



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1942483 B

(45) 授权公告日 2012.09.26

(21) 申请号 200580011205.9

A61K 39/395(2006.01)

(22) 申请日 2005.04.05

C12N 5/12(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

(30) 优先权数据

04008722.3 2004.04.13 EP

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.10.13

WO 9425067 A1, 1994.11.10, 说明书第4页第2行至第15行、第23行至第24行、第5页第30行至第33行、第26页第24行至第27页第7行、第34页第11行至第35页第3行。

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/003581 2005.04.05

MARJAN HEZAREH et al.. Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. JOURNAL OF VIROLOGY 75 24. 2001, 75(24), 12161-12166.

(87) PCT申请的公布数据

W02005/100402 EN 2005.10.27

Esohe E. Idusogie et al.. Mapping of the C1q binding site on Rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. The Journal of Immunology 164. 2000, 1644178.

(73) 专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

审查员 李影

(72) 发明人 Y·格劳斯 J·海姆伯

M·贾森-莫伦纳尔 D·克林

E·科佩茨基 P·帕伦 F·雷伯斯

B·斯坦纳 A·施特恩

P·施特赖因 K-G·施图本拉赫

J·范德温克尔 M·范武格特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 6 页

(54) 发明名称

抗 P 型选凝素抗体

(57) 摘要

本发明涉及抗 P 型选凝素抗体, 并且特别是涉及含有人源衍生的 Fc 部分并且不结合补体因子 C1q 的抗 P 型选凝素抗体及其变体。这些抗体具有新颖性和创造性特性, 对患有重度肢体局部缺血或周围动脉硬化闭塞症 (CLI/PAOD) 的患者有益处。

1. 人抗体或人源化抗体,其选自:
 - (a) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :1 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :2 定义;
 - (b) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :3 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :4 定义;
 - (c) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :5 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :6 定义;
 - (d) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :7 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :8 定义;
 - (e) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :9 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :10 定义;
 - (f) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :11 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :12 定义;
 - (g) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :13 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :14 定义;
 - (h) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :15 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :16 定义;
 - (i) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :17 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :18 定义;
 - (j) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :19 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :20 定义;和
 - (k) 抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :21 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :22 定义。
2. 权利要求 1 所述的抗体,其还包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :28 定义的重链恒定区。
3. 权利要求 1 所述的抗体,其还包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :23 定义的轻链恒定区。
4. 权利要求 1 所述的抗体,其还包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :28 定义的重链恒定区和由氨基酸序列 SEQ ID NO :23 定义的轻链恒定区。
5. 权利要求 1 所述的抗体,其中轻链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :3 定义,并且重链可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO :4 定义。
6. 权利要求 5 所述的抗体,其还包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :28 定义的重链恒定区。
7. 权利要求 5 所述的抗体,其还包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :23 定义的轻链恒定区。
8. 权利要求 5 所述的抗体,其还包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :28 定义的重链恒定区和由氨基酸序列 SEQ ID NO :23 定义的轻链恒定区。
9. 杂交瘤细胞系 DSM ACC2640、DSM ACC2641 或 DSM ACC2642。
10. 抗 P 型选凝素抗体,其获自杂交瘤细胞系 DSM ACC2640、DSM ACC2641 或 DSM ACC2642。
11. 核酸分子,其编码权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体分子。
12. 载体,其包含权利要求 11 的核酸分子。

13. 宿主细胞,其包含权利要求 12 的载体。
14. 用于制备权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体分子的方法,其包括在允许合成所述抗体分子条件下培养权利要求 13 的宿主细胞以及从所述培养物回收所述抗体分子。
15. 组合物,其包含权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体分子。
16. 权利要求 15 的组合物,其是药物组合物或诊断用组合物。
17. 药物组合物,其包含权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体和至少一种可药用赋形剂。
18. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述抗体的用途,用于制备预防和治疗炎性疾病和血栓性疾病的药物。
19. 权利要求 18 的用途,用于制备治疗缩写是 PAOD 的周围动脉硬化闭塞症或缩写是 CLI 的重度肢体局部缺血的药物。
20. 试剂盒,其包含权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体分子、权利要求 11 的核酸分子、权利要求 12 的载体或权利要求 13 的宿主细胞。

抗 P 型选凝素抗体

[0001] 本发明总体上涉及抗 P 型选凝素抗体并且特别是不结合补体因子 C1q 的抗 P 型选凝素抗体。优选地,这些抗体是人抗体或人源化抗体。

[0002] P 型选凝素 (CD62P、GMP-140、PADGEM、LECAM-3) 是对凝血酶和其它激动剂反应时在活化的血小板和活化的内皮细胞表面表达的 140kDa 钙依赖性结合糖的蛋白质 (McEver 等, J Biol Chem 270 :11025(1995) ;Varki, Proc Natl Acad Sci USA 91 :7390(1994) ; Springer TA, Annu RevPhysiol 57 :827(1995))。在这两种细胞类型中,P 型选凝素贮藏于分泌性颗粒内,即血小板的 α -颗粒和内皮细胞的 Weibel-Palade 体内 (McEver 等, J Clin Invest 84 :92(1984))。P 型选凝素是由氨基端的凝集素结构域、紧随其后的 EGF 样结构域、九个与补体调节蛋白同源的短共有重复序列、跨膜结构域和短胞质尾区构成的 I 型跨膜糖蛋白 (Johnston 等, Cell 56 :1033(1989))。P 型选凝素的结构类似于选凝素家族的另外两个成员 :E 型选凝素及 L 型选凝素,它们在细胞因子活化的内皮细胞上表达 (E 型选凝素) 或在绝大部分类型的白细胞上组成型表达 (L 型选凝素)。

[0003] 已知全部选凝素以低亲和性结合至唾液酰化、岩藻糖基化的小寡糖,例如唾液酰路易斯 x (sLe^x ;Foxall 等, J Cell Biol 117 :895(1992) ;Varki, Curr Opin Cell Biol 257 :257(1992))。P 型选凝素和 L 型选凝素还结合特定的硫酸化多糖如硫酸肝素,但 E 型选凝素不结合 (综述参见 McEver 和 Cummings, J Clin Invest 100 :S97(1997))。对 P 型选凝素的高亲和性配体是由附带唾液酰化 O-聚糖簇的多肽骨架组成的粘蛋白样糖蛋白 (McEver 等, J Biol Chem 270 :11025(1995))。与 P 型选凝素偏嗜性结合的一种唾酸粘蛋白配体是由循环白细胞正常表达为带两个由二硫键连接的亚基的同型二聚体的 P 型选凝素糖蛋白配体 -1 (PSGL-1, CD162), 其相对分子量接近 120kDa。P 型选凝素的结合位点位于 PSGL-1 的氨基最末端部分。P 型选凝素通过与其配体的结合介导白细胞在活化的血小板和活化的内皮细胞上滚动。这种滚动过程有效地降低了白细胞运动的速度,这不仅是白细胞牢固粘着于内皮以及随后变移进入内皮下的前提条件,也是白细胞在血栓内聚集的前提条件。

[0004] 利用 P 型选凝素缺陷性小鼠和 P 型选凝素特异性阻断抗体开展的研究已证实 P 型选凝素参与多种急性和慢性炎性疾病的病理生理学,包括局部缺血 / 再灌注损伤 (Winn 等, J Clin Invest 92 :2042(1993) ;Massberg 等, Blood 92 :507(1998))。此外, P 型选凝素在涉及炎性成分的心血管疾病如动脉粥样硬化症 (Collins 等, J Exp Med 191 :189(2000) ;Johnson 等, J Clin Invest 99 :1037(1997))、再狭窄 (Manka 等, Circulation 103 :1000(2001) ;Bienvenu 等, Circulation 103 :1128(2001)) 和血栓症 (Kumar 等, Circulation 99 :1363(1999) ;Andre 等, Proc Natl Acad Sci USA 97 :13835(2000) ;Blann 等, Br. J. Haematol 108 :191(2000) ;Myers 等, ThrombHaemostasis 85 :423(2001) 中也有明确作用。显而易见,对 P 型选凝素功能抑制作为一种疗法将在涉及白细胞对血管内皮或血小板粘着的多种疾病中有效 (参见例如 WO 93/06863)。

[0005] 抗 P 型选凝素抗体已在本领域内描述并已对它们的抗炎效果和抗血栓效果进行了研究。美国专利 4,783,399 和 WO 93/06863 描述了与活化的血小板反应的小鼠抗 P 型选凝素单克隆抗体。Geng J.G. 等 (J. Biol. Chem., 266(1991) 22313-22318) 描述了结合 P

型选凝素的氨基酸(aa)片段 aa60-75(Cys 至 Glu,根据包含信号序列的 Swiss-Prot 序列 P16109 编号)的小鼠单克隆抗体。WO 93/21956 涉及与一种明确的抗体竞争、可以在 P 型选凝素片段(aa 60-75)存在及无钙离子时结合的小鼠抗 P 型选凝素单克隆抗体和人源化抗体 IgG1 亚类。没有一种所提及的抗人 P 型选凝素小鼠单克隆抗体用于治疗人类患者。在 WO 93/21956 中所提及的人源化的抗 P 型选凝素人抗体 IgG1 亚类正处在临床前开发阶段(www.mrcetechnology.org)。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明涉及特征如下的抗体:该抗体结合 P 型选凝素并且不结合人补体因子 C1q。优选地,该抗体还不结合 NK 细胞表面的人 Fc γ 受体。本发明的抗体含有人源衍生的 Fc 部分。优选地,这些抗体是人源化抗体或人抗体。这些抗体具有新颖性和创造性特性,对患有炎症性疾病和血栓性疾病、尤其患有周围动脉硬化闭塞症(PAOD)和重度肢体局部缺血(CLI)的患者有益处。

[0008] 附图简述

[0009] 图 1 显示本发明的抗体抑制白细胞样 HL60 细胞对包被于微量滴定板上的纯化的 P 型选凝素的粘着。突变的抗体比未突变亲本抗体更有效。

[0010] 图 2 显示本发明的抗体在测量凝血酶活化的血小板对 HL60 细胞粘着的玫瑰花结鉴定法中的抑制活性。

[0011] 图 3a 和 3b 描述本发明的抗体与大鼠 P 型选凝素和食蟹猴 P 型选凝素的交叉反应性。图 3a:抗 P 型选凝素抗体不影响凝血酶活化的大鼠血小板对 HL60 细胞的粘着,而可商业性获得的抗 P 型选凝素多克隆抗体(Pharming 09361A)抑制这种相互作用。图 3b:本发明的抗体抑制活化的食蟹猴血小板对 HL60 细胞的粘着。

[0012] 图 4a-c 通过在 P 型选凝素转化子、E 型选凝素转化子和 L 型选凝素转化子上的代表性结合曲线证实抗体对 P 型选凝素、E 型选凝素和 L 型选凝素的选择性。本发明的抗体以 0.01-0.07 μ g/ml 范围的 EC₅₀ 值结合 P 型选凝素 CHO 细胞。在 E 型选凝素 CHO 细胞和 L 型选凝素 300.19 细胞上的 EC₅₀ 值优选地高于 100 μ g/ml。

[0013] 图 5 描述本发明的抗体在完全人流式系统中的抑制活性。本发明抗体以 65 次/秒的剪切速率(shear rate)以浓度依赖性方式抑制人白细胞对血小板单层的粘着。

[0014] 图 6 描述本发明的抗体对白细胞粘着于表达 P 型选凝素的人内皮细胞的抑制效果。图 6a 以对照的%显示对白细胞粘着的总抑制,图 6b 代表性地表现多种抗体中的一种抗体对不同白细胞亚群的绝对数的抑制效果。

[0015] 发明详述

[0016] I. 定义

[0017] 术语“P 型选凝素”指如 Hsu-Lin 等, J Biol Chem 259:9121(1984) 和 Mc Ever 等, J Clin Invest 84:92(1989) 所描述的由人血小板和内皮细胞表达的 140kDa 蛋白质。这种 I 型跨膜糖蛋白由氨基端的凝集素结构域、紧随其后的表皮生长因子(EGF)样结构域和九个共有重复序列结构域组成。该糖蛋白通过一个单跨膜结构域锚定于膜并且含有一个短胞质尾区。本发明提供能够抑制一种或多种由 P 型选凝素介导的活性例如其炎性活性或血栓性活性的抗体。这类抗体结合 P 型选凝素并通过干扰 P 型选凝素对其配体的结合发挥作用。

[0018] 术语“P型选凝素配体”优选地涉及P型选凝素的高亲和性配体和与生物学相关性配体,如由Moore等;J. Cell Biol 118:2445(1992),Sako等,Cell 75:1179(1993)描述的粘蛋白样糖蛋白P型选凝素配体糖蛋白-1(PSGL-1)。PSGL-1是带胞外结构域富含丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸的I型膜蛋白质,该蛋白质包含一系列与唾液酰化O-聚糖簇连接的十聚体重复区。PSGL-1通常由循环白细胞表达为带两个由二硫键连接的亚基并且相对分子量接近120kDa的同型二聚体。P型选凝素的结合位点位于PSGL-1的氨基最末端部分。最近证实由血小板表达并与PSGL-1具有结构相似性的唾液粘蛋白GPIb α 是P型选凝素的血小板配体(Romo等,J Exp Med 190:803(1999))。GPIb α 结合P型选凝素的生理结果仍处于研究中,不过这种相互作用似乎对血小板的滚动和其粘着于活化的内皮细胞有贡献(Berndt等,Thromb Haemost 86:178(2001))。P型选凝素还以低亲和性结合唾液酰化、岩藻糖基化的小寡糖如唾液基路易斯x(Foxall等,J Cell Biol 117:895(1992)),Varki,Curr Opin Cell Biol 257(1992)和特定的硫酸化多糖,如硫酸肝素(McEver等,J Biol Chem 270:11025(1995))。

[0019] 术语“抗体”包括多种形式的抗体,优选地是单克隆抗体,包括但不限于完整抗体、抗体片段、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和基因工程抗体(变异抗体或突变抗体),只要其保留本发明的特征性特性即可。特别优选的是人单克隆抗体或人源化的单克隆抗体,尤其是作为重组人抗体。

[0020] 如本文中所示,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指的是具有一种氨基酸组成的抗体分子的制品。

[0021] 术语“嵌合抗体”指的是通常由重组DNA技术制备的单克隆抗体,其包含来自一个来源或一个种属的可变区即结合区和衍生自不同来源或不同种属的恒定区的至少一部分。特别优选的是包含鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体。此类鼠/人嵌合抗体是包含编码鼠免疫球蛋白可变区的DNA片段和编码人免疫球蛋白恒定区的DNA片段的免疫球蛋白基因的表达产物。本发明所包含的“嵌合抗体”的其它形式是其中恒定区相对原始抗体的恒定区已进行修饰或改变以产生根据本发明的特性,尤其关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合特性改变的嵌合抗体。此类“嵌合抗体”也称作“类别转换抗体”。产生嵌合抗体的方法包括目前在本领域内众所周知的常规重组DNA技术和基因转染技术。参见例如Morrison, S. L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(1984)6851-6855;美国专利号5,202,238和5,204,244。

[0022] 术语“人源化抗体”指这样的抗体,其中构架或“互补决定区”(CDR)已被修饰以便包含与亲本免疫球蛋白特异性相比具有不同特异性的免疫球蛋白CDR。在一个优选的实施方案中,将鼠CDR向人抗体的构架区内移植以产生“人源化抗体”。参见例如Riechmann, L. 等,Nature 332(1988)323-327以及Neuberger, M. S. 等,Nature 314(1985)268-270。特别优选的CDR对应于这样的CDR,其代表识别以上提及的针对嵌合抗体和双功能性抗体的抗原的序列。本发明所包括的“人源化抗体”的其它形式是其中恒定区相对于原始抗体的恒定区已进行修饰或改变以产生根据本发明的特性、尤其关于C1q结合和/或Fc受体(FcR)结合特性的那些人源化抗体。

[0023] 如本文中所示,术语“人抗体”旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。人抗体在本领域内是众所周知的(vanDijk和van de Winkel,Curr Opin Pharmacol 5:368(2001))。还可在免疫后能产生完整的人抗体库而不产生内源性免疫球蛋白的转基因动物(例如小鼠)中产生人抗体。人种系免疫球蛋白基因阵列转入此

类种系突变的小鼠中将导致在以抗原攻击后产生人抗体（参见例如 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551-2555(1993) ;Jakobovits 等, Nature, 362 :255-258(1993) ; Bruggemann 等, Year in Immuno., 7 :33(1993)）。还可以在噬菌体展示文库 (Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227 :381(1992) ;Marks 等, J. Mol. Biol., 222 :581(1999)) 中产生人抗体。Cole 等和 Boerner 等的技术也可用于制备人单克隆抗体 (Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985) 以及 Boerner 等, J. Immunol., 147(1) :86-95(1991))。如对本发明的嵌合抗体和人源化抗体提及,如本文中所述的术语“人抗体”还包含在恒定区中已进行修饰以产生本发明的特性、尤其关于 C1q 结合和 / 或 Fc 受体 (FcR) 结合特性的抗体。此外,本发明包括结合 C1q 和 / 或 FcR 的人抗体。此类人抗体特征在于:对 P 型选凝素的选择性高于对 E 型选凝素和 L 型选凝素的选择性。此类本发明的抗体以 0.01-0.07 μ g/ml 范围内的 EC₅₀ 结合于表达 P 型选凝素的细胞。在表达 E 型选凝素和 L 型选凝素的细胞上的 EC₅₀ 值优选地高于 100 μ g/ml。此类抗体优选地作为制备具有本发明特点的人抗体的中间体使用。

[0024] 如本文中所示,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的全部人抗体,例如从宿主细胞如 NS0 或 CHO 细胞或从人免疫球蛋白基因的转基因动物(例如小鼠)分离的抗体,或利用宿主细胞内已转染的重组表达载体表达的抗体。此类重组人抗体具有重排形式的可变区和恒定区。本发明的重组人抗体已经历体内 (in vivo) 的体细胞高变作用。因此,重组抗体中的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列,它们虽然衍生自人种系 VH 和 VL 序列并与之相关,但是可以不在体内的人抗体种系库中天然存在。

[0025] 如本文中所示,“可变区”(轻链 (VL) 可变区、重链 (VH) 可变区) 指的是重链和轻链对中直接参与使抗体结合抗原的每一可变区。人可变轻链和重链的结构域具有相同的一般结构并且每个结构域包含序列大部分为保守的四个构架 (FR) 区,其由三个“高变区”(或互补决定区, CDR) 连接。构架区为 β 片层构象并且 CDR 可以形成连接 β 片层结构的环。每条链中的 CDR 通过构架区稳定它们的三维结构并且与来自另一条链的 CDR 共同形成抗原结合位点。抗体重链 CDR3 区和轻链 CDR3 区在本发明抗体的结合特异性 / 亲和性中发挥特别重要的作用并且因此作为本发明的另一个目的。

[0026] 当在本文中使用时,术语“高变区”或“抗体的抗原结合部分”指在抗体中负责结合抗原的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是那些除如本文中所定义的高变区残基以外的可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链从 N-末端至 C-末端包含结构域 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。特别地,重链的 CDR3 是对抗原结合贡献最大的区域。CDR 和 FR 区根据 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991) 的标准定义来确定和 / 或是那些来自“高变环”的残基。

[0027] 如本文中所示,术语“核酸”或“核酸分子”旨在包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以呈单链或呈双链,但是优选地是双链 DNA。

[0028] 当核酸与另一个核酸序列处于功能性联系时,该核酸为“有效地连接”。例如,若前序列或分泌性前导区的 DNA 表达为参与多肽分泌的前蛋白,则其与这种多肽的 DNA 有效地连接;若启动子或增强子影响某编码序列的转录,则其与该编码序列有效地连接;或者若核糖体结合位点如此安置以至于促进翻译,则其与编码序列有效地连接。通常,“有效地连

接”意指所连接的DNA序列是邻接的,而且在分泌性前导区的情形中是邻接的并且处在可读相。然而,增强子没有必要呈邻接。在方便的限制性位点内,通过连接作用完成连接。若此类限制性位点不存在,则根据常规习惯使用合成性寡核苷酸衔接体或接头。

[0029] 如本文中所用,互换使用词语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养”并且这些命名均包含子代。因此,表述“转化体”和“转化的细胞”包括原代的受试细胞以及因此所衍生的培养物而不论转移的次数。还应当理解的是因有意突变或无意突变,全部子代可以在DNA内容上不严格地相同。包括作为从最初所转化细胞中筛选出的具有相同功能或生物学活性的变异子代。在打算明确指示时,从上下文将显而易见。

[0030] 虽然“恒定结构域”不直接参与抗体结合抗原,但是表现出多种效应子功能。抗体或免疫球蛋白根据它们重链恒定区的氨基酸序列划分为如下类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且可将这些类别中的几个类别进一步划分为亚类(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4、IgA1和IgA2。将对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。本发明的抗体优选地是IgG型。

[0031] 抗体的Fc部分直接参与补体活化、C1q结合及Fc受体结合。尽管抗体对补体系统的影响依赖某些条件,但是对C1q的结合是由Fc部分中明确的结合位点引起。此类结合位点在本领域内为已知并且例如由Boakle等, Nature 282(1975)742-743、Lukas等, J. Immunol. 127(1981)2555-2560、Brunhouse和Cebra, Mol. Immunol. 16(1979)907-917、Burton等, Nature 288(1980)338-344、Thommesen等, Mol. Immunol. 37(2000)995-1004、Idusogie等, J. Immunol. 164(2000)4178-4184、Hezareh等, J. Virology 75(2001)12161-12168、Morgan等, Immunology 86(1995)319-324、EP 0307434描述。此类结合位点例如是L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331和P329(根据Kabat的EU指数编号,见以下)。IgG1、IgG2和IgG3亚类的抗体通常表现出补体活化作用以及结合C1q和C3,而IgG4不活化补体系统并且不结合C1q和C3。如本文中所用,术语“人源衍生的Fc部分”指这样的Fc部分,其是人抗体IgG4亚类的Fc部分或者是以如此方式受到修饰以至于不能检测到如下所定义的C1q结合和/或FcR结合的人抗体IgG1、IgG2或IgG3亚类的Fc部分。“抗体的Fc部分”是本领域技术人员众所周知的术语并且基于木瓜蛋白酶对抗体的切割来定义。本发明的抗体含有人源衍生的Fc部分作为Fc部分并且优选地含有人恒定区的所有其他部分。优选地,Fc部分是人Fc部分,并且尤其优选地是来自人IgG4亚类或是来自人IgG1亚类的已突变的Fc部分。最优选的是示于SEQ ID NO:25-28中或不带PVA236突变的SEQ ID NO:25中的Fc部分和重链恒定区。

[0032] II. 本发明的优选实施方案

[0033] 本发明包含结合P型选凝素的表征如下的抗体:该抗体的可变重链氨基酸序列CDR3选自重链CDR3序列SEQ ID NO:38、39、40、41或42。

[0034] 本发明优选地提供结合P型选凝素的包含可变重链和可变轻链的表征如下的抗体:可变重链包含CDR序列CDR1、CDR2和CDR3,并且CDR1选自SEQ ID NO:29、30、31、32, CDR2选自SEQ ID NO:33、34、35、36、37, CDR3选自SEQ ID NO:38、39、40、41、42、其中相互独立地选择所述的CDR。

[0035] 本发明抗体优选地特征在于:可变轻链包含CDR序列CDR1、CDR2和CDR3,并且CDR1选自SEQ ID NO:43、44, CDR2选自SEQ ID NO:45、46以及CDR3选自SEQ ID NO:47、

48、49、50、51、52,其中相互独立地选择所述的 CDR。

[0036] 抗体优选地特征在于:含有作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:2 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:1 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ IDNO:4 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:3 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:6 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:5 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:8 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ IDNO:7 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:10 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:9 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:12 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:11 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ IDNO:14 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:13 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:16 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:15 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:18 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:17 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:20 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:19 的 CDR;作为重链 CDR 的 SEQ ID NO:22 的 CDR 以及作为轻链 CDR 的 SEQ ID NO:21 的 CDR。

[0037] CDR 序列可根据 Kabat 等《Sequences of Proteins of Immunological Interest》第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991) 的标准定义来确定。每条链中的 CDR 通过构架氨基酸分隔。SEQ ID NO:1-22 的 CDR 示于 SEQ ID NO:29-52。

[0038] 本发明抗体优选地特征在于:该抗体结合 P 型选凝素并且包含独立选自如下的可变重链区和可变轻链区:

[0039] a) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:2 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:1 定义的轻链可变结构域;

[0040] b) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:4 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:3 定义的轻链可变结构域;

[0041] c) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:6 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:5 定义的轻链可变结构域;

[0042] d) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:8 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:7 定义的轻链可变结构域;

[0043] e) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:10 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:9 定义的轻链可变结构域;

[0044] f) 由氨基酸序列 SEQ IDNO:12 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:11 定义的轻链可变结构域;

[0045] g) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:14 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:13 定义的轻链可变结构域;

[0046] h) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:16 定义的重链可变结构域和由氨基酸序列 SEQ ID NO:15 定义的轻链可变结构域;

[0047] i) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:18 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:17 定义的轻链可变结构域;

[0048] j) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:20 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:19 定义的轻链可变结构域;

[0049] k) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:22 定义的重链可变结构域和由 SEQ IDNO:21 定义的

轻链可变结构域。

[0050] 本发明抗体优选地特征在于：重链可变区包含独立选自 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 和 22 的氨基酸序列。

[0051] 本发明抗体优选地特征在于：轻链可变区包含独立选自 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 和 21 的氨基酸序列。

[0052] 本发明涉及结合 P 型选凝素并且不结合补体因子 C1q 和 / 或 Fc 受体的抗体。这些抗体不引起依赖补体的细胞毒性 (CDC) 和 / 或抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。优选地，抗体特征在于：它结合 P 型选凝素、含有人源衍生的 Fc 部分并且不结合补体因子 C1q。更优选地，抗体是人抗体或人源化抗体。

[0053] 本发明抗体优选地特征在于：恒定链为人类来源。此类恒定链在本领域内是众所周知的并且例如由 Kabat 描述（参见例如 Johnson, G. 以及 Wu, T. T., *Nucleic Acid Res.* 28(2000)214-218)。例如，有用的人重链恒定区包含独立选自 SEQ ID NO :24、25、26、27 和 28 的氨基酸序列。例如，有用的人轻链恒定区包含 κ -轻链恒定区 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列。

[0054] 抗体 Fc 区中的 Fc 部分所介导的效应子功能指的是在抗体结合抗原后起作用的效应子功能（这些功能涉及活化补体级联系统和 / 或通过 Fc 受体 (FcR) 活化细胞）。

[0055] 可通过 CH50 鉴定法评估补体级联系统的功能。向试验血清中添加用抗红细胞抗体 (EA) 致敏的绵羊红细胞以便活化可引起溶血的经典途径。裂解 50% 红细胞所需的血清体积决定 CH50 单位。AP-CH50 测量旁路途径和终末途径。此方法除使用兔红细胞以外与 CH50 鉴定法相似。在添加试验血清后即活化旁路途径。

[0056] C1q 和两种丝氨酸蛋白酶 C1r 及 C1s 形成依赖补体的细胞毒性 (CDC) 途径中的第一种成分即 C1 复合物。为了活化补体级联系统, C1q 结合于已结合靶抗原的至少两个分子的 IgG1 或一个分子的 IgM (Ward 和 Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94(1995))。Burton 描述了 (*Molec. Immunol.*, 22(3):161-206(1985)) 包含第 318 至 337 位氨基酸残基的重链区参与补体固定。Duncan 和 Winter (*Nature* 332:738-40(1988)) 使用定点诱变, 报道 Glu318、Lys320 和 Lys322 形成 C1q 的结合位点。通过含有 Glu318、Lys320 和 Lys 322 残基的合成短肽抑制补体介导性裂解的能力证实这些残基在结合 C1q 中的作用。

[0057] 术语“依赖补体的细胞毒性 (CDC)”指本发明抗体在补体存在时裂解表达 P 型选凝素的人内皮细胞和血小板。CDC 优选地通过在补体存在时用本发明的抗体处理表达 P 型选凝素的人内皮细胞和血小板来测量。这些细胞优选地用钙荧光素标记。若抗体在 30 μ g/ml 浓度时诱导 20% 或更多靶细胞的裂解则出现 CDC。然而本发明人发现对于本发明抗体的特点而言, 在 ELISA 鉴定法中对补体因子 C1q 减少的结合是必需的。在该鉴定法中, ELISA 板原则上用浓度范围的抗体包被, 随后向平板添加纯化的人 C1q 或人血清。通过抗 C1q 的抗体和随后通过过氧化物酶标记的缀合物检测 C1q 结合。将检测结合 (最大结合 :B_{max}) 测量为过氧化物酶底物 ABTS (2,2' - 连氨基 - 双 - [3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸 (6)] 在 405nm (OD₄₀₅) 处的光密度。因此, 本发明涉及表征如下的抗体 : 抗体对补体因子 C1q 的不结合指的是这种 ELISA 鉴定法测定, 其中 C1q 对抗体浓度为 10 μ g/ml 时的抗体的最大结合 (B_{max}) 小于等于对 hu-Mab<P 型选凝素 >LC 1004-002 (DSMACC2641) 细胞系的 LC 1004-002 抗体的 B_{max} 的 30%, 优选地小于等于 20% 或更低。

[0058] 更优选地,本发明的抗体在 ELISA 鉴定法中显示出对补体因子 C3 减弱的结合。此鉴定法按照如 C1q 鉴定法相同的方式进行。在该鉴定法中,ELISA 板原则上以浓度范围的抗体包被,随后向平板添加纯化的人 C3 或人血清。通过抗 C3 的抗体,随后通过过氧化物酶标记的缀合物检测 C3 的结合。将检测结合(最大结合 :Bmax) 测量为过氧化物酶底物 ABTS(2, 2' - 连氨基 - 双 - [3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸 (6)] 在 405nm(OD₄₀₅) 处的光密度。因此,本发明涉及表征如下的抗体:抗体对补体因子 C3 的不结合指的是这种 ELISA 鉴定法测定,其中 C3 对抗体浓度为 10 μg/ml 时的抗体的最大结合 (Bmax) 是对 hu-Mab<P 型选凝素 >LC 1004-002(DSM ACC2641) 细胞系的 LC 1004-002 抗体的 Bmax 的 10%,优选地是 5%或更低。

[0059] 术语“抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)”是由 Fc 受体结合介导的功能,并且指的是在效应细胞存在时裂解表达 P 型选凝素的靶细胞。ADCC 优选地通过在效应细胞存在时,如新鲜分离的 PBMC(外周血单核细胞)或从暗黄覆盖层 (buffy coats) 纯化的效应细胞如单核细胞或 NK(天然杀伤)细胞,用本发明抗体处理表达 P 型选凝素的内皮细胞的制备物来测量。靶细胞用 ⁵¹Cr 标记,随后与抗体温育。将标记的细胞与效应细胞温育并且分析上清液中所释放的 ⁵¹Cr。对照包括将靶标内皮细胞与效应细胞温育但不与抗体温育。通过测量抗体对表达 Fc γ 受体的细胞如粒细胞(表达 Fc γ RII 和 Fc γ RIII)、NK 细胞(表达 Fc γ RIII) 和单核细胞(表达 Fc γ RI 和 Fc γ RII) 的结合测定抗体诱导介导 ADCC 的初始步骤的能力。

[0060] 可通过抗体 Fc 区域与造血细胞上的特化细胞表面受体 Fc 受体 (FcR) 的相互作用来介导 Fc 受体结合的效应子功能。Fc 受体属于免疫球蛋白超家族并已证实 Fc 受体既介导通过吞噬免疫复合物清除包被抗体的病原体,也介导通过依赖抗体的细胞毒性 (ADCC) 裂解包被有相应抗体的红细胞和多种其它细胞性靶标(例如肿瘤细胞)(Van de Winkel 和 Anderson, *J. Leuk. Biol.* 49 :511-24(1991))。FcR 通过它们对免疫球蛋白同种型的特异性来定义;对 IgG 抗体的 Fc 受体称作 Fc γ R,对 IgE 抗体的 Fc 受体称作 Fc ε R,对 IgA 抗体的 Fc 受体称作 Fc α R 等。Fc 受体的结合在例如 Ravetch 和 Kinet, *Ann. Rev. Immunol.* 9(1991)457-492、Capel 等, *Immunomethods*4(1994)32-34、de Haas 等, *J. Lab. Clin. Med.* 126(1995)330-341 以及 Gessner 等, *Ann. Hematol.* 76(1998)231-248 中描述。本发明抗体优选地显示出对 Fc γ 受体、优选地对 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 / 或 Fc γ RIIIA 的减弱结合。

[0061] 本发明的抗体优选地不引起任何效应子功能并且不结合存在于 NK 细胞上的 Fc γ R。因此,术语“不结合 Fc γ R”意指在抗体浓度为 10 μg/ml 时,本发明抗体对 NK 细胞的结合是已发现的对 hu-Mab<P 型选凝素 >LC1004-002(DSM ACC2641) 细胞系的 LC 1004-002 抗体结合的 1%或更低。

[0062] 虽然 IgG4 显示出减弱的 FcR 结合,但其它 IgG 亚类的抗体显示出强结合。然而,Pro238、Asp265、Asp270、Asn297(丢失 Fc 糖)、Pro329 和 234、235、236 和 237、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434 以及 His435 是在改变后也引起减弱的 FcR 结合的残基 (Shields 等, *J. Biol. Chem.* 276(2001), 6591-6604、Lund 等, *FASEB J.* 9(1995), 115-119、Morgan 等, *Immunology* 86(1995)319-324、EP 0307434)。本发明的抗体优选地涉及在 S228、L234、L235 和 / 或 D265 具有突变、和 / 或含有 PVA236 或 GLPSS331 突变的 IgG4 亚类的 FcR 结合或者 IgG1 或 IgG2 亚类的 FcR 结合。突变 S228P(IgG4)、L234A(IgG1)、L235A(IgG1)、L235E(IgG4)、GLPSS331(IgG1) 和 / 或 PVA236(IgG1) 为特别地优选。优选的

突变组合还示于表 1 中。一个额外优选的组合是 D265A/N297A。

[0063] 如本文中所示,术语“结合 P 型选凝素”意指在 BIAcore 鉴定法 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, 瑞典) 或在 ELISA 中抗体对 P 型选凝素的结合,其中纯化的 P 型选凝素或者 P 型选凝素 CHO 转化子包被于微量滴定板上。

[0064] 在 BIAcore 鉴定法中,抗体结合于表面上并且通过表面胞质共振 (SPR) 测定 P 型选凝素的结合。结合的亲和性由术语 k_a (来自抗体 / 抗原复合物中的抗体的结合速率常数)、 k_d (解离常数) 以及 K_D (k_d/k_a) 来定义。本发明的抗体显示 10^{-8} M 或更低、优选地是大约 10^{-11} – 10^{-9} M 的 K_D (参见实施例)。因此,本发明涉及如上述的抗体,其中抗体在 BIAcore 鉴定法中以小于 10^{-8} M 的 K_D 值结合 P 型选凝素,优选地其中 K_D 范围在 10^{-11} – 10^{-9} M。

[0065] 优选地,抗体是 IgG1 或 IgG4 人亚型。

[0066] 更优选地,抗体特征在于:抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或在 L235 和 S228 中含有至少一个突变的人抗体 IgG4 亚类 (根据 EU 指数编号)。

[0067] 在 P 型选凝素特异性 ELISA 中,在微量滴定板内包被纯化的 P 型选凝素并且以生物素化的抗人 IgG 和 ELISA 的常规步骤测定抗体对 P 型选凝素的结合。此鉴定法中的 EC_{50} 值范围在 P 型选凝素 CHO 细胞上优选地在 0.002–0.03 μ g/ml 之间,即本发明涉及这样的抗体,其中对于 P 型选凝素结合的 EC_{50} 值范围在 ELISA 鉴定法中存在 P 型选凝素的 CHO 细胞上是 0.002–0.03 μ g/ml。在其中表达 P 型选凝素的 CHO 转化子包被于在微量滴定板内的鉴定法中, EC_{50} 值范围在 0.01–0.08 μ g/ml 间,优选地在 0.01–0.04 μ g/ml 间。

[0068] 在 E 型选凝素转化子和 L 型选凝素转化子上的 EC_{50} 值优选地高于 100 μ g/ml。本发明的抗体特征在于:如在其中 P 型选凝素以及 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素包被于微量滴定板内的 ELISA 鉴定法中所测定的 EC_{50} 值,抗体结合 P 型选凝素的特异性比结合 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素的特异性高至少 1000 倍。

[0069] 如本文中所示,术语“抑制 P 型选凝素配体对 P 型选凝素的结合”指纯化的或由细胞表达的 P 型选凝素对其在 HL60 细胞表面的配体的结合。P 型选凝素对其配体的结合被本发明的抗体抑制。该抑制可在分析抗体抑制 P 型选凝素对配体结合的能力的体外鉴定法中测量为 IC_{50} 。在实施例中描述了此类鉴定法。将这类鉴定法中使用亲和纯化的 P 型选凝素和活化血小板作为 P 型选凝素的合适来源,并将白细胞样细胞如 HL60 细胞用作配体的合适来源。在此类鉴定法中,不用升高浓度的抗体或使用升高浓度的抗体测量了表达为 P 型选凝素生理相关性配体的 PSGL-1 的 HL60 细胞对 P 型选凝素或活化血小板的粘着。将 IC_{50} 值测量为至少三次独立测量值的平均值。抑制意指不超过 1 μ g/ml、优选地是 0.5–0.08 μ g/ml 的 IC_{50} 值。

[0070] 本发明抗体在 0.08–0.5 μ g/ml、优选地在 0.08–0.11 μ g/ml 的 IC_{50} 值范围内抑制白细胞样 HL60 细胞对纯化的 P 型选凝素的粘着。在 0.05–0.3 μ g/ml 的 IC_{50} 值范围内抑制白细胞样 HL60 细胞对活化的血小板的粘着。

[0071] 因此,本发明的另一个实施方案涉及表征如下的抗体:结合 P 型选凝素的 EC_{50} 值在表达 P 型选凝素的 CHO 转化子包被于微量滴定板内的 ELISA 鉴定法中是在 0.01–0.08 μ g/ml 范围内。优选的范围是 0.01–0.04 μ g/ml。在 E 型选凝素转化子和 L 型选凝素转化子上的 EC_{50} 值高于 100 μ g/ml。在另一个实施方案中,本发明的抗体以 0.08–0.5 μ g/ml 间的

IC50 值抑制白细胞样 HL60 细胞对纯化的 P 型选凝素的粘着。优选的范围是 0.08-0.11 μ g/ml。

[0072] 本发明的抗体在完全人流式系统（以 10 μ g/ml 的浓度）中抑制白细胞与血小板单层的相互作用优选地大于 70%。此外，这些抗体在浓度为 3 μ g/ml 时在人流式系统中以 60-90% 的范围抑制白细胞对活化的内皮细胞的粘着（对不同白细胞亚型具有不同影响）。

[0073] 本发明的抗体优选地能够在 P 型选凝素氨基酸片段 aa60-75 (Swiss-Prot 序列 P16109) 存在时结合 P 型选凝素和 / 或非竞争性地抑制由命名为 ATCC 登录号 HB11041 细胞系分泌的抗体对 P 型选凝素的结合。

[0074] 本发明抗体优选地在 ELISA 鉴定法方式中不抑制 P 型选凝素与血小板膜糖蛋白 GPIb α 的相互作用。在 ELISA 糖萼蛋白中，在微量滴定板的孔内如 (Romo 等, J Exp Med 190 :803 (1999) 所述固定 GPIb α 的可溶性细胞外部分，并且在用 P 型选凝素 HuMab 预温育后，用抗 P 型选凝素多克隆抗体检测纯化的 P 型选凝素的结合。

[0075] 在本发明另一个优选的实施方案中，抗体的特征在于不结合 C3 蛋白质，更优选地特征在于：它不引起依赖补体的细胞毒性 (CDC)。此外，抗体可以表征为它不结合 NK 效应细胞表面的 Fc γ 受体。优选地，抗体的特征在于：它是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是在 L235 和 S228 中含有至少一个突变的人抗体 IgG4 亚类（根据 EU 指数编号）。在另一个优选的实施方案中，抗体的特征在于：它不引起抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。

[0076] 在一个更优选的实施方案中，本发明的抗体特征在于：它们结合 P 型选凝素并且它们包含独立选自如下的可变区：

[0077] a) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :1 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :2 定义的重链可变结构域；

[0078] b) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :3 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :4 定义的重链可变结构域；

[0079] c) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :5 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :6 定义的重链可变结构域；

[0080] d) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :7 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :8 定义的重链可变结构域；

[0081] e) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :9 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :10 定义的重链可变结构域；

[0082] f) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :11 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :12 定义的重链可变结构域；

[0083] g) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :13 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :14 定义的重链可变结构域；

[0084] h) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :15 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :16 定义的重链可变结构域；

[0085] i) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :17 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :18 定义的重链可变结构域；

[0086] j) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :19 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :20 定义的

重链可变结构域 ;和

[0087] k) 由氨基酸序列 SEQ ID NO :21 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO :22 定义的重链可变结构域。

[0088] 优选地, 抗体包含由氨基酸序列 SEQ ID NO :3 定义的轻链可变结构域和由 SEQ ID NO :4 定义的重链可变结构域。

[0089] 优选的抗体特征在于 :抗体是人 IgG4 亚类或包含至少一种导致不结合补体因子 C1q 的氨基酸突变。这些变体抗体包含例如独立选自 SEQ IDNO :25 或 SEQ ID NO :26 以及 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列。

[0090] 在本文中, 抗 P 型选凝素“变体”抗体指这样的分子, 其因在抗 P 型选凝素“亲本”抗体氨基酸序列内添加、缺失和 / 或替换一个或多个氨基酸残基而在氨基酸序列上与亲本抗体序列不同。在一个优选的实施方法中, 变体在亲本抗体的一个或多个恒定区或可变区、优选地在恒定区内包含一个或多个氨基酸替换。例如, 变体可以在亲本抗体的一个或多个可变区内包含至少 1 个, 例如大约 1 个至大约 10 个, 并且优选地大约 2 个至大约 5 个替换。通常, 变体具有与亲本抗体的恒定结构域序列和 / 或可变结构域序列至少 90%、更优选至少 95% 并且最优选至少 99% 的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0091] 在本文中, 将对这种序列的同一性或同源性定义为在比对和根据需要导入缺口以获得最大序列同一性百分数后, 候选序列中与亲本抗体残基相同的氨基酸残基的百分数。抗体序列的 N 末端、C 末端或内部延伸、缺失或插入均不构成影响序列同一性或同源性。变体保留了结合人 P 型选凝素的能力并且优选地具有优于亲本抗体特性的特性。例如, 变体可具有较强的结合亲和性、增强的治疗重度肢体局部缺血或周围动脉硬化闭塞症 (CLI/PAOD) 相关性疾病的能力。

[0092] 本文中特别感兴趣的变体抗体是当与亲本抗体相比时, 因消除对 Fc γ 受体的结合而在粘着鉴定法中在抑制活性上表现出至少大约 4 倍增强的变体抗体。

[0093] 在本文中, “亲本”抗体是由制备变体的氨基酸序列编码的抗体。优选地, 亲本抗体具有人构架区并且根据需要具有人抗体恒定区。例如, 亲本抗体可以是人源化抗体或人抗体。

[0094] 此外, 本发明的抗体包括了具有不影响或不改变以上提及的本发明抗体特征的“保守序列修饰”、核苷酸序列修饰和氨基酸序列修饰的抗体。可以通过本领域内已知的标准技术如定点诱变和 PCR- 介导性诱变导入修饰。保守氨基酸替换包括其中用具有相似侧链的另一种氨基酸残基替换某氨基酸残基的保守氨基酸替换。在本领域中已经定义了具有相似氨基酸侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷极性侧链的氨基酸 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β 分支侧链的氨基酸 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和具有芳香族侧链的氨基酸 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此, 可以优选地用来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替代在人抗 P 型选凝素抗体中被预测为非必需的氨基酸残基。

[0095] 可基于如由 Riechmann, L. 等, Nature 332(1988)323-327 和 Queen, C. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)10029-10033 描述的分子模建, 通过诱变实施氨基酸替换。

[0096] 在另一个优选的实施方案中,抗体包含如由 SEQ ID NO :23 定义的 κ -轻链恒定区。

[0097] 本发明优选的抗体是定义为 IgG1v1 (PVA-236 ;GLPSS331,由 E233P ;L234V ;L235A ; Δ G236 ;A327G ;A330S ;P331S 具体描述)、IgG1v2 (L234A ;L235A) 和 IgG4v1 (S228P ;L235E) 的抗体。

[0098] 在另一个优选的实施方案中,这些抗体还包含选自 Fab、F(ab')₂ 和单链片段的抗体片段。

[0099] 本发明还包括用于产生本发明抗体的方法,包括步骤 a) 用编码本发明亲本人抗体轻链的第一核酸序列和编码该亲本人抗体重链的第二 DNA 序列转化宿主细胞,其中 Fc 部分已进行修饰以至该 Fc 部分不结合补体因子 C1q 和 / 或 Fc 受体 ;b) 表达所述第一 DNA 序列和第二 DNA 序列以便产生抗体的重链和轻链和 c) 从宿主细胞或宿主细胞培养物获得抗体。

[0100] 本发明还涉及表征如下的中间抗体即抗 P 型选凝素抗体 :这些抗体是人抗体或人源化抗体并且如在其中 P 型选凝素和 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素包被于微量滴定板内的 ELISA 鉴定法中所测定,这些抗体结合 P 型选凝素的特异性比结合 E 型选凝素或 L 型选凝素的特异性高至少 1000 倍。优选地,这些抗体是 IgG1 或 IgG4 抗体。这些抗体还可以包含如由 SEQ IDNO :24 γ 1 重链恒定区或 SEQ ID NO :27 γ 4 重链恒定区定义的氨基酸序列。特别地,这些抗体指由选自细胞系 hu-Mab<P 型选凝素 >LC 1004-001 (DSM ACC2640)、hu-Mab<P 型选凝素 >LC 1004-002 (DSM ACC2641) 和 hu-Mab<P 型选凝素 >LC 1004-017 (DSM ACC2642) 产生的抗体。

[0101] 此外,本发明的抗体包括了具有不影响或不改变以上提及的本发明抗体特征的“保守性序列修饰”、核苷酸序列修饰和氨基酸序列修饰的一类抗体。可以通过本领域内所知的标准技术如定点诱变和 PCR- 介导性诱变导入修饰。保守性氨基酸替换包括其中用具有相似侧链的另一种氨基酸残基替换某氨基酸残基保守性氨基酸替换。在本领域中已经定义了具有相似氨基酸侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸 (例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷极性侧链的氨基酸 (例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸 (例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β 分支侧链的氨基酸 (例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和具有芳香族侧链的氨基酸 (例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,可以优选地用来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基替代在人抗 P 型选凝素抗体中被预测为非必需的氨基酸残基。

[0102] 可基于如由 Riechmann, L. 等, Nature 332(1988)323-327 和 Queen, C. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(1989)10029-10033 描述的分子模建,通过诱变实施氨基酸替换。

[0103] 本发明还包括编码如上提及的抗体的核酸分子、包含这些核酸的相应载体和这些载体的相应宿主细胞。本发明包括用于制备抗体的方法,其包括在允许合成所述抗体分子的条件培养相应的宿主细胞以及从该培养物中获得此抗体,例如通过在原核宿主细胞或真核宿主细胞中表达编码重链的核酸以及编码轻链的核酸并从所述的细胞中回收此多肽。

[0104] 也考虑了抗体的诊断用途和治疗用途。在一个诊断应用中,本发明提供用于确定 P

型选凝素蛋白质存在的方法,其包括将怀疑含有 P 型选凝素的样品与抗 P 型选凝素抗体接触并测定抗体对样品的结合。为此用途,本发明提供包含该抗体和使用抗体检测 P 型选凝素蛋白质的说明书的试剂盒。

[0105] 本发明的抗体用于治疗炎性疾病和血栓性疾病。此类疾病包括血管疾病如动脉粥样硬化、动脉和深部静脉血栓形成、血管成形术或支架放置后再狭窄。优选的应用是周围动脉硬化闭塞症 (PAOD) 和重度肢体局部缺血 (CLI)。另一些应用是治疗因心急梗死引起的缺血后白细胞介导性组织损伤、脑缺血事件 (例如中风)、肾梗死等。此类抗体还适用于治疗败血症、急性白细胞介导性肺损伤和过敏反应如哮喘。其他应用是预防器官移植排斥和包括类风湿性关节炎在内的自身免疫性疾病。此外,可以通过抑制循环癌细胞的粘着预防肿瘤转移。

[0106] 本发明还提供用于治疗患有以上提及的炎性疾病和血栓性疾病、特别是 PAOD 和 CLI (周围动脉硬化闭塞症或重度肢体局部缺血) 的哺乳动物的方法。

[0107] 本发明还提供以上抗体用于治疗的用途,例如用于制造治疗这类疾病的药物的用途。

[0108] 本发明还涉及如上定义的抗体用于制备药物组合物的用途,并且包括含有药用有效量的本发明抗体,任选地含有对于因药用目的而配制抗体有用的缓冲剂和 / 或辅助剂的药物组合物。

[0109] 本发明还提供了包含于可药用载体中的此类抗体的药物组合物。在一个实施方案中,可以在制品或试剂盒内包含药物组合物。

[0110] 本发明还提供可产生本发明的此类拮抗性单克隆抗体例如亲本抗体的杂交瘤细胞系。

[0111] 在国际认可用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约下,将本发明优选的杂交瘤细胞系: hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-001 (HuMab001 抗体)、hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-002 (HuMab002 抗体) 和 hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-017 (HuMab017 抗体) 保藏在德国的德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ; DSMZ) :

[0112]

细胞系	保藏编号	保藏日期
hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-001	DSM ACC2640	2004 年 3 月 30 日
hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-002	DSM ACC2641	2004 年 3 月 30 日
hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-017	DSM ACC2642	2004 年 3 月 30 日

[0113] 可从所述的细胞系得到的抗体是本发明优选的实施方案。

[0114] 优选地通过重组方法产生本发明的抗体。此类方法在本领域内是众所周知的并且包括在原核细胞和真核细胞中表达蛋白质,随后分离抗体多肽并且通常纯化至可药用的纯度。为了表达蛋白质,通过标准方法将编码重链和轻链的核酸或其片段插至表达载体内。在适宜的原核宿主细胞或真核宿主细胞如 CHO 细胞、NSO 细胞、SP2/0 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、酵母或大肠杆菌 (E. coli) 细胞内进行表达,并且从细胞 (上清液或裂解后的细胞)

回收抗体。

[0115] 抗体的重组性生产在本领域内是众所周知的并且在例如 Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17(1999)183-202; Geisse, S. 等, *Protein Expr. Purif.* 8(1996)271-282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16(2000)151-161; Werner, R. G., *Drug Res.* 48(1998)870-880 的综述中进行描述。

[0116] 抗体可以在完整细胞、细胞裂解物中以部分纯化或基本纯化的形式存在。为了消除其它细胞性成分或污染物,如其它的细胞核酸或蛋白质,通过包括本领域内众所周知的碱处理/SDS处理、柱层析和其它等在内的标准技术纯化。参见 Ausubel, F. 等编辑《*Current Protocols in Molecular Biology*》, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)。

[0117] 在 NS0 细胞中的表达由例如 Barnes, L. M. 等, *Cytotechnology* 32(2000)109-123; 和 Barnes, L. M. 等, *Biotech. Bioeng.* 73(2001)261-270 描述。瞬时表达由例如 Durocher, Y. 等, *Nucl. Acids. Res.* 30(2002)E9 描述。可变结构域的克隆由 Orlandi, R. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(1989)3833-3837; Carter, P. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(1992)4285-4289 和 Norderhaug, L. 等, *J. Immunol. Methods* 204(1997)77-87 描述。优选的瞬时表达系统 (HEK 293) 由 Schlaeger, E.-J. 和 Christensen, K. 在 *Cytotechnology* 30(1999)71-83 中和由 Schlaeger, E.-J. 在 *J. Immunol. Methods* 194(1996)191-199 中描述。

[0118] 适用于原核生物的控制序列包括例如启动子,任选地包括操纵子序列,以及核糖体结合位点。已知真核细胞使用启动子、增强子和聚腺苷酸化作用信号。

[0119] 当核酸与另一个核酸序列处于功能性联系时,该核酸为“有效地连接”。例如,若前序列或分泌性前导区的 DNA 表达为参与多肽分泌的前蛋白,则其与这种多肽的 DNA 有效连接;若启动子或增强子影响某编码序列的转录,则其与此编码序列有效地连接;或者若核糖体结合位点如此安置以至于促进翻译,则其与编码序列有效地连接。通常,“有效地连接”意指所连接的 DNA 序列是邻接的,而且在分泌性前导区的情形中是邻接的并且处于可读框内。然而,增强子没有必要呈邻接。在方便的限制性位点内,通过连接作用完成连接。若此类限制性位点不存在,则根据常规习惯使用合成性寡核苷酸衔接体或接头。

[0120] 通过常规的免疫球蛋白纯化方法例如蛋白质 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基中合适地分离单克隆抗体。使用常规方法易于分离编码单克隆抗体的 DNA 和 RNA 并对其测序。杂交瘤细胞可作为此类 DNA 和 RNA 的来源。可将分离后的 DNA 插至表达载体内,随后将该表达载体转染至本不产生免疫球蛋白的宿主细胞如 HEK293 细胞、CHO 细胞或骨髓瘤细胞内,以便在宿主细胞内合成重组单克隆抗体。

[0121] 通过向抗体 DNA 中导入适宜的核苷酸变化或者通过核苷酸的合成制备人 P 型选凝素抗体的氨基酸序列变体(或突变体)。然而例如如上所述,仅在极其有限范围内进行此类修饰。例如,修饰不改变以上提及的抗体特性如 IgG 同种型和表位结合,但可以提高重组生产的产率、蛋白质稳定性或促进纯化。

[0122] 也可以替换任何不参与维持抗 P 型选凝素抗体正确构象的半胱氨酸残基,以便提高分子的氧化稳定性和阻止异常交联,通常使用丝氨酸进行替换。反之,可以向抗体中引入半胱氨酸键,以便提高抗体的稳定性(特别是当抗体是抗体片段例如 Fv 片段时)。

[0123] 抗体的另一类型氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化模式。改变意味删除一个或多个在抗体中存在的糖部分和 / 或添加一个或多个在抗体中不存在的糖基化位点。抗体的糖基化一般是 N 型连接。N 型连接指糖部分连接于天冬酰胺残基的侧链。天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸三肽序列是糖部分与天冬酰胺侧链发生酶连接的识别序列, 其中 X 是除脯氨酸以外的任一氨基酸。因此, 在多肽中出现这类三肽中的任何一个将产生潜在的糖基化位点。向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列以使其含有一个或多个上述的三肽序列 (对于 N 型连接的糖基化位点) 而方便地实现。

[0124] 通过本领域内所知的多种方法制备了编码抗 P 型选凝素抗体氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括, 但不限于 (在天然存在的氨基酸序列变体情况下) 从天然来源分离或通过较早制备的人源化抗 P 型选凝素抗体的变异或非变异形式进行寡核苷酸介导的 (或位点定向的) 诱变、PCR 诱变以及盒式诱变。

[0125] 本发明还涉及免疫连接物, 其包含缀合的本发明抗体, 其中抗体缀合至细胞毒性剂如化疗剂、毒素 (例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)、放射性同位素 (即放射缀合物) 或用于预防或治疗炎性疾病和血栓性疾病、特别是 PAOD 和 CLI 的炎性疾病和血栓性疾病的药剂的前体药物。使用双功能蛋白质偶联剂如 N- 琥珀酰亚氨基 -3-(2-吡啶基二硫醇) 丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨基酯的双功能衍生物 (如二甲基己二酰亚胺酯 HCL)、活性酯 (如二琥珀酰亚氨基辛二酸酯)、醛 (如戊二醛)、双 - 叠氮复合物 (如双 - (对叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双 - 重氮衍生物 (如双 - (对重氮苯甲酰基) - 亚乙基二胺)、二异氰酸酯 (如甲苯 2,6- 二异氰酸酯) 和双 - 活性氟化合物 (如 1,5- 二氟 -2,4- 二硝基苯) 制备抗体和细胞毒性剂的缀合物。例如, 可如 Vitetta, E. S. 等, *Science* 238(1987)1098-1104 所描述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳 -14 标记的 1- 异硫氰酰苄基 -3- 甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于使放射性核苷酸缀合至抗体的示例性螯合剂。参见 WO 94/11026。

[0126] 共价修饰的另一个类型涉及以化学方式或酶方式向抗体偶联糖苷。这些方法的有利之处在于它们不需要在具有 N 连接或 O 连接糖基化作用能力的宿主细胞内产生抗体。根据所用的偶联模式, 可以将糖连接于 (a) 精氨酸和组氨酸、(b) 游离羧基、(c) 游离巯基如半胱氨酸的巯基、(d) 游离羟基如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸中的游离羟基、(e) 芳香族残基, 如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸中的芳香族残基或 (f) 谷氨酰胺中的酰胺基。这些方法在 WO 87/05330 以及 Aplin, J. D. 和 Wriston, J. C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* (1981) 259-306 中描述。

[0127] 可以通过化学方式或酶方式除去存在于抗体中的任何糖部分。化学性去糖基化需要使抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等同化合物。这种处理引起除连接糖 (N- 乙酰葡萄糖胺或 N- 乙酰半乳糖胺) 以外的大部分糖或全部糖的切除, 同时保留完整的抗体。化学性去糖基化由 Sojahn, H. T., and Bahl, O. P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259(1987) 52-57 和 Edge, A. S., 等 *Anal. Biochem.* 118(1981) 131-137 描述。可以如 Thotakura, N. R. 和 Bahl, O. P., *Meth. Enzymol.* 138(1987) 350-359 所述, 通过使用多种的外切糖苷酶和内切糖苷酶完成抗体中糖部分的酶切除。

[0128] 抗体共价修饰的另一个类型包括以如美国专利号 4,640,835 ;4,496,689 ;4,301,144 ;4,670,417 ;4,791,192 或 4,179,337 中所述的方式使抗体连接于多种非蛋白聚

合物中的一种,如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。

[0129] 在另一个方面,本发明提供了来自非人转基因动物例如转基因小鼠的经分离 B- 细胞,其表达本发明的人抗 P 型选凝素抗体(例如由选自 hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-001(DSM ACC2640)、hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-002(DSM ACC2641)和 hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-017(DSMACC2642)的细胞系产生的亲本抗体)。KM 小鼠是合适的转染色体小鼠。KM 小鼠含有人重链转染色体和人 κ 轻链转基因。在 KM 小鼠中,内源的小鼠重链基因和轻链基因也被破坏,以至对小鼠的免疫引起产生人免疫球蛋白而不是小鼠免疫球蛋白。在 WO 02/43478 中详述了 KM 小鼠的构建和它们用于产生人免疫球蛋白的用途。

[0130] 优选地,分离的 B 细胞从用纯化或重组形式的 P 型选凝素抗原和 / 或表达 P 型选凝素的细胞免疫的转基因非人类动物例如转基因小鼠得到。优选地,转基因的非人类动物例如转基因小鼠具有在其中包含编码本发明的完整或部分抗体的人重链转基因和人轻链转基因的基因组。随后,将分离的 B- 细胞永生化为作为人抗 P 型选凝素抗体的来源(例如杂交瘤)。因此,本发明还提供能够产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤。在一个实施方案中,杂交瘤包括从转基因非人类动物例如转基因小鼠得到的并且已与永生细胞融合的 B 细胞,其中所述转基因非人类动物具有在其中包含编码本发明的完整或部分抗体的人重链转基因和人轻链转基因的基因组。

[0131] 在一个具体的实施方案中,转基因非人类动物是具有在其中包含编码本发明完整或部分抗体的人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因小鼠。转基因非人类动物可用已纯化或富集的 P 型选凝素抗原制品和 / 或表达 P 型选凝素的细胞来免疫。优选地,转基因非人类动物例如转基因小鼠能够产生抗 P 型选凝素的人单克隆抗体的 P 型选凝素同种型。

[0132] 通过用已纯化或富集的 P 型选凝素抗原制品和 / 或表达 P 型选凝素的细胞免疫转基因非人类动物例如转基因小鼠可产生本发明的人单克隆抗体,其中所述转基因非人类动物具有在其中包含编码本发明的完整或部分抗体的人重链转基因和人轻链转基因的基因组。随后得到动物的 B 细胞(例如脾 B 细胞)并且使之与骨髓瘤细胞融合以便形成分泌抗 P 型选凝素的人单克隆抗体的永生杂交瘤细胞。

[0133] 在一个优选的实施方案中,抗 P 型选凝素的人单克隆抗体可使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因小鼠生成。这些文中称作“HuMab”小鼠的转基因小鼠含有编码未重排的包含重链(μ 和 γ)和 κ 轻链(恒定区基因)的人免疫球蛋白基因的微基因座,并含有使内源性 μ 链和 κ 链基因座失活的靶向性突变(Lonberg, N. 等, Nature 368(1994)856-859)。因此,该小鼠表现出降低的小鼠 IgM 或 IgK 表达并且在免疫后,所导入的人重链转基因和人轻链转基因发生类型转换和体细胞突变以便产生高亲和性的人 IgG 单克隆抗体(Lonberg, N. 等, Nature 368(1994)856-859; 综述见于 Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113(1994)49-101; Lonberg, N. 和 Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25(1995)65-93 以及 Harding, F. 和 Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764(1995)536-546)。在 Taylor, L. 等, Neucleic Acids Research 20(1992)6287-6295; Chen, J. 等, International Immunology 5(1993)647-656; Tuailon, N. 等, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90(1993)3720-3724; Choi, T. K. 等, Nature Genetics 4(1993)117-123; Chen, J. 等, EMBO J. 12(1993)821-830; Tuailon, N. 等, Immunol. 152(1994)2912-2920;

Lonberg, N. 等, Nature 368(1994)856-859 ;Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113(1994)49-101 ;Taylor, L. 等, Int. Immunol. 6(1994)579-591 ;Lonberg, N. 和 Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25(1995)65-93 ;Harding, F. 和 Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764(1995)536-546 ;Fishwild, D. M. 等, Nat. Biotechnol. 14(1996)845-851 中描述了 HuMab 小鼠的产生,所有文章此处完整引用作为参考。更详细参见美国专利号 5,545,806 ;5,569,825 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,789,650 ;5,877,397 ;5,661,016 ;5,814,318 ;5,874,299 ;5,545,807 ;5,770,429 ;WO 98/24884 ;WO 94/25585 ;WO 93/1227 ;WO 92/22645 和 WO 92/03918。

[0134] 为了产生完全的抗 P 型选凝素人单克隆抗体,可以如 Lonberg, N. 等, Nature 368(1994)856-859 ;Fishwild, D. M. 等, Nat. Biotechnol. 14(1996)845-851 和 WO 98/24884 所述,根据常用方法,用已纯化或富集的 P 型选凝素抗原制品和 / 或表达 P 型选凝素的细胞免疫 HuMab 小鼠。优选地,小鼠在首次免疫时为 6-16 周龄。例如,可用已纯化或富集(例如从表达 P 型选凝素的细胞中纯化)的可溶性 P 型选凝素抗原制品在腹膜内免疫 HuMab 小鼠。在用已纯化或富集的 P 型选凝素抗原制品免疫不产生抗体时,还可以使用表达 P 型选凝素的细胞例如肿瘤细胞系免疫小鼠以促进免疫反应。对于多种抗原的累积经验证实首次用在完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内 (i. p.) 免疫,随后以不完全弗氏佐剂中的抗原每隔一星期(例如总计为 6 个星期) i. p. 免疫, HuMab 转基因小鼠产生最佳的反应。可以在免疫方案实施期间用眶后采血得到的血浆样品监测免疫反应。可通过 ELISA 筛查血浆,并且可将具有足够高滴度抗 P 型选凝素人免疫球蛋白的小鼠用于相应 B 细胞的永生。小鼠可以在处死并取出脾脏和淋巴结前 3 至 4 天以静脉内用抗原加强免疫。对于每种抗原,预期需要进行 2-3 次融合。对于每种抗原,将免疫数只小鼠。例如可免疫总共 12 只 HCo7 和 HCo12 系 HuMab 小鼠。

[0135] HCo7 小鼠具有在其内源性轻链 (κ) 基因中的 JKD 破坏(如 Chen, J. 等, EMBO J. 12(1993)821-830 中所述)、在其内源性重链基因中的 CMD 破坏(如 WO 01/14424 的实施例 1 中所述)、KCo5 人 κ 轻链转基因(如在 Fishwild, D. M. 等, Nat. Biotechnol. 14(1996)845-851 中所述)以及 HCo7 人重链转基因(如在美国专利号 5,770,429 中所述)。

[0136] HCo12 小鼠具有在其内源性轻链 (κ) 基因中的 JKD 破坏(如在 Chen, J. 等, EMBO J. 12(1993)821-830 中所述)、在其内源性重链基因中的 CMD 破坏(如在 WO 01/14424 的实施例 1 中所述)、KCo5 人 κ 轻链转基因(如在 Fishwild, D. M. 等, Nat. Biotechnol. 14(1996)845-851 中所述)以及 HCo12 人重链转基因(如在 WO 01/14424 的实施例 2 中所述)。可分离小鼠淋巴细胞并且基于标准方案使用 PEG 使之与小鼠骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤。随后筛选得到的产生抗原特异性抗体的杂交瘤。例如,将来自免疫小鼠的脾源或淋巴结源的淋巴细胞单细胞悬液与六分之一量的非分泌性 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1581) 和 50% PEG 融合。在平底微量滴定板内接种大约 2×10^5 个细胞,随后在选择性培养基内培育大约 2 星期。

[0137] 随后通过 ELISA 筛选各孔的抗 P 型选凝素人 IgM 和 IgG 单克隆抗体。一旦出现大量的杂交瘤生长,则分析培养基,通常在 10-14 天后。将分泌抗体的杂交瘤再次接种,再次筛选,并且若仍显示人 IgG 的抗 P 型选凝素单克隆抗体阳性,则可通过有限稀释法进行至少

两次亚克隆。随后在体外培养稳定的亚克隆以便在组织培养中产生用于表征的抗体。

[0138] 因为 CDR 序列负责抗体 - 抗原的相互作用, 故可以通过构建将本发明 CDR 序列在源自不同人抗体构架序列中包含的表达载体来表达本发明的重组抗体 (参见例如 Riechmann, L. 等, *Nature* 332(1998)323-327 ; Jones, P. 等, *Nature* 321(1986)522-525 ; 和 Queen, C. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(1989)10029-10033)。此类构架序列可从包含人抗体种系基因序列的公共 DNA 数据库得到。这些种系序列之所以与成熟抗体基因序列不同, 在于它们不包含在 B 细胞成熟期间由 V(D)J 连接形成的已完全组装的可变基因。种系基因序列还与高亲和性的二级库抗体的序列均匀地在可变区内的个别地方不同。

[0139] 本发明还包括本发明的抗体用于体外诊断 P 型选凝素的用途, 优选地通过测定样品的 P 型选凝素与本发明抗体间结合的免疫学鉴定法体外诊断。

[0140] 在另一个方面, 本发明提供了组合物例如药物组合物, 其含有与可药用载体共同配制的本发明的一种或组合的人单克隆抗体或其抗原结合部分。更具体地, 组合物是药物组合物或诊断用组合物, 并且药物组合物甚至更具体地包含如上定义的抗体和至少一种可药用的赋形剂。

[0141] 本发明的药物组合物还可以以联合疗法即与其它药剂联合施用。例如, 联合疗法可包含本发明的组合物和至少一种用于预防或治疗重度肢体局部缺血 (CLI/PAOD) 相关性疾病或其它常规疗法中的药剂。

[0142] 如本文中所用, “可药用的载体” 包括生理上可兼容的任何以及所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂等。优选地, 载体适用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用 (例如通过注射或输注)。

[0143] “可药用盐” 指保持抗体的目的生物学活性并且不产生任何非目的毒性效果的盐 (参见例如 Berge, S. M. 等, *J. Pharm. Sci.* 66(1977)1-19)。在本发明中包括此类盐。此类盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些衍生自无毒无机酸的酸加成盐, 如盐酸盐。

[0144] 可以通过本领域内所知的多种方法施用本发明的组合物。如技术人员可理解, 施用的途径和 / 或方式将根据目的结果变化。

[0145] 为通过某些施用途施用本发明的化合物, 需要将化合物用某材料包被或与该材料共同施用以防止化合物失活。例如, 化合物可在适宜的载体如脂质体或稀释剂中向受试者施用。可药用的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。

[0146] 可药用的赋形剂或载体包括灭菌的水溶液或分散剂以及用于临用前制备的灭菌可注射溶液或分散剂的灭菌粉末。在本领域内已知此类介质和药剂作为药用活性物质的用途。

[0147] 如本文中所用, 短语 “肠胃外施用” 和 “经肠胃外施用” 意指除肠道施用和局部施用以外的施用模式, 一般通过注射, 并且包括且不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质层下、关节内、被膜下、蛛网膜下、椎内、硬膜外和胸骨内的注射和输注。

[0148] 这些组合物还可以包含赋形剂或辅料如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过预先的灭菌方法以及通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、酚 \ 山梨酸等确保阻止微生物的存在。在组合物中包含等渗剂如糖、氯化钠等也是受欢迎的。

此外,可通过包含延缓吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶延长可注射形式药物的吸收。

[0149] 无论选择何种施用途径,通过本领域技术人员所知的常规方法将本发明的可以以合适水化形式使用的化合物和 / 或本发明药物组合物配制为可药用的剂型。

[0150] 本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以变动,以便得到可有效实现对特定患者、组合物和施用模式所需要的治疗反应而对患者无毒的活性成分量。所选择的剂量水平取决于多种药物动力学因素,包括所应用的本发明的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、所应用的特定化合物的排泄速率、治疗持续期、与所应用的特定化合物联合使用的其它药物、化合物和 / 或材料、受治疗患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和先前医疗史和其它在医学领域内众所周知的因素。代表性的每周剂量范围可以是大约 0.1mg/kg- 大约 20mg/kg 或更高,这取决于如上提及的因素。

[0151] 组合物必须是无菌的并且具有如此程度的流动性以至可通过注射器送递该组合物。除水以外,载体还可以是等渗的缓冲盐溶液、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。

[0152] 可例如通过使用包衣剂如卵磷脂、通过在分散剂中维持目的粒径、通过使用表面活性剂来维持适度的流动性。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂例如糖、多元醇如甘露醇或山梨醇以及氯化钠。可通过在组合物中包含延缓吸收的试剂如单硬脂酸铝或明胶实现可注射组合物的长期吸收。

[0153] 本发明包括用于治疗需治疗患者的方法,其特征在于:通过向患者施用治疗有效量的结合 P 型选凝素的、含有人源衍生的 Fc 部分并且不结合补体因子 C1q 的抗体。

[0154] 本发明包括结合 P 型选凝素的、含有人源衍生的 Fc 部分并且不结合补体因子 C1q 的抗体用于治疗的用途。

[0155] 本发明包括结合 P 型选凝素的、含有人源衍生的 Fc 部分并且不结合补体因子 C1q 的抗体用于制备预防和治疗炎症性疾病和血栓性疾病的药物的用途。

[0156] 本发明包括结合 P 型选凝素的、含有人源衍生的 Fc 部分并且不结合补体因子 C1q 的抗体用于治疗 PAOD 和 CLI 的用途。

[0157] 因此,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类。在一个实施方案中,抗体是人抗体。在另一个实施方案中,抗体是人源化抗体。

[0158] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中抗体不结合补体因子 C1q 指的是 ELISA 鉴定法测定,其中在抗体的浓度为 10 μ g/ml 时 C1q 对抗体的最大结合 (B_{max}) 小于等于对细胞系 hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-002(DSMACC2641) 的抗体 LC 1004-002 的 B_{max} 的 30%。在另一个实施方案中,最大结合小于等于对细胞系 hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-002(DSMACC2641) 的抗体 LC 1004-002 的 B_{max} 的 20%。

[0159] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人

源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中抗体在 BIAcore 鉴定法以低于 10^{-8} M 的 K_D 值结合 P 型选凝素。在另一个实施方案中, K_D 范围是 10^{-11} - 10^{-9} M。

[0160] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中如在 P 型选凝素以及 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素包被于微量滴定板的 ELISA 鉴定法中所测定的 EC_{50} 值,抗体结合 P 型选凝素的特异性比结合 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素的特异性高至少 1000 倍。在另一个实施方案中,E 型选凝素转化子和 L 型选凝素转化子的 EC_{50} 值高于 $100 \mu\text{g/ml}$ 。

[0161] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中抗体以不超过 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值抑制白细胞样 HL60 细胞对纯化的 P 型选凝素的粘着。在另一个实施方案中, IC_{50} 值的范围是 0.08 - $0.5 \mu\text{g/ml}$ 。仍在另一个实施方案中, IC_{50} 值的范围是 0.08 - $0.11 \mu\text{g/ml}$ 。

[0162] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中

[0163] (a) 以 0.05 - $0.3 \mu\text{g/ml}$ 的 IC_{50} 值抑制白细胞样 HL60 细胞对活化的血小板的粘着;

[0164] (b) 抗体对白细胞与血小板单层的相互作用的抑制大于 70%;

[0165] (c) 抗体在 $3 \mu\text{g/ml}$ 浓度时在人流式系统中对白细胞粘着于活化的内皮细胞的抑制在 60-90% 范围间;

[0166] (d) 抗体不结合 C3 蛋白;

[0167] (e) 抗体不引起依赖补体的细胞毒性 (CDC);

[0168] (f) 抗体不结合 NK 效应细胞上的 Fc γ 受体;或

[0169] (g) 抗体不引起抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。

[0170] 在另一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素的特征如下的抗体:该抗体的可变重链氨基酸序列 CDR3 选自 SEQ ID NO:38、39、40、41 或 42 的重链 CDR3 序列。

[0171] 在一个实施方案中,本发明提供了包含可变重链和可变轻链的结合 P 型选凝素的特征如下的抗体:可变重链包含 CDR 序列 CDR1、CDR2 和 CDR3,并且 CDR1 选自 SEQ ID NO:29、30、31、32, CDR2 选自 SEQ IDNO:33、34、35、36、37, CDR3 选自 SEQ ID NO:38、39、40、41、42,其中彼此独立地选择所述的 CDR。

[0172] 在一个实施方案中,本发明提供特征如下的抗体:可变轻链包含 CDR 序列 CDR1、CDR2 和 CDR3,并且 CDR1 选自 SEQ ID NO:43、44, CDR2 选自 SEQ ID NO:45、46 以及 CDR3 选自 SEQ ID NO:47、48、49、50、51、52,其中彼此独立地选择所述的 CDR。

[0173] 在一个实施方案中,本发明提供特征如下的抗体:该抗体结合 P 型选凝素并且抗体包含独立选自如下的可变区:

[0174] a) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:1 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:2 定义的重链可变结构域;

[0175] b) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:3 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:4 定义的重链可变结构域;

[0176] c) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:5 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:6 定义的重链可变结构域;

[0177] d) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:7 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:8 定义的重链可变结构域;

[0178] e) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:9 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:10 定义的重链可变结构域;

[0179] f) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:11 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:12 定义的重链可变结构域;

[0180] g) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:13 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:14 定义的重链可变结构域;

[0181] h) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:15 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:16 定义的重链可变结构域;

[0182] i) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:17 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:18 定义的重链可变结构域;

[0183] j) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:19 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:20 定义的重链可变结构域;和

[0184] k) 由氨基酸序列 SEQ ID NO:21 定义的轻链可变结构域和由 SEQ IDNO:22 定义的重链可变结构域。

[0185] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中抗体包含由氨基酸序列 SEQ ID NO:3 定义的轻链可变结构域中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域以及由 SEQ ID NO:4 定义的重链可变结构域中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域。在另一个实施方案中,抗体包含由氨基酸序列 SEQ ID NO:3 定义的轻链可变结构域和由 SEQ ID NO:4 定义的重链可变结构域。

[0186] 在一个实施方案中,本发明提供了结合 P 型选凝素、不结合补体因子 C1q、含有人源衍生的 Fc 部分的抗体,并且特征在于:该抗体是在 L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331 和 / 或 P329 中含有至少一个突变的人抗体 IgG1 亚类或者是其中 S228 替换为 P 并且 L235 替换为 E 的人抗体 IgG4 亚类,其中

[0187] (a) 抗体包含至少一个在 Fc 部分中的导致不结合补体因子 C1q 的氨基酸突变;

[0188] (b) 人重链恒定区包含独立选自 SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26 和 28 的氨基酸序列;

[0189] (c) 抗体包含如 SEQ ID NO:23 所定义的 κ 轻链恒定区;

[0190] (d) 抗体包含至少一个导致不结合补体 C1q 的氨基酸突变；

[0191] (e) 抗体包含选自 IgG1v1、IgG1v2 和 IgG4v1 的重链恒定区；或

[0192] (f) 抗体是 Fab、F(ab')₂ 或单链片段。

[0193] 在一个实施方案中，本发明提供特征如下的抗 P 型选凝素抗体：该抗体 a) 是人抗体或人源化抗体，以及 b) 如在其中 P 型选凝素以及 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素包被于微量滴定板的 ELISA 鉴定法中所测定的 EC₅₀ 值，抗体结合 P 型选凝素的特异性比结合 E 型选凝素和 / 或 L 型选凝素的特异性高至少 1000 倍。在一个实施方案中，抗体包含如 SEQ ID NO :24、25 或 26 γ 1 重链恒定区或 SEQ ID NO :27 或 28 γ 4 重链恒定区所定义的氨基酸序列。仍在另一个实施方案中，抗体由选自 hu-Mab<P 型选凝素>LC1004-001 (DSM ACC2640)、hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-002 (DSMACC2641) 和 hu-Mab<P 型选凝素>LC 1004-017 (DSM ACC2642) 的细胞系产生。

[0194] 可以理解本发明提供了具有如段落 [00129] 至 [00141] 中所述定义的实施方案及其组合。

[0195] 提供如下实施例、参考文献、序列表和附图以便辅助理解本发明、后附权利要求书中所述的本发明的实际范围。可以理解在不脱离本发明的精神下可对如前所述的方法进行改变。

[0196] 序列表的描述

[0197] SEQ ID NO :1LC1004-001 轻链, HuMab1004-001 的可变结构域

[0198] SEQ ID NO :2LC1004-001 重链, HuMab1004-001 的可变结构域

[0199] SEQ ID NO :3LC 1004-002 轻链, HuMab002 可变结构域

[0200] SEQ ID NO :4LC 1004-002 重链, HuMab002 可变结构域

[0201] SEQ ID NO :5LC 1004-003 轻链, 的可变结构域 HuMab003

[0202] SEQ ID NO :6LC 1004-003 重链, HuMab003 的可变结构域

[0203] SEQ ID NO :7LC 1004-004 轻链 (I), HuMab004(I) 的可变结构域

[0204] SEQ ID NO :8LC 1004-004 重链 (I), HuMab004(I) 的可变结构域

[0205] SEQ ID NO :9LC 1004-004 轻链 (II), HuMab004(II) 的可变结构域

[0206] SEQ ID NO :10LC 1004-004 重链 (II), HuMab004(II) 的可变结构域

[0207] SEQ ID NO :11 轻链, HuMab005 的可变结构域

[0208] SEQ ID NO :12 重链, HuMab005 的可变结构域

[0209] SEQ ID NO :13 轻链, HuMab010(I) 的可变结构域

[0210] SEQ ID NO :14 重链, HuMab010(I) 的可变结构域

[0211] SEQ ID NO :15 轻链, HuMab010(II) 的可变结构域

[0212] SEQ ID NO :16 重链, HuMab010(II) 的可变结构域

[0213] SEQ ID NO :17 轻链, HuMab010(III) 的可变结构域

[0214] SEQ ID NO :18 重链, HuMab010(III) 的可变结构域

[0215] SEQ ID NO :19 轻链, HuMab011 的可变结构域

[0216] SEQ ID NO :20 重链, HuMab011 的可变结构域

[0217] SEQ ID NO :21 轻链, HuMab017 的可变结构域

[0218] SEQ ID NO :22 重链, HuMab017 的可变结构域

- [0219] SEQ ID NO :23 κ 轻链恒定区
- [0220] SEQ ID NO :24 γ 1 重链恒定区
- [0221] SEQ ID NO :25 γ 1 重链恒定区 PVA236/GLPSS331 (IgG1v1)
- [0222] SEQ ID NO :26 γ 1 重链恒定区 L234A/L235A (IgG1v2)
- [0223] SEQ ID NO :27 γ 4 重链恒定区
- [0224] SEQ ID NO :28 γ 4 重链恒定区 S228/L235E (IgG4v1)
- [0225] SEQ ID NO :29-32 重链 CDR1
- [0226] SEQ ID NO :33-37 重链 CDR2
- [0227] SEQ ID NO :38-42 重链 CDR3
- [0228] SEQ ID NO :43-44 轻链 CDR1
- [0229] SEQ ID NO :45-46 轻链 CDR2
- [0230] SEQ ID NO :47-52 轻链 CDR3
- [0231] 缩写 :
- [0232] 将氨基酸缩写为三字母代码 (Leu) 或单字母代码 (L)
- [0233] 还将抗体 HuMab00X 称作抗体 00X
- [0234] L234 指根据 EU 编号 (Kabat) 在 234 位置处的亮氨酸
- [0235] L234A 指将 234 位置处的亮氨酸变成丙氨酸
- [0236] PVA236 指将 IgG1 中 236 区 ELLG 或 IgG4 中的 EFLG 修改为 PVA
- [0237] GLPSS331 指将 IgG1 中的 331 区 ALPAP 或 IgG2 中的 GLPAP 变为 GLPSS
- [0238] 在其它 IgG 亚类中进行类似修改
- [0239] 实施例
- [0240] 产生抗 P 型选凝素抗体的杂交瘤细胞系的生成
- [0241] 杂交瘤的培养
- [0242] 将 HuMab 杂交瘤在 37°C 和 5% CO₂ 于 IMDM (Cambrex)、胎克隆 1 牛血清 (Perbio Science)、原始杂交瘤克隆因子 (Igen)、丙酮酸钠、青霉素 / 链霉素、2- 巯基乙醇、HAT (Sigma-Aldrich) 和卡那霉素 (Invitrogen) 内培养。
- [0243] 产生抗 P 型选凝素抗体的杂交瘤细胞系的生成
- [0244] 转基因小鼠的免疫程序
- [0245] 方案 A :
- [0246] 将 10 只 HCo7 转基因小鼠 (5 只雄性和 5 只雌性)、GG2201 系 (Medarex, San José, CA, 美国) 用购买自 R&D System 的缺乏 P 型选凝素跨膜结构域和胞内结构域的截短形式的重组 P 型选凝素免疫。对于首次免疫, 将溶解于 100 μ l PBS 的 50 μ g 重组 P 型选凝素与 100 μ l 弗氏完全佐剂混和。对于余下的免疫, 使用与 KLH 偶联的重组 P 型选凝素。对于第二次免疫, 将 50 μ g 与 KLH 偶联的重组 P 型选凝素溶解于 100 μ l PBS 并与 100 μ l 弗氏不完全佐剂混和。对于其它的免疫, 将 20 μ g 与 KLH 偶联的重组 P 型选凝素溶解于 100 μ l PBS 并与 100 μ l 弗氏不完全佐剂混和。轮流以腹膜内免疫和皮下免疫实施免疫, 并首先进行腹膜内免疫。
- [0247] 方案 B :
- [0248] 将 3 只 HCo7 转基因小鼠 (全为雌性)、3KM (全为雄性) 转基因小鼠、GG2489 系

(Medarex, San José, CA, 美国) 用来自人衰老血小板的通过免疫亲和层析(见以下)所纯化的全长 P 型选凝素免疫。对于首次免疫,将溶解于 100 μ l PBS 的纯化的 50 μ g P 型选凝素与 100 μ l 弗氏完全佐剂(CFA ;Difco Laboratories, Detroit, 美国)混和。对于第二次免疫,将溶解于 100 μ l PBS 的纯化的 50 μ g P 型选凝素与 100 μ l 弗氏不完全佐剂(ICFA ; Difco)混和。

[0249] 对于所有其它免疫,使用 20 μ g 纯化的 P 型选凝素并且使之与 100 μ l 弗氏不完全佐剂混和。

[0250] 抗原特异性 ELISA

[0251] 通过抗原特异性 ELISA 测定已免疫小鼠血清中的抗 P 型选凝素滴度。将平板(96 孔平底 ELISA 板, Greiner)以溶解于 PBS 的 0.1 μ g/ml 的纯化 P 型选凝素包被并且在室温下包被过夜。此后,以 PBSTC(含有 0.05% Tween20(Sigma-Aldrich Chemie BV)和 2% 鸡血清(Gibco)的 PBS)在室温下封闭各孔 1 小时。

[0252] 受试的血清样品按 1 : 100 在 PBSTC 中稀释并且加入各孔内。将自免疫前小鼠得到的血清按 1 : 100 在 PBSTC 中溶解并用作阴性对照。将小鼠抗人 P 型选凝素抗体(1/7, 由 Roche Basel 自行生产)按 1 : 100 在 PBSTC 中溶解并用作阳性对照。将平板在室温下温育 1 小时。随后平板用 PBST(含有 0.05% Tween 20 的 PBS)洗涤两次。将 Gt- α -huIgG-HRP(Jackson)按 1 : 5000 在 PBSTC 中稀释并加入含有受试的样品和阴性对照的孔内。将 Rb- α -mIgG(Jackson)按 1 : 3000 在 PBSTC 中稀释并加入含有阳性对照的孔内。将平板在室温下温育 1 小时。最后平板用 PBST 洗涤两次并用新鲜制备的 ABTS[®]溶液(1mg/ml)(ABTS :2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))在室温下黑暗中显色 30 分钟。在 405nm 测定吸收值。

[0253] 小鼠的加强免疫

[0254] 当抗 P 型选凝素的血清滴度足够高时,在融合前 3 天和 4 天用 100 μ l 在 PBS 中的 20 μ g 重组人 P 型选凝素对小鼠进行两次静脉内额外强化免疫。

[0255] 杂交瘤生成

[0256] 处死小鼠并且收集脾脏和分布在腹主动脉和腔静脉两侧的淋巴结。根据标准操作方法进行脾细胞和淋巴结细胞与融合细胞 SP 2.0 细胞的融合。

[0257] 通过本免疫程序获得了具有 SEQ ID NO 1-22 的可变重链序列和可变轻链序列的人单克隆抗体。

[0258] κ -ELISA

[0259] 为确定从融合得到的杂交瘤是否生成抗体,进行了 κ -ELISA。ELISA 板以 PBS 中按 1/10000 稀释的大鼠抗人 IgG κ -轻链抗体(DAKO)通过在 4°C 温育过夜包被。在倾尽各孔后,将平板与 PBSTC 在室温下温育 1 小时封闭。此后,各孔与 PBSTC 中按 1/2 稀释的杂交瘤培养上清液温育。将 PBSTC 中按 1/2 稀释的培养基用作阴性对照, PBSTC 中按 1/2 稀释的 κ -轻链阳性小鼠血清作为阳性对照。随后,将各孔洗涤两次并且与 PBSTC 中按 1/2000 稀释的 HRP-缀合的大鼠抗人 IgG F(ab')₂(DAKO)在 37°C 温育 1 小时。将各孔洗涤三次并且分析平板以新鲜制备的 ABTS[®]溶液(1mg/ml)在室温(RT)下黑暗中显色 30 分钟。用 ELISA 板读数仪于 405nm 处测定吸收值。

[0260] 抗 P 型选凝素 HuMab 的可变结构域的克隆和序列分析

[0261] (κ -轻链和 γ 1-重链)

[0262] 通过标准的 cDNA 合成 /PCR 方法分离了编码 P 型选凝素 HuMab 的轻链可变区 V_L 和重链可变区 V_H 的核苷酸序列。

[0263] 使用 RNeasy[®]微量试剂盒 (Qiagen) 从 1×10^6 - 1×10^7 个杂交瘤细胞制备总 RNA。使用来自杂交瘤的 RNA 作为根据常规方法利用寡脱氧胸苷 (dT) 引物进行的第一链 cDNA 合成的模板。分别用互补于 κ -轻链恒定区核苷酸序列和 γ 1-重链恒定区核苷酸序列的反向轻链引物和反向重链引物以及 5'-特异性轻链引物和 5'-特异性重链引物进行第二链 cDNA 合成以及进一步 PCR 扩增编码 V_L 和 V_H 的 cDNA 片段。使用来自 Invitrogen[™] LifeTechnologies 的 TOPO TA 克隆试剂盒和作为克隆载体的 pCR4-TOPO 对 PCR 产物克隆。使用 EcoRI 消化,通过适宜质粒的限制酶切作图鉴定已克隆的 PCR 产物并且所预期 / 计算的 V_L 和 V_H DNA 片段的大小分别是大约 740bp 和 790bp。

[0264] 通过双链测序测定已克隆的 PCR 片段的 DNA 序列。

[0265] 使用 10.2 版 GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) 软件包进行常规数据处理。使用 GCG modul CLUSTALW 比对 DNA 序列和蛋白质序列。对于序列比对,使用程序 GENEDOC (2.1 版) 制表、编辑和标记颜色。

[0266] 抗 P 型选凝素 IgG1 HuMab 表达质粒的构建

[0267] 在哺乳动物细胞表达载体中分别组装抗 P 型选凝素 HuMab 轻链编码基因和重链编码基因。

[0268] 为此,将编码抗 P 型选凝素 HuMab 轻链可变区 (V_L) 和人 κ -轻链恒定区 (C_L) 的基因片段连接,将编码抗 P 型选凝素 HuMab 重链可变区 (V_H) 和人 γ 1-重链恒定区 (C_{H1} -铰链- C_{H2} - C_{H3}) 的基因片段连接。

[0269] 在 Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. 和 Foeller, C. (1991) SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGY INTEREST, 第五版, NIH Publication No 91-3242 中描述了关于人轻链和重链核苷酸序列的一般信息,从中可以推断出密码子的用途。

[0270] 抗 P 型选凝素 HuMab κ -轻链的转录单位包含如下元件:

[0271] • 来自人巨细胞病毒 (HCMV) 的立即早期增强子和启动子,

[0272] • 包含 Kozak 序列的合成的 5'-UT,

[0273] • 包含信号序列内含子的鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[0274] • 在其 5' 端安置单一 BsmI 限制性位点以及剪接供体位点并在 3' 端带单一 NotI 限制性位点的克隆的抗 P 型选凝素 HuMab 可变轻链 cDNA,

[0275] • 包含小鼠内含子 2 Ig- κ 增强子 [Picard, D. 和 Schaffner, W. (1984) Nature 307, 80-82] 的人基因组 κ -基因恒定区和

[0276] • 人免疫球蛋白 κ -聚腺苷酸化 (“poly A”) 信号序列。

[0277] 抗 P 型选凝素 HuMab γ 1-重链的转录单位包含如下元件:

[0278] • 来自人巨细胞病毒 (HCMV) 的立即早期增强子和启动子,

[0279] • 包含 Kozak 序列的合成的 5'-UT,

[0280] • 包含信号序列内含子的已修饰的鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[0281] • 在其 5' 端安置单一 BsmI 限制性位点以及剪接供体位点并在 3' 端带单一 NotI 限制性位点的已克隆的抗 P 型选凝素 HuMab 可变重链 cDNA,

[0282] • 包含小鼠 Ig μ -增强子 (Neuberger, M. S. (1983)Embo J 2,1373-1378) 的人基因组 γ 1-重链基因恒定区,

[0283] • 人 γ 1-免疫球蛋白聚腺苷酸化 (“poly A”) 信号序列。

[0284] 抗 P 型选凝素 HuMab κ -轻链和 γ 1-重链表达质粒的功能元件:除抗 P 型选凝素 HuMab κ -轻链或 γ 1-重链表达盒以外,这些质粒还包含

[0285] • 潮霉素抗性基因,

[0286] • Epstein-Barr 病毒 (EBV) 的复制起点 oriP,

[0287] • 允许此质粒在大肠杆菌中复制的来自载体 pUC18 的复制起点,和

[0288] • 赋予大肠杆菌氨苄青霉素抗性的 β -内酰胺酶基因。

[0289] 抗 P 型选凝素 IgG4 HuMab 表达质粒的构建

[0290] 通过将人基因组 γ 1-恒定区和 γ 1-免疫球蛋白聚腺苷酸化 (“poly A”) 信号序列替换为人基因组 γ 4-恒定区和 γ 4-免疫球蛋白聚腺苷酸化信号序列,从抗 P 型选凝素 γ 1-重链表达质粒衍生抗 P 型选凝素 γ 4-重链的原型表达质粒。

[0291] 为了表达抗 P 型选凝素 HuMab κ -轻链,使用如对 IgG1 所描述的不同表达质粒 (见上文)。

[0292] 突变的 (变异的) 抗 P 型选凝素 IgG1 和 IgG4 表达质粒的构建

[0293] 通过使用 QuickChange™ 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 对野生型表达质粒进行定点诱变,产生了编码突变抗 P 型选凝素 γ 1-重链和 γ 4-重链的表达质粒。

[0294] 对于 LC1004-002 产生如下突变体。氨基酸根据 EU 编号 [Edelman, G. M.、Cunningham, B. A.、Gall, W. E.、Gottlieb, P. D.、Rutishauser, U. 和 Waxdal, M. J. (1969) Proc Natl Acad Sci USA 63,78-85 ;Kabat, E. A.、Wu, T. T.、Perry, H. M.、Gottesman, K. S. 和 Foeller, C. (1991) SEquence of Proteins of Immunology Interest, 第五版, No 91-3242] 进行编号。

[0295]

同种型	缩写	突变	描述
IgG1	IgG1v1	如 E233P ; L234V ; L235A;Δ G236; A327G; A330S; P331S 具体所述 的 PVA-236; GLPSS331 SEQ ID NO:25	人 γ 1-重链中的氨基酸序列 Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ 替换为人 γ 2-重链中的氨基酸序列 Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ 。 人 γ 1-重链中的氨基酸序列 Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ 替 换为人 γ 4-重链中的氨基酸序列 Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A SEQ ID NO:26	人 γ 1-重链中的氨基酸序列 Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ 替换为氨基酸序列 Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E SEQ ID NO:28	人 γ 4-重链中的 Ser ₂₂₈ 替换为 Pro ₂₂₈ 并且人 γ 4-重链中的 Leu ₂₃₅ 替换为 Glu ₂₃₅

[0296] 重组抗 P 型选凝素 HuMab 的产生

[0297] 通过瞬时转染在补加 10% 超低 IgG FCS(Gibco), 2mM 谷氨酰胺 (Gibco)、1% 体积比非必需氨基酸 (Gibco) 和 250 μ g/ml G418(Roche) 的 DMEM(Gibco) 中培养的贴壁 HEK293-EBNA 细胞 (ATTC#CRL-10852) 产生重组 HuMab。为了转染, 在试剂 (μ l) 对 DNA (μ g) 比例 3 : 1-6 : 1 时使用转染试剂 Fugene™ 6(Roche)。使用 1 : 2-2 : 1 轻链编码质粒对重链编码质粒的摩尔比, 从两个不同质粒表达免疫球蛋白轻链和重链。在转染后第 4 天至第 11 天收获含有 HuMab 的细胞培养上清液。将上清液贮存于 -20°C 直至纯化。

[0298] 在 Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K. 和 Wurm, F. M. (2001) Biotechnol Bioeng 75, 197-203 中描述了有关例如在 HEK293 中重组表达人抗体的一般信息。

[0299] 抗 P 型选凝素 HuMah 亲和性的测定

[0300] 设备:

[0301] 仪器: BIACORE® 2000

[0302] 芯片: CM5

[0303] 偶联法: 胺偶联法

[0304] 缓冲液: HBS (HEPES, NaCl), pH 7.4, 25°C

[0305] 为了测量亲和性, 通过胺偶联法将兔抗人 Fc γ 抗体 (Dianova) 偶联于用来呈现抗 P 型选凝素抗体的芯片表面。结合大致 400RU 抗 P 型选凝素抗体。以 0-50nM 间的多个浓度加入重组 P 型选凝素 (R&D Systems)。通过注入 P 型选凝素 120 秒测量结合, 通过以缓冲液洗涤芯片表面 180 秒测量解离。不同的抗 P 型选凝素抗体的亲和性数据示于表 2。使用 Biaevaluation 软件将动力学数据拟合为 P 型选凝素对所呈递的单克隆抗体的 1 : 1 朗缪

尔结合模型。

[0306]

抗体 HuMab	ka (1/Ms)	kd (1/秒)	KA (1/M)	KD (M)
001	6.08×10^5	4.19×10^{-4}	1.45×10^9	6.89×10^{-10}
002	8.10×10^5	2.13×10^{-3}	3.81×10^9	2.63×10^{-9}
003	$6,60 \times 10^5$	2.91×10^{-4}	2.27×10^9	4.41×10^{-10}
005	$8,42 \times 10^5$	2.89×10^{-4}	2.91×10^9	3.43×10^{-10}
011	1.77×10^6	2.38×10^{-3}	7.44×10^8	1.34×10^{-9}
012	1.08×10^6	1.25×10^{-4}	8.65×10^9	1.16×10^{-10}
013	1.46×10^6	2.02×10^{-4}	7.22×10^9	1.39×10^{-10}
017	7.79×10^5	1.39×10^{-5}	5.59×10^9	1.79×10^{-11}

[0307] P 型选凝素抗体在基于细胞的粘着鉴定法

[0308] 和玫瑰花结鉴定法中的抑制活性

[0309] 材料和方法:

[0310] 细胞粘着鉴定法:在此粘着鉴定法中评估 HuMab 对白细胞样 HL60 细胞 (ATCC CCL 240) 粘着于微量滴定板上包被的 P 型选凝素的作用。HL60 细胞用 BCECF-AM(2', 7'-双-(2-羧乙基)-5-(和-6)-羧基荧光黄乙酰氧甲基酯;目录号 216254, Calbiochem) 标记。全长的纯化 P 型选凝素(纯化方法如上)在含有 150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、20mM Tris(pH 7.4) 和 0.0005% T×100 缓冲液中以 1 μg/ml 的浓度在 96 孔板 (Nunc Immuno Plate Maxisorp F96) 中 4℃ 包被过夜。此后,各孔用含 3.5% 牛血清白蛋白 (BSA, Fluka) 的如上提及的缓冲液在室温 (RT) 封闭 2 小时。各孔用 50 μl 在含 1% BSA 的如上提及的缓冲液中作不同稀释的 P 型选凝素 HuMab 或小鼠 P 型选凝素参考抗体 (WAPS 12.2, 各杂交瘤细胞系由 ATCC 提供) 在室温下预温育 20 分钟。加入标记的 HL60 细胞 (50 μl, 70,000 个细胞/孔) 并允许在室温下结合 45 分钟。在某些实验中,HL60 细胞在加入各孔前与 20 μg/ml 人 IgG1 预温育 30 分钟以封闭 Fc 受体。通过(用以上提及的缓冲液 4 次)温和洗涤除去未结合的 HL60 细胞后,用 120 μl NP-40(Fluka;在 H₂O 中 1%) 裂解粘着的细胞。将 100 μl 上清液转移至平板内以使用荧光分光光度计 LS 50B(Perkin Elmer) 在 485nm 激发波长和 538nm 发射波长处测量相应的荧光。

[0311] 玫瑰花结鉴定法:为评估抗体对活化的血小板与 HL60 细胞相互作用的影响,使用结合双色细胞荧光测量分析 (Evangelista 等, Blood 88:4183(1996)) 的玫瑰花结鉴定法

(Jungi 等, Blood 67 :629(1986))。如 (Fox 等, Methods Enzymol 215 :45(1992)) 所述制备洗涤的人血小板。洗涤的人血小板用凝血酶 (终浓度 1U/ml) 活化 5 分钟并用 FITC- 缀合的抗人 GPIIb 抗体 p1-36 (Kouns 等, J Biol Chem 267 :18844(1992)) 标记。随后将 70 μ l 蒂罗德溶液中的 $1.4-2 \times 10^6$ 个血小板与不同稀释度的 HuMab (100 μ l) 在室温下黑暗中温育 30 分钟。加入 50 μ l 调整为 20×10^6 个 /ml 的 HL60 细胞悬液 (在蒂罗德溶液中)。HL60 细胞通过与 20 μ l 缀合 PE (藻红蛋白) 的抗人 CD45Ab (目录编号 555483, Pharmingen) 温育来标记。将标记的 HL60 细胞与血小板和 HuMab 在 FACS 管 (Becton Dickinson) 中室温下温育 30 分钟后, 使用 FACScan (Becton Dickinson) 通过测量血小板标记荧光和 HL60 细胞标记荧光, 对混和的聚集物或玫瑰花结的形成进行分析。通过对数放大作用, 以 488nm 激发波长和分别为 530nm (FITC) 和 570nm (PE) 发射波长获得前向角散射和侧向角散射以及绿色 (FITC) 信号和红色 (PE) 信号。使用电子补偿消除波谱重叠。HL60 细胞基于前向角散射和侧向角散射进行鉴定。对鉴定为 HL60 细胞的事件设门以排除单个血小板。对于每个样品测量五千个已设门的 HL60 细胞事件。将在 EDTA (10mmol/l) 存在时混和了非活化血小板和 HL60 细胞或由凝血酶活化的血小板和 HL60 细胞的样品用来设置绿色荧光的阈值。高于该阈值的 HL60 细胞百分数代表结合血小板的 HL60 细胞的百分数。血小板标记荧光向较低荧光值的移动表明具有较高数量粘着性血小板的混和聚集物数量的降低有利于具有少量粘着性血小板的混和聚集物数量的增加。

[0312] 结果:

[0313] 在 HL60 细胞粘着鉴定法中, P 型选凝素抗体以 0.08-0.5 μ g/ml 范围的 IC_{50} 值抑制 HL60 细胞对纯化 P 型选凝素的粘着。虽然在抗体的 Fc 部分中导入突变, 但是如图 1 中 0.08-0.11 μ g/ml 的 IC_{50} 值所示, HuMab 的 IgG4 和 IgG1 变体均比亲本抗体更有效。当将 HL60 细胞与人 IgG1 预温育时, 如图 1 中对 HuMab002 所显示, 未突变亲本抗体的效力也以大约 3 至 4 倍 IC_{50} 值降低的方式得到提高。这个发现表明突变体在粘着鉴定法中增加的效力主要归因于消除了 HL60 细胞通过抗 Fc γ 受体的抗体 Fc 部分对 P 型选凝素的粘着。

[0314] 在对表达 P 型选凝素的活化人血小板粘着至 HL60 细胞进行评价的玫瑰花环鉴定法中, HuMab 的 IC_{50} 值因为本鉴定法中较少的 P 型选凝素受体数目均低于粘着鉴定法中的 IC_{50} (IC_{50} :0.05-0.3 μ g/ml、优选地在 0.05-0.2 μ g/ml 之间)。与未突变的亲本抗体相比, 相应 HuMab 的 Fc 变体的功效倾向增加 (图 2)。在与活化的血小板温育前, HL60 细胞与 IgG1 和与 IgG4 预温育没有显著影响突变体和亲本抗体的抑制活性, 这表明与粘着鉴定法相比, 在玫瑰花结鉴定法中 Fc γ 受体介导的结合不起明显作用。

[0315] P 型选凝素抗体与动物物种来源的 P 型选凝素的交叉反应性

[0316] 材料和方法 :通过 (i) 使用 FACS 分析测量 P 型选凝素 HuMab 对来自大鼠和食蟹猴的活化血小板的结合以及测量 (ii) 在评估大鼠血小板和食蟹猴血小板对 HL60 细胞粘着的玫瑰花结鉴定法中 P 型选凝素 HuMab 的抑制活性评价该抗体的交叉反应性。

[0317] 为测量 HuMab 对活化的大鼠血小板和食蟹猴血小板的结合, 与制备洗涤的人血小板 (参见以上) 类似, 制备洗涤的大鼠血小板和食蟹猴血小板。它们用凝血酶 (终浓度 1U/ml) 活化 5 分钟, 活化的血小板与不同稀释度的 HuMab (20 μ l) 在室温下温育 30 分钟。在结合 HuMab 后, 血小板用 2% 的 PFA 在室温下固定 15 分钟。将样品用蒂罗德缓冲液洗涤并且重悬于 300ml 蒂罗德缓冲液内。用 FITC- 缀合的兔抗人 IgG F(ab')₂ 片段 (目录编

号 F0056, Dako) 检测 HuMab 结合。使用兔抗人 P 型选凝素多克隆抗体 (目录编号 09361A, Pharmingen) 作为抑制大鼠 P 型选凝素的对照抗体。

[0318] 如以上对人血小板所述制备洗涤的大鼠血小板和食蟹猴血小板。如对人血小板所述开展玫瑰花结鉴定法。为标记食蟹猴血小板, 使用 FITC- 缀合的抗人 GPIIb 抗体 p1-36, 而用 FITC- 缀合的小鼠抗大鼠 CD61 抗体 (目录编号 554952, Pharmingen) 标记大鼠血小板。

[0319] 结果: 如图 3a 中的某些实施例所示, 证实可抑制人 P 型选凝素所介导功能的本发明 P 型选凝素特异性抗体均不结合大鼠 P 型选凝素或均不抑制由大鼠血小板和 HL60 细胞组成的混合聚集物的形成。然而 P 型选凝素 HuMab 结合并抑制食蟹猴血小板 P 型选凝素 (图 3b)。

[0320] P 型选凝素抗体对 E 型选凝素和 L 型选凝素的选择性

[0321] 材料和方法: P 型选凝素 HuMab 对 E 型选凝素和 L 型选凝素 (ADP1 和 ADP2, R&D Systems) 的选择性在测量抗体对重组 E 型选凝素和 L 型选凝素结合的无细胞 ELISA 中测定以及测量抗体对 E 型选凝素 -CHO 转化子和 L 型选凝素 -300.19 转化子 (如 Goetz 等, J. Cell Biol 137 :509(1997); Ley 等, Blood 82 :1632(1993) 中所述生成转化子) 结合的基于细胞的 ELISA 中测定。

[0322] 在无细胞 ELISA 中, 将溶于含 150mM NaCl、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、20mM Tris (pH 7.4) 和 0.0005% T×100 缓冲液中的 1 μg/ml 浓度的重组 P 型选凝素、E 型选凝素或 L 型选凝素在 96 孔板 (Nunc ImmunoplateMaxisorp F96) 中 4℃ 包被过夜。各孔以含有 3.5% 牛血清白蛋白 (BSA, Fluka) 的如上提及的缓冲液在室温下封闭 2 小时。各孔用 50 μl 在含有 1% BSA 的如上提及缓冲液中作不同稀释的 P 型选凝素 HuMab 或小鼠 P 型选凝素、E 型选凝素参考抗体 (BBA26; R&D Systems) 和山羊 L 型选凝素参考抗体 (AF728; R&D Systems) 于室温预温育过夜。使用生物素化的抗人 IgG (Amersham, RPN1003, 终浓度 1 : 1000) 或对于对照抗体, 以生物素化的抗小鼠 IgG 或抗山羊 IgG 检测 HuMab 的结合。温育 1 小时后, 以如上提及的缓冲液洗涤各孔 (3 次), 并加入 0.1ml 在含有 0.1% BSA 的所提及缓冲液中按 1 : 750 稀释的链霉亲和素生物素化过氧化物酶复合体 (Amersham, RPN1051) 作用 30 分钟。随后洗涤各孔并加入 0.2ml 含有 ABTS (2,2' - 连氨基 - 双 (3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸), Boehringer, Mannheim) 的过氧化物酶底物溶液 (ABTS 贮液: 1ml 40mM ABTS、5 μl 30% H₂O₂ 和 20ml 0.1M 乙酸钠、0.05NaH₂PO₄)。大约 10 分钟后, 使用 50 μl 0.1M 柠檬酸和 0.01% NaN₃ 终止反应。在 405nm 处对颜色反应读数。

[0323] 在基于细胞的 ELISA 中, 用细胞解离溶液 (Sigma C5914) 使细胞脱离壁后, 将 P 型选凝素 -CHO- 转化子和 E 型选凝素 -CHO- 转化子接种至 96 孔板 (TC Microwell F96 Nunc 167008) 的各孔内并调节至 100,000 个细胞 / 孔, 在各自的培养基内于 37℃ 培养过夜 (用于 P-CHO- 转化子的培养基: DMEM+10% FCS+2mM 谷氨酰胺 + 青霉素 100U/ml / 链霉素 100 μg/ml; 用于 E 型选凝素转化子的培养基: HAM F-12+10% FCS+2mM 谷氨酰胺 + 青霉素 100U/ml / 链霉素 100 μg/ml+0.1% 两性霉素 +100 μg/ml 新霉素)。在除去培养基并且以含有 3% TopBlock (目录编号 TB232010; Juro) 的 A-T 缓冲液 (150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM Tris (pH 7.4)) 封闭各孔 1 小时后, 加入 50 μl 溶于含 1% TopBlock 和 0.1% 叠氮化化合物的如上提及缓冲液中的 P 型选凝素 HuMab 或小鼠 P 型选凝素参考抗体和小鼠 E 型选凝

素参考抗体（参见如上）并在室温下温育 60 分钟。在洗涤各孔（4 次）后，使用如上提及的用于无细胞 ELISA 的相同步骤检测结合的抗体。

[0324] 因为 L 型选凝素 300.19 细胞是悬浮的细胞，必需将 L 型选凝素-300.19 转化子在 96 孔聚苯乙烯过滤平板 (Corning 3510) 中的各孔内接种，从而对基于细胞的 ELISA 方法加以调整。使用滤器平板封闭和温育后，将溶液通过平板底部过滤除去，但除此之外本方案与使用 P 型选凝素-CHO 细胞和 E 型选凝素-CHO 细胞的方案相似。使用未转染的 CHO 和未转染的 300.19 作为对照。

[0325] 结果：

[0326] 本发明抗体相对 E 型选凝素和 L 型选凝素而言对 P 型选凝素呈高度选择性。它们以 0.01-0.08 $\mu\text{g/ml}$ 、优选地以 0.01-0.04 $\mu\text{g/ml}$ 范围的 EC_{50} 值结合 P 型选凝素-CHO 细胞，其中在 E 型选凝素-CHO 细胞和 L 型选凝素-300.19 上的 EC_{50} 值明显高于 50 $\mu\text{g/ml}$ 、优选地高于 100 $\mu\text{g/ml}$ 。HuMab002 在基于细胞的 ELISA 中具有对 E 型选凝素和 L 型选凝素超过 4,000 倍选择因子指数的最高选择性。此外，HuMab002 在高于基线水平直至浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 时仍不与 E 型选凝素和 L 型选凝素转化子结合。HuMab002 的 Fc 变体 IgG4v1 和 IgG1v1 的选择性与亲本 HuMab002 的选择性类似（图 4a-c）。

[0327] P 型选凝素抗体在完全人血液流式系统中的离体 (ex vivo) 抑制活性

[0328] P 型选凝素 HuMab 对白细胞粘着血小板单层的影响

[0329] 材料和方法：

[0330] 为说明 P 型选凝素抗体对将白细胞招募至血管壁损伤和血小板血栓形成位置处的作用，基本上如 (Kirchhofer 等, Blood 89:1270(1997)) 所描述，使用允许测量人白细胞与人血小板以不同剪切速率相互作用的人血液流式系统。在平行的平板灌注装置中，将抽取自健康供体肘前静脉的人全血在模拟受损的裸露血管壁的胶原表面撒布。如 (Kirchhofer 等, Blood 89:1270(1997)) 所描述制备已包被胶原的盖玻片。将它们三个平行的平板灌注室内放置。为了允许测量不同剪切速率 (65 次/秒和 280 次/秒)，使用不同大小的灌注室，并且以受到安装于灌注装置远端的滚柱泵控制的 1ml/分钟的恒定血流灌注血液至包被胶原的盖玻片上。从静脉中抽取血液后并分成三个管后，立即加入 GPIIb/IIIa 抑制剂 (0.5 μmol /拉米非班) 以阻止血小板聚集和产生血小板单层。与此同时施以不同浓度的 P 型选凝素抗体 (HuMab、突变体、作为对照的各自参考抗体或人 IgG1 和 IgG4)，随后使血液抑制剂混合物进入包含了包被胶原的盖玻片的灌注室内。在 5.5 分钟灌注期后，使 PBS 通过灌注室灌注 3 分钟而不中断液流。在短暂中断液流后，在 1ml/分钟时用 PBS 中的 3% 多聚甲醛固定灌注室 2 分钟。随后将盖玻片从灌注室内取出，再次用 PBS 中的 3% 多聚甲醛于 4°C 下固定 1 小时并在含 0.03% 叠氮钠的 PBS 中贮存。为评估粘着于血小板单层的白细胞的数目，盖玻片在空气干燥后以 Diff-Quick 溶液 (Dade Behring AG) 染色并包埋入 Merckoglas (Merck, 德国)。使用图像分析系统 (MCID, Imaging Research Inc.) 以确定粘着于对血流方向垂直且离盖玻片开始处 1mm 远的标准区内的白细胞数目。在 65 次/秒和 280 次/秒的剪切速率时，在其表面计数白细胞的面积分别是 3.1mm² 和 2.1mm²。

[0331] 结果：

[0332] P 型选凝素 HuMab 以浓度依赖方式抑制白细胞对血小板单层的粘着，在 65 次/秒的剪切速率和 10 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时，HuMab 抑制 60-99%、优选地 70-99% 的白细胞粘着。与 65

次 / 秒的静脉剪切速率相比, HuMab 的抑制效果在较高的 280 次 / 秒剪切速率 (接近于动脉的情形) 下更明显。总之, 在 280 次 / 秒剪切速率时, 粘着的白细胞数目比在 65 次 / 秒时低。当 Fc 变体与分别的亲本抗体相比时, 它们在离体灌注室内具有类似于 HuMab002 及其变体 IgG4v1 和 IgG1v1 所显示出的抑制活性 (图 5)。在体外鉴定法中已发现的突变体较亲本抗体增强的抑制活性在离体的灌注室内未观察到, 其可能归咎于在人全血中的白细胞 Fc γ 受体的饱和。

[0333] P 型选凝素 HuMab 对白细胞粘着内皮细胞的影响

[0334] 材料和方法 :

[0335] 为说明 P 型选凝素在剪切条件下的抗炎效力, 在盖玻片上已包被内皮细胞的情形下中使用以上提及的人血液流式系统。来自脐带的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 根据 Jaffe 等, 1993 的方法, 通过胶原酶 II 型 (Roche 瑞士) 消化分离。将它们在包被 1% 明胶的组织培养容器内于补加 20% 胎牛血清 (Gibco, Auckland), 100IU/ml 青霉素 (Gibco, Auckland)、0.1mg/ml 链霉素 (Gibco, Auckland)、2mmol/l L-谷氨酰胺 (Gibco, Auckland)、10U/ml 肝素 (Sigma) 和 50 μ g/ml EC 生长补充物 (Sigma, 德国) 的培养基 199 (M199, Sigma, 德国) 中培养。HUVEC 生长至汇合 (大约 4 天), 用胰蛋白酶 / 乙二胺四乙酸 (Gibco, Auckland) 传代并且在事先用 1% 明胶 (Fluka, 德国) 包被的 Thermanox 塑料盖玻片 (大约 200,000 个 EC/ 盖玻片) 上接种。可允许 HUVEC 定植并经过 1-2 天变成汇合。在开始灌注前 24 小时用 20ng/ml IL-4 (R&D Systems) 刺激 HUVEC 并在灌注前 5-10 分钟用 10^{-4} M 组胺 (Fluka, 德国) 刺激 HUVEC。每次实验使用第一次传代的 HUVEC 进行。如以上所述, 将具有已刺激的 HUVEC 汇合单层的盖玻片置于平行平板灌注室内。与如上所述的灌注实验相似, 从健康供体中抽取全血。不过在这些实验中, 血液用凝血酶抑制剂 Ro-46-6240 (10μ M) 抗凝并在向活化的内皮细胞上灌注前即刻, 与不同浓度的 P 型选凝素抗体 (HuMab、突变体、各自的参考抗体) 或作为对照的人 IgG1 和 IgG4 预温育 5 分钟。将血流调节至 1ml/ 分钟, 剪切速率为 65 次 / 秒并且灌注时间是 5.5 分钟。在用 PBS 洗涤 3 分钟后, 将具粘着性白细胞的 HUVEC 用 3% 多聚甲醛在如已描述的相同流动条件下固定 2 分钟。随后, 将盖玻片从室内取出, 在新鲜固定剂中浸没 1 小时, 并在含 0.02% 叠氮钠的 PBS 中保存。对于形态学分析, 白细胞用小鼠抗白细胞共同抗原 CD45 抗体染色, 其中该抗体事先使用修饰的生物素化抗小鼠免疫球蛋白 (Animal Research Kits, Dako, 美国) 标记。细胞核用苏木精 (J. T Baker, 荷兰) 进行复染。

[0336] 结果 :

[0337] 用 IL-4 和组胺组合刺激 HUVEC, 引起 P 型选凝素的表达和不同类型白细胞的粘着, 其中构成粘着性白细胞的主要部分为粒细胞 (包括 PMN 和嗜酸性粒细胞)。本发明的 HuMab 在 3 μ g/ml 时抑制总白细胞群体 60-90% 的粘着。Fc 变体的总体抑制活性与未突变的 HuMab 的总体抑制活性相比较, 没有显著差异。

[0338] P 型选凝素 HuMab 对不同的白细胞亚型表现出差异性影响。与单核白细胞相比, 对粒细胞的影响更显著。本发明的抗体抑制 90-99% 的粒细胞 (包括 PMN 和嗜酸性粒细胞) 粘着、50-88% 的单核细胞粘着以及 5-40% 的淋巴细胞粘着。在图 6 中代表性显示 IgG4v1 对不同白细胞亚型的绝对数目分别的下降。

[0339] P 型选凝素 HuMab 活化补体系统的潜力

[0340] C1q 和 C3c 结合 ELISA :

[0341] 使用 ELISA 方法测定本发明抗体诱导 C1q 结合和 C3a 活化的能力。C1q 是适应性免疫的部分并且在结合免疫复合物后启动数个酶原依次活化。这些酶反过来引起 C3 分子切割,这可导致发生炎症反应、调理外来或异常颗粒和裂解细胞膜。

[0342] 原则上,ELISA 板以浓度范围内的抗体包被,将人 C1q 或作为 C3 来源的人合并血清加入该平板内。通过抗 C1q 或 C3 ϵ 抗体及随后的过氧化物酶标记的缀合物检测 C1q 或 C3 ϵ 的结合。

[0343] HuMab002(杂交瘤来源的材料和瞬时转染瘤来源的材料)、其突变变体及对照抗体在浓度为 0.16-20 μ g/ml 进行测试。使用极微弱结合 C1q 的人 IgG4 (CLB, 荷兰, 0.5 μ g/ml 贮存) 作为阴性对照。包含人 IgG1 (Sigma, 2 μ g/ml 贮存) 作为阳性对照。为检测 C1q, 使用兔抗 C1q 抗体 (Dako) 和缀合辣根过氧化物酶的猪抗兔 IgG 抗体 (Sigma)。为检测 C3 ϵ , 使用小鼠抗人 C3 抗体和缀合辣根过氧化物酶的兔抗小鼠 IgG 抗体 (Sigma)。

[0344] 使用 Graphpad Prism 软件以非线性回归曲线拟合(单位点结合)计算在 10 μ g/ml HuMab 时的 EC₅₀ 值或最大结合 (Bmax)。

[0345] 结果:

[0346] 如由来自杂交瘤的材料和来自瞬时转染瘤的材料的 EC₅₀ 值 0.946 μ g/ml 和 1.159 μ g/ml, 以及 Bmax (OD₄₀₅) 值 0.987 和 0.711 分别显示, 本发明的 HuMab002 能够有效地结合 C1q。如所预期, 由 OD₄₀₅ 的 Bmax 值 0.222 显示, 人 IgG4 阴性对照不结合 C1q。然而分别如 OD₄₀₅ 的 Bmax 值 0.132、0.119 和 0.132 所示(表 3), 全部三种受试的 Fc- 变体 (IgG4v1、IgG1v1、IgG1v2) 均丧失结合 C1q 的能力。与 C1q 结合能力一致, C3 对(来自杂交瘤和来自转染瘤)HuMab002 的沉积以抗体浓度依赖方式发生, 并且 EC₅₀ 值范围在 2.7 μ g/ml-8.3 μ g/ml 间。然而如由 OD₄₀₅Bmax 值 0.104、0.156 和 0.133 分别显示(表 3), 全部三种 Fc- 变体均不能启动 C3 沉积。

[0347] 因为 HuMab002 与补体成分相互作用, 所以该抗体具有内在的诱导体内 (in vivo) CDC 的潜力。因此, 根据本发明修饰了该抗体的 Fc 部分。

[0348]

	C1q ELISA		C3 ELISA	
	Bmax (OD ₄₀₅ 在 10 μ g/ml 时)	背景 (OD ₄₀₅)	Bmax (OD ₄₀₅ 在 10 μ g/ml 时)	背景 (OD ₄₀₅)
HuMab002 (杂交瘤)	0.987	0.079	4.47	0.098
IgG4v1	0.132		0.104	
IgG1v1	0.119		0.156	
IgG1v2	0.132		0.133	
HuMab002 (瞬时)	0.711		4.071	
IgG4	0.222		0.182	

[0349] P 型选凝素 HuMab 结合 Fc γ 受体的潜力

[0350] IgG 抗体依赖的细胞毒性效应由效应细胞上的 Fc γ 受体介导。通过 FACS 分析研究了来自杂交瘤和来自转染瘤的 HuMab002 以及突变变体和对照抗体对来自人血液的表达 Fc γ R 的效应细胞的结合。

[0351] 材料和方法：

[0352] 将 Fc γ RI IIA1.6 转化子或新鲜分离的效应细胞与抗体温育，并且用 FITC 标记的兔抗人 IgG F(ab)₂(DAKO) 或 FITC 标记的兔抗人 IgG F(ab)₂(BD/Pharmingen) 检测抗体结合。HuMab002(瞬时的来自转染瘤的和 / 或来自杂交瘤的材料以及突变变体) 在浓度为 1 μ g/ml (IIA1.6 转化子) 或 10 μ g/ml (效应细胞) 时进行测试。用一级抗体或人 IgG4(10 μ g/ml) 缺乏作为阴性对照。为检测 IIA1.6 细胞上的 Fc γ RI 表达, 使用 FITC 标记的小鼠抗人 CD64(BD/Pharmingen)。在使用已富集 NK 细胞的外周血单核细胞的实验中, 通过使用 PE 标记的小鼠抗人 CD56(BD/Pharmingen) 的双染色鉴定 NK 细胞。基于 FSC/SSC 图谱鉴定粒细胞和单核细胞。

[0353] 将 IIA1.6 细胞、IIA1.6-Fc γ RI 转化子和新鲜分离的效应细胞与抗体温育。用 FITC 标记的 Rb- α -huIgG F(ab)₂(DAKO) 或 FITC 标记的 Rb- α -huIgG F(ab)₂(BD/Pharmingen) 检测抗体结合。

[0354] HuMab002(瞬时的来自转染瘤的材料、来自杂交瘤的材料和突变变体材料) 在 IIA1.6-Fc γ RI 转化子结合鉴定法中以 1 μ g/ml 的浓度进行测试。使用 IIA1.6 野生型细胞作为阴性对照。使用 m- α -huCD64-FITC(BD/Pharmingen) 作为 Fc γ RI 表达的对照。

[0355] HuMab002(瞬时的来自转染瘤的材料、来自杂交瘤的材料和突变变体材料) 在效应细胞结合鉴定法中以 10 μ g/ml 的浓度进行测试。在粒细胞结合鉴定法中不测试瞬时的转染瘤材料。使用 IgG4(10 μ g/ml) 作为在除了粒细胞结合鉴定法以外的所有其它效应细胞结合鉴定法中的阴性对照。

[0356] 使用 NK 分离试剂盒 (Dyna1 Biotech ASA, Oslo, 挪威) 富集全血中的 NK 细胞, 通

过 m- α -huCD56-FITC 染色鉴定 NK 细胞。

[0357] 如 NK 分离试剂盒 (Dyna1 Biotech ASA, Oslo, 挪威) 中包含的手册所描述, 使用 Fico11 方法从全血分离 PBMC (外周血单核细胞)。基于 FSC/SSC 图谱鉴定单核细胞。使用 FACS 裂解缓冲液从全血分离粒细胞并且基于 FSC/SSC 图谱进行鉴定。

[0358] 将新鲜分离的效应细胞与抗体温育, 并且用 FITC 标记的兔抗人 IgG F(ab)₂ (DAKO) 或 FITC 标记的兔抗人 IgG F(ab)₂ (BD/Pharmingen) 检测抗体结合。HuMab002 (瞬时的来自转染瘤的和 / 或来自杂交瘤的材料以及突变变体) 在 10 μ g/ml 浓度下进行测试。用一级抗体或人 IgG4 (10 μ g/ml) 缺乏作为阴性对照。通过 NK 分离试剂盒 (Miltenyi Biotec, 美国) 从 MNC 样品分离 NK 细胞。在使用富集 NK 细胞的外周血单核细胞的实验中, 通过使用 PE 标记的小鼠抗人 CD56 (BD/Pharmingen) 的双染色鉴定 NK 细胞。根据本领域现有技术从 PBMC (例如单核细胞分离试剂盒 (参见以上 Miltenyi)) 分离粒细胞和单核细胞。基于 FSC/SSC 图谱鉴定粒细胞和单核细胞。

[0359] 结果:

[0360] 如通过对粒细胞、单核细胞和 NK 细胞的结合所显示, 本发明的 HuMab002 能够结合 FcR。全部三种受试的 Fc 变体 (IgG4v1、IgG1v1 和 IgG1v2) 完全丧失结合 NK 细胞的能力 (表 4)。此外, HuMab002 有效地结合粒细胞和单核细胞, 同时如表 5 和表 6 中结合细胞的抗体的百分数所显示, 该突变变体表现出与在一级抗体或人 IgG4 缺乏时可比的结合水平。这表明该突变变体丧失与效应细胞上的 FcR 相互作用的能力。

[0361] 因为 HuMab002 可有效地与 FcR 相互作用, 故这种抗体具有内在的诱导体内 (in vivo) 抗体依赖细胞毒性的潜力。本发明 Fc- 变体与 FcR 相互作用的丧失以有效方式防止了 ADCC。

[0362]

表 4	
抗体	NK 细胞结合 (%结合 NK 细胞的抗体)
无抗体	0.03
HuMab002 (杂交瘤)	90.92
HuMab002 (瞬时)	37.40
人 IgG4	0.06
IgG4v1	0.06
IgG1v1	0.12
IgG1v2	0.00

[0363]

表 5	
抗体	单核细胞结合 (%结合单核细胞的抗体)
无抗体	8.5
HuMab002 (杂交瘤)	38.4
HuMab002 (瞬时)	31.3
人 IgG4	9.4
IgG4v1	14.5
IgG1v1	12.3
IgG1v2	14.0

[0364]

表 6	
抗体	粒细胞结合 (%结合粒细胞的抗体)
无抗体	1.2
HuMab002 (杂交瘤)	63.6
IgG4v1	1.6
IgG1v1	2.1
IgG1v2	2.0

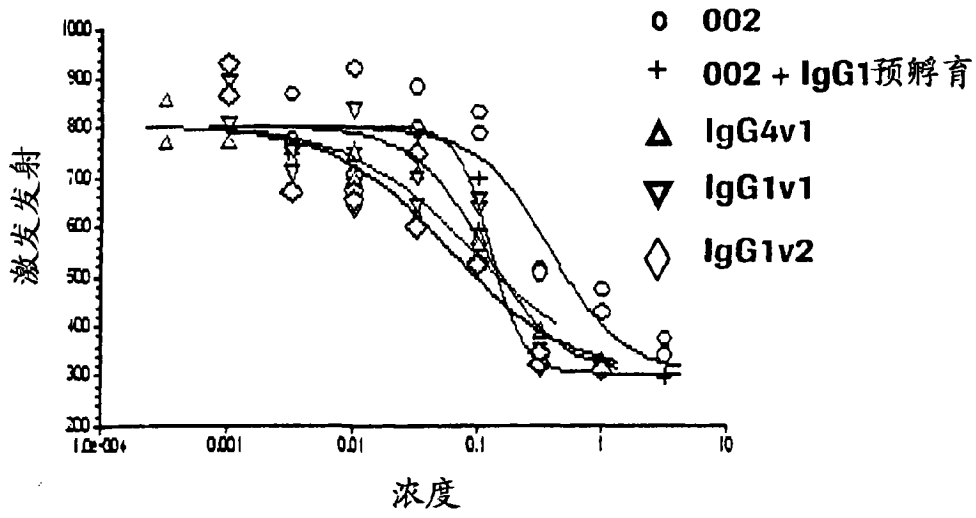


图 1

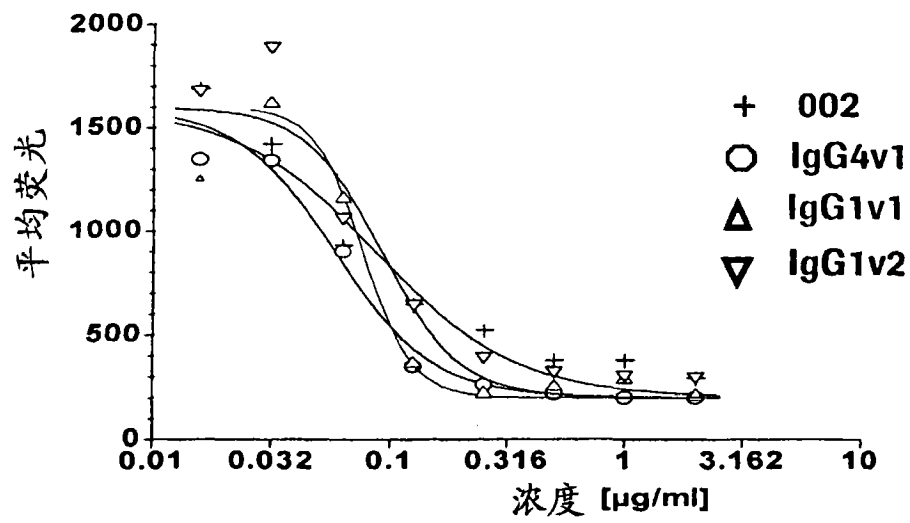


图 2

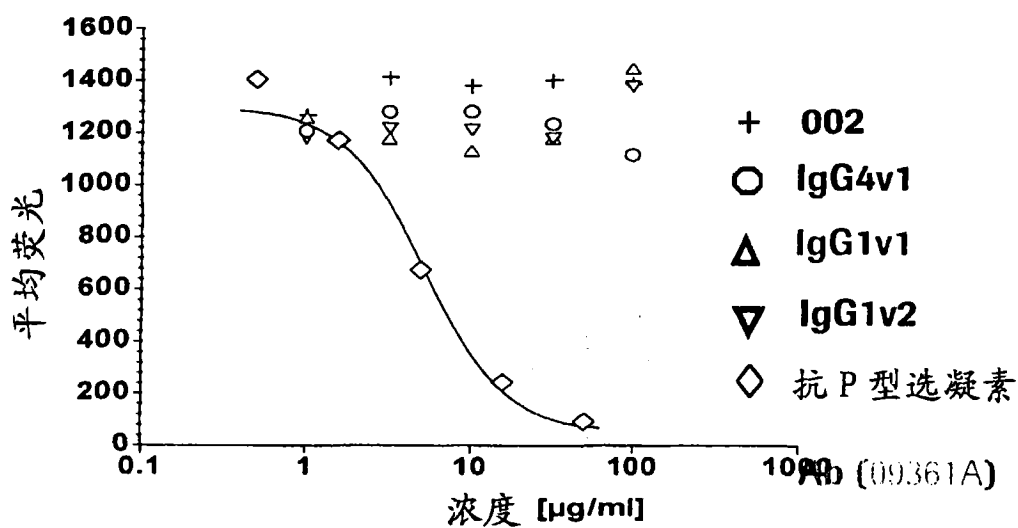


图 3a

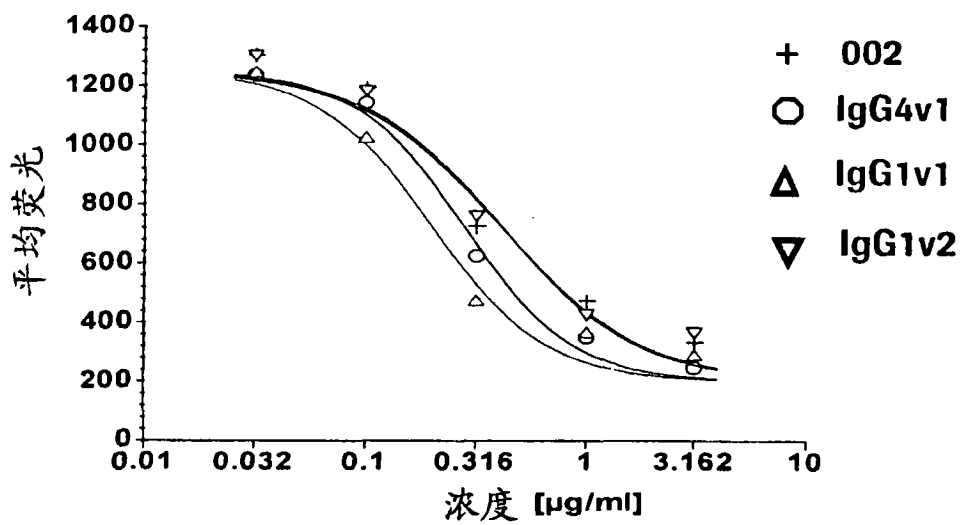


图 3b

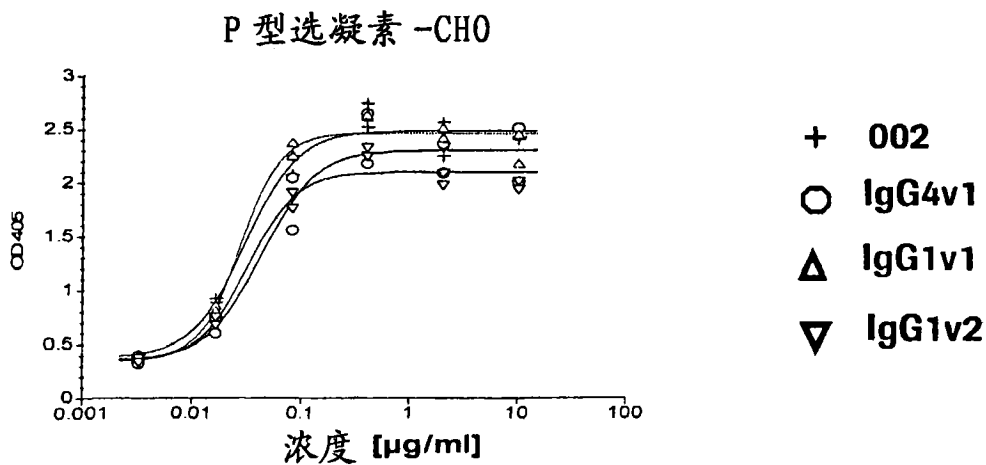


图 4a

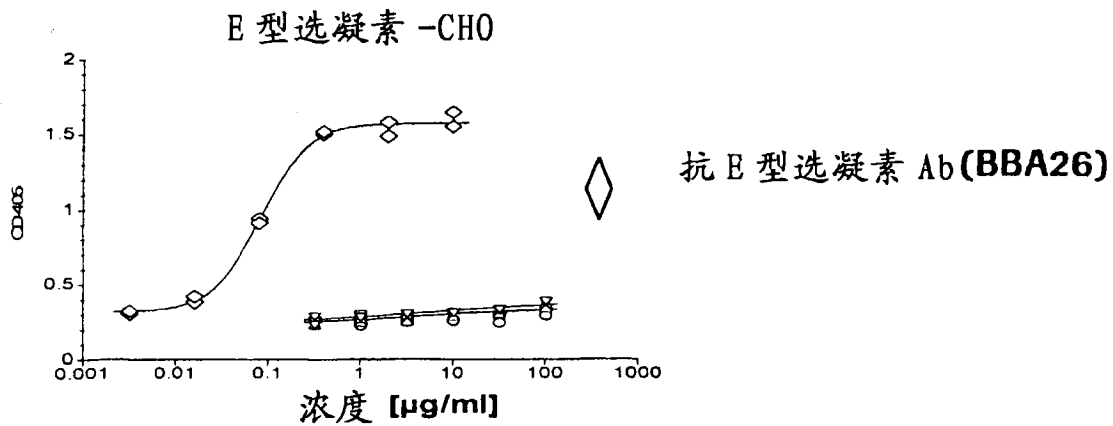


图 4b

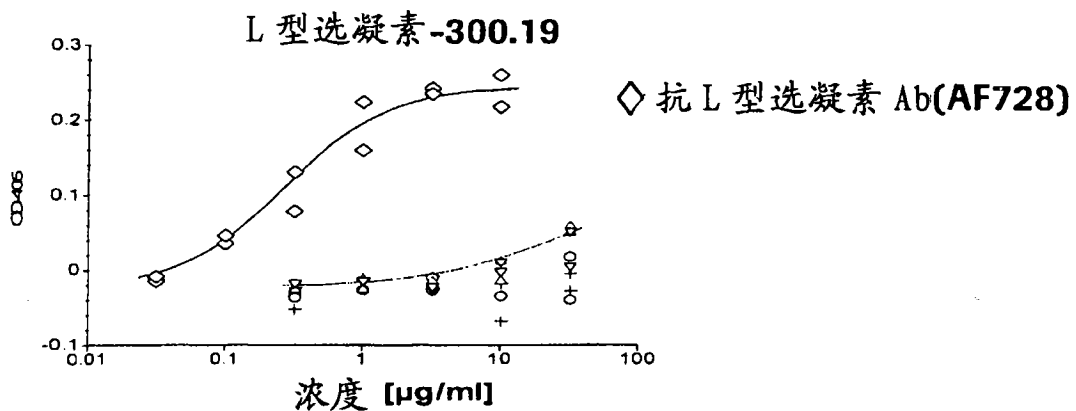


图 4c

剪切速率: 65 次 / 秒

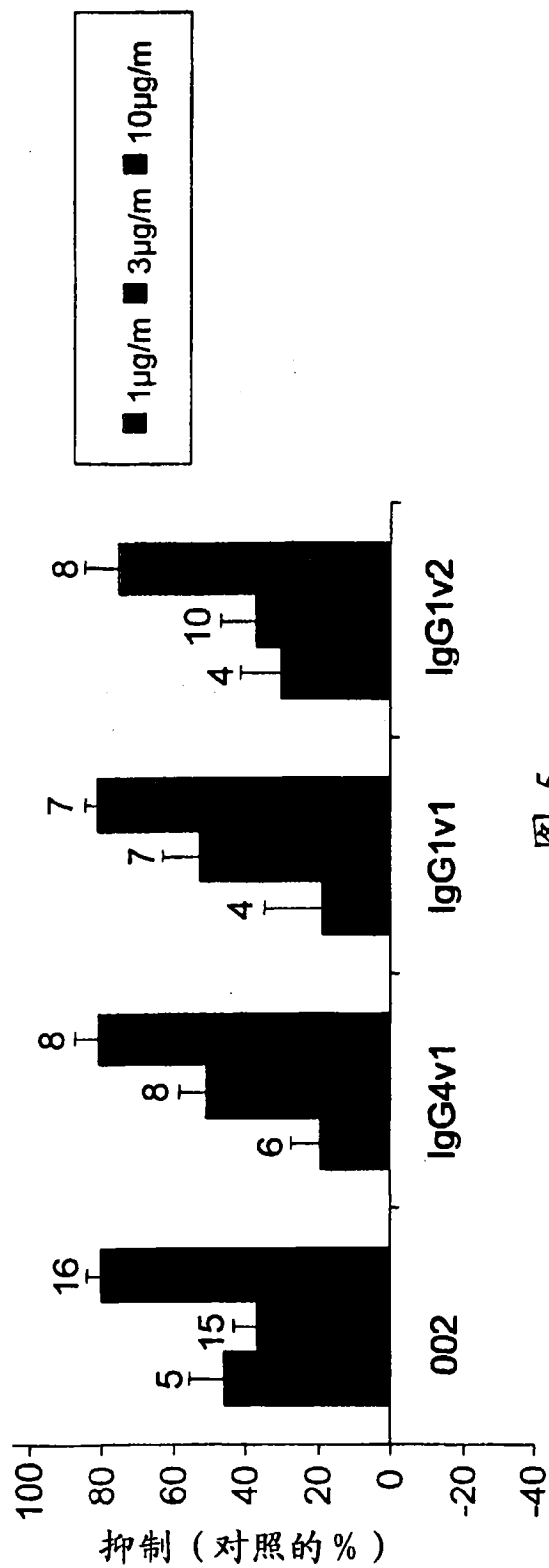


图 5

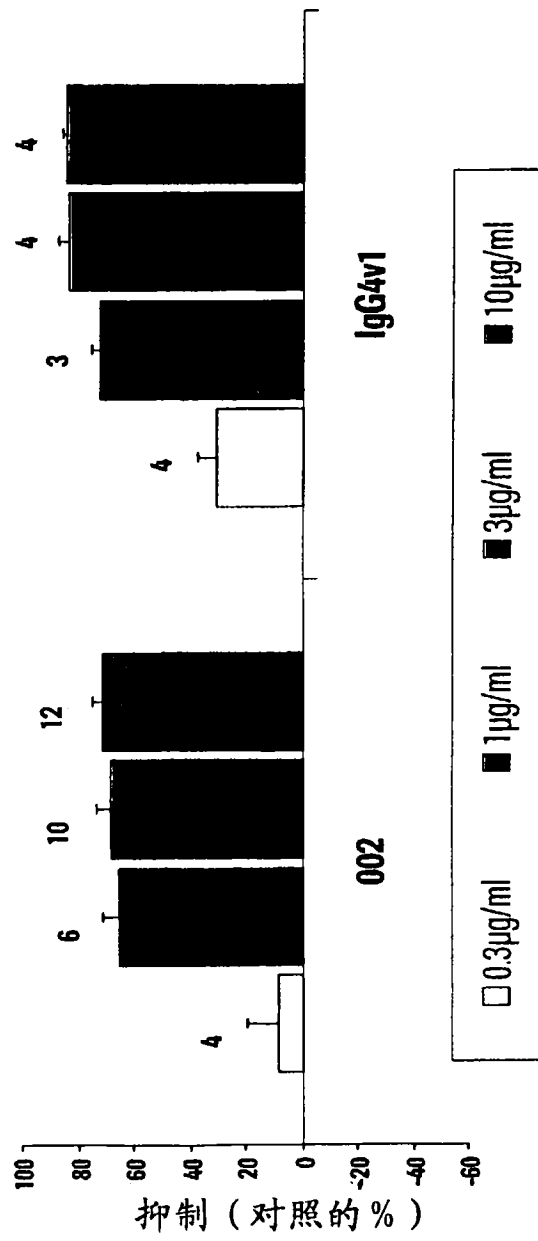


图 6a

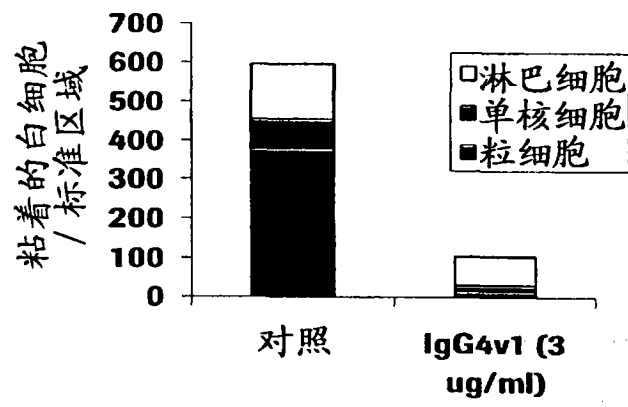


图 6b