



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510799 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202280087754.8

(22) 申请日 2022.12.27

(30) 优先权数据

10-2022-0001647 2022.01.05 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/021371 2022.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/132547 KO 2023.07.13

(71) 申请人 洽纳辅医药科技有限公司

地址 韩国首尔

(72) 发明人 E·D·郑 柳秀旻 金东建

张志勳 李秉喆

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

专利代理师 郑元博

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

G12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

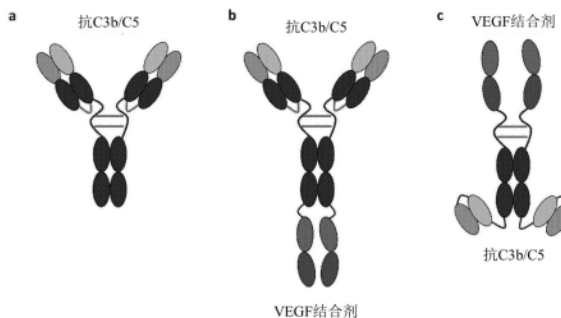
权利要求书2页 说明书27页
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

血管生成抑制剂缀合的抗C3B抗体或抗C5抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种包含抗C3b抗体或抗C5抗体与血管生成抑制剂的融合蛋白,以及利用该融合蛋白治疗眼部疾病特别是黄斑变性的组合物。该蛋白不仅能够抑制补体相关通路,还能有效调控血管生成。因此,该融合蛋白二聚体可有效用于治疗 and 预防补体相关疾病,特别是黄斑变性等眼部疾病,因此具有较高的工业实用性。



1. 一种融合蛋白,包含:与C3b(补体成分3b)或C5(补体成分5)特异性结合的抗体片段;和与VEGF(血管内皮生长因子)特异性结合的蛋白质。
2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中与C3b或C5特异性结合的抗体片段和与VEGF特异性结合的蛋白质通过接头连接。
3. 根据权利要求2所述的融合蛋白,其中所述接头为肽接头、免疫球蛋白片段、或其组合。
4. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白片段包含DANG突变。
5. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其中所述免疫球蛋白片段包含SEQ ID NO:62至68的氨基酸序列中的任一个。
6. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中与VEGF特异性结合的蛋白质包括与VEGF特异性结合的抗体或其片段;或VEGF受体的胞外结构域。
7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中所述VEGF受体为VEGF受体1或VEGF受体2。
8. 根据权利要求7所述的融合蛋白,其中所述VEGF受体的胞外结构域包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列。
9. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白由以下结构式(I)或(II)组成:
N'-X-[接头(1)]_n-Fc结构域或其变体-[接头(2)]_m-Y-C'(I)
N'-Y-[接头(1)]_n-Fc结构域或其变体-[接头(2)]_m-X-C'(II)
在结构式(I)和(II)中,
N'是所述融合蛋白的N端,
C'是所述融合蛋白的C端,
X是与C3b或C5特异性结合的抗体片段,
Y是与VEGF特异性结合的蛋白质,
接头(1)和(2)是肽接头,并且
n和m各自独立地为0或1。
10. 根据权利要求9所述的融合蛋白,其中所述接头(1)包含SEQ ID NO:53至57的氨基酸序列中的任一个。
11. 根据权利要求9所述的融合蛋白,其中所述接头(2)包含SEQ ID NO:58至61的氨基酸序列中的任一个。
12. 根据权利要求9所述的融合蛋白,其中X是与C3b或C5特异性结合的Fab或scFv。
13. 根据权利要求12所述的融合蛋白,其中与C3b特异性结合的Fab或scFv包括:
 - i) 包含SEQ ID NO:20的HCDR1、SEQ ID NO:21的HCDR2和SEQ ID NO:22的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:23的LCDR1、SEQ ID NO:24的LCDR2和SEQ ID NO:25的LCDR3的轻链可变区;
 - ii) 包含SEQ ID NO:28的HCDR1、SEQ ID NO:29的HCDR2和SEQ ID NO:30的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:31的LCDR1、SEQ ID NO:32的LCDR2和SEQ ID NO:33的LCDR3的轻链可变区;或
 - iii) 包含SEQ ID NO:36的HCDR1、SEQ ID NO:37的HCDR2和SEQ ID NO:38的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:39的LCDR1、SEQ ID NO:40的LCDR2和SEQ ID NO:41的LCDR3的轻链可变区。

14. 根据权利要求13所述的融合蛋白,其中与C3b特异性结合的Fab或scFv包括:
- i) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链可变区;
 - ii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的轻链可变区;或
 - iii) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变区。
15. 根据权利要求12所述的融合蛋白,其中与C5特异性结合的Fab或scFv包括:
- 包含SEQ ID NO:44的HCDR1、SEQ ID NO:45的HCDR2和SEQ ID NO:46的HCDR3的重链可变区;或
- 包含SEQ ID NO:47的LCDR1、SEQ ID NO:48的LCDR2和SEQ ID NO:49的LCDR3的轻链可变区。
16. 根据权利要求15所述的融合蛋白,其中与C5特异性结合的Fab或scFv包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:51的轻链可变区。
17. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含:SEQ ID NO:2的多肽和SEQ ID NO:9的多肽;SEQ ID NO:4的多肽和SEQ ID NO:10的多肽;SEQ ID NO:6的多肽和SEQ ID NO:11的多肽;SEQ ID NO:8的多肽和SEQ ID NO:12的多肽;SEQ ID NO:13的多肽;SEQ ID NO:14的多肽;SEQ ID NO:15的多肽;或SEQ ID NO:16的多肽。
18. 一种融合蛋白二聚体,其中两个根据权利要求1至17中任一项所述的融合蛋白彼此连接。
19. 根据权利要求18所述的融合蛋白二聚体,其中,所述融合蛋白二聚体是同二聚体。
20. 一种多核苷酸,编码根据权利要求1至17中任一项所述的融合蛋白。
21. 一种运载体,包含根据权利要求20所述的多核苷酸。
22. 一种宿主细胞,其是用根据权利要求21所述的运载体转化的。
23. 一种用于治疗或预防眼部疾病的药物组合物,其包含根据权利要求1所述的融合蛋白或根据权利要求19所述的融合蛋白二聚体作为活性成分。
24. 根据权利要求23所述的用于治疗或预防眼部疾病的药物组合物,其中所述眼部疾病是选自由以下组成的组中的任一种:年龄相关性黄斑变性(AMD)、地图样萎缩(GA)、脉络膜新生血管(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新生血管和视网膜新生血管。
25. 根据权利要求23所述的用于治疗或预防眼部疾病的药物组合物,其中所述药物组合物还包含药学上可接受的载体。

血管生成抑制剂缀合的抗C3B抗体或抗C5抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含抗C3b抗体或抗C5抗体和血管生成抑制剂的融合蛋白,以及利用该融合蛋白治疗眼部疾病特别是黄斑变性的组合物。

背景技术

[0002] 黄斑变性(老年性黄斑变性,AMD)是50岁以上人群失明的主要原因,是一种因黄斑受损而导致中央视力丧失的眼科疾病。黄斑变性大致可分为湿性黄斑变性和干性黄斑变性。早期为干性黄斑变性,黄斑下出现玻璃膜疣(一种异常胞外沉积物),并且视网膜色素上皮(RPE)发生色素变化。湿性黄斑变性导致脉络膜新生血管、色素上皮脱落、黄斑水肿、视网膜出血和视网膜渗出,从而导致视网膜神经细胞死亡而失明。

[0003] 同时,补体系统是抵抗微生物感染的先天免疫的重要组成部分,包括一组在血清中通常以非活性状态存在的蛋白质。该蛋白质通过经典途径、凝集素途径和旁路途径被激活。微生物表面的分子可以激活该途径,从而形成一种称为C3-转化酶的蛋白酶复合物。

[0004] 补体途径的激活产生补体蛋白的生物活性片段,这些片段介导白细胞趋化中的炎症反应,激活巨噬细胞、中性粒细胞、血小板、肥大细胞和内皮细胞,血管通透性增加,细胞溶解和组织损伤,例如产生过敏毒素如C3a和C5a以及C5b至C9膜攻击复合物(MAC)。

[0005] 此外,最近的研究表明,补体成分C3和C5是AMD患者玻璃膜疣的主要组成部分(Mulling,R.F.et al.,FASEB J.,14,835-46,2000)。此外,日本专利4897690号报道了一些眼部疾病与补体有关。然而,时至今日,对有效治疗眼部疾病、特别是黄斑变性的药物的需求日益增加,对黄斑变性的治疗剂的研究仍在继续。

发明内容

[0006] 技术问题

[0007] 因此,本发明人为了有效地治疗和预防眼部疾病特别是黄斑变性进行了研究。结果本发明人发现,阻断补体相关途径和新生血管途径的融合蛋白可用作黄斑变性的治疗剂,从而完成了本发明。

[0008] 解决方案

[0009] 在本发明的一个方面中,提供了一种融合蛋白,其包含:与C3b(补体成分3b)或C5(补体成分5)特异性结合的抗体片段;和与VEGF(血管内皮生长因子)特异性结合的蛋白质。

[0010] 在本发明的另一个方面,提供了融合蛋白二聚体,其中两个融合蛋白彼此连接。

[0011] 在本发明的另一个方面,提供了编码该融合蛋白的多核苷酸。

[0012] 另一个方面提供了包含该多核苷酸的运载体。

[0013] 在本发明的又一方面,提供了已导入运载体的转化宿主细胞。

[0014] 在本发明的又一方面,提供了一种用于治疗或预防眼部疾病的药物组合物,其包含该融合蛋白或融合蛋白二聚体作为活性成分。

[0015] 发明效果

[0016] 本发明的融合蛋白包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段和与VEGF特异性结合的蛋白质,该融合蛋白不仅可以有效抑制补体相关机制,还可以有效抑制血管生成。因此,可以有效治疗或预防由补体系统引起的眼部疾病和由血管生成引起的眼部疾病。因此,该融合蛋白可以有效地用于治疗黄斑变性,特别是干性黄斑变性和湿性黄斑变性。

附图说明

[0017] 图1a至1c示出了通过SDS-PAGE鉴定制备的MOR09611、MOR09675、S77、依库丽单抗、PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0240、PR0241、PR0242、PR0243、PR0017、KNP-301和阿柏西普所获得的结果。

[0018] 图2为显示本发明的双特异性抗体的示例的示意图。

[0019] 图3a和3b是示出通过ELISA测量KNP-301、PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0241、PR0242、S77、依库丽单抗、MOR09611和MOR09675与人C3b的结合亲和力所获得的结果的图。

[0020] 图4是示出通过ELISA测量PR0239、依库丽单抗、PR0017与人C5的结合亲和力所获得的结果的图。

[0021] 图5a和5b是示出通过ELISA测量阿柏西普、PR0236、PR0237、PR0238、PR0017、PR0239、PR0241和PR0242与人VEGF165的结合亲和力所获得的结果的图。

[0022] 图6a至6c是示出通过溶血试验(AH50)测量KNP-301、PR0236、PR0237、PR0239、PR0241、PR0242、S77、依库丽单抗、MOR09611和MOR09675的补体旁路途径抑制作用所获得的结果的图。

[0023] 图7a至7c是示出通过溶血试验(CH50)测量KNP-301、PR0236、PR0237、PR0239、PR0241、PR0242、S77、依库丽单抗、MOR09611和MOR09675的补体经典途径抑制作用所获得的结果的图。

[0024] 图8a至8c是示出通过使用报告细胞测量阿柏西普、PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0241、PR0242和PR0017的VEGF信号传导抑制效果所获得的结果的图。

具体实施方式

[0025] 包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段的融合蛋白

[0026] 在本发明的一个方面中,提供了一种融合蛋白,其包含:与C3b(补体成分3b)或C5(补体成分5)特异性结合的抗体片段;和与VEGF(血管内皮生长因子)特异性结合的蛋白质。

[0027] 本文所用的术语“C3b(补体成分3b)”是指补体成分C3被C3转化酶裂解后形成的C3片段,可与“补体C3b蛋白”互换使用。C3b在补体系统中特别起着核心作用,并与细胞表面结合作为标志物。此外,它具有调理作用,使具有C3b受体的吞噬细胞能够识别它并引起细胞毒性。此外,它激活C5形成膜攻击复合物(MAC)(kubiimmunology, W.H. Freeman and Company, New York)。

[0028] 本文所用的术语“补体成分”、“补体蛋白”或“补体成分蛋白”是指参与激活补体系统的分子。经典途径成分包括例如C1q、C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9和C5b-9复合物。旁路途径成分包括例如因子B、因子D、备解素、因子H和因子I。

[0029] 如本文所用,术语“与C3b特异性结合的抗体片段”可以与“抗C3b抗体”互换使用,

是指与补体C3b蛋白特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0030] 与C3b特异性结合的抗体或其抗原结合片段与补体成分C3b特异性结合并阻断补体途径的激活。因此,其可用于治疗与补体途径激活相关的病症,例如黄斑变性相关病症(包括例如AMD、北卡罗莱纳黄斑营养不良、Sorsby眼底营养不良、斯塔格特病、模式营养不良、贝斯特氏病、显性玻璃膜疣和Malattia Leventinese(放射状玻璃膜疣)、黄斑变性和/或功能障碍之前或之后发生的黄斑外改变、视网膜脱离、脉络膜视网膜变性、视网膜变性、光感受器变性、RPE变性、粘多糖贮积症、视杆-视锥营养不良、视锥-视杆营养不良和视锥变性等)。

[0031] “与C3b特异性结合的抗体”包含至少两条重链和两条轻链,其通过二硫键相互连接。重链由重链可变区(VH)和重链恒定区组成,轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区组成。VH区和VL区可进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着称为框架区(FR)的更保守的区域。

[0032] “与C3b特异性结合的抗体的抗原结合片段”是指完整抗体中保留与给定抗原(即C3b)特异性结合能力的一个或多个片段。抗体的“抗原结合部分”这一术语所包括的结合片段的例子包括Fab、scFv、F(ab')₂、双抗体、三抗体、sdAb和V_HH。

[0033] 在一个实施方式中,与C3b特异性结合的抗体或其抗原结合片段可以包括:包含SEQ ID NO:20的HCDR1、SEQ ID NO:21的HCDR2和SEQ ID NO:22的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:23的LCDR1、SEQ ID NO:24的LCDR2和SEQ ID NO:25的LCDR3的轻链可变区。此外,其可以包括:包含SEQ ID NO:28的HCDR1、SEQ ID NO:29的HCDR2和SEQ ID NO:30的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:31的LCDR1、SEQ ID NO:32的LCDR2和SEQ ID NO:33的LCDR3的轻链可变区。此外,其还可包括:包含SEQ ID NO:36的HCDR1、SEQ ID NO:37的HCDR2和SEQ ID NO:38的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:39的LCDR1、SEQ ID NO:40的LCDR2和SEQ ID NO:41的LCDR3的轻链可变区。

[0034] 在另一实施方式中,与C3b特异性结合的抗体或其抗原结合片段可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链可变区。此外,其可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的轻链可变区。此外,其可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变区。

[0035] 抗C3b抗体可以是指本领域普通技术人员所知道的任何抗体,没有限制。作为另一示例,该抗体可以是美国专利公开US2010-0291106 A1或美国专利号US 8,377,437 B2中公开的抗C3b抗体或其片段。

[0036] 本文所用的术语“C5(补体成分5)”可以与“补体C5蛋白”互换使用,是一种被C5转化酶切割成C5a和C5b片段并释放的蛋白。C5a是一种过敏毒素,其释放中性粒细胞和炎症介导的细胞因子,而C5b与C6、C7、C8和C9结合形成膜攻击复合物,从而破坏细胞膜。当体内C5a浓度维持较高时,IL-17和IL-22的表达增加,IL-17和IL-22的表达增加已知可作为炎症因子并诱导VEGF和血管生成(Liu B.et.al.,J.Transl.Med.,2011;9:1-12)。

[0037] 如本文所用,术语“与C5特异性结合的抗体片段”可以与“抗C5抗体”互换使用,是指与补体C5蛋白特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0038] 与C5特异性结合的抗体或其抗原结合片段与补体成分C5特异性结合并阻断补体

途径的激活。因此,其可用于治疗与补体途径激活相关的病症,例如黄斑变性相关病症。

[0039] “与C5特异性结合的抗体”包含至少两条重链和两条轻链,其通过二硫键相互连接。重链和轻链如上所述。

[0040] “与C5特异性结合的抗体的抗原结合片段”是指完整抗体中保留与给定抗原(即C5)特异性结合能力的一个或多个片段。抗体的“抗原结合部分”这一术语所包括的结合片段的例子包括Fab、scFv、F(ab')₂、双抗体、三抗体、sdAb和V_HH。

[0041] 在一个实施方式中,与C5特异性结合的抗体或其抗原结合片段可以包括:包含SEQ ID NO:44的HCDR1、SEQ ID NO:45的HCDR2和SEQ ID NO:46的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:47的LCDR1、SEQ ID NO:48的LCDR2和SEQ ID NO:49的LCDR3的轻链可变区。

[0042] 在另一实施方式中,与C5特异性结合的抗体或其抗原结合片段可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:51的轻链可变区。

[0043] 抗C5抗体可以是指本领域普通技术人员所知道的任何抗体,没有限制。作为另一示例,该抗体可以是美国专利号US 6,355,245 B2或美国专利公开US2019-0177436 A1中公开的抗C5抗体或其片段。

[0044] 本文所用的术语“VEGF”是指血管内皮生长因子,通过与其受体VEGFR (VEGF受体)结合而引起血管生成。VEGF通过激活各种信号传导级联,起到诱导内皮细胞增殖、迁移和分化的作用。在病理状态下,VEGF诱导异常血管生成,促进肿瘤细胞和视网膜细胞的生长和血管渗漏,从而引起肿瘤生长和转移、糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性等。

[0045] 此外,在本说明书中,VEGF或VEGF家族蛋白统称为术语“VEGF”。VEGF家族蛋白可以具有与VEGF等同或相似的活性。此时,“活性”可以意味着例如与VEGF受体的特异性结合,并且该特异性结合可以通过本领域技术人员已知的方法测量。

[0046] VEGF家族蛋白可以是选自由VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、PlGF (胎盘生长因子)、重组VEGF组成的组中的一种或多种。优选地,VEGF可以是VEGF-A、VEGF-B或PlGF,它们是血管生成所优先需要的。

[0047] 本文所用的术语“PlGF (胎盘生长因子)”是指由2p21-p16染色体编码的跨膜蛋白。PlGF充当VEGFR-1的选择性配体,可促进血管生成。PlGF的氨基酸组成与VEGF至少有40%一致。在一个实施方式中,PlGF可以是PlGF-1或PlGF-2。

[0048] 本文所用的术语“重组VEGF”是指通过可变外显子剪接重组的VEGF。根据氨基酸数目,重组VEGF可以是例如VEGF111、VEGF121、VEGF145、VEGF148、VEGF165、VEGF183、VEGF189或VEGF206,但不限于此。

[0049] 本文所用的术语“与VEGF特异性结合的蛋白质”是指与VEGF特异性结合的抗体或VEGF受体的胞外结构域。

[0050] 本文所用的术语“VEGF受体”是指与VEGF结合的受体,VEGF的生物学功能通过VEGFR-1 (Flt-1)、VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 和VEGFR-3 (Flt-4) 介导。VEGFR由七个胞外免疫球蛋白(Ig)样结构域、跨膜(TM)结构域、调节性近膜结构域、细胞内酪氨酸激酶结构域、和若干个其他酪氨酸残基组成。具体而言,已知VEGFR-1和VEGFR-2的胞外免疫球蛋白(Ig)样结构域是与VEGF结合的结构域。

[0051] 在本发明中,VEGF受体可以为VEGF受体1 (VEGFR-1) 或VEGF受体2 (VEGFR-2),但不限于此。

[0052] 本文所用的术语“VEGF受体的胞外结构域”是指与VEGF结合的VEGF受体结构域。具体是指VEGF受体的跨膜区和胞质区以外的、包含VEGF配体的胞外结构域部分。

[0053] 具体而言,VEGF受体的胞外结构域可以是VEGF受体的与VEGF结合的片段。此外,VEGF受体的胞外结构域可通过与VEGF-A、VEGF-B或PlGF结合而抑制血管生成。此时,VEGF受体的胞外结构域的一个实施方式可包括SEQ ID NO:52的氨基酸序列。此外,VEGF受体的胞外结构域可为包括SEQ ID NO:52的VEGF受体的胞外结构域的一部分的截短形式或改变形式。

[0054] 如本文所用,术语“与VEGF特异性结合的抗体”是指与VEGF特异性结合并引起抗原抗体反应的抗体或其片段,也称为抗VEGF抗体。

[0055] 抗体是能够特异性地与VEGF进行抗原-抗体结合的分子的统称。另外,抗体可以以任何形式使用,只要其包含能够特异性地与VEGF结合的抗原结合结构域即可。抗体或其片段可以是Fab(抗原结合片段)、F(ab)₂、scFv(单链可变片段)、di-scFv、sdAb(单域抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或其变体。

[0056] 抗VEGF抗体可以包含选自由以下组成的组中的任一者的可变部位:阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、雷莫芦单抗、布洛赛珠单抗、法瑞西单抗、KSI-301、伐努赛珠单抗、BI-836880、HuMab G6-31、B20-4.1、BAT-5906、那赛昔珠单抗、迪帕西单抗、hPV-19、及AT-001。优选地,抗VEGF抗体可包含阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、布洛赛珠单抗、KSI-301、伐努赛珠单抗、BI-836880、或BAT-5906的可变区。

[0057] 此时,阿柏西普是指抑制血管中的VEGF-A和PlGF的重组人源化融合蛋白。阿柏西普可以直接注射到眼内。贝伐单抗是一种作为血管生成抑制剂的抗体,其通过抑制血管内的VEGF-A来抑制血管的生长。对于黄斑变性的治疗,贝伐单抗可以直接注射到眼内。雷珠单抗是一种Fab,其通过抑制血管生成来有效治疗湿性黄斑变性。雷莫芦单抗是一种介导血管生成的物质或抑制VEGF受体2的抗体。布洛赛珠单抗是一种scFv,其与VEGF-A结合,抑制血管生成并治疗湿性黄斑变性。法瑞西单抗是一种双特异性抗体,其抑制VEGF-A和血管生成素-2。

[0058] 此外,KSI-301是一种有效治疗湿性黄斑变性的抗体。伐努赛珠单抗是一种双特异性人源化单克隆抗体,其抑制VEGF-A和血管生成素-2。BI-836880是一种人源化双特异性纳米抗体,其抑制VEGF和血管生成素-2。HuMab G6-31是抑制人VEGF的Fab片段。B20-4.1是抑制人VEGF的scFv片段。

[0059] 此外,BAT-5906是一种有效治疗湿性黄斑变性的抗体。那赛昔珠单抗是一种抗DLL4/VEGF双特异性抗体。迪帕西单抗是一种抗DLL4/VEGF双特异性抗体,也称为ABT-165。hPV-19是一种具有抗血管生成和抗肿瘤活性的抗VEGF抗体。AT-001是一种通过抑制人VEGF受体3来抑制血管生成的抗体。

[0060] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含BI-836880的可变区。具体地,该抗体可包括包含SEQ ID NO:88的CDR1、SEQ ID NO:89的CDR2和SEQ ID NO:90的CDR3的重链可变区。

[0061] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含贝伐单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:91的HCDR1、SEQ ID NO:92的HCDR2和SEQ ID NO:93的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:94的LCDR1、SEQ ID NO:95的LCDR2和SEQ ID NO:96的LCDR3的轻链可变区。

[0062] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含雷珠单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:97的HCDR1、SEQ ID NO:98的HCDR2和SEQ ID NO:99的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:100的LCDR1、SEQ ID NO:101的LCDR2和SEQ ID NO:102的LCDR3的轻链可变区。

[0063] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含雷莫芦单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:103的HCDR1、SEQ ID NO:104的HCDR2和SEQ ID NO:105的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:106的LCDR1、SEQ ID NO:107的LCDR2和SEQ ID NO:108的LCDR3的轻链可变区。

[0064] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含法瑞西单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:109的HCDR1、SEQ ID NO:110的HCDR2和SEQ ID NO:111的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:112的LCDR1、SEQ ID NO:113的LCDR2和SEQ ID NO:114的LCDR3的轻链可变区。

[0065] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含KSI-301的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:115的HCDR1、SEQ ID NO:116的HCDR2和SEQ ID NO:117的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:118的LCDR1、SEQ ID NO:119的LCDR2和SEQ ID NO:120的LCDR3的轻链可变区。

[0066] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含伐努赛珠单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:121的HCDR1、SEQ ID NO:122的HCDR2和SEQ ID NO:123的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:124的LCDR1、SEQ ID NO:125的LCDR2和SEQ ID NO:126的LCDR3的轻链可变区。

[0067] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含BAT-5906的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:127的HCDR1、SEQ ID NO:128的HCDR2和SEQ ID NO:129的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:130的LCDR1、SEQ ID NO:131的LCDR2和SEQ ID NO:132的LCDR3的轻链可变区。

[0068] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含那赛昔珠单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:133的HCDR1、SEQ ID NO:134的HCDR2和SEQ ID NO:135的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:136的LCDR1、SEQ ID NO:137的LCDR2和SEQ ID NO:138的LCDR3的轻链可变区。

[0069] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含迪帕西单抗的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:139的HCDR1、SEQ ID NO:140的HCDR2和SEQ ID NO:141的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:142的LCDR1、SEQ ID NO:143的LCDR2和SEQ ID NO:144的LCDR3的轻链可变区。

[0070] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含hPV-19的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:145的HCDR1、SEQ ID NO:146的HCDR2和SEQ ID NO:147的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:148的LCDR1、SEQ ID NO:149的LCDR2和SEQ ID NO:150的LCDR3的轻链可变区。

[0071] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可包含AT-001的可变区。具体地,该抗体可以包括:包含SEQ ID NO:151的HCDR1、SEQ ID NO:152的HCDR2和SEQ ID NO:153的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:154的LCDR1、SEQ ID NO:155的LCDR2和SEQ ID NO:156的

LCDR3的轻链可变区。

[0072] 在一个实施方式中,抗VEGF抗体可以包含:SEQ ID NO:157的重链和SEQ ID NO:158的轻链;SEQ ID NO:159的重链可变区和SEQ ID NO:160的轻链;SEQ ID NO:161的重链和SEQ ID NO:162的轻链;SEQ ID NO:163的重链和SEQ ID NO:164的轻链;SEQ ID NO:165的重链和SEQ ID NO:166的轻链;SEQ ID NO:167的重链和SEQ ID NO:168的轻链;SEQ ID NO:169的重链和SEQ ID NO:170的轻链;SEQ ID NO:171的重链和SEQ ID NO:172的轻链;SEQ ID NO:173的重链及SEQ ID NO:174的轻链;SEQ ID NO:175的重链可变区和SEQ ID NO:176的轻链可变区;或SEQ ID NO:177的重链可变区和SEQ ID NO:178的轻链可变区。

[0073] 抗VEGF抗体的片段可为scFv(单链可变片段)。此时,scFv是指重链可变区与轻链可变区通过肽接头连接而成的形式。具体地,scFv可包括可变区,所述可变区包括SEQ ID NO:179的CDR1、SEQ ID NO:180的CDR2、SEQ ID NO:181的CDR3、SEQ ID NO:182的CDR4、SEQ ID NO:183的CDR5、以及SEQ ID NO:184的CDR6。此外,scFv还可具有SEQ ID NO:185的氨基酸序列。此时,scFv的一个实施方式可为布洛赛珠单抗。

[0074] 抗VEGF抗体可以包含HuMab G6-31或B20-4.1的可变区。具体地,抗体可包括:包含SEQ ID NO:186的HCDR1、SEQ ID NO:187的HCDR2和SEQ ID NO:188的HCDR3的重链可变区;和包含SEQ ID NO:189的LCDR1、SEQ ID NO:190的LCDR2和SEQ ID NO:191的LCDR3的轻链可变区。具体地,抗体可包括:包含SEQ ID NO:192的HCDR1、SEQ ID NO:193的HCDR2和SEQ ID NO:194的HCDR3的重链可变区;和包含SEQ ID NO:195的LCDR1、SEQ ID NO:196的LCDR2和SEQ ID NO:197的LCDR3的轻链可变区。

[0075] 与VEGF特异性结合的抗体可以是指本领域普通技术人员所知道的任何抗体,没有限制。又例如,该抗体可以是美国专利号US 9,527,925 B2、美国专利号US 8,268,314 B2或美国专利公开号US2019-0167790 A1中公开的抗VEGF抗体或其片段。

[0076] 接头和Fc变体

[0077] 与C3b或C5特异性结合的抗体片段与特异性结合VEGF的蛋白质可通过接头连接。此时接头可为肽接头、免疫球蛋白片段、或其组合,但不限于此。

[0078] 接头连接两个蛋白质。接头的一个实施方式可以包括1至50个氨基酸、白蛋白或其片段、免疫球蛋白的Fc结构域等。此时,免疫球蛋白的Fc结构域是指含有免疫球蛋白的重链恒定区2(CH2)和重链恒定区3(CH3)并且不含免疫球蛋白的重链可变区、轻链可变区和轻链恒定区1(CH1)的蛋白质。免疫球蛋白可以是IgG、IgA、IgE、IgD或IgM,并且优选地可以是IgG1。此时,野生型免疫球蛋白G1的Fc结构域可以具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列。如本文所用,Fc结构域可以指包括CH2和CH3结构域但不包括铰链区的区域。

[0079] 此外,免疫球蛋白的Fc结构域既可以是Fc结构域变体,也可以是野生型Fc结构域。此外,本文所用的术语“Fc结构域变体”可以指在糖基化模式上不同于野生型Fc结构域的形式,与野生型Fc结构域相比具有高糖基化的形式,或与野生型Fc结构域相比具有低糖基化的形式,或脱糖基化形式。此外,无糖基化的Fc结构域也包括在内。Fc结构域或其变体可以适配为具有通过宿主的培养条件或遗传操作而调整的数量唾液的唾液酸、岩藻糖基化或糖基化。

[0080] 此外,免疫球蛋白的Fc结构域的糖基化可以通过常规方法例如化学方法、酶方法和使用微生物的遗传工程方法进行修饰。此外,Fc结构域变体可以是免疫球蛋白IgG、IgA、

IgE、IgD或IgM的相应Fc区的混合形式。此外，Fc结构域变体可以是Fc结构域的一些氨基酸被其他氨基酸取代的形式。

[0081] 本文所用的术语“Fc结构域变体”是指野生型Fc结构域的糖基化发生改变、Fc结构域之间的序列发生混合、或野生型Fc结构域的一些氨基酸发生缺失、改变、取代和/或添加的Fc结构域。野生型Fc结构域的一些氨基酸的缺失、改变、取代和/或添加可以通过本领域普通技术人员已知的方法进行。在一个实施方式中，Fc结构域变体可以是野生型Fc结构域的一些氨基酸序列发生取代和/或添加的Fc结构域变体。

[0082] 通过取代和/或添加引入的“氨基酸”可以是选自以下组成的组中的任一种氨基酸：赖氨酸(K)、丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。

[0083] Fc结构域突变可以调节抗体的活性或功能。在一个实施方式中，Fc结构域突变可以调节抗体的效应功能或抗体细胞毒活性。

[0084] 在一个实施方式中，Fc结构域变体可以包括DANG突变。此时，“DANG突变”是指用于去除人IgG1或小鼠IgG2a中的效应功能的D265A/N297G突变。

[0085] IgG分子中Fc区所介导的效应功能包括C1q结合、补体依赖性细胞毒作用、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如B细胞受体,BCR)下调等,一般而言,这些效应功能需要Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)结合。

[0086] 可以通过取代未突变Fc区的氨基酸序列来改变效应功能,效应功能改变的Fc区可以设计成例如通过修饰C1q结合和/或FcR结合,从而改变CDC活性和/或ADCC活性。即“DANG突变”是指从IgG分子中去除Fc区所介导的效应功能,从而在抗体生产过程中不会发生不需要的效应功能。

[0087] 所述Fc结构域变体的一个实施方式可为SEQ ID NO:68的氨基酸序列中D27A、N59G、D118E、L120M、D27A/N59G或D27A/N59G/D118E/L120M的取代。此外,可在SEQ ID NO:68的氨基酸序列的第209位添加赖氨酸(K)。具体地,所述Fc结构域变体的一个实施方式可具有SEQ ID NO:62至67中的任一个氨基酸序列。

[0088] 融合蛋白可以具有以Fc结构域为接头,将特异性结合C3b或C5的抗体片段与特异性结合VEGF的蛋白质、或将特异性结合VEGF的蛋白质与特异性结合C3b或C5的抗体片段分别连接在其N端和C端的结构。Fc结构域的N端或C端与特异性结合C3b或C5的抗体片段或特异性结合VEGF的蛋白质的连接可以可选地通过接头肽实现。

[0089] 融合蛋白结构

[0090] 具体地,所述融合蛋白可以由以下结构式(I)或(II)组成:

[0091] N'-X-[接头(1)]n-Fc结构域或其变体-[接头(2)]m-Y-C'(I)

[0092] N'-Y-[接头(1)]n-Fc结构域或其变体-[接头(2)]m-X-C'(II)

[0093] 在所述结构式(I)和(II)中,

[0094] N'是所述融合蛋白的N端,

[0095] C'是所述融合蛋白的C端,

[0096] X是与C3b或C5特异性结合的抗体片段,

[0097] Y是与VEGF特异性结合的蛋白质,

[0098] 所述接头(1)和(2)是肽接头,并且

[0099] n和m各自独立地为0或1。

[0100] 与C3b或C5特异性结合的抗体片段、与VEGF特异性结合的蛋白质、以及Fc结构域分别如上所述。

[0101] 本文所用的术语“融合蛋白”是指这样的重组蛋白,其中两个或更多个负责蛋白质内特定功能的蛋白质或结构域连接在一起,使得每个蛋白质或结构域发挥其各自的功能。接头肽通常具有柔性结构,可以插入两个或更多个蛋白质或结构域之间。

[0102] 此时,肽接头(1)可以由5至80个连续氨基酸、7至70个连续氨基酸、10至60个连续氨基酸、12至50个氨基酸组成。在一个实施方式中,肽接头(1)可以由30个氨基酸组成。此外,肽接头(1)可以包含至少一个半胱氨酸。具体地,其可以包含1个、2个或3个半胱氨酸。此外,肽接头(1)可以衍生自免疫球蛋白的铰链,并且可以进一步包括 $(G_4S)_n$ (其中n为1至10的整数)。在一个实施方式中,肽接头(1)可以由SEQ ID NO:53至57的任一个氨基酸序列组成的肽接头。

[0103] 肽接头(2)可以由1至50个连续氨基酸、或3至30个连续氨基酸、或5至20个氨基酸组成。在一个实施方式中,肽接头(2)可以是 $(G_4S)_n$ (其中n是1至10的整数)。此时,在 $(G_4S)_n$ 中,n可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一个实施方式中,肽接头(2)可以由SEQ ID NO:58至61的任一个氨基酸序列组成的肽接头。

[0104] 在一个实施方式中,抗体片段可以是与C3b特异性结合的Fab或scFv。

[0105] 具体地,与C3b特异性结合的Fab或scFv可以包括:包含SEQ ID NO:20的HCDR1、SEQ ID NO:21的HCDR2和SEQ ID NO:22的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:23的LCDR1、SEQ ID NO:24的LCDR2和SEQ ID NO:25的LCDR3的轻链可变区。

[0106] 此外,与C3b特异性结合的Fab或scFv可以包括:包含SEQ ID NO:28的HCDR1、SEQ ID NO:29的HCDR2和SEQ ID NO:30的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:31的LCDR1、SEQ ID NO:32的LCDR2和SEQ ID NO:33的LCDR3的轻链可变区。

[0107] 此外,与C3b特异性结合的Fab或scFv可以包括:包含SEQ ID NO:36的HCDR1、SEQ ID NO:37的HCDR2和SEQ ID NO:38的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:39的LCDR1、SEQ ID NO:40的LCDR2和SEQ ID NO:41的LCDR3的轻链可变区。

[0108] 在一个实施方式中,与C3b特异性结合的Fab或scFv可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链可变区。在一个实施方式中,与C3b特异性结合的Fab或scFv可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的轻链可变区。在一个实施方式中,与C3b特异性结合的Fab或scFv可以包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的轻链可变区。

[0109] 在一个实施方式中,抗体片段可以是与C5特异性结合的Fab或scFv。

[0110] 具体地,与C5特异性结合的Fab或scFv可以包括:包含SEQ ID NO:44的HCDR1、SEQ ID NO:45的HCDR2和SEQ ID NO:46的HCDR3的重链可变区;以及包含SEQ ID NO:47的LCDR1、SEQ ID NO:48的LCDR2和SEQ ID NO:49的LCDR3的轻链可变区。

[0111] 在一个实施方式中,与C5特异性结合的Fab或scFv可以包括包含氨基酸序列SEQ

ID NO:50的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:51的轻链可变区。

[0112] 本发明的融合蛋白可以包括这样的融合蛋白,该融合蛋白包含:抗C3b抗体的轻链可变区和轻链恒定区和抗C3b抗体的重链可变区和重链恒定区(CH1)、Fc结构域以及与VEGF特异性结合的蛋白质。此时,至少一种与VEGF特异性结合的蛋白质可以包括在抗C3b抗体中。此外,与VEGF特异性结合的蛋白质可以结合在抗C3b抗体的C端。

[0113] 此外,本发明的融合蛋白可以包括这样的融合蛋白,该融合蛋白包含:抗C5抗体的轻链可变区和轻链恒定区和抗C5抗体的重链可变区和重链恒定区(CH1)、Fc结构域以及与VEGF特异性结合的蛋白质。此时,至少一种与VEGF特异性结合的蛋白质可以包括在抗C5抗体中。此外,与VEGF特异性结合的蛋白质可以结合在抗C5抗体的C端。

[0114] 在一个实施方式中,融合蛋白可以包括:SEQ ID NO:2的多肽和SEQ ID NO:9的多肽;SEQ ID NO:4的多肽和SEQ ID NO:10的多肽;SEQ ID NO:6的多肽和SEQ ID NO:11的多肽;SEQ ID NO:8的多肽和SEQ ID NO:12的多肽;SEQ ID NO:13的多肽;SEQ ID NO:14的多肽;SEQ ID NO:15的多肽;或SEQ ID NO:16的多肽。

[0115] 具体地,SEQ ID NO:2、4、6分别为包含抗C3b抗体的轻链可变区和轻链恒定区的融合蛋白的氨基酸序列。此外,SEQ ID NO:9、10、11分别为包含以下的氨基酸序列:i)抗C3b抗体的重链可变区和重链恒定区(CH1)、ii)Fc结构域、以及iii)与VEGF特异性结合的蛋白质。

[0116] 此外,SEQ ID NO:8是包含抗C5抗体的轻链可变区和轻链恒定区的融合蛋白的氨基酸序列,SEQ ID NO:12是包含i)抗C5抗体的重链可变区和重链恒定区(CH1)、ii)Fc结构域和iii)与VEGF特异性结合的蛋白质的氨基酸序列。

[0117] 此时,SEQ ID NO:2和9的组合、SEQ ID NO:4和10的组合、SEQ ID NO:6和11的组合、以及SEQ ID NO:8和12的组合各自通过二硫键(-S-S-)连接,并通过非共价相互作用保持在一起。

[0118] 具体地,SEQ ID NO:13、14和15分别是包含scFv的氨基酸序列,所述scFv分别包含i)与VEGF特异性结合的蛋白质、ii)Fc结构域、iii)抗C3b抗体的重链可变区、和iv)抗C3b抗体的轻链可变区。

[0119] 此外,SEQ ID NO:16是包含scFv的氨基酸序列,所述scFv包含i)与VEGF特异性结合的蛋白质、ii)Fc结构域、iii)抗C5抗体的重链可变区、和iv)抗C5抗体的轻链可变区。

[0120] 在另一个实施方式中,融合蛋白包括与SEQ ID NO:2的多肽和SEQ ID NO:9的多肽;SEQ ID NO:4的多肽和SEQ ID NO:10的多肽;SEQ ID NO:6的多肽和SEQ ID NO:11的多肽;SEQ ID NO:8的多肽和SEQ ID NO:12的多肽;SEQ ID NO:13的多肽;SEQ ID NO:14的多肽;SEQ ID NO:15的多肽;或SEQ ID NO:16的多肽具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。此时,同一性例如是百分比同源性,并且可以通过同源性比较软件如国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastN软件来测定。

[0121] 融合蛋白二聚体

[0122] 在本发明的另一个方面,提供了一种融合蛋白二聚体,其中两个融合蛋白彼此连接,所述融合蛋白包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段和与VEGF特异性结合的蛋白质。

[0123] 此时,组成二聚体的融合蛋白之间的结合可以通过但不限于接头中存在的半胱氨酸形成的二硫键来实现。组成二聚体的融合蛋白可以是彼此相同或不同的融合蛋白。优选

地,二聚体可以是同二聚体。

[0124] 编码融合蛋白的多核苷酸

[0125] 本发明的另一个方面,提供了一种编码融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段和与VEGF特异性结合的蛋白质。具体地,所述多核苷酸可以包括SEQ ID NO:77的多核苷酸和SEQ ID NO:70的多核苷酸;SEQ ID NO:78的多核苷酸和SEQ ID NO:72的多核苷酸;SEQ ID NO:79的多核苷酸和SEQ ID NO:74的多核苷酸;SEQ ID NO:80的多核苷酸和SEQ ID NO:76的多核苷酸;SEQ ID NO:81的多核苷酸;SEQ ID NO:82的多核苷酸;SEQ ID NO:83的多核苷酸;或SEQ ID NO:84的多核苷酸。在多核苷酸中,一个或多个核苷酸可以通过取代、缺失、插入或其组合而发生突变。当通过化学合成制备核苷酸序列时,可以使用本领域公知的合成方法,例如在Engels和Uhlmann (*Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988) 中描述的那些。这样的方法可以包括三酯、亚磷酸盐、亚磷酰胺和H-磷酸盐方法、PCR和其他自动引物 (autoprimer) 方法、在固体支持物上合成寡核苷酸等。

[0126] 根据一个实施方式,多核苷酸可以包括与SEQ ID NO:77的多核苷酸和SEQ ID NO:70的多核苷酸;SEQ ID NO:78的多核苷酸和SEQ ID NO:72的多核苷酸;SEQ ID NO:79的多核苷酸和SEQ ID NO:74的多核苷酸;SEQ ID NO:80的多核苷酸和SEQ ID NO:76的多核苷酸;SEQ ID NO:81的多核苷酸;SEQ ID NO:82的多核苷酸;SEQ ID NO:83的多核苷酸;或SEQ ID NO:84的多核苷酸具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%、或至少约100%同一性的核酸序列。

[0127] 多核苷酸还可以包含编码信号序列或前导序列的核酸。如本文所使用的,术语“信号序列”是指引导靶蛋白分泌的信号肽。信号肽在宿主细胞中被翻译后被切割。具体地,信号序列是启动蛋白质跨内质网 (ER) 膜的迁移的氨基酸序列。

[0128] 信号序列的特性在本领域中是众所周知的。这种信号序列通常包含16至30个氨基酸残基,并且可以包含比16至30个氨基酸残基更多或更少的氨基酸残基。典型的信号肽由三个区域组成,即N端区域、中心疏水区域和更具极性的C端区域。中心疏水区域包含4至12个疏水残基,这些残基导致信号序列在未成熟多肽通过膜脂双层迁移的过程中被固定。

[0129] 启动后,信号序列在ER腔内被细胞酶 (通常称为信号肽酶) 切割。在这里,信号序列可以是tPa (组织纤溶酶原激活物) 的分泌信号序列、HSV gDs (单纯疱疹病毒糖蛋白D的信号序列)、或生长激素。优选地,可以使用在包括哺乳动物在内的高等真核细胞等中使用的分泌信号序列。

[0130] 负载有编码融合蛋白的多核苷酸的运载体

[0131] 在本发明的另一方面,提供了包含多核苷酸的运载体。

[0132] 可以将运载体导入要与其重组的宿主细胞中并插入该宿主细胞的基因组中。可替代地,运载体被理解为包含可作为附加体自主复制的多核苷酸序列的核酸手段。运载体包括线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒、RNA运载体、病毒运载体及其类似物。病毒运载体的示例包括但不限于逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。

[0133] 具体地,运载体可以包括质粒DNA、噬菌体DNA等;和商业开发的质粒 (pUC18、pBAD、pIDTSAMRT-AMP等)、大肠杆菌来源的质粒 (pYG601BR322、pBR325、pUC118、pUC119等)、枯草

芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 来源的质粒 (pUB110、pTP5等)、酵母来源的质粒 (YEp13、YEp24、YCp50等)、噬菌体DNA (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、 λ gt10、 λ gt11、 λ ZAP等)、动物病毒运载体 (逆转录病毒、腺病毒、痘苗病毒等)、昆虫病毒运载体 (杆状病毒等)。由于运载体取决于宿主细胞而展现出不同的蛋白质表达水平和修饰,因此优选选择和使用最适合该目的的宿主细胞。

[0134] 如本文使用的,术语靶蛋白的“基因表达”或“表达”理解为意指DNA序列的转录、mRNA转录物的翻译、和融合蛋白产物或其片段的分泌。有用的表达运载体可以是RcCMV (Invitrogen, Carlsbad) 或其变体。表达运载体可以包含用于促进靶基因在哺乳动物细胞中连续转录的人巨细胞病毒 (CMV) 启动子,和用于增加RNA转录后的稳定性水平的牛生长激素多腺苷酸化信号序列。

[0135] 表达融合蛋白的转化细胞

[0136] 在本发明的另一方面,提供了已导入运载体的转化宿主细胞。

[0137] 转化细胞的宿主细胞可以包括但不限于原核细胞、真核细胞、以及哺乳动物、植物、昆虫、真菌或细胞来源的细胞。作为原核细胞的例子,可以使用大肠杆菌。此外,作为真核细胞的例子,可以使用酵母。此外,对于哺乳动物细胞,可以使用CHO细胞、F2N细胞、CS0细胞、BHK细胞、Bowes黑色素瘤细胞、HeLa细胞、911细胞、AT1080细胞、A549细胞、HEK293细胞、HEK293T细胞等。然而,哺乳动物细胞不限于此,可以使用本领域普通技术人员已知可用作哺乳动物宿主细胞的任何细胞。

[0138] 此外,为了将表达运载体导入宿主细胞,可以使用CaCl₂沉淀、通过在CaCl₂沉淀中使用还原剂如二甲亚砜 (DMSO) 而提高了效率的Hanahan方法、电穿孔、磷酸钙沉淀、原生质体融合、使用碳化硅纤维的搅拌、农杆菌属介导的转化、使用PEG的转化、硫酸葡聚糖介导的转化、Lipofectamine介导的转化、和干燥/抑制介导的转化等。

[0139] 如上所述,为了优化融合蛋白作为治疗剂或用于任何其他目的的性质,可以通过本领域普通技术人员已知的方法,通过操纵宿主细胞所具有的糖基化相关基因来调节融合蛋白的糖基化模式 (例如,唾液酸、岩藻糖基化、糖基化)。

[0140] 产生融合蛋白的方法

[0141] 本发明的另一个方面,提供了一种生产包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段;和与VEGF特异性结合的蛋白质的融合蛋白的方法,该方法包括培养转化细胞的步骤。具体地,生产方法可以包括以下步骤:i) 培养转化细胞以获得培养产物;和ii) 从培养产物中回收融合蛋白。

[0142] 培养转化细胞的方法可以采用本领域公知的方法进行。具体地,培养可以分批进行,也可以以分批补料或重复分批补料工艺连续进行。

[0143] 融合蛋白或其二聚体的用途

[0144] 在本发明的另一个方面,提供了一种用于治疗或预防眼部疾病的药物组合物,其包含含有与C3b或C5特异性结合的抗体片段和与VEGF特异性结合的蛋白质的融合蛋白或两种融合蛋白相互连接的融合蛋白二聚体作为活性成分。

[0145] 融合蛋白和融合蛋白二聚体如上所述。

[0146] 本文所用的术语“眼部疾病”可统指发生在眼部的疾病。眼部疾病可指由补体活性或血管生成引发或加重的眼部疾病,或包括过度血管生成作为主要病症的眼部疾病。眼部

疾病可以是选自以下组成的组中的任一种：年龄相关性黄斑变性 (AMD)、地图样萎缩 (GA)、脉络膜新生血管 (CNV)、葡萄膜炎、糖尿病及其他缺血性视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜新生血管和视网膜新生血管。

[0147] 药物组合物的优选剂量因患者的状况和体重、疾病的严重程度、药物形式、施用途径和施用持续时间而异，并且可以由本领域普通技术人员适当地选择。在本发明的用于治疗或预防眼部疾病的药物组合物中，活性成分可以取决于应用、剂型、混合目的等以任何量（有效量）包含，只要活性成分可以表现出治疗眼部疾病的活性，或者特别是对黄斑变性的治疗作用。基于组合物的总重量，其常规有效量将在0.001wt%至20.0wt%的范围内确定。本文中使用的术语“有效量”是指能够诱导改善或治疗眼部疾病状况的效果、特别是诱导改善或治疗黄斑变性状况的效果的活性成分的量。这种有效量可以在本领域普通技术人员的常识范围内通过实验确定。

[0148] 如本文所使用的，术语“治疗”可用于表示治疗性治疗和预防性治疗。此时，预防可用于表示对象的病理状况或疾病得到缓解或减轻。在一个实施方式中，术语“治疗”包括用于治疗包括人在内的哺乳动物的疾病的应用或任何形式的施用。此外，该术语包括：抑制或减缓疾病或疾病进展；并且包括恢复或修复受损或丧失的功能以使疾病部分或完全得到缓解；刺激低效的过程；或减轻严重疾病的含义。

[0149] 诸如生物利用度的药代动力学参数和诸如清除率的潜在参数也可能影响功效。因此，“功效增强”（例如功效改善）可能由于药代动力学参数增强和功效增强而产生，这可通过比较试验动物或人对象的清除率和眼部疾病的治疗或改善等参数来衡量。

[0150] 如本文所使用的，术语“治疗有效量”或“药学有效量”是指有效预防或治疗所讨论疾病的化合物或组合物的量，该量足以以适用于医学治疗的合理的益处/风险比来治疗疾病，并且不会造成不良影响。有效量水平可以根据包括以下的因素来确定：患者的健康状况、疾病的类型和严重程度、药物的活性、患者对药物的敏感性、施用方式、施用时间、施用途径和排泄率、治疗持续时间、组合或同时使用的药物，以及医学领域众所周知的其他因素。在一个实施方式中，治疗有效量是指有效治疗眼部疾病的药物量。

[0151] 在这种情况下，药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是任何载体，只要该载体是适合递送给患者的无毒物质即可。可以含有蒸馏水、醇、脂肪、蜡和惰性固体作为载体。药学上可接受的佐剂（缓冲剂、分散剂）也可以包含在药物组合物中。

[0152] 具体地，通过除了活性成分之外还包含药学上可接受的载体，可以使用本领域已知的常规方法根据其施用途径将药物组合物制备成肠胃外制剂。在这里，术语“药学上可接受的”是指载体所具有的毒性不会比要应用（开处方）的对象可适应的毒性更高，同时不抑制活性成分的活性。

[0153] 当药物组合物制备成肠胃外制剂时，可以根据本领域已知的方法将其制成具有合适的载体的注射剂、透皮贴剂、鼻腔吸入剂以及栓剂形式的制剂。在制成注射剂的情况下，可以使用无菌水、乙醇、多元醇（例如甘油或丙二醇）或其混合物作为合适的载体；并且可以优选使用等渗溶液，例如林格氏溶液、含有三乙醇胺的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或注射用无菌水、或5%葡萄糖等。药物组合物的制剂是本领域已知的，具体可以参考雷明顿药物科学(第

19版,1995年)等。该文件被认为是本说明书的一部分。

[0154] 药物组合物的优选剂量可以在每天0.01 μ g/kg至10g/kg、或0.01mg/kg至1g/kg的范围内,取决于患者的状况、体重、性别、年龄、患者的严重程度和施用途径。该剂量可以每天施用一次或者可以分成每天数次。这样的剂量不应被解释为在任何方面限制本发明的范围。

[0155] 药物组合物可以应用(开处方)的对象是哺乳动物和人,特别优选是人。除活性成分外,本发明的药物组合物还可包含任何已知对眼部疾病、特别是黄斑变性具有治疗作用的化合物或天然提取物。

[0156] 在本发明的另一个方面,提供了包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段;和与VEGF特异性结合的蛋白质的融合蛋白或其二聚体在制造用于治疗或预防眼部疾病的药物中的用途。

[0157] 在本发明的另一个方面,提供了一种治疗和/或预防眼部疾病的方法,包括向对象施用包含与C3b或C5特异性结合的抗体片段;和与VEGF特异性结合的蛋白质的融合蛋白或其二聚体。

[0158] 融合蛋白、两个融合蛋白彼此连接而成的融合蛋白二聚体以及眼部疾病如上所述。此时,对象可以是患有眼部疾病的对象。此外,对象可以是哺乳动物,优选地可以是人。

[0159] 融合蛋白或融合蛋白二聚体的施用途径、剂量和施用频率可以因患者的状况和是否存在副作用而异,并因此可以以各种方式和量向对象施用融合蛋白或融合蛋白二聚体。本领域技术人员可以在适当的范围内选择最佳的施用方法、剂量和施用频率。此外,融合蛋白或融合蛋白二聚体可以与对要治疗的疾病的治疗效果已知的其他药物或生理活性物质组合施用,或者可以与其他药物以组合制剂的形式配制。

[0160] 实施本发明的方式

[0161] 下文将通过以下实施例更为详细地描述本发明。然而,以下实施例仅用于说明本发明,并且本发明的范围不受以下实施例的限制。

[0162] 制备例1.融合蛋白的制备

[0163] [表1]

| 蛋白质 | 形式 | 描述 | 对应序列 | |
|----------|-------|--|---------------------|---------------|
| MOR09611 | Mab | 抗 C3b (MOR09611) HC | SEQ ID NO: 1 | |
| | | 抗 C3b (MOR09611) LC | SEQ ID NO: 2 | |
| MOR09675 | Mab | 抗 C3b (MOR09675) HC | SEQ ID NO: 3 | |
| | | 抗 C3b (MOR09675) LC | SEQ ID NO: 4 | |
| S77 | Mab | 抗 C3b (S77) HC-hu IgG1 Fc DANG | SEQ ID NO: 5 | |
| | | 抗 C3b (S77) LC | SEQ ID NO: 6 | |
| 依库丽单抗 | Mab | 抗 C5 (依库丽单抗) HC-hu IgG1 Fc DANG | SEQ ID NO: 7 | |
| | | 抗 C5 (依库丽单抗) LC | SEQ ID NO: 8 | |
| PRO236 | Fc-融合 | 抗 C3b (MOR09611) HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF 结合剂 | SEQ ID NO: 9 | |
| | | 抗 C3b (MOR09611) LC | SEQ ID NO: 2 | |
| PRO237 | Fc-融合 | 抗 C3b (MOR09675) HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF 结合剂 | SEQ ID NO: 10 | |
| | | 抗 C3b (MOR09675) LC | SEQ ID NO: 4 | |
| PRO238 | Fc-融合 | 抗 C3b (S77) HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF 结合剂 | SEQ ID NO: 11 | |
| | | 抗 C3b (S77) LC | SEQ ID NO: 6 | |
| PRO239 | Fc-融合 | 抗 C5 (依库丽单抗) HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF 结合剂 | SEQ ID NO: 12 | |
| | | 抗 C5 (依库丽单抗) LC | SEQ ID NO: 8 | |
| PRO240 | Fc-融合 | VEGF 结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗 C3b (MOR09611) scFv | SEQ ID NO: 13 | |
| PRO241 | Fc-融合 | VEGF 结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗 C3b (MOR09675) scFv | SEQ ID NO: 14 | |
| PRO242 | Fc-融合 | VEGF 结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗 C3b (S77) scFv | SEQ ID NO: 15 | |
| PRO243 | Fc-融合 | VEGF 结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗 C5 (依库丽单抗) scFv | SEQ ID NO: 16 | |
| PRO017 | Fc-融合 | hu IgG1 Fc DANG | SEQ ID NO: 17 | |
| KNP-301 | Fc-融合 | hu CR1g-hu IgG1 Fc DANG-VEGF 结合剂 | SEQ ID NO: 18 | |
| [0165] | 阿柏西普 | Fc-融合 | VEGF 结合剂-hu IgG1 Fc | SEQ ID NO: 19 |

[0166] [SEQ ID NO:1]是人抗C3b抗体MOR09611的重链序列。

[0167] [SEQ ID NO:2]是人抗C3b抗体MOR09611的轻链序列。

[0168] [SEQ ID NO:3]是人抗C3b抗体MOR09675的重链序列。

[0169] [SEQ ID NO:4]是人抗C3b抗体MOR09675的轻链序列。

[0170] [SEQ ID NO:5]由人抗C3b抗体S77的重链可变区序列、人IgG1 CH1区序列和通过DANG突变(D265A,N297G)去除效应功能的人IgG1 Fc组成。

[0171] [SEQ ID NO:6]是人抗C3b抗体S77的轻链序列。

[0172] [SEQ ID NO:7]由人抗C5(抗C5)抗体依库丽单抗的重链可变区序列、人IgG1 CH1

区序列和人IgG1 Fc DANG组成。

[0173] [SEQ ID NO:8]是人抗C5抗体依库丽单抗的轻链序列。

[0174] [SEQ ID NO:9]由人抗C3b抗体MOR09611的重链可变区序列、人IgG1 CH1区序列、人IgG1 Fc DANG、接头GGGSGGGGS (SEQ ID NO:59) 和阿柏西普的VEGF结合部位组成。

[0175] [SEQ ID NO:10]由人抗C3b抗体MOR09675的重链可变区序列、人IgG1 CH1区序列、人IgG1 Fc DANG、接头GGGSGGGGS和阿柏西普的VEGF结合部位组成。

[0176] [SEQ ID NO:11]由人抗C3b抗体S77的重链可变区序列、人IgG1 CH1区序列、人IgG1Fc DANG、接头GGGSGGGGS和阿柏西普的VEGF结合部位组成。

[0177] [SEQ ID NO:12]由人抗C5抗体依库丽单抗的重链可变区序列、人IgG1 CH1区序列、人IgG1 Fc DANG、接头GGGSGGGGS、阿柏西普的VEGF结合部位组成。

[0178] [SEQ ID NO:13]由阿柏西普的VEGF结合部位、接头GGGGS (SEQ ID NO:58)、人IgG1Fc DANG、接头GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:60)、人抗C3b抗体MOR09611的重链可变区序列、接头GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:61) 和MOR09611的轻链可变区序列组成。

[0179] [SEQ ID NO:14]由阿柏西普的VEGF结合部位、接头GGGGS、人IgG1 Fc DANG、接头GGGSGGGSGGGGS、人抗C3b抗体MOR09675的重链可变区序列、接头GGGSGGGSGGGSGGGGS和MOR09675的轻链可变区序列组成。

[0180] [SEQ ID NO:15]由阿柏西普的VEGF结合部位、接头GGGGS、人IgG1 Fc DANG、接头GGGSGGGSGGGGS、人抗C3b抗体S77的重链可变区序列、接头GGGSGGGSGGGSGGGGS和S77的轻链可变区序列组成。

[0181] [SEQ ID NO:16]由阿柏西普的VEGF结合部位、接头GGGGS、人IgG1 Fc DANG、接头GGGSGGGSGGGGS、人抗C5抗体依库丽单抗的轻链可变区序列、接头GGGSGGGSGGGGS、和依库丽单抗的重链可变区序列组成。

[0182] [SEQ ID NO:17]由人IgG1 Fc DANG组成。

[0183] [SEQ ID NO:18]由人CRIg蛋白的胞外结构域区域(20-283)、接头GGGGS、以及人IgG1Fc DANG组成。

[0184] [SEQ ID NO:19]由阿柏西普的序列组成。

[0185] MOR09611 (SEQ ID NO:1和2) 是人抗C3b抗体。

[0186] MOR09675 (SEQ ID NO:3和4) 是人抗C3b抗体。

[0187] S77 (SEQ ID NO:5和6) 是人抗C3b抗体。

[0188] 依库丽单抗 (SEQ ID NO:7和8) 是人抗C5抗体。

[0189] PR0236 (SEQ ID NO:2和9) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中人抗C3b抗体MOR09611和阿柏西普的VEGF结合部位分别位于N端和C端。

[0190] PR0237 (SEQ ID NO:4和10) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中人抗C3b抗体MOR09675和阿柏西普的VEGF结合部位分别位于N端和C端。

[0191] PR0238 (SEQ ID NO:6和11) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中人抗C3b抗体S77和阿柏西普的VEGF结合部位分别位于N端和C端。

[0192] PR0239 (SEQ ID NO:8和12) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中人抗C5抗体依库丽单抗和阿柏西普的VEGF结合部位分别位于N端和C端。

[0193] PR0240 (SEQ ID NO:13) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中阿柏西普的VEGF结

合部位和人抗C3b抗体MOR09611的单链可变区片段(单链可变片段, scFv)序列分别位于N端和C端。

[0194] PRO241 (SEQ ID NO:14) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中阿柏西普的VEGF结合部位和人抗C3b抗体MOR09675序列的单链可变区片段序列分别位于N端和C端。

[0195] PRO242 (SEQ ID NO:15) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中阿柏西普的VEGF结合部位和人抗C3b抗体S77的单链可变区片段序列分别位于N端和C端。

[0196] PRO243 (SEQ ID NO:16) 是去除效应功能的双特异性抗体,其中阿柏西普的VEGF结合部位和人抗C5抗体依库丽单抗的单链可变区片段序列分别位于N端和C端。

[0197] KNP-301 (SEQ ID NO:18) 是去除效应功能的Fc融合蛋白二聚体,其中人CRIg的胞外结构域区域和阿柏西普的VEGF结合部位分别位于N端和C端。[SEQ ID NO:1] 抗-C3b (MOR09611)HC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMVVRQAPGKGLEWVSSIKIKPDGYAASVKGRFTI

SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLFYQYFARMQYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP

[0198] KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLS

LSPGK

[0199] [SEQ ID NO:2] 抗-C3b (MOR09611)LC

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSG

[0200] TDFTLTISLQPEDFATYYCQQHDTFRPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE

AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0201] [SEQ ID NO:3] 抗-C3b (MOR09675)HC

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYINWVRQAPGQGLEWMIISPNQGTGTYAQKFGQGRV

TMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNYDHLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVIQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK

[0202] SCDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPGK

- [0203] [SEQ ID NO:4] 抗-C3b (MOR09675) LC
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNYLNWYQQKPKGAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSGSG
- [0204] TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDWHITLPTVTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0205] [SEQ ID NO:5] 抗C3b (S77) HC-hu IgG1 Fc DANG
EVQLVESGGGLVQPQGLRSLSCAASGFSFTSSSVSWVRQAPGKLEWVGLIYPYNGFNYYADSVKGRF
TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNALYGGGYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVIQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKLSLSPGK
- [0207] [SEQ ID NO:6] 抗-C3b (S77) LC
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG
- [0208] TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYATLPTFEQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0209] [SEQ ID NO:7] 抗C5 (依库丽单抗) HC-hu IgG1 Fc DANG
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRV
TMRDTSSTVYMESSLRSEDVAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVIQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KLSLSPGK
- [0211] [SEQ ID NO:8] 抗C5 (依库丽单抗) LC

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSG

[0212] TDFTLTISSLQPEDFATYYCQNVLNITPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYRE

AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0213] [SEQ ID NO:9]抗C3b(MOR09611)HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF结合剂

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVSSIKIKPDGYAASVKGRFTI

SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLFYQYFARMQYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EP*

KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

EEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS

LSPGGGGSGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWDNR

KGFI ISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDF

NWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

[0214] [SEQ ID NO:10]抗C3b(MOR09675)HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF结合剂

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTGYIINWVRQAPGQGLEWMGIISPNQGTGTYAQKFGQGRV

TMTRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNYDHLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVIQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPK*

SCDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL

SPGGGGSGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSFNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWDNRK

GFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFN

WEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK

[0215] [SEQ ID NO:11]抗C3b(S77)HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF结合剂

- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFTSSSVSWVRQAPGKGLEWVGLIYPYNGFNYYADSVKGRF
 TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNALYSGGGYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
 GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVIQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYT
QKSLSPGGGGSGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI
 IWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELN
 VGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
- [0216] [SEQ ID NO:12] 抗C5(依库丽单抗)HC-hu IgG1 Fc DANG-VEGF结合剂
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQWVRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRV
 TMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVIQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSPGGGGSGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI
 WDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVN
 GIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
- [0217] TKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSPGGGGSGGGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI
 WDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVN
 GIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
- [0218] [SEQ ID NO:13] VEGF结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗C3b(MOR09611) scFv

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISN
 ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSS
 KHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSDKTHTCPP
CPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 [0219] VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGG
 GGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMTWVRQAPGKGLEWVSSIKIKPDGYAASVKGRFT
 ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLFYQYFARMQYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGSDIQM
 TQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
 PEDFATYYCQHDTRPTFGQGTKVEIK

[0220] [SEQ ID NO:14] VEGF结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗C3b (MOR09675) scFv

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISN
 ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSS
 KHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGSDKTHTCPP
CPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 [0221] VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGG
 GGGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYINWVRQAPGQGLEWMGIIISPNQGTGTYAQKFKQGR
 VTMTDRDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNYDHLDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGGGGGGGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
 EDFATYYCQDWHITLPTVTFGQGTKVEIK

[0222] [SEQ ID NO:15] VEGF结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗C3b (S77) scFv

SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPTNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWD SRKGF I ISN
 ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTI IDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSS
 KHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGS DKTHTCPP
CPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 [0223] VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGG
 GGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFSFTSSVSWVRQAPGKLEWVGLIYPYNGFNYYADSVKGR
 FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARNALYGGGYYAMDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG
 SDIQMTQSPSSLASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
 ISSLPEDFATYYCQQSYATLPTFEQGTKVEIK

[0224] [SEQ ID NO:16] VEGF结合剂-hu IgG1 Fc DANG-抗C5(依库丽单抗) scFv

SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPTNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWD SRKGF I ISN
 ATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTI IDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSS
 KHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGS DKTHTCPP
CPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA

[0225] VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGG
 GGGGGGSMADIQMTQSPSSLASVGDRTVITCGASENIYGALNWYQQKPKGAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQNVLNTPLTFGQGTKVEIKRTGGGGSGGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGA
 SVKVSCKASGYIFSNYWIQVVRQAPGQGLEWVMEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED
 AVYYCARYFFGSSPNWYFDVWGQGLVTVSS

[0226] [SEQ ID NO:17] hu IgG1 Fc DANG

DKTHTCPPCPAPELLGGFSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV

[0227] SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

- [0228] [SEQ ID NO:18]hu CRIG-hu IgG1 Fc DANG-VEGF结合剂
 RPILEVPESVTGPWKGDVNLPCTYDPLQGYTQVLVKWLVRGSDPVTIFLRDSSGDHIQQAKYQGRHL
 VSHKVPGDVSLQLSTLEMDDRSHYTCEVTWQTPDGNQVVRDKITELRVQKLSVSKPTVTTGSGYGFTVPQGMRI
 LQCQARGSPPI SYI WYKQQTNNQEP I K VATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVQSEQHSDIKVFVVKDSSKLL
 KTKTEAPTMTYPLKATSTVKQSWDWTDMGDLGETSAGPGKSLPGGGGSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSSDTGRPFVEMYSE
 IPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI I WDSRKGF I I SNATYKE I GLLTCEATVNGHLY
 KTNYLTHRQTNT I IDVVLSPSHG I ELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSKHKHKKLVNRDLKTQSGSEM
 KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
- [0229] [SEQ ID NO:19]VEGF结合剂-hu IgG1 Fc
 SDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRI I WDSRKGF I I SN
 ATYKE I GLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNT I IDVVLSPSHG I ELSVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPS
 KHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCAPE
- [0230] LLGGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0231] 制备例2.蛋白质的制备
- [0232] 制备例2.1.运载体组成和质粒大量制备
- [0233] 所用的试剂和设备如下表2和表3所述。
- [0234] [表2]

| | 试剂 | 制造商 | 目录# |
|--------|-----------------------|-------------|----------|
| | pTT5 | chempartner | |
| | In-Fusion HD 克隆试剂盒 | Clontech | 639648 |
| [0235] | Accuprime pfx DNA 聚合酶 | Invitrogen | 12344-04 |
| | 凝胶 DNA 片段纯化试剂盒 | TaKaRa | D823A |
| | FastDigest® BamHI | Fermentas | FD0055 |
| | FastDigest® EcoRI | Fermentas | FD0275 |

[0236] [表3]

| 设备和工具 | 制造商 | 型号名称 |
|--------|-----------|------------------|
| 生物安全柜 | NUAIRE | LabGard class II |
| 离心机 | Eppendorf | 5424 |
| 凝胶成像系统 | Tanon | 2500R |

[0238] 将合成的DNA片段通过PCR扩增,PCR产物经凝胶纯化。用限制酶EcoRI和BamHI切割pTT5运载体,然后将凝胶纯化。用In-Fusion试剂盒将各PCR产物与线性运载体连接。将产生的运载体转化到ECOS101 DH5 α 感受态细胞中,在含有100 μ g/ml氨苄青霉素的2xYT琼脂平板上培养细胞。所有操作过程均按照标准转化操作程序进行。用菌落PCR鉴定阳性重组产物,并对重组质粒进行序列验证测序。挑选单菌落,将种子培养物接种到5mL含有100 μ g/mL氨苄西林的2xYT培养基中。37 $^{\circ}$ C振荡培养8小时。

[0239] 随后,将种子培养物以1:1,000的比例稀释在200mL选择性2xYT培养基中。37 $^{\circ}$ C振荡培养16小时。在4 $^{\circ}$ C下以4,700rpm的速度离心10分钟,收获细菌细胞。将细菌沉淀物重新悬浮在12mL RES-EF缓冲液中。随后,加入12mL LYS-EF缓冲液,并将密封管剧烈颠倒以充分混合,然后在室温下孵育5分钟。将12mL NEU-EF缓冲液加入裂解物中,剧烈颠倒以充分快速地混合。在将裂解物注入NucleoBond®Xtra柱过滤器之前,通过将裂解物管颠倒3次来制备沉淀物的均匀悬浮液,以防止过滤器堵塞。

[0240] 随后,用10mL过滤器洗涤缓冲液FIL-EF洗涤NucleoBond®Xtra柱过滤器和NucleoBond®Xtra柱。通过拉出或颠倒柱来移除NucleoBond®Xtra柱过滤器。用90mL洗涤缓冲液ENDO洗涤NucleoBond®Xtra柱。

[0241] 用45mL洗涤缓冲液WASH-EF洗涤NucleoBond®Xtra柱。用15mL洗脱缓冲液ELU洗脱质粒DNA。将洗脱液收集于50mL离心管中。室温下加入10.5mL异丙醇以使洗脱的质粒DNA沉淀。涡旋震荡后使混合物静置2分钟。

[0242] 随后,将5mL 70%乙醇加入沉淀中。使用移液器头小心地将乙醇从管中完全去除。将沉淀在室温(20-25 $^{\circ}$ C)下干燥。随后,用1,000 μ L纯化水溶解DNA沉淀。

[0243] 制备例2.2.细胞转染和蛋白表达

[0244] 所用材料和试剂如下表4所述。

[0245] [表4]

| 材料和试剂 | 制造商(产品#) |
|----------------------------|----------------------|
| 293F 细胞 | Invitrogen (R790-07) |
| OPM 293 | OPM (81075-001) |
| Pluronic® F-68, 10% (100X) | Gibco (24040-032) |
| [0246] 1 mg/mL PEI | Polyscience (23966) |
| OPTI MEM I | Gibco (31985088) |
| 蛋白胨(20x) | FLUKA (P0521-1KG) |
| 摇瓶 | |
| ISF1-X 培养摇床 | Kuhner shaker |

[0247] 将含有293F种子株的完全培养基置于130rpm、37℃、8%CO₂的培养摇床中培养。以 0.3×10^6 至 0.4×10^6 个细胞/mL的密度培养细胞,每2~3天更换一次培养基。转染前24小时,将新鲜传代培养的293F细胞制备成 2.6×10^6 个/mL。将制备好的细胞置于130rpm、37℃、8%CO₂的培养摇床中培养。

[0248] 转染当天,用新鲜培养基将细胞密度调整为 5.0×10^6 个细胞/mL。在3L摇瓶中以总体积1L进行。用50mL OPTI MEM I稀释0.4mg Hc和0.6mg LC质粒,经0.22μm滤膜过滤。此后,用50mL OPTI MEM I稀释2mg PEI,以制备转染试剂。

[0249] 将稀释后的PEI加入DNA混合物中,立即混匀。之后,将其在室温下培养15分钟。将DNA-PEI混合物加入到以 2.6×10^6 个细胞/mL制备的293F细胞中。之后,在130rpm、37℃、8%CO₂的培养摇床中连续培养24小时。转染后24小时,向1/20的培养液中添加10%蛋白胨,使终浓度为0.5%。然后,将细胞在130rpm、37℃、8%CO₂的培养摇床中连续培养。转染后2~5天期间,每天测定并记录细胞密度/活力。转染后7天或细胞活力低于70%时,收获细胞进行纯化。

[0250] 制备例2.3.蛋白纯化

[0251] 下表5至表7描述了用于蛋白质纯化的试剂、各缓冲液的组成和设备。

[0252] [表5]

[0253]

| 试剂 | 制造商 | 目录# |
|-------------------------|-----------------|--------------|
| Mabselect SuRe | GE Healthcare | 11003493 |
| Tris | SIGMA | 77-86-1 |
| NaCl | ACROS ORGANICS | 7647-14-5 |
| 柠檬酸钠 | Adamas-beta | 76198B |
| 柠檬酸 | GENERAL-Reagent | G83162B |
| 精氨酸 | VETEC | V900343-500G |
| 琥珀酸 | Sigma-Aldrich | S9512-500G |
| Triton X-100 | ABCONE | X10010-1L |
| Triton X-114 | SIGMA-ALDRICH | X114 |
| Millex-GP过滤单元,0.22μm,无菌 | MILLIPORE | SLGP033RS |
| NaOH | Merck | B146369740 |

[0254] [表6]

| | |
|-------------|--|
| [0255] 缓冲液A | 25mM Tris,150mM NaCl,pH 8.0 |
| 缓冲液B | 25mM Tris,150mM NaCl,0.1%Triton X-100,0.1%Triton X-114pH 8.0 |
| 缓冲液C | 100mM柠檬酸钠,150mM NaCl,pH 3.0 |
| 缓冲液D | 1M精氨酸,400mM琥珀酸,pH9.0 |
| 最终缓冲液 | 10mM PB,pH 7.4,40mM NaCl,5%蔗糖 |

[0256] [表7]

| | | |
|----------------|---------------|----------------|
| [0257] 设备 | 制造商 | 型号名称 |
| AKTA Pure | GE Healthcare | 29-0182-24 |
| 离心机 | Beckman | J-26xp |
| 凝胶成像系统 | Tanon | 2500R |
| Sartopore 2过滤器 | Sartorius | 5445307H9-00-A |

[0258] 使用MabSelect Sure柱来纯化蛋白质。具体而言,在4℃下以2,000×g离心20分钟收获上清液。之后,用Sartopore 2过滤器过滤上清液。将澄清的上清液上样到用缓冲液A平衡的5ml MabSelect Sure柱中。之后,用缓冲液A洗涤柱直至A280吸光度达到基线。此外,用10CV缓冲液B洗涤柱。此外,用10CV缓冲液A洗涤柱。之后,用6CV缓冲液C洗脱结合的蛋白质,并加入1/6体积的缓冲液D以中和洗脱物。之后,进行SDS-PAGE和SEC-HPLC分析。

[0259] 之后,使用SEC柱纯化蛋白质。具体地,将上清液上样到用最终缓冲液平衡的SEC柱上,然后用最终缓冲液洗脱蛋白质。

[0260] 结果如图1a至1c所示,通过SDS-PAGE鉴定了纯化的融合蛋白二聚体MOR09611、MOR09675、S77、依库丽单抗、PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0240、PR0241、PR0242、PR0243、PR0017、KNP-301和阿柏西普。

[0261] 实验例1.通过ELISA鉴定融合蛋白与补体蛋白及VEGF的结合亲和力

[0262] 为了确定一个实施方式的融合蛋白二聚体是否抑制补体途径,通过酶联免疫试验确定KNP-301、MOR09611、MOR09675、PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0241、PR0242、S77、和依库丽单抗是否与C3b蛋白结合,以及PR0239、依库丽单抗、PR0017是否与C5结合。

[0263] 具体地,将人C3b蛋白固定化在平板上,使KNP-301、MOR09611、MOR09675、PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0241、PR0242、S77、依库丽单抗结合。然后,依次使抗人免疫球蛋白G抗体、抗辣根过氧化物酶(HRP)抗体结合。此外,将人C5蛋白固定化在平板上,使PR0239、依库丽单抗、PR0017与人C5结合。

[0264] 结果如图3a和3b所示,发现KNP-301、MOR09611、MOR09675、PR0236、PR0237、PR0238、PR0241、PR0242、S77以浓度依赖性方式与人C3b结合。此外,如图4所示,发现PR0239和依库丽单抗以浓度依赖性方式与人C5结合。

[0265] 为了确定一个实施方式的融合蛋白是否具有抗VEGF作用,通过酶联免疫试验测定该融合蛋白与人VEGF165蛋白的结合,并通过ELISA测定PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0241、PR0242、PR0017与人VEGF165的结合亲和力。

[0266] 具体地,将人VEGF165蛋白固定于平板上,以PR0236、PR0237、PR0238、PR0239、PR0241、PR0242、PR0017、阿柏西普为对照组进行结合。然后,依次使抗人免疫球蛋白G抗体、抗辣根过氧化物酶(HRP)抗体结合。

[0267] 结果如图5a和5b所示,通过酶联免疫吸附试验发现,具有抗VEGF的阿柏西普、PRO236、PRO237、PRO238、PRO239、PRO241、PRO242以浓度依赖性的方式与人VEGF165结合。

[0268] 实验例2.通过溶血试验分析补体旁途径抑制效果

[0269] 为了确定一个实施方式的融合蛋白二聚体是否抑制补体旁途径,对KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO239、PRO241、PRO242、S77和依库丽单抗进行了溶血试验(AH50)。具体地,使用离心机在400xg下用TBS洗涤0.5mL兔红细胞10分钟。重复该过程两次,然后使用离心机在400xg下用GVB EGTA缓冲液再次洗涤兔红细胞10分钟。之后,使用GVB EGTA缓冲液将兔红细胞的浓度调整至 1×10^9 个细胞/mL。

[0270] 为了通过致敏红细胞分析AH50,将12%人C1q耗竭血清加入96孔板(50 μ L/孔)。此外,以不同浓度的KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO239、PRO241、PRO242、S77及依库丽单抗进行处理。4 $^{\circ}$ C孵育30分钟后,加入兔红细胞(2×10^6 个/孔,50 μ L/孔)。将细胞于37 $^{\circ}$ C孵育1.5小时后,以600xg离心10分钟。收集110 μ L上清液,然后测量OD415值。

[0271] 通过AH50溶血试验鉴定了KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO239、PRO241、PRO242、S77、依库丽单抗的补体旁途径抑制效果。

[0272] 结果如图6a至6c所示,发现KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO239、PRO241、PRO242、S77和依库丽单抗以浓度依赖性方式抑制通过补体旁途径溶血。

[0273] 实验例3.通过溶血试验分析补体经典途径抑制效果

[0274] 为了确定一个实施方式的融合蛋白二聚体是否不抑制补体经典途径,对KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO239、PRO241、PRO242、S77和依库丽单抗进行了溶血试验(CH50)。

[0275] 具体地,将Ab致敏的羊红细胞在TBS中以400xg离心10分钟,该过程重复两次,然后用GVB++缓冲液使用离心机以400xg离心10分钟,洗涤羊红细胞。然后,用GVB++缓冲液将致敏羊红细胞调整至 1×10^9 个细胞/mL的浓度。

[0276] 为了通过致敏红细胞分析CH50,将4.5%人因子B耗竭血清加入96孔板(50 μ L/孔),然后用不同浓度的KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO239、PRO241、PRO242、S77和依库丽单抗进行处理。在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟后,添加致敏羊红细胞(2.5×10^6 个/孔,50 μ L/孔)。将细胞在37 $^{\circ}$ C下培养30分钟。以600xg离心10分钟,收集110 μ L上清液,然后测量OD415值。

[0277] 结果如图7a至7c所示,发现KNP-301、MOR09611、MOR09675、PRO236、PRO237、PRO241、PRO242和S77不抑制通过补体经典途径溶血,但PRO239和依库丽单抗抑制溶血。

[0278] 实验例4.利用VEGF报告细胞分析融合蛋白二聚体的功效

[0279] 为了确定一个实施方式的融合蛋白二聚体是否有效抑制VEGF蛋白,确定其是否抑制VEGF与VEGF受体之间的结合。

[0280] 使用报告细胞测定阿柏西普、PRO236、PRO237、PRO238、PRO239、PRO241和PRO242对VEGF信号传导的抑制作用。具体地,使用VEGF报告细胞(GA3001, Promega, USA)(该细胞在VEGF结合时通过受体介导信号传导产生发光),通过发光程度确认阿柏西普、PRO236、PRO237、PRO238、PRO239、PRO241、PRO242和PRO017是否抑制VEGF与VEGF受体的结合。

[0281] 结果如图8a至8c所示,发现阿柏西普、PRO236、PRO237、PRO238、PRO239、PRO241和PRO242以浓度依赖性方式抑制VEGF的受体介导信号传导。

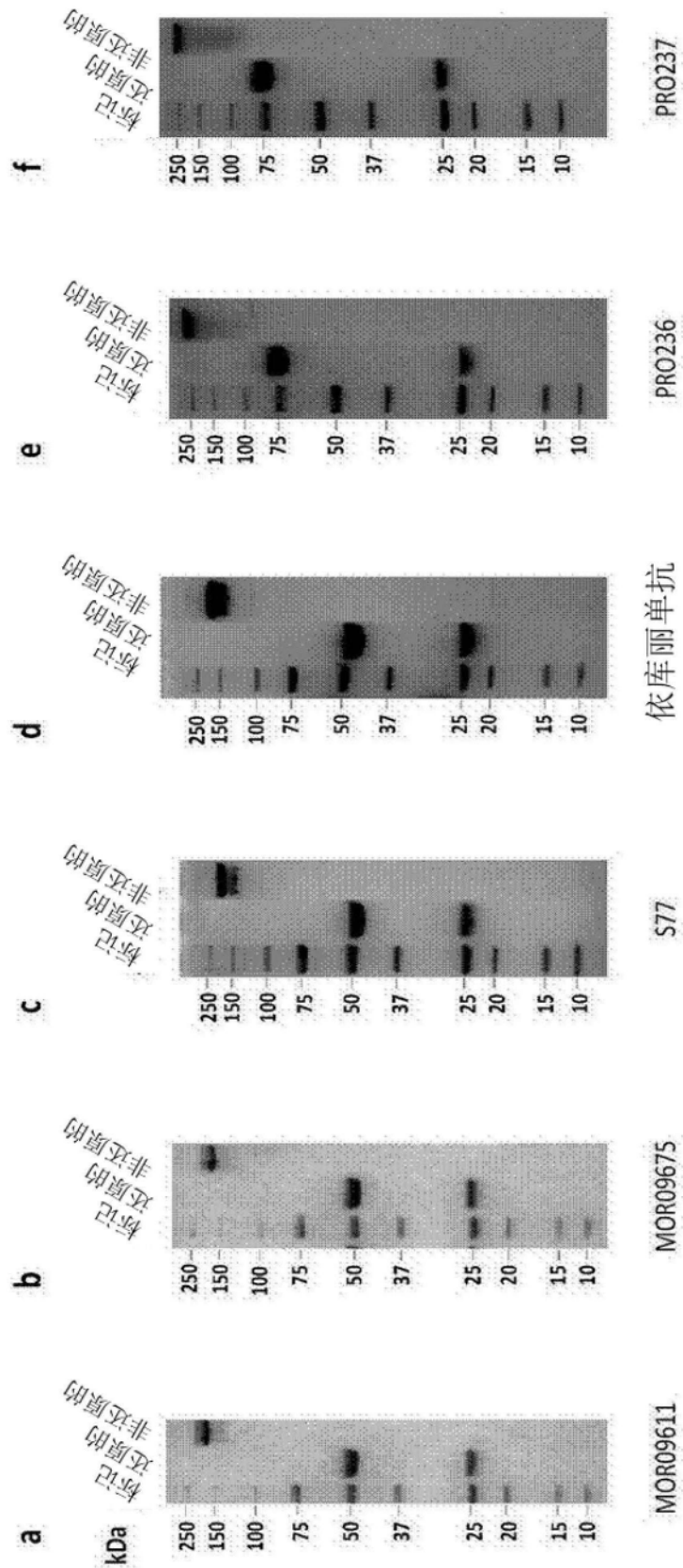


图1a

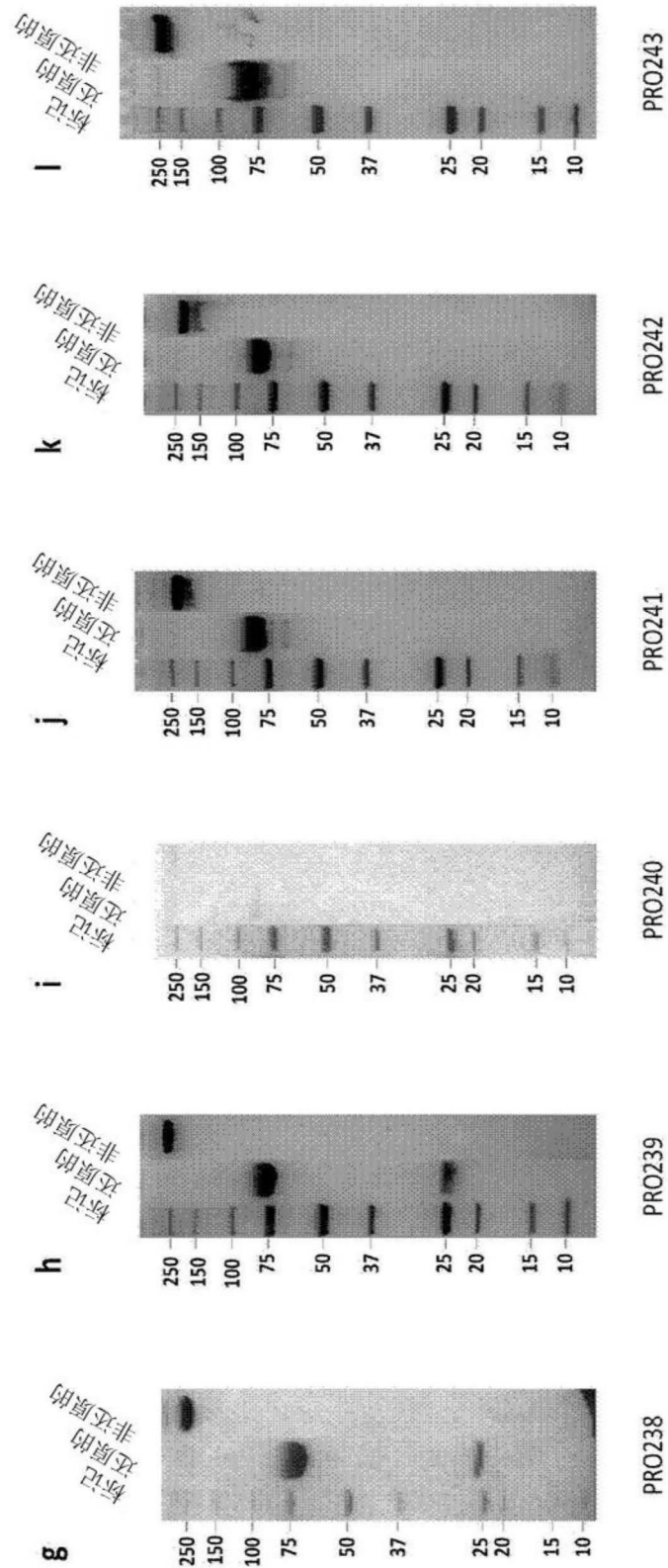


图1b

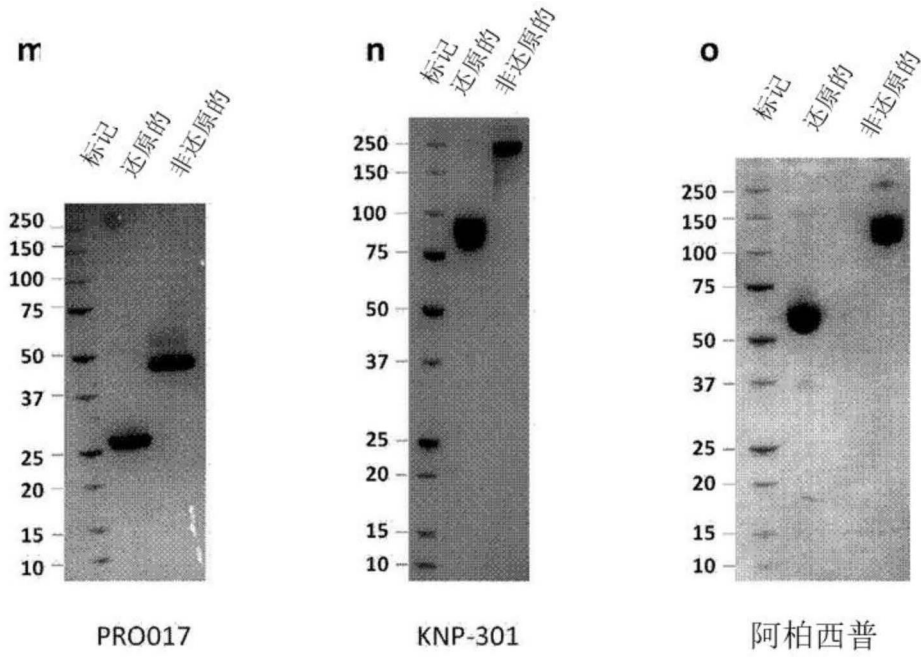


图1c

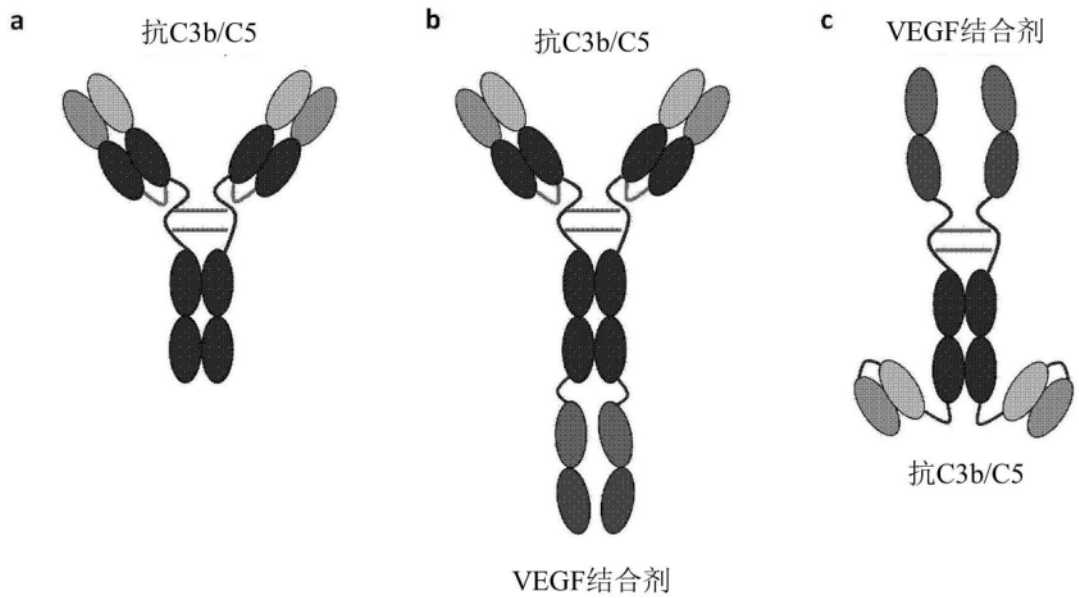


图2

与C3b结合的ELISA

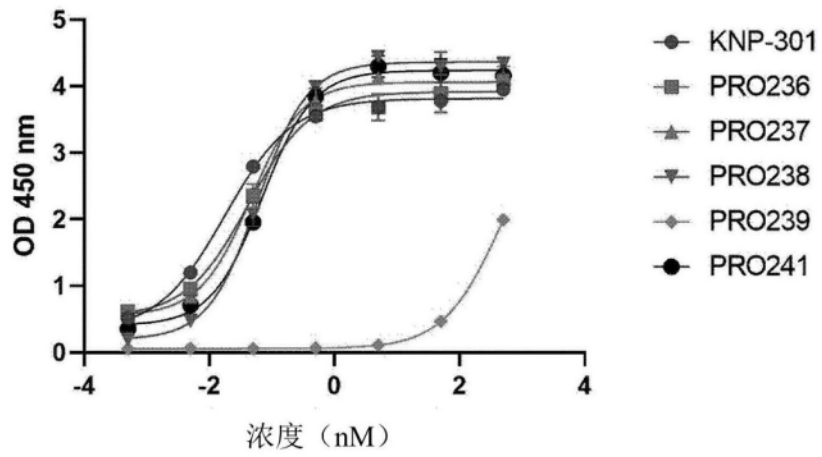


图3a

与C3b结合的ELISA

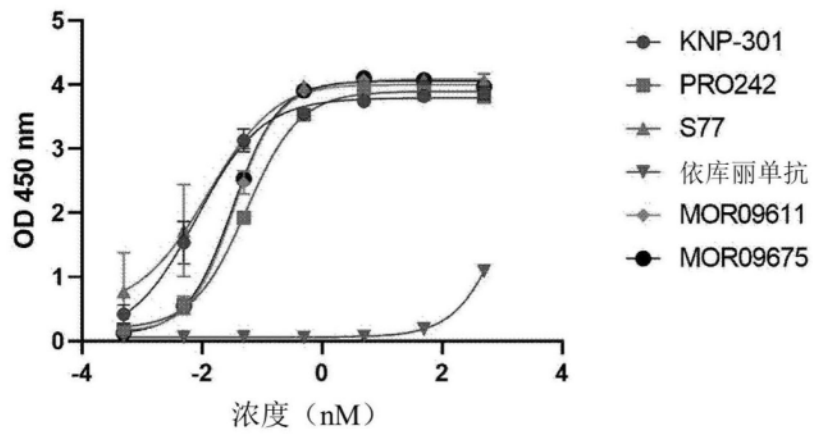


图3b

与C5结合的ELISA

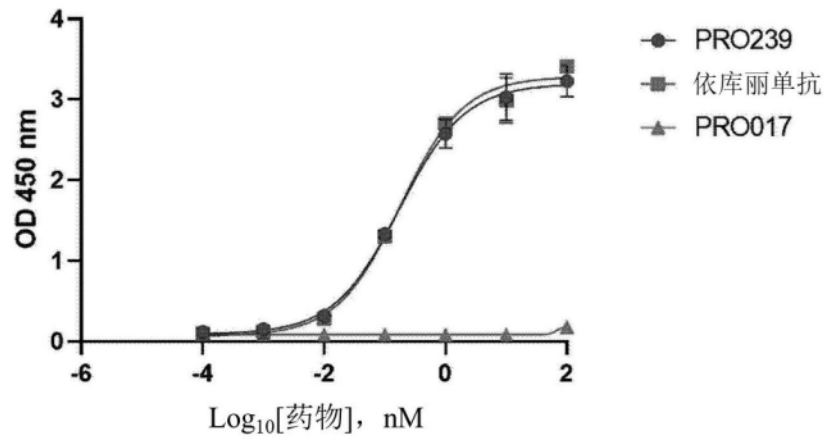


图4

与VEGF165结合的ELISA

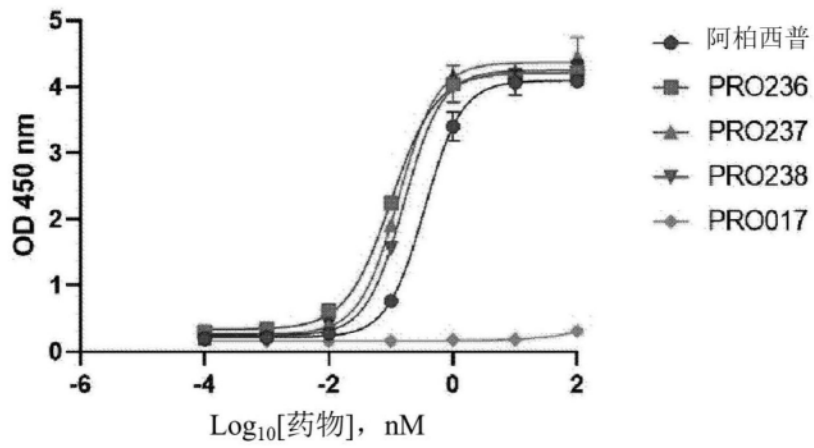


图5a

与VEGF165结合的ELISA

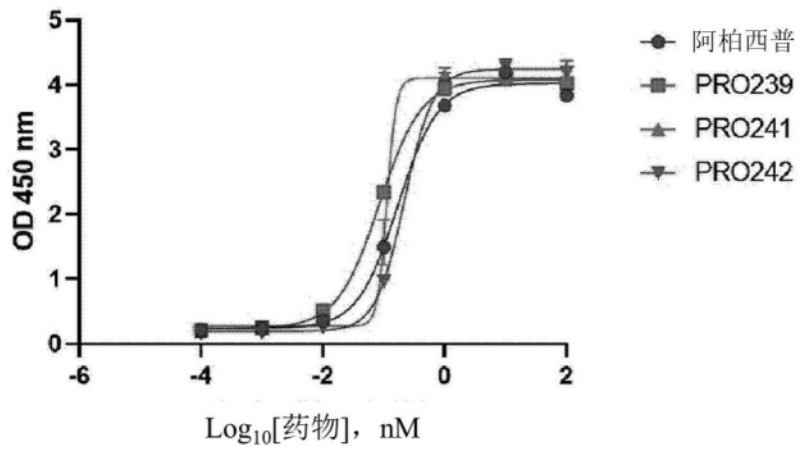


图5b

AH50

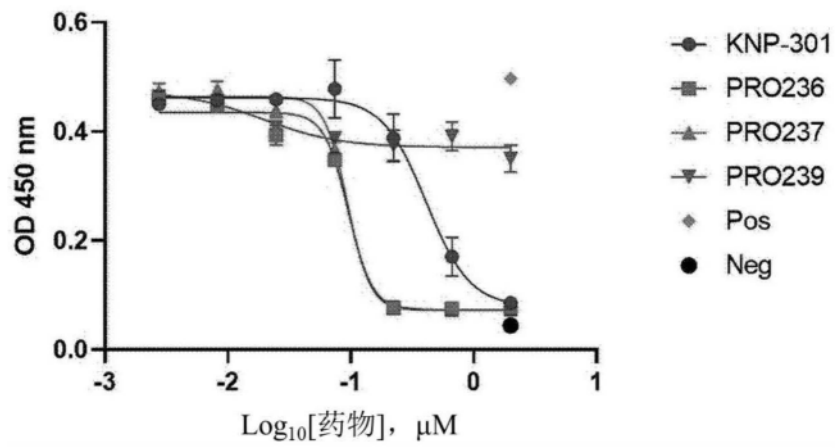


图6a

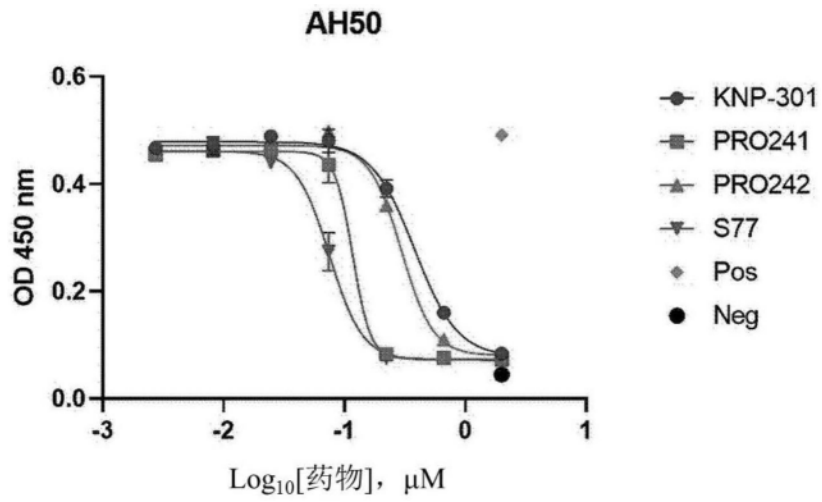


图6b

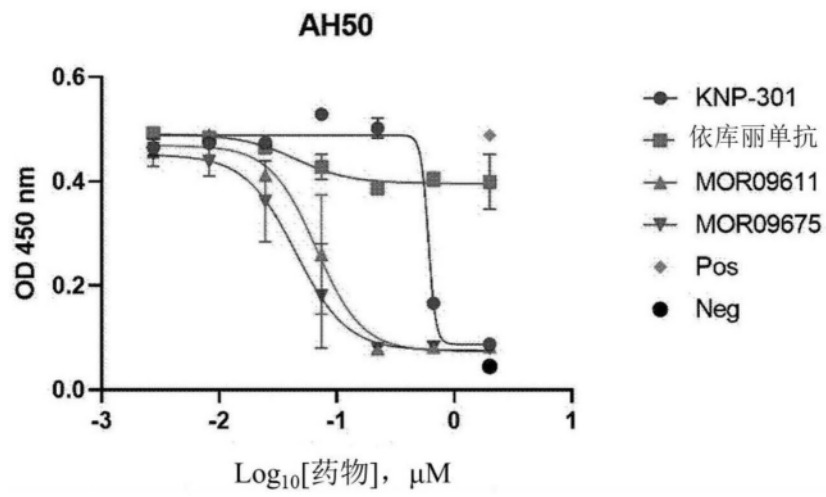


图6c

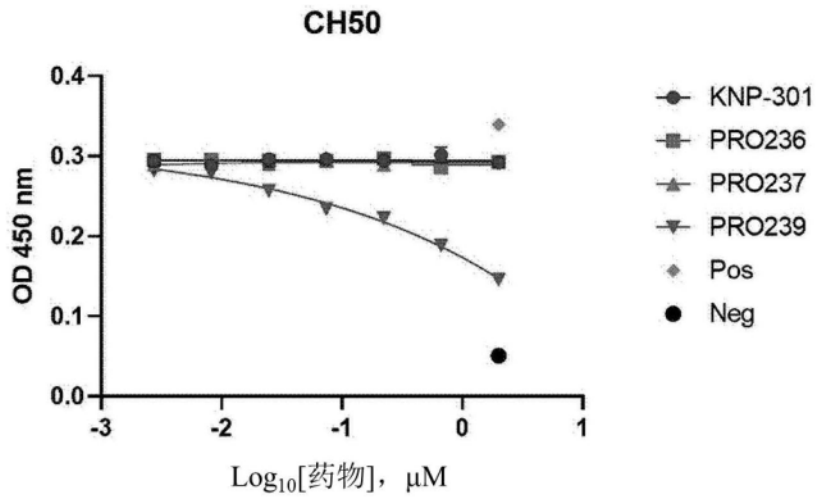


图7a

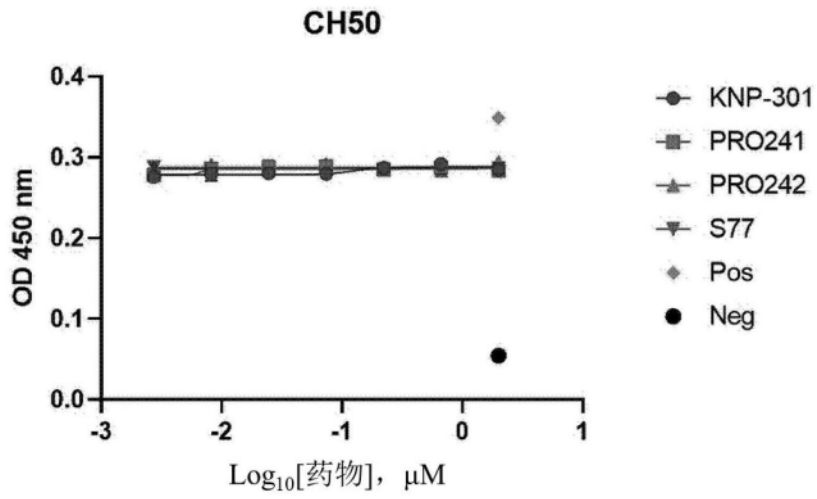


图7b

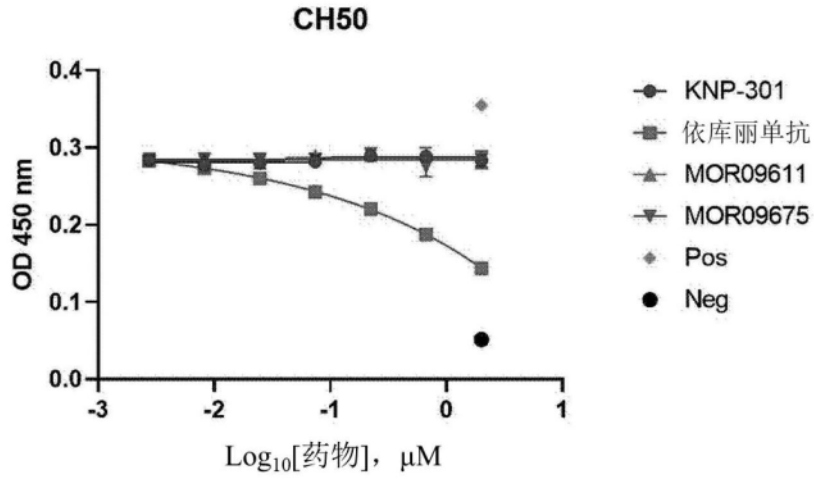


图7c

基于VEGF细胞的试验

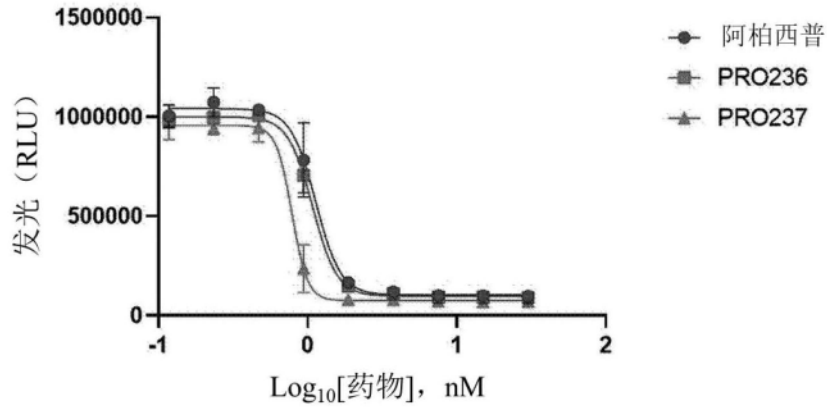


图8a

基于VEGF细胞的试验

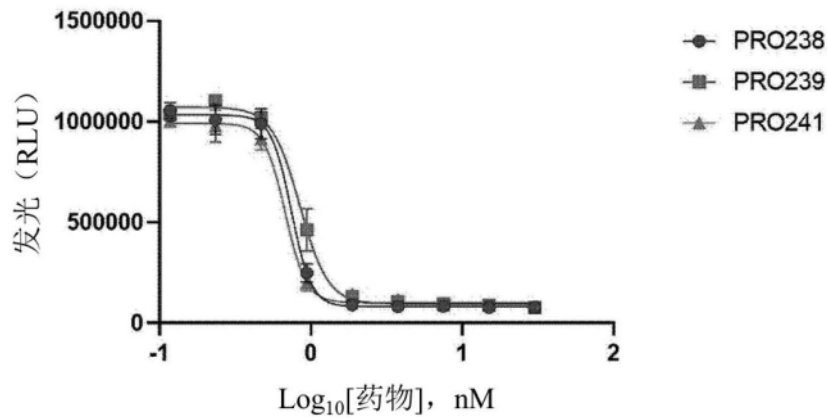


图8b

基于VEGF细胞的试验

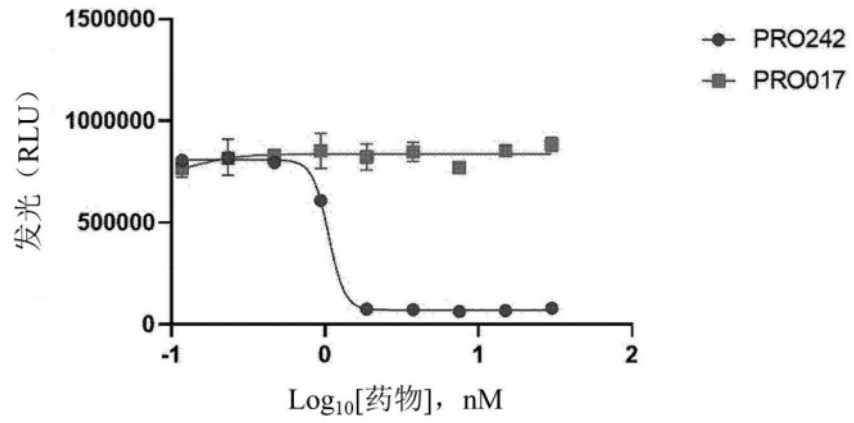


图8c