



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201417829 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：102134844

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 05 月 23 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2007/05/23

美國

60/939,791

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：賀斯 菲利浦 HASS, PHILIP (US)；殷 吉平 YIN, JIANPING (CA)；凱克 肯尼士 二世 KATSCHKE, KENNETH JR. (US)；史戴夫克 麥克 STEFFEK, MICAH (US)；溫斯曼 克利斯堤恩 WIESMANN, CHRISTIAN (DE)；凡 魯克恩 迦配 曼諾 恩 VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO (NL)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：6 共 67 頁

(54)名稱

預防及治療與補體相關之眼部病症

PREVENTION AND THE TREATMENT OF COMPLEMENT-ASSOCIATED EYE CONDITIONS

(57)摘要

本發明係關於藉由投與因子 D 拮抗劑來預防及治療與補體相關之眼睛病症，諸如脈絡膜新血管形成(CNV)及年齡相關之黃斑變性(AMD)。

A

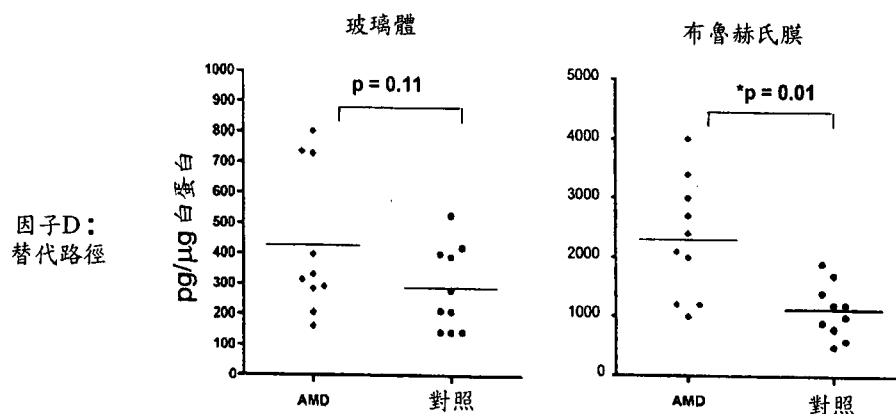


圖1



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201417829 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：102134844

(22)申請日：中華民國 97 (2008) 年 05 月 23 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/395 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

C12N15/09 (2006.01)

A61P27/02 (2006.01)

(30)優先權：2007/05/23

美國

60/939,791

(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：賀斯 菲利浦 HASS, PHILIP (US)；殷 吉平 YIN, JIANPING (CA)；凱克 肯尼士 二世 KATSCHKE, KENNETH JR. (US)；史戴夫克 麥克 STEFFEK, MICAH (US)；溫斯曼 克利斯堤恩 WIESMANN, CHRISTIAN (DE)；凡 魯克恩 迦配 曼諾 恩 VAN LOOKEREN CAMPAGNE, MENNO (NL)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：6 共 67 頁

(54)名稱

預防及治療與補體相關之眼部病症

PREVENTION AND THE TREATMENT OF COMPLEMENT-ASSOCIATED EYE CONDITIONS

(57)摘要

本發明係關於藉由投與因子 D 拮抗劑來預防及治療與補體相關之眼睛病症，諸如脈絡膜新血管形成(CNV)及年齡相關之黃斑變性(AMD)。

A

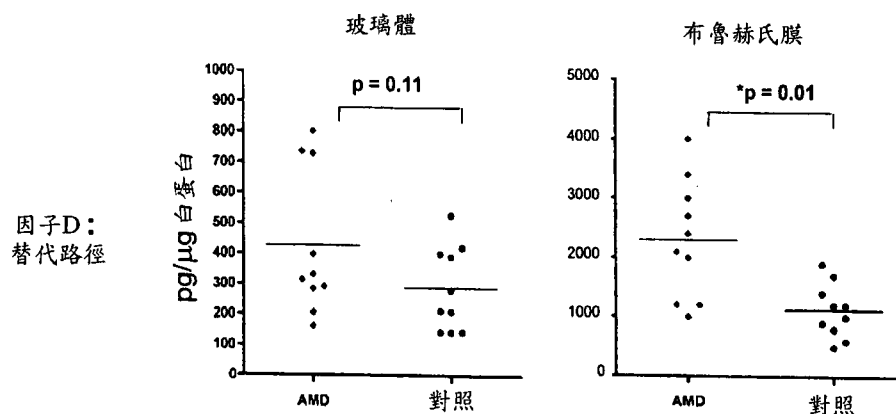


圖1

發明摘要

※ 申請案號：102134844 (由971191945修訂)

※ 申請日：97.5.23

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C02N 15/09 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

【發明名稱】

預防及治療與補體相關之眼部病症

PREVENTION AND THE TREATMENT OF COMPLEMENT-
ASSOCIATED EYE CONDITIONS

○ 【中文】

本發明係關於藉由投與因子D拮抗劑來預防及治療與補體相關之眼睛病症，諸如脈絡膜新血管形成(CNV)及年齡相關之黃斑變性(AMD)。

【英文】

The invention concerns the prevention and treatment of complement-associated eye conditions, such as choroidal neovascularization (CNV) and age-related macular degeneration (AMD), by administration of Factor D antagonists.

○

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1A）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無元件符號說明）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

預防及治療與補體相關之眼部病症

PREVENTION AND THE TREATMENT OF COMPLEMENT-
ASSOCIATED EYE CONDITIONS

【技術領域】

本發明係關於預防及治療與補體相關之眼睛病症，諸如脈絡膜新血管形成(CNV)及年齡相關之黃斑變性(AMD)。

【先前技術】

補體系統係由一系列通常以無活性酶原形式存在之血清糖蛋白組成的複雜酶級聯。兩個主要路徑(經典路徑及替代路徑)可激活補體，兩者在C3水平下合併，其中兩個類似C3轉化酶將C3裂解成C3a及C3b。

巨噬細胞係已顯現一種識別細胞表面表現之鑑別標籤(所謂分子模式)之結構中之細微差異的先天才能之專門細胞(Taylor等人，**Eur J Immunol** 33, 2090-2097 (2003)；Taylor等人，**Annu Rev Immunol** 23, 901-944 (2005)。雖然直接識別此等表面結構為先天免疫性之一基本態樣，但調理作用允許一般巨噬細胞受體介導吞噬，增加吞噬細胞之功效且使吞噬細胞之識別譜系多樣化(Stuart及Ezekowitz, **Immunity** 22, 539-550 (2005))。吞噬過程涉及多個配位體-受體相互作用，且目前清楚各種調理素(包括免疫球蛋白、膠凝素及補體組份)經由與巨噬細胞表面受體之相互作用來引導病原體內在化所需之細胞活性(由Aderem及Underhill, **Annu Rev Immunol** 17, 593-623 (1999)；Underhill及Ozinsky, **Annu Rev Immunol** 20, 825-852 (2002)綜述)。雖

然由生殖系基因編碼之天然免疫球蛋白可識別多種病原體，但大部分調理IgG係經由適應性免疫力產生，且因此經由Fc受體之有效清除非即時的(Carroll, **Nat Immunol** 5, 981-986 (2004))。另一方面，補體快速識別病原體表面分子且預致敏藉由補體受體所吸收之微粒(Brown, **Infect Agents Dis** 1, 63-70 (1991))。

補體由超過30種調理多種病原體以供補體受體識別之血清蛋白組成。視級聯之初始觸發而定，可區別三個路徑(由Walport, **N Engl J Med** 344, 1058-1066 (2001)綜述)。所有三個路徑共用激活中心組份C3之共同步驟，但其不同在於識別性質及導致C3激活之初始生物化學步驟。經典路徑係藉由抗體與病原體表面結合來激活，該等抗體隨後與C1q補體組份結合，引發最終將C3裂解成其活性形式C3b之絲胺酸蛋白酶級聯。凝集素路徑係在碳水化合物基元藉由凝集素蛋白識別後被激活。迄今為止，已鑑別此路徑之三個成員：甘露糖結合之凝集素(MBL)、SIGN-R1家族之凝集素及纖維膠凝蛋白(ficolin)(Pyz等人, **Ann Med** 38, 242-251 (2006))。MBL及纖維膠凝蛋白均與絲胺酸蛋白酶有關，其如同經典路徑中之C1一般，激活組份C2及C4，導致中心C3步驟。替代路徑與經典路徑及凝集素路徑之區別在於其激活係歸因於內部C3酯與病原體表面上之識別基元直接反應。初始C3結合激活表面，經由替代路徑蛋白酶因子B及因子D之作用導致C3b沈積快速放大。重要的是，藉由經典路徑或凝集素路徑沈積之C3b亦可經由因子B及D之作用而導致C3b沈積之放大。在補體激活之所有三個路徑中，調理作用之關鍵步驟為組份C3向C3b之轉變。藉由補體級聯之酶裂解C3使該硫酯曝露於親核進攻，使得C3b經由硫酯功能域共價連接至抗原表面上。此為補體調理之初始步驟。隨後，結合之C3b蛋白水解產生藉由不同受體識別之片段iC3b、C3c及C3dg(Ross及Medof, **Adv Immunol** 37, 217-267 (1985))。此裂解廢除C3b進一步放大C3b沈積且

激活補體級聯之後期組份(包括能夠直接破壞膜之膜攻擊複合物)的能力。然而，巨噬細胞吞噬細胞受體優先識別C3b及其片段；由於酯鍵形成之多功能性，C3介導之調理作用對病原體識別而言為重要的(Holers等人，**Immunol Today** 13, 231-236 (1992))，且因此各種C3降解產物之受體在宿主免疫反應中起重要作用。

C3自身為一種由13個不同功能域組成之複雜且可撓之蛋白質。該分子之核心係由8個所謂的巨球蛋白(MG)功能域組成，該等功能域構成緊密纏繞的C3之 α 及 β 鏈。嵌入此結構中的為CUB(C1r/C1s、Uegf及骨形成蛋白-1)及TED功能域，後者含有使C3b與病原體表面共價締合之硫酯鍵。剩餘功能域含有C3a或充當核心功能域之鏈聯劑及間隔基。C3b及C3c結構與C3之比較證明該分子在經各自蛋白水解下經歷較大構形重排，此不僅曝露TED，而且曝露可與細胞受體相互作用的該分子之其他新表面(Janssen及Gros, **Mol Immunol** 44, 3-10 (2007))。

年齡相關之黃斑變性(AMD)為全世界老年人中失明之主要原因。AMD之特徵為可歸因於黃斑(負責精細視力之眼睛視網膜之高度專化區)之變性及新血管形成變化的中心視力逐漸喪失。最近之評估指出14,000,000人因AMD而失明或視力嚴重受損。該疾病對老年群體及其家庭之身體及精神健康具有極大影響，且正成為主要公眾衛生負擔。

然而，新的發現開始提供與早期AMD有關的相關細胞事件、遺傳因子及生物化學過程之更為清楚的描述。補體因子H基因為多個獨立研究中所鑑別之首個基因，其對AMD之發展賦予重大遺傳風險。因此，三個獨立組報導因子H之胺基酸402處之酪胺酸-組胺酸多態現象與AMD之發展有關(Klein等人，**Science** 308:385-389 (2005)；Haines等人，**Science** 308:419-421 (2005)；及Edwards等人，**Science** 308:421-424 (2005))。已提出藉由疾病相關之因子H等位基因對受損替代路徑之抑制引起或顯著促進AMD發展(Thurman及Holers, **J** 5

Immunol 176:1305-1310 (2006))。

【發明內容】

在一態樣中，本發明係關於一種預防或治療與補體相關之眼睛病症的方法，該方法包含向有需要之個體投與有效量之因子D拮抗劑。

在各個實施例中，有需要之個體為諸如人類之哺乳動物，且因子D拮抗劑係選自由抗因子D抗體及其片段、結合多肽、肽及非肽小分子組成之群。

在一較佳實施例中，因子D拮抗劑為抗體或抗體片段。在各個實施例中，抗體可與因子D之活性位點結合或可與包括因子D之活性位點殘基的抗原決定基結合。

在本發明之範疇內的特異性抗體包括(但不限於)抗體20D12、31A9、25A1及32H12及其變異體。在一較佳實施例中，抗體或抗體片段基本上結合與抗體20D12相同，或包含抗體20D12之重鏈及/或輕鏈CDR序列(SEQ ID NO: 1及2)或為抗體20D12或其片段之抗原決定基。

抗因子D抗體包括人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

抗體片段可為(例如)Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、互補決定區(CDR)片段、線性抗體、單鏈抗體分子、微型抗體、雙功能抗體或由抗體片段形成之多特異性抗體。

與補體相關之眼睛病症包括(例如)年齡相關之黃斑變性(AMD)、脈絡膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性及其他缺血相關之視網膜病、糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、逢希伯-林道疾病(von Hippel-Lindau disease)、眼睛之組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜新血管形成及視網膜新血管形成。

在另一態樣中，本發明係關於一種套組，其包含因子D拮抗劑及用於投與該拮抗劑以治療與補體相關之眼睛病症的說明書。

在另一態樣中，本發明係關於因子D拮抗劑在製備用於治療與補體相關之眼睛病症之藥劑中的用途。

在另一態樣中，本發明係關於因子D拮抗劑，其係用於治療與補體相關之眼睛病症。

【圖式簡單說明】

圖1A.自正常及AMD供體眼睛獲得之玻璃體及布魯赫氏膜(Bruch's)中的因子D含量。因子D含量係藉由如所述之因子D特異性ELISA來量測。B：眼睛中因子D之總含量係藉由計算布魯赫氏膜中表現之因子D之總量及玻璃體中發現之因子D總數來確定。

圖2.來自AMD供體眼睛之布魯赫氏膜之橫截面的因子D免疫組織化學。插圖顯示在布魯赫氏膜上面分層堆積之脈絡膜疣(druse)中因子D之染色。除脈絡膜疣外，布魯赫氏膜及脈絡膜對因子D呈陽性。

圖3.對補體替代路徑具有選擇性之溶血檢定中12D20之表徵。IC50值如下所示且檢定如方法部分中所述來執行。

圖4.鼠科單株抗體12D20之重鏈及輕鏈可變域序列(SEQ ID NO: 1及2)。

圖5.各種抗因子D抗體之抗原決定基定位。指示其在溶血檢定中之相對效能。

圖6.天然人類因子D多肽之胺基酸序列(SEQ ID NO:3)。

表1. AMD中補體組份之分析。

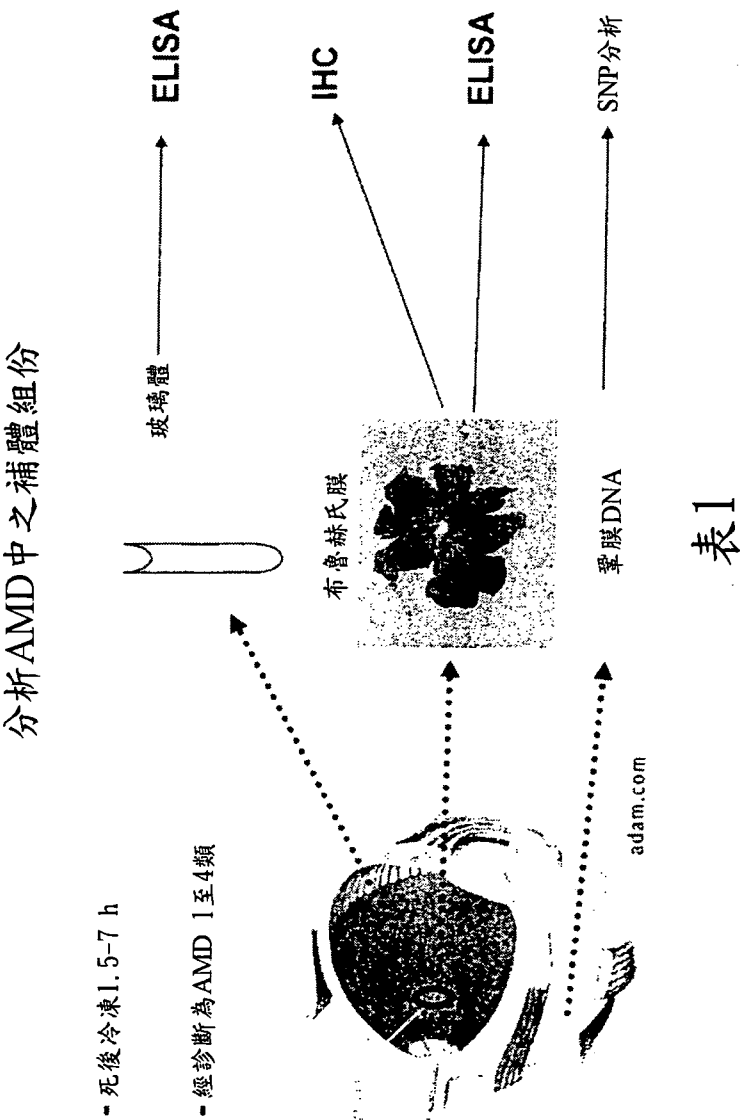


表2.研究中使用之供體組織。

研究中所用之供體組織					解剖記錄	
Genentech #	年齡	性別	AMD階段	視網膜中央凹傷痕，很少黃斑脈絡膜疣	黃斑脈絡膜疣	FS
1	78	F	3	視網膜中央凹傷痕，很少黃斑脈絡膜疣	FS	
1A	78	F		無明顯脈絡膜疣		
2	85	M	4	地區性萎縮	GA	
2A	85	F		無明顯脈絡膜疣		
3	87	F	4	視網膜中央凹中維管傷痕	FS	
3A	87	F		無明顯脈絡膜疣		
4	76	M	4	地區性萎縮	GA	
4A	74	M		存在兩個小的脈絡膜疣		
5	81	F	3+	中等黃斑脈絡膜疣	MD	
5A	81	M		無明顯脈絡膜疣		
6	84	F	3	大量黃斑脈絡膜疣	MD	
6A	86	M		無明顯脈絡膜疣		
7	83	F	4	視網膜中央凹中維管傷痕	FS	
7A	83	M		無明顯脈絡膜疣		
8	72	M	4	視網膜中央凹傷痕，中等黃斑脈絡膜疣	FS	
8A	71	F		無明顯脈絡膜疣		
9	81	F	4	視網膜中央凹傷痕，中等黃斑脈絡膜疣	FS	
9A	83	M		無明顯脈絡膜疣		
10	77	M	3	大量黃斑脈絡膜疣	MD	
10A	78	M		無明顯脈絡膜疣		

☐ 地區性萎縮
☐ 視網膜中央凹傷痕
☐ AMD 3期

表2

【實施方式】

I.定義

術語"因子D"及"補體因子D"可交換使用且係指天然序列及變異因子D多肽。

"天然序列"因子D為無論其製備模式如何，具有與天然來源之因子D多肽相同之胺基酸序列的多肽。因此，天然序列因子D可自天然分離或可藉由重組及/或合成方式產生。除成熟因子D蛋白(諸如，成

熟人類因子D蛋白(NM_001928；SEQ ID NO:3))外，術語"天然序列因子D"特定涵蓋天然存在之因子D前驅體形式(例如無活性之前體蛋白，其係經蛋白水解裂解以產生活性形式)、天然存在之變異形式(例如，替代性拼接形式)及天然存在之因子D對偶基因變異體以及具有與天然來源之因子D多肽相同胺基酸序列的因子D分子之結構構形變異體。非人類動物(包括高級靈長類動物及非人類哺乳動物)之因子D多肽特定包括在此定義內。

"因子D變異體"或"補體因子D變異體"意謂如下所定義之具有與天然序列因子D多肽(諸如，具有SEQ ID NO:3之天然序列人類因子D多肽)至少約80%胺基酸序列一致性的活性因子D多肽。通常，因子D變異體將具有與SEQ ID NO:3之成熟人類胺基酸序列至少約80%胺基酸序列一致性或至少約85%胺基酸序列一致性或至少約90%胺基酸序列一致性或至少約95%胺基酸序列一致性或至少約98%胺基酸序列一致性或至少約99%胺基酸序列一致性。較佳地，最高程度之序列一致性出現在因子D之活性位點內。

因子D之"活性位點"係由人類因子D序列中之His-57、Asp-102及Ser-195(胰凝乳蛋白酶原計數)來定義。因子D在主要特異性袋之底部具有Asp189(胰凝乳蛋白酶計數)且裂解Arg肽鍵。催化三合體係由His-57、Asp-102及Ser-195組成。Asp-102及His-57顯示與其他絲胺酸蛋白酶相比非典型之構形(Narayana等人，*J. Mol. Biol.* 235 (1994), 695-708)。在S1袋底部之Asp189與Arg218之間觀測到獨特鹽橋，其升高環214-218且產生深且窄之S1袋(Jing等人，*J. Mol. Biol.* 282 (1998) 1061-1081)。藉由突變分析顯示此環及活性位點周圍之若干其他殘基為因子D酯水解活性之關鍵結構決定子(Kim等人，*J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24399-24405)。基於此等結果，提出因子D在與C3b結合之因子B結合後可能經受構形變化，導致蛋白水解活性之表現(Volanakis及

Narayana, *Protein Sci.* 5 (1996) 553-564)。

"胺基酸序列一致性百分比(%)"係定義為在將序列及必要時引入之間隙比對以實現最大百分比序列一致性而不考慮將任何保守取代作為序列一致性之部分後，候選序列中與參考因子D序列中胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列一致性百分比而進行之比對可以此項技術內之多種方式實現，例如使用公開可用之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括實現所比較之全長序列上最大比對所需之任何演算法。隨後相對於較長序列來計算序列一致性，亦即，即使較短序列顯示與一部分較長序列有100%序列一致性，但總的序列一致性將小於100%。

"核酸序列一致性百分比(%)"係定義為在將序列及必要時引入之間隙比對以實現最大序列一致性百分比後，候選序列中與參考因子D編碼序列中核苷酸一致之核苷酸百分比。為測定核酸序列一致性百分比而進行之比對可以此項技術內之多種方式實現，例如使用公開可用之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括實現所比較之全長序列上最大比對所需之任何演算法。隨後相對於較長序列來計算序列一致性，亦即，即使較短序列顯示與一部分較長序列有100%序列一致性，但總的序列一致性將小於100%。

"經分離"核酸分子為經鑑別且與至少一種通常在核酸之天然來源中與其締合之污染核酸分子分離的核酸分子。經分離核酸分子不同於天然發現之形式或設置。因此，經分離核酸分子與其存在於天然細胞中之核酸分子不同。然而，經分離核酸分子包括通常表現所編碼多肽之細胞中所含之核酸分子，例如，其中該核酸分子處於與天然細胞之染色體位置不同的染色體位置。

"經分離"編碼因子D多肽之核酸分子為經鑑別且與至少一種通常在編碼因子D之核酸之天然來源中與其締合之污染核酸分子分離的核酸分子。經分離編碼因子D多肽之核酸分子不同於天然發現之形式或設置。因此，經分離編碼因子D多肽之核酸分子與其存在於天然細胞中之編碼核酸分子不同。然而，經分離編碼因子D之核酸分子包括通常表現因子D之細胞中所含的編碼因子D之核酸分子，例如，其中該核酸分子處於與天然細胞之染色體位置不同的染色體位置。

術語"拮抗劑"以最廣泛之意義使用，且包括能夠中和、阻斷、部分或完全抑制、廢除、減少或干擾因子D生物活性的任何分子。因子D拮抗劑包括(但不限於)結合因子D且能夠中和、阻斷、部分或完全抑制、廢除、減少或干擾因子D活性(諸如，因子D參與與補體相關之眼睛病症之病理的能力)的抗因子D抗體及其抗原結合片段、其他結合多肽、肽及非肽小分子。

本文中所定義之"小分子"具有約600道爾頓(dalton)以下、較佳約1000道爾頓以下之分子量。

在本發明之因子D拮抗劑之背景下的"活性"或"生物活性"為拮抗(部分或完全抑制)因子D之生物活性的能力。因子D拮抗劑之較佳生物活性為實現與因子D相關之疾病或病症(諸如，與補體相關之眼睛病症)之狀態(例如，病理)的可量測之改善的能力。活性可在活體外或活體內測試(包括結合檢定)中使用相關動物模型或人類臨床試驗來測定。

術語"與補體相關之眼睛病症"係以最廣泛之意義使用且包括病理涉及補體(包括經典及替代路徑及尤其補體替代路徑)之所有眼睛病症。與補體相關之眼睛病症包括(但不限於)黃斑變性疾病(諸如年齡相關之黃斑變性(AMD)之所有階段，包括乾性及濕性(非滲出性及滲出性))、脈絡膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性及其他缺血相

關之視網膜病及其他眼內新血管形成疾病，諸如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、逢希伯-林道疾病、眼睛之組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜新血管形成及視網膜新血管形成。較佳與補體相關之眼睛病症之群包括年齡相關之黃斑變性(AMD)(包括非滲出性(濕性)及滲出性(乾性或萎縮)AMD)、脈絡膜新血管形成(CNV)、糖尿病性視網膜病(DR)及眼內炎。

"治療"為出於防止病症病理之發展或改變病症病理之目的而進行的介入。因此，"治療"係指治療與預防劑或預防措施兩者。需要治療者包括已患有病症者以及有待預防病症者。在治療免疫相關之疾病中，治療劑可直接改變免疫反應之組份的反應程度，或致使疾病對其他治療劑(例如，抗生素、抗真菌劑、消炎劑、化學治療劑等)之治療更敏感。

疾病(諸如，與補體相關之眼睛病症)之"病理"包括損害患者健康之所有現象。此包括(但不限於)異常或無法控制之細胞生長(嗜中性細胞、嗜伊紅血球、單核細胞、淋巴細胞)、抗體產生、自體抗體產生、補體產生、干擾相鄰細胞之正常功能、細胞激素或其他分泌產物以異常含量釋放、任何發炎或免疫反應之抑制或加劇、發炎細胞(嗜中性細胞、嗜伊紅血球、單核細胞、淋巴細胞)浸潤至細胞空間等。

如本文所用之術語"哺乳動物"係指任何動物，其分類為包括(但不限於)人類、高級靈長類動物、家畜及動物園、運動或玩賞動物(諸如馬、豬、牛、犬、貓及雪貂等)之哺乳動物。在本發明之一較佳實施例中，哺乳動物為人類。

與一或多種其他治療劑"組合"之投藥包括同時(併發)投藥及以任何順序連續投藥。

"治療有效量"為實現目標疾病或病症(諸如，與補體相關之眼睛病症)之狀態(例如，病理)的可量測之改善所需的"因子D拮抗劑"之量 5

術語"對照序列"係指在特定宿主生物體內表現可操作連接之編碼序列所需的DNA序列。適於原核生物之對照序列(例如)包括啓動子、視情況操縱子序列(operator sequence)及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啓動子、聚腺苷酸化信號及增強子。

核酸在將其置於與另一核酸序列之功能性關係中時係"可操作連接"的。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前體蛋白，則其可操作連接於多肽之DNA；若啓動子或增強子影響序列之轉錄，則其可操作連接於編碼序列；或若核糖體結合位點經定位以有助於轉譯，則其可操作連接於編碼序列。一般而言，"可操作連接"意謂所連接之DNA序列為相鄰的，且在分泌前導序列之狀況下為相鄰的且處於閱讀相中。然而，增強子不必為相鄰的。連接係藉由在適宜限制性位點處接合來實現。若該等位點不存在，則根據習知操作使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

雜交反應之"嚴格性"可易於由一般技術者確定，且一般係視探針長度、洗滌溫度及鹽濃度而定之經驗性計算。一般而言，較長探針需要較高溫度以進行適當退火，而較短探針需要較低溫度。雜交一般視互補鏈存在於低於其熔融溫度之環境中時變性DNA再退火之能力而定。探針與可雜交序列之間所需之同源性程度愈高，可使用之相對溫度愈高。因此，由此可見較高相對溫度將傾向於產生更嚴格之反應條件，而較低溫度將傾向於產生較不如此嚴格之反應條件。關於雜交反應嚴格性之額外詳情及解釋參見Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

如本文所定義，"嚴格條件"或"高嚴格條件"可由以下要求來鑑別：(1)對於洗滌而言，採用低離子強度及高溫，例如在50℃下0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉；(2)在雜交期間採用在42℃下之變性劑，諸如甲醯胺，例如50%(v/v)甲醯胺，以及0.1%

牛血清白蛋白/ 0.1% Ficoll/0.1%聚乙炔吡咯啉酮/50 mM磷酸鈉緩衝液 (pH 6.5)及750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉；或(3)採用在42℃下50%甲醯胺、5×SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5×丹哈德溶液(Denhardt's solution)、經超音波處理之鮭魚精DNA(50 µg/ml)、0.1% SDS及10%硫酸葡聚糖，以及在42℃下0.2×SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)中之洗滌液及55℃下50%甲醯胺中的洗滌液，接著在55℃下由含有EDTA之0.1×SSC組成的高嚴格洗滌液。

"中等嚴格條件"可如 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989所述來鑑別，且包括使用不如上文所述者嚴格之洗滌溶液及雜交條件(例如，溫度、離子強度及%SDS)。中等嚴格條件之一實例為在37℃下在包含以下各物之溶液中培育隔夜：20%甲醯胺、5×SSC(150 mM NaCl、15 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5×丹哈德溶液、10%硫酸葡聚糖及20 mg/mL變性剪切鮭魚精DNA，接著在1×SSC中在約37-50℃下洗滌過濾器。熟練技工將認識到如何為適應諸如探針長度及其類似物之因素之需要來調整溫度、離子強度等。

術語"經標記之抗原決定基"在用於本文中時係指包含與"標籤多肽"融合之本發明多肽的嵌合多肽。標籤多肽具有足夠殘基以提供抗原決定基(抗體可針對其產生)，而其足夠短使得其不干擾其所融合之多肽的活性。標籤多肽較佳亦相當獨特以便使抗體實質上不與其他抗原決定基交叉反應。合適之標籤多肽一般具有至少6個胺基酸殘基，且通常介於約8個與50個胺基酸殘基之間(較佳地，介於約10個與20個胺基酸殘基之間)。

術語"抗體"係以最廣泛之意義使用且尤其涵蓋(但不限於)單一抗因子D單株抗體(包括促效劑、拮抗劑及中和抗體)及具有多抗原決定

基特異性之抗因子D抗體組合物。如本文所用之術語"單株抗體"係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即，除可以微量存在之可能的天然存在之突變外組成該群體之個別抗體係相同的。

如本文所用之術語"單株抗體"係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即，除可以微量存在之可能的天然存在之突變外組成該群體之個別抗體係相同的。單株抗體對單一抗原位點具有高度特異性。此外，與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的習知(多株)抗體製劑對比，每一單株抗體係針對抗原上之單一決定子。修飾語"單株"表明該抗體在自實質上均質之抗體群體獲得時的特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，根據本發明待使用之單株抗體可藉由Kohler等人(1975) *Nature* 256:495首次描述之融合瘤方法製備，或可藉由重組DNA方法製備(參見例如美國專利第4,816,567號)。亦可使用例如Clackson等人(1991) *Nature* 352:624-628及Marks等人(1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597中描述之技術自噬菌體抗體文庫分離出"單株抗體"。

本文中之單株抗體尤其包括："嵌合"抗體(免疫球蛋白)，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，而該(等)鏈之剩餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源；以及該等抗體之片段，只要其呈現所需生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855)。

"人類化"形式之非人類(例如，鼠科)抗體為含有自非人類免疫球蛋白獲得之最小序列的嵌合抗體。對於大部分而言，人類化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者高變區之殘基係經來自具有所需特異性、親和力及能力之非人類物種(供體抗體)(諸如小鼠、

大鼠、兔或非人類靈長類動物)高變區之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未在接受者抗體或供體抗體中發現之殘基。進行此等修飾以進一步改善抗體之效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上全部之至少一個且通常兩個可變域，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白之彼等高變環且全部或實質上全部FR區為人類免疫球蛋白序列之彼等FR區。人類化抗體視情況亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)(通常為人類免疫球蛋白之免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。關於進一步詳情，參見Jones等人(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323-329；及Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596。

"物種依賴性抗體"為對來自第一哺乳動物物種之抗原的結合親和力比對來自第二哺乳動物物種之該抗原同系物的結合親和力強的抗體。通常，物種依賴性抗體"特異性結合"人類抗原(亦即，具有不超過約 1×10^{-7} M、較佳不超過約 1×10^{-8} M且最佳不超過約 1×10^{-9} M之結合親和力(K_d)值)，但對來自第二非人類哺乳動物物種之該抗原同系物具有比其對人類抗原之結合親和力弱至少約50倍或至少約500倍或至少約1000倍的結合親和力。物種依賴性抗體可為如上定義之各種類型抗體中之任一者，但較佳為人類化或人類抗體。

如本文所用之"抗體突變體"或"抗體變異體"係指物種依賴性抗體之胺基酸序列變異體，其中物種依賴性抗體之一或多個胺基酸殘基已經修飾。該等突變體必定具有小於100%的與物種依賴性抗體之序列一致性或相似性。在一較佳實施例中，抗體突變體將具有對物種依賴性抗體之重鏈或輕鏈可變域之胺基酸序列有至少75%、更佳至少80%、更佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%胺基酸序列一致性或相似性的胺基酸序列。相對於此序列之一致性或相似性在本文中

係定義為在將序列及必要時引入之間隙比對以實現最大序列一致性百分比後，候選序列中與物種依賴性抗體殘基一致(亦即，相同殘基)或相似(亦即，來自基於共同側鏈性質之相同組的胺基酸殘基，見下文)之胺基酸殘基百分比。N-末端、C-末端或內部擴展、刪除、或嵌入至可變域外之抗體序列中無一應被解釋為影響序列一致性或相似性。

"經分離"抗體為已經鑑別且與其天然環境之組份分離及/或自天然環境之組份中回收之抗體。其天然環境之污染組份為將干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白或非蛋白溶質。在較佳實施例中，抗體將(1)純化至如藉由勞立(Lowry)方法所測定超過95重量%之抗體，且最佳超過99重量%；(2)純化至藉由使用旋杯式序列分析儀足以獲得至少15個殘基之N末端或內部胺基酸序列的程度，或(3)使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染在還原或非還原條件下藉由SDS-PAGE純化至均質。由於抗體天然環境之至少一種組份將不存在，所以經分離抗體包括重組細胞內之原位抗體。然而，經分離抗體通常將藉由至少一個純化步驟來製備。

本文所用之"抗體可變域"係指包括互補決定區(CDR；亦即CDR1、CDR2及CDR3)及構架區(FR)之胺基酸序列的抗體分子之輕鏈及重鏈部分。 V_H 係指重鏈可變域。 V_L 係指輕鏈可變域。根據本發明中所用之方法，分配給CDR及FR之胺基酸位置可根據Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987及1991))來定義。抗體或抗原結合片段之胺基酸編號係根據Kabat之胺基酸編號。

本文所用之術語"互補決定區"(CDRs，亦即CDR1、CDR2及CDR3)係指其存在為抗原結合所必需的抗體可變域之胺基酸殘基。各可變域通常具有三個CDR區，經鑑定為CDR1、CDR2及CDR3。各互補決定區可包含如Kabat所定義之"互補決定區"之胺基酸殘基(亦即，

大致輕鏈可變域中之殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)及重鏈可變域中之31-35(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)；Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))及/或"高變環"之殘基(亦即，大致輕鏈可變域中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)及重鏈可變域中之26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)；Chothia及Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917)。在一些情況下，互補決定區可包括根據Kabat所定義之CDR區與高變環兩者之胺基酸。舉例而言，抗體4D5之重鏈之CDRH1包括胺基酸26至35。

"構架區"(下文中為FR)為CDR殘基以外之可變域殘基。各可變域通常具有四個經鑑定為FR1、FR2、FR3及FR4之FRs。若CDRs根據Kabat定義，則輕鏈FR殘基位於大致殘基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)及98-107(LCFR4)，重鏈FR殘基位於大致重鏈殘基中之殘基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)及103-113(HCFR4)。若CDRs包含高變環之胺基酸殘基，則輕鏈FR殘基位於大致輕鏈中之殘基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)及97-107(LCFR4)，重鏈FR殘基位於大致重鏈殘基中之殘基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)及102-113(HCFR4)。在一些情況下，當CDR包含如Kabat所定義之CDR及高變環兩者之胺基酸時，FR殘基將相應調整。舉例而言，當CDRH1包括胺基酸H26-H35時，重鏈FR1殘基於位置1-25，FR2殘基於位置36-49。

本文所用之"密碼子組"係指一組用以編碼所需變異胺基酸之不同核苷酸三聯體序列。例如可藉由固相合成來合成一組寡核苷酸，其包括代表該密碼子組所提供之核苷酸三聯體之所有可能組合且將編碼所需胺基酸組的序列。密碼子名稱之標準形式為IUB代碼之標準形式，其為此項技術中已知且述於本文。密碼子組通常由3個斜體大寫字母

表示，例如NNK、NNS、XYZ、DVK及其類似物。因此，本文所用之"非任意密碼子組"係指編碼部分滿足、較佳完全滿足本文所述之胺基酸選擇標準之選擇胺基酸的密碼子組。在某些位置具有所選核苷酸"簡并"之寡核苷酸的合成在此項技術中熟知，例如TRIM方法(Knappek等人(1999) *J. Mol. Biol.* 296:57-86；Garrard及Henner (1993) *Gene* 128:103)。該等具有某些密碼子組之寡核苷酸組可使用商業核酸合成儀(可獲自(例如)Applied Biosystems, Foster City, CA)來合成或可購得(例如，購自Life Technologies, Rockville, MD)。因此，一組經合成具有特定密碼子組之寡核苷酸通常將包括複數個具有不同序列之寡核苷酸，該等差異係由整個序列內之密碼子組產生。如根據本發明所使用之寡核苷酸具有允許雜交至可變域核酸模板之序列且亦可(但未必)包括限制酶位點以達成(例如)選殖目的。

術語"抗體片段"係在本文中以最廣泛之意義使用且包括(但不限於)Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb及互補決定區(CDR)片段、線性抗體、單鏈抗體分子、微型抗體、雙功能抗體及由抗體片段形成之多特異性抗體。

"Fv"片段為含有完整抗原識別及結合位點之抗體片段。此區係由一重鏈可變域與一輕鏈可變域緊密締合(其在例如scFv中本質上可為共價的)之二聚體組成。正係在此構型中，各可變域之三個CDR相互作用以界定V_H-V_L二聚體之表面上的抗原結合位點。六個CDR或其子集共同向抗體賦予抗原結合特異性。然而，甚至單個可變域(或Fv之一半，其僅包含三個對抗原具特異性之CDR)亦具有識別且結合抗原之能力，但親和力通常比整個結合位點低。

"Fab"片段含有輕鏈之可變域及恆定域及重鏈之可變域及第一恆定域(CH1)。F(ab')₂抗體片段包含一對一般在羧基末端附近藉由其間的鉸鏈半胱胺酸共價連接之Fab片段。此項技術中亦已知抗體片段之

其他化學偶合。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之 V_H 及 V_L 域，其中此等域存在於單一多肽鏈中。一般而言，Fv多肽進一步包含在 V_H 與 V_L 域之間使scFv能夠形成抗原結合所需之結構的多肽連接子。關於scFv之綜述，參見Pluckthun之*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含與同一多肽鏈(V_H 及 V_L)中之輕鏈可變域(V_L)連接之重鏈可變域(V_H)。藉由使用過短而無法使同一鏈上兩個域之間配對的连接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更完全地描述於(例如)EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448中。

詞語"線性抗體"係指Zapata等人(1995 *Protein Eng.* 8(10):1057-1062)中描述之抗體。簡言之，此等抗體包含一對串聯Fd區段(V_H - C_H1 - V_H - C_H1)，其與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區。線性抗體可為雙特異性抗體或單特異性抗體。

如本文所用之"文庫"係指複數個抗體或抗體片段序列(例如，本發明之多肽)或編碼此等序列之核酸，該等序列在根據本發明之方法引入此等序列中之變異胺基酸之組合方面不同。

"噬菌體呈現"為一種使變異多肽以融合蛋白形式呈現於噬菌體(例如，絲狀噬菌體)粒子表面上之鞘蛋白之至少一部分中的技術。噬菌體呈現之實用性係在於可針對彼等以高親和力與靶抗原結合之序列將隨機化蛋白質變異體之龐大文庫快速且有效分類的事實。已使用肽及蛋白質文庫於噬菌體上之呈現來針對具有特異性結合性質之多肽篩檢數百萬多肽。已使用多價噬菌體呈現方法來經由與絲狀噬菌體之基

因III或基因VIII之融合呈現小隨機肽及小蛋白質。Wells及Lowman (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362及其中所引用之參考文獻。在單價噬菌體呈現中，將蛋白質或肽文庫與基因III或其一部分融合，且在野生型基因III蛋白質存在下以低含量表現以使噬菌體粒子呈現融合蛋白之一個複本或不呈現。相對於多價噬菌體而言，親和力影響係降低的以便基於固有配位體親和力進行分類，且使用使DNA操作簡化之噬粒載體。Lowman及Wells (1991) *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216。

"噬粒"為具有一例如ColE1之細菌複製起點及噬菌體之基因間區域之一複本的質體載體。噬粒可用於任何已知噬菌體，包括絲狀噬菌體及人字形噬菌體。質體一般亦將含有一用於耐抗生素性之可選擇標記物。選殖至此等載體中之DNA區段可繁殖為質體。當為此等載體提供場所之細胞具有產生噬菌體粒子所需之所有基因時，質體之複製模式改為滾環式複製(rolling circle replication)以產生一股質體DNA之複本及封裝噬菌體粒子。噬粒可形成感染性或非感染性噬菌體粒子。此術語包括含有噬菌體鞘蛋白基因或其片段之噬粒，該基因或其片段與異源多肽基因以基因融合形式連接以使該異源多肽呈現於噬菌體粒子之表面上。

術語"噬菌體載體"意謂含有異源基因且能夠複製之噬菌體之雙股複製形式。噬菌體載體具有一允許噬菌體複製及噬菌體粒子形成之噬菌體複製起點。噬菌體較佳為絲狀噬菌體，諸如M13、f1、fd、Pf3噬菌體或其衍生物；或人字形噬菌體，諸如 λ 、21、phi80、phi81、82、424、434等或其衍生物。

如本文所用之"溶劑可及位置"係指基於抗體或抗原結合片段之結構、整體結構及/或模型化結構，經測定可潛在地接近溶劑及/或與諸如抗體特異性抗原之分子接觸的來源抗體或抗原結合片段之重鏈及輕

鏈可變區中胺基酸殘基之位置。通常在CDR中及蛋白質外部上發現此等位置。如本文所定義之抗體或抗原結合片段之溶劑可及位置可使用此項技術中已知之若干演算法中之任一者來確定。較佳地，使用來自抗體之三維模型之座標、較佳使用諸如InsightII程式(Accelrys, San Diego, CA)之電腦程式來確定溶劑可及位置。溶劑可及位置亦可使用此項技術中已知之演算法(例如Lee及Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379及Connolly (1983) *J. Appl. Cryst.* 16, 548)來確定。溶劑可及位置之確定可使用適於蛋白質模型化之軟體及自抗體獲得之三維結構資訊來執行。可用於達成此等目的之軟體包括SYBYL Biopolymer Module軟體(Tripos Associates)。一般且較佳地，在演算法(程式)需要使用者輸入尺寸參數時，計算中所使用之探針之"尺寸"係設定為半徑為約1.4埃或更小。此外，Pacios (1994) *Comput. Chem.* 18(4): 377-386已描述使用用於個人電腦之軟體測定溶劑可及區域及面積方法。

II.詳細描述

補體在身體防禦中起重要作用，且與免疫系統之其他組份一起保護個體以免病原體侵入體內。然而，若未適當激活或控制，則補體亦可引起對宿主組織之損傷。不適當之補體激活包含於多種疾病之發病機制中，將該等疾病稱為與補體相關之疾病或病症，諸如免疫複合物及自體免疫疾病及各種發炎病症，包括補體介導之發炎組織損傷。與補體相關之疾病之病理係變化的且可能涉及長期或短期補體激活、整個級聯、僅一個級聯(例如，經典或替代路徑)、僅級聯之一些組份的激活等。在一些疾病中，補體片段之補體生物活性導致組織損傷及疾病。因此，補體抑制劑具有高度治療潛力。替代路徑之選擇性抑制劑將尤其有用，此係因為經由經典路徑自血液中清除病原體及其他生物體將保持完整。

本發明之因子D拮抗劑適用於預防及治療與補體相關之眼睛病症 5

(病理涉及補體(包括經典及替代路徑及尤其補體替代路徑)之所有眼睛病症及疾病)，諸如黃斑變性疾病(諸如年齡相關之黃斑變性(AMD)之所有階段，包括乾性及濕性(非滲出性及滲出性))、脈絡膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性及其他缺血相關之視網膜病、眼內炎及其他眼內新血管形成疾病，諸如糖尿病性黃斑水腫、病理性近視、逢希伯-林道疾病、眼睛之組織胞漿菌病、視網膜中央靜脈阻塞(CRVO)、角膜新血管形成及視網膜新血管形成。與補體相關之眼睛病症之較佳群包括年齡相關之黃斑變性(AMD)(包括非滲出性(濕性)及滲出性(乾性或萎縮)AMD)、脈絡膜新血管形成(CNV)、糖尿病性視網膜病(DR)及眼內炎。

AMD為年齡相關之黃斑變性，其係60歲以上之個體中不可逆視功能障礙的主要原因。存在兩種類型AMD：非滲出性(乾性)及滲出性(濕性)AMD。乾性或非滲出性形式涉及視網膜中央(黃斑)下面之視網膜色素上皮細胞(RPE)之萎縮及肥大改變以及RPE上之沈積物(脈絡膜疣)。患有非滲出性AMD之患者可進展為濕性或滲出性AMD形式，其中稱為脈絡膜新血管形成膜(CNVM)之異常血管在視網膜下擴大，漏出體液及血液，且最終引起視網膜中及視網膜下致盲橢圓形傷痕。非滲出性AMD(其通常為滲出性AMD之前驅體)更為常見。非滲出性AMD之表現係變化的；可存在硬的脈絡膜疣、軟的脈絡膜疣、RPE地區性萎縮及色素結塊。在AMD早期補體組份沈積於RPE上且為脈絡膜疣之主要成份。

本發明尤其係關於高危險AMD(包括3類及4類AMD)之治療。3類AMD之特徵為在雙眼中不存在晚期AMD，至少一眼具有20/32或更佳之視力以及至少一個大脈絡膜疣(例如，125 μm)、擴大(如藉由脈絡膜疣面積所量測)的中間脈絡膜疣或不涉及黃斑中心之地區性萎縮(GA)或此等之任何組合。3類AMD(仍認為其為"乾性"AMD)具有轉變為脈

絡膜新血管形成(CNV)之高危險性。

4類高危AMD(劃分為"濕性"AMD)之特徵為指標眼睛中視力為20/32或更佳且無晚期AMD(涉及黃斑中心之GA或脈絡膜新血管形成之特徵)。對側眼之特徵為晚期AMD或視力低於20/32(可歸因於AMD黃斑病)。通常，高危AMD若未經治療，則以比1或2類(非高危)AMD進展速率高約10-30倍之速率快速進展為脈絡膜新血管形成(CNV)。

發現因子D拮抗劑尤其適用於預防AMD(尤其3類或4類AMD)進展為CNV及/或預防未受影響或受較少影響之對側眼中AMD或CNV之發展/進展。在此情況中，術語"預防"係以最廣泛之意義使用以包括完全或部分阻斷及減緩疾病進展以及延遲更嚴重形式之疾病的發作。處於發展或進展為高危(4類)AMD或CMV之高危險性中的患者尤其受益於本發明之此態樣。

已知補體因子H(CFH)多態現象與個體發展AMD及/或CNV之危險性有關。CFH之突變可激活補體，其又可能導致AMD/CNV。近來已報導補體因子H(CFH)多態現象解釋50%之AMD歸因危險性(Klein等人，*Science* 308:385-9 (2005))。已發現CFH(HF1/CFH)之常見單倍體(haplotype)使個體易患上年齡相關之黃斑變性(Hageman等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(2):7227-7232 (2005))。AMD已經分離為常染色體顯性特質，其中該疾病基因座定位於標記物D1S466與D1S413之間的染色體1q25-q31，最大Lod評分(maximum lod score)為約3.20(Klein等人，*Arch Ophthalmol.* 116(8):1082-9 (1998)；Majewski等人，*Am. J. Hum. Genet.* 73(3):540-50 (2003)；Seddon等人，*Am. J. Hum. Genet.* 73(4):780-90 (2003)；Weeks等人，*Am. J. Ophthalmol.* 132(5):682-92 (2001)；Iyengar等人，*Am. J. Hum. Genet.* 74(1):20-39 (2004))；定位於標記物D12S1391與D2S1384之間的染色體2q3/2q32，最大Lod評分為2.32/2.03(Seddon等人，見上文)；定位於標記物 5

D12S1300與D12S1763之間的3p13，最大Lod評分爲2.19(Majewski等人，見上文；Schick等人，*Am. J. Hum. Genet.* 72(6):1412-24 (2003))；定位於標記物D6S1056與DS249之間的6q14，最大Lod評分爲3.59/3.17(Kniazeva等人，*Am. J. Ophthalmol.* 130(2):197-202 (2000))；定位於標記物D9S934處之9q33，最大Lod評分爲2.06(Mejwski等人，見上文)；定位於標記物D10S1230處之10q26，最大Lod評分爲3.06(Majewski等人，見上文；Iyengar等人，見上文；Kenealy等人，*Mol. Vis.* 10:57-61 (2004))；定位於標記物D17S928處之17q25，最大Lod評分爲3.16(Weeks等人，見上文)；及定位於標記物D22S1045處之22q12，最大Lod評分爲2.0(Seddon等人，見上文)。因此，遺傳篩檢爲鑑別患者爲預防性治療(包括預防疾病進展爲更嚴重之形式，諸如AMD至CNV)之尤其優良候選者的重要部分。

1.抗因子D抗體

本文之發明包括抗因子D抗體之產生及用途。用於產生抗體之例示性方法更詳細地描述於以下部分中。

使用來源於哺乳動物物種之因子D抗原來選擇抗因子D抗體。抗原較佳爲人類因子D。然而，來自其他物種之因子D(諸如，鼠科因子D)亦可用作靶抗原。可將來自各種哺乳動物物種之因子D抗原自天然來源中分離。在其他實施例中，抗原係藉由重組方法產生或使用此項技術中已知之其他合成方法來製備。

所選抗體通常對因子D抗原具有足夠強之結合親和力。舉例而言，抗體可以不超過約5 nM、較佳不超過約2 nM且更佳不超過約500 pM之 K_d 值與人類因子D結合。抗體親和力可藉由例如基於表面電漿共振之檢定(諸如，如實例中所述之BIAcore檢定)、酶聯結免疫吸附檢定(ELISA)及競爭檢定(例如，RIA's)來測定。

抗體亦可經受其他生物活性檢定(例如)以評估其作爲治療劑之效

力。該等檢定在此項技術中已知且視靶抗原及所希望之抗體用途而定。實例包括HUVEC抑制檢定(如以下實例中所述)；腫瘤細胞生長抑制檢定(如(例如)WO 89/06692中所述)；抗體依賴性細胞毒性(ADCC)及補體介導之細胞毒性(CDC)檢定(美國專利5,500,362)；及下文所述用於鑑別因子D拮抗劑之活體外及活體內檢定。

為篩檢與相關抗原上特定抗原決定基結合之抗體，可執行諸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及David Lane (1988)中描述之常規交叉阻斷檢定。或者，可執行抗原決定基定位(例如，如 Champe 等人(1995) *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394中所述)來測定抗體是否與相關抗原決定基結合。

在一較佳實施例中，使用獨特噬菌體呈現方法來選擇抗因子D抗體。該方法包含基於單一構架模板產生合成抗體噬菌體文庫，設計可變域內之足夠多樣性，呈現具有多樣化可變域之多肽，選擇對靶因子D抗原具有高度親和力之候選抗體及分離所選抗體。

噬菌體呈現方法之詳情可見於(例如)2003年12月11日公開之WO 03/102157中。

在一態樣中，抗體文庫可藉由使抗體可變域之至少一個CDR中溶劑可及位置及/或高度多樣性位置突變來產生。使用本文所提供之方法可使一些或所有CDR突變。在一些實施例中，可較佳藉由使CDRH1、CDRH2及CDRH3中之位置突變以形成單一文庫或藉由使CDRL3及CDRH3中之位置突變以形成單一文庫或藉由使CDRL3及CDRH1、CDRH2及CDRH3中之位置突變以形成單一文庫來產生多樣化抗體文庫。

可產生(例如)在CDRH1、CDRH2及CDRH3之溶劑可及位置及/或高度多樣性位置具有突變的抗體可變域文庫。可產生在CDRL1、CDRL2及CDRL3中具有突變之另一文庫。此等文庫亦可彼此結合使

用以產生具有所需親和力之結合子。舉例而言，在進行用於與靶抗原結合之重鏈文庫的一或多輪選擇後，可將輕鏈文庫置換至重鏈結合子之群中以進行其他輪選擇從而增強結合子之親和力。

較佳地，藉由在重鏈序列可變區之CDRH3區中用變異胺基酸取代初始胺基酸來產生一文庫。所得文庫可含有複數個抗體序列，其中該序列多樣性主要在重鏈序列之CDRH3區中。

在一態樣中，文庫係在人類化抗體4D5序列或人類化抗體4D5序列之構架胺基酸序列之背景下產生。較佳地，文庫係藉由用DVK密碼子組編碼之胺基酸取代重鏈之至少殘基95-100a來產生，其中DVK密碼子組係用以編碼此等位置中之每一者的一組變異胺基酸。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之一實例包含序列(DVK)₇。在一些實施例中，文庫係藉由用由DVK及NNK密碼子組兩者編碼之胺基酸取代殘基95-100a來產生。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之一實例包含序列(DVK)₆(NNK)。在另一實施例中，文庫係藉由用由DVK及NNK密碼子組兩者編碼之胺基酸取代至少殘基95-100a來產生。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之一實例包含序列(DVK)₅(NNK)。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之另一實例包含序列(NNK)₆。合適寡核苷酸序列之其他實例可藉由熟習此項技術者根據本文所述之標準來確定。

在另一實施例中，使用不同CDRH3設計來分離高親和力結合子且分離用於多種抗原決定基之結合子。此文庫中產生之CDRH3之長度範圍為11至13個胺基酸，但亦可產生不同於此之長度。H3多樣性可藉由使用NNK、DVK及NVK密碼子組以及N及/或C末端之更受限之多樣性來擴展。

多樣性亦可在CDRH1及CDRH2中產生。CDR-H1及H2多樣性之設計係按照靶向如所述具有集中比先前設計更緊密匹配天然多樣性之多樣性的修飾之模擬天然抗體譜系的策略。

對於CDRH3之多樣性而言，可單獨建構具有不同H3長度之多個文庫且接著組合以選擇靶抗原之結合子。使用如先前及下文所述之固體支撐物選擇及溶液分類法，可將多個文庫彙集及分類。可採用多個分類策略。舉例而言，一變化形式包含對結合固體之標靶進行分類，接著對可存在於融合多肽(例如，抗gD標籤)上之標籤進行分類，且接著對結合固體之標靶進行另一分類。或者，可首先針對結合固體表面之標靶將文庫分類，接著使用靶抗原濃度降低之溶液相結合將經溶離之結合子分類。利用不同分類方法之組合使僅高度表現序列之選擇最小化且選擇大量不同高親和力純系。

靶因子D抗原之高親和力結合子可自文庫中分離。限制H1/H2區之多樣性減少簡并約 10^4 至 10^5 倍且允許更多H3多樣性提供更高親和力結合子。利用具有不同類型CDRH3多樣性(例如，利用DVK或NVT)之文庫使可與靶抗原之不同抗原決定基結合之結合子分離。

在另一實施例中，產生具有CDRH1、CDRH2及CDRH3區之多樣性的文庫。在此實施例中，使用多種H3區長度且主要使用密碼子組XYZ及NNK或NNS產生CDRH3之多樣性。可使用個別寡核苷酸形成文庫且彙集或將寡核苷酸彙集以形成文庫子集。此實施例之文庫可針對與固體結合之標靶來分類。可針對特異性及親和力使用ELISA檢定來篩檢自多個類別分離之純系。對於特異性而言，可針對所需靶抗原以及其他非靶抗原來篩檢純系。接著可在溶液結合競爭ELISA檢定或點樣競爭檢定中針對親和力來篩檢靶NRP1抗原之彼等結合子。可利用如上所述製備之XYZ密碼子組將高親和力結合子自文庫中分離。此等結合子可如抗體或抗原結合片段一般易於在細胞培養物中以高產率產生。

在一些實施例中，可能需要產生CDRH3區長度具有更大多樣性之文庫。舉例而言，可能需要產生CDRH3區在約7至19個胺基酸範圍

內之文庫。

自此等實施例之文庫中分離的高親和力結合子易於在細菌及真核細胞培養物中以高產率產生。載體可經設計以易於移除諸如gD標籤之序列、病毒鞘蛋白組份序列及/或易於添加至恆定區序列中使得可以高產率產生全長抗體或抗原結合片段。

具有CDRH3突變之文庫可與含有其他CDR(例如, CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1及/或CDRH2)變異型式之文庫組合。因此, 例如在一實施例中, CDRH3文庫與在使用預定密碼子組在位置28、29、30、31及/或32上具有變異胺基酸的人類化4D5抗體序列背景下產生之CDRL3文庫組合。在另一實施例中, 具有CDRH3突變之文庫可與包含變異CDRH1及/或CDRH2重鏈可變域之文庫組合。在一實施例中, 使用在位置28、30、31、32及33上具有變異胺基酸之人類化抗體4D5產生CDRH1文庫。可藉由使用預定密碼子組在位置50、52、53、54、56及58上具有變異胺基酸之人類化抗體4D5序列產生CDRH2文庫。

自噬菌體文庫產生之抗因子D抗體可經進一步修飾以產生具有比親本抗體改良之物理、化學及/或生物性質的抗體突變體。在所用檢定為生物活性檢定之情況下, 抗體突變體在所選檢定中較佳具有比親本抗體在該檢定中之生物活性高至少約10倍、較佳至少約20倍、更佳至少約50倍且有時至少約100倍或200倍的生物活性。舉例而言, 抗因子D抗體突變體較佳具有比親本抗因子D抗體(諸如, 圖5中所示之任何抗體且尤其抗體20D12)之結合親和力強至少約10倍、較佳至少約20倍、更佳至少約50倍且有時至少約100倍或200倍的對NRP之結合親和力。

為產生抗體突變體, 可將一或多種胺基酸改變(例如, 取代)引入親本抗體之一或多個高變區中。或者或另外, 可將構架區殘基之一或

多種改變(例如，取代)引入親本抗體中，其中此等導致抗體突變體對來自第二哺乳動物物種之抗原的結合親和力改良。修飾之構架區殘基之實例包括直接非共價結合抗原之彼等構架區殘基(Amit等人(1986) *Science* 233:747-753)、與CDR構形相互作用/影響其之彼等構架區殘基(Chothia等人(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917)及/或參與V_L-V_H界面之彼等構架區殘基(EP 239 400B1)。在某些實施例中，修飾一或多個該等構架區殘基導致抗體對來自第二哺乳動物物種之抗原的結合親和力增強。舉例而言，在本發明之此實施例中，可改變約一至約五個構架殘基。有時，甚至在無高變區殘基已改變之情況下，此可足以產生適用於臨床前試驗之抗體突變體。然而，通常抗體突變體將包含其他高變區改變。

改變之高變區殘基可隨機變化，尤其是在親本抗體之起始結合親和力使得該等隨機產生之抗體突變體可易於篩檢之情況下。

一種適用於產生該等抗體突變體之程序係稱為"丙胺酸掃描突變誘發"(Cunningham及Wells (1989) *Science* 244:1081-1085)。此處，一或多個高變區殘基經丙胺酸或聚丙胺酸殘基置換以影響胺基酸與來自第二哺乳動物物種之抗原的相互作用。接著藉由在取代位點處或針對取代位點引入其他突變來改進彼等對取代顯示功能敏感性之高變區殘基。因此，當預定用於引入胺基酸序列變異之位點時，突變之性質本身無需預定。如本文所述針對生物活性來篩檢以此方式產生之丙胺酸突變體。

通常將開始保守取代，諸如顯示於下文"較佳取代"之標題下的彼等保守取代。若該等取代引起生物活性(例如，結合親和力)變化，則可引入下表中稱為"例示性取代"或如下文關於胺基酸類別進一步描述之更實質性變化且篩檢產物。較佳取代列於下表中。

初始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala(A)	val ; leu ; ile	val
Arg(R)	lys ; gln ; asn	lys
Asn(N)	gln ; his ; lys ; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro ; ala	ala
His(H)	asn ; gln ; lys ; arg	arg
Ile(I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; 正白胺酸	leu
Leu(L)	正白胺酸 ; ile ; val ; met ; ala ; phe	ile
Lys(K)	arg ; gln ; asn	arg
Met(M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe(F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr ; phe	tyr
Tyr(Y)	trp ; phe ; thr ; ser	phe
Val(V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; 正白胺酸	leu

對抗體生物學性質之甚至更實質性修飾係藉由選擇對維持以下各者之作用顯著不同的取代來實現：(a)取代區之多肽主鏈結構，例如呈片狀或螺旋構形；(b)標靶位點處分子之電荷或疏水性；或(c)側鏈之堆積。基於共同側鏈性質，將天然存在之殘基分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性親水性：cys、ser、thr、asn、gln；
- (3) 酸性：asp、glu；
- (4) 鹼性：his、lys、arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：gly、pro；及

(6) 芳族：trp、tyr、phe。

非保守性取代將會使此等種類中之一者之成員交換成另一種類。

在另一實施例中，使用噬菌體呈現使經選擇進行修飾之位點親和力成熟(見上文)。

藉由此項技術中已知之多種方法製備編碼胺基酸序列突變體之核酸分子。此等方法包括(但不限於)使較早期製備之突變體或親本抗體之非突變體型式發生寡核苷酸介導(或定點)之突變誘發、PCR突變誘發及盒式突變誘發。用於製備突變體之較佳方法為定點突變誘發(參見，例如Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488)。

在某些實施例中，抗體突變體將僅具有單一經取代之高變區殘基。在其他實施例中，親本抗體之兩個或兩個以上高變區殘基將經取代，例如約兩個至約十個高變區取代。

通常，具有經改良之生物性質的抗體突變體將具有對親本抗體之重鏈或輕鏈可變域之胺基酸序列具有至少75%、更佳至少80%、更佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%胺基酸序列一致性或相似性的胺基酸序列。關於此序列之一致性或相似性在本文中係定義為在將序列及必要時引入之間隙比對以實現最大序列一致性百分比後，候選序列中與親本抗體殘基一致(亦即，相同殘基)或相似(亦即，來自基於共同側鏈性質之相同群的胺基酸殘基，見上文)之胺基酸殘基百分比。N-末端、C-末端或內部擴展、刪除或嵌入至可變域外之抗體序列中無一應被解釋為影響序列一致性或相似性。

在產生抗體突變體後，測定該分子相對於親本抗體之生物活性。如上所述，此可包含測定抗體之結合親和力及/或其他生物活性。在本發明之一較佳實施例中，製備一組抗體突變體且針對其對諸如NRP1或其片段之抗原的結合親和力來篩檢該組抗體突變體。選自 5

此初始篩檢之一或多個抗體突變體視情況經受一或多個其他生物活性檢定以證實具有增強之結合親和力的抗體突變體實際上適用於(例如)臨床前研究。

如此選擇之抗體突變體可進一步修飾，通常視所希望之抗體用途而定。該等修飾可包含進一步改變胺基酸序列、與異源多肽融合及/或共價修飾(諸如下文詳細說明者)。關於胺基酸序列改變，上文已詳細說明例示性修飾。舉例而言，任何不涉及維持抗體突變體之適當構形的半胱胺酸殘基亦可經取代，一般以絲胺酸取代，以改良分子之氧化穩定性及防止異常交聯。反之，可將半胱胺酸鍵添加至抗體中，以改良其穩定性(尤其在抗體為諸如Fv片段之抗體片段之情況下)。另一類型胺基酸突變體具有改變之糖基化形式。此可藉由刪除抗體中所發現之一或多個碳水化合物部分及/或添加抗體中不存在之一或多個糖基化位點來實現。抗體之糖基化通常為N-連接型或O-連接型。N-連接型係指碳水化合物部分與天冬醯胺酸殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為碳水化合物部分經酶連接於天冬醯胺酸側鏈之識別序列。因此，此等三肽序列之任一者存在於一個多肽中產生一個潛在之糖基化位點。O-連接型糖基化係指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一與一種羥基胺基酸(最常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸)連接。向抗體中添加糖基化位點方便藉由改變胺基酸序列以使其含有一或多個上述三肽序列來實現(針對N-連接型糖基化位點)。該改變亦可藉由一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至或取代原始抗體之序列來實現(針對O-連接型糖基化位點)。

本發明之抗因子D抗體可使用易於獲得之技術及材料經由重組方式產生。

為重組產生抗因子D抗體，將其編碼核酸分離且嵌入可複製載體

中以進一步選殖(DNA擴增)或表現。編碼該抗體之DNA可輕易分離且使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼該抗體之重鏈及輕鏈之DNAs特異性結合的寡核苷酸探針)合成。可使用多種載體。載體組份一般包括(但不限於)下列一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列。

(i)信號序列組份

本發明之抗體不僅可直接重組產生，且亦可作為與異源多肽之融合多肽而產生，該異源多肽較佳為信號序列或在成熟蛋白或多肽之N末端具有特定裂解位點之其他多肽。所選擇之異源信號序列較佳為經宿主細胞識別且加工(亦即，由信號肽酶裂解)之信號序列。對於並不識別且加工天然抗體信號序列之原核宿主細胞而言，信號序列係經(例如)選自由下列各物組成之群的原核信號序列取代：鹼性磷酸酶、青黴素酶(penicillinase)、lpp或熱穩定性腸毒素II前導序列。對於酵母分泌而言，天然信號序列可經以下各物取代：例如，酵母轉化酶前導序列、 α 因子前導序列(包括酵母(*Saccharomyces*)及刻魯維拉菌(*Kluyveromyces*) α 因子前導序列)或酸性磷酸酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖澱粉酶前導序列或WO 90/13646中所述之信號序列。在哺乳動物細胞表現中，哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導序列(例如，單純性疱疹gD信號序列)係可用的。該前驅體區之DNA在閱讀框架中與編碼抗體之DNA接合。

(ii)複製起點組份

表現及選殖載體均含有使載體能夠在一或多個所選宿主細胞中複製的核酸序列。一般而言，在選殖載體中，此序列為使載體能夠獨立於宿主染色體DNA複製之序列且包括複製起點或自主複製序列。熟知多種細菌、酵母及病毒之該等序列。來自質體pBR322之複製起點適於大部分革蘭氏陰性細菌(Gram-negative bacteria)，2 μ 質體起點適

於酵母，且各種病毒起點(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)適用於哺乳動物細胞中之選殖載體。一般而言，哺乳動物表現載體無需複製起點組份(僅因SV40起點含有早期啟動子，故通常可僅使用該起點)。

(iii)選擇基因組份

表現及選殖載體可含有選擇基因，亦稱為可選擇標記物。典型選擇基因編碼具有下列作用之蛋白：(a)賦予對抗生素或其他毒素(例如，胺苄西林(ampicillin)、新黴素(neomycin)、甲胺喋呤(methotrexate)或四環素(tetracycline))之抗性；(b)補體營養缺陷型不足；或(c)供應自複合培養基不可得之重要營養物，例如對芽孢桿菌(*Bacilli*)而言編碼D-丙胺酸消旋酶之基因。

選擇方案之一實例利用藥物來阻滯宿主細胞之生長。經異源基因成功轉型之彼等細胞產生賦予藥物抗性之蛋白且因此在經歷選擇方案之後存活。此顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸(mycophenolic acid)及濕黴素(hygromycin)。

哺乳動物細胞之合適可選擇標記物的另一實例為可實現鑑別能夠吸收抗體核酸之細胞的彼等者，諸如DHFR、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及-II(較佳為靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

舉例而言，首先藉由在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基中培養所有轉型物來鑑別經DHFR選擇基因轉型之細胞。採用野生型DHFR時合適之宿主細胞為缺乏DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株。

或者，可藉由在含有作為可選擇標記物之選擇試劑(諸如胺基糖苷抗生素，例如康黴素(kanamycin)、新黴素或G418)的培養基中進行細胞生長來選擇經編碼抗體之DNA序列、野生型DHFR蛋白及另一可

選擇標記物(諸如，胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源DHFR之野生型宿主)。參見美國專利第4,965,199號。

用於酵母之合適選擇基因爲存在於酵母質體YRp7中之*trp1*基因(Stinchcomb等人(1979) *Nature* 282:39)。*trp1*基因爲缺乏在色胺酸中生長之能力的酵母突變株(例如，ATCC第44076號或PEP4-1)提供選擇標記物。Jones (1977) *Genetics* 85:12。接著酵母宿主細胞基因組中*trp1*損傷之存在爲偵測藉由在缺乏色胺酸之情況下生長的轉型作用提供有效環境。類似地，缺乏*Leu2*之酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)係由已知帶有*Leu2*基因之質體來補充。

此外，來源於1.6 μ m圓形質體pKD1之載體可用於刻魯維拉菌酵母之轉型。或者，已針對乳酸刻克魯維酵母(*K. lactis*)報導用於大規模產生重組小牛凝乳酶之表現系統。Van den Berg (1990) *Bio/Technology* 8:135。亦已揭示用於藉由刻魯維拉菌之工業菌株分泌成熟重組人類血清白蛋白的穩定多副本表現載體。Fleer等人(1991) *Bio/Technology* 9:968-975。

(iv) 啓動子組份

表現及選殖載體通常含有爲宿主生物體所識別且可操作連接至抗體核酸之啓動子。適用於原核宿主之啓動子包括*phoA*啓動子、 β -內醯胺酶及乳糖啓動子系統、鹼性磷酸酶、色胺酸(*trp*)啓動子系統及雜合啓動子，諸如*tac*啓動子。然而，其他已知之細菌啓動子亦合適。用於細菌系統之啓動子亦將含有可操作連接至編碼抗體之DNA的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

已知真核生物之啓動子序列。實際上所有真核基因均具有定位於轉錄起始位點上游約25至30個鹼基處之AT富集區。在許多基因轉錄起始上游70至80個鹼基處發現的另一序列爲CNCAAT區，其中N可

為任何核苷酸。在大部分真核基因之3'末端處為AATAAA序列，其可為用於將聚腺苷酸尾(poly A tail)添加至編碼序列之3'末端的信號。所有此等序列均適於嵌入真核表現載體中。

用於酵母宿主之合適啟動子序列之實例包括3-磷酸甘油酸激酶或其他糖解酶(諸如，烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸變位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶及葡萄糖激酶)之啟動子。

其他酵母啟動子(其為具有由生長條件控制之轉錄的其他優勢之誘導性啟動子)為醇脫氫酶2、異細胞色素C(isocytochrome C)、酸性磷酸酶、與氮代謝有關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脫氫酶及負責麥芽糖及半乳糖效用之酶的啟動子區。用於酵母表現之合適載體及啟動子進一步描述於EP 73,657中。酵母增強子亦有利地與酵母啟動子一起使用。

抗體自哺乳動物宿主細胞中之載體的轉錄係(例如)由自病毒(諸如，多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(諸如，腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨大病毒、逆轉錄病毒、B型肝炎病毒及最佳猿病毒40(SV40))之基因組獲得之啟動子、異源哺乳動物啟動子(例如，肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)、熱休克啟動子來控制，其限制條件為此等啟動子與宿主細胞系統相容。

SV40病毒之早期及晚期啟動子係作為亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制性片段而便利地獲得。人類細胞巨大病毒之即刻早期啟動子係作為HindIII E限制性片段而便利地獲得。在哺乳動物宿主中使用牛乳頭狀瘤病毒作為載體來表現DNA之系統係揭示於美國專利第4,419,446號中。此系統之修改係描述於美國專利第4,601,978號中。關於人類 β -干擾素cDNA在小鼠細胞中在來自單純性疱疹病毒之胸苷

激酶啟動子控制下之表現，亦參見Reyes等人(1982) *Nature* 297:598-601。或者，勞斯肉瘤病毒長末端重複序列(Rous Sarcoma Virus long terminal repeat)可用作啟動子。

(v)增強子元件組份

由高級真核細胞轉錄編碼本發明之抗體的DNA通常係藉由將增強子序列嵌入載體中來增強。目前已知許多增強子序列來自哺乳動物基因(血球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)。然而，通常將使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括在複製起點之最近側的SV40增強子(bp 100-270)、細胞巨大病毒早期啟動子增強子、複製起點之最近側的多瘤病毒增強子及腺病毒增強子。關於活化真核啟動子之增強元件，亦參見Yaniv (1982) *Nature* 297:17-18。雖然可將增強子在編碼抗體之序列之位置5'或3'處剪接至載體中，但較佳定位於啟動子之5'位點。

(vi)轉錄終止組份

用於真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類或來自其他多細胞生物體之有核細胞)中之表現載體亦將含有終止轉錄且穩定mRNA所必需之序列。該等序列通常可自真核或病毒DNA或cDNA之5'且偶爾自3'之未經轉譯區獲得。此等區含有在編碼抗體之mRNA之未經轉譯部分中轉錄為聚腺苷酸化片段的核苷酸區段。一種適用之轉錄終止組份為牛生長激素聚腺苷酸化區。參見WO 94/11026及其中所揭示之表現載體。

(vii)宿主細胞之選擇及轉型

適用於在本文之載體中選殖或表現DNA之宿主細胞為原核生物、酵母或上述高級真核生物細胞。達成此目的之合適原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科，諸如埃希氏菌(*Escherichia*)(例如，大腸桿菌(*E. coli*))、腸

桿菌(*Enterobacter*)、歐文菌(*Erwinia*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、變形菌(*Proteus*)、沙門氏菌(*Salmonella*)(例如，鼠傷寒沙門菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌(*Serratia*)(例如，黏質沙雷菌(*Serratia marcescans*))及志賀菌(*Shigella*)，以及芽孢桿菌(諸如，枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及益生芽孢桿菌(*B. licheniformis*)(例如，1989年4月12日公開之 DD 266,710 中揭示之益生芽孢桿菌 41P))、假單胞菌(*Pseudomonas*)(諸如，綠膿桿菌(*P. aeruginosa*))及鏈黴菌(*Streptomyces*)。一種較佳大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌 294(ATCC 31,446)，但諸如大腸桿菌 B、大腸桿菌 X1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌 W3110(ATCC 27,325)之其他菌株亦合適。此等實例為例示性而非限制性。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為編碼抗體之載體的合適選殖或表現宿主。在低級真核宿主微生物中最常使用釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常見麵包酵母(baker's yeast)。然而，大量其他種類、物種及菌株在本文中通常為可用且適用的，諸如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；刻魯維拉菌宿主，諸如乳酸刻魯維酵母、脆壁刻魯維酵母(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞刻魯維酵母(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、魏氏刻魯維酵母(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、刻魯雄酵母菌(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅刻魯維酵母(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906)、耐熱刻魯維酵母(*K. thermotolerans*)及馬克斯刻魯維酵母(*K. marxianus*)；耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；念珠菌(*Candida*)；裏氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌(*Neurospora*)、青黴菌(*Penicillium*)、彎頸黴菌(*Tolypocladium*)及曲黴

菌(*Aspergillus*)宿主，諸如構巢麴黴(*A. nidulans*)及黑麴黴(*A. niger*)。

用於表現糖基化抗體之合適宿主細胞來源於多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別來自諸如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的大量桿狀病毒株及變異體及相應允許之昆蟲宿主細胞。多種用於轉染之病毒株公開可得，例如苜蓿丫紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且根據本發明該等病毒可用作本文中之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及煙草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

然而，對脊椎動物細胞之關注最大，且脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中之繁殖已成為一種常規程序。適用之哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7，ATCC CRL 1651)、人類胚胎腎細胞株(293細胞或經次選殖以在懸浮培養物中生長之293細胞，Graham等人(1977) *J. Gen Virol.* 36:59)、幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)、中國倉鼠卵細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216)、小鼠塞特利氏細胞(sertoli cell)(TM4, Mather (1980) *Biol. Reprod.* 23:243-251)、猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)、非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)、人類子宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)、犬科動物腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)、水牛大鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)、人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)、人類肝細胞(Hep G2，HB 8065)、小鼠乳房腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)、TRI細胞(Mather等人(1982) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68)、MRC 5細胞、FS4細胞及人類肝腫瘤細胞株(Hep G2)。

用上述用於產生抗體之表現或選殖載體使宿主細胞轉型，且將其培養於適當時經改質之習知營養培養基中以誘導啟動子、選擇轉型物或擴增編碼所需序列之基因。

(viii) 培養宿主細胞

用以產生本發明之抗體之宿主細胞可在多種培養基中培養。諸如 Ham's F10(Sigma)、最低必需培養基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Sigma)之市售培養基適用於培養該等宿主細胞。此外，描述於Ham等人(1979) *Meth. Enz.* 58:44、Barnes等人(1980) *Anal. Biochem.* 102:255、美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號、WO 90/03430、WO 87/00195或美國專利Re. 30,985中之任何培養基可用作宿主細胞之培養基。任何此等培養基均可在必要時補充激素及/或其他生長因子(諸如，胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如，氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如，HEPES)、核苷酸(諸如，腺苷及胸苷)、抗生素(諸如，GENTAMYCIN™藥物)、微量元素(定義為通常以在微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在的無機化合物)及葡萄糖或等效能量來源。亦可包括熟習此項技術者已知之適合濃度的任何其他必需補充劑。培養條件(諸如，溫度、pH值及其類似條件)為先前所選擇宿主細胞之表現所用之彼等條件，且對一般技術者而言將顯而易見。

(ix) 抗體純化

當使用重組技術時，可在胞質間隙中細胞內產生抗體或將其直接分泌至培養基中。若抗體在細胞內產生，則作為第一步，例如藉由離心或超濾來移除宿主細胞或溶胞片段之微粒碎片。Carter等人(1992) *Bio/Technology* 10:163-167描述用於分離被分泌至大腸桿菌之胞質間隙中的抗體之程序。簡言之，在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA及苯甲

基磺醯氟(PMSF)之存在下經約30 min使細胞漿融解。細胞碎片可藉由離心來移除。在抗體被分泌至培養基中之情況下，一般首先使用市售蛋白濃縮過濾器(例如，Amicon或Millipore, Pellicon超濾單元)來濃縮來自該等表現系統之上清液。在任何先前步驟中可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

自細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羧磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析及親和力層析法來純化，其中親和力層析法為較佳純化技術。蛋白A作為親和配位體之適宜性係視存在於抗體中之任何免疫球蛋白Fc域的種類及同型而定。蛋白A可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13)。對所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ 推薦蛋白G(Guss等人(1986) *EMBO J.* 5:1567-1575)。雖然親和配位體所連接之基質最常見為瓊脂糖，但可使用其他基質。與用瓊脂糖可實現之流動速率及處理時間相比，機械穩定之基質(諸如，可控孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)允許更快之流動速率及更短之處理時間。在抗體包含 C_H3 域之情況下，Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)適用於純化。視待回收之抗體而定，亦可利用其他用於蛋白純化之技術，諸如離子交換管柱分級分離、乙醇沈澱、逆相HPLC、二氧化矽層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如，聚天冬胺酸管柱)之肝素SEPHAROSE™層析儀上的層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

在任何初級純化步驟後，可使包含相關抗體及污染物之混合物經受使用pH值在約2.5-4.5之間的溶離緩衝液較佳在低鹽濃度(例如，約0-0.25 M鹽)下進行之低pH值疏水性相互作用層析。

2.用於鑑別因子D拮抗劑之篩檢檢定及動物模型

可在多種基於細胞之檢定及患有與補體相關之疾病或病症之動 5

物模型中評估因子D拮抗劑。

因此，舉例而言，可藉由使用用於產生轉殖基因動物之標準技術將相關基因之編碼部分引入相關動物基因組中，使重組(轉殖基因)動物模型工程化。可充當轉殖基因操作標靶之動物包括(但不限於)：小鼠、大鼠、兔、豚鼠、綿羊、山羊、豬及非人類靈長類動物，例如狒狒、黑猩猩及其他猴。此項技術中已知之將轉殖基因引入該等動物體內之技術包括：前核微注射(Hoppe及Wanger，美國專利第4,873,191號)；逆轉錄病毒介導之向生殖系內的基因轉移(例如Van der Putten等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6148-615 [1985])；胚胎幹細胞內之基因靶向(Thompson等人，*Cell* **56**, 313-321 [1989])；胚胎電穿孔(Lo, *Mol. Cell. Biol.* **3**, 1803-1814 [1983])；精子介導之基因轉移(Lavitrano等人，*Cell* **57**, 717-73 [1989])。關於綜述參見例如美國專利第4,736,866號。

為達成本發明之目的，轉殖基因動物包括僅在其部分細胞中攜帶轉殖基因之動物("嵌合動物")。轉殖基因可以單一轉殖基因或以串連體(例如，頭-頭或頭-尾串連)整合。將轉殖基因選擇性引入特定細胞類型中亦有可能按照例如Lasko等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 623-636 (1992)之技術來進行。

轉殖基因動物中轉殖基因之表現可藉由標準技術來監測。舉例而言，可使用南方墨點分析或PCR擴增來證實轉殖基因之整合。接著可使用諸如原位雜交、北方墨點分析、PCR或免疫細胞化學之技術來分析mRNA表現含量。

可例如藉由組織學檢查來進一步檢查該等動物之免疫疾病病理之徵象以測定免疫細胞向特定組織中之浸潤。亦可執行阻斷實驗，其中轉殖基因動物經候選因子D拮抗劑處理以測定對補體及補體激活(包括經典及替代路徑)或T細胞增殖之影響程度。在此等實驗中，將與本

發明之多肽結合的阻斷抗體投與動物且監測相關生物效應。

或者，可建構具有缺陷型或經改變之編碼因子D基因的"基因剔除"動物，其係編碼因子D多肽之內源基因與編碼動物胚胎細胞中所引入之相同多肽的經改變基因組DNA之間的同源重組之結果。舉例而言，根據已建立之技術可使用編碼因子D之cDNA來選殖編碼因子D之基因組DNA。編碼因子D之基因組DNA的一部分可經刪除或可經另一基因替代，諸如編碼可用於監測整合之可選擇標記物的基因。通常，載體中包括未經改變之側接DNA(在5'與3'末端)之數千個鹼基[關於同源重組載體之描述參見例如Thomas及Capecchi, *Cell*, **51**:503 (1987)]。將載體引入胚胎幹細胞株(例如，藉由電穿孔)中且選擇所引入之DNA已與內源DNA同源重組之細胞[參見例如Li等人, *Cell*, **69**:915 (1992)]。接著將所選細胞注射至動物(例如，小鼠或大鼠)胚泡內以形成聚集嵌合體[參見例如Bradley, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson編(IRL, Oxford, 1987)，第113-152頁]。接著可將嵌合胚胎植入合適之假孕雌性培育動物體內，且該胚胎最終產生"基因剔除"動物。生殖細胞中含有同源重組DNA之後代可藉由標準技術來鑑別且用於繁殖動物，其中該動物之所有細胞均含有同源重組DNA。基因剔除動物之特徵可在於(例如)其抵禦某些病理學病狀之能力及由於因子D多肽之缺乏而導致其發展病理學病狀。

因此，潛在因子D拮抗劑之生物活性可進一步在鼠科因子D基因剔除小鼠中研究。

患有年齡相關之黃斑變性(AMD)之動物模型係由Ccl-2或Ccr-2基因無效突變之小鼠組成。此等小鼠顯現AMD之主要特徵，包括在視網膜色素上皮(RPE)中脂褐質及視網膜色素上皮(RPE)之下脈絡膜疣的積聚、感光器萎縮及脈絡膜新血管形成(CNV)。此等特徵在6個月月 5

齡以後顯現。可針對脈絡膜疣之形成、感光器萎縮及脈絡膜新血管形成來測試候選因子D拮抗劑。

3.醫藥組合物

可以醫藥組合物形式投與本發明之因子D拮抗劑(包括抗因子D抗體及藉由上文所揭示之篩檢檢定鑑別之其他分子)以治療與補體相關之眼睛病症。

藉由將具有所需純度之活性分子與可選之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑混合(*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第16版, Osol, A.編[1980])以凍乾調配物或水溶液之形式來製備本發明之因子D拮抗劑之醫藥調配物以供儲存。在所採用之劑量及濃度下,可接受之載劑、賦形劑或穩定劑對接受者係無毒的,且包括緩衝劑,諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸;抗氧化劑,包括抗壞血酸及甲硫胺酸;防腐劑(諸如,氯化十八烷基二甲基苄基銨;氯化六羥季銨;氯化苯甲烴銨;苄索氯銨(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苄醇;對羥基苯甲酸烷基酯,諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯;兒茶酚;間苯二酚;環己醇;3-戊醇;及間甲酚);低分子量(小於約10個殘基)多肽;蛋白質,諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白;親水性聚合物,諸如聚乙烯吡咯啉酮;胺基酸,諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸;單醣、二醣及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合劑,諸如EDTA;糖,諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成鹽平衡離子,諸如鈉;金屬錯合物(例如,Zn-蛋白錯合物);及/或非離子界面活性劑,諸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

脂質轉染或脂質體亦可用以將多肽、抗體或抗體片段傳遞至細胞中。在使用抗體片段之情況下,與靶蛋白之結合域特異性結合之最小片段較佳。舉例而言,可基於抗體之可變區序列來設計保留與靶蛋

白序列結合之能力的肽分子。該等肽可藉由化學方法合成及/或藉由重組DNA技術產生(參見，例如Marasco等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7889-7893 [1993])。

亦可將活性分子包埋於(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合所製備之微膠囊(例如，分別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中，包埋於膠狀藥物傳遞系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或包埋於巨乳液中。該等技術係揭示於*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第16版，Osol, A. 編(1980)中。

待用於活體內投藥之調配物必須無菌。此易於藉由經除菌過濾膜過濾來實現。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之合適實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半透性基質，該等基質呈成形物品之形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ -乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(諸如，LUPRON DEPOTTM)(包含乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)之可注射微球體)及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。雖然聚合物(諸如，乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸)使分子能夠釋放歷時100天，但某些水凝膠釋放蛋白歷時較短時間。當經囊封之抗體長時間在體內保持時，由於曝露於37°C下之水分，故其可能變性或聚集，導致生物活性之損失及免疫原性可能之改變。視所涉及之機制而定，可設計合理策略以求穩定。舉例而言，若發現聚集機制係經由硫基-二硫化物互換之分子間S-S鍵形成，則穩定化可藉由改質巰基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用合適之添加劑且研製特定聚合物基質組合物

來達成。

通常藉由眼睛、眼內及/或玻璃體內注射來投與用於預防或治療眼睛疾病或病症之本發明化合物。亦可使用其他投藥方法，包括(但不限於)局部、非經腸、皮下、腹膜內、肺內、鼻內及病灶內投藥。非經腸輸液包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。

用於眼睛、眼內或玻璃體內投藥之調配物可藉由此項技術中已知之方法及使用此項技術中已知之成份來製備。有效治療之主要需求係經由眼睛適當滲透。不同於眼前部之疾病(其中藥物可局部傳遞)，視網膜疾病需要更具位點特異性之方法。滴眼劑及軟膏很少滲入眼睛後部，且血眼障壁阻礙全身投與之藥物滲透至眼睛組織中。因此，選擇用於藥物傳遞以治療視網膜疾病(諸如，AMD及CNV)之方法通常為直接玻璃體內注射。玻璃體內注射通常每隔一段時間重複，該時間間隔視患者病症及所傳遞藥物之性質及半衰期而定。對於眼內(例如，玻璃體內)滲透而言，通常較小尺寸之分子較佳。

治療與補體相關之眼睛病症(諸如，AMD或CNV)的功效可藉由通常用於評估眼內疾病之各種終點來量測。舉例而言，可評估視力損失。可藉由例如(但不限於)以下方式來評估視力損失：量測最佳矯正視力(BCVA)自基線至所需時間點之平均變化(例如，其中BCVA係基於在4公尺之測試距離下的糖尿病性視網膜病早期治療研究(Early Treatment Diabetic Retinopathy Study, ETDRS)視力圖及評估)、量測與基線相比在所需時間點視力損失少於15個字母之個體的比例、量測與基線相比在所需時間點視力增加大於或等於15個字母之個體比例、量測在所需時間點視力Snellen等效物為20/2000或更差的個體之比例、量測NEI視力功能調查表、量測在所需時間點CNV之尺寸及CNV之滲漏量(例如，藉由螢光素血管攝影術等)。可進行眼睛評估，例如其包括(但不限於)(例如)執行眼睛檢查、量測眼內壓、評估視力、量

測狹縫燈壓力(slitlamp pressure)、評估眼內發炎等。

提供以下實施例僅為達成說明性目的且不欲以任何方式限制本發明之範疇。

本說明書中所引用之所有專利及參考文獻均以全文引用的方式明確併入本文中。

實例

除非另外指示，否則根據製造商說明書使用實例中提及之市售試劑。在以下實例及整個說明書中，由ATCC寄存編號鑑別之彼等細胞來源為美國典型菌種保藏中心(American Type Culture Collection)，10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209。

實例1

抗因子D抗體之製備及測試

方法：

製備玻璃體液及布魯赫氏膜(*Bruch's Membrane*)以進行蛋白質分析

將人類AMD及非AMD屍體眼睛融解且將前段與玻璃體、視網膜及RPE一起移除。將玻璃體收集在微管中，在乾冰上冷凍且儲存在-70°C下，直至進一步加工。自後半球除去布魯赫氏膜-脈絡膜層(Crabb, J.W.等人 **Proc Natl Acad Sci USA.**, 99:14682-7 (2002))且自黃斑及中心區周圍分離4 mm或6 mm環鑽樣品以進行後續分析。關於布魯赫氏膜製備、年齡、性別、AMD階段、解剖事宜及蛋白質組分析所用之量參見隨附概述表(表2)。一環鑽樣品(直徑為4 mm)係用於分析補體因子D蛋白含量。將樣品在檢定稀釋劑(PBS/0.5% BSA/0.5% Tween-20)中進行超音波處理歷時10 min且藉由以5000 rpm離心10 min使可溶及不溶部分分離。可溶部分係用於ELISA檢定。

人類因子D之單株抗體的產生

藉由將2 μg 於單磷醯基脂質A/海藻糖二桿狀黴菌酸酯(trehalose dicorynomycolate)佐劑(Corixa, Hamilton, MT)中之因子D(Comptech, Taylor, TX)注射於Balb/c小鼠之墊腳中11次來產生人類因子D之單株抗體。將來自小鼠之腮窩淋巴結與P3X63Ag.U.1骨髓瘤細胞融合。針對鼠科因子D之結合親和力篩檢融合瘤細胞。藉由限制稀釋法選殖產生抗體之細胞株。

溶血檢定

為測定替代路徑活性，將兔紅血球(Er, Colorado Serum)在GVB中洗滌3次且再懸浮至每毫升 2×10^9 。將抑制劑(50 μl)及20 μl Er懸浮液與GVB/0.1M EGTA/0.1M MgCl_2 以1:1混合。補體激活係藉由添加C1q缺乏之人類血清(Quidel; 30 μl ，於GVB中以1:3稀釋)而引發。在室溫下培育30分鐘後，添加200 μl GVB/10 mM EDTA以終止反應且將樣品在500 g下離心5 min。藉由量測412 nm下之吸光度來測定在200 μl 上清液中之溶血。資料係表示為在缺乏抑制劑之情況下引發之溶血%。為測定因子D抗體對補體經典路徑之影響，進行一類似程序，其中例外為Er係由IgM塗佈之綿羊紅細胞(E-IgM, CompTech)代替且在GVB++中之因子B缺乏之人類血清中執行該檢定。

人類因子D ELISA

在4°C下在隔夜培育期間將抗人類補體因子D山羊多株抗體(pAb)(R&D Systems, Minneapolis, MN)在磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中稀釋至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且塗佈在ELISA盤(384孔之高度結合盤，Greiner Bio One，經由VWR International, Bridgepoint, New Jersey)上。在用洗滌緩衝液(PBS/0.05% Tween-20)洗滌3次之後，將該等盤用PBS/0.5%牛血清白蛋白(BSA)阻斷，歷時1至2小時。此及所有其他培育均在室溫下在軌道式振盪器上執行。使用檢定稀釋劑(PBS/0.5% BSA/0.5% Tween-20)稀釋人類玻璃體液及布魯赫氏膜溶解產物樣品。使用相同

緩衝液，製備因子D(Complement Technology, Inc., Tyler, Texas)標準曲線(15.6 pg/mL-1,000 pg/mL)之連續稀釋液。將經預先稀釋以在標準曲線之高、中及低區定量之冷凍對照樣品融解。阻斷步驟後，將該等盤洗滌，且添加樣品、標準及對照且將其培育2小時。洗滌該等盤，且將生物素標記抗人類因子D單株抗體9G7.1.16稀釋至62.5 ng/mL且添加至該等盤中，進行1至2小時培育。將抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化物酶(SA-HRP)(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)在檢定稀釋劑中以1/10,000稀釋且添加至經洗滌之盤中。在30分鐘培育及最後洗滌步驟後，添加四甲基聯苯胺(TMB)(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)且顏色顯現，歷時5至7分鐘。最終，藉由添加1M磷酸來終止反應。使用微定量盤讀出器(450 nm、650 nm參考)獲得光學密度且由標準曲線之4參數擬合來計算樣品濃度。人類玻璃體液及布魯赫氏膜溶解產物樣品中因子D之最小可定量之濃度分別為780 pg/mL(1/50最小稀釋)及156 pg/mL(1/10最小稀釋)。

免疫組織化學

將布魯赫氏膜樣品在OCT化合物中冷凍且在低溫切片機上切割7 μ m切片。進行免疫染色。切片之後，將切片於丙酮中固定，歷時5分鐘，且在-80°C下儲存直至準備染色。將經冷凍之載片在PBS中清洗2次，接著在含有0.1% Tween之Tris-緩衝生理食鹽水(TBST)中清洗2次。按照製造商之指導在室溫下用載體抗生物素蛋白(Avidin)生物素阻斷套組(SP-2001)阻斷內源抗生物素蛋白及生物素。將切片在TBST中清洗(更換2次，各為5分鐘)，且在室溫下將內源免疫球蛋白用3% BSA/PBS中之10%馬血清阻斷30分鐘。在室溫下將切片用在10%馬血清中稀釋至10 μ g/ml之抗人類因子D(9G7.1.16)抗體培育60分鐘。10 μ g/ml之未處理小鼠IgG2a(PharMingen)係用作陰性對照。在TBST中清洗(更換2次，各為5分鐘)後，將切片用在馬血清中稀釋至2.5 μ g/ml。

$\mu\text{g/ml}$ (1:200)之生物素標記馬抗小鼠抗體(Vector)培育30分鐘。將切片在TBST中清洗(更換2次,各為5分鐘)且在室溫下用Vectastain ABC-AP Elite試劑培育30分鐘,在TBST中清洗(更換2次,各為5分鐘)且在新製備之Vector Red溶液中培育。Vector Red製備如下:對於200 mM Tris HCl,將1 M Tris HCl以1:5於 dH_2O 中(1份Tris HCl及4份 dH_2O)稀釋。每5 ml 200 mM新製備之Tris HCl溶液中混合1滴左旋咪唑(Levamisole)。每5 ml 200 mM Tris HCl-左旋咪唑溶液中個別混合2滴來自Vector Red套組之試劑1、2及3。使用5-10分鐘內添加來自Vector Red套組之試劑3。將切片在 H_2O 中清洗,且藉由浸入10-15滴蘇木精(20-30秒)中用邁爾蘇木精(Mayer's hematoxylin)複染色,用水及藍色顏料清洗,且在流水中徹底清洗5分鐘以洗去發藍試劑。用Crystal封片溶液封固切片且使其乾燥隔夜。將經乾燥之Crystal封片覆蓋之載片浸入二甲苯中且使用永久性封片劑(mounting medium)壓上蓋玻片。

20D12重鏈及輕鏈之選殖

使用RNeasy Mini套組(Qiagen, 德國)自產生小鼠抗人類因子D單株20D12之融合瘤細胞萃取出總RNA。使用具有以下簡并引子之RT-PCR擴增可變輕鏈(VL)及可變重鏈(VH)域:

輕鏈(LC)正向:

5'GATCGATATCGTRATGACHCARTCTCA3'(SEQ ID NO: 4)

輕鏈反向:

5'TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC3'(SEQ ID NO: 5)

重鏈(HC)正向: 5'GATCCGTACGCTCAGGTYCARYTGCAR CARTCTGG3'(SEQ ID NO: 6)

重鏈反向: 5'ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGA GACDGTGASHRDRGT3'(SEQ ID NO: 7)

正向引子對VL及VH區之N末端胺基酸序列具有特異性。LC及HC

反向引子經設計以分別黏接至在物種之間高度保守之恆定輕鏈域(CL)及恆定重鏈域1(CH1)中之區域。

將經擴增之含有人類 κ 恆定域之VL選殖至pRK哺乳動物細胞表現載體(Shields等人, J Biol Chem 2000; 276: 6591-604)中。將經擴增之編碼全長人類IgG1恆定域之VH嵌入pRK哺乳動物細胞表現載體中。因此, 20D12經重新格式化成小鼠-人類IgG1嵌合體。

認為以上書面說明書足以使熟習此項技術者能夠實施本發明。本發明不限於所寄存之構築體之範疇, 此係因為所寄存之實施例意欲作為本發明之某些態樣之單一說明且功能等效之任何構築體系在本發明之範疇內。本文中物質之寄存並不構成對以下之許可, 亦不應理解為將申請專利範圍之範疇限於其代表之特定說明: 本文所含之書面描述不足以使本發明之任何態樣(包括其最佳模式)能夠實施。

實際上, 自上文描述, 除本文中彼等所示及所述外的本發明之各種修改將為熟習此項技術者顯而易見且在隨附申請專利範圍之範疇內。

【符號說明】

(無)

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 預防及治療與補體相關之眼部病症

<130> GNE-0244

<140> 097119194

<141> 2008-05-23

<150> 60/939,791

<151> 2007-05-23

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 233

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
 35 40 45

Asp Thr Asp Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg
 50 55 60

Gly Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
 65 70 75 80

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn
 85 90 95

Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn
 100 105 110

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 2
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 2

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1          5          10          15

Ala Tyr Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20          25          30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35          40          45

Thr Ser Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Lys Glu Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50          55          60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn
 65          70          75          80

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn
 85          90          95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100          105          110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115          120          125

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
130          135          140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
145          150          155          160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
165          170          175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
180          185          190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
195          200          205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
210          215          220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
225          230          235          240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
245          250          255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260          265          270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
275          280          285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290          295          300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
305          310          315          320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325          330          335

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
355          360          365

```

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 3
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3
 Met His Ser Ser Val Tyr Phe Val Ala Leu Val Ile Leu Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Cys Ala Ala Gln Pro Arg Gly Arg Ile Leu Gly Gly Gln Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ala His Ala Arg Pro Tyr Met Ala Ser Val Gln Val Asn Gly Thr
 35 40 45
 His Val Cys Gly Gly Thr Leu Leu Asp Glu Gln Trp Val Leu Ser Ala
 50 55 60
 Ala His Cys Met Asp Gly Val Thr Asp Asp Ser Val Gln Val Leu
 65 70 75 80
 Leu Gly Ala His Ser Leu Ser Ala Pro Glu Pro Tyr Lys Arg Trp Tyr
 85 90 95
 Asp Val Gln Ser Val Val Pro His Pro Gly Ser Arg Pro Asp Ser Leu
 100 105 110
 Glu Asp Asp Leu Ile Leu Phe Lys Leu Ser Gln Asn Ala Ser Leu Gly
 115 120 125
 Pro His Val Arg Pro Leu Pro Leu Gln Tyr Glu Asp Lys Glu Val Glu
 130 135 140
 Pro Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp Gly Val Val Thr His Ala
 145 150 155 160
 Gly Arg Arg Pro Asp Val Leu His Gln Leu Arg Val Ser Ile Met Asn
 165 170 175
 Arg Thr Thr Cys Asn Leu Arg Thr Tyr His Asp Gly Val Val Thr Ile
 180 185 190
 Asn Met Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg Asp Thr Cys Arg Gly Asp
 195 200 205
 Ser Gly Ser Pro Leu Val Cys Gly Asp Ala Val Glu Gly Val Val Thr
 210 215 220
 Trp Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Gly Lys Lys Pro Gly Val Tyr Thr
 225 230 235 240
 Arg Val Ser Ser Tyr Arg Met Trp Ile Glu Asn Ile Thr Asn Gly Asn

245

250

255

Met Thr Ser

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 4

gatcgatatc gtratgachc artctca

27

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 5

tttdakytcc agcttggtac c

21

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 6

gatccgtacg ctcaggtyca rytgcarcar tctgg

35

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 7

acagtgggcc ctgggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt

43

申請專利範圍

1. 一種因子D(factor D)抗體或其抗原結合片段，其包含下列互補決定區(CDR)序列：
 - (i) 輕鏈CDR1 序列，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸殘基24-34或其之包含一個殘基修飾之變異體，
 - (ii) 輕鏈CDR2序列，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸殘基50-56或其之包含一個殘基修飾之變異體，
 - (iii) 輕鏈CDR3序列，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸殘基89-97或其之包含一個殘基修飾之變異體，
 - (iv) 重鏈CDR1 序列，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸殘基31-35或其之包含一個殘基修飾之變異體，
 - (v) 重鏈CDR2 序列，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸殘基50-65或其之包含一個殘基修飾之變異體，及
 - (vi) 重鏈CDR3 序列，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸殘基95-102或其之包含一個殘基修飾之變異體；其中該抗體或其抗原結合片段在一個選自上列之序列中包含一個胺基酸改變；及其中該抗體或其抗原結合片段結合因子D。
2. 如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO：1及SEQ ID NO：2之輕鏈及重鏈可變區序列。
3. 如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO：1及SEQ ID NO：2之輕鏈及重鏈序列。
4. 一種因子D抗體或其抗原結合片段，其包含下列互補決定區(CDR)序列：
 - (i) 輕鏈CDR1 序列，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸殘基24-34或其之包含一個殘基修飾之變異體，

- (ii) 輕鏈CDR2序列，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸殘基50-56或其之包含一個殘基修飾之變異體，
- (iii) 輕鏈CDR3序列，其包含SEQ ID NO:1之胺基酸殘基89-97或其之包含一個殘基修飾之變異體，
- (iv) 重鏈CDR1 序列，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸殘基31-35或其之包含一個殘基修飾之變異體，
- (v) 重鏈CDR2 序列，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸殘基50-65或其之包含一個殘基修飾之變異體，及
- (vi) 重鏈CDR3 序列，其包含SEQ ID NO:2之胺基酸殘基95-102或其之包含一個殘基修飾之變異體；

其中該抗體或其抗原結合片段在一個選自上列之序列中包含一個胺基酸改變；及其中該抗體或其抗原結合片段結合與抗體20D12相同之因子D抗原決定基。

- 5. 如請求項4之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於重鏈。
- 6. 如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於重鏈CDR1。
- 7. 如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於重鏈CDR2。
- 8. 如請求項5之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於重鏈CDR3。
- 9. 如請求項4之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於輕鏈。
- 10. 如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於輕鏈CDR1。
- 11. 如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於輕鏈CDR2。
- 12. 如請求項9之抗體或其抗原結合片段，其中該修飾係位於輕鏈CDR3。

圖式

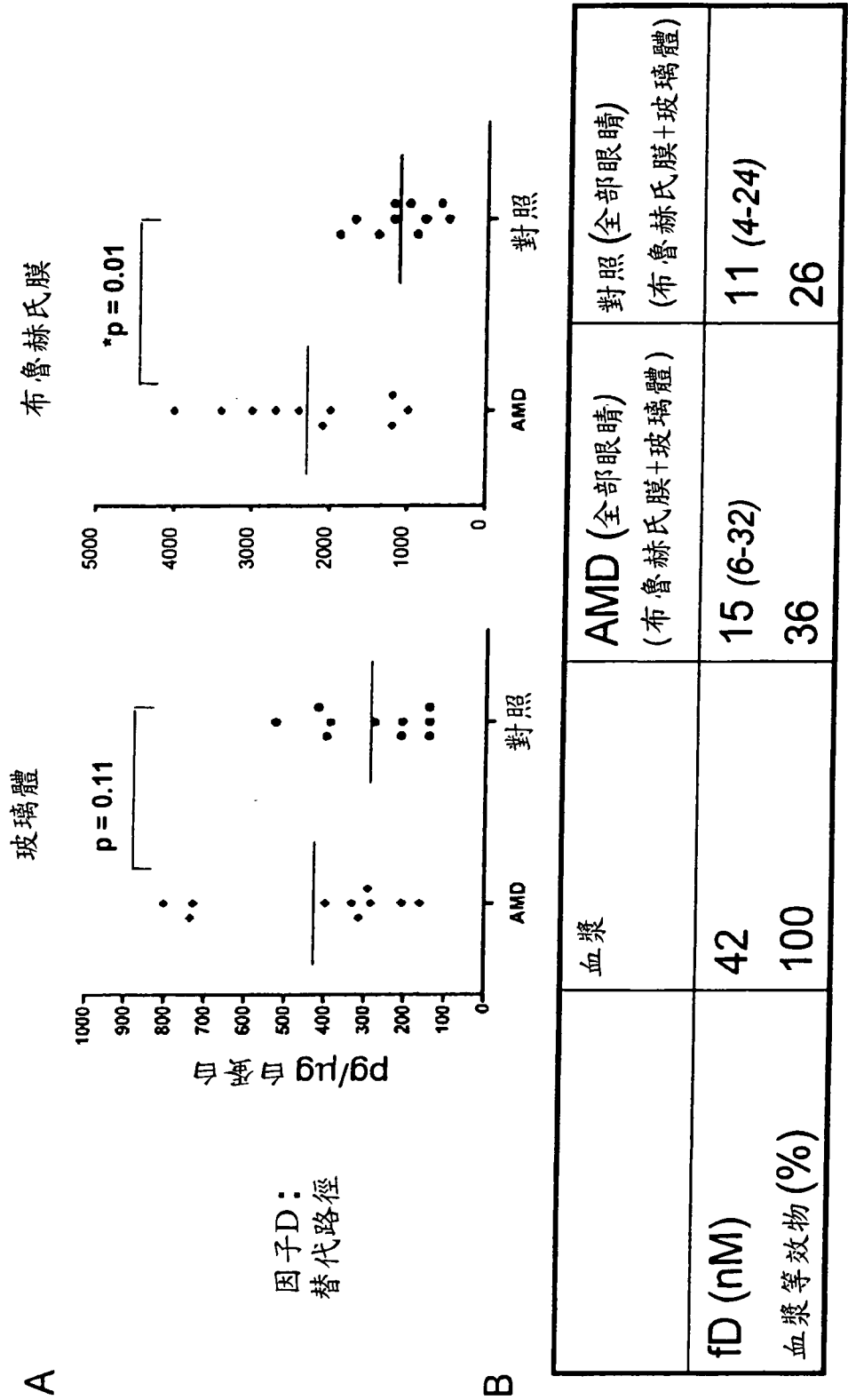


圖1

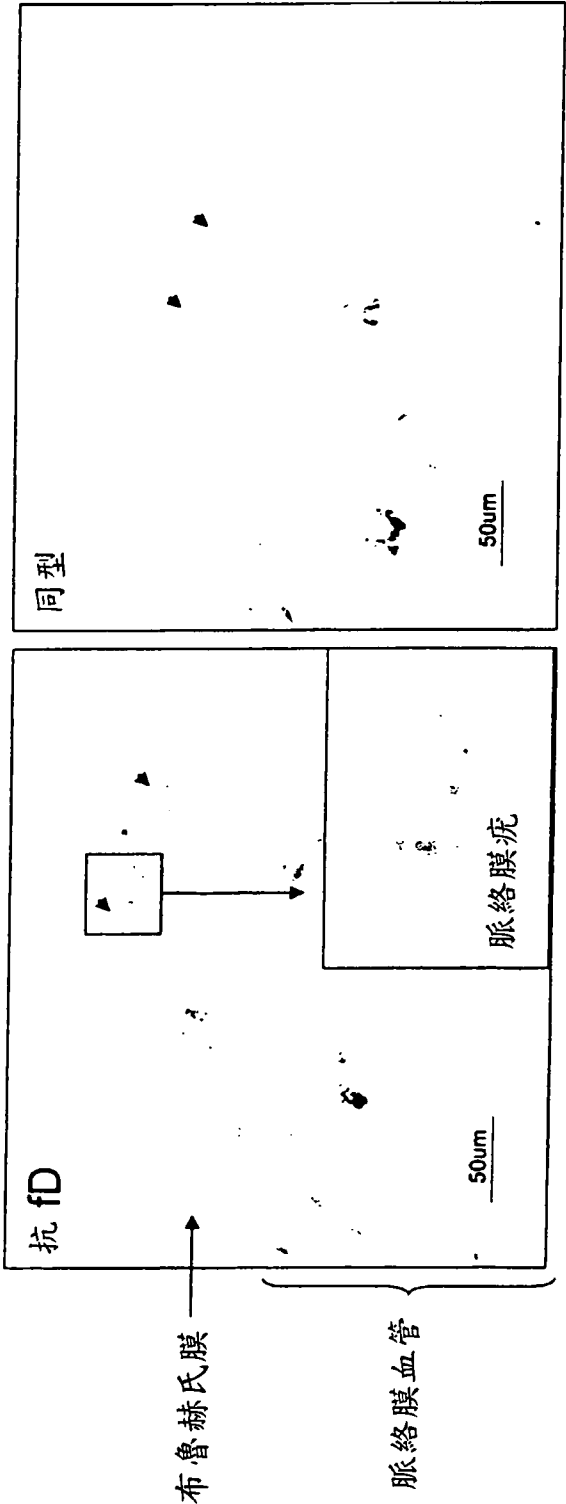
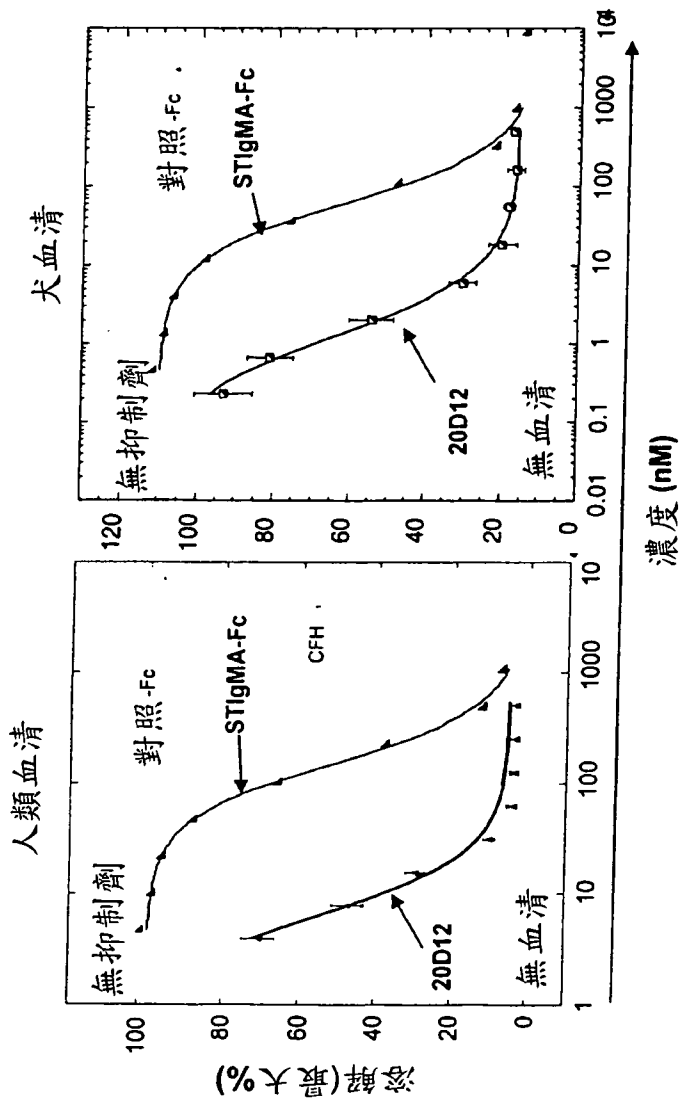


圖2



抗原決定基	IC50 (nM)	比率*	IC90 (nM)
20D12 B	1.3	0.02	9.3

*比率 IC50 α D/STIgMA-Fc

圖3

輕鍵序列 20D12:

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTKASQNVDTD
VAWFQQKPGQSPRGLIYSASSRYSGVPDRFTGSGGTDFTLTISNVQSEDL
AEYFCQQYNNYPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

重鍵序列 20D12

MGWSCIIILFLVATATGAYAQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSY
YMYWVKERPQQGLEWIGEINPTNGGTNFKSKATLTVDTSSTAYMQ
LSSLTSEDSAVYYCAREGGFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

圖 4

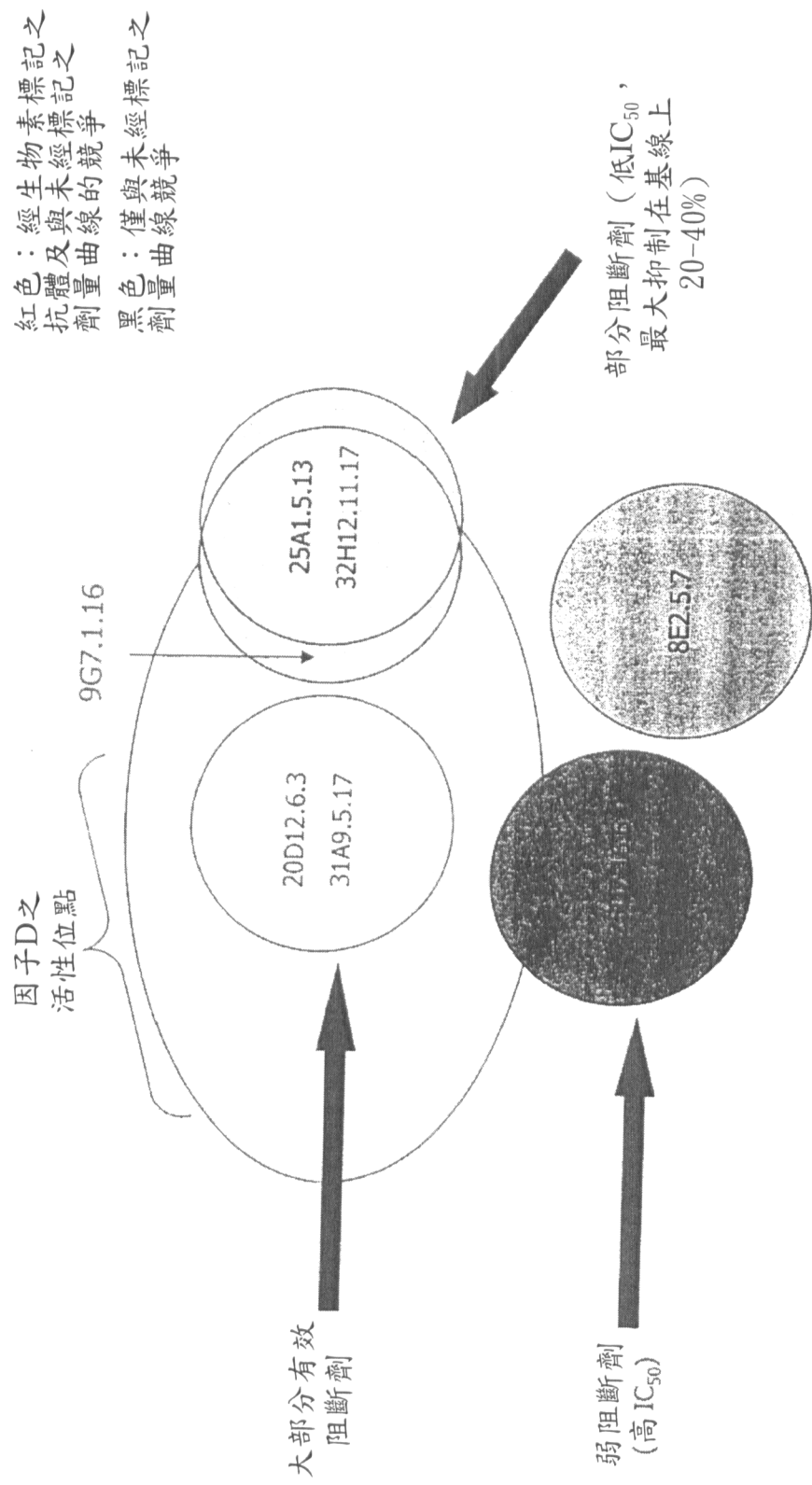


圖5

1 MHSSVYFVAL VILGAAVCAA QPRGRILGGQ EAAAHARPYM
41 ASVQVNGTHV CGGTLLDEQW VLSAAHCMDG VTDDDSVQVL
81 LGAHSLSAPE PYKRWYDVQS VVPHPGSRPD SLEDDLILFK
121 LSQNASLGPH VRPLPLQYED KEVEPGTLCV VAGWGVVTHA
161 GRRPDVLHQL RVSIMNRTTC NLRTHYHDGVV TINMMCAESN
201 RRDTCRGDSG SPLVCGDAVE GVVWGSRVV GNGKKPGVYT
241 RVSSYRMWIE NITNGNMTS

圖6