体外循环如血液透析、血浆置换、血小板分离置换、白细胞清除术、体外膜式人工氧合术(ECMO)、或肝素诱导的体外 LDL 沉淀(HELP)、对采用放射照相对比

剂的过敏反应、移植物排斥、与补体激活密切相关的其它炎症疾病和自身免疫 / 免疫复合物病,如多发性硬化症、重症肌无力、胰腺炎、类风湿关节炎、阿尔茨海默病、哮喘、自发性流产、疼痛、神经原和神经索损伤、烫伤、过敏性休克、肠炎、荨麻疹、血管性水肿、脉管炎、干燥综合征、红斑狼疮、膜性肾炎和脚癣。

[0127] 治疗方法

[0128] 治疗方法通常包括给予需要的哺乳动物对象有效量的所述抗体(即抗因子 B 抗体)。所述抗体的“有效量”是能有效减少补体旁路激活后所产生多肽的量和 / 或水平至少约 20%,至少约 30%,至少约 40%,至少约 50%,至少约 60%,至少约 70%,至少约 80%,至少约 90%或更多的量。

[0129] 给予个体的所述抗体制剂含有药学上可接受的赋形剂。本领域知道各种各样的药学上可接受的赋形剂,本文无需详述。

[0130] 公众不难获得药学上可接受的赋形剂,例如运载体、辅佐剂、载体或稀释剂。而且公众不难获得药学上可接受的辅助物质,如 pH 调节剂、缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等等。

[0131] 在所述方法中,可以任何方便的能导致所需治疗效果的方式给予宿主所述抗体。因此,可将抗体掺入治疗给药的各种制剂中。更具体地说,可将所述抗体与合适的药学上可接受的载体或稀释剂混合配制成药物组合物,可配制成固体、半固体、液体、气体剂型,例如片剂、胶囊、粉末剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂和气溶胶。

[0132] 因此,可经各种途径给予所述抗体,包括口服、含服、经直肠、胃肠外、腹膜内、皮内、皮下、肌肉内、透皮、经鼻、经肺支气管等等给药。

[0133] 就药物剂型而言,给予的药物是其药学上可接受的盐的形式,或它们可单独应用,或与其它药学活性化合物联用。以下方法和赋形剂只是示范性的,而不是限制本发明。

[0134] 可用水性或非水性溶剂,如植物油或其它类似的油、合成的脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇,以及如果需要,与常规添加剂如促溶剂,等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂,溶解、悬浮或乳化所述抗体将其配制成可注射制品。

[0135] 在无菌水溶液、生理盐水或其他药学上可接受的载体形式的组合物中,供注射或静脉内给药的单位剂型可包含抑制剂。

[0136] 术语“单位剂型”本文用于指适合人和动物对象一次剂量的物理上分开的单位,每个单位含有经计算确定足以产生所需效果用量的所述抗体与药学上可接受的稀释剂、载体或运载体。

[0137] 按一定频率和持续时间给予个体所述抗体以实现所需的治疗效果。例如,每月一次、每月二次、每月三次、每隔一周(qow)、每周一次(qw)、每周二次(biw)、每周三次(tiw)、每个、周四次、每周五次、每周六次、每隔一天(qod)、每天(qd)、一天二次(qid)或三次(tid),或基本上连续地,或连续地给予所述抗体;给药的时间从约一天到约一周、约二周到四周、约一个月到二个月、给二个月到四 2 个月、约四 2 个月到六个月或更长。

[0138] 联合治疗

[0139] 在某些实施方式中,给予有效量的抗因子 B 抗体与第二种治疗药物进行联合治疗。第二种药物的例子包括但不限于:消炎药、用于治疗心血管疾病的药物、甾体消炎药等等。

[0140] 消炎药的例子包括但不限于：非甾体消炎药 (NSAID)、扑热息痛、水杨酸盐、乙酰水杨酸 (阿斯匹林、二氟尼酸)、异布洛芬、布洛芬、萘普生、非诺洛芬钙、三水杨酸胆碱镁、吲哚美辛、葡美辛、醋炎痛、舒林酸、甲氧萘丙酸、吡罗昔康、双氯芬酸、苯恶丙酸、酮基布洛芬、恶丙嗪、依托度酸、酮咯酸氨丁三醇、痛力克、萘普酮等，及上述药物二种或多种的混合物。其它合适的消炎药包括甲氨喋呤。

[0141] 甾体消炎药的例子包括但不限于：氢化可的松、泼尼松、强的松龙、甲基氢化泼尼松、地塞米松、倍他米松和去炎松。

[0142] 心血管适应症的药物包括 GP IIb-IIIa 抑制剂，例如 INTEGRILIN (抗血栓药依替巴肽)、抑酞酶、REOPRO (阿昔单抗) 等等。

[0143] 其它二线治疗药物包括 β -肾上腺能药物，包括支气管扩张剂沙丁胺醇、硫酸异丙肾上腺素、硫酸间羟异丙肾上腺素、硫酸叔丁喘宁、醋酸比布特罗和沙美特罗福莫特罗；类固醇包括倍氯米松、倍氯米松双丙酸酯、氟尼缩松、氟地松、布地奈德和曲安缩松。

[0144] 与呼吸道疾病治疗联用的消炎药包括：类固醇，例如倍氯米松双丙酸酯、去炎松奈德缩酮、氟尼缩松和氟地松。消炎药的其它例子包括色甘酸盐如色甘酸钠。合格的可作为支气管扩张剂的其它呼吸道药物包括抗副交感神经剂异丙阿托品。抗组织胺类药物包括但不限于：可他敏、氯苯吡醇胺、克立马丁、茶苯海明、美吡拉敏、曲吡那敏、氯苯那敏、溴苯吡胺、安他乐、赛克利嗪、氯苯甲嗪、氯环嗪、普鲁本近、多西拉敏、氯雷他定和特非那定。具体的抗组胺药包括：氮卓斯汀 (rhinolast) (氮卓斯汀喷雾剂)、claratyne (克敏能)、claratyne D (克敏能 D)、telfast (非索非那定 (Allegra))、仙特明和伯克纳。

[0145] 在某些实施方式中，可与第二种治疗药物并行给予抗因子 B 抗体。本文所用术语“并行”表示所述抗体与第二种药物分开给药，彼此给药分开的时间在约 5-15 秒内、在约 15-30 秒内、在约 30-60 秒内、在约 1-5 分钟内、在约 5-15 分钟内、在约 15-30 分钟内、在约 30-60 分钟内、在约 1-2 小时内、在约 2-6 小时内、在约 6-12 小时内、在约 12-24 小时内、在约 24-48 小时内。

[0146] 在某些实施方式中，在整个治疗期间给予抗因子 B 抗体与第二种药物。在其它实施方式中，给予所述抗体的时间与用第二种药物治疗相重叠，例如所述抗体治疗可开始于用第二种药物治疗开始之前和结束于用第二种药物治疗结束之前；所述抗体治疗可开始于用第二种药物治疗开始之后和结束于用第二种药物治疗结束之后；所述抗体治疗可开始于用第二种药物治疗之后和结束于用第二种药物治疗结束之前；或抗体治疗可开始于用第二种药物治疗开始之前和结束于用第二种药物治疗结束之后。

[0147] 治疗对象

[0148] 可用抗因子 B 抗体和本发明联合疗法治疗的对象包括患以下一种或多种疾病的个体：动脉粥样硬化、急性心肌梗塞缺血后重灌输、过敏性紫癜肾炎、免疫复合物血管炎、类风湿关节炎、动脉炎、动脉瘤、中风、心肌病、出血性休克、挤压伤、多器官衰竭症、低血容量休克和肠缺血、移植排斥、心脏手术、PTCA (经皮冠状动脉成型术)、自发性流产、神经原损伤、脊髓损伤、重症肌无力、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症、多发性硬化症、急性感染性多神经炎、帕金森病、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综合征、哮喘、慢性阻塞性肺病、输液相关性肺损伤、急性肺损伤、古德帕斯彻病、心肌梗塞、心肺分流术后炎症、心肺分流术、败血性休克、移植物排斥、活体外移植、烧伤、全身性红斑狼疮、膜性肾炎、贝惹病、牛皮癣、类天疱

疮、皮炎、抗磷脂综合征、炎性肠病、血液透析、白细胞清除术、血浆置换术、肝素诱导的体外膜式人工氧合 LDL 沉淀术、体外膜式人工氧合术和黄斑变性。

[0149] 在本发明的一具体方面,可用所述方法治疗的对象包括患以下一种或多种疾病的个体:心肺分流术后炎症、心肌梗塞、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、败血性休克、移植排斥、烧伤、多发性硬化症、重症肌无力、心血管病和类风湿关节炎。可用本方法治疗的合适对象也包括患炎症疾病,包括但不限于全身性红斑狼疮、膜性肾炎、类天疱疮、皮炎和抗磷脂综合征的对象。合适的治疗对象还包括肾透析对象。

[0150] 纳入本文的参考文献

[0151] 本文引用的所有参考文献包括专利、专利申请、论文、教课书等,本文引用它们的内容作为参考纳入本文。此外,下文中也引用了参考文献的内容,包括这些文献中所引用的参考文献的内容。

[0152] 相等文件

[0153] 本发明的以上说明和实施例详述的优选实施方式描述了本发明所认为的最佳方式。然而,应明白上文叙述无论如何详细,实施本发明也可有许多方法,本发明的解释应按照附件权利要求书和其相等文件为准。

实施例

[0154] 提供以下实施例是为了说明本发明的优选实施方式和用途,不意味着限制本发明,除非在附件权利要求书中另有说明。以下描述应视作非限制说明,因为通过阅读它们本领域技术人员知道可作出许多变化。所有这些变化应包括在本发明权利要求书的范围和构思内。可对本文所述的本发明方法的组分、操作和安排作出变化但这不背离权利要求书规定的本发明的思路和范围。

[0155] 除非另有说明,所有的试剂都是超纯级。所有的补体试剂购自德州泰拉补体技术公司(Complementech, Tylar Texas)或加州圣地哥的库德尔公司。经典通路用的GVB、磷酸盐缓冲液购自密苏里州圣路易斯的西格玛-阿德瑞公司(Sigma-Aldrich, St Louise MO),补体旁路用的GVB购自德州泰拉补体技术公司,所有的流式细胞术抗体购自加州圣何塞的BD生物科学公司(BDBiosciences, San Jose, CA),TMB底物购自马里兰州盖茨堡的肯卡帕瑞有限公司(Kirkegaard&Perry Limited, Gaithersberg, MD),rRBC和抗体致敏的绵羊红细胞购自德州泰拉补体技术公司,所有第二抗体购自加州圣克利门蒂的美国库莱克斯公司(American Qualex, San Clemente, CA);BSA和其它试剂均购自西格玛-阿德瑞公司。正常人血清用BD生物科学公司的凝固试管新鲜分离。

[0156] ELISA平板读数仪(SpectraMax 190和250)购自分子装置公司(MolecularDevices),流式细胞计数仪是FACSCalibur。用各种3D程序作数据分析。用MicroCal源程序进行曲线拟合,用分子装置公司的SectraMax仪进行溶血动力学试验,ELISA平板购自马萨诸塞州罗尼尔的康宁-柯斯塔公司(CorningCostar, Lowell, MA)。

[0157] 本领域技术人员已证实,补体的体外研究可代表和预见补体系统的体内状况。例如,所用检测因子B与脂多糖(LPS)关系的体外ELISA(酶联免疫吸附试验)方法是一种“评估补体功能,特别是检测补体缺陷状态”的简单快速方法。因此,将此体外技术用于体内同样可能成功地检测疾病状态中补体旁路有无激活。另外,用于衡量补体旁路激活的标准免

红细胞溶血试验本领域已公认是“人补体旁路激活的最方便试验”。

[0158] 实施例 1

[0159] C3 转化酶的装配：因子 B, C3b 与备解素的相互作用

[0160] 已知因子 B 能结合 C3b。也已知备解素结合 C3b, C3 转化酶 (PC3bBb) 在备解素存在时稳定。曾争论过是备解素先结合还是在 C3bBb 转化酶已形成后才结合。已知, 如果 AP 不激活, C3b 在因子 H 和 I 作用下即开始降解成为 iC3b、C3c 和 C3dg。C3b 转化形成较小片段表明 C3b 的降解途径。假定在给定系统中给定时间内, 可能存在某些降解的 C3b 组分。我们评价了 B 结合 C3b 和 PC3b 的亲合力是否有所不同。我们也评价了在存在和缺乏备解素时因子 B 与 iC3b、C3c 和 C3dg 的结合。

[0161] 用 ELISA 结合试验评价因子 B 结合 C3b 和 PC3b

[0162] 在第一次实验中 (图 6), 用 C3b (1 μ g/50 μ l 每孔) 包被板孔过夜。用含 1% BSA 的 PBS 封闭板孔。吸弃蛋白液后洗涤孔, 在存在或缺乏备解素 (5nM 终浓度) 时与因子 B 一起增殖。室温培育 2 小时后, 洗涤孔并用库德公司的用封闭缓冲液 1 : 2000 稀释的抗备解素 #2 抗体培育。1 小时后, 用 PBS 清洗板并用用封闭缓冲液 1 : 2000 稀释的 HRP0 偶联山羊抗 - 小鼠单克隆抗体培育。再经 1 小时培育后, 用 PBS 清洗孔, 以标准程序用 TMB 底物显色。如图 6 所示, 备解素结合 C3b 时 B 与 C3b 的结合亲和力较高。我们希望确定备解素是否结合因子 B。如图 6 所示, 因子 B 高亲和力地结合备解素结合的 C3b。

[0163] 因子 B 结合备解素

[0164] 用因子 B (2 μ g/50 μ l/ 每孔) 包被 ELISA 板孔培育过夜。室温用含 1% BSA 的 PBS 封闭板孔 2 小时。ELISA 板孔与不同浓度的备解素培育。培育平板 2 小时后如上所述检测备解素。如图所示, 显示备解素不结合因子 B (图 7)。

[0165] 因子 B 结合 C3b 的亚型 iC3b、C3c 和 C3dg

[0166] 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 配的人 iC3b、C3c 或 C3dg (1.0 μ g/50 μ l/ 每孔) 包被聚苯乙烯微量滴定板, 4 $^{\circ}$ C 培育过夜。封闭后用标准方法洗涤, 加入等量用 AP 缓冲液配的不同浓度的因子 B, 培育平板 2 小时。加入用封闭缓冲液配的 1 : 2000 稀释的检测抗体 (加州圣地亚哥库德公司 (Quidel, San Diego, CA) 抗人因子 B 抗体, 测定因子 B 结合各种 C3 亚型。室温培育平板 1 小时。用 PBS 洗涤平板后加入过氧化物酶偶联山羊抗小鼠抗体 (用封闭缓冲液 1 : 2000 稀释), 培育 1 小时。用 PBS 充分淋洗板孔后加入 100 微升 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物液。25 $^{\circ}$ C 培育 30 分钟后加入 100 微升磷酸淬灭 TMB 反应, 在微滴板读数仪上读取 450nm 值。另一实验评价存在备解素的作用, 在包被 C3b 亚型的平板上培育用封闭缓冲液配的 5nM 备解素等分试样 1 小时。用 PBS 洗涤 5 次后, 加入不同浓度的因子 B, 如上所述进行该试验的其余步骤。图 8 显示除 C3b 蛋白外, 因子 B 不结合任何 C3b 亚型。

[0167] 实施例 2

[0168] 筛选抗因子 Bb 单克隆抗体

[0169] 给 6 只小鼠注射因子 B 抗原。取小鼠血清评价因子 B 结合, 见图 9。稀释含小鼠血清的所有血清后与因子 B 包被板培育。用过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG 检测结合的抗因子 Bb 单克隆抗体。数据用 MicroCal 源程序作图。在一典型试验中, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 配的人因子 B (加州圣地亚哥的补体技术公司 (Complement Technologies, San Diego, CA)

(2 μg/50 μl/ 每孔) 包被聚苯乙烯微滴板过夜。吸弃因子 B 液后用含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) (密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo), 货号 A7888) 的 PBS 室温封闭板孔 2 小时。无因子 B 包被孔作为本底对照。将封闭缓冲液以不同稀释度配的等份杂交瘤培养上清液加入因子 B 包被孔, 静置平板 1 小时让单克隆抗体结合基材结合的因子 B。用 PBS 淋洗平板后加入用封闭缓冲液配的 1 : 2000 稀释的小鼠抗人因子 B 单克隆抗体 (检测抗体) (加州圣地亚哥的库德尔公司, 抗人因子 B 单克隆抗体), 室温培育 1 小时, 检测结合因子 B 的单克隆抗体。用 PBS 洗涤平板后加入过氧化物酶偶联山羊抗小鼠抗体 (用封闭缓冲液 1 : 1000 稀释) (西格玛化学公司) 培育 1 小时。再用 PBS 充分淋洗平板后加入 100 微升 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (马里兰州盖茨堡的肯卡帕瑞有限公司, 货号 A50-65-00)。25°C 培育 30 分钟, 加入 100 微升磷酸淬灭 TMB 反应, 在微滴板读数仪 (如 SPECTRA MAX 250 型, 加州桑尼维尔的分子装置公司 (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.)) 上读取 450nm 值。所有 6 只小鼠的血清均在低稀释度结合因子 B。如图 9 所示, 所有小鼠血清滴度相当。

[0170] 对所有 6 只小鼠的血清也做了补体旁路依赖的溶血试验。此试验中, 将固定数目的兔红细胞与只允许激活补体旁路的含 10% 正常人血清的缓冲液培育。37°C 培育细胞混合物与不同浓度小鼠血清。在控温 ELISA 平板读数仪上检测 700nm 光散射值的进行性降低 (由于完整细胞的裂解), 以时间作图。记录数据并用 SpectraMax 平板读数仪和 SoftMax pro 软件分析。见图 10, 小鼠 A3 的 1 : 10 稀释血清显示几乎完全抑制。同一小鼠血清在图 9 中显示了优良的滴度。综合这二组数据提示, 选择小鼠 A3 进一步克隆和制备杂交瘤。

[0171] 取得所选小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤。为产生克隆细胞系, 将杂交瘤细胞分种在 9 块 96 孔板中, 各孔只含 1 个细胞。在合适的培养条件下培养这些细胞。收集培养液, 用因子 B 包被板评价因子 B 结合。如图 11 所示, 只有几个克隆显示结合因子 B。

[0172] 然后用 C3b 产生试验评价因子 B 阳性克隆。此试验中, 用含 LPS (2 μg/50 μl/ 每孔) 的 PBS 包被微滴板孔 4°C 培育过夜。不包被孔作为本底对照。吸弃 LPS 液后用封闭液处理板孔, 与含或不含有 AP 缓冲液 (明胶佛罗那缓冲液, 含 5mM MgCl₂, 补体技术公司) 配的杂交瘤上清液的固定浓度的正常人血清一起培育。基本上按以上实施例所述, 37°C 培育 2 小时后, 用小鼠抗人 C3b 抗体 (库德尔公司) 和标准 ELISA 方法检测沉积的 C3b。阻断抗体对 C3b 形成的作用见图 12。如图所示, 只有一个称为 1D3 的克隆抑制了 C3b 产生。用兔 rRBC 溶血试验进一步评价此特定克隆 1D3, 发现其能抑制 AP 缓冲液中 rRBC 的溶血。见图 13。

[0173] 实施例 3

[0174] 产生和纯化 1D3

[0175] 分离 1D3 分泌克隆细胞并培养扩增。为大量生产纯化的单克隆抗体, 将 1D3 细胞注射入小鼠产生肿瘤。检测腹水肿瘤产生的阻断单克隆抗体的活性。如图 14 所示, 腹水单克隆抗体 (NM001) 阻断了正常人血清中兔红细胞的溶血。用蛋白 G 柱纯化此阻断单克隆抗体 (纯度见图 15) 并用实施例 1 所述的 rRBC 再检测其阻断活性。如图 16 所示, NM001 在 100 微克 / 毫升时能阻止 rRBC 溶血。用无花果酶 (Ficin) 按先前报导的方法将 NM001 酶解成片段 F(ab)₂。该纯化片段称为拜卡西奥单抗。

[0176] 实施例 4**[0177] NM001 和拜卡西奥单抗对因子 B 的结合亲和力**

[0178] NM001 能以高亲和力结合因子 B。NM001 不结合 Ba 片段。如图 17 所示, NM001 与因子 B 的结合是可饱和的。图 17 显示 NM001 高亲和力结合 Bb 片段。在一典型试验中, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 配的人因子 Bb ($2 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ / 每孔) (加州圣地亚哥的补体技术公司) 包被聚苯乙烯微滴板过夜。吸弃因子 Bb 液后用含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) (密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司, 货号 A7888) 的 PBS 室温封闭板孔 2 小时。无因子 Bb 包被孔作为本底对照。将封闭液配的不同浓度的 NM001 等分试样加入因子 Bb 包被孔, 静置平板 1 小时让单克隆抗体 (NM001) 结合基材结合的因子 Bb。用 PBS 淋洗平板后加入用封闭液配的 1 : 2000 稀释的过氧化物酶偶联山羊抗小鼠单克隆抗体 (检测抗体) (加州圣地亚哥的西格玛-阿德瑞公司), 室温培育 1 小时。用 PBS 淋洗平板后加入 100 微升 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (马里兰州盖茨堡的肯卡帕瑞有限公司, 货号 A50-65-00)。25°C 培育 30 分钟后, 加入 100 微升磷酸淬灭 TMB 反应, 在微滴板读数仪 (如 SPECTRA MAX 250 型, 加州桑尼维尔的分子装置公司) 上读取板孔的 450nm 值。

[0179] 在另一实验中, 我们评价了拜卡西奥单抗与因子 Bb 的结合。如图 24 所示, 拜卡西奥单抗以高亲和力结合因子 Bb。以上段落中描述了这些试验的基本方法。

[0180] 实施例 5**[0181] 用补体旁路兔红细胞裂解评价 NM001 和拜卡西奥单抗**

[0182] 该细胞试验依据 rRBC 表面最终形成的补体复合物导致 rRBC 裂解。细胞裂解的证据反映为 700nm 光散射进行性降低。用含正常人血清的 AP 缓冲液培育 rRBC。在人血清中 rRBC 的表面触发 AP 激活。AP 级联反应被启动, 导致在 rRBC 表面形成 C5b-9 复合物。预计能抑制此激活的试剂能抑制细胞裂解。

[0183] 为评价 NM001 对 AP 激活的作用, 在控温 ELISA 平板读数仪中将用 AP 缓冲液配的不同浓度 NM001 与正常人血清 (10% NHS) 和固定数目的兔药细胞 (Covance) 37°C 一起培育, 读取 700nm 值。用 700nm 检测光散射的进行性降低 (由于完整细胞裂解) 对时间作图。记录数据并用 SpectraMax 190 平板读数仪和 SoftMax Pro 软件进行分析。计算各浓度 NM001 的总抑制率, 结果表示为未裂解对照的百分比。用 MicroCal 源软件对各浓度数据作 S 形图。图 18 显示在此细胞试验中 NM001 抑制了 AP 激活。

[0184] 图 25 显示拜卡西奥单抗抑制红细胞裂解的强效活性。该抗体能以剂量依赖方式抑制裂解。此图显示拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制裂解。

[0185] 实施例 6**[0186] NM001 不抑制因子 B 结合 C3b**

[0187] 过去证明, 抑制补体激活需要抑制因子 B 结合 C3b。因此, 预计不抑制 C3b-B 结合的抗体不能抑制 AP 激活。

[0188] 令人惊奇的是, 我们的结果证明在存在和缺乏备解素时 NM001 不抑制因子 B 结合 C3b。在评价 NM001 对因子 B 结合 C3b 作用的一典型试验中, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 配的人 C3b ($0.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ / 每孔) (加州圣地亚哥的卡巴开公司 (Calbiochem, San Diego, CA), 货号 204860) 包被的聚苯乙烯微滴板 4°C 培育过夜。吸弃因子 C3b 液后, 用含 1% BSA (密苏里州圣路易斯的西格玛化学公司, 货号 A7888) 的 PBS 室温封闭板孔 2 小时。无 C3b 包被孔

作为本底对照。在存在和缺乏不同浓度的 NM001 时,将用封闭液(含 5mM MgCl₂)配的固定浓度(100nM)人因子 B 的等分试样(德州泰勒的补体技术公司(Complement Technologies, Tyler, Tx)加入诸孔。室温培育 2 小时后,用 PBS 充分淋洗诸孔,加入用封闭缓冲液 1 : 5000 稀释的山羊抗人因子 B 多克隆抗体,室温培育 1 小时后检测 C3b 结合的因子 B。用 PBS 洗涤平板后,加入过氧化物酶偶联的兔抗山羊抗体(用封闭缓冲液 1 : 5000 稀释)(美国库莱克斯公司),培育 1 小时。再用 PBS 充分淋洗平板后,加入 100 微升 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺(TMB)底物(马里兰州盖茨堡的肯卡帕瑞有限公司,货号 A50-65-00)。25℃培育 10 分钟后,加入 100 微升磷酸淬灭 TMB 反应,在微滴板读数仪(如 SPECTRA MAX250 型,加州桑尼维尔的分子装置公司)上读取 450nm 值。

[0189] 如图 19 所示,在存在和缺乏备解素(40nM)时, NM001 均抑制因子 B 结合 C3b。这些结果令人惊喜在于原先已知的概念是,完全阻断补体激活需要抑制 B 结合 C3b。为证实这些发现,用 10% 正常人血清替换因子 B 溶液进行以上段落所述该实验的其余步骤。如图 20 所示, NM001 确实不抑制因子 B 结合 C3b。图 19 显示的结果与图 20 显示的结果相似,证明 NM001 确实不会阻止因子 B 结合 C3b。

[0190] 实施例 7

[0191] NM001 和拜卡西奥单抗抑制 C3b 形成

[0192] 上述结合数据揭示, NM001 和拜卡西奥单抗不会阻止因子 B 结合 C3b。因为因子 B 是 C3 转化酶的关键组分,令我们感兴趣的是确定对于 AP 激活的放大,缺乏因子 B 与 C3b 结合是否可能有利地影响其它 C3b 分子的形成。为了分析因子 B 抗体通过补体旁路对 C3b 形成的作用,采用了一种试验,用细菌 LPS 作为引发补体旁路级联反应的底物。先前的研究业已证明,伤寒沙门菌(沙门菌属)(西格玛化学公司,货号 6386)的脂多糖(LPS)可作为补体旁路激活的强效底物。将用 PBS 配的 LPS(2 μg/50 μl/ 每孔)包被的微滴板孔于 4℃ 培育过夜。未包被孔作为本底对照。吸弃 LPS 液后用封闭液处理各孔,与含不同浓度 NM001(图 21) 或拜卡西奥单抗(图 27) 的 10% 浓度正常人血清一起培育。37℃ 培育 2 小时后,用鼠抗人可溶性 C3c 单克隆抗体(加州圣地亚哥库德尔公司),基本上以上述实施例中所述的标准 ELISA 法检测沉积的 C3b。图 21 和 27 显示单克隆抗体 NM001 能抑制 C3b 形成但不抑制已形成的 C3b 结合因子 B。

[0193] 在另一实验中,我们用库德尔公司的抗 -P#2 抗体检测备解素,显示 NM001 能抑制备解素沉积。虽然该抗体不干扰备解素与 C3b 的结合,但 NM001 阻止了预先结合的 C3b 沉积(图 23)。

[0194] 实施例 8

[0195] NM001 和拜卡西奥单抗抑制 C5b-9 形成

[0196] 以上结合数据揭示因子 B 单克隆抗体不会阻止因子 B 结合 C3b。因为因子 B 是 C3 转化酶的关键组分,令我们感兴趣的是确定 C5b-9 的形成是否要求缺乏因子 B 结合,因为此单克隆抗体最初是在细胞试验中利用抑制 C5b-9 形成才鉴定到的。为了分析因子 B 抗体通过补体旁路对 C5b-9 形成的作用,采用以下试验,用细菌 LPS 作为引发补体旁路级联反应的底物。先前的研究业已证明,伤寒沙门菌(沙门菌属)(西格玛化学公司,货号 6386)的脂多糖(LPS)可作为补体旁路激活的强效底物。用 PBS 配的 LPS(2 μg/50 μl/ 每孔)包被微滴板孔,4℃ 培育过夜。未包被孔作为本底对照。吸弃 LPS 液后用封闭液处理,与含不同浓

度 NM001(图 22) 或拜卡西奥单抗(图 28) 的 10%浓度正常人血清一起培育。37°C 培育 2 小时后,用鼠抗人 C5b-9 单克隆抗体(加州圣地亚哥库德尔公司),基本上以上述实施例中所述的标准 ELISA 法检测沉积的 C5b-9。图 22 和 28 显示抗 -Bb 能抑制 C5b-9 形成但不抑制形成的 C3b 结合因子 B。

[0197] 实施例 9

[0198] 拜卡西奥单抗不抑制补体经典通路的激活

[0199] 本发明的 Bb 单克隆抗体不抑制经典通路。经典通路对宿主防卫至关重要。在此试验中,将抗体致敏的绵羊红细胞与含正常人血清的合适 CP 活化缓冲液一起培育。绵羊红细胞表面形成的抗原-抗体复合物激活了经典补体通路,结果发生红细胞裂解。低血清浓度(1%终浓度)即可发生经典通路激活。虽然基因敲除小鼠的数据提示因子 B 参与了经典通路的激活,但我们的结果证明不涉及经典通路。

[0200] 在一典型试验中,将红细胞与含 1%正常人血清的 CP 缓冲液一起培育让补体激活。CP 激活的结果是在红细胞表面形成 C5b-9,导致细胞裂解。在 700nm 测量光散射的进行性降低随时间的变化。

[0201] 如图 26 所示,拜卡西奥单抗不抑制补体经典通路的激活。这些令人惊喜的结果进一步提示有可能制备能够特异性阻止 AP 的激活而不影响经典通路的抗体。本发明单克隆抗体的开发将保留宿主抗感染防卫的完整经典通路。

[0202] 实施例 10

[0203] 拜卡西奥单抗在心肺分流术管道环路模型中的效用

[0204] 实施例 1-9 显示了体外存在人血清时拜卡西奥单抗的评价结果。在任何疾病中,中性粒细胞、单核细胞和血小板共同组成了炎症应答反应,它们是临床控制的关键细胞类型。我们还没有提供细胞活化的资料。我们选择此心肺分流术简单模型来证明拜卡西奥单抗能防止细胞活化。鉴于抗 -B 是一种活性药物,我们需要确定拜卡西奥单克隆抗体是否能抑制中性粒细胞、单核细胞和血小板的活化。

[0205] 已知当血液与体外循环装置的人造表面接触时会显著激活补体旁路。为检验拜卡西奥单抗(抗 Bb)的作用,将健康献供者的全血收集到装有肝素的聚丙烯(PVC)管中(每毫升全血 5 单位肝素)。全血用普拉载体(plasmalyte)作 1:1 稀释分成 2ml 等份,用或不用药物处理。用带有短片硅管的环闭合装有 2ml 肝素化人血的 PVC 管。37°C 在水浴中垂直转动样品管环路和对照管环路 2 小时。培育后将血样品转移到 5ml 硅化塑料管中。将样品分成二等份,一份作细胞活化的流式细胞术研究,另一份离心分离血浆作血清标记物检测。为评价拜卡西奥单抗对补体和细胞激活的作用,将不同浓度的拜卡西奥单抗与血液混合然后旋转管道环路。37°C 旋转所有管道环路 2 小时,然后检测细胞和补体激活。

[0206] 用样品稀释缓冲液将血浆样品稀释至 5%,用 ELISA 试剂盒(库德尔公司,货号 C3a 为 A015, C5b-9 为 A009)按厂商说明书评价 C3a、C5a 和 sC5b-9。如图 29 所示,拜卡西奥单抗以剂量依赖方式抑制全血产生 C3a,100 微克/毫升的拜卡西奥单抗产生完全抑制。IC50 抑制发生在 20 μ g/ml 浓度。C5a 测定获得类似结果。拜卡西奥单抗以剂量依赖方式完全抑制 C5a 形成(图 30)和 C5b-9(图 31)形成。

[0207] 用荧光标记抗体染色流经管道环路的等份血作流式细胞术研究。用 FITC 标记的 CD15 和 PE 标记的 CD11b 抗体检测中性粒细胞,用 FITC 标记的 CD14 和 PE 标记的 CD11b 抗

体检测单核细胞,用 FITC 标记的 CD61 和 PE 标记的 CD11b 抗体检测血小板。在一典型方法中,将 20 μ l 各标记抗体加入到含 50 μ l 全血的 100 μ l 染色缓冲液中。持续染色 20 分钟后加入 2.0ml 染色液裂解红细胞 20 分钟。离心溶液,用 PBS 洗涤细胞沉淀并重悬于 0.5ml 低聚甲醛液中。用 CellQuest, BD-LSR I 给样品作流式细胞术,用 WinList 5.0 分析数据。用 Ln 中值计算中性粒细胞和单核细胞 CD11b 染色的转移。定量测定血小板群中门控标记细胞的百分比。图 32、33 和 34 显示拜卡西奥单抗抑制了中性粒细胞、单核细胞和血小板的激活。用拜卡西奥单抗可完全抑制提示该抗 Bb 抗体能完全抑制细胞激活,这种细胞激活是补体依赖的。

[0208] 为了进一步证明拜卡西奥单抗能抑制中性粒细胞的弹性蛋白酶释放,也用本室开发的中性粒细胞弹性蛋白酶 ELISA 评价了等份血浆。在一典型的 ELISA 中,采用 1 : 5000 稀释的抗弹性蛋白酶抗体作为包被抗体。将等份血浆加入抗体包被孔中。用 1 : 5000 稀释的 HRP- 偶联抗胰蛋白酶单克隆抗体检测结合的弹性蛋白酶 - 抗胰蛋白酶复合物。如图 36 所示,拜卡西奥单抗抑制了全血中性粒细胞释放弹性蛋白酶。也用 BD 试剂盒检测 TNF α 。图 35 所示数据证明拜卡西奥单抗抑制了 TNF α 的产生。由于 TNF 在关节炎中的作用,可用药物抗 -Bb 来治疗严重的疾病适应症。

[0209] 结果

[0210] 拜卡西奥单抗是抗 -Bb 单克隆抗体的 F(ab)₂ 片段。该单克隆抗体是结合因子 B 的 Bb 区的蛋白酶活性强效抑制剂。拜卡西奥单抗以高亲和力结合 Bb 区并抑制 C3a、C5a 和 C5b-9 的形成。抑制中性粒细胞、单核细胞和血小板活化反映了补体抑制。血小板活化是补体依赖的。拜卡西奥单抗完全阻止了细胞活化。拜卡西奥单抗的这种特征可作为抗炎和抗血小板药物,优于 ReoPro。对于补体旁路在疾病发病中具有作用的所有临床适应症,拜卡西奥单抗应是一种理想的药物。

序列表

<110> 诺福麦德治疗学股份有限公司 (NovelMed Therapeutics, Inc.)

<120> 用因子 Bb 特异性抗体抑制补体活化的方法

<130>NMT-8772WO ORD

<160>6

<170>PatentIn 3.5 版

<210>1

<211>739

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1

```

Thr Pro Trp Ser Leu Ala Trp Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly
1           5           10           15
Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala
          20           25           30
Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr
          35           40           45
Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
          50           55           60
Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
65           70           75           80
Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
          85           90           95
Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
          100          105          110
Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
          115          120          125
Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
          130          135          140
Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
145          150          155          160
Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
          165          170          175
Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser

```

	180		185		190										
Cys	Gln	Asp	Ser	Phe	Met	Tyr	Asp	Thr	Pro	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Ala
	195		200		205										
Phe	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Glu	Gly	Val	Asp	Ala	Glu	Asp
	210		215		220										
Gly	His	Gly	Pro	Gly	Glu	Gln	Gln	Lys	Arg	Lys	Ile	Val	Leu	Asp	Pro
225			230		235										
Ser	Gly	Ser	Met	Asn	Ile	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Gly	Ser	Asp	Ser	Ile
			245		250										
Gly	Ala	Ser	Asn	Phe	Thr	Gly	Ala	Lys	Lys	Cys	Leu	Val	Asn	Leu	Ile
	260		265		270										
Glu	Lys	Val	Ala	Ser	Tyr	Gly	Val	Lys	Pro	Arg	Tyr	Gly	Leu	Val	Thr
	275		280		285										
Tyr	Ala	Thr	Tyr	Pro	Lys	Ile	Trp	Val	Lys	Val	Ser	Glu	Ala	Asp	Ser
	290		295		300										
Ser	Asn	Ala	Asp	Trp	Val	Thr	Lys	Gln	Leu	Asn	Glu	Ile	Asn	Tyr	Glu
305			310		315										
Asp	His	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Asn	Thr	Lys	Lys	Ala	Leu	Gln	Ala
			325		330										
Val	Tyr	Ser	Met	Met	Ser	Trp	Pro	Asp	Asp	Val	Pro	Pro	Glu	Gly	Trp
	340		345		350										
Asn	Arg	Thr	Arg	His	Val	Ile	Ile	Leu	Met	Thr	Asp	Gly	Leu	His	Asn
	355		360		365										
Met	Gly	Gly	Asp	Pro	Ile	Thr	Val	Ile	Asp	Glu	Ile	Arg	Asp	Leu	Leu
	370		375		380										
Tyr	Ile	Gly	Lys	Asp	Arg	Lys	Asn	Pro	Arg	Glu	Asp	Tyr	Leu	Asp	Val
385			390		395										
Tyr	Val	Phe	Gly	Val	Gly	Pro	Leu	Val	Asn	Gln	Val	Asn	Ile	Asn	Ala
			405		410										
Leu	Ala	Ser	Lys	Lys	Asp	Asn	Glu	Gln	His	Val	Phe	Lys	Val	Lys	Asp
	420		425		430										
Met	Glu	Asn	Leu	Glu	Asp	Val	Phe	Tyr	Gln	Met	Ile	Asp	Glu	Ser	Gln
	435		440		445										
Ser	Leu	Ser	Leu	Cys	Gly	Met	Val	Trp	Glu	His	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp
	450		455		460										
Tyr	His	Lys	Gln	Pro	Trp	Gln	Ala	Lys	Ile	Ser	Val	Ile	Arg	Pro	Ser
465			470		475										
Lys	Gly	His	Glu	Ser	Cys	Met	Gly	Ala	Val	Val	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val
			485		490										

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

<210>2

<211>234

<212>PRT

<213> 智人

<400>2

Thr Pro Trp Ser Leu Ala Trp Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala
 20 25 30
 Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr
 35 40 45
 Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
 50 55 60
 Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
 65 70 75 80
 Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
 85 90 95
 Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
 100 105 110
 Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
 115 120 125
 Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
 130 135 140
 Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
 165 170 175
 Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser
 180 185 190
 Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala
 195 200 205
 Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp
 210 215 220
 Gly His Gly Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg
 225 230

<210>3

<211>504

<212>PRT

<213> 智人

<400>3

Lys Ile Val Leu Asp Pro Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu

1	5	10	15
Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys			
	20	25	30
Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Lys Pro			
	35	40	45
Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile Trp Val Lys			
	50	55	60
Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu			
65	70	75	80
Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr			
	85	90	95
Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp			
	100	105	110
Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met			
	115	120	125
Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp			
	130	135	140
Glu Ile Arg Asp Leu Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu			
145	150	155	160
Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn Gln			
	165	170	175
Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His Val			
	180	185	190
Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met			
	195	200	205
Ile Asp Glu Ser Gln Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu His			
	210	215	220
Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile Ser			
225	230	235	240
Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His Glu Ser Cys Met Gly Ala Val Val			
	245	250	255
Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Thr Val Asp Asp			
	260	265	270
Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu			
	275	280	285
Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys			
	290	295	300
Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile			
305	310	315	320

Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr Gly Gln Thr Ile Arg Pro Ile Cys
 325 330 335
 Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr Arg Ala Leu Arg Leu Pro Pro Thr
 340 345 350
 Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu Glu Leu Leu Pro Ala Gln Asp Ile
 355 360 365
 Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu Glu Lys Lys Leu Thr Arg Lys Glu
 370 375 380
 Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys Lys Gly Ser Cys Glu Arg Asp Ala
 385 390 395 400
 Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys Val Lys Asp Ile Ser Glu Val Val
 405 410 415
 Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly Gly Val Ser Pro Tyr Ala Asp Pro
 420 425 430
 Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Val His Lys Arg
 435 440 445
 Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val Ile Ser Trp Gly Val Val Asp Val
 450 455 460
 Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys Gln Val Pro Ala His Ala Arg Asp
 465 470 475 480
 Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val Leu Pro Trp Leu Lys Glu Lys Leu
 485 490 495
 Gln Asp Glu Asp Leu Gly Phe Leu
 500

<210>4

<211>45

<212>PRT

<213> 智人

<400>4

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

<210>5

<211>200

<212>PRT

<213> 智人

<400>5

```

Asn Ile Tyr Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile Gly Ala Ser Asn
1           5           10           15
Phe Thr Gly Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile Glu Lys Val Ala
           20           25           30
Ser Tyr Gly Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr Tyr Ala Thr Tyr
           35           40           45
Pro Lys Ile Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser Ser Asn Ala Asp
           50           55           60
Trp Val Thr Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu Asp His Lys Leu
65           70           75           80
Lys Ser Gly Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala Val Tyr Ser Met
           85           90           95
Met Ser Trp Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp Asn Arg Thr Arg
           100          105          110
His Val Ile Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn Met Gly Gly Asp
           115          120          125
Pro Ile Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu Tyr Ile Gly Lys
           130          135          140
Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val Tyr Val Phe Gly
145          150          155          160
Val Gly Pro Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala Leu Ala Ser Lys
           165          170          175
Lys Asp Asn Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp Met Glu Asn Leu
           180          185          190
Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met Ile
           195          200

```

<210>6

<211>282

<212>PRT

<213> 智人

<400>6

Leu Cys Gly Met Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp Tyr His Lys
 1 5 10 15
 Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser Lys Gly His
 20 25 30
 Glu Ser Cys Met Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val Leu Thr Ala
 35 40 45
 Ala His Cys Phe Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile Lys Val Ser
 50 55 60
 Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val Leu Phe His
 65 70 75 80
 Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile Pro Glu Phe
 85 90 95
 Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Leu Lys Tyr
 100 105 110
 Gly Gln Thr Ile Arg Pro Ile Cys Leu Pro Cys Thr Glu Gly Thr Thr
 115 120 125
 Arg Ala Leu Arg Leu Pro Pro Thr Thr Thr Cys Gln Gln Gln Lys Glu
 130 135 140
 Glu Leu Leu Pro Ala Gln Asp Ile Lys Ala Leu Phe Val Ser Glu Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Lys Leu Thr Arg Lys Glu Val Tyr Ile Lys Asn Gly Asp Lys
 165 170 175
 Lys Gly Ser Cys Glu Arg Asp Ala Gln Tyr Ala Pro Gly Tyr Asp Lys
 180 185 190
 Val Lys Asp Ile Ser Glu Val Val Thr Pro Arg Phe Leu Cys Thr Gly
 195 200 205
 Gly Val Ser Pro Tyr Ala Asp Pro Asn Thr Cys Arg Gly Asp Ser Gly
 210 215 220
 Gly Pro Leu Ile Val His Lys Arg Ser Arg Phe Ile Gln Val Gly Val
 225 230 235 240
 Ile Ser Trp Gly Val Val Asp Val Cys Lys Asn Gln Lys Arg Gln Lys
 245 250 255
 Gln Val Pro Ala His Ala Arg Asp Phe His Ile Asn Leu Phe Gln Val
 260 265 270
 Leu Pro Trp Leu Lys Glu Lys Leu Gln Asp
 275 280

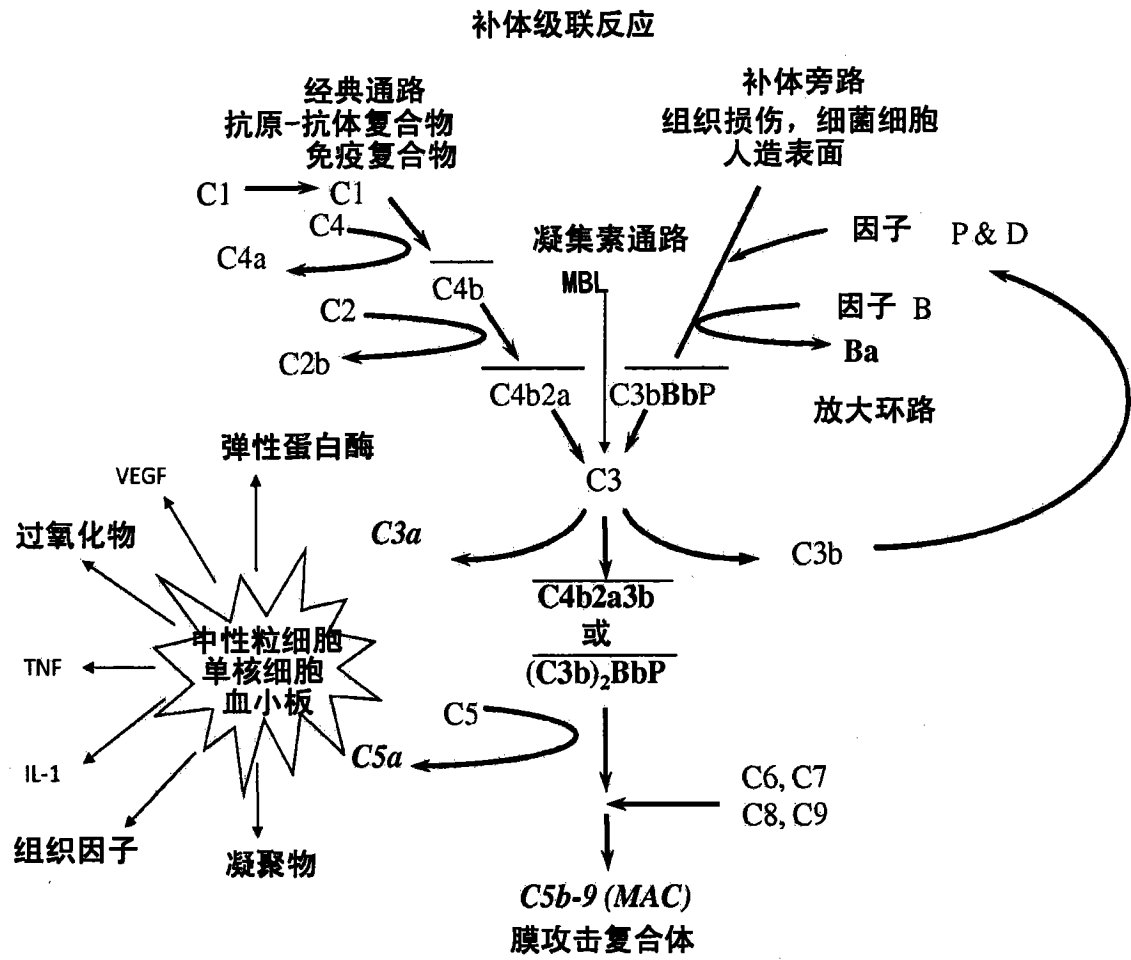


图 1

补体旁路激活图

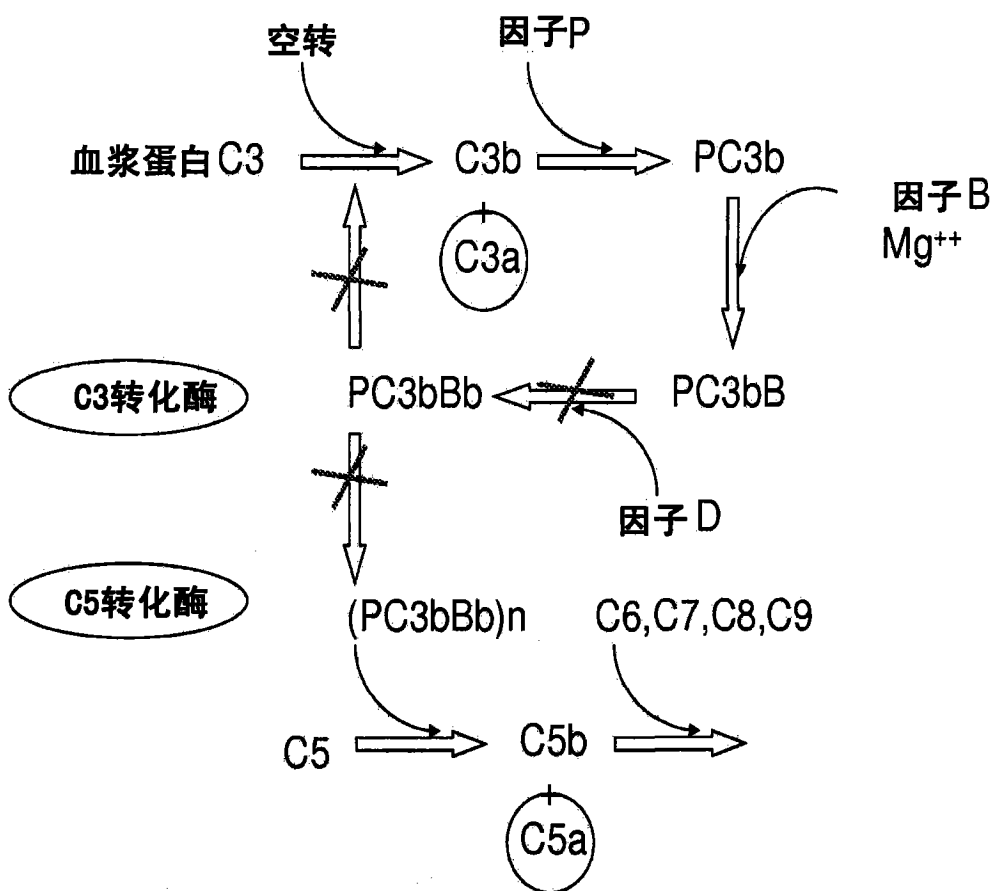


图 2

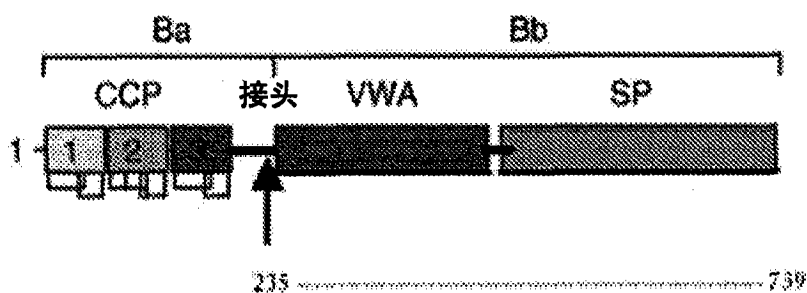


图 3

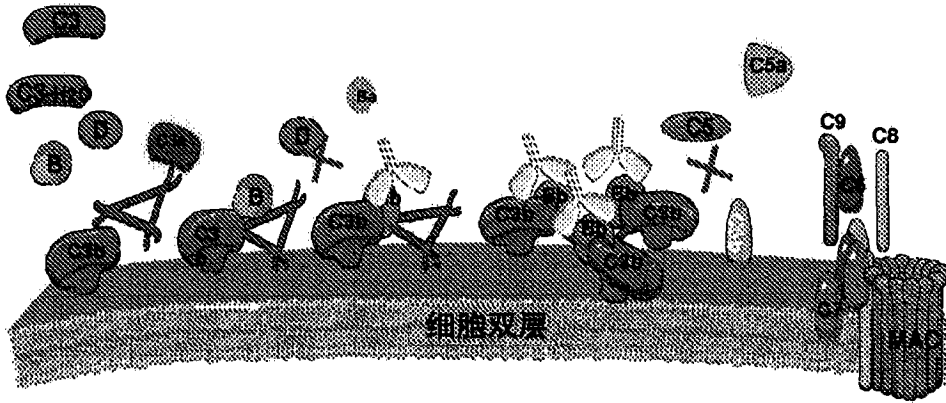


图 5

本发明的抗体是C3转化酶的特异性抑制剂

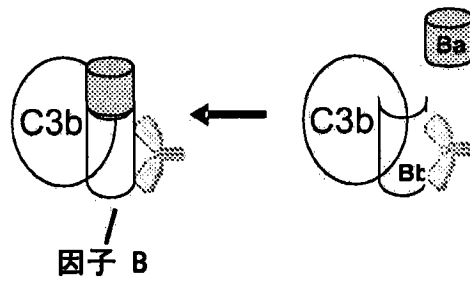


图 4A

现有技术的抗体能阻止因子B结合C3b

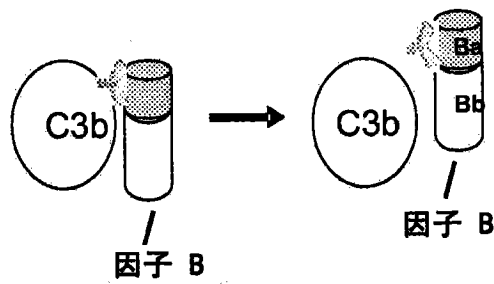


图 4B

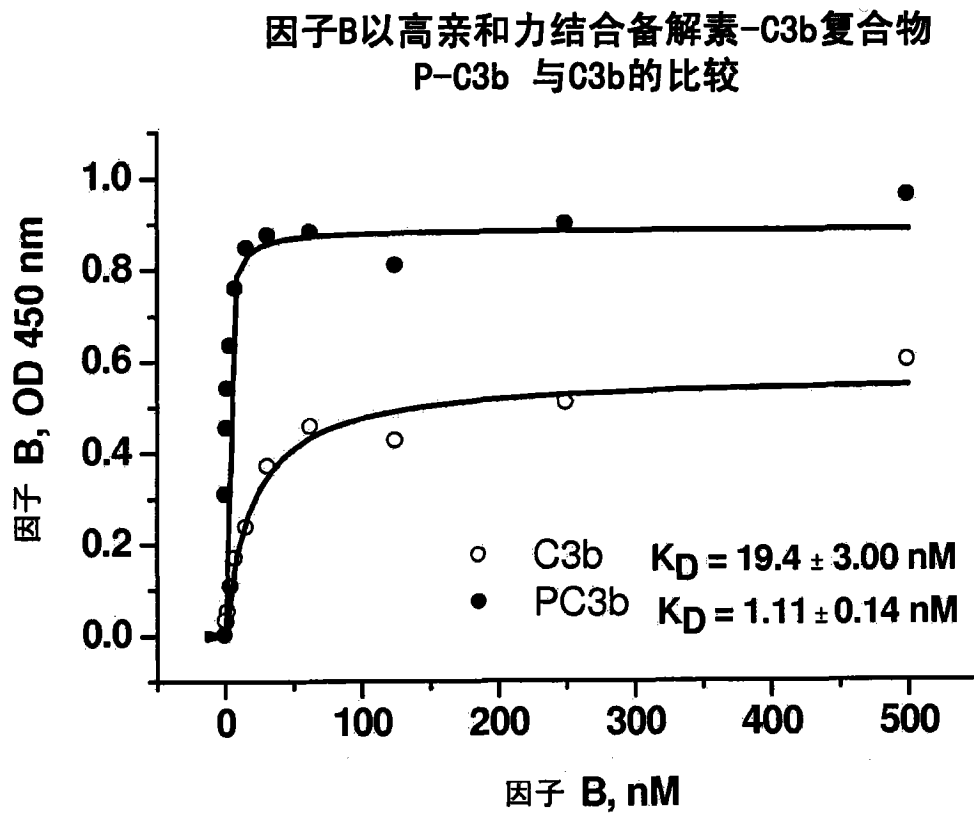


图6 现有技术

因子B不结合备解素

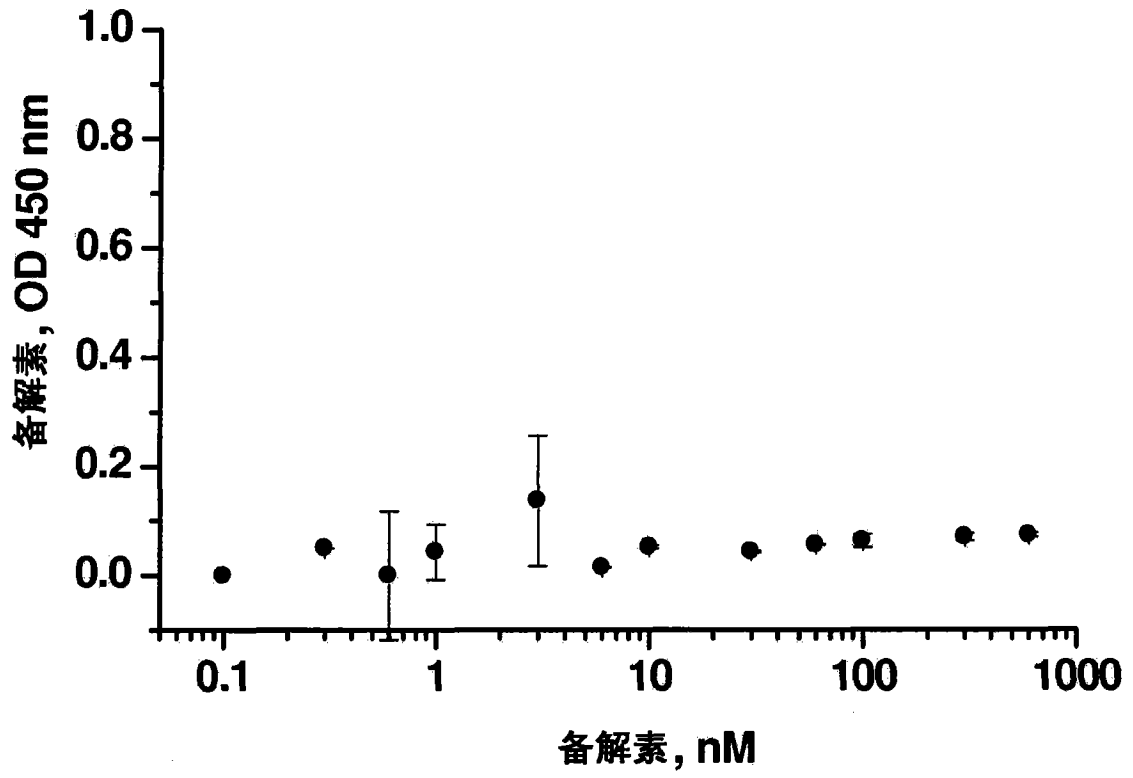


图 7

在存在和缺乏备解素时因子B不结合C3b亚型：
iC3b, C3c和C3dg

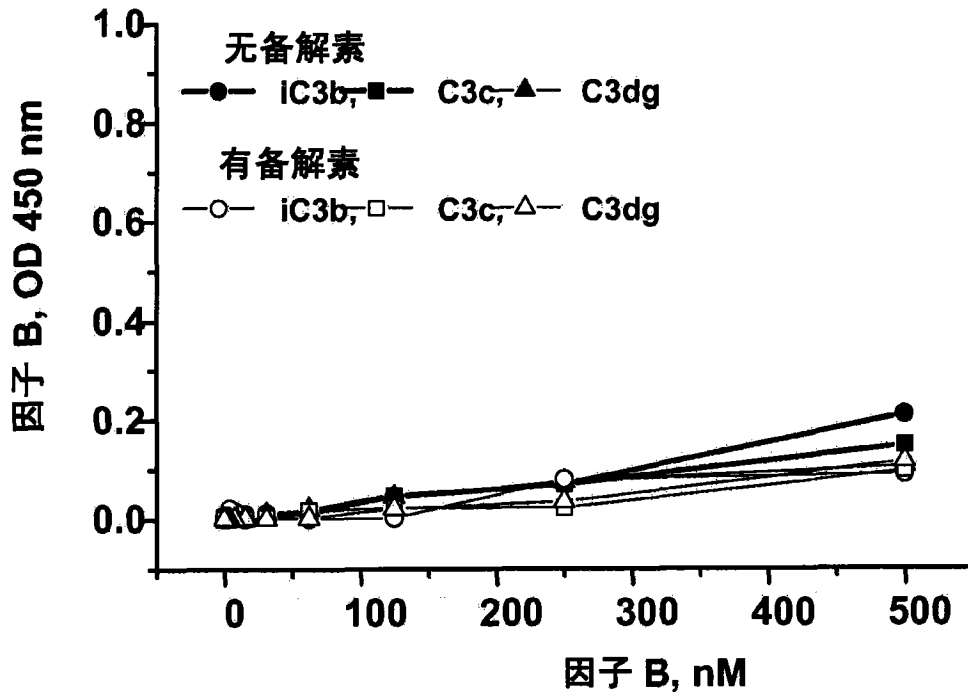


图 8

小鼠血清中存在的抗-因子B抗体的滴度

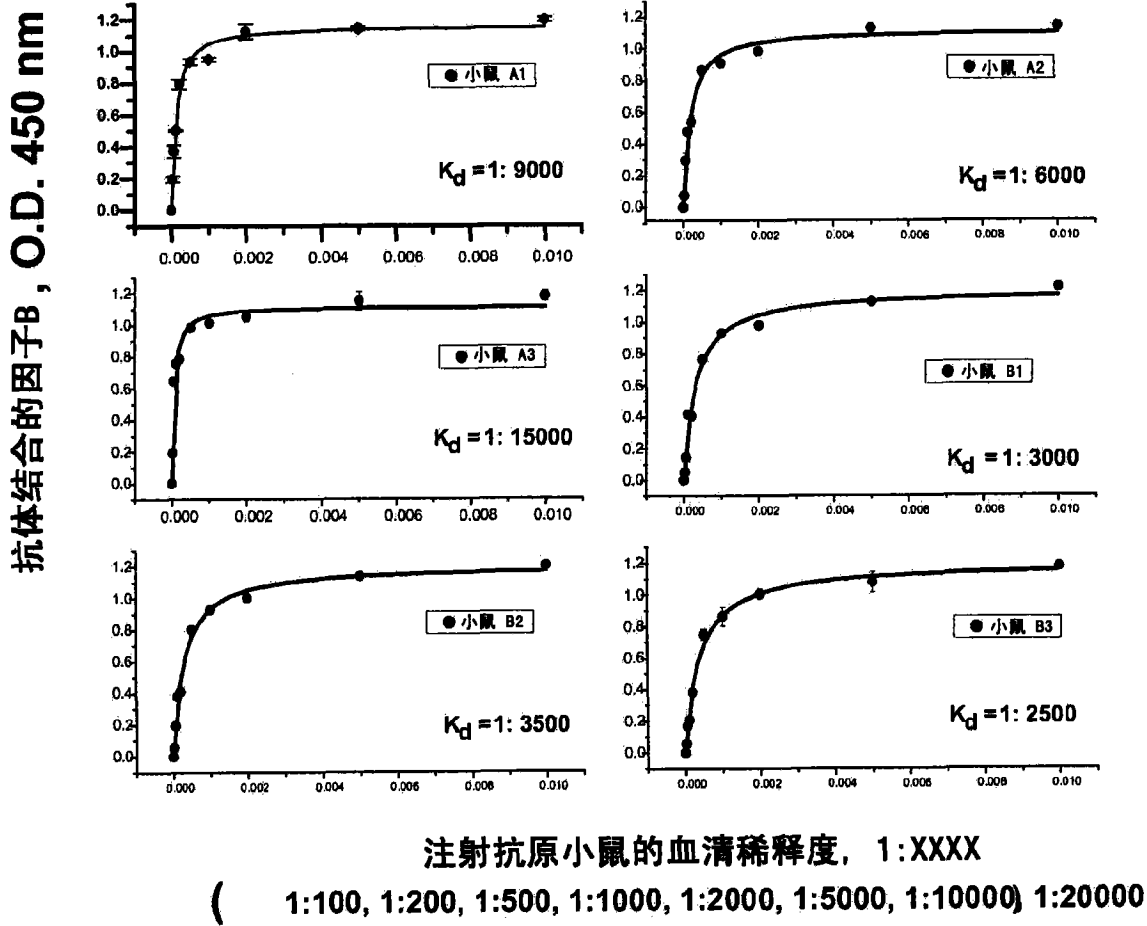


图 9

小鼠血清抑制补体旁路依赖的兔红细胞的溶血

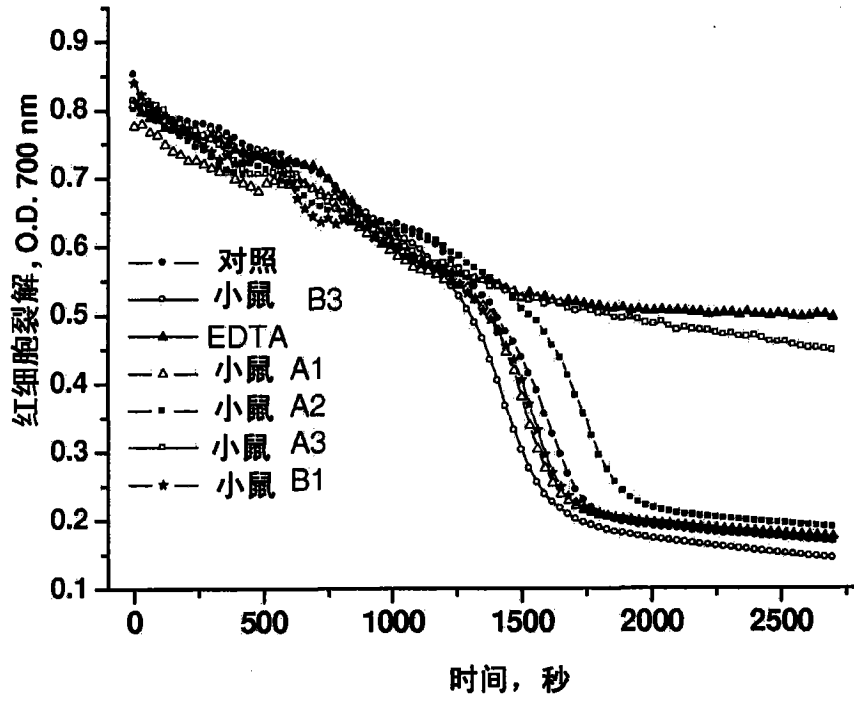


图 10

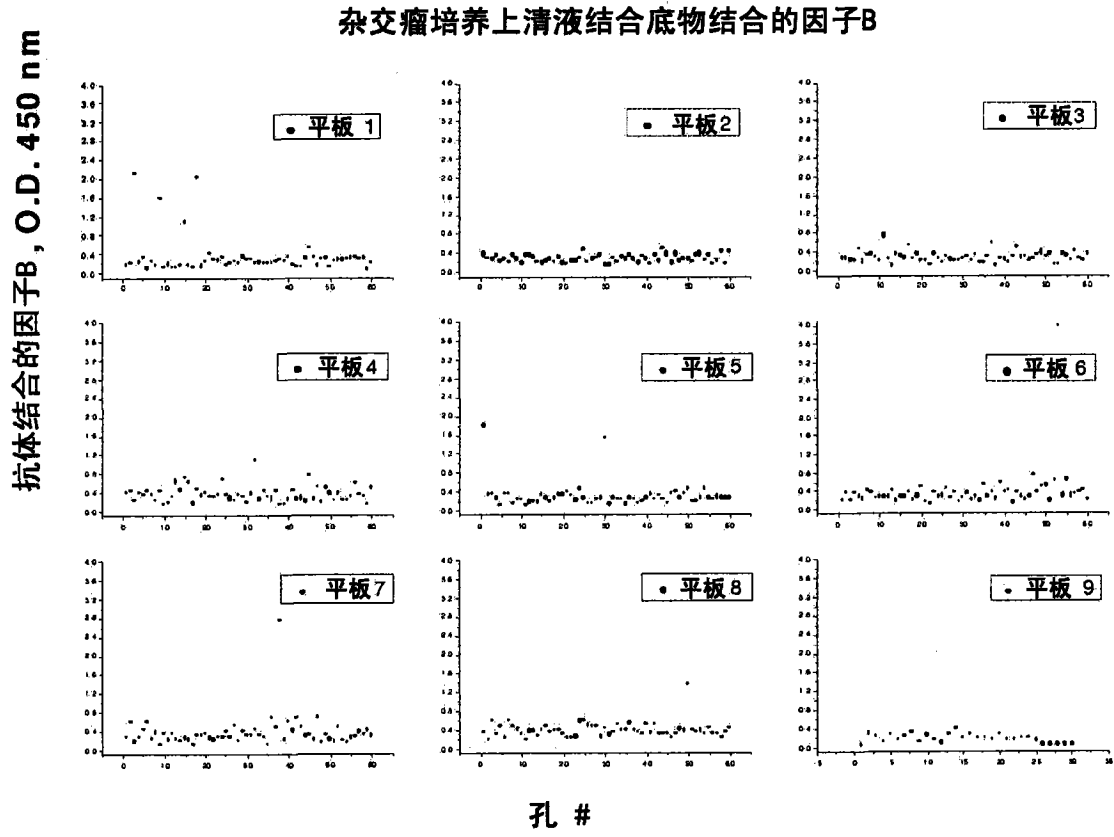


图 11

抑制C3b形成的杂交瘤克隆

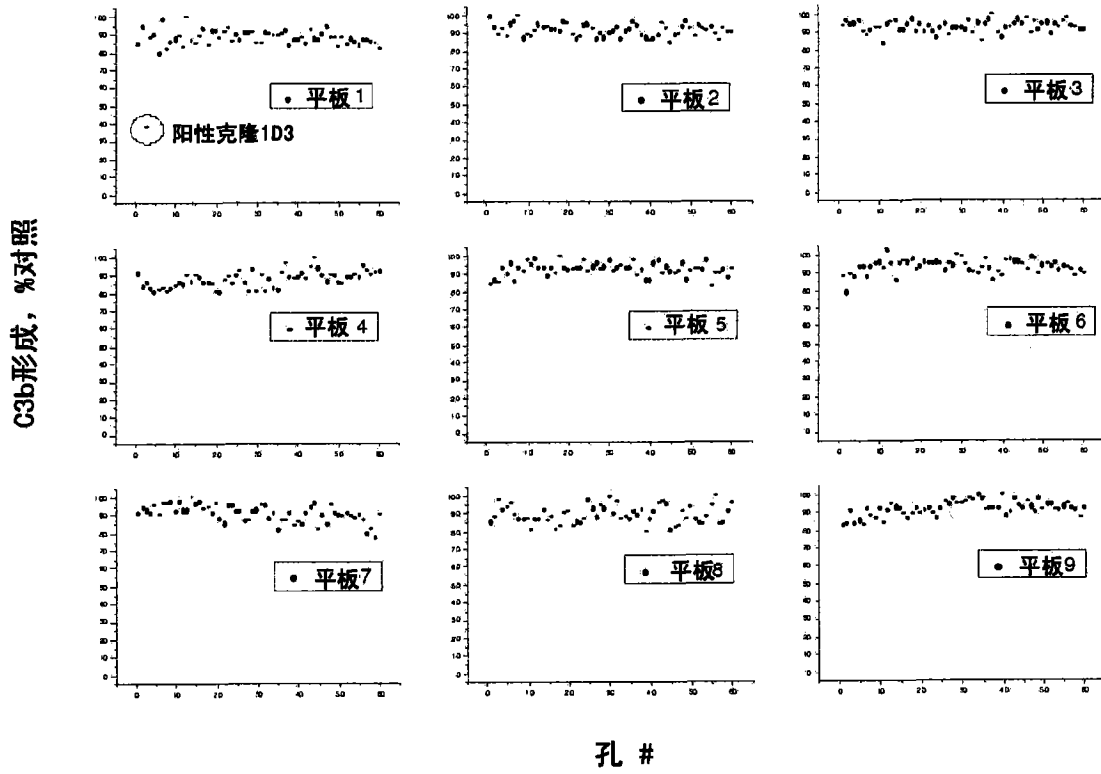


图 12

1D3培养上清液抑制AP依赖的溶血

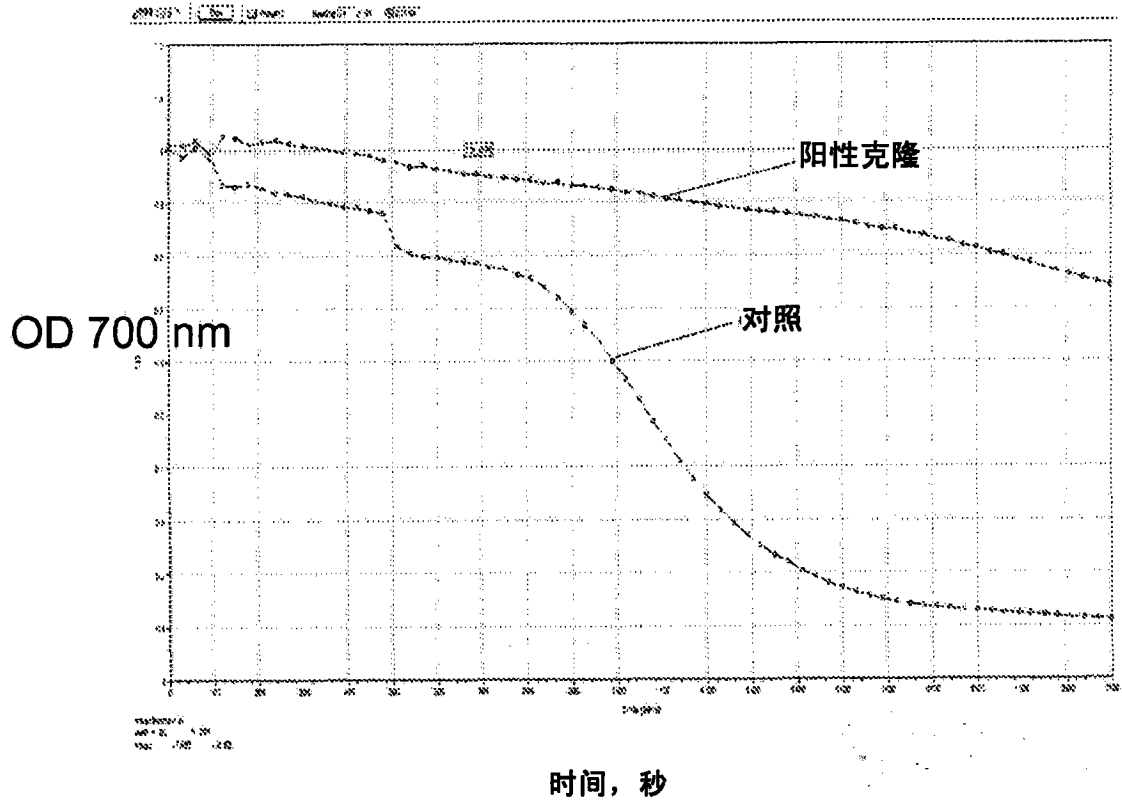


图 13

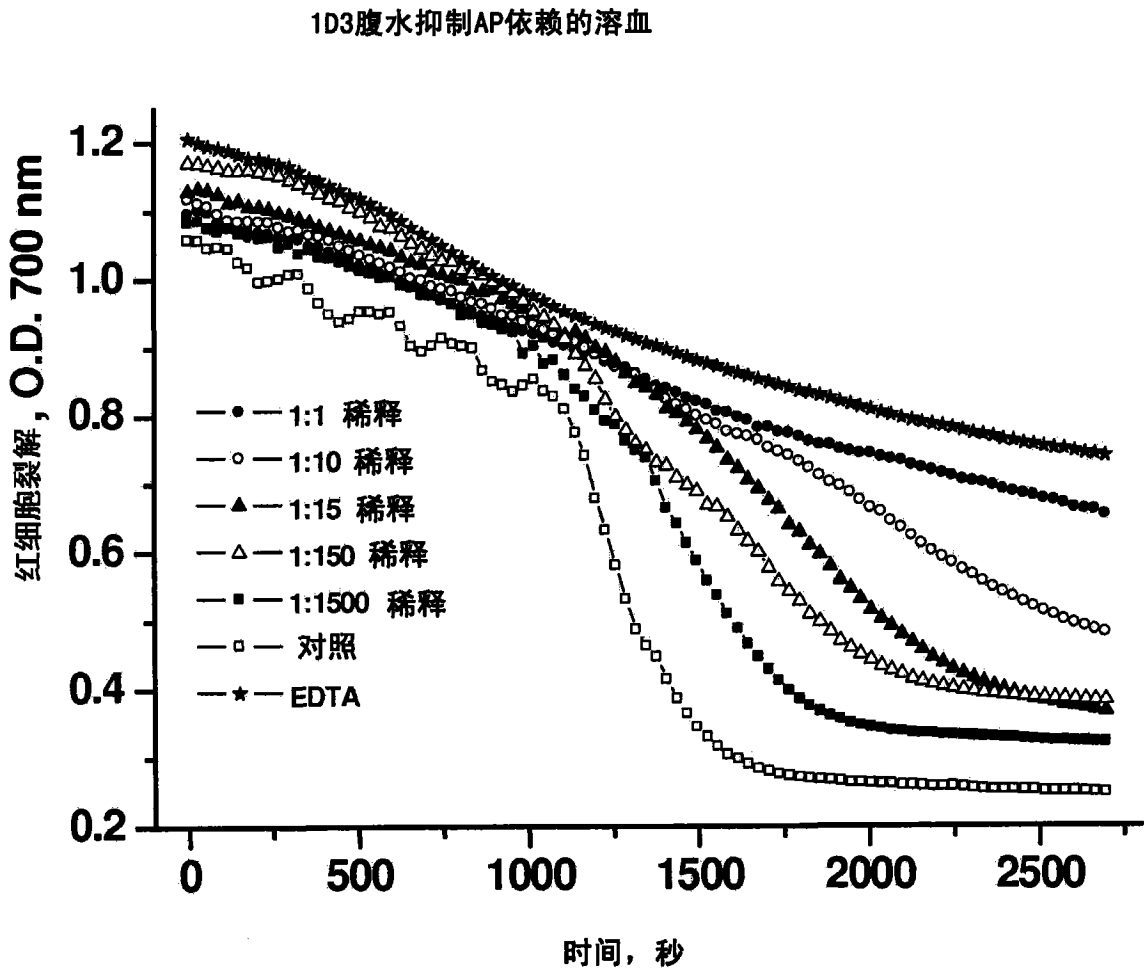


图 14

1D3单克隆抗体的SDS-PAGE



泳道 1: 1D3
泳道 2: 分子量标记

图 15

称为NM001的纯化1D3单克隆抗体抑制AP依赖的溶血

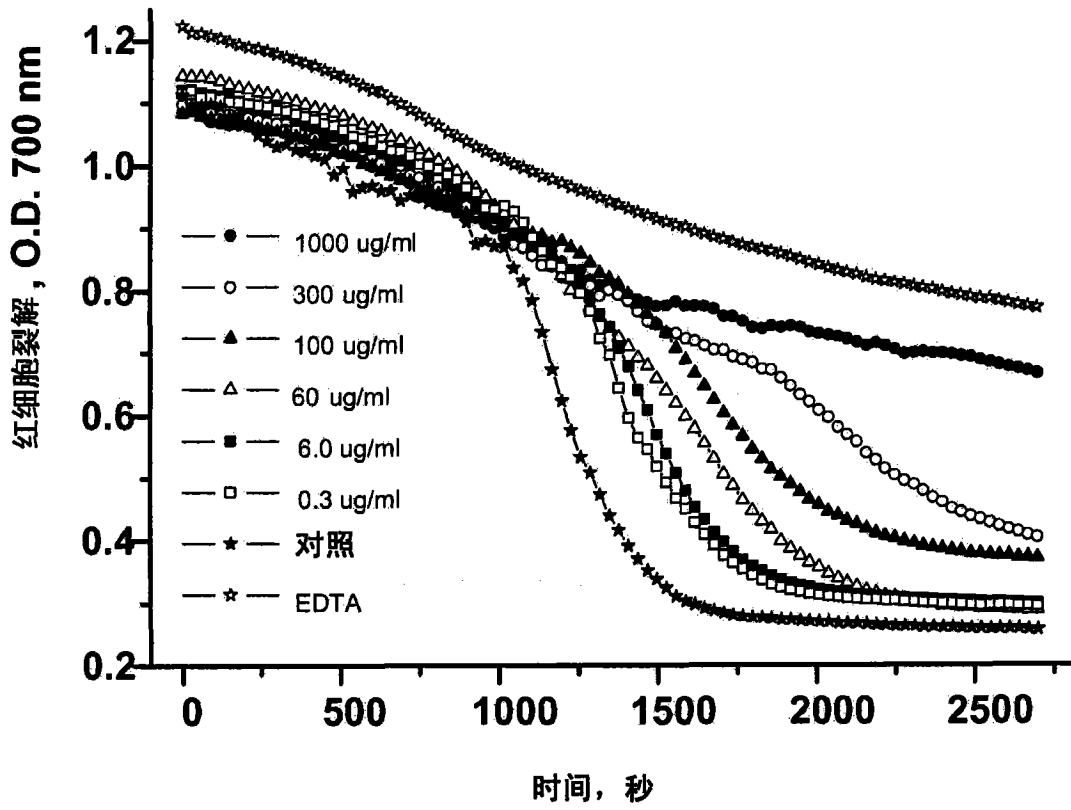


图 16

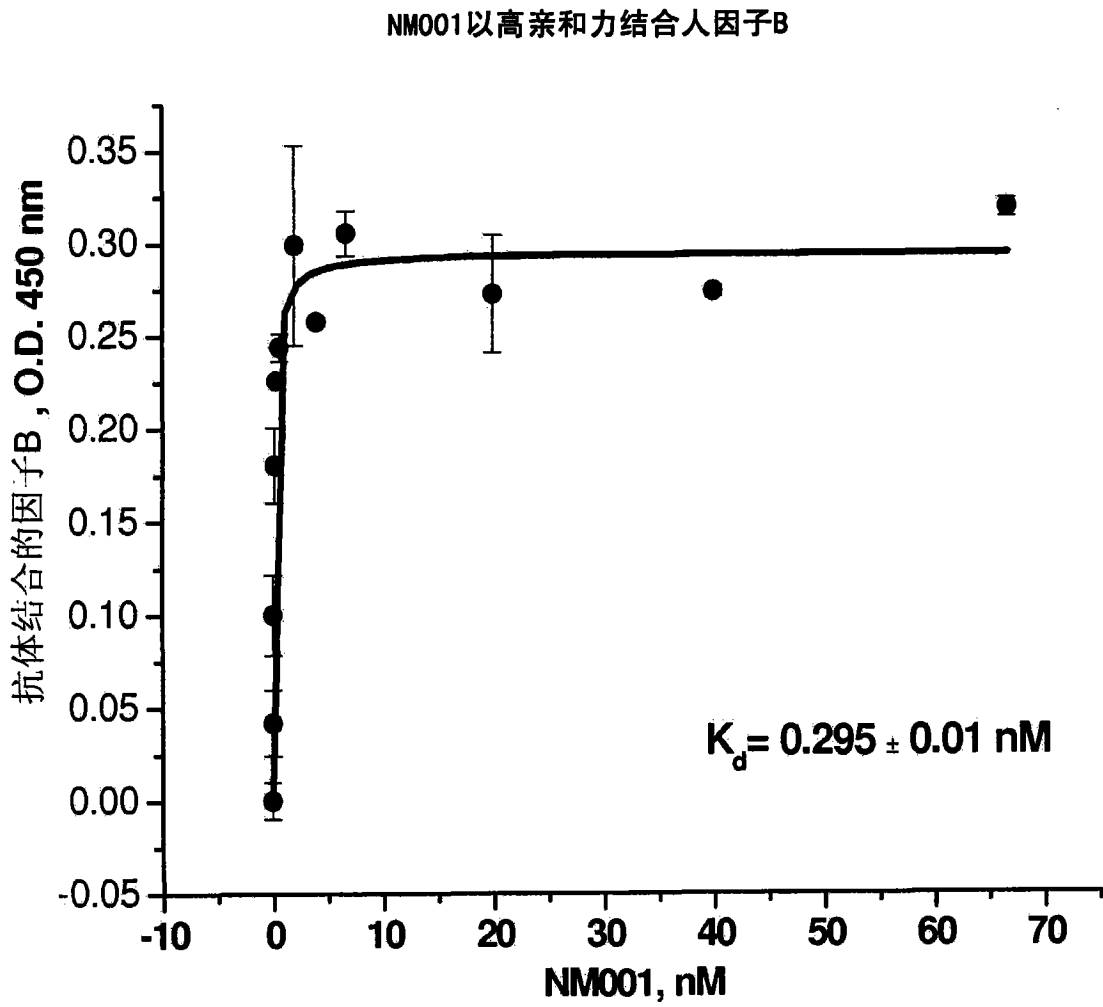


图 17

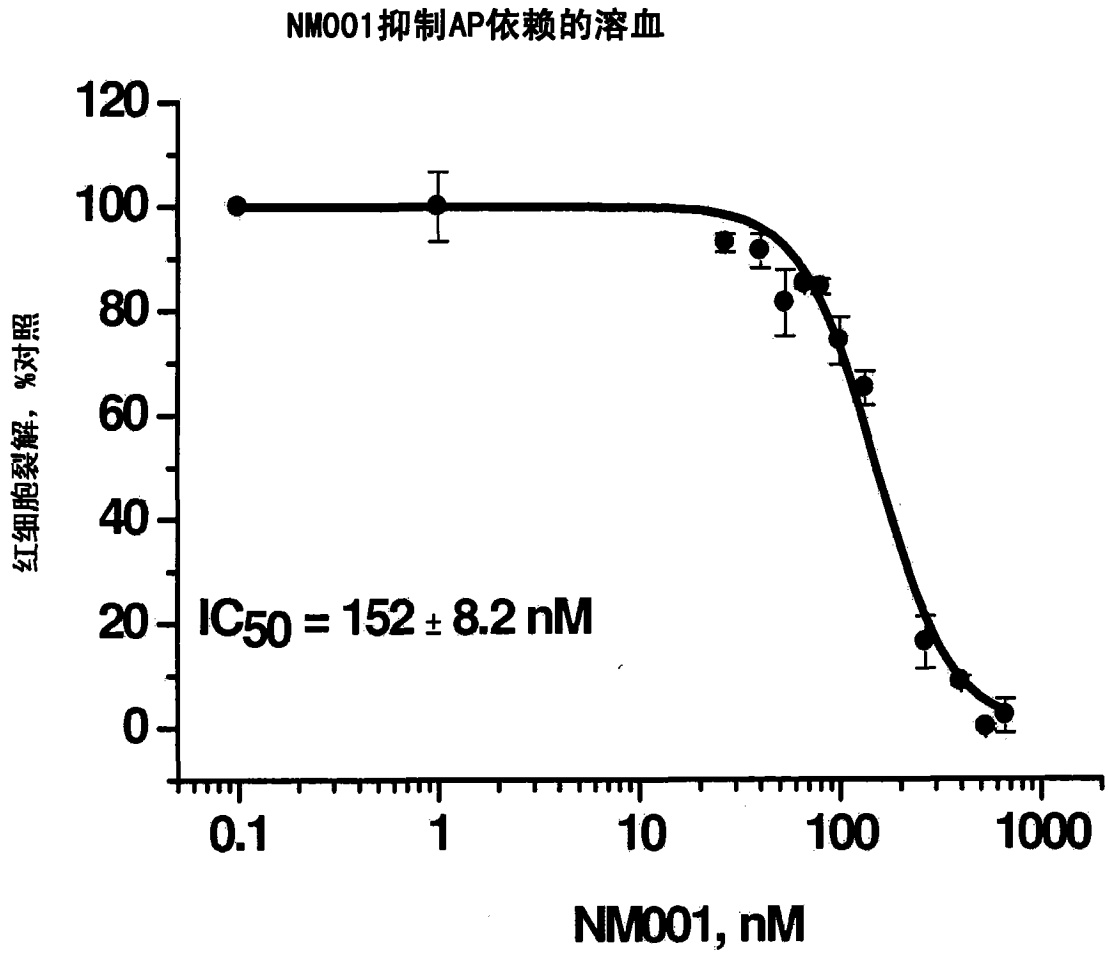


图 18

在存在和缺乏备解素时NM001抑制因子B结合C3b

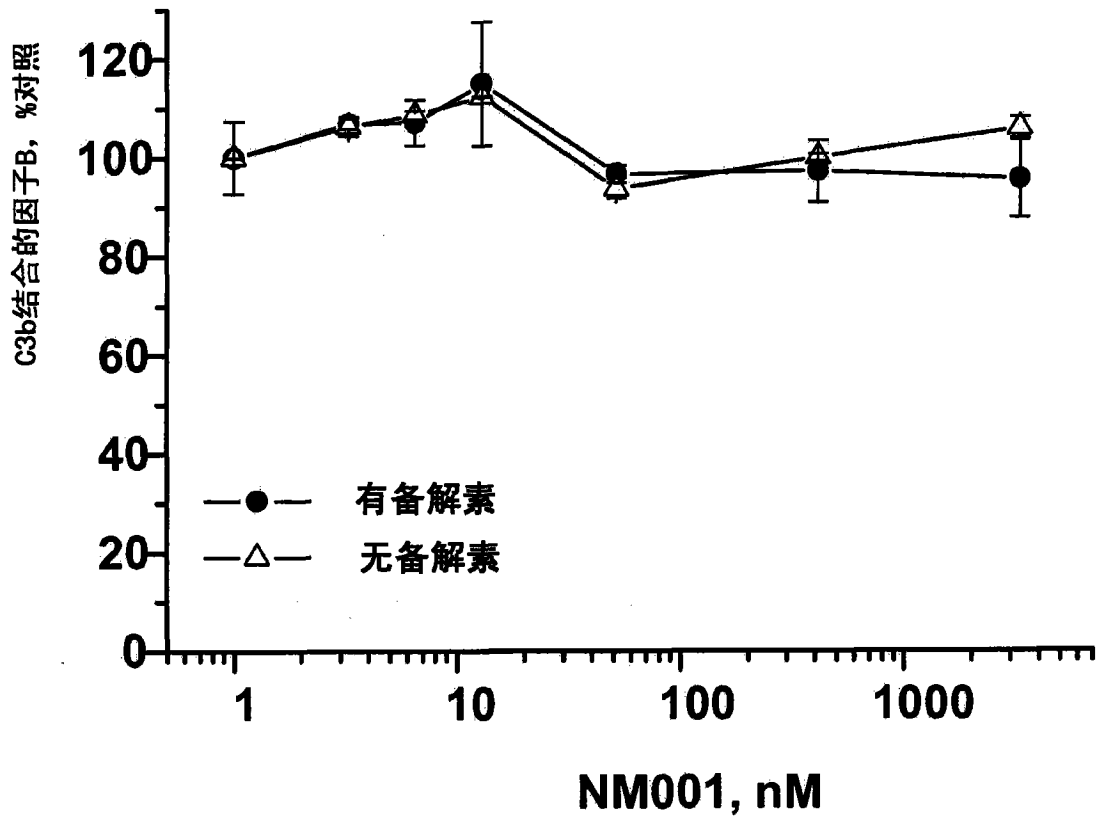


图 19

NM001不抑制正常人血清中的C3b-B

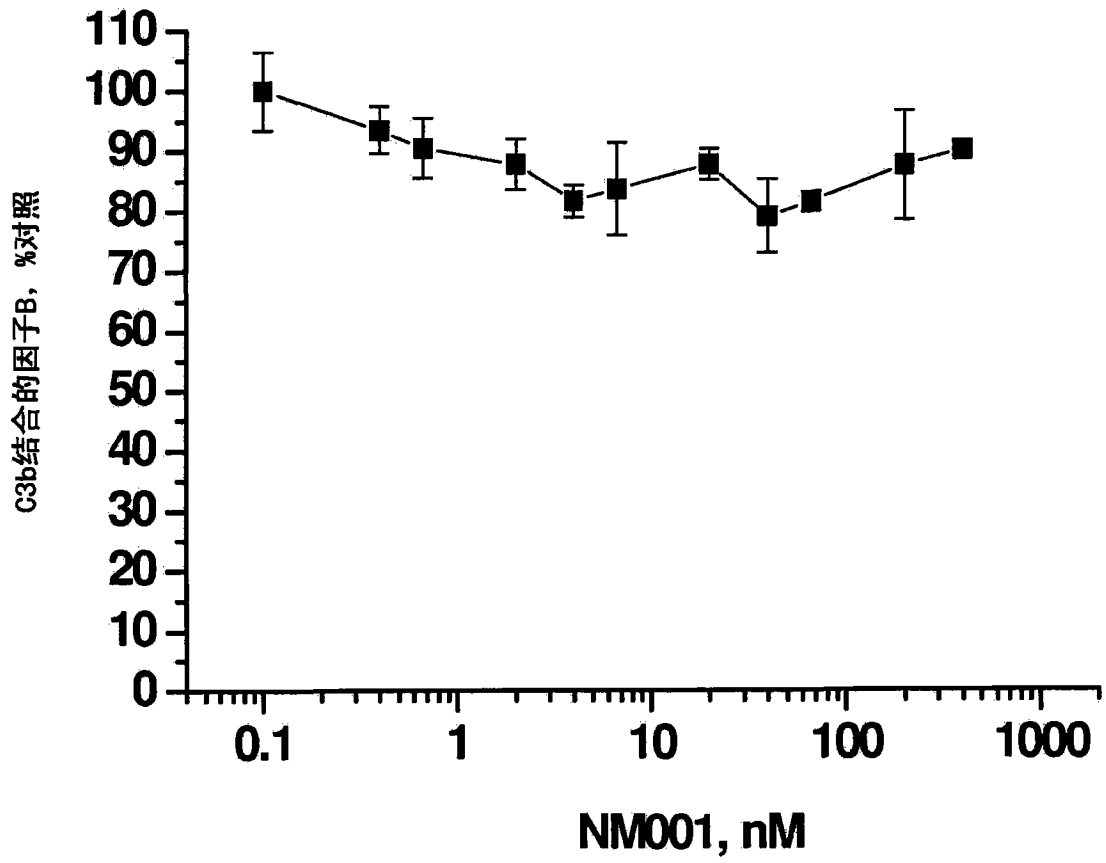


图 20

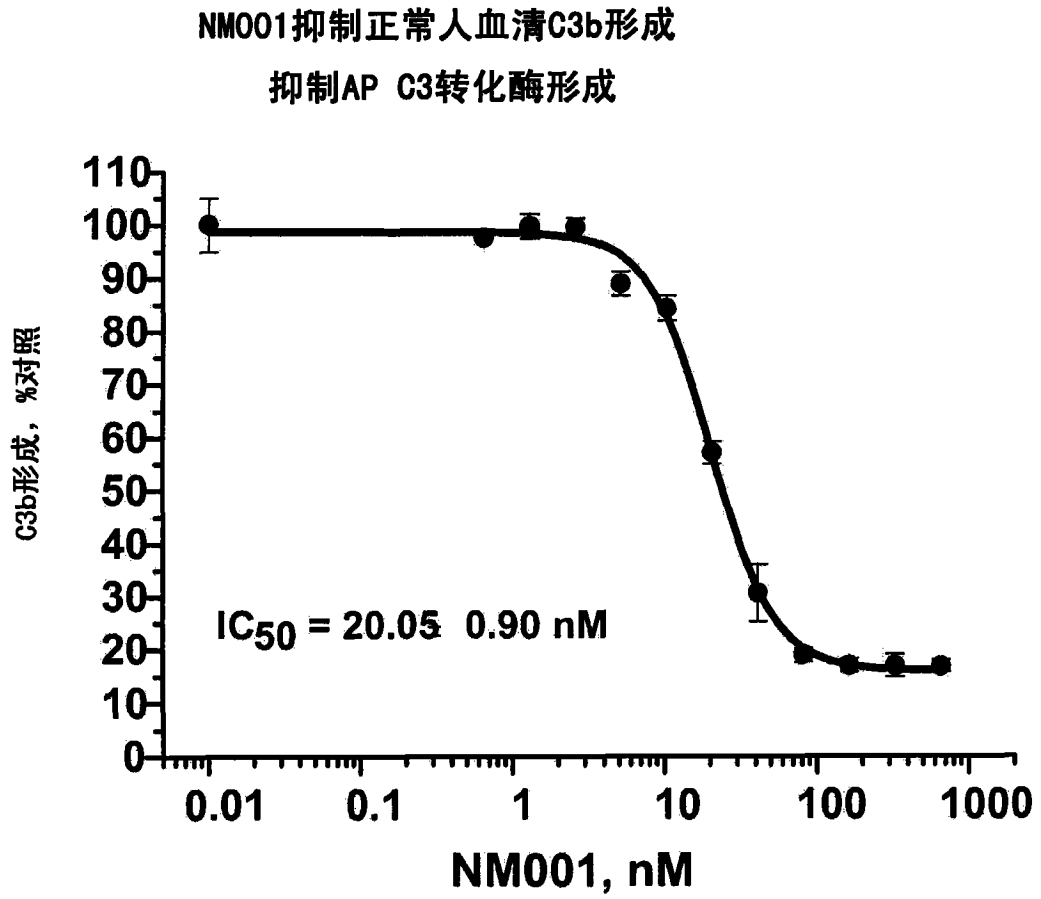


图 21

NM001抑制正常人血清C5b-9形成

抑制AP C3转化酶形成

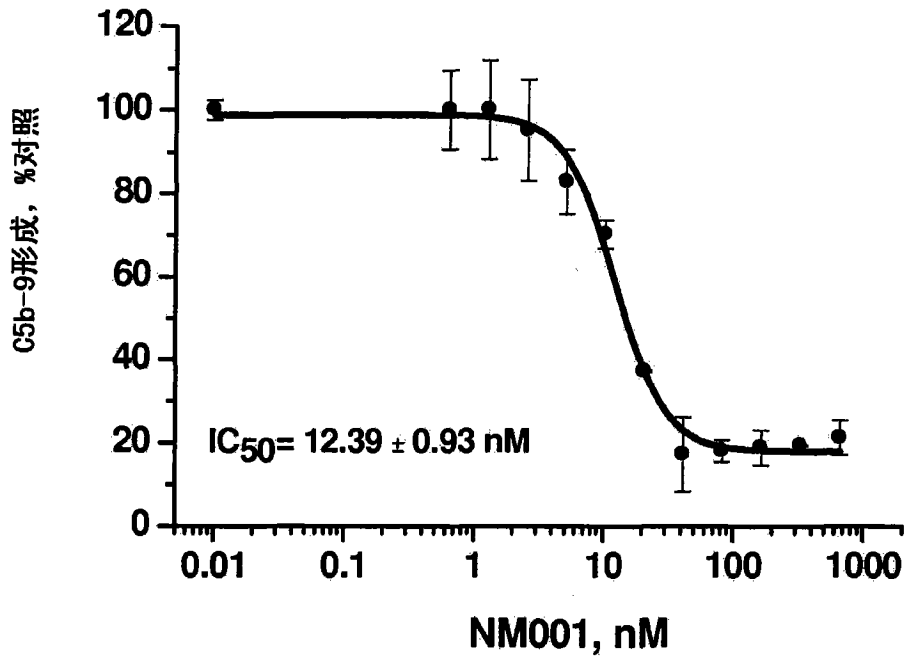


图 22

NM001抑制AP依赖的C3b形成 并阻止备解素-C3b复合物累积

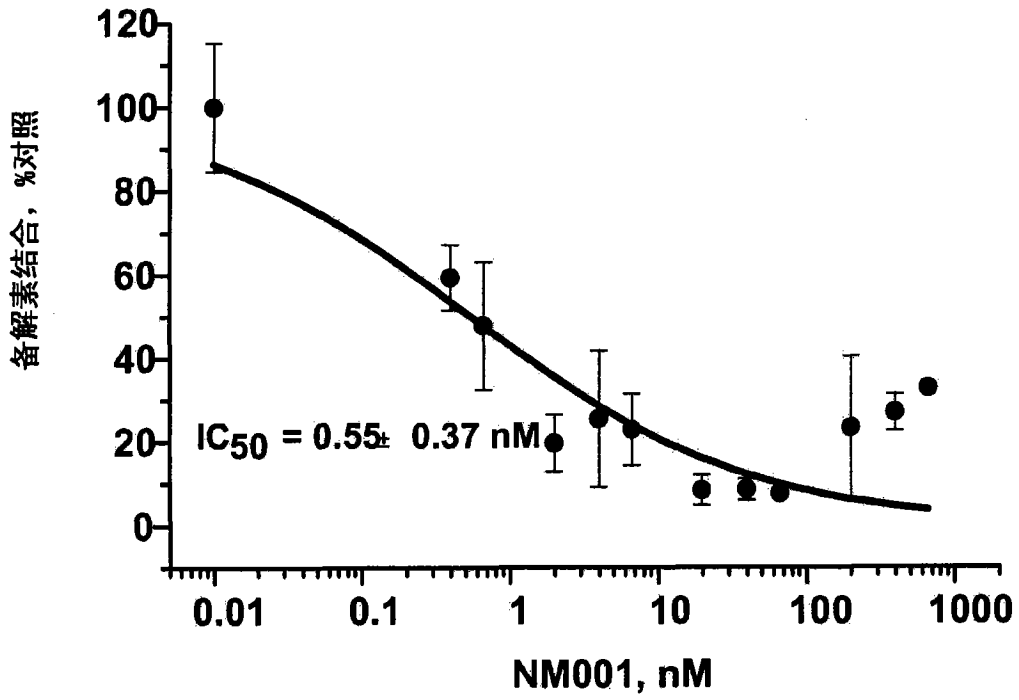


图 23

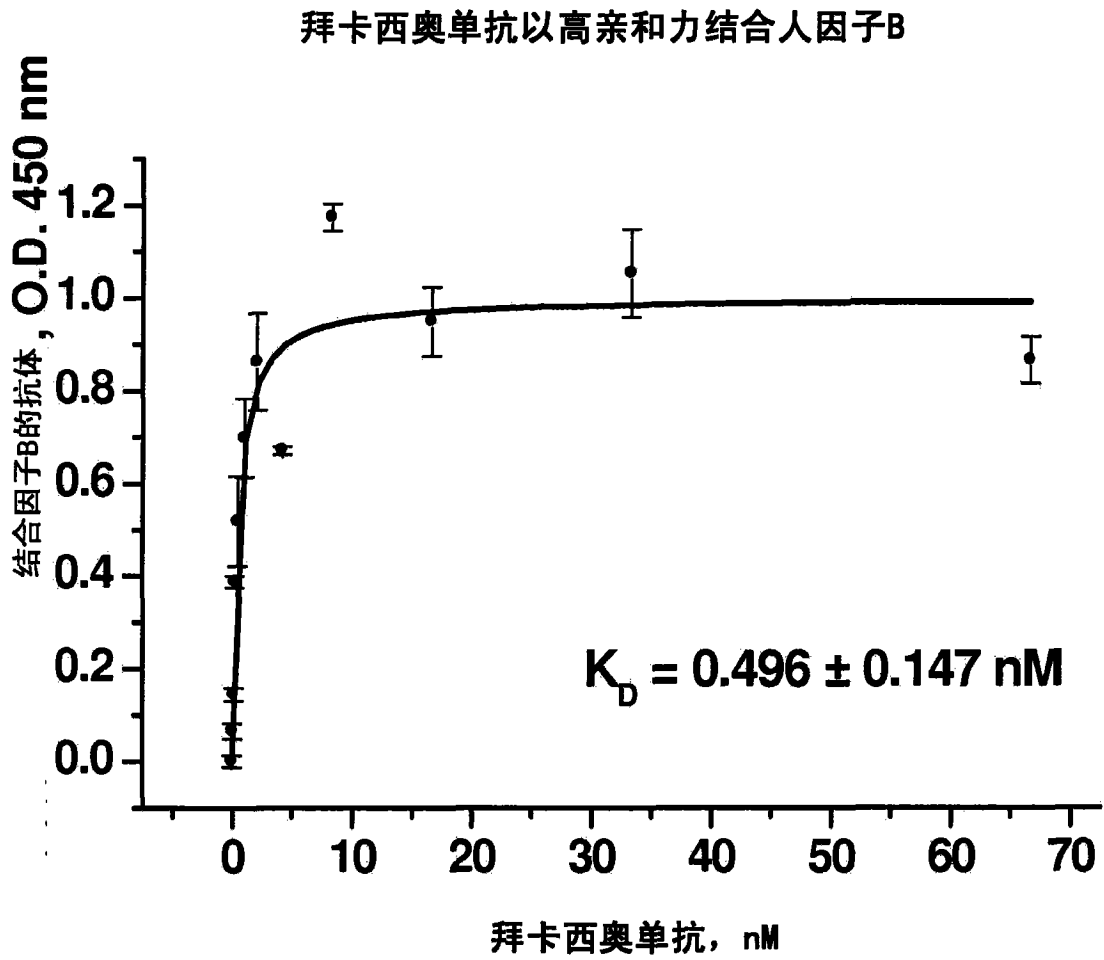


图 24

拜卡西奥单抗抑制AP依赖的溶血

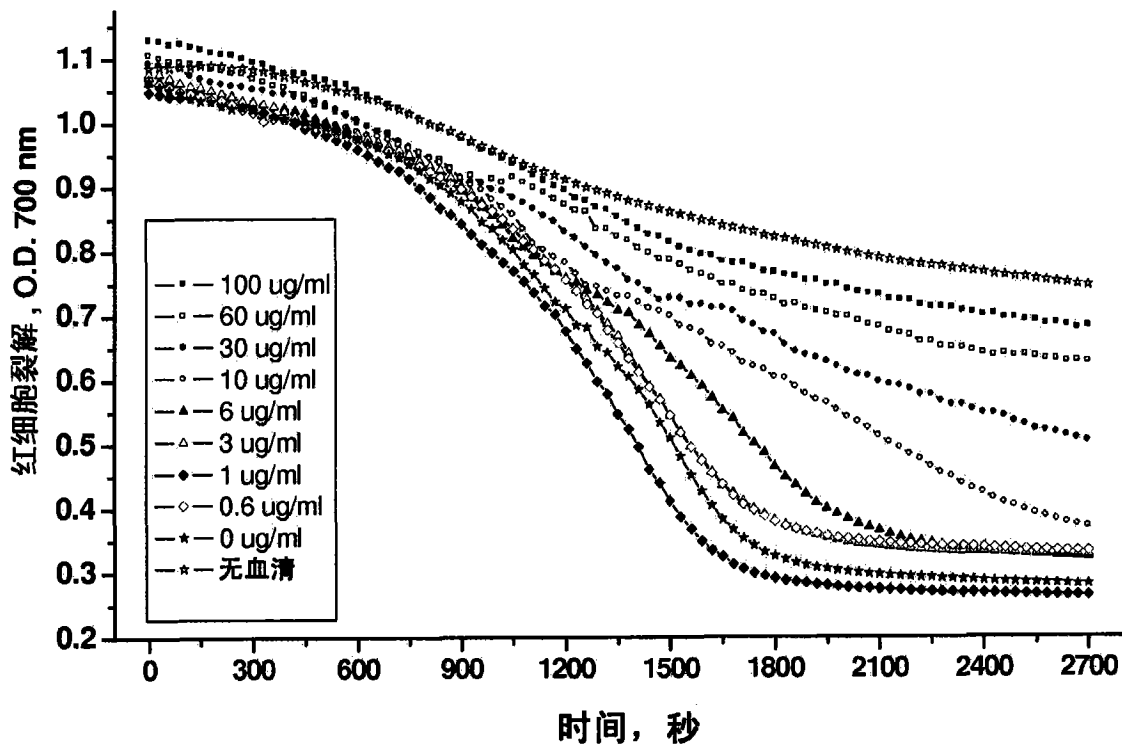


图 25

拜卡西奥单抗不抑制经典通路激活

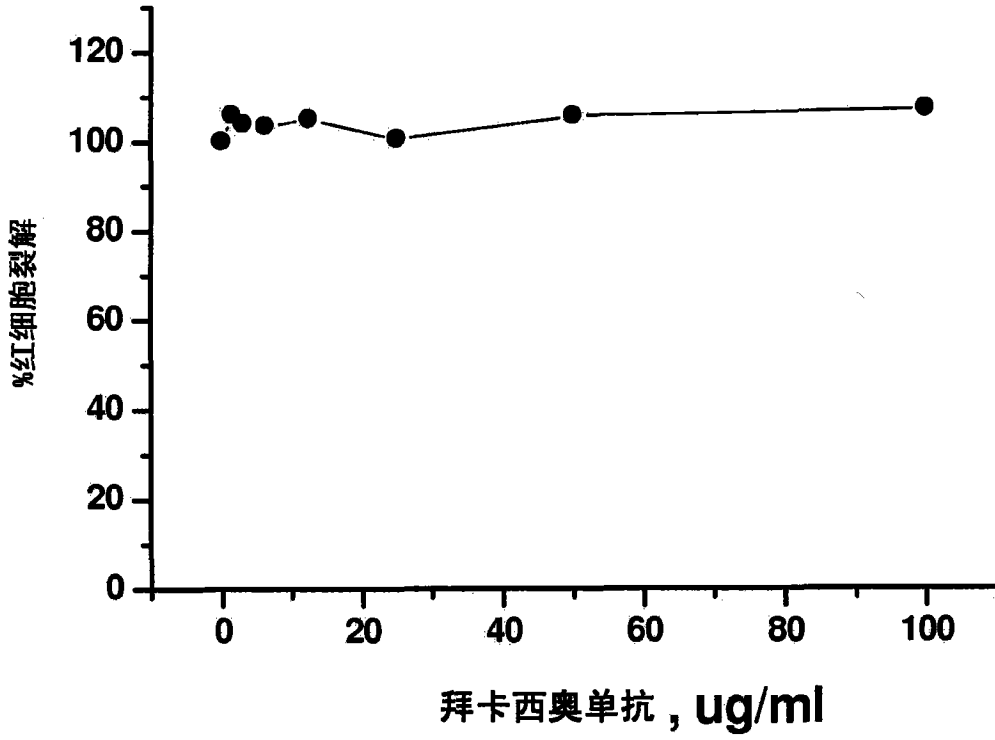


图 26

拜卡西奥单抗抑制正常人血清C3b形成

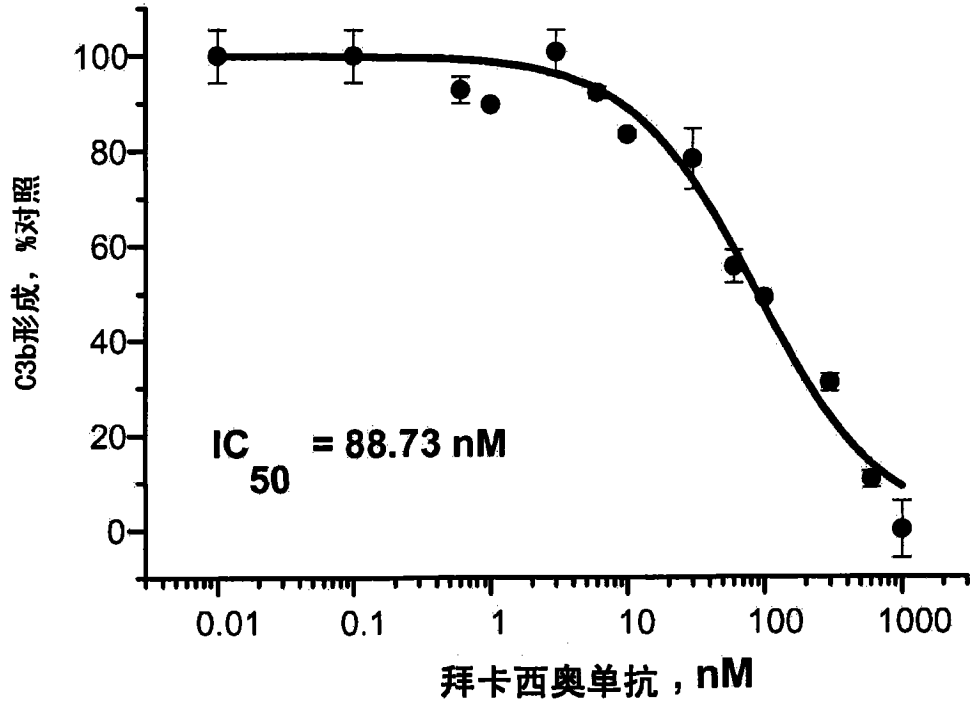


图 27

拜卡西奥单抗抑制正常人血清C5b-9形成

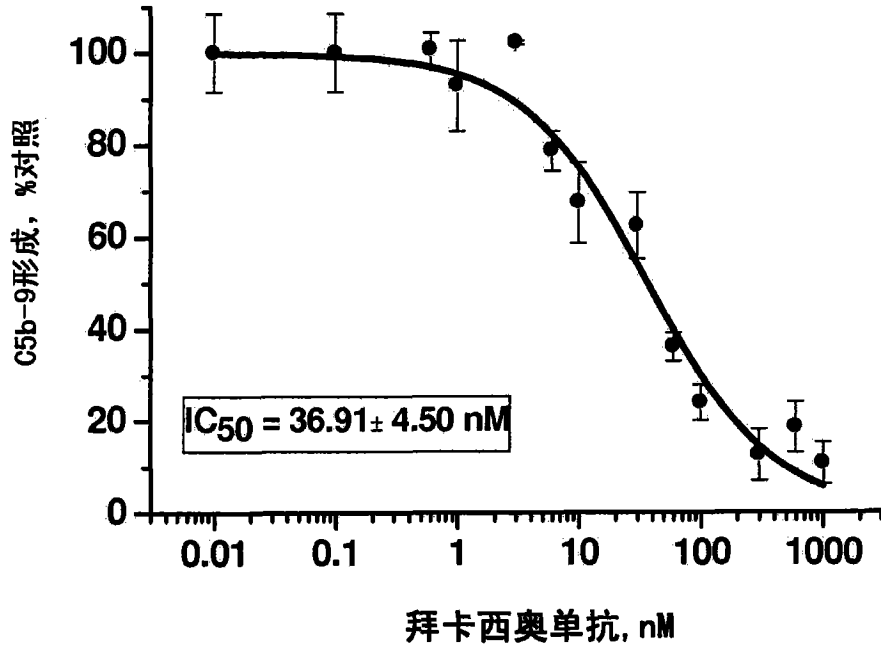


图 28

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时C3b的形成

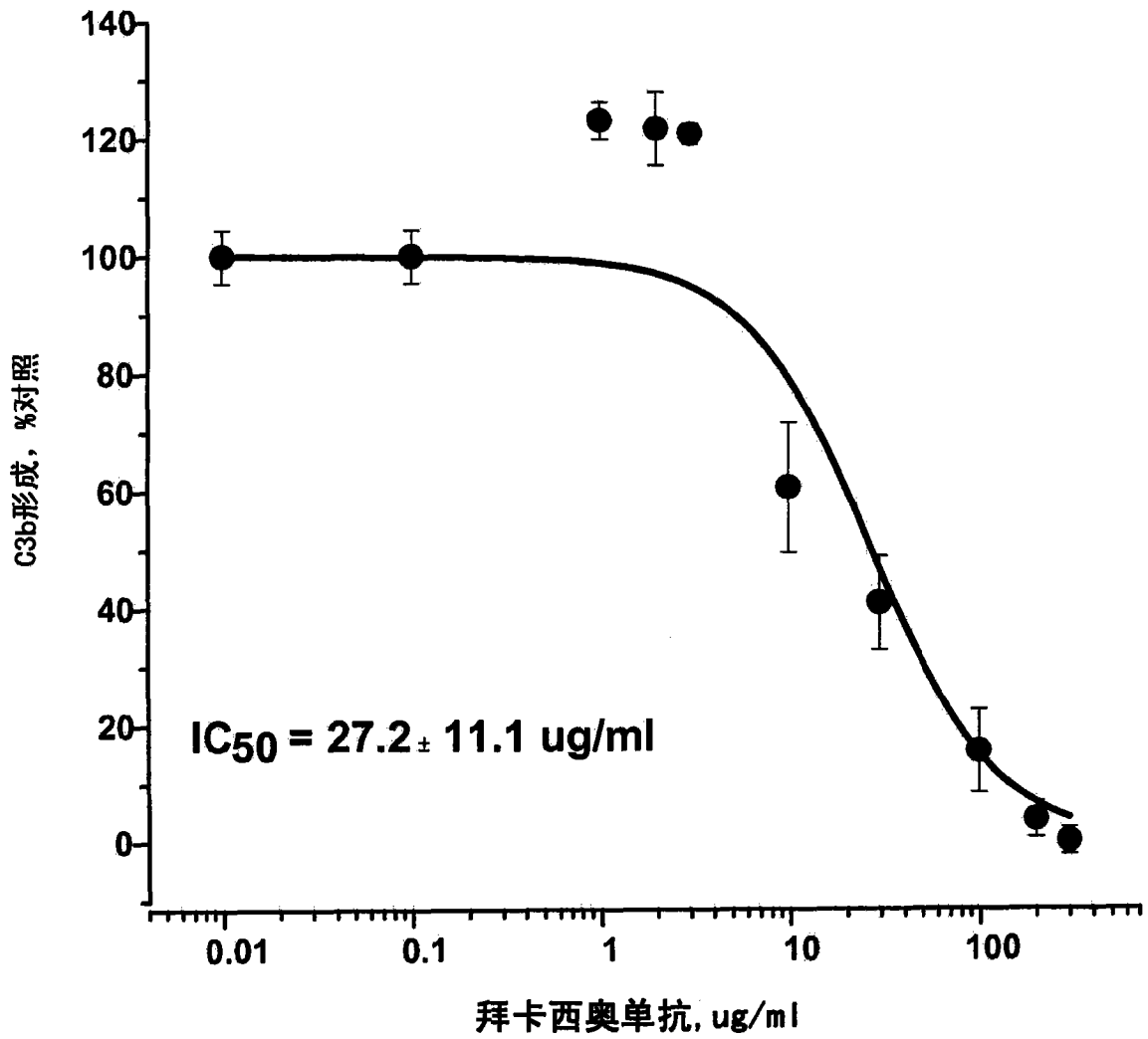


图 29

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时C5a的形成

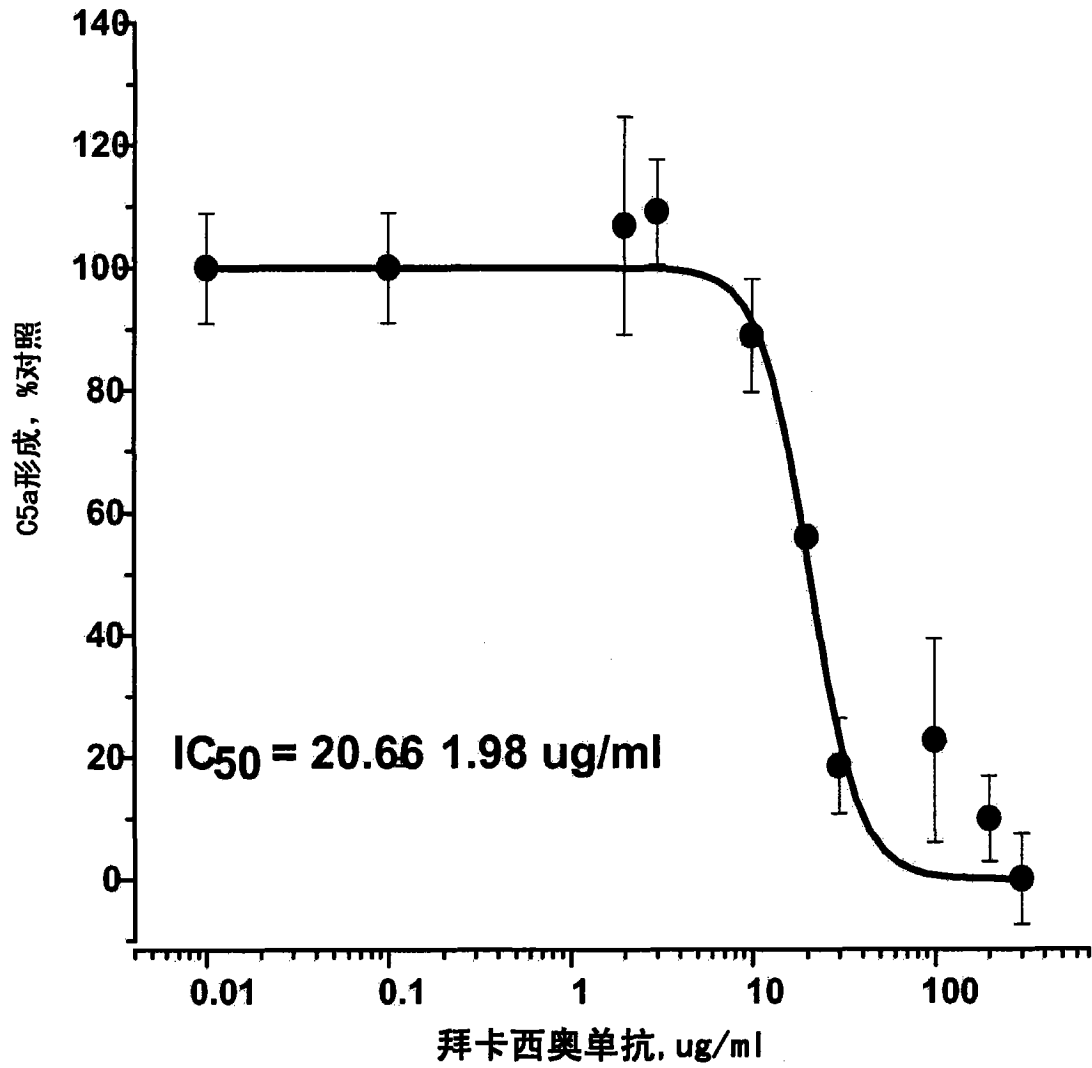


图 30

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时C5b-9的形成

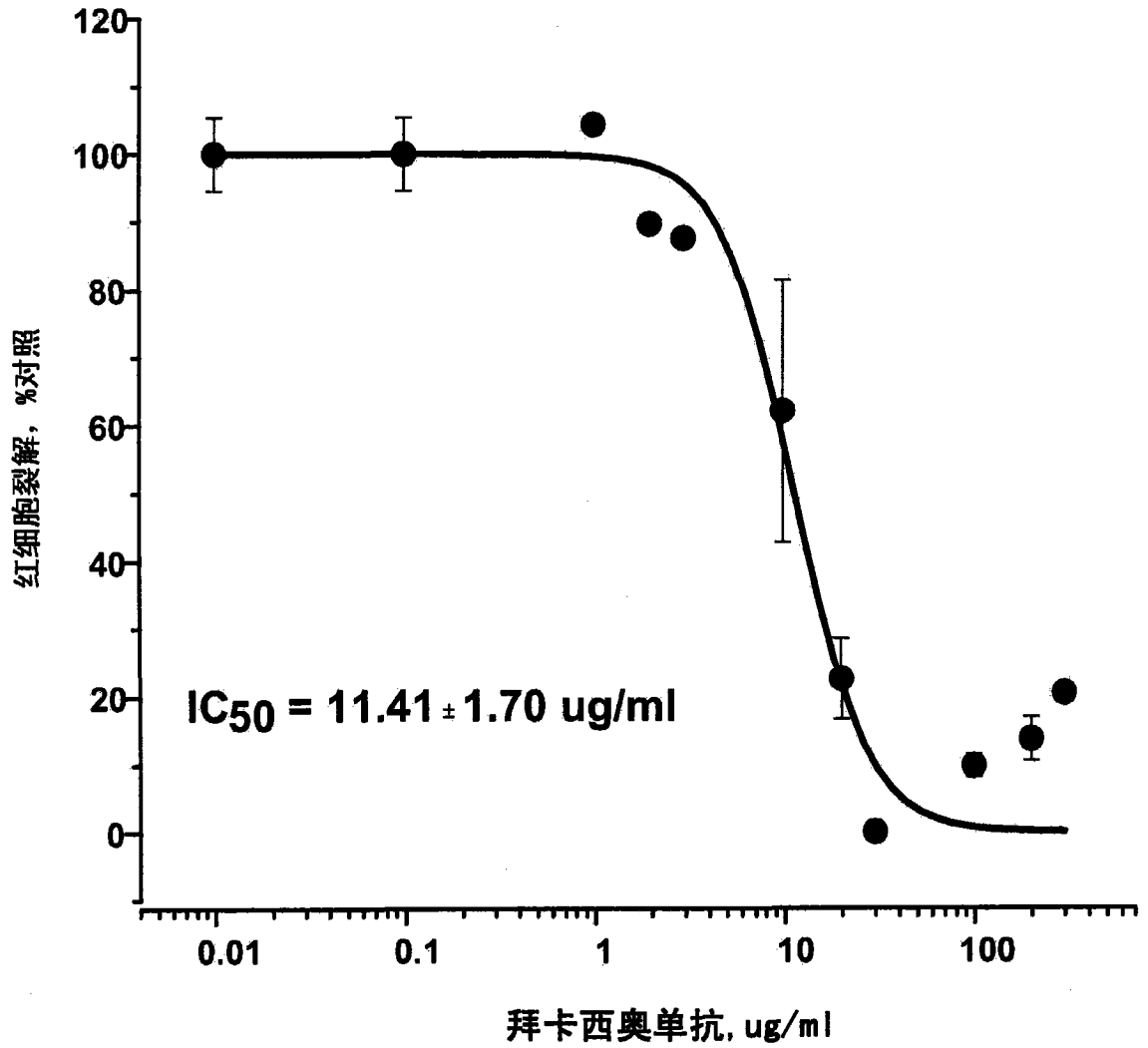


图 31

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时中性粒细胞的活化

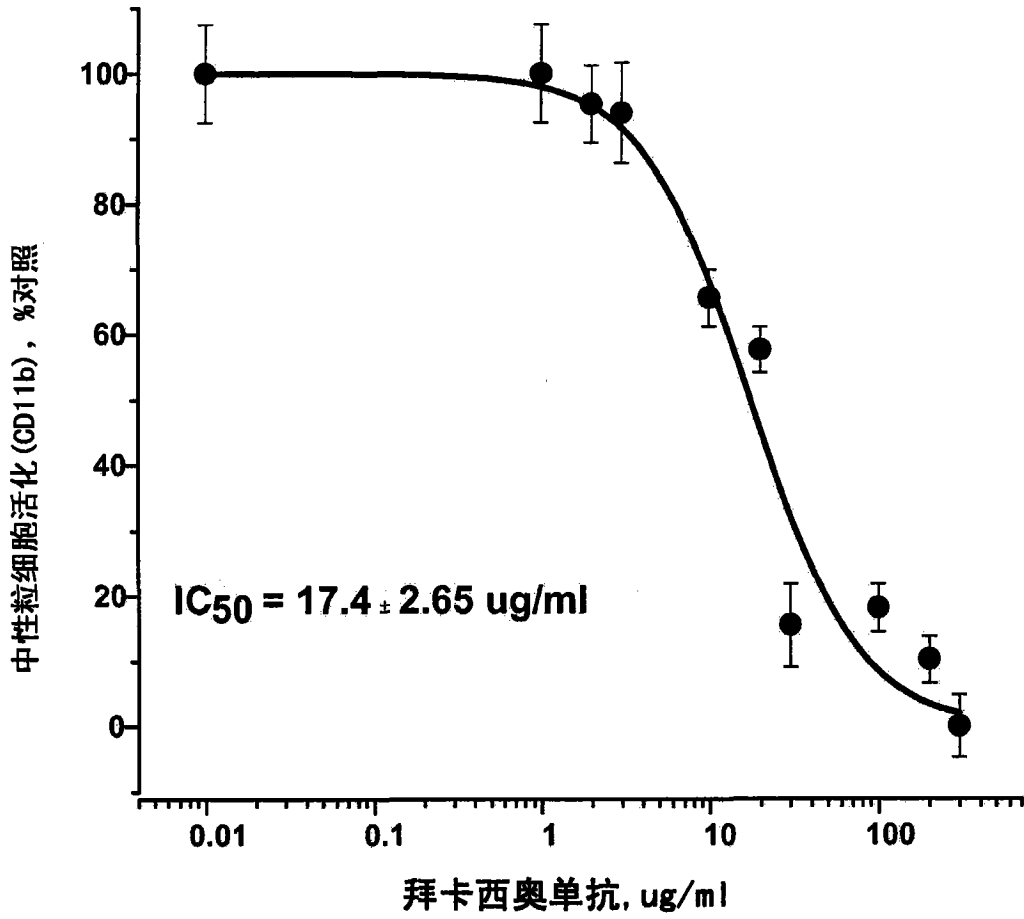


图 32

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时单核细胞的活化

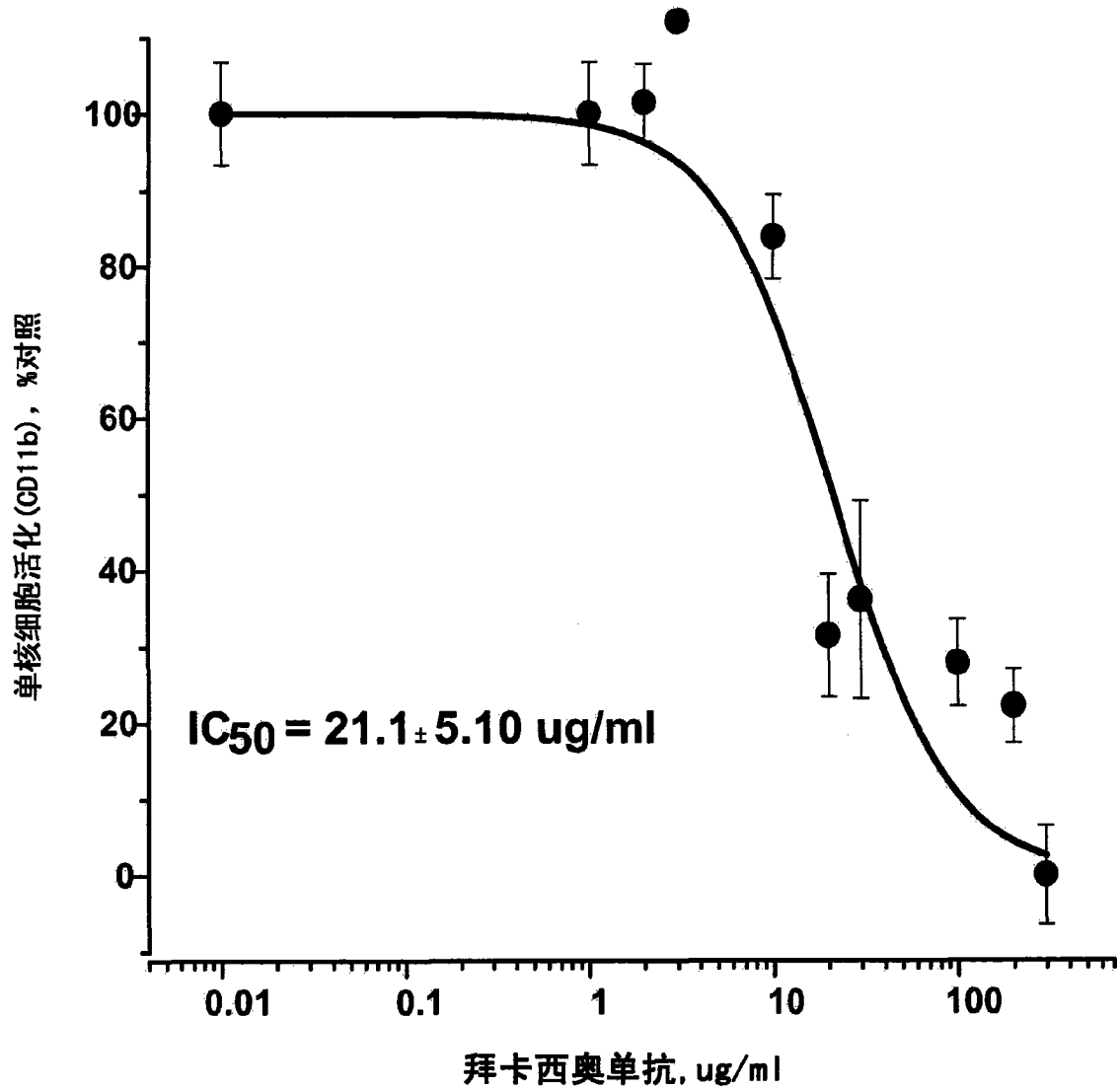


图 33

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时血小板的活化

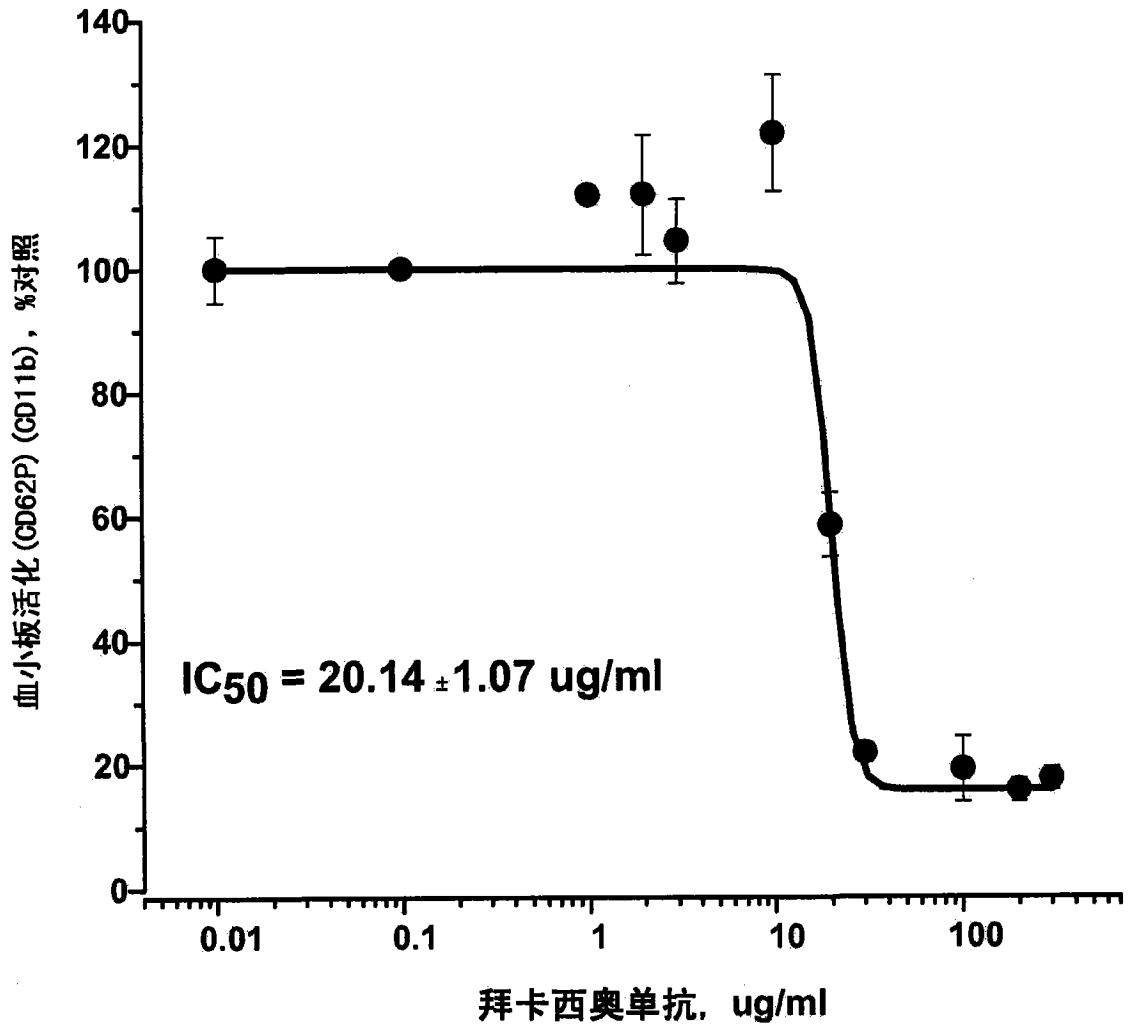


图 34

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时TNF- α 的形成

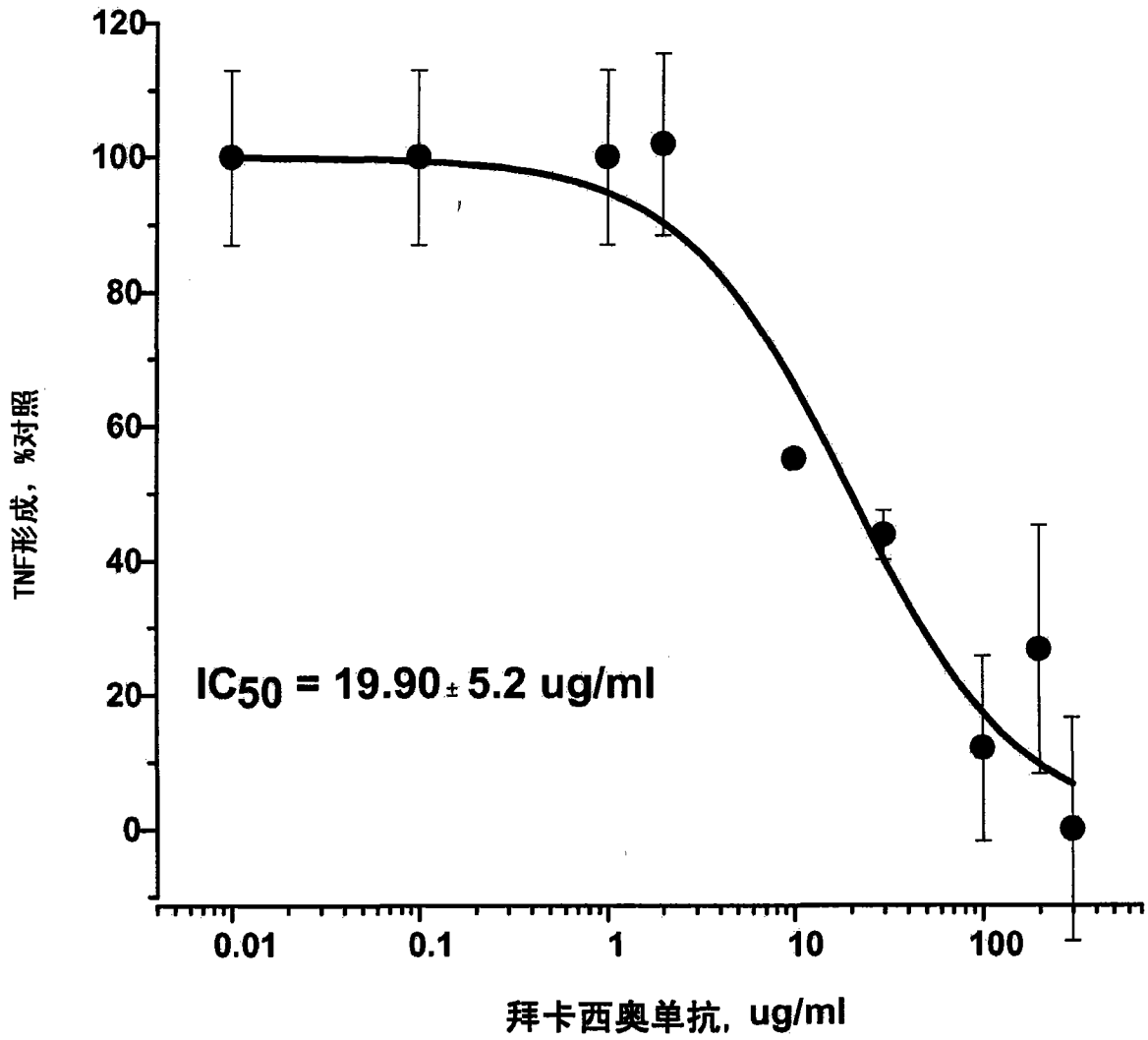


图 35

拜卡西奥单抗抑制人全血体外循环时中性粒细胞弹性蛋白酶的形成

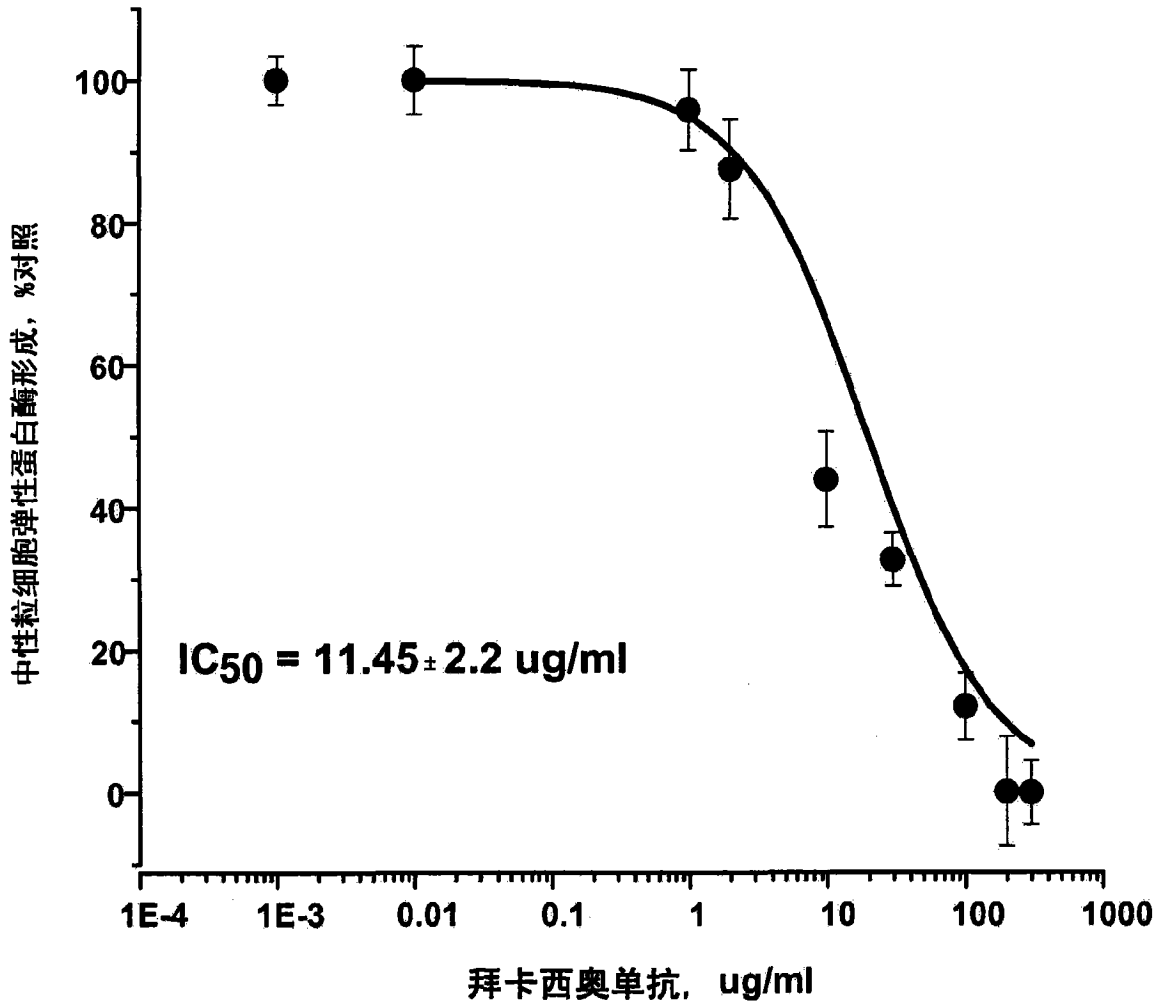


图 35