



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107096029 B

(45) 授权公告日 2021.02.26

(21) 申请号 201610972614.5

门诺·范卢克伦坎佩吉

(22) 申请日 2008.05.22

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 岑晓东

申请公布号 CN 107096029 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2017.08.29

A61K 45/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

60/939,791 2007.05.23 US

C07K 16/40 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

C12N 9/64 (2006.01)

200880100137.7 2008.05.22

A61P 27/02 (2006.01)

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

A61P 9/10 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61P 31/04 (2006.01)

(72) 发明人 菲利普·哈斯 殷建平

A61P 3/10 (2006.01)

小肯尼思·卡奇克

A61P 27/10 (2006.01)

迈卡·斯蒂费克

审查员 黄炎

克里斯琴·威斯曼

权利要求书2页 说明书26页

序列表5页 附图7页

(54) 发明名称

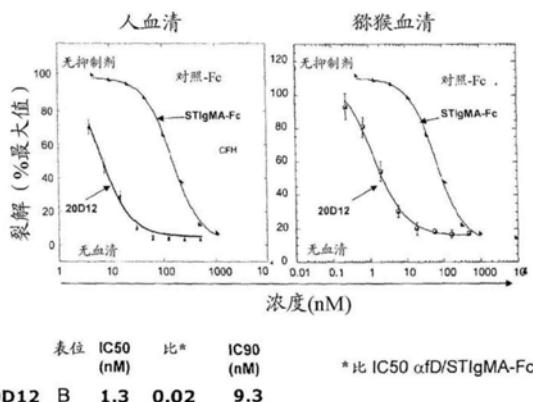
补体相关眼疾的预防和治疗

因子D抗体克隆20D12的表征

(57) 摘要

本发明涉及补体相关眼疾的预防和治疗。本发明关注通过施用因子D拮抗剂来预防和治疗补体相关眼疾，诸如脉络膜新血管形成(CNV)和年龄相关黄斑变性(AMD)。

AP溶血测定法结果



1. 一种分离的抗因子D抗体或其结合片段,其包含抗体20D12轻和重链可变域的互补决定区(CDR),其中轻链CDR1序列如SEQ ID NO:1的氨基酸残基24-34所示,轻链CDR2序列如氨基酸残基50-56所示,且轻链CDR3序列如氨基酸残基89-97所示,且重链CDR1序列如SEQ ID NO:2的氨基酸残基31-35所示,重链CDR2序列如氨基酸残基50-65所示,且重链CDR3序列如氨基酸残基95-102所示。

2. 根据权利要求1所述的抗因子D抗体或结合片段,其是人的、人源化的或嵌合的。

3. 根据权利要求1或2所述的抗因子D抗体或结合片段,其中所述结合片段选自下组:Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、互补决定区(CDR)片段、线性抗体、单链抗体分子、微型抗体、双抗体、和自抗体片段形成的多特异性抗体。

4. 根据权利要求3所述的抗因子D抗体或结合片段,其中所述抗体片段是Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、或(scFv)₂片段。

5. 一种组合物,其包含根据权利要求1-4任一项所述的抗因子D抗体或结合片段。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其为药物组合物。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其为持续释放药物组合物。

8. 一种分离的多核苷酸,其编码根据权利要求1-4任一项所述的抗因子D抗体或结合片段。

9. 一种载体,其包含根据权利要求8所述的多核苷酸。

10. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求9所述的载体。

11. 根据权利要求10所述的宿主细胞,其中该宿主细胞为细菌,酵母,昆虫,或哺乳动物细胞。

12. 根据权利要求11所述的宿主细胞,其中该宿主细胞为CHO细胞。

13. 一种试剂盒,其包含根据权利要求1-4任一项所述的抗因子D抗体或结合片段或根据权利要求5-7任一项所述的组合物。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其进一步包含关于施用所述抗体或结合片段来治疗补体相关眼疾的说明书。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其中所述补体相关眼疾选自下组:年龄相关黄斑变性(AMD)、脉络膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变和其它缺血相关视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病、视网膜中央静脉阻塞(CRVO)、角膜新血管形成、和视网膜新血管形成。

16. 一种生成抗因子D抗体或其结合片段的方法,该方法包括:a) 在适合于编码该抗体或结合片段的多核苷酸表达的条件下培养根据权利要求10-12任一项所述的宿主细胞,并b) 分离该抗体或结合片段。

17. 根据权利要求1-4任一项所述的抗因子D抗体或结合片段在制备用于在受试者中预防或治疗补体相关眼疾的药物中的用途。

18. 根据权利要求17所述的用途,其中该受试者是哺乳动物。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述受试者是人。

20. 根据权利要求17-19任一项所述的用途,其中所述补体相关眼疾选自下组:年龄相关黄斑变性(AMD)、脉络膜新血管形成(CNV)、葡萄膜炎、糖尿病性视网膜病变和其它缺血相关视网膜病变、糖尿病性黄斑水肿、病理性近视、von Hippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌

病、视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)、角膜新血管形成、和视网膜新血管形成。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述AMD是干性AMD。
22. 根据权利要求20所述的用途,其中所述AMD是湿性AMD。

补体相关眼疾的预防和治疗

[0001] 本申请是基于申请日为2008年5月22日,优先权日为2007年5月23日,申请号为201410486706.3,发明名称为:“补体相关眼疾的预防和治疗”的分案申请的再分案申请(原申请号200880100137.7)。

发明领域

[0002] 本发明关注补体相关眼疾 (complement-associated eye conditions) (诸如脉络膜新血管形成 (choroidal neovascularization, CNV) 和年龄相关黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)) 的预防和治疗。

发明背景

[0004] 补体系统是由正常情况下以无活性的酶原形式存在的一系列血清糖蛋白构成的一个复杂酶级联。两种主要途径(即经典途径和旁路途径)能活化补体,它们在C3水平合并,在那里两种相似的C3转化酶将C3切割成C3a和C3b。

[0005] 巨噬细胞是已经发展出如下先天能力的专门细胞,即识别细胞表面表达的鉴定标签(所谓的分子样式)的结构中的微小差异(Taylor等,Eur J Immunol 33,2090-2097 (2003);Taylor等,Annu Rev Immunol 23,901-944 (2005))。虽然这些表面结构的直接识别是先天免疫的一个基础方面,但是调理容许通用巨噬细胞受体介导吞食,如此提高效率和使吞噬细胞的识别全集多样化(Stuart和Ezekowitz,Immunity 22,539-550 (2005))。吞食过程涉及多种配体-受体相互作用,而且现在清楚了多种调理素(包括免疫球蛋白、胶原凝集素、和补体成分)经由与巨噬细胞细胞表面受体的相互作用来引导病原体内化所需要的细胞活性(综述见Aderem和Underhill,Annu Rev Immunol 17,593-623 (1999);Underhill和Ozinsky,Annu Rev Immunol 20,825-852 (2002))。虽然由种系基因编码的天然免疫球蛋白能识别极其多种病原体,但是大多数调理性IgG是经由适应性免疫生成的,而且因此经由Fc受体的高效清除不是立即的(Carroll,Nat Immunol 5,981-986 (2004))。另一方面,补体快速识别病原体表面分子并使微粒准备好被补体受体摄取(Brown,Infect Agents Dis 1,63-70 (1991))。

[0006] 补体由30种以上的血清蛋白质组成,它们调理极其多种病原体,用以被补体受体识别。取决于级联的初始触发物,可区别三种途径(综述见Walport,N Engl J Med 344,1058-1066 (2001))。所有这三种途径共享活化中枢成分C3的共同步骤,但是它们依据识别的本质和导致C3活化的初始生化步骤而不同。经典途径如下活化,抗体结合至病原体表面,其继而结合C1q补体成分,引起一系列蛋白酶级联,最终将C3切割成其活性形式C3b。凝集素途径在碳水化合物基序受到凝集素蛋白质识别后被活化。至今,已经鉴定了此途径的三个成员:结合甘露糖的凝集素(MBL),SIGN-R1凝集素家族和ficolin(Pyz等,Ann Med 38,242-251 (2006))。MBL和ficolin都与丝氨酸蛋白酶有关,其像经典途径中的C1那样起作用,即活化成分C2和C4,导致中枢C3步骤。旁路途径与经典途径和凝集素途径二者形成对照,即它是由于内部C3酯与病原体表面上的识别基序的直接反应而被活化的。经由旁路途径蛋白酶因子B和因子D的作用,初始C3结合活化性表面导致C3b沉积的快速扩大。重要的是,经由因子B

和D的作用,通过经典途径或凝集素途径任一沉积的C3b也能导致C3b沉积的扩大。在补体活化的所有三种途径中,调理中的关键步骤是成分C3转化成C3b。补体级联的酶对C3的切割将硫酯暴露于亲核攻击,容许C3b经由硫酯域共价附着到抗原表面上。这是补体调理中的初始步骤。对所结合的C3b的后续蛋白水解生成iC3b、C3c和C3dg,即受到不同受体识别的片段 (Ross和Medof, *Adv Immunol* 37, 217-267 (1985))。此切割消除了C3b进一步扩大C3b沉积和活化补体级联晚期成分(包括能够指导膜破坏的膜攻击复合物)的能力。然而,巨噬细胞吞噬细胞受体优先识别C3b及其片段;由于酯键形成的多能性,C3介导的调理对于病原体识别是重要的 (Holers等, *Immunol Today* 13, 231-236 (1992)),而且各种C3降解产物的受体因此在宿主免疫应答中发挥重要作用。

[0007] C3自身是由13个独特结构域组成的一种复杂的且柔性的蛋白质。该分子的核心由8个所谓的巨球蛋白(MG)结构域构成,它们构成了C3的压紧的α和β链。插入此结构的是CUB(C1r/C1s、Uegf和骨形态生成蛋白-1)和TED结构域,后者含有容许C3b与病原体表面共价结合的硫酯键。剩余结构域含有C3a,或者起核心结构域的接头和间隔物的作用。C3b和C3c结构与C3的比较证明了该分子在每次蛋白水解时经历重大构象重排,这不仅暴露TED,而且暴露了该分子的能与细胞受体相互作用的别的新的表面 (Janssen和Gros, *Mol Immunol* 44, 3-10 (2007))。

[0008] 年龄相关黄斑变性(AMD)是全世界老年人失明的首要原因。AMD的特征在于中心视力的逐渐损失,其可归于黄斑的变性和新血管性变化,黄斑是眼视网膜中负责细微视敏度的高度专门区域。最新的估算指示1400万人因AMD而失明或视力严重受损。该病对老龄人群及其家庭的生理和心理健康具有巨大影响,而且正在成为重大公众健康负担。

[0009] 然而,新的发现开始提供关于与早期AMD有关的重要细胞事件、遗传因子、和生物化学过程的更清楚图像。补体因子H基因是在多项独立的研究中被鉴定为赋予发生AMD的重大遗传风险的第一种基因。如此,三个分开的小组报告了位于因子H氨基酸402处的酪氨酸-组氨酸多态性与AMD发生有关 (Klein等, *Science* 308, 385-389 (2005); Haines等, *Science* 308, 419-421 (2005); 及Edwards等, *Science* 308, 421-424 (2005))。已经提出,由疾病相关因子H等位基因所致的受损旁路途径抑制或是引起或是大力促成AMD发生 (Thurman和Holers, *J Immunol* 176, 1305-1310 (2006))。

[0010] 发明概述

[0011] 一方面,本发明关注用于预防或治疗补体相关眼疾的方法,包括给有需要的受试者施用有效量的因子D拮抗剂。

[0012] 在各种实施方案中,所述有需要的受试者是哺乳动物,诸如人,而所述因子D拮抗剂选自下组:抗因子D抗体及其片段、结合性多肽、肽、和非肽小分子。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述因子D拮抗剂是抗体或抗体片段。在各种实施方案中,所述抗体可结合因子D的活性位点,或者可结合包含因子D活性位点残基的表位。

[0014] 本发明范围内的具体抗体包括但不限于抗体20D12、31A9、25A1和32H12,及其变体。在一个优选的实施方案中,所述抗体或抗体片段本质上(essentially)与抗体20D12结合相同表位,或者包含抗体20D12的重链和/或轻链CDR序列 (SEQ ID NO:1和2),或者是抗体20D12或其片段。

[0015] 所述抗因子D抗体包括人的、人源化的或嵌合的抗体。

[0016] 所述抗体片段可以是例如Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、互补决定区(CDR)片段、线性抗体、单链抗体分子、微型抗体(minibodies)、双抗体、或自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0017] 补体相关眼疾包括例如年龄相关黄斑变性(age-related macular degeneration) (AMD)、脉络膜新血管形成(choroidal neovascularization) (CNV)、葡萄膜炎(uveitis)、糖尿病性视网膜病变和其它缺血相关视网膜病变(diabetic and other ischemia-related retinopathies)、糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema)、病理性近视(pathological myopia)、von Hippel-Lindau病、眼的组织胞浆菌病(histoplasmosis of the eye)、视网膜中央静脉阻塞(Central Retinal Vein Occlusion) (CRVO)、角膜新血管形成(corneal neovascularization)、和视网膜新血管形成(retinal neovascularization)。

[0018] 另一方面,本发明关注试剂盒,其包含因子D拮抗剂和关于施用所述拮抗剂来治疗补体相关眼疾的指令。

[0019] 另一方面,本发明关注因子D拮抗剂在制备用于治疗补体相关眼疾的药物中的用途。

[0020] 再一方面,本发明关注因子D拮抗剂,其用于补体相关眼疾的治疗。

[0021] 附图简述

[0022] 图1小图A:自正常和AMD供体眼获得的玻璃体和布鲁赫(Bruch) (膜) 中的因子D水平。因子D水平是如所述的通过因子D特异性ELISA而测量的。图1小图B:通过计算布鲁赫膜中表达的因子D的总贡献和玻璃体中找到的因子D的总量,测定眼中的因子D的总水平。

[0023] 图2:来自AMD供体眼的布鲁赫膜的横切片的因子D免疫组织化学。插图显示了在布鲁赫膜之上成层的玻璃疣中的因子D染色。在玻璃疣之外,布鲁赫膜和脉络膜也呈因子D阳性。

[0024] 图3:对补体旁路途径选择性的溶血测定法中12D20的表征。在下方指出了IC50值,而且该测定法是如方法部分中所述实施的。

[0025] 图4:鼠单克隆抗体12D20的重链和轻链可变域序列(SEQ ID NO:1和2)。

[0026] 图5:多种抗因子D抗体的表位作图。指出了它们在溶血测定法中的相对效力。

[0027] 图6:天然人因子D多肽的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0028] 图7:AMD中补体成分的分析。

[0029] 图8:研究中使用的供体组织。

[0030] 发明详述

[0031] I. 定义

[0032] 术语“因子D”和“补体因子D”可互换使用,指天然序列和变异因子D多肽。

[0033] “天然序列”因子D指与自自然界衍生的因子D多肽具有相同氨基酸序列的多肽,无论其制备模式。如此,天然序列因子D可以从自然界分离,或者可以通过重组和/或合成手段生成。在成熟因子D蛋白诸如成熟人因子D蛋白(NM_001928; SEQ ID NO:3)之外,术语“天然序列因子D”明确涵盖因子D的天然存在前体形式(例如无活性的前蛋白,其受到蛋白水解切割而生成活性形式)、因子D的天然存在变体形式(例如可变剪接形式)和天然存在等位变体,以及因子D分子的与自自然界衍生的因子D多肽具有相同氨基酸序列的结构构象变体。

非人动物(包括高等灵长类和非人哺乳类)的因子D多肽被明确包括在此定义内。

[0034] “因子D变体”或“补体因子D变体”意指与天然序列因子D多肽,诸如SEQ ID N0:3的天然序列人因子D多肽具有至少约80%氨基酸序列同一性的如下文中所定义的活性因子D多肽。通常,因子D变体与SEQ ID N0:3的成熟人氨基酸序列会具有至少约80%的氨基酸序列同一性,或至少约85%的氨基酸序列同一性,或至少约90%的氨基酸序列同一性,或至少约95%的氨基酸序列同一性,或至少约98%的氨基酸序列同一性,或至少约99%的氨基酸序列同一性。优选的是,在因子D的活性位点内存在最高程度的序列同一性。

[0035] 因子D的“活性位点”由人因子D序列中的His-57、Asp-102、和Ser-195(胰凝乳蛋白酶原编号方式)来定义。因子D在主要特异性袋的底部具有Asp-189(胰凝乳蛋白酶原编号方式),而且切割Arg肽键。催化性三联体由His-57、Asp-102和Ser-195组成。Asp-102和His-57展示与其它丝氨酸蛋白酶相比非典型的构象(Narayana, J. Mol. Biol. 235 (1994) 695-708)。在位于S1袋底部的Asp-189和Arg-218之间观察到一个独特的盐桥,其提起环214-218并生成深且窄的S1袋(Jing等, J. Mol. Biol. 282 (1998) 1061-1081)。突变分析显示了此环和位于活性位点周围的数个其它残基是因子D的酯水解活性的关键结构决定子(Kim等, J. Biol. Chem. 270 (1995) 24399-24405)。基于这些结果提出,因子D在结合结合了C3b的因子B时可能经历构象变化,导致蛋白水解活性的表达(Volanakis和Narayana, Protein Sci. 5 (1996) 553-564)。

[0036] “百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照因子D序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员能决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然后计算相对于较长序列的序列同一性,即即使较短序列显示与较长序列一部分的100%序列同一性,总体序列同一性也会小于100%。

[0037] “百分比(%)核酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,候选序列中与参照因子D编码序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分率。为测定百分比核酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员能决定用于测量对比的适宜参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然后计算相对于较长序列的序列同一性,即即使较短序列显示与较长序列一部分的100%序列同一性,总体序列同一性也会小于100%。

[0038] “分离的”核酸分子指已经鉴定且与核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的核酸分子因此与存在于天然细胞中时的核酸分子有区别。然而,分离的核酸分子包括通常表达所编码多肽的细胞中包含的核酸分子,例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0039] “分离的”因子D多肽编码核酸分子指已经鉴定且与因子D编码核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的因子D多肽编码核酸分

子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的因子D多肽编码核酸分子因此与存在于天然细胞中时的编码核酸分子有区别。然而，分离的因子D编码核酸分子包括通常表达因子D的细胞中包含的因子D编码核酸分子，例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0040] 术语“拮抗剂”以最广义使用，包括能够中和、阻断、部分或完全抑制、消除、降低或干扰因子D生物学活性的任何分子。因子D拮抗剂包括但不限于抗因子D抗体及其抗原结合片段，结合因子D且能够中和、阻断、部分或完全抑制、消除、降低或干扰因子D活性(诸如因子D参与补体相关眼疾的病理学的能力)的其它结合性多肽、肽、和非肽小分子。

[0041] “小分子”在本文中定义为具有低于约600, 优选低于约1000道尔顿的分子量。

[0042] “有活性的”或“活性”或“生物学活性”在本发明因子D拮抗剂的语境中指拮抗(部分或完全抑制)因子D生物学活性的能力。因子D拮抗剂的一种优选生物学活性是在因子D相关疾病或疾患(诸如例如补体相关眼疾)的状态(例如病理学)中实现可测量的改善的能力。所述活性可在体外或在体内测试中测定，包括结合测定法，使用有关动物模型，或人体临床试验。

[0043] 术语“补体相关眼疾”以最广义使用，包括病理学涉及补体(包括经典途径和旁路途径，特别是补体旁路途径)的所有眼疾。补体相关眼疾包括但不限于黄斑变性性疾病，诸如所有阶段的年龄相关黄斑变性(AMD) (包括干性和湿性(非渗出性和渗出性))形式，脉络膜新血管形成(CNV)，葡萄膜炎，糖尿病性视网膜病变和其它缺血相关视网膜病变，和其它眼内新血管疾病，诸如糖尿病性黄斑水肿，病理性近视，von Hippel-Lindau病，眼的组织胞浆菌病，视网膜中央静脉阻塞(CRVO)，角膜新血管形成，和视网膜新血管形成。一组优选的补体相关眼疾包括年龄相关黄斑变性(AMD) (包括非渗出性(湿性)和渗出性(干性或萎缩性)AMD)、脉络膜新血管形成(CNV)、糖尿病性视网膜病变(DR)、和眼内炎。

[0044] “治疗”或“处理”指旨在预防病症发展或改变病症病理而实施的干预。因而，“治疗”或“处理”指治疗性处理及预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。在免疫相关疾病的治疗中，治疗剂可直接改变免疫应答的一种成分的应答程度，或者使得疾病对其他治疗剂(例如抗生素、抗真菌剂、抗炎剂、化疗剂等)的治疗更敏感。

[0045] 疾病(诸如补体相关眼疾)的“病理”或“病理学”包括所有危及患者康乐的现象。这包括但不限于异常的或不可控的细胞生长(嗜中性细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、淋巴细胞)、抗体生成、自身抗体生成、补体生成、对邻近细胞正常机能的干扰、细胞因子或其它分泌产物的异常水平释放、任何炎性或免疫学应答的抑制或恶化、炎症细胞(嗜中性细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、淋巴细胞)浸润入细胞间隙(cellular spaces)等。

[0046] 如本文中所使用的，术语“哺乳动物”指归为哺乳类的任何动物，包括但不限于人，高等灵长类，家畜和牲畜，及动物园、运动或宠物动物，诸如马、猪、牛、犬、猫和雪貂等。在一个优选的实施方案中，哺乳动物指人。

[0047] 与一种或多种其它治疗剂“联合/组合”施用包括同时(共同)施用和任何次序的序贯施用。

[0048] “治疗有效量”指在目标疾病或疾患(诸如例如补体相关眼疾)的状态(例如病理学)中实现可测量的改善所需要的“因子D拮抗剂”量。

[0049] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如,适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

[0050] 若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中,则它是“可操作连接的”。例如,若前序列(presequence)或分泌前导(secretory leader)的DNA表达成参与多肽分泌的前蛋白质(preprotein),则它与该多肽的DNA可操作连接;若启动子或增强子影响编码序列的转录,则它与该序列可操作连接;或者,若核糖体结合位点的位置促进翻译,则它与编码序列可操作连接。一般而言,“可操作连接的”意味着相连的DNA序列是相邻的,而且在分泌前导的情况下意味着相邻且处于阅读状态。然而,增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若没有此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0051] 杂交反应的“严格性”可以由本领域普通技术人员容易的确定,而且通常根据探针长度、洗涤温度、和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针要求较高的温度以正确退火,而较短的探针需要较低的温度。杂交通常依赖于当互补链存在于低于其解链温度的环境中时变性DNA重新退火的能力。探针和可杂交序列之间的期望同源性程度越高,可使用的相对温度也越高。结果是,推断出较高相对温度会趋向于使反应条件更为严格,而较低温度也就较不严格。关于杂交反应严格性的其它细节和解释,参见Ausubel等,《Current Protocols in Molecular Biology》,Wiley Interscience Publishers,1995。

[0052] “严格条件”或“高严格性条件”,如本文中所定义的,可如下鉴定:(1)采用低离子强度和高温进行清洗,例如0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠,于50°C;(2)在杂交过程中采用变性剂,诸如甲酰胺,例如50% (v/v) 甲酰胺及0.1%牛血清清蛋白/0.1%Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液pH 6.5及750mM氯化钠,75mM柠檬酸钠,于42°C;或(3)采用50% 甲酰胺,5x SSC (0.75M NaCl, 0.075M柠檬酸钠),50mM磷酸钠(pH 6.8),0.1%焦磷酸钠,5x Denhardt氏溶液,超声处理的鲑鱼精DNA (50μg/ml),0.1% SDS,和10%硫酸右旋糖苷,于42°C,及于42°C在0.2x SSC (氯化钠/柠檬酸钠) 和50% 甲酰胺中清洗,于55°C,接着于55°C在含EDTA的0.1x SSC中进行高严格性清洗。

[0053] “中等严格条件”可以如Sambrook等,《Molecular Cloning:A Laboratory Manual》,New York,Cold Spring Harbor Press,1989中所述鉴定,包括使用比上文所述较不严格的清洗溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和% SDS)。中等严格条件的一个例子是于37°C在含20% 甲酰胺,5x SSC (150mM NaCl,15mM柠檬酸三钠),50mM磷酸钠(pH 7.6),5x Denhardt氏溶液,10%硫酸右旋糖苷,和20mg/ml变性的经剪切的鲑鱼精DNA的溶液中温育过夜,接着于约37-50°C在1x SSC中清洗滤膜。技术人员会认识到如何在必要时调整温度、离子强度等以适应诸如探针长度等因素。

[0054] 术语“表位标记的”或“带表位标签的”在用于本文时指包含本发明多肽且其与“标签多肽”融合的嵌合多肽。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体,但又足够短使得其不干扰与其融合的多肽的活性。标签多肽还优选是相当独特的,使得其抗体基本上不与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少6个氨基酸残基,通常在约8个和约50个氨基酸残基之间(优选在约10个和约20个氨基酸残基之间)。

[0055] 术语“抗体”以最广义使用,明确覆盖但不限于单一抗因子D单克隆抗体(包括激动

性、拮抗性、和中和性抗体)和具有多表位特异性的抗因子D抗体组合物。术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。

[0056] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指示抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,有待依照本发明使用的单克隆抗体可以通过首次由Kohler等(1975)Nature 256:495记载的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组DNA方法来制备(参见例如美国专利No.4,816,567)。“单克隆抗体”也可以使用例如Clackson等(1991)Nature 352:624-628及Marks等(1991)J.Mol.Biol.222:581-597中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0057] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No.4,816,567;及Morrison等(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

[0058] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况下,将人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体会包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones等(1986)Nature 321:522-525;Riechmann等(1988)Nature 332:323-329;及Presta(1992)Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596。

[0059] “物种依赖性抗体”指对来自第一哺乳动物物种的抗原具有强于对该抗原来自第二哺乳动物物种的同系物的结合亲和力的抗体。通常,物种依赖性抗体“特异性结合”人类抗原(即具有不超过约 $1\times10^{-7}M$ 、优选不超过约 $1\times10^{-8}M$ 、和最优选不超过约 $1\times10^{-9}M$ 的结合亲和力(K_d)),但是对该抗原来自第二非人哺乳动物物种的同系物具有比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约50倍、或至少约500倍、或至少约1000倍的结合亲和力。物种依赖性抗体可以是上文定义的各种类型抗体,但是优选人源化抗体或人抗体。

[0060] 在用于本文时,“抗体突变体”或“抗体变体”指物种依赖性抗体的氨基酸序列变体,其中物种依赖性抗体的一个或多个氨基酸残基发生了修饰。此类突变体与物种依赖性抗体必然具有小于100%的序列同一性或相似性。在一个优选的实施方案中,抗体突变体所具有的氨基酸序列与物种依赖性抗体的重链或轻链可变域的氨基酸序列具有至少75%、更优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、最优选至少95%的氨基酸序列同一性或

相似性。关于此序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,候选序列中与物种依赖性抗体残基相同(即相同残基)或相似(即根据共同侧链特性来自同一组的氨基酸残基,见下文)的氨基酸残基的百分比。N-末端、C-末端、或内部的延伸、删除、或插入可变域以外的抗体序列都不应视为影响序列同一性或相似性。

[0061] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据Lowry法的测定,抗体重量超过95%,最优选重量超过99%,或(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用考马斯蓝或优选的银染色,达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常会通过至少一个纯化步骤来制备。

[0062] 在用于本文时,“抗体可变域”指抗体分子的轻链和重链中包含互补决定区(CDR;即CDR1、CDR2、和CDR3)和框架区(FR)氨基酸序列的那部分。 V_H 指重链可变域。 V_L 指轻链可变域。依照本发明所使用的方法,归为CDR和FR的氨基酸位置可以依照Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991))来限定。抗体或抗原结合片段的氨基酸编号方式也依照Kabat。

[0063] 在用于本文时,术语“互补决定区(CDR;即CDR1、CDR2、和CDR3)指抗体可变域中其存在是抗原结合所必需的氨基酸残基。每个可变域通常具有三个CDR,鉴定为CDR1、CDR2和CDR3。每个互补决定区可以包含来自如Kabat定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即大约是轻链可变域的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)及重链可变域的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))和/或来自“高变环”的残基(即大约是轻链可变域的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及重链可变域的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917)。在有些情况下,互补决定区可以包含来自依照Kabat定义的CDR和来自高变环二者的氨基酸。例如,抗体4D5重链的CDRH1包含氨基酸26-35。

[0064] “框架区”(以下的FR)指可变域中CDR残基以外的残基。每个可变域通常具有四个FR,鉴定为FR1、FR2、FR3和FR4。如果CDR是依照Kabat定义的,那么轻链FR残基位于大约轻链残基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)、和98-107(LCFR4),而重链FR残基位于大约重链残基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)、和103-113(HCFR4)。如果CDR包含来自高变环的氨基酸残基,那么轻链FR残基位于大约轻链残基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)、和97-107(LCFR4),而重链FR残基位于大约重链残基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)、和102-113(HCFR4)。在有些情况下,在CDR包含来自依照Kabat定义的CDR和来自高变环二者的氨基酸时,FR残基会做相应的调整。例如,当CDRH1包含氨基酸H26-H35时,重链FR1残基位于第1-25位,而FR2残基位于第36-49位。

[0065] 在用于本文时,“密码子集”指用于编码期望变异氨基酸的一套不同核苷酸三联体序列。可以通过例如固相合成来合成一套寡核苷酸,其包括呈现由密码子集提供的核苷酸

三联体的所有可能组合并编码期望氨基酸组的序列。一种标准形式的密码子命名是IUB代码,其是本领域已知的且在本文中有记载。密码子集通常以3个斜体大写字母表示,例如NNK、NNS、XYZ、DVK等等。如此,“非随机密码子集”在用于本文时指编码部分、优选完全满足本文所述氨基酸选择标准的选定氨基酸的密码子集。在某些位置具有选定核苷酸“简并性”的寡核苷酸的合成是本领域众所周知的,例如TRIM法(Knappek等(1999) *J.Mol.Biol.* 296: 57-86; Garrard和Henner (1993) *Gene* 128:103)。此类具有某些密码子集的寡核苷酸集可以使用商品化核酸合成仪来合成(可购自例如Applied Biosystems, Foster City, CA),或者可以通过商业途径获得(例如购自Life Technologies, Rockville, MD)。因此,一套具有特定密码子集的合成寡核苷酸通常会包括具有不同序列(在整个序列中由密码子集建立的差异)的多种寡核苷酸。寡核苷酸,在依照本发明使用时,具有容许与可变域核酸模板杂交的序列,而且还可以但非必须包含可用于例如克隆目的的限制酶位点。

[0066] 术语“抗体片段”在本文中以最广义使用,包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、(scFv)₂、dAb、和互补决定区(CDR)片段、线性抗体、单链抗体分子、微型抗体、双抗体、和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0067] “Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密结合(该结合的本质可以是共价的,例如在scFv中)的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中,每个可变域的三个CDR相互作用而在V_H-V_L二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个CDR或其子集一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是通常亲和力低于完整结合位点。

[0068] “Fab”片段包含轻链的可变域和恒定域及重链的可变域和第一恒定域(CH1)。F(ab')₂抗体片段包含一对Fab片段,它们一般在它们羧基末端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸共价连接。本领域还知道抗体片段的其它化学偶联形式。

[0069] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。一般而言,Fv多肽在V_H与V_L结构域之间进一步包含多肽接头,其使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见Pluckthun,于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》,第113卷,Rosenburg和Moore编,Springer-Verlag, New York,第269-315页,1994。

[0070] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链(V_H及V_L)中包含相连接的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如EP 404,097; WO 93/11161; 及 Hollinger等(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448。

[0071] 表述“线性抗体”指Zapata等(1995) *Protein Eng.*, 8 (10) :1057-1062中所描述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(V_H-CH1-V_H-CH1),该区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的,或者是单特异性的。

[0072] 在用于本文时,“文库”或“库”指众多抗体或抗体片段序列(例如本发明的多肽),或者编码这些序列的核酸,即根据本发明方法导入这些序列中的、变异氨基酸组合方面不同的序列。

[0073] “噬菌体展示”是一种将变异多肽作为与外壳蛋白至少一部分的融合蛋白展示在噬菌体(例如丝状噬菌体)颗粒表面上的技术。噬菌体展示的效用在于能对随机化蛋白质变体的大型文库快速且高效分选那些以高亲和力与靶抗原结合的序列的实情。肽和蛋白质文库在噬菌体上的展示已经用于对数以百万计的多肽筛选那些具有特异性结合特性的多肽。多价噬菌体展示法已经用于展示小随机肽和小蛋白质,其通过与丝状噬菌体的基因III或基因VIII融合来实现。Wells和Lowman (1992) Curr. Opin. Struct. Biol. 3:355-362, 及其中引用的参考文献。在单价噬菌体展示中,将蛋白质或肽文库与基因III或其一部分融合,并在存在野生型基因III蛋白时以低水平表达,使得噬菌体颗粒展示一个拷贝的融合蛋白或者不展示融合蛋白。亲合效应(avidity effect)相对于多价噬菌体得到了降低,使得分选基于内在的配体亲和力,而且使用噬菌粒载体,这简化了DNA操作。Lowman和Wells (1991) Methods: A companion to Methods in Enzymology 3:205-0216。

[0074] “噬菌粒”是具有细菌复制起点(例如Co1E1)和一个拷贝的噬菌体基因区间的质粒载体。噬菌粒可利用任何已知噬菌体,包括丝状噬菌体和λ类噬菌体。质粒一般也会包含抗生素抗性的选择标志。克隆入这些载体的DNA区段可以像质粒一起而扩增。在给携带这些载体的细胞提供生成噬菌体颗粒所必需的所有基因时,质粒的复制模式变成滚环复制,以生成质粒DNA的一条链的拷贝,并包装噬菌体颗粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌体颗粒。此术语包括如下的噬菌粒,它们包含与异源多肽基因连接成基因融合物的噬菌体外壳蛋白基因或其片段,使得异源多肽展示在噬菌体颗粒的表面上。

[0075] 术语“噬菌体载体”指包含异源基因且能够复制的双链复制型噬菌体。噬菌体载体具有容许噬菌体复制和噬菌体颗粒形成的噬菌体复制起点。噬菌体优选是丝状噬菌体,诸如M13、f1、fd、Pf3噬菌体或其衍生物,或者是λ类噬菌体,诸如λ、21、φ80、φ81、82、424、434等或其衍生物。

[0076] 在用于本文时,“溶剂可及位置”指源抗体或抗原结合片段重链和轻链可变区中根据抗体或抗原结合片段的结构、结构系综(ensemble)和/或建模结构确定为潜在地可被溶剂触及和/或与分子(诸如抗体特异性抗原)接触的氨基酸残基位置。这些位置通常发现于CDR中和蛋白质外部上。如本文所定义的抗体或抗原结合片段的溶剂可及位置可使用本领域已知的多种算法之任一种来确定。优选的是,溶剂可及位置是使用来自抗体三维模型的坐标而确定的,优选使用计算法程序,诸如InsightII程序(Accelrys, San Diego, CA)。溶剂可及位置还可以使用本领域已知的算法来确定(例如Lee和Richards (1971) J. Mol. Biol. 55, 379及Connolly (1983) J. Appl. Cryst. 16, 548)。溶剂可及位置的确定可使用适于蛋白质建模的软件和自抗体得到的三维结构信息来进行。可用于这些目的的软件包括SYBYL Biopolymer Module软件(Tripos Associates)。一般和优选的是,若算法(程序)要求用户输入大小参数,计算中所使用的探针的“大小”设为半径大约1.4埃或更小。另外, Pacios (1994) Comput. Chem. 18 (4) :377-386记载了使用供个人计算机用的软件确定溶剂可及区域和面积的方法。

[0077] II. 详述

[0078] 补体在身体的防御中发挥至关重要的作用,而且与免疫系统的其它成分一起保护个体免于病原体侵入身体。然而,如果没有受到正确的活化或控制,那么补体也能引起对宿主组织的损伤。补体的不当活化涉及多种疾病(称作补体相关疾病或病症,诸如免疫复合物

和自身免疫性疾病)和多种炎症状况(包括补体介导的炎性组织损伤)的发病机理。各种补体相关疾病的病理有所不同,而且可涉及时间或长或短的补体活化,整个级联、只有级联之一(例如经典途径或旁路途径)、只有级联的一些成分、等的活化。在有些疾病中,补体片段的补体生物学活性导致组织损伤和疾病。因而,补体的抑制剂具有高度的治疗潜力。旁路途径的选择性抑制剂会是特别有用的,因为经由经典路径自血液中清除病原体和其它生物体会保持完整。

[0079] 本发明的因子D拮抗剂对于补体相关眼疾(病理牵涉补体(包括经典途径和旁路途径,特别是补体旁路途径)的所有眼疾和眼病)的预防和治疗是有用的,诸如例如黄斑变性疾病,诸如所有阶段的年龄相关黄斑变性(AMD)(包括干性和湿性(非渗出性和渗出性)形式),脉络膜新血管形成(CNV),葡萄膜炎,糖尿病性和其它缺血相关视网膜病变,眼内炎,和其它眼内新血管疾病,诸如糖尿病性黄斑水肿,病理性近视,von Hippel-Lindau病,眼的组织胞浆菌病,视网膜中央静脉阻塞(CRVO),角膜新血管形成,和视网膜新血管形成。一组优选的补体相关眼疾包括年龄相关黄斑变性(AMD)(包括非渗出性(湿性)和渗出性(干性或萎缩性)AMD)、脉络膜新血管形成(CNV)、糖尿病性视网膜病变(DR)、和眼内炎。

[0080] AMD,即年龄相关黄斑变性,是60岁以上个体中不可逆的视功能障碍的首要原因。有两类AMD,即非渗出性(干性)和渗出性(湿性)AMD。干性或渗出性形式涉及中央视网膜(黄斑)下面的视网膜色素上皮(RPE)的萎缩性和肥大性变化,以及RPE上的沉积物(玻璃疣)。非渗出性AMD患者可发展成湿性或渗出性AMD,其中称作脉络膜新血管膜(CNVM)的异常血管在视网膜下面形成,渗漏液体和血液,并最终在视网膜中和在视网膜下引起失明性盘状瘢痕。非渗出性AMD(通常是渗出性AMD的前身)更加常见。非渗出性AMD的表现有所不同;可存在硬玻璃疣、软玻璃疣、RPE地理性萎缩、和色素聚团。补体成分在AMD早期在RPE上沉积,而且是玻璃疣的主要组分。

[0081] 本发明具体关注高危(high risk)AMD的治疗,包括第3类和第4类AMD。第3类AMD的特征在于双眼都不存在晚期AMD,至少一只眼具有20/32或更好的视力及至少一粒大的玻璃疣(例如125um)、广泛的(通过玻璃疣面积来测量)中间体玻璃疣、或不牵涉黄斑中心的地理性萎缩(GA)、或这些的任意组合。第3类AMD(仍视为“干性”AMD)有高风险转化成脉络膜新血管形成(CNV)。

[0082] 第4类高危AMD(分类为“湿性”AMD)的特征在于视力为20/32或更好及指标眼中没有晚期AMD(牵涉黄斑中心的GA或脉络膜新血管形成的特征)。对侧眼的特征在于晚期AMD,或视力低于20/32,这可归于AMD黄斑病变。典型的是,如果不治疗的话,高危AMD迅速进展成脉络膜新血管形成(CNV),其速率比第1类或第2类(非高危)AMD的进展速率高大约10-30倍。

[0083] 因子D拮抗剂特别可用于预防AMD(特别是第3类或第4类AMD)进展成CNV,和/或在未受影响的或受影响较小的对侧眼中预防AMD或CNV的发生/进展。在此语境中,术语“预防”以最广义使用,包括完全或部分阻断和减缓疾病的进展,以及延迟疾病更严重形式的发作。处于发生或进展成高危(第4类)AMD或CMV高风险的患者尤其受益于本发明的这个方面。

[0084] 已知补体因子H(CFH)多态性与个体发生AMD和/或CNV的风险有关。CFH中的突变能活化补体,继而可导致AMD/CNV。最近有报告,补体因子H(CFH)多态性占到AMD可归因风险的50%(Klein et al., Science 308:385-9 (2005))。已经发现,CFH中的一种常见单体型(HF1/CFH)使个体易患年龄相关黄斑变性(Hageman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 (2):

7227-7232 (2005))。已经将AMD分离成常染色体显性性状,疾病基因座定位至染色体1q25-q31,在标志物D1S466与D1S413之间,最大优势对数计分为约3.20 (Klein et al., Arch Ophthalmol. 116 (8) :1082-9 (1998); Majewski et al., Am. J. Hum. Genet. 73 (3) :540-50 (2003); Seddon et al., Am. J. Hum. Genet. 73 (4) :780-90 (2003); Weeks et al., Am. J. Ophthalmol. 132 (5) :682-92 (2001); Iyengar et al., Am. J. Hum. Genet. 74 (1) :20-39 (2004)); 染色体2q3/2q32,在标志物D12S1391与D2S1384之间,最大优势对数计分为2.32/2.03 (Seddon et al., supra); 3p13,在标志物D12S1300与D12S1763之间,最大优势对数计分为2.19 (Majewski et al., supra; Schick et al., Am. J. Hum. Genet. 72 (6) :1412-24 (2003)); 6q14,在标志物D6S1056与DS249之间,最大优势对数计分为3.59/3.17 (Kniazeva et al., Am. J. Ophthmol. 130 (2) :197-202 (2000)); 9q33,在标志物D9S934处,最大优势对数计分为2.06 (Majewski et al., supra); 10q26,在标志物D10S1230处,最大优势对数计分为3.06 (Majewski et al., supra; Iyengar et al., supra; Kenealy et al., Mol. Vis. 10: 57-61 (2004)); 17q25,在标志物D17S928处,最大优势对数计分为3.16 (Weeks et al., supra); 和22q12,在标志物D22S1045处,最大优势对数计分为2.0 (Seddon et al., supra)。因而,遗传筛选是鉴定对于预防性处理(包括预防疾病进展成更严重的形式,诸如从AMD进展成CNV)而言是特别好的候选者的患者的一个重要部分。

[0085] 1. 抗因子D抗体

[0086] 本发明包括抗因子D抗体的生产和应用。产生抗体的示例性方法在以下章节中有更详细的描述。

[0087] 用衍生自哺乳动物物种的因子D抗原选出抗因子D抗体。抗原优选是人因子D。然而,来自其它物种的因子D,诸如鼠因子D,也可用作靶抗原。来自各种哺乳动物物种的因子D抗原可分离自天然来源。在其它实施方案中,抗原是重组生产的或者是利用本领域已知的其它合成方法而制备的。

[0088] 所选的抗体通常会具有足够强的针对因子D抗原的结合亲和力。例如,抗体结合人因子D的Kd值可不超过约5nM,优选不超过约2nM,而更优选不超过约500pM。例如,抗体亲和力可由基于表面等离振子共振的测定法(如实施例所述的BIAcore测定法);酶联免疫吸附测定法(ELISA);和竞争测定法(如RIA的)来测定。

[0089] 而且,抗体可进行其它生物学活性测定法,如,用以评估其作为治疗剂的有效性。此类测定法是本领域已知的,而且依赖于靶抗原和抗体的预定用途。实例包括HUVEC抑制测定法(如下文实施例所述的);肿瘤细胞生长抑制测定法(如例如W089/06692所述的);抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CDC)测定法(美国专利5,500,362);及下文关于鉴定因子D拮抗剂描述的体外和体内测定法。

[0090] 为了筛选结合感兴趣抗原上的特定表位的抗体,可进行常规的交叉阻断测定法,诸如如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow和David Lane (1988) 所述的。另外,可进行表位作图,例如如Champe等 (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394所述的,来确定抗体是否结合感兴趣表位。

[0091] 在一个优选的实施方案中,利用独特的噬菌体展示法来选择抗因子D抗体。该方法包括产生基于单个框架模板的合成抗体噬菌体文库,设计可变域内的足够的多样性,展示具有多样化可变域的多肽,选择对靶因子D抗原具有高亲和力的候选抗体,和分离所选的抗

体。

[0092] 噬菌体展示方法的详情可在例如2003年12月11日公布的W003/102157中找到。

[0093] 在一个方面,抗体文库可通过在抗体可变域的至少一个CDR中突变溶剂可及的和/或高度多变的位置来产生。一些或所有CDR可用本文提供的方法来突变。在一些实施方案中,优选突变CDRH1、CDRH2和CDRH3中的位置以形成单个文库或突变CDRL3和CDRH3中的位置以形成单个文库或突变CDRL3和CDRH1、CDRH2和CDRH3中的位置以形成单个文库,由此产生多样的抗体文库。

[0094] 例如,可产生这样的抗体可变域文库,其在CDRH1、CDRH2和CDRH3中溶剂可及的和/或高度多变的位置上有突变。可产生这样的另一种文库,其在CDRL1、CDRL2和CDRL3中有突变。这些文库也可互相结合使用以产生具有期望亲和力的结合物。例如,在对重链文库进行一轮或多轮对靶抗原结合的选择后,可将轻链文库替换成重链结合物群中,用以在其它轮次的选择中提高结合物的亲和力。

[0095] 文库优选通过用重链序列可变区CDRH3区中的变异氨基酸替代原始氨基酸来产生。所得文库可包含多种抗体序列,其中序列多样性主要位于重链序列的CDRH3区中。

[0096] 在一个方面,文库在人源化抗体4D5序列、或人源化抗体4D5序列的框架氨基酸序列的背景中产生。文库优选通过用DVK密码子集编码的氨基酸至少替代重链残基95-100a来产生,其中DVK密码子集用于编码这些位置中每一个位置的变异氨基酸集。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的一个例子包含序列(DVK)₇。在一些实施方案中,文库通过用DVK和NNK两种密码子集编码的氨基酸替代残基95-100a来产生。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的一个例子包含序列(DVK)₆(NNK)。在另一个实施方案中,文库通过用DVK和NNK两种密码子集编码的氨基酸替代残基95-100a来产生。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的一个例子包含序列(DVK)₅(NNK)。可用于产生这些替代的寡核苷酸集的另一个例子包含序列(NNK)₆。根据本文所述标准,本领域技术人员能确定合适寡核苷酸序列的其它例子。

[0097] 在另一个实施方案中,利用不同的CDRH3设计来分离高亲和力结合物和分离针对各种表位的结合物。该文库中产生的CDRH3的长度范围是11至13个氨基酸,尽管也可产生不同于此的长度。通过使用NNK、DVK和NVK密码子集能拓展H3多样性,以及在N和/或C-末端处的更有限的多样性。

[0098] CDRH1和CDRH2中也可产生多样性。CDR-H1和H2多样性的设计遵循目标为模拟所述带有如下修饰的天然抗体全集的策略,所述修饰使多样性较前述设计更紧密地与天然多样性相匹配。

[0099] 对于CDRH3中的多样性,可分开构建多个文库,它们具有不同长度的H3,然后组合起来以选择针对靶抗原的结合物。合并多个文库并用前述和本文下述的固体支持物选择和溶液分选法来选择。可采用多种分选策略。例如,一种变化涉及在结合至固相的靶物上分选,接着分选可能在融合多肽上存在的标签(例如抗gD标签),接着再一次在结合至固相的靶物上分选。或者,文库可首先在结合至固相表面的靶物上选择,然后用靶抗原浓度逐渐减低的溶液相结合来分选所洗脱的结合物。利用不同分选方法的组合能实现最低限度地只选择高度表达的序列并能实现选择许多不同的高亲和力克隆。

[0100] 针对靶因子D抗原的高亲和力结合物可自文库分离。限制H1/H2区中的多样性将简并性降低约10⁴至10⁵倍,而且允许更多H3多样性能得到更多高亲和力结合物。利用在CDRH3

中具有不同类型多样性(例如利用DVK或NVT)的文库能实现分离可与靶抗原的不同表位结合的结合物。

[0101] 在另一个实施方案中,产生在CDRH1、CDRH2和CDRH3区中具有多样性的一个或多个文库。在该实施方案中,用各种长度的H3区并主要用密码子集XYZ和NNK或NNS来产生CDRH3中的多样性。用各寡核苷酸形成文库并合并,或者合并寡核苷酸来形成文库子集。该实施方案的文库可针对结合至固相的靶物进行分选。分离自多次分选的克隆可利用ELISA测定法来筛选特异性和亲和力。对于特异性,克隆可以针对期望靶抗原以及其它非靶抗原进行筛选。然后,在溶液结合竞争ELISA测定法或点竞争测定法中对那些针对靶因子D抗原的结合物筛选亲和力。可以用如上所述制备的XYZ密码子集自文库分离高亲和力结合物。可容易地在细胞培养中以高产率将这些结合物制备成抗体或抗原结合片段。

[0102] 在一些实施方案中,可能希望产生在CDRH3区长度方面具有更多多样性的文库。例如,可能希望产生CDRH3区的范围为约7至19个氨基酸的文库。

[0103] 自这些实施方案的文库分离的高亲和力结合物可容易地在细菌和真核细胞培养中以高产率产生。可设计载体以容易地去除如下序列诸如gD标签、病毒外壳蛋白成分序列,和/或添加恒定区序列来实现高产率地产生全长抗体或抗原结合片段。

[0104] 可以将CDRH3中有突变的文库与包含变异型式的其它CDR(例如CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1和/或CDRH2)的文库组合。如此,例如,在一个实施方案中,将CDRH3文库与CDRL3文库组合,所述CDRL3文库用预先确定的密码子集在第28、29、30、31、和/或32位有变异氨基酸的人源化4D5抗体序列的背景中产生。在另一个实施方案中,将CDRH3有突变的文库与包含变异CDRH1和/或CDRH2重链可变域的文库组合。在一个实施方案中,CDRH1文库用第28、30、31、32和33位有变异氨基酸的人源化抗体4D5序列产生。CDRH2文库可用预先确定的密码子集用第50、52、53、54、56和58位有变异氨基酸的人源化抗体4D5序列产生。

[0105] 可进一步修饰自噬菌体文库产生的抗因子D抗体以产生抗体突变体,所述突变体具有比亲本抗体改善了的物理、化学和/或生物学特性。若所使用的测定法是生物学活性测定法,则优选抗体突变体在所选测定法中的生物学活性比亲本抗体在该测定法中的生物学活性好至少约10倍,优选好至少约20倍,更优选好至少约50倍,有时好至少约100倍或200倍。例如,优选抗因子D抗体突变体针对因子D的结合亲和力比亲本抗因子D抗体(诸如图5中所显示的任何抗体,特别是抗体20D12)的结合亲和力强至少约10倍,优选强至少约20倍,更优选强至少约50倍,有时强至少约100倍或200倍。

[0106] 为了产生抗体突变体,将一处或多处氨基酸改变(例如替代)引入亲本抗体的一个或多个高变区。或者/另外,可将框架区残基的一处或多处改变(例如替代)引入亲本抗体,这些改变导致抗体突变体针对来自第二哺乳动物物种的抗原的结合亲和力有所改善。要修饰的框架区残基的实例包括那些直接非共价结合抗原的(Amit等(1986)Science 233:747-753);与CDR相互作用的/影响CDR构象的(Chothia等(1987)J.Mol.Biol.196:901-917);和/或参与V_L-V_H界面的(EP 239 400B1)。在某些实施方案中,对一个或多个此类框架区残基的修饰导致抗体针对来自第二哺乳动物物种的抗原的结合亲和力有所增强。例如,在本发明的该实施方案中,可改变约1个至约5个框架残基。有时,这可足以产生适合在临床前试验中使用的抗体突变体,甚至其中没有高变区残基被改变。然而,通常,抗体突变体会包含别的高变区改变。

[0107] 所改变的高变区残基可以是随机改变的,尤其是在亲本抗体的起始结合亲和力使得此类随机产生的抗体突变体能被容易地筛选出来的情况下。

[0108] 用于生成此类抗体突变体的一种有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”(Cunningham and Wells (1989) *Science* 244:1081-1085)。这里,一个或多个高变区残基用丙氨酸或多丙氨酸残基替代,以影响氨基酸与来自第二哺乳动物物种的抗原的相互作用。然后通过在或对替代位点引入更多或其它突变,推敲那些对替代展现出功能敏感性的高变区残基。如此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。如本文所述对如此生成的丙氨酸突变体筛选它们的生物学活性。

[0109] 通常,从保守替代诸如下文显示在标题“优选替代”下的那些开始。如果此类替代导致生物学活性(例如结合亲和力)的改变,那么可以引入下表中称为“例示替代”的更实质性改变,或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述,并筛选产物。下表中列出了优选的替代。

[0110]

原始残基	例示替代	优选替代
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; 正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	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; 正亮氨酸	leu

[0111] 对抗体生物学特性的甚至更实质性修饰通过选择在保持以下方面效果上显著不同的替代来实现: (a) 替代区域的多肽主链的结构,例如作为折叠片或螺旋构象, (b) 靶位点处分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的体积。基于共同的侧链特性,将天然存在残基如下分组:

[0112] (1) 疏水性的: 正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0113] (2) 中性、亲水性的:cys、ser、thr、asn、gln;

- [0114] (3) 酸性的:asp、glu;
- [0115] (4) 碱性的:his、lys、arg;
- [0116] (5) 影响链取向的残基:gly、pro;及
- [0117] (6) 芳香族的:trp、tyr、phe。
- [0118] 非保守替代会需要用这些类别之一的一个成员替换另一个类别的。
- [0119] 在另一个实施方案中,利用噬菌体展示(见上),对为修饰而选择的位点进行亲和力成熟。
- [0120] 编码氨基酸序列突变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于对早先制备的突变或非突变型式的亲本抗体的寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变、和盒式诱变。制备突变体的优选方法是定点诱变(参见例如Kunkel (1985) Proc.Nat1.Acad.Sci.USA 82:488)。
- [0121] 在某些实施方案中,抗体突变体仅有单个高变区残基被替代。在其它实施方案中,有亲本抗体的两个或更多个高变区残基被替代,例如约2个至约10个高变区替代。
- [0122] 通常,生物学特性得到改善的抗体突变体所具有的氨基酸序列与亲本抗体重链或轻链任一可变域的氨基酸序列有至少75%,更优选至少80%,更优选至少85%,更优选至少90%,和最优选至少95%的氨基酸序列同一性或相似性。关于此序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,候选序列中与亲本抗体残基相同(即相同残基)或相似(即根据共同侧链特性来自同一组的氨基酸残基,见上文)的氨基酸残基的百分比。N-末端、C-末端、或内部的延伸、删除、或插入可变域以外的抗体序列都不应视为影响序列同一性或相似性。
- [0123] 产生抗体突变体后,测定该分子相对于亲本抗体的生物学活性。如上所示,这可包括测定抗体的结合亲和力和/或其它生物学活性。在本发明的一个优选实施方案中,制备一组抗体突变体并筛选针对抗原(诸如因子D或其片段)的结合亲和力。任选将该初始筛选中选出的一个或多个抗体突变体进行一种或多种其它生物学活性测定法以确证结合亲和力增强的抗体突变体是真正有用的,例如可用于临床前研究。
- [0124] 这样选出的抗体突变体可进一步修饰,这常常取决于抗体的预期用途。此类修饰可包括进一步改变氨基酸序列,融合异源多肽和/或共价修饰,诸如下文所详述的那些。对于氨基酸序列改变,示例性的修饰上文有详述。例如,也可替代任何不涉及保持抗体突变体正确构象的半胱氨酸残基,一般替代为丝氨酸,用以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反地,可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是在抗体是抗体片段,诸如Fv片段时)。另一类氨基酸突变体具有改变的糖基化样式。这可通过删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块和/或增加不存在于抗体中的一个或多个糖基化位点来实现。抗体糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接的指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X是除了脯氨酸之外的任何氨基酸,是碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中存在这些三肽序列之任一产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖之一附着于羟基氨基酸(最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸)。在抗体上增加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使之包含一个或多个上述的三肽序列来方便地实现(用于N-连接的糖基化位点)。也可在原始抗体序列中通过添加、或替代

一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来产生改变(用于O-连接的糖基化位点)。

[0125] 本发明的抗因子D抗体可使用易于得到的技术和材料而重组生产。

[0126] 为了重组生产抗因子D抗体,分离编码它的核酸,并插入可复制载体,用于进一步克隆(DNA扩增)或表达。编码抗体的DNA易于使用常规规程分离或合成(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的DNA特异性结合的寡核苷酸探针)。可以获得许多载体。载体构件通常包括但不限于下列一项或多项:信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

[0127] (1) 信号序列构件

[0128] 本发明的抗体不仅可以直接重组生产,而且可以作为与异源多肽的融合多肽而重组生产,所述异源多肽优选是成熟蛋白质或多肽的N-末端处的信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。所选择的异源信号序列优选是受到宿主细胞识别并加工(即受到信号肽酶切割)的。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,所述信号序列用例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、1pp或热稳定肠毒素II前导序列的原核信号序列取代。为了酵母分泌,天然信号序列可以用例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括糖酵母属和克鲁维氏酵母属 α 因子前导序列)、酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶前导序列、或WO 90/13646中记载的信号取代。在哺乳动物细胞表达中,可以利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导,例如单纯疱疹gD信号。将此类前体区(precursor region)的DNA以符合读码框的方式与编码抗体的DNA连接。

[0129] (2) 复制起点构件

[0130] 表达和克隆载体都包含使载体能够在一种或多种所选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,这种序列是使载体能够不依赖于宿主染色体DNA而复制的序列,包括复制起点或自主复制序列。众所周知多种细菌、酵母和病毒的此类序列。来自质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母,而各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点构件(SV40起点的使用通常可能只是因为它包含早期启动子)。

[0131] (3) 选择基因构件

[0132] 表达和克隆载体可包含选择基因,也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质:(a)赋予对抗生素或其它毒素的抗性,例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素;(b)补足营养缺陷型的缺陷;或(c)提供不能自复合培养基获得的必需营养物,例如用于芽孢杆菌的编码D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0133] 选择方案的一个例子利用药物来阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质,如此幸免于选择方案。此类显性选择的例子使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0134] 适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是那些能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志,诸如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II(优选灵长类金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0135] 例如,首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的一种竞争性拮抗剂)的培养基中进行培养来鉴定经DHFR选择基因转化的细胞。在采用野生型DHFR时,适宜的宿

主细胞是DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0136] 或者,可以通过细胞在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖昔抗生素例如卡那霉素、新霉素或G418的培养基中的生长来选择经编码抗体、野生型DHFR蛋白质、和另一种选择标志诸如氨基糖昔3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是包含内源DHFR的野生型宿主)。参阅美国专利No.4,965,199。

[0137] 适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb et al. (1979) *Nature* 282:39)。trp1基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如ATCC No.44076或PEP4-1提供了选择标志。Jones (1977) *Genetics* 85:12。酵母宿主细胞基因组中存在trp1损伤随之提供了用于通过在缺少色氨酸时的生长来检测转化的有效环境。类似的,用携带Leu2基因的已知质粒补足Leu2缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)。

[0138] 此外,衍生自1.6μm环状质粒pKD1的载体可用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者,报导了用于在乳酸克鲁维氏酵母中大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。Van den Berg (1990) *Bio/Technology* 8:135。还披露了用于由克鲁维氏酵母属的工业用菌株分泌成熟重组人血清清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer et al. (1991) *Bio/Technology* 9:968-975。

[0139] (4) 启动子构件

[0140] 表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子,而且它与抗体核酸可操作连接。适用于原核宿主的启动子包括phoA启动子、β-内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如tac启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子还会包含与编码抗体的DNA可操作连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0141] 已知真核细胞的启动子序列。事实上,所有真核基因都具有富含AT区,它位于起始转录的位点上游大约25至30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70至80个碱基处找到的另一种序列是CNCAAT区,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列,它可能是向编码序列的3'端添加聚腺苷酸尾的信号。将所有这些序列合适的插入真核表达载体。

[0142] 适用于酵母宿主的启动序列的例子包括3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

[0143] 作为具有通过生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于EP 73,657。酵母增强子也可以有利的与酵母启动子一起使用。

[0144] 在哺乳动物宿主细胞中由载体转录抗体受到例如从病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最优选的猿病毒40(SV40)基因组,从异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子,及从热休克启动子获得的启动子的控制,倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

[0145] 方便的以SV40限制性片段的形式获得SV40病毒的早期和晚期启动子,该片段还包含SV40病毒复制起点。方便的以HindIII E限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利No.4,419,446中披露了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利No.4,601,978中记载了该系统的一种改良。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素cDNA还可参见Reyes et al. (1982) *Nature* 297:598-601。或者,可以使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0146] (5) 增强子元件构件

[0147] 常常通过将增强子序列插入载体来提高高等真核细胞对编码本发明抗体的DNA的转录。现在知道来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常会使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括SV40复制起点晚期一侧的增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见Yaniv (1982) *Nature* 297:17-18。可以将增强子剪接到载体中,位于抗体编码序列的5'或3'位置,但是优选位于启动子的5'位点。

[0148] (6) 转录终止构件

[0149] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还会包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可以从真核或病毒DNA或cDNA的5'端和偶尔的3'端非翻译区获得。这些区域包含在编码抗体的mRNA的非翻译部分中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见WO 94/11026及其中披露的表达载体。

[0150] (7) 宿主细胞的选择和转化

[0151] 适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是上文描述的原核生物、酵母或高等真核生物细胞。适于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性生物体或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科,诸如埃希氏菌属(*Escherichia*)例如大肠埃希氏菌/大肠杆菌(*E.coli*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、以及芽孢杆菌属(*Bacilli*)诸如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*) (例如1989年4月12日公布的DD 266,710中披露的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)诸如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC31,446),尽管其它菌株诸如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些例子是例示性的,而不是限制性的。

[0152] 在原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。啤酒糖酵母/酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常用的面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。然而,通常可获得许多其它属、种和菌株且可用于本发明,诸如栗酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,诸如例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、

保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母(*K.wickeramii*) (ATCC 24,178)、*K.waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母(*K.marxianus*)；亚罗酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP183,070)；假丝酵母属(*Candida*)；瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)；许旺酵母属(*Schwanniomyces*)，诸如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；和丝状真菌，诸如例如脉孢菌属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)、和曲霉属(*Aspergillus*)宿主诸如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0153] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定了许多杆状病毒株和变体及相应的允许昆虫宿主细胞，它们来自诸如草地夜蛾*Spodoptera frugiperda* (毛虫)、埃及伊蚊*Aedes aegypti* (蚊子)、白纹伊蚊*Aedes albopictus* (蚊子)、黑腹果蝇*Drosophila melanogaster* (果蝇)和家蚕*Bombyx mori* 等宿主。公众可获得多种病毒株用于转染，例如苜蓿尺蠖*Autographa californica* NPV的L-1变体和家蚕*Bombyx mori* NPV的Bm-5株，而且此类病毒可依照本发明用作本文中的病毒，特别是用于转染草地夜蛾细胞。还可利用棉、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0154] 然而，脊椎动物细胞得到最多关注，而且培养(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已经成为常规规程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651)；人胚肾系(293或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的293细胞, Graham et al. (1977) J.Gen Virol.36:59)；幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10)；中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub et al. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216)；小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4, Mather (1980) Biol.Reprod.23:243-251)；猴肾细胞(CV1, ATCC CCL 70)；非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34)；牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人肺细胞(W138, ATCC CCL 75)；人肝细胞(Hep G2, HB8065)；小鼠乳瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51)；TRI细胞(Mather et al. (1982) Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68; MRC5细胞; FS4细胞；和人肝瘤系(Hep G2)。

[0155] 用上文所述用于生产抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞，并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当更改的常规营养培养基中进行培养。

[0156] (8) 培养宿主细胞

[0157] 可以在多种培养基中培养用于生产本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如Ham氏F10(Sigma)、极限必需培养基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基(DMEM, Sigma)适于培养宿主细胞。另外，可以使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基:Ham et al. (1979) Meth. Enz. 58:44; Barnes et al. (1980) Anal.Biochem. 102:255; 美国专利No.4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利Re.30,985。任何这些培养基可以根据需要补充激素和/或其它生长因子(诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(诸如HEPES)、核苷酸(诸如腺苷和胸苷)、抗生素(诸如

GENTAMYCINTM药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以以适宜浓度包含本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件,诸如温度、pH等,就是先前为表达而选择用于宿主细胞的,这对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0158] (9) 抗体的纯化

[0159] 在使用重组技术时,可以在细胞内、在周质空间中生成抗体,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,通过例如离心或超滤除去宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167记载了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的规程。简单的说,在存在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)时使细胞糊融化约30分钟。可通过离心除去细胞碎片。如果将抗体分泌到培养基中,那么一般首先使用商品化蛋白质浓缩滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元浓缩来自此类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂诸如PMSF来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。

[0160] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化自细胞制备的抗体组合物,优选的纯化技术是亲和层析。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体(Lindmark et al. (1983), J. Immunol. Meth. 62:1-13)。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3(Guss et al. (1986) EMBO J. 5:1567-1575)。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含CH3结构域,则可使用Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土上的层析、肝素SEPHAROSETM上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚丙烯酰胺-SDS-PAGE、和硫酸铵沉淀。

[0161] 在任何预备性纯化步骤后,包含感兴趣抗体和污染物的混合物可进行低pH疏水相互作用层析,使用pH大约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度进行(例如大约0-0.25M盐)。

[0162] 2. 用于鉴定因子D拮抗剂的筛选测定法和动物模型

[0163] 可以在多种基于细胞的测定法和补体相关疾病或病症的动物模型中评估因子D拮抗剂。

[0164] 如此,例如,重组(转基因)动物模型可使用用于生成转基因动物的标准技术通过将感兴趣基因的编码部分导入感兴趣动物的基因组来改造。可充当转基因操作对象的动物包括但不限于小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、绵羊、山羊、猪和非人灵长类,例如狒狒、黑猩猩和其它猴。本领域已知的用于将转基因导入此类动物中的技术包括原核显微注射(pronucleic microinjection) (Hoppe和Wanger, 美国专利No. 4,873,191);逆转录病毒介导的基因转移进入种系中(例如Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 (1985));胚胎干细胞中的基因寻靶(Thompson等, Cell, 56:313-321 (1989));胚胎电穿孔(Lo, Mol. Cel. Biol., 3:1803-1814 (1983));精子介导的基因转移(Lavitrano等, Cell, 57:717-73 (1989))。综述参见例如美国专利No. 4,736,866。

[0165] 为了本发明的目的,转基因动物包括那些只在其部分细胞中携带转基因的动物(“镶嵌动物”)。转基因可作为单一转基因或者串联物例如头-头或头-尾串联物整合。通过遵循例如Lasko等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:6232-636 (1992) 的技术,还可能将转基因选择性导入特定细胞类型中。

[0166] 转基因在转基因动物中的表达可通过标准技术来监测。例如,Southern印迹分析或PCR扩增可用于验证转基因的整合。然后可使用诸如原位杂交、Northern印迹分析、PCR、或免疫细胞化学的技术分析mRNA表达水平。

[0167] 动物可进一步检验免疫病病理学的征候,例如通过组织学检验以测定免疫细胞进入特定组织中的浸润。还可实施阻断实验,其中用本发明的候选因子D拮抗剂处理转基因动物以测定对补体和补体活化(包括经典途径和旁路途径)、或T细胞增殖影响的程度。在这些实验中,将结合本发明多肽的阻断性抗体施用于动物并监测感兴趣生物学效应。

[0168] 或者,可构建“敲除”动物,它由于编码因子D多肽的内源基因和导入动物胚胎细胞中的改变的编码该多肽的基因组DNA之间的同源重组而具有缺陷的或改变的编码因子D的基因。例如,可依照已建立的技术用编码因子D的cDNA克隆编码因子D的基因组DNA。可以将编码因子D的基因组DNA的一部分删除或用另一基因替换,诸如可用于监测整合的、编码选择标志的基因。通常,载体中包含数千碱基未改变的侧翼DNA(5' 和3' 末端都有) (关于同源重组载体的描述参见例如Thomas和Capecci,Cell,51:503 (1987))。将载体导入胚胎干细胞系中(例如通过电穿孔),并选择其中所导入DNA与内源DNA发生了同源重组的细胞(参见例如Li等,Cell,69:915 (1992))。然后将所选择的细胞注射入动物(例如小鼠或大鼠)的胚泡中以形成聚集嵌合体(参见例如Bradley,在《Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:A Practical Approach》中,E.J.Robertson编,IRL,Oxford,1987,第113-152页)。然后可将嵌合胚植入合适的假孕雌性代孕动物中,并使胚胎足月产生“敲除”动物。在其生殖细胞中包含同源重组DNA的后代可通过标准技术鉴定,并用于繁殖其中动物的所有细胞都包含同源重组DNA的动物。敲除动物可以在例如由于缺乏因子D多肽而形成病理疾患和具有抵御某些病理疾患的能力方面进行表征。

[0169] 如此,可以在鼠因子D敲除小鼠中进一步研究潜在因子D拮抗剂的生物学活性。

[0170] 年龄相关黄斑变性(AMD)的动物模型由在Ccl-2或Ccr-2基因中具有无效突变的小鼠组成。这些小鼠形成AMD的主要特征,包括视网膜色素上皮(RPE)中脂褐素的积累和视网膜色素上皮(RPE)下玻璃疣、光感受器萎缩和脉络膜新血管形成(CNV)。这些特征在6月龄后形成。可以对候选因子D拮抗剂测试玻璃疣形成、光感受器萎缩和脉络膜新血管形成。

[0171] 3. 药物组合物

[0172] 可以以药物组合物的形式施用本发明的因子D拮抗剂,包括抗因子D抗体和通过上文所公开的筛选测定法鉴定得到的其它分子来治疗补体相关眼疾。

[0173] 通过将具有期望纯度的活性分子与任选的药学可接受载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,0sol,A.编,1980)混合来制备本发明因子D拮抗剂的治疗用制剂,供贮存,以冻干剂型或水溶液的形式。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸羟基酯,

诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸；单糖、二糖、和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐相反离子，诸如钠；金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物)；和/或非离子表面活性剂，诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0174] 脂转染或脂质体也可用于将多肽、抗体、或抗体片段投递入细胞中。在使用抗体片段的情况下，优选特异性结合靶蛋白质的结合域的最小片段。例如，基于抗体的可变区序列，可设计保留结合靶蛋白质序列的能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术生成(参见例如Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893 (1993))。

[0175] 活性分子还可包载入例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶状药物投递系统(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗滴乳状液。此类技术披露于《Remington's Pharmaceutical Sciences》, 第16版, 0sol, A. 编, 1980。

[0176] 要用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0177] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质以定型产品的形式存在，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利No. 3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子100天以上，但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时，它们可能由于暴露于37°C的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如，如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间S-S键，那么可通过修饰巯基、自酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0178] 用于预防或治疗眼病或眼疾的本发明化合物通常通过眼部、眼内、和/或玻璃体内注射来施用。也可使用其它施用方法，包括但不限于表面、胃肠外、皮下、腹膜内、肺内、鼻内、和病变内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。

[0179] 用于眼部、眼内或玻璃体内施用的制剂可通过本领域已知方法和使用本领域已知成分来制备。有效治疗的一项主要要求是适当渗透穿过眼。与眼前部的疾病(在这种情况下药物可以表面投递)不同，视网膜疾病要求更加位点特异性的办法。滴眼剂和软膏剂很少渗透眼后部，而且血眼屏障妨碍系统性施用的药物渗透到眼组织中。因而，为了治疗视网膜疾病，诸如AMD和CNV而选择的药物投递方法通常是直接玻璃体内注射。玻璃体内注射通常要重复进行，时间间隔取决于患者的状况及所投递药物的特性和半衰期。为了眼内(例如玻璃体内)渗透，通常优选较小的分子。

[0180] 补体相关眼疾，诸如AMD或CNV的治疗功效可以通过评估眼内疾病时常用的多种终点来测量。例如，可评估视觉损失。视觉损失可通过但不限于例如下述各项来测量：测量最

好矫正视力/视敏度(BCVA)自基线到预期时间点的均值变化(例如其中BCVA基于早期治疗糖尿病性视网膜病变研究(ETDRS)视力表和测试距离4米的评估);测量在预期时间点与基线相比视力损失小于15个字母的受试者比例;测量在预期时间点与基线相比视力获得超过或等于15个字母的受试者比例;测量在预期时间点Snellen视力相当于20/2000或更差的受试者比例;测量NEI视觉功能问卷(Visual Functioning Questionnaire);测量预期时间点CNV的大小和CNV渗漏的量,例如通过荧光素血管造影术评估;等。眼部评估可通过下述各项来进行,例如包括但不限于例如实施眼部检查,测量眼内压,评估视力,测量裂隙灯压,评估眼内炎症,等。

[0181] 提供下文实施例仅仅为了例示目的,而非意图以任何方式限制本发明的范围。

[0182] 在此通过述及明确地完整收录本说明书中所引用的所有专利和参考文献。

实施例

[0183] 除非另有说明,实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和整篇说明书中以ATCC编号鉴别的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)。

[0184] 实施例1:抗因子D抗体的制备和测试

[0185] 方法:

[0186] 用于蛋白质分析的玻璃体液和布鲁赫膜的制备

[0187] 融化人AMD和非AMD尸眼,并沿着玻璃体、视网膜和RPE取出前段。在微量管中收集玻璃体,在干冰上冷冻,并保存于-70°C直至进一步加工。自后半球剥离布鲁赫膜-脉络膜层(Crabb, J. W. 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99:14682-7 (2002)),并自黄斑和周围中央区分离4mm或6mm环钻样品,供后续分析用。见所附关于布鲁赫膜制备物、年龄、性别、AMD阶段、解剖记录和蛋白质组分析所使用的量的汇总表(图8)。使用一份环钻样品(4mm直径)来分析补体因子D蛋白质水平。将样品在测定稀释剂(PBS/0.5% BSA/0.5% Tween-20)中超声处理10分钟,并通过以5000rpm离心10分钟将可溶性级分和不溶性级分分开。将可溶性级分用于ELISA分析。

[0188] 针对人因子D的单克隆抗体的生成

[0189] 如下生成针对人因子D的单克隆抗体,即在Balb/c小鼠的足垫中注射单磷酰脂质A/二棒分枝菌酸海藻糖佐剂(Corixa, Hamilton, MT)中的2ug因子D(Comptech, Taylor, TX)11次。将来自小鼠的腘淋巴结与P3X63Ag.U.1骨髓瘤细胞融合。筛选杂交瘤细胞针对鼠因子D的结合亲和力。通过有限稀释来克隆生成抗体的细胞系。

[0190] 溶血测定法

[0191] 为了测定旁路途径活性,将家兔红细胞(Er, Colorado Serum)在GVB中清洗3次,并重悬至 $2 \times 10^9 / ml$ 。将抑制剂(50ul)和20ul Er悬浮液与GVB/0.1M EGTA/0.1M MgCl₂ 1:1混和。通过添加经C1q消减的人血清(Quidel; 30ul, 在GVB中1:3稀释)来启动补体活化。于室温温育30分钟后,添加200ul GVB/10mM EDTA以终止反应,并将样品以500g离心5分钟。通过测量412nm处的吸光度,在200ul上清液中测定溶血情况。数据表述成相对于在缺乏抑制剂时诱导的溶血的百分比。为了测定因子D抗体对补体经典路径的影响,遵循类似的规程,只是

用经IgM包被的绵羊红细胞(E-IgM, CompTech)替换Er且在GVB++中在因子B缺陷的人血清中实施测定法。

[0192] 人因子D ELISA

[0193] 将抗人补体因子D山羊多克隆抗体(pAb) (R&D Systems, Minneapolis, MN) 在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至1ug/mL, 并在4℃过夜温育期间包被到ELISA板(384孔, 高结合板, Greiner Bio One through VWR International, Bridgeport, New Jersey)上。用清洗缓冲液(PBS/0.05% Tween-20)清洗3次后, 将板用PBS/0.5%牛血清清蛋白(BSA) 封闭1-2小时。此温育和所有其它温育均于室温在定轨摇床上实施。用测定稀释剂(PBS/0.5% BSA/0.5% Tween-20)稀释人玻璃体液和布鲁赫膜溶胞物样品。使用相同缓冲液, 配制因子D(Complement Technology, Inc., Tyler, Texas)标准曲线的连续稀释度(15.6pg/mL-1,000pg/mL)。融化为了在标准曲线的高、中、和低区定量而预稀释的冷冻对照样品。封闭步骤后, 清洗板, 并添加样品、标准品、和对照, 温育2小时。清洗板, 并将生物素化的抗人因子D单克隆抗体9G7.1.16稀释至62.5ng/mL, 添加至板, 温育1-2小时。将链霉亲合素-辣根过氧化物酶(SA-HRP) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 在测定稀释剂中1/10,000稀释, 并添加至清洗后的板。30分钟温育和最后一次清洗步骤后, 添加四甲基联苯胺(TMB) (Kirkegaard&Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), 并显色5-7分钟。最后, 通过添加1M磷酸来终止反应。使用微量板读数仪(450nm, 650nm参照)获得光密度, 并自4参数拟合标准曲线计算样品浓度。人玻璃体液和布鲁赫膜溶胞物样品中因子D的最小限度可计量浓度分别为780pg/mL(1/50最低限度稀释) 和156pg/mL(1/10最低限度稀释)。

[0194] 免疫组织化学

[0195] 在OCT化合物中冷冻布鲁赫膜样品, 并在低温切片机上切出7um切片。免疫染色。切片后将切片在丙酮中固定5分钟, 并保存于-80℃直至准备好染色。将冷冻的切片在PBS中漂洗2次, 接着在含有0.1%Tween的Tris缓冲盐水(TBST)中漂洗2次。用Vector亲合素生物素封闭试剂盒(SP-2001)遵循制造商的指导于室温封闭内源亲合素和生物素。将切片在TBST中漂洗, 更换2次, 每次5分钟, 并用3%BSA/PBS中的10%马血清于室温封闭内源免疫球蛋白30分钟。将切片与在10%马血清中稀释至10ug/ml的抗人因子D(9G7.1.16)抗体一起于室温温育60分钟。使用10ug/ml的天然小鼠IgG2a(Pharmingen)作为阴性对照。在TBST中漂洗后(更换2次, 每次5分钟), 将切片与在马血清中稀释至2.5ug/ml(1:200)的生物素化的马抗小鼠抗体(Vector)一起温育30分钟。将切片在TBST中漂洗, 更换2次, 每次5分钟, 并与Vectastain ABC-AP Elite试剂于室温一起温育30分钟, 在TBST中漂洗(更换2次, 每次5分钟), 并在新鲜制备的Vector Red溶液中温育。Vector Red是如下制备的:对于200mM Tris HC1, 在dH₂O中1:5稀释1M Tris HC1(1份Tris HC1和4份dH₂O)。在每5ml新鲜制备的200mM Tris HC1溶液中混和1滴Levamisole。在每5ml 200mM Tris HC1-Levamisole溶液中分别混和2滴来自Vector Red试剂盒的试剂1、2和3。在添加来自Vector Red试剂盒的试剂3后5-10分钟内使用。将切片在H₂O中漂洗, 并如下用Mayer的苏木精复染, 即在苏木精中浸泡10-15次(20-30秒钟), 用水和蓝(blue)漂洗, 并在流水中充分漂洗5分钟以洗去发蓝试剂。将切片在Crystal封固液中封固, 并让其干燥过夜。在二甲苯中浸泡干燥的Crystal封固覆盖的载玻片, 并使用永久封固封固剂盖上盖玻片。

[0196] 20D12的重链和轻链的克隆

[0197] 使用RNeasy迷你试剂盒 (Qiagen, Germany) 自生成小鼠抗人因子D单克隆20D12的杂交瘤细胞提取总RNA。使用RT-PCR用如下简并引物扩增轻链可变域 (VL) 和重链可变域 (VH) :

[0198] 轻链 (LC) 正向:

[0199] 5'GATCGATATCGTRATGACHCARTCTCA3' (SEQ ID NO:4)

[0200] 轻链反向:

[0201] 5'TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC 3' (SEQ ID NO:5)

[0202] 重链 (HC) 正向:

[0203] 5'GATCCGTACGCTCAGGTYCARYTGCARCARCTCTGG 3' (SEQ ID NO:6)

[0204] 重链反向:

[0205] 5'ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT 3' (SEQ ID NO:7)

[0206] 正向引物是对VL和VH区的N端氨基酸序列特异性的。相应地,LC和HC反向引物设计成与在物种中高度保守的轻链恒定域 (CL) 和重链第1恒定域 (CH1) 中的一个区域退火。

[0207] 将扩增得到的VL克隆入含有人κ恒定域的pRK哺乳动物细胞表达载体 (Shields等, J Biol Chem 2000;276:6591-604)。将扩增得到的VH插入编码全长人IgG1恒定域的pRK哺乳动物细胞表达载体。如此,将20D12重定格式成小鼠-人IgG1嵌合物。

[0208] 认为前述书面说明足以使本领域技术人员能够实践本发明。本发明并不限于所保藏构建体的范围,因为所保藏实施方案意图作为本发明某些方面的单一例示,而且功能上相当的任何构建物都在本发明的范围内。本文中的材料保藏并非承认本文中所包含的书面说明不足以能够实践本发明的任何方面,包括其最佳模式,也不能解释为将权利要求的范围限制于它所描述的具体例示。

[0209] 实际上,根据上面的描述,除了本文所显示和描述的,本发明的多种修饰对于本领域技术人员是显而易见的,而且在所附权利要求的范围内。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 健泰科生物技术公司(GENENTECH, INC.)
[0003] <120> 补体相关眼疾的预防和治疗
[0004] <130> GNE-0244 PCT
[0005] <140> 未指定
[0006] <141> 随本文
[0007] <150> 60/939,791
[0008] <151> 2007-05-23
[0009] <160> 7
[0010] <170> PatentIn Ver. 3.3
[0011] <210> 1
[0012] <211> 233
[0013] <212> PRT
[0014] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
[0015] <400> 1
[0016] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[0017] 1 5 10 15
[0018] Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr
[0019] 20 25 30
[0020] Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val
[0021] 35 40 45
[0022] Asp Thr Asp Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg
[0023] 50 55 60
[0024] Gly Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg
[0025] 65 70 75 80
[0026] Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn
[0027] 85 90 95
[0028] Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn
[0029] 100 105 110
[0030] Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
[0031] 115 120 125
[0032] Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
[0033] 130 135 140
[0034] Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[0035] 145 150 155 160
[0036] Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
[0037] 165 170 175
[0038] Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

[0039]	180	185	190
[0040]	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His		
[0041]	195	200	205
[0042]	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val		
[0043]	210	215	220
[0044]	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0045]	225	230	
[0046]	<210> 2		
[0047]	<211> 464		
[0048]	<212> PRT		
[0049]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0050]	<400> 2		
[0051]	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
[0052]	1 5 10 15		
[0053]	Ala Tyr Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys		
[0054]	20 25 30		
[0055]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
[0056]	35 40 45		
[0057]	Thr Ser Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Lys Glu Arg Pro Gly Gln Gly Leu		
[0058]	50 55 60		
[0059]	Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn		
[0060]	65 70 75 80		
[0061]	Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn		
[0062]	85 90 95		
[0063]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
[0064]	100 105 110		
[0065]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[0066]	115 120 125		
[0067]	Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
[0068]	130 135 140		
[0069]	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
[0070]	145 150 155 160		
[0071]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
[0072]	165 170 175		
[0073]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
[0074]	180 185 190		
[0075]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
[0076]	195 200 205		
[0077]	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		

[0078]	210	215	220
[0079]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
[0080]	225	230	235
[0081]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
[0082]	245	250	255
[0083]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[0084]	260	265	270
[0085]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
[0086]	275	280	285
[0087]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[0088]	290	295	300
[0089]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[0090]	305	310	315
[0091]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[0092]	325	330	335
[0093]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[0094]	340	345	350
[0095]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[0096]	355	360	365
[0097]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0098]	370	375	380
[0099]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0100]	385	390	395
[0101]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0102]	405	410	415
[0103]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0104]	420	425	430
[0105]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0106]	435	440	445
[0107]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0108]	450	455	460
[0109]	<210> 3		
[0110]	<211> 259		
[0111]	<212> PRT		
[0112]	<213> 人 (Homo sapiens)		
[0113]	<400> 3		
[0114]	Met His Ser Ser Val Tyr Phe Val Ala Leu Val Ile Leu Gly Ala Ala		
[0115]	1	5	10
[0116]	Val Cys Ala Ala Gln Pro Arg Gly Arg Ile Leu Gly Gly Gln Glu Ala		15

[0117]	20	25	30
[0118]	Ala Ala His Ala Arg Pro Tyr Met Ala Ser Val Gln Val Asn Gly Thr		
[0119]	35	40	45
[0120]	His Val Cys Gly Gly Thr Leu Leu Asp Glu Gln Trp Val Leu Ser Ala		
[0121]	50	55	60
[0122]	Ala His Cys Met Asp Gly Val Thr Asp Asp Ser Val Gln Val Leu		
[0123]	65	70	75
[0124]	Leu Gly Ala His Ser Leu Ser Ala Pro Glu Pro Tyr Lys Arg Trp Tyr		
[0125]	85	90	95
[0126]	Asp Val Gln Ser Val Val Pro His Pro Gly Ser Arg Pro Asp Ser Leu		
[0127]	100	105	110
[0128]	Glu Asp Asp Leu Ile Leu Phe Lys Leu Ser Gln Asn Ala Ser Leu Gly		
[0129]	115	120	125
[0130]	Pro His Val Arg Pro Leu Pro Leu Gln Tyr Glu Asp Lys Glu Val Glu		
[0131]	130	135	140
[0132]	Pro Gly Thr Leu Cys Asp Val Ala Gly Trp Gly Val Val Thr His Ala		
[0133]	145	150	155
[0134]	Gly Arg Arg Pro Asp Val Leu His Gln Leu Arg Val Ser Ile Met Asn		
[0135]	165	170	175
[0136]	Arg Thr Thr Cys Asn Leu Arg Thr Tyr His Asp Gly Val Val Thr Ile		
[0137]	180	185	190
[0138]	Asn Met Met Cys Ala Glu Ser Asn Arg Arg Asp Thr Cys Arg Gly Asp		
[0139]	195	200	205
[0140]	Ser Gly Ser Pro Leu Val Cys Gly Asp Ala Val Glu Gly Val Val Thr		
[0141]	210	215	220
[0142]	Trp Gly Ser Arg Val Cys Gly Asn Gly Lys Lys Pro Gly Val Tyr Thr		
[0143]	225	230	235
[0144]	Arg Val Ser Ser Tyr Arg Met Trp Ile Glu Asn Ile Thr Asn Gly Asn		
[0145]	245	250	255
[0146]	Met Thr Ser		
[0147]	<210> 4		
[0148]	<211> 27		
[0149]	<212> DNA		
[0150]	<213> 人工序列		
[0151]	<220>		
[0152]	<223> 人工序列的描述:合成的引物		
[0153]	<400> 4		
[0154]	gatcgatatc gtratgachc artctca 27		
[0155]	<210> 5		

- [0156] <211> 21
- [0157] <212> DNA
- [0158] <213> 人工序列
- [0159] <220>
- [0160] <223> 人工序列的描述:合成的引物
- [0161] <400> 5
- [0162] tttdakytcc agcttggtag c 21
- [0163] <210> 6
- [0164] <211> 35
- [0165] <212> DNA
- [0166] <213> 人工序列
- [0167] <220>
- [0168] <223> 人工序列的描述:合成的引物
- [0169] <400> 6
- [0170] gatccgtacg ctcaggttca rytgcacarcar tctgg 35
- [0171] <210> 7
- [0172] <211> 43
- [0173] <212> DNA
- [0174] <213> 人工序列
- [0175] <220>
- [0176] <223> 人工序列的描述:合成的引物
- [0177] <400> 7
- [0178] acagtgggcc cttgggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

AMD 眼的布鲁赫氏膜中升高的因子 D 表达

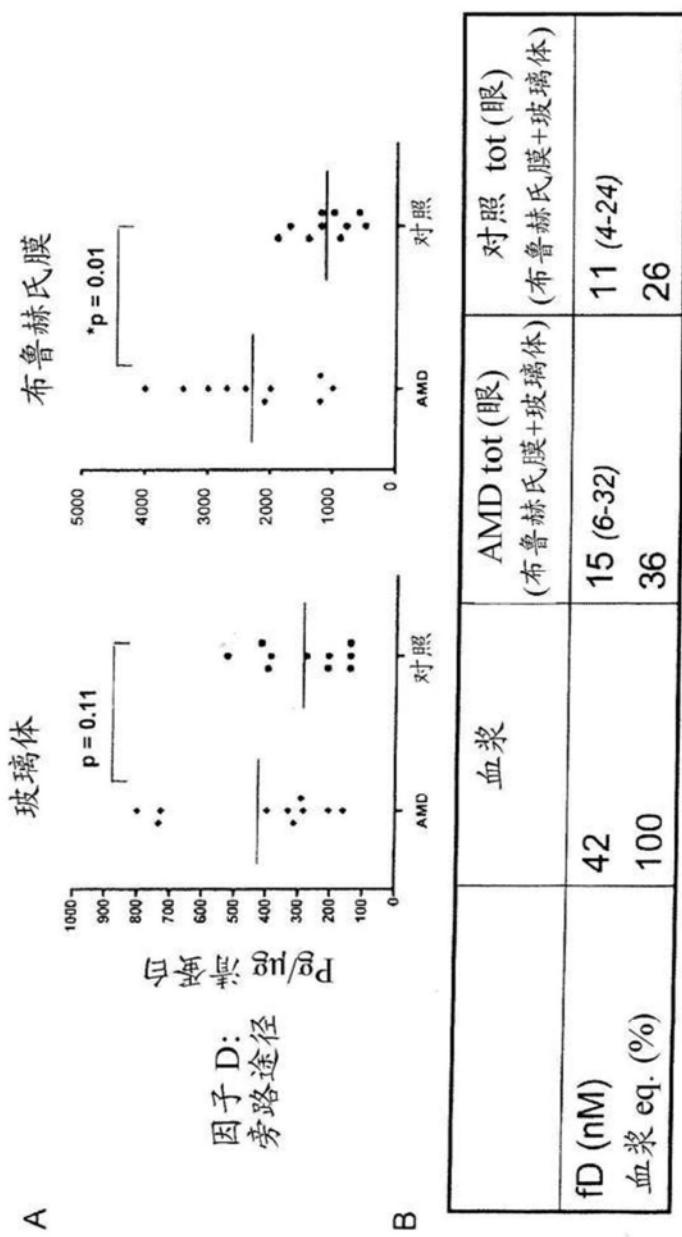


图1

因子D存在于AMD供体的玻璃疣、布鲁赫氏膜和脉络膜中

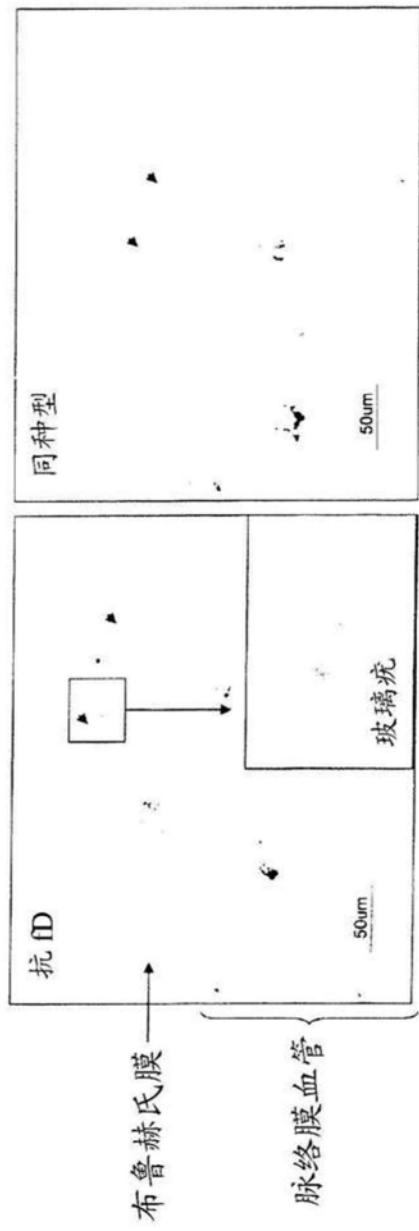
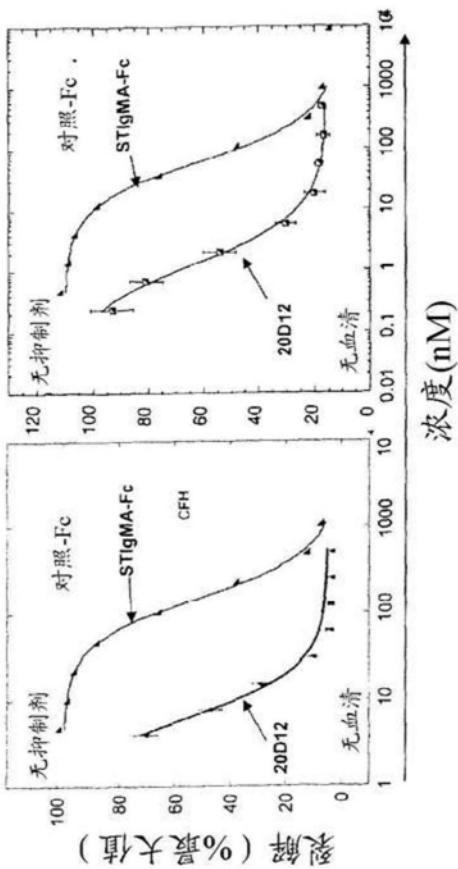


图2

因子 D 抗体克隆 20D12 的表征

AP 溶血测定法结果

人血清



表位	IC50 (nM)	IC90 (nM)	比*
20D12 B	1.3	0.02	9.3

* 比 $IC50 \alpha fD/STIgMA-Fc$

抗体 20D12 的序列

20D12 的轻链序列：

MGWSCIIFLVATATGVHSDIVMTQSQKFMSTSGDRVSVTCKASQNVDTD
VAWFQQKPGQSPRGLIYSASSRYSGVPDRFTGSGSQGTDFTLTISNVQSEDL
AEYFCQQYNNYPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCL
LNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20D12 的重链序列：

MGWSCIIFLVATATGAYAQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGTYFTSY
YMYWVKERPGQQGLEWIGEINPTNGGTFNEKFKSKATLTVDTSSNTAYMQ
LSSLTSEDSEAVYYCAREGGFAYWGQGTLVLT/SAASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGGLYSLSS
WTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPCCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTTPREEQYNSTYRWVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQQPREPQVYTLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWESNGQ
PENNYKTTPPVLDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCCSVMMHEALHNHY
TQKSLSSLSPGK

图4

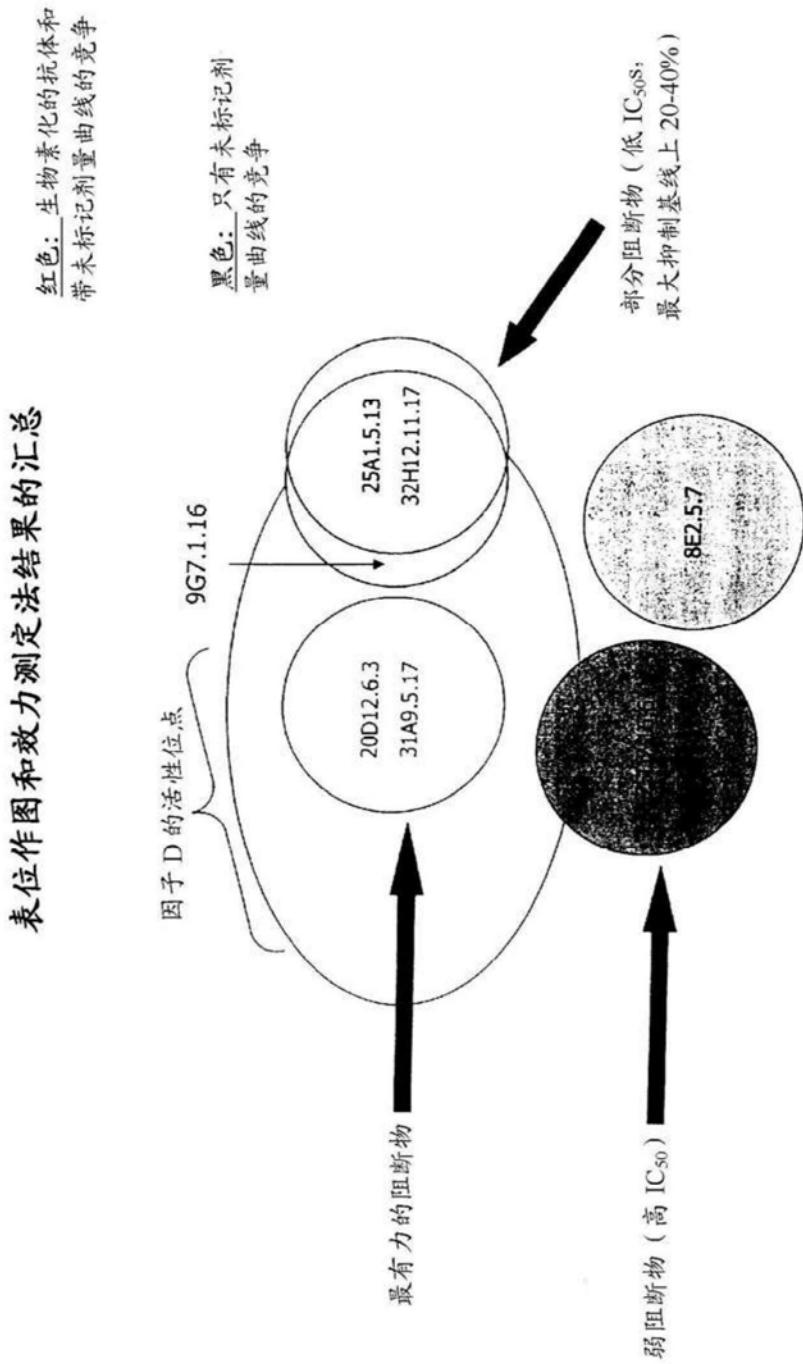


图5

人补体因子 D (NP 038487.1)

1 MHSSVYFVAL VILGAAVCAA QPRGRILGGQ FAAAHHARPYM
 41 ASVQVNGTHV CGGTLLEDEQW VLSAAHCMGDG VTDDDSVQVL
 81 LGAHSLSAPE PYKRWYDVQS VVPHPGSRPD SLEDDLILFK
 121 LSQNASLGPH VRPLPLQYED KEVEPGTLCD VAGWGVVTHA
 161 GRRPDVLHQL RVSIMNRTTC NLRTYHDGVV TINMMCAESN
 201 RRDTCRGDSG SPLVCGDAVE GVVTWGSRVC GNGKKPGVYT
 241 RVSSYRMWIE NITNGNMTS

图6

分析 AMD 中的补体成分

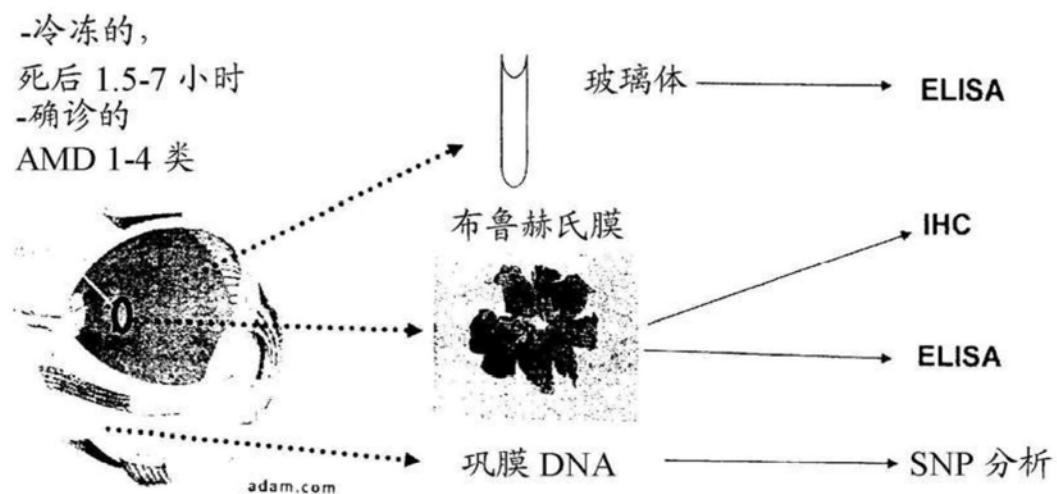


图7

研究中所使用的供体组织

编 号 #	年 龄	性 别	AMD 阶段	解剖记录	
				3	中 心 凹 痕, 少 数 的 黄 斑 玻 璃 痕 FS
1	78	F			无 明 显 玻 璃 痕
1A	78	F			地 理 性 萎 缩
2	85	M	4		无 明 显 玻 璃 痕 GA
2A	85	F			无 明 显 玻 璃 痕
3	87	F	4		中 心 凹 中 的 维 管 痕 痕 FS
3A	87	F			无 明 显 玻 璃 痕
4	76	M	4		地 理 性 萎 缩 GA
4A	74	M			存 在 两 个 小 的 玻 璃 痕
5	81	F	3+		中 等 黄 斑 玻 璃 痕 MD
5A	81	M			无 明 显 玻 璃 痕
6	84	F	3		众 多 黄 斑 玻 璃 痕 MD
6A	86	M			无 明 显 玻 璃 痕
7	83	F	4		中 心 凹 中 的 维 管 痕 痕 FS
7A	83	M			无 明 显 玻 璃 痕
8	72	M	4		中 心 凹 痕, 中 等 黄 斑 玻 璃 痕 FS
8A	71	F			无 明 显 玻 璃 痕
9	81	F	4		中 心 凹 痕, 中 等 黄 斑 玻 璃 痕 FS
9A	83	M			无 明 显 玻 璃 痕
10	77	M	3		众 多 黄 斑 玻 璃 痕 MD
10A	78	M			无 明 显 玻 璃 痕

- 地理性萎缩
 中心凹痕
 3 级 AMD

图 8