



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108373506 A

(43)申请公布日 2018.08.07

(21)申请号 201810028448.2

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

(22)申请日 2012.10.12

公司 11021

(30)优先权数据

代理人 张国梁 程金山

61/547,649 2011.10.14 US

(51)Int.Cl.

(62)分案原申请数据

C07K 16/40(2006.01)

201280050549.0 2012.10.12

C12N 15/13(2006.01)

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

C12N 5/10(2006.01)

地址 瑞士巴塞尔

A61K 39/395(2006.01)

(72)发明人 吴岩 门诺·凡卢克伦-康帕涅

A61K 47/68(2017.01)

丹尼尔·柯克霍弗

A61P 27/02(2006.01)

迈克尔·特里·利帕里

A61P 9/10(2006.01)

小肯尼思·J·卡奇克

保罗·M·莫兰

斯科特·斯塔维奇 梁伟庆

权利要求书6页 说明书52页

序列表30页 附图25页

(54)发明名称

抗HtrA1抗体及使用方法

(57)摘要

本发明涉及抗HtrA1抗体及使用方法。本发明提供抗HtrA1抗体及使用所述抗HtrA1抗体用于诊断和治疗目的的方法。特别地，本发明提供分离的抗体，所述分离的抗体结合HtrA1，其中所述抗体(i)结合包含HtrA1的N224、K248或二者的表位，其解离常数 $\leq 500\text{nM}$ ，和(ii)抑制HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。本发明的抗体能够用于治疗个体的老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病。

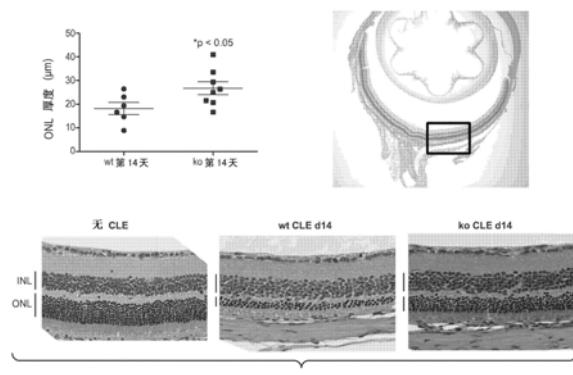


图 14

1. 分离的抗体,所述分离的抗体与包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列的抗体竞争结合HtrA1。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其中竞争结合使用ELISA测定来确定。
3. 分离的抗体,所述分离的抗体结合HtrA1,其中所述抗体(i)结合包含HtrA1的N224、K248或二者的表位,并且(ii)以IC₅₀≤30nM抑制HtrA1。
4. 根据权利要求3所述的抗体,其中所述抗体还包括以下性质中的一种或多种:(i)以1个可变结构域对HtrA1三聚体的一个亚基的比例结合HtrA1,或者(ii)不防止HtrA1的三聚体形成。
5. 根据权利要求3所述的抗体,其中所述IC₅₀使用丝氨酸蛋白酶测定利用具有SEQ ID NO:12的底物来确定。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体,其中所述抗体不与HtrA2、HtrA3和HtrA4中的一种或多种交叉反应。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有≤500nM的解离常数。
8. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述解离常数通过BIAcore使用Fab在25℃确定。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体,所述抗体是单克隆抗体。
10. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体,所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
11. 根据权利要求1-8中任一项所述的抗体,所述抗体是结合HtrA1的抗体片段。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHYFDY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:27);(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列QQX_gX_hX_iX_jPX_kT,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S(SEQ ID NO:24);和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_oYADSVKG,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:26)。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
14. 根据权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
15. 根据权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
16. 根据权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含氨基酸序列GFX₁IX_mX_nYYIH,其中X₁是N、S或T;X_m是S、D、Y或A;并且X_n是G或D(SEQ ID NO:25);(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_oYADSVKG,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:26);和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHYFDY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:27)。
17. 根据权利要求1-12或16中任一项所述的抗体,还包含(a)HVR-L1,所述HVR-L1包含氨基酸序列RASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fA,其中X_a是D、S或V;X_b是V或I;X_c是S、N或G;X_d是T或N;X_e是A或Y;

并且X_f是V或L (SEQ ID NO:23) ; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含氨基酸序列QQX_gX_hX_iX_jPX_kT, 其中X_g是S、V或D; X_h是Y、D或S; X_i是T、S、A、D或N; X_j是T、H、N、S、A、L或R; 并且X_k是P、T、A或S (SEQ ID NO:24) 。

18. 根据权利要求1-12、16或17中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; 和 (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

19. 根据权利要求18所述的抗体, 还包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1-12、16或17中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; 和 (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

21. 根据权利要求20所述的抗体, 还包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

22. 根据权利要求20所述的抗体, 还包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

23. 根据权利要求1-12、16或17中任一项所述的抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

24. 根据权利要求1-12、16或17中任一项所述的抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

25. 根据权利要求1-2、16或17中任一项所述的抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的抗体, 所述抗体还包含SEQ ID NO:17的重链可变结构域构架(FR2)序列。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的抗体, 所述抗体包含 (a) VH序列, 所述VH序列与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性; (b) VL序列, 所述VL序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性; 或 (c) 在(a)中的VH序列和在(b)中的VL序列。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的抗体, 所述抗体包含 (a) 包含SEQ ID NO:32的VH序列; (b) 包含SEQ ID NO:31的VL序列; 或 (c) 包含SEQ ID NO:32的VH序列和包含SEQ ID NO:31的VL序列。

29. 根据权利要求27或28所述的抗体, 所述抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列。

30. 根据权利要求27或28所述的抗体, 所述抗体包含SEQ ID NO:7的VL序列。

31. 根据权利要求27或28所述的抗体, 所述抗体包含SEQ ID NO:30的VH序列。

32. 根据权利要求27或28所述的抗体, 所述抗体包含SEQ ID NO:28的VL序列。

33. 根据权利要求27或28所述的抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:29的VL序列。

34. 抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列。

35. 抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:30的VH序列和SEQ ID NO:28的VL序列。

36. 抗体,所述抗体包含SEQ ID NO:30的VH序列和SEQ ID NO:29的VL序列。

37. 结合HtrA1的抗体,所述抗体包含(a) VH序列,所述VH序列与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性;(b) VL序列,所述VL序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性;或(c) 在(a)中的VH序列和在(b)中的VL序列。

38. 结合HtrA1的抗体,所述抗体包含(a) 包含SEQ ID NO:32的VH序列;(b) 包含SEQ ID NO:31的VL序列;或(c) 包含SEQ ID NO:32的VH序列和包含SEQ ID NO:31的VL序列。

39. 抗体,所述抗体包含(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含氨基酸序列GFX₁IX_mX_nYYIH,其中X₁是N、S或T;X_m是S、D、Y或A;并且X_n是G或D(SEQ ID NO:25);(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_oYADSVKG,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:26);(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHYFDY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:27);(d) HVR-L1,所述HVR-L1包含氨基酸序列RASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fA,其中X_a是D、S或V;X_b是V或I;X_c是S、N或G;X_d是T或N;X_e是A或Y;并且X_f是V或L(SEQ ID NO:23);(e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f) HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列QQX_gX_hX_iX_jPX_kT,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S(SEQ ID NO:24)。

40. 根据权利要求39所述的抗体,其中所述抗体包含(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、和47-51的氨基酸序列;(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5和52的氨基酸序列;(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6和53的氨基酸序列;(d) HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21和33的氨基酸序列;(e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f) HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、和34-46的氨基酸序列。

41. 根据权利要求40所述的抗体,其中所述抗体包含(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

42. 根据权利要求40所述的抗体,其中所述抗体包含(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;(e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

43. 根据权利要求40所述的抗体,其中所述抗体包含(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

44. 根据权利要求1-43中任一项所述的抗体,所述抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

45. 分离的核酸,所述分离的核酸编码权利要求1-44中任一项所述的抗体。

46. 宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求45所述的核酸。

47. 制备抗体的方法,所述方法包括在适于表达编码抗HtrA1抗体的核酸的条件下培养权利要求46的宿主细胞。

48. 根据权利要求47所述的方法,所述方法还包括从所述宿主细胞培养物回收所述抗HtrA1抗体。

49. 免疫缀合物,所述免疫缀合物包含权利要求1-44中任一项所述的抗体和细胞毒性剂。

50. 药物制剂,所述药物制剂包含权利要求1-44中任一项所述的抗体和药用载体。

51. 根据权利要求1-44中任一项所述的抗体,所述抗体用作药物。

52. 根据权利要求1-44中任一项所述的抗体,所述抗体用于治疗老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病。

53. 根据权利要求52所述的抗体,所述抗体用于治疗干性老年性黄斑变性。

54. 根据权利要求1-44中任一项所述的抗体,所述抗体用于抑制视网膜或光感受器细胞的变性。

55. 根据权利要求1-44中任一项所述的抗体,所述抗体用于抑制眼睛中的HtrA1蛋白酶活性。

56. 根据权利要求1-44中任一项所述的抗体在制备药物中的用途。

57. 根据权利要求56所述的用途,其中所述药物用于治疗老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病。

58. 根据权利要求57所述的用途,其中所述老年性黄斑变性是干性老年性黄斑变性。

59. 根据权利要求56所述的用途,其中所述药物用于抑制视网膜或光感受器细胞的变性。

60. 根据权利要求56所述的用途,其中所述药物用于抑制眼睛中的HtrA1蛋白酶活性。

61. 治疗患有老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求1-44中任一项所述的抗体。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述老年性黄斑变性是干性老年性黄斑变性。

63. 抑制个体中视网膜或光感受器细胞变性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求1-44中任一项所述的抗体以抑制视网膜或光感受器细胞变性。

64. 抑制个体眼睛中的HtrA1活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求1-44中任一项所述的抗体以抑制眼睛中的HtrA1活性。

65. 根据权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列; 和 (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。

66. 根据权利要求1-12或65中任一项所述的抗体,所述抗体进一步包含 (a) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列; 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。

67. 抗体,所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b)

HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列; (c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列; (d) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列; (e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。

68. 根据权利要求67所述的抗体,其中所述抗体包含 (a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列; (b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列; (c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列; (d) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列; (e) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

69. 根据权利要求67或68所述的抗体,其中所述抗体包含 (a) HVR-H1,所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、47-51和75-80的氨基酸序列; (b) HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52和81-82的氨基酸序列; (c) HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列; (d) HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33和54-57的氨基酸序列; (e) HVR-L2,所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46和59-74的氨基酸序列。

70. 根据权利要求65-69中任一项所述的抗体,所述抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

71. 分离的核酸,所述分离的核酸编码权利要求65-70中任一项所述的抗体。

72. 宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求71所述的核酸。

73. 制备抗体的方法,所述方法包括在适于表达编码抗HtrA1抗体的核酸的条件下培养权利要求72的宿主细胞。

74. 根据权利要求73所述的方法,所述方法还包括从所述宿主细胞培养物回收所述抗HtrA1抗体。

75. 免疫缀合物,所述免疫缀合物包含权利要求65-70中任一项所述的抗体和细胞毒性剂。

76. 药物制剂,所述药物制剂包含权利要求65-70中任一项所述的抗体和药用载体。

77. 根据权利要求65-70中任一项所述的抗体,所述抗体用作药物。

78. 根据权利要求65-70中任一项所述的抗体,所述抗体用于治疗老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病。

79. 根据权利要求78所述的抗体,所述抗体用于治疗干性老年性黄斑变性。

80. 根据权利要求65-70中任一项所述的抗体,所述抗体用于抑制视网膜或光感受器细胞的变性。

81. 根据权利要求65-70中任一项所述的抗体,所述抗体用于抑制眼睛中的HtrA1蛋白酶活性。

82. 根据权利要求65-70中任一项所述的抗体在制备药物中的用途。

83. 根据权利要求82所述的用途,其中所述药物用于治疗老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病的治疗。

84. 根据权利要求83所述的用途,其中所述老年性黄斑变性是干性老年性黄斑变性。

85. 根据权利要求82所述的用途,其中所述药物用于抑制视网膜或光感受器细胞的变性。

86. 根据权利要求82所述的用途,其中所述药物用于抑制眼睛中的HtrA1蛋白酶活性。

87. 治疗患有老年性黄斑变性、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病或息肉状脉络膜血管病的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求65-70中任一项所述的抗体。

88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述老年性黄斑变性是干性老年性黄斑变性。

89. 抑制个体中视网膜或光感受器细胞变性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求65-70中任一项所述的抗体以抑制视网膜或光感受器细胞变性。

90. 抑制个体眼睛中的HtrA1活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的权利要求65-70中任一项所述的抗体以抑制眼睛中的HtrA1活性。

抗HtrA1抗体及使用方法

[0001] 本申请是国际申请号PCT/US2012/059878,国际申请日2012年10月12日,中国申请号201280050549.0,发明名称为“抗HtrA1抗体及使用方法”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2011年10月14日提交的美国临时申请序列号61/547,649的权益,该申请通过引用完整地结合于此。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含以ASCII格式经由EFS-Web提交的并且通过引用完整地结合于此的序列表。所述于2012年10月8日创建的ASCII版本被命名为P4761R1W0_SequenceListing.TXT并且大小为47,273字节。

发明领域

[0006] 本发明涉及抗HtrA1抗体及其使用方法。

[0007] 背景

[0008] 丝氨酸蛋白酶HtrA1 (PRSS11;PA支 (Clan PA),S1家族) 属于HtrA蛋白的一个进化上保守的家族 (Clausen, T. 等人, *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:152-62 (2011); Clausen, T. 等人, *Mol Cell* 10:443-55 (2002))。在人类中, HtrA1、3、和4共享相同的结构域构造:N端IGFBP样组件和Kazal样组件,具有胰蛋白酶样折叠的蛋白酶结构域,和C端PDZ结构域。通过鉴别引起家族性缺血性脑小血管疾病 (familial ischemic cerebral small-vessel disease) 的人类功能缺失突变,已经可靠地确认了HtrA1的生理相关性 (Hara, K. 等人, *N Engl J Med* 360:1729-39 (2009))。分子机制涉及引起增加的TGF-β信号传导的通过HtrA1的缺陷TGF-β抑制 (Hara等人, 2009)。也许与多种细胞外基质成分的HtrA1介导的降解一起 (Chamberland等人, *J Biol Chem* 284:27352-9 (2009); Grau, S. 等人, *J Biol Chem* 281: 6124-9 (2006); Hadfield, K. D. 等人, *J Biol Chem* 283:5928-38 (2008); Tocharus, J. 等人, *Dev Growth Differ* 46:257-74 (2004); Tsuchiya等人, 2005)), 或者间接经由基质金属蛋白酶的增量调节 (Grau等人, 2006), 归因于异常HtrA1表达的失调TGF-β信号传导还可以导致关节炎疾病 (Oka, C. 等人, *Development* 131:1041-53 (2004); Tsuchiya, A. 等人, *Bone* 37:323-36 (2005))。此外, 人类遗传研究确认了老年性黄斑变性 (age-related macular degeneration) 的发展与HtrA1启动子区中的SNP之间的强的相关性, 这引起了增加的HtrA1转录水平 (Dewan, A. 等人, *Science* 314:989-92 (2006); Yang, Z. 等人, *Science* 314:992-3 (2006))。因此, HtrA1酶功能的抑制是有吸引力的治疗方法, 例如在老年性黄斑变性中和在关节炎疾病 (arthritic disease) 中。

[0009] 概述

[0010] 本发明提供抗HtrA1抗体及使用所述抗HtrA1抗体用于诊断和治疗目的的方法。

[0011] 在一方面中, 本发明提供分离的抗体, 所述分离的抗体与包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列的抗体竞争地结合HtrA1。例如, 使用ELISA测定, 可以确定竞争性结合。

[0012] 在一方面中,本发明提供结合HtrA1的、具有以下性质中的一种或多种的分离的抗体:(i)对于一种或多种HtrA1底物,低于50nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、3nM、2.5nM、2nM、1nM、或更低的IC₅₀;(ii)以1个可变结构域对HtrA1三聚体的一个亚基的比例结合HtrA1(例如,Fab以3 Fab对1 HtrA1三聚体的比例结合HtrA1三聚体,以及IgG以3 IgG对2 HtrA1三聚体的比例结合HtrA1三聚体),(iii)对于包含两个可变结构域的抗体来说,以形成与图9中所示的类似的“笼子”的方式结合HtrA1,(iv)不防止HtrA1的三聚体形成,(v)结合HtrA1蛋白的C环(Loop C)中的一个或多个残基,(vi)结合HtrA1的蛋白酶结构域,(vii)结合表位,所述表位包含SEQ ID NO:13的氨基酸N224或K248中的一个或二者,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的氨基酸(例如,SEQ ID NO:14的氨基酸N224和K248,参见图10A和B);(viii)结合表位,所述表位包含以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:13的N224、K248、V201、T223、K243、K225、E247和H220,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的氨基酸;(ix)与鼠HtrA1交叉反应;(x)不与HtrA2、HtrA3和/或HtrA4交叉反应;(xi)与包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列的抗体竞争地结合HtrA1,(xii)结合HtrA1,并且解离常数≤500nM,或(xiii)抑制HtrA1与α1-胰凝乳蛋白酶(A1AT)之间的复合物形成。

[0013] 在另一方面中,本发明提供结合HtrA1的分离的抗体,其中所述抗体(i)结合包含HtrA1的N224、K248、或二者的表位并且(ii)以IC₅₀≤30nM抑制HtrA1。在某些实施方案中,表位还包含以下HtrA1的残基中的一个或多个:V201、T223、K243、K225、E247和H220。在某些实施方案中,抗体还可以包括以下性质中的一种或多种:(i)以1个可变结构域对HtrA1三聚体的一个亚基的比例结合HtrA1,或者(ii)不防止HtrA1的三聚体形成。在某些实施方案中,IC₅₀使用丝氨酸蛋白酶利用具有SEQ ID NO:12的底物的测定来确定,例如,如在本文中所描述的FRET测定。

[0014] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体不与HtrA2、HtrA3和HtrA4中的一个或多个交叉反应。

[0015] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体具有≤500nM的解离常数。例如,通过BIAcore使用Fab可以确定解离常数。

[0016] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体是单克隆抗体。

[0017] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0018] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体是结合HtrA1的抗体片段。

[0019] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHYFDY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:27);(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列QQX_gX_hX_iX_jPX_kT,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S(SEQ ID NO:24);和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_oYADSVKG,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:26)。

[0020] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列;和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0022] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (b) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列;和 (c) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0023] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-H1,所述HVR-H1包含氨基酸序列GFX₁IX_mX_nYYIH,其中X₁是N、S或T;X_m是S、D、Y或A;并且X_n是G或D (SEQ ID NO:25); (b) HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_oYADSVKG,其中X_o是N或D (SEQ ID NO:26);和 (c) HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHYFDY,其中X_p是S或T (SEQ ID NO:27)。

[0024] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体还包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含氨基酸序列RASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fA,其中X_a是D、S或V;X_b是V或I;X_c是S、N或G;X_d是T或N;X_e是A或Y;并且X_f是V或L (SEQ ID NO:23); (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列QQX_gX_hX_iX_jPX_kT,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S (SEQ ID NO:24)。

[0025] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列; (b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和 (c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体还包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0027] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和 (c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0028] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体还包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0029] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体还包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0030] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0031] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0032] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和 (c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0033] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体还包含SEQ ID NO:17的重链可变结构域构架(FR2)序列。

[0034] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含 (a) VH序列,所述VH序列与SEQ ID

NO:8的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；(b) VL序列，所述VL序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；或(c)如在(a)中的VH序列和如在(b)中的VL序列。

[0035] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含(a) VH序列，所述VH序列与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；(b) VL序列，所述VL序列与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；或(c)如在(a)中的VH序列和如在(b)中的VL序列。

[0036] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含(a) VH序列，所述VH序列与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；(b) VL序列，所述VL序列与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；或(c)如在(a)中的VH序列和如在(b)中的VL序列。

[0037] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含(a) VH序列，所述VH序列与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；(b) VL序列，所述VL序列与SEQ ID NO:30的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；或(c)如在(a)中的VH序列和如在(b)中的VL序列。

[0038] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含(a)包含SEQ ID NO:32的VH序列；(b)包含SEQ ID NO:31的VL序列；或(c)包含SEQ ID NO:32的VH序列和包含SEQ ID NO:31的VL序列。

[0039] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列。

[0040] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:7的VL序列。

[0041] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:30的VH序列。

[0042] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:28的VL序列。

[0043] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:29的VL序列。

[0044] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列。

[0045] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:30的VH序列和SEQ ID NO:28的VL序列。

[0046] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含SEQ ID NO:30的VH序列和SEQ ID NO:29的VL序列。

[0047] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含(a) HVR-H1，所述HVR-H1包含氨基酸序列GFX₁IX_mX_nYYIH，其中X₁是N、S或T；X_m是S、D、Y或A；并且X_n是G或D (SEQ ID NO:25)；(b) HVR-H2，所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_oYADSVKG，其中X_o是N或D (SEQ ID NO:26)；(c) HVR-H3，所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHYFDY，其中X_p是S或T (SEQ ID NO:27)；(d) HVR-L1，所述HVR-L1包含氨基酸序列RASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fA，其中X_a是D、S或V；X_b是V或I；X_c是S、N或G；X_d是T或N；X_e是A或Y；并且X_f是V或L (SEQ ID NO:23)；(e) HVR-L2，所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；和(f) HVR-L3，所述HVR-L3包含氨基酸序列QQX_gX_hX_iX_jPX_kT，其中X_g是S、V或D；X_h是Y、D或S；X_i是T、S、A、D或N；X_j是T、H、N、S、A、L或R；并且X_k是P、T、A或S (SEQ ID NO:24)。

[0048] 在某些实施方案中，在本文中所描述的抗体包含(a) HVR-H1，所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、和47-51的氨基酸序列；(b) HVR-H2，所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5和52的氨基酸序列；(c) HVR-H3，所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6和53的氨基酸序列；(d) HVR-L1，所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21和33的氨基酸序列；(e) HVR-L2，所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；和(f) HVR-L3，所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、

22、和34-46的氨基酸序列。

[0049] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(e)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0050] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;(e)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0051] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(e)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0052] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:89);(b)HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列X_gX_hX_iX_jPX_k,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S(SEQ ID NO:86);和(c)HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_o,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:88)。

[0053] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含氨基酸序列GFX₁IX_mX_nYY,其中X₁是N、S或T;X_m是S、D、Y或A;并且X_n是G或D(SEQ ID NO:87);(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_o,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:88);和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:89)。

[0054] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体还包含(a)HVR-L1,所述HVR-L1包含氨基酸序列X_aX_bX_cX_dX_eX_f,其中X_a是D、S或V;X_b是V或I;X_c是S、N或G;X_d是T或N;X_e是A或Y;并且X_f是V或L(SEQ ID NO:85);(b)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列X_gX_hX_iX_jPX_k,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S(SEQ ID NO:86)。

[0055] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含氨基酸序列GFX₁IX_mX_nYY,其中X₁是N、S或T;X_m是S、D、Y或A;并且X_n是G或D(SEQ ID NO:87);(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含氨基酸序列WIDPYGGDTX_o,其中X_o是N或D(SEQ ID NO:88);(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含氨基酸序列GTFLTX_pWGHY,其中X_p是S或T(SEQ ID NO:89);(d)HVR-L1,所述HVR-L1包含氨基酸序列X_aX_bX_cX_dX_eX_f,其中X_a是D、S或V;X_b是V或I;X_c是S、N或G;X_d是T或N;X_e是A或Y;并且X_f是V或L(SEQ ID NO:85);(e)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,所述HVR-L3包含氨基酸序列X_gX_hX_iX_jPX_k,其中X_g是S、V或D;X_h是Y、D或S;X_i是T、S、A、D或N;X_j是T、H、N、S、A、L或R;并且X_k是P、T、A或S(SEQ ID NO:86)。

[0056] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含选自

SEQ ID NO:4、20、47-51、和75-80的氨基酸序列；(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52、和81-82的氨基酸序列；(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列；(d) HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33、和54-57的氨基酸序列；(e) HVR-L2,所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列；和(f) HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46、和59-74的氨基酸序列。

[0057] 在某些实施方案中,在本文中所描述的抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

[0058] 在另一方面中,提供编码在本文中所描述的抗HtrA1抗体的分离的核酸。

[0059] 在另一方面中,提供包含编码在本文中所描述的抗HtrA1抗体的分离的核酸的宿主细胞。

[0060] 在另一方面中,提供制备抗体的方法。所述方法可以包括在适于表达编码抗HtrA1抗体的核酸的条件下培养包含编码抗HtrA1抗体的分离的核酸的宿主细胞。所述方法还可以包括从宿主细胞培养物回收抗HtrA1抗体、纯化抗HtrA1抗体、或用药用赋形剂配制抗HtrA1抗体。

[0061] 在另一方面中,提供包含抗HtrA1抗体和细胞毒性剂的免疫缀合物。

[0062] 在另一方面中,提供包含抗HtrA1抗体和药用载体的药物制剂。

[0063] 在另一方面中,本申请提供用作药物的抗HtrA1抗体,例如,用于治疗老年性黄斑变性(age-related macular degeneration) (湿性或干性)、地图状萎缩(geographic atrophy)、糖尿病性视网膜病(diabetic retinopathy)、早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity)、或息肉状脉络膜血管病(polypoidal choroidal vasculopathy),用于抑制视网膜或光感受器细胞的变性,或者用于抑制眼睛中的HtrA1蛋白酶活性。

[0064] 在另一方面中,本申请提供抗HtrA1抗体的用于制备药物的用途,例如用于以下用途的药物:用于治疗老年性黄斑变性(AMD,湿性或干性)、地图状萎缩(GA)、糖尿病性视网膜病(DR)、早产儿视网膜病(ROP)、或息肉状脉络膜血管病(PCV),用于抑制视网膜或光感受器细胞的变性,用于抑制眼睛中的HtrA1蛋白酶活性。

[0065] 在另一方面中,本申请提供治疗患有老年性黄斑变性(湿性或干性)、地图状萎缩、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、或息肉状脉络膜血管病的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的如在本文中所描述的抗HtrA1抗体。

[0066] 在另一方面中,本申请提供用于抑制个体中视网膜或光感受器细胞变性的方法,其包括向所述个体施用有效量的如在本文中所描述的抗HtrA1抗体以抑制视网膜或光感受器细胞变性。

[0067] 在另一方面中,本申请提供抑制个体眼睛中的HtrA1丝氨酸蛋白酶活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的如在本文中所描述的抗HtrA1抗体以抑制眼睛中的HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。

[0068] 附图简述

[0069] 本专利或申请文件包含至少一幅彩图。在请求并支付必要费用后,具有彩图的本专利或专利申请公开的副本将由局方提供。

[0070] 图1A-B.图1A显示抗HtrA1抗体94 (YW505.94) (SEQ ID NO:7) 的轻链可变结构域序列。图1B显示抗HtrA1抗体94 (YW505.94) (SEQ ID NO:8) 的重链可变结构域序列。根据Kabat编号系统对残基编号(Kabat, E. A. 等人, 1991, 在Sequences of Proteins of

Immunological Interest (免疫学感兴趣的蛋白质的序列), 第五版. National Institutes of Health, Bethesda, MD 中)。将 YW505.94 轻链可变结构域序列与人 Kappa I 轻链共有序列 (SEQ ID NO:9) 比对, 并且将 YW505.94 重链可变结构域序列与人亚型 III 重链序列 (SEQ ID NO:10) 比对。加框的序列是根据 Kabat 定义的 CDR。加阴影的是抗 HtrA1 (YW505.94) 与共有序列之间的序列差异。

[0071] 图 2.13 种噬菌体来源的抗体 (IgG) 组的筛选。用 HuHtrA1 或 HuHtrA1_PD 温育单一浓度 (0.08–0.28 mg/ml 最终) 的 IgG, 并且在 FRET 测定中测量酶活性。在测试的 13 种抗体中, 抗体 YW503.57、YW504.57、YW504.61 和 YW505.94 (也被称为 Ab94 或 IgG94) 同时抑制 HuHtrA1 活性和 HuHtrA1_PD 活性二者。

[0072] 图 3. 借助 IgG94 和 Fab94 的 HuHtrA1 的抑制。用 IgG94 和 Fab94 将 HuHtrA1 在 37°C 下温育 20 分钟。测量针对肽底物 H2-0pt 的酶活性并且根据确定的线速度计算活性分数 (fractional activity) (v_i/v_o)。在 300 nM 下的 IgG94 不通过胰蛋白酶 (1 nM) 或弹性蛋白酶 (1 nM) 抑制 H2-0pt 水解。

[0073] 图 4. IgG94 通过 HuHtrA1 和 MuHtrA1 抑制萤光染料标记的酪蛋白 (BODIPY FL) 的水解。用 IgG94 将 HuHtrA1 和 MuHtrA1 在 37°C 下温育 15 分钟。在微孔板读数器上在 37°C 下测量酪蛋白 BODIPY FL 试剂的水解, 并且确定荧光增加的线性速率并将其表示为未抑制的速率的百分数 (% 对照)。

[0074] 图 5. IgG94 的特异性。用浓度渐增的 IgG94 温育 MuHtrA1_PD、MuHtrA3_PD 和 MuHtrA4_PD, 并且确定针对肽底物 H2-0pt (上图) 或酪蛋白 BODIPY FL 试剂 (下图) 的酶活性并将其表示为未抑制的酶活性的百分数 (% 对照)。

[0075] 图 6. HuHtrA1 介导的借助 IgG94 的大分子底物裂解的抑制。用 HuHtrA1 (对于 β -酪蛋白来说 10 nM, 对于 饰胶蛋白聚糖 (decorin) 来说 125 nM, 对于 双糖链蛋白聚糖 (biglycan) 来说 75 nM) 将浓度渐增的 IgG94 (对于 β -酪蛋白来说 2.3–150 nM; 对于 饰胶蛋白聚糖来说 2–125 nM; 对于 双糖链蛋白聚糖来说 2.3–150 nM) 在 37°C 下温育 15 分钟。加入底物 β -酪蛋白、饰胶蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖 (50 μ g/ml) 并将其温育 2–14 h。在加入 SDS 样品缓冲液后, 通过 SDS-PAGE (非还原条件) 分析分解物并且通过 SimplyBlue SafeStain 染色。

[0076] 图 7A–C. 对 HuHtrA1_PD 上 IgG94 的功能表位制图。图 7A 显示用丙氨酸替换活性位点周围的残基来测量 IgG94 与 HuHtrA1_PD 突变体的结合的 ELISA 的结果。加阴影行表示造成结合降低大于 5 倍的丙氨酸替换。图 7B 显示 HuHtrA1_PD (PDB 3NWU) 的结构 (Clausen, T. 等人, Nat Rev Mol Cell Biol 12:152–62 (2011)) 并且表示出了突变的残基。中等灰色阴影显示在初始实验中没有丧失 IgG94 结合的突变; 深灰色阴影显示结合亲和力丧失 >5 倍的残基的子集。对在表面图中所示的形成蛋白酶结构域三聚体的三个单体加浅灰色阴影。对催化三联体残基 D250 和 S328 加下划线。图 7C 显示在 HuHtrA1_PD (PDB 3NWU) 的单体 (浅灰色, 作为草图) 上携带表位残基 N224 和 K248 的环的特写视图。还包含催化残基 H220。

[0077] 图 8A–B. Fab94:HuHtrA1_PD (S328A) 复合物 (图 8A) 和 IgG94:HuHtrA1_PD (S328A) 复合物 (图 8B) 的 SEC–MALLS (尺寸排阻层析多角度激光散射)。示出了借助 SEC 的洗脱峰 (x 轴) 和个体蛋白质和复合物的质量 (y 轴; 与洗脱峰交叉的虚线)。

[0078] 图 9. IgG:HuHtrA1–PD 复合物的假定的 ‘笼子模型’。

[0079] 图 10A–B. 人 HtrA1 (SEQ ID NO:13)、鼠 HtrA1 (SEQ ID NO:14)、鼠 HtrA3 (SEQ ID

NO:15)、和鼠HtrA4 (SEQ ID NO:16) 的比对。

[0080] 图11. 在恒定曝光 (constant light exposure) 的小鼠模型 (左上图) 中的视网膜中, HtrA1 mRNA表达增加。在相同的模型 (右上图) 中, HtrA2水平没有明显地变化。在基线 (下图) 的小鼠视网膜中, HtrA1表达明显高于HtrA2、HtrA3和HtrA4表达水平。

[0081] 图12. 在恒定曝光的小鼠模型中缺乏HtrA1表达的情况下增加的双极性细胞/Muller细胞应答。

[0082] 图13. 在恒定曝光的小鼠模型中缺乏HtrA1表达的情况下视网膜的变薄。

[0083] 图14. 在恒定曝光的小鼠模型中缺乏HtrA1表达的情况下外核层 (ONL) 光感受器细胞的变薄。

[0084] 图15. 抗HtrA1抗体YW505.94a的亲合力提高的变体的轻链HVR序列。

[0085] 图16. 抗HtrA1抗体YW505.94a的亲合力提高的变体的重链HVR序列。

[0086] 图17. 噬菌体竞争测定的结果, 显示YW505.94a亲合力提高的变体对HuHtrA1的结合。

[0087] 图18. 噬菌体竞争测定的结果, 显示YW505.94a亲合力提高的变体对MuHtrA1的结合。

[0088] 图19A-C. ELISA测定的结果, 显示大鼠组织 (图19A)、小鼠眼液 (图19B) 和小鼠视网膜组织 (图19C) 中HtrA1蛋白的水平。

[0089] 发明实施方案详述

[0090] I. 定义

[0091] 用于本文目的的“接纳体人构架”是包含衍生自人免疫球蛋白构架或如下所定义的人共有构架的轻链可变结构域 (VL) 构架或重链可变结构域 (VH) 构架的氨基酸序列的构架。“衍生自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的接纳体人构架可以包含其相同的氨基酸序列, 或其可以包含氨基酸序列的变化。在一些实施方案中, 氨基酸变化的数目为10以下, 9以下, 8以下, 7以下, 6以下, 5以下, 4以下, 3以下, 或2以下。在一些实施方案中, VL接纳体人构架的序列与VL人免疫球蛋白构架序列或人共有构架序列相同。

[0092] “亲和力”是指分子 (例如抗体) 的单一结合位点与其结合配偶体 (例如抗原) 之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明, 在用于本文时, “结合亲和力”指反映结合对的成员 (例如抗体与抗原) 之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可用解离常数 (Kd) 来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量, 包括本文中所描述的那些。用于测量结合亲合力的具体说明性和示例性实施方案描述于以下。

[0093] “亲和力成熟的”抗体指这样的抗体, 在该抗体的一个或多个高变区 (HVR) 中具有一处或多处改变, 导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有提高。

[0094] 术语“抗HtrA1抗体”和“结合HtrA1的抗体”是指这样的抗体, 所述抗体能够以足够的亲合力结合HtrA1抗体以致所述抗体可以用作靶向HtrA1中的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中, 抗HtrA1抗体与不相关的、非HtrA1蛋白结合的程度低于所述抗体与HtrA1结合的约10%, 如例如通过放射性免疫测定 (RIA) 测量的。在某些实施方案中, 结合HtrA1的抗体的解离常数 (Kd) $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$, 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 以下, 例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M , 例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施方案中, 抗HtrA1抗体结合在来自不同物种的HtrA1中保守的HtrA1表位。

[0095] 术语“抗体”在本文中以最广义使用，并且包括不同抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体，多特异性抗体(例如，双特异性抗体)，和抗体片段，只要它们显示所需的抗原结合活性。

[0096] “抗体片段”是指不同于完整抗体的分子，其包含完整抗体的部分，所述部分结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0097] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断50%以上的所述参照抗体与其抗原的结合，反之，参照抗体在竞争测定中阻断50%以上的该抗体与其抗原的结合。本文中提供一个示例性竞争测定。

[0098] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体，其中一部分重链和/或轻链来源于特定来源或物种，而剩余的重链和/或轻链来源于不同来源或物种。

[0099] 抗体的“类别”是指其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五个主要类别的抗体：IgA, IgD, IgE, IgG和IgM，并且这些中的数个可以进一步被划分为亚类(同种型)，例如，IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。

[0100] 术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于：放射性同位素(例如, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² 和 Lu 的放射性同位素)；化疗剂或药物(例如，甲氨蝶呤(methotrexate), 阿霉素(adriamycin), 长春花生物碱(vinca alkaloids) (长春新碱(vincristine), 长春碱(vinblastine), 依托泊苷(etoposide)), 多柔比星(doxorubicin), 美法仑(melphalan), 丝裂霉素(mitomycin) C, 苯丁酸氮芥(chlorambucil), 柔红霉素(daunorubicin) 或其它嵌入剂)；生长抑制剂；酶及其片段如核酸水解酶；抗生素；毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶促活性毒素，包括其片段和/或变体；和下面公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0101] “效应子功能”指那些可归于抗体Fc区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的实例包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如B细胞受体)下调；和B细胞活化。

[0102] 试剂例如药物制剂的“有效量”是指在需要的剂量和时间阶段有效获得所需的治疗或预防结果的量。

[0103] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C端区域，所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中，人IgG重链Fc区从Cys226或Pro230延伸至重链的羧基端。然而，Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明，Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统，其也被称为EU索引，如在Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列), 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

[0104] “构架区”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成：FR1, FR2, FR3和FR4。因此，HVR和FR序列通常出现在VH(或VL)的以下序列中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0105] 术语“全长抗体”、“完整的抗体”和“完整抗体”在本文被可交换地用于指结构与天然抗体结构基本相似或具有包含如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0106] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”被可交换地使用并且是指其中引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括初级转化的细胞和来源于其的后代,而不考虑传代的数目。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,而是可以包含突变。本文中包括与在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

[0107] “人抗体”指具有这样的氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于这样抗体的氨基酸序列,所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源,其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0108] “人共有构架”是指这样的构架,即在选择人免疫球蛋白VL或VH构架序列中,其代表最常出现的氨基酸残基。一般而言,对人免疫球蛋白VL或VH序列的选择是从可变结构域序列的亚型中选择。一般而言,该序列的亚型是如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列),第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),1-3卷中的亚型。在一个实施方案中,对于VL,该亚型是如Kabat等(见上文)中的亚型 κ I。在一个实施方案中,对于VH,该亚型是如Kabat等(见上文)中的亚型III。

[0109] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

[0110] 术语“高变区”或“HVR”当在本文中使用时,是指抗体可变结构域的每个区域,其序列高可变和/或形成结构上限定的环(“高变环”)。通常,天然四链抗体包含六个HVR;三个在VH(H1,H2,H3)中,三个在VL(L1,L2,L3)中。HVR通常包含来自高变环和/或“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高序列可变性和/或涉及抗原识别。如在本文中所使用的HVR区包含任意数量的位于位点24-36(对于L1)、46-56(对于L2)、89-97(对于L3)、26-35B(对于H1)、47-65(对于H2)、和93-102(对于H3)内的残基。因此,HVR包含在前面描述的位点中的残基:

[0111] A) 24-34(L1),50-52(L2),91-96(L3),26-32(H1),53-55(H2),和96-101(H3)。(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987));

[0112] B) L1的24-34,L2的50-56,L3的89-97,H1的31-35B,H2的50-65,和H3的95-102。(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列),5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。

[0113] C) 30-36(L1),46-55(L2),89-96(L3),30-35(H1),47-58(H2),93-100a-j(H3)(MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996))。

[0114] 除了VH中的CDR1,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,其是与抗原接触的残基。SDR包含在被称为缩短的(abbreviated)-CDR或a-

CDR的CDR区域中。示例性a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2, 和a-CDR-H3) 发生在氨基酸残基L1的31-34, L2的50-55, L3的89-96, H1的31-35B, H2的50-58, 和H3的95-102。(见Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))。除非另外说明, 可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如, FR残基) 在本文中根据Kabat等(见上文) 编号。

[0115] “免疫缀合物”是与一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂) 缀合的抗体。

[0116] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于, 家养动物(例如, 牛, 羊, 猫, 狗和马), 灵长类动物(例如, 人和非人灵长类动物如猴), 兔, 以及啮齿类动物(例如, 小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0117] “分离的”抗体是这样的抗体, 其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中, 将抗体纯化至超过95%或99%纯度, 如通过例如电泳(例如, SDS-PAGE, 等电聚焦(IEF), 毛细管电泳)或层析(例如, 离子交换或反相HPLC)确定的。对于用于评估抗体纯度的方法的综述, 参见, 例如, Flatman等, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

[0118] “分离的”核酸是指这样的核酸分子, 其已经与其天然环境的组分分离。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子, 但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处、或者仅包含编码序列。

[0119] “分离的编码抗HtrA1抗体的核酸”是指一个或多个核酸分子, 其编码抗体重和轻链(或其片段), 包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子, 以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

[0120] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体, 即除了可能的变体抗体(该变体抗体例如含有天然存在的突变或在产生单克隆抗体制剂的过程中出现, 此类变体通常少量存在)外, 构成群体的个体抗体是相同的和/或结合相同的表位。相比于通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂, 单克隆抗体制剂中的每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此, 修饰语“单克隆”表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征, 不应解释为要求通过任何特定方法来产生抗体。例如, 将根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成, 包括但不限于杂交瘤法, 重组DNA法, 噬菌体展示法, 和利用包含所有或部分的人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法, 这样的方法和用于制备单克隆抗体的其他示例性方法描述于本文中。

[0121] “裸抗体”是指没有缀合异源部分(如细胞毒性部分)或放射性标记的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0122] “天然抗体”是指天然存在的具有变化的结构的免疫球蛋白分子。例如, 天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白, 其由两个相同的轻链和两个相同的重链组成, 所述链通过二硫键结合。从N末端至C末端, 每个重链具有可变区(VH), 其也被称为可变重结构域或重链可变结构域, 其后是三个恒定结构域(CH1, CH2和CH3)。类似地, 从N末端到C末端, 每个轻链具有可变区(VL), 其也被称为可变轻结构域或轻链可变结构域, 其后是恒定轻(CL)结构域。基于其恒定结构域的氨基酸序列, 抗体的轻链可以被分配给被称为kappa(κ)和lambda(λ)的两个类型中的一个。

[0123] 术语“包装说明书”用于指通常包括在治疗产品的商品包装中的使用说明, 其包含关于适应征、用法、剂量、给药、组合疗法、禁忌症的信息和/或关于使用这样的治疗产品的

警告。

[0124] 相对于参比多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在将所述序列进行比对(并在必要时导入空位)以获取最大百分比序列同一性,且不将任何保守置换视为序列同一性的部分之后,候选序列中的氨基酸残基与参比多肽序列中的氨基酸残基相同的百分数。可使用本领域各种方法进行序列比对以便测定百分比氨基酸序列同一性,例如,使用公众可得到的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以决定测量比对的适宜参数,包括对所比较的序列全长获得最大比对所需的任何算法。然而,为此目的,%氨基酸序列同一性值使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生。ALIGN-2序列比较计算机程序的作者是Genentech, Inc, 并且源代码已经随用户文档提交至美国版权局(Washington D.C., 20559), 其美国版权注册登记号为TXU510087。公众可通过Genentech, Inc. (South San Francisco, California) 得到ALIGN-2程序, 或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应当为在UNIX操作系统、包括数字UNIXV4.0D上使用而进行编译。ALIGN-2程序设定了所有序列比对参数并且不变。

[0125] 在ALIGN-2应用于氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A相对于(to)、与(with)、或针对(against)给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者说:给定氨基酸序列A具有或含有相对于、与或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性)如下计算:

[0126] 100乘以X/Y比值

[0127] 其中X是用序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,且其中Y是B中的氨基酸残基总数。可以理解,当氨基酸序列A与氨基酸序列B的长度不相等时,A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另外具体说明,在本文用的所有%氨基酸序列同一性的值都是用ALIGN-2计算机程序如前段所描述的那样得到的。

[0128] 术语“药物制剂”指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不包含对施用所述制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

[0129] “药用载体”是指药物制剂中不同于活性成分的成分,其对受试者是无毒的。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0130] 除非另外说明,术语“高温必需相关A(High-temperature requirement associated A)”、或“HtrA1”当用于本文中时是指来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物如灵长类动物(例如人)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠))的任何天然HtrA1,除非另有说明。该术语涵盖“全长”未加工的HtrA1以及由细胞内加工产生的任何形式的HtrA1。该术语还包括天然存在的HtrA1的变体,例如,剪接变体或等位变体。在SEQ ID N0:13中示出了示例性HtrA1的氨基酸序列。人HtrA1的示例性片段包括:包含氨基酸Q23-P480或P161-K379的片段、基本上由氨基酸Q23-P480或P161-K379组成的片段、或由氨基酸Q23-P480或P161-K379组成的片段。

[0131] 用于本文时,“治疗(treatment)”(及其语法变化如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)指在尝试改变待治疗的个体的天然进程中的临床干预,并且可以为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的理想效果包括但不限于防止疾病发生或复发,缓和症状,消除疾病的任何直接或间接病理学后果,预防转移,减少疾病进展速率,改善或减轻疾

病状态,和症状缓解或改善的预后。在一些实施方案中,将本发明的抗体用于延缓疾病的发生或减缓疾病的进展。

[0132] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链(VH和VL,分别地)的可变结构域通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的构架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman and Co.91页(2007))。单个VH或VL结构域可以足以给予抗原结合特异性。此外,可以使用来自与特定抗原结合的抗体的VH或VL结构域来分离结合所述抗原的抗体,以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano等,J. Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature 352:624-628(1991)。

[0133] 术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

[0134] II.组合物和方法

[0135] 在一方面中,本发明部分基于以下发现:HtrA1活性的降低对眼睛中的光感受器细胞、外核层、和对视网膜电图功能具有保护效果。在一些实施方案中,提供结合人HtrA1的抗体。本发明的抗体可以例如用于诊断或治疗与HtrA1活性相关的多种疾病,包括眼部病症如老年性黄斑变性或地图状萎缩。

[0136] A.示例性的抗HtrA1抗体

[0137] 在一方面中,本发明提供结合HtrA1的分离的抗体。在某些实施方案中,抗HtrA1抗体具有以下性质中的一种或多种:(i)对于一种或多种HtrA1底物,具有低于50nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、3nM、2.5nM、2nM、1nM、或更低的IC₅₀;(ii)以1个可变结构域对HtrA1三聚体的一个亚基的比例结合HtrA1(例如,Fab以3 Fab对1 HtrA1三聚体的比例结合HtrA1三聚体,以及IgG以3 IgG对2 HtrA1三聚体的比例结合HtrA1三聚体),(iii)对于包含两个可变结构域的抗体来说,以致使形成与图9中所示的类似的“笼子”的方式结合HtrA1,(iv)不防止HtrA1的三聚体形成,(v)结合HtrA1蛋白的C环(Loop C)中的一个或多个残基,(vi)结合HtrA1的蛋白酶结构域,(vii)结合表位,所述表位包含SEQ ID NO:13的氨基酸N224或K248中的一个或二者,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的氨基酸(例如,SEQ ID NO:14的氨基酸N224和K248,参见图10A-B);(viii)结合表位,所述表位包含以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:13的N224、K248、V201、T223、K243、K225、E247和H220,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的氨基酸;(ix)与鼠HtrA1交叉反应;(x)不与HtrA2、HtrA3和/或HtrA4交叉反应;(xi)与包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列的抗体竞争地结合HtrA1,或(xii)结合HtrA1,并且解离常数≤500nM,或(xiii)抑制HtrA1与α1-抗胰蛋白酶(A1AT)之间的配合物形成。

[0138] 在一方面中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种HVR的抗HtrA1抗体:(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列;(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;(d)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;(e)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86

的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种HVR的抗HtrA1抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种HVR的抗HtrA1抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、47-51、和75-80的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52、和81-82的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33、和54-57的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46、和59-74的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种HVR的抗HtrA1抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种HVR的抗HtrA1抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种HVR的抗HtrA1抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0139] 在一方面中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列; 和 (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体包含HVR-H3和HVR-L3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含: 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的HVR-L3、和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列; 和 (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。

[0140] 在一方面中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的抗体: (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述

HVR-H2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体包含HVR-H3和HVR-L3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L3、和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0141] 在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的抗体:(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、47-51和75-80的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52和81-82的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6和53的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体包含HVR-H3和HVR-L3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46和59-74的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含HVR-H3、HVR-L3、和HVR-H2,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46和59-74的氨基酸序列,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52和81-82的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、47-51和75-80的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52和81-82的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列。

[0142] 在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的抗体:(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体包含HVR-H3和HVR-L3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L3、和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,抗体包含(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0143] 在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的抗体:(a)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。在另一个实施方案中,抗体包含HVR-H3和HVR-L3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L3、和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-H2。在另一个实施方案中,抗体包含HVR-H3和

HVR-L3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在进一步的实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-L3、和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-H2。在进一步的实施方案中,抗体包含(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列;(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;和(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0144] 在另一方面中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的抗体:(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的抗体:(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0145] 在另一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的抗体:(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33和54-57的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46和59-74的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33和54-57的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46和59-74的氨基酸序列。

[0146] 在另一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的抗体:(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0147] 在另一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的抗体:(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0148] 在另一个实施方案中,本发明提供包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的抗体:(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID

NO:22的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含(a)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;(b)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0149] 在另一方面中,本发明的抗体包含(a)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的VH结构域:(i)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列;和(b)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的VL结构域:(i)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一个实施方案中,本发明的抗体包含(a)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的VH结构域:(i)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列;和(b)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的VL结构域:(i)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0150] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含(a)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的VH结构域:(i)HVR-H1,所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、47-51和75-80的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52和81-82的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列;和(b)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的VL结构域:(i)HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33和54-57的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46和59-74的氨基酸序列。

[0151] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含(a)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的VH结构域:(i)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;和(b)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的VL结构域:(i)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0152] 在另一个实施方案中,本发明的抗体包含(a)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VH HVR序列的VH结构域:(i)HVR-H1,所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;和(b)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的VL结构域:(i)HVR-L1,所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0153] 在另一方面中,本发明的抗体包含(a)包含选自以下各项的至少一种、至少两种、

或全部三种VH HVR序列的VH结构域: (i) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列, (ii) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列, 和 (iii) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; 和 (b) 包含选自以下各项的至少一种、至少两种、或全部三种VL HVR序列的VL结构域: (i) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列, (ii) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列, 和 (c) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0154] 在另一方面中, 本发明提供抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列。在一个实施方案中, 本发明提供抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。

[0155] 在另一个实施方案中, 本发明提供抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、47-51、和75-80的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、52、和81-82的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、53和83-84的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、33、和54-57的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含选自SEQ ID NO:2和58的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、34-46、和59-74的氨基酸序列。

[0156] 在另一个实施方案中, 本发明提供抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0157] 在另一个实施方案中, 本发明提供抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0158] 在另一个实施方案中, 本发明提供抗体, 所述抗体包含 (a) HVR-H1, 所述HVR-H1包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 所述HVR-H2包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列; (c) HVR-H3, 所述HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (d) HVR-L1, 所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列; (e) HVR-L2, 所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列; 和 (f) HVR-L3, 所述HVR-L3包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

[0159] 在任何以上的实施方案中, 抗HtrA1抗体都是人源化的。在一个实施方案中, 抗HtrA1抗体包含如在任何以上实施方案中的HVR, 并且还包含接纳体人框架, 例如, 人免疫球蛋白框架或人共有框架。在另一个实施方案中, 抗HtrA1抗体包含如在任何以上实施方案中

的HVR,并且还包含含有SEQ ID NO:17的FR2序列的VH。

[0160] 在另一个方面中,抗HtrA1抗体包含重链可变结构域(VH)序列,其与SEQ ID NO:8或29中任一个的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的VH序列包含相对于参照序列的置换(例如保守性置换),插入或缺失,但是包含该序列的抗HtrA1抗体保持与HtrA1结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:8或29中,总计1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR外的区域(即,在FR中)。任选地,抗HtrA1抗体包含SEQ ID NO:8、29或32中的VH序列,包括所述序列的翻译后修饰。在具体的实施方案中,VH包含选自以下各项的一种、两种或三种HVR:(a) HVR-H1,所述HVR-H1包含选自SEQ ID NO:4、20、25和47-51的氨基酸序列,(b) HVR-H2,所述HVR-H2包含选自SEQ ID NO:5、26和52的氨基酸序列,和(c) HVR-H3,所述HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6、27和53的氨基酸序列。

[0161] 在另一个方面中,提供抗HtrA1抗体,其中所述抗HtrA1抗体包含轻链可变结构域(VL),其与SEQ ID NO:7、28或30中任一个的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性。在某些实施方案中,具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性的VL序列包含相对于参照序列的置换(例如保守性置换),插入或缺失,但是包含该序列的抗HtrA1抗体保持与HtrA1结合的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:7、28或30中,总计1至10个氨基酸被置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换,插入或缺失发生在HVR外的区域(即,在FR中)。任选地,抗HtrA1抗体包含SEQ ID NO:7、28、30或31中的VL序列,包括所述序列的翻译后修饰。在具体的实施方案中,VL包含选自以下各项的一种、两种或三种HVR(a) HVR-L1,所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:1、18、21、23和33的氨基酸序列;(b) HVR-L2,所述HVR-L2包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c) HVR-L3,所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:3、19、22、24和34-36的氨基酸序列。

[0162] 在另一方面中,提供抗HtrA1抗体,其中所述抗体包含如在任何以上提供的实施方案中的VH,和如在任何以上提供的实施方案中的VL。在一个实施方案中,抗体包含分别在SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:31中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,抗体包含分别在SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:7中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,抗体包含分别在SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:28中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,抗体包含分别在SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0163] 在进一步的方面中,本发明提供抗体,所述抗体结合与本文提供的抗HtrA1抗体相同的表位。例如,在某些实施方案中,提供这样的抗体,所述抗体结合与包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列的抗HtrA1抗体相同的表位。在某些实施方案中,提供结合HtrA1的表位的抗体,所述表位含有SEQ ID NO:13的残基N224、K248或二者,或者在不同HtrA1序列与其等同的残基。在某些实施方案中,HtrA1的表位还包含以下残基中的一种或多种:SEQ ID NO:13的V201、T223、K243、K225、E247和H220,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的氨基酸。在某些实施方案中,提供结合HtrA1的表位的抗体,所述表位含有SEQ ID NO:13的残基N224、K248和V201中的一种或多种或前述的全部,或者在不同的HtrA1序列中

与其等同的残基。在某些实施方案中,提供结合HtrA1的表位的抗体,所述表位含有SEQ ID NO:13的残基N224、K248、V201、T223和K243中的一种或多种或前述的全部,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的残基。在某些实施方案中,提供结合HtrA1的表位的抗体,所述表位含有SEQ ID NO:13的残基N224、K248、V201、T223、K243、K225、E247和H22A中的一种或多种或前述的全部,或者在不同的HtrA1序列中与其等同的残基。在某些实施方案中,表位是线性表位。在其它实施方案中,表位是构象表位。

[0164] 在本发明的另一个方面中,根据任何以上实施方案的抗HtrA1抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗HtrA1抗体是抗体片段,例如, Fv, Fab, Fab', scFv, 双抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体是全长抗体,例如,完整IgG1抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同种型。

[0165] 在某些实施方案中,根据以上实施方案中任何一个的抗HtrA1抗体不是具有SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列的抗体。

[0166] 在另一方面中,根据任何以上实施方案的抗HtrA1抗体可以结合如在以下部分1-7中所述的任何特征(单独地或组合地):

[0167] 1. 抗体亲合力

[0168] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有的解离常数(Kd)≤1μM,≤100nM,≤10nM,≤1nM,≤0.1nM,≤0.01nM,或≤0.001nM(例如10⁻⁸M以下,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如,10⁻⁹M至10⁻¹³M)。

[0169] 在一个实施方案中,Kd通过用目的抗体的Fab形式及其抗原进行的放射性标记的抗原结合测定法(RIA)测量,如由以下测定所述的。Fab对抗原的溶液结合亲合力通过在存在未标记抗原的滴定系列的情况下,用最小浓度的(¹²⁵I)-标记的抗原平衡Fab,接着用抗-Fab抗体-包被的板捕获结合的抗原来测量(参见,例如,Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定测定的条件,将MICROTITER[®]多孔板(Thermo Scientific)用5μg/ml的在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,并随后用PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白在室温(约23°C)封闭2-5小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[¹²⁵I]-抗原与目的Fab的系列稀释物混合(与在Presta等,癌症研究(Cancer Res).57:4593-4599(1997)中的抗-VEGF抗体,Fab-12的评估一致)。接着,将目的Fab温育过夜;然而温育可以持续更长的阶段(例如65小时)从而确保达到平衡。随后,将混合物转移到捕获板中以在室温进行温育(例如1小时)。接着,去除溶液,并将所述板用在PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20[®])洗涤8次。当所述板已经干燥时,加入150μl/孔的闪烁剂(MICROSCINT-20TM; Packard),并将所述板在TOPCOUNTTMγ计数器(Packard)上计数10分钟。选择提供少于或等于20%的最大结合的每种Fab的浓度用在竞争性结合测定中。

[0170] 根据另一个实施方案,Kd是通过表面等离子共振测定法使用BIACORE[®]-2000或BIACORE[®]-3000仪器(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C使用固定化抗原CM5芯片在~10个应答单位(RU)测量的。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和N-羟基-琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIACORE Inc.)。用10mM乙酸钠pH4.8将抗原稀释至5μg/ml(~0.2μM),然后以5μl/分钟的流速注入至获得约10个应答单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M

乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,在25°C以约25μl/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20TM) 表面活性剂的PBS (PBST) 中的两倍连续稀释的Fab (0.78nM至500nM)。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIACORE[®] Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen等, J.Mol.Biol. (分子生物学杂志) 293:865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$,那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或8000系列 SLM-AMINCOTM 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯 (stirred cuvette) 的测量,在存在浓度渐增的抗原的条件下,测量PBS, pH 7.2中的20nM抗-抗原抗体 (Fab形式) 在25°C的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm带通) 的升高或降低。

[0171] 2. 抗体片段

[0172] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于,Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, 和 scFv 片段, 以及以下描述的其他片段。对于特定抗体片段的综述,请参见Hudson等Nat.Med.9:129-134 (2003)。对于scFv片段的综述,请参见,例如, Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (单克隆抗体的药理学), 卷113, Rosenberg和Moore编辑, (Springer-Verlag, New York), 269-315页 (1994); 还请参见 WO 93/16185; 和美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包含拯救受体 (salvage receptor) 结合表位残基和具有提高的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0173] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见,例如, EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson等, Nat.Med.9:129-134 (2003); 和 Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993)。三抗体和四抗体也描述于Hudson等, Nat.Med.9:129-134 (2003) 中。

[0174] 单一结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单一结构域抗体是人单一结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见,例如, 美国专利号6,248,516 B1)。

[0175] 抗体片段可以通过不同技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞 (例如大肠杆菌或噬菌体) 产生,如本文所述。

[0176] 3. 嵌合和人源化抗体

[0177] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体于例如美国专利第4,816,567号; 及 Morrison等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855 (1984) 中描述。在一个实例中,嵌合抗体包含非人类可变区 (例如源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或例如猴的非人类灵长类动物的可变区) 及人类恒定区。在另一实例中,嵌合抗体是种类或亚类已经自亲本抗体的种类或亚类发生变化的“种类转变”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0178] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,非人类抗体经人源化以降低对人类的免疫原性,同时保持亲本非人类抗体的特异性及亲和力。一般而言,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVRs, 例如CDRs (或其部分) 源自非人类抗体,且FRs (或其部分) 是源自人类抗体序列。人源化抗体任选地也将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实

施方案中,人源化抗体中的一些FR残基经来自非人类抗体(例如HVR残基所源自的抗体)的相应残基置换,例如以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0179] 人源化抗体及其制备方法于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中评述,且进一步于例如Riechmann等人,Nature(自然)332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA86:10029-10033(1989);美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号和第7,087,409号;Kashmiri等人,Methods(方法)36:25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)移植)Padlan,Mol.Immunol.(分子免疫学)28:489-498(1991)(描述“表面重整”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR重组(shuffling)”);及Osbourne等人,Methods(方法)36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer(英国癌症杂志),83:252-260(2000)(描述FR重组(shuffling)的“导向选择”方法)中描述。

[0180] 可用于人源化的人类构架区包括,但不限于,使用“最佳拟合”法选择的构架区(参见例如Sims等人,J.Immunol.(免疫学杂志)151:2296(1993));源自特定亚群的轻链或重链可变区的人类抗体共同序列的构架区(参见例如Carter等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);及Presta等人,J.Immunol.(免疫学杂志),151:2623(1993));人类成熟(体细胞突变)构架区或人类生殖系构架区(参见例如Almagro及Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));及源自筛选FR文库的构架区(参见例如Baca等人,J.Biol.Chem.(生物化学杂志)272:10678-10684(1997)及Rosok等人,J.Biol.Chem.(生物化学杂志)271:22611-22618(1996))。

[0181] 4.人抗体

[0182] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体是人抗体。可使用本领域中已知的各种技术来制备人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.(当前药学观志)5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.(当前免疫学观点)20:450-459(2008)。

[0183] 可通过向已经经过修饰因而对于抗原攻击刺激产生完整人抗体或具有人类可变区的完整抗体的转基因动物施用免疫原,来制备人抗体。这些动物通常含有全部或一部分人类免疫球蛋白基因座,其替代了内源免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合于动物染色体内。在这些转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座一般已经失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.(自然生物技术)23:1117-1125(2005)。也参见例如描述XENOMOUSETM技术的美国专利第6,075,181号及第6,150,584号;描述HUMAB[®]技术的美国专利第5,770,429号;描述K-MMOUSE[®]技术的美国专利第7,041,870号,及描述VELOCIMOUSE[®]技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900。这些动物产生的完整抗体的人类可变区可进一步修饰,例如通过与不同人类恒定区组合。

[0184] 人抗体也可通过基于杂交瘤的方法制得。用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤及小鼠-人融合骨髓瘤细胞系已经描述。(参见例如Kozbor J.Immunol.(免疫学杂志),133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications(单克隆抗体产生技术及应用),第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);并且Boerner等人,J.Immunol.(免疫学杂志),147:86(1991)。)通过人类B细胞杂交瘤技术产生的抗体也在Li等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中描述。其他方法包括例如美国专利第7,189,826号(描述由杂交瘤细胞系产生单克隆人类IgM抗体)及Ni,

Xiandai Mianyixue, 26 (4) : 265-268 (2006) (描述人-人杂交瘤) 中所述的那些方法。人杂交瘤技术 (Trioma技术) 也于 Vollmers 和 Brandlein, Histology and Histopathology (组织学和组织病理学), 20 (3) : 927-937 (2005), 及 Vollmers 和 Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology (实验和临床药学方法和发现), 27 (3) : 185-91 (2005) 中描述。

[0185] 也可通过分离选自源自人噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生人抗体。随后可将这些可变结构域序列与所需人恒定结构域组合。下文描述自抗体文库选择人抗体的技术。

[0186] 5. 源自文库的抗体

[0187] 可通过在组合文库中筛选具有所需活性的抗体来分离本发明抗体。举例来说, 本领域中已知多种用于产生噬菌体展示文库并且在这些文库中筛选具有所需结合特征的抗体的方法。这些方法于例如 Hoogenboom 等人, Methods in Molecular Biology (分子生物学方法) 178:1-37 (O'Brien 等人编, Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中评述, 并且进一步于例如 McCafferty 等人, Nature (自然) 348:552-554; Clarkson 等人, Nature (自然) 352:624-628 (1991); Marks 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 222:581-597 (1992); Marks 及 Bradbury, Methods in Molecular Biology (分子生物学方法) 248:161-175 (Lo 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 338 (2) : 299-310 (2004); Lee 等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 340 (5) : 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34) : 12467-12472 (2004); 并且 Lee 等人, J. Immunol. Methods (免疫学方法杂志) 284 (1-2) : 119-132 (2004) 中描述。

[0188] 在某些噬菌体展示方法中, VH 及 VL 基因库 (repertoire) 是通过聚合酶链式反应 (PCR) 分别克隆并且随机重组于噬菌体文库中, 随后可如 Winter 等人, Ann. Rev. Immunol. (免疫学年度综述), 12:433-455 (1994) 中所述在其中筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常呈现单链 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段形式的抗体片段。来自免疫来源的文库无需构建杂交瘤即可提供免疫原的高亲和力抗体。或者, 天然库可经克隆 (例如自人) 以在无任何免疫的情况下提供针对多种非自体抗原以及自体抗原的抗体单一来源, 如 Griffiths 等人, EMBO J, 12: 725-734 (1993) 所述。最后, 也可以通过从干细胞克隆未重排的 V 基因区段, 并且使用含有随机序列的 PCR 引物来编码高变性 CDR3 区, 并且实现体外重排来合成制得天然文库, 如 Hoogenboom 及 Winter, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开物包括例如: 美国专利第 5,750,373 号, 及美国专利公开第 2005/0079574 号、第 2005/0119455 号、第 2005/0266000 号、第 2007/0117126 号、第 2007/0160598 号、第 2007/0237764 号、第 2007/0292936 号和第 2009/0002360 号。

[0189] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被视为本文的人抗体或人抗体片段。

[0190] 6. 多特异性抗体

[0191] 在某些实施方案中, 本文中所提供的抗体是多特异性抗体, 例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 一种结合特异性是针对 HtrA1 而另一种是针对任何其他抗原。在某些实施方案中, 双特异性抗体可结合至 HtrA1 的两个不同表位。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达 HtrA1 的细胞。双特异性抗体可制成全长抗体或抗体片段形式。

[0192] 制造多特异性抗体的技术包括,但不限于,具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein及Cuello,Nature(自然)305:537(1983));WO 93/08829;及Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991)),及“凸起-入-孔洞(knob-in-hole)”工程改造(参见例如美国专利第5,731,168号)。也可通过以下方法制得多特异性抗体:工程改造用于制备抗体Fc-异二聚体的静电导引作用(WO 2009/089004A1);将两种或两种以上抗体或片段交联(参见例如美国专利第4,676,980号,及Brennan等人Science(科学),229:81(1985));使用亮氨酸拉链来产生双特异性抗体(参见例如Kostelny等人,J. Immunol.(免疫学杂志),148(5):1547-1553(1992));使用“双抗体”技术来制得双特异性抗体片段(参见例如Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber等人,J. Immunol.(免疫学杂志),152:5368(1994));及如例如Tutt等人,J. Immunol.(免疫学杂志)147:60(1991)中所述制备三特异性抗体。

[0193] 本文中也包括具有三个或三个以上功能性抗原结合位点的经工程改造抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0194] 本文中的抗体或片段也包括包含结合至HtrA1以及另一不同抗原的抗原结合位点的“双重作用FAb或“DAF”(例如参见US 2008/0069820)。

[0195] 7.抗体变体

[0196] 在某些实施方案中,涵盖本文中所提供的抗体的氨基酸序列变体。举例来说,可能需要其来提高抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。可通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当修饰或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这些修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基缺失和/或插入其中和/或对其进行置换。可进行缺失、插入和置换的任何组合以获得最终构建体,其限制条件是最终构建体具有所需特征,例如抗原结合。

[0197] a) 置换、插入和缺失变体

[0198] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换性诱变的相关位点包括HVRs和FRs。保守性置换显示在表1中在“保守性置换”的标题下。更多实质性变化于表1中的“示例性置换”的标题下提供且如下文关于氨基酸侧链种类进一步描述。可将氨基酸置换引入相关抗体中并筛选具有所需活性,例如保持/提高的抗原结合、降低的免疫原性、或提高的ADCC或CDC的产物。

[0199] 表1

[0200]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮 氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮 氨酸	Leu

[0201] 可根据常见侧链特性将氨基酸分组：

[0202] (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0203] (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0204] (3) 酸性: Asp、Glu;

[0205] (4) 碱性: His、Lys、Arg;

[0206] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0207] (6) 芳香性:Trp、Tyr、Phe。

[0208] 非保守性置换将需要将一种这些种类中的成员换成另一种类。

[0209] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般而言,选择用于进一步研究的所得变体的某些生物学特性相对于亲本抗体改变(例如提高)(例如亲和力增加、免疫原性降低)和/或将实质上保持亲本抗体的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体,其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术,例如本文中所述的那些,方便地产生。简言之,一个或多个HVR残基被突变,且变异抗体呈现于噬菌体上,并针对特定生物活性(例如结合亲和力)对其进行筛选。

[0210] 可在HVR中进行改变(例如置换),例如以提高抗体亲和力。这些改变可于HVR“热点”也即由在体细胞成熟过程中经历高频率突变的密码子编码的残基中进行(参见例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* (分子生物学方法) 207:179-196 (2008));并且/或于SDRs (a-CDRs),其中测试所得变异VH或VL的结合亲和力。通过构建并且自第二文库重新选择而获得的亲和力成熟已于例如Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* (分子生物学方法) 178:1-37 (O' Brien等人编Human Press, Totowa, NJ, (2001)) 中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR(error-prone PCR)、链重组(shuffling)或寡核苷酸定向诱变)中任一种将多样性引入经选择以供成熟的可变基因中。随后产生第二文库。随后筛选该文库以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。另一引入多样性的方法涉及HVR定向方法,其中随机选择数个HVR残基(例如每次4-6个残基)。可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化特定地鉴别抗原结合中所涉及的HVR残基。特定地,通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

[0211] 在某些实施方案中,置换、插入或缺失可在一或多个HVR内进行,只要这些改变不实质上降低抗体结合抗原的能力即可。举例来说,可在HVR中进行不实质上降低结合亲和力的保守性改变(例如如本文中所提供的保守性置换)。这些改变可在HVR“热点”或SDR外部。在上文提供的变异VH及VL序列的某些实施方案中,各HVR未经改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0212] 适用于鉴别可靶向以供诱变的抗体的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”如Cunningham及Wells (1989) *Science* (科学), 244:1081-1085所述。在此方法中,残基或靶残基的群(例如诸如arg、asp、his、lys和glu的带电残基)经鉴别且由中性或带负电氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)置换以确定是否影响抗体与抗原的相互作用。可在对初始置换显示功能敏感性的氨基酸位置处引入其他置换。备选地或另外地,抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴别抗体与抗原之间的接触点。这些接触残基及邻近残基可以作为置换候选物被靶向或消除。可以筛选变体以确定其是否含有所需特性。

[0213] 氨基酸序列插入物包括长度在一个残基至含有一百个或一百个以上残基的多肽范围内的氨基端和/或羧基端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入物。末端插入物的实例包括具有N端甲硫氨酸残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N端或C端与酶(例如对于ADEPT而言)或增加抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0214] b) 糖基化变体

[0215] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体经改变以增加或降低抗体经糖基化的程度。对抗体的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖

基化位点而方便地实现。

[0216] 若抗体包含Fc区，则与其连接的糖类可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含一般通过N-连接与Fc区CH2结构域的Asn297连接的分支链双触角寡糖。参见例如Wright等人, TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可包括多种糖类，例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及与双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中，可对本发明抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改良特性的抗体变体。

[0217] 在一实施方案中，提供具有缺乏与Fc区连接(直接或间接)的岩藻糖的糖结构的抗体变体。举例来说，该抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过相对于根据MALDI-TOF质谱法所测量的所有与Asn 297连接的糖结构(例如复合型、杂合型及高甘露糖型结构)的总和，计算糖链内Asn297处岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量，例如如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约位置297处(Fc区残基的Eu编号)的天冬酰胺残基；然而，由于抗体中的微小序列变化，Asn297也可能位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处，也即介于位置294与300之间。这些岩藻糖基化变体可具有提高的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US 2003/0157108 (Presta, L.)；US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基”或“岩藻糖缺乏”抗体变体有关的公开文本的实例包括US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki等人, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 336: 1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人, Biotech. Bioeng. (生物技术和生物工程) 87:614 (2004)。能够产生脱除岩藻糖基的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺乏的Lec13CHO细胞(Ripka等人Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta, L; 及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其实施例11)；及基因敲除细胞系，例如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因、FUT8、基因敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人, Biotech. Bioeng. (生物技术和生物工程) 87:614 (2004)；Kanda, Y等人, Biotechnol. Bioeng. (生物技术和生物工程), 94 (4) :680-688 (2006)；及WO 2003/085107)。

[0218] 进一步提供具有平分型寡糖(biseected oligosaccharide)的抗体变体，例如其中与抗体的Fc区连接的双触角寡糖经GlcNAc平分。这些抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或提高的ADCC功能。这些抗体变体的实例例如于WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)；美国专利第6,602,684号 (Umana等人)；及US 2005/0123546 (Umana等人) 中描述。也提供在与Fc区连接的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这些抗体变体可具有提高的CDC功能。这些抗体变体于例如WO 1997/30087 (Patel等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及WO 1999/22764 (Raju, S.) 中描述。

[0219] c) Fc区变体

[0220] 在某些实施方案中，可在本文中所提供的抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生Fc区变体，以便增强例如抗体治疗涉及异常血管发生和/或血管通透性或渗漏的疾病或病症的有效性。Fc区变体可包含在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0221] 在某些实施方案中,本发明涵盖具有一些但非所有效应子功能的抗体变体,这使其成为某些应用的理想候选物,在所述应用中抗体的活体内半衰期是重要的,但某些效应子功能(例如补体及ADCC)是不必要或有害的。可进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/衰竭。举例来说,可进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保持FcRn结合能力。介导ADCC的初级细胞、NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII。FcR在造血细胞上的表达于Ravetch及Kinet,Annu.Rev.Immunol.(免疫学年度综述)9:457-492(1991)的第464页上的表3中总结。评定相关分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例于美国专利5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))及Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.(实验医学杂志)166:1351-1361(1987))中描述。或者,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA)及CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI))。适用于这些测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)及自然杀伤(NK)细胞。备选地或另外地,相关分子的ADCC活性可于体内评定,例如在例如Clynes等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中所揭示的动物模型中评定。也可进行C1q结合测定以证明抗体无法结合C1q且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中的C1q及C3c结合ELISA。为评定补体活化,可进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods(免疫学方法杂志)202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood(血液)101:1045-1052(2003);及Cragg,M.S.及M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可使用本领域中已知的方法进行FcRn结合及活体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.(国际免疫学)18(12):1759-1769(2006))。

[0222] 效应子功能降低的抗体包括Fc区残基238、265、269、270、297、327及329中一个或多个置换的那些抗体(美国专利6,737,056)。这些Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327的两个或两个以上位置处具有置换的Fc突变体,包括残基265和297置换为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0223] 描述某些与FcRs的结合提高或减少的抗体变体。(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,及Shields等人,J.Biol.Chem.(生物化学杂志)9(2):6591-6604(2001))。

[0224] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个提高ADCC的氨基酸置换的Fc区,例如在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处置换。

[0225] 在一些实施方案中,在Fc区中进行改变,其导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)改变(也即,通过提高或降低),例如如美国专利第6,194,551号、WO 99/51642和Idusogie等人,J.Immunol.(免疫学杂志)164:4178-4184(2000)中所述。

[0226] US2005/0014934A1(Hinto等人)中描述具有增加的半衰期及提高的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体,其中FcRn负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人J.Immunol.(免疫学杂志)117:587(1976)及Kim等人,J.Immunol.(免疫学杂志)24:249(1994))。那些抗体包含具有一或多个置换的Fc区,所述置换提高Fc区与FcRn的结合。这些Fc变体包括在Fc区残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、

382、413、424或434中的一或者者处具有置换(例如置换Fc区残基434)的那些Fc变体(美国专利第7,371,826号)。

[0227] 关于Fc区变体的其他实例,也参见Duncan及Winter,Nature(自然)322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号;及WO 94/29351。

[0228] d) 经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0229] 在某些实施方案中,可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体,例如“硫代MAb”,其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中,经置换的残基出现在抗体的可接近位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,反应性硫醇基团通过定位于抗体的可接近位点处且可用于将抗体结合至其他部分,例如药物部分或接头-药物部分,以产生如本文中进一步描述的免疫缀合物。在某些实施方案中,任一或多个以下残基可经半胱氨酸置换:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);及重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利第7,521,541号中所述,产生经半胱氨酸工程改造的抗体。

[0230] e) 抗体衍生物

[0231] 在某些实施方案中,本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括,但不限于,水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于,聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二噁烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。聚乙二醇丙醛因其在水中的稳定性可能具有制造优势。聚合物可具有任何分子量,且可有分支或无分支。与抗体连接的聚合物的数目可以变化,且若连接一种以上聚合物,则其可以是相同或不同分子。一般而言,用于衍生作用的聚合物数目和/或类型可以基于包括,但不限于,以下的考虑因素来确定:要提高的抗体的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的疗法等。

[0232] 在另一实施方案中,提供抗体与可通过暴露于辐射来选择性加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国科学院学报)102:11600-11605(2005))。该辐射可具有任何波长,且包括但不限于,不损伤普通细胞但能将非蛋白质部分加热至可杀死抗体-非蛋白质部分附近的细胞的温度的波长。

[0233] B, 重组方法和组合物

[0234] 抗体可以使用例如在美国专利号4,816,567中描述的重组方法和组合物产生。在一个实施方案中,提供了编码本文描述的抗HtrA1抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含其VH的氨基酸序列(例如抗体的轻链和/或重链)。在又一个实施方案中,提供了包含此类核酸的一个或多个载体(例如表达载体)。在又一个实施方案中,提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如,用下述各项转化):(1)包含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列,或(2)包含核酸的第一载体,所述核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列,和包含核酸的第二载体,所述核酸编码包含抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0,NS0,Sp20细胞)。在

一个实施方案中,提供了制备抗HtrA1抗体的方法,其中所述方法包括,在适合抗体表达的条件下,培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,如上文所提供的,和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

[0235] 为了重组产生抗HtrA1抗体,分离编码抗体(例如上文所描述的抗体)的核酸,并插入一个或多个载体,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行)。

[0236] 用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如,抗体可在细菌中产生,特别当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,见,例如,美国专利号5,648,237,5,789,199和5,840,523。(还见Charlton,分子生物学中的方法(Methods in Molecular Biology),卷248(B.K.C.Lo,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后,抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离,并且可以进一步纯化。

[0237] 除了原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括真菌和酵母菌株,其糖基化途径已经进行“人源化”,导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.(自然生物技术)22:1409-1414(2004),和Li等,Nat.Biotech.(自然生物技术)24:210-215(2006)。

[0238] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株,其可与昆虫细胞联合使用,特别是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0239] 还可利用植物细胞培养物作为宿主。见,例如,美国专利号5,959,177,6,040,498,6,420,548,7,125,978和6,417,429(其描述了在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIESTM技术)。

[0240] 也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如,可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,如例如Graham等,遗传病毒学杂志(J.Gen Virol.)36:59(1977)中所描述的);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4细胞,如例如在Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中描述的);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳瘤(MMT 060562);TRI细胞,如例如Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所描述的;MRC 5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等,美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)77:4216(1980));并且骨髓瘤细胞系如Y0,NS0和Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如Yazaki和Wu,在分子生物学中的方法(Methods in Molecular Biology),卷248(B.K.C.Lo,ed.,Human Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0241] C. 测定

[0242] 本文中提供的抗HtrA1抗体可以对其物理/化学特性和/或生物活性,通过本领域中已知的不同测定来识别、筛选或表征。

[0243] 1.结合测定和其他测定

[0244] 在一方面中,测试本发明的抗体的抗原结合活性,例如,通过已知方法如ELISA、蛋白印迹等。

[0245] 在另一方面中,竞争测定可以被用于鉴定与Fab94或IgG94竞争结合HtrA1的抗体。在某些实施方案中,这样的竞争性抗体结合与Fab94或IgG94结合的表位相同的表位(例如,线性或构象表位)。用于定位与抗体结合的表位的详细的示例性方法提供在Methods in Molecular Biology(分子生物学中的方法)vol.66(Humana Press, Totowa, NJ)中的Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols(表位定位实验方法)"中。

[0246] 在示例性竞争测定中,在溶液中温育固定的HtrA1,所述溶液包含与HtrA1结合的第一标记抗体(例如,Fab94或IgG94)和被测试其与所述第一抗体竞争结合HtrA1的能力的第二未标记抗体。所述第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在这样的溶液中温育固定的HtrA1,所述溶液包含第一标记抗体但是不包含第二未标记抗体。在允许所述第一抗体与HtrA1结合的条件下温育后,除去过量的未结合的抗体,并且测量与固定的HtrA1结合的标记的量。如果相对于对照样品在测试样品中与固定的HtrA1结合的标记的量显著降低,则说明所述第二抗体与所述第一抗体竞争结合HtrA1。参见Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual(抗体:实验室手册)ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0247] 2.活性测定

[0248] 在一方面中,提供用于鉴别具有生物学活性的抗HtrA1抗体的测定。生物学活性可以包括,例如,阻断、拮抗、抑制、干扰、调节和/或降低HtrA1的一种或多种生物学活性。还提供在体内和/或体外具有这样的生物学活性的抗体。

[0249] 在某些实施方案中,测试本发明的抗体的这种生物活性。在某些实施方案中,抗HtrA1抗体结合HtrA1并且降低或抑制其对一种或多种HtrA1底物的丝氨酸蛋白酶活性,所述HtrA1底物包括,例如,如在以下实施例中描述的H2-0pt肽、 β -酪蛋白或BODIPY FL酪蛋白底物、或任何其他适合的HtrA1底物。在某些实施方案中,抗HtrA1抗体抑制HtrA1丝氨酸蛋白酶活性,并且对于一种或多种HtrA1底物来说,IC₅₀低于50nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、3nM、2.5nM、2nM、1nM、或更低。在某些实施方案中,在眼部疾病模型如以下实施例中描述的恒定曝光小鼠模型中,抗HtrA1抗体保护光感受器细胞不被降解,保护外核层的厚度,或者保护视网膜电图功能活性。

[0250] D.免疫缀合物

[0251] 本发明也提供包含本文中的抗HtrA1抗体与一或多种细胞毒性剂,例如化疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素、细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)或放射性同位素缀合的免疫缀合物。

[0252] 在一实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括,但不限于,美坦生类化合物(参见美国专利第5,208,020号、第5,416,064号及欧洲专利EP 0 425 235 B1);奥利司他汀(aurantstatin),如单甲基奥利司他汀药物(monomethylauristatin)部分DE及DF(MMAE及MMAF)(参见美国专利第5,635,483号及第5,780,588号,及第7,498,298号);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116

号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号及第5,877,296号；Hinman等人,Cancer Res. (癌症研究) 53:3336-3342 (1993)；及Lode等人,Cancer Res. (癌症研究) 58:2925-2928 (1998)；蒽环类抗生素(anthracycline)如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(参见Kratz等人Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)；Jeffrey等人,Bioorganic&Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)；Torgov等人,Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)；Nagy等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国科学院学报) 97:829-834 (2000)；Dubowchik等人,Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)；King等人,J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)；及美国专利第6,630,579号)；甲氨喋呤(methotrexate)；长春地辛(vindesine)；紫杉烷(taxane)如多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、拉洛紫杉醇(larotaxel)、特赛紫杉醇(tesetaxel)及奥他紫杉醇(ortataxel)；单端孢霉烯族化合物(trichothecene)；及CC1065。

[0253] 在另一实施方案中,免疫缀合物包含如本文中所述的抗体与酶促活性毒素或其片段缀合,酶促活性毒素或其片段包括,但不限于,白喉(diphtheria)A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白(ricin)A链、相思豆毒蛋白(abrin)A链、蓖麻毒蛋白(modeccin)A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(Aleutites fordii)蛋白、香石竹毒蛋白(dianthin protein)、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(*sapaponaria officinalis*)抑制剂、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)。

[0254] 在另一实施方案中,免疫缀合物包含如本文中所述的抗体与放射性原子缀合形成放射性缀合物。多种放射性同位素可用于制备放射性缀合物。实例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu的放射性同位素。当使用放射性缀合物进行检测时,其可包含用于闪烁摄影研究的放射性原子,例如Tc^{99m}或I¹²³或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记物,如碘-123及碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0255] 抗体与细胞毒性剂的缀合物可使用多种双功能蛋白质偶合剂制得,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚氨基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸二甲基己二亚酰胺化物)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。举例来说,蓖麻毒蛋白免疫毒素可如Vitetta等人,Science (科学) 238:1098 (1987)中所述来制备。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于使放射性核苷酸与抗体结合的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。接头可以是促进细胞毒性药物在细胞中释放的“可裂解接头”。举例来说,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Res. (癌症研究) 52:127-131 (1992)；美国专利第5,208,020号)。

[0256] 本文中的免疫缀合物或ADCs明确涵盖,但不限于,用交联剂试剂制备的这些缀合

物,该等交联剂试剂包括,但不限于:BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代-EMCS、硫代-GMBS、硫代-KMUS、硫代-MBS、硫代-SIAB、硫代-SMCC及硫代-SMPB及SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯),交联剂试剂可商购获得(例如购自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.)。

[0257] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0258] 在某些实施方案中,本文中提供的任何抗HtrA1抗体可以用于检测HtrA1在生物样品中的存在。术语“检测”用于本文中时,包括定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包含细胞或组织,如包含光感受器细胞、视网膜色素上皮细胞、外核层的细胞、内核层、Muller细胞、睫状体上皮、或视网膜组织的样品。

[0259] 在一个实施方案中,提供用于诊断或检测方法的抗HtrA1抗体。在另一个方面中,提供检测HtrA1在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗HtrA1抗体在允许抗HtrA1抗体与HtrA1结合的条件下接触,并检测在抗HtrA1抗体和HtrA1之间是否形成复合物。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,抗HtrA1抗体被用于选择适合利用抗HtrA1抗体的治疗的受试者,例如其中HtrA1是用于选择患者的生物标记物。

[0260] 在某些实施方案中,通过检测在HtrA1基因或HtrA1控制序列中的一种或多种多态性,如HtrA1启动子多态性rs11200638(G/A),可以确认适于用抗HtrA1抗体治疗的病人(参见例如,A.DeWan等人,Science 314:989-992(2006))。

[0261] 可以使用本发明的抗体诊断的示例性疾病包括眼部病症,如,例如,湿性老年性黄斑变性(AMD)、干性老年性黄斑变性、地图状萎缩(GA)、糖尿病性视网膜病(DA)、早产儿视网膜病(ROP)、或息肉状脉络膜血管病(PCV)。

[0262] 在某些实施方案中,提供标记的抗HtrA1抗体。标记包括但不限于,被直接检测的标记或部分(如荧光标记,发色团标记,电子致密标记,化学发光标记,和放射性标记),以及被间接检测的部分,如酶或配体,例如,通过酶促反应或分子相互作用。示例性标记包括但不限于,放射性同位素³²P,¹⁴C,¹²⁵I,³H,和¹³¹I,荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明及其衍生物,丹酰(dansyl),伞形酮(umbelliferone),荧光素酶(luciferase),例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号4,737,456),荧光素(luciferin),2,3-二氢卟啉二酮,辣根过氧化物酶(HR),碱性磷酸酶,β-半乳糖苷酶,葡萄糖淀粉酶,溶解酶,糖类氧化酶,例如,葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,加上利用过氧化氢氧化染料前体的酶如HR,乳过氧化物酶,或微过氧化物酶(microperoxidase),生物素/亲和素,自旋标记,噬菌体标记,稳定的自由基,等等。

[0263] F. 药物制剂

[0264] 如本文所述的抗HtrA1抗体的药物制剂通过将具有所需纯度的所述抗体与一种或多种任选的药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,0sol, A. 编(1980))混合来制备,以冻干制剂或水溶液的形式。药用载体通常在所用剂量及浓度对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸及甲硫氨酸;防腐剂(如氯化十八烷基二甲基苄铵、氯化六羟季铵、氯苄烷铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血

清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他糖类，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖类，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐平衡离子，如钠；金属复合体（例如Zn-蛋白质复合体）；和/或非离子表面活性剂，如聚乙二醇（PEG）。本文中的示例性药用载体还包括药物间质分散剂，如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白（sHASEGP），例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白，如rHuPH20（HYLENEX[®] Baxter International, Inc.）。某些示例性sHASEGPs及使用方法，包括rHuPH20，描述于美国专利公开号2005/0260186及2006/0104968中。在一方面中，sHASEGP与一种或多种其他葡糖胺聚糖酶例如软骨素酶组合。

[0265] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958。水性抗体制剂包括美国专利号6,171,586和W02006/044908中所述的那些，后一种制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0266] 本文的制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。例如，为了治疗与不希望的新生血管形成（neovascularization）相关的眼部病症，如湿性AMD，理想的是还提供抗血管生成治疗，如抗VEGF治疗，比如LUCENTIS[™]（来尼珠单抗（ranibizumab））。这种活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。在其它实施方案中，与不希望的眼部新生血管形成相关的疾病或病症的治疗可以包括抗HtrA1抗体与光动力学治疗（photodynamic therapy）的组合（例如，与MACUGEN[™]或VISUDYNE[™]）。

[0267] 可以将活性成分截留于例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微囊，例如，分别是羟甲基纤维素或明胶微囊及聚-（甲基丙烯酸甲酯）微囊中、胶状药物传递系统（例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒及纳米胶囊）中或粗滴乳状液中。这些技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 0sol, A. 编 (1980) 中。

[0268] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

[0269] 欲用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以例如借助通过无菌过滤膜的过滤而轻易地实现。

[0270] G. 治疗方法和组合物

[0271] 任何本文提供的抗HtrA1抗体可以用于治疗方法。

[0272] 在某些实施方案中，抗HtrA1抗体可以用于抑制患有眼部病症或处于发生眼部病症的风险中的病人（例如，具有HtrA1多态性、在眼睛中的增加的HtrA1表达、或在至少一只眼睛中的玻璃疣的病人）的眼睛中视网膜细胞（如，例如，视网膜色素上皮（RPE）细胞）或光感受器细胞的变性。在某些实施方案中，在眼睛中具有玻璃疣、需要治疗的病人眼睛中，抗HtrA1抗体可以用于延缓向晚期地图状萎缩或干性老年性黄斑变性的发展。在某些实施方案中，通过检测病人的至少一只眼睛中疾病的发病，可以确认适于用抗HtrA1抗体治疗的病人。例如，某些病人可以通过检测一只眼睛中的玻璃疣、地图状萎缩、或脉络膜新生血管形成（choroidal neovascularization）来选择，而同时另一只眼睛是无症状的。对于无症状的眼睛中的预防性治疗来说此类病人可能是良好的候选者，例如，用来在无症状的眼睛中延缓发病或降低此类症状（例如，玻璃疣、地图状萎缩、和/或脉络膜新生血管形成）的严重性。备选地，根据在本文中所描述的方法，可以治疗有症状的眼睛，或者可以治疗有症状的

和无症状眼睛二者。因此,抗HtrA1抗体可以用于预防或抑制病人眼睛中眼部病症的发展,其中病人另一只眼睛中已经发展成为玻璃疣、湿性AMD、或地图状萎缩,但是被治疗的眼睛还没有症状。备选地,治疗有症状的眼睛,或者治疗有症状的和无症状眼睛二者。

[0273] 在另一个实施方案中,抗HtrA1抗体可以用于治疗关节炎。

[0274] 在一方面中,提供用作药物的抗HtrA1抗体。在进一步的方面中,提供用于治疗眼部疾病或病症(如,例如,AMD(湿性或干性)、GA、DR、PCV或ROP)的抗HtrA1抗体。在某些实施方案中,提供用于治疗方法中的抗HtrA1抗体。在某些实施方案中,本发明提供抗HtrA1抗体,所述抗HtrA1抗体用于治疗患有眼部疾病或病症的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗HtrA1抗体。在一个这种实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如以下所述的。在进一步的实施方案中,本发明提供抗HtrA1抗体,所述抗HtrA1抗体用于抑制病人眼睛中视网膜细胞(如,例如,RPE细胞)或光感受器细胞的变性。在某些实施方案中,本发明提供抗HtrA1抗体,所述抗HtrA1抗体用于抑制个体中视网膜或光感受器细胞的变性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗HtrA1抗体以抑制视网膜或光感受器细胞的变性。在进一步的实施方案中,本发明提供抗HtrA1抗体,所述抗HtrA1抗体用于抑制病人眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。在某些实施方案中,本发明提供抗HtrA1抗体,所述抗HtrA1抗体用于抑制个体眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗HtrA1抗体以抑制眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。根据任何以上实施方案的“个体”优选是人。在进一步的实施方案中,本发明提供抗HtrA1抗体,所述抗HtrA1抗体用于抑制需要其的病人中的PCV,例如,患有具有息肉状动脉瘤样扩张(polypl-like aneurysmal dilations)的脉络膜血管网络的病人。

[0275] 在其他方面中,本发明提供抗HtrA1抗体在生产或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗眼部病症,如,例如,AMD(湿性或干性)、GA、DR、PCV或ROP。在进一步的实施方案中,所述药物用于治疗眼部病症的方法,所述方法包括向患有眼部病症的个体施用有效量的所述药物。在一个这种实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如以下所述的。在进一步的实施方案中,所述药物用于抑制个体眼睛中视网膜细胞或光感受器细胞的降解。在进一步的实施方案中,所述药物用于抑制个体中视网膜细胞或光感受器细胞的变性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述药物以抑制个体中视网膜或光感受器细胞的变性。在进一步的实施方案中,所述药物用于抑制个体眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。在进一步的实施方案中,所述药物用于抑制个体眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述药物以抑制眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。根据任何以上实施方案的“个体”可以是人。

[0276] 在进一步的方面中,本发明提供用于治疗眼部病症的方法,如,例如,AMD(湿性或干性)、GA、DR、PCV或ROP。在一个实施方案中,所述方法包括向患有这种眼部病症的个体施用有效量的抗HtrA1抗体。在一个这种实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如以下所述的。根据任何以上实施方案的“个体”可以是人。

[0277] 在进一步的方面中,本发明提供用于抑制个体中视网膜或光感受器细胞的变性的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗HtrA1抗体以抑制个体中视网膜或光感受器细胞的变性。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0278] 在进一步的方面中,本发明提供用于抑制个体眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗HtrA1抗体以抑制个体眼睛中HtrA1丝氨酸蛋白酶活性。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0279] 可以借助通常用于评价眼内疾病的多种终点来测量使用抗HtrA1抗体治疗眼部病症的功效,如,例如,进行眼睛检查、测量眼内压、评估视力、测量裂隙灯压(slit lamp pressure)、评估眼内炎症、测量CNV的大小、测量CNV的渗漏(例如,通过荧光素血管造影术)、测量玻璃疣的量、测量玻璃疣的位置等。在某些实施方案中,例如,通过测量从基线至期望时间点的最佳矫正视力(BCVA)(例如,其中BCVA基于早期治疗糖尿病性视网膜病研究(ETDRS)视力表和在测试距离为4米处的评估),测量在期望的时间点相比于基线在视力中损失少于15个字母的受试者比例,测量在期望的时间点相比于基线在视力中得到大于或等于15个字的受试者比例,测量在期望的时间点具有等同于20/2000或更差的视力斯内伦(Snellen)的受试者比例,测量NEI视觉功能问卷,可以评估视觉损失。

[0280] 在另一方面中,本发明提供药物制剂,所述药物制剂包含任何本文提供的抗HtrA1抗体,例如,用于任何以上的治疗方法。在一个实施方案中,所述药物制剂包含任何本文提供的抗HtrA1抗体和药用载体。在另一个实施方案中,所述药物制剂包含任何本文提供的抗HtrA1抗体和至少一种另外的治疗剂,例如,如以下所描述的。

[0281] 在治疗中,本发明的抗体可以单独使用或与其他试剂组合使用。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂一起共同给药。在某些实施方案中,另外的治疗剂是适于治疗与眼睛中不希望的新生血管形成相关的眼部病症,如,例如,湿性AMD。适合的治疗药剂包括,例如,抗血管生成治疗,如抗VEGF治疗,比如LUCENTISTM(来尼珠单抗)。

[0282] 这样的以上所述的组合疗法包括组合给药(其中两种以上治疗剂被包含在相同或分开的制剂中),和分别给药,其中,本发明的抗体的给药可以发生在另外的治疗剂和/或佐剂的给药前、同时和/或之后。本发明的抗体还可以与光动力学治疗(例如,与MACUGENTM或VISUDYNETM)组合使用。

[0283] 本发明的抗体(以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药,包括肠胃外给药,肺内给药和鼻内给药,并且,如果局部治疗需要,病变内给药。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在示例性实施方案中,本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过玻璃体内注射给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定,可通过任何适合途径,例如通过注射,例如静脉内、玻璃体内或皮下注射给药。本文中涵盖各种用药时程,包括,但不限于,单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

[0284] 本发明的抗体将以与良好医疗实践相一致的方式配制、给药和施用。在该背景下考虑的因素包括待治疗的具体病症、待治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状态、病症的原因、递送试剂的位点、施药方法、施药时间安排、和医疗从业者已知的其他因素。所述抗体不需要,但任选地,与目前用于预防或治疗待讨论病症的一种或多种试剂一起配制。所述其他试剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、病症或治疗的类型、和以上讨论的其他因素。这些一般以相同剂量,并使用如本文中所述的施药途径,或以本文中所述的剂量的约1-99%,或以通过经验/临床确定合适的任意剂量和任何途径来使用。

[0285] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、

所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答,和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。根据疾病的类型和严重性,约1 μ g/kg-15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是用于向患者施用的最初候选剂量,无论,例如,通过一次或多次分别施药,或通过连续输注。一个典型的每日剂量可以在约1 μ g/kg-100mg/kg或更多的范围内,其取决于上文提及的因素。为了重复施用数目或更长,根据病症,通常将持续治疗直至出现疾病症状的理想抑制。所述抗体的一个示范性剂量应该在约0.05mg/kg-约10mg/kg范围内。因此,约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)的一个或多个剂量可以施用于患者。这样的剂量可以间隔地,例如每周或每三周施用(例如以使得患者接受约2-约20或例如约6剂量的所述抗体)。可以施用最初较高的负荷剂量,随后是一个或多个较低的剂量。

[0286] 要理解,任何以上制剂或治疗方法可以使用本发明的免疫缀合物进行以代替抗HtrA1抗体或作为抗HtrA1抗体的补充。

[0287] H. 制品

[0288] 在本发明的另一方面中,提供一种制品,所述制品包含可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的材料。该制品包括容器和在容器上或与容器一起的标签或包装说明书(package insert)。适合的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器、IV溶液包等。所述容器可以由各种材料诸如玻璃或塑料制成。容器装有组合物,所述组合物是单独地或与可有效用于治疗、预防和/或诊断所述病症的另一种组合物结合,对于所述疾患的治疗有效的组合物,并且可以具有无菌的存取口(例如,所述容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中至少一种活性试剂是本发明的抗体。标签或包装说明书标明该组合物是用于治疗特定的病症。此外,所述制品可以包含(a)其中包含组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)其中包含组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性剂或其他的治疗剂。本发明的该实施方案中的制品还可以包括包装说明书,所述包装说明书指明所述组合物可以用于治疗特定病症。备选地,或另外地,所述制品还可以包括第二(或第三)容器,所述第二(或第三)容器包含药用缓冲剂,如抑菌注射用水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,Ringer溶液和葡萄糖溶液。从商业和用户立场,它还可以包括所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤膜、针头和注射器。

[0289] 要理解,任何以上制品可以包括本发明的免疫缀合物以代替抗HtrA1抗体或作为抗HtrA1抗体的补充。

[0290] 序列关键字

[0291] 抗HtrA1抗体YW505.94的轻链HVR

[0292] HVR L1:RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:1)

[0293] HVR L2:SASFLLYS (SEQ ID NO:2)

[0294] HVR L3:QQSYTTPPT (SEQ ID NO:3)

[0295] 抗HtrA1抗体YW505.94的重链HVR

[0296] HVR H1:GFNISGYYIH (SEQ ID NO:4)

[0297] HVR H2:WIDPYGGDTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)

[0298] HVR H3:GTFLTSWGHYFDY (SEQ ID NO:6)

[0299] 抗HtrA1抗体YW505.94的轻链VR

[0300]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:7)

[0301] 抗HtrA1抗体YW505.94的重链VR

[0302]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISGYYIHWVROAPGKGLEWVGWIDPYGGDTNYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLOMNSLRAEDTAVYYCARGTFTSWGHYFDYWGQGT (SEQ ID NO:8)

[0303] 人HtrA1 (全长序列以大写字母表示,蛋白酶结构域以下划线表示,残基N224和K248以阴影表示)

[0304]

mqipraallpllllllaapasaQLSRAGRSAPLAAGCPDRCEPARCPPQPEHCEGGRARDACGCCE
VCGAPEGAAACGLQEGPCGEGLQCVVPFGVPASATVRRRAQAGLCVCASSEPVCGSDA
NTYANLCQLRAASRRSERLHRPPVIVLQRGACGQGQEDPNSLRHKYNFIADVVEKIAP
AVVHIELFRKLPSKREVPVASGSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHRVKVELKNGATYE
AKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLPVLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTT
QRGGKEGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSSGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKI
KKFLTESHDRQAKGKAITKKYIGIRMMSLTSSAKELKDRHDFPDVISGAYIIEVIPD
TPAEAGGLKENDVIISINGQSVVSANDVSDVIKRESTLNMVVRGNEDIMITVIPEEIDP
(SEQ ID NO:13)

[0305] 鼠HtrA1 (全长序列以大写字母表示,蛋白酶结构域以下划线表示)

[0306]

mqslrtt11s111111aaps1a1PSGTGRSAPAATVCPEHCDPTRCAPPTDCEGGRVRDAGCCEVCGA
LQEGPCGEGLQCVVPFGVPASATVRRRAQAGLCVCASSEPVCGSDAKTYTNLCQLRAASRRSEKLRQPPVIVLQRGA
CGQGQEDPNSLRHKYNFIADVVEKIAPAVVHIELYRKLPSKREVPVASGSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKNRKVE
LKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLPVLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQRGGKELG
LRNSDMDYIQTDAIINYGNSSGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDRQAKGKAVTKKKYIGI
RMMSLTSSAKELKDRHDFPDVLSGAYIIEVIPDTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVTANDVSDVIKKENTLNMV
RRGNEDIVITVIPEEIDP (SEQ ID NO:14)

[0307] 鼠HtrA3 (蛋白酶结构域以下划线表示)

[0308]

MQARALLPATLAILATLAVLALAREPPAAPCPARCDVSRCPSPRCPGGYVPDLCNCCLVCAASEGEPCGRPLDSPCG
DSLECVRGVCRCRWTHVCGTDGHTYADVCALQAASRRALQVSGTPVRQLQKGACPSGLHQLTSPRYKFNFIADVVE
KIAPAVVHIELFLRPLFGRNVPLSSGSGFIMSEAGLIVTNAHVSSSSTASGRQQLKVQLQNGDAYEATIQDIDKK
SDIATIVIHPKKKLPVLLGHSADLRPGEFVVAIGSPFALQNTVTTGIVSTAQRDGKELGLRDSDMDYIQTDAIINY
GNSSGPLVNLDGEVIGINTLKVAAGISFAIPSDRITRFLSEFQNKHVKDWKKRFIGIRMRTITPSLVEELKAANPDF
PAVSSGIYVQEVPNSPSQRGGIQDGDIIVKVNGRPLADSSELQEAVLNNESSLLLEVRRGNDDLLFSIIPEVVM
(SEQ ID NO:15)

[0309] 鼠HtrA4 (蛋白酶结构域以下划线表示)

[0310]

MSFQRLWAVRTQFLLWLLPAVPVPWAEARRSRVSLPCPDACDPTRCPTLPTCSAGLAPVPDRCGCCRVCAAECQ
ECGGARGRPCAPRLRCGAPFSRDPSSGAWLTCGCAEGAEDAVVCGSDGRTYPSLCALRKENRAARORGALPAVPVQ
KGACEEAGTTRAGRLRRKYNFIAAVVEKVAPSVHLQLFRRSPLTNQEIPSSSGSGFIVSEDGLIVTNAHVLTNQQK

IQVELQSGARYEATVKDIDHKLDLALIKIEPDTELPVLLGRSSDLRAGEFVVALGSPFSLQNTVTAGIVSTTQRGG
RELGLKNSDIDYIQTDAIINHGNSGGPLVNLDGDVIGINTLKVTAGISFAIPSDRIRQFLEDYHERQLKGKAPLQKK
YLGLRMLPLTLNLLQEMKRQDPEFPDVSSGVFVYEVIQGSAAASSGLRDHDIVSINGQPVTTTDVIEAVKDNDFL
SIIVLRGSQLFLTVTPEIIN (SEQ ID NO:16)

- [0311] YW505.95HC FR2
- [0312] WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:17)
- [0313] 抗HtrA1抗体YW505.94a.28的轻链HVR
- [0314] HVR L1:RASQSINTYLA (SEQ ID NO:18)
- [0315] HVR L2:SASFLYS (SEQ ID NO:2)
- [0316] HVR L3:QQSDDTPPT (SEQ ID NO:19)
- [0317] 抗HtrA1抗体YW505.94a.28的重链HVR
- [0318] HVR H1:GFSISGYYIH (SEQ ID NO:20)
- [0319] HVR H2:WIDPYGGDTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)
- [0320] HVR H3:GTFLTSWGHYFDY (SEQ ID NO:6)
- [0321] 抗HtrA1抗体YW505.94a.28的轻链VR
- [0322]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINTYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQSDDTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:28)

- [0323] 抗HtrA1抗体YW505.94a.28的重链VR
- [0324]
- EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFSISGYYIHWVRQAPGKGLEWVGWIDPYGGDTNYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFLTSWGHYFDYWGQGT (SEQ ID NO:29)
- [0325] 抗HtrA1抗体YW505.94a.54的轻链HVR
- [0326] HVR L1:RASQVVGNYLA (SEQ ID NO:21)
- [0327] HVR L2:SASFLYS (SEQ ID NO:2)
- [0328] HVR L3:QQSDDHPPT (SEQ ID NO:22)
- [0329] 抗HtrA1抗体YW505.94a.54的重链HVR
- [0330] HVR H1:GFSISGYYIH (SEQ ID NO:20)
- [0331] HVR H2:WIDPYGGDTNYADSVKG (SEQ ID NO:5)
- [0332] HVR H3:GTFLTSWGHYFDY (SEQ ID NO:6)
- [0333] 抗HtrA1抗体YW505.94a.54的轻链VR
- [0334]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVVGNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQSDDHPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:30)

- [0335] 抗HtrA1抗体YW505.94a.54的重链VR
- [0336]
- EVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFSISGYYIHWVRQAPGKGLEWVGWIDPYGGDTNYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFLTSWGHYFDYWGQGT (SEQ ID NO:29)
- [0337] 轻链HVR共有序列

[0338] HVR L1:RASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fA, 其中X_a是D、S或V; X_b是V或I; X_c是S、N或G; X_d是T或N; X_e是A或Y; 并且X_f是V或L (SEQ ID NO:23) ;

[0339] HVR L2:SASFLYS (SEQ ID NO:2)

[0340] HVR L3:QQX_gX_hX_iX_jPX_kT, 其中X_g是S、V或D; X_h是Y、D或S; X_i是T、S、A、D或N; X_j是T、H、N、S、A、L或R; 并且X_k是P、T、A或S (SEQ ID NO:24) ;

[0341] 重链HVR共有序列

[0342] HVR H1:GFX₁IX_mX_nYYIH, 其中X₁是N、S或T; X_m是S、D、Y或A; 并且X_n是G或D (SEQ ID NO:25) ;

[0343] HVR H2:WIDPYGGDTX_oYADSVKG, 其中X_o是N或D (SEQ ID NO:26) ;

[0344] HVR H3:GTFLTX_pWGHYFDY, 其中X_p是S或T (SEQ ID NO:27) 。

[0345] 共有轻链VR

[0346]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQX_gX_hX_iX_jPX_kTFGQGTKVEIKR,

[0347] 其中X_a是D、S或V; X_b是V或I; X_c是S、N或G; X_d是T或N; X_e是A或Y; X_f是V或L; X_g是S、V或D; X_h是Y、D或S; X_i是T、S、A、D或N; X_j是T、H、N、S、A、L或R; 并且X_k是P、T、A或S; (SEQ ID NO:31)

[0348] 共有重链VR

[0349]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFX₁IX_mX_nYYIH WVRQAPGKGLEWVG WIDPYGGDTX_oYADSVKGRFTISADT
SKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGTFLTX_pWGHYFDYWGQGT, 其中X₁是N、S或T; X_m是S、D、Y或A; X_n是G或D; X_o是N或D; 并且X_p是S或T (SEQ ID NO:32)

[0350] YW505.94a51 HVR L1:RASQDVGTyla (SEQ ID NO:33)

[0351] YW505.94a.1 HVR L3:QQVYSHPPT (SEQ ID NO:34)

[0352] YW505.94a.7 HVR L3:QQSYTNPPT (SEQ ID NO:35)

[0353] YW505.94a.22 HVR L3:QQSYATPTT (SEQ ID NO:36)

[0354] YW505.94a.37 HVR L3:QQSYSSPAT (SEQ ID NO:37)

[0355] YW505.94a.39 HVR L3:QQVYTTPPT (SEQ ID NO:38)

[0356] YW505.94a.40 HVR L3:QQVYATPST (SEQ ID NO:39)

[0357] YW505.94a.42 HVR L3:QQSYNSPAT (SEQ ID NO:40)

[0358] YW505.94a.46 HVR L3:QQSYSTPAT (SEQ ID NO:41)

[0359] YW505.94a.50 HVR L3:QQSYTAPTT (SEQ ID NO:42)

[0360] YW505.94a.51 HVR L3:QQDSTLPPT (SEQ ID NO:43)

[0361] YW505.94a.52 HVR L3:QQSDAAPPT (SEQ ID NO:44)

[0362] YW505.94a.78 HVR L3:QQSYSTPPT (SEQ ID NO:45)

[0363] YW505.94a.89 HVR L3:QQSYTRPPT (SEQ ID NO:46)

[0364] YW505.94a.7 HVR H1:GFSISDYYIH (SEQ ID NO:47)

[0365] YW505.94a.26 HVR H1:GFSIDGYYIH (SEQ ID NO:48)

[0366] YW505.94a.38 HVR H1:GFTIYDYYIH (SEQ ID NO:49)

[0367] YW505.94a.78 HVR H1:GFSIAGYYIH (SEQ ID NO:50)

[0368] YW505.94a.82 HVR H1:GFTISDYYIH (SEQ ID NO:51)

[0369] YW505.94A.42 HVR H2:WIDPYGGDTDYADSVKG (SEQ ID NO:52)

[0370] YW505.94A.46 HVR H3:GTFLTTWGHYFDY (SEQ ID NO:53)

[0371] 表A.抗HtrA1 YW505.94抗体及其亲合力提高的变体的HVR和可变结构域序列。

[0372]

	SEQ ID NOs							
	H1	H2	H3	L1	L2	L3	HC VR	LC VR
共有序列	25	26	27	23	2	24	32	31
YW505.94	4	5	6	1	2	3	8	7
YW505.94a	20	5	6	1	2	3	29	7
YW505.94a.28	20	5	6	18	2	19	29	28
YW505.94a.54	20	5	6	21	2	22	29	30
YW505.94a.1	20	5	6	1	2	34		
YW505.94a.7	47	5	6	1	2	35		
YW505.94a.22	20	5	6	1	2	36		
YW505.94a.26	48	5	6	1	2	3		
YW505.94a.37	47	5	6	1	2	37		
YW505.94a.38	49	5	6	1	2	3		
YW505.94a.39	20	5	6	1	2	38		
YW505.94a.40	20	5	6	1	2	39		
YW505.94a.42	20	52	6	1	2	40		
YW505.94a.46	20	5	53	1	2	41		
YW505.94a.47	20	52	6	1	2	3		
YW505.94a.50	47	5	6	1	2	42		
YW505.94a.51	20	5	6	33	2	43		
YW505.94a.52	20	5	6	1	2	44		
YW505.94a.77	20	5	53	1	2	3		
YW505.94a.78	50	5	6	1	2	45		
YW505.94a.82	51	5	6	1	2	3		
YW505.94a.89	20	52	6	1	2	46		

III. 实施例

[0373] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。要理解,根据以上提供的一般性描述,可以实施多种其他实施方案。

[0374] 实施例1:抗HtrA1抗体的产生

[0375] 噬菌体展示。合成抗体文库在M13噬菌体上展示了二价Fab片段,并且在重链的三个互补决定区(CDR)中通过使用寡核苷酸定向诱变产生多样性。先前描述了Fab文库的细节(Lee,C.V.等人,J Mol Biol.340:1073-93(2004);Lee,C.V.等人,JImmunol Methods.284:119-32(2004))。Nunc 96孔Maxisorp免疫板在4°C用MuHtrA1_PD(10μg/ml)包被过夜,并且之后用噬菌体封闭缓冲液(PBS、1% (w/v) BSA、0.05% (v/v) Tween 20)在室温封闭1h。将抗体噬菌体文库加入至MuHtrA1_PD包被的平板并在室温下温育过夜。用PBS、0.05% (v/v) Tween-20缓冲液洗涤平板,并且用50mM HC1-500mM NaCl洗脱结合的噬菌体30分钟,并且用等体积的1M Tris-HCl、pH 7.5中和。回收的噬菌体在大肠杆菌(E.coli)XL-1blue细胞中扩增。在随后的选择轮次中,抗体噬菌体与抗原包被的平板的温育降至2-3小时,板洗涤的严格性逐渐升高。将13种鉴别的克隆转型为IgG(如以下所述用于Fab94的),在293细胞中表达并且通过蛋白A亲和层析纯化。13种纯化的IgG在结合ELISA中结合至MuHtrA1_PD。

[0376] 抗HtrA1 Fab94和IgG94表达与纯化。将Fab94(YW505.94)的重链和轻链二者的可

变区亚克隆至大肠杆菌Fab表达载体(AEP1)中。将得到的质粒转化至大肠杆菌菌株34B8中。将单菌落在补充有50 μ g/ml的羧苄青霉素(Carbenicillin)的30ml LB培养基中在37℃下过夜生长。将5ml的培养物接种至500ml的补充有羧苄青霉素(50 μ g/ml)的完全C.R.A.P.培养基中(Simmons, L.C.等人, J Immunol Methods. 263:133-47 (2002))并且在30℃下生长24h。使用蛋白A琼脂糖树脂纯化Fab94蛋白。

[0377] 将Fab94的轻链和重链二者的可变结构域克隆至用于在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中瞬时表达的具有人轻链或重链(人IgG1)恒定结构域的基于pRK5的质粒。通过使用蛋白A琼脂糖层析纯化IgG94蛋白。

[0378] 在图1A和1B中分别示出了Fab94 (YW505.94) 的轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列。

[0379] 实施例2:HtrA1蛋白的制备

[0380] 蛋白构建体。通过PCR扩增使用Taq聚合酶由全长克隆来克隆全长人HtrA1 (HuHtrA1) (Q23-P480) 和全长鼠HtrA1 (MuHtrA1) (P24-P480)。引物含有将限制性位点BamHI 和EcoRI的部分加入至得到的PCR产物所需的核苷酸。将PCR片段连接至在BamHI限制性位点的上游含有His6序列 (SEQ ID NO:90) 的改性pAcGP67杆状病毒转移载体(BD Pharmingen)中,得到在HtrA1蛋白上的N端His6标签 (SEQ ID NO:90)。

[0381] 通过PCR扩增克隆缺少N结构域和PDZ结构域的人HtrA1 (HtrA1_PD) 的蛋白酶结构域(例如,含有残基D161-K379)。将扩增的DNA插入至改性的pET载体中,得到N端His6标签 (SEQ ID NO:90),并且在HtrA1的D161密码子的上游融合凝血酶酶切位点。根据制造商规程,使用QuikChange XL位点定向诱变试剂盒产生HtrA1_PD Ala突变体(Agilent Technologies, Santa Clara CA)。通过DNA测序确认构建体。使用Pfu (Agilent) 聚合酶由全长克隆来克隆鼠HtrA1 (MuHtrA1_PD) (G156-S367)、鼠HtrA3 (MuHtrA3_PD) (P133-F350) 和鼠HtrA4 (MuHtrA4_PD) (E159-Y371) 的蛋白酶结构域。引物含有将限制性位点Not I和Stu I加入至得到的PCR产物所需的核苷酸。将PCR片段连接至具有phoA启动子的表达载体的pST23中。这种表达载体在Not I限制性位点的上游含有氨基酸序列MK (HQ) 6MHQSTAA (SEQ ID NO: 11),导致unizyme标签向蛋白酶结构域的N端融合。

[0382] 如在本文中所描述的,分别参照SEQ ID NO:13-16制备huHtrA1、muHtrA1、muHtrA3、和muHtrA4的氨基酸残基。氨基酸位点指定为:单字母氨基酸代码,随后是其在SEQ ID NO:13-16中的一个内的位置。例如,全长huHtrA1包含以在SEQ ID NO:13的位置23的谷氨酰胺起始并且以在SEQ ID NO:13的位置480的脯氨酸结束的序列,例如,Q23-P480。类似地,在HtrA蛋白内特定位置的突变表示为:初始氨基酸、其后是在SEQ ID NO:13-16中的一个内的位置、其后是置换的氨基酸。例如,在HuHtrA1 (SEQ ID NO:13) 的位置248的赖氨酸突变为丙氨酸被称为K248A。

[0383] 蛋白表达与纯化。在粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)昆虫细胞中表达HuHtrA1和MuHtrA1 (Expression Systems LLC, Woodland, CA)。收获的昆虫细胞培养基(在将pH调节至6.8后)具有分别加入为1.0、2.5和150mM的最终浓度的NiCl₂、CaCl₂、和NaCl。

[0384] 在大肠杆菌BL21 (Stratagene) 中表达HuHtrA1_PD构建体(野生型和S328A突变体)。使大肠杆菌培养物在37℃下在含有50 μ g/ml羧苄青霉素的LB培养基中生长,直到A₆₀₀达到0.8至1.0为止,并且之后用0.4mM IPTG诱导并在16℃下生长24h。将细菌细胞粒料在1/10th

培养物体积的50mM Tris pH 8.0、500mM NaCl中重悬，并且使用微流体化机(Microfluidizer)破裂。将裂解物在30,000xg下离心30分钟。

[0385] 使用镍氨基三乙酸(nickel-nitrilo-triacetic acid)树脂(Qiagen)纯化HuHtrA1、MuHtrA1、HuHtrA1_PD和HuHtrA1_PD(S328A)。在负载昆虫细胞培养基或大肠杆菌裂解物后，用10柱体积(CV)的50mM Tris pH 8.0、500mM NaCl洗涤柱，接着用10CV的50mM Tris pH 8.0、1M NaCl、20mM咪唑洗涤柱。用50mM Tris pH 8.0、200mM NaCl、10%甘油、0.25%CHAPS、300mM咪唑洗脱蛋白。通过在S-200柱(GE Healthcare)上的尺寸排阻层析进一步纯化汇集的级分，并且收集对应于三聚体蛋白形式的峰级分。如通过SDS-PAGE评估的，蛋白纯度大于90%，并且使用BCATM蛋白测定来确定蛋白浓度(Pierce, Rockford, IL)。

[0386] 将HuHtrA1_PD Ala突变体(除S328A外的15个突变体的组)表示为对于HuHtrA1_PD的野生型形式所描述的(参见以上)。以50ml裂解缓冲液/500ml粒料，将裂解缓冲液(PopCulture, EMD Chemical, San Diego CA)加入至细菌细胞粒料中。用polytron将粒料完全悬浮在裂解缓冲液中并且在室温下搅拌30分钟。将细胞裂解物在33,700xg下在4℃离心(Beckman, LA-16.250旋转器)30分钟，并且将得到的上清液经由0.22μm过滤器单元(Nalgene)过滤。将过滤的上清液加样至用50mM Tris、300mM NaCl、10mM咪唑、10%甘油pH 8.0(缓冲液A)预平衡的Ni-NTA柱(3ml, Qiagen)上。一旦加样，用12CV的缓冲液A洗涤柱，接着用20CV的缓冲液A+0.1%Triton X-114洗涤柱。再次用15CV的缓冲液A洗涤柱以移除洗涤剂。用缓冲液A+200mM咪唑、0.25%CHAPS洗脱蛋白。利用通过50mM Tris pH 8.0、200mM NaCl、10%甘油、0.25%CHAPS平衡的Superdex 200(Hi load 16/60, 120ml, GE Healthcare)进一步纯化汇集的级分。汇集对应于HtrA1_PD三聚体峰的级分。如通过SDS-PAGE评估的，蛋白纯度大于90%，并且使用BCATM蛋白测定来确定蛋白浓度(Pierce, Rockford, IL)。

[0387] 在大肠杆菌58F3中表达MuHtrA1_PD、MuHtrA3_PD和MuHtrA4_PD(Szeto, W.等人, Cancer Res. 61: 4197-205 (2001))。将在30℃下在含有50μg/ml羧苄青霉素的LB培养基中过夜生长的大肠杆菌培养物稀释(1/100体积)至更大的含有培养物的补充有50μg/ml羧苄青霉素的C.R.A.P.培养基(Simmons, L.C.等人, J Immunol Methods. 263: 133-47 (2002))中。在接种后，使大肠杆菌下30℃下生长约20h。按照对于HuHtrA1_PD所描述的，纯化MuHtrA1_PD(参见以上)。为了纯化MuHtrA3_PD和MuHtrA4_PD，将裂解缓冲液(50mM Tris pH 8.5、500mM NaCl、10mM咪唑、10%甘油)加入至细菌细胞粒料。用polytron将粒料在裂解缓冲液中均化，并且用微流体化机将细胞破裂。将细胞裂解物离心并且将得到的上清液经由0.22μm过滤器单元(Nalgene)过滤。将过滤的上清液加样至用25mM Tris pH 8.5、500mM NaCl、20mM咪唑、10%甘油(缓冲液B)预平衡的3ml Ni-NTA柱(Qiagen)上。在加样后，用12CV的缓冲液B洗涤柱，接着用20CV的缓冲液B+0.1%Triton X-114洗涤柱。再次用15CV的缓冲液B洗涤柱以移除洗涤剂。用25mM Tris pH 8.5、500mM NaCl、250mM咪唑、10%甘油、0.25%CHAPS洗脱蛋白。在用25mM Tris pH 8.5、10%甘油、0.5mM TCEP、0.25%CHAPS平衡的120ml Superdex 75(GE Healthcare)上进一步纯化汇集的级分。汇集对应于蛋白酶三聚体峰的级分。如通过SDS-PAGE评估的，蛋白纯度大于90%。

[0388] 实施例3：使用FRET测定的抗HtrA1抗体的抑制活性的确定

[0389] 肽底物的合成。肽H2-Opt(Mca-IRRVSYSF(Dnp)KK) (SEQ ID NO:12)，最初描述为用

于HtrA2的底物 (Martins, L.M. 等人, J Biol Chem. 278:49417-27 (2003)) , 使用借助HBTU的标准偶联过程在Fmoc-Lys (Boc) -王树脂 (wang resin) 上合成。Fmoc-Lys (DNP) -OH (Anaspec) 结合在P5' 位置。将肽合成多至P5 (Mca, 7-甲氧基-香豆素, Aldrich) , 并且之后使用三氟乙酸、三异丙基硅烷和水在室温下在2小时内从固体载体切除。使肽从乙醚中沉淀, 用乙酸、乙腈、水萃取, 并且冻干。溶解粗标记的肽并且在制备反相C18柱上使用乙腈/水纯化。汇集、冻干被纯化的级分并分析通过液相色谱法/质谱法 (PE/Sciex) 分析, 并且发现与它们的计算出的质量一致。

[0390] 与肽底物的酶测定。用在50mM Tris-HCl、pH 8.0、200mM NaCl、0.25%CHAPS (测定缓冲液) 中连续稀释的IgG94或Fab94将HtrA1在96孔黑色光学底平板 (Nalge Nunc Int., Rochester, NY) 中在37°C温育20分钟。为了初始测试一组13种噬菌体来源的抗HtrA1抗体, 用HuHtrA1或HuHtrA1_PD温育单一浓度的IgG (最终浓度0.16mg/ml-0.28mg/ml)。将10mM肽底物Mca-IRRVSYSF (Dnp) KK (SEQ ID NO:12) (H2-0pt) 的储备溶液在水中稀释为12.5μM, 在37°C下预热, 并且之后加入至反应混合物中。反应物的最终浓度是: 5nM HuHtrA1或MuHtrA1、0.005-300nM IgG94、0.02-900nM Fab94、2.5μM H2-0pt。在SPECTRAmax M5微孔板读数器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上测量荧光信号的增加 (激发328nm, 发射393nm) , 并且确定H2-0pt裂解的线性速率 (mRFU/分钟)。除了最终酶浓度是1nM、IgG94浓度是300nM并且温育时间是15分钟之外, 相同地进行利用胰蛋白酶 (Roche) 和弹性蛋白酶 (MP Biomedicals) 的IgG94抑制的实验。

[0391] 如在图2中所示, 用HuHtrA1或HuHtrA1_PD温育一组13种噬菌体来源的抗体 (IgG) 并且测量酶活性。在测试的13种抗体中, 抗体YW503.57、YW504.57、YW504.61和YW505.94 (也被称为Fab94、抗体94、Ab94或IgG94) 同时强烈地抑制HuHtrA1活性和HuHtrA1_PD活性二者。

[0392] 如在图3中所示, IgG94以浓度依赖性的方式以IC₅₀值为1.8nM抑制HuHtrA1针对H20pt底物的酶活性。30nM以上的IgG94实现了完全抑制。相比之下, 胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶家族的两个其他成员, 胰蛋白酶和弹性蛋白酶, 不被在300nM的IgG94抑制, 表明IgG94具有针对HuHtrA1的特异性。Fab94也以浓度依赖性的方式抑制HuHtrA1, 但是, 如通过29.1nM的IC₅₀值指出的, 没有IgG94强烈。这些结果出色地符合通过表面等离子共振实验确定的31.1nM的K_D值 (参见以下表1)。结果显示, IgG94和Fab94能够完全抵消HuHtrA1针对小合成肽底物的酶活性, 并且这种活性是特异性的。此外, 基于质量分析, IgG94相对于Fab94的约16倍的效力的增加与根据‘笼子状’ IgG94:HtrA1复合物预测的亲抗原性效应一致 (参见例如, 表2和图9)。

[0393] 使用上述测定, 利用荧光猝灭的肽底物H20pt和1.0nM的HuHtrA1或1.5nM的HuHtrA1_PD, 还确定了亲合力提高的变体抗体YW505.94a.28的抑制效力。以下示出了结果。

[0394]	YW505.94a.28 形式	HuHtrA1_PD IC ₅₀ nM	HuHtrA1 IC ₅₀ nM
	IgG	0.229	0.335
	Fab	2.03	1.95

[0395] 实施例4: 使用大分子底物的抗HtrA1抗体的抑制活性的测定

[0396] 在MonoQ离子交换柱上将牛β-酪蛋白 (Sigma-Aldrich) 再纯化以生产高度纯化的材料。将HuHtrA1连同测定缓冲液中浓度渐增的IgG94在Eppendorf管中在37°C下温育15分

钟,之后加入大分子底物。对于 β -酪蛋白消化来说,反应物的最终浓度是:10nM HuHtrA1、50 μ g/ml β -酪蛋白、2.3-150nM IgG94。对于饰胶蛋白聚糖来说,最终浓度是:125nM HuHtrA1、50 μ g/ml 饰胶蛋白聚糖(R&D Systems)、2-125nM IgG94。对于双糖链蛋白聚糖来说,最终浓度是:75nM HuHtrA1、50 μ g/ml 双糖链蛋白聚糖(R&D Systems)、2.3-150nM IgG94。在37°C下温育后(对于 β -酪蛋白来说2h,对于饰胶蛋白聚糖来说14h,对于双糖链蛋白聚糖来说6h),加入SDS样品缓冲液,并且将样品煮沸并通过SDS-PAGE分析(非还原)。

[0397] 在96孔黑色光学底平板(Nalge Nunc Int., Rochester, NY)中进行萤光染料标记的酪蛋白、BODIPY FL酪蛋白(Invitrogen)的水解。用在测定缓冲液中连续稀释的IgG94将HuHtrA1或MuHtrA1在37°C下温育15分钟。在测定缓冲液中加入BODIPY FL后,反应物浓度如下:30nM HuHtrA1、30nM MuHtrA1、5 μ g/ml BODIPY FL、0.24-250nM IgG94。在SPECTRAmax M5微孔板读数器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上测量荧光信号的增加(激发484nm,发射535nm),并且确定BODIPY FL裂解的线性速率(mRFU/分钟)并表示为未抑制的速率的百分数(%对照)。

[0398] 如在图6中所示,HuHtrA1降解大分子底物 β -酪蛋白、饰胶蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖(第2道)。在缺乏HuHtrA1的情况下,底物在实验期间保持完整(图6,第1道)。利用浓度渐增的IgG94的HuHtrA1的预温育(图6,第3道-第3道)引起底物降解的浓度依赖性抑制。在测试的最高IgG94浓度下,完全防止了 β -酪蛋白、饰胶蛋白聚糖和双糖链蛋白聚糖的降解(图6,第3道)。结果显示,IgG94强烈地并且有效地抑制HuHtrA1针对三种大分子底物的活性。

[0399] 如在图4中所示,通过分别具有8.3nM和5.4nM的IC₅₀值的HuHtrA1和MuHtrA1二者,IgG94浓度依赖性地抑制BODIPY FL水解。结果显示,IgG94识别并且完全抵消HuHtrA1和MuHtrA1二者针对大分子底物BODIPY FL的酶活性。

[0400] 实施例5:抗HtrA1抗体对HtrA1的特异性的测定

[0401] 通过测量与其抑制结构相关的蛋白酶MuHtrA3_PD和MuHtrA4_PD的能力相比较的其抑制muHtrA1_PD的活性,评估IgG94的特异性(参见图5)。除了MuHtrA1_PD、MuHtrA3_PD和MuHtrA4_PD的浓度分别为6nM、20nM和20nM并且IgG94的浓度范围为0.2-400nM之外,使用如以上在实施例3中描述的FRET测定来确定特异性。除了MuHtrA1_PD、MuHtrA3_PD和MuHtrA4_PD的浓度为50nM并且IgG94的浓度范围为1.4-1000nM之外,还使用如以上在实施例4中描述的BODIPY FL酪蛋白底物分析特异性。IgG94抑制H2-0pt(图5,上图)和BODIPY FL(图5,下图)的MuHtrA1_PD裂解,但是不通过多至400nM和1000nM(分别对于H2-0pt和BODIPY FL底物来说)的浓度的MuHtrA3_PD和MuHtrA4_PD抑制相同底物的裂解。结果暗示,IgG94具有优异的特异性和不损害相关蛋白酶的活性。

[0402] 实施例6:借助BIAcore的抗体亲合力的确定

[0403] 为了通过单周期动力学确定Fab94的结合亲和力,使用借助BIAcoreTMT100仪器的表面等离子共振(SRP)测量。简而言之,根据供应商的说明书用EDC和NHS试剂激活S系列传感器芯片CM5,并且偶联链霉亲和素(Pierce)以实现约2000个应答单位(RU),接着用1M乙醇胺阻断未反应的基团。

[0404] 对于动力学测量来说,首先以10 μ l/分钟的流速注射生物素化的HuHtrA1_PD或MuHtrA1_PD以在除FC1(参照池)外的3个不同的流动池(FC)捕获约100RU,并且之后注射(流

速:30 μ l/分钟)在0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、0.005%表面活性剂P20中的Fab94 (0.48nM-300nM)的5倍连续稀释液,而且在注射之间没有再生。记录传感图并且在去除参照池信号后通过BIAcoreTMT100评价软件(2.0版本)评价。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。以比率 k_{off}/k_{on} 计算平衡解离常数(K_D) (参见以下表1)。Fab94对HuHtrA1_PD和MuHtrA1_PD的结合动力学非常相似。 K_D 值分别为31.1nM和28.9nM。

[0405] 表1. 借助Fab94对HuHtrA1_PD和MuHtrA1_PD的结合亲合力。

[0406]

	k_{on} (10^5 M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (10^4 s ⁻¹)	K_D (nM)
HuHtrA1_PD	3.5	109.0	31.1
MuHtrA1_PD	4.5	129.0	28.9

[0407] 实施例7:对HuHtrA1_PD上IgG94的表位作图

[0408] 为了确定IgG94的功能结合表位,产生一组具有单个丙氨酸突变的HuHtrA1_PD突变体用于结合实验。大多数突变的残基位于活性位点周围的表面环上,并且还包括催化性的丝氨酸(S328)和天冬酰胺(D250)。突变体在大肠杆菌中表达并且通过如在实施例2中描述的尺寸排阻层析来纯化三聚体。使用ELISA测定来确定结合,ELISA测定使用包被有2 μ g/ml的HuHtrA1_PD突变体的MAXISORPTM微量滴定板在PBS中进行1h,接着用PBST缓冲液(在PBS中的0.5% BSA和0.05% Tween 20)在室温下阻断1h。加入在PBST缓冲液中5倍连续稀释的Ig94(50nM至0.0006nM)并且温育30分钟。用PBT缓冲液(在PBS中的0.05% Tween 20)洗涤平板,加入(在PBST缓冲液中1:5000)HRP缀合的羊抗人IgG(H+L)(Invitrogen)并且温育1h。用PBT缓冲液洗涤平板,并且通过加入四甲基联苯胺底物(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)显影。对在450nm的吸光度作图作为溶液中抗体浓度的函数以确定EC₅₀值。然后将进行结合的突变体的位置定位至HtrA1的结构上。

[0409] 在结合ELISA中,IgG94显示出与突变体HuHtrA1_PD(N224A)和HuHtrA1_PD(K248A)的结合的最大的降低(参见图7A)。在使用较低浓度的HtrA1以包被平板(1 μ g/ml)和缩短的温育时间(从1小时降低至20分钟温育)重复实验时,IgG94还显示出与HuHtrA1突变体V201A、H220A、T223A、K225A、K243A和E247A的结合的至少5倍的降低(参见图7A)。结果表明,IgG94结合包含位于B环和C环上的残基N224和K248的表位(参见图7B和7C)。在胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶中,已知这些环是与底物相互作用的特异性决定区的一部分。K248(环C)非常接近催化性的D250和N224以催化H220。因此,如对于抵消也识别C环中残基的抗HGFA抗体而发现的,IgG94与这些残基的结合可以通过直接的空间位阻或者通过间接的变构机制损害底物进入催化裂隙(Ganesan, R. 等人, Structure 17:1614-1624 (2009); Wu, Y. 等人, Proc Natl Acad Sci USA 104:19784-9 (2007))。备选地,抗体结合可以通过直接影响催化三联体残基D250和/或H220来抑制催化。

[0410] 实施例8:通过尺寸排阻层析多角度光散射(SEC-MALLS)的HtrA1_PD与Fab94和IgG94的复合物的化学计量

[0411] 催化性地非活性形式HuHtrA1_PD(S328A)用于复合物形成。在Tris缓冲液(50mM Tris-HCl、pH 8.0、200mM NaCl、10%甘油、0.25%CHAPS)中形成Fab94:HuHtrA1_PD(S328A)

和IgG94:HuHtrA1_PD (S328A) 复合物。复合物和个体组分在4°C下单独温育过夜,并且之后注射并在S200Superdex10/300GL柱(GE Healthcare) 上在流速为0.5mL/分钟的Tris缓冲液中解析。利用来自Wyatt Technologies的18角度光散射检测器(具有QELS的Dawn Helios II) 和折射率检测器(Optilab reX) 收集数据。用Astra 5软件完成分析以产生独立于洗脱时间的摩尔质量。用对照IgG进行归一化。

[0412] SEC-MALLS实验显示,Fab94和IgG94与HuHtrA1_PD (S328A) 形成具有不同质量的复合物。表2中示出了复合物的确定的质量和推导出的化学计量。

[0413] 表2. 通过SEC-MALLS确定在与Fab94和IgG94的复合物中的HuHtrA1_PD (S328A) 的化学计量。

[0414]

组分 [*]	由MALLS得到的质量 ^{**} (Da)	最佳拟合的化学计量 ^{&}	预期质量(Da)	质量差(%)
HtrA1_PD	76,755	--	--	--
Fab94	47,400	--	--	--
IgG94	151,200	--	--	--
Fab94:HtrA1_PD	210,100	3:1	218,955	4.2
IgG94:HtrA1_PD	618,600	3:2	607,110	1.9

[0415] *HuHtrA1_PD是催化性的丝氨酸突变为丙氨酸的HuHtrA1_PD (HuHtrA1_PD (S328A)) ;质量代表三聚体

[0416] **两个独立实验的平均值

[0417] [&]抗体:蛋白酶三聚体的比例

[0418] 210,100Da的Fab94:HtrA1_PD (S328A) 复合物的确定的质量与3个Fab结合一个HuHtrA1_PD (S328A) 三聚体的复合物(3:1复合物)一致。这种3:1复合物的实验质量和理论质量之间的差仅为4.2%。因此,一个Fab能够结合一个HtrA1同源三聚体内的每个HuHtrA1_PD (S328A) 单体。

[0419] 618,600Da的IgG94:HtrA1_PD (S328A) 复合物的确定的质量很好地与3:2的化学计量相匹配,其中3个IgG分子结合两个HuHtrA1_PD (S328A) 三聚体。这种3:2复合物的实验质量和理论质量之间的差仅为1.9%。

[0420] 阐明的化学计量与Fab94和IgG94能够完全抑制HtrA1活性的发现一致,其中在HtrA1三聚体内的每个单体结合一个Fab或IgG的一个Fab臂。因此,在这些复合物中不存在‘游离的’ HtrA1单体,与通过Fab94和IgG94完全抑制HtrA1酶活性一致。我们提出了IgG94:HtrA1_PD (S328A) 的‘笼子’模型,其中3个IgG的Fab臂桥接两个三聚体,每个Fab臂结合一个单体(参见图9)。所述模型还解释了在酶测定中IgG94超过Fab94约16倍的增加的效力(参见例如,图3),其中IgG94从在其结合HtrA1_PD三聚体中的亲抗原性效应大大地受益。

[0421] 实施例9:YW505.94的亲和力成熟

[0422] 构建用于抗HtrA1亲和力成熟的文库。通过在CDR H1内将Kabat残基N28改变为丝氨酸以移除潜在的N-连接的糖基化位点,克隆YW505.94a来源于YW505.94[Ab94]。噬菌粒pW0703,来源于噬菌粒pV0350-2b(Lee等人,J.Mol.Biol 340,1073-1093(2004)),在所有

CDR-L3位置含有终止密码子(TAA)并且在M13噬菌体的表面上展示单价Fab,充当用于移植克隆YW505.94a的重链可变结构域(V_H)以用于亲和力成熟的文库模板。硬性随机化和软性随机化的策略均用于亲和力成熟。对于硬性随机化,使用设计为模拟天然人抗体的氨基酸,对在三个轻链CDR具有选定位置的一个轻链文库(L1/L2/L3硬性)进行随机化,并且所设计的DNA简并性同描述的一样(Lee等人,2004)。对于软性随机化,靶向在Kabat位置CDR-L3的91、92、93、94和96,CDR-H1的28-35,CDR-H2的50-58,以及CDR-H3的95-100处选定的残基连同CDR环、L3/H1软性、L3/H2软性和L3/H3软性的两个不同组合,用于随机化。为了实现在选定位置引入约50%的突变速率的软性随机化条件,利用有利于野生型核苷酸的碱基的70-10-10-10混合物合成诱变的DNA(Galllop等人,J.of Med.Chem.37,1233-1251(1994))。

[0423] 分离亲合力提高的变体的噬菌体分选策略。对于亲和力提高选择,对噬菌体文库进行第一轮板分选,然后进行四轮溶液分选。对于第一轮板分选,针对人HtrA1(HuHtrA1)包被板(NUNC Maxisorp平板),各自利用以约30.D./ml的噬菌体输入在1%BSA和0.05%Tween 20中将四种文库(L1/L2/L3硬性、L3/H1软性、L3/H2软性和L3/H3软性)在室温(RT)下分选1小时。在第一轮板分选后,进行四轮溶液分选以提高选择的严格性。对于溶液分选,用500nM的生物素化HuHtrA1在100ul含有1%Superblock(Pierce biotechnology)的缓冲液和0.05%Tween20中将10.D./ml的由第一轮板分选繁殖的噬菌体在室温下(RT)温育至少1小时。用1%Superblock将混合物进一步稀释10X并且在15分钟内在RT下伴随着轻微振荡将100ul/孔施加至中性亲和素(neutravidin)包被的孔(10ug/ml),以使得生物素化的HuHtrA1可以结合噬菌体。用PBS-0.05%Tween20将孔洗涤十次。为了确定背景结合,在中性亲和素包被的平板上捕获含有不具有生物素化的HuHtrA1选择的噬菌体的对照孔。结合的噬菌体用0.1N HCl洗脱20分钟,用1/10体积的1M Tris pH11中和、滴定并繁殖以用于下一轮。接下来,同时使用两种增加选择严格性的方法再进行三轮溶液分选。第一种方法用于结合速率(on-rate)选择,使生物素化的靶蛋白浓度从10nM降低至0.1nM。第二种方法用于解离速率(off-rate)选择,加入过量的非生物素化的HuHtrA1蛋白(100~1000倍以上)以竞争掉较弱的结合物。另外,降低噬菌体的输入(0.1~0.50.D/ml)以降低背景噬菌体的结合。

[0424] 高通量亲和力筛选ELISA(单点竞争)。从第五轮筛选中挑选菌落并且在37°C下在350ul/孔的含有50ug/ml羧苄青霉素和1e 10/ml K07的2YT培养基中在96孔板(QIAgene)中过夜生长。从相同的平板中挑选XL-1感染的亲本噬菌体的菌落作为对照。将96孔Nunc Maxisorp平板在PBS中在RT下用100ul/孔的HuHtrA1蛋白(2ug/ml)包被2小时。用100ul的0.5%BSA和0.05%Tween在PBS(PBST缓冲液)中将平板封闭一小时。

[0425] 在具有或不具有100ul总体积的5nM HuHtrA1的PBST缓冲液中,将噬菌体上清液稀释1:5,并且在RT下温育至少1小时。之后,将75ul的混合物转移至HuHtrA1包被的平板。将平板温和振荡15分钟以允许将未结合的噬菌体捕获至HuHtrA1包被的平板。用0.05%Tween20在PBS(PBT缓冲液)中将平板洗涤五次。通过在ELISA缓冲液(1:5000)中加入辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗M13抗体,并在RT下温育30分钟来量化结合。用PBT缓冲液将平板洗涤五次。接下来,将100ul/孔的1:1比率的3,3',5,5' -四甲基联苯胺(TMB)过氧化物酶底物和过氧化物酶溶液B(H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories(Gaithersburg,MD))添加到所述孔中,并且在RT下温育5分钟。通过向每孔加入100ul 1M磷酸(H₃PO₄)并允许在RT下温育5分钟来终止反应。使用标准ELISA平板读数器在450nm测定每个孔的OD。通过以下方程式计算

OD降低(%)：

[0426] $OD_{450nm} \text{下降}(\%) = [(含有竞争物的孔的} OD_{450nm}) / (不含竞争物的孔的} OD_{450nm})] * 100。$

[0427] 与亲本噬菌体的孔(100%)的OD_{450nm}下降(%)相比,挑选具有低于50%的OD_{450nm}下降(%)的克隆用于序列分析(参见图15和16)。选择独特克隆用于噬菌体制备以通过噬菌体竞争ELISA确定结合亲合力(噬菌体IC₅₀) (参见图17和18)。之后,将大多数亲合力提高的克隆(YW505.94a.28&YW505.94a.54)转型为人IgG1以用于抗体制备和进一步的BIAcore结合动力学分析。

[0428] 确定IC₅₀的噬菌体竞争ELISA。用在PBS中的2 μ g/ml的HuHtrA1将MAXISORPTM微量滴定板在RT下包被2小时,并且之后用PBST缓冲液在RT下封闭额外一小时。在组织培养物微量滴定板中,用在PBST缓冲液中连续稀释的HuHtrA1或MuHtrA1将纯化的噬菌体培养物上清液温育一小时,之后在15分钟内将80 μ l的混合物转移至HuHtrA1包被的孔以捕获未结合的噬菌体。用PBT缓冲液洗涤平板,并且在一小时内加入(在PBST缓冲液中1:5000)HRP缀合的抗M13(Amersham Pharmacia Biotech)。用PBT缓冲液洗涤平板,并且通过加入四甲基联苯胺底物(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)显影。对在450nm的吸光度作图作为溶液中HuHtrA1或MuHtrA1浓度的函数以确定噬菌体IC₅₀。以此作为展示在噬菌体的表面上的Fab克隆的亲合力估值。图17示出了来自噬菌体竞争测定的结果,其显示YW505.94a亲合力提高的变体对HuHtrA1的结合。图18示出了来自噬菌体竞争测定的结果,其显示YW505.94a亲合力提高的变体对MuHtrA1的结合。

[0429] 通过BIAcore的抗体亲合力确定。为了通过单周期动力学确定HtrA1抗体的结合亲合力,使用借助BIAcoreTM T100仪器的表面等离子共振(SRP)测量。简而言之,根据供应商的说明书用EDC和NHS试剂激活S系列传感器芯片CM5,并且偶联链霉亲和素(Pierce)以实现约2000个应答单位(RU),接着用1M乙醇胺阻断未反应的基团。

[0430] 对于动力学测量来说,首先以10 μ l/分钟的流速注射生物素化的人或鼠HtrA1以在除FC1(参照)外的3个不同的流动池(FC)捕获约100RU,并且之后在相同的周期中一个接一个地注射(流速:30 μ l/分钟)从低(0.48nM)到高(300nM)[5个点]的在HBS-P缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4、0.15M NaCl、0.005%表面活性剂P20)中的抗HtrA1 Fab的5倍连续稀释液,而且在注射之间没有再生。记录传感图,并且在通过BIAcoreTM T100评价软件(版本2.0)评价前对其去除参照和缓冲液。使用简单一对一朗格缪尔结合模型计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。以比率k_{off}/k_{on}计算平衡解离常数(Kd)。结果在以下表3中示出。

[0431] 表3.与亲本Fab相比的亲和力成熟的Fab的结合亲和力。

[0432]

Fab	HuHtrA1			MuHtrA1		
	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (nM)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (nM)
YW505.94	3.51e5	109e-4	31.1	4.47e5	129e-4	28.9
YW505.94a	8.13e5	4.48e-2	55	1.48e6	8.56e-2	58
YW505.94a.28	1.69e6	5.74e-3	3.4	2.02e6	9.3e-3	4.6
YW505.94a.54	2.97e6	7.84e-3	2.6	2.82e6	4.55e-3	1.6

[0433] 实施例10:在缺乏恒定曝光后的HtrA1的情况下光感受器、外核层(ONL)、和机能反应的降低。

[0434] HtrA1敲除小鼠的构建。为了产生HtrA1 (+/-) 胚胎干细胞,将线性化的靶向载体DNA电穿孔至Balb/c背景的ES细胞中以在外显子1的5'区和外显子1的3'区以及引入的新霉素抗性基因(Neo)中引入Flox位点。选择耐新霉素的ES克隆,并且通过用表达cre-重组酶的表达质粒将ES细胞电穿孔来切断外显子1和新霉素表达盒。通过靶向的ES细胞中全部HtrA1基因座和上游启动子区域的测序来确认同源重组。将靶向的克隆注射至C57BL/6胚泡中以产生种系传递的雄性嵌合小鼠。进行+/-雌性和+/-雄性小鼠的杂交以在Balb/c背景上产生-/-雌性或-/-雄性HtrA1小鼠。通过来自HtrA1野生型(wt)和敲除(ko)小鼠的卵巢的RT-PCR确认成功的HtrA1的缺失。

[0435] 恒定曝光模型。8-13周大的雄性Balb/c HtrA1野生型/野生型或敲除/敲除小鼠处于普通圈养(在笼子中,<100勒克斯)中,直到恒定曝光(CLE)开始。为了开始CLE,将小鼠单独圈养在仅覆盖有铁丝架而没有过滤器顶的普通笼子中。将用于提供营养的食物粒料和水凝胶置于笼子的底部上,而不是铁丝顶部,以便不妨碍光进入笼子。将十个笼子置于装备有萤光灯并且封装在白色门面板中的Metro架上以向小鼠递送~1200勒克斯(1ux)多至14天。在每天CLE期间在架周围逆时针旋转笼子以确保平均的曝光。如果使用多个架子,还在架子之间旋转笼子以确保平均的曝光。

[0436] 光学相干断层扫描技术。在曝光前4-7天进行光学相干断层扫描技术(OCT)以提供视网膜厚度基线测量。使用Heidelberg Spectralis HRA+OCT摄像机进行OCT。用在150-300ul无菌盐水中的70-80mg/kg氯胺酮(ketamine)/15mg/kg赛拉嗪(xylazine)将动物麻醉,用1%托吡卡胺(tropicamide)滴液将眼睛放大并且通过OCT测量视网膜厚度。使用人造眼泪保持眼睛潮湿以防止白内障。在OCT后,使动物从麻醉中恢复并且还其送回至它们的笼子和光架。

[0437] 视网膜电图。在曝光前7天和CLE后15天进行视网膜电图(ERG)ERGs。使用Diagnosys LLC Espion 2视觉电生理学系统和Colordome desktop Ganzfeld作为光源进行并且记录ERG。在暗室中使小鼠暗适应过夜以平衡光感受器。一旦暗适应,在仅用红色光照射的黑暗中进行所有随后的过程。用在200-300ul PBS中的氯胺酮,75-80mg/kg, & 赛拉嗪, 7.5-15mg/kg, IP麻醉动物。使用连接至其对照单元的恒温板将小鼠体温维持在37°C。用1%托吡卡胺放大瞳孔。将用Burian-Allen银或铂线圈电极同时记录来自两只眼睛的ERG。

将小鼠置于平台上,经由前额将参比电极皮下插入,并且在尾根部皮下插入接地电极。将Gonak羟丙基甲基纤维素(hypermellose)溶液置于角膜上以在角膜和电极之间建立电接触,并且在实验期间保护眼睛不干燥。将电极置于左眼和右眼上并且将小鼠插入至ColorDome光刺激器中。将会用白色光刺激眼睛(7种闪光强度4e-5、2e-5、0.5、2、5、10、20cd.s/m²),并且将信号在0.15-1000Hz带通滤光并在2kHz取样。

[0438] 小鼠视网膜和卵巢中HtrA mRNA水平的确定。摘除整个眼睛,将视网膜移除并置于RLT缓冲液(Qiagen)中,并且在-80℃下冷冻直到均化。通过gentleMACS M管(Miltinyi Biotec)将视网膜均化并且破碎。与视网膜相似,将卵巢从雌性HtrA1野生型、杂合和敲除小鼠中分离并且按照对于视网膜所描述的均化。使用Qiagen Plus RNeasy试剂盒分离RNA;用高容量cDNA试剂盒(Applied Biosystem)产生cDNA;使用20ug cDNA、Taqman基因表达主混合物(Taqman Gene Expression Master Mix)(Applied Biosystem)和Taqman基因表达测定(Taqman Gene Expression Assay)引物(Applied Biosystem)对外显子1-2(视网膜和卵巢)、外显子3-4(卵巢)和外显子5-6(卵巢)进行Taqman qPCR,并且在ABI 7500实时PCR系统(Applied Biosystem)上运行。将HtrA表达标准化为18s表达(来自Applied Biosystem的引物)。

[0439] 如在图11中所示,在恒定曝光的小鼠模型中HtrA1 mRNA表达增加。然而,在相同的模型中,视网膜中HtrA2水平不增加。此外,在未曝光的小鼠的视网膜中,HtrA1水平明显高于HtrA2、HtrA3和HtrA4水平。

[0440] 此外,我们发现,在光诱导变性的小鼠模型中,缺少HtrA1表达的小鼠显示出光感受器(图13)、外核层(ONL)(图14)、和机能反应(ERG)(图12)的降低。

[0441] 实施例11:恒定曝光的大鼠模型中抗HtrA1抗体的效果

[0442] 将会对大鼠进行如以上对于小鼠所描述的恒定曝光。将会评价抗HtrA1抗体的保护大鼠眼睛不因曝光而导致变性的功效。将会以适合维持在实验进程期间眼睛中抗HtrA1抗体的有效浓度的一定剂量和频率对大鼠眼睛进行抗HtrA1抗体的玻璃体内注射。如以上对于小鼠模型所描述的,将会在曝光后监测大鼠眼睛以通过OCT确定视网膜厚度并且通过ERG确定功能。

[0443] 实施例12:在光应力时HtrA1表达在大鼠玻璃体中充足并且在小鼠眼液和眼组织中积累

[0444] ELISA测定。为了分析大鼠组织,将抗muHtrA1兔多克隆抗体(Genentech)稀释至125ng/mL,同时为了分析小鼠眼液和视网膜组织,将抗huHtrA1小鼠单克隆抗体(Genentech)稀释至250ng/mL,二者均在PBS中,并且在4℃温育过夜期间包被在384孔ELISA平板(Nunc;Neptune,NJ)上。平板用PBS和0.05%Tween 20洗涤并且在用PBS和0.5%牛血清白蛋白(BSA)的两个小时温育期间封闭。这个和所有随后的温育在温和搅拌的情况下在室温进行。将重组鼠HtrA1标准品(Genentech)和来自大鼠或鼠组织的样品在样品/标准品稀释缓冲液(PBS、0.5%BSA、15ppm Proclin、0.05%Tween 20、0.25%CHAPS、0.2%BgG、5mM EDTA、0.35M NaCl、(pH 7.4))中稀释,加入至洗涤平板,并且温育1.5-2小时。对于大鼠组织,在1小时温育期间用稀释至100ng/mL的生物素化的抗muHtrA1兔多克隆抗体(Genentech)检测结合HtrA1的平板,并且对于小鼠眼液和视网膜组织,将生物素化的抗huHtrA1小鼠单克隆抗体(Genentech)稀释至200ng/mL,二者均在测定缓冲液(PBS、0.5%

BSA、15 ppm Proclin、0.05% Tween 20) 中,接着是洗涤步骤和用链霉亲和素HRP (GE Healthcare; Piscataway, NJ) 的30分钟的温育,而且在测定缓冲液(1:20,000)中稀释。在最终洗涤后,加入四甲基联苯胺 (KPL, Gaithersburg, MD),显色10-15分钟,并且用1M磷酸停止反应。使用微孔板读数器,用620nm参照,在450nm对平板读数。根据与muHtrA1标准曲线匹配的四个参数计算大鼠或鼠HtrA1的浓度。

[0445] 如在图19A中所示,与大鼠玻璃体中HtrA1的表达的水平相比,大鼠卵巢、脑、脾、和全部眼组织中HtrA1的表达低。如在图19B中所示,与对照相比,恒定曝光的模型中的小鼠眼液中HtrA1的水平增加。如在图19C中所示,与对照相比,恒定曝光的模型中的小鼠视网膜组织中HtrA1的水平增加。

[0446] 虽然为了清楚的理解,已经借助于附图和实例详细描述了上述发明,但是描述和实例不应当解释为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司

<120> 抗HtrA1抗体及使用方法

<130> P4761R1-W0

<140>

<141>

<150> 61/547, 649
<151> 2011-10-14

<160> 90

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 2

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 3

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 4

Gly Phe Asn Ile Ser Gly Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 5

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 5
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 6
Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002] <220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr
115

[0003]

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽

<400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105

[0004] <210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 11
 Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Met His
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Ala Ala
 20

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<220>
 <223> N-term Mca

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Lys(DNP)

<400> 12
 Ile Arg Arg Val Ser Tyr Ser Phe Lys Lys

1	5	10														
<210> 13																
<211> 480																
<212> PRT																
<213> 智人 (Homo sapiens)																
<400> 13																
Met	Gln	Ile	Pro	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu		
1										10				15		
Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Arg	Ser	Ala	Pro	
						20		25			30					
Leu	Ala	Ala	Gly	Cys	Pro	Asp	Arg	Cys	Glu	Pro	Ala	Arg	Cys	Pro	Pro	
						35		40			45					
Gln	Pro	Glu	His	Cys	Glu	Gly	Gly	Arg	Ala	Arg	Asp	Ala	Cys	Gly	Cys	
					50		55			60						
Cys	Glu	Val	Cys	Gly	Ala	Pro	Glu	Gly	Ala	Ala	Cys	Gly	Leu	Gln	Glu	
					65		70			75			80			
Gly	Pro	Cys	Gly	Glu	Gly	Leu	Gln	Cys	Val	Val	Pro	Phe	Gly	Val	Pro	
					85			90			95					
Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Arg	Arg	Arg	Ala	Gln	Ala	Gly	Leu	Cys	Val	Cys	
					100			105			110					
[0005]	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Val	Cys	Gly	Ser	Asp	Ala	Asn	Thr	Tyr	Ala	Asn
					115			120			125					
Leu	Cys	Gln	Leu	Arg	Ala	Ala	Ser	Arg	Arg	Ser	Glu	Arg	Leu	His	Arg	
					130		135			140						
Pro	Pro	Val	Ile	Val	Leu	Gln	Arg	Gly	Ala	Cys	Gly	Gln	Gly	Gln	Glu	
					145		150			155			160			
Asp	Pro	Asn	Ser	Leu	Arg	His	Lys	Tyr	Asn	Phe	Ile	Ala	Asp	Val	Val	
					165			170			175					
Glu	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	Val	Val	His	Ile	Glu	Leu	Phe	Arg	Lys	Leu	
					180			185			190					
Pro	Phe	Ser	Lys	Arg	Glu	Val	Pro	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe	Ile	
					195			200			205					
Val	Ser	Glu	Asp	Gly	Leu	Ile	Val	Thr	Asn	Ala	His	Val	Val	Thr	Asn	
					210		215			220						
Lys	His	Arg	Val	Lys	Val	Glu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Thr	Tyr	Glu	Ala	
					225		230			235			240			
Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Asp	Glu	Lys	Ala	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Ile	
					245			250			255					
Asp	His	Gln	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Arg	Ser	Ser	Glu	
					260			265			270					

Leu Arg Pro Gly Glu Phe Val Val Ala Ile Gly Ser Pro Phe Ser Leu
 275 280 285

Gln Asn Thr Val Thr Thr Gly Ile Val Ser Thr Thr Gln Arg Gly Gly
 290 295 300

Lys Glu Leu Gly Leu Arg Asn Ser Asp Met Asp Tyr Ile Gln Thr Asp
 305 310 315 320

Ala Ile Ile Asn Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp
 325 330 335

Gly Glu Val Ile Gly Ile Asn Thr Leu Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser
 340 345 350

Phe Ala Ile Pro Ser Asp Lys Ile Lys Lys Phe Leu Thr Glu Ser His
 355 360 365

Asp Arg Gln Ala Lys Gly Lys Ala Ile Thr Lys Lys Tyr Ile Gly
 370 375 380

Ile Arg Met Met Ser Leu Thr Ser Ser Lys Ala Lys Glu Leu Lys Asp
 385 390 395 400

Arg His Arg Asp Phe Pro Asp Val Ile Ser Gly Ala Tyr Ile Ile Glu
 405 410 415

[0006] Val Ile Pro Asp Thr Pro Ala Glu Ala Gly Gly Leu Lys Glu Asn Asp
 420 425 430

Val Ile Ile Ser Ile Asn Gly Gln Ser Val Val Ser Ala Asn Asp Val
 435 440 445

Ser Asp Val Ile Lys Arg Glu Ser Thr Leu Asn Met Val Val Arg Arg
 450 455 460

Gly Asn Glu Asp Ile Met Ile Thr Val Ile Pro Glu Glu Ile Asp Pro
 465 470 475 480

<210> 14
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 14
 Met Gln Ser Leu Arg Thr Thr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Leu Ala Leu Pro Ser Gly Thr Gly Arg Ser Ala Pro
 20 25 30

Ala Ala Thr Val Cys Pro Glu His Cys Asp Pro Thr Arg Cys Ala Pro
 35 40 45

Pro Pro Thr Asp Cys Glu Gly Gly Arg Val Arg Asp Ala Cys Gly Cys
 50 55 60

Cys Glu Val Cys Gly Ala Leu Glu Gly Ala Ala Cys Gly Leu Gln Glu
 65 70 75 80

Gly Pro Cys Gly Glu Gly Leu Gln Cys Val Val Pro Phe Gly Val Pro
 85 90 95

Ala Ser Ala Thr Val Arg Arg Arg Ala Gln Ala Gly Leu Cys Val Cys
 100 105 110

Ala Ser Ser Glu Pro Val Cys Gly Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Thr Asn
 115 120 125

Leu Cys Gln Leu Arg Ala Ala Ser Arg Arg Ser Glu Lys Leu Arg Gln
 130 135 140

Pro Pro Val Ile Val Leu Gln Arg Gly Ala Cys Gly Gln Gln Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Asn Ser Leu Arg His Lys Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val
 165 170 175

Glu Lys Ile Ala Pro Ala Val Val His Ile Glu Leu Tyr Arg Lys Leu
 180 185 190

Pro Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Val Ala Ser Gly Ser Gly Phe Ile
 195 200 205

[0007] Val Ser Glu Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Thr Asn
 210 215 220

Lys Asn Arg Val Lys Val Glu Leu Lys Asn Gly Ala Thr Tyr Glu Ala
 225 230 235 240

Lys Ile Lys Asp Val Asp Glu Lys Ala Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Asp His Gln Gly Lys Leu Pro Val Leu Leu Leu Gly Arg Ser Ser Glu
 260 265 270

Leu Arg Pro Gly Glu Phe Val Val Ala Ile Gly Ser Pro Phe Ser Leu
 275 280 285

Gln Asn Thr Val Thr Thr Gly Ile Val Ser Thr Thr Gln Arg Gly Gly
 290 295 300

Lys Glu Leu Gly Leu Arg Asn Ser Asp Met Asp Tyr Ile Gln Thr Asp
 305 310 315 320

Ala Ile Ile Asn Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp
 325 330 335

Gly Glu Val Ile Gly Ile Asn Thr Leu Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser
 340 345 350

Phe Ala Ile Pro Ser Asp Lys Ile Lys Lys Phe Leu Thr Glu Ser His
 355 360 365

Asp Arg Gln Ala Lys Gly Lys Ala Val Thr Lys Lys Tyr Ile Gly
 370 375 380
 Ile Arg Met Met Ser Leu Thr Ser Ser Lys Ala Lys Glu Leu Lys Asp
 385 390 395 400
 Arg His Arg Asp Phe Pro Asp Val Leu Ser Gly Ala Tyr Ile Ile Glu
 405 410 415
 Val Ile Pro Asp Thr Pro Ala Glu Ala Gly Gly Leu Lys Glu Asn Asp
 420 425 430
 Val Ile Ile Ser Ile Asn Gly Gln Ser Val Val Thr Ala Asn Asp Val
 435 440 445
 Ser Asp Val Ile Lys Lys Glu Asn Thr Leu Asn Met Val Val Arg Arg
 450 455 460
 Gly Asn Glu Asp Ile Val Ile Thr Val Ile Pro Glu Glu Ile Asp Pro
 465 470 475 480
 <210> 15
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 15
 Met Gln Ala Arg Ala Leu Leu Pro Ala Thr Leu Ala Ile Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 [0008] Leu Ala Val Leu Ala Leu Ala Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Arg Cys Asp Val Ser Arg Cys Pro Ser Pro Arg Cys Pro Gly Gly
 35 40 45
 Tyr Val Pro Asp Leu Cys Asn Cys Cys Leu Val Cys Ala Ala Ser Glu
 50 55 60
 Gly Glu Pro Cys Gly Arg Pro Leu Asp Ser Pro Cys Gly Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Arg Gly Val Cys Arg Cys Arg Trp Thr His Thr Val Cys
 85 90 95
 Gly Thr Asp Gly His Thr Tyr Ala Asp Val Cys Ala Leu Gln Ala Ala
 100 105 110
 Ser Arg Arg Ala Leu Gln Val Ser Gly Thr Pro Val Arg Gln Leu Gln
 115 120 125
 Lys Gly Ala Cys Pro Ser Gly Leu His Gln Leu Thr Ser Pro Arg Tyr
 130 135 140
 Lys Phe Asn Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile Ala Pro Ala Val
 145 150 155 160

Val His Ile Glu Leu Phe Leu Arg His Pro Leu Phe Gly Arg Asn Val
 165 170 175

Pro Leu Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ile Met Ser Glu Ala Gly Leu Ile
 180 185 190

Val Thr Asn Ala His Val Val Ser Ser Ser Ser Thr Ala Ser Gly Arg
 195 200 205

Gln Gln Leu Lys Val Gln Leu Gln Asn Gly Asp Ala Tyr Glu Ala Thr
 210 215 220

Ile Gln Asp Ile Asp Lys Lys Ser Asp Ile Ala Thr Ile Val Ile His
 225 230 235 240

Pro Lys Lys Lys Leu Pro Val Leu Leu Leu Gly His Ser Ala Asp Leu
 245 250 255

Arg Pro Gly Glu Phe Val Val Ala Ile Gly Ser Pro Phe Ala Leu Gln
 260 265 270

Asn Thr Val Thr Thr Gly Ile Val Ser Thr Ala Gln Arg Asp Gly Lys
 275 280 285

Glu Leu Gly Leu Arg Asp Ser Asp Met Asp Tyr Ile Gln Thr Asp Ala
 290 295 300

[0009] Ile Ile Asn Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly
 305 310 315 320

Glu Val Ile Gly Ile Asn Thr Leu Lys Val Ala Ala Gly Ile Ser Phe
 325 330 335

Ala Ile Pro Ser Asp Arg Ile Thr Arg Phe Leu Ser Glu Phe Gln Asn
 340 345 350

Lys His Val Lys Asp Trp Lys Lys Arg Phe Ile Gly Ile Arg Met Arg
 355 360 365

Thr Ile Thr Pro Ser Leu Val Glu Glu Leu Lys Ala Ala Asn Pro Asp
 370 375 380

Phe Pro Ala Val Ser Ser Gly Ile Tyr Val Gln Glu Val Val Pro Asn
 385 390 395 400

Ser Pro Ser Gln Arg Gly Gly Ile Gln Asp Gly Asp Ile Ile Val Lys
 405 410 415

Val Asn Gly Arg Pro Leu Ala Asp Ser Ser Glu Leu Gln Glu Ala Val
 420 425 430

Leu Asn Glu Ser Ser Leu Leu Leu Glu Val Arg Arg Gly Asn Asp Asp
 435 440 445

Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Glu Val Val Met
 450 455

<210> 16
<211> 483
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 16
Met Ser Phe Gln Arg Leu Trp Ala Val Arg Thr Gln Phe Leu Leu
1 5 10 15

Trp Leu Leu Leu Pro Ala Val Pro Val Pro Trp Ala Glu Ala Arg Arg
20 25 30

Ser Arg Val Ser Leu Pro Cys Pro Asp Ala Cys Asp Pro Thr Arg Cys
35 40 45

Pro Thr Leu Pro Thr Cys Ser Ala Gly Leu Ala Pro Val Pro Asp Arg
50 55 60

Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Ala Ala Glu Gly Gln Glu Cys Gly
65 70 75 80

Gly Ala Arg Gly Arg Pro Cys Ala Pro Arg Leu Arg Cys Gly Ala Pro
85 90 95

Phe Ser Arg Asp Pro Ser Gly Gly Ala Trp Leu Gly Thr Cys Gly Cys
100 105 110

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Ala Val Val Cys Gly Ser Asp Gly Arg Thr
115 120 125
[0010]

Tyr Pro Ser Leu Cys Ala Leu Arg Lys Glu Asn Arg Ala Ala Arg Gln
130 135

Arg Gly Ala Leu Pro Ala Val Pro Val Gln Lys Gly Ala Cys Glu Glu
145 150 155 160

Ala Gly Thr Thr Arg Ala Gly Arg Leu Arg Arg Lys Tyr Asn Phe Ile
165 170 175

Ala Ala Val Val Glu Lys Val Ala Pro Ser Val Val His Leu Gln Leu
180 185 190

Phe Arg Arg Ser Pro Leu Thr Asn Gln Glu Ile Pro Ser Ser Ser Gly
195 200 205

Ser Gly Phe Ile Val Ser Glu Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His
210 215 220

Val Leu Thr Asn Gln Gln Lys Ile Gln Val Glu Leu Gln Ser Gly Ala
225 230 235 240

Arg Tyr Glu Ala Thr Val Lys Asp Ile Asp His Lys Leu Asp Leu Ala
245 250 255

Leu Ile Lys Ile Glu Pro Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Leu Gly
260 265 270

Arg Ser Ser Asp Leu Arg Ala Gly Glu Phe Val Val Ala Leu Gly Ser
 275 280 285

Pro Phe Ser Leu Gln Asn Thr Val Thr Ala Gly Ile Val Ser Thr Thr
 290 295 300

Gln Arg Gly Gly Arg Glu Leu Gly Leu Lys Asn Ser Asp Ile Asp Tyr
 305 310 315 320

Ile Gln Thr Asp Ala Ile Ile Asn His Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu
 325 330 335

Val Asn Leu Asp Gly Asp Val Ile Gly Ile Asn Thr Leu Lys Val Thr
 340 345 350

Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Ile Arg Gln Phe Leu
 355 360 365

Glu Asp Tyr His Glu Arg Gln Leu Lys Gly Lys Ala Pro Leu Gln Lys
 370 375 380

Lys Tyr Leu Gly Leu Arg Met Leu Pro Leu Thr Leu Asn Leu Leu Gln
 385 390 395 400

Glu Met Lys Arg Gln Asp Pro Glu Phe Pro Asp Val Ser Ser Gly Val
 405 410 415

[0011] Phe Val Tyr Glu Val Ile Gln Gly Ser Ala Ala Ala Ser Ser Gly Leu
 420 425 430

Arg Asp His Asp Val Ile Val Ser Ile Asn Gly Gln Pro Val Thr Thr
 435 440 445

Thr Thr Asp Val Ile Glu Ala Val Lys Asp Asn Asp Phe Leu Ser Ile
 450 455 460

Ile Val Leu Arg Gly Ser Gln Thr Leu Phe Leu Thr Val Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Ile Ile Asn

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的
 肽

<400> 17
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 19

Gln Gln Ser Asp Asp Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 20

Gly Phe Ser Ile Ser Gly Tyr Tyr Ile His
1 5 10

[0012]

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Val Val Gly Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 22

Gln Gln Ser Asp Asp His Pro Pro Thr
1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
共有肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Asp, Ser或Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val或Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser, Asn或Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Thr或Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ala或Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Val或Leu

<400> 23
 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 1 5 10

[0013] <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的
 共有肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Ser, Val或Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr, Asp或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Thr, Ser, Ala, Asp或Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Thr, His, Asn, Ser, Ala, Leu或Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Pro, Thr, Ala或Ser

<400> 24
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 共有肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Asn, Ser或Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ser, Asp, Tyr或Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Gly或Asp

<400> 25
 Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0014] <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 共有肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Asn或Asp

<400> 26
 Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 共有肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Ser或Thr

<400> 27
 Gly Thr Phe Leu Thr Xaa Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的
 多肽

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asp Thr Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

[0015]

<210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的
 多肽

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr
115

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Val Val Gly Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Asp His Pro Pro
85 90 95

[0016]

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 31
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
共有多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..^{..} (28)
<223> Asp, Ser或Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..^{..} (29)
<223> Val或Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..^{..} (30)
<223> Ser, Asn或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..^{..} (31)
<223> Thr或Asn

<220>
<221> MOD_RES

<222> (32).. (32)
 <223> Ala或Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33).. (33)
 <223> Val或Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (91).. (91)
 <223> Ser, Val或Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (92).. (92)
 <223> Tyr, Asp或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (93).. (93)
 <223> Thr, Ser, Ala, Asp或Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (94).. (94)
 <223> Thr, His, Asn, Ser, Ala, Leu或Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (96).. (96)
 <223> Pro, Thr, Ala或Ser

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

[0017]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 32
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述：合成的
 共有多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28).. (28)

<223> Asn, Ser或Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

<223> Ser, Asp, Tyr或Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> Gly或Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (59)..(59)

<223> Asn或Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (104)..(104)

<223> Ser或Thr

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0018]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Phe Leu Thr Xaa Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr
115

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 34
Gln Gln Val Tyr Ser His Pro Pro Thr
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 35
Gln Gln Ser Tyr Thr Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 36
Gln Gln Ser Tyr Ala Thr Pro Thr Thr
1 5

[0019] <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 37
Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ala Thr
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 38
Gln Gln Val Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 39
Gln Gln Val Tyr Ala Thr Pro Ser Thr

1

5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 40
Gln Gln Ser Tyr Asn Ser Pro Ala Thr
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 41
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ala Thr
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0020] <220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 42
Gln Gln Ser Tyr Thr Ala Pro Thr Thr
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 43
Gln Gln Asp Ser Thr Leu Pro Pro Thr
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 44
Gln Gln Ser Asp Ala Ala Pro Pro Thr
1 5

<210> 45
<211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽
 <400> 45
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽
 <400> 46
 Gln Gln Ser Tyr Thr Arg Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽
 <400> 47
 Gly Phe Ser Ile Ser Asp Tyr Tyr Ile His
 [0021] 1 5 10
 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽
 <400> 48
 Gly Phe Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Ile His
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽
 <400> 49
 Gly Phe Thr Ile Tyr Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的

肽

<400> 50
Gly Phe Ser Ile Ala Gly Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 51
Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 52
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0022]

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 53
Gly Thr Phe Leu Thr Thr Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 54
Asp Val Ser Thr Ala Val
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 55
Ser Ile Asn Thr Tyr Leu
1 5

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 56
Asp Val Gly Thr Tyr Leu
1 5

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 57
Val Val Gly Asn Tyr Leu
1 5

<210> 58
<211> 6
<212> PRT
[0023] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 58
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
1 5

<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 59
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
1 5

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 60
Val Tyr Ser His Pro Pro
1 5

<210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 61
 Ser Tyr Thr Asn Pro Pro
 1 5

<210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 62
 Ser Tyr Ala Thr Pro Thr
 1 5

<210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

[0024] <400> 63
 Ser Asp Asp Thr Pro Pro
 1 5

<210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 64
 Ser Tyr Ser Ser Pro Ala
 1 5

<210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 65
 Val Tyr Thr Thr Pro Pro
 1 5

<210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 66
Val Tyr Ala Thr Pro Ser
1 5

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 67
Ser Tyr Asn Ser Pro Ala
1 5

<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 68
Ser Tyr Ser Thr Pro Ala
1 5

[0025]

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 69
Ser Tyr Thr Ala Pro Thr
1 5

<210> 70
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 70
Asp Ser Thr Leu Pro Pro
1 5

<210> 71
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 71
Ser Asp Ala Ala Pro Pro
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 72
Ser Asp Asp His Pro Pro
1 5

<210> 73
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 73
Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
1 5

<210> 74
<211> 6
<212> PRT
[0026] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 74
Ser Tyr Thr Arg Pro Pro
1 5

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 75
Gly Phe Ser Ile Ser Gly Tyr Tyr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 76
Gly Phe Ser Ile Ser Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 77
 Gly Phe Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 78
 Gly Phe Thr Ile Tyr Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 79
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

[0027] <400> 79
 Gly Phe Ser Ile Ala Gly Tyr Tyr
 1 5

<210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 80
 Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 81
 Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asn
 1 5 10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 82
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asp
1 5 10

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 83
Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr
1 5 10

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 84
Gly Thr Phe Leu Thr Thr Trp Gly His Tyr
1 5 10

[0028] <210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Asp, Ser或Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Val或Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ser, Asn或Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Thr或Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ala或Tyr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)

<223> Val或Leu
 <400> 85
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 86
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ser, Val或Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Tyr, Asp或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Thr, Ser, Ala, Asp或Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Thr, His, Asn, Ser, Ala, Leu或Arg

[0029] <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Pro, Thr, Ala或Ser

<400> 86
 Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 1 5

<210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Asn, Ser或Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ser, Asp, Tyr或Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Gly或Asp

<400> 87
 Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Tyr
 1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Asn或Asp

<400> 88
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Xaa
1 5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

[0030] <220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Ser或Thr

<400> 89
Gly Thr Phe Leu Thr Xaa Trp Gly His Tyr
1 5 10

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
6xHis标签

<400> 90
His His His His His His
1 5

Kabat#	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 30 31 32 33 34 35 36 37	
		Kabat - CDR L1
		Chothia - CDR L1
		Contact - CDR L1
hukI	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q	
YW505.94	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S E T A V A W Y Q	
Kabat#	38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74	
		Kabat - CDR L2
		Chothia - CDR L2
		Contact - CDR L2
hukI	Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T	
YW505.94	Q K P G K A P K L L I Y S A S E L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T	
Kabat#	75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	
		Kabat - CDR L3
		Chothia - CDR L3
		Contact - CDR L3
hukI	T S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E T K R	
YW505.94	T S S L Q P E D F A T Y Y C C O O S Y T T P P T F G Q G T K V E T K R	

图 1A

Kabat#	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 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40	Kabat - CDR H1		
hum III	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R I S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A	Chothia - CDR H1		
YW505.94	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R I S C A A S G F Q I S G Y Y I E W V R Q A	Contact - CDR H1		
Kabat#	41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 A 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79	Kabat - CDR H2		
hum III	P G K G L E W V S V I S G D G S T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y	Chothia - CDR H2		
YW505.94	P G K G L E W V G W I D P Y G G D T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y	Contact - CDR H2		
Kabat#	80 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G 101 102 103 104 105 106 107	Kabat - CDR H3		
hum III	L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G	Chothia - CDR H3		
YW505.94	L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G T F L I S W G H Y - - F D Y W G Q G T	Contact - CDR H3		

图 1B

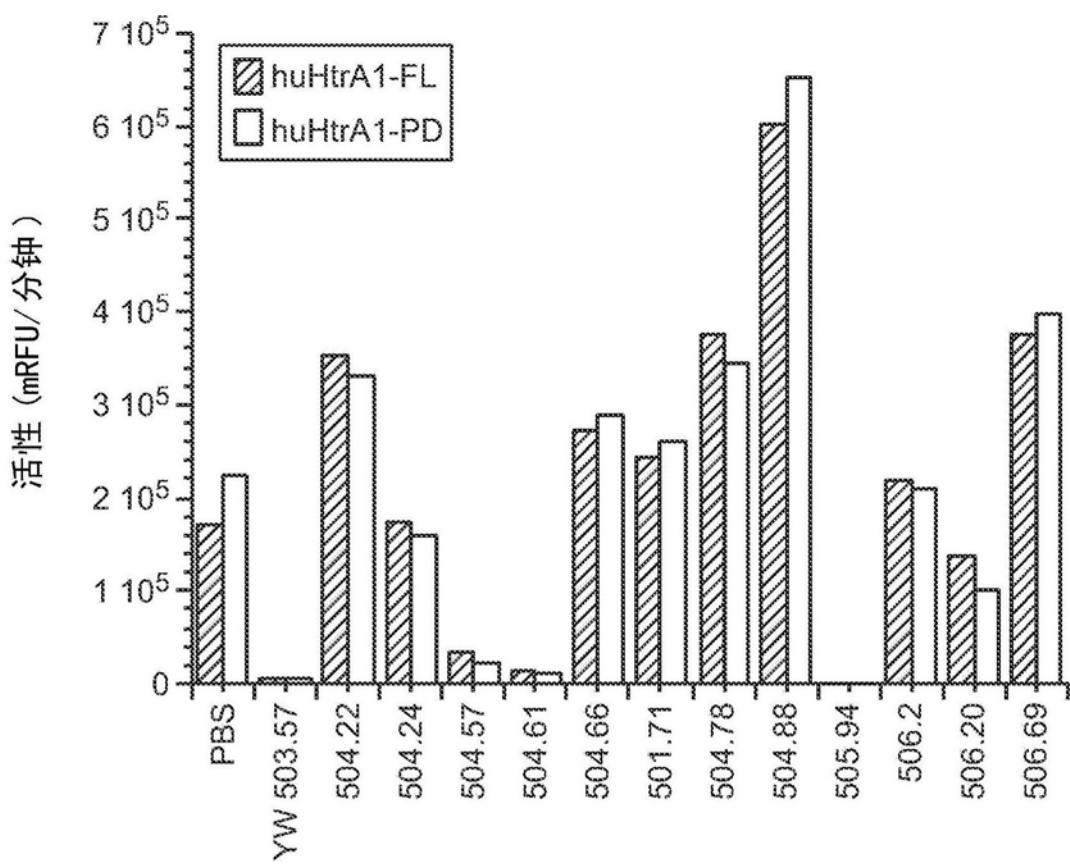


图2

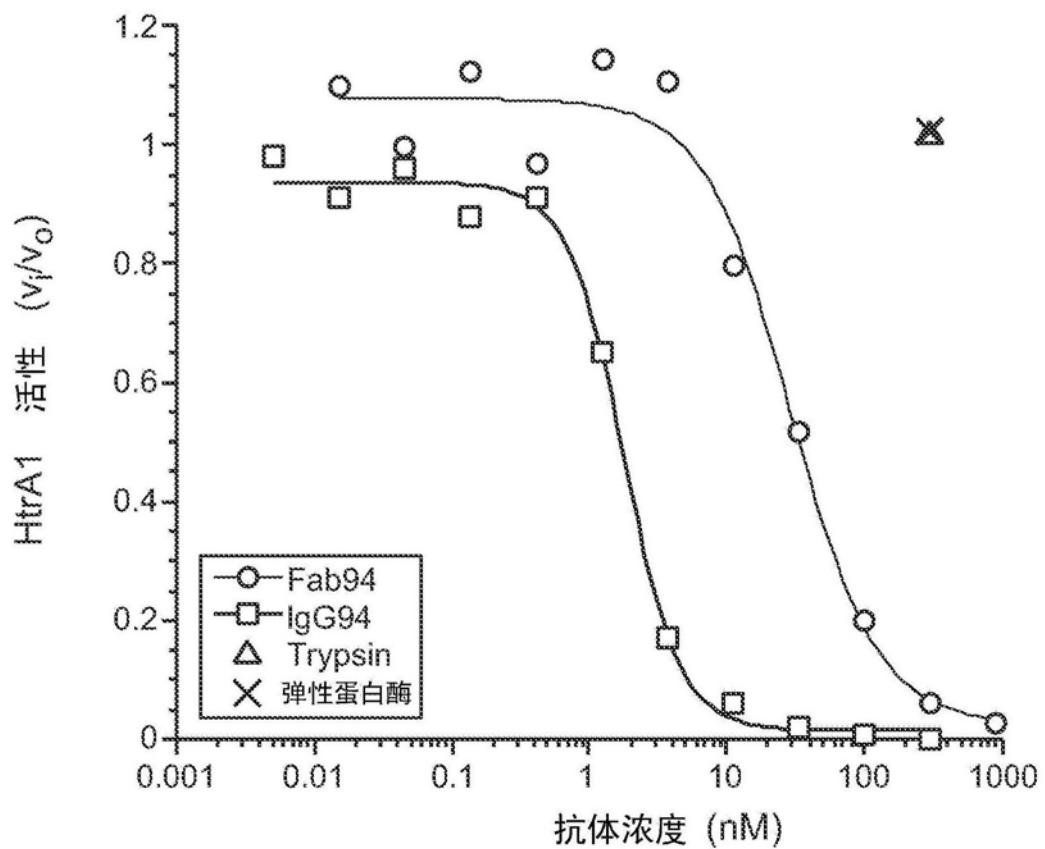


图3

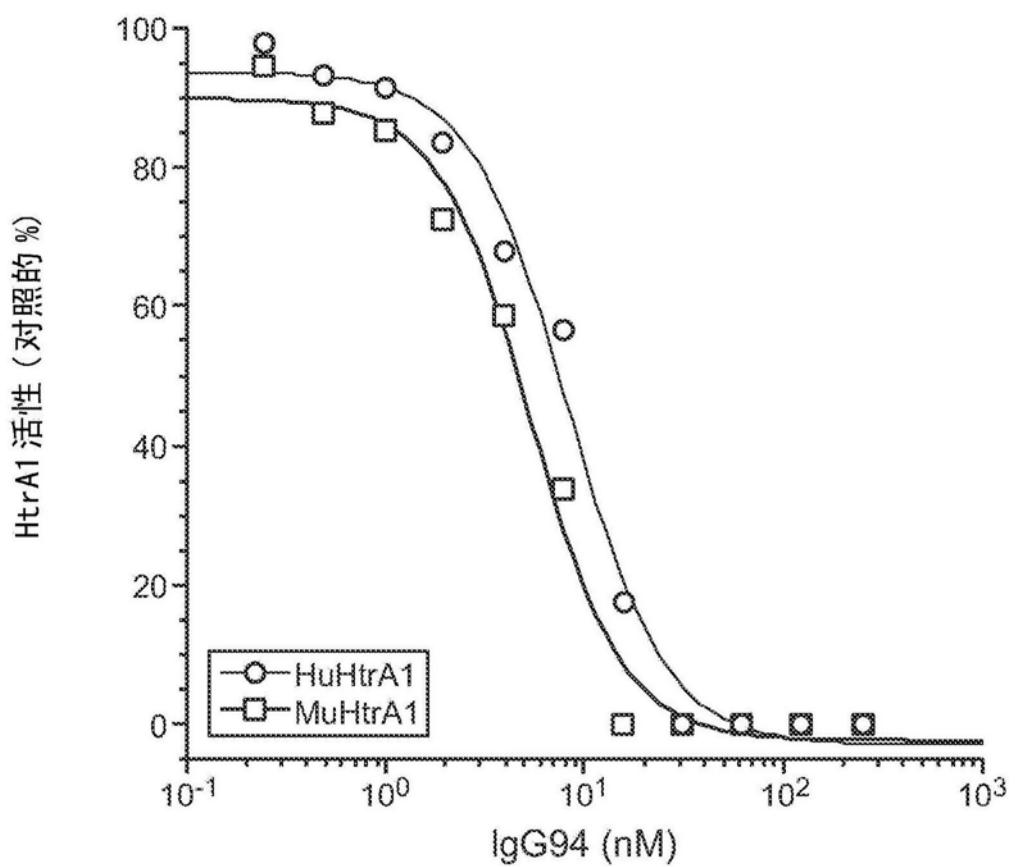
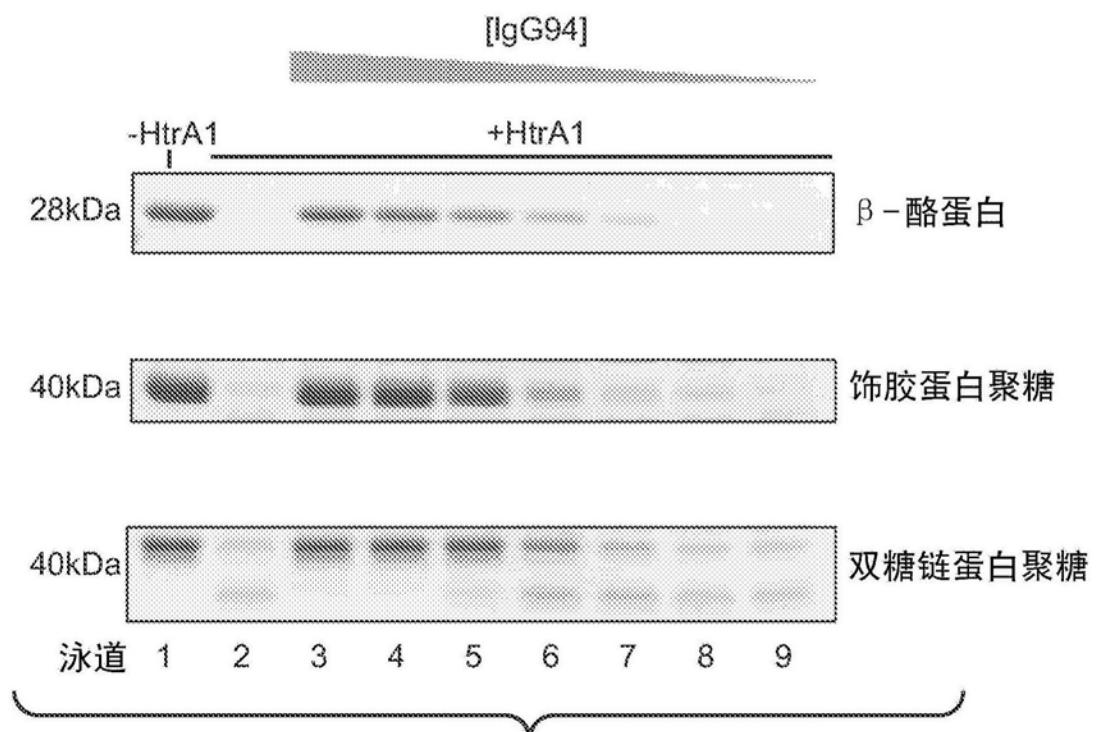


图4



冬 6

图6

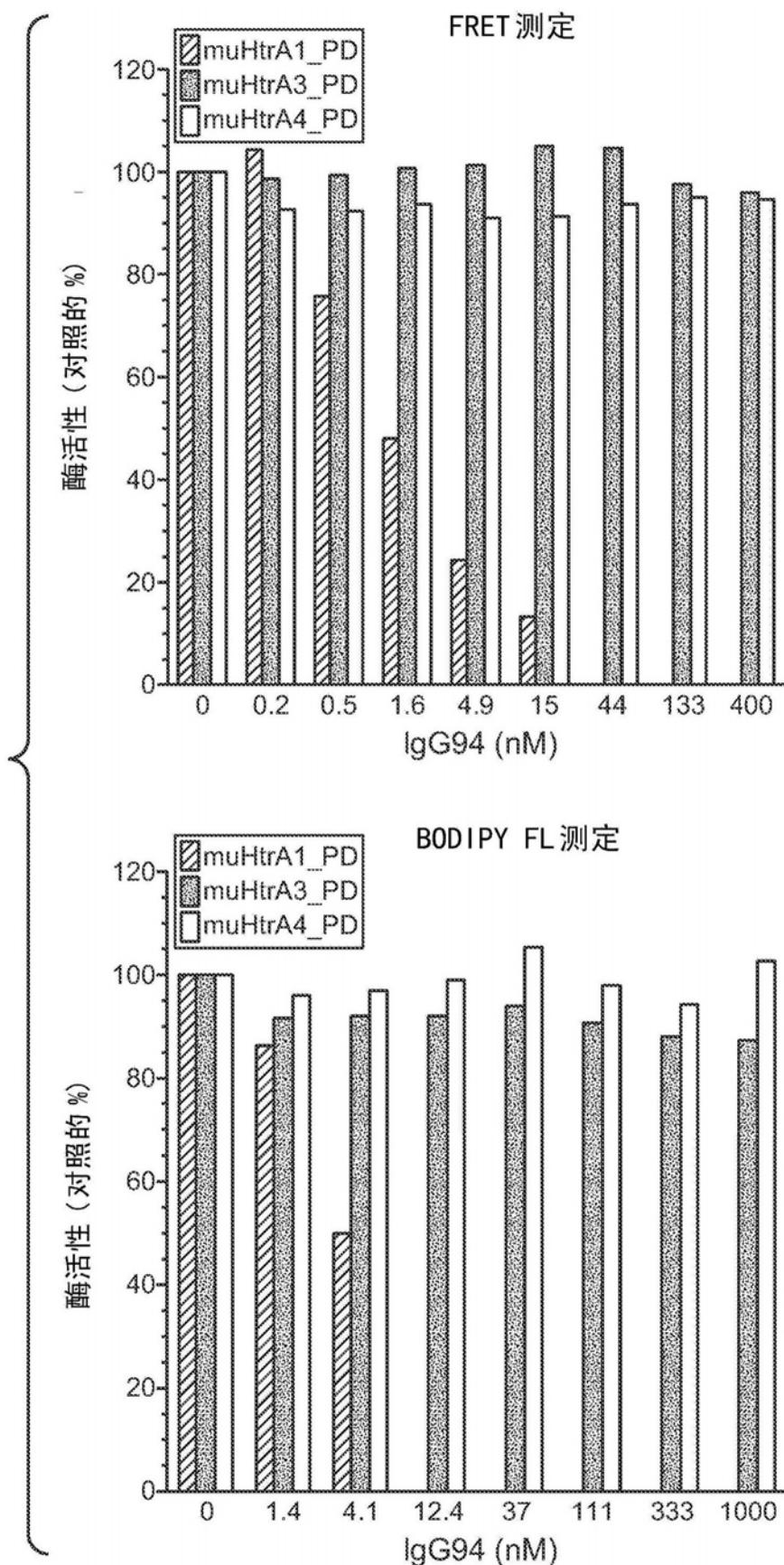


图5

HtrA1 残基编号	YW505.94 Fab [EC50 (nM)] 平均值±SD	相对于 WT EC50 的倍数降低
R190A	—	—
K191A	14.0 ± 3.3	2.5
V201A	112.5 ± 16.4	20
H220A	32.0 ± 1.4	5.7
T223A	62.9 ± 2.2	11.2
N224A	134.6 ± 12.3	24
K225A	52.2 ± 1.3	9.3
R227A	25.9 ± 0.2	4.6
E239A	5.4 ± 0.2	0.9
K241A	23.0 ± 0.5	4.1
K243A	64.9 ± 4.2	11.6
D244A	4.7 ± 0.3	0.8
E247A	41.7 ± 0.9	7.4
K248A	195.8 ± 21.9	35
D250A	9.4 ± 3.5	1.7
Y325A	7.7 ± 0.6	1.4
S328A	2.3 ± 0.3	0.4
L345A	—	—
WT	5.6 ± 0.9	1

图7A

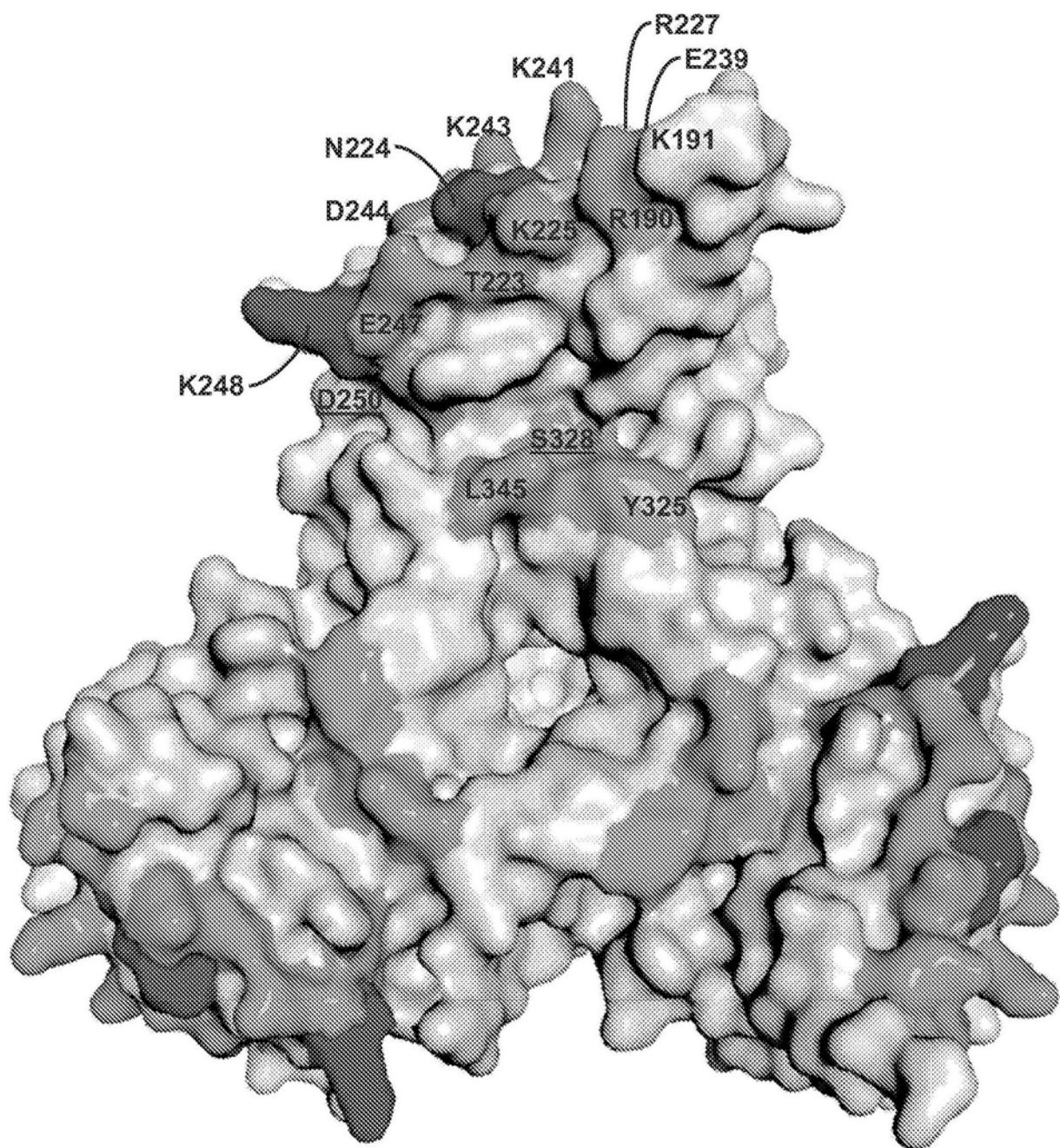


图7B

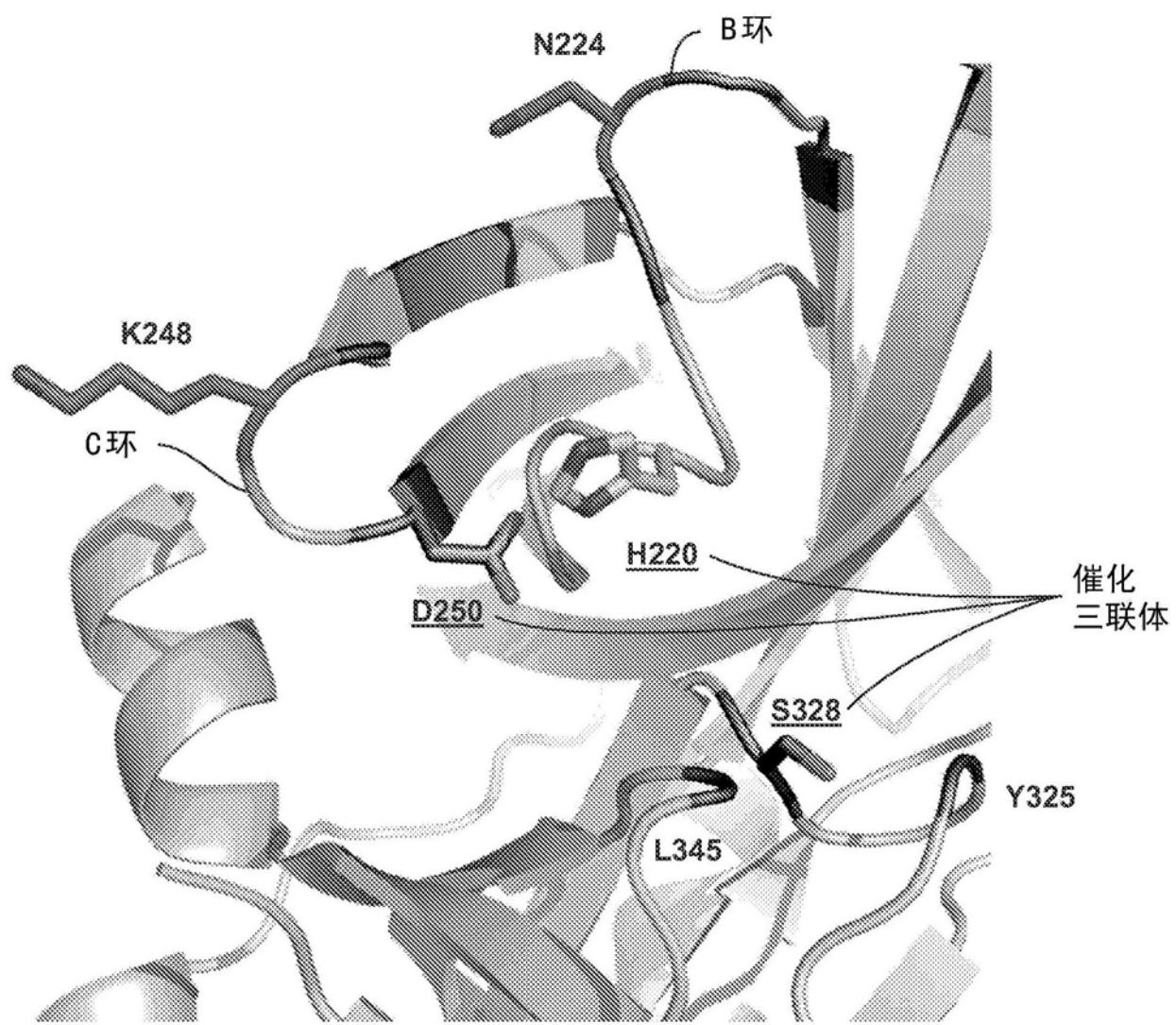


图7C

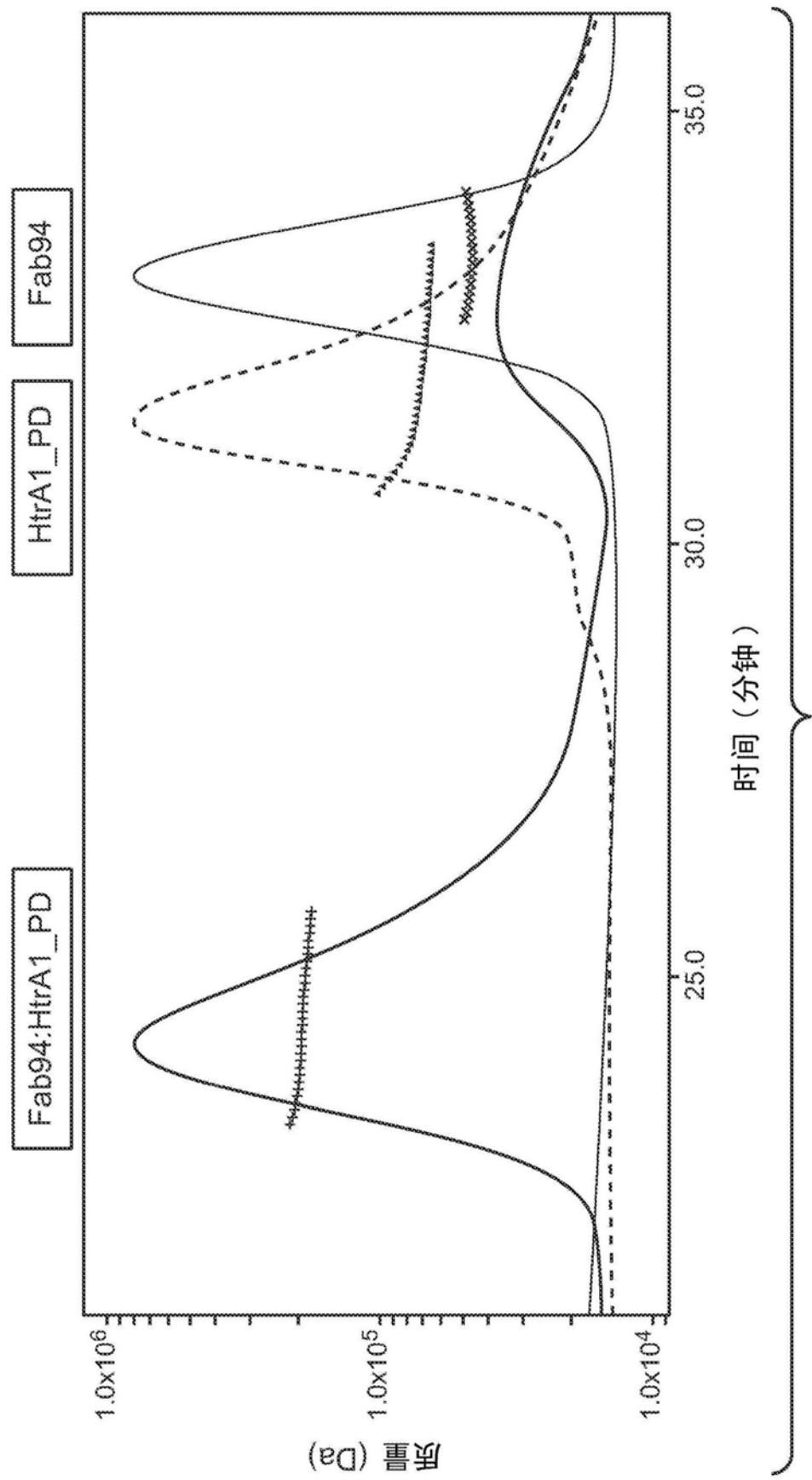


图8A

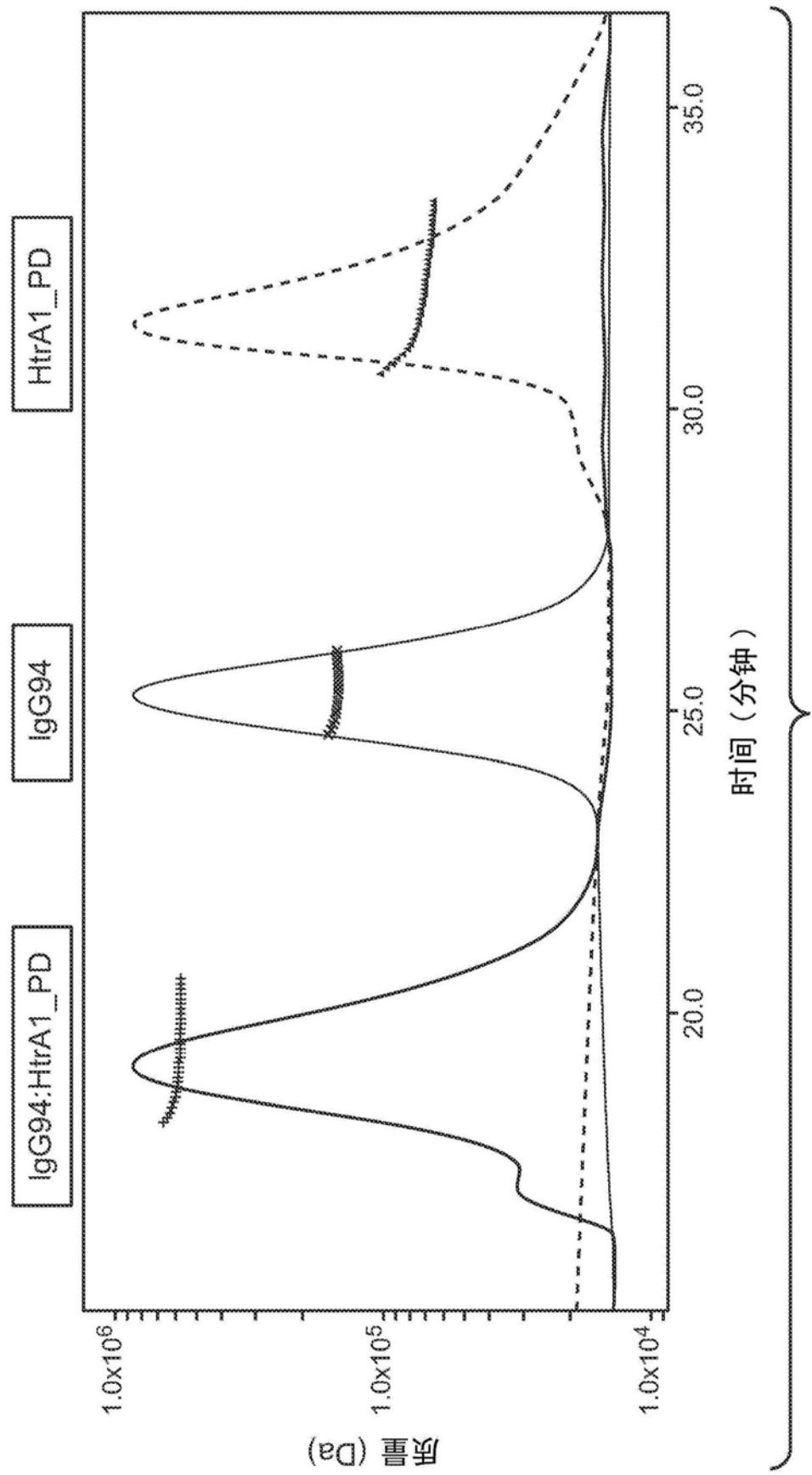
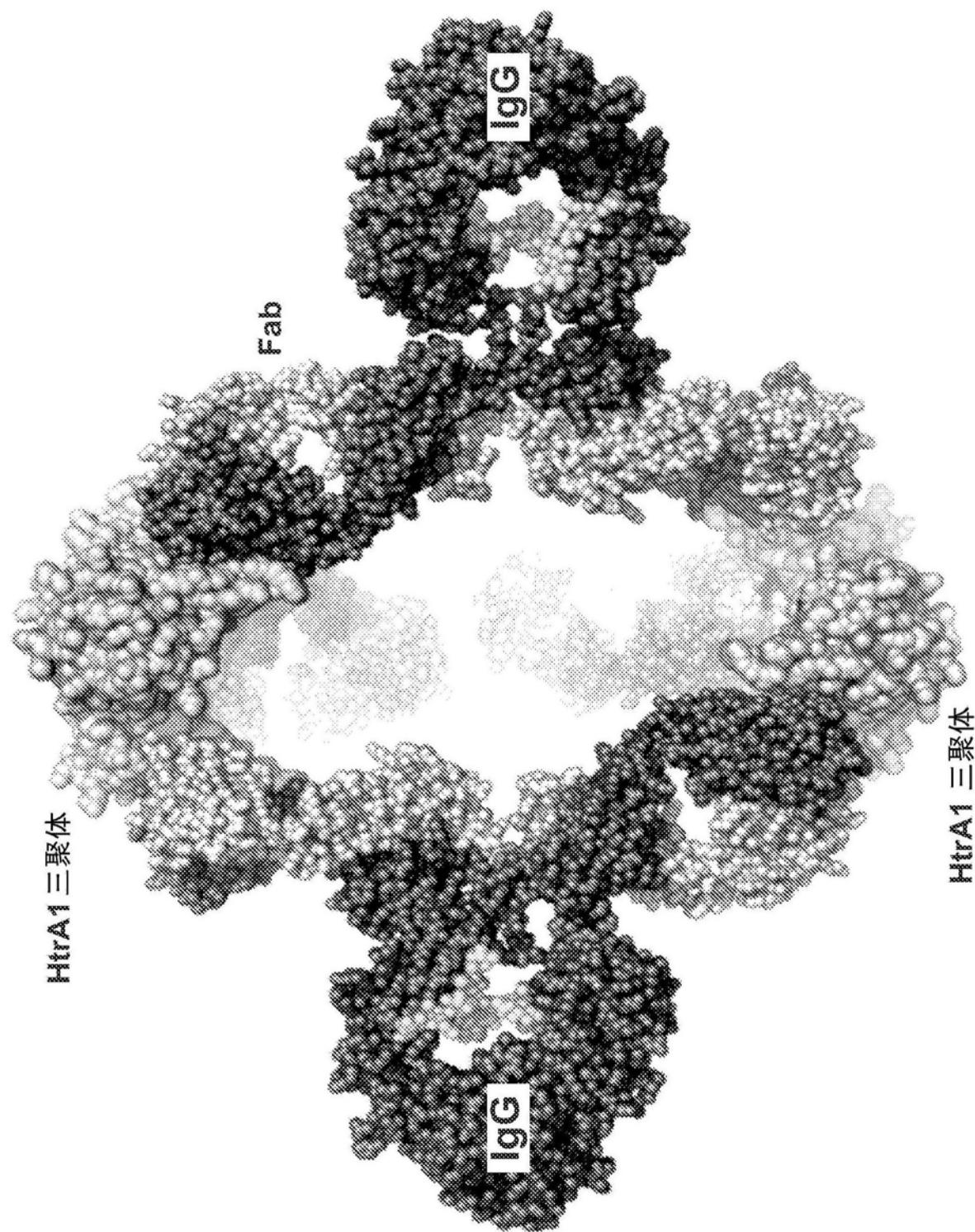


图 8B

图8B



huhtrA1	ADVVEKIAPAVHVIELFLRKLPSKREVPVAVSGSGFIVSEDGLIVTVN	-----KH	226
muHtrA1	ADVVEKIAPAVHVIELLYRKLPFSKREVPVAVSGSGFIVSEDGLIVTVN	-----KN	226
muHtrA3	ADVVEKIAPAVHVIELFLRHPLEGRNVPLSSGSGFIMSEAGLIVTVN	-----STASGRO	209
muHtrA4	AAVVEKVAAPSVVHQLFRRSPLTNQEIPSSSGSGFIVSEDGLIVTVN	-----QQ	230

图10A

huHtrA1	SLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSSGGPLVNLDGEVIGINTLK	346
muHtrA1	SLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSSGGPLVNLDGEVIGINTLK	346
muHtrA3	ALQNTVTTGIVSTAQDGRKELGLRDSMDYIQTDAIINYGNSSGGPLVNLDGEVIGINTLK	329
muHtrA4	SLQNTVTAGIVSTTQRGGREGLKNSDIDYIQTDAIINHGNSSGGPLVNLDGDVIGINTLK	350
	*****	*****
huHtrA1	VTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDROAQKGKAITKKYIGIRMMMSLTSSKAKELKDRHRDFP	406
muHtrA1	VTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDROAQKGKAUTKKYIGIRMMMSLTSSKAKELKDRHRDFP	406
muHtrA3	VAAGISFAIPSDRITRFLSEFQNKHVKD---WKKRFIGIRMRTITPSLVEELKAANPDFFP	386
muHtrA4	VTAGISFAIPSDRIRQFLEDYHERQLKGKAPLQKYLGLRMLPLTNLQEMKRDPEFFP	410
	*****	*****
huHtrA1	DVLSGAYIIEVIPDTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVSANDVSDVIKRESTLNMVVRGN	466
muHtrA1	DVLSGAYIIEVIPDTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVITANDVSDVIKKENTLNMVVRGN	466
muHtrA3	AVSSGLYVQEVVPNSPSQRGGLQDGDLIVKVNGRPLADSSSELQEAVLNESSLLLEVRRGN	446
muHtrA4	DVSSGVFVYEVIOGSAAASSGLRDHDIVSINGQPVTTTDVIEAVKDNDLFLSIIIVLRGs	470
	*****	*****
huHtrA1	EDIMITVPEEIDP 480	
muHtrA1	EDIVITVPEEIDP 480	
muHtrA3	DDLFSIIEPEVVM- 459	
muHtrA4	QTLFLTVTPEIIN- 483	

图10B

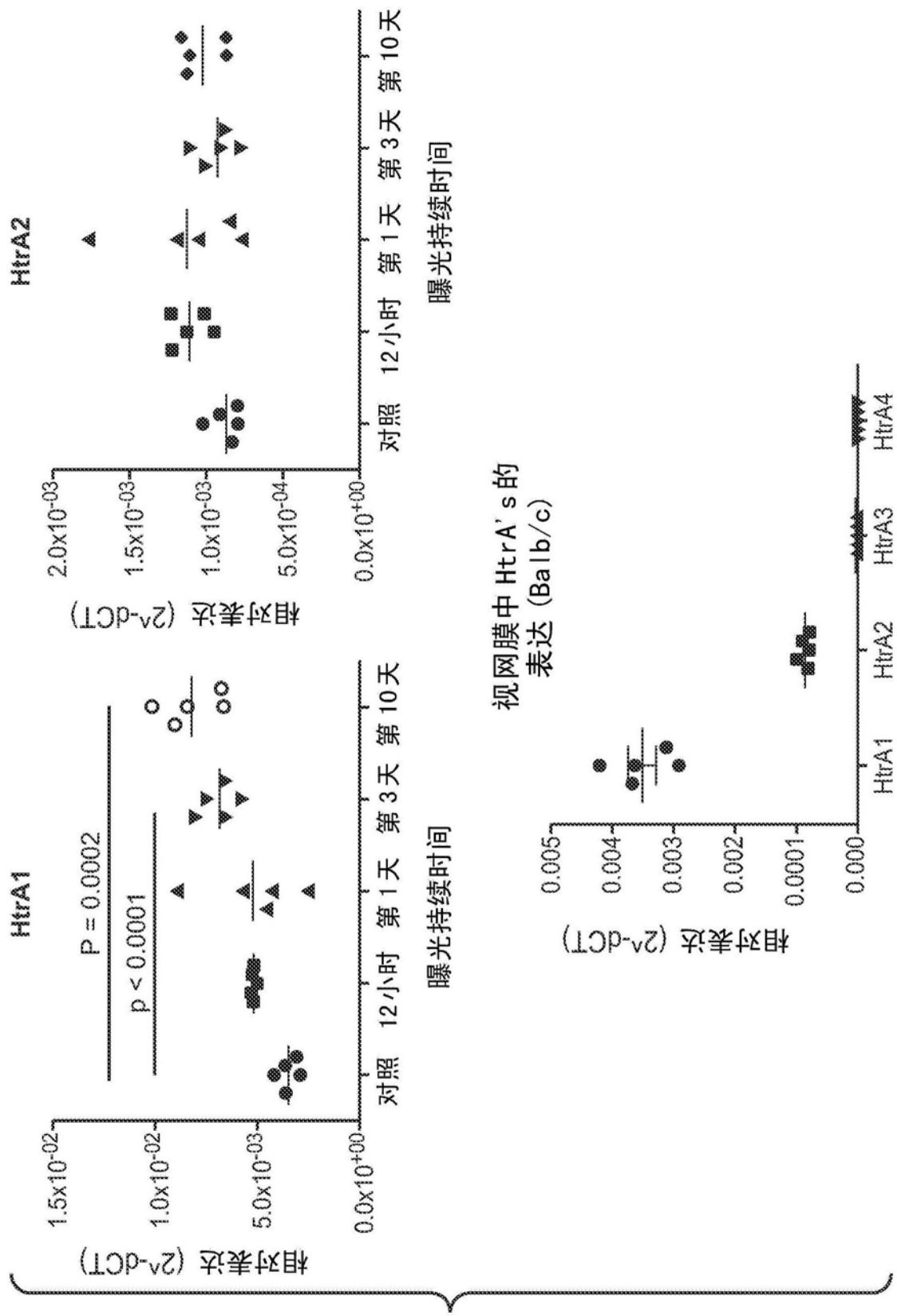


图11

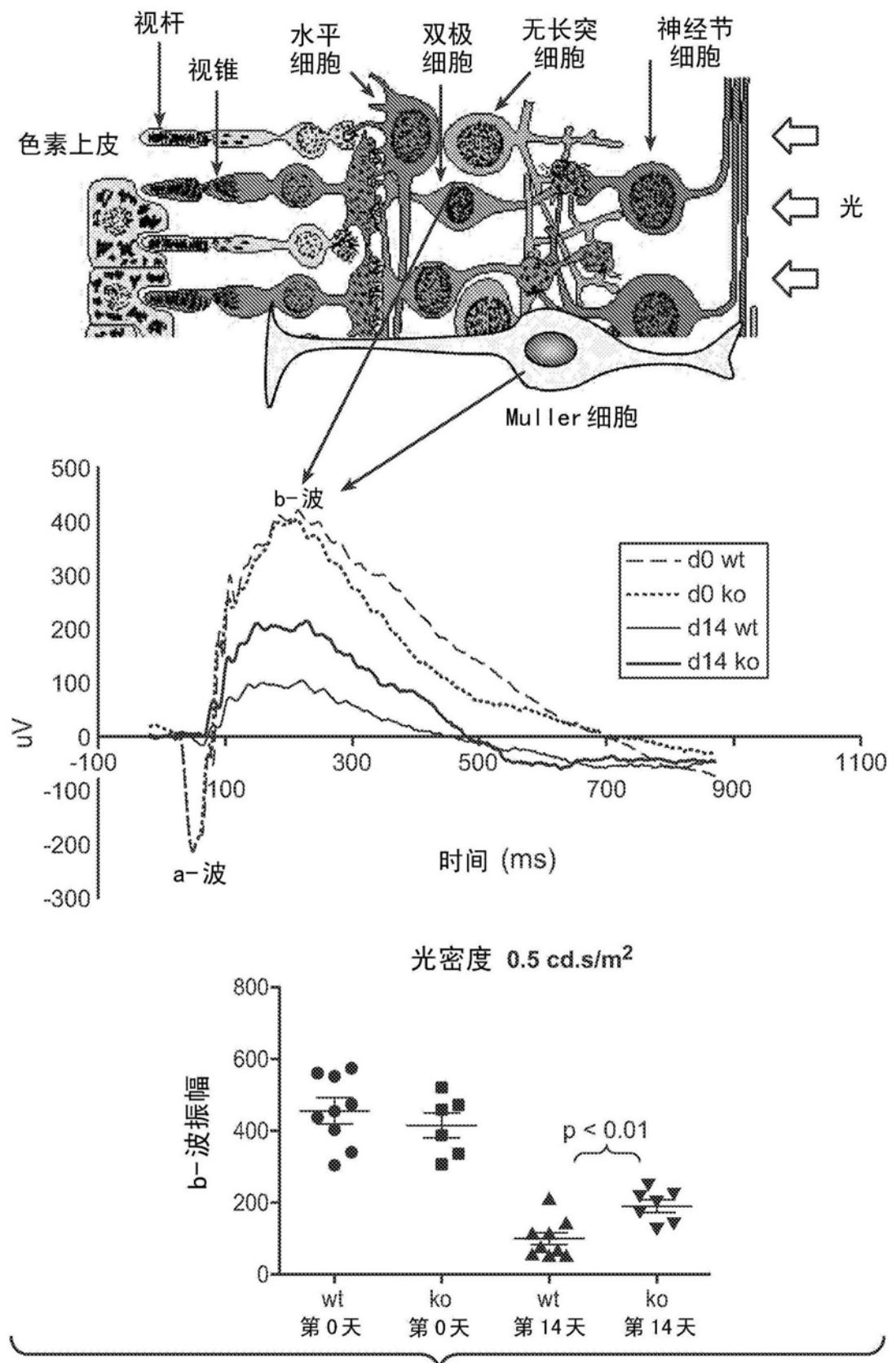


图 12

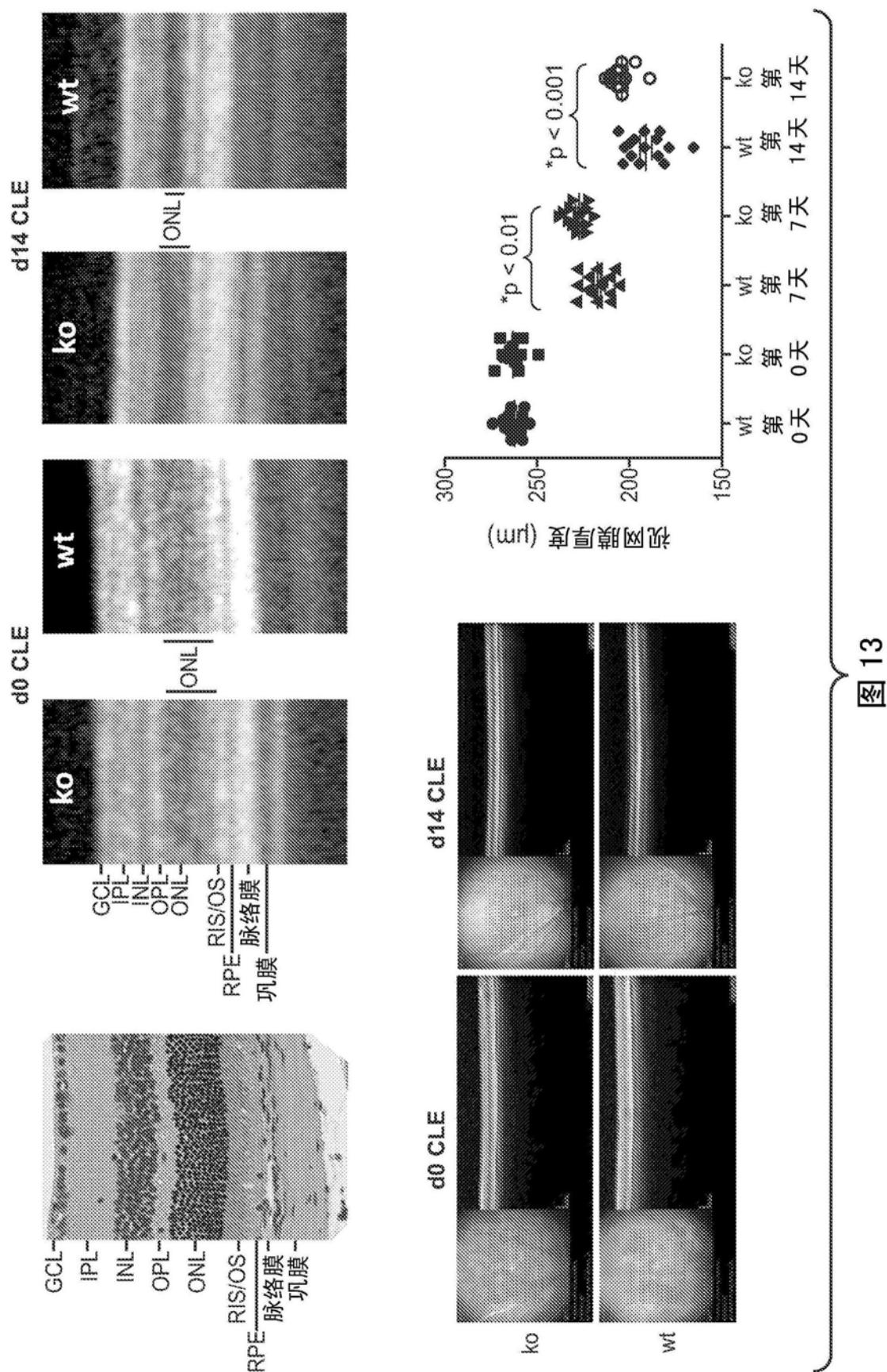


图 13

图13

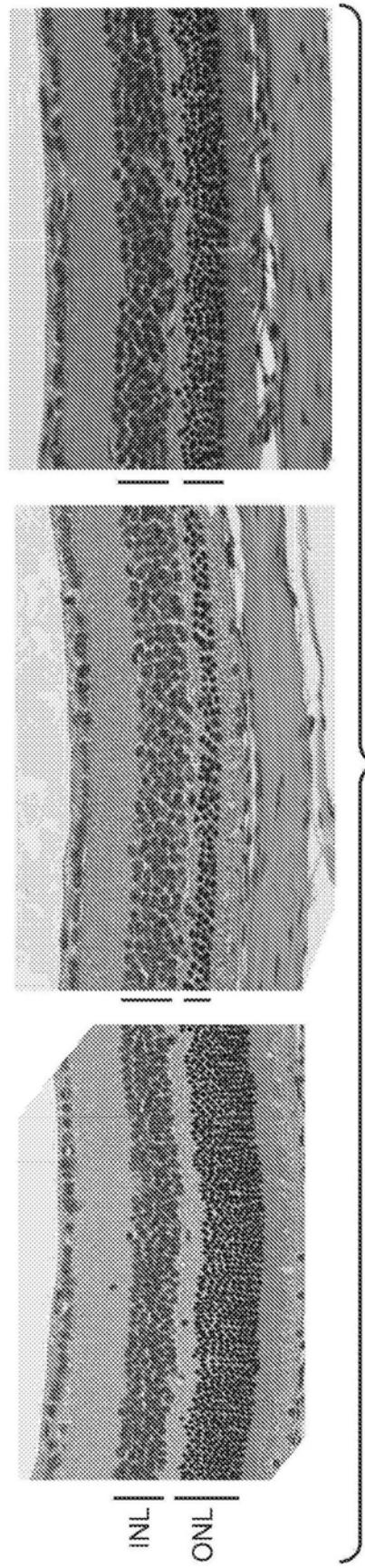
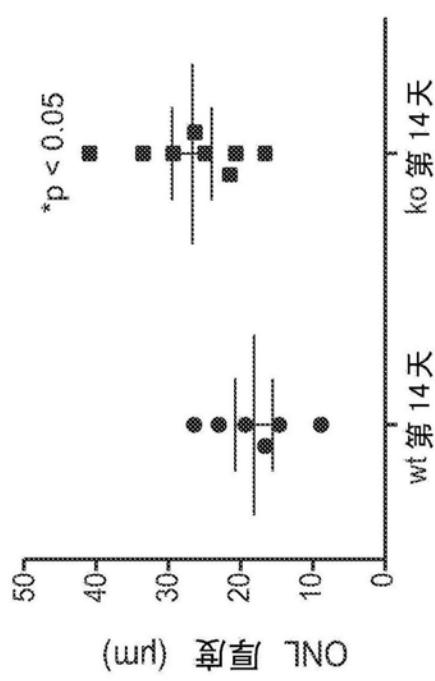
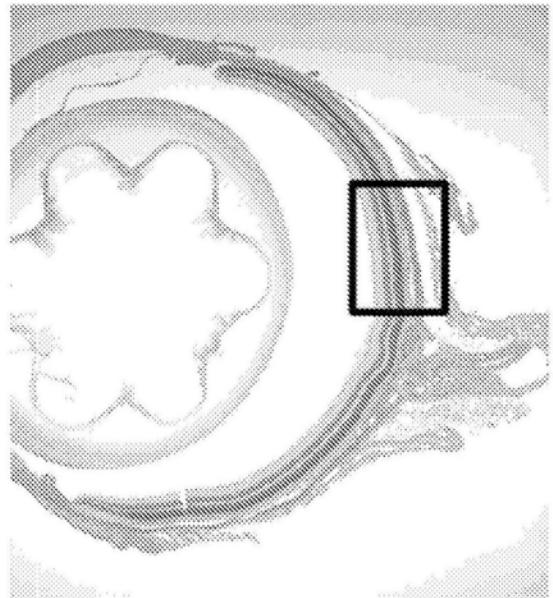


图 14

图14

克隆	CDR-L1												CDR-L2												CDR-L3											
	28	29	30	31	32	33	SEQ	50	51	52	53	54	55	SEQ	91	92	93	94	95	96	SEQ															
YW505.94a (WT)	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	¶	P	P	59															
YW505.94a.1	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	V	V	S	H	P	P	60															
YW505.94a.7	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	N	P	P	61															
YW505.94a.22	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	A	¶	P	P	62															
YW505.94a.26	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	¶	P	P	59															
YW505.94a.28	S	I	N	¶	Y	L	55	S	A	S	P	L	Y	58	S	D	D	¶	P	P	63															
YW505.94a.37	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	S	S	P	A	64															
YW505.94a.38	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	¶	P	P	59															
YW505.94a.39	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	V	V	¶	¶	P	P	65															
YW505.94a.40	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	V	V	A	¶	P	S	66															
YW505.94a.42	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	V	N	S	P	A	67															
YW505.94a.46	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	S	¶	P	A	68															
YW505.94a.47	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	¶	P	P	59															
YW505.94a.50	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	A	P	P	69															
YW505.94a.51	D	V	G	¶	Y	L	56	S	A	S	P	L	Y	58	D	S	¶	L	P	P	70															
YW505.94a.52	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	D	A	A	P	P	71															
YW505.94a.54	V	V	G	N	Y	L	57	S	A	S	P	L	Y	58	S	D	D	H	P	P	72															
YW505.94a.77	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	¶	P	P	59															
YW505.94a.78	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	V	S	¶	P	P	73															
YW505.94a.82	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	V	¶	¶	P	P	59															
YW505.94a.89	D	V	S	¶	A	V	54	S	A	S	P	L	Y	58	S	Y	¶	R	P	P	74															

图15

克隆	CDR-H1												CDR-H2												CDR-H3						
	26	27	28	29	30	31	32	33	SEQ	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	SEQ	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	SEQ
YW505.94a (WT)	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.1	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.7	G	F	S	I	S	D	Y	Y	76	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.22	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.26	G	F	S	I	D	G	Y	Y	77	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.28	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.37	G	F	S	I	S	D	Y	Y	76	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.38	G	F	T	I	Y	D	Y	Y	78	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.39	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.40	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.42	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	D	82	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.46	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	T	W	G	H	Y	84
YW505.94a.47	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	D	82	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.50	G	F	S	I	S	D	Y	Y	76	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.51	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.52	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.54	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.77	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	84
YW505.94a.78	G	F	S	I	A	G	Y	Y	79	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.82	G	F	T	I	S	D	Y	Y	80	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.89	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	D	82	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83

图16

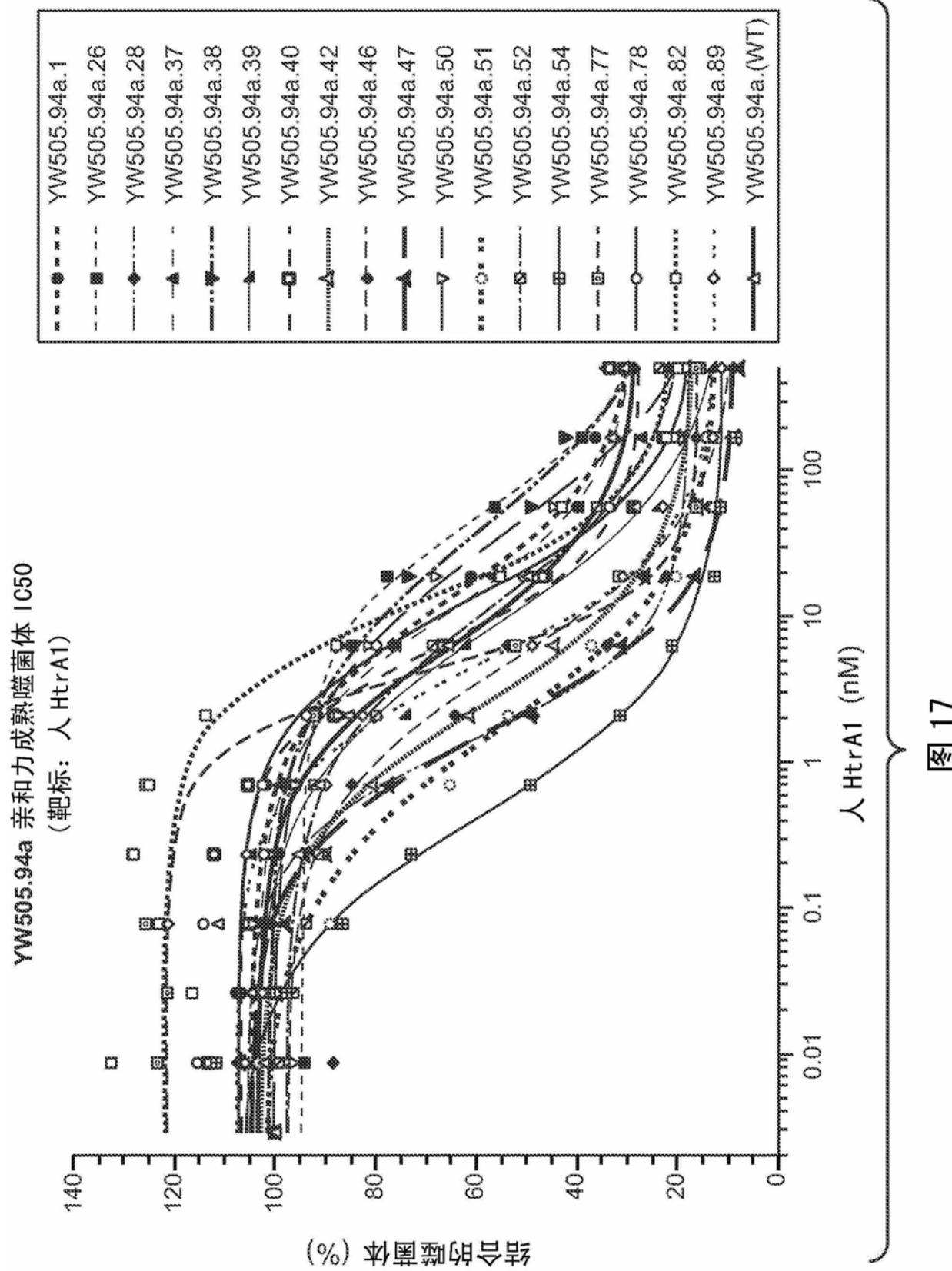


图17

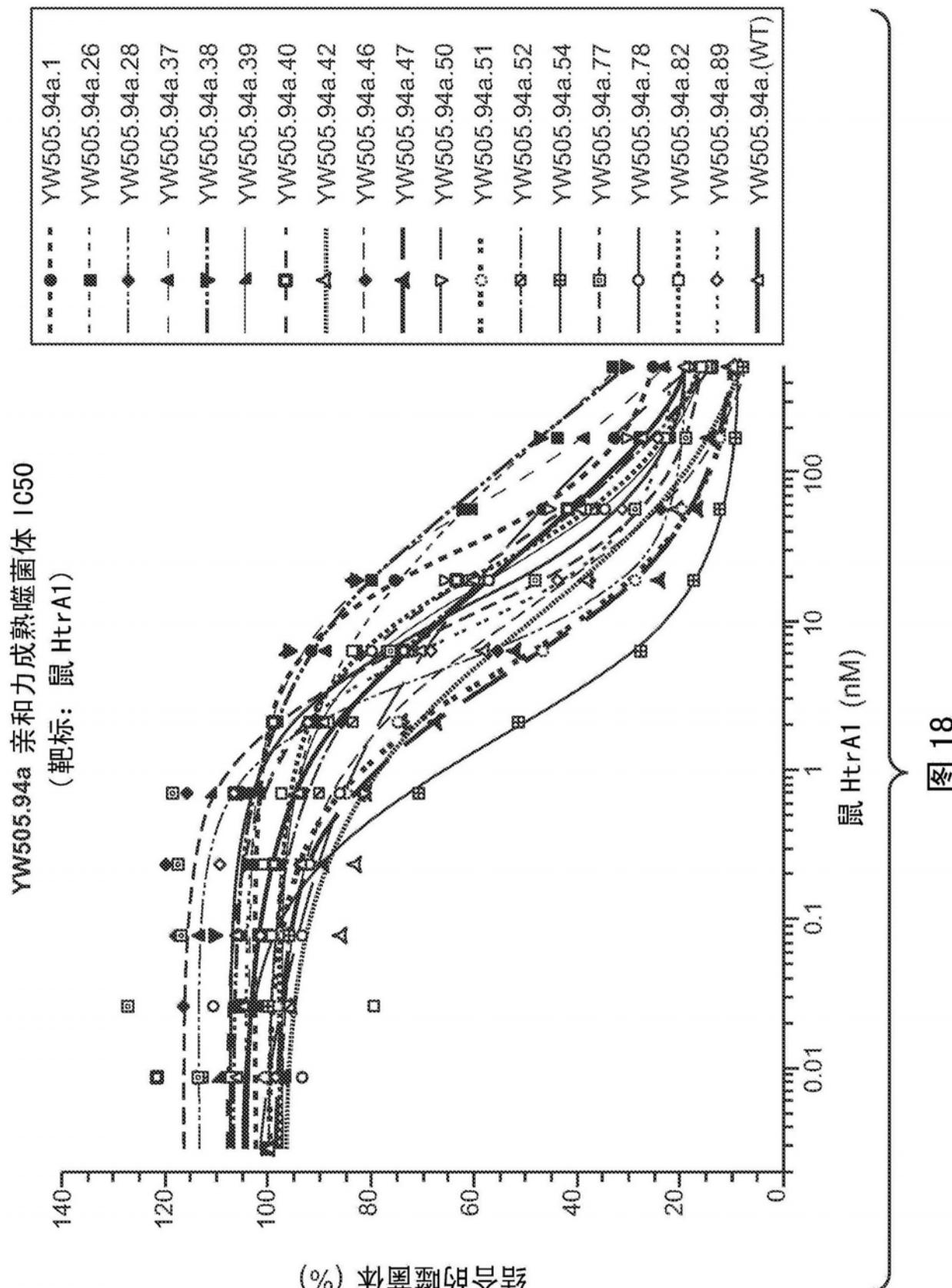


图 18

图18

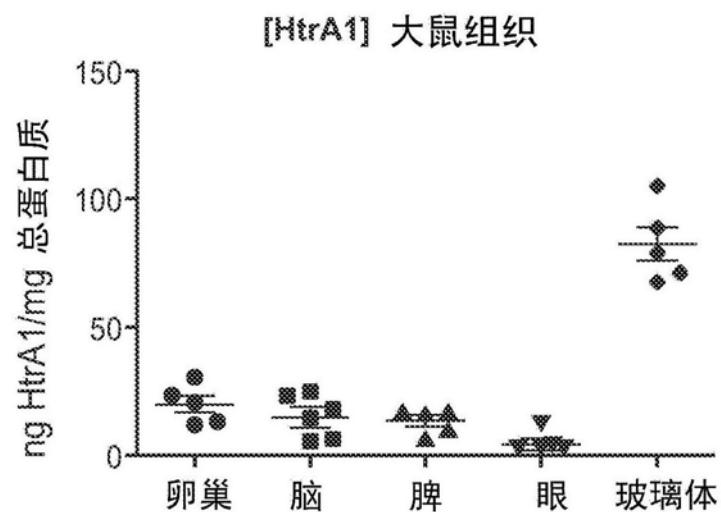


图19A

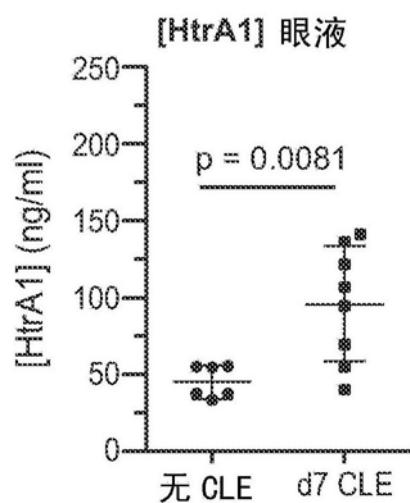


图19B

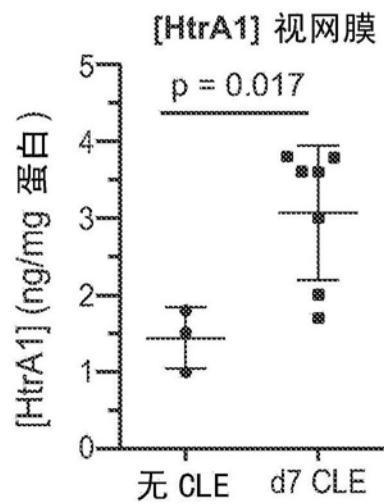


图19C

Abstract:

The present invention relates to anti-HtrA1 antibody and method of use. The invention provides anti-HtrA1 antibody and the method of using the anti-HtrA1 antibody for diagnostic and therapeutic purposes. In particular, the invention provides an isolated antibody that binds to HtrA1, wherein the isolated antibody (i) binds to an epitope comprising N224, K248 or both of HtrA1, and has a dissociation constant of $\leq 500\text{nM}$, and (ii) inhibits the activity of HtrA1 serine protease. The antibody of the invention can be used to treat age-related macular degeneration, macular atrophy, diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity or polypoid choroidal vascular disease in an individual.