



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 108350086 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201480017698.6

(22)申请日 2014.01.23

(30)优先权数据

61/755,968 2013.01.23 US

61/755,960 2013.01.23 US

61/771,565 2013.03.01 US

61/771,560 2013.03.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.09.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/012831 2014.01.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/116880 EN 2014.07.31

(83)生物保藏信息

PTA-13522(B4/14/12) 2013.02.07

PTA-13523(C2/19/8) 2013.02.07

(71)申请人 南卡罗来纳医科大学研究发展基金会

地址 美国南卡罗来纳

申请人 科罗拉多大学董事会,法人团体
美国退伍军人事务部

(72)发明人 B·M·罗勒 M·霍乐尔斯

S·汤姆林森 J·M·瑟曼

C·阿特金森 L·库里克

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路 区斌

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

权利要求书5页 说明书124页 附图49页

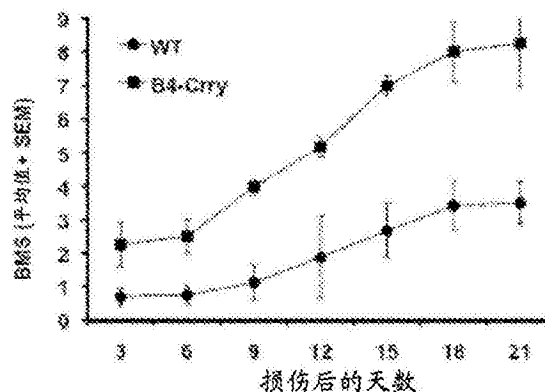
(54)发明名称

基于天然抗体的靶向构建体及其用途

(57)摘要

本发明提供用于治疗炎症性疾病和/或体内检测个体中的组织损伤的靶向递送方法和构建体。靶向递送法使用识别被发现存在于炎症部位处的表位的抗体。本发明还提供抑制个体眼睛中的补体驱动的炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用抗体或其片段或其组合物,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂。还提供治疗补体相关眼病或涉及氧化损伤的眼病的相关方法。另外,本发明提供检测个体的眼组织中补体介导的损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用构建体或其组合物,其中所述构建体包含(a)特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂的抗体或其片段;和(b)可检测部分。

A



1. 一种抑制个体中具有非缺血性损伤的组织中补体介导的炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性结合膜联蛋白 IV 或磷脂;和 (b) 补体抑制剂。

2. 一种治疗个体中的炎性疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性结合膜联蛋白 IV 或磷脂;和 (b) 补体抑制剂。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述补体抑制剂选自由以下组成的组:抗C5抗体、抗MASP抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗C3b抗体、抗C6抗体、抗C7抗体、抗B因子抗体、抗D因子抗体和抗备解素抗体、膜辅因子蛋白 (MCP)、衰变加速因子 (DAF)、CD59、Crry、CR1、H因子、I因子、线性肽、环肽、康普塔汀、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸 (NAAGA) 以及任何所述前述物质的生物活性片段。

4. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述补体抑制剂是旁路途径的特异性抑制剂。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述补体抑制剂是凝集素途径的特异性抑制剂。

6. 一种检测个体的组织中补体介导的损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV 或磷脂;和 (b) 可检测部分,其中所述组织处所述可检测部分的存在指示补体介导的组织损伤。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述方法还包括检测所述可检测部分。

8. 如权利要求6或权利要求7所述的方法,其中所述可检测部分选自由以下组成的组:放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。

9. 如权利要求1和3-8中任一项所述的方法,其中所述组织损伤由炎症病症、移植排斥、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性疾病中的任一种引起。

10. 如权利要求1和3-8中任一项所述的方法,其中所述组织是眼睛、关节、肾、脑、心脏、脊髓和肝中的任一者。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述组织是眼睛、关节和肾中的任一者。

12. 如权利要求2-5和7-8中任一项所述的方法,其中所述疾病是眼病、关节炎或肾损伤中的任一者。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白 IV 的所述结合。

15. 如权利要求13或14所述的方法,其中所述抗体或其抗体片段与单克隆抗体B4结合相同的表位。

16. 如权利要求13-15中任一项所述的方法,其中所述膜联蛋白 IV 存在于个体中的经历非缺血性损伤的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

17. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体C2与磷脂的所述结合。

19. 如权利要求17或18所述的方法,其中所述抗体或其片段结合与单克隆抗体C2所结

合的表位相同的表位。

20. 如权利要求17-19中任一项所述的方法,其中所述磷脂存在于个体中的经历组织损伤和/或氧化损伤的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

21. 如权利要求17-20中任一项所述的方法,其中所述磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。

22. 如权利要求17-20中任一项所述的方法,其中所述磷脂是MDA。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述构建体是融合蛋白。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述抗体或其片段和所述补体抑制剂或可检测部分通过肽接头连接。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述抗体或其片段是scFv。

26. 如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述抗体或其片段是Fab、Fab' 或F(ab')₂。

27. 一种构建体,其包含:(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:1或7的序列、SEQ ID NO:2或8的序列或SEQ ID NO:3或9的序列的轻链可变结构域;和/或(ii) 包含SEQ ID NO:4或10的序列、SEQ ID NO:5或11的序列或SEQ ID NO:6或12的序列的重链可变结构域。

28. 如权利要求27所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:1或7的序列的轻链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:2或8的序列的轻链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:3或9的序列的轻链可变结构域。

29. 如权利要求27或28所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:4或10的序列的重链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:5或11的序列的重链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:6或12的序列的重链可变结构域。

30. 如权利要求27-29中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:13或14的轻链可变结构域。

31. 如权利要求27-30中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:15或16的重链可变结构域。

32. 如权利要求27-31中任一项所述的构建体,其中所述抗体或片段是具有所述SEQ ID NO:17或18的序列的scFv。

33. 如权利要求27-32中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白IV的所述结合。

34. 如权利要求27-33中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段与单克隆抗体B4结合相同的表位。

35. 如权利要求27-34中任一项所述的构建体,所述膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤或处于经历组织损伤的风险的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

36. 一种构建体,其包含:(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:25或31的序列、SEQ ID NO:26或32的序列或SEQ ID NO:27或33的序列的轻链可变结构域;和/或(ii) 包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结

构域。

37. 如权利要求36所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:25或31的序列的轻链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:26或32的序列的轻链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:27或33的序列的轻链可变结构域。

38. 如权利要求36或37所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:34或35的轻链可变结构域。

40. 如权利要求36-39中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:36的重链可变结构域。

41. 如权利要求36-40中任一项所述的构建体,其中所述抗体或片段是具有所述SEQ ID NO:37或38的序列的scFv。

42. 如权利要求36-41中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体C2与磷脂的所述结合。

43. 如权利要求36-42中任一项所述的构建体,其中所述抗体或其片段与单克隆抗体C2结合相同的表位。

44. 如权利要求36-43中任一项所述的构建体,其中所述磷脂存在于个体中的经历组织损伤或处于经历组织损伤的风险的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

45. 如权利要求36-44中任一项所述的方法,其中所述磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。

46. 如权利要求36-44中任一项所述的方法,其中所述磷脂是MDA。

47. 如权利要求27-46中任一项所述的构建体,其中所述构建体包含补体调节剂。

48. 如权利要求47所述的构建体,其中所述补体调节剂是补体抑制剂。

49. 如权利要求48所述的构建体,其中所述补体抑制剂选自由以下组成的组:抗C5抗体、抗MASP抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗C3b抗体、抗C6抗体、抗C7抗体、抗B因子抗体、抗D因子抗体和抗备解素抗体、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CD59、Crry、CR1、H因子、I因子、线性肽、环肽、康普塔汀、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸(NAAGA)以及任何所述前述物质的生物活性片段。

50. 如权利要求48所述的构建体,其中所述补体抑制剂是旁路途径的特异性抑制剂。

51. 如权利要求48所述的构建体,其中所述补体抑制剂是凝集素途径的特异性抑制剂。

52. 如权利要求27-46中任一项所述的构建体,其中所述构建体包含可检测部分。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述可检测部分选自由以下组成的组:放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。

54. 如权利要求27-53中任一项所述的构建体,其中所述构建体是融合蛋白。

55. 如权利要求54所述的构建体,其中所述抗体或其片段和所述补体调节剂或可检测部分通过肽接头连接。

56. 一种药物组合物,其包含如权利要求27-51和54-55中任一项所述的构建体。

57. 一种抑制个体中补体介导的炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的

如权利要求56所述的组合物。

58. 一种治疗个体中的炎症性疾病的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的如权利要求56所述的组合物。

59. 一种组合物, 其包含如权利要求52或53中任一项所述的构建体。

60. 一种检测个体的组织中补体介导的损伤的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的如权利要求59所述的组合物。

61. 一种抑制个体眼睛中的补体驱动的炎症的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段不会活化补体活化, 并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂; 或 (b) 包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含: (i) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂, 和 (ii) 治疗剂。

62. 一种治疗补体相关眼病或涉及氧化损伤的眼病的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段不会活化补体活化, 并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂; 或 (b) 包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含: (i) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂, 和 (ii) 治疗剂。

63. 如权利要求61或权利要求62所述的方法, 其中所述方法包括施用抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段不会活化补体活化, 并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂。

64. 如权利要求61或权利要求62所述的方法, 其中所述方法包括施用包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含: (i) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂, 和 (ii) 治疗剂。

65. 如权利要求64所述的方法, 其中所述治疗剂是补体抑制剂。

66. 如权利要求65所述的方法, 其中所述补体抑制剂选自由以下组成的组: 抗C5抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗C3b抗体、抗C6抗体、抗C7抗体、抗B因子抗体、抗MASP抗体、抗D因子抗体和抗备解素抗体、膜辅因子蛋白 (MCP)、衰变加速因子 (DAF)、CD59、Crry、CR1、H因子、I因子、线性肽、环状肽、康普塔汀、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸 (NAAGA) 和任何所述前述物质的生物活性片段。

67. 如权利要求62-66中任一项所述的方法, 其中所述眼病选自由以下组成的组: 年龄相关性黄斑变性 (AMD) (包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒 (CMV) 视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎 (前部和后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎 (RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。

68. 如权利要求67所述的方法, 其中所述眼病是AMD。

69. 一种检测个体的眼组织中补体介导的损伤的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂; 和 (b) 可检测部分, 其中所述组织处所述可检测部分的存在指示补体介导的眼组织损伤。

70. 如权利要求69所述的方法, 其中所述方法还包括检测所述可检测部分。

71. 如权利要求69或70所述的方法, 其中所述可检测部分选自由以下组成的组: 放射性

同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。

72. 如权利要求61-71中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV。

73. 如权利要求72所述的方法, 其中所述抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白IV的所述结合。

74. 如权利要求72或权利要求73所述的方法, 其中所述抗体或其片段结合与单克隆抗体B4所结合的表位相同的表位。

75. 如权利要求72-74中任一项所述的方法, 其中所述膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤和/或氧化损伤的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜上或病理结构中。

76. 如权利要求61-71中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂。

77. 如权利要求76所述的方法, 其中所述抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体C2与磷脂的所述结合。

78. 如权利要求76或77所述的方法, 其中所述抗体或其片段结合与单克隆抗体C2所结合的表位相同的表位。

79. 如权利要求76-78中任一项所述的方法, 其中所述磷脂存在于个体中的经历组织损伤和/或氧化损伤的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜上或病理结构中。

80. 如权利要求76-79中任一项所述的方法, 其中所述磷脂选自由以下组成的组: 磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。

81. 如权利要求76-79中任一项所述的方法, 其中所述磷脂是MDA。

82. 如权利要求61-81中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段是scFv。

83. 如权利要求61-81中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段是Fab、Fab' 或F(ab')₂。

84. 如权利要求64-83中任一项所述的方法, 其中所述构建体是融合蛋白。

85. 如权利要求64-83中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段和所述治疗剂或可检测部分通过接头连接。

86. 如权利要求64-83中任一项所述的方法, 其中所述抗体或其片段和所述治疗剂或可检测部分直接连接。

87. 如权利要求61-86中任一项所述的方法, 其中所述施用是通过注射至所述眼睛中来进行。

88. 如权利要求61-87中任一项所述的方法, 其中所述个体是人。

基于天然抗体的靶向构建体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2013年1月23日提交的美国临时专利申请号61/755,960、2013年1月23日提交的美国临时专利申请号61/755,968、2013年3月1日提交的美国临时专利申请号61/771,560和2013年3月1日提交的美国临时专利申请号61/771,565的优先权权益,所述专利申请各自的全部内容以引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及基于天然抗体的靶向构建体及其用途。本申请还涉及治疗眼病,具体地与氧化应激相关的眼病的组合物和方法。

[0004] 关于联邦资助的研究或研发的声明

[0005] 本发明是根据以下批准(合同)号在政府支持下进行的:美国陆军医学研究和装备司令部(U.S.Army Medical Research and Materiel Command) (MRMC) 授予W81XWH-06-1-0520和W81XWH-07-1-0286,以及美国国立卫生研究院(National Institutes of Health) R01AI31105、C06RR015455和R01EY019320,以及美国退伍军人事务部(Department of Veterans Affairs) I01 RX000444;贝克曼黄斑研究所(Beckman Institute for Macular Research)。

[0006] 背景

[0007] 天然抗体存在于具有免疫能力的个体中,并且可存在于未知已被抗体所结合的特异性抗原刺激的个体的血清或血浆中。由本发明人和同事所进行的先前研究已表明某些类型的天然抗体识别缺血组织上的表位,并且促进缺血再灌注损伤的起始和随后发展(Fleming等人,2002,J.Immunol.169:2126-2133;Rehrig等人,2001,J.Immunol.167:5921-5927)。已知缺血再灌注损伤以及低血容量性休克和随后的组织损伤是由补体和Fc受体活化以及嗜中性粒细胞和其他炎性细胞的募集和活化引起的(Rehrig等人,2001,同上)。还已表明与磷脂和其他细胞外或细胞内抗原如DNA广泛反应的单个单克隆抗体可在缺乏其他抗体的小鼠(即,B细胞缺陷型小鼠)中引起缺血再灌注损伤。

[0008] 缺血再灌注(IR)损伤是指当在一段时间缺血(血液供给限制)后血液供给返回组织时引起的对组织的损伤。来自血液的氧和营养的缺失产生这样的病状:循环的恢复导致炎症和氧化损伤而不是正常功能的恢复。缺血再灌注损伤可与创伤性损伤(包括出血性休克)以及许多其他医学病状如中风或大血管闭塞相关,并且是主要医学问题。更具体地,缺血再灌注损伤在心脏病发作、中风、血管手术后肾衰竭、移植后损伤和慢性排斥以及各种类型的创伤性损伤中是重要的,其中出血将导致器官灌注不足并且随后导致液体复苏期间的再灌注损伤。还在多种自身免疫性和炎性疾病中观察到缺血再灌注损伤或由于再灌注和缺血事件导致的损伤。独立于其他因素,缺血再灌注损伤导致死亡率增加。

[0009] 还有越来越多的证据表明再灌注损伤可见于传统上不认为是再灌注损伤相关的自身免疫性和炎性疾病中。例如,类风湿性关节炎患者中滑膜是经受恒定再灌注应力(例如,低pH、许多组织压力和不良灌注)的部位。存在于患有这种疾病的过度活动患者中的较

高量的滑液造成关节内压力增加,这然后因关节运动而加剧。这可通过缺氧/再灌注机制加重局部炎症,其进而引起由于间歇性缺血所致的氧化损伤(例如,参见Punzi等人,Rheumatology 2001;40:202-204;Pianon等人,Reumatismo 1996;48(增刊1):93;以及Jawed等人,Ann Rheum Dis 1997;56:686-9)。多种炎性和自身免疫性疾病还可与局部细胞的细胞应激反应中类似的变化相关,所述变化类似于或模仿再灌注损伤中的一些变化。

[0010] Kulik等人表明需要识别膜联蛋白IV的病原性天然抗体来发展肠缺血再灌注损伤。J.Immunol.2009;182:5363-5373。美国专利申请公布号2011/0014270公开了用于预防和/或治疗与多种疾病和病状相关的缺血再灌注损伤和再灌注损伤的脂质、膜联蛋白和脂质-膜联蛋白复合物。

[0011] 天然抗体也涉及在眼病的病理学中。年龄相关性黄斑变性(AMD)特征在于由对视网膜的中心区域中的感光细胞的损伤造成的中心视觉的逐渐丧失,黄斑是工业化国家的老年人视觉丧失的主要原因(Council,N.(1999)Vision research-a national plan:1999-2003,executive summary.(National Eye Institute,N.i.o.h.编辑,Washington,DC)。虽然AMD以两种形式,新生血管性(湿性)和萎缩性(干性)发生,但两者均与黄斑区中的视网膜色素上皮(RPE)/脉络膜界面的病理性病变相关(Nowak,J.Z.(2006)Pharmacol Rep 58,353-363)。早期AMD特征在于布鲁赫氏膜(Bruch's membrane)的增厚,其包括基底线状沉积物和玻璃疣(Hageman,G.S.,Luthert,P.J.,Victor Chong,N.H.,Johnson,L.V.,Anderson,D.H.,和Mullins,R.F.(2001)Prog Retin Eye Res 20,705-732)。另外,已报道了RPE形态、色素沉着和其作为血-视网膜屏障的功能的劣化的变化(McLeod,D.S.,Taomoto,M.,Otsuji,T.,Green,W.R.,Sunness,J.S.,和Lutty,G.A.(2002)Invest Ophthalmol Vis Sci 43,1986-1993)。晚期AMD特征在于使早期病理性损伤加剧的另外亚型特异性形态特征(Bhutto,I.和Lutty,G.(2012)Mol Aspects Med33,295-317)。干性AMD或地图状萎缩由RPE的丧失、接着光感受器的丧失引起;而湿性AMD与脉络膜新血管形成和这些新血管的渗漏相关。

[0012] AMD是具有遗传风险因素和环境风险因素两者的复杂疾病。主要环境风险因素是无论可能由吸烟、营养不足或甚至光暴露所引起的持久性氧化应激(Snodderly,D.M.(1995)Am J Clin Nutr 62,1448S-1461S)。所述疾病的主要遗传风险因素是补体蛋白的基因的多态性,所述补体蛋白包括补体因子H(CFH)、补体因子B(CFB)、补体因子2(C2)和补体因子3(C3)(综述于(Charbel Issa,P.,Chong,N.V.和Scholl,H.P.(2011)Graefes Arch Clin Exp phthalmol 249,163-174)中)。发现补体基因作为风险因素与先前临床研究一致,这证明补体系统活化产物在AMD的所有阶段局部地存在于眼睛中(Hageman,G.S.,Anderson,D.H.,Johnson,L.V.,Hancox,L.S.,Taiber,A.J.,Hardisty,L.I.,Hageman,J.L.,Stockman,H.A.,Borchardt,J.D.,Gehrs,K.M.,Smith,R.J.,Silvestri,G.,Russell,S.R.,Klaver,C.C.,Barbazetto,I.,Chang,S.,Yannuzzi,L.A.,Barile,G.R.,Merriam,J.C.,Smith,R.T.,Olsh,A.K.,Bergeron,J.,Zernant,J.,Merriam,J.E.,Gold,B.,Dean,M.和Allikmets,R.(2005)Proc Natl Acad Sci USA 102,7227-7232)。动物模型中的后续实验,尤其是湿性AMD的后续实验进一步支持以下假设:对补体-驱动炎症的控制不足可能是AMD的疾病发病机制的主要因素(例如,(Nozaki,M.,Raisler,B.J.,Sakurai,E.,Sarma,J.V.,Barnum,S.R.,Lambris,J.D.,Chen,Y.,Zhang,K.,Ambati,B.K.,Baffi,J.Z.和

Ambati, J. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2328-2333; Bora, P. S., Sohn, J. H., Cruz, J. M., Jha, P., Nishihori, H., Wang, Y., Kaliappan, S., Kaplan, H. J. 和 Bora, N. S. (2005) *J Immunol* 174, 491-497; Rohrer, B., Coughlin, B., Kunchithapautham, K., Long, Q., Tomlinson, S., Takahashi, K. 和 Holers, V. M. (2011) *Mol Immunol* 48, e1-8)。虽然对 AMD 的当前了解是随时间推移慢性氧化损伤导致光感受器、RPE/布鲁赫氏膜和脉络膜血管层复合物(尤其是黄斑)的改变,从而导致慢性炎症和补体活化(Zarbin, M. A. 和 Rosenfeld, P. J. (2010) *Retina* 30, 1350-1367), 但尚不清楚补体级联中哪些组分参与引起损伤, 和这些组织中哪些配体或年龄相关性变化实现补体活化。补体级联(进化上古老且高度保守的系统)是先天性和适应性免疫系统的一部分, 由 >40 种可溶性且膜结合的组分组成(Muller-Eberhard, H. J. (1988) *Annu Rev Biochem* 57, 321-347)。补体级联的通常作用是补充抗体和吞噬细胞消除病原体的能力。为了找出这些微生物, 与无活性血清蛋白酶复合的模式识别分子在血液中循环。在配体相互作用之后, 蛋白酶变得活化以起始补体级联。这导致将吞噬细胞、调理素募集至标记材料以用于去除的过敏毒素的产生和使细胞膜破裂并且导致靶细胞中的促炎性信号传导的膜攻击复合物(MAC)的产生。自体细胞通过膜结合或可溶性补体抑制剂保护。然而, 在病理条件下, 补体抑制可能受损, 从而导致自体表面上的补体活化。

[0013] 补体系统可通过三种途径(经典途径、凝集素途径和旁路途径)中的一种活化, 每种途径具有其独特的模式识别分子。当 C1q 结合其配体(包括 C-反应性蛋白(CRP))时, 经典途径(CP)被活化; 血清淀粉样蛋白或 IgG 和 IgM 分子作为免疫复合物存在; 当甘露聚糖结合凝集素(MBL)或纤维胶凝蛋白(H-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白或 M-纤维胶凝蛋白)结合特定碳水化合物或外来细胞上的乙酰化分子或结合至抗原的 IgM 分子, 凝集素途径(LP)被活化; 并且最终旁路途径(AP)在被称为空转(tickover)的过程以及当 C3b 通过 CP 或 LP 在细胞表面上产生并且成为 AP 的底物时以低水平自发地且连续地活化。全部三种途径导致途径特异性 C3 转化酶的产生, 所述 C3 转化酶然后以其上述生物作用触发共同末端途径。

[0014] 本文所提及的所有公布、专利、专利申请和公布的专利申请的公开内容特此以引用的方式整体并入本文。

[0015] 发明概述

[0016] 一方面, 本公开提供一种抑制个体中具有非缺血性损伤的组织中补体介导的炎症的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合膜联蛋白 IV 或磷脂; 和 (b) 补体抑制剂。

[0017] 另一方面, 本公开提供一种治疗个体中的炎性疾病的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合膜联蛋白 IV 或磷脂; 和 (b) 补体抑制剂。

[0018] 在以上方法的一些实施方案中, 补体抑制剂选自以下组成的组: 抗 C5 抗体、抗 MASP 抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗 C3b 抗体、抗 C6 抗体、抗 C7 抗体、抗 B 因子抗体、抗 D 因子抗体和抗备解素抗体、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CD59、Crry、CR1、H 因子、I 因子、线性肽、环状肽、康普塔汀(compstatin)、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸(NAAGA) 和任何前述物质的生物活性片段。在一些实施方案中, 补体抑制剂是旁路途径的特异性抑制剂。在一些实施方案中, 补体抑制剂是凝集素途径的特异性抑制剂。

[0019] 另一方面,本公开提供一种检测个体的组织中补体介导的损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示补体介导的组织损伤。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分选自由以下组成的组:放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。

[0020] 在以上方法的一些实施方案中,组织损伤由炎症病症、移植排斥、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性疾病中的任一种引起。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节、肾、脑、心脏、脊髓和肝中的任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,疾病是眼病、关节炎或肾损伤中的任一者。

[0021] 在以上方法的一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与单克隆抗体B4(如B4/14/12,ATCC保藏号PTA-13522)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历非缺血性损伤的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

[0022] 在所述方法的一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体C2与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与单克隆抗体C2(如C2/19/8,ATCC保藏号PTA-13523)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤和/或氧化损伤的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是MDA。

[0023] 在以上方法的一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,抗体或其片段和补体抑制剂或可检测部分通过肽接头连接。在一些实施方案中,抗体或其片段是scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段是Fab、Fab'或F(ab')₂。

[0024] 另一方面,本公开提供一种包含以下的构建体:(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1或7的序列、SEQ ID NO:2或8的序列或SEQ ID NO:3或9的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:4或10的序列、SEQ ID NO:5或11的序列或SEQ ID NO:6或12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1或7的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:2或8的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:3或9的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:4或10的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:5或11的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:6或12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:13或14的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:15或16的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段是具有SEQ ID NO:17或18的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与单克隆抗体B4结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤或处于经历组织损伤的风险的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

[0025] 另一方面,本公开提供一种包含以下的构建体:(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:25或31的序列、SEQ ID NO:26或32的序列或SEQ ID NO:27或33的序列的轻链可变结构域;和/或(ii) 包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:25或31的序列的轻链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:26或32的序列的轻链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:27或33的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) 包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:34或35的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或片段是具有SEQ ID NO:37或38的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体C2与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与单克隆抗体C2结合相同的表位。

[0026] 在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤或处于经历组织损伤的风险的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是MDA。

[0027] 在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂。在一些实施方案中,补体调节剂是补体抑制剂。在一些实施方案中,补体抑制剂选自由以下组成的组:抗C5抗体、抗MASP抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗C3b抗体、抗C6抗体、抗C7抗体、抗B因子抗体、抗D因子抗体和抗备解素抗体、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CD59、Crry、CR1、H因子、I因子、线性肽、环状肽、康普塔汀、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸(NAAGA)和任何前述物质的生物活性片段。在一些实施方案中,补体抑制剂是旁路途径的特异性抑制剂。在一些实施方案中,补体抑制剂是凝集素途径的特异性抑制剂。

[0028] 在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分选自由以下组成的组:放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。

[0029] 在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,抗体或其片段和补体调节剂或可检测部分通过肽接头连接。

[0030] 另一方面,本公开提供一种包含上述构建体的药物组合物。还提供一种抑制个体中补体介导的炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本文所述的药物组合物。另外,本公开提供了一种治疗个体中的炎性疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本文的药物组合物。本文还提供了一种包含构建体的组合物,所述构建体包含可检测部分,例如放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。还提供一种检测个体组织中补体介导的损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含可检测部分的构建体的组合物。

[0031] 一方面,本公开提供一种抑制个体眼睛中补体驱动的炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;或(b) 包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(i) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或

磷脂,和(ii)治疗剂。

[0032] 另一方面,本公开提供一种治疗补体相关眼病或涉及氧化损伤的眼病的方法,所述方法包括向个体施用有效量的(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;或(b)包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(i)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂,和(ii)治疗剂。

[0033] 在一些实施方案中,所述方法包括施用抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂。

[0034] 在一些实施方案中,所述方法包括施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(i)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂和(ii)治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是补体抑制剂。在一些实施方案中,补体抑制剂选自但不限于由以下组成的组:抗C5抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗C3b抗体、抗C6抗体、抗C7抗体、抗B因子抗体、抗MASP抗体、抗D因子抗体和抗备解素抗体、抗MBL抗体、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CD59、Crry、CR1、H因子、I因子、线性肽、环肽、康普塔汀、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸(NAAGA)和任何前述物质的生物活性片段。在一些实施方案中,补体抑制剂是人补体抑制剂(例如,人MCP、人DAF、人CD59、人CR1、人H因子或源自人的另一种补体抑制剂)。在一些实施方案中,补体抑制剂是人补体抑制剂(例如,小鼠DAF、小鼠CD59(也被称为同种型A)、小鼠CD59同种型B、小鼠Crry、小鼠H因子、或源自小鼠的另一种补体抑制剂)。还考虑来自其他物种的补体抑制剂和变体补体抑制剂。

[0035] 在所述方法的一些实施方案中,眼病选自但不限于由以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0036] 另一方面,本公开提供一种检测个体的眼组织中补体介导的损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示补体介导的眼组织损伤。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,可检测部分选自但不限于由以下组成的组:放射性同位素、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、顺磁性剂、磁性剂和纳米颗粒。

[0037] 在以上方法的一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与单克隆抗体B4(如B4/14/12,ATCC保藏号PAT-13522)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤和/或氧化损伤的组织中或邻接所述组织的细胞的表面、基底膜上或病理结构中。

[0038] 在以上方法的一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制单克隆抗体C2与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与单克隆抗体C2(如C2/19/8,ATCC保藏号PAT-13523)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤和/或氧化损伤的组织中或邻接所述组织的细

胞的表面、基底膜上或病理结构中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是MDA。

[0039] 在以上方法中任一者的一些实施方案中,抗体或其片段是scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段是Fab、Fab' 或F(ab')₂。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,抗体或其片段和治疗剂或可检测部分通过接头连接。在一些实施方案中,抗体或其片段和治疗剂或可检测部分直接连接。

[0040] 在以上方法中任一者的一些实施方案中,通过注射至眼睛中来施用。在一些实施方案中,个体是人。

[0041] 还提供适用于本文所述的方法的单位剂型、试剂盒和制品。

[0042] 应了解,本文所述的各个实施方案的一种、一些或所有特性可组合以形成本发明的其他实施方案。

[0043] 附图简述

[0044] 图1是示出B4scFv和B4scFv-Crry蛋白的表征的一系列图。A) B4scFv,而不是对照C2scFv,直接体外结合重组膜联蛋白IV。B) B4scFv竞争性地抑制B4mAb与膜联蛋白IV的结合。C) 类似于阳性对照CR2-Crry, B4scFv-Crry体外抑制补体活化。

[0045] 图2是示出施用B4mAb和C2mAb克服保护免受Rag1^{-/-}小鼠中由于缺血性损伤所致的脊髓损伤(SCI)和脑缺血再灌注损伤的一系列图。A) 施用不同mAb的Rag1^{-/-}小鼠中实验性诱导SCI之后的运动活性。Rag1^{-/-}小鼠(实心方块)在损伤后21天被保护免受SCI,而野生型小鼠(实心圆圈)在损伤后21天显示运动活性的降低。当施用B4mAb(空心圆圈或C2mAb(实心三角形)时,Rag1^{-/-}小鼠中的损伤被重建至可比得上野生型小鼠的水平。相比之下,施用对照F632mAb(空心菱形)的Rag1^{-/-}小鼠在损伤后21天保持保护免受SCI。 $P<0.05$, $n=6-9$ 。B) 在施用靶向构建体之后,缺血性中风(脑缺血再灌注损伤)的小鼠模型中的缺血后梗塞体积(TTC染色)。相较于C57Bl/6野生型小鼠对照,Rag1^{-/-}小鼠被保护免受脑梗塞($\#p<0.001$)。使用增加量的C2或B4mAb重建恢复对Rag1^{-/-}小鼠的损伤($@p=0.01$)。使用100 μ g对照抗体重建未恢复Rag1^{-/-}小鼠中的损伤。 $n=8-12$ 。

[0046] 图3是示出B4scFv-Crry靶向构建体保护小鼠免受SCI的一系列图。A) 施用靶向构建体的野生型小鼠中实验性诱导SCI之后的运动活性。相较于施用PBS的野生型小鼠,示出为B4-Crry的靶向补体抑制剂B4scFv-Crry(0.2mg)保护野生型小鼠免受SCI。紧随冲击,所有小鼠的得分为0。从第3天, $p<0.05$, $n=6$ 。B) 创伤性损伤后3天,组织防护的形态测定分析。120 μ m增量的横截面积(H&E)。B4-Crry指示野生型处理的小鼠,WT指示用PBS处理的野生型小鼠,所有其他为用所指示的IgM mAb、C2mAb、B4mAb和F632mAb重建或施用PBS的Rag1^{-/-}小鼠(示出为Rag1^{-/-})。 $p<0.01$, 损伤部位的每侧达1.2mm。平均值 $\pm$ SD, $n=6$ /组。

[0047] 图4是IgM和C3沉积的免疫荧光共焦分析。A-C) 在损伤后24小时,来自针对A) IgM或B) C3染色的未处理的野生型小鼠的脊髓切片。C) IgM和C3染色的合并图像。D和E) 在损伤后24小时,来自用B4scFv-Crry处理且针对D) IgM或E) C3染色的野生型小鼠的切片。

[0048] 图5是示出在施用B4scFv-Crry之后,急性脓毒性腹膜炎的盲肠结扎和穿孔模型中动物存活率的图。C3缺陷型小鼠(C3^{-/-})中C3的不存在导致在48小时内死亡。在B4scFv-Crry(在工序后立即用0.2mg剂量处理)与野生型未处理的对照之间所观察到的存活率无显著差异。 $n=5-6$ 。

[0049] 图6示出在将B4mAb施用至Rag1^{-/-}受体之后,移植心脏中B4mAb的定位。A) B4mAb结合至移植心脏而非天然心脏的内皮细胞。B) 野生型小鼠的移植物中C3d(左图)和内源性IgM(中间图)的共定位。叠加图像(右图)示出C3d和内源性IgM的共定位。

[0050] 图7示出A-D) 针对移植心脏中的心肌缺血再灌注损伤,B4scFv和B4scFv-Crry的保护作用。A) 图示出在移植后,在将单剂量的B4scFv或B4scFv-Crry施用至受体的情况下,心肌肌钙蛋白I的血清水平降低。ns=不显著。B) 总结心脏损伤的组织学评分的图示出使用单剂量的B4scFv或B4scFv-Crry,损伤组织学得分的显著降低。ns=不显著。C) 示出结合至内皮细胞的体内B4scFv-HisTag的免疫荧光成像。D) 在用0.2mg B4scFv-Crry(下图)或PBS对照(上图)处理受体之后,同种异体移植物心脏移植中针对C3d的免疫荧光染色。在处理48小时后,仅在B4scFv-Crry处理的动物中观察到微弱C3d血管染色。表示n=3的图像。E和F) 示出B4scFv和B4scFv-Crry处理对移植的同种异体移植物中的IgM和C3d沉积的作用。用PBS、B4scFv或B4scFv-Crry处理受体小鼠,并且在移植后6小时或48小时分离同种异体移植物以用于分析。示出移植物中IgM和C3d沉积的代表性图像。在移植后6和48小时,E) IgM和F) C3d沉积的半定量组织学评分。*P<0.01,**P<0.001,平均值±SEM,n=6-8。

[0051] 图8是示出在用B4scFv或B4scFv-Crry处理后,同种异体移植物受体中特异性细胞因子的减少的一系列图。A) MCP-1、B) IL-6、C) KC、D) CXCL9和E) IFN-γ的细胞因子水平。n=4-10,#p<0.01。

[0052] 图9是示出在心脏移植之后立即施用且6小时后分析的受体小鼠中¹²⁵I标记的B4scFv-Crry的生物分布的图。

[0053] 图10示出结合至A-B) 小鼠脑内皮细胞系(bEnd.3)和C-D) 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的B4mAb的抗IgM免疫荧光图像,两者均经受3小时缺氧(左图)和1小时再氧合(右图)。B4mAb不结合至未暴露于缺氧条件的任一细胞类型。

[0054] 图11是示出施用B4mAb和C2mAb克服Rag1^{-/-}小鼠中保护免受肝缺血再灌注损伤的一系列图。A) I/R后6小时,假手术(Rag1^{-/-})、野生型、Rag1^{-/-}小鼠和注射25μg C2mAb或B4mAb的Rag1^{-/-}小鼠中的血清ALT水平。平均值±SD,n=4-9。B) IR后6小时,假手术(Rag1^{-/-})、野生型、Rag1^{-/-}小鼠和注射25μg C2mAb或B4mAb的Rag1^{-/-}小鼠中的坏死指数。平均值±SD,n=7。##,P<0.001对野生型;**,P<0.001对Rag1^{-/-};@,P<0.01对Rag1^{-/-};*,P<0.05对Rag1^{-/-}。

[0055] 图12是示出在Rag1^{-/-}小鼠中进行70%部分肝切除术后,施用B4mAb和C2mAb刺激肝再生的一系列图。A) Rag1^{-/-}小鼠和用10μg C2mAb或B4mAb处理的Rag1^{-/-}小鼠中PHx后48小时的血清ALT水平。**,@@P<0.01对rag IR损伤。平均值±SD,n=6。B) Rag1^{-/-}小鼠和用10μg C2mAb或B4mAb处理的Rag1^{-/-}小鼠中PHx后48小时的坏死指数得分(H&E染色)。##,P<0.01对野生型;*和@,P<0.05对Rag1^{-/-}。平均值±SD,n=4。C) Rag1^{-/-}小鼠和用10μg C2mAb或B4mAb处理的Rag1^{-/-}小鼠中PHx后48小时的有丝分裂指数。##,P<0.01对野生型;**,P<0.01对Rag1^{-/-};@@,P<0.01对Rag1^{-/-}。平均值±SD,n=4。

[0056] 图13是示出在Rag1^{-/-}小鼠中进行70%部分肝切除术后,施用B4mAb和C2mAb刺激肝再生的一系列图。A) Rag1^{-/-}小鼠和用10μg C2mAb或B4mAb处理的Rag1^{-/-}小鼠中PHx后48小时的肝重量恢复。B) Rag1^{-/-}小鼠和用10μg C2mAb或B4mAb处理的Rag1^{-/-}小鼠中PHx后48小时的Brdu阳性细胞。***,P<0.001;**,P<0.01;*,P<0.05。

[0057] 图14是A) IR后6小时,野生型小鼠(wt)、Rag1^{-/-}小鼠和用C2mAb或B4mAb处理的

Rag1^{-/-}小鼠的肝切片中IgM染色的一系列免疫组织化学图片;B) 示出在肝IR后,用B4mAb重建的Rag1^{-/-}小鼠中内源性IgM(左图)和C3d(中间图)的定位的一系列免疫荧光图像。叠加图像(右图)示出C3d和内源性IgM的共定位。C) IgM和C3d的免疫组织化学染色显示在70%PHx后48小时,WT和用B4mAb或C2mAb重建的Rag1^{-/-}小鼠中呈正弦波图案的IgM和C3d染色。在用PBS处理的Rag1^{-/-}中未观察到染色。来自每组3个动物的代表性图像,放大率x400;和D) 示出在70%PHx后用B4mAb重建的Rag1^{-/-}小鼠中IgM(左图)和C3d(中间图)的定位的免疫荧光图像。叠加图像(右图)示出C3d和内源性IgM的共定位。来自3个动物的代表性图像,放大率x520。

[0058] 图15是示出B4scFv-Crry的体内动力学、在IR或70%Phx后Rag1^{-/-}小鼠中IgM抗体的生物分布以及B4scFv构建体的体内结合的一系列图。A) B4scFc-Crry具有从循环27分钟半衰期($t_{1/2}$)的初始快速消除期;B) 6.5小时半衰期的第二延长期;C和D) 在IR、PHx或假手术后,用I¹²⁵放射性标记的B4、C2或同种型对照(F632) IgM重建Rag1^{-/-}动物。在手术后6小时收获组织并测量放射性。C) 相较于假手术对照,在肝IR后IgM的生物分布显示肝中B4和C2的水平增加。同种型对照抗体F632不在任何组织中积聚。D) 70%PHx后,Rag1^{-/-}中的IgM的生物分布。B4和C2放射性标记的mAb在肝中特异性地积聚。在假手术动物或70%PHx后F632同种型对照处理的动物中无抗体的组织积聚。数据代表2个独立实验,对于每一组n=2;以及E和F) 在IR、PHx或假手术后,Rag1^{-/-}中I¹²⁵放射性标记的B4scFv的生物分布。在手术之后立即向Rag1^{-/-}小鼠腹膜内给予放射性标记的B4scFv,在手术后6小时收获组织并测量放射性。E) IR或假手术后Rag1^{-/-}小鼠中B4scFv的生物分布显示B4scFv的积聚主要在IR的小鼠的肝中,而在假手术动物中无可感知的B4scFv的积聚。对于每组n=3,平均值±SD。F) 70%PHx或假手术后,Rag1^{-/-}中放射性标记的B4scFv的生物分布显示给予70%PHx的小鼠的肝中B4scFv的积聚,而假手术小鼠中无积聚,对于每组n=2。生物分布研究代表2个独立的实验。

[0059] 图16示出针对肝缺血再灌注损伤B4scFv和B4scFv-Crry的保护作用。A) IR后24小时假手术、野生型和注射25μg B4scFv或B4scFv-Crry的野生型小鼠中的血清ALT水平。n=3。B-E) 再灌注后24小时,B) 假手术、C) 野生型小鼠、D) B4scFv处理的小鼠和E) B4scFv-Crry处理的小鼠肝脏中的H&E染色。在40倍变焦下取得的图像。

[0060] 图17是人肝脏中B4IgM沉积的成像分析。A) 移植肝脏的再灌注后针对IgM染色的人肝脏切片。B) CD31(内皮标志物,左图)或B4IgM(中间图)染色的缺血性非灌注人肝脏切片的免疫荧光共焦图像。右图示出CD31和B4IgM染色的合并图像。

[0061] 图18是示出肝移植后人血清抗体水平的一系列图。A) 总IgM抗体、B) 抗-白蛋白2抗体和C) 总IgG抗体。

[0062] 图19是示出肝移植后人血清抗体水平的一系列图。A) 抗-PE抗体、B) 抗-膜联蛋白IV抗体、C) 抗-PC-BSA抗体和D) 抗-心磷脂抗体。

[0063] 图20示出用抗-CD20抗体消减B细胞减少患有阿霉素肾病的小鼠中的肾小球IgM沉积。在诱导阿霉素肾病前将小鼠注射抗-CD20单克隆抗体以消减它们的B细胞。A) 在诱导阿霉素肾病之后四周,对肾进行免疫荧光显微术以评定肾小球IgM的丰度。检查了来自三至五只小鼠/组的肾。将三十个肾小球/切片可视化,并且测定每只小鼠的平均值。与对照动物相比,注射阿霉素的小鼠展示肾小球IgM沉积的显著增加。用抗-CD20处理的小鼠展示更少的

肾小球IgM。将已经注射抗-CD20、而且还用从患有阿霉素肾病的小鼠的肾中洗脱的纯化IgM (Adria/抗-CD20/IgM) 重建的患有阿霉素肾病的小鼠展示肾小球IgM的明显增加。肾小球以箭头指示。原始放大X200。比例尺=100μM。在将图像转换为灰度级后,调整所示图像的亮度和对比度。相等地调整所有图像。B) 不同处理组中肾小球IgM的定量分析确认在注射阿霉素后,肾小球IgM沉积增加,但是这种增加在注射抗-CD20疗法的小鼠中衰减。

[0064] 图21示出用抗-CD20处理减少患有阿霉素肾病的小鼠中的肾小球补体活化。在诱导阿霉素肾病前将小鼠注射抗-CD20单克隆抗体以消灭B细胞。在注射阿霉素之后四周,通过免疫荧光显微术检查肾小球中的补体活化。A) 针对C4的染色展示在注射阿霉素后,肾小球C4沉积增加,但是用抗-CD20处理小鼠防止这种增加。B) 针对C3染色展示在注射阿霉素后,肾小球C3沉积增加。用抗-CD20处理小鼠防止C3沉积的这种增加。肾小球以箭头指示。检查了来自三至五只小鼠/组的肾。将三十个肾小球/切片可视化,并且测定每只小鼠的平均值。原始放大X200。比例尺=100μM。在将图像转换为灰度级后,调整所示图像的亮度和对比度。相等地调整所有图像。

[0065] 图22示出用抗-CD20处理减少患有阿霉素肾病的小鼠中的蛋白尿。在诱导阿霉素肾病前将小鼠注射抗-CD20mAb以消灭B细胞。A) 测量尿白蛋白/肌酸酐水平。用阿霉素处理小鼠导致高水平蛋白尿,但这通过用抗-CD20处理显著衰减。再次注射从患病的肾中纯化的IgM的用抗-CD20处理的小鼠具有与在阿霉素处理的小鼠中所观察到的蛋白尿水平类似的蛋白尿水平。B) 评定不同处理组中的肾小球硬化症。检查了来自三至五只小鼠/组的肾。使四十个肾小球/切片可视化。肾小球以箭头指示。C) 相较于阿霉素处理的小鼠,用阿霉素和抗-CD20处理的小鼠中肾小球硬化症更少,但是这种减少不具有统计显著性。D) 针对胶原IV染色肾展示将小鼠注射阿霉素引起肾小球胶原IV沉积增加,并且这不受用抗-CD20处理显著影响。检查了来自三只小鼠/组的肾。将三十个肾小球/切片可视化,并且测定每只小鼠的平均值。示出来自每个组的小鼠的代表性肾小球。原始放大X400。比例尺=100μM。

[0066] 图23示出腹膜B细胞消灭减少患有阿霉素肾病的小鼠中IgM、C3和C4的肾小球沉积。在诱导阿霉素肾病之前两周开始,用低渗休克消灭腹膜细胞。A) 免疫荧光显微术展示消灭腹膜细胞衰减IgM的肾小球沉积。B) 针对C4的免疫荧光显微术展示消灭腹膜细胞还减少肾小球内的C4沉积,但是这未达到统计显著性。C) 针对C3的免疫荧光显微术展示消灭腹膜细胞防止肾小球内的补体C3活化。检查了来自三至四只小鼠/组的肾。将三十个肾小球/切片可视化,并且测定每只小鼠的平均值。肾小球以箭头指示。原始放大X200。比例尺=100μM。

[0067] 图24示出消灭腹膜B细胞减少患有阿霉素肾病的小鼠中的蛋白尿。在诱导阿霉素肾病之前两周开始,用低渗休克消灭腹膜细胞。测量尿白蛋白/肌酸酐水平。在注射阿霉素后一周(A)和四周(B),B细胞的腹膜消灭显著衰减蛋白尿的水平。C) 相较于也患有阿霉素肾病的对照小鼠,腹膜细胞消灭显著降低肾小球硬化症的程度。检查了来自三至七只小鼠/组的肾。将四十个肾小球/切片可视化,并且测定每只小鼠的平均值。示出来自每个组的小鼠的代表性肾小球。肾小球以箭头指示。原始放大x400。比例尺=100μM。D) 针对胶原IV染色肾展示将小鼠注射阿霉素引起肾小球胶原IV沉积增加,并且这不受腹膜B细胞消灭显著影响。检查了来自四只小鼠/组的肾。将三十个肾小球/切片可视化,并且测定每只小鼠的平均值。示出来自每个组的小鼠的代表性肾小球。原始放大x400。

[0068] 图25示出在患有FSGS患者的肾小球中共定位的IgM和C3d。A) 将来自患有FSGS的19名患者的可用组织针对IgM和C3d进行双重染色。在含有IgM和C3d两者的活组织切片中,两种免疫因子在肾小球内共定位。B) 将来自患有FSGS的19名患者的组织针对IgM和C4进行双重染色。在含有IgM和C4两者的活组织切片中,两种免疫因子似乎在肾小球内共定位。原始放大X400。比例尺=100 μ M。调整所示图像的亮度和对比度以改进所述因子在叠加中的定位。

[0069] 图26示出在肾缺血/再灌注(I/R)后,沉积在小鼠肾小球中的IgM。免疫荧光显微术揭示在假手术处理(A、C)或肾IR(B、D)后24小时,IgM存在于小鼠的肾小球系膜中。E) 定量分析确认在缺血后,肾小球系膜IgM沉积增加。F) 在由经受假手术处理或IR的肾制成的溶解物的还原条件下的蛋白印迹分析也展示在缺血后的IgM增加。箭头指示肾小球。A和B,原始放大3400;C和D,原始放大3100。

[0070] 图27示出在肾IR损伤小鼠模型中定位至肾小球的A) B4mAb和B) C2mAb的抗-IgM免疫荧光图像。

[0071] 图28示出A) 野生型(wt)小鼠和B) 因子H缺陷型(fH^{-/-})小鼠的肾小球中C3沉积的免疫荧光图像。

[0072] 图29示出A) 3月龄(左图)、6月龄(中间图)和9月龄(右图)的野生型(wt)小鼠;和B) 3月龄(左图)、6月龄(中间图)和9月龄(右图)的因子H缺陷型(fH^{-/-})小鼠的肾小球中IgM沉积的免疫荧光图像。

[0073] 图30示出A) 3月龄和B) 9月龄的因子H缺陷型(fH^{-/-})小鼠的肾小球中C3和IgM沉积的免疫荧光图像。C) 示出9月龄的因子H缺陷型(fH^{-/-} μ MT)小鼠的肾小球中C3和IgM沉积的免疫荧光图像。

[0074] 图31示出A) 因子H缺陷型(fH^{-/-})小鼠的肾小球中IgM沉积和与突触足蛋白的共定位的免疫荧光图像和B) 因子H缺陷型(fH^{-/-})小鼠的肾小球中IgM沉积和与BM标志物的共定位的免疫荧光图像。

[0075] 图32示出A) 3月龄和B) 9月龄的因子H缺陷型(fH^{-/-})小鼠的肾小球中C3和C4沉积的免疫荧光图像。

[0076] 图33是示出9月龄的野生型小鼠、fH^{-/-}小鼠和fH/ μ MT小鼠中A) 血清尿素氮(SUN)水平和B) 尿白蛋白与肌酐(Cr)比的一系列图。

[0077] 图34示出A-D) 使用肾小球系膜细胞的体外IgM和补体蛋白结合实验的一系列流式细胞术直方图。A) IgM结合至肾小球系膜细胞,B) IgG未结合至肾小球系膜细胞,C) C3结合至肾小球系膜细胞和D) C4结合至肾小球系膜细胞。E-J) 单克隆IgM克隆展示体内和体外与肾小球细胞的选择性结合。向B细胞缺陷型小鼠给予静脉内注射单克隆IgM。通过免疫荧光针对IgM的存在评定肾切片。G) IgM沉积在将单克隆IgM克隆C2注射至B细胞缺陷型小鼠后发生。示出代表性肾小球且用箭头标记。H) 对应苏木精染色的切片以箭头突出肾小球的位置。I) 注射单克隆IgM克隆D5的小鼠未展示IgM沉积的证据。J) 对应苏木精染色的切片。原始放大x200。将培养的鼠肾小球系膜细胞与多克隆IgM或七种不同的单克隆IgM克隆一起孵育。在孵育后,通过流式细胞术对细胞进行分析以测定IgM结合的程度。E) 示出表现出与肾小球系膜细胞的阳性结合的IgM抗体。F) 示出剩余的五种单克隆IgM克隆,所述克隆都未展示与肾小球系膜细胞的结合。同种型对照由阴影直方图表示。

[0078] 图35是示出施用B4mAb使类风湿性关节炎模型中的关节炎症状显著恶化的图。

[0079] 图36提供氧化应激的ARPE-19细胞单层中的补体途径分析。A) 通过用500 μ M H₂O₂处理细胞来诱导氧化应激,这使得当用10%正常人血清(NHS)处理细胞时,单层对补体攻击敏感(Thurman, J.M., Renner, B., Kunchithapautham, K., Ferreira, V.P., Pangburn, M.K., Ablonczy, Z., Tomlinson, S., Holers, V.M. 和 Rohrer, B. (2009) *J Biol Chem* 284, 16939-16947)。使用消减特异性补体组分的血清进行途径分析。所示的结果是在因子B-、C1q-、MBL-和C1q/MBL-消减的血清的存在下起始值的百分比,从而揭示H₂O₂-处理的细胞上的补体活化由凝集素触发并且通过旁路途径扩增。B) 在不存在补体因子C2或C4时探测凝集素途径活化以检查这些组分的潜在旁路。从NHS消除C2或C4消除H₂O₂+血清对TER的作用,从而指示两种组分均支持活性。通过分别用纯化的C2和C4蛋白质重建来确认消减的血清的特异性。

[0080] 图37提供对参与凝集素途径活化的模式识别受体的分析。A) 针对凝集素途径的组分对通过甘露聚糖柱的血清进行分析。蛋白质印迹分析显示两种样品(泳道2和3)中MBL、MASP-2以及M-、L-和H-纤维胶凝蛋白的消减,而C3水平未受影响。正常人血清(泳道1)用作对照。B) 使用NHS作为来源在氧化应激细胞中检查结合ARPE单层的纤维胶凝蛋白,之后进行特异性抗体结合。可记录M-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白的特异性饱和结合,而未观察到L-纤维胶凝蛋白中的饱和结合。基于人血清中的已知浓度计算纤维胶凝蛋白的浓度。C) 使用TER作为读出,进行重建测定以检查触发补体活化的ARPE-19细胞上的配体是由纤维胶凝蛋白还是MBL识别。TER被H₂O₂+血清减少,但是当血清通过甘露聚糖结合柱(MBL dep1)时TER被消除。通过添加MASP-2连同模式识别受体之一来重建TER的减少;未发现添加全部三种是加成性的。

[0081] 图38示出为了测定天然抗体是否活化凝集素途径而进行的实验的结果。A) 使用血清进行TER测量,使用来自所述血清的所有抗体(消减所有Ig的NHS)或IgM和IgD(来自rag1-/-小鼠的血清),从而指示在此测定中抗体是补体活化所需的。B) 使用血清作为IgM的来源,在于96孔板中作为单层培养的ARPE-19细胞上检查IgM与ARPE单层的结合,之后比色检测与抗-IgM抗体结合的IgM,。当比较对照和氧化应激的细胞时,不能检测到IgM与ARPE-19细胞的总体结合的差异。C) 当使用对氧化应激表位具有特异性的IgM抗体(IgM-C2)时,观察到与细胞的特异性结合,所述结合在氧化应激反应存在下增强。D) 进行重建测定以确定已知识别由氧化应激产生的新表位的IgM抗体是否能够活化Ig消减的血清中的补体级联。在Ig消减的血清中除去TER的减少。发现在IgM天然抗体C2存在下使用的Ig消减的人血清在此测定中活化补体级联,而对照抗体F1102是无效的。

[0082] 图39提供IgM-C2天然抗体的表位分析。A) 进行ELISA分析,用偶联至磷脂酰胆碱(PC)的BSA涂覆板。如先前所报道,可观察到IgM-C2与此配体的特异性结合(Elvington, A., Atkinson, C., Kulik, L., Zhu, H., Yu, J., Kindy, M.S., Holers, V.M. 和 Tomlinson, S. (2012) *J Immunol* 188, 1460-1468),而对膜联蛋白IV具有特异性的对照IgM(IgM-B4)未显示结合。B) 由于丙二醛(MDA)通过氧化应激在脂质上产生,因此检查是否可记录IgM-C2与MDA-BSA的特异性结合。ELISA测定揭示当与PC-BSA比较时,IgM-C2与MDA-BSA的结合(虽然可能是以较低的明显亲和力),或者MDA-BSA孔可能具有更低容量。对于对照IgM(IgMB4),没有结合可被记录。C和D) 为了测试使用IgM-C2抗体重建Ig消减的血清是由MDA-结合C)还是未修饰的脂质结合D)介导,使用BSA-MDA或PC-BSA预先吸收IgM-C2。将BSA-MDA或PC-BSA添加至Ig消减的

血清作为对照。可通过IgM-C2抗体与两种脂质配体中的任一者的结合介导TER的减少。

[0083] 图40示出为了测定丙二醛(MDA)新表位是否存在于氧化应激的ARPE-19细胞上而进行的实验的结果。A)在存在和不存在H₂O₂的情况下,使用 α -MDA进行ARPE细胞的免疫荧光染色。当与对照细胞相比时,在氧化应激的细胞中揭示特异性染色。进行无第一抗体的孵育作为阴性对照。B)抗-MDA(红色; α -MDA)和IgM-C2抗体(绿色; α -C2)两者均识别以点状形式存在于ARPE细胞上的表位。

[0084] 图41示出为了测定MDA-新表位是否存在于氧化应激的原代人胚胎细胞上而进行的实验的结果。原代人胚胎RPE细胞以单层生长,并且响应于500 μ M H₂O₂和10%正常人血清(NHS)评定TER。A)消除免疫球蛋白(Ig-消减的血清)显著减少TER的下降。Ig消减的血清可使用IgM-C2和IgM-B4抗体重建,而不可用对照(IgM-F1102)抗体重建。B)使用IgM-C2抗体重建Ig消减的血清部分地由MDA-结合介导,因为用BSA-MDA预先吸收消除所述作用。对于RPE细胞,氧化应激反应介导的磷脂新表位的产生是更普遍的现象。

[0085] 图42示出为了测定由氧化应激产生的新表位是否充当氧化应激的ARPE-19细胞上的补体因子H(CFH)的配体而进行的实验的结果。已假定丙二醛(MDA)充当细胞表面上的配体以募集CFH并且防止补体介导的损伤(Weismann,D.,Hartvigsen,K.,Lauer,N.,Bennett,K.L.,Scholl,H.P.,Charbel Issa,P.,Cano,M.,Brandstatter,H.,Tsimikas,S.,Skerka,C.,Superti-Furga,G.,Handa,J.T.,Zipfel,P.F.,Witztum,J.L.和Binder,C.J.(2011) Nature 478,76-81)。在添加500 μ M H₂O₂+25%正常人血清(NHS);H₂O₂+补充有375 μ g纯化CFH的25%NHS;用H₂O₂处理的细胞,其在添加HNH+外源性CFH之前除去;或H₂O₂+补充有50 μ g的CR2-FH(使CFH的抑制性结构域靶向C3d沉积位点的旁路途径的靶向抑制性蛋白)的25%NHS之后进行跨上皮电阻(TER)测量。仅CR2-FH能够阻断由H₂O₂+NHS诱导的TER降低,从而表明由氧化应激产生的新表位不将CFH募集至细胞表面以用于保护。

[0086] 图43示出为了测定C2-IgM新表位是否在脉络膜新生血管形成(CNV)病变中产生并且这样是否用于增强用C2-IgM重建的抗体-缺陷型小鼠中的CNV生长而进行的实验的结果。A)使用IgM-C2抗体进行的CNV病变的免疫荧光染色。当与其中省略第一抗体的对照相比时,揭示特异性染色。B)在CNV发展过程中,使用C2-IgM、B4-IgM或对照IgM(F1102和F632)的三种注射重建抗体缺陷型rag1-/-小鼠。当与对照抗体相比时,C2-IgM和B4-IgM注射两者均导致病变尺寸的显著增加。野生型小鼠中CNV病变尺寸未受影响。

[0087] 发明详述

[0088] 本发明提供用于治疗炎症性疾病和/或体内检测个体中的组织损伤的靶向递送方法和构建体。靶向递送法使用识别被发现存在于炎症部位处的表位的抗体。具体地说,据发现初始被鉴别为病原性IgM天然抗体的单克隆抗体B4和C2识别广泛分布于经历缺血再灌注损伤的器官以及经历非缺血性损伤的炎症部位上的表位。这些观察结果证明IgM天然抗体参与缺血再灌注损伤之外的炎症病症,并且表明这些天然抗体在这类病症的先天免疫识别中的广泛作用。本申请因此提供基于这类天然抗体的结合特性,用于治疗炎症性疾病和/或体内检测组织损伤的靶向递送方法和构建体。

[0089] 因此,一方面,本申请提供一种治疗个体中的炎症性疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)补体调节剂(如补体抑制剂)。。

[0090] 另一方面,提供一种检测个体的组织中损伤或炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)可检测部分。

[0091] 另一方面,提供一种包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)补体调节剂或可检测部分。

[0092] 还提供将补体调节剂(如补体抑制剂)或可检测部分递送至个体中的组织损伤部位的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)补体调节剂(如补体抑制剂)或可检测部分。

[0093] 本发明还提供用于治疗眼病的方法和组合物。使用体外和体内技术的组合,显示在眼病如年龄相关性黄斑变性(“AMD”)的发展中涉及眼睛中的某些新表位,即基于膜联蛋白IV和磷脂的新表位。新表位由天然抗体(如与IgM单克隆抗体B4和C2识别相同表位的抗体)识别。天然抗体与其相应表位继而导致凝集素补体途径和旁路补体途径的活化。本申请因此首次限定氧化应激的眼组织(如视网膜色素上皮单层(“RPE”))中补体活化的机制,这为用于眼病的治疗剂和诊断剂的发展提供基础。

[0094] 因此,一方面本申请提供一种抑制个体眼睛中的炎症或治疗眼病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段:(i)特异性地结合膜联蛋白IV(例如,膜联蛋白IV的表位);或(ii)特异性地结合磷脂(例如,磷脂上的表位)。

[0095] 另一方面,提供一种抑制个体眼睛中的炎症或治疗眼病的方法,所述方法包括向所述个体施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段:(i)特异性地结合膜联蛋白IV(例如,膜联蛋白IV的表位);或(ii)特异性地结合磷脂(例如,磷脂上的表位);和(b)治疗剂(如补体抑制剂)。

[0096] 另一方面,提供一种检测个体眼睛中的损伤或炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段:(i)特异性地结合膜联蛋白IV(例如,膜联蛋白IV的表位);或(ii)特异性地结合磷脂(例如,磷脂上的表位);和(b)可检测部分,其中所述可检测部分在眼睛中的存在指示眼睛中的损伤或炎症。

[0097] 还提供将补体调节剂(如补体抑制剂)或可检测部分递送至个体中的组织损伤部位的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV并且竞争性地抑制单克隆抗体B4与膜联蛋白IV的结合;和(b)补体调节剂(如补体抑制剂)或可检测部分。

[0098] 还提供适用于本文所述的方法的单位剂型、试剂盒和制品。

[0099] 定义

[0100] 术语“个体”是指哺乳动物,包括人。个体包括但不限于,人、牛、马、猫科动物、犬科动物、啮齿类动物或灵长类动物。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体是人。

[0101] 如本文所用,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是用于获得有益或所需结

果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益或所需临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:减轻由疾病引起的一种或多种症状、减弱疾病的程度、稳定疾病(例如,预防或延迟疾病的恶化)、预防或延迟疾病的传播、预防或延迟疾病的复发;延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、提供疾病的缓解(部分或全部)、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药剂的剂量、延迟疾病的进展、提高或改善生命质量、增加体重增长和/或延长存活期。“治疗”还涵盖降低疾病的病理后果。本发明的方法考虑这些治疗方面中的任何一种或多种。

[0102] 本文所用的术语“有效量”是指足以治疗特定病症、病状或疾病如改善、缓和、减轻和/或延迟其症状中的一种或多种的化合物或组合物的量。

[0103] 如本文所用,“组合疗法”意指第一药剂与另一药剂联合施用。“联合”是指施用另一种治疗方式之外的一种治疗方式,如向同一个体施用另一种药剂之外,施用本文所述的纳米颗粒组合物。因此,“联合”是指在将另一治疗方式递送至个体之前、期间或之后,施用一种治疗方式。

[0104] 如本文所用,“药学上可接受的”或“药理学上相容的”意指不是生物学上或其他方面不希望的材料,例如,所述材料可掺入至施用至个体或患者的药物组合物中而不会以有害的方式与包含其的组合物的任何其他组分引起任何显著不希望的生物作用或相互作用。药学上可接受的载体或赋形剂优选地符合毒理学和生产测试所要求的标准,和/或包括由美国食品与药品管理局制定的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)中。

[0105] 如本文中和所附权利要求中所使用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数提及物,除非上下文另外清楚地指示。

[0106] 本文中对“约”某一个值或参数的提及包括(以及描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如,关于“约X”的描述包括“X”的描述。

[0107] 应理解,本文所述发明的方面、变型和实施方案包括由方面、变型和实施方案“组成”和/或“基本上由其组成”。

[0108] 治疗疾病的方法

[0109] 在一些实施方案中,本申请提供一种抑制补体活化、抑制炎症或治疗个体中的炎性疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,通过注射如胃肠外、静脉内、皮下、眼内、关节内或肌肉内注射来施用组合物。在一些实施方案中,提供一种将补体调节剂(如补体抑制剂)递送至个体中的组织损伤(如非缺血性组织损伤)部位的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)补体抑制剂。

[0110] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体中具有非缺血性损伤的组织中补体活化(或抑制炎症例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病理性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病理性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损

伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,炎症(如补体介导的炎症)与由炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约2%、3%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0111] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体中具有非缺血性损伤的组织中补体活化(或抑制炎症例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,炎症(如补体介导的炎症)与由炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约2%、3%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0112] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体中具有氧化损伤的组织中补体活化(或抑制炎症例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽

接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,炎症(如补体介导的炎症)与由炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约2%、3%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0113] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体中具有氧化损伤的组织中补体活化(或抑制炎症例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,炎症(如补体介导的炎症)与由炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约2%、3%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0114] 在一些实施方案中,提供一种治疗个体中的炎性疾病(或涉及氧化损伤的疾病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,炎性疾病是炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的,如超急性异种移植注射)、妊娠相关疾病、药物不良反应(如药物过敏和IL-2诱导的血管渗漏综合征)、自身免疫性或免疫复合物性病症中的任一种。

[0115] 在一些实施方案中,提供一种治疗个体中的炎性疾病(或涉及氧化损伤的疾病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)补体抑制剂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,炎性疾病是炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的,如超急性异种移植注射)、妊娠相关疾病、药物不良反应(如药物过敏和IL-2诱导的血管渗漏综合征)、自身免疫性或免疫复合物性病症中的任一种。

[0116] 在一些实施方案中,待治疗的疾病是眼病。在一些实施方案中,疾病是与补体活化相关的眼病。在一些实施方案中,疾病是年龄相关性黄斑变性(“AMD”),包括湿性AMD和干性AMD。可通过本文所述的方法治疗的其他眼病包括但不限于CMV视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎、青光眼、糖尿病性视网膜病变、色素性视网膜炎、视网膜脱离、增生性玻璃体视网膜病变和眼黑色素瘤。

[0117] 在一些实施方案中,待治疗的疾病是炎性关节炎。

[0118] 在一些实施方案中,待治疗的疾病是肾病,包括但不限于急性肾损伤、肾小球肾炎、慢性肾病和局灶性节段性肾小球硬化症。

[0119] 在一些实施方案中,待治疗的疾病是炎性病症,其包括但不限于烧伤、内毒素血症、败血性休克、成人呼吸窘迫综合征、心肺分流、血液透析、过敏性休克、哮喘、血管性水肿、克罗恩氏病、镰状细胞性贫血、链球菌感染后肾小球肾炎、膜性肾炎和胰腺炎。

[0120] 在一些实施方案中,待治疗的疾病是妊娠相关疾病,其包括但不限于HELLP(溶血性贫血、肝酶升高和低血小板计数)、复发性流产和先兆子痫。

[0121] 在一些实施方案中,待治疗的疾病是自身免疫性或免疫复合物性病症,其包括但不限于重症肌无力、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、视神经脊髓炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgG4相关疾病、胰岛素依赖型糖尿病、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、抗磷脂抗体综合征、血栓性血小板减少性紫癜、自身免疫性肝炎、克罗恩氏病、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、桥本氏病、特发性血小板减少性紫癜、天疱疮、斯耶格伦氏综合征、高安氏动脉炎、自身免疫性肾小球肾炎、II型膜性增生性肾小球肾炎、膜性疾病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑病变、葡萄膜炎、视网膜变性病症、糖尿病性肾病、局灶性节段性肾小球硬化症、ANCA相关性脉管炎、溶血性尿毒综合征、志贺毒素相关性溶血性尿毒综合征和非典型溶血性尿毒综合征。在一些实施方案中,待治疗的疾病是自身免疫性肾小球肾炎,其包括但不限于免疫球蛋白A肾病或I型膜性增生性肾小球性肾炎。

[0122] 治疗眼病的方法

[0123] 在一些实施方案中,本申请提供一种抑制个体眼睛中的补体活化、抑制眼睛中的炎症或治疗眼病(例如,涉及氧化损伤的眼病或补体相关性眼病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段:(i)特异性地结合膜联蛋白IV;或(ii)特异性地结合磷脂。

[0124] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体眼睛中的补体活化或抑制炎症(如补体驱动的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0125] 在一些实施方案中,提供一种抑制对个体眼睛的氧化损伤(包括例如对光感受器、RPE/布鲁赫氏膜、黄斑和/或脉络膜毛细血管复合体的氧化损伤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)氧化损伤。

[0126] 在一些实施方案中,提供一种治疗个体中的眼病(如补体相关性眼病或涉及氧化损伤的眼病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,眼病选自由以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜炎

变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0127] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体眼睛中的补体活化或抑制炎症(如补体驱动的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0128] 在一些实施方案中,提供一种抑制对个体眼睛的氧化损伤(包括例如对光感受器、RPE/布鲁赫氏膜、黄斑和/或脉络膜毛细血管复合体的氧化损伤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)氧化损伤。

[0129] 在一些实施方案中,提供一种治疗个体中的眼病(如补体相关性眼病或涉及氧化损伤的眼病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段不会活化补体活化,并且其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,眼病选自自由以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜

脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0130] 另一方面,提供一种抑制个体眼睛中的炎症或治疗眼病的方法,所述方法包括向所述个体施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段:(i) 特异性地结合膜联蛋白IV(例如,膜联蛋白IV的表位);或(ii) 特异性地结合磷脂(例如,磷脂上的表位);和(b) 治疗剂(如补体抑制剂)。

[0131] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体眼睛中的补体活化或抑制炎症(如补体驱动的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 治疗剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0132] 在一些实施方案中,提供一种抑制对个体眼睛的氧化损伤(包括例如对光感受器、RPE/布鲁赫氏膜、黄斑和/或脉络膜毛细血管复合体的氧化损伤)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 治疗剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)氧化损伤。

[0133] 在一些实施方案中,提供一种治疗个体中的眼病(如补体相关性眼病或涉及氧化损伤的眼病)的方法,所述方法包括向所述个体施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 治疗剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,眼病选自由以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和

后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0134] 在一些实施方案中,提供一种抑制个体眼睛中的补体活化或抑制炎症(如补体驱动的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)治疗剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)补体活化或炎症。

[0135] 在一些实施方案中,提供一种抑制对个体眼睛的氧化损伤(包括例如对光感受器、RPE/布鲁赫氏膜、黄斑和/或脉络膜毛细血管复合体的氧化损伤)的方法,所述方法包括向所述个体施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)治疗剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,抑制了至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%中任一者)氧化损伤。

[0136] 在一些实施方案中,提供一种治疗个体中的眼病(如补体相关性眼病或涉及氧化损伤的眼病)的方法,所述方法包括向所述个体施用包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)治疗剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带

正电荷的。在一些实施方案中,眼病选自以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0137] 本文所述的方法还适用于以下中的任何一项或多项:(1)抑制、预防或延迟眼睛中玻璃疣的形成;(2)抑制、预防或延迟感光细胞的丧失;(3)抑制、预防或延迟与眼病(如AMD)相关的新血管形成;(3)抑制、预防或延迟视网膜脱离;(4)抑制、预防或延迟氧化应激介导的损伤;和(5)改善个体眼睛的视敏度或视野。

[0138] 检测组织损伤的方法

[0139] 在一些实施方案中,本申请提供一种检测补体介导的组织损伤或炎症或者诊断个体中的炎性疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)可检测部分。在一些实施方案中,提供一种将可检测部分递送至个体中补体介导的组织损伤或炎症部位的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)可检测部分。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,通过注射如胃肠外、静脉内、皮下、眼内、关节内或肌肉注射来施用组合物。

[0140] 在一些实施方案中,提供一种检测补体介导的组织损伤或炎症或者诊断个体中的炎性疾病的方法,所述方法包括使所述个体的组织与包含构建体的组合物相接触,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂;和(b)可检测部分。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。

[0141] 在一些实施方案中,提供一种检测个体的组织中补体介导的损伤(或检测炎症,例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示补体介导的组织损伤(或补体介导的炎症)。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,炎症(如补体介导的炎症)与由炎性疾病、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性疾病引起的组织损伤相

关。

[0142] 在一些实施方案中,提供一种检测个体的组织中补体介导的损伤(或检测炎症,例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示补体介导的组织损伤(或补体介导的炎症)。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,炎症(如补体介导的炎症)与由炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。

[0143] 在一些实施方案中,提供一种检测个体组织中的氧化损伤(或涉及氧化损伤的炎性疾病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示组织中的氧化损伤。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,氧化损伤与由炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。

[0144] 在一些实施方案中,提供一种检测个体组织中的氧化损伤(或涉及氧化损伤的炎性疾病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构

建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂; 和 (b) 可检测部分, 其中所述组织处可检测部分的存在指示组织中的氧化损伤。在一些实施方案中, 所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体C2) 与磷脂的结合。在一些实施方案中, 抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体 (如单克隆抗体C2) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 磷脂存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/或氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上 (或病理结构 (例如, 玻璃疣)) 中。在一些实施方案中, 磷脂选自由以下组成的组: 磷脂酰乙醇胺 (PE)、心磷脂 (CL) 和磷脂酰胆碱 (PC)。在一些实施方案中, 磷脂是丙二醛 (MDA)。在一些实施方案中, 磷脂是中性的。在一些实施方案中, 磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中, 磷脂是氧化的。在一些实施方案中, 构建体是融合蛋白。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。在一些实施方案中, 组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤, 包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中, 组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中, 组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中, 氧化损伤与由炎症病症、移植排斥 (细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。

[0145] 在一些实施方案中, 提供一种检测个体组织中的非缺血性组织损伤 (或涉及非缺血性组织损伤的炎症疾病) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV; 和 (b) 可检测部分, 其中所述组织处可检测部分的存在指示非缺血性组织损伤。在一些实施方案中, 所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体B4) 与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中, 抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体 (如单克隆抗体B4) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/或氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上 (和/或病理结构中)。在一些实施方案中, 膜联蛋白IV由有核细胞 (如哺乳动物细胞) 产生。在一些实施方案中, 膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中, 构建体是融合蛋白。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。在一些实施方案中, 组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤, 包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中, 组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中, 组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中, 非缺血性组织损伤与由炎症病症、移植排斥 (细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。

[0146] 在一些实施方案中, 提供一种检测个体组织中的非缺血性组织损伤 (或涉及非缺血性组织损伤的炎症疾病) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物, 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂; 和 (b) 可检测部分, 其中所述组织处可检测部分的存在指示非缺血性组织损伤。在一些实施方案中, 所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体C2) 与磷脂的结合。在一些实施方案中, 抗体或其抗体片段

与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,组织是肝或门管区、心脏、肌肉、脑、中枢或周围神经系统、胃肠道、肺、肢体、动脉或静脉血管系统、皮肤,包括红细胞、血小板和有核细胞的骨髓细胞、胰腺、眼睛、关节和肾中任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,组织是眼睛、关节和肾中的任一者。在一些实施方案中,非缺血性组织损伤与由炎症病症、移植排斥(细胞或抗体介导的)、妊娠相关疾病、药物不良反应、自身免疫性或免疫复合物性病症引起的组织损伤相关。

[0147] 在一些实施方案中,提供一种诊断(或有助于诊断)个体中的组织特异性炎症性疾病(或涉及氧化损伤的疾病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示组织中的炎症性疾病。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,待诊断的炎症性疾病是炎症病症、移植排斥(细胞或抗体介导的,如超急性异种移植注射)、妊娠相关疾病、药物不良反应(如药物过敏和IL-2诱导的血管渗漏综合征)、自身免疫性或免疫复合物性病症中的任一种。

[0148] 在一些实施方案中,提供一种诊断(或有助于诊断)个体中的组织特异性炎症性疾病(或涉及氧化损伤的疾病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示组织中的炎症性疾病。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合

蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,待诊断的炎性疾病是炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的,如超急性异种移植注射)、妊娠相关疾病、药物不良反应(如药物过敏和IL-2诱导的血管渗漏综合征)、自身免疫性或免疫复合物性病症中的任一种。

[0149] 在一些实施方案中,提供一种诊断(或有助于诊断)个体中的组织特异性炎性疾病(或涉及氧化损伤的疾病)的方法,所述方法包括使来自个体的组织样品与有效量的包含构建体的组合物相接触,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示组织中的炎性疾病。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,待诊断的炎性疾病是炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的,如超急性异种移植注射)、妊娠相关疾病、药物不良反应(如药物过敏和IL-2诱导的血管渗漏综合征)、自身免疫性或免疫复合物性病症中的任一种。

[0150] 在一些实施方案中,提供一种诊断(或有助于诊断)个体中的组织特异性炎性疾病(或涉及氧化损伤的疾病)的方法,所述方法包括使来自个体的组织样品与有效量的包含构建体的组合物相接触,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示组织中的炎性疾病。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构(例如,玻璃疣))中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,待诊断的炎性疾病是炎性病症、移植排斥(细胞或抗体介导的,如超急性异种移植注射)、妊娠相关疾病、药物不良反应(如药物过敏和IL-2诱导的血管渗漏综合征)、自身免疫性或免疫复合物性病症中的任一种。

[0151] 在一些实施方案中,待诊断的疾病是眼病。在一些实施方案中,疾病是与补体活化相关的眼病。在一些实施方案中,疾病是年龄相关性黄斑变性("AMD"),包括湿性AMD和干性AMD。可通过本文所述的方法诊断的其他疾病包括但不限于CMV视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎、青光眼、糖尿病性视网膜病变、色素性视网膜炎、视网膜脱离、增生性玻璃体视网膜病变

和眼黑色瘤素。

[0152] 在一些实施方案中,待诊断的疾病是炎性关节炎。

[0153] 在一些实施方案中,待诊断的疾病是肾病,包括但不限于急性肾损伤、肾小球肾炎、慢性肾病和局灶性节段性肾小球硬化症。

[0154] 在一些实施方案中,待诊断的疾病是炎性病症,包括但不限于烧伤、内毒素血症、败血性休克、成人呼吸窘迫综合征、心肺分流、血液透析、过敏性休克、哮喘、血管性水肿、克罗恩氏病、镰状细胞性贫血、链球菌感染后肾小球肾炎、膜性肾炎和胰腺炎。

[0155] 在一些实施方案中,待诊断的疾病是妊娠相关疾病,包括但不限于HELLP (溶血性贫血、肝酶升高和低血小板计数)、复发性流产和先兆子痫。

[0156] 在一些实施方案中,待诊断的疾病是自身免疫性或免疫复合物性病症,包括但不限于重症肌无力、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、视神经脊髓炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgG4相关疾病、胰岛素依赖型糖尿病、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、抗磷脂抗体综合征、血栓性血小板减少性紫癜、自身免疫性肝炎、克罗恩氏病、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、桥本氏病、特发性血小板减少性紫癜、天疱疮、斯耶格伦氏综合征、高安氏动脉炎、自身免疫性肾小球肾炎、II型膜性增生性肾小球肾炎、膜性疾病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑病变、葡萄膜炎、视网膜变性病症、糖尿病性肾病、局灶性节段性肾小球硬化症、ANCA相关性脉管炎、溶血性尿毒综合征、志贺毒素相关性溶血性尿毒综合征和非典型溶血性尿毒综合征。在一些实施方案中,待诊断的疾病是自身免疫性肾小球肾炎,其包括但不限于免疫球蛋白A肾病或I型膜性增生性肾小球性肾炎。

[0157] 检测眼睛中的组织损伤的方法

[0158] 本文还提供检测个体眼睛中的损伤或炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含:(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段:(i) 特异性地结合膜联蛋白IV或(ii) 特异性地结合磷脂;和(b) 可检测部分,其中所述可检测部分在眼睛中的存在指示眼睛中的损伤或炎症。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,通过注射如眼内注射来施用组合物。

[0159] 在一些实施方案中,所述方法适用于检测感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜的劣化。在一些实施方案中,所述方法适用于检测感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜中的炎症。在一些实施方案中,所述方法适用于检测感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜的氧化损伤。在一些实施方案中,所述方法适用于检测黄斑中RPE/脉络膜界面处的病理性病变。

[0160] 在一些实施方案中,提供一种检测个体的眼组织中补体介导的损伤(或检测炎症,例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示补体介导的眼组织损伤(或补体介导的炎症)。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合

相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和可检测部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,眼组织是感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜。在一些实施方案中,提供一种检测个体眼组织中的氧化损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示眼组织中的氧化损伤。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和可检测部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,眼组织是感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜。

[0161] 在一些实施方案中,提供了一种诊断(或有助于诊断)个体炎性眼病(或涉及氧化损伤的眼病)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中构建体包含(a)抗体或其片段,其中抗体或其片段特异性地结合到膜联蛋白IV;和(b)可检测部分,其中眼组织处可检测部分的存在指示了组织中的炎性眼病(或涉及氧化损伤的眼病)。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测的部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(诸如单克隆抗体B4)结合到膜联蛋白IV。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段结合到与病原性抗体(诸如单克隆抗体B4)结合到膜联蛋白IV相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于经受组织损伤(诸如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或具有经受的风险)的组织中或与所述组织相邻的个体的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(诸如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和可检测部分通过接头(诸如肽接头)连接。在一些实施方案中,眼病选自年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、细胞巨化病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和后部)、青光眼、开/宽角性青光眼、闭/窄角性青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼部黑瘤素。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0162] 在一些实施方案中,提供一种检测个体的眼组织中补体介导的损伤(或检测炎症,例如补体介导的炎症)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示补体介导的眼组织损伤(或补体介

导的炎症)。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,眼组织是感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜。

[0163] 在一些实施方案中,提供一种检测个体眼组织中的氧化损伤的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)可检测部分,其中所述组织处可检测部分的存在指示眼组织中的氧化损伤。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,眼组织是感光细胞、视网膜神经节细胞、RPE、布鲁赫氏膜、脉络膜毛细血管复合体、黄斑或角膜。

[0164] 在一些实施方案中,提供一种诊断(或有助于诊断)个体中的炎性眼病(或涉及氧化损伤的眼病)的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含构建体的组合物,其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂;和(b)可检测部分,其中眼组织处可检测部分的存在指示所述组织中的炎性眼病(或涉及氧化损伤的眼病)。在一些实施方案中,所述方法还包括检测可检测部分。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,眼病选自自由以下组成的组:年龄相关性黄斑变性(AMD)(包括湿性AMD和干性AMD)、巨细胞病毒(CMV)视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎(前部和后部)、青光眼、开角型/宽角型青光眼、闭角型/窄角型青光眼、色素性视网膜炎(RP)、增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植和眼黑色素瘤。在一些实施方案中,眼病是AMD。

[0165] 靶向构建体

[0166] 本申请在一些实施方案中提供可用于但不限于本文所述的方法中的任何一种或多种的靶向构建体。应当理解,本文中本章节中所述的任何构建体可用于以上章节中所述的任何方法。本申请还提供通过向个体施用本文所述的靶向构建体中的任一种,将本文所公开的补体调节剂或可检测部分中的任一个递送至个体中的补体活化部位、组织损伤(如非缺血性组织损伤)部位或补体相关性疾病部位的方法。

[0167] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)治疗剂或可检测部分。在一些实施方案中,构建体包含治疗剂(如补体调节剂,例如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,抗体或其片段(下文还被称为“靶向部分”)和可检测部分(下文还被称为“活性部分”)通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0168] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列、SEQ ID NO:2的序列或SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:4的序列、SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列、SEQ ID NO:8的序列或SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:10的序列、SEQ ID NO:11的序列或SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0169] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域;

和(iii)包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0170] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0171] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;(iii)包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;(iv)包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域;(v)包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域;和(vi)包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域;(iii)包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域;(iv)包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域;(v)包含SEQ ID NO:11

的序列的重链可变结构域;和(vi)包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0172] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)SEQ ID NO:1的轻链CDR1;(ii)SEQ ID NO:2的轻链CDR2;(iii)SEQ ID NO:3的轻链CDR3;(iv)SEQ ID NO:4的重链CDR1;(v)SEQ ID NO:5的重链CDR2;和(vi)SEQ ID NO:6的重链CDR3。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)SEQ ID NO:7的轻链CDR1;(ii)SEQ ID NO:8的轻链CDR2;(iii)SEQ ID NO:9的轻链CDR3;(iv)SEQ ID NO:10的重链CDR1;(v)SEQ ID NO:11的重链CDR2;和(vi)SEQ ID NO:12的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0173] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体

包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV; 和 (b) 补体调节剂或可检测部分, 其中所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO:16 的重链可变结构域。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性单克隆抗体 (如单克隆抗体 B4) 与膜联蛋白 IV 的结合。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 B4) 与膜联蛋白 IV 的结合。在一些实施方案中, 抗体或其片段与结合膜联蛋白 IV 的病原性抗体 (如单克隆抗体 B4) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上 (和/或病理结构中)。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 由有核细胞 (如哺乳动物细胞) 产生。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 是重组蛋白。在一些实施方案中, 构建体包含补体调节剂 (如补体抑制剂)。在一些实施方案中, 构建体包含可检测部分。在一些实施方案中, 构建体是融合蛋白。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分直接连接。

[0174] 在一些实施方案中, 提供一种构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV; 和 (b) 补体调节剂或可检测部分, 其中所述抗体或其片段包含: (i) SEQ ID NO:13 的轻链可变结构域; 和 (ii) SEQ ID NO:15 的重链可变结构域。在一些实施方案中, 提供一种构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV; 和 (b) 补体调节剂或可检测部分, 其中所述抗体或其片段包含: (i) SEQ ID NO:14 的轻链可变结构域; 和 (ii) SEQ ID NO:16 的重链可变结构域。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 B4) 与膜联蛋白 IV 的结合。在一些实施方案中, 抗体或其片段与结合膜联蛋白 IV 的病原性抗体 (如单克隆抗体 B4) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上 (和/或病理结构中)。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 由有核细胞 (如哺乳动物细胞) 产生。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 是重组蛋白。在一些实施方案中, 构建体包含补体调节剂 (如补体抑制剂)。在一些实施方案中, 构建体包含可检测部分。在一些实施方案中, 构建体是融合蛋白。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分直接连接。

[0175] 在一些实施方案中, 提供一种构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV; 和 (b) 补体调节剂或可检测部分, 其中所述抗体或片段是具有 SEQ ID NO:17 的序列的 scFv。在一些实施方案中, 提供一种构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白 IV; 和 (b) 补体调节剂或可检测部分, 其中所述抗体或片段是具有 SEQ ID NO:18 的序列的 scFv。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 B4) 与膜联蛋白 IV 的结合。在一些实施方案中, 抗体或其片段与结合膜联蛋白 IV 的病原性抗体 (如单克隆抗体 B4) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上 (和/或病理结构中)。在一些实施方案中, 膜联蛋白 IV 由有核细胞 (如哺乳动物细胞) 产生。

在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0176] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:25的序列、SEQ ID NO:26的序列或SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:31的序列、SEQ ID NO:32的序列或SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0177] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:25的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:26的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:31的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理

结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0178] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0179] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:25的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:26的序列的轻链可变结构域;(iii)包含SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域;(iv)包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域;(v)包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域;和(vi)包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:31的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变结构域;(iii)包含SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域;(iv)包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域;(v)包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域;和(vi)包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选

自由以下组成的组：磷脂酰乙醇胺 (PE)、心磷脂 (CL) 和磷脂酰胆碱 (PC)。在一些实施方案中，磷脂是丙二醛 (MDA)。在一些实施方案中，磷脂是中性的。在一些实施方案中，磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中，磷脂是氧化的。在一些实施方案中，构建体包含含有治疗性部分 (如补体抑制剂) 的活性部分。在一些实施方案中，构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中，构建体是融合蛋白。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。

[0180] 在一些实施方案中，提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC)；和 (b) 活性部分 (例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:25 的轻链 CDR1；(ii) SEQ ID NO:26 的轻链 CDR2；(iii) SEQ ID NO:27 的轻链 CDR3；(iv) SEQ ID NO:28 的重链 CDR1；(v) SEQ ID NO:29 的重链 CDR2；和 (vi) SEQ ID NO:30 的重链 CDR3。在一些实施方案中，提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC)；和 (b) 活性部分 (例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:31 的轻链 CDR1；(ii) SEQ ID NO:32 的轻链 CDR2；(iii) SEQ ID NO:33 的轻链 CDR3；(iv) SEQ ID NO:28 的重链 CDR1；(v) SEQ ID NO:29 的重链 CDR2；和 (vi) SEQ ID NO:30 的重链 CDR3。在一些实施方案中，抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 与磷脂的结合。在一些实施方案中，抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 结合相同的表位。在一些实施方案中，磷脂存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/或氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜 (例如布鲁赫氏膜) 上或病理结构 (例如，玻璃疣) 中。在一些实施方案中，磷脂选自由以下组成的组：磷脂酰乙醇胺 (PE)、心磷脂 (CL) 和磷脂酰胆碱 (PC)。在一些实施方案中，磷脂是丙二醛 (MDA)。在一些实施方案中，磷脂是中性的。在一些实施方案中，磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中，磷脂是氧化的。在一些实施方案中，构建体包含含有治疗性部分 (如补体抑制剂) 的活性部分。在一些实施方案中，构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中，构建体是融合蛋白。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。

[0181] 在一些实施方案中，提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC)；和 (b) 活性部分 (例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO:34 的轻链可变结构域。在一些实施方案中，提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC)；和 (b) 活性部分 (例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO:36 的重链可变结构域。在一些实施方案中，提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC)；和 (b) 活性部分 (例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO:35 的轻链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 与磷脂的结合。在一些实施方案中，抗体或其抗体片段与结合磷

脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0182] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:34的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:35的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0183] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段是具有SEQ ID NO:37的序列的scFv。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段是具有SEQ ID NO:38的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布

鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0184] 在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接键合、共价键合或可逆地键合。

[0185] 本文所用的“构建体”或“靶向构建体”是指包含“靶向部分”和“活性部分”的非天然存在的分子。靶向部分能够特异性地结合膜联蛋白IV。靶向构建体的靶向部分负责将分子靶向递送至例如补体活化的部位。活性部分负责治疗活性,例如特异性地抑制补体活化或检测,例如允许检测和/或定位靶向部分。靶向构建体分子的靶向部分和活性部分可通过本领域中已知的任何方法连接在一起,只要维持两个部分的所需功能性。

[0186] 因此,本文所述的靶向构建体通常具有结合由本文所述的抗体识别的表位和施加治疗活性或允许检测的双重功能。“单克隆抗体B4抗体的表位”是指结合天然存在的B4或C2抗体的任何分子,所述分子包括结合B4或C2抗体的具有天然结合B4抗体的表位的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中任一者的结合亲和力的表位。结合亲和力可通过本领域中已知的任何方法测定,包括例如表面等离子体共振、量热滴定法、ELISA和流式细胞术。

[0187] 在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体通常能够抑制补体活化(例如抑制旁路途径和/或凝集素途径的活化)。如本文所述,靶向构建体可以是比天然存在的抗体更有效的补体抑制剂。例如,在一些实施方案中,靶向构建体具有为B4或C2抗体的补体抑制活性的约1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、40倍中任一者或更多倍的补体抑制活性。在一些实施方案中,靶向构建体具有包括端值在内的小于约100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM或10nM中任一者(包括这些数字之间的任何值)的EC50。在一些实施方案中,靶向构建体分子具有约5至60nM的EC50,包括例如8至50nM、8至20nM、10至40nM和20至30nM中的任一者。在一些实施方案中,靶向构建体分子具有B4或C2抗体的补体抑制活性的约50%、60%、70%、80%、90%或100%中任一者的补体抑制活性。

[0188] 补体抑制可基于本领域中已知的任何方法进行评价,包括例如体外酵母聚糖测定、红细胞溶解测定、抗体或免疫复合物活化测定、旁路途径活化测定和甘露聚糖活化测定。

[0189] 在一些实施方案中,靶向构建体是融合蛋白。本文所用的“融合蛋白”是指两个或更多个彼此可操作地连接的肽、多肽或蛋白质。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接彼此融合。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过氨基酸接头序列连接。接头序列的实例是本领域中已知的并且包括例如(Gly4Ser)、(Gly4Ser)₂、(Gly4Ser)₃、(Gly3Ser)₄、(SerGly4)、(SerGly4)₂、(SerGly4)₃和(SerGly4)₄。连接序列还可包括在补体因子的不同结构域之间发现的“天然”连接序列。融合蛋白中靶向部分和活性部分的次序可改变。例如,在一些实施方案中,靶向部分的C-末端融合(直接或间接)至靶向构建体的活性部分的N-末端。在一些实施方案中,靶向部分的N-末端融合(直接或间接)至靶向构建体的活性部分的

C-末端。

[0190] 在一些实施方案中,靶向构建体的靶向部分由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:19-24和57中任一者的核酸序列。在一些实施方案中,靶向构建体分子由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:19-24和57中任一者的核酸序列至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,靶向构建体的靶向部分由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:37或38中任一者的核酸序列。在一些实施方案中,靶向构建体分子由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:37或38中任一者的核酸序列至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核酸序列。

[0192] 在一些实施方案中,靶向构建体包含通过化学交联剂连接的靶向部分和活性部分。所述两部分的连接可在位于所述两部分的反应性基团上发生。可使用交联剂靶向的反应性基团包括伯胺、巯基、羰基、碳水化合物和羧酸,或者可添加至蛋白质的活性基团。化学接头的实例是本领域中熟知的,并且包括但不限于双马来酰亚胺基己烷、马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯,NHS-酯-马来酰亚胺交联剂如SPDP、碳二亚胺、戊二醛、MBS、磺基-MBS、SMPB、磺基-SMPB、GMBS、磺基-GMBS、EMCS、磺基-EMCS,亚氨酸酯交联剂如DMA、DMP、DMS、DTBP、EDC和DTME。

[0193] 在一些实施方案中,靶向部分和活性部分是非共价连接的。例如,所述两部分可通过两个相互作用的桥接蛋白质(如生物素和链霉亲和素)连接在一起,各自连接至靶向部分或活性部分。

[0194] 在一些实施方案中,靶向构建体包含两个或更多个本文所述的(相同的或不同的)靶向部分。在一些实施方案中,靶向构建体包含两个或更多个本文所述的(相同或不同的)活性部分。这两个或更多个靶向(或活性)部分可彼此串联连接(如融合)。在一些实施方案中,靶向构建体包含靶向部分和两个或更多个(如三、四、五或更多个)活性部分。在一些实施方案中,靶向构建体包含活性部分和两个或更多个(如三、四、五或更多个)靶向部分。在一些实施方案中,靶向构建体包含两个或更多个靶向部分以及两个或更多个活性部分。

[0195] 在一些实施方案中,提供分离的靶向构建体。在一些实施方案中,靶向构建体形成二聚体或多聚体。

[0196] 靶向构建体中的活性部分和靶向部分可来自相同的物种(如人或小鼠)或不同的物种。

[0197] 本文还提供包含靶向构建体分子的靶向构建体和组合物(如药物组合物)。本申请还提供通过向个体施用本文所述的靶向构建体中的任一种,将本文所公开的补体调节剂或可检测部分中的任一者递送至所述个体中的补体活化部位、组织损伤(如非缺血性组织损伤)部位或补体相关性疾病部位的方法。

[0198] 本文所用的“靶向构建体”是指包含“靶向部分”和“活性部分”的非天然存在的分子。在某些实施方案中,靶向部分能够结合至膜联蛋白IV。在某些实施方案中,靶向部分能够结合磷脂如PC、PE和/或CL。因此,靶向构建体的靶向部分负责将分子靶向递送至例如补体活化的部位。活性部分负责治疗活性,例如特异性地抑制补体活化或检测,例如允许检测和/或定位靶向部分。靶向构建体分子的靶向部分和活性部分可通过本领域中已知的任何

方法连接在一起,只要维持两个部分的所需功能性。

[0199] 因此,本文所述的靶向构建体通常具有结合由本文所述的抗体识别的表位和施加治疗活性或允许检测的双重功能。“B4或C2抗体的表位”是指结合天然存在的B4或C2抗体的任何分子,所述分子包括结合B4或C2抗体的具有天然结合B4或C2抗体的表位的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%中任一者的结合亲和力的表位。结合亲和力可通过本领域中已知的任何方法测定,包括例如表面等离子体共振、量热滴定法、ELISA和流式细胞术。

[0200] 在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体通常能够抑制补体活化(例如抑制旁路途径和/或凝集素途径的活化)。如本文所述,靶向构建体可以是比天然存在的抗体更有效的补体抑制剂。例如,在一些实施方案中,靶向构建体具有为B4或C2抗体的补体抑制活性的约1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、40倍中任一者或更多倍的补体抑制活性。在一些实施方案中,靶向构建体具有小于约100nM、90nM、80nM、70nM、60nM、50nM、40nM、30nM、20nM或10nM中任一者的EC50。在一些实施方案中,靶向构建体分子具有约5-60nM的EC50,包括例如8-50nM、8-20nM、10-40nM和20-30nM中的任一者。在一些实施方案中,靶向构建体分子具有B4或C2抗体的补体抑制活性的约50%、60%、70%、80%、90%或100%中任一者的补体抑制活性。

[0201] 补体抑制可基于本领域中已知的任何方法进行评价,包括例如体外酵母聚糖测定、红细胞溶解测定、免疫复合物活化测定和甘露聚糖活化测定。

[0202] 在一些实施方案中,靶向构建体是融合蛋白。本文所用的“融合蛋白”是指两个或更多个彼此可操作地连接的肽、多肽或蛋白质。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接彼此融合。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过氨基酸接头序列连接。接头序列的实例是本领域中已知的并且包括例如(Gly4Ser)、(Gly4Ser)₂、(Gly4Ser)₃、(Gly3Ser)₄、(SerGly4)、(SerGly4)₂、(SerGly4)₃和(SerGly4)₄。连接序列还可包括在补体因子的不同结构域之间发现的“天然”连接序列。融合蛋白中靶向部分和活性部分的次序可改变。例如,在一些实施方案中,靶向部分的C-末端融合(直接或间接)至靶向构建体的活性部分的N-末端。在一些实施方案中,靶向部分的N-末端融合(直接或间接)至靶向构建体的活性部分的C-末端。

[0203] 在一些实施方案中,靶向构建体的靶向部分由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:19-24、39-43、57和58中任一者的核酸序列。在一些实施方案中,靶向构建体分子由多核苷酸编码,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:19-24和39-43中任一者的核酸序列至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的核酸序列。

[0204] 在一些实施方案中,靶向构建体包含通过化学交联剂连接的靶向部分和活性部分。所述两部分的连接可在位于所述两部分的反应性基团上发生。可使用交联剂靶向的反应性基团包括伯胺、巯基、羰基、碳水化合物和羧酸,或者可添加至蛋白质的活性基团。化学接头的实例是本领域中熟知的,并且包括但不限于双马来酰亚胺基己烷、马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯,NHS-酯-马来酰亚胺交联剂如SPDP、碳二亚胺、戊二醛、MBS、磺基-MBS、SMPB、磺基-SMPB、GMBS、磺基-GMBS、EMCS、磺基-EMCS,亚氨酸酯交联剂如DMA、DMP、DMS、DTBP、EDC和DTME。

[0205] 在一些实施方案中,靶向部分和活性部分是非共价连接的。例如,所述两部分可通过两个相互作用的桥接蛋白质(如生物素和链霉亲和素)连接在一起,各自连接至靶向部分或活性部分。

[0206] 在一些实施方案中,靶向构建体包含两个或更多个本文所述的(相同的或不同的)靶向部分。在一些实施方案中,靶向构建体包含两个或更多个本文所述的(相同或不同的)活性部分。这两个或更多个靶向(或活性)部分可彼此串联连接(如融合)。在一些实施方案中,靶向构建体包含靶向部分和两个或更多个(如三、四、五或更多个)活性部分。在一些实施方案中,靶向构建体包含活性部分和两个或更多个(如三、四、五或更多个)靶向部分。在一些实施方案中,靶向构建体包含两个或更多个靶向部分以及两个或更多个活性部分。

[0207] 在一些实施方案中,提供分离的靶向构建体。在一些实施方案中,靶向构建体形成二聚体或多聚体。

[0208] 靶向构建体中的活性部分和靶向部分可来自相同的物种(如人或小鼠)或不同的物种。

[0209] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)治疗剂或可检测部分。在一些实施方案中,构建体包含治疗剂(如补体调节剂,例如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,抗体或其片段(下文还被称为“靶向部分”)和可检测部分(下文还被称为“活性部分”)通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0210] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列、SEQ ID NO:2的序列或SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:4的序列、SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列、SEQ ID NO:8的序列或SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:10的序列、SEQ ID NO:11的序列或SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0211] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0212] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0213] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列的

轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域；(iii) 包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域；(iv) 包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中，提供一种构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV；和(b) 补体调节剂或可检测部分，其中所述抗体或其片段包含：(i) 包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域；(iii) 包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域；(iv) 包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中，抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中，膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中，膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中，膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中，构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中，构建体包含可检测部分。在一些实施方案中，构建体是融合蛋白。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分直接连接。

[0214] 在一些实施方案中，提供一种构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV；和(b) 补体调节剂或可检测部分，其中所述抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:1的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:2的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:3的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:4的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:5的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:6的重链CDR3。在一些实施方案中，提供一种构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV；和(b) 补体调节剂或可检测部分，其中所述抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:7的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:8的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:9的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:10的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:11的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:12的重链CDR3。在一些实施方案中，抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中，抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中，膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中，膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中，膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中，构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中，构建体包含可检测部分。在一些实施方案中，构建体是融合蛋白。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分直接连接。

[0215] 在一些实施方案中，提供一种构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV；和

(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:16的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性单克隆抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0216] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:13的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:14的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:16的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0217] 在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a) 抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b) 补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或片段是具有SEQ ID NO:17的序列的scFv。在

一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV;和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或片段是具有SEQ ID NO:18的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体B4)与膜联蛋白IV的结合。在一些实施方案中,抗体或其片段与结合膜联蛋白IV的病原性抗体(如单克隆抗体B4)结合相同的表位。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。在一些实施方案中,构建体包含补体调节剂(如补体抑制剂)。在一些实施方案中,构建体包含可检测部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接连接。

[0218] 在一些实施方案中本申请提供用于靶向递送的各种靶向构建体。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:25的序列、SEQ ID NO:26的序列或SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)补体调节剂或可检测部分,其中所述抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:31的序列、SEQ ID NO:32的序列或SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0219] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i)包含序列SEQ ID NO:25的轻链可变结构域;(ii)包含序列SEQ ID NO:26的轻链可变结构域;和(iii)包含序列SEQ ID NO:27的轻链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包

含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC); 和 (b) 活性部分 (例如, 治疗性部分或可检测部分), 其中所述抗体或其片段包含: (i) 包含 SEQ ID NO:31 的序列的轻链可变结构域; (ii) 包含 SEQ ID NO:32 的序列的轻链可变结构域; 和 (iii) 包含 SEQ ID NO:33 的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 与磷脂的结合。在一些实施方案中, 抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 磷脂存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/或氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜 (例如布鲁赫氏膜) 上或病理结构 (例如, 玻璃疣) 中。在一些实施方案中, 磷脂选自由以下组成的组: 磷脂酰乙醇胺 (PE)、心磷脂 (CL) 和磷脂酰胆碱 (PC)。在一些实施方案中, 磷脂是丙二醛 (MDA)。在一些实施方案中, 磷脂是中性的。在一些实施方案中, 磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中, 磷脂是氧化的。在一些实施方案中, 构建体包含含有治疗性部分 (如补体抑制剂) 的活性部分。在一些实施方案中, 构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中, 构建体是融合蛋白。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。

[0220] 在一些实施方案中, 提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC); 和 (b) 活性部分 (例如, 治疗性部分或可检测部分), 其中所述抗体或其片段包含: (i) 包含 SEQ ID NO:28 的序列的重链可变结构域; (ii) 包含 SEQ ID NO:29 的序列的重链可变结构域; 和 (iii) 包含 SEQ ID NO:30 的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中, 抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 与磷脂的结合。在一些实施方案中, 抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体 (如单克隆抗体 C2) 结合相同的表位。在一些实施方案中, 磷脂存在于个体中的经历组织损伤 (如非缺血性损伤) 和/或氧化损伤 (或处于经历所述损伤的风险) 的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜 (例如布鲁赫氏膜) 上或病理结构 (例如, 玻璃疣) 中。在一些实施方案中, 磷脂选自由以下组成的组: 磷脂酰乙醇胺 (PE)、心磷脂 (CL) 和磷脂酰胆碱 (PC)。在一些实施方案中, 磷脂是丙二醛 (MDA)。在一些实施方案中, 磷脂是中性的。在一些实施方案中, 磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中, 磷脂是氧化的。在一些实施方案中, 构建体包含含有治疗性部分 (如补体抑制剂) 的活性部分。在一些实施方案中, 构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中, 构建体是融合蛋白。在一些实施方案中, 靶向部分和活性部分通过接头 (如肽接头) 连接。

[0221] 在一些实施方案中, 提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC); 和 (b) 活性部分 (例如, 治疗性部分或可检测部分), 其中所述抗体或其片段包含: (i) 包含 SEQ ID NO:25 的序列的轻链可变结构域; (ii) 包含 SEQ ID NO:26 的序列的轻链可变结构域; (iii) 包含 SEQ ID NO:27 的序列的轻链可变结构域; (iv) 包含 SEQ ID NO:28 的序列的重链可变结构域; (v) 包含 SEQ ID NO:29 的序列的重链可变结构域; 和 (vi) 包含 SEQ ID NO:30 的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中, 提供一种靶向构建体 (或包含构建体的组合物, 如药物组合物), 其中所述靶向构建体包含 (a) 抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂 (如 PE、CL、MDA 和/或 PC); 和 (b) 活性部分 (例如, 治疗性部分或可检测部分), 其中所述抗体或其片段包含: (i) 包含 SEQ ID NO:31 的序列

的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变结构域；(iii) 包含SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域；(iv) 包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中，抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中，磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如，玻璃疣)中。在一些实施方案中，磷脂选自自由以下组成的组：磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中，磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中，磷脂是中性的。在一些实施方案中，磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中，磷脂是氧化的。在一些实施方案中，构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中，构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中，构建体是融合蛋白。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0222] 在一些实施方案中，提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)；和(b) 活性部分(例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:25的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:26的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:27的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:28的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:29的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:30的重链CDR3。在一些实施方案中，提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)；和(b) 活性部分(例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:31的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:32的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:33的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:28的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:29的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:30的重链CDR3。在一些实施方案中，抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中，抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中，磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如，玻璃疣)中。在一些实施方案中，磷脂选自自由以下组成的组：磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中，磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中，磷脂是中性的。在一些实施方案中，磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中，磷脂是氧化的。在一些实施方案中，构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中，构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中，构建体是融合蛋白。在一些实施方案中，靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0223] 在一些实施方案中，提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物，如药物组合物)，其中所述靶向构建体包含(a) 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)；和(b) 活性部分(例如，治疗性部分或可检测部分)，其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:34的轻链可变结构域。在一些实施方案中，提供一种靶向构建

体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分可检测部分),其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:35的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0224] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:34的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:35的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0225] 在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其

片段是具有SEQ ID NO:37的序列的scFv。在一些实施方案中,提供一种靶向构建体(或包含构建体的组合物,如药物组合物),其中所述靶向构建体包含(a)抗体或其片段,其中所述抗体或其片段特异性地结合磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC);和(b)活性部分(例如,治疗性部分或可检测部分),其中所述抗体或其片段是具有SEQ ID NO:38的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或其片段竞争性地抑制病原性抗体(如单克隆抗体C2)与磷脂的结合。在一些实施方案中,抗体或其抗体片段与结合磷脂的病原性抗体(如单克隆抗体C2)结合相同的表位。在一些实施方案中,磷脂存在于个体中的经历组织损伤(如非缺血性损伤)和/或氧化损伤(或处于经历所述损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂选自由以下组成的组:磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)和磷脂酰胆碱(PC)。在一些实施方案中,磷脂是丙二醛(MDA)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂是氧化的。在一些实施方案中,构建体包含含有治疗性部分(如补体抑制剂)的活性部分。在一些实施方案中,构建体包含为可检测部分的活性部分。在一些实施方案中,构建体是融合蛋白。在一些实施方案中,靶向部分和活性部分通过接头(如肽接头)连接。

[0226] 在一些实施方案中,靶向部分和活性部分直接键合、共价键合或可逆地键合。

[0227] 靶向部分(例如,识别损伤相关的新表位的抗体)

[0228] 本文所述的抗体或其片段(当在靶向构建体的背景下提供时还被称为靶向部分)特异性地结合膜联蛋白IV或磷脂。

[0229] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段(当在靶向构建体的背景下提供时还被称为靶向部分)特异性地结合膜联蛋白IV。

[0230] 膜联蛋白IV属于为Ca²⁺和磷脂蛋白质的蛋白质家族。膜联蛋白的结构由四个膜联蛋白重复单元(对于膜联蛋白IV,八个)的保守Ca²⁺和膜结合核心与可变N-末端区组成。膜联蛋白是可溶的胞质蛋白,但尽管缺乏明显的信号序列且明显不能进入经典分泌途径,膜联蛋白已在细胞外液中鉴别出或通过了解甚少的结合位点与细胞外表面相关。膜联蛋白IV主要由上皮细胞产生,并且还以高水平存在于肺、肠、胰腺、肝、光感受器和肾中。Rescher等人,J.Cell Sci.,(2004),117:2631-2639,Kulik等人.,(2009) J Immunol.182(9):5363-73和Zernii等人,Biochemistry (Mosc).,(2003),68(1):129-60。它还存在于玻璃疣中,玻璃疣是年龄相关性黄斑变性(AMD)的标志(Rayborn,M.E.,Sakaguchi,S.,Shadrach,K.,Crabb,J.W.,和Hollyfield,J.G.(2006) Ret Degen Dis Adv Exp Med Bio 572,75-78)。

[0231] 在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中)。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体的经历非缺血性损伤(或处于经历非缺血性损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体的经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体的经历缺血-再灌注损伤(或处于经历缺血-再灌注损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。

[0232] 在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体中的经历组织损伤(或处于经历组织

损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体的经历非缺血性损伤(或处于经历非缺血性损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体的经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV存在于个体的经历缺血-再灌注损伤(或处于经历缺血-再灌注损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,膜联蛋白IV由有核细胞(如哺乳动物细胞)产生。在一些实施方案中,膜联蛋白IV是重组蛋白。

[0233] 在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于个体中的经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中),但不存在于未经历组织损伤(或不处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于个体中的经历非缺血性损伤(或处于经历非缺血性损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中),但不存在于未经历非缺血性损伤(或不处于经历非缺血性损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上,但不存在于未经历氧化损伤(或不处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于个体中的经历缺血-再灌注损伤(或处于经历缺血-再灌注损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(和/或病理结构中),但不存在于未经历缺血再灌注损伤(或不处于经历缺血再灌注损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上。

[0234] 在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于个体中的经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历组织损伤(或不处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于个体中的经历非缺血性损伤(或处于经历非缺血性损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历非缺血性损伤(或不处于经历非缺血性损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历氧化损伤(或不处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,针对抗体或其片段的膜联蛋白IV上的表位存在于个体中的经历缺血-再灌注损伤(或处于经历缺血-再灌注损伤的风险)的组织中或邻近所述组

组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历缺血再灌注损伤(或不处于经历缺血再灌注损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。

[0235] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段(当在靶向构建体的背景下提供时还被称为靶向部分)特异性地结合磷脂,所述磷脂包括但不限于磷脂酰乙醇胺(PE)、心磷脂(CL)、磷脂酰胆碱(PC)和丙二醛(MDA)。PE、CL和PC是存在于生物膜中的磷脂类别。磷脂酰胆碱更常存在于细胞膜的外质膜或外小叶中。认为它通过磷脂酰胆碱转移蛋白(PCTP)在细胞内在膜之间转运。磷脂由胆碱头基和甘油磷酸与多种脂肪酸组成,一种是饱和脂肪酸且一种是不饱和脂肪酸。PE由用两种脂肪酸酯化的甘油与磷酸的组合组成。而磷酸酯基团在磷脂酰胆碱中与胆碱组合,它在PE中与乙醇胺组合。两种脂肪酸可以是相同或不同的,并且通常在1,2位(但它们可在1,3位)。心磷脂(IUPAC名称“1,3-二(sn-3'-磷脂酰基)-sn-甘油”)是线粒体内膜的重要组分,其中它占总脂质组合物的约20%。心磷脂(CL)是一种双磷脂酰甘油脂质,其中两个磷脂酰甘油与甘油主链在中心连接以形成二聚体结构。在大多数动物组织中,心磷脂包含18-碳脂肪烷基链,其中它们中的每一个上具有2个不饱和键。已经提出(18:2)4酰基链构型是哺乳动物线粒体中CL与内膜蛋白的高亲和力的重要结构要求。磷脂积聚已在患有年龄相关性黄斑变性的眼睛中显示(Lommatzsch,等人(2008) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.246(6):803-10)。

[0236] 丙二醛(MDA)从活性氧物种(ROS)产生,并且如此通常在体内作为氧化应激的生物标志物测定。活性氧物种降解多不饱和脂质,从而形成丙二醛。这种化合物是活性醛并且是在细胞中引起毒性应激并且形成被称为高级脂质氧化终产物(ALE)的共价蛋白质加合物的许多活性亲电子试剂物种之一。这种醛的产生还用作测量生物体中氧化应激水平的生物标志物。MDA修饰已在患有年龄相关性黄斑变性的眼睛和湿性AMD的小鼠激光诱导的CNV模型中显示(Weissman等人(2011) *Nature*.478(7367):76-81)。

[0237] 在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)存在于个体中经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构例如玻璃疣中)。在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)存在于个体的经历眼病(或处于经历眼病的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构例如玻璃疣中)。在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)存在于个体的经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上(或病理结构例如玻璃疣中)。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)是氧化的。

[0238] 在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)存在于个体中经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的眼组织中或邻近所述眼组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)存在于个体的经历眼病(或处于经历眼病的风险)的眼组织中或邻近所述眼组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)存在于个体的经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,磷脂是中性的。在一些实施方案中,磷脂是带正电荷的。在一些

实施方案中,磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)是氧化的。

[0239] 在一些实施方案中,抗体或其片段所结合的磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)的表位存在于个体中的经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历组织损伤(或不处于经历组织损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,抗体或其片段所结合的磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)的表位存在于个体中的经历眼病(或处于经历眼病的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历非眼病(或不处于经历非眼病的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,抗体或其片段所结合的磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)上的表位存在于经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历氧化损伤(或不处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面上或病理结构(例如,玻璃疣)中。

[0240] 在一些实施方案中,抗体或其片段所结合的磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)的表位存在于个体中的经历组织损伤(或处于经历组织损伤的风险)的眼组织中或邻近所述眼组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历组织损伤(或不处于经历组织损伤的风险)的眼组织中或邻近所述眼组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,抗体或其片段所结合的磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)的表位存在于个体中的经历眼病(或处于经历眼病的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历非眼病(或不处于经历非眼病的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。在一些实施方案中,抗体或其片段所结合的磷脂(如PE、CL、MDA和/或PC)上的表位存在于经历氧化损伤(或处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中,但不存在于未经历氧化损伤(或不处于经历氧化损伤的风险)的组织中或邻近所述组织的细胞的表面、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)上或病理结构(例如,玻璃疣)中。

[0241] 如本文所述,在如本文所述的特定组织中或邻近所述组织的细胞(和/或病理结构)包括为组织或器官的一部分或邻近组织或器官(靠近、直接接近、在其微环境中、邻接、侧接、毗邻)的细胞(和/或病理结构,例如玻璃疣),其中某些事件(如非缺血性损伤或氧化损伤)将会发生、可能发生或开始发生。如本文所述,在如本文所述的特定组织中或邻近所述组织的细胞、基底膜(例如,布鲁赫氏膜)或病理结构(例如,玻璃疣)包括为组织或器官的一部分或邻近组织或器官(靠近、直接接近、在其微环境中、邻接、侧接、毗邻)的细胞,其中某些事件(如非缺血性损伤或氧化损伤)将会发生、可能发生或开始发生。在相邻细胞的情况下,细胞充分处于特定组织或器官的微环境内,以使得氧化损伤和/或炎症的病状影响相邻细胞以及特定组织或器官。这种细胞可展示应激的迹象,包括但不限于展示“应激蛋白”(例如,热休克蛋白和与细胞应激反应相关的其他蛋白,包括膜联蛋白)或细胞表面上的其他分子(磷脂、碳水化合物部分),包括展示蛋白质、修饰的蛋白质或细胞表面上的其他分子的不正常水平。这种细胞可正经历细胞凋亡或显示细胞凋亡的迹象,这类迹象包括细胞的

形态改变、染色质凝聚、细胞信号转导蛋白相互作用的变化、细胞内钙水平的变化、磷脂的外化、细胞脱离、细胞表面结构的损失等。

[0242] 如本文所用,术语“选择性地结合”是指一个蛋白质与另一个蛋白质、脂质或碳水化合物部分的特异性结合(例如,抗体、其片段或结合配偶体与抗原的结合),其中如通过任何标准测定(例如,免疫测定)所测量,结合的水平在统计学上显著高于所述测定的背景对照。例如,当进行免疫测定时,对照通常包括仅包含抗体或抗原结合片段(即,不存在抗原)的反应孔/管,其中抗体或其抗原结合片段在不存在抗原时的反应性量(例如,与孔的非特异性结合)被认为是背景。可使用本领域中标准的多种方法来测量结合,所述方法包括但不限于:蛋白质印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、免疫沉淀、表面等离子体共振、化学发光、荧光偏振、磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱、微细胞术、微阵列、显微术、荧光活化细胞分选(FACS)和流式细胞术。

[0243] 根据本发明,给定蛋白或肽或其他分子的“表位”通常关于抗体被定义为较大分子的一部分或较大分子上的位点,其中抗体或其抗原结合片段将结合所述较大分子并且将产生针对所述较大分子的抗体。术语表位可与术语给定蛋白质或抗原的“抗原决定簇”、“抗体结合位点”或“保守的结合表面”互换使用。更具体地,表位可由参与抗体结合的氨基酸残基以及还有由其在三维空间中的构象(例如,构象表位或保守的结合表面)来限定。表位可被包括在小至约4-6个氨基酸残基的肽中,或可被包括在蛋白质的较大区段中,并且当提及表位的三维结构、尤其是关于抗体结合表位时,不需要由连续氨基酸残基组成。抗体结合表位常常是构象表位,而不是序列表位(即,线性表位),或换言之,由氨基酸残基限定的表位以三维形式排列在抗体所结合的蛋白质或多肽的表面上。如上所述,构象表位不由氨基酸残基的连续序列组成,而是相反地,所述残基或许在蛋白质一级序列中广泛分隔开,并且在三维空间中以处于其天然构象的蛋白质折叠的方式集合在一起以形成结合表面。

[0244] 可使用本领域的标准技术(例如,竞争性ELISA或其他结合测定)进行竞争测定。例如,可检测竞争性抑制剂并且通过其抑制抗原与已知的标记抗体(例如,mAb B4)或与血清或已知包含针对特定抗原的抗体(例如,已知包含针对抗原的天然抗体的血清)的另一种组合物的结合的能力定量。

[0245] 根据本发明,抗体特征在于它们包含免疫球蛋白结构域并且因此,它们是蛋白质的免疫球蛋白超级族的成员。一般来说,抗体分子包含两种类型的链。一种类型的链被称为重链或H链,并且另一种类型被称为轻链或L链。两种链以等摩尔比率存在,其中每个抗体分子通常具有两个H链和两个L链。两个H链通过二硫键连接在一起,并且每个H链通过二硫键连接至L链。仅存在被称为 λ 链(λ)和 κ 链(κ)的两种类型的L链。相比之下,存在被称为同种型的五种主要H链类别。五种类别包括免疫球蛋白M(IgM或 μ)、免疫球蛋白D(IgD或 δ)、免疫球蛋白G(IgG或 γ)、免疫球蛋白A(IgA或 α)和免疫球蛋白E(IgE或 ϵ)。此类同种型之间的独特特征由免疫球蛋白的恒定结构域限定,并且在下文详细讨论。人免疫球蛋白分子包括九种同种型,IgM,IgD,IgE,IgG的四种亚类包括IgG1(γ 1)、IgG2(γ 2)、IgG3(γ 3)和IgG4(γ 4),以及IgA的两种亚类包括IgA1(α 1)和IgA2(α 2)。在人中,IgG亚类3和IgM是最有效的补体活化剂(经典补体系统),而IgG亚类1且在甚至更小程度上亚类2是经典补体系统的中度至低度活化剂。IgG4亚类不会活化补体系统(经典或旁路)。已知活化旁路补体系统的唯一人免疫

球蛋白同种型是IgA。在小鼠中,IgG亚类是IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。鼠IgG1不会活化补体,而IgG2a、IgG2b和IgG3是补体活化剂。

[0246] 免疫球蛋白分子的每个H链或L链包含两个区,所述区被称为L链可变结构域(VL结构域)和L链恒定结构域(CL结构域),以及H链可变结构域(VH结构域)和H链恒定结构域(CH结构域)。完整的CH结构域包含三个亚结构域(CH1、CH2、CH3)和铰链区。一条H链和一条L链一起可形成具有免疫球蛋白可变区的免疫球蛋白分子的臂。完整的免疫球蛋白分子包含两个缔合的(例如,二硫键连接的)臂。因此,整个免疫球蛋白的每个臂包含VH+L区和CH+L区。如本文所用,术语“可变区”或“V区”是指VH+L区(也被称为Fv片段)、VL区或VH区。此外如本文所用,术语“恒定区”或“C区”是指CH+L区、CL区或CH区。

[0247] 免疫球蛋白分子的抗原特异性由可变区或V区的氨基酸序列赋予。因此,不同免疫球蛋白分子的V区可取决于其抗原特异性而显著不同。V区的某些部分比其他部分更保守,并且被称为构架区(FR区)。相比之下,V区的某些部分高度可变,并且被命名为高变区。当VL结构域和VH结构域在免疫球蛋白分子中配对时,来自每个结构域的高变区缔合,并且产生形成抗原结合位点(抗原组合位点)的高变环。由此,高变环决定免疫球蛋白的特异性,并且被称为互补性决定区(CDR),因为它们的表面是与抗原互补的。

[0248] L链和H链V基因区段均含有三个实质氨基酸序列变异性区域。这类区域分别被称为L链CDR1、CDR2和CDR3,以及H链CDR1、CDR2和CDR3。L链CDR1的长度可基本上在不同VL区之间变化。例如,CDR1的长度可从约7个氨基酸至约17个氨基酸变化。相比之下,L链CDR2和CDR3的长度通常不会在不同VL区之间变化。H链CDR3的长度可基本上在不同VH区之间变化。例如,CDR3的长度可从约1个氨基酸至约20个氨基酸变化。每个H链和L链CDR区由FR区侧接。

[0249] 用蛋白酶限制性消化免疫球蛋白可产生两个片段。抗原结合片段被称为Fab、Fab'或F(ab')₂片段。缺乏结合抗原的能力的片段被称为Fc片段。Fab片段包含免疫球蛋白分子的一个臂,其含有与VH区配对的L链(VL+CL结构域)以及CH区的一部分(CH1结构域)。Fab'片段对应于Fab片段,其中铰链区的一部分连接至CH1结构域。F(ab')₂片段对应于两个Fab'片段,所述两个Fab'片段通常通过一般在铰链区中的二硫键彼此共价连接。

[0250] 本发明的分离抗体可包括含有此类抗体的血清,或已被纯化至不同程度的抗体。本发明的全抗体可以是多克隆的或单克隆的。或者,全抗体的功能等效物,如其中一个或多个抗体结构域被截短或缺失的抗原结合片段(例如,Fv、Fab、Fab'或F(ab')₂片段)以及遗传工程化抗体或其抗原结合片段,包括单链抗体(例如,scFv)、人源化抗体、可结合一个以上表位的抗体(例如,双特异性抗体)或可结合一个或多个不同抗原的抗体(例如,双或多特异性抗体)也可在本发明中使用。

[0251] 在一些实施方案中,本文提供的靶向构建体的靶向部分包含抗体。在一些实施方案中,靶向部分是scFv。在一些实施方案中,靶向部分是包含(i) SEQ ID NO:13的轻链可变结构域;和/或(ii) SEQ ID NO:15的重链可变结构域的scFv。在一些实施方案中,靶向部分是包含(i) SEQ ID NO:14的轻链可变结构域;和/或(ii) SEQ ID NO:16的重链可变结构域的scFv。在一些实施方案中,靶向部分是具有SEQ ID NO:17的序列的scFv。在一些实施方案中,靶向部分是具有SEQ ID NO:18的序列的scFv。

[0252] 在一些实施方案中,靶向部分是包含(i) SEQ ID NO:34的轻链可变结构域;和/或(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域的scFv。在一些实施方案中,靶向部分是包含(i) SEQ

ID NO:35的轻链可变结构域;和/或(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域的scFv。在一些实施方案中,靶向部分是具有SEQ ID NO:37的序列的scFv。在一些实施方案中,靶向部分是具有SEQ ID NO:38的序列的scFv。

[0253] 在一个实施方案中,本发明的靶向构建体包括人源化抗体或其片段(如人源化scFv)。人源化抗体或其片段是具有来源于非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点的分子,所述分子的剩余免疫球蛋白源性部分源自人免疫球蛋白。抗原结合位点可包含融合至人恒定结构域上的完整可变区;或仅接枝至适当的人可变结构域中的构架区上的互补决定区(CDR)。可产生人源化抗体或其片段,例如通过使用遗传工程化技术如CDR接枝来建模抗体可变结构域且产生抗体。用于产生人源化抗体的各种技术的说明见于例如Morrison等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-55;Whittle等人.(1987)Prot.Eng.1:499-505;Co等人(1990)J.Immunol.148:1149-1154;Co等人.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:2869-2873;Carter等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.89:4285-4289;Routledge等人(1991)Eur.J.Immunol.21:2717-2725和PCT专利公布号WO 91/09967;WO 91/09968和WO 92/113831中。

[0254] 在一些实施方案中,抗体或其片段不会活化补体活化。通过降低或消除抗体或其片段的补体活化活性来修饰抗体或其片段的方法是本领域中已知的(Tan等人(1990)Proc Natl Acad Sci USA 87,162-166)。

[0255] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列、SEQ ID NO:2的序列或SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:4的序列、SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列、SEQ ID NO:8的序列或SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域;和/或(ii)包含SEQ ID NO:10的序列、SEQ ID NO:11的序列或SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。

[0256] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域。

[0257] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域;和(iii)包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。

[0258] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;(iii)包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;(iv)包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域;(v)包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域;和(vi)包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i)包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域;(ii)包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域;(iii)包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域;(iv)包

含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。

[0259] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:1的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:2的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:3的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:4的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:5的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:6的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:7的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:8的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:9的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:10的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:11的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:12的重链CDR3。

[0260] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:16的重链可变结构域。

[0261] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:13的轻链可变结构域；和(ii) SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:14的轻链可变结构域；和(ii) SEQ ID NO:16的重链可变结构域。

[0262] 在一些实施方案中,抗体或片段是具有SEQ ID NO:17的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或片段是具有SEQ ID NO:18的序列的scFv。

[0263] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:25的序列、SEQ ID NO:26的序列或SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域；和/或(ii) 包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:31的序列、SEQ ID NO:32的序列或SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域；和/或(ii) 包含SEQ ID NO:28的序列、SEQ ID NO:29的序列或SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。

[0264] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:25的序列的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:26的序列的轻链可变结构域；和(iii) 包含SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:31的序列的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变结构域；和(iii) 包含SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域。

[0265] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域；和(iii) 包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。

[0266] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:25的序列的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:26的序列的轻链可变结构域；(iii) 包含SEQ ID NO:27的序列的轻链可变结构域；(iv) 包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:30的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:31的序列的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变结构域；(iii) 包含SEQ ID NO:33的序列的轻链可变结构域；(iv) 包含SEQ ID NO:28的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:29的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:30

的序列的重链可变结构域。

[0267] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) SEQ ID NO:25的轻链CDR1;(ii) SEQ ID NO:26的轻链CDR2;(iii) SEQ ID NO:27的轻链CDR3;(iv) SEQ ID NO:28的重链CDR1;(v) SEQ ID NO:29的重链CDR2;和(vi) SEQ ID NO:30的重链CDR3。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合磷脂,并且包含:(i) SEQ ID NO:31的轻链CDR1;(ii) SEQ ID NO:32的轻链CDR2;(iii) SEQ ID NO:33的轻链CDR3;(iv) SEQ ID NO:28的重链CDR1;(v) SEQ ID NO:29的重链CDR2;和(vi) SEQ ID NO:30的重链CDR3。

[0268] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:34的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含SEQ ID NO:35的轻链可变结构域。

[0269] 在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:34的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段包含:(i) SEQ ID NO:35的轻链可变结构域;和(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。

[0270] 在一些实施方案中,抗体或片段是具有SEQ ID NO:37的序列的scFv。在一些实施方案中,抗体或片段是具有SEQ ID NO:38的序列的scFv。

[0271] 在一些实施方案中,抗体或其片段不会活化补体活化。通过降低或消除抗体或其片段的补体活化活性来修饰抗体或其片段的方法是本领域中已知的(Tan等人(1990) Proc Natl Acad Sci USA 87,162-166)。

[0272] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:1的序列、SEQ ID NO:2的序列或SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;和/或(ii) 包含SEQ ID NO:4的序列、SEQ ID NO:5的序列或SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:7的序列、SEQ ID NO:8的序列或SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域;和/或(ii) 包含SEQ ID NO:10的序列、SEQ ID NO:11的序列或SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。

[0273] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域。

[0274] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:4的序列的重链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域;和(iii) 包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。

[0275] 在一些实施方案中,抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV,并且包含:(i) 包含SEQ ID NO:1的序列的轻链可变结构域;(ii) 包含SEQ ID NO:2的序列的轻链可变结构域;(iii) 包含SEQ ID NO:3的序列的轻链可变结构域;(iv) 包含SEQ ID NO:4的序列的重链可

变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:5的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:6的序列的重链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV，并且包含：(i) 包含SEQ ID NO:7的序列的轻链可变结构域；(ii) 包含SEQ ID NO:8的序列的轻链可变结构域；(iii) 包含SEQ ID NO:9的序列的轻链可变结构域；(iv) 包含SEQ ID NO:10的序列的重链可变结构域；(v) 包含SEQ ID NO:11的序列的重链可变结构域；和(vi) 包含SEQ ID NO:12的序列的重链可变结构域。

[0276] 在一些实施方案中，抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV，并且包含：(i) SEQ ID NO:1的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:2的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:3的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:4的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:5的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:6的重链CDR3。在一些实施方案中，抗体或其片段特异性地结合膜联蛋白IV，并且包含：(i) SEQ ID NO:7的轻链CDR1；(ii) SEQ ID NO:8的轻链CDR2；(iii) SEQ ID NO:9的轻链CDR3；(iv) SEQ ID NO:10的重链CDR1；(v) SEQ ID NO:11的重链CDR2；和(vi) SEQ ID NO:12的重链CDR3。

[0277] 在一些实施方案中，抗体或其片段包含SEQ ID NO:13的轻链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段包含SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段包含SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段包含SEQ ID NO:16的重链可变结构域。

[0278] 在一些实施方案中，抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:13的轻链可变结构域；和(ii) SEQ ID NO:15的重链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或其片段包含：(i) SEQ ID NO:14的轻链可变结构域；和(ii) SEQ ID NO:16的重链可变结构域。

[0279] 在一些实施方案中，抗体或其片段是scFv。在一些实施方案中，靶向部分是包含(i) SEQ ID NO:34的轻链可变结构域；和/或(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域的scFv。在一些实施方案中，scFv包含(i) SEQ ID NO:35的轻链可变结构域；和/或(ii) SEQ ID NO:36的重链可变结构域。在一些实施方案中，抗体或片段是具有SEQ ID NO:37的序列的scFv。在一些实施方案中，抗体或片段是具有SEQ ID NO:38的序列的scFv。

[0280] 治疗性部分和补体调节剂

[0281] 在某些实施方案中，靶向构建体包含为治疗性部分的活性部分。在一些实施方案中，使治疗性部分靶向或呈递至由靶向部分识别的结合配偶体例如膜联蛋白IV、PE、PC、MDA和/或CL的附近空间。

[0282] 在一些实施方案中，治疗性部分包含如用于治疗黄斑水肿的抗-VEGF药物，包括但不限于例如，单克隆抗体贝伐单抗(Avastin)、贝伐单抗的衍生物如雷珠单抗(Lucentis)、抑制由VEGF刺激的酪氨酸激酶的可口服的小分子(例如，拉帕替尼(Tykerb)、舒尼替尼(Sutent)、索拉非尼(Nexavar)、阿西替尼和帕唑帕尼)以及阿柏西普(aflibercept)(EYLEA)(由融合至人IgG1的Fc部分的人VEGF受体1和2细胞外结构域的部分组成的重组融合蛋白)。

[0283] 在某些实施方案中，靶向构建体中的治疗性部分是如用于治疗CMV视网膜炎的抗病毒剂，包括但不限于例如更昔洛韦、膦甲酸、福米韦生、缙更昔洛韦和西多福韦。在某些实施方案中，靶向构建体中的治疗性部分是如用于治疗葡萄膜炎的皮质类固醇或抗-TNF α 剂，包括但不限于例如泼尼松、泼尼松龙、英夫利昔单抗(Remicade)、阿达木单抗(Humira)、赛妥珠单抗(Cimzia)和戈利木单抗(Simponi)、依那西普(Enbrel)、黄嘌呤衍生物(例如，己酮

可可碱)和安非他酮。在一些实施方案中,治疗剂是用于治疗青光眼的药剂,包括但不限于例如前列腺素、前列腺素类似物(如米索前列醇、拉坦前列素、比马前列素或曲伏前列素)、 β 阻断剂(如噻吗洛尔、levobumolol或倍他洛尔)、碳酸酐酶抑制剂(如多佐胺(Trusopt)、布林佐胺(Azopt)或乙酰唑胺(Diamox))、缩瞳剂(如毛果芸香碱)、胆碱能剂以及用于预防视网膜神经节细胞变性的神经营养因子。

[0284] 在某些实施方案中,治疗剂是用于治疗糖尿病性视网膜病变的药剂,包括但不限于例如抗-VEGF药物或蛋白激酶C抑制剂。在某些实施方案中,治疗剂是用于治疗色素性视网膜炎的药剂,例如睫状神经营养因子(CNTF)、碳酸酐酶抑制剂乙酰唑胺、钙通道阻滞剂(如地尔硫卓)和免疫抑制剂(如果存在抗视黄醛抗体)。

[0285] 在某些实施方案中,治疗剂是用于治疗增生性玻璃体视网膜病变的药剂,包括但不限于例如米诺环素和柔红霉素。

[0286] 将靶向部分如B4或C2抗体或其抗体结合片段缀合至药物(如本文所述的药物)的方法是本领域中已知的并且在例如McDonagh等人(2006) *Prot Engineer Design Select* 19(7):299-307;Hurwitz等人(1975) *Cancer Res* 35:1175-1181;Garnett等人(1983) *Int J Cancer* 31(5):661-670;Kovtun,等人(2007) *Cancer Letters* 255(2):232-40;Teicher等人(2012) *N Engl J Med* 367(19):1847-8等中有所描述。

[0287] 在一些实施方案中,治疗性部分是补体调节剂。补体调节剂的一个实例是补体抑制剂。在一些实施方案中,这种治疗性部分是补体抑制剂。因此,如本文所用,术语“治疗性部分”可涵盖补体调节剂和补体抑制剂两者。

[0288] 在一些实施方案中,本文所述构建体包含补体调节剂,如补体抑制剂。

[0289] 如本文所用,术语“补体抑制剂”是指降低或消除补体活性的任何化合物、组合物或蛋白质。补体活性的降低可为递增的(例如,活性的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%降低)或完全的。例如,在一些实施方案中,补体抑制剂可在标准体外红细胞溶血测定或体外CH50eq测定中将补体活性抑制至少10%(例如,至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%或更高)。参见例如Kabat和Mayer(编),“*Experimental Immunochimistry*,第2版,”135-240, Springfield, IL, CC Thomas(1961),第135-139页,或所述测定的常规变型如鸡红细胞溶血,如例如Hillmen等人(2004) *N Engl J Med* 350(6):552中所描述。

[0290] CH50eq测定是用于测量血清中的总经典补体活性的方法。这种测试是溶解测定,其使用抗体敏化红细胞作为经典补体途径的活化剂以及测试血清的各种稀释液来测定给出50%溶解(CH50)所需的量。可例如使用分光光度计来测定溶血百分比。CH50eq测定提供对末端补体复合物(TCC)形成的间接测量,因为TCC本身直接负责所测量的溶血。

[0291] 所述测定是熟知的并且通常由本领域的技术人员实践。简言之,为了活化经典补体途径,将未稀释的血清样品(例如,人血清样品)添加至含有抗体敏化红细胞的微量测定孔中以从而产生TCC。接着,将活化的血清在微量测定孔中稀释,所述孔涂覆有捕获试剂(例如,结合TCC的一种或多种组分的抗体)。存在于活化样品中的TCC结合涂覆微量测定孔的表面的单克隆抗体。洗涤所述孔并且将可检测地标记并且识别结合的TCC的检测试剂添加至每个孔。可检测的标记可以是例如荧光标记或酶标记。测定结果以CH50单位当量/毫升(CH50U Eq/mL)表示。

[0292] 用于检测和/或测量体外补体活性的另外的方法在工作实施例列出且例示。

[0293] 在一些实施方案中,本文所述的补体抑制剂是凝集素途径的特异性抑制剂。在一些实施方案中,补体抑制剂是旁路途径的特异性抑制剂。在一些实施方案中,补体抑制剂是经典途径的特异性抑制剂。

[0294] 在一些实施方案中,补体抑制剂是可溶性或膜结合蛋白,例如像膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF/CD55)、CD59、小鼠补体受体1-相关基因/蛋白质y(Crry)、人补体受体1(CR1)或因子H或因子I,或对补体途径的组分具有特异性的抗体例如像依库珠单抗(抗-CS抗体,以商品名Soliris®销售)、培克珠单抗(依库珠单抗的抗原结合片段)、抗因子B抗体(如ATCC保藏号PTA-6230产生的单克隆抗体1379)、抗备解素抗体、抗因子D抗体、抗MASP抗体、抗MBL抗体等(参见下文)。或者,补体抑制剂可以是小分子或线性或环状肽,例如像康普塔汀、N-乙酰基天冬氨酰基谷氨酸(NAAGA)等。在一些实施方案中,补体抑制剂选自由以下组成的组:抗C5抗体、依库珠单抗、培克珠单抗、抗C3b抗体、抗C6抗体、抗C7抗体、抗因子B抗体、抗因子D抗体和抗备解素抗体、人膜辅因子蛋白(MCP)、人衰变加速因子(DAF)、小鼠衰变加速因子(DAF)、人CD59、小鼠CD59、小鼠CD59同种型B、小鼠Crry、人CR1、因子I、人因子H、小鼠因子H以及任何前述物质的生物活性片段。

[0295] 如本文所用,术语“膜辅因子蛋白”、“MCP”或“CD46”是指广泛分布的C3b/C4b结合细胞表面糖蛋白,其抑制宿主细胞上的补体激活并且充当I因子介导的C3b和C4b(包括其同源物)裂解的辅因子。T.J.Oglesby等人,J.Exp.Med.(1992)175:1547-1551。MCP属于已知为补体活化的调节剂(“RCA”)的家族。家族成员共享某些结构特征,包括不同数目的短共有重复序列(SCR)结构域,所述结构域长度通常为60与70个氨基酸之间。从MCP的氨基末端开始,MCP包含四个SCR,即富含丝氨酸/苏氨酸/脯氨酸的区域、功能不明确区域、跨膜疏水结构域、细胞质锚区和胞质尾区。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且人MCP或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。

[0296] SEQ ID NO:44代表全长人MCP氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P15529)。氨基酸1-34对应于信号肽,氨基酸35-343对应于细胞外结构域,氨基酸344-366对应于跨膜结构域,并且氨基酸367-392对应于细胞质结构域。在细胞外结构域中,氨基酸35-96对应于SCR1,氨基酸97-159对应于SCR2,氨基酸160-225对应于SCR3,氨基酸226-285对应于SCR4,并且氨基酸302-326对应于富含丝氨酸/苏氨酸的结构域。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且MCP或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。如本文所用,术语MCP的“生物活性”片段是指缺乏细胞质结构域和跨膜结构域两者的任何可溶性片段,包括以下片段:包含1、2、3或4个SCR结构域或者基本上由其组成或者由其组成,有或没有富含丝氨酸/苏氨酸的结构域,具有全长人MCP蛋白的一些或全部补体抑制活性。在一些实施方案中,补体抑制剂部分包含全长人MCP(SEQ ID NO:44的氨基酸35-392)、人MCP的细胞外结构域(SEQ ID NO:44的氨基酸35-343)或人MCP的SCR1-4(SEQ ID NO:44的氨基酸35-285)。

[0297] 衰变加速因子(还被称为CD55(DAF/CD55)(SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46))是约70千道尔顿(kDa)的膜结合糖蛋白,其抑制宿主细胞上的补体活化。如同几种其他补体调控蛋白,DAF包含被称为短共有重复序列(SCR)的几个约60个氨基酸的重复基序。

[0298] 如本文所用,术语“衰变加速因子”、“DAF”或“CD55”指70千道尔顿(“kDa”)的膜糖

蛋白,其包含四个短共有重复序列(SCR)结构域,随后是从膜表面提升分子的位于C-末端的富含重度O-糖基化丝氨酸/苏氨酸的结构域,随后是糖基磷脂酰肌醇(“GPI”)锚。通过解离裂解补体蛋白C3和扩增补体级联所需的膜结合C3转化酶,DAF保护细胞表面免于补体活化。DAF阻止旁路和经典补体途径的C3转化酶和C5转化酶两者的组装或加速其衰变。

[0299] SEQ ID NO:45代表全长人DAF氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P08173);SEQ ID NO:46代表全长小鼠DAF氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号Q61475)。在人DAF序列中,氨基酸1-34对应于信号肽,氨基酸35-353出现在成熟蛋白质中,并且氨基酸354-381在翻译后从多肽中除去。在成熟蛋白质内,氨基酸35-96对应于SCR 1,氨基酸96-160对应于SCR 2,氨基酸161-222对应于SCR 3,氨基酸223-285对应于SCR 4并且氨基酸287-353对应于富含O-糖基化丝氨酸/苏氨酸的结构域。GPI锚在353位的丝氨酸处连接至人DAF。在小鼠DAF序列中,氨基酸1-34对应于信号肽,氨基酸35-362出现在成熟蛋白质中,并且氨基酸363-390在翻译后从多肽中除去。在成熟蛋白质内,氨基酸35-96对应于SCR 1,氨基酸97-160对应于SCR 2,氨基酸161-222对应于SCR 3,氨基酸223-286对应于SCR 4并且氨基酸288-362对应于富含O-糖基化丝氨酸/苏氨酸的结构域。GPI锚在362位的丝氨酸处连接至小鼠DAF。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且DAF或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。如本文所用的,术语DAF的“生物活性片段”是指缺乏GPI锚和/或其所连接的氨基酸(即Ser-353)的任何DAF片段,包括全长DAF蛋白的任何片段,所述片段包含1、2、3或4个SCR结构域、基本上由其组成或由其组成,有或没有富含O-糖基化丝氨酸/苏氨酸的结构域,具有全长DAF蛋白的一些或全部补体抑制活性。

[0300] 如本文所用,术语“CD59”是指膜结合的128个氨基酸的糖蛋白,其有效抑制补体的膜攻击复合物(MAC)。CD59通过在组装期间结合MAC的C8和/或C9组分来起作用,从而最终阻止MAC中心处的渗透孔完全形成所需的C9的多个拷贝的并入。CD59既是N-糖基化的又是O-糖基化的。N-糖基化主要包含有和无氨基乳糖苷的双触角结构或三触角结构以及外臂岩藻糖残基,并在一些位点处存在可变唾液酸化。如同DAF,CD59通过连接至氨基酸102处的天冬酰胺的糖基磷脂酰肌醇(“GPI”)锚被锚定在细胞膜中。已经产生了CD59的可溶形式(sCD59),但它们通常在体外具有低功能活性,特别是在血清存在的情况下,从而表明未修饰的sCD59具有很小或没有治疗功效。参见例如S.Meri等“Structural composition and functional characterization of soluble CD59:heterogeneity of the oligosaccharide and glycosphosphoinositol(GPI) anchor revealed by laser-desorption mass spectrometric analysis,”*Biochem.J.*316:923-935(1996)。

[0301] SEQ ID NO:47代表全长人CD59氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P13987);SEQ ID NO:48代表全长小鼠CD59序列,同种型A(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号055186);SEQ ID NO:49代表全长小鼠CD59序列,同种型B(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P58019)。在人CD59序列中,SEQ ID NO:47的氨基酸1-25对应于前导肽,SEQ ID NO:47的氨基酸26-102对应于成熟蛋白质,并且SEQ ID NO:47的氨基酸103-128在翻译后除去。GPI锚在SEQ ID NO:47的102位的天冬酰胺处连接至CD59。在小鼠CD59序列的同种型A中,SEQ ID NO:48的氨基酸1-23对应于前导肽,SEQ ID NO:48的氨基酸24-96对应于成熟蛋白质,并且SEQ ID NO:48的氨基酸97-123在翻译后除去。GPI锚在SEQ

ID NO:48的96位的丝氨酸处连接至CD59。在小鼠CD59序列的同种型B中,SEQ ID NO:49的氨基酸1-23对应于前导肽,SEQ ID NO:49的氨基酸24-104对应于成熟蛋白质,并且SEQ ID NO:49的氨基酸105-129在翻译后除去。GPI锚在SEQ ID NO:49的104位的天冬酰胺处连接至CD59。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且CD59或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。

[0302] 如本文所用,术语人CD59的“生物活性”片段是指人CD59的缺乏GPI锚和/或其所连接的氨基酸(即Asn-102)的任何片段,包括全长人CD59蛋白的具有全长CD59蛋白的一些或全部补体抑制活性的任何片段;并且术语小鼠CD59的“生物活性”片段是指小鼠CD59同种型A或同种型B的缺乏GPI锚和/或其所连接的氨基酸(即,同种型A的Ser-96,或同种型B的Asp-104)的任何片段,包括任一全长小鼠CD59蛋白同种型的具有全长CD59蛋白的一些或全部补体抑制活性的任何片段。

[0303] 如本文所用,术语“小鼠补体受体1-相关基因/蛋白y”或“Crry”是指调控补体活化的膜结合小鼠糖蛋白,包括其同源物。Crry通过充当补体因子I的辅因子调控补体活化,补体因子I是裂解沉积在宿主组织上的C3b和C4b的丝氨酸蛋白酶。Crry还充当衰变促进因子,从而防止C4b2a和C3bBb(补体级联的扩增转化酶)的形成。

[0304] SEQ ID NO:50代表全长小鼠Crry蛋白氨基酸序列。氨基酸1-40对应于前导肽,SEQ ID NO:50的氨基酸41-483对应于成熟蛋白质,其包含对应于细胞外结构域的SEQ ID NO:50的氨基酸41-405、对应于跨膜结构域的SEQ ID NO:50的氨基酸406-426以及对应于细胞质结构域的SEQ ID NO:50的氨基酸427-483。在细胞外结构域中,SEQ ID NO:50的氨基酸83-143对应于SCR 1,SEQ ID NO:50的氨基酸144-205对应于SCR 2,SEQ ID NO:50的氨基酸206-276对应于SCR3,SEQ ID NO:50的氨基酸277-338对应于SCR 4,并且SEQ ID NO:50的氨基酸339-400对应于SCR 5。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且小鼠Crry蛋白或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。如本文所用,术语小鼠Crry蛋白的“生物活性”片段是指小鼠Crry的缺乏跨膜结构域和细胞质结构域的任何可溶性片段,包括包含1、2、3、4或5个SCR结构域、基本上由其组成或者由其组成的片段,包括全长小鼠Crry蛋白的具有全长Crry蛋白的一些或全部补体抑制活性的任何片段。

[0305] 如本文所用,术语“补体受体1”、“CR1”或“CD35”是指编码2039个氨基酸的具有220千道尔顿(“kDa”)预测分子量的蛋白质的人基因,包括其同源物。所述基因主要表达在红细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和B细胞上,但也存在于一些T淋巴细胞、肥大细胞和肾小球足细胞上。CR1蛋白通常以每个细胞100与1000个之间的拷贝表达。CR1是用于加工和清除补体调理的免疫复合物的主要系统。CR1负调控补体级联、介导免疫粘附和吞噬作用并且抑制经典补体途径和旁路补体途径两者。全长CR1蛋白包含42个氨基酸的信号肽、1930个氨基酸的细胞外结构域、25个氨基酸的跨膜结构域以及43个氨基酸的C-末端细胞质结构域。CR1的细胞外结构域具有25个潜在N-糖基化信号序列,并且包含30个短共有重复序列(“SCR”)结构域,所述短共有重复序列结构域还被称为补体控制蛋白(CCP)重复序列或寿司结构域,各自60至70个氨基酸长。SCR之间的序列同源性在60%-99%之间的范围。30个SCR结构域被进一步分成称为长同源重复序列(“LHR”)的各自编码CR1蛋白的约45kDa区段的四个较长区,其被指定为LHR-A、LHR-B、LHR-C和LHR-D。前三个各自包含七个SCR结构域,而LHR-D包含9个SCR结构域。CR1蛋白的细胞外结构域上的活性位点包括在包含氨基酸42-295的SCR 1-4中

对C3b具有较低亲和力的C4b-结合位点,在包含氨基酸490-745的SCR 8-11中对C4b具有较低亲和力的C3b-结合位点、在包含氨基酸940-1196的SCR 15-18中对C4b具有较低亲和力的C3b-结合位点、以及包含氨基酸1394-1842的SCR 22-28中的C1q-结合位点。

[0306] SEQ ID NO:51代表全长人CR1氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P17927)。氨基酸1-41对应于信号肽,氨基酸42-2039对应于成熟蛋白质,其包含对应于细胞外结构域的氨基酸42-1971、对应于跨膜结构域的氨基酸1972-1996以及对应于细胞质结构域的氨基酸1997-2039。在细胞外结构域中,氨基酸42-101对应于SCR 1,102-163对应于SCR2,氨基酸164-234对应于SCR3,氨基酸236-295对应于SCR4,氨基酸295-355对应于SCR5,氨基酸356-418对应于SCR6,氨基酸419-489对应于SCR7,氨基酸491-551对应于SCR8,氨基酸552-613对应于SCR9,氨基酸614-684对应于SCR10,氨基酸686-745对应于SCR11,氨基酸745-805对应于SCR12,氨基酸806-868对应于SCR13,氨基酸869-939对应于SCR14,氨基酸941-1001对应于SCR15,氨基酸1002-1063对应于SCR16,氨基酸1064-1134对应于SCR17,氨基酸1136-1195对应于SCR18,氨基酸1195-1255对应于SCR 19,氨基酸1256-1318对应于SCR 20,氨基酸1319-1389对应于SCR 21,氨基酸1394-1454对应于SCR 22,氨基酸1455-1516对应于SCR 23,氨基酸1517-1587对应于SCR 24,氨基酸1589-1648对应于SCR 25,氨基酸1648-1708对应于SCR 26,氨基酸1709-1771对应于SCR 27,氨基酸1772-1842对应于SCR 28,氨基酸1846-1906对应于SCR 29,氨基酸1907-1967对应于SCR 30。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且CR1蛋白或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。如本文所用,术语CR1蛋白的“生物活性”片段是指CR1的缺乏跨膜结构域和细胞质结构域的任何可溶性片段,包括包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个SCR结构域、基本上由其组成、或者由其组成的片段,包括全长CR1蛋白的具有全长CR1蛋白的一些或所有补体抑制活性的任何片段。

[0307] 如本文所用,术语“补体因子H”、“H因子”或“FH”是指补体因子H(一种单链多肽血浆糖蛋白),包括其同源物。所述蛋白质由20个约60个氨基酸的保守性短共有重复序列(SCR)结构域组成,所述结构域以如串珠样的连续方式排列,各自由2-6个氨基酸的短接头序列隔开。H因子结合C3b,加速旁路途径C3-转化酶(C3bBb)的衰变,并且充当C3b的蛋白水解失活的辅因子。在存在H因子的情况下,通过I因子蛋白水解导致C3b的裂解和失活。H因子具有至少三个不同的C3b结合结构域,所述结构域位于SCR 1-4、SCR 5-8和SCR 19-20内。每个结构域结合至C3b蛋白内的不同区:N-末端位点结合天然C3b;位于H因子中间区中的第二位点结合C3c片段并且位于SCR19和20内的位点结合C3d区。此外,H因子还含有肝素结合位点,所述位点位于H因子的SCR7、SCR 5-12和SCR20内,并与C3b结合位点的那些重叠。结构和功能分析已经表明,H因子的补体抑制活性结构域位于前4个N-末端SCR结构域内。

[0308] SEQ ID NO:52代表全长人H因子氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P08603);SEQ ID NO:53代表全长小鼠H因子氨基酸序列(参见,例如,UniProtKB/Swiss-Prot.登录号P06909)。在人H因子序列中,SEQ ID NO:52的氨基酸1-18对应于信号肽,并且SEQ ID NO:52的氨基酸19-1231对应于成熟蛋白质。在所述蛋白质内,SEQ ID NO:52的氨基酸21-80对应于SCR 1,SEQ ID NO:52的氨基酸85-141对应于SCR 2,SEQ ID NO:52的氨基酸146-205对应于SCR 3,SEQ ID NO:52的氨基酸210-262对应于SCR 4,并且SEQ ID NO:52的氨基酸267-320对应于SCR 5。在小鼠H因子序列中,SEQ ID NO:53的氨基酸1-18对

应于信号肽,并且SEQ ID NO:53的氨基酸19-1234对应于成熟蛋白质。在所述蛋白质内,SEQ ID NO:53的氨基酸19-82对应于SCR 1,SEQ ID NO:53的氨基酸83-143对应于SCR 2,SEQ ID NO:53的氨基酸144-207对应于SCR 3,SEQ ID NO:53的氨基酸208-264对应于SCR 4,并且SEQ ID NO:53的氨基酸265-322对应于SCR 5。应理解,对于所公开的肽、多肽和蛋白质,存在物种和品系变异,并且H因子或其生物活性片段涵盖所有物种和品系变异。

[0309] 如本文所用,术语H因子的“生物活性”片段是指H因子蛋白的具有全长H因子蛋白的一些或全部补体抑制活性的任何部分,并且包括但不限于包含SCR 1-4、SCR 1-5、SCR 1-8、SCR 1-18、SCR 19-20的H因子片段或者天然存在的H因子的任何同源物或其片段,如下文所详细描述。在一些实施方案中,H因子的生物活性片段具有一种或多种以下特性:(1)结合C-反应蛋白(CRP),(2)结合C3b,(3)结合肝素,(4)结合唾液酸,(5)结合内皮细胞的细胞表面,(6)结合细胞整联蛋白受体,(7)结合病原体,(8)C3b辅因子活性,(9)C3b衰变加速活性以及(10)抑制旁路补体途径。

[0310] 因此,在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体的治疗性部分包含补体抑制剂或其生物活性片段。在一些实施方案中,补体抑制剂选自由以下组成的组:人MCP、人DAF、小鼠DAF、人CD59、小鼠CD59同种型A、小鼠CD59同种型B、小鼠Crry蛋白、人CR1、人H因子或小鼠H因子、I因子或其生物活性片段。

[0311] 在一些实施方案中,靶向构建体的补体抑制剂部分包含全长人MCP(SEQ ID NO:44)。在一些实施方案中,靶向构建体的补体抑制剂部分包含人MCP(SEQ ID NO:44)的生物活性片段。在一些实施方案中,人MCP的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-4(SEQ ID NO:44的氨基酸35-285)、SCR 1-4加富含丝氨酸/苏氨酸的结构域(SEQ ID NO:44的氨基酸35-326)和MCP的细胞外结构域(SEQ ID NO:44的氨基酸35-343)。

[0312] 在一些实施方案中,靶向构建体的补体抑制剂部分包含全长人DAF。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含人DAF(SEQ ID NO:45)的生物活性片段。在一些实施方案中,人DAF的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-4(SEQ ID NO:45的氨基酸25-285)和SCR 1-4加富含O-糖基化丝氨酸/苏氨酸的结构域(SEQ ID NO:45的氨基酸25-353)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长小鼠DAF(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含小鼠DAF的生物活性片段。在一些实施方案中,小鼠DAF的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-4(SEQ ID NO:46的氨基酸35-286)和SCR 1-4加富含O-糖基化丝氨酸/苏氨酸的结构域(SEQ ID NO:46的氨基酸35-362)。

[0313] 在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长人CD59(SEQ ID NO:47)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含人CD59(SEQ ID NO:47)的生物活性片段。在一些实施方案中,人CD59的生物活性片段包含人CD59的缺乏其GPI锚的细胞外结构域(SEQ ID NO:47的氨基酸26-101)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长小鼠CD59,同种型A(SEQ ID NO:48)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含小鼠CD59,同种型A(SEQ ID NO:48)的生物活性片段。在一些实施方案中,小鼠CD59同种型A的生物活性片段包含小鼠CD59同种型A的缺乏其GPI锚的细胞外结构域(SEQ ID NO:48的氨基酸24-95)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长小鼠CD59,同种型B(SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含小鼠CD59,同种型B(SEQ ID NO:49)的生物活性片段。在一些实施方案中,小鼠CD59同种型B的生物活性片段包含小鼠

CD59同种型B的缺乏其GPI锚的细胞外结构域(SEQ ID NO:49的氨基酸24-103)。

[0314] 在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长小鼠Crry蛋白(SEQ ID NO:50)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含小鼠Crry蛋白(SEQ ID NO:50)的生物活性片段。在一些实施方案中,小鼠Crry蛋白的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-5(SEQ ID NO:50的氨基酸41-400)和小鼠Crry蛋白的细胞外结构域(SEQ ID NO:50的氨基酸41-405)。

[0315] 在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长人CR1蛋白(SEQ ID NO:51)。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含人CR1蛋白(SEQ ID NO:51)的生物活性片段。在一些实施方案中,人CR1蛋白的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-4(SEQ ID NO:51的氨基酸42-295)、SCR 1-10(SEQ ID NO:51的氨基酸42-684)、SCR 8-11(SEQ ID NO:51的氨基酸490-745)、SCR 15-18(SEQ ID NO:51的氨基酸940-1196)和SCR 22-28(SEQ ID NO:51的氨基酸1394-1842)。

[0316] 在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含全长人(SEQ ID NO:52)或小鼠(SEQ ID NO:53)H因子。在一些实施方案中,构建体的补体抑制剂部分包含人(SEQ ID NO:52)或小鼠(SEQ ID NO:53)H因子的生物活性片段。在一些实施方案中,人H因子(SEQ ID NO:52)的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-4(SEQ ID NO:52的氨基酸21-262)、H因子的SCR 1-5(SEQ ID NO:52的氨基酸21-320)、H因子的SCR 1-8(SEQ ID NO:52的氨基酸21-507)以及H因子的SCR 1-18(SEQ ID NO:52的氨基酸21-1104)。在一些实施方案中,小鼠H因子(SEQ ID NO:53)的生物活性片段选自由以下组成的组:SCR 1-4(SEQ ID NO:53的氨基酸19-264)、H因子的SCR 1-5(SEQ ID NO:53的氨基酸19-322)、H因子的SCR 1-8(SEQ ID NO:53的氨基酸19-507)以及H因子的SCR 1-18(SEQ ID NO:53的氨基酸19-1109)。在一些实施方案中,人(SEQ ID NO:52)或小鼠(SEQ ID NO:53)H因子的生物活性片段包含(并且在一些实施方案中,由以下组成或基本上由以下组成):H因子的至少前四个N-末端SCR结构域,包括例如至少H因子的前5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或更多个N-末端SCR结构域中的任一者。

[0317] 在一些实施方案中,靶向构建体的补体抑制剂部分是本文所述的补体抑制剂中任一者的同源物或其生物活性片段。补体抑制剂(或其生物活性片段)的同源物包括不同于天然存在的补体抑制剂(或其生物活性片段)的蛋白质,不同之处在于至少一个或几个,但不限于一个或几个氨基酸已经缺失(例如所述蛋白质的截短型式,如肽或片段)、插入、反转、取代和/或衍生化(例如通过糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊烯化、棕榈酸化、酰胺化和/或添加糖基磷脂酰肌醇)。例如,补体抑制剂的同源物可具有以下氨基酸序列:所述氨基酸序列与天然补体抑制剂的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:44-53)至少约70%相同,例如与天然存在的补体抑制剂的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:44-53)至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同中的任一者。可以多种方式测定氨基酸序列同一性,例如使用可公开使用的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN(MDNAST AR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0318] 在某些实施方案中,补体抑制剂(或其生物活性片段)的同源物保留所述同源物所

源自的补体抑制剂(或其生物活性片段)的全部旁路补体途径抑制活性。在某些实施方案中,补体抑制剂(或其生物活性片段)的同源物保留所述同源物所源自的补体抑制剂(或其生物活性片段)的补体抑制活性的至少约50%,例如至少约60%、70%、80%、90%或95%中的任一者。

[0319] 在一些实施方案中,补体抑制剂是结合补体组分的抗体(或其抗原结合片段),例如,选自由以下组成的组的补体组分:C1、C1q、C1s、C2、C2a、C3、C3a、C3b、C4、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8和C9。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段所结合的补体多肽可为人多肽,例如人C1、C1q、C1s、C2、C2a、C3、C3a、C3b、C4、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、B因子、D因子或备解素多肽。前述补体蛋白的氨基酸序列是本领域中熟知的,用于制备用以在制备对一种或多种补体蛋白具有特异性的抗体(或其抗原结合片段)中使用的蛋白质或其片段的方法也是本领域中熟知的。合适的方法还在本文描述且例示。

[0320] 适于并入本文所述的靶向构建体并且适于在本文所述的任何方法中后续使用的示例性抗补体蛋白抗体也是本领域中熟知的。例如,结合补体组分C5且抑制C5裂解成片段C5a和C5b的抗体包括例如依库珠单抗(**Soliris®**; Alexion Pharmaceuticals公司, Cheshire, CT)和培克珠单抗(Alexion Pharmaceuticals公司Cheshire, CT)。参见例如, Kaplan (2002) Curr Opin Investig Drugs 3 (7):1017-23; Hill (2005) Clin Adv Hematol Oncol 3 (11):849-50; Rother等人 (2007) Nature Biotechnol 25 (11):1256-1488; Whiss (2002) Curr Opin Investig Drugs 3 (6):870-7; Patel等人 (2005) Drugs Today (Barc) 41 (3):165-70; 和Thomas等人 (1996) Mol Immunol 33 (17-18):1389-401。

[0321] 在一些实施方案中,抗-C5抗体可结合人补体组分C5蛋白的 α 链中的表位。结合C5的 α 链的抗体在例如PCT申请公布号W0 2010/136311和美国专利号6,355,245中描述。

[0322] 在一些实施方案中,抗-C5抗体可结合人补体组分C5蛋白的 β 链中的表位。结合C5 β 链的抗体在例如Moongkarndi等人 (1982) Immunobiol 162:397; Moongkarndi等人 (1983) Immunobiol 165:323; 和Mollnes等人 (1988) Scand J Immunol 28:307-312中描述。

[0323] 适用于本文所述的靶向构建体的另外的抗-C5抗体及其抗原结合片段在例如PCT申请公布号W0 2010/015608中描述,所述申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0324] 结合C3b并且例如抑制C3b转化酶的抗体也是本领域中熟知的。例如,PCT申请公布号W0 2010/136311、W0b2009/056631和W0 2008/154251,其各自的公开内容以引用的方式整体并入本文。拮抗性抗-C6抗体和抗-C7抗体已在例如Brauer等人 (1996) Transplantation 61 (4):S88-S94和美国专利号5,679,345中描述。

[0325] 在一些实施方案中,补体抑制剂是抗B因子抗体(如由ATCC保藏号PTA-6230产生的单克隆抗体1379)。抗-B因子抗体也在例如Ueda等人 (1987) J Immunol 138 (4):1143-9; Tanhehco等人 (1999) Transplant Proc 31 (5):2168-71; 美国专利申请公布号20050260198和2008029911; 以及PCT公布号W0 09/029669中描述。

[0326] 在一些实施方案中,补体抑制剂是抗-D因子抗体,例如在Pascual等人 (1990) J Immunol Methods 127:263-269; Sahu等人 (1993) Mol Immunol 30 (7):679-684; Pascual等人 (1993) Eur J Immunol 23:1389-1392; Niemann等人 (1984) J Immunol 132 (2):809-815; 美国专利号7,439,331; 或美国专利申请公布号20080118506中描述的抗体。

[0327] 在一些实施方案中,补体抑制剂是抗备解素抗体。合适的抗备解素抗体也是本领域

域中熟知的并且包括例如美国专利申请公布号20110014614和PCT申请公布号W02009110918。

[0328] 在一些实施方案中,补体抑制部分是抗MBL抗体。甘露糖结合、甘露聚糖结合凝集素(MBL)(一种血浆蛋白)与已知为MBL-相关丝氨酸蛋白酶(MASP)的蛋白质形成复合物。MBL结合几种无哺乳动物蛋白质特征的单糖,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰甘露糖胺、L-岩藻糖和葡萄糖,而唾液酸和半乳糖不结合。当MBL-MASP复合物结合微生物时,丝氨酸蛋白酶的酶原形式被活化并且介导补体组分C4和C2的活化,从而产生C3转化酶C4b2b并且通过沉积C4b和C3b片段产生调理作用。MASP-2已显示裂解C4和C2,而MASP-1可负责C3的直接裂解。对MASP-3和MAp19的功能的了解较少。研究表明MBL的低水平与调理缺乏以及临床表现如严重腹泻、慢性肝炎和HIV感染以及自身免疫性疾病之间的明显联系。参见Petersen等人, *J. Immunological Methods*, 257:107-16 (2001); Petersen等人, *Molecular Immunology*, 38:133-49 (2001)。抗甘露聚糖结合凝集素抗体是本领域中已知的(参见,例如Pradhan等人(2012) Rheumatol公司, 2012年9月电子出版(epublished))且可商购(AbCam)。

[0329] 在一些实施方案中,补体抑制部分是抗MASP抗体。甘露聚糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶(MASP)是至少三种蛋白质(甘露聚糖结合凝集素相关的丝氨酸蛋白酶-1、-2和-3(分别MASP-1、MASP-2和MASP-3))的家族,其已被教导在调节补体活化的凝集素途径中发挥显著作用。Petersen等人, *Molecular Immunology* 38:133-149 (2001)。

[0330] MASP-1具有在胰蛋白酶和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶中发现的类型的组氨酸环结构。已发现MASP-1参与MBL的补体活化。据报道编码MASP-1的cDNA克隆编码19个氨基酸的推定前导肽、随后预计形成成熟肽的680个氨基酸残基。MASP-2(MBL相关的丝氨酸蛋白酶2)是在结构上也类似于补体途径的Clr和Cls的丝氨酸蛋白酶。类似于这些,但与MASP-1相反,它不具有在胰蛋白酶和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶中发现的类型的组氨酸环结构。已理论论证, MASP-1可裂解C3,从而产生C3b,所述C3b可沉积于活化的细胞或组织表面上。

[0331] 已证明MASP-2裂解C4和C2,从而产生C3转化酶, C4b2b(Thiel等人, *Nature*, 386:506-10 (1997))。MASP-2蛋白包含多个结构域,即CUB1、EGF、CUB2、CCP1、CCP2和丝氨酸蛋白酶结构域。据信,负责与MBL缔合的结构域位于N-末端,而丝氨酸蛋白酶结构域负责MASP-2的丝氨酸蛋白酶活性。sMAP(也被称为MAp19)是源自与MASP-2相同的基因的19kd,其缺乏丝氨酸蛋白酶域和A链的主要部分。Skjoedt等人, *Immunobiology*, 215:921-31 (2010)。最近,鉴别了所述家族的第三成员MASP-3,其与MASP-1共享高度同源性,这使得MASP-1和MASP-3看起来作为初级mRNA转录物的选择性剪接的结果产生。

[0332] 已例如在W004/075837;US 2009/0017031中公开了针对MBL、MASP-1、MASP-2、MASP-3和MBL/MASP复合物的抗体以及其用于抑制补体活化的不利作用如缺血再灌注损伤的用途。

[0333] 针对MASP-2的其他抗体先前也已描述。参见例如W0 02/06460、US2007/0009528, Peterson等人 *Mol. Immunol.* 37:803-11 (2000), Moller-Kristensen等人 *J. of Immunol. Methods* 282:159-67 (2003), Petersen等人 *Mol. Immunol.* 35:409和W0 04/106384。

[0334] 据报道,相较于MASP-1和MASP-3以低血清水平存在的另外相关的蛋白质MBL/纤维胶凝蛋白相关蛋白(MAP-1)充当局部凝集素途径特异性补体抑制剂。Skjodt等人,

Molecular Immunology, 47:2229-30 (2010)。因此MAP-1本身或MAP-1的片段可在本发明中适用作MASP的抑制剂并且因此适用作补体活化的凝集素途径特异性抑制剂。最后,蛋白质的纤维胶凝蛋白家族特征在于碳水化合物结合和调理活性,从而共享类似于MBL的结构。如同MBL,纤维胶凝蛋白已显示与血清中的MASP缔合并且可响应于病原性、坏死或凋亡细胞特异性碳水化合物标志物介导补体活化。因此,纤维胶凝蛋白家族或其功能片段的抑制剂可在本发明中适用作MASP的抑制剂并且适用作补体活化的凝集素途径特异性抑制剂。美国专利6,333,034和美国专利7,423,128;还参见WO 2008/154018和WO 2009/110918。

[0335] 在一些实施方案中,补体抑制剂部分是特异性地结合人补体组分蛋白质(例如,人C5、C6、C7、C8或C9)的抗体(或其抗原结合片段)。术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指两个分子形成在生理条件下相对较稳定的复合物(例如,抗体与补体组分蛋白质之间的复合物)。通常,当缔合常数(K_a)高于 $10^6 M^{-1}$ 时,结合被认为是特异性的。因此,抗体可以至少(或大于) 10^6 (例如,至少或大于 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 或更高) M^{-1} 的 K_a 特异性地结合C5蛋白。特异性地结合人补体组分C5蛋白的抗体的实例在例如美国专利号6,355,245和PCT申请公布号WO 2010/015608中描述。

[0336] 用于确定抗体是否结合蛋白质抗原和/或抗体对蛋白质抗原的亲力的方法是本领域中已知的并且在本文中描述。例如,可使用多种技术来检测和/或量化抗体与蛋白质抗原的结合,所述技术如但不限于蛋白质印迹法、斑点印迹法、表面等离子体共振法(例如, BIAcore系统;Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden and Piscataway,N.J.)或酶联免疫吸附测定(ELISA)测定。参见例如Harlow和Lane(1988)“Antibodies:A Laboratory Manual”Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Benny K.C.Lo(2004)“Antibody Engineering:Methods and Protocols,”Humana Press(ISBN: 1588290921);Borrebaek(1992)“Antibody Engineering,A Practical Guide,”W.H.Freeman and Co.,NY;Borrebaek(1995)“Antibody Engineering,”第2版,Oxford University Press,NY,Oxford;Johne等人(1993)Immunol Meth.160:191-198;Jonsson等人(1993)Ann Biol Clin 51:19-26;和Jonsson等人(1991)Biotechniques 11:620-627。还参见美国专利号6,355,245。

[0337] 在本文所述的任何实施方案中,靶向构建体还包含连接靶向部分和治疗性部分(或其生物活性片段)的氨基酸接头序列。

[0338] 在一些实施方案中,靶向构建体的靶向部分连接(例如,直接或通过接头)至治疗性部分的氨基末端。在一些实施方案中,靶向构建体的靶向部分连接(例如,直接或通过接头)至治疗性部分(例如,本文所述的补体抑制剂或药物)的羧基末端。

[0339] 在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体包含多于一个(例如,2、3、4、5、6或7个或更多个)治疗性部分,例如,多于一种本文所述的补体抑制剂多肽或药物。两个或更多个治疗性部分可以是相同的或不同的。例如,在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体可包含两个或更多个可溶性CD59部分(例如,可溶性人CD59部分)或两种或更多种 β -阻滞剂。在另一实例中,本文所述的靶向构建体可包含两个或更多个补体抑制剂多肽部分,其中一个是可溶性人CD59,且另一个是可溶性人MCP。在另一个实例中,本文所述的靶向构建体可包含补体抑制剂和药物,例如一个可溶性CD59部分和一个皮质类固醇。因此,例如,本文所述的靶向构建体可包含:(a)靶向部分(例如,C2抗体、B4抗体或前述任一者的抗原结合片段);

(b) 第一治疗性部分(例如,可溶性形式的CD59,例如,人CD59);和(c)第二治疗性部分(例如,可溶性形式的DAF,例如,可溶性形式的人DAF或皮质类固醇如泼尼松)。例如,治疗性部分可以是本文所述的那些中的任一种,包括本文所述的补体抑制剂的变体和生物活性片段。

[0340] 在一些实施方案中,靶向构建体的靶向部分的轻链包含至少一个治疗性部分并且重链包含至少治疗性部分。两个或更多个补体抑制剂多肽可以是相同的或不同的。例如,在一些实施方案中,靶向构建体包含本文所述的靶向部分的Fab片段,其中:(i) Fab片段的轻链(在其C末端)包含补体抑制剂多肽,如DAF、CD59或本文所述的任何补体抑制剂多肽,并且(ii) Fab片段的轻链(在其C末端)包含与(i)中相同的或不同的治疗性部分,例如本文所述的补体抑制剂或药物。两条链的适当配对可预期作为Fab的固有特性发生。补体抑制剂部分和Fab的轻链或重链可直接或通过接头序列(如本文所述的任何接头序列)连接在一起。

[0341] 可检测部分

[0342] 在一些实施方案中,靶向构建体包含融合至为可检测部分的活性部分的靶向部分。在一些实施方案中,可检测部分可以是顺磁性分子、顺磁性纳米颗粒、超小超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒或USPIO纳米颗粒聚集体。在某些实施方案中,USPIO纳米颗粒聚集体的直径为约10nm与约150nm之间、约65nm与约85nm之间或约75nm。在某些实施方案中,USPIO纳米颗粒聚集体的直径为约150nm。在某些实施方案中,USPIO纳米颗粒聚集体涂覆有葡聚糖或两亲聚合物,或者USPIO纳米颗粒聚集体以磷脂封装。在某些实施方案中,磷脂是聚乙二醇化的。在某些实施方案中,聚乙二醇化的磷脂是胺官能化的或羧酸官能化的。在某些实施方案中,聚乙二醇化的、胺官能化的磷脂是1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-PEG2000。

[0343] 在某些实施方案中,顺磁性纳米颗粒是超顺磁性氧化铁(“SPIO”)纳米颗粒、SPIO纳米颗粒聚集体、标准超顺磁性氧化铁(“SSPIO”)、SSPIO纳米颗粒聚集体、多分散性超顺磁性氧化铁(“PSPIO”)、PSPIO纳米颗粒聚集体、单晶SPIO、单晶SPIO聚集体、单晶氧化铁纳米颗粒、单晶氧化铁或本领域的技术人员已知的任何其他纳米颗粒造影剂。将此类颗粒缀合至靶向部分和检测顺磁性颗粒缀合的靶向部分的方法是本领域中已知的,并且例如在Richardson等人(2001) *Biosens and Bioelect* 16:989-993; Boyaci等人(2005) *Anal Bioanal Chem* 382(5):1234-41; Toma等人(2005) *Br J Cancer* 93(1):131-6;以及其他文献中描述。

[0344] 在一些实施方案中,可检测部分是脂质体或含有钆螯合物(“Gd-螯合物”)分子的另一种递送媒介物。在一些实施方案中,可检测部分是电子致密试剂,如钆、碘化造影剂、硫酸钡、二氧化钍、金、金纳米颗粒、金纳米颗粒聚集体。在一些实施方案中,可检测部分是生物胶体或微泡。在一些实施方案中,可检测部分是放射性同位素或放射性核素,包括但不限于例如³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、⁸²Rb、氟脱氧葡萄糖、发射放射性核素的 γ 射线、放射性标记的葡萄糖、放射性标记的水或放射性标记的氨。在某些实施方案中,可检测部分是发射正电子的放射性核素。在某些实施方案中,可检测部分是半抗原、蛋白质(如生物素)、酶、地高辛或荧光团、双光子荧光团、荧光染料或荧光部分(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素或荧光素衍生物)。将此类可检测部分缀合至靶向部分的方法是本领域中已知的并且在本文别处进行描述。

[0345] 包含可检测部分的靶向构建体可用于检测有需要的个体的眼睛中补体介导的炎症或补体活化的无创方法中。如本文中其他地方所提及,所述方法包括向个体施用包含有效量的包含可检测部分的靶向构建体的组合物,并且使用能够检测可检测部分的存在仪器和/或方法(例如MRI、CT、SPECT、射线照相术、光谱学、显微术、PET、超声或本文所述的任何其他检测方法)测量可检测部分的存在。

[0346] MRI可用于无创地获得具有高分辨率的组织图像。顺磁性剂或USPIO纳米颗粒或其聚集体增强T2-加权的磁共振图像上的信号衰减,并且此类纳米颗粒与例如本文所述的抗体(或其片段)或本文所述的构建体的缀合允许检测细胞水平的特异性分子。例如,使用纳米颗粒检测剂的MRI可对细胞迁移(J.W.Bulte等人,2001,Nat.Biotechnol.19:1141-1147)、细胞凋亡(M.Zhao等人2001,Nat.Med.7:1241-1244)成像,并且可检测癌症的小病灶。参见例如Y.W.Jun等人,2005,J.Am.Chem.Soc.127:5732-5733;Y.M.Huh等人2005,J.Am.Chem.Soc.127:12387-12391。对比度增强型MRI非常适合大分子或分子事件的动态无创成像,但它需要特异性地结合目标分子的配体。J.W.Bulte等人,2004,NMR Biomed.17:484-499。荧光染料和荧光团(例如荧光素、异硫氰酸荧光素和荧光素衍生物)可用于无创地获取具有高分辨率的组织图像,使用例如分光光度测定、双光子荧光、双光子激光显微术或荧光显微术(例如组织活检切片的)。MRI可用于无创地获取具有高分辨率的组织图像,使用例如顺磁性分子、顺磁性纳米颗粒、超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒、USPIO纳米颗粒聚集体、超顺磁性氧化铁(“SPIO”)纳米颗粒、SPIO纳米颗粒聚集体、单晶氧化铁纳米颗粒、单晶氧化铁、其他纳米颗粒造影剂。MRI可用于无创地获取具有高分辨率的组织图像,使用例如钆,包括含有钆螯合物(“Gd-螯合物”)分子的脂质体或其他递送媒介物。正电子发射断层摄影术(PET)、PET/计算机断层摄影术(CT)、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)和SPECT/CT可用于无创地获取具有高分辨率的组织图像,使用例如放射性核素(例如碳-11、氮-13、氧-15、氟-18、铷-82)、氟脱氧葡萄糖(例如氟-18标记的)、任何发射 γ 射线的放射性核素、发射正电子的放射性核素、放射性标记的葡萄糖、放射性标记的水、放射性标记的氨。超声波(超声波检查法)和对比度增强型超声波(对比度增强型超声波检查法)可用于无创地获取具有高分辨率的组织图像,使用例如生物胶体或微泡(例如包括微泡壳,其包括白蛋白、半乳糖、脂质和/或聚合物;微泡气体核心,其包括空气、重气体、全氟化碳、氮、八氟丙烷、全氟己烷脂质微球、全氟丙烷等)。X-射线成像(射线照相术)或CT可用于无创地获得具有高分辨率的组织图像,使用例如碘化造影剂(例如碘海醇、碘克沙醇、碘佛醇、碘帕醇、碘昔兰、碘普胺、二乙酰氨基三碘苯甲酸盐、甲泛影钠、碘克酸)、硫酸钡、二氧化钍、金、金纳米颗粒或金纳米颗粒聚集体。这些检测方法和仪器以及能够通过相应方法测量或检测的可检测部分是非限制性实例。

[0347] 如本文所用,术语“超小型超顺磁性氧化铁纳米颗粒”或“USPIO纳米颗粒”是指直径在1至50nm范围内、更通常地直径在5与40nm之间(在合成后施加的任何涂层,不包括5)的超顺磁性氧化铁颗粒。USPIO纳米颗粒通常由具有不成对自旋的含晶体区的磁赤铁矿(Fe_2O_3)或磁铁矿(Fe_3O_4)制成。这些磁畴在不存在磁场时为无序的,但当施加磁场时(即,当使用MRI时),磁畴对准以产生远大于单独不成对电子的总和的磁矩而不导致颗粒的剩余磁化。当注射至血流中时,USPIO纳米颗粒被巨噬细胞吸收并且在发炎组织中积聚。它们的铁部分负增强T2加权图像上的信号衰减,并且它们的相对浓度可通过降低的T2-信号强度

或更精确地通过减少的自旋-自旋T2-弛豫时间评定。减少的T2-弛豫时间(横向弛豫时间)因此可用于检测炎症。缩短的T2弛豫时间导致颗粒所位于的磁共振图像的颜色变深,从而产生“阴性造影”。这种方法已成功地用于检测若干模型中的肾炎症。在一些情况下,USPIO纳米颗粒可在合成后聚集以产生其的聚集体(本文称为“超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒聚集体”或“USPIO纳米颗粒聚集体”),所述聚集体直径为25nm、50nm、75nm、100nm或150nm或甚至更大。

[0348] USPIO纳米颗粒或其聚集体可涂覆有多种材料或未被涂覆,所述材料包括天然或合成聚合物、表面活性剂、磷脂或无机材料,这些材料中的任一种可改性或衍生化以允许直接或通过不同类型的接头连接靶向基团,所述接头包括肽、多肽、蛋白质或其他化学基团。可能的涂层包括合成聚合物如基于聚(乙烯-乙酸乙烯酯)共聚物、聚乙烯吡咯烷酮(“PVP”)、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(“PLGA”)、聚乙二醇(“PEG”)、聚乙烯醇(“PVA”)、聚丙烯酸等的那些合成聚合物;天然聚合物如凝胶、葡聚糖、壳聚糖、普鲁兰多糖等;表面活性剂如油酸钠、十二烷胺、羧甲基纤维素钠等;无机材料如金或二氧化硅;以及生物材料如磷脂。

[0349] 因此,可通过施用本文提供的抗体靶向的USPIO纳米颗粒或纳米颗粒聚集体组合物和/或USPIO纳米颗粒缀合的或USPIO纳米颗粒聚集体缀合的靶向构建体并且取得个体或个体眼睛的磁共振图像,来以无创方式检测个体中补体介导的炎症(如眼中)。在本文所述的一些实施方案中,施用至个体的组合物是包含本文所述的抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体中任一者的药物组合物。在本文所述的一些实施方案中,施用至个体的组合物是包含本文所述的抗体靶向的USPIO纳米颗粒聚集体组合物中任一者的药物组合物。

[0350] 如本文所用,术语“磁共振成像”或“MRI”是指通常用于可视化身体的结构和功能的提供任何平面的身体详细图像的无创医学成像技术。MRI在身体的不同软组织之间提供比其他无创成像方法如计算机断层摄影术(CT)大得多的对比度,从而使得它特别适用于神经、肌肉骨骼、心血管和肿瘤(癌症)成像。与CT不同,它不使用电离辐射,而是使用强大磁场来对准身体中的水中的氢原子的核磁化。射频场用于系统地改变这种磁化的对准,从而引起氢原子核产生可由扫描仪检测的旋转磁场。可由另外磁场操控这个信号以积累足够信息来重新构建身体或其部分(例如眼睛)的图像。

[0351] 当个体躺在扫描仪上时,在整个个体身体的水分子中发现的大量氢原子核(即,质子)与强主磁场对准。随后使在射频下振荡并且垂直于主磁场的第二电磁场脉冲以使一定比例的质子与主磁场不对准。这些质子随后变动回成与主磁场对准,从而在它们这样做时发射可检测的射频信号。因为不同身体组织(例如脂肪对比肌肉)中的质子以不同速度重新对准,所以可对不同的身体结构成像。可静脉内注射造影剂以增强血管、器官(例如眼睛)、肿瘤或炎症位点的外观。

[0352] 如本文所用,抗体靶向的超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒或纳米颗粒聚集体组合物(包括本文所述的任何药物组合物)的“有效量”或“诊断有效量”是足以产生(如眼中)补体介导的炎症的临床上有用的磁共振图像的量。临床上有用的磁共振图像是含有足够细节以使有经验的临床医生能够评定炎症的等级和/或程度以用于诊断、监测治疗干预的功效等目的的一种技术。如本文所用,抗体靶向的可检测部分或包含可检测部分的靶向构建体(包括本文所述的任何药物组合物)的“有效量”或“诊断有效量”是当与能够检测抗体(或其片段)和/或靶向部分的检测方法结合时,足以产生(例如个体、患者、人、哺乳

动物、临床样品、组织、活检切片中)补体介导的炎症或补体活化的临床上有用的表征或测量的量。补体介导的炎症或补体活化的临床上有用的表征或测量是含有足够细节以使有经验的临床医生能够评定炎症和/或补体活化的等级和/或程度以用于诊断、监测治疗干预的功效等目的表征或测量。

[0353] 通过将抗体和/或靶向构建体递送至补体活化位点来将超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒、USPIO纳米颗粒聚集体、顺磁性氧化铁(“SPIO”)纳米颗粒、SPIO纳米颗粒聚集体或其他纳米颗粒造影剂(可检测部分的实例)递送至活动性炎症位点允许这种炎症的无创磁共振成像,从而能够特异性检测整个身体的补体活化并且将补体介导的炎症与其他类型的炎症区分开来。

[0354] 因此,一方面,本发明提供包含纳米颗粒造影剂的组合物,所述纳米颗粒造影剂缀合至本文所述的抗体(或其抗原结合片段)或构建体以用于无创医学或诊断成像应用。在某些实施方案中,纳米颗粒造影剂缀合的抗体(或其抗原结合片段)或构建体包含USPIO纳米颗粒或其聚集体。在某些实施方案中,纳米颗粒造影剂缀合的抗体(或其抗原结合片段)或构建体包含脂质体或含有钆螯合物(“Gd螯合剂”)分子的其他媒介物。超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒或聚集体是可缀合至本文所述的靶向构建体的可检测部分的实例。

[0355] 超小型超顺磁性氧化铁(“USPIO”)纳米颗粒或其聚集体的至少两种物理化学特征随单个纳米颗粒或纳米颗粒聚集体的尺寸而不同。首先,USPIO纳米颗粒制剂增强MRI成像中的对比度和对比度增强程度的两者的能力随纳米颗粒直径而不同,因为单个USPIO纳米颗粒的磁矩也随颗粒直径而不同。具有达约15nm(优选小于10nm)直径的氧化铁纳米颗粒保留超顺磁性,但是较大氧化铁纳米颗粒失去其超顺磁性特性。因此,适合用作MRI造影试剂的USPIO纳米颗粒的直径存在上限。这种限制可通过使用较小单个USPIO纳米颗粒的多颗粒聚集体克服。此类USPIO纳米颗粒聚集体有效地增强MRI对比度,因为每个纳米颗粒聚集体内的单个纳米颗粒的磁矩是累加的。与单个氧化铁纳米颗粒不同,在尺寸增加的情况下,超小型超顺磁性氧化铁纳米颗粒的聚集体不丧失其顺磁性特性。

[0356] 其次,USPIO纳米颗粒或其聚集体的体内半衰期(例如,循环血浆或血液半衰期和/或组织半衰期)和生物分布随纳米颗粒或聚集体尺寸而变化。例如,直径为约10nm或更小的USPIO纳米颗粒(单晶氧化铁纳米颗粒)具有约81分钟的循环血液半衰期(R.Weissleder等人,1990,Radiol.175(2):489-493),直径为约50nm的USPIO纳米颗粒具有约30分钟的循环半衰期(D.Pouliquen等人,1991,Magnet.Resonance Imag.9(3):275-283),直径为约150nm的USPIO纳米颗粒被认为具有少于约30分钟的循环半衰期,并且直径为约80nm的USPIO纳米颗粒具有约一至数天(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多天)的组织半衰期和约45天的全身半衰期(R.Weissleder等人,1989,Am.J.Roentgenol.152(1):167-173)。有效靶向的MRI对比度增强试剂必须在血管中循环足够长的时间以识别并且结合所需靶标(例如,膜联蛋白IV或磷脂如PE、PC、CL或MDA),同时仍被快速清除以便足以将任何潜在毒性最小化。用于产生临床上有用的磁共振图像的最佳USPIO纳米颗粒或纳米颗粒聚集体尺寸取决于待成像的器官(例如,肾、眼睛、视网膜)、组织和/或生理现象(例如,补体介导的炎症)而不同。

[0357] USPIO纳米颗粒或纳米聚集体的循环半衰期也可通过用不同的材料涂覆它们来改变(即,减少或延长)。例如,USPIO纳米颗粒或纳米聚集体可涂覆有(除其他材料之外)天然或合成聚合物、表面活性剂或磷脂,所述材料中的任一种可改性或衍生化以允许直接或通

过不同类型的接头间接连接本文所述的抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体,所述接头包括肽、多肽、蛋白质或其他化学基团。在一些情况下,涂层可进一步改性以掺入合成聚合物、天然聚合物、两亲聚合物或适用于稳定聚集体或将它们对外渗、调理作用、吞噬作用、内吞作业或其他生理清除模式的易感性最小化的其他分子(例如,聚乙烯吡咯烷酮(“PVP”)、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(“PLGA”)、聚乙二醇(“PEG”)、聚乙烯醇(“PVA”)、聚丙烯酸等)。在一些情况下,缀合至抗体(或其抗原结合片段)或构建体的USPIO纳米颗粒或纳米颗粒聚集体可以是磷脂封装的。关于USPIO纳米颗粒或纳米颗粒聚集体的尺寸,适用于将纳米颗粒或纳米聚集体靶向至所需器官(例如,肾、眼睛、视网膜)、组织和/或生理现象(例如,补体介导的炎症)的具体涂层、改性或衍生化可根据经验确定。

[0358] 靶向构建体的变体

[0359] 还涵盖靶向构建体的变体。本文所述的靶向构建体的变体可为:(i)其中靶向部分和/或活性部分(即,其中活性部分包含蛋白质)的一个或多个氨基酸残基被保守性或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)取代并且这种取代的氨基酸残基可以或可以不由遗传密码编码的变体;或(ii)其中靶向和/或活性部分的一个或多个氨基酸残基包括取代基的变体;或(iii)其中靶向构建体与另一种化合物(如增加靶向构建体的半衰期的化合物(例如聚乙二醇))融合的变体;或(iv)其中另外的氨基酸融合至靶向构建体(如靶向部分或活性部分,其中活性部分包含蛋白质)的变体,如前导或分泌序列或者用于纯化靶向构建体的序列,或(v)其中靶向构建体与较大多肽(即,人白蛋白、抗体或Fc)融合以增加作用持续时间的变体。根据本文的教义,此类变体应在本领域的技术人员范围内。

[0360] 在一些实施方案中,靶向构建体的变体包含在一个或多个预定的、优选非必需氨基酸残基处进行的保守性氨基酸取代(下文进一步定义)。“非必需”氨基酸残基是从蛋白质的野生型序列改变而不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基是生物活性所需的。“保守性氨基酸取代”是以下取代,其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基置换。

[0361] 在蛋白质中通常发现二十种氨基酸。那些氨基酸可基于其侧链的化学特性分成九类或九组。用一个氨基酸残基取代同一类或组中的另一个氨基酸在本文被称为“保守性”取代。保守性氨基酸取代经常可在蛋白质中进行,而不会显著改变蛋白质的构象或功能。用一个氨基酸残基取代不同类或组中的另一个氨基酸残基在本文被称为“非保守性”取代。相比之下,非保守性氨基酸取代倾向于破坏蛋白质的构象或功能。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中进行了定义。这些家族包括具有以下的氨基酸: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、谷氨酰胺、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)、 β 支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。(参见以下表1。)

[0362] 表1:氨基酸分类的实例

[0363]

较小/脂肪族残基:	Gly,Ala,Val,Leu,Ile
环状亚氨基酸:	Pro
含羟基的残基:	Ser,Thr

酸性残基:	Asp、Glu
酰胺残基:	Asn、Gln
碱性残基:	Lys、Arg
咪唑残基:	His
芳香族残基:	Phe、Tyr、Trp
含硫残基:	Met、Cys

[0364] 在一些实施方案中,保守性氨基酸取代包括用甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)和亮氨酸(L)中的任一个取代这些脂肪族氨基酸中的任何另外一个;用丝氨酸(S)取代苏氨酸(T),反之亦然;用天冬氨酸(D)取代谷氨酸(E),反之亦然;用谷氨酰胺(Q)取代天冬酰胺(N),反之亦然;用赖氨酸(K)取代精氨酸(R),反之亦然;用苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)取代这些芳香族氨基酸中的任何另外一个;以及用甲硫氨酸(M)取代半胱氨酸(C),反之亦然。其他取代也可以被视为是保守性的,这取决于特定氨基酸环境以及其在蛋白质的三维结构中的作用。例如,甘氨酸(G)和丙氨酸(A)经常可互换,丙氨酸(A)和缬氨酸(V)也可互换。相对疏水性的甲硫氨酸(M)可经常与亮氨酸和异亮氨酸互换,并且有时与缬氨酸互换。赖氨酸(K)和精氨酸(R)在氨基酸残基的显著特征为其电荷且这两种氨基酸残基的不同pK不显著的位置中经常可互换。在特定的环境下,仍有其他一些变化可被视为“保守性的”(参见,例如Biochemistry第13-15页,第2版Lubert Stryer编辑(Stanford University);Henikoff等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA(1992) 89:10915-10919;Lei等人,J.Biol.Chem.(1995) 270(20):11882-11886)。

[0365] 在靶向构建体的靶向部分和/或活性部分中引入氨基酸取代以改进靶向构建体的功能性。例如,氨基酸取代可引入至靶向构建体的靶向部分中以增加靶向部分对其配体的结合亲和性,增加靶向构建体对其配体的结合特异性,改进靶向构建体对所需位点的靶向性,增加靶向构建体的二聚化或多聚化,以及改进靶向构建体的药物代谢动力学。类似地,氨基酸取代可引入至靶向构建体的活性部分中以增加靶向构建体分子的功能性且改进靶向构建体的药物代谢动力学。

[0366] 在一些实施方案中,靶向构建体与另一种化合物融合,如增加靶向构建体的半衰期和/或降低靶向构建体的潜在免疫原性的化合物(例如聚乙二醇,“PEG”)。PEG可用于赋予靶向构建体增加的稳定性、水溶性、大小、缓慢肾清除速率以及降低的免疫原性。参见例如美国专利号6,214,966;Lee等人(1999) Bioconjug Chem 10(6):973-8;Kinstler等人(2002) Advanced Drug Deliveries Reviews 54:477-485;以及Roberts等人(2002) Advanced Drug Delivery Reviews 54:459-476。稳定部分可使多肽的稳定性或保留提高至少1.5(例如至少2、5、10、15、20、25、30、40或50或更多)倍。在聚乙二醇化的情况下,本文所述的靶向构建体与PEG的融合可通过本领域的技术人员已知的任何方式完成。例如,可通过首先将半胱氨酸突变引入至靶向部分或活性部分(即,其中活性部分包含蛋白质)、随后用PEG-马来酰亚胺位点特异性衍生化来完成聚乙二醇化。可将半胱氨酸添加至靶向构建体的C末端。参见例如Tsutsumi等人(2000) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97(15):8548-8553。可对靶向构建体进行的另一种修饰涉及生物素化。在某些情况下,将靶向构建体生物素化可能是有用的,以使得它可容易地与链霉亲和素反应。用于蛋白质生物素化的方法是本领域中熟知的。此外,硫酸软骨素可与靶向构建体连接。

[0367] 在一些实施方案中,靶向构建体融合至进一步增加靶向构建体的靶向效率的另一个部分。例如,包含B4抗体的靶向构建体可融合至例如C2抗体或具有与血管的内皮细胞结合或以另外的方式连接的能力的另一种抗体(被称为“血管内皮靶向氨基酸配体”)。示例性血管内皮靶向配体包括但不限于VEGF、FGF、整联蛋白、纤粘蛋白、I-CAM、PDGF或者在血管内皮细胞表面上表达的分子的抗体。

[0368] 在一些实施方案中,靶向构建体与细胞间粘附分子的配体缀合(如融合)。例如,靶向构建体分子可与结合细胞间粘附分子的一个或多个碳水化合物部分缀合。碳水化合物部分有助于靶向构建体分子定位至损伤部位。碳水化合物部分可通过细胞外事件如化学或酶连接的方式连接至靶向构建体分子,或者可以是通过适当酶的表达而实现的细胞内加工事件的结果。在一些实施方案中,碳水化合物部分结合特定类别的粘附分子,如整联蛋白或选择蛋白,包括E-选择蛋白、L-选择蛋白或P-选择蛋白。在一些实施方案中,碳水化合物部分包括N-连接的碳水化合物,例如复合物型,包括岩藻糖基化和唾液酸化的碳水化合物。在一些实施方案中,碳水化合物部分与路易斯X抗原,例如唾液酸化的路易斯X抗原相关。

[0369] 对于眼病如AMD的治疗来说,靶向构建体可与识别玻璃疣的表位的抗体缀合(如融合)。还可使用其他靶向分子如较小靶向肽。靶向构建体的其他修饰包括例如糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护基团/封闭基团进行的衍生化等。

[0370] 靶向构建体可包括添加免疫学活性结构域(如抗体表位或其他标签)以有助于靶向或纯化多肽。6xHis和GST(谷胱甘肽S转移酶)作为标签的用途是众所周知的。在融合接点处或附近包括裂解位点将有助于在纯化后从靶向构建体除去外来多肽。可包括在靶向构建体中的其他氨基酸序列包括功能结构域如来自酶如水解酶的活性位点、糖基化结构域和细胞靶向信号。

[0371] 靶向构建体的变体包括具有与本文所述的靶向构建体的氨基酸序列足够相似的氨基酸序列的多肽。术语“足够相似的”意指相对于第二氨基酸序列含有足够或最小数目的相同或等效氨基酸残基的第一氨基酸序列,以使得第一和第二氨基酸序列具有共同结构域和/或共同的功能活性。例如,包含至少约45%、优选约75%至98%相同的共同结构域的氨基酸序列在本文被定义为足够相似。变体包括在严格条件下与本发明的多核苷酸或其补体杂交的多核苷酸编码的靶向构建体的变体。这类变体通常保留本发明的靶向构建体的功能活性。多核苷酸的片段文库可用于产生用以筛选和随后选择的片段的多样化群体。例如,片段文库可通过以下方式产生:在每分子仅发生约1次切口的条件下,用核酸酶处理多核苷酸的双链PCR片段,使双链DNA变性、使DNA复性以形成可包括来自不同切口产物的有义/反义对的双链DNA,通过用S1核酸酶处理从重新形成的双链体中除去单链部分,并且将所得到的片段文库连接至表达载体中。通过这种方法,可导出编码本发明的靶向构建体的不同大小的N-末端和内部片段的表达文库。

[0372] 变体包括由于诱变而在氨基酸序列方面不同的靶向构建体。此外,靶向构建体的生物等效类似物还可通过对靶向部分和/或活性部分中的残基或序列进行各种取代来构建。

[0373] 在一些实施方案中,靶向构建体在其N-末端融合至信号肽。这类信号肽适用于靶向构建体的分泌。合适的信号肽包括例如CD5蛋白质的信号肽(如人CD5蛋白的信号肽MPMGS LQPLATLYLLGMLVAS, SEQ ID NO:54)。在一些实施方案中,使用CR2蛋白的信号肽。例

如,在一些实施方案中,使用人CR2蛋白的信号肽(MGAAGLLGVFLALVAPG,SEQ ID NO:55或MGAAGLLGVFLALVAPGVLG,SEQ ID NO:56)。

[0374] 靶向构建体产生方法

[0375] 可使用分子生物学和蛋白质化学领域中已知的多种技术来产生本文所述的靶向构建体。例如,编码本文所述的靶向构建体的核酸可插入包含转录和翻译调控序列的表达载体中,所述序列包括例如启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、转录终止子信号、多腺苷酸化信号以及增强子或活化子序列。调控序列包括启动子和转录起始和终止序列。此外,表达载体可包括多于一个复制系统,以使得它可维持在两种不同的生物体中,例如维持在哺乳动物或昆虫细胞中以用于表达并且维持在原核宿主中以用于克隆和扩增。

[0376] 若干可能的载体系统可用于在哺乳动物细胞中从核酸表达靶向构建体。一类载体依赖于所需基因序列整合至宿主细胞基因组中。具有稳定整合的DNA的细胞可通过同时引入以下耐药基因来进行选择:如大肠杆菌gpt (Mulligan和Berg (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:2072) 或Tn5 neo (Southern和Berg (1982) Mol Appl Genet 1:327)。选择性标志物基因可连接至待表达的DNA基因序列,或通过共转染引入相同细胞(Wigler等人 (1979) Cell 16:77)。第二类载体利用赋予染色体外质粒自主复制能力的DNA元件。这些载体可来源于动物病毒,如牛乳头瘤病毒 (Sarver等人 (1982) Proc Natl Acad Sci USA, 79:7147)、多瘤病毒 (Deans等人 (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:1292) 或SV40病毒 (Lusky和Botchan (1981) Nature 293:79)。

[0377] 表达载体可以适于核酸的随后表达的方式引入细胞中。引入方法在很大程度上由靶细胞类型指定,如以下所讨论。示例性方法包括CaP04沉淀、脂质体融合、脂质转染剂、电穿孔,病毒感染、葡聚糖介导的转染、聚凝胺介导的转染、原生质体融合和直接显微注射。

[0378] 用于表达靶向构建体的适当宿主细胞包括酵母、细菌、昆虫、植物以及如上所述哺乳动物细胞。感兴趣的是细菌如大肠杆菌、真菌如酿酒酵母和毕赤酵母、昆虫细胞如SF9,哺乳动物细胞系(例如人细胞系)以及原代细胞系(例如原代哺乳动物细胞)。在一些实施方案中,靶向构建体可在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或合适的骨髓瘤细胞系如(NS0)中表达。合适的细胞系还包括,例如,BHK-21(幼仓鼠肾)细胞;293(人胚肾)细胞;HMEpC(人乳腺上皮细胞);3T3(小鼠胚胎成纤维细胞)细胞。

[0379] 靶向部分和一个或多个活性部分可任选地彼此直接连接,或可任选地通过接头连接。当靶向部分和活性部分直接连接时,制备出杂合载体,其中使用已知的科学方法将编码靶向部分和活性部分的DNA本身彼此直接连接。当使用接头时,制备出杂合载体,其中编码靶向部分的DNA连接至编码接头的一端的DNA;并且编码活性部分的DNA连接至接头的另一端。以正确取向进行这些连接的方法是已知的。可以串联形式或作为三路连接来进行这种连接。可充当本发明中的接头序列的序列的实例包括长度为约2至约16个氨基酸的短肽。适用作本发明的接头的肽序列是(Gly-Ser) n ,其中 $n=1$ 至8;(GlyGlyGlySer) n ,其中 $n=1$ 至4;(GlySerSerGly) n ,其中 $n=1$ 至4。适用作本发明的接头序列的序列的其他实例包括来自以下补体相关蛋白中的一种或多种的一个或多个短保守区(SCR)结构域:H因子;补体受体1;补体受体2;B因子;DAF等。

[0380] 本领域的技术人员将认识到,可用于本发明的许多活性部分作为联合信号肽或前

导肽的分泌蛋白和/或作为经历进一步细胞内或细胞外加工的前肽而天然存在。在此类情况下,本发明的杂合载体可包含编码此类信号肽或前导肽的一个或多个DNA序列和/或编码此种前肽序列的一个或多个DNA序列,这取决于是否需要此类分泌和/或加工。或者,本公开的杂合载体可包括编码不同信号肽或前导肽的DNA序列和/或被选择来优化靶向构建体的表达和定位的前肽序列。在大多数情况下,可省略信号肽,因为靶向部分将为活性部分靶向受试者体内的所需组织和细胞提供足够信息。

[0381] 在一些实施方案中,可在转基因动物(例如,转基因哺乳动物)中表达且从其纯化本文所述的靶向构建体。例如,本文所述的靶向构建体可在转基因非人哺乳动物(例如,啮齿动物、绵羊或山羊)中产生并从乳中分离,如例如在Houdebine (2002) *Curr Opin Biotechnol* 13 (6):625-629; van Kuik-Romeijn等人(2000) *Transgenic Res* 9 (2):155-159; 和Pollock等人(1999) *J Immunol Methods* 231 (1-2):147-157中所描述。在哺乳动物乳产物中产生蛋白质的另外方法描述于例如,美国专利申请公布号200600105347和20040006776以及美国专利号7,045,676中。

[0382] 可通过在足以允许蛋白质表达的条件且持续一定时间量下,培养用含有编码抗体的核酸的表达载体转化的宿主细胞来从细胞产生本文所述的靶向构建体。蛋白质表达的此类条件将根据表达载体和宿主细胞的选择而不同,并且将由本领域的技术人员通过常规实验容易地确定。例如,大肠杆菌中表达的多肽可从包涵体重折叠(参见例如Hou等人(1998) *Cytokine* 10:319-30)。细菌表达系统及其使用方法是本领域中众所周知的(参见, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley&Sons, 和 *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*--第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001))。密码子、合适的表达载体以及合适的宿主细胞的选择将取决于多种因素而不同,并且可根据需要容易地优化。本文所述的靶向构建体可在哺乳动物细胞中或其他表达系统中表达,包括但不限于酵母、杆状病毒和体外表达系统(参见,例如, Kaszubska等人(2000) *Protein Expression and Purification* 18:213-220)。

[0383] 在表达后,可分离靶向构建体。当应用于本文所述的任何蛋白质(例如,靶向构建体、靶向部分和/或活性部分)时,术语“纯化的”或“分离的”是指已从天然伴随其的组分(例如,蛋白质或其他天然存在的生物或有机分子)分离或纯化的多肽,例如,表达所述蛋白质的原核细胞中的其他蛋白质、脂质和核酸。通常,当多肽占样品中总蛋白质的至少60重量%(例如,至少65重量%、70重量%、75重量%、80重量%、85重量%、90重量%、92重量%、95重量%、97重量%或99重量%)时,多肽是纯化的。

[0384] 取决于存在于样品中的其他组分,可以本领域中的技术人员已知的多种方式分离或纯化本文所述的靶向构建体。标准纯化方法包括电泳技术、分子技术、免疫学技术和色谱技术,包括离子交换色谱法、疏水色谱法、亲和色谱法和反相HPLC色谱法。例如,可使用标准抗靶向构建体抗体亲和柱来纯化靶向构建体。与蛋白浓缩结合的超滤技术及渗滤技术也是有用的。参见例如Scopes (1994) “*Protein Purification*, 第3版” Springer-Verlag, New York City, New York。所需的纯化程度将取决于所需用途而不同。在一些情况下,将不需要其表达多肽的纯化。

[0385] 用于测定纯化多肽的产率或纯度的方法是本领域中已知的,并且包括,例如, Bradford测定、UV光谱、双缩脲蛋白测定、Lowry蛋白测定、酰氨黑蛋白测定、高压液相色谱

(HPLC)、质谱(MS)和凝胶电泳法(例如,使用蛋白质染色,如考马斯蓝或胶体银染色)。

[0386] 在一些实施方案中,可使用本领域中众所周知的化学方法,全部或部分地从头合成本文所述的靶向构建体。例如,组分氨基酸序列可通过固相技术合成,从树脂裂解,并通过制备型高效液相色谱法进行纯化,然后化学连接以形成所需多肽。可通过氨基酸分析或测序确认合成肽的组成。

[0387] 一旦表达和/或纯化,可使用体外或体内测定(如本文所述的测定中的任一种),测定本文所述的靶向构建体的多种所需特性中的任一种。例如,可测定本文所述的靶向构建体抑制补体活性的能力,如中所述。

[0388] 在一些实施方案中,可从靶向构建体制剂中除去内毒素。用于从蛋白质样品中除去内毒素的方法是本领域中已知的。例如,可使用多种可商购的试剂从蛋白质样品中除去内毒素,所述试剂包括但不限于ProteoSpin™内毒素去除试剂盒(Norgen Biotek Corporation)、Detoxi-Gel内毒素去除凝胶(Thermo Scientific;Pierce Protein Research Products)、MiraCLEAN®内毒素去除试剂盒(Mirus)或Acrodisc™-Mustang®E膜(Pall公司)。

[0389] 用于检测和/或测量存在于样品(纯化前和纯化后两者)中的内毒素的量的方法是本领域中已知的,并且可使用商业试剂盒。例如,蛋白质样品中内毒素的浓度可使用QCL-1000显色试剂盒(BioWhittaker)、基于鲎变形细胞溶解物(LAL)的试剂盒如可从Associates of Cape Cod Incorporated获得的Pyrotell®、Pyrotell®-T、Pyrochrome®、Chromo-LAL和CSE试剂盒进行测定。

[0390] 在表达和纯化后,可修饰本文所述的靶向构建体。修饰可以是共价修饰或非共价修饰。可通过以下方式将此类修饰引入靶向构建体中:例如,使靶向部分和/或活性部分中的靶向氨基酸残基与有机衍生化试剂反应,所述有机衍生化试剂能够与选定侧链或末端残基反应。可使用多种标准中的任何一种选择修饰的合适位点,所述标准包括例如,本文所述的靶向构建体的结构分析或氨基酸序列分析。

[0391] 在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体可与异源部分缀合。在异源部分为多肽的实施方案中,本文所述的靶向构建体和相应的异源部分可以融合蛋白的方式连接。异源部分可以是,例如,异源多肽、治疗剂(例如,毒素或药物)或可检测标记,如但不限于,放射性标记、酶标记、荧光标记或发光标记。合适的异源多肽包括,例如用于纯化靶向构建体的抗原性标签(例如,FLAG、聚组氨酸、血凝素(HA)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或麦芽糖结合蛋白(MBP))。异源多肽还包括适用作诊断或可检测标志物的多肽,例如,荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。当异源部分是多肽时,所述部分可被并入本文所述的融合蛋白中,从而产生融合蛋白。

[0392] 在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体可与可检测部分缀合。在可检测部分为多肽(例如GFP)的实施方案中,本文所述的靶向部分和相应的可检测部分可以融合蛋白的方式连接。可检测部分可以是,例如,异源多肽、治疗剂(例如,毒素或药物)或可检测标记,如但不限于,放射性标记、酶标记、荧光标记或发光标记。合适的异源多肽包括,例如用于纯化靶向构建体的抗原性标签(例如,FLAG、聚组氨酸、血凝素(HA)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)或麦芽糖结合蛋白(MBP))。异源多肽还包括适用作诊断或可检测标志物的多肽,例

如,荧光素酶、绿色荧光蛋白 (GFP) 或氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。

[0393] 缀合物

[0394] 在一些实施方案中,通过将两个独立产生的多肽片段(例如,抗体(例如,B4或C2抗体的Fab片段)和补体调节多肽(例如,可溶性形式的CD59))连接起来而产生本文所述的融合分子。在某些实施方案中,靶向部分通过赖氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸氨基酸与活性部分缀合。靶向部分可通过例如包括以下的反应与活性部分缀合:硫醇化靶向部分和活性部分的马来酰基活化的胺;EDC/NHS-活化的靶向部分和活性部分的胺;或活性部分的EDC/NHS-活化的羧酸和靶向部分的胺。在一些实施方案中,可使用多种已知的化学交联剂中的任一种使两种蛋白质(例如,本文所述的靶向构建体和异源部分,或靶向构建体的两个组成部分)化学交联。此类交联剂的实例是通过包括“位阻”二硫键的键联连接两个氨基酸残基的那些交联剂。在这些键联中,交联单元内的二硫键被保护(通过二硫键任一侧上的位阻基团)免于例如通过还原的谷胱甘肽或二硫化物还原酶的作用还原。一种合适的试剂4-琥珀酰亚胺基氧基羰基-甲基- α (2-吡啶二硫代) 甲苯 (SMPT) 利用一个蛋白质上的末端赖氨酸和另一个蛋白质上的末端半胱氨酸在两个蛋白质之间形成这种键联。还可使用通过每个蛋白质上的不同偶联部分进行交联的异双功能试剂。其他有用的交联剂包括,但不限于,连接两个氨基的试剂(例如,N-5-叠氨基-2-硝基苄基氧基琥珀酰亚胺)、连接两个巯基的试剂(例如,1,4-双-马来酰亚胺基丁烷)、连接氨基和巯基的试剂(例如,m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、连接氨基和羧基的试剂(例如,4-[对叠氨基水杨基酰胺基]丁胺)以及连接氨基和存在于精氨酸侧链中的胍基的试剂(例如,对-叠氨基苯基乙二醛一水合物)。

[0395] 在一些实施方案中,本文所述的融合蛋白可含有异源部分,所述异源部分化学连接至融合蛋白。例如,在一些实施方案中,可将本文所述的药物、荧光标记、顺磁性标记、放射性标签等直接缀合至靶向构建体和/或靶向部分的氨基酸主链(例如,以用于使用标记的靶向构建体进行体内成像研究)。

[0396] 在一些实施方案中,例如,可用改进靶向构建体在循环中(例如,在血液、血清或其他组织中)的稳定和/或保留的部分修饰靶向构建体。例如,本文所述的靶向构建体可以是PEG化的,如例如Lee等人(1999) *Bioconjug Chem* 10 (6):973-8;Kinstler等人(2002) *Advanced Drug Deliveries Reviews* 54:477-485;和Roberts等人(2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476中所描述。稳定部分可使靶向构建体的稳定性或保留提高至少1.5(例如至少2、5、10、15、20、25、30、40或50或更多)倍。

[0397] 在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体可以是糖基化的。在一些实施方案中,本文所述的靶向构建体可经受酶或化学处理,或从细胞产生,以使得靶向构建体、靶向部分和/或活性部分的糖基化降低或不存在。用于产生具有降低的糖基化的多肽的方法是本领域中已知的,并且在例如美国专利号6,933,368;Wright等人(1991) *EMBO J* 10 (10):2717-2723;和Co等人(1993) *Mol Immunol* 30:1361-1367中描述。

[0398] 药物组合物

[0399] 本文还提供药物组合物,其包含本文所述的抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)和药学上可接受的载体。药物组合物可适用于本文所述的多种施用模式,包括例如全身或局部施用。药物组合物可呈滴眼剂、可注射溶液的形式,或者呈适合于

吸入(通过口或鼻)或口服施用的形式。本文所述的药物组合物可以单个单位剂量或以多剂型包装。

[0400] 在一些实施方案中,药物组合物包含本文所述的抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)以及适合于向人施用的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物包含靶向构建体以及适合于眼内注射的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物包含靶向构建体以及适合于局部施用至眼睛的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物包含靶向构建体以及适合于静脉内注射的药学上可接受的载体。在一些实施方案中,药物组合物包含靶向构建体以及适合于注射至动脉(例如肾动脉)中的药学上可接受的载体。

[0401] 组合物通常被配制为无菌、大致上等渗并且完全遵循美国食品药品监督管理局的所有药品生产质量管理规范(GMP)条例。在一些实施方案中,所述组合物不含病原体。对于注射,药物组合物可呈液体溶液的形式,例如呈生理相容的缓冲液如汉克氏溶液(Hank's solution)或林格氏溶液(Ringer's solution)的形式。此外,靶向构建体药物组合物可呈固体形式且在使用之前即刻再溶解或悬浮。还包括冻干组合物。

[0402] 对于口服施用,药物组合物可采取通过常规方式用药学上可接受的赋形剂制备的例如片剂或胶囊的形式,所述赋形剂如粘合剂(例如,预胶凝玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(例如月桂基硫酸钠)。用于口服施用的液体制剂可采取例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或它们可呈现为用于在使用之前用水或其他适合的媒介物复原的干燥产品。所述液体制剂可通过常规手段用药学上可接受的添加剂制备,所述添加剂如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水媒介物(例如,油、油酯、乙醇或分馏植物油);和防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。所述制剂还可包含适当的缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

[0403] 在一些实施方案中,本发明提供组合物,其包含抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)以及适于施用至眼睛的药学上可接受的载体。此类药物载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物和合成来源的那些油,如花生油、大豆油、矿物油等。盐水溶液和右旋糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、凝胶、麦芽、大米、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、甘油、丙烯、水等。如果需要,药物组合物还可包含少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。靶向构建体以及组合物的其他组分可包入聚合物或纤维蛋白胶中以提供靶向构建体的控制释放。这些组合物可采取溶液、悬浮液、乳液、软膏、凝胶或其他固体或半固体组合物等形式。组合物通常具有4.5至8.0范围内的pH。组合物还必须被配制成具有与眼睛和眼组织的房水相容的渗透值。此类渗透值将通常在约200至约400渗透压克分子数/千克水("mOsm/kg")的范围内,但将优选地为约300mOsm/kg。认为视网膜具有约283mOsm/kg的渗透值。

[0404] 在一些实施方案中,组合物根据常规程序配制为适合于静脉内、腹膜内或玻璃体内注射的药物组合物。通常,用于注射的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂(如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。一般来说,所

述成分单独或混合在一起以单位剂型(例如作为干燥冻干粉末或无水浓缩物)提供于指示活性剂的量的密闭容器(如安瓿或药囊)中。当组合物待通过输注施用,所述组合物可用含有无菌药用级水或盐水的输注瓶来分配。当组合物是通过注射施用,可提供注射用无菌水或盐水的安瓿以使得成分可在施用之前混合。

[0405] 组合物还可包含另外的成分,例如防腐剂、缓冲剂、张度剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子型润湿剂或澄清剂、增粘剂等。

[0406] 用于在溶液中使用的适合防腐剂包括聚季铵盐-1、苯扎氯铵、硫柳汞、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯乙醇、依地酸二钠、山梨酸、苄索氯铵等。通常(但不是必须地),这类防腐剂以0.001重量%至1.0重量%的水平使用。

[0407] 合适的缓冲剂包括硼酸、碳酸氢钠和碳酸氢钾、硼酸钠和硼酸钾、碳酸钠和碳酸钾、乙酸钠、磷酸氢钠等,其量足以将pH维持在约pH 6与pH 8之间,并且优选地在约pH 7与pH 7.5之间。

[0408] 合适的张度剂为葡聚糖40、葡聚糖70、右旋糖、甘油、氯化钾、丙二醇、氯化钠等,以使得眼用溶液的氯化钠当量在 $0.9 \pm 0.2\%$ 的范围内。

[0409] 合适的抗氧化剂和稳定剂包括亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、硫脲等。合适的润湿剂和澄清剂包括聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆282和泰洛沙泊。合适的增粘剂包括葡聚糖40、葡聚糖70、明胶、甘油、羟乙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、羊毛脂、甲基纤维素、凡士林、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素等。

[0410] 使用增粘剂提供粘度比简单水溶液的粘度大的局部用组合物对于增加活性化合物被靶组织眼内吸收或者增加在眼中的保留时间来说可能是期望的。这类增粘剂包括例如聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素或本领域的技术人员已知的其他试剂。此类试剂通常以0.01重量%至2重量%的水平使用。

[0411] 在一些实施方案中,提供一种用于递送编码靶向构建体的核苷酸的药物组合物。用于基因疗法的药物组合物可在可接受的稀释剂中,或者可包含基因递送媒介物或化合物包埋于其中的缓慢释放基质。或者,在可由重组细胞完整产生整个基因递送系统(例如,逆转录病毒载体)的情况下,药物组合物可包含一个或多个产生基因递送系统的细胞。

[0412] 在临床环境中,用于基因治疗的基因递送系统可通过多种方法中的任一种引入受试者中。举例来说,基因递送系统的药物组合物可例如通过静脉内注射全身引入,并且蛋白质在靶细胞中的特异性转导主要由于以下原因发生:基因递送媒介物提供的转染特异性、由于控制受体基因表达的转录调控序列所致的细胞型或组织型表达或其组合。在其他实施方案中,重组基因的初始递送更多地受向十分局部化的动物中引入的限制。例如,基因递送媒介物可通过导管引入,参见美国专利5,328,470,或者通过立体定向注射,Chen等(1994), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:3054-3057。可使用Dev等(1994), *Cancer Treat. Rev.* 20:105-115描述的技术,通过电穿孔在基因疗法构建体中递送编码靶向构建体的多核苷酸。

[0413] 在一些实施方案中,提供用于基因递送到眼睛的药物组合物。用于储存和/或递送表达载体的眼用溶液已经例如在W003077796A2中公开。

[0414] 待治疗的疾病

[0415] 本文所述的治疗和诊断的方法可用于治疗或诊断多种疾病,包括但不限于炎性疾

病、移植排斥、妊娠相关疾病、药物不良反应、由缺血再灌注损伤引起的组织损伤、眼病、肾病、关节病以及自身免疫性疾病或免疫复合物性疾病。在一些实施方案中，待治疗或诊断的疾病包括但不限于系统性红斑狼疮和肾小球肾炎、类风湿性关节炎、心肺分流和血液透析、器官移植中的超急性排斥、心肌梗塞、局部缺血/再灌注损伤、抗体介导的同种异体移植排斥（例如肾中）、以及成人呼吸窘迫综合征。此外，其他炎性病状和自身免疫性/免疫复合物性疾病也与补体活化密切相关，包括但不限于热损伤、严重哮喘、过敏性休克、肠炎症、荨麻疹、血管性水肿、血管炎、多发性硬化症、重症肌无力、心肌炎、膜性增生性肾小球肾炎、非典型溶血性尿毒综合征、斯耶格伦氏综合征、肾和肺部局部缺血/再灌注和其他器官特异性炎性疾病。因此，在一些实施方案中，本文所述的方法特别适用于治疗或诊断补体介导的疾病，所述疾病包括但不限于炎性疾病、移植排斥、妊娠相关疾病、药物不良反应、由缺血再灌注损伤引起的组织损伤、眼病、肾病、关节病或自身免疫性或免疫复合物性疾病。在一些实施方案中，本文还提供治疗或诊断个体中补体介导的疾病的方法，所述方法包括向所述个体施用有效量的本文所述的任何组合物（如包含靶向构建体的组合物）。

[0416] 本文所述的方法特别适用于治疗或诊断炎性疾病，所述疾病包括但不限于烧伤、内毒素血症、败血性休克、成人呼吸窘迫综合征、心肺分流、血液透析、过敏性休克、哮喘、血管性水肿、克罗恩氏病、镰状细胞性贫血、链球菌感染后肾小球肾炎、膜性肾炎、胰腺炎、类风湿性关节炎、炎性关节炎、炎性肠病、急性肺损伤和弥散性血管内凝血（DIC）。在一些实施方案中，炎症（如补体介导的炎症）与由以下引起的组织损伤相关：炎性疾病或自身炎性疾病、移植排斥（细胞或抗体介导的）、妊娠相关疾病、药物不良反应，变性、新生血管性、溶血性、血栓形成性、血管炎性、关节炎性、再生性、创伤性、自身免疫性或免疫复合物性疾病。

[0417] 本文所述的组合物还适用于治疗或诊断移植排斥，包括但不限于超急性移植排斥、抗体介导的移植排斥、细胞介导的移植排斥、急性移植排斥和慢性移植排斥。在一些实施方案中，移植物是异种移植物、同种异体移植物或同系移植物。在一些实施方案中，移植物是流体、细胞、组织或器官。在一些实施方案中，移植物选自由以下组成的组：心、肝、肾、肺、胰腺、肠、胃、睾丸、手、臂、腿、子宫、卵巢和胸腺。在一些实施方案中，移植物选自由以下组成的组：骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜、郎格罕氏岛、骨髓、造血干细胞、输血或静脉。在一些实施方案中，移植物是心脏、肝或肾。移植排斥可导致若干并发症如移植物抗宿主病。在一些实施方案中，补体介导的疾病是移植物抗宿主病。

[0418] 本文所述的方法还特别适用于治疗或诊断妊娠相关的疾病，包括但不限于HELLP（溶血性贫血、肝酶升高和低血小板计数）、复发性流产、非典型溶血性尿毒综合征、胎儿缺氧综合征、高血压病和先兆子痫。

[0419] 此外，本文所述的方法适用于治疗或诊断药物不良反应，包括但不限于药物过敏、射线照相造影剂过敏和IL-2诱导的血管渗漏。

[0420] 本文所述的方法还适用于治疗或诊断由缺血再灌注损伤引起的组织损伤，包括但不限于急性心肌梗塞、动脉瘤、动脉瘤修复、深低温停循环技术、止血带使用、实体器官移植、中风（包括围产期中风）、失血性休克、挤压伤、多器官衰竭、血液透析、低血容量性休克、脊髓损伤、创伤性脑损伤、肠局部缺血、视网膜局部缺血、心肺分流、用于失败的经皮腔内冠状动脉成形术（PCTA）的急性冠状动脉手术以及使用血管横跨钳闭的任何血管手术、操纵胰腺或胆管后的胰腺炎。在一些实施方案中，组织损伤可在触发缺血再灌注损伤的缺血

性事件(如肠缺血)之前、期间或之后治疗。

[0421] 在一些实施方案中,通过在再灌注前施用本文所公开的靶向构建体(或包含靶向构建体的组合物),使用本文所公开的任何方法治疗或诊断组织损伤。在一些实施方案中,通过在再灌注之后施用本文所公开的靶向构建体(或包含靶向构建体的组合物),使用本文所公开的任何方法治疗或诊断组织损伤。在一些实施方案中,缺血再灌注损伤选自自由以下组成的组:心肌缺血再灌注损伤、肾缺血再灌注损伤、胃肠缺血再灌注损伤、肝缺血再灌注损伤、骨骼肌缺血再灌注损伤、脑缺血再灌注损伤、肺缺血再灌注损伤、肠缺血再灌注损伤、视网膜缺血再灌注损伤和关节缺血再灌注损伤。在一些实施方案中,组织损伤由氧化损伤引起。

[0422] 存在疗法或手术诱导再灌注但不诱导缺血(本文称为非缺血性再灌注损伤)的情况。此类疗法或手术包括但不限于,药理溶栓,包括用于中风、急性冠脉综合征、外周动脉闭塞、肺栓塞、肾动脉闭塞的静脉内和血管内疗法,机械溶栓,例如经皮冠状动脉介入治疗、外周动脉血管成形术、内脏动脉血管成形术、冠状动脉旁路移植术、颈动脉内膜切除术,肠系膜缺血,休克包括出血性、心源性、神经性、过敏性休克,皮瓣失败(例如整形手术),指状物和肢状物的再植入以及绞窄性肠梗阻。因此,在一些实施方案中,通过施用本文所公开的靶向构建体(或包含靶向构建体的组合物),使用本文所公开的任何方法治疗或诊断由非缺血性再灌注损伤引起的组织损伤。

[0423] 本文所述的方法还特别适用于治疗或诊断肾病,包括但不限于急性肾损伤、溶血性尿毒综合征、肾小球肾炎、膜性肾小球肾炎、系膜增生性肾小球肾炎、急性感染后肾小球肾炎(如链球菌感染后肾小球肾炎)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎、狼疮性肾炎、膜增生性肾小球肾炎(如肾小球系膜毛细血管性肾小球肾炎)、致密物沉积病、微小病变疾病、糖尿病性肾病、亨舍二氏紫癜性肾炎、IgA肾病、慢性肾病、肾移植的移植物功能恢复延迟、急性和慢性肾移植排斥、蛋白尿肾病和肾病综合征、高血压肾病和局灶性节段性肾小球硬化症。在一些实施方案中,肾病是肾小球疾病。例如,所述方法适用于治疗或诊断导致天然IgM结合至损伤的肾小球的肾小球疾病。在一些实施方案中,损伤的肾小球可以是机械、代谢、化学、氧化或免疫应激的结果。在一些实施方案中,损伤的肾小球可以是缺血、糖尿病、高血压和继发性局灶性节段性肾小球硬化症的结果。损伤的肾小球的症状包括炎症反应如细胞因子释放和纤维化如胶原系膜基质沉积、管状细胞损伤和肾小管间质纤维化。所述方法还可适于治疗或诊断为肾小球炎症的肾病如肾小球肾炎。肾小球肾炎通常与包含补体组分(包括C3)的肾小球中的电子致密材料的沉积相关。所述方法还适用于治疗或诊断与肾缺血相关的急性肾损伤。缺血是急性肾损伤的主要原因。缺血和随后再灌注通过可导致小管周毛线血管的稀疏的内皮功能障碍、白细胞介导的炎症和减少的微血管血流量,将皮质髓质连接处的脆弱氧供需平衡朝负氧平衡偏移而引起急性肾损伤。平衡的偏移造成低氧环境并且可导致纤维化的积聚和慢性肾病的后续发展。在一些实施方案中,肾病是由于H因子缺乏所致。

[0424] 本文所述的方法还适用于治疗或诊断关节疾病,包括但不限于关节炎(如类风湿性关节炎)和与感染(如乙型肝炎感染)、炎症疾病(如炎症肠病)或自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮)相关的关节炎。在一些实施方案中,本文提供的方法适用于治疗或诊断关节疾病,包括但不限于关节炎、淀粉样关节病、淀粉样变性、强直性脊柱炎、腕管综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、多关节痛、腱炎、惠普尔病、滑囊炎、三叉神经痛、纤维肌瘤、纤维组织

炎、自身免疫性关节炎、类风湿性关节炎、幼年性关节炎、银屑病性关节炎、狼疮关节炎、多发性关节炎、非由自身免疫性疾病或病症引起的炎性关节炎,如感染性关节炎(即,由感染剂如细菌(包括支原体)、病毒、真菌引起的关节疼痛、酸痛、僵硬和肿胀)、脓毒性关节炎或骨关节炎。关节疾病可与症状如关节僵硬、疼痛、无力、关节疲劳、压痛和肿胀相关。因此,在一些实施方案中,可通过施用本文所公开的靶向构建体(或包含靶向构建体的组合物),使用本文所公开的任何方法治疗或诊断关节疾病的症状。例如,所述组合物适用于治疗或诊断关节炎或关节炎的症状。在一些实施方案中,关节炎选自以下组成的组:类风湿性关节炎、幼年发病型类风湿性关节炎、银屑病性关节炎和狼疮关节炎。在一些实施方案中,关节炎是骨关节炎。在一些实施方案中,关节炎是由细菌病原体引起的感染性关节炎,所述细菌病原体如流感嗜血杆菌、淋菌属种、支原体属种、脑膜炎球菌属种、肺炎球菌属种、链球菌属种、葡萄球菌属种、沙门氏菌属种、布氏杆菌属种、奈瑟氏球菌属种、念珠状链杆菌(哈弗希尔热)、肺结核分枝杆菌、苍白密螺旋体(梅毒)、雅司螺旋体(雅司)或立克次氏体属种。在一些实施方案中,关节炎是由病毒病原体引起的感染性关节炎,所述病毒病原体如风疹病毒、腮腺炎病毒、水痘带状疱疹病毒、腺病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、细小病毒、逆转录病毒和甲病毒属或肝炎病毒。在一些实施方案中,关节炎是由真菌引起的感染性关节炎,所述真菌如球孢子菌属种、组织浆菌属种、子囊酵母菌属种、隐球菌属种、假丝酵母属种或申克孢子丝菌属种。作为另一个实例,所述组合物适用于治疗或诊断关节疾病或关节疾病的症状。在一些实施方案中,关节疾病是关节炎、淀粉样关节病、淀粉样变性、强直性脊柱炎、腕管综合征、颞动脉炎、风湿性多肌痛、多关节痛、腱炎、惠普尔病、滑囊炎、三叉神经痛、纤维肌瘤和纤维组织炎。在一些实施方案中,关节疾病与关节炎相关。在一些实施方案中,关节疾病在关节炎的发展之前。在一些实施方案中,关节疾病由于关节炎的发病而发展。

[0425] 类风湿性关节炎影响约1%的人口,其中女性受影响的几率普遍比男性高三倍。类风湿性关节炎和幼年发病型类风湿性关节炎是除关节炎症方面之外,具有多种病理表现的全身性疾病。在类风湿性关节炎中,这些表现包括血管炎(血管的炎症),其几乎可影响任何器官系统并且可引起多种病理后遗症,包括多发性神经病、皮肤溃疡和内脏梗塞。胸膜肺表现包括胸膜炎、间质性纤维化、胸膜肺结节、肺炎和动脉炎。其他表现包括炎性类风湿性结节在多个关节周结构如伸面以及胸膜和脑膜上的发展。骨骼肌的无力和萎缩是常见的。许多患有系统性红斑狼疮的患者还发展了被称为狼疮关节炎的关节炎症。系统性红斑狼疮是未知原因的自身免疫性疾病,其中许多不同的细胞、组织和器官被病原性自身抗体和免疫复合物损伤。系统性红斑狼疮的临床表现是多种的并且包括多种斑状丘疹、肾炎、大脑炎、血管炎、血液异常(包括血细胞减少和凝血功能障碍)、心包炎、心肌炎、肋膜炎、胃肠症状和前述关节炎症。骨关节炎代表最常见的慢性关节疾病。它表现为所涉及关节的疼痛、僵硬和肿胀。负责关节的最关键机械功能的关节软骨是骨关节炎的主要靶组织,并且骨关节炎中关节软骨的断裂由各种酶如金属蛋白酶、血纤维蛋白溶酶和组织蛋白酶介导,所述酶继而由还可充当炎性介体的各种因子刺激。这些因子包括细胞因子如白介素-1,其已知活化病原性软骨和滑液蛋白酶。随着疾病进展,滑膜炎症变得更频繁。银屑病性关节炎是一种慢性炎性关节,其影响5%至8%患有银屑病的人。这些个体中相当大比例(四分之一)进行性破坏性疾病。25%的患有关节炎症的银屑病患者发展对称性关节炎症,其类似于类风湿性关

节炎的炎症表现,并且这些患者中一半以上继续发展不同程度的关节破坏。

[0426] 本文所述的方法适用于治疗或诊断自身免疫性或免疫复合物,包括但不限于重症肌无力、阿尔茨海默氏病、多发性硬化症、肺气肿、肥胖症、视神经脊髓炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、IgG4相关疾病、胰岛素依赖型糖尿病、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森氏病、抗磷脂抗体综合征、血栓性血小板减少性紫癜、自身免疫性肝炎、克罗恩氏病、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯氏病、格林-巴利综合征、桥本氏病、特发性血小板减少性紫癜、天疱疮、斯耶格伦氏综合征、高安氏动脉炎、自身免疫性肾小球肾炎、致密物沉积病(也被称为II型膜增生性肾小球肾炎)、膜性疾病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑病变、葡萄膜炎、视网膜变性病症、糖尿病性肾病、局灶性节段性肾小球硬化症、ANCA相关脉管炎、溶血性尿毒综合征、Shiga-毒素相关的溶血性尿毒综合征、非典型溶血性尿毒综合征以及与心肺分流和血液透析相关的炎症。在一些实施方案中,待治疗或诊断的疾病是自身免疫性肾小球肾炎,其包括但不限于免疫球蛋白A肾病或I型膜性增生性肾小球性肾炎。在一些实施方案中,自身免疫性或免疫复合物性病症是炎症性疾病。

[0427] 本文所述的方法特别适用于治疗或诊断眼病,包括但不限于年龄相关性黄斑变性(“AMD”),包括湿性AMD和干性AMD、CMV视网膜炎、黄斑水肿、葡萄膜炎、青光眼、糖尿病性视网膜病变、色素性视网膜炎、视网膜脱离、增生性玻璃体视网膜病变和眼黑色素瘤。例如,所述方法适用于治疗或诊断年龄相关性黄斑变性(AMD)。AMD的临床特征在于由于被称为黄斑的视网膜区域中感光细胞的损伤而发生的中心视觉的逐渐丧失。AMD已经大致分成两种临床状态,湿型和干型,其中干型占总病例的高达80%-90%。干型的临床特征在于黄斑玻璃疣的存在和以伴随光感受器萎缩的RPE细胞死亡为特征的地图状萎缩,所述黄斑玻璃疣是位于视网膜色素上皮细胞(RPE)与布鲁赫氏膜之间的局部沉积物。湿性AMD(其占严重视觉丧失的约90%)与黄斑区域的新血管形成以及这些新血管的渗漏相关。血液和流体的积聚可引起视网膜脱离,接着快速光感受器变性和视觉丧失。一般认为AMD的湿型之前是干型并由干型引起。

[0428] AMD患者中玻璃疣的内含物分析已经显示大量炎性蛋白(包括淀粉状蛋白)、凝血因子以及大量补体途径的蛋白质。补体因子H的遗传变异大大增加了年龄相关性黄斑变性(AMD)的风险,从而表明不受控制的补体活化是AMD发病机制的基础。Edward等人, Science 2005, 308:421; Haines等人, Science 2005, 308:419; Klein等人, Science 308:385-389; Hageman等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102:7227。

[0429] 在一些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗或诊断巨细胞病毒(CMV)视网膜炎。CMV视网膜炎是引起视网膜中感光细胞的炎症的感染。CMV通常在免疫活性个体中罕见。然而,免疫功能不全的个体(例如由于疾病、移植或化学疗法)非常易感CMV视网膜炎。视网膜炎通常在一只眼睛中开始,但经常进展至另一只眼睛。在无治疗的情况下,对视网膜的进行性损伤可在4-6个月或更短的时间内导致失明。

[0430] 在一些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗或诊断黄斑水肿。黄斑水肿在流体和蛋白质沉积物在眼睛的黄斑之上或之下聚集时发生,从而引起增稠和肿胀。肿胀可扭曲个体的中心视觉,因为黄斑将提供明显、清晰的中心视觉以使得人能够看到直接凝视方向上的细节、形式和颜色的锥紧密聚集。黄斑水肿可分为两种类型。囊样黄斑水肿(CME)涉及继发于异常中心凹周视网膜毛细血管渗透性的外网层中的流体积聚。糖尿病性黄斑水肿

(DME)类似地由渗漏黄斑毛细血管引起。DME是增生性和非增生性糖尿病性视网膜病变两者中视觉丧失最常见原因。

[0431] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗或诊断葡萄膜炎,即葡萄膜(巩膜下的眼睛的虹膜、睫状体和脉络膜)的炎症。葡萄膜炎通常与眼感染、眼损伤和/或自身免疫性病症相关。然而,在许多情况下,原因是未知的。葡萄膜炎的最常见形式是涉及虹膜内炎症的前葡萄膜炎。后葡萄膜炎影响脉络膜,其是眼睛中部的血管层和结缔组织。葡萄膜炎的另一个形式是睫状体扁平部炎。这种炎症影响虹膜与脉络膜之间的狭窄区域(睫状体扁平部)。

[0432] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗或诊断青光眼,其是导致对视神经的损伤和视觉丧失的一组眼睛病状。神经损伤涉及视网膜神经节细胞在特征图中的损失。青光眼的许多不同亚型可全部被认为是视神经病变的一种类型。眼内压升高(例如高于21mmHg或2.8kPa)是对于青光眼来说最重要且唯一可更改的风险因素。眼内压随眼睛睫状突的液态房水产生以及其通过小梁网的引流变化。房水从睫状突流入后房,所述后房后部由晶状体和睫状小带限定,并且前部由虹膜限定。房水然后通过虹膜的瞳孔流入前房,所述前房后部由虹膜限定,并且前部由角膜限定。从那里,小梁网通过施莱姆管将房水引流至巩膜丛和常规血液循环中。

[0433] 在开角型/宽角型青光眼中,由于初始功能为吸收房水的小梁网的变性和阻塞,通过小梁网的流减少。房水吸收的丧失导致阻力增加并且因此导致眼中压力的慢性无痛积聚。在闭角型/窄角型青光眼中,虹膜角膜角度为完全闭合的,因为虹膜末卷和根部针对角膜向前位移,从而导致含水流体不能从后房流至前房,并且然后流出小梁网。房水的积聚引起压力和疼痛的急性增加。

[0434] 在一些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗和/或诊断糖尿病性视网膜病变(一种引起由微血管视网膜变化导致的损伤的糖尿病并发症)。小血管,如眼睛中的那些小血管,尤其易受不良血糖控制的侵害。葡萄糖和/或果糖的过度积聚会损伤视网膜中的微小血管。高血糖症诱导的周细胞死亡和基底膜增厚导致视血管壁的渗透性增强,这改变血液-视网膜屏障的形成。在一些个体中,糖尿病性视网膜病变伴有黄斑水肿。随着糖尿病性视网膜病变进展,视网膜中氧的缺乏使得脆弱、新的血管沿视网膜并且在玻璃状液中生长。如果不及及时治疗,这些新血管可能会出血、使视力模糊并破坏视网膜和/或引起牵引性视网膜脱离。

[0435] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗或诊断色素性视网膜炎(RP),其是一组引起严重视觉损害和失明的遗传性变性眼病。已知多于60个基因的突变引起色素性视网膜炎。约20%的RP是常染色体显性(ADRP),20%是常染色体隐性(ARRP),并且10%是X连锁(XLRP),而剩余的50%存在于无任何已知患病亲属的患者中。与色素性视网膜炎相关的基因在视网膜中光感受器的结构和功能中起重要作用,并且这些细胞的进行性变性引起视觉丧失。

[0436] 在某些实施方案中,本文所述的方法可用于治疗或诊断增生性玻璃体视网膜病变,即通常为孔源性视网膜脱离并发症的眼内瘢痕组织的形成。在孔源性视网膜脱离期间,来自玻璃状液的流体进入视网膜孔。视网膜下腔中流体的积聚和视网膜上玻璃体的牵引力导致孔源性视网膜脱离。在此过程中,视网膜细胞层与玻璃体细胞因子相接触,这触发视网

膜色素上皮细胞(RPE)的增殖和迁移。RPE细胞经历上皮间质转化(EMT)并且发展迁移出进入玻璃体的能力。在此过程中,损失RPE细胞层-神经视网膜粘附和RPE-ECM(细胞外基质)粘附。RPE细胞铺设在纤维变性膜上,同时它们迁移并且这些膜在视网膜处收缩并且牵拉,并且这可导致原发性视网膜脱离手术后的继发性视网膜脱离。

[0437] 在某些实施方案中,本文所述的治疗方法可与例如用于修复视网膜裂孔、穿孔、脱离的手术或与例如用于治疗眼黑色素瘤的放射疗法结合使用。

[0438] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于治疗和/或改善角膜伤口愈合和/或角膜移植的结果。角膜伤口愈合反应是涉及上皮细胞、基质角膜细胞、角膜神经、泪腺、泪膜和免疫系统的细胞之间的细胞因子介导的相互作用的复杂级联。组织的反应取决于刺激损伤而变化。例如,类似于角膜屈光性外科手术中使用的那些,切开的层状和表面刮擦损伤之后是在一些方面类似但在其他方面不同的典型创伤愈合反应。例如,在身体的其他地方,伤口愈合以瘢痕形成和血管形成结束,而角膜伤口愈合的最重要方面之一是愈合过程如何达到使这些最终结果最小化的目的,否则将会具有严重视觉后果。角膜瘢痕的原因包括对正常角膜结构和功能的几乎任何破坏,无论是来自感染、激光屈光性手术、角膜移植、眼创伤(化学或物理)或角膜营养不良。

[0439] 角膜移植(也被称为角膜移植(corneal grafting))是其中受损或患病的角膜被捐献的角膜组织(移植物)全部(穿透性角膜移植术)或部分(板层角膜移植术)置换的外科手术。所述移植物来自最近逝者,所述逝者未患有已知疾病或可能影响所捐献的组织或受体的健康的其他因素。因为角膜不具有血管(它从房水吸取营养),它比皮肤上的切口愈合得更慢。风险与其他眼内手术类似,但另外包括移植排斥(终生)、脱离或板层移植的位移和原发性移植物无功能。还存在感染的风险。

[0440] 本发明提供通过施用有效量的包含靶向构建体的组合物来治疗或诊断本文所述的眼病的方法。在一些实施方案中,本发明提供治疗或诊断本文所述的眼病的一个或多个方面或症状的方法,所述方面或症状包括但不限于眼玻璃疣的形成、眼或眼组织中的炎症、感光细胞的丧失、视觉丧失(包括例如视敏度和视野)、新血管形成(如脉络膜新血管形成或CNV)和视网膜脱离。还包括其他相关方面,如光感受器变性、RPE变性、视网膜变性、脉络膜视网膜变性、视锥变性、视网膜功能障碍、响应于光暴露(如恒定光暴露)的视网膜损伤、布鲁赫氏膜的损伤、RPE功能丧失、RPE功能增益、正常黄斑的细胞和/或细胞外基质的组织构造(histoarchitecture)的完整性丧失、黄斑中细胞功能的丧失、光感受器营养不良、黏多糖贮积症、试杆视锥营养不良、视锥视杆营养不良、前葡萄膜炎和后葡萄膜炎以及糖尿病性神经病变。

[0441] 在一些实施方案中,提供治疗或诊断玻璃疣相关疾病的方法。术语“玻璃疣相关疾病”是指任何疾病,其中玻璃疣或玻璃疣样细胞外病斑的形成发生,并且其中玻璃疣或玻璃疣样细胞外病斑引起或促成所述疾病或者代表所述疾病的病征。例如,特征在于黄斑玻璃疣形成的AMD被认为是玻璃疣相关疾病。非眼玻璃疣相关的疾病包括但不限于淀粉样变性、弹性组织变性、致密物沉积病和/或动脉粥样硬化。

[0442] 眼病

[0443] 本文所述的组合物和方法特别适用于治疗眼病。例如,组合物和方法可适用于检测和/或治疗对眼睛的缺血/再灌注(I/R)损伤。如本文所用,术语“缺血/再灌注损伤”是指

低氧组织再灌注后对内皮和皮下实质组织的炎性损伤。它是造成对各种组织的急性和慢性损伤的常规综合症,所述各种组织包括例如心肌、中枢神经系统、后肢、肠和眼睛。缺血再灌注损伤可导致坏死和不可逆转的细胞损伤。补体途径(包括旁路补体途径)是I/R损伤的主要介体。本文提供的无创方法因此适用于检测与眼中发生的缺血再灌注相关的补体介导的炎症。

[0444] 本文提供的组合物和方法还可用于检测和/或治疗与玻璃疣相关疾病中补体介导的炎症。例如,特征为黄斑玻璃疣形成的年龄相关性黄斑变性(AMD)被认为是玻璃疣相关疾病。AMD的临床特征在于,由于被称为黄斑的视网膜区域中感光细胞的损伤而发生的中心视觉的渐进式丧失。AMD已经大致分成两种临床状态,湿型和干型,其中干型占总病例的高达80-90%。干型的临床特征在于黄斑玻璃疣的存在和以伴随光感受器萎缩的RPE细胞死亡为特征的地图状萎缩,所述黄斑玻璃疣是位于视网膜色素上皮细胞(RPE)与布鲁赫氏膜之间的局部沉积物。湿性AMD(其占严重视觉丧失的约90%)与黄斑区域的新血管形成以及这些新血管的渗漏相关。血液和流体的积聚可引起视网膜脱离,接着快速光感受器变性和视觉丧失。一般认为AMD的湿型之前是干型并由干型引起。

[0445] AMD患者中玻璃疣的内含物分析已经显示大量炎性蛋白(包括淀粉状蛋白)、凝血因子以及大量补体途径的蛋白质。补体因子H的遗传变异大大增加了年龄相关性黄斑变性(AMD)的风险,从而表明不受控制的补体活化是AMD发病机制的基础。Edward等人, Science 2005, 308:421; Haines等人, Science 2005, 308:419; Klein等人, Science 308:385-389; Hageman等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102:7227。此外,脂质积聚和修饰以及膜联蛋白II的存在已经在与AMD相关的病理结构中报道(参见例如以上引用的参考文献)。AMD的动物模型对补体治疗剂良好反应,如(Rohrer等人, (2009) Invest Ophthalmol Vis Sci. 50 (7):3056-64; Rohrer等人, (2012) J Ocul Pharmacol Ther. 28 (4):402-9)中所述的补体治疗剂。

[0446] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗巨细胞病毒(CMV)视网膜炎。CMV视网膜炎是引起视网膜中感光细胞炎症的感染。CMV通常在免疫活性个体中罕见。然而,免疫功能不全的个体(例如由于疾病、移植或化学疗法)非常易感CMV视网膜炎。视网膜炎通常在一只眼睛中开始,但经常进展至另一只眼睛。在无治疗的情况下,对视网膜的进行性损伤可在4-6个月或更短的时间内导致失明。

[0447] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗黄斑水肿。黄斑水肿在流体和蛋白质沉积物在眼睛的黄斑之上或之下聚集时发生,从而引起增稠和肿胀。肿胀可扭曲个体的中心视觉,因为黄斑将提供明显、清晰的中心视觉以使得人能够看到直接凝视方向上的细节、形式和颜色的锥紧密聚集。黄斑水肿可分为两种类型。囊样黄斑水肿(CME)涉及继发于异常中心凹周视网膜毛细管渗透性的外网层中的流体积聚。糖尿病性黄斑水肿(DME)类似地由渗漏黄斑毛细血管引发。DME是增生性和非增生性糖尿病性视网膜病变两者中视觉丧失最常见原因。

[0448] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗葡萄膜炎,即葡萄膜(巩膜下的眼睛的虹膜、睫状体和脉络膜)的炎症。葡萄膜炎通常与眼感染、眼损伤和/或自身免疫性病症相关。然而,在许多情况下,原因是未知的。葡萄膜炎的最常见形式是涉及虹膜内炎症的前葡萄膜炎。后葡萄膜炎影响脉络膜,其是眼睛中部的血管层和结缔组

织。葡萄膜炎的另一个形式是睫状体扁平部炎。这种炎症影响虹膜与脉络膜之间的狭窄区域(睫状体扁平部)。

[0449] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗青光眼,其是导致对视神经的损伤和视觉丧失的一组眼睛病状。神经损伤涉及视网膜神经节细胞在特征图中的损失。青光眼的许多不同亚型可全部被认为是视神经病变的一种类型。眼内压升高(例如高于21mmHg或2.8kPa)是对于青光眼来说最重要且唯一可更改的风险因素。眼内压随眼睛睫状突的液态房水产生以及其通过小梁网的引流变化。房水从睫状突流入后房,其后部由晶状体和睫状小带限定,并且前部由虹膜限定。房水然后通过虹膜的瞳孔流入前房,所述前房后部由虹膜限定,并且前部由角膜限定。从那里,小梁网通过施莱姆管将房水引流至巩膜丛和常规血液循环中。

[0450] 在开角型/宽角型青光眼中,由于初始功能为吸收房水的小梁网的变性和阻塞,通过小梁网的流减少。房水吸收的丧失导致阻力增加并且因此导致眼中压力的慢性无痛积聚。在闭角型/窄角型青光眼中,虹膜角膜角度为完全闭合的,因为虹膜末卷和根部针对角膜向前位移,从而导致含水流体不能从后房流至前房,并且然后流出小梁网。房水的积聚引起压力和疼痛的急性增加。

[0451] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗糖尿病性视网膜病变(一种引起由微血管视网膜变化导致的损伤的糖尿病并发症)。小血管,如眼睛中的那些小血管,尤其易受不良血糖控制的侵害。葡萄糖和/或果糖的过度积聚损伤视网膜中的微小血管。高血糖症诱导的周细胞死亡和基底膜增厚导致视血管壁的渗透性增强,这改变血液-视网膜屏障的形成。在一些个体中,糖尿病性视网膜病变伴有黄斑水肿。随着糖尿病性视网膜病变进展,视网膜中氧的缺乏使得脆弱、新的血管沿视网膜并且在玻璃状液中生长。如果不及时治疗,这些新血管可能会出血、使视力模糊并破坏视网膜和/或引起牵引性视网膜脱离。

[0452] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗色素性视网膜炎(RP),其是一组引起严重视觉损害和失明的遗传性变性眼病。已知多于60个基因的突变引起色素性视网膜炎。约20%的RP是常染色体显性(ADRP),20%是常染色体隐性(ARRP),并且10%是X连锁(XLRP),而剩余的50%存在于无任何已知患病亲属的患者中。与色素性视网膜炎相关的基因在视网膜中光感受器的结构和功能中起重要作用,并且这些细胞的进行性变性引起视觉丧失。

[0453] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于检测和/或治疗增生性玻璃体视网膜病变,即通常为孔源性视网膜脱离并发症的眼内瘢痕组织的形成。在孔源性视网膜脱离期间,来自玻璃状液的流体进入视网膜孔。视网膜下腔中流体的积聚和视网膜上玻璃体的牵引力导致孔源性视网膜脱离。在此过程中,视网膜细胞层与玻璃体细胞因子相接触,这触发视网膜色素上皮细胞(RPE)的增殖和迁移。RPE细胞经历上皮间质转化(EMT)并且发展迁移出进入玻璃体的能力。在此过程中,损失RPE细胞层-神经视网膜粘附和RPE-ECM(细胞外基质)粘附。RPE细胞铺设在纤维变性膜上,同时它们迁移并且这些膜在视网膜处收缩并且牵拉,并且这可导致原发性视网膜脱离手术后的继发性视网膜脱离。

[0454] 在某些实施方案中,本文所述的组合物可与例如用于修复视网膜裂孔、穿孔、脱离的手术或与例如用于治疗眼黑色素瘤的放射疗法结合使用。

[0455] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于治疗和/或改善角膜伤口愈合和/或角膜移植的结果。角膜伤口愈合反应是涉及上皮细胞、基质角膜细胞、角膜神经、泪腺、泪膜和免疫系统的细胞之间的细胞因子介导的相互作用的复杂级联。组织的反应取决于刺激损伤而变化。例如,类似于角膜屈光性外科手术中使用的那些,切开的层状和表面刮擦损伤之后是在一些方面类似但在其他方面不同的典型创伤愈合反应。例如,在身体的其他地方,伤口愈合以瘢痕形成和血管形成结束,而角膜伤口愈合的最重要方面之一是愈合过程如何达到使这些最终结果最小化的目的,否则将会具有严重视觉后果。角膜瘢痕的原因包括对正常角膜结构和功能的几乎任何破坏,无论是来自感染、激光屈光性手术、角膜移植、眼创伤(化学或物理)或角膜营养不良。

[0456] 角膜移植(也被称为角膜移植(corneal grafting))是其中受损或患病的角膜被捐献的角膜组织(移植物)全部(穿透性角膜移植术)或部分(板层角膜移植术)置换的外科手术。所述移植物来自最近逝者,所述逝者未患有已知疾病或可能影响所捐献的组织或受体的健康的其他因素。因为角膜不具有血管(它从房水吸取营养),它比皮肤上的切口愈合得更慢。风险与其他眼内手术类似,但另外包括移植排斥(终生)、脱离或板层移植的位移和原发性移植物无功能。还存在感染的风险。

[0457] 本发明提供通过施用有效量的包含靶向构建体的组合物来检测和/或治疗本文所述的眼病的方法。在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防本文所述的眼病的一个或多个方面或症状的方法,所述方面或症状包括但不限于眼玻璃疣的形成、眼或眼组织中的炎症、感光细胞的丧失、视觉丧失(包括例如视敏度和视野)、新血管形成(如脉络膜新血管形成或CNV)和视网膜脱离。还包括其他相关方面,如光感受器变性、RPE变性、视网膜变性、脉络膜视网膜变性、视锥变性、视网膜功能障碍、响应于光暴露(如恒定光暴露)的视网膜损伤、布鲁赫氏膜的损伤、RPE功能丧失、RPE功能增益、正常黄斑的细胞和/或细胞外基质的组织构造(histoarchitecture)的完整性丧失、黄斑中细胞功能的丧失、光感受器营养不良、黏多糖贮积症、试杆视锥营养不良、视锥视杆营养不良、前葡萄膜炎和后葡萄膜炎以及糖尿病性神经病变。在一些实施方案中,本发明提供改善角膜伤口愈合和/或改善角膜移植的结果的方法。

[0458] 在一些实施方案中,提供治疗个体中的眼病例如本文所述的眼病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)包含治疗性部分或其片段的活性部分。在某些实施方案中,眼病是AMD。在某些实施方案中,AMD是湿性AMD。在某些实施方案中,AMD是干性AMD。除黄斑变性之外,可通过本发明的方法治疗的其他眼病包括例如色素性视网膜炎、糖尿病性视网膜病变和涉及局部炎性过程的其他眼病。在一些实施方案中,眼病是葡萄膜炎(前葡萄膜炎和后葡萄膜炎)。在一些实施方案中,眼病是色素性视网膜炎。在一些实施方案中,眼病涉及角膜。在一些实施方案中,眼病是增生性玻璃体视网膜病变、视网膜脱离、角膜伤口愈合、角膜移植或眼黑色素瘤。

[0459] 在一些实施方案中,提供治疗(如降低、延迟、消除或预防)个体的眼睛中玻璃疣的形成和其他细胞外沉积的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,例如本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供治疗(如降低、延迟、消除或

预防)个体眼睛中的炎症的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,例如本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供治疗(如降低、延迟、消除或预防)个体中感光细胞的丧失的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,例如本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供治疗(如降低、延迟、消除或预防)个体中感光细胞的丧失的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,例如本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供治疗(如降低、延迟、消除或预防)与AMD相关的新血管形成的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,即本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供治疗(如降低、延迟、消除或预防)视网膜脱离的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,例如本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供改善(包括例如减少、延迟或阻断其丧失)个体眼睛中视敏度或视野的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的包含靶向构建体的组合物,所述靶向构建体包含:a)包含B4或C2抗体或其片段的靶向部分,和b)活性部分,即本文所述的一种或多种治疗性部分。在一些实施方案中,提供改善个体眼睛中的角膜伤口愈合或角膜移植的结果的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的本文所述的靶向构建体。

[0460] 在一些实施方案中,提供治疗玻璃疣相关疾病的方法。术语“玻璃疣相关疾病”是指任何疾病,其中玻璃疣或玻璃疣样细胞外病斑的形成发生,并且其中玻璃疣或玻璃疣样细胞外病斑引起或促成所述疾病或者代表所述疾病的病征。例如,特征在于黄斑玻璃疣形成的AMD被认为是玻璃疣相关疾病。非眼玻璃疣相关的疾病包括但不限于淀粉样变性、弹性组织变性、致密物沉积病和/或动脉粥样硬化。

[0461] 施用模式

[0462] 本文所述的组合物可通过任何途径施用至个体,所述途径包括但不限于静脉内(例如,通过输注泵)、腹膜内、眼内、动脉内、肺内、口服、吸入、膀胱内、肌内、气管内、皮下、眼内、鞘内、透皮、经胸膜、动脉内、局部、吸入(例如,作为喷雾)、粘膜(如通过鼻粘膜)、皮下、透皮、胃肠、关节内、脑池内、心室内、直肠(即,通过栓剂)、阴道(即,通过子宫托)、颅内、尿道内、肝内和瘤内。在一些实施方案中,全身性施用组合物(例如通过静脉内注射)。在一些实施方案中,局部施用组合物(例如通过动脉内注射或眼内注射)。

[0463] 在一些实施方案中,组合物直接施用至眼或眼组织。如本文所用,术语“眼”是指与眼相关的任何和所有解剖学组织和结构。眼具有由三个不同层组成的壁:巩膜外层、脉络膜中层和视网膜内层。晶状体后方的腔室充满被称为玻璃体液的胶状流体。眼的后部是探测光的视网膜。角膜是光学透明的组织,其将图像传输至眼的后部。角膜包括药物渗透至眼中的一个途径。其他与眼相关的解剖学组织结构包括泪液引流系统,其包括分泌系统、分配系统和排泄系统。分泌系统包括由眨眼以及由于泪液蒸发导致的温度变化刺激的分泌腺和具有传出副交感神经分布并响应于物理或情绪刺激而分泌泪液的反射分泌腺。分配系统包括

眼睑和睁开眼睛的眼睑边缘周围的泪河,其通过眨眼使泪液分布在眼表面上,从而减少干燥区域发展。

[0464] 在一些实施方案中,组合物直接施用至眼或眼组织。在一些实施方案中,组合物例如以滴眼剂局部施用至眼。在一些实施方案中,组合物通过注射施用至眼(眼内注射)或至与眼相关的组织。可例如通过以下方式施用组合物:眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射(intracameral injection)、结膜下注射、结膜下注射、眼球筋膜下注射(sub-Tenon's injection)、球后注射、球周注射或后近巩膜递送(posterior juxtасcleral delivery)。这些方法是本领域中已知的。例如,对于视网膜药物递送的示例性眼周途径的描述,参见Periocular routes for retinal drug delivery,Raghava等人(2004),Expert Opin.Drug Deliv.1(1):99-114。组合物可例如施用至玻璃体、房水、巩膜、结膜、巩膜与结膜之间的区域、脉络膜组织、视网膜脉络膜组织、黄斑或者个体眼内或附近的其他区域。组合物也可作为植入物施用至个体。优选的植入物是生物相容性和/或生物可降解性缓释制剂,其在一段时间内逐渐释放化合物。用于药物递送的眼睛植入物是本领域中已知的。参见例如美国专利号5,501,856、5,476,511和6,331,313。也可使用离子电渗疗法将组合物施用至个体,包括但不限于在美国专利号4,454,151和美国专利申请公布号2003/0181531和2004/0058313中描述的离子电渗疗法。

[0465] 在一些实施方案中,血管内如静脉内(IV)或动脉内施用组合物。在一些实施方案中(例如对于治疗肾病来说),将组合物直接施用至动脉(诸如肾动脉)。

[0466] 在一些实施方案中,将组合物直接施用至关节组织。在一些实施方案中,将组合物施用至滑膜。

[0467] 组合物的最佳有效量可凭经验确定,并且将取决于疾病的类型和严重性、施用途径、疾病进展以及个体的健康、质量和身体面积。此类确定在本领域技术人员的技能内。有效量也可基于体外补体激活测定确定。可用于本文所述方法的抗体(或其抗原结合片段)的剂量的实例包括但不限于在以下任一种的剂量范围内的有效量:约0.01 μ g/kg至约300mg/kg或者约0.1 μ g/kg至约40mg/kg或者约1 μ g/kg至约20mg/kg或者约1 μ g/kg至约10mg/kg。例如,当眼内施用时,组合物可以低微克范围施用,包括例如约0.1 μ g/kg或更少、约0.05 μ g/kg或更少或者约0.01 μ g/kg或更少。在一些实施方案中,施用至个体的抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)的量是每剂量约10 μ g至约500mg,包括例如以下中任一者:每剂量约10 μ g至约50 μ g、约50 μ g至约100 μ g、约100 μ g至约200 μ g、约200 μ g至约300 μ g、约300 μ g至约500 μ g、约500 μ g至约1mg、约1mg至约10mg、约10mg至约50mg、约50mg至约100mg、约100mg至约200mg、约200mg至约300mg、约300mg至约400mg或者约400mg至约500mg。

[0468] 抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)组合物可以单一日剂量施用,或者总每日剂量可以每天两次、三次或四次的分次剂量施用。组合物也可比每天一次更少频率地施用,例如一周六次、一周五次、一周四次、一周三次、一周两次、一周一次、每两周一次、每三周一次、一月一次、每两月一次、每三月一次或每六月一次。组合物也可以缓释制剂(如植入物)施用,其用于在一段时间内使用逐渐释放组合物,并且其允许组合物以更低频率施用,如一月一次、每2-6个月一次、每年一次或者甚至单次施用。缓释装置(如小球、纳米颗粒、微颗粒、纳米球、微球等)可通过注射施用或手术移植在眼睛或与眼睛相关组织

中的不同位置中,如眼内、玻璃体内、视网膜下、眼周、结膜下或眼球筋膜下(sub-Tenons)。

[0469] 抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)组合物可单独或与其他分子组合施用,所述其他分子已知对视网膜附着或损伤的视网膜组织具有有益作用,包括能够组织修复和再生和/或抑制炎症的分子。有用的辅因子的实例包括抗VEGF剂(如针对VEGF的抗体)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、阿索开(CNTF的突变蛋白质)、白血病抑制因子(LIF)、神经营养因子3(NT-3)、神经营养因子-4(NT-4)、神经生长因子(NGF)、胰岛素样生长因子II、前列腺素E₂、30kD存活因子、牛磺酸和维生素A。其他有用的辅因子包括减轻症状的辅因子,包括抗菌剂、抗生素、抗病毒和抗真菌剂以及镇痛药和麻醉剂。

[0470] 基因疗法

[0471] 靶向构建体还可通过体内表达靶向构建体融合蛋白递送,这经常被称为“基因疗法”。例如,细胞可用编码融合蛋白的多核苷酸(DNA或RNA)进行离体工程化,工程化的细胞然后被提供给待用融合蛋白治疗的个体。这类方法是本领域中熟知的。例如,细胞可通过使用含有编码本发明的融合蛋白的RNA的逆转录病毒颗粒通过本领域中已知的工序进行工程化。

[0472] 使用基因疗法局部递送本发明的靶向构建体可向靶区域例如眼睛或眼组织提供治疗剂。

[0473] 抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)也可通过体内表达抗体和/或靶向构建体递送,这经常被称为“基因疗法”。例如,细胞可用编码抗体和/或靶向构建体的多核苷酸(DNA或RNA)进行离体工程化,工程化的细胞然后被提供给待用所述抗体和/或靶向构建体治疗的个体。这类方法是本领域中熟知的。例如,细胞可通过使用含有编码本发明的抗体和/或靶向构建体的RNA的逆转录病毒颗粒通过本领域已知的工序进行工程化。

[0474] 使用基因疗法局部递送本发明的抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)可向靶区域例如眼睛或眼组织提供治疗剂。

[0475] 基因递送的方法是本领域中已知的。这些方法包括但不限于直接DNA转移,参见例如Wolff等人(1990) *Science* 247:1465-1468;2) 脂质体介导的DNA转移,参见例如Caplen等人(1995) *Nature Med.* 3:39-46;Crystal(1995) *Nature Med.* 1:15-17;Gao和Huang(1991) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 179:280-285;3) 逆转录病毒介导的DNA转移,参见例如Kay等人(1993) *Science* 262:117-119;Anderson(1992) *Science* 256:808-813;4) DNA病毒介导的DNA转移。这类DNA病毒包括腺病毒(优选地基于Ad2或Ad5的载体)、疱疹病毒(优选地基于单纯疱疹病毒的载体)以及细小病毒(优选地基于“缺陷型”或非自主性细小病毒的载体,更优选地基于腺相关病毒的载体,最优选地基于AAV-2的载体)。参见,例如Ali等人(1994) *Gene Therapy* 1:367-384;美国专利号4,797,368,其以引用的方式并入本文;以及美国专利号5,139,941。

[0476] 从中可获得上文提及的逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括但不限于莫洛尼小鼠白血病病毒(Moloney Mouse Leukemia Virus)、脾坏死病毒、逆转录病毒如劳氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)、哈维肉瘤病毒(Harvey Sarcoma Virus)、禽白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒。在一个实施方案中,逆转录病毒质粒载体源自莫洛尼小鼠白血病病毒。

[0477] 腺病毒具有以下优点：它们具有广泛的宿主范围，能够感染休眠或末端分化的细胞如神经元或肝细胞，并且实质上呈现非致瘤性。参见例如Ali等人(1994)，同上，第367页。腺病毒似乎未整合至宿主基因组中。因为它们存在于染色体外，所以插入诱变的风险被大大降低。Ali等人(1994)，同上，第373页。

[0478] 腺相关病毒表现出与基于腺病毒的载体类似的优点。然而，AAV表现出在人染色体19上的位点特异性整合(Ali等人(1994)，同上，第377页)。

[0479] 基因疗法载体包括一个或多个启动子。在一些实施方案中，载体具有在多种细胞类型中驱动表达的启动子。在一些实施方案中，载体具有在特定细胞类型(如视网膜细胞或肾中的细胞)中驱动表达的启动子。可使用的合适启动子包括但不限于逆转录病毒LTR；SV40启动子；和描述于Miller等(1989) *Biotechniques* 7 (9) :980-990中的人巨细胞病毒(CMV)启动子，或者任何其他启动子(例如细胞启动子如真核细胞启动子，包括但不限于组蛋白、聚合酶III (pol III) 和 β 肌动蛋白启动子)。可使用的其他病毒启动子包括但不限于腺病毒启动子、胸苷激酶(TK)启动子和B19细小病毒启动子。通过本文所含的教义，合适启动子的选择对于本领域的技术人员来说将是显而易见的。

[0480] 编码抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)的核酸序列处于合适启动子的控制下。可使用的合适启动子包括但不限于腺病毒启动子如腺病毒主要晚期启动子；或者异源启动子，如巨细胞病毒(CMV)启动子；呼吸道合胞病毒(RSV)启动子；诱导型启动子，如MMT启动子；金属硫蛋白启动子；热休克启动子；白蛋白启动子；载脂蛋白A1(ApoA1)启动子；人球蛋白启动子；病毒腺苷激酶启动子，如单纯疱疹腺苷激酶启动子；逆转录病毒LTR(包括上文所述的修饰的逆转录病毒LTR)； β -肌动蛋白启动子；和人生长激素启动子。

[0481] 逆转录病毒质粒载体可用于转导包装细胞系以形成生产细胞系。可被转染的包装细胞的实例在Miller(1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14中描述。载体可通过本领域中已知的任何方式转导包装细胞。这类方式包括但不限于电穿孔、使用脂质体以及CaPO₄沉淀法。在一种替代方案中，逆转录病毒质粒载体可被封装至脂质体中或者偶联至脂质，并且然后施用至宿主中。生产细胞系产生感染性逆转录病毒载体颗粒，其包含编码多肽的核酸序列。这类逆转录病毒载体颗粒然后可用于在体外或体内转导真核细胞。转导的真核细胞将表达编码多肽的核酸序列。可被转导的真核细胞包括但不限于胚胎干细胞、胚胎癌细胞以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、角化细胞、内皮细胞和支气管上皮细胞。

[0482] 在一些实施方案中，使用指导抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)在眼睛中的表达的基因递送载体。用于基因递送至眼睛的载体是本领域中已知的，并且已经在例如美国专利号6,943,153和美国专利申请公布号US20020194630、US20030129164、US200600627165中公开。

[0483] 在一些实施方案中，通过在允许抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)发挥抑制补体活化作用的条件下，使体液与包含抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)的组合物离体接触来抑制补体活化。合适的体液包括可返回至个体的那些体液，如血液、血浆或淋巴液。亲和吸附分离通常描述于Nilsson等人(1988) *Blood* 58 (1) :38-44；Christie等人(1993) *Transfusion* 33:234-242；Richter等人(1997) *ASAIO J.* 43 (1) :53-59；Suzuki等人(1994) *Autoimmunity* 19:105-112；美国专利号5,733,254；

Richter等人(1993)Metabol.Clin.Exp.42:888-894;以及Wallukat等人(1996)Int'l J.Card.54:1910195中。

[0484] 因此,本发明包括治疗个体中的本文所述的一种或多种疾病的方法,所述方法包括在允许分子发挥抑制补体活化作用的条件下,体外(即在身体外部或者离体)用包含靶向构建体的组合物处理个体的血液,并且将血液返回至个体。

[0485] 单位剂量、制品和试剂盒

[0486] 还提供抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)组合物的单位剂型,每个剂量含有约0.01mg至约50mg,包括例如以下中任一者:约0.1mg至约50mg、约1mg至约50mg、约5mg至约40mg、约10mg至约20mg或者约15mg的靶向构建体。在一些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)和/或构建体(例如靶向构建体)组合物的单位剂型包括约以下中的任一者:0.01mg-0.1mg、0.1mg-0.2mg、0.2mg-0.25mg、0.25mg-0.3mg、0.3mg-0.35mg、0.35mg-0.4mg、0.4mg-0.5mg、0.5mg-1.0mg、10mg-20mg、20mg-50mg、50mg-80mg、80mg-100mg、100mg-150mg、150mg-200mg、200mg-250mg、250mg-300mg、300mg-400mg或400mg-500mg的靶向构建体。在一些实施方案中,单位剂型包括约0.25mg的靶向构建体。术语“单位剂型”是指适合作为用于个体的单元剂量的物理离散单位,每个单位含有与合适的药物载体、稀释剂或赋形剂缔合的经过计算以产生所需治疗效果的预定量的活性材料。这些单位剂型可储存在单个或多个单位剂量的合适包装中并且还可进一步灭菌和密封。

[0487] 还提供处于合适包装中的包含本文所述的组合物的制品。用于本文所述的组合物(如眼用组合物)的合适包装是本领域中已知的,并且包括例如小瓶(如密封的小瓶)、容器、安瓿瓶、瓶子、罐、柔软包装(例如密封的聚酯薄膜或塑料袋)等。这些制品可进一步灭菌和/或密封。

[0488] 本发明还提供包括本文所述的组合物(或单位剂型和/或制品)的试剂盒,并且还可包括关于使用所述组合物的方法(如本文所述的用途)的说明书。本文所述的试剂盒还可包括从商业和使用者立场来看合乎需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器以及具有关于进行本文所述的任何方法的说明书的包装插页。

实施例

[0489] 实施例1:靶向构建体的产生。

[0490] 为了鉴别识别缺血组织上的新表位的自身反应性单克隆抗体(mAb),使用新鲜分离的肠上皮细胞(IEC)来筛选通过使来自野生型C57BL/6小鼠的腹膜、淋巴结和脾细胞与Sp2/0-Ag14骨髓瘤细胞系融合所获得的杂交瘤,如Kulik等人,J Immunol.,(2009),182:5363-5373中所述。简言之,基于反应性,通过对IEC溶解产生物的蛋白印迹分析和如通过流式细胞术分析所检测的IEC的阳性表面染色来筛选杂交瘤融合。对于流式细胞术分析,在染色缓冲液(2%FCS/0.01%NaN₃/PBS)中洗涤分离的IEC,然后再悬浮于含有杂交瘤上清液的染色缓冲液中并且在室温下孵育30分钟。在孵育后,将细胞在染色缓冲液中洗涤三次,并且然后与第二山羊抗小鼠IgM(μ -链特异性)抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)一起在室温下孵育30分钟。在孵育后,如上所述洗涤细胞,并且然后再悬浮于染色缓冲液中。使用BD Biosciences FACSCalibur进行流式细胞术。对于蛋白印迹分析,将IEC在缓冲液中在冰上溶解20分钟,所述缓冲液含有0.5%Triton X-100、0.5%Chaps、20mM Tris-HCl

(pH 7.5)、1mM EDTA、10 μ g/ml亮抑酶肽和蛋白酶抑制剂混合物(Roche Molecular Biochemicals)。通过在8000xg下离心5分钟来将溶解产物澄清。在通过8%Tris-甘氨酸SDS-PAGE分离后,将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯膜。使用溶解于PBS中的5%脱脂奶将膜封闭过夜。将膜在PBS中洗涤,并且然后在2%奶/PBS中用来自杂交瘤上清液的抗体探测1-2小时,洗涤并且然后与HRP缀合的第二抗体孵育。使用ECL系统(PerkinElmer)将阳性信号可视化。随后连续再克隆候选杂交瘤以获得稳定产生单mAb的单克隆细胞系。为了纯化候选mAb,在具有山羊抗人IgM(Sigma-Aldrich)的琼脂糖珠粒的柱上亲和纯化来自所培养杂交瘤的耗竭上清液的抗体。用含有0.1M甘氨酸(pH 2.3)的缓冲液洗脱结合的抗体,并且将所述抗体收集至含有1.5M Tris(pH 8.8)的缓冲液中。用PBS(pH 7.4)将洗脱的mAb透析48小时,并且在Centricon Plus-20(Millipore)上使用离心过滤浓缩。通过测量样品的A280nm来测定抗体浓度并且通过10%SDS-PAGE凝胶上的分析确认纯度。

[0491] 目标杂交瘤产生IgM κ 同种型抗体,其被命名为mAb B4。流式细胞术分析展示mAb B4结合至IEC上的表面表位,但不结合至新鲜分离的脾细胞或胸腺细胞。通过蛋白质印迹分析,mAb B4识别IEC溶解产物中具有37kDa分子量的蛋白质,但不识别来自新鲜分离的脾细胞或胸腺细胞的溶解产物。当用mAb B4通过蛋白质印迹法探测其他组织溶解产物时,发现表位广泛分布,包括在肺、肝和肾中。为了鉴别由IEC上的mAb B4识别的蛋白质,基于Vossenaar等人,Arthritis Res.Ther.,(2004),6:R142-R150和Kulik等人,J Immunol.,(2009),182:5363-5373中描述的方法根据蛋白质的分子量和电荷进行蛋白质的2D凝胶分离。在2D分离后,将与mAb B4反应的蛋白质通过电喷雾液相色谱MS分析来表征,如Kulik等人,J Immunol.,(2009),182:5363-5373中所述,并且确定小鼠膜联蛋白IV是由mAb B4识别的蛋白质。

[0492] 另一种目标杂交瘤产生被命名为mAb C2的IgM抗体,其不与IEC的蛋白质印迹反应。为了测定mAb C2对磷脂的反应性(已提出其暴露于细胞凋亡的和缺血细胞中),使用磷脂作为结合配偶体进行ELISA分析,如Elvington等人J Immunol.,(2012),188:1460-1468中所述。简言之,将涂覆有100 μ l/孔的于甲醇中的50 μ g/ml磷脂的微量滴定板(Immulon 1B; Dynatech Laboratories, Chatilly, VA)在吹入空气下干燥以允许有机溶剂蒸发,并且然后用PBS洗涤孔且用1%BSA封闭。将来自mAb C2杂交瘤的上清液添加至孔,并且通过碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠IgM(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)检测结合的抗体。所测定的磷脂包括磷脂酰丝氨酸(PS)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-[磷酸-L-丝氨酸](Avanti Polar-lipids, Alabaster, AL)(被称为PS)、来自牛心脏的心磷脂(被称为CL)、磷脂酰乙醇胺(PE)-1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(被称为PE)、来自蛋黄卵磷脂的磷脂酰甘油(PG)-1,2-二酰基-sn-甘油基-3-磷酸-(1-rac-甘油)(被称为PG)和磷酸胆碱(PC)(10)-BSA(Biosearch Technologies, Novato, CA)(被称为PC-BSA)。mAb C2显示识别包括PC-BSA、PE和CL但不包括PG或PS的磷脂的亚群。

[0493] 由于B4和C2mAb被鉴别为识别可促成补体途径介导的损伤的缺血组织的新表位的抗体,所以产生包含靶向部分(在这种情况下,从IgM-B4抗体或IgM-C2抗体分离的scFv)和活性部分(在这种情况下,补体调节剂)的靶向构建体并且测试其保护缺血组织不受损伤的能力。对于靶向构建体的产生,通过扩增来自cDNA的分离VH和VL基因并且通过使用重叠延伸PCR连接来制备来自IgM-B4抗体和IgM-C2抗体两者的scFv,并且将其表达为具有N-末端

His-标签的scFv。通过SDS-PAGE,纯化的scFv具有预期分子量。纯化的scFv保持亲本IgM结合特异性,如由其直接结合其结合配偶体的能力所证明,在B4scFv的情况下,所述能力是体外直接结合重组膜联蛋白IV以及竞争性地抑制B4mAb与膜联蛋白IV的结合的能力(图1A和1B)。将编码序列的靶向部分B4scFv或C2scFv用人工接头(G4S1)2连接至编码序列的活性部分,所述活性部分选自补体调节剂:补体受体1样蛋白(Crry)、补体因子H(fH)或CD59分子补体调控蛋白(CD59))。对于Crry和CD59,使用了编码蛋白质的细胞外结构域的序列。对于fH,使用了编码N-末端5个短共有重复序列结构域(活性区)的序列。将编码序列的靶向构建体插入表达载体并且将表达质粒转染至中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中。通过限制性稀释测定选择阳性高表达克隆,并且产生靶向构建体蛋白(具体地B4scFv-Crry、B4scFv-fH、B4scFv-CD59、C2scFv-Crry、C2scFv-fH和C2scFv-CD59蛋白)、从培养物上清液中回收所述靶向构建体蛋白并且使用针对活性部分或His标签的抗体通过亲和色谱法纯化所述靶向构建体蛋白。通过SDS-PAGE,纯化的靶向构建体具有预期分子量并且补体调节剂的活性得以保留。在B4scFv-Crry的情况下,在测量酵母多糖颗粒上的C3沉积的标准测定中测试体外补体调节活性并且将其与阳性对照CR2-Crry比较(图1C)。

[0494] 小鼠单克隆抗体B4在ATCC以ATCC保藏号PTA-13522(B4/14/12)保藏。小鼠单克隆抗体C2在ATCC以ATCC保藏号PTA-13523(C2/19/8)保藏。

[0495] 实施例2:通过用靶向构建体治疗减少脊髓损伤。

[0496] 研究了自身反应性C2或B4mAb在脊髓损伤(SCI)和大脑缺血再灌注损伤(缺血性中风)中的作用。先前已报道不产生成熟T-细胞或B-细胞且因此为抗体缺陷型的Rag1-/-小鼠被保护免受缺血再灌注(IR)损伤参见Williams等人,J.Appl.Physiol.(1999),86:938-942。对于这些研究,如Qiao等人,Am.J.Pathol.(2006),169:1039-1047和Atkinson等人J.Immunol.,(2006),177:7266-7274中所述,使用SCI和大脑中动脉闭塞(MCAo)(具有60分钟缺血和24小时再灌注)的小鼠模型。对于MCAo模型,在SCI后60分钟或在再灌注时静脉内施用抗体。在SCI后,使用针对大鼠开发但适用于小鼠的Basso、Beattie和Bresnahan(BBB)评定量表评定运动功能(Noble等人,J.Neuroscience,(2002),22:7526-7535)。为了测量MCAo后的梗塞体积,将来自分离的脑的冠状面用2%三苯基四氮唑(TTC)染色并且使用NIH图像分析软件测定梗塞面积(不包括染料)。据测定,如通过运动活性所测量,IgM抗体缺陷型Rag1-/-小鼠被保护免受SCI,但是通过静脉内施用C2或B4mAb,损伤在Rag1-/-小鼠中重建至野生型小鼠水平,但使用对照F632mAb不会如此(图2A)。此外,B4mAb和C2mAb而不是对照抗体在Rag1-/-小鼠中重建大脑缺血和再灌注损伤(图2B)。

[0497] 向C57B1/6野生型小鼠施用靶向构建体B4scFv-Crry以测试在SCI的缺血损伤模型中这种靶向构建体针对自身反应性抗体的可能保护作用。在这种SCI模型中,在损伤后60分钟静脉内注射0.2mg B4-Crry或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。运动活性的评定显示,如与PBS处理的小鼠相比,B4-Crry处理的小鼠具有显著改善的恢复并且保护小鼠免受SCI(图3A)。还在SCI后3天分析组织防护,并且与施用PBS的对照C57B1/6野生型小鼠(图3B,实心圆圈)相比,在B4scFv-Crry处理的C57B1/6野生型小鼠(图3B,实心三角形)中存在显著增加的组织防护。B4scFv-Crry处理的C57B1/6野生型小鼠的组织防护可比得上用PBS(图3B,实心圆圈,上线)或对照F632mAb(图3B,空心正方形)处理的Rag1-/-小鼠中的组织防护,但与用C2mAb(图3B,实心正方形)或B4mAb(图3B,空心圆圈)重建的Rag1-/-小鼠相比显著增加。此外,确认在

C57BL/6野生型小鼠中在SCI后结合至脊髓的IgM,并且IgM和C3显示在损伤后24小时在野生型小鼠的脊髓中共定位(图4A-C)。在损伤后24小时,施用B4scFv-Crry降低IgM和C3沉积(图4D和E)。

[0498] 实施例3:施用靶向构建体不会增加宿主对感染的易感性。

[0499] 靶向对比系统性补体抑制的主要潜在优势是靶向方法不太可能影响补体的生理上重要的作用。一种此类重要作用和与移植患者具有一些相关性的一种作用是宿主防御感染。使用多微生物败血症的充分表征的模型,用0.2mg剂量研究B4scFv-Crry对感染的易感性的作用,所述剂量在SCI的动物模型以及肝和心肌缺血再灌注损伤的动物模型中是治疗性的。在C3缺陷型小鼠或用B4scFv-Crry或PBS处理的野生型小鼠中进行盲肠结扎和穿孔,并且监测存活。在急性脓毒性腹膜炎的模型中,B4scFv-Crry对宿主的感染易感性无作用,并且用B4scFv-Crry处理的小鼠在盲肠结扎穿孔后存活显著更长时间,并且与PBS处理的野生型小鼠相比存活无显著不同(图5)。相比之下,所有缺乏C3的小鼠在48小时内死亡,这是与先前针对C3缺陷型小鼠和用治疗剂量的Crry-Ig(B4scFv-Crry的系统对应物)处理的小鼠两者所获得的类似的结果。

[0500] 实施例4:通过用靶向构建体治疗减少心肌缺血再灌注损伤。

[0501] 从C57BL/6野生型供体将心脏移植至抗体缺陷型Rag1-/-受体或用C2mAb或B4mAb重建的Rag1-/-受体后,在同系移植物中研究自身反应性天然IgM在移植后心肌缺血再灌注损伤中的作用。在移植心脏的再灌注之后立即将mAb静脉内施用至受体。在用适当荧光标记的抗体染色的8微米冰冻切片上进行内皮标志物IgM和C3结合的免疫荧光,并且用共聚焦显微镜成像。对于组织病理学,将切片用H&E染色并且由对实验组不知情的观察者评分。将切片以0-3的标尺评分,如Atkinson等人, *J. Immunol.*, (2010), 185:7007-7013中所述。与野生型受体(Balb/C至C57BL/6)中的移植物相比,通过腹腔异位心脏移植移植至抗体缺陷型Rag1-/-受体小鼠中的心脏被保护免受移植后心脏IR损伤,如由减少的组织学损伤和炎症以及降低的心肌肌钙蛋白I血清水平(心肌细胞损伤的指数)所证明。然而,在Rag1-/-受体中用B4mAb或C2mAb而不是对照F632IgM重建使移植心脏中的心脏IR损伤恢复至野生型受体中所观察到的损伤。通过移植物切片的免疫荧光分析研究B4mAb和C2mAb的移植物特异性和结合特性。在B4mAb(图6A)和C2mAb处理的的心脏受体Rag1-/-小鼠中,两种mAb均结合至移植心脏而非天然心脏的心肌内的小动脉、毛细血管和微血管的内皮细胞。移植物中的另外mAb结合在肌细胞上观察到,优选定位至心外膜中的损伤肌细胞。在用F623对照mAb重建的动物中的移植物或天然心脏中不能检测到IgM免疫染色(图6A)。对IgM结合和补体活化的分析显示B4IgM与C3d(补体活化产物)在移植于Rag1-/-受体的心脏中共定位,并且内源性IgM与C3d在野生型受体的移植物中共定位(图6B)。

[0502] 在治疗方案中,将0.2mg剂量的B4scFv-Crry或B4scFv在移植后立即施用至野生型同种异体移植物移植模型(Balb/C至C57BL/6)中。在再灌注后6小时(在静脉内B4scFv处理后)或48小时(在静脉内B4scFv-Crry处理后)收获同种异体移植物并且分析。当在再灌注后立即施用时,B4scFv或B4scFv-Crry的施用导致心肌IRI显著减少,如由减少的心肌肌钙蛋白I(心肌细胞损伤水平的指数)所证明(图7A)。还针对损伤和炎性细胞浸润的组织学证据对移植物进行评定。根据心肌肌钙蛋白I水平,来自B4scFv-Crry处理的受体的移植物具有比来自媒介物处理的受体显著更低的损伤和炎症组织学得分(图7B)。相比于接受PBS媒介

物的受体,还观察到B4scFv处理的受体中减少的移植物损伤和炎症(图7B)。在His-标记的B4scFv处理的同种异体移植物中,将移植物切片用抗-His抗体阳性染色(图7C),并且B4scFv与泛内皮标志物(Endo-1)共定位,其中在所有尺寸的缺血后血管中观察到B4scFv结合。此外,如由减少的C3免疫染色所示,B4scFv-Crry减少C3沉积(图7D)。图像的定量分析展示IgM结合和C3d沉积在来自用PBS处理的受体的移植物中发生,其中染色在移植后6小时时主要在微血管系统中,并且在移植后48小时时主要在微血管系统和肌细胞上(图7E和F)。在移植后6小时时,用B4scFv或B4scFv-Crry处理受体显著减少或消除移植物中的IgM和C3d沉积两者。然而,在移植后48小时时,仅在来自B4scFv-Crry处理的受体的移植物中观察到IgM结合和C3d沉积的显著减少(图7E和F)。为了进一步研究由B4scFv-Crry调节的炎性环境,评定这种分子对特定细胞因子和趋化因子的移植物水平的作用。相较于PBS媒介物处理,受体的B4scFv-Crry处理显著降低心脏毒性细胞因子IL-6和MCP-1的移植物水平。在移植后48小时时,KC的移植物水平未因用B4scFv-Crry处理改变(图8)。相较于PBS对照处理的小鼠,这些分子还减少炎性细胞浸润。

[0503] 为了测定B4scFv-Crry的循环半衰期($t_{1/2}$),将100 μ g B4scFv-Crry静脉内注射至C57BL/6受体小鼠中,并且在不同时间点使用抗-Crry抗体通过ELISA测定蛋白质的血浆浓度。存在两阶段消除曲线:9.7分钟的 $t_{1/2}$ 的初始快速阶段和5.5小时的 $t_{1/2}$ 的第二延长阶段。对于其他生物制剂(包括未靶向的Crry(Crry-Ig))已显示类似的两阶段消除曲线,但是Crry-Ig的第二阶段 $t_{1/2}$ 显著更长(40小时)。用0.2mg剂量的B4scFv-Crry观察到显著治疗功效,并且因为在靶位点处的优先积聚将预期转变为治疗益处的较低剂量要求,所以进行生物分布研究。在心脏移植之后立即将¹²⁵I-标记的B4scFv-Crry注射至受体小鼠中,并且在6小时后测定放射性标记的组织分布。除了存在于循环中,¹²⁵I-B4scFv-Crry主要定位至移植的移植物中(图9)。

[0504] 实施例5:自身反应性IgM的物种交叉反应性。

[0505] 用人天然IgM重建Rag1-/-小鼠通过IgM介导的补体活化重建了缺血再灌注损伤(IRI),从而证明物种交叉反应性。此外,人血清中存在高水平的抗膜联蛋白IV Ab(B4mAb特异性)。通过在体外在B4mAb或C2mAb存在下,将人脐静脉内皮细胞和小鼠脑内皮细胞系暴露于3小时缺氧、接着12小时常氧来进一步研究小鼠B4mAb和C2mAb的交叉物种反应性。流式细胞术和免疫荧光显微术展示,两种mAb均结合至暴露于缺氧的小鼠细胞(图10A)和人细胞(图10C),但不结合至对照常氧细胞(图10B和10D),从而指示B4和C2显示针对人新表位的交叉特异性。

[0506] 实施例6:通过用靶向构建体治疗减少肝缺血再灌注损伤。

[0507] 补体活化在肝缺血/再灌注损伤(IRI)和肝再生的引发阶段两者中均起重要作用。使用单独的肝IRI和70%部分肝切除术(Phx)模型,研究IgM在肝IRI和肝脏再生两者中的作用。对于IRI实验,在30分钟总体暖局部缺血后并且就在再灌注前,将盐水或25 μ g剂量的C2mAb或B4mAb注射至抗体缺陷型(Rag1-/-)小鼠中。在6小时再灌注后取得样品。通过ELISA测量血清ALT水平并且在H&E染色切片中对组织学坏死进行定量(尺度0-3)。对于70%部分肝切除术实验,在70%Phx之后立即将盐水或10 μ g剂量的C2mAb或B4mAb注射至抗体缺陷型(Rag1-/-)小鼠中。在Phx后48小时取得样品。计算有丝分裂指数作为肝再生的量度(10hpf中的有丝分裂象/总细胞)。测量血清ALT水平并且对组织学坏死进行定量(尺度0-3)。结果

表明抗体缺陷型Rag1^{-/-}小鼠被保护免受肝IRI,并且用B4mAb或C2mAb重建Rag1^{-/-}小鼠使IRI恢复至接近在野生型小鼠中所观察到的水平,如通过血清ALT水平(图11A)和组织学评分(图11B)所测定。在Rag1^{-/-}小鼠中进行70%PHx后,相较于野生型小鼠存在残肝中的损伤增加,并且用B4mAb或C2mAb重建Rag1^{-/-}小鼠是保护性的,如通过血清ALT水平(图12A)和组织学评分(图12B)所测定。相较于野生型小鼠,在进行70%PHx后,Rag1^{-/-}小鼠具有受损的再生反应,但是用B4mAb或C2mAb重建恢复再生,如通过有丝分裂指数(图12C)、肝重量恢复(图13A)和BrdU阳性细胞的增加(图13B)所评定。肝切片的分析显示在缺血和再灌注后,IgM沉积在野生型小鼠的肝中,并且在IR后(图14A)和在PHx后(图14C),B4mAb和C2mAb两者均沉积在Rag1^{-/-}小鼠的肝中。此外,在IR损伤(图14B)或PHx(图14D)后肝切片的分析表明IgM沉积与C3沉积共定位,并且在来自未处理的Rag1^{-/-}小鼠的切片中不存在可检测的IgM或C3。

[0508] 为了测定B4scFv-Crry的循环半衰期($t_{1/2}$),将100 μ g B4scFv-Crry静脉内注射至小鼠中,并且在不同时间点使用抗-Crry抗体通过ELISA测定蛋白质的血浆浓度。存在两阶段消除曲线:27分钟的 $t_{1/2}$ 的初始快速阶段和6.5小时的 $t_{1/2}$ 的第二延长阶段(图15A和B)。为了进一步测定C2和B4IgM对损伤组织的特异性,在Rag1^{-/-}小鼠中进行生物分布研究。在以下程序之一后:假手术、70%PHx或IR,用125碘放射性标记的C2、B4或同种型对照抗体F632静脉内注射Rag1^{-/-}小鼠。在外科手术后6小时收获器官和血液。通过心脏穿刺除去血液,并且用PBS灌注动物,之后除去心脏、脑、肝、肠、肺、肾和脾。将组织用PBS冲洗、切碎、称重,并且然后用Hewlett-Packard 5780 γ 计数器测量放射性。结果记录为 μ Ci/g组织。在IR或PHx后,C2和B4抗体两者均主要靶向肝(图15C和D)。另外,在IR或PHx后在肾中且在IR后在肠中观察到C2和B4两者的一些结合。相较于假手术动物,未在任何器官中以更高定量发现同种型对照抗体F632。这些发现表明在IR和PHx两者后,类似表位在肝中表达并且这些表位仅在损伤的组织上发现。鉴于这些表位对损伤组织的特异性,它们可充当配体以在PHx或IRI后特异性地靶向肝的治疗。为了确认IgM的作用,将B4scFv施用至动物。在IRI或Phx后,B4scFv具有与用于以上研究的B4IgM mAb相同的生物分布曲线(图15E和F)。

[0509] 在肝缺血再灌注损伤的小鼠模型中评定靶向部分B4scFv和靶向构建体B4scFv-Crry的体内活性。在经受35分钟缺血、接着24小时再灌注的小鼠中施用B4scFv或B4scFv-Crry保护小鼠免受肝缺血再灌注损伤,如由血清ALT水平(图16A)和免疫组织化学(图16B-E)所证明。

[0510] 为了测定B4mAb是否结合至人缺血肝组织,就在移植前收获冷冻的人组织样品。因此这些肝缺血但尚未再灌注。还将切片的肝针对再灌注后IgM进行染色(图17A)。观察到B4mAb结合至人缺血组织并且与血管内皮标志物CD31共定位,从而证明B4mAb结合至人和小鼠两者的缺血组织(图17B)。

[0511] 为了测定天然IgM的血清水平是否在人肝移植后降低,在三个时间点从经历肝移植的患者取得血清样品:就在移植前、移植后1小时和移植后24小时。使用ELISA测量天然IgM,观察到相较于就在移植前所观察到的水平,对磷脂和膜联蛋白IV具有特异性的IgM的患者血清水平在移植后1小时和24小时降低(图19)。总IgM水平在时间点之间无显著不同(图18)。人血清中消减的抗体的抗原特异性与小鼠mAbs B4和C2的特异性相同。为了测试来自血清的这些抗体的消减是否是其结合至暴露于缺血后肝的新表位的结果,在缺血前并且然后在再灌注后测量肝中结合IgM的水平。在正常灌注的肝中几乎未检测到IgM。然而,缺血

并且然后再灌注的肝具有高水平的以特征性正弦模式结合的IgM。这些数据指示类似事件在鼠科动物和人肝IRI中发生,类似之处在于特异性循环天然IgM识别且结合至在缺血后表达的新表位。

[0512] 实施例7:肾损伤的化学和缺血再灌注小鼠模型中IgM作用的体内研究。

[0513] 研究天然IgM抗体在化学诱导的肾损伤小鼠模型中的作用。用11mg/kg阿霉素的单次静脉内注射,在8至10周龄雄性小鼠中的Ba1b/c小鼠中诱导阿霉素肾病,并且检查肾小球IgM的丰度(图20)。用阿霉素注射小鼠引起肾小球IgM丰度的显著增加。用抗-CD20预处理小鼠防止在用阿霉素注射后肾小球IgM的增加,并且接受抗-CD20和阿霉素两者的小鼠的肾小球IgM水平与健康对照中观察到的那些水平类似。为了测定当再次注射至小鼠中时,从患有阿霉素肾病的肾特异性洗脱的IgM是否将结合肾小球表位,纯化来自阿霉素处理的小鼠的肾的IgM,并且然后注射至先前经历用抗-CD20消减B细胞的患有阿霉素肾病的小鼠中。将此在研究过程中每周重复。在重建的小鼠中观察到朝向更大肾小球IgM的趋势(图20A和B)。在患有阿霉素肾病的小鼠中,在对照小鼠中检测到低水平的肾小球C4d沉积,但所述沉积在用阿霉素处理的小鼠中显著增加(图21A)。用抗-CD20处理小鼠减少肾小球C4d,从而确认肾小球C4d沉积是由免疫球蛋白介导的补体活化引起。针对C3沉积对肾进行免疫染色显示类似模式。用阿霉素处理后,小鼠中C3沉积增加,并且用抗-CD20处理小鼠防止这种增加(图21B)。作为肾小球损伤的标志物测量尿白蛋白/肌酸酐比例。患有阿霉素肾病的小鼠总体为蛋白尿的(图22A),并且用抗-CD20处理小鼠降低患有阿霉素肾病的小鼠中蛋白尿的程度。然而,当用阿霉素处理抗-CD20处理的小鼠并且然后再次注射纯化的肾小球IgM时,蛋白尿的程度可比得上在仅接受阿霉素中的小鼠中所观察到的程度。这表明IgM是此模型中损伤的重要介体。用抗-CD20抗体处理的小鼠中存在较少肾小球硬化症(图22B-C)。用阿霉素处理的小鼠展示比对照小鼠更大的肾小球胶原IV沉积,但用抗-CD20处理未显著降低肾小球胶原IV沉积(图22D)。天然抗体IgM主要由腹膜B-1a细胞产生。用抗-CD20处理小鼠消减腹膜B细胞,但是比其消减脾B细胞效率低。为了有效减少腹膜B细胞而不影响脾B细胞功能,通过低渗休克溶解腹膜细胞。这种处理导致所有腹膜细胞(包括巨噬细胞)的溶解,但其不影响脾B细胞。使用这种战略观察到循环B细胞减少,从而表明腹膜隔室是一些循环B细胞的来源。虽然通过这种方法减少了所有腹膜细胞,但是所述处理未降低B-1a细胞数目占总腹膜细胞的百分比。因此,这种处理的作用可能对B-1a细胞的消减没有特异性。血清中总IgM的水平未受这种处理影响。为了消减患有阿霉素肾病的小鼠中的腹膜B细胞,在注射阿霉素之前,将腹膜细胞每三天通过低渗休克溶解持续两周,以便给予预形成的IgM足够长的时间来更新。在研究过程中,通过每三天腹膜内注射蒸馏水来维持细胞的消减。虽然这种处理在立即减少腹膜B细胞数目方面非常有效,但细胞再次积聚并且在第14天消减不完全。作为对照,根据相同的计划表,另一组小鼠接受腹膜注射PBS。当报告为总腹膜细胞的百分比时,B-1a细胞未通过这种处理减少,因为所述处理相等地减少所有腹膜细胞。在经历腹膜B细胞消减的小鼠中,在用阿霉素注射小鼠后,肾小球IgM的积聚显著衰减(图23A)。腹膜细胞的消减显示朝向减少肾小球C4沉积的趋势,并且通过这种处理减少肾小球C3沉积(图23B-C)。肾小管间质C3沉积不受这种处理影响。这些结果证明腹膜B细胞产生沉积在这种模型的肾小球中相当大的比例的IgM。虽然肾小球沉积减少,但循环IgM的水平未受腹膜细胞消减影响,从而表明肾小球IgM沉积包括结合至特异性肾小球抗原的IgM。关于用抗-CD20处理小鼠,腹膜

B细胞的消滅减少肾小球补体活化。在用阿霉素注射后1或4周收集的样品中测量尿白蛋白/肌酐酞比例(图24A)。在早期和后期时间点两者处,经历腹膜细胞消滅的小鼠中蛋白尿的水平显著较低。1周时间点处蛋白尿的减少指示在这种模型的早期,肾小球IgM促成损伤。经历腹膜细胞消滅的小鼠中的一些肾小球看起来是正常的(图24B)。然而,如在用抗-CD20处理小鼠中所观察到,腹膜B细胞的消滅未显著衰减阿霉素处理的小鼠中胶原IV积聚的总体程度,但是存在较少肾小球硬化症(图24B-D)。据先前系列报道可在高达90%的患有FSGS的患者中检测到肾小球IgM和/或C3。查看了在过去八年中评估的174例局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS)的活组织检查报告。在这些活检切片中,约23%的活检切片展示肾小球IgM而无C3,约2%的活检切片展示肾小球C3而无IgM,并且7%的活检切片展示肾小球IgM和C3。在可检测到两种因子的组织上针对IgM和C3d进行双重染色(图25A)。C3d和IgM显示在整个肾小球中的类似分布模式。还进行针对IgM和C4的双重染色(图25B)。这种染色展示这些因子在肾小球内类似的共定位。

[0514] 检查假手术处理的小鼠和经受肾IR损伤的小鼠的IgG和IgM的组织沉积。关于肾IR损伤小鼠模型的描述,参见Renner等人,J. Immunol., (2010), 185:4393-440。简言之,通过腹膜内注射,用300 μ l 2,2,2-三溴乙醇(Sigma-Aldrich)麻醉小鼠。进行剖腹手术,并且将肾蒂通过钝器解剖进行定位和分离。将所述蒂用外科夹钳(Miltex Instrument, Bethpage, NY)夹住,并且通过目视检查肾确认血流阻断。将夹钳置于合适的位置24分钟并且然后松开。观察肾持续约1分钟以确保血液回流,并且然后用4-0丝(U.S. Surgical, Norwalk, CT)缝合筋膜和皮肤。以相同方式进行假手术,不同之处在于肾蒂未被夹住。用0.5ml生理盐水皮下注射使小鼠体积恢复。在再灌注8、24、48或72小时后,麻醉小鼠并且通过心脏穿刺获得血液。进行剖腹手术并且收获肾。未在任何肾中发现IgG,但是在假手术处理的肾(图26A和C)和经历IR(图26B和D)的肾的肾小球系膜中观察到IgM。在肾I/R后,肾小球系膜IgM的水平增加(图26E-F),从而表明循环IgM在再灌注期间结合至肾小球系膜。沿管状基底膜未观察到IgM。通过将蒸馏水注射至腹膜来使野生型小鼠中的腹膜B细胞消滅2周,并且用等体积的PBS注射对照小鼠。通过B220、CD5和CD19的流式细胞仪分析确认B-1群体的消滅。相较于对照小鼠,在假手术处理后和肾I/R后,腹膜B-1细胞的溶解未改变循环IgM的总体水平,但是它确实降低了肾小球系膜IgM的水平。在24小时再灌注后,腹膜B-1细胞的消滅还与血清尿素氮(SUN)的显著衰减的增加相关。SUN水平与通过48小时再灌注的对照小鼠无显著不同。虽然肾小球系膜IgM的降低与肾功能保护相关,但是经历腹膜B细胞消滅的小鼠仍展示可得上在野生型小鼠中所观察到的管状坏死。

[0515] 研究自身反应性C2或B4mAb在肾IR损伤模型中的作用。关于肾IR损伤小鼠模型的描述,参见Renner等人,J. Immunol., (2010), 185:4393-440。简言之,通过腹膜内注射,用300 μ l 2,2,2-三溴乙醇(Sigma-Aldrich)麻醉小鼠。进行剖腹手术,并且将肾蒂通过钝器解剖进行定位和分离。将所述蒂用外科夹钳(Miltex Instrument, Bethpage, NY)夹住,并且通过目视检查肾确认血流阻断。将夹钳置于合适的位置24分钟并且然后松开。观察肾持续约1分钟以确保血液回流,并且然后用4-0丝(U.S. Surgical, Norwalk, CT)缝合筋膜和皮肤。以相同方式进行假手术,不同之处在于肾蒂未被夹住。用0.5ml生理盐水皮下注射使小鼠体积恢复。在再灌注8、24、48或72小时后,麻醉小鼠并且通过心脏穿刺获得血液。将100mcg剂量的B4mAb注射至经受单侧肾缺血再灌注的B细胞缺陷型(Mu)小鼠中并且收获肾以用于免疫

组织化学分析。在这个模型中,B4mAb和C2mAb在肾小球中共定位,这与B4mAb识别由于缺血所致的新表位的能力一致(图27A和B)。

[0516] 实施例8:肾病的系统因子H缺陷型小鼠模型中IgM作用的体内研究。

[0517] 具有系统因子H缺陷的患者主要发展在肾小球中具有补体沉积的肾病。因子H敲除小鼠发展具有C3和蛋白尿的肾小球沉积的类似疾病。参见Pickering等人,Nature Genetics.,(2002) .,31:424-28。研究了天然IgM沉积和补体活化在fH敲除模型(fH^{-/-}小鼠)中的作用,所述模型不是免疫复合物模型。还产生并且研究了缺乏因子H和B的双敲除小鼠(fH/ μ MT小鼠)。从野生型、fH^{-/-}和fH/ μ MT小鼠中收获肾以用于免疫组织化学分析。免疫荧光染色展示相较于野生型小鼠,fH/ μ MT和fH^{-/-}小鼠中肾小球C3沉积增加(图28A和B)。免疫荧光染色还展示,相较于野生型小鼠,fH^{-/-}小鼠中随年龄增加(图29A和B)在C3沉积后(图30A和B)的肾小球IgM沉积增加。来自fH/ μ MT的肾小球的免疫荧光染色显示C3沉积但无IgM沉积(图30C)。来自fH^{-/-}小鼠的肾小球的免疫荧光图像的超微结构分析显示与肾小球基底膜的标志物的共定位(图31)。来自fH^{-/-}小鼠的肾小球的另外的免疫荧光染色显示C3和C4两者均沉积(图32)。来自fH^{-/-}小鼠的肾的组织病理学切片显示基底膜增厚和足突消失。在野生型、fH^{-/-}和fH/ μ MT小鼠中,血清尿素氮(SUN)和肌酐(Cr)是类似的(图33A)。然而,fH^{-/-}小鼠发展蛋白尿,而fH/ μ MT小鼠显示保护免于蛋白尿(图33B)。

[0518] 为了鉴别IgM的沉积位点,通过将鼠系膜细胞系与野生型小鼠血清一起孵育来进行体外实验。然后通过流式细胞术针对C3、C4、IgM和IgG的存在对细胞进行分析。流式细胞术分析展示IgM而非IgG结合至肾小球系膜细胞(图34A和B)。此外,C3和C4两者均由肾小球系膜细胞结合(图34C和D)。

[0519] 为了表征肾小球表位,针对其结合到肾小球系膜细胞的能力对单克隆天然IgM抗体进行筛选。所测试的两种单克隆抗体C2和F632体外结合至肾小球系膜细胞(图34E)。所测试的五种其他克隆未结合至肾小球系膜细胞(图34F)。还测试了这些mAb与来自在原代培养物中生长的C57BL/6小鼠的肾小球系膜细胞和与从H-2Kb-tsA58转基因小鼠发展的条件永生化的肾小球系膜细胞的结合。C2和F632也结合至这些肾小球系膜细胞系,而其他IgM克隆不结合。接着,测试这些抗体体外结合的能力。向三只 μ MT小鼠各自注射100 μ g的mAb C2、F632或D5(D5不体外结合至肾小球系膜细胞)。在注射C2(图34,图G和H)和F632的所有小鼠的肾中观察到IgM的沉积,但在注射D5(图34,图I和J)的小鼠中未观察到沉积。在所有三种肾小球系膜细胞类型和体内实验情况下所观察到的相同的mAb结合模式支持在这些测定中IgM结合的特异性。它还表明靶抗原在所有这些测定中可能是相同的。

[0520] 实施例9:关节炎的缺血再灌注小鼠模型中IgM作用的体内研究。

[0521] 研究了天然IgM抗体在关节炎的缺血再灌注小鼠模型中的作用。在这些实验中,通过静脉内输送次最大剂量的针对CII的单克隆抗体的混合物(ArthroGen-CIA®, Chemicon)和/或单克隆抗体B4mAb以及来自野生型小鼠的纯化的总IgM来诱导被动关节炎。作为阴性对照施用针对三硝基苯酚-KLH的IgM单克隆抗体(抗-TNP;BD Pharmingen)。滴定ArthroGen以测定用于与测试和对照抗体组合使用的将在动物中产生次最大疾病的剂量。在施用每种抗体后三天后,腹膜内注射50微克/小鼠的LPS。在初始输送后第1天至第14天,基于以下尺度,针对爪的关节炎的病征,由对它们的处理不知情的个体每日对小鼠进行评分:0=不发红或肿胀,1=一个脚趾肿胀,2=两个脚趾肿胀,3=三个脚趾受累,和4=整个

爪肿胀伴随关节僵硬。将小鼠的四个爪中每个的得分相加以给出最终得分,其中最大严重程度为16。对关节炎病征得分析表明施用B4mAb导致比施用聚IgM或次最大剂量的诱导关节炎的单克隆抗体的混合物Arthrogen显著更高的关节炎得分(图35)。

[0522] 实施例10:年龄相关性黄斑变性的小鼠模型中IgM作用的体外和体内研究。

[0523] 方法和材料

[0524] 试剂

[0525] 来自Quidel公司(Santa Clara,CA)的汇集的正常人血清(NHS)用作补体的来源。为了探测经典途径的参与,补体C2-和C4-消减的血清以及补体蛋白C2和C4购自Complement Technology公司(CompTech;Tyler,TX),并且C1q-消减的血清由Deborah Fraser,(University of California Irvine,Irvine,CA)(Fraser,D.A.,Laust,A.K.,Nelson,E.L.,和Tenner,A.J.(2009) *J Immunol* 183,6175-6185)贡献。为了探测凝集素途径的参与,使用了重组M-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白和甘露聚糖结合凝集素(MBL)-缔合的丝氨酸蛋白酶2(MASP-2)(Frederiksen,P.D.,Thiel,S.,Larsen,C.B.,和Jensenius,J.C.(2005) *Scand J Immunol* 62,462-473;Thiel,S.,Kolev,M.,Degn,S.,Steffensen,R.,Hansen,A.G.,Ruseva,M.,和Jensenius,J.C.(2009) *J Immunol* 182,2939-2947;Zacho,R.M.,Jensen,L.,Terp,R.,Jensenius,J.C.,和Thiel,S.(2012) *J Biol Chem* 287,8071-8081)、纯化的L-纤维胶凝蛋白(Lacroix,M.,Dumestre-Perard,C.,Schoehn,G.,Houen,G.,Cesbron,J.Y.,Arlaud,G.J.,和Thielens,N.M.(2009) *J Immunol* 182,456-465)和重组的MBL(Jensenius,J.C.,Jensen,P.H.,McGuire,K.,Larsen,J.L.,和Thiel,S.(2003) *Biochem Soc Trans* 31,763-767)。最后,为了测定旁路途径的需要,从CompTech购买因子B-消减的血清。为了分析免疫球蛋白(Ig)在触发凝集素途径中的参与,Ig消减的血清获自Sunnylab(Sittingbourne,UK)或收集自rag1-/-小鼠;并且通过反向添加抗原特异性(IgM-C2)(Elvington,A.,Atkinson,C.,Kulik,L.,Zhu,H.,Yu,J.,Kindy,M.S.,Holers,V.M.,和Tomlinson,S.(2012) *J Immunol* 188,1460-1468)或对照IgM(F1102;针对缀合至KLH并且以与IgM-C2相同方式纯化的4-羟基-3-硝基苯乙酰基半抗原而产生)进行重建实验。第一抗体包括来自Millipore(Billerica,MA)的小鼠单克隆抗-MBL、来自Abcam(Cambridge,MA)的兔多克隆抗-MBL、兔多克隆MASP-2、针对人C3的山羊抗体(CompTech)以及来自Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz,CA)的针对人H-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白和M-纤维胶凝蛋白的单克隆抗体。物种特异性第二抗体来自Zymed Laboratories(Invitrogen;Carlsbad,CA)。

[0526] 小鼠和血清收集

[0527] C57BL/6(B6)和B6rag1-/-小鼠从育种对产生(Jackson Laboratory;Bar Harbor,ME)。对于血清的收集,深度麻醉小鼠(氯胺酮/塞拉嗪,80/10mg/kg)。通过心脏穿刺将血液收集在BD真空采血管中,并且在凝块形成后(冰上2小时)收集血清并且离心(1000-1400rcf,4℃,持续10分钟)。

[0528] 细胞培养

[0529] 在具有10%胎牛血清(FBS)和如前所述的抗生素的杜氏改良的伊格尔培养基F12(Invitrogen)中扩增ARPE-19细胞(Thurman,J.M.,Renner,B.,Kunchithapautham,K.,Ferreira,V.P.,Pangburn,M.K.,Ablonczy,Z.,Tomlinson,S.,Holers,V.M.,和Rohrer,B.

(2009) J Biol Chem 284,16939-16947)。按照所公布的方案(Bandyopadhyay,M.和Rohrer,B.(2012) Invest Ophthalmol Vis Sci 53,1953-1961),制备人胚胎视网膜色素上皮细胞(RPE)细胞并且在具有15%FBS的最低必需培养基(MEM;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)中扩增。Globe由Advanced Bioscience Recourses(Alameda,CA)供应,并且实验遵守关于涉及人材料的医学研究的伦理学原则的赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki)。

[0530] 跨上皮电阻(TER)测量

[0531] 将ARPE-19细胞或人胚胎RPE在5%FBS存在下,作为成熟单层在6孔Transwell插入物(Corning,0.4 μ m PET,24mm插入物)中生长2-3周(Ablonczy,Z.和Crosson,C.E.(2007) Exp Eye Res 85,762-771)。在实验前最后2-3天,将细胞换至不含血清的培养基。如先前所报道诱导补体活化(Thurman,J.M.,Renner,B.,Kunchithapautham,K.,Ferreira,V.P.,Pangburn,M.K.,Ablonczy,Z.,Tomlinson,S.,Holers,V.M.和Rohrer,B.(2009) J Biol Chem 284,16939-16947),在10%正常人血清(NHS)存在下使细胞暴露于0.5mM H2O2。先前显示亚溶解补体活化引起VEGF释放,这继而降低屏障功能(Thurman,J.M.,Renner,B.,Kunchithapautham,K.,Ferreira,V.P.,Pangburn,M.K.,Ablonczy,Z.,Tomlinson,S.,Holers,V.M.,和Rohrer,B.(2009) J Biol Chem 284,16939-16947),TER测量可便利地读取补体级联中的活性水平。通过用EVOM伏特-欧姆计(World Precision Instruments,Sarasota,FL)测量单层上的电阻来测定TER。通过减去不具有细胞的过滤器的TER来测定细胞单层的值并且使用起始值作为参考来计算百分比。

[0532] 结合测定

[0533] 为了测试纤维胶凝蛋白的结合、非特异性IgM或抗原特异性IgM(IgMC2)结合,将ARPE-19细胞作为单层生长于96孔板中。在实验前2天,将细胞换至不含血清的培养基。为了鉴别纤维胶凝蛋白结合,将正常人血清用作纤维胶凝蛋白的来源。将细胞与血清的连续稀释液在37℃下孵育1小时,洗涤并且固定于含有4%多聚甲醛的PBS中,并且用于PBS中的1%BSA封闭非特异性结合位点。用对应抗体、之后用碱性磷酸酶缀合的第二抗体检测结合的纤维胶凝蛋白并且使用pNPP磷酸酶底物系统(KPL;Gaithersburg,MD)显色。为了表征结合对照和氧化应激的ARPE-19细胞的非特异性IgM或抗原特异性IgM(IgM-C2),通过在与血清的连续稀释液(用于检测IgM结合)或C2抗体(于PBS中)孵育前,将细胞暴露于0.5mM H2O2 10分钟来产生新表位。用碱性磷酸酶缀合的第二抗体检测结合的IgM并且使用pNPP磷酸酶底物系统显色。

[0534] MBL的消减

[0535] 根据所公布的方案(Rajagopalan,R.,Salvi,V.P.,Jensenius,J.C.,和Rawal,N.(2009) Immunol Lett 123,114-124),使用甘露聚糖-琼脂糖(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)作为消减珠粒来制备MBL消减的人血清。制备2.0mL柱的甘露聚糖-琼脂糖并且用含有氯化钙(3mM)和氯化镁(10mM)的Veronal缓冲液(Lonza;Allendale,NJ)进行平衡。使正常人血清通过所述柱并且收集流出物。通过ELISA和蛋白质印迹法确认MBL的消减。

[0536] MBL ELISA

[0537] 在4℃下,将微量滴定(Immulon2;Dynatech Laboratories,Chatilly,VA)板首先用10 μ g/mL多克隆兔抗-MBL捕获抗体涂覆过夜。然后将所述板用PBS洗涤三次并且在室温下用PBS中的3%奶封闭1小时,之后在37℃下暴露于抗原(正常人血清或MBL消减的人血清)2

小时。再次洗涤板并且与针对MBL的单克隆抗体孵育、接着与过氧化物酶缀合的第二抗体孵育,并且使用Turbo-TMB ELISA (Pierce; Thermo Scientific, Rockford, IL) 显色。

[0538] IgM-C2表位的表征

[0539] 如所述 (Elvington, A., Atkinson, C., Kulik, L., Zhu, H., Yu, J., Kindy, M.S., Holers, V.M., 和 Tomlinson, S. (2012) J Immunol 188, 1460-1468) 进行ELISA以测定IgM-C2对磷脂的反应性。简言之,用于甲醇中的50 μ g/mL磷脂以100 μ L/孔涂覆微量滴定板 (Immulon 1B)。在将板风干后,用PBS洗涤孔并且用1%BSA封闭。将IgM添加至孔,并且通过碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠IgM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 检测结合的Ab。通过将单独滴定的血清的405nm处的OD与先前建立的OD测量值的标准曲线 (Elvington, A., Atkinson, C., Kulik, L., Zhu, H., Yu, J., Kindy, M.S., Holers, V.M., 和 Tomlinson, S. (2012) J Immunol 188, 1460-1468) 进行比较来计算Ab的相对单位。将IgM-C2的结合与已知与膜联蛋白IV交叉反应的对照IgM (IgM-B4) 进行比较 (Elvington, A., Atkinson, C., Kulik, L., Zhu, H., Yu, J., Kindy, M.S., Holers, V.M. 和 Tomlinson, S. (2012) J Immunol 188, 1460-1468)。测定两种磷脂: 磷酸胆碱 (PC) (10)-BSA (Biosearch Technologies, Novato, CA) 和丙二醛 (MDA)-BSA (Cell Biolabs, San Diego, CA)。

[0540] SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹

[0541] 根据制造商的说明书 (Pierce, Rockford, IL), 通过BCATM蛋白质测定来测定蛋白质浓度。对于每个样品,使40 μ g蛋白质变性,经受SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳并且用适当的抗体通过免疫印迹法进行分析。

[0542] 免疫荧光染色

[0543] 通过免疫荧光显微术检查磷脂特异性表位的表面暴露。将ARPE-19细胞生长在35-mm赖氨酸涂覆的玻璃底培养皿上 (MatTek Corporation; Ashland, MA), 用H2O2处理10分钟, 固定在含有4%多聚甲醛的PBS中, 并且用于PBS (预吸收缓冲液) 中的1%正常山羊血清和3%BSA将非特异结合位点封闭2小时。将细胞与兔抗-MDA多克隆抗体 (PBS中1:200) 在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 接着与FITC-缀合的山羊抗-兔IgG (1:200; Zymed Laboratories, Invitrogen) 在室温下孵育1小时; 或与IgM天然抗体 (IgM-C2)、接着与山羊抗-小鼠IgM (1:200; Zymed Laboratories, Invitrogen) 在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。作为阴性对照, 省略第一抗体。还对具有CNV病变的眼睛离体进行染色 (参见下文)。将洗眼杯固定在4%多聚甲醛中、洗涤、预吸收并且在4 $^{\circ}$ C下与C2-IgM (1:200)、接着与抗小鼠IgM (1:200) 孵育过夜, 如上所述。省略第一抗体染色用作阴性对照。通过共聚焦显微镜 (Olympus FluoView) 检查细胞和铺片的染色。

[0544] 体内CNV诱导和评定

[0545] 将B6rag1-/-和C57BL/6小鼠在12:12小时白天:黑夜循环下饲养于南卡罗莱纳医科大学的动物保护设施中, 其中它们可随意获得食物和水。所有实验根据视觉与眼科研究协会 (Association for Research in Vision and Ophthalmology) 进行并且得到动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准。如先前所述使用氩激光凝固 (532nm; 100 μ m斑点尺寸; 0.1秒持续时间; 100mW) 产生CNV病变 (在每个眼睛中围绕视神经的四个斑点) (Rohrer, B., Long, Q., Coughlin, B., Wilson, R.B., Huang, Y., Qiao, F., Tang, P.H., Kunchithapautham, K., Gilkeson, G.S. 和 Tomlinson, S. (2009) Invest Ophthalmol Vis Sci 50, 3056-3064)。在第0、2和4天, 使用腹膜内 (IP) 注射用C2-IgM或对

照F1102-IgM(稀释在400 μ L PBS中的100 μ g)处理动物(n=6-8/处理组)。已显示IP注射对于将抗体递送至CNV病变是有效的(Campa,C.,Kasman,I.,Ye,W.,Lee,W.P.,Fuh,G.,和Ferrara,N.(2008) Invest Ophthalmol Vis Sci 49,1178-1183)。在用ICAM2染色的RPE-脉络膜的铺片制剂中测定相关的CNV尺寸(Campa,C.,Kasman,I.,Ye,W.,Lee,W.P.,Fuh,G.,和Ferrara,N.(2008) Invest Ophthalmol Vis Sci 49,1178-1183)。如先前所报道,进行染色、铺片、成像和通过共聚焦显微镜分析荧光测量值(Rohrer,B.,Long,Q.,Coughlin,B.,Wilson,R.B.,Huang,Y.,Qiao,F.,Tang,P.H.,Kunchithapautham,K.,Gilkeson,G.S.和Tomlinson,S.(2009) Invest Ophthalmol Vis Sci 50,3056-3064)。数据表达为平均值 $\pm$ SEM/眼。

[0546] 统计学

[0547] 对于由多组组成的数据,使用单向ANOVA、接着使用Fisher事后检验($P<0.05$);通过学生t检验分析($P<0.05$)对单一比较进行分析。

[0548] 随补体状态变化的亚溶解补体活化。

[0549] 使用血清-消减战略的组合,分析参与TER减少的补体活化途径(图36A)。作为单层生长在Transwell过滤器上的ARPE-19细胞发展40-45/cm²的TER水平,这是在4小时暴露于0.5mM的H₂O₂或10%的正常人血清(NHS)的过程中不受影响的值。然而,用H₂O₂+NHS共处理使TER减少>40%(即,导致<60%基线TER值; $P<0.001$)。对照血清中的TER减少与在C1q-消减的血清中引出的无显著不同,而发现MBL-或因因子B-消减的血清两者在减少TER方面是无效的(即,在4小时暴露后导致约95%基线TER值;无显著性差异)。总之,这些结果允许得出以下结论:凝集素途径负责触发氧化应激的RPE细胞上的补体攻击,接着通过旁路途径扩增。

[0550] 凝集素途径丝氨酸蛋白酶MASP-2的典型活性是将补体C2和C4分裂为其相应a组分(C2a和C4a)和b组分(C2b和C4b),从而导致C3转化酶的形成(C4b2a复合体)(Takahashi,M.,Mori,S.,Shigeta,S.和Fujita,T.(2007) Adv Exp Med Biol 598,93-104)。然而,最近观察到旁路机制;MASP-2已经显示通过C2-旁路途径活化旁路途径(Tateishi,K.和Matsushita,M.(2011) Microbiol Immunol 55,817-821),并且Schwaebler和同事已描述了凝集素途径依赖性C4-旁路(Schwaebler,W.J.,Lynch,N.J.,Clark,J.E.,Marber,M.,Samani,N.J.,Ali,Y.M.,Dudler,T.,Parent,B.,Lhotka,K.,Wallis,R.,Farrar,C.A.,Sacks,S.,Lee,H.,Zhang,M.,Iwaki,D.,Takahashi,M.,Fujita,T.,Tedford,C.E.和Stover,C.M.(2011) Proc Natl Acad Sci USA 108,7523-7528)。从正常人血清除去C2或C4使H₂O₂+血清对TER的作用衰减(约80%基线TER值)(图36B),但是未衰减至MBL消减的血清的水平(约95%基线TER值)。生理水平的C2(10 μ g/mL)和C4(400 μ g/mL)添加至其相应消减的血清重建了血清对C2-和C4-消减的血清两者中的TER的作用(图36B)。基于对C2-和C4-消减的血清中TER减少的部分作用,所述结果表明虽然凝集素途径中的活性涉及规则C4b2a复合物的产生,但是旁路途径的MASP-2介导的活化的贡献不能被排除,如针对MASP-1和MASP-3所述(Banda,N.K.,Takahashi,M.,Takahashi,K.,Stahl,G.L.,Hyatt,S.,Glogowska,M.,Wiles,T.A.,Endo,Y.,Fujita,T.,Holers,V.M.和Arend,W.P.(2011) Mol Immunol 49,281-289)。

[0551] 凝集素途径中的模式识别分子

[0552] 补体活化要求通过模式识别分子结合配体。对于凝集素途径,那些进入分子是甘露聚糖结合凝集素(MBL)和纤维胶凝蛋白(H-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白和M-纤维胶凝

蛋白),它们然后活化MBL缔合的丝氨酸蛋白酶,MASP-2。在此,使用结合测定和重建实验的组合来测定可使用哪种模式识别分子来识别氧化应激的RPE细胞上的配体以活化凝集素途径。

[0553] 在血液中,MBL或纤维胶凝蛋白两者均与失活MASP复合;因此如果使用甘露聚糖-琼脂糖柱从血清中除去MBL,则MASP水平也可能受影响。此外,L-纤维胶凝蛋白已显示直接结合至氰活化的琼脂糖珠粒(Tan,S.M.,Chung,M.C.,Kon,O.L.,Thiel,S.,Lee,S.H.和Lu,J.(1996) *Biochem J* 319(Pt 2),329-332),这是也可能适用于H-纤维胶凝蛋白和M纤维胶凝蛋白的问题。蛋白印迹分析确认通过甘露聚糖-琼脂糖柱的血清中消减了MBL、MASP-2、M-纤维胶凝蛋白和L-纤维胶凝蛋白,或水平低于检测水平,而H纤维胶凝蛋白水平急剧下降(图37A)。作为阳性对照,补体C3水平不受消减过程影响(图37A)。为了缩小哪种纤维胶凝蛋白识别ARPE-19细胞上的结合位点,在0.5mM H2O2(1小时,37℃)存在下使单层暴露于血清的连续稀释液,并且使用亚型特异性抗体检测结合的纤维胶凝蛋白(图37B)。在氧化应激的细胞中,发现M-和H-纤维胶凝蛋白结合在生理浓度下是饱和的(纤维胶凝蛋白的平均血清浓度是M-纤维胶凝蛋白1.1、L-纤维胶凝蛋白3.3和H-纤维胶凝蛋白18.4μg/mL;(Zacho,R.M.,Jensen,L.,Terp,R.,Jensenius,J.C.和Thiel,S.(2012) *J Biol Chem* 287,8071-8081)),而L-纤维胶凝蛋白结合是不饱和的,但缺失看起来发生结合。然而,因为已显示L-纤维胶凝蛋白在固相结合测定中非特异性地结合BSA,所以不能完全排除L-纤维胶凝蛋白的可能贡献(Faro,J.,Chen,Y.,Jhaveri,P.,Oza,P.,Spear,G.T.,Lint,T.F.和Gewurz,H.(2008) *Clin Exp Immunol* 151,275-283)。

[0554] 因此,将来自甘露聚糖-琼脂糖柱的流出物用于重建实验,将MBL与M-和H-纤维胶凝蛋白针对其在TER测定中重建活性的能力进行比较(图37C)。在暴露4小时后,使单层暴露于H2O2+MBL消减的血清导致约95%基线TER值,而H2O2+NHS使TER降低至<基线值的60%。与生理水平的三种模式识别分子中的任一种组合添加MASP-2(50ng/mL)使TER测定($P<0.05$)中的活性增加至与完全正常人血清的活性无显著不同的水平。将MBL添加至M-或H-纤维胶凝蛋白或两者未进一步增加活性。因此,通过MBL/MASP或纤维胶凝蛋白/MASP,可在氧化应激的细胞中活化凝集素途径。

[0555] 通过天然IgM活化凝集素途径

[0556] 历史上,凝集素途径被认为是由识别病原体表面上的特异性碳水化合物或乙酰化分子的纤维胶凝蛋白/MASP或MBL/MASP活化的途径;然而近来,已显示识别在缺血再灌注损伤期间产生的表位的IgM分子可活化凝集素途径(Zhang,M.,Takahashi,K.,Alicot,E.M.,Vorup-Jensen,T.,Kessler,B.,Thiel,S.,Jensenius,J.C.,Ezekowitz,R.A.,Moore,F.D.和Carroll,M.C.(2006) *J Immunol* 177,4727-4734)。这个实验表明纤维胶凝蛋白/MASP或MBL/MASP需要免疫球蛋白(且具体地说天然IgM)来起始RPE细胞的细胞表面上的补体活化。

[0557] 在补体充分的血清(小鼠或人)中测试TER减少并且与已遗传上(rag1-/-小鼠)或通过消减(人Ig-消减的血清)消除Ig的血清进行比较(图38A)。人和小鼠两者补体充分的血清两者均使TER降低40%-50%,而Ig-消减的血清是无效的。为了表征结合对照和氧化应激的ARPE-19细胞的非特异性IgM,使细胞暴露于血清的连续稀释液,之后使用偶联至碱性磷酸酶的IgM特异性第二抗体检测结合的IgM。然而,就像对于纤维胶凝蛋白和MASP一样,在两种条件下的结合为不可分辨的(图38B)。当比较结合对照和氧化应激的ARPE-19细胞的表位

特异性IgM-C2时,使细胞暴露于IgM-C2抗体的连续稀释液,之后比色检测结合的IgM,当比较对照和氧化应激条件时,可记录IgM-C2的约2.5倍更高的结合(图38C)。添加IgM-C2而不是对照抗体(IgM F1102,针对二硝基苯酚而产生)能够将活性重建至与正常人血清不可分辨的水平(图38D)。

[0558] 鉴别RPE细胞上的天然IgM的配体

[0559] 细胞结合测定已显示IgM-C2结合和损伤在氧化应激条件下增强(图38C)。膜磷脂的氧化损伤导致丙二醛(MDA)(一种脂质过氧化的终产物)的形成。进一步表征氧化应激的RPE细胞上IgM-C2的天然配体。

[0560] 使用涂覆有于甲醇中的磷酸胆碱(PC)-BSA或丙二醛(MDA)-BSA的微量滴定板进行ELISA以测定IgM-C2与配体的反应性。IgM-C2识别PC和MDA两者(图39A、B)。为了测定哪一种配体与结合氧化应激的RPE细胞的IgM-C2相关,用MDA-BSA或PCBSA预吸收IgM-C2。用MDA-BSA或PC-BSA预吸收的IgM-C2完全废除了其重建Ig-消减的血清的能力(图39C、D)。当与对照细胞比较时,可在H2O2处理的细胞上以点状方式鉴别MDA和C2-IgM新表位。抗-MDA抗体和IgM-C2抗体两者均识别存在于ARPE-19细胞的顶面上的点中的表位(图40)。

[0561] 为了确认相同的新表位在第一人RPE细胞中产生,使原代胚胎RPE细胞生长为具有250-300cm²的稳定TER水平的单层。这些单层易受补体攻击(图41),但是未达到与ARPE-19细胞相同的程度。H2O2+10%NHS的组合处理显著降低TER,所述TER通过消除所有免疫球蛋白(Ig-消减的血清;P<0.01)而衰减(P<0.001)。IgM-C2(P<0.01)而不是IgM-F1102能够重建Ig-消减的血清,这是通过用MDA-BSA预吸收可消除的作用。

[0562] 近来显示MDA结合CFH。在人急性单核细胞白血病细胞系中,丙二醛-乙醛-BSA引出促炎性反应,如通过IL-8分泌所测定,其被生理浓度的CFH抑制。如果MDA代表ARPE-19细胞中CFH的配体,生理浓度的CFH可抑制补体活化以防止TER降低。因为到目前为止所有实验一直是用10%NHS进行,所以用更高NHS浓度并且在外源CFH存在下重复实验。血清中的平均CFH浓度是约500μg/mL。因此,在25%NHS(图42)或补充有375μg的CFH的25%NHS存在下进行TER实验。两种组合均不能防止由H2O2+NHS所致的TER降低。为了确保通过H2O2潜在修饰CFH不会损害其结合其在ARPE-19细胞上的配体,在5分钟刺激后,除去含有H2O2的上清液并且添加NHS+外源CFH,这也不防止TER劣化。然而,CR2-fH(10μg/mL)(一种由偶联至CFH的抑制结构域的C3bi和C3d的补体受体-2结合结构域组成的CFH模拟物)能够抑制由H2O2+NHS诱导的TER劣化,如先前所报道(Thurman, J.M., Renner, B., Kunchithapautham, K., Ferreira, V.P., Pangburn, M.K., Ablonczy, Z., Tomlinson, S., Holers, V.M. 和 Rohrer, B. (2009) *J Biol Chem* 284, 16939-16947)。因此,在ARPE-19细胞上,使用H2O2作为氧化剂刺激物,MDA看起来不充当CFH的配体。

[0563] 体内鉴别IgM-C2的作用

[0564] 针对用C2-IgM抗体标记通过免疫组织化学检查小鼠CNV激光病变。当与仅第二抗体对照比较时,可在与围绕病变的区域相反的CNV病变中鉴别特异性标记(图43A)。MDA-特异性抗体标记与先前所示的无法区分(Weismann, D., Hartvigsen, K., Lauer, N., Bennett, K.L., Scholl, H.P., Charbel Issa, P., Cano, M., Brandstatter, H., Tsimikas, S., Skerka, C., Superti-Furga, G., Handa, J.T., Zipfel, P.F., Witztum, J.L. 和 Binder, C.J. (2011) *Nature* 478, 76-81)。

[0565] 为了论述CNV病变中C2-IgM自身抗体的生理相关性,检查C2-IgM重建实验是否将改变rag1-/-小鼠中的损伤。在每48小时3次施用PBS、F1102-IgM、F632-IgM、B4-IgM或C2-IgM(于100 μ L的PBS中100 μ g/小鼠)后,在rag1-/-小鼠中检查CNV病变。虽然当与注射PBS的动物比较时,对照IgM抗体(F1102-IgM和F632-IgM)对CNV病变的尺寸无影响,但是CNV病变的尺寸为约在C2-IgM注射($P<0.01$)或B4-IgM后两倍。C2-IgM和B4-IgM注射两者均在野生型小鼠中不具有任何作用(图43B)。

[0566] 研究氧化应激RPE单层中的补体活化在此获得的主要发现可总结如下:(1)氧化应激在包含磷脂(包括MDA)的RPE细胞表面上产生新表位;(2)存在于正常血清中的特异性自身抗体识别这些表面表位并且因此使用凝集素途径触发补体级联的活化;(3)MBL和纤维胶凝蛋白两者均可充当凝集素途径的模式识别受体;(4)由凝集素途径产生的这种基态活性随后通过旁路途径扩增以产生最大作用;以及最后(5)C2-IgM抗体识别小鼠CNV病变中的新表位并且增强抗体缺陷型rag1-/-小鼠中的CNV发展。

[0567] 在本实施例中,TER用作补体活化的方便、快速且灵敏的读出。补体-和Ig-消减的血清以及纯化的蛋白质和单个IgM的可用性允许对这些氧化应激的RPE细胞上末端补体级联的活化途径进行详细分析。因为3种补体途径需要独特的进入或活化因子分子,所有可产生途径特异性血清(C1q-消减的血清,无CP;MASP-2消减的血清,无LP;因子B消减的血清,无AP;和C1q-MASP-2-双重消减的血清,仅AP)(图36)。LP和AP对于产生TER的损失来说均是必要的。AP在扩增氧化应激的RPE细胞上的补体级联中起作用。因为发现针对LP途径组分消减的血清消减MASP-2、MBL和所有三种纤维胶凝蛋白(图37A),所有可用单个模式识别分子进行重建研究。使用TER测定可展示MBL、M-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白的作用。因为可在完全血清的背景下展示M-和H-纤维胶凝蛋白与RPE细胞的特异性结合,所以可通过特异性抗体/抗原复合物的存在活化LP。虽然使用Ig-消减的血清展示Ig-依赖性(图38A),但是总IgM(图38B)或总IgG(数据未示出)中的H2O2-依赖性变化不能展示。然而,揭示了磷脂抗原特异性IgM(IgM-C2)结合中的H2O2-依赖性变化(图38C),并且在重建测定中,IgM-C2抗体而非对照抗体F1102导致对Ig-消减的血清中的TER的作用的重建(图38D)。当在结合测定中测试时,对照抗体F1102还显示与RPE细胞无饱和结合(数据未示出)。最后,针对C2-IgM的抗原特异性通过ELISA(图39A)和TER实验(图39B、C)进一步细化。因为配体的原始表征(Elvington,A.,Atkinson,C.,Kulik,L.,Zhu,H.,Yu,J.,Kindy,M.S.,Holers,V.M.和Tomlinson,S.(2012)J Immunol 188,1460-1468)在不存在H2O2的情况下进行,但磷脂可经历过氧化,所以比较磷脂酰胆碱(非氧化的)与偶联至牛血清白蛋白(BSA)的丙二醛(MDA;氧化的)之间的结合。可通过ELISA记录特异性结合,并且用MDA-BSA或PC-BSA预吸收抗体干扰TER测定中的活性。可记录MDA特异性抗体以及RPE细胞表面上的新表位特异性IgM两者的H2O2依赖性结合(图40)。最后,可由IgM-C2和IgM-B4识别的新表位也存在于氧化应激的原代胚胎人RPE细胞上(图41)。

[0568] 实施例的结果显示由氧化应激介导的补体活化产生的屏障功能的改变需要磷脂作为配体、LP起始分子和旁路途径扩增,之后末端途径的活化,包括瞬态膜攻击复合物活化。这是在与AMD相关的模型中鉴别潜在配体(模式识别受体)和活化所需的途径的第一报道。

[0569] 尽管为了理解清楚的目的已经通过说明和实施例详细地描述了前述发明,但是对

本领域的技术人员显而易见的是,可进行某些小的改变和改进。因此,描述和实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0570] 序列表

[0571] 表2.序列概述

[0572]

SEQ ID NO:	功能	序列类型
1.	B4 CDR-L1	氨基酸
2.	B4 CDR-L2	氨基酸
3.	B4 CDR-L3	氨基酸
4.	B4 CDR-H1	氨基酸
5.	B4 CDR-H2	氨基酸
6.	B4 CDR-H3	氨基酸
7.	B4 CDR-L1	氨基酸
8.	B4 CDR-L2	氨基酸
9.	B4 CDR-L3	氨基酸
10.	B4 CDR-H1	氨基酸
11.	B4 CDR-H2	氨基酸
12.	B4 CDR-H3	氨基酸
13.	B4 轻链可变结构域	氨基酸
14.	B4 轻链可变结构域	氨基酸
15.	B4 重链可变结构域	氨基酸
16.	B4 重链可变结构域	氨基酸
17.	B4 scFV	氨基酸
18.	B4 scFV	氨基酸
19.	B4 轻链可变结构域	核酸
20.	B4 轻链可变结构域	核酸
21.	B4 重链可变结构域	核酸
22.	B4 重链可变结构域	核酸
23.	B4 scFV	核酸
24.	B4 scFV,用于CHO表达的优化序列	核酸
25.	C2 CDR-L1	氨基酸
26.	C2 CDR-L2	氨基酸
27.	C2 CDR-L3	氨基酸
28.	C2 CDR-H1	氨基酸
29.	C2 CDR-H2	氨基酸

[0573]

30.	C2 CDR-H3	氨基酸
31.	C2 CDR-L1	氨基酸
32.	C2 CDR-L2	氨基酸

33.	C2 CDR-L3	氨基酸
34.	C2 轻链可变结构域	氨基酸
35.	C2 轻链可变结构域	氨基酸
36.	C2 重链可变结构域	氨基酸
37.	C2 scFV	氨基酸
38.	C2 scFV	氨基酸
39.	C2 轻链可变结构域	核酸
40.	C2 轻链可变结构域	核酸
41.	C2 重链可变结构域	核酸
42.	C2 scFV	核酸
43.	C2 scFV,用于CHO表达的优化序列	核酸
44.	全长人膜辅因子蛋白 (MCP)	氨基酸
45.	全长人衰变加速因子 (DAF)	氨基酸
46.	全长小鼠衰变加速因子 (DAF)	氨基酸
47.	全长人CD59	氨基酸
48.	全长小鼠CD59	氨基酸
49.	全长小鼠CD59,同种型B	氨基酸
50.	全长小鼠Crry	氨基酸
51.	全长人CR1	氨基酸
52.	全长人因子H	氨基酸
53.	全长小鼠因子H	氨基酸
54.	人CD5蛋白的信号肽	氨基酸
55.	人CR2蛋白的信号肽	氨基酸
56.	人CR2蛋白的信号肽	氨基酸
57.	B4 scFV	核酸
58.	C2 scFV	核酸

[0574] 序列

[0575] B4 CDR-L1氨基酸序列

[0576] SSISSNY (SEQ ID NO:1)

[0577] B4 CDR-L2氨基酸序列

[0578] RTS (SEQ ID NO:2)

[0579] B4 CDR-L3氨基酸序列

[0580] QQGSSIPRTRSEGAPSWK (SEQ ID NO:3)

[0581] B4 CDR-H1氨基酸序列

[0582] GYTFTSYW (SEQ ID NO:4)

[0583] B4 CDR-H2氨基酸序列

[0584] IGPNSGGT (SEQ ID NO:5)

[0585] B4 CDR-H3氨基酸序列

[0586] ARRNVKGCYGLLGPRDHGHRLL (SEQ ID NO:6)

- [0587] B4 CDR-L1氨基酸序列
[0588] QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO:7)
[0589] B4 CDR-L2氨基酸序列
[0590] KVS (SEQ ID NO:8)
[0591] B4 CDR-L3氨基酸序列
[0592] FQGSHPY (SEQ ID NO:9)
[0593] B4 CDR-H1氨基酸序列
[0594] GYTFTDYY (SEQ ID NO:10)
[0595] B4 CDR-H2氨基酸序列
[0596] INPNNGGT (SEQ ID NO:11)
[0597] B4 CDR-H3氨基酸序列
[0598] ARYDYAWYFDV (SEQ ID NO:12)
[0599] B4 VL氨基酸序列
[0600] DIELTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNL
[0601] ASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPRTRSEGAPSWK
[0602] (SEQ ID NO:13)
[0603] B4 VL氨基酸序列
[0604] DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
[0605] KVSNRFSQVDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPYTFGGGT
[0606] KLEIK (SEQ ID NO:14)
[0607] B4 VH氨基酸序列
[0608] VKLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPRGLEWIGRIG
[0609] PNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRMVKG
[0610] CYGLLGPRDHGHRLL (SEQ ID NO:15)
[0611] B4 VH氨基酸序列
[0612] VKLQESGPVLVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGDINP
[0613] NNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARYDYAWY
[0614] FDVWGQTTVTVSS (SEQ ID NO:16)
[0615] B4 scFV氨基酸序列
[0616] HHHHHVVKLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPRGRL
[0617] EWIGRIGPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA
[0618] RRMVKG CYGLLGPRDHGHRLLKGRIPAHWRPLLVDPSVPSLASGGGGSG
[0619] GGSWISA EFALDIELTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNYLHWYQQKPGF
[0620] SPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPR
[0621] TRSEGAPSWK (SEQ ID NO:17)
[0622] B4 scFV氨基酸序列
[0623] MSVPTQVLG LLLWLT DARC VKLQESGPVLVKPGASVKISCKASGYTFTDYY
[0624] MNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELR
[0625] SLTSEDSAVYYCARYDYAWYFDVWGQTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGDV

- [0626] LMTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
- [0627] SNRFSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGYYCFQGSHVPYTFGGGTKL
- [0628] EIKRIEGRHHHHHHH (SEQ ID NO:18)
- [0629] B4 VL核酸序列
- [0630] GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGA
- [0631] GAAGATCACTATCACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCAATTACTT
- [0632] GCATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGATTCTCCCTAAACTCTTGATTTATAG
- [0633] GACATCCAATCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTC
- [0634] TGGGACCTCTTACTCTCTCACAATTGGCACCATTGGAGGCTGAAGATGTTGC
- [0635] CACTTACTACTGCCAGCAGGGTAGTAGTATACCACGTACACGTTCCGAGG
- [0636] GGGCACCAAGCTGGA (SEQ ID NO:19)
- [0637] B4 VL核酸序列
- [0638] GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGAGAT
- [0639] CAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
- [0640] AACACCTATTTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCT
- [0641] CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCA
- [0642] TGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGG
- [0643] CTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTACA
- [0644] CGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACG (SEQ ID NO:20)
- [0645] B4 VH核酸序列
- [0646] GTGAACTGCAGGAGTCAGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGT
- [0647] GAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCA
- [0648] CTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTG
- [0649] GTCCTAATAGTGGTGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCC
- [0650] AACTGACTGTAGACAAACCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAG
- [0651] CCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAAGAATGGTAA
- [0652] AGGGGTGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
- [0653] A (SEQ ID NO:21)
- [0654] B4 VH核酸序列
- [0655] GTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGT
- [0656] GAAGATATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGA
- [0657] ACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATT
- [0658] AATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGC
- [0659] CACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCA
- [0660] GCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATGATTACG
- [0661] CTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
- [0662] (SEQ ID NO:22)
- [0663] B4 scFV核酸序列
- [0664] GCCGCCACCATGAGTGTGCCACTCAGGTCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGG

- [0665] CTTACAGATGCCAGATGTGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGT
[0666] GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGT
[0667] TCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTT
[0668] GAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAACCA
[0669] GAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAG
[0670] CCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACT
[0671] GTGCAAGATATGATTACGCTTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACC
[0672] ACGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGAGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGG
[0673] CGGAGGTGGGGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAG
[0674] TCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACA
[0675] TAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGT
[0676] CTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAG
[0677] ACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC
[0678] AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACA
[0679] TGTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGATCG
[0680] AAGGCCGGCATCACCATCATCACCCTGATAG (SEQ ID NO: 23)
[0681] CHO优化的B4 scFV核酸序列
[0682] ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTCGGACTCCTGCTGCTGTGGCTCACCGAC
[0683] GCCAGGTGTGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGACCCGAGCTGGTGAAGCCTG
[0684] GAGCCTCCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCTTCCGATACACCTTCACCGAC
[0685] TACTATATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCACGGCAAGAGCCTGGAGTGGAT
[0686] CGGCGACATCAACCCTAACAACGGCGGCACCTCCTACAACCAGAAGTTCA
[0687] AGGGCAAGGCTACACTGACCGTGGACAAGTCCTCCAGCACCGCCTACATG
[0688] GAGCTCAGGAGCCTGACCTCCGAGGATTCCGCCGTCTATTACTGTGCCCCG
[0689] GTACGACTACGCCTGGTATTTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACAACCGTCA
[0690] CAGTCTCCAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGCGGAGGATCCGAGGCGG
[0691] AGGCGATGTCCTGATGACACAGACACCTCTGAGCCTCCCCGTGAGCCTGG
[0692] GAGACCAAGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTCCAGTCCATCGTGACAGC
[0693] AATGGCAACACCTACCTGGAGTGGTATCTGCAGAAGCCTGGCCAGTCCCC
[0694] CAAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGTTTCAGCGGCGTCCCTGACA
[0695] GGTTCTCCGATCCGGAAGCGGCACAGATTTACCCCTGAAGATCAGCAGG
[0696] GTCGAGGCCGAGGACCTGGGAGTGTACTACTGCTTCCAGGGCTCCCATGT
[0697] CCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAACTGGAGATCAAGCGGATCGAGG
[0698] GCAGGCATCACCACCATCACCCTGA (SEQ ID NO: 24)
[0699] C2 CDR-L1氨基酸序列
[0700] KSVSTSGYSY (SEQ ID NO: 25)
[0701] C2 CDR-L2氨基酸序列
[0702] LVS (SEQ ID NO: 26)
[0703] C2 CDR-L3氨基酸序列

- [0704] QHIRELTRSEGGPSWK (SEQ ID NO:27)
- [0705] C2 CDR-H1氨基酸序列
- [0706] GYTFTSYW (SEQ ID NO:28)
- [0707] C2 CDR-H2氨基酸序列
- [0708] INPSNGGT (SEQ ID NO:29)
- [0709] C2 CDR-H3氨基酸序列
- [0710] ARRGIRLRHFDY (SEQ ID NO:30)
- [0711] C2 CDR-L1氨基酸序列
- [0712] QDVGTA (SEQ ID NO:31)
- [0713] C2 CDR-L2氨基酸序列
- [0714] WAS (SEQ ID NO:32)
- [0715] C2 CDR-L3氨基酸序列
- [0716] QQYSSYPLT (SEQ ID NO:33)
- [0717] C2 VL氨基酸序列
- [0718] DIVMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIY
- [0719] LVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPS
- [0720] WK (SEQ ID NO:34)
- [0721] C2 VL氨基酸序列
- [0722] DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTA VAWYQQKPGQSPKLLIYWAS
- [0723] TRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLE
- [0724] LK (SEQ ID NO:35)
- [0725] C2 VH氨基酸序列
- [0726] VKLQESGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGNIN
- [0727] PSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRGIRLR
- [0728] HFDYWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:36)
- [0729] C2 scFV氨基酸序列
- [0730] VKLQESGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGNIN
- [0731] PSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRGIRLR
- [0732] HFDYWGQGTTVTVSSRANSADIHHTGGRSSMHLEGP I RPIVSRISGGGGGSGG
- [0733] GGSWISAEFALDIVMTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQ
- [0734] QKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHI
- [0735] RELTRSEGGPSWK (SEQ ID NO:37)
- [0736] C2 scFV氨基酸序列
- [0737] MSVPTQVLG L L L L W L T D A R C V K L Q E S G T E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y
- [0738] W M H W V K R P G Q G L E W I G N I N P S N G G T N Y N E K F K S K A T L T V D K S S T A Y M Q
- [0739] L S S L T S E D S A V Y Y C A R R G I R L R H F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G S G G G S
- [0740] D I Q M T Q S P K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V G T A V A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S
- [0741] T R H T G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T K L E
- [0742] L K R I E G R H H H H H H (SEQ ID NO:38)

[0743] C2 VL核酸序列

[0744] GACATTGTGATGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAG
[0745] AGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTA
[0746] TAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCC
[0747] TCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTG
[0748] GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
[0749] GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTC
[0750] GGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA (SEQ ID NO:39)

[0751] C2 VL核酸序列

[0752] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGA
[0753] CAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAG
[0754] CCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGG
[0755] GCATCCACCCGGCAGACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC
[0756] TGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGC
[0757] AGATTATTTCTGTGAGCAATATAGCAGCTATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGG
[0758] GACCAAGCTGGAGCTGAAAC (SEQ ID NO:40)

[0759] C2 VH核酸序列

[0760] GTGAAACTGCAGGAGTCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGT
[0761] GAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCA
[0762] CTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTA
[0763] ATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCC
[0764] AACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAG
[0765] CCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGAAGAGGCATAC
[0766] GGTACGACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
[0767] (SEQ ID NO:41)

[0768] C2 scFV核酸序列

[0769] GCCGCCACCATGAGTGTGCCCCTCAGGTCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGG
[0770] CTTACAGATGCCAGATGTGTGAAACTGCAGGAGTCTGGGACTGAACTGGT
[0771] GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTT
[0772] CACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTG
[0773] AGTGGATTGGAAATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAG
[0774] AAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGC
[0775] CTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTG
[0776] TGCAAGAAGAGGCATACGGTTACGACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGA
[0777] CCACGGTCACCGTCTCCTCTGGCGGAGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCT
[0778] GGCGGAGGTGGGTGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCCAAATTCATGTC
[0779] CACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATG
[0780] TGGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAA
[0781] CTA CTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCAGACTGGAGTCCCTGATCGCTTC

- [0782] ACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCA
[0783] GTCTGAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCTCT
[0784] CACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGATCGAAGGCCGGC
[0785] ATCACCATCATCACCCTGATAG (SEQ ID NO:42)
[0786] CHO优化的C2_{sc}FV核酸序列
[0787] ATGAGCGTGCCTACACAGGTGCTCGGCCTGCTGCTCCTCTGGCTGACAGA
[0788] CGCCCGGTGTGTGAAGCTGCAGGAGTCCGGAACCGAGCTGGTGAAACCTG
[0789] GCGCCAGCGTGAACTGAGCTGCAAAGCCAGCGGATACACCTTCACCTCC
[0790] TACTGGATGCACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGCCAGGGCCTGGAATGGAT
[0791] TGGCAACATCAACCCAGCAACGGCGGCACCAACTACAATGAGAAGTTCA
[0792] AGAGCAAGGCCACCCTGACCGTGGATAAGTCTCTCCACCGCCTACATG
[0793] CAGCTGTCTCTCCCTCACCTCCGAGGACAGCGCGTCTATTACTGTGCCAGG
[0794] CGGGGCATCAGGCTGAGGCACTTCGACTACTGGGGCCAAGGCACAACCGT
[0795] CACCGTGAGCTCCGAGGAGGAGGCAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGCGGA
[0796] GGCGGAAGCGACATTGAGTGACCCAGAGCCCCAAGTTCATGTCCACCTC
[0797] CGTCGGCGACAGGGTGAGCATCACCTGTAAGGCCAGCCAGGATGTCGGCA
[0798] CAGCTGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTG
[0799] ATCTACTGGGCTTCCACAAGGCATACCGGCGTCCCCGATAGGTTACAGG
[0800] CTCCGGCTCCGGCACCAGCTTCACTCACCATCAGCAACGTCCAGTCCG
[0801] AGGACCTGGCCGACTACTTCTGCCAGCAGTACTCCAGCTACCCCTCACCT
[0802] TCGGCGCTGGCACCAAGCTGGAAGTCAAGCGGATCGAGGGCAGGCATCAC
[0803] CACCATCACCCTGATAG (SEQ ID NO:43)
[0804] 全长人膜辅因子蛋白 (MCP)
[0805] MEPPGRRECPFPSWRFPGLLLAAMVLLLYSFSACEEPPTFEAMELIGKPKPY
[0806] YEIGERVDYKCKKGYFYIPPLATHTICDRNHTWLPVSDDACYRETCPYIRDPL
[0807] NGQAVPANGTYEFGYQMHFICNEGYLIGEEILYCELKGSVAIWSGKPPICEK
[0808] VLCTPPPKIKNGKHTFSEVEVFEYLDVAVTYSDDPAPGPDPSLIGESTIYCGDN
[0809] SVWSRAAPECKVVKCRFPVVENGKQISGFGKKFYKATVMFECDKGFYLDG
[0810] SDTIVCDNSTWDPPVPKCLKVLPPSSTKPPALSH
[0811] SVSTSSTTKSPASSASGPRPTYKPPVSNYPGYKPEEGILDSL DVWVIAVIVIAI
[0812] VVGVAIVCVVPYRYLQRRKKKGTYLTDETHREVKFTSL (SEQ ID NO:44)
[0813] 全长人衰变加速因子 (DAF)
[0814] MTVARPSVPAALPLLGLPRLLLLVLLCLPAVWGDGLPPDVPNAQPALEGR
[0815] TSFPEDTVITYKCEESFVKIPGEKDSVICLKGSQWSDIEEFCNRSCEVPTRLNSA
[0816] SLKQPYITQNYFPVGTVEYECRPGYRREPSLSPKLTCLQNLKWSTAVEFCKK
[0817] KSCPNGEIRNGQIDVPGGILFGATISFSCNTGYKLFGSTSSFCLISGSSVQWSD
[0818] PLPECREIYCPAPPQIDNGIIQGERDHYGYRQSVTYACNKGFTMIGEHSIYCTV
[0819] NNDEGEWSGPPPECRGKSLTSKVPPTVQKPTTVNVPTTEVSPTSQKTTTKTTT
[0820] PNAQATRSTPVSRTTKHFHETTPNKGSGTTS GTTRLLSGHTCFTLTGLLGTL

- [0821] VTMGLLT (SEQ ID NO:45)
- [0822] 全长小鼠衰变加速因子 (DAF)
- [0823] MIRGRAPRTRSPPPPPLLPLLSLSLLLLSPTVRGDCGPPPDIPNARPILGRHSKFA
- [0824] EQSKVAYSCNNGFKQVPDKSNIVVCLENGQWSSHETFCCKSCVAPERLSFAS
- [0825] LKKEYLNMNFFPVGTIVEYECRPGFRKQPPLPGKATCLEDLVWSPVAQFCKK
- [0826] KSCPNPKDLNNGHINIPTGILFGSEINFSCNPGYRLVGVSSSTFCSTGTNTVDWD
- [0827] DEFPVCTEIHCPPEPKINNGIMRGESDSYTSQVVTYSCDKGFIIVGNASIYCT
- [0828] VSKSDVGQWSSPPPRCIEKSKVPTTKPTINVPSTGTPSTPQKPTTESVNPNGDQ
- [0829] PTPQKPSTVKVSATQHVPVTKTTVRHPIRTSTDKGEPNTGGDRYIYGHTCLITL
- [0830] TVLHVMLSLIGYLT (SEQ ID NO:46)
- [0831] 全长人CD59
- [0832] MGIQGGSVLFGLLLVLAVFCHSGHSLQCYNCPNPTADCKTAVNCSSDFDACL
- [0833] ITKAGLQVYNKCKWFEHCNFDVTTTLRENELTYYCCKKDLNCFNEQLENG
- [0834] GTSLSEKTVLLLVTPFLAAAWSLHP (SEQ ID NO:47)
- [0835] 全长小鼠CD59
- [0836] MRAQRGLILLLLLLLAVFCSTAVSLTCYHCFQPVVSSCNMNSTCSPDQDSCLYA
- [0837] VAGMQVYQRCWKQSDCHGEIIMDQLEETKLKFRCCQFNLCNKSDGSLGKTP
- [0838] LLGTSVLVAILNLCLSHL (SEQ ID NO:48)
- [0839] 全长小鼠CD59,同种型B
- [0840] MRAQRGLILLLLLLLAVFCSTAVSLKCYNCFQFVSSCKINTTCSPNLDSCLYAV
- [0841] AGRQVYQQCWKLSDCNSNYIMSRLDVAGIQSKCCQWGLCNKNDGLEEPN
- [0842] NAETSSLRKTALLGTSVLVAILKFCF (SEQ ID NO:49)
- [0843] 全长小鼠补体受体1-相关的基因/蛋白y (Crry)
- [0844] MEVSSRSSEPLDPVWLLVAFGRGGVKLEVLLLFLLPFTLGELRGGLGKHGHT
- [0845] VHREPAVNRLCADSKRWSGLPVSAQRPFPMGHCPAPSQPSAKPINLTDESM
- [0846] FPIGTYLLYECLPGYIKRQFSITCKQDSTWTSKEDKCIKQCKTPSPDENGVLH
- [0847] VHTGIIQFGSRINYTCNQGYRLIGSSSAVCVITDQSDVDWTEAPICEWIPCEIPPG
- [0848] IPNGDFFSSTREDFHYGMVVITYRCNTDARGKALFNLVGEPSLYCTSNDGEIGV
- [0849] WSGPPPQCIELNKCTPPPYVENAVMLSENRSLSLRDIVEFRCHPGFIMKGASS
- [0850] VHCQSLNKWEPELPSCFKGVICRLPQEMSGFQKGLGMKKEYYYGENVTLEC
- [0851] EDGYTLEGSSQSQSQSDGSWNPLAKCVSRISGLIVGIFIGIIVFILVIVFIWMI
- [0852] LKYKKRNTTDEKYKEVG IHLNFKEDSCVRLQSLTTSQENSSTTSPARNSLTQE
- [0853] VS (SEQ ID NO:50)
- [0854] 全长人补体受体1 (CR1)
- [0855] MGASSPRSEPEVGPAPGLPFCCGSSLLAVVVLLALPVAWGQCNAPWLPFA
- [0856] RPTNLTDDEFPIGTLYLNYECRPGYSGRPFSSII CLKNSVWTGAKDRCCRKSCRN
- [0857] PPDPVNGMVHVIKGIQFGSQIKYSCTKGYRLIGSSSATCIIISGDTVWDNETPIC
- [0858] DRIPCGLPPTITNGDFISTNRENFHYGSVVITYRCNPGSGGRKVFELVGEPSIYC
- [0859] TSNDQVGIWSGPAPQCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCPQG

[0860] FVMKGPRRVKQALNKWEPELPSCSRVCQPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQE
[0861] VFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGDWSPAAPTCEVKSCDDFMGQLLNGRVLF
[0862] PVNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSSASYCVLAGMESLWNSSVPVCEQIFCPSP
[0863] PVIPNGRHTGKPLEVFPFGKAVNYTCDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNG
[0864] VWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLLFAKLKTQTNASDFPIGTSLKYECRPEYYGRP
[0865] FSITCLDNLVWSSPKDVCKRKCKTTPDPVNGMVHVITDIQVGSRIYNSCTTG
[0866] HRLIGHSSAECILSGNAHWSTKPPICQRI PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGS
[0867] VVTYRCNPGSGGRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVG IWSGPAPQCIIPNKCTPPN
[0868] VENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCPGFVFMKGPRRVKQALNKWEPELPSCS
[0869] RVCQPPDVLHAERTQRDKDNFSPGQEVFYSCEPGYDLRGAASMRCTPQGD
[0870] WSPAAPTCEVKSCDDFMGQLLNGRVLF PVNLQLGAKVDFVCDEGFQLKGSS
[0871] ASYCVLAGMESLWNSSVPVCEQIFCPSP PVIPNGRHTGKPLEVFPFGKAVNYT
[0872] CDPHPDRGTSFDLIGESTIRCTSDPQNGVWSSPAPRCGILGHCQAPDHFLLFAK
[0873] LKTQTNASDFPIGTSLKYECRPEYYGRPFSITCLDNLVWSSPKDVCKRKCKT
[0874] PDPVNGMVHVITDIQVGSRIYNSCTTG HRLIGHSSAECILSGNTAHWSTKPPIC
[0875] QRI PCGLPPTIANGDFISTNRENFHYGS VVTYRCNLGSRGRKVFELVGEPsiY
[0876] CTSNDDQVG IWSGPAPQCIIPNKCTPPNVENGILVSDNRSLSLNEVVEFRCPGF
[0877] VFMKGPRRVKQALNKWEPELPSCSRVCQPPPEILHGEHTPSHQDNFSPGQE
[0878] VFYSCEPGYDLRGAASLHCTPQGDWSPEAPRCAVKSCDDFLGQLPHGRVLF
[0879] LNLQLGAKVSFVCDEGFRLKGSSVSHCVLVGMRLWNSSVPVCEHIFCPNPP
[0880] AILNGRHTGTPSGDIPYGKEISYTCDPHPDRGMTFNLIGESTIRCTSDPHGNGV
[0881] WSSPAPRCELSVRAGHCKTPEQPFASPTIPINDFEFPVGTSLNYECRPGYFGK
[0882] MFSISCLENLVSSVEDNCRKSCGPPPEPFNGMVHINTDTQFGSTVNYSCNE
[0883] GFRLIGSPSTTCLVSGNNVTWDDKAPICEIISCEPPPTISNGDFYSNNRTSFHNG
[0884] TVVTYQCHTGPDEQLFELVGERSIYCTSKDDQGVWSSPPPRCISTNKCTAP
[0885] EVENAIRVPGNRSFFSLTEIIRFRCQPGFVMVGSHTVQCQTNGRWGPKLPHCS
[0886] RVCQPPPEILHGEHTLSHQDNFSPGQEVFYSCEPSYDLRGAASLHCTPQGDWS
[0887] PEAPRCTVKSCDDFLGQLPHGRVLLPLNLQLGAKVSFVCDEGFRLKGRSASH
[0888] CVLAGMKALWNSSVPVCEQIFCPNPPAILNGRHTGTPFGDIPYGKEISYACDT
[0889] HPDRGMTFNLIGESSIRCTSDPQNGVWSSPAPRCELSVPAACPHPPKIQNG
[0890] HYIGGHVSLYLPGMTISYTCDPGYLLVGKGFIFCTDQGIWSQLDHYCKEVNCS
[0891] FPLFMNGISKELEMKKVYHYGDYVTLKCEDGYTLEGSPWSQCQADDRWDPP
[0892] LAKCTSRADALIVGTLSGTIFFILLIIFLSWII LKHKGNNAHENPKEVAIHLHS
[0893] QGGSSVHPRTLQTNEENSRVLP (SEQ ID NO: 51)
[0894] 全长人因子H
[0895] MRLLAKIIICMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCR
[0896] PGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNPLRKCQKRPCGHPGDTPFGTFTLTGGNVFE
[0897] YGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPENGKI
[0898] VSSAMEPDREYHFQAVRFVCNSGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEIS

[0899] CKSPDVINGSPISQKIIYKENERFQYKCNMGYEYSERGDVCTESGWRPLPSC
[0900] EEKSCDNPIYPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTAKCTSTGWI
[0901] PAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCCDEHFETPSGS
[0902] YWDHIHCTQDGWSPA VPCLRKCYFPYLENGYNQNYGRKFVQGSIDVACHP
[0903] GYALPKAQTTVTCMENGWSPTRCIRVKTCSSIDIENGFI SESQYTYALKEK
[0904] AKYQCKLGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFI
[0905] WFKLNDTLDYEC HDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDV
[0906] HLVPDRKKDQYKVGEVLKF SCKPGFfi VGPNSVQCYHFGLSPLDPICKEQVQS
[0907] CGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYYCNPRFLMKGPNKIQ CVDGEWTTL
[0908] PVCIVEESTCGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCSESFTMIGHRSITCIHG
[0909] VWTQLPQCVAIDKLKKCKSSNLIILEEHLKNKKEFDHNSNIRYRCRGKEGWIH
[0910] TVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNYRDGEKVS VLCQE
[0911] NYLIEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTK
[0912] LSYTCEGGFRISEENETTCYMGKWSSPPQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSY
[0913] QYGEEVITYKCFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCIKTDCLSLPSFENAIPMGE
[0914] KKDVKAGEQVITYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVNPPTV
[0915] QNAYIVSRQMSKYPSEGERVRYQCRSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDS
[0916] TGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNL YQLEGNKRITCRNGQWS
[0917] EPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTA KQKLYSRTGESVEFVCKRGYRLSSRS
[0918] HTLRTTCWDGKLEYPTCAKR (SEQIDNO:52)
[0919] 全长小鼠因子H
[0920] MRLSARI IWLILWTVCAAEDCKGPPPRENSEILSGSWSEQLYPEGTQATYKCR
[0921] PGYRTLGTIVKVCKNGKWVASNPSRICRKKPCGHPGDT PFGSFRLAVGSQFEF
[0922] GAKVVYTCDG YQLLGEIDYRECGADGWINDIPLCEVVKCLPVTELENGRIV
[0923] SGAAETDQEYYFGQVVRFECSNGFKIEGHKEIHCSENGLWSNEKPRCVEILCT
[0924] PPRVENDGINVKPVYKENERYHYKCKHGYVPKERGDVCTGSGWSSQPFC
[0925] EEKRCSPPYILNGIYTPHRIIHRSDDEIRYECNYGFYPTGSTVSKCTPTGWIPV
[0926] PRCTLKPCEFPQFKYGRLYYEE SLRPNFPVSI GNKYSYKCDNGFSPPSGYSWD
[0927] YLRCTAQGWEPEVPCVRKCVFHYVENGD SAYWEKVYVQGQSLKVQCYNGY
[0928] SLQNGQDTMTCTENGWSPPPKCI RIKTCSASDIHIDNGFLSESSSIYALNRETSY
[0929] RCKQGYVTNTGEISGSITCLQNGWSPQPSCIKSCDMPVFENSITKNTRTWFKL
[0930] NDKLDYECLVGFENEYKHTKGSITCTYYGWS DTPSCYERECSVPTLDRKL VV
[0931] SPRKEKYRVGDLLF SCHSGHRVGPDSVQCYHFGWSPGFPTCKGQVASCAPP
[0932] LEILNGEINGAKKVEYSHGEVVKYDCKPRFL LKGPKNKIQ CVDGNWTTLPVCIE
[0933] EERTCGDIPELEHGS AKCSVPPYHHGDSVEFI CEENFfMIGHGSVSCISGKWTQ
[0934] LPKCVATDQLEKCRVLKSTGIEA I KPKLTEFfHNSTMDYKCRDKQEYERSICIN
[0935] GKWDPEPNCTSKTSCPPPPQIPNTQVIETT VKYLDGEKLSVLCQDNYLTQDSE
[0936] EMVCKDGRWQSLPRCIEKIPCSQPPTIEHGSINL PRSSEERRDSIESSSHEHGTTF
[0937] SYVCDDGFRIPEENRITCYMGKWSTPPRCVGLPCGPPPSIPLGTVSLELESYQH

- [0938] GEEVTYHCSTGFGIDGPAFIICEGGKWS DPPKCIKTDCDVLPTVKNAIIRGKSK
- [0939] KSYRTGEQVTFRCQSPYQMNGSDTVTCVNSRWIGQPVCKDNSCVDPHPVPN
- [0940] ATIVTRTKNKYLHGDRVRYECNKPLELFGQVEVMCENGIWTEKPKCRDSTG
- [0941] KCGPPPIDNGDITSLSLPVYEPLSSVEYQCQKYLLKGKKTITCTNGKWSEPP
- [0942] TCLHACVIPENIMESHNIILKWRHTEKIYSHSGEDIEFGCKYGYKARDSPPFR
- [0943] TKCINGTINYPTCV (SEQ ID NO:53)
- [0944] 人CD5蛋白的信号肽
- [0945] MPMGSLQPLATLYLLGMLVAS (SEQ ID NO:54)
- [0946] 人CR2蛋白的信号肽
- [0947] MGAAGLLGVFLALVAPG (SEQ ID NO:55)
- [0948] 人CR2蛋白的信号肽
- [0949] MGAAGLLGVFLALVAPGVLG (SEQ ID NO:56)
- [0950] B4 scFV核酸序列
- [0951] GACACGTGATCAGCCGCCACCATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGC
- [0952] CACCTTGACCTGCTGGGGATGCTGGTCGCTTCCGTGCTAGCGCATCATCA
- [0953] TCATCATCATGTGAACTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTG
- [0954] GGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCT
- [0955] ACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACGAGGCCTTGAGTGGATT
- [0956] GGAAGGATTGGTCCTAATAGTGGTGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAA
- [0957] GAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCCTCCAGCACAGCCTACATGC
- [0958] AGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGA
- [0959] AGAATGGTAAAGGGGTGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
- [0960] ACCGTCTCCTCAAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTG
- [0961] GATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTCAGGAGGCGGTGGCGGCTCGGG
- [0962] TGGCGGCGGCTCTTGATATCTGCAGAATTGCGCCCTTGACATTGAGCTCAC
- [0963] CCAGTCTCCAACCACCATGGCTGCATCTCCCGGGGAGAAGATCACTATCA
- [0964] CCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCAATTACTTGCATTGGTATCAGC
- [0965] AGAAGCCAGGATTCTCCCTAAACTCTTGATTTATAGGACATCCAATCTGG
- [0966] CTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACT
- [0967] CTCTCACAATTGGCACCATGGAGGCTGAAGATGTTGCCACTTACTACTGCC
- [0968] AGCAGGGTAGTAGTATACCACGTACACGTTCCGAGGGGGCACCAAGCTGG
- [0969] AAATAATAGACTAGTCGTGCG (SEQ ID NO:57)
- [0970] C2 scFV核酸序列
- [0971] GACACGAAGCTTGCCGCCACCATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGC
- [0972] CACCTTGACCTGCTGGGGATGCTGGTCGCTTCCGTGCTAGCGCATCATCA
- [0973] TCATCATCATGTCAAGCTGCAGGAGTCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTG
- [0974] GGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCT
- [0975] ACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATT
- [0976] GGAAATATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAA

[0977] GAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC
[0978] AGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGA
[0979] AGAGGCATACGGTTACGACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGT
[0980] CACCGTCTCCTCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCC
[0981] GCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATA
[0982] TCAGGAGGCGGTGGCGGCTCGGGTGGCGGCGGTCTTGGATATCTGCAGA
[0983] ATTCGCCCTTGACATTGTGATGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCT
[0984] CTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATAAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTAC
[0985] ATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCAC
[0986] CCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCA
[0987] GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCT
[0988] GTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCT
[0989] TACACGTTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAATAGCCCGGGCGTGCG
[0990] (SEQ ID NO:58)

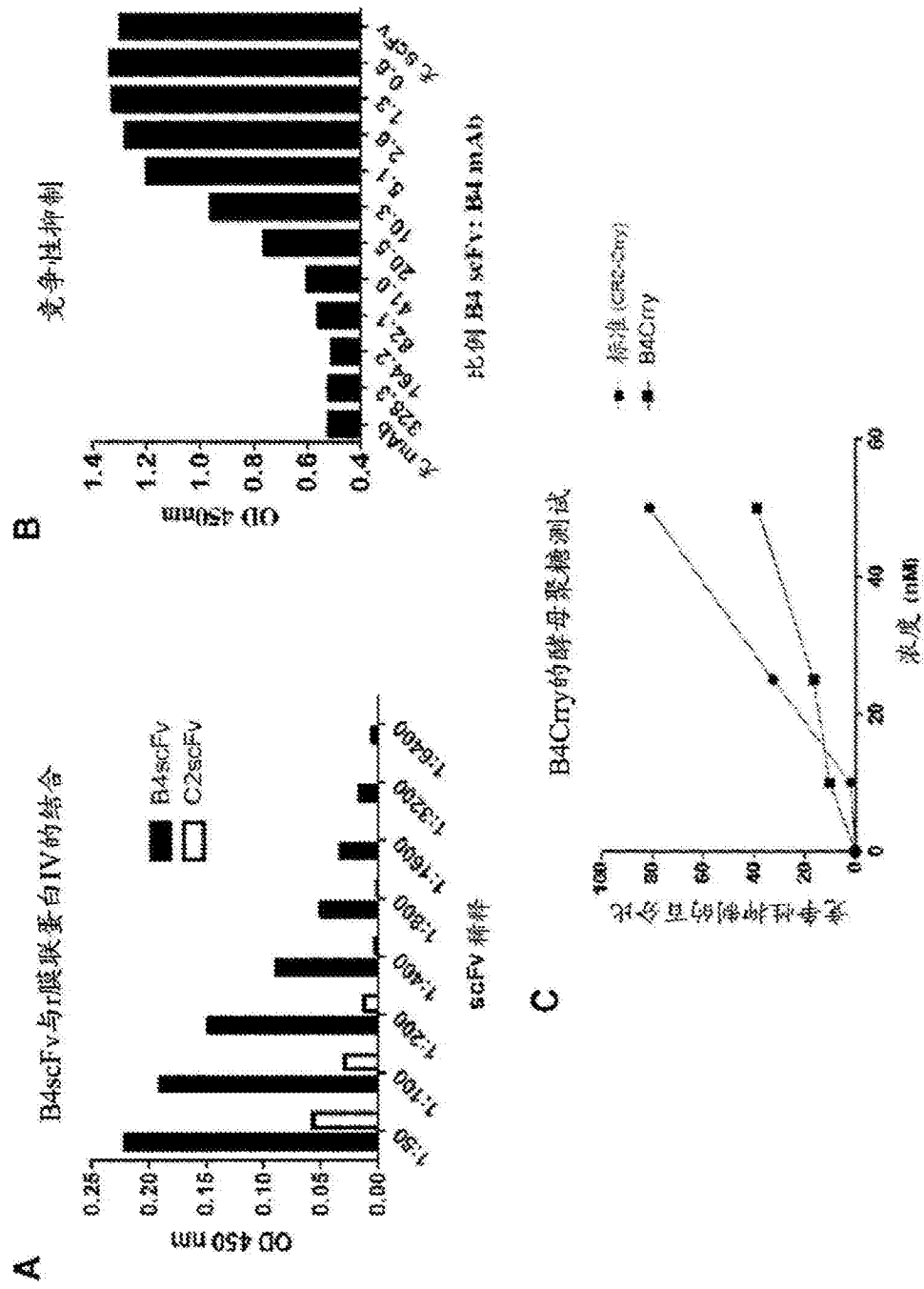


图1

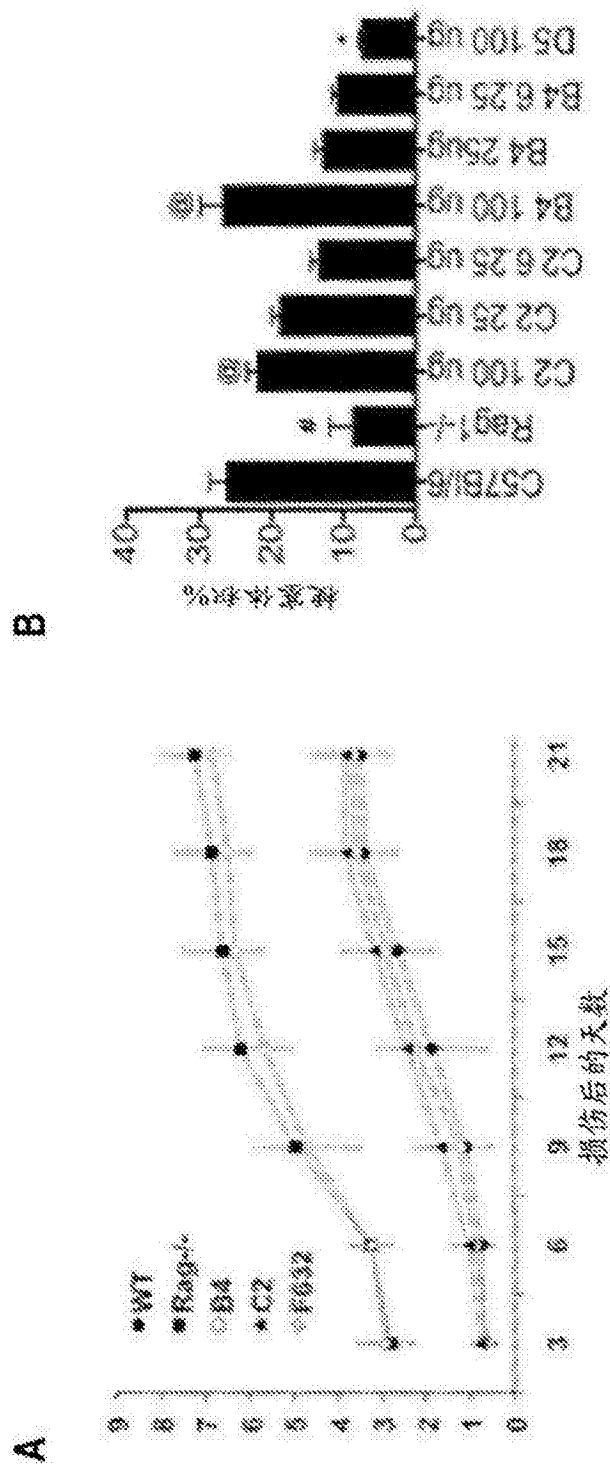


图2

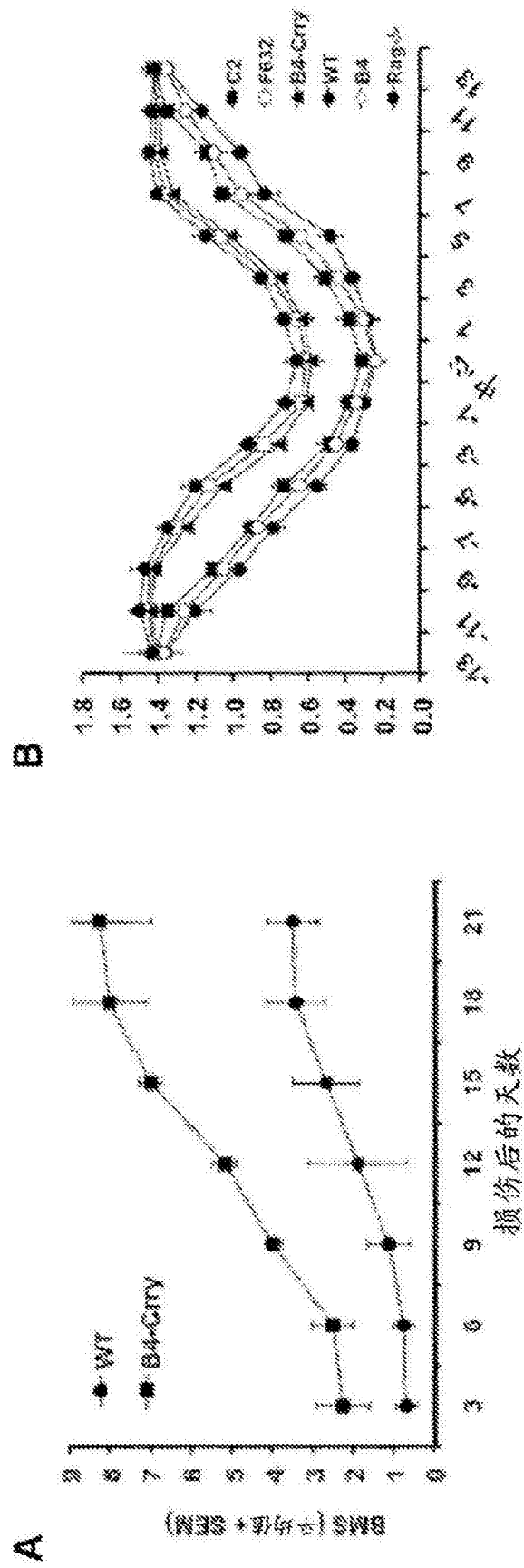


图3

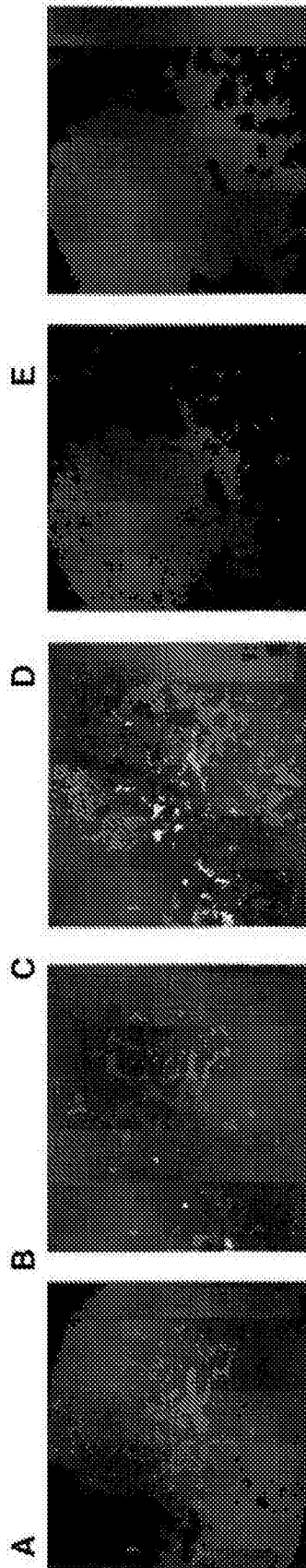


图4

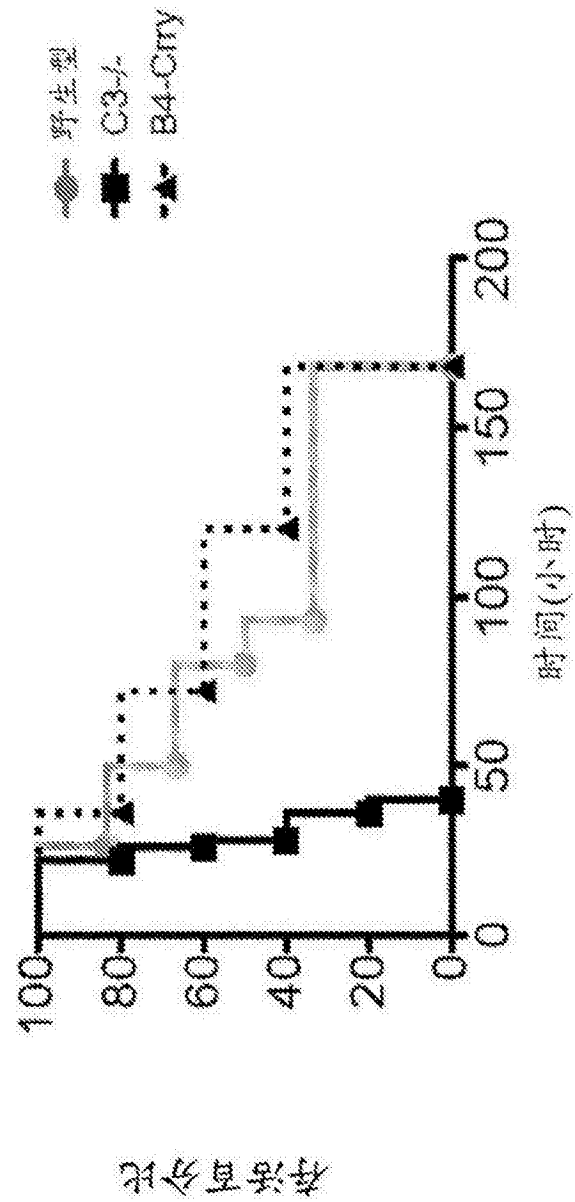


图5

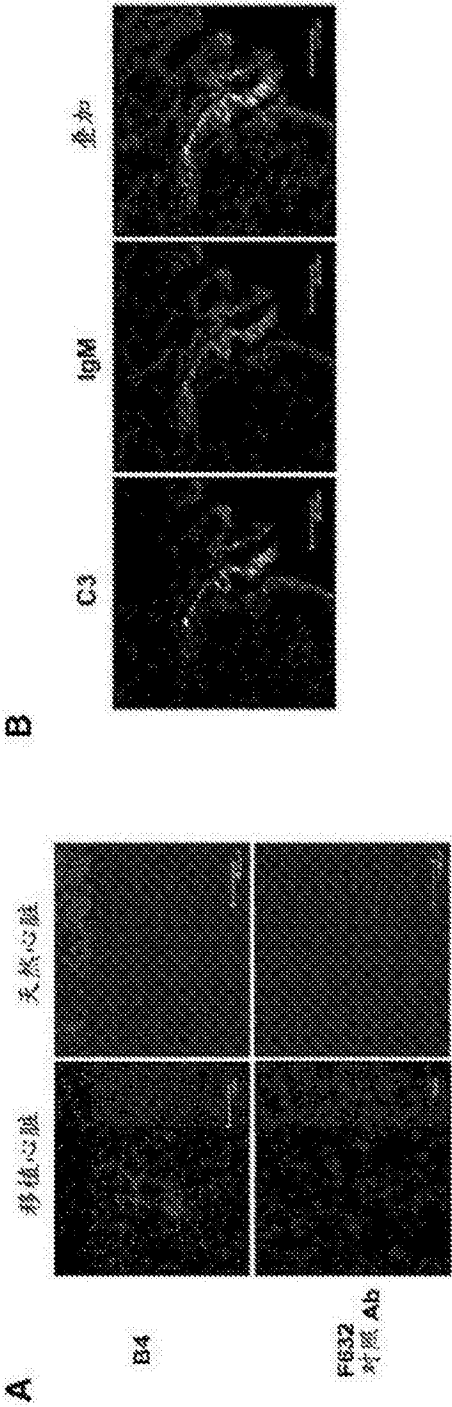
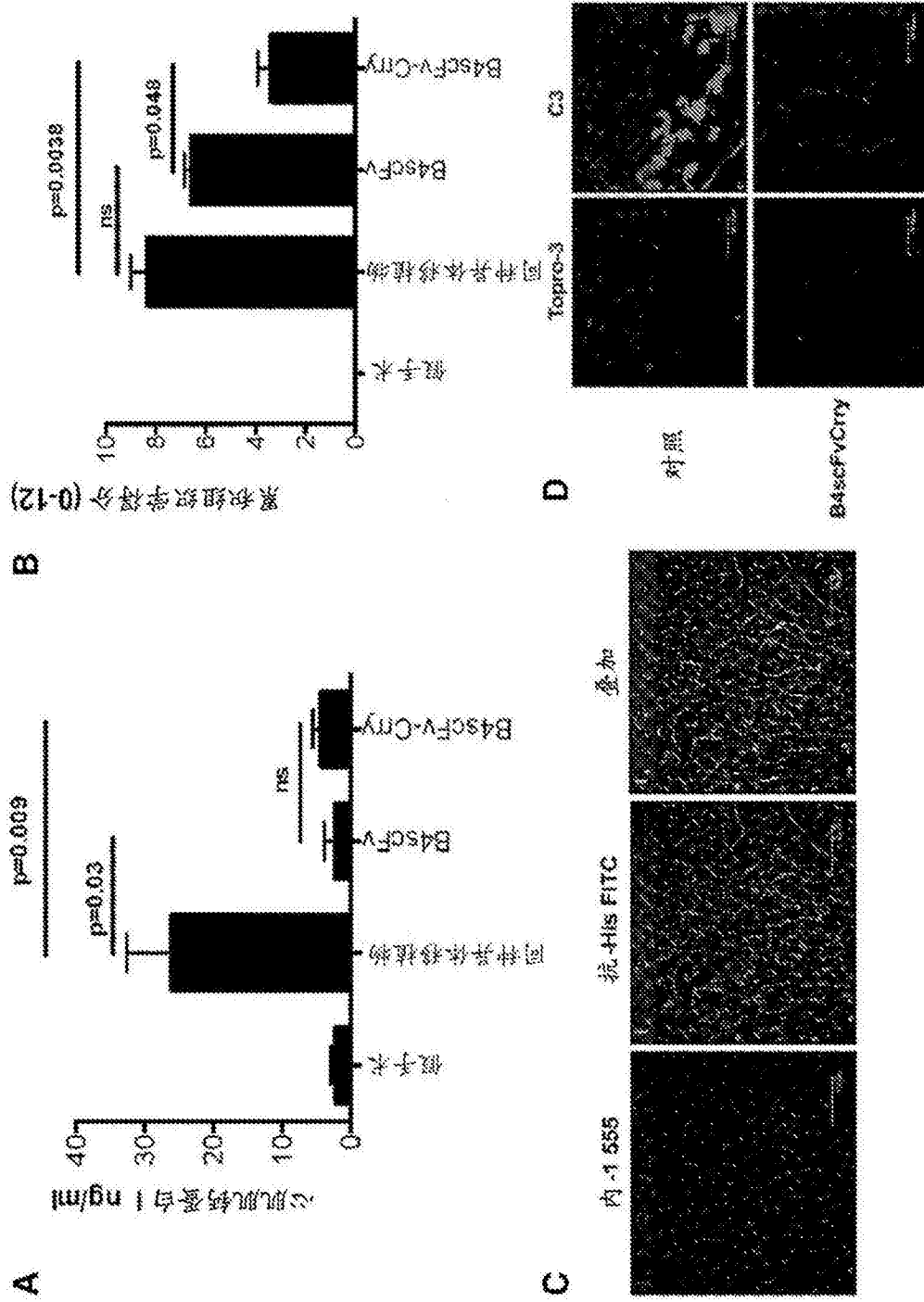


图6



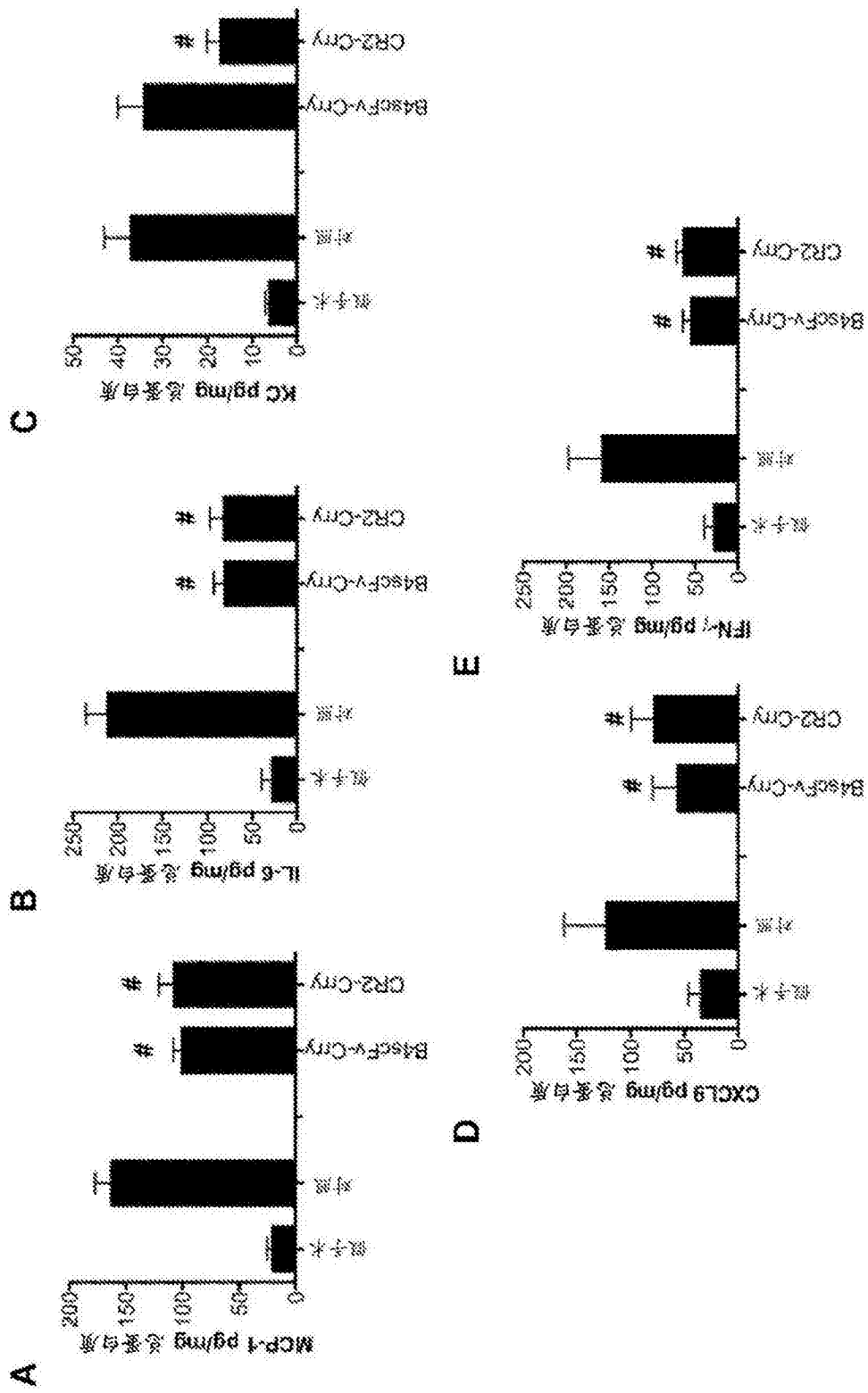


图8

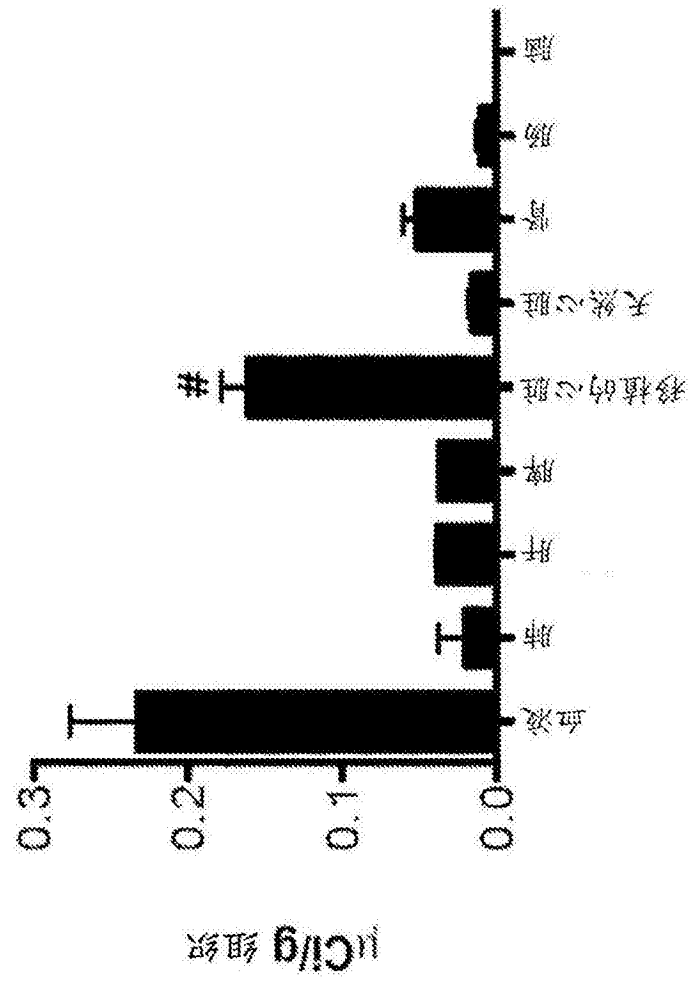


图9

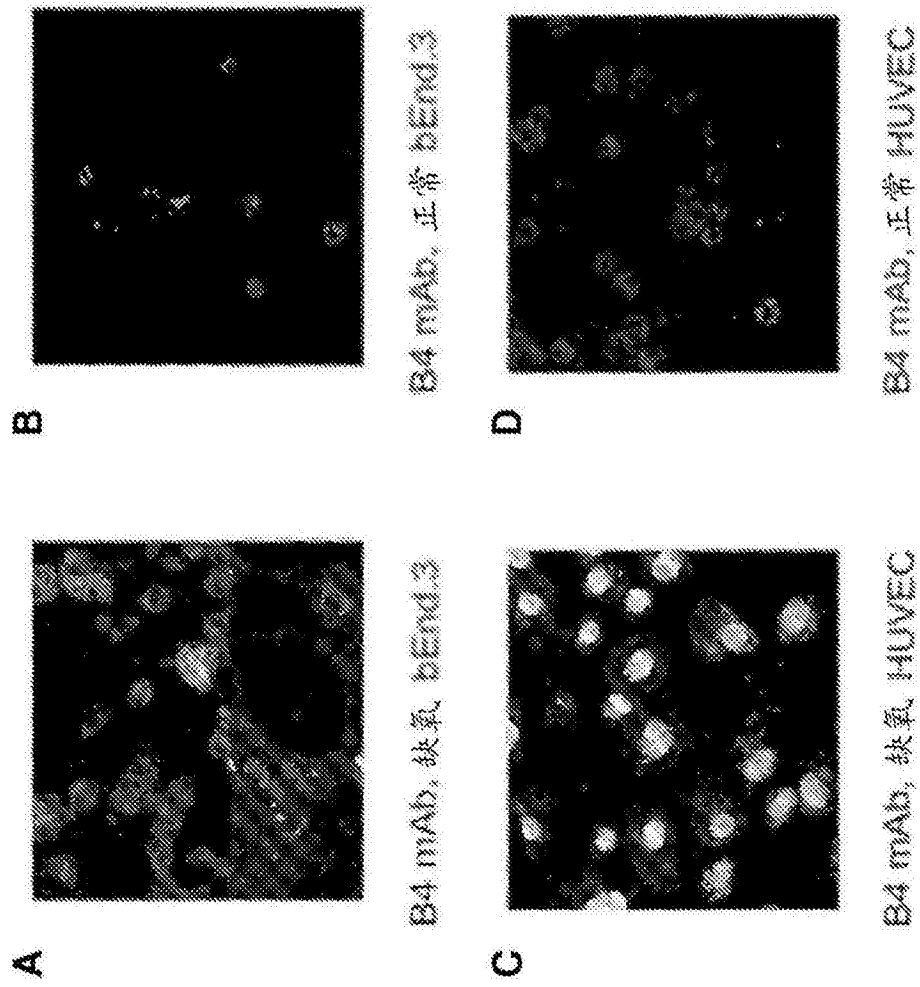


图10

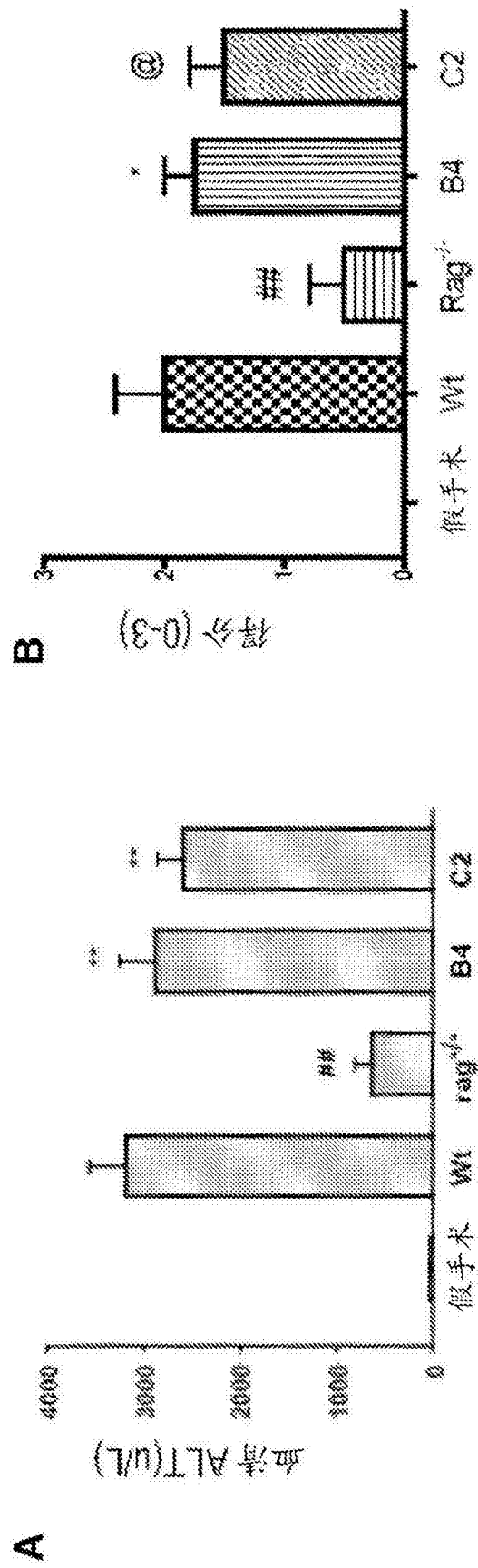


图11

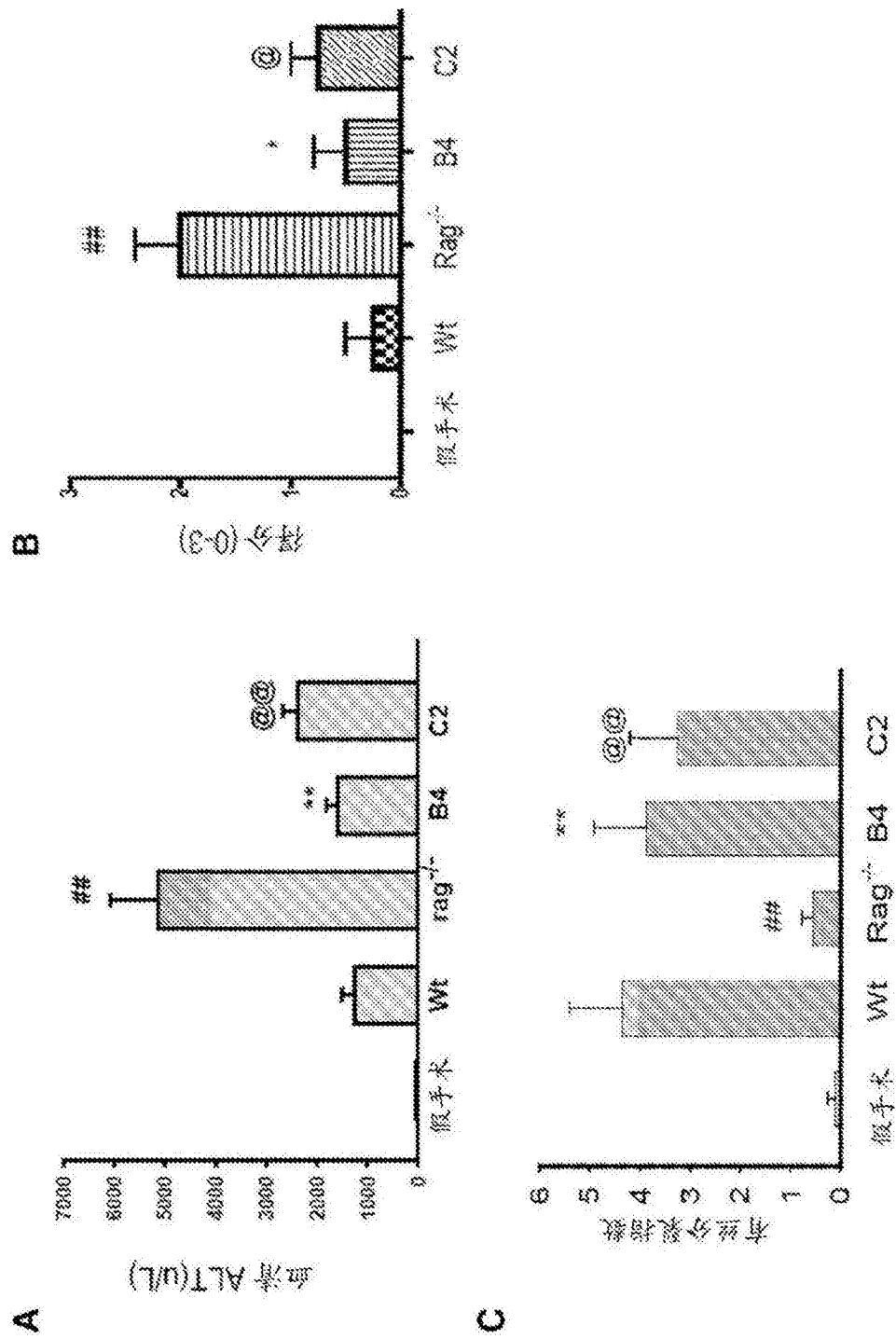


图12

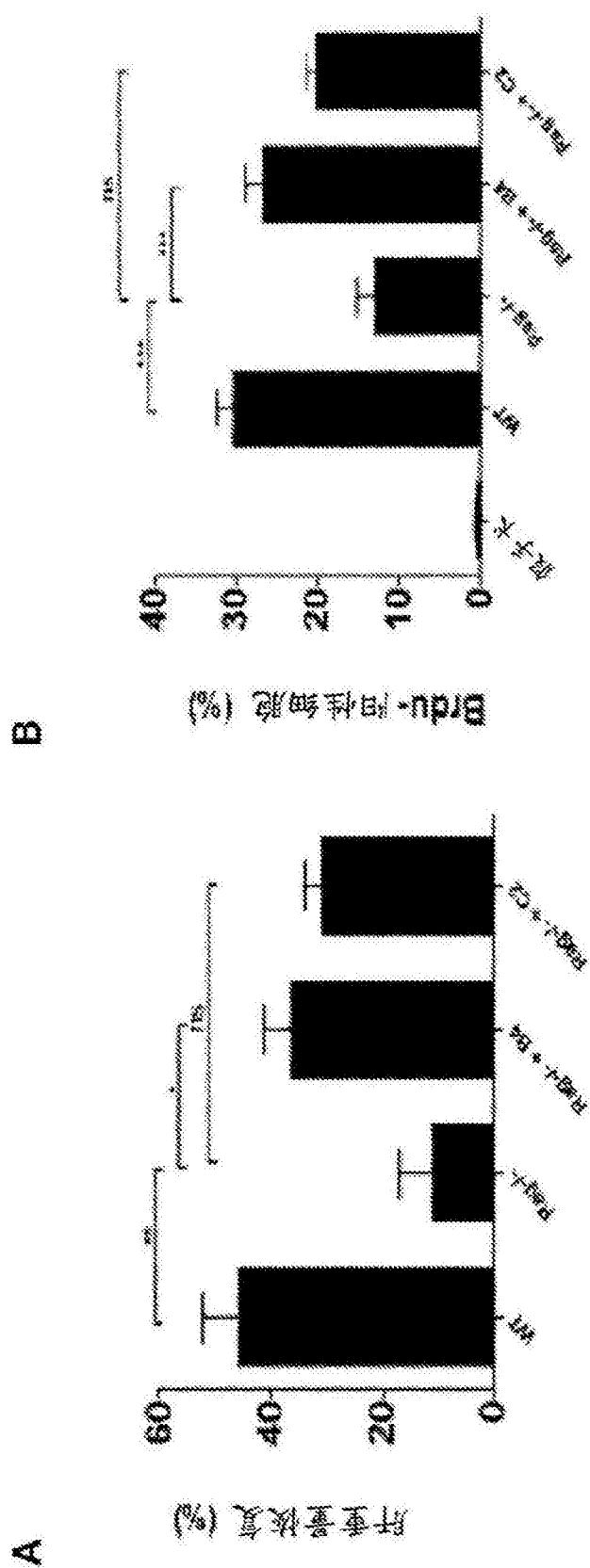
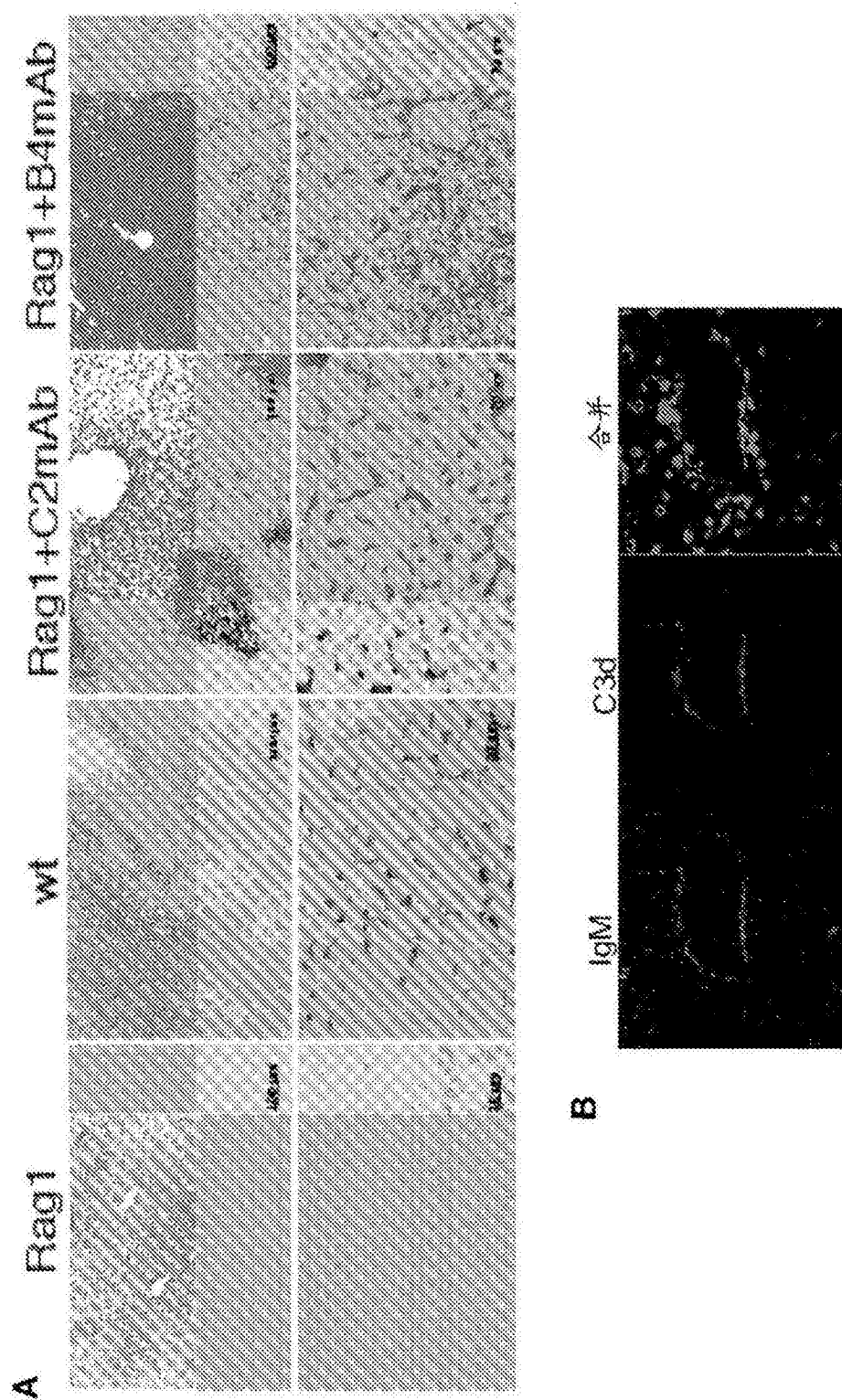


图13



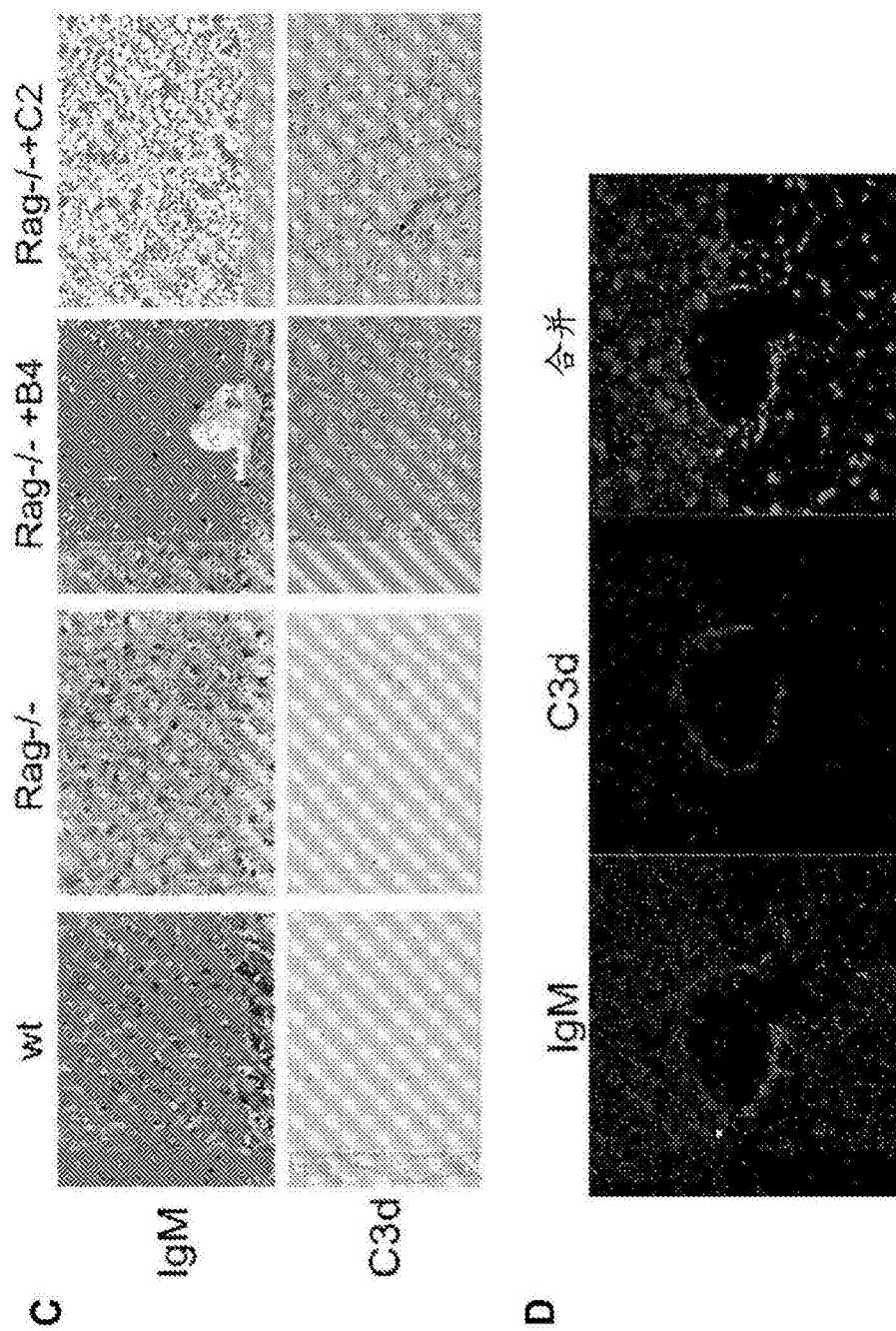
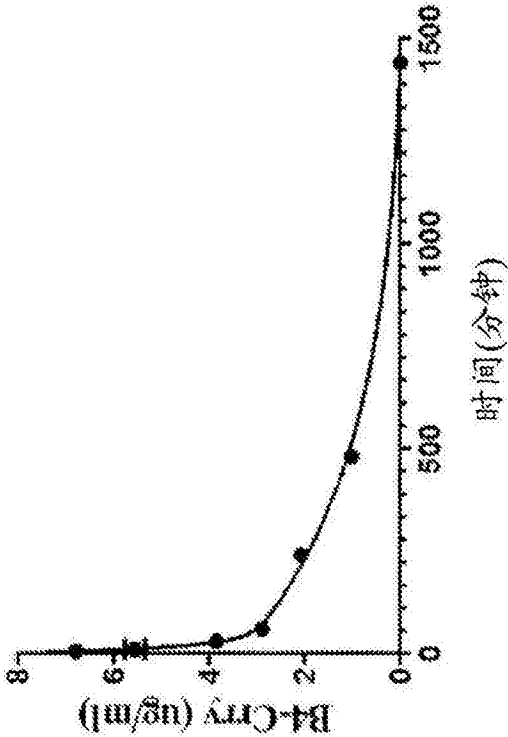
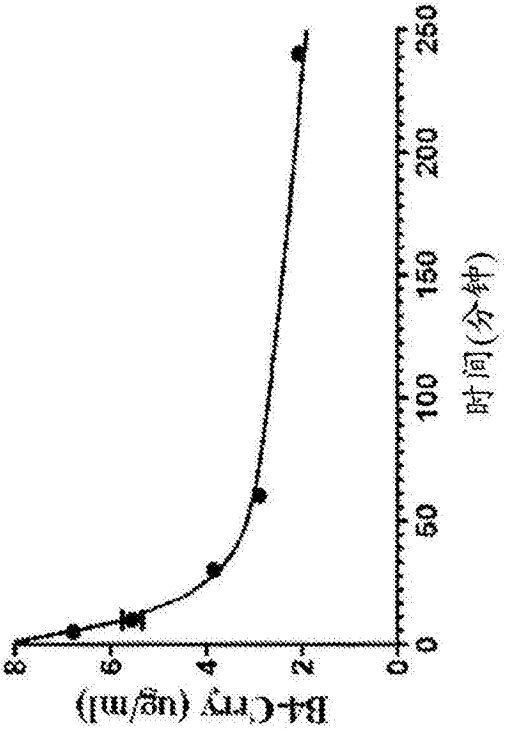


图14

B



A



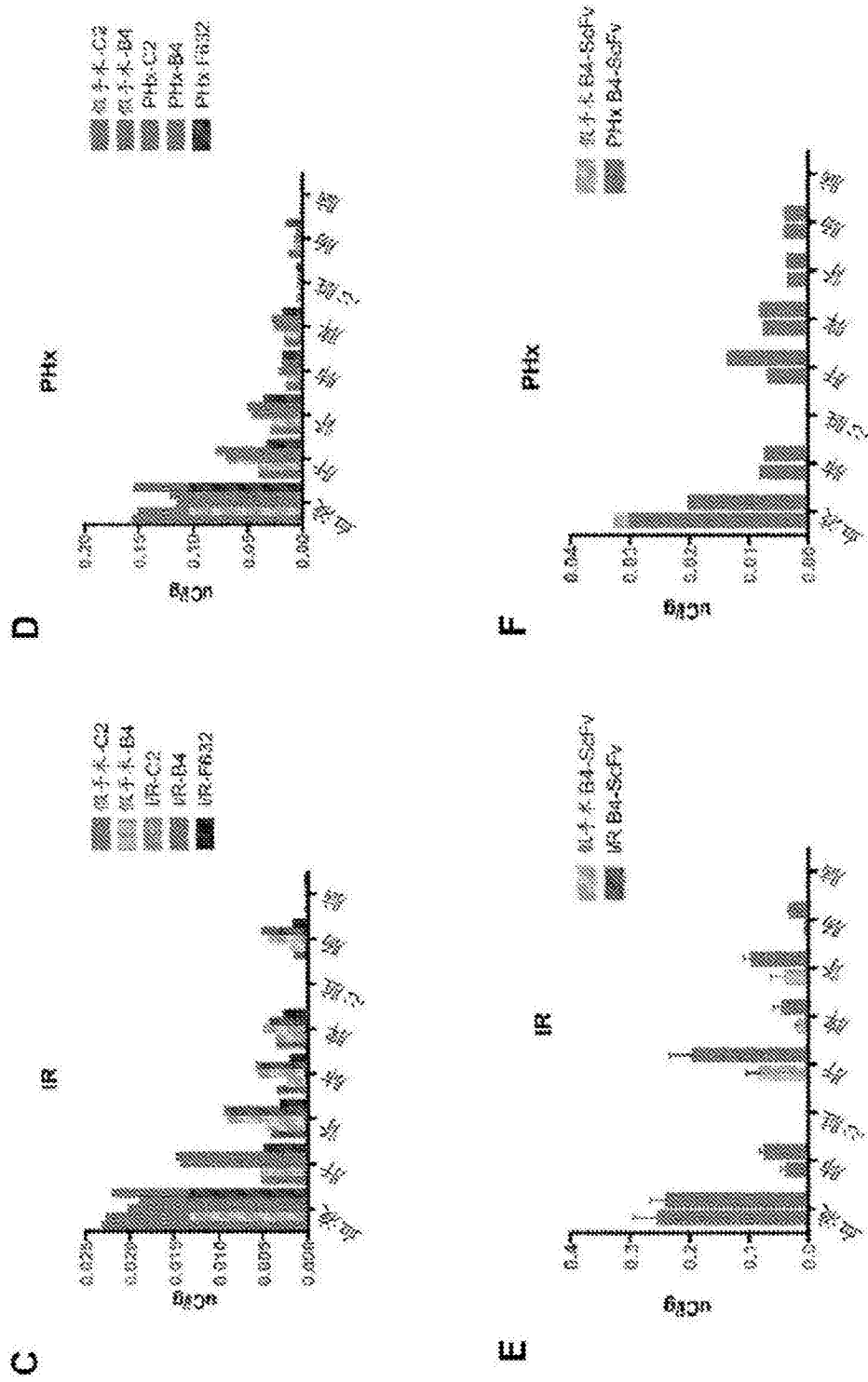


图15

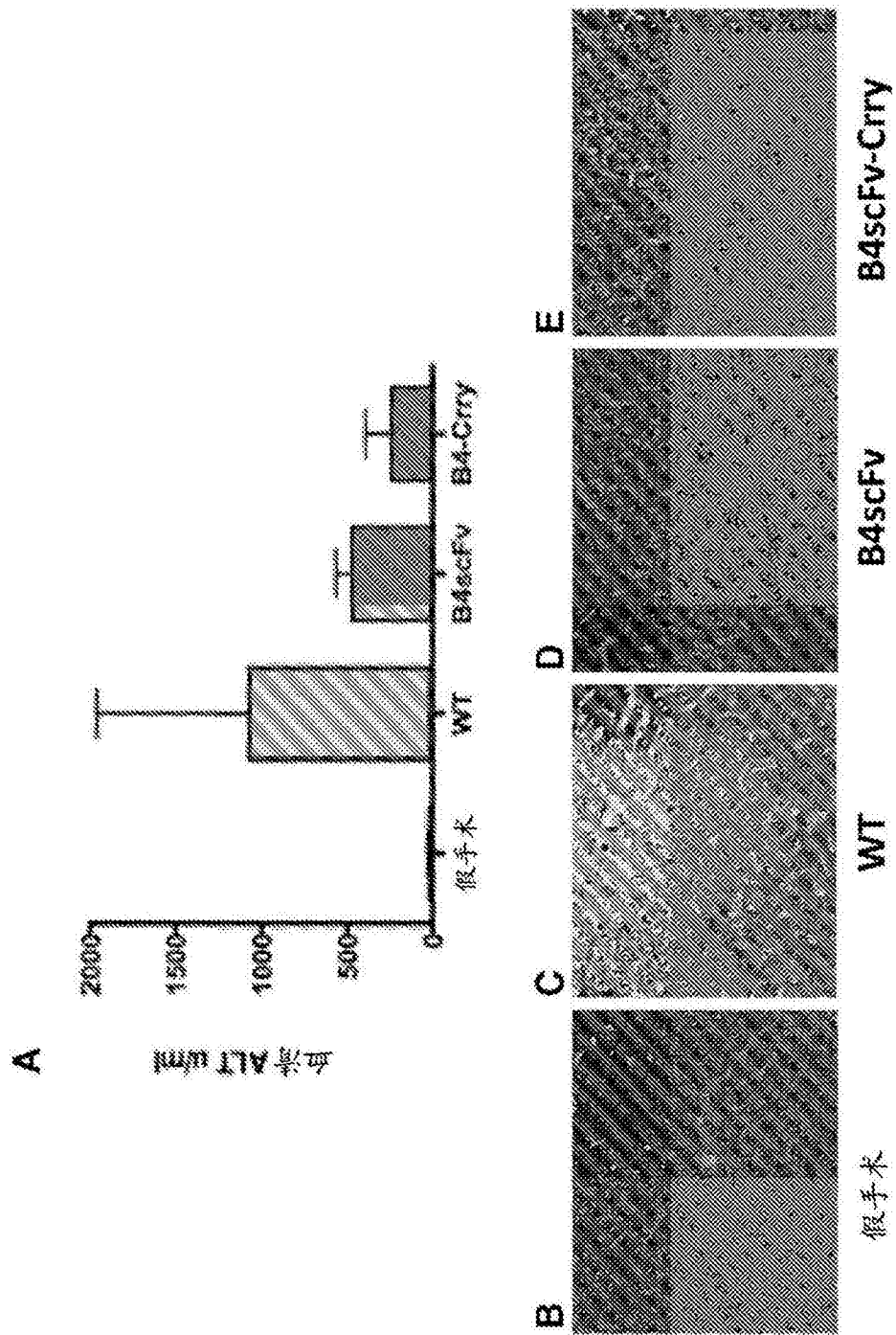


图16

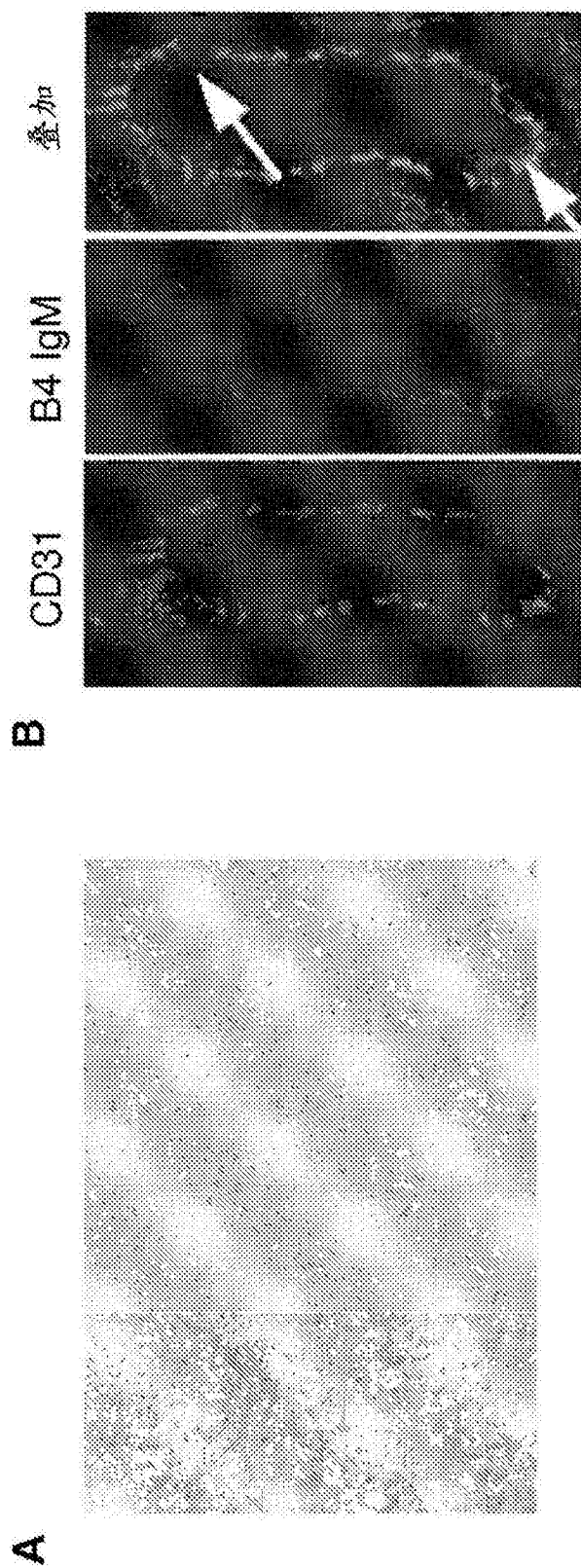


图17

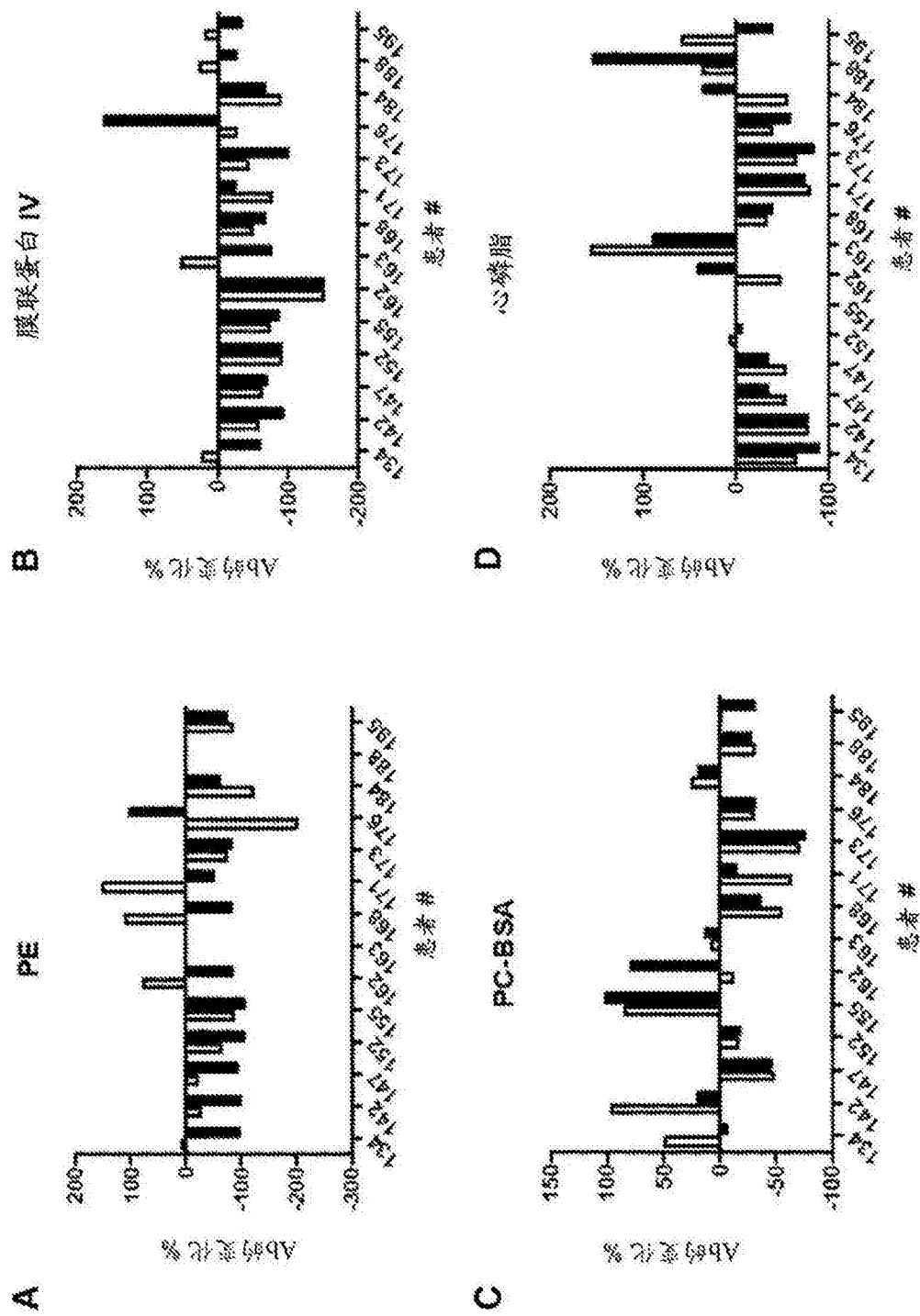


图19

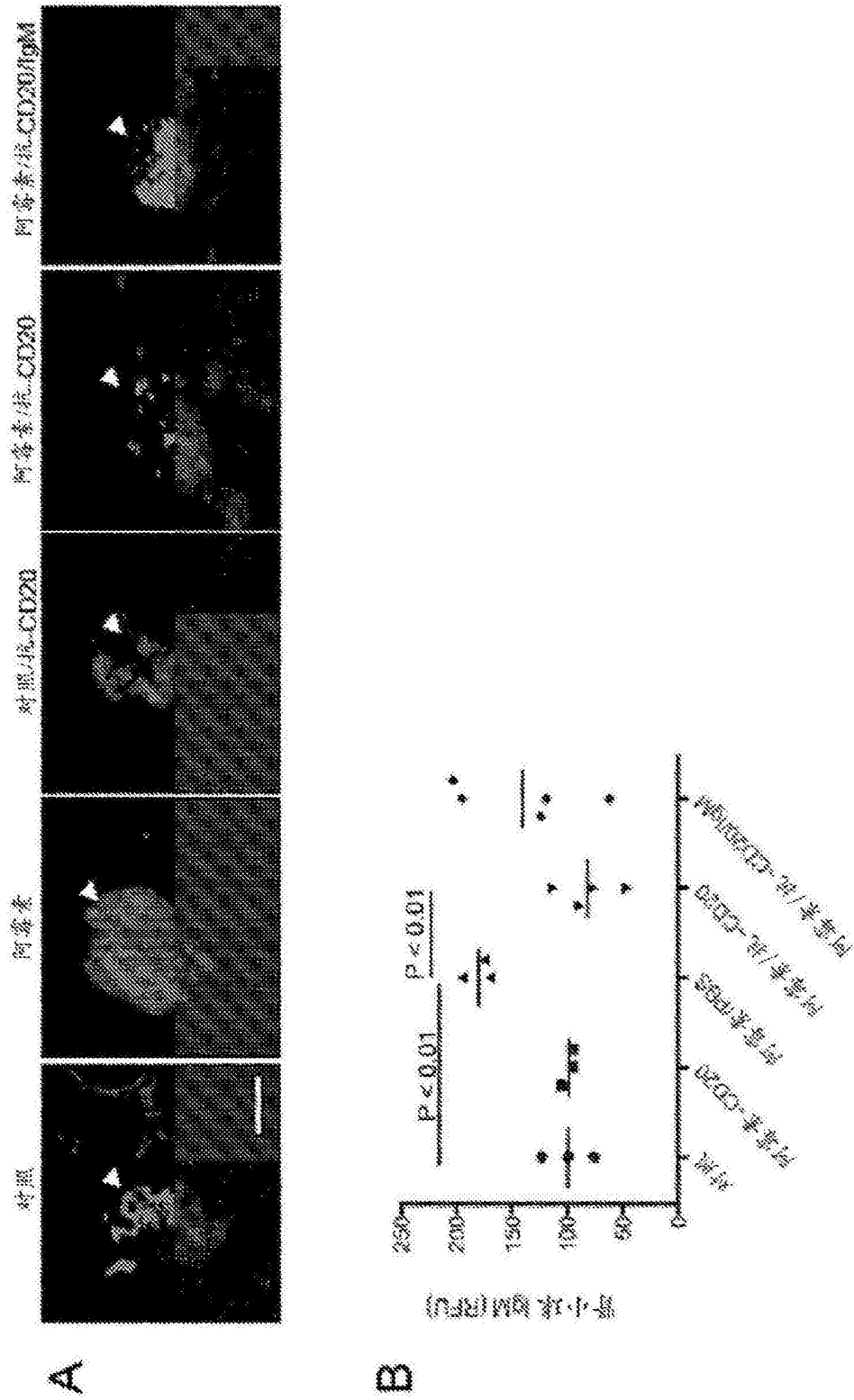


图20

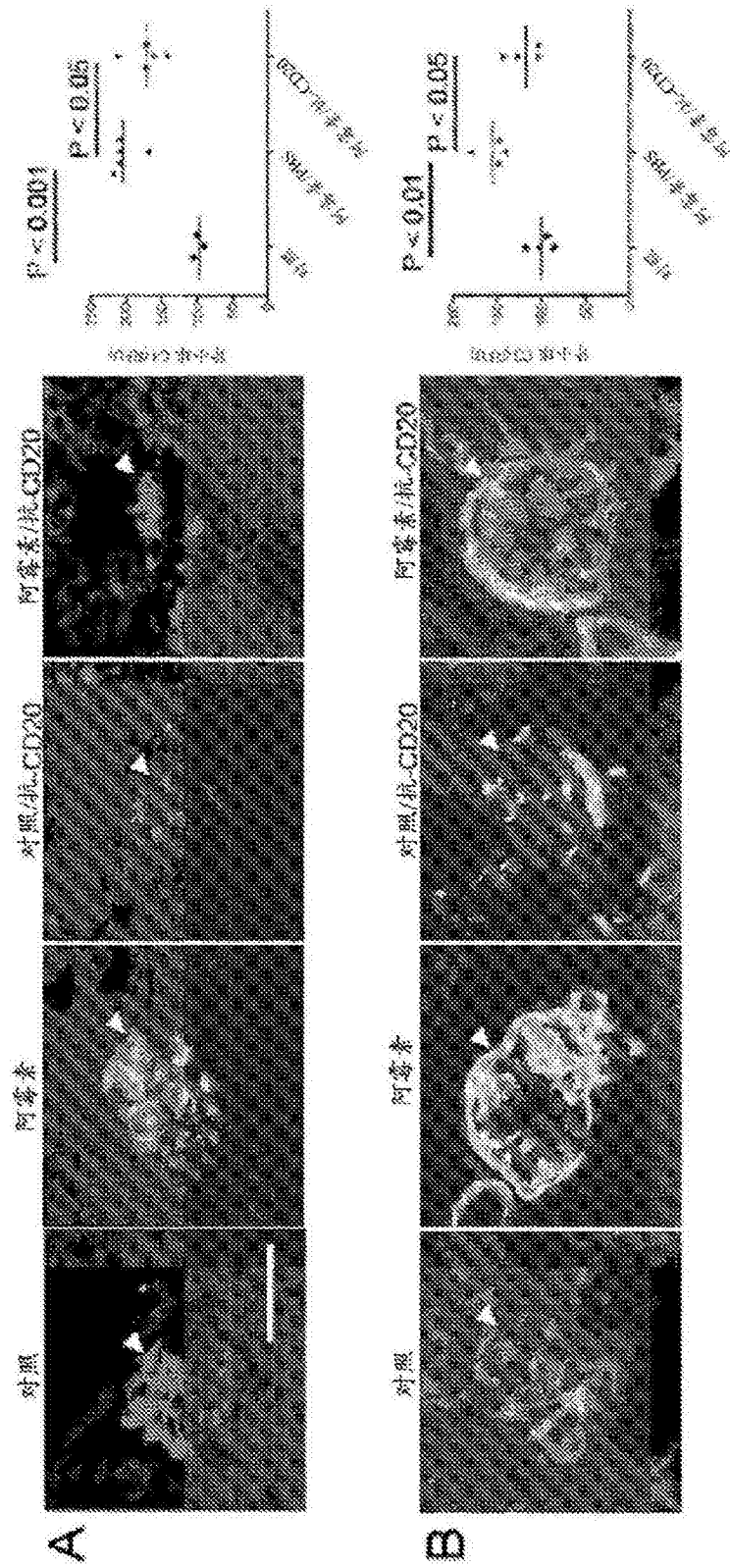
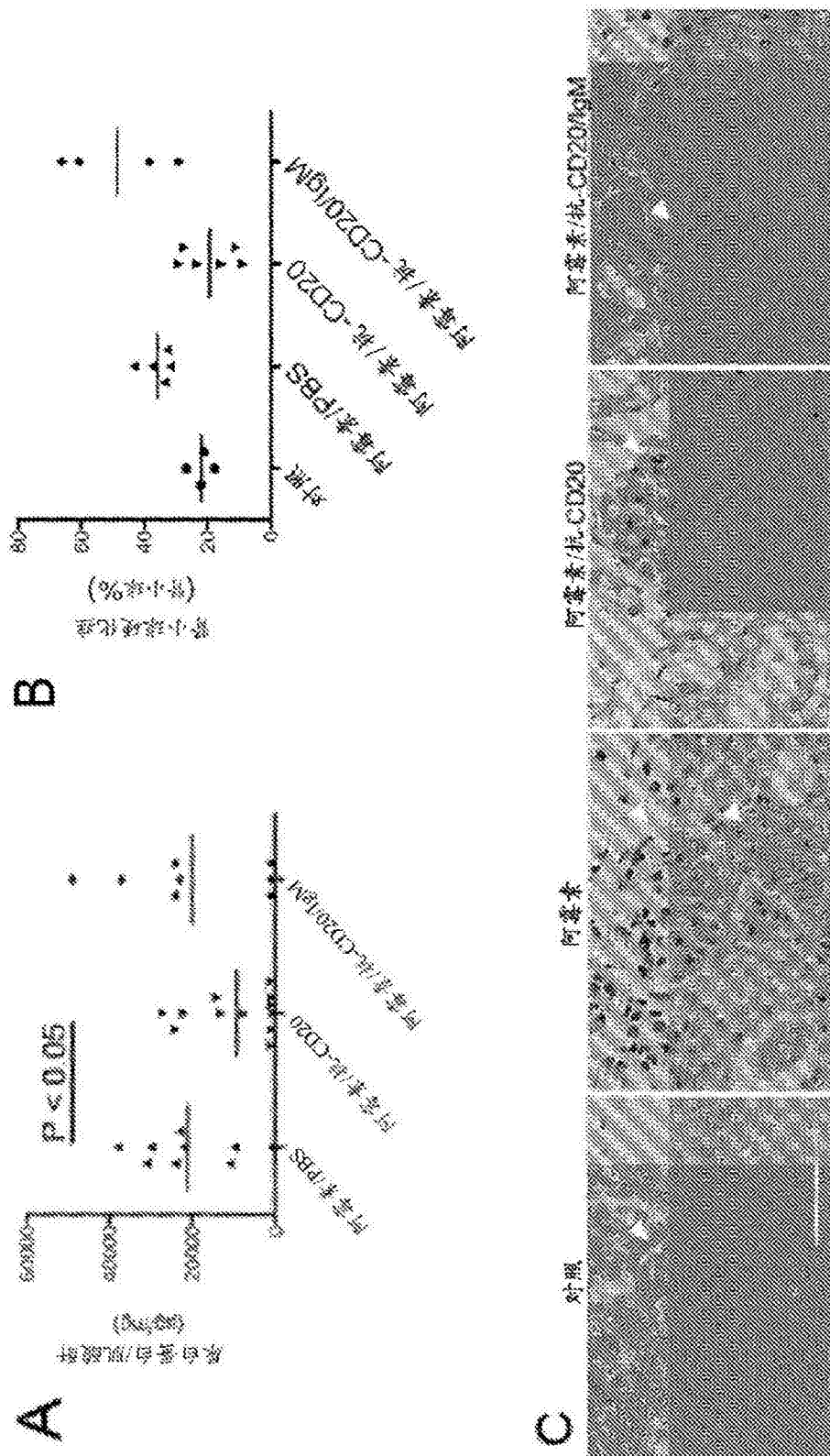


图21



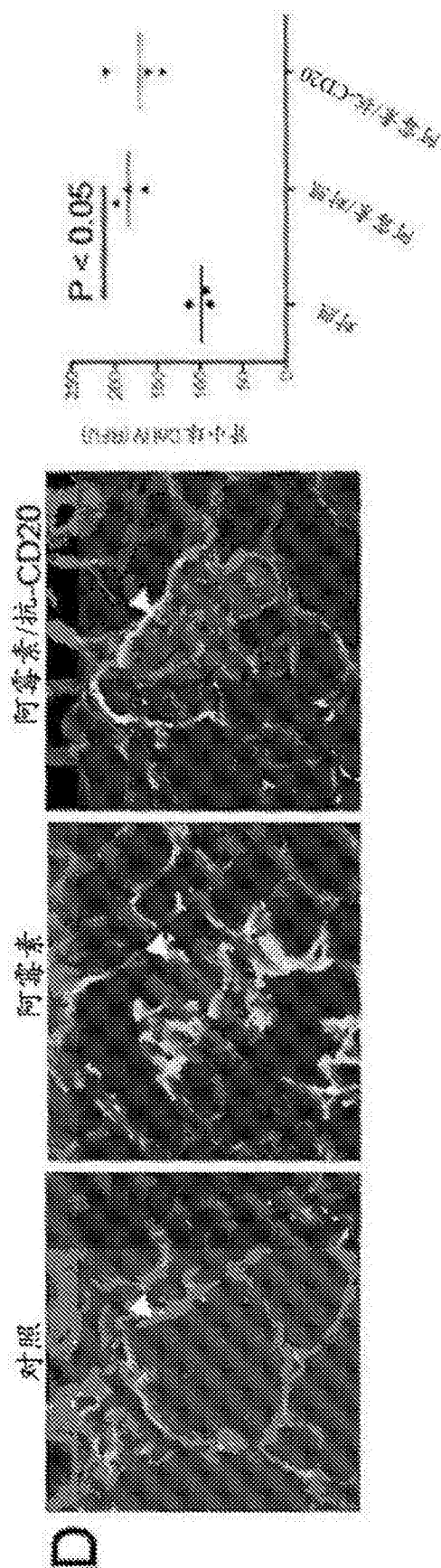


图22

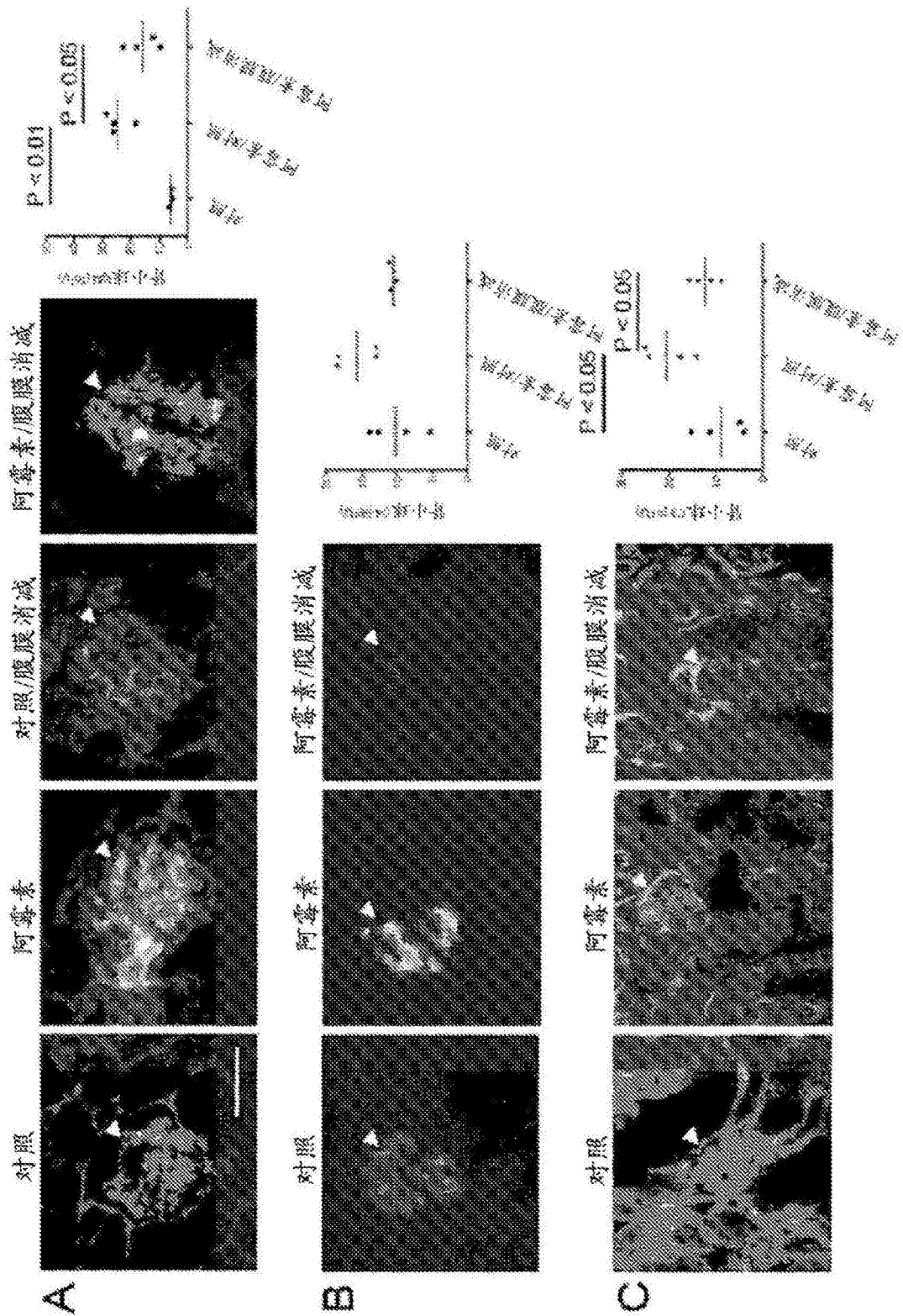
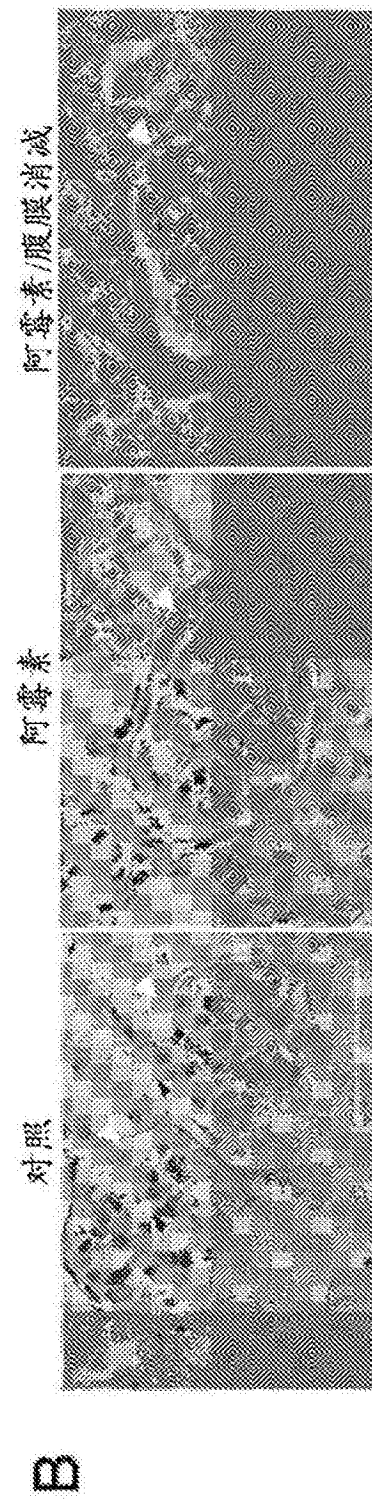
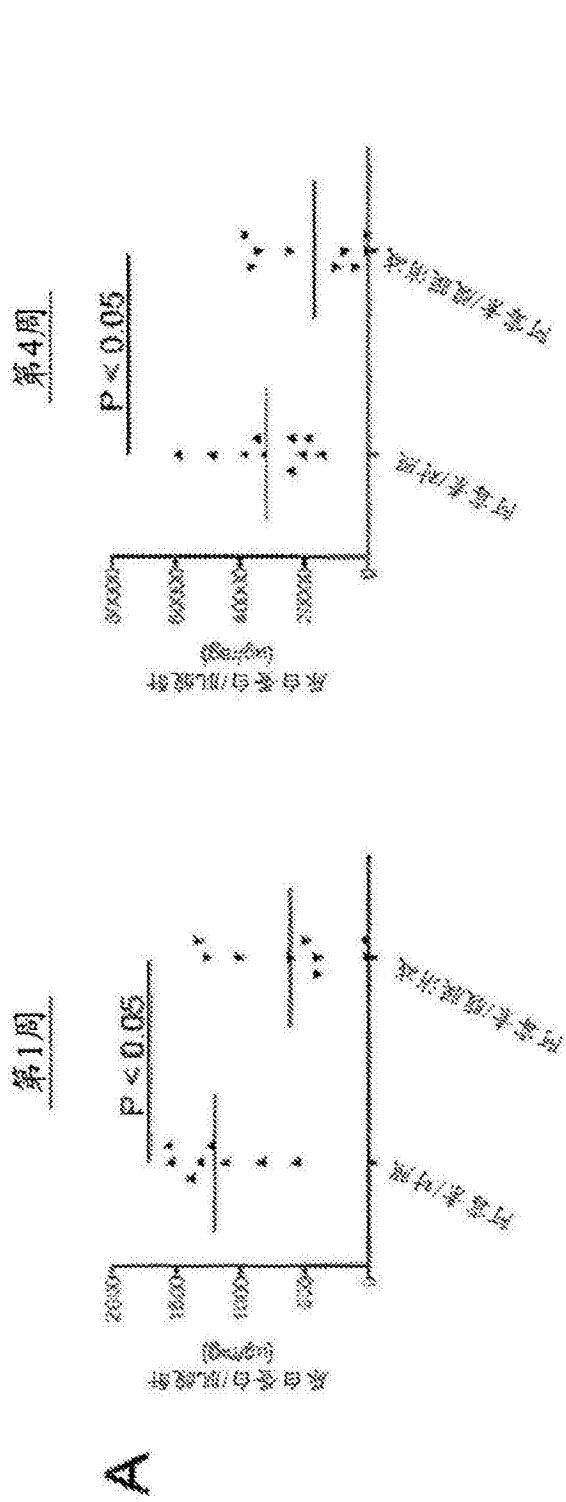


图23



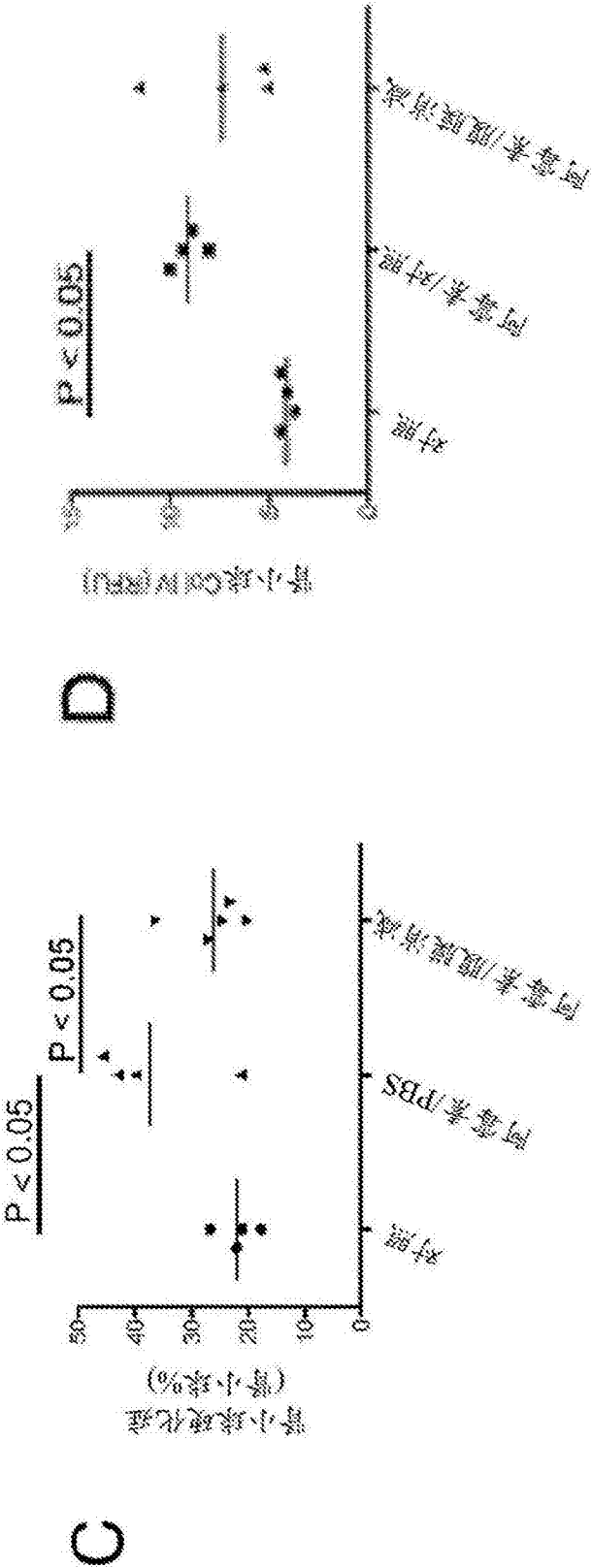


图24

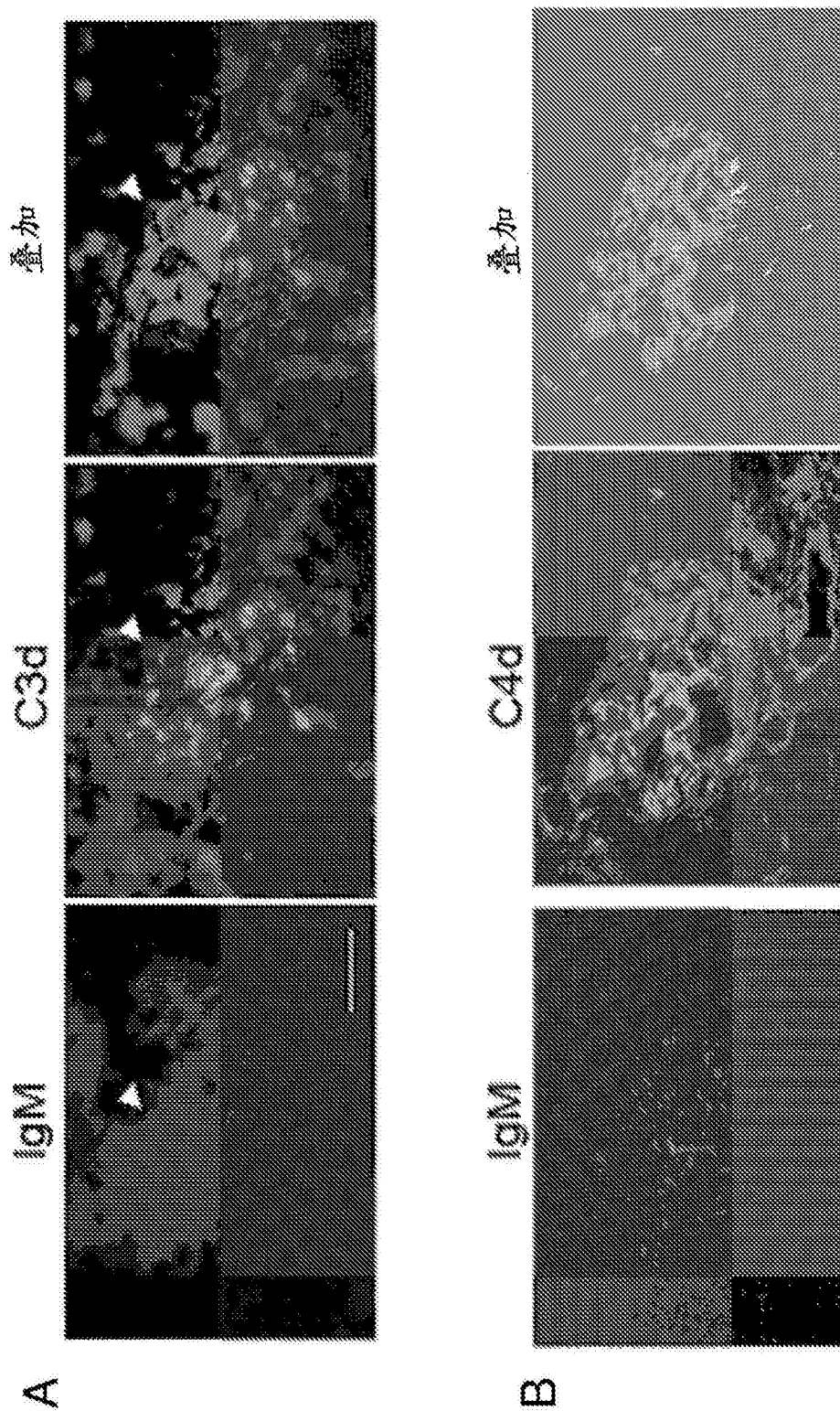


图25

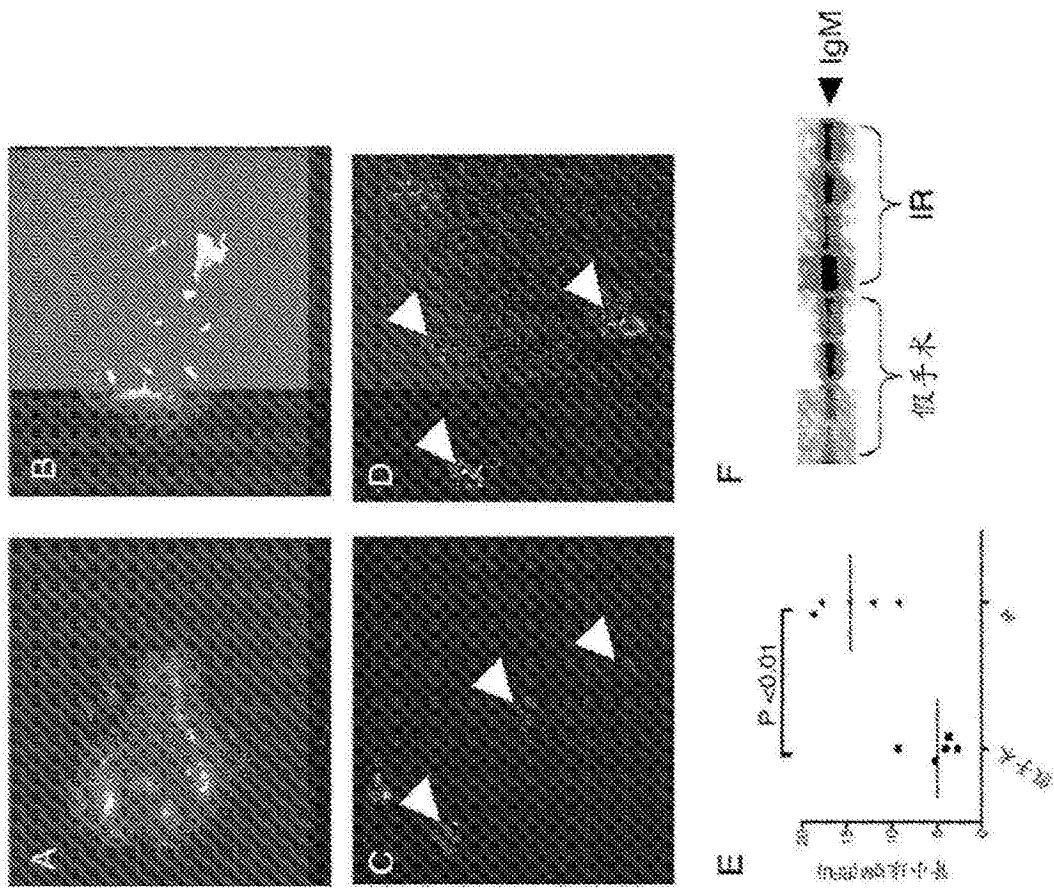


图26

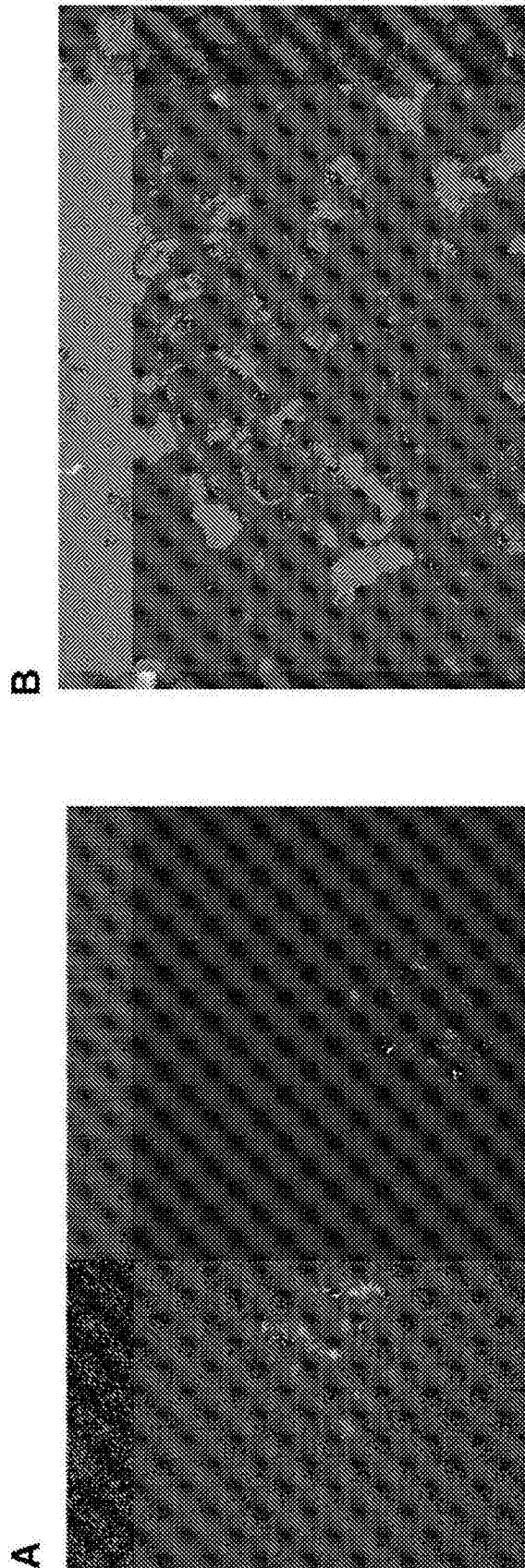


图27

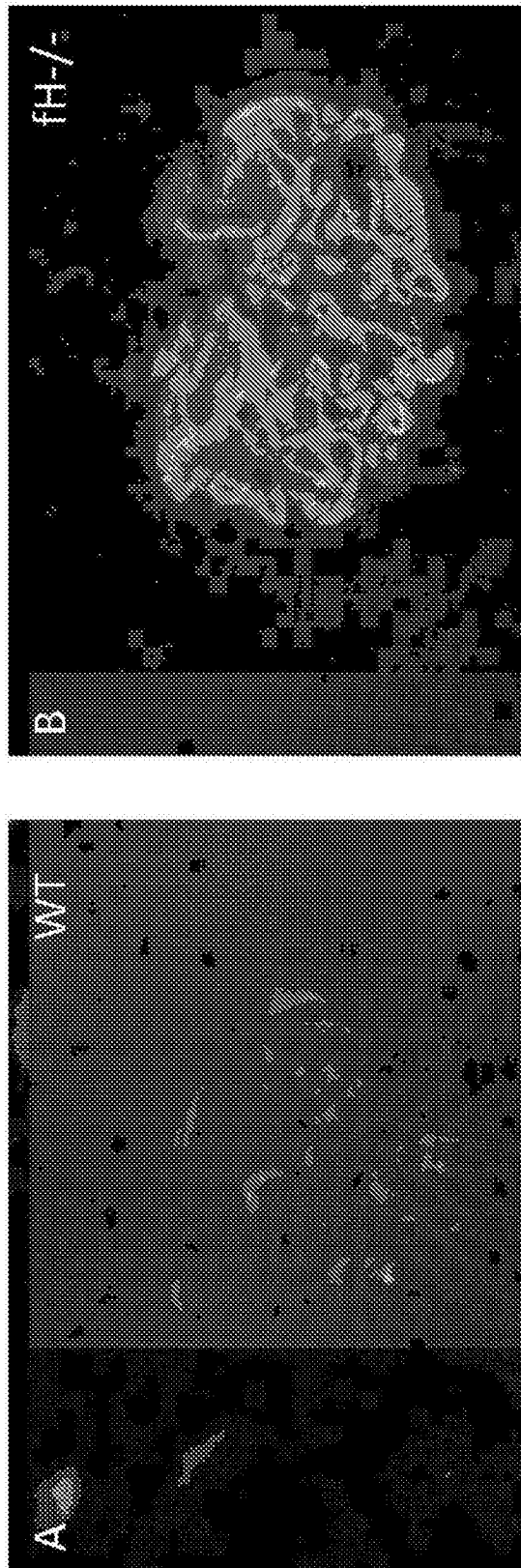


图28

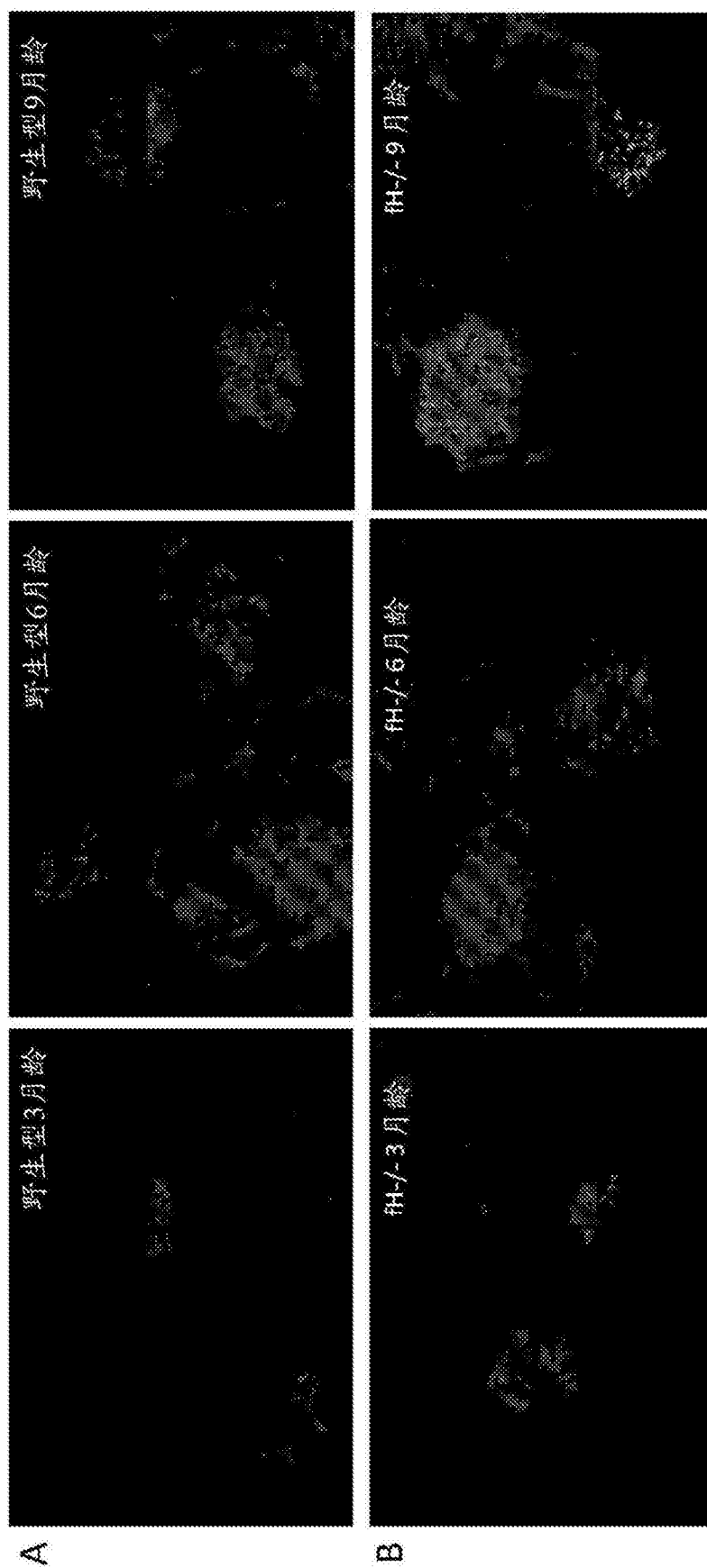


图29

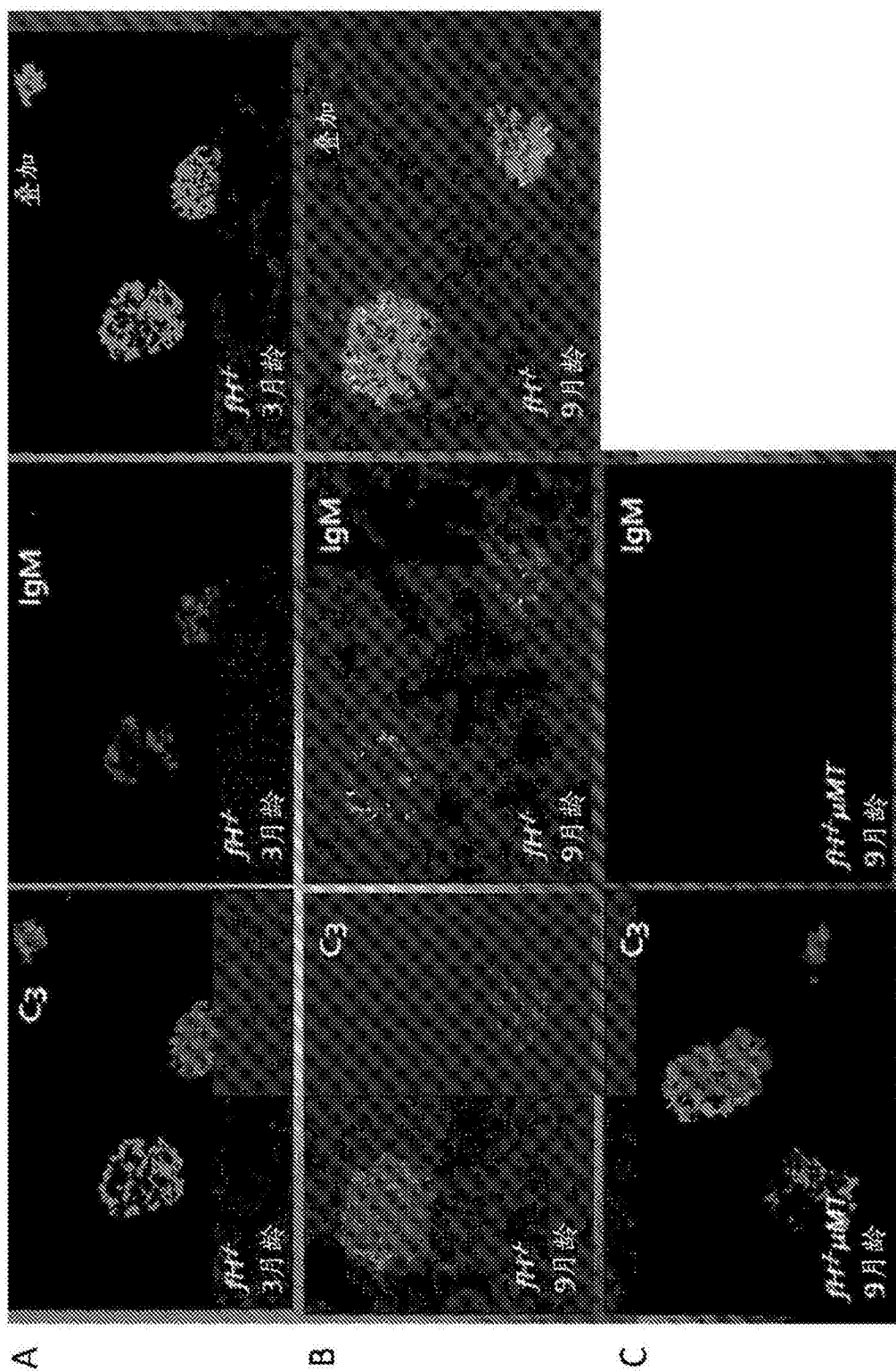


图30

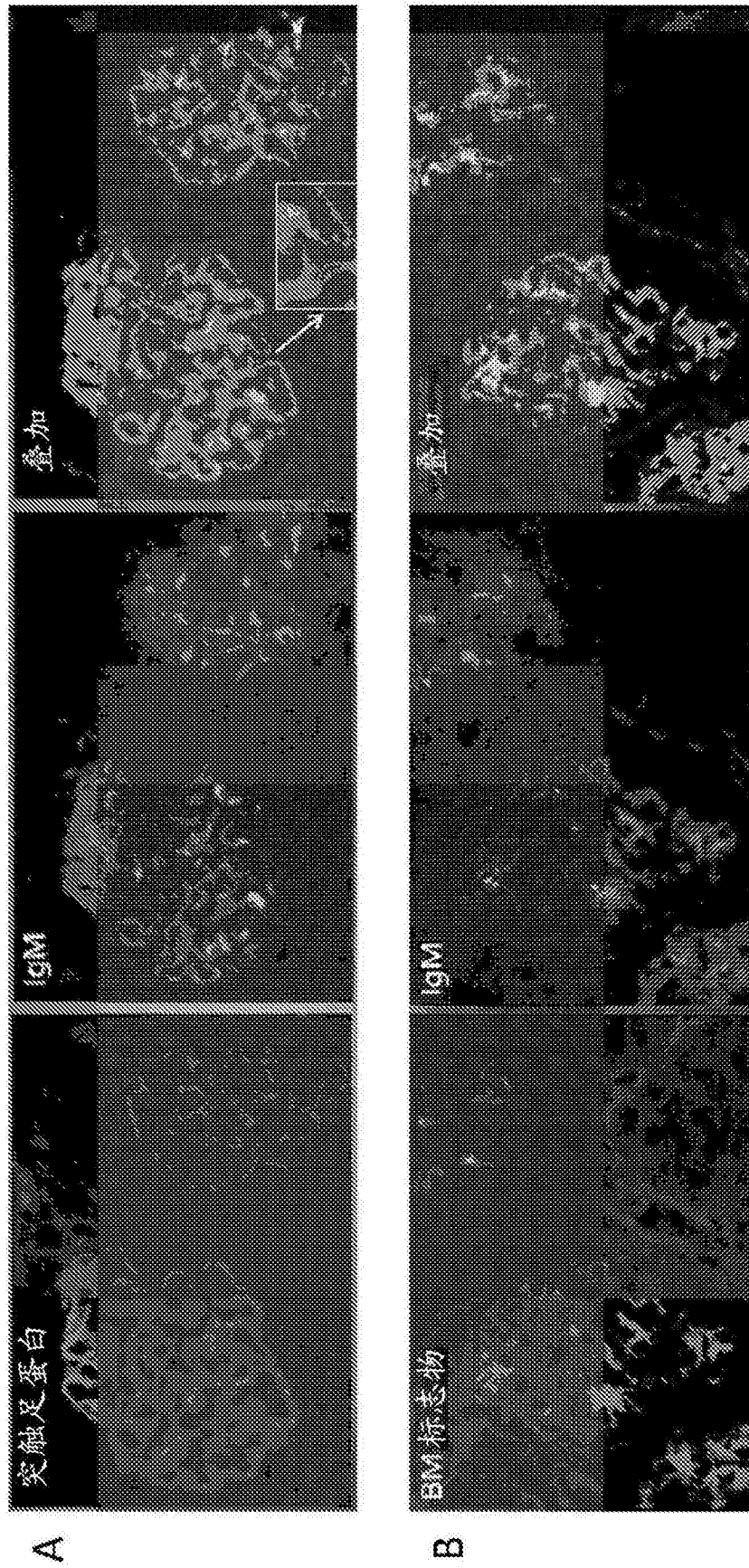


图31

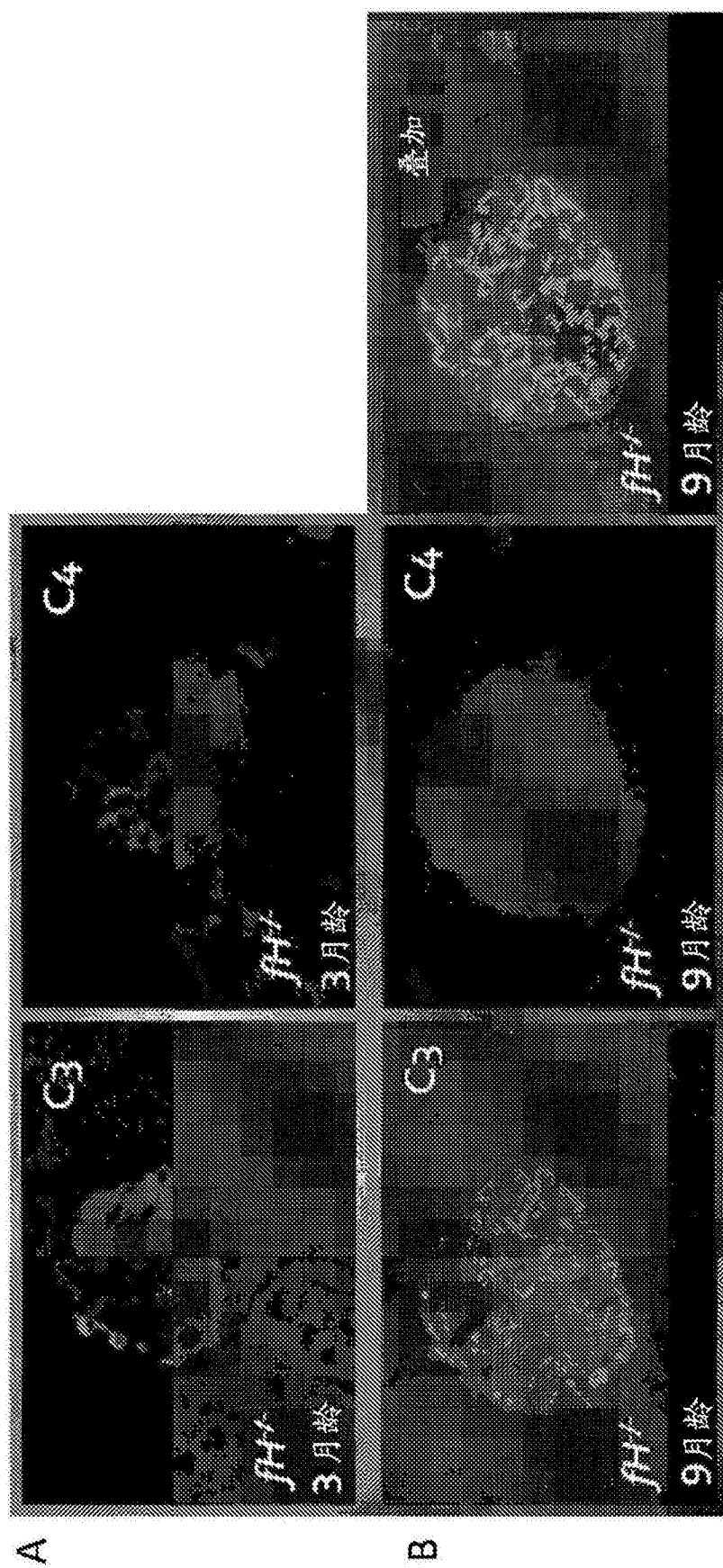


图32

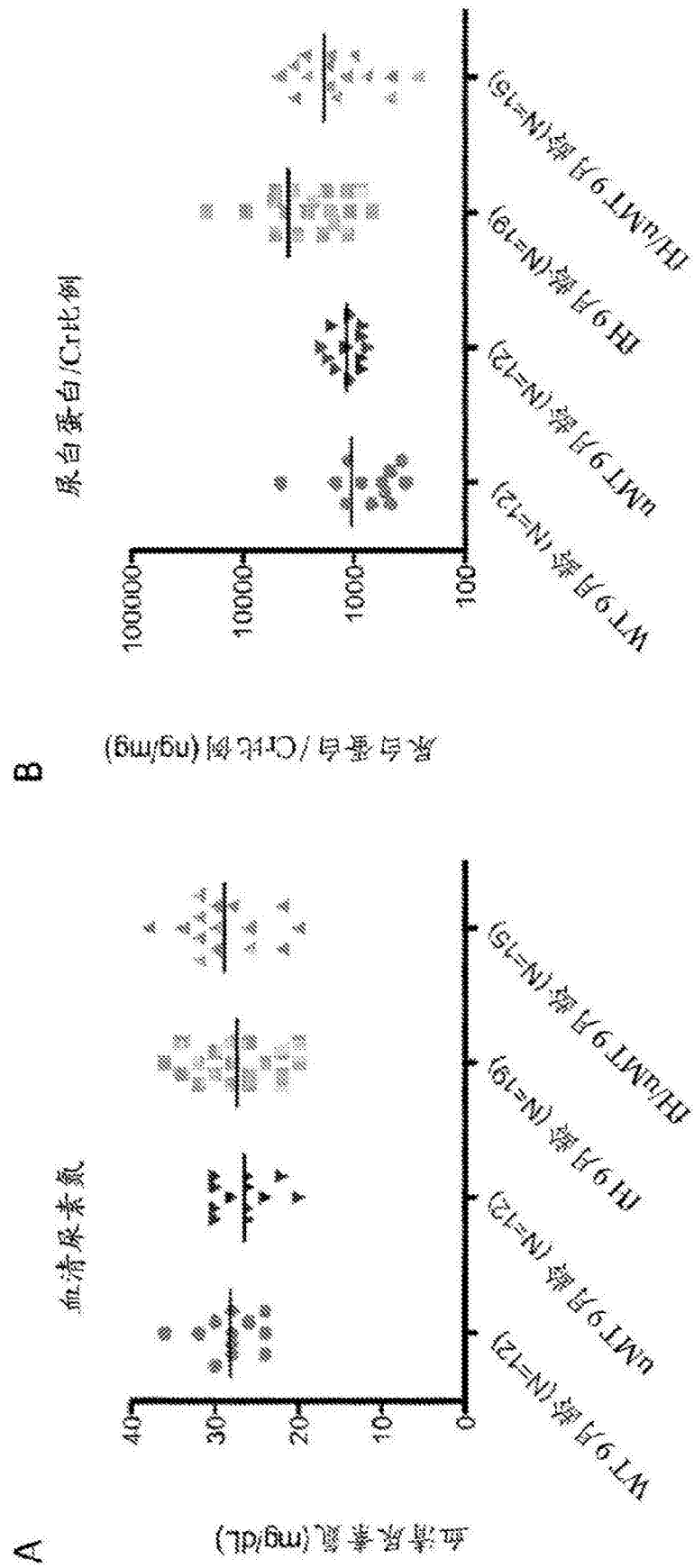
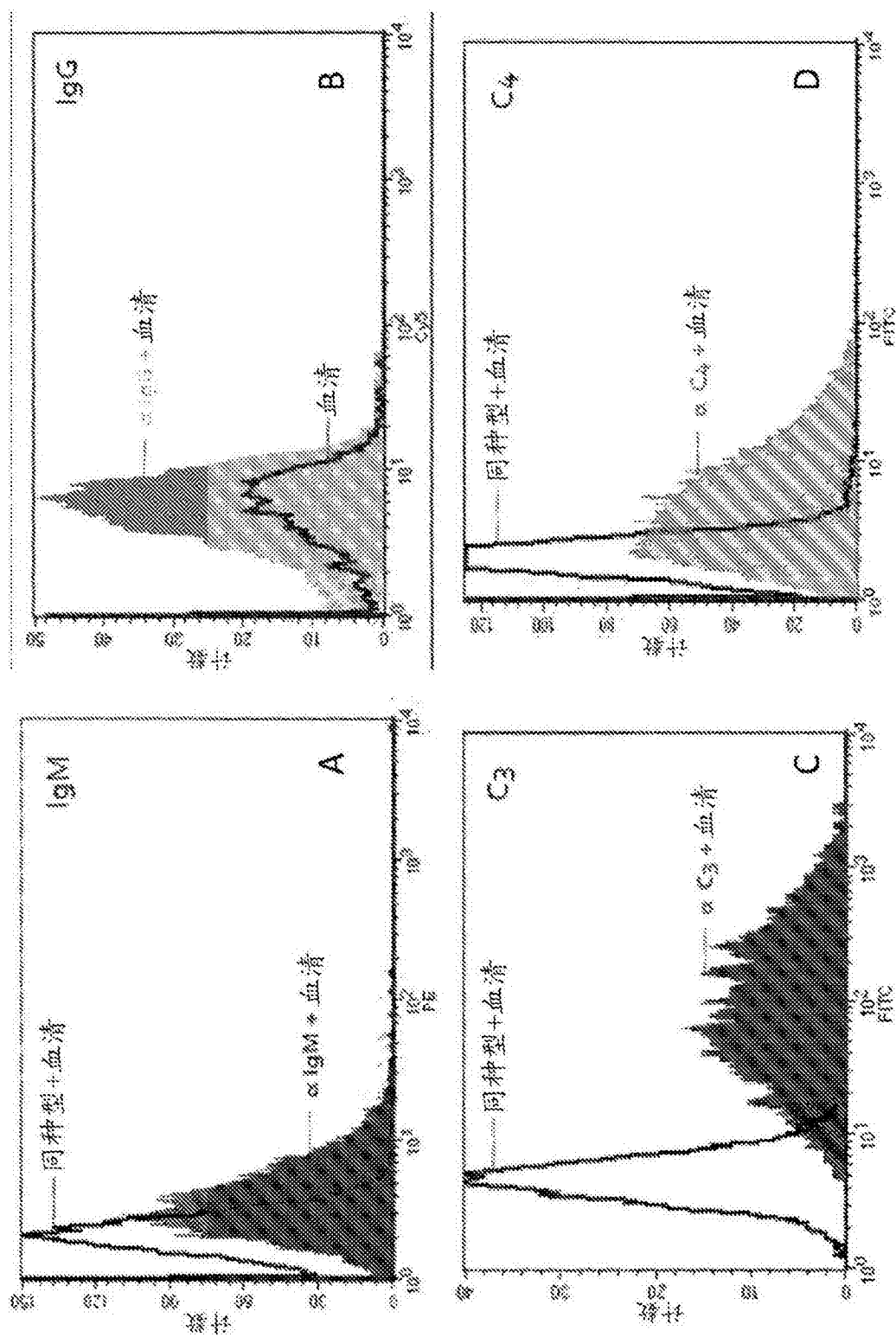


图33



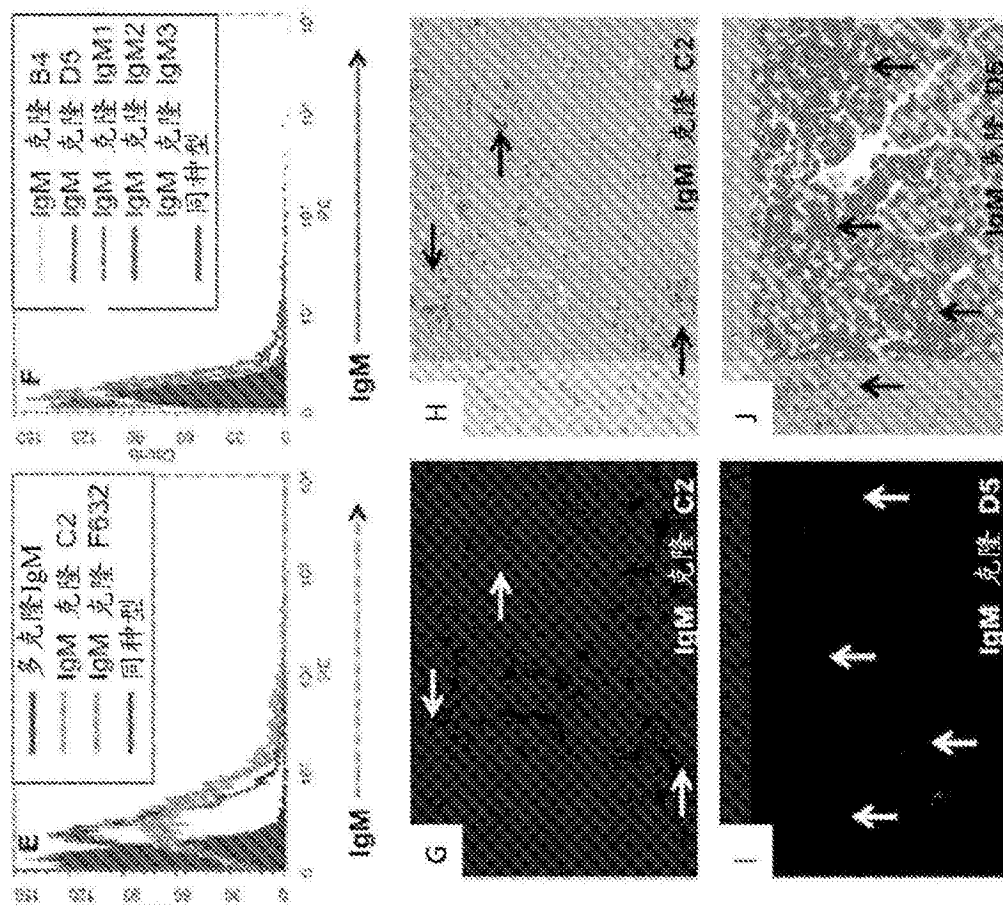


图34

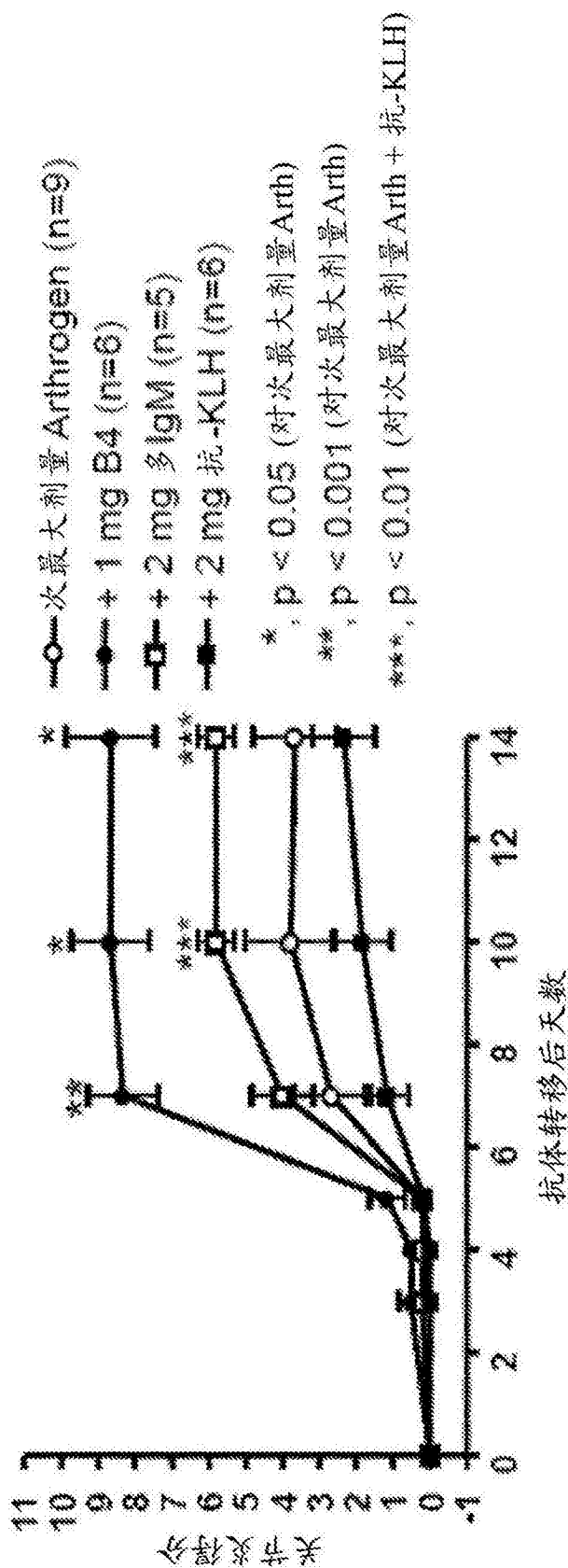


图35

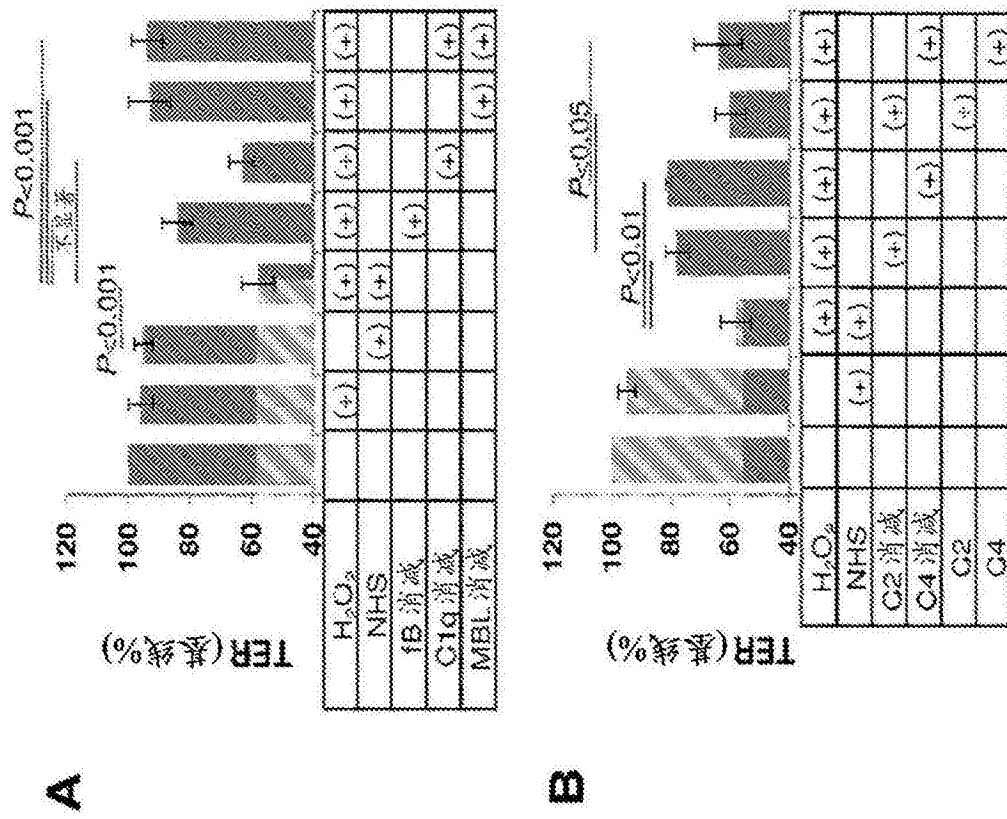


图36

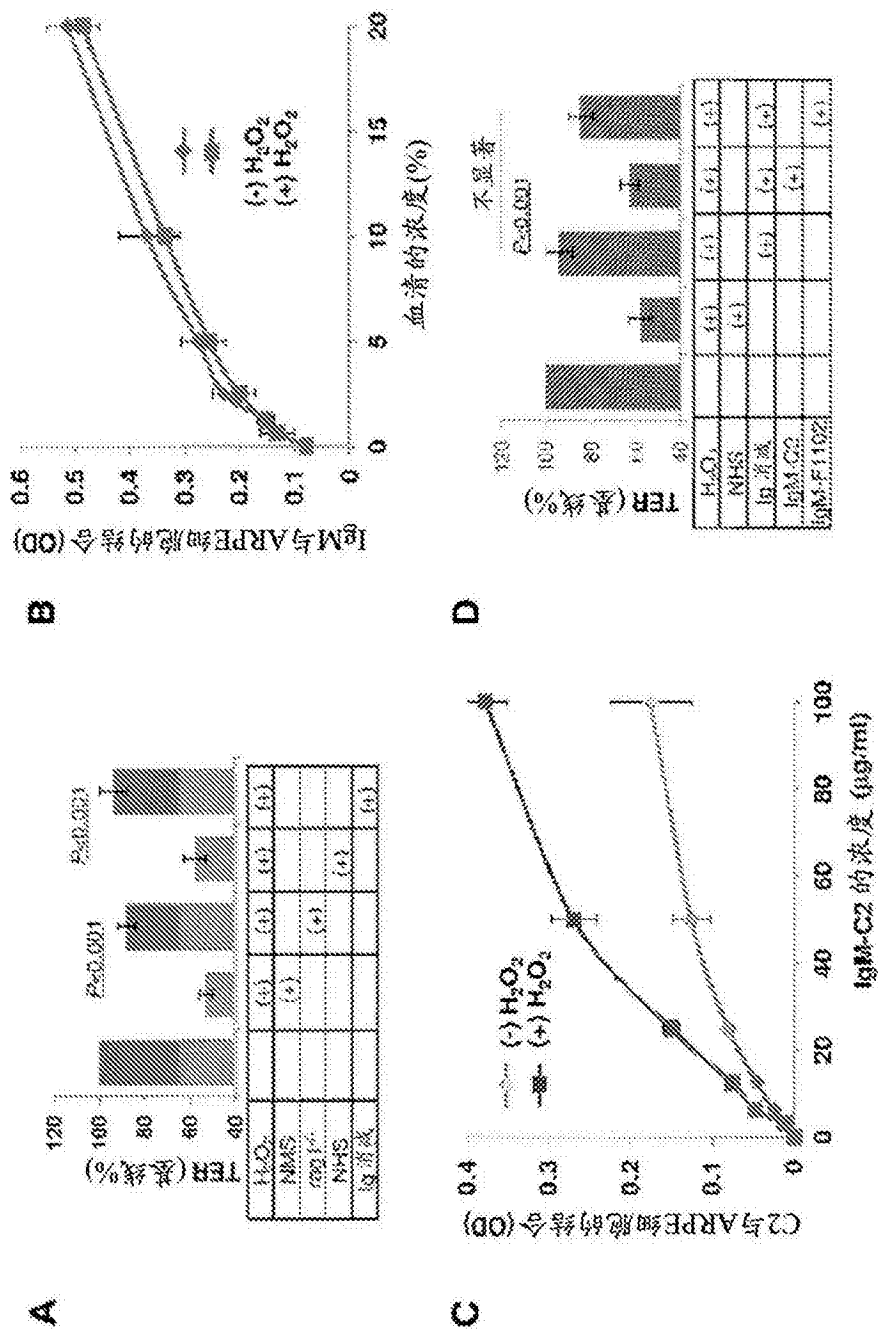


图38

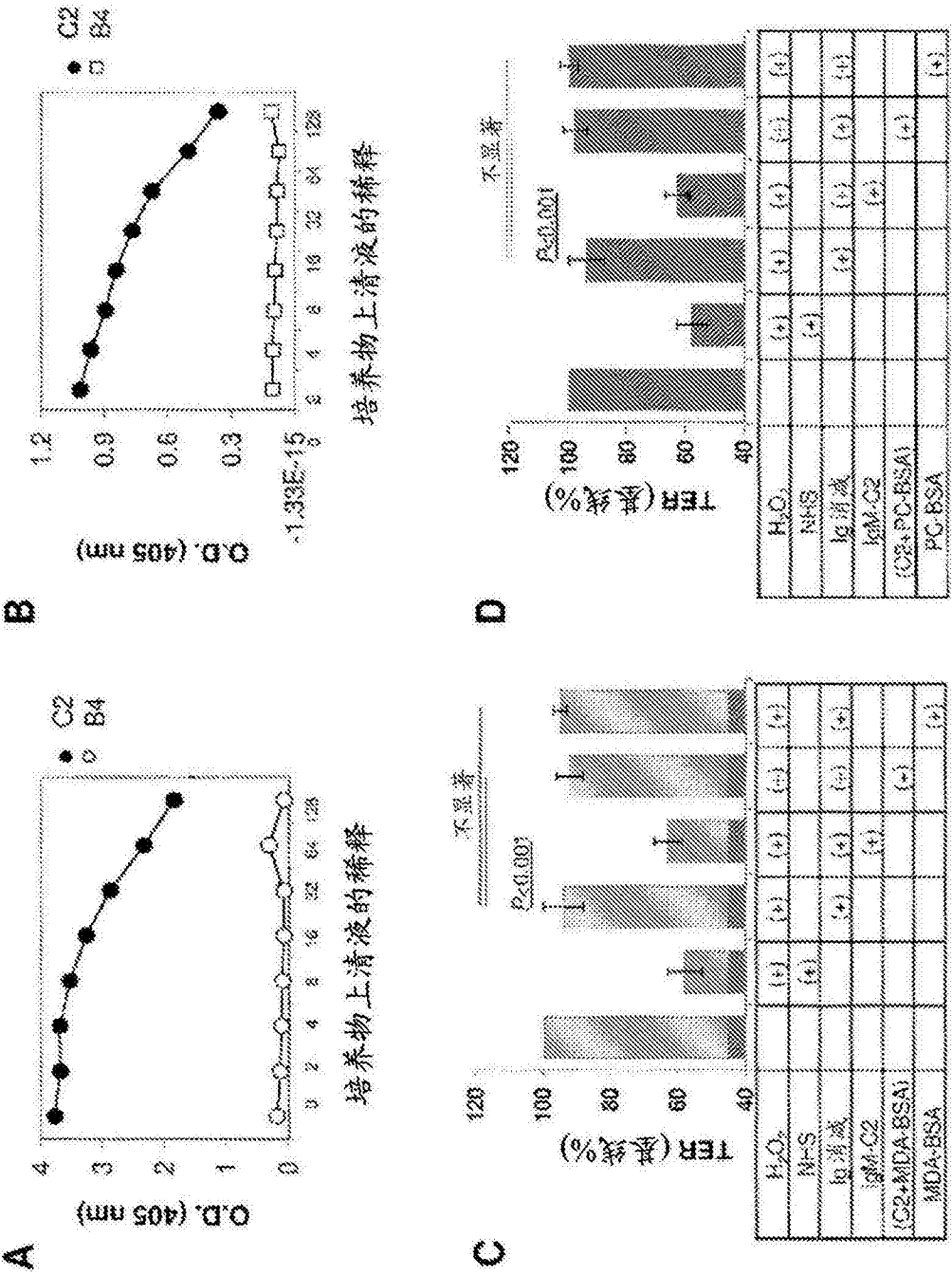


图39

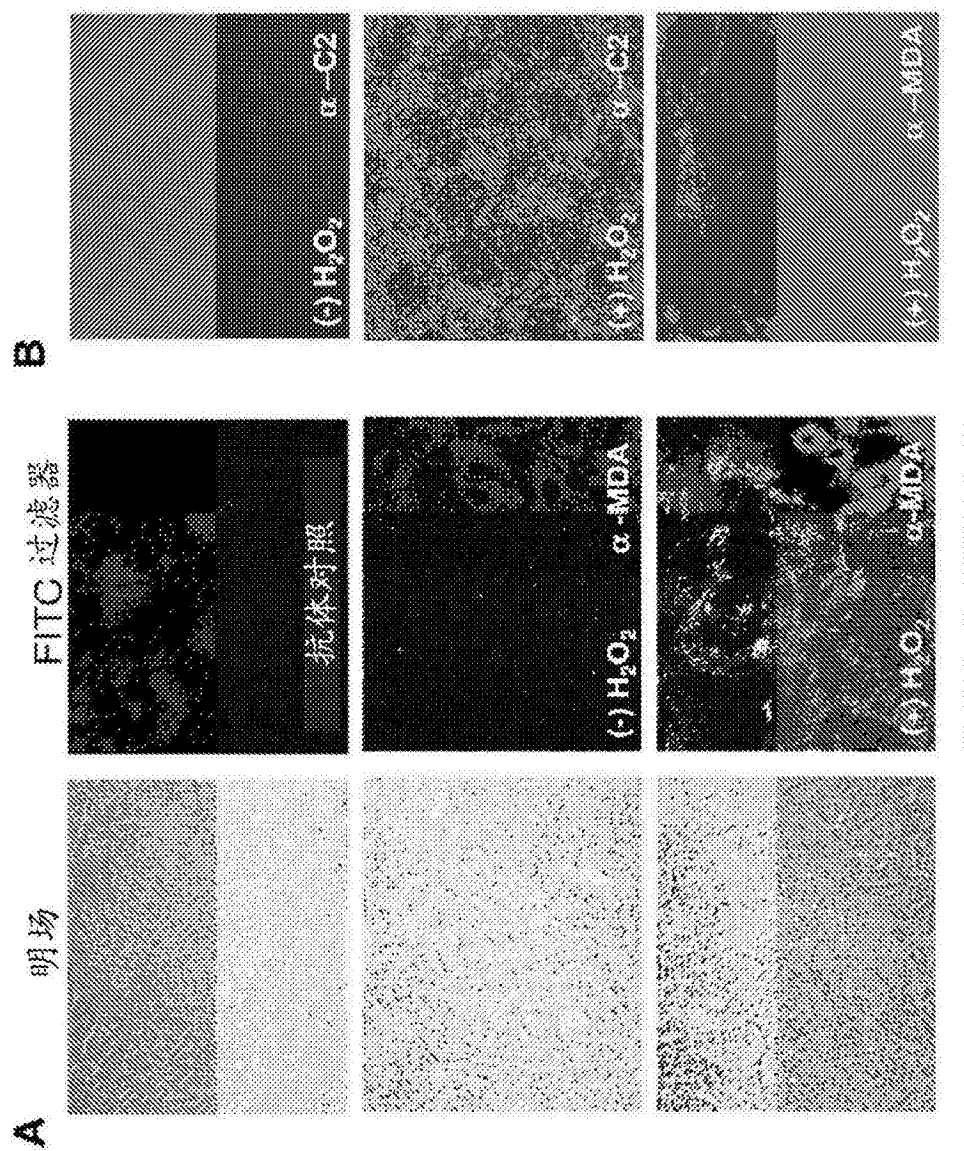


图40

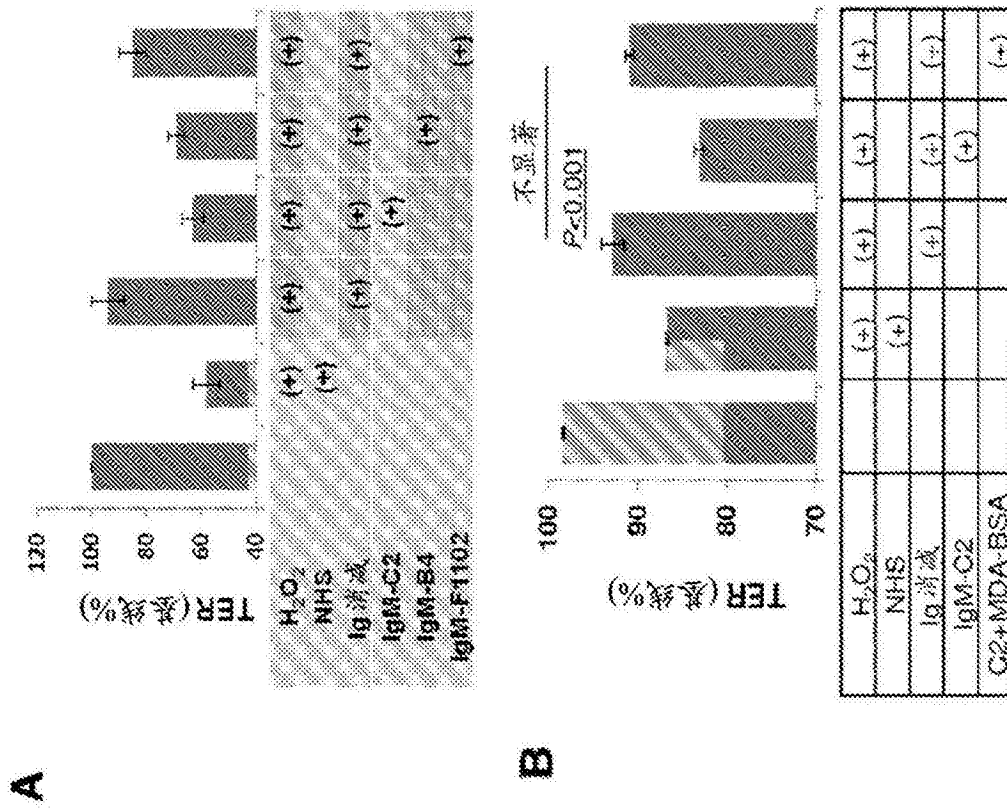


图41

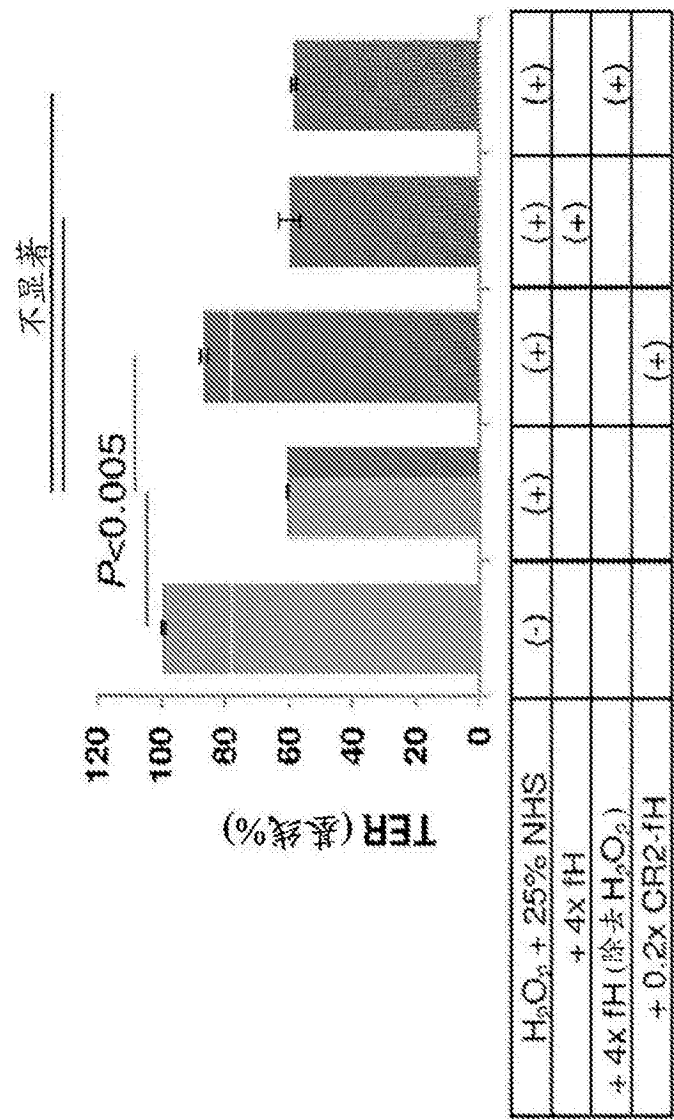


图42

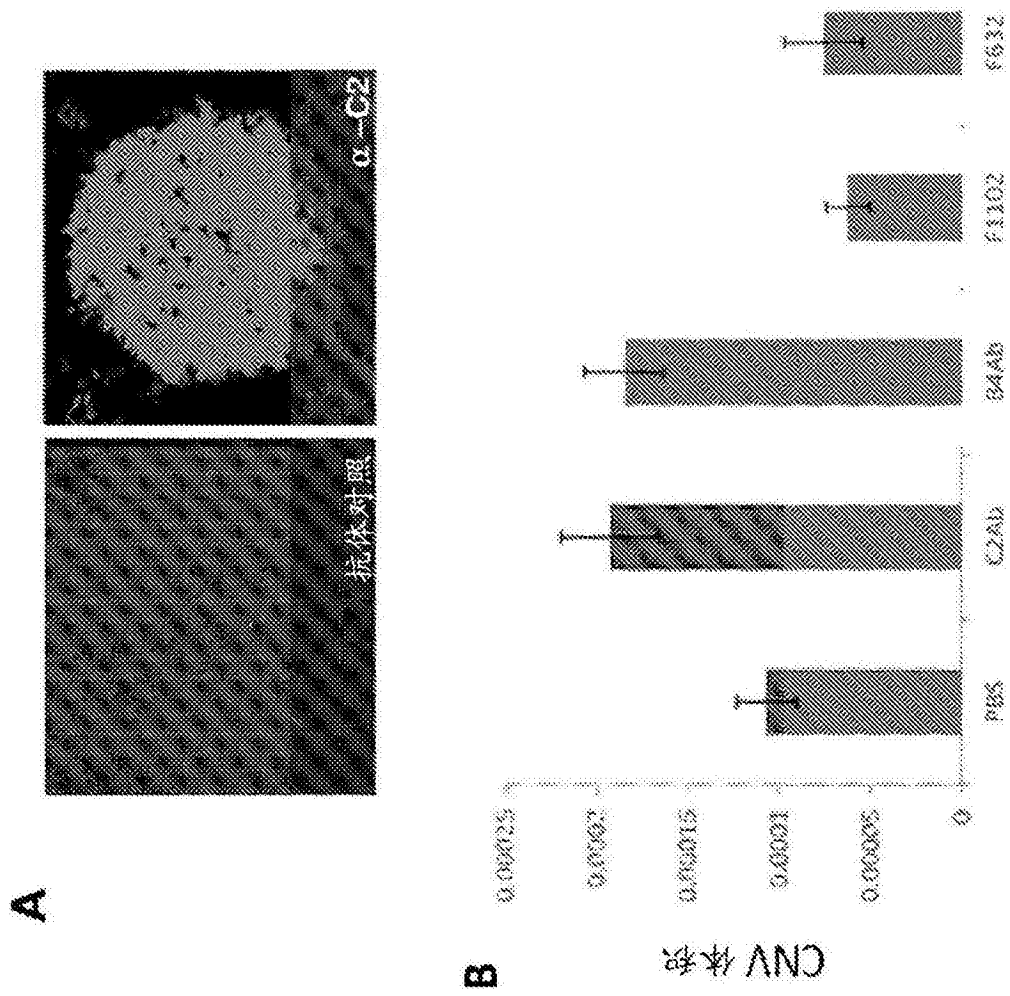


图43