

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03812397.5

[51] Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1326879C

[22] 申请日 2003.3.27 [21] 申请号 03812397.5

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 29 [33] US [31] 60/369,044

[86] 国际申请 PCT/US2003/009260 2003. 3. 27

[87] 国际公布 WO2003/085089 英 2003. 10. 16

[85] 进入国家阶段日期 2004. 11. 29

[73] 专利权人 先灵公司

地址 美国新泽西州

共同专利权人 阿布格尼克斯公司

[72] 发明人 S·格林费德 J·科尔瓦兰

[56] 参考文献

US5683892A 1997. 11. 4

审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 68 页

[54] 发明名称

人源抗白细胞介素 5 单克隆抗体及其制备方法和包含这些抗体的组合物

[57] 摘要

本发明涉及特异性结合白细胞介素 5(IL-5), 特别是人 IL-5 的抗体和其抗原结合片段。本发明还涉及人源抗 IL-5 抗体, 包括嵌合抗体、双特异性抗体、衍生抗体、单链抗体或融合蛋白的部分。本发明还涉及从抗 IL-5 抗体衍生来的分离的重链和轻链免疫球蛋白分子以及编码这些分子的核酸分子。本发明还涉及制备抗 IL-5 抗体的方法, 以及包含这些抗体的药物组合物和使用这些抗体和组合物进行诊断和治疗的方法。本发明还提供了使用编码人源抗 IL-5 抗体的重链和/或轻链免疫球蛋白分子的核酸分子进行基因治疗的方法。本发明还涉及基因治疗的方法和含有本发明的核酸分子的转基因动物。

1. 能与 IL-5 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或片段包括:

a. 包含 SEQ ID NOS: 8、10 和 12 分别所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链氨基酸序列; 和

b. 包含 SEQ ID NOS: 14、16 和 18 分别所示的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链氨基酸序列。

2. 编码权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

3. 如权利要求 2 所述的核酸序列, 其可操作地与表达控制序列相连。

4. 一种宿主细胞, 其被权利要求 3 所述的核酸序列转化。

5. 一种制备能特异性结合 IL-5 的抗体或其抗原结合片段的方法, 该方法包括培养权利要求 4 所述宿主细胞的步骤。

6. 一种组合物, 其含有如权利要求 1 所述的抗体或其片段和药物可接受的载体。

7. 如权利要求 6 所述的组合物, 其进一步含有选自如下的组分:

(a) 诊断剂; 和

(b) 治疗剂。

8. 一种试剂盒, 其含有如权利要求 1 所述的抗体或其片段。

9. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或抑制以 IL-5 活性异常为特征的病症或疾病的药物组合物中的用途。

10. 如权利要求 9 所述的用途, 其中的病症或疾病选自: 哮喘、哮喘恶化、哮喘恶性发作、慢性肺炎、过敏性鼻炎、常年过敏性鼻炎、过敏性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞增多症、Churg- Strauss 综合征、特应性皮炎、盘尾丝虫皮炎、间歇性血管水肿、嗜酸粒细胞性肌痛综合征、腹腔病、嗜酸粒细胞性胃肠炎、蠕虫感染、何杰金氏病、鼻息肉、Loeffler's 综合征、荨麻疹、嗜酸粒细胞过度增多性支气管炎、结节性动脉炎、鼻窦炎、慢性鼻窦炎、嗜酸粒细胞性食管炎、过敏性嗜酸粒细胞性食管炎、变应性结膜炎。

11. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或抑制受试者体内由 IL-5 介导的变态反应的药物组合物中的用途。

12. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或抑制受试者中由 IL-5 介导的选自下列的状况的药物组合物中的用途：

- (a) 嗜酸性粒细胞的增殖、成熟、存活、激活、血流迁移、内皮粘附、组织浸润；
- (b) 肺水肿；
- (c) 支气管收缩；
- (d) 气道过度应激；
- (e) 肺嗜酸粒细胞增多或中性粒细胞增多；
- (f) 皮肤嗜酸粒细胞增多；和
- (g) 气道上皮损伤。

13. 如权利要求 9-12 中任一项所述的用途，其中所述药物组合物进一步包含另一种治疗剂。

14. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或抑制 IL-5 与 IL-5 受体结合的药物组合物中的用途。

15. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或抑制 IL-5 受体介导的酪氨酸磷酸化的药物组合物中的用途。

人源抗白细胞介素 5 单克隆抗体及其制备方法 和包含这些抗体的组合物

技术领域

本发明涉及特异性结合白细胞介素 5 (IL-5) 的人源单克隆抗体及其抗原结合片段及其制备方法和包含这些抗体或抗原结合片段的组合物。

背景技术

嗜酸性粒细胞在哮喘的发病机理中起重要作用。哮喘的严重程度及气管过度应激的程度都与血液或痰中嗜酸性粒细胞的数量有关。支气管活检研究显示嗜酸性粒细胞是哮喘气道炎症的主要成分，其颗粒含量在哮喘患者气管内液中的浓度增加。这些颗粒由大量蛋白质组成，它们通过多种机制对气管细胞有直接毒性作用，比如上皮细胞脱落、纤毛停滞、产生氧自由基和气管神经纤维损伤等。嗜酸性粒细胞还能产生增强肥大细胞组织胺释放的介质。

嗜酸性粒细胞的这些作用与支气管慢性炎症直接相关，表现为气管壁肿胀和产生气管粘液等。这种炎症反应使空气传播的物质更容易穿过损伤的气管上皮，直接导致神经应激和平滑肌收缩的增强 (Greenfeder 等, Respiratory Research 2: 71-79, 2001)。

白细胞介素 5 (IL-5) 是嗜酸性粒细胞中的主要介质，也是哮喘气道损伤时的重要炎症因子。它主要由 T 细胞中的 Th2 亚类产生，也有一小部分由其他细胞包括嗜酸性粒细胞产生。IL-5 对骨髓中嗜酸性粒细胞的成熟非常重要，其次对嗜酸性粒细胞的趋化反应也很重要。IL-5 还能刺激嗜酸性粒细胞的活化、延长其存活时间、增强其对特殊刺激因子 (如 IgA 或 IgG) 的脱颗粒反应，它也是一般的前炎症介质。在临床哮喘和人支气管抗原诱发模型中均检测到 IL-5 水平增加 (Greenfeder et al. , Respiratory Research 2: 71-79, 2001)。

目前对哮喘的治疗最有效的方法是通过鼻腔或口腔给予固醇类药物来抑制哮喘中一些关键介质 (包括 IL-5) 的表达，以减轻肺部炎症。然而众所周知长期使用固醇类药物是不利的，因而直接的抗 IL-5 治疗是哮喘治疗中的有意义的靶标。

因此，有必要获得高亲和力的抗体，特别是人源抗 IL-5 抗体，用于治疗人体由 IL-5 介导的疾病。

发明概述

本发明提供了抗体或其抗原结合片段，它们能特异地结合 IL-5。在某些实施方案中，这些分离到的抗体或抗原结合片段可以是多克隆的也可以是单克隆的。在优选的实施方案中，这些抗体能特异地结合人 IL-5。在更优选的实施方案中，这些抗体是人源单克隆抗体。本发明包括由人源抗体重链和/或人源抗体轻链组合物的抗体、完整的人源抗体可变区或其任何部分、以及所述抗体的单独 CDRs。

在一些实施方案中，这些抗体或其抗原结合片段的重链氨基酸序列包含从人 V3-23 基因、人 D1-20 基因和人 JH4B 基因的胚系氨基酸序列衍生而来的氨基酸序列。在更优选的实施方案中，这些抗体或其抗原结合片段的重链 CDR2 与胚系氨基酸相比有 1 个氨基酸置换，重链 CDR3 与胚系氨基酸相比有 2 个氨基酸置换。

在一些实施方案中，这些抗体或其抗原结合片段的轻链氨基酸序列包含从人 VK08/018 基因和人 JK4 基因的胚系氨基酸序列衍生而来的氨基酸序列。在更优选的实施方案中，这些抗体或其抗原结合片段的轻链 CDR1、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 与胚系氨基酸相比各有 1 个氨基酸置换。

在一些实施方案中，抗体的重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2 所示的序列。在另一些实施方案中，抗体的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别为 SEQ ID NO: 8、10 和 12 所示的序列。在另一种实施方案中，抗体的重链包含一段如表 2 所示从 CDR1 到 CDR3 连续的氨基酸序列。在更优选的实施方案中，抗体的重链可变区序列为 SEQ ID NO: 6 所示的序列。在另一些实施方案中，任何上述抗体的轻链序列为 SEQ ID NO: 4 所示的轻链氨基酸序列，或轻链可变区序列为 SEQ ID NO: 4 的 23~130 位氨基酸所示的序列，或轻链 CDR1 到 CDR3 如表 3 所示具有 SEQ ID NO: 4 的 46~119 位氨基酸的序列，或轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO: 14、16 和 18 所示的序列。

本发明的抗体或其片段可以是免疫球蛋白 G (IgG)、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子。在一种优选的实施方案中，这种人源抗体是 IgG，可能是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型。在更优选的实施方案中，这

种人源抗体是 IgG4 亚型。在更优选的实施方案中,这种人源抗体是 20.13.3。在另一种实施方案中,这种抗体或其抗原结合片段可以从 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链抗体或嵌合抗体衍生而来。在另一种实施方案中,这种抗体或其抗原结合片段可以作为融合蛋白的一部分。

另一方面,本发明提供了包含上述重链和轻链免疫球蛋白分子或其片段的编码序列的多核苷酸分子,特别是提供了编码重链和轻链可变区、编码重链和轻链 CDR1 到 CDR3 连续的氨基酸序列以及编码单独 CDRs 的核苷酸序列。

本发明的另一个目的是提供经过标记的或衍生的人源抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段。在一种实施方案中,这种抗体或其片段是经过放射性标记物、酶标记物、毒素、磁性物质或药物偶联物的标记。在另一种实施方案中,这种抗体或其片段经过衍生以提高其一种或多种特性,比如半衰期、生物利用度或活性。在一种优选的实施方案中,这种抗体或其片段用聚乙二醇,至少 1 个甲基或乙基或至少一个糖链衍生。在另一种优选的实施方案中,经过标记或衍生的抗体或其片段被用于诊断或治疗方法。

本发明的另一个目的是提供具有下述一种或多种特性的抗 IL-5 抗体或其片段:抑制或减轻 IL-5 介导的炎症反应和嗜酸性细胞在体内的成熟、活化、脱颗粒或组织浸润;抑制 IL-5 引起的平滑肌的过度应激;降低 IL-5 在肺、气道或血液中的水平。在一种优选的实施方案中,这种人源抗体能抑制或减轻嗜酸性细胞在体内的组织浸润。在一种优选的实施方案中,这种组织是肺组织或气道内壁组织。

本发明的另一个方面是提供包含上述抗体或抗原结合片段和药学上可接受载体的药物组合物或试剂盒。在一种优选的实施方案中,这种药物组合物或试剂盒还含有其他成分,如显色剂或治疗剂。在优选的实施方案中,这种药物组合物或试剂盒被用于诊断或治疗方法。

本发明还包括诊断方法。一种实施方案中,本发明提供一种方法用于诊断表达 IL-5 的组织的存在和位置。在一种优选的实施方案中,这种方法使用标记的抗体或其片段。这种方法可在体内或体外使用。另一种实施方案中,提供的诊断方法能检测人源抗 IL-5 抗体是否能抑制或减轻嗜酸性细胞的组织浸润,如肺组织浸润。

本发明的另一个目的包括用人源抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段来进行治疗的方法。在一种实施方案中,这种治疗包括给予需要的患者有效剂量的抗体。在一种优选的实施方案中,该患者患有下列某种疾病:哮喘、哮喘恶化、哮喘恶性发作、慢性肺炎、过敏性鼻炎、常年过敏性鼻炎、过敏性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞增多症、Churg-Strauss 综合征、特应性皮炎、盘尾丝虫皮炎、间歇性血管水肿、嗜酸粒细胞性肌痛综合征、腹腔病、嗜酸粒细胞性胃肠炎、蠕虫感染、何杰金氏病、鼻息肉、Loeffler's 综合征、荨麻疹、嗜酸粒细胞过度增多性支气管炎、结节性动脉炎、鼻窦炎、慢性鼻窦炎、嗜酸粒细胞性食管炎、过敏性嗜酸粒细胞性食管炎、变应性结膜炎。在优选的实施方案中,这种治疗能抑制或减轻嗜酸性细胞的肺组织浸润。抗体或其片段给予的次数可以从每日三次到每 6 个月一次,给予的途径可以是静脉、皮下、肌肉、胃肠外或局部途径。在另一种实施方案中,治疗可以和外科手术或其他免疫治疗同时进行。在更优选的实施方案中,抗体可经过放射性标记物、药物偶联物、免疫毒素或毒素的标记,或者与一段毒性肽组合物融合蛋白。

另一方面,本发明提供了制备本发明所述抗体或其抗原结合片段的方法,包括用永生性细胞株、人工合成、重组表达或噬菌体展示技术等方法来制备。

本发明的另一个目的是提供编码抗 IL-5 抗体的重链和/或轻链、其抗原结合片段、其衍生物的核酸。在一种优选的实施方案中,该核酸分子是从表达抗 IL-5 抗体的细胞或细胞系中获得。在更优选的实施方案中,该核酸分子是从杂交瘤细胞中获得。在更进一步优选的实施方案中,该杂交瘤细胞是 20.13.3。另一方面,本发明提供了包含该核酸分子的载体和宿主细胞。进一步说,本发明提供了制备重组抗体的重链和/或轻链、其抗原结合片段、或其衍生物的方法。

本发明还提供了通过给予需要的患者有效剂量的编码抗 IL-5 抗体重链和/或轻链、其抗原结合片段、或其衍生物的核酸分子来进行治疗的方法。在一种优选的实施方案中,这种方法可治疗下列(并不仅限于下列)疾病:哮喘、哮喘恶化、哮喘恶性发作、慢性肺炎、过敏性鼻炎、常年过敏性鼻炎、过敏性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞增多症、Churg- Strauss 综合征、特应性皮炎、盘尾丝虫皮炎、间歇

性血管水肿、嗜酸粒细胞性肌痛综合征、腹腔病、嗜酸粒细胞性胃肠炎、蠕虫感染、何杰金氏病、鼻息肉、Loeffler's 综合征、荨麻疹、嗜酸粒细胞过度增多性支气管炎、结节性动脉炎、鼻窦炎、慢性鼻窦炎、嗜酸粒细胞食管炎、过敏性嗜酸粒细胞性食管炎、变应性结膜炎。

发明的详细描述

定义与一般技术

除在这里特别定义的以外，本发明中使用的科学和技术术语其含义与本领域普通技术人员通常所理解的一致。此外，除非上下文需要，本发明中使用的单数名词包括复数含义，复数名词包含单数含义。通常来说，这里描述的细胞组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、蛋白质和核酸化学的相关术语是本领域中众所周知和常用的。本发明使用的方法和技术除非特别说明基本上是按照本领域中众所周知的常规方法进行的，这些方法在各种普通或专门的参考书籍中都有描述，如 Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992); Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1990) 等。酶促反应和纯化技术按制造商说明书操作，有的是本领域的常规方法，有的在这里做了描述。这里使用的与分析化学、有机合成化学和药物化学相关的名词或实验操作程序都是本领域众所周知的和常用的。化学合成、化学分析、药物制剂、处方、运输和对病人的治疗均采用标准技术。

除非特别说明下列名词术语均为下述含义：

术语“多肽”包括天然或人工合成蛋白质、蛋白质片段和某蛋白质序列的多肽类似物。它可以是单体，也可以是多聚体。与本发明有关的多肽包括人免疫球蛋白重链分子和κ轻链分子，也包括由免疫球蛋白重链分子和轻链分子（如κ轻链分子）组合物的抗体分子，还包括这些分子的片段和其类似物。

术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”是指某种蛋白质或多肽具有下列某种来源或特点：（1）不含其天然状态下与之共存的其他

成分；（2）不含同一物种的其他蛋白；（3）用不同物种的细胞表达而来；或（4）自然界不存在。因此，某种化学合成的多肽或由与其来源不同的物种细胞表达出的多肽是与其天然状态下共存的其他成分“分离的”。同样某种蛋白质也可以用本领域的常规的蛋白纯化技术与与其天然状态下共存的其他成分分离。

某种蛋白或多肽“基本纯”、“基本均一”或“基本纯化的”是指样品中单一多肽的含量至少为 60~75%。该蛋白或多肽可以是单体或多聚体。基本纯的蛋白或多肽可以指蛋白样品中纯度（重量比）约 50%、60%、70%、80%或 90%，通常约 95%，优选纯度在 99%以上。蛋白的纯度或均一性用本领域的常规方法检测，如将蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，再用常规染料使胶上的单一蛋白条带显现出来。如需要，也可用本领域常用的 HPLC 或其他方法提供更高的检测分辨率。

术语“多肽片段”在这里是指某种多肽氨基端和/或羧基端缺失，但其剩余的氨基酸序列与天然多肽相应位置的序列完全相同。片段一般至少 5、6、8 或 10 个氨基酸长，优选至少 14 个氨基酸长，更优选至少 20 个氨基酸长，通常至少 50 个氨基酸长，更优选至少 70 个氨基酸长。

术语“多肽类似物”在这里是指某种多肽含有一段 25 个氨基酸以上的片段，该片段与在合适条件下能特异性结合 IL-5 的氨基酸序列的某一部分基本相同。通常多肽类似物与天然序列相比含有一个保守氨基酸的置换（或插入或缺失）。多肽类似物一般至少 20 个氨基酸长，优选至少 50 个氨基酸长或更长，常常可以与天然存在的多肽一样长。

非肽类似物在制药工业中常被开发为药物，其与模板多肽的特性类似。这些非肽化合物被称为“肽模拟物”（peptide mimetics 或 peptidomimetics）。参考文献见 Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); 和 Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)。这些化合物常通过计算机分子模建辅助设计。肽模拟物结构上与有治疗作用的多肽相似，可以产生同样的防治作用。一般来说，肽模拟物与典型多肽（即有特定的生化特性或药物活性的多肽，如某种人抗体）在结构上相似，但是有一个或多个肽键被下列基团取代：--CH₂NH--，--CH₂S--，--CH₂-

CH₂--, --CH=CH--(顺式和反式), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, --CH₂SO--, 采用的是本领域的常规方法。系统性的用同一氨基酸的 D-氨基酸形式来置换某一保守序列的一个或多个氨基酸(如用 D-赖氨酸代替 L-赖氨酸)也可以用来构建更稳定的肽。此外, 包含某一保守序列或基本相同的保守序列变异体的特定结构的肽也可以用本领域的方法来构建(见参考文献: Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992)), 比如, 通过假如内部半胱氨酸残基能够形成分子内二硫键, 从而使某一多肽环化。

术语“免疫球蛋白”是一种四聚体分子。自然界存在的免疫球蛋白四聚体是由两个相同多肽链对组合物的, 每个多肽链对有一条“轻”链(约 25 kD)和一条“重”链(约 50-70 kD)。每条链的氨基端部分包含一个约 100-110 左右氨基酸的可变区, 主要负责识别抗原。每条链的羧基端部分是恒定区主要负责发挥功能效应。人类的轻链分为 κ 链和 λ 链两类; 重链被分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 、 ϵ 五类, 对应抗体的亚类分别为 IgM, IgD, IgG, IgA 和 IgE。轻重链的可变区和恒定区均由一个约 12 个左右氨基酸的“J”区连接, 重链还包括一个约 10 个左右氨基酸的“J”区。参考文献见: See generally, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))。每个轻/重链对的可变区形成抗体的结合位点, 因此完整的免疫球蛋白分子有两个结合位点。

免疫球蛋白链具有基本相同的结构: 在相对保守的骨架区(FR)间有三个高度可变的区域, 也叫互补决定区(CDRs)。两条链的 CDRs 被骨架区排成一行, 使它们能够结合特异的表位。无论轻链或重链从 N 端到 C 端的功能区依次为 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。每个功能区所含氨基酸的划分与下列文献一致: Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342: 878-883 (1989)。

术语“抗体”是指完整的免疫球蛋白或者其抗原结合片段, 该片段能和完整抗体竞争特异的结合位点。抗原结合片段可以由完整抗体通过重组蛋白质技术、酶解反应或化学切割等方法而获得。抗原结合

片段主要包括：Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、双价抗体(diabodies)以及至少包括某种免疫球蛋白一部分而具有抗原结合特性的多肽。Fab是一种单价片段，由VL、VH、CL、CH I几个结构域组合物；F(ab')₂是一种二价片段，由两个Fab片段通过位于铰链区的二硫键连接而成；Fd片段由VH和CH I组合物；Fv由抗体的VL和VH组合物；dAb片段(Ward et al. , Nature 341: 544-546, 1989)由一个VH结构域构成。单链抗体(scFv)是由VL和VH区通过合成的接头相连为一条蛋白链而形成的一种单价的抗体分子(Bird et al. , Science 242: 423-426, 1988; Huston et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, 1988)。双价抗体(diabodies)是双价双特异性的抗体，它的VH和VL区位于一条多肽链，但是二者间的接头太短使同条链的两个结构域无法配对，因此迫使其与另一条链对应结构域配对而形成两个抗原结合位点(Holliger, P. , et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993; Poljak, R. J. , et al. , Structure 2: 1121-1123, 1994)。一个或多个CDR可以用共价或非共价的形式插入某个分子形成免疫粘附素。免疫粘附素可以是将CDR插入一条大的多肽链，也可以用共价或非共价的形式将CDR与另一条多肽链相连。CDR使免疫粘附素能特异性的结合感兴趣的特定抗原。

抗体可以有一个或不止一个结合位点。如果结合位点不止一个，那么它们可以相同也可以不同。比如自然界存在的免疫球蛋白有两个相同的结合位点，单链抗体或Fab片段仅有一个结合位点，而“双特异性”或“双功能性”抗体有两个不同的结合位点。双特异性抗体可用多种方法获得，如杂交瘤细胞融合或不同Fab'片段结合。参考文献见：Songsivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny et al. J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)。

术语“分离的抗体”是指某种抗体(1)不含其天然状态下与之共存的其他成分，包括其他抗体；(2)不含同一物种的其他蛋白；(3)用不同物种的细胞表达而来；或(4)自然界不存在。分离的抗体的例子包括用IL-5亲和纯化而来的抗IL-5抗体，用杂交瘤细胞或其他细胞系在体外合成而来的抗IL-5抗体，以及从转基因鼠获得的抗IL-5抗体。

术语“人源抗体”包括所有含一个或多个由人免疫球蛋白序列衍生来的可变区和恒定区的抗体。这些抗体可用多种方法制备，如下所述。

人源化抗体是指从非人源抗体衍生而来的抗体，其重链和轻链骨架区和恒定区的某些氨基酸被突变，以避免或减轻在人体的免疫反应。作为替代方法，人源化抗体也可以通过将人抗体恒定区与非人源抗体的可变区融合而获得。如何制备人源化抗体的例子可参考美国专利 6,054,297、5,886,152 和 5,877,293。

术语“嵌合抗体”是指抗体的一个或多个功能区分别来源于不同抗体。

术语“ K_{off} ”是指一种抗体从抗原/抗体复合物上解离下来的速度常数。

术语“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。

术语“表位”包括所有能特异结合免疫球蛋白或 T 细胞受体的蛋白决定簇。表位决定簇通常由分子表面化学活性基团组合物，如氨基酸或糖链，通常具有特定的三维结构以及特异的带电性质。当解离常数 $\leq 1\mu\text{M}$ ，优选 $\leq 100\text{nM}$ ，最优选 $\leq 10\text{nM}$ 时，称抗体与抗原特异性结合。

抗体或免疫球蛋白分子片段或类似物可用本领域的常规技术按本说明书的介绍进行制备。优选的片段或类似物的氨基端或羧基端位于功能结构域附近。通过与公共或私有数据库中核苷酸和/或氨基酸数据的比较可以确定抗体的结构和功能结构域。优选的方法是用计算机比较方法来鉴别序列基序或预测在其他已知结构和/或功能的蛋白质中出现过的构象结构域。已有方法可以确定蛋白序列是否折叠成已知的三维结构 (Bowie et al. Science 253: 164 (1991))。

优选的氨基酸置换可以：(1)降低对蛋白水解的敏感性，(2)降低对氧化作用的敏感性，(3)改变形成蛋白复合物时的结合亲和力，(4)改变结合亲和性，和(5)给予或改变这些类似物的其他物理化学或功能特性。类似物可以包含与自然界存在的蛋白序列不同的各种突变。比如，可在自然界存在的蛋白序列中（特别是在发生分子间接触的结构域以外的部分）进行单个或多个氨基酸置换（特别是保守氨基酸的置换）。保守氨基酸的置换不应该改变亲本序列的结构特性（比如取代的氨基酸不应该打断亲本序列的螺旋结构，或改变亲本

序列的其他特定二级结构)。一些已知的蛋白二级和四级结构的例子参见 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991)。

本说明书使用的二十种基本氨基酸及其缩写均采用常规格式, 参考文献见 *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))。二十种基本氨基酸的立体异构体(如 D-氨基酸), 非自然界氨基酸如 α, α -双取代氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸, 以及其他非传统氨基酸也可以在本发明的多肽中使用。非传统氨基酸的例子有: 4-羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N, N, N-三甲基色氨酸、 ϵ -N-乙酰基赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、s-N-甲基精氨酸, 以及其他类似氨基酸和亚氨基酸(如 4-羟脯氨酸)。这里采用的多肽表示方法左边是氨基末端, 右边是羧基末端, 与常规标准用法一致。

术语“多核苷酸”这里指至少 10 个碱基长的核苷酸聚合物, 核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸, 也可以是核苷酸的修饰形式。多核苷酸包括 DNA 的单链或双链形式。

术语“分离的多核苷酸”这里指基因组、cDNA 或人工合成而来的多核苷酸或其组合, 具有以下特性: (1) 不含其天然状态下与之共存的其他多核苷酸的全部或部分; (2) 可以与其天然状态下不相连的某种多核苷酸相连; 或 (3) 在自然界不作为一个更大核酸序列的一部分存在。

术语“寡核苷酸”在这里包括自然界存在的、自然界存在的但含修饰核苷酸的和自然界不存在的寡核苷酸。寡核苷酸是多核苷酸的一个亚类, 一般含 200 或更少的碱基。优选寡核苷酸含 10-60 个碱基, 更优选含 12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 至 40 个碱基。寡核苷酸一般是单链, 比如探针; 但也可以是双链, 比如用作构建基因突变体。本发明所指寡核苷酸可以是正义也可以是反义寡核苷酸。

术语“自然界存在的核苷酸”这里包括脱氧核糖核苷酸和核糖核

苷酸。“修饰的核苷酸”这里包括经过修饰的或糖基取代以及类似改变的核苷酸。“寡核苷酸连接”这里包括下列寡核苷酸连接方式如：磷酸硫化、磷酸二硫化、磷酸硒化、磷酸二硒化、磷酸苯胺硫化、磷酸苯胺化、磷酸酰胺化，等等。参考文献见：LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)) ; Stec et al. U. S. Patent No. 5,151, 510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990)。寡核苷酸如需要可以用一种标记物标记便于检测。

除特别说明，单链多聚核苷酸序列的左边是 5'端；双链多聚核苷酸序列的左边是 5'方向。初始 RNA 转录体的 5'至 3'方向指转录的方向；与 RNA 序列一致的 DNA 链序列如果 5'端和 RNA 的 5'端方向一致，称为“上游序列”，如果方向相反，称为“下游序列”。

术语“可操作地连接”序列包括与目的基因连在一起的表达控制序列，也包括反式作用的或与目的基因间隔有一段距离的表达控制序列。“表达控制序列”这里指能够影响与其相连的编码序列的表达或加工的多聚核苷酸序列。表达控制序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列；有效的 RNA 加工信号如剪切和 PolyA 信号；能稳定细胞质 mRNA 的序列；能增强翻译效率的序列（如 Kozak 序列）；能增强蛋白稳定性的序列；在需要时能增强蛋白分泌性的序列。自然界中不同的宿主的这些控制序列不同；在原核生物，这些序列一般包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；在真核生物，这些序列一般包括启动子和转录终止序列。术语“控制序列”至少包括所有表达和加工必需的成分，也包括对表达和加工有用的其他成分，比如引导序列和融合序列。

术语“载体”这里指能运输与其相连的其他核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”，它是环形双链 DNA，其他 DNA 片段可以插入其中。另一类载体是病毒载体，其他 DNA 片段可以插入病毒基因组。某些载体可以在其进入的宿主细胞中自动复制（如包含细菌复制原点的细菌

载体和游离的哺乳动物载体)。有些载体(如非游离的哺乳动物载体)可以在进入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,与宿主基因组一起复制。此外,某些载体可以指导其所连基因的表达。这样的载体在这里称为“重组表达载体”(或简称“表达载体”)。在重组DNA技术上使用的表达载体一般为质粒的形式。本说明书中“质粒”和“载体”交替使用,因为质粒是最常用的载体形式。但是,本发明包括了其他形式的表达载体,如病毒载体(如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们具有同样的功能。

术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)这里指被转进重组表达载体的细胞。需要指出这个术语不仅指特定的原始细胞,还包括其后代细胞。因为突变或环境因素的作用,后代细胞可能出现某些改变,从而与亲本细胞不完全相同,但是仍包括在这里使用的术语“宿主细胞”的范围之内。

术语“选择性杂交”这里是指可检测的特异性的结合。本发明中的多核苷酸、寡核苷酸和它们的片段与核酸链进行选择性的杂交,杂交和洗涤的条件是使非特异性结合最小。如本领域的常规及此处所讨论的那样,“高严谨性”和“高严谨的”条件可以获得选择性杂交的结果。“高严谨性”和“高严谨的”条件的一个例子是将一种多核苷酸与另一种多核苷酸按如下方法孵育:将其中一种多核苷酸固定在一种固相表面如某种膜上,杂交液为 $6\times$ SSPE 或 SSC, 50% 甲酰胺, $5\times$ Denhardt's 试剂, 0.5% SDS, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性的鲑鱼精 DNA 片段, 42°C 杂交 12-16 小时,再用含 $1\times$ SSC, 0.5% SDS 的洗液 55°C 洗两次。参见 Sambrook et al., supra, pp. 9.50-9.55。

如果两个氨基酸序列部分或完全相同则二者是同源的。比如,85%的同源性是指两个序列以最优配对的方式比较有85%的氨基酸是相同的。在最优配对的方式下允许有缺口(在配对的两个序列的任何一个中,)5个或少于5个氨基酸的缺口优选,2个或少于2个氨基酸的缺口更优选。可选地和优选地,采用ALIGN程序的突变数据矩阵,缺口限制为6或更大,如果两个蛋白序列(或由它们衍生而来的长于30个氨基酸的多肽序列)得分大于5(按标准差单位),则按本说明书的理解这两个序列是同源的。参见 Dayhoff, M. O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National

Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10。如果两个序列或其部分用 ALIGN 程序的最佳配对方式有 50%或以上的氨基酸相同, 则这两个序列或其部分是更优选的同源。

术语“对应于”这里指一个多核苷酸序列与参考多核苷酸序列的全部或部分相同, 也指一个多肽序列与参考多肽序列相同。相反。术语“与...互补”这里指互补序列与参考多核苷酸序列的全部或部分相同。举例说明, 核苷酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”, 而与参考序列“GTATA”互补。

下列术语用来描述两个或多个多核苷酸或氨基酸序列间的关系: “参考序列”, “比较窗”, “序列一致”, “序列一致百分数”和“基本一致”。“参考序列”是特定的序列作为序列比较的基础; “参考序列”可能是一个更大序列的一部分, 如序列表中一条全长 cDNA 或基因序列的一部分, 也可以是全长 cDNA 或基因序列。一般来说, 参考序列至少 18 个核苷酸或 6 个氨基酸长, 有时至少 24 个核苷酸或 8 个氨基酸长, 常常是至少 48 个核苷酸或 16 个氨基酸长。因为两个多核苷酸或氨基酸序列可以分别 (1) 包含在两个分子间相似的序列 (如完整的多核苷酸或氨基酸序列的一部分), (2) 也可以包含在两个多核苷酸或氨基酸序列中不同的序列。两个或多个序列的比较通常通过“比较窗”来进行, 以确定和比较局部区域的序列相似性。

“比较窗”在这里指一个至少 18 个连续核苷酸或 6 个氨基酸长的概念上的片段, 在此处一个多核苷酸或氨基酸序列可以与一个至少 18 个核苷酸或 6 个氨基酸长的参考序列比较, 比较窗中的多核苷酸序列部分与参考序列相比 (采用最优配对比较) 可以包含 20%或更少的插入、缺失、置换及其他变化 (如缺口) 等, 这里的参考序列不含插入和缺失。比较窗中最优配对比较可采用 Smith 和 Waterman (Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)) 的局部同源性算法, Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)) 的同源配对算法, Pearson 和 Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85: 2444 (1988)) 的相似性搜索方法, 计算机执行的上述算法 (Wisconsin Genetics 软件包 7.0 版中的 GAP, BESTFIT, FASTA 和 TFASTA 软件 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks,

或 MacVector 软件包), 或采用各种其他方法进行比较和最优配对(如比较窗中的同源性最大百分数)。

术语“序列一致”指两个多核苷酸或氨基酸序列在比较窗中是相同的(比如在核苷酸对核苷酸或氨基酸残基对氨基酸残基的基础上)。术语“序列一致百分数”这样来计算: 在比较窗中比较两个最优配对的序列, 确定两个序列中核苷酸碱基(如 A、T、C、G、U 或 I)或氨基酸残基相同的个数即配对数, 用配对数除以比较窗中序列的总长度(即窗大小), 将计算值乘以 100 即得序列一致百分数。术语“基本一致”这里指多核苷酸或氨基酸序列的一种特性, 即在比较窗中多核苷酸或氨基酸序列与参考序列有至少 85% 的序列一致, 优选有至少 90-95% 的序列一致, 更优选有至少 98% 的序列一致, 最优选有至少 99% 的序列一致, 比较窗有至少 18 个核苷酸(6 个氨基酸)长, 更多情况是至少 24-48 个核苷酸(8-16 个氨基酸)长, 序列一致百分数的计算通过在比较窗中将参考序列与含插入或缺失不超过参考序列的 20% 的序列相比较来进行。参考序列可能是一个更大序列的一部分。

对多肽来说, 术语“基本一致”是指两个多肽序列用 GAP 或 BESTFIT 程序的默认缺口权重进行最优配对后有至少 80% 的序列一致, 优选有至少 90% 的序列一致, 更优选有至少 95% 的序列一致, 进一步更优选有至少 98% 的序列一致, 最优选有至少 99% 的序列一致。优选地, 氨基酸残基的不同是由保守氨基酸的置换造成的。保守氨基酸的置换是指有相似侧链的氨基酸残基间的互换。比如, 含脂肪族侧链的一组氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸; 含脂肪族-羟基侧链的一组氨基酸包括丝氨酸和苏氨酸; 含酰胺基侧链的一组氨基酸包括天冬酰胺和谷氨酰胺; 含芳香族侧链的一组氨基酸包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸; 含碱基侧链的一组氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸; 含巯基侧链的一组氨基酸包括半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸置换方式为: 缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸, 苯丙氨酸-酪氨酸, 赖氨酸-精氨酸, 丙氨酸-缬氨酸, 谷氨酸-天冬氨酸, 以及天冬酰胺-谷氨酰胺。

这里所讨论的抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的较小变化包含在本发明的保护范围之内, 只要氨基酸序列变化仍保持了至少 75% 以上, 优选至少 80%、90%、95% 以上, 最优选 99% 的序列一致。特

别是包含了保守氨基酸的替代情况。保守氨基酸的替代是指发生在侧链相关的氨基酸家族间的变化。基因编码的氨基酸通常分为几个家族：（1）酸性=天冬氨酸、谷氨酸；（2）碱性=赖氨酸、精氨酸、组氨酸；（3）非极性=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；（4）不带电的极性=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。优选的家族为：丝氨酸和苏氨酸的脂肪族-羟基家族；天冬酰胺和谷氨酰胺的含酰胺基家族；丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的脂肪族家族；和苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的芳香族家族。举例来说，可以合理地预测用异亮氨酸或缬氨酸来代替亮氨酸，用谷氨酰胺来代替天冬酰胺，用丝氨酸来代替苏氨酸，或用一个结构相关的氨基酸来代替另一个氨基酸不会对一个目的分子的结合或特性有大的影响，尤其是替换不涉及骨架区的氨基酸时更是如此。一个氨基酸的变化是否会导致多肽功能的改变可以通过测定改变后的多肽的特异活性来分析。本说明书详细描述了测定方法。

这里使用的术语“标记的”或“标记过的”是指在抗体分子中整合另一个分子。在一种实施方案中，标记物是一种可检测的标记物，比如整合一种放射性标记的氨基酸或在多肽上连接可被标记亲和素检测的生物素分子，标记亲和素可以是含光学或比色方法可测的荧光标记物或酶标记物的链亲和素。在另一种实施方案中，标记物或标志可以是治疗性的，比如药物偶联物或毒素。本领域中有多种标记多肽或糖蛋白的方法可以使用。标记多肽的例子有以下几种（并不限于与此）：放射性同位素或放射性核素（如 ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I ），荧光标记物（如 FITC，若丹明，镧系磷光体），酶标记物（如辣根过氧化物酶， β -半乳糖苷酶，荧光素酶，碱性磷酸酶），化学发光标记，生物素基团，被二级报告物识别的已知多肽表位（如亮氨酸拉链对序列，二级抗体结合位点，金属结合域，表位标签），磁性剂如螯化钆，毒素如白喉毒素，紫杉酚，细胞松弛素 B，短杆菌肽 D，溴化乙锭，吐根碱，丝裂霉素，表白亚乙苷（etoposide），拓扑异构酶抑制剂（tenoposide），长春新碱，长春化碱，秋水仙碱，阿霉素，红比霉素，二羟炭疽菌素二酮，mitoxantrone，光辉霉素，更生霉素，1-去氢睾酮，糖皮质激素，普鲁卡因，丁卡因，利多卡因，

心得安，嘌呤霉素及其类似物或衍生物。在某些实施方案中，标记物通过各种长度的间隔臂与多肽相连以降低可能的空间位阻。

术语“剂”这里指某种化合物，化合物的混合物，生物大分子或生物材料的提取物。

术语“药剂或药物”这里指在适当的给予病人后可产生治疗作用的某种化合物或组合物。这里使用的其他化学名词参照本领域的常规用法，参考文献包括 The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S. , Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))。

术语患者包括人及动物患病者。

整个说明书和权利要求书中，词语“包括”或相关词如“包含”或“含有”等理解为含所述数字或数字组，但不排除其他数字或数字组。

人源抗体和抗体的人源化

人源抗体避免了含小鼠或大鼠可变区和/或恒定区抗体的某些问题。这些小鼠或大鼠来源的蛋白的存在可导致这些抗体在患者体内的快速清除或导致患者产生对这些抗体的免疫反应。全人源的抗 IL-5 抗体可望使小鼠或小鼠衍生而来的单抗内在的免疫原性和变态反应减到最小，从而增加抗体使用的有效性和安全性。使用全人源的抗体可望对慢性和反复发作的人类疾病提供帮助，比如对炎症和癌症的治疗，它们可能需要多次重复的给予抗体。

制备抗体及产抗体细胞系的方法

免疫

在本发明的一种实施方案中，人源抗体通过用 IL-5 或其具有免疫原性的片段免疫含部分或所有人免疫球蛋白基因位点的非人动物来制备。优选的一种非人动物为 XenoMouse™ 小鼠。

XenoMouse™ 小鼠是一种基因改造的小鼠，其包含了人免疫球蛋白基因位点大片段，同时不具有产生小鼠抗体的能力。参考文献如下：Green et al. Nature Genetics 7: 13-21 (1994)；美国专利 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598 和 6,130,364。相关国际专利：W0 91/10741, 1991 年 7 月 25 日公开；W0 94/02602, 1994 年 2 月 3 日公开；W0 96/34096 和 W0 96/33735, 1996 年 10 月 31 日公开；W0 98/16654, 1998 年 4

月 23 日公开; WO 98/24893, 1998 年 6 月 11 日公开; WO 98/50433, 1998 年 11 月 12 日公开; WO 99/45031, 1999 年 9 月 10 日公开; WO 99/53049, 1999 年 10 月 21 日公开; WO 00/09560, 2000 年 2 月 24 日公开和 WO 00/037504, 2000 年 6 月 29 日公开。

XenoMouse™小鼠是用酵母人工染色体(YACs)改造的,该染色体含人重链基因位点 245kb 片段和 κ 轻链基因位点 190kb 片段,包含了核心的可变区和恒定区的序列特征。XenoMouse™小鼠可产生与成人相似的全人源的抗体库,可从中获得抗原特异性的人源单克隆抗体(单抗)。第 2 代 XenoMouse™小鼠通过导入含人重链基因位点和 κ 轻链基因位点百万碱基大小的酵母人工染色体,可产生约 80%的人源抗体库。参考文献见 Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156 (1997); Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188: 483-495 (1998); 及美国专利申请号 08/759,620, 1996 年 12 月 3 日提交。

在另一种实施方案中,含人免疫球蛋白基因位点的非人动物具有一个人免疫球蛋白“小区(minilocus)”。 “小区”方法是指外源基因的 Ig 基因位点是通过从 Ig 基因位点的个别基因的结合来模仿。因此,一种或多种 V_H基因、D_H基因、J_H基因, μ 恒定区,和另一个恒定区(优选 γ 恒定区)形成构建体来插入动物。相关的参考文献主要有美国专利 5,545,807、5,545,806、5,625,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,591,669、5,612,205、5,721,367、5,789,215、5,643,763 等,此处引入作为参考。

小区方法的优点是包含 Ig 基因位点的部分可以快速的构建并导入动物。但是这种方法的一个潜在缺点是免疫球蛋白可能没有足够的多样性以支持 B 细胞的发育,因此产生的抗体可能较少。

在另一种实施方案中,本发明提供了一种从非人、非小鼠动物中制备抗 IL-5 抗体的方法,即通过免疫含人免疫球蛋白基因位点的非人转基因动物来获得。制造这种动物的方法可见美国专利 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598 和 6,130,364。也可参见国际专利 WO 91/10741, 1991 年 7 月 25 日公开; WO 94/02602, 1994 年 2 月 3 日公开; WO 96/34096 和 WO 96/33735, 1996 年 10 月 31 日公开; WO 98/16654, 1998 年 4

月 23 日公开; WO 98/24893, 1998 年 6 月 11 日公开; WO 98/50433, 1998 年 11 月 12 日公开; WO 99/45031, 1999 年 9 月 10 日公开; WO 99/53049, 1999 年 10 月 21 日公开; WO 00/09560, 2000 年 2 月 24 日公开和 WO 00/037504, 2000 年 6 月 29 日公开。这些专利中的方法可以如美国专利 5,994,619 所述那样修改。优选的非人动物可以为大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。

为制备抗 IL-5 抗体,用 IL-5 抗原或其具有免疫原性的片段免疫含部分或全部人免疫球蛋白基因位点的非人动物。一种实施方案中,IL-5 抗原是分离得到和/或纯化得到的 IL-5。优选的 IL-5 抗原是人 IL-5。另一种实施方案中,IL-5 抗原是 IL-5 的一个片段。还有一种实施方案中 IL-5 抗原是含至少一个 IL-5 表位的片段。还有一种实施方案中 IL-5 抗原是表达 IL-5 的细胞。

动物免疫可按本领域任一种常规方法进行。参考可见 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990。免疫非人动物如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛和马的方法是本领域常规。可参考上面 Harlow 和 Lane 的书和美国专利 5,994,619。优选的方法是将 IL-5 与一种佐剂共同使用来刺激免疫反应。这些佐剂包括完全或不完全福氏佐剂、RIBI (muramyl dipeptides) 或 ISCOM (免疫刺激复合物)。这些佐剂可以通过将多肽在局部沉积以避免其被快速分散,或含有可以刺激宿主分泌巨噬细胞趋化因子和其他免疫活性因子的物质。如使用某种多肽免疫,优选的免疫程序是 2 次或更多次的给予多肽,整个免疫时间可以是数周。

抗体和产抗体细胞系的制备

在用 IL-5 抗原免疫某种动物之后,可从该动物体内获得抗体和/或产抗体的细胞。一种实施方案中,通过给动物放血或处死动物来获得含抗 IL-5 抗体的血清。从动物体内获得的血清可用来分离免疫球蛋白组分,或纯化抗 IL-5 抗体。具备本领域基本技术的人员都知道这种方法获得的血清或免疫球蛋白是多克隆的。使用血清中的多克隆抗体的缺点是可获得的抗体量是有限的,并且多克隆抗体具有组合物复杂、不均一的特性。

另一种实施方案中,可从免疫动物中制备产抗体的永生化细胞。免疫后,动物被处死,从脾或淋巴结获得的 B 细胞被用本领域常规的

方法永生化，这些方法包括转化细胞（如用 EBV）或将细胞与合适的永生化细胞系（如骨髓瘤细胞）融合等，均为本领域常规。参考上面 Harlow 和 Lane 的书。优选的骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽（一种非分泌细胞系）。在融合和抗生素选择后，用 IL-5、其部分片段或表达 IL-5 的细胞来筛选杂交瘤。优选的初始筛选方法是酶联免疫吸附试验（ELISA）或放免试验。最值得优选的初始筛选方法是 ELISA。ELISA 筛选的一个例子参见专利 WO 00/37504。

产生抗 IL-5 抗体的杂交瘤被选择、克隆后从中进一步筛选具有理想特性的克隆，包括杂交瘤生长迅速，抗体产生量高和抗体特性理想等，下面将进一步讨论。杂交瘤细胞可在体内通过同系动物或免疫系统缺失动物来扩增，也可在体外通过细胞培养来扩增。杂交瘤细胞的选择、克隆和扩增方法是本领域的常规技术。

优选的免疫动物是表达人免疫球蛋白基因的非人动物，从脾或淋巴结获得的 B 细胞与来源于同种非人动物的骨髓瘤融合。特别优选的免疫动物是 XenoMouseTM 小鼠，骨髓瘤细胞系是非分泌的小鼠骨髓瘤。在特定实施方案中，骨髓瘤细胞系是 NS0-bc12 或 P3-X63-Ag8.653，参见例如实施例 1。

在一种实施方案中，制备的杂交瘤可以产生人源抗 IL-5 抗体。优选的一种实施方案中，杂交瘤是小鼠杂交瘤，如上所述。优选的另一种实施方案中，杂交瘤是在非人非小鼠动物如大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中制备的。在另一种实施方案中，杂交瘤是人杂交瘤，是用人的非分泌骨髓瘤细胞与表达抗 IL-5 抗体的人细胞融合而来的。

核酸、载体、宿主细胞和制备重组抗体的方法

核酸

本发明还包括编码人源抗 IL-5 抗体的核酸分子。在一种实施方案中，核酸分子编码完整人源抗 IL-5 免疫球蛋白的重链和/或轻链。一种优选实施方案中，核酸分子编码人源抗 IL-5 免疫球蛋白的重链，另一核酸分子编码人源抗 IL-5 免疫球蛋白的轻链。更优选的实施方案中，编码的免疫球蛋白是人 IgG。编码的轻链可以是 λ 链或 κ 链。更优选的实施方案中，编码的轻链是 κ 链。

在优选的实施方案中，编码重链可变区（VH）的核酸分子来源于人 DP-47/3-11 VH 基因。在各种实施方案中，编码 VH 的核酸分子与

胚系 DP-47/3-11 基因的氨基酸差异不超过 10 个、6 个或 3 个。在一种优选实施方案中，编码 VH 的核酸分子与胚系序列间至少有 1 个氨基酸的差异，这一点和抗体 20.13. 3 重链胚系中氨基酸的变化相同。更优选的实施方案中，编码 VH 的核酸分子与胚系序列间至少有 3 个氨基酸的差异，这些氨基酸和抗体 20.13. 3 VH 胚系中的至少 3 个氨基酸的变化相同。

在一些实施方案中，核酸分子还包括从人 D1-20 多样性片段基因衍生来的核苷酸序列。另一些实施方案中，核酸分子还包括从人 JH4B 衍生来的核苷酸序列。

表 1 列举了抗体 20.13. 3 或其部分片段的核酸序列和编码的氨基酸序列。

表 1 单抗 20.13. 3 或其部分片段的序列表

SEQ ID NO:	序列说明
1	重链 DNA 全序列
2	重链蛋白全序列
3	轻链 DNA 全序列
4	轻链蛋白全序列
5	重链可变区 (V _H) DNA 全序列
6	重链可变区 (V _H) 蛋白全序列
7	V _H CDR1 DNA 序列
8	V _H CDR1 蛋白序列
9	V _H CDR2 DNA 序列
10	V _H CDR2 蛋白序列
11	V _H CDR3 DNA 序列
12	V _H CDR3 蛋白序列
13	V _L CDR1 DNA 序列
14	V _L CDR1 蛋白序列
15	V _L CDR2 DNA 序列
16	V _L CDR2 蛋白序列
17	V _L CDR3 DNA 序列

18	V _L CDR3 蛋白序列
----	--------------------------

在优选的实施方案中,核酸分子至少包含了编码抗体 20.13.3 VH CDR1 到 CDR3 氨基酸(如表 2 所示)的核酸序列。在另一种实施方案中,核酸分子包含了编码抗体 20.13.3 重链 1 个或多个 CDR 氨基酸的核酸序列。在另一种实施方案中,核酸分子包含了编码单抗 20.13.3 重链氨基酸(如 SEQ ID NO: 2 所示)的核酸序列。在另一种实施方案中,核酸分子包含了编码单抗 20.13.3 重链的核酸序列(如 SEQ ID NO: 1 所示)。在另一种实施方案中,核酸分子包含了编码单抗 20.13.3 重链 1 个或多个 CDR(如表 2 所示,或分别见 SEQ ID NO: 8, 10, 12)的核酸序列。

表2 单克隆抗体20.13.3重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

前19个氨基酸为信号肽,用下划线表示。互补决定区1-3 (CDR1、CDR2和CDR3)用加粗和下划线表示。	
1	<u>MEFGLSWLFL VAILKGVQCE</u> VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS
	信号肽
51	<u>YAMSWVRQAP</u> GKGLEWVSTI <u>SGSGGSTYYA</u> <u>DSVKGR</u> FTIS RDNSKNTLYL
CDR1	CDR2
101	QMNSLRAEDT AVYYCAK <u>ERY NWNYLHY</u> WGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA
	CDR3 ▲ CH1开始
151	PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201	YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPSCPAP
251	EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
301	EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
351	EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
401	SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
451	HNHYTQKSLS LSLGK

在另一实施方案中,上述核酸分子可以在高严谨条件下(如上文描述的那样)与任何上文提到的核酸序列杂交。

在其他一些实施方案中,编码抗体轻链可变区的核酸分子包含由人 08/018 Vκ 基因衍生来的核酸序列。这种核酸分子与胚系 08/018 Vκ 基因的氨基酸差异可能达到 10 个、6 个或 3 个。在优选的实施方案中,

这种核酸分子与胚系 V κ 序列间至少有 3 个氨基酸的差异，这一点与单抗 20.13.3 的胚系的变化相同。进一步优选，任何上面提到的核酸分子还包含由人 J κ 4 连接片段基因衍生来的核苷酸序列。

在优选的实施方案中，该核酸分子包含编码单抗 20.13.3 轻链可变区氨基酸的核酸序列，至少包含从 CDR1 至 CDR3（如表 3 所示）的核酸序列。在一种实施方案中，该核酸分子包含了编码单抗 20.13.3 轻链 1 个或多个 CDR 氨基酸的核酸序列。在另一种实施方案中，该核酸分子包含了编码单抗 20.13.3 轻链氨基酸（如 SEQ ID NO: 4 所示）的核酸序列。在另一种实施方案中，该核酸分子包含了 SEQ ID NO: 3 所示的核酸序列。在另一种实施方案中，该核酸分子包含了编码单抗 20.13.3 轻链 1 个或多个 CDR 氨基酸（如 SEQ ID NO: 14, 16, 18 所示）的核酸序列。

表3 单克隆抗体20.13.3轻链的氨基酸序列（SEQ ID NO: 4）

前22个氨基酸为信号肽，用下划线表示。注：信号肽起始是"MDMRV..."还是"MRV..."尚未确定。互补决定区1-3（CDR1、CDR2和CDR3）用加粗和下划线表示。	
1	<u>MDMRVPAQLL</u> <u>GLLLWLSGA</u> <u>RCDIQMTQSP</u> <u>SSLSASVGDR</u> <u>VTITCQASQD</u> CDR1
51	<u>IINYNLWYQQ</u> <u>KPGKAPKLLI</u> <u>YSASNLETRV</u> <u>PSRFSGSGSG</u> <u>TDFTFTISL</u> CDR1 CDR2
101	<u>QPEDIATYYC</u> <u>QOYDNHPLTF</u> <u>GGGTKVEIRR</u> <u>TVAAPSVFIF</u> <u>PPSDEQLKSG</u> CDR3 ▲CL1开始
151	<u>TASVVCLLNN</u> <u>FYPREAKVQW</u> <u>KVDNALQSGN</u> <u>SQESVTEQDS</u> <u>KDSTYLSST</u>
201	<u>LTLKADYEK</u> <u>HKVYACEVTH</u> <u>QGLSSPVTKS</u> <u>FNRGEC</u>

在另一种实施方案中，编码 VL 的核酸分子可在前文描述的高严谨条件下与上面描述的编码 VL 的核酸序列杂交。

编码一种抗 IL-5 抗体的完整重链或完整轻链或它们的可变区的核酸分子可以从任何产生抗 IL-5 抗体的材料中获得。在本发明的一种实施方案中，此核酸分子可以从表达抗 IL-5 抗体的一种杂交瘤细胞中获得。分离编码抗体的 mRNA 的方法是本领域的常规技术。参考 Sambrook 等的文献。获得的 mRNA 可以逆转录为 cDNA，来作为聚合酶链反应（PCR）的模板或用作抗体基因的 cDNA 克隆。在一种优选的实

实施方案中，此核酸分子从一种杂交瘤细胞中获得，该杂交瘤细胞由含表达人源免疫球蛋白基因的转基因动物细胞融合而来。在更优选的实施方案中，融合用的转基因动物细胞来源于 Xenomouse™ 小鼠。在另一种实施方案中，该杂交瘤细胞来源于前文描述的一种非人、非小鼠的转基因动物。

在一种优选的实施方案中，一种抗 IL-5 抗体的重链可通过将编码重链可变区的核酸分子与编码重链恒定区的核酸分子融合而构建得到。同样，一种抗 IL-5 抗体的轻链可通过将编码轻链可变区的核酸分子与编码轻链恒定区的核酸分子融合而构建得到。在更优选的实施方案中，编码重链可变区的核酸分子编码的是 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，编码轻链可变区的核酸分子编码的是 SEQ ID NO: 4 的残基 23-130 位的氨基酸序列。SEQ ID NO: 2 的残基 139-465 位的氨基酸序列描述了单抗 20.13.3 的重链恒定区的氨基酸序列，SEQ ID NO: 4 的残基 131-236 位的氨基酸序列描述了单抗 20.13.3 的轻链恒定区的氨基酸序列。SEQ ID NO: 1 的残基 415-709、1102-1137、1256-1585 和 1683-2002 位的核苷酸序列描述了编码单抗 20.13.3 的重链恒定区的核苷酸序列，SEQ ID NO: 3 的残基 391-708 位的核苷酸序列描述编码单抗 20.13.3 的轻链恒定区的核苷酸序列。在一种优选的实施方案中，编码重链恒定区的核酸分子编码的是 SEQ ID NO: 2 的残基 139-465 位的氨基酸序列，编码轻链恒定区的核酸分子编码的是 SEQ ID NO: 4 的残基 131-236 位的氨基酸序列。在更优选的实施方案中，编码重链恒定区的核酸分子具有 SEQ ID NO: 1 的残基 415-709、1102-1137、1256-1585 和 1683-2002 位的核苷酸序列，编码轻链恒定区的核酸分子具有 SEQ ID NO: 3 的残基 391-708 位的核苷酸序列。

在另一种实施方案中，产生抗 IL-5 抗体的细胞其自身可能是从一种非人动物中分离而来。在一种实施方案中，这种产抗体的细胞可能来源于表达人源免疫球蛋白基因的转基因动物，该动物经过 IL-5 抗原的免疫。转基因动物可以是小鼠，如 Xenomouse™ 小鼠，或者是其他非人的转基因动物。在另一种实施方案中，这种产生抗 IL-5 抗体的细胞可能来源于非转基因动物。

在另一种实施方案中，这些核酸分子可用本领域的常规方法插入

载体中。参考 Sambrook 等和 Ausubel 等的文献。在一种实施方案中，载体可以是质粒或粘粒。在另一种实施方案中，载体可以是病毒载体。病毒载体主要包括腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒和其他小 RNA 病毒、肝炎病毒和杆状病毒等。载体也可以是噬菌体，包括 M13 噬菌体等。

这些核酸分子可以用来重组表达大量的抗 IL-5 抗体，如下文所述。这些核酸分子也可以用来制备嵌合抗体、单链抗体、免疫粘附素、双价抗体、突变的抗体或抗体的衍生物等，如下文所述。

在一种实施方案中，编码重链和轻链可变区的核酸分子被改造成全长的抗体基因。在一种实施方案中，这些核酸分子被插入表达载体，这些载体已经分别包含编码重链或轻链恒定区的序列，因而 VH 或 VL 片段可以分别与载体上的 CH 或 CL 片段连接。在另一种实施方案中，编码 VH 和/或 VL 链的核酸分子通过另一种方法被改造成全长的抗体基因，即采用标准的分子生物学技术，将编码 VH 链的核酸分子与编码 CH 链的核酸分子相连。也可以通过将编码 VH 链和 VL 链的核酸分子相连达到同样的结果。人源重链和轻链恒定区基因的序列是本领域已知的，参考文献见 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991。

载体

为表达本发明的抗体或其部分片段，将以上文方法获得的编码部分或全长轻链和重链的 DNA 分子插入表达载体中，这样这些基因就可以与转录和翻译控制序列相连。表达载体包括质粒、逆转录病毒、粘粒、酵母人工染色体、EBV 衍生的附加体等等。抗体基因插入载体使载体上的转录和翻译控制序列可以发挥它们调节抗体基因的转录和翻译的功能。表达载体和表达控制序列的选择要与所用的表达宿主细胞相适合。抗体的轻链基因和重链基因可以插入不同的载体。在一种优选的实施方案中，两种基因被插入同一个表达载体。抗体基因插入表达载体采用标准的方法（如将抗体基因片段和载体通过互补的限制酶位点相连，或者在无合适限制酶位点时采用平末端连接）。

一种使用方便的载体含有功能完整的人源 CH 或 CL 免疫球蛋白编码序列，并且构建了合适的限制酶位点以使 VH 或 VL 序列可以容易的

插入和表达，如上文所述。在这样的载体上，剪接通常发生在插入的 J 区上的剪接供体位点与前面的人源 C 区的剪接受体位点之间，也发生在人源 CH 外显子内的剪接区。天然染色体上存在的 Poly A 和转录终止信号位于编码区的下游。重组表达载体也可以含编码信号肽的序列使抗体可以从宿主细胞中分泌出来。抗体基因可以克隆到载体上，使信号肽位于抗体基因的氨基端，并且阅读框正确。信号肽可以是一种免疫球蛋白的信号肽也可以是一种异源信号肽（即从非免疫球蛋白的蛋白而来的信号肽）。

除了抗体基因外，重组表达载体还含有调节序列，可以控制抗体基因在宿主细胞中的表达。本领域的技术人员在设计表达载体包括选择调节序列时会考虑一些因素，如转化宿主细胞的选择，希望得到的蛋白表达水平，等等。优选的哺乳动物细胞表达的调节序列包括使蛋白在哺乳细胞中高水平表达的病毒元件，如从逆转录病毒的 LTR 而来的启动子和/或增强子、巨细胞病毒 (CMV) (如 CMV 启动子/增强子)，SV40 (如 SV40 启动子/增强子)，腺病毒 (如腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP))，多瘤病毒和哺乳动物的强启动子如天然免疫球蛋白和肌动蛋白启动子等。对病毒调节元件及其序列的进一步描述可参考美国专利 5,168,062 (Stinski)，4,510,245 (Bell 等)，4,968,615 (Schaffner 等)。

除了抗体基因和调节序列外，本发明的重组表达载体还可以含其他序列，比如调节载体在宿主细胞中复制的序列（例如复制元点）和选择标记基因。选择标记基因可以筛选出导入载体的宿主细胞（可参考 Axel 等的美国专利 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017）。举例来说，典型的选择标记基因使导入载体的宿主细胞产生对一些药物（如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤）的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的基因（用于 dhfr⁻ 宿主细胞，用氨甲蝶呤进行筛选/扩增）和 neo 基因（用 G418 筛选）。

非杂交瘤宿主细胞和制备重组蛋白的方法

编码抗 IL-5 抗体的核酸分子和含这些抗体基因的载体可用于转化合适的哺乳动物细胞。转化可用已知的任何一种将多核苷酸导入宿主细胞的方法。将异源多核苷酸导入哺乳动物细胞的方法为本领域所熟知，包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原

生质体融合、电转化、脂质体形成的多核苷酸包囊、以及直接将 DNA 显微注射进细胞核内等。此外，核酸分子可以通过病毒载体导入哺乳动物细胞。转化细胞的方法为本领域所熟知，可参考美国专利 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455。

可作为表达宿主的哺乳动物细胞系为本领域所熟知，包括许多从美国 ATCC（典型培养物收藏中心）获得的永生细胞系。这些细胞系包括中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NS0、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼龄仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞（COS）、人肝癌细胞（如 Hep G2）、A549 细胞、以及其它一些细胞系。细胞系的优先选择通过比较哪种细胞系具有较高的表达水平来决定。其它可以使用的细胞系包括昆虫细胞系，如 Sf9 细胞。编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞之后，通过培养宿主细胞一段足够长的时间来表达抗体，优选的方式是将抗体分泌到宿主细胞的培养基中。可用标准的蛋白纯化方法从培养基中收获抗体。

进一步说，本发明的抗体在细胞中的表达可以用一些已知的技术得到加强。例如，谷氨酸合成酶基因表达系统（GS 系统）是在特定条件下加强表达的常用方法。GS 系统在下列文献中被全部或部分的讨论：欧洲专利 0,216,846、0,256,055 和 0,323,997，欧洲专利申请 89303964.4。

转基因动物

本发明的抗体也可以用转基因的方法制备，即构建含目标免疫球蛋白重链和轻链序列的转基因哺乳动物或植物，从而以一种可回收的方式制备抗体。与转基因动物相关的抗体制备方法包括从山羊、母牛或其他动物的乳汁中制备和回收抗体，相关文献见美国专利 5,827,690、5,756,687、5,750,172 和 5,741,957。在一种实施方案中，含人源免疫球蛋白基因位点的非人转基因动物被 IL-5 或其片段免疫。可以用下列参考文献描述的方法来构建这样的转基因动物：美国专利 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598 和 6,130,364；国际专利：WO 91/10741，1991 年 7 月 25 日公开；WO 94/02602，1994 年 2 月 3 日公开；WO 96/34096 和 WO 96/33735，1996 年 10 月 31 日公开；WO 98/16654，1998 年 4 月 23 日公开；WO 98/24893，1998 年 6 月 11 日公开；WO

98/50433, 1998 年 11 月 12 日公开; WO 99/45031, 1999 年 9 月 10 日公开; WO 99/53049, 1999 年 10 月 21 日公开; WO 00/09560, 2000 年 2 月 24 日公开和 WO 00/037504, 2000 年 6 月 29 日公开。在另一种实施方案中, 转基因动物可以含有人源免疫球蛋白基因的“小区”。上面提到的方法可以如美国专利 5,994,619 所述那样修改。优选的非人动物可以为大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。在另一种实施方案中, 转基因动物含有编码抗 IL-5 抗体的核酸分子。在优选的实施方案中, 转基因动物含有编码与 IL-5 特异性结合的重链和轻链的核酸分子。在另一种实施方案中, 转基因动物含有编码改造的抗体, 如单链抗体、嵌合抗体或人源化抗体的核酸分子。抗 IL-5 抗体可以在任何转基因动物中制备。优选的非人动物是小鼠、大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。

噬菌体展示文库

除上文描述的抗 IL-5 抗体之外, 本发明的重组人源抗 IL-5 抗体可以通过筛选重组组合抗体库来分离得到, 优选的抗体库是 scFv 噬菌体展示文库, 该文库是通过从人淋巴细胞分离的 RNA 制备的人源 VL 和 VH cDNA 来构建的。构建和筛选这些文库的方法为本领域所熟知。也可以买到构建噬菌体展示文库的试剂盒(例如 Pharmacia 公司的重组噬菌体抗体系统, 目录号: 27-9400-01; Stratagene 公司的 SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒, 目录号: 240612)。也有其他方法和试剂可用于构建和筛选抗体展示文库。参考文献: Ladner 等, 美国专利号 5,223,409; Kang 等, 国际专利公开号 WO 92/18619; Dower 等, 国际专利公开号 WO 91/17271; Winter 等, 国际专利公开号 WO 92/20791; Markland 等, 国际专利公开号 WO 92/15679; Breitling 等, 国际专利公开号 WO 93/01288; McCafferty 等, 国际专利公开号 WO 92/01047; Garrard 等, 国际专利公开号 WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 89: 3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; and Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982。

在优选的实施方案中，为得到具有所需特性的人源抗 IL-5 抗体，上文描述的人源抗 IL-5 抗体首先被用来筛选对 IL-5 有相似结合活性的人源重链和轻链序列，使用的表位印迹方法在 Hoogenboom 等，国际专利公开号 WO 93/06213 中有介绍。这种方法中使用的抗体库最好是 scFv 文库，其制备和筛选方法见 McCafferty 等，国际专利公开号 WO 92/01047; McCafferty et al. , Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths et al. , (1993) EMBO J 12: 725-734。scFv 抗体文库最好用 IL-5 作为抗原来进行筛选。

一旦初始的人源 VL 和 VH 片段被筛选到，用“混合配对”试验来选择最佳的 VL/VH 配对组合，“混合配对”试验是指检测不同配对的初筛的 VL 和 VH 片段与 IL-5 的结合能力。下一步，为进一步提高抗体的质量，最佳的 VL/VH 配对中的 VL 和 VH 片段可以被随机突变，特别是在 VH 和/或 VL 的 CDR3 区中进行突变，其过程类似于体内自然免疫反应中的抗体亲和力成熟过程中的体细胞突变。这种体外的亲和力成熟可以通过用针对 VH CDR3 或 VL CDR3 的 PCR 引物扩增 VH 和 VL 区来完成，这些引物中的特定位置是 4 种核苷酸碱基的随机混合，因此获得的 VH 和 VL 片段的 PCR 产物中的 VH 和/或 VL 的 CDR3 区中就被导入随机突变。这些含随机突变的 VH 和 VL 片段可被用于重新筛选与 IL-5 的结合能力。

从一个重组的免疫球蛋白展示文库中筛选和分离到本发明的一种抗 IL-5 抗体后，可用标准的重组 DNA 技术从噬菌体中（例如其基因组中）得到编码筛选到的抗体的核酸，并将其亚克隆到其他表达载体中。如需要，该核酸可以进一步被改造，产生本发明的其他抗体形式，如下文所述。为表达从组合文库中筛选到的重组人源化抗体，将编码抗体的 DNA 克隆到一个重组表达载体中，再导入一种哺乳动物宿主细胞，如上文所述。

类别转换

本发明的另一个方面是提供一种机制，即抗 IL-5 抗体的一种类

型可与另一种发生转换。在本发明的一个方面，编码 VL 或 VH 的核酸分子是用本领域的常规方法分离得到的，它们不含任何编码 CL 或 CH 的核酸序列。接着编码 VL 或 VH 的核酸分子被连接到一个编码另一种不同类型的免疫球蛋白分子的 CL 或 CH 的核酸分子中。这可以通过含 CL 或 CH 链的载体或核酸分子而达到，如上文所述。例如，一种抗 IL-5 IgM 抗体可以通过类别转换变为 IgG。进一步，类别转换还可以用来将 IgG 从一种亚类变为另一种，如从 IgG 1 变为 IgG2。

抗体衍生物

可以用本领域的常规技术用上文所述的核酸分子来构建抗体衍生物。

突变抗体

在另一种实施方案中，核酸分子、载体和宿主细胞可以用来构建突变的抗 IL-5 抗体。可以突变抗体重链和/或轻链的可变区来改变抗体的结合性质。例如，可以在一个或多个 CDR 中产生突变来增加或降低抗 IL-5 抗体的 K_d 值、 K_{off} 值，或改变抗体的结合特性。定位突变技术为本领域所熟知，可参考上面提到的 Sambrook 等和 Ausubel 等的文献。在优选的实施方案中，突变的氨基酸残基选择在抗 IL-5 抗体的可变区中与母本序列相比发生变化的位置。更优选的实施方案中，在本发明的一种抗 IL-5 抗体的可变区中与母本序列相比发生变化的氨基酸残基处构建一个或多个突变。在另一种实施方案中，可在核酸分子的一个或多个骨架区产生突变。在骨架区或恒定区产生的突变可用于增加抗 IL-5 抗体的半衰期。见参考文献美国专利申请号 09/375,924，1999 年 8 月 17 日公开。在骨架区或恒定区产生的突变也可用于改变抗体的免疫原性，为与另一个分子的共价或非共价结合提供位点，或者改变抗体的补体结合性质。突变可以发生在突变抗体的每一个骨架区、恒定区和可变区中。同时，突变也可以仅发生在突变抗体的一个骨架区、可变区或恒定区中。

在一种实施方案中，突变的抗 IL-5 抗体的 VH 或 VL 区与突变前相比变化的氨基酸数均不超过 10 个。在更优选实施方案中，突变的抗 IL-5 抗体的 VH 或 VL 区变化的氨基酸数均不超过 5 个，更优选，不超过 3 个。在另一种实施方案中，恒定区氨基酸的变化不超过 15 个，更优选，不超过 10 个，更优选，不超过 5 个。

融合抗体和免疫粘附素

在另一种实施方案中,可以将一种抗 IL-5 抗体的全部或部分与另一种多肽连接来构建融合抗体或免疫粘附素。一种优选的实施方案是只将抗 IL-5 抗体的可变区与多肽相连。另一种优选的实施方案是将抗 IL-5 抗体的 VH 区与第一种多肽相连,而将抗 IL-5 抗体的 VL 区与第二种多肽相连,第二种多肽与第一种多肽联合使 VH 和 VL 可以相互作用形成一个抗体结合位点。在另一种优选的实施方案中,VH 区和 VL 区被一个连接序列(linker)隔开,使二者之间可以相互作用(见下面关于单链抗体的内容)。这种 VH-VL 抗体然后再和目的多肽相连。融合抗体对将一种多肽导向表达 IL-5 的细胞或组织非常有用。这种多肽可以是一种治疗药物,比如一种毒素、生长因子或其他调节蛋白,也可以是一种诊断剂,比如可以显色的酶如辣根过氧化物酶。此外,融合抗体也可以通过将两个(或多个)单链抗体彼此相连来构建。这对希望在多肽链上构建双价或多价抗体,或者构建双特异性抗体十分有用。在一种实施方案中,融合抗体或免疫粘附素是用单抗 20.13.3 的可变区来构建的。在另一种实施方案中,融合抗体或免疫粘附素是用抗 IL-5 抗体(如 20.13.3)的一个或多个 CDR 区来构建的。

单链抗体

构建单链抗体(scFv)需要将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段通过一段柔性接头(如编码(Gly₄-Ser)₃的序列)连接在一起,从而使 VH 和 VL 可以通过柔性接头以一个连续的单链蛋白的形式表达,参考文献见 Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554。单链抗体可以是单价的,即只用一个 VH 和 VL 构建,也可以是双价的,即用两个 VH 和 VL 构建,或多价的,即用两个以上 VH 和 VL 构建。

在一种实施方案中,单链抗体是用单抗 20.13.3 的一个或多个可变区来构建的。在另一种实施方案中,单链抗体是用上述抗 IL-5 抗体的一个或多个 CDR 区来构建的。

Kappabodies, Minibodies, Diabodies 和 Janusins

在另一种实施方案中,可以用编码抗 IL-5 抗体的核酸分子来构建其他类型的改造抗体。例如,“Kappa bodies”(Ill et al., Protein

Eng 10: 949-57 (1997)), “Minibodies” (Martin et al., EMBO J 13: 5303-9 (1994)), “Diabodies” (Holliger et al., PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)), 或 “Janusins” (Traunecker et al., EMBO J 10: 3655-3659 (1991) 和 Traunecker et al. “Janusin : new molecular design for bispecific reagents” Int J Cancer Suppl 7 : 51-52 (1992)) 等, 这些改造抗体均可以在本说明书的指导下, 用本领域标准的分子生物学技术来构建。

在一种实施方案中, 这些改造抗体是用单抗 20.13.3 的一个或多个可变区来构建的。在另一种实施方案中, 这些改造抗体是用上述抗 IL-5 抗体的一个或多个 CDR 区来构建的。

嵌合抗体

在另一方面, 可以构建双特异性的抗体。在一种实施方案中, 构建的嵌合抗体的一个结合区与 IL-5 特异性结合, 另一个结合区与另一种分子结合。嵌合抗体可以通过分子生物学重组技术构建, 也可以通过物理方法接合在一起。此外, 可以构建含一个以上 VH 和 VL 的单链抗体, 使其能同时与 IL-5 和另一个分子特异性结合。这些双特异性抗体可以用常用的技术构建, 可参考 Fanger et al. Immunol Methods 4 : 72-81 (1994) 和上面提到的 Wright and Harris 的文献, 以及 Traunecker et al. Int.J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)。在一种优选的实施方案中, 嵌合抗体同时与 IL-5 和另一种能促进嗜酸性粒细胞和嗜碱性细胞增殖的分子结合。优选的其他分子是 eotaxin、IL-3 或 GM-CSF。

在一种实施方案中, 这些嵌合抗体是用单抗 20.13.3 的一个或多个可变区来构建的。在另一种实施方案中, 这些改造抗体是用上述抗 IL-5 抗体的一个或多个 CDR 区来构建的。

衍生的和标记的抗体

本发明的抗体或抗体片段可以被衍生或与另一种分子(如另一个肽或蛋白质)连接。一般来说, 抗体或抗体片段在被衍生或标记后, 其结合 IL-5 的特性不受影响。相应地, 本发明的抗体或抗体片段包括了所有上文描述的人源抗 IL-5 抗体的完整的和改造的类型。例如, 本发明的一种抗体或抗体片段可以与另一种或多种分子连接(通过化学交联、基因融合、非共价连接或其他方式), 连接的分子可以是另

一种抗体（例如一种双特异性抗体或一种 diabody）、一种检测剂、一种细胞毒性剂、一种药物、和/或一种能介导抗体或抗体片段与另一种分子作用的蛋白或肽（如链亲合素核心区或多聚组氨酸标签）。

一种类型的衍生抗体是将 2 个或多个抗体交联在一起，交联的抗体可以是同类型的，也可以是不同类型的，例如构建双特异性抗体。合适的交联剂包括异源双功能的，即含两个由适当的间隔的不同的活性基团（如 m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester），和同源双功能的（如 disuccinimidyl suberate）。这些交联剂可以从 Pierce Chemical Company, Rockford, Ill 买到。

另一种类型的衍生抗体是标记的抗体。可以用于标记本发明的抗体或抗体片段的检测物包括荧光化合物，有荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、5-二甲胺-1-磺酰氯、藻红素、镧系磷光体等等。也可以用酶来标记抗体用于检测，如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等等。用一种可检测的酶标记抗体后，需要加入另一种试剂作为酶的底物，使酶的作用可以观测得到。例如，当有辣根过氧化物酶存在时，加入过氧化氢和氨基联苯胺可产生一种可以被检测到的有颜色的产物。抗体还可以用生物素标记，通过间接测量其与卵清亲和素或链亲和素的结合来检测。抗体还可以被已知的可被二级报告试剂所识别的多肽表位所标记，如亮氨酸拉链序列、二级抗体结合位点、金属结合域和表位标签等。在一些实施方案中，标记物通过不同程度的间隔序列与抗体连接以降低潜在的空间位阻。

抗 IL-5 抗体还可以用放射性元素标记的氨基酸来标记。放射性标记既可以用于诊断目的也可以用于治疗目的。放射性标记的抗 IL-5 抗体可以用于诊断，如测定患者体内的 IL-5 水平。此外，放射性标记的抗 IL-5 抗体也可以用于治疗，如以嗜酸性粒细胞浸润为特征的过敏性疾病，包括哮喘、哮喘恶化、哮喘恶性发作、慢性肺炎、过敏性鼻炎、常年过敏性鼻炎、过敏性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞过度增多、Churg- Strauss 综合征、特应性皮炎、盘尾丝虫皮炎、间歇性血管水肿、嗜酸粒细胞增多性肌痛综合征、腹腔病、嗜酸粒细胞增多性胃肠炎、蠕虫感染、何杰金氏病、鼻息肉、Loeffler's 综合征、荨麻疹、嗜酸粒细胞过度增多性支气管炎、结节性动脉炎、鼻窦炎、

慢性鼻窦炎、嗜酸粒细胞增多性食管炎、过敏性嗜酸粒细胞增多性食管炎、变应性结膜炎等等。多肽的放射性标记物包括下列（并不仅限于下列）放射性同位素或放射性核素： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 。

抗 IL-5 抗体还可以偶联上一个化学基团，如聚乙二醇（PEG）、甲基或乙基、糖基等。这些基团可能对改善抗体的生物学特性有用，如延长其血清半衰期或增加其组织结合能力。

抗 IL-5 抗体的表征

抗 IL-5 抗体的类和亚类

抗 IL-5 抗体的类和亚类可用任何本领域已有的方法测定。通常，抗体的类和亚类可以用能特异性结合不同抗体类和亚类的第二抗体来测定。这样的抗体可以买到。类和亚类可以用 ELISA、Western Blot 或其他方法检测。另外，类和亚类也可以通过测定抗体的重链和/或轻链的恒定区的全部或部分序列来确定，即将它们的氨基酸序列与已知的免疫球蛋白不同类和亚类的氨基酸序列进行比较来确定抗体的类和亚类。

在本发明的一种实施方案中，抗体是指多克隆抗体。在本发明的另一种实施方案中，抗体是指单克隆抗体。抗体可以是 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子。在一种优选的实施方案中，抗体是 IgG 分子，具有 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚型。更优选的实施方案中，抗 IL-5 抗体是 IgG2 亚型。在另一种优选的实施方案中，抗 IL-5 抗体与单抗 20.13.3 具有相同的类和亚类。

抗 IL-5 抗体与 IL-5 结合的亲和力

在本发明的另一个方面，抗 IL-5 抗体与 IL-5 结合的亲和力很高。在一种实施方案中，抗 IL-5 抗体结合 IL-5 的 K_d 为 1×10^{-8} M 或更小。在较优选的实施方案中，抗体结合 IL-5 的 K_d 为 1×10^{-9} M 或更小。在更优选的实施方案中，抗体结合 IL-5 的 K_d 为 0.5×10^{-9} M 或更小（甚至为 0.25×10^{-9} M 或更小）。在另一种实施方案中，抗体结合 IL-5 的 K_d 与单抗 20.13.3 的 K_d 基本相同。在另一种实施方案中，抗体结合 IL-5 的 K_d 与包含单抗 20.13.3 一个或多个 CDR 的抗体的 K_d 基本相同。

抗 IL-5 抗体与 IL-5 结合的亲和力和解离速度可以用本领域任何

已知方法来测定。在一种实施方案中，结合亲和力可用竞争 ELISA、RIA、BIAcore 或 KinExA 技术来测定。解离速度也可以用 BIAcore 或 KinExA 技术来测定。在一种实施方案中，结合亲和力和解离速度可以用表面胞质共振（SPR）技术测定，如用 BIAcore 仪器。

抗 IL-5 抗体识别的 IL-5 表位的鉴定

本发明还提供了一种抗 IL-5 抗体，它能与一种人源抗 IL-5 抗体结合同样的抗原或表位。此外，本发明还提供了一种抗 IL-5 抗体，它能够与一种人源抗 IL-5 抗体交叉竞争。在一种优选的实施方案中，这种人源抗 IL-5 抗体是单抗 20.13.3。在另一种优选的实施方案中，这种人源抗 IL-5 抗体包含单抗 20.13.3 的一个或多个 CDR。在一种优选的实施方案中，上述的抗 IL-5 抗体是另一种人源抗体。

可用本领域的许多已知方法来测定抗 IL-5 抗体是否结合同样的抗原。例如，可以用下述方法来测定一种待测的抗 IL-5 抗体是否结合同样的抗原，即用一种抗 IL-5 抗体去捕获已知与另一种抗 IL-5 抗体结合的抗原（如 IL-5），将抗原从抗体上洗脱下来，然后测定待测的抗体是否与洗脱下来的抗体结合。可以用下述方法来测定一种抗体是否能与一种抗 IL-5 抗体结合同样的表位，即让抗 IL-5 抗体与 IL-5 在饱和的实施方案中结合，然后检测待测抗体结合 IL-5 的能力。如果待测抗体能在与抗 IL-5 抗体同样的时间与 IL-5 结合，那么待测抗体与抗 IL-5 抗体结合表位不同。但是，如果待测抗体不能在与抗 IL-5 抗体同样的时间与 IL-5 结合，那么待测抗体与抗 IL-5 抗体结合表位相同。这个试验可以采用 ELISA、RIA 或表面胞质共振（SPR）技术进行。在一种优选的实施方案中，这个试验可以采用表面胞质共振（SPR）技术进行。在更优选的实施方案中，使用 BIAcore 仪器。还可以测定一种抗 IL-5 抗体是否能与另一种抗 IL-5 抗体交叉竞争。在一种优选的实施方案中，可能采用测定一种抗 IL-5 抗体是否与另一种抗 IL-5 抗体结合同样的表位的方法来测定一种抗 IL-5 抗体是否能与另一种抗 IL-5 抗体交叉竞争。

轻链与重链的使用

本发明还提供了一种抗 IL-5 抗体，它含有人源 V κ 基因和人源 J κ 基因编码的可变区序列。在单抗 20.13.3 中， κ 轻链使用与人源 J κ 4 基因连接的人源 08/18V κ 基因。

在优选的实施方案中，与胚系 08/18 基因氨基酸序列相比，本发明的抗 IL-5 抗体轻链可变区含有与单抗 20.13.3 相同的氨基酸置换。例如，在一些实施方案中，与胚系 08/18 基因氨基酸序列相比，抗 IL-5 抗体轻链可变区可以含有一个或多个氨基酸置换，这些置换在单抗 20.13.3 中同样出现。通过这种方式，可以混合和交叉抗体结合的不同性质，以改变诸如抗体与 IL-5 结合的亲和力或解离速度。

在另一种实施方案中，轻链可变区含有的氨基酸置换的位置与单抗 20.13.3 相同，但是置换的氨基酸不同。优选的置换氨基酸是与单抗 20.13.3 相同位置的氨基酸相对保守的氨基酸。例如，根据本发明，在 20.13.3 特定位置的谷氨酸相对于胚系序列是一个置换，那么也可以在这个位置置换上保守氨基酸天冬氨酸。同样，如果置换的氨基酸是丝氨酸，也可以置换上苏氨酸。

在另一种优选的实施方案中，轻链可变区含有与单抗 20.13.3VL 相同的氨基酸序列。在另一种特别的实施方案中，轻链含有与单抗 20.13.3 的轻链 CDR 区相同的氨基酸序列（如表 3 及 SEQ ID NO: 14、16、18 所示）。在另一种优选的实施方案中，轻链含有与单抗 20.13.3 的轻链至少 1 个 CDR 区相同的氨基酸序列。

在另一种实施方案中，抗体或其片段含有 λ 轻链。

本发明还提供了一种抗 IL-5 抗体或其片段，该抗体含有人源重链或由人源重链衍生而来的序列。在一种实施方案中，这种重链氨基酸序列是从人源 V_H DP-47 基因家族衍生而来的。在更优选的实施方案中，这种重链与胚系 V_H DP-47 的差别不超过 8 个氨基酸，更优选不超过 6 个氨基酸，进一步更优选不超过 3 个氨基酸。

在一种优选的实施方案中，与胚系氨基酸序列相比，抗 IL-5 抗体的 V_H 含有与单抗 20.13.3 相同的氨基酸置换。在另一种实施方案中，氨基酸置换的位置与单抗 20.13.3 的 V_H 发生置换的位置相同，但是置换的氨基酸可能是保守氨基酸而不一定是相同的氨基酸。

在另一种优选的实施方案中，重链含有与单抗 20.13.3VH 相同的氨基酸序列。在另一种特别的实施方案中，重链含有与单抗 20.13.3 的重链 CDR 区相同的氨基酸序列（如表 2 所示）。在另一种优选的实施方案中，重链含有与单抗 20.13.3 的重链至少 1 个 CDR 区相同的氨基酸序列。在另一种优选的实施方案中，重链含有选自 SEQ ID NO: 2、

6、8、10、12 的氨基酸序列。在另一种优选的实施方案中，重链含有选自 SEQ ID NO: 8、10、12 的氨基酸序列。

用抗 IL-5 抗体抑制 IL-5 受体活性

抑制 IL-5 与 IL-5 受体结合

在另一种实施方案中，本发明提供了一种抗 IL-5 抗体，它能抑制 IL-5 与 IL-5 受体的结合。在一种优选的实施方案中，IL-5 受体是人源的。在另一种优选实施方案中抗 IL-5 抗体是人源抗体。在另一种实施方案中，抗体或其片段抑制 IL-5 与 IL-5 受体结合的 IC_{50} 不超过 50nM。在一种优选实施方案中， IC_{50} 不超过 10nM。在更优选的实施方案中， IC_{50} 不超过 2.0nM、0.5nM、0.25nM、0.1nM、或 0.05nM。 IC_{50} 可用任何本领域已知的方法测定。常用的方法有 ELISA、RIA 或功能拮抗试验等。在一种优选实施方案中， IC_{50} 用功能拮抗试验测定。

用抗 IL-5 抗体抑制 IL-5 介导的细胞增殖（体外）

在另一种优选实施方案中，本发明提供了一种抗 IL-5 抗体，它能抑制 IL-5 介导的 IL-5 敏感细胞系的增殖。在一种优选实施方案中，这种细胞系是人源的。更优选的实施方案中，细胞系是人源嗜酸粒细胞系或人源红白血病细胞系，例如 TF-1。

在一种优选实施方案中，抗体是人源抗体。更优选的实施方案中，抗体是单克隆抗体 20.13.3 或其功能片段。

在某些实施方案中，抗 IL-5 抗体或其片段抑制 IL-5 敏感细胞系增殖的 IC_{50} 不超过 10nM。在优选实施方案中， IC_{50} 不超过 1nM。在其他优选实施方案中， IC_{50} 不超过 250pM。在另外的优选的实施方案中， IC_{50} 不超过 100pM 甚至 50pM。

抑制嗜酸粒细胞在体内的聚集

在另一种实施方案中，抗 IL-5 抗体抑制嗜酸粒细胞在体内的聚集。在一种优选实施方案中，抗体抑制嗜酸粒细胞的聚集的程度是通过与未用抗体处理的动物体内嗜酸粒细胞的聚集相比较而得出的。在较优选的实施方案中，抗体抑制 50%嗜酸粒细胞的聚集。在更优选的实施方案中，抗体抑制 75%嗜酸粒细胞的聚集。

在某些实施方案中，这种抗 IL-5 抗体治疗与其他一种或多种治疗剂联合使用。在一种优选实施方案中，增加的制剂能够加强对哺乳动物中嗜酸粒细胞产生、成熟、血液迁移、活化、聚集或组织浸润的

抑制。在某些实施方案中，增加的制剂包括下列一种或多种：皮质激素类、 β_2 激动剂、5-L0 抑制剂、LTD4 受体拮抗剂和抗组胺药等。皮质激素类包括（不仅限于下列）： β -倍他米松、强的松龙和氢化可的松。增加的一种或多种治疗剂可以单独给予也可以与本发明的某种抗 IL-5 抗体同时给予。在一种优选实施方案中，制剂和抗 IL-5 抗体联合使用在一个周期（22-24 天）能抑制至少 50%，优选 75%更优选 90%嗜酸粒细胞的聚集。

药物组合物和试剂盒

本发明还与治疗疾病，特别是过敏性疾病的药物组合物有关，这些疾病的特点是在哺乳动物中存在 IL-5 介导的嗜酸粒细胞的产生、成熟、血液迁移、活化、或组织浸润。在一种实施方案中，这些药物组合物用于治疗下列（不仅限于下列）嗜酸粒细胞疾病：哮喘、哮喘恶化、哮喘恶性发作、慢性肺炎、过敏性鼻炎、常年过敏性鼻炎、过敏性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞过度增多、Churg- Strauss 综合征、特应性皮炎、盘尾丝虫皮炎、间歇性血管水肿、嗜酸粒细胞性肌痛综合征、腹腔病、嗜酸粒细胞性胃肠炎、蠕虫感染、何杰金氏病、鼻息肉、Loeffler's 综合征、荨麻疹、嗜酸粒细胞过度增多性支气管炎、结节性动脉炎、鼻窦炎、慢性鼻窦炎、嗜酸粒细胞性食管炎、过敏性嗜酸粒细胞性食管炎、变应性结膜炎。

本发明的抗 IL-5 抗体可以整合入药物组合物以便于给予患者。这种药物组合物一般包括一种本发明的抗体或其功能片段和一种药学上可接受载体。这里“药学上可接受载体”包括所有各种溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌物质、等渗和缓释介质、以及类似的生理性可配伍的物质。药学上可接受载体的例子包括一种或多种水、盐水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖、甘油、乙醇等等，还包括它们的联合使用。在许多实施方案中，优选在药物组合物中加入等渗剂，例如糖类，多元醇如甘露醇、山梨醇，或氯化钠等。药学上可接受的物质如保湿剂或小量的助剂如保湿或乳化剂、防腐剂或缓冲液等能够延长抗体或其片段的贮存期或疗效。

本发明的组合物可以有多种形式。比如包括液体、半固体和固体剂型，如液体溶液（注射液或输注液）、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。剂型的选择由给予的方式和治疗的用途来

决定。优选的组合物一般是以注射液或输注液的剂型，如同用其他抗体对人群进行被动免疫时所用的组合物。优选的给药方式是胃肠外给予（如静脉、皮下、腹腔、肌肉）。在一种优选的实施方案中，抗体通过静脉输注或注射给予。在另一种优选实施方案中，抗体通过肌肉或皮下注射给予。

治疗组合物一般要求无菌并在生产和贮存条件下稳定。组合物可以是溶液、微乳剂、分散液、脂质体或其他特定结构以获得较高的药物浓度。无菌注射液可以通过将需要量的抗 IL-5 抗体与合适的溶剂混合来制备，溶剂可以是上面列举的一种或几种混合，经过过滤除菌处理。一般说来，分散液的制备是将活性成分掺入无菌的赋形剂中，赋形剂含一种基础的分散介质及需要的上面列举的其他成分。在用无菌药粉制备无菌注射液时，优选的方法是将含活性物质和其他需要成分的无菌过滤溶液真空干燥或冻干成药粉。可通过一些方法来维持溶液的流动性，例如使用一种包衣如卵磷脂，在分散时保持颗粒为所需的大小，以及使用表面活性剂等。药物的缓释可以通过在组合物中加入缓释剂来实现，如单硬脂酸盐和明胶等。

本发明的抗体或抗原结合片段可用本领域已知的多种方法给予，尽管对许多治疗用途来说，优选的给予途径/方式是皮下、肌肉、静脉或输注。正如有经验的专业人员所知，应根据需要的结果而采用不同的给予途径和/或方式。

在某些实施方案中，活性成分是与防止其快速释放的某种载体一起做成一种剂型，比如一种控制释放剂型，包括植入片、皮肤植入块和微胶囊运载系统等。可以使用一些生物可降解的和生物相容的聚合物，如乙二醇乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙二醇酸、胶原、polyorthoesters、多聚乳酸等。许多制备这类剂型的方法已被申请专利或为本领域专业人员所熟知。参考 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

在某些实施方案中，本发明的抗 IL-5 抗体或片段可以口服给药，例如通过一种惰性的稀释剂或可食用的载体。化合物（和需要的其他成分）还可以包裹在硬壳或软壳的明胶胶囊中，压成药片或直接掺入患者的食物中。对口服治疗给药，药物混合物可以掺入赋型剂，以可

摄取的药片、口含片、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等形式给予。除胃肠外给药外，在给予本发明的化合物时可能需要用防止药物的失活的某种材料包裹或共同给予。

组合物中还可以加入辅助性的活性成分。在某些实施方案中，本发明的某种抗 IL-5 抗体可以与一种或多种其他治疗剂制成混合制剂和/或共同使用。这些药物包括（不限于下列）：结合其他靶标的抗体（如结合一种或多种生长因子或细胞因子或它们的细胞表面受体的抗体），能降低 IL-5 的产生或活性的制剂，如 IL-5 结合蛋白、抗 IL-5 或其受体的反义寡核苷酸、阻断 IL-5 受体活性的肽类似物、可溶性 IL-5 受体、糖皮质激素和环孢菌素，以及抑制嗜酸粒细胞的产生、成熟、存活、活化、或从骨髓中迁移的制剂，如皮质激素类制剂。这样的联合治疗可能需要较小剂量的抗 IL-5 抗体和/或共同使用的制剂，因此可能避免各种制剂单独使用时的毒性或并发症。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或抗体片段。“治疗有效量”是指为达到要求的治疗效果从剂量和治疗周期上考虑所需要的药物量。治疗有效量的抗体或抗体片段随一些因素的不同也可能不同，这些因素比如疾病的状况，患者的年龄、性别和体重，以及抗体或抗体片段在不同个体产生有效反应的差异等。治疗有效量也是抗体或抗体片段的有益作用超过其毒副作用的剂量。“预防有效量”是指为达到要求的预防效果从剂量和治疗周期上考虑所需要的药物量。由于预防剂量是在患者患病前或患病的早期使用，因此预防有效量一般小于治疗有效量。

应调整摄入剂量以获得最佳的使用效果（如治疗效果或预防效果）。例如，根据治疗情况的不同可以一次给予大剂量，在一段时间内分次给予一定剂量，或者在治疗中适当的减小或加大剂量。在制备胃肠外使用的剂型时保持统一的剂量单位和剂量的一致性是非常有益的。剂量单位这里指对治疗的哺乳动物个体来说合适的单一剂量，每个剂量单位包含预先确定的一定量的能产生有效作用的活性成分（在必要的药物载体中）。本发明对剂量单位形式的说明是依据(a)抗体的独特性质和要达到的特定治疗或预防效果，和(b)不同个体对抗体治疗敏感性的差异造成药物配制的内在局限性。

本发明的抗体或抗体片段有效的治疗或预防剂量的非限定参考

值范围是 0.1-100 mg/kg, 更优选 0.1-50 mg/kg, 更优选 0.1-20 mg/kg, 进一步更优选 1-10 mg/kg (如 0.3、1、或 3 mg/kg)。需要注意剂量可能根据疾病的种类和严重程度而变化。还要了解对特定的患者, 需根据个体需要和对组合物及使用情况的判断随时调整摄入的剂量, 上面的剂量范围仅供参考, 并不是对某种药物组合物使用范围的限制。

本发明的另一个方面是提供含抗 IL-5 抗体或抗原结合片段的试剂盒和含这些抗体的药物组合物。试剂盒中除了抗体或药物组合物外还包括诊断剂或治疗剂。试剂盒中还有诊断或治疗方法的说明书。在一种优选的实施方案中, 试剂盒中含有某种抗体或其药物组合物和某种可以下述方法使用的诊断剂。在另一种优选的实施方案中, 试剂盒中含有某种抗体或其药物组合物和某种或几种可以下述方法使用的治疗剂。

诊断方法的使用

本发明的抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段可用于检测生物样品中的 IL-5。抗 IL-5 抗体可用于常规的免疫试验, 包括(不限于)ELISA、RIA、FACS、免疫组化、Western blot 或免疫沉淀等。本发明的抗 IL-5 抗体可用于检测人源的 IL-5。在另一种实施方案中, 抗 IL-5 抗体可用于检测一些来自古老的灵长类如食蟹猴和恒河猴、黑猩猩和类人猿的 IL-5。本发明提供了一种检测生物样品中 IL-5 的方法, 包括用本发明的某种抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段与生物样品接触, 检测抗体与 IL-5 的结合, 以确定样品中的 IL-5。在一种实施方案中, 抗 IL-5 抗体直接用某种可检测的标记物标记。在另一种实施方案中, 抗 IL-5 抗体(第一抗体)不标记, 而第二抗体或其他可结合抗 IL-5 抗体的分子被标记。本领域的专业人员都知道, 选择的第二抗体应能特异性结合第一抗体的种属和类别。例如, 如果抗 IL-5 抗体是一种人源 IgG, 那么第二抗体可以是抗人 IgG 抗体。能结合抗体的其他分子包括(不限于)蛋白 A 和蛋白 G, 二者都能从 Pierce Chemical Co. 等公司买到。

合适的抗体或第二抗体标记物在上文已做了描述, 包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性物质等。合适的酶标记物包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶等; 合

适的辅基复合物包括链亲和素/生物素和卵清亲和素/生物素等；合适的荧光材料包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白等；发光材料有发光氨；合适的放射性物质包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 等。

在另一种实施方案中，生物样品中的 IL-5 可以通过竞争免疫试验来检测，即使用以可测物质标记的 IL-5 标准品和未标记的抗 IL-5 抗体进行试验。在这项试验中，生物样品、标记的 IL-5 标准品和抗 IL-5 抗体混合在一起，测定与未标记的抗体结合的标记的 IL-5 标准品的量。生物样品中的 IL-5 的量与抗 IL-5 抗体结合的标记的 IL-5 标准品的量成反比。

上述的免疫试验方法可有多种用途。在一种实施方案中，抗 IL-5 抗体或片段可用于检测样品中特别是生物样品中的 IL-5。

治疗方法的使用

在另一种实施方案中，本发明提供了通过给需要的患者使用本发明的某种抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段来抑制 IL-5 活性的方法。本说明书描述的任何类型的抗体都可能用于治疗。在一种优选的实施方案中，这种抗 IL-5 抗体是一种人源化抗体。在另一种优选的实施方案中，这种 IL-5 是人源的，患者是指病人。另外，这种抗体或其片段也可给予表达与此抗体有交叉反应的 IL-5 的非人哺乳动物（如灵长类，食蟹猴或恒河猴），用于兽医目的或作为人类疾病的动物模型。这种动物模型可能对评价本发明的抗体的治疗效果有用。

在本说明书中术语“与 IL-5 有害活性有关的异常”包括各种疾病和异常，其特点是患者体内的 IL-5 的存在已显示出或被怀疑是这种异常的病理原因或是加重这种异常的一个因素。因此，与 IL-5 有害活性有关的异常可通过抑制 IL-5 的活性来减轻这种异常的症状和/或转归。这种 IL-5 介导的异常包括（不限于）过敏性疾病，特别是皮肤和肺组织的过敏性疾病和肺部炎症。这些异常可能有些迹象可被观察到，例如骨髓、血液或其他组织或者支气管肺泡灌洗液（BAL）中的嗜酸粒细胞和/或嗜碱细胞数目增多。这些异常还有一些特点，包括：肺或皮肤嗜酸粒细胞增多，支气管过度应激，嗜酸粒细胞在肺组织、血管周围和/或支气管周围的聚集，气道上皮损伤，气道间质水肿，支气管粘液分泌增多或支气管狭窄。另外，病理性的 IL-5 活

性还可能有以下一种或多种表现：骨髓嗜酸粒细胞增多，嗜酸粒细胞存活增加，嗜酸粒细胞对内皮细胞吸附增强和嗜酸粒细胞细胞毒性增强。

在一种优选实施方案中，本发明的某种抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段可以治疗炎症患者，包括以嗜酸粒细胞浸润为特征的过敏性疾病，如鼻炎、鼻息肉、哮喘、先天性嗜酸粒细胞增多症、和特应性皮炎。在一种优选的实施方案中，抗 IL-5 抗体可以用于治疗慢性肺部炎症。在更优选的实施方案中，这种治疗可使炎症减轻或消失。

在另一种优选实施方案中，抗 IL-5 抗体可用于治疗骨髓、血液或其他组织中的嗜酸粒细胞增多的患者。嗜酸粒细胞增多在本学科领域被认为与一些疾病有关，包括（不限于）：哮喘、哮喘恶化、哮喘恶性发作、慢性肺炎、过敏性鼻炎、常年过敏性鼻炎、过敏性支气管肺曲霉病、嗜酸粒细胞增多症、Churg- Strauss 综合征、特应性皮炎、盘尾丝虫皮炎、间歇性血管水肿、嗜酸粒细胞性肌痛综合征、腹腔病、嗜酸粒细胞性胃肠炎、蠕虫感染、何杰金氏病、鼻息肉、Loeffler's 综合征、荨麻疹、嗜酸粒细胞过度增多性支气管炎、结节性动脉炎、鼻窦炎、慢性鼻窦炎、嗜酸粒细胞性食管炎、过敏性嗜酸粒细胞性食管炎、变应性结膜炎。在一种优选实施方案中，本发明的抗 IL-5 抗体或其抗原结合片段可用于治疗哮喘病人。在较优选的实施方案中，这种治疗可防止或减轻疾病的发展。

抗体或其片段给予的次数可以从每日三次到每 6 个月一次，优选的给予途径可以是口服、粘膜给药、含服、鼻内、吸入、静脉、皮下、肌肉、胃肠外、肿瘤内给药或局部途径。抗体或其片段也可以通过微型真空泵连续给药。抗体通常需要在整个疾病过程中持续使用，只要它能使病症停止恶化或得到改善。抗体通常作为药物组合物的一部分给予，如上文所述。抗体也可以作为预防使用来防止过敏性炎症和/或嗜酸粒细胞浸润的发生。这对已被证实对 IL-5 介导或嗜酸粒细胞介导的疾病高危险性的患者特别有用。

基因治疗

本发明的核酸分子可以用基因治疗的方法给予需要的患者。治疗可以在体内或离体进行。在一种优选实施方案中，编码重链和轻链的核酸分子同时给予患者。在更优选的实施方案中，核酸分子给予后能

稳定整合到 B 细胞的染色体上，因为 B 细胞是专门产生抗体的细胞。在一种优选实施方案中，前 B 细胞在离体时被转染或感染，然后在再重新移植到需要的患者体内。在另一种优选实施方案中，前 B 细胞或其他细胞在体内被感染，使用一种能感染目标细胞的病毒。典型的用于基因治疗的载体包括脂质体、质粒、或病毒载体，如逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。在用体内或离体方式感染后，抗体表达水平可以通过从病人体内取样进行检测，使用上述的本领域各种免疫试验方法。

在一种优选的实施方案中，基因治疗方法包括以下步骤：给予有效剂量的某种分离得到的编码人源抗体的重链或其抗原结合片段的核酸分子，并让该核酸分子在体内表达。在另一种实施方案中，基因治疗方法包括以下步骤：给予有效剂量的某种分离得到的编码人源抗体的轻链或其抗原结合片段的核酸分子，并让该核酸分子在体内表达。在更优选的实施方案中，基因治疗方法包括以下步骤：给予有效剂量的某种分离得到的编码人源抗体的重链或其抗原结合片段的核酸分子，同时给予有效剂量的某种分离得到的编码人源抗体的轻链或其抗原结合片段的核酸分子，并让两种核酸分子在体内表达。在这种基因治疗方法中还可以给予另一种与抗体或其功能片段有相似治疗作用的另一种药物，如同上文描述的那样。

为了使本发明更容易理解，下面举一些例子。这些例子只是为了说明本专利，并不表示对本专利保护范围的任何限制。

实施例 1

获得产生抗 IL-5 抗体的杂交瘤细胞

本发明抗体的制备、筛选和检测方法如下：

免疫和杂交瘤细胞的获得

共有 288 只 8 到 15 周龄的 IgG2 或 IgG4 XenoMice™ 小鼠按 15 到 20 只每组分组，按表 4 的程序免疫。

表4 免疫程序

组别	#小鼠		融合#	免疫原	途径	剂量		间隔	#次数
	IgG2	IgG4				首次	以后		
1	10	15	SP1-SP2	CFA/IFA中	尾底	20 ug	10 ug	2-3 周	4
	10	13	SP3-SP6						7
2	10	15	SP7-SP10	CFA/IFA中	尾底	20 ug	10 ug	2-3 周	4
	10	15	SP11-SP14						7
3	10	15	SP15-SP18	CFA/IFA中	尾底	20 ug	10 ug	2-3 周	4
	10	15	SP19-SP20						7
4	20	20	SP23-SP24	CFA/IFA中	尾底	20 ug	10 ug	4-5 周	7
5	10	20	SP33-SP35	CFA/IFA中	尾底	20 ug	10 ug	3-4 周	8
6	10	10	SP21-SP22	Ribi中	足垫	20 ug	10 ug	3-4 天	7
7	20	20	SP25-SP30	Ribi或CFA	bip	20 ug	10 ug	2-3 周	5
8	10	10	SP31-SP32	IL5-抗小鼠-CD3	尾底	20 ug	20 ug	2-3 周	4

尾底 (base of tail, bot) 免疫: 将人 IL-5 在完全福氏佐剂 CFA (首次免疫) 或不完全福氏佐剂 IFA (后续免疫) 中乳化。按上表的免疫剂量和时间免疫。(IL-5 序列见欧洲专利申请公开号 EP0267779)。足垫 (footpad, FP) 免疫: 抗原在 Ribi 佐剂中乳化。一些动物 (第 7 组) 同时通过 bot 和腹腔 (ip) 接受抗原 (在 CFA 或 Ribi 中)。第 8 组动物接受的抗原是人 IL-5 通过化学方法与小鼠抗 CD3 抗体 (抗 m-CD3) 连接而成的结合物。

免疫小鼠的脾和/或淋巴结细胞与非分泌的骨髓瘤细胞系 P3-X63-Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD) 或骨髓瘤细胞系 NS0-bc12 (B. Diamond, Albert Einstein College of Medicine, NY) 融合, 如上文所述 (Galfre and Milstein, Methods Enzymol. 73: 3-46, 1981)。定期观察杂交细胞的生长, 收集含杂交瘤细胞孔的培养上清, 用 ELISA 初步筛选特异性结合 IL-5 的人源 IgG/ κ 抗体。

IL-5 结合试验

ELISA 板用 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 IL-5 抗原 50 μl /孔包被, 包被液: 0.1 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6), 8.4g/1 NaHCO_3 (分子量 84), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时。用洗液 (PBS 含 0.05% Tween 20) 洗 3 次, 再用封闭液 (PBS 含 0.5% BSA, 0.1% Tween 20, 0.01% 硫柳汞) 200 μl /孔室温封闭 1 小时。用洗液洗板 3 次后, 加入样品 (或对照) 50 μl /孔室温孵育 2 小时。用洗液洗板 3 次后, 加入检测抗体羊抗-人 IgG Fc-HRP (目录号 H10507) 100 μl /孔室温孵育 1 小时, 在二次筛选

时使用的是羊抗-人 κ 抗体-HRP。洗板后每孔加入 100 μ l 显色液(10ml 底物缓冲液(7.14g/l 柠檬酸, 16.96g/l 磷酸氢二钠), 10mg 邻苯二胺(Sigma 目录号 P-7288), 10 μ l 30% H_2O_2)。约 10 分钟后, 每孔加入终止液(2 M H_2SO_4), 用 ELISA 读板机在 492nm 处检测结果。阳性细胞转到 48 孔板中培养, 长满后再转入 24 孔板中培养。

共获得 116 株可与 IL-5 反应的杂交瘤细胞株, 其中 7 株为 IgG2, 109 株为 IgG4。IgG4 抗体多得不成比例可能与 IL-5 对类别转换的影响有关。在 116 株产生特异性抗 IL-5 抗体的杂交瘤细胞中, 选择一株 IgG4/ κ 杂交瘤命名为 20.13 进一步研究, 该杂交瘤产生的抗体具有与一株小鼠 IgG 对照抗体(39D10, Schering-Plough 公司)相似的较强的中和活性。

实施例 2

增殖试验检测抗体的生物学功能

经亲和纯化的杂交瘤腹水或细胞培养上清被用于定量功能试验来检测抗体对 IL-5 诱导的 TF1 细胞增殖的中和作用(DNAX)。简单地说, 重组人 IL-5 用含 1%FBS 的 RPMI-1640 培养液稀释成 1.0 ng/ml, 对照抗体 39D10(Schering-Plough)用这种含 IL-5 的培养液稀释到 1.0 μ g/ml。将 IL-5 溶液或含 39D10 的 IL-5 溶液加入 96 孔板。对照孔仅含培养液或 IL-5。

TF1 细胞用 RPMI-1640 培养液洗 2 次, 吹散后用含 FBS 培养液稀释成 2.5×10^5 TF1 细胞/ml。每孔加入 100 μ l 细胞悬浮液, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 孵育 48-56 小时。48 小时后, 每孔加入 20 μ l Alamar Blue, 孵育过夜。用 FluoroCount™ 读板机激发波长 530nm, 发射波长 590nm, PMT600 伏读板。

无论是从腹水或细胞培养上清中纯化得到的抗体 20.13.3, 试验结果均显示其能有效的阻断 IL-5 诱导的细胞增殖。

实施例 3

测定中和 IC_{50}

用 TF1 细胞抗增殖试验检测了单抗 20.13.3 中和人和小鼠 IL-5 的活性(Egan et al. Drug Res. 49: 779-790 (1999))。简单地说, 在 96 孔细胞培养板中每孔加入 50 μ l 试验溶液(RPMI 1640 含 1%谷氨酰胺, 1%青霉素/链霉素溶液, 0.1%巯基乙醇, 0.05%两性霉

素 B 和 1% 胎牛血清)。再加入不同浓度的单抗 20.13.3, 室温孵育 30 分钟。在每孔中(阴性对照孔除外)加入 20 μ l 人或小鼠 IL-5 (12ng/ml)。将 TF1 细胞配成 5 $\times$ 10⁵ 细胞/ml, 向所有孔中均加入 30 μ l 该细胞悬液。细胞板在 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵育 44-48 小时。然后在每孔中加入 25 μ l 5mg/ml 的 MTT 溶液, 再孵育 6 小时。每孔加入 100 μ l 10% 的 SDS 溶液, 孵育过夜。用 UVMAX™ 分光光度计检测细胞板。试验结果显示: 单抗 20.13.3 对人和小鼠 IL-5 的 IC₅₀ 值分别为 250pM 和 380 pM。

实施例 4

体内功能试验

在抗原诱导的肺炎小鼠模型(Kung et al, 1994)中对本发明的抗 IL-5 抗体进行了评价。简单地说, 在用雾化的卵清蛋白(OVA)攻击 2 小时以前, 分别皮下给予 OVA 致敏的小鼠生理盐水或 5、1、0.5、0.1 mg/kg 的单抗 20.13.3, 或以 1 mg/kg 腹腔给予作为阳性对照的小鼠抗 IL-5 单抗 TRFK-5 (Schering Plough Research Institute; Mita et al., J. Immunol. Methods 125: 233 (1987))。攻击 24 小时后收集支气管肺泡灌洗液(BAL), 测定细胞构成。TRFK-5 使所有参数均有显著性下降。单抗 20.13.3 在 5、1、0.5mg/kg 剂量时显著抑制了 BAL 中的总细胞数和嗜酸性粒细胞数。

用上述模型评价了本发明的抗 IL-5 抗体的活性持续时间。在用雾化的 OVA 攻击 2 小时、2 周、4 周、6 周、8 周或 12 周以前, 分别皮下给予 OVA 致敏的小鼠生理盐水或 5 和 1mg/kg 的单抗 20.13.3。攻击 24 小时后收集支气管肺泡灌洗液(BAL)测定细胞构成, 同时取血样进行药代动力学分析。当在 OVA 攻击 2 小时和 13 天之前给予时, 5 和 1mg/kg 剂量的单抗 20.13.3 能显著抑制 BAL 中的总细胞数和嗜酸性粒细胞数。当在 OVA 攻击 4 周之前给予时, 仅 5mg/kg 剂量的单抗 20.13.3 能显著抑制 BAL 中的总细胞数和嗜酸性粒细胞数。当在攻击 6-12 周之前给予时, 未检测到单抗 20.13.3 的抑制作用。

我们在抗原诱导的肺炎恒河猴模型(Mauser et al, 1995)中评价了单抗 20.13.3 的作用。简单地说, 9 只天生对 *Ascaris suum* 过敏的猴子首先给予溶剂(皮下给予生理盐水), 18 小时后用雾化的 *Ascaris suum* (抗原)攻击。攻击 24 小时后, 收集 BAL 液和血液样

品，测定 BAL 液和血液样品的细胞含量。

3 周后，皮下给予这 9 只猴子 0.3mg/kg 剂量的单抗 20.13.3，18 小时后，用 *Ascaris suum* 攻击，攻击 24 小时后收集 BAL 液。在攻击前和攻击后的选定时间取血样。在给予单抗 20.13.3 后的第 4 周和第 8 周，用 *Ascaris suum* 重复攻击，每次攻击前和攻击后 24 小时测定 BAL 液的细胞含量。在给予单抗 20.13.3 4 周后，BAL 中的抗原诱导的嗜酸性粒细胞聚集显著下降，给予 8 周后仍有下降的趋势（55%下降）。在给予单抗 42 小时、2 周、4 周、8 周和 12 周后，外周血中的嗜酸性粒细胞数显著下降，给予 14 周后回到接近给予前水平。

实施例 5

全人源单克隆抗体结构分析

为分析本发明抗体的结构，从产生抗 IL-5 单克隆抗体的杂交瘤细胞中克隆出编码重链和轻链片段的核酸序列，并进行了序列分析。采用 MacVector 和 Geneworks 软件组将所得序列与“V BASE sequence directory”（Tomlinson et al. , MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK）进行了对比分析。

为克隆编码单抗 20.13.3 的 cDNA，用 RNazol（Tel-Test, INC）从约 1×10^6 杂交瘤细胞中分离出 RNA，用 oligo-dT(18) 和 AdvantageTM RT/PCR 试剂盒（Clonetech）将 mRNA 逆转录为 cDNA。用下列引物扩增 cDNA。

引物名称	引物序列
轻链正向: vk018-Eco	5'-GGAAGAATTCACCTGTGCAGGAGTCAGTCC-3' (SEQ ID NO: 19)
轻链反向: ckp2-Apa	5'-TGAGATCGAGGGCCCCTTCTCCCTCTAACACTCTCC-3' (SEQ ID NO: 20)
重链正向: v3-23-Eco	5'-CCGGAATTCAGAGAGAACTCACCATGGAGTTTG-3' (SEQ ID NO: 21)
重链反向: Jh4/5- Nhe	5'-GAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCT-3' (SEQ ID NO: 22)

20.13.3 cDNA 轻链 PCR 产物用 1%琼脂糖/TAE 电泳分离，用 sephaglas beads (Amersham)回收纯化约 760 bp 条带，亚克隆到 PCR TOP02. 1 载体(Invitrogen)。插入的 cDNA 用 dye 引物测序试剂盒 (Applied Biosystems)测序，测序引物为 vk018-Eco 和 ckp2-Apa。用 SeqEd 和 Gene Works 软件进行序列分析。从鉴定正确的质粒上切下的 EcoR I/Apa I 片段被克隆到表达载体 pManuKappa 中。

20.13.3 重链 PCR 产物用 EcoRI/NheI 酶切，1%琼脂糖/TAE 电泳分离，用 sephaglas beads (Amersham)回收纯化约 435 bp 条带，亚克隆到 pManuGamma4 中。用 dye 引物测序试剂盒 (Applied Biosystems)测序，测序引物为 v3023-Eco 和 Jh4- Nhe。

对每个克隆的两条链均测序至少 3 次以确保序列正确。

基因应用分析

表 5 显示了本发明的 20.13.3 杂交瘤基因应用情况。

表 5 重链和轻链基因的应用

克隆	重链			κ 轻链	
	VH	D	JH	VK	JK
20.13.3	(3-23) DP-47	D1-20	JH4B	08/018	JK4

突变分析

显然基因应用分析仅能提供有限的抗体结构信息。由于 XenoMouse™小鼠的 B 细胞随机产生 V-D-J 重链和 V-J κ 轻链转录物，因此还会发生一些二级加工的过程，包括体细胞过度突变、插入和 CDR3 延伸等，可参考 Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997) 和国际专利 W098/24893, 1998 年 10 月 11 日公开。相应地，为进一步分析抗体结构，我们从由杂交瘤克隆中获得的 cDNA 预测了抗体的氨基酸序列。

单抗 20.13.3 重链可变区与胚系序列相比有 3 个氨基酸的置换——CDR2 中 1 个，CDR3 中 2 个。单抗 20.13.3 轻链可变区与胚系序列相比有 5 个突变——CDR1、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 各 1 个。

可以发现以上鉴别出的氨基酸置换或插入中有许多与 CDR 接近或就在 CDR 中。这些置换可能对抗体与 IL-5 的结合有作用。此外，这

些置换对抗体的亲和力有显著影响。

实例 6

用动力学排除试验测定全人源的抗 IL-5 单克隆抗体的亲和力常数 (Kd)

用 KinExA 3000™ (Sapidyne Instruments Inc.)测定了单抗 20.13. 3 的平衡解离常数。KinExA 采用动力学排除试验方法，其原理是测量抗体、抗原和抗体-抗原复合物三者的混合物中游离抗体的浓度。将混合物以很短的时间与固相化的抗原接触来测量游离抗体浓度。在实际操作中，将流动相抗原-抗体混合物通过固定在流动槽中的包被有抗原的颗粒。获得的数据用常用软件分析。平衡常数的计算采用基于下列假设的数学方法：

1. 平衡时抗原抗体的结合和解离达到平衡：
$$K_{on} [Ab] [Ag] = K_{off} [Ab Ag];$$
2. 抗体与抗原 1:1 结合，总抗体等于抗原-抗体复合物加上游离抗体；
3. 仪器测定信号与游离抗体浓度线性相关。

所有试验操作均参照 KinExA 3000™使用手册。所有检测均重复 2 次。下表显示了抗体浓度分别为 0.1nM 和 0.01nM 时标准方法测定 Kd 的试验条件：

	抗体浓度	
	0.1 nM	0.01 nM
样品体积	500 µl	2000 µl
样品流速	0.25 ml/min	0.25 ml/min
标记体积	500 µl	500 µl
标记流速	0.25 ml/min	0.25 ml/min
最高抗原浓度	500 pM	40 pM
最低抗原浓度	0.5 pM	0.07 pM

每次试验将 2 倍系列稀释的抗原与固定浓度的抗体混合。混合物室温放置 2 小时以达到平衡。

上述试验使用的材料有：单抗 20.13. 3；重组人 IL-5 (rhIL-5)

(Sigma 目录号: I 5273, R & D Systems 目录号: 205-IL-005; Amersham 目录号: ARM19005, Calbiochem 目录号: 407641,); PMMA 颗粒, 8 微米 (Sapidyne 目录号: 440198); Neutravidin (Pierce 目录号: 31000); EZ-link TFP PEO-Biotin (Pierce 目录号: 21219); 生物素标记的 rhIL-5 (生物素/蛋白比率: 19/1); Cy5 标记的羊抗人 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories 目录号: 109-175-003)。PMMA 颗粒用生物素标记的 rhIL-5 包被, 参照 Sapidyne “Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms”。rhIL-5 的生物素标记采用 EZ-link TFP PEO-Biotin, 参照供应商优选的方法 (Pierce bulletin 0874)。生物素/蛋白比率用 HABA 试验估计 (Pierce bulletin 0212)。

在“标准模式”下的双曲线分析 (0.1nM 和 0.01nM 的抗体浓度) (对双曲线分析的解释见 KinExA 3000™ 手册) 得到较好的 Kd 最适曲线, 具有清楚的最小值。用这种方法得到的单抗 20.13.3 的 Kd 计算值是 1.5×10^{-11} M。用双曲线 (未知抗原) 方法得到的单抗 20.13.3 的 Kd 计算值是 1.95×10^{-11} M, 与用双曲线 (标准) 方法得到的 Kd 值相近。计算时抗体的分子量使用 150KD。

动力学分析显示用本发明方法制备的抗体对人 IL-5 具有较高的亲和力。

在本说明书和权利要求书中, 词语“包含”或其变异体“包括”或“含有”意味着包括所述的数字或一组数字, 但并不排除其他数字或一组数字。

本说明书中引用的所有公开发表文献和专利申请书均为本发明的参考, 每篇文献或专利申请书在其引用之处都已单独指出。尽管在本说明书中通过解释和实例对本发明做了较细致的描述, 但是显然掌握本领域常规技术的人员在本发明的指导下可以做一些变化和修改, 这些并不排除在后面的权利要求书保护的精神和范围之外。

序列表

<110> Schering Corporation and Abgenix, Inc.

Greenfeder, Scott

Corvalan, Jose

<120> 人源抗白细胞介素-5 单克隆抗体及其制备方法和包含这些抗体的组合物

<130> LI01564

<160> 22

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2002

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> V_区

<222> (1)..(414)

<223>

<220>

<221> CH1 C_区

<222> (415)..(709)

<223>

<220>

<221> 铰链区

<222> (1102)..(1137)

<223>

<220>

<221> CH2 C_区

<222> (1256)..(1585)

<223>

<220>

<221> CH3 C_区

<222> (1683)..(2002)

<223>

<400> 1

atggagtttg ggetgagetg getttttctt gtggetatatt taaaaggtgt ccagtgtgag

60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggettg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc	120
tgfgcagcct ctggattcac ctttagcage tatgccaatga gctgggtccg ccaggtccca	180
gggaagggge tggagtgggt ctcaactatt agtggtagtg gtggtagcac ataactacga	240
gaactcgtga agggccgggt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gctfgagage cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa agagaggtat	360
aactggaaat acctacacta ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctcagctagc	420
accaagggcc cactcgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca	480
gcgccttgg gctgcctggf caaggactac ttccccaac cggtagcggt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagegg cgtgcacacc ttcccgctg tectacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggf gacctgccc tcacagcgt tgggcacgaa gacctacacc	660
tgcacgttag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttgg tgagaggcca	720
gcacagggag ggaggggtgc tgcctggaagc caggtcagc cctcctgcct ggacgcaccc	780
cggtctgcca gcccagccc agggcagcaa ggcatgcccc atctgtctcc tcacccggag	840
gcctctgacc accccactca tgcctcaggga gagggtcttc tggatttttc caccaggtc	900
cgggcagcca caggctggat gccctaccc caggccctgc gcatacaggg gcaggtgctg	960
cgtcagacc tgccaagage catatccggg aggacctgc cctgacctc agcccacccc	1020
aaaggccaaa ctctccactc cctcagctca gacacctct cctctcccag atctgagtaa	1080
ctcccaatct tctctctgca gattccaaat atgggtcccc atgcccatac tgcccaggta	1140
agccaaccca ggctctgccc tcagctcaa ggccggacag gtgccctaga gtagectgca	1200
tcagggaaca ggcccagcc ggggtctgac gctccacct ccatctcttc ctcagacct	1260
gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg ttccccccaa aaccaagga cactctcatg	1320
atctcccgga cccctgaggt cactgtcgtg gtggtagcac tgagccagga agaccccgag	1380

```

gtccagttca actggtagct ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1440

gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtec tcaccgtcct gcaccaggac 1500

tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc 1560

gagaaaacca tctccaaagc caaaggtggg acccacgggg tgcgagggcc acatggacag 1620

aggtcagctc ggcccacct ctgccctggg agtgaccgct gtgccaacct ctgtccctac 1680

agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa 1740

gaaccaggtc agctgacct gcctggteaa aggettctac cccagcgaca tcgccgtgga 1800

gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc 1860

cgacggctcc ttcttctct acagcaggt aacctggac aagagcaggt ggcaggaggg 1920

gaatgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggtctgcac aacctaca cacagaagag 1980

ctctccctg tctctggga aa 2002

```

<210> 2

<211> 465

<212> 蛋白质

<213> 智人

<220>

<221> 信号

<222> (1)..(19)

<223>

<220>

<221> 可变 区

<222> (20)..(138)

<223>

<220>

<221> CH1 区

<222> (139)..(236)

<223>

<220>

<221> 铰链区

<222> (237)..(248)

<223>

<220>

<221> CH2 区

<222> (249)..(358)

<223>

<220>

<221> CH3 区

<222> (359)..(465)

<223>

<400> 2

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Glu Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Leu His Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr

145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 225 230 235 240

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

	325		330		335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys					
	340		345		350
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
	355		360		365
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr					
	370		375		380
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
385		390		395	400
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
	405		410		415
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys					
	420		425		430
Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	435		440		445
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly					
	450		455		460
Lys					
465					

<210> 3

<211> 708

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

atggacatga gggtcctgc tcagtcctg gggctcctgc tgetctgget ctcaggtgcc	60
agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcttcctgt ctgcattctgt gggagacaga	120
gtcaccatca ctgtccagge gagtcaggac attatcaact atttaaattg gtatcagcag	180
aaaccaggga aagccccfaa actctctgac tacagtgett ccaatttgga aacaagagtc	240
ccatcaaggt tcagtggaag tggttctggg acagatttta ctttcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag atattgcaac atattattgt caacagtatg ataatcacc gctcactttc	360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcagacga actgtggctg caccatctgt ctccatcttc	420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac	480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
tcccaggaga ggttcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
ctgacgttga gcaaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
cagggcctga gctgcctcgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt	708

<210> 4

<211> 236

<212> 蛋白质

<213> 智人

<220>

<221> 信号肽

<222> (1).. (22)

<223>

<400> 4

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

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

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Asp Ile Ile Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Arg Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Tyr Asp Asn His Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Glu Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 5

<211> 414

<212> DNA

<213> 智人

<400> 5

atggagtttg ggetgagctg gctttttctt gtggetatct taaaagggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggtctg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttagcagc tatgcatga gctgggtccg ccaggtccca 180

gggaaggggc tggagtgggt ctcaactatt agtggtagtg gtggtagcac ataactacga 240

gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa agagaggtat 360

aactggaaat acctacacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 414

<210> 6

<211> 119

<212> 蛋白质

<213> 智人

<400> 6

Glu Val Glu Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly

	100	105	110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115		
<210>	7		
<211>	15		
<212>	DNA		
<213>	智人		
<400>	7		
	agctatgccatggagc		15
<210>	8		
<211>	5		
<212>	蛋白质		
<213>	智人		
<400>	8		
	Ser Tyr Ala Met Ser		
	15		
<210>	9		
<211>	51		
<212>	DNA		
<213>	智人		

<400> 9
actatttagtg gtagtgggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 10

<211> 17

<212> 蛋白质

<213> 智人

<400> 10

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

Gly

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 11
gagaggtata actggaacta cctacactac 30

<210> 12

<211> 10

<212> 蛋白质

<213> 智人

<400> 12

Glu Arg Tyr Asn Trp Asn Tyr Leu His Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> 智人

<400> 13

caggegagtc aggacattat caactattta aat 33

<210> 14

<211> 14

<212> 蛋白质

<213> 智人

<400> 14

Glu Ala Ser Gln Asp Ile Ile Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 15

gtgcttccaa ttgtgaaaca 20

<210> 16

<211> 7

<212> 蛋白质

<213> 智人

<400> 16

Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr
1 5

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> 智人

<400> 17

caacagtaTg ataatcaccc gctcact 27

<210> 18

<211>	9	
<212>	蛋白质	
<213>	智人	
<400>	18	
Gln Gln Tyr Asp Asn His Pro Leu Thr		
1	5	
<210>	19	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	19	
ggaagaattc accctgtgca ggagtcagtc c		31
<210>	20	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	20	
tgagatcgag ggccccttct cctctaaca ctctcc		36
<210>	21	

<211> 34

<212> DNA

<213> 智人

<400> 21

ccggaattcc agagagaact caccatggag ttg 34

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> 智人

<400> 22

gagagagagc tagctgagga gacggtgacc agggttccct 40