



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102575277 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080046037. 8

A61K 35/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 30

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/248, 014 2009. 10. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/050873 2010. 09. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02011/041518 EN 2011. 04. 07

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 凯特琳娜·阿卡索格鲁

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 申基成 武晶晶

(51) Int. Cl.

C12P 21/08 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 25 页

序列表 7 页 附图 4 页

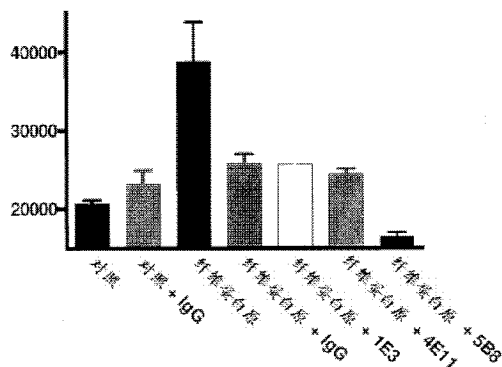
(54) 发明名称

单克隆抗体

(57) 摘要

本发明提供一种结合纤维蛋白或纤维蛋白原 YC 结构域的分选抗体。在各个方面,所述抗体抑制小胶质细胞与纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域粘附,抑制 Mac-1 与纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域结合,和 / 或抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 的临床症状。提供了使用所述抗体、药物组合物、试剂盒、载体、包含载体的细胞的各种方法和抗体生成方法。

吞噬作用



1. 一种结合纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域的分离抗体,其中所述抗体表现出对小胶质细胞与所述纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域粘附高于 20% 的抑制。

2. 一种结合纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域的分离抗体,其中所述抗体表现出对 Mac-1 与所述纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域结合高于 50% 的抑制。

3. 一种结合纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域的分离抗体,其中所述抗体抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 复发时的临床症状。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体,其中所述抗体结合所述纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域的 $\gamma^{377-395}$ 表位。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体,其中所述抗体结合所述纤维蛋白或纤维蛋白原 γ C 结构域的 $\gamma^{190-202}$ 表位。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗体,其中所述抗体为人源化抗体。

8. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的抗体,其中所述抗体为人抗体。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有 3 个包含选自 RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO :2)、QMSNLAS (SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT (SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链。

10. 根据权利要求 1 至 8 所述的抗体,其中所述抗体包含具有 3 个包含选自 GYTFTSYWIH (SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC (SEQ ID NO :8) 的氨基酸序列的互补性决定区域的重链。

11. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有 3 个包含选自 RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO :2)、QMSNLAS (SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT (SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链和具有 3 个包含选自 GYTFTSYWIH (SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC (SEQ ID NO :8) 的氨基酸序列的互补性决定区域的重链。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含 SEQ ID NO :1 的轻链可变氨基酸序列。

13. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含 SEQ ID NO :5 的重链可变氨基酸序列。

14. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含 SEQ ID NO :1 的轻链可变氨基酸序列和 SEQ ID NO :5 的重链可变氨基酸序列。

15. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体单独包含具有 3 个包含与选自 RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO :2)、QMSNLAS (SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT (SEQ ID NO :4) 的序列有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链,和具有 3 个包含与选自 GYTFTSYWIH (SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG (SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC (SEQ ID NO :8) 序列有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链;并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

16. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体,其中所述抗体单独包含具有 3 个包含与选自 RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID NO :2)、QMSNLAS (SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT (SEQ ID NO :4) 的序列有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链,和具有 3 个包含

与选自 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链 ; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

17. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体, 其中所述抗体单独包含具有 3 个包含与选自 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的序列有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含与选自 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链 ; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

18. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗体, 其中所述抗体单独包含具有 3 个包含与选自 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的序列有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含与选自 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链 ; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

19. 一种减轻与 Mac-1 结合纤维蛋白或 Mac-1 结合纤维蛋白原相关的病变症状的方法, 其中所述方法包括向期望这种减轻的受试者按足以减轻所述受试者病变症状的量施用根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体。

20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述受试者为人。

21. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述病变选自多发性硬化、脊髓损伤、阿尔茨海默氏病、中风、类风湿关节炎和癌症。

22. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

23. 一种试剂盒, 所述试剂盒包含根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体。

24. 一种载体, 所述载体包含编码纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位 CKKTTMKIIPFNRLTIG(SEQ ID NO :18) 或其生物活性衍生物的核酸序列。

25. 一种细胞, 所述细胞包含根据权利要求 24 所述的载体。

26. 一种生成免疫特异性结合纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位或其生物活性衍生物的抗体的方法, 所述方法包括向受试者施用第一剂量的根据权利要求 23 所述的细胞, 其中所述第一剂量足以在所述受试者体内产生免疫反应。

27. 根据权利要求 26 所述的方法, 所述方法进一步包括向所述受试者施用第二剂量的所述细胞的步骤, 其中所述第二剂量足以在所述受试者体内产生免疫反应。

28. 根据权利要求 26 至 27 中任一项所述的方法, 其中所述生成的抗体抑制所述受试者体内的纤维蛋白 / Mac-1 结合。

29. 一种筛选结合 Mac-1 受体并调节 Mac-1 受体活性的配体的方法, 所述方法包括 : (a) 提供根据权利要求 1 所述的抗体 ; (b) 接触纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位 CKKTTMKIIPFNRLTIG(SEQ ID NO :18) 或其生物活性衍生物, 并且形成抗体 / 多肽复合体 ; (c) 使所述抗体 / 多肽复合体与包含候选化合物的组合物接触 ; 和 (d) 确定候选化合物是否结合单克隆抗体 ; 由此所述候选化合物的结合表明所述候选化合物为调节 Mac-1 受体活

性的配体。

单克隆抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 10 月 2 日提交的美国临时申请序列第 61/248,014 号的优先权,其通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究或研发的声明

[0004] 本发明部分是在美国国家卫生研究院基金 NS052189 的政府资助下完成的。政府对本发明具有一定的权利。

[0005] 提交的电子材料通过引用并入

[0006] 作为本公开一部分的序列列表包括由美国专利商标局 3.5 版 PatentIn 软件生成的标题为“RUC110WO_ST25”的文件中提供的序列,包括本发明的核苷酸和 / 或氨基酸序列。序列列表的主题通过引用整体并入本文。

发明领域

[0007] 本发明总体涉及单克隆抗体的生成,具体涉及识别纤维蛋白 yC 结构域的单克隆抗体以及将所述单克隆抗体用作治疗剂的方法。

[0008] 介绍

[0009] 当免疫系统攻击大脑和脊髓时发生多发性硬化,从而损害隔离和保护神经纤维的髓鞘。称为小胶质细胞的脑细胞参与这种攻击并且在本应保护脑部不受入侵物损害的细胞衬里血脑屏障 (BBB) 受到破坏时被激活。由于 BBB 受到破坏,称为纤维蛋白原的血蛋白渗漏至脑部。除在凝血中的已知作用以外,纤维蛋白原还激活小胶质细胞并因此增加多发性硬化动物模型的炎症反应。另外,已经确定纤维蛋白原牵涉某些癌症、类风湿关节炎和其它疾病的发病机理以及发生组织损伤并由此使纤维蛋白原“渗漏”的病变。参见例如, Akassoglou 等,2002, Neuron, 33 :861-875 ;Akassoglou 等,2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 :6698-6703 ;Adams 等,2007, J. Exp. Med. , 35 :2428-34。还已确定纤维蛋白原用于介导这些效应的特异性受体 Mac-1 不牵涉纤维蛋白原的有益凝结性质。然而,至今未开发出纤维蛋白原 /Mac-1 结合的特异性抑制剂。

[0010] 因此,需要的是降低受试者脑部和其它部位纤维蛋白原的促炎影响,同时保持纤维蛋白原在凝血中的有益作用的纤维蛋白原 /Mac-1 结合的特异性抑制剂。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了结合纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域的分选抗体。在本发明的某些方面,抗体表现出对小胶质细胞与纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域粘附高于 20% 的抑制。另一方面,抗体表现出对 Mac-1 与纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域结合高于 50% 的抑制。又一方面,抗体抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 复发时的临床症状。

[0013] 在各个实施方案中,抗体结合纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域的 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 表位。本发明的抗体可选地结合纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域的 y¹⁹⁰⁻²⁰² 表位。这种抗体为单克隆抗体,并且在各个方面为人源化抗体或人抗体。

[0014] 在本发明的各个方面,抗体包含具有 3 个包含包括 RSSKSLHSSGITYLS (SEQ ID

NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链。在各个方面, 抗体包含具有 3 个包含包括 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 的氨基酸序列的互补性决定区域的重链。某些情况下, 抗体包含具有 3 个包含包括 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含包括 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 的氨基酸序列的互补性决定区域的重链。

[0015] 在各个方面, 以上抗体包含 SEQ ID NO :1 的轻链可变氨基酸序列。在各个方面, 以上抗体包含 SEQ ID NO :5 的重链可变氨基酸序列。在又一方面, 以上抗体包含 SEQ ID NO :1 的轻链可变氨基酸序列和 SEQ ID NO :5 的重链可变氨基酸序列。

[0016] 在本发明的又一方面, 以上抗体单独包含具有 3 个包含与包括 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的序列有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含与包括 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 80% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

[0017] 在本发明的又一方面, 以上抗体单独包含具有 3 个包含与包括 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的序列有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含与包括 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

[0018] 在本发明的又一方面, 以上抗体单独包含具有 3 个包含与包括 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的序列有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含与包括 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 95% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

[0019] 在本发明的又一方面, 以上抗体单独包含具有 3 个包含与包括 RSSKSLHSSGITYLS(SEQ ID NO :2)、QMSNLAS(SEQ ID NO :3) 和 AQNLELPLT(SEQ ID NO :4) 的序列有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的轻链, 和具有 3 个包含与包括 GYTFTSYWIH(SEQ ID NO :6)、LIDPSDSYTNYNQKFRG(SEQ ID NO :7) 和 SDPTGC(SEQ ID NO :8) 序列有至少 99% 序列同一性的氨基酸序列的互补性决定区域的重链; 并且其中所述轻链互补结构域和重链互补结构域保持 Mac-1 结合能力。

[0020] 还提供了一种减轻与 Mac-1 结合纤维蛋白或 Mac-1 结合纤维蛋白原相关的病变症状的方法, 所述方法包括向期望这种减轻的受试者按足以减轻受试者病变症状的量施用权利要求 1 所述的抗体。在本方法的各个方面, 受试者为人。在各个方面, 病变包括多发性硬化、脊髓损伤、阿尔茨海默氏病、中风、类风湿关节炎和癌症。

[0021] 还提供了一种包含以上抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。另一方面,

提供包含上述抗体的试剂盒。又一方面,提供了一种包含编码纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位、CKKTTMKIIPFN RLTIG (SEQ ID NO :18) 或其生物活性衍生物的核酸序列的载体。另一方面,提供了一种包含载体的细胞。

[0022] 在本发明的又一方面,提供了一种生成免疫特异性结合纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位或其生物活性衍生物的抗体的方法,所述方法包括:向受试者施用第一剂量的权利要求 23 所述的细胞,其中所述第一剂量足以在所述受试者体内产生免疫反应。在各个方面,所述方法可进一步包括向所述受试者施用第二剂量的所述细胞的步骤,其中所述第二剂量足以在所述受试者体内产生免疫反应。在各个方面,所生成的抗体抑制所述受试者体内的纤维蛋白 / Mac-1 结合。

[0023] 另一方面,提供了一种筛选结合 Mac-1 受体并调节 Mac-1 受体活性的配体的方法,所述方法包括:(a) 提供权利要求 1 所述的抗体;(b) 接触纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位 CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ ID NO :18) 或其生物活性衍生物,并且形成抗体 / 多肽复合物;(c) 使所述抗体 / 多肽复合物与包含候选化合物的组合物接触;和 (d) 确定候选化合物是否结合单克隆抗体;由此候选化合物的结合表明所述候选化合物为调节 Mac-1 受体活性的配体。

[0024] 参考以下描述、实例和所附权利要求,本发明的这些和其它特征、方面和优点将变得更好理解。

[0025] 附图

[0026] 本领域的技术人员将了解以下所述附图仅仅为了说明目的。附图并非旨在以任何方式限制本教导的范围。

[0027] 图 1。与市售的 Mac-1 封闭性抗体 (M1/70) 相比,在 595nm 下进行吸光度测量评估的单克隆抗体。

[0028] 图 2。ELISA 测量与纤维蛋白原结合的单克隆抗体的结果。

[0029] 图 3。针对修饰的纤维蛋白 $y^{377-395}$ 表位的单克隆抗体 5B8 显示出在抑制吞噬作用中的效果增强。

[0030] 图 4。在 PLP EAE 中与抗体 (A) 4E11 和 (B) 5B8 有关的临床症状首次发生后施用抗纤维蛋白抗体的体内实验。单克隆抗体 5B8 在复发时显示抑制。

[0031] 发明详述

[0032] 缩写和定义

[0033] 除非另外定义,关于本发明使用的科学技术术语应具有本领域中普通技术人员普遍所理解的含义。另外,除非上下文另有需要,单数术语应包括复数形式,而复数术语应包括单数形式。通常,结合本文所述的细胞和组织培养、分子生物学和蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交使用的命名法及其技术是本领域中众所周知且常用的。标准技术用于重组 DNA、寡核苷酸合成、组织培养和细胞转化。使用市售的试剂盒根据生产商说明或如本领域通常实现那样或如本文所述进行酶促反应和纯化技术。

[0034] 除非另外注明,本发明的实践将采用在本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。这些技术在文献中得到全面解释,例如 Molecular Cloning :A Laboratory Manual,第 2 版 (Sambrook 等,1989) Cold Spring Harbor Press ;Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait 编,1984) ;Methods in

Molecular Biology, Humana Press ;Cell Biology :A Laboratory Notebook(J. E. Cellis 编,1998)Academic Press ;Animal Cell Culture(R. I. Freshney 编,1987) ;Introduction to Cell and Tissue Culture(J. P. Mather 和 P. E. Roberts,1998)Plenum Press ;Cell and Tissue Culture :Laboratory Procedures(A. Doyle、J. B. Griffiths 和 D. G. Newell 编,1993-1998)J. Wiley 和 Sons ;Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.) ; Handbook of Experimental Immunology(D. M. Weir 和 CC. Blackwell 编) ;Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J. M. Mille 和 M. P. Calos 编,1987) ;Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel 等编,1987) ;PCR :The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等编,1994) ;Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan 等编,1991) ;Short Protocols in Molecular Biology(Wiley 和 Sons,1999) ;Immunobiology(CA. Janeway 和 P. Travers,1997) ;Antibodies(P. Finch,1997) ;Antibodies :apractical approach(D. Catty. 编, IRL Press,1988-1989) ;Monoclonal antibodies :apractical approach(P. Shepherd 和 C. Dean 编, Oxford University Press,2000) ;Using antibodies :a laboratory manual(E. Harlow 和 D. Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999) ; The Antibodies(M. Zanetti 和 J. D. Capra 编, Harwood Academic Publishers,1995) ; 和 Cancer :Principles and Practice of Oncology(V. T. DeVita 等编, J. B. Lippincott Company,1993)。

[0035] 结合使用的命名法和本文所述抗体生成、杂交瘤生成、分析化学、合成有机化学和药物和制药化学的实验程序和技术是本领域中众所周知且常用的。标准方法用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0036] 除非另外注明,根据本公开所用的以下术语应被理解为具有以下含义:

[0037] 抗体:如本文所使用的术语“抗体”指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分,即含有免疫结合抗原的抗原结合位点的分子。抗体包括但不限于多克隆、单克隆、嵌合、dAb(结构域抗体)、单链、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ 和 $F_{(ab')_2}$ 片段、单链 Fv 片段(scFv) 和 F_{ab} 表达文库。已知抗体基本结构单元包括四聚体。每个四聚体由 2 对相同的多肽链组成,每一对具有一条“轻”链(约 25kDa) 和一条“重”链(约 50-70kDa)。每条链的氨基端部分包括约 100 至 110 个或更多个主要负责抗原识别的氨基酸的可变区。每条链的羧基端部分限定了主要负责效应子功能的恒定区。通常,从人获得的抗体分子涉及任何类别 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD,分子中存在的重链的性质互不相同。某些类别也具有子类,例如 IgG₁、IgG₂ 和其它。而且,在人体中,轻链可为 κ 链或 λ 链。

[0038] 单克隆抗体:如本文所使用的术语“单克隆抗体”(MAb) 或“单克隆抗体组合物”指含有由唯一轻链基因产物和唯一重链基因产物组成的唯一一个物种的抗体群体。具体而言,在群体的所有分子中单克隆抗体的互补性决定区域(CDR) 相同。Mab 含有能够免疫结合特征在于对其有独特结合亲和力的抗原的特定表位的抗原结合位点。

[0039] 抗原结合位点/结合部分:术语“抗原结合位点”或“结合部分”指抗体分子参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重链(“H”)和轻链(“L”)的 N 端可变(“V”)区的氨基酸残基形成。重链和轻链的 V 区内 3 个称为“高变区”的高度分支延伸插入多个称为“骨架区”或“FR”的保守侧向延伸段之间。因此,术语“FR”指免疫球蛋白的高变区之间天然存在且与之相邻的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的 3 个高变区和重链的 3 个高变区相对于

彼此呈三维空间布置以形成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面互补,并且每条重链和轻链的3个高变区称为“互补性决定区域”或“CDR”。根据 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 及 1991)) 或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196 :901-917 (1987), Chothia 等, Nature 342 :878-883 (1989) 的定义为每个结构域分配氨基酸。CDR 鉴定指南可在 <http://www.bioinf.org.Uk/abs/#cdrid> 得到。

[0040] 表位:如本文所使用的术语“表位”包括抗原能够特异性结合抗体或 T 细胞受体的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基群 (grouping) 组成,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,可增加针对多肽的 N 端或 C 端肽的抗体。据称当解离常数 $\leq 1 \mu\text{M}$, 优选 $\leq 100\text{nM}$ 且最优选 $\leq 10\text{nM}$ 时, 抗体特异性结合抗原。可如本领域中技术人员提供的那样确定 $y^{377-395}$ 表位 CKKTTM KIIPFNRLTIG (SEQ ID NO:18) 的生物活性衍生物。参见例如, Ugarova 等, Identification of a novel recognition sequence for integrin $\alpha_M \beta_2$ within the γ -chain of fibrinogen. J Biol Chem. 1998 ;273 :22519-22527 ;Ugarova 等, Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. Ann N Y Acad Sci. 2001 ;936 :368-385。

[0041] 免疫结合:如本文所使用的术语“免疫结合”和“免疫结合性质”指免疫球蛋白分子和对免疫球蛋白有特异性的抗原之间发生的这种类型的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力根据相互作用的解离常数 (K_d) 表示,其中 K_d 越小表示亲和力越强。可使用本领域中众所周知的方法定量所选多肽的免疫结合性质。一种这样的方法需要测量抗原结合位点 / 抗原复合体形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合体伴侣的浓度、相互作用的亲和力和同样影响两个方向的速率的几何参数。因此,可通过计算浓度和缔合和解离的实际速率确定“结合速率常数” ($K_{\text{结合}}$) 和“解离速率常数” ($K_{\text{解离}}$)。(参见 Nature 361 : 186-87 (1993))。 $K_{\text{解离}}/K_{\text{结合}}$ 之比使得能够消除与亲和力无关的所有参数,并且等于解离常数 K_d (通常参见, Davies 等 (1990) Annual Rev Biochem 59 :439-473)。据称,当通过例如放射性配体结合检测或本领域中技术人员已知的相似检测测定,平衡结合常数 (K_d) $\leq 1 \mu\text{M}$, 优选 $\leq 100\text{nM}$, 更优选 $\leq 10\text{nM}$ 且最优选 $\leq 100\text{pM}$ 至约 1pM 时,本发明的抗体特异性结合纤维蛋白原 $y^{377-395}$ 表位。

[0042] 纤维蛋白和纤维蛋白原:如本文所使用的术语“纤维蛋白”和“纤维蛋白原”可交换地使用并且指保持 Mac-1 结合能力的多肽、片段或类似物。纤维蛋白原是纤维蛋白的可溶性前体并且均保持 yC 结构域并因此保持本发明的表位。

[0043] 分离的多核苷酸:如本文所使用的术语“分离的多核苷酸”应指基因组、cDNA 或其合成起源或一些组合的多核苷酸,由于其起源,“分离的多核苷酸”(1) 与其中“分离的多核苷酸”天然存在的所有或部分多核苷酸无关,(2) 可操作地与在自然界中并未连接的多核苷酸连接,或 (3) 并非作为较大序列的一部分天然存在。

[0044] 分离蛋白质:本文所指的术语“分离蛋白质”指 cDNA、重组 RNA 或其合成起源或一些组合的蛋白质,由于其起源或衍生来源,“分离蛋白质”(1) 与自然界中存在的蛋白质无关,(2) 无来自相同来源的其它蛋白质,(3) 由来自不同物种的细胞表达,或 (4) 在自然界中不存在。

[0045] 多肽:本文使用的术语“多肽”指天然蛋白质、蛋白质片段和多肽序列的片段或类

似物。天然蛋白质片段和类似物被认为是多肽属种类。根据本发明,多肽的实例包括表示为 SEQ ID NO :1 的轻链免疫球蛋白分子和表示为 SEQ ID NO :5 的重链免疫球蛋白分子以及表示为 SEQ ID NO :2、3、4、6、7 和 8 的 CDR,由包含重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子,例如 κ 轻链免疫球蛋白分子的组合(反之亦然)形成的抗体分子及其片段和类似物。

[0046] 天然存在:如本文所使用的应用于一个对象的术语“天然存在”指对象在自然界中存在的事实。例如,可从自然界中的来源分离的生物(包括病毒)中存在并且在实验室未受人有有意修饰的多肽或多核苷酸序列天然存在。

[0047] 可操作地连接:如本文所使用的术语“可操作地连接”指所述组分所处的位置关系允许它们按预期的方式发挥作用。“可操作地连接”至编码序列的控制序列按照在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达的方式连接。

[0048] 控制序列:如本文所使用的术语“控制序列”指实现与之相连的编码序列的表达和加工所必需的多核苷酸序列。这种控制序列的性质存在差异,这取决于宿主生物。在原核生物中,这种控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。在真核生物中,通常这种序列包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”旨在至少包括其存在对于表达和加工所必需的所有组分并且还可包括其存在有利的另外的组分,例如前导序列和融合伴侣序列。

[0049] 多核苷酸:如本文所使用的术语“多核苷酸”指长度为至少 10 个碱基的核苷酸聚合化合物,核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或任一类型的核苷酸的修饰形式。术语包括单链和双链形式的 DNA。

[0050] 寡核苷酸:如本文所使用的术语寡核苷酸包括通过天然存在和非天然存在的寡核苷酸键连在一起的天然存在的和经修饰的核苷酸。寡核苷酸为通常包含长度为 200 个或更少碱基的多核苷酸亚类。优选地,寡核苷酸长度为 10 至 60 个碱基,并且最优选地长度为 12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 至 40 个碱基。虽然寡核苷酸可能为双链,例如用于构建基因突变体中,但是例如对于探针而言,寡核苷酸通常为单链。本发明的寡核苷酸为正义或反义寡核苷酸。

[0051] 天然存在的核苷酸:如本文所使用的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文提到的术语“经修饰的核苷酸”包括具有经修饰或取代的糖基等的核苷酸。本文提到的术语“寡核苷酸键”包括例如硫代磷酸、phosphoroselenoate、phosphoroanilothioate、phosphoraniladate 等寡核苷酸键。参见例如,LaPlanche 等, Nucl. Acids Res. 14 :9081(1986);Stec 等, J. Am. Chem. Soc. 106 :6077(1984), Stein 等, Nucl. Acids Res. 16 :3209(1988), Zon 等, Anti Cancer Drug Design 6 :539(1991);Zon 等, Oligonucleotides and Analogues :A Practical Approach, 第 87-108 页 (F. Eckstein 编, Oxford University Press, Oxford England(1991));Stec 等, 美国专利 No. 5, 151, 510; Uhlmann 和 Peyman Chemical Reviews 90 :543(1990)。若需要,寡核苷酸可包括用于检测的标记。

[0052] 选择性杂交:如本文所使用的术语“选择性杂交”指可检测地和特异性地结合。根据本发明所述的多核苷酸、寡核苷酸及其片段在将与非特异性核酸可检测结合的可观量减到最少的杂交和洗涤条件下与核酸链选择性杂交。高严格性条件可用于实现本领域已知的和本文所讨论的选择性杂交条件。通常,本发明的多核苷酸、寡核苷酸和片段与目标核酸

序列之间的核酸序列同源性为至少 80%，且更为典型的是优选提高的同源性，至少 85%、90%、95%、99% 和 100%。如果 2 个氨基酸序列之间存在部分或完全同一性，则 2 个氨基酸序列同源。例如，85% 同源性指在比对 2 个序列的最大匹配时 85% 的氨基酸相同。在最大匹配中允许（在匹配的 2 个序列的任一个中）空位，空位长度优选为 5 或更小，更优选为 2 或更小。可选且优选地，如本文使用的这个术语，如果使用具有突变数据矩阵的 ALIGN 程序测量 2 个蛋白质序列的比对得分大于 5（标准偏差单位）且空位罚分为 6 或更高，则 2 个蛋白质序列（或源自蛋白质序列的长度为至少 30 个氨基酸的多肽序列）同源。参见 Dayhoff, M. O., Atlas of Protein Sequence and Structure 中第 101-110 页（第 5 卷, National Biomedical Research Foundation(1972)）和本卷的增刊 2, 第 1-10 页。如果使用 ALIGN 程序最优比对时 2 个序列的氨基酸大于或等于 50% 相同, 这 2 个序列或其部分更优选为同源。本文使用术语“相应”指多核苷酸序列与所有或部分参考多核苷酸序列同源（即, 相同, 非严格性进化相关）, 或多肽序列与参考多肽序列相同。相反, 本文使用术语“互补”指互补序列与所有或部分参考多核苷酸序列同源。举例说明, 核苷酸序列“TATAC”相应于参考序列“TATAC”并且与参考序列“GTATA”互补。

[0053] 以下术语用于描述两个或多个多核苷酸或氨基酸序列之间的序列关系：“参考序列”、“比较窗口 (comparison window)”、“序列同一性”、“序列同一性%”和“大体同一性”。

[0054] 参考序列：“参考序列”是用作序列比较的基准的定义序列。参考序列可为较大序列亚类, 例如序列表中指定的全长 cDNA 或基因序列的一段或可能包含完整 cDNA 或基因序列。通常, 参考序列长度为至少 18 个核苷酸或 6 个氨基酸, 经常长度为至少 24 个核苷酸或 8 个氨基酸, 并且常常长度为至少 48 个核苷酸或 16 个氨基酸。由于两个多核苷酸或氨基酸序列可能各自 (1) 包含两个分子之间的相似序列（即, 完整多核苷酸或氨基酸序列的一部分）, 并且 (2) 可能进一步包含两个多核苷酸或氨基酸序列之间的分支序列, 通常通过比较两个分子“比较窗口”上的序列进行两个（或多个）分子之间的序列比较以鉴定和比较序列相似的局部区域。

[0055] 比较窗口：如本文所使用的术语“比较窗口”指至少 18 个邻近核苷酸位置或 6 个氨基酸的概念片段, 其中多核苷酸序列或氨基酸序列可与至少 18 个邻近核苷酸或 6 个氨基酸序列的参考序列比较, 并且其中与参考序列（不包含添加或缺失）相比进行两个序列的最优比对, 比较窗口中这部分的多核苷酸序列可能包含 20% 或更少的添加、缺失、取代等。可通过 Smith 和 Waterman *Adv. Appl. Math.* 2 :482(1981) 的局部同源性算法, 通过 Needleman 和 Wunsch *J. Mol. Biol.* 48 :443(1970) 的同源性比对算法, 通过 Pearson 和 Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 85 :2444(1988) 的相似性搜索法, 通过计算机化执行这些算法 (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks 或 MacVector 软件包), 或通过检查进行比对比较窗口的序列最优比对, 并且选择用各种方法生成的最佳比对（即, 产生比较窗口的同源性时期最高%）。

[0056] 序列同一性：术语“序列同一性”指比较窗口上两个多核苷酸或氨基酸序列相同（即在核苷酸与核苷酸或残基与残基基础上）。术语“序列同一性%”通过以下进行计算：比较比较窗口上两个最优比对序列, 确定两个序列中相同核酸碱基（例如, A、T、C、G、U 或 I）或残基出现的位置的数量以获得匹配位置的数量, 用匹配位置的数量除以比较窗口中位

置的总数量(即,窗口大小),并用结果乘以 100,获得序列同一性%。如本文所使用的术语“大体同一性”表示多核苷酸或氨基酸序列的特征,其中多核苷酸或氨基酸包含与至少 18 个核苷酸(6 个氨基酸)位置的比较窗口上,通常在至少 24-48 个核苷酸(8-16 个氨基酸)位置的窗口上的参考序列相比,具有至少 85%序列同一性,优选至少 90 至 95%序列同一性,更通常具有至少 99%序列同一性的序列,其中通过在比较窗口上比较参考序列和可能包括为参考序列总计 20%或更少的缺失或添加的序列计算序列同一性%。参考序列可为较大序列的亚类。

[0057] 氨基酸:如本文所使用,20 个常规氨基酸及其缩写按照常规使用。参见 Immunology-A Synthesis(第 2 版, E. S. Golub 和 D. R. Gren 编, Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991))。20 个常规氨基酸的立体异构体(例如, D-氨基酸)、非天然氨基酸(例如 α -, α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸)和其它非常规氨基酸也可能为本发明多肽的适合组分。非常规氨基酸的实例包括:4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N, N, N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟赖氨酸、 α -N-甲基精氨酸和其它相似氨基酸和亚氨基酸(例如, 4-羟脯氨酸)。在本文所使用的多肽标记法中,根据标准用法和惯例,左侧方向为氨基端方向而右侧方向为羧基端方向。类似地,除非另外说明,单链多核苷酸序列的左侧端为 5' 端,而双链多核苷酸序列的左侧方向称为 5' 方向。新生 RNA 转录物的 5' 至 3' 添加方向称为 DNA 链上具有与 RNA 相同序列的转录方向序列区域, RNA 转录物的 5' 至 5' 端称为“上游序列”, DNA 链上具有与 RNA 相同序列的序列区域,并且 RNA 转录物的 3' 至 3' 端称为“下游序列”。

[0058] 大体同一性:如应用于多肽,术语“大体同一性”指例如通过 GAP 或 BESTFIT 程序,使用默认空位权重进行最优比对时,两个肽序列共有至少 80%序列同一性,优选至少 90%序列同一性,更优选至少 95%序列同一性和最优选至少 99%序列同一性。优选地,不相同的残基位置由于保守性氨基酸取代不同。保守性氨基酸取代指具有相似侧链的残基的可交换性。例如,一组具有脂肪族侧链的氨基酸为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;一组具有脂肪族羟基侧链的氨基酸为丝氨酸和苏氨酸;一组具有含酰胺的侧链的氨基酸为天冬酰胺和谷氨酰胺;一组具有芳香族侧链的氨基酸为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;一组具有碱性侧链的氨基酸为赖氨酸、精氨酸和组氨酸;以及一组具有含硫侧链的氨基酸为半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守性氨基酸取代基团为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0059] 如本文所讨论,认为抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的变化涵盖于本发明中,条件是氨基酸序列的变化保持至少 75%,更优选至少 80%、90%、95%和最优选 99%。包括其间的某些百分比,例如 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和 99%序列同一性。尤其,包括保守性氨基酸置换。保守性置换是在与侧链相关的氨基酸家族中发生的置换。遗传编码的氨基酸通常分为以下家族:(1) 酸性氨基酸为天冬氨酸、谷氨酸;(2) 碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3) 非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸,和(4) 不带电的极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。亲水性氨基酸包括:精氨酸、天冬酰胺、天

冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸。疏水性氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。其它氨基酸家族包括 (i) 为脂肪族羟基家族的丝氨酸和苏氨酸; (ii) 为含有酰胺的家族的天冬酰胺和谷氨酰胺; (iii) 为脂肪族的丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸; 和 (iv) 为芳香族的苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。例如, 有理由期望用异亮氨酸或缬氨酸单独置换亮氨酸, 用谷氨酸单独置换天冬氨酸, 用丝氨酸单独置换苏氨酸, 或用结构相关的氨基酸对氨基酸进行相似置换对所得分子的结合或性质无较大影响, 特别是如果置换不牵涉骨架位点内的氨基酸时。通过检测多肽衍生物的特异性活性可易于确定氨基酸变化是否产生功能性肽。本文对检测进行了详细描述。本领域的普通技术人员可易于制备抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物。片段或类似物的优选氨基端和羧基端出现在功能结构域边界附近。可通过比较核苷酸和 / 或氨基酸序列数据和公共或私有序列数据库鉴定结构和功能结构域。优选地, 使用计算机化比较法鉴定其它已知结构和 / 或功能的蛋白质中出现的序列基序或预测蛋白质构象结构域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法已知。Bowie 等 *Science* 253 :164 (1991)。因此, 前述实例证明本领域的技术人员可根据本发明识别可能用于限定结构和功能结构域的序列基序和结构构象。

[0060] 优选的氨基酸取代为: (1) 降低蛋白质水解易感性的取代, (2) 降低氧化易感性的取代, (3) 改变形成蛋白质复合体的结合亲和力的取代, (4) 改变结合亲和力的取代, 和 (4) 赋予或修饰这种类似物的其它物理化学或功能性质的取代。类似物可包括除天然存在的肽序列之外的序列的各种突变蛋白质。例如, 可在天然存在序列 (优选地在形成分子间接触的结构域外的多肽部分) 中产生单个或多个氨基酸取代 (优选地保守性氨基酸取代)。保守性氨基酸取代不应大体上改变亲本序列的结构特征 (例如, 置换氨基酸不应趋于打破亲本序列中存在的螺旋, 或破坏表征亲本序列的其它类型的二级结构)。Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton 编, W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden 和 J. Tooze 编, Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); 和 Thornton 等 *Nature* 354 :105 (1991) 中描述了本领域公认的多肽二级和三级结构的实例。

[0061] 多肽片段: 如本文所使用的术语“多肽片段”指具有氨基端和 / 或羧基端缺失, 但是其中剩余氨基酸序列与 (例如) 由全长 cDNA 序列推断的天然存在序列中相应位置相同的多肽。片段通常为至少 5、6、8 或 10 个氨基酸长, 优选至少 14 个氨基酸长, 更优选至少 20 个氨基酸长, 通常为至少 50 个氨基酸长, 甚至更优选至少 70 个氨基酸长。如本文所使用的术语“类似物”指由具有至少 5 个氨基酸, 具有与推断氨基酸序列的一部分的大体同一性的片段组成并且在适合结合条件下对纤维蛋白 $\gamma^{377-395}$ 表位、CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ ID NO : 18) 或其生物活性衍生物具有特异性结合的多肽。通常, 多肽类似物包含关于天然存在序列的保守性氨基酸取代 (或添加或缺失)。通常类似物为至少 5 个氨基酸长, 优选至少 10 个氨基酸长或更长, 并且常常可与天然存在的全长多肽一样长。

[0062] 肽类似物通常作为具有与模板肽类似性质的非肽药物用于制药业中。这些类型的非肽化合物称为“肽模拟物”或“模拟肽”。Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15 :29 (1986), Veber 和 Freidinger *TINS*, 第 392 页 (1985); 和 Evans 等, *J. Med. Chem.* 30 :1229 (1987)。常常借助于计算机化分子建模研发这种化合物。与治疗上有用的肽结构上相似的肽模拟物可用于

产生等效治疗或预防效果。通常,模拟肽与范例性多肽(即,具有生物化学性质或药理学活性的多肽,例如人抗体)结构相似,但是有一个或多个肽键通过本领域众所周知的方法被选自以下的键任选地置换: $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。用相同类型的D-氨基酸对共有序列的一个或多个氨基酸进行系统性取代(例如用D-赖氨酸置换L-赖氨酸)可用于生成更稳定的肽。另外,可通过本领域已知的方法(Rizo和Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61 :387(1992));例如通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫键的内部半胱氨酸残基生成包含共有序列或大体上相同的共有序列变化的限制性肽。

[0063] 试剂:如本文所使用的术语“试剂”表示化合物、化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制备的提取物。

[0064] 标记:如本文所使用的术语“标记”或“标记的”指(例如)通过并入放射性标记的氨基酸或可由标记抗生物素蛋白(例如含有可通过光学或测热法检测的荧光标记或酶促活性的链霉抗生物素蛋白)检测的生物素部分的多肽连接来并入可检测的标记物。在某些情况下,标记或标记物也可用于治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法在本领域中已知并且可使用。多肽标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、荧光标记(例如,FITC、若丹明、稀土元素磷光体)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、p-半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶)、化学发光的生物素组、由二级报告子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链成对序列、二次抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记与各种长度的间隔臂连接以减少可能的位阻。

[0065] 药剂或药物:如本文所使用的术语“药剂”或“药物”指当向患者适当施用时能够诱导预期疗效的化合物或组合物。

[0066] 如 *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms*(Parker, S. 编, McGraw-Hill, San Francisco(1985))例证,根据本领域中的常规用法使用本文的其它化学术语。

[0067] 基本上纯的:如本文所使用的术语“基本上纯的”指目标种类为存在的主要种类(即,按摩尔计,比组合物中任何其它个别种类量更大),并且优选地,基本上纯的成分是其中目标种类包含存在的所有大分子种类的至少约50%(按摩尔计)的组合物。通常,基本上纯的组合物包含组合物中存在的所有大分子种类的约80%以上,更优选地约85%、90%、95%和99%以上。最优选地,将目标种类纯化至基本均一(通过常规检测方法在组合物中不可检测出污染种类),其中组合物基本上由单个大分子种类组成。

[0068] 患者:如本文所使用的术语患者包括人和兽医受试者。

[0069] 单克隆抗体

[0070] 本发明提供了抑制纤维蛋白原 γ -Mac-1结合的单克隆抗体。尤其,本发明提供了特异性结合纤维蛋白和纤维蛋白原 γ C结构域的 $y^{377-395}$ 表位的单克隆抗体。本发明还提供了结合纤维蛋白和纤维蛋白原 γ C结构域的 $y^{190-202}$ 表位的抗体。这种抗体阻断了神经系统中纤维蛋白的损害作用,而不影响其在血液凝固中的有益作用。这种单克隆抗体可阻断MS斑和某些癌症的形成。本发明的示例性抗体包括(例如)5B8抗体(靶向 $y^{377-395}$ 表位)。另外,本发明的抗体包括(例如)1E3抗体(靶向 $y^{190-202}$ 表位)。本文提供了与5B8抗体相关的各种

多核苷酸和多肽序列和这些序列的用途。这些序列包括 5B8 轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO : 1)、3 个轻链 CDR 氨基酸序列 (CDR-L1, SEQ ID NO : 2 ; CDR-L2, SEQ ID NO : 3 ; 和 CDR-L3, SEQ ID NO : 4)、重链氨基酸序列 (SEQ ID NO : 5)、3 个重链 CDR 氨基酸序列 (CDR-H1, SEQ ID NO : 6 ; CDR-H2, SEQ ID NO : 7 ; 和 CDR-H3, SEQ ID NO : 8)、轻链核苷酸序列 (SEQ ID NO : 9)、重链核苷酸序列 (SEQ ID NO : 10)、3 个轻链 CDR 的核苷酸序列 (CDR-L1, SEQ ID NO : 11 ; CDR-L2, SEQ ID NO : 12 ; 和 CDR-L3, SEQ ID NO : 13) 和 3 个重链 CDR 的核苷酸序列 (CDR-H1, SEQ ID NO : 14 ; CDR-H2, SEQ ID NO : 15 ; 和 CDR-H3, SEQ ID NO : 16)。

[0071] 本发明的单克隆抗体具有抑制体外和体内吞噬作用, 阻断体内和体外细胞因子释放和巨噬细胞激活、体内和体外小胶质细胞激活、体内和体外炎症性脱髓鞘和实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE), 多发性硬化动物模型的临床症状的能力。参见例如, 通过引用整体并入本文的 PCT 公布 WO 2007/038407。本领域的技术人员还将认识到本发明的单克隆抗体也可影响癌症。参见例如, 通过引用整体并入本文的 PCT 公布 WO 2007/024817。另外, 这种单克隆抗体可用于治疗牵涉从受损组织的纤维蛋白原渗漏的疾病, 包括类风湿关节炎、脊髓损伤、阿尔茨海默氏病和中风。参见例如, Flick 等, *J. Clin. Investigation*, 2007, 117, 11 : 3224-3235 ; Akassoglou 等, 2002, *Neuron*, 33 : 861-875 ; Akassoglou 等, 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 : 6698-6703 ; Adams 等, 2007, *J. Exp. Med.*, 35 : 2428-34。应注意, 本发明的单克隆抗体降低了受试者脑部和其它地方纤维蛋白原的促炎性影响, 同时保持纤维蛋白原在凝血中的有益作用, 与影响凝血的化合物不同。

[0072] 本发明还包括结合与本文所述抗体相同的表位的抗体。本领域的技术人员将认识到无需过度实验, 通过确定单克隆抗体是否阻止本发明的单克隆抗体与纤维蛋白 γ C 结构域的 $\gamma^{377-395}$ 表位或 $\gamma^{190-202}$ 表位结合就可能确定前者是否具有与后者相同的特异性。如果试验的单克隆抗体与本发明的单克隆抗体竞争, 表现为本发明的单克隆抗体结合减少, 则很可能两种单克隆抗体与相同或密切相关的表位结合。可通过测量通过全长纤维蛋白原多肽上 Mac-1 受体阻断小胶质细胞粘附的能力进行本发明单克隆抗体的筛选。本文提供了这样筛选的实例。

[0073] 本领域中已知的各种方法均可用于生产针对纤维蛋白原 -Mac-1 结合或针对其衍生物、片段、类似物、同源物或直系同源物的多克隆或单克隆抗体。(参见例如, *Antibodies : A Laboratory Manual*, 如上)。

[0074] 通过众所周知的技术, 例如使用主要提供免疫血清的 IgG 成分的蛋白质 A 或蛋白质 G 进行亲和色谱法纯化抗体。随后或可选地, 可通过免疫亲和色谱法将免疫球蛋白寻求的靶标的特异性抗原或其表位固定在柱上以纯化免疫特异性抗体。

[0075] 本发明的抗体 (例如, 5B8 和 1E3) 为单克隆抗体。例如, 用从经肽抗原免疫的动物获得的克隆生成抑制纤维蛋白原 /Mac-1 结合的单克隆抗体。通过使来自免疫动物的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合生成细胞系。在体外从生成小鼠腹水的培养基纯化抗体。以下实施例部分中还提供了生成抗体的方法。

[0076] 例如, 使用杂交瘤方法, 例如 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256 : 495 (1975) 所述的方法制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中, 通常用免疫试剂使小鼠、仓鼠或其它适当的宿主动物以引出生成或能够生成将特异性结合免疫试剂的抗体的淋巴细胞。可选地, 可在体外免疫淋巴细胞。

[0077] 免疫试剂通常包括蛋白质抗原、其片段或其融合蛋白。通常,如果需要人源细胞,使用外周血淋巴细胞,或者如果需要非人哺乳动物来源,使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用适合的融合剂,例如聚乙二醇使淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) 第 59-103 页)。永生化细胞系通常为转化的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛和人源骨髓瘤细胞。通常,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。可在优选含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或存活的物质的适合培养基中培养杂交瘤细胞。例如,如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(“HAT 培养基”),这些物质阻碍 HGPRT 缺乏细胞的生长。

[0078] 优选的永生化细胞系是有效融合,支持所选抗体生成细胞稳定的高水平抗体表达的细胞系,并且对培养基(例如 HAT 培养基)敏感。更优选的永生化细胞系是(例如)可从美国加利福尼亚州圣地亚哥沙克研究所细胞配送中心和马纳萨斯美国模式培养物保藏所获得的鼠骨髓瘤系。还描述了将人骨髓瘤和小鼠-人异质骨髓瘤细胞系用于生成单克隆抗体。(参见 Kozbor, *J. Immunol.*, 133 :3001 (1984) ; Brodeur 等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第 51-63 页)。

[0079] 然后可检测培养杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的存在。优选地,通过免疫沉淀反应或通过体外结合检测,例如放射性免疫检测(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)确定杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。这种技术和检测在本领域中已知。例如,可通过 Munson 和 Pollard, *Anal. Biochem.*, 107 :220 (1980) ; Patrono, C. 和 Peskar, B. A. (编) *Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1987 ; Dwenger, A. *Radioimmunoassay: An Overview*. *J Clin Biochem* 22 :883, 1984 的 Scatchard 分析确定单克隆抗体的结合亲和力。而且,在单克隆抗体的治疗应用中,重要的是鉴定对靶抗原具有高度特异性和高结合亲和力的抗体。

[0080] 鉴定所需杂交瘤细胞后,可通过限制稀释法亚克隆克隆并通过标准方法使其生长。(参见 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) 第 59-103 页)。为此目的适合的培养基包括(例如)达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基和 RPMI-1640 培养基。可选地,可使杂交瘤细胞在体外,如哺乳动物腹水中生长。

[0081] 可通过常规免疫球蛋白纯化方法,例如蛋白质 A-琼脂糖、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法从培养基或腹水中分离或纯化亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0082] 也可通过例如美国专利 No. 4, 816, 567 中所述的重组 DNA 法制备单克隆抗体。使用常规方法(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)易于分离并测序编码本发明单克隆抗体的 DNA。例如,SEQ ID NO :9 和 10 提供了本发明 5B8 单克隆抗体的核苷酸序列。本发明的杂交瘤细胞用作这种 DNA 的优选来源。一旦分离,就将 DNA 置于表达载体中,然后转染到不会以其它方式生成免疫球蛋白的宿主细胞中,例如猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以获得在重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。例如,也可通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列(参见美国专利 No. 4, 816, 567 ; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994))或通过共价结合非免疫球蛋白多肽的免疫球蛋白编码序列或编码序列的一部分修饰 DNA。可用这种非免疫球蛋白

多肽取代本发明抗体的恒定结构域,或取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体。

[0083] 全人抗体为其中由人基因产生的轻链和重链的整个序列(包括 CDR)的抗体。这种抗体本文称为“人抗体”或“全人抗体”。单克隆抗体可使用以下技术制备:三源杂交瘤技术;人 B 细胞杂交瘤技术(参见 Kozbor 等,1983 *Immunol Today* 4:72);和 EBV 杂交瘤技术以生成单克隆抗体(参见 Cole 等,1985 *In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页)。可利用单克隆抗体并且可通过使用人杂交瘤(参见 Cote 等,1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2026-2030)或通过用体外易普斯坦-巴尔病毒转化人 B 细胞(参见 Cole 等,1985 *In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页)生成单克隆抗体。

[0084] 另外,还可使用另外的技术,包括噬菌体展示文库生成成人抗体(参见 Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991))。类似地,可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如内源免疫球蛋白基因已被部分或完全失活的小鼠)体内制备人抗体。一经激发,就会观察到人抗体生成,在各个方面与在人体中看到的非常类似,包括基因重排、装配和抗体谱。例如,在美国专利 No. 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 569, 825、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 661, 016 和 Marks 等, *Bio/Technology* 10, 779-783(1992); Lonberg 等, *Nature* 368 856-859(1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13(1994); Fishwild 等, *Nature Biotechnology* 14, 845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826(1996); 和 Lonberg 和 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93(1995) 中描述了这种方法。

[0085] 另外,可使用经修饰以生成全人抗体而不生成对抗原激发反应的动物内源抗体的转基因非人动物生成另外的人抗体。在这种动物中,已经使非人宿主中编码重和轻免疫球蛋白链的内源基因失能,并且将编码人重链和轻链免疫球蛋白的活性基因座插入宿主基因组中。例如,SEQ ID NO:11-16 提供了编码单克隆抗体 5B8 的 3 个轻链和 3 个重链 CDR 的核苷酸序列。例如,使用含有必需人 DNA 片段的酵母人工染色体并入人基因。然后通过杂交繁殖含有少于全部修饰的中间转基因动物获得提供了所有所需修饰的动物作为后代。这种非人动物的实例为 Amgen (Thousand Oaks, CA) 提供的称为 Xenomouse® 的小鼠。这种动物生成分泌全人免疫球蛋白的 B 细胞。用目标免疫原例如多克隆抗体制剂免疫后,可直接从动物获得抗体,或可选地从源自动物的永生 B 细胞,例如生成单克隆抗体的杂交瘤获得抗体。另外,可回收并表达编码具有人可变区的免疫球蛋白的基因以直接获得抗体,或可进一步修饰基因以获得抗体的类似物,例如单链 Fv(scFv) 分子。

[0086] 以缺乏内源免疫球蛋白重链表达的小鼠为例,美国专利 No. 5, 939, 598 中公开了生成非人宿主的方法的实例。可通过包括以下步骤的方法获得:从胚胎干细胞中至少一个内源重链基因座删除 J 片段基因以防止基因座重排并防止重排免疫球蛋白重链基因座的转录物形成,通过含有编码可选标记物的基因的靶向载体实现删除;和由胚胎干细胞生成体细胞和生殖细胞含有编码可选标记物的基因的转基因小鼠。

[0087] 美国专利 No. 5, 916, 771 中公开了一种生成目标抗体(例如人抗体)的方法。这种方法包括将含有编码重链的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:10)的表达载体引入一种培养的哺乳动物宿主细胞中,将含有编码轻链的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:9)的表达载

体引入另一种哺乳动物宿主细胞中,和使两种细胞融合以形成杂交细胞。杂交细胞表达含有重链和轻链的抗体。

[0088] 可用含有编码上述单链抗体的 DNA 片段的载体表达抗体。

[0089] 这些包括载体、脂质体、裸露 DNA、佐剂辅助 DNA、基因枪和导管。优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学轭合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼氏鼠白血病毒。优选 DNA 病毒载体。这些载体包括痘载体(例如正痘病毒或禽痘病毒载体)、疱疹病毒载体(例如单纯疱疹 I 型病毒(HSV)载体)(参见 Geller, A. I. 等, *J. Neurochem*, 64 :487(1995); Lim, F. 等, in *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover 编, (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. 等, *Proc Natl. Acad. Sci. :U. S. A.* 90 :7603(1993); Geller, A. I. 等, *Proc Natl. Acad. Sci USA* 87 :1149(1990)、腺病毒载体(参见 LeGal LaSalle 等, *Science*, 259 :988(1993); Davidson 等, *Nat. Genet* 3 :219(1993); Yang 等, *J. Virol.* 69 :2004(1995) 和腺伴随病毒载体(参见 Kaplitt, M. G. 等, *Nat. Genet.* 8 :148(1994))。

[0090] 痘病毒载体将基因引入细胞质。禽痘病毒载体仅引起核酸的短期表达。优选腺病毒载体、腺伴随病毒载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体用于将核酸引入神经细胞。腺病毒载体引起比腺伴随病毒(约 4 个月)更短期的表达(约 2 个月),而所述腺伴随病毒比 HSV 载体更短。选择的特定载体依赖于靶细胞和待治疗的病状。可通过标准技术,例如感染、转染、转导或转化进行引入。转基因模式的实例包括(例如)裸露 DNA、CaPO₄ 沉淀、DEAE 葡聚糖、电穿孔、原生质体融合、脂质转染、细胞微注射和病毒载体。

[0091] 可采用载体基本上靶向任何所需靶细胞。例如,立体定位注射可用于将载体(例如,腺病毒、HSV)导向所需位置。另外,可通过使用微型输注系统,例如 SynchroMed 输注系统(Medtronic, Minneapolis, MN)进行脑室内(icv)输注递送颗粒。可使用的其它方法包括导管、静脉内、肠胃外、腹膜内和皮下注射和口服或其它已知施用途径。

[0092] 可使用这些载体表达大量可按各种方法使用的抗体。例如,可使用抗体检测纤维蛋白原和纤维蛋白原/Mac-1 结合的存在。

[0093] 可使技术适于生成对本发明的抗原蛋白质有特异性的单链抗体(参见例如,美国专利 No. 4, 946, 778)。另外,可使方法适于构建 F_{ab} 表达文库(参见例如, Huse 等, 1989 *Science* 246 :1275-1281) 以使快速并有效鉴定对蛋白质或其衍生物、片段、类似物或其同源物具有所需特异性的单克隆 Fab 片段。可通过本领域中已知的技术生成含有蛋白质抗原的个体基因型的抗体片段,包括但不限于:(i) 由胃蛋白酶消化抗体分子生成的 F_{(ab')₂} 片段;(ii) 通过还原 F_{(ab')₂} 片段的二硫键生成的 F_{ab} 片段;(iii) 通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子生成的 F_{ab} 片段和 (iv) F_v 片段。本发明还包括 F_v、F_{ab}、F_{ab'} 和 F_{(ab')₂} 抗纤维蛋白 y¹⁹⁰⁻²⁰² 和 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 片段、单链抗 y¹⁹⁰⁻²⁰² 和 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 纤维蛋白抗体、双特异性抗 y¹⁹⁰⁻²⁰² 和 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 纤维蛋白抗体和异质轭合物抗 y¹⁹⁰⁻²⁰² 和 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 纤维蛋白抗体。

[0094] 双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的抗体。在目前这种情况下,结合特异性之一是对 y¹⁹⁰⁻²⁰² 和 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 纤维蛋白表位的特异性。第二结合靶标为任何其它抗原,并且有利的是细胞表面蛋白或受体或受体亚单位。

[0095] 制备双特异性抗体的方法在本领域中已知。传统上,双特异性抗体的重组生成是基于两对免疫球蛋白重链/轻链的共同表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein 和 Cuello, *Nature*, 305 :537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂

交瘤（四源杂交瘤）生成 10 种不同抗体分子的可能混合物，其中仅一种具有恰当的双特异性结构。恰当分子的纯化通常通过亲和色谱步骤实现。

[0096] 具有所需结合特异性（抗体-抗原组合位点）的抗体可变结构域可与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。优选与免疫球蛋白重链恒定结构域融合，包括至少一部分的铰链、CH2 和 CH3 区。优选具有含有至少一种融合物中存在的轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区（CH1）。可将编码免疫球蛋白重链融合物的 DNA 和（若需要）免疫球蛋白轻链插入单独的表达载体中，并且共转染至适合宿主生物中。生成双特异性抗体的更多详情，参见例如 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121 :210 (1986)。

[0097] 可将双特异性抗体制成长抗体或抗体片段（例如， $F_{(ab')_2}$ 双特异性抗体）。文献中已经描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，可使用化学键制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science* 229 :81 (1985) 描述了经蛋白水解将完整抗体裂解以生成 $F_{(ab')_2}$ 片段的方法。在二巯基络合剂砷化钠的存在下还原这些片段以稳定邻位二巯基并防止分子间二硫化物形成。然后将生成的 $F_{ab'}$ 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯（TNB）衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将一种 $F_{ab'}$ -TNB 衍生物再转化为 Fab' -巯基并且与等摩尔量的另一种 $F_{ab'}$ -TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。生成的双特异性抗体可用作酶选择性固定的试剂。

[0098] 另外，可直接从大肠杆菌 (*E. coli*) 回收 $F_{ab'}$ 片段并且化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby 等, *J. Exp. Med.* 175 :217-225 (1992) 描述了全人源化双特异性抗体 $F_{(ab')_2}$ 分子的生成。

[0099] 还描述了直接由重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如，已使用亮氨酸拉链生成了双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.* 148 (5) : 1547-1553 (1992)。这种方法还可用于生成抗体同型二聚体。Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :6444-6448 (1993) 描述的“双链抗体”技术已提供了制备双特异性抗体片段的替代性机制。片段包含通过太短而不允许相同链上的两个结构域之间配对的连接子与轻链可变结构域 (V_L) 连接的重链可变结构域 (V_H)。因此，迫使一个片段的 V_H 和 V_L 结构域与另一片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对，从而形成两个抗原结合位点。已报道了使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一策略。参见, Gruber 等, *J. Immunol.* 152 : 5368 (1994)。

[0100] 包括具有两种以上化合价的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt 等, *J. Immunol.* 147 :60 (1991)。

[0101] 本发明还涉及包含与细胞毒素试剂（例如毒素（例如，靶向癌细胞的化学治疗剂，细菌、真菌、植物或动物源酶活性毒素或其片段）或放射性同位素（即，放射性轭合物）轭合的抗体的免疫轭合物。化学治疗剂的实例包括烷化剂、亚硝基脲、抗代谢物、萘环类抗生素和相关药物、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇激素和其它化疗药物。

[0102] 可用的酶活性毒素及其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链（来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)）、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、垂序商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树素、分裂素、限制素、酚霉素、依诺霉素和端孢霉烯族毒素。各种放射性核素可用于生产放射性轭合抗体。实例包括 ^{212}Bi 、

^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0103] 使用各种双功能蛋白质偶联剂制备抗体和细胞毒素试剂的轭合物,所述双功能蛋白质偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯 (SPDP)、亚氨基硫醇 (IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物 (例如己二亚氨基二酯)、活性酯 (例如二琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛 (例如戊二醛)、二叠氮化合物 (例如二(p-叠氮苯甲酰基酰肼)己二胺)、二重氮衍生物 (例如二(p-重氮苯甲酰基酰肼)乙二胺)、二异氰酸酯 (例如甲苯 2,6-二异氰酸酯) 和双活性氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如 Vitetta 等, *Science* 238 :1098(1987) 所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰苄基-3-甲基二乙烯基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 为用于轭合放射性核苷酸与抗体的示例性整合剂。

[0104] 本领域的普通技术人员将认识到很多种类的可能部分可与本发明的所得抗体偶联。(参见例如,通过引用整体并入本文的 "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J. M. Cruse 和 R. E. Lewis, Jr (编), Carger Press, New York, (1989))。

[0105] 可通过使两个分子结合的任何化学反应实现偶联,只要抗体和其它部分保持它们各自的活性。这种连接包括多种化学机制,例如共价结合、亲和性结合、嵌插、配位结合和络合作用。然而,优选的结合为共价结合。可通过现有侧链的直接缩合或通过并入外部桥接分子实现共价结合。许多二价或多价连接剂均可用于使蛋白质分子 (例如本发明的抗体) 与其它分子偶联。例如,代表性的偶联剂包括有机化合物,例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和己二胺。该列表并非旨在详尽列出本领域中已知的各种类别的偶联剂,而是示例更多常见偶联剂。(参见 Killen 和 Lindstrom, *Jour. Immun.* 133 : 1335-2549(1984); Jansen 等, *Immunological Reviews* 62 :185-216(1982); 和 Vitetta 等, *Science* 238 :1098(1987))。

[0106] 文献中描述了连接子。(参见例如, Ramakrishnan, S. 等, *Cancer Res.* 44 : 201-208(1984), 描述了 MBS (M-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯) 的用途。同样参见, 美国专利 No. 5, 030, 719, 描述了经由寡肽连接子与抗体偶联的卤化乙酰肼的用途。示例性连接子包括: (i) EDC (1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基) 碳二亚胺盐酸化物); (ii) SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧化羧基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二巯基)-甲苯 (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G)); (iii) SPDP (琥珀酰亚胺基-6[3-(2-吡啶基二巯基) 丙酰胺基] 己酸酯 (Pierce Chem. Co., Cat#21651G)); (iv) 硫代-LC-SPDP (硫代琥珀酰亚胺基 6[3-(2-吡啶基二巯基)-丙酰胺] 己酸酯 (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); 和 (v) 与 EDC 轭合的硫代-NHS (N-羟基硫代-琥珀酰亚胺; Pierce Chem. Co., Cat. #24510)。

[0107] 上述连接子含有具有不同属性的组分,从而产生具有不同物理化学性质的轭合物。例如,烷基羧酸盐的硫代-NHS 酯比芳香族羧酸盐的硫代-NHS 酯更稳定。含有连接子的 NHS 酯比硫代-NHS 酯溶解性差。进一步地,连接子 SMPT 含有位阻二硫键并且可形成稳定性更高的轭合物。因为二硫键在体外裂解,产生更少的可用轭合物,所以通常二硫键比其它键稳定性差。尤其,硫代-NHS 可增强碳二亚胺偶联物的稳定性。当用于与硫代-NHS 轭合时,碳二亚胺偶联物 (例如 EDC) 形成比单独的碳二亚胺偶联物更具水解抗性的酯类。

[0108] 也可将本文公开的抗体制成免疫脂质体。通过本领域中已知的方法,例如 Epstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 :3688(1985); Hwang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 :

4030(1980) ;和美国专利 No. 4, 485, 045 和 4, 544, 545 中所述的方法制备含有抗体的脂质体。美国专利 No. 5, 013, 556 中公开了循环时间增加的脂质体。

[0109] 可通过逆相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 源性磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物生成特别有用的脂质体。通过限定孔径的过滤器挤出脂质体以获得具有所需直径的脂质体。可如 Martin 等, *J. Biol. Chem.*, 257 :286-288 (1982) 所述, 通过二硫化物交换反应使本发明抗体的 F_{ab} 片段与脂质体轭合。

[0110] 针对纤维蛋白表位 $y^{190-202}$ 和 $y^{377-395}$ 抗体的用途

[0111] 包括本发明单克隆抗体的本发明治疗制剂用于治疗或减轻与纤维蛋白相关病症 (例如, 多发性硬化、伤口愈合、肺部缺血、脊髓损伤、阿尔茨海默氏病、中风、类风湿关节炎和癌症) 有关的症状, 优选不影响血凝固。本发明还提供了治疗或减轻与纤维蛋白相关病症 (例如, 多发性硬化、伤口愈合、肺部缺血、脊髓损伤、阿尔茨海默氏病、中风、类风湿关节炎和癌症) 有关的症状, 优选不影响血凝固的方法。通过使用标准方法鉴定患有 (或有发展风险) 与纤维蛋白相关病症 (例如, 多发性硬化、伤口愈合、肺部缺血、脊髓损伤、阿尔茨海默氏病、中风、类风湿关节炎和癌症) 的受试者 (例如, 人) 实现治疗方案。与这些纤维蛋白相关病症有关的症状包括 (例如) 炎症、疼痛和感官知觉丧失。联合诊断或治疗特定纤维蛋白相关病症的任何已知方法确定治疗的功效。纤维蛋白相关病症的一种或多种症状减轻表明抗体赋予了临床受益。向受试者施用抗体制剂, 优选对靶抗原具有高特异性和高亲和力的抗体制剂, 并且由于其与靶标结合通常有效。施用抗体可消除或抑制或干扰靶标 (例如, $y^{190-202}$ 和 $y^{377-395}$ 纤维蛋白表位) 的信号功能。施用抗体可消除或抑制或干扰靶标 (例如, 纤维蛋白) 与靶标自然结合的内源配体 (例如, Mac-1) 的结合。例如, 抗体结合靶标并抑制纤维蛋白 /Mac-1 结合。

[0112] 应了解, 根据本发明施用治疗实体将与适合载体、赋形剂和并入制剂的其它试剂一起施用以提供经改善的转移、递送、耐受性等。在 Blaug, Seymour 的处方集 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (第 19 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995)), 尤其是其中的第 87 章中可找到大量适当制剂。这些制剂包括 (例如) 粉剂、膏剂、药膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含有囊泡的脂质 (日离子或阴离子) (例如 Lipofectin™)、DNA 轭合物、无水吸收膏剂、水包油和油包水乳剂、乳剂碳蜡 (各种分子质量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有碳醋的半固体混合物。任何前述混合物可适于根据本发明的治疗和疗法, 条件是制剂中的活性成分不被制剂失活并且制剂在生理上相容并可耐受施途径。同样参见 Baldrick P. " *Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.* " *Regul. Toxicol Pharmacol.* 32(2) :210-8(2000), Wang W. " *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.* " *Int. J. Pharm.* 203(1-2) : 1-60(2000), Charman W N" *Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery—some emerging concepts.* " *J Pharm Sci.* 89(8) :967-78(2000), Powell 等 " *Compendium of excipients for parenteral formulations* " *PDA J Pharm Sci Technol.* 52 : 238-311(1998) 和其中药物化学家众所周知的有关制剂、赋形剂和载体的另外的信息的引用。

[0113] 本发明的抗体 (本文也称为“活性化合物”) 及其衍生物、片段、类似物及其同源物可并入可包含药学上可接受的载体的药物组合物中。如本文所使用的术语“药学上可接受

的载体”旨在包括任何及所有与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟试剂等。通过引用并入本文的本领域标准参考文本的最新版 Remington's Pharmaceutical Sciences 中描述了适合的载体。这种载体或稀释剂的优选实例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和 5% 人血清白蛋白。也可使用脂质体和非水媒介物,例如不挥发性油。本领域中众所周知这种介质和试剂用于药物活性物质的用途。包括任何常规介质或试剂与活性在组合物中的用途,除非其与活性化合物不相容,。补充活性化合物也可并入组合物中。

[0114] 将本发明的药物组合物配制为与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口腔(例如,吸入)、经皮(即,局部)、跨粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲液,例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂,例如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱,例如盐酸或氢氧化钠调节 pH。可将肠胃外制剂装入用玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量瓶内。

[0115] 适于注射用的药物组合物包括无菌水溶液(水溶性)或分散剂和用于临时制备无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉剂。对于静脉内施用,适合的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物可为无菌并且应为易于注射程度的流动性。它可在生产和储存条件下稳定并且必须保存免受微生物,例如细菌和真菌的污染作用。载体可为含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质及其混合物。例如,可通过使用包衣(例如卵磷脂),通过在分散情况下保持所需粒径和通过使用表面活性剂保持适当的流动性。可通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如尼泊金、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等实现微生物作用的预防。在许多情况下,在组合物中可优选包括等渗剂,例如糖、多元醇(例如甘露醇、山梨糖醇)、氯化钠。可通过将延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铅和明胶)包括在组合物内引起可注射组合物的延长吸收。

[0116] 可通过将适当溶剂中所需量的活性化合物与以上所列成分的组合合并,根据需要,然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,可通过将活性化合物并入含有碱性分散介质和来自以上所列成分的其他所需成分的无菌媒介物中制备分散剂。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉剂情况下,制备方法为真空干燥和冷冻干燥,由先前无菌过滤的溶液获得活性成分和任何另外的所需成分的粉剂。

[0117] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。可将它们装入明胶胶囊内或压缩成片剂。为了口服治疗施用的目的,可将活性化合物与赋形剂合并并且以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。也可使用用作漱口水的液体载体制备口服组合物,其中液体载体中的化合物经口服应用并且漱口、咳出或吞咽。可作为组合物的一部分将药学上相容的结合剂和/或佐剂材料包括在内。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可含有以下任何成分或相似性质的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄耆胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如褐藻酸、Primogel 或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂,例如胶质二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或芳香剂,例如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橘子调味品。

[0118] 对于经吸入施用,以来自含有适合推进物(例如二氧化碳等气体)压力容器或分配器或喷雾器的气溶胶喷雾形式递送化合物。

[0119] 也可通过跨粘膜或经皮方式进行全身性施用。对于跨粘膜或经皮施用,将适于待渗透屏障的渗透剂用于制剂中。这种渗透剂通常在本领域中已知,并且对于跨粘膜施用而言包括(例如)去垢剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。跨粘膜施用可通过使用鼻用喷雾或栓剂实现。对于经皮施用,可将活性化合物配制成如本领域中通常已知的药膏、软膏、凝胶或乳膏。

[0120] 也可将化合物制成栓剂(例如,具有常规栓剂基质(例如可可油)和其它甘油酯)或保持灌肠剂形式用于直肠递送。

[0121] 在一个实施方案中,用防止化合物从体内迅速消除的载体,例如控释制剂,包括植入物和微囊递送系统制备活性化合物。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,例如乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。对于本领域的技术人员,制备这种制剂的方法显而易见。也可从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 购买获得材料。脂质悬浮液(包括靶向具有单克隆抗体或病毒抗原的感染细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法制备,例如美国专利 No. 4,522,811 中所述的方法。

[0122] 尤其有利的是按易于施用和剂量均匀性的剂量单位形式配制口服和肠胃外组合物。如本文所使用的剂量单位形式指作为待治疗的受试者的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有经计算产生预期疗效的预定量的活性化合物和所需药物载体。规定了本发明剂量单位形式的说明并且直接取决于活性化合物的独特特征和要达到的特定疗效,和化合领域中固有的限制,例如用于治疗个体的活性化合物。

[0123] 药物组合物可与施用说明一起包括在容器、包装或分配器中。

[0124] 使用抗体片段时,优选特异性结合靶蛋白结合结构域的最小抑制性片段。例如,基于抗体的可变区序列,可将肽分子设计为保持结合靶蛋白序列的能力。可经化学合成和/或通过重组 DNA 技术生成这种肽。(参见例如,Marasco 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893(1993))。制剂也可含有一种以上待治疗的特定指征所必须的活性化合物,优选不会相互产生不利影响的具有互补活性的活性化合物。可选地或另外地,组合物可包含增强其功能的试剂,例如细胞毒素试剂、细胞因子、化学治疗剂或生长抑制剂。这些分子适合以对预期目的有效的量以组合方式存在。

[0125] 也可将活性成分分别诱捕于胶质递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微型乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或微型乳剂中(例如)通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如羟甲基纤维素或凝胶微胶囊和聚(异丁烯酸甲酯)微胶囊。

[0126] 用于体内施用的制剂可为无菌。这易于通过无菌滤膜过滤实现。

[0127] 可制备缓释制剂。缓释制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形物品形式,例如薄膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙醇醇))、聚交酯(美国专利 No. 3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基 L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(例如 LUP ON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球))和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使

得能够释放分子 100 天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间段更短。

[0128] 本发明抗体的治疗有效量通常涉及达到治疗目标所需的量。如上所述,这可能是抗体及其在某些情况下干扰靶标作用的靶抗原之间的结合相互作用。而且,需要施用的量还取决于施用的抗体从施用的受试者自由体积损耗的速率。就非限制性实例而言,本发明抗体或抗体片段的治疗有效剂量的常见范围为约 0.1mg/kg 体重至约 50mg/kg 体重。例如,常见剂量频率范围为每日两次至每周一次。

[0129] 抗体筛选方法

[0130] 筛选具有所需特异性的抗体的方法包括但不限于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和本文领域中已知的其它免疫介导技术。

[0131] 在本领域中已知关于纤维蛋白定位和 / 或定量的方法中可使用针对 $y^{190-202}$ 和 $y^{377-395}$ 纤维蛋白表位的抗体。在指定实施方案中,对含有抗体源抗原结合结构域的 $y^{190-202}$ 和 $y^{377-395}$ 纤维蛋白表位或其衍生物、片段、类似物或同源物有特异性的抗体用作药理学活性化合物 (此后称为“治疗剂”)。

[0132] 也可使用对 $y^{190-202}$ 和 $y^{377-395}$ 纤维蛋白表位有特异性的抗体,通过标准技术,例如免疫亲和色谱法或免疫沉淀分离纤维蛋白多肽。可通过偶联 (即,物理连接) 抗体与可检测物质促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。适合酶类的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白 / 生物素和抗生物素蛋白 / 生物素;适合荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白,并且适合放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0133] 根据本发明的抗体可用作用于检测样本中 $y^{190-202}$ 和 / 或 $y^{377-395}$ 纤维蛋白表位的存在的试剂。在一些实施方案中,抗体含有可检测标记。抗体为多克隆,或更优选为单克隆。使用完整抗体或其片段 (例如, F_{ab} 、scFv 或 $F_{(ab)_2}$)。关于探针或抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过偶联 (即,物理连接) 可检测物质与探针或抗体对探针或抗体进行的直接标记,以及通过与另一种被直接标记的试剂反应对探针或抗体进行的间接标记。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体检测一级抗体和用生物素对 DNA 探针进行末端标记使得可用荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。术语“生物样本”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物液体以及受试者体内存在的组织、细胞和液体。因此,在术语“生物样本”的使用中包括血液和血液成分或组分,包括血清、血浆或淋巴。即,本发明的检测方法可用于检测体外以及体内生物样本中的分析物 mRNA、蛋白质或基因组 DNA。例如,体外检测分析物 mRNA 的技术包括 Northern 杂交和原位杂交。体外检测分析物蛋白质的技术包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。体外检测分析物基因组 DNA 的技术包括 Southern 杂交。例如,在“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology”,第 42 卷,J.R.Crowther(编)Human Press,Totowa,N.J.,1995;“Immunoassay”,E.Diamandis 和 T.Christopoulus,Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.,1996;和“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985 中描述了进行免疫检测的方法。而且,体内检测分析物蛋白质的技术包括将标记的抗分析物蛋白质抗体引入受试者体内。例如,可

用放射性标记物标记抗体,可通过标准成像技术检测所述放射性标记物在受试者体内的存在和位置。

[0134] 抑制剂筛选方法

[0135] 本发明提供了鉴定调节剂的方法(本文也称为“筛选检测”),即调节或以其它方式干扰纤维蛋白和 Mac-1 的候选或试验化合物或试剂(例如,肽、肽模拟物、小分子或其它药物),或调节或以其它方式干扰纤维蛋白、Mac-1 和 / 或纤维蛋白 / Mac-1 复合物的信号功能的候选或试验化合物或试剂。本发明还包括在本文所述的筛选检测中鉴定的化合物。

[0136] 在一个实施方案中,本发明提供了筛选调节纤维蛋白 / Mac-1 复合物的信号功能和 / 或纤维蛋白与 Mac-1 之间的相互作用的候选或试验化合物的检测法。可使用本领域中已知组合文库法中大量方法中的任一种获得本发明的试验化合物,包括:生物文库、空间可寻址的平行固体相或溶液相文库、需要去卷积的合成文库法和使用亲和色谱选择的合成文库法。生物文库方法限于肽文库,而其它 4 种方法可应用于肽、非肽寡聚体或小分子化合物文库。(参见例如, Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12 :145)。

[0137] 如本文所使用的“小分子”意在指分子量低于约 5kD 且最优选低于约 4kD 的组合物。小分子可为(例如)核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂质或其它有机或无机分子。化学和 / 或生物混合物文库,例如真菌、细菌或藻类提取物在本领域中已知并且可用本发明的任何检测法筛选。

[0138] 分子文库合成方法的实例可在本领域中找到,例如在 DeWitt 等, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 :6909 ;Erb 等, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 :11422 ; Zuckermann 等, 1994. *J. Med. Chem.* 37 :2678 ;Cho 等, 1993. *Science* 261 :1303 ;Carrell 等, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 :2059 ;Carell 等, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 :2061 ;和 Gallop 等, 1994. *J. Med. Chem.* 37 :1233 中。

[0139] 在溶液中(参见例如, Houghten, 1992. *Biotechniques* 13 :412-421) 或珠子上(参见 Lam, 1991. *Nature* 354 :82-84)、芯片上(参见 Fodor, 1993. *Nature* 364 :555-556)、细菌(参见美国专利 No. 5, 223, 409)、孢子(参见美国专利 No. 5, 233, 409)、质粒(参见 Cull 等, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :1865-1869) 或噬菌体上(参见 Scott 和 Smith, 1990. *Science* 249 :386-390 ;Devlin, 1990. *Science* 249 :404-406 ;Cwirla 等, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 :6378-6382 ;Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222 :301-310 ;和美国专利 No. 5, 223, 409) 可呈现化合物文库。

[0140] 在一个实施方案中,将候选化合物引入抗体-抗原复合物中并确定候选化合物是否破坏抗体-抗原复合物,其中这种复合物破坏表明候选化合物调节纤维蛋白 / Mac-1 复合物的信号功能和 / 或纤维蛋白与 Mac-1 之间的相互作用。例如,单克隆抗体 5B8 和抗原纤维蛋白原复合物。可选地,单克隆抗体为 1E3 且抗原为纤维蛋白原。

[0141] 在另一实施方案中,提供了纤维蛋白 / Mac-1 复合物并暴露于至少一种中和单克隆抗体。检测到抗体-抗原复合物形成,并且将一种或多种候选化合物引入复合物中。如果在引入一种或多种候选化合物之后抗体-抗原复合物被破坏,则候选化合物可用于治疗与纤维蛋白 / Mac-1 结合相关的病症。

[0142] 在另一实施方案中,提供了本发明的可溶性嵌合蛋白并暴露于至少一种中和单克隆抗体。检测到抗体-抗原复合物形成,并且将一种或多种候选化合物引入复合物中。如

果在引入一种或多种候选化合物之后抗体-抗原复合物被破坏,则候选化合物可用于治疗与纤维蛋白/Mac-1 结合相关的病症。

[0143] 例如可通过偶联具有放射性同位素的试验化合物或酶标记,使得可通过检测复合物中的标记化合物而确定试验化合物与抗原或其生物活性部分的结合来实现确定试验化合物干扰或破坏抗体-抗原复合物的能力。例如,可用 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 直接或间接标记试验化合物,并且可通过无线电发射直接计数或通过闪烁计数检测放射性同位素。可选地,可用(例如)辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或萤光素酶酶促标记试验化合物,并且可通过确定适当底物向产物的转化检测酶标记。

[0144] 在一个实施方案中,检测包括使抗体-抗原复合物与试验化合物接触和确定试验化合物与抗原相互作用或以其它方式破坏现有抗体-抗原复合物的能力。在该实施方案中,确定试验化合物与抗原相互作用和/或破坏抗体-抗原复合物的能力包括确定与抗体相比,试验化合物优先结合抗原或其生物活性部分的能力。

[0145] 在另一实施方案中,检测包括使抗体-抗原复合物与试验化合物接触和确定试验化合物调节抗体-抗原复合物的能力。确定试验化合物调节抗体-抗原复合物的能力可通过(例如)确定在试验化合物存在下抗原与抗体结合或相互作用的能力来实现。

[0146] 本领域的技术人员将认识到,在本文公开的任何筛选方法中,抗体可为中和抗体,例如单克隆抗体 5B8 和/或 1E3,每一种抗体均可调节或以其它方式干扰纤维蛋白/Mac-1 结合。

[0147] 在一个实施方案中,可能期望固定抗体或抗原以便在引入候选化合物之后分离一种或两种的复合和非复合形式,以及适应检测的自动化。可在适于容纳反应物的任何容器中实现在候选化合物存在和不存在时抗体-抗原复合物的观察。这种容器的实例包括微量滴定板、试管和微型离心管。在一个实施方案中,可提供融合蛋白以增加允许一种或两种蛋白质与基质结合的结构域。例如, GST 抗体融合蛋白或 GST 抗原融合蛋白可吸附至谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠(Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) 或谷胱甘肽源微量滴定板上,然后与试验化合物组合,并且在有益于复合物形成的条件下(例如,在生理盐和 pH 条件下)培育混合物。培育之后,洗涤珠子或微量滴定板孔以去除任何未结合的组分、固定的基质(在为珠子的情况下),直接或间接确定复合物。可选地,可使复合物与基质分离,并且可使用标准技术确定抗体-抗原复合物形成的水平。

[0148] 将蛋白质固定在基质上的其它技术也可用于本发明的筛选检测中。例如,可利用生物素和链霉抗生物素蛋白的轭合固定抗体(例如 5B8 和/或 1E3)或抗原(例如纤维蛋白)。可使用本领域众所周知的技术(例如,生物素化试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, III.) 由生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备生物素化抗体或抗原分子,并固定与涂覆链霉抗生物素蛋白的 96 孔板(Pierce Chemical)上。可选地,可将与目标抗体或抗原反应,但并不干扰目标抗体-抗原复合物形成的其它抗体衍生化至板的孔中,并且通过抗体轭合将未结合抗体或抗原诱捕于孔中。检测这种复合物的方法,除以上所述对于 GST 固定复合物的方法外,包括使用这种与抗体或抗原反应的其它抗体免疫检测复合物。

[0149] 本发明进一步属于通过前述任何筛选检测鉴定的新型试剂及其如本文所述用于治疗用途。

[0150] 诊断检测

[0151] 可通过适当检测,例如常规类型的免疫检测来检测本发明的抗体。例如,可进行夹心分析法,其中使全长纤维蛋白原、纤维蛋白或其片段附于固体相。保持培育足够长时间以使样本中的抗体与固体相上的固定多肽结合。首次培育之后,分离固体相和样本。洗涤固体相以去除也可能存在于样本中的未结合材料和干扰物质,例如非特异性蛋白质。随后与第二种标记抗体或与偶联剂(例如生物素或抗生物素蛋白)结合的抗体一起培育含有与固定多肽结合的目标抗体(例如单克隆抗体 5B8 和 / 或 1E3) 的固体相。这第二种标记抗体可为另一种抗纤维蛋白抗体。抗体的标记在本领域中众所周知并且包括放射性核素、酶(例如马来酸脱氢酶、辣根过氧化物酶、葡糖氧化酶、过氧化氢酶)、氟石(异硫氰酸荧光素、若丹明、藻蓝蛋白、荧光胺)、生物素等。与固体一起培育标记抗体并测量与固体相结合的标记。通过本领域的普通技术人员可易于进行这些和其它免疫检测。

[0152] 检测生物样本中纤维蛋白的存在或不存在的示例性方法包括从测试受试者获得生物样本和使生物样本与根据本发明所述的标记单克隆抗体接触使得检测出生物样本中纤维蛋白的存在。

[0153] 如本文所使用的关于探针或抗体的术语“标记”旨在涵盖通过偶联(即,物理连接)可检测物质和探针或抗体对探针或抗体进行的直接标记以及通过与直接标记的另一试剂反应对探针或抗体进行的间接标记。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体检测一级抗体和用生物素对 DNA 探针进行末端标记使得可用荧光标记的链霉抗生物素蛋白检测。术语“生物样本”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物流体,以及受试者体内存在的组织、细胞和流体。即,本发明的检测方法可用于检测体外以及体内生物样本中的纤维蛋白。例如,体外检测纤维蛋白的技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光法。而且,体内检测纤维蛋白的技术包括将标记的抗纤维蛋白抗体引入受试者体内。例如,可用放射性标记物标记抗体,可通过标准成像技术检测所述放射性标记物在受试者体内的存在和位置。

[0154] 在一个实施方案中,生物样本含有来自受试者的蛋白质分子。一种优选的生物样本是通过常规方式从受试者分离的外周血白细胞样本。

[0155] 试剂盒

[0156] 本发明还涵盖用于检测生物样本中纤维蛋白的存在的试剂盒。例如,试剂盒可包含:能够检测生物样本中纤维蛋白的标记化合物或试剂;确定样本中纤维蛋白的量的方法;和将样本中纤维蛋白的量与标准物进行比较的方法。可将化合物或试剂包装在适合容器中。试剂盒可进一步包含使用试剂盒检测样本中的纤维蛋白的说明书。

[0157] 在以下实施例中将进一步描述本发明,其并不限制权利要求中所述本发明的范围。

实施例

[0158] 依照以下实施例可进一步理解本发明的各方面,其不应被理解为以任何方式限制本教导的范围。

[0159] 实施例 1- 单克隆抗体的生成

[0160] 合成与纤维蛋白原 γ 链上的精确氨基酸对应的肽序列(肽 #1: CGWTVLQKRIDGSL (SEQ ID NO :17) 和肽 #2: CKKTTMKIIPFNRLTIG (SEQ ID NO :18)), 已证实所

述肽序列对纤维蛋白原与 Mac-1 的相互作用至关重要。用相应的 N 端半胱氨酸残基合成这两种肽以允许耦合并促进体内有力抗体反应的载体蛋白钥孔戚血蓝蛋白 (KLH)。两种肽均用于免疫 3 只小鼠,在这些小鼠体内产生抗体反应。初步血清筛选显示对这些肽的强抗体滴度并导致随后生成产生针对这两种肽序列的克隆抗体的杂交瘤。通过 ELISA 对两种肽以及载体蛋白进行 480 个杂交瘤克隆的初始筛选。扩展阳性克隆并再次测试以通过 ELISA 确认肽表位反应性。这种初始筛选的最终结果产生 46 个对肽 #1 或 #2 有特异性的克隆。在这些 ELISA 的深层分析中,结果鉴定出 16 个靶候选物用于进一步检查。筛选这 16 个克隆阻断通过全长纤维蛋白原上的 Mac-1 受体的小胶质细胞粘附的能力。在这些抗体克隆存在下,为组织培养孔涂覆 50 μ g/mL 纤维蛋白原,其上接种小胶质细胞 (200,000 个细胞/mL)。30min 后洗涤孔并用 0.1% 结晶紫为剩余粘附细胞染色。用 1% PFA 固定染色细胞并用 0.5% TritonX-100 溶解。在 595nm 下通过吸光度测量评估,其中 5 种克隆显示出与市售的 Mac-1 封闭性抗体 (M1/70) 相似的防止小胶质细胞与纤维蛋白原粘附的显著能力 (图 1;经吸光度转变测量具有高于 20% 的抑制)。预期本发明的抗体可防止小胶质细胞与纤维蛋白原粘附高于 30%、40% 或 50%。克隆 1A5、1D6 和 1E3 识别肽 #1 表位,而克隆 4E11 和 5B8 识别肽 #2 表位。通过蛋白质印迹进一步分析这 5 种克隆识别纤维蛋白原的能力。这 5 种抗体识别纤维蛋白原的 Y 链程度相似。为检查这些抗体是否以剂量依赖性方式识别纤维蛋白原,对全长涂覆纤维蛋白原进行 ELISA (图 2)。发现所有这 5 种抗体特异性结合浓度递增的全长纤维蛋白原。从这 5 种抗体中选择 3 种 (1E3、4E11 和 5B8;当通过吸光度转变测量时,对 Mac-1 结合纤维蛋白或纤维蛋白原 yC 结构域的抑制高于 50%) 进行分离和大规模纯化。预期本发明的抗体可抑制 Mac-1 结合纤维蛋白高于 50%、60% 或 70%。最初,纯化这 3 种抗体 20mg 用于体外吞噬作用检测和 EAE 实验。

[0161] 实施例 2- 针对纤维蛋白原 y 链的单克隆抗体抑制小胶质细胞的吞噬作用

[0162] 吞噬作用是 Mac-1 介导的激活小胶质细胞和巨噬细胞的主要功能。如先前所述对小胶质细胞进行吞噬作用检测。参见,通过引用整体并入本文的 Adams 等,2007, J. Exp. Med. 204 :571-582。纤维蛋白源性 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 肽抑制小胶质细胞激活并抑制中枢神经系统自身免疫疾病的复发性麻痹。针对修饰纤维蛋白 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 表位的单克隆抗体 5B8 在抑制体外吞噬作用中显示出较高功效。如先前对 y³⁷⁷⁻³⁹⁵ 肽所述,在体内研究中该抗体显示预防和治疗性施用于 MS 动物模型中。

[0163] 实施例 3- 单克隆抗体 5B8 抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎的缓解 - 复发动物模型中的复发发病率

[0164] 为评估纤维蛋白抗体在调节体内小胶质细胞激活和脱髓鞘作用中的效果,在 PLP EAE 发展后向小鼠施用吞噬作用检测中鉴定的 2 种克隆。按每只小鼠 250 μ g 施用抗体 5B8 和 4E11,每周 3 次。如图 4 所示,抗体 4E11 对 EAE 的发展没有实质影响。相反,抗体 5B8 显示对复发时临床症状的抑制。

[0165] 其它实施方案

[0166] 提供上述详细描述是为了帮助本领域的技术人员实施本发明。然而,本文公开的特定实施方案并不限制本文所述和要求的本发明的范围,因为这些实施方案旨在作为本发明几个方面的说明。任何等效实施方案均被预计在本发明范围之内。实际上,除本文示出和描述的修改外,对于本领域的技术人员而言,通过不背离本发明精神和范围的先前描述,

本发明的各种修改变得显而易见。这些修改也旨在属于所附权利要求的范围之内。

[0167] 引用的参考文献

[0168] 本文参考的引用不得被理解为承认这是本发明的现有技术。

[0001]

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会
凯特琳娜·阿卡索格鲁

<120> 单克隆抗体

<130> RUC-110W0

<150> US 61/248,014

<151> 2009-10-02

<160> 18

<170> 3.5 版 PatentIn

<210> 1

<211> 158

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Thr Phe Asp Ser Pro Tyr Gln Val Arg Arg Met Arg Phe Ser Ala Gln
1 5 10 15

Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro Gly Ser Thr Ala Asp Ile
 20 25 30

Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Ile Thr Leu Gly Thr Ser
 35 40 45

Ala Ser Met Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Ser Gly
 50 55 60

Ile Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln
65 70 75 80

Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg
 85 90 95

[0002]

Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg
 100 105 110

Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu
 115 120 125

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 130 135 140

Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Cys Thr Lys Gly Glu Phe
 145 150 155

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Ser Gly Ile Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

[0003]

<400> 4

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 5

<211> 166

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Asn Thr Ala Phe Ala Gly Phe Gly Arg Asn Met Arg Ser Leu Phe Ser
1 5 10 15

Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Ala Met Gly Trp Ser Cys Ile
20 25 30

Ile Val Leu Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln
35 40 45

Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys
50 55 60

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
65 70 75 80

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
85 90 95

Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys
100 105 110

Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu
115 120 125

[0004]

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Ser
 130 135 140

Asp Pro Thr Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Pro
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Thr Pro Pro
 165

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
 1 5 10

<210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 7

Leu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0005]

<400> 8

Ser Asp Pro Thr Gly Cys

1 5

<210> 9

<211> 474

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 9

acttttgact caccatatca agttcgcaga atgaggttct ctgctcagct tctggggctg 60

cttgtgctct ggatccctgg atccactgca gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc 120

aatccaatca ctcttgaac atcagcttcc atgtctgca ggtctagtaa gagtctccta 180

catagtagtg gcatacctta tttgtcttgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 240

ctctgattt atcagatgtc caaccttgc tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt 300

gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatt agccgagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 360

tattactgtg ctcaaatct agaacttccg ctcacgttgc gtgctgggac caagctggag 420

ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta tccgcatgca ccaagggcga attc 474

<210> 10

<211> 499

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 10

gaacaactgcg tttgetggct ttggaagaaa catgagatca ctgttctctc tacagttact 60

gagcacacag gacctcgcca tgggatggag ctgtatcatt gtctcttgg tatcaacagc 120

tacaggtgct cactcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgagctgg tgaggcctgg 180

gacttcagtg aagttgtcct gcaagcttc tggctacacc ttcaccagct actggataca 240

[0006]

ctgggtaaag cagaggcctg gacaaggcct tgagtggate ggactgattg atccttctga	300
tagttatact aactacaate aaaagttcag gggcaaggcc acattgactg tagacacate	360
ctccagcaca gectacatgc agctcagcag cctgacatct gaggactctg eggcttatta	420
ctgtgcaagc tccgatecta caggetgctg gggccaagge accactctca cagtctcccc	480
agctagcaca acaccccca	499
<210> 11	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 11	
aggtctagta agagtctcct acatagtagt ggcacactt atttgtct	48
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 12	
cagatgtcca accttgcctc a	21
<210> 13	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 13	
gctcaaaate tagaacttcc gctcag	27
<210> 14	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 14	

[0007]

ggctacacct tcaccagcta ctggatacac	30
<210> 15	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 15	
ctgattgatac cttctgatag ttatactaac tacaatcaaa agttcagggg c	51
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 16	
tccgatccta caggctgc	18
<210> 17	
<211> 14	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 17	
Cys Gly Trp Thr Val Leu Gln Lys Arg Ile Asp Gly Ser Leu	
1 5 10	
<210> 18	
<211> 17	
<212> PRT	
<213> 小家鼠	
<400> 18	
Cys Lys Lys Thr Thr Met Lys Ile Ile Pro Phe Asn Arg Leu Thr Ile	
1 5 10 15	
Gly	

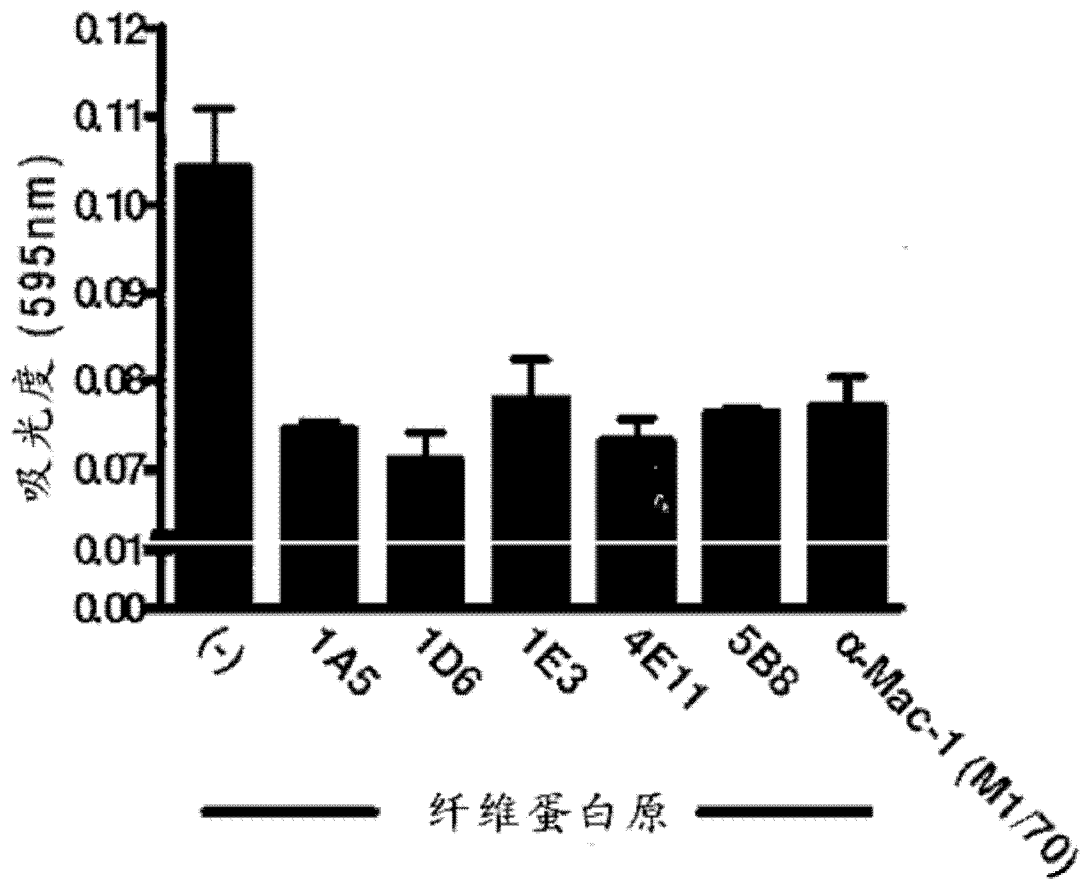


图 1

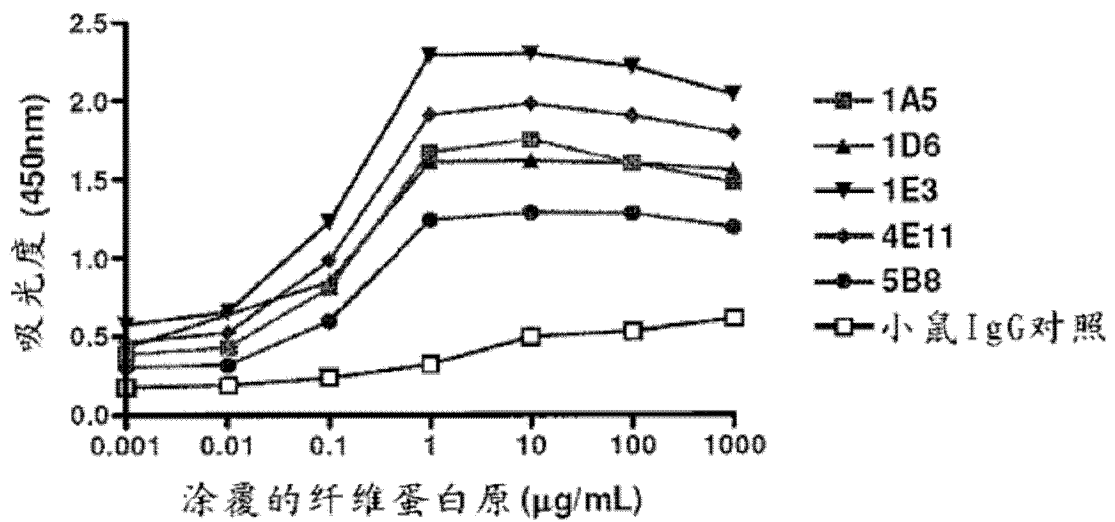


图 2

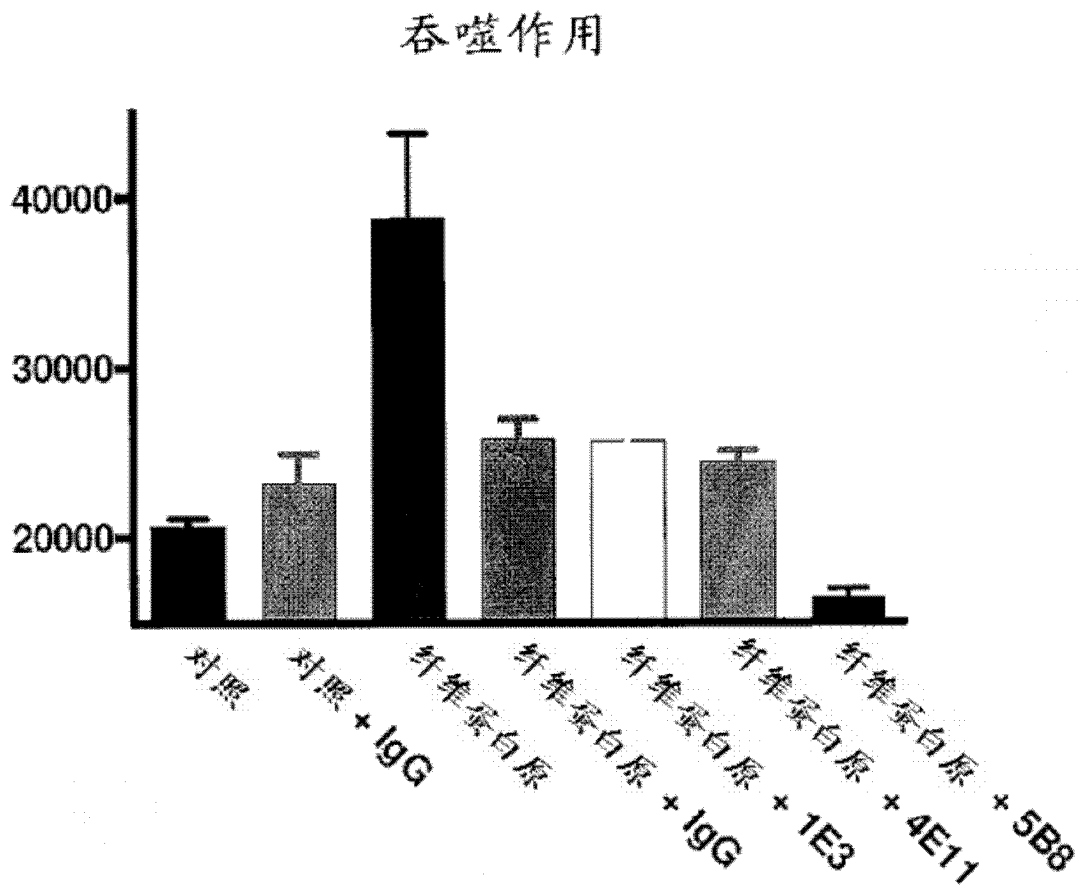


图 3

纤维蛋白抗体 4E11 EAE

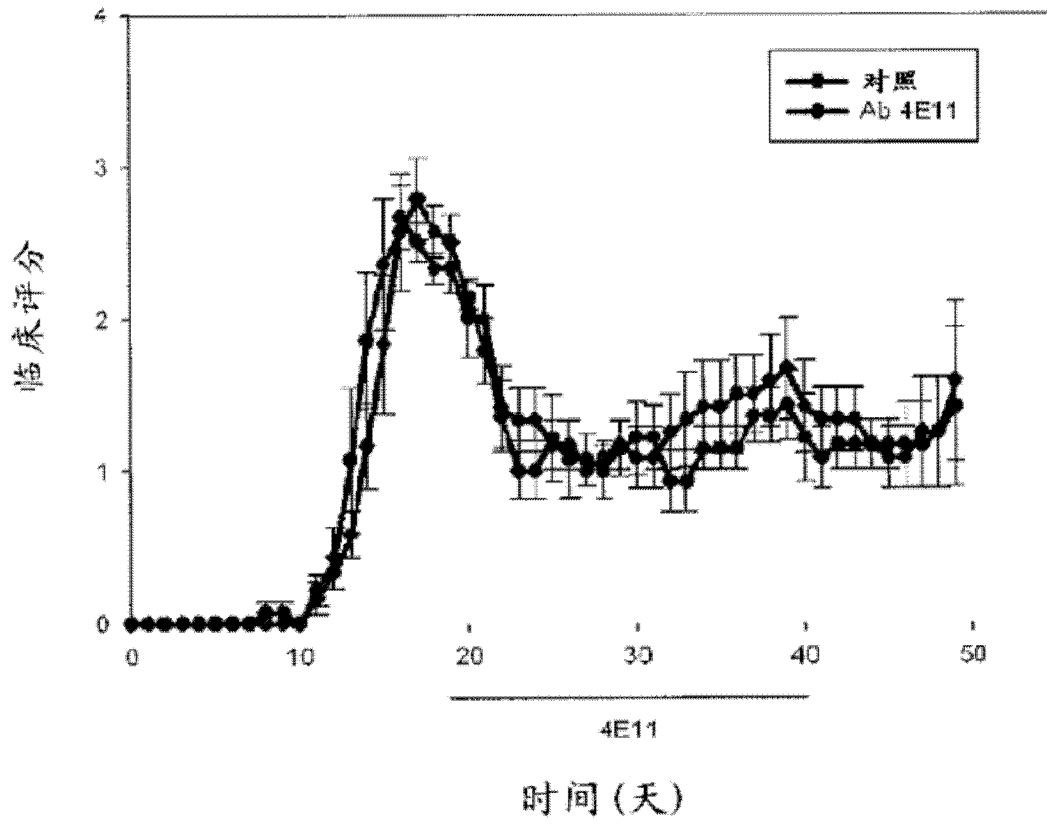


图 4A

治疗性纤维蛋白抗体 EAE

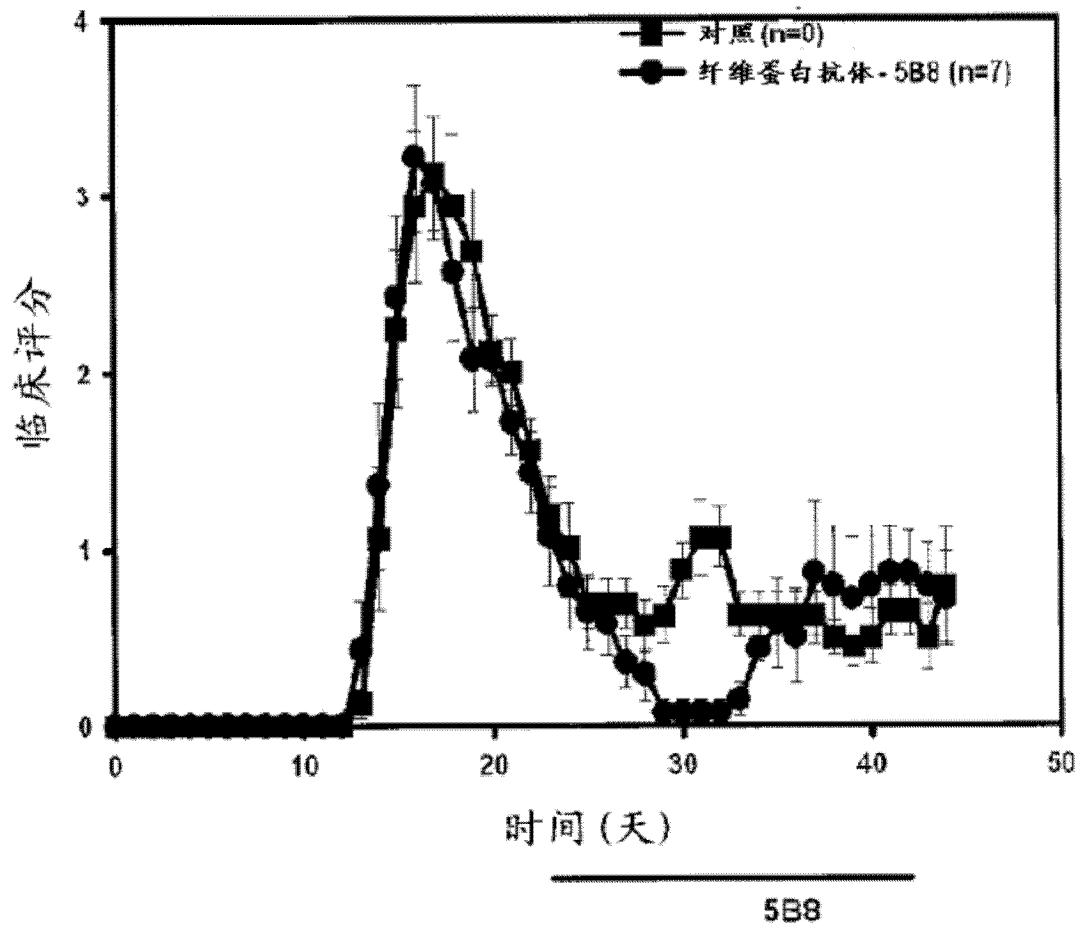


图 4B

专利名称(译)	单克隆抗体		
公开(公告)号	CN102575277A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201080046037.8	申请日	2010-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	凯特琳娜阿卡索格鲁		
发明人	凯特琳娜·阿卡索格鲁		
IPC分类号	C12P21/08 A61K35/14 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 G01N2500/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06		
代理人(译)	武晶晶		
优先权	61/248014 2009-10-02 US		
其他公开文献	CN102575277B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种结合纤维蛋白或纤维蛋白原YC结构域的分选抗体。在各个方面,所述抗体抑制小胶质细胞与纤维蛋白或纤维蛋白原YC结构域粘附,抑制Mac-1与纤维蛋白或纤维蛋白原YC结构域结合,和/或抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的临床症状。提供了使用所述抗体、药物组合物、试剂盒、载体、包含载体的细胞的各种方法和抗体生成方法。

