[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 16/18
C07K 16/08
C07K 19/00
C12N 5/00
C12N 15/63
A61K 39/42
A61K 39/39

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510053037.1

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1680447A

[22] 申请日 1996.6.6

[21] 申请号 200510053037.1

分案原申请号 96196163.5

[30] 优先权

[32] 1995. 6. 7 [33] US [31] 08/488376

[71] 申请人 生物基因 IDEC 公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 P·布拉姆斯 S·S·沙马特
L·-Z·潘 E·E·沃尔什
C·J·赫德 R·A·纽曼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王 玥

A61P 31/12 G01N 33/577

权利要求书 3 页 说明书 46 页 附图 17 页

[54] 发明名称 特异于呼吸道合胞病毒融合蛋白的高亲和性人单克隆抗体

[57] 摘要

本发明提供了生产人抗体，尤其是特异于 RSV 融合蛋白之人抗体的高效方法，所述方法包括在 SCID 小鼠中体外致敏人脾细胞，并且用抗原加强免疫。 此方法可产生以 IgG 同种型占优势的很高的人抗体滴度，所述抗体对所需抗原有高特异性和亲和性。 此方法很适于产生能用于治疗和诊断以及用于拯救人细胞以产生组合人抗体基因文库的人单克隆抗体。 本发明提供了两个人单克隆抗体，RF－1 和 RF－2 以及它们相应的氨基酸和 DNA 序列，RF－1 和 RF－2 对 RSVF－蛋白的亲和性各≤2×10^{-9}M，这些抗体可用作治疗和预防剂以治疗或预防 RSV 感染以及诊断分析物中的 RSV。

ISSN1008-4274

1.人单克隆抗体，所述抗体与RSV融合蛋白特异性地结合，并且对RSV F－蛋白的亲和性≤2×10^{-9}M。

2.权利要求1的人单克隆抗体，所述抗体可在体外中和RSV。

3.人单克隆抗体，所述抗体与RSV融合蛋白特异性地结合，并选自由RF－1，RF－2和含有RF－1或RF－2可变重链和轻链区的重组人单克隆抗体组成的组中。

4.权利要求3的人单克隆抗体，其中所述抗体是RF－1。

5.权利要求3的人单克隆抗体，其中所述抗体是RF－2。

6.权利要求3的人抗体，其中所说抗体是含有人γ1、人γ4或人γ4 PE恒定区的重组抗体。

7.被编码RF－1或RF－2重链和轻链可变区的DNA序列转染的真核细胞。

8.权利要求7的细胞，其中所述真核细胞是CHO细胞。

9.权利要求7的真核细胞，其中所述DNA序列选自图7a、7b、8a、8b、9a、9b、10a或10b中的任一个所列的DNA序列。

10.Epstein－Barr无限增殖化B细胞系，所述细胞系可分泌人单克隆抗体，所述抗体对RSV融合蛋白的亲和性≤2×10^{-9}M。

11.权利要求10的细胞系，其中所述抗体在体外中和RSV。

12.权利要求10的细胞系，其中所述细胞系选自RF－1和RF－2。

13.生产特异于RSV融合（F）蛋白的人抗体的方法，所述方法包括：

（i）在IL－2存在下体外致敏人脾细胞；

（ii）将所述经致敏的人脾细胞转移至SCID小鼠；

（iii）用RSV F－蛋白加强免疫所述SCID小鼠；

（iv）从所述SCID小鼠中分离可分泌特异于RSV F－蛋白的人单克隆抗体的人B细胞。

14.权利要求13的方法，其中所述经分离的人B细胞被无限增殖化。

15.权利要求14的方法，其中使用Epstein－Barr病毒（EBV）实现无限增殖化。

16.权利要求15的方法，其中使用小鼠胸腺瘤细胞系EL－4 B5作为饲养层克隆所述的EBV无限增殖化细胞。

17.权利要求13的方法，其中在IL－4或IL－6的存在下实现致敏步

骤。

18.编码 RF－1 或 RF－2 可变重链和/或可变轻链区的 DAN 序列。

19.可表达根据权利要求 18 之 DNA 序列的表达载体。

20.权利要求 18 的 NA 序列，所述 DNA 序列选自图 7a、7b、8a、8b、9a、9b、10a 或 10b 所列 DNA 序列。

21.在易感的或已感染 RSV 的人群中预防或治疗 RSV 感染的方法，所述方法包括施用预防或治疗有效量的一种或多种人单克隆抗体，所述抗体对 RSV F－蛋白的亲和性 $\leqslant 2\times10^{-9}$M，并可在体外中和 RSV。

22.权利要求 21 的方法，其中所述抗体选自 RF－1、RF－2 和含有 RF－1 或 RF－2 的可变重链和轻链区的重组人单克隆抗体。

23.权利要求 21 的方法，其中所述抗体通过注射或烟雾化的形式被施用。

24.权利要求 21 的方法，其中所述抗体与佐剂联合施用。

25.权利要求 24 的方法，其中所述佐剂是完全弗氏佐剂（CFA）、明矾或它们的联合。

26.适于预防或治疗易感或已感染 RSV 的人群中的 RSV 感染的药物组合物，所述药物组合物包括预防或治疗有效量的人单克隆抗体和药用可接受的载体，所述抗体可在体外中和 RSV，对 RSV F－蛋白的亲和性 $\leqslant 2\times10^{-9}$M。

27.权利要求 26 的药物组合物，其中所述人单克隆抗体选自 RF－1、RF－2 和含 RF－1 或 RF－2 可变重链和轻链区的重组人单克隆抗体。

28.检测分析物中 RSV 的存在的方法，所述方法包括在可形成 RSV F－蛋白抗体免疫复合物的条件下，将所述分析物与人单克隆抗体一起保温，所述单克隆抗体对 RSV F－蛋白的亲和性 $\leqslant 2\times10^{-9}$M;

检测所述 RSV F－蛋白抗体免疫复合物的存在以确定分析物中是否有 RSV 存在。

29.权利要求 28 的方法，其中所述抗体是 RF－1 或 RF－2。

30.权利要求 29 的方法，其中所述抗体直接或间接与报道分子结合。

31.权利要求 30 的方法，其中所述报道分子是可检测的酶或放射性核素。

32.权利要求 28 的方法，其中分析物含有得自呼吸组织的液体。

33.检测分析物中 RSV 的存在的检测试剂盒，其中包括:

（i）对 RSV F－蛋白的亲和性≤2×10^{-9}M 的人单克隆抗体；

（ii）直接或间接与所述人单克隆抗体结合的报道分子。

34.权利要求 33 的检测试剂盒，其中所述人单克隆抗体是 RF－1 或 RF－2。

特异于呼吸道合胞病毒融合蛋白的高亲和性人单克隆抗体

本申请是申请日为1996年6月6日，申请号为96196163.5，发明名称为“特异于呼吸道合胞病毒融合蛋白的高亲和性人单克隆抗体”的发明专利申请的分案申请。

发明背景

呼吸道合胞病毒（RSV）是肺病毒属的Parmixovirus，它常感染上下呼吸道，它的传染性很强以致于大多数两岁左右的孩子曾经被它感染，甚至实质上所有四岁左右的孩子已经对RSV有免疫力。

典型地，RSV感染是温和的，它局限于上呼吸道并引起与感冒类似的综合征，不需广泛的治疗。然而对某些受试者而言，如免疫受抑制的个体（如婴儿、老人）或患有潜在的心肺病的病人，此病毒可渗入下呼吸道，从而需要住院治疗以及支持器。在一些这种病例中，RSV感染可导致永久的肺部损害或甚至对生命造成威胁，仅在美国RSV就会导致每年约有90,000人次入院治疗，并导致约4500人死亡。

主要依据与吸附糖蛋白G有关的血清学差异将RSV划分为两个主要的毒株亚群A和B。在分离株之间主要的表面糖蛋白，即90KD的G蛋白在氨基酸水平上的差异超过50％，Johnson et al. Proc. Natl. Acad. Sci.（1987），84, 5625－5629。与之相反，不同RSV毒株的潜在治疗靶70KD融合（F）蛋白是高度保守的，即在氨基酸水平上约有89％相同，Johoson et al, J,Gen, Virol.（1988），69, 2623－2628。Johnson et al. J.Virol,（1987），10, 3163－3166，P.L. Collins, Plenum Press, NY（1991），103－162。而且已知抗特定型F－蛋白产生的抗体可以与其他型交叉反应。

F－蛋白是由线性前体产生的异二聚体，它分别由48和23KD的二硫键连接的片段组成，Walsh et al, J. Gen, Virol,（1985），66, 401－415。通过多克隆抗体抑制合胞体的形成与23KD片段的显著反应有关。

正如所指出的，尽管RSV感染通常是温和的，但在一些个体中RSV感染可能会威胁生命。最近通过服用抗病毒剂Ribavarin来治疗严重的RSV感染，然而，尽管Ribavarin对于控制RSV感染有一些效力，但它的使用因几个原因而受到冷遇，例如它很昂贵并且只有在医院才能施用。其他已知的RSV治疗法仅仅治疗RSV感染的综合征，包括给患

有气管炎的病人使用烟雾化的支气管扩张药，给患有支气管炎和RSV肺炎的病人使用皮质类固醇疗法。

迄今为止，欲加强抗病毒保护性抗体的RSV疫苗很不成功，例如，基于约25年前试验的福尔马林灭活的RSV的疫苗所诱导的抗体在融合抑制活性方面有缺陷， Murphy et al, Clinical Microbiology（1988）， 26, 1595 - 1597，有时甚至会加重病情。这可以解释为被福尔马林灭活的病毒不具备诱导保护性抗体的能力。当在疫苗受体中检测到高抗体滴度时，特殊的保护性滴度比对照群中的低，这可能是由于被福尔马林灭活的RSV不能显示产生保护性抗体所需的必需构象表位所致。

尽管目前还没有已知有效的RSV疫苗，但存在一些临床证据，即对于易感个体而言，抗体疗法可能会赋予抗RSV感染的保护作用，甚至可能会清除现存的RSV感染，例如，已有极道称新生儿严重气管炎的发生率低，假定这归功于保护性母体抗体的存在， Ogilvie et al, J. Med Virol（1981）， 7, 263 - 271。而且对再次感染有免疫力的孩子与被再次感染的那些孩子相比，在统计学上显示出较高的抗-F-蛋白滴度。另外，由高滴度RSV-免疫供体制备的静脉内免疫球蛋白（IVIG）可减少鼻内RSV的流出并可改善氧合作用。 Hemming et al, Anti. Viral Agents and Chemotherapy（1987）， 31, 1882 - 1886。最新的研究已暗示通过施用富含RSV的免疫球蛋白（RSVIG）可与病毒抵抗并防止肺的损害， Groothuis et al, The New England J. Med.（1993）， 329, 1524 - 1530， K.McIntosh. The New England J. Med.（1993）， 329, 1572 - 1573， J.R.Groothuis, Antiviral Research,（1994）， 23, 1 - 10， Siber et al. J. Infectious Diseases（1994）， 169, 1368 - 1373， Siber et al. J. Infectious Diseases（1992）， 165: 456 - 463。

类似地，一些动物研究暗示含病毒中和抗体的抗体疗法可赋予抗RSV的保护作用，或甚至可清除现存的RSV感染，例如，已报道体外中和的小鼠单克隆抗体可保护小鼠以抗感染，也可清除已确立的RSV感染， Taylor et al. J. Immunology,（1984）， 52， 137 - 142， Stott et al.，“Immune Responses, Virus Infections and Disease, I.R.L. Press,London（1989）， 85 - 104。而且在体外和体内RSV模型中

RSV F -蛋白的单克隆抗体显示出高的亲和性。 Tempest et al. Bio/Technology, (1991), 9, 266 - 271, Crowe et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1994), 91,1386 - 1390, Walsh et al Infection and Immunity, (1984), 43, 756 - 758, Barbas III, et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 89, 10164 - 10168, Walsh. et al., J Gen. Vitol. (1986), 67, 505 - 513。已报道在动物研究中低至520 - 2000μg/kg体重的抗体浓度可导致几乎立即恢复, Crowe et al. Proc, Natl. Acad, Sci. (1994), 91, 1386 - 1390。而且已公开这些单克隆抗体既可中和A株也可中和B株,包括实验室毒株和野生型毒株。或者通过注射, Croothuis et al. The New England J. Med. (1993), 329, 1524 - 1530, Siber et al., J. Infectious Diseases (1994), 169, 1368 - 1373 或者通过烟雾化 Crowe et al, Proc. Natl. Acad. Sci (1994), 91, 1386 - 1390 可施用这些抗体。

在以前的文献中已描述了两种不同类型的有潜在治疗作用的RSV F -蛋白单克隆抗体, 人源化的鼠抗体在 Tempest et al., Biol. Technology, (1991) 9, 266 - 271, 或真正的人抗体(Fab片段)在 Barbas III, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1992), 89, 10164 - 10168。通过将中和交叉毒株的鼠抗- F -蛋白抗体CDR移植到普通的人FC以及可变区部分的结构区域即可产生人源化的鼠抗体,通过组合文库技术可产生人Fab片段,所述技术使用了得自HIV阳性供体(免疫妥协的)的人骨髓细胞。人源化的和人的RSV抗体治疗的活体内滴度分别为5和2mg/kg体重。然而应注意人源化抗体是在合胞体抑制试验中被检测的, 而检测人抗- RSV Fab片段是为了测定它们的病毒中和活性, 因此有关人源化和人抗- RSV抗体的报道结果不能直接相比较。

据报道由组合文库技术产生的Fab片段在烟雾化的形式下是有效的, 这可能是由于相对小的分子大小。这些结果很能鼓舞人, 因为RSV疫苗的主要靶群体是婴儿, 因此烟雾剂是十分合乎需要的施用模式。

然而, 不抵制先前已公开的特异于RSV的人源化和人的Fab片段的有关报道, 仍然很需求是有改良的治疗潜力的改良的抗- RSV抗体, 尤其是对RSV F蛋白有高亲和性和特异性的抗- RSV抗体, 它能有效中和和预防RSV感染。

抗体疗法可被次分为两个主要的不同行为：（ i ）使用未受损的不经标记的抗体或经标记的抗体的被动免疫疗法和（ ii ）使用抗－独特型以重新建立自身免疫的网络平衡的主动免疫疗法。

在被动免疫疗法中，施用裸露的抗体以中和抗原或者将效应子功能导向被击靶的膜相关抗原。中和作用可以是中和淋巴因子，激素或敏毒素，即 C5a 。效应子功能包括补体的结合，巨噬细胞的激活和征集以及依赖抗体的细胞介导的细胞毒性（ ADCC ）。已经使用裸露的抗体来治疗白血病， Ritz et al., S. F. Blood , (1981), 58, 141 - 152 , 使用 GD2 的抗体来治疗成神经细胞瘤 Schulz et al, Cancer Res. (1984), 44 : 5914 和黑素瘤 Irie et al, Proc Natl. Acad. Sci. (1986), 83 : 8694 。最近在实验性试验中使用了具有高的抗－RSV 滴度的静脉内免疫γ球蛋白（ IVIG ）抗体以治疗由 RSV 感染引起的呼吸窘迫 Hemming et al, Anti. Viral Agents and Chemotherapy, (1987), 31, 1882 - 1886 , Groothuis et al., The New England J. Med. (1993), 329, 1524 - 1530 , K. McIntosh, The New England J. Med. (1993), 329 , 1572 - 1573 , J.R.Groothuis 、 Antiviral Research, (1994) , 23, 1 - 10 , Siber et al, J. Infectious Diseases (1994) , 169, 1368 - 1373 。

单克隆抗体的治疗效力取决于下列因素。包括例如与抗原结合之抗体的量，反应性，特异性和类别，抗体的体内半寿期也是值得注意的治疗因素。

可显著影响抗体治疗潜力的另一个因素是它们来源的种，最近，用于免疫疗法的单克隆抗体几乎全部来源于啮齿动物。 Schulz et al. Cancer Res, (1984) , 44 : 5914 , Miller et al, Blood (1981) 。 58, 78 - 86 , Lanzavecchia et al, J. Edp. Med. (1988) , 167 , 345 - 352 , Sikora et al, Br. Med. Bull. (1984) , 40 : 240 , Tsujisaki et al., Cancer Research (1991) , 51 : 2599 。这大半是由于啮齿动物单克隆抗体的产生使用了被详尽描述和高度有效的技术 Köhler et al, Nature, (1975), 256 : 495 , Galfre et al, Nature, (1977), 266 : 550 。然而尽管啮齿动物单克隆抗体具有治疗效力，但它们相对于人抗体而言却存在限制和不利之处，例如，它们经常诱导宿主效应子功能（如 CDCC , ADCC 等）的亚－最适刺激，鼠抗体也可诱导人抗－鼠

抗体（ HAMA ）反应， Schroff et al, Can, Res, （ 1985 ）， 45： 879 - 885， Shawler et al, J. Lmmunol （ 1985 ）， 135： 1530 - 1535。这可以导致抗体半寿期缩短， Dillman et al, Mod. （ 1986 ）， 5, 73 - 84， Miller et al, Blood, （ 1983 ）， 62： 988 - 995，在一些情况下会导致毒性副作用，如血清疾病和过敏症。

在一些受试者中，如免疫受重度抑制的受试者（如遭受大剂量化学物质或放射介导的癌症治疗的病人， Irie et al, Proc, Natl. Acad, Sci, （ 1986 ）， 83： 8694， Dillman et al, Mod, （ 1986 ）， 5, 73 - 84， Koprowski et al, Proc. Natl Acad. Sci,（ 1984 ）， 81： 216 - 219），鼠单克隆抗体的使用会导致受限制的消极副作用。与之相比，对于具有正常或超高活性免疫系统的病人，鼠抗体至少对某些疾病状态的效力受到限制。

在排除鼠单克隆抗体的局限性的努力中，已使用重组 DNA 技术产生嵌合的抗体， Morrison et al, Proc. Natl, Acad. Sci.（ 1984 ）， 81： 216 - 219， Boulianne et al, Nature, （ 1984 ）， 312, 644 - 646，通过“ CDR 移植”产生了人源化抗体， Riechmann et al, Nature （ 1984 ）， 332， 323 - 327，通过用其他氨基酸取代特异的表面残基以减轻或消除抗原性产生了“虚饰”抗体。

然而，尽管这种抗体在临床上已被成功地使用， Gillis et al, J.Immunol, Meth （ 1989 ）， 25： 191，但已证实这种抗体的制备很麻烦，这是由于有关最适抗原识别和亲和性需求的认识仍未被完全理解，人构架和小鼠的 CDR 区域在空间上也常常相互作用，给抗体活性造成消极影响，而且这种抗体有时仍会在病人体内诱导强烈的 HAMA 反应。

人抗体与它们的鼠同类物相比存在很多优点；它们诱导可任意选择的效应子功能，它们不诱导 HAMA 反应，宿主抗原－特异性的抗体可导致有治疗价值之表位的鉴定，所述表位因太稀少而不能被异种生殖的免疫系统识别， Lennox et al, “ Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine,” London： Academic Press （ 1982 ）。

尽管人抗体很合乎需要，但它们的生产因多种因素而变得复杂，包括伦理学上的考虑，以及常规下用于生产人抗体的方法经常无效这一事实，例如出于伦理学和安全性的考虑，一般不能用多数抗原充分

地免疫接种人受试者，结果，有关分离对特殊抗原是有有用的亲和性，≥ 10^8 摩尔的人单克隆抗体的报道非常少， McCabe et al, Cancer Research, （ 1988 ）， 48, 4348 - 4353 。经证实从供体致敏细胞中分离抗－病毒的人单克隆抗体也不方便，例如， Gorny 报道了 HIV 阳性供体的外周血单核细胞（ PMBC ）经 EBV 转化的 14329 个培养物中只稳定有 7 个可成为能产生的特异性抗－ HIV 抗体的细胞系， Gorny et al, Proc. Natl, Acad, Sci （ 1989 ）， 86： 1624 - 1628 。

迄今为止，从癌症患者的外周血淋巴细胞（ PBL ） Irie et al, Br. J. Cancer, （ 1981 ）， 44： 262 或肿瘤正在消退的淋巴结淋巴细胞 Schlom et al, Proc. Natl, Acad. Sci.（ 1980 ）， 77： 6841 - 6845， Cote et al, Proc. Natl. Acad. Sci, （ 1983 ）， 88： 2026 - 2030 中已生产出大多数人抗－肿瘤抗体。然而，这种抗体经常与细胞内的，因而在治疗上没什么用的抗原反应， Ho et al, In Hybridoma Technology, Amsterdam （ 1988 ）。 37 - 57 ，或者为 IgM 类， McCabe et al, Cancer Research （ 1988 ）， 48， 4348 - 4353 ，此类抗体与 IgG 相比，渗入实体肿瘤的能力较差，很少将这些人抗体搬到临床试验中， Probyski et al, R.C. Transplantation （ 1991 ）， 51, 1190 - 1196 ，这暗示着被获救的抗体可能具有亚－最适的特性，而且即然这些方法利用了试验供体致敏的 B 细胞，那么显然这些细胞不是有用的单克隆抗体获救的最佳来源。

最近，通过用 CD40 刺激以导致人 B 细胞的扩展 Banchereau et al, F. Science （ 1991 ）， 251： 70， Zhang et al, J. Immunol. （ 1990 ）， 144， 2955 - 2960， Tohma et al, J. Immunol （ 1991 ）， 146： 2544 - 2552 ，或通过额外的体外加强步骤引发无限增殖化 Chaudhuri et al, Cancer Supplement （ 1994 ）， 73, 1098 - 1104 已经改善了由致敏供体产生人抗体。此原理已被用于使致敏供体的细胞对巨细胞病毒， Epstein - Barr 病毒（ EBV ）和流感嗜血杆菌（ Hemophilus influenza ）产生人单克隆抗体（ 42 - 44 ），而且产量明显高于用其他方法得到的产量（ 32 ）。

另外，为了论述供体致敏的限制，已报道了健康供体淋巴细胞的体内免疫和培养，使用致敏供体的 PBL 细胞的来自于人（ ex homine ）的加强作用产生人单克隆抗体取得的一些成功已有报道， Maeda et al,

Hybridoma（1986），5：33－41，Kozbor et al, J. Immunol,（1984），14：23，Duchosal et al, Nature.（1992），355：258－262。1967年Mishell和Dutton使用鼠淋巴细胞首次阐明了体外免疫的可行性Mishell et al, J. Exp. Med（1967），126：423－442，1973年，Hoffman成功地免疫了人淋巴细胞Hoffman et al, Nature（1973），243：408－410。也已报道了外周血（Luzzati et al, J. Exp. Med,（1975），144：573－585，Misiti et al, J. Exp. Med.（1981），154：1069－1084，Komatsu et al, Int, Archs . Allergy Appl. Immunol.（1986），80：431－434，Ohlin et al, C.A.K.Immunology（1989），68：325（1989）），扁桃腺（Strike et al, J. Immunol,（1978），132：1789－1803）和脾[后者得自外伤（Ho et al. In Hybridoma Technology, Amsterdam（1988），37－57，Boerner et al. J. Immunol.（1991），147：86－95，Ho et al. J. Immunol.（1985），135：3831－3838，Wasserman et al, J. Immunol. Meth.（1986），93：275－283，Wasserman et al. J. Immunol Meth,（1986），93：275－283，Brams et al, Hum.Antibod. Hybridomas（1993），4, 47－56，Brams et al, Hum. Antibod. Hydribomas（1993），4, 57－65）和原发性血小板减少性紫癜（ITP）患者（Boerner et al, J. Immunol.（1991），147：86－95，Brams et al, Hum, Antibod, Hybridomas（1993）4，47－56，Brams et al, Hum, Antibod. Hybridomas（1993），4，57－65，McRoberts et al, "*In Vitro* Immunization in Hybridoma Technology",Elsevier, Amsterdam（1988），267－275，Lu et al, P. Hybridoma（1993），12, 381－389）]的淋巴细胞成功的初次免疫接种。

体外免疫接种显现出相当多的优点，如易于再现的免疫接种，利用适当的培养和操作技术将其自身很容易地提供给抗体类操作。Chaudhuri et al, Cancer Supplement（1994），73，1098－1104，也有证据表明在IVI过程中对自身抗原的体内耐受性较少见Boerner et al, J. Immunol,（1991），147：86－95，Brams et al, J. Immunol, Methods（1987），98：11。因此，此技术有望可用于产生自身抗原的抗体，所述自身抗原如肿瘤标记物和涉及自身免疫的受体。

几个研究小组已报道了对多种仅在体外攻击的抗原，如肿瘤相关

抗原（TAA）之反应的产生Boerner et al, J, Immunol, （1991）, 147: 86 - 95, Borrebaeck et al, Proc Natl. Acad. Sci（1988）, 85: 3995。然而不幸的是所得抗体典型地为IgM而非IgG亚类, McCabe et al, Cancer Research（1988）, 48, 4348 - 4353, Koda et al, Hum. Antibod, Hybridomas,（1990）, 1: 15，仅在有关使用经免疫之供体的淋巴细胞的方案中报道了再次（IgG）应答。因此，显然这些方案仅仅成功地诱导了初次免疫应答，但需要供体经免疫的细胞产生回忆应答。

已经开展的研究系统地分析了培养和免疫接种的变化，以开发出一种一般性的方案，能有效地在体外诱导人单克隆抗体 Boerner. J. Immunol.（1991）147: 86 - 95, Brams et al. Hum Antibod Hybridomas（1993）, 4, 47 - 56, Lu et al, Hybridoma（1993）, 12, 381 - 389。这已经导致经原初人脾细胞的IVI诱导，特异于铁蛋白之人单克隆抗体的分离 Boerner et al, J. Immunol,（1991）, 147: 86 - 95。此项研究还导致了一个方案，通过它可在体外从头开始完整地诱导再次（IgG）应答 Brams et al, Hum, Antibod, Hybridomas（1993）, 4, 57 - 65。

然而，尽管IVI有很大的潜在优势，但由于免疫细胞在培养容器内以单层生长这一事实使得这种方法的效力受到严重限制。与之相比，在免疫应答的活性期，脾脏中发现了具有三维结构的体内生发中心，这些三维结构含有被激活的T - 和B - 细胞，所述细胞被抗原 - 呈递细胞包围，大多数免疫学家相信所述抗原呈递细胞可比得上B - 细胞抗原 - 特异性激活的位点。

天然脾脏环境的替代物是在免疫妥协的动物宿主，如“重度联合免疫缺损”（SCID）小鼠体内“再造”或模拟脾脏的条件。人淋巴细胞易于被SCID小鼠过继（hu - SCID）并产生高水平的免疫球蛋白 Mosier et al, Nature（1988）, 335: 256, McCune et al, L, Science（1988）, 241, 1632 - 1639。而且，如果用于重建的供体已被暴露于特殊的抗原，在这种小鼠体内会产生对相同抗原强烈的再次应答，例如，Duchosal等人, Douchosal et al, Nature（1992）, 355: 258 - 262报道了得自17年前被破伤风类毒素接种之供体的人外周血B - 细胞在SCID环境中可再次被刺激以产生较高的血清水平，即10^4

左右。他们进一步公开了使用λ和M13噬菌体组合文库法 Huse et al, R. A.Science （ 1989 ）， 246： 1275 克隆和表达得自经提取的人细胞的两个人抗－ TT 抗体的基因。此抗体被报道的抗原亲和性范围为 10^8 － 10^9/M，然而此方案需要供体致敏细胞且产量非常低，从 370,000 个克隆的文库中仅能得到 2 个克隆。

因此，以前 hu － SPL － SCID 小鼠仅被用于产生针对抗原的人单克隆抗体，其中供体或者已被有效地自然致敏或者已被免疫接种 Stähli et al, Methods in Enzymology （ 1983 ）， 92， 26 － 36，大多数情况下均涉及暴露于病毒或细菌抗原。使用 hu － SCID 动物模型被报道的血清滴度水平显著低于通过免疫接种正常小鼠典型获得的血清滴度水平。

另外，已描述了两种方案，通过它们在 hu － SCID 小鼠中使用原初人淋巴细胞诱导了初次抗体应答之后还可诱导再次抗体应答。然而，这两种方案的使用实质上受到了限制，在第一个方案中，在 hu － SCID 小鼠中诱导了初次应答，其中已知被手术移植了人胎儿的肝脏，胸腺和淋巴结，然而此方法受到胎儿组织有限的可用性以及该方案繁杂的外科方法学的很大的限制 McCune et al, L. Science （ 1988 ）， 241， 1632 － 1639、在第二个方案中，用 T －和 B －细胞描述的人骨髓和 SCID 小鼠骨髓细胞重建了经致死剂量放射的正常小鼠 Lubin et al, Science,（ 1991 ）， 252： 427。然而此方法是不利的，因为它需要四个月的保温期，而且两种方案的结果产生了很低的抗体滴度，即 10^8 以下。

Carlson 等人 Carlsson et al, J. Immunol, （ 1992 ）， 148： 1065 － 1071 于 1992 年描述的方法使用了得自被抗原（破伤风类毒素）致敏的供体的 PBMC 。在转移至 SCID 小鼠之前的简短体外培养和致敏期，细胞首先要被耗尽巨噬细胞和 NK 细胞，然后用抗原加强免疫 hu － SPL － SCID 小鼠，据报道此方法可导致在 hu － SPL － SCID 血清中平均的 TT 特异性人 IgG 滴度≈ 10^4，还有报道称大于 5×10^5。

人单克隆抗体的产生进一步典型地需要无限增殖化 B －细胞的产生以得到的可分泌所需人单克隆抗体连续不断的理想的永久来源的细胞。 B －细胞的无限增殖化一般通过下列四种方法中的一种来实现：（ i ）用 EBV 转化，（ ii ）小鼠－人异源融合，（ iii ） EBV 转化，

接着再异源融合，和（iv）组合免疫球蛋白基因文库技术。

在大量报道中成功使用了EBV转化，主要是用于产生抗-HIV抗体，Gorny, et al, Proc. Natl, Acad. Sci.（1989），86：1624-1628，Posner, et al, J. Immunol,（1991），146：4325-32。主要的优点在于每200个B-细胞中约有个被转化，然而，被EBV转化的细胞典型地是不稳定的，产生了少量主要的IgM抗体，克隆少得可怜，培养几个月之后停止制备抗体。异源融合 Carrol,et al, J. Immunol, Meth,（1986），89：61-72典型地利于产生可分泌高水平IgG抗体的杂交瘤，通过有限稀释易于克隆杂交瘤，然而不利之处是产量低，即每20,000个淋巴细胞≤1个杂交瘤 Boerner. et al, J. Immunol,（1991），147：86-95，Ohlin, et al, C,A,K.Immunology（1989），68：325，Xiu-mei et al, Hum. Antibod, Hybridomas（1990），1：42，Borrebaeck. C.A.K. Abstract at the "Second International Conference" on "Human Antibodies and Hybridomas," April 26-28，1992，Cambridge, England. 联合EBV转化接着再异源融合有两个优点：（i）经EBV转化之后人B-细胞更易于融合伙伴融合，和（ii）产生更稳定，更高产的杂交瘤。Ohlin,et al, Immunology,（1989），68：325，Xiu-mei, et al, Hum, Antibod, Hybridomas（1990），1：42，Borrebaeck C.A.K. Absract at the "Second International Conference" on "Human Antibodies and Hybridomas" April 26-28，1992，Cambridge, England.最后一个技术，即组合免疫球蛋白基因文库技术的优点是利用M13 Fab表达技术可筛选出很大的文库 Huse, et al, Science（1989），246：1275，William Huse, Antibody Engineering:A Practical Guide, Borrebaeck C.A.K..ed 5:103-120，基因易于被转移到生产细胞系中这一事实，然而，产量典型地非常低，大约每370,000克隆中有1个 Duchosal, et al, Nature（1992），355：258-262。

因此，基于上述内容，生产人单克隆抗体，尤其是特异于RSV之抗体的更有效的方法将会很有利，这一点是显而易见的，而且，比那些最近使用的具有更高结合亲和性，特异性和效应子功能的特异于RSV F-蛋白的人抗体也是很合乎需要的，这一点也是显而易见的。

本发明的目的

本发明的目的是提供产生特异于所需抗原的高滴度的人抗体的改良方法。

本发明更具体的目的是提供产生高滴度人抗体的新的方法，所述方法包括（ i ）在体外用抗原致敏原初人脾细胞，（ ii ）将在体外被抗原致敏的脾细胞转移至免疫妥协的供体，如 SCID 小鼠，和（ iii ）用抗原加强免疫。

本发明另一个具体的目的是提供产生特异于呼吸道合胞病毒（ RSV ），尤其是 RSV 融合（ F ）蛋白的人单克隆抗体的改良方法。

本发明的另一个目的是提供产生 EBV 无限增殖化 B - 细胞的改良方法，所述方法利于形成分泌 IgG 占优势的 EBV 无限增殖化的 B - 细胞。

本发明更具体的目的是提供产生分泌 IgG 占优势的 EBV 无限增殖化的人 B - 细胞的改良方法，此方法包括:

（ i ）在体外用抗原致敏原初人脾细胞;

（ ii ）将这种在体外用抗原致敏的原初脾细胞转移至免疫妥协的动物供体内，如 SCID 小鼠;

（ iii ）用抗原加强免疫免疫妥协的动物供体如 SCID 小鼠;

（ iv ）从被抗原加强免疫的免疫妥协供体如 SCID 小鼠中分离产生人抗体的 B - 细胞;

（ v ）用 EBV 转化所述经分离的产生人抗体的 B - 细胞。

本发明的另一个目的是提供含有 EBV 转化的得自 SCID 小鼠的人 B 细胞的新组合物，所述人 B 细胞分泌人 IgG 占优势。

本发明更具体的目的是提供含有 EBV 转化的人 B 细胞的新组合物，所述人 B 细胞分泌人 IgG 占优势，并且是由包括以下步骤的方法产生的:

（ i ）在体外用抗原致敏原初人脾细胞;

（ ii ）将这种在体外用抗原致敏的原初脾细胞转移至免疫妥协的动物供体内，如 SCID 小鼠;

（ iii ）用抗原加强免疫免疫妥协的动物供体如 SCID 小鼠;

（ iv ）从被抗原加强免疫的免疫妥协供体如 SCID 小鼠中分离产生人抗体的 B - 细胞;

（ v ）用 EBV 转化所述经分离的产生人抗体的 B - 细胞。

本发明另一个具体的目的是产生可中和 RSV 的人单克隆抗体，所述抗体与 RSV F - 蛋白的亲和性 $\leqslant 2 \times 10^{-9}$M 。

本发明另一个目的是提供 EBV 无限增殖化细胞系，所述细胞系可

分泌能中和 RSV 的人 IgG 单克隆抗体，所述抗体与 RSV F - 抗原的亲和性≤ 2×10^{9}M。

本发明更具体的目的是提供两个 EBV 无限增殖化细胞系， RF - 2 和 RF - 1，它们分别分泌的人单克隆抗体也被称作 RF - 2 和 RF - 1，所述抗体在体内可中和 RSV，每种抗体对 RSV F - 蛋白的亲和性≤ 2×10^{-9}M。

本发明的另一个目的是用编码 RF - 1 和 RF - 2 重链和轻链可变区的 DNA 序列转染真核细胞以产生可分泌含 RF - 1 或 RF - 2 可变区的人抗体的转染子。

本发明的更具体的目的是提供经转染的 CHO 细胞，所述细胞可表达 RF - 1 或 RF - 2 重链和轻链可变区。

本发明的另一个目的是通过施用治疗或预防有效量的特异于 RSV F - 蛋白的可中和 RSV 的人单克隆抗体以治疗或预防人类 RSV 感染，所述抗体对 RSV F - 蛋白的 Kd ≤ 2×10^{-9}M。

本发明更具体的目的是通过施用治疗或预防有效量的在经转染的真核细胞中表达的 RF - 1 或 RF - 2 或人单克隆抗体以治疗或预防人类 RSV 感染，所述真核细胞含有并表达 RF - 1 或 RF - 2 的可变重链和轻链区。

本发明的另一个目的是提供治疗或预防 RSV 感染的疫苗，所述疫苗含有治疗或预防有效量的特异于 RSV F - 蛋白，对 RSV F - 蛋白的 Kd ≤ 2×10^{-9}M 的人单克隆抗体，和药用可接受的载体或赋形剂的联合，所述抗体可在体外中和 RSV。

本发明更具体的目的是提供治疗或预防 RSV 感染的疫苗，所述疫苗含有治疗或预防有效量的得自经转染的真核细胞的 RF - 1 和 RF - 2 或人单克隆抗体和药用可接受的载体和赋形剂的联合，所述真核细胞含有和表达编码 RF - 1 或 RF - 2 可变重链和轻链区的 DNA 序列。

本发明的另一个目的是提供通过使用对 RSV 融合（ F ）蛋白的亲和性≤ 2×10^{-9}M 的人单克隆抗体检测分析物，如呼吸道中的液体中 RSV 的存在以诊断 RSV 感染的方法。

本发明的另一个目的是提供用于检测 RSV 感染的新的免疫探针和检测试剂盒，它包括特异于 RSV F - 蛋白的人单克隆抗体，所述抗体对 RSV F 蛋白的亲和性≤ 2×10^{-9}M，其抗体直接或间接地与适当的报道分子，如酶或放射性核素结合。 在优选的实施方案中，这些人单克隆抗体可含有真核细胞，如 CHO 细胞产生的 RF - 1 或 RF - 2 或重组人单克隆抗体，所述细胞被 RF - 1 或 RF - 2 的可变重链和轻链区转染。

发明简述

本发明最宽的实施方案涉及制备所需抗原之人抗体，尤其是涉及预防，治疗或检测人类疾病状态之抗原的人抗体的新方法。这些方法包括在体外用抗原致敏原初人脾细胞，将所得的在体外经抗原致敏的脾细胞转移至免疫妥协的供体，如SCID小鼠，并用抗原加强免疫所述免疫妥协的供体。

本发明也涉及产生利于生产可分泌IgG之细胞的Epstein－Barr病毒（EBV）无限增殖化的B－细胞的方法，所述方法包括：在体外用抗原致敏原初人脾细胞；将所得的在体外经抗原致敏的脾细胞转移至免疫妥协的供体，如SCID小鼠；并用抗原加强免疫免疫妥协的供体；从被抗原加强免疫的免疫妥协供体，如SCID小鼠中分离可分泌人抗体，尤其是可分泌IgG的B－细胞；用EBV转化所述的经分离的可分泌人抗体的细胞。

本发明更具体地涉及制备RSV，尤其是RSV融合（F）蛋白的人抗体的改良方法以及这些方法产生的人单克隆抗体，所述抗体对RSV F－蛋白有高亲和性，也可中和RSV感染。优选通过下列步骤实现此方法，即在体外用I1－2和任选地用RSV F－蛋白致敏原初人脾细胞；将所得的在体外被致敏的脾细胞转移至免疫妥协的供体，如SCID小鼠中，并用RSV F－蛋白加强免疫以产生可分泌中和性抗－RSV F－蛋白人抗体的人B－细胞，所述抗体对RSV F－蛋白具有高亲和性，即$\leqslant 2 \times 10^{-9}$M。

优选使所得B－细胞无限增殖化以便提供人抗－RBV F－蛋白单克隆抗体的连续不断的稳定来源。在优选的实施方案中，从被抗原加强免疫的SCID小鼠中分离B－细胞，并用EBV病毒转化此细胞以产生经EBV转化的分泌人IgG占优势的人B－细胞。

然后克隆这些细胞以选择被EBV转化的可分泌对RSV F－蛋白具有高亲和性，即$\leqslant 10^{-7}$和优选$\leqslant 2 \times 10^{-9}$M的人单克隆抗体的细胞系。

本发明也涉及这种抗－RSV F－蛋白人单克隆抗体作为治疗和/或预防以及诊断剂的用途。正如上文所提及的，本发明方法可导致人单克隆抗体的产生，所述抗体对RSV F－蛋白具有高亲和性，即对RSV F－蛋白的Kd $\leqslant 2 \times 10^{-9}$M，所述抗体在体外也可中和RSV。

因此，由于RSV F－蛋白是不同RSV分离株之间高度保守的表面蛋白这一事实的存在，这些抗体理想的适于用作预防和治疗剂以预防或治疗RSV感染。假定本发明的人单克隆抗体对RSV F－蛋白有高亲和性和特异性，它们也可被用来诊断RSV感染。

本发明更具体地提供了两个特殊的针对RSV F－蛋白的人单克隆抗体，即RF－1和RF－2以及由它们衍生的重组人抗体，所述抗体优选在CHO细胞中产生，所述细胞已被编码RF－1或RF－2可变重链或轻链区的DNA序列转染。这些抗体作为治疗或预防RSV感染的预防和/或治疗剂特别有用。而且这些抗体作为诊断剂是有用的，因为它们以高亲和性与RSV F－蛋白结合，即它们对RSV F－蛋白的亲和性各≤ 2×10^{-9}。它们用作治疗剂特别有用，因为它们对RSV F－蛋白有高亲和力和特异性，它们在体外能有效中和RSV感染。

附图简述

图1显示了用抗－F蛋白hu－SPL－SCID血清免疫印迹F蛋白，在SDS－PAGE中电泳原始（A）和变性的（B）F蛋白并通过Western印迹转移至硝酸纤维素上。硝酸纤维素条与阳性对照小鼠抗－F蛋白MAb反应（泳道1A和1B），与阴性对照hu－SPL－SCID血清抗－TT反应（泳道2A和2B），和来自小鼠#6（泳道3A和3B），#3（泳道4A和4B）和#4（泳道5A和5B）的hu－SPL－SCID抗－F蛋白血清反应。

图2显示了用hu－SPL－SCID血清抗－F蛋白使HEP－2细胞发免疫荧光，未被感染（左）和被RSV感染的HEP－2细胞与加强免疫后15天取出的以1：50稀释的hu－SPL－SCID小鼠#6的血清反应，结合表现为GAH IgG－FITC。

图3表示纯化的RF－1和RF－2与结合于塑料板上经亲和纯化的RSV F－蛋白的反应性，也记录了作为参照的人抗－RSV血清LN的反应性。ELISA板被50ng的RSV F－蛋白包被。

图4表示纯化自肿瘤细胞上清液的RF－1（泳道2）和RF－2（泳道3）人MAb的IEF。IEF在pH梯度为3－10下进行，泳道1表示pi标准。

图5表示HEP－2细胞和被RSV感染的HEP－2细胞（1×10^{6}，与不同量的RF－1一起保温，随后与FITC－标记的GAH IgG一起

保温）的间接免疫荧光流式细胞计量试验，整个群相对平均强度被记录下来。

图6表示用于表达人抗体的NEDSPLA载体，CMV = 巨细胞病毒启动子，EBTA = 小鼠β珠蛋白主要的启动子，BGH = 牛生长激素聚腺苷酸化信号，SVO = SV40复制起点，N1 = 新霉素磷酸转移酶外显子1，N2 = 新霉素磷酸转移酶外显子2，LIGHT = 人免疫球蛋白Kappa恒定区，HEAVY = 人免疫球蛋白γ1或γ4 PE恒定区，L = 前导序列，SV = SV40聚腺苷酸化区域。

图7a表示RF－1可变轻链区的氨基酸和核酸序列

图7b表示RF－1可变重链区的氨基酸和核酸序列。

图8a表示RF－2可变轻链区的氨基酸和核酸序列。

图8b表示RF－2可变重链区的氨基酸和核酸序列。

图9a表示RF－1轻链，前导序列和人Kappa恒定区序列的氨基酸和核酸序列。

图9b表示RF－1重链，前导序列和人γ/恒定区序列的氨基酸和核酸序列。

图9c表示人恒定区序列。

图10表示被称为NSKE1的NEOSPLA载体，它含有图9a－9c所列的RF－1核酸序列和人γ/恒定区。

图11a表示RF－2轻链，前导序列和人Kappa恒定区的氨基酸核酸序列。

图11b表示RF－2重链，前导序列和人γ/恒定区的氨基酸和核酸序列。

图11c表示人γ/恒定区的氨基酸和核酸序列。

图12图解表示了被称为NSKG1的NEOPLA表达载体，它含有图11a－11c所示的RF－2核酸序列和人γ/恒定区序列。

发明详述

如上文所讨论的，本发明提供了产生抗所需抗原，优选为人类疾病状态所涉及的抗原的人单克隆抗体的新的高效方法。人类疾病状态所涉及的抗原典型地为含有适当的抗体治疗靶的表面抗原，例如它包括病毒的表面蛋白以及人类癌细胞表面表达的抗原，在优选的实施方案中，表面抗原包括RSV的融合蛋白（F－蛋白）。

人类疾病状态包括例如病毒感染，如RSV，乳头状瘤病毒，肝炎病毒，ALDS等，癌症，细菌感染，酵母菌感染，寄生虫感染，如疟疾等。实质上人类疾病状态欲包含通过施用特异于特殊抗原的人单克隆抗体可潜在地预防或治疗的任何人类疾病状态。

产生人单克隆抗体的本发明的方法实质上涉及体外致敏原初人脾细胞，将这些脾细胞转移至免疫妥协的供体，即SCID小鼠中，接着用抗原加强免疫已经施用了所述脾细胞的SCID小鼠。令人惊奇地是发现了产生人抗体的这两个已知方法的联合会导致协同的结果，具体地说，导致对免疫抗原的抗原特异性反应大大增强，IgG同种型人单克隆抗体的滴度很高，更具体地说，已发现这种联合导致前所未有的高的再次应答：hu－SPL－SCID血清中的人IgG反应比那些将原初细胞转移至SCID得到的要高10倍，特异性的抗体反应增加1000倍。已发现所得抗体的高亲和性和特异性可以与实验用高活性的免疫动物产生的抗体相比。也已发现当使用原初脾细胞时，为了得到这种出乎意料的结果，必须既在体外又在导入所得hu－SPL－SCID小鼠之后用抗原攻击，优选但不是必需在用抗原加强免疫前的瞬间将额外的新鲜的未致敏脾细胞导入hu－SPL－SCID供体中，已发现这可以导致抗体反应的进一步增强。

在由原初人脾细胞产生再次应答的最适体外初次和加强免疫方案已经公开之后（Brams et al，Hum. Antibod. Hybridomas（1993），4，57－65），本发明得以有所进展。已发现此方案（Brams et al，Hum. Antibod. Hybridomas（1993），4，57－65）所提供的抗原特异性IgG反应约比由经受一次抗原攻击的培养物得到的高2－10倍。使用很不相同的抗原可使这种体外免疫接种（IVI）方案得以开发和最优化，所述抗原即为：马铁蛋白（HoF），钙调蛋白，前列腺特异性抗原（PSA），小鼠IgG，运铁蛋白，与依赖T－细胞的蛋白载体结合的匙孔血蓝蛋白（KLH）二硝基苯基（DNP）以及RSV融合（F）蛋白。

实质上此方案涉及在以抗原和自身脾细胞的比率为1：1开始培养1天后再次刺激脾细胞培养物。已阐明使用此方案测得的IgG反应是重复暴露于抗原的结果，与再次应答相当。

这些实验进一步阐明未受损伤的脾脏是淋巴细胞的最佳来源，包

括愈伤的和 ITP 脾脏。与之形成对照的是经证实外周血淋巴细胞（ PBL ）和扁桃体或淋巴结的细胞不适宜诱导抗原特异性反应。而且，除去或中和任何细胞成分会导致低劣的反应（ Boerner et al， J. Lmmunol.（ 1991 ）， 147： 86 - 95 ）。这些实验也表明对于特定脾细胞制品和抗原，存在唯一最适的抗原浓度。

因此，已经建立了最适的体外初次和加强免疫方案以由原初人脾细胞产生再次应答；已设想出将此方案与以前的体内方法联合起来试验以产生人单克隆抗体，即 SCID 小鼠。在试验前，不知道什么影响（如果有的话为被抗原致敏的脾细胞的施用）会施加于由 SCID 小鼠最终产生的抗特定抗原的人单克隆抗体或者人淋巴细胞在 SCID 小鼠体内维持的能力，然而我们希望能使在体外被抗原致敏的原初脾细胞的抗原加强免疫和表达增强。

在这点上，以前有人报道人淋巴细胞可在 SCID 中建立自身并在其中存活几个月（ McCune et al， Science（ 1988 ）， 241， 1632 - 1639， Lubin et al， Science（ 1991 ） 252： 427 ）。而且如上文所提及，使用 SCID 或针对抗原的人单克隆抗体的前述方法已使用了先前或自然地或通过免疫接种暴露于抗原之供体的细胞，该方法典型地不会产生高的人抗体滴度。

十分令人惊奇地是，已发现在 hu - SCID 模型中，用于使人原初脾细胞产生再次应答的体外初次和加强免疫方案的联合会导致协同的结果（ Brams et al， Hum. Antibod. Hybridomas（ 1993 ）， 4， 57 - 65 ），这一点已由对免疫抗原的高度显著的抗原特异性 IgG 反应所证实。

已进一步发现这些方法的联合（使用马铁蛋白（ HOF ）作为模式抗原）：

（ i ）在转移至 SCID 之前引入体外免疫接种步骤对于可靠地诱导显著抗原特异性反应是必需的；

（ ii ）必须将人细胞转移至腹膜内以在 SCID 小鼠体内非强制性地维持人脾细胞；

（ iii ）最适的体外培养约为 3 天；

（ iv ）在体外使用 IL - 2 和任选使用 IL - 4 或 IL - 6 会在 hu - SPL - SCID 体内导致抗原特异性反应的最高抗体滴度；

（v）优选使用在佐剂，如弗氏完全佐剂（FCA）和/或明矾中乳化的抗原加强免疫 hu - SPL - SCID 小鼠；

（vi）令人奇怪地是无论是鼠源或人源的 NK 细胞的杀伤或中和对抗体的产生都没什么益处，然而已发现将 SCID - 米色小鼠（NK 地位较低的系）用作体外致敏细胞的宿主，当使用佐剂的联合，即 FCA 和明矾来实现加强免疫时可提供较强的应答。

（vii）约 1/3 hu - SPL - SCID 小鼠的脾脏，而不是淋巴结比正常的 SCID 胀大了 25 倍，而且在这种脾脏中有多至 2/3 的细胞被检测到正常的人淋巴细胞膜标记物。

更具体地说，本发明的方法包括用抗原在体外致敏原初人脾细胞约 1 - 10 天，优选约 3 天，将经致敏的细胞转移至 SCID 小鼠，随后用抗原加强免疫此小鼠，随后意味着约 3 - 14 天后，优选约 7 天后。已阐明从约第 24 天之前，所得 hu - SPL - SCID 小鼠的血清中就出现了高的抗原特异性 IgG 反应。典型地，使用首次用于实验的抗原马铁蛋白时，血清终点稀释滴度约为 10^6（在约为 50 mg IgG/ml 时最大反应的一半），当用病毒抗原即 RSV 的融合蛋白诱导回忆应答时，血清终点稀释滴度约为 10^7（在约为 50mg IgG/ml 时最大反应的一半），根据这些结果我们希望使用其他抗原也能得到类似的反应。

如上文所提及，在 hu - SPL - SCID 小鼠中所需抗体反应的最佳诱导需要既在体外也在体内用抗原攻击人细胞，还发现在体外致敏过程中 IL - 2 是必需的，而 IL - 4 和 IL - 6 与 IL - 2 相伴施用会进一步增强 hu - SPL - SCID 小鼠的反应，而且，SCID 的重建被促进了，但它不依靠相伴随的腹膜内施用经照射的同种异型淋巴细胞。

已进一步发现一个脾脏与另一个脾脏之间抗体反应有显著差异，例如一些脾脏需要在第 10 天相伴施用抗原和新鲜的自身脾细胞以产生抗原特异性抗体反应。也已发现在不同的 hu - SPL - SCID 小鼠中抗体反应的水平也有某种程度上的差异，然而基于本申请的教导，本领域的技术人员会容易选择适当的条件以对特定抗原产生最适抗原特异性抗体反应。

例如，通过检测几个不同的脾脏制品在培养物中产生特异性抗体的能力（例如体外免疫接种 10 天后），即可鉴定出最强的反应者。而且，既然从每个脾脏中已制备和冷冻了大量细胞，就可以从选定的脾

脏中建立一套为期3天的新的体外免疫接种方案，随后再转移至SCID小鼠中。与之形成对照的是假定从单次转移的一个供体中可回收的PBL的量完全受限制其他细胞材料，如外周血细胞不适宜这种最优化。

如上文所提及的，与以前的报道形成对比的是已发现对于本方法而言，当使用外周血细胞时，中和人NK活性对于脾脏没什么影响，而且，用结合补体的抗-唾液酸GMI抗体中和SCID NK细胞会减小抗原特异性IgG反应。与之相比，使用一株NK细胞水平降低的SCID/米色小鼠与使用正常SCID相比，不会提供显著增加的抗原特异性IgG反应。

另外，还比较了两种免疫接种途径（静脉内（IV）和腹膜内（IP））所提供的SCID小鼠重建的能力，即脾细胞在其中维持并产生人抗体的能力。已发现腹膜是细胞转移和免疫接种的最佳场所，而且迄今为止，当在小鼠血清中检测到大于0.01 μg/ml的人IgG时，从未发现静脉内转移细胞会产生重新进入的群体。

也已发现所得IgG的浓度与被转移的人细胞数目直接相关，例如，当腹膜内注射5 × 10^6个体外致敏脾细胞时，SCID重新进入的群体为92 %，当腹膜内注射5 × 10^7个体外致敏脾细胞时，SCID重新进入的群体实质上为100 %。根据本申请的教导本领域技术人员可选择最适当数目的体外致敏脾细胞供注射用，通常约为10^4 - 10^8个细胞，更优选约10^6 - 10^8个细胞，最优选至少约为10^7 - 10^8个细胞。

也已发现特殊佐剂的存在会影响抗体反应，更具体地说据观察当使用被完全弗氏佐剂（CFA）或CFA和明矾的联合乳化的抗原加强免疫hu - SPL - SCID小鼠时可得到最大的人抗体反应。对被铁蛋白加强免疫的hu - SPL - SCID的试验表明CFA是比明矾更好的佐剂，它们各自产生了33 mg和13 mg/ml人IgG。CFA和明矾的联合不能改善SCID中的反应，然而，在SCID/米色 - hu（此小鼠含有能导致NK细胞活性降低的突变）中使用这些佐剂与仅使用CFA相比，其IgG的产量增加了8 - 10倍。然而，希望其他佐剂或它们的联合也可产生类似的或甚至更强的结果。同时使用完全弗氏佐剂和明矾的最高的人IgG总浓度约为10 mg/ml，特异性的最高IgG浓度约为500μg/ml单克隆抗体等价物。

使用包括铁蛋白的此方法产生了在特异性，反应性和 Ig 链同种型的使用方面与得自高免疫力山羊、兔和猪的可以相比的多克隆抗体反应。hu - SPL - SCID 血清抗体大多数为 IgG，它仅与铁蛋白含量高的组织的细胞结合，而不与铁蛋白含量低或不含铁蛋白的组织的细胞结合，在 Western 印迹中既能被天然的铁蛋白识别，也能被变性的铁蛋白识别，这些结果在抗体浓度和所得人抗体的抗原特异性方面都十分出乎意料，而且使用不同的抗原得到了类似的结果。

注射后发现人细胞趋向于在两处积累，即腹膜和小鼠脾脏。尽管在血液中发现的人细胞不超过约 7 %，但淋巴结和肝脏为人抗原，在一些动物肿胀的脾脏和偶发的肿瘤中有 25 % - 33 % 的细胞来源于人。在肿胀的脾脏中这些人细胞几乎全是 B 和 T - 细胞，有少量 $CD14^+$ 细胞，主要为单核细胞。

通过流式细胞计量术研究脾脏，淋巴结，肝脏和腹膜来测定这些结果。在那些人脾细胞重新进入脾脏的情况下，发现脾脏经常肿胀，比原初 SCID 的脾脏大 25 倍。提取后立即测量，脾脏中人细胞构成了总细胞数的约 30 %，剩下的不知其来源。然而培养 3 天后，由于细胞与抗体结合并未表现出与小鼠淋巴细胞的交叉反应性，故所发现的大多数存活细胞来源于人。

进一步观察到经重构的小鼠可被分为两组，即具有正常大小脾脏的那些和具有肿大脾脏的那些。具有肿胀脾脏，即 25 倍于正常大小的脾脏的 Hu - SPL - SCID 小鼠所具有的人 IgG 水平约比具有正常脾脏的那些小鼠高 150 倍，在经类似处理的具有正常大小的脾脏上述小鼠中，抗原特异性人 IgG 约高 10,000 倍。也已发现在反应始末抗原特异性反应的相对亲和性有所增加，这表明较高百分比的总免疫球蛋白库由具有较好结合特性的抗体组成，这些结果表明系统是由抗原驱动的。

这些结果非常有意义，且表明了一般应该可以从 hu - SPL - SCID 中拯救人细胞，并将之用于产生组合人抗体基因文库，从而得到能用于临床和/或诊断的高亲和性和特异性的人单克隆抗体。

更具体地说，本发明提供了抗 RSV F - 蛋白的新的人单克隆抗体，所述抗体对 RSV F - 蛋白具有高亲和性，即 $\leqslant 2 \times 10^{-9}$M 蛋白质，所述人单克隆抗体能在体外中和 RSV。本发明进一步提供了制备这种

抗 RSV F - 蛋白人单克隆抗体的方法。

通常按下述生产这种人抗体，即在体外用 RSV F - 蛋白免疫接种原初人脾细胞，将这种在体外经免疫接种的人脾细胞转移至免疫妥协的动物供体，即 SCID 小鼠中，用 RSV F - 蛋白加强免疫所述动物，从中分离人 B 细胞，所述细胞分泌抗 RSV F - 蛋白的人单克隆抗体，免疫接种所述人 B 细胞，克隆所述经免疫的 B 细胞并选择能分泌对 RSV F - 蛋白具有高亲和性（优选至少 10^{-7}M，更优选≤ 2×10^{-9}M）的人单克隆抗体的细胞。

如上文所讨论的，已发现体外免疫接种，尤其是人脾细胞的联合相对于在 SCID 小鼠中制备人抗体的常规方法可提供显著的优点，上述联合即为先前已经或未曾暴露于 RSV F - 抗原并转移至免疫妥协的动物供体，即 SCID 小鼠中，随后用 RSV F - 蛋白抗原加强免疫所述供体。也就是上述联合可提供很高的抗体滴度，即最高的抗 - F 蛋白滴度约为 10^{-7}，还可提供高 IgG 浓度，即对于最强的反应者而言约为 3mg/ml 。而且此方法考虑到产生具有高度有利的特性组合的人抗体，即所述抗体既对 RSV F - 蛋白有高亲和性，又显示出显著的体外中和活性。

在实施例中将要更详细地描述本发明人已分离了两个人单克隆抗体，RF - 1，当通过胞质基因组共振测定时，RF - 1 显示出对 F - 蛋白的亲和性常数 Ka，Ka = 10^{10}M，RF - 2，当通过微量滴定比色法测定时，RF - 2 显示出亲和性常数 Ka = 5×10^{8}M，RF - 2 经计算的 Kd = 2×10^{-9}M 。而且这两种抗体在浓度为 8 - 120ng/ml 时会显示出体外中和病毒的特性，并表现出抑制先前已被 RSV 感染的细胞融合的能力。值得注意地是可使用这种体外中和活性抵抗多种不同的野生型和实验室 RSV 毒株，包括 A 和 B 病毒型。

假定这些结果，即本发明抗体对 RSV F - 蛋白的高亲和性（所述 RSV F - 蛋白包括被 RSV 感染的细胞表面表达的表面蛋白）以及有效中和病毒和抑制被病毒感染之细胞的融合的能力，本发明的人单克隆抗体应该适于作为治疗剂和预防剂，即在易感的或经 RSV 感染的受试者中治疗或预防 RSV 感染。如上文所提及，RSV 感染在婴儿以及免疫妥协的人群中特别流行，因此，本发明的单克隆抗体特别适于在这种受试者中预防或治疗 RSV 感染。

而且假定本发明的单克隆抗体来源于人，它们特别适于被动免疫疗法，这是因为它们可能不会遭受鼠单克隆抗体潜在的约束。即 HAMA 反应和正常人效应子功能的缺乏。实际上，根据本发明的人单克隆抗体的鉴定（下文实施例中有述），RF－1 和 RF－2 显然比以前公开的鼠或嵌合抗－F 蛋白抗体和得自重组文库的人 Fab 片段具有实质上更高的体外中和活性和抑制先前已被 RSV 感染之细胞的融合的能力。假定它们是来源于人的，还希望这种中和活性通过体内施用得以维持。

本发明的人单克隆抗体的另一个优点是它们实质上缺乏与正常组织的反应性。如下文所示，本发明的人单克隆抗体仅与被 RSV 感染的细胞结合，而不与代表淋巴样组织，肝脏，前列腺的或喉的表皮的细胞系结合。因此，通过体内施用的这些抗体应能有效地与被 RSV 感染的细胞结合，而不与正常的组织结合，从而应能提供对 RSV 感染的中和作用。另外基于已公开的特性，希望使用本发明抗 RSV F－蛋白的人单克隆抗体以保护易感受宿主免受 RSV 感染。

更具体地说，例如通过从外伤或 LTP 来源得到人脾细胞，然后在体外致敏即可产生本发明抗 RSV F－蛋白的人单克隆抗体。此方法实质上包括在足够量的 IL－2 和任选为 RSV F－蛋白的存在下在体外培养所述原初人脾细胞以诱导免疫接种，这也称作抗原致敏。通常可以使用的 RSV F－蛋白的量的范围约为 1－200ng/ml RSV 蛋白，更优选 10－100ng/ml，最优选约为 40ng/ml RSV F－蛋白。

体外培养的培养基优选含有淋巴因子，尤其是 IL－2，任选含有 IL－4 和 IL－6。其用量应能供免疫接种和按所需产生生产抗体的细胞，例如对 IL－2 而言，适当的其量的范围约为 5－200 IU/ml，更优选约为 10－50 IU/ml，最优选 25 IU/ml。

此培养基也可含有在培养物中维持人脾细胞的存活所必需的其他成分，如氨基酸和血清。在实施例中，使用的培养基含有 IMDM，其中添加有 2mM 各氨酰胺，2mM 丙酮酸钠，非必需的氨基酸，25 IU/ml IL－2 和 20％胎牛血清。然而根据本申请的教导本领域技术人员可使用常规的最优化方案改变培养基。

体外免疫接种步骤可以在足以诱导免疫接种的时间内实现，通常在 RSV F－蛋白的存在下将细胞培养约 1－10 天，优选培养约 3 天，

然而根据例如特殊的脾脏样品也可改变培养时间。类似地，本领域技术人员根据本申请的教导使用已知方法可确定体外免疫接种步骤适当的期限。

用于体外免疫接种的抗原优选为经纯化的 RSV F - 蛋白以确保脾细胞被免疫接种是为了抗 F - 蛋白，而不是抗其他无用的（非表面的）抗原。得到纯化的 RSV 蛋白的方法是本领域技术人员已知的，本发明人特别使用了 Walsh et al， J. Gen. Virol.， 70,2953 - 2961， 1989 的方法。然而，如果已得到足够纯度的 RSV F - 蛋白，从而可得到对 RSV F - 蛋白有特异性的人单克隆抗体，那么对特殊的方法不必苛求。另外，通过 1994 年 2 月 22 日授予的美国专利 No. 5288630 中所述的重组方法可生产 RSV F - 蛋白。

体外免疫接种之后，将经 RSV F - 蛋白免疫或致敏的原初人脾细胞导入免疫妥协的供体，即 SCID 小鼠体内。这优选通过将经 RSV F - 蛋白致敏的人脾细胞腹膜内施用给 SCID 小鼠来实现，所施用的这种脾细胞的数目典型地在约 10^4 - 10^8 个脾细胞间变化，优选为 10^7 - 10^8 个脾细胞，这种细胞的数目应能导致所需的重建，即可产生特异性 RSV F - 蛋白的可回收浓度的人抗体的 SCID 小鼠，优选在施用前将这种脾细胞悬浮于 HBSS 中，使其浓度约为 8×10^8 个细胞/ml 。

在腹膜内转移脾细胞之后，再用 RSV F - 蛋白加强免疫 SCID 小鼠，此步骤可在与脾细胞转移足够接近的时刻实现，以使按所需产生人抗 - RSV F - 蛋白抗体得以实现。通常此步骤在转移之后要实行 3 - 14 天，最适在转移之后的实行 7 天。所述抗原的施用优选在腹膜内实现，所施用的 RSV F - 蛋白的量的范围约为 1 - 50μg，优选均为 1 - 10μg 。在实施例中施用了 5μg 蛋白。然而，根据特殊的小鼠，脾脏样品和 RSV F - 蛋白的纯度，免疫接种的量和时间会有所变化。

优选在佐剂（如完全弗氏佐剂，明矾，皂苷等，其中优选完全弗氏佐剂（ CFA ）和明矾）的存在下实现抗原的加强免疫，然而预计其他已知的佐剂可以取代以得到实质上相当的或甚至更强的结果。

抗原加强免疫之后，对 SCID 小鼠取血，如尾血，并检测它们的血清中人 IgG 浓度和抗 - F 蛋白抗体滴度，然后使用那些显示出最高抗体滴度和浓度的动物以回收可分泌人 IgG 的细胞。

已发现具有最高抗 - F 人抗体滴度的 SCID 小鼠长出了大的腹部肿

瘤，此肿瘤可提供分泌人抗体之细胞的良好来源。优选通过在无菌状态下切除以回收这些肿瘤，制备单细胞悬浮液，然后洗涤细胞并培养之。在实施例中，用含有 2 % 胎牛血清的 IMDM 洗涤细胞，在含有含 10 % FCS 的 IMDM 的 T - 25 烧瓶中的 10^6 个细胞/ml 的悬浮液中培养细胞，然而本领域技术人员可改变这种培养条件。

然后优选使用 EBV 使这些细胞无限增殖化，然后用已知方法（如 ELISA ）鉴定可分泌抗 - F 蛋白抗体的无限增殖化细胞。如上文所提及，此方法已被阐明可导致特异性结合 RSV F - 蛋白的两个不同的人单克隆抗体，即 RF - 1 和 RF - 2 的鉴定。然而根据申请中的教导，尤其是根据实施例中的教导，本领域技术人员无需经过过多的实验即可得到具有类似特性的抗 RSV F - 蛋白的其他人单克隆抗体。假定这些抗体中的大多数是使用不同的 SCID 在两个不同的实验中产生这一事实，这些抗体则是不同的。表达 RF - 1 和 RF - 2 的细胞系已经能在培养物中维持更长的时间，即分别约为 18 和 16 个月；用约 36 - 48 小时的大致的双倍时间来划分。在以 0.5 × 10^6 个细胞/ml 接种，培养了 3 天的培养物中特异性抗体浓度平均约为 0.8 - 1 μg/ml 。

如下文将更详细讨论的，RF - 1 和 RF - 2 都是 IgG （ 1， k ），在 ELISA 中对 F - 蛋白的一半 - 最大结合分别为 0.6 和 1 ng/ml，分别在约 8.8 和 8.9 处显示出等电点。

而且这些抗体对 RSV F - 蛋白表现出高亲和性，具体地说，对 RF - 1 而言，在 IASYS 仪上通过胞质基因组共振测得的 RF - 1 解离常数约为 10^{-10}M， RF - 2 的 Ka 常数同样很高；当根据 Wiseman et al ，（ 1989 ）和 Robert et al.（ 1989 ）通过微量滴定比色法测定时，约为 2 × 10^{-9}M 。

另外，已阐明这些抗体可有效结合被 RSV 感染的细胞，而不会结合被检测的正常的人细胞，如呼吸道内表面（ HEp - 2 ，喉表皮癌，CCL 23 ），肝脏（ HepG2 ，人肝细胞瘤细胞系， HB 8068 ），淋巴样组织（ SB ，人 B 成淋巴细胞样细胞系， Cat. No. CCL 120 和 HSB ，T 成淋巴细胞样细胞系， Cat. No. CCL 120.1 ）和前列腺（ LNCaP ，FGC ，人前列腺癌系， Cat. No. CRL 1740 ）。

值得注意的是 RF - 1 和 RF - 2 已显示出实质上在体外的对 RSV 病毒的中和作用，这一点已被两个不同的试验阐明（下文将更详细地

描述），即通过在将病毒加入至细胞之前，使之与纯化的单克隆抗体预－反应而实现的感染中和试验（此试验是为了测定抗体抑制病毒感染性的能力）和为测定单克隆抗体抑制病毒生长和抑制病毒进入细胞后的扩充的能力的融合抑制试验。

而且，如下文将要详细讨论的，RF－1和RF－2分别在浓度约为30ng/ml－1000ng/ml时可抑制病毒感染12个不同的分离株，因此RF－2显然工作得比RF－1好，它在浓度比RF－1低约1.25－10倍的情况下产生50％病毒抑制作用（ED50）。

与之相比，在以前已被感染的细胞中需要更高浓度的单克隆抗体来抑制融合和病毒抗原的表达，RF－1的效力比RF－2要高5－10倍，而且RF－1和RF－2都能有效地抵抗Type B RSV,Type B原型RS 6556和Type A RSV，Type A原型RS Long。因此体外结果表明本发明的人单克隆抗体可被用于治疗或预防由Type A和Type B原型的不同RSV毒株引起的RSV感染。如上文所讨论的，RSV F－蛋白在不同的RSV分离株中非常保守，因此本发明的抗RSV F－蛋白的单克隆抗体有可能与RSV F－蛋白保守的表位结合。

如上文所讨论的，含有可变重链和轻链序列的本发明人单克隆抗体或重组人抗体（其制备在下文中讨论）将被用作治疗和预防剂以通过被动抗体疗法治疗或预防RSV感染。具体地说，可将编码这些DNA可变区的DNA序列掺入图2所示的归IDEC所有的表达载体中。此形式实质上被描述于1995年1月25日提交的共同转让的美国申请No.08/379,072中，本文将它列入参考文献。此载体含有人恒定区，如人γ 1，人γ 4或被称为γ 4 PE的它们的突变形式（见美国申请No.08/379,072，本文将它列入参考文献）。通常还包括给易感的受试者或显示出RSV感染的个体施用治疗或预防有效量的本发明的人单克隆抗体。有效剂量的量优选范围为约50－20,000μg/kg，更优选约为100－5000μg/kg。然而根据如被治疗宿主的身体状况，体重等的因素可改变适当的剂量，本领域技术人员可确定合适的有效剂量。

可通过适于施用抗体的任何施用方式施用本发明的人单克隆抗体，典型地可通过注射，如静脉内，肌内或腹膜内注射，或更优选通过烟雾化施用本发明的抗体。如上文所提及的如果被治疗的受试者包括新生儿则特别优选烟雾化施用。

可通过使用已知药用载体和赋形剂的已知方法实现药用可接受形式的抗体的配制，适当的载体和赋形剂包括例如缓冲盐水，牛血清白蛋白等。

而且，假定本发明抗体对 RSV 感染细胞具有高特异性和亲和性，那么可将它用作免疫探针以诊断 RSV 感染。它通常包括从怀疑有 RSV 感染的个体身上取样，如呼吸道液体，并将此样品与本发明的人单克隆抗体一起保温以检测被 RSV 感染的细胞的存在。

此方法包括用报道分子直接或间接地标记本发明的人抗体，所述报道分子可提供对人单克隆抗体－ RSV 免疫复合物的检测，已知标记物的例子包括例如酶（如β －内酰胺酶，萤光素酶等）和放射性标记物。

本领域的技术人员已知使用单克隆抗体实现抗原的免疫检测的方法，本发明的抗－ RSV F －蛋白抗体联合诊断有效量的适当报道分子也可被配制成检测试剂盒以检测 RSV 感染。

材料和方法

实施例 1 － 6 中使用了下述材料和方法。

F 蛋白的制备和纯化:

实质上可根据 Walsh et al. J. Gen. Virol, 70, 2953 － 2961，（ 1989 ）的方法制备 F 蛋白，简单地说，即用 RSV 的 Long 毒株（ A 型实验室适应株）感染 70 % 铺满的 HEp － 2 细胞，在 T － 150 培养烧瓶中的添加有 5 % 胎牛血清， ZmM 谷氨酰胺和 2mM 丙酮酸钠的 IMDM 中培养 48 小时之后，将细胞置于含 1 % Triton － x － 100 和 1 % 脱氧胆酸盐的 PBS 裂解缓冲液中裂解，在偶联有鼠单克隆抗－ F 抗体 B4（ Hiroyki Tsutsumi 友情赠送）的 Sephadex 亲和柱上从细胞粗裂解液中纯化 F 蛋白（ Tsutsumi et al. 1987 ），用裂解缓冲液充分洗涤上述亲和柱，在含 0.1 % 脱氧胆酸盐的 0.1 M 甘氨酸 pH2.5 中洗脱经纯化的 F 蛋白，立即用 1 M Tris， pH8.5 中和洗脱液并对 PBS 透析，当在 Extracti － D 凝胶柱（ Pierce， Rockford， IL， Cat. No.20346 ）上除去去污剂后，通过 EIA 测定 F 蛋白的浓度，并通过 γ 照射使溶液灭菌。

淋巴样细胞的制备:

在临床上对特发性血小板减少性紫癜（ ITP ）患者行脾切除术后可得到脾脏，通过过金属筛可制备单细胞悬液，并在添加有 2 % 胎牛血清的 IMDM 培养基中洗涤，通过在 37 ℃下用氯化铵裂解缓冲液处理

90秒可除去红血细胞，然后用含血清的培养基将富含白血细胞的悬浮液洗涤两次，以10^8个细胞/ml的浓度重新悬浮于冰冷的正在结冰的培养基中（95％FCS，5％DMSO），并在液氮中冷冻直至使用。

体外免疫接种（IVI）：

在添加有2mM谷氨酰胺，2mM丙酮酸钠，非必需氨基酸，25μg/ml IL－2和10％胎牛血清的IMDM中建立培养，加入抗生素混合液，其中包括2.5μg/ml两性霉素，100μg/ml氨苄青霉素，100μg/ml卡那霉素，5μg/ml氯四环素，50μg/ml新霉素和50μg/ml庆大霉素，在6－孔群中以3×10^6个细胞/ml的浓度将细胞与40ng/ml的F蛋白一起培养，3天后收集细胞，洗涤之并以8×10^8个细胞/ml的浓度重新悬浮于HBSS中以供SCID重建。

SCID小鼠的重建:

通过腹膜内注射200μl含4×10^7个经IVI的人脾细胞的HBSS来重建5－8周龄的雌性CB17/SCID小鼠；腹膜内注射1周后用于CFA中的5μg F蛋白加强免疫小鼠，再过15天后抽尾血，检测其血清中人IgG的浓度和抗－F蛋白的抗体滴度。

从hu/SCID小鼠中回收人细胞:

两个具有高抗－F人抗体滴度的hu－SPL－SCID小鼠长出大的腹部肿瘤，在无菌状态下从被处死的小鼠身上行切除术以回收肿瘤，制备单细胞悬浮液，用含2％胎牛血清的IMDM洗涤细胞，并在T－25烧瓶中的含10％FCS的IMDM中培养至10^6个细胞/ml。

检测人IgG和抗－F蛋白抗体:

在ELISA中进行人IgG和抗－F抗体的检测，为了此目的，分别用于0.1M碳酸氢盐缓冲液，pH9.5中的GAH－Ig（0.05μg/孔）或F蛋白（0.05μg/孔）将培养板包被过夜，并用含1％胎牛血清的PBS转闭，使小鼠血清，培养物上清或纯化抗体的连续释放液在培养板中反应，通过随即加入GAH IgG－HRP和OPD底物（Sigma,…，…,）显示出结合的人IgG，在两个试验中，将选定的高滴度人血清用作阳性对照，在估计人IgG和单克隆抗体的浓度时，分别使用纯化的多克隆人IgG，或（γ.K.）骨髓瘤蛋白作为标准。

人抗体的同种定型:

如上所述在经F蛋白包被的培养板上用ELISA进行同种定型，通

过随即加入与 HRP 偶联的特异于人γ 1，γ 2，γ 3，γ 4，μ，k 和λ链的小鼠单克隆抗体可显示结合的人 IgG，阳性对照与（γ 1,k），（γ 2，k），（γ 3，λ），（γ 4，λ）或（λ，λ）同种型骨髓瘤蛋白和游离的 K 和λ链一起泳动。

A 蛋白的纯化:

在 A 蛋白－ Sepharose 4B 柱上从培养物上清液中纯化抗体，简单地说，收集上清液，通过 0.2mm 的滤纸器过滤，并添加 0.02 % 叠氮化钠，用含 0.02 % 叠氮化钠的 PBS 平衡柱（凝胶体积约为 0.5ml），然后以低速上样上清液，充分洗涤后，在 0.1M 柠檬酸钠缓冲液，pH3.5 中洗脱结合的人单克隆 IgG，使用 Centricon 10 滤器（ Amicon,）对 PBS－叠氮化物进行透析，并通过γ照射灭菌直至使用，用柠檬酸（ pH2.5 ）使柱再生，并用含 0.02 % 叠氮化钠的 PBS 再次平衡柱以供再次使用。

等电聚焦:

在聚丙烯酰胺预制凝胶（ Pharmacia, Uppsala, Sweden, Cat. No. 80－1124－80），pH3－pH10 中进行人抗体的等电聚焦（ IEF），简单地说，上样 20μl 样品并在 1500 伏下电泳 90 分钟，pi5.8－10.25 的标准物被用作 pi 参照物（…），在考马斯亮蓝染料中将凝胶染色，并在含 25 % 甲醇，68 % 水和 8 % 醋酸的脱色缓冲液中脱色。

Western 印迹:

原始的和通过煮沸变性的纯化 F 蛋白在 10 % 聚丙烯酰胺凝胶中迁移，将凝胶印迹到硝酸纤维素膜上，30 伏下 2 小时，60 伏下过液。转移后在室温下用含 1 % BSA 和 0.1 % 吐温－20 的 PBS 将硝酸纤维素膜封闭 1 小时，用 PBS 洗涤不同的条，并加入初次抗体，hu－SPL－SCID 抗－F 蛋白血清，或 hu－SPL－SCID 抗破伤风类毒素阴性对照或小鼠抗－F 蛋白阳性对照达 1 小时，所有血清以 1：500 稀释，用 PBS 充分洗涤之后，对于样品和阴性对照加入再次抗体，GAH IgG－HRP 达 1 小时，或对于阳性对照加入 GAM IgG 达 1 小时，印迹用 4－氯－1－萘酚显示。

免疫荧光:

使用冰冷的丙酮将被 RSV 感染的 HEp－2 细胞（ 4×10^4 ）固定在玻璃载玻片上，在 37 ℃下与 20μl 以 1：10 稀释的血清，或纯化的

MAb， 2μg/ml反应1小时，洗涤载玻片，在37℃下用GAH IgG - FITC显示结合抗体达30分钟，并在荧光显微镜下观察。

FACScan分析:

用洗涤缓冲液(含0.1％叠氮化钠的PBS)洗涤被RSV感染的HEp-2细胞（10^6个细胞/样品），将细胞碎片重新悬浮于50μl含2μg/ml RF - 1或RF - 2的保温缓冲液中（添加有0.1％ BSA并含0.1％叠氮化钠的PBS），在冰上保温15分钟后，洗涤细胞并重新在冰上将细胞重新悬浮于含GAH IgG - FITC保温缓冲液中达15分钟，洗涤3次后，在1ml含1％甲醛的PBS中固定细胞并在Becton - Dickinson FACScan装置上进行分析。

亲和性测定:

使用两种方法测定人MAb对可溶性F蛋白的亲和性:

在使用IASYS仪的胞质基因组共振中，抗体与装置潮湿的那边共价结合，根据装置干燥的那边所发出光的折射的变化可测定质量的变化，加入不同浓度的F－蛋白，随后用不断流过的PBS洗脱下F－蛋白，测量作为从抗体上释放下来的F－蛋白的结果的质量上的变化，从动力学上讲测定了Koff，通过检测从不同水平的最初饱和上脱下的速率可计算出Ka。

另外，通过根据Wiseman等人和Robert等人的微量量热法可测定亲和性常数，方法如下，在42℃的热容器中将已知浓度的RF - 2和F蛋白一起保温，测量由于溶液中免疫复合物的形成而造成的焓变化，在50℃下重复反应，根据Robert等人的理论，在下列等式中将与结合相关的常数K计算成温度和焓变的函数:

$$K=Kobs.e^{\Delta Hobs/R.(1/T-1/Tobs)}.e^{\Delta CTobs/R.(1/T-1/TTobs)}.(T/Tobs)^{\Delta C/R}$$

其中Kobs是在特定绝对温度Tobs下的结合平衡常数，ΔH^{obs}是在特定绝对温度Tobs下实验观察到的焓变；R是大气常数（1.987），ΔC是实验测得的结合热容的变化。

补体－增强的病毒中和试验:

使用两个实验室毒株（Long，A型和18537， B型）和从住院婴儿体内分离到的10株野生型RS病毒分离物来评价抗－F蛋白人MAb

的中和能力。室温下在微量滴定培养板的 100μl IMDM/孔中，在补体的存在下将连续稀释的人 MAb 与病毒（ 50 - 100pfu ）一起预保温 30 分钟，在 100μl MEM 中加入 HEp - 2 细胞（ 5×10^4 孔）并在 37 ℃，5 % CO_2 下保温 3 天，洗涤培养板用丙酮固定并风干，通过使用小鼠 MAb 的 ELISA 检测 RSV 抗原，将中和作用的终点任意测定为与无抗体的对照孔相比可将抗原的产生降低 50 % 的稀释度。

病毒融合抑制试验:

通过在 37 ℃， 5 % CO_2 下，将 100 $TCID_{50}$ RSV Long （ A 原型病毒）或 RS 6556 （ B 型临床分离物）与 VERO 细胞（ 5×10^3/孔）在微量滴度培养板中预保温 4 小时可测定融合抑制作用的滴度，在每孔中加入不同浓度的人单克隆抗体或对照，并在 37 ℃， 5 % CO_2 下将一式四份的培养物保温 6 天。对照培养物含有未被病毒感染的细胞（阴性）或在抗体缺乏的情况下被感染的细胞（阳性），在使用兔多克隆抗 - F 蛋白抗血清和经 HRP - 标记的抗 - 兔 IgG 的 ELISA 中检测病毒的生长，用 TMBlue 底物（ KPI, Gaithersburg, MD ）进行反应，根据 MAb 剂量反应的回归分析，滴度（ ED50 ）被定义为抑制 50 % 病毒生长的抗体浓度。

实施例 1

HU - SPL - SCID 滴度:

15 只 SCID 小鼠接受了患有 ITP 三单个供体的人脾细胞，在 IL - 2 和不同浓度之可溶性 F 蛋白的存在下将细胞预培养 3 天，成功地重建了所有动物，并在用 F 蛋白加强免疫之后，血清中人 IgG 总浓度在 12μg/ml - 10mg/ml 之间变化，抗 - F 蛋白滴度在 3×10^2 - 10^6 之间变化（表 1），在体外暴露于 F 蛋白和体内抗 - F 蛋白滴度之间没有观察到相关性。有关本发明的方法，以前已在马铁蛋白抗原系统中观察到：在脾细胞的体外培养期间必需暴露于抗原以确保随后的体内特异性抗体滴度。这两个系统之间的差异可归结为所涉及抗原的差异：由于人不会自然暴露于马铁蛋白， IVI 步骤涉及用抗原致敏脾细胞并在体外诱导初次应答；另一方面，通过幼年时自然的感染实质上所有人对 RSV 都有免疫力，这里所说的自然感染会导致对 F 蛋白永久的记忆，因此在体外仅用 IL - 2 刺激，随后在体内加强免疫一次就足以诱导再次应答。

由等电聚焦模式判断（数据未显示），抗血清为多克隆的，在Western印迹中检测了它们对F蛋白的反应性，我们的结果表明二聚体形式（140KD）和单聚体形式（70KD）的多克隆人Ab都不能识别可溶性的原始下蛋白；它们也能与变性F蛋白强烈反应，特异性地与48KD和23KD的这2个亚单位结合（代表性的数据见图1），这暗示着至少对下蛋白的体液反应的一部分直接抗分子的线性，非构象表位。免疫荧光研究进一步阐明了hu－SPL－SCID血清的特异性，这是由于免疫血清而不是原始SCID小鼠血清能与RSV－感染的HEp－2细胞强烈地反应（图2）。对用作阴性对照的未被感染的HEp－2细胞未观察到反应性，因此可得出结论：可溶性的F蛋白是产生特异于自然感染的细胞上表达的膜病毒抗原之抗体的适当的抗原。

实施例2

鉴定肿瘤细胞培养物中的抗体:

处死具有高抗－F蛋白滴度的所有小鼠，从腹腔灌洗和脾脏中收获人细胞。两只小鼠（hu－SPL－SCID#6和hu－SPL－SCID#15）同时长出腹部的实体肿瘤，回收所述肿瘤并刮成单细胞悬液，肿瘤细胞分泌的特异性抗－F蛋白抗体在ELISA中得以测定，这些肿瘤和抗体被称作RF－1（RSV F－蛋白）和RF－2。RF－1和RF－2在间隔约2个月的两个不同实验中产生，并从各个hu－SPL－SCID小鼠中分离得到，因此它们是不同的抗体；它们分别在培养物中已建立自身达18个月和16个月以上，以36－48小时的双倍时间分开。以0.5×10^6个细胞/ml的浓度接种并培养3天，培养物中特异性抗体浓度典型地为0.5－1μg/ml。

为了进一步鉴定，通过使用A蛋白Sepharose柱的亲和层析从培养物上清液中纯化两种人MAb。RF－1和RF－2都是IgG（1,k），在ELISA中与F－蛋白最大结合的一半分别为0.6和1ng/ml（图3）。从IEF中的迁移模式看，RF－1和RF－2的等电点分别被测定为8.8和8.9（图4），在流式细胞术中RF－1和RF－2特异性地识别被RSV感染的HEp－2细胞（图5）。在LASYS仪上通过胞质基因组共振测定的RF－1解离常数Kd约为10^{-10}M，根据Wiseman等人（1989）和Robert等人（1989）的微量滴定比色法测定的RF－2Kd常数为2×10^{-9}M。

实施例 3

抗－ F 蛋白的组织特异性:

利用通过流式细胞术测量的间接免疫荧光试验筛选纯化抗体与一系列可得自 ATCC 的人细胞系的反应性（表 11）。此结果表明抗体不与以下列为代表的细胞系结合，即呼吸道内表面（ HEp － 2，喉表皮癌， Cat. No. CCL 23 ），肝脏（ HEpG2，人肝细胞瘤细胞系， Cat. No. HB 8065 ），淋巴样组织（ SB，人 B 成淋巴细胞样细胞系， Cat. No. CCL 120 和 HSB， T 成淋巴细胞样细胞系， Cat. No. CCL 120.1 ）和前列腺（ LNCaP. FGC.人前列腺癌系， Cat. No. CRL 1740 ）。

实施例 4

体外功能活性:

为了测定抗体在体外是否具有中和病毒的作用，将抗体经受两种类型的功能性测定：在将病毒加入细胞之前，使之与纯化的 MAb 预反应可进行感染中和试验，因此反映出 MAb 抑制病毒感染性的能力；融合抑制作用反映出 Ab 抑制病毒生长和病毒进入细胞之后的扩展的能力。如 EIA 中通过病毒抗原滴定所测定的，两个试验的结果被测定为特定保温时间之后培养物中释放的病毒量。

对于所测试的所有 12 个分离株而言，浓度分别为 30ng/ml － 1000ng/ml 和 8ng/ml － 165ng/ml 的 RF － 1 和 RF － 2 Ab 能抑制病毒感染， RF － 2 始终比 RF － 1 工作得更好，在浓度比 RF － 1 低 1.25 － 10 倍时产生 50 % 病毒抑制作用（ ED50 ），代表性的数据列于表 III 。

正如所期望的，在以前曾被感染的细胞中需要较高浓度的 MAb 抑制融合和病毒抗原表达，在此试验中， RF － 1 的效力比 RF － 2 高 5 － 10 倍。在 Type B 原型 RS 6556 中的两种 MAb 比 TypeA 原型 RS Long 中的更有效（表 III ）。

表 I

小鼠 #	[Ag] 体外的	新鲜细胞	hu IgG (μg/ml)	抗-F 滴度
1	1 μg/ml	+	1,000	10^6
2	1 μg/ml	+	12.3	10^3
3	1 μg/ml	+	3,000	10^6
4	1 μg/ml	+	8,750	10^6
5	1 μg/ml	+	1,000	10^6
6	1 μg/ml	-	1,500	10^5
7	1 μg/ml	-	162	10^5
8	1 μg/ml	-	4,500	10^6
9	1 μg/ml	-	333	10^5
10	40 ng/ml	-	3,300	$5x10^5$
11	40 ng/ml	-	554	$3x10^2$
12	1 μg/ml	-	10,000	$5x10^5$
13	1 μg/ml	-	200	$5x10^4$
14	0 μg/ml	-	182	$5x10^4$
15	0 μg/ml	-	3,300	10^5

表 I：在 IL－2 存在下，将单个供体的脾细胞与或不与 F 蛋白一起培养 3 天，用 4×10^7 个细胞重建 SCID 小鼠并用于 CFA 中的 10μg F 蛋白腹膜内加强免疫所述小鼠，在小鼠#1，2，3，4 和 5 中注射新鲜的自身细胞（20×10^6）以加强免疫，通过与多克隆 IgG 的标准曲

线比较可测定人 IgG 的浓度，通过 EIA 中的终点稀释测定抗－F 蛋白滴度。

表 II

细胞系	组织类型	组织标记
HEp-2	喉表皮	－
RSV 感染的-HEp-2	喉表皮(RSV)	＋＋＋＋
SB	淋巴样	－
HSB	淋巴样	－
LNCaP	前列腺	－
HepG2	肝脏	－

表 II： RF－2 与多种细胞系的反应性。用 RF－2， $200ng/10^6$ 个细胞间接免疫荧光标记不同的细胞系。Fab 山羊抗－人 IgG－FITC 被用作第二步骤，（－）表示 RF－2 的存在不会导致平均荧光波道的变化；（＋）表示平均标记量以 0.5 log 增加。

表 III

抗体	融合抑制活性 ED_{50} 滴度		抗体	感染中和活性 ED_{50} 滴度	
	RS Long(A 型)	RS 6556(B 型)		MR144(A 型)	18537(B 型)
RF-1	660ng/ml	40ng/ml	RF-1	30ng/ml	30ng/ml
RF-2	3300ng/ml	400ng/ml	RF-2	8ng/ml	12ng/ml

表 III： ED_{50} 被定义为根据单克隆抗体剂量反应的回归分析抑制 50 % 病毒生长的抗体浓度。

实施例 5（比较实施例）

在体外诱导对 F－蛋白的 IgG 回忆应答:

两岁以上的群体中，95 % 以上已经暴露于 RSV 并对 RSV 作出了成功的反应（Henderson et al, J. Med.（1979），300，530－534）。因此在体外用 RSV F－蛋白攻击脾细胞应该导致回忆应答，而事实上在体外诱导了脾细胞主要的 IgG 反应（见图 5）。最适抗原浓度 40ng/ml

至少比所观察到的诱导初次应答的抗原浓度即铁蛋白， Ilig/ml 要小一个数量级（ Boerner et al.， J. Immunol.， 1991, 147, 86 - 95； Brams et al, Hum. Antibod. Hybridomas, 1993, 4, 47 - 56 ）。因此应考虑到在体外用 F - 蛋白致敏会诱导类似的再次应答，对于 PBMC 和得自扁桃体的细胞而言，几种在体外诱导对 RSV F - 蛋白的显著反应的尝试均告失败。

由体外致敏的脾细胞产生单克隆抗体的有限的努力产生几个抗 RSV F - 蛋白的单克隆 IgG 抗体，然而在 ELISA 中，大多数所述抗体会与几个对照抗原中的一个交叉反应（结果未显示）。

实施例 6

克隆编码 RF - 2 的基因:

RF - 1 和 RF - 2 克隆都不能产生显著量的抗体。这两个细胞系在含 20 % FCS 的培养基中长得最好，这是不利的，因为它会导致纯化抗体被牛 IgG 污染。因此为了能产生和纯化大量进行有意义的动物模型试验所需的抗体（所述试验典型地需要多至 1 克的一种选定抗体），将编码 RF - 1 和 RF - 2 的基因转移至生产载体和细胞系是有利的。本受让人 IDEC 制药公司已开发出很有效的真核生产系统，该系统在 CHO 细胞中可产生人单克隆抗体，此载体系统被描述于共同转让的美国申请 No. 08/379,072（ 1995 年 1 月 25 日提交）和 No. 08/149,099（ 1993 年 11 月 3 日提交）中，本文将它们都列为参考文献。常规下使用此系统，在每升旋动培养的无血清培养基中被抗体基因转染的 CHO 细胞产生了约 200mg 抗体，比用氨甲蝶呤扩增后发酵罐中的抗体高 500mg/l 。

使用 mRNA 分离试剂盒， Fast Tract （ InVitroGen, San Diego, California ）提取经克隆的 RF - 2 细胞的细胞培养物（见下文），约 5 × 10^6 中的 RNA，使用寡 - dT 引物和逆转录酶制备单链 cDNA，将 cDNA 的等分试样用作聚合酶链反应（ PCR ）的起始物质以扩增可变区的基因，使用两套引物进行 PCR （见表 IV ）。

表 IV*

含 Mlu 1 位点的重链引物

V_H1 5' $(AG)_{10}$ACGCGTG(T/C)CCA(G/C)TCCCAGGT(G/C)CAGCTGGTG 3'

V_H2 5 $(AG)_{10}$ACGCGTGTC(T/C)TGTCCCAGGT(A/G)CAG(C/T)TG(C/A)AG 3'

V_H3 5 $(AG)_{10}$ACGCGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTG 3'

V_H4 5 $(AG)_{10}$ACGCGTGTCCTGTCCCAGGTGCAG 3'

V_H5 5 $(AG)_{10}$ACGCGTGTCTGGCCGAAGTGCAGCTGGTG 3'

含 Nhe 1 位点的重链恒定区引物反义链

IgGl-4 $(AG)_{10}$GCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGG 3'

含 Dra III 位点的 Kappa 链引物

1. 5' $(AG)_{10}$CCAGGTGCACGATGTGACATCCAGATGACC 3'
2. 5' $(AG)_{10}$CCTGGATCACGATGTGATATTGTGATGAC 3'
3. 5' $(AG)_{10}$CCAGATACACGATGTGAAATTGTGTTGAC 3'
4. 5' $(AG)_{10}$TCTGGTGCACGATGTGACATCGTGATGAC 3'

含 Bsi WI 位点的 Kappa 恒定区引物反义链

C_k 5 $(AG)_{10}$TGCAGCCACCGTACGTTTGATTTCCA(G/C)CTT 3'

*表 IV 的说明：合成的寡核苷酸引物用以 PCR 扩增人免疫球蛋白重链和轻链可变区，下划粗线的是克隆的限制性位点。

设计第一套引物是为了扩增重链可变区，它由一个与 J 区结合的 3′引物和五个与晚期前导序列和构架 1 区域结合的家族特异性 5′引物组成。设计第二套引物是为了扩增 Kappa 可变区，它由一个 3′引物和 4 个与晚期前导序列和构架 1 区域结合的 5′引物组成。在球脂糖凝胶上电泳 PCR 反应产物，切下正确大小的 350 碱基对带，电洗脱 DNA，用适当的限制性酶切割并克隆到 IDEC 的 NEOSPLA 表达载体（见图 6）中，用于表达人抗体的 NEOSPLA 载体含有：CMV = 巨细胞病毒启动子，BETA = 小鼠β株蛋白主要的启动子，BGH = 牛生长激素聚腺苷酸化信号，SVO = SV40 复制起点，N1 = 新霉素磷酸转移酶外显子 1，N2 = 新霉素磷酸转移酶外显子 2，LIGHT = 人免疫球蛋白 Kappa 恒定区，HEAVY = 人免疫球蛋白γ 1 或γ 4 PE 恒定区，L =

前导序列， SV = SV40 聚腺苷酸化区域。

IDEC 的 NEOSPLA 表达载体被设计用于大量生产免疫球蛋白基因（见全部列入参考文献的 Reff et al, Blood, （ 1994 ）， 83, 435 - 445 ），使用这些载体已高水平地成功表达了小鼠/人嵌合，灵长类动物/人嵌合和人抗体。 NEOSPLA 含有新霉素磷酸转移酶基因以选择已稳定整合了质粒载体 DNA 的 CHO 细胞。另外， NEOSPLA 含有二氢叶酸还原酶基因以在氨甲蝶呤中扩增人恒定轻链（ k 或λ ）和人恒定重链区（ γ 1 或γ 4 （ PE ））。γ 4 （ PE ）是具有 2 处突变的人γ 4 恒定区，在 CH2 区引入谷氨酸是为了消除残基的 FcR 结合，在轻链区的脯氨酸取代欲增强重链二硫键相互作用的稳定性， Algre et al, J. Immunol., 148, 3461 - 3468 , （ 1992 ）； Angal et al, Mol. Immunol., 30, 105 - 108 （ 1993 ），这两篇都已列入本文参考文献。在载体中还掺入了独特的限制性位点已便于所需的区域和轻链可变区的插入， Reff et al., Blood, （ 1994 ）， 83, 435 - 445 。

在重复实验中， RF - 2 的轻链已被克隆到 NEOSPLA ，并根据 Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. （ 1977 ）， 74， 5463 - 5467 的方法测定其序列。 Kappa 链是 Kappa 2 亚组中的成员，类似地，已分离出人 RF - 2 重链可变区并将它克隆到人γ 1 恒定区的前面。

RF - 1 和 RF - 2 的轻链编码基因易于克隆，而使用普通的 Tac 逆转录酶不能产生编码重链之基因的 cDNA ，然而通过替换高温（ 70 ℃ ）逆转录酶，此问题可迎刃而解，从而用主要来自 V_H2 家族基因的引物可产生完整的 PCR 产物。

RF - 1 轻链和重链可变区的氨基酸序列和核酸序列分别示于图 7a 和 7b， RF - 2 轻链和重链可变区的氨基酸序列和核酸序列分别示于图 8a 和 8b，图 9a - 9c 表示本发明 NEOSPLA 载体表达的 RF - 1 的核酸和氨基酸序列，图 9a 和 9b 表示前导序列，可变轻链和重链序列，和人恒定区序列，即人 Kappa 区和人γ /恒定区，图 9c 表示人γ /恒定区的氨基酸和核酸序列，图 10 图解表示了在 CHO 细胞中可表达图 9a - 9c 所示序列从而得到重组 RF - 1 的表达载体。

图 11a - 11c 类似地表示了前导序列， RF - 1 可变轻链，人 Kappa 恒定区， RF - 2 可变重链和人γ /恒定区的氨基酸和核酸序列，图 12 图解表示了可在 CHO 细胞中表达重组 RF - 2 的表达载体。

实施例 7

克隆经 EBV 转化之细胞的方案的建立:

经EBV转化之细胞的抗体生产不断地减少并最终停止，Kozbor et al.，J. Immunol.（1981），127，1275 - 1280。因此为了使抗体的生产无限增殖化，必需在此事件之前从细胞中提取编码免疫球蛋白的基因，并将所述基因转移到适当的表达系统。为了分离编码由 EBV - 转化细胞产生的结合抗原之抗体的可变区的基因，必需确保细胞材料是单克隆的，然而无论通过有限稀释或在半固体琼脂培养基中都很难克隆经 EBV 转化的细胞，本发明的两个抗 - F 蛋白抗体 RF - 1 和 RF - 2 的 A 蛋白纯化制品的等电聚焦凝胶电泳表明在 RF - 2 制品中至少有两群抗体，在 RF - 1 制品中可能有寡克隆性。

通过将小鼠胸腺瘤细胞系 EL - 4 B5（Zhang et al, J. Immunol.,（1990），144，2955 - 2960）用作饲养层，细胞通过有限稀释由单个细胞得以扩充，人胸腺瘤细胞系 EL - 4 B5 可表达膜受体形式的 gp 39, gp39 可诱导 B 细胞生长，将 5×10^4 个 EL - 4 B5 细胞/孔平铺于微量滴定培养板上，将培养物中的细胞以不同浓度（从 0.38 个细胞/孔起逐渐升高）平铺于 EL - 4 B5 层上，适当长的时间后，计数对所铺的每个浓度有生长现象的孔的数目。

检测上清液中人 IgG 和抗原 - 特异性 IgG 的存在，用此方案我们从原始的寡克隆制品中已分离和克隆了分别产生 RF - 1（见表 V）和 RF - 2（见表 VI）的细胞。克隆过程中发现的非特异性抗体仅被分析了其同种型方面的内容，发现它与特异性抗体 IgG 1K 相同。根据在 RF - 1 培养过程中的不同时间点冰冻制备的 F - 蛋白特异性克隆的产量，以及所产生的 IgG 的量，估计从培养一开始，特异性抗体就构成了总抗体量的约 1/20，培养约 8 个月后特异性抗体消失，RF - 2 构成了总 IgG 的更大的一部分，在任何特定的时间都不少于 10 %。使用寡克隆制品的抗体来产生体外中和数据，结果超出了对 ED50 滴度的估计，然而我们使用胞质基因组共振来研究亲和性不必依赖纯抗体的使用，对经克隆的物质进行使用微量滴定比色法的亲和性研究。

表 V*

# 细胞/孔	# 孔	# 抗-F 孔(%)	#有生长现象的孔(%)
30	48	48(100)	48(100)
10	48	48(100)	48(100)
3.3	96	27(28)	68(71)
1.1	192	17(9)	112(58)
0.38	384	18(5)	116(30)

*表 V 的说明: 通过有限稀释克隆 RF - 1，以 5 × 10^4 个细胞/孔将 EL4 - B5 细胞平铺于平底 96 孔培养板上，约 24 小时之后，将所述浓度的指数生长的 RF - 1 细胞平铺于饲养层上，2 - 3 周后，对孔进行生长和抗 - F 活性存在的评分。

表 VI*

#细胞/孔	# 孔	#抗-F 孔(%)	#有生长现象的孔(%)
30	40	40(100)	15(37.5)
10	120	120(100)	22(18)
3.3	120	102(85)	9(7.5)
1.1	120	50(41.6)	1(0.83)
.33	180	30(16.7)	5(2.8)

*表 VI 的说明: 通过有限稀释克隆 RF - 2，接与表 V 相同的方式进行。

为了进一步证实这两个具有体外中和病毒之活性的人单克隆抗体的临床可用性，在两个不同的动物模型中进一步鉴定了这些抗体清除 RSV 感染的效力，通过 CHO 细胞产生的物质来进行这些预临床表现的评价，所述 CHO 细胞被插入专用表达载体（见图 6）中的编码抗体的

克隆基因所转染。将检测两个抗体模型，一个具有完整的补体和Fc受体结合区γ1，一个没有这些区域，γ4（PE突变）（Alegre et al, J. Immunol.,（1992），148，3461－3468；Angal et al., Molecular Immunology,（1993），30，105－108）。出于两个考虑来确定检测γ4形成的基本原理：（i）尽管当直接施用于肺时，抗－F蛋白Fab已显示出显著的体外Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci.（1992），89，10164－10168以及体内Crowe et al., Proc. Natl. Acad. Sci.（1994），91，1386－1390中和病毒的作用，（ii）在通过病毒感染已经应激的敏感组织中由效应子功能激活作用引起的潜在的可避免的肺损伤是有利可图的。由机构内部的非特异性杂交瘤IgG_1抗体产生一套非特异性的对照抗体，一个γ1和一个γ4（PE）。

第一个动物模型是小鼠模型，Taylor et al., J. Immunology（1984），52，137－142；Walsh, E.E., J.Infectious Diseases（1994），170，345－350，此模型被用于测定有效剂量，所述有效剂量被定义为在保温1周后，导致肺组织中荷载病毒2 log降低的最小剂量，此模型也可被用来测定哪个抗体模型会继续下去。第二个动物模型是使用非洲绿候的灵长类动物模型，Kakuk et al, J. Infectious Diseases（1993），167，553－561，RSV在非洲绿猴中导致肺部损伤，此模型的主要目的是评价抗体预防损伤的特性。用此模型的试验数目被限定为以5个不同的剂量检测1个抗体，可根据在小鼠模型中的发现确定抗体，剂量和相对于感染日期的输注日期。在噬斑检测试验中检查肺切片负载病毒的情况，并通过光学显微镜检测由RSV引起的损伤。

可观察到在刺激和扩充产生两个抗体之细胞的过程中，氨基酸序列中是否已发生了任何变化。通过用一套根据RF－1和RF－2重链·CDR3区域的PCR引物检测，可确定编码RF－1和RF－2的基因序列是否存在于原始冷冻的产生了两个细胞系的细胞材料中。阳性对照是RF－1和RF－2被抑制的来源的细胞，根据下列原理进行分析：Levy et al.，1989，Levy et al.，J. Exp. Med.（1989），169：2007和Alegre et al.，J. Immunol.（1992），148，3461－3468；Angal et al.，Molecular Immunology（1993），30，105－108；Foote et al.，Natwre（1991），352，530－532；Rada et al.，Proc.

Natl. Acad. Sci. （ 1991 ）， 85， 5508 - 5512； Kocks et al.， Rev. Immunol.（ 1989 ）， 7， 537 - 559； Wysocki et al.， Proc. Natl. Acad. Sci.（ 1986 ）， 83， 1847 - 1851； Kipps et al.， J. Exp. Med.（ 1990 ）， 171， 189 - 196； Ueki et al.， Exp. Med.（ 1990 ）， 171， 19 - 34。

实施例 8

生产能产生大量（>100mg/l ） RF - 1 和 RF - 2 的 CHO 细胞系：

a.转染表达质粒，分离和扩充 G418 抗性的可表达最高水平 RF - 1 和 RF - 2 的 CHO 克隆。

一旦 RF - 1 和 RF - 2 可变区基因被克隆到 NEOSPLA 中，中国仓鼠卵巢（ CHO ）细胞（ DG44 ）（ Urlanb et al， J. Somat. Cell Mol. Genet.，（ 1986 ）， 16,555 ）即可被质粒 DNA 转化，在 SSFM H⁻次黄嘌呤和胸苷（ GIBCO ）中培养 CHO 细胞，使用 BTX 600 电穿孔装置（ BTX， San Diego， CA ）在 0.4ml 一次性样品池中用 25μg 质粒 DNA 电穿孔 4 × 10^6 个细胞，在电穿孔前，用 PacI 限制性酶切质粒 DNA，该酶可将在哺乳动物细胞中表达的基因从用于在细菌中生长的质粒部分上切割下来。电穿孔的条件是 230 伏， 400 微法拉第， 13 欧姆。每个电穿孔在 96 孔盘（约 40,000 个细胞/孔）中展开，电穿孔 3 天后用含 400μg/ml G418（ Geneticin， GIBCO ）的培养基饲养盘中的细胞，然后周期性地用所述培养基饲养细胞直到集落产生，在 ELISA 中检测集落上清液中人 IgG 和抗 - F 蛋白活性的存在。

b. 在氨甲蝶呤中扩增抗体的表达。

然后将 G418 抗性的可产生最大量免疫球蛋白的集落转移到较大容器中并扩充之，通过基因扩增，通过在 96 孔盘中的 JnM 氨甲蝶呤（ MIX ）中选择可增加能分泌最多 G418 的克隆的表达。然后扩充能产生最大量抗体的 5nM 集落，再通过在 96 孔盘中的 50nM MTX 中选择再次扩增表达。根据此方案，我们以前已能分离出在旋动培养 7 天后能分泌大于 200mg/l 之抗体的 CHO 细胞（比在发酵罐中 6 天后产生的抗体高 0.5 克/升），然后使用 A 蛋白亲和层析从上清液中纯化人抗体。

c.生产和纯化抗体。

每种抗体生产了 100mg，以在小鼠模型研究中确定的量生产选定

的抗体，使用旋动烧瓶生产所需量的抗体，所述烧瓶中含有于 CHO - S SFM II 无血清培养基中的选定 CHO 转染瘤（ GIBCO Cat. No. 91 - 0456 DK ），所述培养基中含有 50nM 氨甲蝶呤。收获上清液并通过一套滤器过滤以除去特殊的物质，以 0.2nM 滤器结束过滤。根据抗体总量，通过预定大小的 A 蛋白标注动上清液，洗涤后，用 0.1 M 甘氨酸/HCl， pH2.8 从柱上将抗体洗脱到中和缓冲液中（ 1M Tris/HCl，pH7.4 ），通过 Amicon Centriprep 或 Centricon 30（ Cat. no. 4306 和 4209 ）进行超滤，用无菌 PBS 使洗脱/中和缓冲液充分交换（ ≥ 1000 次）。抗体的浓度被调节约 2mg/ml，并穿过 0.2nm 滤器过滤以使抗体无菌。纯化抗体，并置于 2ml 冷冻管中在冰上贮藏直至用于动物。

实施例 9

就在 RSV 动物模型中的性能而言鉴定 RF - 1 和 RF - 2。

使用适当的动物模型检测 RF - 1 和 RF - 2 的性能，评价工作分两步进行，首先（ a ）使用 Balb/c 模型（ Taylor et al., J. Immunology （ 1984 ）， 52， 137 - 142； Crowe et al., Proc. Natl. Acad. Sci.（ 1994 ）， 91， 1396 - 1390； Connors et al., J. Virology （ 1992 ），66， 7444 - 7451 ）以检测抗体的效力，以及检测哪种类型的支持物（效应物）功能对于抗体清除病毒荷载是必需的。从小鼠模型中得到的数据看，可选择一个候选者在灵长类动物模型中进一步研究。灵长类动物模型是非洲绿猴模型（ Kakuk et al., J. Lnfectious Diseases （ 1993 ）， 167， 553 - 561 ）。灵长类动物模型特别适合于进一步证实本发明的单克隆抗体可用于预防与病毒相关的肺部损伤。

a.在小鼠模型中检测性能。

我们已选择的啮齿类动物模型是 Balb/c 小鼠，此模型已被详细地描述（ Crowe et al., Proc. Natl. Acad. Sci.（ 1994 ）， 91， 1386 - 1390； Connors et al., J. Virology （ 1992 ）， 66， 7444 - 7451 ），以用于有关被动疗法研究的研究。所有年龄的 Balb/c 小鼠都很能容忍 RSV 在上下呼吸道中生长，（ Taylor et al., J. Immunology （ 1984 ），52， 137 - 142 ）。分 5 组圈养动物，饲喂标准的小鼠食物并随意喂小，并根据 Rochester General Hospital 动物园守则照顾这些小鼠，这些守则遵照纽约州卫生部的联邦动物福利条例和 DHHS 法则。在开口的

罩布下用 penthrane 麻醉小鼠后进行所有程序，包括注射，病毒感染，眼窝取血和通过颈关节脱位处死小鼠。

i. 测定抗体的有效剂量并比较RF－1和RF－2的γ1和γ4（PE形式）的性能。

通过在第 0 天鼻内滴注于 100μl 体积中的 RSV106 Long（A 亚组）或 10^5 18537（B 亚组）噬斑形成单位（PFU）以感染 5 组小鼠，在第 4 天病毒滴度到达峰值时，给动物腹膜内注射四种 F－蛋白特异性单克隆抗体制品中的每一种或对照抗体。检测到的剂量最初与参照剂量差不多，由体外研究计算出的参照剂量提供的血清中和滴度约为 1： 300 或更高。在小动物中此滴度可与抵抗 RSV 攻击的保护性水平相联系，通过用 25， 5， 1， 1/5 和 1/25 的参照剂量处理来评价剂量反应，如果许可的话可进行较高或较低剂量实验。如上所述，给对照注射相同剂量的同种型匹配的单克隆抗体。24 小时后，第 5 天是病毒流出的高峰期，处死小鼠。通过心脏内穿刺得到血清，除去鼻甲骨和肺，称重，并分别在 1 和 2ml NMM 中匀浆，滴定匀浆液中 HEp－2 细胞上的病毒，病毒滴度以 TCID50/gm 组织表示，通过学生 t－试验将组之间的平均滴度与对照组的相比，在感染和处死的时刻得到血清，以通过酶免疫测定法和中和试验测定人单克隆抗体的量。既然在上呼吸道中，IgG 同种型不能有效地被分泌出来（与 IgA 相比），那么可期望病毒滴度最大程度的降低会是肺部病毒的生长，在感染第 4 天可能的治疗被证明在降低肺部病毒方面是无效的，在第 2 和/或 3 天的治疗将被评价。

如上文所述，使用 ELISA 测定贮存溶液和经注射动物的血清中每种单克隆抗体的滴度，在固相中使用了根据确立的方法（82）通过亲和层析纯化的 RSV 融合蛋白，也要设计测定 RSV G 蛋白的分离试验以评价小鼠 IgG 对实验性 RSV 感染的反应。在 ELISA 中使用特异于人 IgG 和小鼠 IgG 的兔抗体（可购自 Virion Systems， Inc.， Bethesda， MD）检测人单克隆抗体或小鼠抗体。

对于抗体而言，单克隆抗体的剂量反应效果被测定为可将病毒滴度降低 2 $\log_{10}$ 以上或使病毒滴度降低>99 % 的最低抗体滴度。保护的程度与处死小鼠时得到的血清抗体水平相关，另外，测定了人单克隆抗体不同联合的潜在协同效果。上文所述的最初的体外研究的结果被

用来指导体内实验，例如，如果 RF - 1 和 RF - 2 具有 RSV F 蛋白上的不同的抗原结合位点，相同同种型（γ1 或γ4）的联合会提供协同保护作用。

ii. 肺组织的组织学评价.

通过标准的组织病理学和免疫组化技术评价被动疗法对肺部炎症的疗效，初次或再次感染后的小鼠中的细支气管周围的浸润和肺泡的浸润都已被描述，Conners et al.，J. Virology，（1992），66，7444 - 7451。如上所述用单克隆抗体处理实验动物，未被感染的未经处理的对照小鼠被用作对比物以评价组织学效果。在感染后第 5 和 8 天，摘下肺，并在恒定的填充压（30cm H_2O）下用福尔马林使肺充气 30 分钟，切片并用苏木精 - 伊红染色后，使用标准化的评分系统测定细支气管周围和肺泡区炎症浸润的程度（分别为 PMN 和淋巴细胞）。由于期望γ1 和γ4 单克隆抗体可以有区别地结合和激活补体，使用商购的兔抗 - 小鼠 C3 抗体（Viron Systems，Inc. Bethesda，MD）和与过氧化物酶偶联的山羊抗 - 兔 IgG 染色肺切片以显示炎症区域小鼠 C3 的沉积。

除了评价在被固定的肺组织中看到的组织学变化以外，通过评价肺泡细胞学评价了肺部的炎症。处死按上述处理的多组小鼠，通过将 3 ml PBS 重复地灌进下呼吸道以进行支气管肺泡灌洗（BAL），进行 BAL 细胞计数，通过染色细胞离心制品鉴定细胞类型。

iii. 抗体疗法对抗感染的自然免疫应答的影响。

在棉田鼠和夜猴模型中，尽管动物通过再次攻击已被完全保护，用多克隆的 IgG 制品抗 RSV 感染的被动疗法消除了随后对病毒的自然抗体反应（Hemming et al.，J. Infectious Diseases（1985），152，1083 - 1086；Prince et al.，Virus Research（1985），3，193 - 206）。与之形成对照的是，Graham 发现经处理的小鼠的抗体反应减弱，而且所述小鼠对病毒的再次攻击敏感（Graham et al.，Ped. Research（1993），34，167 - 172）。为了使用人单克隆抗体评价这种可能性，如上所述用 RSV Long 毒株感染小鼠，并在第 4 天用保护性剂量的抗体处理小鼠，对照包括被感染的未经处理的动物和未被感染的经处理动物。隔周（共 8 周）然后第 4 周（共 8 周）给小鼠抽血以检测抗体，通过 ELISA 测定抗 RSV F 和 G 蛋白的人单克隆抗体和小

鼠抗体，另外，测定每个时间点的血清中和滴度，从ELISA结果和未被感染的经抗体处理之对照的中和活性结果中可推断出残留的人单克隆抗体和活跃产生的小鼠抗体对中和作用的贡献。当通过ELISA检测不到人单克隆抗体时，用相同的RSV毒株再次攻击动物，4天后处死动物，测定肺和鼻组织中病毒的滴度并与对照组相比。

为了评价单克隆抗体疗法对细胞毒T－细胞（CTL）诱导的影响，进行类似的实验，但感染6周后处死小鼠，并用活RSV刺激脾细胞培养物5天（Walsh，E.E.，J. Infectious Diseases（1994），170，345－350）。通过使用持续被感染的Balb/c成纤维细胞细胞系（BCH4细胞）的标准铬51释放试验评价CTL活性并与未被感染的Balb/c成纤维细胞细胞系比较。

主要根据确定的RSV感染被动疗法的有效剂量研究，再测定哪种抗体，RF－1或RF－2能最有效地预防或治疗RSV感染。在γ1或γ4（PE）形式之间的选择考虑到肺组织学研究，尤其是补体的征集是否能被Clq结合抗体显著增强，尽管随后被增强的血管形成可能会增强病毒－抗体对抗补体的大规模激活作用潜在地具有不利的作用。

c. 在猴模型中检测性能

对于选定抗体的决定性试验在灵长类动物模型中进行，我们选择了非洲绿猴（Cercopithecus aethiops），因为它能高度容忍RSV，感染可导致增强的肺病理学和可测的损伤（Kakuk et al.，J. Infectious Diseases（1993），167，553－561）非洲绿猴也易于使用并且没有增加危险性。这种猴重量为5－10kg。最高希望的抗体最大剂量是20 mg/kg，每只10kg的含20mg/kg抗体的3只动物等于600mg抗体，一些野生的非洲绿猴对RSV有自然的免疫力，之所以需要将猴纳入我们的研究之中，是因为它们对RSV为血清阴性。

根据在小鼠模型中建立的基准，有效剂量/kg和治疗前的感染时间，进行有限系列的试验以确立减少病毒的有效剂量，以及进一步证实所述剂量是否与肺病理学的预防，尤其是薄壁组织炎症的卷入有关，仅检测了一个病毒株，Long（A亚型），起初检测了25，5，1和1/25倍的参照剂量，分析了两个对照组，一个接受了病毒但未接受抗体，另一个接受了病毒和最大剂量的同种型匹配的对照抗体，实质上如上所述进行实验，也通过鼻内滴注10^6 PFU病毒感染3组猴，

用病毒感染猴 6 - 7 天后，处死猴，如上所述取出肺和咽样品以检测病毒和进行组织学研究。

实质上如上所述进行组织学研究，简而言之，在恒定的填充压下用 10 % 中性缓冲的福尔马林灌注肺，将肺置于福尔马林中至少一周，切片并用苏木精 - 伊红染色后，根据 Kakuk et al., J. Infectious Diseases (1993), 167, 553 - 561 评价载玻片的组织病理学，在 ELISA 和感染中和试验中取血清样品以测定抗 RSV 人抗体的滴度。

实施例 10

1.通过人组织切片的体外试验证实组织特异性

通过在两个不同个体的不同冷冻正常组织切片上的免疫组织学研究进一步检测抗体对正常组织的潜在的交叉反应性，简单地说，使冷冻组织的低温控制切片机切片经受 3 个试验：结合分析，硝化分析和特异性/分布分析，加入于含 1 % BSA 的 PBS 中的纯化的经生物素标记的抗 - RSV F - 蛋白抗体，于 200 ℃下在潮湿的小容中将载玻片保温 30 分钟，然后用含 1 % BSA 的 PBS 洗涤载玻片，再将载玻片与含 1 % BSA 的 PBS 中的亲和素 - HRP 保温 30 分钟，HRP 可与 3,3 二氨基联苯胺 - 四氢氯化物反应，通过 HRP 氧化作用的介导形成不溶性的沉淀染料，这就可以鉴定本发明的人单克隆抗体的任何潜在的交叉反应。Impath Laboratories, N.Y., N.Y.可进行此试验，此试验已获 FDA 批准 I.N.D. 提交人疗法指定的产物，此组织学方法使用了预先已存在的组织，并比可代替的用放射性标记的抗体对被 RSV 感染的猴的击靶研究更便宜。

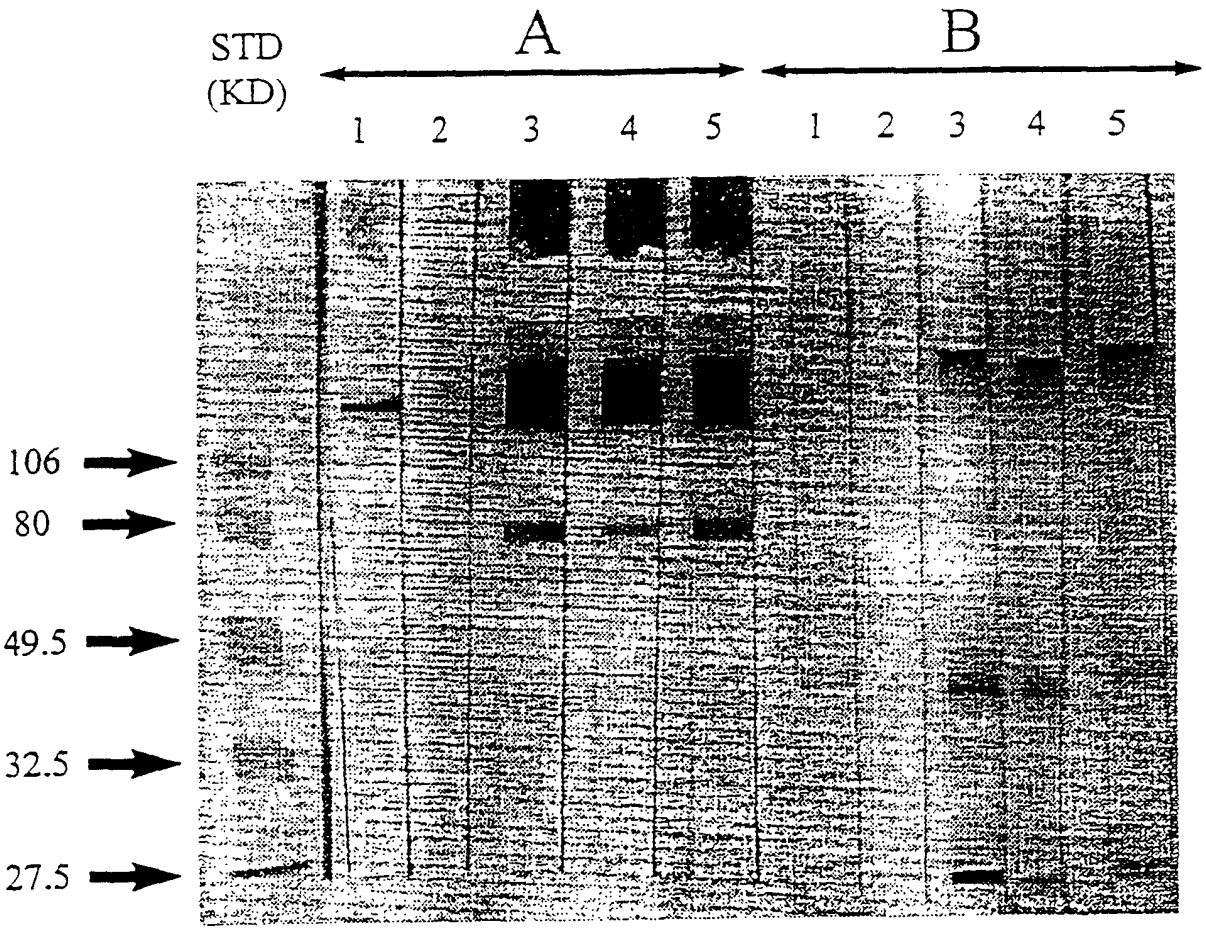

图 1

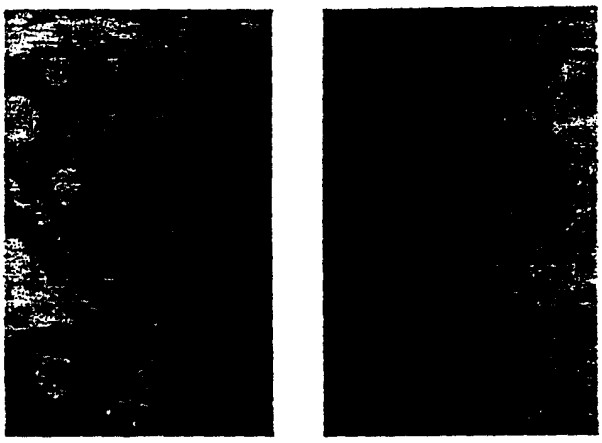

图 2

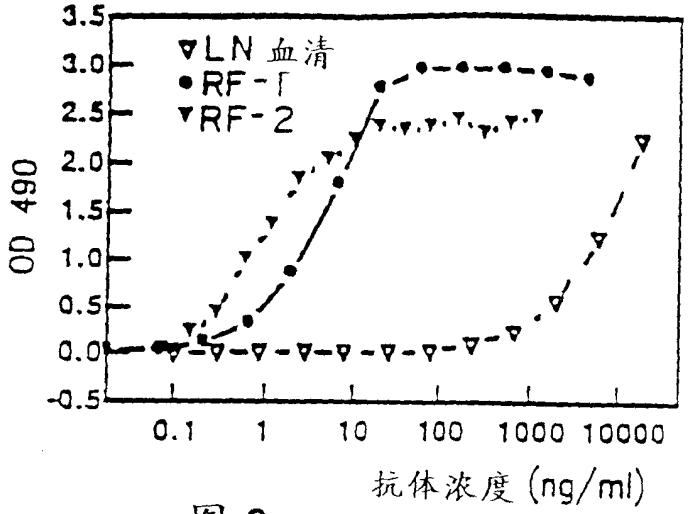
LN 血清
RF-1
RF-2
OD 490
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.1
1
10
100
1000
10000
抗体浓度 (ng/ml)

图 3

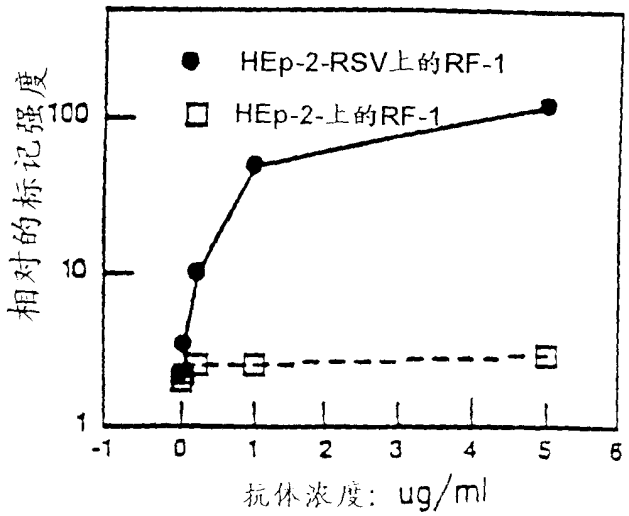
HEp-2-RSV上的RF-1
HEp-2-上的RF-1
相对的标记强度
100
10
1
-1
0
1
2
3
4
5
6
抗体浓度: ug/ml

图 5

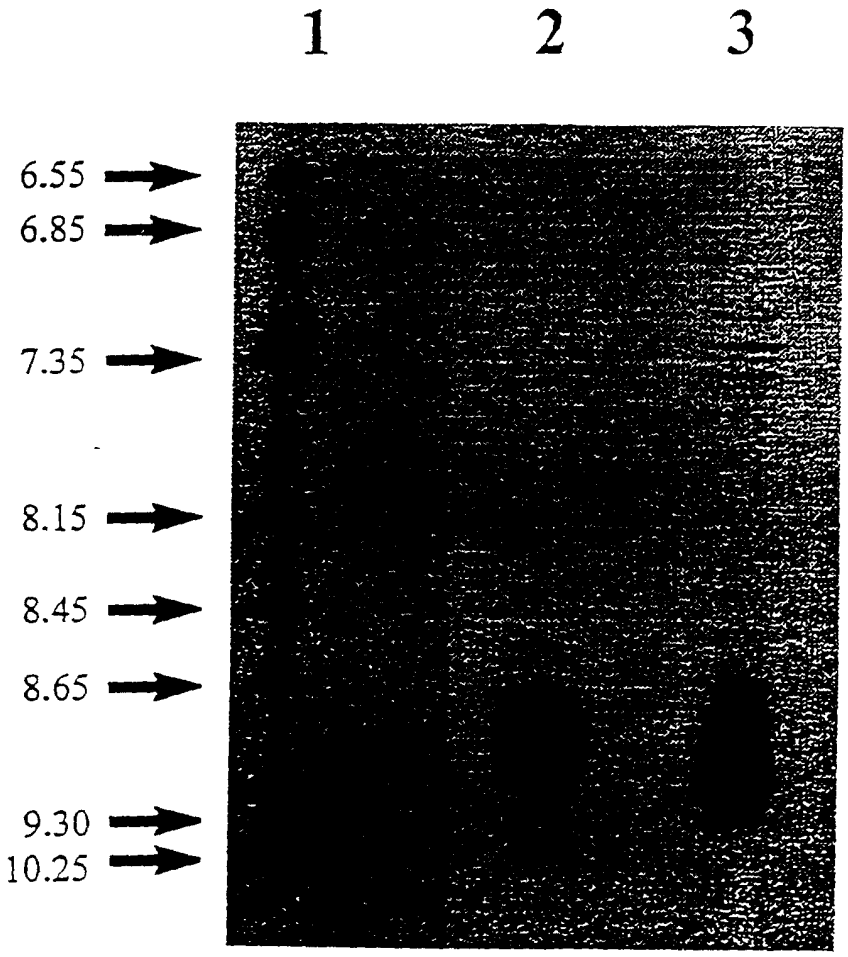

图 4

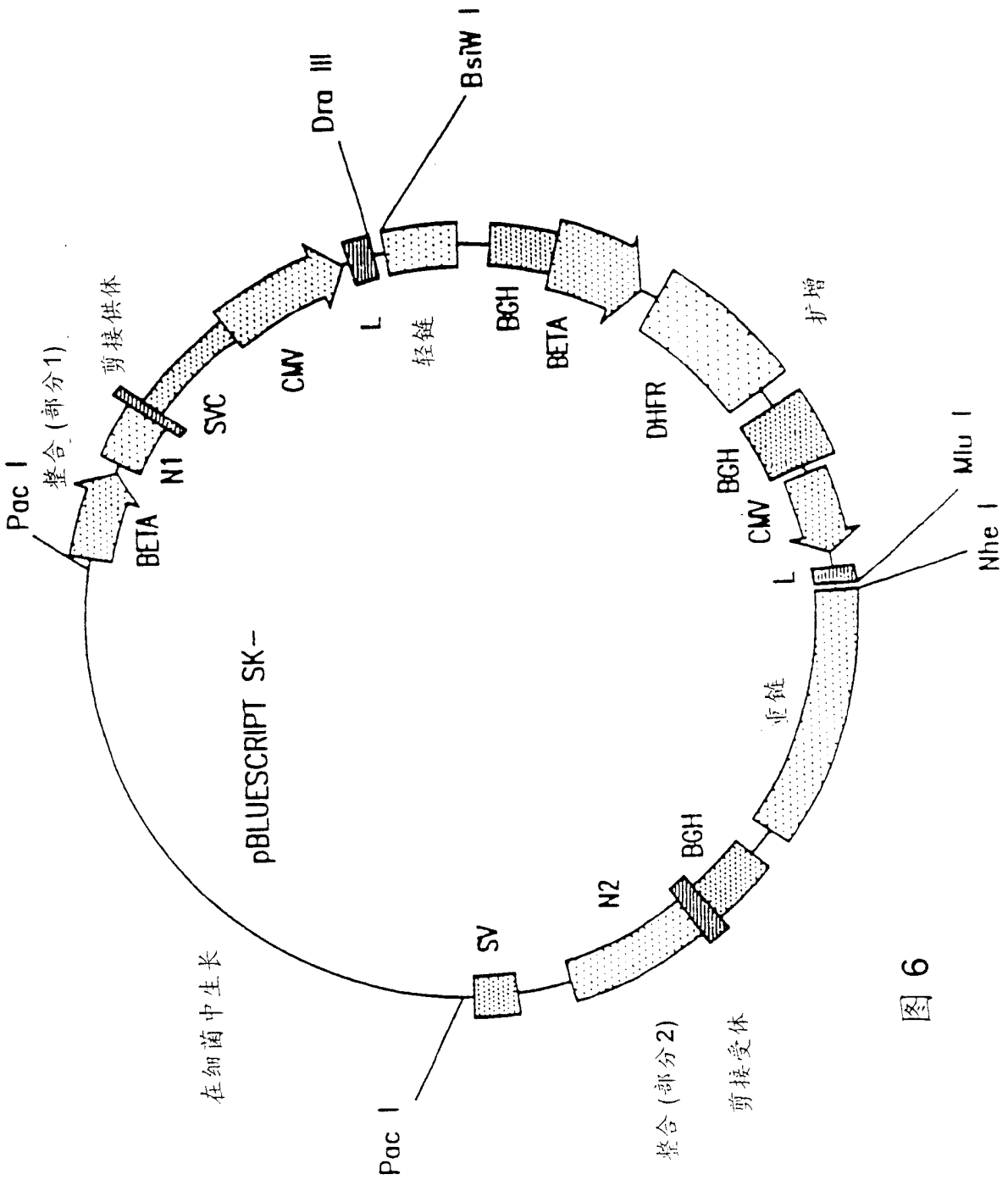
Pac I
接合(部分1)
剪接供体
BETA
N1
SVC
CMV
L
Dra III
BsiW I
轻链
BGH
BETA
DHFR
BGH
CMV
L
扩增
Mlu I
Nhe I
重链
pBLUESCRIPT SK-
在细菌中生长
SV
N2
BGH
Pac I
接合(部分2)
剪接受体

图 6

构架 1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA GTC ACC
9 18 27 36 45 54

I T C R A G Q R I A S Y L N W Y Q H K P G K
ATC ACT TGC CGG GCA GGT CAG AGG ATT GCT AGT TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAC AAA CCA GGG AAA
69 78 87 96 105 114 123

A P K L L I Y A G S N L H R G V P S R F S G
GCC CCT AAG CTC CTG ATA TAT GCT GGA TCC AAT TTG CAC CGT GGG GTC CCG TCA AGG TTC AGT GGC
135 144 153 162 171 180 189

G G S G T D F T L T I N S L Q P E D F A T Y
GGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AAC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC
201 210 219 228 237 246 255

Y C Q Q A Y S T P W T F G P G T K V E I K
TAT TGT CAA CAG GCT TAC AGT ACC CCC TGG ACT TTC GGC CCA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
267 276 285 294 303 312 321

图 7a

构架 1 Q V Q L Q E S G P A L V K P T Q T L T L
CAG GTA CAG TTG CAG GAG TCT GGT CCT GCG CTG GTA AAA CCC ACA CAG ACC CTC ACA CTG
9 18 27 36 45 54
T C T F S G F S L S T R G M S V N W I R Q P
ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC AGC ACC AGA GGA ATG AGT GTG AAC TGG ATC CGT CAG CCC
69 78 87 96 105 114 123
P G K A L E W L A R I D W D D D T F Y S A S
CCA GGG AAG GCC CTG GAA TGG CTA GCC CGC ATT GAT TGG GAC GAT ACA TTC TAC AGC GCT TCT
135 144 153 162 171 180 189
L K T R L S I S K D T S K N Q V V L R M T N
CTG AAG ACT AGG CTC AGC ATC TCC AAG GAC ACC TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTC AGA ATG ACC AAC
201 210 219 228 237 246 255
V D P V D T A T Y F C A R A S L Y D S D S F
GTA GAC CCT GTG GAC ACA GCC ACA TAT TTT TGT GCA CGG GCC TCA CTA TAT GAC AGT GAT AGT TTC
267 276 285 294 303 312 321
Y L F Y H A Y W G Q G T V V T V S S
TAC CTC TTC TAC CAT GCC TAC TGG GGC CAG GGA ACC GTG GTC ACC GTC TCC TCA
333 342 351 360 369 378

图 7b

构架	1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
		GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTC	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC
				9			18			27			36			45			54		

I	T	C	R	A	S	Q	S	I	A	S	Y	V	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K
ATC	ACT	TGC	CGG	GCA	AGT	CAG	AGC	ATT	GCC	AGT	TAT	GTA	AAT	TGG	TAT	CAA	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA
		69			78			87			96			105			114			123	

A	P	K	V	L	I	F	A	S	A	N	L	V	S	G	V	P	S	R	F	S	G
GCC	CCT	AAA	GTC	CTC	ATT	TTT	GCT	TCA	GCC	AAT	TTG	GTG	AGT	GGG	GTC	CCA	TCA	AGA	TTC	AGT	GGC
		135			144			153			162			171			180			189	

S	G	S	G	T	V	F	T	L	T	I	S	N	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
AGT	GGA	TCT	GGG	ACA	GTT	TTC	ACC	CTC	ACC	ATC	AGC	AAT	CTG	CAA	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	ACC	TAC
		201			210			219			228			237			246			255	

F	C	Q	Q	S	Y	T	N	F	S	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K
TTC	TGT	CAG	CAG	AGT	TAC	ACT	AAT	TTC	AGT	TTT	GGC	CAG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA
		267			276			285			294			303			312		

图 8a

构架 1

```
Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  V  V  V  K  P  T  E  T  L  T  L
CAG GTG CAG TTG CAG GAG TCT GGT CCT GTG GTG GTG AAA CCC ACA GAG ACC CTC ACG CTG
                9         18        27        36        45        54

T  C  T  V  S  G  F  S  L  S  N  P  R  M  G  V  T  W  I  R  Q  P
ACC TGC ACC GTC TCT GGG TTC TCA CTC AGC AAC CCT AGA ATG GGT GTG ACC TGG ATC CGT CAG CCC
       69        78        87        96       105       114       123

P  G  K  A  L  E  W  L  G  N  I  F  S  S  D  E  K  S  F  S  P  S
CCC GGG AAG GCC CTA GAA TGG CTT GGA AAC ATT TTT TCG AGT GAC GAG AAG TCC TTC AGT CCT TCT
       135       144       153       162       171       180       189

L  K  S  R  L  T  T  S  Q  D  T  S  R  S  Q  V  V  L  S  L  T  N
CTG AAG AGC AGA CTC ACC ACC TCC CAG GAC ACC TCC AGA AGC CAG GTG GTC CTA AGC TTG ACC AAC
       201       210       219       228       237       246       255

V  D  P  V  D  T  A  T  Y  Y  C  A  R  V  G  L  Y  D  I  N  A  Y
GTG GAC CCT GTG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA CGG GTA GGA CTG TAT GAC ATC AAT GCT TAT
       267       276       285       294       303       312       321

Y  L  Y  Y  L  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
TAC CTA TAC TAC CTG GAT TAT TGG GGG CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
       333       342       351       360       369       378
```

图 8b

```
ATG GAG ACC CCT GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG CTC CGA        48
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg
  1               5                  10                  15

GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT        96
Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30

GCA TCT GTC GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA GGT CAG AGG       144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Gly Gln Arg
        35                  40                  45

ATT GCT AGT TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAC AAA CCA GGG AAA GCC CCT       192
Ile Ala Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

AAG CTC CTG ATA TAT GCT GGA TCC AAT TTG CAC CGT GGG GTC CCG TCA       240
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Gly Ser Asn Leu His Arg Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

AGG TTC AGT GGC GGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AAC       288
Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
                85                  90                  95

AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAT TGT CAA CAG GCT TAC       336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr
            100                 105                 110

AGT ACC CCC TGG ACT TTC GGC CCA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT       384
Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG       432
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT       480
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG       528
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC       576
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA       624
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC       672
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA                           705
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
225                 230                 235
```

图 9a

```
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT          48
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
                240                 245                 250

GTC CTG TCC CAG GTG CAG TTG CAG GAG TCT GGT CCT GTG GTG GTG AAA          96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Val Val Val Lys
            255                 260                 265

CCC ACA GAG ACC CTC ACG CTG ACC TGC ACC GTC TCT GGG TTC TCA CTC         144
Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
        270                 275                 280

AGC AAC CCT AGA ATG GGT GTG ACC TGG ATC CGT CAG CCC CCC GGG AAG         192
Ser Asn Pro Arg Met Gly Val Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
    285                 290                 295

GCC CTA GAA TGG CTT GGA AAC ATT TTT TCG AGT GAC GAG AAG TCC TTC         240
Ala Leu Glu Trp Leu Gly Asn Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Phe
300                 305                 310                 315

AGT CCT TCT CTG AAG AGC AGA CTC ACC ACC TCC CAG GAC ACC TCC AGA         288
Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Thr Ser Gln Asp Thr Ser Arg
                320                 325                 330

AGC CAG GTG GTC CTA AGC TTG ACC AAC GTG GAC CCT GTG GAC ACA GCC         336
Ser Gln Val Val Leu Ser Leu Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala
            335                 340                 345

ACA TAT TAC TGT GCA CGG GTA GGA CTG TAT GAC ATC AAT GCT TAT TAC         384
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gly Leu Tyr Asp Ile Asn Ala Tyr Tyr
        350                 355                 360

CTA TAC TAC CTG GAT TAT TGG GGG CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC         432
Leu Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    365                 370                 375

TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC         480
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
380                 385                 390                 395

AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC         528
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
                400                 405                 410

TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC         576
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
            415                 420                 425

AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC         624
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
        430                 435                 440

TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG         672
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
    445                 450                 455

ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC         720
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
460                 465                 470                 475

AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA                                 750
Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
                480                 485
```

图 9b

```
        696         705         714         723         732         741         750

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC
        759         768         777         786         795         804         813

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG
        822         831         840         849         858         867         876

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
        885         894         903         912         921         930         939

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC
        948         957         966         975         984         993        1002

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC
       1011        1020        1029        1038        1047        1056        1065

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG
       1074        1083        1092        1101        1110        1119        1128

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
       1137        1146        1155        1164        1173        1182        1191

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
       1200        1209        1218        1227        1236        1245        1254

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC
       1263        1272        1281        1290        1299        1308        1317

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG
       1326        1335        1344        1353        1362        1371        1380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys TER
CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
       1389        1398        1407        1416        1425
```

图 9c

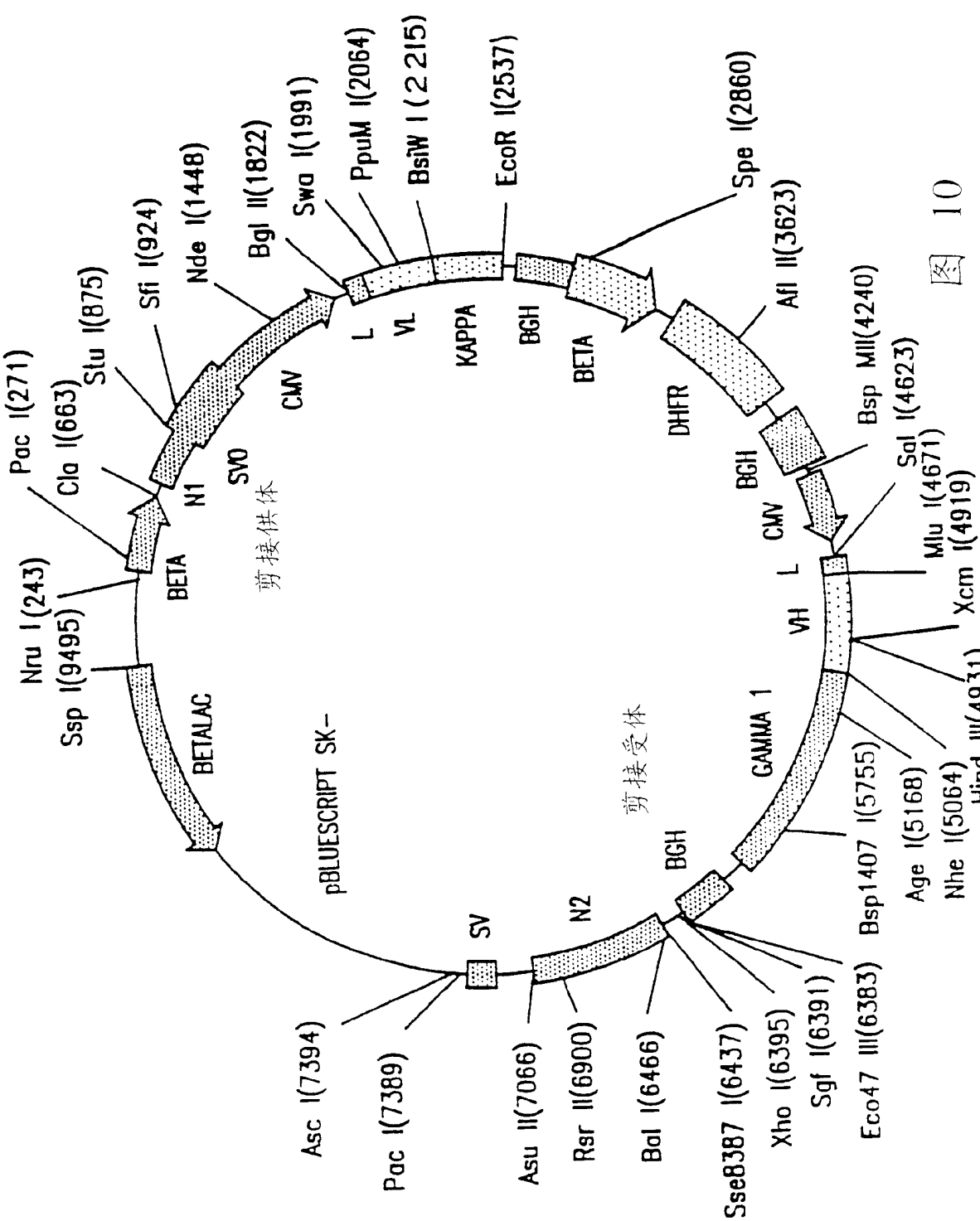
Pac I(271)
Cla I(663)
Stu I(875)
Sfi I(924)
Nde I(1448)
Bgl II(1822)
Swa I(1991)
PpuM I(2064)
BsiW I(2215)
EcoR I(2537)
Spe I(2860)
Afl II(3623)
Bsp MII(4240)
Sal I(4623)
Mlu I(4671)
Xcm I(4919)
Hind III(4931)
Nhe I(5064)
Age I(5168)
Bsp1407 I(5755)
Eco47 III(6383)
Sse8387 I(6437)
Xho I(6395)
Sgf I(6391)
Bal I(6466)
Rsr II(6900)
Asu II(7066)
Pac I(7389)
Asc I(7394)
Nru I(243)
Ssp I(9495)
BETALAC
pBLUESCRIPT SK-
BETA
N1
SV0
CMV
L
VL
KAPPA
BGH
BETA
DHFR
BGH
CMV
L
VH
GAMMA 1
BGH
SV
N2
剪接供体
剪接受体

图 10

```
ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTA CTC TGG          48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
          9          18          27          36          45

CTC CGA GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC          96
Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
                    66          75          84          93

CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT         144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
     102         111         120         129         138

CAG AGC ATT GCC AGT TAT GTA AAT TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGG AAA         192
Gln Ser Ile Ala Ser Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
147         156         165         174         183         192

GCC CCT AAA GTC CTC ATT TTT GCT TCA GCC AAT TTG GTG AGT GGG GTC         240
Ala Pro Lys Val Leu Ile Phe Ala Ser Ala Asn Leu Val Ser Gly Val
        201         210         219         228         237

CCA TCA AGA TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GTT TTC ACC CTC ACC         288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr
    246         255         264         273         282

ATC AGC AAT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCA ACC TAC TTC TGT CAG CAG         336
Ile Ser Asn Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
291         300         309         318         327         336

AGT TAC ACT AAT TTC AGT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA         384
Ser Tyr Thr Asn Phe Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        345         354         363         372         381

CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG         432
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
    390         399         408         417         426

CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC         480
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
435         444         453         462         471         480

TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA         528
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
        489         498         507         516         525

TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC         576
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    534         543         552         561         570

ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG         624
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
579         588         597         606         615         624

AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG         672
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        633         642         651         660         669

CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TGA                         708
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  *
    678         687         696         705
```

图 11 a

```
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT          48
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
            240                 245                 250

GTC TTG TCC CAG GTA CAG TTG CAG GAG TCT GGT CCT GCG CTG GTA AAA          96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
        255                 260                 265

CCC ACA CAG ACC CTC ACA CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC         144
Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
    270                 275                 280

AGC ACC AGA GGA ATG AGT GTG AAC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGG AAG         192
Ser Thr Arg Gly Met Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
285                 290                 295                 300

GCC CTG GAA TGG CTA GCC CGC ATT GAT TGG GAC GAT GAT ACA TTC TAC         240
Ala Leu Glu Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Thr Phe Tyr
                305                 310                 315

AGC GCT TCT CTG AAG ACT AGG CTC AGC ATC TCC AAG GAC ACC TCC AAA         288
Ser Ala Ser Leu Lys Thr Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
            320                 325                 330

AAC CAG GTG GTC CTC AGA ATG ACC AAC GTA GAC CCT GTG GAC ACA GCC         336
Asn Gln Val Val Leu Arg Met Thr Asn Val Asp Pro Val Asp Thr Ala
        335                 340                 345

ACA TAT TTT TGT GCA CGG GCC TCA CTA TAT GAC AGT GAT AGT TTC TAC         384
Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Ser Leu Tyr Asp Ser Asp Ser Phe Tyr
    350                 355                 360

CTC TTC TAC CAT GCC TAC TGG GGC CAG GGA ACC GTG GTC ACC GTC TCC         432
Leu Phe Tyr His Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Thr Val Ser
365                 370                 375                 380

TCA GCT AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC         480
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
                385                 390                 395

AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC         528
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
            400                 405                 410

TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC         576
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
        415                 420                 425

AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC         624
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
    430                 435                 440

TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG         672
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
445                 450                 455                 460

ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC         720
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
                465                 470                 475

AAG AAA GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA                                 750
Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
            480                 485
```

图 11 b

```
        696         705         714         723         732         741         750

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC
        759         768         777         786         795         804         813

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG
        822         831         840         849         858         867         876

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT
        885         894         903         912         921         930         939

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC
        948         957         966         975         984         993        1002

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC
       1011        1020        1029        1038        1047        1056        1065

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG
       1074        1083        1092        1101        1110        1119        1128

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
       1137        1146        1155        1164        1173        1182        1191

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
       1200        1209        1218        1227        1236        1245        1254

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC
       1263        1272        1281        1290        1299        1308        1317

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG
       1326        1335        1344        1353        1362        1371        1380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys TER
CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
       1389        1398        1407        1416        1425
```

图 11c

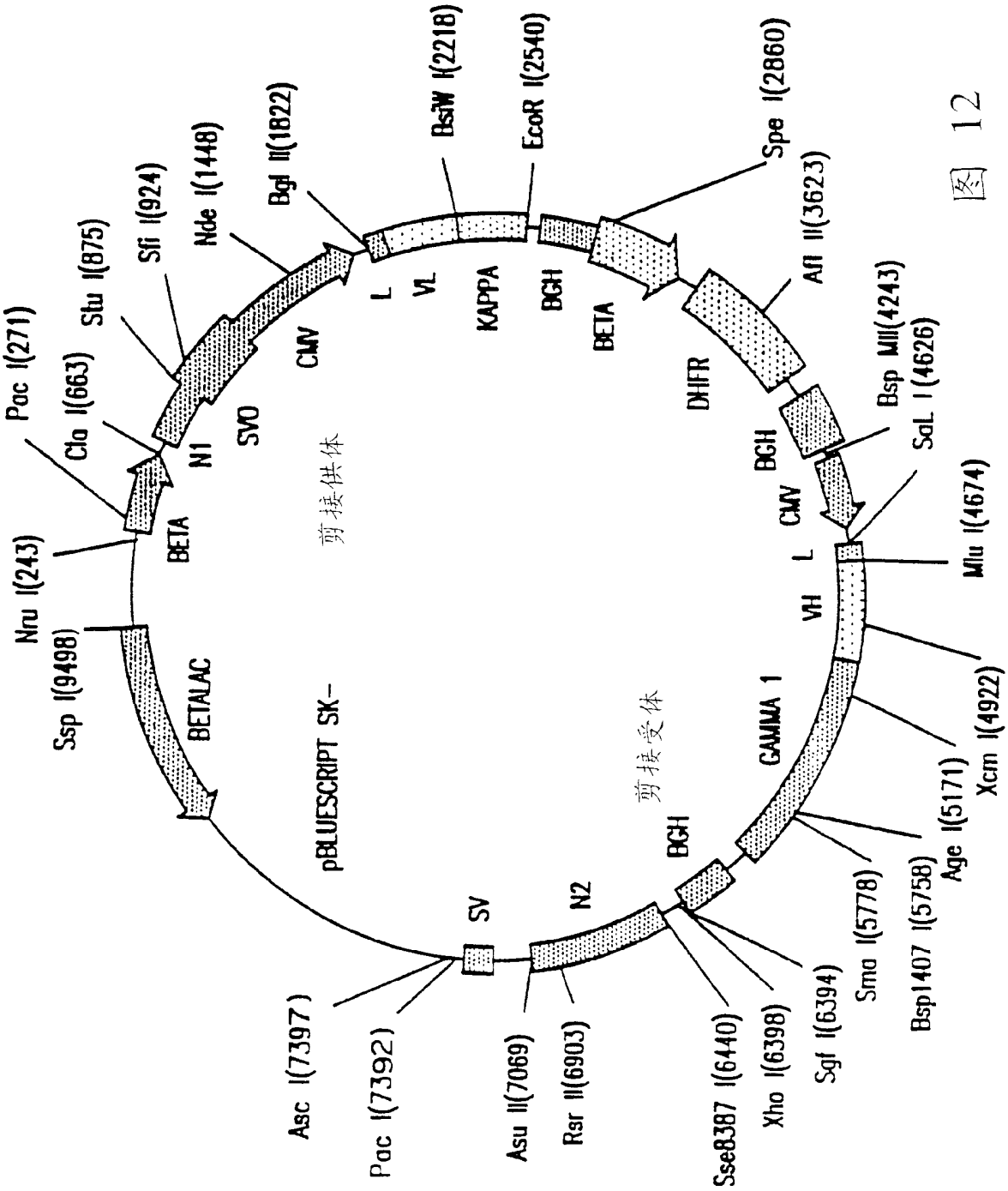
Pac I(271)
Cla I(663)
Stu I(875)
Sfi I(924)
Nde I(1448)
Bgl II(1822)
BsiW I(2218)
EcoR I(2540)
Spe I(2860)
Afl II(3623)
Bsp MII(4243)
Sal I(4626)
Mlu I(4674)
Xcm I(4922)
Age I(5171)
Bsp1407 I(5758)
Sma I(5778)
Sgf I(6394)
Xho I(6398)
Sse8387 I(6440)
Rsr II(6903)
Asu II(7069)
Pac I(7392)
Asc I(7397)
Nru I(243)
Ssp I(9498)
BETALAC
pBLUESCRIPT SK-
BETA
N1
SVO
CMV
L
VL
KAPPA
BGH
BETA
DHFR
BGH
CMV
L
VH
GAMMA 1
BGH
剪接供体
剪接受体
SV
N2

图 12