

[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 200410068439.4

C12P 21/00

C12P 21/08

G01N 33/563

C12N 5/12

C07K 16/18

A61K 39/395

A61P 31/18

[43] 公开日 2005 年 6 月 15 日

[11] 公开号 CN 1626669A

[22] 申请日 2004. 7. 15

[21] 申请号 200410068439.4

[30] 优先权

[32] 2003. 7. 16 [33] US [31] 10/622003

[71] 申请人 CCL 控股有限公司

地址 台湾省台北市

[72] 发明人 金立德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 31 页 附图 4 页

[54] 发明名称 完全人源化抗体的制备

[57] 摘要

本发明提供了一种完全人源化抗体的制备方法, 它能识别预先确定的抗原, 而且不需依赖已经接触过抗原的人类供体。为了达到这个目的, 将来自天然人类供体的淋巴细胞, 在体外用感兴趣的抗原进行免疫, 然后鉴定出针对上述抗原的抗体产生细胞。因为淋巴细胞在体外而不是在体内免疫, 所以可以调控抗体识别的抗原或抗原片段。优选的抗原是 HIV gp120 肽, 特别是 gp120 的共同受体结合区。

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

1. 一种能识别抗原的完全人源化抗体的制备方法，包括：
 - (a) 提供一组来自天然人类供体的淋巴细胞；
 - 5 (b) 在体外用抗原免疫所说的淋巴细胞；
 - (c) 将免疫的淋巴细胞与异源骨髓瘤细胞系融合，形成三元杂交瘤细胞；
 - (d) 鉴定出能产生可识别抗原的抗体的三元杂交瘤细胞；以及
 - (e) 收集步骤(d)中鉴定出的三元杂交瘤细胞所产生的抗体。
2. 权利要求1的方法，进一步包括在步骤(b)之前，从所说的淋巴细胞
10 中去除CD8⁺细胞和CD56⁺细胞的步骤。
3. 权利要求1或2的方法，进一步包括在步骤(d)之前用第二抗原筛选步
骤(c)的三元杂交瘤细胞，由此筛选出能产生同时识别第一抗原和第二抗原
的抗体的细胞。
4. 上述任一权利要求的方法，其中抗体识别抗原的K_d值约为30 nM或更少。
- 15 5. 上述任一权利要求的方法，其中抗体是IgG抗体。
6. 上述任一权利要求的方法，其中抗体是IgG1抗体。
7. 上述任一权利要求的方法，其中步骤(d)中的三元杂交瘤细胞，在细
胞培养中能产生抗体至少约3个月。
8. 上述任一权利要求的方法，其中步骤(d)中的三元杂交瘤细胞，在细
20 胞培养中能产生抗体至少约6个月。
9. 上述任一权利要求的方法，其中步骤(d)中的三元杂交瘤细胞，在细
胞培养中能产生抗体至少约9个月。
10. 上述任一权利要求的方法，其中步骤(d)中的三元杂交瘤细胞，在
细胞培养中能产生抗体至少约12个月。
- 25 11. 上述任一权利要求的方法，其中抗原是HIV抗原。
12. 权利要求11的方法，其中抗原来自gp120。
13. 权利要求12的方法，其中抗原包括gp120的共同受体结合区。
14. 上述任一权利要求的方法，其中抗原包括T辅助细胞序列。
15. 一种分离的完全人源化抗体或其抗原结合片段，其中抗体能识别至少
30 两种HIV株。

16. 权利要求15的抗体或片段, 其能识别至少两种HIV株的gp120。
17. 权利要求16的抗体或片段, 其能识别gp120共同受体结合区。
18. 权利要求15的抗体或片段, 其能识别选自SEQ ID Nos:2-17中的至少两种序列。
- 5 19. 权利要求15-18任一权利要求中的抗体或片段, 其中抗体是IgG抗体。
20. 权利要求15-18任一权利要求中的抗体或片段, 其中抗体是IgG1抗体。
21. 一种组合物, 其包括权利要求15-20任一项中的抗体或片段。
22. 权利要求21的组合物, 其进一步包括药学上可接受的载体或赋形剂。
23. 一种预防、治疗或缓解HIV感染的方法, 包括将有效量的权利要求21的
- 10 组合物给予需要的治疗对象。
24. 权利要求23的方法, 其中治疗对象患有AIDS。
25. 一种能识别至少两种不同抗原的完全人源化抗体的制备方法, 包括:
- (a) 提供一组来自天然人类供体的淋巴细胞;
- (b) 在体外用第一抗原免疫所说的淋巴细胞;
- 15 (c) 将免疫的淋巴细胞与异源骨髓瘤细胞系融合, 形成三元杂交瘤细胞;
- (d) 用第二抗原筛选三元杂交瘤细胞, 鉴定出能产生同时识别第一抗原和第二抗原的抗体的细胞; 以及
- (e) 收集步骤(d)中鉴定出的三元杂交瘤细胞产生的抗体。
26. 权利要求25的方法, 其中第一抗原与第二抗原来自微生物。
- 20 27. 权利要求25的方法, 其中第一抗原与第二抗原来自微生物的两种不同株。
28. 权利要求27的方法, 其中微生物是HIV。
29. 权利要求28的方法, 其中第一抗原与第二抗原衍生自gp120。
30. 一种提高抗原体外免疫淋巴细胞效率的方法, 包括:
- 25 (a) 提供一群淋巴细胞;
- (b) 从所说的淋巴细胞群中去除掉CD8⁺和CD56⁺细胞; 以及
- (c) 在体外用抗原接触所说的淋巴细胞群。
31. 权利要求30的方法, 其中用对CD8和CD56有特异性的磁珠将CD8⁺和CD56⁺细胞去除。
- 30 32. 一种体外细胞群, 其由下述方法制备:

(a) 提供来自天然人类供体的外周血单核细胞；
(b) 从所说的外周血单核细胞中去除掉CD8⁺和CD56⁺细胞；以及
(c) 在体外用抗原接触步骤 (b) 的细胞，使细胞产生出能识别所述抗原的抗体。

5 33. 一种抗体产生细胞，它是通过在克隆条件下培养权利要求32的细胞群，并分离能产生可识别所述抗原的抗体的克隆而制备得到的。

34. 权利要求33的抗体产生细胞，其能产生识别HIV gp120的抗体。

35. 权利要求34的抗体产生细胞，其能产生识别至少两种来自不同HIV株的gp120分子。

完全人源化抗体的制备

5 发明领域

本发明涉及针对任何感兴趣抗原的完全人源化抗体(full human antibodies)的制备方法以及得到的抗体。

参考文献

- U.S. Patent No. 5,023,252
- 10 U.S. Patent No. 6,190,871
- U.S. Patent No. 6,228,361
- U.S. Patent No. 6,261,558
- U.S. Patent No. 6,391,635
- U.S. Patent No. 6,395,275
- 15 U.S. Patent No. 6,514,496
- U.S. Patent No. 6,592,904
- Breedveld FC. (2000) 治疗性单克隆抗体, *Lancet* 355:735-40.
- Chin LT, Hinkula J, Levi M, Ohlin M, Wahren B, Borrebaeck CAK.(1994) 定点初级体外免疫: 从血清阴性供体生产中和HIV-1的人单克隆抗体, *Immunology* 81:
- 20 428-434。
- Chin LT, Malmborg AC, Kristensson K, Hinkula J, Borrebaeck, CAK.(1995) 体外模拟体液免疫应答导致自体T辅助细胞抗原特异性同种型转换, *Eur. J. Immunol.*25:657-663。
- Chin LT, Cheng, JY, Lu, SC, Chang, ACH, Chu, CH, Meng, CL. (2001) 用于无限增殖人免疫球蛋白的电融合产生的小鼠-人异种骨髓瘤细胞系, *J Biomed Lab Sci* 13:117-123。
- Demotz S, Lanzavecchia A, Eisel U, Niemann H, Widmann C, Corradin, G. (1989) 几种DR限制的破伤风毒素T细胞表位的描绘, *J Immunol.* 142: 394-402。
- Dragic, T. (2001) CCR5和CXCR4共同受体(co-receptor)功能的决定子的综述
- 30 , *J. General Virology* 82: 1807-1814。

Dueñas M, Chin LT, Malmborg AC, Casalvilla R, Ohlin M, Borrebaeck CAK. (1996) 如噬菌体展示法所示, 天然人B细胞产生高亲和性免疫球蛋白G抗体, *Immunology* 89(1):1-7。

Hahn B.H., Shaw G. M., Taylor M. E., Redfield R. R., Markham P. D.,
5 Salahuddin S.Z., Wong-Staal F., Gallo R. C., Parks E.S., Parks W. P.(1986) 在艾滋病患者或有患艾滋病风险的患者中HTLV-III/LAV随时间的遗传变化, *Science* 232: 1548-1554。

Hahn BH, Gonda MA, Shaw GM, Popovic M, Hoxie JA, Gallo RC, Wong-Staal F. (1985) 获得性免疫缺损综合症病毒HTLV-III的基因组差异: 不同的病毒的衣壳基因显示最大的差异, *Proc Natl Acad Sci (USA)* 82:4813-4817。
10

Hill CM, Deng H, Unutmaz D, Kewalramani VN, Bastiani L, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Littman DR. (1997) 人免疫缺损病毒1型和2型的衣壳糖蛋白和猿免疫缺损病毒可用人CCR5作为病毒入侵的共同受体, 并与此细胞因子受体产生直接CD4依赖性反应, *J Virol.* 71:6296-304。

Korber BTM, Brander C, Haynes BF, Koup R, Kuiken C, Moore JP, Walker BD, Watkins DI (编辑), *HIV Molecular Immunology 2001*. Publisher: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR 02-4663。
15

Kuhmann S. E., Platt E. J., Kozak S. L., Kabat D. (2000) 1型人免疫缺损病毒的
20 感染需要多个CCR5共同受体的合作, *J Virol* 74:7005-15。

Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW.(1999) 淋巴细胞亚组、树枝状细胞和不同地条件化的单核细胞来源的巨噬细胞上CD4、CCR5和CXCR4水平的定量分析, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5215-5220。

Modrow S., Hahn B.H., Shaw G. M., Gallo R. C., Wong-Staal F., Wolf H. (1987)
25 7种人免疫缺损综合症病毒分离物的衣壳蛋白序列的计算机辅助分析: 预测在保守和可变区中的抗原表位, *J. Virol* 61:570-578。

Nermut MV, Grief C, Hashmi S, Hockley DJ. (1993) 人和猿免疫缺损病毒二十面体对称的进一步证据, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9 :929-38。

Ohlin M, Kristensson K, Carlsson R, Borrebaeck CA. (1992) Epstein-Barr病毒
30 诱导的人B淋巴细胞转化: L-亮氨酸-L-亮氨酸甲酯抑制T细胞增殖的作用,

Immunol Lett. 34:221-8。

Ohlin M., Danielsson L, Carlsson R, Borrebaeck, CAK. (1989) 亮氨酸-亮氨酸甲酯对EBV转化的人B淋巴细胞的增殖和Ig分泌的作用, *Immunology* 66:485-490

。

- 5 Shiino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, Sato H.(2000) 一组来自人免疫缺损病毒1型E亚型的V3序列的非合胞体诱导性、利用CCR5的变异体对阳性筛选压力有抗性, *J Virol.* 74(3):1069-78。

Staudinger R, Phogat SK, Xiao X, Wang X, Dimitrov DS, Zolla-Pazner S. (2003) CD4增强的通过细胞因子受体CCR5的信号传导的证据, *J Biol Chem.* 278:10389-

10 92。

Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R. (2002) HIV-1遗传形式的分子流行病学和它对疫苗开发和治疗的重要性, *Lancet Infect Dis* 2:461-71。

van Dijk MA, van de Winkel JG. (2001) 作为下一代治疗剂的人抗体, *Curr Opin Chem Biol.* 5(4):368-74。

- 15 Weiner LM. (1999) 癌症的单克隆抗体疗法综述, *Semin Oncol* 26:41-50。

Wu H, Myszka DG, Tendian SW, Brouillette CG, Sweet RW, Chaiken IM, Hendrickson WA. (1996) 有HIV gp120结合缺陷的突变型CD4受体的动力学和结构分析, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:15030-5。

- 20 Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J. (1995) V1/V2可变环结构与通过受体结合诱导的人免疫缺损病毒1型gp120表位的暴露有关, *J Virol.* 69:5723-33。

Zafiroopoulos A, Andersson E, Krambovitis E, Borrebaeck CAK. (1997) 通过人天然B淋巴细胞的体外免疫诱导抗原特异性同种型转换, *J Immunol Methods.* 200(1-2):181-90。

- 25 以上所述或本申请其它地方所引用的出版物、专利和专利申请等全文在此引入以供参考，如同明确而逐一指明全文引入各个出版物、专利或专利申请以供参考。

发明背景

- 30 人源化的单克隆抗体已经成功地用于治疗各种疾病 (Breedveld, 2000)。通常这些疾病都是传染病，如被呼吸道合胞体病毒 (RSV) 感染。然而最近，抗

体日益广泛地用于治疗其它许多疾病，包括自身免疫症，和各种恶性肿瘤如转移性乳腺癌，非霍奇金氏淋巴瘤，慢性淋巴细胞白血病，急性骨髓淋巴细胞瘤（Breedveld, 2000; Weiner, 1999）。而且在血管成形术中对于器官的排斥反应或血液的凝结反应，抗体也能起到预防的作用。

5 典型地，人源化抗体可以通过用人源抗体的相应部分，取代小鼠抗体对抗原特异性不重要的区域而制备得到。由此得到的重组抗体由于其含有残余的鼠类序列，因此在将其给予病人时，往往会在病人中引发免疫应答反应（人抗鼠反应）。因此，希望制备出不含非人类序列的完全人源化抗体。完全人源化抗体已经有过报道，例如利用噬菌体展示技术构建和筛选人源抗体文库，以获得
10 人源化抗体，或者将来自免疫人类供体的淋巴细胞植入重度联合免疫缺陷小鼠（SCID），以获得人源化抗体，或者利用基因工程技术构建表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠，以获得人源化抗体（van Dijk et al.,2001）。针对致病抗原的完全人源化抗体，也可以通过对脐带血的大量筛选，将包含IgM天然全组分的脐带血进行分离而得到（例如，参见美国专利 No.6,391,635）。然而上述这些方
15 法，或者得到的是亲和力低的抗体，或者需要依赖具有特定免疫应答的人类供体。

由于严重的副作用以及抗药性阻碍了对HIV的化疗，所以针对HIV的完全人源化抗体将会具有治疗价值。特别感兴趣的是能识别HIV包膜糖蛋白gp120的抗体。HIV进入靶细胞是通过gp120与靶细胞上的CD4分子和共同受体分子（
20 CCR5或CXCR4）先后相互作用而启动的(Dragic, 2001)。Gp120是由五个恒定区(C1-C5)和五个可变环（V1-V5）组成的。CD4与gp120结合产生的高键能，引起gp120构象改变而暴露出其共同受体分子结合位点（gp120 V3-C4区）。接着，共同受体分子与gp120结合，使病毒和靶细胞膜融合，病毒进入细胞。因此，能够识别CD4结合位点或共同受体分子结合位点的抗体，可以扰乱HIV进入细胞，阻
25 止病毒在细胞内复制。

针对gp120的完全人源化抗体已经有过报道。美国专利No.6,190,871公开了四种源自慢性感染病人的针对gp120的单克隆人源化中和抗体，但是所有上述的抗体都是与CD4结合区反应。美国专利No.6,228,361公开了另一种IgG1单克隆人源化中和抗体，它来自血清阳性的病人，也是与gp120的CD4结合区反应
30 。除了整个的抗体分子以外，作用于相同区位的免疫球蛋白片段（Fab）也可

以从感染供体的骨髓获得（美国专利No.6,261,558和6,395,275）。

然而，能够识别共同受体分子结合位点而不是CD4分子结合位点，而且具有治疗作用的抗体是更优选的，原因如下：首先，超显微结构研究显示，成熟HIV颗粒有大约72个刺状突起，包含有gp120的靶细胞结合位点（Nermut et al., 1993）。外周淋巴细胞CD4分子的平均数量，据报道有 $65,330 \pm 6,049$ 个（Lee et al., 1999.）。而且，CD4和gp120之间的亲和力极高，其Kd值是很低的纳摩尔级，即0.2-30 nM（Wu et al., 1996; Hill et al., 1997）。将上述两方面一起考虑，由于CD4分子和gp120 CD4结合位点都很多，因此它们之间的总结合力（亲和力）将会非常之高。这样，不仅需要大量的抗体去阻断gp120 CD4结合位点与CD4分子之间的相互作用，而且特别是需要有超高亲和力的抗体去克服上述分子之间的亲和力。相反，共同受体分子的结合位点，直到gp120与CD4结合之后才会被有效暴露。因此，只需要很少量的能够结合共同受体分子结合位点的抗体，就能阻断HIV与靶细胞的结合，而且这些抗体的亲和力并不需要特别高就能有效抑制HIV的感染。

制备出有治疗效果的靶向gp120的抗体的进一步问题是，gp120的一级结构，即氨基酸序列，在不同HIV-1株中是高度可变的（Kuhmann et al., 2000; Hahn et al., 1985; Modrow et al., 1987; Thomson et al., 2002）。事实上，甚至同一病人的先后分离物也显示出变异性（Hahn et al., 1986）。因此，能够识别gp120空间构象表位的完全人源化抗体，用于治疗 and/或预防可针对多种HIV的毒株感染，则是令人期望的。理想的抗体将能识别gp120的共同受体分子结合位点，特别是能识别其空间构象表位。

发明概述

本发明提供了一种制备完全人源化抗体的方法，此抗体能识别预先确定的抗原，而不需依赖已经接触抗原的人类供体。为了达到这个目的，将来自天然（naive）人类供体的淋巴细胞在体外与靶抗原接触，然后鉴定出产生针对所选抗原的抗体的细胞。由于淋巴细胞在体外而不是在体内免疫，所以调控哪些抗原或者抗原的哪一部分被抗体识别将成为可能。因此，此方法在针对致命微生物的抗体制备中特别有用，因为不需要用致命微生物去免疫动物，更无须用其免疫人类。

优选的抗原是HIV gp120糖蛋白或其免疫源性片段。更优选地，抗原是包

含gp120共同受体分子结合位点的肽。由于抗原具有变异性，产生针对gp120的广谱抗体一直是个难题，现存针对gp120的抗体比较典型地是仅仅识别HIV的一个亚型或者甚至是HIV的一个分化株(clade)的gp120。本发明进一步提供了能够识别至少两种不同抗原的抗体制备方法。通过用一种抗原免疫淋巴细胞，再用
5 另一种抗原筛选免疫过的淋巴细胞，就能获得能够识别两种抗原的完全人源化抗体。

为了提高细胞的抗体产生能力，抗体产生细胞可以任选地进行各种进一步的处理。例如，可以将抗体产生细胞与异源骨髓瘤细胞融合，形成三元杂交瘤(trioma)细胞，三元杂交瘤细胞将能够长时间存活，并且能稳定地产生抗体。

10 相应地，本发明的一个方面是，提供一种能够识别抗原的完全人源化抗体的制备方法，包括：

- (a) 提供一组来自天然人类供体的淋巴细胞；
- (b) 在体外用抗原免疫所说的淋巴细胞；
- (c) 将免疫过的淋巴细胞与异源骨髓瘤细胞系融合，形成三元杂交瘤细
15 胞；
- (d) 鉴定出能识别所述抗原的三元杂交瘤抗体产生细胞；以及
- (e) 收集步骤(d)中鉴定出的三元杂交瘤细胞产生的抗体。

该方法也可以进一步包括下列步骤，在步骤(b)之前从所说的淋巴细胞中去除掉CD8⁺细胞和CD56⁺细胞。另外地或可选择地，该方法还可以进一步包括
20 ，在步骤(d)之前用第二抗原筛选步骤(c)获得的三元杂交瘤细胞，由此鉴定出能够同时识别第一抗原和第二抗原的抗体。

将三元杂交瘤细胞在克隆条件下培养，用本发明的方法可以制备出单克隆抗体。可选择地，将抗体产生细胞在非单一克隆条件下培养，用本发明的方法则可以制备出多克隆抗体。优选地，上述抗体识别抗原的Kd值约为100 nM或
25 更少，约为30 nM或更少，约为10 nM或更少，约为3 nM或更少，或者约为1 nM或更少。抗体优选是IgG抗体，特别是IgG1抗体。

本发明也提供了能产生完全人源化抗体的抗体产生细胞的制备方法，如上述的三元杂交瘤细胞。特别地，细胞能长时间地持续产生抗体，如在细胞培养中持续产生抗体至少约3, 6, 9, 12, 15, 18, 21或24个月。

30 本发明中所用的抗原优选是HIV抗原，更优选是HIV gp120分子及其片段

。特别地，抗原是来自gp120共同受体分子结合区的多肽。

本发明的另一方面是，提供了用本发明方法制备的完全人源化抗体。特别地，所述抗体能够识别HIV抗原如gp120，更优选地，所述抗体能够识别来自两种不同HIV株的抗原。最优选地，抗体可以识别三种或更多的HIV株，其亚型
5，或其分化体。完全人源化抗体优选识别至少两种HIV株的共同受体分子结合区。例如，抗体能识别多种包括不同gp120共同受体分子结合区中的至少两种抗原，如选自SEQ ID NOs:2-17序列组成的组。抗体优选是IgG抗体，特别是IgG1抗体。也提供了包含抗体的药用组合物，包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

10 本发明还有的另一个方面是，提供了预防、治疗或者改善HIV感染的方法，包括给予治疗对象有效量的本发明的抗体或包含上述抗体的组合物。特别是，本方法能够用于预防、治疗或缓解AIDS。

本发明的进一步方面是，提供了能够识别至少两种不同抗原的完全人源化抗体的制备方法，包括：

- 15 (a) 提供一组来自天然人类供体的淋巴细胞；
(b) 在体外用第一抗原免疫所说的淋巴细胞；
(c) 将免疫过的淋巴细胞与异源骨髓瘤细胞系融合，形成三元杂交瘤细胞；
；
(d) 用第二抗原去筛选三元杂交瘤细胞，鉴定出能够同时识别第一、第
20 二两种抗原的抗体产生三元瘤细胞；以及
(e) 收集步骤(d)中鉴定出的三元杂交瘤细胞产生的抗体。

第一抗原、第二抗原可以是感兴趣的任意抗原。例如，第一、第二抗原可以分别选自多肽，蛋白，糖蛋白，碳水化合物，脂类，糖脂，细胞，病毒，细菌，真菌，朊病毒，以及寄生虫。抗原优选来自于一种微生物，如来自同一微
25 生物两种不同株的表面抗原。微生物优选是HIV，抗原优选是gp120。因此，第一、第二抗原可以是来自HIV不同株的gp120分子，特别是gp120分子的共同受体分子结合区。

本发明的另一方面是，提供了一种提高抗原体外免疫淋巴细胞效率的方法，包括：

- 30 (a) 准备一定数量的淋巴细胞群；

(b) 从所说的淋巴细胞群中去除CD8⁺和CD56⁺细胞；以及

(c) 在体外用抗原接触所说的淋巴细胞群。

CD8⁺和CD56⁺细胞可以用任何现有文献中记载的方法去除。例如，这些细胞可以用分别对CD8，CD56有特异性的抗体去除。在一个实施方案中，将这些抗体附在磁珠上。

本发明的进一步方面是，提供了由下述方法制备的细胞群，包括：

(a) 准备一些来自天然人类供体的淋巴细胞；

(b) 从所说的淋巴细胞中去除CD8⁺和CD56⁺细胞；以及

(c) 在体外用抗原接触步骤 (b) 获得的淋巴细胞，得到能够识别所述抗原的抗体产生细胞。

淋巴细胞可以由外周血单核细胞提供。淋巴细胞群可以进一步作为单一克隆进行稀释和培养，然后鉴定出产生目的抗体的克隆。因此，也提供了一种抗体产生细胞，通过在克隆培养条件下培养上述的细胞群，然后分离能够识别所述抗原的抗体产生克隆而制备得到。抗体产生细胞可以用EBV感染，或者与另一可融合细胞进行融合。优选地，细胞能长时间地持续产生抗体，例如在细胞培养中持续产生抗体至少约3, 6, 9, 12, 15, 18, 21或24个月。抗原优选是HIV抗原，更优选是源自gp120的抗原，最优选是gp120共同受体分子结合区的抗原。特别地，细胞能产生可识别至少两种不同HIV株gp120分子的抗体。

附图简述

图1

典型的LTC-gp120-IgG1k huMAb，与破伤风类毒素，人转铁蛋白，牛血清白蛋白，以及与来自HIV-1 III_B，MN株的天然重组gp120和10M尿素变性重组gp120的ELISA反应图。

图2

LTC-gp120-IgG1k与来源于gp120不同区位的合成肽，各种病毒亚型合成肽的ELISA反应图。

图3

LTC-gp120-IgG1k huMAb与HIV-1的抗体中和分析。以病毒逆转录酶 (RT) 活性的相对抑制百分数来表示抗体的中和程度。所用的HIV株为III_B株 (■) 和MN株 (○)。以人骨髓瘤蛋白 (△) 代替检测抗体，用作空白对照。

图4

竞争性ELISA分析显示了LTC-gp120-IgG1k与多肽V3B (III B) (■), V3B (MN) (○) 的反应性。多肽TT (△) 作为空白对照。在图A, 图B中, 将LTC-gp120-IgG1k与多肽gp120 (III B), gp120 (MN) 分别结合的ELISA平均值设定为100%。当竞争肽的浓度出现增加时, 与多肽gp120 (III B), gp120 (MN) 结合的抗体则逐渐减少。

发明详述

本发明提供了一种完全人源化抗体的制备方法, 该抗体能够识别预先确定的抗原而不需依赖已经接触过该抗原的人类供体。为了达到这个目的, 在体外将来自天然人类供体的淋巴细胞用感兴趣的抗原进行免疫, 然后鉴定、筛选出针对所述抗原的抗体产生细胞。由于淋巴细胞在体外而不是在体内免疫, 则可以调控被抗体识别的抗原或抗原片段。优选的抗原是HIV gp120蛋白, 特别是gp120共同受体分子结合位点。

如无其他说明, 在进一步详细说明本发明之前, 本申请中使用的术语定义如下。

“完全人源化抗体”是指只包含人类序列的抗体。抗体优选是单克隆抗体。

“天然人类供体(naive human donor)”是指从没有接触过特定抗原的人, 被用作提供免疫细胞或免疫因子的资源库。天然人类供体的血液中, 不含有可检测到的针对特定抗原的游离抗体。典型地, 天然人类供体应该是健康的、有规律的供体, 并且其HIV抗体筛选一直阴性。

用抗原“免疫”细胞或动物, 是指将细胞或动物与抗原接触。细胞或动物可以用细胞或动物与抗原接触的任何方式来免疫。

“异源骨髓瘤细胞系”是指两种不同骨髓瘤细胞融合而得到的细胞系。两种不同骨髓瘤细胞优选是人骨髓瘤细胞和鼠骨髓瘤细胞。异源骨髓瘤细胞系是现有技术已知的。例如, 美国专利No. 6,228,361, 以及Chin et al., 2001中记载了各种骨髓瘤细胞系的制备, 特点, 以及用途。

“三元杂交瘤细胞”是指细胞与异源骨髓瘤细胞的融合产物。

“可融合细胞(fusion partner)”是指为了有益目的, 能够将其与抗体产生细胞进行融合的细胞。典型地, 这种细胞融合将延长抗体的持续产生。因此,

如果抗体产生细胞没有与可融合细胞进行融合，那么在培养中它将会停止产生抗体。但是，抗体产生细胞与可融合细胞一旦融合，则可以筛选出在培养中持续产生抗体至少约3个月的融合细胞，优选持续产生抗体至少约6，9，12，18，24个月或更多。可融合细胞，包括但不限于骨髓瘤细胞，异源骨髓瘤细胞。

5 “治疗或改善”疾病或病情，是指减轻或消除疾病症状或病情，或者缓解疾病或病情。疾病或病情的减轻，优选是至少约10%，更优选是至少约20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，或90%。

“预防”疾病或病情，是指对未显示出疾病症状或病情的对象采取措施，以致治疗对象不生患病或患病程度较轻。

10 “有效量”是指，足够达到预期效果的有效量试剂。例如，对于用于治疗或缓解疾病的抗体来说，有效量是指抗体的量足够缓解或消除疾病症状，或者延缓疾病发生。

“样品”是指物质，材料或群体中有代表性的部分。例如，样品可以是水，污水，油，沙子，血液，生物组织，尿液，或粪便。

15 “生物样品”是指从某个生物对象中收集的样品，如动物，植物或微生物。

方法

本发明提供了一种完全人源化抗体的制备方法，它不需要免疫任何动物，包括人类。为了获得抗体，将来自天然人类供体的淋巴细胞在体外与特定抗原接触。然后，将免疫过的淋巴细胞在克隆条件下培养，鉴定出产生目的抗体的细胞克隆。为了使抗体的克隆与鉴定操作容易，免疫过的细胞可以选择性被EBV病毒感染。可选的或附加的，免疫过的淋巴细胞也可以与可融合细胞进行融合，特别是与异源骨髓瘤细胞系融合，以能够长期、稳定地产生抗体。

25 将HIV gp120的共同受体分子结合位点，用作示范本发明的抗原。因此，根据来自不同HIV亚型的gp120 V3环的序列来合成多肽（实施例1）。如上所述，gp120序列有高度的变异性。因此，需要制备出多种不同的多肽，包括来自A-H，J，K，O1-O4亚型的共有序列，以及来自B亚型两种不同分化株，即MN和III B株的共有序列（表1）。为了增强针对抗原的免疫应答，B亚型MN株的gp120 V3序列也可以与T细胞抗原表位序列相连接，而形成杂合抗原（表2）。

30 在体外将肽抗原加入来自天然人类供体的外周血单核细胞（PBMC），如

在实施例2中所描述的那样，需要进行两步免疫过程（Chin et al., 1995; Zafiroopoulos et al., 1997）。通常，将体外用于免疫的细胞用L-亮氨酸-L-亮氨酸甲酯（LeuLeuOMe）处理，以除去那些可抑制免疫的细胞。本申请的发明人确信，在细胞免疫之前去除来自PBMC中的CD8⁺和CD56⁺细胞，将提高体外免疫的效
5 率。因此，发明人比较了传统处理方法（LeuLeuOMe），与去除CD8⁺细胞，CD56⁺细胞，或者同时去除CD8⁺细胞和CD56⁺细胞方法之间的效果。的确，将CD8⁺细胞和CD56⁺细胞同时去除后，产生特异性抗体的细胞数量特别高（表3）。因此，优选是将CD8⁺细胞和CD56⁺细胞在免疫前从淋巴细胞中去除，也可选择性地结合用LeuLeuOMe方法进行处理。

10 在免疫后，筛选出产生特异性抗体的细胞。筛选步骤可以用现有技术中已知的任一方法进行，典型的是使用细胞免疫抗原通过酶联免疫吸附分析（ELISA）进行。实施例3中记载了一种可选择的方法，其中，用HIV的一个分化株，即B亚型MN株的共同受体分子结合区免疫淋巴细胞，再用HIV的另一分化株，即B亚型IIB株的共同受体分子结合区筛选上述免疫过的细胞。由此得到的
15 抗体可以识别两种毒株的gp120共同受体分子结合区。事实上除了有少数例外，获得的抗体几乎可以识别所有的表1中所列的V3共有序列肽。因此，本发明提供了一种广谱抗体，能够用于那些抗原多变性病原体的诊断和治疗。本发明进一步提供了一种完全人源化抗体的制备方法，它能够识别至少两种抗原，即第一抗原和第二抗原，包括用第一抗原与来自天然人类供体的一组淋巴细胞进行
20 接触，然后用第二抗原筛选抗体产生细胞的步骤。收集用上述方法鉴定出的细胞所产生的抗体，接着与第一抗原反应以验证它能够识别两种抗原。

更重要的是，虽然上述的抗体与来自MN株或IIB株的抗原都有特异性的反应，但是当抗原变性后，其反应性就会大大降低。这些结果显示，抗体能够识别这些抗原的共有空间构象表位，而不是某一抗原的线性序列。因此，本发
25 明也提供了一种对空间构象表位特异性的完全人源化抗体的制备方法，特别是对两种或多种抗原的共有空间构象表位特异性的完全人源化抗体的制备方法。

不进行细胞融合，可以将体外免疫的细胞用于构建抗体文库，然后从文库中筛选出感兴趣的抗体。因此在体外免疫后，抗体产生细胞可以用抗原进行鉴定（细胞在这时期可以选择性地被EBV病毒感染）。然后，用这些抗体产生细
30 胞构建出噬菌体展示文库，通过用抗原筛选文库就能鉴定出含有目标抗体片段

的噬菌体。构建噬菌体展示文库的方法在现有文献中是已知的（参见如，Dueñas et al., 1996）。

将一种抗原用于免疫细胞而将另一种抗原用于筛选抗体，这个方法特别地有用。例如，用第一抗原去免疫淋巴细胞，而用第二抗原与免疫过的细胞反应，就可鉴定出抗体产生细胞，然后用抗体产生细胞构建噬菌体展示文库。接着，用抗原筛选文库，鉴定出含有目标抗体片段的克隆。要使鉴定出的克隆能够识别更多的抗原，可以用第三抗原筛选噬菌体文库。任一能识别第三抗原的克隆，对第一，第二抗原是否具有特异性，则需要再用第一，第二抗原来鉴定。以此方式鉴定出的抗体片段，很可能通过结合它们的共有空间构象表位而能够识别所有的三种抗原。

本发明的另一方面是，提供了一种治疗病患者的治疗方法，包括给予患者本发明制备的抗体，其中抗体能够治疗或缓解疾病。类似地，抗体可以预防人们感染疾病。例如，这人属于疾病高风险人群，可能因遗传或其它先天因素，或者可能居住在微生物传染病的蔓延区，或者由于他或她的职业必须频繁地接触致病原。抗体在这方面使用是否有效，可以通过现有文献中已知的方法来确定。例如，可以将抗体对致病原或毒素的中和能力，用来表示其预防、治疗或缓解疾病的能力。优选地，使用的抗体量能够达到至少约50%的中和，更优选是至少约60%，70%，80%，或90%的中和，最优选至少约95%的中和。

优选地，疾病是肿瘤，或由微生物引起的传染病。肿瘤优选自下列的组：包括血液恶性肿瘤如淋巴瘤，白血病，骨髓瘤；癌症如腺癌，其原发部位在食道，肺，乳房，卵巢，肝脏，子宫内膜，子宫颈，结肠，胰腺，前列腺，胃，小肠，直肠，以及子宫；鳞状细胞癌，其原发部位在口腔，舌头，喉咙，食道，肺，皮肤，膀胱，子宫颈，眼睑，眼结膜，阴道等。其它可治疗的常见肿瘤，包括：肉细胞瘤，如纤维肉瘤，肌源性肉瘤；神经细胞瘤；黑色素瘤；滋养层细胞瘤，生殖细胞瘤；神经内分泌细胞瘤，神经外胚层细胞瘤。特别地，肿瘤选自下列的组，包括：转移性乳腺癌，非霍奇金淋巴瘤，慢性淋巴细胞白血病，急性骨髓白血病。

微生物优选是HIV。但是其它的人类慢性病毒传染病，如乙型肝炎病毒（HBV），丙型肝炎病毒（HCV），人嗜T淋巴细胞病毒-1和2（HTLV-1，HTLV-2），细小病毒，人疱疹病毒包括单纯疱疹病毒（HSV）1和2，Epstein Barr病毒（EBV

), 细胞肥大病毒 (CMV), 人乳头瘤病毒 (HPV), 带状疱疹病毒 (VZV), 以及人疱疹病毒6 (HHV-6), 都可以用本发明的抗体预防、治疗或者缓解。能在细胞内复制的其他病原感染例如致病原生体如锥形体, 疟疾, 弓形体; 细菌如分支杆菌, 沙门氏菌, 沙眼衣原体, 利斯特氏衣原体; 真菌如念珠菌, 也都
5 可以发展成为慢性疾病, 因此, 它们也是本发明抗体预防/治疗的理想候选物。

本发明也可应用于其它疾病, 包括: 例如毒素中毒。毒素包括微生物毒素和动物毒素, 如肠毒素, 外毒素, 内毒素, 胶霉毒素, 赭曲霉毒素, 黄曲霉毒素, 以及蛇毒。

本发明进一步提供了阻止HIV与人细胞结合的方法, 以及预防人类细胞被
10 HIV感染的方法, 包括将人细胞与用本发明方法制备的抗HIV抗体接触, 如将人细胞与实施例4中所描述的抗体接触。人细胞优选在人体内, 其中将有效量的抗体给予病人, 以阻止HIV与人细胞结合, 或防止人细胞被HIV感染。

本发明的抗体可以用现有技术中已知的任一合适的方法给药, 如通过血管, 粘膜, 静脉, 肌肉, 胃肠外, 皮下, 脊髓, 腹膜, 局部, 口腔, 直肠, 阴道,
15 鼻, 肺, 以及肿瘤内给药。

也提供了一种检测样品中HIV是否存在的方法, 包括将合适的样品与本发明的抗体接触, 以使抗体与样品中的HIV形成抗原-抗体复合物, 然后检测上述复合物是否存在, 由此检测出样品中是否含有HIV。具体地, 将人源化抗体用可检测的标记分子进行标记。用于本发明的合适样品体包括但不限于来自人类的
20 的生物流体, 如血液, 血清, 血浆, 尿液, 鼻粘膜液, 口腔粘膜液, 阴道粘膜液, 精液, 肛门粘膜液, 浆膜液。

组合物

本发明的另一方面是, 提供了包含用本发明方法制备的完全人源化抗体的组合物。优选地, 抗体以高亲和力结合抗原。优选的Kd值是约100 nM或更低
25 , 较优选是约30 nM或更低, 更优选是约10 nM或更低, 更优选是约3 nM或更低, 最优选是约1 nM或更低。特别地, 抗体能识别最少两种相关抗原, 如因遗传变异导致的微生物不同抗原, 或由等位基因编码的不同抗原。

本发明也包括含有一种或多种抗体作为活性成分, 与药学上可接受的载体或赋形剂组合的药用组合物。制备本发明的组合物, 活性成分/抗体通常与赋形剂混合, 被赋形剂稀释, 或者用胶囊, 小袋(sachet), 纸或其他容器形式封闭。
30

药学上可接受的赋形剂作为稀释剂，可以是固体，半固体，或液体，它是活性成分的载体或介质。因此，组合物可以是溶液（特别是消毒注射液），片剂，丸剂，粉剂，锭剂，袋剂，扁囊剂，芳香酞剂，混悬液，乳剂，糖浆，气溶胶（在固体或液体介质中），如含有抗体重量在10%以上的膏剂，软硬胶囊，栓剂，以及包装消毒的粉剂。

一些合适赋形剂的例子包括乳糖，葡萄糖，蔗糖，山梨醇，甘露醇，淀粉，阿拉伯胶，磷酸钙，藻酸盐，黄芪胶，凝胶，硅酸钙，微晶纤维素，聚乙烯吡咯烷酮，纤维素，无菌水，糖浆，以及甲基纤维素。另外，上述制剂还可包括：润滑剂如滑石粉，硬脂酸镁，矿物油；湿润剂；乳化剂和悬剂；防腐剂如甲基苯甲酸，羟丙基苯甲酸；甜味剂；以及矫味剂。用现有技术中已知的方法给予病人本发明的组合物制剂，它能够快速，持续，稳定地释放活性成分。

要制备固体组合物如片剂，可以将主要活性成分/抗体与药用赋形剂混合，形成本发明化合物混合均一的固体预制剂组合物。预制剂组合物是均一的，就是指活性成分平均分散在整个组合物中，以使组合物能快速地分成相等的有效单位剂量形式如片剂，丸剂和胶囊。

可以将本发明的片剂或丸剂包被或进行其他加工，以提供能延长给药效果的剂量形式。例如，片剂或丸剂可以包括内部剂量组分和外部剂量组分，外部剂量组分将内部剂量组分进行包被。两种组分可以用肠衣分离，肠衣可以保护药物在胃部不崩解而保护十二指肠不接触内部药物组分，或者延缓药物释放。有多种材料可以用于这样的肠衣或衣膜，如包括紫胶，正十六醇，醋酸纤维素在内的多种聚合酸以及它们的混合物。

本发明的新组合物混合成的液体形式可以口服给药或注射给药，包括水溶液（如PBS），可食用糖浆，水或油的混悬液，食用油乳剂如玉米油，棉籽油，芝麻油，可可油，花生油，以及酞酒及其类似药物载体。

可吸入或喷射的组合物，包括药学上可接受的溶液或悬液，水或有机溶剂或其混合物，以及粉剂（例如，参见美国专利Nos6,514,496和6,592,904）。液体或固体组合物可以包含合适的如本文中所述的药学上可接受的赋形剂。优选地，组合物以喷射或鼻吸的方式给药，以达到局部或系统给药。优选的药学上可接受的溶剂组合物，是能用惰性气体将其雾化的组合物。雾化溶液可以直接从雾化器吸入，或者可以从连接有面罩或间歇性正压呼吸机的雾化器吸入。溶液，

混悬液或粉剂，可以通过以合适方式输送药剂的装置给药，优选以口腔或鼻腔给药。

用在本发明方法中的另一优选的制剂是，利用能穿透皮肤给药的运输装置（“贴剂(patch)”）。这样的透过皮肤给药的贴剂，可以以可调节的量连续或不连续地输入本发明的抗体。运送药物的能穿透皮肤给药的贴剂的构建和使用，是现有技术中已知的。例如参见美国专利5,023,252，在此将其并入作为参考。这样的贴剂可以构建成以连续方式给药，脉冲给药，或者以需要运送的药物量给药。

其他的可用于本发明的合适剂型，可以在Remington's Pharmaceutical Sciences一书中找到。

本发明进一步提供了用本发明方法制备的细胞，特别是抗体产生细胞。因此，本发明提供了制备的一组细胞群，通过分离来自天然人类供体的PBMC，从PBMC中去除掉CD8⁺和CD56⁺细胞，再用特定抗原接触上述细胞而制备得到。本发明进一步提供了分离自上述细胞群的细胞，它能产生出识别特定抗原的抗体。细胞可以用EBV感染，或者可以与另一可融合细胞如骨髓瘤细胞系，异源骨髓瘤细胞系进行融合。这种细胞能够典型地在培养中产生抗体至少约3个月，更优选至少约6, 9, 12, 15, 18, 21, 24个月，最优选多于24个月。

优选地，细胞产生的抗体能够识别HIV抗原，特别是gp120肽，最好是能识别gp120肽的共同受体分子结合区。进一步地，优选的细胞产生抗体是，能够识别来自HIV的至少两种毒株，亚型或分化株的抗原。抗体优选是IgG抗体，特别是IgG1。

下面提供的实施例用于对本发明进行说明，但并不以任何方式解释为对本发明范围进行限制。

实施例

在下面的实施例中，下述的缩略语表示如下的意义。未加定义的缩略语使用其通常可接受的定义。

°C	=	摄氏度
hr	=	小时
min	=	分钟
sec	=	秒

μ M	=	微摩尔
mM	=	毫摩尔
M	=	摩尔
ml	=	毫升
μ l	=	微升
mg	=	毫克
μ g	=	微克
Mab	=	单克隆抗体
huMab	=	人单克隆抗体
DMEM	=	杜氏改进型伊格尔培养基
MEM	=	改进型伊格尔培养基
PBS	=	磷酸盐缓冲液
HANKS	=	汗氏平衡盐溶液
FBS	=	胎牛血清
HIV	=	人免疫缺陷病毒
HTLV	=	人T细胞白血病病毒
HCV	=	丙型肝炎病毒
HBsAg	=	乙型肝炎表面抗原
ALT	=	丙氨酸转氨酶
PBMC	=	外周血单核细胞
LeuLeuOMe	=	L-亮氨酰-L-亮氨酸甲基酯

材料与amp;方法

培养基

在本申请中使用的培养基，如果没有其他的说明，一般采用补加1×必需氨基酸（Life Technologies, Grand Island, NY），10% 胎牛血清（FBS; Life Technologies），50 mg/ml庆大霉素和卡那霉素（China Chemical & Pharmaceutical, Taipei, Taiwan）的RPMI-1640培养基（HyQTM, HyClone, Logan, UT）。

人外周血单核细胞的制备

来自健康血液供给者的血清细胞，对HIV-1/2，HTLV-I/II，HCV，HBsAg

筛选均呈阴性，并且其丙氨酸转移酶（ALT）水平值正常，是由中华血液服务基金会台南血液中心（Tainan, Taiwan）提供的。外周血单核细胞（PBMC）用Ficoll-Paque离心机（Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden）进行梯度密度离心（ $400\times g$ ）分离。接着，细胞用PBS洗涤两次，以 $100\times g$ 离心收集。

5 细胞的磁珠纯化

PBMC先用CD45RO MACS微磁珠（Miltenyi Biotec, Auburn CA）磁化标记，然后用VarioMACS仪（Miltenyi Biotec）对其进行分离。简单地说，细胞被超顺磁性的MACS微磁珠进行了特异性标记。磁化标记之后，细胞通过一个置于永久强磁场中的分离柱。可磁化的柱内基质用于产生一个高梯度的磁场。磁化标记的细胞将被保留在柱内，这样与流出柱外的未标记细胞得到了分离。将分离柱的磁场除去，则可以洗脱保留在柱内的细胞。将洗脱的CD45RO⁺细胞进行 $100\times g$ 离心而重新获得，可以立即使用。

CD45RO⁺ T细胞替换因子

CD45RO⁺ T细胞使用补加了 $1\times$ 非必需氨基酸，10% 人血清，50 mg/ml庆大霉素/卡那霉素，50 mM 2-巯基乙醇，10 mg/ml美洲商陆有丝分裂原的RPMI-1640培养基（PWM; Sigma Chemicals），以 2×10^6 个细胞/ml的细胞密度，在组织培养摇瓶中培养。经过24小时的温育，细胞以 $400\times g$ 离心分离而被去除。最后，CD45RO⁺ T细胞提取物，即培养细胞的上清液，可以通过将收集到的培养细胞上清液进行0.45 mm滤膜过滤而制备得到，再将其在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻保存。

20 细胞毒细胞从PBMC中的去除

将抑制体外免疫的细胞毒细胞去除，可以用L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯（LeuLeuOMe）处理，或者用细胞磁化去除。进行LeuLeuOMe处理，就是将250 mM L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯溴化氢（Sigma, St. Louis, MO）的水溶液加入到前述的PBMC(10^7 个细胞/ml)悬液中(Ohlin et al., 1989; Chin et al., 1994; Chin et al., 1995)。进行磁化去除，就是用连接有单克隆抗鼠CD8和CD56抗体的胶状超顺磁珠（Miltenyi Biotech），以在上述“细胞的磁珠纯化”一节中描述的方法进行操作即可。

体外免疫

PBMC，特别是去除细胞毒细胞的PBMC，在体外使用两次免疫的标准方法进行免疫。在含有10 nM肽抗原（TT-V3B(MN)），50 mM 2-巯基乙醇，10% 热

失活的人血清, 0.05 ng/ml rIL2(Calbiochem, San Diego, CA), 以及25% (v/v) T细胞提取物的培养基中温育细胞6天, 进行初次免疫。第7天, 收集初次免疫的细胞, 在Ficoll-Paque离心机上以40%速度离心。对细胞进行二次免疫, 将 3×10^7 个细胞在摇瓶里与肽抗原混合, 再加入5mg/ml CD40L, 静止过夜 (CD154; 5 Vinci-Biochem, Vinci, Italy)。在补加了5%人血清, 50 mM 2-巯基乙醇, 以及10 nM多肽抗原的培养基中将细胞培养3-5天。

用Epstein-Barr病毒 (EBV) 感染

将体外免疫过的细胞用EBV病毒感染。简单地说, 将 10^7 个淋巴细胞与1 ml包含EBV的上清液一起, 间歇震荡37°C温育2小时。含有EBV的上清液来自表达EBV的猴细胞系B95-8 (American Type Culture Collection, ATCC CRL 1612; 10 Dr. L. F. Shu友情提供, Tri Services General Hospital, Taipei)。感染后的细胞以 10^5 /孔, 与丝裂霉素 (Kyowa Hakko Kogyo, Toyoko, Japan) 处理过的作为饲养细胞的PBMC (10^4 /孔) 一起加入到96孔培养板中。

体细胞的电融合杂交

15 用先前描述的电融合进行体细胞的杂交 (Chin et al., 1994; Chin et al., 1995)。简单地说, 将淋巴样细胞与异源骨髓瘤细胞, 以2个异源骨髓瘤细胞 (Chin et al., 2001) 与1个人淋巴样细胞的比例, 在24孔组织培养板 (Nalge Nunc International, Roskilde, DK) 的等渗基质 (280 mM山梨醇, 0.5mM醋酸镁, 0.1mM醋酸钙, 以及1mg/ml BSA; pH 6.9-7.1) 中进行融合。用BTX Electro Cell 20 Manipulator Mode 200仪, 以38V (200 V/cm) 30秒, 接着三次285V (1500 V/cm) 15微秒脉冲, 进行细胞融合。融合后, 将细胞置于微皿中20-30分钟, 然后轻轻加入补充了10% FCS的培养基使其重新混悬。抗原特异性杂交瘤的筛选和克隆, 在Chin et al., 2001中有描述。

肽抗原与载体的连接

25 表1、表2中给出的合成肽, 是用作ELISA的分析抗原。将每一肽冻干, 用 Sulfo-MBS(Pierce, Rockford, IL)作为交联剂通过两步反应与BSA连接。首先, BSA用2 ml的蒸馏水溶解形成10 mg/ml的溶液。将200 μ l上述BSA溶液与100 μ l Sulfo-MBS溶液 (2 mg/ml) 在试管中混合, 室温下震荡1小时。将马来酰亚胺活化的BSA (约100 μ l) 经过Sephadex G-10柱纯化, 以除去过多的交联剂。然后 30 , 加入500 μ l在连接缓冲液 (4 mg/ml) 中的含巯基多肽, 将上述混合物在室温

下温育2小时。将反应产物进行透析，再冻干以进一步使用。将抗原-载体连接物（2 mg/ml）以100 μ l/孔加入到96孔微量滴定板中，滴定板4 $^{\circ}$ C温育过夜以固定抗原，准备进行ELISA。

酶联免疫放射分析（ELISA）

5 进行抗原特异性的ELISA，首先要用1 mg/ml杆状病毒表达的重组HIV-1 III_B或MN gp120（ImmunoDiagnostics, Woburn, MA），5 mg/ml人转铁蛋白（Sigma），10 mg/孔牛血清白蛋白（BSA; Sigma）或破伤风类毒素（ADImmune Corporation, Taichung, Taiwan）将微量滴定板在室温下包被过夜。用10 mM pH 8.0的磷酸钠缓冲液，将细胞培养上清液稀释到合适的浓度，磷酸钠缓冲液含有0.5M
10 的氯化钠和0.1%的Tween-20。将包被过夜的滴定板与稀释的细胞培养上清液温育，洗涤，再与过氧化物酶标记的抗人IgG和IgM（Zymed Laboratories, So. San Francisco, CA）的二抗温育，加入100 μ l的生色底物邻苯二胺（OPD）（Sigma）进行反应（15 min）。30 min后加入1M硫酸终止反应，测定490 nm处的吸光度值。

15 竞争性ELISA

huMAb的特异性可以用竞争性抑制ELISA分析。简单地说，将0.1-100 mM多肽抗原在稀释缓冲液中（0.5M氯化钠和0.1% Tween 20, pH8.0），与1 nM要测定的huMAb 4 $^{\circ}$ C温育过夜。将混合物转移至重组gp120包被过的ELISA滴定板。37 $^{\circ}$ C温育两小时，与滴定板结合的gp120特异性huMAb的量，可以通过用过
20 氧化酶标记的对人IgG（Zymed Laboratories, So. San Francisco, CA）特异性的羊二抗来测定。

HIV-1的中和反应

要测定的huMAb以20 μ l/孔，在96孔U形底板中（Nalge Nunc International）与40 μ l/孔的IL-2培养基质混合。如果需要，huMAb可以先进行稀释。然后，
25 将14 μ l的HIV-1 MN或III_B病毒（500-2500 TCID₅₀）加入至每孔，在37 $^{\circ}$ C温育1小时。接着，将100 μ l的PBMC（含有500,000种细胞）加入至每孔，37 $^{\circ}$ C温育过夜。将培养细胞接着用相同的基质洗涤三次，以除去基质中的病毒。在第4天（从加入PBMC开始计算），将25 μ l的细胞培养上清液转移至一个新的96孔板的相应孔，以通过非放射性分析的方法（RetroSysTM Innovagen AB, Lund,
30 Sweden）来测量逆转录酶（RT）的活性。与以huMAb同样方式稀释的空白对

照，即人骨髓瘤IgG1k（The Binding Site Limited, Birmingham, UK）相比，来计算RT酶活性的降低值。

实施例1

肽抗原的制备

5 相应于HIV-1 gp120 V3环的合成肽列于表1。

表1

合成肽		HIV-1 gp120 V3共同受体分子结合区合成肽的氨基酸序列																			
HIV-1株/亚型		氨基酸序列和序列对比																			
		N'	-	R	K	S	I	H	I	.	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	-	C'
V3 _{ALL} con	HIV-1 共有序列	N'	-	R	K	S	I	H	I	.	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	-	C'
V3 _A con	Subtype A共有序列	N'	-	-	-	V	R	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C'
V3 _B con	Subtype B共有序列	N'	-	-	-	-	-	-	-	.	-	-	-	R	-	-	-	T	-	-	C'
V3 _{BQ(MN)}	MN (B subtype)	N'	-	-	-	R	-	-	-	.	-	-	-	R	-	-	-	T	-	-	C'
V3 _{B(MB)}	IIIB (B subtype)	N'	-	-	-	-	R	-	Q	R	-	-	-	R	-	-	V	-	C'		
V3 _C con	Subtype C共有序列	N'	-	-	-	-	R	-	-	.	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C'
V3 _D con	Subtype D共有序列	N'	-	-	Q	-	T	-	-	.	-	-	-	-	-	L	-	-	-	-	C'
V3 _E con	Subtype E共有序列*	N'	-	-	T	-	-	T	-	.	-	-	-	-	V	-	-	R	-	-	C'
V3 _F con	Subtype F共有序列	N'	-	-	-	-	-	-	L	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C'
V3 _G con	Subtype G共有序列	N'	-	-	-	-	-	R	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C'
V3 _H con	Subtype H共有序列	N'	-	-	-	-	-	-	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C'
V3 _J con	Subtype J共有序列	N'	-	-	-	G	-	-	M	.	-	-	-	-	V	L	-	-	-	-	C'
V3 _K con	Subtype K共有序列	N'	-	-	-	-	-	-	-	.	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	C'
V3 _{O1} con	Subtype O1共有序列	N'	-	-	T	-	-	T	-	.	-	-	-	-	V	-	-	R	-	-	C'
V3 _{O2} con	Subtype O2共有序列	N'	-	-	-	-	V	R	-	.	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	C'
V3 _{O3} con	Subtype O3共有序列	N'	-	-	-	G	-	-	-	.	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	C'
V3 _{O4} con	Subtype O4共有序列	N'	-	-	-	-	V	-	-	.	-	-	-	-	T	W	-	-	-	-	C'

氨基酸残基和序列源自Los Alamos National Laboratory(Los Alamos, NM; 参见Korber et al.,2001), 除了亚型E共有序列*之一选自Shiino et al, 2000以外。小划线 (-) 表示与同列的顶部序列一致, 圆点 (.) 表示缺失。

HIV-1 gp120 V3环的衍生肽序列列于表2。例如，为了获得同时包含T细胞和B细胞表位的免疫原，可以将来自破伤风毒素830-844氨基酸（参见表2中的肽“TT”，SEQ ID NO: 20; Chin et al., 1994; Chin et al., 1995; Demotz et al., 1989）的“辅助者”序列，与HIV-1 MN株V3片段序列(表1中的肽“V3_{B(MN)}”，SEQ ID NO: 6)连接，形成TT-V3_{B(MN)}片段（表2，SEQ ID NO: 1）。

表2

来自HIV-1 gp120 V3环的合成肽的氨基酸序列		
合成肽	氨基酸序列	SEQ ID NO.
TT-V3 _{B(MN)}	N ^o -QYIKANSKFIGITELRKRIHIGPGRAFYTT-C ^o	1
V3-C4 _D con	N ^o -RQSTHIGPGQALYTTKDIIGDIRQAHCNISGAEWN-C ^o	18
V3-C4 _o con	N ^o -RTSITIGPGQVFYRTGDIIGDIRKAYCEINGTKWN-C ^o	19
TT	N ^o -QYIKANSKFIGITEL-C ^o	20

实施例2

CD8⁺和CD56⁺细胞群的去除致使抗原应答免疫细胞增加

因为细胞毒性或抑制性细胞群的去除，在体外抗原免疫应答的整体中，扮演着不可缺少的作用（Ohlin et al., 1989; 1992），在体外免疫研究中比较了各种用于去除细胞毒细胞试剂的效果。这些试剂包括LeuLeuOMe,细胞磁化去除中使用的抗CD8抗体，细胞磁化去除中使用的抗CD56抗体，以及细胞磁化去除中使用的抗CD8抗体与抗CD56抗体的组合。这样，外周血单核细胞（PBMC_s）用每一种试剂处理，或者不加任何试剂作为空白对照（nil）。测验了四位来自不同供体的PBMC。用“材料与方法”一节中描述的方法进行体外免疫，包括用肽抗原TT-V3B（MN）进行初次免疫和二次免疫。为了延长免疫细胞的存活周期，接着将细胞用上述的EBV病毒感染。各种试剂的处理效果，可以基于某个特定的参数来评估，例如，通过计数培养板中能分泌针对TT-V3B（MN）抗原特异性抗体的孔数来评估试剂的处理效果。

如表3所示，CD8或CD56细胞的去除，使体外特异性免疫刺激的效率有所增加。同时去除CD8和CD56细胞，特异性免疫刺激的效率更高。这种处理的效果，比用常规方法LeuLeuOMe的处理效果要好。不加处理（nil），则没有抗体产生。因此，这些结果显示，CD8或CD56细胞的去除，极大地提高了体外免疫应答的效率。

表3

供体	用TT-V3 _{B (MN)} 肽抗原体外刺激的特异性效率								
	有特异性抗体表达的孔数*								
	Nil	LeuLeuOMe	CD8 removal	CD56 removal	CD8 & CD56 removal				
A	0/47 (0%)	0/75 (0%)	1/70 (1.43%)	0/70 (0%)	5/75 (6.66%)				
B	0/47 (0%)	0/72 (0%)	0/77 (0%)	1/96 (1.04%)	2/96 (2.08%)				
C	0/47 (0%)	3/80 (3.75%)	3/76 (3.95%)	0/53 (0%)	3/77 (3.90%)				
D	0/47 (0%)	0/68 (0%)	0/81 (0%)	0/46 (0%)	2/52 (3.85%)				

特异性效率(specific efficiency)定义为:

$$\frac{\text{有特异性抗体产生的孔数}}{\text{EBV激活和体外免疫后有淋巴母细胞生长的孔数}}$$

5

*符合下列条件的含有淋巴母细胞的孔定义为产生特异性抗体的孔:

1. 针对重组gp120(III_B)的ELISA OD值至少是阳性对照的五倍
2. 反应系数 (RI) >2, 其中 $RI = \frac{OD_{gp120(III_B)} - OD_{培养基对照针对gp120(III_B)}}{OD_{BSA} - OD_{培养基对照针对BSA}}$

10

实施例3

能识别多种抗原的抗体的制备

在HIV治疗领域, 一个未解决的主要问题之一是, 如何开发出一种能中和多种HIV变异株的单一制剂。迄今为止报道的能识别HIV共同受体结合区的大多数抗体, 都是菌株特异性的。另一方面, 本发明提供了一种新的免疫方法, 它可以产生能识别HIV共同受体结合区构象表位的抗HIV抗体, 而且上述抗体能识别多种HIV毒株。上述方法也可用于制备能识别其他抗原/微生物的广谱抗体。

在此实施例中, 用一种HIV株的共同受体结合区免疫PBMC, 接着再用另一有不同共同受体结合区氨基酸序列的HIV-1株抗原进行ELISA筛选。因此, 基于HIV-1 MN株gp120氨基酸序列的合成肽TT_{V3B (MN)} (参见表2) 用于免疫, 而有不同一级结构的来自III_B株的重组gp120序列 (参见表1) 则用于筛选。

能产生可识别两种毒株gp120抗原的抗体产生细胞, 可以通过上述的免疫/筛选工艺获得。抗体可以用实施例4中描述的方法鉴定。

实施例4

稳定分泌人IgG1的特异性三元瘤细胞系的制备和鉴定

为了使上述实施例中描述的在体外产生的抗体产生细胞永久存活，以长期地生产抗体，可以将上述细胞与异源骨髓瘤细胞系融合。经过克隆与筛选，获得了稳定的（多于两年）人三元瘤细胞系。上述细胞系产生的单克隆抗体，命名为LTC-gp120-IgG1k。此人单克隆抗体是IgG1的同种型，带有 κ 轻链，产率为 $1\text{mg}/(10^6\text{细胞} \times 24\text{hr})$ 。图1显示了LTC-gp120-IgG1k的特异性。此抗体与gp120(III_B), gp120(MN)都有强烈反应，但是与不相关抗原如破伤风类毒素，转铁蛋白，BSA，仅仅只显示出背景的反应水平。而且，无论是与来自III_B还是与来自MN的变性gp120，抗体与之的反应性都有大大的降低。因为变性蛋白中只有线性表位可被识别，所以这些结果表明，LTC-gp120-IgG1k可以与在几种HIV-1株gp120中通常发现的空间构象表位反应。事实上，除了D亚型和O1亚型，此huMAb能识别所有表1中列出的HIV-1株的V3共有序列肽。而且，观察到的与D亚型和O1亚型肽抗原反应性的降低，可以通过加入gp120 C4区的片段肽逆转，这证实了huMAb结合的是gp120的共同受体结合位点。抗体的特异性，也可以用图4中显示的竞争性ELISA来得到证实。

LTC-gp120-IgG1k能以剂量依赖的方式，中和HIV-1 III_B和MN毒株。将病毒在能感染宿主细胞的条件下培养，在培养基质中加入上述抗体，以确定其抑制病毒活性的效果。测量病毒的逆转录酶活性，将其作为病毒的感染性指标。如图3所示， $0.38\ \mu\text{g/ml}$ 浓度的抗体中和了病毒逆转录酶90%的活性。因此，上述抗体将是有效的抗HIV感染的治疗或预防剂。

 序列表

<110> Chin, Li-Te

<120> 完全人源化抗体的制备

<130> 16863-002001

<140> US 10/622,003

<141> 2003-07-16

<160> 20

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 1

Gln	Tyr	Ile	Lys	Ala	Asn	Ser	Lys	Phe	Ile	Gly	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg
1			5					10						15	
Lys	Arg	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr		
			20					25					30		

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 2

Arg	Lys	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Tyr	Ala	Thr
1				5					10					15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 3

Arg	Lys	Ser	Val	Arg	Ile	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Tyr	Ala	Thr
1				5					10					15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 4

Arg	Lys	Ser	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 5

Arg	Lys	Arg	Ile	His	Ile	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Phe	Tyr	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 6

Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 7

Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 8

Arg Gln Ser Thr His Ile Gly Pro Gly Gln Ala Leu Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 9

Arg Thr Ser Ile Thr Ile Gly Pro Gly Gln Val Phe Tyr Arg Thr
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 10

Arg Lys Ser Ile His Leu Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 11

Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 12

Arg Lys Gly Ile His Met Gly Pro Gly Gln Val Leu Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<400> 13

Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 14

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有序列

<400> 14
 Arg Thr Ser Ile Thr Ile Gly Pro Gly Gln Val Phe Tyr Arg Thr
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有序列

<400> 15
 Arg Lys Ser Val Arg Ile Gly Pro Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有序列

<400> 16
 Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有序列

<400> 17

Arg Lys Ser Val His Ile Gly Pro Gly Gln Thr Trp Tyr Ala Thr
 1 5 10 15

<210> 18

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 18

Arg Gln Ser Thr His Ile Gly Pro Gly Gln Ala Leu Tyr Thr Thr Lys
 1 5 10 15
 Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala
 20 25 30
 Glu Trp Asn
 35

<210> 19

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 19

Arg Thr Ser Ile Thr Ile Gly Pro Gly Gln Val Phe Tyr Arg Thr Gly
 1 5 10 15
 Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Lys Ala Tyr Cys Glu Ile Asn Gly Thr
 20 25 30
 Lys Trp Asn
 35

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

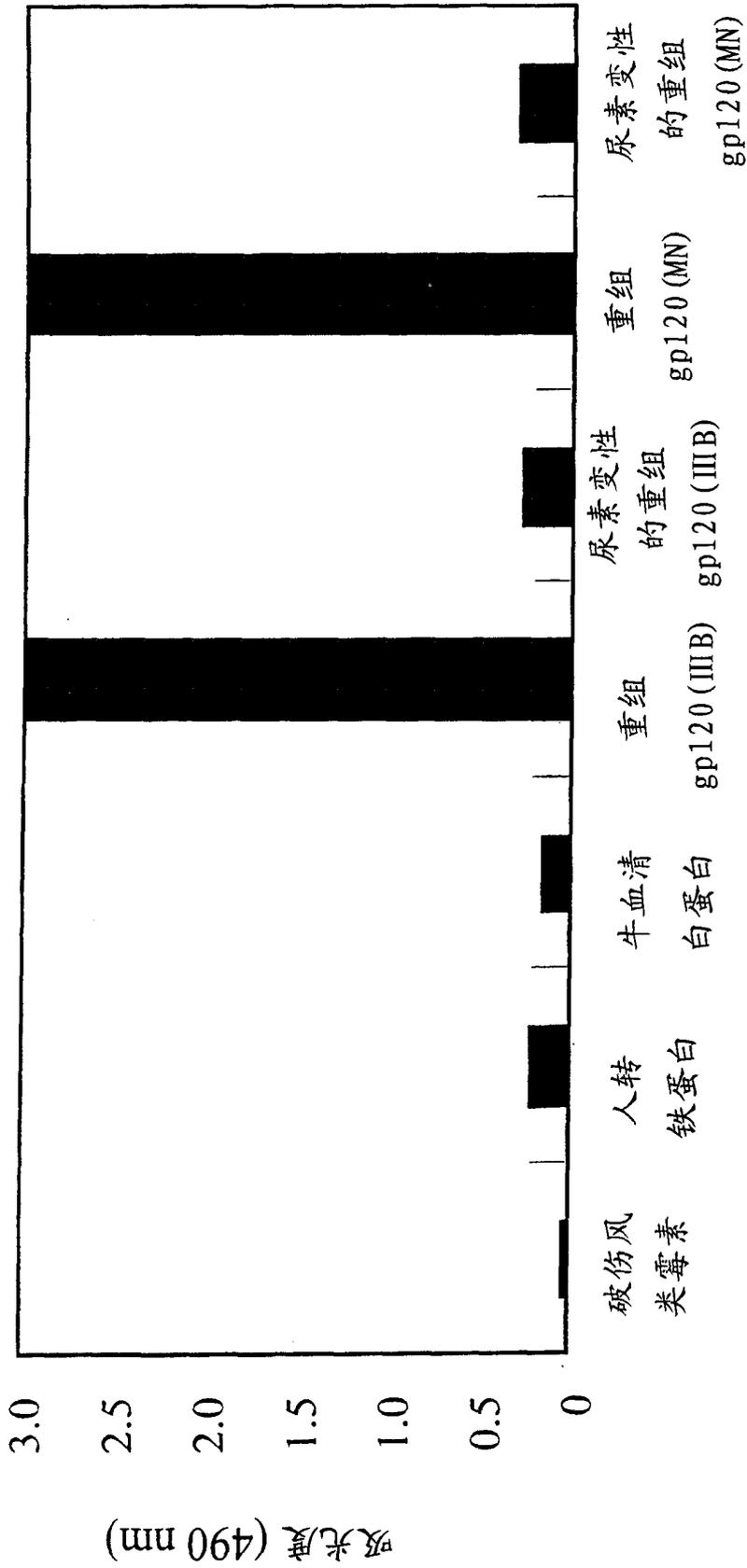
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

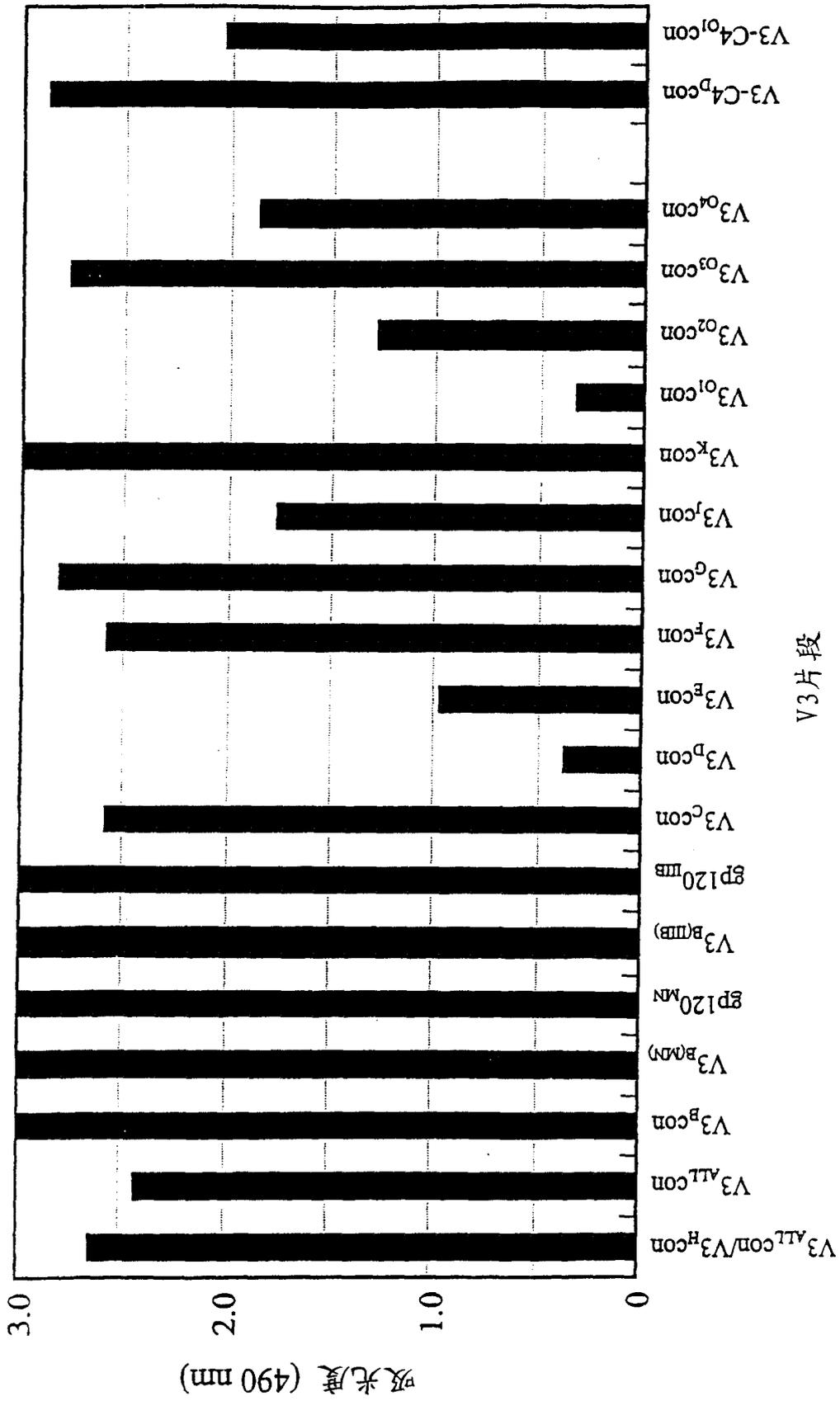
<400> 20

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15



固定化的抗原

图 1



V3片段

图 2

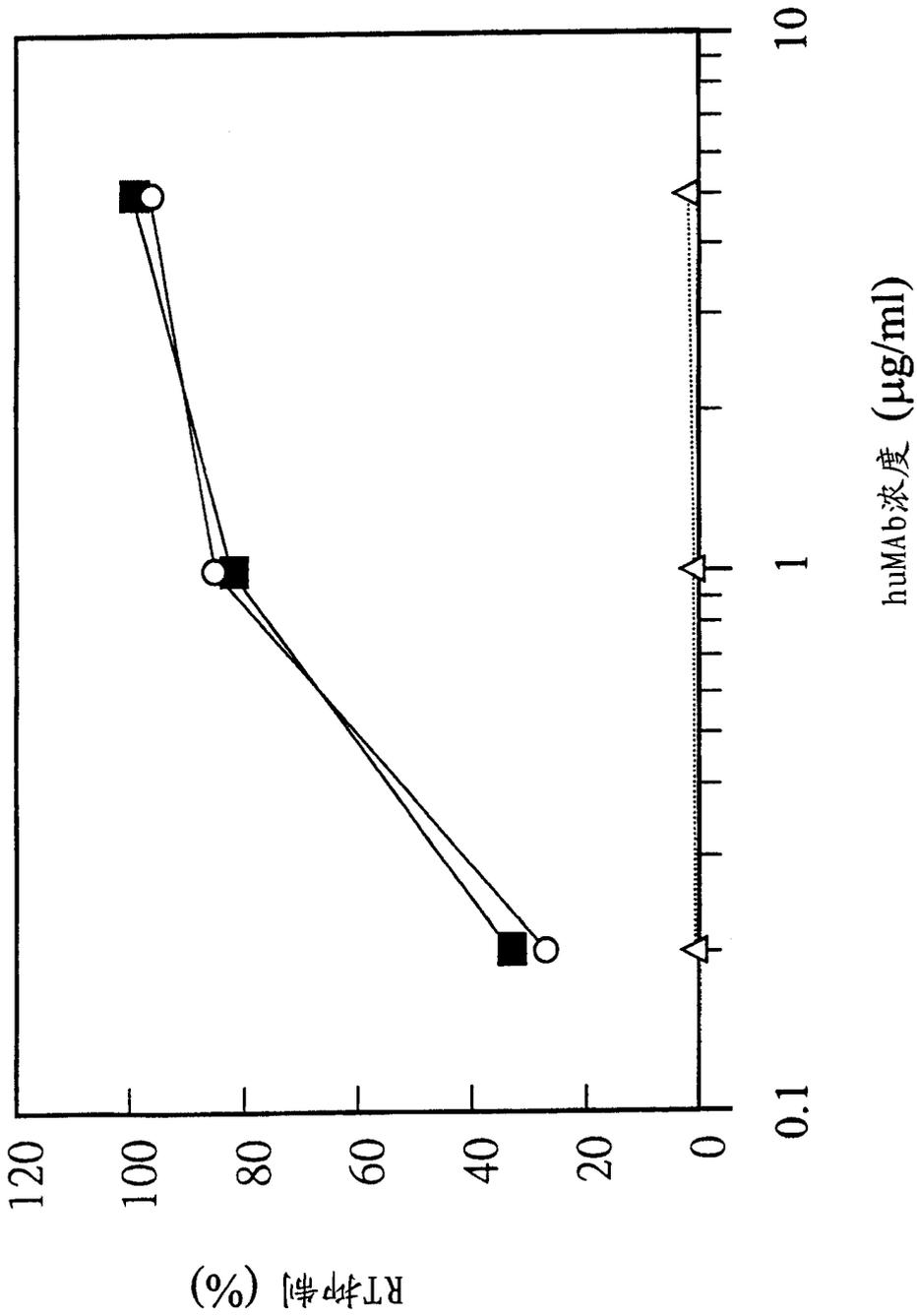


图 3

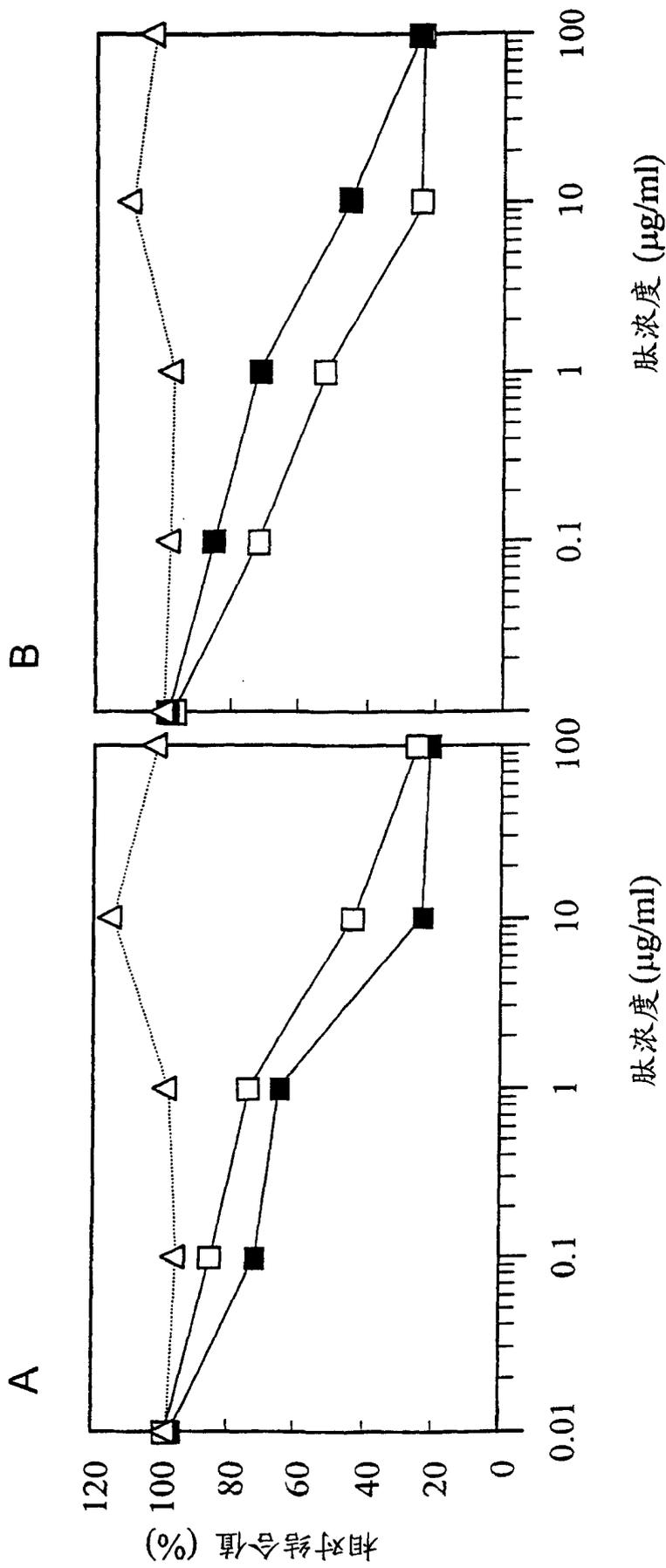


图 4