



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116063522 A

(43) 申请公布日 2023.05.05

(21) 申请号 202211394154.4

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2012.06.12

C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

61/496,249 2011.06.13 US

A61P 1/04 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 37/06 (2006.01)

201280039482.0 2012.06.12

A61P 3/10 (2006.01)

(71) 申请人 美国全心医药生技股份有限公司

A61P 11/06 (2006.01)

地址 美国特拉华州

A61P 29/00 (2006.01)

(72) 发明人 S.巴萨拉布 B.恩恩克尔

A61P 17/06 (2006.01)

P.加里德尔 H.肖特 S.辛

A61P 19/02 (2006.01)

T.利特曾伯格

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理人 陈丹丹

权利要求书1页 说明书37页

序列表（电子公布） 附图7页

(54) 发明名称

抗PSGL-1抗体及其用途

(57) 摘要

在一个方面，本文中提供了免疫特异性结合PSGL-1的抗体、包含编码此类抗体的核苷酸序列的多核苷酸，和用于生成此类抗体的表达载体和宿主细胞。本文中还提供了包含特异性结合PSGL-1的抗体的试剂盒和药物组合物，以及使用本文中描述的抗体来治疗由活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高引起的或与其有关的病症或疾病的方法。

1. 一种免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:
 - (i) 可变轻(“VL”)链区,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;
 - (ii) 包含可变重(“VH”)链区的重链,所述可变重(“VH”)链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;和
 - (iii) 人IgG4恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸228处包含丝氨酸至脯氨酸的取代。
2. 一种免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:
 - (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链;和
 - (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链。
3. 一种免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:
 - (i) 由SEQ ID NO:2组成的重链;和
 - (ii) 由SEQ ID NO:1组成的轻链。
4. 一种单克隆抗体,其免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含如下的重链,所述重链包含:
 - (i) 包含SEQ ID NO:8、9和10的VH链区;和
 - (ii) 人IgG4重链恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。
5. 权利要求4的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体进一步包含轻链,所述轻链包含含有SEQ ID NO:5、6和7的VL链区。
6. 权利要求1至5中任一项的单克隆抗体,其中所述抗体是纯化的。
7. 一种药物组合物,其包含权利要求1至6中任一项的单克隆抗体和药学上可接受的载体。
8. 权利要求7的药物组合物,其中所述单克隆抗体是纯化的。
9. 一种抗体重链,其包含SEQ ID NO:2。
10. 一种试剂盒,其包含含有权利要求1至6中任一项的单克隆抗体的第一容器。

抗PSGL-1抗体及其用途

[0001] 本申请是申请号为201810722769.2、发明名称为“抗PSGL-1抗体及其用途”且申请日为2012年6月12日的中国专利申请(PCT申请号为PCT/US2012/042068)的分案申请。

[0002] 1. 相关申请

[0003] 本申请要求2011年6月13日提交的题目为“ANTI-PSGL-1 ANTIBODIES AND USES THEREOF”的美国临时专利申请61/496,249的提交日权益。所提及的临时申请的全部教导和内容在本文引入作为参考。

2. 发明领域

[0004] 本文中提供了特异性结合P-选择蛋白糖蛋白配体-1(PSGL-1)的抗体、编码此类抗体的多核苷酸、包含此类核苷酸的表达载体、包含此类表达载体的宿主细胞、及相关组合物。本文中还提供了使用抗PSGL-1抗体来治疗由活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高引起或与其有关的病症或疾病(诸如银屑病)的方法。

[0005] 3. 发明背景

[0006] 对感染或损伤的炎性应答由白细胞对血管壁的粘附启动(McEver等,1997,J.Clin.Invest.,100(3):485-492)。选择蛋白代表一种糖蛋白家族,其介导炎症期间第一次白细胞-内皮细胞和白细胞-血小板相互作用。选择蛋白家族(其由L-选择蛋白、E-选择蛋白、和P-选择蛋白组成)包含NH₂端凝集素域,接着是EGF样域、一系列共有重复序列、跨膜域、和短的胞质尾区。选择蛋白的凝集素域与特定的糖缀合物配体相互作用以促进细胞粘附。大多数白细胞上表达的L-选择蛋白结合一些内皮细胞和其它白细胞上的配体。细胞因子活化的内皮细胞上表达的E-选择蛋白结合大多数白细胞上的配体。活化的血小板和内皮细胞上表达的P-选择蛋白也结合大多数白细胞上的配体。

[0007] P-选择蛋白糖蛋白配体-1(“PSGL-1”),又称为SELPLG或CD162(分化簇162)是一种用于所有三种选择蛋白的人粘蛋白型糖蛋白配体(Constantin,Gabriela,2004,Drugs News Perspect,17(9):579-585;McEver等,1997,J.Clin.Invest.,100(3):485-492)。PSGL-1是一种具有两个120-kD亚基的二硫键键合的同二聚体,并且在单核细胞、淋巴细胞、粒细胞的表面上及在一些CD34⁺干细胞中表达。PSGL-1有可能有助于多种炎性病症中的病理性白细胞募集,因为它促进选择蛋白的粘附相互作用,这提示了PSGL-1的抑制剂,诸如针对PSGL-1的抗体是潜在有用的抗炎药物。

[0008] 已经开发出数种抗PSGL-1抗体(见例如国际申请公开文本WO 2005/110475,2005年11月24日公布;国际申请公开文本WO 2003/013603,2003年2月20日公布;Constantin,Gabriela,2004,Drugs News Perspect,17(9):579-585)。

[0009] 4. 发明概述

[0010] 在一个方面,本文中提供了特异性结合PSGL-1的抗体和抗体所衍生的抗原结合片段。在一个实施方案中,本文中提供了免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变轻(“VL”)链区;(ii)包含可变重(“VH”)链区的重链,所述可变重(“VH”)链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;和(iii)人IgG4恒定区,其在依照

EU (γ -G1免疫球蛋白)索引(参见Edelman等,1969,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,63 (1):78-85)编号的重链氨基酸228处包含丝氨酸至脯氨酸的取代。在一个具体的实施方案中,本文中提供了免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:(i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链;和(ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链。在另一个具体的实施方案中,本文中提供了免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:(i)由SEQ ID NO:2组成的重链;和(ii)由SEQ ID NO:1组成的轻链。在另一个具体的实施方案中,本文中提供了免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其含有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链和互补的轻链。在一个具体的实施方案中,任一种前述单克隆抗体是纯化的。

[0011] 在另一个方面,本文中提供了药物组合物,其包含任一种前述单克隆抗体和药学上可接受的载体。在一个具体的实施方案中,所述药物组合物包含纯化的单克隆抗体。

[0012] 在一个实施方案中,本文中提供了药物制剂,其包含任一种前述单克隆抗体的水性溶液,所述水性溶液包含柠檬酸钠、氯化钠和一水合柠檬酸。在一个具体的实施方案中,所述药物制剂是包含9.1mM二水合柠檬酸钠、150mM氯化钠、和0.9mM柠檬酸的水性溶液。在另一个具体的实施方案中,所述单克隆抗体在药物制剂中以0.267mM的浓度存在。在一个具体的实施方案中,所述药物制剂是包含2.676g/L钠、8.766g/L氯化钠、0.2g/L聚山梨酯80和0.189g/L柠檬酸的水性溶液。在另一个具体的实施方案中,所述单克隆抗体在药物制剂中以40g/L的浓度存在。在一个具体的实施方案中,所有前述水性溶液为pH 6.0。

[0013] 在另一个方面,本文中提供了编码本文中描述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。在一个具体的实施方案中,本文中提供了分离的多核苷酸,其编码包含SEQ ID NO:2的抗体重链。在一个实施方案中,表达载体包含前述分离的多核苷酸。在一些实施方案中,所述表达载体进一步包含编码抗体轻链的多核苷酸,所述抗体轻链包含SEQ ID NO:1。在一个具体的实施方案中,所述表达载体是哺乳动物表达载体。在另一个方面,本文中提供了包含前述表达载体的宿主细胞。在一个具体的实施方案中,所述宿主细胞包含(a)编码SEQ ID NO:2的第一核酸,其与在所述宿主细胞中的功能性启动子可操作地连接;和(b)编码SEQ ID NO:1的第二核酸,其与在所述宿主细胞中的功能性启动子可操作地连接。在另一个具体的实施方案中,所述宿主细胞的第一核酸和第二核酸在同一表达载体中或者在不同表达载体中。

[0014] 在另一个方面,本文中提供了生成任何前述单克隆抗体的方法,其包括培养任何前述宿主细胞,使得所述细胞表达所述第一核酸和第二核酸,并且所述重链和轻链装配在一起以形成所述抗体。

[0015] 在另一个方面,本文中提供了包含SEQ ID NO:2的抗体重链或包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至228的抗体重链片段。在一个具体的实施方案中,本文中提供了包含SEQ ID NO:2的抗体重链。在另一个具体的实施方案中,本文中提供了包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至228的抗体重链片段。本文中还提供了生成前述重链的方法,其包括培养任何前述宿主细胞,使得细胞表达所述重链,并分离所述重链。在一个具体的实施方案中,生成任何前述抗体的方法包括依照前述用于生成重链的方法生成重链,分离所述重链,并将所述重链与包含SEQ ID NO:1的抗体轻链复合。

[0016] 在另一个方面,本文中提供了试剂盒,其包含含有任何前述单克隆抗体的第一容器。在一个具体的实施方案中,所述第一容器是小瓶,其含有作为真空下冻干的无菌粉末的

所述单克隆抗体，并且所述试剂盒进一步包含第二容器，所述第二容器包含药学上可接受的流体。本文中还提供了注射装置，其含有任何前述单克隆抗体。在一个具体的实施方案中，所述注射装置是注射器。

[0017] 在另一个方面，本文中提供了用于预防和/或治疗疾病或病症的方法，所述疾病或病症与相对于健康个体或没有所述特定疾病或病症的个体而言活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高有关，或者(完全或部分)由所述活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高引起。在一个具体的实施方案中，本文中提供了用于治疗炎性病症的方法，其包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的任何前述单克隆抗体。在另一个具体的实施方案中，用于治疗炎性病症的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的任何前述药物组合物。在一个具体的实施方案中，所述炎性病症是自身免疫性疾病。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是银屑病。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是斑块状银屑病。在另一个具体的实施方案中，所述斑块状银屑病是中度至重度的斑块状银屑病。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是红皮性银屑病。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是银屑病关节炎。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是类风湿性关节炎。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是克罗恩氏病。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是强直性脊柱炎。在另一个具体的实施方案中，所述炎性病症是糖尿病。

[0018] 5.附图简述

[0019] 图1描绘了h15A7和15A7H的非还原性毛细管凝胶电泳(CGE)。箭头标示半个抗体分子的峰。

[0020] 图2描绘了15A7H和对照抗体对活化的人CD4⁺T细胞的结合。通过将平均荧光强度(MFI)对抗体浓度绘图使用一位点4参数拟合模型(one site 4-parameter fit model)得到EC₅₀值(nM)。

[0021] 图3描绘了4个供体PBMC中体内转移性迟发超敏反应(trans-vivo DTH)中15A7H抗体的合并剂量应答。用0.03、0.1、0.3、1和10mg/kg抗体，或媒剂处理后4个供体的合并的均值±SEM。pbmc：仅PBMC, V：媒剂、0.03、0.1、0.3、1和10mg/kg 15A7H抗体。响应0.03、0.1、0.3、1和10mg/kg 15A7H抗体处理的足垫厚度抑制百分比。

[0022] 图4描绘了在单次腹膜内注射后C57BL/6小鼠中15A7H抗体的24小时血浆浓度。将实验动物中2种抗体的合并的血浆水平(均值±SEM, n=4)相对于其在体内转移性DTH测定法中的足垫厚度的抑制百分比绘图。

[0023] 图5描绘了C57BL/6小鼠中15A7H血浆浓度对时间绘图。用0.03、0.1、0.3、1、和10mg/kg 15A7H抗体对4只Satellite小鼠腹膜内注射给药。在1、3、5和24小时采集血液样品。

[0024] 图6描绘了15A7H和对照抗体的CDC活性(其以不同浓度(5、0.5、0.05、0.005和0.0005μg/ml)测试)。

[0025] 图7A描绘了抗体15A7H的重链氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。可变重链区(SEQ ID NO:4)为粗体的。CDR(CDR1(SEQ ID NO:8)、CDR2(SEQ ID NO:9)和CDR3(SEQ ID NO:10))是框示的。还标示了框架区(FR1(SEQ ID NO:17)、FR2(SEQ ID NO:18)、FR3(SEQ ID NO:19)和FR4(SEQ ID NO:20))。标示了恒定区。铰链区氨基酸序列(SEQ ID NO:12)是框示的。铰链区中氨基酸位置228处取代的脯氨酸是斜体的。

[0026] 图7B描绘了抗体15A7H的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)。可变轻链区 (SEQ ID NO:3) 为粗体的。CDR(CDR1 (SEQ ID NO:5)、CDR2 (SEQ ID NO:6) 和 CDR3 (SEQ ID NO:7)) 是框示的。还标示了框架区 (FR1 (SEQ ID NO:13)、FR2 (SEQ ID NO:14)、FR3 (SEQ ID NO:15) 和 FR4 (SEQ ID NO:16))。标示了恒定区。

[0027] 表1:SEQ ID NO及其相应序列的列表

SEQ ID NO.	相应序列
SEQ ID NO: 1	15A7H轻链氨基酸序列
SEQ ID NO: 2	15A7H重链氨基酸序列
SEQ ID NO: 3	15A7H可变轻链区(VL)氨基酸序列
SEQ ID NO: 4	15A7H可变重链区(VH)氨基酸序列
SEQ ID NO: 5	15A7H VL CDR1氨基酸序列
SEQ ID NO: 6	15A7H VL CDR2氨基酸序列
SEQ ID NO: 7	15A7H VL CDR3氨基酸序列
SEQ ID NO: 8	15A7H VH CDR1氨基酸序列
SEQ ID NO: 9	15A7H VH CDR2氨基酸序列
SEQ ID NO: 10	15A7H VH CDR3氨基酸序列
SEQ ID NO: 11	全长人PSGL-1氨基酸序列
SEQ ID NO: 12	IgG4铰链区氨基酸序列
SEQ ID NO: 13	15A7H VL FR1
SEQ ID NO: 14	15A7H VL FR2
SEQ ID NO: 15	15A7H VL FR3
SEQ ID NO: 16	15A7H VL FR4
SEQ ID NO: 17	15A7H VH FR1
SEQ ID NO: 18	15A7H VH FR2
SEQ ID NO: 19	15A7H VH FR3
SEQ ID NO: 20	15A7H VH FR4
SEQ ID NO: 21	IgG4野生型铰链区氨基酸序列

[0030] 6. 发明详述

[0031] 本文中提供了特异性结合PSGL-1的抗体。还提供了编码此类抗体的分离的核酸。进一步提供了包含编码此类抗体或其抗原结合片段的核酸的载体和宿主细胞。还提供了生成此类抗体、细胞(例如CHO细胞)、由此类细胞生成的抗体和纯化所生成抗体的方法。本文

中还提供了治疗和/或预防本文中描述病症或疾病(例如炎性病状)的方法,其包括施用本文中描述的免疫特异性结合PSGL-1的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在一个具体的实施方案中,所述抗体是下文实施例1-4中描述的IgG4单克隆抗体15A7H。

[0032] 6.1抗体

[0033] 本文中提供了免疫特异性结合人P-选择蛋白糖蛋白配体-1(“PSGL-1”)的单克隆抗体。在一个具体的实施方案中,本文中提供了免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的可变轻(“VL”)链区;(ii)包含可变重(“VH”)链区的重链,所述可变重(“VH”)链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;和(iii)人IgG4恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸228处包含的丝氨酸至脯氨酸的取代。人恒定区的非限制性实例在本领域中有所描述,例如参见Kabat等(1991)*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版,U.S. Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242。优选地,所述抗体结合PSGL-1,并且选择性地诱导活化的T细胞凋亡(相对于表达PSGL-1的其它细胞)。在一个具体的实施方案中,抗体对PSGL-1的结合不干扰P-选择蛋白与PSGL-1的相互作用、与PSGL-1有关的功能和、活化的T细胞和嗜中性粒细胞有效定位至靶组织的要求。

[0034] 在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合PSGL-1的抗体是全长4类免疫球蛋白G(IgG4),且优选地,包含SEQ ID NO:2的重链序列,且甚至更优选地,包含SEQ ID NO:2的重链序列和SEQ ID NO:1的轻链序列(后一种是单克隆抗体15A7H)。

[0035] 本文中还提供了抗体的抗原结合片段,其包含可变区序列SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4及人重链恒定区的至少一部分,该部分含有人IgG4铰链区且在依照EU索引编号的人重链氨基酸228处包含丝氨酸至脯氨酸的取代。在一个具体的实施方案中,本文中的抗体所衍生的抗原结合片段是F(ab')₂片段。

[0036] 本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段优选是分离的,最优选是纯化的。

[0037] 如本文中使用且除非另有规定,术语“免疫特异性结合”、“免疫特异性识别”、“特异性结合”和“特异性识别”在抗体和抗体所衍生的抗原结合片段背景中是类似术语,并且在本文中可互换使用,指抗体或抗体所衍生的抗原结合片段经由其抗原结合位点结合其表位,如本领域技术人员会理解的。在一个具体的实施方案中,特异性结合抗原的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段也可以结合其它肽或多肽,尽管一般以较低的亲和力结合,如通过例如免疫测定法、BiacoreTM、KinExA3000仪(Sapidyne Instruments,Boise, ID),或本领域中已知的其它测定法测定的。在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合抗原的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段以如下的K_a结合抗原,所述K_a比所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段结合另一种抗原时的K_a大至少2个对数级、2.5个对数级、3个对数级、4个对数级或更大。在另一个具体的实施方案中,免疫特异性结合抗原的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段不通过与其它蛋白质结合起交叉反应。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段特异性结合PSGL-1的天然同等型或天然变体(其是可以从动物、优选人分离的动物中的PSGL-1的天然存在的同等型或变体)。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段免疫特异性结合人PSGL-1或其片段。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段特异性结合人PSGL-1和/或猕猴

PSGL-1或其片段。

[0038] 氨基酸序列SEQ ID NO:11描绘了全长人PSGL-1,GenBankTM登录号AAA74577.1、GI:902797。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体免疫特异性结合PSGL-1,例如如通过ELISA或本领域中已知的或本文中描述的其它抗原结合测定法测定的。

[0039] 在具体的方面,本文中提供了一种抗体,其特异性结合人和/或猕猴PSGL-1,并且是4类免疫球蛋白G(IgG4)(其具有 γ -重区),所述IgG4是两个相同的各包含重链和轻链的二硫键键合的二聚体的四聚体。优选地,所述抗体包含SEQ ID NO:2的重链。更优选地,所述抗体包含SEQ ID NO:2的重链和SEQ ID NO:1的轻链。就所述轻链而言,在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体的轻链是 κ 轻链。

[0040] 在具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含重链,该重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,并且包含重链,该重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含轻链,该轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含重链,该重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或者由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0041] 在一个具体的实施方案中,本文中提供的抗体是特异性结合PSGL-1的IgG4单克隆抗体。已知IgG4抗体经历称作Fab臂交换的过程,又称为IgG4改组,其中天然IgG4铰链二硫键对还原的敏感性升高容许重链分开并且随机再结合以生成具有随机化的重链和轻链对的IgG4分子的混合群体(Aalberse等,1999. *Int Arch Allergy Immunol* 118:187-189; Labrijn等,2009, *Nat Biotechnol* 27:767-771; Schuurman等,2001. *Mol Immunol* 38:1-8; van der Neut Kolfschoten等,2007. *Science* 317:1554-1557)。

[0042] 已经证明了人IgG4的铰链区中使用Kabat编号法(Kabat等1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)的位置241处或使用EU索引(Edelman等,1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63(1):78-85)的位置228处的丝氨酸至脯氨酸突变导致链内二硫键形成的相当大的降低,这导致IgG4“半抗体”分子的减少和IgG4分子异质性/改组的降低(Bloom等1997, *Protein Sci.*, 6:407-415; Angal等,1993, *Molecular Immunology*, 30(1): 105-108)。还有如下的发表报告,即此铰链突变可以降低IgG4改组,并且延长IgG4分子的体内半衰期(Labrijn等,2009, *Nat Biotechnol* 27:767-771; Stubenrauch等,2010, *Drug Metab Dispos* 38:84-91)。Van der Neut Kolfschoten等报告了IgG4的C_H3域而非核心铰链主要地牵涉于Fab臂交换反应中(参见Van der Neut Kolfschoten等,2007, *Science*, 317:1554-1557(“Van der Neut Kolfschoten”)第1555页,第2栏)。Van der Neut Kolfschoten报告了用IgG4的C_H3域交换IgG1的C_H3域激活IgG1的Fab臂交换,而交换IgG4的C_H3域消除IgG4的Fab臂交换(见第1555页和图2D)。

[0043] 在一个具体的实施方案中,本文中提供了IgG4抗体或其抗原结合片段,其特异性结合PSGL-1,并且在IgG4铰链区中含有一处或多处氨基酸取代,其中所述抗体或其抗原结合片段保留对所述PSGL-1的特异性结合,且其中IgG4改组相对于包含不含所述一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的抗体降低。在一个具体的实施方案中,所述IgG4铰链区仅包含

单一氨基酸取代。“人IgG4铰链区”的实例是IgG4抗体重链上介于C_H1和C_H2域之间的由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的区域,如Angal等,1993,Molecular Immunology,30(1):105-108中所述。

[0044] 在一个具体的实施方案中,如下测定IgG4改组的降低,即通过与从含有不包含一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的IgG4分子生成的半抗体分子或臂交换的量相比,检测到更低量的由在铰链区中含有所述一处或多处氨基酸取代的本文中描述的抗体生成的半抗体分子或臂交换。本领域中公知的任何测定法可用于检测半抗体生成和双特异性抗体分子。关于检测双特异性抗体生成的测定法的实例,参见例如Van der Neut Kolschoten等,2007,Science,317:1554-1557。

[0045] 在一个具体的实施方案中,本文中提供了特异性结合PSGL-1的IgG4单克隆抗体,其在依照EU索引编号的重链氨基酸位置228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0046] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链和包含依照EU索引编号的重链的位置228处的脯氨酸的重链。

[0047] 在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体包含:(i)具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链;和(ii)包含在IgG4铰链区中含有一处或多处氨基酸取代的人IgG4恒定区的重链,其中所述抗体保留对所述PSGL-1的特异性结合,且其中IgG4改组相对于包含不含所述一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的抗体降低。

[0048] 在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体包含(i)具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链;和(ii)包含人IgG4恒定区的重链,所述人IgG4恒定区包含依照EU索引编号的重链的氨基酸位置228处或依照Kabat编号系统(Kabat等1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;及Edelman等,1969,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,63(1):78-85)的位置241处的丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0049] 在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VL链区;(ii)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH链区;和(iii)含有在铰链区中包含一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的人IgG4恒定区,其中所述抗体保留对PSGL-1的特异性结合,且其中所述IgG4改组相对于包含不含所述一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的抗体降低。

[0050] 在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体包含:(i)包含VH链区的重链,所述VH链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列,和(ii)人IgG4重链恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸位置228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0051] 在一个具体的实施方案中,免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体包含:(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VL链区;(ii)包含VH链区的重链,所述VH链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;和(iii)人IgG4重链恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸位置228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0052] 在一些实施方案中,如本文中描述的IgG4单克隆抗体包含具有本文中描述的氨基酸序列的VH CDR(例如参见表3)和具有本文中描述的氨基酸序列的VL CDR(例如参见表2),其中所述抗体免疫特异性结合PSGL-1,并且具有降低IgG4改组的铰链区突变(例如依照EU索引编号的重链的氨基酸位置228处的丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代)。在一个具体的实施

方案中,所述IgG4单克隆抗体免疫特异性结合PSGL-1,并且包含重链,该重链包含(a)包含SEQ ID NO:8、9和10的VH链区;和(b)人IgG4重链恒定区,该人IgG4重链恒定区含有依照EU索引编号的重链的氨基酸位置228处的丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。更优选地,所述抗体进一步包含轻链,该轻链含有包含SEQ ID NO:5、6和7的VL链区。

[0053] 下文表2呈现了15A7H的氨基酸序列的VL CDR(特别是VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)。下文表3呈现了15A7H的氨基酸序列的VH CDR(特别是VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3)。在具体的实施方案中,本文中描述的免疫特异性结合人PSGL-1(SEQ ID NO:11)的抗体包含表2中的VL CDR序列。在具体的实施方案中,本文中描述的免疫特异性结合人PSGL-1(SEQ ID NO:11)的抗体包含选自表3中的那些序列的VH CDR序列。

[0054] 表2:VL CDR氨基酸序列

	Ab	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
[0055]	15A7H	RSSQSIVHNDGNTYFE (SEQ ID NO:5)	KVSNRFS (SEQ ID NO:6)	FQGSYVPLT (SEQ ID NO:7)

[0056] 表3:VH CDR氨基酸序列

	Ab	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
[0057]	15A7H	SFGMH (SEQ ID NO:8)	YINGGSSTIFYANAVKG (SEQ ID NO:9)	YASYGGGAMDY (SEQ ID NO:10)

[0058] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含:(i)可变轻(“VL”)链区,该可变轻(“VL”)链区包含分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(ii)可变重(“VH”)链区,该可变重(“VH”)链区包含分别具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和(iii)人IgG4重链恒定区,其含有在铰链区中包含一处或多处氨基酸取代的IgG铰链区,其中所述抗体保留对所述PSGL-1的特异性结合,且其中IgG4改组相对于包含不含所述一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的抗体降低。

[0059] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含:(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VL链区;(ii)VH链区,其包含分别具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和(iii)人IgG4重链恒定区,其含有在铰链区中包含一处或多处氨基酸取代的IgG铰链区,其中所述抗体保留对所述PSGL-1的特异性结合,且其中IgG4改组相对于包含不含所述一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的抗体降低。

[0060] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含:(i)包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VL链区;(ii)包含VH链区的重链,所述VH链区包含分别具有SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和(iii)人IgG4重链恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸位置228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0061] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含:(i)VL链区,其包含分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列的

VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3；(ii)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VH链区；和(iii)人IgG4重链恒定区,其含有在铰链区中包含一处或多处氨基酸取代的IgG铰链区,其中所述抗体保留对所述PSGL-1的特异性结合,且其中IgG4改组相对于包含不含所述一处或多处氨基酸取代的IgG4铰链区的抗体降低。

[0062] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含:(i)VL链区,其包含分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(ii)包含VH链区的重链,所述VH链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;和(iii)人IgG4重链恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸位置228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0063] 在具体的实施方案中,本文中描述的免疫特异性结合PSGL-1(例如SEQ ID NO:11的人PSGL-1多肽)的抗体包含框架区(例如VL域和VH域的框架区)。人框架区的非限制性实例在本领域中有所描述,例如参见Kabat等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。

[0064] 下文表4呈现了抗体15A7H的VL框架(FR)氨基酸序列(特别是VL FR1、VL FR2、VL FR3和VL FR4序列)。下文表5呈现了抗体15A7H的VH FR氨基酸序列(特别是VH FR1、VH FR2、VH FR3和VH FR4序列)。

[0065] 表4:VL FR氨基酸序列

	Ab	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
[0066]	15A7H	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITC (SEQ ID NO: 13)	WYQQKPGKAP KLLIY (SEQ ID NO: 14)	GVPSRSGSGSGTHFTLT ISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 15)	FGQGTKVEI KR (SEQ ID NO: 16)

[0067] 表5:VH FR氨基酸序列

	Ab	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
[0068]	15A7H	EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAAS GFTFS (SEQ ID NO: 17)	WVRQAPGKGLE WVA (SEQ ID NO:18)	RFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCA R (SEQ ID NO: 19)	WGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 20)

[0069] 在一些实施方案中,上述在铰链区中具有降低IgG4改组突变的IgG4抗体包含具有本文中描述的氨基酸序列的VL FR(参见表4)。在具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含VL链区,其包含表1和3的FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0070] 在一些实施方案中,上述在铰链区中具有降低IgG4改组突变的IgG4抗体包含具有本文中描述的氨基酸序列的VH FR(参见表5)。在具体的实施方案中,抗体包含VH链区,其包含表2和4的FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。

[0071] 在另一个具体的实施方案中,本文中描述的IgG4单克隆抗体包含(i)VL链区,其包含分别具有SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列的VL FR1、VL FR2、VL FR3和VL FR4;和(ii)VH链区,其包含分别具有SEQ ID NO:17、18、19和20的氨基酸序列的VH FR1、VH FR2、VH

FR3和VH FR4,并且在铰链区中具有降低IgG4改组的突变。在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含VL链区,该VL链区包含分别具有SEQ ID NO:13、14、15和16的氨基酸序列的VL FR1、VL FR2、VL FR3和VL FR4。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体包含VH链区,该VH链区包含分别具有SEQ ID NO:17、18、19和20的氨基酸序列的VH FR1、VH FR2、VH FR3和VH FR4。

[0072] 在具体的实施方案中,可修饰本文中描述的抗体的恒定区的糖基化。例如,可生成无糖基化(aglycoslated)的抗体恒定区(即,抗体恒定区缺乏糖基化)或者可生成如下的抗体恒定区,其包含一个或多个糖基化位点处的突变或取代以消除所述一个或多个糖基化位点处的糖基化。

[0073] 糖基化可经由N连接的(或天冬酰胺连接的)糖基化或O连接的糖基化发生。N连接的糖基化涉及多肽中天冬酰胺氨基酸的侧链NH₂基团处的碳水化合物修饰。O连接的糖基化涉及丝氨酸、苏氨酸或羟赖氨酸氨基酸的侧链上羟基基团处的碳水化合物修饰。

[0074] 在一些实施方案中,无糖基化抗体可在缺乏必需的糖基化装置的细菌细胞中生成。具有改变的糖基化装置的细胞已经在本领域中描述过,并且可以用作宿主细胞,在该宿主细胞中表达本文中描述的重组抗体,由此生成具有改变的糖基化的抗体。参见例如Shields, R.L.等(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740;Umana等(1999)Nat.Biotech.17:176-1,以及欧洲专利No:EP 1,176,195;PCT公开文本WO 03/035835;WO 99/54342。

[0075] 在一些实施方案中,一般可对本文描述的抗体的Fc区进行一处或多处修饰,以改变所述抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合,和/或抗原依赖的细胞介导的细胞毒性作用。这些修饰是本领域中已知的,并且记载于例如国际专利申请公开文本WO 2008/153926 A2。此类修饰的实例包括但不限于:1)改变铰链区中半胱氨酸残基的数目以便于轻链和重链的装配或者以提高或降低抗体的稳定性;2)将抗体的Fc-铰链片段的CH2-CH3域界面区中的一个或多个氨基酸突变以缩短所述抗体的生物学半衰期;3)将一个或多个选自依照Kabat的EU索引的氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的氨基酸用不同氨基酸残基替换,使得所述抗体对效应配体具有改变的亲和力但是保留亲本抗体的抗原结合能力;和/或4)修饰依照Kabat的EU索引的下列位置处的一个或多个氨基酸:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439,以提高所述抗体介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)的能力和/或提高抗体对Fc γ 受体的亲和力。本文中提供了抗体和抗体所衍生的抗原结合片段,其免疫特异性结合PSGL-1,并且可调控PSGL-1活性。在一些实施方案中,本文中提供的抗体和抗体所衍生的抗原结合片段在不抑制PSGL-1结合P-选择蛋白的情况下免疫特异性结合PSGL-1,并且诱导活化的T细胞凋亡。PSGL-1活性可指本领域中已知或描述的任何PSGL-1活性,例如炎性应答期间的T细胞活化。PSGL-1活性或PSGL-1功能在本文中可互换使用。在一些方面,PSGL-1活性由结合PSGL-1的PSGL-1配体(例如P-选择蛋白)诱导。

[0076] 在一些实施方案中,本文中描述的抗PSGL-1抗体或抗体所衍生的抗原结合片段不阻断或抑制P-选择蛋白对PSGL-1的结合。

[0077] 在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段降低炎性应答期间的白细胞募集。

[0078] 在一些方面,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段降低或抑制表达PSGL-1并且响应PSGL-1活性信号传导的细胞(例如响应PSGL-1配体刺激,PSGL-1信号传导或选择蛋白结合而增殖的细胞)的存活,例如诱导活化的T细胞凋亡。细胞存活测定法在本领域中有所描述,并且本领域技术人员可以容易地实施。例如,细胞存活力可以通过使用台盼蓝染色(trypan-blue staining)或本领域中已知的其它细胞死亡或存活力标志物(例如膜联蛋白-1、碘化丙啶(PI)或7-AAD,参见Gerber A,Bohne M,Rasch J,Struy H,Ansorge S,Gollnick H.,2000.Investigation of annexin V binding to lymphocytes after extracorporeal photoimmunotherapy as an early marker of apoptosis.Dermatology.2000;201(2):111-7,Coder,D.M.2001.Assessment of Cell Viability.Current Protocols in Cytometry.9.2.1-9.2.14,及Muppidi,J.,Porter,M.and Siegel,R.M.2004.Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death.Current Protocols in Immunology.59:3.17.1-3.17.36.)评估。

[0079] 在具体的实施方案中,本文中描述的抗体特异性结合PSGL-1,并且抑制(例如部分或完全抑制)活化的T细胞存活,如通过本文中描述的或本领域技术人员已知的方法(例如台盼蓝排斥测定法,参见Coder,D.M.2001.Assessment of Cell Viability.Current Protocols in Cytometry.9.2.1-9.2.14)所评估的。在一些实施方案中,术语“抑制”意指降低或防止活化的T细胞存活。与对照(例如在缺乏本文中描述的抗体的情况下或者在存在非特异性抗体的情况下T细胞存活)相比,活化的T细胞存活可降低约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%或更多。

[0080] 在一些方面,本文中描述的抗PSGL-1抗体能够诱导表达PSGL-1的活化的T细胞凋亡(即,程序性细胞死亡)。凋亡测定法在本领域中有所描述,并且本领域技术人员可以容易地实施(参见例如Muppidi,J.,Porter,M.and Siegel,R.M.2004.Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death.Current Protocols in Immunology.59:3.17.1-3.17.36)。术语“诱导”意指启动凋亡或者凋亡增加到对照水平之上。与对照(例如在缺乏本文中描述的抗体的情况下或者在存在非特异性抗体的情况下活化的T细胞存活的凋亡)相比,活化的T细胞凋亡可以诱导约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约125%、约150%或更多。

[0081] 适合于用于涉及PSGL-1活性的本文中描述的测定法的T细胞和T细胞系容易地可获得(例如ARR、DU.528、Jurkat、H-SB2、RPMI 8402、CML-T1、Karpas 45、KE-37/SKW-3、SUP-T1、SUP-T3、MOLT 3/4、P12-Ichikawa、PF-382、CCRF-CEM、HPB-ALL、K-T1、TALL-1、MOLT 16/17、TALL-104、DND-41、Loucy、MOLT 13、Peer/Be13、HUT 78/H9、HUT 102、MT-1、DEL、JB6、Karpas 299、SU-DHL1、12H5、3D054.8、3D011.10、8D051.15或3D018.3)或者可使用本领域中已知的方法容易地鉴定(参见例如Thornton,A.M.2003.Fractionation of T and B Cells Using Magnetic Beads.Current Protocols in Immunology.55:3.5A.1-3.5A.11.,Hathcock,K.2001.T Cell Enrichment by Cytotoxic Elimination of B Cells and Accessory Cells.Current Protocols in Immunology.00:3.3.1-3.3.5.,Horgan,K.,Shaw,S.and Boirivant,M.2009.Immunomagnetic Purification of T Cell

Subpopulations. *Current Protocols in Immunology*. 85:7.4.1-7.4.9., 及 Kanof, M.E. 2001. *Purification of T Cell Subpopulations. Current Protocols in Immunology*. 00:7.3.1-7.3.5)。在具体的实施方案中, 用于细胞增殖测定法的细胞或细胞系可内源地或重组地表达PSGL-1。用于细胞存活力测定法的细胞或细胞系可内源地或重组地表达PSGL-1, 并且响应PSGL-1配体或抗PSGL-1抗体结合而在细胞存活力上发生变化。用于凋亡测定法的细胞或细胞系可内源地或重组地表达PSGL-1, 并且响应PSGL-1配体或抗PSGL-1抗体结合而在凋亡上发生变化。优选地, 所述细胞或细胞系是人的(例如ARR、DU.528、Jurkat、H-SB2、RPMI 8402、CML-T1、Karpas 45、KE-37/SKW-3、SUP-T1、SUP-T3、MOLT 3/4、P12-Ichikawa、PF-382、CCRF-CEM、HPB-ALL、K-T1、TALL-1、MOLT 16/17、TALL-104、DND-41、Loucy、MOLT 13、Peer/Be13、HUT 78/H9、HUT 102、MT-1、DEL、JB6、Karpas 299, 或SU-DHL1)。

[0082] 用于测定抗体对其靶抗原的免疫特异性结合的方法是本领域中容易地可用且有所描述的。例如, 可以通过本领域中已知的多种体外测定方法(基于生物化学或免疫学的测定法)诸如平衡方法(例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、或放射性免疫测定法(RIA)), 或动力学(例如BiacoreTM分析), 和其它方法, 诸如间接结合测定法、竞争性抑制测定法、荧光共振能量转移(FRET)、免疫沉淀、凝胶电泳和色谱法(例如凝胶过滤)测定抗体对其靶抗原的亲和力和结合特性。这些和其它方法可以利用所检查的一种或多种组分上的标记物和/或采用多种检测方法, 包括但不限于生色的、荧光的、发光的、或同位素的标记物。在一些实施方案中, 标记物的使用不是必需的, 例如BiacoreTM系统利用天然的表面等离振子共振(SPR)现象来实时递送数据, 而不使用标记物。

[0083] 在一个具体的实施方案中, 本文中描述的抗体是分离的。在一个具体的实施方案中, 本文中描述的抗体是纯化的。在一个具体的实施方案中, 本文中描述的抗体是重组单克隆抗体。

[0084] 在一个具体的实施方案中, 本文中提供了已经以适合于大规模制造的方式修饰的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。这可涉及将编码抗PSGL-1抗体的必需域, 诸如一个或多个CDR或FR的多核苷酸序列克隆入还含有编码合适的恒定区的多核苷酸序列的合适表达载体中, 从而生成整个抗体。由所述表达载体提供的多核苷酸序列是如下的核苷酸序列, 其可经过优化以使细胞培养制造条件和纯化工艺的抗体产量和稳定性最大化。

[0085] 6.2多核苷酸

[0086] 在一些方面, 本文中提供了包含核苷酸序列的多核苷酸, 和包含此类多核苷酸以在宿主细胞(例如微生物生物体, 诸如大肠杆菌(E.coli)和哺乳动物细胞, 诸如鼠杂交瘤细胞、CHO细胞和3T3成纤维细胞)中重组表达的载体, 所述核苷酸序列编码本文中描述的免疫特异性结合PSGL-1抗原的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。本文中提供了包含核苷酸序列的多核苷酸, 及包含此类多核苷酸序列的载体, 例如用于实现其在宿主细胞, 例如哺乳动物细胞中有效表达的表达载体, 所述核苷酸序列编码本文中提供的任何抗体或其抗体所衍生的抗原结合片段。在一个具体的实施方案中, 所述包含核苷酸序列的多核苷酸是分离的或纯化的, 所述核苷酸序列编码本文中描述的任何抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。

[0087] 在具体的方面, 本文中提供了包含编码抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的核苷酸序列的多核苷酸, 所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段免疫特异性结合PSGL-1, 并且

包含如本文中描述的氨基酸序列。

[0088] 在具体的实施方案中,本文中描述的多核苷酸编码具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链。

[0089] 多核苷酸可以包含编码重链的核苷酸序列,所述重链包含本文中描述的抗体的VH FR和CDR(参见例如表2和4),并且进一步包含铰链区中降低IgG4改组的突变。

[0090] 本文中还提供了编码包含SEQ ID NO:2的抗体重链的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列替换和消除mRNA不稳定性元件优化。本文中还提供了编码包含SEQ ID NO:1的抗体轻链的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列替换、和消除mRNA不稳定性元件优化。通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制区来生成编码抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的优化核酸用于重组表达的方法可通过采用例如美国专利5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132;和6,794,498中描述的优化方法相应地实施。例如,可在不改变由核酸序列编码的氨基酸的情况下使RNA内的潜在剪接位点和不稳定性元件(例如富含A/T或A/U的元件)突变以提高用于重组表达的RNA的稳定性。改变利用遗传密码的简并性,例如使用相同氨基酸的备选密码子进行。在一些实施方案中,可以期望改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如与原氨基酸具有类似的化学结构和特性和/或功能的类似氨基酸。相对于由尚未优化的多核苷酸编码的抗PSGL-1抗体的表达,此类方法可提高抗PSGL-1抗体或其抗原结合片段的表达。此外,所述多核苷酸序列可设计为匹配宿主细胞中的优选密码子选择,例如大肠杆菌密码子选择或CHO密码子选择。

[0091] 编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的优化的多核苷酸序列可与编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的未优化的多核苷酸序列杂交。在具体的实施方案中,编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的优化的核苷酸序列在高严格性条件下与编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的未优化的多核苷酸序列杂交。在一个具体的实施方案中,编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的优化的核苷酸序列在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的未优化的核苷酸序列杂交。关于杂交条件的信息已有所描述,参见例如美国专利申请公开文本US2005/0048549(例如段落72-73),其全部引入本文作为参考。

[0092] 可通过本领域中已知的任何方法获得多核苷酸,并测定所述多核苷酸的核苷酸序列。编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和这些抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的修饰型式的核苷酸序列可使用本领域中公知的方法确定,即以该方法装配已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以生成编码抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的核酸。编码抗体的此类多核苷酸可从化学合成的寡核苷酸(例如如记载于Kutmeier等,1994, BioTechniques 17:242的)装配,例如其涉及合成含有编码抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的序列部分的重叠寡核苷酸,对那些寡核苷酸的退火和连接,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。从寡核苷酸生成合成基因的各种方法是本领域中已知的。

[0093] 或者,编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的多核苷酸可以使用本领域中公知的方法(例如PCR和其它分子克隆方法)由来自合适来源(例如杂交瘤)的核酸生成。例如,可使用从生成感兴趣抗体的细胞(例如杂交瘤细胞)获得的基因组DNA实施PCR扩增,所述PCR扩增使用与已知序列的3'和5'端可杂交的合成引物。此类PCR扩增方法可用

于获得包含编码抗体轻链和/或重链的序列的核酸。此类PCR扩增方法可用于获得编码抗体的可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。可将所述扩增的核酸克隆入载体中以在宿主细胞中表达以及进一步克隆,例如以生成嵌合的和人源化的抗体。对于抗体轻链,恒定链通常是 κ 或 λ ;对于抗体重链,恒定链可以是但不限于任何IgG同种型(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或其它免疫球蛋白,包括等位变体。

[0094] 若含有编码特定抗体的核酸的克隆不可用,但是所述抗体分子的序列是已知的,则可使用本领域中公知的任何方法化学合成编码免疫球蛋白的核酸,并将其克隆入可复制的克隆载体中。

[0095] 可使用常规的操作(例如通过使用能够特异性结合编码所述抗体重链和轻链的核酸的寡核苷酸探针)对编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的DNA容易地分离并测序。一旦分离,可将DNA放入表达载体中,然后将所述表达载体转染入在其它情况下不生成免疫球蛋白蛋白质的原核或真核宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、酵母(毕赤酵母(Pichia)、酵母(Saccharomyces))、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、骨髓瘤细胞(NS0)、昆虫或植物细胞中,以在重组宿主细胞中获得抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的合成。

[0096] 6.3宿主细胞和抗体的重组表达

[0097] 在一些方面,本文中提供了重组表达本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的宿主细胞及相关表达载体。本文中提供了包含多核苷酸的表达载体以在原核和真核宿主细胞中,优选在哺乳动物细胞中重组表达,所述多核苷酸包含编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的核苷酸序列。本文中还提供了包含此类表达载体的宿主细胞以重组表达本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在一个具体的方面,本文中提供了用于生成本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的方法,其包括自宿主细胞表达此类抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。

[0098] 本文中描述的免疫特异性结合PSGL-1抗原的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的重组表达涉及构建含有多核苷酸的表达载体,所述多核苷酸编码所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。一旦获得了编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的多核苷酸,可使用本领域中公知的技术通过重组DNA技术来生成用于生成抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的载体。因此,本文中描述了通过表达含有抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的编码核苷酸序列的多核苷酸制备所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的方法。本领域技术人员公知的方法可用于构建表达载体,所述表达载体含有抗体编码序列或抗体所衍生的抗原结合片段编码序列和合适的转录和翻译控制信号。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。还提供了可复制载体,其包含编码本文中描述的抗体、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变域、或抗体所衍生的抗原结合片段的核苷酸序列,该核苷酸序列与启动子,特别是提供在哺乳动物细胞中表达的启动子可操作连接。此类载体可包含编码所述抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如国际公开文本WO 86/05807和WO 89/01036;及美国专利5,122,464),并且可将所述抗体的可变域克隆入此类载体中以表达整条重链、整条轻链、或整条重链和整条轻链两者。表达载体包括质粒、逆转录病毒、粘粒、EBV衍生的附加体、人工染色体等。所选用的表达载体和表达控制序列与宿主细胞相容。所述重组表达载体还可编码信号肽,其促进抗体链从宿主细胞分泌。所述信号肽可

以是免疫球蛋白信号肽、来自非免疫球蛋白蛋白质的异源肽或人工肽。

[0099] 通过本领域中已知的常规技术(例如脂质体介导的转染、聚阳离子介导的转染、原生质体融合、微注射、磷酸钙沉淀、电穿孔、通过病毒的转移)将所述表达载体转移至宿主细胞,然后,通过常规技术培养所述经转染的细胞以生成本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。因此,本文中提供了含有与异源启动子可操作连接的多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸编码本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在一些表达双链抗体的实施方案中,可在宿主细胞中共表达编码重链和轻链两者的载体以表达整个免疫球蛋白分子,如下文所详述。在一些实施方案中,宿主细胞含有包含多核苷酸的载体,所述多核苷酸编码本文中描述的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链两者。在具体的实施方案中,宿主细胞含有两种不同的载体,第一载体包含编码本文中描述的抗体或其片段(例如其抗原结合片段)的重链的多核苷酸,且第二载体包含编码本文中描述的抗体或其片段(例如其抗原结合片段)的轻链的多核苷酸。在其它实施方案中,第一宿主细胞包含第一载体,其包含编码本文中描述的抗体或其片段的重链的多核苷酸,且第二宿主细胞包含第二载体,其包含编码本文中描述的抗体的轻链的多核苷酸。

[0100] 可利用多种宿主表达载体系统来表达本文中描述的抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段(参见例如美国专利5,807,715和美国专利7,604,800)。此类宿主表达系统代表可生成且随后纯化感兴趣的编码序列的媒剂,而且还代表在用合适的核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达本文中描述的抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段的细胞。这些包括但不限于经含有抗体编码序列或抗体所衍生的抗原结合片段编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物诸如细菌(大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)) ;经含有抗体编码序列或抗体所衍生的抗原结合片段编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酵母(*Saccharomyces*)、毕赤酵母) ;经含有抗体编码序列或抗体所衍生的抗原结合片段编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;经重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染或经含有抗体编码序列或抗体所衍生的抗原结合片段编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如绿藻类诸如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)) ;或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、MDCK、HEK293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、Hs78Bst、HeLa,和NIH 3T3细胞),所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子和/或增强子(例如金属硫蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、肌动蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子和/或增强子(例如腺病毒晚期启动子;痘病毒7.5K启动子, CMV, 猴病毒40)。在真核细胞中表达的其它调节元件是多聚腺苷酸化信号诸如BGH polyA、SV40晚期或早期polyA。或者,可使用免疫球蛋白或其它基因的多聚腺苷酸化信号。在另一个具体的实施方案中,真核细胞(特别是用于表达本文中描述的IgG4单克隆抗体的)用于表达本文中描述的抗体或其抗原结合片段。例如,哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,连同载体诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件是一种用于抗体的有效表达系统(Foecking等,1986, *Gene* 45:101;及Cockett等,1990, *Bio/Technology* 8:2)。在一些实施方案中,通过CHO细胞或NS0细胞生成本文中描述的抗体。在一个具体的实施方案中,通过组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节编码本文中描述的免疫特异性结合PSGL-1抗原的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的核苷酸序列的表达。

[0101] 在细菌系统中,许多表达载体可根据所表达的抗体分子的预期用途有利地选择。例如,在要生成大量此类抗体或抗体所衍生的抗原结合片段(为了生成抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段的药物组合物)时,指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体是所需的。

[0102] 另外,可以选择宿主细胞株,其调控插入序列的表达,或者以期望的特定方式修饰并加工基因产物。对蛋白质产物的此类修饰(例如糖基化)和加工对于蛋白质的功能可以是重要的。不同宿主细胞对于蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰具有特征性且特异性的机制。可选择合适的细胞系或宿主细胞以确保对已表达的外来蛋白质的正确修饰和加工。为此,可使用真核宿主细胞,其拥有对基因产物的初级转录物、糖基化和磷酸化适当加工的细胞装置。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(一种鼠骨髓瘤细胞系,其不内源生成任何免疫球蛋白链)、CRL7030和Hs78Bst细胞。在一些实施方案中,在哺乳动物细胞,诸如CHO细胞中生成本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。

[0103] 对于重组抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的长期高产量生产,稳定表达是优选的。例如,可以工程化改造稳定表达所述抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段的哺乳动物细胞系。宿主细胞可经合适的表达控制元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸化位点,等等)控制的DNA和选择标志物而不是使用含有病毒复制起点的表达载体转化。在导入外来DNA后,可容许工程化细胞在非选择性培养基中生长1-2天,然后,转换成选择性培养基。重组质粒中的选择标志物赋予对该选择的抗性,并且容许细胞将质粒稳定整合入其染色体中。在单细胞克隆后,将细胞扩充成生产细胞系。此方法可有利地用于表达抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段的工程化改造细胞系。此类工程化细胞系可特别用于筛选并评估与抗体分子直接或间接相互作用的组合物。

[0104] 可使用许多选择系统,包括但不限于可在tk-、hgprt-或aprt-细胞中分别采用单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska和Szybalski,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA48:202),和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy等,1980,Cell 22:8-17)基因。还有,抗代谢物抗性可用作选择下列基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等,1980,Natl.Acad.Sci.USA77:357;O'Hare等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan和Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu和Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,1993,Science 260:926-932;及Morgan和Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;May,1993,TIB TECH 11(5):155-215);及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等,1984,Gene 30:147)。可常规应用重组DNA技术领域中通常已知的方法来选择期望的重组克隆,并且此类方法记载于例如Ausubel等(编),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons, NY(1993);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990);及第12章和第13章,Dracopoli等(编),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons, NY(1994);Colberre-Garapin等,1981,J.Mol.Biol.150:1中,其全部引入本文作为参考。

[0105] 抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段的表达水平可通过载体扩增来提高(关于

综述,参见Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3 (Academic Press, New York, 1987)。在表达抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的载体系统中的标志物可扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的升高会增加标志物基因的拷贝数。由于扩增区与抗体或抗体所衍生的抗原结合片段基因有关,因此所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的生成也会增加(Crouse等,1983, Mol. Cell. Biol. 3: 257)。

[0106] 可用本文中描述的两种或更多种表达载体共转染所述宿主细胞,第一载体编码重链衍生的多肽,且第二载体编码轻链衍生的多肽。所述两种载体可含有相同的选择标志物或不同的选择标志物,其使得重链多肽和轻链多肽的充分表达。可用不同量的两种或更多种表达载体共转染所述宿主细胞。

[0107] 或者,可以使用单一载体,其编码并且能够表达重链多肽和轻链多肽两者。所述重链和轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。所述表达载体可以是单顺反子的或多顺反子的。例如,双顺反子核酸构建体可以以如下次序包含启动子、本文中描述的抗体的重链、和本文中描述的抗体的轻链。在此类表达载体中,两条链的转录均可由启动子驱动,而重链mRNA的翻译可通过帽依赖性扫描机制进行,并且轻链mRNA的翻译可通过不依赖于帽的机制(例如通过IRES)进行。

[0108] 在一些实施方案中,可如下生成所述抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段,即刻将宿主细胞培养一段足以容许所述分子在所述宿主细胞中的高度表达的时间。在一些实施方案中,在无血清培养基中或在化学成分确定培养基中哺乳动物细胞中,例如在CHO细胞中表达所述分子。在一些实施方案中,所述抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段可以从培养基中以分泌性多肽回收或者它可从宿主细胞裂解物中回收(若例如在没有分泌信号的情况下表达)。

[0109] 一旦通过重组表达生成了本文中描述的抗体分子或抗体所衍生的抗原结合片段,它可通过用于纯化免疫球蛋白分子的本领域中已知的任何方法,例如通过色谱法(例如离子交换色谱、亲和力色谱,特别是通过蛋白A后对特定抗原的亲和力色谱,和尺寸筛分柱色谱)、离心、差别溶解度、沉淀、过滤、反相HPLC、或者通过用于纯化蛋白质以获得基本上同质且有生物学活性的分子制备物的任何其它标准技术来纯化。此外,可将本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段与异源多肽序列融合以便于纯化。

[0110] 在具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段是分离的或纯化的。例如,在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的制备物基本上不含细胞材料、培养基组分和/或化学前体。语句“基本上不含细胞材料”包括如下的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段制备物,其中所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段与其从中分离或重组生成的细胞的细胞组分分开。当重组生成所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段时,它一般也基本上不含培养基,即培养基占所述蛋白质制备物体积的小于约20%、10%、2%、1%、0.5%,或0.1%。当通过化学合成生成抗体或抗体所衍生的抗原结合片段时,它一般基本上不含化学前体或其它化学品,即它与蛋白质合成中牵涉的化学前体或其它化学品分开。因而,此类抗体或抗体所衍生的抗原结合片段制备物具有小于约30%、20%、10%、5%(按干重)的化学前体或除了感兴趣的抗体或感兴趣的抗体所衍

生的抗原结合片段外的化合物。

[0111] 6.4药物组合物

[0112] 本文中提供了包含本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的组合物、药物组合物。在具体的方面,本文中描述的组合物可供体外、体内或离体使用。在具体的实施方案中,本文中提供了一种药物组合物,其包含本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0113] 可以制备含有本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的治疗性组合物,所述制备通过将具有期望纯度的抗体与任选的生理学可接受载体、赋形剂或稳定剂混合来进行,并以冻干制剂或水性溶液形式贮存(Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版(2006) Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度对受体无毒,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐、柠檬酸钠脱水物、和其它有机酸;和/或非离子型表面活性剂诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0114] 在治疗的特定适应症需要时,组合物诸如本文中描述的那些组合物还可含有超过一种活性化合物(例如分子,例如本文中描述的一种或多种抗体)。在一些实施方案中,所述制剂包含本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和一种或多种未彼此不利影响的具有互补活性的活性化合物。此类分子适宜地以对于预期目的有效的组合存在。例如,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可与一种或多种其它治疗剂组合。可连续或同时或顺次对患者施用此类组合疗法。

[0115] 要用于体内施用的所述组合物可以是无菌的。这可通过滤过例如无菌过滤膜容易地实现。

[0116] 在具体的方面,本文中提供的药物组合物在药学上可接受的载体中含有治疗有效量的本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段,和任选地一种或多种另外的预防剂或治疗剂。此类药物组合物可用于预防和/或治疗本文中描述的病症或疾病,诸如银屑病,或一种或多种其症状。术语“治疗有效量”指安全且足以预防或治疗疾病的量。如本文中使用的,术语“治疗”或“处理”在本文中用于指在患有疾病的受试者中提供有益或期望的临床结果。有益或期望的临床结果包括但不限于减轻症状、降低疾病程度、稳定即不恶化)疾病状态、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或减轻,和消退(无论部分还是全部),无论可检测还是不可检测的。“治疗”还可意指与没有接受治疗时预期的存活相比延长存活。

[0117] 适合于施用本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的药用载体包括本领域技术人员已知适合于特定施用方式的任何此类载体。在一个实施方案中,将抗体或抗体所衍生的抗原结合片段配制成合适的药物制剂,诸如供肠胃外施用的无菌溶液或悬浮液。

[0118] 另外,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可以作为组合物中唯一的药学活性成分配制或者可与其它活性成分(诸如一种或多种其它预防剂或治疗剂)组合。

[0119] 在所述组合物中,将本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段与合适的药用载体混合。所述组合物中的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的浓度可例如有效递送在施用后预防和/或治疗本文中描述的病症或疾病(例如炎性病症)及其症状的量。

[0120] 在一个实施方案中,将所述组合物配制用于单剂量施用。为了配制组合物,以有效的浓度将重量份的化合物在选择的载体中溶解,悬浮,分散或以其它方式混合,使得病症得到缓解,治疗或者一种或多种症状得到改善。

[0121] 在一些方面,本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段以有效量包含在药学上可接受的载体中,所述有效量足以对治疗的患者施加治疗有用的效果而无不必要的副作用或有最小程度或可忽略的不想要的副作用。治疗有效浓度可使用常规方法通过测试在体外和体内系统中的化合物凭经验确定,然后自其推断人用剂量。

[0122] 所述药物组合物中抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的浓度会取决于例如所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的物理化学特征、剂量方案,和施用的量及本领域技术人员已知的其它因素。

[0123] 在另一个实施方案中,药物组合物提供了每天每千克体重约0.001mg至约100mg抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的剂量。可制备药物剂量单位形式以提供每个剂量单位形式约0.001mg至约100mg,和/或其它任选必需成分的组合。在一个具体的实施方案中,所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段配制为40mg/mL的浓度。

[0124] 所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可一次施用,或者可分成要以时间间隔施用的多个较小剂量。应当理解,精确剂量和治疗持续时间是治疗的本文中描述的疾病或病症的函数,并且可凭经验使用已知的测试方案或者通过从体内或体外测试数据推断来确定。应当注意到,浓度和剂量数值还可随要减轻的疾病或病症的严重性而变化。应当进一步理解,对于任何特定的受试者,可以依照个体需要和施用或监督组合物施用的个人的专业判断随时间调整特定的剂量方案。

[0125] 以含有合适量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的单位剂量形式,诸如无菌肠胃外溶液或悬浮液提供药物组合物以对人和动物施用。在一个实施方案中,将所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段以单位剂量形式或多剂量形式配制并施用。如本文中使用的单位剂量形式指适合于人和动物受试者且单独包装的物理离散单位,如本领域中已知的。每个单位剂量含有足以产生期望的治疗效果的预定量的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段,以及需要的药用载体、媒剂或稀释剂。单位剂量形式的实例包括安瓿和注射器。单位剂量形式可以以其部分或倍数施用。多剂量形式是包装于单一容器以分离的单位剂量形式施用的多个相同的单位剂量形式。多剂量形式的实例包括小瓶,或品脱瓶或加仑瓶。因此,多剂量形式是在包装中不分离的多个单位剂量。

[0126] 在一些实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段在液体药物组合物中。药学上可施用的液体组合物可例如通过如下方法制备:将本文中描述的抗体在载体,诸如例如水、盐水、含水右旋糖、甘油、乙二醇、乙醇等中溶解、分散,或以其它方式混合,由此形成溶液或悬浮液。如果需要,要施用的药物组合物还可含有少量无毒性辅助物质诸如润湿剂、乳化剂、增溶剂和pH缓冲剂,等等。

[0127] 制备此类剂量形式的实际方法对于本领域技术人员是已知的,或会是显而易见的;例如,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版 (2006) Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, MD。

[0128] 可制备含有范围为0.005%至99.9%的抗体及由无毒性载体补足余量的剂量形式

或组合物。用于制备这些组合物的方法是本领域技术人员已知的。

[0129] 在一个实施方案中,肠胃外施用以注射为特征,皮下注射、肌肉内注射或静脉内注射也涵盖在本文中。可注射物可以以常规形式制备为液体溶液或悬浮液、适于注射前适合于液体中的溶液或悬浮液的固体形式,或者乳剂。可注射物、溶液和乳剂还含有一种或多种赋形剂。例如,合适的赋形剂是水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。另外,如果需要,要施用的药物组合物还可含有少量无毒性辅助物质诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂,和其它此类药剂。其它施用路径可以包括肠内施用、脑内施用、鼻施用、动脉内施用、心脏内施用、骨内输注、鞘内施用、静脉内输注、皮下植入或注射、肌肉内施用、直肠内输注、阴道内施用、胃内施用、气管内施用、肺内施用和腹膜内施用。

[0130] 用于肠胃外施用的制剂包括准备用于注射的无菌溶液、准备用于仅在使用前与溶剂混合的无菌干燥可溶性产品,诸如冻干粉末,包括准备用于注射的无菌悬浮液,准备用于仅在使用前与媒剂混合的无菌干燥不溶性产品和无菌乳剂。所述溶液可以是水性的或非水性的。

[0131] 若静脉内施用,则合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、水、和含有增稠剂和增溶剂,诸如葡萄糖、聚乙二醇、和聚丙二醇及其混合物的溶液。

[0132] 肠胃外制剂中使用的药学上可接受的载体包括水性媒剂、非水性媒剂、抗微生物剂、等张剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮和分散剂、乳化剂、掩蔽或螯合剂和其它药学上可接受的物质。药用载体还包括乙醇、聚乙二醇和丙二醇用作水可混溶的媒剂;和氢氧化钠、氢氯酸、柠檬酸或乳酸用于pH调节。

[0133] 例如地,静脉内或动脉内输注含有抗体的无菌水性溶液是有效的施用方式。另一个实施方案是无菌水性或油性溶液或悬浮液,其含有产生期望的药理学效果需要注射的活性材料。

[0134] 在一个具体的实施方案中,药物制剂包含柠檬酸钠、氯化钠、柠檬酸、聚山梨酯80和水。在一个具体的实施方案中,药物制剂包含柠檬酸钠、氯化钠、和柠檬酸。在一个具体的实施方案中,药物制剂包含9.1mM柠檬酸钠、150mM氯化钠和0.9mM柠檬酸。在一个具体的实施方案中,药物制剂包含浓度为0.267mM的本文中描述的抗体或缀合物。在一个具体的实施方案中,药物制剂包含2.676g/L柠檬酸钠、8.766g/L氯化钠、0.2g/L聚山梨酯80和0.189g/L柠檬酸。在一个具体的实施方案中,药物制剂包含浓度为40g/L的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。优选地,前述药物制剂为pH 6.0。

[0135] 在其它实施方案中,所述药物组合物是冻干的粉末,其可重建为溶液、乳剂和其它混合物用于施用。它们也可以重建并配制为固体或凝胶。

[0136] 通过在合适的溶剂中溶解本文中提供的抗体来制备所述冻干的粉末。在一些实施方案中,所述冻干的粉末是无菌的。所述溶剂可以含有粉末或从粉末制备的重建溶液的稳定性或其它药理学组分的赋形剂。可使用的赋形剂包括但不限于右旋糖、山梨糖醇(sorbitol)、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的药剂。所述溶剂还可含有缓冲剂,诸如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或本领域技术人员已知的其它此类缓冲剂,其在一个实施方案中约为中性pH。随后将所述溶液无菌过滤,接着在本领域技术人员已知的标准条件下冻干,从而提供期望的制剂。在一个实施方案中,将所得的溶液分配入小瓶中以冻干。每个小瓶会含有单剂量或多剂量所述化合物。可在合适的条件下(诸如于约4°C至室

温)贮存所述冻干粉末。

[0137] 用注射用水重建此冻干粉末提供用于肠胃外施用的制剂。对于重建,将冻干粉末添加至无菌水或其它合适的载体。精确量取决于所选择的化合物。此类量可凭经验确定。

[0138] 6.5治疗性方法

[0139] 本文中描述的抗体和抗体所衍生的抗原结合片段可用于治疗病症和疾病,所述病症和疾病与相对于健康个体或没有所述特定病症或疾病的个体中找到的活化T细胞的增殖和/或数目而言活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高有关或者(完全或部分)由活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高引起。此类疾病和病症是本领域技术人员已知的或者可由本领域技术人员确定。在一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体和抗体所衍生的抗原结合片段可用于治疗炎性疾病或病症。在一个实施方案中,所述炎性疾病是自身免疫性疾病。在一个具体的实施方案中,所述炎性疾病或病症是银屑病、斑块状银屑病、银屑病关节炎、类风湿性关节炎、克罗恩氏病和强直性脊柱炎。

[0140] 可使用本文中描述的抗体和抗体所衍生的抗原结合片段治疗的病症和疾病的非限制性实例包括银屑病、克罗恩氏病、强直性脊柱炎、关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎和银屑病关节炎)、糖尿病、多发性硬化、脑脊髓炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosis)、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、口疮性溃疡(aphthous ulcer)、虹膜炎、结膜炎、角膜结膜炎、I型糖尿病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、哮喘、变应性哮喘、皮肤红斑狼疮、硬皮病、阴道炎、直肠炎、药疹、麻风逆转反应(leprosy reversal reaction)、麻风结节性红斑(erythema nodosum leprosum)、自身免疫性葡萄膜炎、变应性脑脊髓炎、急性坏死性出血性脑病、特发性双侧进行性感觉神经性听力丧失(idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss)、再生障碍性贫血、单纯红细胞性贫血、特发性血小板减少(idiopathic thrombocytopenia)、多软骨炎、韦格纳(Wegener)氏肉芽肿病、慢性活动性肝炎、史-约综合征(Stevens-Johnson syndrome)、特发性脂肪腹泻(idiopathic sprue)、扁平苔藓/lichen planus)、格雷夫斯(Graves)氏病、原发性胆汁性肝硬化、后葡萄膜炎(uveitis posterior)、间质性肺纤维化(interstitial lung fibrosis)、变态反应诸如特应性变态反应、AIDS和T细胞肿瘤诸如白血病或淋巴瘤。

[0141] 另外,抗体和抗体所衍生的抗原结合片段可用于预防和/或治疗一些病症和疾病,所述病症和疾病与相对于健康个体或没有所述特定病症或疾病的个体中找到的活化T细胞的增殖增加和/或数目而言活化的T细胞的增殖和/或数目升高有关或者(完全或部分)由活化的T细胞的增殖增加和/或数目升高引起。可使用本文中描述的抗体和抗体所衍生的抗原结合片段预防和/或治疗的病症和疾病的非限制性实例包括移植植物抗宿主疾病和移植排斥病例(包括使用同种或异种组织的移植排斥)诸如骨髓移植、肝移植、肾移植、或任何器官或组织的移植。

[0142] 因而,本文中提供了使用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段预防和治疗本文中描述的疾病和病症的方法。在一个具体的实施方案中,此类方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段.在具体的实施方案中,为了治疗本文中描述的病症或疾病而施用的抗体是15A7H。

[0143] 在一个实施方案中,“治疗”病症或疾病指改善疾病或病症或其至少一种可辨别的

症状。在另一个实施方案中，“治疗”指改善至少一种与疾病或病症有关的可测量的身体参数,其不必是受试者可辨别的。在又一个实施方案中，“治疗”指在身体上(例如稳定可辨别症状),在生理上(例如稳定身体参数),或这两者上抑制疾病或病症的进展。

[0144] 在具体的实施方案中,本文中描述的治疗方法提供本文中描述的病症或疾病的进展、严重性和/或持续时间的降低或改善。在其它具体实施方案中,本文中描述的治疗方法减少本文中描述的病症或疾病的一种或多种症状。

[0145] 在一个具体的实施方案中,用于治疗本文中描述的病症或疾病的方法由于施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可实现至少一项、两项、三项、四项或更多项下列效果:(i) 病症或疾病和/或一种或多种与其有关的症状的严重性的降低或改善;(ii) 与病症或疾病有关的一种或多种症状的持续时间缩短;(iii) 预防病症或疾病的复发;(iv) 病症或疾病和/或与其有关的一种或多种症状的消退;(v) 受试者住院的降低;(vi) 住院长度的缩短;(vii) 受试者存活的增加;(viii) 抑制病症或疾病和/或与其有关的一种或多种症状的进展;(ix) 增强或改善另一种疗法的治疗效果;(x) 病症或疾病的降低或消除;(xi) 死亡率降低;(xii) 住院率降低;(xiii) 预防与病症或疾病有关的一种或多种症状的形成或发作。

[0146] 在一个实施方案中,“预防”病症或疾病指完全或部分抑制所述病症或疾病的发作或形成。

[0147] 在一个具体的实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是银屑病。一般公认的是,T淋巴细胞在银屑病的发病机制中发挥关键作用。在一个具体的实施方案中,用于治疗银屑病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,用于改善或预防一种或多种银屑病症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。银屑病的症状包括但不限于覆盖有银色鳞屑的皮肤红斑、凸起的皮肤斑、皮肤上的小脱皮点、干性皮肤、破裂的皮肤(包括脓疱、痒性皮肤)、增厚的、凹陷的或起皱的指甲、肿胀且僵直的关节。

[0148] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是斑块状银屑病。斑块状银屑病或寻常性银屑病是最常见的银屑病形式,并且特征在于被银色鳞屑覆盖的边界清楚的、凸起的红斑状皮肤斑。存在有损伤累及四肢的伸肌表面、腰骶区、和头皮的偏爱。相应的组织病理学发现包括真皮和表皮的显著的炎性细胞浸润、扩张血管数目增加,和表皮的实质性增厚伴有角质形成细胞的紊乱分化和过度角化。约三分之一的斑块状银屑病患者分类为具有中等或重度疾病,并且因此是除仅表面治疗之外的疗法的候选者。

[0149] 在一个具体的实施方案中,用于治疗斑块状银屑病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,用于改善或预防一种或多种斑块状银屑病症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。斑块状银屑病的症状包括但不限于覆盖有银色鳞屑的皮肤红斑、凸起的皮肤斑、皮肤上的小脱皮点、干性皮肤、破裂的皮肤(包括脓疱、痒性皮肤)、增厚的、凹陷的或起皱的指甲、肿胀且僵直的关节。

[0150] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的病症是慢性斑块状银屑病。在一个具体的实施方案中,用于治疗慢性斑块状银屑病的方法包括对有此需要的受试者施

用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的方法用于改善或预防慢性斑块状银屑病的一种或多种症状,其包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。斑块状慢性银屑病的症状包括但不限于身体的任何部分(包括但不限于膝、肘、腰骶区、头皮、和指甲)上皮肤的单个或多个凸起的变红的斑块,范围为硬币大小至更大。

[0151] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的病症是滴状银屑病。在另一个具体的实施方案中,用于治疗滴状银屑病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,用于预防或改善滴状银屑病的一种或多种症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。滴状银屑病的症状包括但不限于皮肤上水滴形状鳞屑性斑块的红肿(flares),接着是感染,诸如链球菌性咽喉感染。

[0152] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是反转型银屑病。在一个具体的实施方案中,用于治疗反转型银屑病(又称作擦烂性银屑病和屈侧银屑病)的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,用于预防或改善反转型银屑病的一种或多种症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。反转型银屑病的症状包括但不限于在下列一个或多个身体部分上,皮肤的平滑的、通常潮湿的区域是红色且发炎的,其不同于与斑块状银屑病有关的脱皮:腋窝、腹股沟,乳房下,及生殖器和臀周围的其它皮肤皱襞中。

[0153] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是脓疱性银屑病。在一个具体的实施方案中,用于治疗脓疱性银屑病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的用于预防或改善脓疱性银屑病的一种或多种症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。脓疱性银屑病的症状包括但不限于充满脓液的水疱,其在大小和位置上有所变化,但是主要在手和脚上。

[0154] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是红皮性(erythodermic)银屑病。在一个具体的实施方案中,用于治疗红皮性银屑病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的用于预防或改善红皮性银屑病的一种或多种症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。红皮性银屑病的症状包括但不限于皮肤的周期性的、分布广泛的、红肿的发红和床单中鳞屑脱落,而不是较小的薄片。皮肤的红化和脱落经常伴有重度的发痒和疼痛、心率增加和体温波动。

[0155] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是类风湿性关节炎。在一个具体的实施方案中,用于治疗类风湿性关节炎的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的方法用于预防或治疗类风湿性关节炎的一种或多种症状,其包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。类

风湿性关节炎的症状包括但不限于疲劳,食欲不振(loss of appetite),低热(low fever),腺体肿胀,虚弱,腕、肘、肩、髋、膝、踝、足趾、颞、手、足、手指和/或颈的关节疼痛,晨僵,呼吸时胸部疼痛(胸膜炎),眼部烧灼(eye burning)、发痒和分泌物(discharge),皮肤下的结节,或手足部的麻木感、麻刺感(tingling)或烧灼。

[0156] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是克罗恩氏病。在一个具体的实施方案中,用于治疗克罗恩氏病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的方法用于预防或改善克罗恩氏病的一种或多种症状,其包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。克罗恩氏病的症状包括但不限于痉挛性(crampy)腹部(腹部区)疼痛、发烧、疲劳、食欲不振、排便疼痛(pain with passing stool)(里急后重)、持久性水性腹泻、非自愿性重量减轻、便秘、眼部炎症、瘘(通常在直肠区周围,可以引起脓液、粘液或粪便的排出)、关节疼痛、肝炎症、口部溃疡、直肠出血和血便、皮肤肿块或疮(溃疡),和齿龈肿胀。

[0157] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是强直性脊柱炎。在一个具体的实施方案中,用于治疗强直性脊柱炎的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,用于改善或预防强直性脊柱炎的一种或多种症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。强直性脊柱炎的症状包括但不限于下背和臀部、脊柱、和/或颈中频繁的疼痛和僵硬;和扩散到肋、肩胛、髋、股和踵的疼痛和触痛;眼部炎症(虹膜睫状体炎和葡萄膜炎),其引起发红、眼痛、视力丧失、飞蚊症(floater)和畏光;疲劳;以及恶心。

[0158] 在另一个实施方案中,依照本文中描述的方法治疗的疾病或病症是糖尿病。在一个具体的实施方案中,用于治疗糖尿病的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在另一个具体的实施方案中,用于改善或预防糖尿病的一种或多种症状的方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。糖尿病的症状包括但不限于重量减轻、多尿(频繁排尿)、多饮(口渴增加)、多食(饥饿增加)、心血管疾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变、高渗性非酮性状态(hyperosmolar nonketotic state),和糖尿病酮症酸中毒。

[0159] 在具体的实施方案中,对先前已经接受,或者目前在接受一种或多种其它疗法的患者施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。

[0160] 在具体的实施方案中,对先前已经接受,或者目前在接受一种或多种其它疗法的患者施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在其它具体的实施方案中,对患者施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段,所述患者是对抗炎疗法有抗性或难治性的或者怀疑对抗炎疗法有抗性或难治性的。

[0161] 在一些方面,本文中提供了用于杀死有此需要的个体中的T细胞的方法,其中所述方法包括对所述个体施用有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在一些方面,本文中提供了用于诱导有此需要的个体中的活化的T细胞凋亡的方法,其中所述方法包括对所述个体施用有效量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。

[0162] 在一些实施方案中,可以通过任何合适的方法对有此需要的受试者施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或其药物组合物。施用方法的非限制性实例包括静脉内输注、皮下注射或植入、肌肉内、鞘内、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内、胃内、气管内或肺内递送和/或本文中描述的或本领域中已知的任何其它物理递送方法。在一个实施方案中,对有此需要的受试者系统性地(例如肠胃外)施用抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或其药物组合物。在另一个实施方案中,对有此需要的受试者局部地(例如肿瘤内)施用抗体或其药物组合物。每剂可能或可能不通过相同的施用路径施用。在一些实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可经由多种施用路径与其它剂量的本文中描述的相同或不同的抗体同时施用或在其后施用。

[0163] 当治疗疾病或其症状时,所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的施用通常在疾病或其症状发作后发生。当预防疾病的症状时,所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的施用通常在症状发作前发生。

[0164] 依照预防和/或治疗同时使副作用最小化的方法实施本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或其药物组合物的施用剂量和频率。鉴于与需要治疗的受试者相关的因素,从业人员可确定要对特定受试者施用的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或其药物组合物的确切剂量。可考虑的因素包括疾病状态的严重性、受试者的一般健康、年龄,和受试者的体重、饮食、施用的次数和频率、与其它治疗剂或药物的组合、反应敏感性,以及对疗法的耐受性/响应。可随时间调整本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或其药物组合物的施用剂量和频率以提供足够水平的所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段,或者维持期望的效果。

[0165] 制剂中采用的精确剂量还将取决于施用路径,和炎性病症或疾病的严重性,并且应当依照从业人员的判断和每名患者的情况决定。

[0166] 可从自体外或动物模型测试系统得到的剂量-反应曲线推断出有效剂量。

[0167] 在一个实施方案中,对患者施用以预防和/或治疗本文中描述的疾病或病症的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的剂量通常是0.001mg/kg至100mg/kg患者体重。在另一个实施方案中,对于预防和/或治疗本文中描述的疾病或病症治疗有效的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的合适剂量在0.01mg/kg至100mg/kg患者体重的范围中。

[0168] 在具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的“有效量”指足以实现至少一项、两项、三项、四项或更多项下列效果的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的量:(i)本文中描述的疾病或病症和/或与其有关的一种或多种症状的严重性的降低或改善;(ii)与病症或疾病有关的一种或多种症状的持续时间缩短;(iii)预防疾病或病症的复发;(iv)疾病或病症和/或与其有关的一种或多种症状的消退;(v)受试者住院的降低;(vi)住院长度的缩短;(vii)受试者存活的增加;(viii)抑制疾病或病症和/或与其有关的一种或多种症状的进展;(ix)增强或改善另一种疗法的治疗效果;(x)疾病或病症的降低或消除;(xi)死亡率降低;(xii)住院率降低;(xiii)预防与疾病或病症有关的一种或多种症状的形成或发作;和(xiv)生命质量的改善,如通过本领域中公知的方法,例如问卷法所评估的。在一些实施方案中,如本文中使用的“有效量”指本文中描述的抗体实现下文第6部分中描述的详细结果的量。在一些实施方案中,抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的有效量是约0.01mg至约1,000mg。

[0169] 在一些实施方案中,对患者一次或多次施用单剂量本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段以预防和/或治疗本文中描述的病症或疾病。

[0170] 在具体的实施方案中,依照用于预防和/或治疗本文中呈现的病症或疾病的方法对受试者周期性地施用抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或其药物组合物,其中将所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或药物组合物施用一段时间,接着是一段休息期(即,一段时间不施用所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或药物组合物)。

[0171] 本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可在施用一种或多种另外的疗法(例如药剂)之前、同时、或之后施用以用于预防和/或治疗本文中描述的病症或疾病。使用术语“组合”不限制对受试者施用抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和一种或多种另外的疗法的次序。在具体的实施方案中,可以连续或序贯施用所述疗法。

[0172] 在另一个具体的实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段与一定量的另一种疗法(例如抗炎剂)组合使用以预防和/或治疗本文中描述的疾病或病症。在一个具体的实施方案中,此类组合疗法具有协同作用。在其它实施方案中,此类组合具有加成作用。

[0173] 在一个具体的实施方案中,所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和另外的疗法容许使用较低剂量(例如亚最佳剂量)的所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和/或另外的疗法和/或更不频繁地对受试者施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或另外的疗法。在一些实施方案中,利用较低剂量的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和/或另外的疗法和/或更不频繁地施用所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段,或所述另外的疗法的能力可降低与分别对受试者施用所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段或所述另外的疗法有关的毒性,而不降低所述抗体或所述另外的疗法分别在预防和/或治疗本文中描述的病症或疾病中的效力。在一些实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段与另外的疗法的组合施用导致本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和/或所述另外的疗法在预防和/或治疗本文中描述的病症或疾病中的效力改善。在一些实施方案中,本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段和一种或多种另外的疗法的施用可避免或降低与使用任何单一疗法有关的不利的或不想要的副作用。

[0174] 在一个具体的实施方案中,施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的受试者是动物(例如猕猴或人受试者)。在一个优选的实施方案中,施用本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的受试者是人。在一个具体的实施方案中,施用抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的受试者展现出本文中描述的疾病或病症的一种或多种症状。

[0175] 6.6基于细胞的方法

[0176] 本文中提供了用于在表达PSGL-1的细胞中诱导或增强凋亡的方法,其包括使所述细胞与有效量的本文中描述的抗体接触。在一个实施方案中,所述细胞是免疫细胞。在一个具体的实施方案中,所述细胞是T细胞。在一个更具体的实施方案中,所述细胞是活化的T细胞。用于检测凋亡的方法在本领域中有所描述,并且本领域技术人员可容易地实施。在具体的实施方案中,用于诱导或增强表达PSGL-1的活化的T细胞凋亡的方法包括使所述细胞与有效量的本文中描述的抗体接触,其中所述有效量足以诱导或增强凋亡,如通过本领域技术人员已知的方法所评估的。

[0177] 本文中提供了用于降低或抑制表达PSGL-1的细胞存活的方法,其包括使所述细胞

与有效量的本文中描述的抗体接触。在一个实施方案中,所述细胞是免疫细胞。在一个具体的实施方案中,所述细胞是T细胞。在一个更具体的实施方案中,所述细胞是活化的T细胞。细胞存活测定法在本领域中有所描述,并且本领域技术人员可容易地实施。例如,可以通过使用台盼蓝染色或本领域中已知的其它细胞死亡标志物(例如膜联蛋白-5染色)或存活活力标志物(例如碘化丙啶或7-AAD排斥法)评估细胞存活力。在具体的实施方案中,用于降低或抑制表达PSGL-1的活化的T细胞的存活的方法包括使所述细胞与有效量的本文中描述的抗体接触,其中所述有效量降低或抑制细胞的存活,如通过本领域技术人员已知的方法(例如台盼蓝排除测定法或碘化丙啶或7-AAD排斥法)所评估的。

[0178] 6.7试剂盒

[0179] 本文中提供了包含一个或多个容器的药用包装或试剂盒,所述容器充满本文中描述的药物组合物的一种或多种成分,诸如本文中提供的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。任选地,与此类容器结合的可以是由管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的标识,该标识反映已被制造、使用或销售的机构批准用于人施用。

[0180] 在一个具体的实施方案中,本文中提供了包含第一容器的试剂盒,所述第一容器含有本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段。在一个具体的实施方案中,试剂盒包含第一容器,该第一容器是含有作为真空下冻干的无菌粉末的所述抗体或所述抗体所衍生的抗原结合片段的小瓶,并且所述试剂盒进一步包含第二容器,该第二容器包含药学上可接受的流体。

[0181] 在一个具体的实施方案中,本文中提供了包含本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段的注射装置。在一个具体的实施方案中,所述注射装置包含无菌溶液中的抗体。在一个具体的实施方案中,本文中提供的注射装置是注射器。

[0182] 本文中还提供了可用于上述方法的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含一个或多个容器中的本文中描述的抗体或抗体所衍生的抗原结合片段,优选纯化的抗体。在一个具体的实施方案中,本文中描述的试剂盒含有基本上分离的PSGL-1作为对照。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的试剂盒进一步包含不与PSGL-1起反应的对照抗体。在另一个具体的实施方案中,本文中描述的试剂盒含有一种或多种元件用于检测抗体或抗体所衍生的抗原结合片段对PSGL-1的结合(例如所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段可与可检测底物(诸如荧光化合物、酶促底物、放射性化合物或发光化合物)缀合,或识别所述一抗或抗体所衍生的抗原结合片段的二抗可与可检测底物缀合)。在具体的实施方案中,所述试剂盒可包含重组生成的或化学合成的PSGL-1。试剂盒中提供的PSGL-1也可附着于固体支持物。在一个更具体的实施方案中,上文描述的试剂盒的检测工具包括PSGL-1附着的固体支持物。此类试剂盒还可包含非附着的经报告分子标记的抗人抗体。在此实施方案中,可通过所述经报告分子标记的抗体的结合检测所述抗体或抗体所衍生的抗原结合片段对PSGL-1的结合。

实施例

[0183] 此部分(即部分6)中提供的实施例作为例示,而不作为限制。

[0184] 7.1实施例1:生成抗PSGL-1单克隆抗体

[0185] 抗体h15A7含有国际申请公开文本WO 2005/110475(2005年11月24日公布,其全部

引入本文作为参考)中描述的人源化15A7重链和轻链可变区。抗体h15A7是一种具有κ型轻链的IgG4同种型抗体。使用诱变引物通过PCR将Ser²²⁸→Pro²²⁸突变引入h15A7的铰链区中。所得的h15A7铰链突变体在本文中称作15A7H。15A7H的剩余蛋白质序列与h15A7相同。15A7H的氨基酸序列显示于图7A-B,并且在SEQ ID NO:1和2中有所描述。将重链和轻链的抗体编码基因序列导入源自载体pAD-CMV1(记载于EP 393 438)的真核表达载体中。

[0186] 使用本领域中已知的方法生成15A7H。简而言之,编码除重链和轻链外的15A7H的重组表达载体还分别编码二氢叶酸还原酶(DHFR)和新霉素磷酸转移酶选择标志物,将它们共转染入悬浮液适应性CHO-DG44宿主细胞中。转染后2天在无次黄嘌呤/胸苷的选择培养基中且添加抗生素G418的情况下发生稳定转染的细胞的选择。一旦从初始选择回收细胞,通过添加甲氨蝶呤诱导基于DHFR的基因扩增。通过单细胞沉积,针对15A7H开发出使用CHO-DG44宿主细胞的单克隆生成细胞系。为了生成15A7H抗体,扩充细胞以得到供生产生物反应器用的接种物。以分批补料模式将生产生物反应器运行8至14天。为了支持抗体的生成并且为了延长细胞培养生产期,在生产阶段期间添加营养物补料培养基。如下收获细胞培养肉汤(broth),即进行离心和死端式过滤以有效除去细胞,为进一步纯化产物提供无细胞培养流体(CCF)。在收获期间除去细胞后,经由蛋白A亲和色谱及阴离子和阳离子交换色谱纯化蛋白质。另外,包括两个强力的病毒清除步骤,即低pH病毒灭活步骤和用于除去病毒的纳米过滤步骤。

[0187] 通过毛细管凝胶电泳方法测定15A7H的纯度。将样品用SDS(十二烷基硫酸钠)变性,并在充满凝胶缓冲液的作为筛析介质的毛细管中基于大小分离。在还原性样品中,用2-巯基乙醇还原二硫键,产生抗体的重链和轻链的分离的峰。在非还原性样品中,添加碘乙酰胺(一种烷化剂)以避免由样品制备诱导的任何片段化并且确保IgG主峰保持完整。

[0188] 将样品以电动力学方式注射,并使用UV检测仪通过200nm的UV吸光度检测运动的蛋白质。对于还原性样品,报告了重链和轻链总和(%LC+HC)的时间校正面积百分比(TCA%)。非还原性样品的可报告数值是IgG主峰的TCA%。

[0189] 通过非还原性毛细管凝胶电泳(CGE)检出较少量的半抗体分子(图1),这指示Ser²²⁸→Pro²²⁸突变显著降低铰链区中链内二硫键的形成。半抗体分子的量从约8-10%(对于h15A7)降低至低于1%(对于15A7H)。

[0190] 表6中显示了15A7H的制剂。

[0191] 表6:15A7H的制剂

组分	浓度 [mmol/L]	浓度 [g/L]	组分用途
二水合柠檬酸钠 C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2 H ₂ O	9.1	2.676	缓冲剂组分
氯化钠	150	8.766	
聚山梨酯 80	----	0.2	
一水合柠檬酸 C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	0.9	0.189	
15A7H	0.267	40	
注射用水(WFI)	----	将 WFI 添加至终体积 1.0 L	

[0193] 所述制剂的pH是6.0。

[0194] 7.2实施例2:15A7H抗体在活化的原代人T细胞上的结合

[0195] 检查15A7H在原代活化的人CD4⁺T细胞中的结合。

[0196] 7.2.1.材料和方法

[0197] 细胞培养和T细胞活化。将 1×10^6 个外周血CD4⁺T细胞于37℃在RPMI完全培养基中培养,并在添加20ug/ml PHA-L (Sigma,产品目录编号#L2769)下刺激2天。将细胞于37℃与20ng/ml IL-2 (R&D systems,产品目录编号#RD202-IL)一起孵育额外的4至5天以产生“活化的CD4⁺T细胞”。

[0198] 细胞结合测定法:将活化的人CD4⁺T细胞计数,并以 1×10^5 个细胞/100μl FACS缓冲液分配于v形底96孔培养板(Falcon BD,产品目录编号#353263)中,并在冰上孵育30分钟。

[0199] 将抗溶菌酶IgG4同种型对照、h15A7和15A7H在圆底稀释板(Falcon,产品目录编号#353077)中在FACS缓冲液中稀释至90ug/ml。在所述板上针对每种抗体制得抗体制备物的11种3倍连续稀释液,起始浓度为30ug/ml。

[0200] 将一式两份细胞样品沉淀,并在100μl每种抗体稀释液中重悬以得到初始起始浓度30μg/ml。将细胞在冰上孵育60分钟。将细胞沉淀,并用洗涤缓冲液洗涤,接着添加100μl稀释的山羊F(ab)₂抗人Ig R-PE缀合物二抗。预先将山羊F(ab')₂抗人Ig R-PE缀合物二抗(BD Biosciences,产品目录编号#554655;1.05mg/ml的储备液)以1:800在FACS缓冲液中稀释。将细胞在冰上在黑暗中孵育30分钟,然后沉淀,并用洗涤缓冲液洗涤两次。将细胞在150μl洗涤缓冲液中重悬,并通过添加50μl BD Cytofix/Cytoperm固定缓冲液(BD Biosciences,产品目录编号#554655)固定。

[0201] 将样品在BD FACS Array生物分析仪上分析。对每种细胞样品使用BD FACS Array流式细胞仪用依照SSC和FSC及对每份样品测定的均值荧光设置的“淋巴细胞”门获得约5000个事件。

[0202] 数据分析:如下测定抗溶菌酶IgG4、h15A7和15A7H抗体对活化的CD4⁺T细胞的结合亲和力,即使用XLfit(模型:剂量响应一位点,205)对于每份样品副本将抗体浓度对均值荧光指数(MFI)绘图。测定各结合曲线的EC₅₀值。

[0203] 7.2.2结果:

[0204] 对活化的人T细胞的结合:使用流式细胞术,测定15A7H对活化的人CD4⁺T细胞的结合。图2证明了15A7H以0.22nM的EC₅₀结合。

[0205] 来自多个供体的聚集体结合数据证明了15A7H以平均EC₅₀为0.22+/-0.02结合活化的CD4⁺T细胞。使用来自4个供体的EC₅₀值来计算平均+/-SEM。抗体h15A7在相同条件下测试,并且以平均EC₅₀为0.27+/-0.05结合活化的CD4⁺T细胞。因此,15A7H和h15A7表明相当的对活化的T细胞的结合(参见表7)。

[0206] 表7:对活化的CD4⁺T细胞的结合测定

[0207]	EC ₅₀ (nM)	均值+/-SEM
	15A7H	0.22+/-0.02
	h15A7	0.27+/-0.05

[0208] 7.3实施例3:15A7H在人体内转移性迟发型超敏小鼠模型中的体内活性

[0209] 在雌性C57BL/6小鼠中的体内转移性迟发型超敏(DTH)模型中测试15A7H。在配制缓冲液中i.p.给药0.03、0.10、0.3、1和10mg/kg剂量的15A7H。在相同条件下测试抗体h15A7。

[0210] 7.3.1材料和方法

[0211] 体内转移性测定法:雌性C57BL/6小鼠在6-8周龄时购自Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, Indiana),并且在到达4周内使用。将所有小鼠在无病原体环境中收容,并且依照NIH指南处理。所有动物实验得到机构动物护理和使用委员会(IACUC)审阅和批准,并且遵照NIH指南,“Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings”进行。

[0212] 通过静脉穿刺从已知为良好破伤风响应者的正常人供体采集血液。将100ml全血抽到CPT真空采血管(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)中,并且以1800RCF旋转30分钟。将含有单核细胞和血小板的血沉棕黄层(buffy layer)分离,洗涤三次,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中重悬,并计数。通过在PBS中多次洗涤使血小板污染最小化。容许血小板与PBMC比率不超过1:1。将所述细胞立即注射入小鼠足垫中。

[0213] 以每个注射部位0.25Lf的浓度使用磷酸铝吸附的破伤风类毒素(TT-Tetguard)(Lf单位是凝聚单位,即在与1个国际单位的抗毒素混合时产生最佳的絮凝化混合物的类毒素量)。

[0214] 将总体积50μl中与0.25Lf单位TT混合的7-10×10⁶个PBMC注射入小鼠的后部足垫中。使用刻度盘式测厚仪(Mitutoyo, Aurora, IL)在注射前和注射后24小时测量足垫厚度。从24小时时的注射后厚度扣除注射前厚度以获得脚爪厚度的变化。以英寸进行所有测量。

[0215] 15A7H和h15A7的测试:将15A7H和h15A7(10mg/ml储备液)在含有25mM柠檬酸钠和115mM氯化钠及0.04% Tween 80的媒剂(pH 5.97)中溶解。以0.03、0.1、0.3、1、和10mg/kg给小鼠i.p.注射0.2ml媒剂或15A7H或h15A7,一小时后足垫注射含或不含TT的PBMC。对来自四个不同供体的PBMC测试各剂量的15A7H和h15A7抗体,并且每个供体每次处理使用一只小鼠。将15A7H和h15A7处理组与媒剂处理组比较。

[0216] 统计学:除非另有规定,所有数值以均值±SEM报告。比较药物处理组与媒剂处理组中的足垫厚度变化。将来自4个个别供体实验的△脚爪厚度合并,并计算均值±SEM。脚爪

厚度抑制百分比如下计算: $100 \times (\Delta \text{脚爪厚度}_{\text{媒剂}} - \Delta \text{脚爪厚度}_{\text{药物}}) / (\Delta \text{脚爪厚度}_{\text{媒剂}} - \Delta \text{脚爪厚度}_{\text{PBMC}})$ 。使用Kruskal-Wallis单因素方差分析(ANOVA)按秩检验测定抑制效果的显著性。认为小于0.05的p值是统计学显著的。

[0217] C57BL/6小鼠中的15A7H和h15A7的血浆水平:在雌性C57BL/6小鼠中腹膜内注射后24小时,测定0.03、0.1、0.3、1、和10mg/kg 15A7H和h15A7的血浆水平。实验终止后从体内转移性DTH实验动物采集血浆样品。对所有样品实施生物分析。

[0218] 15A7H的Satellite药动学研究:使用接受腹膜内剂量的15A7H(与上文相同的剂量水平)的Satellite雌性C57BL/6小鼠来收集数据,其在15A7H血浆浓度方面更精细(intensive)。这些小鼠未经人PBMC或破伤风类毒素处理。这些“PK”小鼠的取样时间是给药后1、3、5、和24小时。PK小鼠的每个剂量组由6只小鼠组成。在每个剂量组内,一个3只小鼠的亚组用于在1和5小时取样,并且另一个3只小鼠的亚组用于在3和24小时取样。

[0219] h15A7和15A7H的生物分析:使用夹心ELISA来定量小鼠血浆中的h15A7或15A7H的浓度。简而言之,使用PSGL-1包被的96孔微量滴定板来结合稀释的血浆样品中的h15A7或15A7H。在洗涤后,通过经生物素标记的单克隆抗人IgG₄抗体和经酶(HRP)标记的链霉抗生物素蛋白(streptavidin)检测结合的h15A7或15A7H。底物反应期间形成的有色产物的量以光度计测量,并且随样品中h15A7或15A7H浓度增加而增加。经由非线性标准曲线的数据拟合计算与测量的光学吸光度对应的h15A7或15A7H浓度。校准样品的范围是0.04至1.2ng/mL。以至少1:100稀释样品。因此,全血浆中h15A7或15A7H的定量下限是4ng/mL。通过使用较高的稀释因子,可以将定量上限向上提高至2.4mg/mL(1:2000000)。

[0220] 由于ELISA中h15A7和15A7H参照材料的反应性的略微差异,因此使用两种校准曲线和两组质量对照。相对于h15A7校准曲线分析来自经h15A7处理的动物的样品,并相对于15A7H校准曲线分析来自用15A7H处理的动物的样品。

[0221] 7.3.2结果

[0222] 体内转移性DTH:图3显示了4种供体PBMC中体内转移性DTH中合并的15A7H抗体剂量响应,如通过用15A7H处理后百分比DTH抑制显示的。在-1小时以0.03、0.1、0.3、1和10mg/kg对小鼠i.p.给药时,h15A7和15A7H两者都以剂量依赖性方式抑制体内转移性DTH。表8显示了体内转移性DTH中15A7H和h15A7的剂量响应和抑制百分比。0.3mg/kg及更高的单剂量15A7H或h15A7显示了对体内转移性DTH的显著抑制。此测定法中h15A7和15A7H的ED₅₀分别是0.09和0.1mg/kg,n=4个供体。

[0223] 表8:体内转移性DTH中的剂量响应和抑制百分比

[0224]

Δ (英寸)		均值	SEM	n
	PBMC	0.0005	0.0000	4
	媒剂	0.0090	0.0010	4
	h15A7 0.03mpk	0.0061	0.0007	4
	h15A7 0.1mpk	0.0047	0.0008	4
	h15A7 0.3mpk	0.0033	0.0006	4
	h15A7 1mpk	0.0018	0.0003	4
	h15A7 10mpk	0.0009	0.0001	4

	15A7H 0.03mpk	0.0060	0.0007	4
	15A7H 0.1mpk	0.0049	0.0006	4
	15A7H 0.3mpk	0.0040	0.0010	4
	15A7H 1mpk	0.0024	0.0006	4
	15A7H 10mpk	0.0012	0.0004	4
抑制百分比				
	媒剂	0.00	0.00	4
	h15A7 0.03mpk	33.31	6.67	4
	h15A7 0.1mpk	51.02	2.52	4
	h15A7 0.3mpk	67.83	4.26	4
	h15A7 1mpk	85.14	3.17	4
	h15A7 10mpk	95.43	1.41	4
	15A7H0.03mpk	35.56	3.25	4
	15A7H0.1mpk	47.95	2.88	4
	15A7H0.3mpk	61.20	5.62	4
	15A7H1mpk	79.15	5.19	4
	15A7H10mpk	91.32	4.94	4

[0225] 化合物血浆浓度:图5中汇总了Satellite PK和DTH小鼠两者的15A7H血浆浓度。图4显示了相对于DTH的抑制百分比绘图的24小时合并的15A7H血浆浓度。注意到对于给定的剂量水平,PK和DTH小鼠在给药后24小时的均值浓度是非常相似的。这提示了虽然PK和DTH小鼠差别处理(仅DTH小鼠接受PBMC和破伤风类毒素),两种情况中15A7H的药动学是非常相似的。在研究过程中,h15A7和15A7H两者的血浆浓度(给药后1-24小时的浓度测量)仅在相当窄的范围内波动。

[0226] PK-PD:表9和表10显示了在相同剂量时h15A7和15A7H抗体的24小时血浆浓度(PK)和对应的体内转移性DTH的抑制百分比(PD)。图4比较体内转移性DTH模型中15A7H的PK-PD关系。计算h15A7和15A7H的 ED_{50} 分别为687和770ng/ml,n=4个供体。

[0227] 表9:体内转移性DTH模型中PK-PD关系。

[0228]

(A) 药动学(PK) ng/ml			
h15A7剂量 mg/kg, i.p.	均值	SEM	n
0.03	111	12	4
0.1	618	64	4
0.3	2320	172	4
1	9355	642	4
10	67668	23686	4

(B) 药效学(PD) 抑制百分比			
h15A7剂量 mg/kg, i.p.	均值	SEM	n
0.03	33	7	4
0.1	51	3	4
0.3	68	4	4
1	85	3	4
10	95	1	4

[0229] 表10:体内转移性DTH模型中的PK-PD关系

(A) 药动学(PK) ng/ml			
15A7H剂量 mg/kg, i.p.	均值	SEM	n
0.03	228	20	4
0.1	708	79	4
0.3	1968	228	4
1	6163	469	4
10	54725	13612	4

(B) 药效学(PD) 抑制百分比			
15A7H剂量 mg/kg, i.p.	均值	SEM	n
0.03	36	3	4
0.1	48	3	4
0.3	61	6	4
1	79	5	4
10	91	5	4

[0231] 7.3.3 结论

[0232] 单剂量0.3mg/kg和更高的15A7H或h15A7显示了显著的体内转移性DTH抑制百分比。体内转移性DTH测定法中h15A7和15A7H的ED₅₀分别是0.09和0.1mg/kg。在研究过程中, h15A7和15A7H两者的血浆浓度仅在相当窄的范围内波动。

[0233] 7.4 实施例4: 评估补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0234] 为了测定15A7H是否具有CDC活性, 使用乳酸脱氢酶释放测定法测量多个浓度的CDC活性。

[0235] 7.4.1. 材料和方法

[0236] 将Ramos细胞(获自ATCC; 产品目录编号#CRL-1596)用作靶细胞, 并在具有0.5mg/ml遗传霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA; 产品目录编号10131)的完全DMEM培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA; 产品目录编号11995)中培养。使用兔补体作为补体蛋白来源(Accurate Chemical&Scientific Corp., Westbury, NY; 产品目录编号:AIC4000-1)。Cedarlane细胞毒性培养基用作测定培养基(Accurate Chemical&Scientific Corp., Westbury, NY; 产品目录编号:CL95100)。

[0237] 使用Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) (Roche Applied Science, Indianapolis, IN; 产品目录编号:04 744 934 001)通过靶细胞的LDH释放测定CDC活性。使

用从1F5杂交瘤(ATCC)纯化的小鼠抗人CD20(Birmingham, AL; 产品目录编号:6140-01)作为测定法中的阳性对照抗体来激活补体。人IgG4κ(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 产品目录编号:I4639)用作同种型对照。样品和对照如下设置(所有样品具有多份副本):

[0238] • 样品: 100μl标准兔补体(在测定培养基中以1:6稀释)+50μl靶细胞(测定培养基中的Ramos细胞)+50μl抗体稀释液

[0239] • 背景对照: 200μl测定培养基

[0240] • 最大释放对照: 50μl靶细胞+100μl标准兔补体+50μl测定培养基

[0241] • 自发释放对照: 50μl靶细胞+100μl标准兔补体+50μl测定培养基

[0242] 将板于37°C在湿润的CO₂培养箱中孵育3小时。孵育结束前30分钟(2.5小时孵育后), 对最大释放对照样品添加10μl裂解溶液(Cytotoxicity Detection Kit中提供)。在孵育结束时, 将板以200g于室温离心10分钟, 并且将100μl无细胞上清液转移至96孔平底板的相应孔中以进行LDH检测。向每孔添加100μl反应混合物(Cytotoxicity Detection Kit中提供), 并且将板于室温在黑暗中孵育15-30分钟。在第二次孵育结束时, 通过添加50μl停止溶液(Cytotoxicity Detection Kit中提供)停止反应。在SpectraMAX Plus读板仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)上在490-492nm波长处测量吸光度。使用([抗体诱导的释放]-[自发释放对照])/([最大释放]-[自发释放对照])×100%计算CDC%。

[0243] 7.4.2.结果

[0244] 用Ramos细胞在针对抗CD20的CDC应答优化的条件下测试15A7H的CDC活性。如图6和表11中显示的, 在1:12的固定补体稀释情况下测试不同浓度的抗体的CDC活性。对于15A7H、h15A7或者对于IgG4阴性对照未检出CDC活性。小鼠抗人CD20表明清楚的抗体剂量响应。

[0245] 表11:不同浓度的15A7H的CDC活性百分比

抗体浓度(μg/ml)	h15A7	IgG4 κ	小鼠抗CD20	15A7H
[0246]	5	1.54	-0.87	na
	0.5	4.25	0.50	68.26
	0.05	0.84	3.22	59.60
	0.005	2.08	3.29	31.42
	0.0005	na	na	6.77

[0247] 7.4.3.结论

[0248] 在对Ramos细胞实施的测定法中, 在1:12的补体稀释时, 15A7H高达5μg/ml抗体浓度没有显示CDC活性。

[0249] 7.5实施例5:临床研究

[0250] 通过静脉内施用单一升高剂量125μg/kg、500μg/kg、1000μg/kg和2000μg/kg向受试者给予15A7H并通过皮下施用单剂量500μg/kg和1000μg/kg在其它受试者中给予15A7H。给药是适合的。使用表6中描述的制剂中重悬的15A7H。在施用后,使用本领域中已知的方法进行临床实验室测试(例如血液学、临床化学和尿液分析),例如每周一次。还使用本领域中已知的方法测定药动学参数,例如每周一次。

[0251] 综上,本申请涉及以下方面:

[0252] 1.一种免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:

[0253] (i)可变轻(“VL”)链区,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;

[0254] (ii)包含可变重(“VH”)链区的重链,所述可变重(“VH”)链区包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;和

[0255] (iii)人IgG4恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸228处包含丝氨酸至脯氨酸的取代。

[0256] 2.一种免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:

[0257] (i)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链;和

[0258] (ii)包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链。

[0259] 3.一种免疫特异性结合人PSGL-1的单克隆抗体,其包含:

[0260] (i)由SEQ ID NO:2组成的重链;和

[0261] (ii)由SEQ ID NO:1组成的轻链。

[0262] 4.一种单克隆抗体,其免疫特异性结合人PSGL-1,并且包含如下的重链,所述重链包含:

[0263] (i)包含SEQ ID NO:8、9和10的VH链区;和

[0264] (ii)人IgG4重链恒定区,其在依照EU索引编号的重链氨基酸228处包含丝氨酸至脯氨酸的氨基酸取代。

[0265] 5.项4的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体进一步包含轻链,所述轻链包含含有SEQ ID NO:5、6和7的VL链区。

[0266] 6.项1至5中任一项的单克隆抗体,其中所述抗体是纯化的。

[0267] 7.一种药物组合物,其包含项1至6中任一项的单克隆抗体和药学上可接受的载体。

[0268] 8.项7的药物组合物,其中所述单克隆抗体是纯化的。

[0269] 9.一种抗体重链,其包含SEQ ID NO:2。

[0270] 10.一种试剂盒,其包含含有项1至6中任一项的单克隆抗体的第一容器。

[0271] 11.一种注射装置,其含有项1至6中任一项的单克隆抗体。

[0272] 12.项11的注射装置,其中所述注射装置是注射器。

[0273] 13.一种用于治疗炎性病症的方法,所述方法包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的项1至6中任一项的单克隆抗体或项8或项9的药物组合物。

[0274] 14.一种用于治疗炎性病症的方法,其包括对有此需要的受试者施用治疗有效量的项7或8的药物组合物。

[0275] 15.项13或14的方法,其中所述炎性病症是自身免疫性疾病。

[0276] 16. 项13至15中任一项的方法,其中所述炎性病症是:银屑病、斑块状银屑病、慢性斑块状银屑病、滴状银屑病、反转型银屑病、脓疱性银屑病、红皮性银屑病、银屑病关节炎、类风湿性关节炎、克罗恩氏病、强直性脊柱炎,或糖尿病。

[0277] 本申请中引用的所有公开、专利和专利申请全部引入本文作为参考,如同将各公开或专利申请具体地且单独地引入作为参考一样。虽然为了清楚理解的目的,已将前述发明通过例示和实例进行了相当详细的描述,但是根据本发明的教导,本领域普通技术人员显然能够在不偏离所附权利要求书的精神或范围的前提下对其做出一些改变和修改。

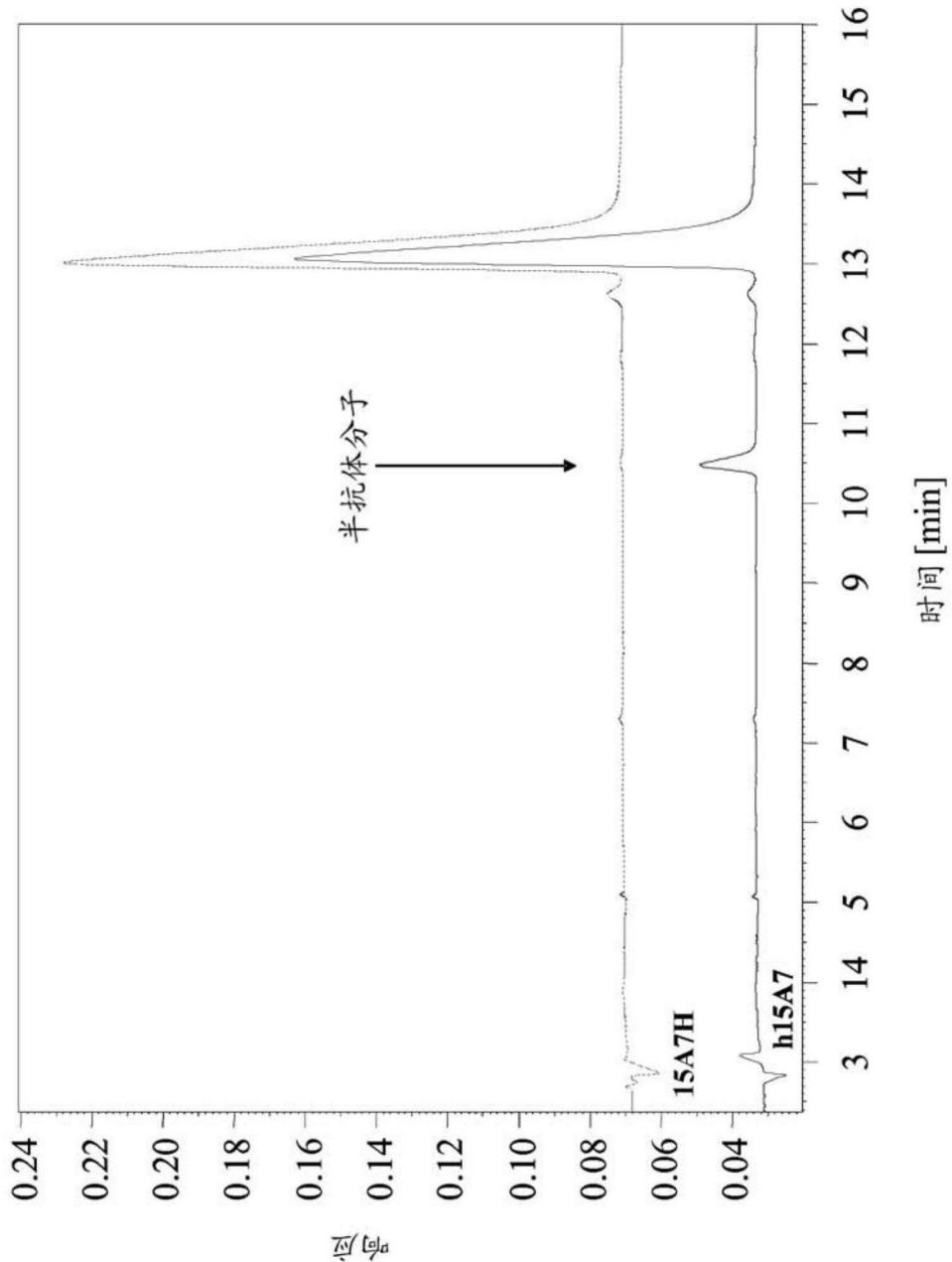


图1

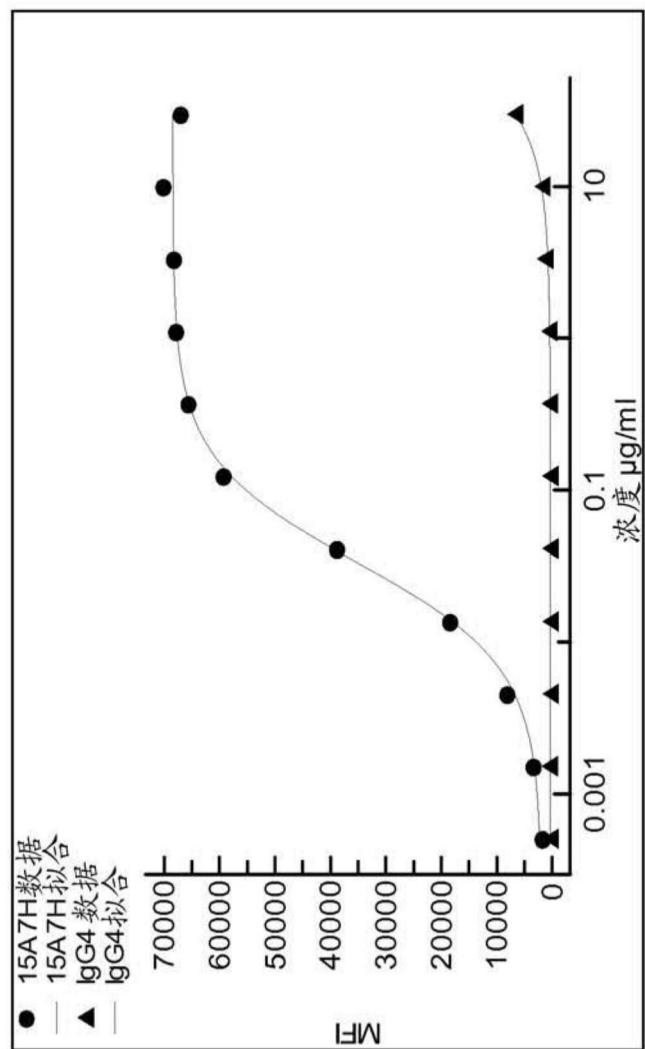


图2

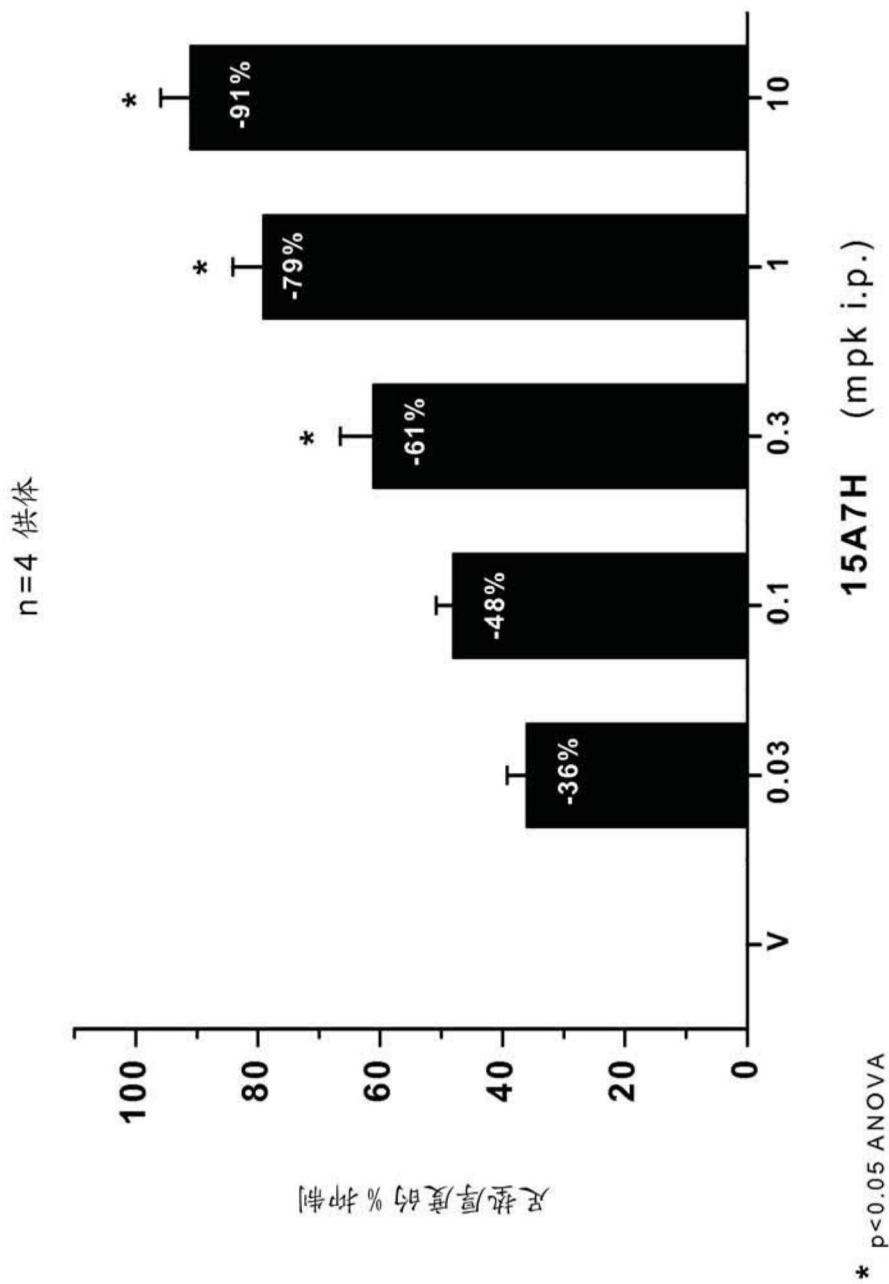


图3

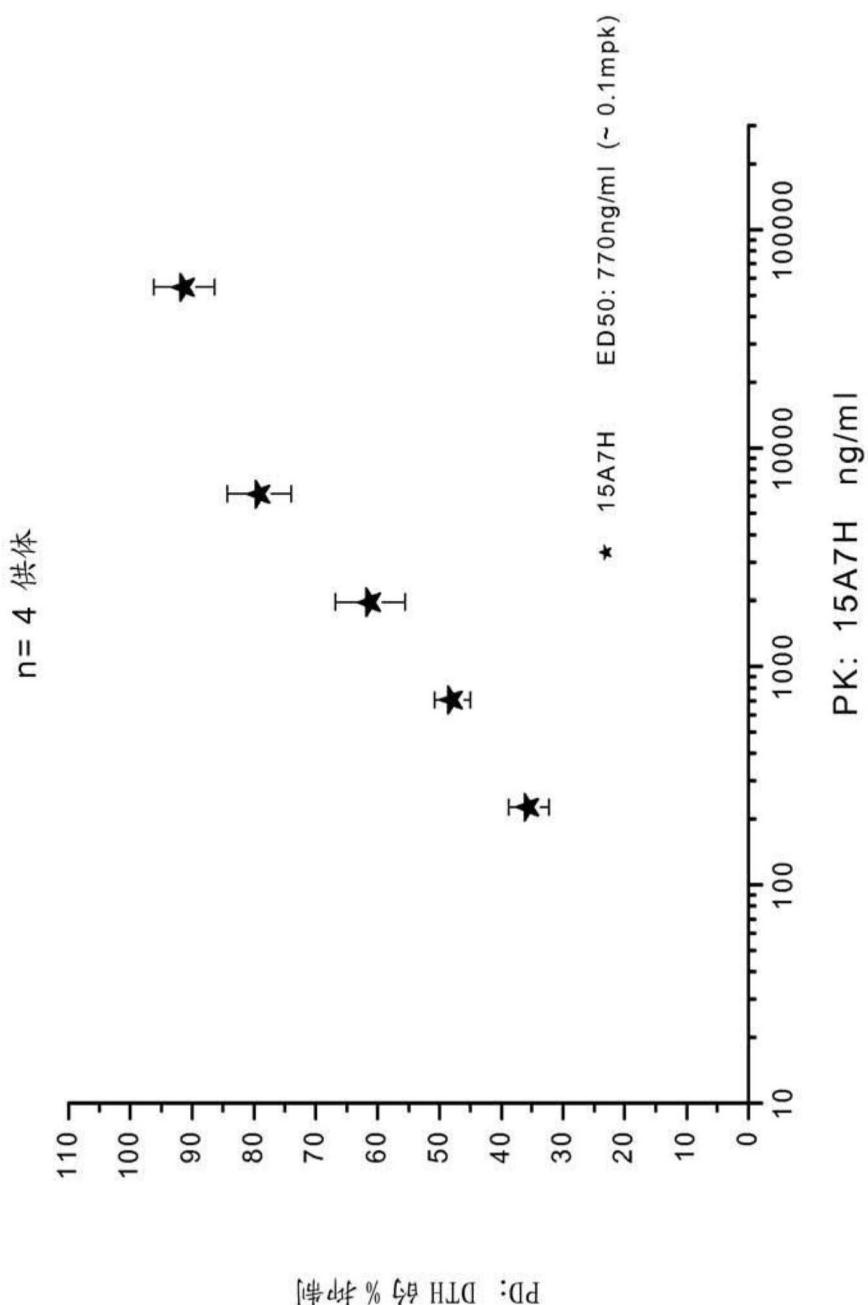


图4

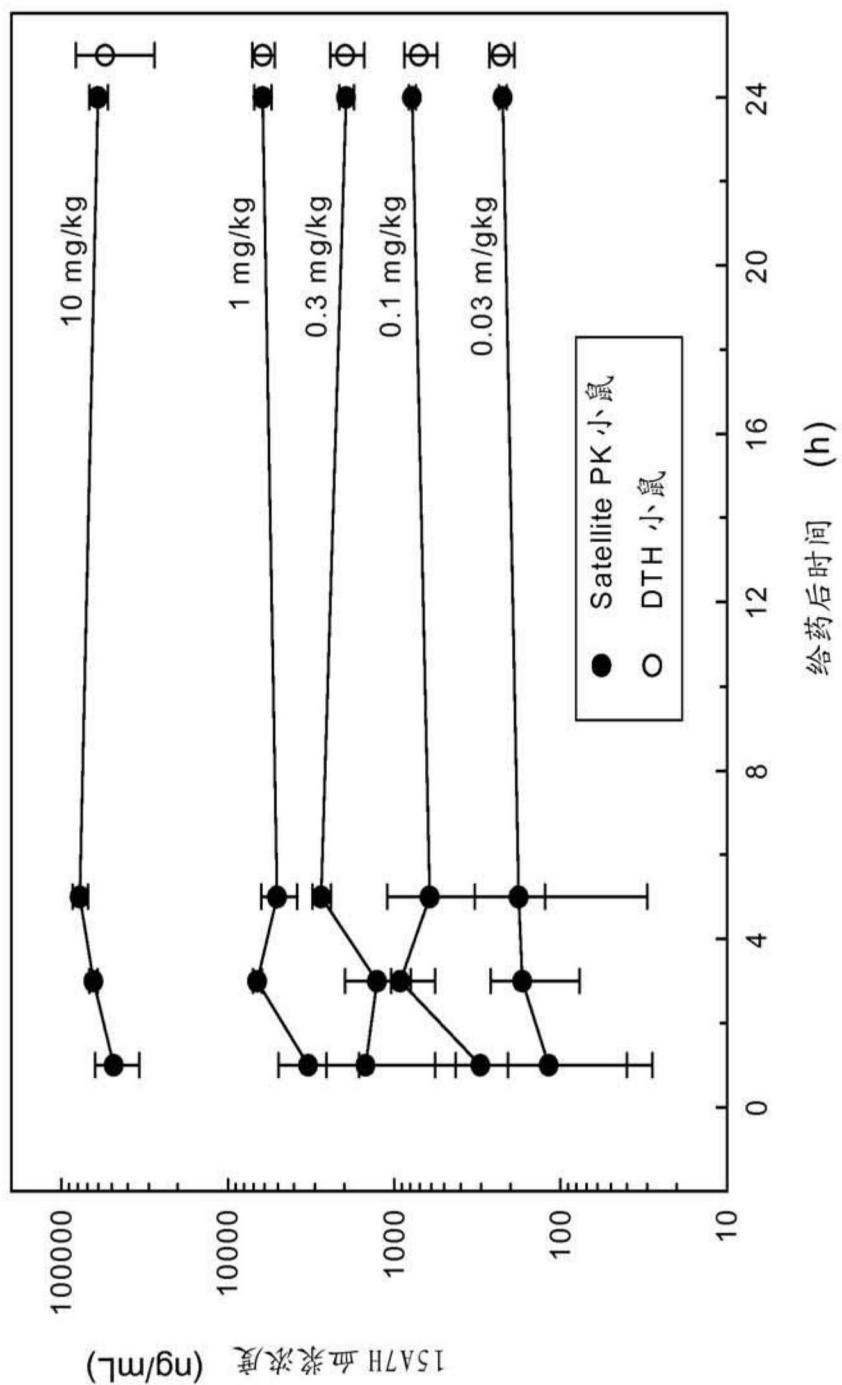


图5

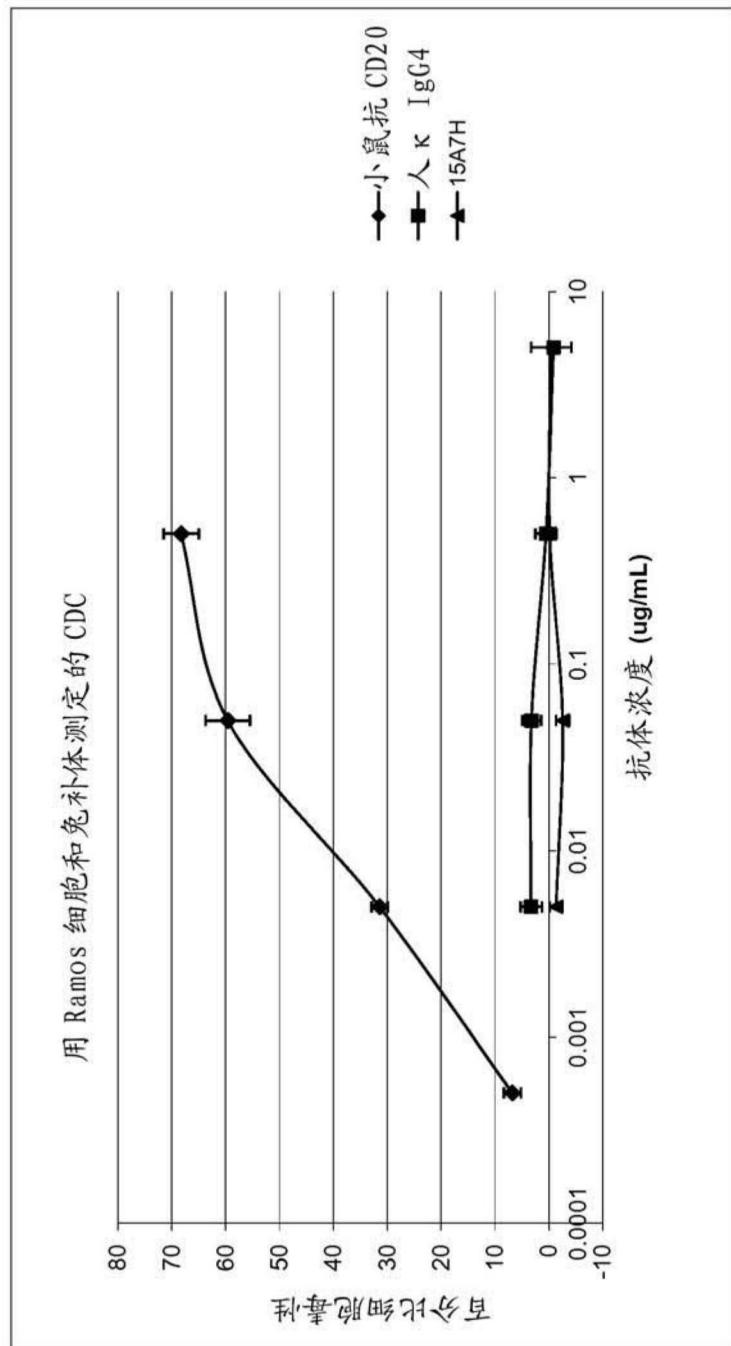


图6

A. 重链

1 { (可变区) FR1 CDR1 FR2
 1 **EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS** **SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY**
 CDR2 FR3
 51 **INGGSSTIFY ANAVKG** **RFTI SRDN** **AKNTLY LQMNSLRAED TAVYYC** **ARYA**
 CDR3 FR4 } {
 101 **YGGGAMDYW GQGTLVTVSS** ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK
 151 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGKT
 (铰链区)
 201 YTCNVDHKPS NTKVDKRV **ES KYGPPCPCPA** PEFLGGPSV FLFPPKPKDT
 (恒定区)
 251 LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
 301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 351 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD
 }
 401 DGSFFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

B. 轻链

1 { FR1 (可变区) CDR1 FR2
 1 **DIQMTQSPSS LSASVGDRV** **ITCRSSQSIV HNDGNTYFEW** **YQQKPGKAPK**
 CDR2 FR3 CDR3
 51 **LLIYKVSNRF SGVPSRFSGS GSGTHFTLTI SSLQPEDFAT YYC** **FQGSYVP**
 FR4 }
 101 **LTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK**
 (恒定区)
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTTLSKAD YEHKVYACE
 }
 201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

图7A-7B