



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103261893 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 21

(21) 申请号 201180060953. 1

C07K 16/18 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 11. 29

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/52 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/417, 682 2010. 11. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 06. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/062418 2011. 11. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02012/075023 EN 2012. 06. 07

(71) 申请人 诺沃姆德治疗公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 R·班赛尔

(74) 专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所

(普通合伙) 33239

代理人 戚秋鹏

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书6页 说明书15页 附图14页

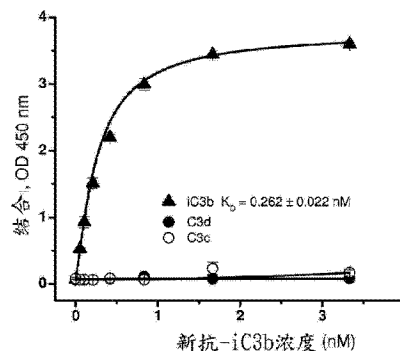
(54) 发明名称

用于诊断组织损害的新抗体

(57) 摘要

一种用于诊断受试者体内组织损害的发展的方法, 包括给所述受试者组织施用新抗体样品, 以达到检测是否存在承载新抗原表位的补体蛋白的目的。

新抗-iC3b检测底物结合的iC3b, 但不检测C3c、C3d



1. 一种在受试者中诊断组织损害的发展的方法,包括给所述受试者的组织施用新抗体的样品,以达到检测承载新抗原表位的补体蛋白是否存在的目的。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述组织来自身体的任何部分。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,所述的组织为眼部组织。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述的组织损害是组织疾病的结果。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,所述的组织损害是眼部组织疾病的结果。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述眼部组织疾病是黄斑变性相关的病症。
7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中,黄斑变性相关的病症能够是渗出性的与年龄有关的黄斑变性 (AMD),非渗出性的与年龄相关的黄斑变性 (AMD),北卡罗来纳州黄斑营养不良症,Sorsby' s 眼底营养不良症,Chemical Stargardt' s 疾病,图形样营养不良,卵黄状黄斑变性疾病,显性玻璃膜疣,malattia leventinese,视网膜脱离,脉络膜退化,视网膜退化,光感受器退化,RPE 退化,黏多糖症,视杆锥细胞营养不良,视锥杆细胞营养不良,或视网膜退化。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中,所述眼部组织疾病是 AMD。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述新抗体是 scFv、双特异抗体、minibody、ScFv-Fc 和完整抗体、Fab 或 Fab' 。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述承载新抗原表位的补体蛋白,选自 :C3b、C3a、iC3b、C3dg、C3d、C4d、Ba、Bb、C5b、C5a、和 C5b-9/SC5b-9。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述承载新抗原表位的补体蛋白由称为新抗体的抗体检测。
12. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述新抗体识别不存在于所述母体分子中的非天然的或新颖的抗原表位。
13. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述新补体蛋白在所述眼部组织中表达。
14. 一种用于诊断在受试者中与年龄有关的黄斑变性 (AMD) 的发展的方法,包括 :检测所述受试者的眼部组织在的一种新补体蛋白,其指示补体激活,并且与没有 AMD 的受试者的对照群的基线水平相比显著升高。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新补体蛋白选自 :C3b、C3a、iC3b、C3dg、C3d、C4d、Ba、Bb、C5b、C5a 和 C5b-9。
16. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新补体蛋白被分类为新抗 -C3b、新抗 -C3a、新抗 -iC3b、新抗 -C3dg、新抗 -C3d、新抗 -C4d、新抗 -Ba、新抗 -Bb、新抗 -Cb5、新抗 -C5a 或新抗 -C5b-9。
17. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C3b 不识别所述母体分子 C3。
18. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C3a 不识别 C3。
19. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -iC3b 不识别 C3。
20. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C3dg 不与 C3 交叉反应。
21. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C3dg 不与 C3 交叉反应。
22. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C4d 不与 C4 交叉反应。
23. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -Ba 不与 B 交叉反应。
24. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -Bb 不与 B 交叉反应。

25. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b 不与 C5 交叉反应。
26. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5a 不与 C5 交叉反应。
27. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C5 交叉反应。
28. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C6 交叉反应。
29. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C7 交叉反应。
30. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C8 交叉反应。
31. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C9 交叉反应。
32. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 能够与聚合体 C9 交叉反应,但不与单体 C9 交叉反应。
33. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,C5b-9 只由新抗聚合体 C9 抗体检测。
34. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,抗 -C5、抗 -C6、抗 -C7、抗 -C8、和抗 -C9 抗体不检测所述新抗原。
35. 一种用于在受试者体中诊断与年龄相关的黄斑变性 (AMD) 的发展的方法,包括:检测所述受试者眼部组织中的一种替代途径特异性新补体蛋白,其指示替代补体活化,并且与没有 AMD 的受试者的对照群的基线水平相比显著升高。
36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新补体蛋白选自:C3b、C3a、iC3b、C3dg、C3d、C4d、Ba、Bb、C5b、C5a 和 C5b-9。
37. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新补体蛋白选自:新抗 -C3b、新抗 -C3a、新抗 -iC3b、新抗 -C3dg、新抗 -C3d、新抗 -C4d、新抗 -Ba、新抗 -Bb、新抗 -Cb5、新抗 -C5a 或新抗 -C5b-9。
38. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C3b 不识别母体分子 C3。
39. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C3a 不识别 C3。
40. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -iC3b 不识别 C3。
41. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C3dg 不与 C3 交叉反应。
42. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C3d 不与 C3 交叉反应。
43. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -Ba 不与 B 交叉反应。
44. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -Bb 不与 B 交叉反应。
45. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b 不与 C5 交叉反应。
46. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5a 不与 C5 交叉反应。
47. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C5 交叉反应。
48. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C6 交叉反应。
49. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C7 交叉反应。
50. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C8 交叉反应。
51. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C9 交叉反应。
52. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 能够与聚合体 C9 交叉反应,但不与单体 C9 交叉反应。
53. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,C5b-9 只由新抗聚合体 C9 抗体检测。
54. 根据权利要求 35 所述的方法,其中,抗 -C5、抗 -C6、抗 -C7、抗 -C8,和抗 -C9 抗体不检测新抗原。

55. 一种用于诊断在受试者体中与年龄相关的黄斑变性 (AMD) 的发展的方法, 包括: 通过标记抗体至新补体蛋白来检测所述受试者眼部组织中替代途径特异性新补体蛋白, 其指示替代补体活化, 并且与没有 AMD 的受试者的对照群的基线水平相比显著升高。

56. 根据权利要求 37 所述的方法, 其中, 所述新抗体是 IgG 或 IgM。

57. 根据权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述抗体是鼠的, 嵌合的, 人源化的, de- 免疫的, 全人或重组的。

58. 根据权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述新重组抗体是 IgG, Fab2, Fab', Fab 或单链。

59. 根据权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述新抗体在动物、培养基或合成途径产生。

60. 根据权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述新抗体上的标记能够选自: Tc99, immunoPet 或其它显像剂。

61. 一种使用得 -99m 标记所述新抗体的方法, 其中, 结合得到蛋白在所述组织中有效地识别所述新抗原。

62. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中, 所述的组织来自人体。

63. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中, 在所述人体内的所述组织选自: 肝脏, 肾脏, 心脏, 肠, 胰腺或眼睛。

64. 根据权利要求 63 所述的方法, 其中, 所述的组织来自眼睛。

65. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中, 所述新抗原的存在于人体的任何部分中。

66. 根据权利要求 61 所述的方法, 其中, 所述新抗原存在于补体蛋白 / 片段中。

67. 一种在组织样品中检测新抗原的方法, 该方法包括以下所述步骤:

(a) 在所述组织中使特异性抗体结合新补体抗原;

(b) 使用成像技术测定结合的新抗体的量, 以获得各试剂的结合值;

(c) 将在步骤 (b) 中测定的值与从结合所述样品中存在的新补体抗原的特定新补体抗体的量计算的值相关联。

68. 根据权利要求 67 所述的方法, 其中, 所述的特异性结合剂是抗体。

69. 根据权利要求 67 所述的方法, 其中, 至少一种所述特异性结合剂是标记的。

70. 根据权利要求 67 所述的方法, 其中, 单克隆抗体是针对补体成分片段的新抗原的。

71. 一种创建诊断测试系统以用于测定结合组织的特定新补体成分片段的种类和量的方法, 所述系统包括下列的试剂盒形式:

(a) 第一特异性结合剂, 其对补体成分 C3b、C3a、iC3b、C3dg、C3d、C4d、Ba、Bb、C5b、C5a 和 C5b-9 具有特异性; 和;

(b) 第二特异性结合剂, 在该情况下标记的次级抗体至新抗体, 包括标记; 当与待测样品中所述新抗体接触时, 所述第一和第二特异性结合剂单独结合, 并形成复合体。

72. 根据权利要求 71 所述的方法, 其中, 所述第一结合剂特异于新抗原, 以及所述所述第二结合剂对免疫复合体的抗体成分具特异性。

73. 根据权利要求 71 所述的方法, 其中, 所述新补体蛋白选自: C3b、C3a、iC3b、C3dg、C3d、C4d、Ba、Bb、C5b、C5a 和 C5b-9。

74. 权利要求 71 所述的方法, 其中, 所述新补体蛋白被分类为新抗 C3b、新抗 -C3a、新抗 -iC3b、新抗 -C3dg、新抗 -C3d、新抗 -C4d、新抗 -Ba、新抗 -Bb、新抗 -Cb5、新抗 -C5a 或新

抗 C5b-9。

75. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C3b 不识别所述母体分子 C3。
76. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C3a 不识别 C3。
77. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -1C3b 不识别 C3。
78. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C3dg 不与 C3 交叉反应。
79. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C3d 不与 C3 交叉反应。
80. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C4d 不与 C4 交叉反应。
81. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -Ba 不与 B 交叉反应。
82. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -Bb 不与 B 交叉反应。
83. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b 不与 C5 交叉反应。
84. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5a 不与 C54 交叉反应。
85. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C5 交叉反应。
86. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C6 交叉反应。
87. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C7 交叉反应。
88. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C8 交叉反应。
89. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C9 交叉反应。
90. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 与聚合物 C9 交叉反应,但不与单体 C9 交叉反应。
91. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,C5b-9 仅由新抗聚合物 C9 抗体检测。
92. 根据权利要求 71 所述的方法,其中,抗 -C5、抗 -C6、抗 -C7、抗 -C8,和抗 -C9 抗体不检测所述新抗原。
93. 一种用于诊断在受试者体中与年龄相关的黄斑变性 (AMD) 的发展的方法,包括:在新抗体组上施用放置标记的样品,用于检测在所述组织中是否存在所述承载新抗原表位的补体蛋白的异常水平。
94. 根据权利要求 93 所述的方法,其中,所述标记是放射性和非放射性的示踪。
95. 根据权利要求 93 所述的方法,其中,通过两种光子成像捕获所述标记。
96. 根据权利要求 93 所述的方法,其中,所述标记为 immuno-pet。
97. 一种用于诊断在受试者体中组织伤害的发展的方法,包括:在所述受试者组织的样品中施用抗 - 聚合物 C9 抗体样品,用于检测在所述组织中是否存在承载聚合物 C9 的补体复合体。
98. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述组织来自身体的任何部分。
99. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的组织为眼部组织。
100. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的组织为肾组织。
101. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述组织在活的个体中。
102. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的组织在外植体的条件。
103. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的组织在培养条件。
104. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的组织在哺乳动物中。
105. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的组织损害为组织疾病的结果。
106. 根据权利要求 105 所述的方法,其中,所述的组织损害为眼部组织疾病的结果。

107. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述的眼部组织疾病为黄斑变性-相关的病症。

108. 根据权利要求 97 所述的方法,其中,所述黄斑变性相关的病症能够是与年龄有关的黄斑变性(AMD)、北卡罗来纳州黄斑营养不良症、Sorsby's 眼底营养不良症、Chemical Stargardt's 疾病、模式营养不良、卵黄状黄斑变性疾病、显性玻璃膜疣、malattia leventinese、视网膜脱离、脉络膜退化、视网膜退化、光感受器退化、RPE 退化、黏多糖症、视杆锥细胞营养不良、视锥杆细胞营养不良、或视锥细胞退化。

109. 根据权利要求 108 所述的方法,其中,所述的眼部组织疾病为 AMD。

110. 一种使用新抗体定位在黄斑变性相关的病症中的 Bruch's 膜的损伤和/或损害的位点的方法。

111. 根据要求 110 所述的方法,其中,所述新抗体包括:新抗 C3b、新抗 -C3a、新抗 -iC3b、新抗 -C3dg、新抗 -C3d、新抗 -C4d、新抗 -Ba、新抗 -Bb、新抗 -Cb5、新抗 -C5a、或新抗 -C5b-9。

112. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C3b 不识别母体分子 C3。

113. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C3a 不识别 C3。

114. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -iC3b 不识别 C3。

115. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C3dg 不与 C3 交叉反应。

116. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C3d 不与 C3 交叉反应。

117. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -Ba 不与 B 交叉反应。

118. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -Bb 不与 B 交叉反应。

119. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b 不与 C5 交叉反应。

120. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5a 不与 C5 交叉反应。

121. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C5 交叉反应。

122. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C6 交叉反应。

123. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C7 交叉反应。

124. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C8 交叉反应。

125. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 不与 C9 交叉反应。

126. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,所述新抗 -C5b-9 与聚合物 C9 交叉反应,但不与单体 C9 交叉反应。

127. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,C5b-9 仅由新抗聚合物 C9 抗体检测。

128. 根据权利要求 111 所述的方法,其中,抗 -C5、抗 -C6、抗 -C7、抗 -C8、和抗 -C9 抗体不检测所述新抗原。

129. 一种用于诊断在受试者体中组织伤害的发展的方法,包括:向所述受试者组织的样品施用新抗体样品,以达到检测是否存在承载新抗原表位的补体蛋白的目的。

130. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,所述新抗 - 聚合物 C9 识别底物沉积的 C9。

131. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,所述新抗 - 聚合物 C9 不识别单体 C9。

132. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,所述新抗 - 聚合物 C9 不识别体液中的单体 C9。

133. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,新抗 - 聚合物 C9 在组织内识别聚合物 C9 以

反映组织损害。

134. 根据权利要求 133 所述的方法,其中,组织损害在眼睛内。

135. 根据权利要求 133 所述的方法,其中,组织损害在人体内。

136. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,所述新抗 - 聚合物 C9 使用标签标记。

137. 根据权利要求 136 所述的方法,其中,所述标签能够是放射性的,基于正电子的、或本技术领域的。

138. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,所述新抗聚体 C9 可以用作为示踪剂,以确定组织损害。

139. 根据权利要求 129 所述的方法,其中,所述新抗聚合物 C9 能够为 IgG、Fab'、Fab、scFv、nanobody、双特异抗体。

140. 一种用于诊断在受试者体中年龄相关的黄斑变性 (AMD) 的发展的方法,包括:通过标记在所述受试者的眼睛组织中检测一种替代途径特异性新补体蛋白。

用于诊断组织损害的新抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2010 年 11 月 29 日提交的美国临时申请号 61/417,682 的优先权,其通过引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及在受试者中在诊断或鉴定组织损害的组合物和方法,更具体地,本发明涉及在受试者中在诊断或鉴定补体介导的组织损害的组合物和方法。

背景技术

[0004] 当补体激活完成终端途径以产生膜攻击复合体 (MAC, C5b-9) 时,会发生补体介导的组织损害。已知这些复合体导致组织损害。在一些疾病的指征,包括黄斑变性、类风湿性关节炎、心肌梗塞、和器官的再灌注损害中,补体起着重要的病理作用。使用非侵入性技术难以确定部位、强度和组织损伤的程度。在人类受试者中,一般是很难使用其他的非侵入性技术,以确定内部组织损伤,包括眼睛的损害。然而,可以应用诊断程序,如在本申请中提出的那些,以显示该信息。

[0005] 发明概述

[0006] 本申请涉及新抗体 (neoantibody) 或其片段,以及新抗体或其片段用于在受试者中以非侵入性或最小侵入方式诊断或鉴别组织损害。在某些实施方案中,所述新抗体或其片段可以用来鉴别和 / 或诊断疾病,如黄斑变性,中老年人中常见的眼科疾病。预期由新抗体或其片段明确确定该补体介导的病理学部位。通过沉积的 C5b-9 和作为补体激活的结果而在蛋白质上形成的其他新抗原表位 (neoepitope) 来测定病理学部位。

[0007] 在一些实施方案中,所述疾病可以是年龄相关的黄斑变性 (AMD),并且玻璃膜疣可以是眼部组织中的病理位点。玻璃膜疣为黄色或白色的细胞外沉积,位于 RPE 和 Bruch 膜之间的黄斑区内,围绕视盘或外围。有两类玻璃膜疣;那些病理的和其他无病理的。本发明描述的新抗体或其片段通过检测与病理玻璃膜疣相关的补体蛋白质活化产物,能检测病理玻璃膜疣的存在。

[0008] 根据本申请的新抗体或其片段能靶向独特的抗原表位,称为“新抗原表位 (neoepitope)”,其在补体活化过程中形成,并且在补体活化之前不存在于补体蛋白质上。新抗原表位可以包括独特的抗原表位 (其在补体片段上形成,作为补体蛋白质的裂解结果,并且其在母体补体 (parent complement) 蛋白质上不存在)、以及独特的抗原表位 (其在补体活化产物中形成,作为补体蛋白质或片段在补体活化中复合或聚集的结果,并且在补体活化之前不存在于补体蛋白质上)。

[0009] 例如,在补体激活中,C3 被转换成 C3a 和 C3b。可以通过抗 -C3 抗体检测到 C3a 和 C3b,检测 C3a 和 C3b 的共同抗原表位。C3a 和 C3b 还包括新抗原表位,其作为 C3 裂解的结果出现并且不存在于母体 C3 分子中。补体活化产物的新抗原表位的检测可以用于在受试者中补体 - 介导的组织损伤的检测。相似地,C5a 和 C5b 含有作为 C5 裂解结果形成的新抗

原表位。靶向针对 C5a 和 C5b 的新抗体及其片段不与 C5 蛋白质交叉反应,即使两者都来自 C5。B 因子通过 D 因子裂解成 Ba 和 Bb,在本发明中,可以使用 Ba 和 Bb 的新抗体。虽然结合 Ba 和 Bb 的抗体还将结合 B 因子,新抗 -Ba 和新抗 -Bb 将不会结合 B 因子。针对 Ba 和 Bb 的新抗体或其片段可以用于补体介导组织损伤的检测。尽管结合 Ba 和 Bb 的抗体会与因子 B 结合,但是新抗 -Ba(neo anti-Ba) 和新抗 -Bb(neo anti-Bb) 不会结合因子 B。

[0010] 同样地,对 C5b-9 具有特异性的新抗体或其片段也是这样,被称为 MAC 复合体。MAC 复合体由蛋白 C5、C6、C7、C8 和 C9 组成。C6、C7 和 C8 的抗体将检测 C5b-9 的存在。在血液或 MAC 复合体中发现的它们各自的游离蛋白质之间,这种抗体不会区分。能特异性地检测 MAC 复合体 C5b-9 的新抗体或其片段可以包括抗 - 聚合物 C9 或抗 -C5b-9。非新抗体 (Non-neoantibody) 也会识别和检测这些蛋白质。然而,只有新抗 - 聚合物 C9 和新抗 -C5b-9 能在受试者中,在 MAC 复合体 C5b-9 和它的组成补体蛋白质之间区别。这些新抗体或其片段将无法识别组成 MAC 的组成蛋白质的可溶性形式。

[0011] 可以使用各种抗 - 补体抗体来分析采自患者的血液样品是否存在补体蛋白。然而,不论组织是否损伤,可溶性补体蛋白基本上存在于血液中。补体激活后形成的新抗原表位非特异的抗体,将检测这些蛋白质和可溶性形式,并且检测病理将不可靠。在本发明中描述的新抗体或其片段能用来获得补体介导的组织损伤的特定属性。

[0012] 在一些实施方案中,通过施用合适量的新抗体或其片段,本文中描述的新抗体或其片段可以用来检测病理学玻璃膜疣的存在。补体蛋白质包括被发现与玻璃膜疣相关的 MAC(C5b-9)、布鲁赫膜 (Bruch' s membrane), RPE 的基底面,在眼部组织中的下 -RPE (sub-RPE)。因子 C3、C5、C9、以及所述 C5b-9 终端复合体已经发现与玻璃膜疣相关。已经发现,其它补体 - 相关分子 CR1、CR2、clustrin 和玻连蛋白与玻璃膜疣相关。定位在布鲁赫膜和 / 或玻璃膜疣中的其它补体途径相关分子包括 :C3d、C6、C7、C8、C9、因子 D、因子 H、因子 L、因子 B、丛生蛋白 (clusterin)、和甘露糖结合蛋白 (mannose binding protein)。而且,一些补体途径相关分子 (例如 CD21、CD35、CD55/ 衰变加速因子、和 CD59/ 保护) 存在于 PRE 的基底面中。

[0013] 检测玻璃膜疣的新抗体或其片段能包括抗 - 新聚合物 C9 (anti-neo polymeric C9) 抗体,其仅识别由在所述 C5b-9 复合体中聚合物 C9 形成的新抗原表位。在补体介导的病理学中,可发生组织损伤,作为 C5b-9 在组织上沉积的结果。这种沉积,以及组织损伤的程度,因此,可以使用抗聚合物 C9 来可视化。

[0014] 可以用成像方法诊断眼相关性疾病,包括年龄相关性黄斑变性 (AMD), North Carolina 黄斑营养不良, Sorsby' s 眼底营养不良, Chemical Stargardt' s 疾病, 图形样营养不良, Best 疾病, 显性玻璃膜疣, malattia leventinese, 视网膜脱离, 脉络膜退化, 视网膜退化, 光感受器退化, RPE 退化, 黏多糖症, 杆锥细胞营养不良, 锥杆细胞营养不良, 和视锥细胞退化。

[0015] 替代的补体途径的异常激活已经涉及到急性和慢性性质的几个病理情况。在几个损害的迹象中已经发现了替代途径激活副产物的水平升高,如体外循环损害,心血管疾病,移植排斥反应,眼部疾病,溶血性疾病,呼吸系统疾病,神经系统疾病,外伤引起的损伤,全身炎症 & 骨相关疾病,肾脏疾病,器官的再灌注损伤,生殖和泌尿生殖系统疾病,皮肤疾病,胃肠道疾病,内分泌疾病,或其他疾病的适应症如下所示。通过这些损伤相关的产物,本文

描述的新抗体或其片段能用在这些补体活化的检测中。

[0016] 体外循环损害的例子包括：体外循环后炎症，手术后的肺功能不全，体外循环，血液透析，白细胞分离法，血浆除去法，血小板除去法，肝素诱导体外 LDL 沉淀 (HELP)，灌注后综合征，体外膜肺氧合 (ECMO)，全身性炎症反应，和多器官功能衰竭。

[0017] 心血管疾病的例子包括：川崎氏症，过敏性紫癜性肾炎，血管渗漏综合征，经皮冠状动脉介入治疗 (PCI)，缺血再灌注后急性心肌梗塞，心肌梗塞，动脉粥样硬化，血管炎，免疫复合体性血管炎，败血症，动脉炎，动脉瘤，心肌病，Takayasu's 动脉炎，扩张型心肌病，静脉气体栓塞 (VGE)，韦格纳肉芽肿病，以及白塞氏综合征。

[0018] 移植损害的例子包括：移植的排斥反应，移植物抗宿主病，器官或移植的异种器官移植，器官或移植物的同种异体移植，和超急性排斥反应。

[0019] 眼部疾病的例子包括：年龄相关性黄斑变性（干性和湿性），脉络膜的 neurovascularization (CNV)，角膜新生血管，视网膜新生血管，视网膜损伤，糖尿病视网膜病变，糖尿病视网膜微血管病变，糖尿病性黄斑水肿，眼部组织胞浆菌病，葡萄膜炎，病理性近视，视网膜中央静脉阻塞 (CRVO)，视网膜色素上皮细胞 (RPE)，和 Purtscher retinopathy。

[0020] 溶血性疾病的例子包括：灾难性抗磷脂综合征 (CAPS)，冷凝集素疾病 (CAD)，自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)，内毒素血症，非典型溶血尿毒综合征 (aHUS)，阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH)，败血症，感染性休克，镰状细胞性贫血，溶血性贫血，嗜酸性细胞增多综合征，抗磷脂综合征 (APLS)。

[0021] 呼吸系统疾病的例子：哮喘，嗜酸细胞性肺炎，过敏性肺炎，过敏性支气管炎 bronchiectasis，反应性气道疾病综合征，呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染，副流感病毒感染，鼻病毒感染，腺病毒感染，过敏性支气管肺曲霉病 (ABPA)，结核病，寄生虫肺部疾病，成人呼吸窘迫综合征，慢性阻塞性肺疾病 (COPD)，肺气肿，支气管炎，囊性纤维化，间质性肺疾病，急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)，输血相关的急性肺损伤，急性肺损伤，棉尘肺，和石棉诱发的炎症。

[0022] 神经系统疾病的例子包括：重症肌无力，多发性硬化症，格林巴利综合征，中风，阿尔茨海默氏病，多灶性运动神经病 (MMN)，亨廷顿氏病，肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)，帕金森氏病，退变性椎间盘疾病 (DDD)，脑膜炎颅神经损伤，变异型克雅氏症 (vCJD)，特发性多发性神经病，和神经病理性疼痛。

[0023] 外伤引起的损伤的例子包括：失血性休克，低血容量性休克，脊髓损伤，神经损伤，脑外伤，脑缺血再灌注损伤，挤压伤，伤口愈合，严重烧伤和冻伤。

[0024] 全身炎症 & 骨炎 & 骨相关病症的例子包括：系统性红斑狼疮 (SLE)，类风湿性关节炎，全身性幼年型类风湿性关节炎，骨关节炎，骨质疏松症，肉样瘤。

[0025] 肾脏疾病的例子包括：肾缺血再灌注损伤，链球菌感染后肾炎 (PSGN)，肺出血 - 肾炎疾病，膜性肾炎，伯杰氏病 / IgA 肾病，系膜增生性肾小球肾炎，膜性肾小球肾炎，膜增生性肾小球肾炎，和肾皮质坏死 (RCN)。

[0026] 器官的再灌注损伤的例子可包括，但不限于，心脏，脑，肾，和肝。

[0027] 生殖和泌尿生殖系统疾病的例子包括：自然流产，母胎耐受，先兆子痫，感觉膀胱疾病，间质性膀胱炎。

[0028] 皮肤疾病的例子包括：类天疱疮，获得性大疱性表皮松解，自身免疫性大疱性皮肤病，大疱性类天疱疮，硬皮病，血管神经性水肿，遗传性血管神经性水肿 (HAE)，多形性红斑，疱疹妊娠期，干燥综合征，牛皮癣，皮炎，嗜酸（细胞）性海绵样水肿，特应性皮炎，和疱疹性皮炎。

[0029] 胃肠道疾病的例子包括：克罗恩氏病，腹腔疾病 / 麸胶敏感性肠病，Whipple 氏病，肠道缺血，炎症性肠道疾病，和溃疡性结肠炎。

[0030] 内分泌疾病的例子包括：桥本氏甲状腺炎，少年淋巴细胞性甲状腺炎，I 型糖尿病，应激焦虑，疾病影响催乳激素，生长因子，和促肾上腺皮质激素释放，胰腺炎，阿狄森氏病，和抗胰岛素性。

[0031] 其它疾病的例子可以包括：肺出血 - 肾炎病，帕金森氏病，烧伤，阿尔茨海默氏病，荨麻疹，亨廷顿氏病，Berger 疾病，心脏外科，低血容量性休克，克罗恩氏病，器官移植超急性排斥反应，热损伤，重症哮喘，肠道炎症，经皮冠状动脉介入治疗，肝素诱导的体外膜肺氧合，和过敏性休克。

[0032] 本申请的其它实施方案涉及新抗体或其片段，其与注射到血流中的标记试剂缀合，使能够检测到感兴趣的病理组织。在一些实施方案中，新抗体也可以包括完整的 IgG 或其片段。新抗体或其片段能与标记、成像或对照试剂（如吖啶青绿染料， ^{99m}Tc ，immunoPET）缀合，并通过对这些标记、成像或对照试剂特异性的成像方法检测到。

[0033] 本申请的其它实施方案又涉及在受试者中通过检测在组织中补体活化的片段，诊断黄斑变性相关疾病的方法。存在的任何大小的玻璃膜疣可用新抗体及其片段检测。这种抗体不可与衍生出所述新抗原表位的游离母体蛋白交叉反应。在一些实施方案中，这种新抗体特异性结合在眼部组织内的补体途径相关分子。在其它实施方案中，只检测到异常水平的新抗原表位。

[0034] 本申请的其它实施方案涉及在受试者中诊断、或者鉴定发展为黄斑变性相关病症的易患病体质的方法。这些方法检测在眼部组织中含有补体蛋白质和 / 或片段的新抗原表位的存在。所述眼部组织可以来自患有黄斑变性的患者。所述黄斑变性相关新抗原 (neoantigen) 含有分子，选自：C3b，iC3b，C3dg，C3c，C5b，C5b-9，C3a 和 C5a。在一些实施方案中，组织样品来自患有疾病的受试者，可以用于诊断目的。所述组织样品可以包括体液和眼睛的液体。

[0035] 在其它实施方案中，所述检测步骤限定使用标记的新抗体或者其片段，以在患有黄斑眼睛疾病患者的眼部组织中检测新抗原表位。在这种方法中，在使用成像系统检测后，所述标记的新抗体片段结合黄斑变性相关分子。一些方法包括在所述受试者中检测至少一个黄斑变性相关的新抗原表位。一些方法进一步包括用眼科成像方法检验所述受试者。

[0036] 本申请的其它实施方案又涉及在受试者中诊断或鉴定发展为黄斑变性相关疾病的易患病体质的试剂盒。所述标记的抗体将包括至少一个黄斑变性相关新抗原、成像试剂标记的新抗体、以及介质样品，从而建立所述新抗体与新抗原的结合。

[0037] 附图概述

[0038] 图 1 显示了新抗 -iC3b 的所述结合特性，其中，新抗 -iC3b 检测底物结合的 iC3b，但不检测 C3c、C3d。

[0039] 图 2 显示了新抗 -C3d 的所述结合特性，其中，在新抗 -C3d 结合 C3d，但不结合

C3c。

[0040] 图 3 显示了抗 -Bb 和新抗 -Bb 关于因子 B 的所述结合特性。

[0041] 图 4 显示了新抗 -SC5b-9 的所述结合特征,其中,新抗 -SC5b-9 仅结合到聚合体 C9 和 SC5b-9。

[0042] 图 5 显示了 C5、C6、C7、C8、和 C9 与抗 -C5、抗 -C6、抗 -C7、抗 -C8 和抗 -C9 的所述结合特性之间的所述关系。

[0043] 图 6 显示了抗 -C5 的所述结合特征,其中,抗 -C5 与 C5 结合,但不与 SC5b-9 结合。

[0044] 图 7 显示了抗 -C6 的所述结合特征,其中,抗 -C6 与 C6 和 SC5b-9 结合。

[0045] 图 8 显示了抗 -C7 的所述结合特征,其中,抗 -C7 与 C7 和 SC5b-9 结合。

[0046] 图 9 显示了抗 -C8 的所述结合特征,其中,抗 -C8 与 C8 和 SC5b-9 结合。

[0047] 图 10 显示了抗 -C9 的所述结合特征,其中,抗 -C9 与 C9 结合,但不与 SC5b-9 结合。

[0048] 图 11 显示了新抗 - 聚合体 C9 的所述结合特征,其中,新抗 - 聚合体 C9 与聚合体 C9 和 SC5b-9 结合。

[0049] 图 12 显示了抗 - 聚体 C9 的所述结合特征,其中,底物结合的 SC5b-9 的抗 - 聚合体 C9 检测,在人类血清中不受蛋白抑制。

[0050] 图 13 显示了新抗 - 聚合体 C9、抗 -C6、抗 -C7、和抗 -C8 的所述结合特征,其中,这些抗体检测所述 MAC 复合体。

[0051] 图 14 显示了新抗 - 聚合体 C9 的所述结合特征,其中,新抗 - 聚合体 C9 检测病理玻璃膜疣。

[0052] 发明详述

[0053] 如本文所述,所述术语“抗体”包括全长单克隆抗体、多克隆抗体、纳米抗体和多克隆抗体。生物抗体通常是约 150,000 道尔顿,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重链(H)组成的杂四聚体糖蛋白。两条重链通过二硫键连接在一起,并且每一个重链与轻链由二硫键连接。每个全长 IgG 分子含有至少两个对目标或抗原特异性的结合位点。轻链为 κ (kappa) 或 λ (lambda)。这两个轻链含有可变氨基酸序列的结构域,称为可变区(分别称为“ V_L ”,“ V_κ ”或“ $V_{\lambda\text{-区域}}$ ”)和氨基酸序列相对保守的结构域,称为恒定域(“CL 区域”)。同样的,每一个重链含有可变区($V_{H\text{-区域}}$)和三个恒定结构域(“ CH_1 ”, “ CH_2 ”, “和” CH_3 -区域”)和铰链区。

[0054] 如本文所述,所述术语“抗体片段”、“抗原 - 结合片段”或抗体的“其片段”是指全长抗体的部分,一般被称为作为靶结合或可变区。例子包括 Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和 Fv 片段。“Fv”片段是含有完整的目标识别和结合位点的最小抗体片段。Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 缺乏 Fc 区。片段可以由全长抗体通过蛋白酶消化制备。片段可由本领域的技术人员使用标准的重组 DNA 方法生产。

[0055] 如本文所述,所述术语“抗原表位”是指蛋白质、多肽、补体因子、补体片段上的(与抗体和其片段结合的)位点,并且执行功能活性。所述术语抗原表位与“抗原位点”、“抗体结合位点”是相同的。

[0056] 如本文所述,“Fab 片段”是指轻链的恒定区和重链的第一恒定区。Fab' 片段与 Fab 片段不同,区别为在重链 CH1 结构域的羧基端有额外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或更多的半胱氨酸。F(ab') 片段通过在 $F(ab')_2$ 胃液素消化产物的铰链半胱氨酸

的二硫键断裂而产生。

[0057] 如本文所述,所述术语抗体的“功能片段”是指具有与全长抗体性质上相同的生物活性的抗体片段。

[0058] 如本文所述,所述术语“人类共同框架”指的是一个框架,它指示在人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列选择中最常出现的氨基酸残基。一般来说,人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的选择是来自可变结构域序列的子群。

[0059] 如本文所述,“人源化抗体”是指主要是人序列组成的抗体,除了 CDR1、CDR2 和 CDR3。所有框架区域也人源化。嵌合抗体包含鼠 CDR、鼠框架区、和人恒定区。总的来说,嵌合抗体含有鼠可变区和人恒定区。

[0060] 如本文所述,关于抗体链多肽序列,所述术语“相同的”或“基本相同的”可以被解释为相对于存在于抗原结合片段可变区中存在的多肽序列,该抗体链表现出至少 65%,70%,80%,90%或 95%的序列同一性。关于核苷酸序列,所述术语被解释为相对于核苷酸序列,该核苷酸序列表现至少约 65%,75%,85%,90%,95%或 97%的序列同一性。

[0061] 如本文所述,所述术语“个体”或“受试者”是指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。服从治疗的个人,包括那些目前无症状但是具有发展为有症状的紊乱的风险,其中补体替代途径起到了重要作用,或补体替代途径的激活起到了重要作用。

[0062] 如本文所述,所述术语“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人类、高等灵长类动物、驯养的和农场动物,马、猪、牛、狗、猫和雪貂等。在本发明的一个实施方案中,所述哺乳动物是人。

[0063] 如本文所述,“单克隆抗体”是指抗体的同质群体。这样的抗体是高度特异性的,并且针对单个目标抗原。通过杂交瘤培养同质地产生这些单克隆抗体,不被其他的免疫球蛋白。单克隆抗体也可以由其他程序,例如已知方法的 phase display 来产生。

[0064] 本文所述实施方案包括包含新抗体或其片段的组合物和方法,其结合蛋白质分子上的新表位。结合补体活化产物的新抗体或其片段包括那些与在补体活化产物内的新颖表位结合的抗体,其不结合存在于母体补体蛋白质或分子内的。例如,本文描述的新抗体或其片段能结合 C3b 而不结合 C3,结合 C3a 而不结合 C3,结合 C3d 而不结合 C3,结合 C3c 而不结合 C3,结合 iC3b 而结合 C3,结合 C5b 但不结合 C5,结合 C5b-9 不结合 C5、C6、C7、C8、C9。

[0065] 为了检测在眼内到正在进行的补体活化,需要目标高度特异性的单克隆抗体,其可以特异性地识别激活的、沉积的蛋白质(而没有结合游离蛋白质)。这种新的和特定的位点驱动的单克隆抗体是本文所描述的抗体的目标之一。这些抗体也被称为新抗体。这些单克隆抗体结合在蛋白质上、在活化发生后形成的新的抗原决定簇。单克隆抗体不识别 C3 但识别抗原,可以选自:抗 -C3b、抗 -iC3b、抗 -C3c、和抗 -C3d;并且单克隆抗体不识别 C5、C6、C7、C8 和 C9,但却识别“聚合体 C9”或其他 C5b-9 复合体的新抗原表位。

[0066] 本文所述的新抗体或其片段能使用成像系统,检测到存在于眼部组织中的新抗原。用显像剂标签的新抗体可以注射和施用至眼,或者通过任意给药途径给药。新抗体然后结合新抗原表位(其在活化补体的组织内,在补体蛋白质上形成)。在眼部组织中,所述活化的补体蛋白(新抗原)是病理指标。因此在组织中的新表位的鉴定可以翻译成病理位点的鉴定。眼部组织可以使用先进的成像技术检验新抗体结合(例如,RPE,脉络膜)。

[0067] 这是可能的,以区分作为经典的(CP)与替代(AP)的补体活化途径的结果形成的

新抗原。如果经典补体途径被激活,那么可以识别对 CP 活化特异性形成的新抗原。如果替代途径被激活,则可以识别对 AP 激活特异性的新抗原。

[0068] 可以产生许多不同的抗体,靶向巨大的蛋白质。通过新表位为基础的筛选选择新抗体或其片段。例如,抗-C3b、抗-iC3b、抗-C3c、和抗-C3d 仅识别和检测新表位,而不检测母体分子 C3。单克隆和多克隆抗体都可以在新表位为基础的筛选中使用。新抗原含有新颖的表位,其:a) 不存在于母体分子中;并且 b) 只存在于新形成的子分子中。新抗原的例子包括 C3b、iC3b、C3c、C3dg。虽然这些分子是来自于 C3 分子,但是它们带有新颖的表位,其对单独的蛋白片段具有特异性。

[0069] 新抗体或其片段针对多种黄斑变性相关的新抗原,例如 (a) C3a、C3b、iC3b、C3c、C3dg ;(b) Ba、Bb ;(c) C5b、C5a ;(d) C5b-9 ;以及 (e) C4b,能与它们的母体分子相区别。这些分子可以通过各自的对上述的每个分子具有特异性的新抗体或其片段检测到。本文描述的新抗体将不检测 C3、因子 B、C5、C6、C7、C8、和 C9。

[0070] 例如,C3a、C3b、iC3b、C3c、和 C3dg 是 C3 的裂解产物。因此,抗-C3 单克隆抗体和多克隆抗体可以与 C3a、C3b、iC3b、C3c、和 C3dg 交叉反应。本文描述的新抗体或其片段不与 C3 交叉反应,并且只分别结合 C3a、C3b、iC3b、C3c、和 C3dg。C3 片段的形成暴露了在所述片段内的新基序,称为新表位。这种表位仅被新抗体检测到。

[0071] 在 C5b-9 中,为由 C5 裂解产物和蛋白质(例如 C6、C7、C8、和多个单体的 C9)组成的复合体。因此,抗-C6、C7 和 C8 将检测所述 C5b-9 复合体。这些抗体也检测游离蛋白质,并且因此不能将存在的游离蛋白质与所述 C5b-9 复合体的组成部分区分开。本文描述的新抗体或其片段仅包括新抗体或其片段,其识别在所述复合体内的新表位,即抗-C5b、抗-聚合的 C9、和抗-C5b-9。

[0072] 抗-C5b 抗体即能识别游离 C5,又识别 C5b。本文描述的新抗体或其片段能识别 C5b,但不识别 C。抗-聚合体 C9 能识别 C5b-9,并且不识别游离 C9。抗-C5b-9 能识别 MAC,而不识别单个的组成蛋白质。

[0073] 本申请的一些实施方案包括通过测定补体新抗原的存在,来诊断、或测定发展为黄斑变性相关病症的易患病体质的方法。可以用这些方法诊断的所述指征包括:年龄相关性黄斑变性 (AMD)、北卡罗莱纳州黄斑营养不良、Sorsby 的眼底营养不良、Stargardt 病、图形样营养不良 (pattern dystrophy),卵黄状黄斑变性 (Best disease),显性玻璃膜疣,和 Malattia Leventinese。可以用这些方法诊断的其他眼部病症包括:视网膜脱离、脉络膜视网膜变性、视网膜变性、光感受器变性、视网膜色素上皮变性、黏多糖症、杆锥细胞营养不良、视锥杆细胞营养不良、和视锥细胞变性。

[0074] 本文描述所述的方法可以用于群体大规模筛选黄斑变性相关的疾病的存在。本文描述的方法可用于监测已经被诊断并正接受治疗的受试者的治疗响应。所述方法检测针对一些黄斑变性相关分子的新抗原的存在,并且可以与检测其它(与黄斑变性相关疾病或者玻璃膜疣相关疾病相关的)表型或基因型标记的方法联合进行。。

[0075] 在其它实施方案中,本文所述的新抗体或其片段可以以标签、对照或显像剂被标记。使用化学实体标记蛋白质是众所周知的。这些标记的新抗体可用于体外、离体和体内试验。使用类似的化学产品、化学实体,可以特异地缀合至 IgG, Fab, F(ab')₂, Fab' 和单链新抗体的位点。使用的 Fab' 来生产生物缀合物是已知的。此生物缀合物可用于检测组

织或体液是否存在新抗体目标。在这些生物缀合物施用于人体,并通过成像的方法可视化。新抗体或其片段也可以与化学实体是共轭的。化学实体包括放射性同位素或成像荧光团,其可以使用各种成像过程来检测。

[0076] 在一些实例中,该标记可以包括镓-99m。镓-99m一般可作为高镓酸钠。高镓酸盐可以与还原剂,如氯化亚锡接触。在蛋白质,螯合剂,或类似的物质(其是放射性标记的)的存在下,其还原镓为+3,+4或+5氧化态。镓可以保持在此还原状态下,以保持镓分子和被放射性标记的新抗体之间的化学键。镓能够牢固地绑定到新抗体,使得还原的镓不传输到在试验中存在的其它分子或其它蛋白质,患者的血液或其他介质(在其中放射性标记的物质)将被利用。已经描述了镓-99m放射性标记的单克隆抗体的几种不同的方法。

[0077] 在一些实施方案中,使用新抗体或其片段检测补体介导的病理可以提供干性和湿性AMD位点和疾病进展程度的准确描绘。本文所述的新抗体或其片段也可用于测量治疗个体的进展程度或疾病回归。本文所述的新抗体或其片段也可以检测AMD的发病和进展。新抗体或其片段可用于适合于眼睛的配方。

[0078] 通过举例的方式,在个体的快速(相对缓慢)的疾病进展之间,眼底成像可以区分。具体而言,病理损伤的位点和损伤的萎缩性补丁可以很容易地识别。明确的例子可能为老妇的场景,其一只眼睛中具脉络膜新生血管(CNV),以及另一只眼睛中具软性玻璃膜疣。本文所述的诊断方法可以区分在新抗体沉积水平基础上的CNV眼和玻璃膜疣眼之间的疾病进展的相对程度。通过成像比较新抗体的相对水平,临床医生可以判断,是否眼睛只含有玻璃膜疣将发展为CNV。本文所述的方法可以揭露信息表明疾病的进展以及病理玻璃膜疣沉积向CNV潜在的过渡。

[0079] Bruch's膜破裂为重要的病理标记,用于检测从干性,无渗出型AMD转换成湿性,渗出型AMD。Bruch's膜的破裂与视网膜和脉络膜中的流体或出血性分泌物临床结果相关联。因此,本文描述的方法可以通过检测膜区域来识别Bruch's膜破裂上的位点,其显示高水平新抗体沉积。来自成像研究的信息其用于新抗体或其片段可以给予是否需要临床干预-手术或药物的洞察力。

实施例

[0080] 实施例1:新抗-iC3b(neo anti-iC3b)抗体针对iC3b的结合,但是不针对C3c和C3d

[0081] 新抗-iC3b(Neo anti-iC3b)抗体应该与在抗原iC3b上的新抗原表位结合。预期此抗体还没有结合C3c或者C3d。所述C3分子激活后转化为C3b和C3a。C3b被因子I灭活生成iC3b。新抗-iC3b(Neo anti-iC3b)识别iC3b分子上的新抗原表位。该新抗体不结合C3c表明,C3b受体分子的 α 链和 β 链不具备的新抗原表位。新抗-iC3b(neo anti-iC3b)对于C3c和C3d的交叉反应性的缺乏表明,当C3c和C3d产生时识别抗原表位的抗体丢失。预计新抗-iC3b(neo anti-iC3b)在体内对组织表现出类似的结合特性。

[0082] 聚苯乙烯微量滴定板涂有人类因子iC3b、C3d和C3c(泰勒(TX),德克萨斯州(TX),Complement Technology),每个以(05 μ g/50 μ L/孔)在PBS中4 $^{\circ}$ C过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含1.0%牛血清白蛋白(BSA,Sigma-Aldrich公司,圣路易斯,密苏里州)的PBS室温下封闭1小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗-iC3b(neo

anti-iC3b) (Quidel 公司, San Diego, CA) 的等分试样, 在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后, 用 PBS 洗涤各孔。

[0083] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体, 以 1 : 2000 稀释, 检测蛋白质结合的新抗 -iC3b。在室温孵育 1 小时之后, 洗涤平板, 并添加 100 μ l 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。在室温孵育 30 分钟之后, 通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止, 并且所述平板在 450nm, 在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 上读数。新抗 -iC3b 对多种底物 - 结合蛋白结合的估计 Kd 值, 是根据在 50% 最大结合 (Microcal Origin, Northampton, MA) 时新抗 -iC3b 的浓度。

[0084] 新抗 -iC3b 以 262pM 的亲合力与 iC3b 结合, 但不结合 C3d 和 C3c, 因此新抗 -iC3b 具有高度特异性。来自这些数据的表观结合常数, 定义为达到最大结合的一半时需要的新的抗 -iC3b 的浓度, 为大约 200-300pM。这些数据在图 1 中示出。

[0085] 实施例 2: 新抗 -C3d (neo anti-C3d) 抗体针对 C3d 的结合, 但是不针对 C3c

[0086] 新抗 -C3d 抗体不结合 C3c 分子 (C3c 分子含有 C3b 分子的 α 和 β 链)。C3b 的裂解后, C3c 和 C3d 的形成。C3d 分子从 C3b 分子释放, 以产生 C3c。新抗 -C3d 特异性地结合 C3d 分子, 不结合 C3c。

[0087] 聚苯乙烯微量滴定板涂有人类 C3d 和 C3c (Complement Technology), 每个以 (05 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后, 孔用含 1.0% 牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭, 并作为背景对照。新抗 -C3d (Quidel Corporation) 的等分试样, 在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后, 用 PBS 洗涤各孔。

[0088] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体, 以 1 : 2000 稀释, 检测蛋白质 - 结合的新抗 -C3d。在室温孵育 1 小时之后, 冲洗所述平板, 并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories) 在 25 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟之后, 通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止, 并且所述平板在 450nm, 在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。新抗 -C3d 对多种底物 - 结合蛋白结合的估计 Kd 值, 是根据在 50% 最大结合 (Microcal Origin) 时新抗 -C3d 的浓度。

[0089] 新抗 -C3d 以 447pM 的亲合力结合 C3d, 但不结合 C3c, 因此新抗 -C3d 具有高度特异性。来自这些数据的表观结合常数, 定义为达到最大结合的一半时需要的新的抗 -C3d 的浓度, 为大约 350-550pM。这些数据在图 2 中示出。

[0090] 实施例 3: 抗 -Bb (Anti-Bb) 和新抗 -Bb (neo anti-Bb) 对 B 因子具有不同的结合率

[0091] 新抗 -Bb 抗体不结合 B 因子 (Factor B), 但是非 - 新抗 -Bb (non-neo anti-Bb) 结合因子 B。Bb 是可选途径的特异性蛋白质, 并且能用新抗 -Bb 抗体 (neo anti-Bb antibody) 检测。

[0092] 聚苯乙烯微量滴定板涂有人类 B (Complement Technology), 每个以 (05 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后, 孔用含 1.0% BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭, 并作为背景对照。新抗 -Bb (Quidel Corporation) 的等分试样, 在封闭液中以不同浓度添加到 B 因

子涂覆的孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0093] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测 B 因子结合的新/非 - 新抗 -Bb (neo/non-neo anti-Bb)。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。

[0094] 新抗 -Bb 不结合底物 - 涂覆的 B 因子表明,所述新抗原表位在 B 因子上不表达。来自这些数据的表观结合常数,定义为达到最大结合的一半时需要的非新抗 -Bb (non-neo anti-Bb) 的浓度,为大约 212pM。这些数据在图 3 中示出。新抗 -Bb (neo anti-Bb) 似乎仅仅对在 Bb 上的新抗原表位具有特异性。

[0095] 实施例 4 :新抗 -SC5b-9 (Neo anti-SC5b-9) 只结合聚合体 C9 (Polymeric C9) 和 SC5b-9

[0096] 新抗 -C5b-9 识别底物 - 结合的 C9,具有 1.12nM 亲和力。底物 - 结合的 C9 功能类似于在所述 SC5b-9 复合体中的聚合体 C9。聚合体 C9 含有在补体活化途径中形成的新抗原表位。所述新抗体与在 SC5b-9 复合体中由聚合体 C9 形成的表位。新抗 -SC5b-9 抗体以 1.12nM 的亲和力结合底物 - 结合的 (聚合) C9,与之相比,该抗体以 585pM 的结合亲和力结合 SC5b-9。该新抗体不结合底物 - 结合的 C5、C6、C7、和 C8 蛋白质。

[0097] 聚苯乙烯微量滴定板涂有人类 C9 或 SC5b-9 (Complement Technology),以 (05 μ g/50 μ L/孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0 % BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 -SC5b-9 (Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0098] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测蛋白质 - 结合的新抗 -SC5b-9。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。新抗 -SC5b-9 以高亲和力 (使用 Microcal Origin 计算) 既结合 C9,又以高亲和力 (使用 Microcal Origin 计算) 结合 SC5b-9。

[0099] 新抗 -SC5b-9 以 585pM 的亲和力结合 SC5b-9,并以 1120pM 的亲和力结合聚合体 C9。来自这些数据的表观结合常数,定义为达到最大结合的一半时需要的抗 -SC5b-9 的浓度,是高度亲和的。这些数据在图 4 示出。

[0100] 实施例 5 :抗 -C5、-C6、-C7、-C8、和 -C9 与相应蛋白质的结合

[0101] 为了确保 C5、C6、C7、C8 和 C9 蛋白质与 ELISA 平板结合,在实施例 4 中,我们用相应的抗体检测了这些蛋白质。允许抗 -C5、-C6、-C7、-C8、和 -C9 与底物 - 结合的蛋白质结合。如在图 5 中所示的,所述抗体以相似的亲和力结合相应的抗原。单一浓度图在图 5 中示出。

[0102] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C5、C6、C7、C8 和 C9 (Complement Technology),以 (05 μ g/50 μ L/孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为

背景对照。在封闭液中相应抗体 (Quidel Corporation) 的等分试样,被添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0103] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测抗原结合的抗体。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。形成饱和结合曲线,并且对所有抗体绘制接近饱和的单一浓度,以进行比较。所述数据在图 5 中示出。

[0104] 如在图 5 中示出,所有抗体,抗 -C5、抗 -C6、抗 -C7、抗 -C8 和抗 -C9 是有完全活性,并且表明与相应抗原具有良好的结合力。

[0105] 实施例 6 :抗 -C5,对底物 - 结合的 C5、以及 SC5b-9 的结合

[0106] 如图 6 所示,抗 C5 结合 C5,但不检测在所述 SC5b-9 复合体中的 C5b,表明了:抗 -C5 不能检测由 C5b-9 导致的损伤。这个发明选择识别在 SC5b-9 或者 C5b-9 上的新抗原表位的新抗体。

[0107] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C5 和 SC5b-9 (Complement Technology),以 (05 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0 % BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 -C5 (Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0108] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测 C5 和 SC5b-9 结合的抗体。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。形成饱和结合曲线,并且对所有抗体绘制接近饱和的单一浓度,以进行比较。

[0109] 如图 6 所示,抗 -C5 识别底物 - 结合的 C5 而不是 SC5b-9。因此,抗 -C5 不能检测补体介导的组织损伤。

[0110] 实施例 7 :抗 -C6 对于底物 - 结合的 C6、以及 SC5b-9 的结合

[0111] 如在图 7 中所示,抗 -C6 以大约 200pM 的相似亲和力,结合 C6 和 SC5b-9 复合体,表明:抗 -C6 将既检测 C6 又检测 SC5b-9,并且不能区分 C5b-9 和游离 C6。

[0112] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C6 和 SC5b-9 (Complement Technology),以 (05 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0 BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 -C6 (Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0113] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测 C6 和 SC5b-9 结合的抗体。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。形成饱和结合曲线,并且对所有抗体绘制接近饱和的单一浓度,以进行比较。

[0114] 如在图 7 中所示,抗 -C6 既识别底物 - 结合的 C6 又识别 SC5b-9。因此,抗 -C6 不能特异性检测组织损伤。

[0115] 实施例 8 :抗 -C7 对于底物 - 结合的 C7、以及 SC5b-9 的结合

[0116] 如在图 8 中所示,抗 -C7 以 200-400pM 范围的亲和力既结合 C7 又结合 SC5b-9 复合物,表明 :抗 -C7 不检测 C7 和 SC5b-9,并且不能区分 SC5b-9 和游离 C7。

[0117] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C7 和 SC5b-9(Complement Technology),以 (05 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0 % BSA(Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 -C7(Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0118] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测 C7 和 SC5b-9 结合的抗体。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物(Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪(SPECTRAMAX250,Molecular Devices,Sunnyvale) 上读数。形成饱和结合曲线,并且对所有抗体绘制接近饱和的单一浓度,以进行比较。

[0119] 如在图 8 中所示,抗 -C7 既识别底物 - 结合的 C7 又识别 SC5b-9。因此,抗 -C7 不能特异性检测组织损伤。

[0120] 实施例 9 :抗 -C8 针对底物 - 结合的 C8、以及 SC5b-9 的结合

[0121] 如在图 9 中所示,抗 -C8 以 600-1000pM 范围的亲和力既结合 C8 又结合 SC5b-9 复合物,表明,抗 -C8 将既检测 C8 又 SC5b-9,并且不区分 SC5b-9 和游离 C8 之间。

[0122] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C8 和 SC5b-9(Complement Technology),以 (0.5 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0BSA(Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 -C8(Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0123] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测 C8 和 SC5b-9 结合的抗体。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物(Kirkegaard&Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪(SPECTRAMAX250,Molecular Devices,Sunnyvale) 上读数。形成饱和结合曲线,并且对所有抗体绘制接近饱和的单一浓度,以进行比较。

[0124] 如在图 9 中所示,抗 C8,既识别底物 - 结合的 C8 又识别 SC5b-9。因此,抗 -C8 不能特异性检测组织损伤。

[0125] 实施例 10 :抗 -C9 针对底物 - 结合的 C9、以及 SC5b-9 的结合

[0126] 如在图 10 中所示,抗 -C9 结合 C9 但不结合 SC5b-9 复合物,表明,抗 -C9 不检测组织损伤因为它不识别 SC5b-9。

[0127] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C9 和 SC5b-9(Complement Technology),每个以 (1 μ g/50 μ L/ 孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0 % BSA(Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 -C9(Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。

在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0128] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测 C9 和 SC5b-9 结合的抗体。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。形成饱和结合曲线,并且对所有抗体绘制接近饱和的单一浓度,以进行比较。

[0129] 如在图 10 中所示,抗 C9 识别底物 - 结合的 C9,但不识别 SC5b-9。因此,抗 -C9 不检测由 SC5b-9 引起的组织损伤。

[0130] 实施例 11:新抗 - 聚合体 C9 (Neo anti-polymeric C9) 结合聚合体 C9 和 SC5b-9

[0131] 新抗 - 聚合体 C9 以 1.12nM 亲和力识别底物 - 结合的 C9。底物 - 结合的 C9 也表现聚合体 C9 的性质。因为它是人工建立的聚合体 C9,所述 C9 可以作为单体或者聚合体存在。所述底物 - 结合的 C9 可以模仿聚合的 C9。聚合体 C9 含有在活化过程中形成的新抗原表位。所述新抗 - 聚合体 C9 抗体结合聚合体 C9 和在 SC5b-9 复合体中的聚合体 C9。所述新抗 - 聚合体 C9 抗体以 1.12nM 的亲和力结合底物 - 结合的 (聚合的) C9,与之相比较,此抗体与 SC5b-9 的结合亲和力为 585pM。没有观察到这个抗体结合底物 - 结合的 C5、C6、C7、和 C8 蛋白质。

[0132] 聚苯乙烯微量滴定板涂有 C9 或者 SC5b-9 (Complement Technology),以 (0.5 μ g/50 μ L/孔) 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0 % BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。新抗 - SC5b-9 (Quidel Corporation) 的等分试样,在封闭液中以不同浓度添加到孔中。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。

[0133] 通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1 : 2000 稀释,检测底物 - 涂覆的 C5b-9 和 C9 结合的新抗 C5b-9。在室温孵育 1 小时之后,冲洗所述平板,并添加 100 μ l 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 100 μ l 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices, Sunnyvale) 上读数。新抗 - SC5b-9 既以高亲和力 (使用 Microcal Origin 计算) 结合 C9,又以高亲和力使用 Microcal Origin 计算) 结合 SC5b-9。

[0134] 新抗 - 聚合体 C9 以 585pM 的亲和力结合 SC5b-9,并以 1120pM 的亲和力结合聚合体 C9。来自这些数据的表观结合常数,定义为达到最大结合的一半时所需要的新抗 - 聚合体 C9 (neo 抗 - 聚合体 C9) 的浓度,是高度亲和的。这些数据在图 11 中示出。

[0135] 实施例 12:抗 - 聚合体 C9 抗体在存在正常人类血清的情况下检测底物 - 结合的 SC5b-9

[0136] 图 1 至 11 的结果证明,新抗体 (新抗体) 将特异性地检测组织损伤 (以聚合体 C9 的形成为代表)。例如,新抗 - iC3b、新抗 - C3d、新抗 - Bb、和新抗 - 聚合体 C9 将检测在补体途径中的多个步骤中的 AP 活化。新抗 - 聚合体 C9 将检测 AP 活化的最终步骤。聚合体 C9 的存在指示了组织损伤,因为所述 C5b-9 复合体是细胞裂解的原因。为了确保新抗 - 聚合体 C9 能特异性结合活体内的聚合体 C9,进行了竞争实验。这个实验使用过量的正常人类血清,以与底物 - 结合的 SC5b-9 竞争,去结合新抗 - 聚合体 C9。在高达 50% 的生理血清浓度下,正常人类血清没有抑制新抗 - 聚合体 C9 对底物 - 结合的 SC5b-9 的结合。因此,新

抗-聚合物 C9 将对活体内的 C5b-9 具有特异性,并且不会结合在血清中存在的游离补体蛋白质。在血清中正常存在的 C9 的量为 $60 \mu\text{g/ml}$ 。在这个研究中使用的血清最高浓度为 50%,其转化为 $30 \mu\text{g/ml}$ 的 C9。就 nM 而言,对于每个稀释使用的在血清中的所述 C9 浓度为:422nM、253nM、126nM、42nM、25nM、12nM、4.2nM、2.5nM、1.3nM、0.42nM 和 0nM。

[0137] 新抗-聚合物 C9 而不是抗-单体的 C9 检测新抗原 SC5b-9。这表明,聚合物 C9 抗体特异性检测底物-结合的 SC5b-9。此聚合物 C9 抗体不识别游离的或者单体的 C9,并且因此对于由 C5b-9 表达的新抗原表位是目标特异的。抗-单体的 C9 仅结合游离的 C9,但不识别 SC5b-9。

[0138] 在这个模型中,用 SC5b-9 涂覆 ELISA 孔,以指示含有 C5b-9 复合体的组织。此涂覆的板然后用各种浓度的正常人血清以及固定浓度的新抗-聚合物 C9 孵育。新抗体将结合 SC5b-9,因此在体内将对 C5b-9 具有特异性。

[0139] 在这个实验中,聚苯乙烯微量滴定板涂有 SC5b-9 或 C9 (Complement Technology),以 ($0.5 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /孔) 在 PBS 中 4°C 过夜。在抽吸蛋白质溶液后,孔用含 1.0% BSA (Sigma-Aldrich) 的 PBS 室温下封闭 1 小时。无蛋白质涂层的孔类似地封闭,并作为背景对照。固定浓度的新抗-SC5b-9 (Quidel Corporation) 与不同浓度的正常人类血清,在封闭液中混合。在室温下孵育 1 小时后,用 PBS 洗涤各孔。通过添加过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体,以 1:2000 稀释,检测(结合 SC5b-9 的)新抗-聚合物 C9。在室温孵育 1 小时之后,洗涤平板,并添加 $100 \mu\text{l}$ 的 TMB 底物 (Kirkegaard & Perry Laboratories)。在室温孵育 30 分钟之后,通过添加 $100 \mu\text{l}$ 的 1M 磷酸使所述 TMB 反应终止,并且所述平板在 450nm,在酶标仪 (SPECTRAMAX250, Molecular Devices) 上读数。存在于血清或其它中的游离 C9 将不影响结合到 C5b-9 复合体的新抗-聚合物 C9 的特异性结合。

[0140] 如在图 12 中所示,新抗-聚合物 C9 对 SC5b-9 的结合不受人正常血清抑制。这表明新抗-聚合物 C9 能用来检测活体内的组织损伤。

[0141] 实施例 13:新抗-聚合物 C9 检测来自正常人类血清的沉积的 C5b-9

[0142] 为了测定新抗-聚合的是否结合从正常人血清中形成的沉积 C5b-9,使用体外试验。在该试验中,涂上 lipopolysaccharide (LPS) 的孔与 50%、30%、20%、10%、8%、6%、4%、0% 正常人血清在缓冲液中孵育,使替代途径 (AP) 活化。已知 LPS 激活替代途径,并因此 C5b-9 在 LPS 的表面上形成。使用抗-C5、抗-C6、抗-C7、抗-C8、抗-C9、和新抗-聚合物 C9,以检测新沉积的 C5b-9。抗-C6、抗-C7、抗-C8 能够检测到沉积的 C5b-9。此外,新抗-聚合物 C9 (但不是抗-单体 C9) 检测沉积的 C5b-9。新抗-聚合物 C9 以高亲和力结合 C5b-9 说明,这种抗体将是一个有效的方法来检测在体内形成的 C5b-9。

[0143] 如在图 13 中所示,即使在存在正常人血清的情况下,新抗-聚合物 C9 特异性地检测 C5b-9。

[0144] 实施例 14:新抗-聚合物 C9 抗体检测在病理玻璃膜疣中沉积的 C5b-9

[0145] 眼睛采购自 AMD 患者,通过经 IRB 批准的眼库。制备石蜡块的和显示黄斑的切片。切片用新抗-聚合物 C9 进行染色。如在图 14 中所示,新抗-聚合物 C9 通过在来自 AMD 患者组织中的聚合物 C9 沉积,检测玻璃膜疣。因此,被归类为正常的个人可能有 AMD 的风险。

[0146] 虽然本发明已参考其优选实施例具体地示出和描述,本领域技术人员可以理解,不脱离由所附权利要求涵盖的本发明范围的情况下,可以做出多种形式和细节上的改变。

在前述说明书中引用的所有专利、出版物和参考文献通过引用的方式全文并入本文。

新抗-iC3b检测底物结合的iC3b
，但不检测C3c、C3d

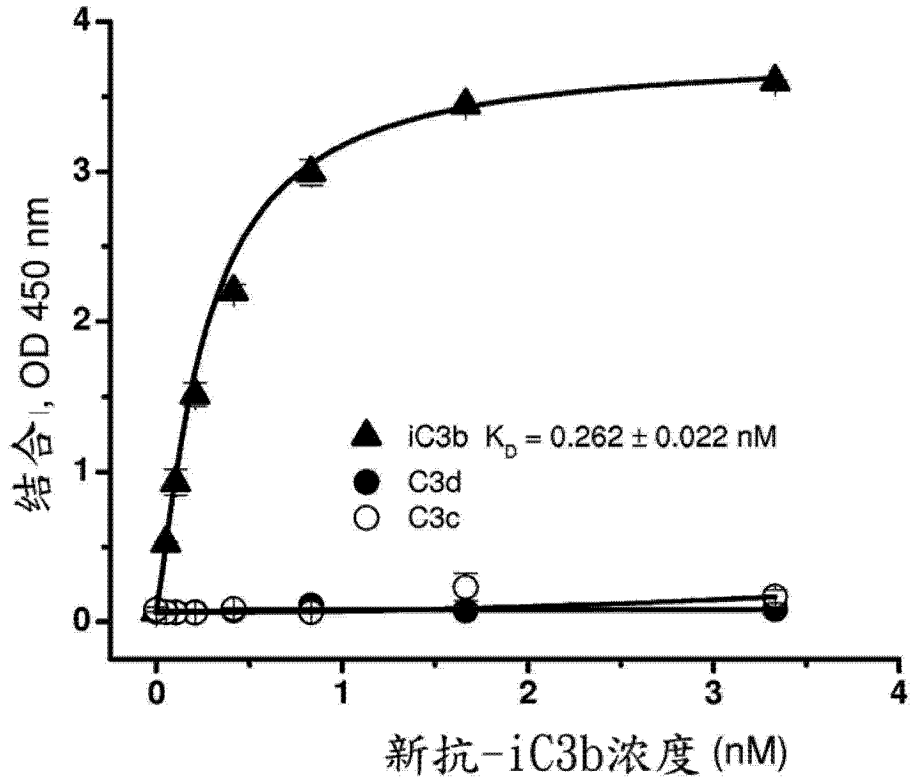


图 1

新抗-C3d以高亲和力结合C3d
，但不结合C3c

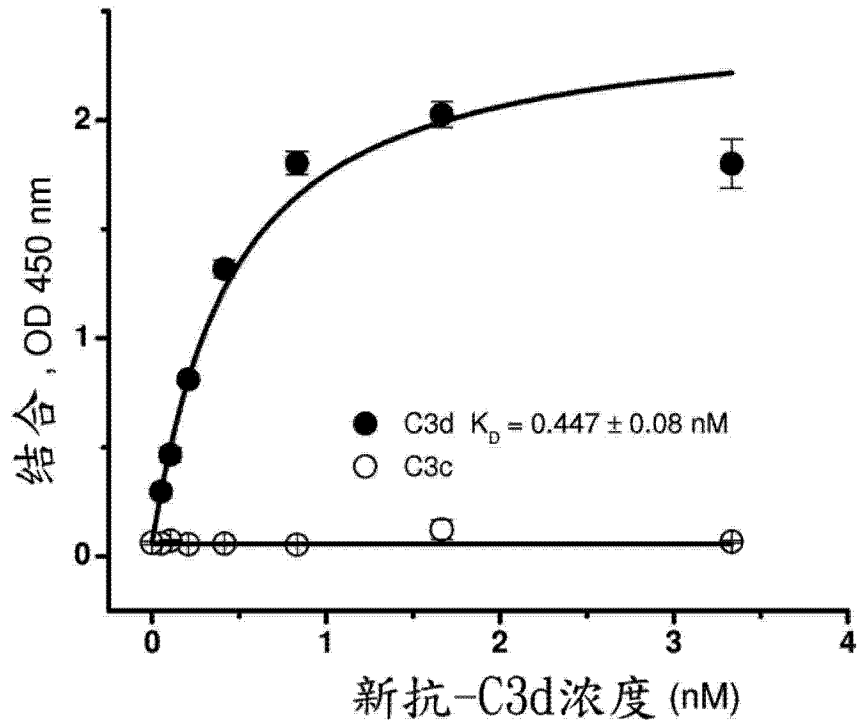


图 2

抗-Bb和新抗-Bb对于因子B具有不同的结合

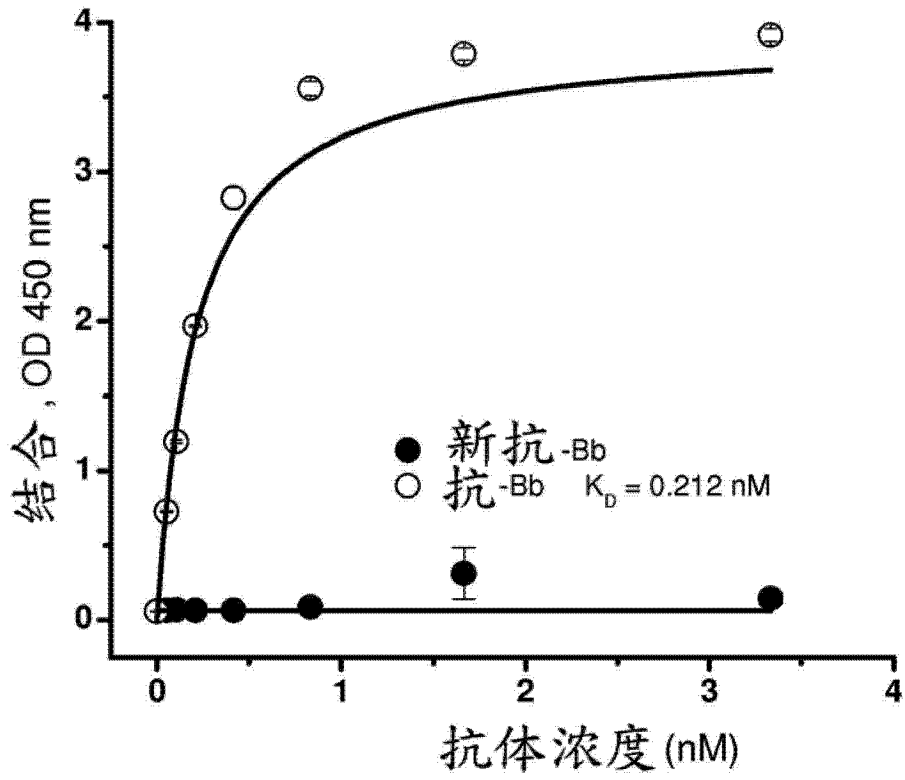


图 3

新抗-SC5b-9仅结合到聚合C9和SC5b-9。

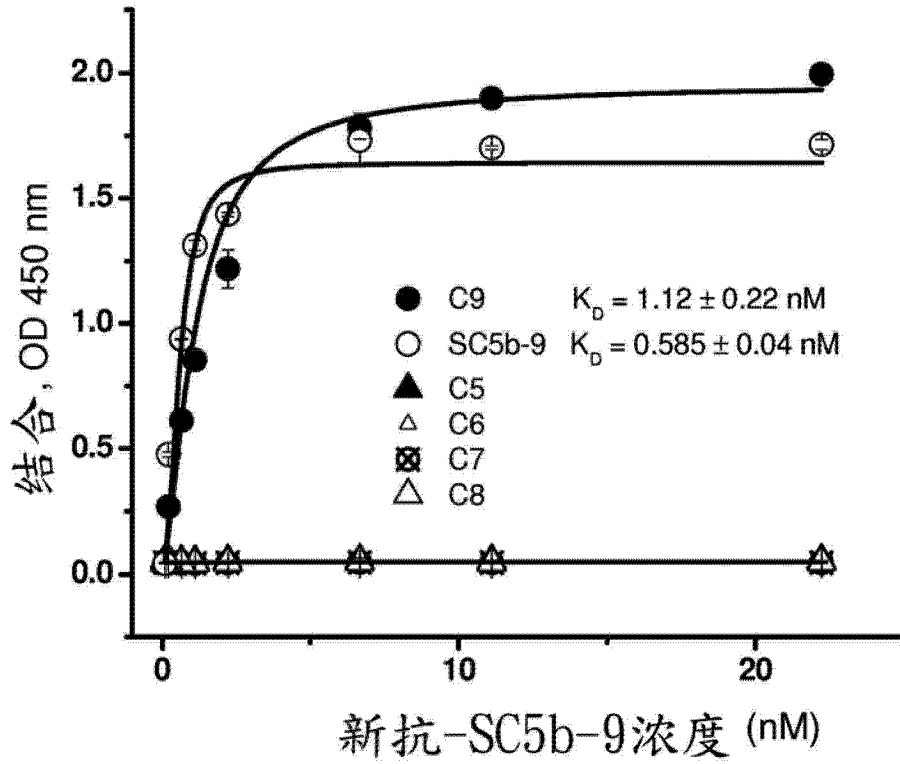


图 4

抗-C5、抗-C6、抗-C7、抗-C8和抗-C9检测相应的蛋白

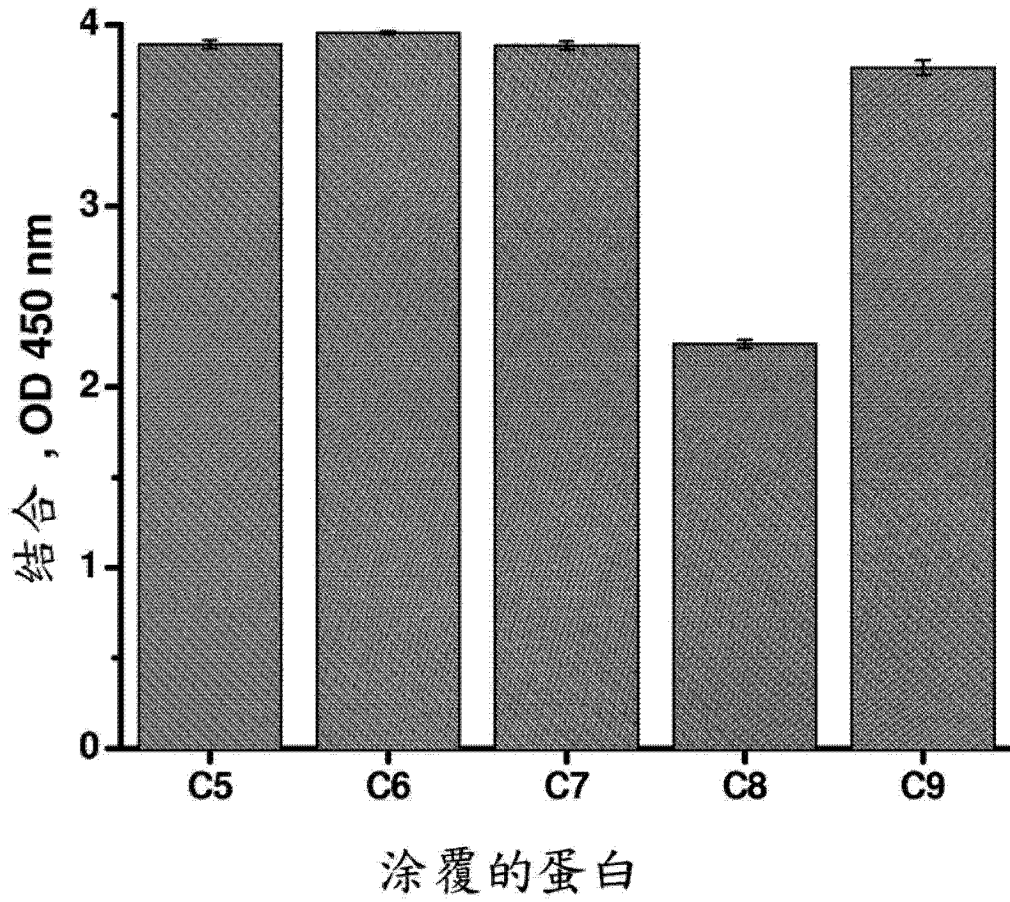


图 5

抗-C5检测C5结合，但不检测SC5b-9。

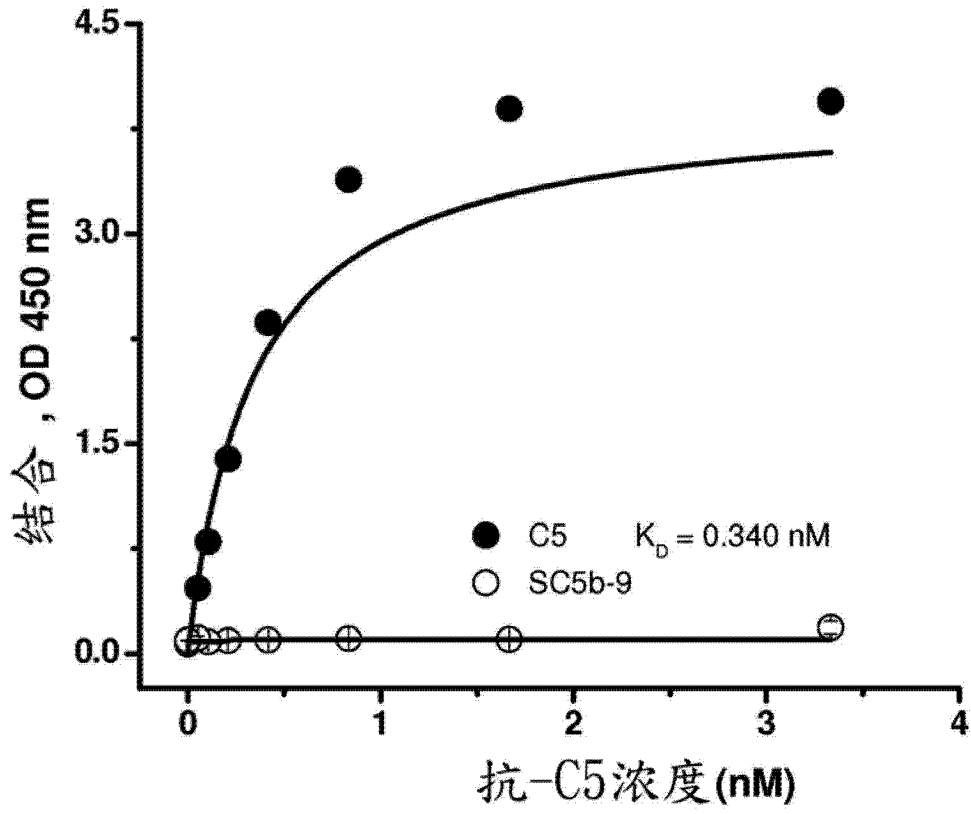


图 6

抗-C6检测C6和SC5b-9

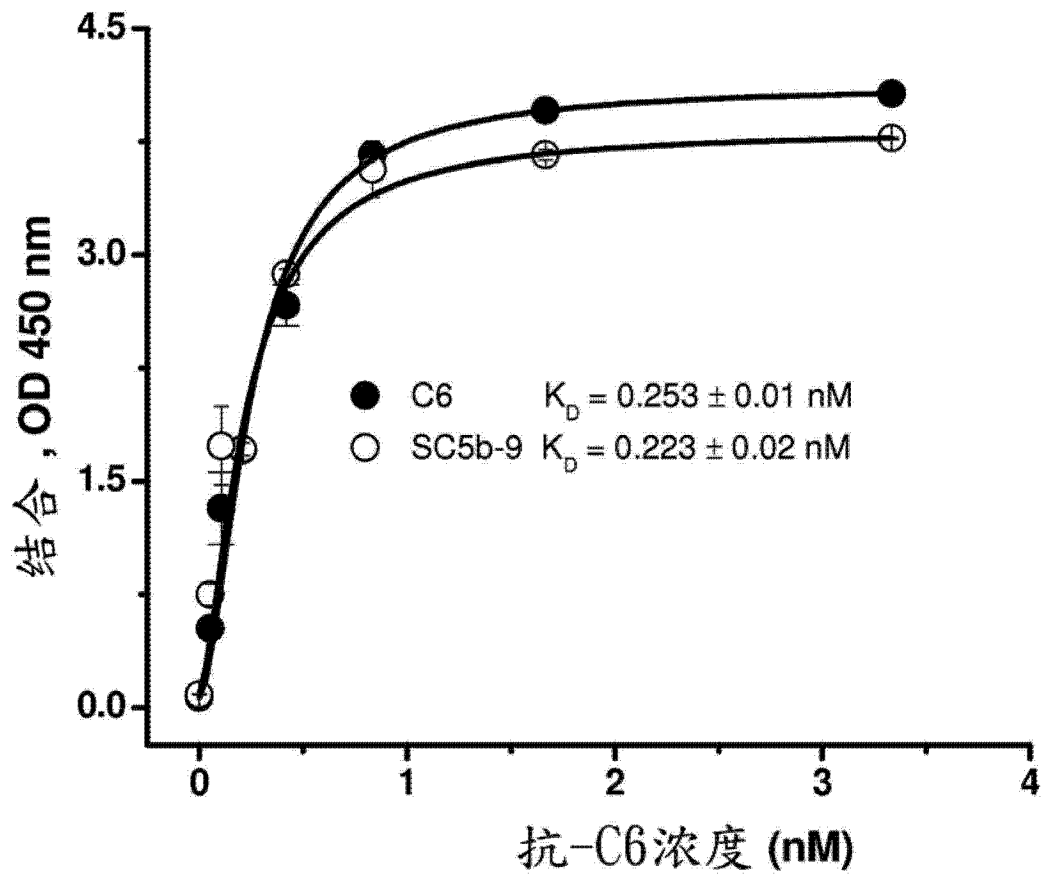


图 7

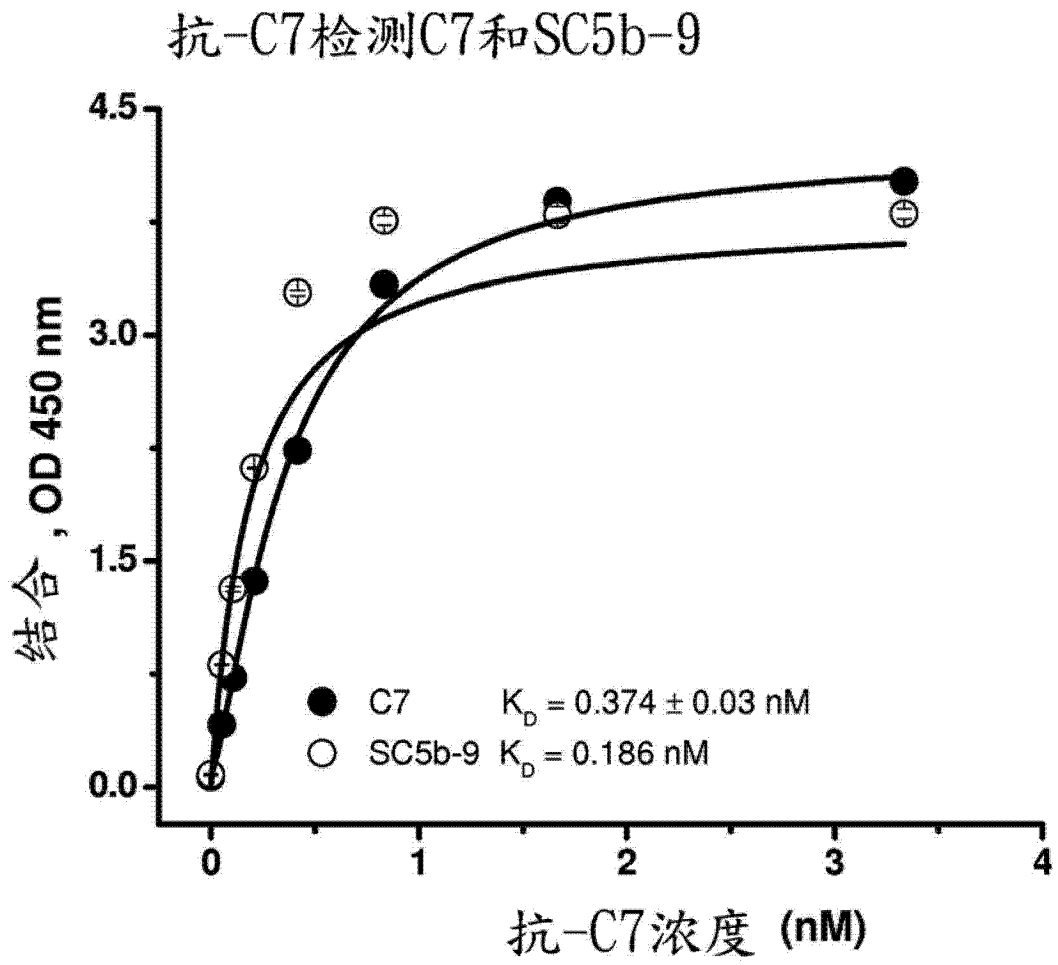


图 8

抗-C8检测C8和SC5b-9

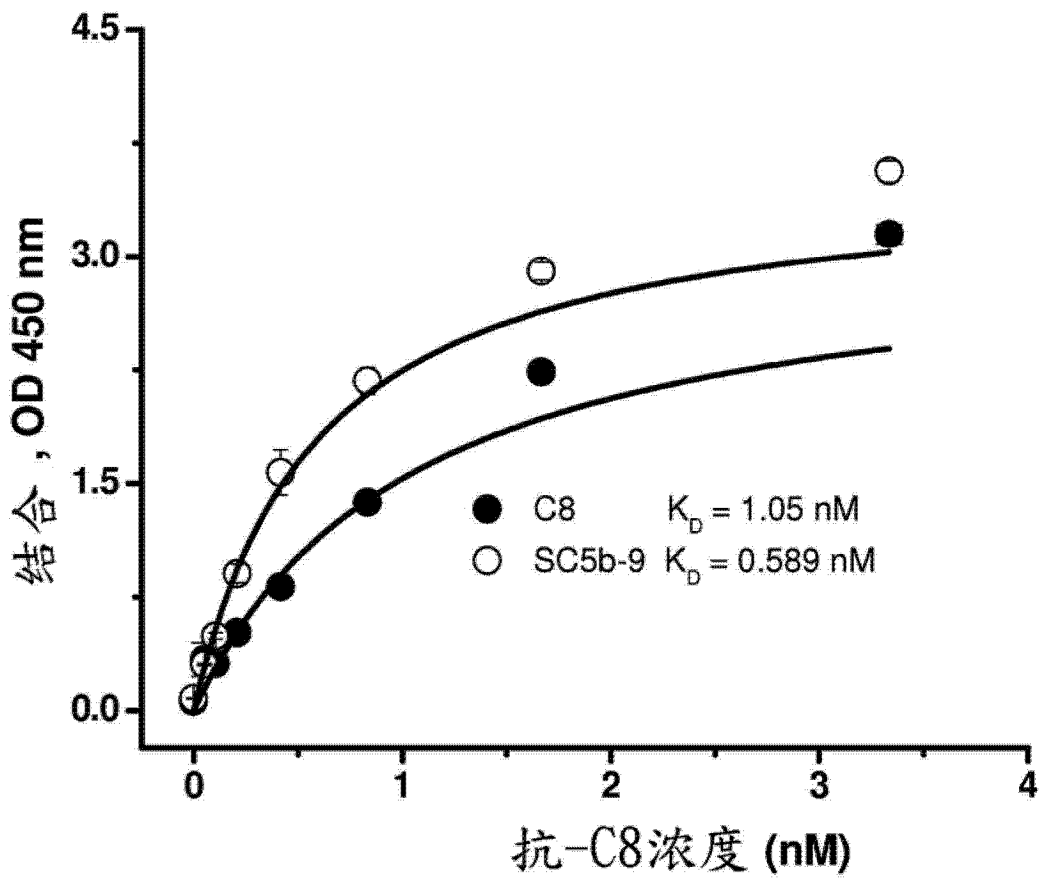
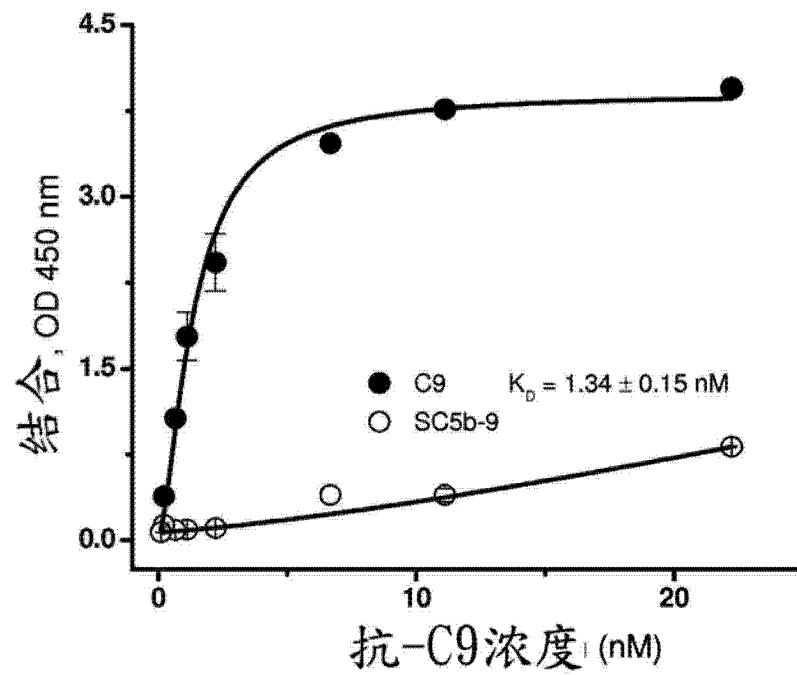


图 9

抗-C9检测C9结合但不能检测SC5b-9



抗-C9在10/01/10实验中显示低亲和力，
因此浓度保持与10/08/10相同。

图 10

新抗-聚合C9结合聚合C9和SC5b-9

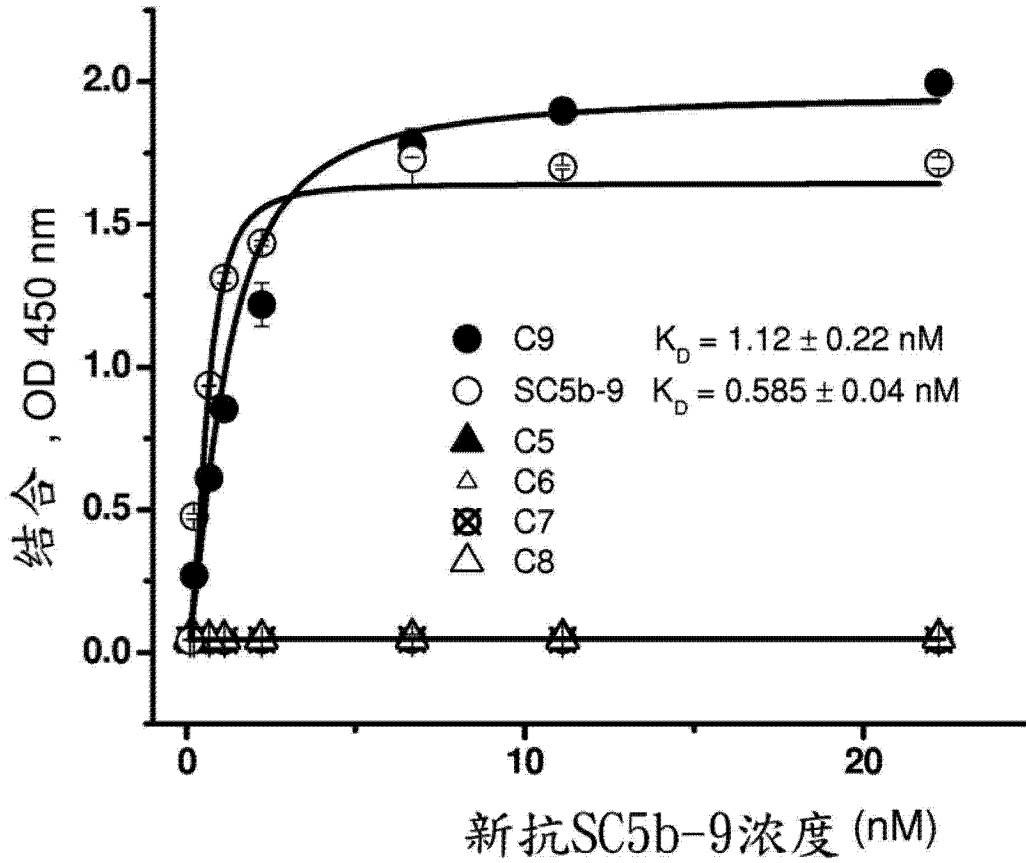
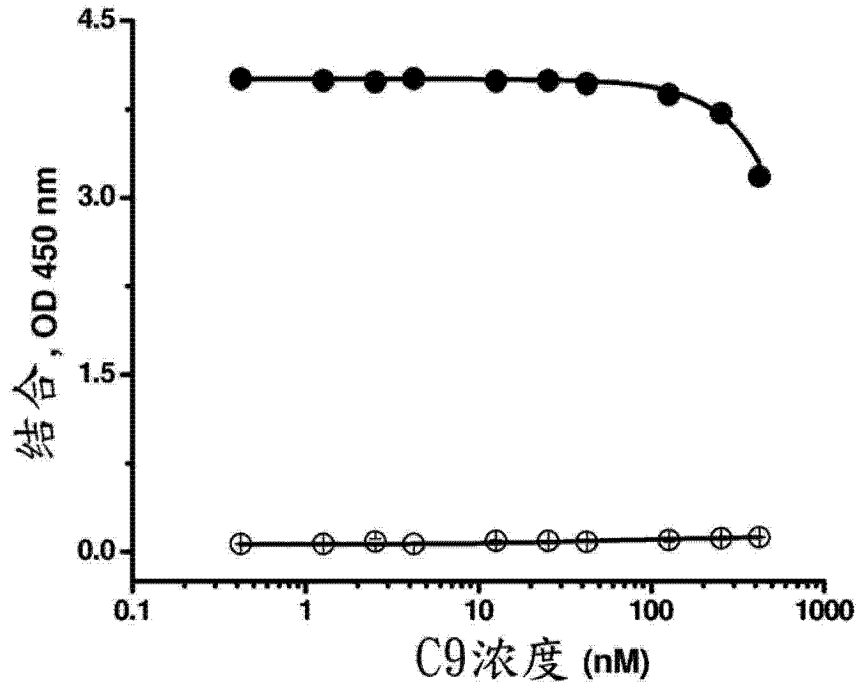


图 11

底物结合的SC5b-9的抗-聚合C9检测 在人类血清中不受蛋白抑制



C9浓度代表在人正常血清的
多种稀释液中存在的C9

图 12

新抗-聚合C9、抗-C6、抗-C7、和抗-C8检测沉积的C5-9

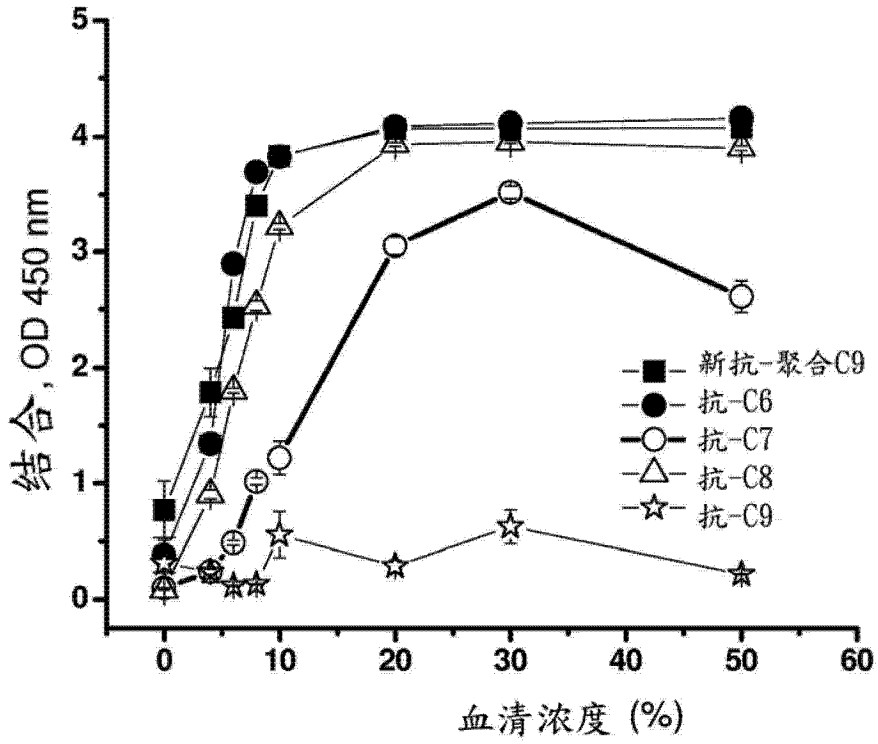


图 13

新抗-聚合C9，检测病理玻璃膜疣

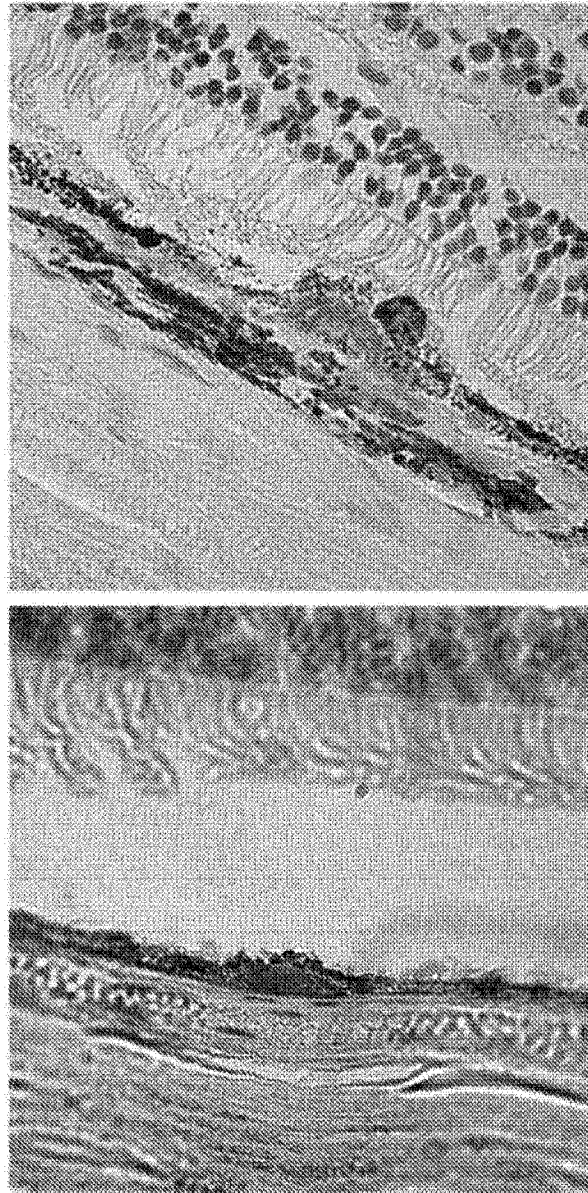


图 14

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于诊断组织损害的新抗体 | | |
| 公开(公告)号 | CN103261893A | 公开(公告)日 | 2013-08-21 |
| 申请号 | CN201180060953.1 | 申请日 | 2011-11-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 诺沃姆德治疗公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 诺沃姆德治疗公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | NOVELMED Therapeutics公司. | | |
| [标]发明人 | R班赛尔 | | |
| 发明人 | R·班赛尔 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/68 C07K16/18 G01N33/532 G01N33/52 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6896 A61K49/00 A61K51/1018 C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/92 G01N33/6878 G01N33/74 G01N2333/4716 G01N2800/16 | | |
| 优先权 | 61/417682 2010-11-29 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种用于诊断受试者体内组织损害的发展的方法，包括给所述受试者组织施用新抗体样品，以达到检测是否存在承载新抗原表位的补体蛋白的目的。

新抗-iC3b检测底物结合的iC3b，但不检测C3c、C3d

