

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813215.4

**A61K 38/00**

A61K 38/02 A61K 38/17

A61K 39/395 G01N 33/53

C07K 2/00 C07K 14/00

C07K 14/435 C07K 16/18

C07K 16/28 C07H 21/02

C07H 21/04

[43] 公开日 2003 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 1443074A

[22] 申请日 2001.6.8 [21] 申请号 01813215.4

[30] 优先权

[32] 2000. 6. 8 [33] US [31] 60/210,272

[86] 国际申请 PCT/US01/18510 2001.6.8

[87] 国际公布 WO01/93892 英 2001.12.13

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.22

[71] 申请人 血液研究中心

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 迈克尔·C·卡罗尔

小弗朗西斯·D·穆尔

赫伯特·B·赫克特曼

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 8 页 说明书 36 页 序列表 5 页  
附图 6 页

[54] 发明名称 抑制免疫球蛋白介导的再灌注损伤的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了用于治疗或防止受试者中免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法和组合物。提供了鉴定致病性免疫球蛋白和局部缺血抗原或补体途径的成分之间相互作用的抑制剂的方法。还公开了致病性免疫球蛋白及其突变形式。

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

1. 一种在受试者中治疗或预防免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法，包括：
  - 5 给受试者施用有效量的致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂；从而减少与局部缺血特异性抗原结合的致病性免疫球蛋白的数目，以便抑制或减少损伤。
  2. 一种在受试者中治疗或预防免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法，包括：
    - 10 给受试者施用有效量的致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间相互作用的抑制剂；从而减少激活补体活性的致病性免疫球蛋白的数目，以便抑制或减少损伤。
    3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中致病性免疫球蛋白是 IgM。
    4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中致病性免疫球蛋白是 IgM 的一个亚类。
    - 15 5. 权利要求 1 或 2 的方法，其中致病性免疫球蛋白由 B 细胞的一个亚群产生。
    6. 权利要求 1 的方法，其中局部缺血特异性抗原存在于内皮细胞或实质组织的表面。
    7. 权利要求 1 或 2 的方法，其中受试者是哺乳动物。
    - 20 8. 权利要求 7 的方法，其中哺乳动物是人。
    9. 权利要求 1 或 2 的方法，其中再灌注或局部缺血损伤由自然发生的事件引起。
    10. 权利要求 1 或 2 的方法，其中再灌注或局部缺血损伤发生在手术操作期间或之后。
    - 25 11. 权利要求 10 的方法，其中手术操作选自血管成形术，斯腾特氏印模放置操作，粥样硬化斑切除术和旁路手术。
    12. 权利要求 1 或 2 任一项的方法，其中抑制剂选自蛋白质，肽，有机小分子，抗体或其片断，碳水化合物和糖蛋白。
    13. 权利要求 1 或 2 任一项的方法，其中损伤发生在心血管组织。
    - 30 14. 一种治疗或预防受试者中免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法，包括：

从受试者除去或灭活致病性免疫球蛋白或产生该致病性免疫球蛋白的 B 细胞，从而减少受试者中存在的致病性免疫球蛋白或 B 细胞的量。

15. 权利要求 14 的方法，其中除去或灭活步骤回体进行。

16. 权利要求 15 的方法，其中致病性免疫球蛋白的除去或灭活步骤通  
5 过给受试者施用抗独特型抗体进行。

17. 权利要求 16 的方法，其中 B 细胞的除去或灭活步骤通过给受试者施用与毒素偶连的靶向 B 细胞的半分子进行。

18. 权利要求 14 的方法，其中受试者是哺乳动物。

19. 权利要求 18 的方法，其中哺乳动物是人。

10 20. 权利要求 14 的方法，其中损伤发生在体内。

21. 权利要求 14 的方法，其中损伤发生在心血管组织。

22. 一种分离的致病性免疫球蛋白，或其抗原结合部分，具有一种或多种下列特性：(i)能与局部缺血特异性抗原相互作用；(ii)能固定补体；或(iii)由 B 细胞的一个亚群产生。

15 23. 权利要求 22 的致病性免疫球蛋白，它是 IgM。

24. 一种修饰的致病性免疫球蛋白，它具有改变补体结合或活性的突变。

25. 权利要求 24 的修饰的致病性免疫球蛋白，它能与局部缺血特异性抗原相互作用。

20 26. 权利要求 24 的修饰的致病性免疫球蛋白，它是 IgM。

27. 一种用于分离局部缺血特异性抗原的方法，包括：

提供一种致病性免疫球蛋白；

在允许致病性免疫球蛋白与样品特异性结合的条件下，使含有局部缺血特异性抗原的样品与致病性免疫球蛋白接触；

25 检测致病性抗体与样品的结合水平相对于对照的任何改变，其中样品中存在的致病性免疫球蛋白结合水平相对于在对照中所检测到的水平的改变是特异性结合的指标；和

从样品中分离局部缺血特异性抗原。

28. 权利要求 27 的方法，其中该样品富含局部缺血特异性抗原。

30 29. 权利要求 27 的方法，其中该样品从具有再灌注或局部缺血损伤的受试者获得。

30 权利要求 27 的方法，其中该样品是生化分离物。

31 权利要求 27 的方法，其中该样品是表达文库。

32. 一种从众多试验化合物中鉴定致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂的方法，包括：

5 在允许致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原发生结合的条件下，提供包括致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原的反应混合物；

使致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原与一种或多种试验化合物接触，和

10 检测存在给定试验化合物时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原的结合相对于不存在该试验化合物时检测到的结果的任何改变，

其中存在该试验化合物时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的结合水平相对于不存在该试验化合物时所检测到的水平的改变表明，该试验化合物是致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂。

15 33. 一种从众多试验化合物中鉴定致病性免疫球蛋白与补体途径成分之间相互作用的抑制剂的方法，包括：

在允许致病性免疫球蛋白与补体途径成分发生结合的条件下，提供包括致病性免疫球蛋白和补体途径成分的反应混合物；

20 使致病性免疫球蛋白和补体途径成分与一种或多种试验化合物接触，和

检测存在给定试验化合物时致病性免疫球蛋白和补体途径成分的结合相对于不存在该试验化合物时检测到的结合的任何改变，

25 其中存在该试验化合物时致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间的结合水平相对于不存在该试验化合物时所检测到的水平的改变表明，该试验化合物是致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间相互作用的抑制剂。

34. 权利要求 32 或 33 任一项的方法，其中致病性免疫球蛋白是致病性 IgM。

35. 权利要求 32 或 33 任一项的方法，其中局部缺血特异性抗原从内皮组织或内皮裂解产物获得。

30 36. 权利要求 32 或 33 任一项的方法，它在体外进行。

37. 权利要求 32 或 33 任一项的方法，其中致病性免疫球蛋白用可检测

的信号标记。

38. 权利要求 32 或 33 任一项的方法, 其中局部缺血特异性抗原用可检测的信号标记。

39. 权利要求 32 或 33 任一项的方法, 还包括重复至少一个步骤。

5 40. 权利要求 32 或 33 任一项的方法, 其中众多试验化合物包括至少  $10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7$ , 或  $10^8$  种化合物。

41. 权利要求 32 或 33 任一项的方法, 其中该试验化合物是肽或有机小分子。

10 42. 用权利要求 32 的方法鉴定的致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂。

43. 用权利要求 33 的方法鉴定的致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间相互作用的抑制剂。

44. 一种治疗或预防免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法, 包括:

15 给受试者施用通过下述方法测定的具有抑制致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原之间相互作用的特性的一种试剂;

在允许致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原发生结合的条件下, 提供包括致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原的反应混合物;

20 使致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原与该试剂接触, 和检测存在该试剂时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原的结合相对于不存在该试剂时检测到的结合的任何改变,

其中存在该试剂时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的结合水平相对于不存在该试剂时所检测到的水平的改变表明, 该试剂是致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂。

25 45. 一种治疗或预防免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法, 包括:

给受试者施用通过下述方法测定的具有抑制致病性免疫球蛋白与补体途径成分之间相互作用的特性的一种试剂:

30 在允许致病性免疫球蛋白与补体途径成分发生结合的条件下, 提供包括致病性免疫球蛋白和补体途径成分的反应混合物;

使致病性免疫球蛋白和补体途径成分与该试剂接触, 和

检测存在该试剂时致病性免疫球蛋白和补体途径成分结合相对于不存在该试剂时检测到的结合的任何改变，

其中存在该试剂时致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间的结合水平相对于不存在该试剂时所检测到的水平的改变表明，该试剂是致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间相互作用的抑制剂。

46. 一种治疗或预防免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法，包括：

给受试者施用一种试剂，其中在下述试验中检测时所述的试剂能抑制致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原之间的相互作用：

10 在允许致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原发生结合的条件下，提供包括致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原的反应混合物；

使致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原与该试剂接触，和

检测存在该试剂时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原的结合相对于不存在该试剂时检测到的结合的任何改变，

15 其中存在该试剂时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的结合水平相对于不存在该试剂时所检测到的水平的抑制表明，该试剂是致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂。

47. 一种治疗或预防免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法，包括：

20 给受试者施用一种试剂，其中在下述试验中检测时所述的试剂能抑制致病性免疫球蛋白与补体途径成分之间的相互作用：

在允许致病性免疫球蛋白与补体途径成分发生结合的条件下，提供包括致病性免疫球蛋白和补体途径成分的反应混合物；

使致病性免疫球蛋白和补体途径成分与该试剂接触，和

25 检测存在该试剂时致病性免疫球蛋白和补体途径成分的结合相对于不存在该试剂时检测到的结合的任何改变，

其中存在该试剂时致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间的结合水平相对于不存在该试剂时所检测到的水平的抑制表明，该试剂是致病性免疫球蛋白和补体途径成分之间相互作用的抑制剂。

30 48. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白由 B-1 细胞产生。

49. 权利要求 22 的分离的致病性抗体，它由以保藏号\_\_保藏在 ATCC 的杂交瘤产生。
50. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，它具有包含 SEQ ID NO : 8 的氨基酸序列的轻链可变区。
- 5 51. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，它具有包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链可变区。
52. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白具有包括 CDR1 区的轻链可变区，其中所述 CDR1 区包含 SEQ ID NO :10 所示氨基酸序列。
- 10 53. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白具有包括 CDR2 区的轻链可变区，其中所述 CDR2 区包含 SEQ ID NO :12 所示氨基酸序列。
54. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白具有包括 CDR1 区的重链可变区，其中所述 CDR1 区包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列。
- 15 55. 权利要求 22 的分离的致病性抗体，其中该免疫球蛋白具有包括 CDR2 区的重链可变区，其中所述 CDR2 区包含 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列。
56. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白具有包含 SEQ ID NO :8 所示氨基酸序列的轻链可变区，和包含 SEQ ID NO :2 所示氨基酸序列的重链可变区。
- 20 57. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白是人免疫球蛋白。
58. 权利要求 22 的分离的致病性抗体，其中该免疫球蛋白是非人免疫球蛋白。
- 25 59. 权利要求 58 的分离的致病性免疫球蛋白，其中非人抗体来自哺乳动物。
60. 权利要求 59 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该哺乳动物选自奶牛，山羊，小鼠，大鼠，绵羊，猪和兔。
- 30 61. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白是重组抗体。

62. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白，其中该免疫球蛋白包含 SEQ ID NO : 4 和 SEQ ID NO : 6 所示的重链 CDR1 和 CDR2 区，或其抗原结合片断，和 SEQ ID NO : 10 和 SEQ ID NO : 12 所示的轻链 CDR1 和 CDR2 区，或其抗原结合片断。
- 5        63. 权利要求 62 的分离的致病性抗体，其中该免疫球蛋白包含人框架区。
64. 一种分离的核酸分子，它选自：
- a) 包含与 SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 5 的核苷酸序列有至少 96% 相同的核苷酸序列的核酸分子；
- 10        b) 包含 SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 3 或 SEQ ID NO : 5 的核苷酸序列的核酸分子；和
- c) 在严格条件下与 SEQ ID NO : 1 的核苷酸序列杂交的核酸分子。
65. 编码包含 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4 或 SEQ ID NO : 6 的氨基酸序列的多肽的分离的核酸分子。
- 15        66. 权利要求 64 的核酸分子，它还包含载体核酸序列。
67. 含有权利要求 64 的核酸分子的宿主细胞。
68. 权利要求 66 的宿主细胞，它是哺乳动物宿主细胞。
69. 一种分离的核酸分子，它选自：
- a) 包含与 SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 9 或 SEQ ID NO : 11 的核苷酸序列有至少 96% 相同的核苷酸序列的核酸分子；
- 20        b) 包含 SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 9 或 SEQ ID NO : 11 的核苷酸序列的核酸分子；
- c) 在严格条件下与 SEQ ID NO : 7 的核苷酸序列杂交的核酸分子。
70. 编码包含 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10 或 SEQ ID NO : 12 的氨基酸序列的多肽的分离的核酸分子。
- 25        71. 权利要求 69 的核酸分子，它还包含载体核酸序列。
72. 含有权利要求 69 的核酸分子的宿主细胞。
73. 权利要求 72 的宿主细胞，它是哺乳动物宿主细胞。
74. 一种分离的多肽，含有 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, 或 SEQ ID
- 30        NO : 6 的氨基酸序列。
75. 权利要求 74 的多肽，其中该多肽包含 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序



列。

76. 一种分离的多肽, 含有 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO :10,或 SEQ ID NO : 12 的氨基酸序列。

77. 权利要求 76 的多肽, 其中该多肽包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列。

5 78. 一种生产多肽的方法, 该方法包括在表达核酸分子的条件培养权利要求 67 的宿主细胞。

79. 一种生产多肽的方法, 该方法包括在表达核酸分子的条件培养权利要求 72 的宿主细胞。

10 80. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白, 其中该免疫球蛋白具有包含 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO : 10 的氨基酸序列的轻链可变区。

81. 权利要求 22 的分离的致病性免疫球蛋白, 其中该免疫球蛋白具有包含 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列和 SEQ ID NO : 6 的氨基酸序列的重链可变区。

抑制免疫球蛋白介导的再灌注损伤  
的方法和组合物

5

发明背景

补体系统参与先天性和适应性免疫(Muller-Eberhard, H. J. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57,321-347; Carroll, M. C. (1998)Ann. Rev. Immunol 16, 545-568; Fearon 等, (1995) Annu. Rev. Immunol 13, 127-149)。最近使用血清补体或补体受体的特定成分缺陷型小鼠(例如, CD21/CD35)的研究不仅证实了补体的许多已知作用, 而且清楚地显示了在天然和适应性免疫中重要的新机制 (Carroll, M. C. (1998)出处同上)。例如, 补体增强对 T-依赖型抗原产生记忆反应的一种机制是通过 CD21/CD19/Tapa-1 共同受体介导在生发中心(GC) B 细胞中的残存信号。另外, 缺陷型小鼠在证实将传统途径鉴定为诱导损伤所必需的重要性中是重要的 (Weiser 等, (1996) J Exp. Med. 1857-1864)。

局部缺血再灌注(reperfusion)(I/R)损伤表现为在低含氧量组织的再灌注后对内皮和下面的实质组织的炎症性损伤。它是导致对包括诸如心肌, 中枢神经系统, 下肢和肠的各种组织急性和慢性损伤的全身性综合征。局部缺血再灌注损伤可导致坏死和不可逆的细胞损伤。例如, 局部缺血性骨骼肌的再灌注导致内皮细胞损伤, 其特征在于带有渗透性水肿的血管渗漏(Weiser 等, (1996) J. Exp. Med. 1857-1864), 小肠再灌注导致粘膜破坏(Williams, 等, (1999) J; Appl. Physiol., 938-942)。一般来说, 局部缺血的时间越长, 炎症性反应越显著。I/R 损伤的程度也由诸如局部缺血区域的大小和涉及的具体组织等因素来决定(Williams, 等, (1999) J. Appl. Physiol., 938-942)。

I/R 损伤的主要介质是补体系统。Weisman 等报道了在大鼠心脏模型中使用补体 C3b 的可溶性抑制剂(sCRI) 部分抑制 I/R 损伤的机制(Weisman 等 (1990) Science 249,146-151)。可溶性 CR1 受体在灭活 C3 转化酶(convertase), 即将天然 C3 转化成其活性 C3b 形式的酶复合物中非常有效。CR1 受体充当在 C3b 的因子 I 裂解中和和在从转化酶转移 C3b 中的辅因子。局部缺血诱导

5 前用 sCR1 静脉内注射小鼠明显减小对处理动物的再灌注损伤。处理动物的组织学检查揭示出在心肌中补体沉积水平和组织损伤程度减小(Weisman 等, (1990)出处同上)。在下肢损伤模型中用 sCR1 预处理小鼠获得了相似的结果(Hill 等(1992) J. Immunol. 149,1723-1730)。在该模型中, 通过在下肢放置止血器使流向下层下肢的血流被阻断大约 2 小时。在流向该组织的血流恢复前, 小鼠静脉内施用放射性碘标记的白蛋白作为渗透性的标记。

10 尽管这些研究确定了损伤由补体介导, 但他们没有阐述引发损伤的机理问题。Weiser 等证实了抗体缺陷型小鼠部分防止在下肢模型中的损伤。通过用正常的小鼠血清重建可回复损伤。Williams 等将该观察延伸到小肠模型中并证实了纯化的 IgM 足以在抗体缺陷型小鼠中回复损伤。

### 发明概述

15 本发明部分基于对致病性免疫球蛋白(Ig), 特别是识别局部缺血特异性抗原的致病性 IgM 的鉴定。不受理论的约束, 据信这些致病性 IgM 与局部缺血特异性抗原的结合触发特别是补体途径的激活, 最终导致再灌注或局部缺血损伤。申请人还揭示了致病性 IgM 由本文称为“B-1 细胞”的 B 细胞亚群产生。

20 因此, 本发明的特征在于一种治疗或预防受试者中免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法, 包括给受试者施用有效量的致病性免疫球蛋白, 例如, 致病性 IgM 与局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂, 从而减少与局部缺血特异性抗原结合的致病性免疫球蛋白的数目, 以便抑制或减小损伤。

25 在一个优选的实施方案中, 再灌注或局部缺血损伤在自然出现的发作, 例如中风后产生。再灌注或局部缺血损伤可在手术操作期间和/或之后出现。引起损伤的举例性手术操作包括选自血管成形术, 斯腾特氏印模放置操作, 粥样硬化斑切除术和旁路手术的血管矫正技术。在一个优选的实施方案中, 再灌注或局部缺血损伤在心血管组织, 例如心脏中发生。

30 优选的是, 本发明的抑制剂通过一种或多种下列活性拮抗致病性免疫球蛋白: (i)抑制或减少致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的相互作用(例如, 结合); (ii)抑制或减少致病性免疫球蛋白和补体途径的成分之间的相互作用(例如, 结合); (iii)中和致病性免疫球蛋白, 例如, 通过螯合

免疫球蛋白和/或瞄准其降解；或(iv)抑制或减少致病性免疫球蛋白的产生，例如抑制致病性抗体的合成，装配，和/或翻译后修饰。该抑制剂可以是蛋白质或肽；小分子；抗体或其片断，例如，抗独特型抗体；糖类；或糖蛋白。在另一优选的实施方案中，抑制剂可以是本文所述的修饰抗体。在一个优选的实施方案中，在几小时，几天，几周，几月或几年的时间内一次或连续接触施用该抑制剂。抑制剂可在引起损伤的自然发生的发作之前，期间和/或之后施用。该抑制剂也可在手术操作，例如与再灌注或局部缺血损伤相关的手术操作之前，期间和/或之后施用。在一个优选的实施方案中，该抑制剂可与其它治疗剂，例如，抗凝剂，补体抑制剂结合施用。

10 在另一方面，本发明的特征在于一种治疗或预防受试者中免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法，包括给受试者施用有效量的致病性免疫球蛋白，例如，致病性 IgM 与补体途径的成分之间相互作用的抑制剂，从而减少激活补体活性的致病性免疫球蛋白的数目，以便抑制或减小损伤。

15 在一个优选的实施方案中，致病性免疫球蛋白是 IgM 或 IgG (例如，IgG1 和 IgG3)。优选的是，致病性免疫球蛋白是 IgM，且更优选的是，它是 IgM 亚类。在另一优选的实施方案中，致病性免疫球蛋白由 B 细胞的一个亚群，例如，B-1 细胞产生，或者致病性免疫球蛋白由将以保藏号\_\_保藏在 ATCC 的杂交瘤产生。致病性免疫球蛋白具有包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的轻链可变区和包含 SEQ ID NO:8 所示氨基酸序列的重链可变区。在一个  
20 优选的实施方案中，局部缺血特异性抗原存在于内皮细胞和/或实质组织的表面。

在优选的实施方案中，补体途径是传统的补体途径，且补体途径的成分可以是 C1 分子或其亚基(例如，C1q)。在另一实施方案中，受试者是哺乳动物，例如，啮齿类(例如，小鼠)或灵长类(例如，人类)。

25 在一个优选的实施方案中，再灌注或局部缺血损伤在自然出现的发作，例如中风后产生。再灌注或局部缺血损伤可在手术操作期间和/或之后出现。引起损伤的举例性手术操作包括选自血管成形术，斯腾特氏印模放置操作，粥样硬化斑切除术和旁路手术的血管矫正技术。在一个优选的实施方案中，再灌注或局部缺血损伤在心血管组织，例如心脏中发生。

30 优选的是，本发明的抑制剂通过一种或多种下列活性拮抗致病性免疫球蛋白：(i)抑制或减少致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的相

互作用(例如, 结合); (ii)抑制或减少致病性免疫球蛋白和补体途径的成分之间的相互作用(例如, 结合); (iii)中和致病性免疫球蛋白, 例如, 通过螯合免疫球蛋白和/或瞄准其降解; 或(iv)抑制或减少致病性免疫球蛋白的产生, 例如抑制致病性抗体的合成, 装配, 和/或翻译后修饰。该抑制剂可以是蛋白质或肽; 小分子; 抗体或其片断, 例如, 抗独特型抗体; 糖类; 或糖蛋白。在另一优选的实施方案中, 抑制剂可以是本文所述的修饰抗体。在一个优选的实施方案中, 在几小时, 几天, 几周, 几月或几年的时间内一次或连续接触施用该抑制剂。抑制剂可在引起损伤的自然发生的发作之前, 期间和/或之后施用。该抑制剂也可在手术操作, 例如与再灌注或局部缺血损伤相关的手术操作之前, 期间和/或之后施用。在一个优选的实施方案中, 该抑制剂可与其它治疗剂, 例如, 抗凝剂, 补体抑制剂结合施用。

在另一方面, 本发明的特征在于一种治疗或预防受试者中免疫球蛋白介导的再灌注或局部缺血损伤的方法, 包括从受试者中除去或灭活致病性免疫球蛋白, 例如, 本文所述的致病性 IgM, 和/或产生致病性免疫球蛋白的 B 细胞(例如, 本文所述的 B-1 细胞), 从而减少受试者中存在的致病性免疫球蛋白和/或 B 细胞的量。

在一个优选的实施方案中, 除去或灭活步骤回体(*ex vivo*)进行。在一个实施方案中, 致病性免疫球蛋白或 B 细胞可通过血灌注除去。在另一实施方案中, 可使用 B 细胞特异性抗体(例如, 抗-B-1 抗体或抗-CD5 抗体或抗 CD11G/CD18)除去 B 细胞。可通过用固定的抗原(例如, 局部缺血特异性抗原)或固定的抗独特型抗体接触来自受试者的血液除去致病性免疫球蛋白, 例如, IgM。在一个优选的实施方案中, 致病性免疫球蛋白的除去或灭活步骤通过给受试者施用抗独特型抗体进行。在另一实施方案中, B 细胞的除去或灭活步骤通过给受试者施用与毒素, 例如, 蓖麻毒或白喉毒素偶连的 B 细胞靶向半分子(例如, 抗体或其抗原结合片断, 或抗原)进行。在一个优选的实施方案中, 受试者是哺乳动物, 例如, 啮齿类(例如, 小鼠)或灵长类(例如, 人类)。在一个优选的实施方案中, 再灌注或局部缺血损伤在自然发生的发作, 例如, 中风后产生。优选的是, 除去步骤在自然发生的发作后几分钟, 1 至 5 小时, 5 至 10 小时, 10 至 24 小时, 1 至 5 天内进行。在一个优选的实施方案中, 再灌注或局部缺血损伤在心血管组织, 例如, 心脏中发生。在另一实施方案中, 通过在手术操作之前, 期间, 和/或之后从受试

者除去致病性免疫球蛋白,和/或 B 细胞预防和/或减小再灌注或局部缺血损伤。例如,可在手术操作前至少 1 到 5 小时, 5 到 10 小时, 10 到 20 小时, 或 1, 2 或 3 天进行除去步骤。

在另一方面,本发明的特征在于一种分离的致病性免疫球蛋白,例如  
5 本文所述的致病性 IgM。优选的是,致病性免疫球蛋白具有一种或多种下列特性:(i)能与局部缺血特异性抗原相互作用;(ii)能固定补体;或(iii)由 B 细胞的一个亚群产生。在一个优选的实施方案中,致病性免疫球蛋白由 B 细胞的一个亚群,例如, B-1 细胞产生。在另一实施方案中,致病性免疫球蛋白由将在 ATCC 保藏,具有保藏号\_\_\_\_的杂交瘤产生。致病性免疫球蛋白  
10 白可具有包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的轻链可变区。在另一实施方案中,致病性免疫球蛋白具有包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的重链可变区。在另一实施方案中,致病性免疫球蛋白与存在于内皮细胞表面的局部缺血特异性抗原相互作用(例如,结合)。

在另一方面,本发明的特征在于一种致病性免疫球蛋白,例如,本文  
15 所述的致病性 IgM。在一个优选的实施方案中,致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原相互作用(例如,结合)。致病性免疫球蛋白可显示出降低激活补体的能力。在一个优选的实施方案中,致病性免疫球蛋白具有一个或多个氨基酸取代,缺失,和/或插入。例如,涉及补体结合和/或激活的一个或多个氨基酸残基被突变。在一个优选的实施方案中,致病性免疫球蛋白  
20 是由将在 ATCC 保藏,具有保藏号\_\_\_\_的细胞系产生的致病性免疫球蛋白。在其它实施方案中,致病性抗体,或其抗原结合部分具有包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的轻链可变区或其片断。在其它实施方案中,致病性抗体至少包含 SEQ ID NO: 10 的 CDR1 区,或其抗原结合部分,和/或至少一个 SEQ ID NO: 12 的 CDR2 区,或其抗原结合部分。优选的是,致病性抗体至少包  
25 含 SEQ ID NO: 10 的 CDR1 区,和 SEQ ID NO: 12 的 CDR2 区,或其抗原结合部分。在另一实施方案中,致病性抗体,或其抗原结合部分具有包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的重链可变区或其片断。在其它实施方案中,致病性抗体至少包含 SEQ ID NO: 4 的 CDR1 区,或其抗原结合部分,和/或至少一个 SEQ ID NO: 6 的 CDR2 区,或其抗原结合部分。优选的是,致  
30 病性抗体至少包含 SEQ ID NO: 4 的 CDR1 区,和 SEQ ID NO: 6 的 CDR2 区,或其抗原结合部分。

在另一实施方案中，致病性抗体，或其抗原结合部分具有包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列的轻链可变区，或其抗原结合片断，以及包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的重链可变区，或其抗原结合片断。致病性抗体可以是对局部缺血特异性抗原具有的结合亲和力类似于，例如大于，小于，或等于由将在 ATCC 保藏，具有保藏号\_\_\_\_的杂交瘤产生的致病性抗体的结合亲和力的人抗体。在另一实施方案中，致病性抗体可以是非人抗体，例如，奶牛，山羊，小鼠，大鼠，绵羊，猪或兔抗体。优选的是，非人抗体是鼠抗体。致病性抗体可以是重组抗体。在一个优选的实施方案中，致病性抗体是人源化的抗体。在另一实施方案中，分离的致病性免疫球蛋白与由将在 ATCC 保藏，具有保藏号\_\_\_\_的杂交瘤产生的免疫球蛋白具有相同的抗原特异性。

在另一方面，本发明的特征在于一种用于分离局部缺血特异性抗原的方法，包括提供一种致病性免疫球蛋白，例如，致病性 IgM，例如本文所述的致病性 IgM，在允许致病性免疫球蛋白与样品特异性结合的条件下接触含有局部缺血特异性抗原的样品，例如生化分离物(例如，内皮细胞分离物)，或蛋白质库(例如，表达文库)与致病性免疫球蛋白，检测致病性抗体与样品的结合水平相对于对照的任何改变，其中样品中存在的致病性免疫球蛋白结合水平相对于在对照中所检测到的改变是特异性结合的指标，以及从样品中分离，例如纯化局部缺血特异性抗原。在一个优选的实施方案中，样品富集局部缺血特异性抗原，例如，所述抗原从再灌注或局部缺血损伤的受试者(例如，人类患者)中获得。在其它实施方案中，样品是生化分离物，例如内皮组织，或者表达文库，例如来自内皮组织的文库。在一个优选的实施方案中，接触步骤在体外发生。

在另一方面，本发明的特征在于一种从一种或多种(例如，众多的)试验化合物中鉴定致病性免疫球蛋白，例如致病性 IgM 与局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂的方法，包括在允许致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原发生结合的条件下提供包括致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原(例如，从带有再灌注或局部缺血损伤的受试者(例如，人类患者)获得的内皮组织或裂解产物)的反应混合物，接触致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原与一种或多种试验化合物(例如，组合文库的成员)，并检测存在给定试验化合物时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原结合相对于

不存在该试验化合物时检测到的结果的任何改变，其中存在该试验化合物时致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的结合水平相对于不存在该试验化合物时所检测到的水平的改变(例如，下降)表明该试验化合物是致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用的抑制剂。在一个优选的实施方案中，接触步骤在体内实现。该方法可进一步包括用一种或多种试验化合物预处理致病性免疫球蛋白。然后可将预处理的致病性免疫球蛋白注射进致病性免疫球蛋白缺陷型小鼠中。

在另一方面，本发明的特征在于一种从一种或多种(例如，众多的)试验化合物中鉴定致病性免疫球蛋白，例如致病性 IgM 与补体途径的成分之间相互作用的抑制剂的方法，包括在允许致病性免疫球蛋白与补体途径的成分发生结合的条件下提供包括致病性免疫球蛋白和补体途径的成分的反应混合物，使致病性免疫球蛋白和补体途径的成分与一种或多种试验化合物(例如，组合文库的成员)接触，并检测存在给定试验化合物时致病性免疫球蛋白和补体途径的成分结合相对于不存在该试验化合物时检测到的结果的任何改变，其中存在该试验化合物时致病性免疫球蛋白和补体途径的成分之间的结合水平相对于不存在该试验化合物时所检测到的水平的改变(例如，下降)表明该试验化合物是致病性免疫球蛋白和补体途径的成分之间相互作用的抑制剂。在优选的实施方案中，致病性免疫球蛋白是本文所述的致病性 IgM，且局部缺血特异性抗原从带有再灌注或局部缺血损伤的受试者(例如，人类患者)获得的内皮组织或裂解产物获得。在另一实施方案中，该方法在体外进行。在一个优选的实施方案中，致病性免疫球蛋白或局部缺血特异性抗原之一(或两者)用可检测的信号，例如，荧光团，比色酶，放射性同位素，发光化合物等标记。该方法可进一步包括重复至少一个步骤，例如，与文库的第二个或下一个成员或多个成员的接触步骤。在一个优选的实施方案中，检测了众多试验化合物，例如，文库成员。众多的试验化合物，例如文库成员可包括至少  $10$ ， $10^2$ ， $10^3$ ， $10^4$ ， $10^5$ ， $10^6$ ， $10^7$ ，或  $10^8$  个化合物。在一个优选的实施方案中，众多的试验化合物，例如文库成员共有一种结构或功能特性。试验化合物可以是肽或有机小分子。在另一实施方案中，补体途径是经典补体途径。在一个优选的实施方案中，补体途径的成分是 C1 分子或其亚基(例如，C1q)。

在另一方面，本发明的特征在于一种编码致病性 IgM 抗体，或其片断



5 的分离的核酸。在优选的实施方案中，分离的核酸编码 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区。在另一优选的实施方案中，该核酸序列编码包含 SEQ ID NO: 10 的 CDR1 的轻链可变区，或其抗原结合部分。在另一优选的实施方案中，该核酸序列编码的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 12 的 CDR2, 或其抗原结合部分。在另一优选的实施方案中，该核酸序列编码的轻链可变区包含 SEQ ID NO: 10 的 CDR1, 或其抗原结合部分, 和 SEQ ID NO: 12 的 CDR2, 或其抗原结合部分。在一个优选的实施方案中，该核酸编码鼠源，人源的轻链可变区或鼠与人氨基酸序列的组合。例如，该核酸可编码包含 SEQ ID NO: 10 的 CDR1 和/或 SEQ ID NO: 12 的 CDR2 的轻链可变区, 和人的框架序列。

10 在其它优选的实施方案中，该分离的核酸编码 SEQ ID NO: 2 的重链可变区。在另一优选的实施方案中，该核酸序列编码含有 SEQ ID NO: 4 的 CDR1 的重链可变区，或其抗原结合部分。在另一优选的实施方案中，该核酸序列编码含有 SEQ ID NO: 6 的 CDR2 的重链可变区, 或其抗原结合部分。在另一优选的实施方案中，该核酸序列编码的重链可变区含有 SEQ ID NO: 4 的 CDR1, 或其抗原结合部分, 以及 SEQ ID NO: 6 的 CDR2, 或其抗原结合部分。在一个优选的实施方案中，该核酸编码鼠源，人源的重链可变区或鼠与人氨基酸序列的组合。例如，该核酸可编码包含 SEQ ID NO: 4 的 CDR1 和/或 SEQ ID NO: 6 的 CDR2 的重链可变区, 和人的框架序列。在另一实施方案中，该分离的核酸编码包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的轻链可变区和包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的重链可变区。

15 在另一方面，本发明的特征在于一种分离的核酸分子及其片断。在一个优选的实施方案中，分离的核酸分子包含 SEQ ID NO: 7 的轻链核苷酸序列。在另一实施方案中，该核酸分子包含 SEQ ID NO: 9 的轻链 CDR1 核苷酸序列，或其部分。在另一优选的实施方案中，该核酸分子包含 SEQ ID NO: 11 的轻链 CDR2 核苷酸序列，或其部分。在另一优选的实施方案中，该核酸分子包含 SEQ ID NO: 9 的轻链 CDR1 核苷酸序列, 或其部分以及 SEQ ID NO: 11 的轻链 CDR2 核苷酸序列, 或其部分。包含轻链序列，例如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, 或其组合的本发明的核酸分子包含与其具有 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 的序列相同性的核苷酸。另外，包含轻链序列，例如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, 或其组合的本发明的核酸分子包含在严格条件下，例如，低度，中

20

25

30

度, 高度或更高严格条件下与其杂交的核苷酸。

在另一实施方案中, 本发明的特征在于与编码轻链多肽, 例如, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO: 10, 和 SEQ ID NO : 12 的轻链多肽的核酸分子具有至少 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 的序列相同性的核酸分子。在  
5 另一实施方案中, 本发明的特征在于与编码致病性抗体的轻链可变区或其部分, 例如 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO: 10, 和 SEQ ID NO : 12 的轻链可变区的核酸序列杂交的核酸分子。

在其它优选的实施方案中, 核酸分子包含 SEQ ID NO :1 的重链核苷酸序列。在另一实施方案中, 该核酸分子包含 SEQ ID NO : 3 的重链 CDR1 核苷酸序列, 或其部分。在另一优选的实施方案中, 该核酸分子包含 SEQ ID  
10 NO :5 的重链 CDR2 核苷酸序列, 或其部分。在另一优选的实施方案中, 该核酸分子包含 SEQ ID NO :3 的重链 CDR1 核苷酸序列, 或其部分以及 SEQ ID NO :5 的重链 CDR2 核苷酸序列, 或其部分。包含重链序列, 例如 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO:5, 或其组合的本发明的核酸分子还包含  
15 与其具有 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 的序列相同性的核苷酸。另外, 包含轻链序列, 例如 SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO:5, 或其组合的本发明的核酸分子包含在严格条件下, 例如, 低度, 中度, 高度或极高严格条件下与其杂交的核苷酸。

在另一实施方案中, 本发明的特征在于与编码重链多肽, 例如, SEQ ID  
20 NO :2, SEQ ID NO: 4, 和 SEQ ID NO :6 的重链多肽的核酸分子具有至少 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 的序列相同性的核酸分子。在另一实施方案中, 本发明的特征在于与编码致病性抗体的重链可变区或其部分, 例如 SEQ ID NO :2, SEQ ID NO: 4, 和 SEQ ID NO :6 的重链可变区的核酸序列杂交的核酸分子。

25 本发明的另一方面的特征在于分离的多肽及其片断。在优选的实施方案中, 分离的多肽包括, 例如, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO: 10, 或 SEQ ID NO : 12 的氨基酸序列, 或片断或其组合; 或 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, 或 SEQ ID NO : 6, 或片断或其组合。本发明的多肽包括与 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10, 或 SEQ ID NO: 12; 或 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, 或 SEQ ID  
30 NO : 6 具有至少, 但不超过 20, 10, 5, 4, 3, 2, 或 1 个氨基酸不同的多肽。优选的多肽是保留生物学活性, 例如, 结合局部缺血特异性抗原的能

力, 和/或结合补体的能力的多肽。在另一实施方案中, 该多肽包含与轻链可变区或其部分, 例如 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10, 或 SEQ ID NO : 12 的轻链可变区多肽具有至少 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 的序列相同性的多肽。在另一实施方案中, 该多肽包含与重链可变区或其部分, 例如 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, 或 SEQ ID NO : 6 的重链可变区多肽具有至少 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 和 99% 的序列相同性的多肽。在另一实施方案中, 本发明的特征在于包含 SEQ ID NO : 8 和 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列, 还包含一个 IRES 序列的多肽。

在另一方面, 本发明提供了包含编码 SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 10, 或 SEQ ID NO : 12 或片断或其组合, 或 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 4, 或 SEQ ID NO : 6 或片断或其组合的本发明的核酸分子的表达载体。在一个优选的实施方案中, 表达载体包含编码具有包括 SEQ ID NO : 8 的氨基酸序列的可变区的抗体轻链或其部分的核酸分子, 和编码具有包括 SEQ ID NO : 2 的氨基酸序列的可变区的抗体重链或其部分的核苷酸序列。在另一方面, 本发明提供了包含本发明的表达载体的宿主细胞。在优选的实施方案中, 宿主细胞可包含至少 1 个或 2 个或多个表达载体, 即编码轻链, 例如 SEQ ID NO : 8 或其部分的一个表达载体, 编码重链, 例如 SEQ ID NO : 2 或其部分的一个表达载体。在另一实施方案中, 宿主细胞可包含能表达轻链可变区和重链可变区的表达载体。本文所用的术语“载体”是指能转运与其连接的另一核酸分子的核酸分子, 可包括质粒, 粘粒或病毒载体。载体可以是能够自主复制的, 或者可整合进宿主 DNA 中。病毒载体包括, 例如复制缺陷型逆转录病毒, 腺病毒和腺伴随病毒。

使用本文所述的方法鉴定的致病性免疫球蛋白/局部缺血抗原, 和/或致病性免疫球蛋白/补体成分相互作用的抑制剂也在本发明的范围内。

25

#### 附图简述

图 1 是表示肠局部缺血和再灌注后或者无损伤(假性对照)的近交小鼠肠渗透性改变的线段图。WT 表示 Cr2<sup>-/-</sup>小鼠的亲本品系。Cr2<sup>-/-</sup>用合并的 IgG 或 IgM 或生理盐水对照重建。处理前大约 1 小时静脉内施用合并的 IgM 或 IgG (0.5 mg)。数值是平均值 ± 标准差; n=实验中各组小鼠的数目。

图 2 是在腹膜 B-1 淋巴细胞的阳性选择中补体和补体受体预期作用的

示意图。

图 3A 显示了用来自 22 个单独的 B-1 细胞杂交瘤克隆的合并的 IgM 在抗体缺陷型小鼠(RAG-1)中重建 I/R 损伤。合并 24 $\mu$ g 的各杂交瘤 IgM 并在开始剖腹术前 30 分钟静脉内注射。在再灌注结束时, 获得血液且以干燥的肠与血液的  $^{125}$ I 计数的比率计算渗透性指数。数值代表平均值  $\pm$  SE; n = 实验中各组使用的小鼠数目。1 = 生理盐水; 2 = 合并的杂交瘤; 3 = 50 $\mu$ g 杂交瘤 22A5; 4 = 400 $\mu$ g 合并的 IgM。

图 3B 证实了来自杂交瘤克隆 22A5 的 IgM 回复(restore)RAG-1 小鼠中的 I/R 损伤。用 IgM 重建的小鼠接受总血清 IgM (400 $\mu$ g)或者 22A5 杂交瘤 IgM (各 50 $\mu$ g)。数值代表平均值  $\pm$  SE; n = 实验中各组使用的小鼠的数目。1 = 生理盐水; 2 = 合并的杂交瘤; 3 = 50 $\mu$ g 杂交瘤 22A5; 4 = 400 $\mu$ g 合并的 IgM。

图 4A 显示了 B-1 杂交瘤 22A5 的 IgM 序列分析。显示了 22A5 IgM 的重链核酸序列(SEQ ID NO : 1)。从 22A5 杂交瘤细胞纯化 RNA 并逆转录成 cDNA。使用 5'VH 和 3'Cm 特异性的寡核苷酸引物经半嵌套式 PCR 扩增免疫球蛋白重链 cDNA。cDNA 产物在琼脂糖凝胶上纯化且通过自动测序测定核苷酸序列。框架区(FWR)和互补决定区(CDR)在核苷酸上面表示。在 NCBI 核苷酸数据库中检索发现, 22A5 重链与免疫球蛋白序列 VMU-3.2 (注册号 X03088)共有 95%的同源性。

图 4B 显示了 B-1 杂交瘤 22A5 的 IgM 序列分析。显示了 22A5 IgM 的轻链核酸序列(SEQ ID NO :7)。从 22A5 杂交瘤细胞纯化 RNA 且逆转录成 cDNA。使用 5'Vk 和 3'Ck 特异性的寡核苷酸引物经半嵌套式 PCR 扩增免疫球蛋白轻链 cDNA。cDNA 产物在琼脂糖凝胶上纯化且通过自动测序测定核苷酸序列。框架区(FWR)和互补决定区(CDR)在核苷酸上面表示。在 NCBI 核苷酸数据库中检索发现, 22A5 轻链与免疫球蛋白序列 Vk19-23 基因(保藏号 AJ235961)享有同源性。

图 5A 显示了相应于 SEQ ID NO : 1 的重链核酸序列的氨基酸序列(SEQ ID NO : 2)。框架区(FWR)和互补决定区(CDR)在氨基酸残基上面表示。

图 5B 显示了相应于 SEQ ID NO :7 的轻链核酸序列的氨基酸序列(SEQ ID NO :8)。框架区(FWR)和互补决定区(CDR)在氨基酸残基上面表示。

### 发明详述

本发明部分基于对致病性免疫球蛋白(Ig),特别是识别局部缺血特异性抗原的致病性 IgM 的鉴定。据信这些致病性 IgM 与局部缺血特异性抗原的结合触发特别是补体途径的激活,最终导致再灌注或局部缺血损伤。申请人还揭示了致病性 IgM 由本文称为“B-1 细胞”的 B 细胞亚群产生。因此,5 本发明提供了用于治疗或预防受试者中由致病性免疫球蛋白,即致病性 IgM 引起的再灌注后组织损伤的方法和组合物。

在本发明的进一步的描述前,为了方便,这里收集了在说明书,实施例和所附权利要求书中使用的某些术语。

10 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。

本文使用的术语“免疫球蛋白”(或缩写形式“Ig”)和“抗体”是指含有以二硫键互相连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的一个糖蛋白。每个重链包含一个重链可变区(本文缩写为 HCVR 或 VH)和一个重链恒定区。重链恒定区包含 3 个结构域 CH1, CH2 和 CH3,或对于 IgM 有 4 个结构域,15 即 CH1, CH2, CH3,和 CH4。每个轻链包含一个轻链可变区和一个轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域 CL。VH 和 VL 区可进一步细分成散布在更保守的,称为框架区(FR)的区域中的,称为互补决定区(CDR)的高变区。VH 和 VL 各由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成,从氨基末端到羧基末端按下列顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。重链和轻链可变区含有20 一个与抗原相互作用的结合区。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白结合宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和传统补体系统的第一成分(C1q)。

有多达 5 种主链重链类型,称为 $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ 和 $\mu$ ,  $\gamma$ 链进一步细分成 $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ 和 $\gamma 4$ ,  $\alpha$ 链分成 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 链。两种轻链类型称为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 。重链的存在25 产生免疫球蛋白的主要类型: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM。IgG 可进一步细分成 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4 亚类, IgA 可分成 IgA1 和 IgA2 亚类。

本文使用的术语“免疫球蛋白 M”或“IgM”是指由 J 链连接的 5 个 IgM 单体的五聚体。单体 IgM 分子与上述免疫球蛋白分子具有相同的基本结构。IgM 是在抗体反应中合成的第一种免疫球蛋白。作为一个五聚体,它具有30 多个功能域且因此是一种强效的补体激活剂。

术语“致病性免疫球蛋白”是指介导再灌注后组织损伤的上述免疫球

蛋白分子。在一个实施方案中，致病性免疫球蛋白可定位于内皮表面或实质组织上，例如，通过与内皮细胞表面或实质组织上存在的抗原(例如，局部缺血特异性抗原)结合来定位。一旦定位到内皮表面或实质组织表面，致病性免疫球蛋白可介导免疫细胞(例如，效应细胞)或传统补体系统的成分，  
5 例如，C1q 的结合，从而触发组织损伤。抗体可以是各种同种型，包括：IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgA 小类, IgD, 或 IgE。优选的是，致病性免疫球蛋白是作为补体激活剂的抗体同种型。优选的是，致病性免疫球蛋白是 IgM。致病性免疫球蛋白优选是全长的(例如，IgM 或 IgG (例如，IgG1 和 IgG3)抗体)。

10 本文使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”或“片断”)是指抗体的一个或多个保留与抗原(例如，靶抗原，例如，局部缺血抗原)的特异性结合能力的片断。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片断的例子包括(i)Fab 片断，由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域组成的单价片断；(ii) F(ab')<sub>2</sub> 片断，包含由铰链区的二硫键连接的两个 Fab 片断的二价片断；  
15 片断；(iii)由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片断；(iv)由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片断，(v) dAb 片断(Ward 等，(1989)

Nature 341: 544-546)，由 VH 结构域组成；和(vi)分离的互补决定区(CDR)。另外，尽管 Fv 片断的两个结构域，VL 和 VH 由分离的基因编码，但可使用重组方法用合成接头将它们连接起来，使得可作为单个蛋白质链  
20 来制备它们，其中 VL 和 VH 区域对形成单价分子(称为单链 Fv (scFv)；参见例如，Bird 等(1988) Science 242 : 423-426;和 Huston 等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883)。该单链抗体也打算包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片断可使用本领域的技术人员已知的常规技术获得，并按与完整抗体相同的方式筛选该片断用途。

25 本文使用的“再灌注”是指在例如，局部缺血中血流狭窄或阻塞后恢复血管中的血流的过程。

术语“局部缺血性再灌注”是指局部缺血的组织再灌注后的急性炎症反应。再灌注可在自然出现的发作，例如中风后，或者在故意阻断血管中血流的手术操作期间产生。由于，例如，阻断血管中血流的血凝块可触发  
30 血管的狭窄或阻塞。在诸如此类的情况下，内皮的完整性被破坏，结果可开始凝血级联并形成位于原始凝块阻塞下游的更小的毛细血管中的新凝

块。组织损伤在这种再流动期间发生。

“免疫球蛋白介导的再灌注损伤”是指由免疫球蛋白，例如，致病性免疫球蛋白直接或间接介导的内皮完整性的破坏。不受理论的约束，据信局部缺血期间，新抗原(例如，局部缺血特异性抗原)在内皮细胞表面表达或者暴露于其上。然后这些新抗原被靠近损伤位点聚集的致病性免疫球蛋白识别。集中的致病性免疫球蛋白能触发内皮组织损伤，例如通过激活效应细胞功能或补体途径。

本文使用的术语“局部缺血”是指器官或组织血流的暂时或持久性不足。在心血管组织中，局部缺血可引起至少两种心血管疾病，即心绞痛和急性心肌梗塞(心脏病发作)。一般来说，涉及心肌的局部缺血可由诸如动脉粥样硬化或痉挛的冠状动脉疾病引起。术语“局部缺血损伤”是指由组织或器官血流暂时或持久不足引起的在例如，组织或器官中的内皮完整性破坏。

本文使用的术语“局部缺血特异性抗原”是指存在于内皮细胞表面的抗原。优选的是，局部缺血特异性抗原响应损伤，例如局部缺血损伤而表达或暴露。

本文使用的“B-1 细胞”是指 B 细胞的一个产生致病性免疫球蛋白的亚群。一般来说，B-1 细胞表达低水平的 IgD 和 CD23，这些细胞的一个主要亚群表达细胞表面蛋白 CD5(Hardy 等，(1994) *Immunol. Rev.* 137,91; Kantor 等，(1993) *Annu. Rev Immunol.* 11, 501-538)。它们一般返回腹膜和肠系膜组织且至少在小鼠中不出现循环(Herzenberg 等，(1986) *Immunol. Rev.* 93: 81-102; Martin 等，*Cur Op. Immunol.* 13: 195-201)。与常规 B-细胞不同，它们不经历体细胞(somatic)高变和亲和力成熟。它们在胎儿和新生儿发育期间出现且通过成人骨髓移植不容易再生。通过在外周淋巴结和脾脏中有限的出现率和通过主要位于腹膜腔中可进一步区分这些细胞。

术语“补体”是指由超过 20 种蛋白质(包括调控因子)组成的蛋白质级联。与凝血系统一样，该系统的激活启动级联事件，其中酶原被依次激活，通过蛋白裂解产生细胞表面受体的配体，潜在的生物活性肽和插入细胞膜中导致细胞死亡的末期复合物。中央成分是第三成分或 C3。它可通过 3 种不同的途径，即，传统，凝集素或旁路途径激活(Reid 等，(1981) *Semin. Immunopathol.* 15: 307-326; Muller-Eberhard,(1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:

321-347)。

在一个实施方案中，致病性免疫球蛋白可通过传统补体途径起作用。传统途径通过抗原和抗体相互作用形成免疫复合物而被激活。抗体只有在与其抗原反应后才可结合或“固定”补体。复合物的形成诱导抗体分子中的构象改变，暴露结合第一补体成分 C1 的位点。C1 是由分别称为 C1q 的三个肽的 6 条链和各两个的 C1s 和 C1r 组成的多聚体化合物。6 个 C1q 链本身成“束”排列且 4 个 C1r 和 C1s 分子以钙依赖型相互作用附着。当抗体结合两个或多个 C1q 头时，C1r 裂解产生活性分子 C1r，后者裂解 C1s。C1s 通过将下一个补体成分 C4 裂解成 C4b 和 C4a 延伸激活过程，C4b 继续反应过程。C4 裂解成 C4b 露出一个内部硫酯键，它即刻被结合的水分子灭活，除非它与细胞表面蛋白质或糖类形成共价键。如果这样，C4b 变得相对稳定且在镁依赖型反应中结合 C2。C2 然后被 C1s 裂解形成复合物 C4b2a，称为传统途径 C3 转化酶。C3 是 C4 的相似分子，具有内部硫酯键。C3 裂解产生两种片断。其中的较小片断 C3a 具有强大的生物学特性。较大的 C3b 展示出不稳定的结合位点，允许该分子结合 C4b2a。C3b 与 C4b2a 的结合导致产生传统途径的最后一个酶 C4b2a3b，称为传统途径 C5 转化酶，它裂解 C5，即膜攻击途径的一种成分。

在另一实施方案中，致病性免疫球蛋白可通过补体旁路途径起作用。在这种旁路途径中，C3 产生 C3b，C3bB 和 C3bBb，而 C3bBb 裂解 C3。如果活化酶稳定在细菌的细胞壁，或者如果从传统途径产生更多的 C3b 则加速该过程。这种旁路途径产生 C5 转化酶 C3bBb3b。

本文使用的语言“受试者”打算包括人类和非人动物。优选的人类动物包括局部缺血再灌注损伤的病人。本发明的术语“非人动物”或“非人”包括所有脊椎动物，例如，哺乳动物和非哺乳动物，例如，非人灵长类，啮齿类，绵羊，狗，奶牛，鸡，两栖类，爬行类等。

本文使用的“抑制剂”是指减小或抑制(完全或部分)致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间相互作用；或减小或抑制致病性免疫球蛋白和补体途径的成分，例如 C1q 之间的相互作用的一种试剂。术语“相互作用”是指两个或多个分子之间的物理联系，例如，结合。相互作用可以是直接或间接的。优选的是，抑制剂拮抗致病性免疫球蛋白的一种或多种下列活性：(i) 抑制或减小致病性免疫球蛋白和局部缺血特异性抗原之间的相互作用



用(例如, 结合); (ii)抑制或减少致病性免疫球蛋白和补体途径的成分, 例如 C1q 之间的相互作用(例如, 结合); (iii)中和致病性免疫球蛋白, 例如, 通过螯合免疫球蛋白和/或瞄准其降解; 或(iv)抑制或减少致病性免疫球蛋白的产生, 例如抑制致病性抗体的合成, 装配, 和/或翻译后修饰。该抑制剂可以是蛋白质(例如, 抗体, 例如抗独特型抗体或其片断), 肽; 小的有机分子。术语“抑制剂”和“试剂”在本文中可互换使用。

本文使用的抑制剂的“有效量”是指试剂的量在单次或多次剂量施用给受试者, 例如患者时, 在减小或消去再灌注或局部缺血损伤方面是有效的。再灌注损伤的这种减小或消去可反映为, 比没有该治疗时所预期的受试者(例如患者)的存活期延长, 或者相对于没有该治疗的受试者的预后的任何改善。抑制剂可用于治疗(例如, 减小或消去已有的损伤)或预防(例如, 延迟其发作的发生或复发)再灌注或局部缺血损伤。本领域的技术人员会预料到有些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时间选择, 包括但不限于疾病或紊乱的严重性, 以前的治疗, 受试者的总体健康状况和/或年龄, 和存在的其它疾病。

本文使用的术语“共有序列”是指由相关序列的一个家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见, 例如, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 德国 1987))。在蛋白质家族中, 共有序列中的各位置被在该家族中在该位置最常出现的氨基酸占据。如果两个氨基酸以相等的频率出现, 在共有序列中可包含两者中的任一氨基酸。“共有框架”是指在共有免疫球蛋白序列中的框架区。

本文使用的术语“在低度严格, 中度严格, 高度严格或极高严格条件下杂交”描述了杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导可参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, 它被作为参考文献引用。在该参考文献中描述了含水的和不含水的方法且可使用任一种。本文涉及的具体杂交条件如下: 1)在大约 45°C 的 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交, 接着在 0.2XSSC, 0.1% SDS 中在至少 50°C 下洗涤两次(低度严格条件的洗涤温度可增加到 55°C)的低度严格条件; 2) 在大约 45°C 的 6X SSC 中杂交, 接着在 0.2XSSC, 0.1% SDS 中在 60°C 下洗涤一次或多次的中度严格条件; 3) 在大约 45°C 的 6X SSC 中杂交, 接着在 0.2XSSC, 0.1% SDS 中在 65°C 下洗涤一次或多次的高度严格条件; 和优选 4)极高严格

条件是在 65℃ 的 0.5M 磷酸钠, 7% SDS 中杂交, 接着在 0.2XSSC, 1% SDS 中在 65℃ 下洗涤一次或多次。极高严格条件(4)是优选的条件且是应使用的条件, 除非另有说明。

5 序列之间的同源性或序列相同性(该术语在本文中可互换使用)的计算按如下进行。

为了测定两个氨基酸序列, 或两个核酸序列的相同性百分数, 对比该序列以达到最佳比较的目的(例如, 为了最佳对比可在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个序列中导入缺口且为了进行比较可不考虑非同源性序列)。在一个优选的实施方案中, 用于比较目的而对比的参考序列的长度占参考序列长度的至少 30%, 优选至少 40%, 更优选至少 50%, 60%, 10 且甚至更优选至少 70%, 80%, 90%, 100%。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当在第一序列中的一个位置被与第二序列相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时, 那么分子在该位置是相同的(本文使用的氨基酸或核酸“相同性”等价于氨基酸或核酸“同源性”)。15 两序列之间的相同性百分数是序列所共有的相同位置数的函数, 同时考虑为了两序列的最佳对比而需要导入的缺口数, 和各缺口的长度。

序列比较和两序列之间相同性百分数的测定可使用数学算法进行。在一个优选的实施方案中, 两个氨基酸序列之间的相同性百分数使用编入 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得) 的 GAP 程序中的 Needleman 20 和 Wunsch ( (1970) *J. Mol. Biol.* 48 : 444-453)算法, 使用 Blossum-62 模型(matrix)或 PAM250 模型, 缺口权重为 16, 14, 12, 10, 8, 6, 或 4 且长度权重为 1, 2, 3, 4, 5, 或 6 来测定。在另一优选的实施方案中, 两个核苷酸序列之间的相同性百分数使用在 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)中的 GAP 程序, 使用 NWSgapdna. CMP 模型, 缺口权重为 40, 50, 25 60, 70, 或 80 且长度权重为 1, 2, 3, 4, 5, 或 6 来测定。特别优选的参数组(且是应使用的参数组, 除非另有说明)是缺口罚分为 12, 缺口伸长罚分为 4 和移码缺口罚分为 5 的 Blossum 62 计分模型。

两个氨基酸或核苷酸序列之间的相同性百分数可使用已编入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller ( (1989) *CABIOS*, 4: 11-17)算法, 使用 30 PAM120 权重剩余表, 缺口长度罚分为 12 且缺口罚分为 4 来测定。

### 鉴定致病性免疫球蛋白抑制剂的方法

在一个方面，本发明提供了从一种或多种(例如，众多的)试验化合物中鉴定能抑制致病性免疫球蛋白与局部缺血特异性抗原，或者致病性免疫球蛋白与补体途径的一种成分之间相互作用的抑制剂的方法。该抑制剂可以  
5 是一种蛋白质(例如，抗体或其片断); 肽; 糖类; 糖蛋白; 或者有机小分子。

### 试验化合物的文库

抑制剂可以是有机小分子，例如组合文库的一个成员。

在一个实施方案中，本发明提供了抑制剂的文库。组合文库的合成是  
10 本领域熟知的且已有综述(参见，例如，E. M. Gordon 等, *J Med. Chem.* (1994) 37: 1385-1401 ; DeWitt, S. H.; Czarnik, A. W. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29 : 114; Armstrong, R. W.; Combs, A. P.; Tempest, P. A.; Brown, S. D.; Keating, T. A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 123 ; Ellman, J. A. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29: 132; Gordon, E. M.; Gallop, M. A.; Patel, D. V. *Acc. Chem. Res.* (1996) 29 : 144;  
15 Lowe, G. *Chem. Soc. Rev.* (1995) 309, Blondelle 等 *Trends Anal. Chem.* (1995) 14: 83 ; Chen 等, *J Am. Chem. Soc.* (1994) 116: 2661 ;美国专利 5,359,115, 5,362,899, 和 5,288,514 ; PCT 公开号 WO92/10092 , WO93/09668 , WO91/07087, WO93/20242, WO94/08051)。

本发明的化合物文库可按各种方法来制备，其中的一些方法在本领域  
20 是已知的。例如，“分开-合并(split-pool)”策略可按下述方式实施：在众多反应容器中放置功能化聚合体支持物的珠；适合于固相肽合成的各种聚合体支持物是已知的，且有些是商业上可获得的(例如，参见，例如，M. Bodansky “Principles of Peptide Synthesis”，第二版，Springer-Verlag，柏林(1993))。向每等分的珠中加入不同的活化氨基酸的溶液，允许反应进行以  
25 产生众多固定的氨基酸，每个反应容器中一种。然后洗涤等分的衍生珠，“合并”(即，重组)，并再分开该珠的合并物，每个等分放在分离的反应容器中。然后向各等分的珠中加入另一种活化的氨基酸。重复该合成循环直到获得所需的肽长度。可随机选择在每次合成循环中加入的氨基酸残基；另外，可选择氨基酸以提供“偏向性(biased)”文库，例如，非随机选择抑  
30 制剂的某些部分以提供例如，与已知肽具有已知结构相似性或同源性的抑制剂的文库，该已知肽能与抗体相互作用，例如抗独特型抗体的抗原结合

位点。可预料到以这种方式可容易地产生各种肽类，肽模拟物，或非肽化合物。

“分开-合并”策略产生诸如抑制剂的肽文库，可用于制备本发明的试验化合物的文库。在另一举例性的合成中，以 Hobbs DeWitt 等(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909 (1993))的方法构建“多样体文库(diversomer library)”。也可使用包括 Houghten 的“茶包(teabag)”技术(参见，例如，Houghten 等，Nature 354 : 84-86 (1991))的其它合成方法合成根据本发明的化合物的文库。

可筛选化合物文库以测定该文库的任何成员是否具有所需活性，且如果有，则鉴定为活性种类。筛选组合文库的方法已有描述(参见，例如，Gordon 等，*J Med.Chem.*，出处同上)。可溶性化合物文库可用合适的受体以亲和色谱法筛选以分离该受体的配体，接着通过常规技术(例如，质谱分析法，NMR 等)鉴定分离的配体。固相化合物通过用可溶性受体与化合物接触可筛选；优选的是，可溶性受体结合到可被检测以指示配体结合的标记(例如，荧光团，比色酶，放射性同位素，发光化合物等)上。另外，固相化合物可选择性释放并允许通过膜扩散以便与受体相互作用。下面描述了用于筛选本发明的文库的举例性试验。

在一个实施方案中，通过试验各化合物直接结合免疫球蛋白或抑制免疫球蛋白与局部缺血抗原之间相互作用的活性，例如，通过在例如，单孔平板或诸如标准 96 孔微量滴定板的多孔平板中将试验化合物与免疫球蛋白和一种裂解产物，例如内皮细胞裂解产物一起温育，可筛选本发明的化合物与致病性免疫球蛋白相互作用的能力。在该实施方案中，可测定各单个化合物的活性。可使用无试验化合物的一个孔或多个孔作为对照。温育后，可通过分析各孔而测定各试验化合物的活性。因此，可平行测定众多试验化合物的活性。

### 蛋白质或肽抑制剂

蛋白质或肽抑制剂可使用例如，上文所述的组合系统来鉴定。另外，可使用致病性免疫球蛋白，靶抗原或补体途径成分中任一种的片断或肽抑制这些蛋白质间的相互作用。

包含“非必需”氨基酸取代的致病性免疫球蛋白，靶抗原或补体途径

成分中任一种的片断或肽的变异体也在本发明的范围内。非必需氨基酸取代是指不消除或更优选的是，基本上不改变生物学活性的对野生型序列做出的改变，而“必需”氨基酸残基导致这样一种改变。

“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代。

5 具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已有定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸，精氨酸，组氨酸)，酸性侧链(例如，天冬氨酸，谷氨酸)，不带电荷的极性侧链(例如，甘氨酸，天冬酰胺，谷酰胺，丝氨酸，苏氨酸，酪氨酸，半胱氨酸)，非极性侧链(例如，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，甲硫氨酸，色氨酸)， $\beta$ 分支侧链(例如，苏氨酸，缬氨酸，异亮氨酸)和芳香侧链(例如，酪氨酸，苯丙氨酸，色氨酸，组氨酸)的氨基酸。因此，在致病性免疫球蛋白中预测的非必需氨基酸残基可优选被来自相同侧链家族的另一氨基酸残基取代。作为选择，在另一实施方案中，可在全部或部分致病性免疫球蛋白的编码序列中通过例如，饱和和诱变随机导入突变，并筛选所得的突变体的生物学活性。

15 在另一方面，本发明还有一个特征在于一种例如，用作兴奋剂(模拟物)或用作拮抗剂的修饰的致病性免疫球蛋白。优选的是，修饰的致病性免疫球蛋白用作补体激活的拮抗剂。致病性免疫球蛋白的变异体可通过诱变，例如分散的点突变，插入或缺失序列或致病性免疫球蛋白的截短来产生。致病性免疫球蛋白的兴奋剂可基本上保留蛋白质的天然存在形式的相同或一部分(subset)生物学活性。致病性免疫球蛋白的拮抗剂可通过，例如能与局部缺血特异性抗原结合，但不能激活补体途径来抑制致病性免疫球蛋白的天然存在形式的一种或多种活性。因此，可通过用限制功能的变异体处理来产生特定的生物学效应。

25 在一个实施方案中，可诱变致病性免疫球蛋白(例如，致病性 IgM)内结合 C1q 的位点使其不再能够结合 C1q。例如，可诱变已知含有 C1q 结合位点的 IgG 的 C<sub>H</sub>2 结构域和 IgM 的 C<sub>H</sub>4 结构域(参见 WO 94/29351)。例如，可突变表现出介导 C1q 结合和随后的补体激活的 IgG 的 C<sub>H</sub>2 结构域的羧基末端一半(残基 231 至 239，优选在 234 至 239 内)。作为另一例子，Wright 等证实了在 IgM 恒定区结构域中的单个核苷酸改变产生在起启动补体依赖型  
30 细胞裂解方面有缺陷的抗体。单核苷酸改变导致在第三个恒定区的氨基酸位置 436 处编码丝氨酸残基，而不是正常的脯氨酸残基(Wright 等 1988, J.

Biol. Chem. 263: 11221)。为了改变补体结合或活性而对抗体做出的氨基酸取代是本领域中熟知的(参见例如, Wright 等, 1988, J. Biol. Chem. 263: 11221; Shulman 等(1986), Proc.Natl. Acad Sci. USA 83: 7678-7682; Arya 等, (1994) J. Immunol. 253: 1206-1212;Poon 等, (1995) J. Biol. Chem. 270: 8571-8577, 这里引用所有这些文献的内容以供参考)。因此, 在一个实施方案中, 本发明的抗体具有改变补体结合或活性的突变。加入, 缺失或取代了氨基酸的抗体本文称为修饰的抗体或改变的抗体。正如本领域的技术人员会预料到的, 用于在核苷酸或氨基酸序列中引起该改变的方法将依赖于所需的结果而改变。

10 致病性免疫球蛋白的变异体可通过筛选致病性免疫球蛋白的突变体, 例如截短突变体的组合文库的兴奋剂或拮抗剂活性来鉴定。

致病性免疫球蛋白编码序列的片断, 例如 N 末端, C 末端或内部片断的文库可用于产生多样化的片断群体用于筛选和随后选择该蛋白质的变异体。特别优选加入或缺失半胱氨酸残基或加入或缺失糖基化残基的变异体。

15 用于筛选由点突变或截短制备的组合文库的基因产物的方法, 和用于筛选具有选定特性的基因产物的 cDNA 文库的方法。循环整体诱变(REM)是一种提高文库中功能性突变体的频率的技术, 它可与筛选试验结合使用来鉴定变异体(Arkin 和 Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 7811-7815; Delgrave 等, (1993) *Protein Engineering* 6 (3): 327-331)。

20 可开发基于细胞的试验以分析多样化文库。例如, 可将表达载体文库转染进细胞系, 例如, 一般以底物依赖型方式应答该蛋白质的细胞系。然后可从评价为抑制, 或者任选加强由致病性免疫球蛋白-底物产生的信号的细胞中回收质粒 DNA, 并进一步鉴定单个的克隆。

25 在另一方面, 本发明的特征在于一种制备致病性免疫球蛋白, 例如具有非野生型活性的致病性免疫球蛋白, 例如, 天然存在的致病性免疫球蛋白的拮抗剂, 兴奋剂, 或超兴奋剂的方法。该方法包括: 通过例如取代或缺失本文公开的非保守区, 结构域或残基的一个或多个残基改变致病性免疫球蛋白的序列, 并检测改变的多肽的所需活性。

30 在另一方面, 本发明的特征在于一种制备改变了天然致病性免疫球蛋白生物学活性的致病性免疫球蛋白片断或类似物的方法。该方法包括: 通过例如取代或缺失致病性免疫球蛋白的一个或多个残基, 例如改变本文公

开的非保守区序列，或结构域或残基，并检测改变的多肽的所需活性。

### 免疫球蛋白的产生

5 在其它实施方案中，抑制剂可以是抗体或其片断，例如，抗独特型抗体或其抗原结合片断。

10 本文使用的术语“单克隆抗体”(mAb 或 mAbs)是指单分子成分的抗体分子。单克隆抗体成分表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。因此，术语“人单克隆抗体”是指具有来自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的表现出单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中，人单克隆抗体由杂交瘤产生，该杂交瘤包括与永生细胞融合的从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物，例如转基因小鼠获得的 B 细胞。

15 生产抗体的方法是本领域熟知的。例如，抗靶(例如，致病性免疫球蛋白或细胞上的局部缺血特异性抗原)的单克隆抗体可通过各种技术来生产，包括常规单克隆抗体方法学，例如 Kohler 和 Milstein, *Nature* 256: 495 (1975) 的标准体细胞杂交技术。尽管优选体细胞杂交方法，但原则上可采用用于产生单克隆抗体的其它技术，例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌转化。制备杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。在小鼠中的杂交瘤生产是非常成熟的方法。免疫方法和分离用于融合的免疫脾细胞的技术在本领域是已知的。融合对  
20 象(例如，鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

25 使用携带非小鼠系统的人免疫球蛋白基因的转基因小鼠可产生人单克隆抗体。来自用目的抗原免疫的这些转基因小鼠的脾细胞用于生产分泌对人蛋白质的表位具有特异性亲和力的人 mAbs 的杂交瘤(参见，例如，Wood 等，国际申请 WO 91/00906，Kucherlapati 等，PCT 公开号 WO 91/10741; Lonberg 等，国际申请 WO 92/03918; Kay 等，国际申请 92/03917; Lonberg, N.等，1994 *Nature* 368 : 856-859 ; Green, L. L.等，1994 *Nature Genet.* 7: 13-21; Morrison, S. L.等，1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Bruggeman 等，1993 *Year Immunol* 7 : 33-40 ; Tuailon 等，1993 *PNAS* 90: 3720-3724; Bruggeman 等，1991 *Eur J Immunol* 21: 1323-1326)。

30 在一个实施方案中，杂交瘤可由人 CD5<sup>+</sup>, B-1 细胞产生。另外，可使用识别交叉反应性“局部缺血抗原”的“人源化”鼠杂交瘤。

单克隆抗体也可用重组 DNA 技术领域的技术人员已知的其它方法产生。称为“组合抗体展示(display)”方法的另一方法已被开发用于鉴定和分离具有特定抗原特异性的抗体片断并可用于产生单克隆抗体(关于组合抗体展示的描述,参见例如, Sastry 等, 1989 *PNAS* 86: 5728; Huse 等, 1989 *Science* 5 246: 1275; 和 Orlandi 等 1989 *PNAS* 86: 3833)。用上述免疫原免疫动物后, 克隆所得 B-细胞库的抗体库。使用寡聚体引物的混合物和 PCR 获得免疫球蛋白分子的不同群体的可变区的 DNA 序列的方法是公知的。例如, 相应于 5'前导(信号肽)序列和/或框架(FR1)序列的混合寡核苷酸引物以及保守的 3'恒定区引物可用于 PCR 扩增许多鼠抗体的重链和轻链可变区(Larrick 等, 10 1991, *Biotechniques* 11: 152-156)。相似的方法也可用于扩增人抗体的人重链和轻链可变区。(Larrick 等, 1991, *Methods; Companion to Methods in Enzymology* 2: 106-110)。

在一个举例性的实施方案中, 使用标准方法(例如, 美国专利号 4,683,202; Orlandi,等, *PNAS* (1989) 86: 3833-3837; Sastry 等, *PNAS* (1989) 15 86: 5728-5732; 和 Huse 等(1989) *Science* 246: 1275-1281)从 B 淋巴细胞, 例如外周血细胞, 骨髓或脾制品中分离 RNA。使用重链恒定区及  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链各自特异性的引物以及信号序列的引物合成第一链 cDNA。使用可变区 PCR 引物分别单独或者组合扩增重链和轻链可变区, 并连接进合适的载体中用于在制备展示包装体中进一步操作。用于扩增方案的寡核苷酸引物可以是 20 单一序列或简并序列或可在简并位置掺入肌苷。限制性核酸内切酶识别序列也可插入引物中以便允许将扩增片断在预定的阅读框克隆进载体中用于表达。

从免疫产生的抗体库克隆的 V-基因文库可通过展示包装体的群体, 优选来自丝状噬菌体的群体进行表达以形成抗体展示文库。理想的是, 展示 25 包装体包含允许极大多样化抗体展示文库的取样, 每轮亲和分离后迅速分类和容易从纯化的展示包装体分离抗体基因的系统。除了商业上可获得的用于产生噬菌体展示文库的试剂盒(例如, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 目录号 27-9400-01; 和 Stratagene SurfZAP<sup>TM</sup> 噬菌体展示试剂盒, 目录号 240612)外, 特别适用于产生多样化抗体展示文库的方法和 30 试剂的例子可参见, 例如, Ladner 等, 美国专利号 5,223,409; Kang 等, 国际公开号 WO 92/18619; Dower 等, 国际公开号 WO 91/17271; Winter 等,



国际公开号 WO 92/20791; Markland 等, 国际公开号 WO 92/15679; Breitling 等, 国际公开号 WO 93/01288; McCafferty 等, 国际公开号 WO 92/01047; Garrard 等, 国际公开号 WO 92/09690; Ladner 等, 国际公开号 WO 90/02809; Fuchs 等(1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay 等(1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3: 81-85; Huse 等(1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths 等, (1993) *EMBO J* 12: 725-734; Hawkins 等(1992) *J Mol Biol* 226: 889-896; Clackson 等(1991) *Nature* 352: 624-628; Gram 等(1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard 等(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom 等(1991) *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137; 和 Barbas 等 (1991) *PNAS* 88: 7978-7982。

10 在有些实施方案中, 重链和轻链的 V 区结构域可在通过弹性接头连接  
的同一多肽上表达以形成单链 Fv 片断, 并将 scFV 基因随后克隆进所需表  
达载体或噬菌体基因组中。按 McCafferty 等, *Nature* (1990) 348: 552-554 中  
的一般性描述, 以弹性(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> 接头连接的抗体的完整 VH 和 VL 结构域  
可用于产生单链抗体, 该抗体可产生基于抗原亲和性可分离的展示包装体。  
15 与抗原免疫反应的分离的 scFV 抗体随后配制成药用制品用于本方法。

一旦在展示包装体(例如, 丝状噬菌体)的表面展示, 可用靶抗原或其肽  
片断筛选抗体文库以鉴定和分离表达对靶抗原具有特异性的抗体的包装  
体。可从展示包装体(例如, 从噬菌体基因组)中回收编码选定抗体的核酸并  
通过标准重组 DNA 技术亚克隆进其它表达载体中。

20 对表面蛋白具有高亲和力的特异性抗体分子可按照本领域的技术人员  
已知的方法, 例如包含文库筛选的方法(Ladner, R. C., 等, 美国专利  
5,233,409; Ladner, R. C.等, 美国专利 5,403,484)来制备。另外, 可使用筛选  
这些文库的方法获得作为抗体结构性决定簇的模拟物的结合决定簇。

具体地说, 特定抗体分子结合 Fv 的表面按照蛋白质-蛋白质相互作用  
25 的原则与其靶配体相互作用, 因此 VH 和 VL 的序列数据(后者可以是  $\kappa$  或  
 $\lambda$  链型的数据)是本领域的技术人员已知的蛋白质工程技术的基础。使用从  
NMR 研究或晶体学数据获得的来自其它抗体的以前测定的三维结构通过模  
拟方法可从抗体序列信息获得包含结合决定簇的蛋白质表面的详情。参见,  
例如, Bajorath, J.和 S. Sheriff, 1996, *Proteins: Struct, Funct., and Genet.* 24(2),  
30 152-157; Webster, D. M.和 A. R. Rees, 1995, “抗体结合位点的分子模型”, 参  
见 S. Paul, 编辑, *Methods in Molecular Biol.* 51, 抗体工程方法, Humana Press,

Totowa, NJ,第 17-49 页;和 Johnson, G,Wu, T. T.和 E. A. Kabat, 1995, "Seqhunt: A program to screen aligned nucleotide and amino acid sequences", 见 *Methods in Molecular Biol.* 51, *op. cit.*, 第 1-15 页。

5 在一个实施方案中, 多样化肽文库由展示包装体群来表达以形成肽展示文库。理想的是, 展示包装体包含允许极大多样化的肽展示文库的取样, 每轮亲和分离后迅速分类和容易从纯化的展示包装体分离编码肽的基因的系统。肽展示文库可以在, 例如原核生物和病毒中, 它可被迅速扩增, 相对容易操作, 且允许产生大量克隆。优选的展示包装体包括例如, 无性繁殖的细菌细胞, 细菌芽孢, 且最优选细菌病毒(特别是 DNA 病毒)。然而, 10 本发明也包含使用包括酵母及其孢子的真核细胞作为潜在的展示包装体。噬菌体展示文库在上文中描述。

其它技术包括用合适的“受体”, 例如, 靶抗原进行亲和层析, 接着以常规技术(例如, 质谱法和 NMR)鉴定分离的结合试剂或配体。优选的是, 15 将可溶性受体偶连标记物(例如, 荧光团, 比色酶, 放射性同位素, 或发光化合物), 检测该标记就可指示与配体的结合。另外, 可选择性释放固相化合物并允许通过膜扩散与受体相互作用。

化合物的组合文库合成后可以带有编码文库各成员身份的“标记”(参见, 例如, W.C. Still 等, 国际申请 WO 94/08051)。一般来说, 该方法的特征在于使用附着到固相支持物或化合物上的惰性但容易被检测的标记。当 20 检测活性化合物时, 通过鉴定特有的伴随标记确定化合物的身份。这一标记方法允许合成大型文库, 其中可在文库的全套所有化合物中鉴定极低水平的化合物。

术语“修饰的抗体”打算包括通过例如, 缺失, 加入或取代该抗体的一部分而进行了修饰的抗体, 例如单克隆抗体, 嵌合抗体, 和人源化抗体。 25 例如, 可通过缺失铰链区, 从而产生单价抗体来修饰抗体。本发明的抗体可以是其可变区或其部分, 例如互补决定区(CDR 或 CDRs)在非人生物体, 例如大鼠或小鼠中产生的抗体。本发明包括嵌合的, CDR-嫁接的(grafted)和人源化的抗体。本发明包括在非人生物体, 例如大鼠或小鼠中产生的, 且然后在例如可变框架或恒定区被修饰以降低在人体中的抗原性的抗体。 30 任何修饰都在本发明的范围内, 只要该抗体具有至少一个抗原结合部分。

嵌合抗体(例如, 小鼠-人单克隆抗体)可用本领域已知的重组 DNA 技

术产生。例如，编码鼠(或其它物种)单克隆抗体分子 Fc 恒定区的基因用限制性酶消化以取出编码鼠 Fc 的区域，并取代编码人 Fc 恒定区的基因的对等部分(参见 Robinson 等，国际专利申请 PCT/US86/02269；Akira,等，欧洲专利申请 184,187；Taniguchi, M.,欧洲专利申请 171,496；Morrison 等，欧洲专利申请 173,494；Neuberger 等，国际申请 WO 86/01533；Cabilly 等，美国专利号 4,816,567；Cabilly 等，欧洲专利申请 125,023；Better 等(1988 *Science* 240: 1041-1043)；Liu 等(1987) *PNAS* 84: 3439-3443；Liu 等，1987, *J. Immunol.* 139: 3521-3526；Sun 等(1987) *PNAS* 84: 214-218；Nishimura 等，1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005；Wood 等(1985) *Nature* 314 : 446-449；和 Shaw 等，1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80 : 1553-1559)。

用来自人类 Fv 可变区的对等序列取代不直接涉及抗原结合的 Fv 可变区序列可进一步人源化嵌合抗体。产生人源化抗体的常规方法参见 Morrison, S. L., 1985, *Science* 229: 1202-1207, Oi 等，1986, *BioTechniques* 4: 214, 和 Queen 等 US 5,585,089, US 5,693,761 和 US 5,693,762, 这里引入所有这些文献的内容以供参考。这些方法包括分离，操作，和表达编码来自至少一个重链或轻链的全部或部分免疫球蛋白 Fv 可变区的核酸序列。该核酸的来源是本领域的技术人员熟知的，例如可从 7E3 和生产抗-GPII<sub>b</sub>III<sub>a</sub> 抗体的杂交瘤获得。然后可将编码嵌合抗体或其片断的重组 DNA 克隆进合适的表达载体中。合适的人源化抗体可任选通过 CDR 取代产生。美国专利 5,225,539；Jones 等，1986 *Nature* 321: 552-525；Verhoeyan 等，1988 *Science* 239: 1534；和 Beidler 等，1988 *J. Immunol.* 141: 4053-4060。

人源化的或 CDR-嫁接的抗体可通过 CDR-嫁接或 CDR 取代产生，其中可取代免疫球蛋白链的一个，两个，或全部 CDR。参见例如，美国专利 5,225,539；Jones 等，1986 *Nature* 321: 552-525；Verhoeyan 等，1988 *Science* 239: 1534；Beidler 等，1988. *J. Immunol.* 141: 4053-4060；Winter US 5,225,539, 这里清楚地引入所有这些文献的内容以供参考。Winter 描述了一种可用于制备本发明的人源化抗体的 CDR-嫁接方法(英国专利申请 GB 2188638A, 申请日为 1987 年 3 月 26 日；Winter US 5,225,539), 清楚地引用其内容以供参考。

人源化的或 CDR-嫁接的抗体有至少一个或两个，但一般是所有的受体的(重链和/或轻链免疫球蛋白链的)CDR 用供体 CDR 取代。优选的是，供体

是啮齿类抗体，例如大鼠或小鼠抗体，受体是人的框架或人的共有框架。一般来说，提供 CDR 的免疫球蛋白称为“供体”，提供框架的免疫球蛋白称为“受体”。在一个实施方案中，供体免疫球蛋白是非人的(例如，啮齿类)。受体框架可以是天然存在的(例如，人的)框架或共有框架，或与其大约 85  
5 %或更高，优选 90%，95%，99%或更高相同的序列。

特定抗体的所有 CDRs 可用非人 CDR 的至少一部分取代，或者只有一部分 CDRs 被非人 CDRs 取代。只需要取代人源化抗体与 Fc 受体结合所需数目的 CDRs。

取代，缺失或加入了特定氨基酸的嵌合和人源化抗体也在本发明的范  
10 围内。具体地说，优选的人源化抗体在框架区具有氨基酸取代以便例如提高与抗原的结合。例如，人源化抗体具有与供体框架残基或者与除受体框架残基以外的另一氨基酸相同的框架残基。作为另一例子，在具有小鼠 CDRs 的人源化抗体中，位于人框架区的氨基酸可用位于小鼠抗体相应位置的氨基酸取代。已知在有些情况下该取代提高人源化抗体与抗原的结合。

15 如上所述，本文使用的术语“抗原结合部分”或“抗体部分”或“片断”是指保留特异性结合抗原(例如，靶抗原，例如局部缺血抗原)的能力的抗体的一个或多个片断。使用本领域的技术人员已知的常规方法获得本发明的抗体片断。例如，用胃蛋白酶消化抗体产生 F(ab')<sub>2</sub> 片断和多个小片断。巯基乙醇还原抗体产生独立的重链和轻链。用木瓜蛋白酶消化抗体产生独  
20 立的 Fab 片断和 Fc 片断。如上所述按与完整抗体相同的方式筛选抗体片断的用途。

22A5 IgM 重链可变区的核苷酸序列在图 4A (SEQ ID NO : 1)中显示，22A5 IgM 重链可变区的氨基酸序列在图 5A (SEQ ID NO : 2)中显示。重链可变区的 CDR1 结构域相应于 SEQ ID NO : 2 的氨基酸大约 30 至 34 (SEQ ID  
25 NO : 4)且包含 SEQ ID NO : 1 的核苷酸大约 91-105(SEQ ID NO : 3)，重链可变区的 CDR2 结构域相应于 SEQ ID NO : 2 的氨基酸 49 至 65(SEQ ID NO : 6)且包含 SEQ ID NO : 1 的核苷酸 148-198(SEQ ID NO : 5)。

22A5 IgM 轻链可变区的核苷酸序列在图 4B (SEQ ID NO : 7)中显示，22A5 IgM 轻链可变区的氨基酸序列在图 5B(SEQ ID NO : 8)中显示。轻链可  
30 变区的 CDR1 结构域相应于 SEQ ID NO : 8 的氨基酸大约 23 至 33(SEQ ID NO : 10)且包含 SEQ ID NO : 7 的核苷酸大约 71-103(SEQ ID NO : 9)，轻链可

变区的 CDR2 结构域相应于 SEQ ID NO :8 的大约氨基酸 49 至 55(SEQ ID NO :12)且包含 SEQ ID NO :7 的核苷酸大约 149-169(SEQ ID NO :11)。

技术人员会预料到编码本发明的抗体或其片断(例如, CDR 结构域, 例如 CDR2 结构域, 或片断)的核苷酸序列可使用遗传密码和标准分子生物学  
5 技术从本申请所述的核苷酸和氨基酸序列产生。而且, 技术人员会预料到由于遗传密码的简并性, 其它核苷酸序列可编码本文所列的氨基酸序列。

尽管通常是天然序列(除了修饰的限制性位点等以外), 但是可从 cDNA, 基因组或混合体突变本发明的核酸成分, 由此按照标准技术提供基因序列。对于编码序列, 这些突变可影响所需的氨基酸序列。具体地说,  
10 本发明包含基本上相同于或来自于本文所述的天然 V, D, J, 恒定区, 转换区和其它这类序列的核苷酸序列(其中“来自于”是指一个序列相同于另一序列或者由它修饰而来)。

在一个实施方案中, 分离的核酸包含具有图 4A (SEQ ID NO :1)所示核苷酸序列, 或与其具有至少 96%, 97%, 98%, 99%或更高相同性的序列的  
15 22A5 IgM 重链可变区核苷酸序列。在另一实施方案中, 该分离的核酸编码具有图 4B(SEQ ID NO :7)所示核苷酸序列, 或与其具有至少 96%, 97%, 98%, 99%或更高相同性的序列的 22A5 IgM 轻链可变区核苷酸序列。

在另一实施方案中, 本发明提供了编码包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的重链 CDR1 结构域或其片断或修饰形式的分离核酸。该核酸可仅编码  
20 CDR1 区或者可编码完整的抗体重链可变区。例如, 该核酸可编码具有包含 SEQ ID NO : 6 的氨基酸序列的 CDR2 结构域的重链可变区。在另一实施方案中, 本发明提供了编码包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的重链 CDR2 结构域或其片断或修饰形式的分离核酸。该核酸可仅编码 CDR2 区或者可编码完整的抗体重链可变区。例如, 该核酸可编码具有包含 SEQ ID NO :4 的  
25 氨基酸序列的 CDR1 结构域的轻链可变区。

在另一实施方案中, 本发明提供了编码包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的轻链 CDR1 结构域或其片断或修饰形式的分离核酸。该核酸可仅编码  
CDR1 区或者可编码完整的抗体轻链可变区。例如, 该核酸可编码具有包含 SEQ ID NO : 12 的氨基酸序列的 CDR2 结构域的轻链可变区。在另一实施方案中, 本发明提供了编码包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列的轻链 CDR2 结  
30 构域或其片断或修饰形式的分离核酸。该核酸可仅编码 CDR2 区或者可编

码完整的抗体轻链可变区。例如，该核酸可编码具有包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列的 CDR1 结构域的轻链可变区。

### 药用组合物和用药

5 本发明的抑制剂可掺入适合于给受试者用药的药用组合物中。一般来说，药用组合物包含本发明的抑制剂(例如，修饰的致病性免疫球蛋白)和药用上可接受的载体。本文使用的“药用上可接受的载体”包括生理学上可配伍的任意和所有溶剂，分散介质，糖衣，抗细菌和抗真菌试剂，等渗剂和吸收延迟剂等。药用上可接受的载体的例子包括水，盐水，磷酸盐缓冲液，葡萄糖，甘油，乙醇等中的一种或多种，以及其组合。在许多例子中，10 优选在组合物中包含等渗剂，例如，糖，诸如甘露醇，山梨醇等多元醇，或氯化钠。药用上可接受的载体可进一步包含增加抗体或抗体部分货架寿命或效力的少量辅助物质，例如润湿剂或乳化剂，保存剂或缓冲液。

药用组合物配制成与其计划的用药途径相配伍。用药途径的例子可包括，例如，肠胃外，例如静脉内，真皮内，皮下，经口的(例如，吸入)，经15 皮肤的(局部)，经粘膜的和直肠用药。因此，本发明的组合物可以是各种形式。它们包括，例如，液体，半固体和固体配药形式，例如液体溶液(例如，可注射的和可灌輸的溶液)，分散体或悬液，片剂，丸剂，粉剂，脂质体和栓剂。优选的形式依赖于计划的用药方式和治疗应用。一般优选的组合物20 是可注射的或可灌輸的溶液的形式，例如相似于用其它抗体被动免疫人体所用的那些组合物。优选的用药方式是肠胃外的(例如，静脉内，皮下，腹膜内，肌肉内的)。在一个优选的实施方案中，通过静脉内灌輸或注射施用抗体。在另一优选的实施方案中，通过肌肉内或皮下注射施用抗体。

用于肠胃外，例如真皮内或皮下应用的溶液或悬液可包括，例如下列25 成分：诸如注射用水，盐水溶液，固定油，聚乙二醇，甘油，丙二醇或其它合成溶剂等无菌稀释剂；诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯等抗细菌剂；诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠等抗氧化剂；诸如乙二胺四乙酸等螯合剂；诸如乙酸盐，柠檬酸盐或磷酸盐等缓冲剂和诸如氯化钠或葡萄糖等用于调节渗透压的试剂。pH 可用诸如盐酸或氢氧化钠等酸或碱调节。肠胃外制剂可30 密封在由玻璃或塑料制成的安瓿，一次性注射器或多剂量小瓶中。

适合于注射使用的药用组合物包括无菌水溶液(如果是水溶性的)或分

散体和用于临时配制无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内用药，合适的载体包括生理盐水，抑菌水，Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲液(PBS)。在所有情况下，组合物必须是无菌的且流动性应达到容易注射的程度。它在生产和存贮条件下应当稳定且必须防止诸如细菌和真菌等微生物的污染。载体可以是含有例如，水，乙醇，多元醇(例如，甘油，丙二醇，和液态聚乙二醇等)，及其合适的混合物的溶剂或分散介质。通过，例如使用诸如卵磷脂等糖衣，通过在分散体的情况中维持所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂可维持合适的流动性。防止微生物的活动可通过各种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯类，氯丁醇，酚，抗坏血酸，硫柳汞等来实现。在许多情况中，组合物中优选包括等渗剂，例如糖，多元醇如甘露醇，山梨醇，氯化钠。可注射的组合物的延迟吸收可通过在组合物中包含延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

治疗性组合物一般在生产和存贮条件下必须是无菌的和稳定的。该组合物可配制成溶液，微乳状液，分散体，脂质体，或适合于高药物浓度的其它有序结构。可在具有上文所列一种或多种成分的合适溶剂中掺入所需量的活性化合物(即，抗体或抗体部分)，然后过滤除菌制备无菌可注射溶液。一般来说，通过将活性化合物掺入含有基础分散介质和所需的上述其它成分的无菌载体中制备分散体。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥以产生活性成分加上来自前面无菌过滤溶液的任何其它所需成分的粉末。可通过，例如，使用诸如卵磷脂等糖衣，对于分散体通过维持所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂来维持溶液的合适流动性。

本发明的抑制剂可通过本领域已知的各种方法来给药，但对于许多治疗应用而言，优选的给药途径/方式是静脉内注射或灌输。正如本领域的技术人员可预料到的，给药的途径和/或方式可随所需的结果而变化。在某些实施方案中，活性化合物可用防止该化合物迅速释放的载体来制备，例如控释制剂，包括植入体，皮下植入块，和微包裹传递系统。可使用生物可降解的，生物相容的聚合体，例如乙烯乙酸乙酯，聚酞类，聚乙酸(polyglycolic acid)，胶原蛋白，聚原酸酯和聚乳酸。制备这种制剂的许多方法已有专利或是本领域的技术人员公知的。参见，例如，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, 编辑，Marcel Dekker, Inc., New York,

1978。

在某些实施方案中，本发明的抑制剂可用例如，惰性稀释剂或可同化的食用载体口服给药。该化合物(和其它成分，如果需要)也可密封在硬壳或软壳明胶胶囊中，压成片剂，或直接掺入受试者饮食中。对于口服治疗给药，该化合物可掺入赋形剂并以可吞咽的片剂，口含片，锭剂，胶囊剂，5 酞剂，悬浮剂，糖浆剂，糯米纸囊剂等的形式使用。为了通过非肠胃外给药施用本发明的化合物，必须用一种材料包裹该化合物，或者使该化合物与一种材料一起施用以防止其失活。为了通过吸入给药，从增压容器或含有合适的推进剂，例如，诸如二氧化碳等气体的分配器，或者喷雾器中以气溶胶喷雾的形式递送该化合物。10

本发明的抑制剂可用防止该化合物从身体迅速释放的载体来制备，例如控释制剂，包括植入体和微包裹传递系统。可使用生物可降解的，生物相容的聚合体，例如乙烯乙酸乙酯，聚酞类，聚乙酸(polyglycolic acid)，胶原蛋白，聚原酸酯和聚乳酸。制备该配制品的方法对本领域的技术人员而言是显而易见的。该材料也可从 Alza Corporation and Nova Pharmaceutical, Inc.以商品形式买到。脂质体悬液也可用作药用上可接受的载体。按照本领域的技术人员已知的方法，例如美国专利号 4,522,811 所述的方法可制备它们。15

药用组合物可与给药说明一起包含在容器，包装或分配器中。20

### 实施例

#### 实施例 1: 局部缺血-再灌注损伤的机理

本实施例显示了补体系统缺陷型小鼠对局部缺血-再灌注损伤有抗性。

为了检查局部缺血-再灌注损伤的机理，在下肢模型中处理补体 C3 缺陷型小鼠。基于透性指数减少大约 50%，C3-/-小鼠有针对损伤的部分保护作用(参见，Weiser 等(1996) *J. Exp. Med.* 1857-1864)。因此，补体 C3 是在该鼠模型中诱导完全损伤所必需的。25

在 Weiser 等的实验中没有鉴定如何激活补体。血清补体系统可通过至少三种不同的途径，即传统途径，凝集素途径或旁路途径被激活。了解所涉及的途径是重要的，因为它暗示着损伤的机理。例如，传统途径通过免疫球蛋白的 IgM 和 IgG 同种型或者通过血清识别蛋白 C-反应蛋白非常有效30



地被激活。凝集素途径在结合甘露聚糖的凝集素(MBL)识别诸如甘露聚糖等特异性糖类后激活(Epstein 等, (1996) *Immunol* 8,29-35)。在两种途径中,补体 C4 在与催化中央成分 C3 裂解的 C2 形成酶复合物中是必需的。相反,两者择一的途径自发激活导致 C3 转变成其活性形式(C3b)且附着到外来或自身组织上。该途径受到严密调控,因为所有的宿主细胞通过失活或者转移 C3 转化酶表达补体途径放大的抑制剂(Muller-Eberhard, H. J., (1988) *Ann. Rev. Biochem.*57: 321-347)。确定所涉及的途径的一种方法是使用 C4 缺陷型小鼠,即不能通过传统或凝集素途径形成 C3 转化酶。在下肢模型中比较 C3 或 C4 缺陷型小鼠与野生型(WT)对照揭示了 C4 也是诱导完全损伤所必需的(Weiser 等, 出处同上)。这一发现是重要的,因为它表明可能涉及抗体或 MBL。

#### 实施例 2: 天然 IgM 介导局部缺血再灌注(I/R)损伤

本实施例显示了免疫球蛋白缺陷型小鼠对局部缺血-再灌注损伤有抗性。

为了确定抗体是否参与介导 I/R 损伤,在肠模型中鉴定了免疫球蛋白完全缺陷型, RAG2-/- (重组酶激活基因-2 缺陷型)小鼠以及补体缺陷型动物。有意义的是, RAG-2-/- 小鼠的保护水平类似于在补体缺陷型动物中观察到的水平(Weiser 等, 出处同上)。由于 RAG2-/- 动物也缺少成熟的淋巴细胞,因此重要的是确定致病性效应是抗体依赖型的(Shinkai 等(1992) *Cell* 68,855-867)。为了证实损伤由血清抗体介导,用正常的小鼠血清(Weiser 等, 出处同上)或纯化的 IgM (Williams 等(1999) *J. Appl Physiol* 86; 938-42)重建缺陷型动物。在两种情况下,重建的 RAG-2-/- 小鼠不再受到保护并回复(restored)损伤。在后一种实验中,使用肠损伤模型,因为在该模型中,认为损伤主要是由补体介导。

这些结果的解释是,在局部缺血期间,新抗原在内皮细胞表面表达或暴露。循环 IgM 表现出识别新的决定簇,结合并激活补体的传统途径。尽管不知道该抗原的性质,但似乎 IgM 而不是 IgG 主要负责补体的激活,因为用合并的 IgG 重建缺陷型小鼠不能明显回复小鼠的损伤。另一假设是存在另一起动事件,例如识别改变的内皮表面,诱导低水平的补体激活,接着暴露新的抗原位点的 MBL 途径并通过结合 IgM 放大该途径。

### 实施例 3: 致病性 IgM 是 B-1 细胞的产物:

由于据认为大多数循环 IgM 代表天然抗体, 即重排种系基因的产物, 因此, 可能有 B-1 淋巴细胞缺陷的小鼠也受到保护。B-1 细胞具有与更常规的 B-2 细胞不同的表型在于它们表达低水平的 IgD 和 CD23 且大多数表达细胞表面蛋白 CD5(Hardy 等, (1994) *Immunol. Rev.* : 137, 91; Kantor 等(1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 501-538, 1993)。B1 细胞的区别还在于在小鼠中循环减少, 在外周淋巴结和脾脏中出现频率有限且主要位于腹膜腔内。为了检查 B-1 细胞作为致病性 IgM 来源的作用, 抗体缺陷型小鼠(RAG-2<sup>-/-</sup>)用 5 X 10<sup>5</sup> 个腹膜 B-1 细胞重建并在处理前静息大约 30 天。在接受转移后 1 月内循环 IgM 水平达到接近正常的范围。在肠局部缺血模型中对 B-1 细胞重建的小鼠的鉴定证实 B-1 细胞是致病性 IgM 的主要来源(参见 Williams 等(1999), 出处同上)。这是一个重要的观测结果, 因为 B-1 细胞天然抗体库比常规 B-2 细胞预期的抗体库有限得多。因此, 可能致病性抗体代表了种系的产物。

### 实施例 4: Cr2<sup>-/-</sup>小鼠受到防止局部缺血再灌注损伤的保护:

最初对 Cr2<sup>-/-</sup>敲除小鼠的鉴定揭示了 B-1a 或 CD5<sup>+</sup> B-1 细胞的出现率减少了大约 50%(Ahearn 等(1996) *Immunity* 4: 251-262)。但对 Cr2-缺陷型小鼠的另一品系的鉴定没有鉴别出相似的减少(Molina 等(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,3357-3361)。CD5<sup>+</sup> 细胞出现率的差别是由品系背景差别还是由环境差别引起尚不清楚。尽管在 Cr2<sup>-/-</sup>小鼠中 B-1a 细胞的出现率减少, 但 IgM 的循环水平在正常范围内。这些发现表明 IgM 库可能在 Cr2-缺陷型动物中有所不同。为了检验该假设, 鉴定了肠 I/R 模型小鼠。令人惊奇的是, Cr2<sup>-/-</sup>小鼠与抗体彻底缺陷型小鼠同等地受到保护(图 1)。在肠模型中在处理 25 天后 5 天内比较存活率表明与 Cr2-缺陷型动物相比 WT 的死亡率显著增加。与死亡率增加一致, 从处理的 WT 或 Cr2<sup>-/-</sup>缺陷型小鼠获得的组织切片中观察到损伤显著减小。

在野生型小鼠或用合并的 IgM 或 B-1 细胞重建的 Cr2<sup>-/-</sup>小鼠中观察到 30 肠粘膜层的广泛损伤。相比之下, 从处理的 Cr2<sup>-/-</sup>小鼠分离的组织切片相似于假性对照。因此, 尽管 IgM 循环水平正常, 但 Cr2-缺陷型小鼠可防止损

伤。这些结果不仅证实了 B-1 细胞作为致病性抗体来源的重要性，而且表明补体系统以某种方式参与天然抗体库的形成或维持。例如，补体可参与 B-1 细胞的阳性选择。

#### 5 实施例 5: 致病性 IgM 的鉴定

本实施例描述了从正常 B-1 细胞产生特异性杂交瘤克隆和鉴定产生致病性 IgM 的一个克隆。显示了致病性 IgM 回复抗体缺陷型小鼠的体内损伤。

在携带补体受体 CD21/CD35 缺陷的小鼠中进行的研究揭示了该小鼠缺少致病性抗体。该发现是意想不到的，因为在它们的血液中具有正常的 IgM  
10 水平。这些发现产生了这样的假设，即 B-1 细胞这种特殊的 B 细胞群体负责分泌致病性 IgM。例如，用来自正常小鼠的 B-1 细胞植入受体缺陷型小鼠(Cr2<sup>-/-</sup>)可回复损伤，证实了 B-1 细胞的重要性。为了鉴定负责损伤的具体抗体，从收获自正常小鼠的腹膜 B-1 细胞的富集库构建一组杂交瘤克隆。从腹膜细胞的富集部分制备杂交瘤的一般方法包括，从 7 天前用 IL-10 处理  
15 的小鼠收获腹膜细胞，随后通过用磁珠进行阴性选择来富集 CD23<sup>+</sup>B 细胞。用 IgM，Mac-1 和 CD23 特异性 Mab 染色后通过 FACS 分析所富集的 B 细胞。通过用 LPS 培养 24 小时进一步激活富集的群体。激活的细胞与融合配偶体骨髓瘤细胞在 PEG 存在的条件下混合并在 HAT-选择性培养基中生长。通过 ELISA 筛选杂交瘤中分泌 IgM 的克隆，扩增阳性孔用于纯化 IgM。

20 通过从每个克隆收集等量的 IgM 产物分析 22 个分泌 IgM 的杂交瘤克隆。用收集的 IgM 处理抗体缺陷型小鼠可回复损伤，相似于使用从血清收集的 IgM 所见的结果。这一发现证实了致病性 IgM 确实存在于所产生的 22 个杂交瘤中。通过将抗体库分成两个部分，即 1-11 和 12-22，用这两个部分处理小鼠，发现用包括克隆号 22 的抗体库分离到致病性抗体。最后，用克  
25 隆 17 或 22 重建小鼠。克隆 22 能回复损伤而其它克隆不能(见图 3A 和 3B)。

#### 实施例 6: 补体参与对 B-1 细胞的选择:

已提出了两个不同的模型以解释 B-1 细胞的发育。谱系假说提出，B-1 细胞在早期胎儿时期作为不同的群体发育(Kantor 等(1993)出处同上)。另一  
30 种假说是，B-1 细胞从与常规 B 细胞相同的祖先发育，但依赖于其环境，即与抗原的相遇，它们发育成 B-1 或保留 B-2 细胞表型(Wortis,H. H. (1992) *Int.*

5 *Rev. Immunol.* 8,235; Clarke, J. (1998) *Exp. Med.* 187,1325-1334)。不论其起源，已知 B-1 细胞以不同于 B-2 细胞的频率从成人骨髓中补充且其表型更相似于早期胎儿肝脏 B 细胞或新生儿骨髓(BM)细胞。虽然有相同的早期起源，它们的细胞库易于偏向表达更多的邻近 VH 基因且 N-核苷酸的添加有限(Gu 等, (1990) *EMBO J* 9, 2133; Feeney, J. (1990) *Exp. Med.* 172,1377)。似乎合理的是，虽然成人 BM 干细胞补充减少，但 B-1 细胞将自我更新且抗原刺激可能在其更新，扩增或者甚至起始选择中是重要的(Hayakawa 等, (1986) *Eur. J. Immunol.* 16,1313)。事实上根据常规模型，B-1 细胞可能是抗原选择的。

10 支持 B-1 细胞阳性选择需要 B-细胞受体(BCR)信号的证据来自于携带改变 BCR 信号的突变的小鼠。例如，通过 CD19 (19,20)，vav (21)或 Btk (22)削弱 BCR 信号显著影响 B-1 细胞的发育。相比之下，诸如在 CD22-或 SHP-1 缺陷型小鼠中阴性选择的丧失可导致 B-1 细胞频率增大(O'Keefe 等(1996) *Science* 274,798-801; Shultz 等(1993) *Cell* 73, 1445)。最近，用携带两个不同 Ig 转基因，V<sub>H</sub>12 (B-1 细胞表型)或 V<sub>H</sub>B1-8 (B-2 细胞表型)的小鼠的精采研究支持这样的观点，即 B-1 细胞通过自身抗原阳性选择。例如，V<sub>H</sub>12 单独表达或与 B1-8 一起表达的 B 细胞发育成 B-1 细胞表型。然而，如果有 B 细胞的话，只有少量鉴定为表达 B 1-8 tg。因此，这些结果表明转基因 B 细胞与自身-PtC 相遇导致表达 V<sub>H</sub>12 的那些细胞扩增。最近由 Hardy 等(1994) *Immunol. Rev.* 137,91)报道了 B-1 细胞的选择。在其模型中，在表达同源 (cognate)抗原的小鼠中选择并扩增表达对 Thy 1.1 特异性的免疫球蛋白转基因的 B 细胞。相比之下，在表达另一同种异型 Thy1.2 的小鼠中未发现转基因<sup>+</sup> B-1 细胞。

25 补体在何处适应 B-1 细胞发育? B-1a 细胞频率的总体减少和更具体的表达与 I/R 损伤相关的 IgM 的 B-1 细胞的损失表明了 CD21/CD35 在阳性选择或 B-1a 细胞维持中的作用。补体的一个可能的作用是在与同源抗原相遇时它增强 BCR 信号。对 CD21/CD35 缺陷型小鼠的生化研究和分析证实了共同受体信号在常规 B 细胞的激活和存活中的重要性(Carroll, M. C., (1998) *Ann. Rev. Immunol* 16, 545-568 ; Fearon 等(1995) *Annu. Rev. Immunol* 13, 127-149)。很可能 B-1 细胞同样地利用共同受体信号来增强 BCR 信号。例如，细菌表达诸如磷酸酰胆碱等典型 B-1 细胞抗原且理所当然的是用补体配体 C3d 包裹细菌会增强共同受体与 BCR 的交联并增强总体信号。因此，

以较低浓度表达的抗原可能需要补体增强以便同源 B 细胞识别它并扩增或阳性选择。补体受体的另一作用是将抗原定位在淋巴区室内的滤泡树突状细胞(FDC)上。然而, 由于 B-1 细胞的主要群体占据腹膜组织, 不清楚它们是否在淋巴结构内遇到 FDC。B-1 细胞进行阳性选择的实际位点是未知的。

5 可能它们在早期胚胎发育或在新生儿 BM 中遇到同源抗原。如果是这样, 可预期这些区室内基质细胞上的补体受体结合抗原以呈递给 B 细胞。可能补体会参与两个发育阶段。首先, 它们可能增强最初阳性选择中的抗原信号。其次, 由于选择的 B-1 细胞在外周位点得到补充, 因此补体受体可能再次参与 BCR 信号的增强。

10 图 2 是在腹膜 B-1 淋巴细胞的阳性选择中补体和补体受体预定作用的示意图。补体 - 配体包裹的抗原(自身抗原和非自身抗原)的相互作用导致 CD21/CD19 共同受体和细胞表面 BCR 的共连接, 产生增强的信号和阳性选择。

#### 15 等价形式

使用不超出常规的实验, 本领域的技术人员将认识到, 或者能确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等价形式。这些等价形式打算由下面权利要求书包括。

## 序列表

<110> 血液研究中心 (CBR, Inc.)

<120> 抑制免疫球蛋白介导的再灌注损伤的方法和组合物

<130> 10861-024W01

<140> PCT/US01/18510

<141> 2001-06-08

<150> US 60/210,272

<151> 2000-06-08

<160> 12

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 338

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (338)

<400> 1

gag gtg cag ctg cag gag tct ggg gct gag ctg gtg aag cct ggg gcc 48  
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aaa gct tct ggc tac gca ttc agt agc tac 96  
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga aag ggt ctt gag tgg att 144  
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

gga cag att tat cct gga gat ggt gat act aac tac aac gga aag ttc 192  
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 240  
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

atg cag ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

gca aga gaa gat tac tac ggt agt gac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc 336  
 Ala Arg Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
                   100                  105                  110

ag 338

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 2

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1                  5                  10                  15  
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp  
                   20                  25                  30  
 Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
                   35                  40                  45  
 Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys  
                   50                  55                  60  
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65                  70                  75                  80  
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
                   85                  90                  95  
 Arg Glu Asp Tyr Tyr Gly Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly  
                   100                  105                  110

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (15)

<400> 3

agc tac tgg atg aac 15  
 Ser Tyr Trp Met Asn  
 1                  5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 4

Ser Tyr Trp Met Asn  
 1                  5

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (51)

<400> 5

cag att tat cct gga gat ggt gat act aac tac aac gga aag ttc aag 48  
Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys  
1 5 10 15

ggc 51  
Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 6

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 7

<211> 349

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (5)... (349)

<400> 7

tgat att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 49  
Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg ggt act gct 97  
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 145  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 193  
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 241



```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
   65                               70                               75

gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat agc agc tat cct ctc      289
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu
   80                               85                               90                               95

acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg ggc tga tgc tgc      337
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly * Cys Cys
   100                               105                               110

acc aaa act gta      349
Thr Lys Thr Val

```

```

<210> 8
<211> 114
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

```

```

<400> 8
Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp
   1                               5                               10                               15
Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val
   20                               25                               30
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
   35                               40                               45
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
   50                               55                               60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser Glu
   65                               70                               75                               80
Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
   85                               90                               95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Cys Cys Thr Lys
   100                               105                               110
Thr Val

```

```

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> 小鼠(Mus musculus)

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)... (33)

```

```

<400> 9
aag gcc agt cag gat gtg ggt act gct gta gcc      33
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
   1                               5                               10

```

<210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 10  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala  
 1                   5                   10

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

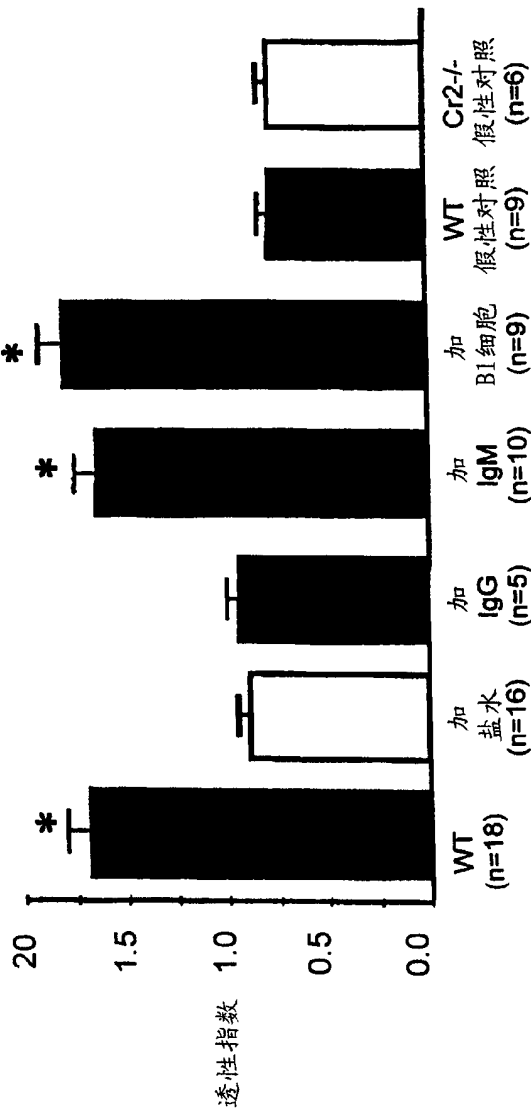
<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (21)

<400> 11  
 tgg gca tcc acc cgg cac act  
 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 1                   5

21

<210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 12  
 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 1                   5



\*p < 0.00001

图 1

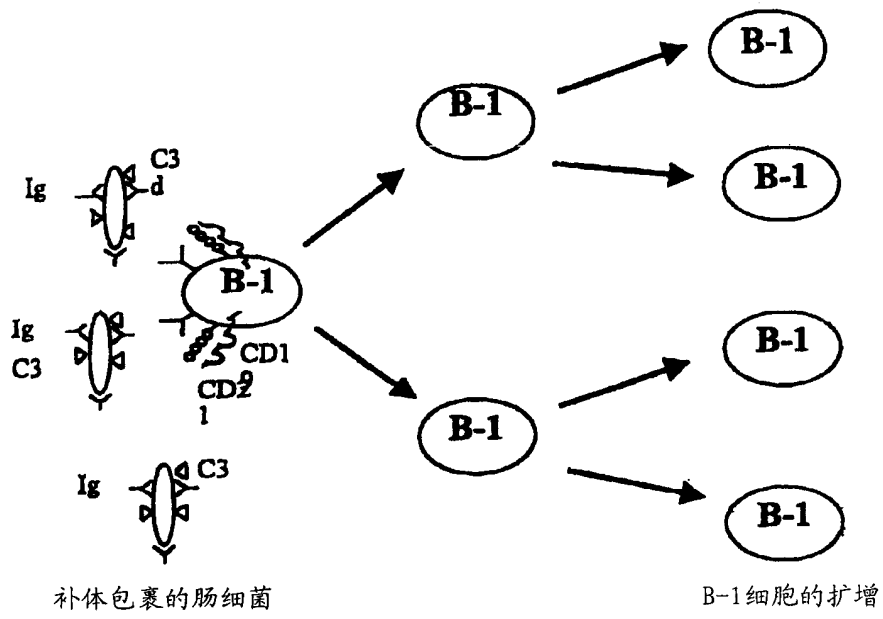


图 2

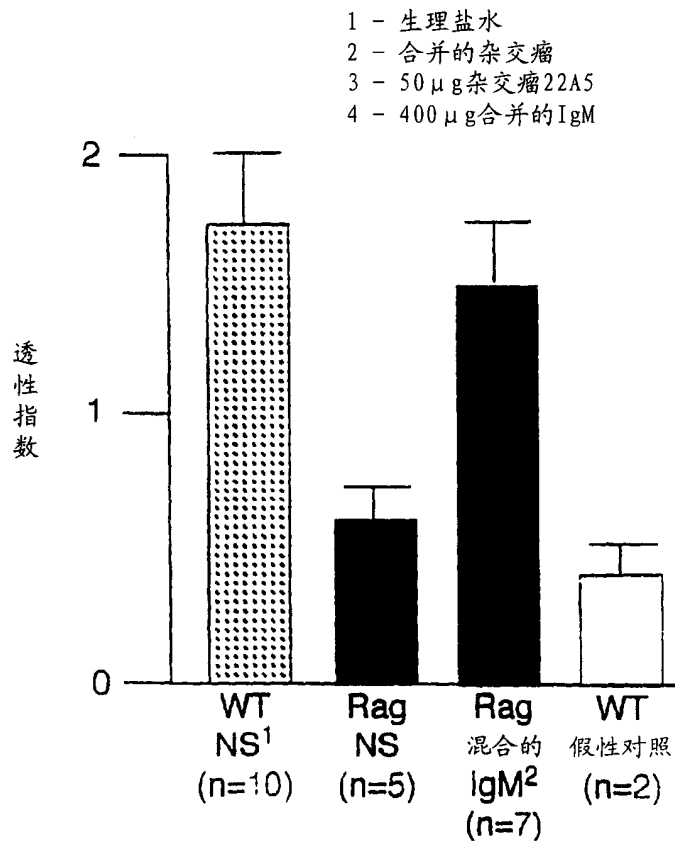


图 3A

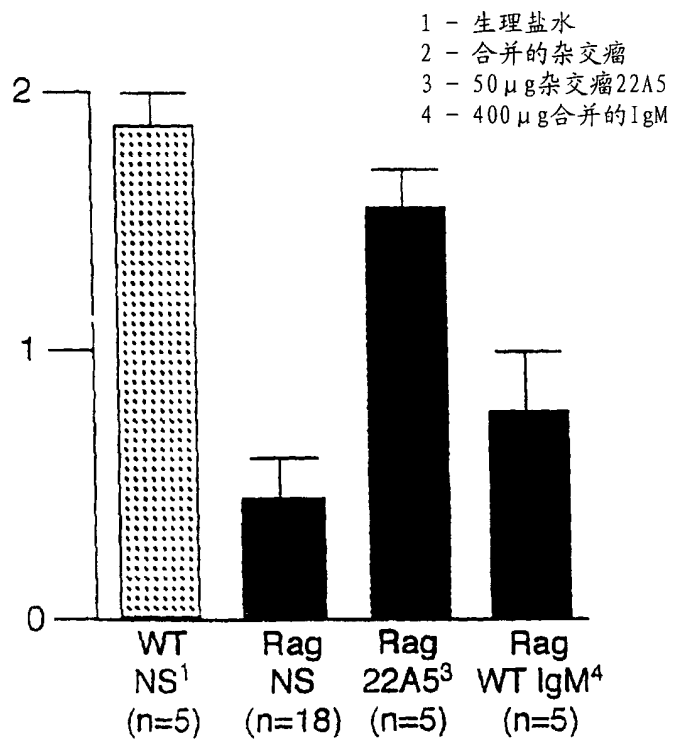


图 3B

```

-----FWR1----->
GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAGATTTCCCTGCAAAGCTTCTGGCTACGCATTCACT
<-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
AGCTACTGGATGAAC TGGTGAAGCAGAGGCCCTGGAAGGGTCTTGAGTGGATTGGA CAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAAC
-----> <-----
TACAAAGGAAAGTTCAAGGC AAGGCCACACTGACTGCAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCT
-----FWR3-----> <-----D-----> <-----J----->
GAGGACTCTGGGTCTATTCTGTGCAAGA GAAGATTACTACGGTAGTGACTGGTACTTCGATGCTGGGGCAG 338 (SEQ ID NO:1)

```

图 4A

```

-----FWR1-----> <-----CDR1----->
TGATATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGC AAGGCCAGTCAGGATGT
-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
GGTACTGCTGTAGCC TGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTAC TGGGCATCCACCCGGCACACT
-----FWR3----->
GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATT
-----> <-----J----->
ATTTCTGT CAGCAATATAGAGTATCCTCTCACCTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAACGGGGCTGATGCTGCACCA

```

AAACTGTA 349 (SEQ ID NO:7)

图 4B

```

-----FWR1-----> <CDR1> <-----FWR2----->
VQLQESGAELVKPGASVKISCKASGYAFS SYWMN WVKQRPGKGLEWIG

<-----CDR2-----> <-----FWR3----->
QIYPGDGDTNYNGKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR

<-D-> <---J--->
EDYYGSDWYFDVWG(SEQ ID NO:2)

```

图 5A

```

-----FWR1-----> <---CDR1--> <-----FWR2----->
IVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC KASQDVGTAVA WYQQKPGQSPKLLIY

<-CDR2-> <-----FWR3----->
WASTRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQ

<-----J----->
QYSSYPLTFGSGTKLEIKRG.CCTKTV(SEQ ID NO:8)

```

图 5B