



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192352.5

[51]Int.Cl⁶

[43]公开日 1996 年 6 月 19 日

A61K 39 / 395

[22]申请日 94.5.4

[30]优先权

[32]93.5.4 [33]WO[31]PCT / US93 / 04272

[32]93.5.5 [33]US[31]08 / 057,292

[32]94.2.25 [33]US[31]08 / 202,047

[86]国际申请 PCT / US94 / 04935 94.5.4

[87]国际公布 WO94 / 25067 英 94.10.11

[85]进入国家阶段日期 95.12.4

[71]申请人 赛特公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 罗伯特·W·切斯纳特

玛格丽特·J·波利 S·塔兰·琼斯

乔斯·W·萨尔丹那

玛丽·M·班迪格

迈克尔·克赖格勒尔 卡尔·佩里茨

罗伯特·拜尔 迈克尔·努恩

詹姆斯·C·波尔森

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

C12P 21 / 00 C12N 5 / 10

C12N 7 / 01 C12N 15 / 00

权利要求书 7 页 说明书 112 页 附图页数 31 页

[54]发明名称 P-选择蛋白抗体及其应用

[57]摘要

本发明涉及利用抑制白细胞对激活的血小板和 / 或对激活的血管内皮进行吸附的新型阻断性 P-选择蛋白抗体在体内治疗发炎和其它病理状况的药物组合物和方法。同时提供了人抗体和鼠抗体。

权 利 要 求 书

1、一种阻断性P - 选择蛋白抗体，其在以竞争抑制试验测量时可竞争性地抑制由ATCC保藏号为HB 1 1 0 4 1 的细胞株分泌的抗体与P - 选择蛋白的结合。

2、如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体，在钙离子不存在时可抑制嗜中性白细胞与P - 选择蛋白的结合。

3、如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体，在多肽C Q N R Y T D L V A I Q N K N E 存在时可抑制嗜中性白细胞与P - 选择蛋白的结合。

4、如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体，其为一I g G 免疫球蛋白。

5、如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体，其为一鼠抗体。

6、如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体，其是由ATCC保藏号为HB 1 1 0 4 1 的细胞株产生的。

7、如权利要求1 所述的抗体，其为F a b 、F a b ' 、F (a b ')₂ , F a b c 或F v 片段。

8、一种检测P - 选择蛋白的方法，该方法包括：
给予病人或其组织样品如权利要求1 所述的抗体；
以及

检测该抗体与待检样品中的P - 选择蛋白特异结合所形成的复合体。

9、一种治疗免疫系统疾病的方法，该方法包括给予患此疾病的病人药物学上有效剂量的包含一药学上可接受的载体和如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白

抗体的药物组合物。

1 0 、如权利要求9 所述的方法，其中阻断性P - 选择蛋白抗体是I g G 1 。

1 1 、如权利要求9 所述的方法，其中阻断性P - 选择蛋白抗体是鼠抗体。

1 2 、如权利要求9 所述的方法，其中阻断性P - 选择蛋白抗体是由A T C C 保藏号为H B 1 1 0 4 1 的细胞株所产生。

1 3 、如权利要求9 所述的方法，其中的疾病是急性肺损伤的结果。

1 4 、如权利要求9 所述的方法，其中的疾病是局部缺血 - 再充血损伤。

1 5 、如权利要求9 所述的方法，其中阻断性P - 选择蛋白抗体经静脉内用药。

1 6 、一种治疗免疫系统病情的方法，该方法包括给予有此病情的病人药物学上有效剂量的包含一药学上可接受的载体和如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体的药物组合物。

1 7 、一种抑制白细胞与内皮细胞或血小板吸附的方法，该方法包括运用药物学上有效剂量的包含如权利要求1 所述的抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。

1 8 、一种药物组合物，包括一药学上可接受的载体和如权利要求1 所述的阻断性P - 选择蛋白抗体。

1 9 、如权利要求1 8 所述的药物组合物，其中的阻断性P - 选择蛋白抗体由A T C C 保藏号为H B 1 1 0 4 1 的细胞株所分泌。

2 0 、如权利要求1 9 所述的药物组合物，其中的抗体是鼠抗体。

2 1 、一包含A T C C 保藏号为H B 1 1 0 4 1 的细胞株的组合物。

2 2 、一种包含人源化重链和人源化轻链的人源化免疫球蛋白：

(1) 所述的人源化轻链包含三个具有来自鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白轻链的相应互补决定区的氨基酸序列的互补决定区 (C D R 1 、 C D R 2 和 C D R 3) , 和来自人k a p p a 轻链可变区构架序列的可变区构架；以及

(2) 所述的人源化重链包含三个具有来自鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白重链的相应互补决定区的氨基酸序列的互补决定区 (C D R 1 、 C D R 2 和 C D R 3) , 和来自人重链可变区构架序列的可变区构架；

其中所述的人源化免疫球蛋白以下限约为 $10^7 M^{-1}$ 和上限约是鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白结合亲和力的5 倍的结合亲和力特异性地与P - 选择蛋白结合。

2 3 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中：

人k a p p a 轻链可变区构架序列在选自由L 2 1 、L 4 6 、L 6 0 和L 7 0 组成的第一组中的至少一个位置上被鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白轻链可变区构架序列的等价位置上的氨基酸取代；以及

人重链可变区构架序列在选自由H 1 、H 2 、H 7 1 和H 7 3 组成的第二组中的至少一个位置上被鼠P B 1 . 3 重链可变区构架序列的等价位置上的氨基酸取代。

2 4 、如权利要求2 3 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化重链可变区构架是一个2 1 / 2 8 ' C L 重链可变区构架序列。

2 5 、如权利要求2 4 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化轻链可变区构架是一D E N 轻链可变区构架序列。

2 6 、如权利要求2 5 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化轻链可变区构架至少在第一组的两个位置上被取代。

2 7 、如权利要求2 6 所述的人源化免疫球蛋白，其中人源化重链可变区构架至少在第二组的两个位置上被取代。

2 8 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化轻链包含图1 4 所示的1 7 4 8 R L A 成熟轻链可变区氨基酸序列（序列号为__）。

2 9 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化轻链包含图1 5 所示的1 7 4 8 R L B 成熟轻链可变区氨基酸序列（序列号为__）。

3 0 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化轻链包含图1 6 所示的1 7 4 8 R L C 成熟轻链可变区氨基酸序列（序列号为__）。

3 1 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化轻链包含图1 7 所示的1 7 4 8 R L D 成熟轻链可变区氨基酸序列（序列号为__）。

3 2 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化重链包含图1 1 所示的1 7 4 8 R H A 成熟重链可变区氨基酸序列（序列号为__）。

3 3 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化重链包含图1 2 所示的1 7 4 8 R H B 成熟重链可变区氨基酸序列（序列号为__）。

3 4 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，

其中所述的人源化重链包含图1 3 所示的1 7 4 8 R H C 成熟重链可变区氨基酸序列（序列号为_ _）。

3 5 、如权利要求3 1 所述的人源化免疫球蛋白，其中所述的人源化重链包含图1 2 所示的1 7 4 8 R H B 成熟重链可变区氨基酸序列（序列号为_ _）。

3 6 、如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白，其为F a b ， F a b ' F (a b ') ₂ 、F a b c 或F v 片段。

3 7 、如权利要求3 5 所述的人源化免疫球蛋白，进一步包含一恒定区域。

3 8 、如权利要求3 7 所述的人源化免疫球蛋白，其中的恒定区域具有效应子功能。

3 9 、如权利要求3 5 所述的人源化免疫球蛋白，其中的恒定区域没有效应子功能。

4 0 、如权利要求3 8 所述的人源化免疫球蛋白，其中的效应子功能是能够进行补体结合或有抗体依赖的细胞毒性。

4 1 、编码如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白重链的核酸。

4 2 、编码如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白轻链的核酸。

4 3 、编程在监视器或打印机上显示如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白的三维构型的计算机。

4 4 、一种包含如权利要求3 5 所述的人源化抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。

4 5 、一种包含如权利要求2 2 所述的人源化免疫球蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

4 6 、如权利要求4 5 所述的药物组合物，其中所

述的人源化免疫球蛋白是F a b 片段。

4 7 、一种检测P - 选择蛋白的方法，该方法包括：
将如权利要求3 5 所述的人源化免疫球蛋白给予病人或其组织样品；以及

检测由该免疫球蛋白和待测样品中的P - 选择蛋白特异结合形成的复合体。

4 8 、一种抑制白细胞与内皮细胞或血小板吸附的方法，该方法包括给予药物学上有效剂量的如权利要求4 5 所述的药物组合物。

4 9 、一种治疗患免疫系统疾病的病人的方法，该方法包括给予患此病的病人药物学上有效剂量的如权利要求4 5 所述的药物组合物。

5 0 、如权利要求4 9 所述的方法，其中的疾病是急性肺损伤的结果。

5 1 、如权利要求4 9 所述的方法，其中的疾病是局部缺血 - 再充血损伤。

5 2 、如权利要求5 1 所述的方法，其中的病人患有表皮、心肌、肾、大脑、脾、肝、脊髓、内脏、肺、部分身体或全身性的局部缺血。

5 3 、一种治疗处于免疫系统病态的疾人的方法，该方法包括给予患此症状的病人药物学上有效剂量的如权利要求4 5 所述的药物组合物。

5 4 、一种稳定细胞株，包含：

编码如权利要求3 5 所述的人源化免疫球蛋白重链的核酸片段，所述的片段可通过操作与一启动子相连以表达该重链；

编码如权利要求3 5 所述的人源化免疫球蛋白轻链的另一核酸片段，所述的片段可通过操作与另一启动子

相连以表达该轻链；

其中的稳定细胞株能产生如权利要求3 5 所述的人源化免疫球蛋白。

5 5 、如权利要求5 4 所述的细胞株，其能产生约3 0 μ g 人源化免疫球蛋白/ 10^6 细胞/ 天。

5 6 、如权利要求5 5 所述的细胞株，记为CHO - 4 8 B 4 ，ATCC 保藏号为__。

5 7 、具有多达1 0 0 个氨基酸的纯化的P - 选择蛋白多肽，该多达1 0 0 个的氨基酸包括图3 4 所示的氨基酸序列（序列号为__）的4 4 8 位到4 6 7 位间的至少5 个连续的氨基酸。

5 8 、如权利要求5 7 所述的纯化多肽，其中多达1 0 0 个的氨基酸包括图3 4 所示的氨基酸序列（序列号为__）的4 4 8 位到4 6 7 位间的连续氨基酸片段。

5 9 、如权利要求5 8 所述的纯化多肽，其主要由图3 4 所示的氨基酸序列（序列号为__）的4 4 8 位到4 6 7 位间的氨基酸的连续片段组成。

说 明 书

P - 选择蛋白抗体及其应用

有关申请的相互参考

本申请是1993年5月5日申请的08/057, 292的一个部分继续申请, 而08/057, 292又是现已放弃的1992年5月5日申请的07/880, 196的一个部分继续申请。这些申请以其全文作为本申请的参考资料。

技术领域

本申请一般地涉及可与细胞表面受体P - 选择蛋白上有功能的抗原决定簇起反应的新型免疫球蛋白。本发明还一般地涉及应用这些抗体进行诊断和治疗的方法。

发明背景

细胞相互吸附的能力在发育、正常生理及疾病过程(如发炎)中起着关键作用。此能力由吸附分子所得, 这些分子通常是在细胞膜上表达的糖蛋白。通常是一种细胞上的一个吸附分子会与不同种细胞上的另一吸附分子相结合, 形成一个受体-反应体对。吸附分子的三大重要类群是整合蛋白, 选择蛋白和免疫球蛋白(Ig)超家族成员(见Springer, Nature 346: 425 (1990); Osborn, Cell 62: 3 (1990); Hynes, Cell 69: 11 (1992), 在此所有这些文献以其全文作为本申请的参考资料)。这些分子对白细胞和血小板与

其自身及胞外基质和血管内皮的相互作用尤其必需。

P - 选择蛋白也被称为CD62，粒状膜蛋白140 (GMP-140) 或血小板激活依赖性粒状外膜 (PADGEM) 或LECCAM-3，它是一特化的位于血管内皮细胞和血小板上的细胞表面受体，其涉及各种循环细胞的识别。P - 选择蛋白为一表面糖蛋白，带有一凝集素样结构域，一与表皮生长因子同源的区域及一与补体调节蛋白同源的区域 (见McEver, Blood Cells 16: 73-83 (1990))。P - 选择蛋白的结构与另两个细胞表面受体的结构相似，这两个受体是白细胞内皮吸附分子 (ELAM-1) 和淋巴细胞归巢受体 (LHR)。由于它们都拥有一个凝集素样的结构域以及吸附功能的选择性，建议用“选择蛋白”这个术语来指代这一普遍的受体群。

P - 选择蛋白位于对多种刺激产生应答的血小板和内皮细胞的表面，介导血小板-白细胞和内皮-白细胞的相互作用。相比之下，ELAM-1 只在内皮细胞上表达，LHR 则在外周淋巴结的内皮微静脉内的多种白细胞上表达。P - 选择蛋白的表达是可诱导的且不在未激活的内皮细胞或血小板上表达。P - 选择蛋白的表达不需要从头合成，因为它被贮存在血小板和内皮细胞的分泌颗粒 (或Weibel-Palade体) 中。因此，在用凝血酶、组胺或佛波酯类或其它体液因子将这两种细胞的任一种激活后数分钟内，P - 选择蛋白就被快速重新分配到此细胞的可与其它细胞结合的表面上。

目前已报道了许多P - 选择蛋白的鼠抗体 (见，如美国专利4,783,330, WO91/06632, PCT 申请FR90/00565, McEver等,

J . B i o l . C h e m . 2 5 9 : 9 7 9 9 - 9 8 0 4 (1 9 8 4) ; G e n g 等, N a t u r e 3 4 3 : 7 5 7 - 7 6 0 ; P a r m e n t i e r 等, B l o o d 7 7 : 1 7 3 4 - 1 7 3 9 (1 9 9 1) , P - 选择蛋白的另外一个抗体已被描述于L a J o l l a C a l i f o r n i a 的S c r i p p s 研究所的论文中, 并在于1 9 9 2 年1 月1 6 日举行的一个“根本原理学术讨论会”(K e y s t o n e C o l l o q u i u m) 上提出。其中某些阻断P - 选择蛋白介导的吸附的抗体是钙离子依赖性的。

利用P - 选择蛋白抗体所做的体外实验已对此受体的配位体特异性提供了一个有限的了解。已有人报道P - 选择蛋白可结合嗜中性白细胞、单核细胞和某些癌细胞 (B e v i l a c q u a 等, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 9 2 3 8 - 9 2 4 2 (1 9 8 7) ; G e n g 等, N a t u r e 3 4 3 : 7 5 7 - 7 6 0 (1 9 9 0) ; L a r s e n 等, C e l l 6 3 : 4 6 7 - 4 7 4 (1 9 9 0) ; 及P o l l e y 等.) 。也有人报道P - 选择蛋白将L e ^x 作为一高亲和力的配位体加以识别 (L a r s e n 等, C e l l 6 3 : 4 6 7 - 4 7 4 (1 9 9 0)) , 然而, 以后的实验表明事实上含S L e ^x 的寡糖对P - 选择蛋白介导的吸附有比L e ^x 更强的抑制作用 (P o l l e y 等, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 6 2 2 4 - 6 2 2 8 (1 9 9 1)) 。

P - 选择蛋白在体外参与细胞间吸附表明, 与其它吸附因子一样, P - 选择蛋白可能参与了在体内促成炎症的细胞间的相互作用。然而, P - 选择蛋白可能于其

中起主要作用的特殊炎症疾病尚未被阐明。与之相似，能有效阻断P - 选择蛋白介导的特异炎症的药剂的抗原决定簇的特异性也属未明。在已知的P - 选择蛋白抗体中，有些可与P - 选择蛋白结合但并不阻断其介导的胞间相互作用，其它的则有些阻断力，但仅在高的钙离子浓度下才表现，此条件在体内并不总是存在。高钙离子浓度的体内缺乏会导致这些作为治疗制剂的抗体失效。而且，目前生产的所有P - 选择蛋白抗体都来源于鼠，因此在临床应用时可能导致人抗鼠抗体反应（HAMA）。

基于上述，显然需求有适当抗原特异性并能在体内阻断导致炎症的胞间相互作用的、对抗P - 选择蛋白的新型药剂。此种制剂也最好不要在治疗人时引起HAM A反应。本发明圆满实现了此种及它种需求。

本发明的概述

一方面，本发明提供了能特异结合P - 选择蛋白的阻断性抗体。其中的一个典型抗体被命名为mu MA b PB 1 . 3（由ATCC保藏号为HB 1 1 0 4 1的一个细胞株产生）。竞争抑制实验表明，其它的抗体能竞争性地抑制mu MA b PB 1 . 3对P - 选择蛋白的结合。优选的抗体能在无钙离子时与P - 选择蛋白结合。本发明的抗体包含完整抗体及其片段如Fab，Fab'，F(a b')₂，Fabc及Fv。

另一方面，本发明也提供了药物组合物。这些组合物包括如上所述的阻断性P - 选择蛋白抗体及一药学上可接受的载体。

本发明也提供了治疗免疫系统疾病的治疗方法。这些方法包括将一有效剂量的上述药物组合物给予患者。

急性肺损伤和局部缺血再充血损伤是本发明可治疗的病例。

本发明的一些抗体是人源化免疫球蛋白。人源化免疫球蛋白包括人源化重链和人源化轻链。人源化轻链包括三个氨基酸序列来源于鼠免疫球蛋白P B 1 . 3 轻链的相应互补决定区的互补决定区 (C D R 1 , C D R 2 和C D R 3) 及一来源于人k a p p a 轻链可变区构架序列的可变区构架。人源化重链包括三个氨基酸序列来源于鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白重链的相应互补决定区的互补决定区 (C D R 1 , C D R 2 和C D R 3) 及来源于人重链可变区构架序列的可变区构架。人源化免疫球蛋白可特异地与P - 选择蛋白结合, 结合亲和力的下限约为 10^{-7} m^{-1} , 上限约为鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白的结合亲和力的5 倍。

在许多人源化免疫球蛋白中, 人k a p p a 轻链的可变区构架序列在选自由L 2 1 , L 4 6 , L 6 0 和L 7 0 组成的第一组中的至少一个位置上被位于鼠P B 1 . 3 免疫球蛋白轻链可变区构架序列的等价位置上的氨基酸所取代。与此相似, 人重链可变区构架序列也在选自由H 1 , H 2 , H 7 1 和H 7 3 组成的第二组中的至少一个位置上被位于鼠P B 1 . 3 重链可变区构架序列的等价位置上的氨基酸所取代。一些人源化免疫球蛋白的人源化重链可变区构架是一个2 1 / 2 8 ' C L 重链可变区构架序列。一些人源化免疫球蛋白的轻链可变区构架是一个D E N 轻链可变区构架序列。典型的成熟轻链可变区氨基酸序列示于图1 4 - 1 7 。典型的成熟重链可变区氨基酸序列示于图1 1 - 1 3 。优选的人源化免疫球蛋白包括图1 7 所示的成熟轻链可变区和图1 2 所

示的成熟重链可变区。

本发明提供了完整的人源化免疫球蛋白和人源化免疫球蛋白片段如 Fab , Fab' $F(ab')_2$, $Fabc$ 和 Fv 。一些人源化免疫球蛋白进一步包括一个恒定区, 此恒定区可以有效应子功能, 也可以没有。

另一方面, 本发明提供了编码上述人源化免疫球蛋白的核酸, 一些核酸编码重链, 另一些编码轻链。

本发明也提供了编程在监视器上或打印机上显示上述免疫球蛋白的三维构型的计算机。

本发明还提供了包括上述人源化免疫球蛋白和一药学上可接受的载体的药物组合物。

另一方面, 本发明提供了用上述人源化免疫球蛋白检测 P - 选择蛋白的方法。将人源化免疫球蛋白给予病人或来源于此病人的组织样品。通过检测免疫球蛋白和被检样品中的 P - 选择蛋白特异结合所形成的复合体可示出 P - 选择蛋白的存在。

本发明还提供了用人源化免疫球蛋白治疗患免疫系统疾病的病人的方法。这些方法包括将有效剂量的上述药物组合物给予病人。易于治疗的疾病包括局部缺血一再充血损伤和急性肺损伤。例如, 这些组合物对治疗表皮、心肌、肾、大脑、脾、肝、脊髓、内脏、肺、局部或全身性局部缺血的病人是有用的。

另一方面, 本发明还进一步提供了产生人源化免疫球蛋白的稳定细胞株。这些稳定细胞株包括两个核酸片段。一个核酸片段编码上述人源化免疫球蛋白的重链, 此片段可通过操作连于一启动子后表达此重链。另一核酸片段编码人源化免疫球蛋白的轻链, 此片段可通过操作连于另一启动子后表达此轻链。优选的细胞株每天能

产生约30 μ g 人源化免疫球蛋白/ 10^6 细胞。

另一方面，本发明提供了P - 选择蛋白片段。这些片段可长达100个氨基酸，这些氨基酸包括来自示于图3 4 的氨基酸序列的448位-467位间的至少五个连续氨基酸。在优选的片段中，这些氨基酸包括448位-467位氨基酸的完整的连续片段。

附图的简要说明

图1 列出了本发明的抗炎免疫球蛋白抑制凝血酶激活的血小板对嗜中性白细胞的结合的数据。

图2 A 和2 B 显示了以通透性 (图2 A) 和出血 (图2 B) 为指标测量时，本发明的抗炎免疫球蛋白有效地防止由于注入眼镜蛇毒液因子 (CVF) 所引起的肺损伤。

图3 A - 3 H 显示了眼镜蛇毒液注入所引发的在动物肺中P - 选择蛋白表达量的提高，通过mu MA b P B 1 . 3 的辣根过氧化物酶的染色而可见。(a) -

(d) 组显示了注入CVF 后不同时间P - 选择蛋白在肺微静脉中的表达。时间0, 5, 10, 15 分钟分别与a、b、c 和d 组相对 (图3 A)、图3 B 是光学透射电子显微镜照片，显示用200 μ g 非阻断性P - 选择蛋白抗体 (mu MA b P N B 1 . 6) 处理后 (图框a、c) 或用阻断性P - 选择蛋白抗体 (mu MA b P B 1 . 3) 处理后 (图框b、d) CVF 所诱导的鼠急性肺损伤。用P N B 1 . 6 处理的动物中，广泛的肺泡内出血显示了血管的损伤 (图框a)，并伴随有嗜中性白细胞 (图框c，箭头) 在血管内的凝集，与内皮细胞接触紧密。与之相反，用mu MA b P B

1. 3 处理的动物中未见肺泡内出血 (图框b), 血管内的嗜中性白细胞与内皮也几乎没有接触 (图框d, 箭头), (图框a 和b 为用甲苯胺蓝染色的树脂包埋切片, 放大1 6 0 倍; 图框c 和d, 醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色, 放大2 2 5 0 倍)。

图4 显示了单克隆抗体mu MA b PB 1. 3 对P - 选择蛋白的结合: 用EDTA 螯合二价阳离子所产生的作用。图中空心符号 (较低的曲线) 是在Ca⁺⁺和Mg⁺⁺存在下的结合, 而实心符号 (较高的曲线) 是在EDTA 存在下的结合。抗体以1. 6 mg / ml 的起始浓度被稀释。

图5 显示了多肽C Q N R Y T D L V A I Q N K N E 对mu MA b PB 1. 3 与P - 选择蛋白的结合的作用。实心符号是在0. 3 5 mg / ml 多肽存在下的情况, 空心符号则是多肽不存在时的情况。mu MA b PB 1. 3 的稀释始于1. 6 mg / ml 的溶液。

图6 A、6 B 和6 C 显示了单克隆抗体交叉阻断对P - 选择蛋白的结合的能力。阻断性抗体浓度为5 0 μg / ml, 生物素标记的抗体的稀释起始浓度为: mu MA b PB 1. 3 : 1. 6 mg / ml, mu MA b PNB 1. 6 : 0. 8 7 mg / ml 及mu MA b 8 4 / 2 6 : 0. 5 9 mg / ml。

图7 显示了在对照条件下凝血酶诱导的血小板的凝集程度在不存在抗体时和在渐增的纯化mu MA b PB 1. 3 抗体浓度 (1 - 1 0 0 μg / ml) 时是相同的。

图8 显示了以危及面积百分比表达的心肌局部缺血程度。用阻断性P - 选择蛋白抗体 (mu MA b P

B 1 . 3) 处理的动物中缺血程度明显低于用非阻断性 P - 选择蛋白抗体处理的动物中的缺血程度。而且, 与 μ MAb PNB 1 . 6 处理的动物相比, 用 μ MAb PB 1 . 3 处理的动物的冠状动脉在乙酰胆碱作用下的舒张能力明显地较大。与 PNB 1 . 6 处理的动物相比, μ MAb PB 1 . 3 处理的动物的心肌组织中 PMN 数量有所降低, 这表明这些现象可归因于心肌白细胞滤出的减小。

图9 显示了PB 1 . 3 重链信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 0 显示了PB 1 . 3 轻链信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 1 显示了CY 1 7 4 8 重链A 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 2 显示了CY 1 7 4 8 重链B 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 3 显示了CY 1 7 4 8 重链C 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 4 显示了CY 1 7 4 8 轻链A 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 5 显示了CY 1 7 4 8 轻链B 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 6 显示了CY 1 7 4 8 轻链C 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 7 显示了CY 1 7 4 8 轻链D 的信号肽和可变区的序列和翻译。

图1 8 显示了表达人重链 (γ - 1 恒定区) 的neo 质粒的物理图谱。

图1 9 显示了表达人轻链 (k a p p a 恒定区) 的 n e o 质粒的物理图谱。

图2 0 显示了嵌合的P B 1 . 3 和重构的C Y 1 7 4 8 译本对r s P - 选择蛋白的结合曲线。

图2 1 显示了嵌合的P B 1 . 3 和重构的C Y 1 7 4 8 译本对r s P - 选择蛋白的结合曲线。

图2 2 显示了嵌合的P B 1 . 3 和重构的C Y 1 7 4 8 译本对r s P - 选择蛋白的结合曲线。

图2 3 显示了表达人重链 (g a m m a -1 恒定区) 的d h f r 质粒的物理图谱。

图2 4 显示了表达人重链 (g a m m a -4 恒定区) 的d h f r 质粒的物理图谱。

图2 5 显示了被P B 1 . 3 和C Y 1 7 4 8 R H Δ / R L Δ -I g G 1 所抑制的生物素标记的P B 1 . 3 与r s P - 选择蛋白的结合。

图2 6 显示了被P B 1 . 3 和C Y 1 7 4 8 R H Δ / R L Δ -I g G 4 所抑制的生物素标记的P B 1 . 3 与r s P - 选择蛋白的结合。

图2 7 显示了抗体P B 1 . 3 防止了兔耳局部缺血和再充血后的肿胀。

图2 8 显示了抗体P B 1 . 3 防止了兔耳局部缺血和再充血后的坏死的发展。

图2 9 显示了抗体P B 1 . 3 抑制了由肥大细胞脱粒剂化合物4 8 / 8 0 诱导的白细胞 - 内皮细胞的相互作用。

图3 0 显示了推测的P - 选择蛋白结构区域的折叠模式。

图3 1 显示了用于确定P B 1 . 3 识别的抗原决定

簇所作的P - 选择蛋白的各种缺失突变体。

图3 2 显示了P B 1 . 3 和兔多克隆抗体与P - 选择蛋白缺失突变体的结合。

图3 3 显示了P B 1 . 3 和P 6 H 6 与P - 选择蛋白和P - 选择蛋白 Δ 5 C R P (它缺失了P - 选择蛋白的第5 个C R P) 的结合。

图3 4 显示了由P - 选择蛋白第五个C R P 区的氨基酸序列所衍生的合成多肽的序列及P B 1 . 3 对这些固定化多肽的反应活性。全长P - 选择蛋白多肽的氨基酸按J o h n s t o n 等, C e l l 5 6 : 1 0 3 3 - 1 0 4 4 (1 9 8 9) 的标准进行编号。

定义

2 0 个天然氨基酸的缩写遵照传统用法 (I m m u n o l o g y - A S y n t h e s i s (第二版, E . S . G o l u b 和D . R . G r e n 编, S i n a n e r A s s o c i a t e s , S u n d e r l a n d , M A 1 9 9 1)) 。 2 0 个常用氨基酸的立体异构体 (如: D - 氨基酸), 非天然氨基酸如 α , α - 二取代氨基酸, N - 烷基氨基酸, 乳酸及其它非常用氨基酸也可以是本发明的多肽的合适组分。非常用氨基酸包括: 4 - 羟脯氨酸, γ - 羧基谷氨酸, ϵ - N, N, N - 三甲基赖氨酸, ϵ - N - 乙酰赖氨酸, O - 磷酸丝氨酸, N - 乙酰丝氨酸, N - 甲酰甲硫氨酸, 3 - 甲基组氨酸, 5 - 羟基赖氨酸, ω - N - 甲基精氨酸及其它类似氨基酸和亚氨基酸 (如4 - 羧脯氨酸), 而且氨基酸也可以经糖基化作用、磷酸化作用等被修饰。

本文中提及多肽时, 其左向为氨基端方向, 右向为

羧基端方向，这是与标准用法和传统相一致的。同样，除非特殊说明，单链多核苷酸序列的左端为5'端，双链多核苷酸序列的左向指5'方向。新合成RNA转录物的5'到3'的延伸方向被称为转录方向。位于与RNA序列相同的DNA链上的、其5'端对应RNA转录产物5'端的序列区被称为“上游序列”。位于与RNA序列相同的DNA链上的、其3'端对应RNA转录产物的3'端的序列区被称为“下游序列”。

短语“多核苷酸序列”指从5'端到3'端的单链或双链脱氧核糖核酸碱基或核糖核酸碱基的多聚物，包括自主复制的质粒，感染性的DNA或RNA多聚体和非功能性DNA或RNA。

以下术语用于描述两个或多个核苷酸间的序列关系：“参考序列”、“比较窗口”、“序列相同”、“序列相同百分率”和“大体相同”。“参考序列”是一用于序列对比的基础序列；一个参考序列可以是一更大序列的亚单位，如作为列于序列表中的一全长cDNA或基因序列（如图9-17中的一个多核苷酸序列）的一部分，也可以包括一完整的DNA或基因序列。一般地，参考序列至少长达20个核苷酸，一般不少于25个核苷酸，经常不少于50个核苷酸。由于两个多核苷酸都可以（1）包含一个在二者间相似的序列（即完整多核苷酸的一部分），（2）进一步包括一个在二者之间有差异的序列，所以两个或多个核苷酸之间的序列对比一般通过比较两个多核苷酸的“比较窗口”来确认并对比序列相似的局部区域来实现。“比较窗口”在此指至少包括20个连续的核酸位置的概念性区段，多核苷酸序列可在此与至少包括20个连续核苷酸的参考序列相比

较。为了最适地对比这两段序列，比较窗口内的多核苷酸序列部分，与参考序列（不包含增补或缺失）相比，可以包括不超过20%的增补或缺失（即断裂）。为确定比较窗口，被比较序列的最适对比可依照下列方法来完成：S m i t h 和W a t e r m a n (A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 (1 9 8 1)) 的局部同源算法、N e e d l e m a n 和W u n s c h (J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 3 (1 9 7 0)) 的同源对比算法、P e a r s o n 和L i p m a n 的相似性方法研究 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) 8 5 : 2 4 4 4 (1 9 8 8)) (这些文献以其全文作为本申请的参考资料)，这些算法的计算机化 (G A P , B E S T F I T , F A S T A 及T F A S T A i n t h e W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e R e l e a s e 7 . 0 , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r . , M a d i s o n , W I) 或目视法。然后选择出按这种方法产生的最佳的对比（即在比较窗口处可导致最高的序列相似百分率）。术语“序列相同”指两个核苷酸序列在比较窗口处是完全相同的（即，基于核苷酸与核苷酸的对比）。术语“序列相同百分率”通过下述方法算得：比较在比较窗口处最适对比的两个序列，确定在二序列中出现相同的核酸碱基（如，A、T、C、G、V或I）的位置数以获得配对位置数，用比较窗口内的总位置数（即，窗口大小）除配对位置数，将结果乘以100便得到序列相同百分率。术语“大体相同”指多核苷酸与参考序列相比在比较窗口上至少有85%的序列

相同，优选90 - 95 %，更经常的则是至少99 %的序列相同，比较窗口至少有20个核苷酸，通常是25 - 50个核苷酸。其中序列相同百分率是通过将参考序列与多核苷酸序列（此序列在比较窗口处包括不超过参考序列的20 %的增补或缺失）相比较而算得的。参考序列可以是一个较大序列（如示于图10 - 17的序列）的一部分。

对于多肽而言，术语“序列相同”指多肽在相对应的位置上拥有相同的氨基酸。“序列相似”则指多肽在相对应的位置上有相同或相似的氨基酸（即保守取代）。术语“大体相同”指在最适对比下（如用GAP或BESTFIT程序），两个多肽序列至少有80 %的序列相同，优选的是不少于90 %，95 %以上更优选（如99 %的序列相同），而且氨基酸残基的不同最好由保守氨基酸取代引起。术语“大体相似”指二多肽有相应百分比的序列相似。

术语“大体上纯的”指一种物质是主要的存在成分（即以分子数而言，它比任何其它成分的量都大），且大体上纯的部分最好占有所有大分子的50 %（分子数）以上。一般地，大体上纯的成分应占该组合物大分子总数的80 - 90 %，该物质最好被纯化到基本均一的程度（常规手段不能测出污染物的存在）从而组合物便基本上只包含一种大分子。

为了将氨基酸取代划分为保守性的和非保守性的，氨基酸被分为以下几组：组I（疏水侧链）包括：正亮氨酸、蛋氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸；组II（中性亲水性侧链）包括：半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸；组III（酸性侧链）包括：天冬氨酸、谷氨酸；组

IV (碱性侧链) 包括: 天冬酰胺, 谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸; 组V (影响多肽链取向的残基) 包括: 甘氨酸、脯氨酸; 组VI (芳香侧链) 包括: 色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。保守取代指同组内氨基酸间的互换, 非保守取代指不同组间氨基酸的互换。

成熟的免疫球蛋白重链和轻链可变区的氨基酸被分别称为Hx 和Lxx, 其中x 是按照Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987) 和 (1991)) 的方案指明的氨基酸的位置数 (以后这个参考文献统称为“Kabat 等”, 并以其全文作为本申请的参考资料)。Kabat 等为每个抗体亚群列出了许多氨基酸序列, 并在每个位置上列出了该亚群最常出现的氨基酸。Kabat 等使用了一种为序列中每个氨基酸分配一个残基数的方法, 此方法已成为该领域的标准方法。通过将被研究抗体与Kabat 等的保守序列一起对比, 可以将Kabat 等的方案扩展到不被其纲目所包括的其它抗体上。利用Kabat 等的计数系统可以方便地认明不同抗体的等价位置上的氨基酸。例如, 一个人抗体的L50 位上的氨基酸的位置等价于一个鼠抗体的L50 位置。

“免疫球蛋白”、“抗体”或“抗体多肽”指完整抗体或其可与完整抗体竞争的P - 选择蛋白的结合片段。

“大体上抑制”指至少抑制50%, 优选抑制60% - 80%, 更经常的则是大于85% (以体外竞争结合试验来测量)。

嵌合抗体是指从来源于不同种生物的免疫球蛋白基因片段，通常通过遗传工程的方法，构建出其重链和轻链基因的抗体。例如：可将鼠单克隆抗体基因的可变区（V）部分与人的恒定区（C）部分如 $\gamma 1$ 和 $\gamma 4$ 相连接。显然也可用其它的哺乳动物，但典型的治疗用嵌合抗体是由鼠抗体的V区或抗原结合区与人抗体的C区或效应子区组成的杂种蛋白。

优选实施方案的描述

本发明提供了抑制由P - 选择蛋白介导的免疫系统的疾病及病情的药物组合物和方法。本发明尤其提供了具有在体内抑制P - 选择蛋白介导的细胞吸附能力的免疫球蛋白。

I、免疫球蛋白的特征：

A、概述

众所周知，抗体的基本结构单位包括一个四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成，每对多肽链有一个“轻”链（大约25 KDa）和一个“重”链（约50 - 70 KDa）。每个链的氨基端部分包括一个由约100到110或更多的氨基酸组成的主要负责抗原识别的可变区。每个链的羧基端部分界定了一个负责效应子功能的恒定区。

轻链分为 κ (kappa) 或 λ (lambda) 两种。重链则分为 γ , μ , α , δ 或 ϵ , 并分别将抗体确定为IgG, IgM, IgA, IgD 和IgE型。在轻链和重链中，可变区和恒定区由约12或更多个氨基酸组成的“J”区所连结，同时重链还包括一个约10

个或更多个氨基酸组成的“D”区（主要见：Fundamental Immunology (Paul W. 编，第二版，Raven 出版社，N. Y. 1989)，第七章）。（以其全文作为本申请的参考资料）。

每对轻/重链的可变区形成抗体的结合位点。所有的链都有由三个超变区（也称为互补决定区或CDR）连结的相对保守的构架区（FR）组成的一个相同的普遍结构。每对的两个链上的CDR由构架区所排列，使之能与特异性抗原决定簇相结合。CDR和FR残基按照上述Kabatt等的标准序列定义进行描述。Chothia等建议了另外一种结构定义（J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)；Natrue 342: 878-883 (1989)；及J. Mol. Biol. 186: 651-663 (1989)）（此后统称为Chothia等，并以其全文作为本申请的参考资料）。

B、结合特异性和亲和力

本发明的免疫球蛋白（或抗体）可选择性地结合与应答组织损伤和发炎有关的P-选择蛋白的有功能的抗原决定簇。一般地，抗体与P-选择蛋白的有功能的抗原决定簇的结合能在体内有效地抑制白细胞吸附激活的血小板和/或激活的血管内皮。有此特性的抗体称为“阻断性抗体”。优选的阻断性抗体能抑制白细胞对激活的血管内皮的吸附以预防或抑制发炎或血栓病情。

本发明的许多阻断性抗体与被称为mu MA b PB 1.3的典型抗体竞争以特异与P-选择蛋白结合。产生mu MA b PB 1.3抗体的一个杂交瘤依照布达佩斯条约已保藏于American Type

Culture Collection, Rockville, Maryland, 保藏号为HB11041。此单克隆抗体的生产述于实施例1。本发明的其它阻断性抗体可与另外一个被称为84/26的典型抗体相竞争。

通过测量被测免疫球蛋白对一参考抗体（如muMAb PB1.3）与P-选择蛋白分子上的一抗原决定簇的特异性结合的抑制来确定竞争。目前已经知道了许多类型的竞争结合试验，如：固相直接或间接放射免疫试验（RIA），固相直接或间接酶免疫试验（EIA），夹心竞争试验（见Stahli等，Methods in Enzymology 9:242-253 (1983)）；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA（见Kirkland等，J. Immunol. 137:3614-3619 (1986)）；固相直接标记实验，固相直接标记夹心试验（见，Harlow和Lane，“Antibodies, A Laboratory Manual”，Cold Spring Harbor出版社 (1988)）；用I-125标记的固相直接标记RIA（见Morel等，Molec. Immunol., 25(1):7-15 (1988)）；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA（Cheung等，Virology, 176:546-552 (1990)）；以及直接标记RIA（Moldenhauer等，Scand. J. Immunol. 32:77-82 (1990)）。一般地，这样的试验涉及到利用结合到固体表面的纯化的P-选择蛋白或产生P-选择蛋白的细胞，未被标记

的待测免疫球蛋白及标记的参考免疫球蛋白。竞争抑制可通过确定被测免疫球蛋白存在时结合到固体表面的标记量来测定。通常被测免疫球蛋白过量存在。一个适当的竞争结合试验的例子可见于实施例8。由竞争试验确认的抗体（竞争性抗体）包括与参考抗体结合相同抗原决定簇的抗体和结合到距参考抗体结合的抗原决定簇足够近的以致能发生位阻现象的邻近抗原决定簇的抗体。通常，当竞争抗体过量存在时，它至少可以将参考蛋白与P-选择蛋白的特异结合抑制10%，25%，50%或75%。

被 μ MA b PB1.3结合的抗原决定簇已被定位于P-选择蛋白的448和467位氨基酸之间。见图34和Johnson等，Cell 56: 1033-1044 (1989)（在此以其全文作为本申请的参考资料）。此抗原决定簇位于P-选择蛋白的第5个CRP区域。见图30。与 μ MA b PB1.3竞争的抗体通常结合到448和467位氨基酸之间的片段上或第5个CRP区域内的另一片段上。

本发明的许多阻断性抗体的结合特异性通过在钙离子完全或大体上不存在时（如在体外测定中在2.5 mM EDTA（一种钙离子螯合剂）存在时以及钙离子不存在时），其与P-选择蛋白的结合能力来进一步确定。阻断活性要求钙离子辅助因子的抗体在钙离子的水平可能波动的体内条件下可能是无效的。

通过观察其与P-选择蛋白特异结合的能力不被具有CQNR YTDLV AI QNKNE氨基酸序列的P-选择蛋白片段所抑制，进一步揭示了与 μ MA b PB1.3竞争的抗体的特征。在分子数上过量的该

片段对这些抗体的特异结合的抑制通常小于5 %。因此 μ MAb PB 1 . 3 及竞争性抗体可与已报道的被命名为G 1 , G 2 和G 3 的鼠抗体 (G e n g 等, T h e J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 6 6 : 2 2 3 1 3 - 2 2 3 1 8 (1 9 9 1) 相区别, 这些鼠抗体与P - 选择蛋白的结合可被上述多肽部分或全部抑制。

本发明的一些抗体的进一步的特征在于其可选择性地抑制一些P - 选择蛋白介导的反应而不损伤其它反应的能力。例如, 一些抗体在体内能阻断嗜中性白细胞对激活了的内皮细胞的特异性结合而不抑制血小板凝聚。这样的抗体在治疗炎症同时又不损伤病人对需要血小板凝集的状态 (如受伤) 进行反应的能力上尤其有用。

本发明的抗体对P - 选择蛋白通常有至少 10^7 , 10^8 , 10^9 或 10^{10} M^{-1} 的特异性结合亲和力。通常, 抗体对P - 选择蛋白的结合亲和力的上限位于 μ MAb PB 1 . 3 上限的大约3 倍、5 倍或1 0 倍的一个因数内。亲和力的下限也位于 μ MAb PB 1 . 3 的下限的大约3 倍、5 倍或1 0 倍的一个因数内。在本文中, 术语“大约”包含常在结合亲和力测量中发生的小的实验错误。

II、免疫球蛋白的生产

A、非人抗体

非人的单克隆抗体 (如鼠的、兔的、马的) 的生产已经熟知且可通过如用含携带P - 选择蛋白的细胞 (如凝血酶激活的血小板)、分离的P - 选择蛋白或其片段 (如胞外区域) 的制剂免疫动物来实现。由被免疫的动

物获得的产生抗体的细胞被永久化并进行筛选，或先为可结合P - 选择蛋白的抗体的生产进行筛选再永久化。见上述的H a r l o w 和L a n e 。另一种方法是，大体上单一特异性的抗体可通过多克隆血清的层析纯化来生产。

B、抗P - 选择蛋白的人抗体

另一方面，本发明也提供了抗P - 选择蛋白的人抗体。一些人抗体通过竞争结合实验筛得，要不然就是有与一鼠特异抗体如 μ M A b P B 1 . 3 相同的抗原决定簇特异性。这样的抗体极可能具有 μ M A b

P B 1 . 3 所显示的有用的治疗特点。按照H u s e 等，S c i e n c e 2 4 6 : 1 2 7 5 - 1 2 8 1 (1 9 8 9) 所述的一般方法，通过筛选人B 细胞的D N A 文库可以生产P - 选择蛋白的人抗体。筛选能结合P - 选择蛋白的抗体或其片段，然后克隆并扩增编码这些抗体（或结合片段）的序列。将H u s e 所述的方法与噬菌体展示技术结合使用会更加有效。见如：D o w e r 等，W O 9 1 / 1 7 2 7 1 及M c C a f f e r t y 等，W O 9 2 / 0 1 0 4 7 （每个都以全文作为本申请的参考资料）。在这些方法中，构建由外表面展示不同抗体的成员构成的噬菌体文库。抗体通常作为F v 或F a b 片段展示出来。由对P - 选择蛋白多肽或其片段的亲和力的强度可筛选携带有所需特异性的抗体的噬菌体。

在一噬菌体展示方法的变异方法中，可生产具有被选定的鼠抗体的结合特异性的人抗体。见W i n t e r , W O 9 2 / 2 0 7 9 1 。在此方法中，被选定的鼠抗体（如 μ M A b P B 1 . 3 ）的重链或轻链可变

区被用作出发材料。如果，例如，轻链可变区被选为出发材料，则可构建成员表现相同的轻链可变区（即鼠出发材料）和不同的重链可变区的噬菌体文库。可以从重排的人重链可变区文库获得重链可变区。从中选出对P-选择蛋白具有强的特异结合力（如至少 10^8 ，优选至少 10^9 M^{-1} ）的噬菌体。然后将此噬菌体上的人重链可变区作为出发材料以构建另外一个噬菌体文库。此文库中，每个噬菌体有相同的重链可变区（即，由第一个展示库所确认的可变区）和不同的轻链可变区。这些轻链可变区来自重排后的人轻链可变区文库。再次筛选对P-选择蛋白具有强的特异结合力的噬菌体。这些噬菌体将完全具有抗P-选择蛋白的人抗体的可变区。这些抗体通常具有与鼠出发材料（如mu MA b PB 1 . 3）相同或相似的抗原特异性。

C、人源化抗体

本发明提供了具有主要来自人免疫球蛋白（称为受体免疫球蛋白）的可变构架区和主要来自名为mu MA b PB 1 . 3（称为供体免疫球蛋白）的鼠免疫球蛋白的互补决定区的人源化免疫球蛋白。恒定区，若存在的话，也主要来自人免疫球蛋白。本发明的人源化抗体在如下几个方面优于鼠供体抗体，此鼠供体抗体已在动物模型中证明有效。

1) 人免疫系统应不会将人源化抗体的构架区或恒定区作为外源物质加以识别，因此对注入抗体的抗体反应应低于对全部外源性鼠抗体或一部分外源性嵌合抗体的反应。

2) 由于人源化抗体的效应子部分是人的，故它可

以更好地与人免疫系统的其它部分相互作用。

3) 据报道, 注入的鼠抗体在人体循环中的半衰期大大低于正常的人抗体的半衰期 (S h a w 等, J . I m m u n o l , 1 3 8 : 4 5 3 4 - 4 5 3 8 (1 9 8 7))。注入的人源化抗体的半衰期则基本等于自然产生的人抗体的半衰期, 从而可以较低的频率和较小的剂量用药。

(1) m u M A b P B 1 . 3 可变区域的克隆和测序

编码m u M A b P B 1 . 3 抗体的重链和轻链可变区的c D N A 的克隆和测序述于实施例1 0 , 核苷酸和预期的氨基酸序列示于图1 1 和图1 2 , 表1 和表2 表明了构架区和互补决定区氨基酸编码序列的再分。从N - 末端到C - 末端, 轻链和重链都包含F R 1 , C D R 1 , F R 2 , C D R 2 , F R 3 , C D R 3 和F R 4 区域。按照上述K a b a t 等的传统记录方法将氨基酸分配到每一区域。

(2) 提供构架残基的人抗体的选择

如果人可变区构架采用与产生C D R 的鼠可变区构架相同或相似的构型, 则将鼠的C D R 取代入人的可变区构架中极可能导致其正确空间定向的保留。这可以通过从构架序列与产生C D R 的鼠可变构架区域序列高度相同的人抗体获得人可变区域来实现。重链和轻链可变构架区可从相同或不同的人抗体序列衍生出来。人抗体序列可以是自然发生的人抗体的序列, 也可以是几个人抗体的一致序列。见K e t t l e b o r o u g h 等,

Protein Engineering 4: 773 (1991); Kolbinger 等, Protein Engineering 6: 971 (1993)。

通过用计算机比较鼠可变区的氨基酸序列与已知的人抗体的序列可以确认出适当的人抗体序列。轻链和重链要分开比较但原理彼此相似。这种比较表明 μ MA b PB1.3 轻链与人的 κ a p p a -1 亚型的轻链有最大的序列相同, μ MA b PB1.3 重链与人的1 亚型重链有最大的序列相同, 见上述 K a b a t 等所确定。因此, 轻和重链的人构架区通常来自这些亚型的人抗体或这些亚型的一致序列。与 μ MA b PB1.3 的相应区域有最大序列相同性的优选的重链和轻链可变区分别来自抗体 2 1 / 2 8 ' C L 和 D E N。

(3) 计算机模拟

鼠 C D R 区与人可变构架区的非自然并置会导致一些非天然构型的限制, 除非通过取代某些氨基酸残基进行校正, 否则这些构型限制会导致结合亲和力的丧失。要取代的氨基酸残基的选择部分上是通过计算机模拟确定的。产生免疫球蛋白的三维图象的计算机硬件和软件随处可得。分子模型的产生一般是从免疫球蛋白链或其区域的已解决的结构开始的。比较被模拟链与三维结构已知的链或区域的氨基酸序列相似性。显示最大序列相似性的链或区域被选为构建分子模型的出发点。例如, 对 μ MA b PB1.3 的轻链, 模拟的出发点是人轻链 D E N。修改已知的出发结构以容纳被模拟的免疫球蛋白链或区域的真实氨基酸与出发结构中的氨基酸

的差异。然后将修改了的结构拼凑成一综合的免疫球蛋白，最后，通过能量最小化以及通过证实所有原子位于适当的距离之内、键长和键角位于化学上可接受的范围之内来进一步完善此模型。这样的—个模型反过来又可以用为预言—含有取代于人的构架结构中的 μ MA b

P B 1 . 3 的互补决定区的抗体的三维结构的出发点。当下面将要讨论的进一步的氨基酸取代被引入时，其它模型也可以被构建出来以代表结构。

(4) 氨基酸残基的取代

如上所述，本发明的人源化抗体包括主要来源于人免疫球蛋白的可变构架区和主要来源于称为 μ MA b P B 1 . 3 的鼠免疫球蛋白的互补决定区。在确认了 μ MA b P B 1 . 3 的互补决定区和适当的人受体免疫球蛋白之后，下一步是要确定这些成分中哪些残基（如果有的话）应被取代以使产生的人源化抗体的性质最佳。一般应使鼠对人氨基酸残基的取代最小化，因为鼠残基的引入加大了抗体在人体中引起HAMA反应的危险。用于取代的氨基酸的选择基于其对CDR构型和/或 与抗原结合可能产生的影响。这种可能的影响用以下方式进行检查，模拟，检查特殊位置的氨基酸的性质、或经验地观察特定氨基酸取代或突变的效果。

当氨基酸在 μ MA b P B 1 . 3 可变构架区和等价的人可变构架区之间不同时，通常应由等价的鼠氨基酸取代人构架氨基酸，如果合理地希望这种氨基酸：

(1) 直接非共价地结合抗原（如，位于 μ MA b P B 1 . 3 的H1，H2和L60的氨基酸）。

(2) 与CDR区相邻，作为上述Chothia

等人提出的另一种定义的CDR区的一部分，或否则与CDR区相互作用（如，位于CDR区大约3 Å的范围内）（如，mu MA b PB 1 . 3 的H 7 3，表1和3）或

(3) 位于V_L - V_H界面。

用于取代的其它候选物是在某位置对人免疫球蛋白不寻常的受体人构架氨基酸。这些氨基酸可被来自更典型的人免疫球蛋白的等价位置的氨基酸所取代。或者，当mu MA b PB 1 . 3 等价位置的氨基酸是人免疫球蛋白在等价位置上的典型氨基酸时，可将这些氨基酸引入人构架区。

一般说来，满足上述标准的氨基酸的全部或大部分取代是需要的。然而，偶然情况下，某特定氨基酸是否符合上述标准比较难以确定。而且会产生可替换的不同的免疫球蛋白，其一具有那种特殊的取代，另一则不具备。令人吃惊的是，一种被称为重构的MA b PB 1 . 3 (H_BL_D) 的典型的人源化抗体仅含有一个人重链可变区构架残基的取代和仅两个人轻链可变区构架残基的取代，然而它对具有被融入了人恒定区的完整的鼠可变区的鼠抗体或嵌合抗体（称为chi MA b PB 1 . 3）有相似的结合亲和力。

本发明的一些人源化抗体在位置L 2 1、L 4 6，L 6 0 和L 7 0 中的至少1个，2个或3个，有时4个的位置上含有用相应的mu MA b PB 1 . 3 残基对人轻链构架残基的一个取代（见表2和4）。一些人源化抗体通常在位置H 1，H 2，H 7 1 和H 7 3 的至少1个，2个或3个，有时4个的位置上含有人重链构架残基的一个取代（见表1和3），许多人源化抗体同

时含有轻链和重链可变构架区的取代。优选的抗体包含至少在位置H7 1 上的人重链构架残基的取代和至少在位置2 1 和4 6 上的人轻链构架残基的取代。

人源化抗体的C D R 区通常大体上相同，与m u M A b P B 1 . 3 抗体的相应C D R 区更常常相同。尽管一般并不期望，但有时可能会在不影响产生的人免疫球蛋白的结合亲和力的情况下取代C D R 残基的一个或多个保守氨基酸。偶而，C D R 区的取代会提高结合亲和力。

除上述的特殊氨基酸取代外，人源化免疫球蛋白的构架区通常大体上是相同的，更经常与产生它们的人源化抗体的构架区相同。当然，构架区的许多氨基酸对抗体的特异性和亲和力很少或没有直接贡献。因此，许多构架残基的单个的保守取代可以被容忍而不会明显改变形成的人免疫球蛋白的特异性和亲和性。然而，一般来说，这些取代是不受欢迎的。

(5) 可变区的产生

在主观上选择了人源化免疫球蛋白的C D R 和构架成分之后，可利用多种方法生产这种免疫球蛋白。因为密码的简并性，许多核酸序列将为每一免疫球蛋白氨基酸序列编码。期望的核酸序列可通过从头固相D N A 合成或通过期望的多核苷酸的一个早已准备好的变种的P C R 突变而产生。寡核苷酸介导的突变是制备靶多肽D N A 的取代、缺失和插入变种的一种优选的方法。见A d e l m a n 等，D N A 2 : 1 8 3 (1 9 8 3)，简言之，靶多肽D N A 可以通过将编码目标突变的寡核苷酸与一单链D N A 模板杂交而被改变。杂交之后，用

DNA 多聚酶来合成一个完整的模板的第二互补链，第二模板链含有寡核苷酸引物，并且编码靶多肽DNA上的被选择的改变。

(6) 恒定区的选择

上述产生的人源化抗体的可变部分一般与免疫球蛋白恒定区 (F C)、一般是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分相连。人恒定区DNA序列可以按照熟知的程序从多种人体细胞，但优选的是永久传代的B细胞（见上述K a b a t 等，和WO 87 / 02671）（每个都可以其全文作为本申请的参考资料）中分离出来。一般，抗体同时包含轻链和重链恒定区。重链恒定区通常包括C H 1 区，关节区，C H 2 区，C H 3 区和C H 4 区。

人源化抗体包括具有所有类型恒定区的抗体，包括I g M，I g G，I g D，I g A 和I g E，和任一同型，包括I g G 1，I g G 2，I g G 3 和I g G 4。当期望人源化抗体显示细胞毒活性时，恒定区域通常为互补结合性的恒定区域，其类型一般为I g G 1，当不需要此细胞毒活性时，恒定区可为I g G 4 类。人源化抗体可包含来自不止一个类型或同型的序列。

(7) 表达系统

编码人轻、重链可变区（任选地与恒定区相连）的核酸被插入到表达载体中。轻、重链可被克隆到相同或不同的表达载体上。编码免疫球蛋白各链的DNA片段被连接到确保免疫球蛋白多肽表达的表达载体的控制序列之后。此控制序列包括信号序列，启动子，增强子和

转录终止序列。表达载体在宿主体内或作为独立复制子或整合到宿主染色体DNA上，一般是可复制的。通常，表达载体将包含选择标记，如四环素或新霉素，以便检测用所需DNA序列转化了的那些细胞（如见美国专利4,704,362）。

大肠杆菌是对克隆本发明的多核苷酸尤其有用的一种原核宿主。其它适合使用的微生物宿主包括芽胞杆菌如枯草芽胞杆菌以及其它肠细菌如沙门氏菌、沙雷氏杆菌和各种假单胞菌属。在这些原核宿主中也可构建表达载体，这些表达载体一般包含可与宿主细胞共存的表达控制序列（如复制起点）。而且，可存在任何数量的各种熟知的启动子，如乳糖启动子系统，色氨酸（t r p）启动子系统， β -内酰胺酶启动子系统，或来自 λ 噬菌体的启动子系统。这些启动子将典型地控制表达，它们任选地带有一操纵子序列，并且具有核糖体结合位点序列及其类似物，用于转录和翻译的起始和完成。

其它微生物，如酵母，也可用于表达。酵母属是一种优选的宿主，带有含表达控制序列如启动子，包括三磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶，及复制起始位点，终止序列和其他的上述类似物。

除微生物以外，哺乳动物组织细胞培养物也可用于表达和生产本发明的多肽（见Winnacker, F r o m G e n e s t o C l o n e s (VCH出版公司, N. Y., N. Y. 1987)）。真核细胞实际上是优选的，因为目前已发展了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适的寄主细胞系。用于表达编码本发明免疫球蛋白的核酸的优选寄主细胞包括：SV40转化的猴肾CV1细胞系（COS-7 ATCC CRL

1651) ; 人胚肾细胞系 (293) (Graham 等, J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)) ; 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC, CCL 10) ; 中国仓鼠卵巢细胞DHFR (CHO Ur1aub 和Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77: 4216 (1980)) ; 鼠谢尔托立氏细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)) ; 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; 非洲绿猴肾细胞 (VERO -76, ATCC CRL 1587) ; 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ; 布法罗兔肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL 1442) ; 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75) ; 人肺细胞 (Hep G2, HB8065) ; 鼠乳腺癌细胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51) ; 和TRT细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-46 (1982)) ; 杆状病毒细胞。

含有感兴趣的多核苷酸序列 (如, 重、轻链编码序列和表达控制序列) 的载体可用熟知的方法转入宿主细胞, 这些方法由于细胞宿主类型的不同而不同。例如, $CaCl_2$ 转染通常被用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电穿孔常被用于其它细胞宿主 (主要见Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor 出版社, 第二版, 1989))。 (这些文献以其全文作为本申请的参考资料)。当重、

轻链被克隆在不同的表达载体上时，这些载体便被共转染以使完整的免疫球蛋白得以表达和组装。重组DNA导入后，表达免疫球蛋白产物的细胞株是可选择的。能稳定表达的细胞株比较优选（即，细胞株传代50次以后表达水平仍不降低）。

一旦被表达，整个抗体，其二聚体，单个轻、重链或本发明的其它免疫球蛋白形式可根据现有技术中的标准程序进行纯化，这些程序包括硫酸胺沉淀，亲和柱层析，柱层析，凝胶电泳等（主要见，*Scopes, Protein Purification* (Springer-Verlag, N. Y., 1982)）。作为治疗用时，纯度至少在90-95%的大体上纯的免疫球蛋白较优选，纯度为98-99%或更高的最优选。

上述重组技术也可用于编码人或鼠抗体的天然序列的表达。这一方法对从不稳定细胞株分离出的人抗体的表达尤其有益。

III、抗体片段

本发明另一方面提供了上述完整抗体的片段。具有代表性的是，这些片段可与产生它们的完整抗体相竞争特异地结合P-选择蛋白，并且以至少 10^7 、 10^8 、 10^9 M^{-1} 或 10^{10} M^{-1} 的亲和力相结合。抗体片段包括不同的重链和轻链Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc 和Fv。这些片段可通过完整免疫球蛋白的酶法或化学法降解而产生。例如，F(ab')₂ 片段可运用一些如在Harlow和Lane, *Antibodies: A Laboratory Man*

ual, Cold Spring Harbor 出版公司, N. Y. (1988) 中所述的标准方法, 在pH为3.0-3.5时用胃蛋白酶进行蛋白质分解消化从IgG分子中获得。Fab片段可通过有限还原从F(a b')₂片段获得, 或在还原剂存在下用木瓜蛋白酶消化完整的抗体而获得。(见同上), 这些片段也可通过重组DNA技术产生。编码选定片段的核酸片段可通过用限制性内切酶消化全长编码序列而产生, 或通过从头合成而产生。这些片段经常以噬菌体外壳融合蛋白的形式被表达。这种表达方式对下述于IV部分的抗体亲和力的加强非常有益。

IV、亲和力强化抗体

上述的许多免疫球蛋白能在结合特异性或效应子功能不丧失或结合亲和力的减退可容忍(即, 大约在 10^{-7} M⁻¹以下)的情况下, 在可变区和恒定区进行非关键性氨基酸的取代、添加或缺失。通常, 掺入了这些改变的免疫球蛋白与产生它们的对照免疫球蛋白的序列大体相同。偶而, 可选择到一个突变了的免疫球蛋白, 与产生它的对照免疫球蛋白相比具有相同的特异性和提高了的亲和力。噬菌体展示技术为选择这些免疫球蛋白提供了有力的技术。(见例如, Dower等, WO91/17271; McCafferty等, WO92/01047; 和Huse, WO92/06204)。

V、杂交抗体

本发明还提供了既与P-选择蛋白的阻断性抗体有相同特异性又与次级部分能特异结合的杂交抗体。在杂

交抗体中，一对重链和轻链通常来自于一个P - 选择蛋白抗体，另外一对则来自于抗另一抗原决定簇的抗体。这就产生了多功能价的特性，即至少同时与两个不同抗原决定簇相结合的能力，其中至少一个抗原决定簇是阻断性P - 选择蛋白抗体结合的那个抗原决定簇。这些杂交抗体可通过产生相应组分抗体的杂交瘤的融合或通过重组技术而形成。

免疫球蛋白也可与来自其它基因（如，酶）的功能区相融合，以产生具有新性质的融合蛋白（如，免疫毒素）。

VI、核酸

上述完整的抗体和抗体片段经常通过核酸的表达而产生。编码任何抗体或本申请所述抗体的所有核酸均清晰地包括在本发明中。核酸修饰可通过多种熟知的技术很容易地实现，如定点突变（见G i l l m a n 和S m i t h , G e n e , 8 : 8 1 - 9 7 (1 9 7 9) 和R o b e r t s 等, N a t u r e , 3 2 8 : 7 3 1 - 7 3 4 (1 9 8 7) ）。本发明的许多核酸与编码m u M A b P B 1 . 3 的重链和轻链或其典型的人源化衍生物的核酸大体上序列相同。

VII、计算机

另一方面，本发明提供了编程可以在监视器或打印机上显示出抗体三维图象的计算机。例如，在U N I X 操作系统下运行和使用Q U A N T A 分子模拟块的S i l i c o n G r a p h i c s I R I S 4 D 工作站是很合适的。计算机对人源化抗体的变种形成可见模

型很有用。总的说来，本发明的抗体已提供了满意的结合亲和力。然而，通过某些氨基酸残基的进一步变化以确认具有更强结合亲和力的抗体也是可能的。三维图像也能确认许多非关键氨基酸，这些氨基酸可以作为不影响抗体结合亲和力的保守取代的对象。

VIII、抗体的大批量生产

为了得到大批量的抗体，产生在其染色体上含有编码重链和轻链免疫球蛋白的基因的多个拷贝的稳定细胞。多拷贝通过扩增细胞染色体DNA的分离区而获得。通过使用使在一定生长条件下很重要的细胞酶（如，DHFR）失活的选择试剂，如氨甲喋呤（MTX），可实现这种扩增。扩增，即DHFR基因多个拷贝的积累导致与更大量的MTX相应的更大量的DHFR的产生。尽管存在内源性的DHFR，通过在培养液中加入更大量的MTX扩增压力也可发挥作用。目的基因（指编码免疫核蛋白重链和轻链的基因）的扩增通过在相同或不同的质粒上将每一基因连到DHFR基因的一个拷贝上并转染此质粒而实现。与MTX呼应的DHFR基因的扩增导致了目的免疫球蛋白基因拷贝数量的伴随上升。目的基因拷贝数量的增加又导致了期望的异源蛋白质的更大量表达。每 10^6 个细胞每天大约表达 $10-100$ 、 $20-50$ 或 $30\mu\text{g}$ 人源化免疫球蛋白的稳定细胞株较为优选。

XI、P - 选择蛋白片段

另一方面，本发明还提供了P - 选择蛋白的片段。这些片段包括来自P - 选择蛋白的第5个C3b - C4

b 调节区 (第5 CRP)。该片段包含被 μ MA b PB 1 . 3 结合的抗原决定簇和/或被竞争抗体结合的相邻抗原决定簇。此片段通常包含总数至多为5, 10, 20, 25, 50, 75, 100或200个氨基酸。大多数片段包含了图3 4所示的人P-选择蛋白序列上448位到467位之间的部分或全部氨基酸。这些氨基酸决定了被 μ MA b PB 1 . 3 特异结合的抗原决定簇。在许多片段上,至少有5个连续氨基酸来自图3 4所示氨基酸序列的448到467位之间。其它片段包含了448到467之间完整连续的氨基酸片段。某些片段基本上由氨基酸的这些连续片段组成。在这些片段上,不存在对片段结合特异性或亲和性有贡献的其它氨基酸。通常,任何种类的其他氨基酸都是不存在的。

本发明的多肽片段有多种用途。这些片段可作为免疫原以产生与 μ MA b PB 1 . 3 相竞争而特异结合P-选择蛋白的抗体。将该片段作为免疫原使用缩小了分离具有所需特异性的抗体的筛选范围。该多肽片段也可用于如下文所述的诊断方法和治疗方法。一些片段可与全长P-选择蛋白分子竞争结合激活的嗜中性白细胞。因此,这些片段可用于治疗由P-选择蛋白与其位于激活的嗜中性白细胞上的配体相互作用而介导的免疫系统的疾病和症状。通过与位于这些细胞表面的P-选择蛋白的配体相结合,一些片段也可用于检测激活的嗜中性白细胞的存在。一些小的片段尤其适合于体内用药后药物的有效分布。纯粹来源于人的片段可降低用其它试剂可能导致的副作用的危险。

X、治疗和诊断方法

治疗方法运用上述的抗体（整个和结合片段）和P-选择蛋白片段作为治疗制剂来治疗多种疾病。这些治疗剂在预防和治疗免疫系统多种疾病和紊乱方面有用。这些疾病和紊乱包括移植排斥，移植物抗宿主疾病，自身免疫疾病如依赖于胰岛素的糖尿病，多发性脑脊髓硬化症，人强直性综合症，类风湿关节炎，重症肌无力，红斑狼疮和发炎性疾病。这些制剂也可用于阻止肿瘤转移，抑制循环性癌细胞的粘连，如结肠癌和黑素瘤。一些治疗制剂通过阻断或拮抗P-选择蛋白分子与其配体的作用而行使功能。其他治疗制剂通过杀死带有本制剂所对抗的多肽的细胞而发挥功能。

这些治疗制剂尤其适合于发炎性和血栓性症状的治疗，这些症状包括局部缺血后白细胞介导的组织损伤（再充血），它起因于创伤休克，窒息，心肌梗塞，急性移植排斥，冻伤损伤，区域综合症，及与下列疾病有关的病理生理状况，它们是：心肺旁路，急性白细胞介导的肺损伤（如，成人呼吸困难综合症），脓毒性休克与由病毒（如，疱疹病毒复合体）引起的脓毒症有关的损伤，IgE介导的过敏反应（如急性哮喘病）和慢性炎症（包括类风湿关节炎，皮炎和牛皮癣）。

局部缺血/再充血损伤是一种发炎性疾病，它在患有供给阻断导致的局部缺血（氧缺乏）的器官血流恢复时发生。除非通过再充血得以迅速缓解，局部缺血会导致周围细胞的死亡并且最终造成整个器官或患者的死亡。然而，积累的证据表明再充血本身会对周围组织造成恶性影响。据信导致再充血恶性影响的原因部分在于由恢复了的血流中的激活的嗜中性白细胞介导的发炎反应。

一些病人呈现全身局部缺血，另外一些病人局部缺血只限于身体某些特殊的部分或器官。例如，一个病人可患有表皮缺血，心肌缺血，肾缺血，大脑缺血，脾缺血，肝缺血，脊髓缺血，内脏缺血，肺缺血，部分身体缺血或全身局部缺血。本发明的这些治疗制剂通过拮抗这些淋巴细胞与P - 选择蛋白的相互作用而发挥作用。

急性过敏症（包括哮喘病）的一个主要成分是用抗原处理对此抗原特异致敏的对象后发生的肥大细胞脱粒化。肥大细胞脱粒化的结果包括支气管收缩反应，也包括以白细胞累积为部分特征的发炎反应。与其它发炎介体一起包含于肥大细胞中的组织胺可诱发血管内皮细胞上P - 选择蛋白的表达，这表明肥大细胞的脱粒可导致P - 选择蛋白表达和其后的白细胞积聚。由于肥大细胞脱粒在过敏症的病理遗传中是一个关键因素，运用P - 选择蛋白的抗体对人类过敏症的治疗将是有用的。

这些方法对人类尤其有用，但也可用于兽类疾病。这些治疗方法通常用于有生命的对象的器官。然而，一些方法，如局部缺血 - 再充血疗法，同样适用于被解剖了的器官，尤其是在这些器官正待移植入一个受体病人体内时。治疗方法也可在体外完成。

针对P - 选择蛋白的治疗制剂和组合物也与针对其它分子，尤其是可与不同粘连分子反应的人源化或人抗体的制剂结合使用。合适的免疫球蛋白包括那些对CD 1 1 a、CD 1 1 b、CD 1 8、E - 选择蛋白、L - 选择蛋白和I C A M - 1 有特异性的免疫球蛋白。这些免疫球蛋白应与上述粘结分子的抗原决定簇结合，从而抑制白细胞尤其是嗜中性白细胞与内皮细胞的结合。在组合疗法中使用的其它合适的抗体和那些对淋巴激活素

(如I L - 1 , I L - 2 和I F N - γ 及它们的感受器) 有特异性的抗体。这些抗体用来阻断内皮细胞的活化, 从而阻止它们在发炎反应中与嗜中性白细胞的相互作用。

本发明的阻断性P - 选择蛋白抗体和药物组合物对胃肠外用(即皮下用药, 肌内用药和静脉用药) 尤其有用。目前正在发展许多新的给药途径。本发明的药物组合物也适合于用这些新方法用药。(见L a n g e r , S c i e n c e , 2 4 9 : 1 5 2 7 - 1 5 3 3 (1 9 9 0)) 。

阻断性P - 选择蛋白抗体可直接或间接地与化学药剂结合使用。可用现有技术中公知的各种方法实现的这种配合使用不应明显抑制免疫球蛋白结合受体的能力, 也不应明显降低化学药剂的活性。可尝试将许多化学疗法与之配合使用以定向。例如, 可被配合使用的抗发炎试剂包括免疫调节剂、血小板激活因子(P A F) 拮抗剂、环化加氧酶抑制剂、脂肪氧合酶抑制剂和白三烯拮抗剂。一些较好的成分包括环孢菌素A, 消炎痛、甲氧基甲基茶乙酸、F K - 5 0 6 、霉酚酸等。与之相似, 抗氧化剂, 如超氧化歧化酶, 对治疗再充血损伤是有用的。同样, 抗癌制剂, 如道诺霉素、阿霉素、长春花碱、博来霉素等也可被定向。

P - 选择蛋白的定向也可经由亲水脂分子、或以聚集的形式存在于水溶液中的两性分子(极性: 非极性) 来实现。亲水脂分子包括非极性脂类、极性脂类、甘油一酯和甘油二酯、硫酯、溶血卵磷脂、磷脂、皂苷、胆酸和胆盐。这些分子的乳剂和泡沫、微团、不溶性单层、液晶、磷脂分散物和片层的形式存在。这些物质在此统称为脂质体。在这些制剂中, 欲在体内输送的药物作为

包埋了抗P - 选择蛋白免疫球蛋白的脂质体的一部分被掺入。在这种方法中，只要免疫球蛋白能有效地将脂质体定向于P - 选择蛋白分子，免疫球蛋白就不需要与P - 选择蛋白上有功能的抗原决定簇相结合。当脂质体被运送到被影响细胞的附近时，脂质体便将治疗药物释放出来。

有许多方法可以用于制备脂质体，如S z o k a 等，(A n n . R e v . B i o p h y . B i o e n g . 9 : 4 6 7 (1 9 8 0))，美国专利4 , 2 3 5 , 8 7 1 , 4 , 5 0 1 , 7 2 8 和4 , 8 3 7 , 0 2 8 所述（它们以其全文作为本申请的参考资料）。用各种定向试剂（例如，配体、受体和单克隆抗体）进行的脂质体定向方法已被熟知（见，如美国专利4 , 9 5 7 , 7 7 3 和4 , 6 0 3 , 0 4 4 , 二者以其全文作为本申请的参考资料）。可利用标准方法将定向试剂与脂质体结合。抗体定向的脂质体可用如结合了蛋白质A的脂质体构建（见，R e n n e i s e n 等，J . B i o l . C h e m . 2 6 5 : 1 6 3 3 7 - 1 6 3 4 2 (1 9 9 0) 及L e o n e t t i 等，P r o c . N a t l . A c a d . S c i . (U S A) 8 7 : 2 4 4 8 - 2 4 5 1 (1 9 9 0))。

肠胃外用药使用的药物组合物通常包括治疗试剂（例如，抗P - 选择蛋白（完整的或结合片段或P - 选择蛋白片段）抗体）的溶液或溶于一可接受载体（优选水载体）的几个这种试剂的混合物。可使用多种水载体，如：水、缓冲液、0 . 4 % 盐水、0 . 3 % 甘氨酸等。这些溶液是无菌的，且通常不含特殊物质。这些制剂可用熟知的常规消毒技术消毒。当需要辅助物模拟生理条件，如调整p H 值并起缓冲作用的试剂、体力调节剂等，

如醋酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等时，这些组合物可以含有这些药学上可接受的辅助物。在这些配制制剂中，抗体的浓度可以变化很大，即从低于0.5%，通常为或不低于0.1%到高达1.5%或2.0%（重量），用药浓度可依据用药的特殊方式并基于液体体积、粘度等进行选择。制备肠胃外用药组合物的实际方发是本领域技术人员公知的或显而易见的，这些方法被详细描述于如Remington的Pharmaceutical Sciences，第17版，Mark出版公司，Easton Pennsylvania（1985）（在此以其全文作为本申请的参考资料）。

本发明的抗体可以冷冻干燥保存，并在使用前在一合适的载体中恢复。已经表明这种技术对常规的免疫球蛋白是有效的，这种方法利用的是熟知的冷冻干燥法和恢复技术。冷冻干燥法和恢复技术可导致各种不同程度的抗体活性丧失（如，对常规免疫球蛋白，IgM抗体比IgG抗体有更大的活性丧失），因此为了补偿需调整用药量。

含有本发明抗体及其混合物的这些组合物可作为药物用于预防和/或治疗。在用于治疗时，这些组合物以足以治愈或至少可部分阻止感染及并发症的剂量施于患者。能够实现上述目的剂量定义为“有效治疗剂量”。有效治疗剂量依据患者疾病的严重程度和患者本身免疫系统总体状况的不同而不同，但一般变化范围大约为0.05毫克/千克体重-5毫克/千克体重，优选的范围大约为0.2毫克/千克体重-1.5毫克/千克体重。

本发明的材料一般可用于程度较重的疾病，即危及

生命的或潜在危及生命的情形。在这些情况下，考虑到外源物质的最小化和本发明的人或人源化抗体所引起的异物排斥（如，HAMA）的较低的可能性，治疗医生使用大体上过量的这些抗体是可能的且值得的。

在用于预防时，将含有本发明抗体及其混合物的组合物用于尚未处于患病状态的病人以提高其抵抗力。这一剂量定义为“有效预防剂量”。在这一用途中，正确的剂量也依病人的健康状况及其总体免疫水平的不同而不同，但通常在上述范围内。

可用治疗医生所选择剂量的水平和形式使用这些组合物的一种或多种进行治疗。任何情况下，药方应提供足以有效医治病人的本发明免疫球蛋白的量。

本发明的抗体（整体和结合性片段）和P-选择蛋白片段也可用于诊断。足以达到这一目的的量定义为“有效诊断剂量”。用于诊断时，正确剂量依赖于病人的健康状况，用药方式，等等。这些抗体可以标记也可不标记。未标记的抗体可与其它能与抗体反应的标记抗体（第二抗体）结合使用，如对特殊免疫球蛋白恒定区有特异性的抗体。另一方面，这些抗体可直接被标记，如用放射性核素、荧光物质、酶、酶底物、酶辅助因子、酶抑制剂、配体（特别是辅抗原）标记。

这些抗体（整体和结合性片段）对于测定带有P-选择蛋白受体的细胞的存在是有用的。这些细胞的存在可诊断出炎症或疾病，并可能标志着需要开始使用上述治疗方法。通过从病人身上进行细胞取样的方法可完成诊断。然而，样本的个体细胞中被表达的P-选择蛋白受体的量可通过如固定化细胞的免疫组织化学染色或将细胞抽提物与本发明抗体进行Western杂交等方

法加以确定。P - 选择蛋白片段对测定激活的嗜中性白细胞的存在有用，这一存在可能暗示着一个不希望的免疫反应。

诊断也可通过标记抗体（优选的是人源化的或人抗体）的体内使用并经体内成象的检测来实现。使用的M A b 的浓度应足量，从而与背景信号相比，与带有靶抗原的细胞的结合可被检测到。诊断试剂可用于用于相机成像的放射性同位素，或用于磁共振或电子自旋共振成像的顺磁性同位素来标记。

细胞样品中或从个体抽出来的P - 选择蛋白的水平变化（一般为上升），即超出了临床确定的常规水平可表明取得样品的个体中一个不希望的发炎应答反应的存在，和/ 或表明个体倾向于发生（或正经历）一个这样的反应。P - 选择蛋白也可用作分化标记以确认并分类具有特定谱系和发育起源的细胞。这种细胞类型特异测定可用于不期望的免疫反应的组织病理诊断。

试剂盒也可与本发明抗体一起被提供使用。因此，本发明的抗体组合物通常以冷冻形式，单独或与另外的对需要的细胞类型特异的抗体一起盛在一个容器中。这些抗体（可结合一个标记或毒素或不结合）与缓冲剂如T r i s ， 磷酸盐，碳酸盐等，稳定剂，抗微生物剂、惰性蛋白（如血清蛋白等）等和一套使用指南一起包含在一个试剂盒中。通常，这些材料以活性抗体重量计以大约低于5 %（重量）存在，并通常基于抗体的浓度以大约至少为. 0 0 1 %（重量）的总量存在。通常有必要包括一个惰性补充剂或赋形剂以稀释活性成分，在此赋形剂可以大约总制剂重量的1 - 9 9 %的比例存在。在检测中，当利用可结合P - 选择蛋白抗体的第二抗体

时，第二抗体通常盛在一个隔离小瓶中。第二抗体常常与一个标记结合，并如上配制。

下面提供一些实施例说明本发明但不是限制本发明。

实施例1

试剂的制备

本实施例描述用于实施例2 和实施例3 中的免疫和实施例4 中的E L I S A 的试剂的制备或分离。

A “不新鲜血小板”

血小板制备物是从由S a n D i e g o 血库获得的“不新鲜血小板”纯化制得的。使用的方法是如M o o r e 等, J . C e l l . B i o l . 1 1 2 : 4 9 1 - 4 9 9 (1 9 9 1) (在此以其全文作为本申请的参考资料) 所述方法的改进方法。简而言之, 2 5 单位的富含不新鲜血小板的血浆以1 2 0 0 r p m (3 0 0 x g) , 1 0 分钟离心两次, 以除去非血小板的血细胞杂质。纯化了的血小板制备物用含0 . 1 M 氯化钠, 2 0 m M T r i s 和5 m M 苯甲脒的缓冲液洗三次。该缓冲液还含有3 . 8 % 的柠檬酸钠, 其p H 值用1 N 盐酸调至7 . 5 。纯化后的血小板在7 0 °C 储存, 注射前在P B S 中洗一次。

B、纯化的P - 选择蛋白

血小板的分级分离: 洗过的不新鲜血小板基本上按M o o r e 等, 1 9 9 1 , 如上述的方法分级分离。将2 5 单位洗过的血小板溶于1 0 0 m M 的抑酶醛肽和1 m M 的4 - (2 - 氨基乙基) - 苯磺酰基氟化物 (A E B

S F) 中, 在干冰/ 甲醇中冻融三次, 并用D o u n c e 匀浆器搅拌十次。悬浮液在B e c k m a n T i 7 0 转头上以3 5 , 0 0 0 r p m 于4 °C下离心6 0 分钟。离心所得的上清液是用于纯化可溶性P - 选择蛋白的出发材料。将沉淀重新悬浮于3 0 m l 含1 m M 氯化锰, 1 m M 氯化钙, 5 m M 苯甲脒 - 盐酸, 0 . 1 M 氯化钠, 2 0 m M T r i s , 2 % T r i t o n X - 1 0 0 , p H 7 . 5 的悬浮液中, 用D o u n c e 匀浆器搅拌十次, 在4 °C保温1 小时。将悬浮液在B e c k m a n T i 7 0 转头上以3 5 , 0 0 0 r p m , 4 °C离心1 小时。离心所得的上清液是分离“膜结合”P - 选择蛋白的出发材料。

从被分离的血小板中分离P - 选择蛋白: “可溶性”和“膜结合”P - 选择蛋白分离通过下述程序的一部分或全部进一步纯化。用于分离膜结合形式的P - 选择蛋白的所有缓冲剂中均含有浓度为0 . 1 % 的非离子去垢剂R e n n e x 3 0 。 (A c c u r a t e C h e m i c a l a n d S c i e n t i f i c 公司)。这些缓冲剂还都含有1 m M 氯化钙和1 m M 氯化锰, 含有P - 选择蛋白的部分通过用单克隆抗体P N B 1 . 6 进行W e s t e r n 杂交进行测定。

扁豆凝集素层析法: 将从2 5 单位血小板中获得的“可溶性P - 选择蛋白”上清液或“膜结合P - 选择蛋白”去垢剂抽提物通过一个与琼脂糖4 B (S i g m a 化学公司, L - 0 5 1 1) 结合的从扁豆获得的凝集素(扁豆凝集素) 的柱子 (1 . 5 × 5 . 5 c m) 。然后用1 5 0 m l , 含2 0 m M T r i s , 0 . 1 M 氯化钠, p H 为7 . 5 的溶液洗涤此柱。再用1 0 × 3 m l 等份

的20 mM Tris, 0.5 M氯化钠, 0.5 M α -甲基-D-甘露吡喃糖苷, pH 7.5 的溶液从柱上洗脱被结合糖蛋白。含P-选择蛋白的部分在Amicon Centriprep 30 中溶液到1.5-2 ml。

凝胶过滤层析法: 将从扁豆凝集素层析法获得的浓缩部分注入用pH 7.5, 20 mM Tris, 0.1 M氯化钠溶液平衡的Toso Haas G300 SW HPLC柱 (21.5 mm $\times$ 30 cm)。用同样的缓冲液以0.75 ml / 分的流速洗脱该柱。收集各部分 (1.5 ml); 并用Western杂交分析。合并含有P-选择蛋白的各部分, 在Amicon Centriprep 30 中浓缩到1.5-2 ml, 然后用20 mM Tris (pH 7.5) 换液几次。

肝素-琼脂糖层析法: 将溶于20 mM pH 7.5 的Tris 的样品置于1 ml 肝素-琼脂糖中, 用同一缓冲液洗柱, 并用含20 mM Tris, 1.5 mM氯化钠, pH 7.5 的缓冲液洗脱。

阴离子交换层析法: 被洗脱的部分在20 mM Tris, pH 7.5 的溶液中进行透析, 然后注入已用20 mM Tris, pH 7.5 溶液平衡的Toso Haas DEAE-5 PW柱 (7.5 mm $\times$ 7.5 cm), 用1 M氯化钠的盐梯度洗脱。合并含P-选择蛋白的各部分, 在Amicon Centriprep 30 中浓缩, 存于-80 $^{\circ}$ C。

阳离子交换层析法: 将样品在pH 7 的10 mM磷酸盐缓冲液中透析, 注入已被同一缓冲液平衡的Pors CM/P (4.6 / 100) 柱, 然后用达1 M

氯化钠的盐梯度洗脱。

C、新鲜的人血小板的分离和激活

血小板分离程序中使用的全部化学试剂均购自S i g m a 化学公司, S t . L o u i s , M O 。

1、从一志愿献血者身上用含7 ml 酸性柠檬酸盐葡萄糖抗凝血剂 (A C D) 的注射器抽取4 2 ml 血液。

A C D 抗凝血剂的制备物

葡萄糖	2 . 0 克
柠檬酸钠	2 . 4 9 克
柠檬酸	1 . 2 5 克

加蒸馏水至1 0 0 ml

2、拨下针头, 将血液移至两个无菌的5 0 ml 离心管中。

3、将离心管在配有一个9 2 1 转头 (半径为1 7 . 2 c m) 的离心机中室温下8 0 0 r p m (大约为9 0 ×g) 离心1 5 分钟, 不刹车。

4、将上清液用塑料移液管移出, 并尽可能取至凝血层。

5、将上清液1 2 0 r p m (大约3 0 0 ×g) 离心6 分钟。

6、移出上清液。

7、将上清液以2 0 0 0 r p m (大约1 2 0 0 ×g) 离心1 0 分钟, 血小板以细胞块形式出现在离心管底部, 弃掉上清液。

8、按如下方式洗涤血小板: 加入含有终浓度为1 0 0 m M 的前列腺素E 1 (P G E 1) 的2 ml p H

6.5 的Tyrode-Hepe s 缓冲液, 轻轻重悬血小板。再加入同样缓冲液10 ml, 将样品3000 rpm 离心10 分钟。

Tyrode-Hepe s 缓冲液的制备

NaCl	8.0 克
KCl	0.2 克
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.057 克
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.184 克
NaHCO ₃	0.1 克
葡萄糖	1.0 克
HEPES	2.383 克

加蒸馏水至1 升, 用1 N NaOH 将pH 值调至6.5。

9、重复第8 步, 然后用不含PGE₁ 的相同缓冲液洗涤一次血小板。

10、用Coulter 计数器计数血小板并稀释至 2×10^8 / ml。

11、将血小板悬浮液的pH 值调至7.2, 并确定达最大激活所要求的凝血酶(Human thrombin-Sigma) 的量。尽管存在一定量的供体变化, 但是最适激活通常在0.25 -0.5 单位/ml 的范围内获得。最大激活, 即最大的凝血酶诱导的凝集, 表现为与P-选择蛋白的最长表达相对应。

12、在血小板制备物中加入所要求的凝血酶量, 将混合物室温下放置20 分钟, 不搅拌, 以防止聚集。

实施例2

阻断性P - 选择蛋白抗体的制备

本实施例描述mu MAb PB1.3, 即抑制由凝血酶激活的血小板与嗜中性白细胞结合的P - 选择蛋白的单克隆抗体的制备。

用从J a c k s o n 实验受到获得的一只R B F / D n J 雄鼠作为抗体产生细胞的来源, 并按照以下程序进行免疫(所有注射均采用腹腔内注射)。

1、第一个月-200 μ l 含有大约 6×10^9 血小板的浓缩的“不新鲜血小板”。

2、第二个月-250 μ l 浓缩的“不新鲜血小板”(8×10^9 血小板)

3、第四个月-250 μ l 浓缩的“不新鲜血小板”(8×10^9 血小板)

4、第五个月-在扁豆凝集素上分离的P - 选择蛋白可溶性部分。

5、第六个月-通过扁豆凝集素、凝胶过滤、肝素-琼脂糖和离子交换层析法纯化的可溶性P - 选择蛋白。

免疫使用的所有制剂的详细制备过程可参见实施例1。

A、骨髓瘤融合细胞系:

FOX-NY, 腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (APRT) 和次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPR T) 缺陷的鼠骨髓瘤细胞系, 得自A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (CRL1732), 在含有10%胎牛血清 (Hyclone) 和1%L - 谷氨酰胺的RPMI 1640 中维持。

B、细胞融合程序

最后一次免疫注射四天后，将RBF / DnJ 雄鼠的脾摘除，分离得 1.2×10^8 个脾细胞。这些细胞按下面的程序用PEG 1500 (BMB) 与FOX - NY 骨髓瘤细胞融合：在无血清细胞培养液中洗涤分离出的脾细胞两次。脾细胞与骨髓瘤细胞以1 : 4 : 8 (骨髓瘤细胞：脾细胞) 的比例结合。在无血清培养液中洗涤结合后的细胞沉淀两次，然后通气致干。通过轻打并在37 °C水浴中加热一分钟以重悬细胞沉淀。沉淀分布在50 ml 圆锥形离心管的管壁和底部。在60秒内，边旋转以保持细胞薄层边加入1 ml 事先加热至37 °C的PEG 1500 (50 % w / v 在75 mM HEPES 中，BMB Lot # 14702800)。在60秒内缓慢加入1 ml 无血清培养液。稍快地加入另外1 ml 培养液。再加入8 ml 培养液，可将离心管放置8分钟，然后300 ×g 离心5分钟。将最终的沉淀重悬于含10 % 胎牛血清 (Hy clone)，1 % L - 谷氨酰胺，1 % 丙酮酸钠和1 × AAT (Sigma) 的RPMI 1640 中。将细胞加入10个平底96孔微量滴定板 (COSTAR) 中。不使用任何饲养细胞。

实施例3

非阻断性P - 选择蛋白抗体的制备

本实施例描述MAB PNB 1.6，即不抑制凝血酶激活的血小板与嗜中性白细胞结合的P - 选择蛋白的单克隆抗体的制备。

本实施例使用从J a c k s o n 实验室取得的一R

B F / D n J 雄鼠作为产生抗体的细胞来源，并按以下程序对其进行免疫（所有注射均为腹腔内注射）：

1、第一个月-1 0 0 μ l 凝血酶激活的新鲜分离出的血小板（大约为 3×10^8 个血小板）。

2、第二个月-2 0 0 μ l 凝血酶激活的新鲜血小板（ 6×10^9 个血小板）

3、第四个月-1 0 0 μ l 凝血酶激活的血小板（ 3×10^9 个血小板）

最后一次注射四天后，将脾摘出并分离得脾细胞。大致按照O i 等，“I m m u n o g l o b u l i n - P r o d u c i n g H y b r i d C e l l L i n e s ” i n S e l e c t e d M e t h o d s i n C e l l u l a r I m m u n o l o g y , M i s h e l l 和S h i i g i 编，p p 3 5 1 - 3 7 2 , 1 9 8 0 （在此以其全文作为本申请的参考资料）所述，使用P E G 1 5 0 0 （S i g m a ）将这些脾细胞与F O X - N Y 骨髓瘤细胞融合。

实施例4

筛选抗体

本实施例描述从实施例2 和实施例3 中产生的融合细胞上清培养液的筛选。实施例2 的上清培养液用E L I S A 试验测定：（a）凝血酶激活的血小板；（b）纯化的P - 选择蛋白和（c）重组P - 选择蛋白。实施例2 的上清培养液用E L I S A 试验测定凝血酶激活的血小板。下面分别叙述每一个试验。每一试验所用制剂的制备述于实施例1 中。

A、凝血酶激活的血小板

1、以100 μ ml / 孔加入明胶并在37 $^{\circ}$ C保温15分钟使96孔平底COSTAR滴定板被0.1%明胶(2%明胶-Sigma)包被。

2、去除明胶并在每孔中加入100 μ l 凝血酶激活的血小板(10^8 / ml)

3、滴定板在37 $^{\circ}$ C保温15分钟。

4、将滴定板800 rpm (90 $\times$ g) 离心2分钟。

5、去除未结合的血小板, 并用PBS洗涤滴定板两次。

6、每孔中加入含1%BSA的PBS 100 μ l, 可将滴定板室温放置60分钟。

7、每孔中加入100 μ l 上清液。将滴定板室温放于一摇床上60分钟。

8、用PBS洗涤滴定板4次。

9、每孔中加入100 μ l 在含1%BSA的PBS稀释至1/1000的过氧化物酶耦联的山羊抗鼠IgG, 可将滴定板室温放置30分钟。

10、用PBS洗涤滴定板7次。

11、每孔中加入100 μ l ABTS底物系统(Kirkegaard和Perry, Laboratories, Inc.)。

12、可使滴定板室温发育达30分钟之久。

13、在Titertek Multiskan MCC/340上测量414 nm处的OD值。

B、纯化的P-选择蛋白

1、经扁豆凝集素层析、凝胶过滤层析和DEAE柱层析分离的“可溶的”或“膜结合的”P-选择蛋白

在DPBS 磷酸盐缓冲液 (含CaCl₂ (1 mM) 和MgSO₄ (0.5 mM) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中稀释, 并在4 °C过夜以覆盖到Falcon 96 孔微量滴定板上。

2、用DPBS +1 %BSA 封阻滴定板1 小时或更长时间。

3、然后在孔中加入待检上清注, 室温培养30 - 60 分钟。

4、用DPBS 洗涤滴定板, 然后在孔中加入绵羊抗鼠IgG 的辣根过氧化物酶偶联物 (Sigma A-6782, DPBS +1 %BSA 中1 : 1000), 室温保温滴定板1 小时。

5、然后用DPBS 洗涤滴定板, 用TMB Microwell 底物系统 (Kierdegard 和Perry, Laboratories, Inc.) 进一步处理。

C. 重组P - 选择蛋白

1、用100 µl 已散布在用重组P - 选择蛋白基因转染的一293 个细胞克隆群的无血清培养液中的P - 选择蛋白4 °C过夜, 将96 孔平底滴定板覆盖。这一上清液中包含至少8 ng / ml 的P - 选择蛋白, 并覆盖于COSTAR 滴定板上 (不稀释或用培养液稀释1 : 8)。

2、用Dulbecco PBS (DPBS) 洗涤一次滴定板, 用200 µl 含1 %BSA 的DPBS 室温下封阻滴定板30 分钟。

3、然后按照A 部分 (第9 页) 第7 -13 步的程序处理滴定板以进行ELISA 检测。

D、抗P - 选择蛋白的m A B S 的同型分析

Mu MAb PB1.3 和Mu MAb PB1.6 的同型分析表明两个单克隆抗体均为鼠免疫球蛋白亚纲, I g G1, 同型分析使用Boehringer Mannheim Mouse-Hybridoma-Subtyping 的方法。

实施例5

P - 选择蛋白的检测

本实施例描述用Western 杂交法检测P - 选择蛋白。将含有P - 选择蛋白的样品与一等体积的SDS - PAGE 样品缓冲液 (非还原性的) 混合, 在100 °C加热。使之通过一Novex 8 - 16 %梯度的凝胶, 然后再通过电泳转移到硝酸纤维素膜上。然后在磷酸盐缓冲液 (PBS) + 1 %牛血清蛋白 (BSA) 中将硝酸纤维素膜封阻至少1 小时。然后将硝酸纤维素膜与来自表达适当的单克隆抗体的杂交瘤的组织培养液或者用在PBS + 1 %BSA中纯化的抗体 (5 μ g / ml) 一起室温保浊1 小时或更长时间。然后在PBS + 1 %BSA中洗涤硝酸纤维素膜若干次, 并与溶于PBS + 1 %BSA的经1 / 1000 稀释的绵羊抗鼠I g G的辣根过氧化物酶偶联物 (Sigma, A - 6782) 一起保温1 小时。然后洗涤此膜, 并用四甲基联苯胺/ 膜增强剂 (Kinkgaard 和Perry, Laboratories, Inc.) 显色染色带。

在产Mu MAb PB1.3 和Mu MAb PB1.6 的组织培养物上清液中检测到一分子量为140 kd 的蛋白。在被溶解的血小板膜和纯化的P - 选

择蛋白的制备物中均出现了此现象。

实施例6

阻断性P - 选择蛋白抗体在体内对急性发炎损伤的抑制

此实施例提供了证明本发明的阻断性P - 选择蛋白抗体具有治疗急性肺损伤的能力的数据。此实施例中，系统的补体激活是通过将眼镜蛇毒液因子（C V F）经血管注入鼠体产生的。在此模型中损伤发展迅速且已知依赖于嗜中性白细胞产生的有毒的氧产物。

为了进行这些研究，采用了述于实施例2 和实施例3 中的两个单克隆抗体。对本研究来说，极其重要的是阻断性P - 选择蛋白抗体Mu M A b P B 1 . 3 也抑制了凝血酶激活的鼠血小板对人嗜中性白细胞的吸附（图1 ）。这些资料暗示Mu M A b P B 1 . 3 可识别一保守的有功能的P - 选择蛋白抗原决定簇，也暗示了阻断性P - 选择蛋白抗体可能在治疗其它的发炎损伤上也是有用的。

为了进行这些体内实验，将C V F 以2 0 单位C V F / 千克体重静脉注入3 0 0 克的成年雄性L o n g - E v a n s 大鼠中。这导致了血液中的嗜中性白细胞在肺内和血管内的快速隔离，同时导致在内皮细胞和嗜中性白细胞的物理接触位点上发生中间毛细血管内皮细胞的损伤。使用时，将Mu M A b P B 1 . 3 和Mu M A b P B 1 . 6 以被指明的量与C V F 一起以0 . 5 m l 的总体积静脉注射。负对照的动物则静脉注入0 . 5 m l 磷酸盐缓冲液（P B S ）。在所有情形中，注入

物质也都含有痕量的O-125标记的牛血清白蛋白和同源的Cr-51标记的血红细胞(RBC)。30分钟后按Mulligan等, J. Clin Invest. 88: 1396 (1991)所确定的技术确定肺损伤的参数(白蛋白的泄露和RBC的外渗)。

这些实验的结果示于图2 A和2 B中。与未经自主蝗CVF正对照值相比, 200 μ g的PNB1.6 (非阻断性抗P-选择蛋白的抗体)与CVF的共同注射未能导致肺损伤的任何减轻。因此, 注射CVF和溶于PBS的PNB1.6的动物便被作为正对照。娄用100 μ g Mu MAb PB1.3抗体与CVF一起注射时, 通透性降低了19.2% ($p=0.02$), 出血降低了37.5% ($p=0.001$) (数据未列出)。当加入200 μ g Mu MAb PB1.3时, 通透性降低了50.8% ($P<0.001$) (图2 A), 出血分别降低了70.0% ($P<0.001$)和70.1% ($P<0.001$) (图2 B)。

来自动物伴组的肺经超声波匀浆, 测量髓过氧化物酶的活性(MPO)以估计肺中嗜中性白细胞的含量。通过按照标准程序(Warren等, J. Clin. Invest. 84: 1873 (1989))测量双氧水在邻联菌香胺存在下的分解可以确定MPO。如图3 A所示, 用100 μ g, 200 μ g或400 μ g Mu MAb PB1.3处理可使MPO含量分别比正对照组降低26% ($P=0.024$), 41% (≤ 0.001)和50% ($P<0.001$), 用200 μ g PNB1.6注射的动物中MPO含量没有降低(图3 A), 这与此抗体不能保护CVF诱导的肺损伤

相一致。因此，阻断性抗体Mu MA b PB 1 . 3 的保护作用是与其干扰嗜中性白细胞在肺组织中的聚集相关的。透射式电子显微镜对肺部的检查证实用Mu MA b PB 1 . 3 处理导致嗜中性白细胞在肺部中间毛细血管聚集的降低，嗜中性白细胞对内皮细胞吸附的减少和内皮细胞受损事实的减少（图3 B）。

为了检查C V F 静脉冲射后P - 选择蛋白在肺部的表达，将另一组大鼠用C V F 注射并在0 , 5 , 10 , 15 , 20 和60 分钟后杀死。用0 . C . T . 灌肺，快速冷冻，切片，并用Mu MA b PB 1 . 3 用免疫组织化学技术检测P - 选择蛋白的存在。在0 分钟时，肺部的血管结构中几乎没有可检测到的反应活性，而在5 分钟时有非常清楚的着色，在C V F 注射后的15 分和20 分着色进一步增强。着色模式涉及肺部小静脉和隔区，与中间毛细血管的着色模式一致。60 分钟时，着色基本消失（数据未列出）。虽然推测在C V F 注射前P - 选择蛋白存在于胞内的贮存颗粒中，但显然P - 选择蛋白向内皮表面的移动大大增强了其与Mu MA b PB 1 . 3 抗体的反应活性。

实施例7

竞争结合试验

从人血中分离血小板、用凝血酶激活被分离的血小板以及分离P M N S （嗜中性白细胞）的方法已述于上面的实施例1 中。

携带P - 选择蛋白的单克隆抗体的凝血酶激活的血小板的培养：

a 、向24 个E p p e n d o r f 离心管（1 . 5

ml) 中每个加入20 μ l 凝血酶激活的血小板 (2×10^8 / ml) 。

b、向其中8 只管中加入20 μ l 由P N B 1 . 6 纯化制得的溶于含1 mM Ca Cl₂ , pH 7 . 2 的Tyrode - HEPES 缓冲液中的浓度为10 μ g / ml 的Ig G 部分。向另外8 只管中加入20 μ l 浓度为1 μ g / ml 的相同的Ig G 制备物。向余下的8 只管中只加入20 μ l 缓冲液。

c、混合并在室温放置20 分钟。

d、向每8 只管中加入20 μ l 由Mu MAb P B 1 . 3 纯化制得的浓度为10 μ g / ml 到0 . 03 μ g / ml 的Ig G 部分。

e、混合，室温放置20 分钟。

f、加入20 μ g 浓度为 3×10^6 / ml 的嗜中性白细胞。

g、混合，室温放置20 分钟。

h、以如下方法在显微镜下估计吸附：每个样品计数100 个嗜中性白细胞。结合了两个或更多的血小板的细胞计为正，结合的血小板少于2 个的细胞计为负。计算正细胞的百分率。

如图1 所示，用Mu MAb P B 1 . 6 预处理凝血酶激活的血小板并不影响Mu MAb P B 1 . 3 阻断血小板在P - 选择蛋白介导下对嗜中性白细胞吸附的能力。

实施例8

阻断性P - 选择蛋白抗体的结合的说明

I、(a) 单克隆抗体的纯化: 通过将组织培养物上清液通过一蛋白质G琼脂糖4快流柱 (Pharmacia) 可分离制得单克隆抗体P NB 1. 6 和8 4 / 2 6。柱子要用磷酸缓冲液 (P B S) 充分冲洗, 用0. 1 M p H 2. 7 的甘氨酸-盐酸溶液将结合的抗体洗脱到装有0. 2 -0. 5 倍体积的p H 8. 8 的1 M T r i s 的管子中。用于分离Mu M A b P B 1. 3 的方法与此相同, 只是结合到Q蛋白上的抗体是用0. 1 M, p H 2. 5 的醋酸-盐酸洗脱到装有0. 3 倍体积的p H 1 0 的2 M T r i s 的管子中。合并含有各种成分的抗体, 并在4 °C下在P B S 中透析, P B S 要更换几次。

(b) mu M A b P B 1. 3 亲和柱的制备: 为了用于P-选择蛋白的纯化, 按照生产商的亲和指南 (S c h l i e c h e r 和S c h u e l l) 将mu M A b P B 1. 3 与t r e s y l 活化的琼脂糖相结合。

(c) P-选择蛋白的纯化: 向上述制得的洗过的不新鲜人血小板中加入1 % 体积的5 m g / m l 抑酶醛肽和1 % 体积的3 5 m g / m l 的A E B S F (C a l b i o c h e m) 混合后, 将血小板在干冰/ 甲醇浴中或液氮中冻融3 次, 用D o u n c e 匀浆器搅拌1 0 次, 用B e c k m a n 7 0 T I 转头4 °C, 3 5, 0 0 0 r p m 离心1 小时。沉淀重悬于D u l b e c c o 磷酸盐缓冲液 (D P B S, w h i t t a k e r B i o p r o d u c t s, 它包含约0. 9 μ M C a ⁺⁺ 和0. 5 m M M g ⁺⁺), 并加入5 m M 苯甲脒-盐酸, 1 0 0 m M 的抑酶醛肽和2 % 的T r i t o n x -1 0 0。

重悬悬液并用Duncce 匀浆器搅拌10次, 4℃保温1小时, 在Beckman 70TI 转头上4℃, 35,000rpm离心1小时。将上清液通过一已用DPBS + 0.05%Rennex 30 (Accurate Chemical and Scientific Corp.) 平衡的mu MAb PB1.3-琼脂糖柱。用DPBS + 0.05%Rennex 30 充分洗柱, 再用0.1M三乙基胺-盐酸, 0.05% Rennex 30, pH11.5的溶液将结合在柱上的P-选择蛋白洗脱到装有0.1倍体积的pH6.8的1M磷酸盐溶液的试管中。合并含P-选择蛋白的各部分洗脱物, 在DPBS + 0.05%Rennex 30 中透析, 用Centricon 30 或Centrprep 30 旋转浓缩仪 (Amicon) 浓缩, 分装, -80℃存放。

(d) 多肽CQNRVTDLVAIQNKNE (Cys-Glu-Asn-Arg-Tyr-Thr-Asp-Leu-Val-Ala-Glu-Asn-Lys-Asn-Glu-NH₂) 的制备:

用Fmoc保护的氨基酸和用于氨基酸激活的2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3,4-四甲基脲六氟磷酸酯在Applied Biosystems公司 (Foster City, CA) 的430A多肽合成仪上合成此肽。每个氨基酸一般都加倍结合。Fmoc保护的氨基酸和羟基苯并三唑购自Applied Biosystems公司。所有溶剂均购自Burdick和Jackson公司。HBTU购自Richelien Biotechnologies公司 (St. Hyacinthe, Canada)

， 哌啶和三氟乙酸， 乙酸酐， 苯甲硫醚， 苯酚和二硫乙烷购自Sigma公司。

将Fmoc-Amide树脂(Bachem Biosciences)放入多肽合成反应容器中， 并用N-甲基吡咯烷酮(NMP)洗涤一次。然后按下面操作顺序进行：

1、用溶于NMP的25%哌啶处理结合了氨基酸的树脂以除去Fmoc保护基团。

2、用NMP洗涤树脂五次。

3、向反应容器中加入含N- α -Fmoc-L-谷氨酸 γ -叔丁酯， 二异丙基乙胺， HBTU和NMP的混合物， 剧烈搅拌下反应30分钟。

4、排出溶剂， 用NMP洗涤树脂三次。

5、再重复做两遍第(3)、(4)步。

6、再用NMP洗涤树脂四次。

对多肽的每一氨基酸重复第1-6步。在最后一次偶联循环之后， 通过与在NMP中的25%哌啶反应与树脂结合的多肽被去保护， 用NMP洗涤此多肽七次， 用二氯甲烷洗涤两次。真空干燥此树脂24小时。通过用含2.5%二硫乙烷， 5%苯甲硫醚， 7.5%苯酚和5%水的三氟乙酸处理， 从此树脂中分出多肽。通过过滤从三氟乙酸溶液中分离出聚苯乙烯树脂。真空蒸发去除三氟乙酸。用二乙醚研磨粗肽， 并溶于水中。用冷冻干燥去除水。然后用乙腈、水(均含0.1% TFA作为调节剂)梯度通过C₈柱(VYDAC)上反相HPLC纯化多肽。

(e) 单克隆抗体的生物素标记

抗体在pH 8.5的0.1M NaHCO₃溶液

中透析。加入NHS -LC生物素 (P i e r c e) 至 0 . 3 m g / m l , 室温两小时后, 抗体在P B S 中透析并换液几次。

(f) 包被用于E L I S A 的微量滴定板: 以5 0 μ l / 孔加入溶于D P B S 的2 μ g / m l 经亲和纯化的P - 选择蛋白, 4 $^{\circ}$ C过夜, 包被9 6 孔微量滴定板 (F a l c o n M i c r o t e s t I I I) 。

(g) W e s t e r n 杂交: 当血小板被溶于S D S -P A G E 电泳缓冲液 (未还原), 进行S D S -P A G E 电泳并被转移到硝酸纤维素膜上时, μ M A b P B 1 . 3 , μ M A b P N B 1 . 6 和8 4 -2 6 全部与一个1 4 0 K D 的带结合 (数据未列出)。还发现当样品用 β - 巯基乙醇还原时, μ M A b P B 1 . 3 和 μ M A b P N B 1 . 6 在W e s t e r n 杂交法中不再识别P - 选择蛋白。

II、二价阳离子的螯合对单克隆抗体与P - 选择蛋白结合的作用:

用上述经亲和层析纯化的P - 选择蛋白包被两个微量滴定板。滴定板1 用2 0 0 μ l / 孔 P B S + 1 % B S A 阻断, 而滴定板2 用2 0 0 μ l / 孔D P B S + 1 % B S A (D P B S 含C a $^{++}$ 和M g $^{++}$) 阻断。1 小时后, 洗涤二滴定板 (滴定板1 用P B S 洗涤, 滴定板2 用D P B S 洗涤)。在滴定板1 的孔中加入2 5 μ l 含2 5 m M E D T A 的P B S + 1 % B S A 溶液, 在滴定板2 中加入2 5 μ l D P B S + 1 % B S A 。1 小时后, 两个滴定板的孔中分别加入2 5 μ l 的各种稀释度的适当抗体的溶液。对应滴定板1 的各种稀释用P

B S + 1 % B S A 完成, 对应滴定板2 的各种稀释用D P B S + 1 % B S A 完成。1 小时后, 洗涤两个滴定板, 加入5 0 μ l 1 / 1 0 0 0 稀释度的辣根过氧化物酶偶联的绵羊抗鼠I g G (滴定板1 的各种稀释用P B S + 1 % B S A 完成, 滴定板2 用D P B S + 1 % B S A 完成)。1 小时后, 洗涤两个滴定板, 加入5 0 μ l 过氧化物酶底物T M B (3 , 3 ' , 5 , 5 ' - 四甲基联苯胺, K i r k a g a a r d 和P e r r y L a b o r a t o r i e s , I n c .) 待颜色达适宜水平后, 通过加入2 5 μ l 1 M 的磷酸结束底物反应, 在4 5 0 n m 处读吸收值。

图4 显示了在含有C a ⁺⁺ 和Mg ⁺⁺ 的D P B S 缓冲液中和在P B S + 2 5 m M E D T A (一种二价金属阳离子螯合剂) 中, P - 选择蛋白单克隆抗体与P - 选择蛋白的结合。为支持嗜中性白细胞吸附到P - 选择蛋白上, D P B S 中二价阳离子浓度过量 (G e n g 等, 1 9 9 1) ; 而为阻断嗜中性白细胞吸附到P - 选择蛋白上, 2 5 m M 的螯合剂E D T A 过量。E D T A 的存在对所有单克隆抗体与P - 选择蛋白结合几乎没有影响, 这表明C a ⁺⁺ 对结合的发生不是必需的。m u M A b P B 1 . 3 是一种阻断性抗体, 这就是说, 它能阻断嗜中性白细胞与P - 选择蛋白 (如在激活的血小板上) 的结合。P N B 1 . 6 是另一种非阻断性抗体。8 4 / 2 6 阻断嗜中性白细胞与P - 选择蛋白结合的能力尚未被完全阐明。相对而言, 在G e n g 等所述的P - 选择蛋白单克隆抗体中, 只有非阻断性抗体S 1 2 在C a ⁺⁺ 不存在情况下能够结合。

Ⅲ、多肽CQNRVTDLVAIQNKNE对 μ MAb PB1.3 与P-选择蛋白结合的作用：用上述经亲和层析纯化的P-选择蛋白包被一个微量滴定板，用200 μ l / 孔DPBS + 1 %BSA阻断该滴定板1 小时，然后洗涤。各种稀释度的含 μ MAb PB1.3 的DPBS + 1 %BSA溶液与溶于PBS 的0.35 mg / ml CQNRVTDLVAIQNKNE混合，或作为对照只与PBS 混合。1 小时后，将50 μ l 每种稀释度的抗体加入微量滴定板中，并保温1 小时。用DPBS 洗涤滴定板，加入溶于DPBS + 1 %BSA 的稀释度为1 / 1000 的辣根过氧化物酶偶联的绵羊抗鼠IgG。1 小时后，洗涤滴定板，加入底物TMB，按如上所述终止显色反应并读吸收值。

图5 显示了当多肽浓度为0.35 mg / ml 时，与P-选择蛋白凝集素结构域的残基19-34 同源的多肽CQNRVTDLVAIQNKNE对 μ MAb PB1.3 与P-选择蛋白的结合没有影响。这一特点将这种特殊的单克隆抗体与单克隆抗体G1、G2 和G3 区别开来，这些单克隆体与P-选择蛋白的结合可被这一多肽部分或全部阻断。

Ⅳ、Cytel μ MAb PB1.3， μ MAb PNB1.6 和84 / 26 阻断彼此与P-选择蛋白结合的能力：用DPBS + 1 %BSA 阻断由经上述亲和层析纯化的P-选择蛋白包被的微量滴定板1 小时，然后洗涤滴定板。在适当的孔中加入25 μ l 溶于DPBS + 1 %BSA 的50 μ g / ml 的 μ MAb PB1.3， μ MAb PNB1.6 或8

4 / 2 6 溶液, 保温1 小时。然后, 加入2 5 μ l 生物素标记的抗体的D P B S + 1 % B S A 稀释液。滴定板在平台型摇床上保温1 小时。洗涤后, 加入5 0 μ l 1 / 1 0 0 0 稀释度的链亲和素-辣根过氧化物酶偶联物, 并保温1 小时。用D P B S 洗涤后, 如上所述用底物T M B 处理滴定板。

图6 显示了m u M A b P B 1 . 3 , m u M A b P N B 1 . 6 和8 4 / 2 6 干扰彼此与P - 选择蛋白结合的能力。图6 A 中显示出只有m u M A b P N B 1 . 6 能够阻断生物素标记的m u M A b P N B 1 . 6 与P - 选择蛋白的结合, 这表明m u M A b P B 1 . 3 和8 4 / 2 6 一定是识别与m u M A b P N B 1 . 6 不同的抗原决定簇。同样, 在图6 B 中, m u M A b P B 1 . 3 , 而不是m u M A b P N B 1 . 6 或8 4 / 2 6 , 能够阻断生物素标记的P B 1 . 3 与P - 选择蛋白的结合, 这表明其它两种单克隆抗体一定是识别不同的抗原决定簇。图6 C 中, m u M A b 8 4 / 2 6 和m u M A b P B 1 . 3 (但非m u M A b P N B 1 . 6) 均能阻断生物素标记的m u M A b 8 4 / 2 6 与P - 选择蛋白的结合。

V、阻断性P - 选择蛋白抗体不抑制凝血酶诱导的人血小板的凝聚: 本实施例表明P - 选择蛋白抗体, m u M A b P B 1 . 3 和P N B 1 . 6 不抑制血小板的凝血酶诱导的凝聚。按前述方法分离新鲜的人血小板, 并以 2×10^8 / ml 的浓度重悬于p H 7 . 2 的T y r o d e - H e p e s 缓冲液中。

血小板凝聚在L u m i 凝聚仪 (C h r o n o - L

o g C o r p .) 中完成。为此试验, 将0 . 4 5 m l 血小板悬浮液置于一个标准的硅化过的小杯中。在其中加入1 0 μ l 抗体或载体对照。5 分钟后, 3 7 $^{\circ}$ C下加入0 . 1 单位的凝血酶 (人的, S i g m a) , 并记录凝聚。

在对照条件下抗体不存在时, 测量血小板凝聚时, 获得了7 1 单位的凝聚反应。当来自产生mu MAb P B 1 . 3 抗体的细胞1 0 μ l 未稀释培养物上清液存在时, 获得了一个相同程度的凝聚 (图7) 。在血小板悬浮液中加入不同浓度的mu MAb P B 1 . 3 (1 -1 0 0 μ g / m l) 。在任何浓度的mu MAb P B 1 . 3 存在下, 血小板凝聚与抗体不存在时测定的反应均相同 (图7) 。

实施例9

阻断性P - 选择蛋白抗体mu MAb P B 1 . 3 在猫心肌局部缺血和再充血过程中的体内保护作用

按照T s a o 的方法 (C i r c u l a t i o n 8 2 : 1 4 0 2 -1 4 1 2 (1 9 9 0)) 用猫完成了心肌局部缺血和再充血损伤的模型。简而言之, 用戊巴比妥钠 (3 0 m g / k g) 麻醉雄猫 (2 . 5 -3 . 5 千克) 。通过中线切口插入一个气管内管子, 并通过一个H a r v a r d 小型动物呼吸器对所有猫实现间歇性正压通气。将一个聚乙烯导管插入外部的颈静脉, 右股静脉插管并与一个S t a t h a m P 2 3 A C 压力转换器连接以测量动脉血压。实施中线胸廓切开术, 将心包打开暴露心脏。用一个2 -0 丝线小心地围住距其起始点1 0 -1 2 m m 的左前方下行动脉 (L A D) 。稳

定30分钟后，通过完全捆住LAD，心肌局部缺血开始，1.5小时后，进行4.5小时的再充血。再充血开始前10分钟，进行剂量为1 mg / kg 的阻断性抗体 (mu MAb PB1.3) 和非阻断性抗体 (mu MAb PNB1.6) 的静脉内用药。将氮蓝四唑未着色的组织部分确定为局部缺血的心肌，并以危及面积的百分比来表示。在再充血末期将左前方下行动脉 (LAD) 重新闭合，通过向左心房注入E v a n s 蓝染料来确定危及面积。因此，危及面积是用负染色法确定的。

通过测量乙酰胆碱诱导的原先用凝血酶敏感素A2类的U46619收缩的环的舒张确定了冠状动脉环的内皮依赖舒张。实验数据以舒张百分比来表达。

用polytron匀浆的心肌组织的髓过氧化物酶活性测量了心肌中嗜中性白细胞的聚集。

这些实验的结果示于图8中。在用非阻断性P-选择蛋白抗体mu MAb PNB1.6处理的猫中，心肌局部缺血的范围为危及面积的 $33 \pm 5\%$ 。相对而言，在用mu MAb PB1.3处理的猫中，局部缺血的范围明显低于 ($p < 0.01$) 危及面积的 $15 \pm 5\%$ 。与mu MAb PNB1.6相比，从用mu MAb PB1.3处理的猫中取出的局部缺血再充血冠状动脉中，乙酰胆碱引起的内皮依赖舒张也明显被保护 ($67 \pm 6\%$ 对 $11 \pm 3\%$, $p < 0.01$)。与mu MAb PNB1.6处理的动物相比，用mu MAb PB1.3处理的动物中取出的心肌组织中PMN数量的明显减少 (136 ± 12 PMN / mm^2 对 64 ± 7 PMN / mm^2) ($p < 0.1$)，表

明这些现象可归因于心肌白细胞滤出的减少。

实施例10 P-选择蛋白人源化抗体的生产

A、 μ MA b PB1.3 可变区的克隆和测序

μ MA b PB1.3 的分离述于实施例2。将总RNA从产生 μ MA b PB1.3 的杂交瘤细胞中分离出来。编码 μ MA b PB1.3 的重链和轻链可变区的cDNA通过聚合酶链反应(PCR)得以扩增。利用在前导序列中杂交的简并引物和与v-c接合区附近的鼠恒定区杂交的单一引物的混合物扩增完整的鼠可变区。见Jones和Bending, Bio/Technology, 9: 88-89 (1991) 和Bio/Technology 9: 579 (1991)。将PCR片段克隆、测序。 μ MA b PB1.3 重链和轻链可变区的核苷酸序列和相应的氨基酸序列分别示于图9和图10。

B、 μ MA b PB1.3 可变区的结构模拟

建立一 μ MA b PB1.3 V_L 和 V_H 区的分子模型。此模型建立在一个在UNIX操作系统下运行并使用分子模拟包QUANTA (Polygen Corp. USA) 的Silicon Graphics IRI S 4D工作站上。 μ MA b PB1.3 可变区的氨基酸序列与结构已知的免疫球蛋白可变区序列进行了比较。见表1、2。

C、重构的 μ MA b PB1.3 可变区的设计

选择与在 μ MA b PB1.3 可变区发现的

构架区域极为相似的人可变区。选择人m A B D E N 轻链可变区和人m A b 2 1 / 2 8 ' C L 重链可变区作为构架区与相应的m u M A b P B 1 . 3 的互补决定区 (C D R) 连接。人构架区的修饰使用Monoclonal Antibodies, 2 : Applications in Clinical Oncology(Editor A. Epenetos: Chapman和Hall,1992, 在此以其全文作为本申请的参考资料; 尤其是, Bending等, The Humanization of Mouse Monoclonal Antibodies by CDR-Grafting: Examples with Anti-Viral and Anti-Tumor Cell Antibodies, 在此以其全文作为本申请的参考资料) 所述的方法。导致重构的人源化P B 1 . 3 可变区的设计的可变区氨基酸的对比示于表1 , 2 。

重链可变区的三个模本被模拟, 并被命名为C Y 1 7 4 8 R H _A, C Y 1 7 4 8 R H _B, 和C Y 1 7 4 8 R H _C。这些信号肽和可变区的核苷酸序列和相应的氨基酸序列分别示于图1 1 , 1 2 和1 3 中。C Y 1 7 4 8 R H _B 中, 在C Y 1 7 4 8 R H _A 中前两个保守鼠氨基酸残基 (谷氨酸和丙氨酸) 被重新变成在人F R 1 供体中发现的原来的人氨基酸 (谷氨酰胺和缬氨酸); 在C Y 1 7 4 8 R H _C 中, 计算机模拟表明7 3 位的鼠赖氨酸可能与C D R 2 中的第5 5 个残基 (天冬氨酸) 形成一个盐桥。若果真如此, 则赖氨酸将对H 2 环的稳定极为重要。此位上的人苏氨酸残基将不能形成这样一个盐桥。因此, 模本C Y 1 7 4 8 R H _C 在C Y 1 7 4 8 R H _A 的7 3 位上换用了鼠的赖氨酸, 模本C Y 1 7 4 8 R H _B 包含最高数目的人氨基酸残基。重链的这三个模本间的氨基酸差异总结于表3 中。

轻链可变区的四个模本被模拟，并被命名为CY1748RL_A，CY1748RL_B，CY1748RL_C，和CY1748RL_D。这些可变区和信号肽的核苷酸和氨基酸序列分别示于图14，15，16和17中。计算机模拟表明60位上的鼠谷氨酸残基在结合P-选择蛋白时有重要作用。此残基被掺入模本CY1748RL_A，但在模本CY1748RL_B中被原始的人构架的丝氨酸残基所取代。鼠天冬氨酸残基可能与环1（L1）上的24位残基有电荷相互作用，因此除了在70位上用鼠的天冬氨酸残基取代了人构架的谷氨酸残基外，CY1748RL_C是与CY1748RL_A完全相同的。CY1748RL_D将这两个氨基酸取代都含于其中，并是这四个模本中包含了最高数目的人氨基酸残基的模本。轻链的这四个模本间的氨基酸差异总结于表4。

D、将编重链和轻链可变区的cDNA亚克隆到表达载体上

(1) 表达载体的构建

(a) pHCMV-1748RL-KR-neo

此表达载体包含人细胞肥大病毒（HCMV）的增强子和启动子以驱动重组的免疫球蛋白轻链的转录，编码细菌neo基因的序列以在稳定转化中作为显性选择标记，以及SV40的复制起点以在cos细胞中产生高水平瞬时表达。为构建此载体，通过利用合适的寡核苷酸接头将一个来自包含HCMV的PstI-m片段的pUC8载体（Boshart et al.，Cell 41：521-530（1985））的

Hi n d Ⅲ - S a c Ⅱ 片段转换成 E c o R I - Hi n d Ⅲ 片段。在三片段连接反应中，含 HCMV 增强子 - 启动子的 1.2 kb 的 E c o R I - Hi n d Ⅲ 片段与来自 p S V 2 n e o 的 5.05 kb 的 B a m H I - E c o R I 片段 (S o u t h e r n a n d B e r g , J . M o l . A p p . G e n e r 1 : 3 2 7 - 3 4 1 (1982)) 和含 V_L l y s k a p p a 轻链可变区的 0.5 kb 的 Hi n d Ⅲ - B a m H I 片段 (F o o t e a n d W i n t e r , J . M o l . B i o l . 2 2 4 : 4 8 7 - 4 9 9 (1992)) 相连接。在此之前，p S V 2 - n e o 中的 Hi n d Ⅲ 切点已经 K l e n o w 聚合酶补平去掉，形成了命名为 p H C M V - V_L l y s - n e o 的质粒。

一个 2.6 kb 的基因组人 k a p p a 区片段已被克隆 (R a b b i t t s 等, C u r r . T o p . M i c r o b i o l . I m m u n o . 1 1 3 : 1 6 6 - 1 7 1 (1984)) 并亚克隆到名为 p U C K R 1 7 的 p U C 载体上 (M e n g l e - G a w , E M B O J . 6 : 1 9 5 9 - 1 9 6 5 (1987))。利用 E c o R I - B a m H I 接头将 B a m H I 切点加到此片段的两端，然后将此片段以适当方向插入 p H C M V - V_L l y s - n e o 的 B a m H I 位点，以产生质粒 p H C M V - V_L l y s - K R - n e o。为了便于重构的人可变区的插入，用 K l e n o w 聚合酶补平除去了人 k a p p a 恒定区 3' 侧的 B a m H I 位点。在形成的命名为 p H C M V - 1 7 4 8 R L - K R - n e o 的质粒中，含 V_L l y s 的 Hi n d Ⅲ - B a m H I 片段很容易地为一重构的抗体的 V_L 所取代。

(b) p HCMV -1 7 4 8 - γ 1 C -neo

此载体的构建过程始于与上述构建p HCMV -V_L l y s -neo 相同的三片段连接, 只是用0.7 kb 的含V_H l y s 重链可变区的Hind III -BamHI 片段 (Verhoeven 等, Science 239: 1534-1536 (1988)) 取代了0.5 kb 的含V_L l y s k a p p a 轻链的Hind III -BamHI 片段。编码人 γ 1 恒定区的cDNA 经PCR 扩增从分泌人 γ 1 抗体的人细胞株中克隆到。在此cDNA 的两端构建出了BamHI 位点, 且拼接受体位点和65 bp 的内含子序列被导入了此cDNA 的5'-末端。然后将包含人 γ 1 cDNA 及拼接受体位点和内含子序列的BamHI 片段 (1176 bp) 克隆到表达载体上。当用轻链表达载体时, 人 γ 1 恒定区的3'侧的BamHI 切点被Klenow 聚合酶补平除去。利用此命名为p HCMV -1 7 4 8 - γ 1 C -neo 的载体, 含不想要的V_H l y s 的 Hind III -BamHI 片段可容易地用重构抗体的V_H 取代。

(2) 免疫球蛋白编码序列的插入

通过标准技术将编码mu Ma b PB1.3 的重链可变区和三个人源化模本的cDNA 插入了表达载体HCMV - γ 1 C -neo 中, 得到表达质粒HCMV -1 7 4 7 CH - γ 1 C -neo、HCMV -1 7 4 8 RH_A - γ 1 C -neo、HCMV -1 7 4 8 RH_B - γ 1 C -neo 和HCMV -1 7 4 8 RH_C - γ 1 C -neo。人IgG₁ 恒定区cDNA 的核苷酸

序列及相应的蛋白质序列见Et l i s o n 等, N r c . A c i d s . R e s . , 1 0 : 4 0 7 1 - 4 0 7 9 (1 9 8 2) 。将编码C Y 1 7 4 7 (P B . 3) 的轻链可变区和四个人源化的模本的c D N A 插入到表达载体H C M V - K R - n e o 上, 得到质粒H C M V - 1 7 4 7 C L - K R - n e o , H C M V - 1 7 4 8 R L _A - K R - n e o 等。人k a p p a 恒定区基因的核苷酸序列和相应的蛋白质序列见H i e t e r 等, C e l l

2 2 : 1 7 9 - 2 0 7 (1 9 8 0) (在此以其全文作为本申请的参考资料)。重链和轻链表达载体的简图见图1 8 和1 9 。通过适当组合的重链和轻链的共表达, 几种抗体可被表达出来。如H C M V - 1 7 4 8 R H _A - γ 1 C - n e o 和H C M V - 1 7 4 8 R H _B - γ 1 C - n e o 的共表达会产生重构的M A b P B 1 . 3

(H_A / L_A) , H C M V - 1 7 4 7 C H - γ 1 C - n e o 和H C M V - 1 7 4 7 C L - K R - n e o 的共表达会产生c h i M A b P B 1 . 3 (即包含鼠可变区和人可变区的嵌合抗体) 。

E . C O S 细胞的电穿孔转化

为瞬时表达c h i M A b P B 1 . 3 和M A b P B 1 . 3 抗体的各种重构的模本, 在C O S 细胞中检测上述D N A 构建物。用G e n e P u l s e r 仪 (B i o r a d) 以电穿孔法将D N A 导入C O S 细胞中。将C O S 细胞用胰酶消化并在磷酸盐缓冲液 (P B S) 中洗一次。将D N A (重链质粒和轻链质粒1 0 μ g) 和0 . 8 m l 的悬于P B S 中浓度为1 $\times$ 1 0 ⁷ 细胞/ m l 的细胞放入无菌的基因脉冲小杯 (B i o r a

d, 0.4 cm 缝宽) 中, 以1900 伏, 25 微法的电容发射一脉冲。室温下经过10 分钟的回复期后, 向其中加入20 ml 含10 % 胎牛血清的DME M培养液 (GIBCO / BRL)。保温48 小时, 收集培养液, 离心除去细胞碎片, 在无菌条件下短时间内存放于4 °C。

实施例1 1 人源化抗体的分析

用ELISA 测定此转染的COS 细胞培养液以定量化所产生的人抗体的水平并分析与重组的可溶性P - 选择蛋白 (rs P - 选择蛋白) 的结合能力。以每孔100 μ l 终浓度为12.5 μ g / ml 的山羊抗人IgG (完整分子, Sigma #I -1886) 溶液 (DPBS) 或在Dulbecco 磷酸盐缓冲液 (DPBS) 中稀释了的rs P - 选择蛋白溶液 (1.2 mg / ml) 包被免疫微量滴定板 (Dynatech, #011-101-3355), 4 °C过夜或37 °C2 小时包被。用DPBS 洗板三次, 然后用DPBS +1 %牛血清白蛋白 (BSA, Sigma, #A-7888) 以400 μ l / 孔在室温下阻断滴定板1 个小时或更长时间。然后用DPBS 洗三次。

将在DPBS +1 %BSA 中连续稀释的单克隆抗体加入到滴定板中 (100 μ l / 孔), 室温保温1 小时。然后用DPBS 洗三次。将在DPBS +1 %BSA 中稀释到1 : 1000 的第二抗体 (山羊抗人IgG 的过氧化物酶偶联物, Sigma #A-8867) 以100 μ l / 孔加入滴定板中, 室温保温1 小时。然后用DPBS 洗三次。将四甲基联苯胺过氧化物酶底物 / H₂O₂ (TMB, Kirkegaard 和Per

r y 实验室, # 5 0 - 7 6 - 0 0) 以 1 0 0 μ l / 孔加入滴定板中, 经过适当的时间进行显色 (一般为 3 - 1 5 分钟), 向每孔加入 1 0 0 μ l 1 M 磷酸以终止反应。在 T i t e r t e k M u l t i s k a n M C C / 3 4 0 上读取 4 5 0 n m 处的吸收值。

通过将 I g G 的 E L I S A 结果与已知浓度的人 I g G 1 抗体 (k a p p a 轻链, S i g m a # I - 3 8 8 9) 相比, 确定所有 C O S 细胞上清液中的抗体浓度。

P - 选择蛋白的结合以光密度值比 I g G 浓度的形式来表达。c h i P B 1 . 3 和重构的 M A b P B 1 . 3 的各种重构的模本结合曲线示于图 2 0 , 2 1 和 2 2 中。目的是要选出一具有基本上与 c h i M A b

P B 1 . 3 不可区分的结合特性的人源化抗体。如果不止一个人源化抗体有如此特性, 则以含有最多人氨基酸残基 (或最少的鼠氨基酸) 的那个为优选, 因为此模本在临床应用上最不可能引起 H A M A 反应。与重链 C Y 1 7 4 8 R H Δ 共表达的四个重构的轻链都产生了可与 r s P - 选择蛋白和 c h i M A b 1 . 3 结合的抗体。其中轻链可变区 C Y 1 7 4 8 L R Δ 被选出来做进一步实验, 因为它含有最多人氨基酸残基。当与轻链可变区 C Y 1 7 4 8 R L Δ 和 C Y 1 7 4 8 R L Δ 共表达时, 重链可变区 C Y 1 7 4 8 R H Δ 和 C Y 1 7 4 8 R H Δ 也产生了可以与 c h i M A b P B 1 . 3 相同程度的结合 r s P - 选择蛋白的抗体 (图 2 2)。这些重链中, 优选的是重链 C Y 1 7 4 8 R H Δ , 因为它含有最多人氨基酸残基。因此, 从轻链 D 和重链 B 出发构建了一优选的人源化抗体, 命名为 M A b P B 1 .

3 (H_B / L_D) 。

实施例1 2 重构的MAb PB1. 3 (H_B/ L_D) 在CHO细胞中的稳定表达

A、将人源化的免疫球蛋白链导入CHO细胞

(1) 载体的构建

(a) p HCMV -1 7 4 8 RH - γ 1 C -d h f r

此载体与述于实施例1 1 中的p HCMY -1 7 4 8 RH - γ 1 C -neo 相同, 只是用连接到一缺陷的SV40 启动子-增强子序列的二氢叶酸还原酶基因 (d h r f) 取代了neo 基因。为了从SV40 早期启动子中去掉增强子序列, 将p SV2 -d h f r (S u b r a m a n i 等, Mol . Cell . Biol . 1 : 8 5 4 -8 6 4 (1 9 8 1)) 的质粒DNA用S p h I 和P v u II 消化, K l e n o w 聚合酶补平, 并自连以得到p SV2 -d h f r - Δ E。用E c o R I 从质粒p HCMV -V_Hl y s - γ 1 -neo 上切下一包含HCMV 启动子, V_Hl y s 重链可变区和人 γ 1 恒定区的基因组DNA克隆的3 . 7 k b E c o R I 片段。将此片段连接到E c o R I 消化的p SV2 -d h f r - Δ E 质粒上以产生p HCMV -V_Hl y s - γ 1 -d h f r。用述于实施例1 1 的含人 γ 1 恒定区的c DNA 克隆的B a m H I 片段取代 γ 1 恒定区的基因组克隆。然后象实施例1 1 中一样, 人 γ 1 恒定区的3' 侧的B a m H I 位点通过用K l e n o w 聚合酶补平以除去。形成的质粒命名为p HCMV -1 7 4 RH - γ

C - d h f r 。载体中含不想要的V_H l y s 的H i n d Ⅲ - B a m H I 片段很容易地用一重构的抗体的V_H取代。

(b) p H C M V - 1 7 4 8 R H - γ 4 - d h f r

此载体与上述p H C M V - 1 7 4 8 R H - γ 1 C - d h f r 相同, 只是用人 γ 4 恒定区的基因组克隆取代了人 γ 1 恒定区的c D N A 克隆。为构建此载体, 将一含人 γ 4 恒定区基因组克隆的7 . 0 k b 的D N A 片段 (B r u g g e m a n 等, J . E x p . M e d . 1 6 6 : 1 3 5 1 - 1 3 6 1 (1 9 8 7)) 亚克隆到p U C 1 9 的H i n d Ⅲ位点以产生质粒4 2 8 D。因为人 γ 4 片段已在3'端有一B a m H I 位点, 故此亚克隆以使此位点位于p U C 1 9 的多酶接头的B a m H I 位点的远侧的方向插入p U C 1 9。用B a m H I 将此7 . 0 k b 的人 γ 4 片段从4 2 8 D上切下, 连入p H C M V - V_H l y s - n e o 以产生质粒p H C M V - V_H l y s - γ 4 - n e o。

将一个含H C M V 增强子 - 启动子和p S V 2 - d h f r - Δ E 质粒序列的5 . 4 k b 的B a m H I - H i n d Ⅲ片段, 一个0 . 5 k b 的含重构的人1 7 4 8 抗体的V_H的H i n d Ⅲ - B a m H I 片段和此7 . 0 k b 的含人 γ 4 恒定区基因组克隆的B a m H I - B a m H I 片段经过一个三片段连接反应, 构建出目的质粒。

(2) 免疫球蛋白编码序列的插入

将编码1 7 4 8 R H Δ 重链可变区的c D N A 克隆到表达载体H C M V - 1 C - d h f r 上, 得到质粒H

CMV-1748RH_A-1C-dhfr。将编码1748RH_B的cDNA克隆到表达载体HCMV-1C-dhfr和HCMV-4C-dhfr上,分别得到质粒HCMV-1748RH_B-1C-dhfr和HCMV-1748RH_B-4C-dhfr。人IgG4恒定区基因的核苷酸序列和相应的氨基酸序列见Ellison等, DNA, 1:11-18 (1981)。当与kappa轻链载体共表达时,载体HCMV-1C-dhfr表达IgG1型抗体,载体HCMV-γ4C-dhfr表达IgG4型抗体。dhfr表达载体的简图分别示于图23和24。

在αMEM (+核苷酸, GIBCO/BRL) 和10%胎牛血清中培养dhfr缺陷的CHO细胞。用电穿孔的方法利用Gene Pulser仪将质粒DNA导入CHO细胞。用胰酶消化CHO细胞并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗一次。将DNA(每个重链质粒和适当的轻链质粒10 μg)和一份0.8 ml的悬于PBS中的浓度为 1×10^7 细胞/ml的细胞放入一无菌的Gene Pulser小杯中(0.4 cm的裂缝)。以1900伏, 25微法电容发射一脉冲。室温回复10分钟, 将电穿孔的细胞加入到20 ml αEM (+核苷酸) / 10%PBS中。培养24-48小时后用胰酶消化细胞, 铺入含αMEM (+核苷酸) / 10%透析过的PBS (以选择含dhfr质粒的表达) 并补加了500 μg/ml G418 (GIBCO/BRL, 以选择含neo质粒的表达) 的100 mm培养皿中。每3-4天换液一次直至克隆出现。用克隆圆筒分离单克隆, 扩增, 并用ELISA分析IgG

的产量。

有三组DNA被导入CHO dhfr 缺陷的细胞:
1) HCMV-1748 RH_A-γ1C-dhfr 和 HCMV-1748 RL_A-KR-neo, 表达重构的IgG1型的MAb PB1.3 (H_A/L_A);
2) HCMV-1748 RH_B-γ1C-dhfr 和 HCMV-1748 RL_B-KR-neo, 表达重构的IgG1型的MAb PB1.3 (H_B/L_B);
和3) HCMV-1748 RH_B-γ4C-dhfr 和 HCMV-1748 RL_B-KR-neo, 表达重构的IgG4型的MAb PB1.3 (H_B/L_B)。

扩增CHO细胞并种入10室(总表面积6000 cm²) Nunc 细胞工厂中。72小时后收集培养液, 并使之通过蛋白质A琼脂糖快流柱(Pharmacia)。洗柱, 并在pH4.5洗脱牛IgG。在pH3.5洗脱人源化抗体, 在PBS或20mM醋酸, 0.15M NaCl, pH5.5的溶液中透析。用分光光度法测定抗体浓度并用人IgG ELISA实验证实。

(纯化的人IgG4抗体(kappa, Sigma #I-4639)被用为IgG4型的mu MAb PB1.3 (H_B/L_B)的对照。)用SDS-PAGE确证纯度。

B、竞争结合试验:

用竞争ELISA试验测量了重构的MAb PB1.3的各种模本对P-选择蛋白的相对结合亲和力。试验测量了将标记的mu MAb PB1.3与P-选择蛋白的结合抑制50%时未标记的抗体的浓度。

将2 ml 纯化的MAb PB1.3 (1 mg / ml) 与100.8 μ l NHS-LC-生物素 (1 mg / ml, Pierce) 混合, 4 °C过夜。将2.1 ml 样品上NAP25柱 (size exclusion 柱, Pharmacia)。用PBS 每0.3 ml 组分洗脱此柱, 在280 nm 计数每组分的吸收值。合并有最高O.D. 280 nm 的各组分。用此生物素标记的MAb PB1.3 滴定rsP-选择蛋白以选出用于竞争结合试验的合适浓度。

以50 μ l / 孔的rsP-选择蛋白 (在DPBS 中稀释至2 μ g / ml) 包被96孔板, 4 °C过夜或37 °C, 90分钟。将板倒置并取出残余的液体。

以200 μ l / 孔的DPBS + 1 %牛血清白蛋白 (BSA, Sigma #A-7888) 阻断此被包被的板和另外一空白板, 室温1小时。倒置空白板并取出残液。在稀释抗体期间使rsP-选择蛋白包被的板继续阻断, 将 (在DPBS + 1 %BSA中) 连续稀释了的样品抗体以50 μ l / 孔加入空白板, 这些抗体的初始浓度为100 μ g / ml。将生物素标记的PB1.3 (在DPBS + 1 %BSA中稀释至0.3 μ g / ml) 以50 μ l / 孔加入空白板的样品抗体中, 吹吸混合。将rsP-选择蛋白包被的板用DPBS 洗三次。将样品抗体/ 生物素标记的PB1.3 混合物吸入rsP-选择蛋白包被的板中, 50 μ l / 孔, 室温保温1小时, 然后用DPBS 洗三次。

向板中以50 μ l / 孔加入在DPBS + 1 %BSA 中稀释至1 : 2000 的链亲和素辣根过氧化物酶偶联物 (Pierce #21124), 室温温育1小

时。然后用DPBS洗板三次。

将四甲基联苯胺过氧化物酶底物/ H_2O_2 (TMB, Kirkegaard 和Perry Laboratories #50-76-00) 以 $50\ \mu\text{l}$ /孔加入板中, 经适当时间 (通常3-10分钟) 显色, 以 $50\ \mu\text{l}$ /孔加入1 M磷酸以终止反应。在Titertek Multiskan MCC/340上读取450 nm处的吸收值。

表观结合亲和力以光密度为450 nm处的最大光密度的二分之一时与rsP-选择蛋白结合的抗体的浓度来表示。在二分之一最大结合处的样品抗体的浓度与对照抗体 (未标记的PB1.3) 的浓度之比用于估计被测抗体对rsP-选择蛋白的相对结合亲和力。

两个典型竞争结合实验的结果示于图25和26中。在第一个实验中, 将标记的PB1.3的结合抑制到最大值的50%时所需要的重构的IgG1型MAb PB1.3 (H_AL_A) ($2.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 是PB1.3 ($1.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 的两倍。因此, 此人源化抗体能结合rsP-选择蛋白的50%和PB1.3。与此相似, 在第二个实验中, PB1.3 / (H_BL_D) (IgG4型) 能结合rsP-选择蛋白的50%和PB1.3。

实施例13 用DHFR扩增提高CHO细胞中的抗体产量

将CHO细胞铺入培养瓶并在换液前长至会合 (T-25 cm^2 的瓶中加入8 ml 或T-75 cm^2 的瓶中加入20 ml)。培养48-72小时后收集培养液,

并用E L I S A 测定I g G 的产量。用胰酶消化细胞并计数。以2 4 小时内每百万细胞所分泌的抗体的微克数来表达抗体的产率。

将3 到6 个产量最高的克隆分开扩增, 将剩余的7 个最好的合并扩增。以 1×10^5 细胞/ 1 0 0 m m 皿的浓度将细胞铺入含选择培养基的培养皿中。在第一轮扩增中, 将细胞铺入含 α M E M (-核苷酸) / 1 0 % 透析过的F B S 并补加了 $500 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的G 4 1 8 和1 0 , 2 0 或5 0 n M 氨甲喋呤 (S i g m a # A 0 - 6 7 7 0) 的三套培养皿中。每四天换液一次。在1 0 - 1 4 天时用克隆园筒分离单克隆, 扩增, 并用E L I S A 测定I g G 的产量。另外几轮的扩增是针对各单克隆或克隆合并物进行的, 氨甲喋呤的浓度为其起始浓度的5 - 1 0 倍。

表5 总结了表达P B 1 . 3 的三个人源化模本的C H O 细胞的抗体产量。一个被扩增的表达重构的M A b

P B 1 . 3 (H B L D) (I g G 4 型) 的细胞克隆选自表达量低于 $0.2 \mu\text{g} / 10^6$ 细胞/ 天的克隆合并物, 在第一轮中扩增到 $2.0 \mu\text{g} / 10^6$ 细胞/ 天, 在第三轮后达到 $33.0 \mu\text{g} / 10^6$ 细胞/ 天。选择此克隆进行培养以大规模生产重构的 M A b P B 1 . 3 。

实施例1 4 生物反应器的运转

将1 6 0 g 胶原蛋白包被的微载体珠 (1 5 0 - 2 0 0 微米, J R H B i o s c i e n c e s # 6 0 1 4 2 - 1 0 0) 在8 0 0 m l 无菌水中水合3 0 分钟, 将水慢慢倒出。将珠子重悬于8 0 0 m l 水中, 高压灭

菌30分钟。冷至室温后，用无菌的无血清 α MEM（-核苷酸）洗两次，重悬于1升 α MEM（-核苷酸）/5%透析过的FBS完全培养基中。

以 3.3×10^6 μ g / 10^6 细胞/天的速率表达重构的MAb PB1.3 (H₂L₂) (IgG4型)的细胞株CHO-48B4被扩展到36个含 α MEM（-核苷酸）/10%透析过的FBS / 500 nM氨甲喋呤的T-225 cm² 培养瓶中。当细胞长至会合时，用胰酶消化并以 $5.0 - 8.0 \times 10^4$ 细胞/ml的终浓度重悬于2升完全培养液中（无氨甲喋呤）。

通过无菌操作将1升珠子，2升细胞悬浮物和2升新鲜的完全培养液加入Proteus 2000生物反应器（Wheaton）的灭过菌的10升容器中。用空气和5%CO₂对上部空间连续灌气。为使细胞吸附到微载体上，对Proteus编程，使之以70 rpm搅拌细胞/微载体悬浮物一分钟，然后0 rpm，59分钟。48次循环后，向反应器中加入5升培养液。将反应器编程，使悬浮物维持在37℃，pH 7.0，并以空气中的氧的30%溶氧，以50 rpm连续搅拌。

3天后对反应器编程使之以5升/天的速度更换完全培养液，用一重力滤器接在收集口处（以使微载体留在反应器内），收集的培养液存于4℃，备用。生物反应器运转5-7天，直至积累的细胞碎片使培养液收集物变模糊（起因于通气破坏）。

将培养液收集物通过Millipak-600.45微米的滤器（Millipore）以澄清。将20升过滤后的上清液以0.55升/小时的流速通过一蛋白质A琼脂糖快流柱（ 2.5×12 cm）（Pha

r m a c i a) , 用1 . 5 升P B S (B i o w h i t t a k e r , # 1 7 - 5 1 6 Y) 洗柱。然后用8 × 4 0 m l p H 4 . 5 的0 . 2 M 乙酸钠预洗脱, 用8 × 4 0 m l p H 3 . 5 的0 . 2 M 甘氨酸, 0 . 5 M N a C l 溶液洗脱, 二者都洗入装有1 0 m l p H 8 . 0 的2 M T r i s - H C l 的管中。将在2 8 0 n m 有最大吸收值的单一组分在p H 5 . 5 的2 0 m M 乙酸, 0 . 1 5 M N a C l 溶液中透析, 于4 °C 贮存。

在5 - 7 天中, 每天可收集2 0 0 m g 抗体。纯化产率约为5 0 % , 因此生物反应器一次可生产5 0 0 - 7 0 0 m g 纯化抗体。

实施例1 5 m u M A b P B 1 . 3 对兔耳重植后由局部缺血再充血引起的损伤的作用

用氯胺酮和甲苯噻嗪合剂麻醉一些纽西兰兔, 然后用利多卡因渗透耳朵根部。将左耳部分切除, 余下完整的中央动脉、中央静脉和一软骨桥。切断所有的神经以使耳朵完全麻木。然后把耳朵重新贴上, 用一小血管钳夹住动脉以使完全局部缺血。将这些兔子放在维持在2 3 . 5 °C 的房间中, 6 小时, 然后移去小血管钳, 使耳朵再充血。在再充血以前用m u M A b P B 1 . 3

(2 m g / k g) 或盐水或同型 (I g G 1) 的称为P N B 1 . 6 的鼠单克隆抗体 (2 m g / k g) 进行处理。通过排水量连续7 天每天测量耳朵的容积以定量化组织水肿。第七天以总表面积的百分率来估计坏死。

再充血后在用盐水或P N B 1 . 6 处理的对照动物中, 耳朵容积有明显增大 (图2 7) 。由于未发现这两个对照组有差异所以合并了它们的数据。在用M A b

P B 1 . 3 处理的动物中水肿也增大了, 但增大的程度在所测的所有时间点上都明显低于对照组。在用 m u M A b P B 1 . 3 处理的动物中, 第七天所测得的坏死程度也明显低于对照组 (图 2 8) 。

因此, 随后又再充血的重植兔耳的局部缺血首先导致了水肿反应, 然后是广泛的组织坏死, 在用 P - 选择蛋白抗体 m u M A b P B 1 . 3 预处理的动物中这两种组织损伤现象大体上明显降低了。

实施例 1 6

m u M A b P B 1 . 3 对狗骨骼肌局部缺血再充血后血管开放作用

本实验利用了一个分离的狗股薄肌局部缺血再充血的模型。再充血损伤的一个特点是所谓的“不复流”现象, 即经过原来局部缺血组织的微循环的血流在再充血后未出现或严重减少。

如原先所述 (C a r d e n 等, C i r c . R e s . 6 6 : 1 4 3 6 - 1 4 4 4 (1 9 9 0)) , 本实验利用了一个分离出的狗股薄肌肌肉。简单说来, 将成年杂种狗用戊巴比妥钠麻醉, 切开放薄肌上的皮肤, 经钝解剖将肌肉与其周围组织分开, 切断闭孔肌神经, 向近端臀动脉和臀静脉中插入插管并捆住其它所有的并行血管, 将股动脉插管连到一恒流充血泵上, 从股静脉流出的血排入一再充血储存器中, 经由侧枝检测动脉和静脉压, 调整血流将充血压力维持在 1 0 0 m m 汞柱, 若关掉充血泵时动脉充血压力降至低于 2 0 m m 汞柱, 则可认为血管的分离是彻底的。

通过在实验程序结束时向分离的股薄肌肌肉中灌注

对比介质（墨汁）以估计微血管的开放。将分离出的狗股薄肌肌肉连续充血4 . 5 小时，或先局部缺血4 小时再充血0 . 5 小时或先局部缺血4 小时再在P - 选择蛋白抗体m u M A b P B 1 . 3 以4 0 μ g / ml 存在于灌注液中再充血0 . 5 小时。然后用计算机控制的图象成像定量这些股薄肌肌肉的组织切片中每个肌纤维中含墨水的微血管（直径< 1 0 μ m）的数目。

在对照动物中，局部缺血再充血方法将开放的微血管数降低至3 6 $\pm$ 3 %。当m u M A b P B 1 . 3 被加入到灌注液中时，局部缺血再充血后开放的微血管数是对照组的1 1 9 $\pm$ 1 8 %。

因此，以开放微血管数而言，P - 选择蛋白抗体m u M A b P B 1 . 3 在局部缺血再充血的狗股薄肌肌肉中完全防止了“不复流”现象的发生。

实施例1 7

m u M A b P B 1 . 3 对由组织肥大细胞脱粒诱导的白细胞与内皮细胞相互作用的影响

I 、方法

a) 活体体内显微镜检术

雄性Wi s t a r 鼠 (2 0 0 - 2 5 0 克) 购自H a r l a n S p r a g u e D a w l e y , I n d i a n a p o l i s , 在手术前禁食1 2 - 2 4 小时。通过肌肉内注射氯胺酮/ 甲苯噻嗪/ 乙酰丙嗪进行手术麻醉。在左颈脉静脉内放入一个导管，并实施胸廓切开术以便于自发呼吸。去毛并清洗腹部，沿中线切入腹腔，切口3 / 4 英寸长，注意避免任何出血。将鼠放于专为活体体内显微镜检术而设计的显微镜镜台上。将管化好

的回肠后环拉出，将肠系膜覆盖在加热到 37°C 的观察基座上。整个实验中，用加热的碳酸氢盐缓冲液（ 37°C ， $\text{pH}7.4$ ）以 $2\text{ ml} / \text{分}$ 的速度使肠系膜过冷。另外，将若干片小的Saran-Wrap保鲜膜（事先在酒精中浸泡并用盐水冲洗）放于回肠和观察区域周围的肠系膜区域上以保持这些区域湿润。用配有 $10\times$ 目镜和 $20\times$ 物镜（水浸；镜口率为 0.4 ）的活体显微镜（Mikron Instruments, San Diego）观察微循环床。包括一个装于显微镜上的图象摄影机（Hitachi 彩色CCD），一个VCR（Sony SVO-9500MD）和一个探测器（Sony Trinitron）的高分辨系统使显微镜图像得以记录。在每个肠系膜制备物中，按下列标准挑选3个大约长 $18\mu\text{m}$ 的后毛细血管微静脉段用于重复记录：

(1) 真正的从直径为 $15-30\mu\text{m}$ 的会合毛细血管接受血液的毛细血管微静脉；(2) 快捷的血流，从而不能分辨出单个血红细胞；(3) 白细胞的某种基底循环（任何给定时间内在血管段中存在的白细胞少于8个），但没有牢固吸附的白细胞。如果在血管壁停留的时间超过30秒，则将其定义为牢固吸附的白细胞。

b) 实验程序

手术过程完成后的第20分钟和25分钟时，作了所选择的静脉管内基底白细胞相互作用的一分钟图像记录。第二次基数记录前所有处理全部采用静脉内用药。手术后30分时，开始向过冷缓冲液中注入化合物 $48/80$ （Sigma，目录号#（4257），并在实

验的其余部分继续注入,使之在肠系膜上的终浓度为 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$,这样做是为了诱导肥大细胞脱粒。开始使用 $48 / 80$ 化合物后 20 分钟和 30 分钟时再次进行微静脉记录。在实验结束时,通过分析录相带确定白细胞内皮细胞相互作用的程度。从记录序列中 0 秒, 15 秒, 30 秒, 45 秒和 60 秒固定的画面可以确定清晰可见的白细胞(即与血管壁相互作用的细胞)的数量,并由这五个值计算平均数。这样,计数的白细胞既包括牢固吸附的细胞也包括循环的细胞。

c) 统计数字

每个实验组包括 $5 - 6$ 个动物,从每个动物身上取 $2 - 3$ 个微静脉。给出了平均数和标准差。各组平均数的显著差异通过变量分析再配以 Tukey-Kramer HSD 试验得以测试。单个微静脉在处理前后的差异通过成对 t -测验进行研究。所有测试均使用运行于 Macintosh IIx 上的 JMP 软件进行, $p < 0.05$ 时则认为有显著性。

II、结果

对鼠肠系膜局部运用化合物 $48 / 80$,在使用后 3 分钟内导致了 90% 肥大细胞的可见的脱粒。随后,可发现白细胞的循环和吸附有所增加。使用 $48 / 48$ 化合物后发现 20 分钟和 30 分钟时间点之间白细胞聚集无明显差异,因此在统计分析中使用这两个时间点的平均数。模型中微静脉间变异性很大,伴有单个微静脉中的白细胞数目在 $0 - 4.8$ 之间变化的基底相互作用和 PBS 处理组中的白细胞数目在 $2.8 - 25.6$ 之

间变化的肥大细胞诱导的相互作用（变异性系数，C V，37 %）。动物平均数显示的变异性很低（C V，16 %）；因此，为了统计将每个单一的微静脉作为一个单独的实验对象进行处理。

如图2 9 所示，与配制的缓冲液对照组相比，用m u M A b P B 1 . 3 进行静脉内处理抑制了90 % 的肥大细胞诱导的血管内白细胞聚集。无反应活性的抗体P 6 H 6 在本模型中不起作用。

因此，用P - 选择蛋白抗体m u M A b P B 1 . 3 对鼠用药完全阻止了白细胞与血管内皮的相互作用及白细胞随后向被肥大细胞脱粒试剂4 8 / 8 0 诱导的组织迁移。

实施例1 8

m u M A b P B 1 . 3 抗原决定簇的定位

P - 选择蛋白是在血小板和内皮细胞的分泌颗粒中发现的一种完整的膜糖蛋白。细胞激活后，P - 选择蛋白迅速重新分布于原生质膜。成熟的分子是拥有多个区域的蛋白质，这些区域包括一个“凝集素”区，E G F 区域，九个串联的相同的“C 3 b - C 4 b 调节蛋白”（C R P）重复区，一个跨膜区域和一个细胞质区域。

见J o h n s t o n 等，C e l l ， 5 6 : 1 0 3 3 - 1 0 4 4 （1 9 8 9）（在此以其全文作为本申请的参考资料）关于P - 选择蛋白的描述。图3 0 显示了P - 选择蛋白各区域的一个推测的折叠模式。

P - 选择蛋白缺失分析

为了定位被m u M A b P B 1 . 3 结合的抗原

决定簇，通过缺失连续的CRP区域（图3 1）构建了重组P-选择蛋白的突变体。这种定点诱变是使用对每一CRP区域特异的引物通过PCR扩增实现的。用于PCR突变的模板是一个被截短并在DNA序列2 3 5 4位突变的P-选择蛋白的pUC DNA克隆。（序列位置与上述Johnston等发表的P-选择蛋白序列一致）。最早通过体外诱变获得的这一模板质粒PG Δ 1，T缺少P-选择蛋白的跨膜区域和细胞质羧基端，且转而编码SV40大T抗原的羧基端11氨基酸残基。此SV40衍生的C末端可被单克隆抗体KT-3识别（见MacArthur等，Journal of Virology 52: 483-491 (1984)）。PCR扩增后，将此缺失的DNA分子纯化、连接、转化细菌，并按下述进行克隆和测序。将带有CRP与T-抗原tag序列适当连接的DNA亚克隆到pCDNA1表达载体上（Invitrogen），并转染COS细胞。

在质粒pGMP Δ 1，T上完成PCR诱变。5'端磷酸化后，将表6中的引物以1 μ M的浓度与T抗原序列引物lys-1一起加到每个PCR反应中。在Perkin Elmer-Cetus机器中95 $^{\circ}$ C、50秒，50 $^{\circ}$ C、1分钟，73 $^{\circ}$ C、4分钟循环30次来完成PCR反应，根据制造者建议的条件使用Pfu多聚酶（Stratagen）。用琼脂糖凝胶电泳纯化及用Qiaex（Qiagen Corp.）洗脱后，突变的pUC DNA被连接并转化E. coli

InvF' α 细胞（Invitrogen）。通过DNA序列分析确认带有期望突变的克隆的DNA，含

突变的P - 选择蛋白基因的S a l I - H p a I 部分被克隆到表达载体p c D N A I 的X h o I 和X b a I 位点 (I n v i t r o g e n) 。将这些p c D N A 克隆转入E . c o l i M C 1 0 6 1 菌株 (I n v i t r o g e n) 并纯化质粒D N A 以转染C O S 细胞。

DEAE - 葡聚糖转染法

本方法述于K r i e g l e r , M. 的G e n e T r a n s f e r a n d E x p r e s s i o n : A L a b o r a t o r y M a n u a l , W. H. F r e e m a n a n d C o m p a n y (1990) , 以 1×10^6 细胞/ 100 mm 培养皿将C O S 细胞植入装有D M E M (B i o w h i t t a k e r) 和10 % 胎牛血 (F B S) 的培养皿中。第二天, 将质粒D N A 用乙醇沉淀, 并以 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的浓度重悬于无菌T E (10 mM T r i s , p H 8 . 0 , 1 mM E D T A) , 将 $150 \mu\text{l}$ D N A 与 $300 \mu\text{l}$ 无菌T B S (T r i s 缓冲的盐溶液, 140 mM N a C l , 5 mM K C l , 1 . 4 mM N a ₂ P H O ₄ , 25 mM T r i s - b a s e , p H 7 . 5 , 1 . 0 mM C a C l ₂ 和0 . 5 mM M g C l ₂) 及 $30 \mu\text{l}$ 无菌DEAE 葡聚糖 (S i g m a , # D - 9 8 8 5 , T B S 中 $1 \text{ mg} / \text{ml}$) 混合。向生长培养液通气, 将细胞单层用P B S 和T B S 各洗一次。将 $750 \mu\text{l}$ D N A / D E A E 葡聚糖/ T B S 混合物加入单层中。将培养皿在环境温度下置于分层通风橱中, 每五分钟摇动一次共1 小时。培养1 小时后, 向D N A 溶液通气, 并将细胞先用T B S 再用P B S 各洗一次。使细胞在一

个补加了 $100\text{ }\mu\text{M}$ 氯喹 (S i g m a , # C - 6 6 2 8) 的完全培养液中于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }\%\text{CO}_2$ 培养。4 小时后, 将此培养液用完全培养液取代。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }\%\text{CO}_2$ 培养细胞。转染后48 小时后, 用不含血清的D M E M 生长培养液培养细胞。24 小时后收集培养液, 在台式医用离心机中 1500 r p m 离心5 分钟除去细胞碎片。

用捕获E L I S A 分析被分泌的P - 选择蛋白的突变蛋白质

将96 孔C o s t a r 滴定板用K T - 3 抗体 (在腹水中产生并经蛋白质G 琼脂糖纯化, P h a r m a c i a) 以 $40\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ 的浓度 $100\text{ }\mu\text{l} / \text{孔}$ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜包被。将滴定板用D P B S 洗三次, 用 $250\text{ }\mu\text{l} / \text{孔}$ D P B S + $1\text{ }\%\text{BSA}$ 室温阻断1 小时。滴定板用D P B S 洗三次。以 $100\text{ }\mu\text{l} / \text{孔}$ 加入C O S 细胞上清液, 室温保温2 小时。用D P B S 洗涤滴定板三次后, 通过加入 $100\text{ }\mu\text{l} / \text{孔}$ 的 (a) $1\text{ ng} / \text{ml}$ 兔抗P - 选择蛋白多克隆I g , 或 (b) 生物素标记的m u M A b P B 1 . 3 , 或 (c) 在D P B S / $1\text{ }\%\text{BSA}$ 中稀释的生物素标记的P 6 H 6 , 室温1 小时, 以检测结合的P - 选择蛋白。用D P B S 洗涤滴定板3 次后, 用 $100\text{ }\mu\text{l} / \text{孔}$ $1:1000$ 稀释度的H R P 偶联的山羊抗兔抗体 (B i o r a d) 检测抗体, 并用来自K T - 3 细胞系的组织培养液 ($10\text{ }\%$) 在D P B S + $1\text{ }\%\text{BSA}$ 中室温阻断30 分钟。生物素标记的抗体用 $100\text{ }\mu\text{l} / \text{孔}$ $1:1000$ 稀释度的H R P - 链亲和素 (P i e r c e) 室温下30 分钟来检测。被结合

的HRP与TMB一起保温并用1 M磷酸终止。图3 2显示所得信号低于来自模拟物转染的COS细胞的上清的背景。此“模拟”柱指来自一全长P-选择蛋白转染的细胞的上清液，其不含SV40T-抗原tag，因此KT-3捕获ELISA未能检测到它。X轴指由不同突变的P-选择蛋白cDNA表达的CRP量，从第2个柱的9个CRP到第10个柱的1个CRP。结果表明，尽管缺少羧基末端的5个CRP的P-选择蛋白突变体通过多克隆大鼠Ig可检测到，但这些分子并不与PB1.3反应。这表明PB1.3的结合位点位于第五个CRP重复区域内。

为了证实抗原决定簇定位的结果，缺失分析扩展到仅缺失第五个CRP区域，而使P-选择蛋白的羧基端序列保持完整（见图3 0）。设计用与上述相同的方法设计PCR扩增引物的除去P-选择蛋白的编码407-466氨基酸（表6）的区域。用抗体mu MA b PB1.3和P6H6直接通过ELISA分析细胞上清液（图3 3）。虽然mu MA b PB1.3可结合完整的P-选择蛋白，但它未能结合缺失的分子。而P6H6可同样地结合这两种分子。

合成多肽分析

通过合成跨越P-选择蛋白第五个CRP的62个氨基酸区域（图3 4）的多肽及用ELISA实验为mu MA b PB1.3的结合进行筛选进一步阐明了mu MA b PB1.3的抗原决定簇。根据Johnston等的命名法，第五个CRP从氨基酸序列407位延伸到468位。多肽序列为968.01，氨

氨基酸# 4 0 8 -4 2 6 ; 9 6 8 . 0 2 , 氨基酸# 4 1 8 -4 3 6 ; 9 6 8 . 0 4 . 氨基酸# 4 0 8 -4 3 3 ; 9 6 8 . 0 5 为9 6 8 . 0 4 的氧化模本; 9 6 8 . 0 6 , 氨基酸# 4 2 8 -4 4 7 ; 和9 6 8 . 0 8 , 氨基酸# 4 4 8 -4 6 7 。将每个多肽溶于二甲亚砜 (D M S O) 中至2 m g / m l , 用1 微克/ 1 0 0 μ l P B S 的稀释液将其包被于9 6 孔微量滴定板上, 3 7 $^{\circ}$ C过夜干燥。用P B S 洗涤被包被的孔, 并用2 5 0 μ l / 孔的P B S / 1 % B S A 溶液室温阻断3 0 分钟。将孔用P B S 洗涤, 并以1 0 0 μ l / 孔与用P B S 1 % B S A 稀释至1 微克/ m l 的P B 1 . 3 室温保温1 小时。结合的m u M A b P B 1 . 3 用H R P 偶联的山羊抗鼠抗体试剂和前述的T M B 底物检测。图3 4 显示了P B 1 . 3 与多肽反应活性的比较。羧基端多肽# 9 6 8 . 0 8 可与P B 1 . 3 剧烈反应。因此, 由P B 1 . 3 识别的抗原决定簇定位于人P - 选择蛋白第五个C R P 的4 4 8 位到4 6 7 位氨基酸之间。

为清晰和便于理解起见, 通过上述实施例和上述公开详细描述了本发明。然而, 显然可以在后附的权利要求的范围内进行某些变动和修改。上面引用的所有出版物和专利申请在此均以其全文作为本申请的参考资料, 如同每个都被分别引述一样。

表 1 (8-1)

用于设计重构的人PB1.3重链可变区的氨基酸序列的对比

Kabat	I	FR 或 CDR	鼠 1747	鼠 II A	人 I	人 2128*CL	RH V _H 1747	评论
1	1	FRI	E	E	Q	PCA	E	接近H I. 可能在抗原 结合中有作用
2	2	I	A	V	V	V	A	不寻常氨基酸 接近H I 可能在抗原结 合中有作用
3	3	I	Q	Q	Q	Q	Q	
4	4	I	L	L	L	L	L	
5	5	I	Q	Q	V	V	V	
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	I	S	S	S	S	S	
8	8	I	G	G	G	G	G	
9	9	I	P	P	A	A	A	
10	10	I	E	E	E	E	E	

表 1 (8-2)

11		11	I		L	L		V	V	V	
12		12	I		V	V		K	K	K	
13		13	I		E	K		K	K	K	
14		14	I		P	P		P	P	P	
15		15	I		G	G		G	G	G	
16		16	I		A	A		A	A	A	
17		17	I		S	S		S	S	S	
18		18	I		V	V		V	V	V	
19		19	I		K	K		K	K	K	
20		20	I		V	I		V	V	V	
21		21	I		S	S		S	S	S	
22		22	I		C	C		C	C	C	
23		23	I		K	K		K	K	K	
24		24	I		A	A		A	A	A	
25		25	I		S	S		S	S	S	
26		26	I		G	G		G	G	G*	
27		27	I		Y	Y		Y	Y	Y*	
28		28	I		T	T		T	T	T*	
29		29	I		F	F		F	F	F*	

表 1 (8-3)

30		30	FR1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
31		31	CDR1	N	D	S	S	S	S	S	S	S	N°
32		32		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y°
33		33		V	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	V
34		34		M	M	M	M	M	M	M	M	M	M°
35		35		H	N	S	S	S	S	S	S	S	H
35A				.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
35B			CDR1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36		36	FR2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37		37		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38		38		K	K	K	K	K	K	K	K	K	R
39		39		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40		40		K	S	S	S	S	S	S	S	S	A
41		41		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42		42		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
43		43		Q	K	K	K	K	K	K	K	K	Q
44		44		G	S	S	S	S	S	S	S	S	R
45		45		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

表 1 (8-4)

46	46	:	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	:	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	:	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
49	49	FR2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR2	F	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
51	51	:	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	:	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52A	53	:	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B		:	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
52C		:	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53	54	:	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	S
54	55	:	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
55	56	:	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	D
56	57	:	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
57	58	:	P	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	P
58	59	:	K	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	K
59	60	:	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	:	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
61	62	:	E	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	E
62	63	:	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R

表 1 (8-5)

63		64		F	F	F	F	F	F	
64		65		K	K	K	Q	Q	K	
65		66	CDR2	N	G	G	G	G	N	
66		67	FR3	K	K	R	R	R	R	
67		68		A	A	V	V	V	V	
68		69		T	T	T	T	T	T	
69		70		L	L	I	I	I	I	
70		71		T	T	T	T	T	T	
71		72		S	V	A	R	S°	H 2 规范结 构 可能支持 H2	
72		73		D	D	D	D	D	D	
73		74		K	K	T	T	T	T	
74		75		S	S	S	S	S	S	
75		76		S	S	T	A	A	A	
76		77		S	S	S	S	S	S	
77		78		T	T	T	T	T	T	
78		79		A	A	A	A	A	A	

表 1 (8-7)

96	100	I	R	X	P	.	R	
97	101	I	P	Y	G	.	P	
98	102	I	G	Y	Y	.	G	
99	103	I	F	S	G	G	F	
100	104	I	D	S	S	.	D	
100A		I	.	S	G	.	.	
100B		I	.	Y	G	.	.	
100C		I	.	M	G	.	.	
100D		I	.	X	C	.	.	
100E		I	.	A	Y	.	.	
100F		I	.	X	R	Y	.	
100G		I	.	X	G	Y	.	
100H		I	.	Y	D	G	.	
100I	105	I	W	Y	Y	S	W	
100J	106	I	Y	A	.	G	Y	

表 1 (8-8)

100K	107	!	F	F	F	F	F	F	S	F	
101	108	!	D	D	D	D	D	D	N	D	
102	109	CDR3	V	V	Y	Y	Y	Y	Y	V	
103	110	FR4	W	W	W	W	W	W	W	W	
104	111	!	G	G	G	G	G	G	G	G	
105	112	!	A	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
106	113	!	G	G	G	G	G	G	G	G	
107	114	!	T	T	T	T	T	T	T	T	
108	115	!	T	T	T	T	L	L	L	L	
109	116	!	V	V	V	V	V	V	V	V	
110	117	!	T	T	T	T	T	T	T	T	
111	118	!	V	V	V	V	V	V	V	V	
112	119	!	S	S	S	S	S	S	S	S	
113	120	FR4	S	S	S	S	S	S	S	S	

表 2 (7-1)

用于设计重构的人PB1.3轻链可变区的氨基酸序列的对比

Kabat	I	FR 或 CDR	鼠 1747	鼠 c-v	人 c-l	人 DEN	RH VL 1747	评论
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2	I	I	I	I	I	I	
3	3	I	V	Q	Q	Q	Q	
4	4	I	M	M	M	M	M	
5	5	I	T	T	T	T	T	
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	I	S	S	S	S	S	
8	8	I	Q	P	P	P	P	
9	9	I	K	S	S	S	S	
10	10	I	F	S	S	T	T	
11	11	I	M	L	L	L	L	
12	12	I	S	S	S	S	S	
13	13	I	T	A	A	A	A	
14	14	I	S	S	S	S	S	

表 2 (7-2)

15	15	I	V	L	V	V	
16	16	I	G	G	G	G	
17	17	I	D	D	D	D	
18	18	I	R	R	R	R	
19	19	I	V	V	V	V	
20	20	I	S	T	T	T	
21	21	I	V	I	I	I	支持L1, I可能破坏 核心
22	22	I	T	T	T	T	
23	23	FRI	C	C	C	C	
24	24	CDRI	K	R	R	K	
25	25	I	A	A	A	A*	
26	26	I	S	S	S	S*	
27	27	I	Q	Q	Q	Q*	
27A	28	I	N	D	S	N	
27B		I	.	.	L	.	
27C		I	.	.	V	.	
27D		I	.	.	.	.	
27E		I	.	.	.	.	

表 2 (7-4)

44		44	:	P	P	P	P	P	P	
45		45	:	K	K	K	K	K	K	
46		46	:	A	L	L	L	L	A	可能支持L2, L可能会改变 L2的取向
47		47	:	L	L	L	L	L	L	
48		48	:	I	I	I	I	I	I°	
49		49	FR2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
50		50	CDR2	T	Y	A	A	G	T°	
51		51	:	A	A	A	A	A	A°	
52		52	:	S	S	S	S	S	S°	
53		53	:	Y	R	S	S	N	Y	
54		54	:	R	L	L	L	L	R	
55		55	:	F	H	E	E	E	F	
56		56	CDR2	S	S	S	S	S	S	
57		57	FR3	G	G	G	G	G	G	
58		58	:	V	V	V	V	V	V	
59		59	:	P	P	P	P	P	P	

表 2 (7-5)

60	60	I	E	S	S	S	S	E	接近L2的54位残基,位于表面并可结合抗原
61	61	I	R	R	R	R	R	R	
62	62	I	F	F	F	F	F	F	
63	63	I	S	S	S	S	S	S	
64	64	I	G	G	G	G	G	G*	
65	65	I	S	S	S	S	S	S	
66	66	I	G	G	G	G	G	G	
67	67	I	S	S	S	S	S	S	
68	68	I	G	G	G	G	G	G	
69	69	I	T	T	T	T	T	T	
70	70	I	D	D	D	D	E	D	可能与L1的24位残基有电荷相互作用
71	71	I	F	Y	F	F	F	F*	
72	72	I	T	S	T	T	T	T	
73	73	I	L	L	L	L	L	L	
74	74	I	T	T	T	T	T	T	
75	75	I	I	I	I	I	I	I	

表 2 (7-6)

76	76			T	S	S	S	S	S	
77	77			N	N	S	S	S	S	
78	78			V	L	L	L	L	L	
79	79			Q	E	Q	Q	Q	Q	
80	80			S	Q	P	S	S	S	
81	81			E	E	E	D	D	D	
82	82			D	D	D	D	D	D	
83	83			L	I	F	F	F	F	
84	84			A	A	A	A	A	A	
85	85			Q	T	T	T	T	T	
86	86			Y	Y	Y	Y	Y	Y	
87	87			F	F	Y	Y	Y	Y	
88	88	FRJ		C	C	C	C	C	C	
89	89	CDRJ		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
90	90			Q	Q	Q	Q	Q	Q*	
91	91			Y	G	Y	Y	Y	Y*	
92	92			N	N	N	D	D	N*	
93	93			N	T	S	S	S	N*	

表 2 (7-7)

94		94	I		Y	L	L		F	Y°	
95		95	I		P	P	P		P	P°	
95A			I		.	.	E		.	.	
95B			I		.	.	.		.	.	
95C			I		.	.	.		.	.	
95D			I		.	.	.		.	.	
95E			I		.	.	.		.	.	
95F			I		.	.	I		.	.	
96		96	I		Y	R	W		Y	Y°	
97		97	CDR3		T	T	T		T	T	
98		98	FR4		F	F	F		F	F	
99		99	I		G	G	G		G	G	
100		100	I		G	G	Q		Q	Q	
101		101	I		G	G	G		G	G	
102		102	I		T	T	T		T	T	
103		103	I		K	K	K		K	K	
104		104	I		V	L	V		L	L	
105		105	I		E	E	E		E	E	
106		106	I		I	I	I		I	I	
106A			I		.	.	.		.	.	
107		107	FR4		Q	K	K		K	K	

表 3

三个重构的PB1.3模本的重链可变区域的氨基酸序列的差异

氨基酸

构建物	氨基酸		
	1	2	73
1748RHA	GLU	ALA	THR
1748RH _B	GLN	VAL	THR
1748RH _C	GLU	ALA	LYS

表 4

四个重构的PB1.3模本的轻链可变区域的氨基酸序列的差异

构建物	氨基酸	
	60	70
1748RLA	GLU	ASP
1748RLB	SER	ASP
1748RLC	GLU	GLU
1748RLD	SER	GLU

表 5

生产人源化PB1.3(CY1748)的三个不同模本的
扩增的CHO细胞株的抗体产率
(微克/10⁶细胞/天)

抗体	未扩增	第1轮	第3轮	第2轮
1748A-IgG1	0.36	2.1	8.2	29.6
	0.36	2.1	13.7	21.8
	0.36	0.90	9.9	19.7
1748B-IgG1	0.10	1.6	23.9	
	0.24	1.5	21.1	
	< 0.2	7.3	18.6	
	0.10	1.6	17.8	
1748B-IgG4	< 0.3	< 2.0	33.0	
	< 0.3	< 2.0	26.9	
	0.75	2.6	23.2	
	< 0.3	3.0	20.8	
	0.80	6.5	20.8	
	< 0.3	< 2.0	19.4	
	0.78	2.5	18.6	
	0.78	8.8	17.8	

表6

用于产生人P-选择蛋白CRP缺失突变体的PCR扩增引物的DNA序列

与去除的CRP数对应的 PCR 3'-扩增引物		突变体的预期的, 氨基酸序列		
		CRP		TAg
9	5'-TTTCACAGCTCTGCATGC-3'	...CRAVK	TIQEA	LK...
8-9	5'-TGCTATGCCTTTGCAGGT-3'	...CKGIA	TIQEA	LK...
7-9	5'-CTTGATGGCTTCACACAT-3'	...CEAIK	TIQEA	LK...
6-9	5'-GGGAATGGCTTGGCATTTC-3'	...CQAIP	TIQEA	LK...
5-9	5'-CTGCAAAGCTTGACAGAC-3'	...CQALQ	TIQEA	LK...
4-9	5'-CGAAATAGCCTCACAGGT-3'	...CEAIS	TIQEA	LK...
3-9	5'-CTGCACAGCTTTACACAC-3'	...CKAVQ	TIQEA	LK...
2-9	5'-CTGGGCAGCTAAACACTG-3'	...CLAAQ	TIQEA	LK...
5'-扩增引物, lys-1				
	5'-AAACCTCCCACACCCCCT-3'			

仅缺失CRP#5时,用下列2个扩增引物

5'-扩增引物	5'-TGCACACCTTTGCTAAGC-3'
3'-扩增引物	5'-CTGCAAAGCTTGACAGAC-3'

说明书附图

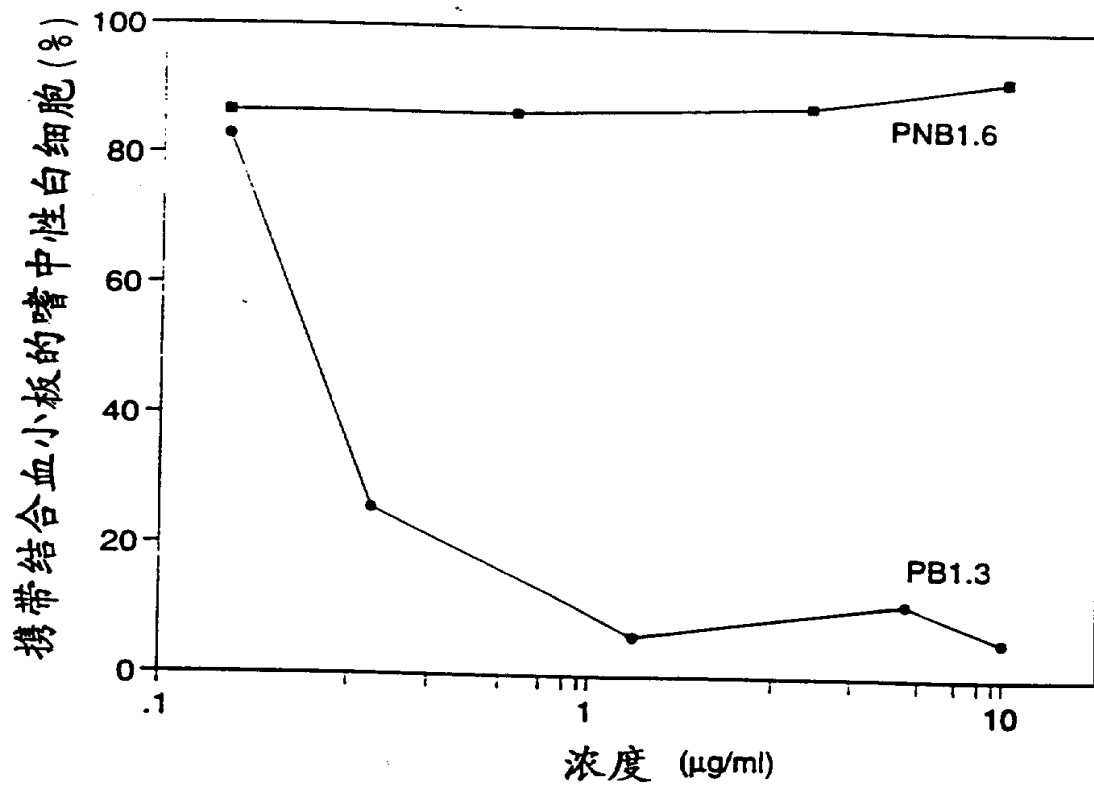


图 1

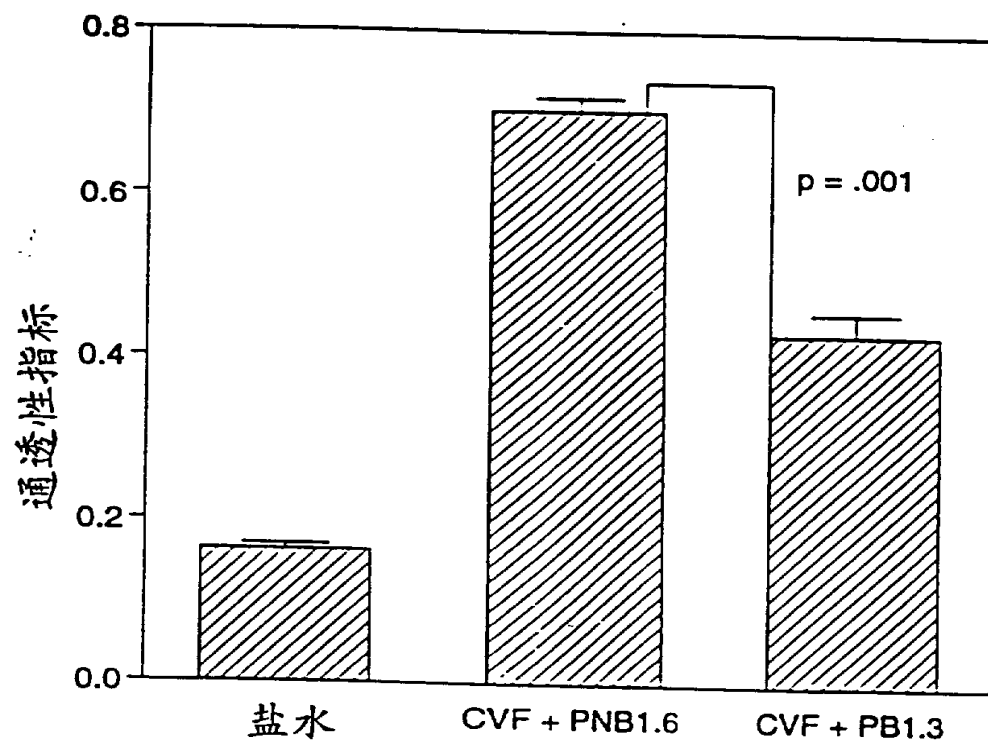


图 2A

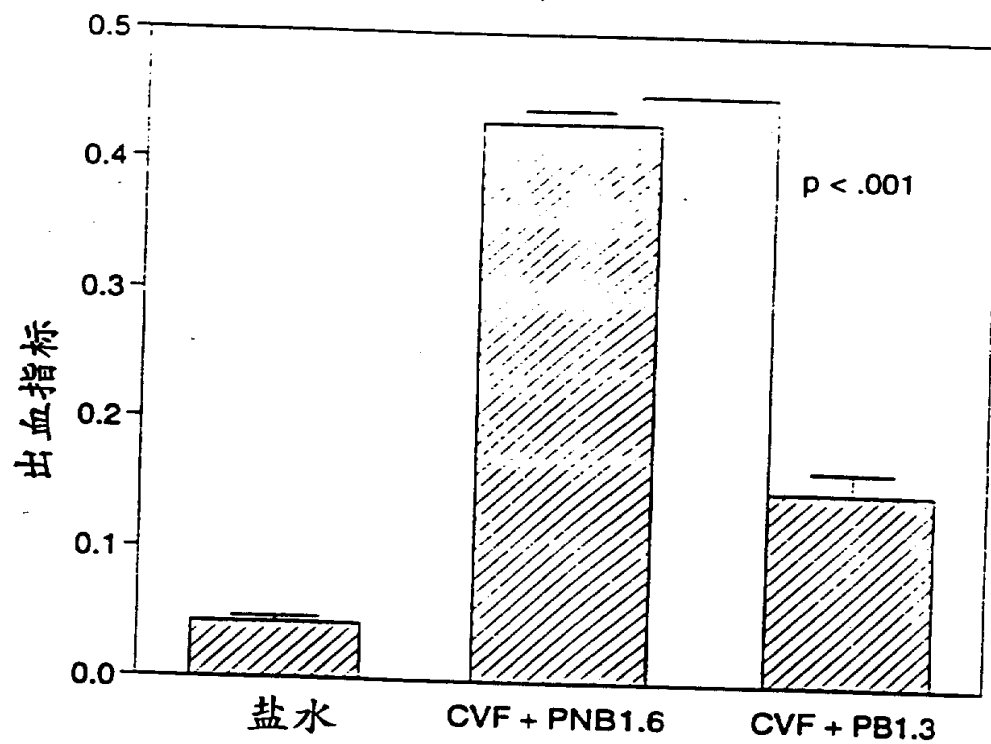


图 2B

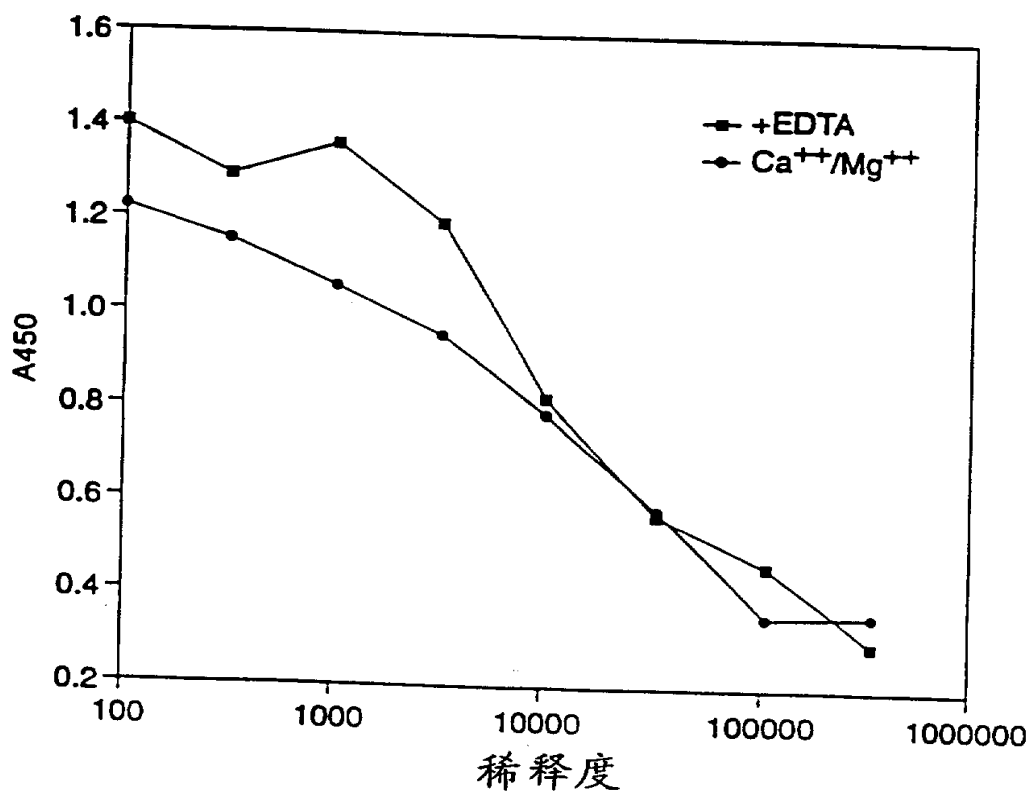


图 4

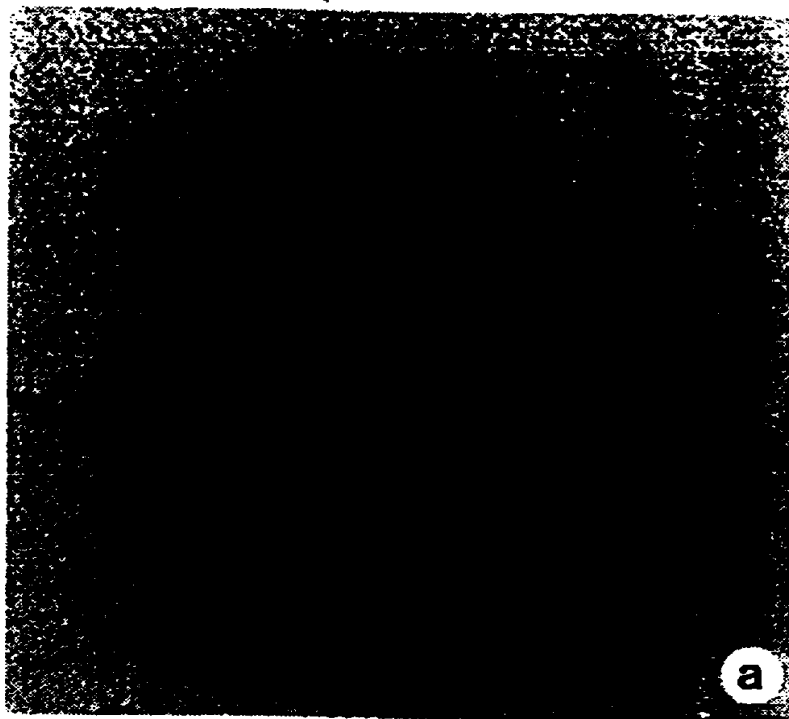


图3A

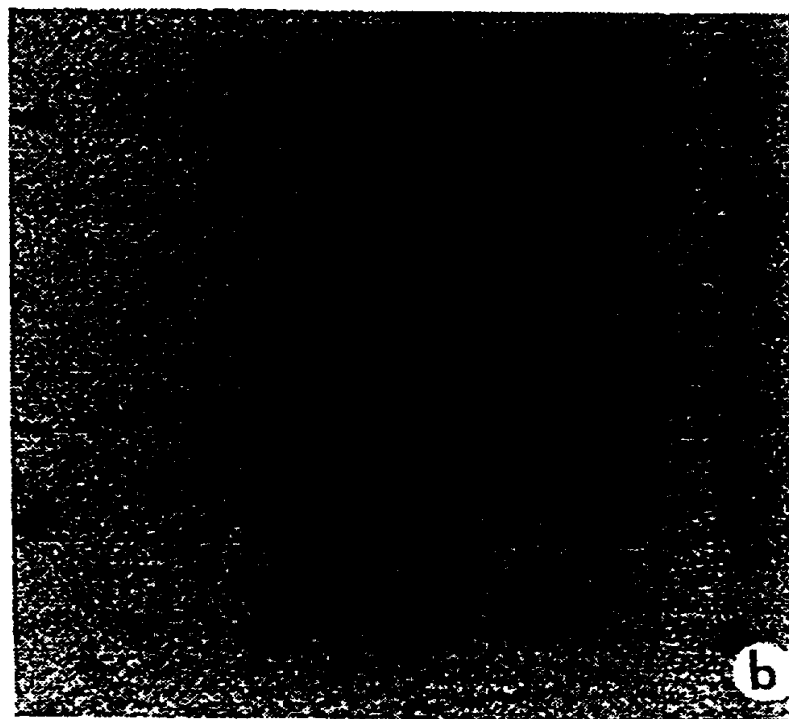


图3B

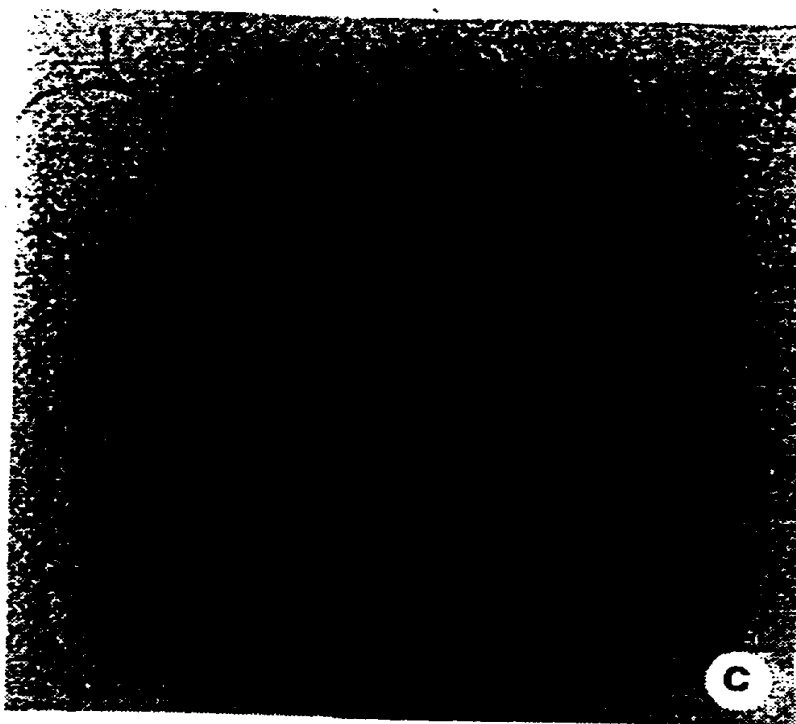


图3C

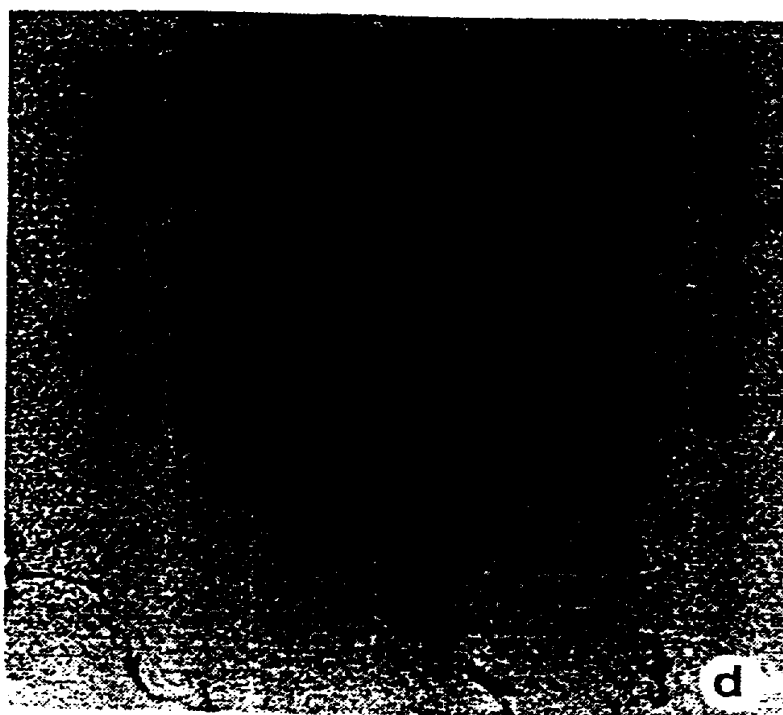


图 3.D

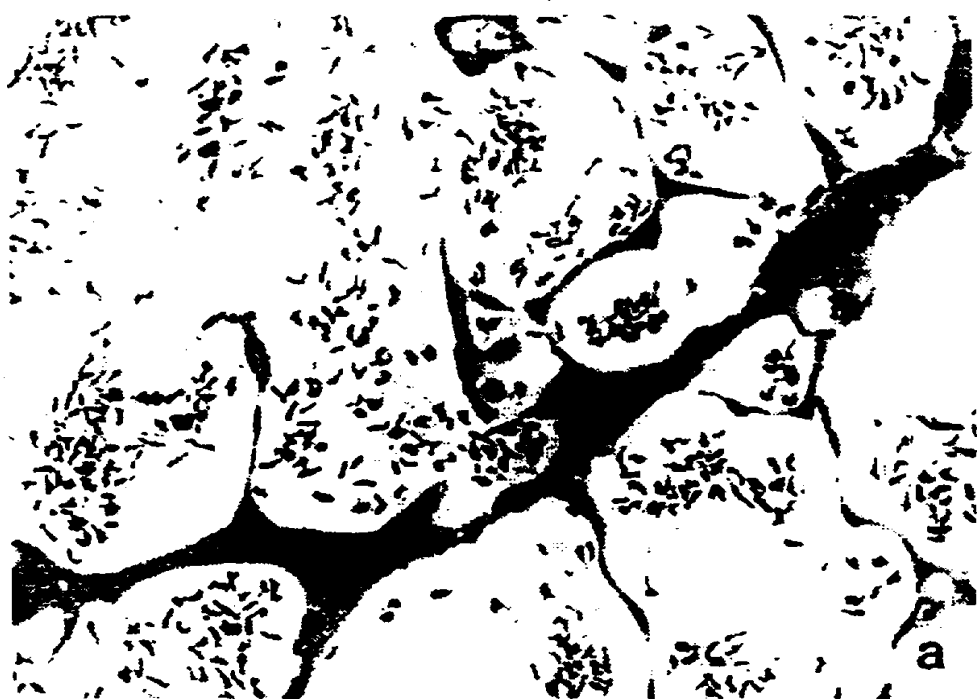


图3E



图3F



图3G

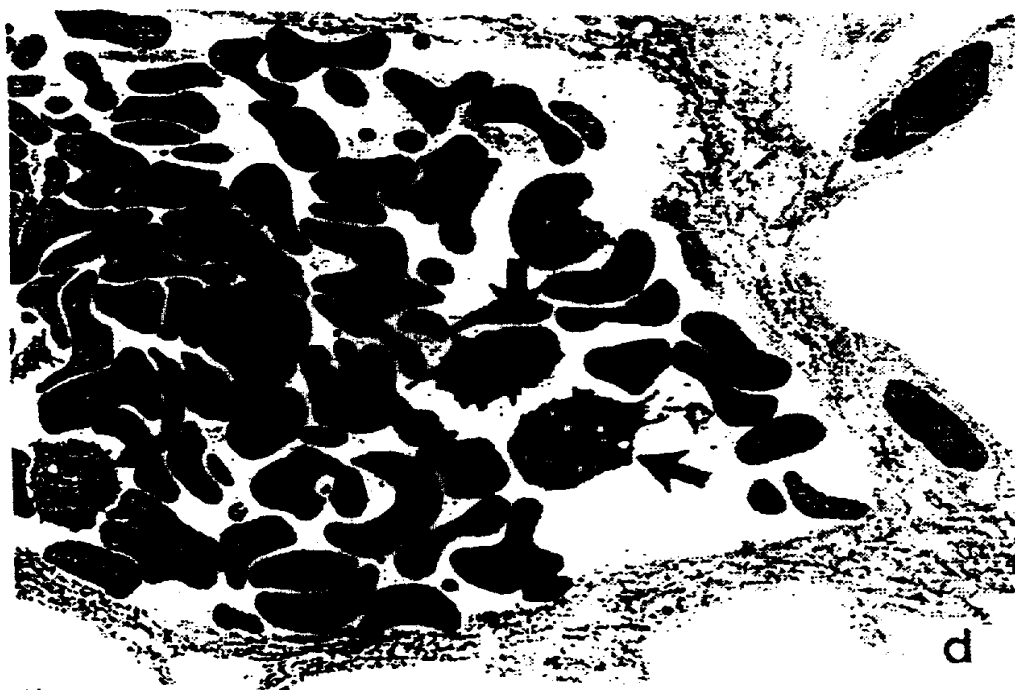


图3H

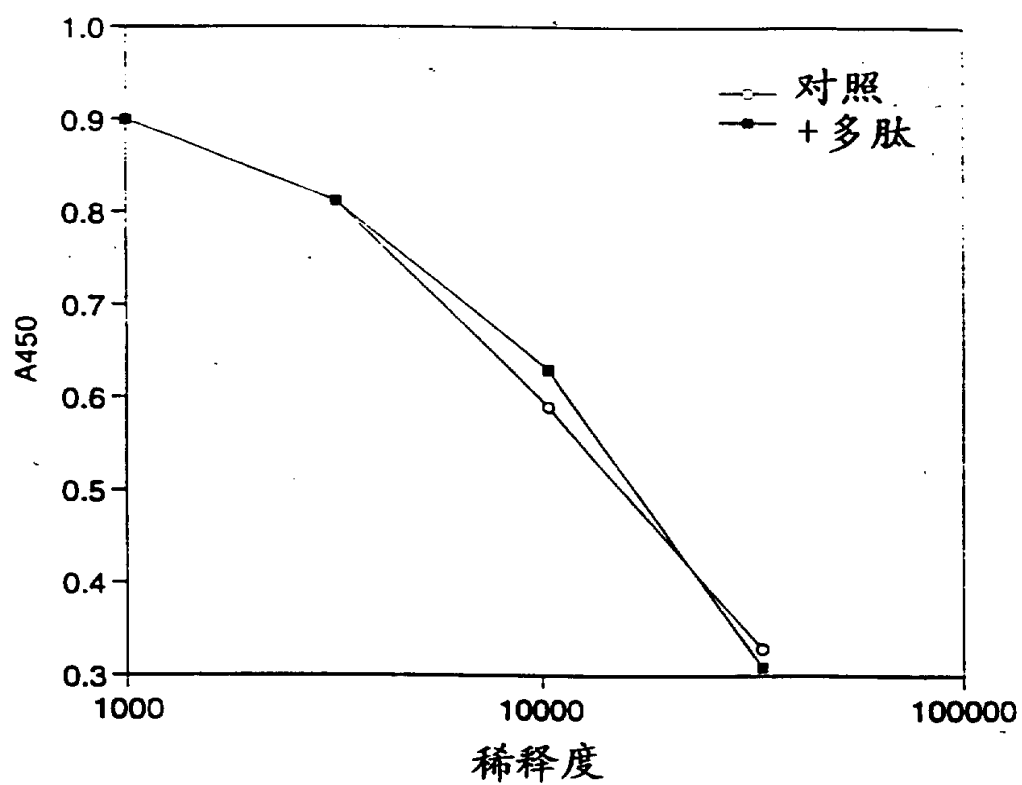


图 5

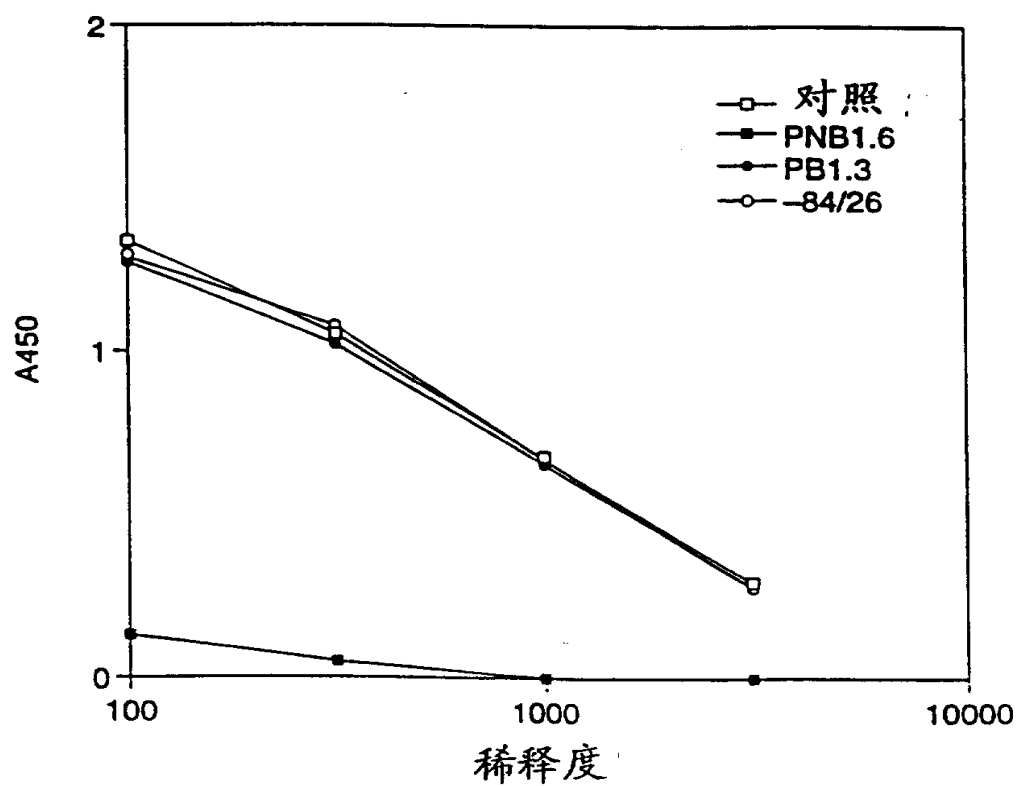


图 6A

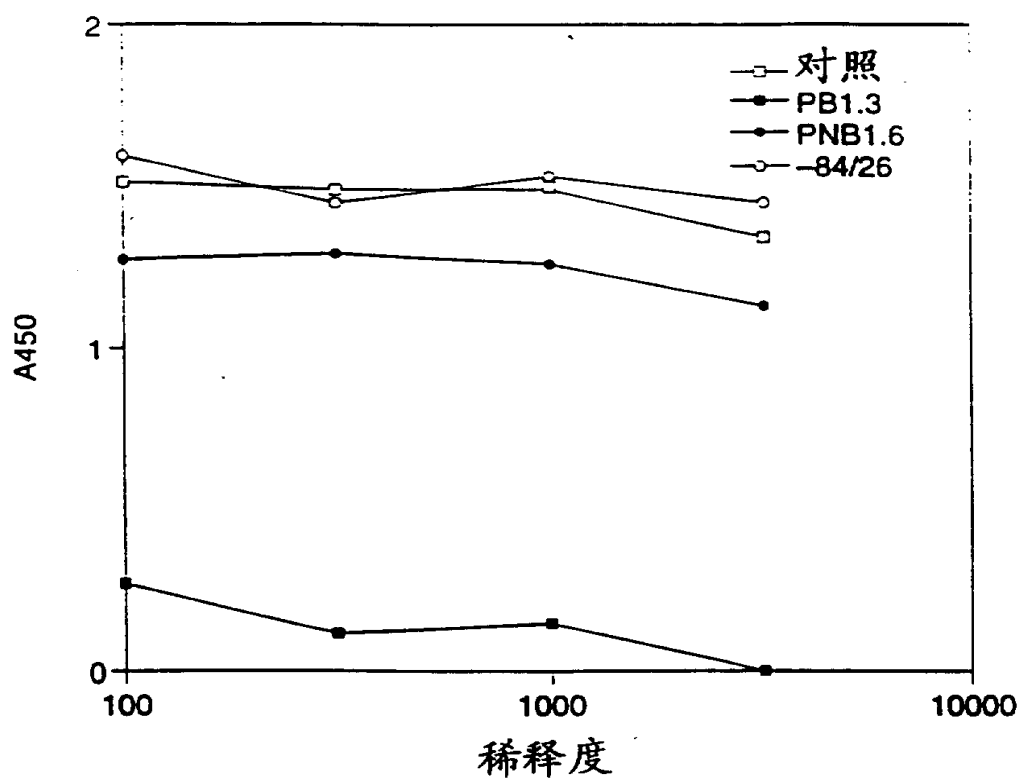


图 6B

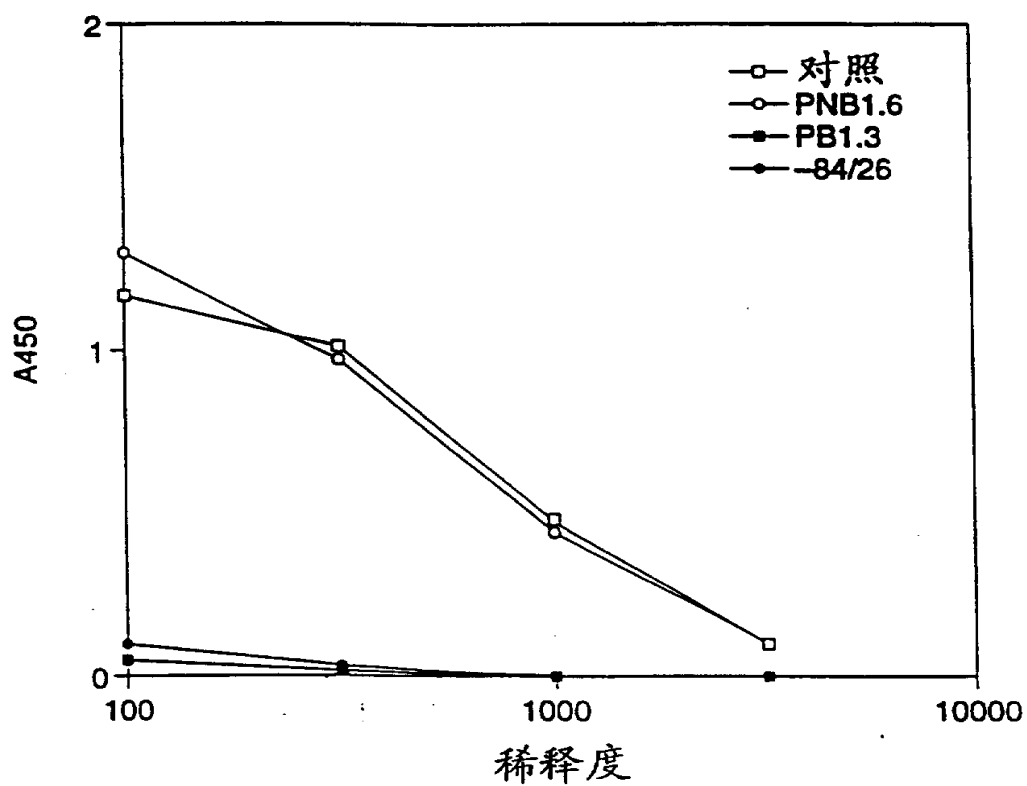


图 6C

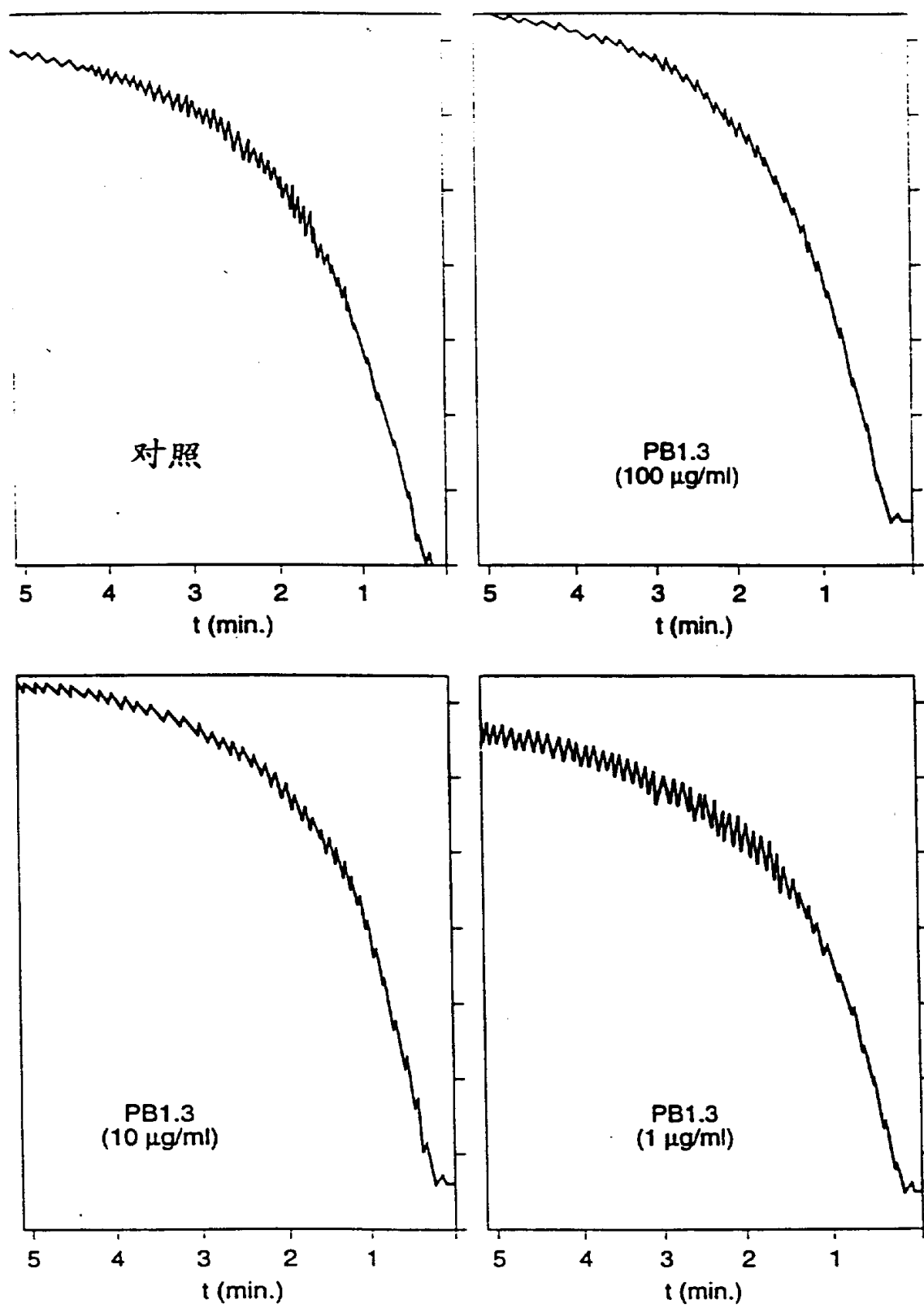


图 7

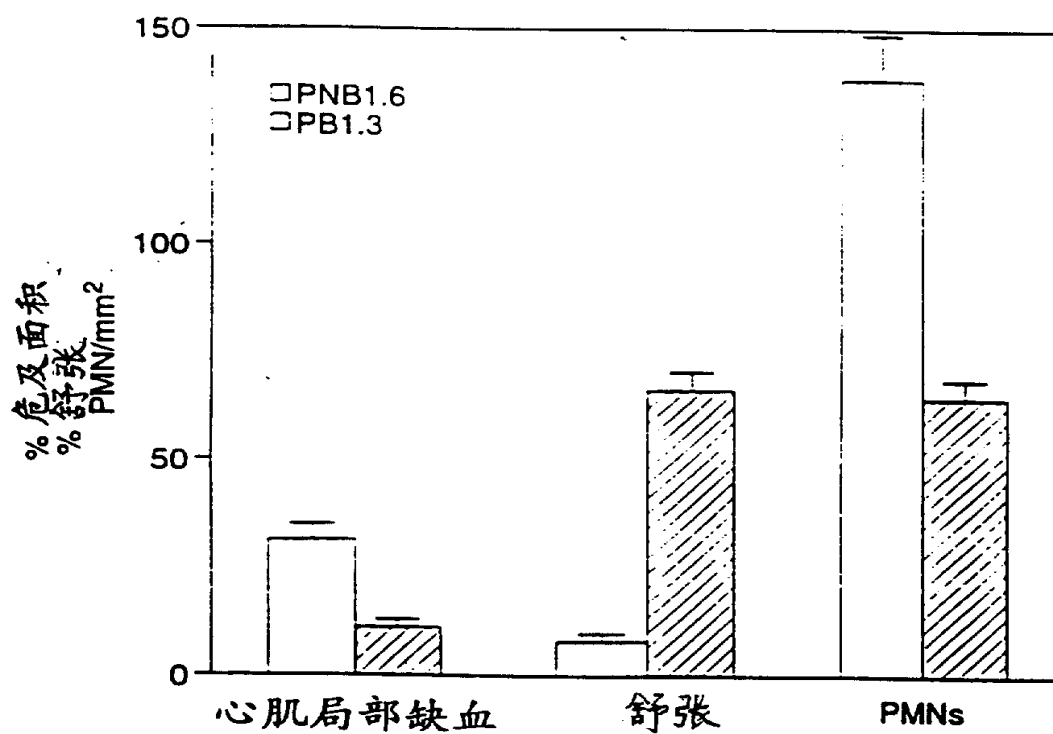


图 8

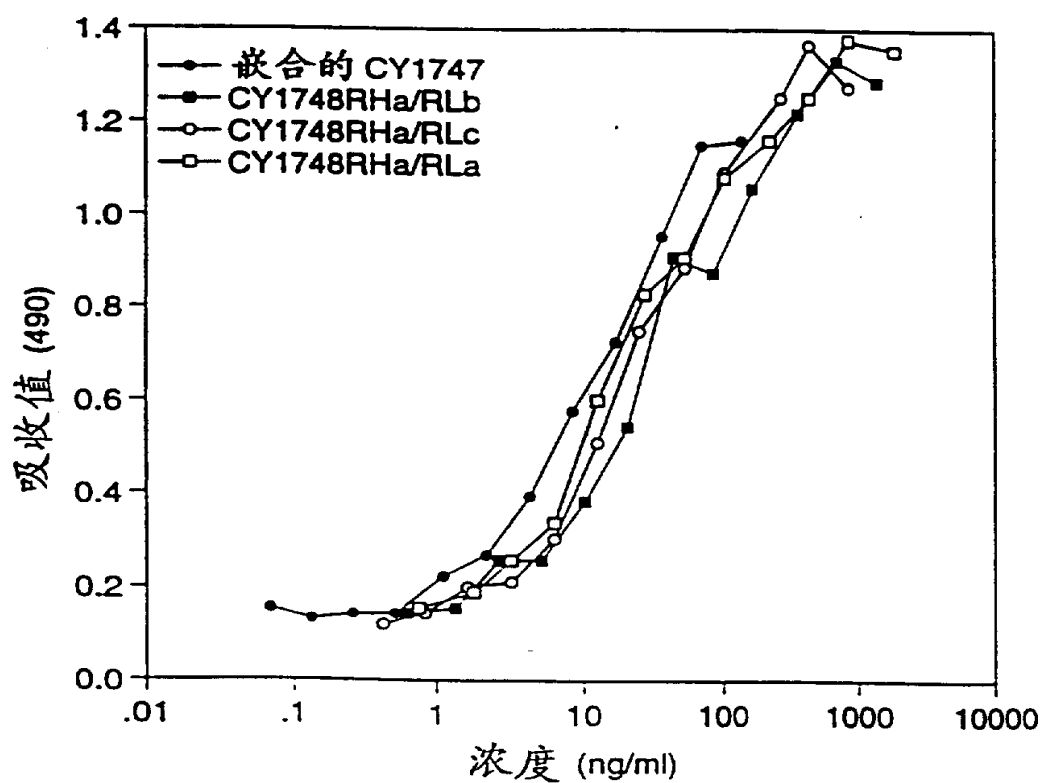


图 20

48
*

ATG GGA TGG AGC GGG GTC TTT CTC TTT CTC CTG TCA GGA ACT GCA GGT
Met Gly Trp Ser Gly Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly>

96
*

信号序列 — 成熟可变区序列
 CTC CAC TCT GAG GCC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA GAG
Val His Ser Glu Ala Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Glu>

144
*

CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe>

192
*

ACC AAC TAT GTT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT
Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu>

240
*

GAG TGG ATT GGA TTT ATT AAC CCA TCC AAT GAT GGT CCT AAG TAC AAT
Glu Trp Ile Gly Phe Ile Asn Pro Ser Asn Asp Gly Pro Lys Tyr Asn>

288
*

GAG AGG TTC AAA AAC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC
Glu Arg Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser>

336
*

ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GTC TCT GCG GTC
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Val Ser Ala Val>

384
*

TAT TTC TGT GCA AGA GCC CGC CCG GGG TTC GAC TGG TAC TTC GAT GTC
Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Arg Pro Gly Phe Asp Trp Tyr Phe Asp Val>

TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

图 9

48

ATG GGC ATC AAG ATG GAG TCA CAG ATT CAG GTC TTT GTA TAC ATG TTG
Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu>

信号序列 — 成熟可变区序列

96

CTG TGG TTG TCT GGT GTT GAT GGA GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT CAA
Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln>

144

AAA TTC ATG TCC ACA TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC GTC ACC TGC AAG
Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys>

192

GCC AGT CAG AAT GTG GCT ACT AAT GTA GTC TGG TAT CAA CAG AGA CCA
Ala Ser Gln Asn Val Ala Thr Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Arg Pro>

240

GGA CAA TCT CCT AAA GCG CTT ATT TAT ACG GCA TCC TAC CGG TTC AGT
Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Tyr Arg Phe Ser>

288

GGA GTC CCT GAA CGC TTC TCA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr>

336

CTC ACC ATC ACC AAT GTG CAG TCT GAA GAC TTG GCA GAC TAT TTC TGT
Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys>

384

CAA CAA TAT AAC AAC TAT CCC TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG GTG
Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val>

GAA ATT CAA
Glu Ile Gln

图 10

48
*

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GCT ATT TTA AAA GGT
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly>

96
*

信号序列 _ 成熟可变区序列

GTC CAG TGT GAG GCC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAA AAG
Val Gln Cys Glu Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys>

144
*

CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe>

192
*

ACC AAC TAT GTT ATG CAC TGG GTG CGC CAA GCT CCC GGG CAG AGG CTT
Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu>

240
*

GAG TGG ATG GGA TTT ATT AAC CCA TCC AAT GAT GGT CCT AAG TAC AAT
Glu Trp Met Gly Phe Ile Asn Pro Ser Asn Asp Gly Pro Lys Tyr Asn>

288
*

GAG AGG TTC AAA AAC AGG GTC ACA ATC ACT TCA GAC ACA TCC GCC AGC
Glu Arg Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser>

336
*

ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTC
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val>

384
*

TAT TAC TGT GCC AGA GCA CGC CCG GGG TTC GAC TGG TAC TTC GAT GTC
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Pro Gly Phe Asp Trp Tyr Phe Asp Val>

TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

图 11

48
*
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GCT ATT TTA AAA GGT
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly>

信号序列 - 成熟可变区序列 96
*
GTC CAG TGT CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAA AAG
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys>

144
*
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe>

192
*
ACC AAC TAT GTT ATG CAC TGG GTG CGC CAA GCT CCC GGG CAG AGG CTT
Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu>

240
*
GAG TGG ATG GGA TTT ATT AAC CCA TCC AAT GAT GGT CCT AAG TAC AAT
Glu Trp Met Gly Phe Ile Asn Pro Ser Asn Asp Gly Pro Lys Tyr Asn>
288
*

GAG AGG TTC AAA AAC AGG GTC ACA ATC ACT TCA GAC ACA TCC GCC AGC
Glu Arg Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser>

336
*
ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTC
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val>

384
*
TAT TAC TGT GCC AGA GCA CGC CCG GGG TTC GAC TGG TAC TTC GAT GTC
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Pro Gly Phe Asp Trp Tyr Phe Asp Val>

TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

图 12

48
*

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG CTT TTT CTT GTG GCT ATT TTA AAA GGT
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly>

96
*

信号序列 成熟可变区序列:
 CTC CAG TGT GAG GCC CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAA AAG
 Val Gln Cys Glu Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys>

144
*

CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe>

192
*

ACC AAC TAT GTT ATG CAC TGG GTG CGC CAA GCT CCC GGG CAG AGG CTT
 Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu>

240
*

GAG TGG ATG GGA TTT ATT AAC CCA TCC AAT GAT GGT CCT AAG TAC AAT
 Glu Trp Met Gly Phe Ile Asn Pro Ser Asn Asp Gly Pro Lys Tyr Asn>

288
*

GAG AGG TTC AAA AAC AGG GTC ACA ATC ACT TCA GAC AAA TCC GCC AGC
 Glu Arg Phe Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser>

336
*

ACC GCC TAC ATG GAA CTG TCC AGC CTG CGC TCC GAG GAC ACT GCA GTC
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val>

384
*

TAT TAC TGT GCC AGA GCA CGC CCG GGG TTC GAC TGG TAC TTC GAT GTC
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Pro Gly Phe Asp Trp Tyr Phe Asp Val>

TGG GGA CAG GGT ACC CTT GTC ACC GTC AGT TCA
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

图 13

48
*

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly>

96
*

信号序列 — 成熟可变区序列
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA TCC ACC CTG TCT GCA
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala>

144
*

AGC GTA GGA GAC AGA GTC ACC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val>

192
*

GCT ACT AAT GTA GTC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA GAG GCT CCT AAA
Ala Thr Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys>

240
*

GCG CTT ATT TAT ACG GCA TCC TAC CGG TTC AGT GGA GTC CCT GAA CGC
Ala Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro Glu Arg>

288
*

TTC TCA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser>

336
*

CTG CAG TCT GAT GAC TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TAT AAC AAT
Leu Gln Ser Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn>

TAC CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTC GAA ATC AAA
Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

图 14

48
*

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly>

96
*

信号序列 — 成熟可变区序列

GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA TCC ACC CTG TCT GCA
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala>

144
*

AGC GTA GGA GAC AGA GTC ACC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val>

192
*

GCT ACT AAT GTA GTC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA GAG GCT CCT AAA
Ala Thr Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys>

240
*

GCG CTT ATT TAT ACG GCA TCC TAC CGG TTC AGT GGA GTC CCT TCA CGC
Ala Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg>

288
*

TTC TCA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser>

336
*

CTG CAG TCT GAT GAC TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TAT AAC AAT
Leu Gln Ser Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn>

TAC CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTC GAA ATC AAA
Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

图 15

48
*

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly>

96
*

信号序列 — 成熟可变区序列
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA TCC ACC CTG TCT GCA
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala>

144
*

AGC GTA GGA GAC AGA GTC ACC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val>

192
*

GCT ACT AAT GTA GTC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA GAG GCT CCT AAA
Ala Thr Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys>

240
*

GCG CTT ATT TAT ACG GCA TCC TAC CGG TTC AGT GGA GTC CCT GAA CGC
Ala Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro Glu Arg>

288
*

TTC TCA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser>

336
*

CTG CAG TCT GAT GAC TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TAT AAC AAT
Leu Gln Ser Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn>

TAC CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTC GAA ATC AAA
Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

图 16

48
*

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly>

96
*

信号序列 _ 成熟可变区序列

GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA TCC ACC CTG TCT GCA
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala>

144
*

AGC GTA GGA GAC AGA GTC ACC GTC ACC TGC AAG GCC AGT CAG AAT GTG
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val>

192
*

GCT ACT AAT GTA GTC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA GAG GCT CCT AAA
Ala Thr Asn Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys>

240
*

GCG CTT ATT TAT ACG GCA TCC TAC CGG TTC AGT GGA GTC CCT TCA CGC
Ala Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg>

288
*

TTC TCA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser>

336
*

CTG CAG TCT GAT GAC TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG TAT AAC AAT
Leu Gln Ser Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn>

TAC CCA TAC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTC GAA ATC AAA
Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

图 17

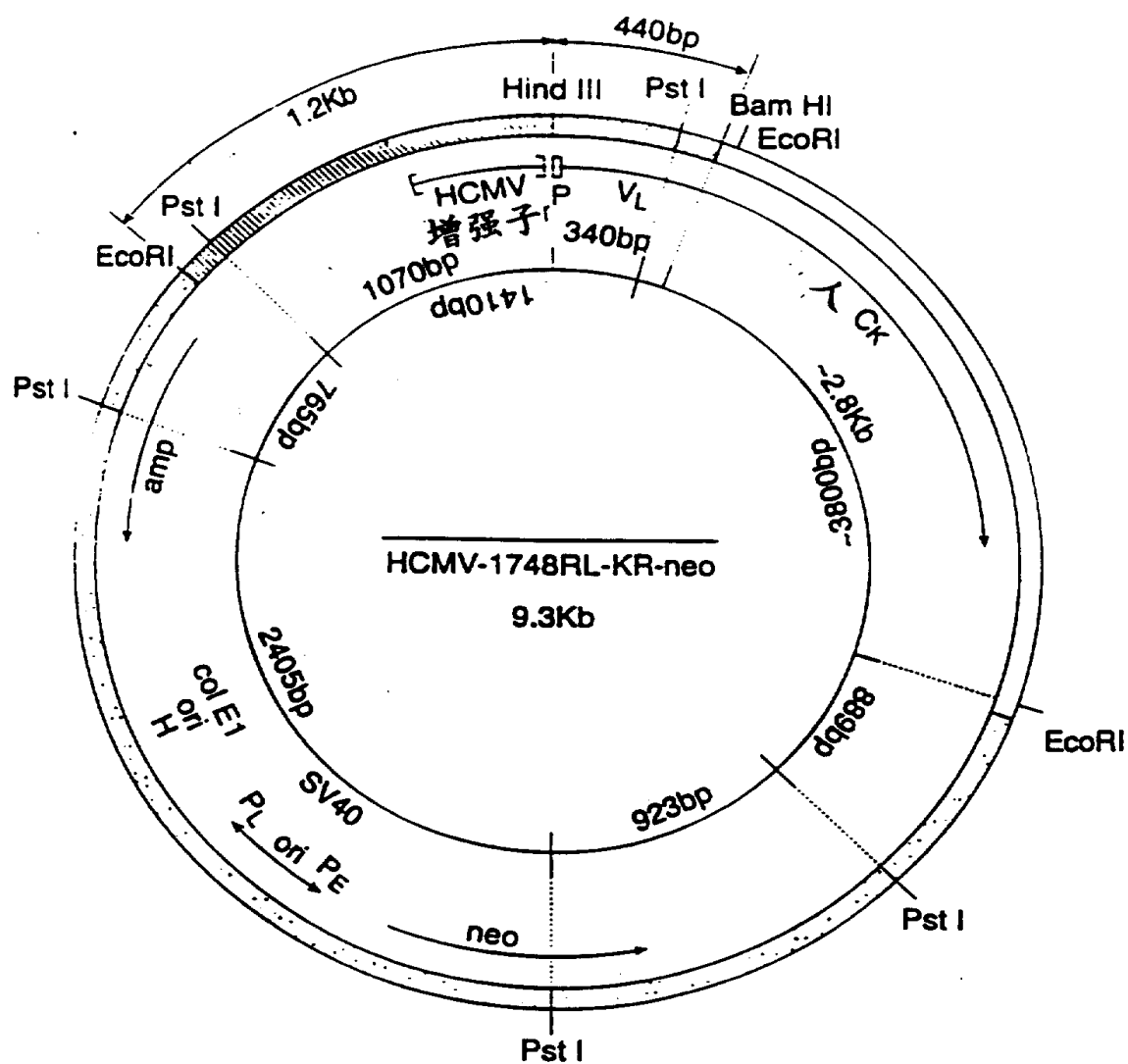


图 19

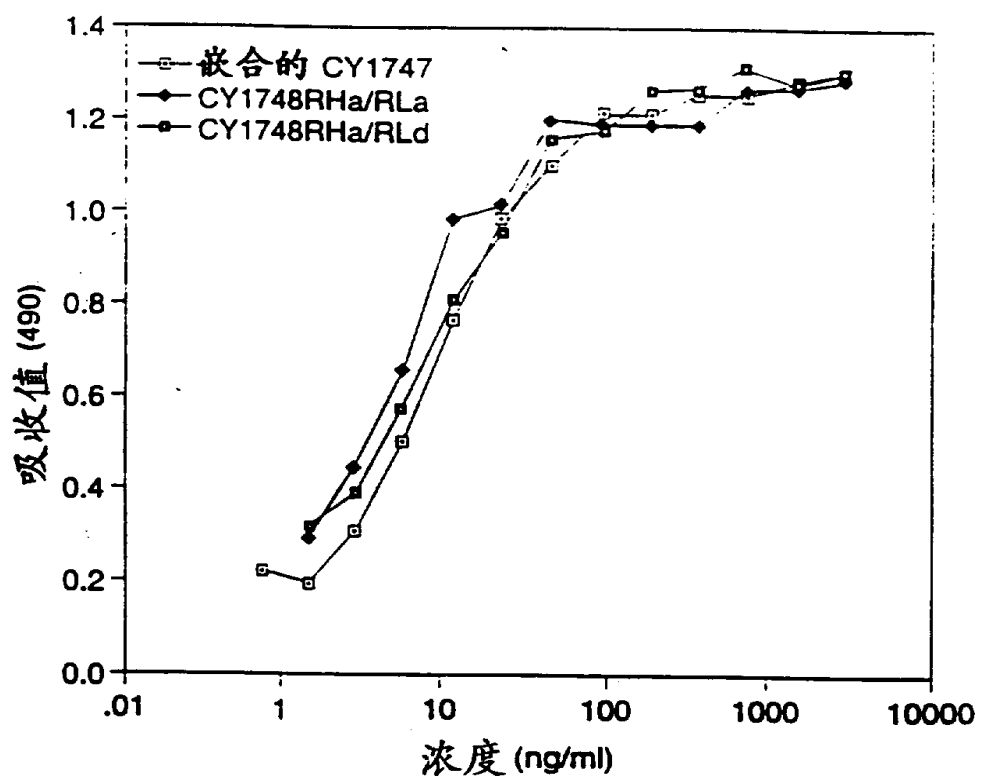


图 21

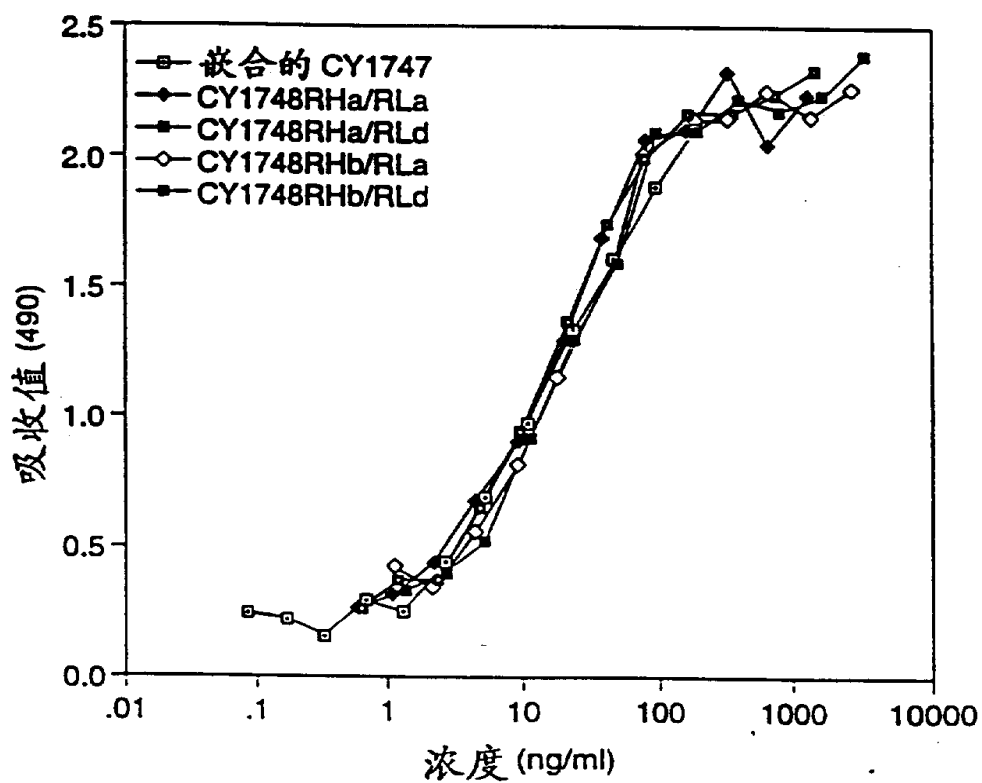
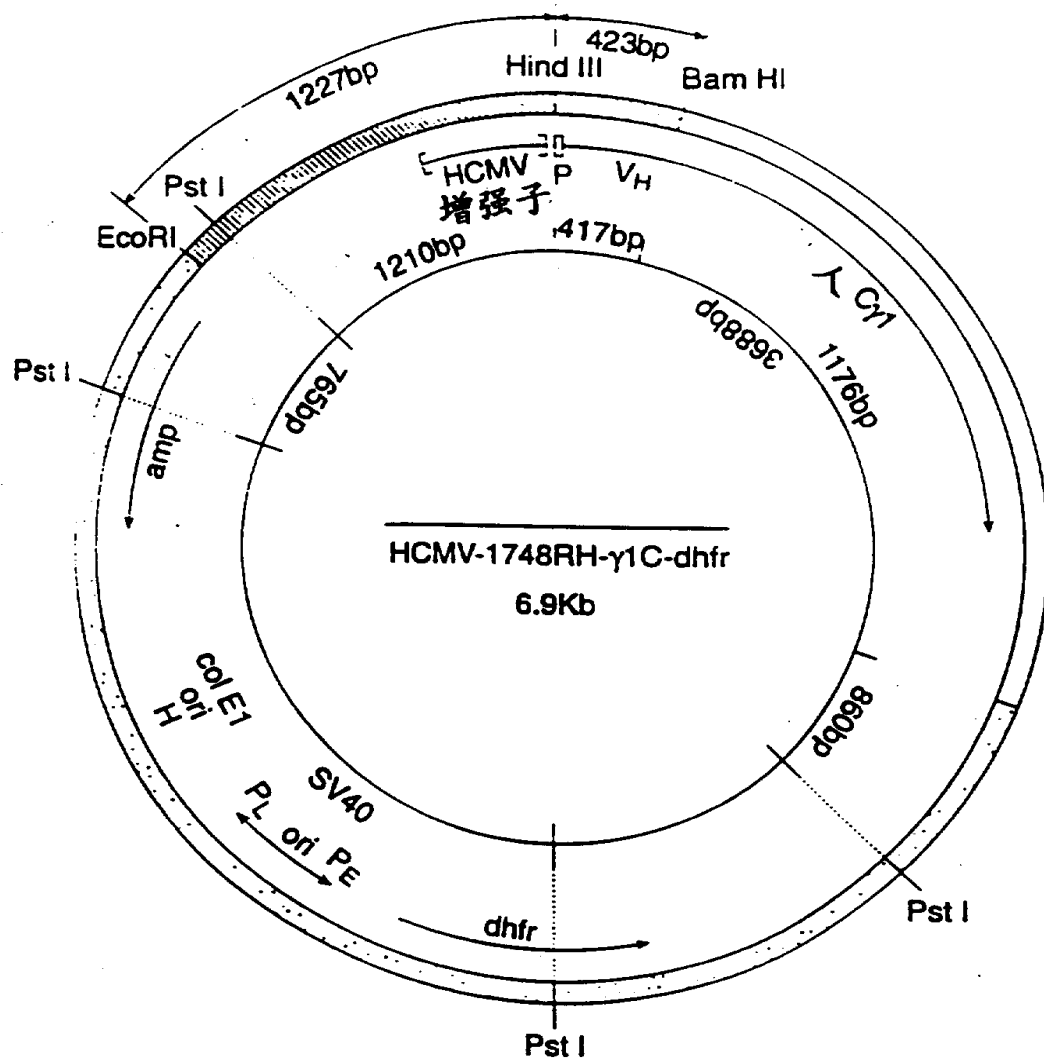
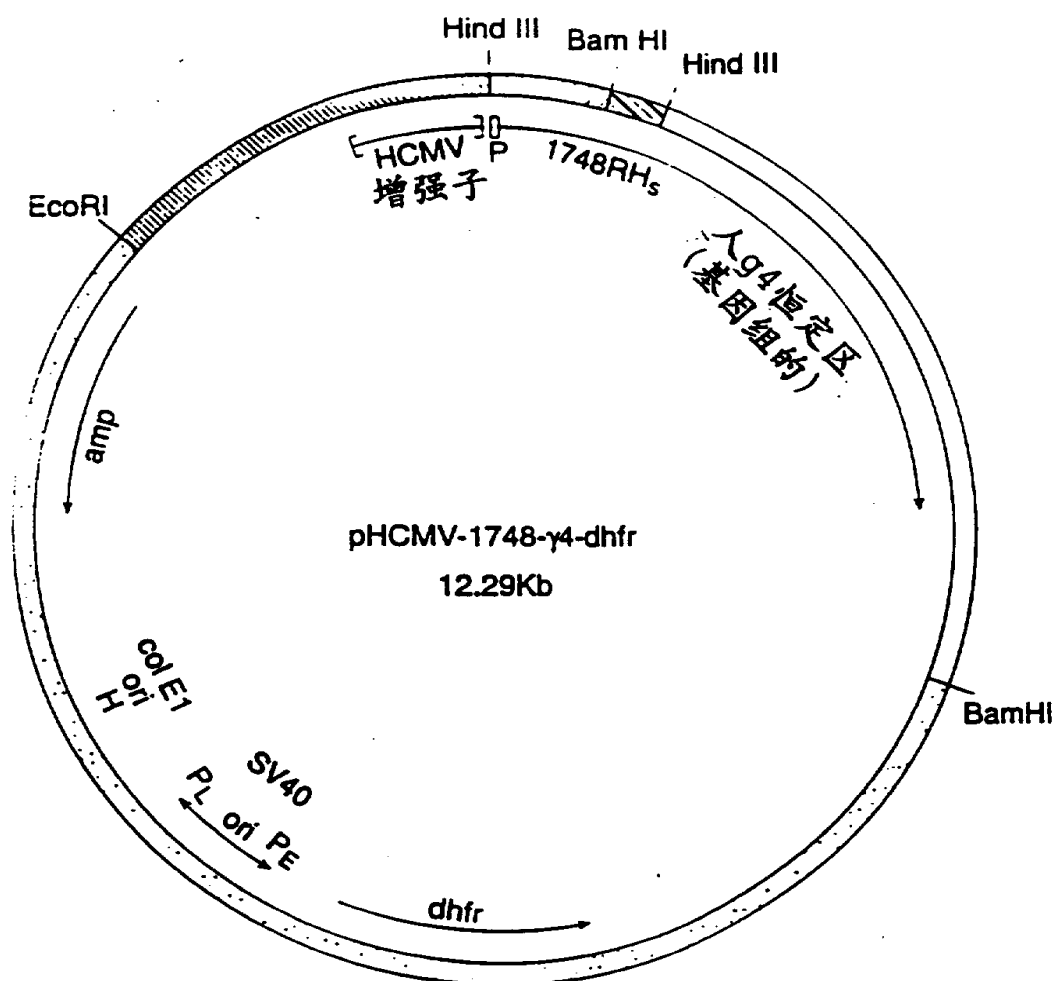


图 22



- ▨ 重构的1748RH可变区
- 人γ-1恒定区(cDNA片段)
- ▨ HCMV DNA 片段
- pSV2neo 载体片段

图 23



- ▣ 重构的1748RH可变区
- 人γ-4恒定区(基因组的)
- ▨ HCMV 启动子/增强子
- pSV2dhfr
- ▨ MCS (BamHI-XbaI-SalI-PstI=HindIII)

图 24

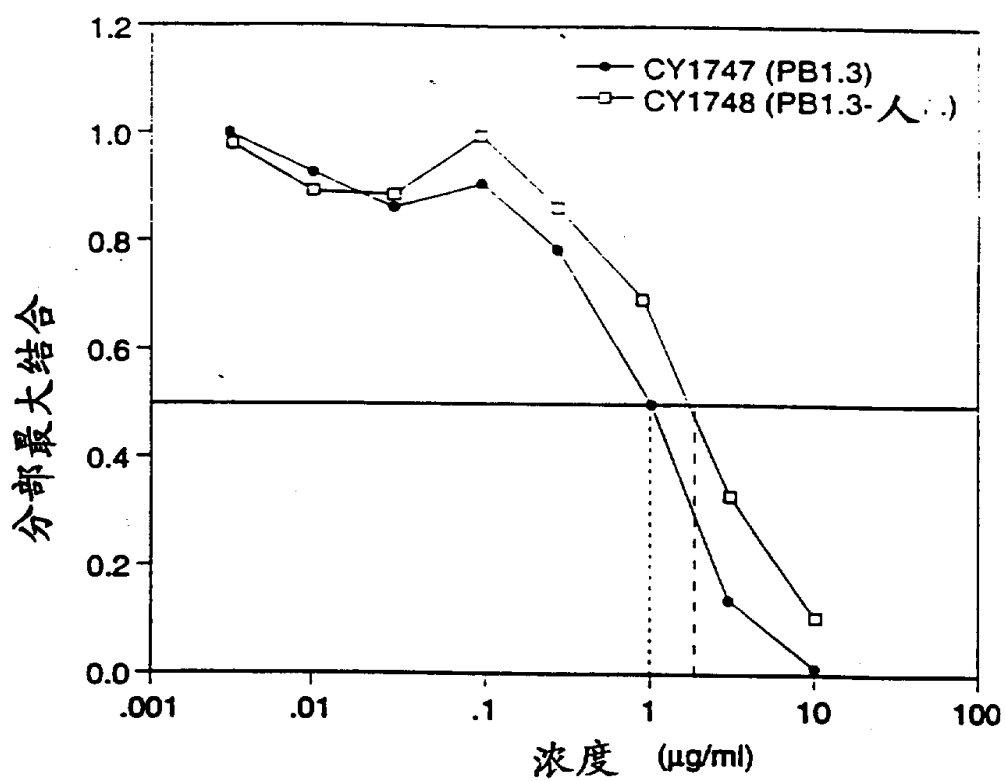


图 25

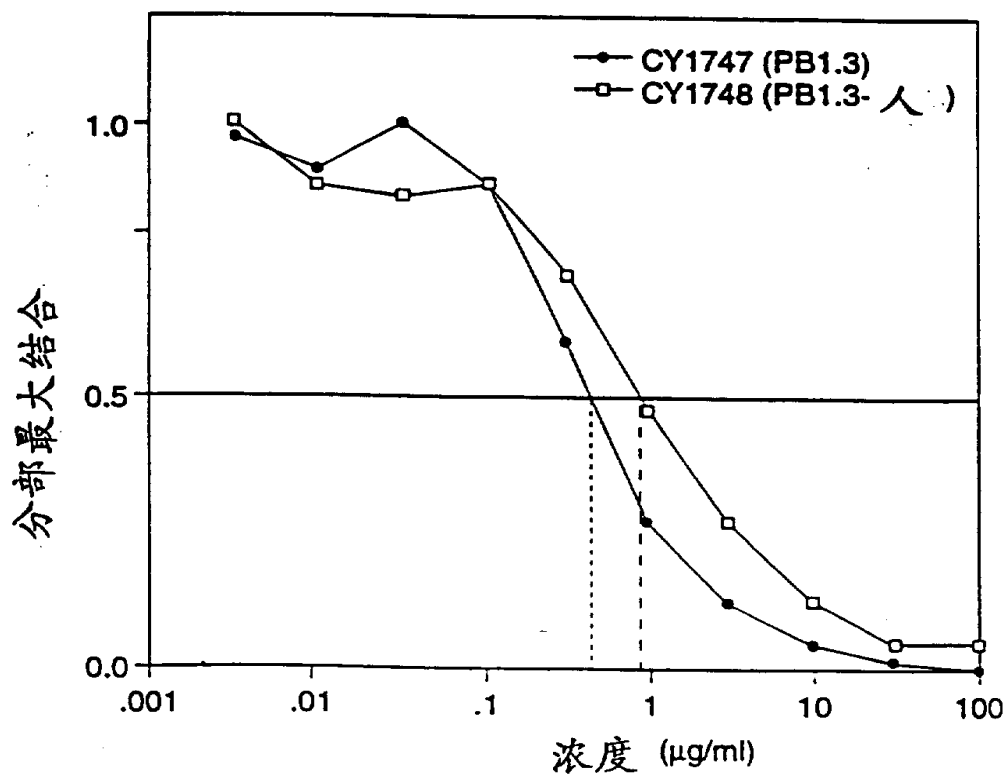


图 26

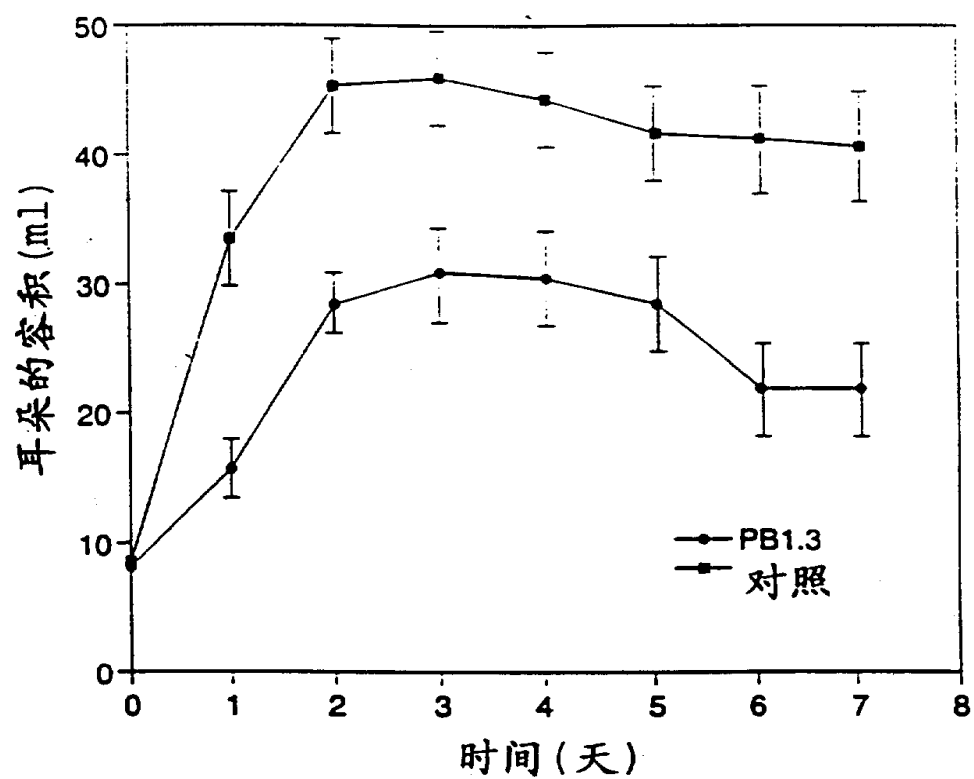


图 27

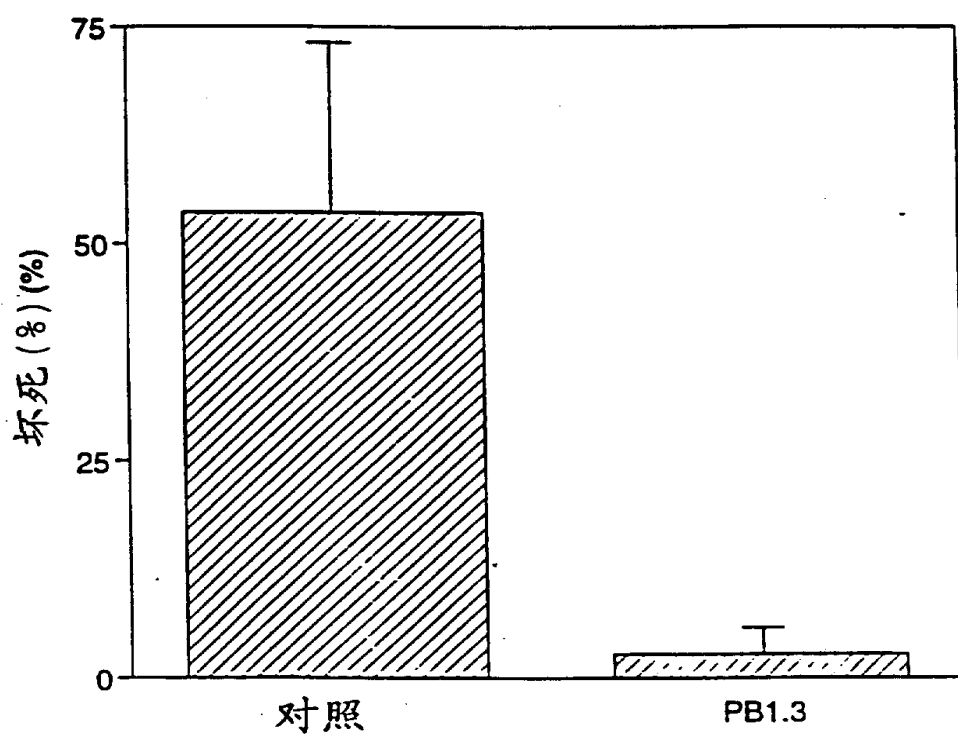


图 28

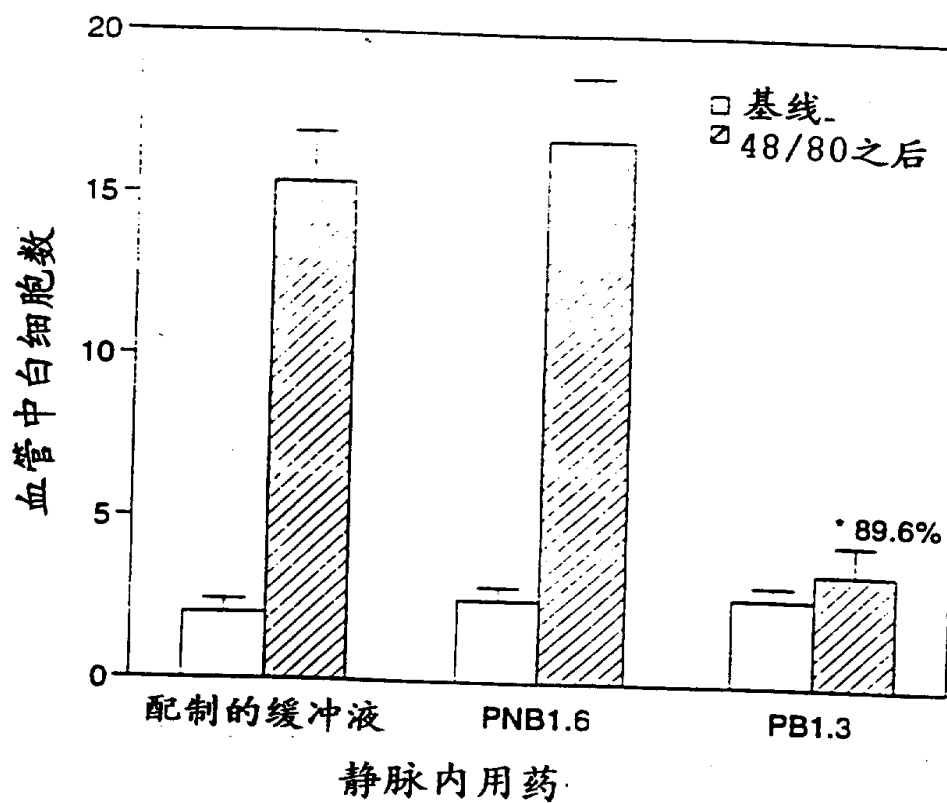


图 29

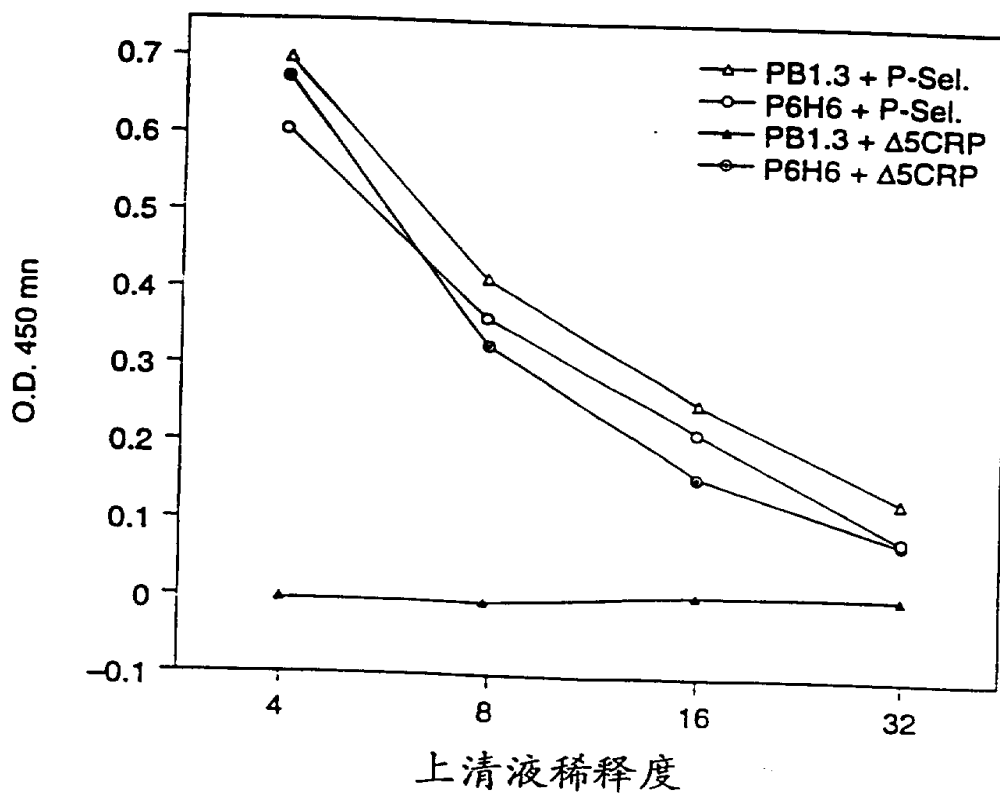


图 33

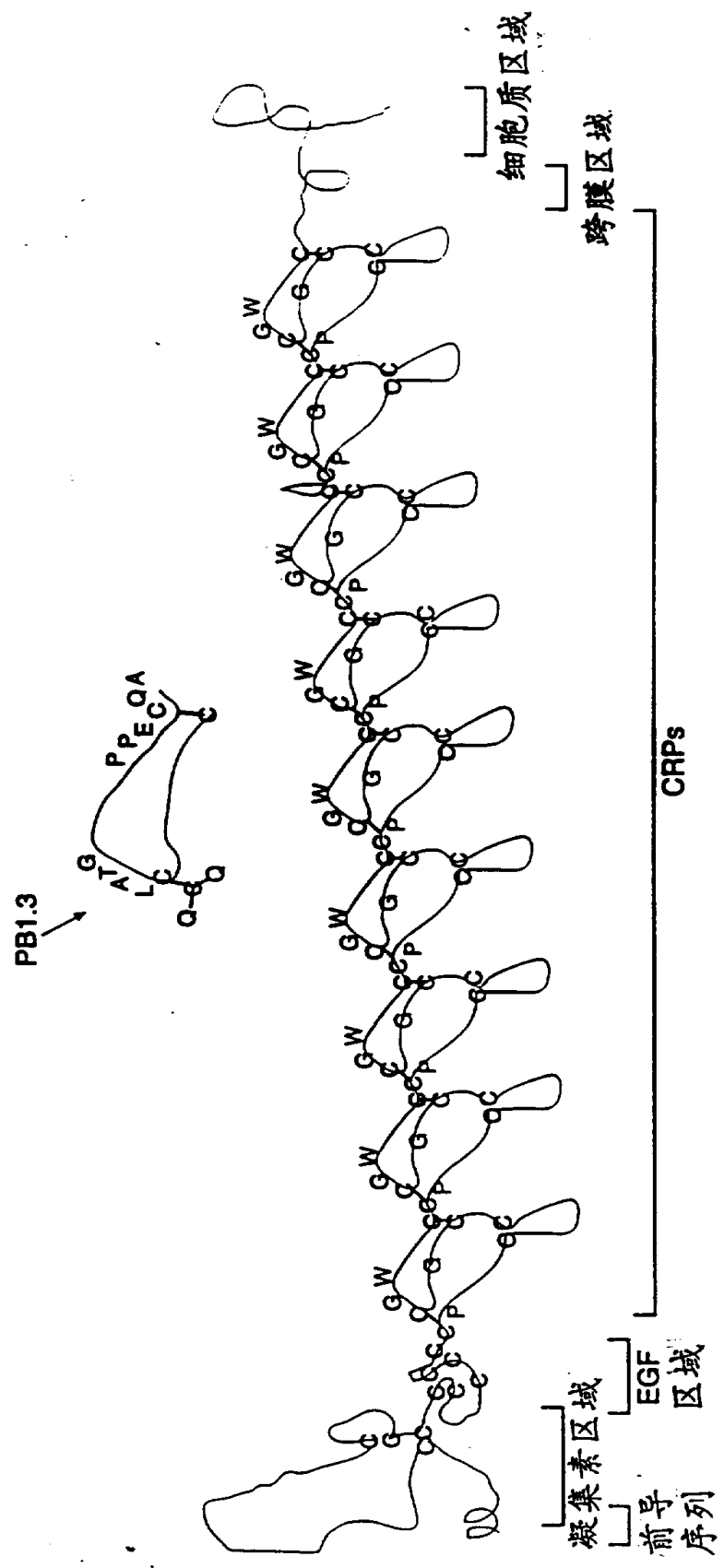


图 30

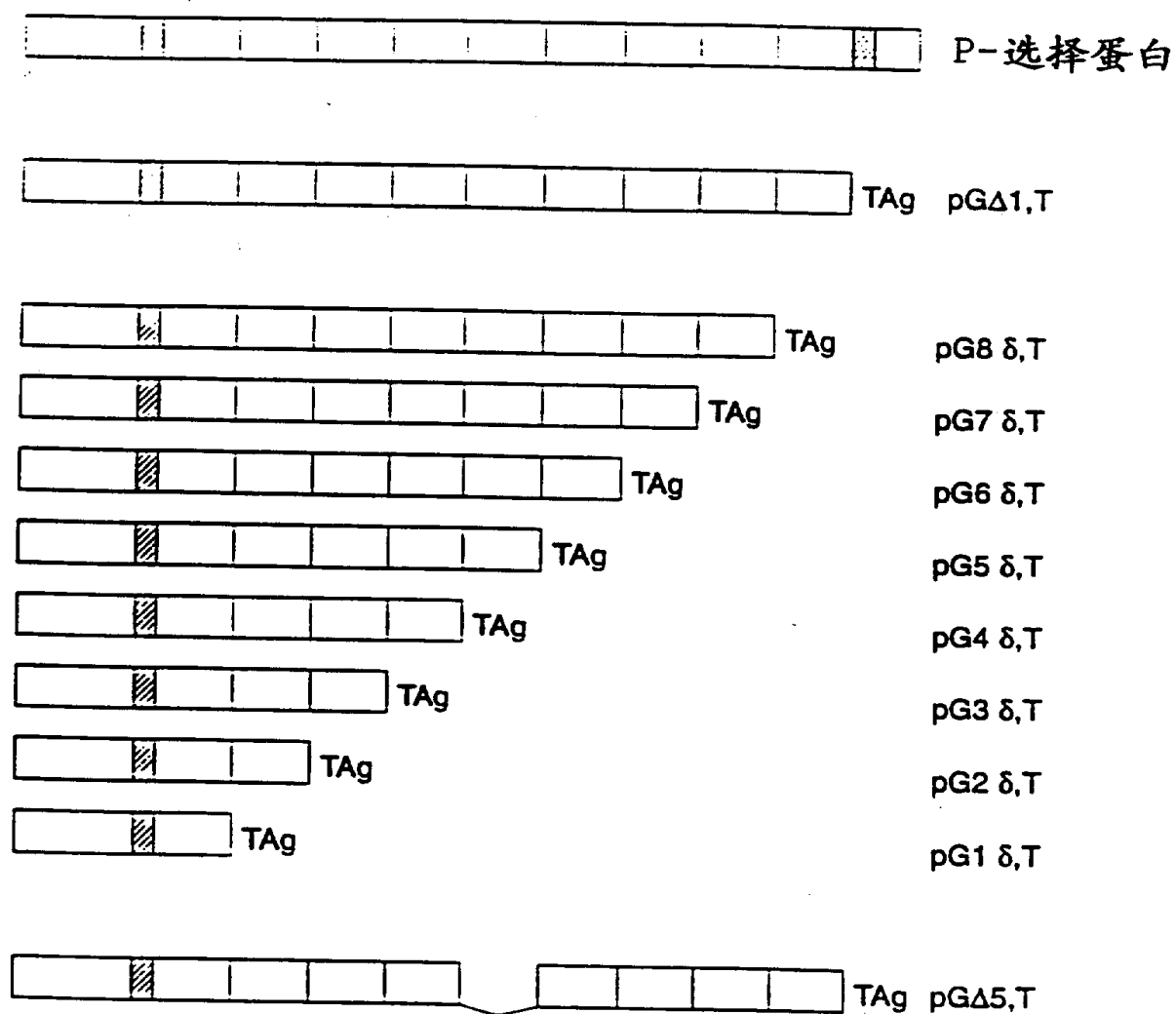
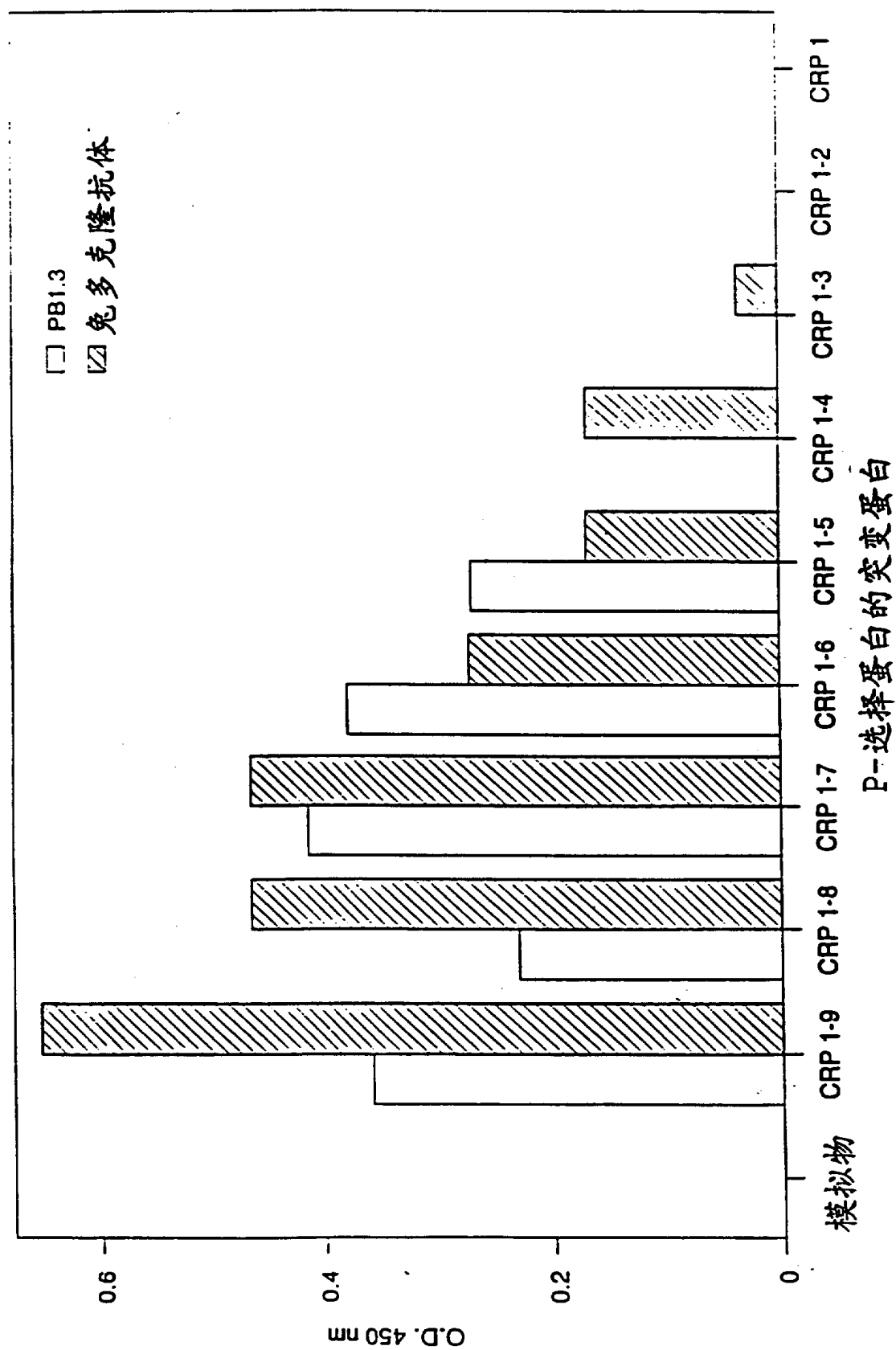


图 31



P-选择蛋白的突变蛋白

图 32

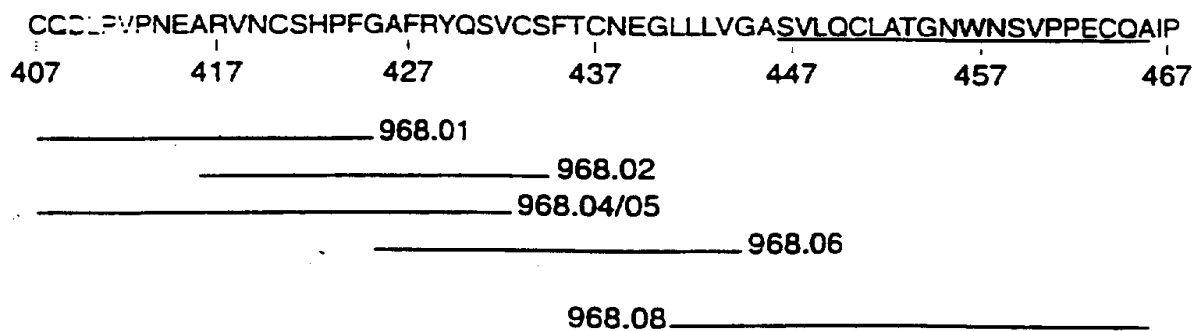


图 34A

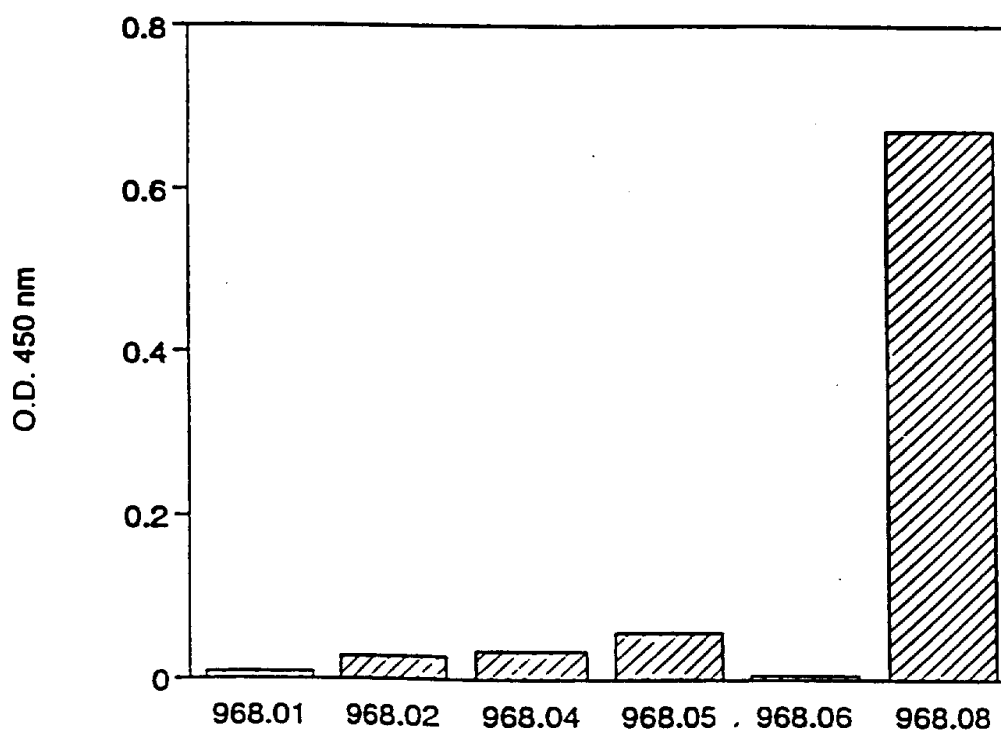


图 34B