



(21) 申请号 201811364139.9

WO 9008822 A1,1990.08.09

(22) 申请日 2013.12.03

Yanagihara Shigehiro等.Production of novel anti-recombinant human

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109517063 A

erythropoietin monoclonal antibodies and develoment of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bioactive human erythropoietin.《Journal of Immunoassay & Immunochemistry》.2008,第29卷(第2期),第181-196页.

(43) 申请公布日 2019.03.26

(30) 优先权数据

61/733,566 2012.12.05 US

(62) 分案原申请数据

201380072233.6 2013.12.03

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

Watanabe D等.Erythropoeitin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy.《New England Journal of Medicine》.2005,第353卷(第8期),第782-792页.

(72) 发明人 J·高希 M·A·鲁茨

K·U·提索-达贾特

I·斯普劳斯基 M·罗古斯卡

Javey Golnaz等.Emerging pharmacotherapies for diabetic macular dedma.《Experimental Diabetes Research》.2012,第1-12页.

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 凌立 黄革生

Yanagihara Shigehiro等.Production of novel anti-recombinant human erythropoietin monoclonal antibodies and develoment of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bioactive human erythropoietin.《Journal of Immunoassay & Immunochemistry》.2008,第29卷(第2期),第181-196页.

(51) Int.Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104968678 B,2018.12.11

审查员 夏颖

权利要求书3页 说明书64页 附图2页

(54) 发明名称

靶向EPO的抗体的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制EPO的组合物和方法。

本发明提供结合EPO且能够抑制EPO依赖性细胞增殖和/或EPO依赖性细胞信号发放的抗体及其抗原结合片段。

1. 一种用于治疗视网膜血管病的包含抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中,所述抗体或其抗原结合片段以从0.1mg/眼至10mg/眼施用给受试者,并且其中所述抗体或其抗原结合片段结合EPO,且包含:

a) 分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

b) 分别如SEQ ID NO:21、22和23中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:24、25和26中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

c) 分别如SEQ ID NO:41、42和43中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:44、45和46中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

d) 分别如SEQ ID NO:61、62和63中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:64、65和66中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以从1mg/眼至9mg/眼玻璃体内地施用。

3. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以从2mg/眼至8mg/眼玻璃体内地施用。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以从3mg/眼至7mg/眼玻璃体内地施用。

5. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以从4mg/眼至6mg/眼玻璃体内地施用。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以从4.5mg/眼至5.5mg/眼玻璃体内地施用。

7. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以选自由以下组成的组的剂量玻璃体内地施用:0.1mg/眼、0.2mg/眼、0.3mg/眼、0.4mg/眼、0.5mg/眼、0.6mg/眼、0.7mg/眼、0.8mg/眼、0.9mg/眼、1mg/眼、2mg/眼、3mg/眼、4mg/眼和5mg/眼。

8. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段以5mg/眼玻璃体内地施用。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3,并且所述抗体或其抗原结合片段包含分别包含与SEQ ID NO:13和14具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

10. 根据权利要求9所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别具有如SEQ ID NO:15和16中所示的氨基酸序列的重链和轻链。

11. 根据权利要求1-8任一项所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别如SEQ ID NO:21、22和23中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:24、25和26中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3,并且所述抗体或其抗原结合片段包含分别包含与SEQ ID NO:33和34具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别具

有如SEQ ID NO:35和36中所示的氨基酸序列的重链和轻链。

13. 根据权利要求1-8任一项所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别如SEQ ID NO:41、42和43中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:44、45和46中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3,并且所述抗体或其抗原结合片段包含分别包含与SEQ ID NO:53和54具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别具有如SEQ ID NO:55和56中所示的氨基酸序列的重链和轻链。

15. 根据权利要求1-8任一项所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别如SEQ ID NO:61、62和63中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:64、65和66中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3,并且所述抗体或其抗原结合片段包含分别包含与SEQ ID NO:73和74具有至少90%同一性的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别具有如SEQ ID NO:75和76中所示的氨基酸序列的重链和轻链。

17. 根据权利要求1-16任一项所述的药物组合物,其中所述抗体或抗原结合片段是Fab。

18. 根据权利要求1-17任一项所述的药物组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段是在病毒载体中表达的。

19. 根据权利要求18所述的药物组合物,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

20. 根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述AAV载体是AAV2。

21. 根据权利要求19或20所述的药物组合物,其中所述AAV载体是在受试者中视网膜下地施用的。

22. 根据权利要求1-21任一项所述的药物组合物,其中所述视网膜血管病是糖尿病性黄斑水肿。

23. 根据权利要求1-21任一项所述的药物组合物,其中所述视网膜血管病是增生性糖尿病性视网膜病、黄斑水肿、年龄相关黄斑变性、或视网膜静脉阻塞。

24. 根据权利要求1-23任一项所述的药物组合物,其中该受试者被进一步施用抗血管内皮生长因子(VEGF)抗体、抗VEGF受体抗体、或VEGF抑制剂。

25. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述抗VEGF抗体是雷珠单抗(ranibizumab)。

26. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述抗VEGF抗体是贝伐单抗(bevacizumab)。

27. 根据权利要求24所述的药物组合物,其中所述抗VEGF抑制剂是阿柏西普(aflibercept)。

28. 抗体或其抗原结合片段在制造用于治疗EPO依赖性疾病的药物中的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

b) 分别如SEQ ID NO:21、22和23中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:24、25和26中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

c) 分别如SEQ ID NO:41、42和43中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:44、45和46中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

d) 分别如SEQ ID NO:61、62和63中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:64、65和66中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中EPO依赖性疾病是视网膜血管病。

30. 根据权利要求29的用途,其中所述视网膜血管病与选自以下的疾病或病症相关:糖尿病性视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、增生性糖尿病性视网膜病、非增生性糖尿病性视网膜病、年龄相关黄斑变性、视网膜静脉阻塞、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成和早产儿视网膜病。

31. 根据权利要求28所述的用途,其中EPO依赖性疾病是黄斑水肿。

32. 根据权利要求28所述的用途,其中EPO依赖性疾病是糖尿病性视网膜病。

33. 根据权利要求28所述的用途,其中EPO依赖性疾病是糖尿病性黄斑水肿。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段减少视网膜静脉扩张、减少血管渗漏和/或增加眼中的血流量。

35. 根据权利要求28所述的用途,其中EPO依赖性疾病是增生性糖尿病性视网膜病。

36. 抗体或其抗原结合片段在制造用于抑制EPO依赖性细胞增殖的药物中的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

b) 分别如SEQ ID NO:21、22和23中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:24、25和26中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

c) 分别如SEQ ID NO:41、42和43中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:44、45和46中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

d) 分别如SEQ ID NO:61、62和63中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:64、65和66中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

37. 抗体或其抗原结合片段在制造用于抑制表达EPO受体的细胞中的EPO依赖性细胞增殖的药物中的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 分别如SEQ ID NO:1、2和3中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:4、5和6中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

b) 分别如SEQ ID NO:21、22和23中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:24、25和26中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

c) 分别如SEQ ID NO:41、42和43中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:44、45和46中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3;或

d) 分别如SEQ ID NO:61、62和63中所示的重链可变区HCDR1、HCDR2和HCDR3,及分别如SEQ ID NO:64、65和66中所示的轻链可变区LCDR1、LCDR2和LCDR3。

38. 权利要求37的用途,其中细胞是B细胞。

## 靶向EPO的抗体的组合物和方法

[0001] 本申请是申请人于2013年12月3日提交的题为“靶向EPO的抗体的组合物和方法”的中国专利申请201380072233.6的分案申请。

### 背景技术

[0002] 糖尿病性视网膜病 (DR) 是糖尿病患者最常见的并发症。糖尿病性黄斑水肿 (DME) 可以发生在DR的任意阶段,是DR患者视力丧失的主要原因。已报道随访10年后DME的发生率在1型糖尿病中为20.1%,在2型胰岛素依赖性糖尿病中为25.4%,在2型非胰岛素依赖性糖尿病中为13.9% (Klein等 (1995) *Ophthalmology* 102,7-16)。ETDRS试验 ((1985) *Photocoagulation for Diabetic Macular Edema-Early Treatment Diabetic-Retinopathy Study Report.1.Archives of Ophthalmology* 103,1796-1806) (DR的开拓性研究) 证明,虽然激光光凝疗法使第3年DME眼中度视力丧失的风险降低~50%,但只有少数眼获得视力,一些眼甚至在强化治疗后也继续经历视力丧失。近年来,药物疗法和眼部药物递送的进步已显示在DME治疗中的前景。DME中两项关键III期试验之一的RESTORE研究 (Mitchell等 (2011) *Ophthalmology* 118,615-625) 证明,**Lucentis**® 优于激光单一疗法。主要临床终点最佳矫正视力 (BCVA) 的平均改变在 **Lucentis**® 组中显著改善 (**Lucentis**® 组的+6.1字母对激光组的+0.8字母;  $p < 0.0001$ )。用VEGF Trap-Eye (Regeneron Inc.NY,USA) 和**Ozurdex**® (地塞米松玻璃体内植入;Allergan Inc.,CA,USA) 证明了相似的有益作用 (Do等 (2011) *Ophthalmology* 118,1819-1826;Haller等 (2010) *Archives of Ophthalmology* 128,289-296)。但是,16%的Ozurdex治疗眼出现眼内压提高 (青光眼风险)。

[0003] 尽管有这些新的DME治疗选择,但仍存在大量未得到满足的医疗需要。**Lucentis**® 关键性试验中~25%的眼在12个月治疗后未获得任何视力,~50%的眼视力为20/40或更差。全基因组关联研究表明,促红细胞生成素 (Epo) 启动子多态性 (T) 纯合的糖尿病患者具有高2.17倍的风险发展增生性DR (Tong等 (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105,6998-7003)。有趣的是,与具有G等位基因的人相比,具有Epo的T启动子等位基因的人具有高约7.5倍的玻璃体 (vitreous) Epo浓度 (Tong等 (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105,6998-7003)。

[0004] 仍存在发展糖尿病性视网膜病尤其是DME的有效疗法来取代或补充现有疗法的需要。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及本文所述的结合Epo和/或Darbepoietin的抗体或抗原结合片段。

[0007] 本文所述的分离的抗体或抗原结合片段以小于或等于100pM的 $K_D$ 结合Epo和/或Darbepoietin。例如,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以以小于或等于50pM、小于或等于40pM、小于或等于35pM、小于或等于30pM、小于或等于25pM、小于或等于20pM、小于或等于15pM、小于或等于14pM、小于或等于13pM、小于或等于12pM、小于或等于11pM、小于或等于10pM的 $K_D$ 结合人Epo和/或Darbepoietin。更具体而言,本文所述的分离的抗体或抗原结

合片段还可以以通过Biacore测量的小于或等于35pM、或通过溶液平衡滴定 (SET) 测量的小于或等于6pM的 $K_D$ 结合人Epo。更具体而言,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以以通过Biacore测量的小于或等于24pM、或通过SET测量的小于或等于4pM的 $K_D$ 结合Darbepoietin。

[0008] 本发明涉及结合人、食蟹猴、小鼠和/或大鼠Epo的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还涉及结合含有选自人Epo螺旋D和环A-B的氨基酸的构象表位的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还涉及结合含有选自人Epo螺旋D、环A-B和螺旋A的氨基酸的构象表位的分离的抗体或其抗原结合片段。在本发明的具体方面,该分离的抗体或其抗原结合片段可以结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)。在其他方面,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以结合环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)。在其他方面,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以结合环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)和螺旋A(人Epo的氨基酸4-26;SEQ ID NO:86)。在本发明的其他方面,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)和环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)。还在本发明的其他方面,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)和螺旋A(人Epo的氨基酸4-26;SEQ ID NO:86)。还在本发明的其他方面,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段可以结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)、环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)和螺旋A(人Epo的氨基酸4-26;SEQ ID NO:86)。

[0009] 本发明还涉及结合Epo上的含有人Epo (SEQ ID NO.81) 的氨基酸残基Thr44、Lys45、Val46、Asn47、Phe48、Tyr49、Ala50、Lys52、Arg53、Asn147、Arg150、Gly151、Lys154、Leu155、Glu159和Arg162的构象表位的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还涉及结合Epo上的含有人Epo (SEQ ID NO.81) 的氨基酸残基Ser9、Gln13、Thr44、Lys45、Val46、Asn47、Phe48、Tyr49、Ala50、Lys52、Arg53、Asn147、Arg150、Gly151、Lys154、Leu155、Gly158、Glu159和Arg162的构象表位的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还进一步涉及结合Epo上的含有人Epo (SEQ ID NO.81) 的氨基酸残基Glu23、Asp43、Thr44、Lys45、Val46、Asn47、Phe48、Tyr49、Ala50、Lys52、Arg53、Arg131、Arg143、Asn147、Arg150、Gly151、Lys154、Leu155、Glu159和Arg162的构象表位的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0010] 本发明还涉及结合Epo且进一步与表1中所述的抗体竞争结合的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明还进一步涉及结合与表1中所述的抗体相同的表位的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0011] 本发明还涉及结合Epo且具有大于8.2、大于8.3、大于8.4、大于8.5或大于9.0的等电点 (pI) 的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0012] 本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以以小于或等于100pM、小于或等于80pM、小于或等于70pM、小于或等于60pM、小于或等于50pM、小于或等于40pM、小于或等于35pM、小于或等于30pM、小于或等于25pM、小于或等于20pM、小于或等于15pM、小于或等于10pM、小于或等于5pM、小于或等于4pM、小于或等于3pM、小于或等于2pM、小于或等于1pM的 $K_D$ 结合食蟹猴Epo、小鼠Epo和/或大鼠Epo。更具体而言,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以以通过Biacore测量的小于或等于80pM、或SET测量的小于或等于40pM的 $K_D$ 结合

食蟹猴Epo、小鼠Epo和/或大鼠Epo。更具体而言,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以通过Biacore测量的小于或等于80pM、或通过SET测量的小于或等于8pM的 $K_D$ 结合食蟹猴Epo。更具体而言,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以通过Biacore测量的小于或等于45pM、或通过SET测量的小于或等于37pM的 $K_D$ 结合小鼠Epo。更具体而言,本文所述的分离的抗体或抗原结合片段还可以通过Biacore测量的小于或等于57pM、或通过SET测量的小于或等于13pM的 $K_D$ 结合大鼠Epo。

[0013] 本文所述的分离的抗体和抗原结合片段的结合亲和力可以通过SET来测定。进行SET的方法为本领域已知,并在下文中进一步详述。备选地,本文所述的分离的抗体或片段的结合亲和力可以通过Biacore测定来测定。进行Biacore动力学测定的方法为本领域已知,并在下文中进一步详述。

[0014] 本文所述的分离的抗体和抗原结合片段可以用于以小于或等于350pM、小于或等于300pM、小于或等于250pM、小于或等于200pM、小于或等于190pM、小于或等于180pM、小于或等于175pM、小于或等于170pM、小于或等于160pM、小于或等于150pM、小于或等于125pM、小于或等于115pM、小于或等于110pM、小于或等于100pM、小于或等于90pM或小于或等于80pM的 $IC_{50}$ 抑制Epo依赖性细胞增殖。更具体而言,本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以以小于或等于338pM、小于或等于183pM、小于或等于175pM、小于或等于174pM、小于或等于145pM、小于或等于112pM、小于或等于89pM或小于或等于74pM的 $IC_{50}$ 抑制通过体外Ba/F3-EpoR细胞增殖测定测量的Epo依赖性细胞增殖。

[0015] 本文所述的分离的抗体和抗原结合片段可以用于抑制B细胞的Epo依赖性细胞增殖。更具体而言,本文所述的分离的抗体和抗原结合片段可以用于抑制小鼠B细胞的Epo依赖性细胞增殖。例如,分离的抗体或其抗原结合片段可以以小于或等于350pM、小于或等于300pM、小于或等于250pM、小于或等于200pM、小于或等于175pM、小于或等于150pM、小于或等于125pM、小于或等于115pM、小于或等于110pM、小于或等于100pM、小于或等于90pM或小于或等于80pM的 $IC_{50}$ 抑制通过体外Ba/F3-EpoR细胞增殖测定测量的Epo依赖性细胞增殖。更具体而言,本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以以小于或等于338pM、小于或等于174pM、小于或等于112pM或小于或等于74pM的 $IC_{50}$ 抑制通过体外Ba/F3-EpoR细胞增殖测定测量的Epo依赖性细胞增殖。

[0016] 本文所述的分离的抗体和抗原结合片段可以用于抑制人B细胞的Epo依赖性细胞增殖。例如,分离的抗体或其抗原结合片段可以以小于或等于200pM、小于或等于190pM、小于或等于180pM、小于或等于170pM、小于或等于160pM、小于或等于150pM、小于或等于125pM、小于或等于100pM或小于或等于90pM的 $IC_{50}$ 抑制通过体外F36E细胞增殖测定测量的Epo依赖性细胞增殖。更具体而言,本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以以小于或等于183pM、小于或等于175pM、小于或等于145pM或小于或等于89pM的 $IC_{50}$ 抑制通过体外F36E细胞增殖测定测量的Epo依赖性细胞增殖。

[0017] 分离的抗体或其抗原结合片段还可以阻断Epo与Epo受体的结合和/或阻止Epo结合至细胞表面。

[0018] 本发明的另一方面包括特异性结合人、食蟹猴、小鼠和/或大鼠Epo的分离的抗体或其抗原结合片段。在另一方面,该分离的抗体或抗原结合片段与表1中所述的抗体或抗原结合片段竞争结合。

[0019] 本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体、人或人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、Fv片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、或ScFv片段、和/或IgG同种型。

[0020] 本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段还可以包含这样的构架,其中氨基酸残基已取代为来自各人VH或VL种系序列的抗体构架。

[0021] 本发明的另一方面包括具有表1中所述Fab的全长重链和轻链序列的分离的抗体或其抗原结合片段。更具体而言,该分离的抗体或其抗原结合片段可以具有Fab NVS1、NVS2、NVS3或NVS4的重链和轻链序列。

[0022] 本发明的另一方面包括具有表1中所述Fab的重链和轻链可变结构域序列的分离的抗体或其抗原结合片段。更具体而言,该分离的抗体或其抗原结合片段可以具有Fab NVS1(分别为SEQ ID NO 13和14)、NVS2(分别为SEQ ID NO 33和34)、NVS3(分别为SEQ ID NO 53和54)或NVS4(分别为SEQ ID NO 73和74)的重链和轻链可变结构域序列。

[0023] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含选自SEQ ID NO1、21、41和61的重链CDR1,选自SEQ ID NO:2、22、42和62的重链CDR2,及选自SEQ ID NO:3、23、43和63的重链CDR3,其中该分离的抗体或其抗原结合片段结合人Epo。在另一方面,这种分离的抗体或其抗原结合片段进一步包含选自SEQ ID NO:4、24、44和64的轻链CDR1,选自SEQ ID NO 5、25、45和65的轻链CDR2,及选自SEQ ID NO 6、26、46和66的轻链CDR3。

[0024] 本发明还涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含选自SEQ ID NO:4、24、44和64的轻链CDR1,选自SEQ ID NO 5、25、45和65的轻链CDR2,及选自SEQ ID NO 6、26、46和66的轻链CDR3,其中该分离的抗体或其抗原结合片段结合人Epo。

[0025] 本发明还涉及具有HCDR1、HCDR2、HCDR3和LCDR1、LCDR2、LCDR3的结合Epo的分离的抗体或其抗原结合片段,其中HCDR1、HCDR2、HCDR3包含SEQ ID NO:1、2、3,而LCDR1、LCDR2、LCDR3包含SEQ ID NO:4、5、6;或HCDR1、HCDR2、HCDR3包含SEQ ID NO:21、22、23,而LCDR1、LCDR2、LCDR3包含SEQ ID NO:24、25、26;或HCDR1、HCDR2、HCDR3包含SEQ ID NO:41、42、43,而LCDR1、LCDR2、LCDR3包含SEQ ID NO:44、45、46;或HCDR1、HCDR2、HCDR3包含SEQ ID NO:61、62、63,而LCDR1、LCDR2、LCDR3包含SEQ ID NO:64、65、66。

[0026] 本发明还涉及这样的抗体或抗原结合片段,其具有如Chothia所定义的SEQ ID NO:13、33、53或73的可变重链的HCDR1、HCDR2和HCDR3,及SEQ ID NO:14、34、54或74的可变轻链的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在本发明的另一方面,该抗体或抗原结合片段可以具有如Kabat所定义的SEQ ID NO:13、33、53或73的可变重链的HCDR1、HCDR2和HCDR3,及SEQ ID NO:14、34、54或74的可变轻链的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0027] 在本发明的一个方面,该分离的抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:13、33、53和73的重链可变结构域(VH)序列。该分离的抗体或其抗原结合片段可以进一步包含轻链可变结构域(VL)序列,其中该重链可变结构域和轻链可变结构域组合形成Epo的抗原结合部位。具体而言,该轻链可变结构域序列可以选自SEQ ID NO:14、34、54和74,其中该分离的抗体或其抗原结合片段结合Epo。

[0028] 本发明还涉及包含选自SEQ ID NO:14、34、54和74的轻链可变结构域序列的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该分离的抗体或其抗原结合片段结合人Epo。该分离的抗体或抗原结合片段可以进一步包含重链可变结构域序列,其中该轻链可变结构域序列和重链可变结构域组合形成Epo的抗原结合部位。



[0029] 具体而言,结合Epo的分离的抗体或其抗原结合片段可以具有分别包含SEQ ID NO:13和14、33和34、53和54或73和74的序列的重链和轻链可变结构域。

[0030] 本发明进一步涉及包含与选自SEQ ID NO:13、33、53和73的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变结构域的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体结合Epo。在一方面,该分离的抗体或其抗原结合片段还包含与选自SEQ ID NO:14、34、54和74的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变结构域。在本发明的另一方面,该分离的抗体或抗原结合片段具有如Kabat所定义和如表1中所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3。还考虑HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3可以如Chothia所定义和如表1中所述。

[0031] 本发明还涉及具有与选自SEQ ID NO:14、34、54和74的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变结构域的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体结合Epo。

[0032] 在本发明的另一方面,结合Epo的分离的抗体或其抗原结合片段可以具有包含SEQ ID NO:15、35、55或75的序列的重链。该分离的抗体还可以包含可以与该重链组合形成对人Epo的抗原结合部位的轻链。具体而言,该轻链可以具有包含SEQ ID NO:16、36、56或76的序列。具体而言,结合Epo的分离的抗体或其抗原结合片段可以具有分别包含SEQ ID NO:15和16、35和36、55和56或75和76的序列的重链和轻链。

[0033] 本发明还进一步涉及包含与选自SEQ ID NO:15、35、55和75的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的重链的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体结合Epo。在一方面,该分离的抗体或其抗原结合片段还可以包含与选自SEQ ID NO:16、36、56和76的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链。

[0034] 本发明还进一步涉及包含与选自SEQ ID NO:16、36、56和76的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的轻链的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体结合Epo。

[0035] 本发明还涉及包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。以及与可药用载体组合的抗体组合物。具体而言,本发明进一步包括含有表1的抗体或其抗原结合片段(例如抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4)的药物组合物。本发明还涉及包含表1的两种或多种分离的抗体或其抗原结合片段的组合的药物组合物。

[0036] 本发明还涉及编码具有选自SEQ ID NO:13、33、53和73的序列的可变重链的分离的核酸序列。具体而言,该核酸具有与选自SEQ ID NO:17、37、57和77的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在本发明的具体方面,该序列是SEQ ID NO:17、37、57或77。

[0037] 本发明还涉及编码具有选自SEQ ID NO:14、34、54和74的序列的可变轻链的分离的核酸序列。具体而言,该核酸具有与选自SEQ ID NO:18、38、58和78的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在本发明的具体方面,该序列是SEQ ID NO:18、38、58或78。

[0038] 本发明还涉及包含编码这样的多肽的序列的分离的核酸,该多肽包含与选自SEQ ID NO:18、38、58和78的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列

同一性的轻链可变结构域。

[0039] 本发明还涉及包含本文所述的一种或多种核酸分子的载体。

[0040] 本发明还涉及包含本文所述的一种或多种核酸分子或载体的分离的宿主细胞。本发明还涉及包含编码上述抗体的重链的重组DNA序列和编码上述抗体的轻链的第二重组DNA序列的分离的宿主细胞,其中该DNA序列与启动子有效连接,且能够在该宿主细胞中表达。考虑该抗体可以是人单克隆抗体。还考虑该宿主细胞是非人哺乳动物细胞,例如CHO细胞。

[0041] 本发明还涉及抑制Epo依赖性细胞增殖的方法,其中该方法包括使Epo(例如使个体中的Epo)与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。在一方面,该方法包括使细胞(例如包含Epo的细胞)与包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触。本发明还涉及用于抑制个体中的Epo依赖性细胞增殖的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。考虑该细胞是人细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。

[0042] 本发明还涉及抑制Epo依赖性细胞信号发放的方法,其中该方法包括使Epo与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触,以阻止Epo与细胞表面受体相互作用的步骤。在一方面,该方法包括使包含Epo的细胞与含有本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触。本发明还涉及用于抑制个体中的Epo依赖性细胞信号发放的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。考虑该细胞是人细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。

[0043] 本发明还涉及抑制Epo依赖性细胞增殖或信号发放的方法,其中该方法包括使Epo与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触,以阻止Epo与细胞表面受体相互作用的步骤。考虑该细胞是B细胞。考虑该细胞是人细胞。

[0044] 本发明还涉及抑制Epo与Epo受体结合的方法,其中该方法包括使Epo(例如使个体中的Epo)与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于抑制Epo与个体细胞上的Epo受体结合的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。考虑该细胞是人细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。

[0045] 本发明还进一步涉及抑制Epo与细胞结合的方法,其中该方法包括使(例如个体中的)Epo与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。在一方面,该方法包括使细胞(例如包含Epo的细胞)与包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触。本发明还进一步涉及用于抑制Epo与个体中的细胞结合的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。在一方面,考虑该细胞是人细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。

[0046] 本发明还涉及在个体中治疗黄斑水肿的方法,其中该方法包括对该个体施用有效量的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于在个体中治疗黄斑水肿的包含本文所述抗

体或其抗原结合片段的组合物。一方面,黄斑水肿与视网膜血管病相关。考虑与黄斑水肿相关的视网膜血管病可以包括糖尿病性视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、增生性糖尿病性视网膜病、非增生性糖尿病性视网膜病、年龄相关黄斑变性、视网膜静脉阻塞、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成或早产儿视网膜病。还考虑该个体是人。

[0047] 本发明还涉及在个体中治疗视网膜血管病相关病症或障碍的方法,其中该方法包括对该个体施用有效量的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于在个体中治疗视网膜血管病相关病症或障碍的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物。在一方面,考虑该视网膜血管病相关病症或障碍是糖尿病性视网膜病。在另一方面,考虑该病症或障碍是年龄相关黄斑变性。还进一步考虑该视网膜血管病相关病症或障碍可以是视网膜静脉阻塞、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成或早产儿视网膜病。还考虑该个体是人。

[0048] 本发明还涉及在个体中治疗糖尿病性视网膜病相关病症或障碍的方法,其中该方法包括对该个体施用有效量的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于在个体中治疗糖尿病性视网膜病相关病症或障碍的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物。考虑该个体是人。

[0049] 本发明还涉及在个体中治疗黄斑水肿相关病症或障碍的方法,其中该方法包括对该个体施用有效量的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于在个体中治疗黄斑水肿相关病症或障碍的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物。进一步考虑该黄斑水肿相关病症或障碍是糖尿病性黄斑水肿。进一步考虑该个体是人。

[0050] 本发明还涉及在个体中治疗增生性糖尿病性视网膜病的方法,其中该方法包括对该个体施用有效量的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤;具体而言,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于在个体中治疗增生性糖尿病性视网膜病的包含本文所述抗体或其抗原结合片段的组合物。进一步考虑对该个体的眼施用该组合物,其中该组合物减少视网膜静脉扩张、减少血管渗漏和/或增加眼中的血流量。进一步考虑该个体是人。

[0051] 前述分离的抗体或其抗原结合片段中的任一种可以是单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0052] 定义

[0053] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解相同的含义。

[0054] 本文所用的术语“抗体”意指完整抗体及其任意抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。完整抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由CH1、CH2和CH3三个结构域组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由CL一个结构域组成。VH和VL区可进一步细分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其中散布更保守的称为构架区(FR)的区域。每个VH和VL由三个CDR和4个FR组成,从氨基端到羧基端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与

抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0055] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”指完整抗体的一个或多个片段,其保留特异性结合给定抗原(例如促红细胞生成素:Epo)的能力。抗体的抗原结合功能可以由完整抗体的片段执行。涵盖在术语抗体的抗原结合部分或抗原结合片段之内的结合片段的实例包括:Fab片段(由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段);F(ab)<sub>2</sub>片段,包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域或VL结构域组成的单结构域抗体(dAb)片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546);及分离的互补决定区(CDR)。

[0056] 此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但可用重组方法,通过人工肽接头将它们连接,该人工肽接头使得它们能够制备成单条蛋白质链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等,1988Science 242:423-426;和Huston等,1988Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。这类单链抗体包括抗体的一个或多个抗原结合部分或片段。用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并筛选该片段,以与完整抗体相同的方式使用该片段。

[0057] 抗原结合片段也可掺入到单结构域抗体、巨型抗体(maxibody)、微型抗体(minibody)、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如Hollinger和Hudson,2005,Nature Biotechnology,23,9,1126-1136)。抗体的抗原结合部分可移植入基于多肽如III型纤连蛋白(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199,其描述了纤连蛋白多肽单抗体)。

[0058] 抗原结合片段可掺入到包含一对串联Fv区段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,该串联Fv区段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等,1995Protein Eng.8(10):1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0059] 本文所用的术语“亲和力”指抗体与抗原在单个抗原部位上相互作用的强度。在每一抗原部位中,抗体“臂”的可变区与抗原在许多位点上通过弱的非共价力相互作用;相互作用越多,亲和力越强。本文所用的术语抗体或其抗原结合片段(例如Fab片段)的“高亲和力”通常指具有10<sup>-9</sup>M或更小的KD的抗体或抗原结合片段。

[0060] 术语“氨基酸”指天然存在和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸时由遗传密码编码的那些,以及随后修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即结合氢的α-碳、羧基、氨基和R基团)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。这类类似物具有经修饰的R基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥功能的化合物。

[0061] 本文所用的术语“结合特异性”指单个抗体结合部位仅与一个抗原决定簇反应的能力。

[0062] 短语与抗体(例如Epo结合抗体)“特异性(或选择性)结合”指确定关联抗原(例如人Epo或食蟹猴Epo)在蛋白质和其它生物制品的异源群体中的存在的结合反应。短语“识别

抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

[0063] 术语“视网膜血管病相关病症或障碍”指其中视网膜变性或变得功能异常的病症、障碍或疾病。这包括糖尿病性视网膜病 (DR)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、增生性糖尿病性视网膜病 (PDR)、非增生性糖尿病性视网膜病 (NPDR)、年龄相关黄斑变性 (AMD)、视网膜静脉阻塞 (RVO)、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成或早产儿视网膜病。可以通过Epo抑制来治疗的视网膜血管病的解剖特征包括黄斑水肿、静脉扩张、血管迂曲、荧光素血管造影术测量的血管渗漏、视网膜出血、及微血管异常 (例如微动脉瘤、棉絮斑、IRMA)、毛细血管脱落、白细胞黏附、视网膜局部缺血、视盘新血管形成、后极新血管形成、虹膜新血管形成、视网膜内出血、玻璃体出血、黄斑瘢痕、视网膜下纤维化和视网膜纤维化。

[0064] 术语“糖尿病性视网膜病相关病症或障碍”指其中视网膜由于糖尿病 (1型或2型) 对视网膜血管系统、视网膜代谢、视网膜色素上皮、血液视网膜屏障、或高级糖化终产物 (AGE) 的眼水平、醛糖还原酶活性、糖基化血红蛋白和蛋白激酶C的影响而变性或变得功能异常的病症。糖尿病性视网膜病患者中的视力丧失可以是视网膜局部缺血、黄斑水肿、血管渗漏、玻璃体出血的结果,或是提高的葡萄糖水平对视网膜神经元的直接影响。可以通过Epo抑制来治疗的糖尿病性视网膜病的解剖特征包括微动脉瘤、棉絮斑、静脉扩张、黄斑水肿、视网膜内微血管异常 (IRMA)、视网膜内出血、血管增生、视盘新血管形成、发红和视网膜局部缺血。“糖尿病性黄斑水肿”发生在患有糖尿病性视网膜病的个体中,且可以发生在该疾病的任意阶段。

[0065] 术语“黄斑水肿相关病症或障碍”指其中黄斑由于视网膜血管渗液、“黄斑水肿”而发生肿胀或增厚的病症或障碍。黄斑水肿发生在视网膜血管病中,且通常是视网膜血管病的并发症。具体的黄斑水肿相关病症或障碍包括糖尿病性视网膜病、糖尿病性黄斑水肿、增生性糖尿病性视网膜病、非增生性糖尿病性视网膜病、年龄相关黄斑变性、视网膜静脉阻塞、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成或早产儿视网膜病。可以通过眼底检查、光学相干断层扫描和改善的视力来测定Epo的抑制对黄斑水肿的治疗。

[0066] 术语“嵌合抗体”是抗体分子,其中 (a) 改变、替换或交换恒定区或其部分,使得抗原结合部位 (可变区) 连接到不同的或改变类型的效应子功能和/或物种,或者完全不同的分子 (其赋予嵌合抗体新的特性,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等) 的恒定区上;或 (b) 用具有不同的或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换可变区或其部分。例如,可以通过用来自人免疫球蛋白的恒定区替换其恒定区来修饰小鼠抗体。由于用人恒定区替换,嵌合抗体可保留其在识别抗原中的特异性,同时与最初的小鼠抗体相比在人中具有降低的免疫原性。

[0067] 术语“Epo蛋白”或“Epo抗原”或“EPO”或“Epo”可互换使用,指不同物种中的促红细胞生成素蛋白。例如,人Epo具有表1中所示的序列SEQ ID NO:81。表1中提供了来自其他物种的Epo蛋白的序列:SEQ ID NO:82、83、84或85。人、食蟹猴、小鼠、大鼠和兔Epo的蛋白质序列公开可得并在表1中描述。人Epo还可以是高糖基化的。高糖基化Epo在本领域中也称为“darbepoietin”,且可以从包括LEK Pharmaceuticals的多种来源获得。

[0068] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列二者。对于特定核酸序列,保守修饰的变体指编码相同或基本相同氨基酸序列的那些核酸,或者在该核酸不编码氨基酸序

列时,则指基本相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任意给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。因此,在每一位置上(其中密码子确定丙氨酸),可将密码子改变成所述任意对应的密码子,而不改变所编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其为保守修饰变异的一种。本文编码多肽的每一核酸序列也描述了该核酸的每一种可能的沉默变异。本领域技术人员将认识到,可修饰核酸中的每一密码子(除了AUG(其通常是甲硫氨酸的唯一密码子)和TGG(其通常是色氨酸的唯一密码子)),以产生功能上相同的分子。因此,在每一所述序列中暗含了编码多肽的核酸的每一沉默变异。

[0069] 对于多肽序列,“保守修饰的变体”包括对多肽序列的各取代、缺失或添加,其导致用化学上类似的氨基酸取代氨基酸。提供功能上类似的氨基酸的保守替换表为本领域所熟知。此类保守修饰变体附加至而不排斥本发明的多态性变体、种间同源物和等位基因。以下8组含有彼此为保守替换的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如,Creighton,Proteins(1984))。在一些实施方案中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0070] 术语“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团,如氨基酸或糖侧链组成,且通常具有特异的三维结构特征,以及特异的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,与前者而不是后者的结合在变性溶剂的存在下丧失。

[0071] 本文所用的术语“人抗体”旨在包括具有其中构架区和CDR区二者都源自人来源的序列的可变区的抗体。此外,如果该抗体包含恒定区,则该恒定区也源自这类序列,例如人种系序列,或人种系序列的突变形式。本发明的人抗体可包括不由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0072] 术语“人单克隆抗体”指展示单一结合特异性的抗体,其具有如下可变区,其中构架区和CDR区都源自人序列。在一个实施方案中,通过杂交瘤产生人单克隆抗体,该杂交瘤包括:(i) 从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞;(ii) 该B细胞与永生化细胞融合。

[0073] “人源化”抗体是保留非人抗体的反应性,同时在人类中免疫原性较低的抗体。这例如可通过保留非人CDR区并用它们的人类对应物替换抗体的其余部分(即恒定区,以及可变区的构架部分)来达到。见例如Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,1984;Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92,1988;Verhoeyen等,Science,239:1534-1536,1988;Padlan,Molec.Immun.,28:489-498,1991;及Padlan,Molec.Immun.,31:169-217,1994。人改造技术的其他实例包括但不限于US 5,766,886中公开的Xoma技术。

[0074] 在两条或更多核酸或多肽序列的背景中,术语“同一的”或100%百分比“同一性”指相同的两条或更多序列或子序列。在为了比较窗内或指定区域内的最大对应而用以下序列比较算法之一或通过手工比对和视觉检查测量来比较和比对时,如果两条序列具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在特定区域内,或在不指定时,在全长序列内60%同一性,可选地65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),那么两条序列“基

本相同”。可选地,同一性存在于长度至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域,或更优选地在长度为100至500或1000或更多核苷酸(或20、50、200或更多氨基酸)的区域。

[0075] 对于序列比较,通常一条序列作为参考序列,测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时,将测试和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数,或可指定备选参数。序列比较算法然后基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0076] 本文所用的“比较窗口”包括参考选自20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150的任一数目的相邻位置的区段,其中可在两条序列进行最佳比对后将序列与相同数目相邻位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法为本领域所熟知。例如可通过Smith和Waterman(1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法、通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988的搜索相似性法、通过这些算法的计算机化执行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)、或通过手工比对和视觉检查(参见例如Brent等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbrou ed., 2003))来进行序列最佳比对用于比较。

[0077] 适合于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977;和Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990中。用于进行BLAST分析的软件可通过National Center for Biotechnology Information公开获得。此算法涉及首先通过鉴定查询序列中长度为W的短字来鉴定高得分序列对(HSP),当与数据库序列中相同长度的字比对时,该短字匹配或满足某一正值阈值得分T。T称为邻近字得分阈值(Altschul等,上文)。这些初始邻近字命中作为起始搜索的种子,以发现含有它们的更长HSP。只要可增加累积比对得分,则沿每一序列的两个方向延伸字命中。对于核苷酸序列,用参数M(对一对匹配残基的奖赏得分;总是大于0)和N(对错配残基的罚分;总是小于0)计算累积得分。对于氨基酸序列,用得分矩阵来计算累积得分。在累积比对得分从其最高达到值跌落X量、累积得分由于一个或更多负得分残基比对的累积而到达零或以下、或到达任一序列的末端时,停止字命中在每一方向上的延伸。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用默认字长(W) 11、期望值(E) 10、M=5、N=-4和两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用默认字长3、期望值(E) 10和BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989)比对(B) 50、期望值(E) 10、M=5、N=-4和两条链的比较。

[0078] BLAST算法也进行两条序列之间相似性的统计学分析(参见例如, Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993)。BLAST算法提供了一种相似性测量是最小总和概率(P(N)),其提供两条核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率低于约0.2、更优选低于约0.01、最优选低于约0.001,那么认为核酸与参考序列相似。

[0079] 也可使用已经整合入ALIGN程序(版本2.0)的E. Meyers和W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988)的算法,使用PAM120加权残基表、缺口长度罚分12

和缺口罚分4测定两条氨基酸序列之间的百分比同一性。此外,可使用已经整合入GCG软件包(可在www.gcg.com上获得)中的GAP程序的Needleman和Wunsch(J.Mol,Biol.48:444-453,1970)算法,使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,以及空位加权16、14、12、10、8、6或4和长度加权1、2、3、4、5或6来测定两条氨基酸序列之间的百分比同一性。

[0080] 除了上文指出的百分比序列同一性外,两条核酸序列或多肽基本相同的另一指示是第一条核酸编码的多肽与针对第二条核酸编码的多肽产生的抗体免疫交叉反应,如下文所述。因此,例如,在两条肽仅因保守取代而不同时,多肽通常与第二条多肽基本相同。两条核酸序列基本相同的另一指示是两个分子或其互补序列在严格条件下彼此杂交,如下文所述。两条核酸序列基本相同的又一指示是可用相同的引物来扩增该序列。

[0081] 术语“抑制Epo依赖性细胞增殖”指抗-Epo抗体干扰Epo刺激和/或诱导的细胞激活(例如细胞信号发放)、复制和/或增殖的能力。具体而言,“抑制”指在与本文所述的抗-Epo抗体或其片段接触后,相对于对照,个体中的Epo依赖性细胞增殖或其他参数(例如Epo依赖性细胞信号发放、血管发生)的统计上显著的减少(即 $p < 0.05$ )。本文所用的“抑制Epo依赖性细胞增殖”还可以指用本文所述抗-Epo抗体在诊断为患有下文所述的视网膜血管病相关病症或障碍的患者中治疗后,视觉功能或视网膜解剖学的临床相关改善。

[0082] 本文所用的“抑制Epo依赖性细胞信号发放”指本文所述的抗-Epo抗体产生Epo刺激或诱导的胞内信号传导途径的统计上显著(即 $p < 0.05$ )的减少的能力。

[0083] 术语“分离的抗体”指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如特异性结合Epo的分离的抗体基本不含特异性结合Epo以外的抗原的抗体)。但是,特异性结合EPO的分离的抗体可以对其他抗原具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本不含其他细胞物质和/或化学药品。

[0084] 术语“同种型”指由重链恒定区基因提供的抗体种类(例如,IgM、IgE、IgG,如IgG1或IgG4)。同种型还包括这些种类之一的修饰形式,其中进行修饰来改变Fc功能,例如以增强或减低效应子功能或与Fc受体的结合。同种型也指由轻链恒定区提供的抗体种类(例如 $\kappa$ 、 $\lambda$ )。

[0085] 本文所用的术语“Kassoc”或“Ka”旨在指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而本文所用的术语“Kdis”或“Kd”旨在指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文所使用的术语“ $K_D$ ”旨在指解离平衡常数,其从Kd与Ka的比值(即 $Kd/Ka$ )获得,并表示为摩尔浓度(M)。抗体的 $K_D$ 值可以用本领域完善的方法测定。用于测定抗体 $K_D$ 的方法包括用生物传感系统如Biacore<sup>®</sup>系统测量表面等离子共振,或通过溶液平衡滴定(SET)测量溶液中的亲和力。

[0086] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单分子组合物的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物对特定表位展示单结合特异性和亲和力。

[0087] 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用,指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。术语涵盖含有已知的核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键的核酸,其为合成的、天然存在的和非天然存在的,其具有与参考核酸相似的结合性质,并且其以与参考核苷酸相似的方式进行代谢。这类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。

[0088] 除非另有指出,特定核酸序列也暗中涵盖其保守修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列,以及明确指出的序列。具体而言,如下文详述,可通过产生这样的序列来完



成简并密码子取代,其中用混和碱基和/或脱氧肌苷残基取代一个或更多所选(或全部)密码子的第三个位置(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081,1991;Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608,1985;和Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98,1994)。

[0089] 术语“有效连接”指两个和更多个多核苷酸(例如DNA)区段的功能关系。通常,它指转录调节序列与转录序列之间的功能关系。例如,如果启动子或增强子序列刺激或调节编码序列在适当宿主细胞或其他表达系统中的转录,那么该启动子或增强子序列有效连接至编码序列。通常,有效连接至转录序列的启动子转录调节序列与转录序列在物理空间上邻近,即它们是顺式作用。然而,一些转录调节序列,如增强子不需要与编码序列(增强子增强其转录)在物理空间上邻近或位于其附近。

[0090] 本文所用的术语“优化的”意指已用生产细胞或生物中优选的密码子改变核苷酸序列来编码氨基酸序列,该生产细胞或生物通常是真核细胞,例如毕赤酵母属(*Pichia*)细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞。改造优化的核苷酸序列,以完全或尽可能多地保留起始核苷酸序列(其也称为“亲本”序列)最初编码的氨基酸序列。本文的优化序列已改造为具有哺乳动物细胞中优选的密码子。但是,本文也设想这些序列在真核细胞或原核细胞中的优化表达。由优化的核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为优化的。

[0091] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物。术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或更多氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,还适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有指出,特定多肽序列也暗中涵盖其保守修饰的变体。

[0092] 本文所用的术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或从其制备的杂交瘤分离的抗体,从转化用于表达人抗体的宿主细胞(例如从转染瘤)分离的抗体,从重组的组合人抗体文库分离的抗体,及通过涉及将人免疫球蛋白基因、序列的全部或部分剪接至其他DNA序列的任意其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。这类重组人抗体具有如下可变区,其中构架区和CDR区源自人种系免疫球蛋白序列。但是,在某些实施方案中,可对这类重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用人Ig序列的转基因动物时进行体内体细胞诱变),从而重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,该序列尽管源自人种系VH和VL序列并与之相关,但可能并不天然存在于体内的人抗体种系库中。

[0093] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)指已将重组表达载体引入其中的细胞。应理解,这类术语旨在不仅指具体的主题细胞,还指这种细胞的后代。由于某些修饰可以因突变或环境影响而存在于后代中,这种后代事实上可以与亲本细胞不同,但仍包含在本文所用的术语“宿主细胞”的范围之内。

[0094] 术语“个体”包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物(例如哺乳动物和非哺乳动物),如非人灵长类(例如食蟹猴)、绵羊、狗、奶牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除了指出时,术语“患者”或“个体”在本文中可互换使用。本文所用的术语“cyno”或“食蟹猴”指食蟹猴(*Macaca fascicularis*)。

[0095] 在一个实施方案中,本文所用的术语“治疗”任意疾病或障碍(例如视网膜血管病、糖尿病性视网膜病、黄斑水肿)指改善疾病或障碍(即减慢或阻止或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一实施方案中,“治疗”指减轻或改善至少一种物理参数,包括患者

不可识别的那些。还在另一实施方案中，“治疗”指在物理上(例如稳定不可识别的症状)、在生理学上(例如稳定物理参数)或在物理和生理学上调节疾病或障碍。还在另一实施方案中，“治疗”指预防或推迟疾病或障碍的起始或发展或进展。“预防”本身涉及本文所述的适应症，包括视网膜血管病相关病症或障碍、糖尿病性视网膜病相关病症或障碍、和/或黄斑水肿相关病症或障碍，意指在处于下文所述视觉功能、视网膜解剖学、视网膜血管病参数、糖尿病性视网膜病参数和/或黄斑水肿病参数恶化风险的患者中防止或减慢所述恶化的任意动作。更具体而言，视网膜血管病相关病症或障碍、糖尿病性视网膜病相关病症或障碍和/或黄斑水肿相关病症或障碍的“治疗”意指导致或考虑其导致视觉功能和/或视网膜解剖学的改善或保持的任意动作。用于评估疾病的治疗和/或预防的方法为本领域已知并在下文描述。

[0096] 术语“载体”旨在指能够转运与它连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一类载体是“质粒”，其指其他DNA区段可以连接入其中的环状双链DNA环。另一类载体是病毒载体，如腺相关病毒载体(AAV或AAV2)，其中其他DNA区段可以连接入病毒基因组。某些载体能够在它们所引入的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)可以在引入宿主细胞时整合入宿主细胞的基因组，从而与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与它们有效连接的基因的表达。这类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。一般而言，用于重组DNA技术中的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是最常用的载体形式。但是，本发明旨在包括这类其他形式的表达载体，如病毒载体(例如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)，其执行等同的功能。

[0097] 附图简述

[0098] 图1显示EPO诱导中央视网膜中的血管扩张。

[0099] 图2显示抗-EPO Fab中和兔眼中的EPO。

[0100] 图3显示抗-EPO Fab中和兔眼中的EPO。

[0101] 发明详述

[0102] 本发明部分基于特异性结合Epo的抗体分子的发现。本发明涉及全IgG形式抗体及其抗原结合片段(如Fab片段)二者(例如，参见抗体NVS1、NVS2、NVS3和NVS4)。

[0103] 因此，本发明提供特异性结合Epo(例如人Epo、食蟹猴Epo、大鼠Epo和小鼠Epo)的抗体、药物组合物、这类抗体和组合物的产生方法和使用方法。

[0104] Epo抗体和抗原结合片段

[0105] 本发明提供特异性结合Epo的抗体。在一些实施方案中，本发明提供特异性结合人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo以及人高糖基化Epo(darbepoietin)的抗体。本发明的抗体包括但不限于按实施例所述分离的人单克隆抗体和Fab。

[0106] 本发明提供特异性结合Epo蛋白(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)的抗体，其中该抗体包含具有SEQ ID NO:13、33、53或73的氨基酸序列的VH结构域。本发明还提供特异性结合Epo蛋白的抗体，其中该抗体包含具有下文表1中所列VH CDR中任一个的氨基酸序列的VH CDR。具体而言，本发明提供特异性结合Epo蛋白(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)的抗体，其中该抗体包含一个、两个、三个或多个具有下文表1中所列VH CDR中任一个的氨基酸序列的VH CDR(或备选地，由其组成)。

[0107] 本发明提供特异性结合Epo蛋白的抗体,该抗体包含具有SEQ ID NO:14、34、54或74的氨基酸序列的VL结构域。本发明还提供特异性结合Epo蛋白(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)的抗体,该抗体包含具有下文表1中所列VL CDR中任一个的氨基酸序列的VL CDR。具体而言,本发明提供特异性结合Epo蛋白(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)的抗体,该抗体包含一个、两个、三个或多个具有下文表1中所列VL CDR中任一个的氨基酸序列的VL CDR(或备选地,由其组成)。

[0108] 本发明的其他抗体包括已突变但在CDR区中与表1中所述序列中所示的CDR区具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸。在一些实施方案中,它包括突变氨基酸序列,其中在与表1中所述序列中所示的CDR区比较时,突变了CDR区中的不超过1、2、3、4或5个氨基酸。

[0109] 本发明还提供编码特异性结合Epo蛋白(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)的抗体的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。这类核酸序列可以针对哺乳动物细胞中的表达进行优化(例如,表1显示本发明抗体的重链和轻链的优化核酸序列)。

[0110] 表1.Epo抗体、Fab和Epo蛋白的实例

[0111]

氨基酸序列或多核苷酸(PN)	序列标识(SEQ.I.D.NO:)和序列
NVS1	
CDRH1 Kabat	1 SYAIS
CDRH2 Kabat	2 GIDPISGFADYAQKFQG
CDRH3 Kabat	3 ELYYPGTWMAVMAY
CDRL1 Kabat	4 SGDNIPEYYVH
CDRL2 Kabat	5 RDNERPS
CDRL3 Kabat	6 QVFDESSWHWV
CDRH1 Chothia	7 GGTFRSY
CDRH2 Chothia	8 DPISGF
CDRH3 Chothia	9 ELYYPGTWMAVMAY
CDRL1 Chothia	10 DNIPEYY
CDRL2 Chothia	11 RDN
CDRL3 Chothia	12 FDESSWHW
VH	13 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRSYAISWVRQAP GQGLEWMGGIDPISGFADYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDYAVYYCARELYYPGTWMAVMAYWGRGTLTVSS
VL	14 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDNIPEYYVHWYQQKPGQA PVLVIYRDNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCQVFDESSWHWVFGGGTKLTVL
重链	15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFRSYAISWVRQAP GQGLEWMGGIDPISGFADYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL

		SSLRSEDTAVYYCARELYYPGTWMAVMAYWGRGTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSC
轻链		16 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDNIPYVHWHYQQKPGQA PVLVIYRDNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCQVFEDESSWHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS
编 SEQ.I.D.NO:13 PN	码的	17 caggtgcagctggtgcagtcagggcgcgaagtgaagaaaccggctctagcgtgaaggtgctc ctgtaaagctagtgggcggcacccttagatcctacgctattagctgggtgagacaggtccagggc cagggcctcgaatggatggggcggcatcgaccctattagcggcttcgagcactacgctcagaaa ttcagggcagagtgactatacaccgcgacgagtctactagcaccgcctacatggaactgtcta gctgagatcagaggacaccgcctgtactactgcgctagagagctgtactaccggcaccct ggatggcctgatggcctattggggcagaggcacctggtgacagtgctctct
编 SEQ.I.D.NO:14 PN	码的	18 agctacgtgctgaccagccccctagcgtgctcagtgcccctggcaagaccgctagaatcact gtagcggcgataacatccccagtgactacgtgcaactggatcagcagaagcccggccagggccc cgtgctggtgatctatagagataacgagcggcctagcggcatccccgagcgggtttccggctc taatagcggcaacaccgctaccctgactatttcaagagtggaagcccggcgaagggcggacta ctactgtcaggtgtcgacgagcttcatggcactgggtgttcggcggaggcaccaagctgacc gtgctg
编 SEQ.I.D.NO:15 PN	码的	19 caggtgcagctggtgcagtcagggcgcgaagtgaagaaaccggctctagcgtgaaggtgctc ctgtaaagctagtgggcggcacccttagatcctacgctattagctgggtgagacaggtccagggc cagggcctcgaatggatggggcggcatcgaccctattagcggcttcgagcactacgctcagaaa ttcagggcagagtgactatacaccgcgacgagtctactagcaccgcctacatggaactgtcta gctgagatcagaggacaccgcctgtactactgcgctagagagctgtactaccggcaccct ggatggcctgatggcctattggggcagaggcacctggtgacagtgctctctctgtagactaa gggccccctcgtgttccctctggccccctccagcaagtctacctctggcggcaccgctgctctgg gctgctggtgaaggactacttccctgagcctgtgacagtgctctggaactctggcggcctgacc tcggcgtgcacaccttccctgcccgtgctgagctctcggcctgtactcctgctcctcgtggtg acagtgcttctccagcctgggacccagacctatctgcaacgtgaaccacaagccttcca acaccaaggtggacaagcgggtggagcctaagtcctgc
编 SEQ.I.D.NO:16 PN	码的	20 agctacgtgctgaccagccccctagcgtgctcagtgcccctggcaagaccgctagaatcact gtagcggcgataacatccccagtgactacgtgcaactggatcagcagaagcccggccagggccc cgtgctggtgatctatagagataacgagcggcctagcggcatccccgagcgggtttccggctc taatagcggcaacaccgctaccctgactatttcaagagtggaagcccggcgaagggcggacta ctactgtcaggtgtcgacgagcttcatggcactgggtgttcggcggaggcaccaagctgacc gtgctggccagcctaaggctgccccagcgtgacctgttccccagcagcggaggagctg caggccaacaaggccaacctggtgtgctgatcagcacttctaccaggcgcctgacctg gctggaaggccgacagcagccccgtgaaggccggcgtggagaccaccacccccagcaagc agagcaacaacaagtagcggccagcagctactgagcctgacccccagcagctggaagag ccacaggtcctacagctgccaggtgaccacgagggcagcaccctggaagaccgctggccc caaccgagtgagc
NVS2		
CDRH1_Kabat		21SYWIG

[0112]

[0113]

CDRH2 Kabat	22 WIDPYRSEIRYSPSFQG
CDRH3 Kabat	23 VSSEPFDS
CDRL1 Kabat	24 SGDKLGDHYAY
CDRL2 Kabat	25 DDSKRPS
CDRL3 Kabat	26 ATWTFEGDYV
CDRH1 Chothia	27 GYSFTSY
CDRH2 Chothia	28 DPYRSE
CDRH3 Chothia	29 VSSEPFDS
CDRL1 Chothia	30 DKLGDHY
CDRL2 Chothia	31 DDS
CDRL3 Chothia	32 WTFEGDY
VH	33 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGWIDPYRSEIRYSPSFQGVVVISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARVVSSEPFDSWGQGTLLVTVSS
VL	34 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDKLGDHYAYWYQQKPGQ APVLVIYDDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCATWTFEGDYVFGGGTKLTVL
重链	35 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMP GKGLEWMGWIDPYRSEIRYSPSFQGVVVISADKSISTAYLQW SSLKASDTAMYYCARVVSSEPFDSWGQGTLLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSC
轻链	36 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDKLGDHYAYWYQQKPGQ APVLVIYDDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCATWTFEGDYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS
编 码 的 SEQ.I.D.NO:33 PN	37 Gaggtgcagctggtgcagtcaggcgcgaagtgagaagcccggcgagtcactgaagatta getgtaaaggctcagctatagcttcactagctactggatcggtgggtgacagatgcccgg caagggcctggaatggatggctggatgacccctatagatcagagattaggtatagccctag cttcagggccaggtgacaattagcgcgataagctattagcaccgctacctgcagtggtcta gctgaaggctagtgcaccgctatgtactactgcgctagagtgctagcgagcccttcgatag ctggggccagggcacctggtgacagtgctctca
编 码 的 SEQ.I.D.NO:34 PN	38 agctacgtgctgaccagccccctagcgtgctcagtgcccctggcaagaccgctagaatcact gtagcggcgataagctgggcgatacactacgcctactggatcagcagaagcccggccaggcc cccgtgctggtgatctacgacgactcctaacggcctagcggcatcccagcgggttagcggct ctaatacgggcaacaaccgctaccctgactattcaagagtggaagcccggcgacgagggcgact actactgcgctacctggaccttcagggcgactacgtgttcggcggaggcactaagctgacctg gctg
编 码 的 SEQ.I.D.NO:35 PN	39 gaggtgcagctggtgcagtcaggcgcgaagtgagaagcccggcgagtcactgaagattag ctgtaaaggctcagctatagcttcactagctactggatcggtgggtgacagatgcccggc

[0114]

	aagggcctggaatggatgggctggatcgaccctatagatcagagattaggtatagccctagc ttcagggccaggtgacaatfagcgcgataagtctatfagcaccgctacctgcagtggtc gctgaaggctagtgacaccgctatgfactactgcgctagagtgctagcgcgacctegatag ctggggccagggcaccctggtagcagtgctctcagctagcactaagggccccctcctgctcct ctggccccctcagcaagtctacctctggggcaccgctgctctgggctgctggtgaaggact acttccctgagcctgtgacagtgctctggaactctggcgcctgacctcgggctgcaacctc ctgcccgtgctgagctctcggcctgtaacctctctcctcctggtgacagtgctctcctcagc ctgggcaccagacctatctgcaacgtgaaccacaagccttcaacaccaaggtggacaag cgggtggagcctaagtcctgc
编 码 的 SEQ.I.D.NO:36 PN	40 agetaegtgtgacccagccccctagcgtgctagtgccctggcaagaccgctagaatcact gtagcggcgataagetggggcactacgctactggtatcagcagaagccccggccagggc cccgtgctggtgatctcagcagctctaaaggcctagcggcctccccagcgggttagcggct ctaafagcggcaacaccgctacctgactattcaagagtgaagccggcgacagggccgact actactgcctacctggacctcagggcgactacgtgttcggcggaggcactaagctgacctg gtggggcagcctaaggetgccccagcgtgacctgttccccccagcagcaggagctgca ggccaacaagccacctggtgtgctgatcagcgaacttctaccagggcctgacctggtgc ctggaagccgacagcagccccgtgaagccggcgtggagaccaccaccccagcaagcag agcaacaacaagtacggccagcagctacctgagcctgacccccagcagtggaagagcc acaggtctacagctgcagggtgaccacaggggcagcaccgtggaagaccgtgccccca accgagtgagc
NVS3	
CDRH1_Kabat	41 SNTAAWN
CDRH2_Kabat	42 VIYYRSKWYNDYAVSVKS
CDRH3_Kabat	43 SVPGGDPGLEHAFAY
CDRL1_Kabat	44 SGDNLGTYYYVE
CDRL2_Kabat	45 DDSDRPS
CDRL3_Kabat	46 ASFASWSDSV
CDRH1 Chothia	47 GDSVSSNTA
CDRH2 Chothia	48 YYRSKWY
CDRH3 Chothia	49 SVPGGDPGLEHAFAY
CDRL1 Chothia	50 DNLGTYYY
CDRL2 Chothia	51 DDS
CDRL3 Chothia	52 FASWSDS
VH	53 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNTAAWNWIRQS PSRGGLEWLGVIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARSVPGGDPGLEHAFAYWGRGTLTV SS
VL	54 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDNLGTYYYVEWYQQKPGQ APVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCASFASWSDSVFSGGKTLTVL
重链	55 QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNTAAWNWIRQS PSRGGLEWLGVIYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSL QLNSVTPEDTAVYYCARSVPGGDPGLEHAFAYWGRGTLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPKSC

[0115]

轻链	56 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCSGDNLGTYVVEWYQQKPGQ APVLVIYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCASFASWSDSVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS
编 码的 SEQ.I.D.NO:53 PN	57 Caggtgcagctgcagcagtcaggccctggcctggtgaaacctagtcagacctgagcctgac ctgcctattagcggcgatagcgtgcatctaacaccgcccctggaactggattagacagtea cctagtagaggcctggaatggctgggctgactactataggtctaaagtgtacaacgaactacg ccgtgctagtgaaagttaggatacaatfaaccccgaacctetaagaatcagttcagcctgca gtgaaatagcgtgacccccgaggacaccgctgactactgctagatagtcctggcggg cgacccccgctggaacacgcctttgctactggggcagaggcacctggtgacagtgctctct
编 码的 SEQ.I.D.NO:54 PN	58 agetaegtgtgacctgacccccctagcgtgctagtgccctggcaagaccgctagaatcacct gtagcggcgataacctgggcaactactacgtggaatggatcagcagaagccccggccaggcc cccgctgctggtgatctacgacgatagcagtagacctagcggcaccctggcggctttagcggct ctaatagcggcaacaccgtaacctgactattagtagagtggaagccggcgacgaggccgact actactgcgctagtttcgctagttggagcgattcagtgctcggggaggcactaagctgacctg ctg
编 码的 SEQ.I.D.NO:55 PN	59 caggtgcagctgcagcagtcaggccctggcctggtgaaacctagtcagacctgagcctgacc tgcctattagcggcgatagcgtgcatctaacaccgcccctggaactggattagacagtcac ctagtagaggcctggaatggctgggctgactactataggtctaaagtgtacaacgaactacgc cgtgctagtgaaagttaggatacaatfaaccccgaacctetaagaatcagttcagcctgca ctgaaatagcgtgacccccgaggacaccgctgactactgctagatcagtgctcggggc gacccccgctggaacacgcctttgctactggggcagaggcacctggtgacagtgctctctctg ctagcactaagggccccctcgtgttcctctggccccctccagcaagtctacctctggcggcacc gctgctctgggctgctggtgaaaggactacttccctgagcctgtgacagtgctcctggaactctgg cgccctgacctcggcgtgcaacacttccctgcccgtgctgagtcctcggcctgtactcctctg ctcctggtgacagtgcttctccagcctgggcaaccagacctatctgcaactgaaaccac aagcctccaacaccaaggtggacaagcgggtggagcctaagctcatgc
编 码的 SEQ.I.D.NO:56 PN	60 agctacgtgtgacctgacccccctagcgtgctagtgccctggcaagaccgctagaatcacct gtagcggcgataacctgggcaactactacgtggaatggatcagcagaagccccggccaggcc cccgctgctggtgatctacgacgatagcagtagacctagcggcaccctggcggctttagcggct ctaatagcggcaacaccgtaacctgactattagtagagtggaagccggcgacgaggccgact actactgcgctagtttcgctagttggagcgattcagtgctcggggaggcactaagctgacctg ctgggcccagcctaaggtgccccagcgtgacctgttccccccagcagcgaggagctgag gcaacaaggccacctggtgctgctgacagcacttaccaggcgcctgacacctggcct ggaaggccgacagcagccccgtgaaaggcggcgtggagaccaccacccccagcaagcaga gcaacaacaagtaacggccagcagctacctgagcctgacccccagcagtggaagagcca caggtctacagctgccaggtgacctgagggcagcaccgtggaaaagaccgtggccccca ccgagtgacgc
NVS4	
CDRH1_Kabat	61 SYYS
CDRH2_Kabat	62 WINPLKGNTNYAQKFQG
CDRH3_Kabat	63 EGMFYDI
CDRL1_Kabat	64 SGDSIGDKYVY

CDRL2 Kabat	65 DTNKRPS
CDRL3 Kabat	66 QSWDLDFNTYV
CDRH1 Chothia	67 GYTFTSY
CDRH2 Chothia	68 NPLKGN
CDRH3 Chothia	69 EGMFYDI
CDRL1 Chothia	70 DSIGDKY
CDRL2 Chothia	71 DTN
CDRL3 Chothia	72 WDLDFNTY
VH	73 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMSWVRQA PGQGLEWMGWINPLKGNNTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY MELSRLRSEDVAVYYCAREGMFYDIWGQGLTLTVSS
VL	74 SYELTQPLSVSVALGQATARITCSGDSIGDKYVYWYQQKPGQA PVLVIYDTNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADY YCQSWDLDFNTYVFGGGTKLTVL
重链	75 qvqlvqsgaevkkpgasvkvscasgytftsyymswvrqapqgglewmgwinplkgn nyaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsrlrsedvavyycaregmfydiwgqgltlvtvssastk gpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssv vtpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepksc
轻链	76 SYELTQPLSVSVALGQATARITCSGDSIGDKYVYWYQQKPGQA PVLVIYDTNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADY YCQSWDLDFNTYVFGGGTKLTVLGPKAAPSVTLFPSSSE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS
编 码 SEQ.I.D.NO:73 PN 的	77 caggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaaaccggcctagtggaaggtgctc ctgtaaagctagtggtacacctcactagctactacatgagctgggtgacagggccctgga cagggcctggaatggatggctggattaaccctgaagggaacactaactacgcccagaa attccagggcagtgactatgactagggactagcattagcaccgctacatggaactgtct aggetgagatcagaggacaccgctgactactgcctagagaaggcatgacttgcacatc tggggccagggcaccctggtgacagtgtctct
编 码 SEQ.I.D.NO:74 PN 的	78 agtaecagctgactcagccctgagcgtgctcagtgccctgggacagaccgctagaatcacc tgtagcggcgactctatcgcgacaaatacgtgactggtatcagcagaagccggcagggcc ccgctgctggtgatcagacactaacaagcggcctagcggcaccgagcgggttagcggct ctaatacgggcaacaaccgtaacctgactattagtaggctcagggcggcagcagggcagct actactgctcagctatgggacctggaactcaaacctacgtgttcggcggaggcactaagctgac cgtgctg
编 码 SEQ.I.D.NO:75 PN 的	79 caggtgcagctggtgcagtcaggcgccgaagtgaagaaaccggcctagtggaaggtgctc ctgtaaagctagtggtacacctcactagctactacatgagctgggtgacagggccctgga cagggcctggaatggatggctggattaaccctgaagggaacactaactacgcccagaa attccagggcagtgactatgactagggactagcattagcaccgctacatggaactgtct aggetgagatcagaggacaccgctgactactgcctagagaaggcatgacttgcacatc tggggccagggcaccctggtgacagtgtctctctgtagcactaaggggccctcctgcttccctct ggccctccagcaagtctactctggtggcaccgctgctctgggctgctggtggaaggactac

[0116]



	ttccctgagcctgtgacagtgctctggaactctggcgccctgacctcggcgtgcacaccttccctgcegtgtgcagtcctccggcctgactccctgtctcctcggtgacagtgcttctccagcctgggcaccagacctatctgcaacgtgaaccacaagccttccaacccaaggtggacaagcgggtggagcctaagtcctgc
编 码 SEQ.I.D.NO:76 的 PN	80 agetaegagctgactcagccctgagcgtgtcagtgccctgggacagaccgctagaatcaccgttagcggcgactctatcggcgacaaatcgtgtactggatcagcagaageccggccaggcccctgtggtgatctacgacactaacaagcggcctagcggcatccccgagcggtttagcggctctaatacgggcaacaaccgctaccctgactattagtagggctcagcggcgacgaggccgactactactgtcagtcattgggacctggaettcaaacctacgtgttcggcgaggcactaagctgacgtgctgggcaagcctaaggctgccccagcgtgacctgttccccccagcagcaggagctgcaggccaacaaggccaccctgggtgctgacagcgaettetaccaggcgccgtgacctggcctggaaggccgacagcagcccggaaggccggcgtggagaccaccacccccagcaagcagagcaacaacaagtagccgccagcagctacctgagcctgacccccgagcagtggaagagccacaggtctacagctgccaggtgaccacgagggcagcacctggaaaagaccgtggcccaccgagtgacg
人 Epo NP_000790.2	81 apprlicdsrvlerylleakeaenittgcaehcslnenitvptdkvnfyawkrmevgqqavevwqglallseavlrqgallvnssqpweplqlhvdkaavglrsltllralgaqkeaisppdaasaaplrtitadtfrklfrvysnflrgklklytgeacrtdr
食蟹猴 Epo Uniprot: P07865	82 apprlicdsrvlerylleakeaenvtmgcsescslnenitvptdkvnfyawkrmevgqqavevwqglallseavlrqavlanssqpfeplqlhmdkaisglrsittllralgaqkaislpdaasaaplrtitadtfciklfrvysnflrgklklytgeacrtdr
小鼠 Epo NP_031968.1	83 apprlicdsrvlerylleakeaenvtmgcaegprlsenitvptdkvnfyawkrmeveeqaievwqglslseailqaqallanssppetlqlhidkaisglrsltllrvlgaqkelmsppdtppaplrtitvdtfciklfrvyanflrgklklytgeacrtdr
大鼠 Epo NP_058697.1	84 apprlicdsrvlerylleakeaenvtmgcaegprlsenitvptdkvnfyawkrmkveeqavevwqglslseailqaqalqanssppeslqlhidkaisglrsltllrvlgaqkelmsppdatqaaplrtitadtfciklfrvysnflrgklklytgeacrtdr
兔 Epo NP_001075559.1	85 Klatmgvrglallplallcllvalglpvlgaparlicdsrvlerylleakeaenvtmgcaegcslgenitvptdkvnfhhwkksagrhavevwqglallseamlrsqallanss qlpetlqvhdkaavglrsltllralgvqkeavspeaassaaplrtvaadtcklfriysnflrgklklytgeacrtdr
Epo 螺旋 A, SEQ ID NO: 81 的氨基酸 4-26	86 rlidcsrvlerylleakeaenit
Epo 螺旋 B, SEQ ID NO: 81 的氨基酸 56-83	87 vgqqavevwqglallseavlrqgallvn
Epo 螺旋 D, SEQ ID NO: 81 的氨基酸 138-162	88 frklfrvysnflrgklklytgeacr
Epo 环 A-B, SEQ ID NO: 81 的氨基酸 27-55	89 tgcaehcslnenitvptdkvnfawkrme

[0117]

[0118] 本发明的其他抗体包括其中已突变氨基酸或编码氨基酸的核酸但与表1中所述序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%同一性的那些。一些实施方案包括突变氨基酸序列，其中在与表1中所述序列中所示的可变区比较时，突变了可变区中的不超过1、2、3、4或5个氨基酸，同时保留基本相同的抗原结合活性。

[0119] 由于这些抗体中的每一个都可结合Epo,可“混合和匹配”VH、VL、全长轻链和全长重链序列(氨基酸序列和编码氨基酸序列的核苷酸序列),以产生本发明的其他Epo结合抗体。可用本领域已知的结合测定(例如ELISA和在实施例章节中描述的其他测定)测试此类“混合和匹配”的Epo结合抗体。在混合和匹配这些链时,应当用结构相似的VH序列替换来自具体VH/VL配对的VH序列。同样地,应当用结构相似的全长重链序列替换来自具体全长重链/全长轻链配对的全长重链序列。同样地,应当用结构相似的VL序列替换来自具体VH/VL配对的VL序列。同样地,应当用结构相似的全长轻链序列替换来自具体全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列。因此,在一方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有:包含选自SEQ ID NO:13、33、53和73的氨基酸序列的重链可变结构域;及包含选自SEQ ID NO:14、34、54和74的氨基酸序列的轻链可变结构域;其中该抗体特异性结合Epo(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)。更具体而言,在某些方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:13和14的氨基酸序列的重链可变结构域和轻链可变结构域。在其他具体方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:33和34的氨基酸序列的重链可变结构域和轻链可变结构域。还在其他方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:53和54的氨基酸序列的重链可变结构域和轻链可变结构域。还在其他方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:73和74的氨基酸序列的重链可变结构域和轻链可变结构域。

[0120] 在另一方面,本发明提供:(i)分离的抗体,其具有:包含已针对哺乳动物细胞中的表达优化的选自SEQ ID NO:15、35、55和75的氨基酸序列的全长重链,及包含已针对哺乳动物细胞中的表达优化的选自SEQ ID NO:16、36、56和76的氨基酸序列的全长轻链;或(ii)包含其抗原结合部分的功能蛋白质。更具体而言,在某些方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:15和16的氨基酸序列的重链和轻链。在其他具体方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:35和36的氨基酸序列的重链和轻链。还在其他方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:55和56的氨基酸序列的重链和轻链。还在其他方面,本发明提供分离的抗体或其抗原结合区,其具有分别包含选自SEQ ID NO:75和76的氨基酸序列的重链和轻链。

[0121] 本文所用的术语“互补决定区”和“CDR”指抗体可变区内赋予抗原特异性和结合亲和力的氨基酸的序列。一般而言,每个重链可变区中有三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),每个轻链可变区中有三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

[0122] 可以用许多公知的方案中的任一种容易地测定给定CDR的精确氨基酸序列边界,包括Kabat等(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案)、Al-Lazikani等,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)中所述的那些。

[0123] 例如,在Kabat下,重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。在Chothia下,VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);VL中的氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52

(LCDR2) 和91-96 (LCDR3)。通过组合Kabat和Chothia二者的CDR定义,CDR在人VH中由氨基酸残基26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和95-102 (HCDR3) 组成,在人VL中由氨基酸残基24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和89-97 (LCDR3) 组成。

[0124] 在另一方面,本发明提供包含表1中所述重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3或其组合的Epo结合抗体。抗体VH CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:1、21、41或61中。抗体VH CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:2、22、42或62中。抗体VH CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:3、23、43或63中。抗体VL CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:4、24、44或64中。抗体VL CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:5、25、45或65中。抗体VL CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:6、26、46或66中。这些CDR区用Kabat系统描述。

[0125] 备选地,如用Chothia系统 (Al-Lazikani等、(1997) JMB 273,927-948) 定义,抗体VH CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:7、27、47或67中。抗体VH CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:8、28、48或68中。抗体VH CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:9、29、49或69中。抗体VL CDR1的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:10、30、50或70中。抗体VL CDR2的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:11、31、51或71中。抗体VL CDR3的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:12、32、52或72中。

[0126] 鉴于这些抗体中的每一种都可以结合Epo,且抗原结合特异性主要由CDR1、2和3区提供,可以“混合和匹配”VH CDR1、2和3序列及VL CDR1、2和3序列(即可以混合和匹配来自不同抗体的CDR,但每种抗体优选包含VH CDR1、2和3及VL CDR1、2和3),以产生本发明的其他Epo结合分子。可用本领域已知的结合测定和实施例所述的那些(例如ELISA、SET、Biacore)测试此类“混合和匹配”的Epo结合抗体。在混合和匹配VH CDR序列时,应当用结构相似的CDR序列替换来自具体VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列。同样地,在混合和匹配VL CDR序列时,应当用结构相似的CDR序列替换来自具体VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列。对普通技术人员而言,显而易见的是,可以通过用来自本文显示的本发明的单克隆抗体的CDR序列的结构相似的序列取代一个或多个VH和/或VL CDR区序列来产生新的VH和VL序列。除前述外,在一个实施方案中,本文所述抗体的抗原结合片段可以包含VH CDR1、2和3或VL CDR 1、2和3,其中该片段作为单可变结构域结合Epo。

[0127] 在本发明的某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以具有表1中所述Fab的重链和轻链序列。更具体而言,抗体或其抗原结合片段可以具有Fab NVS1、NVS2、NVS3或NVS4的重链和轻链序列。

[0128] 在本发明的其他实施方案中,特异性结合Epo的抗体或抗原结合片段包含Kabat所定义和表1中所述的重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3。还在本发明的其他实施方案中,特异性结合Epo的抗体或抗原结合片段包含Chothia所定义和表1中所述的重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3。

[0129] 在具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:1的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:2的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:3的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:4的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:5的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:6的轻链可变区CDR3。在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:21的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:22的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:23的重链可变区CDR3、SEQ

ID NO:24的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:25的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:26的轻链可变区CDR3。在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:41的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:42的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:43的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:44的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:45的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:46的轻链可变区CDR3。在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:61的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:62的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:63的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:64的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:65的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:66的轻链可变区CDR3。

[0130] 在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:7的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:8的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:9的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:10的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:11的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:12的轻链可变区CDR3。在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:27的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:28的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:29的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:30的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:31的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:32的轻链可变区CDR3。在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:47的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:48的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:49的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:50的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:51的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:52的轻链可变区CDR3。在另一具体实施方案中,本发明包括特异性结合Epo的抗体,其包含SEQ ID NO:67的重链可变区CDR1、SEQ ID NO:68的重链可变区CDR2、SEQ ID NO:69的重链可变区CDR3、SEQ ID NO:70的轻链可变区CDR1、SEQ ID NO:71的轻链可变区CDR2和SEQ ID NO:72的轻链可变区CDR3。

[0131] 在某些实施方案中,本发明包括特异性结合表1中所述Epo的抗体或抗原结合片段。在优选实施方案中,结合Epo的抗体或抗原结合片段是Fab NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。

[0132] 如果本文所用的人抗体的可变区或全长链获自使用人种系免疫球蛋白基因的系统,则该抗体包含是特定种系序列的“产物”或“衍生自”特定种系序列的重链或轻链可变区或全长重链或轻链。此类系统包括用目的抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或用目的抗原筛选在噬菌体上展示的人免疫球蛋白基因文库。例如可通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列,并选择与人抗体的序列在序列上最相近(即最高%同一性)的人种系免疫球蛋白序列来鉴定是人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体。与种系序列相比,是特定人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“衍生自”特定人种系免疫球蛋白序列的人抗体可以包含例如由天然存在的体细胞突变或刻意引入的定点突变引起的氨基酸差异。然而,在VH或VL构架区中,所选人抗体在氨基酸序列上通常与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%同一性,并含有这样的氨基酸残基,在与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如,鼠种系序列)比较时,该氨基酸残基将人抗体鉴定为人的。在某些情况下,人抗体在氨基酸序列上与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少60%、70%、80%、90%、或至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%同一性。通常,重组人抗体与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列在VH或VL构架区中具有不超过10个氨基酸差异。在某些情况下,人抗体与种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有不超过5个,或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸差异。人种系

免疫球蛋白基因的实例包括但不限于下文所述的可变结构域种系片段,以及DP47和DPK9。

[0133] 同源抗体

[0134] 还在另一实施方案中,本发明提供包含与表1中所述的序列同源的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段,并且该抗体结合Epo蛋白(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo),并保留表1中所述的那些抗体的期望的功能特性。

[0135] 例如,本发明提供分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其包含重链可变结构域和轻链可变结构域,其中该重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:13、33、53和73的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列;该轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:14、34、54和74的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一的氨基酸序列;且该抗体特异性结合Epo(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)。在本发明的某些方面,该重链和轻链序列进一步包含Kabat所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,例如,分别为SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;分别为SEQ ID NO:21、22、23、24、25和26;分别为SEQ ID NO:41、42、43、44、45和46;或分别为SEQ ID NO:61、62、63、64、65和66。在本发明的某些其他方面,该重链和轻链序列进一步包含Chothia所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3序列,例如,分别为SEQ ID NO:7、8、9、10、11和12;分别为SEQ ID NO:27、28、29、30、31和32;分别为SEQ ID NO:47、48、49、50、51和52;或分别为SEQ ID NO:67、68、69、70、71和72。

[0136] 在其他实施方案中,VH和/或VL氨基酸序列可以与表1中所示的序列80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。在其他实施方案中,VH和/或VL氨基酸序列可以相同,只是在不超过1、2、3、4或5个氨基酸位置处具有氨基酸取代。可以通过诱变(例如定点诱变或PCR介导诱变)分别编码SEQ ID NO:13、33、53或73和SEQ ID NO:14、34、54或74的核酸分子来获得具有与表1中所述的那些的VH和VL区具有高(即80%或更高)同一性的VH和VL区的抗体,然后用本文所述的功能测定针对所保留的功能测试所编码的改变的抗体。

[0137] 在其他实施方案中,全长重链和/或全长轻链氨基酸序列可以与表1中所示的序列80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。可以通过诱变(例如定点诱变或PCR介导诱变)编码这类多肽的核酸分子来获得具有与SEQ ID NO:15、35、55或75中任一个的全长重链和SEQ ID NO:16、36、56或76中任一个的全长轻链具有高(即80%或更高)同一性的全长重链和全长轻链的抗体,然后用本文所述的功能测定针对所保留的功能测试所编码的改变的抗体。

[0138] 在其他实施方案中,全长重链和/或全长轻链核苷酸序列可以与表1中所示的序列80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。

[0139] 在其他实施方案中,重链可变区和/或轻链可变区核苷酸序列可以与表1中所示的序列80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一。

[0140] 本文所用的两条序列间的百分比同一性是序列所共有的相同位置数的函数(即%同一性等于相同位置数/位置总数 $\times$ 100),其中考虑缺口数和每一缺口的长度,需要引入该缺口用于两条序列的最佳比对。如下文非限制性实施例所述,可用数学算法实现两条序列间序列的比较和百分比同一性的确定。

[0141] 此外或备选地,本发明的蛋白质序列可进一步用作“查询序列”来针对公共数据库进行搜索,例如以鉴定相关序列。例如,可用Altschul等,1990J.Mol.Biol.215:403-10的

BLAST程序(版本2.0)进行此类搜索。

[0142] 具有保守修饰的抗体

[0143] 在某些实施方案中,本发明的抗体具有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区及包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体的指定氨基酸序列或其保守修饰,其中该抗体保留本发明的Epo结合抗体的期望的功能特性。因此,本发明提供分离的抗体或其抗原结合片段,其包含含有CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区及含有CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中:重链可变区CDR1氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、21、41和61及其保守修饰;重链可变区CDR2氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、22、42和62及其保守修饰;重链可变区CDR3氨基酸序列选自SEQ ID NO:3、23、43和63及其保守修饰;轻链可变区CDR1氨基酸序列选自SEQ ID NO:4、24、44和64及其保守修饰;轻链可变区CDR2氨基酸序列选自SEQ ID NO:5、25、45和65及其保守修饰;轻链可变区CDR3氨基酸序列选自SEQ ID NO:6、26、46和66及其保守修饰;该抗体或其抗原结合片段特异性结合Epo。

[0144] 在其他实施方案中,发明的抗体针对在哺乳动物细胞中的表达优化,且具有全长重链序列和全长轻链序列,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述抗体的指定氨基酸序列或其保守修饰,其中该抗体保留本发明的Epo结合抗体的期望的功能特性。因此,本发明提供由全长重链和全长轻链组成的针对哺乳动物细胞中的表达优化的分离的抗体,其中该全长重链具有选自SEQ ID NO:15、35、55和75及其保守修饰的氨基酸序列;该全长轻链具有选自SEQ ID NO:16、36、56和76及其保守修饰的氨基酸序列;该抗体特异性结合Epo(例如人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo)。

[0145] 结合相同表位的抗体

[0146] 本发明提供与表1中所述的Epo结合抗体结合相同表位的抗体。因此可基于它们在Epo结合测定(如实施例中所述的那些)中与本发明的其他抗体竞争(例如以统计学上显著的方式竞争性抑制结合)的能力鉴定其他抗体。测试抗体抑制本发明的抗体与Epo蛋白结合的能力证明该测试抗体可与该抗体竞争结合Epo;根据非限制性理论,这种抗体可以和与其竞争的抗体结合Epo蛋白上相同或相关(例如结构上相似或空间上接近)的表位。在某实施方案中,与本发明抗体结合Epo上相同的表位的抗体是人单克隆抗体。可按本文所述制备和分离此类人单克隆抗体。如本文所用,在等摩尔浓度的竞争抗体存在下,竞争抗体使本发明的抗体或抗原结合片段的Epo结合抑制超过50%时,抗体“竞争”结合。

[0147] 在一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段结合Epo的螺旋D结构域(Epo蛋白的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)。在其他实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段结合Epo的螺旋A(Epo蛋白的氨基酸4-26;SEQ ID NO:86)和环A-B(Epo蛋白的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)。

[0148] 在其他实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)。在其他实施方案中,分离的抗体或抗原结合片段结合环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)。在其他实施方案中,分离的抗体或抗原结合片段结合环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)和螺旋A(人Epo的氨基酸4-26;SEQ ID NO:86)。还在其他实施方案中,分离的抗体或抗原结合片段结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)和环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ

ID NO:89)。在其他实施方案中,分离的抗体或抗原结合片段结合Epo的D螺旋结构域(人Epo的氨基酸138-162;SEQ ID NO:88)、环A-B结构域(人Epo的氨基酸27-55;SEQ ID NO:89)和螺旋A(人Epo的氨基酸4-26;SEQ ID NO:86)。

[0149] 在本发明的其他方面,分离的抗体或抗原结合片段结合包含人Epo (SEQ ID NO.81)的位置44-50、52、53、147、150、151、154、155、159和162处的氨基酸的表位。在本发明的其他方面,分离的抗体或抗原结合片段结合包含人Epo (SEQ ID NO.81)的位置9、13、44-53、147、150、151、154、155、158、159和162处的氨基酸的表位。在本发明的其他方面,分离的抗体或抗原结合片段结合包含人Epo (SEQ ID NO.81)的位置23、43-50、52、53、131、143、147、150、151、154、155、159和162处的氨基酸的表位。在本发明的具体方面,分离的抗体或抗原结合片段结合包含人Epo (SEQ ID NO.81)的氨基酸Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala(位置44-50处)、Lys-Arg(位置52-53处)、Asn(位置147处)、Arg-Gly(位置150-151处)、Lys-Leu(位置154-155处)、Glu(位置159处)和Arg(位置162处)的表位。在本发明的其他具体方面,分离的抗体或抗原结合片段结合包含人Epo (SEQ ID NO.81)的氨基酸Ser(位置9)、Glu(位置13)、Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala(位置44-50)、Lys-Arg(位置52-53)、Asn(位置147)、Arg-Gly(位置150-151)、Lys-Leu(位置154-155)、Gly(位置158)、Glu(位置159)和Arg(位置162)的表位。还在本发明的其他方面,分离的抗体或抗原结合片段结合包含人Epo (SEQ ID NO.81)的氨基酸Glu(位置23)、Asp-Thr-Lys-Val-Asn-Phe-Tyr-Ala(位置43-50)、Lys-Arg(位置52-53)、Arg(位置131)、Arg(位置143)、Asn(位置147)、Arg-Gly(位置150-151)、Lys-Leu(位置154-155)、Glu(位置159)和Arg(位置162)的表位。

[0150] 本发明还包括人Epo上的构象表位——包含氨基酸残基Thr44、Lys45、Val46、Asn47、Phe48、Tyr49、Ala50、Lys52、Arg53、Asn147、Arg150、Gly151、Lys154、Leu155、Glu159和Arg162的表位,其中结合该表位的抗体将抑制Epo与Epo受体的结合。还考虑结合本发明的表位的抗体将进一步抑制Epo依赖性细胞增殖。

[0151] 本发明进一步包括人Epo上的构象表位——包含氨基酸残基Ser9、Glu13、Thr44、Lys45、Val46、Asn47、Phe48、Tyr49、Ala50、Lys52、Arg53、Asn147、Arg150、Gly151、Lys154、Leu155、Gly158、Glu159和Arg162的表位,其中结合该表位的抗体将抑制Epo与Epo受体的结合。还考虑结合本发明的表位的抗体将进一步抑制Epo依赖性细胞增殖。

[0152] 本发明还进一步包括人Epo上的构象表位——包含氨基酸残基Glu23、Asp43、Thr44、Lys45、Val46、Asn47、Phe48、Tyr49、Ala50、Lys52、Arg53、Arg131、Arg143、Asn147、Arg150、Gly151、Lys154、Leu155、Glu159和Arg162的表位,其中结合该表位的抗体将抑制Epo与Epo受体的结合。还考虑结合本发明的表位的抗体将进一步抑制Epo依赖性细胞增殖。

[0153] 改造和修饰的抗体

[0154] 还可用具有一个或多个本文所示VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来制备本发明的抗体,以改造修饰的抗体,该修饰的抗体可以具有从起始抗体改变的特性。可通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个构架区内的一个或多个残基来改造抗体。此外或备选地,可通过修饰恒定区内的残基来改造抗体,例如以改变该抗体的效应子功能。

[0155] 可以进行的一种类型的可变区改造是CDR移植。抗体主要通过定位在六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此,CDR内的氨基酸序列在各

抗体之间比CDR外的序列更多样化。因为CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,所以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体的特性的重组抗体是可能的,该表达载体包括移植到具有不同特性的不同抗体的构架序列上的CDR序列,该CDR序列来自特定天然存在的抗体(参见例如,Riechmann,L.等,1998Nature 332:323-327;Jones,P.等,1986Nature 321:522-525;Queen,C.等,1989Proc.Natl.Acad.,U.S.A.86:10029-10033;Winter的美国专利号5,225,539;和Queen等的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0156] 因此,本发明的另一个实施方案涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区,其含有分别具有选自SEQ ID NO:1、21、41和61的氨基酸序列的CDR1序列,具有选自SEQ ID NO:2、22、42和62的氨基酸序列的CDR2序列,具有选自SEQ ID NO:3、23、43和63的氨基酸序列的CDR3序列;及轻链可变区,其具有分别具有选自SEQ ID NO:4、24、44和64的氨基酸序列的CDR1序列,具有选自SEQ ID NO:5、25、45和65的氨基酸序列的CDR2序列,及具有选自SEQ ID NO:6、26、46和66的氨基酸序列的CDR3序列。因此,此类抗体包含单克隆抗体的VH和VL CDR序列,但还可包含来自这些抗体的不同构架序列。

[0157] 备选地,本发明的另一个实施方案涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包含:重链可变区,其含有分别具有选自SEQ ID NO:7、27、47和67的氨基酸序列的CDR1序列,具有选自SEQ ID NO:8、28、48和68的氨基酸序列的CDR2序列,具有选自SEQ ID NO:9、29、49和69的氨基酸序列的CDR3序列;及轻链可变区,其具有分别具有选自SEQ ID NO:10、30、50和70的氨基酸序列的CDR1序列,具有选自SEQ ID NO:11、31、51和71的氨基酸序列的CDR2序列,及具有选自SEQ ID NO:12、32、52和72的氨基酸序列的CDR3序列。因此,此类抗体包含单克隆抗体的VH和VL CDR序列,但还可包含来自这些抗体的不同构架序列。

[0158] 可从公共DNA数据库或包括种系抗体基因序列的出版的参考文献中获得此类构架序列。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于“Vase”人种系序列数据库(可在互联网[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)上获得),以及Kabat,E.A.等,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;Tomlinson,I.M.等,1992J.Mol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.等,1994Eur.J Immunol.24:827-836中;各自的内容在此明确引入作为参考。

[0159] 用于本发明抗体的构架序列的实例是与本发明所选抗体使用的构架序列(例如本发明的单克隆抗体使用的共有序列和/或构架序列)结构相似的那些构架序列。VH CDR1、2和3序列及VL CDR1、2和3序列可移植到与见于构架序列所衍生自的种系免疫球蛋白基因中的序列具有相同序列的构架区上,或者该CDR序列可移植到与种系序列相比含有一个或多个突变的构架区上。例如,已经发现在某些情况下突变构架区内的残基来维持或增强抗体的抗原结合能力是有利的(参见例如,Queen等的美国专利号5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。可以用作支架来在其上构建本文所述的抗体或抗原结合片段的构架包括但不限于VH1A、VH1B、VH3、Vk1、V12和Vk2。其他构架为本领域已知,且可见于互联网[www.vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN\\_position=1:1](http://www.vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1)上的vBase数据库中。

[0160] 因此,本发明的一个实施方案涉及分离的Epo结合抗体或其抗原结合片段,其包含含有选自SEQ ID NO:13、33、53和73的氨基酸序列,或在这类序列的构架区中具有一个、两



个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,且进一步包含含有选自SEQ ID NO:14、34、54和74的氨基酸序列,或在这类序列的构架区中具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的轻链可变区。

[0161] 另一类型的可变区修饰是突变VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基,由此改善目的抗体的一种或更多结合特性(例如亲和力),称为“亲和力成熟”。可进行定点诱变或PCR介导的诱变来引入突变,并可在如本文所述以及实施例提供的体外或体内测定中评价对抗体结合或其他目的功能特性的影响。可引入保守修饰(如上文所讨论)。该突变可以是氨基酸替换、添加或缺失。此外,通常改变CDR区内的不超过1、2、3、4或5个残基。

[0162] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供分离的Epo结合抗体或其抗原结合片段,其由重链可变区组成,该重链可变区具有:由选自SEQ ID NO:1、21、41和61的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1、21、41和61相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列组成的VH CDR1区;具有选自SEQ ID NO:2、22、42和62的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、22、42和62相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR2区;具有选自SEQ ID NO:3、23、43和63的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:3、23、43和63相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR3区;具有选自SEQ ID NO:4、24、44和64的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4、24、44和64相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR1区;具有选自SEQ ID NO:5、25、45和65的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:5、25、45和65相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR2区;及具有选自SEQ ID NO:6、26、46和66的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6、26、46和66相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0163] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供分离的Epo结合抗体或其抗原结合片段,其由重链可变区组成,该重链可变区具有:由选自SEQ ID NO:7、27、47和67的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7、27、47和67相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列组成的VH CDR1区;具有选自SEQ ID NO:8、28、48和68的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8、28、48和68相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR2区;具有选自SEQ ID NO:9、29、49和69的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9、29、49和69相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR3区;具有选自SEQ ID NO:10、30、50和70的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10、30、50和70相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR1区;具有选自SEQ ID NO:11、31、51和71的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:11、31、51和71相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR2区;及具有选自SEQ ID NO:12、32、52和72的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:12、32、52和72相比具有1、2、3、4或5个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0164] 将抗原结合结构域移植入备选构架后支架

[0165] 可利用多种抗体/免疫球蛋白构架或支架,只要所得到的多肽包括至少一个特异性结合Epo的结合区。此类构架或支架包括人免疫球蛋白的5个主要独特型或其片段,并包括其他动物物种的免疫球蛋白,优选具有人源化方面的免疫球蛋白。单重链抗体如在骆驼中鉴定的那些在这方面尤其有利。本领域技术人员不断发现和发展新的构架、支架和片段。

[0166] 在一方面,本发明涉及用可在其上移植本发明的CDR的非免疫球蛋白支架产生基于非免疫球蛋白的抗体。可以利用已知或未知的非免疫球蛋白构架和支架,只要它们包含

对靶Epo蛋白特异的结合区。已知的非免疫球蛋白构架或支架包括但不限于纤连蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、锚蛋白(Molecular Partners AG, Zurich, 瑞士)、结构域抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, MA, and Ablynx nv, Zwijnaarde, 比利时)、脂笼蛋白(Pieris Proteolab AG, Freising, 德国)、小模块免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、巨型抗体(Avidia, Inc., Mountain View, CA)、蛋白A(Affibody AG, 瑞典)和affilin( $\gamma$ -晶体蛋白或泛素)(Scil Proteins GmbH, Halle, 德国)。

[0167] 纤连蛋白支架基于III型纤连蛋白结构域(例如, III型纤连蛋白的第十个模块(10Fn3结构域))。III型纤连蛋白结构域具有分布在两个 $\beta$ 折叠之间的7个或8个 $\beta$ 链, 该两个 $\beta$ 折叠自身彼此包装形成蛋白质的核心, 并且还含有将 $\beta$ 链彼此连接且暴露在溶剂中的环(与CDR类似)。在 $\beta$ 折叠夹层每一边缘处具有至少三个这样的环, 其中该边缘是与 $\beta$ 链方向垂直的蛋白质边界(参见US 6,818,418)。这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白, 但总体折叠与骆驼和骆马IgG中的最小功能抗体片段(包含整个抗原识别单位的重链可变区)十分相近。由于此结构, 非免疫球蛋白抗体模拟抗原结合特性, 该抗原结合特性在性质和亲和力上与抗体的抗原结合特性相似。这些支架可用于体外环随机化和改组策略, 该策略与体内抗体的亲和力成熟过程相似。这些基于纤连蛋白的分子可用作支架, 其中使用标准克隆技术用本发明的CDR替换分子的环区。

[0168] 锚蛋白技术基于用具有锚蛋白来源的重复模块的蛋白质作为携带可变区的支架, 该可变区可用于结合不同靶。该锚蛋白重复模块是由两个反向平行的 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 转角组成的33个氨基酸的多肽。通过使用核糖体展示来对可变区的结合进行最大程度优化。

[0169] Avimers衍生自含有天然A结构域的蛋白质, 如LRP-1。这些结构域天然地用于蛋白质-蛋白质相互作用, 并且在人超过250个蛋白质在结构上基于A结构域。Avimers由通过氨基酸接头连接的大量不同的“A结构域”单体(2-10)组成。可用例如美国专利申请公开号20040175756、20050053973、20050048512和20060008844中所述的方法产生可以结合靶抗原的Avimers。

[0170] Affibody亲和配体是由基于蛋白A的一个IgG结合域的支架的三螺旋束组成的小的简单蛋白质。蛋白A是来自细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白。该支架结构域由58个氨基酸组成, 随机化其中13个来产生具有大量配体变体的affibody文库(参见例如, US 5,831,012)。Affibody分子模拟抗体, 与抗体150kDa的分子量相比, 它们具有6kDa的分子量。尽管其尺寸小, 但affibody分子的结合部位与抗体的结合部位类似。

[0171] Anticalins是Pieris ProteoLab AG公司开发的产品。它们衍生自脂笼蛋白, 脂笼蛋白是一大类小而坚固的蛋白质, 通常涉及化学敏感或不溶解的化合物的生理运输或储藏。若干天然脂笼蛋白在人组织或体液中存在。蛋白质结构表明是在刚性构架上面具有高变环的免疫球蛋白。然而, 与抗体或其重组片段相比, 脂笼蛋白由具有160到180个氨基酸残基的单条多肽链组成, 仅比单个免疫球蛋白结构域稍大。构成结合袋的四环组显示明显的结构可塑性并耐受多种侧链。因此结合部位在专有方法中可重塑, 以识别具有高亲和力 and 特异性的不同形状的规定的靶分子。脂笼蛋白家族的一个蛋白质——欧洲粉蝶(*Pieris Brassicae*)的后胆色素(bilin)结合蛋白(BBP)已经用于通过诱变处理四环组来开发anticalins。描述anticalins的专利申请的一个实例在PCT公开号WO 199916873中。

[0172] Affilin分子是针对对蛋白质和小分子的特异性亲和力设计的小的非免疫球蛋白蛋白质。可从两个文库中非常快速地选择新的affilin分子,该文库的每一个基于不同的源自人的支架蛋白。Affilin分子与免疫球蛋白蛋白质不显示任何结构同源性。目前,利用两种affilin支架,其中一种是 $\gamma$ 晶体蛋白——人结构晶状体蛋白质,另一种是“泛素”超家族蛋白质。两种人支架都非常小,显示高的温度稳定性,并对pH改变和变性剂几乎是有抗性的。该高稳定性主要是由于蛋白质扩展的 $\beta$ 折叠结构。 $\gamma$ 晶体蛋白来源的蛋白质的实例描述于W0200104144中,“泛素样”蛋白质的实例描述于W02004106368中。

[0173] 蛋白质表位模拟物(PEM)是模拟蛋白质 $\beta$ 发夹二级结构的中等大小、环形、肽样分子(MW 1-2kDa),蛋白质 $\beta$ 发夹二级结构是涉及蛋白质-蛋白质相互作用的主要二级结构。

[0174] 本发明提供特异性结合Epo蛋白的全人抗体。与嵌合抗体或人源化抗体相比,本发明的人Epo结合抗体在对人个体施用时具有进一步降低的抗原性。

[0175] 骆驼抗体

[0176] 从骆驼和单峰驼(双峰驼(*Camelus bactrianus*)和单峰驼(*Camelus dromaderius*))家族的成员,包括新世界成员如美洲驼物种(驼羊(*Lama pacos*)、大羊驼(*Lama glama*)和小羊驼(*Lama vicugna*))中获得的抗体蛋白质已经在关于大小、结构复杂性和对人个体的抗原性方面进行了表征。自然界中发现的来自该哺乳动物家族的某些IgG抗体缺少轻链,并因此在结构上不同于来自其他动物的抗体的具有两条重链和两条轻链的典型四链四级结构。参见PCT/EP93/02214(1994年3月3日公开的WO 94/04678)。

[0177] 可通过遗传改造获得鉴定为VHH的小的单个可变结构域的骆驼抗体的区域,以产生对靶具有高亲和力的小蛋白质,得到低分子量的抗体衍生蛋白质,称为“骆驼纳米抗体”。参见1998年6月2日授权的美国专利号5,759,808;还参见Stijlemans,B.等,2004J Biol Chem 279:1256-1261;Dumoulin,M.等,2003Nature 424:783-788;Pleschberger,M.等2003Bioconjugate Chem 14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等2002Int J Cancer 89:456-62;和Lauwereys,M.等1998EMBO J 17:3512-3520。例如从Ablynx,Ghent,比利时可购得骆驼抗体和抗体片段的改造文库。如同非人来源的其他抗体一样,可重组改变骆驼抗体的氨基酸序列来获得与人序列更像的序列,即纳米抗体可以进行“人源化”。因此,骆驼抗体对人的天然低抗原性可进一步降低。

[0178] 骆驼纳米抗体具有人IgG分子的分子量的大概十分之一的分子量,并且该蛋白质物理直径仅几纳米。小尺寸的一种结果是骆驼纳米抗体结合对更大的抗体蛋白质而言在功能上不可见的抗原部位,即骆驼纳米抗体可用作使用经典免疫技术检测不到的抗原的检测试剂,并可能用作治疗剂。因此,小尺寸的另一结果是骆驼纳米抗体因此可抑制与靶蛋白质的沟或窄缝中的特性异部位的结合,并因而可具有这样的能力,其比经典抗体更像经典的低分子量药物的功能。

[0179] 低分子量和紧密尺寸还导致骆驼纳米抗体极其热稳定,对极端pH和蛋白酶解消化稳定,并且抗原性弱。另一结果是骆驼纳米抗体容易从循环系统转移到组织,甚至穿过血脑屏障,可治疗影响神经组织的障碍。纳米抗体可进一步便于药物运输跨过血脑屏障。参见2004年8月19日公开的美国专利申请20040161738。这些特征与对人的低抗原性组合指示巨大的治疗潜能。另外,这些分子可在原核细胞,如大肠杆菌(*E.coli*)中充分表达,并用噬菌体表达为融合蛋白,且是有功能的。

[0180] 因此,本发明的特征是对Epo具有高亲和力的骆驼抗体或纳米抗体。在本文的某些实施方案中,该骆驼抗体或纳米抗体在骆驼动物中天然产生,即使用本文针对其他抗体所述的技术,用Epo或其肽片段免疫骆驼后产生。备选地,改造结合Epo的骆驼纳米抗体,即如本文实施例中所述用Epo作为靶标的淘选方法,通过例如从适当诱变处理的骆驼纳米抗体蛋白质的噬菌体展示文库中选择来产生结合Epo的骆驼纳米抗体。可通过遗传改造进一步定制改造的纳米抗体,以在受体个体中具有从45分钟到两周的半衰期。在具体实施方案中,如例如WO 1994/004678中所述,通过将本发明的人抗体的重链或轻链的CDR序列移植入纳米抗体或单结构域抗体构架序列来获得骆驼抗体或纳米抗体。

[0181] 双特异性分子和多价抗体

[0182] 在另一方面,本发明涉及双特异性或多特异性分子,其包含本发明的Epo结合抗体或其片段。本发明的抗体或其抗原结合区可衍生为或连接至另一功能分子(例如另一肽或蛋白质(例如,另一抗体或受体的配体)),以产生结合至少两个不同结合部位或靶分子的双特异性分子。本发明的抗体可实际上衍生为或连接至超过一种其他功能分子,以产生结合多于两个不同结合部位和/或靶分子的多特异性分子;此类多特异性分子也旨在为本文所使用的术语“双特异性分子”所涵盖。为了产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可功能性连接(例如,通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,使得产生双特异性分子。

[0183] 因此,本发明包括含有至少一种对Epo的第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性的双特异性分子。例如,该第二靶表位是Epo的不同于该第一靶表位的另一表位。

[0184] 此外,对于其中双特异性分子是多特异性分子的发明,除第一和第二靶表位外,该分子可进一步包括第三结合特异性。

[0185] 在一个实施方案中,本发明的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或单链Fv)作为结合特异性。该抗体还可以是轻链或重链二聚体,或其任意最小片段,如Ladner等的美国专利号4,946,778中所述的Fv或单链构建体。

[0186] 双抗体是二价、双特异性分子,其中VH和VL结构域表达在单条多肽链上,通过太短而不允许同一条链上的两个结构域之间配对的接头连接。VH和VL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部位(参见例如Holliger等,1993Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak等,1994Structure 2:1121-1123)。双抗体可以通过在同一细胞内表达具有结构VHA-VLB和VHB-VLA(VH-VL构型)或VLA-VHB和VLB-VHA(VL-VH构型)的两条多肽链来产生。它们中的大多数可以在细菌中以可溶形式表达。通过用约15个氨基酸残基的接头连接两条形成双抗体的多肽链来产生单链双抗体(scDb)(参见Holliger和Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.,45(3-4):128-30;Wu等,1996Immunotechnology,2(1):21-36)。scDb可以在细菌中以可溶、活性单体形式表达(参见Holliger和Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.,45(34):128-30;Wu等,1996Immunotechnology,2(1):21-36;Pluckthun和Pack,1997Immunotechnology,3(2):83-105;Ridgway等,1996Protein Eng.,9(7):617-21)。双抗体可以与Fc融合产生“双-双抗体”(参见Lu等,2004J.Biol.Chem.,279(4):2856-65)。

[0187] 其他可以用于本发明的双特异性分子的抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

[0188] 可使用本领域已知的方法,通过缀合组成结合特异性来制备双特异性分子。例如,可分开产生双特异性分子的每一结合特异性,然后相互缀合。在该结合特异性是蛋白质或肽时,可用多种偶联剂或交联剂来进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳化二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、o-亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(参见例如Karpovsky等,1984J.Exp.Med.160:1686;Liu,MA等,1985Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其他方法包括Paulus,1985Behring Ins.Mitt.No.78,118-132;Brennan等,1985Science 229:81-83);及Glennie等,1987J.Immunol.139:2367-2375)中所述的那些。缀合剂是SATA和磺基-SMCC,两者均可从Pierce Chemical Co.(Rockford,IL)获得。

[0189] 在该结合特异性是抗体时,它们可通过两条重链的C端铰链区的巯基成键而缀合。在具体实施方案中,在缀合之前修饰铰链区以含有奇数个巯基残基,例如1个。

[0190] 备选地,两种结合特异性可在相同载体中编码,并在相同宿主细胞中表达和装配。在双特异性分子是mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')<sub>2</sub>或配体x Fab融合蛋白时,该方法尤其有用。本发明的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。例如在美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858中描述了用于制备双特异性分子的方法。

[0191] 可以通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(REA)、FACS分析、生物测定(例如生长抑制)、或Western印迹测定来验证双特异性分子与其特异性靶标的结合。这些测定法中的每一种一般通过利用对目的复合物特异的标记试剂(例如抗体)来检测特别重要的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0192] 另一方面,本发明提供多价化合物,其包含本发明的结合Epo的抗体的至少两个相同或不同的抗原结合部分。该抗原结合部分可通过蛋白质融合或共价或非共价键而连接在一起。备选地,已针对双特异性分子描述了连接方法。例如通过将本发明的抗体的抗体与结合本发明抗体的恒定区(例如Fc或铰链区)的抗体交联来获得四价化合物。

[0193] 例如在Borean的专利EP 1 012 280B1中描述了三聚化结构域。例如在W0 1998/018943中描述了五聚化模块。

[0194] 具有延长的半衰期的抗体

[0195] 本发明提供特异性结合Epo蛋白的在体内具有延长的半衰期的抗体。

[0196] 许多因素可影响蛋白质在体内的半衰期。例如,肾过滤、肝中的新陈代谢、通过蛋白水解酶(蛋白酶)的降解和免疫原性应答(例如,通过抗体的蛋白质中和以及通过巨噬细胞和树突状细胞的摄取)。多种策略可用于延长本发明的抗体的半衰期。例如,通过化学连接聚乙二醇(PEG)、reCODEPEG、抗体支架、聚唾液酸(PSA)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合配体和糖类保护层;通过与结合血清蛋白质(如白蛋白、IgG、FcRn)的蛋白质遗传融合并转移;通过偶联(遗传上或化学上)到其他结合部分,该结合部分结合血清蛋白质,如纳米抗体、Fab、DARPin、avimer、affibody和anticalin;通过遗传融合rPEG、白蛋白、白蛋白的结构域、白蛋白结合蛋白质和Fc;或通过掺入到纳米载体、缓释制剂或医疗设备中。

[0197] 为了延长抗体在体内的血清循环,可使用或不使用多功能接头,通过将PEG位点特异性缀合到抗体N端或C端或通过赖氨酸残基上存在的 $\epsilon$ 氨基将惰性聚合分子(如高分子量聚乙二醇(PEG))附着到抗体或其片段上。为了聚乙二醇化抗体,抗体或其片段通常与PEG(如PEG的活性酯或醛衍生物)在其中一个或多个PEG基团变得附着到抗体或抗体片段的条件下进行反应。可用反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)通过酰化反应或烷化反应进行聚乙二醇化。本文所用的术语“聚乙二醇”和“PEG”旨在包括PEG的任何形式,其已经用于衍生化其他蛋白质,如单(C1-C10)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体是去糖基化的抗体。使用导致生物活性损失最小的线性或分支聚合物衍生化。可通过SDS-PAGE和质谱密切监测缀合的程度,以保证PEG分子与抗体的正确缀合。可通过大小排阻层析或通过离子交换层析从抗体-PEG缀合物中分离未反应的PEG。可使用本领域技术人员熟知的方法,例如通过本文描述的免疫测定来测试PEG衍生的抗体的结合活性以及体内功效。聚乙二醇化蛋白质的方法为本领域已知,并可应用于本发明的抗体。参见例如,Nishimura等的EP 0 154 316和Ishikawa等的EP 0 401 384。

[0198] 其他修改的聚乙二醇化技术包括重构化学正交指导的改造技术(ReCODE PEG),其将化学上指定的侧链通过包括tRNA合成酶和tRNA的重构系统掺入到生物合成蛋白质中。该技术能够在大肠杆菌、酵母和哺乳动物细胞中将多于30个新氨基酸掺入到生物合成蛋白质中。该tRNA将非天然氨基酸掺入到琥珀密码子定位的任何位置,使琥珀密码子从终止密码子转化成发信号使化学上指定的氨基酸掺入的密码子。

[0199] 重组聚乙二醇化技术(rPEG)也可用于血清半衰期延长。该技术涉及将300-600个氨基酸的无结构蛋白质尾巴遗传融合到现有的药物蛋白质上。因为这种无结构蛋白质链的表观分子量比其实际分子量大约15倍,所以极大增加了该蛋白质的血清半衰期。与需要化学缀合和再纯化的传统聚乙二醇化不同,该制备方法极其简化并且产品是均质的。

[0200] 多唾液酸化是另一种技术,其用天然聚合物聚唾液酸(PSA)来延长活性期并提高治疗性肽和蛋白质的稳定性。PSA是唾液酸(糖)的聚合物。在用于蛋白质和治疗性肽药物递送时,聚唾液酸为缀合提供保护性微环境。这增加了治疗性蛋白质在循环中的活性期并防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然见于人体中。其被某些细菌采用,该细菌进化了超过数百万年,用该PSA聚合物包被自身的壁。通过分子拟态,这些天然聚唾液酸化细菌然后能够挫败身体的防御系统。PSA是自然界的最终隐形技术,可容易地从此类细菌大量产生并具有预定的物理特征。甚至在与蛋白质偶联时,细菌PSA也是完全非免疫原性的,因为它与人体中的PSA在化学上相同。

[0201] 另一技术包括使用连接抗体的羟乙基淀粉(“HES”)衍生物。HES是衍生自蜡状玉米淀粉的经修饰的天然聚合物,并可通过身体的酶进行新陈代谢。一般施用HES溶液来替换不足的血液容量并改善血液的流变学特性。抗体的羟乙基淀粉化使得能够通过提高分子的稳定性,以及通过降低肾清除率来延长循环半衰期,导致提高的生物学活性。通过改变不同的参数,如HES的分子量,可定制广泛的HES抗体缀合物。

[0202] 也可通过向IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链Fc结构域片段)中引入一个或更多氨基酸修饰(即取代、插入或缺失)来产生具有增加的体内半衰期的抗体。参见例如,国际公开号W0 98/23289;国际公开号W0 97/34631;和美国专利号6,277,375。

[0203] 另外,抗体可缀合到白蛋白(例如人血清白蛋白;HSA)上,以使抗体或抗体片段在体内更稳定或在体内具有更长的半衰期。技术为本领域所熟知,参见例如国际公开号WO 93/15199、WO 93/15200和WO 01/77137;和欧洲专利号EPO 413622。此外,在上述双特异性抗体的背景中,可以这样设计抗体的特异性,使得抗体的一个结合结构域结合Epo,而抗体的第二结合结构域结合血清白蛋白,优选HSA。

[0204] 用于增加半衰期的策略在纳米抗体、基于纤连蛋白的结合剂和其他希望增加其体内半衰期的抗体或蛋白质中尤其有用。

[0205] 抗体缀合物

[0206] 本发明提供特异性结合Epo蛋白的抗体或其片段,该抗体或其片段重组融合或化学缀合(包括共价和非共价缀合)到异源蛋白质或多肽(或其片段,优选至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的多肽),以产生融合蛋白。具体而言,本发明提供包含本文所述抗体的抗原结合片段(例如,Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)2片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)和异源蛋白质、多肽或肽的融合蛋白。用于将蛋白质、多肽或肽融合或缀合到抗体或抗体片段上的方法为本领域所知。参见例如美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851和5,112,946;欧洲专利号EP 0307434和EP 0367166;国际公开号WO 96/04388和WO 91/06570;Ashkenazi等,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539;Zheng等,1995,J.Immunol.154:5590-5600;和Vil等,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11337-11341。

[0207] 可通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(共同称为“DNA改组”)的技术产生其他融合蛋白。可利用DNA改组来改变本发明抗体或其片段的活性(例如,具有更高亲和力和更低解离速率的抗体或其片段)。一般参见美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252和5,837,458;Patten等,1997,Curr.Opinion Biotechnol.8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.16(2):76-82;Hansson等,1999,J.Mol.Biol.287:265-76;及Lorenzo和Blasco,1998,Biotechniques 24(2):308-313(这些专利和出版物中的每一个以其整体引入作为参考)。可在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变抗体或其片段,或编码的抗体或其片段。编码特异性结合Epo蛋白的抗体或其片段的多核苷酸可与一种或多种异源分子的一个或多个成分、基序、节段、部分、结构域、片段等重组。

[0208] 此外,可将抗体或其片段融合到标记序列(如肽)以便于纯化。在优选实施方案中,标记氨基酸序列是六组氨酸肽,如pQE载体(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,CA,91311)中提供的标签等,其中许多是市售的。如Gentz等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824中所述,例如,六组氨酸为纯化融合蛋白提供了便利。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于对应于衍生自流行性感凝血凝素蛋白质的表位(Wilson等,1984,Cell 37:767)的血凝素(“HA”)标签和“flag”标签。

[0209] 在其他实施方案中,本发明的抗体或其片段与诊断剂或检测剂缀合。此类抗体可作为临床测试程序的一部分(如测定特定疗法的功效),用于对疾病或障碍的起始、发展、进展和/或严重性进行监测或预后。可通过将抗体与可检测物质偶联来实现这种诊断和检测,该可检测物质包括但不限于多种酶,如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶;辅基,如但不限于链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物

素;荧光物质,如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质,如但不限于鲁米诺;生物发光物质,如但不限于荧光素酶、萤光素和水母发光蛋白;放射性物质,如但不限于碘(131I、125I、123I和121I)、碳(14C)、硫(35S)、氡(3H)、铟(115In、113In、112In和111In,)、锝(99Tc)、钽(201Ti)、镓(68Ga、67Ga)、钯(103Pd)、钼(99Mo)、氙(133Xe)、氟(18F)、153Sm、177Lu、159Gd、149Pm、140La、175Yb、166Ho、90Y、47Sc、186Re、188Re、142Pr、105Rh、97Ru、68Ge、57Co、65Zn、85Sr、32P、153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn和117Tm;及使用多种正电子发射断层术的正电子发射金属,和非放射性顺磁金属离子。

[0210] 本发明还包括与治疗性部分缀合的抗体或其片段的用途。抗体或其片段可缀合到治疗性部分,如细胞毒素(例如细胞生长抑制剂或细胞杀伤剂),治疗剂或放射性金属离子,例如 $\alpha$ 粒子发射体。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任意物质。

[0211] 另外,抗体或其片段可缀合到修饰给定生物学应答的治疗性部分或药物部分。治疗性部分或药物部分不解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有想要的生物学活性的蛋白质、肽或多肽。此类蛋白质可包括例如,毒素,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子、 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物、细胞凋亡剂、抗血管生成剂;或生物应答修饰因子,例如淋巴因子。

[0212] 此外,抗体可缀合到治疗性部分,如放射性金属离子,如 $\alpha$ -发射体,如213Bi,或用于将放射性金属离子(包括但不限于131In、131Lu、131Y、131Ho、131Sm)缀合到多肽的大环螯合剂。在某些实施方案中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可通过接头分子附着到抗体上。此类接头分子为本领域公知,并描述于Denardo等,1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson等,1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7;和Zimmerman等,1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50中,每一参考文献以其整体引入作为参考。

[0213] 用于将治疗性部分缀合到抗体上的技术是众所周知的,参见例如Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld等(编辑),第243-56页(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”, Controlled Drug Delivery (第2版), Robinson等(编辑),第623-53页(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等(编辑),第475-506页(1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等(编辑),第303-16页(Academic Press 1985); 和Thorpe等,1982, Immunol. Rev. 62:119-58。

[0214] 抗体也可附着到固相支持物上,该固相支持物尤其用于靶抗原的免疫测定或纯化。此类固相支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0215] 产生本发明的抗体的方法



[0216] 编码抗体的核酸

[0217] 本发明提供基本纯化的核酸分子,其编码包含上述Epo结合抗体链的区段或结构域的多肽。本发明的一些核酸包含编码SEQ ID NO:13、33、53或73中所示的重链可变区的核苷酸序列,和/或编码SEQ ID NO:14、34、54或74中所示的轻链可变区的核苷酸序列。在具体实施方案中,该核酸分子是在表1中鉴定的那些核酸分子。本发明的一些其他核酸分子包含与表1中鉴定的那些核酸分子的核苷酸序列基本相同(例如至少65%、80%、95%或99%)的核苷酸序列。在从适当的表达载体表达时,由这些多核苷酸编码的多肽能够显示Epo抗原结合能力。

[0218] 本发明还提供这样的多核苷酸,该多核苷酸编码来自上文所示的Epo结合抗体的重链或轻链的至少一个CDR区且通常为全部三个CDR区。一些其他多核苷酸编码上文所示的Epo结合抗体的重链和/或轻链的全部或基本上全部可变区序列。由于密码子的简并性,多种核酸序列将编码每一种免疫球蛋白氨基酸序列。

[0219] 本发明的核酸分子可编码抗体的可变区和恒定区二者。本发明的一些核酸序列包含编码成熟重链序列的核苷酸,该成熟重链序列与SEQ ID NO:15、35、55或75中所示的成熟重链序列基本相同(例如,至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)。一些其他核酸序列包含编码成熟轻链序列的核苷酸,该成熟轻链序列与SEQ ID NO:16、36、56或76中所示的成熟轻链序列基本相同(例如,至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)。

[0220] 可通过从头固相DNA合成或通过编码Epo结合抗体或其结合片段的现有序列(例如下文实施例中所述的序列)的PCR诱变来产生多核苷酸序列。可通过本领域已知的方法实现核酸的直接化学合成,如Narang等,1979, *Meth. Enzymol.* 68:90的磷酸三酯法;Brown等, *Meth. Enzymol.* 68:109,1979的磷酸二酯法;Beaucage等, *Tetra. Lett.*, 22:1859,1981的二乙基亚磷酰胺法;和美国专利号4,458,066的固相支持物法。可按例如PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (编辑), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis等(编辑), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila等, *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; 和Eckert等, *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991中所述进行通过PCR向多核苷酸序列中引入突变。

[0221] 本发明还提供用于产生上述Epo结合抗体的表达载体和宿主细胞。可用多种表达载体来表达编码Epo结合抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的表达载体和非病毒表达载体都可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括质粒、游离型载体(通常具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)和人工染色体(参见例如, Harrington等, *Nat Genet* 15:345, 1997)。例如,用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达Epo结合多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B&C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B&C (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV载体及本领域已知用于表达其他蛋白质的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP EB病毒、痘苗病毒载体和Semliki Forest病毒(SFV)的载体。参见, Brent等, *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; 和Rosenfeld等, *Cell* 68:143, 1992。

[0222] 表达载体的选择依赖于将在其中表达该载体的预期宿主细胞。通常,该表达载体含有有效连接编码Epo结合抗体链或片段的多核苷酸的启动子和其他调节序列(例如增强

子)。在一些实施方案中,用诱导型启动子来防止插入序列除了在诱导条件下之外的表达。诱导型启动子包括,例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可在非诱导条件下扩大转化生物的培养,而不偏向编码序列的群体,该编码序列的表达产物能更好地由宿主细胞耐受。除启动子外,还可要求或希望将其他调节元件用于Epo结合抗体链或片段的有效表达。这些元件通常包括ATG起始密码子和邻近核糖体结合位点或其他序列。此外,可通过包括适合于所使用的细胞系统的增强子来增强表达的效率(参见例如,Scharf等,Results Probl.Cell Differ.20:125,1994;和Bittner等,Meth.Enzymol.,153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可用于提高哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0223] 表达载体也可提供分泌信号序列位置,以与所插入的Epo结合抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更经常地,在包括进入载体之前,将该插入的Epo结合抗体序列与信号序列连接。待用于接受编码Epo结合抗体轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。此类载体允许可变区表达为与恒定区的融合蛋白,由此导致完整抗体或其片段的产生。通常,此类恒定区是人的恒定区。

[0224] 用于包含并表达Epo结合抗体链的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。大肠杆菌是用于克隆和表达本发明的多核苷酸的一种原核宿主。适于使用的其他微生物宿主包括芽孢杆菌,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其他肠杆菌科(enterobacteriaceae),如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和多种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。在这些原核宿主中,也可以制备表达载体,其通常含有与该宿主细胞相容的表达控制序列(例如复制起点)。此外,将存在任意数目的多种众所周知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 $\beta$ -内酰胺酶启动子系统,或来自 $\lambda$ 噬菌体的启动子系统。该启动子通常可选地与操纵子序列一起控制表达,并具有核糖体结合位点序列等,用于起始并完成转录和翻译。其他微生物,如酵母也可用于表达本发明的Epo结合多肽。也可将昆虫细胞与杆状病毒载体组合使用。

[0225] 在一些优选实施方案中,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本发明的Epo结合多肽。例如,它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如实施例所述的1D6.C9骨髓瘤杂交瘤克隆)或包含外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如下文示例的SP2/0骨髓瘤细胞)。这些包括任意正常死亡的或正常或非正常永生的动物细胞或人细胞。例如,已经发展了能够分泌完整免疫球蛋白的大量适宜的宿主细胞系,包括CHO细胞系、多种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、经转化的B细胞和杂交瘤。一般在例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中讨论了哺乳动物组织细胞培养物在表达多肽中的用途。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列,如复制起点、启动子和增强子(参见例如,Queen等,Immunol.Rev.89:49-68,1986),及必要的加工信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体一般含有衍生自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。适宜的启动子可以是组成型的、细胞类型特异型的、阶段特异型的、和/或可调整的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人立即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0226] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而不同。

例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook,等,上文)。其他方法包括,例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、生物射弹方法、病毒颗粒、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合物(Elliot和O'Hare,Cell 88:223,1997)、DNA的活性剂增强摄取和离体转导。对于重组蛋白质的长期、高产率产生,通常将希望稳定表达。例如,可用含有病毒复制起点或内源表达元件和选择标记基因的本发明的表达载体来制备稳定表达Epo结合抗体链或结合片段的细胞系。引入载体后,可以使细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转换到选择性培养基。选择标记的目的是赋予对选择的抗性,并且其存在允许成功表达所引入的序列的细胞在选择性培养基中生长。可以用适于该细胞类型的组织培养技术增殖具有抗性的稳定转染的细胞。

[0227] 本发明的单克隆抗体的产生

[0228] 可通过多种技术来产生单克隆抗体(mAb),包括常规单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein,1975Nature 256:495的标准体细胞杂交技术。可利用产生单克隆抗体的许多技术,例如,B淋巴细胞的病毒转化或致癌性转化。

[0229] 用于制备杂交瘤的动物系统是鼠、大鼠和兔系统。小鼠中杂交瘤的产生是完善的方法。分离经免疫的脾细胞用于融合的免疫方案和技术为本领域所知。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是已知的。

[0230] 可在按上文所述制备的鼠单克隆抗体的序列基础上制备本发明的嵌合抗体或人源化抗体。可用标准分子生物学技术从目的鼠杂交瘤中获得编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA,并进行改造以含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可用本领域已知的方法将鼠可变区连接到人恒定区(参见例如,Cabilly等的美国专利号4,816,567)。为了产生人源化抗体,可用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人构架中。参见例如,Winter的美国专利号5225539和Queen等的美国专利号5530101、5585089、5693762和6180370。

[0231] 在某实施方案中,本发明的抗体是人单克隆抗体。可用携带人免疫系统的部分而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生抗Epo的此类人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括本文分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并在此处统称为“人Ig小鼠”。

[0232] HuMAb**小鼠**<sup>®</sup>(Medarex, Inc.) 含有编码未重排的人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和K轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座(miniloci),以及失活内源 $\mu$ 和K链基因座的靶向突变(参见例如,Lonberg,等,1994Nature 368(6474):856-859)。因此,该小鼠显示降低表达的小鼠IgM或K,并且响应免疫时,所引入的人重链和轻链转基因经历种类转换和体细胞突变,以产生高亲和力人IgG<sub>K</sub>单克隆抗体(Lonberg, N.等,1994上文;综述于Lonberg, N., 1994Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg, N.和Huszar, D., 1995Intern. Rev. Immunol. 13:65-93;及Harding, F.和Lonberg, N., 1995Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546中)。HuMAb小鼠的制备和用途以及该小鼠所携带的基因组修饰进一步描述于Taylor, L.等,1992Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen, J.等,1993International Immunology 5:647-656;Tuaille等,1993Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724;Choi等,1993Nature Genetics 4:117-123;Chen, J.等,1993EMBO J. 12:821-830;Tuaille等,1994J. Immunol. 152:2912-2920;

Taylor, L. 等, 1994 *International Immunology* 579-591; 及 Fishwild, D. 等, 1996 *Nature Biotechnology* 14:845-851 中, 所有参考文献的内容在此以其整体明确引入作为参考。进一步参见均为 Lonberg 和 Kay 的美国专利号 5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,789,650、5,877,397、5,661,016、5,814,318、5,874,299 和 5,770,429; Surani 等的美国专利号 5,545,807; 均为 Lonberg 和 Kay 的 PCT 公开号 WO 92103918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97113852、WO 98/24884 和 WO 99/45962; 及 Korman 等的 PCT 公开号 WO 01/14424。

[0233] 在另一实施方案中, 可用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠, 如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠来产生本发明的人抗体。Ishida 等的 PCT 公开 WO 02/43478 中详细描述了本文称为“KM 小鼠”的此类小鼠。

[0234] 另外, 表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统在本领域中可得, 并可用于制备本发明的 Epo 结合抗体。例如, 可使用称为 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的备选转基因系统。例如 Kucherlapati 等的美国专利号 5,939,598、6,075,181、6,114,598、6,150,584 和 6,162,963 中描述了此类小鼠。

[0235] 此外, 表达人免疫球蛋白基因的备选转染色体动物系统在本领域中可得, 并可用于制备本发明的 Epo 结合抗体。例如, 可使用称为“TC 小鼠”的携带人重链转染色体和人轻链转染色体二者的小鼠; Tomizuka 等, 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 中描述了此类小鼠。此外, 携带人重链和轻链染色体的奶牛在本领域中已有描述 (Kuroiwa 等, 2002 *Nature Biotechnology* 20:889-894), 并可用于制备本发明的 Epo 结合抗体。

[0236] 也可用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示法制备本发明的人单克隆抗体。在本领域中建立或在下文实施例中描述了用于分离人抗体的此类噬菌体展示法。参见例如: Ladner 等的美国专利号 5,223,409、5,403,484 和 5,571,698; Dower 等的美国专利号 5,427,908 和 5,580,717; McCafferty 等的美国专利号 5,969,108 和 6,172,197; 及 Griffiths 等的美国专利号 5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915 和 6,593,081。

[0237] 也可用 SCID 小鼠制备本发明的人单克隆抗体, 在该 SCID 小鼠中, 已经重构了人免疫细胞, 使得可在免疫后产生人抗体应答。例如 Wilson 等的美国专利号 5,476,996 和 5,698,767 中描述了此类小鼠。

[0238] 构架或 Fc 改造

[0239] 本发明的改造抗体包括其中已对 VH 和/或 VL 内的构架残基进行了修饰, 例如以改善抗体特性的那些抗体。通常进行这类构架修饰来降低抗体的免疫原性。例如, 一种方法是将一个或多个构架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体而言, 已经经历了体细胞突变的抗体含有不同于抗体所衍生自的种系序列的构架残基。可通过比较抗体构架序列与该抗体所衍生自的种系序列来鉴定此类残基。为了将构架区序列恢复成它们的种系构型, 可以例如通过定点诱变来将体细胞突变“回复突变”至种系序列。此类“回复突变的”抗体也旨在包括在本发明内。

[0240] 另一类型的构架修饰涉及突变构架区内或甚至一个或多个 CDR 区内的一个或多个残基, 以去除 T 细胞表位, 由此降低抗体的潜在免疫原性。该方法也称为“去免疫化”, 并进一步详细描述于 Carr 等的美国专利公开号 20030153043 中。

[0241] 除在构架或 CDR 区内进行修饰外或作为备选, 可改造本发明的抗体以包括 Fc 区内的修饰, 通常用来改变抗体的一种或多种功能特性, 如血清半衰期、补体固定、Fc 受体结合、

和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,可化学修饰(例如,一个或多个化学部分可附着到抗体上)或修饰本发明的抗体以改变其糖基化,同样用于改变抗体的一种或多种功能特性。下文中进一步详细描述了这些实施方案中的每一个。Fc区中残基的编号是Kabat的EU指数的编号。

[0242] 在一个实施方案中,修饰CH1的铰链区,使得改变,例如增加或减少铰链区中半胱氨酸残基的数目。Bodmer等的美国专利号5,677,425中进一步描述了该方法。改变CH1的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如以便于轻链和重链的装配,或提高或降低抗体的稳定性。

[0243] 在另一实施方案中,突变抗体的Fc铰链区,以降低抗体的生物半衰期。更具体而言,向Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区引入一个或多个氨基酸突变,使得抗体相对于天然的Fc铰链结构域SpA结合具有受损的葡萄球菌蛋白A (SpA) 结合。Ward等的美国专利号6,165,745中进一步详细描述了该方法。

[0244] 在另一实施方案中,修饰抗体以增加其生物半衰期。可使用多种方法。例如,如Ward的美国专利号6,277,375中所述,可引入一个或多个以下突变:T252L、T254S、T256F。备选地,如Presta等的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述,为了增加生物半衰期,可在CH1或CL区内改变抗体以含有从IgG的Fc区的CH2结构域取得的2个环取得的救助受体结合表位。

[0245] 还在其他实施方案中,通过用不同氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可用不同氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,使得抗体对效应子配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变对其亲和力的效应子配体可以是例如,Fc受体或补体的C1组分。Winter等的美国专利号5,624,821和5,648,260中都进一步详细描述了该方法。

[0246] 在另一实施方案中,可用不同氨基酸残基替换选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸,使得抗体具有改变的C1q结合/或降低的或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。Idusogie等的美国专利号6,194,551中进一步详细描述了该方法。

[0247] 在另一实施方案中,改变一个或多个氨基酸残基,由此改变抗体固定补体的能力。Bodmer等的PCT公开W0 94/29351中进一步详细描述了该方法。

[0248] 还在另一实施方案中,修饰Fc区以提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或通过修饰一个或多个氨基酸来增加抗体对Fc $\gamma$ 受体的亲和力。Presta的PCT公开W0 00/42072中进一步详细描述了描述该方法。此外,已经定位了人IgG1上的Fc $\gamma$ R1、Fc $\gamma$ R2、Fc $\gamma$ R3和Fc $\gamma$ Rn结合部位,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields,R.L.等,2001J.Biol.Chem.276:6591-6604)。

[0249] 还在另一实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可制备去糖基化的抗体(即该抗体缺乏糖基化)。可改变糖基化,例如以增加抗体对“抗原”的亲和力。可通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现此类糖类修饰。例如,可进行导致一个或多个可变区构架糖基化位点消除的一个或多个氨基酸取代,由此消除该位点处的糖基化。这种去糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。Co等的美国专利号5,714,350和6,350,861中进一步详细描述了该方法。

[0250] 此外或备选地,可以制备具有改变类型的糖基化的抗体,如具有减少量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分G1cNac结构的抗体。已经证明此类改变的糖

基化模式提高抗体的ADCC能力。例如通过在具有改变的糖基化机器的宿主细胞中表达抗体来实现此类糖类修饰。已经在本领域中描述了具有改变的糖基化机器的细胞,并且该细胞可用作在其中表达本发明的重组抗体的宿主细胞,由此产生具有改变的糖基化的抗体。例如, Hang等的EP 1,176,195描述了具有功能上破坏的FUT8基因的细胞系,该基因编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示低岩藻糖基化。Presta的PCT公开WO 03/035835描述了变体CHO细胞系Lec13细胞,其将岩藻糖附着到Asn(297)-连接的糖类上的能力降低,也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖化(也参见Shields,R.L.等,2002J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等的PCT公开WO 99/54342描述了这样的细胞系,该细胞系经改造以表达修饰糖蛋白的糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII)),使得在改造的细胞系中表达的抗体显示增加的二等分GlcNac结构,这导致抗体的ADCC活性提高(也参见Umana等,1999Nat.Biotech.17:176-180)。

[0251] 改造改变的抗体的方法

[0252] 如上文所讨论,具有本文所示的VH和VL序列或全长重链和轻链序列的Epo结合抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列、VH和/或VL序列、或附着到其上的恒定区来产生新的Epo结合抗体。因此,在本发明的另一方面,用本发明的Epo结合抗体的结构特征来产生结构上相关的Epo结合抗体,该抗体保留了本发明的抗体的至少一种功能特性,如结合人Epo,以及抑制Epo的一种或多种功能特性(例如,抑制Epo与Epo受体的结合,抑制Epo依赖性细胞增殖)。

[0253] 例如,本发明的抗体的一个或多个CDR区或其突变可与已知的构架区和/或其他CDR重组组合,以产生上文讨论的本发明的其他重组改造的Epo结合抗体。其他类型的修饰包括在先前部分中描述的那些。用于改造方法的起始材料是本文提供的一个或多个VH和/或VL序列,或其一个或多个CDR区。为了产生改造的抗体,不必实际制备(即表达为蛋白质)具有本文提供的一个或多个VH和/或VL序列,或其一个或多个CDR区的抗体。而是,将序列中包含的信息用作起始材料来产生衍生自初始序列的“第二代”序列,然后制备该“第二代”序列并将其表达为蛋白质。

[0254] 因此,在另一实施方案中,本发明提供用于制备经修饰的Epo结合抗体的方法,该方法包括步骤:a)产生Epo结合抗体,该Epo结合抗体包含具有选自SEQ ID NO:1、21、41和61的CDR1序列、选自SEQ ID NO:2、22、42和62的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:3、23、43和63的CDR3序列的重链可变区抗体序列,及具有选自SEQ ID NO:4、24、44和64的CDR1序列、选自SEQ ID NO:5、25、45和65的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:6、26、46和66的CDR3序列的轻链可变区抗体序列;b)改变该重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基来产生至少一个改变的抗体序列;和c)将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0255] 因此,在另一实施方案中,本发明提供用于制备Epo结合抗体的方法,该Epo结合抗体由具有选自SEQ ID NO:7、27、47和67的CDR1序列、选自SEQ ID NO:8、28、48和68的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:9、29、49和69的CDR3序列的重链可变区抗体序列及具有选自SEQ ID NO:10、30、50和70的CDR1序列、选自SEQ ID NO:11、31、51和71的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:12、32、52和72的CDR3序列的轻链可变区抗体序列组成;改变该重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基来产生至少一个改变的抗体序列;并将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0256] 因此,在另一实施方案中,本发明提供用于制备针对哺乳动物细胞中的表达优化的Epo结合抗体的方法,该方法有以下组成:具有选自SEQ ID NO:15、35、55和75的序列的全长重链抗体序列及具有选自SEQ ID NO:16、36、56和76的序列的全长轻链抗体序列;改变该全长重链抗体序列和/或全长轻链抗体序列内的至少一个氨基酸残基来产生至少一个改变的抗体序列;并将该改变的抗体序列表达为蛋白质。在一个实施方案中,该重链或轻链中的改变是在该重链或轻链的构架区中。

[0257] 也可通过筛选抗体文库来制备该改变的抗体序列,该抗体文库具有如US2005025552中描述的固定的CDR3序列或最小必需结合决定簇以及CDR1和CDR2序列上的多样性。可按照适合于从抗体文库中筛选抗体的任意筛选技术(如噬菌体展示技术)进行筛选。

[0258] 标准分子生物学技术可用于制备和表达改变的抗体序列。由该改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述Epo结合抗体的一种、一些或全部功能特性的抗体,该功能特性包括但不限于:与人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠Epo特异性结合;及抗体在F36E和/或Ba/F3-EpoR细胞增殖测定中抑制Epo依赖性细胞增殖。

[0259] 在本发明的改造抗体的方法的某些实施方案中,可沿全部或部分Epo结合抗体编码序列随机地或选择性地引入突变,并且可按本文所述筛选所得到的经修饰的Epo结合抗体的结合活性和/或其他功能特性。已经在本领域中描述了突变方法。例如,Short的PCT公开W0 02/092780描述了用饱和诱变、合成连接装配或其组合来产生和筛选抗体突变的方法。备选地,Lazar等的PCT公开W0 03/074679描述了用计算筛选方法来优化抗体理化性质的方法。

[0260] 在本发明的某些实施方案中,已改造抗体来去除脱酰胺位点。已知脱酰胺在肽或蛋白质中导致结构和功能变化。脱酰胺可导致蛋白质药物的生物活性降低,以及药物代谢动力学和抗原性改变。(Anal Chem.2005年3月1日;77(5):1432-9)。

[0261] 在本发明的某些实施方案中,已改造抗体来提高pI并改善它们的药物样特性。蛋白质的pI是分子整体理化性质的主要决定因素。已知具有低pI的抗体溶解性更低、稳定性更低,且易于聚集。此外,低pI抗体的纯化富有挑战,尤其是在为临床使用进行放大期间可成为问题。提高本发明的抗-Epo抗体或Fab的pI改善了它们的溶解性,使得能够按更高的浓度(>100mg/ml)配制抗体。按高浓度(例如>100mg/ml)配制抗体提供了能够经玻璃体内注射将更高剂量的抗体施用入患者眼中的优势,其转而可以使得能够降低给药频率,这对包括视网膜血管病的慢性病的治疗而言是显著的优势。更高的pI还可以增加IgG形式的抗体的FcRn介导的再循环,从而使得药物在体内保持更长时间,需要更少的注射。最后,由于更高的pI导致更长的货架期和体内生物活性,抗体的总体稳定性显著提高。优选地,pI大于或等于8.2。

[0262] 可用本领域中可得的标准测定和/或本文描述的测定,如实施例中所示的那些(例如,ELISA)来评估经改变的抗体的功能性质。

[0263] 预防和治疗用途

[0264] 通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体或抗原结合片段,可以按治疗上有用的浓度用本文所述结合Epo的抗体治疗Epo水平和/或活性提高相关的疾病或障碍。本发明提供通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体来治疗视网膜血管病相关病症

或障碍的方法。本发明提供通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体来治疗糖尿病性视网膜病 (DR) 相关病症或障碍的方法。本发明提供通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体来治疗黄斑水肿相关病症或障碍的方法。本发明还提供通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体来治疗糖尿病性黄斑水肿 (DME) 的方法。本发明还提供通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体来治疗增生性糖尿病性视网膜病 (PDR) 的方法。另外, 本发明还提供通过对有需要的个体施用有效量的本发明的抗体来治疗年龄相关黄斑水肿 (AMD)、视网膜静脉阻塞 (RVO)、血管性水肿、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成和/或早产儿视网膜病的方法。本发明还提供治疗 $\beta$ 地中海贫血和/或癌症的方法。

[0265] 本发明还涉及用于治疗Epo水平和/活性提高相关疾病或障碍的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。本发明还涉及用于治疗视网膜血管病相关病症或障碍的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。本发明还涉及用于治疗糖尿病性视网膜病 (DR) 相关病症或障碍的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。本发明还涉及用于治疗黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿 (DME) 和/或增生性糖尿病性视网膜病 (PDR) 相关病症或障碍的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。本发明还涉及用于治疗年龄相关黄斑水肿 (AMD)、视网膜静脉阻塞 (RVO)、血管性水肿、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成和/或早产儿视网膜病的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。本发明还涉及用于治疗 $\beta$ 地中海贫血和/或癌症的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。更具体而言, 除表1中所述的那些之外, 用于治疗Epo水平和/活性提高相关疾病或障碍的本文所述分离的抗体或其抗原结合片段可以是本文所述抗体或抗原结合片段中的任一种。另外, 除表1中所述的那些之外, 用于治疗视网膜血管病相关病症或障碍的本文所述分离的抗体或其抗原结合片段可以是本文所述抗体或抗原结合片段中的任一种。本发明的抗体尤其用于预防视网膜血管病相关病症或障碍 (例如DR、DME、NPDR、PDR、年龄相关黄斑变性 (AMD)、视网膜静脉阻塞 (RVO)、血管性水肿、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成和/或早产儿视网膜病) 的进展, 治疗或预防视网膜血管病相关黄斑水肿, 降低**Lucentis®** (RTM) 注射频率, 及改善由视网膜血管病进展引起的视力丧失。本发明的抗体也可以与抗-VEGF疗法组合用于治疗视网膜血管病患者。

[0266] 在一方面, 本发明涉及抑制Epo依赖性细胞增殖的方法, 其中该方法包括使Epo (例如使个体中的Epo) 与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤; 尤其是, 该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。在一方面, 该方法包括使细胞 (例如包含Epo的细胞) 与含有本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触。本发明还涉及用于抑制个体中的Epo依赖性细胞增殖的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。考虑该细胞是人细胞。该细胞可以是B细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。

[0267] 可以通过例如裂隙灯生物显微术 (bio-microscop)、光学相干断层扫描、彩色眼底照相术和荧光素血管造影术来测量细胞增殖 (Heng等Diabet.Med. 2013年6月; 30 (6) : 640-50)。此外, 可以用诸如下文所述的F36E或Ba/F3-EpoR细胞增殖测定的测定来测量本文所述抗体或抗原结合片段抑制Epo依赖性细胞增殖的能力。

[0268] 本发明还涉及抑制Epo依赖性细胞信号发放的方法, 其中该方法包括使Epo与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触来阻止Epo与细胞表面的受



体相互作用的步骤。在一方面,该方法包括使含有Epo的细胞与包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触。本发明还涉及用于抑制个体中的Epo依赖性细胞信号发放的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。考虑该细胞是人细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。

[0269] Epo与EpoR的结合诱导经JAK2激酶的信号发放,导致包括磷脂酰-肌醇3-激酶(PI-3K)/Akt、MAP激酶、STAT5和蛋白激酶C的下游信号传导途径的激活(Jelkmann,2007; Jelkmann,2004)。已报道Epo或Epo受体(EpoR)由不同细胞类型如内皮细胞、平滑肌细胞和CNS细胞内源产生(Ogunshola和Bogdanova,2013)。通过结合Epo激活EpoR可触发下游信号传导途径,导致不同的活性,如钙转运(Korbel等,2004)、细胞存活(Velly等,2010)、神经保护(Grimm等,2002)和血管发生(Ribatti,2010;Ribatti等,2003)。因此,可以通过测量这些信号传导途径中的一种或多种的活性来测定Epo依赖性细胞信号发放的抑制。例如,可以通过测量JAK2激酶、PI-3K/Akt、MAP激酶、STAT5或蛋白激酶C来测定Epo依赖性细胞信号发放的抑制。用于测量这些信号传导途径的方法为本领域已知,用于测量这种途径活性的试剂盒可购得。此外,可以通过测量上述细胞增殖来测定Epo依赖性细胞信号发放的抑制。细胞增殖可以在个体中(例如血管发生),或可以用诸如下文所述的F36E或Ba/F3-EpoR细胞增殖测定的测定来测量。在一方面,相对于对照,在本文所述抗体存在下,Epo依赖性细胞信号发放统计上显著地( $p < 0.05$ )减少。

[0270] 本发明还涉及抑制Epo依赖性细胞增殖或信号发放的方法,其中该方法包括使Epo与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触来阻止Epo与细胞表面的受体相互作用的步骤。考虑该细胞是B细胞。考虑该细胞是人细胞。

[0271] 本发明还涉及抑制Epo与Epo受体结合的方法,其中该方法包括使Epo(例如使个体中的Epo)与有效量的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤;尤其是,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。本发明还涉及用于抑制个体的Epo与细胞上的Epo受体结合的包含本文所述分离的抗体或其抗原结合片段的组合物;尤其是,该组合物可以包含抗体NVS1、NVS2、NVS3或NVS4。考虑该细胞是人细胞。进一步考虑该细胞在个体中。还考虑该细胞在该个体的眼中。还进一步考虑该个体是人。可以按Khankin等PLoS ONE,20105:e9246所述测量Epo与Epo受体结合的抑制。

[0272] 视网膜血管病及视网膜血管病相关黄斑水肿的治疗和/或预防可由眼科学家或健康护理专业人员用视觉功能和/或视网膜解剖学的临床相关测量来测定。视网膜血管病相关病症或障碍的治疗意指导致或考虑其导致视觉功能和/或视网膜解剖学的改善或保护的任意行动(例如施用本文所述抗-Epo抗体)。此外,在它涉及视网膜血管病相关病症或障碍时,预防意指在处于视觉功能、视网膜解剖学和/或本文定义的视网膜血管病参数恶化风险的患者中防止或减慢该恶化的任意行动(例如施用本文所述抗-Epo抗体)。

[0273] 视觉功能可以包括例如视力、低照度视力、视野、中央视野、周边视力、对比敏感度、暗适应、光应力恢复、辨色力、阅读速度、辅助装置依赖性(例如大字体、放大装置、望远镜)、面部识别、驾驶机动车熟练程度、进行日常生活中的一项或多项活动的能力和/或患者报告的视觉功能相关满意度。

[0274] 视觉功能的示例性测量包括Snellen视力、ETDRS视力、低照度视力、Amsler方格表、Goldmann视野、Humphrey视野、微视野检查(microperimetry)、Pelli-Robson图表、

SKILL卡片、Ishihara色板、Farnsworth D15或D100色彩测试、标准视网膜电描记术、多焦视网膜电描记术、经验证的阅读速度测试、面部识别、驾驶模拟和患者报告的满意度。因此，血管病和/或黄斑水肿的治疗可以说是通过获得或未丧失ETDRS量表上的2或更多行(或10字母)的视力。此外，血管病和/或黄斑水肿的治疗可以说是在个体显示阅读速度(字/分钟)提高至少10%或未降低10%时发生。此外，血管病和/或黄斑水肿的治疗可以说是在个体显示Ishihara测试上正确鉴别的板或Farnsworth测试上正确排序的盘的比例提高20%或未降低20%时发生。另外，视网膜血管病和/或黄斑水肿的治疗可以说是在个体达到预先指定的暗适应程度的时间具有例如至少10%的减少或未增加10%或更多时发生。此外，视网膜血管病和/或黄斑水肿的治疗可以说是在个体显示表示为由合格健康护理专业人员(即眼科学家)测定的视角的视力盲点的总面积例如减少至少10%或未增加10%或更多时发生。

[0275] 可以治疗或预防的视网膜解剖学的不希望的方面包括例如微动脉瘤、黄斑水肿、棉絮斑、视网膜内微血管异常(IRMA)、毛细血管脱落、白细胞黏附、视网膜局部缺血、视盘新血管形成、后极新血管形成、虹膜新血管形成、视网膜内出血、玻璃体出血、黄斑瘢痕、视网膜下纤维化、和视网膜纤维化、静脉扩张、血管迂曲、血管渗漏。因此，例如黄斑水肿的治疗可以通过光学相干断层扫描测量的中央视网膜子域厚度减少20%或更多来测定。

[0276] 评估视网膜解剖学的示例性手段包括眼底镜检查、眼底照相术、荧光素血管造影、靛青绿血管造影、光学相干断层扫描(OCT)、谱域光学相干断层扫描、扫描激光检眼镜检查、共焦显微术、自适应光学、眼底自发荧光、活组织检查、尸体剖检和免疫组织化学。因此，在通过荧光素血管造影测定的渗漏面积减少10%时，可以说在个体中治疗了血管病和/或黄斑水肿。

[0277] 待用本发明的治疗剂治疗的个体也可以以已知的治疗糖尿病相关病症的方法施用其他治疗剂，如所有形式的胰岛素和抗高血压药物。

[0278] 眼病(如年龄相关黄斑变性(AMD)、视网膜静脉阻塞(RVO)、血管性水肿、多灶性脉络膜炎、近视性脉络膜新血管形成和/或早产儿视网膜病)的治疗和/或预防可以由眼科学家或健康护理专业人员通过任意上述测量用视觉功能和/或视网膜解剖学的临床相关测量来测定。虽然本文所述的测量不适用于本文的各种和每种眼病，但本领域技术人员将识别出可以用来治疗给定眼病的视觉功能和/或视网膜解剖学的临床相关测量。

[0279] 在将本发明的治疗剂与另一种药物一起施用时，二者可以以任一顺序顺次施用或同时施用。在一些方面，对还接受第二药物(例如**Lucentis®**)治疗的个体施用本发明的抗体。在其他方面，结合手术治疗施用该结合分子。

[0280] 适合与Epo结合抗体组合治疗的药物包括本领域已知的能够调节VEGF、VEGF受体的活性的药物，其他受体酪氨酸激酶抑制剂，或调节HIF-1介导途径的其他实体。已报道其他药物抑制这些途径，包括雷珠单抗(ranibizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、哌加他尼(pegaptanib)、阿柏西普(aflibercept)、帕唑帕尼(pazopanib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)和雷帕霉素。与抗炎剂如糖皮质激素、NSAIDs和TNF- $\alpha$ 抑制剂的组合治疗在视网膜血管病和黄斑变性，例如糖尿病性视网膜病和DME的治疗中可以是有益的。

[0281] 联合治疗方案可以是附加性的，或者它可以产生协同结果(例如，对于两种药物的组合使用，视网膜病严重度比预期降低的更多)。在一些实施方案中，本发明提供用本发明的Epo结合抗体和抗血管发生剂(如抗-VEGF剂)预防和/或治疗上述视网膜血管病和黄斑变

性(具体而言,糖尿病性视网膜病,包括DME和/或PDP)的联合治疗。

[0282] 药物组合物

[0283] 本发明提供包含与可药用载体配制在一起的Epo结合抗体(完整或结合片段)的药物组合物。该组合物可以还包含适合用于治疗或预防例如糖尿病性视网膜病的一种或多种其他治疗剂。可药用载体增强或稳定该组合物,或者可以用来便于制备该组合物。可药用载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包被、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0284] 本发明的药物组合物可以通过本领域已知的多种方法施用。施用的途径和/或方式取决于希望的结果而变。优选玻璃体内、静脉内、肌内、腹膜内或皮下施用,或靠近靶部位施用。可药用载体应适合用于玻璃体内、静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。取决于施途径,可将活性化合物(即抗体、双特异性和多特异性分子)包被在材料中,以保护该化合物免受可失活该化合物的酸和其他天然条件的作用。

[0285] 组合物应为无菌和流体。例如,可通过使用诸如卵磷脂的包被、在分散体的情况下通过维持所需颗粒大小及通过使用表面活性剂来维持恰当的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇或山梨醇和氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的物质(例如单硬脂酸铝或明胶)来产生可注射组合物的长期吸收。

[0286] 本发明的药物组合物可按照本领域熟知和常规实施的方法制备。参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Mack Publishing Co.,第20版,2000;及Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。药物组合物优选在GMP条件下制造。通常,在本发明的药物组合物中利用Epo结合抗体的治疗有效剂量或有效剂量。通过本领域技术人员已知的常规方法将Epo结合抗体配制为可药用剂型。调整剂量方案以提供最优的期望应答(例如治疗应答)。例如,可以施用单次快速浓注、可以随时间推移施用若干分份剂量或者按治疗情况的紧急需要所指示按比例降低或提高剂量。以剂量单位形式配制胃肠外组合物对施用的容易性和剂量的均一性尤其有利。本文所用的剂量单位形式指适合作为待治疗的个体的单个剂量的物理上分开的单位;每个单位包含计算为与所需药物载体联合产生期望的疗效的预定活性化合物量。

[0287] 可改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以获得活性成份的量,该量就具体患者、组合物和施用方式而言对达到所希望的治疗应答有效,而对患者无毒性。所选剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素,包括本发明所利用的具体组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施途径、施用时间、所利用的具体化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所利用的具体组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、待治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和过往病史等因素。

[0288] 医师或兽医可以在低于达到希望的疗效所需的水平的水平开始本发明的抗体用于药物组合物中的剂量,并逐渐增加剂量,直至达到希望的作用。通常,本发明的组合物治疗本文所述视网膜血管病的有效剂量取决于许多不同因素而变,包括施手段、靶部位、患者的生理状态、患者是人还是动物、所施用的其他药物、及处理是预防性的还是治疗性的。需滴定治疗剂量来优化安全性和有效性。对于抗体全身施用,剂量在约0.0001至100mg/kg、且更通常是0.01至15mg/kg宿主体重的范围内。对于抗体玻璃体内注射,剂量可在0.1mg/眼至10mg/眼的范围内。更具体而言,剂量可在1mg/眼至9mg/眼、2mg/眼至8mg/眼、3mg/眼至

7mg/眼、4mg/眼至6mg/眼或4.5mg/眼至5.5mg/眼的范围内。在某些情况下,剂量可以是0.1mg/眼、0.2mg/眼、0.3mg/眼、0.4mg/眼、0.5mg/眼、0.6mg/眼、0.7mg/眼、0.8mg/眼、0.9mg/眼、1mg/眼、2mg/眼、3mg/眼、4mg/眼、5mg/眼、6mg/眼、7mg/眼、8mg/眼、9mg/眼或10mg/眼。示例性治疗方案需要每两周一次或每个月一次或每3至6个月一次全身施用。示例性治疗方案需要每两周一次或每个月一次或每3至6个月一次或根据需要 (PRN) 全身施用。

[0289] 抗体通常在多个场合施用。单个剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。间隔也可以是如测量患者血液Epo结合抗体水平所指示的不规律的。此外,备选的给药间隔可以由医师确定,并每月施用或根据有效性的需要施用。有效性基于病灶生长、**Lucentis®**挽救速率、光学相干断层扫描 (OCT) 测定的视网膜厚度及视力。在全身施用的一些方法中,施用剂量以达到1-1000 $\mu$ g/ml且在一些方法中为25-500 $\mu$ g/ml的血浆抗体浓度。备选地,抗体可以作为缓释制剂施用,在这种情况下,需要较低的施用频率。剂量和频率取决于抗体在患者中的半衰期而变。通常,人源化抗体显示比嵌合抗体和非人抗体的半衰期更长的半衰期。施用的剂量和频率可以取决于处理是预防性的还是治疗性的而变。在预防性应用中,在长时期内按相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生中持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要按相对短的间隔施用相对高的剂量,直至疾病的进展减少或终止,且优选直至患者显示疾病症状的部分或完全改善。然后,患者可以施用预防性方案。

## 实施例

[0290] 提供以下实施例来进一步阐述本发明但不限制其范围。本发明的其他变通形式对本领域普通技术人员而言将显而易见,且也为所附权利要求所涵盖。

[0291] 实施例1:亲和力成熟的Epo抗体的产生

[0292] 用全人噬菌体展示文库来产生本文所述的Epo结合抗体。

[0293] 将生物素化和非生物素化的人和食蟹猴Epo用于溶液和固相淘选。进行了标准淘选以及RapMAT方法 (Prassler等, (2009) *Immunotherapy* 1 (4) :571-583)。第二筛选和RapMAT淘选后,选择克隆进行序列分析,选择8种抗体的一组进行FabCys型式转化、种系化、pI优化和脱酰胺位点去除。用专有的**RapCLONE®**法实现FabCys产生。按用于方便和有效地将大量Fab克隆转化为IgG和FabCys型式的两步法进行**RapCLONE®**。在第一克隆步骤中,经BsiWI/MfeI (对于 $\kappa$ 库) 或HpaI/MfeI (对于 $\lambda$ 库) 消化和随后的连接将真核表达盒引入表达载体 **pMORPH®x11** (对于HuCAL **PLATINUM®**)。这之后是第二克隆步骤,其中用EcoRV/BlpI ( $\kappa$ 和 $\lambda$ 库) 消化包含表达盒的Fab库,随后克隆入用于哺乳动物细胞中表达的 **pMorph®4\_IgG1f** 或 **pMorph®4\_h\_FabCys** 受体载体。对于此项目,仅将**RapCLONE®**应用于独特、经测序和表征的Fab。因此,所有克隆均在**RapCLONE®**后恢复。

[0294] 低pI (<8.2) 通常与包括稳定性和聚集的生物物理特性差相关。选择8个最终候选者 (HCDR3独特克隆) 进行种系化、pI优化和脱酰胺位点去除,产生总计12个种系变体。合成了12个VL基因 (11317、11324、11331和11345为两个) 和一个VH (11324)。可能由于具有PTM的候选者的早期脱选,只有11317 (VL)、11332 (VL) 和11380 (VH) 包含脱酰胺位点,用种系化将

其去除。种系化通常按最接近的种系进行。为了提高pI,选择λ种系3h用于6个候选者替代或加至最接近的种系3r。此外,构建了三个候选者的λ3j变体,以使风险最小化(11317、11331和11345)。

[0295]	初始抗体	PTM-修饰*	pI修饰**	最终FabCys	FabCys的最终pI
	11317	3j,S96T	NA	NVS4	9.4
	11319	3h	Q105R	NVS1	8.3
	11331	3h	Q1E	NVS2	8.8
	11380	3h	Q105R,S33T	NVS3	8.3

[0296] NA,不适用

[0297] \*所有PTM-修饰都存在于VL中,\*\*pI修饰存在于VH中

[0298] 如上文所提到,蛋白质的pI是分子总体生物物理特性的关键决定因素。从噬菌体展示文库鉴定出的抗-Epo Fab具有低于8.2的pI。为了改善制备特性,特别改造抗体,以提高它们的pI,并改善它们的药物样特性。提高抗-Epo Fab的pI改善了它们的溶解性,使得能够按更高的浓度(>100mg/ml)配制Fab。按高浓度(例如>100mg/ml)配制Fab提供了能够将更高剂量的Fab施用入患者眼中的优势,这转而可以使得能够降低给药频率,这对包括但不限于湿性AMD和糖尿病性视网膜病的慢性眼病的治疗而言是显著的优势。

[0299] 所得到的Fab显示在表1中(NVS1、NVS2、NVS3和NVS4)。

[0300] 实施例2:经优化的抗体的表征

[0301] 以下实施例描述可以用于测量抗体亲和力的方法。测量结合亲和力的这些方法及其他方法为本领域已知。

[0302] 亲和力测定

[0303] 用 **Biacore®**T200 (Biacore) 和溶液平衡滴定 (SET) 通过表面等离子共振 (SPR) 测量了抗体对Epo的亲和力。下文描述每种技术及对应的Epo结合的平均结果的解释。模拟假设考虑系统中Epo的浓度,Epo生物合成的动力学和半衰期,以及所希望的给药方案,并标明对Epo的亲和力低于50pM的Fab足以降低游离Epo的水平。

[0304] Biacore测定

[0305] 可以从传感图中的信息确定相互作用的动力学,即复合物形成 ( $k_a$ ) 和解离 ( $k_d$ ) 的速率。如果样品通过所制备的传感表面时发生结合,则传感图中的响应增加。如果达到平衡,则将看到恒定的信号。用缓冲液替换样品导致所结合的分子解离,响应减少。Biacore评价软件通过将数据拟合至相互作用模型来产生  $k_a$  和  $k_d$  的值。

[0306] 用三个流动池进行方法运行。流动池1 (fc1) 作为参考(其中未捕获EpoFab),以评估Epo与抗体包被的芯片表面的非特异性结合。在流动池2-4上进行捕获和结合步骤二者。

[0307] 捕获步骤:为了达到20的Rmax,fc2-4上抗-hu Fab的捕获水平为约50RL。使浓度为1ug/ul的抗-hu Fab按10μl/分钟的流速流过Fc2-4。

[0308] 相对Rmax的计算如下:

[0309] 
$$\text{Fab:} R_{\max} = R_L * (\text{MW}_{\text{分析物}} / \text{MW}_{\text{配体}}) * \text{化学计量} 20 = \text{RL} * (21.4 / 50) * 1 = 50\text{RL}$$

[0310] 分析物以20nM的浓度开始,并包括8个1:2稀释液,在2.5nM重复,进行长期和短期解离。分析物按60μl/分钟的流速运行240秒。解离时间设为4000秒和600秒。对于NVS2和NVS4的10nM、2.5nM和0.3125nM分析物浓度,解离时间设为4000秒。样品注射后,有再生缓冲

液的洗涤步骤。

[0311] 每个循环结束时在所有流动池上进行再生。

[0312] 用于此方法的再生条件为含10%氢氧化钠的1%磷酸,60ul/分钟进行100秒。

[0313] 所有其他运行条件都在25℃下在1x HBS-EP+缓冲液(Biacore目录号BR-1006-69)中进行。通过双参考调整所得到的信号,从而减去来自参考流动池和无分析物的结合步骤的折射率值。按10Hz收集数据,并用 **Biacore®**T100评价软件1.1版(GE Healthcare)分析。此程序用全局拟合分析法来测定每个相互作用的速率常数和亲和力常数。

[0314] Biacore结合动力学测定的结果显示在表2中。如所示,本文所述抗体显示对人Epo的高亲和力, $K_D$ 值通常小于或等于40pM。

[0315] 表2:Epo抗体的亲和力结合(Biacore)

	$K_D$ (pM)			
	NVS2	NVS3	NVS4	NVS1*
<b>Epo</b>				
<b>人</b>	<b>34.2</b>	<b>37</b>	<b>27.1</b>	<b>11</b>
<b>人-darbapoetin</b>	<b>23.5</b>	<b>ND</b>	<b>18.1</b>	<b>ND</b>
<b>食蟹猴</b>	<b>78.7</b>	<b>49</b>	<b>76.0</b>	<b>31</b>
<b>小鼠</b>	<b>44.9</b>	<b>1</b>	<b>30.5</b>	<b>22</b>
<b>大鼠</b>	<b>56.6</b>	<b>38</b>	<b>34.4</b>	<b>41</b>
<b>兔</b>	<b>5160</b>	<b>674</b>	<b>ND</b>	<b>661</b>

[0317] ND:未测定

[0318] \*针对NVS1显示的数据为单数据点

[0319] SET测定

[0320] 与使用传感表面的动力学测定如SPR不同,SET是在溶液中测定亲和力的方法。它是不提供动力学数据的平衡测量。

[0321] 在SET中,将恒量的抗体与不同浓度的抗原孵育,直至达到平衡。通过将溶液施加在抗原包被的MSD™板(Meso Scale Discovery™)上,然后与ECL标记的二抗孵育,并测量信号密度来测定平衡溶液中游离抗体的浓度。在低抗原浓度下,达到强信号(结合平板上的抗原的高浓度的游离抗体),而对于高抗原浓度,抗体完全被抗原捕获,导致低信号。如果有足够数目的匹配范围内的抗原浓度可用,则滴定曲线允许用适当的拟合模型合理测定亲和力。对于完整滴定,必须应用比预期 $K_D$ 高至少10倍的抗原浓度。测定中所应用的恒定浓度的抗体应在 $K_D$ 的范围内或低于 $K_D$ (表3)。

[0322] 对于SET测定 $K_D$ ,使用抗体蛋白质的单体级分(至少90%单体含量,通过分析型SEC分析;对于Fab和IgG,分别为Superdex75(Amersham Pharmacia)或Tosoh G3000SWXL(Tosoh Bioscience))。

[0323] 基本按文献(Friguet等305-19)中所述进行溶液中的亲和力测定。为了提高SET法的灵敏度和准确度,将它从经典ELISA转至基于ECL的技术(Haenel等,2005)。

[0324] 在孵育缓冲液(含2%BSA(Sigma目录号A4503)和1%Tween20和1%Triton-X(Sigma目录号234729)的PBS)中将Epo抗体稀释至固定浓度,并加至孵育缓冲液中的Epo系列稀释液(1:5)。

[0325] Epo的最终最高浓度:

[0326] 人、Hu-darbapoetin、食蟹猴、小鼠、大鼠 = 10nM

[0327] 兔 = 100nM

[0328] Fab的最终浓度

[0329] NVS2: 2pM, 除兔 = 30pM外

[0330] NVS3: 2pM, 除兔 = 5pM外

[0331] NVS4: 2pM, 除兔 = 10nM外

[0332] NVS1: 2pM

[0333] 通过RT过夜孵育使样品达到平衡。

[0334] 用25 $\mu$ l孵育缓冲液RT封闭链霉抗生物素蛋白包被的标准MSD板 (Meso-Scale Discovery, 384孔:MSD目录号L11SA) 1小时。在TBST缓冲液(含0.05% Tween20的25mM TBS)中洗涤平板3x,加入25 $\mu$ l含0.1 $\mu$ g/ml生物素化Epo的孵育缓冲液,RT孵育1小时。在TBST缓冲液中洗涤平板3x。将含有Fab和Epo滴定的样品加至平板(25 $\mu$ l),RT孵育15分钟。在TBST缓冲液中洗涤平板3x。加入25 $\mu$ l检测抗体(抗-人(山羊)磺基-TAG, 1:1000于孵育缓冲液中,MSD目录号R32AJ-1),RT孵育60分钟。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x,加入50 $\mu$ l 1x MSD读板缓冲液T(含表面活性剂,MSD目录号R92TC-1)。在MSD Spector Imager 6000上读板。

[0335] 在不同天进行三次实验,每个数据点三个重复。

[0336] 用GraphPad Prism软件v4分析数据,从每个值减去背景(不含Fab的孔的平均值)。将X轴的值(溶液中的Epo浓度)转化为log<sub>10</sub>x。

[0337] 从以下模型拟合KD值(KD):

[0338] 
$$Y = (Top - ((Top / (2 \times Fab)) \times (((10^x) + Fab) + KD) - ((((((10^x) + Fab) + KD) \times ((10^x) + Fab) + KD) - (4 \times (10^x) \times Fab))^{0.5}))))$$

[0339] Top = 抗原浓度 = 0时的信号

[0340] x = 溶液中的Epo浓度

[0341] Fab = 对Fab浓度的限制设为1pM

[0342] 用SET测定测定了Epo Fab的亲合力,所得到的K<sub>D</sub>值([pM]浓度)总结在表3中。NVS2以低于10pM的K<sub>D</sub>结合人、人-darbepoetin和食蟹猴Epo。NVS2还以低于50pM的K<sub>D</sub>结合小鼠Epo,以低于20pM的K<sub>D</sub>结合大鼠Epo。NVS3以低于5pM的K<sub>D</sub>结合人、人-darbepoetin、食蟹猴、小鼠和大鼠Epo。NVS4以低于10pM的K<sub>D</sub>结合人、人-darbepoetin、食蟹猴、小鼠和大鼠Epo。

[0343] 表3: Epo抗体的亲合力结合(SET)

	K <sub>D</sub> (pM)			
Epo	NVS2	NVS3	NVS4	NVS1*
人	5.4	0.9	2.5	1.2
Darbepoietin	3.7	0.5	1.3	ND
食蟹猴	7.3	0.8	7.3	4.4
小鼠	37.0	2.5	7.8	16.1
大鼠	12.7	1.2	12.7	5.4
兔	3864.7	39.9	28670	ND

[0344]

[0345] ND:未测定

[0346] \*针对NVS1显示的数据为单数据点

[0347] 实施例3:Epo诱导的细胞增殖的抑制

[0348] 可以用生长和存活依赖于促红细胞生成素的细胞来借助Epo依赖性增殖抑制测量抗-Epo治疗剂的功效(Chiba等,1991)。

[0349] 实施例3a:Ba/F3-EpoR细胞增殖测定

[0350] 此测定在表达Epo受体的小鼠Ba/F3细胞(Ba/F3-EpoR细胞)中证明Epo抗体抑制Epo诱导的细胞增殖的能力。Ba/F3细胞的生长和存活依赖于IL-3,且已显示其在用多种致癌酪氨酸激酶转化后以独立于IL-3的方式生长。用EpoR稳定转化后,Ba/F3-EpoR细胞变得独立于IL-3。使用核转染设备(Amaxa,Nucleofactor™II),按照厂家的说明用Amaxa核转染系统(目录号VCA-1003,Amaxa GmbH)将携带人EpoR的哺乳动物表达质粒pcDNA3.1转入Ba/F3细胞。

[0351] 材料

材料	描述	来源	目录#
384 孔板	基质 384 空微孔板	ThermoScientific	50823639
384 孔板	uClear-Plate Black, 384 孔 TC w/Lid	Greiner Bio-One	7881091
RPMI 1640		Invitrogen	11875
FBS		Hyclone	SH30071.03
[0352] 青霉素/链霉素		Invitrogen	15140
潮霉素 B		Invitrogen	10687010
Epo		Genway	10-663-45072
Darbepoietin		Sandoz	CAS #: 209810-58-2
Ba/F3-EpoR 细胞		本文所述	
Cell Titer Blue		Promega	G8081

[0353] 细胞维持

[0354] 生长培养基:RPMI1640/10%FBS/1%青霉素-链霉素/100μg/ml潮霉素B/1U/ml Epo

[0355] 测定培养基:RPMI1640/10%FBS/1%青霉素-链霉素/100μg/ml潮霉素B

[0356] 将Ba/F3-EpoR细胞维持在生长培养基(RPMI1640/10%FBS/1%青霉素-链霉素/100μg/ml潮霉素B/1U/ml Epo)中。在~1e6细胞/ml时(每3-4天)将细胞传代为0.4-0.6e5细胞/ml。

[0357] Epo诱导的细胞增殖测定

[0358] 1.实验前一天,通过离心去除生长培养基,然后将细胞重悬在不含Epo的测定培养



基(RPMI1640/10%FBS/1%青霉素-链霉素/100 $\mu$ g/ml潮霉素B)来制备Ba/F3-EpoR细胞。

[0359] 2. 实验当天,在测定培养基中洗涤细胞2-3次(1000转/分钟离心5分钟),并按1.25x 10<sup>5</sup>细胞/ml重悬在测定培养基中。

[0360] 3. 向384孔黑色平板(透明底,经TC处理)中的每个测定孔加入2500个细胞。

[0361] 4. 用测定培养基将Epo系列稀释在384孔微孔板中,使得Epo的终浓度比希望的终浓度高两倍。

[0362] 5. 将20 $\mu$ l系列稀释的Epo(三个重复)一式三份加至384孔黑色平板的含有Ba/F3-EpoR细胞的样品孔。

[0363] 6. 离心机中1000转/分钟甩板30-60秒,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下孵育48小时。

[0364] 7. 终点前4小时,向所有孔加入8 $\mu$ l Cell Titer Blue,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下再次孵育。

[0365] 8. 4小时后,在具有Paradigm Multimode SW的Beckman Coulter Paradigm或相当的扫描仪上读板。

[0366] 9. Epo刺激Ba/F3-EpoR细胞的增殖超出基线4倍。Epo以11.2pM的平均EC<sub>50</sub>及10pM至26pM的范围刺激Ba/F3-EpoR细胞。

[0367] 10. 将抗-Epo抗体一式三份地系列稀释在384孔微孔板中,该微孔板包含含有4ng/ml Epo的测定培养基,室温孵育30分钟。

[0368] 11. 将20 $\mu$ l/孔的以上Epo/抗-Epo抗体混合物加至384孔黑壁板,然后每孔接种2500个BaF3/EpoR细胞。

[0369] 12. 按以上步骤7-9中所述处理孵育后的平板。

[0370] 结果

[0371] Epo抗体在48小时后抑制1ng/ml Epo存在下的Ba/F3-EpoR细胞增殖。抗体以小于或等于350pM的IC<sub>50</sub>抑制Ba/F3-EpoR细胞增殖。

[0372] 表4:

	IC <sub>50</sub> (pM)				
[0373] <b>测定</b>	<b>NVS2</b>	<b>NVS3</b>	<b>NVS4</b>	<b>NVS1</b>	<b>Epo26</b>
<b>Ba/F3 测定</b>	<b>112.0</b>	<b>76.3</b>	<b>173.1</b>	<b>338</b>	<b>590</b>

[0374] 实施例3b:F36E细胞增殖测定

[0375] F36E细胞的增殖高度依赖于Epo。用上述方法用Epo刺激通常导致比基线高6倍的信号。此曲线的EC50为7pM。

[0376] 用于中和Epo诱导的F36E细胞增殖测定的流程

[0377] 用使用F36E细胞系(衍生自亲本骨髓细胞系的Epo依赖性淋巴细胞样无限增殖化细胞系)的增殖测定筛选抗-Epo治疗性抗体,并选择用于发展的候选者。

[0378] 材料

	材料/试剂	来源	目录#
	384 孔聚苯乙烯细胞培养微孔板, 黑色	Greiner Bio One	781091
	384 孔聚苯乙烯无盖微孔板	Greiner Bio One	781280
	RPMI 1640	Invitrogen	11875
	FBS	Hyclon	SH30071.03
[0379]	青霉素/链霉素	Invitrogen	15140
	Darbepoietin	Sandoz	CAS #: 209810-58-2
	F36E 细胞	Riken Cell Bank	RCD0776
	Cell Titer Blue	Promega	G8081
	Epo26 抗-人 Epo 单克隆抗体	Stem Cell Tech	01350

[0380] 细胞维持

[0381] 用Darbepoietin(重组高糖基化人Epo)进行细胞维持和本文所述增殖测定。Darbepoietin以与重组人Epo相当的EC50刺激F36E细胞中的增殖(63.2pg/ml darbepoietin和81.25pg/ml促红细胞生成素;参见LU-15432,第44页)。按0.25e6细胞/ml的最小密度至1.0e6细胞/ml的最大密度将F36E细胞维持在生长培养基(RPMI1640/5%FBS/1%青霉素-链霉素/5.2U/ml dEpo)中至多10代。

[0382] Epo诱导的增殖测定流程

[0383] 1.在测定培养基(RPMI1640/5%FBS/1%青霉素-链霉素)中稀释Epo至4ng/ml(4倍于所希望的终浓度)。

[0384] 2.在测定培养基中稀释抗-Epo抗体至200nM(4倍于终浓度),并在测定培养基中系列稀释此浓度六个点。重复进行阳性参照抗体(例如Epo26)和阴性参照抗体(例如抗-鸡溶菌酶单克隆抗体)的稀释。

[0385] 3.在384孔聚苯乙烯微孔板中一式三份地将7.5ul稀释的dEpo和7.5ul抗-Epo抗体系列稀释液混合,并在室温孵育30分钟。

[0386] 4.沉淀F36E细胞(每个384孔板2e6),吸出生长培养基,在测定培养基中洗涤细胞一次(1200转/分钟离心5分钟),然后在测定培养基中重悬至3.33e5细胞/ml。

[0387] 5.向384孔聚苯乙烯细胞培养板中的所有孔加入15ul/孔的细胞(5,000细胞/孔)。

[0388] 6.向细胞加入15ul抗体-Epo混合物。

[0389] 7.在37°C、5%CO2下孵育68小时。

[0390] 8.每孔加入8ul Cell Titer Blue,并在37°C、5%CO2下孵育4小时。

[0391] 9.在Fluoroskan Ascent微孔板荧光计或相当的扫描仪上在560(20)Ex/590(10)Em测量荧光。

[0392] 10.在Graph Pad Prizm软件中用平均RFU+/-标准差对nM抗体作图,并通过非线性回归曲线拟合测定IC50。

[0393] 结果

[0394] 抗-Epo抗体以小于或等于200pM的IC<sub>50</sub>抑制F36E细胞增殖。

[0395] 表5:

[0396]	测定	IC <sub>50</sub> (pM)				
		NVS2	NVS3	NVS4	NVS1	Epo26
	<b>F36E 测定</b>	<b>144.1</b>	<b>88.7</b>	<b>182.7</b>	<b>175</b>	<b>590</b>

[0397] 实施例4:表位结合

[0398] 合成肽和肽截短研究

[0399] 合成或重组表达了对应于人Epo (hEpo) 的结构域、hEpo的结构域截短或包含hEpo和人血小板生成素 (TPO) 的部分的嵌合分子的合成肽。与合成肽的阳性结合指示包含在Epo的该结构域中的残基涉及与抗-Epo抗体的结合。对于截短的蛋白质,结合的丧失指示所截短的部分涉及与抗-Epo抗体的结合。但是,结合的丧失并不排除该截短显著改变了剩余蛋白质的结构,以致影响与抗-Epo抗体的结合的可能性。人Epo-人TPO嵌合体使得能够维持结构,同时仍允许表位定位。与包含hTPO的部分的变体的结合的丧失指示hEPO中的同源区对与抗-Epo抗体的结合很重要。

[0400] 抗-促红细胞生成素抗体的肽表位定位

[0401] 合成了以下六种对应于促红细胞生成素的螺旋的肽(表6)。

[0402] 表6:

肽	序列	EPO 结构域
1	<b>SEQ ID NO: 86</b> <b>RLICDSRVLERYLLEAKEAENITTG</b>	<b>螺旋 A</b>
2	<b>SEQ ID NO: 89</b> <b>ITVPDTKVNIFYAWKRM</b>	<b>环 A-B</b>
3	<b>SEQ ID NO: 87</b> <b>EVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNS</b>	<b>螺旋 B</b>
4	<b>SEQ ID NO: 90</b> <b>EPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPD</b>	<b>螺旋 C</b>
5	<b>SEQ ID NO: 91</b> <b>DKAVSGLRSLTLLRAL</b>	<b>螺旋 C</b>
6	<b>SEQ ID NO: 88</b> <b>TFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACR</b>	<b>螺旋 D</b>

[0404] 测定设置

[0405] 1. 将25ul 含肽的PBS (5ug/ml) 过夜包被在384孔MSD标准板 (Mesoscale Discovery, 目录号L21XA-4) 上。

[0406] 2. 用90ul PBS+5%BSA/0.1%Tween-20/0.1%TritonX-100封闭平板4小时。

[0407] 3. 向平板加入含500nM Morphosys Epo Fab的PBS+2%BSA/0.1%Tween-20/0.1% TritonX-100稀释液并孵育1小时。

[0408] 4. 洗涤平板,并用Epo Fab的磺基标记抗-人IgG (Meso Scale Discovery, 目录号R32AJ-1) 或适合于参考蛋白质/抗体的种类孵育(1小时)。

[0409] 5. 洗涤平板,并加入MSD读板缓冲液 (Meso Scale Discovery, 目录号R92TC-1)。

[0410] 6. 读板。

[0411] 用促红细胞生成素的截短变体进行抗-促红细胞生成素抗体的表位定位

- [0412] Epo变体1:螺旋A
- [0413] Epo变体2:螺旋A、环A-B
- [0414] Epo变体3:螺旋A、环A-B、螺旋B
- [0415] Epo变体4:螺旋A、环A-B、螺旋B、环B-C、螺旋C
- [0416] Epo变体5:全长促红细胞生成素
- [0417] 测定设置
- [0418] 1. 在标准链霉抗生物素蛋白384孔板 (Mesoscale Discovery, 目录号L21SA-1) 上用生物素化的HEK293表达的Epo变体4℃过夜包被平板。
- [0419] 2. 用90u1 PBS+5%BSA/0.1%Tween-20/0.1%TritonX-100封闭平板4小时。
- [0420] 3. 洗涤平板, 向平板加入500nM Morphosys Epo Fab, 并孵育1小时。
- [0421] 4. 洗涤平板, 并用Epo Fab的磺基标记抗-人IgG (Meso Scale Discovery, 目录号R32AJ-1) 或适合于参考蛋白质/抗体的种类孵育 (1小时)。
- [0422] 5. 洗涤平板, 并加入MSD读板缓冲液 (Meso Scale Discovery, 目录号R92TC-1)。
- [0423] 6. 读板。
- [0424] 用Epo/血小板生成素 (Tpo) 和兔/人Epo嵌合体进行抗-促红细胞生成素抗体的表位定位
- [0425] Epo/Tpo嵌合体
- [0426] Epo/Tpo变体1: 含Tpo螺旋A的人Epo
- [0427] Epo/Tpo变体2: 含Tpo环A-B的人Epo
- [0428] Epo/Tpo变体3: 含Tpo螺旋B的人Epo
- [0429] Epo/Tpo变体4: 含Tpo螺旋C的人Epo
- [0430] Epo/Tpo变体5: 含Tpo螺旋D的人Epo
- [0431] 兔/人Epo嵌合体
- [0432] Rb/Hu Epo变体1: 含人螺旋A的兔Epo
- [0433] Rb/Hu Epo变体2: 含人环A-B的兔Epo
- [0434] Rb/Hu Epo变体3: 含人螺旋B的兔Epo
- [0435] Rb/Hu Epo变体4: 含人环B-C和螺旋C的兔Epo
- [0436] Rb/Hu Epo变体5: 含人环C-D的兔Epo
- [0437] Rb/Hu Epo变体6: 含人螺旋D的兔Epo
- [0438] 测定设置
- [0439] 1. 将25u1含Epo嵌合体的PBS (2ug/ml) 4℃过夜包被在384孔MSD标准板 (Mesoscale Discovery, 目录号L21XA-4) 上。
- [0440] 2. 用90u1 PBS+5%BSA/0.1%Tween-20/0.1%TritonX-100封闭平板4小时。
- [0441] 3. 向平板加入含500nM Morphosys Epo Fab的PBS+2%BSA/0.1%Tween-20/0.1% TritonX-100稀释液并孵育1小时。
- [0442] 4. 洗涤平板, 并用Epo Fab的磺基标记抗-人IgG (Meso Scale Discovery, 目录号R32AJ-1) 或适合于参考蛋白质/抗体的种类孵育 (1小时)。
- [0443] 5. 洗涤平板, 并加入MSD读板缓冲液 (Meso Scale Discovery, 目录号R92TC-1)。
- [0444] 6. 读板。

## [0445] 一般流程

[0446] 用肽(5ug/ml于PBS中,New England Peptide LLC)或Epo嵌合体(2ug/ml于PBS中)包被标准捕获384孔MSD板(Meso Scale Discovery),并在4°C过夜孵育。将生物素化的截短Epo变体(2ug/ml于PBS中)过夜包被在标准链霉抗生物素蛋白捕获384孔MSD板上。用TBST(Thermo Scientific,目录号28360)洗涤平板1X后,在稀释液(PBS、5%BSA、0.1%Tween-20、0.1%TritonX-100)中室温封闭平板4小时。在TBST中洗涤平板3X。将500nM的抗-促红细胞生成素fab加至肽/Epo变体预先包被的MSD平板1小时。在TBST中洗涤平板3X,加入抗-人IgG-磺基标记(1ug/ml,Meso Scale Discovery,目录号R32AJ-1),并孵育60分钟。在TBST中洗涤平板3X,加入1X读板缓冲液T(Meso Scale Discovery,目录号R92TC-1)。在MSD Spector Imager 6000上读板,并用GraphPad Prism软件v4分析数据。

## [0447] 结果:

[0448] 结果显示,抗体最小程度地结合以下结构域(表7)。无抗体结合螺旋C。

## [0449] 表7:

	螺旋A	环A-B	螺旋D
NVS1	++		+
NVS2		++	+
NVS3	+	+	++
NVS4			++

[0451] (++) 显性表位; (+) 观察到的结合

[0452] 与Epo复合的抗体的晶体结构

[0453] 糖基化重组人促红细胞生成素(Epo)获自LEK Pharmaceuticals, Inc.。

[0454] 用蛋白质去糖基化混合物(New England Biolabs, cat#P6039S)对Epo进行去糖基化。将30g hEpo与1ml蛋白质去糖基化混合物组合,并在37°C孵育1小时,如通过SDS-PAGE测定,此时去糖基化不完全。然后向Epo加入附加的0.5ml蛋白质去糖基化混合物,并在37°C再孵育1小时。凝胶分析显示Epo几乎完全去糖基化。然后用在25mM HEPES pH 7.5、150mM NaCl中平衡的120ml Superdex75柱(GE Healthcare, cat#28-9893-33)进一步纯化此蛋白质。将含有最高水平的去糖基化hEpo的洗脱级分混合。通过将5mg去糖基化的Epo与7mg NVS3组合,然后在冰上孵育1小时来形成蛋白质复合物。然后浓缩蛋白质复合物混合物,并施加至25mM HEPES pH 7.5、150mM NaCl中平衡的120ml Superdex75。将含有SDS凝胶评价的化学计量比的Epo:NVS3的级分混合,并浓缩至19mg/ml(通过LCUV估计的浓度)(PRONOVA#27SN)。用此浓缩的Epo:NVS3复合物建立结晶筛选。通过坐滴蒸汽扩散技术培养晶体,液滴包含等体积的蛋白质和贮液。用以下贮液条件在4°C形成了晶体:0.1M Hepes pH7.0、12% PEG3350、50mM脱水乙酸锌。用以下冻存液冷冻晶体:0.1M Hepes pH7.0、15%PEG3350、50mM脱水乙酸锌、22%甘油。

[0455] 在Advanced Photon Source(Argonne National Laboratory,USA)上的光束线17-ID处收集Epo:NVS3复合物晶体衍射数据。处理数据,并用autoPROC(Global Phasing, LTD)在晶胞尺寸 **$a=125.57\text{\AA}$** 、 **$b=150.15\text{\AA}$** 、 **$c=163.84\text{\AA}$** 、 $\alpha=90^\circ$ 、 $\beta=110.81^\circ$ 、 $\gamma=90^\circ$ 的空间群C2中按 **$2.6\text{\AA}$** 缩放。用Phaser(McCoy等,(2007)J.Appl.Cryst.40:658-674)通

过分子替换来解析Epo:NVS3结构。将来自PDB数据库中的3H0T结构 (Berman 2000) 的Fab分为可变结构域和恒定结构域,并用人促红细胞生成素结构 (Syed等, Nature.1998Oct 1;395 (6701):511-6, PDB编码1EER) 作为搜索模型。

[0456] 在COOT (Emsley&Cowtan (2004) Acta Cryst.60:2126-2132) 中建立每个不对称单位包含3分子Epo:NVS3复合物的最终模型,并用PHENIX (Adams等, Acta Cryst.D66,213-221 (2010)) 提炼至R和 $R_{free}$  值分别为23.0%和26.7%,键长和键角的rmsd分别为**0.010 Å**和1.34°。

[0457] 解析Epo:NVS3的晶体结构,并提炼至**2.6Å**。它揭示了不对称单位由三个Epo:NVS2蛋白质复合物组成,每个复合物由一个结合于一个Epo蛋白质的Fab组成。这些复合物中的两个形成锌介导的二聚体,第三个复合物显示更高的b-因子和更弱的密度。从Fab至Epo的相互作用由来自NVS3的重链和轻链二者的互补决定区 (CDR) 环介导。在与1EER相比时,Epo的构象变化限于远离Fab结合表位的环,全部144个比对的氨基酸的RMSD为**0.5Å**。Fab NVS3的重链和轻链显示典型的免疫球蛋白样结构域折叠。

[0458] 用Epo:NVS3的晶体结构来鉴定结合NVS3的片段抗原的Epo表位。Epo上的相互作用表面主要由包括残基Ser<sup>9</sup>、Glu<sup>13</sup>、残基Thr<sup>44</sup>至Arg<sup>53</sup>和残基Asn<sup>147</sup>至Arg<sup>162</sup>的残基形成。这些对应于表示为α-螺旋A、环βA-αB和α-螺旋D的Epo二级结构元件。这些残基形成NVS3识别的三维表面。相互作用包括主链相互作用、溶剂介导的相互作用和直接的侧链相互作用。

[0459] 表8:Epo与NVS3的相互作用残基

[0460]

氨基酸	残基编号	接触面积 (Å <sup>2</sup> )	暴露面积 (Å <sup>2</sup> )	埋藏百分比 (%)
Ser	9	11.79	93.23	13
Glu	13	14.89	103.00	14
Thr	44	22.47	61.60	36
Lys	45	39.98	172.59	23
Val	46	34.38	55.22	62
Asn	47	48.17	81.92	59
Phe	48	83.76	129.76	65
Tyr	49	96.12	137.70	70
Ala	50	12.68	57.03	22
Trp	51	0.63	43.74	1
Lys	52	23.97	135.25	18
Arg	53	49.96	181.86	27
Asn	147	34.39	48.65	71
Arg	150	73.32	140.37	52
Gly	151	18.97	24.63	77
Lys	154	73.59	127.20	58
Leu	155	34.85	75.06	46
Gly	158	18.59	43.31	43
Glu	159	32.95	122.17	27

Arg	162	36.72	185.91	20
-----	-----	-------	--------	----

[0461] 包含与NVS3接触的原子的Epo残基在表9中列出。接触定义为处于NVS3的**5 Å**之内,以解释潜在的水介导的相互作用。

[0462] 表9:

[0463]

蛋白质	氨基酸	序列位置*	Epo结构域
Epo	S	9	螺旋A
Epo	E	13	螺旋A
Epo	T	44	环A-B
Epo	K	45	环A-B
Epo	V	46	环A-B
Epo	N	47	环A-B
Epo	F	48	环A-B
Epo	Y	49	环A-B
Epo	A	50	环A-B
Epo	W	51	环A-B
Epo	K	52	环A-B
Epo	R	53	环A-B
Epo	N	147	螺旋D
Epo	R	150	螺旋D
Epo	G	151	螺旋D
Epo	K	154	螺旋D
Epo	L	155	螺旋D
Epo	G	158	螺旋D
Epo	E	159	螺旋D
Epo	R	162	螺旋D

[0464] \*序列位置是相对于SEQ ID NO:81

[0465] 列出了包含与NVS2接触的原子的Epo残基。接触定义为处于蛋白质配偶体的**5 Å**之内,以解释潜在的水介导的相互作用。

[0466] 表10:

蛋白质	氨基酸	序列位置*	Epo 结构域
Epo	E	23	Helix A
Epo	D	43	Loop A-B
Epo	T	44	Loop A-B
Epo	K	45	Loop A-B
Epo	V	46	Loop A-B
Epo	N	47	Loop A-B
Epo	F	48	Loop A-B
Epo	Y	49	Loop A-B
Epo	A	50	Loop A-B

Epo	K	52	Loop A-B
Epo	R	53	Loop A-B
Epo	R	131	Helix D
Epo	R	143	Helix D
Epo	N	147	Helix D
Epo	R	150	Helix D
Epo	G	151	Helix D
Epo	K	154	Helix D
Epo	L	155	Helix D
Epo	E	159	Helix D
Epo	R	162	Helix D

[0469] \*序列位置是相对于SEQ ID NO:81

[0470] 实施例5:体内模型

[0471] 实施例5a:目珠管的小鼠模型

[0472] 用ssAAV2-EPO-eGFP (DR005) 和ssAAV2-EGFP (TM003) (对照) 视网膜下注射C57/B16小鼠 (Taconic)。注射后3周 (21天) 处死小鼠。将视网膜铺片,并测量血管管径。

[0473] 方法

[0474] ssAAV2-EPO-eGFP和ssAAV2-eGFP的视网膜下注射

[0475] 将8周龄C57/B16小鼠分为两组 (每组10只小鼠,20眼/组), 视网膜下注射1 $\mu$ l 2x10<sup>9</sup>DRP/ $\mu$ l的ssAAV2。第一组 (对照) 接受视网膜下ssAAV2-EPO (TM003), 第二组 (实验) 接受ssAAV2-eGFP (DR005)。注射后21天在视网膜铺片中检查小鼠Epo对视网膜血管改变的影响。

[0476] 所测试的AAV (腺相关病毒) 是:ssAAV2-EPO-eGFP [来自Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility,The University of North Carolina at Chapel Hill的 (AAV2-CMV-mEPO-IRES-eGFP),Lot#AV3782] 和ssAAV2-GFP [来自Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility,The University of North Carolina at Chapel Hill的 (AAV2-eGFP),Lot#AV3725]。

[0477] 方法:



[0478] AAV载体经所测试的小鼠的两只眼上的视网膜下注射递送。所描述的所有方法都用无菌试剂、注射器和适当的PPE在无菌条件下进行。

[0479] 1. 固定小鼠,用一滴环戊通(1%)、然后用一滴2.5%去氧肾上腺素使它们的瞳孔扩张。

[0480] 2. 然后,用腹膜内三溴乙醇(250mg/kg)麻醉动物。用一滴0.5%丙美卡因局部麻醉角膜。

[0481] 3. 将动物放置在手术显微镜下之后,用微型解剖刀在角膜缘后产生0.5mm鼻切口。

[0482] 4. 用附着于10 $\mu$ l Hamilton注射器的钝针头通过巩膜切口向颞侧视网膜切向插入。针头行进至感觉到阻力。

[0483] 5. 将1 $\mu$ l ssAAV2载体(ssAAV2-EPO-eGFP或ssAAV2-GFP,二者都含有1:50稀释的荧光素以显示递送)缓慢注射入视网膜下空间。

[0484] 6. 在手术显微镜下检查眼。通过显示含有荧光素的视网膜脱附来确认成功的视网膜下注射。

[0485] 7. 依据视网膜损伤(通过出血大小来显示)和晶状体损伤的程度对注射进行评分。

[0486] 8. 将动物翻转至另一侧,并重复该方法。

[0487] 9. 注射后将抗生素膏剂施加至两只眼。

[0488] 视网膜铺片上的视网膜解剖、成像和定量

[0489] 1. 安乐死(CO<sub>2</sub>)前1至5分钟注射(静脉内,尾静脉)0.1ml伴刀豆球蛋白-A(Con-A)。

[0490] 2. 摘出眼睛,并在多聚甲醛(4%于PBS中)中固定2小时。然后将它们在PBS缓冲液中4 $^{\circ}$ C维持1-3天,直至解剖。

[0491] 3. 去除角膜和晶状体,从后眼杯(视网膜色素上皮/脉络膜)剖出视网膜。

[0492] 4. 对视网膜产生5个放射状切口,并在Vectashield封固介质中光感受器层朝下铺片。

[0493] 5. 一旦封固,即使铺片以中央视网膜为中心(用视神经乳头作为参考),并用Zeiss成像系统(AxioVision)按20X捕获Con-A标记的视网膜血管。

[0494] 6. 用AxioVision软件来测量距离视神经乳头200 $\mu$ m的中央视网膜血管的直径。

[0495] 7. 用GraphPad Prism分析所得到的数据。

[0496] 结果和结论:

[0497] 血管直径的定量揭示,与ssAAV2-GFP和首次用于实验的眼(6只眼)相比,ssAAV2-EPO在中央视网膜诱导显著(\* $p$ <0.001)的血管扩张(图1)。比较ssAAV2-GFP和首次用于实验的组未发现显著差异。用Dunnet事后检验(C)各组的代表性铺片,用单因素方差分析分析了样品。通过AAV2-Epo-eGFP长期递送Epo导致静脉管径的统计上显著的增加(图1),这是人类中糖尿病性黄斑水肿的关键标志。因此,在一方面,本发明涉及通过以治疗有效量对个体施用本文所述的抗-EPO抗体来减小眼中的静脉管径的方法。

[0498] 实施例5b:抗-Epo抗体的体内功效

[0499] 可以在上述目珠管的小鼠模型中评估本文所述抗-Epo抗体的体内活性和治疗功效。

[0500] 小鼠模型中的体内攻击

[0501] 用以下之一视网膜下注射8周龄C57B6小鼠。

[0502] 组:

[0503] 组1:效价为 $2 \times 10^9$ DRP的AAV2-eGFP, 1 $\mu$ l/眼, n=10只小鼠的20只眼

[0504] 组2:效价为 $2 \times 10^9$ DRP的AAV2-Epo-eGFP, 1 $\mu$ l/眼, n=10只小鼠的20只眼

[0505] 组3:效价为 $2 \times 10^9$ 的AAV2-Epo-eGFP, 1 $\mu$ l/眼, +抗-Epo Fab, 100 $\mu$ g/眼, 每周一次, n=10只小鼠的20只眼

[0506] 通过在注射后2周测量血管直径来检查适当施用的抗-Epo抗体在小鼠模型中的作用。

[0507] AAV-GFP (AAV2-eGFP) 和AAV2-Epo-eGFP (AAV2-CMV-mEpo-IRES-eGFP) 来自Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility, The University of North Carolina at Chapel Hill.

[0508] 眼内注射抗-Epo抗体将抑制视网膜血管扩张, 抗-Epo抗体改善Epo对减少视网膜中的血流量和缺氧条件的影响。因此, 预期抗-Epo抗体减少也见于视网膜血管病 (如湿性AMD和糖尿病性视网膜病) 患者中的视网膜病理。

[0509] 实施例6: 体内中和游离EPO

[0510] 实施例6a: 用抗-Epo Fab体内中和游离EPO

[0511] 在兔眼中评估抗-EPO抗体的体内活性和治疗功效如下。用抗-EPO Fab NVS2 (1mg/眼) 对兔进行玻璃体内给药, 随后用EPO (3 $\mu$ g/眼) 玻璃体内给药4天进行攻击。处死动物, 并取得包括玻璃体的眼组织。按下文所述测定玻璃体中游离EPO和总EPO的量。

组	[抗-EPO Fab] mg/眼	EPO ug/眼
1	1	-
2	1	3

[0512] 总/游离EPO水平:

[0514] 使用包被缓冲液 (PBS) 和孵育缓冲液 (含2% BSA (Sigma目录号A4503) 和0.1% Tween20和0.1% Triton-X的PBS), 用标准结合MSD板 (Meso-Scale Discovery, 384孔, MSD目录号L21XA) 进行测定。

[0515] 按1 $\mu$ g/ml于PBS (25 $\mu$ l) 中包被捕获抗体, 并在4 $^{\circ}$ C过夜孵育。在洗涤缓冲液 (含0.05% Tween20的PBS) 中洗涤平板3x, 并用25 $\mu$ l孵育缓冲液在RT下封闭2小时。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x。将孵育缓冲液中的玻璃体稀释液加至平板 (25 $\mu$ l), 并在RT下孵育60分钟。用人重组Darbepoietin作为标准 (A000123, 以2 $\mu$ g/ml起始)。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x。加入25 $\mu$ l一抗 (1 $\mu$ g/ml于孵育缓冲液中), 并在RT下孵育60分钟。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x。加入25 $\mu$ l抗-物种第二磺基-标记抗体 (1:1000于孵育缓冲液中), 并在RT下孵育60分钟。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x, 加入25 $\mu$ l 1x MSD读板缓冲液T (含表面活性剂, MSD目录号R92TC-1)。在MSD Spector Imager 6000上读板。

	<b>总 EPO</b>	<b>包被抗体</b>	<b>Epo-26 克隆 26G9C10</b>
		<b>一抗</b>	<b>抗-EPO Fab</b>
		<b>二抗</b>	<b>抗-人 R32AJ-1</b>
		<b>玻璃体稀释液</b>	<b>1:20-1:25</b>
		<b>灵敏度</b>	<b>0.03ng/ml</b>
[0516]	<b>游 离 EPO</b>	<b>包被抗体</b>	<b>抗-EPO Fab</b>
		<b>一抗</b>	<b>Epo-26 克隆 26G9C10</b>
		<b>二抗</b>	<b>抗 - 小 鼠 R32AC-1</b>
		<b>玻璃体稀释液</b>	<b>1:75-1:500</b>
		<b>灵敏度</b>	<b>1.6ng/ml</b>

[0517] 结果和结论

[0518] 在用抗-EPO或载体注射的动物的玻璃体中测量的总EPO水平与预期相似(图2)。相反,在用抗-EPO Fab注射的兔的玻璃体中未测量到游离EPO,但在用载体注射的兔的玻璃体中测量到平均~100ng/ml的游离EPO。玻璃体内施用的抗-EPO Fab如预期完全中和了游离EPO水平。

[0519] 实施例6b:用抗-Epo Fab体内中和游离EPO

[0520] 在兔眼中评估抗-EPO抗体的体内活性和治疗功效如下。用抗-EPO Fab NVS2(1mg/眼)和EPO(3ug/眼)的预混溶液对兔进行玻璃体内给药。处死动物,并取得包括玻璃体的眼组织。按下文所述测定玻璃体中游离EPO和总EPO的量。注意:一些眼接收抗-EPO Fab、EPO和VEGF的预混溶液。

组	[抗-EPO Fab] mg/眼	EPO ug/眼	VEGF ng/眼
1	-	-	200
2	-	3	200
3	1	3	200
4	1	3	-

[0522] 总/游离EPO水平:

[0523] 使用包被缓冲液(PBS)和孵育缓冲液(含2%BSA(Sigma目录号A4503)和0.1%Tween20和0.1%Triton-X的PBS),用标准结合MSD板(Meso-Scale Discovery,384孔,MSD目录号L21XA)进行测定。

[0524] 按1μg/ml于PBS(25μl)中包被捕获抗体,并在4℃过夜孵育。在洗涤缓冲液(含0.05%Tween20的PBS)中洗涤平板3x,并用25μl孵育缓冲液在RT下封闭2小时。在洗涤缓冲

液中洗涤平板3x。将孵育缓冲液中的玻璃体稀释液加至平板(25 $\mu$ l),并在RT下孵育60分钟。用人重组Darbepoietin作为标准(A000123,以2 $\mu$ g/ml起始)。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x。加入25 $\mu$ l一抗(1 $\mu$ g/ml于孵育缓冲液中),并在RT下孵育60分钟。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x。加入25 $\mu$ l抗-物种第二磺基-标记抗体(1:1000于孵育缓冲液中),并在RT下孵育60分钟。在洗涤缓冲液中洗涤平板3x,加入25 $\mu$ l 1x MSD读板缓冲液T(含表面活性剂,MSD目录号R92TC-1)。在MSD Spector Imager 6000上读板。

	<b>总 EPO</b>	<b>包被抗体</b>	<b>Epo-26 克隆 26G9C10</b>
		<b>一抗</b>	<b>抗-EPO Fab</b>
		<b>二抗</b>	<b>抗-人 R32AJ-1</b>
		<b>玻璃体稀释液</b>	<b>1:20-1:25</b>
		<b>灵敏度</b>	<b>0.03ng/ml</b>
[0525]	<b>游 离 EPO</b>	<b>包被抗体</b>	<b>抗-EPO Fab</b>
		<b>一抗</b>	<b>Epo-26 克隆 26G9C10</b>
		<b>二抗</b>	<b>抗 - 小 鼠 R32AC-1</b>
		<b>玻璃体稀释液</b>	<b>1:75-1:500</b>
		<b>灵敏度</b>	<b>1.6ng/ml</b>

[0526] 结果和结论

[0527] 在用抗-EPO或载体注射的动物的玻璃体中测量的总EPO水平与预期相似(图3)。相反,在用抗-EPO Fab注射的兔的玻璃体中未测量到游离EPO,而在用载体注射的兔的玻璃体中测量到平均~200ng/ml的游离EPO(图3)。VEGF的存在似乎对测量到的游离或总EPO水平无任何影响。玻璃体内施用的抗-EPO Fab如预期完全中和了游离EPO水平。

平均视网膜血管直径

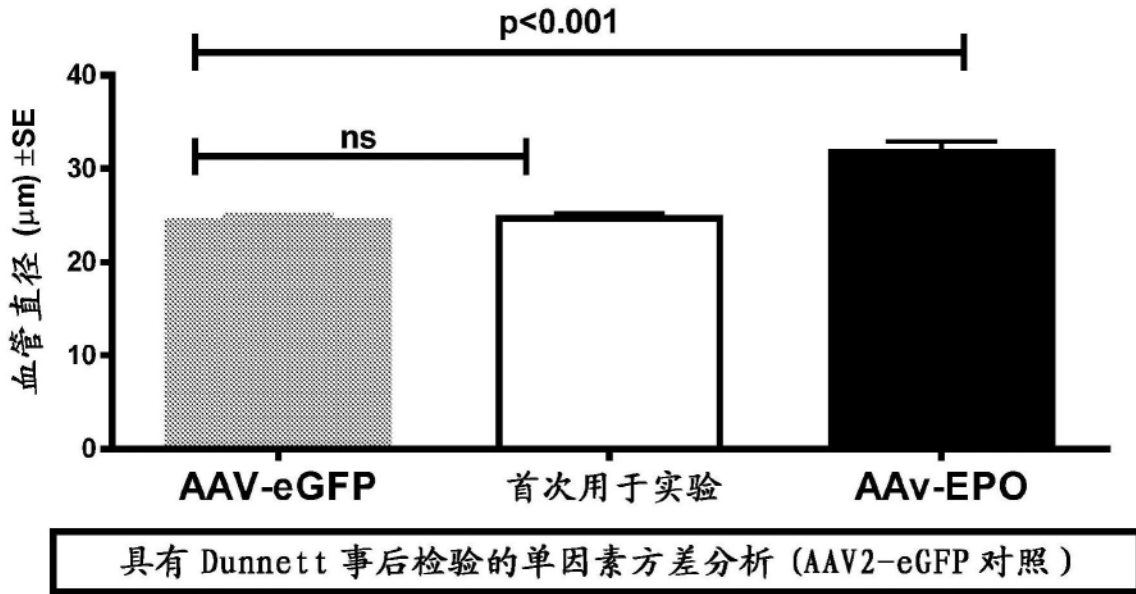


图1

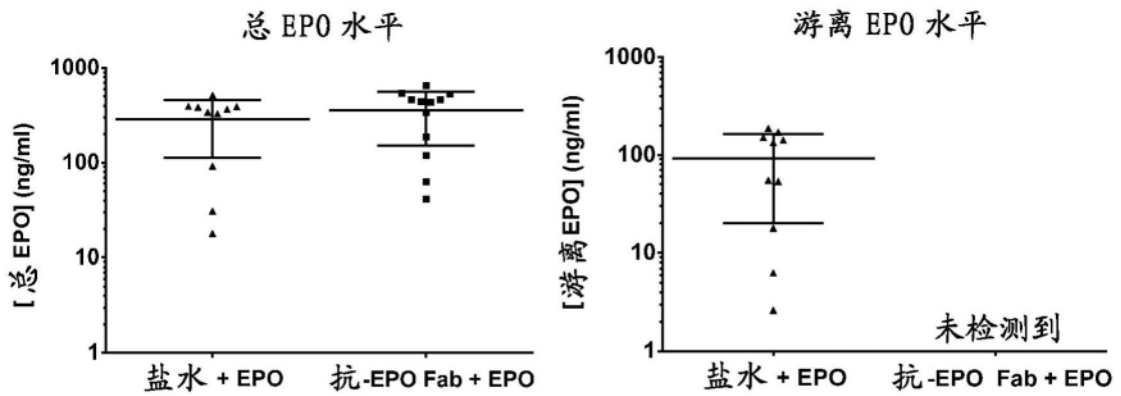


图2

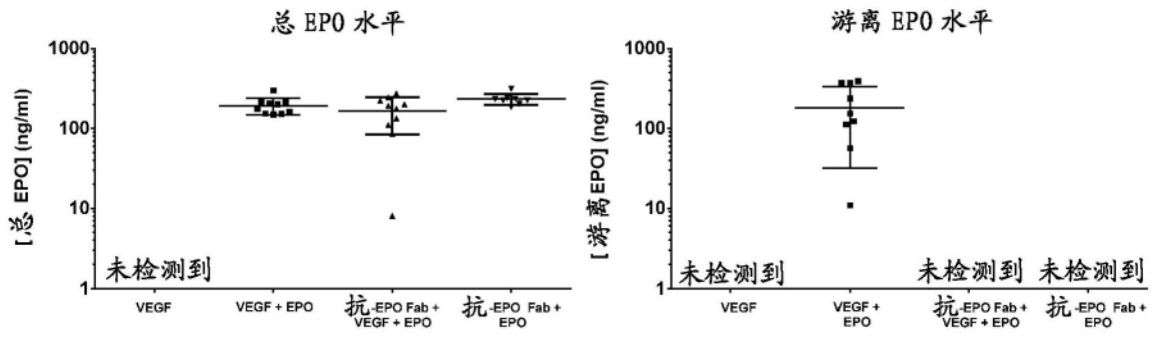


图3