

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99805606.5

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1326880C

[22] 申请日 1999.4.30 [21] 申请号 99805606.5

[30] 优先权

[32] 1998. 4. 30 [33] US [31] 60/083,575

[86] 国际申请 PCT/US1999/009466 1999. 4. 30

[87] 国际公布 WO1999/055735 英 1999. 11. 4

[85] 进入国家阶段日期 2000. 10. 30

[73] 专利权人 泰诺士公司

地址 美国德州休士顿史代拉路 10301 号

[72] 发明人 倪宝福 比尔·N·C·孙

舍西利·R·Y·孙

[56] 参考文献

US5581476A 1996. 12. 3

US5665863A 1997. 9. 9

US5362853A 1994. 11. 8

审查员 姜 涛

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 高存秀

权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 18 页

[54] 发明名称

G - CSF 受体兴奋剂抗体及其筛选方法

[57] 摘要

本发明涉及一种兴奋剂分子，其可特异性地结合人体 G - CSF 受体或与其相互作用，并将受体二聚化或活化与受体相关连的激酶磷酸化而刺激细胞增生和分化。此兴奋剂分子包括单克隆抗体，或片段，同源物或其类似物，或肽或有机化合物。公开了二种小鼠单克隆兴奋剂抗体的例子：mAb163 - 93 及 mAb174 - 74 - 11。

1.一种兴奋剂抗体或它的结合片段，其可特异性地与序列 ID 号：27 氨基酸残基之间的人粒细胞集落刺激因子受体结合或相互作用，使粒细胞集落刺激因子受体发生二聚化，或使粒细胞集落刺激因子受体相关激酶磷酸化活化，从而刺激细胞的增殖与分化。

2.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或其结合片段，其中所述的抗体刺激嗜中性粒细胞或其前体细胞的增殖与分化。

3.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或其结合片段，其中用以生成所述抗体的免疫原物质是天然的人粒细胞集落刺激因子，或者是人粒细胞集落刺激因子的取代、插入或缺失突变体，只要所生成的抗体能够与天然的人粒细胞集落刺激因子受体相结合即可。

4.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中所述的抗体为单克隆抗体。

5.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中所述的抗体为含有 F(ab)₂ 的片段。

6.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中所述的抗体为 mAb 163-93，由保藏于弗吉尼亚州马那赛斯、ATCC 保藏号为 HB 12699 的杂交瘤细胞株产生。

7.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中所述的抗体为 mAb 174-74-11，由保藏于弗吉尼亚州马那赛斯、ATCC 保藏号为 HB 12700 的杂交瘤细胞株产生。

8.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中所述的抗体与单克隆抗体 mAb 163-93 的相同抗原决定部分相结合。

9.根据权利要求 1 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中所述的抗体与单克隆抗体 mAb 174-74-11 的相同抗原决定部分相结合。

10.根据权利要求 8 所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，它的重链可变区域的互补决定区域包括至少下列一种氨基酸序列：CDR1：Asn Tyr Gly Met Asn，序列 ID 号：15，CDR2：Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gly Asp Phe Lys Gly，序列 ID 号：16，和 CDR3：Glu Gly Phe Tyr Gly Gly His Pro Gly Phe Asp Tyr，序列 ID 号：17，或者它的轻链可变区域的互补决定区域包括至少下列一种氨基酸序列：CDR1：Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala，序列 ID 号：18，CDR2：Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser，序列 ID 号：19，和 CDR3：Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr，序列 ID 号：20，或者重链可变区域的

互补决定区域和轻链可变区域的互补决定区域均包含至少与上述重链和轻链分别对应的一种氨基酸序列。

11.根据权利要求9所述的兴奋剂抗体或它的结合片段，其中的重链可变区域的互补决定区域包含至少以下一种氨基酸序列：CDR1: Ser Tyr Ala Met Ser, 序列ID号: 21, CDR2: Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gly Thr Leu Lys Gly, 序列ID号: 22 和 CDR3: Glu Ala Tyr Asn Asn Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr, 序列ID号: 23, 或者它的轻链可变区域的互补决定区域包含至少以下一种氨基酸序列：CDR1: Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Val His, 序列ID号: 24, CDR2: Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser, 序列ID号: 25, 和 CDR3: Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Phe Thr, 序列ID号: 26, 或者重链可变区域的互补决定区域和轻链可变区域的互补决定区域均包含至少与上述重链和轻链分别对应的一种氨基酸序列。

12.一种抗体，其含有 SEQ ID No. 15、16、17、18、19 和 20。

13.一种抗体，其含有 SEQ ID No. 21、22、23、24、25 和 26。

14.根据权利要求1至13的任一权利要求所述的兴奋剂抗体，其中所述的抗体可刺激人或小鼠表达粒细胞集落刺激因子受体的细胞增殖，这种增殖通过体外增殖试验来测定。

15.杂交瘤细胞株，其保藏于弗吉尼亚州马那赛斯、ATCC 保藏号为 HB 12699。

16.杂交瘤细胞株，其保藏于弗吉尼亚州马那赛斯、ATCC 保藏号为 HB 12700。

17.编码如权利要求1至13的任一权利要求所述的兴奋剂抗体或其结合片段的 DNA 序列。

18.包含权利要求17所述 DNA 序列的基因传递系统。

19.权利要求18所述的基因传递系统，包含至少一种编码序列ID号为15至26的任一种氨基酸的 DNA 序列。

20.权利要求19所述的基因传递系统，其中所述的基因传递系统包含一个病毒载体，一个质粒，或一个非载体传递系统。

21.权利要求1至13的任一权利要求所述的兴奋剂抗体在制备治疗嗜中性白血球减少症的药物组合物中的用途。

22.筛选具有粒细胞集落刺激因子兴奋剂活性的抗体的方法，该方法包括构建粒细胞集落刺激因子反应性细胞株和测量被检抗体刺激后细胞内酶的活性或荧光密度，该细胞株表达的报告基因在粒细胞集落刺激因子反应性启动子的控制下。

23.根据权利要求22所述的方法，其中的粒细胞集落刺激因子反应性细胞株为 NFS60。

24.根据权利要求22所述的方法，其中的报告基因为荧光素酶， β

一半乳糖苷酶，绿荧光蛋白，或二氢叶酸还原酶。

25.根据权利要求 22 至 24 任一项所述的方法，其中所述的测定方法用于结合比色测定系统，或者结合使用表达粒细胞集落刺激因子受体的细胞的摄取测定。

26.权利要求 25 所述的方法，其中的比色测定系统包含测定 3-(4, 5-二甲基噻唑-2 基)-2, 5-二苯基-四唑溴化物 (MTT) 的还原性。

27.权利要求 25 所述的方法，其中所述的受体结构包含粒细胞集落刺激因子受体的胞外功能区序列。

G-CSF 受体兴奋剂抗体及其筛选方法

发明背景

骨髓中血细胞生长，分裂及分化过程称为造血过程（Dexter, T. M. 及Spooneer, E., 细胞生物学年鉴, 3: 423, 1987）。有许多不同类型的血细胞属于可区别细胞谱系。各不同血细胞类型源自多能干细胞，其可进行自我更新，或生成祖先细胞而得分化成所有不同的成熟细胞型。活体内一般细胞有三种型式：红血球细胞，血小板及白血球细胞，大多数白血球细胞参与宿主免疫防御反应。

造血前体细胞的增生及分化由一个细胞因子家族调节，含集落刺激因子（CSFs）及白细胞介素（Arai, K-I., 等人, Annu. Rev. Biochem. 1990, 59: 783-836）。至少四种细胞因子涉及产生嗜中性白血球及巨噬细胞，即白细胞介素-3（IL-3），粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF），粒细胞集落刺激因子（G-CSF）及巨噬细胞刺激因子（M-CSF）。其中，G-CSF专一作用于限于嗜中性白血球粒细胞谱系的细胞（Demetri, G. D., and Griffin, J. D., Blood, 1991, 78: 2791-2808）。G-CSF于活体内的主要生物作用为从指定的祖先细胞增加嗜中性白血球的增生及分化（Cohen, A. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84: 2484-2488）。G-CSF也可促进成熟嗜中性白血球的迁移，存活及功能，包括增加吞噬细胞活性及抗微生物的杀伤性（Crawford, J., 等人, N. Engl. J. Med., 1991, 325: 164-170, Moore, M.A.S., Annu. Rev. Immunol. 1991, 9: 159）。此生理过程可作为关键性宿主防御系统的基础且可于活体内大规模发生。

市售重组人类G-CSF（Neupogen®，Amgen，Inc.）于活体内的半寿期仅为3.5小时，且应每日用药以维持临界值量的G-CSF以刺激嗜中性白血球的生成（Physician's Desk Reference，53rd，1999，532-537）。高剂量重组人类粒细胞集落刺激因子（“rhG-CSF”）疗法的主要副作用为骨疼痛，很可能是因注射后活体内rhG-CSF瞬时量过高；然而，此较不常发生于接受低剂量rhG-CSF的病人。

已研发各种方法以延长rhG-CSF的活体内半寿期，包括偶合以聚乙二醇（PEG）。然而，一个近来报导指出PEG偶合物较未修饰蛋白质活性为低，因偶合至蛋白质的PEG组域分子量与活体外活性有反关连。参见Bowen S.，等人，Exp. Hemat.，1999，27：425-432。此外，动物研究的数据指出rhG-CSF偶合以PEG可延长半寿期至1~3天，但不超过此。

与PEG偶合至rhG-CSF相反，单克隆抗体（“mAb”）的活体内半寿期约为2-3周，是视抗体同种型而定。预期单次注射入抗人体粒细胞集落刺激因子受体的兴奋剂抗体可提供粒细胞集落刺激因子样活性数周。因此，化疗及严重慢性嗜中性白血球减少症的病人将受益于此，因兴奋剂单克隆抗体的较长生物活性而降低到医院次数。此外，血液循环中兴奋剂抗体的持久水平可持续刺激嗜中性白血球祖先细胞的增生及分化，而表现较高潜力，造成低剂量用量且降低Neupogen®或其它rhG-CSF衍生物的副作用。

各种G-CSF作用是由经其2个分离结合位结合G-CSF至其受体，形成1：2配体 / 受体复合物而引发。此粒细胞集落刺激因子受体，在嗜中性粒细胞白血球的祖先细胞及在成熟的定形细胞上表达，是属于细胞因子/造血受体的超家族。虽然多数此家族成员，包括白细胞介素-2（IL-2）至白介素-7（IL-7）的白介素受体及GM-CSF，是由形成含 α ， β ，及有时甚至 γ 亚基的杂聚复合物而活化，粒细胞集落刺激因子受体蛋白质，由单链多肽组成，已知可由配体结合形成同二聚复合物（Fukunaga，R.，等人，J. Bio. Chem.，1990，265：14008）。

已知G-CSF受体的同二聚化为信号转导所必需（Wells，J. A.，and Vos，A. M.，Annu. Rev. Biochem.，1996，65：609）。G-CSF受体不含内

部蛋白激酶功能域，虽然酪氨酸激酶活性为转导粒细胞集落刺激因子信号所必需。由G-CSF诱导的受体同型二聚化导致的G-CSF受体活化信号可由非共价结合各种酪氨酸激酶来介导，如JAK1及JAK2 (Barge, R. M. Y., 等人, Blood, 1996, 87: 2148-2153), 随后磷酸化转录因子Stats如Stat3及Stat5 (Tian, S-S., 等人, Blood, 1994, 84: 1760-1764; Watowich, S. S., 等人, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 1996, 12: 91; Dong F., 等人, J. Immunol., 1998, 161: 6503-6509)。这些酪氨酸激酶为G-CSF受体磷酸化及与G-CSF反应的Stat活化所必需 (Tian S-S. 等人, blood, 1996, 88: 4435-4444; Shimoda, K., 等人, Blood, 1997, 90: 597-604)。

除了G-CSF受体，但红细胞生成素 ("EPO") 受体，生长激素 ("GH")，催乳素受体 ("PRL") 及血小板生成素 ("TPO") 也显示可由配体引发受体同二聚化，造成特定激酶磷酸化而触发 (Yousoufian, H., 等人 Blood, 1993, 81: 2223; Alexander, W. S., 等人, EMBO, 1995, 14: 5569; Heldin C.H., Cell, 1995, 83: 213)。因此，本发明公开的筛选方法，是用以筛选粒细胞集落刺激因子受体兴奋剂，它基于其引起经同型二聚体化的信号转导及携带受体的细胞的增生，该方法也可用以筛选针对其它受体的兴奋剂。

发明概要：

本发明是关于对粒细胞集落刺激因子受体及其它同二聚化细胞因子受体有反应力的兴奋剂分子，其是借结合至此受体或与其相互作用，起着与配体相同的生物学作用。本发明包括兴奋剂分子，其可结合2个细胞因子受体蛋白质或与其相互作用，更优选的是，与2个相同细胞因子受体蛋白质，如2个G-CSF受体蛋白质结合或相互作用。此兴奋剂分子含整个抗体分子，包括多克隆及单克隆抗体，及修饰或其衍生物，含免疫球蛋白片段如Fab, scFv及双价F(ab')₂，及可引起与天然G-CSF相同或类似兴奋剂效应的同源物或其类似物。此兴奋剂抗体及片段可源自动物，人-

小鼠嵌合体，人源化，去免疫化抗体或全部源自人。

在优选的实施方案中，G-CSF受体兴奋剂可刺激表达G-CSF受体的细胞生长及 / 或分化。其是由结合自G-CSF受体细胞外结构域，将G-CSF受体二聚化及 / 或将与G-CSF受体相关激酶活化磷酸化。此表达G-CSF受体的细胞一般含原始干细胞 / 造血祖先细胞，因此兴奋剂可促进原始造血细胞分化及 / 或增生导至嗜中性粒性白血球谱系的细胞再生。

本发明另一领域是关于筛选同二聚化细胞激素受体兴奋剂的方法，如G-CSF受体兴奋剂抗体，使用活体外细胞分析系统。如下述，将细胞转染以G-CSF受体，或G-CSF受体部份当结合兴奋剂后可被活化，细胞可于存在兴奋剂分子下监测其增生。

本发明也关于使用此兴奋剂，含兴奋剂抗体，用于诊断及治疗。此杂交瘤产生兴奋剂抗体命名为单克隆抗体mAb163-93及单克隆抗体mAb174-74-11，存于美国典型培养物保藏中心(ATCC)，10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209，保藏号码各为 HB12699 及 HB12700。此杂交瘤细胞株产生单克隆抗体，其有G-CSF受体兴奋剂活性，已存于ATCC且保藏号码为HB-12524。

附图的简要说明

图1A显示由MTT分析得知亲代鼠细胞32D-c123的增生可由重组小鼠IL-3激活，但不被重组人类G-CSF (R&D Biosystems) 激活。

图1B显示32D-c123用完整人类G-CSF受体转染，由MTT分析得知转染的D4细胞可分别被重组小鼠IL-3及重组人类G-CSF (R&D Biosystems) 激活。

图1C显示转染株D4细胞当生长于培养液含重组小鼠IL-3或重组人类G-CSF但不含对照单克隆抗体mAb时，对³H-胸腺嘧啶的吸收以浓度依赖形式增加。

图2显示以重组人类G-CSF引发完整长度人类G-CSF受体转染的D4细胞的JAK1激酶的酪氨酸磷酸化。相同JAK1激酶的酪氨酸磷酸化基至于存在

重组人类G-CSF (R&D Biosystems) 下, 仍无法在亲代细胞32D-c123测得。正对照组中, 人类G-CSF细胞AML-193 (ATCC, 保藏号码为CRL-9589) 其表达基本人类G-CSF受体, 也显示JAK1激酶的酪氨酸磷酸化可由重组人类G-CSF刺激而引发。IP: 免疫沉淀图中的抗体。印迹: 监测以HRP-偶合抗体。抗pTyr: 抗磷酸酪氨酸抗体4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)。

图3为由ELISA显示结合单克隆抗体mAb163-93至G-CSF受体/IgG4 (F_x) 嵌合体蛋白质。人类G-CSF受体/IgG4 (F_c) 被山羊抗人IgG (F_c) 抗体被覆于Immulon 2平板而捕捉。结合小鼠抗体mAb163-93至人类G-CSF受体/IgG4 (F_c) 嵌合体蛋白质可由结合山羊抗-鼠IgG (F_c) 抗体偶合以HRP而监测。

图4A显示单克隆抗体mAb163-93, 但非异形对照单克隆抗体mAb G3-519, 对完整人类G-CSF受体转染小鼠细胞D4的结合百分比, 由FACS分析知以浓度依赖形式增加。图4B显示单克隆抗体mAb163-93可专一结合至小鼠细胞D4表达完整人类G-CSF受体, 并不结合至亲代细胞32D-c123, 由细胞结合百分比所示。

图5A及5B显示人类G-CSF受体转染小鼠细胞D4的增生可由各种小鼠单克隆兴奋剂抗体激活, 含单克隆抗体mAb163-93及单克隆抗体mAb174-74-11, 其是由MTT分析测得。同种型匹配的单克隆抗体mAb G3-519抗HIV-gpt120及重组人类G-CSF (R&D Biosystems) 各为负及正对照。

图5C显示单克隆抗体, 含单克隆抗体mAb163-93及单克隆抗体mAb174-74-11, 可刺激人类G-CSF受体转染小鼠细胞D4的增生, 以³H-胸腺嘧啶嵌入量增加表示。

图6A及6B显示激酶JAK2 (图6A) 及转录因子 (图6B) 的酪氨酸磷酸化, 在人类G-CSF受体转染小鼠细胞D4刺激以细胞因子重组小鼠IL-3, 重组人类G-CSF, 及兴奋剂单克隆抗体mAb163-93。

图7A及7B显示由人类G-CSF生成的量分析: 图7A: 重组人类G-CSF及小鼠单克隆抗体mAb163-93 (对照单克隆抗体mAbG3-519为单克隆抗体mAb163-93同种型抗体) 及图7B: 其它小鼠兴奋剂单克隆抗体。

图8显示人类骨髓生成嗜中性粒性集落是刺激以：8A：单克隆抗体mAb G3-519的异形对照；8B：重组人类G-CSF（R&D Biosystems）；8C：兴奋剂单克隆抗体mAb163-93；8D：8C中集落当以细胞染色后的细胞外形。

图9显示小鼠单克隆抗体mAb163-93可以浓度依赖形式激活黑猩猩骨髓形成粒细胞集落。

图10显示黑猩猩骨髓生成嗜中性粒性集落是刺激以：10A：同种型单克隆抗体G3-519（浓度50微毫摩尔）；10B：重组人类G-CSF（R&D Biosystems）（浓度0.5微毫摩尔）；10C：兴奋剂单克隆抗体mAb163-93（浓度5微毫摩尔）；10D：C中集落当以细胞染色后的细胞外形。

图11显示抗人类G-CSF受体的兴奋剂单克隆抗体mAb163-93可刺激小鼠细胞NFS60表达内质小鼠G-CSF受体的增生。

所列序列的说明

SEQ ID号码1~6为各种引物用于克隆G-CSF受体。

SEQ ID号码7~14为各种引物用于克隆本发明二个兴奋剂抗体的变化区域。

SEQ ID号码15~26为本发明二个兴奋剂抗体的CDR的氨基酸序列（轻链及重链）。

SEQ ID号码27为人类G-CSF受体细胞外结构域的氨基酸序列。

制备本发明及其用途

1. 制备本发明兴奋剂

此处所述G-CSF受体兴奋剂宜为G-CSF受体于细胞外结构域的标的表位。兴奋剂例子含由杂交瘤细胞株163-93及174-74-11产生的单克隆抗体。

本发明单克隆兴奋剂抗体可由免疫化及融合产生（参见下文实施例4），或由单离淋巴瘤细胞使用EBV转形，或由人类G-CSF受体转染昆虫或

动物细胞。兴奋剂抗体宜为嵌合体，去免疫化抗体，人源化或人类抗体以临床用途。此抗体可降低免疫性而避免人抗小鼠（HAMA）抗体反应。宜为抗体IgG4，IgG2或其它基因突变IgG或IgM，其不扩大抗体依赖细胞毒性（S. M. Canfield及S. L. Morrison, J. Exp. Med., 1991: 173: 1483-1491）及补体活化细胞分解（Y. Xu等人, J. Biol. Chem., 1994: 269: 3468-3474；V. L. Pulito等人, J. Immunol., 1996; 156: 2840-2850）。

嵌合抗体可由熟知的重组DNA方法产生，且有动物变化区域及人共同区域。人抗体较嵌合体抗体具有较高程度的人肽序列。在人抗体中，仅补体决定区域（CDRs），其负责抗原结合及专一性，源自动物及含氨基酸序列相对于动物抗体，及几近所有分子剩余部份（除某些例子中，在变化区域主干的小部份）源自人及相对于人抗体的氨基酸序列。参见L. Riechmann等人, Nature, 1988; 332: 323-327; G. Winter, 美国专利号5, 225, 539; C. Queen等人, 美国专利号5, 530, 101。

去免疫化抗体为抗体其中已除去T及B细胞的表位，如世界专利申请书PCT/GB98/01473所述。其当投予活体内时并无或免疫性显著降低。

人抗体可由数法制得，含使用人免疫球蛋白表达文库（Stratagene Corp., La Jolla, California）产生人抗体的片段（ V_H , V_L , F_v , F_d , Fab , 或 $F(ab')_2$ ），及使用此片段以构建完整人抗体，是使用似产生嵌合抗体的技术。也可由转基因小鼠与人免疫球蛋白染色体产生人抗体。此小鼠可得自Abgenix, Inc., Fremont, California, 及Medarex, Inc., Annandale, New Jersey。

所有完整及部份人抗体的免疫性较完整鼠类单克隆抗体mAbs低。双价片段（也用于本发明）免疫性也较低。因此所有此型抗体较不会引发人的免疫反应。同时，其较完整动物抗体更适于活体内投予至人，尤以需重复或长期投予者，也在本发明兴奋剂抗体所预期。

另一投予抗体至病人为由基因疗法产生本质兴奋剂抗体。DNA序列编码兴奋剂抗体，其片段，衍生物或其类似物可由活体内以基因疗法传递，含腺病毒，AAV或反转录病毒，或非载体传递系统。表达兴奋剂抗体，其片段，衍生物或其类似物可有额外优点用于临床治疗慢性嗜中性白血

球减少症。

此处兴奋剂分子也含小分子，如肽或有机化合物其可专一结合或反应与G-CSF受体，造成其二聚化及活化。此小分子也显示较低免疫性。

人类G-CSF受体的细胞外结构域(本发明中用以产生抗体抗人类G-CSF受体)可使用熟知的分子重组DNA方法产生。细胞外结构域于成熟人类G-CSF受体中，由N端的1-603氨基酸基(SEQ ID号码:27)。参见美国专利号5,589,456; 5,422,248; 5,574,136。然而，也可使用纯化或部份纯化形式的人类G-CSF受体细胞外结构域为免疫原。

人类G-CSF受体的细胞外结构域可直接作为免疫原以免疫动物(如小鼠)，或可先融合以载体分子以于免疫前增加其免疫性。适当载体分子含肽，如Tag, Flag, 白胺酸-拉链，或蛋白质如麸胱甘肽-S-转移酶(GST)，碱性磷酸酶(AP)，或免疫球蛋白的共同区域(如下用以制备兴奋剂抗体)。载体分子可由重组DNA方法偶合至G-CSF。除了增强免疫性，此嵌合体蛋白质含G-CSF受体的细胞外结构域也可助于纯化抗原，其中使用亲和层析。此DNA片段编码此抗原含此G-CSF受体的细胞外结构域可置于表达载体，其可转染至寄主细胞，如E. coli, 酵母菌，昆虫细胞，及动物细胞，含COS细胞，中国田鼠子宫(CHO)细胞或黑瘤细胞。此法产生抗原可由通常方法纯化。

适当免疫原含天然或野生型G-CSF受体的细胞外结构域，含取代，删除或嵌入，由人工或天然产生。细胞表达G-CSF受体或其类似物也可作为免疫原。此细胞含原人类细胞及细胞株如AML-193，人类或小鼠细胞(或任意昆虫细胞使用baculovirus为表达载体)转染以载体以表达完整或部份G-CSF受体，或嵌合体蛋白质含G-CSF受体的细胞外结构域(Takhashi, T., 等人, J. Biol. Chem. 1996, 271: 17555-17560)。

为产生兴奋剂抗体抗G-CSF受体(多株或单株)，可使用此处的抗原以致免疫啮齿类动物(例如老鼠，白鼠，黄金鼠及天竺鼠)或其它动物，例如兔子，山羊，绵羊，非人的灵长类，或基因转形小鼠表达人免疫球蛋白及移植以人的B淋巴细胞或人骨髓至严重结合免疫不足(SCID)小鼠，是由常用方法达到。杂交瘤可由常用方法由融合已免疫动物的B淋巴

细胞以黑瘤细胞而得（例如Sp2/0及NS0），如G. Kohler及C. Milstein（Nature, 1975: 256: 495-497）所述。抗G-CSF受体的抗体也可由噬菌体表达系统，由筛选人B淋巴细胞或人骨髓的重组单链Fv或Fab文库而得（Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 1991, 227: 381; Marks等人, J. Mol. Biol., 1991, 222: 581）。

筛选G-CSF受体的专一抗体可由常用ELISA方法进行，如直接及间接夹心分析，其中将抗原，或优选为G-CSF受体/IgG4（Fc）嵌合体蛋白质，直接或间接被覆于平板。由酵素标记免疫吸附法ELISA测得单克隆抗体mAb163-93与嵌合体蛋白质的结合示于图3。使用竞争酵素标记免疫吸附法ELISA以监测抗体其表位与配体相近或重叠（Current protocols in molecular biology, ed. Ausubel, F. M. 等人, published by Wiley Interscience, 1996）。

在竞争性ELISA中当G-CSF受体/IgG4（Fc）嵌合体蛋白质直接或间接被覆于ELISA平板后，可使用重组人类G-CSF（R&D Biosystems, Minneapolis, NAN）。抗体与G-CSF受体的结合可由加入二次抗小鼠抗体，如羊抗-小鼠抗体而监测。此二次抗小鼠抗体可偶合以各种化合物及蛋白质以监测，含辣根过氧酶。

抗体与表达于细胞表面的人类G-CSF受体的结合专一性，如下文转染小鼠细胞D4，可由FACS分析测得（实施例6）。如图4A所述，小鼠单克隆抗体mAb 163-93可特异性地结合至小鼠转染细胞D4表达人类G-CSF受体，但对照单克隆抗体mAb无法结合。此外，单克隆抗体mAb 163-93可特异性地结合至D4细胞表达人类G-CSF受体，但无法结合至其亲代细胞32D-c123（图4B）。

由活体外细胞生物功能分析的G-CSF受体兴奋剂筛选方法也在本发明范围内。大量筛选兴奋剂中，含构建G-CSF-反应细胞株如NFS60，其中构建片夹以表达报导基因并由所嵌入G-CSF-反应基因促进子所控制（Schindler, C. 及Darnell, J. E., Annu. Rev. Biochem., 1995, 64: 621）。此处所用报导基因可为发光酶，或 β -半乳糖酶，绿荧光蛋白质或二氢叶酸还原酶（Pelletier, J. N., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

，1998，95：4290）。由测量刺激后细胞中酶活性或荧光强度，G-CSF受体的兴奋剂可由高速筛选而选出。

兴奋剂的活体外细胞生物功能分析，含兴奋剂抗体，也含活体外细胞增生分析。本发明优选实施例之一中，构建小鼠细胞株D4表达完整人类G-CSF受体以大量筛选兴奋剂抗体，其结合以MTT的比色分析。使用MTT的比色分析系是设计以光学定量细胞因应细胞因子及其兴奋剂的生长，而不需使用放射线同位素。亲代小鼠细胞株，如BaF₃及FDC-P1，或最好为本发明实施例7的32D-c123，为小鼠白介素-3小鼠IL-3依赖及适当宿主细胞以表达完整人类G-CSF受体（Hapel, A. J., 等人, Blood, 1984, 64：786-790）。当转染以载体其中完整人类G-CSF受体的表达是于持续人类CMV促进子所控制，筛选后，转染株，如D4，也成为可因应以G-CSF，是由MTT的比色分析及³H-胸腺嘧啶的吸收测定，如下文实施例7所述，并示于图1。

小鼠转染细胞株D4中酪氨酸激酶JAK1的磷酸化可由重组人类G-CSF（R&D Biosystems）引发，形式同于人类细胞株AML-193）表达本质人类G-CSF受体（图2）。如实施例7所述，使用人类G-CSF受体转染小鼠细胞株D4结合以MTT分析可大大地促进兴奋剂的筛选过程，尤为兴奋剂抗体。也可使用此筛选方法于天然G-CSF-依赖人类细胞株，如AML-193，小鼠细胞株表达人类G-CSF受体突变株，或嵌合体蛋白质含人类G-CSF受体的细胞外结构域融合以另一细胞因子受体的细胞外结构域，如促红细胞生成素受体（Goldsmith, M. A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95：7006-7011）或Fas受体（Takahashi, T. 等人, J. Biol Chem., 1996，271：17555-17560）。

也可使用人类骨髓的粒细胞集落形成分析以筛选本发明的兴奋剂抗体。此外，也可使用此分析以测定兴奋剂抗体于刺激人类骨髓增生及分化嗜中性粒性白血球的强度，有效性及专一性，及其与非人灵长类的相互反应力。此分析结果显示本发明的兴奋剂抗体可作为重组人类G-CSF，并可以浓度依赖方式专一地刺激人类骨髓增生及分化嗜中性粒性白血球。此外，此分析显示兴奋剂单克隆抗体mAb163-93有效性与重组人类G-CSF

(图7)相同。此外,由兴奋剂单克隆抗体刺激人类骨髓所得集落的细胞显示典型嗜中性白血球外形(图8D)。需知注射后,重组人类G-CSF会快速地由活体循环系清除,主要经由肾,造成短期药效应(Tanaka, H., 等人, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989, 251: 1198-1203; Layton, J. E., 等人, Blood, 1989, 74: 1303-1307)。反之,本发明的粒细胞集落形成分析,重组人类G-CSF表现实质活性以自人类骨髓激活嗜中性白血球的增生及分化,因无活体内的清除机制。可预期兴奋剂抗体mAb163-93,因其活体内半寿期长,而刺激嗜中性白血球的增生及分化潜力将与重组人类G-CSF相当或更高,其为比较长半寿期的PEG化的人类生长激素及人类生长激素得知(Clark, R., 等人, J. Bio. Chem., 1996, 271: 21969-21977)。

使用上述筛选技术,制备单克隆兴奋剂抗体,含单克隆抗体mAb163-93及单克隆抗体mAb174-74-11,以抗人类G-CSF受体。兴奋剂抗体mAb163-93作用如重组人类G-CSF,活化G-CSF受体,含酪氨酸激酶JAK1的磷酸化(图6A,左方,其中磷酸化以抗pTyr抗体测得)及转录因子(图6B,左方,其中磷酸化以抗pTyr抗体测得)。本发明数个兴奋剂抗体于此图抗体中显示可于活体外刺激G-CSF因应细胞的增生(图5A-C)。单克隆抗体mAb163-93显示可特异性地结合至G-CSF受体于细胞表面(图4A及4B)。此外,人类G-CSF受体兴奋剂抗体可特异性地刺激人类骨髓形成嗜中性粒性白血球集落,又再度显示其活体内有效性(Figs. 7A, 7B及8A-C)。此为第一个单克隆抗体可由人类骨髓刺激嗜中性粒性白血球集落的形成。

人类G-CSF受体兴奋剂抗体的种间交叉活性也可使用粒细胞集落形成分析测定。人类G-CSF受体兴奋剂抗体,如单克隆抗体mAb163-93,可特异性地由非人灵长类骨髓刺激不同程度嗜中性粒性白血球的增生及分化(下表1)。于黑猩猩骨髓由兴奋剂单克隆抗体mAb163-93刺激粒细胞集落形成是以浓度-依赖方式增加(图9)。细胞染色结果显示此兴奋剂单克隆抗体可特异性地由黑猩猩骨髓刺激嗜中性白血球的增生及分化(图10)。也可使用此种间交叉活性分析以选择适当动物模型于临床前研究。

表1. 由非人灵长类骨髓刺激嗜中性粒性白血球集落形成

非人灵长类	重组人类G-CSF (0.5微毫摩尔)	mAb163-93
黑猩猩	68	62 (5微毫摩尔)
恒河猴	43	41 (50微毫摩尔)
Cynomolgus猴	70	40 (50微毫摩尔)
狒狒	36	3 (50微毫摩尔)

上文阐明双价兴奋剂抗体可活化G-CSF受体，即可交叉连结G-CSF受体以模拟G-CSF形成复合物能力并活化受体。此外，如下所示，抗体的单价部份如scFv及Fab，其仅结合至一个受体分子，也作为拮抗剂以与G-CSF竞争。

2. 使用本发明兴奋剂

重组人类G-CSF为第一个由重组DNA技术制得的细胞因子且成功地用于治疗用途。已广泛使用此细胞因子以降低中介以各种先天及医原的感染。至今，美国FDA已通过5种疾病以重组人类G-CSF治疗：（1）癌症病人进行骨髓抑制化疗；（2）病人具急性骨髓白血病引发或坚实化疗；（3）癌症病人进行骨髓移植；（4）癌症病人进行周围血祖先细胞收集及治疗；及（5）病人具慢性嗜中性白血球减少症（Physician's Desk Reference, 53rd edition, 1999, 532-537）。重组人类G-CSF于嗜中性粒性白血球源增生及分化的独特功能专一性也使其可用于其它疾病，含HIV病人，病人具系统发炎反应症（SIRS）及败血病，及病人具糖尿病性脚感染及其它感染疾病（Miles, S. A., 等人, Blood 1990, 75: 2137-2142; Kuritzkes, D. R., 等人, AIDS 1998, 12: 65-74; Weiss, M. 等人, Blood 1999, 93: 425-439; Lancet 1997, 350: 855-859; Deresinski, S. C., 等人, Infect. Med. 1998, 15: 856-70）。

此处公开的人类G-CSF受体兴奋剂及抗体可作为重组人类G-CSF，经由引起JAK1激酶及转录因子的酪氨酸磷酸化机制而专一结合至细胞表面

G-CSF受体，因而活化G-CSF受体及其增生。此外，人类G-CSF受体兴奋剂抗体可如重组人类G-CSF，可特异性地自人类骨髓激活嗜中性白血球集落的增生及分化。因此此处公开人类G-CSF受体兴奋剂及抗体预期可用于所有与重组人类G-CSF相同的治疗应用。此外，兴奋剂抗体较长内半寿期及活体内稳定度提供优于重组人类G-CSF治疗的潜力。

本发明兴奋剂及兴奋剂抗体可由适当制药处方以各种途径投予，含肌肉内，腹膜内及皮下注射，但不限于此。剂量可由动物模型及临床试验而定。

本发明兴奋剂及兴奋剂抗体可用以由重组细胞或天然来源亲合纯化G-CSF受体。可使用任何常用亲合性纯化技术。

本发明抗体可免疫反应与G-CSF受体及细胞表达G-CSF受体表面的水溶性细胞外结构域。因此，本发明也提供使用常用免疫方法，免疫监测及测定水溶性及/或细胞表面G-CSF受体的方法。此外，兴奋剂抗体单价片段如Fab及scFv，及其衍生物可作为拮抗剂以预防G-CSF竞争反应与G-CSF受体，因而抑制G-CSF生物功能，其可用于治疗特定肿瘤及癌症。正常，异常或突变受体结构或受体表达也可使用此处公开的抗体，经由免疫活性研究测定。此结果可用于诊断及治疗目的。

实施例1. 克隆人类G-CSF受体蛋白质的细胞外部份：

克隆G-CSF受体蛋白质如下示。使用1微毫克人类骨髓cDNA(Clontech, Palo Alto, CA)为PCR模板。总反应体积为100微升，含引物：AAG TGG TGC TAT GGC AAG GCT G (SEQ ID号码：1)；及CAC TCC AGC TGT GCC CAG GTC TT (SEQ ID 号码：2)，终浓度为500微毫摩尔。已知此引物与编码人类G-CSF受体细胞外部份的cDNA5'及3'端有同源性。反应条件如下：1分于94℃；30秒于62℃；3分于72℃；重复40次。

依BI0101 (Vista, CA)方法，自琼脂胶分离PCR的DNA片段(约1.6 kb)，嵌入TA克隆载体(Invitrogen, Carlsbad, CA)，得重组质粒pT1-11。嵌入DNA序列可使用测序组购自United States Biochemical (Cleveland, Ohio)测定二端序列。将含编码人类G-CSF受体细胞外部份的DNA片段

(使用由Fukunaga, R. 等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 1990, 87: 8702定义的序列)的pT1-11切割以EcoRI, 终端以Klenow片段填入。嵌入至质粒pFc1含IgG4(Fc)编码cDNA, 其已切割以XbaI。将终端以Klenow片段填入, 得质粒pFT1-9。将DNA片段编码人类G-CSF受体细胞外部份及IgG4 (Fc) 于pFT1-9切割以AseI及HincII, 填入以Klenow片段, 再嵌入动物表达载体pcDNA3 (Invitrogen)。将此载体切割以EcoRV及HincII, 填入以Klenow片段, 可得质粒pCGC23, 其中人类G-CSF受体/IgG4 (Fc) 细胞外部份的表达是由人类CMV促进子控制。

实施例2. 表达人类G-CSF受体/IgG4 (Fc) 嵌合体蛋白质的细胞外部份于动物细胞:

将NS0细胞依下文转染以线形pCGC23。收集 4×10^7 对数生长期NS0细胞并悬浮于0.8毫升IMDM培养液补充以2% FBS。于冰上培养以10微克线形质粒DNA 10分钟后, 将细胞液使用BioRad apparatus电击于200伏特及960 μ F。于冰上培养20分钟后, 将100微升稀释细胞液加至约20个96井平板的各井中。2天后, 加入相同IMDM培养液且含G418 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 100微升至各井中得终浓度G418为0.8毫克/毫升。10天后, 取出培养上清液, 由如下ELISA筛选表达人类G-CSF受体/IgG4 (Fc) 细胞外部份的嵌合蛋白质。

将Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) 微测试平板的井被覆以50微升抗人IgG (Fc) 抗体(1微克/毫升), 于室温下过夜。拍打平板除去被覆溶液后, 于室温下加入200微升的BLOTTO (5%无脂奶粉于PBS) 至各井以封闭非专一性位。1小时后, 将井清洗以缓冲液PBST (PBS含0.05% Tween 20)。收集50毫升各井的培养上清液, 混与50微升BLOTTO, 再加至微测试平板各井中。于室温下培养1小时后, 将井清洗以PBST。已结合人类G-CSF受体/IgG4 (Fc) 嵌合蛋白质细胞外部份可由与辣根过氧酶 (HRP) 偶合以羊抗人IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) 反应, 稀释以1: 2000 BLOTTO而测得。过氧酶受质溶液含0.1%的3, 3', 5, 5' 四甲基联苯胺 (Sigma, St. Louis

, MO) 及0.0003%过氧化氢(sigma)至各井中以比色30分。加入50微升的0.2M H₂SO₄至各井中以中止反应。使用BioTek 酵素标记免疫吸附法ELISA计数器(BioTek Instruments, Winooski, VM)读取反应液OD₄₅₀₋₅₇₀。

收集转染株具高OD₄₅₀₋₅₇₀读值, 使用限制稀释方法作单细胞克隆。同样以上述ELISA再筛选高产生细胞株表达嵌合蛋白质含人类G-CSF受体及IgG4 (Fc) 细胞外部份。

实施例3: 纯化人类G-CSF受体/IgG4 (Fc) 细胞外部份的嵌合蛋白质

收集1升转染株表达人类G-CSF受体/IgG4 (Fc) 细胞外部份的嵌合蛋白质的上清液, 由Prosep-A亲和性层析并依厂商说明(Bioprocessing Inc. Princeton, NJ) 自上清液纯化嵌合蛋白质。再以羊抗人IgG (Fc) 亲和柱纯化蛋白质。以SDS-PAGE及免疫方法测定此嵌合蛋白质的纯度。

实施例4: 制备杂交瘤

将BALB/c小鼠(Harlan, Houston, TX), 皮下注射以50微克纯化融合蛋白质含人类G-CSF受体及IgG4 (Fc) 细胞外部份于完全Freund氏佐剂(Difco Laboratories, Detroit, MI) 及200微升磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH7.4)。2周及4周后各再注射以相同融合蛋白质于不完全Freund氏佐剂。2周后及杀死前3天, 将小鼠再由腹膜内注射相同融合蛋白质。将脾细胞融合以Sp2/0黑瘤细胞。将5 x 10⁸的Sp2/0及5 x 10⁸脾细胞融合于培养液含50%聚乙二醇(MW 1450)(Kodak, Rochester, NY) 及5%二甲亚砜(Sigma St. Louis, MO)。将细胞调至5 x 10⁴脾细胞/200微升悬浮液于Iscove培养液(Gibco, BRL, Gaithersburg, MD), 补充以5%FBS, 100单位/毫升青霉素, 100微克/毫升链霉素, 0.1毫摩尔次黄嘌呤, 0.4毫摩尔氨基喋呤, 及16毫摩尔胸腺嘧啶。将200毫升细胞悬浮液加至约100个微培养平板井中。约10天后取出培养上清液, 以实施例7所述活体外细胞增生分析筛选。

实施例5: 克隆cDNA编码完整人类G-CSF受体:

将全RNA自人细胞株AML-193 (ATCC 保藏号CRL-9598) 分离, 由Ultraspec-3 RNA分离试剂盒并按厂商说明书施行(Biotex Laboratories Inc., Houston, TX)。使用10微克来自人细胞株AML-193的全RNA为模板, 依厂商说明书(Gibco, BRL, Gaithersburg, MD)于反转录合成第一股cDNA。为扩增cDNA编码人类G-CSF受体的C端, 于50微升反应液含2个引物进行PCR: Nhe1: CCC CCC CAG CGC TAG CAA TAG CAA CAA GAC CTG GAG G (SEQ ID 号码: 3); 及R10: GGA ATT CCT AGA AGC TCC CCA GCG CCT CC (SEQ ID 号码: 4), 使用所得第一链cDNA为模板。反应条件如下: 94℃下1分钟; 60℃下1分钟; 及72℃下3分钟; 重复40次。将PCR产物克隆至克隆载体pUC19切割以SmaI得质粒pC3。为制造新酶切位点Nhe1于cDNA片段编码人类G-CSF受体的N端, 以2个引物进行PCR并使用质粒pCGC23 DNA为模板。引物为T7P: AAT ACG ACT CAC TAT AG (SEQ ID 号码: 5); 及Nhe2: AGG TCT TGT TGC TAT TGC TAG CGC TGG GGG GGC CCA GG (SEQ ID 号码: 6)。将PCR所得DNA片段, 其编码人类G-CSF受体的N端, 克隆至载体pCR-Blunt (Invitrogen, carlsbad, CA), 得质粒pB12。为得完整人类G-CSF受体, 将质粒pB12 G-CSF受体的N端DNA片段, 嵌入至质粒pC3切割以Nhe1及HincII, 得质粒pCB1。质粒cDNA片段编码完整人类G-CSF受体嵌入动物表达载体pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 得质粒pCGF4。

实施例6: 建立并鉴定G-CSF依赖性小鼠及人类细胞株

将人类完整G-CSF受体表达质粒pCGF4, 先切割以BspC1线性化, 以如实施例2所述电击转染至小鼠细胞株32D-c123, 或人类细胞株TF-1 (ATCC, VA)。将转染株筛选生长于RPMI 1640补充以10%FBS, G418 (0.8毫克/毫升) 及小鼠IL-3 (1微毫克/毫升), 或人类GM-CSF (1微毫克/毫升) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 再以如实施例7所述MTT分析使用RPMI 1640补充以10%FBS, G418 (0.6毫克/毫升) 及重组人类G-CSF (1微毫克/毫升) (R&D Systems) 筛选。转染株其生长可由人类G-CSF刺激者可再以限制稀释法作单细胞克隆。

人及小鼠转染株, 其含人类完整G-CSF受体表达质粒, 其增生依赖人

类G-CSF，是以如实施例7所述由生长此转染株于存在或无人类G-CSF，人类GM-CSF或小鼠IL-3下测定。转染株增生依赖此细胞因子是以如实施例7所述使用MTT分析及³H-胸腺嘧啶的吸收测定。

转染株表达人类G-CSF受体于细胞膜表面是由FACS分析确定。清洗以PBS含1%BSA，将纯化单克隆抗体加至转染细胞且终浓度为5微克/毫升。将细胞液培养以冰上30分并每15分摇晃。清洗以冷PBS3次，加入羊抗小鼠IgG[F(ab')₂]偶合以FITC以1:50稀释至转染细胞并培养以冰上30分钟。用冷PBS清洗3次，将细胞固定以1%三聚甲醛过夜。将转染细胞与单克隆抗体的结合百分比以FACS分析。

实施例7. 活体外细胞增生分析:

使用基于MTT的比色分析 (te Boekhorst P. A., 等人, Leukemia 1993, 7: 1637-44) 以筛选, 并测定兴奋剂抗体刺激人类G-CSF受体转染小鼠或人类细胞株的增生能力。将转染细胞预生长于RPMI培养液含10% FBS及1微毫克/毫升的小鼠IL-3, 清洗以RPMI 含10% FBS 3次除去小鼠IL-3, 以 $2-5 \times 10^4$ /井种于RPMI含10% FBS。将得自杂交瘤平板或纯化抗体的上清液加至各井。培养3天后, 加入10微升MTT (2.5 毫克/毫升于PBS, Boehringer-Mainiheim Biochemical) 至各井。培养6小时后, 加入100微升溶液含10% SDS及0.01 N HCl至裂解细胞, 将平板培养过夜。G-CSF依赖细胞激活以兴奋剂抗体的增生可由OD₅₄₀₋₆₉₀读值测得。于MTT分析中为测得纯化抗体的兴奋剂活性, 将重组人类G-CSF及抗体以2倍系列稀释并作2次或3次重复。

此兴奋剂抗体刺激人类G-CSF受体转染细胞的能力可使用³H-胸腺嘧啶的吸收测得。清洗以无细胞因子培养液含10% FBS 3次后, 将 $1-2 \times 10^4$ 转染细胞 (50微升/井) 混以各种浓度的小鼠IL-3, 重组人类G-CSF (R&D Biosystems), 杂交瘤培养上清液或纯化抗体于96-井平板含RPMI 1640及10%渗析FBS。将1 μ Ci的³H-胸腺嘧啶 (专一活性: 6.7Ci/毫摩尔, New England Nuclear) 混以50微升相同培养液, 并加至各井。培养48小时后, 由细胞收集机收集细胞 (Skatron, VA), 以液体放射分析计 (Packard

, IL) 分析³H-胸腺嘧啶的吸收并作3次重复。

实施例8. 纯人类G-CSF受体兴奋剂单克隆抗体:

将得自杂交瘤的抗体由Prosep-A亲和性层析并依厂商说明 (Bioprocessing Inc. Princeton, NJ) 纯化。以SDS-PAGE及免疫方法测定此人类G-CSF受体兴奋剂抗体的纯度。纯化2种单克隆抗体各命名为mAb163-93及mAb174-74-11。

实施例9. 骨髓集落形成分析:

自健康自愿者收集约10毫升的人类骨髓, 依标准方法进行Ficoll-Paque分离。以巴斯德吸管小心收集界面的细胞, 悬浮于3倍体积IMDM及2% FBS, 离心于400g 5分钟。依此法可得终骨髓细胞悬浮液富含2-4倍量的原细胞, 是因较成熟及密度较高骨髓细胞与红血球一起移除。为测定此人类G-CSF受体兴奋剂抗体专一性, 依厂商说明书方法 (StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canada) 进行粒细胞集落形成分析。为定量分析兴奋剂抗体刺激人类或黑猩猩骨髓形成嗜中性粒性集落的潜力及有效性, 使用一系列不同浓度的兴奋剂抗体或重组人类G-CSF并作2次重复于此分析。如图7及9所示, 兴奋剂单克隆抗体mAb163-93), 如重组人类G-CSF (R&D Biosystems), 可以浓度依赖形式刺激人类或黑猩猩骨髓形成嗜中性粒性集落。由细胞染色结果显示此兴奋剂单克隆抗体刺激人类及黑猩猩骨髓嗜中性白血球的增生及分化专一性 (图8及10)。

实施例10. 酪氨酸磷酸化分析:

由细胞因子及兴奋剂抗体引起酪氨酸磷酸化的分析如下。收集约 2×10^7 对数生长期细胞, 清洗以无血清培养液3次后置于无血清RPMI培养液4小时。将所收集细胞刺激以小鼠IL-3, 重组人类单克隆抗体 (R&D Biosystems) 或兴奋剂单克隆抗体其终浓度为2.6微毫摩尔15分钟, 并离心收集。将细胞裂解于0.5毫升裂解缓冲液 (50毫摩尔Tris.HCl, pH 7.5 / 150毫摩尔NaCl / 1% (vol/vol) Triton X-100 / 1毫摩尔EDTA并加入1

毫摩尔 Na_3VO_4 ，1微摩尔pepstatin，50微摩尔3，4，二氯异熏草素，1毫摩尔苯甲磺酰氟化物，1毫摩尔1，10-啡啉，亮肽素（10微克/毫升）及抑肽酶（10微克/毫升）。于冰上培养30分钟后，将裂解液于14,000rpm离心15分钟。于免疫沉淀中，将兔子对JAK1，JAK2，或Stat3的多克隆抗体（Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY）加至清裂解液并于4℃培养2小时。加入50微升蛋白质A珠（Gibco, BRL）至各裂解液并于4℃培养2小时。培养后，将珠清洗以裂解缓冲液3次并悬浮于35微升的Laemmli's 样本缓冲液（62.5毫摩尔Tris: pH 7.6, 2% SDS, 10%甘油，及5% 2-巯基乙醇（2-mercaptoethanol））。将悬浮液加热至9℃5分钟并于4%-7.5% SDS-PAGE下电泳。印迹后将膜依厂商说明书方法，于4℃下培养以HRP-偶合小鼠单克隆抗磷酸氨酸抗体4G10（Upstate Biotechnology）过夜。用含0.05%Tween-20的PBS及PBS清洗，将膜依厂商说明书方法用SuperSignal Substrate kit（Pierce, Rockford, IL）监测。将硝纤维素膜再如所示探针以抗体及二次抗体偶合以辣根过氧酶（HRP）。

实施例11 克隆并分析DNA片段编码杂交瘤细胞兴奋剂抗体的变化区域：

将全RNA分离自产生兴奋剂抗体的杂交瘤细胞，并如实施例1所示作为RT-PCR模板。PCR反应所用引物为如下SEQ ID号码：7~14。将PCR所得DNA片段克隆至克隆载体pCR-Blunt（Invitrogen），使用自动DNA sequencer Genetic Analyzer 310（PE Applied Biosystems, Foster City, CA）并依厂商说明分析。分析由二次不同RT-PCR反应所得个别重组载体以确定重链及轻链变化区域DNA序列是来自兴奋剂抗体。

用以克隆变化区域所用引物的DNA序列：

用以克隆单克隆抗体mAb163-93变化区域所用引物：

轻链：

5'：MKV7：ATG GGC WTC AAG ATG GAG TCA CAK WYY CWG G（SEQ ID 号码：7）

3'：MKC：ACT GGA TGG TGG GAA GAT GG（SEQ ID号码：8）

重链:

5': NHV9: ATG GMT TGG GTG TGG AMC TTG CTA TTC CTG (SEQ ID 号码: 9)

3': MHCG1: CAG TGG ATA GAC AGA TGG GGG (SEQ ID号码: 10)

用以克隆单克隆抗体mAb174-74-11所用引物:

轻链:

5': MKV5: ATG GAT TTW CAG GTG CAG ATT WTC AGC TTC (SEQ ID 号码: 11)

3': MKC: ACT GGA TGG TGG GAA GAT GG (SEQ ID号码: 12)

重链:

5': NHV4: ATG RAC TTT GGG YTC AGC TTG RTT T (SEQ ID号码: 13)

3': MHCG2a: CAG TGG ATA GAC CGA TGG GGC (SEQ ID号码: 14)

此抗体变化区域的互补确定区域含如下序列:

单克隆抗体mAb163-93 (IgG1亚型) 变化区域重链CDR序列:

CDR1: Asn Tyr Gly Met Asn (SEQ ID号码: 15)

CDR2: Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gly Asp Phe Lys Gly (SEQ ID号码: 16)

CDR3: Glu Gly Phe Tyr Gly Gly His Pro Gly Phe Asp Tyr (SEQ ID 号码: 17)

单克隆抗体mAb163-93变化区域轻链CDR序列:

CDR1: Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala (SEQ ID号码: 18)

CDR2: Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser (SEQ ID号码: 19)

CDR3: Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr (SEQ ID号码: 20)

单克隆抗体mAb174-74-11 (IgG2a亚型) 变化区域重链CDR序列:

CDR1: Ser Tyr Ala Met Ser (SEQ ID号码: 21)

CDR2: Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gly Thr
Leu Lys Gly (SEQ ID号码: 22)

CDR3: Glu Ala Tyr Asn Asn Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr (SEQ ID
号码: 23)

单克隆抗体mAb174-74-11变化区域轻链CDR序列:

CDR1: Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Val His (SEQ ID号码
: 24)

CDR2: Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser (SEQ ID号码: 25)

CDR3: Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Phe Thr (SEQ ID号码: 26)

需知上述用词, 表达, 实施例及具体实施例仅作例示用而不限于此, 本发明范围由如下申请专利范围所定义, 并含所有与本发明申请专利范围相当者。

序 列 表

<110> 倪宝福

比尔.N.C. 孙

舍西利.R.Y. 孙

<120> G-CSF 受体兴奋剂抗体及其筛选方法

<130> 98-3

<150> 60/083,575

<151> 1998-04-30

<160> 27

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

aagtgggtgct atggcaaggc tg
22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

cactccagct gtgccaggt ctt
23

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cccccccagc gctagcaata gcaacaagac ctggagg
37

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ggaattccta gaagctccc agcgctcc
29

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠

<400> 5

aatacgactc actatag
17

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

aggtcttggt gctattgcta gcgctggggg ggcccagg
38

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 7

atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g
31

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 8

actggatggt gggaagatgg
20

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 9
atggmttggg tgtggamctt gctattcctg
30

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 10
cagtggatag acagatgggg g
21

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 11
atggatttgc aggtgcagat twtcagcttc
30

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 12
actggatggt gggaagatgg
20

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 13
atgractttg ggytcagctt grttt
25

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 14
cagtggatag accgatgggg c
21

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 15

Asn Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 16

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gly Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 17

Glu Gly Phe Tyr Gly Gly His Pro Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 19

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 20

<211> 8

```

      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 20
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
 1                      5

      <210> 21
      <211> 5
      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 21
Ser Tyr Ala Met Ser
 1                      5

      <210> 22
      <211> 17
      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 22
Gly Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gly Thr Leu Lys
 1                      5              10              15
Gly

      <210> 23
      <211> 11
      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 23
Glu Ala Tyr Asn Asn Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr
 1                      5              10

      <210> 24
      <211> 10
      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 24
Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Val His
 1                      5              10

      <210> 25

```

```

      <211> 7
      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 25
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1                               5

      <210> 26
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> 小鼠

      <400> 26
Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Phe Thr
1                               5

      <210> 27
      <211> 603
      <212> PRT
      <213> 人类

      <400> 27
Glu Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly
1                               5                               10                               15
Asp Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu
20                               25                               30
Asp Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gly Pro
35                               40                               45
Gly Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile
50                               55                               60
Thr Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu
65                               70                               75                               80
Asn Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala
85                               90                               95
Gly Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu
100                              105                              110
Thr Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His
115                              120                              125
Leu Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys
130                              135                              140
Gln Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln
145                              150                              155                              160
Ser His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met
165                              170                              175
Gly Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro
180                              185                              190

```

```

Gln Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met
195 200 205
Leu Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly
210 215 220
Cys Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn
225 230 235 240
Gln Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp
245 250 255
Ala Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys
260 265 270
Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg
275 280 285
Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu
290 295 300
Arg Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg
305 310 315 320
Gln Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val
325 330 335
Pro Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp
340 345 350
Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr
355 360 365
Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala
370 375 380
Leu Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr Ser Arg Pro Thr Pro Val Val
385 390 395 400
Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu Thr Arg Leu His Ala Met Ala
405 410 415
Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp
420 425 430
Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser
435 440 445
Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly
450 455 460
Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile
465 470 475 480
Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met Gly Pro Ser Gln His Val Tyr
485 490 495
Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser His Ala Pro Glu Leu His Leu
500 505 510
Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro
515 520 525
Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr
530 535 540
Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg
545 550 555 560
Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro Ala Ser Leu Tyr His Ile His
565 570 575

```

Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr
580 585 590

Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser Glu Leu
595 600

图1A

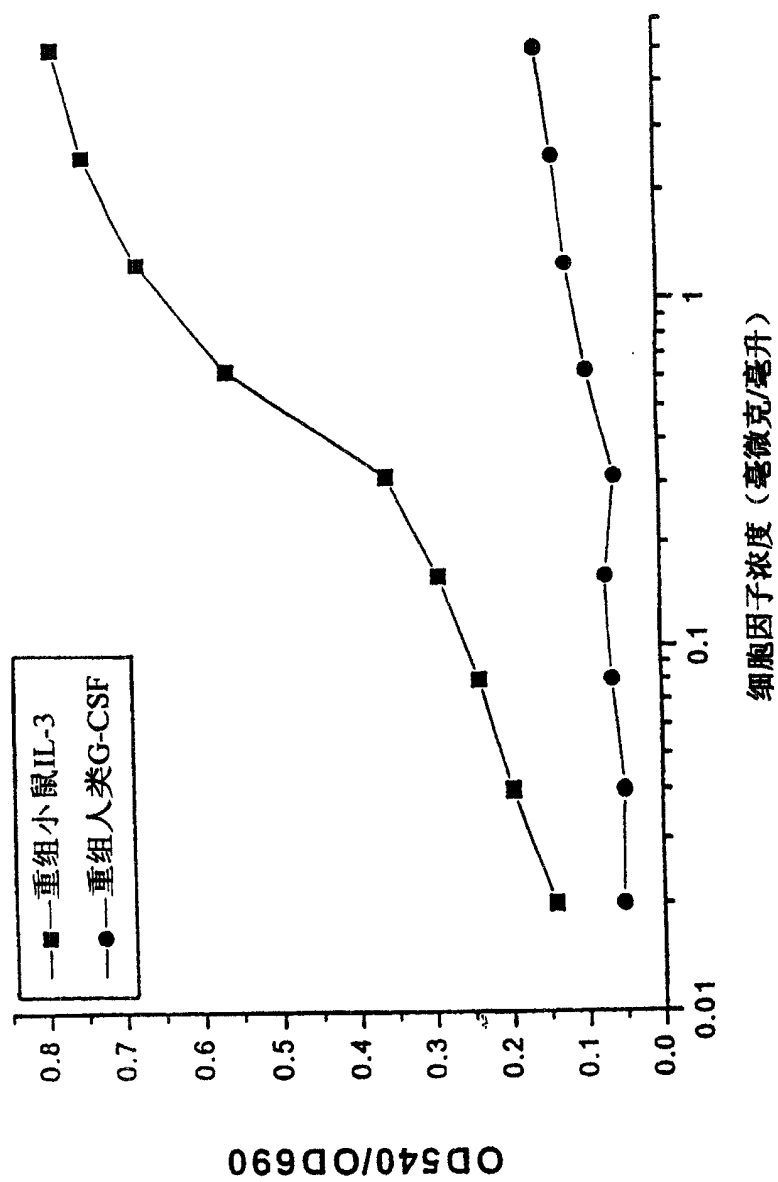


图1B

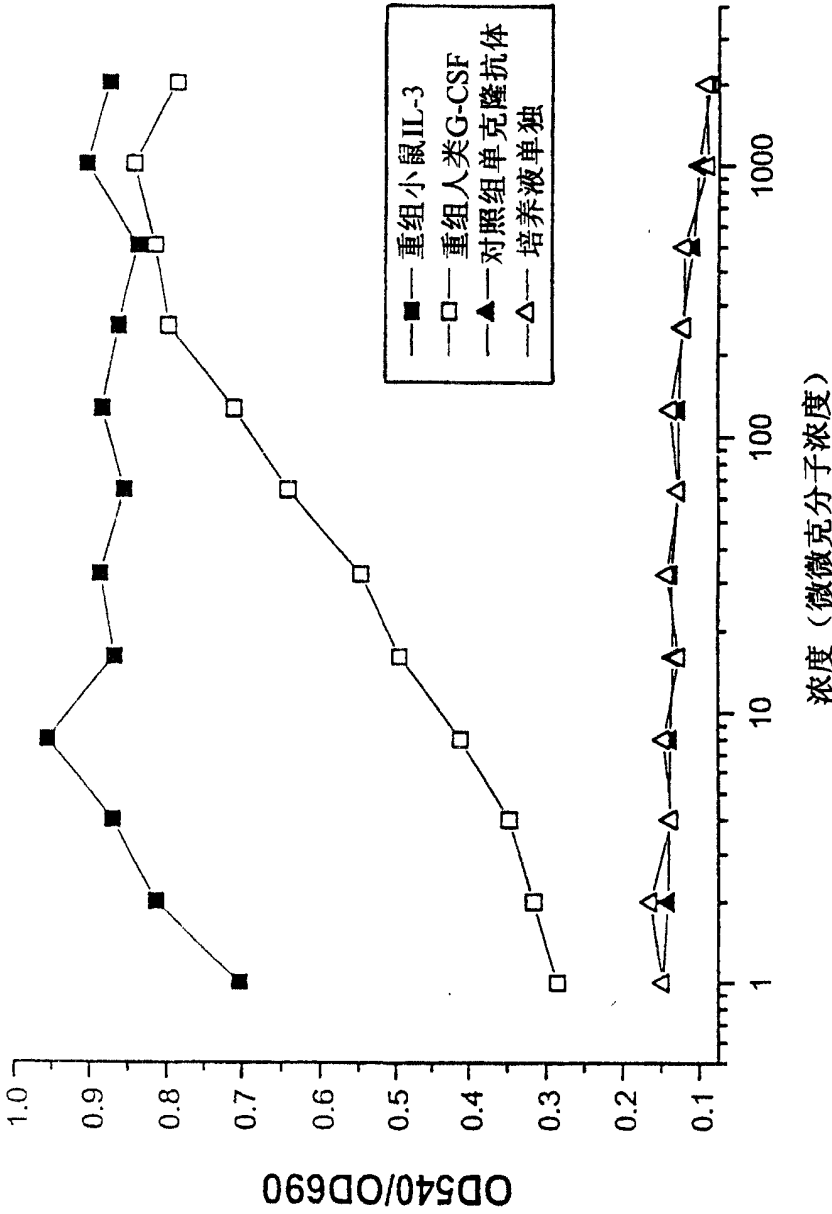


图1C

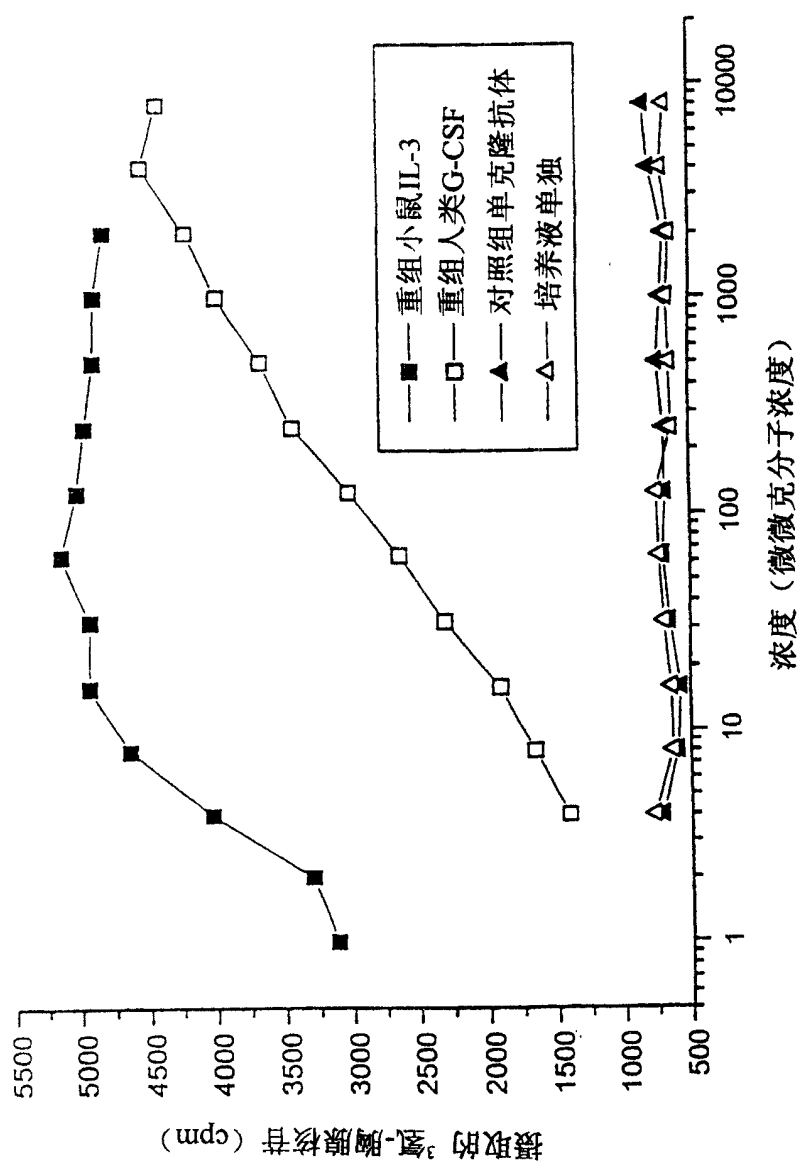


图 2

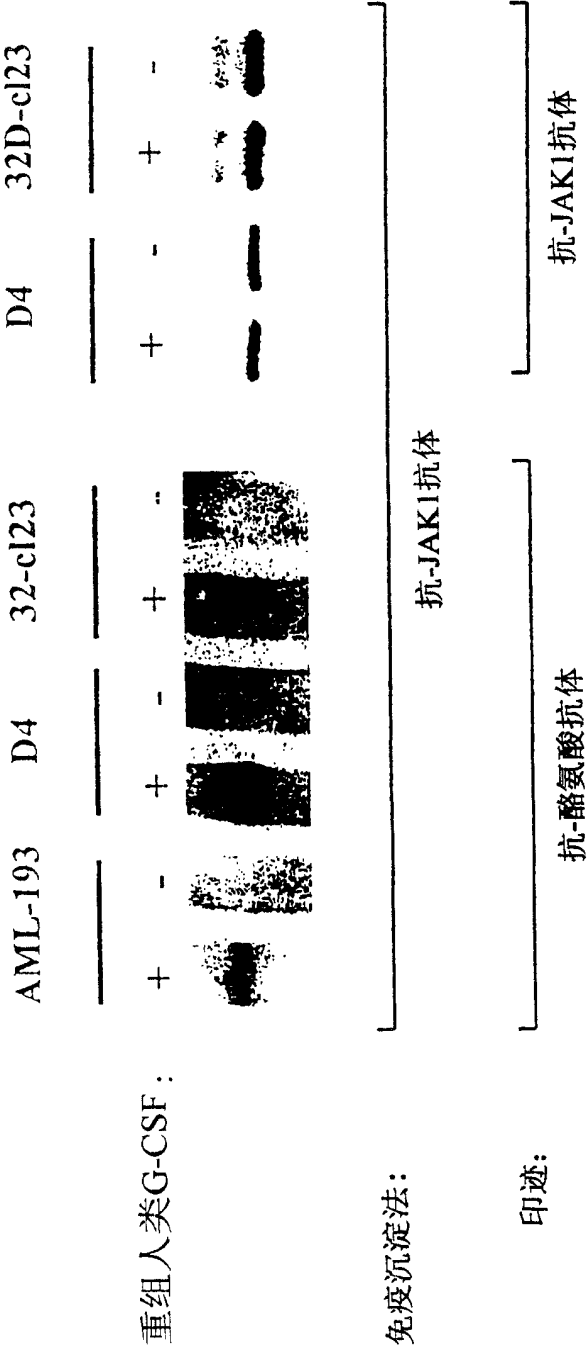


图 3

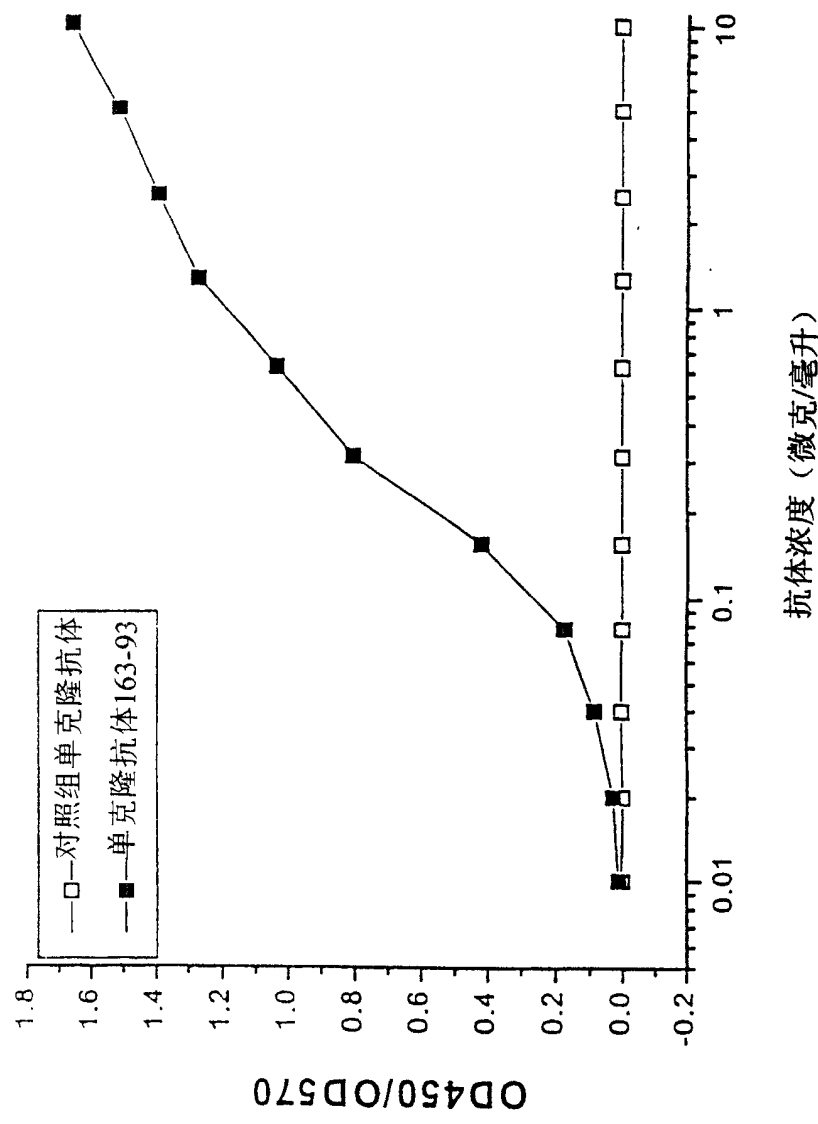


图 4A

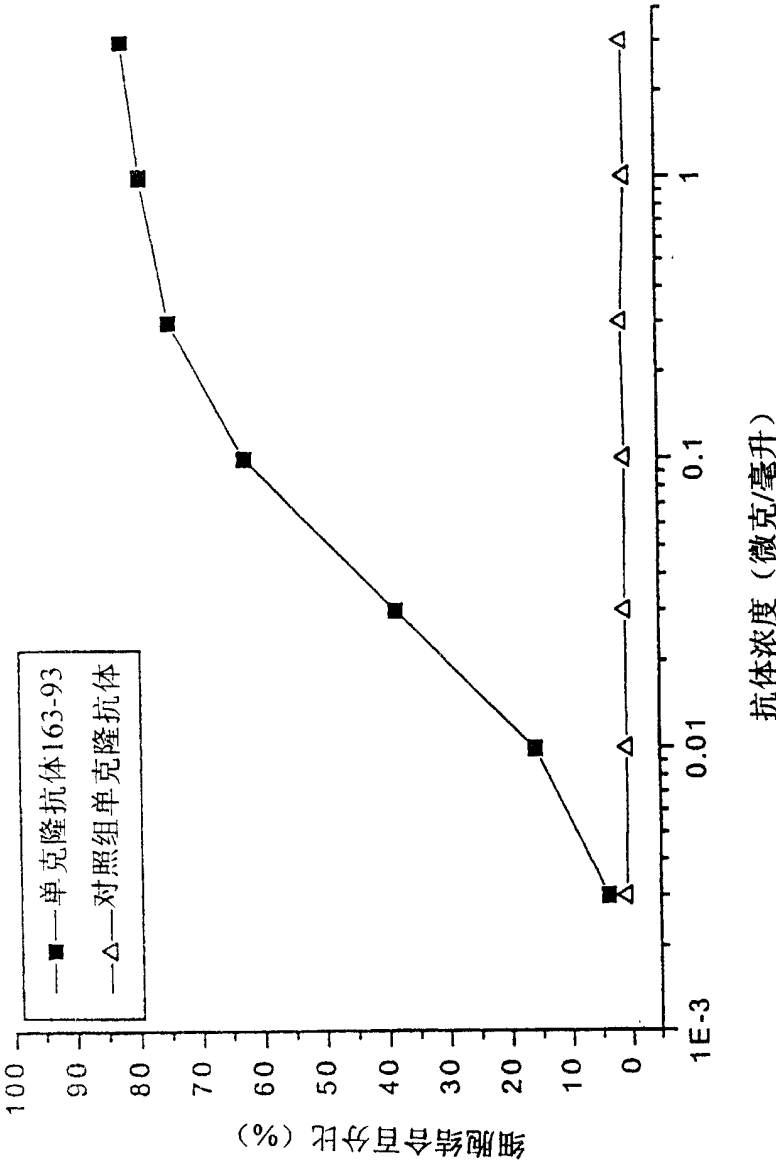


图4B

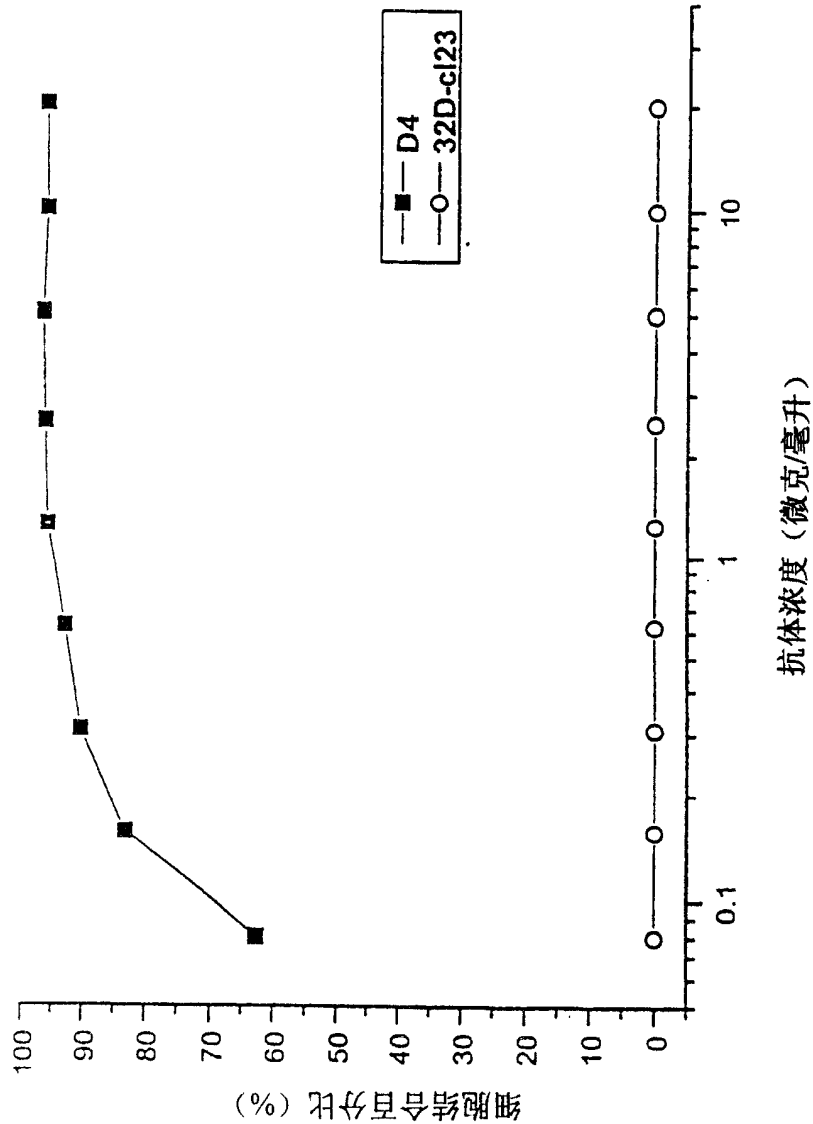


图 5A

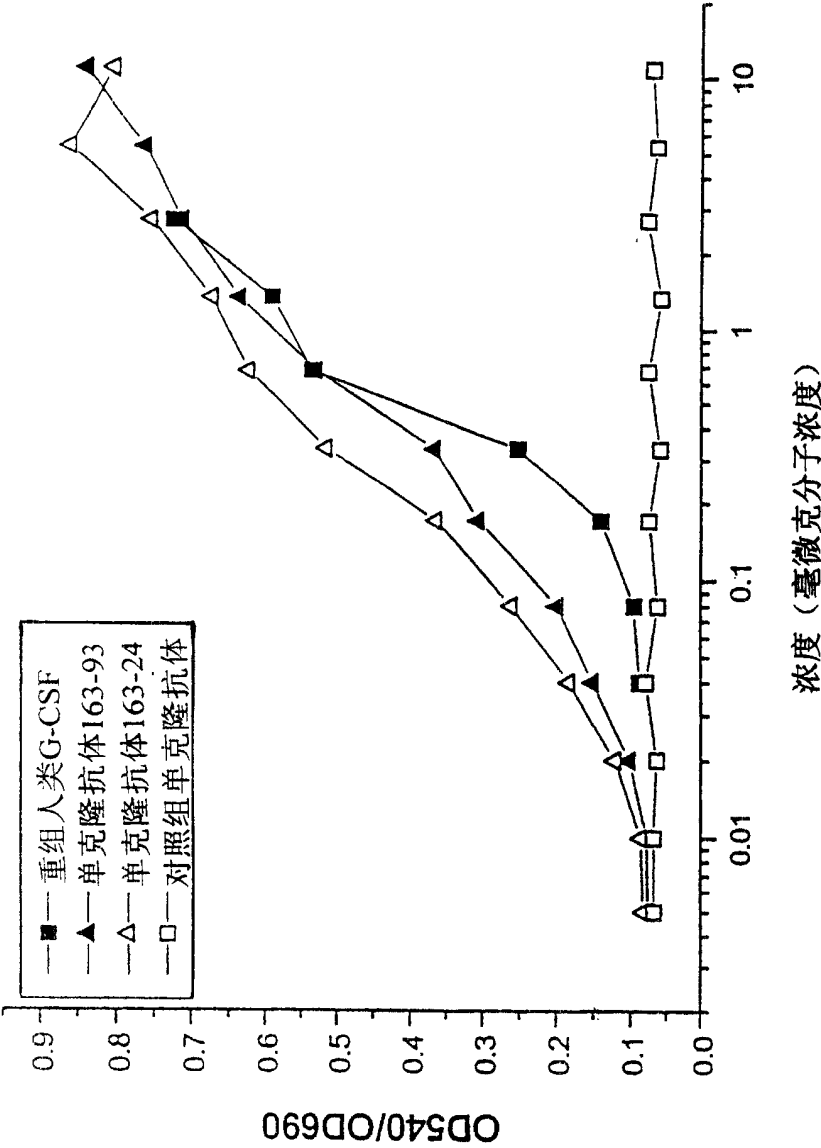


图 5B

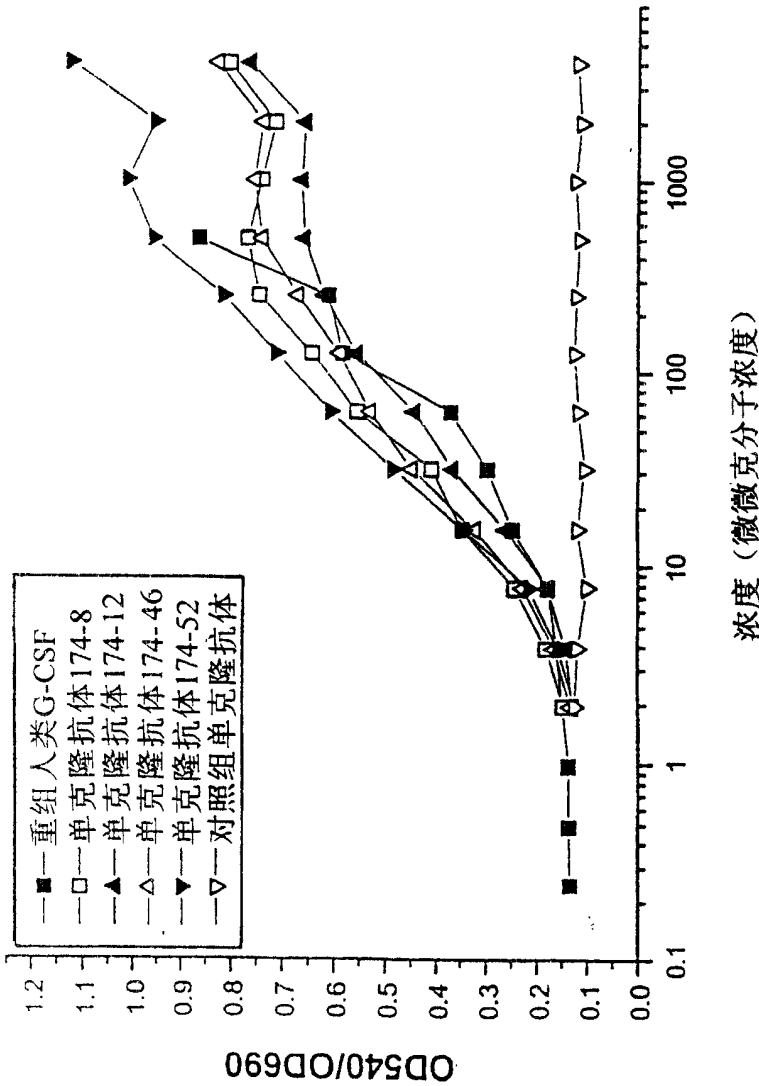
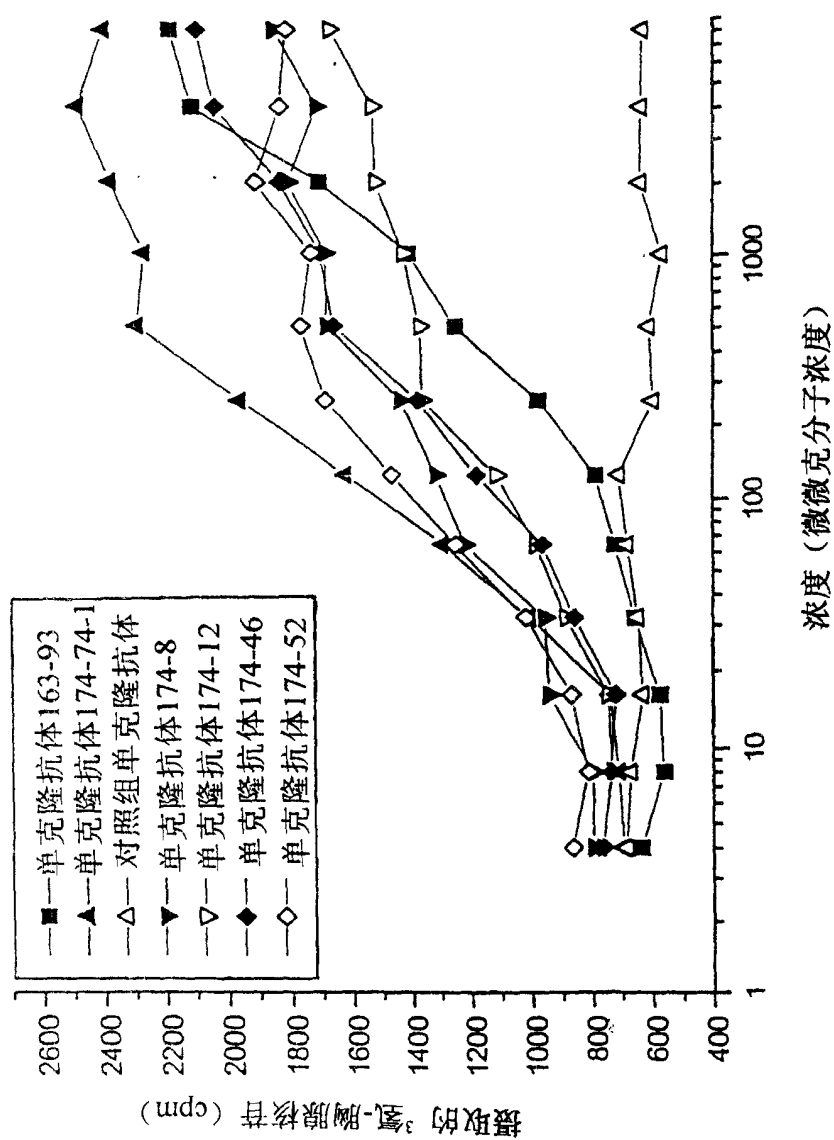


图5C



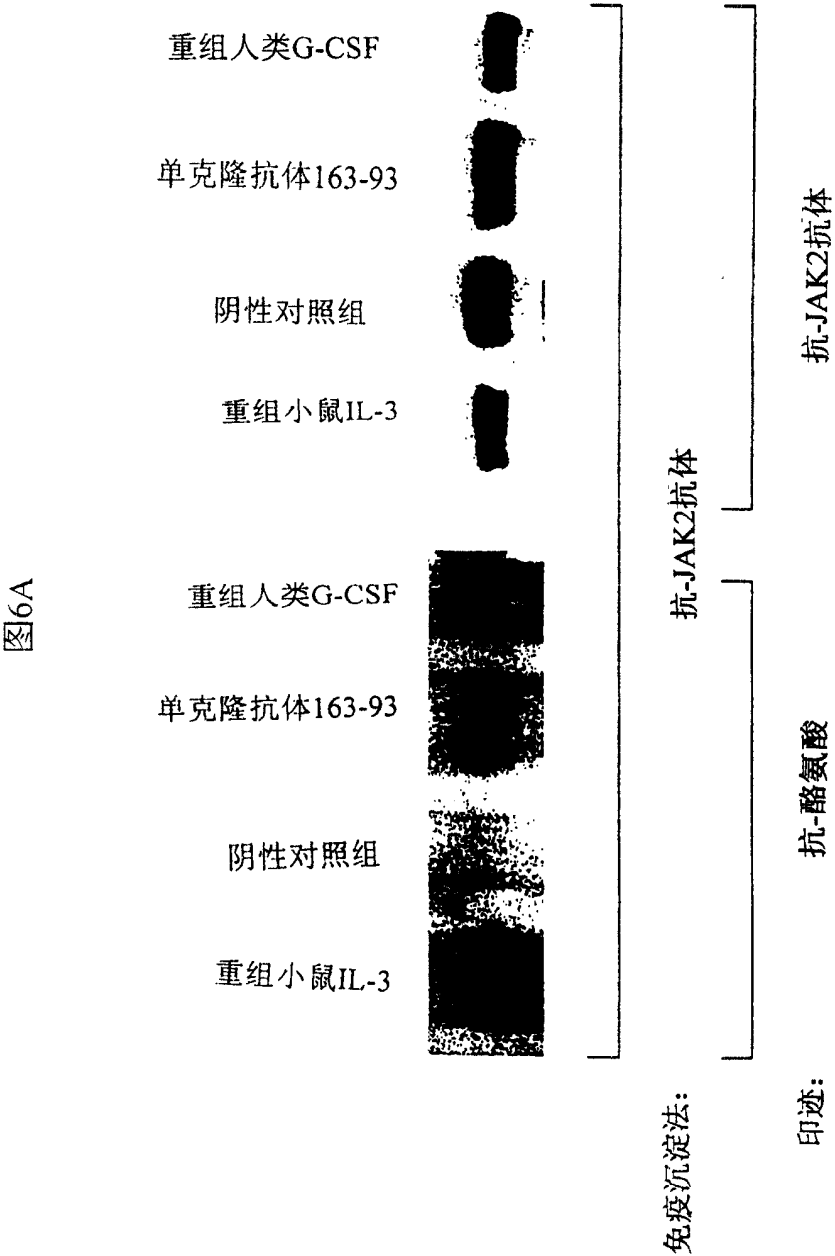


图6B

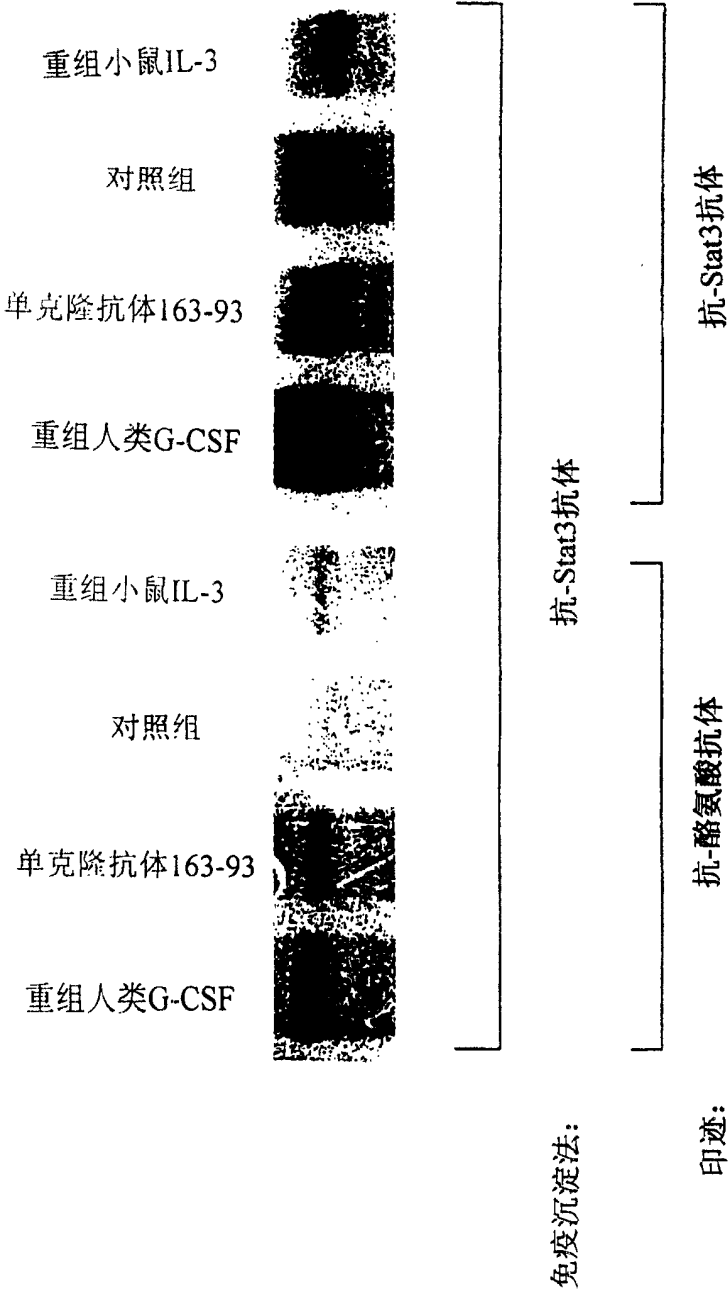


图7A

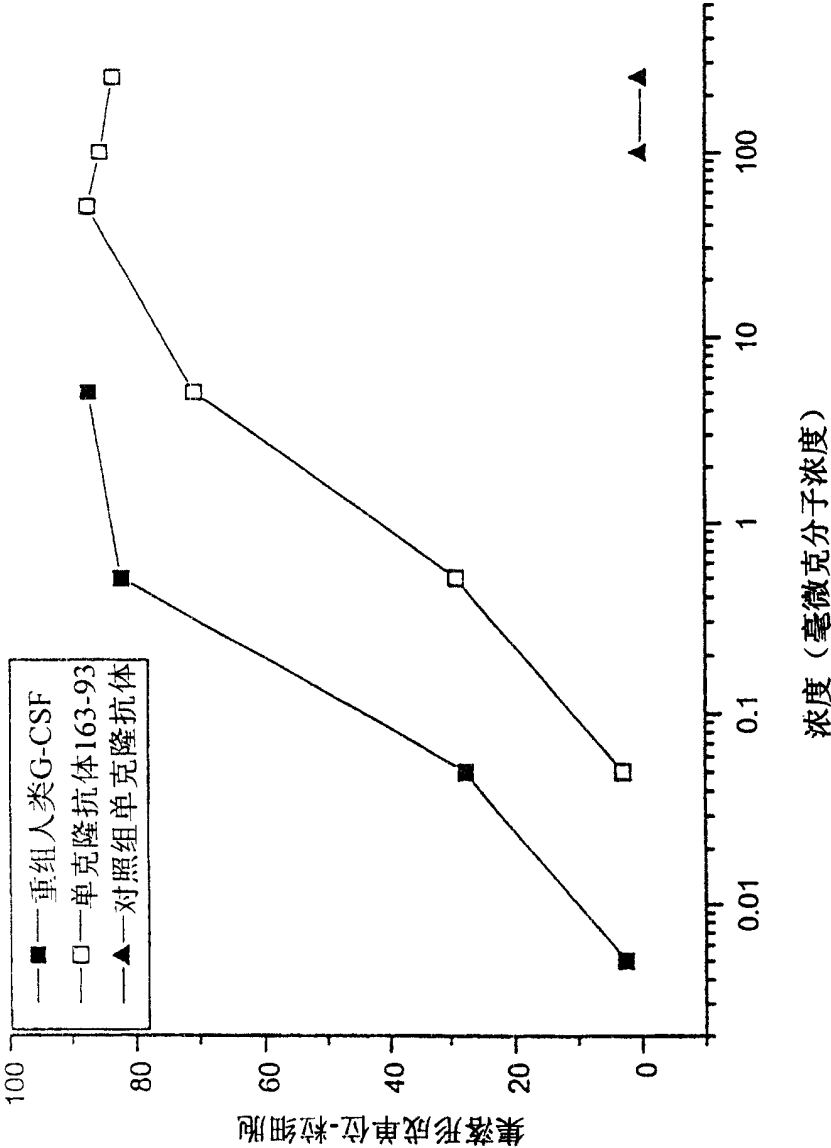


图7B

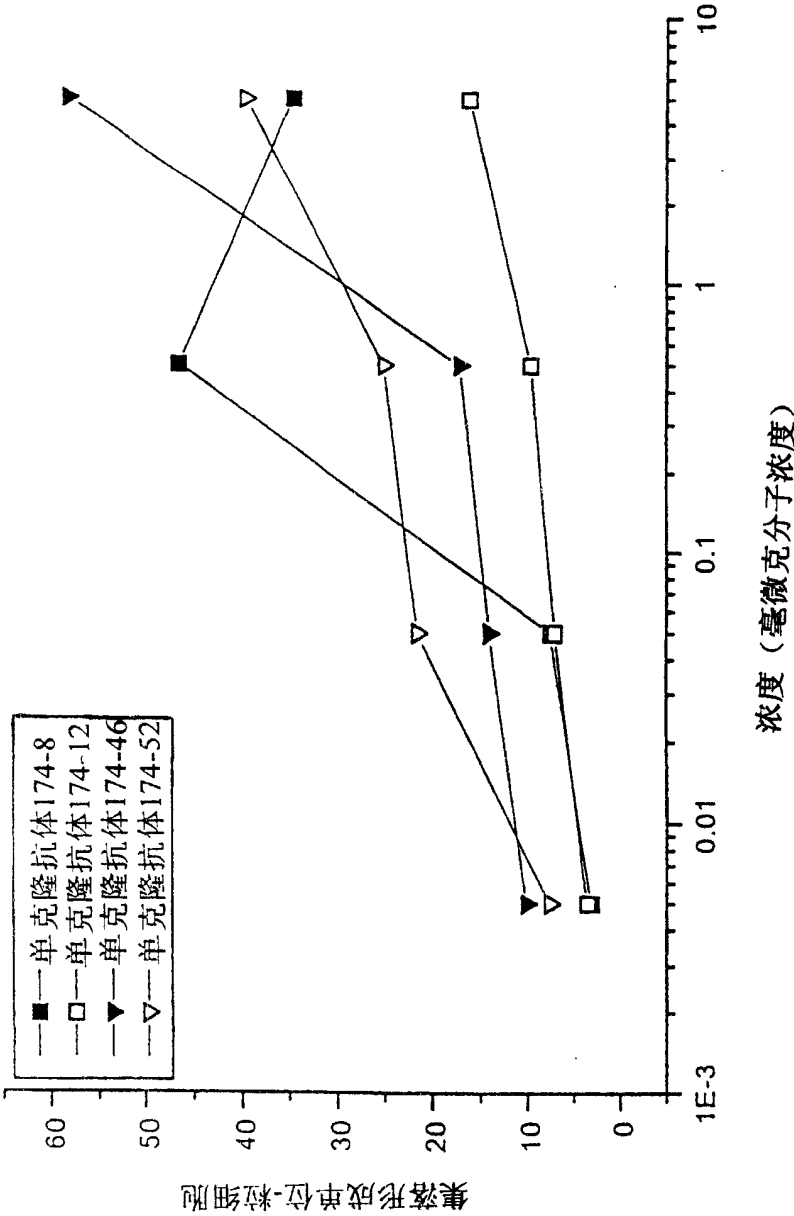


图8B 重组人类G-CSF



图8D 细胞染色

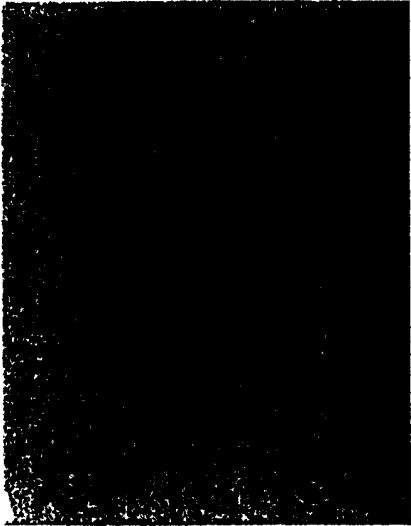


图8A 单克隆抗体mAb

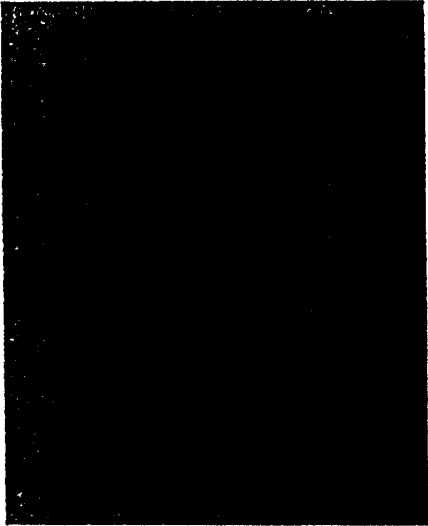


图8C 单克隆抗体mAb163-93



图9

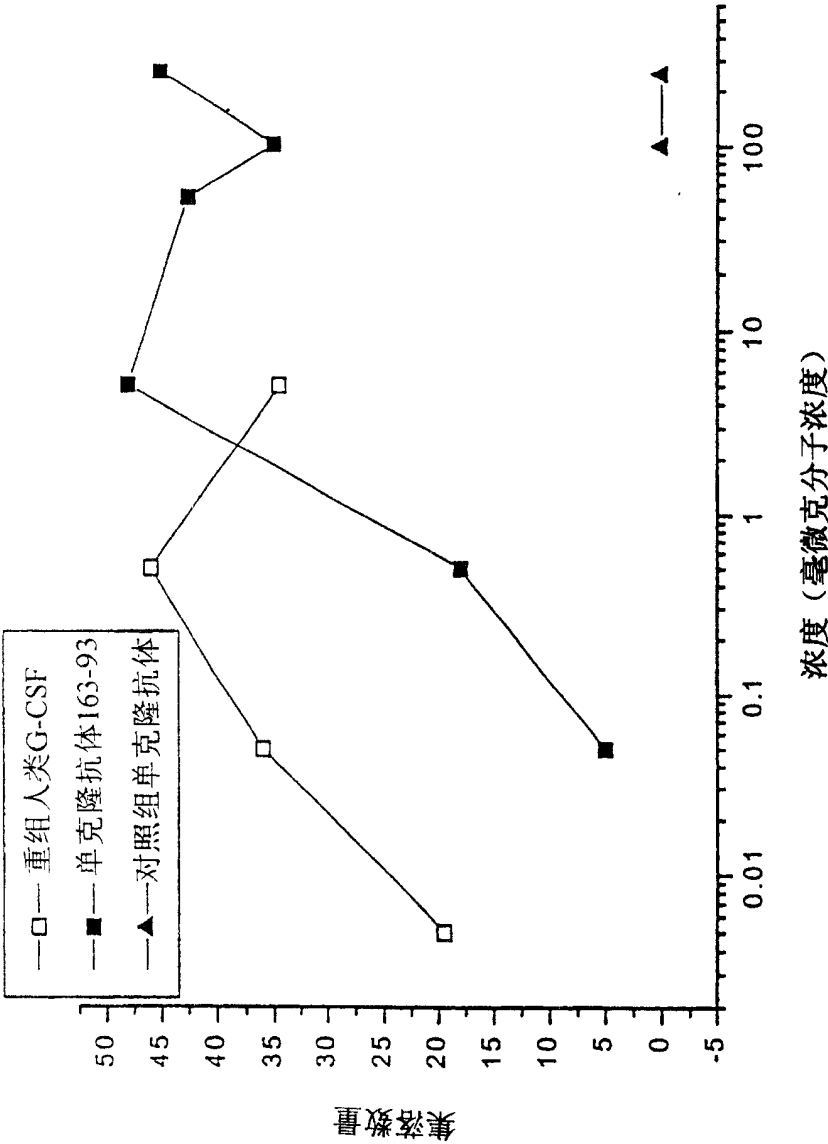


图10A 同种型单克隆抗体G3-519 (50nM) 图10B 重组人类G-CSF (0.5 nM)



图10C 单克隆抗体mAb163-93 (5 nM)



图10D 细胞染色



图11

