

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03820402.9

A61K 39/395

G01N 33/574

C12N 5/06

C12N 5/16

C12N 15/09

C12N 15/13

C12P 21/00

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1678347A

[22] 申请日 2003.6.30 [21] 申请号 03820402.9

[30] 优先权

[32] 2002.7.1 [33] US [31] 10/189,032

[86] 国际申请 PCT/US2003/020602 2003.6.30

[87] 国际公布 WO2004/003166 英 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.28

[71] 申请人 萨文特医药公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 A·莱瓦农 R·本-莱维

D·普拉克辛 E·桑顿

Y·哈加尔 H·霍奇马-哈伊姆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

C07K 16/00 C07H 21/04

权利要求书 7 页 说明书 68 页 序列表 5 页
附图 15 页

[54] 发明名称 抗体及其应用

[57] 摘要

本发明提供可与癌症细胞结合的抗体及其片段,所述抗体或其片段在生理现象如细胞滚动和转移中起重要作用。本发明还提供用所述抗体或其片段进行治疗、诊断、预测预后或分期的方法和所述抗体或其片段的组合物。本发明的方法和组合物可用于诊断和治疗疾病,如癌症(包括肿瘤生长和转移)、白血病、自身免疫疾病和炎症性疾病。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种结合 PSGL-1 表位的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段具有 SEQ ID NO:1 scFv 的结合能力。
- 5 2. 权利要求 1 的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段包含一种选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 的重链互补决定区 (CDR)。
 3. 权利要求 2 的抗体或其片段，其中 2 种重链 CDR 选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。
- 10 4. 权利要求 3 的抗体或其片段，其中 3 种重链 CDR 选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。
 5. 权利要求 4 抗体或其片段，其中所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO:1。
- 15 6. 一种结合 PSGL-1 表位的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段包含一种选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 的重链互补决定区(CDR)。
 7. 权利要求 6 的抗体或其片段，其中 2 种重链 CDR 选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。
 8. 权利要求 7 的抗体或其片段，其中 3 种重链 CDR 选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4。
- 20 9. 一种结合 PSGL-1 表位的抗体或其片段，所述抗体或其片段包含 SEQ ID NO:1。
 10. 权利要求 1 的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段包含至少 1 种来源于 DP32 种系的骨架可变区。
- 25 11. 权利要求 1 的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段为大致圆形或环形的肽或多肽。
 12. 权利要求 1 抗体或其片段，其中所述表位包含至少 1 个硫酸化部分。

13. 权利要求 1 的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段结合 2 个或更多表位, 每个表位包含 1 个或多个硫酸化酪氨酸残基。

14. 权利要求 13 的抗体或其片段, 其中每个表位包含至少 1 个由 2 个或更多个酸性氨基酸组成的酸性氨基酸簇。

5 15. 权利要求 1 的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段与 2 个或更多表位交叉反应, 每个表位具有 1 个或多个硫酸化酪氨酸残基。

16. 权利要求 15 的抗体或其片段, 其中每个表位包含至少 1 个由 2 个或更多酸性氨基酸组成的酸性氨基酸簇。

10 17. 权利要求 1 的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段与至少一种下述类型细胞上的表位结合: T-ALL 细胞、AML 细胞、B 白血病细胞、B-CLL 和多发性骨髓瘤细胞。

18. 权利要求 1 的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段与脂、糖类、肽、糖脂、糖蛋白、脂蛋白、和/或脂多糖分子上的表位结合。

15 19. 权利要求 1 的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段与下述药物偶联或复合: 抗癌药、抗白血病药、抗转移药、抗肿瘤药、抗病药、抗粘附药、抗血栓形成药、抗再狭窄药、抗自身免疫药、抗聚集药、抗菌药、抗病毒药和抗炎药。

20. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中药物为选自阿昔洛韦、更昔洛韦和齐多夫定的抗病毒药。

20 21. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中药物为选自西洛他唑、达肝素钠、瑞肝素钠和阿斯匹林的抗血栓形成/抗再狭窄药。

25 22. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中药物为选自扎托洛芬、普拉洛芬、屈噁昔康、乙酰水杨酸 17、双氯芬酸、布洛芬、右布洛芬、舒林酸、萘普生、氨托美丁、赛来考昔、吲哚美辛、罗非考昔和尼美舒利的抗炎药。

23. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中药物为选自来氟米特、地尼白介素 2、subreum、WinRho SDF、去纤苷和环磷酰胺的抗自身免疫药。

24. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中药物为选自利马前列素、氯克罗孟和透明质酸的抗粘附/抗聚集药。

25. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中药物选自毒素、放射性同位素、成像剂和药用物质。

5 26. 权利要求 25 的抗体或其片段, 其中毒素选自白树毒素、假单胞菌外毒素(PE)、PE40、PE38、蓖麻毒素及它们的修饰物或衍生物。

27. 权利要求 25 的抗体或其片段, 其中放射性同位素选自 γ 发射物、正电子发射物、x 射线发射物、 β 发射物和 α 发射物。

10 28. 权利要求 25 的抗体或其片段, 其中放射性同位素选自 ^{111}In 、 ^{113}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{105}Tc 、 ^{101}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Ru}$ 、 $^{121\text{m}}\text{Pb}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Pb}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Pb}$ 、 ^{165}Yb 、 ^{167}Yb 、 ^{168}Yb 、 ^{123}I 、 ^{126}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{33}Ar 、 ^{90}Y 、 ^{213}Bi 、 ^{77}Br 、 ^{18}F 、 ^{95}Tl 、 ^{97}Tl 、 ^{103}Tl 、 ^{105}Tl 、 ^{107}Pb 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Re 和 ^{68}Re 。

29. 权利要求 25 的抗体或其片段, 其中药用物质为蒽环霉素。

15 30. 权利要求 29 的抗体或其片段, 其中蒽环霉素选自多柔比星、柔红霉素、伊达比星、地托比星、洋红霉素、表柔比星、依索比星、吗啉代多柔比星、吗啉代柔红霉素和甲氧吗啉多柔比星。

20 31. 权利要求 25 的抗体或其片段, 其中药用物质选自顺铂、泰素、加利车霉素、长春新碱、阿糖胞苷(Ara-C)、环磷酰胺、强的松、氟达拉滨、苯丁酸氮芥、干扰素 α 、羟基脲、替莫唑胺、沙利度胺和博莱霉素、以及它们的衍生物和组合物。

32. 权利要求 19 的抗体或其片段, 其中所述抗体或其片段与媒介或载体偶联或复合, 所述媒介或载体可与超过 1 种药物偶联或复合。

33. 权利要求 32 的抗体或其片段, 其中媒介或载体选自葡聚糖、亲脂聚合物、HPMA 和脂质体、以及它们的衍生物和修饰物。

25 34. 一种分离的表位, 其中所述表位包含与权利要求 1 的抗体或其片段结合的氨基酸序列。

35. 权利要求 34 的分离表位, 其中所述分离表位包含至少一个硫酸化部分。

36. 权利要求 35 的分离表位, 其中硫酸化部分为硫酸化酪氨酸。
37. 权利要求 34 的分离表位, 其中所述分离表位包含负电荷氨基酸簇。
38. 权利要求 37 的分离表位, 其中所述氨基酸簇包含成熟 PSGL-1 的 1-17 氨基酸。
39. 一种分离或纯化的多核苷酸, 所述多核苷酸编码权利要求 1 抗体或其片段。
40. 一种包含权利要求 39 多核苷酸序列的表达载体。
41. 一种包含权利要求 40 表达载体的重组宿主细胞。
42. 权利要求 41 的重组宿主细胞或其子代细胞, 其中细胞表达所述抗体或其片段。
43. 一种生产重组细胞的方法, 所述方法包括用权利要求 40 表达载体转染细胞。
44. 一种生产抗体或其片段的方法, 所述方法包括在允许所述抗体或其片段表达的条件下培养权利要求 41 的细胞。
45. 权利要求 44 的方法, 其中所述方法进一步包括从细胞或细胞培养基中分离或纯化抗体或其片段。
46. 一种包含权利要求 1 抗体或其片段和药用载体的药用组合物。
47. 一种用于诊断、预后预测或分期的试剂盒, 所述试剂盒包含权利要求 1 的抗体或其片段和成像剂。
48. 权利要求 47 的诊断、预后预测或分期试剂盒, 其中成像剂为放射性同位素。
49. 一种治疗疾病的方法, 所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。
50. 一种治疗细胞滚动的方法, 所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。
51. 一种缓解炎症、预防炎症、治疗炎症或抑制炎症发展的方法,

所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

52. 一种治疗感染的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

53. 权利要求 52 的方法，其中感染由 HIV 引起。

5 54. 权利要求 52 的方法，其中所述给药阻止 HIV 进入细胞。

55. 一种治疗自身免疫疾病的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

56. 一种治疗转移的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

10 57. 一种治疗肿瘤细胞生长和/或增殖的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

58. 一种增加肿瘤细胞死亡率的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

15 59. 一种治疗白血病细胞生长和/或增殖的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

60. 一种增加白血病细胞死亡率的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

61. 一种改变疾病细胞对抗病药性损伤的敏感性的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

20 62. 一种增强肿瘤细胞对抗癌药性损伤的敏感性的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

63. 一种增强白血病细胞对抗癌药性损伤的敏感性的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

25 64. 一种抑制肿瘤患者中的肿瘤细胞数量增加的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

65. 一种降低肿瘤患者中的肿瘤细胞数量的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

66. 一种抑制白血病患者中的白血病细胞数量增加的方法，所述

方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

67. 一种降低白血病患者中的白血病细胞的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

68. 一种引起抗体依赖性细胞介导性细胞毒性(ADCC)的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

69. 一种刺激天然杀伤细胞(NK)或 T 细胞的方法，所述方法包括给予有需要的患者权利要求 46 的药用组合物。

70. 一种对患者疾病进行诊断或预后预测的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后确定权利要求 1 的抗体或其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为所述疾病风险患者或患有所述疾病。

71. 一种对患者炎症进行诊断或预后预测的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后确定权利要求 1 的抗体或其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为炎症风险患者或患有炎症。

72. 一种对患者感染进行诊断或预后预测的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后确定权利要求 1 的抗体或其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为感染风险患者或患有感染。

73. 权利要求 72 的方法，其中感染由 HIV 引起。

74. 一种对患者自身免疫疾病进行诊断或预后预测的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，确定权利要求 1 的抗体或其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为自身免疫疾病风险患者或患有自身免疫疾病。

75. 一种对患者的转移进行诊断、预后预测或分期的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后确定权利要求 1 的抗体或其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为转移风险患者或存在转移。

76. 一种对患者肿瘤细胞进行诊断、预后预测或分期的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后确定权利要求 1 的抗体或

其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为肿瘤细胞风险患者或存在肿瘤细胞。

77. 一种对患者白血病进行诊断、预后预测或分期的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后确定权利要求 1 的抗体或其片段是否与患者细胞结合，由此表明患者为白血病风险患者或患有白血病。

78. 一种消除患者肿瘤细胞的方法，所述方法包括提供包含患者细胞的样品，然后将患者细胞与权利要求 1 的抗体或其片段温育。

79. 权利要求 78 的方法，其中消除患者肿瘤细胞在体外完成。

80. 权利要求 46 的药用组合物在制备治疗疾病的药物中的用途。

81. 权利要求 80 的用途，其中疾病选自细胞滚动、炎症、自身免疫疾病、感染、转移、肿瘤细胞生长和/或增殖、以及白血病细胞生长和/或增殖。

82. 用于制备治疗疾病的药物的权利要求 46 的药用组合物。

83. 权利要求 82 的药用组合物，其中疾病选自细胞滚动、炎症、自身免疫疾病、感染、转移、肿瘤细胞生长和/或增殖、以及白血病细胞生长和/或增殖。

84. 一种生产抗体或其片段的方法，所述方法包括以下步骤：

提供噬菌体展示文库；

提供至少 2 种与抗体或其片段结合的分子或细胞，所述抗体或其片段具有与 SEQ ID NO:1 的 scFv 抗体或其片段的结合能力；

淘选噬菌体展示文库，选出显示寡肽或多肽的噬菌体颗粒，所述寡肽或多肽可与至少 2 种所述分子或细胞结合；

产生抗体或其片段，包括抗体或其片段或其结合片段而且包括结合至少 2 种所述分子或细胞的肽或多肽。

85. 一种用权利要求 84 的方法产生的抗体或其片段。

抗体及其应用

5

发明领域

本发明涉及与特殊表位结合的抗体，所述表位存在于细胞上，如癌细胞、转移细胞、白血病细胞、白血球和血小板，在细胞滚动、转移、炎症和自身免疫疾病等生理学现象中起重要作用。具体的说，所述抗体可具有抗癌活性、抗转移活性、抗白血病活性、抗病毒活性、抗感染活性和/或抗其它疾病活性，如炎症性疾病、自身免疫疾病、心血管疾病(如心肌梗塞、视网膜疾病)和依赖硫酸化酪氨酸的蛋白-蛋白相互作用导致的疾病。

10

发明背景

15 抗体、噬菌体展示和组织靶向

组织选择性靶向治疗药物是药物工业中新兴的方向。现已设计了新的基于靶向的癌症治疗方法，在增加治疗特异性和效力的同时降低了毒性，因而提升了整体效力。针对肿瘤相关抗原的小鼠单克隆抗体(MAb)已尝试用于将毒素、放射性核苷酸和化学治疗缀合物靶向肿瘤。此外，分化抗原如 CD19、CD20、CD22 和 CD25 已被开发用作治疗造血系统恶性肿瘤的癌症特异性靶标。

20

虽然进行了详细的研究，这种方法具有某些局限性。一个缺陷是分离合适的显示选择性结合的 MAb 十分困难。第二个缺陷是作为成功分离抗体的先决条件，需要高抗体免疫原性物。第三个缺陷是最终产物具有非人类序列，这会引发免疫应答；如当给予人类小鼠 MAb 时，会产生人抗小鼠抗体(HAMA)应答。HAMA 应答常常导致血浆半衰期缩短，并且不能反复治疗，因此降低了该抗体的治疗价值。后一个缺陷激起了工程改造生产小鼠源的嵌合或人源化单克隆

25

抗体的兴趣，以及开发人抗体的兴趣。这种方法还有一个缺陷是只能分离抗已知纯化抗原的单一抗体类型。而且这种方法选择性不够高，其分离的抗体针对存在于正常细胞和恶性细胞上的细胞表面标记。

- 5 有许多因素可影响 MAb 治疗癌症的治疗效果。这些因素包括肿瘤细胞上抗原表达的特异性和水平、抗原异质性和肿瘤包块的可接近性。白血病和淋巴瘤对抗体治疗的反应性比实体肿瘤(例如癌)更好。MAb 迅速与血流中的白血病细胞和淋巴瘤细胞结合，容易进入淋巴组织中的恶性细胞，因此基于 MAb 的治疗对淋巴肿瘤有良好效果。
- 10 理想系统需要鉴定识别产生恶性细胞的干细胞表面标记。

噬菌体文库已用于筛选与目标蛋白结合的随机单链变异体片段(scFv)，所述目标蛋白是预先决定的分离的蛋白，如抗体、激素和受体。抗体展示文库、尤其是噬菌体 scFv 文库的应用促进另一种发现靶向特殊细胞表面部分的独特分子的方法，即使该细胞表面部分仍未被人们所了解或性质未明。

15

白血病、淋巴瘤和骨髓瘤为发源于骨髓和淋巴组织的癌症，涉及细胞不受控制的生长。急性成淋巴细胞性白血病(ALL)为异质性疾病，由特定的临床和免疫特性定义。与其它形式的 ALL 相似，大多数 B 细胞 ALL(B-ALL)的确切病因是未知的；但是许多情况下该疾病由一种细胞 DNA 中的获得性遗传改变引起，该改变导致异常和持续性增殖。与其它白血病患者相比，B-ALL 患者的预后显著较差，在儿童和成人中都是如此。B 细胞 CLL(B-CLL)是慢性淋巴细胞白血病(CLL)的一个实例，是一种发展缓慢的白血病，其特征为淋巴细胞数量增加。急性骨髓白血病(AML)是一种异质肿瘤，包括祖细胞，祖细胞在正常情况下最终会形成髓系分化细胞(红血球、粒细胞、单核细胞和血小板)。和其它形式肿瘤一样，AML 涉及获得性遗传改变，该改变导致相对未分化的胚细胞代替了正常分化的骨髓细胞，表现为存在 1 种或多种早期髓系分化类型。AML 通常起源于骨髓，较

20

25

涉及次级造血器官。AML 主要影响成人，发病率高峰在 15-40 岁之间，但已知它也影响儿童和年龄较大的成人。几乎所有 AML 患者确诊后需要立即治疗以获得临床缓解，即使是没有循环未分化胚细胞异常迹象的患者。

5 至今已开发出各种细胞裂解活性的抗肿瘤细胞 MAb。小鼠 MAb muMab4D5 拮抗 HER2(P185)的胞外域，可显著抑制过度表达 HER2 的人肿瘤细胞的增殖，它被人源化以生产药物 HERCEPTIN®(trastuzumab)，该药物经 FDA 许可用于治疗人乳腺癌(美国专利号 5,821,337 和 5,720,954)。结合后，抗体可抑制依赖 HER2
10 生长因子受体的肿瘤细胞生长。此外，抗 CD20 嵌合抗体最近也通过了 FDA 许可(美国专利号 5,843,439)，该抗体导致外周 B 细胞迅速耗尽，包括淋巴瘤 B 细胞。该抗体与目标细胞结合导致依赖补体的裂解。该产品最近通过许可，当前临床上用于治疗低度 B 细胞非霍杰金氏淋巴瘤。

15 某些其它人源化和嵌合抗体正在开发或临床试验中。例如，与 CD33 抗原特异性反应的人源化免疫球蛋白(Ig)与抗癌药加利车霉素 CMA-676 结合(Sievers et al., Blood Supp. 308: 504a (1997))，CD33 表达于正常骨髓细胞上和大多数种类的骨髓白血病细胞上。该结合物又称为药物 MYLOTARG®，最近已获得 FDA 许可(Caron et al.,
20 Cancer Supp. 73: 1049-56(1994))。根据其细胞裂解活性，另一个处于临床试验的抗 CD33 抗体(HumM195)与某些细胞毒性药物结合，包括白树毒素毒素(McGraw et al., Cancer Immunol. Immunother. 39: 367-74(1994))和放射性同位素 ¹³¹I(Caron et al., Blood 83: 1760-68 (1994))，⁹⁰Y(Jurcic et al., Blood Supp. 92: 613a(1998))和 ²¹³Bi(Humm et
25 al., Blood Supplement 38: 231P (1997))。抗白细胞抗原 CD45 的嵌合抗体(cHuLym3)也处于临床试验，用于治疗人白血病和淋巴瘤(Sun et al., Cancer Immunol. Immunother 48: 595-602(2000))。在体外测定中，ADCC(抗体依赖性细胞介导细胞毒性)测定中可观察到特异性细胞裂

解(Henkart, *Immunity* 1: 343-46(1994); Squier and Cohen, *Current Opin. Immunol.* 6: 447-52(1994)).

5 这些治疗性抗体经特殊的工程改造, 使其对目标具有更高的亲和力, 更稳定, 并具有最佳的生物分布。参见如 Presta, *Current Pharma. Biotechnol.*, 3: 237-56(2002); Presta et al., *Biochem. Society Transactions*, 30 (4): 487-90(2002)。

与小鼠单克隆人源化和嵌合抗体的构建相比, 噬菌体展示技术的应用允许完全人序列 scFv 的分离。最近开发了基于 scFv 克隆的抗人 TGF β 2 受体的完全人抗体, 所述克隆即来源于噬菌体展示技术。
10 该 scFv 可被转化为与 TGF β 2 结合竞争的完整人 IgG4(Thompson et al., *J. Immunol. Meth.* 227: 17-29 (1999)), 具有很强的抗增殖活性。噬菌体展示技术作为本领域技术人员已知的技术, 在下述出版物中由更详细的描述: Smith, *Science* 228: 1315 (1985); Scott et al., *Science* 249: 386-90 (1990); Cwirla et al., *PNAS* 87: 6378-82 (1990); Devlin et al., *Science* 249: 404-06 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 13 (14): 3245-60 (1994); Bass et al., *Proteins* 8: 309-14 (1990); McCafferty et al., *Nature* 348: 552-54 (1990); Nissim et al., *EMBO J.* 13: 692-98 (1994);
15 美国专利号 5,427,908、5,432,018、5,223,409 和 5,403,484, lib。

20 分离的 scFv 抗体分子的配体

血小板、纤维蛋白原、GPIb、选择蛋白和 PSGL-1(P-选择蛋白糖蛋白配体-1)都在某些致病性状态或疾病阶段中起重要作用, 如异常或致病炎症、异常或致病免疫反应、自身免疫反应、转移、异常或致病粘附、血栓形成和/或再狭窄, 以及异常或致病聚集。因此,
25 与血小板和上述分子结合或交叉反应的抗体可用于诊断和治疗涉及这些和其它致病状态的疾病和失调。

血小板

血小板是血液系统典型特征成分，在止血、血栓形成和/或再狭窄中起某些重要作用。血管损伤启动已知为止血的过程，所述过程以一系列连续的事件为特征。对受损血管的最初反应是血小板附着到血管内表面的受影响区域。下一步骤是多层血小板聚集到前面粘附的血小板上，形成止血栓，阻塞血管。止血栓进一步被纤维蛋白聚合体的沉积强化。凝块或栓在损伤修复后才降解。

循环的血小板是从外周巨核细胞释放的细胞质颗粒。血小板在止血中起重要作用。在血管损伤时，血小板粘附到受损组织表面，彼此结合(粘附)。这一系列事件迅速发生，在血管损伤部位形成无结构的块(通常称为血小板栓或血栓)。粘附现象也称为聚集，可由各种物质或激动剂体外引起，如胶原、二磷酸腺苷(ADP)、肾上腺素、血清素和利托菌素。聚集是为测定血小板功能而进行的众多体外试验中的一种。

15

血小板在转移中的重要性

肿瘤转移或许是限制癌症患者生存的最重要因素。积累的数据指出，肿瘤细胞与宿主血小板相互作用的能力代表了转移的必要决定因素之一(Oleksowicz, Thrombosis Res. 79: 261-74 (1995))。转移性癌细胞进入血流时，形成由血小板和白细胞包围肿瘤细胞的多细胞复合物。该复合物可称为微栓子，有助于肿瘤细胞躲避免疫系统。血小板包被肿瘤细胞需要血小板表达P选择蛋白。

已经证实，肿瘤细胞与血小板聚集的能力与肿瘤细胞的转移潜力相关，啮齿动物模型中对肿瘤引起血小板聚集的抑制与转移的抑制相关。已经证实，肿瘤细胞与血小板的相互作用涉及膜粘附分子和激动剂分泌。已鉴定出肿瘤细胞系上免疫相关血小板糖蛋白的表达。已经证实，血小板免疫相关糖蛋白 GPIb、GPIIb/IIIa、GPIb/IX 和整联蛋白 α_v 亚基表达于乳腺肿瘤细胞系表面(Oleksowicz, (1995),

25

同前; Kamiyama et al., J. Lab. Clin. Med. 117 (3): 209-17 (1991))。

Gasic et al. (PNAS 61: 46-52 (1968))表明, 抗体引起的血小板减少症显著降低 CT26 结肠腺癌、Lewis 肺癌和 B16 黑素瘤产生的转移灶的数量和体积(Karpatkin et al., J. Clin. Invest. 81(4): 1012-19 (1988);
5 Clezardin et al., Cancer Res. 53 (19): 4695-700(1993))。此外, 发现 HEL 细胞的表面膜上表达单链多肽(60kd), 所述多肽链与 GPIb 密切相关, 相当于不完整或异常 O 糖基化的 GPIb α 亚基(Kieffer et al., J. Biol. Chem. 261 (34): 15854-62 (1986))。

10 GPIb 复合物

止血过程中的每个步骤都需要血小板表面上受体的存在。止血中一种重要的受体为糖蛋白 IB-IX 复合物(也称为 CD42)。该受体通过结合内皮下膜 von Willebrand 因子(vWF), 介导血小板粘附(起始附着)到血管壁的受损部位。它还在止血中另 2 个重要的血小板功能中
15 起关键作用: (a)动脉狭窄区域中高剪切力诱导的血小板聚集; 和(b)低浓度凝血酶诱导的血小板活化。

GPIb-IX 复合物为血小板质膜外表面一种主要成分。该复合物包含 3 个跨膜多肽 - 二硫键连接的 GPIb 130kDa α 链和 25kDa β 链, 以及非共价连接的 GPIX(22kDa)。为了有效的细胞表面表达和 CD42 复
20 合物功能, 所有亚基等摩尔量存在于血小板膜上, 表示在质膜上完全表达是 3 个亚基正确装配所必须的。GPIb 的 α 链由 3 个不同结构域组成: (1)包含富亮氨酸重复序列和半胱氨酸结合侧翼序列的球形 N 端肽域; (2)高度糖基化的粘蛋白样巨糖肽域; 和(3)包含 GPIb α 二硫键以及跨膜和胞质序列的膜相关 C 端域。

某些证据表明, GPIb-IX 复合物的 vWF 和凝血酶结合域位于 GPIb α N 端包含约 300 氨基酸的球形区。由于人血小板 GPIb-IX 复
25 合物为介导血小板功能和反应性的关键膜受体, 通过 GPIb 识别内皮下结合 vWF 使血小板粘附于受损血管。此外, vWF 与 GPIb α 结合还引

起血小板活化,这可能涉及 GPIb-IX 的胞质域与细胞骨架或磷脂酶 A2 的相互作用。此外, GPIb α 包含 α 凝血酶高亲和力结合位点,该位点通过未知机制促进血小板活化。

5 GPIb α 的 N 端球形域包含负电荷氨基酸簇。某些证据表明,在转染 CHO 细胞表达的 GPIb-IX 和血小板 GPIb α 中,该域中包含的 3 个酪氨酸残基被硫酸化(Tyr-276, Tyr-278 和 Tyr-279)。

蛋白硫酸化

10 蛋白硫酸化是常见的翻译后修饰,它涉及酶催化硫酸与糖侧链或多肽骨架的共价连接。该修饰过程可跨越高尔基腔室。硫酸化蛋白包含分泌蛋白、靶向颗粒的蛋白和质膜蛋白胞外区。酪氨酸为一种已知可硫酸化的氨基酸残基(Kehoe et al., Chem. Biol. 7: R57-61 (2000))。其它氨基酸如苏氨酸也可被硫酸化,尤其是在疾病细胞中。

15 已发现一些蛋白的酪氨酸被硫酸化,但同在 GPIb 上发现的那样在一个多肽上存在 3 个或更多硫酸化酪氨酸的情况并不常见。GPIb α (CD42)由血小板和巨核细胞表达,通过结合 vWF 介导血小板在内皮下膜附着和滚动,其 N 端区域也包含众多负电荷。该高酸性和亲水环境被认为是硫酸化的先决条件,因为酪氨酸蛋白磺基转移酶特异性识别和硫酸化酸性氨基酸残基附近的酪氨酸(Bundgaard et al., J. Biol. Chem. 272: 21700-05 (1997))。GPIb α 酸性区的完全硫酸化产生带有显著负电荷密度的区域-19 个氨基酸的长度中带 13 个负电荷-成为与其它蛋白静电相互作用的候选位点。

25 硫酸化 N 端酪氨酸还被认为可影响 CC 趋化因子受体如 CCR5 的作用,所述受体作为相关 7 个跨膜片段(7TMS)受体的共同受体,涉及人类和猿免疫缺陷病毒(HIV-1、HIV-2 和 SIV)进入目标细胞。例如,硫酸化 N 端酪氨酸被认为有助于 CCR5 与 MIP-1 α 、MIP-1 β 、和 HIV-1 gp120/CD4 复合体的结合,有助于 HIV-1 进入表达 CCR5 和 CD4 的细胞。另一个重要的 HIV-1 共同受体 CXCR4 也可硫酸化

(Farzan et al., Cell 96 (5): 667-76 (1999)). 与依赖 CCR5 的进入相比, 在依赖 CXCR4 的 HIV-1 进入中, 酪氨酸硫酸化的作用较不显著; 因此表明了酪氨酸硫酸化在 CXC 趋化因子家族中可能的作用, 以及 HIV-1 利用 CCR5 和 CXCR4 的一般区别(Farzan et al., J Biol. Chem. 277 (33): 29,484-89 (2002)).

选择蛋白和 PSGL-1

P、E 和 L 选择蛋白是粘附分子家族的成员, 所述分子家族的功能之一是介导白细胞在血管内皮上的滚动。P 选择蛋白以颗粒形式贮藏于血小板中, 在血小板被凝血酶、组胺、佛波醇酯或其它刺激分子活化后被输送至表面。P 选择蛋白也表达于活化内皮细胞上。E 选择蛋白表达于内皮细胞上, L 选择蛋白表达于嗜中性细胞、单核细胞、T 细胞和 B 细胞上。

PSGL-1(也称为 CD162)为 P 选择蛋白、E 选择蛋白和 L 选择蛋白的粘蛋白糖蛋白配体, 它与 GPIb 具有相似结构(Afshar-Kharghan et al. (2001), 同前)。PSGL-1 为双硫键连接的同型二聚体, 具有 PACE (配对碱性氨基酸转化酶)酶切位点。在 10-16 个富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸的十聚体之前, PSGL-1 还有 3 个潜在酪氨酸硫酸化位点。PSGL-1 的胞外部分包含 3 个 N 联糖基化位点和众多唾液酸化和岩藻糖化 O 联寡糖分支(Moore et al., J. Biol. Chem. 118: 445-56 (1992)). 大多数 N 聚糖位点和许多 O 聚糖位点已被占据。已测定了来源于人 HL-60 细胞的 PSGL-1 的 O 聚糖结构。这些 O 聚糖的亚型为 core-2, 其唾液酸化和岩藻糖化结构是与选择蛋白结合所必须的。PSGL-1 氨基端区域的酪氨酸硫酸化也是与 P 选择蛋白和 L 选择蛋白结合所必须的。此外, 还有可翻译后切除的 N 端前肽。

HL60 细胞中的 PSGL-1 具有 361 个残基, 其中有 267 个胞外区残基, 25 个跨膜残基和 69 个胞内区残基, 在细胞表面形成二硫键连接的同型二聚体或异型二聚体(Afshar-Kharghan et al., Blood 97:

3306-12 (2001))。编码 PSGL-1 的序列位于单个外显子中，因此不可能有可变剪接。但是，HL60 细胞和大多数细胞系中的 PSGL-1 在其胞外区具有 15 个连续重复的 10 残基共有序列，而多形核白细胞、单核细胞和某些其它细胞系(包括大多数天然白细胞)中具有 14 和 16 个重复的该序列。

嗜中性细胞上 PSGL-1 表达为二聚体，表观分子量为 250kDa 和 160kDa，而在 HL60 上二聚体的表观分子量为约 220kDa。当在还原条件下分析时，每个亚基被不完全还原(reduced by half)。其分子量差异是由于分子多态性所致，所述多态性是十聚体重复数量不同引起的(Leukocyte Typing VI. Edited by T. Kishimoto et al. (1997))。

大多数血液白细胞，如嗜中性细胞、单核细胞、白细胞、B 细胞亚群和所有 T 细胞表达 PSGL-1(Kishimoto et al. (1997)，同前)。PSGL-1 介导白细胞在活化内皮、活化血小板、其它白细胞上以及炎症部位上的滚动，还介导嗜中性细胞在 P 选择蛋白上的滚动。PSGL-1 也可通过结合 L 选择蛋白介导嗜中性细胞-嗜中性细胞相互作用，因此介导炎症(Snapp et al., Blood 91 (1): 154-64 (1998))。

白细胞滚动在炎症中很重要，P 选择蛋白(表达于活化内皮和血小板上，可固定在损伤部位)和 PSGL-1 间的相互作用使白细胞在血管壁上附着并滚动(Ramachandran et al., PNAS 98 (18): 10166-71 (2001); Afshar-Kharghan et al. (2001)，同前)。细胞滚动在转移中也很重要，内皮细胞上的 P 和 E 选择蛋白被认为可与转移细胞结合，因此促进其从血流外渗到周围组织中。

因此，发现 PSGL-1 存在于所有白细胞上：嗜中性细胞、单核细胞、淋巴细胞、活化外周 T 细胞、粒细胞、嗜酸性细胞、血小板、某些 CD34 阳性干细胞和特定 B 细胞亚群。P 选择蛋白选择性表达于活化血小板和内皮细胞上。P 选择蛋白和 PSGL-1 间的相互作用促进白细胞在血管壁上的滚动，白细胞在血管部位上的异常聚集导致各种病理性炎症。PSGL-1 上各个酪氨酸硫酸酯的立体特异性对于 P 选

择蛋白与 PSGL-1 的结合很重要。电荷对于结合也很重要: 降低 NaCl (从 150 到 50mM)增强结合(Kd ~ 75nM)。PSGL-1 上酪氨酸的硫酸化增强 PSGL-1 粘附在 P 选择蛋白上, 但不是粘附必需的。PSGL-1 酪氨酸硫酸化在所有剪切速率下都支持更慢的滚动粘附, 并在更高的剪切速率下支持滚动粘附(Rodgers et al., Biophys. J. 81: 2001-09 (2001))。此外, 有人提出 PSGL-1 在血小板上的表达是在白细胞上表达的 25-100 分之一(Frenette et al., J. Exp. Med. 191 (8): 1413-22 (2000))。

商业化供应的抗人 PSGL-1 单克隆抗体 KPL1 已表明可抑制 PSGL-1 和 P 选择蛋白间以及 PSGL-1 和 L 选择蛋白间的相互作用。KPL1 表位定位于 PSGL-1 的酪氨酸硫酸化区域(YEYLDYD)(Snapp et al., Blood 91 (1): 154-64 (1998))。

用 O-唾液酸糖蛋白酶预处理肿瘤细胞也抑制肿瘤细胞-血小板复合物的形成, 所述处理除去了唾液酸化和岩藻糖化粘蛋白配体。体内实验表明这些治疗中的任一种导致更多单核细胞与循环肿瘤细胞的结合, 表明降低血小板结合可促使免疫细胞接触循环肿瘤细胞(Varki and Varki, Braz. J. Biol. Res. 34 (6): 711-17 (2001))。

纤维蛋白原

有 2 种正常人纤维蛋白原-正常 γ 型和 γ' 型, 每种都可在正常个体中找到。正常纤维蛋白原为主(占体内总纤维蛋白原的约 90%), 由 2 个相同 55kDa α 链、2 个相同 95kDa β 链和 2 个相同 49.5kDa γ 链组成。正常变体纤维蛋白原较少(占体内总纤维蛋白原的约 10%), 由 2 个相同 55kDa α 链、2 个相同 95kDa β 链、1 个 49.5kDa γ 链和 1 个变体 50.5kDa γ' 链组成。 γ 链和 γ' 链均由相同基因编码, 由 3'端发生可变剪接形成。正常 γ 链由 1-411 位氨基酸组成, 变体 γ 链由 427 个氨基酸组成, 其中 1-407 位氨基酸与正常 γ 链相同而 408-427 位氨基酸为 VRPEHPAET EYDSL YPEDDL。该区域通常由凝血酶分

子占据。

纤维蛋白原经凝血酶作用在离子化钙存在下被转化为纤维蛋白，使血液产生凝结。纤维蛋白也是血栓和急性炎症渗出物的成分。

5 目的

本发明目的之一是提供抗体、其片段或其复合物，所述抗体、其片段或其复合物与各种分子上的表位结合，所述分子涉及如细胞滚动、炎症、免疫反应、感染、自身免疫反应和转移等过程，但不涉及如粘附、血栓形成和/或再狭窄和聚集等过程，所述表位存在于疾病细胞上，如 AML 细胞、T-ALL 细胞、Pre-B-ALL 细胞、B 白血病、B-CLL 细胞、多发性骨髓瘤细胞和转移细胞。

本发明的另一个目的包含上述抗体在药物开发和制备中的用途，所述药物用于抑制细胞滚动、炎症、免疫反应、感染、自身免疫反应和转移，但不涉及粘附、血栓形成和/或再狭窄和聚集，该药物还用于治疗疾病如 AML、T-ALL、B 白血病、B-CLL、Pre-B-ALL、多发性骨髓瘤、转移、心血管疾病如心肌梗塞、视网膜疾病、依赖硫酸化酪氨酸的蛋白-蛋白相互作用导致的疾病，或这些细胞功能或作用起明显作用的其它疾病。

本发明还有一个目的是上述抗体在诊断、预测预后或分期不同疾病状态个体的方法中的应用，所述疾病如 AML、T-ALL、B 白血病、B-CLL、Pre-B-ALL、多发性骨髓瘤和转移，或细胞功能或作用如细胞滚动、炎症、免疫反应、感染、自身免疫反应、转移等起明显作用的其它疾病。本发明的另一个目的是提供消除肿瘤细胞的方法。

25 本发明的另一个目的是提供通过给予所述抗体活化 ADCC 或刺激 NK 细胞或 T 细胞的方法。

本文中提供了本发明的上述和其它目的。

发明简述

5 本发明提供具有 SEQ ID NO:1 scFv 抗体片段结合能力的抗体或其片段。本发明还提供抗体或其片段，其中至少一种抗体或其结合片段具有 SEQ ID NO:2 的第一高变区、SEQ ID NO:3 的第二高变区和/或 SEQ ID NO:4 的第三高变区。本发明的抗体或其片段优选与 PSGL-1 的表位结合或交叉反应。本发明抗体或其片段还优选与至少一种下述细胞上的表位结合，所述细胞选自 T-ALL、AML、B 白血病、B-CLL 和多发性骨髓瘤白血病细胞。

10 本发明还提供分离的表位，所述表位具有可与本发明抗体或其结合片段结合的氨基酸序列。优选该分离的表位位于成熟 PSGL-1 的 1 和 17 位氨基酸之间，处于负电荷氨基酸簇之中。

15 本发明还提供上述抗体或其片段的药用组合物和生产上述抗体或其片段的方法。本发明还提供用该药用组合物治疗各种疾病的方法，所述疾病包含涉及抑制或治疗细胞滚动；抑制或治疗炎症；抑制或治疗自身免疫疾病；抑制或治疗感染(如 HIV 等病毒感染)；抑制或治疗转移；抑制或治疗肿瘤细胞生长和/或增殖；增加肿瘤细胞死亡率；抑制白血病细胞生长和/复制；增加白血病细胞死亡率；改变疾病细胞对抗病药损伤的敏感性；增加肿瘤细胞对抗癌药损伤的敏感性；增加白血病细胞对抗白血病药损伤的敏感性；抑制患有肿瘤的患者中肿瘤细胞数量的增加；降低患癌症的患者中肿瘤细胞的数量；抑制患有白血病的患者中白血病细胞数量的增加；降低患白血病的患者中白血病细胞的数量。本发明还提供用本发明抗体或其片段引起 ADCC 或刺激 NK 细胞或 T 细胞的其它方法。

20 本发明还提供消除患者肿瘤细胞的方法，所述方法为提供取自患者的细胞样品，将患者细胞与本发明抗体或多肽温育。

定义

抗体(Ab)或免疫球蛋白(Ig)为与抗原结合的蛋白分子。天然产生

抗体的每个功能结合单位为通过二硫键连接的 4 个多肽链组成的单位(2 个重链和 2 个轻链)。每条链具有恒定区和可变区。天然产生抗体基于其重链成分可分为数类, 包含 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。IgG 类包含若干亚类, 包含但不限于 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。免疫球蛋白在体内由 B 淋巴细胞产生, 每个该分子识别特定外源抗原决定簇并促进所述抗原的清除。

可以用许多形式生产和使用抗体, 包括抗体复合物。本文使用的术语“抗体复合物”用于指 1 个或多个抗体与另 1 个抗体、或 1 个或多个抗体片段的复合物, 或 2 个或多个抗体片段的复合物。抗体片段的实例包含 Fv、Fab、F(ab')₂、Fc 和 Fd 片段。相应的, 本文使用的术语“抗体或其片段”包含抗体复合物。

如本文说明书和权利要求中所述, Fv 定义为由人抗体重链可变区和人抗体轻链可变区组成的分子, 所述可变区可相同或不同, 其中重链可变区与轻链可变区相连、结合、融合或共价连接。Fv 可为单链 Fv(scFv)或二硫键稳定的 Fv(dsFv)。scFv 包含抗体重链和轻链的可变区, 可变区由柔性氨基酸多肽间隔基或连接基连接。连接基可带支链或不带支链。优选连接基为 0-15 个氨基酸残基, 最优选连接基为(Gly₄Ser)₃。

Fv 分子本身包含第一链和第二链, 每条链具有第一、第二和第三高变区。轻链和重链可变区中的高变环称为互补决定区(CDR)。每条重链和轻链中有 CDR1、CDR2 和 CDR3 区。这些区域形成抗原结合位点, 并可被特别修饰以获得增强的结合能力。这些区域中本质上最多变的为重链 CDR3 区。CDR3 区被理解为 Ig 分子最暴露的区域, 并且如本文所示为对观察到的选择性和/或特异性结合特性起主要作用的位点。

Fv 分子的片段定义为任何小于原始 Fv 但仍保留原始 Fv 选择性和/或特异性结合特性的分子。该片段的实例包含但不限于(1)仅包含 Fv 重链片段的小型抗体(minibody), (2)包含抗体重链可变区微小片

段单位的微型抗体(国际申请号 PCT/IL99/00581), (3)具有轻链片段的相似抗体(similar bodies), 和(4)具有轻链可变区功能单位的相似抗体。应领会的是 Fv 分子片段可为大致圆形或环形的多肽。

本文使用的术语“Fab 片段”为免疫球蛋白的单价抗原结合片段。

5 Fab 片段由轻链和部分重链组成。

F(ab')₂ 片段为通过胃蛋白酶消化免疫球蛋白得到的二价抗原结合片段。它包含 2 条轻链和 2 条重链的部分。

Fc 片段为免疫球蛋白的非抗原结合部分。它包含重链 C 端部分和 Fc 受体结合位点。

10 Fd 片段为免疫球蛋白重链可变区和第一恒定区。

多克隆抗体为免疫应答的产物, 由一些不同 B 淋巴细胞产生。单克隆抗体来源于单个克隆 B 细胞。

本发明中定义且应用于多肽的盒是指给定的连续氨基酸序列, 它作为骨架, 被认为是一个单位, 可以对其进行操作。可在其一端或两端置换、插入、缺失或连接多个氨基酸。同样, 可在其一端或
15 两端置换、插入、缺失或连接多个氨基酸区段。

本文使用的术语“表位”指与抗体、抗体片段、抗体复合物或具有其结合片段的复合物或 T 细胞受体相互作用的抗原决定簇或识别位点或抗原位点。本文使用的术语表位可与术语配体、域和结合
20 区域互换。

本文中的选择性定义为目标分子从实体或实体态混合物中选择并结合一种实体或细胞的能力, 其中所有实体或实体态可对目标分子有特异性。

本文使用的术语“亲合力”是衡量结合分子(如抗体上的一个结合位点)和配体(如抗原决定簇)之间结合力量(结合常数)。抗体上的各个抗原结合位点和各个表位之间非共价相互作用的力量总和即为抗体对该表位的亲合力。低亲合力抗体与抗原结合较弱并倾向解离, 而高亲合力抗体与抗原结合更紧密并保持结合状态更长时间。术语
25

“抗体亲抗原性”与亲合力有所区别，因为前者反映抗原-抗体相互作用的效力。

5 抗体-抗原相互作用的特异性：虽然抗原-抗体反应是特异的，但某些情况下用一种抗原产生的抗体可与另一种无关抗原产生交叉反应。如果 2 个不同抗原具有同源或相似结构、表位或其锚定区，或如果特异性针对某一表位的抗体与具有相似结构构像或化学性质的无关表位结合，即发生交叉反应。

10 血小板为巨核细胞的圆盘形胞质碎片，它在骨髓窦中脱落，随后在外周血流中循环。血小板具有某些生理功能，包括在凝血中起的主要作用。血小板包含位于中心的颗粒和外周透明胞质，但没有明确的核。

本文使用的凝集指悬浮的细菌、细胞、血小板或其它类似大小的颗粒粘附形成凝块的过程。该过程与沉淀相似，但颗粒较大，多为悬浮液而不是溶液。

15 术语聚集指血小板与凝血酶和胶原共同作为连续机制的一部分在体外引起的结块，形成血栓或止血栓。

20 保守氨基酸置换定义为氨基酸组成的改变，所述改变通过变换肽、多肽或蛋白或其片段中 1 或 2 个氨基酸进行。该置换是具有相似性质的氨基酸(如酸性、碱性、芳香形、大小、正或负电荷、极性、非极性)，因此置换不会实质性改变肽、多肽或蛋白的特性(如电荷、等电点、亲合力、抗体亲抗原性、构象、溶解性)或活性。一般保守氨基酸置换发生在下列氨基酸组中：

甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)和异亮氨酸(I)；

天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)；

25 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)；

组氨酸(H)、赖氨酸(K)和精氨酸(R)；

天冬酰胺(N)和谷酰胺(Q)；

苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。

保守氨基酸置换可在以下区域中进行, 如对分子选择性和/或特异性结合特性起主要作用的高变区侧翼区域, 以及分子的其它部分如可变重链盒。此外, 修饰可通过重建分子完成, 以形成全尺寸抗体、二体(二聚体)、三体(三聚体)和/或四体(四聚体), 或形成小型抗体或微型抗体。

噬菌粒定义为携带质粒 DNA 的噬菌体颗粒。噬菌粒为设计含有丝状噬菌体复制原点如 fd 噬菌体 m13 的质粒载体。由于携带质粒 DNA, 噬菌粒颗粒没有足够空间包含整套噬菌体基因组。噬菌体基因组中缺失的成分为组装噬菌体颗粒必须的信息。因此, 为繁殖噬菌体, 必须将目标噬菌体颗粒与可补足组装信息缺失的辅助噬菌体共同培养。

启动子为 DNA 上 RNA 聚合酶结合并启动转录的区域。

噬菌体展示文库(也称为噬菌体肽/抗体文库、噬菌体文库或肽/抗体文库)包含大量噬菌体(10^8 或更多), 每个噬菌体颗粒展示不同的肽或多肽序列。这些肽或多肽片段可构建为各种长度。展示的肽或多肽的来源包含但不限于人抗体重链或轻链。

药用组合物指包含本发明抗体或肽或多肽及其药学可接受载体、赋形剂或稀释剂的制剂, 或指抗体-药物复合物和其药学可接受载体、赋形剂或稀释剂。

药物指用于对哺乳动物活动性疾病进行治疗、预防性治疗或诊断的药物, 哺乳动物包含但不限于人、牛、马、猪、小鼠、犬、猫或任何其它温血动物。药物选自放射性同位素、毒素、药用物质、寡核苷酸、重组蛋白、抗体片段、抗癌药、抗粘附药、抗血栓形成药、抗再狭窄药、抗自身免疫药、抗聚集药, 抗菌药、抗病毒药和抗炎药。这些药物其它的实例包含但不限于包含阿昔洛韦、更昔洛韦和齐多夫定的抗病毒药; 包含西洛他唑、达肝素钠、瑞肝素钠和阿斯匹林的抗血栓形成/再狭窄药; 包含扎托洛芬、普拉洛芬、屈噁昔康、乙酰水杨酸 17、双氯芬酸、布洛芬、右布洛芬、舒林酸、萘

普生、氨托美丁、赛来考昔、吲哚美辛、罗非考昔和尼美舒利的抗炎药；包含来氟米特、地尼白介素 2、subreum、WinRho SDF、去纤苷和环磷酰胺的抗自身免疫药；以及包含利马前列素、氟克罗孟和透明质酸的抗粘附/抗聚集药。

5 抗白血病药为具有抗白血病活性的药物。例如，抗白血病药包含抑制或停止白血病细胞或未成熟前白血病细胞生长的药物，杀死白血病细胞或前白血病细胞的药物，增加白血病细胞或前白血病细胞对其它抗白血病药敏感性的药物，以及抑制白血病细胞转移的药物。在本发明中，抗白血病药也可作为预防、抑制、延缓或停止肿瘤血管形成的抗血管生成活性药物。

10 对基因的表达模式的研究可通过分析在各种条件下、特定时间、各种组织中等产生的基因表达产物的量来进行。当基因产物的量比在正常对照如非病态对照中发现的量高时，认为基因是“过度表达”的。

15 某种细胞可在其表面表达具有给定抗体结合位点(或表位)的蛋白，但在细胞某阶段中结合位点可以隐蔽形式存在(如空间位阻或封闭，或缺乏结合抗体所需特性)，这被称为第一期(I 期)。I 期可为正常、健康、非疾病状态。当表位以隐蔽形式存在时，它不被给定抗体识别，即没有抗体与该表位或 I 期给定细胞结合。但是，该表位可由于其本身经历修饰、或由于其附近或相连分子被修饰或由于某区域经历构象改变而暴露。修饰的实例包含折叠改变、翻译后修饰的改变、磷脂化的改变、硫酸化的改变、糖基化的改变等。这些改变可在细胞进入不同阶段时发生，这被称为第二期(II 期)。第二期的实例包含活化、增殖、转化或处于恶性状态。经过修饰，表位暴露，

20 抗体可与其结合。

25 肽模拟物为氨基酸之间不包含任何肽键即酰胺键的分子(如抗体)；但是，在本发明内容中，术语肽模拟物包含不完全为天然肽的分子，如伪肽、半肽和类肽。无论是完全或部分为非肽，本发明的

肽模拟物提供空间排列的反应性化学部分，与用作肽模拟物基础的肽中活性基团的三维排列非常类似。这些分子包含小分子、脂、多糖或其结合物。

5

附图简述

图 1 表示 T-ALL 细胞用 TM3.13 scFv 染色后的 FACS 分析。

图 2 表示来自在 scFv 抗体存在下血小板聚集的 Lumiaggregometer 分析的数值数据，表示为洗涤血小板或 PRP 对照聚集的百分比。

图 3 表示比较各种 scFv 抗体与血小板结合的 FACS 分析：图 3A 为 AN51-PE(FSC)，图 3B 为 AN51-PE(FL2-H)，图 3C 为阴性对照，图 3D 为 Y1-myc+，图 3E 为 Y1，图 3F 为 L32，图 3G 为 TM1.1。

图 4 表示比较不同浓度 scFv 抗体(N01、Y1-myc+和 L32)竞争和干扰标记 Y1 抗体与 KG-1 细胞结合的 FACS 分析：图 4A 为 0ng，图 4B 为 100ng，图 4C 为 250ng，图 4D 为 500ng，图 4E 为 1000ng，图 F 为 2500ng，图 4G 为 5000ng。

图 5 表示比较 scFv 抗体(N01、Y1-myc+和 L32)竞争和干扰标记 Y1 抗体与 KG-1 细胞结合的 FACS 分析的数值数据。

图 6 表示来自提供不同浓度 scFv 抗体(TM1.1、Y1-myc+、Y1 和 L32)与糖盖蛋白结合比较的 ELISA 分析的数值数据。

图 7 表示 L32 和 Y1 scFv 抗体与 GC、血浆和 KG-1 和 Raji 细胞膜蛋白结合的 Western 分析。

图 8 表示提供不同浓度 scFv 抗体(Y1-myc+、TM1.1 和 L32)与纤维蛋白原、PSGL-1 和 GPIIb α 相关肽结合比较的 ELISA 分析的数值数据。

图 9 表示在各种浓度 GPIIb 衍生肽存在下血小板用 Y17 scFv 抗体染色后的 FACS 分析的数值数据。结果以单用 scFv 抗体所得反应降低百分比的几何平均值形式表示。

图 10 表示 Y1 和 Y17 scFv 抗体与各种不同位置硫酸化的 PSGL1

结合后 ELISA 分析的数值数据。

图 11 表示 FACS 分析的数值数据，比较 scFv 抗体(图 11A 为 TM1.1, 图 11B 为 TM1.3, 图 11C 为 L32)与 T-ALL 细胞和正常外周血细胞(N-PBL)的结合相对于各 scFv 抗体浓度的变化。

5 图 12 表示给予 L32 和 Y1 scFv 抗体对 SCID 小鼠 Molt4 细胞肿瘤模型中肝重量(图 12A)和肿瘤发生率(图 12B)的效果体内研究的数值数据。

发明详述

10 本发明涉及具有 SEQ ID NO:1 scFv 抗体片段结合 PSGL-1 能力的抗体或其片段。因此，这些本发明抗体具有与 SEQ ID NO:1 类似的结合亲合力。SEQ ID NO:1 的 scFv 片段被称为 L32。相应的，优选本发明抗体为 L32。该抗体通过筛选只在重链 CDR3 区有多样性的噬菌体文库确定，通过抗白血病细胞选择出识别白血病细胞表面抗原决定簇的特异性抗体，其中特异性受体事先未知或未鉴定。采用
15 同样的方法鉴定了另一个抗体 L31。虽然本发明包含许多抗体，L32 示例性用于下文中。

以前在美国申请号 10/032,423；10/032,037；10/029,988；10/029,926；09/751,181 和 60/258,948 以及国际申请号 PCT/US01/49442
20 和 PCT/US01/49440 中使用同样的噬菌体文库确定了其它与白血病细胞结合的抗体。这些申请中公开的抗体的具体实例包括 Y1 和 Y17 抗体。发现这些申请中公开的抗体与造血细胞蛋白上存在的表位特异性结合，所述表位 N 端酪氨酸被硫酸化，被认为涉及细胞迁移，如肿瘤转移。

25 L32 抗体和 Y1/Y17 申请中公开的抗体均与白血病细胞结合，虽然 L32 与白血病细胞结合的亲合力比 Y1 大约 5 倍。基于该事实，以及抗体分离自普通种系(DP32)这一事实，进行了比较研究以决定它们各自结合表位之间的相关性。随后证实 L32 结合的硫酸化表位与

提出其表达水平比在白细胞上低 25-100 倍(Frenette et al., J. Exp. Med. 191 (8): 1413-22 (2000)), 对 L32 与血小板的结合也进行了评价。但是发现 L32 只与血小板可忽略的结合, 而且不影响血小板聚集。表 1 中列出的为 Y1 的 scFv 和 IgG 相比于 L32 的 scFv 和 IgG 的概要。

5

表 1

	Y1 scFv	Y1 IgG	L32 scFv	L32 IgG
WBC 结合	低	高	高	很高
白血病细胞结合	低	高	高	很高
PSGL-1 反应性	低	高	高	很高
与 KPL1 竞争性	一些	是	是	是
血小板结合	高	高	低-无	低-无
血小板聚集	抑制	诱导	无影响	-
GPIb 反应性	结合	结合	很低-无	很低-无
胞质成分	纤维蛋白原	纤维蛋白原	未测到	很低-无
	γ' CCF4	γ' CCF4		
体外效果	未测到	ADCC	未测到	ADCC

前面鉴定的与 Y1/Y17 结合的硫酸化表位的特征为存在硫酸化部分, 如硫酸化酪氨酸残基或硫酸化糖类或脂部分, 优选在 2 个或更多氨基酸簇中, 所述硫酸化部分发现于配体和受体上, 在不同过程如炎症、免疫反应、感染、自身免疫反应、转移、粘附、血栓形成和/或再狭窄、细胞滚动和聚集中起重要作用。这些表位也在疾病细胞上发现, 如 B 白血病细胞、B-CLL 细胞、AML 细胞、多发性骨髓瘤细胞和转移细胞。这些表位为治疗这些过程的有用目标, 可用于包括分期的诊断或预测预后方法。

15

L32 scFv 对硫酸化 PSGL-1 选择性更强。在疾病如动脉粥样硬化的炎症过程中, 炎性白细胞如单核细胞、嗜中性细胞和淋巴细胞主

的炎症过程中，炎性白细胞如单核细胞、嗜中性细胞和淋巴细胞主要由4种粘附分子(PSGL-1、P选择蛋白、VLA-4和VCAM-1)募集(Huo and Ley, *Acta Physiol. Scand.*, 173: 35-43 (2001); Libby, *Sci. Am.* May: 48-55 (2002); Wang et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 38: 577-582 (2001))。

5 L32 对这些重要分子的干涉提示 L32 在消除相关疾病中的潜在作用。具体的说，P 选择蛋白调控细胞粘附和滚动。此外，P 选择蛋白和 PSGL-1 的相互作用激活一些细胞上与肿瘤产生(当涉及恶性细胞时)和炎症反应(当涉及白细胞时)整体相关的其它分子(Shebuski and Kilgore, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 729-735 (2002))。基于对 P 选择蛋白调控细胞过程能力的这种理解，显然 L32 scFv 对硫酸化 PSGL-1 更强的选择性可使其作为治疗各种恶性和炎症性疾病的分子更有优势。此外，恶性疾病的模型表明，P 选择蛋白与恶性细胞的结合需要 PSGL-1 的硫酸化(Ma and Geng, *J. Immunol.* 168: 1690-1696(2002))。这种要求与对 L32 结合的要求相似。因此可以预计，L32 可消除 P 选择蛋白对进行性恶性疾病的促进。

此外，还发现本发明抗体的结合依赖细胞发育阶段(AML 亚型使用在常规方法和细胞化学染色下观察到的形态学基于 French-American-British 系统划分)：抗体与 M3 亚型或以上的 AML 细胞结合，但与 M0 或 M1 亚型细胞不结合。此外，抗体可与 M2 亚型细胞结合或不可结合。相应的，本发明抗体不与正常健康骨髓细胞(如 CD34+细胞)结合。这些差异被认为是基于 PSGL-1 表达和/或硫酸化的改变，以及 PSGL-1 可能的暴露少许不同表位的构像变化。

25 优选本发明 L32 抗体与不同涉及炎症的分子或表位结合，如 PSGL-1。还优选 L32 抗体与至少一种涉及炎症或肿瘤发生的细胞上存在的表位结合，包含 T-ALL 细胞、AML 细胞和 B 白血病细胞。更优选本发明 L32 抗体与脂、糖类、肽、糖脂、糖蛋白、脂蛋白和/或脂多糖分子上的表位结合。所述表位优选具有至少一个硫酸化部分。或者但也优选 L32 抗体与两种或更多表位交叉反应，每种表位

具有 1 个或多个硫酸化酪氨酸残基和至少一个 2 个或更多酸性氨基酸的簇，其中一个实例为 PSGL-1。

在与细胞表面上存在的 PSGL-1 结合后，某些本发明抗体或其片段可内化进入细胞。一般完整 IgG 抗体可内化，而较小的抗体片段(如 scFv)不能内化。应当理解的是抗体可内化进入任何表达 PSGL-1 的细胞，例如包含 AML 细胞。内化可通过胞吞作用发生，所述胞吞为方式、时间和温度依赖的主动过程。

本发明 L32 抗体的高变区参与抗原结合位点的形成。抗原结合位点与抗体结合表位的结构互补，因此这些结合位点称为互补决定区(CDR)。抗体每条轻链和重链上有 3 个 CDR(CDR1、CDR2 和 CDR3)，每个位于与 V_H 和 V_L 结构域 β 片层相连的环上。这些区域中最易变的是重链 CDR3 区。CDR3 区被认为是 Ig 分子最暴露的区域，如本文所述在决定观察到的选择性和/或特异性结合特性中起中心作用。

DP32 为噬菌体展示文库 49 种系之一，是一种噬菌体文库特殊种系，本发明 scFv 抗体由其分离获得。因此，DP32 为本发明抗体至少提供重链和轻链骨架可变区、轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区，和/或重链 CDR1 和 CDR2。DP32 还提供与高变区一致的三维结构。抗体的特异性由其三维构像决定是熟知的。因此，DP32 施加的限制可在决定 L32 抗体特异性中起显著作用。此外，DP32 具有多种电荷氨基酸，这在 L32 抗体的识别中也起结构性作用。

根据本发明，CDR 可被插入盒中产生抗体。本发明中定义和应用用于多肽的盒指作为骨架的连续氨基酸给定序列，被认为是一个单位，可对其进行操作。可在其一端或两端置换、插入、缺失或连接多个氨基酸。同样，可在其一端或两端置换、插入、缺失或连接氨基酸区段。

盒的氨基酸序列大体是固定的，但置换、插入或连接序列是高度可变的。盒可包含某些区域，每个区域包含最终构成物重要的功

能。

本发明具体实施方案的盒从 N 端开始, 包含骨架区 1(FR1)、CDR1、骨架区 2(FR2)、CDR2、骨架区 3(FR3)和骨架区 4(FR4)。

5 在一个本发明实施方案中, 可在盒内置换明显的区。例如, 盒的 CDR2 和 CDR1 高变区可被非保守、优选保守氨基酸取代或修饰。

在本发明一个优选实施方案中, 抗体或其片段具有重链和轻链, 每条链具有第一、第二和第三高变区, 分别为 CDR3、CDR2 和 CDR1 区。具体的说, 一条链的 CDR3 区决定结合选择性和特异性, 即轻链 CDR3 区、优选为重链 CDR3 区、更优选为重链和轻链两者的 CDR3 10 区。其次, 结合选择性和特异性由轻链和重链(优选)的 CDR2 和 CDR1 区决定。第一、第二和/或第三高变区侧翼上游或下游区域也可影响结合选择性和特异性。

在本发明一个优选实施方案中, 至少一种抗体或其片段具有 SEQ ID NO:2 的第一高变区(CDR3)。此外, 至少一种抗体或其片段具有 SEQ 15 ID NO:3 的第二高变区(CDR2)。另外, 至少一种抗体或其片段具有 SEQ ID NO:4 的第三高变区(CDR1)。更优选至少一种抗体或其片段具有 SEQ ID NO:2 的第一高变区(CDR3)和 SEQ ID NO:3 的第二高变区(CDR2)以及 SEQ ID NO:4 的第三高变区(CDR1)。

20 在一个具体优选实施方案中, 至少一种抗体或抗体结合片段为具有 SEQ ID NO:1 的 scFv。

对于本文描述和详述的所有 ≤ 25 个氨基酸残基的氨基酸序列(如 CDR 区、CDR 侧翼区), 应理解并认为本发明进一步实施方案是这些氨基酸序列内包含 1 或 2 个氨基酸取代, 所述取代优选为保守氨基酸取代。对于本文描述和详述的所有大于 25 个氨基酸残基的氨基酸 25 序列, 应理解并认为本发明实施方案是这些氨基酸序列的范围内包含与原序列相似性 $\geq 90\%$ 的氨基酸序列(Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-402 (1997))。相似或同源氨基酸定义为具有相似性质的不同氨基酸, 如酸性、碱性、芳族、大小、正电荷或负电荷、极

性、非极性性质相似。

氨基酸相似性或同源性或序列相似性百分比通过比较 2 种不同肽或多肽的氨基酸序列决定。抗体序列由 DNA 测序决定。通常使用一种设计用于此目的的计算机程序，排列 2 段序列，在每个位置比较氨基酸残基。然后决定氨基酸的一致性或同源性。然后利用一种算法确定氨基酸相似性百分比。通常优选比较氨基酸序列，这是由于测定肽、多肽或蛋白分子之间精确关系的敏感性大大增强了。蛋白比较可考虑到保守氨基酸取代，因为如果不同氨基酸具有相似物理和/或化学性质时，错配可产生正分(Altschul et al. (1997)，同前)。

在本发明一个实施方案中，每个轻链和重链的 3 个高变区可在 2 条链之间以及链内和/或链间的 3 个高变位点之间互换。此外，可改变高变区的序列以跨越 2 个或更多 CDR。同样可发生在骨架可变区中，还可仅部分发生在 1 个 CDR 内。

本发明提供具有抗体或其抗原结合片段、或其构建物、或其片段构建物的肽或多肽。根据本发明，抗体包含 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 抗体。IgG 类包含若干亚型，包括 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 和 IgG₄。

抗体可以各种形式提供，如片段、复合物和多聚体。根据本发明，抗体片段包含 Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab₂ 和 Fd 分子。较小的抗体片段，如 Fv 片段和 Fab 片段，也包含在术语“片段”中，只要它们保留原始抗体或更大片段的结合特性。构建物包括例如二体、三体和四体的多聚体。除非另有说明或根据上下文和/或本领域知识表明，短语“抗体，其结合片段，或具有抗体或其结合片段的复合物”和“抗体或片段”包含所有这些分子，以及其衍生物、组合物、修饰物、同系物、模拟物及其变体。

已经确定的是 scFv 可穿过组织，因为其尺寸较小，其从血液中清除的速度比完整大小抗体快(Adams et al., Br. J Cancer 77: 1405-12 (1988); Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11 (5): 548-557 (1999); Wu et al., Tumor Targeting 4: 47 (1999))。因此，scFv 常用于涉及放射性

标记的诊断如肿瘤成像,使放射性标记更快从体内清除。某些癌症靶向性 scFv 多聚体最近在进行临床前体内稳定性和效力评价(Adams et al. (1988), 同前; Wu (1999), 同前)。

5 一般 scFv 单体设计为 V_H 域的 C 端通过多肽连接序列与 V_L 域的 N 端残基相连。任选使用相反方向: V_L 域的 C 端通过多肽连接序列与 V_H 域的 N 端残基相连(Power et al., *J. Immun. Meth.* 242: 193-204(2000))。多肽连接序列一般长度为 15 个氨基酸左右。当连接序列减少至 3-7 个氨基酸时, scFv 不能折叠为有功能的 Fv 域, 或者与第二个 scFv 相连形成二体。连接序列长度进一步减少至少于 3 个氨基酸时, 根据连接序列长度、组成和 Fv 域来源, 迫使 scFv 连接为三
10 体或四体(Powers(2000), 同前)。

最近发现, 多价抗体片段如 scFv 二体、三体或四体常提供超过其亲代抗体与目标结合的亲合力。该高亲合力提供了潜在的优势, 包括增强肿瘤靶向应用的药物动力学。此外, 在研究涉及白细胞粘
15 附和滚动的 P 选择蛋白及其配体 PSGL-1 时, 科学家推断表达 PSGL-1 二聚体形式的细胞由于其高结合亲合力表现出更稳定的滚动粘附。该粘附对剪切力抵抗性更高, 表现出更小的滚动速率变动(Ramachandran et al., *PNAS*, 98 (18): 10166-71 (2001))。

scFv 多价形式已由其它人设计和生产。一种方法是用连接序列
20 连接 2 个 scFv。另一种方法涉及在 2 个 scFv 之间使用二硫键连接。生产二聚体或三聚体 Fv 最简单的方法由 Holliger et al., *PNAS* 90: 6444-48 (1993)和 Kortt et al., *Protein Eng.* 10: 423-33 (1997)报道。一种设计用于制备 scFv 二聚体的方法是在 scFv 的 C 端加入 FOS 和 JUN 蛋白区序列, 在它们之间形成亮氨酸拉链(Kostelny et al., *J Immunol.*
25 148 (5): 1547-53 (1992); De Kruif et al., *J Biol Chem.* 271 (13): 7630-34 (1996))。另一种设计用于制备四聚体的方法是在 scFv 的 C 端加入链霉亲合素序列。链霉亲合素由 4 个亚基组成, 因此当 scFv-链霉亲合素折叠时, 4 个亚基形成四聚体(Kipriyanov et al., *Hum Antibody*

Hybridomas 6(3): 93-101(1995))。另一种制备二聚体、三聚体或四聚体的方法是在所需蛋白中引入游离半胱氨酸。基于肽的交联序列具有各种数量(2-4)的顺丁烯二酰亚胺基团,用于将所需蛋白与游离半胱氨酸交联(Cochran et al., Immunity 12(3): 241- 50(2000))。

5 这些多价形式更高的结合亲和力有利于诊断、预测预后、分期和治疗方案。例如, scFv 可用作与目标受体结合的阻断药物,因此阻断“天然”配体的结合。在该情况下,在 scFv 和受体之间的高亲和力结合是理想的,以降低解离的可能性,导致天然配体与目标不能有效结合。此外,在目标受体涉及粘附和滚动或当目标受体存在于高剪切力血流区的细胞如血小板上时,该高亲和力是有利的。

10 在该系统中,噬菌体文库(如本文以上所述)可设计用于展示 scFv,所述 scFv 可折叠为抗体 Fv 区的单价形式。此外,也如本文以上的讨论,构建物合适用于细菌表达。遗传工程 scFv 包含重链和轻链可变区,由连续编码 15 个氨基酸的柔性肽间隔基连接。优选间隔基为(Gly₄Ser)₃。该间隔基的长度同其氨基酸一起,提供一个不大的间隔基,允许 V_H和 V_L区折叠成可与其目标有效结合的有功能 Fv 域。

15 间隔基长度的变化是另一种形成二聚体、三聚体和四聚体(本领域通常分别指二体、三体和四体)的优选方法。二聚体在连接 2 个 scFv 可变链的间隔基缩短至通常 5-12 个氨基酸残基的条件下形成。该缩短的间隔基阻止同一分子的 2 个可变链折叠形成有功能的 Fv 域。作为替代,域被迫域另一分子的互补域配对,产生 2 个结合域。在优选方法中,仅有 5 个氨基酸(Gly₄Ser)的间隔基用于构成二体。该二聚体可形成自 2 个相同的 scFv,或形成自 2 个不同的 scFv,保留亲代 scFv 的选择性和/或特异性增强结合能力,和/或表现出增强的结合力或亲和力。

25 以相似的方式,三聚体在连接 2 个 scFv 可变链的间隔基缩短至通常少于 5 个氨基酸残基的条件下形成,防止同一分子的 2 个可变链折叠形成有功能的 Fv 域。作为替代,3 个独立 scFv 分子联合形成

三聚体。在一个优选方法中，通过除去该柔性间隔基获得三体。三体可形成自 3 个相同的 scFv，或形成自 2 个或 3 个不同 scFv，保留亲代 scFv 的选择性和/或特异性增强结合能力，和/或表现出增强的结合力或亲合力。

- 5 四体在连接 2 个 scFv 可变链的间隔基缩短至通常少于 5 个氨基酸残基的类似条件下形成，防止同一分子的 2 个可变链折叠形成有功能的 Fv 域。作为替代，4 个独立 scFv 分子联合形成四聚体。四体可形成自 4 个相同的 scFv，或形成自 1-4 个不同 scFv，并应保留亲代 scFv 的选择性和/或特异性增强结合能力，和/或表现出增强的结合力或亲合力。在间隔基通常少于 5 个氨基酸残基长度的情况下，是否形成三体或四体依赖混合物中具体 scFv 的氨基酸序列和反应条件。
- 10

- 一旦挑选出或开发出具有所需的结合能力的抗体、片段和构建物，使用本文提供的指导，在本领域技术人员的能力范围内可生产保留原始抗体特性的构建物和片段。例如，可制备完整抗体分子、Fv 片段、Fab 片段、Fab₂ 片段、二聚体、三聚体和其它构建物，它们保留了原始选定或开发出的抗体、片段和构建物的所需特性。
- 15

- 如果需要取代氨基酸但仍保留抗体或片段的特性，在本领域技术人员的能力范围内可进行保守氨基酸取代。可对抗体或片段进行修饰，如与各种药物连接，而不改变其结合特性。可对抗体或片段进行其它修饰，如为产生更稳定抗体或片段而进行的修饰，而不改变其特异性。例如，可进行类肽修饰、半类肽修饰、环肽修饰、N 端修饰、C 端修饰、肽键修饰、骨架修饰和残基修饰。在本说明书的指导下，在本领域技术人员的能力范围内还可测试修饰抗体或片段以评定它们的结合特性是否改变。
- 20
- 25

 同样的，使用本文提供的指导，在本领域技术人员的能力范围内可改变抗体、片段或构建物的结合特性，以获得具有更理想特性的分子。例如，一旦鉴定具有所需性质的抗体，可使用随机或定向

诱变以产生各种抗体变异体，并可筛选这些变异体以获得理想特性。

5 使用本领域已知的传统方法，技术人员还可确定其它具有 L32 scFv 结合能力的抗体或其片段。例如，其它抗体可用本文描述的生物淘选法分离，其中所述与 L32 结合的分子或细胞用于筛选特殊的噬菌体展示文库，尤其是来源于白血病、淋巴瘤和骨髓瘤患者的文库。

10 本发明抗体和片段还可具有可插入或连接的标记，所述标记有助于其制备和鉴定，可用于诊断或预测预后，包括分期。标记可随后从分子中除去。有用标记的实例包含 AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、谷氨酸-谷氨酸、HA、His6、HSV、HTTPhh、IRS、KT3、蛋白 C、S-TAG®、T7、V5 和 VSV-G(Jarvik and Telmer, Ann. Rev. Gen., 32, 601-18 (1998))。标记优选为 c-myc 或 KAK。

15 抗体、其抗体片段或构建物、肽、多肽、蛋白以及它们的片段及构建物可在原核或真核表达系统中生产。原核或真核系统中生产抗体和片段的方法是本领域熟知的。

20 如本发明所定义和本文的讨论，真核细胞系统指通过遗传工程方法生产肽或多肽的表达系统，其中宿主细胞为真核细胞。真核表达系统可为哺乳动物系统，哺乳动物表达系统中产生的肽或多肽在纯化后优选基本上不含哺乳动物污染物。其它真核表达系统的有用实例包含酵母表达系统。

25 用于生产本发明肽或多肽的原核系统优选使用大肠杆菌(*E. Coli.*)作为表达载体的宿主。大肠杆菌系统中生产的肽或多肽在纯化后基本上不含大肠杆菌污染蛋白。使用原核表达系统可导致某些或全部本发明提供的序列 N 端加入甲硫氨酸残基。如本领域已知，可在生产肽或多肽后除去 N 端甲硫氨酸残基，使肽或多肽的完全表达，一个实例是在合适条件下使用气单胞菌(*Aeromonas*)氨肽酶(美国专利号 5,763,215)。

在本发明一个优选实施方案中，生产抗体或其片段的方法具有

以下步骤：(a)获得噬菌体展示文库；(b)获得分子或细胞，所述分子或细胞可与具有 SEQ ID NO:1 的 scFv 抗体片段结合能力的抗体或其片段结合；(c)筛选噬菌体展示文库以获得展示与分子或细胞结合的寡肽或多肽的噬菌体颗粒；和(d)生产抗体或其片段，包括至少一种抗体或其结合片段而且包括可与分子或细胞结合的肽或多肽。

本发明抗体和多肽可与各种药用物质复合(如结合、联合、融合或连接)，如药物、毒素和放射性同位素，任选还有药学有效的载体，形成包含抗体/多肽和抗病和/或抗癌活性药用物质的肽-药物组合物。该组合物可用于诊断目的。

用于本发明的载体实例包含葡聚糖、HPMA(一种亲水聚合物)、或其它聚合物如亲水聚合物，及其衍生物、结合物和修饰物。或者，可使用修饰脂质体，如 scFv Y1 分子修饰的脂质体(如 Doxil，一种商品化供应的包含大量多柔比星的脂质体)。可制备这种脂质体，使其包含 1 种或多种所需药物并与本发明抗体混合，以提供较高的药物/抗体比率。

或者，抗体或其片段和药物之间的连接可为直接连接。可通过分子中元素或元素基团之间的化学键产生 2 个或更多相邻分子之间的直接连接。化学键可为，例如，离子键、共价键、疏水键、亲水键、静电键或氢键。本发明键可为，例如，酰胺键、碳-硫键、肽键和/或二硫键。为了将抗体与药物或连接序列相相连，可使用胺、羧基、羟基、巯基和酯功能基团，用本领域已知技术形成共价键。

肽和药物之间或肽和载体之间或载体和药物之间的连接可通过连接化合物完成。本文说明书和权利要求中使用的连接化合物定义为连接 2 个或更多部分的化合物。连接化合物可为直链或支链。支链连接化合物可包含双分支、三分支、四分支或更多分支的化合物。用于本发明的连接化合物可选自二羧酸、顺丁烯二酰亚胺基酰肼(maleimido hydrazides)、PDPH、羧酰肼和小肽。

用于本发明的连接化合物更具体实例包含：(a)二羧酸如丁二酸、

戊二酸和己二酸；(b)顺丁烯二酰亚胺基酰肼如 N-[顺丁烯二酰亚胺基己酸]酰肼、4-[N-顺丁烯二酰亚胺基甲基]环己烷基-1-羧酰肼和 N-[顺丁烯二酰亚胺基十一酸]酰肼；(c)(3-[2-吡啶基二硫]丙酰肼)；和(d)选自 2-5 碳原子的羧酰肼及其衍生物、结合物、修饰物和类似物。

5 也可使用小肽连接化合物通过直接偶联连接。例如抗癌药多柔比星游离糖和 scFv 的直接偶联连接可用小肽完成。小肽的实例包含 AU1、AU5、BTag、c-myc、FLAG、谷氨酸-谷氨酸、HA、His6、HSV、HTTAPHH、IRS、KT3、蛋白 C、S-TAG®、T7、V5、VSV-G 和 KAK。

10 本发明抗体及其片段可与成像剂(也称为指示性标记)(如放射性同位素)结合、连接、复合或以其它方式联合,所述连接物可用于诊断、预测预后、分期或成像目的。可提供具有放射性同位素-抗体(或片段)连接物的试剂盒。

15 用于诊断、预测预后或分期的放射性同位素的实例包含 ¹¹¹ 铟、¹¹³ 铟、^{99m} 锝、¹⁰⁵ 锝、¹⁰¹ 锝、^{99m} 锝、^{121m} 碲、^{122m} 碲、^{125m} 碲、¹⁶⁵ 铟、¹⁶⁷ 铟、¹⁶⁸ 铟、¹²³ 碘、¹²⁶ 碘、¹³¹ 碘、¹³³ 碘、^{81m} 氩、³³ 氩、⁹⁰ 钇、²¹³ 铋、⁷⁷ 溴、¹⁸ 氟、⁹⁵ 钷、⁹⁷ 钷、¹⁰³ 钷、¹⁰⁵ 钷、¹⁰⁷ 汞、²⁰³ 汞、⁶⁷ 镓和 ⁶⁸ 镓。优选放射性同位素不透过 X 射线或任何顺磁性离子。

指示性标记分子还可为荧光标记分子。荧光标记分子的实例包含荧光黄、藻红蛋白或蓝光碱性萘香红,或其修饰物或连接物。

20 与指示性标记分子连接的抗体或片段可用于诊断、预测预后或分期,通过提供含有患者细胞的样品,确定本发明抗体是否与患者细胞结合,由此表明患者有危险患或患有疾病。此外,本发明还提供消除患者肿瘤细胞的方法,所述方法通过提供包含患者细胞的样品,并将患者细胞与本发明抗体温育。这些活动可在体内、体外或
25 离体进行。当在体内或离体进行时,成像剂优选为生理学可接受的,即其不会伤害患者至不可接受的程度。可接受的伤害程度可由临床医师根据疾病严重程度和其它备选药物等标准决定。

对于癌症,患者疾病的分期通常根据大小、类型、位置和肿瘤

侵袭决定疾病分类。一种通过肿瘤特征对癌症分类的系统为“TNM恶性肿瘤分类”(6th Edition)(L. H. Sobin, Ed.), 所述系统通过整体引用结合到本文中, 该系统根据癌症大小和位置将其分为 T、N 和 M 三类, T 表示原发肿瘤, N 表示局部淋巴结, M 表示远处转移。此外, 数字 I、II、III 和 IV 用于表示期, 每个数字指 TNM 因子可能的组合。例如, I 期乳腺癌由 TMN 类定义为: T1,N0, M0, 这表示: T1-肿瘤直径为 2cm 或更小, N0-没有局部淋巴结转移, M0-没有远处转移。另一个系统用于分期 AML, 使用在常规处理和细胞化学染色下观察到的形态根据 French-American-British 系统划分亚型。

此外, 最近世界卫生组织(WHO)建议的对造血组织和淋巴组织瘤性疾病的分期或分类包括(尤其对于 AMLS)传统 FAB 型疾病分类, 以及涉及特殊细胞遗传发现的其它疾病类型和与骨髓增生异常相关的 AML。还有其它人建议的病理学分类。例如, 一种特别针对 AML 的建议包括涉及特殊细胞遗传易位的疾病类型, 可通过形态学鉴定和免疫表型可靠的识别, 所述分类体现了相关骨髓增生异常改变的重要性。该系统得到细胞遗传或分子遗传研究支持, 并且随着描述新的可识别临床病理实例的出现还可扩展(Arber, Am. J. Clin. Pathol. 115 (4): 552-60 (2001))。

本发明提供诊断、预测预后或分期试剂盒, 用于治疗前、治疗期间或治疗后治疗效果的体外分析, 所述试剂盒具有与指示性标记分子或成像剂相连的本发明肽。本发明进一步提供使用成像剂对癌症, 更具体的说是肿瘤, 诊断性定位、生存预后预测、分期或成像的方法, 包括以下步骤: (a)使细胞与组合物接触; (b)测定与细胞结合的放射性; 因此(c)显示肿瘤。

合适成像剂的实例包含荧光染料, 如 FITC、PE 等, 以及荧光蛋白, 如绿色荧光蛋白。其它实例包含放射性分子和与底物反应产生可识别变化(如颜色变化)的酶。

在一个实施例中, 试剂盒的成像剂为荧光染料, 如 FITC, 试剂

盒提供癌症治疗效果的分析，更具体的说是造血相关癌症，如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。FACS 分析用于测定疾病各期的成像剂染色细胞的百分比和染色强度，如诊断时、治疗期间、缓解期和复发期。

5 本发明抗体及其片段可与抗癌药、抗肿瘤药、抗病毒药、抗转移药、抗炎药、抗血栓形成药、抗再狭窄药、抗聚集药、抗自身免疫药、抗粘附药、抗心血管病药、药用物质或其它抗病药结合、连接或以其它方式缔合。药物指用于对哺乳动物进行预防性治疗或诊断的药物，所述哺乳动物包含但不限于人、牛、马、猪、小鼠、犬、猫或任何其它温血动物。

10 所述药物的实例包含但不限于包括阿昔洛韦、更昔洛韦和齐多夫定的抗病毒药；包括西洛他唑、达肝素钠、瑞肝素钠和阿斯匹林的抗血栓形成/再狭窄药；包括扎托洛芬、普拉洛芬、屈噁昔康、乙酰水杨酸 17、双氯芬酸、布洛芬、右布洛芬、舒林酸、萘普生、氨托美丁、赛来考昔、吲哚美辛、罗非考昔和尼美舒利的抗炎药；
15 包括来氟米特、地尼白介素 2、subreum、WinRho SDF、去纤苷和环磷酰胺的抗自身免疫药；以及包括利马前列素、氯克罗孟和透明质酸的抗粘附/抗聚集药。

20 示例性药用物质包含萘环类抗生素，如多柔比星(阿霉素)、柔红霉素(道诺霉素)、伊达比星、地托比星、洋红霉素、表柔比星、依索比星、吗啉和取代衍生物及其组合物。更多示例性药用物质包含顺铂、泰素、加利车霉素、长春新碱、阿糖胞苷(Ara-C)、环磷酰胺、强的松、氟达拉滨、伊达比星、苯丁酸氮芥、干扰素 α 、羟基脲、替莫唑胺、沙利度胺和博莱霉素，以及它们的衍生物、组合物和修饰物。

25 癌细胞生长的抑制包括，例如，(i)阻止癌性或转移性生长，(ii)减缓癌性或转移性生长，(iii)完全阻止癌细胞的生长过程或转移过程，而保持细胞完整和存活，(iv)干扰癌细胞与微环境的接触，或(v)杀死癌细胞。

白血病细胞生长的抑制包括,例如,(i)阻止白血病性或转移性生长,(ii)减缓白血病性或转移性生长,(iii)完全阻止白血病细胞的生长过程或转移过程,而保持细胞完整和存活,(iv)干扰癌细胞与微环境的接触,或(v)杀死白血病细胞。

5 用于连接本发明抗体及其片段的抗病药、抗癌和抗白血病药的实例包括毒素、放射性同位素和药物。

毒素的实例包含白树毒素、假单胞菌外毒素(PE)、PE40、PE38、白喉毒素、蓖麻毒素、或它们的衍生物、组合物和修饰物。

10 放射性同位素的实例包含可用于定位和/或治疗的 γ 发射物、正电子发射物和 X 射线发射物,以及可用于治疗的 β 发射物和 α 发射物。前述用作诊断、预测预后和分期的放射性同位素也可用于治疗。

15 非限制性抗癌或抗白血病药实例包含蒽环霉素如多柔比星(阿霉素)、柔红霉素(道诺霉素)、伊达比星、地托比星、洋红霉素、表柔比星、依索比星、以及它们的吗啉代及取代衍生物、组合物和修饰物。示例性药用物质包含顺铂、泰素、加利来霉素、长春新碱、阿糖胞苷(Ara-C)、环磷酰胺、强的松、柔红霉素、伊达比星、氟达拉滨、苯丁酸氮芥、干扰素 α 、羟基脲、替莫唑胺、沙利度胺、博莱霉素以及它们的衍生物、组合物和修饰物。优选抗癌药或抗白血病药为多柔比星、吗啉代多柔比星或吗啉代柔红霉素。

20 在一个实施方案中,本发明提供通过给予本发明抗体诱导或活化 ADCC 的方法。相应的,这些抗体可活化 ADCC 和/或刺激天然杀伤细胞(NK)(如 CD56+), T 细胞毒性细胞(如 CD8+), 和/或单核细胞,它们可导致细胞裂解。一般来说,给予包含 Fc 区的抗体或抗体部分后,所述抗体与效应细胞(例如 NK 细胞)上的 Fc 受体(FcR)结合,引起穿孔素和粒酶 B 的释放,导致细胞凋亡。各种因素可影响 ADCC,包括涉及效应细胞的类型、细胞因子(例如 IL-2 和 G-CSF)、温育时间、存在于细胞表面受体的数量和抗体亲合力。

25 在一个实施方案中,本发明药用组合物包含具有 SEQ ID NO:1

的 scFv 抗体片段结合能力的抗体或其片段和药学可接受载体。该抗体或其片段的量为有效剂量，所述有效剂量可有效抑制或治疗细胞滚动、炎症、感染、自身免疫疾病、转移、肿瘤细胞或白血病细胞的生长和/或增殖，或有效抑制或治疗患肿瘤的患者中肿瘤细胞或患白血病的患者中白血病细胞数量的增加。或者，抗体或其片段的量为有效剂量，可有效增加肿瘤细胞或白血病细胞的死亡率。又或者，抗体或其片段的量为有效剂量，可有效改变疾病细胞对抗病药损伤、肿瘤细胞对抗癌药损伤或白血病细胞对抗白血病药损伤的敏感性。再一方面，抗体或其片段的量为有效剂量，可有效降低患肿瘤的患者中肿瘤细胞的数量或患白血病的患者中白血病细胞的数量。

本发明抗体、构建物、连接物和片段可通过合适的方法给予需要的病人。示例性方法包括静脉内、肌内、皮下、局部、气管内、鞘内、腹膜内、淋巴内、鼻、舌下、口服、直肠、阴道、呼吸道、口腔、真皮内、透皮或胸膜内给药。

对于静脉内给药，优选制备制剂使给予患者的所需组合物剂量为约 0.1mg-约 1000mg 的有效剂量。更优选给予所需组合物的剂量在约 1mg-约 500mg 的范围中。本发明组合物在较大的剂量范围内有效，并依赖许多因素，如所治疗疾病的具体情况、基于肽或多肽的药用组合物在患者体内的半衰期、与抗体或其片段以及药用组合物复合的药物的物理和化学性质、药用组合物的给药方法、所治疗或诊断患者的具体情况、以及治疗医师认为重要的其它参数。

用于口服给药的药用组合物可为任何合适的形式。实例包括片剂、液体剂、乳剂、悬浮剂、糖浆剂、丸剂、胶囊型片剂和胶囊剂。制备药用组合物的方法是本领域熟知的(见如 Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (pub))。

还可配制本发明药用组合物，以有助于定时、持续、脉冲或连续释放。本发明药用组合物还可通过装置给药，如定时、持续、脉

5 冲或连续释放装置。用于局部给药的药用组合物可为任何合适的形式，如霜剂、软膏剂、洗剂、贴剂、溶液剂、悬浮剂、冷冻干燥剂和凝胶剂。具有本发明抗体、构建物、连接物和片段的组合物可包含传统药学可接受的稀释剂、赋形剂、载体等。片剂、丸剂、胶囊型片剂和胶囊剂可包含传统的赋形剂如乳糖、淀粉和硬脂酸镁。栓剂可包含赋形剂如蜡和甘油。可注射溶液包含无菌无热原介质，如盐水，还可包含缓冲剂、稳定剂或防腐剂。还可使用传统的肠衣。

10 本发明抗体或其片段及其药用组合物可用于治疗需要患者疾病的方法(如治疗可包括缓解疾病症状、预防疾病或抑制疾病进展)。所述方法包括抑制或治疗细胞滚动、炎症、自身免疫疾病、转移、肿瘤细胞或白血病细胞的生长和/或增殖，或抑制或治疗患肿瘤的患者中肿瘤细胞或患白血病的患者中白血病细胞的数量增加。此外，所述方法还包括增加肿瘤细胞或白血病细胞的死亡率，或改变疾病细胞对抗病药损伤、肿瘤细胞对抗癌药损伤或白血病细胞对抗癌药损伤的敏感性。这类方法还包括降低患肿瘤的患者中肿瘤细胞的数量或患白血病的患者中白血病细胞的数量。

15 本发明还提供消除患者肿瘤细胞的方法，通过提供含有患者细胞的样品，并将患者细胞与本发明抗体温育。在一个实施方案中，消除肿瘤离体下进行。

20

实施例

列出下列实施例用于帮助理解本发明和进一步说明本发明，但无意也不应理解为限制本发明的任何范围。虽然描述了特殊的试剂和反应条件，可对其进行修改而仍然属于本发明范畴。

25

实施例 1

本实施例表明了 L32 scFv 抗体片段的筛选、生产和主要特征。简单的说，展示 scFv 抗体片段的噬菌体展示文库用于获得和生产目

标分子，流式细胞术尤其是荧光激活细胞分选(FACS)用于鉴定和分离特殊的噬菌体克隆，所述克隆展示的肽或多肽识别目标细胞。本文使用的噬菌体展示文库构建自 49 位非免疫人捐赠者的外周血淋巴细胞。

- 5 通过已知为生物淘选的多步方法选择和鉴定噬菌体克隆。通过将噬菌体展示蛋白配体变体(噬菌体展示文库)与目标细胞温育进行淘选，通过洗涤技术除去未结合噬菌体，并特异性洗脱结合的噬菌体。洗脱的噬菌体克隆任选扩增，然后为额外的结合和任选扩增的循环，这有利于包含与目标结合最佳抗体片段的噬菌体克隆的富集。在数
10 轮淘选后，鉴定个体噬菌体克隆，通过对噬菌体病毒体相应的 DNA 测序确定克隆展示的肽序列。

 在本发明中，T 淋巴瘤细胞的筛选的最初淘选步骤是对未定义表位进行的，随后对需要的目标细胞(如 B 白血病细胞、B-CLL 细胞、AML 细胞、多发性骨髓瘤细胞、和转移性细胞)进行克隆选择，所述
15 目标细胞表面标记为未知的。

- 使用 L1 方案，通过在完整 T 淋巴瘤细胞上淘选噬菌体展示文库发现 L32 scFv 抗体克隆。此方案开始于预洗涤。储存于-70°C，含有
20 2×10^7 个冷冻患者白血病/淋巴瘤 T 细胞的 1ml 试样在 37°C 下快速融解，立即稀释于 10ml 冷 2% PBS-牛乳(MPBS)中。细胞在室温(RT)下
120 $\times g$ 离心 5 分钟，洗涤两次，悬浮于 MPBS 中，用血细胞计数器计数。在 MRC 协定下使用 ScFv 展示噬菌体文库(Nissim et al., EMBO J., 13: 692-98 (1994))。文库最初构建为展示 scFv 片段的噬菌粒文库，其中 V_H 和 V_L 域由柔性多肽连接。噬菌粒文库中展示的 scFv 与噬菌体次衣壳蛋白 pIII 的 N 端融合，随后亚克隆至 pHEN1 载体中。
25 全部抗体片段首先通过 PCR 从未免疫人类外周血淋巴细胞重排 V 基因产生(指“天然全体”)。为使全部抗体片段多样化，向 49 个克隆的人类 V_H 基因片段库中引入编码 4-12 个残基长度的重链 CDR3 的随机核苷酸序列。所有克隆中融合的 V_L 片段为 IGLV3S1 种系单个未

变异 V 基因, 产生约 10^8 个克隆的单罐文库(single pot library)。

L32 scFv 抗体克隆的选择在最终体积为 0.5ml 含有 10^6 个 T 细胞、 10^{11} 个噬菌粒克隆形成单位(CFU)(Nissim 文库)和 10^{13} 个野生型 M13 噬菌体的 MPBS 溶液中进行, 4°C 下缓慢振摇 1 小时。然后细胞洗涤同上, 用 MPBS 悬浮细胞并在 4°C 下 $120 \times g$ 离心。选择和细胞洗涤过程重复 3 次。

第一轮选择后, 通过将细胞在室温下与 pH2.2 的 150 μ l 0.1M 甘氨酸温育 5 分钟, 从 T 淋巴瘤细胞洗脱结合噬菌粒。中和后, 离心并弃去细胞, 收集含有洗脱噬菌体颗粒的上清液, 命名为 E1 原液。通过加入 1ml 指数生长期 TG-1 细胞并在 37°C 下温育 30 分钟, 扩增该 E1 库。一份置于平板上用于滴定, 其余体积的样品置于含有 2xTY/AMP(1.6%胰蛋白胨、1%酵母浸出物、0.5% NaCl 和 100 μ g/ml 氨苄青霉素)的大平板(150mm)上。平板 30°C 下保温过夜。为确定每轮淘选后的产量, 计数滴定平板上的克隆, 并计算总产量。

通过培养细胞至 A_{600} 为 0.5-0.9(指数生长期), 制备用于感染(扩增)的 TG-1 菌株和 HB2151 菌株新鲜细菌培养物。大肠杆菌 TG-1 细胞用于繁殖噬菌体, 大肠杆菌 HB2151 细胞用于生产 scFv 蛋白。刮取并汇集自大平板的克隆。一份($\sim 10^7$)液体培养的氨苄青霉素抗性大肠杆菌 TG-1 细胞生长至 A_{600} 为约 0.5, 然后用辅助噬菌体(VSC-M13, Stratagene)感染生产大量扩增的噬菌粒库。噬菌粒用 PEG 沉淀方法回收(Harrison et al., Methods in Enzymology (1996) 267: 83-109)。约 10^{12} 噬菌粒/ml 的扩增 E1 原液如上述用于下一轮用 T 细胞的淘选。

第二和第三轮“顺序淘选”用基本与第一轮淘选相同的方法进行, 只作下述改变: (i)第二轮淘选, 使用约 10^{11} 个噬菌粒, (ii)选择和洗涤后, 通过将细胞在室温下用 PBS/1%BSA+ATP(10mM)温育 15 分钟, 洗脱结合噬菌粒。离心细胞并收集上清。包含该方法第二轮洗脱噬菌粒的产物命名为 E1AT1, 所述产物不经扩增而如上述用于顺序淘选的第三轮。如第二轮, ATP 洗脱后, 噬菌粒如上述在 TG-1

细胞中扩增。最终扩增原液命名为 E1AT2。一份(5 μ l)与 TG-1 培养物混合用于感染、滴定和序列分析。剩余体积(45 μ l)与 1.3ml TG-1 细胞液温育用于扩增和保藏。

5 L1 生物淘选方案的三个连续步骤中, 估计用于淘选的噬菌粒数量(投入)和估计洗脱的结合噬菌粒数量(产出)总结于表 2。表中列出了细胞来源和得到每种产物的洗脱介质, 以及用于分辨每个独立库的条件。

表 2

投入的原液	细胞来源	洗脱液	产出	扩增的原液
Nissim 文库-10 ¹²	T 淋巴瘤	酸	3.3 \times 10 ⁶	E1
E1-10 ¹¹	T 淋巴瘤	ATP(10mM)	500	E1AT1*
E1AT1-500	T 淋巴瘤	ATP(10mM)	37	E1AT2

10 * 洗脱但没有扩增。

表 1 中的结果表明, 当 ATP 洗脱液用于第二和第三轮时, 洗脱噬菌体的数量很少, 表明噬菌体特异性可能增加。

15 淘选后, 每轮选择某些克隆用于测序。这一部分提供的氨基酸序列如下: (a)在所选克隆中出现超过 1 次的序列, (b)仅重链 CDR3 区的序列(VH-CDR3), 和(c)每种分离克隆 VH 种系的种类。

表 3

克隆	VH-CDR3 大小	VH-CDR3 序列	种系	产物	频率
L32	8	Leu Asn Pro Lys Val Lys His Met (SEQ ID NO:4)	VH3- DP32	E1AT 2	4/15
L31	7	Leu Arg Gly Gly Asn Ala Met (SEQ ID NO:5)	VH3- DP32	E1AT 2	5/15

20 L1 生物淘选方案后鉴定了 2 类克隆, L32 和 L31, 它们的序列

见表 3。表中显示了 CDR3 区中氨基酸残基的数量(VH-CDR3 大小)和特异性 CDR3 序列, 以及每种克隆的种系命名。此外, 显示了特殊克隆类型分离的次数, 作为 L1 方案总测序克隆数量的函数(频率)。有趣的是, 虽然文库包含 5 个不同 VH 家族(VH1、VH2、VH3、VH4 和 VH6)来源的 VH, 其中 VH3 占利用基因约 47%, 2 种分离的克隆都属于 VH3 家族(DP32)。这对于 scFv 纯化方法有利, 这是由于蛋白 A 琼脂糖用于纯化来源于 VH3 家族的 scFv, 而且不能用于纯化来源于 VH3 以外家族的克隆。

10

实施例 2

本实施例描述了各种对比研究中用作对照的 scFv 抗体的生产。

15

美国申请号 10/032,423; 10/032,037; 10/029,988; 10/029,926; 09/751,181 和 60/258,948 以及国际申请号 PCT/US01/49442 和 PCT/US01/49440 中详细描述了 Y1 和 Y17 scFv 抗体克隆的分离和表征。

20

此外, 选择了阴性对照 scFv 克隆。对于所有结合实验, 从天然文库(选择前)挑选单一克隆。从该克隆制备噬菌体原液和可溶性 scFv, 命名为 N14。序列分析表明它属于 V_H4-DP65 基因家族。该克隆编码的 11-mer V_H-CDR3 序列命名为 N14 CDR3, 为 SEQ ID NO:6。另一种阴性克隆 N01 用于结合分析实验。N01 克隆(与重组肝炎 B 病毒[HBV]颗粒反应)属于 V_H3-DP35 家族, 此克隆编码的 9-mer V_H-CDR3 序列命名为 N01 CDR3, 为 SEQ ID NO:7。

25

通过在 T 淋巴瘤细胞膜上淘选噬菌体展示文库, 用 TM 方案分离 TM scFv 抗体克隆(下述)。在此方案中, 如上面 L1 方案中所述, 预洗涤 T 细胞(2×10^7)。预洗涤 T 细胞后, 通过加入 2ml 含有 10^{12} 个噬菌粒(来源于原始 Nissim 文库)的 MPBS, 在固定的 T 淋巴瘤细胞膜上进行选择。试管缓慢振摇 30 分钟, 然后不振摇温育 90 分钟(2 步反应在室温下进行)。轻轻倒出试管内容物, 除去未结合噬菌粒,

用 PBS 和 0.1%吐温洗涤 10 次，然后用 PBS 洗涤 10 次。对于洗脱，直接向试管中加入指数生长的大肠杆菌 TG-1 细胞(2ml)，37°C 下温育并缓慢振摇。如上所述一份置于平板上用于滴定，剩余体积置于平板上用于扩增。此外，扩增如 L1 方案所述进行。另 2 轮中选择程序重复 2 次，使用 10^{11} 个前述扩增原液的噬菌粒。固定 T 细胞膜上的第三轮淘选程序扩增原液的第一种克隆命名为 TM1.1-myc+/TM1.1。从该克隆制备某些 scFv 抗体，尤其是 TM1.1 及其带 myc 标记的变体(TM1.1-myc+)。

除了 TM1.1-myc+克隆，用 TM 方案分离下列其它克隆。第三轮膜淘选的扩增库用于淘选完整 T 淋巴瘤细胞。该方法基本上按上面 L1 方案所述进行，使用 2×10^7 个细胞和 10^{10} 个噬菌粒。4°C 下保温 2 小时后，用 50 μ l 胰蛋白酶: EDTA(0.25%: 0.05%)从洗涤过的细胞团上洗脱结合噬菌粒，然后加入 50 μ l FCS 中和。对于滴定和扩增，使用 1ml 大肠杆菌 TG-1 培养物($A_{600}=0.5$)。扩增原液命名为 TM2，用于另一轮 T 淋巴瘤细胞上的淘选，如上所述。最终的原液命名为 TM3。按照 TM 方案，分离到的 scFv 的序列如表 4 所示。还估计了 ScFv FITC 标记后的结合活性，以证实 scFv 特异性的保留(参见实施例 7)。例如，TM3.13 与 T-ALL 细胞结合的特异性根据 FACS 分析通过其结合被证实(参见附图 1)。

表 4

克隆	VH-CDR3 大小	VH-CDR3 序列	种系	产物	频率
TM2.3 1	7	Leu Thr His Arg Ser Ser Arg	VH3- DP46	TM2	2/10
TM2.2 3	7	Thr Gln Arg Arg Asp Leu Gly	VH3- DP53	TM2	5/10
TM3.2 0	7	Lys Arg Val Ser Leu Leu Thr	VH3- DP70	TM3	1/7
TM3.1 8	7	Ser Tyr Arg Arg His Ser Arg	VH3- DP47	TM3	2/7
TM3.1 3	11	Arg Asp Lys Thr Thr Asn Phe Tyr Phe Met Lys	VH3- DP26	TM3	1/7

5

实施例 3

本实施例表明了 L32 scFv 克隆的生产、纯化、标记和表征。

对于可溶 scFv 的生产，用于构建原始噬菌粒文库的载体 pHEN1 被设计为在 scFv 和 pIII 基因连接处具有一个琥珀终止密码子。因此，当通过噬菌粒感染，所选择克隆的载体引入无抑制基因的大肠杆菌 HB2151 时，该系统可产生可溶 scFv 并将其分泌到细菌胞质中 (Harrison et al., Methods in Enzymol. 267: 83-109 (1996))。然后 scFv 可容易地从培养基中回收。可溶 scFv 在 lacZ 启动子的调控下用 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)诱导生产(Gilbert and Muller-Hill, PNAS (US) 58: 2415 (1967))。

15

编码 10 个氨基酸 c-myc 标记的序列(SEQ ID NO:8)包含在载体中琥珀变化的上游。表达 scFv 的 C 端应携带 c-myc 标记，所述标记可用小鼠抗 myc 标记抗体检测(来源于欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的 9E10 杂交瘤)。

20

所选择克隆和对照克隆 N01 的 scFv 都属于 VH3 家族，可在蛋白 A 亲和柱上纯化。制备来自每种克隆诱导培养物的周质部分(100-250ml)，与蛋白 A 琼脂糖珠(Sepharose beads)保温。用酸洗脱(0.1M

甘氨酸, pH 3.0)回收结合 scFv, 随后用 Tris pH 8.0 中和洗脱液。回收蛋白的浓度通过测定 A_{280} 确定, 随后通过透析或在 G-25 琼脂糖柱上进行 PBS 缓冲液更换。

5 来源于 L1 方案克隆 L32 的 scFv 也属于 VH3 基因家族(DP-32)。但是, 从周质提取后, 需要在将样品加样到蛋白 A 亲和柱上之前加入 5mM DTT, 然后如上述从蛋白 A 琼脂糖珠中纯化和回收, 进行 PBS 缓冲液更换。

10 阴性克隆 N14 的 scFv 属于 VH4 基因家族, 不能在蛋白 A 亲和柱上纯化, 因此在 Sephacryl S-200 柱上纯化。通过用 60%硫酸铵沉淀 200ml 诱导培养物周质部分总蛋白, 纯化 scFv N14。沉淀悬浮于 2ml $0.1 \times$ PBS, 5mM EDTA, 5mM PMSF, 加样到用运行缓冲液($0.1 \times$ PBS, 5mM EDTA)预平衡的 Sephacryl S-200 柱(1.5 x 90cm)上。分部收集蛋白, 合并含有 N14 scFv 的部分(用 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析检测), 冷冻干燥, 悬浮于 1/10 体积的水中。然后 N14 scFv(未标记和 FITC 15 标记)在 FACS 分析实验中用作阴性对照。

纯化的 scFv 然后用 FITC 标记。每个标本约 1mg 的纯化 scFv 悬浮于 PBS, 按制造商说明, 使用荧光标记 FITC 偶合商业试剂盒 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)使其与 FITC 偶合。在纯化和 FITC 20 标记后, 用 SDS-PAGE、蛋白质印迹、使用 Superdex-75 柱的 HPLC(A_{280} 和 A_{495})和荧光测定分析各标本(标记的和未标记的)的特征。分析表明 N14 scFv 的纯度为 80%, VH3 克隆的纯度为 90%, 每个 scFv 分子与约 2 个 FITC 分子结合(F/P 比为 2: 1)。

实施例 4

25 本实施例表明了 L32 scFv 与洗涤血小板和富血小板血浆(PRP)的结合, 以及 L32 scFv 对血小板聚集的效果。

对于血小板聚集研究, 用含 3.8%柠檬酸钠的试管收集血。通过在 $250 \times g$ 下离心 10 分钟制备 PRP。从血库获得酸-柠檬酸盐-右旋糖

(ACD)中的血小板浓缩物。分离血小板,用含 ACD 的缓冲液洗涤一次,并用盐水以 1:7 的比例洗涤。每次洗涤后血小板在 800g 下离心 10 分钟,并悬浮于 Tyrodes 溶液(2mM MgCl₂、137mM NaCl, 2.68mM KCl, 3mM NaH₂PO₄, 0.1%葡萄糖, 5mM HEPES 和 0.35%白蛋白, pH 7.35)中, 计数细胞数量。

在 Lumiaggregometer(Chronolog, Havertown, PA)中, 全血中的 PRP 和洗涤血小板 37°C 下以 500rpm 搅拌。它们之间通过血小板悬浮液和悬浮介质的透光率差异被认为是 100%聚集。在加入激动剂之前, 通过加入不同浓度的 L32 评价 L32 对血小板聚集的效果, 记录 4 分钟的结果(附图 2)。

用洗涤血小板进行聚集测定。反应混合物含有 2×10^8 洗涤血小板/ml 和 4 μ g/ml 的猪 von Willebrand 因子。37°C 保温 3 分钟后, 加入 0.4mg/ml 的利托菌素(聚集激动剂), 记录 4 分钟的聚集反应。L32 和其它 scFv 抗体对血小板聚集的效果通过在加入激动剂前加入 50 μ g/ml 所述 scFv 评价, 记录 4 分钟的结果。在 2 个洗涤血小板样品中(N=2)测试 L32 对洗涤血小板 vWF 依赖凝集的效果, 相对于已知效果的 scFv Y1 对凝集的消除, 可观察到正常凝集(90%凝集)。评价采用 TM 方案分离的 TM1.1-myc+的效果作为对照。在相同条件下, Y1 scFv 抗体抑制 70%的利托菌素诱导的血小板聚集(附图 2)。

对于使用 PRP 的聚集测定, 反应混合物含 PRP(约 2×10^8 /ml)。37°C 保温 3 分子后, 加入 1mg/ml 利托菌素(聚集激动剂), 记录 4 分钟的聚集反应。它们之间通过血小板悬浮液和 PPP(贫血小板血浆)的透光率差异被认为是 100%聚集。通过在加入激动剂前加入 50 μ l/ml L32 scFv, 评价来自 3 个不同捐献者(N=3)的 PRP 中 L32 对血小板聚集的效果, 记录 4 分钟的结果。向 PRP 中加入 L32 scFv 后可观察到正常聚集(90%聚集)(附图 2)。如上所述, 比较 L32 与 TM1.1 和 Y1 的效果。与洗涤血小板相似, Y1 抑制 70%的 PRP 血小板聚集。

可得出结论, 50 μ g/ml 的克隆 L32 对洗涤血小板或 PRP 的血小

板聚集没有显著抑制性效果。

5 血小板的 L32 scFv 染色(结合)也通过 FACS 评价。该方法用于基于荧光标记染色强度的测定。如附图 3 所示,用 Y1 和 Y1-myc+ scFv(带有 c-myc 标记的糖盖蛋白反应 Y1 scFv 抗体)染色从 PRP 得到染色血小板。相反,与用对照抗体染色相比,用 L32 scFv 染色所述血小板后,荧光信号相对未变(比较附图 3 中的直方图,其中 TM1.1-myc+为不与任何血小板相关表位结合的 scFv)。

10 实施例 5

scFv L32 与各种不同细胞系的结合用 FACS 分析。分析在用(i)L32; (ii)抗单链抗体;和(iii)抗兔 FITC 标记抗体 3 步染色后进行。根据与 L32 结合后细胞群体几何平均值与阴性对照的比划分不同细胞系,如表 5 所示。低结合指比值为 1 的细胞,中等结合指比值为 1-4 的细胞,高结合指比值大于 4 的细胞。

15

表 5

L32 高	L32 中	L32 低
KG-1	Molt-4	Raji
Jurkat	Hut78	Daudi
	HEL	UMUC3
	K562	Namalwa
	CCRF-CEM	
	HL60	

20 通过所述单链抗体考察 Y1 和 L32 之间对这些细胞上同一结合位点的竞争。在一个这种实验中,评价未标记抗体与生物素标记 Y1(Y1-myc+)对 KG-1 细胞(来源于 AML 患者的人类细胞系)的竞争。结果如附图 4 和 5 所示。如图所示,L32 竞争 Y1 与 KG-1 细胞的结合,类似于 Y1 scFv 本身。初步放射受体测定研究支持该结果,所述

研究中 L32 scFv 剂量依赖性部分置换 ^{125}I 标记的 Y1 scFv 与 KG-1 细胞的结合。

在竞争研究中评价未标记抗体与生物素标记 L32 scFv(0.5、2 或 5 μg)竞争结合 KG-1 细胞的能力。美国申请号 10/032,423; 10/032,037; 5 10/029,988; 10/029,926; 09/751,181 和 60/258,948 以及国际申请号 PCT/US01/49442 和 PCT/US01/49440 中的结果表明, Y1 和抗 CD162 抗体竞争与 CD162 抗原的结合。FACS 分析用于测量标记抗体结合, 结果表示为结合的几何平均值。所述结果总结于表 6, 表明 Y1 scFv 和抗 CD162 抗体置换的浓度依赖性。当未标记抗体的量远远大于标 10 记抗体的量时, 超过 70% 的结合被特异性抗体置换, 而非特异性 TM1.1 scFv 对 L32 结合没有显著影响。虽然抗 CD162 具有最强置换 L32 的能力(高达 89%), Y1 和 L32 scFv 抗体以不同程度置换 L32 的结合。基于所述和其它结果, 与 Y1 相比只需较少的 L32 与 L32 和 Y1 竞争, 表明对相同位点 L32 比 Y1 具有更强的结合能力。因此, 这些结果进 15 一步支持了 L32 结合的特异性, 以及 L32 表位和 Y1 和抗 CD162 抗体识别表位之间的基本关系。

表 6

抑制剂浓度	L32 生物素浓度		
	0.5 μg L32-B	2 μg L32-B	5 μg L32-B
无	22.65		
50 μg TM1.1	21.6	28.3	38.32
50 μg Y1	6.36	12.99	21.99
50 μg L32	5.66	9.34	22.58
5 μg 抗 CD162	4.06	3.95	4.4

20 通过测定标记抗 CD162 抗体与 KG-1 细胞结合的置换程度进一步评价 L32、Y1 和抗 CD162 抗体之间的竞争。发现 L32 和 Y1 scFv 抗体(50 μg)均可使抗 CD162(5 μg) 标记 KG-1 细胞的几何平均值降低

约 82%。因此，所述抗体的表位显然紧密相关。

实施例 6

5 本实施例通过 ELISA 证实 L32 scFv 抗体与 GPIb 蛋白水解片段糖盖蛋白(GC)的结合。

如 Michalson (Blood 67: 19-26 (1986))所述，从新鲜人血小板纯化 GC。在用于测定前，用 2 种不同商业单克隆抗体制剂通过 EIA 法确定 GPIb；第一种抗体(H1P1 克隆)，购自 Phannigen(San Diego, CA)，抑制利托菌素诱导的血小板聚集，第二种抗体制剂(PM6/40 克隆)，
10 购自 Serotec Inc.(Raleigh, NC)，不抑制血小板聚集。

通过 ELISA 定量分析 L32 与 GC 的结合。通过 4°C 下保温过夜，用稀释至 1µg/ml(PBS × 1)的 GC 包被 Maxisorp 板孔。除去过量 GC 后，板用 PBSTM(含有 2%牛乳和 0.05%吐温的磷酸缓冲盐溶液)在室温下封闭 1 小时。用 PBST 彻底洗涤后，板与用 PBSTM 稀释至各种
15 浓度的 scFv 保温。随后，板与 1: 250 稀释的抗 scFv 或 1: 50 稀释的抗 VL 或 1: 100 稀释的抗 myc 保温，随后与用 PBSTM 1: 25,000 稀释的抗兔 HRP(Jackson)或 1: 25,000 稀释的抗小鼠 HRP 保温(相关抗体)。用 TMB 进行显色反应，加入 0.5M 硫酸中止反应。用 ELISA 读数器在 450nm 下读板，平均双份样品的结果，通过从平均值中减
20 去背景(无第一抗体染色)OD 值计算 ELISA 单位值。结果见附图 6，表明 GC 与 Y1 的结合比 L32 的结合大约 3-4 倍。

实施例 7

25 本实施例通过蛋白质印迹分析显示 L32 scFv 抗体与各种人来源蛋白的结合。

制备细胞提取物(溶胞产物)。收集细胞(2×10^6)，在微量离心管中离心(1300rpm, 4°C, 5 分钟)。用 0.5-1ml PBS 洗涤沉淀，轻柔混合，混合物如前离心。重复用 0.5-1ml PBS 洗涤，成团的细胞用裂解

缓冲液悬浮(200 μ l/20 \times 10⁶ 细胞团)。虽然可使用其它合适的裂解缓冲液,所用的裂解缓冲液为 50mM Tris pH 7.4、1mM PMSF、1% NP-40 和 1mM EDTA。悬浮液在冰上保温约 60 分钟,然后离心(3000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 分钟)。然后收集上清,分为数份。

5 还制备粗膜碎片和膜蛋白提取物。20 倍体积的匀化缓冲液加入到 1 倍体积的压紧细胞中。匀化缓冲液含有 2%(w/v)吐温 20、1mM MgSO₄、2mM CaCl₂、150mM NaCl 和 25mM Tris-HCl, pH 7.4。加入下列蛋白酶抑制剂: 1mM PMSF、5 μ g/ml Leupeptin 和 5 μ g/ml Aprotinin。细胞用带旋转 Teflon 槌的 Potter-Elvehjem 匀浆器(Ultra-Torex)匀浆,速度为 3-5 次。样品在匀浆时保持冷却,然后冰浴中搅拌 1 小时。样品在匀浆器中再研磨数次,然后 4 $^{\circ}$ C 下 3000g 离心 30 分钟。收集上清,4 $^{\circ}$ C 下 45000g(ss-34 转子 19000rpm)离心 1 小时。弃去 45000g 离心的上清。向沉淀加入含 50mM Tris 7.4、1mM EDTA、1% NP-40 和蛋白酶抑制剂的溶液,溶解的沉淀置于冰上 1 小时。

15 将汇集的血库健康个体血浆用 PBS 稀释至 1: 10(v/v)后,制备血浆蛋白样品。稀释后的溶液经 0.45 μ m 膜过滤,将数份冷冻储存(-20 $^{\circ}$ C)直至分析。然后样品在 Sigma Z37,503-9 电泳仪上以 140-160 伏特电压进行 10% SDS-PAGE,时间约为 3.5 小时。电泳后的样品在 Tris 甘氨酸缓冲液中(20% MeOH、192mM 甘氨酸、25mM Tris, pH 8.3)以 20 伏特电压室温过夜,转移至硝酸纤维素膜上。

25 硝酸纤维素膜用 5%脱脂牛乳室温下封闭 1 小时。膜然后在室温下用 0.05%吐温 20 洗涤 3 次,每次 5 分钟。然后膜于室温下与 2%脱脂牛乳和 PBS 中含的 5 μ g/ml Y1-生物素、L32-生物素或 TM1.1-生物素保温 1 小时。然后在冷室中(约 4-约 10 $^{\circ}$ C)用冷的含 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤膜 3 次,每次 5 分钟。然后在冷室中膜与含 2%脱脂牛乳和 0.05% 吐温的 1: 1000 稀释的 SAV-HRP(链霉亲和素-HRP)(最终浓度为 1 μ g/ml)保温。稀释在室温下进行(约 25 $^{\circ}$ C),使用前稀释的 SAV-HRP 在冰上冷却 10-15 分钟。保温轻柔振荡下进行约 1 小时。

与 SAV-HRP 保温后, 如上述洗涤膜。按商业化方案的指导, 膜与 Super Signal 混合物(Pierce)保温 5 分钟, 干燥过量溶液。膜暴露于 X 射线胶片(Fuji), 使胶片显影。这些研究的结果(附图 7)表明, L32 与白血病细胞上的蛋白结合, 所述蛋白分子量为 PSGL-1 的分子量, 约 105kD。此外, L32 和 Y1 与相同 GC 带和 KG-1 细胞反应。但是, L32 与血浆蛋白的结合远远低于 Y1, 而且 Raji 细胞提取物中该大于 100kDa 的带为阴性。

实施例 8

10 本实施例通过 ELISA 显示 L32 和 Y1 与硫酸化和非硫酸化肽可比性的结合。

制备基于合适表位(GPIb 的 268-285 位氨基酸和成熟 PSGL-1 的 1-17 位氨基酸)的硫酸化和非硫酸化合成肽, 用于评价 L32 scFv 抗体结合特异性(ELISA)。硫酸化和非硫酸化肽(1 μ M)连接于合适 ELISA 分析的微量滴定板, 在非特异性结合位点被封闭前彻底洗去未连接的肽。板在室温下与所示浓度 scFv 抗体(参见附图 8)保温 1 小时。连接的 scFv 用多克隆兔抗 V_L 抗体检测, 随后为辣根过氧化物酶(HRP)抗兔抗血清。样品用底物 TMB 显色, 约 10 分钟后用 0.5M 硫酸停止过氧化物酶反应。比较 L32 与这些肽的结合和 Y1 和 TM1.1 scFv 抗体与肽的结合(作为阴性对照)。从每个获得的值中减去背景染色(无第一抗体时), 获得条形图显示的值。用于评价结合的肽及其基本结构性质显示于表 7。

表 7

肽的来源	命名	序列	AA	MW	硫酸化
纤维蛋白原 γ 原	A	VRPEHPAETEYESLYPED DL	20	2389	-
纤维蛋白原 γ 原	B	VRPEHPAETEY*ESLY*P EDDL	20	2549	硫酸化
PSGL-1 N 端	C	QATEYEYLDYDFLPETE	17	2126	-
PSGL-1 N 端	D	QATEY*EYLDYDFLPETE	17	2206	硫酸化
PSGL-1 N 端	E	QATEY*EY*LDYDFLPET E	17	2286	硫酸化
PSGL-1 N 端	F	QATEY*EYLDY*DFLPET E	17	2286	硫酸化
PSGL-1 N 端	G	QATEY*EY*LDYDFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1 N 端	H	QATEY*EY*LDY*DFLPET E	17	2286	硫酸化
PSGL-1 N 端	I	QATEY*EY*LDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
PSGL-1 N 端	J	QATEY*EY*LDY*DFLPE TE	17	2286	硫酸化
GPIb α	K, P1	GDEGDTDLYDYYPEEDT E	18	2126	-
GPIb α	L, P1S	GDEGDTDLY*DY*Y*FEE DTE	18	2366	硫酸化
GPIb α	P14S	GDEGDTDLYDY*Y*PEED TE	18	1732	硫酸化
GPIb α	P28S	TDLY*DYYPEEDTE	13	1732	硫酸化
CCRS	M	MDYQVSSPIYDINYYTSE	19	2189	-
CCRS	N	MDY*QVSSPIY*DINY*Y TSE	18	2429	硫酸化

Y*表示硫酸化酪氨酸

- 5 用 F、H、I 和 J 肽(即在第三个酪氨酸残基上硫酸化的 PSGL-1 相关肽)以及 L 和 P28S 肽(即在第一个酪氨酸残基上硫酸化 GPIb α 相关肽)获得了显著的剂量相关性 L32 scFv 抗体结合(附图 8)。L32 scFv 抗体与 J 的结合和其与 I 的结合非常类似。虽然其与 GPIb 相关 L(P1S) 肽的结合是显著性的, 这比用 PSGL-1 相关肽获得的结果低。Y1 或
- 10 L32 均未发现与硫酸化 PSGL-1 相关肽 G 和 D 显著结合(在第三个残

基缺少硫酸化)。此外, Y1 或 L32 均不与纤维蛋白原 γ 链相关硫酸化(或非硫酸化)肽结合。没有 scFv 抗体与酪氨酸未硫酸化的肽结合, 表明硫酸化对于结合是必须的。此外, GPIb 相关肽 P28S 的数据表明, 第一个酪氨酸的硫酸化对于结合 GPIb 是显著性的, 而与 E 相比, PSGL-1 肽 I 和 J 的数据表明, 第三个酪氨酸的硫酸化对于结合 PSGL-1 是显著性的。虽然对于硫酸化肽(在此测定中), Y1 和 L32 的结合行为表现出基本相同模式, 各种情况下 Y1 比 L32 表现出更高的亲合力。

从上述实验结果和美国申请号 10/032,423; 10/032,037; 10/029,988; 10/029,926; 09/751,181 和 60/258,948 以及国际申请号 PCT/US01/49442 和 PCT/US01/49440 中显示的数据, 可得出结论, L32 scFv 抗体的表位位于成熟 PSGL-1 的 1-17 位氨基酸之间, 其中有负电荷氨基酸簇。

PSGL-1 为 E、L 和 P 选择蛋白的受体, 作为 Y1 抗体的配体基于竞争性测定鉴定, 其中 Y1 抗体与 KG-1 细胞的结合在不同商业化供应的抗 PSGL-1 抗体存在下进行。PSGL-1 的 N 端区包含硫酸化酪氨酸残基和负电荷氨基酸簇。(美国申请号 10/032,423; 10/032,037; 10/029,988; 10/029,926; 09/751,181 和 60/258,948 以及国际申请号 PCT/US01/49442 和 PCT/US01/49440)。

虽然 Y1 抗体与某些分子结合, 如血小板上糖盖蛋白分子、纤维蛋白原 γ' 、人血浆补体化合物 4 和 PSGL-1 分子, 其与来源于 AML 或多发性骨髓瘤(MM)患者的原代白血病细胞的亲合力比与前述表位的亲合力高。

不希望受限于任何特定理论, Y1 与硫酸化肽更高的亲合力(与 L32 相比), 以及 L32 与白血病细胞系和恶性细胞更高的亲合力(与 Y1 相比)一样(如下面实施例 10、16 和 17 中所示), 可能由于各种因素如细胞上全长天然蛋白中有关肽序列的构像或暴露的可能差别。例如, 用于实验的肽为线形, 没有其天然状态时的二级和三级结构。这些差异在非限制性线形合成肽中不明显。因此, 细胞系统提出的 L32 抗体结合潜在的治疗用途在人工肽系统中可能未观测到。

实施例 9

美国申请号 10/032,423; 10/032,037; 10/029,988; 10/029,926; 09/751,181 和 60/258,948 以及国际申请号 PCT/US01/49442 和 PCT/US01/49440 中的结果表明, Y1 和 Y17 抗体在血小板上具有相似
5 的识别特征。本实施例显示 GPIb 来源肽的酪氨酸硫酸化和突变对 Y17 scFv 抗体与洗涤血小板结合的影响, 以及 Y17 与 PSGL-1 来源肽的结合对酪氨酸硫酸化的依赖。

GPIb 来源肽选自表 6, 另外 2 个具有下述序列的 N 端缩短 GPIb 来源肽用于这些研究: P2S-TDLY*DY*Y*PEEDTE 和 P25S-
10 TDLYDY*Y*PEEDTE。

通过 FACS 测定 Y17 scFv 抗体与洗涤血小板的结合, 如实施例 4 中所述。通过加入血小板制剂前首先将 Y17 与所示浓度的肽(参见附图 9)保温, 评价各种肽对 Y17 与血小板结合的影响。

所有受试肽中, 包含 276 位硫酸化酪氨酸的 GPIb 来源肽(P28S)最大程度的抑制 Y17 与洗涤血小板结合。制备包含氨基酸变化的 GPIb
15 来源肽, 试验确认 Y17 识别的共有序列要求。这些结果表明第一个硫酸化酪氨酸对于 Y17 与洗涤血小板结合十分重要。但是, 第二个酪氨酸的硫酸化显然在 Y17 识别中不起作用。277 和 275 位的天冬氨酸负电荷氨基酸残基(D)对于 Y17 的结合也十分重要。该结果与用
20 Y1 观察到的结果相似。

为证实决定 Y17 scFv 抗体与 PSGL1 结合的条件, 用与板结合的 PSGL1 来源肽进行 ELISA 分析。5 μ g/ml 和 20 μ g/ml 的 Y17 scFv 抗体牢固的与两种 PSGL1 来源肽结合, 即第三位上含有硫酸化酪氨酸的 I 和包含 3 个硫酸化肽的 J。附图 10 表明, Y17 scFv 与 J 的结合稍大于 Y1 与 J 的结合, 两种 scFv 与 I 的结合类似。它们与 I 的结合比它们与 J 的结合更强。Y1 或 Y17 均未显著的与 G 结合(无硫酸化的 PSGL1
25 肽)。

总之, 在肽水平, 所有 3 个克隆 Y1、Y17 和 L32 具有相似的特

异性特征。

实施例 10

5 本实施例显示 L32 与来自正常志愿者原代细胞和白血病患者原代细胞的结合。

所有细菌克隆培养、诱导、scFv 抗体片段收获和抗体片段纯化的方法根据 Harrison et al., (1996), 同前进行。基本上, 任何 2 种或 2 种以上的各个 scFv 克隆可选自 Nissim I 抗体噬菌体展示文库, 以制备兔源多克隆抗体, 所述抗体可识别任何存在于 Nissim 文库中的
10 个体 scFv 抗体或含有相同 V_L 或其片段的任何 IgG 或其片段。

产生的多克隆抗体拮抗来源于 Nissim I 抗体噬菌体展示文库的 scFv 抗体克隆(Y1)的 VL。编码人抗体 VL 域的 DNA 片段为来自 Y1 克隆的 PCR 克隆(相同的 DNA 片段可从 Nissim I 文库的其它任何克隆获得(Nissim et al., (1994), 同前)甚至可用相同方法从人基因组获得)
15 得), 使用下述合成寡核苷酸引物: oligo 5'-NdeI (TTTCATATGGAGCTGACTCAGGACCCTGCT) 和 oligo 3'-EcoRI (TTTGAATTCCTATTTTGCTTTTGCGGC)。用聚合酶链反应扩增后 (PCR 条件: 94°C 1 分钟, 56°C 2 分钟, 72°C 2 分钟 × 30 次, 然后 65°C 5 分钟), 获得的 DNA 片段用 NdeI 和 EcoRI 限制性内切酶消化, 并
20 克隆到预消化质粒的 NdeI 和 EcoRI 限制性内切酶位点中, 所述质粒为大肠杆菌中用于重组蛋白原核表达的 IPTG 诱导表达载体。

大肠杆菌细胞用连接混合物转染, 用上述寡核苷酸引物通过 PCR 扩增选择阳性克隆。培养包含该质粒的细胞并用 IPTG 诱导表达。IPTG 诱导后, 1L 培养物 22°C 生长 16 小时后, 离心收集细菌细胞。分离
25 包涵体, 将其溶解于胍-HCl + DTE 中, 通过稀释于包含 Tris-精氨酸-EDTA 的缓冲液重新折叠。5-10°C 重新折叠 48 小时后, 在 20mM 甘氨酸(pH 9)中透析并浓缩含有蛋白的溶液。透析后含有蛋白的溶液用离子交换柱 HiTrapQ 重新纯化, 用梯度 NaCl 洗脱。主峰用 SDS-PAGE

和凝胶过滤分析。从 1L 培养物中至少获得 10mg 纯化的 V_L 。

兔用 V_L (400mg)和 CFA(完全弗氏佐剂)免疫, 然后以 2-4 周的间隔用 V_L (200mg)和 IFA(不完全弗氏佐剂)免疫。获得的滴度较低(1:50-1:100), 可能是由于人和兔之间 V_L 同源性较高。

5 使用直接来自免疫后兔血清的或在蛋白 A 琼脂糖柱上纯化后的多克隆抗 scFv 抗体, 检测 scFv 抗体与经 FACS 分析细胞的结合或与 SDS-PAGE 分离的各种蛋白的结合(蛋白质印迹分析)。

一般来说, 3 种 FACS 分析之一用于测试和确认所选克隆的特异性。建立了“三步染色法”, 使用粗提取物或纯化的未标记 scFv, 10 然后为小鼠抗 myc 抗体, 最后为与 FITC 或 PE 结合的抗小鼠抗体。该方法还可用兔抗 VL 作为第二种试剂, 随后为 FITC 标记抗兔抗体。血或骨髓样品细胞的 FACS 分析需要 $5-8 \times 10^5$ 个悬浮于 PBS(含 1%BSA)的白细胞。结合在 4°C 下进行 1 小时。每个步骤后, 洗涤细胞并悬浮于含 1% BSA 的 PBS 中。最终染色步骤后, 测定的最后步 15 骤为红细胞的裂解, 随后将细胞悬浮于 PBS, 用 FACS 读数(Becton-Dickinson)。“两步染色”法细胞染色分析可作为三步方法的替代进行, 首先将细胞暴露于 myc 或生物素标记的第一抗体, 随后分别用 FITC 标记抗 myc 抗体或 PE 标记链霉亲和素染色。建立用 scFv-FITC 直接细胞染色的方法, 用于随后的 FACS 分析。此新方法仅需要 1 20 步 scFv-FITC 标记的保温步骤。此外, 当 scFv-FITC 用于 FACS 分析时, 抗 myc 与正常 PBL 反应性引起的高固有本底大幅降低。直接 FITC-scFv 标记和“三步染色”获得的结果十分相似, 表明标记 scFv 的生物活性没有被 FITC 标记过程破坏。因此, 标记 scFv 保留了与未标记抗体相似的结合活性。

25 进行 FACS 方案, 分析血和骨髓样品。样品由医院提供, 经患者许可。最初细胞样品用 3 步染色法染色, 其中结合 scFv 抗体的检测用小鼠抗 myc 标记抗体, 然后用荧光标记抗小鼠 Ig 抗体完成。在此分析中, 结果见附图 11, 与正常外周血淋巴细胞(N-PBL)相比, 受

试 scFv(来源于 T 细胞淘选的 TM1.1、TM3.13 和 L32)一致表现出与 T 淋巴瘤/白血病细胞高水平结合。相反, B-CLL 细胞表现出低水平 scFv 染色,与 N-PBL 表现相似(表 8)。当 1/50 的 scFv 稀释物用于 FACS 分析时,只检测到背景结合。

5

表 8

细胞类型	对照	L32
T 淋巴瘤/白血病	1.4	40
B-CLL	0.2	5
N-PBL**	4.9	5

* 只使用了抗 myc 和抗小鼠 FITC

** 正常外周血淋巴细胞

在后续研究中,患者全血或骨髓样品(以及正常个体的样品)调整至 30 μ l/管。每管加入 5 μ l CD33-APC(AML)或 CD19-APC(B-CLL)或 CD38-APC(多发性骨髓瘤),每管还加入 5 μ l CD45-PerCp 和 5 μ l scFv Y1 或对照 scFv TM1.1 或 CD162-PE(KPL1)。试管 4 $^{\circ}$ C 下保温 30 分钟,轻柔振摇。加入 2ml PBS, 1200rpm 离心 5 分钟,洗去过量试剂。弃去上清。在一步测定中然后进行裂解步骤。500 μ l BD 赖氨酸溶液用 ddH₂O 按 1: 10 稀释,每个患者样品中加入 300 μ l。高速漩涡振荡样品,4 $^{\circ}$ C 保温 12 分钟,如上述洗涤。弃去上清后,加入 500 μ l PBS。样品用 FACS 读数,用根据国际标准设定血样采集。对于涉及 2 步或 3 步的测定,工作缓冲液包含 PBS + 1% BSA + 0.05%叠氮化钠,保温和洗涤如上述进行。

对于正常个体的血样,用 FACS 进行分析,以确定与 Y1 选择性相比, L32 与血细胞亚群结合的选择性。用标记的第二或第三抗体染色后,测定结合。Y1 和 L32 结合中都存在捐献者间变异性。相应的,代表大多数情况的结合定性总结于表 9。L32 scFv 与粒细胞、淋巴细胞和单核细胞的结合一般强于 Y1 scFv 与这些细胞的结合。相

反, L32 scFv 与血小板的结合与背景类似, 一般弱于 Y1 scFv。这些结果进一步支持实施例 6 结果(参见附图 2), 其中描述了 L32 scFv 对 PRP 中血小板聚集和洗涤血小板凝集较小的影响。

5

表 9

细胞类型	相对阴性对照的结合	
	Y1	L32
淋巴细胞	背景-低	低+/-
单核细胞	+/-低	中+/++
粒细胞	低-中+	中-高++
血小板	+/-低	背景-

根据以下标准分级(这不是绝对的分级标准-比率的 2 倍可被解释为高数倍的结合):

- 背景染色;
- 10 +/- 阴性 scFv 与受试 scFv 之间的平均流量比 ≤ 2 ;
- + 阴性 scFv 与受试 scFv 之间的平均流量比为 2-3;
- ++ 阴性 scFv 与受试 scFv 之间的平均流量比为 4-6;
- +++ 阴性 scFv 与受试 scFv 之间的平均流量比为 6-8;
- ++++ 阴性 scFv 与受试 scFv 之间的平均流量比大于 10。

15

需要注意表中所有的结果来自涉及信号放大的 2 步或 3 步染色方法, 这一点非常重要。此外, 当使用 1 个以上的染色步骤时, 血小板被活化, 来自方法相关效果的信号被放大。在这些方法中, 标记抗体与 GPIb 和活化血小板上新暴露的 PSGL-1 结合。

20

对于癌症患者血/骨髓样品, 用 FACS 分析以确定与 Y1 选择性相比, L32 结合的选择性。测定结合, 为标记第二抗体结合的结果。所述结果如表 10 所示, 表明一般 L32 与疾病细胞结合超过 Y1。同时, L32 与粒细胞、淋巴细胞和单核细胞的结合超过 Y1。该增加的

结合表示与正常细胞间的相互作用降低，这可解释为低抗体剂量用于治疗。

表 10

疾病	细胞类型	相对阴性对照的结合	
		Y1	L32
AML(4 个样品)			
	疾病细胞	+ ~ +++	++++
	淋巴细胞	+ ~ ++	+++
	粒细胞	+/-	++
MM(2 个样品)			
	疾病细胞	+++	++++
	淋巴细胞	++	+++
	单核细胞	++	+++
	粒细胞	++	+++
B 白血病 (2 个样品)			
	疾病细胞	- ~ +	+
	淋巴细胞	+ ~ ++	+++
	单核细胞	+++	++++
	粒细胞	++	++++

5

应注意的是在所有受试样品中，商业 CD162 特异性单克隆抗体抗人 PSGL1 置换 L32 的结合，包括 AML、毛细胞白血病和 B 细胞恶性肿瘤(如 Pre-B-ALL、B-ALL、B-CLL、B-CLL 和多发性骨髓瘤)。

完整 IgG、二体、三体和 Fab 片段都共有 scFv 抗体的特异性，
10 抗 CD162 置换每种抗体形式的结合。

实施例 11

本实施例证实 L32 与各物种动物原代细胞结合。

对于各物种动物血样，评价 L32 与血细胞亚群结合的选择性。

全血样品用 L32 或 Y1 scFv 染色，然后为 PE 标记兔抗 scFv(2 步染色)。

- 5 样品随后用 FACS 进行分析。结果如表 11 所示，表明 2 种抗体的结合在物种间存在变异。然而，一般 Y1 对粒细胞染色超过 L32，普遍发现 Y1 染色血小板，而 L32 不染色这两种细胞，表明实际上 Y1 比 L32 具有更广的特异性。

10

表 11

物种/细胞	根据 FACS 分析的结合	
	Y1	L32
小鼠(Balb/c)		
粒细胞	+/-	-
血小板	++	-
其它细胞	-	-
大鼠		
所有细胞	-	-
兔		
粒细胞	+	+
其它细胞	-	-
豚鼠		
淋巴细胞	+	-
单核细胞	++	-
粒细胞	++	-
血小板	+	-
狗		
淋巴细胞	-	-

单核细胞	++	+/-
粒细胞	+	-
血小板	+++	-

实施例 12

本实施例显示向带有人源恶性细胞的小鼠给予 L32 的效果。

SCID 小鼠(Jackson)用 100mg/kg CTX 预处理, CTX 注射 5 天后
 5 通过尾静脉注射(i.v.)接种 Molt-4(T 白血病)细胞。小鼠随机分成
 治疗组(每组 6 只), 5 天后开始治疗, 3 周采用 PBS、Molt-4、Y1 治
 疗, 2 周采用 L32 治疗。不治疗 Molt-4 组的小鼠。在第 33 天, 杀死
 小鼠, 称重其肝脏。附图 12 显示 Molt-4 生长的小鼠其肝脏重量加倍,
 组织学测定的肿瘤发生率为约 65%。Y1 或 L32 scFv 抗体治疗明显缩
 10 小治疗小鼠的肿瘤。

实施例 13

本实施例显示 L32 二体和三体的构建、表达和纯化。

编码原始 L32 的载体 pHEN-L32 用 PCR 分别扩增其 V_L 和 V_H 区。
 15 有义寡核苷酸和反义寡核苷酸用于 V_L 的 PCR 反应。纯化所需大小的
 cDNA, 测序, 用限制性内切酶消化。用相同的方法扩增 V_H 区。 V_H
 的 PCR 产物用限制性内切酶消化。三连接法用于预消化 pHEN 载体。
 最终载体命名为 pTria-L32。大肠杆菌转化后, 挑选某些克隆用于进
 一步分析, 所述分析包括 DNA 测序、蛋白表达和从细菌周质间隙提
 20 取。在还原条件下进行 SDS-PAGE 并进行蛋白质印迹分析, 确认 L32
 三体的大小。

用限制性内切酶处理 pTria-L32 载体使其线性化, 预退火合成互
 补双链寡核苷酸, 将其连接到 L32 重链和 L32 轻链的限制性酶切位
 点中。该新载体命名为 pDia-L32。如对三体所述, 确认其 DNA 序列
 25 和蛋白表达。

大肠杆菌中的表达基本如对 scFv L32 所述。但是，从转化大肠杆菌细胞周质中纯化 L32 二体和三体有所不同。scFv L32 单体形式可在蛋白 A 琼脂糖珠的亲合柱上纯化。但是，L32 的多聚形式不能用这种方法纯化，因此从细菌提取的周质蛋白用 60%硫酸铵沉淀过夜，悬浮于水中，上样于 $0.1 \times$ PBS 预平衡的 Sephacryl-200(Pharmacia) 大小排阻柱。分部收集并用 HPLC 分析，单独收集含有二体或三体的部分，用于 FITC 标记和 FACS 分析。

实施例 14

10 本实施例说明 L32-cys-kak(半胱氨酸二聚体)的生产。

1 升 λ pL-L32-cys-kak 细菌培养物 42°C 诱导 2-3 小时。5000rpm 下离心该培养物 30 分钟，沉淀悬浮于 180ml TE(50mM Tris-HCl pH 7.4, 20mM EDTA)中，加入 8ml 溶菌酶(5mg/ml 母液)中，保温 1 小时。加入 20ml 5M NaCl 和 25ml 25% Triton，再保温 1 小时。 4°C 下 15 13000rpm 离心该混合物 60 分钟，弃去上清。沉淀在组织破碎器(或匀浆器)的帮助下悬浮于 TE。此过程重复 3-4 次，直到包涵体(沉淀)颜色为灰色/浅褐色。

包涵体溶解于 6M 胍-HCl、0.1M Tris(pH 7.4)、2mM EDTA 中(1.5 克包涵体溶于 10ml 溶解缓冲液，得到约 10mg/ml 可溶蛋白)。该溶液温育至少 4 小时。测定蛋白浓度，调整至 10mg/ml。加入 DTE 至 20 65mM 的最终浓度，室温下保温过夜。将 10ml 蛋白稀释于(滴加)含有 0.5M 精氨酸、0.1M Tris pH 8、2mM EDTA 和 0.9mM GSSG 的溶液，开始重折叠。重折叠溶液在约 10°C 下保温 48 小时。含有蛋白的重折叠溶液在含有 25mM 磷酸盐和 100mM 尿素，pH 为 6 的缓冲液中透析，浓缩至 500ml。经浓缩/透析的溶液与 SP 琼脂糖柱结合，25 蛋白用梯度 NaCl(最高 1M)洗脱。

实施例 15

全长 L32 IgG 抗体以及 Fab₁ 和 F(ab')₂ 片段的产生如下述进行, Y1 IgG 的生产同此进行。

5 CHO 细胞 5% CO₂ 中 37°C 下培养于加入了 10%胎牛血清和 40μg/ml 庆大霉素的 F-12 培养基。转染 1 天前, 1-1.5-1 × 10⁶ 个细胞接种于 90mm 培养皿。培养物用 10μg 编码 L32 抗体轻链和重链的 DNA 共转染。转染用 FuGene(Roche)转染试剂技术进行。非选择性生长培养基中生长 2 天后, 细胞在含 550μg/ml 新霉素和 3μg/ml 嘌呤霉素的 F-12 培养基中培养 10-12 天。用胰蛋白酶消化细胞, 通过在 Costar 96
10 孔塑料板上有限稀释至 0.5 细胞/孔克隆细胞。挑选单个克隆, 在 6 孔板上生长, 转移到培养瓶中以进一步选择(确定表达水平和分泌到生长培养基中抗体的水平)。

CHO 细胞 5% CO₂ 中 37°C 下培养于加入了 10%胎牛血清和 40μg/ml 庆大霉素的 F-12 培养基。转染 1 天前, 0.8-1 × 10⁶ 个细胞接种于 90mm 培养皿。培养物用 10μg DNA 转染, 所述 DNA 编码克隆在 CMV(巨细胞病毒)启动子下的 L32 抗体轻链和重链和克隆在 sv-40 启动子下的 dhfr 基因。转染用 FuGene(Roche)转染试剂技术进行。非选择性生长培养基中生长 2 天后, 细胞在含有 100nM-5μM 氨甲蝶呤 (MTX)的培养基中培养, 透析除去胎牛血清以选择全长 L32 抗体表达水平升高的克隆(有限稀释后)。
20

建立夹心 ELISA 测定法以确定转染 CHO 细胞分泌到上清中的抗体的浓度。为定量抗体浓度, 使用下列试剂: 单克隆抗人 IgG1(Fc) (Sigma)作为包被抗体, 山羊抗人 IgG(γ 链特异性)生物素连接物作为检测分子(Sigma), 纯化的人 IgG1λ(Sigma)作为标准。

25 细胞在加入 10%胎牛血清、新霉素和嘌呤霉素(如上述)的 F-12 培养基中滚瓶生长至终浓度 1-2 × 10⁸ 个细胞/瓶。对于抗体生产, 在相同培养基中培养细胞, 但用 2%胎牛血清再培养 2 天。分泌的抗体在蛋白 G 琼脂糖柱(Pharmacia)和离子交换柱-Q 琼脂糖(Pharmacia)上

纯化。结合在 pH 7.0 的 20mM 磷酸钠缓冲液中进行，洗脱在 pH 2.5-3.0 的 0.1M 甘氨酸缓冲液中进行。纯化抗体的量用 UV 吸光度和 ELISA 测定，纯度用 SDS-PAGE 和 HPLC 分析。

5 L32 IgG 裂解为 Fab₁ 和 F(ab')₂。最初，用固定化无花果蛋白酶 (Pierce) 制备单价和二价的抗体片段。无花果蛋白酶在 1mM 半胱氨酸存在下的裂解作用产生 F(ab')₂ 片段。相像地，通过将消化缓冲液中的半胱氨酸活化剂增加至 10mM，可从原始 IgG 得到 Fab 片段。消化后，片段在固定化蛋白 A 柱上纯化。F(ab')₂ 和 Fab₁ 片段用微量浓缩器浓缩，截留分子量设为 10,000 或 30,000 道尔顿。用 280nm 处的吸光度测定蛋白回收率。片段纯度用凝胶电泳测定。

10 进一步在消化缓冲液用 0.5ml 固定化木瓜蛋白酶浆料 37°C 处理 10mg 纯化 L32 抗体 16 小时。用 1.5ml 结合缓冲液洗脱消化物，中止反应。用蛋白 A 柱和结合缓冲液从未消化 IgG 和 Fc 片段中分离 Fab1。Fab1 包含在流动相中。通过读出 280nm 处吸光度，合并包含片段的峰部分，浓缩，用 pH 7.4 的 PBS 透析过夜。通过 280nm 处吸光度和凝胶电泳测定蛋白回收率、纯度和性质。

实施例 16

20 通过使用 FACS 分析的竞争性测定评价 scFv L32 对 scFv Y1 与 ML2 细胞结合的影响(表 11)或对 IgG Y1 与 ML2 细胞结合的影响(表 12)。

向 ML2 细胞加入 1μg 竞争抗体(L32 scFv、Y1 scFv(P03)、KPL-1 或对照 N06 scFv)(每次测定 0.5×10^6 细胞)。保温 30 分钟后，加入 Y1-PE 标记的 scFv 或 IgG，再在 37°C 保温 30 分钟。保温后样品用 FACS 缓冲液洗涤一次，然后进行分析。

25 结果表示为几何平均值，所述平均值为 2 个试管分析双份结果中值的平均。几何平均值是结合亲合力的指数性表示而非线性表示。

表 12 中所示结果表明，L32 scFv 有效地抑制(约 80%)scFv Y1-PE

与 ML2 细胞的结合, 即 L32 scFv 以与 Y1 scFv 相似的方式起抑制作用。相反地, 无关阴性对照抗体 scFv N06 仅抑制 20% 的结合。

表 12

样品	中值	抑制百分比
对照	5	-
KPL-1-PE	700	-
Y1-PE	240	-
Y1-PE+N06	190	20
Y1-PE+P03	48	80
Y1-PE+L32	40	83

5

表 13

样品	中值			抑制百分比		
	200ng	500ng	1000ng	200ng	500ng	1000ng
对照	3	ND	ND	-	ND	ND
Y1	12.5	ND	ND	-	ND	ND
Y1-PE+Y1	3	ND	ND	100%	ND	ND
Y1-PE+KPL-1	2	ND	ND	100%	ND	ND
Y1-PE+P03	7.5	6	5	40%	52%	60%
Y1-PE+L32	5.5	3.8	3.7	54%	79%	80%

ND=由于在低浓度下达到完全抑制, 因此未进行实验。

10

表 13 中所示结果表明, IgG Y1 单独(最终浓度 200 ng)与细胞结合的几何平均值为 12.5, 200ng “冷” IgG Y1 或 KPL-1(商业化供应的抗 PSGL1 小鼠单克隆抗体)的竞争分别降低 IgG Y1 结合的几何平均值至 3 和 2。IgG Y1 与 ML2 细胞的结合被 scFv Y1 抗体以剂量依赖的方式抑制(竞争), 即 200ng 的 scFv Y1 抗体降低 IgG Y1 结合的几何平均值至 7.5, 而 1000ng 降低其几何平均值至 5。IgG Y1 与 ML2 细胞的结合也被 scFv L32 抗体以剂量依赖的方式抑制(竞争), 但抑制程度超过 scFv Y1, 即 200ng 的 scFv L32 抗体降低 IgG Y1 结合的几

15

何平均值至 5.5, 而 1000ng 降低其几何平均值至 3.7。

虽然 scFv Y1 和 scFv L32 都抑制 IgG Y1 与 ML2 细胞的结合, 在相同的抗体浓度下, scFv L32 产生的抑制比 scFv Y1 产生的抑制更显著。此外, 与 2 个受试 scFv 抗体相比, 受试 IgG 抗体(IgG Y1 和 KPL-1)都与 ML2 细胞具有更高的亲合力, 它们分别降低 IgG Y1 结合的几何平均值至 3 和 2。

实施例 17

本实施例用 FACS 分析证实 L32 与各种血细胞亚群的结合, 包括正常细胞(表 14)和疾病细胞(表 15)。

首先, 进行分析, 测定与 Y1 scFv 相比 L32 scFv 与 CD34+前体细胞结合的选择性, 所述细胞来自正常人骨髓(NBM)样品。用标记抗体(抗 scFv-PE)染色后测定结合。在相同测定中用 2 种抗体测试每个 NBM 样品。

评价结合的标准如下:

几何平均值(GM)低于 10-阴性;

几何平均值(GM)在 11-20 之间-低亲合力结合;

几何平均值(GM)在 21-40 之间-中等亲合力结合;

几何平均值(GM)在 41 和 41 以上-高亲合力结合。

如表 14 中所示, 32 个受试 NBM 样品中, 24 个(75%)不与 L32 或 Y1 结合。6 个样品(19%)对 L32 表现出低亲合力结合, 1 个(3%)对 L32 表现出中等亲合力结合, 1 个(3%)对 L32 和 Y1 表现出中等亲合力结合。总的说来, L32 和 Y1 与 CD34+细胞结合的特性相似。

表 14

数字	代号	P03	L32	数字	代号	P03	L32
N1	105351	阴性	阴性	N17	AHSBM24	阴性	阴性
N2	AH/NBM01	阴性	13	N18	AHJBM26	阴性	阴性
N3	AH/NBM03	阴性	阴性	N19	AHSBM27	9.6	22
N4	AH/NBM04	阴性	阴性	N20	AHSBM28	阴性	17
N5	KBM33	阴性	14	N21	AHJBM31	26	28
N6	AH/NBM08	阴性	阴性	N22	AHJBM36	阴性	阴性
N7	AH/NBM09	10	13	N23	AHJBM37	阴性	阴性
N8	AH/NBM10	10	14	N24	AHJBM38	阴性	阴性
N9	AH/NBM11	阴性	阴性	N25	AHJBM39	阴性	阴性
N10	AH/NBM12	阴性	阴性	N26	AHJBM40	阴性	阴性
N11	AH/NBM13	阴性	阴性	N27	AHJBM41	阴性	阴性
N12	105377	阴性	阴性	N28	AHJBM42	阴性	阴性
N13	AH/NBM14	阴性	阴性	N29	AHJBM43	阴性	阴性
N14	AH/NBM20	9	16	N30	AHJBM44	阴性	阴性
N15	AH/NBM22	阴性	阴性	N31	AHJBM45	阴性	阴性
N16	AH/NBM23	阴性	阴性	N32	102546	阴性	阴性

表中的值代表样品的几何平均值。

此外，对 L32 scFv 和 Y1 scFv(P03)与从患者血样中分离的人原代白血病细胞(AML、MM、B-CLL 和 B-ALL)结合进行比较性 FACS 分析。在同样的测定同一样品中比较 L32 以及 Y1 的结合。结合标准设定如上述。

表 15 表示从所有受试患者样品获得的数据，表 16 总结了 AML 和 B-CLL 样品中 L32 和 Y1 的亲合力数据。

10

表 15

编号	类型	细胞类型			
		疾病细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞

L32 与白血病患者结合

编号	类型	细胞类型			
		疾病细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞
1	42824 AML/M2	53/1000 ¹	68	-	-
2	42841 AML/M4	330	123	900 ²	280
3	42868 AML/M2	43	120	1000	345 -
4	42873 AML/M4	24	94	-	80
5	42874 AML/M4	阴性	73	35	阴性
6	42902 AML/M6	26	78	-	-
7	42933 AML/M5	200	18		
8	42939 AML/M2	57	110	-	160
9	42946 AML/M0	阴性	98	-	-
10	R0298 AML/M0	23	260	-	-
12	R9849 AML/M4	470	260	-	340
13	KAM095 RAEB	30	83	-	240
14	R5440-7 AML/M3	200	140	-	-
	AML/M1/M				
15	R0376 2	102	65	295	186
16	KAM096 AML/M2	36	41	-	-
	复发				
17	KAM108 AML	94 ³	143	360	280
18	KAM109 AML/M5	91	18	-	38
19	KMM097 MM	100	27	-	-
20	42934 MM	650	130	560	150
21	42938 MM	550	110	360	160
22	KPC105 浆细胞瘤	340	330	-	280
23	KBC098 B-CLL	37	154	-	240
24	KBC100 B-CLL	10	46	-	68
25	KBC101 B-CLL	阴性 ⁴	140	280	190
26	KBC102 B-CLL	阴性	-	-	110
27	KBC103 B-CLL	13	46	300	230
28	KBC104 B-CLL	阴性 ⁴	60	260	阴性
29	KBC105 B-CLL	70	250	-	260
30	KBC106 B-CLL	阴性	68	200	140

编号	类型	细胞类型				
		疾病细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	
31	KBC107	B-CLL	17	165	420	270
32	R3093-7	B-ALL	阴性	41	490	90
33	R313-0	B-ALL	阴性	26	-	100
Y1 scFv 与白血病患者结合						
1	42824	AML/M2	阴性/87 ¹	50		
2	42841	AML/M4	125	59	270 ²	126
3	42868	AML/M2	15	53	100	180
4	42873	AML/M4	12	38	-	43
5	42874	AML/M4	阴性	36	30	阴性
6	42902	AML/M6	19	24	-	-
7	42933	AML/M5	62	10		
8	42939	AML/M2	8	18	-	51
9	42946	AML/M0	阴性	27	-	-
10	R0298	AML/M0	阴性	43		
12	R9849	AML/M4	230	160	-	225
13	KAM095	RAEB	12	20	-	74
14	R5440-7	AML/M3	95	43		
15	R0376	AML/M1/M 2	29	18	100	63
16	KAM096	AML/M2	17	15	-	-
17	KAM108	复发 AML	15 ³	20	110	120
18	KAM109	AML/M5	40	14	-	18
19	KMM097	MM	70	13	-	-
20	42934	MM	170	30	160	50
21	42938	MM	184	30	128	68
22	KPC105	浆细胞瘤	117	116	-	100
23	KBC098	B-CLL	21	70	-	140
24	KBC100	B-CLL	19	17	-	27
25	KBC101	B-CLL	阴性 ⁴	29	84	47
26	KBC102	B-CLL	阴性	-	-	60
27	KBC103	B-CLL	阴性	20	86	110

编号	类型	疾病细胞	细胞类型			
			淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	
28	KBC104	B-CLL	阴性 ⁴	10	84	阴性
29	KBC105	B-CLL	46	117	-	133
30	KBC106	B-CLL	阴性	41	98	65
31	KBC107	B-CLL	9.5	79		126
32	R3093-7	B-ALL	阴性			
33	R313-0	B-ALL	阴性			

1 两种疾病;

2 疾病细胞中;

3 含 2.5% CD34+细胞的外周血;

5 4 细胞为 CD19+/CD5-

17 种受试 AML 样品中, 15 种(88%)与 L32 结合阳性, 其中 10 种样品(59%)表现出高亲合力结合(平均几何平均值 165), 5 种样品(29%)表现出中等亲合力结合(平均几何平均值 28)。13 种(76%)AML 样品与 Y1 结合也为阳性, 但比较性分析(表 16)表明, 相同样品中 L32 的平均结合亲合力总是明显高于 Y1 的平均结合亲合力。一般来说, 约 50%的 M2 期 AML 患者样品表现出可与 L32 和 Y1 结合。在 M3 和更晚的时期, 约 90%的样品可与 2 种抗体结合, 其亲合力程度各不相同(数据未显示)。

9 种受试 B-CLL 样品中, 4 种(44%)与 L32 结合阳性, 其中 1 种样品(11%)表现出高亲合力结合(几何平均值 70), 1 种样品(11%)表现出中等亲合力结合(几何平均值 37), 2 种样品(22%)表现出低亲合力结合(平均几何平均值 15)。3 种(33%)受试 B-CLL 样品与 Y1 结合也为阳性, 但比较性分析(表 16)表明, 相同样品中 L32 的平均结合亲合力常常明显高于 Y1 的平均结合亲合力。

4 种受试 MM 和浆细胞瘤样品中, 所有样品表现出与 L32 和 Y1 的高亲合力结合, 但 L32 的亲合力常常明显高于 Y1 的亲合力(平均

几何平均值分别为 410 和 135)。2 种受试 B-ALL 样品中，2 种与 L32 和 Y1 的结合均为阴性。

表 16

	AML		B-CLL	
	L32	Y1	L32	Y1
高几何平均值				
疾病细胞	165	61	70	46
淋巴细胞	117	50	107	42
单核细胞	638	145	323	58
粒细胞	239	110	169	70
中等几何平均值				
疾病细胞	28	12	37	21
淋巴细胞	41	15	26	9
单核细胞	35	30	阴性	阴性
粒细胞	阴性	阴性	阴性	阴性
低几何平均值				
疾病细胞	无	无	13	9
淋巴细胞	18	12	阴性	阴性
单核细胞	阴性	阴性	阴性	阴性
粒细胞	阴性	阴性	阴性	阴性

5

* 平均几何平均值基于表 14 结果。高、中等和低亲合力组根据 L32 数据确定。

表 15 和 16 中的结果清楚表明，在原代 AML 和 B-CLL 血样的疾病细胞和其它成熟细胞亚群(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)中，L32 抗体的结合常常明显高于 Y1 的结合。

10

	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly	65	70	75	80
5	Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala	85	90	95	100
	Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	105	110	115	120
10	Cys Ala Arg Met Arg Ala Pro Val Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg	125	130	135	140
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln	145	150	155	160
15	Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser	165	170	175	180
	Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val	185	190	195	200
20	Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser	205	210	215	220
	Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr	225	230	235	240
	Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr	245	250	255	260
30	Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala	265	270	275	280
35	<210> 2				
	<211> 6				

<212> PRT

 <213> 智人(Homo sapiens)

 5
 <400> 2

 Met Arg Ala Pro Val Ile

 5
 10

 <210> 3

 <211> 16
 15
 <212> PRT

 <213> 智人(Homo sapiens)

 20
 <400> 3

 Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 25

 <210> 4

 30 <211> 8

 <212> PRT

 <213> 智人(Homo sapiens)
 35

 <400> 4

<211> 9

<212> PRT

5 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

10 Thr Asn Trp Tyr Leu Arg Pro Leu Asn
1 5

15 <210> 8

<211> 10

20 <212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

25 <400> 8

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

图 1

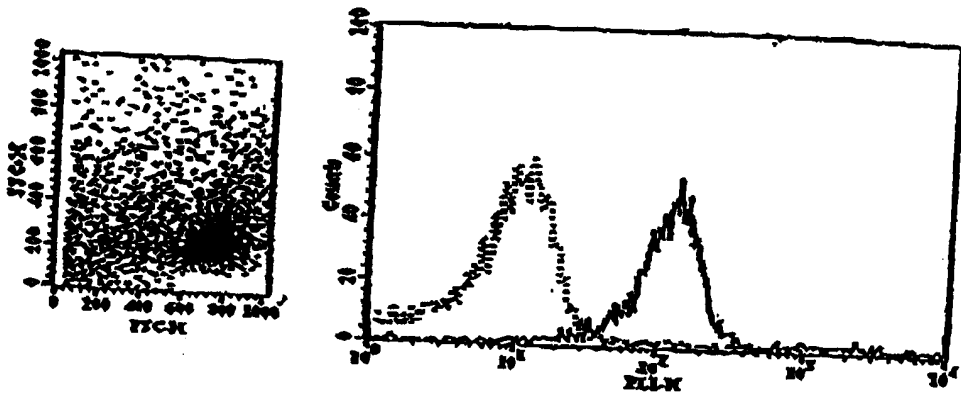


图 2

Y1 二聚体对利托菌素活化血小板聚集(PRP)的影响

日期	克隆	浓度	聚集前	聚集%	
				前	后
6.2.02	洗涤血小板	30	3	20	70
10.3.02	CysKAK 二聚体	25	4.5	30	87
11.3.02	CysKAK 二聚体	25	3	61	
13.3.02	二聚体混合物 024-118	25	14	100	
			平均n=3	63%	
6.2.02	洗涤血小板	7.5	2.5	17	72
10.3.02	CysKAK 二聚体	10	4	27	87
11.3.02	CysKAK 二聚体	10	3	61	
13.3.02	二聚体混合物 024-118	10	3	61	
			平均n=3	60%	
6.2.02	洗涤血小板	7.5	2.5	17	72
10.3.02	CysKAK 二聚体	4	2	13	67
13.3.02	二聚体混合物 024-118	4	2	13	90
			平均n=2	13%	
6.2.02	洗涤血小板	0.5	1	22	81
10.3.02	CysKAK 二聚体	1	0	0	
11.3.02	CysKAK 二聚体	1	0	0	
13.3.02	二聚体混合物 024-118	1	0	0	
			平均n=3	0%	

图 3

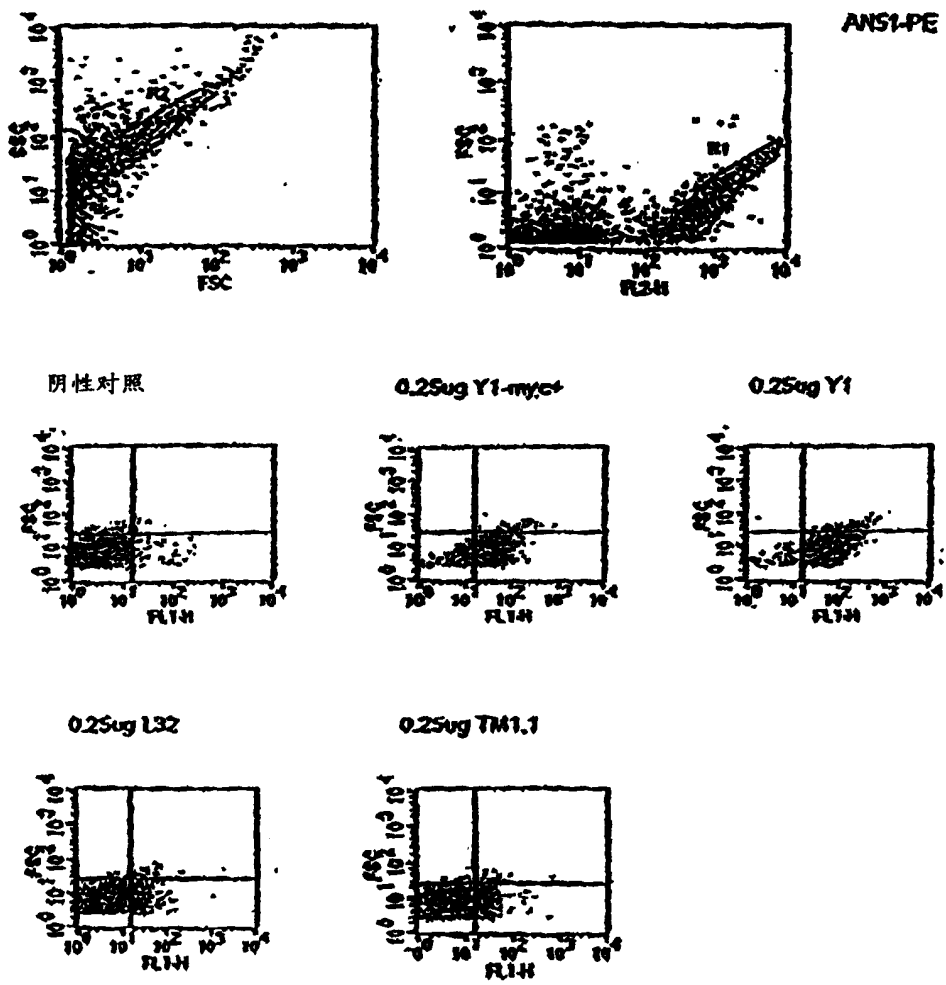


图 4

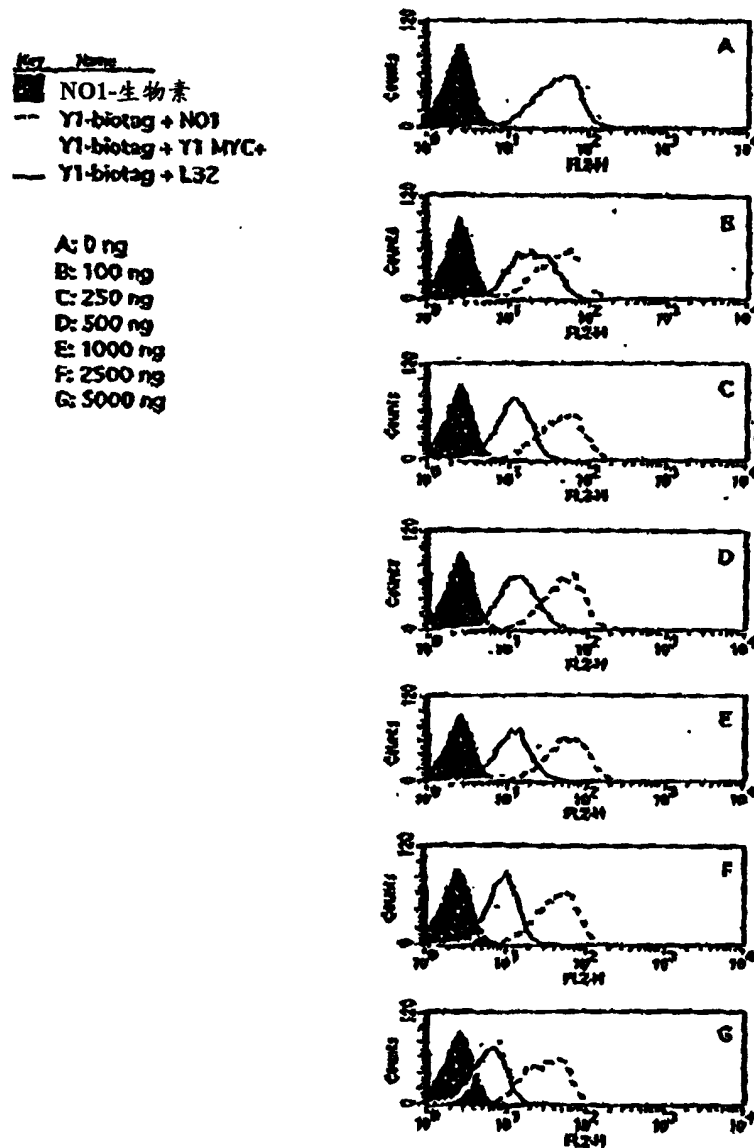


图 5

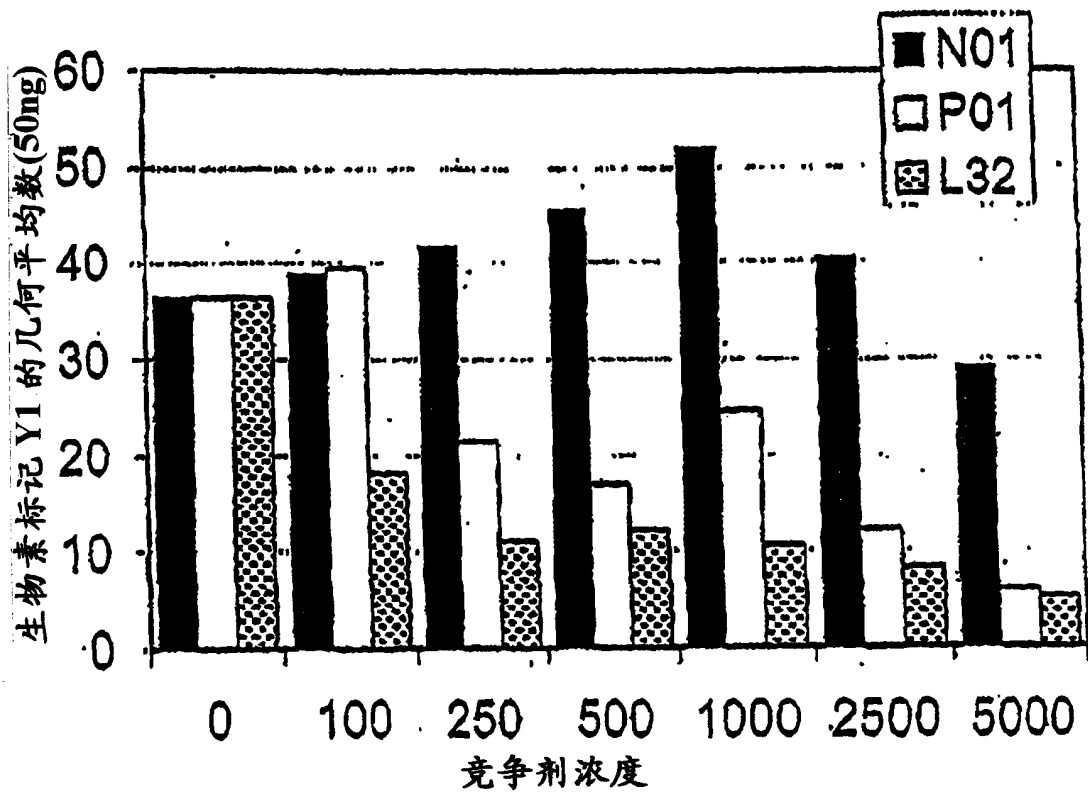


图 6

Y1 和 L32 与 GC 的结合

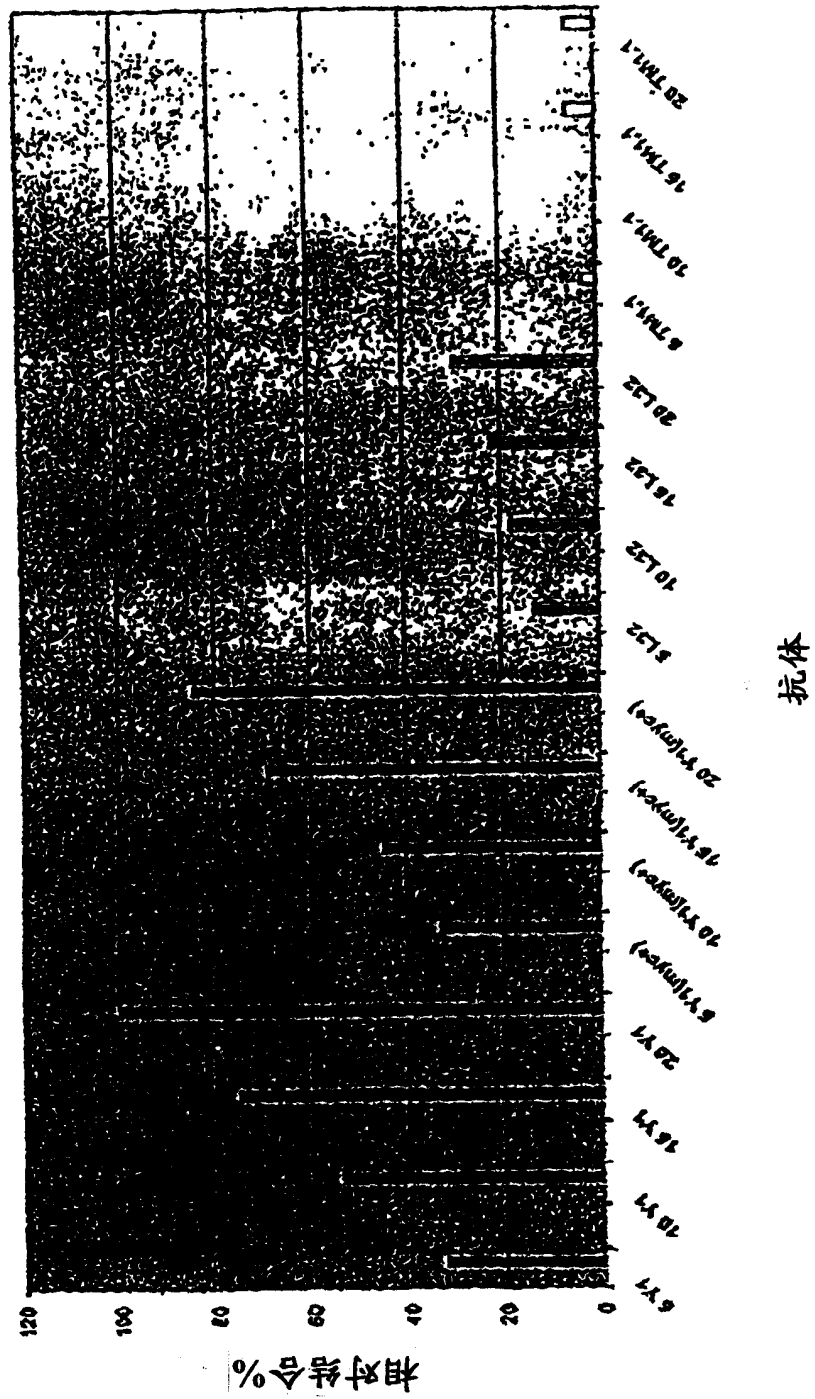


图 7

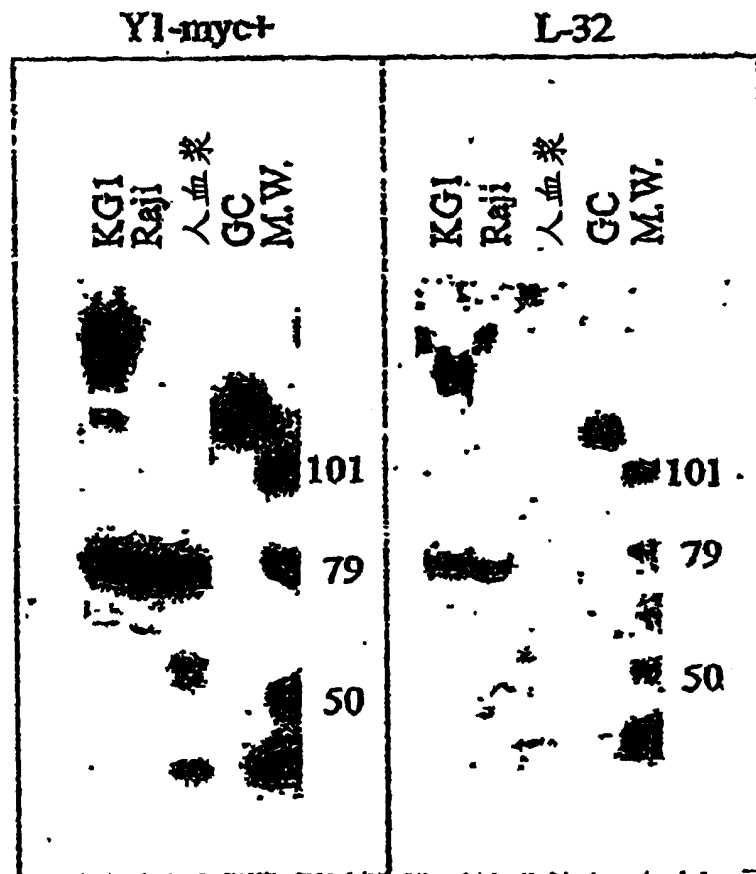


图 8

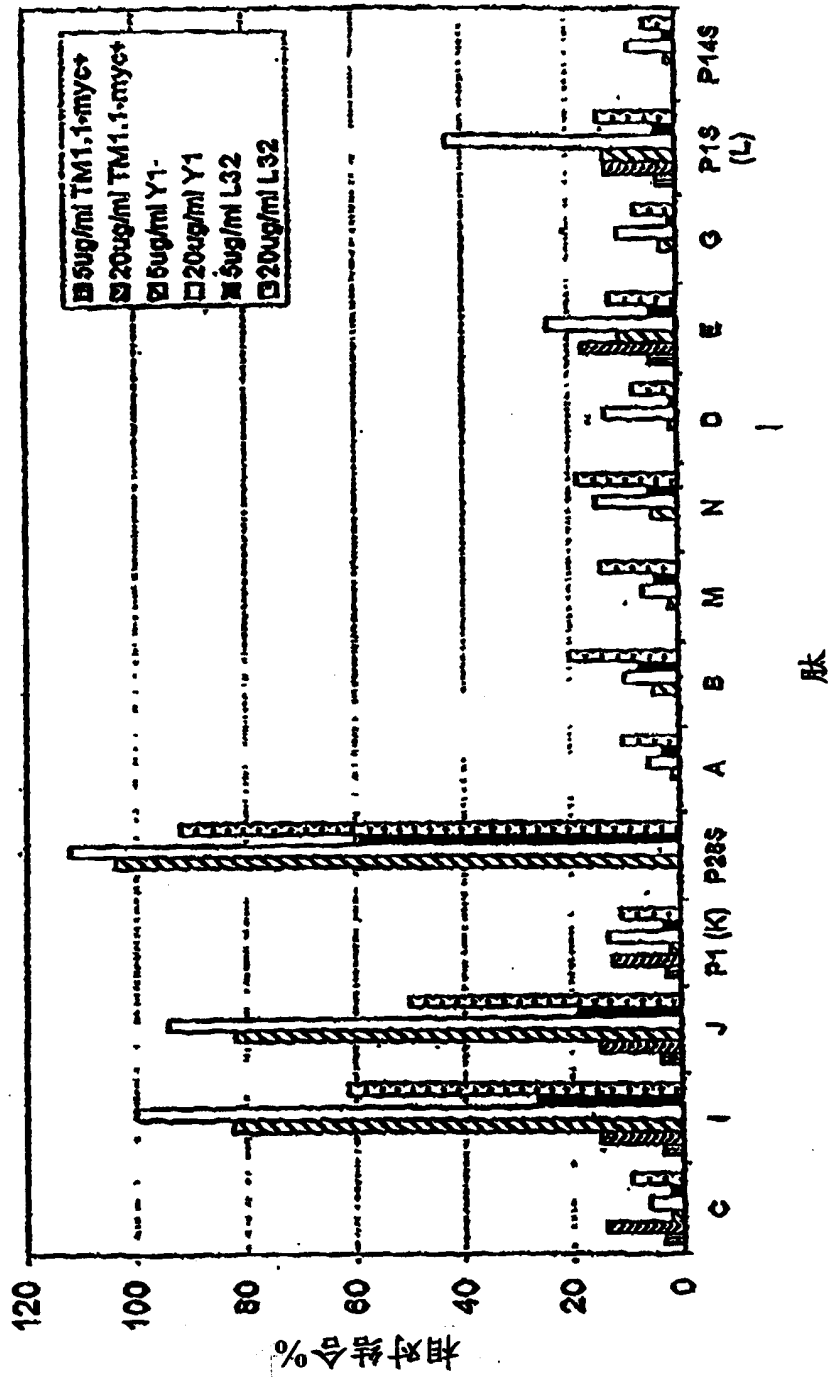


图9

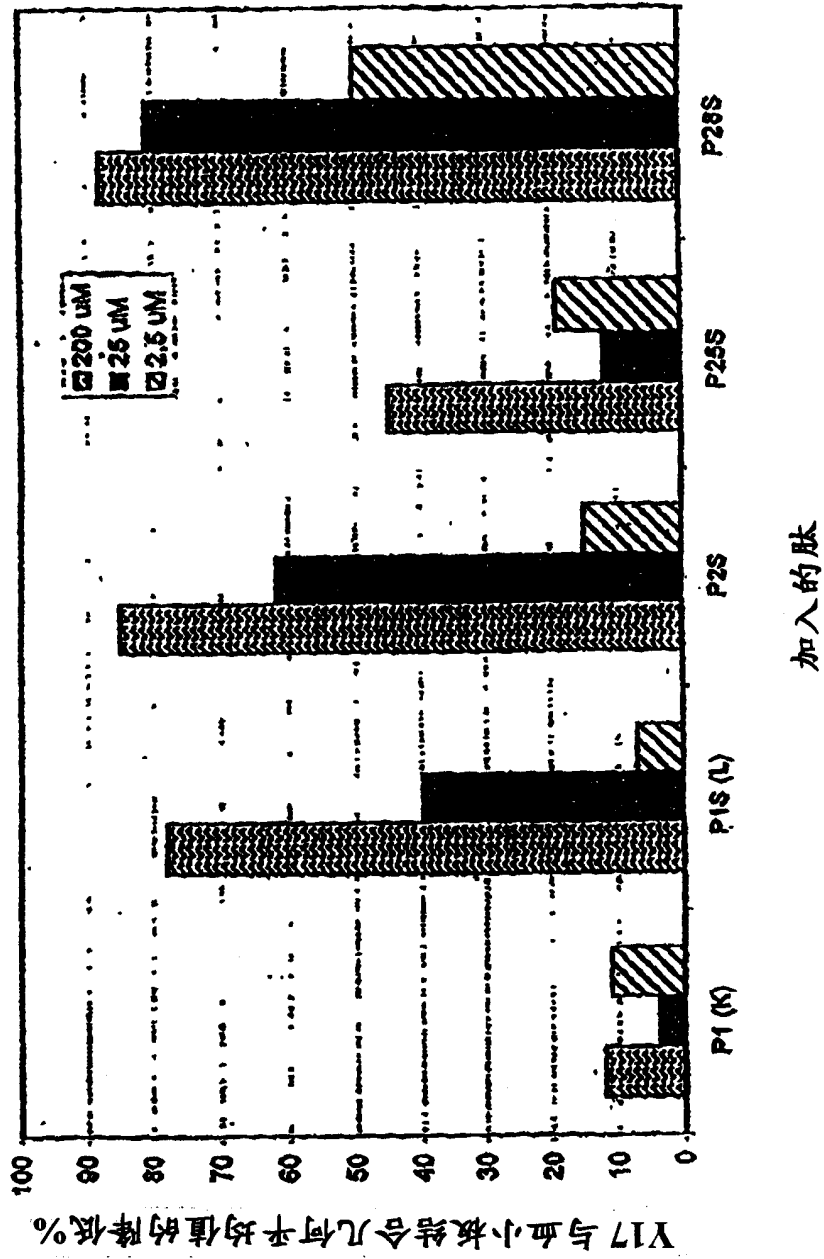


图 10

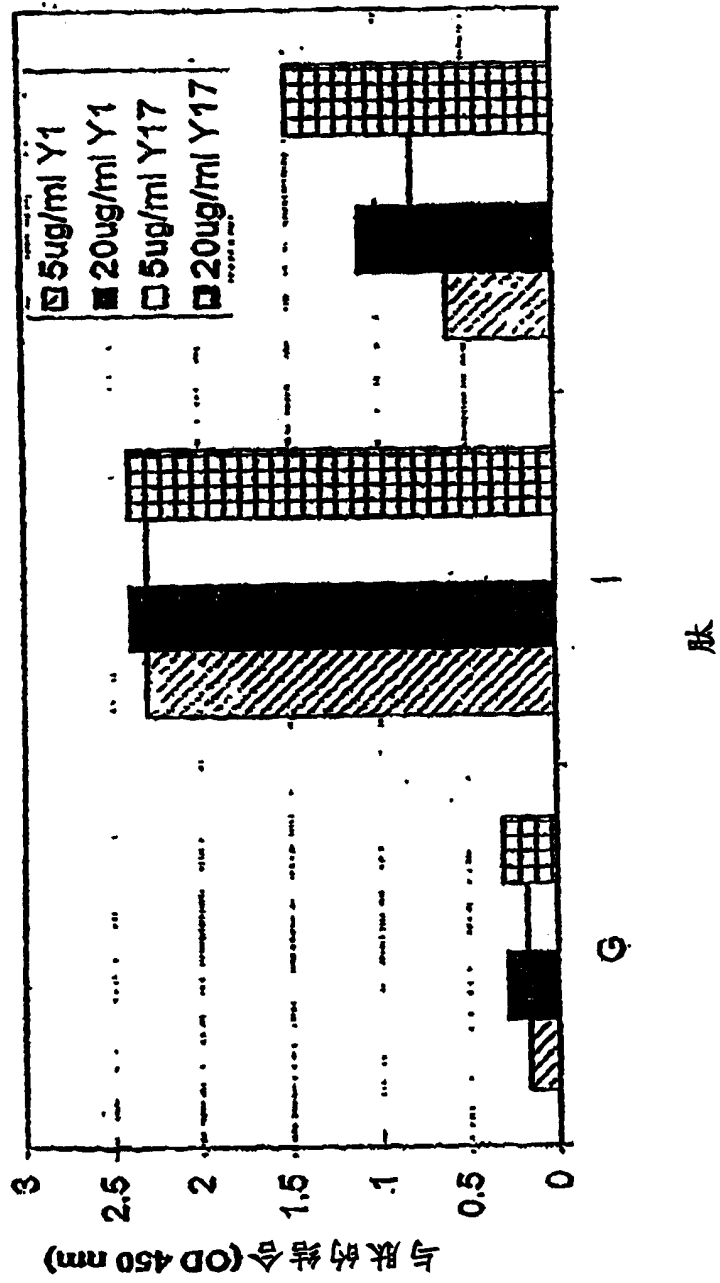


图 11A

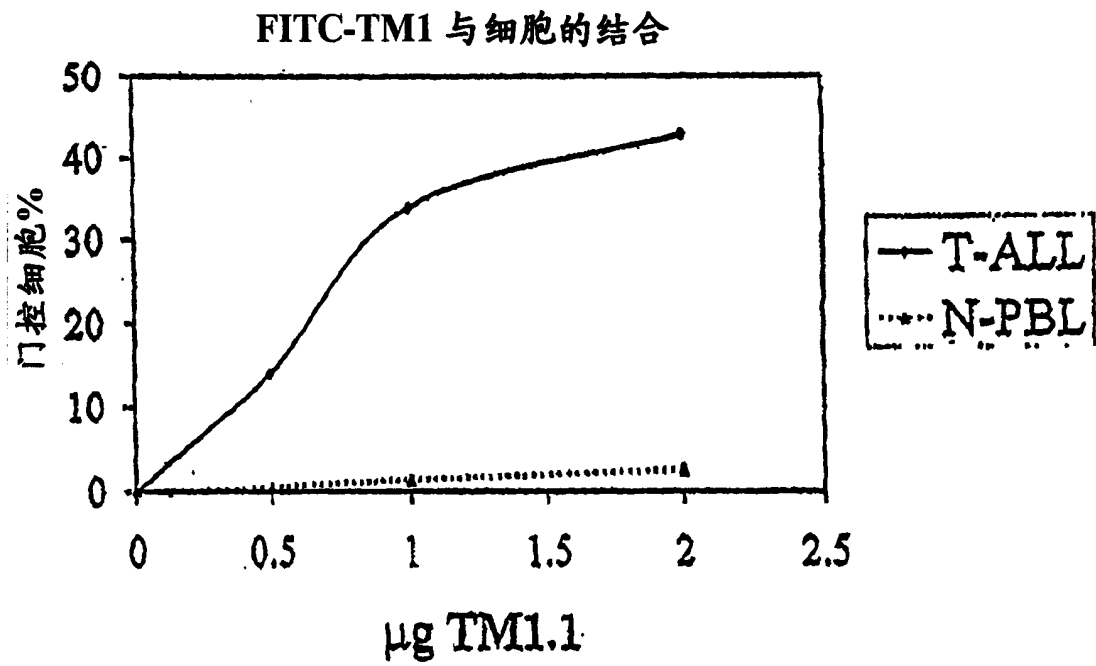


图 11B

FITC-TM13 与细胞的结合

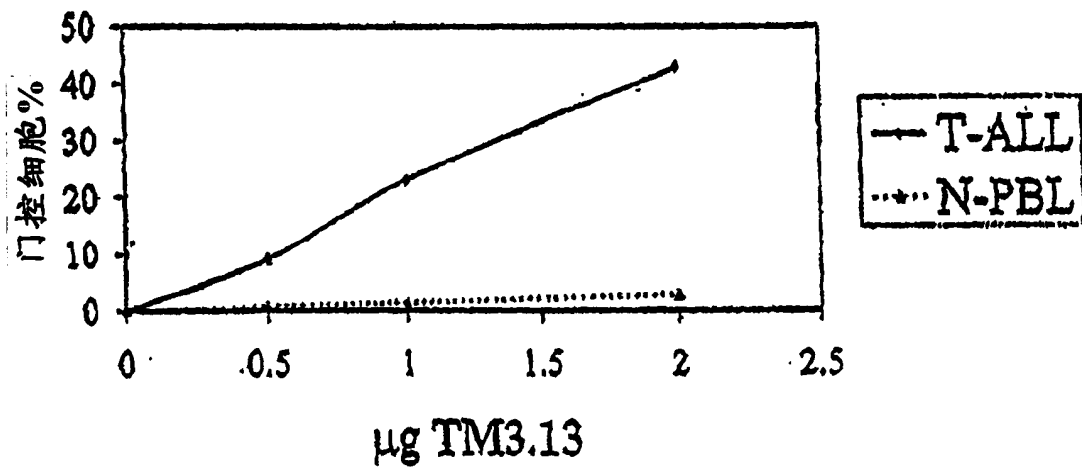


图 11C

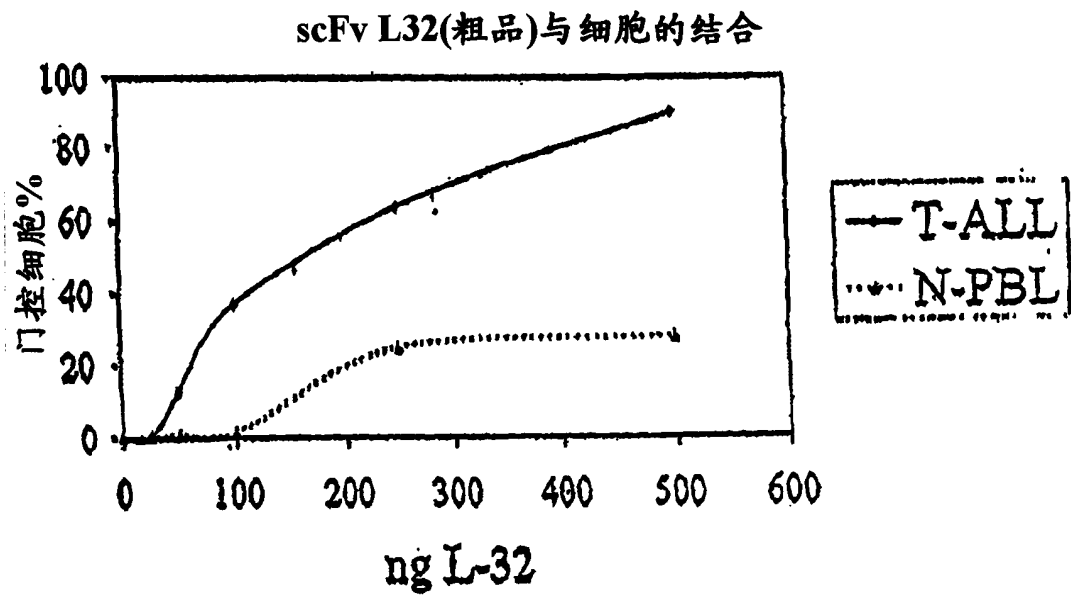


图 12A

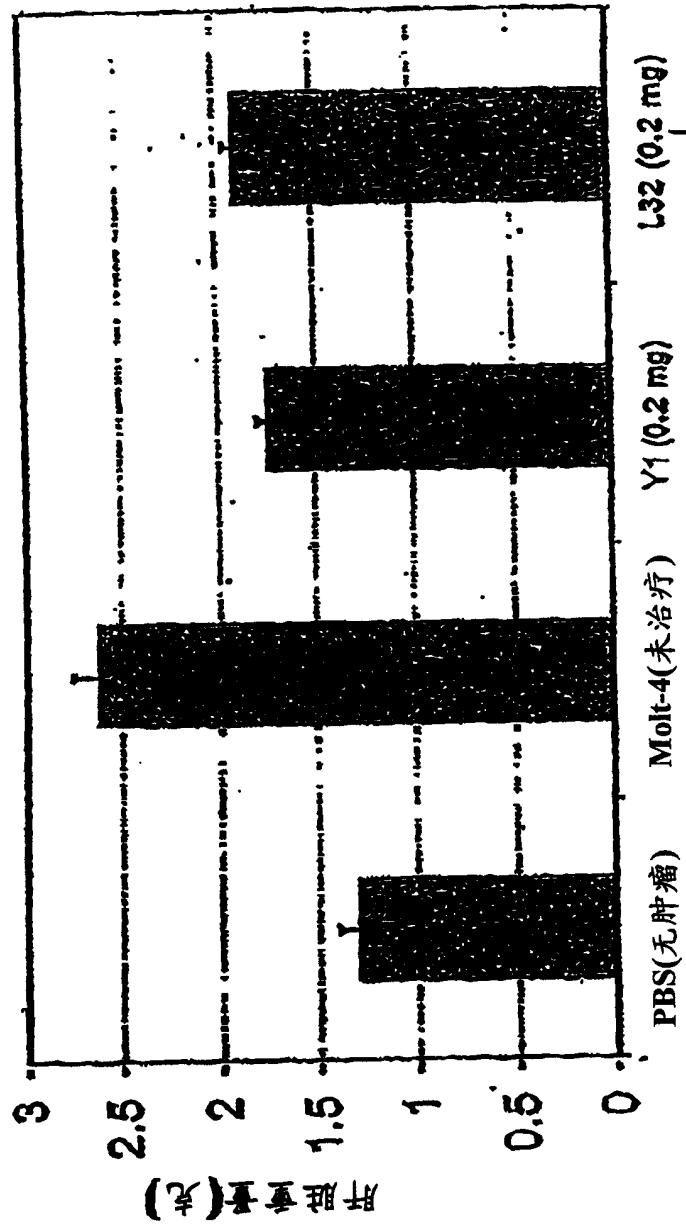


图 12B

