

[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 98804345.9

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1310947C

[22] 申请日 1998.2.17 [21] 申请号 98804345.9

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 20 [33] US [31] 08/803085

[32] 1998. 2. 5 [33] US [31] 09/019441

[86] 国际申请 PCT/US1998/002253 1998. 2. 17

[87] 国际公布 WO1998/037099 英 1998. 8. 27

[85] 进入国家阶段日期 1999. 10. 20

[73] 专利权人 生物基因 IDEC 麻省公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 M·E·雷夫 W·S·克勒策尔

T·纳卡穆拉

[56] 参考文献

WO9217207A1 1992. 10. 15

WO8707302A 1987. 12. 3

WO9302108A1 1993. 2. 4

审查员 陆 纯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 70 页 附图 10 页

[54] 发明名称

γ -1 和 γ -3 抗人 CD23 单克隆抗体及其作为治疗剂的用途

[57] 摘要

本文公开了能特异性地结合人 CD23 (即 IgE 的低亲和性受体(FcεRII/CD23)), 并含有人 γ -1 或人 γ -3 恒定区的单克隆抗体。该抗体可用于调节或抑制诱导 IgE 表达。因此, 它们对于有关病态(其中对诱导 IgE 产物的抑制作用是治疗上所需的)的治疗和预防具有实用性, 这些病态包括变应性疾病、自身免疫疾病和炎性疾病。

1. 一种抗人 CD23 抗体，该抗体包含
 - (a)来源于 SEQ ID NO: 8 的 1-118 位氨基酸的 5E8 重链可变区的重链可变区，只是 SEQ ID NO: 8 的+78 位天冬酰胺残基被替换为赖氨酸残基；
 - (b)来源于 SEQ ID NO: 6 的 1-107 位氨基酸的 5E8 轻链可变区的轻链可变区；
 - (c)与人 Fc γ 受体结合的恒定区，
其中该抗人 CD23 抗体特异性与人 CD23 结合并抑制 IgE 表达。
2. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体，该抗体包含人 γ -1 或人 γ -3 恒定区。
3. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体，该抗体是人源化抗体。
4. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体，该抗体抑制 B 细胞的 IgE 体外产生。
5. 权利要求 4 的抗人 CD23 抗体，该抗体抑制 IL-4 诱导的 B 细胞的 IgE 体外产生。
6. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体，该抗体抑制 IL-4 诱导的 B 细胞的 IgE 体内产生。
7. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体，该抗体具有 0.01 nM-1000 nM 的结合亲和性。
8. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体，该抗体至少具有 5 nM 的 CD23 结合亲和性。
9. 权利要求 8 的抗人 CD23 抗体，该抗体至少具有 100 nM 的 CD23 结合亲和性。
10. 一种药物组合物，该组合物包含权利要求 1-9 中任何一项的用于抑制病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。
11. 一种药物组合物，该组合物包含权利要求 1-9 中任何一项的用于抑制患变应性疾病的病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。
12. 一种药物组合物，该组合物包含权利要求 1-9 中任何一项的用于抑制患自身免疫性疾病的病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。
13. 一种药物组合物，该组合物包含权利要求 1-9 中任何一项的用于抑制患炎症性疾病的病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。

14. 权利要求 2 的抗人 CD23 抗体, 该抗体包含人 γ -1 恒定区。
15. 权利要求 2 的抗人 CD23 抗体, 该抗体包含人 γ -3 恒定区。
16. 权利要求 1 的抗人 CD23 抗体, 其中重链可变区含有 SEQ ID NO: 8 的 1-118 位氨基酸, 只是+78 位天冬酰胺残基被替换为赖氨酸残基, 轻链可变区含有 SEQ ID NO: 6 的 1-107 位氨基酸。
17. 一种抗人 CD23 抗体, 该抗体包含
 - (a)抗体 5E8 的轻链和重链的互补决定区 CDR1、CDR2 和 CDR3, 其中
 - 抗体 5E8 的轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别由 SEQ ID NO: 6 的 24-34、50-56 和 89-97 位氨基酸组成;
 - 抗体 5E8 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别由 SEQ ID NO: 8 的 31-37、52-68 和 101-107 位氨基酸组成; 和
 - (b)与人 Fc γ 受体结合的恒定区, 其中该抗人 CD23 抗体特异性与人 CD23 结合并抑制 IgE 表达。
18. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 该抗体包含人 γ -1 或人 γ -3 恒定区。
19. 权利要求 18 的抗人 CD23 抗体, 该抗体包含人 γ -1 恒定区。
20. 权利要求 18 的抗人 CD23 抗体, 该抗体包含人 γ -3 恒定区。
21. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 该抗体为人源化抗体。
22. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 该抗体抑制 B 细胞的 IgE 体外产生。
 23. 权利要求 22 的抗人 CD23 抗体, 该抗体抑制 IL-4 诱导的 B 细胞的 IgE 体外产生。
 24. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 该抗体抑制 IL-4 诱导的 B 细胞的 IgE 体内产生。
 25. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 该抗体具有 0.01-1000nM 的结合亲和性。
 26. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 该抗体至少具有 5nM 的 CD23 结合亲和性。
 27. 权利要求 26 的抗人 CD23 抗体, 该抗体至少具有 100nM 的 CD23 结合亲和性。
 28. 权利要求 17 的抗人 CD23 抗体, 其中重链可变区含有 SEQ ID

NO: 8 的 1-118 位氨基酸, 只是+78 位天冬酰胺残基被替换为赖氨酸残基, 轻链可变区含有 SEQ ID NO: 6 的 1-107 位氨基酸。

29. 一种药物组合物, 该组合物包含权利要求 17-27 中任何一项的用于抑制病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。

30. 一种药物组合物, 该组合物包含权利要求 17-27 中任何一项的用于抑制患变应性疾病的病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。

31. 一种药物组合物, 该组合物包含权利要求 17-27 中任何一项的用于抑制患自身免疫性疾病的病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。

32. 一种药物组合物, 该组合物包含权利要求 17-27 中任何一项的用于抑制患炎性疾病的病人的 IgE 产生的抗人 CD23 抗体。

33. 权利要求 1-11 中任何一项的抗体在制备用于抑制病人的 IgE 产生的药物中的用途。

34. 权利要求 1-11 中任何一项的抗体在制备用于抑制患变应性疾病的病人的 IgE 产生的药物中的用途。

35. 权利要求 1-11 中任何一项的抗体在制备用于抑制患自身免疫性疾病的病人的 IgE 产生的药物中的用途。

36. 权利要求 1-11 中任何一项的抗体在制备用于抑制患炎性疾病的病人的 IgE 产生的药物中的用途。

37. 权利要求 17-27 中任何一项的抗体在制备用于抑制病人的 IgE 产生的药物中的用途。

38. 权利要求 17-27 中任何一项的抗体在制备用于抑制患变应性疾病的病人的 IgE 产生的药物中的用途。

39. 权利要求 17-27 中任何一项的抗体在制备用于抑制患自身免疫性疾病的病人的 IgE 产生的药物中的用途。

40. 权利要求 17-27 中任何一项的抗体在制备用于抑制患炎性疾病的病人的 IgE 产生的药物中的用途。

γ -1 和 γ -3 抗人 CD23 单克隆抗体及其作为治疗剂的用途

本发明领域

本发明涉及能特异性地结合人 CD23 (即 IgE 的低亲和性受体 (FceRII CD23)), 并含有人 γ -1 或人 γ -3 恒定区的单克隆抗体, 以及它们作为治疗剂的用途。

本发明背景

IgE 是免疫球蛋白家庭的成员之一, 它能介导诸如哮喘, 食物变应性反应, I型超敏反应和常见的鼻窦炎变应性鼻炎与结膜炎之类的变应性反应, 并且其结果是在一般人群中造成广泛感染。IgE 由 B-细胞分泌, 并在其表面上表达。由 B-细胞合成的 IgE 可以由连接在成熟 IgE 序列上的短跨膜结构域锚定在 B-细胞膜中。膜和所分泌的 IgE 形式是通过 IgE RNA 转录物的差别剪接形成于相同的细胞中的。

IgE 也可以通过它的 Fc 区与低亲和性 IgE 受体 (FceRII, 以后称为 "FCEL") 的结合来与 B-细胞 (和 T 细胞、单核细胞、朗氏细胞、小结树突细胞、天然杀伤细胞、嗜伊红性粒细胞以及血小板) 结合, 以及通过它的 Fc 区与高亲和性 IgE 受体 (FceRI, 以后称为 "FCEH") 的结合来与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合。低亲和性 IgE 受体在文献中一般称为 CD23。

当哺乳类动物接触到变应原时, 抗原呈递细胞加工用于呈递给辅助 T 细胞的抗原。这些辅助 T 细胞分泌细胞因子, 如协助 B-细胞进行克隆扩增和分泌更多的变应原特异性 IgE 的 IL-4。新合成的 IgE 反过来释放进入循环, 在循环中, IgE 通过在其细胞表面上的高亲和性受体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合。这样的肥大细胞和嗜碱性粒细胞由此而对所述特异性变应原敏感。当再次接触到相同的变应原时导致其与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面上的特异性 IgE 结合, 由此而将 FceRI 交联在这些细胞上, 并因此激活它们释放决定临床超敏反应和过敏反应的组胺和其它因子。

本技术领域曾报导过能够结合与 FCEL (CD23) 结合的 IgE, 但不能够结合与 FCEH 结合的 IgE 的抗体 (参见, 例如, WO 89/00138 和美国专利 4, 940, 782)。这些报导揭示这些抗体可在临床上加以利用, 因为

它们结合与低亲和性受体 (FCEL) 结合的 IgE 或者结合循环 IgE's, 但是不结合与高亲和性受体 (FCEH) 结合的 IgE. 因此, 这些抗体将不激活肥大细胞或者嗜碱性粒细胞。

此外, 有人报导抗 CD23 抗体在治疗学上具有潜力, 例如, 用于治疗变应性紊乱、炎症疾病和自身免疫疾病。例如, Bonnefoy 等 (WO 9612741) 报导: 结合 CD23 的配体, 例如单克隆抗体, 可用于治疗或者预防炎症、自身免疫和变应性疾病。

抗 CD23 单克隆抗体作为 IgE 兴奋剂和拮抗剂的用途已经有人报导过。有人报导 IgE 拮抗剂具有治疗其中 IgE 抑制是治疗上所需的病或者疾病的潜在效用, 例如, 诸如变应性鼻炎和结膜炎、特应性皮炎和哮喘之类的变应性疾病。例如, Bonnefoy 等 (WO 8707302, 1987) 报导过抗人 CD23 单克隆抗体, 该抗体确实可用于分析 IgE 受体在细胞类型上的存在, 并可用于治疗其中 IgE 的调节是治疗学上所需的疾病。

部分由于它们作为治疗剂和诊断剂的潜力, 许多小组已经报导过抗 CD23 单克隆抗体的产生。参见, 例如, Rector 等, 免疫学, 55: 481-488 (1985); Suemura 等, 免疫学杂志, 137: 1214-1220 (1986); Noro 等, 免疫学杂志, 137: 1258-1263 (1986); Bonnefoy 等, 免疫学杂志, 138: 2970-2978 (1987); Flores-Romo 等, 科学, 261: 1038-1046 (1993); Sherr 等; 免疫学杂志, 142: 481-489 (1989); 和 Pene 等, 美国科学院院报, 85: 6880-6884 (1988)。此外, 如上述文献所公开的, 也报导了这样的抗体的用途, 该抗体特异地抑制 IgE 在系统 (其中 IgE 合成是由细胞因子 IL-4 诱导的) 中的产生。(Flores-Romo 等 (同上); Sherr 等 (同上); Bonnefoy 等 (WO 8707302); Bonnefoy 等 (WO 8707302); Bonnefoy 等 (WO 9612741)); Bonnefoy 等, 欧洲免疫学杂志, 20: 139-144 (1990); Sarfati 等, 免疫学杂志, 141: 2195-2199 (1988) 和 Wakai 等, 杂交瘤, 12: 25-43 (1993)。另外, Flores-Romo 等 (同上) 报导: 由抗 CD23 抗体制备的 Fabs 能在大鼠活体内抑制抗原特异性诱导的 IgE 反应。尽管有这些报导, 然而, 抗 CD23 抗体调节 IgE 表达的机理, 尤其是它们抑制 IL-4 诱导的 IgE 产生的方式仍然是不清楚的。

有人认为抗 CD23 抗体通过经由 CD23 (存在于分泌 IgE 的 B 细胞的表面上) 的信号传导来抑制 IgE 产生。有人指出 CD23 (其在分泌 IgE 的

B 细胞上得到正调节)的功能是反馈对 IgE 产生的抑制作用(Yu 等, 自然, 369, 753-756 (1994)). 这已成为一种理论, 因为相对于对照来说, 小鼠(其中 CD23 基因已经除去)增加和保持了 IgE 的生产量(Yu 等)。此外, 有人报导: 通过 IgE 配合物或者抗 CD23 单克隆抗体与 CD23 的结合, 抑制由组成型分泌 IgE 的淋巴母细胞细胞系正在进行的 IgE 合成(Sherr 等, 同上)。这似乎表明: 这是由于在这一细胞中分泌的 IgE 重链的信使 RNA 的负调节所致(Saxon 等, 免疫学杂志, 147: 4000-4006 (1991))。然而, 抑制 IgE 表达的确切机理目前在系统(其中 IgE 分泌是由 IL-4 诱导的)中还没有得到解释。

也有人报导: Fc γ RII 与 B 细胞上的表面 Ig (B 细胞受体)的交联可导致 Ig 表达的负调节(D'Ambrosia 等, 科学, 268:293-297 (1995))。有人认为: 可以用一种类似的机理说明分泌 IgE 的 B 细胞, 该细胞也有细胞表面 CD23 和 Fc γ RII. 通过抗原(CD23)与细胞结合并且也通过 Fc 相互作用与 Fc γ RII 结合的抗人 CD23 抗体, 能够通过 Fc γ RII 传输抑制 IgE 分泌的信号。

有人建议: 与通过抗 CD23 抗体的 IgE 抑制作用有关的机制包括阻断不同于膜 CD23 和 IgE 之间的相互作用的相互作用。与此有关的是, CD23 (它是 C 型凝集素家庭的成员)显示出与存在于各类细胞(包括 T 细胞和单核细胞)上的其它几种配体(如 CD21、CD11b 和 CD11c)的相互作用。在本文中, 可将 CD23 设想为细胞粘着分子。

因此, 有人认为 CD21-CD23 相互作用可以参与在抗原呈递和尔后的 IgE 产生。模型表明: 在与活化 T 细胞(主要存在于特异性个体中)上的 CD23 结合之后, B 细胞上的 CD21 发送用于 IgE 产生的活化信号。(Lecoanet 等, 免疫学, 88: 35-39 (1996); 和 Bonnefoy 等, Int. Amer. Allergy Immunol., 107: 40-42 (1995))。对这一与抗 CD23 的相互作用的阻断, 能够阻断诱导 IgE 产生。(Aubry 等, 自然, 358: 505-507 (1992) 和免疫学, 5: 944-949 (1993); Grosjean 等, Curr. Opin. Eur. J. Immunol., 24: 2982-2988 (1994); Henchoz-Lecoanet 等, 免疫学, 88: 35-39 (1996); Nambu 等, 免疫学通讯, 44: 163-167 (1995); Bonnefoy 等, Int. Amer. Allergy Immunol., 107: 40-42 (1995))。也有可能是, 抗原呈递受到与 T 细胞上的 CD21 结合的抗原呈递 B 细胞上的 CD23 的正调节。

另一种可能解释 CD23 对 IgE 产生的效应的机理涉及可溶形式的 CD23。有人建议：CD23 从可释放几种不同形式的可溶性 CD23 或者 IgE 结合因子的细胞表面上切割下来 (Sarfati 等, 免疫学, 53: 197-205 (1984))。可溶性 CD23 是细胞因子, 有关它的活性的报导之一是由 B 细胞产生的 IgE 产量 (IL-4 诱导) 的增加 (Pene 等, 细胞生物化学杂志, 39: 253-269 (1989); Pene 等, 欧洲免疫学杂志, 18: 929-935 (1988); Sarfati 等, 免疫学杂志, 141: 2195-2197 (1988); Sarfati 等 (1984) (同上); Saxon 等, 临床免疫学变态反应杂志, 86 (第 3 篇第 1 部分): 333-344 (1990))。也有人报导, 某种形式的可溶性 CD23 抑制 IgE 产生 (Sarfati 等, 免疫学; 76: 662-667 (1992))。因此, 抗 CD23 抗体有可能通过以下机理抑制 IgE 产生: 1) 抑制 IgE 对可溶性 CD23 的增加效应和/或 2) 抑制可溶性 D23 自细胞表面上的蛋白酶解释放。

因此, 基于上文所述, 在本技术领域的更具特异性 CD23 的功能和对 IgE 产生的效应方面, 以及其特异性配体影响 IgE 产生的方式方面, 很明显有很大的复杂性和不确定性。

本发明目的

因此, 本发明的目的是产生 CD23 特异性的新配体 (抗体), 并利用这样的抗体阐明抗 CD23 抗体调节 IgE 表达的机理。

本发明的另一个目的是产生结合 CD23, 尤其是人 CD23 的新配体 (抗体), 它具有改善的抑制诱导 IgE 表达的能力。

本发明的更具体的目的是产生包含人 γ -1 或人 γ -3 恒定区的抗人 CD23 抗体。

本发明的另一个目的是产生多价抗人 CD23 抗体, 该抗体可以借助于它们交联 CD23 和 Fc 受体的能力的提高而变得更为有效。

本发明的另一个目的是提供包含抗人 CD23 单克隆抗体 (包含能够抑制诱导 IgE 产生的人 γ -1 或 γ -3 恒定区) 的药物组合物。

本发明的另一个目的是利用包含人 γ -1 或人 γ -3 恒定区的抗人 CD23 单克隆抗体治疗或预防病态 (其中对诱导 IgE 产生的抑制作用是治疗学上所需的)。

更具体地说, 本发明的目的是利用包含人 γ -1 或者人 γ -3 恒定区的抗人 CD23 单克隆抗体, 治疗或预防变应性疾病、自身免疫疾病和炎性疾病。

附图的简要描述

图 1 比较了鼠抗人 CD23 单克隆抗体 (MHM6) 和五种灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 (5E8、6G5、B3B11 和 3G12) 的体外 IgE 抑制活性;

图 2 显示, 灵长类单克隆抗体 5E8 和 6G5 结合人 CD23 上的表位, 它同于市售鼠抗人 CD23 单克隆抗体 MHM6 (图 2, 中图) 并可相互竞争 (图 2, 下图)。灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 2C8 和 B3B11 可与 MHM6 相互竞争 (图 2, 上图)。

图 3 比较了特殊的灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 5E8 与四种不同 PRIMATIZED®形式的上述灵长类单克隆抗体的体外 IgE 抑制活性, 其序列如下文所述:

p5E8G4P-这一 PRIMATIZED®抗体含有下列序列: 人 κ 轻链恒定区和含有 P 突变的人 γ 4 恒定区 (Angal 等, 分子免疫学, 30: 105-108 (1993));

p5E8G4PN-这一 PRIMATIZED®抗体含有人 κ 轻链恒定区和具有 P 突变的人 γ 4 恒定区 (Angal 等, 分子免疫学, 30: 105-108 (1993))。这一抗体在其重链可变区中也含有突变, 该突变把天冬酰胺残基 (潜在的糖附着位点) 改变为赖氨酸。

p5E8G1 这一 PRIMATIZED®抗体含有人 κ 轻链恒定区和人 γ 1 恒定区;

p5E8G1N-这一 PRIMATIZED®抗体含有人 κ 轻链恒定区和人 γ 1 恒定区。这一抗体在其重链可变区中也含有突变, 该突变把天冬酰胺残基 (糖附着位点) 改变成为赖氨酸

图 4 包含比较在图 3 中确定的抗体的以 nM 为单位的表观 Kd 值的表, 并规纳了它们的 IgE 抑制活性。

图 5 比较了一种特殊的灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 6G5 和两种不同 PRIMATIZED®形式的 6G5 的体外 IgE 抑制活性, 这两种 PRIMATIZED®形式的 6G5 的序列如下文所述:

p6G5G1 这一 PRIMATIZED®抗体含有人 λ 轻链恒定区和人 γ 1 恒定区;

p6G5G4P 这一 PRIMATIZED®抗体含有人 λ 轻链恒定区和具有 P 突变的人 γ 4 恒定区 (Angal 等; 分子免疫学, 30: 105-108 (1993));

图 6 比较灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 2C8 和源于 2C8 的 F (ab')₂ 的体外 IgE 抑制活性;

图 7 显示, 源于 2C8 的 F (ab')₂ 拮抗灵长类抗人 CD23 单克隆抗体

2C8 对体外 IgE 活性的抑制。

图 8 显示，特殊的灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 5E8 在 SCID 动物模型中的体内 IgE 抑制活性；

图 9 比较了灵长类抗人 6G5 和其 PRIMATIZED®形式 p6G5G4P 的体内抑制活性。

图 10 表示灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 6G5 和其 PRIMATIZED®形式 p6G5G1 的体内 IgE 抑制活性。

本申请所用术语的定义

嵌合抗体：

一种包含得自两种不同抗体（通常为不同物种抗体，更典型为啮齿动物可变序列和人恒定区序列）的区的重组抗体。

抗人 CD23 γ 1 抗体：

一种能特异性地结合人 CD23 的抗体，该抗体含有抑制诱导 IgE 产生的人 γ 1 恒定区或其片段或修饰。具体地说，这包括包含啮齿动物或灵长类可变区或抗原结合部分的抗体，人源化的单克隆抗体、PRIMATIZED®形式的单克隆抗体和人抗人 CD23 单克隆抗体，这种单克隆抗体包含人 γ 1 恒定区、片段或其修饰，并且抑制诱导 IgE 的体外产生。

抗人 CD23 γ 3 抗体：

一种能特异性地结合人 CD23 的抗体，该抗体含有抑制诱导 IgE 产生的人 γ 3 恒定区或其片段或修饰。具体地说，这包括包含啮齿动物或灵长类可变区或抗原结合部分的抗体、人源化的单克隆抗体、PRIMATIZED®形式的单克隆抗体和人抗人 CD23 单克隆抗体，这种单克隆抗体包含人 γ 3 恒定区、片段或其修饰，并且抑制诱导 IgE 的体外产生。

抗体恒定区的修饰：

本发明的抗体包含恒定区突变、取代或者缺失，其可以在效应水平上（例如在 FcR 结合中）产生所需的改变，而不改变由恒定区介导的基本的效应子功能。

PRIMATIZED®抗体：

一种包含灵长类可变序列或抗原结合部分和人恒定区序列的重组抗体。

人源化抗体:

一种包含非人可变区或者抗原结合部分的重组抗体, 该抗原结合部分已经修饰得更为相似地模仿人抗体可变区, 因此, 消除或减少了施用于人时的潜在免疫原性, 而无需牺牲免疫球蛋白的特异性或亲和性。已知有几种人源化方法, 包括包含表面残基的选择性修饰的“交合”、构架置换、(CDR 移植)和模拟和分子模拟。

$\gamma 1$ 恒定区:

一种特定类型恒定区序列, 该序列提供抗体特异性效应子活性。在本申请中, $\gamma 1$ 恒定区是指人 $\gamma 1$ 恒定区、其片段或修饰, 该结构域在与抗 CD23 可变区序列或者抗原结合部分的结合过程中保持 $\gamma 1$ 效应子功能。修饰包括人 $\gamma-1$ 恒定区, 其包含一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或增加。该效应子功能为包含这样恒定区的抗体对诱导 IgE 产生的抑制能力所证明。

$\gamma 3$ 恒定区:

一种特定类型恒定区序列, 该序列提供抗体特异性效应子活性。在本申请中, $\gamma 3$ 恒定区意指人 $\gamma 3$ 恒定区、其片段或修饰, 该结构域在与抗 CD23 可变区序列或者抗原结合部分的结合过程中保持 $\gamma 3$ 效应子功能。修饰包括人 $\gamma-3$ 恒定区, 其包含一个或多个氨基酸残基的缺失、取代或增加。该效应子功能为包含这样恒定区的抗体对诱导 IgE 产生的抑制能力所证明。

CD23:

其意指 IgE 的低亲和性受体, Fc ϵ R2/CD23。

抗 CD23 抗体:

一种特异性地结合 CD23, 优选为人 CD23, 的抗体。

本发明详尽描述

正如以上所讨论的, 虽然许多小组已经报导抗 CD23 抗体的产生及其作为调节 IgE 产生的拮抗剂和兴奋剂的用途, 但是这些抗体在 IL-4 诱导 IgE 产生的系统中调节 IgE 表达的确切机理仍然是不清楚的。因此, 如果这样的抗体调节 IgE 表达的方式得到阐明, 或者至少得到较好的解释, 那将是有益的, 因为这样的信息在设计治疗有关疾病(其中对 IgE 产生的调节是治疗学上所需的)的治疗方案方面具有潜在的用途。尤其是, 由于据认为提高的 IgE 水平涉及许多疾病过程, 例如变

应性疾病、炎性病和自身免疫疾病，因此，如果获得对于 CD23 专一的改进抗体，那么将有益于提高抑制诱导 IgE 产生的能力。这样的疾病包括，例如，特应性皮炎、湿疹、变应性鼻炎和结膜炎、约伯综合症以及哮喘。

结果是，本发明者惊人地发现含有人 γ -1 恒定区的抗人 CD23 单克隆抗体在系统中抑制 IgE 产生，该系统即其中 IL-4 能比其它效应子类型（例如那些包含人 γ -4 恒定区或者 CD23 单克隆抗体或同时缺乏效应子功能的抗体片段的效应子）的 CD23 单克隆抗体更好地诱导 IgE 产生。因为人 γ -3 恒定区显示出介导与人 γ -1 相同的效应子的功能，所以也包含含有人 γ -3 恒定区的抗人 CD23 单克隆抗体。

目前，对于 IgG (γ) 类的抗体，已经确定了五种效应子功能。其中的两种功能（即补体活化和 Fc γ RN 相互作用）在本发明所描述的体外分析中没有被发现，因此它们可能与该分子机理无关。已经证明其它三种 Fc γ R 受体与 IgG 类的抗体产生相互作用：Fc γ RI、Fc γ RII（其中至少有六种不同的蛋白质）和 Fc γ RIII（其中至少有两种不同的蛋白质）。所有这三种受体都与 IgG1 和 IgG3 产生相互作用。

Fc γ RI 是三种之中唯一具有可观的 IgG 亲和性的受体。它以大约 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 的 K_a 值结合单体 γ -1 和 γ -3。然而它对于人 γ -4 的亲和性要少大约 10 倍，并且它完全不结合人 γ -2 (Fries 等, 1982, 免疫学杂志, 129: 1041-1049; Kurlander 和 Batker, 1982, 临床研究杂志, 69: 1-8; Woof, 1984, G. Mol. Immunol. 21: 523-527; 也参见 Burton 和 Woof, 1992, 人抗体效应子功能, 免疫学进展, 51: 1-84)。

虽然人 Fc γ RII 和 Fc γ RIII 对人 IgG 的亲和性常常是十分低的 ($K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$)，但是当它们与抗原结合时，它们对于人 IgG1 和人 IgG3 的亲和性却显著增加 (K_a 大约为 $2-5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) (Karas 等, 1982, 血液, 60: 1277-1282)。人 Fc γ RII 对于与抗原结合的人 IgG2 的亲和性出现了产生冲突的结果。人 Fc γ RIII 不结合人 IgG2。人 Fc γ RII 和人 Fc γ RIII 不结合人 IgG4 (van de Winkel 和 Anderson, 1991, J. Leuk. Biol. 49: 511-524; Huizinga 等, 1989, 免疫学杂志, 142: 2359-2364)。

尽管 Fc 介导的效应子功能对于重要抗体的治疗活性有时是重要的，这一发现在抗 CD23 抗体的情况下是令人感到惊讶的，因为以前没有报导过效应子功能在抗 CD23 抗体的 IgE 抑制活性中的作用。事实上，

以前的证据表明：抗体效应子功能对于抗 CD23 抗体抑制诱导 IgE 产生的能力并不重要。例如，Flores-Romo 等，科学，261：1038-1041 (1993) 曾报导过：由多克隆抗 CD23 抗体制备的 Fabs 抑制体内诱导的 IgE 抗原特异性反应。

显然包括，在本发明者分离到对 CD23 专一的各种灵长类抗体(具有抗 IgE 抑制活性)，并比较了这些抗体与 PRIMATIZED®形式的对 IL-4 诱导的体内和体外 IgE 产生的抑制能力之后，发现了通过抗 CD23 抗体的恒定区介导的效应子功能，由人 γ -4 恒定区构建的抗体不能抑制体外 IgE 抗原特异性反应，而包含人 γ -1 恒定区的抗体则可以成功地抑制体外 IgE 抗原特异性反应。

由于三类 Fc γ R 受体 (Fc γ RI、Fc γ RII 或者 Fc γ RIII) 的一个(或多个)都有可能涉及通过 γ -1 结构域介导的特异性效应子功能，并且由于这些类型的受体也结合包含 γ -3 结构域的抗体，因此，合乎逻辑的是包含 γ -3 结构域的抗 CD23 抗体也能成功地抑制体外 IgE 抗原特异性反应。

更具体地说，以及正如以下所更细节地描述的，按照在共同转让的申请流水号 08/379,072 (1997 年 8 月 19 日授权为美国专利 5,658,570) 中公开的方法，从 Old World monkey (短尾猴) 中分离出特异性地结合细胞和可溶性 CD23 的五种灵长类单克隆抗体，该申请以其整体收作本文参考文献。这一申请详尽地描述了一种用以在短尾猴身上产生抗所需抗原、所需的人抗原的单克隆抗体的方法，以及它们作为治疗剂相对其它物种抗体的优点，例如，由于人和短尾猴的系统发育接近而致在人体中减少或可能缺乏免疫原性。事实上，由于这些物种的系统发育接近，因此难以通过序列比较来区别短尾猴免疫球蛋白与人体免疫球蛋白。

在下文详尽描述的体外 B 细胞分析中，这五种灵长类单克隆抗人 CD23 抗体的四种显示出能够抑制 IL-4 诱导的 IgE 产生，并且在 SCID 小鼠动物模型(也在下文详尽描述)中也显示出最有效地抑制 IL-4 诱导的 IgE 产生的能力。基于这种 IgE 抑制活性和所期待的在人体内的低免疫原性，这样的抗体最有可能适合作为用于治疗有关疾病(其中对 IgE 产生的抑制作用是治疗上所需的)的治疗剂。

然而，为了进一步降低免疫原性，按照也在美国申请流水号 08/379,072 (美国专利 5,658,570) (收作本文参考文献) 中描述的方法

法，也选出 PRIMATIZE®形式的两种灵长类单克隆抗体（一种嵌合类型的抗体）。PRIMATIZATION®本质上指的是 IDEC 药物公司开发的重组抗体产物，其包含灵长类可变区和人恒定区。两种具有强有力 IgE 抑制活性的灵长类抗人 CD23 单克隆 (5E8 和 6G5) 抗体的 PRIMATIZATION®可以除去任何潜在的可归因于灵长类恒定区的免疫原性。

再者，由于本发明者的来自于已出版文献的初始期望是认为 Fc 效应子功能对诱导 IgE 抑制作用来说是不必要的，因此最初产生了这些特殊抗体的人 γ 4 形式。然而，令人十分惊讶的是，结果发现由以上两种灵长类单克隆抗体产生的 γ -4 形式是无效的，即，它们比灵长类抗体要求更高浓度的 PRIMATIZED® γ -4 抗体，以便在体外分析中抑制 IL-4 诱导的 IgE 产生。

其次，更令人感到惊讶的是，发现当相同的两种灵长类抗体转化为人 γ -1 形式（通过用人 γ -1 恒定区取代灵长类恒定区来实现）时，这些 γ -1 抗体十分有效地抑制诱导体外 IgE 产生。因此，我们的结果表明，Fc 效应子功能对于抗人 CD23 抗体抑制诱导 IgE 产生的能力来说是十分重要的。当第三种灵长类抗人 CD23 单克隆（即 2C8 抗体，我们已证明其能够抑制体外 IgE 产生）转化成为 F(ab')₂（发现其本质上不能抑制诱导体外 IgE 产生）时，这一假说得到证实。事实上，发现这一 F(ab')₂ 拮抗对于诱导灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 2C8 的 IgE 阻断活性的抑制效应。

此外发现，除去抗体之一 (5E8) 的重链可变区中的糖基化位点对抗体与 CD23 的结合没有任何效应（由所获得的 Kd 值证明），或者对诱导 IgE 抑制作用没有任何效应。因此，在 IgE 抑制作用方面的不同显示出明显地不包括糖基化差别。

发现 PRIMATIZED® γ 1 形式的灵长类 6G5 抑制诱导 IgE 在 SCID 小鼠中的表达。而相同浓度的灵长类 6G5 或者 PRIMATIZED® p6G5G4p 不抑制诱导 IgE 表达。因此，发现在体内动物模型中，包含人 γ -1 恒定区的抗体比灵长类单克隆抗体更有效。此外，本发明者预测，包含人 γ -3 恒定区的抗 CD23 抗体将与那些具有 γ -1 恒定区的抗体一样有效，因为 γ -1 和 γ -3 恒定区都具有对同类 Fc 受体的亲和性。

因此，基于这些结果，惊人地发现：活性 Fc 区，尤其是人 γ -1 或者人 γ -3 的活性 Fc 区，经由抗人 CD23 单克隆抗体极大地参与对 IL-4

诱导的 IgE 产生的抑制作用的机理。这一发现是未曾预料到的，尤其是对于基于更早期的报告(得自多克隆抗 CD23 抗体的 Fabs 能够抑制诱导 IgE 产生)和也基于关于 CD23 如何影响诱导 IgE 表达的各种理论所得到的预计来说。

因此，本发明涉及包含人 γ -1 或 γ -3 恒定区的抗人 CD23 抗体，和基于它们有效地抑制 IgE 表达的能力而作为治疗剂的用途。

本领域技术人员利用本领域用于制造嵌合抗体的熟知方法，能够制备包含人 γ -1 或 γ -3 恒定区的抗人 CD23 抗体。本质上，这样的方法包含：在所需的宿主中或在体外产生抗人 CD23 抗体，克隆产生显示出所需特征(例如足够的 CD23 结合亲和性)的抗人 CD23 单克隆抗体的杂交瘤或者细胞系，克隆编码得自上述杂交瘤或者细胞系的这样抗体的核酸序列，例如利用合适的引物经由聚合酶链式反应，分离包含于其中的可变区，将所述可变区与人 γ -1 或者 γ -3 恒定区和适当的人轻链恒定区重组，并且在合适的表达系统中表达所产生的编码嵌合的抗人 CD23 γ -1 或者 γ -3 免疫球蛋白的核酸序列。优选地，本发明的抗人 CD23 抗体的表观 CD23 结合亲和力为 0.1 nM 至 1000 nM，更优选为至少 50 nM，最优选为至少 5 nM。

适合于重组免疫球蛋白的表达的宿主细胞是本领域所熟知的。例如，重组抗体可以在下列细胞中表达：中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、DG44 或 DUXB11，或者 CHO 细胞 CHO K-1，小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 或 X63-Ag8.653 或 NS0，大鼠骨髓瘤细胞 YB2/0，幼小仓鼠肾细胞 BHK，人胚肾细胞系 293，猴肾细胞 CV1，人肺脏成纤维细胞 WI38，人颈部癌细胞 HELA，昆虫细胞、植物细胞、酵母或者细菌。此外，适合于免疫球蛋白表达的载体也是本领域所熟知的，并且有市售的。

一个特别优选的载体系统是在美国申请流水号 08/147,696 (1997 年 7 月 15 日授权为美国专利 5,648,267) 中公开的翻译损伤载体系统，该系统包含含有内含子(一种所需的异源 DNA 插入其中)的翻译损伤显性选择标记(neo)。发现这一载体系统提供很高产量的重组蛋白质，例如免疫球蛋白。然而，所讨论的抗 CD23 抗体可以在任何适合于功能性免疫球蛋白表达的载体系统中产生。

再者，本发明包含对人 CD23 专一性的 γ -1 或 γ -3 类型的人单克隆抗体。用于分离人单克隆抗体的方法也是本领域所熟知的，并且包括体

外方法(例如, 组织培养中的人 B 细胞的体外免疫)和体内方法(例如, SCID 小鼠中的人单克隆抗体的合成)。在 SCID 小鼠中产生人单克隆抗体的优选方法(其包含结合人脾细胞的体外引导, 然后引入 SCID 小鼠)公开在美国申请流水号 08/488, 376 (1998 年 9 月 22 日授权为美国专利 5, 811, 524) (以其整体收作本文参考文献)中。这一方法是有利的, 因为它提供具有抗所需抗原(例如人抗原)的高亲和性的单克隆抗体的再生性回收。

本发明也包含与用于结合 CD23 的灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 5E8 和 6G5 不相上下的人单克隆抗体。

实施例 1

灵长类抗 CD23 抗体的产生

大体上按照在申请流水号 08/379, 072 (美国专利 5, 658, 570, 已被收作本文的参考文献)中公开的方法, 从短尾猴中分离出五种对 CD23 专一的灵长类单克隆抗体。所利用的确切技术如下文所详尽描述的。

分离和鉴定抗人 CD23 单克隆抗体的方法

从 8866 细胞中纯化免疫原 sCD23

在纯化期间, 利用鼠抗 CD23 抗体(结合位点, 目录#MC112)作为捕捉, 由三步 ELISA 量化可溶性 CD23 (sCD23)。利用补充有 10 %胎牛血清(JRH 生物科学)和 4 mM 谷氨酰胺(JRH 生物科学; 目录#90114)的 RPMI 1640 (JRH 生物科学; 目录#56-509), 在 37°C 下从 8866 细胞(保持在悬浮生物反应器中)培养物中部分纯化抗原。利用二氧化碳来保持 7.1 的 pH 值。在利用 0.45 μm 过滤除去细胞之后, 加入苯甲基磺酰氟(终浓度 0.2 mM, Sigma 化学公司; 目录#p-7626)和乙二胺四乙酸(终浓度 3 mM, Sigma 化学公司; 目录#EDS)到上清液中, 并将溶液存储在 2-8°C 下。在环境温度下, 利用中空纤维超滤柱(A/T 技术; 目录#UFP-10-9A; 10,000 d MWCO)或者切向流超滤柱(Filtron 公司; 10,000 d MWCO)浓缩无细胞上清液大约 15 至 20 倍。无菌过滤所浓缩的上清液, 并将其存储在-70°C 下。通过加入 5 g/L 的 SM-2 BioBeads (BioRad 工业; 目录#152-3920)和在 2-8°C 下搅拌一夜, 使解冻的浓缩液脱脂。由过滤除去树脂并将溶液存储在 2-8°C 下。对于一些 sCD23 的制备物, 在脱脂之前或之后利用硫酸铵(35-70 % (W/V); Fisher; 目录#A702-3)分级分离浓缩物。

其后在 2-8°C 下利用亲和层析纯化去脂溶液。通过利用 CNBr 活化

的琼脂糖凝胶 4B (Sigma 化学公司; 目录#C-99142) 来共价连接鼠抗 CD23 单克隆抗体 (BU38) 与琼脂糖凝胶, 来制备亲和性基质。利用 A 蛋白层析从腹水 (结合位点; 目录#CUS830) 中纯化 BU38 抗体至大于 90 % 均一性。将去脂溶液施用于用 pH 7.2 的 1XPBS (Gibco BRL; 目录#70013-0.32) 平衡的亲和柱 (1.5×5 cm) 中, 并用包含 0.05 % NP40 (Sigma 化学公司) 的、pH 值为 7.2 的 1XPBS 洗涤柱, 以除去不结合的蛋白质。利用 3.5 M MgCl₂ Fisher; 目录#M33-500) 洗脱可溶性 CD23。在 2-8℃ 下结合并用 1×PBS (PH7.2) 透析 (Baxter Spectra/Por; 目录#D1615-1) 包含 sCD23 的组分。在透析之后, 利用 Centriprep 10 旋转过滤器 (Amicon 公司; MWC0 10,000 d) 通过离心浓缩蛋白质溶液, 并将制备物存储在 -70℃ 下。利用 SDS-PAGE 分析 (4-20 % 预制凝胶, Novex 公司) 和 Coomassie 染色估得 sCD23 的纯度大于 70 %。

灵长类的免疫和免疫细胞的分离

用自人 RPMI 8866 细胞 (B 细胞淋巴瘤, Hassner 和 Saxon, 免疫学杂志, 132: 2844 (1984)) 的上清液中纯化的可溶性 CD23 免疫接种猕猴 (White Sands 研究中心, Alamogordo, 新墨西哥)。用在混合有 167 μl Temuritide (佐剂肽) (Sigma, St. Louis, MO, 目录#A-9519) 和 333 μl 3X PROVAX ® ((IDEC 药物公司) 的 500 μl PBS 中的 200 μg 可溶性 CD23, 每第三周免疫接种每只猴子一次。免疫可由如下方式实现: 皮内、腹膜内、肌肉内和皮下。通过对 8866 细胞进行的 ELISA 来测定猴子血清中的抗 CD23 抗体的滴度, 并将该滴度与得自相同猴子的预先流血的滴度进行比较。

处死具有五万血清滴度的猴子 PRO 978, 并外科除去脾和淋巴结, 并在冰上将所得样品输送到 IDEC 药物上, 将其浸没于补加有 10 % 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、2 mM 丙酮酸钠和 50 μg/ml 庆大霉素的无菌 RPMI-1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, 目录#21870-050) 中。一旦到达, 就通过用玻璃研棒挤压其通过金属丝网, 以匀化脾。用以氯化铵为基的低渗缓冲液溶解红血细胞, 收集余下的淋巴细胞并用 RPMI-1640 至少洗涤三次。同样地将淋巴结匀化为单一细胞悬液, 收集之并用 RPMI-1640 洗涤至少三次。

杂交瘤的产生

在最后洗涤之后, 计算细胞量, 然后利用标准技术 (Boerner 等,

免疫学杂志, 147: 86 (1991)), 将以上获得的灵长类细胞体融合到小鼠-人异种杂交瘤细胞系 H6K6/B5 (Carroll 等, 免疫学方法杂志, 89: 61 (1986)) 中, 并且以每孔 300,000 个细胞将其平板接种到 96 孔平皿(对于脾为 175 个平皿或 14,700 个孔, 对于淋巴结为 17 个平皿或者 1386 个孔)中。

该方法包括以 2: 1 的比例混合淋巴细胞和以上确定的融合配偶体, 其中用 1 分钟使细胞缓慢地再悬浮进入 50 % 的 PEG 1500 (Sigma, 目录#P5402) 中, 然后静置细胞 1 分钟, 并使其缓慢地再悬浮于过量的 RPMI-1640 中。其后, 再一次静置细胞 15 分钟, 然后以 250×g 的低速旋转。然后使细胞再悬浮于 RPMI-1640 生长培养基中, 该培养基补加有 20 % 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸和 50 μg/ml 庆大霉素, 该庆大霉素包含 100 μM 次黄嘌呤、16 μM 胸苷 (BoehringerMannheim, 德国, #623091) 和 5.8 μM 重氮丝氨酸 (Sigma, 目录#A 1164) (HTA)。HTA 是选择剂, 其使成功融合的细胞(与异种杂交瘤融合配偶体融合的灵长类淋巴细胞)得以存活。

大约 65 % 的孔显示出生长 (10,500 个孔)。然后利用三步细胞 ELISA 来筛选这些孔, 以确定抗人 CD23 抗体的存在。

ELISA 方法

ELISA 的第一步包括将 50 μl 上清液从每孔转移至 96 孔平板中, 该平板每孔预先涂布有 10^5 个 8866 细胞 (CD23 阳性细胞系)。在室温下首先用 50 μl 包含 20 μg/ml 聚 L-赖氨酸 (Sigma, 目录#P1399, MW 150,000-300,000) 的水溶液涂布平板三十分钟, 来制备这些平板。除去(“摇出”)余下的溶液, 并将平板静置干燥。一旦干燥, 就转移 50 μl 在 PBS 中的 8866 细胞, 并且在 600 g 下旋转五分钟。通过用 15 分钟加入在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 50 μl 0.5 % 戊二醛 (Sigma, 目录#06257), 使 8866 细胞与平板共价结合。除去(摇出)戊二醛, 并用在 0.1 % BSA-PBS 中的 150 μl 100 mM 甘氨酸 (Sigma, 目录#2879) 封闭平板。在上清液加入之后, 在 37°C 下温育平板 1-2 小时并用自来水洗涤 7-9 次, 并且加入偶联至辣根过氧化物酶 (HRPO) (Southern Biotech, 伯明翰, Alabama, 目录#2040-50) 上的山羊抗人 IgG 抗体, 该 HRPO 已以 1: 2000 稀释至在 PBS-0.05 % 吐温 20 (Sigma, 目录#P1379) 中的 1 % 干燥脱脂乳 (Vons) 中。在 37°C 下温育平板 45 分钟, 并用自来水再洗涤

7-9 次。在每孔加入 100 μl TMB 试剂 (Kirkegaard 和 Perry, Gaithersburg, MD, 目录#50-76-02 和 50-65-02) 之后, 通过颜色发展来检测 HRPO 的存在。通过加入 25 μl 4N H_2SO_4 来停止反应。在分光光度计 (Titertek Multiscan) 上在 470 nm 波长下测量光密度 (OD)。比背景值大 2 倍的光密度值打分为阳性。

进行 ELISA 的第二步以确定: 在第一步 ELISA 中打分为阳性的上清液与 CD23 反应而不与一些无关的抗原反应。通过利用相同的 ELISA 方法, 在 SupT1 细胞 (ERC BioServices 公司, Rockville, MD, 目录#100) (一种 CD23 阴性人细胞系) 上检验上清液, 可以实现这一步。弃去在两个检验中同样打分的上清液。这些结果表明: 10,500 个有生长的孔中的 56 个显示出灵长类单克隆抗体的存在, 其中该单克隆抗体在两步独立筛查步骤中在不同时间结合至 8866 细胞上, 并且没有结合到 SupT1 细胞上。

实施 ELISA 的第三步以确定: 按照前两步 ELISA 鉴定的上清液是否与可溶性 CD23 反应。在该第三步 ELISA 中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用包含在 50 mM pH 9.3 碳酸氢盐缓冲液中的 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BG-6 (Biosource International, Camarillo, CA, 目录#CT-CD23-CF) 涂布 96 孔平板一夜, 其中 BG-6 是一种结合到可溶性 CD23 上但不抑制 CD23-IgE 结合的小鼠单克隆抗体。在除去涂布的缓冲液之后, 在平板上加入 50 μl 半纯化的可溶性 CD23 (以预定比例稀释于 PBS 中), 并在室温下温育两小时。在用自来水洗涤平板 7-9 次之后, 加入 50 μl 得自所选孔的上清液。在用自来水洗涤平板 7-9 次之后, 加入 50 μl 用 0.05% 吐温 20 以 1:4000 稀释在 1% 干燥脱脂乳 (在 PBS 中) 中的兔抗人 IgG (小鼠吸附的)-HRPO (Southern Biotech, 目录#6145-05), 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育两小时, 用自来水洗涤 7-9 次并用如上所述的 TMB 发展之。再一次给具有比背景值大 2 倍的光密度的孔打分为阳性。

在 ELISA 中, 显示出与 8866 细胞结合的 56 孔之 21 孔也与 sCD23 结合。通过以每三孔一个细胞的密度平板接种细胞, 来扩展这些孔并亚克隆至少两次。在大约三个月之后, 获得产生对 CD23 的灵长类单克隆抗体的五种稳定的杂交瘤。

用 A 蛋白方法纯化抗体

本质上, 通过离心培养物上清液以除去细胞和碎屑来纯化抗体。然

后通过 0.2 μm 滤器过滤所产生的离心样品。然后制备 A 蛋白琼脂糖凝胶快速流柱, 并利用 PBS (pH 7.4) 平衡之。然后以一适当流速 (2 ml/min) 将上清液加样到柱上。加样之后, 以 10 柱量 PBS (pH 7.4) 洗涤洗柱。然后用洗脱缓冲液 (0.2 M 乙酸、0.1 M 甘氨酸、pH 3.5) 以 1 ml/min 流速自柱上洗脱抗体。然后收集包含 100 μl Tris 的 1 ml 组分/管 (2.0 M Tris-HCl pH 10.0)。其后, 在 280 nm 获取分光光度计读数。然后收集所产生的、在 280 nm 波长下具有高吸收率的、包含抗体的组分, 并用 PBS 透析一夜。然后由通过 0.22 μm 膜的过滤来给产物灭菌, 并存储在 20 $^{\circ}\text{C}$ 下。

这五种灵长类抗人 CD23 单克隆抗体的四种 (B3B11、2C8、5E8 和 6G5) 在体外分析中显示出抑制 IgE 产生, 其中这种分析测定由 IL4-氯化可的松诱导外周血单核细胞 (PBMC) 培养物造成的 IgE 产生。这些结果显示在图 1 中。测定条件如下所述。第五种灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 3G12 在这一测定中是失活的。

由 IL-4 刺激的外周血单核细胞的 IgE 产生

正如以上所讨论的, 评估主题灵长类抗体及其 PRIMATIZED[®] 形式在体外分析中抑制 IgE 产生的能力, 该分析测定这样的抗体对由 IL-4 刺激的外周血单核细胞诱导的 IgE 产生的效应。

用于体外 IL-4 IgE 分析的材料

48 孔平底群集平板 (Costar, 目录#3548) (每孔 (48 孔平板) 每升一百五十万 PBMCs))

人重组 IL-4 (Genzyme 目录#2181-01; 10 μg (2.5×10^7 单位))

抗 CD23Mabs: 鼠 Mab (MHM6; DAKO. 目录#M763); 灵长类 Mabs (无防腐剂); PRIMATIZED[®] (无防腐剂)

HB101 基础培养基: (Irvine 科学目录#T000)

HB101 补料: (Irvine 科学目录#T151)

胎牛血清: (FBS; Bio-Whittaker 目录#14-501F)

二甲基亚砷: (DMSO; Fisher 科学目录#D128-500)

氯化可的松: (Sigma 目录#H-0888)

嘌呤霉素: (Sigma 目录#P-7255)

环己酰胺: (Sigma 目录#C-7698)

Histopaque[®] (: (Sigma 目录#H-8889)

Hanks 缓冲盐溶液: (HBSS; Irvine 科学目录#9232)

在 HBSS 中的 1 % FBS

浓缩的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水 (10x DPBS; Bio-Whittaker, 目录 #17-517Q)

在 DPBS 中的浴池清洁杀微生物剂 (Fisher, 目录#13-641-334)
溶液

嘌呤霉素溶液: 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在 HB101 生长培养基中

环己酰胺溶液: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在 HB101 生长培养基中

氢化可的松溶液: 在 DMSO 中的 0.1 M 溶液

充分透析抗 CD23 鼠 Mabs, 以除去防腐剂

HB101 生长培养基: HB101 基础培养基, 500 ml; 在 10 ml 中的 HB101 补料; 无菌过滤的蒸馏水, 5 ml; FBS, 10 ml; 氢化可的松溶液 (终浓度为 0.5 μM), 0.25 ml

体外分析方法

在室温下利用 HBSS 以 1: 4 稀释 buffy 涂层细胞。在室温下温育一夜以溶解和分离原生质组分之后, 从全血中得到这些细胞, 凝结血小板和血纤蛋白以及 buffy 涂层细胞。

然后在 50 ml 圆锥形试管中将 30 微升稀释的 buffy 涂层覆盖在 15 微升 Histopaque 上。然后在没有制动闸 (IEC 216 摇摆桶转子) 下, 在室温下以 1700 rpm 离心这些试管 20 分钟。然后利用无菌移液管收集白色 PBMC 层, 注意不要扰动其它层次。PBMCs (外周血单核细胞) 是 buffy 涂层细胞, 其中该细胞沉淀由在形成清晰可见的白色细胞层的 HISTOPAQUE[®] 密度梯度下的部分离心得到。用移液管收集这些细胞, 并用 HBSS 漂洗之, 然后用血细胞计计算其个数。典型地, 可以从单一的 450 ml buffy 涂层包中回收 300 至 600 百万个 PBMCs。

然后用 1 % FBS/HBSS 洗涤所收集的 PBMCs 三次。在 7 $^{\circ}\text{C}$ 下由离心 (1300 rpm, 7 分钟) 收集洗得的细胞。

然后利用血细胞计测定收集得到的细胞的数量。将细胞浓度调整至每毫升 HB101 生长培养基大约三百万个细胞。

然后将大约 1.5 百万个细胞 (0.5 ml) 加入至 48 孔平板的每孔中。一般, 为每一实验制备五个重复样品。每个平板的周边孔不用于细胞样品。因此, 这些孔利用例如 0.5 ml 0.05 % 浴池清洁液/DPBS 填充。

然后将包含所需量 IL-4 和 Mab 的 0.5 ml HB101 生长培养基加至孔中。所使用 IL-4 是重组 DNA 产生的人白细胞介素 4。用于分析的 Mab 是鼠、灵长类或者 PRIMATIZED® 抗体。典型地，以终浓度 100 U/ml 加入 IL-4，以终浓度 0.01 至 3 µg/ml 加入 Mab。

然后在潮湿温箱设备中在 37°C 下以 5 % CO₂ 温育细胞 9-11 天。温育之后，收集上清液并测定 IgE 含量。

IgE ELISA

下列表确定用于 IgE ELISAs 的材料和溶液。

IgE ELISAs 所需的材料和溶液

硫酸, 4 M

涂布缓冲液: 10 mM 碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6 的浓缩磷酸盐缓冲盐溶液 (10x PBS) 母液:

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaH ₂ PO ₄ | 26.6 gm |
| Na ₂ HPO ₄ | 289 gm |
| NaCl | 1064 gm |
| 蒸馏水 | 10 L |

抑制缓冲液: 10 % FBS/PBS

稀释缓冲液: 1 % BSA/0.05 % 吐温 20/PBS

洗涤缓冲液: 0.05 % 吐温 20/PBS

山羊抗人 IgE (ε 链特异性), 未标记的: (Tago 目录 #4104)

人 IgE 标准物: (结合位点目录 #BP094)

山羊抗人 IgE, HRP 标记的: (Tago 目录 #AHI 0504)

TMB 过氧化物酶底物: (KPL 目录 #50-76-02)

过氧化物酶溶液 B: (KPL 目录 #50-65-02)

工作底物溶液: 以 1:1 混合底物和溶液 B

Immulon II 微量滴定板 (Dynatech Labs 目录 #011-010-3455)

IgE ELISA 方法

利用包含 2 µg/ml 山羊抗人 IgE 的 100 µl 缓冲液涂布微量滴定板的每孔。

然后在 4°C 下温育涂布的平板一夜。

温育之后，然后以 200 µl 吐温 20/PBS 洗涤平板上的每孔三次。洗涤之后，在 37°C 下以 200 µl 抑制缓冲液/孔抑制非特异性结合位点

1 小时。

然后在每孔中加入 100 μl 样品或者标准物；然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育这些孔一夜。温育之后，在稀释或者不稀释的条件下检验样品。利用几个从 0.1 至 50 ng/ml 的 IgE 稀释液制备每个平板的标准浓度曲线。

温育一夜之后，以吐温 20/PBS 洗涤每个平板五次。

然后将以 1: 14,000 稀释在稀释缓冲液中的 100 μl 辣根辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗人 IgE 加入至每个导流孔中。然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育平板 4 小时。

然后以吐温 20/PBS 洗涤平板 5 次，并以水洗涤 3 次。

然后将 100 μl 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺工作底物溶液加入至每孔中。然后在室温下在暗处温育平板 25 分钟。温育之后，通过加入 50 μl 4 M 硫酸来停止正发展的反应。

然后在 450 nm 和 540 nm 同时读取吸收值。减去作为背景的 540 nm 吸收值。

灵长类单克隆抗人 CD23 抗体的 Kd 测定值的分析

Scatchard 分析方法

1. 放射性标记方法

用 100 mN 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 以每 2 粒小珠 1 mL 缓冲液洗涤碘代珠两次。然后在滤纸上干燥小珠。

然后将以上两粒小珠加入至包含大约 1 mCi 碘的 100 μl ^{125}I 溶液中，用 200 μl 磷酸缓冲液稀释之，并在室温下存放 5 分钟。

将抗体 (50 μg s) 加入至预装填的小珠中。得到最大掺入的放射性活度的反应时间是 6 分钟。

通过从反应容器中除去放射性标记的抗体来停止反应。

然后进行凝胶过滤以从放射性标记抗体溶液中除去过量的 ^{125}I 或者未结合的 ^{125}I 。由使放射性标记抗体通过由 1.5 mL 葡聚糖凝胶-G25、1.5 mL DEAE 葡聚糖凝胶-A25 和 0.5 mL 安伯来特组成的柱来实现这一步骤。洗脱下放射性标记抗体，其总量为 5 mL，浓度为大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 。(洗脱缓冲液：包含 10 %明胶、2 %叠氮化钠和 1 % BSA 的 1XPBS)

2. 优化分析(直接结合研究)

取 1 μl 样品并使样品运行在 γ 计数器上，测定 10 $\mu\text{g/ml}$ 放射性标记溶液的比活性。

例子:

- 1×10^5 cpm/ $\mu\text{l} \times 1000 \mu\text{l} / 10 \mu\text{g}$ 抗体

- 1×10^5 cpm/ μg 抗体

- 1×10^4 cpm/ng 抗体

- 抗体分子量=75,000 ng/nmole

- 比活性:

- 1×10^4 cpm/ng $\times 75,000$ ng/nmole = 7.5×10^8 cpm/nmole

在室温下用 200 μl /孔的抑制缓冲液(抑制缓冲液, 包含 10 %明胶、2 %叠氮化钠、1 %BSA 和 10 %FBS 的 1xPBS)抑制涂布抗原的平板 1 小时, (以消除非特异性结合, 例如, 用 mB7.1-CHO)和背景平板(即未转染的 CHO)。

然后洗涤平板, 典型地用手以自来水洗涤 10 次。

然后利用多通道移液管, 使两倍系列稀释液通过平板, 来滴定 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 放射性标记的抗体 (50 μl s)。在室温下温育 1 小时。

以 200 μl /孔洗涤缓冲液再一次洗涤平板大约 6-7 次(洗涤缓冲液: 包含 10 %明胶和 2 %叠氮化钠的 1xPBS)。

然后通过 γ 计数器上运行孔来测定每孔的放射性计数。

最适的放射性标记抗体浓度是其中特异性计数和本底计数之间的差别达到最大时的浓度。

3. 竞争性测定的 Scatchard 分析

将 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 放射性标记的溶液稀释为在直接结合实验中确定的最适浓度。

在室温下用 200 μl /孔的抑制缓冲液抑制涂布抗原的平板和背景平板 1 小时。

然后以自来水用手洗涤平板, 例如, 大约 10 次。

然后用两倍稀释液在单独的 U 型底微型滴定板中滴定“冷”(没有放射性标记的)抗体。“冷”抗体的起始浓度应该比放射性标记抗体的最适浓度大至少 100 倍。

例子:

- 最佳放射性标记浓度: 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- “冷”抗体浓度: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注意: 在第一孔中的 1: 2 滴定将使“冷”抗体浓度调整到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

然后加入 50 μl /孔的最适放射性标记抗体至包含“冷”抗体的孔中。

然后转移 100 μl /孔的混合溶液到涂布抗原的平板的对应孔中，并在室温下温育 1 小时。

此外，进行下列控制实验也是所需的：

- a) 放射性标记抗体与涂布抗原的平板(5孔)的直接结合；
- b) 放射性标记抗体与背景平板(5孔)的直接结合。

温育之后，用 200 μl /孔的洗涤缓冲液洗涤平板，例如，大约 6-7 次。

然后通过 γ 计数器上运行孔来测定每孔中的放射性计数。

通过计算每孔中的比计数率来测定这些计算值，其中比计数率通过由结合涂布抗原的平板计数减去本底计数来试验得到。

4. Scatchard 分析的计算

然后可以按以下方法确定结合抗体[B]的摩尔浓度：

例子：50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ “冷抗体”

结合的计数比：4382 cpm

存在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ “冷”抗体时结合的计数：215 cpm

差：4382 cpm-215 cpm =4167 cpm

比活性(放射性标记的抗体)： 5.54×10^9 cpm/nmole

$4167 \text{ cpm} \div 5.54 \times 10^9 \text{ cpm/nmole} = 7.52 \times 10^{-7} \text{ nmole}$

$7.53 \times 10^{-7} \text{ nmole} \div 0.05 \text{ mL (样品体积)}$

$= 1.50 \times 10^{-5} \text{ nmole/ml}$

$= 1.50 \times 10^{-8} \mu\text{mole/mL}$

$[\text{B}] = 1.50 \times 10^{-11} \text{ 摩尔/mL (M)}$

按以下方式确定总摩尔浓度[T]：

$50 \mu\text{g/mL} \times 1 \mu\text{mole}/75,000 \mu\text{g} = 6.67 \times 10^{-4} \mu\text{mole/mL}$

$= 6.67 \times 10^{-7} \text{ mmole/mL (M)}$

$[\text{T}] = 66667 \times 10^{-11} \text{ mmole/mL (M)}$

按以下方法确定自由抗体[F]：

自由摩尔浓度=总摩尔浓度-结合的摩尔浓度

$[\text{F}] = (66667 \times 10^{-11}) - (1.50 \times 10^{-11})$

$= 66665.5 \times 10^{-11} \text{ mmole/mL (M)}$

计算 B/F

在 Cricket 绘图软件上绘制 B-B/F 图。

本发明的抗人 CD23 抗体的活性和亲和性

在上文确定的体外分析中，发现在五种分离的灵长类抗人 CD23 单克隆抗体中有四种 (B3B11、2C8、5E8 和 6G5) 能抑制 IgE 产生，其中体外分析用来测定为 IL4-氢化可的松诱导外周血单核细胞 (PBMC) 培养物中的 IgE 产生。这些结果显示在图 1 中。第五个灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 3G12 在这一测定中是失活的。

结果发现：在这一体外分析中发现有活性的四种灵长类单克隆抗人 CD23 抗体中的两种 (B3B11 和 2C8) 与市售的鼠抗人 CD23 抗体 MHM6 (CAKO A/S, Glostrup, 丹麦目录 #M763) 不相上下。(图 2, 上图)。然而, 在重复的分析中, 这些抗体不如 MHM6 那样是有效的 IgE 抑制剂 (数据没有显示)。相反, 发现其它灵长类抗 CD23 单克隆抗体 (5E8 和 6G5) 彼此之间是相当的, 并且不能与 MHM6 相匹敌。(图 2, 中图和下图)。此外, 在体外分析中发现灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 5E8 是 IL-4 诱导的 IgE 的有效抑制剂。(参见图 1 和 3)。

用于人 IgE 合成的改进的 Hu-SCID-小鼠模型和测定体内抗 CD23 抗体对 IL-4 诱导的 IgE 产生的抑制作用

也发展了一个改进的 hu-PBMC-SCID 小鼠模型以检测主题抗体对诱导人体内 IgE 产生的效应。用 IL-4 将得自两个供体的 PBMCs 体外培养两天。集中 PBMCs, 并用它来构建有和没有抗体的 C.B.-17 SCID 小鼠组。在 14、21、28 和 35 天使小鼠出血, 并由 ELISA 来测定血清 IgG 和 IgE 水平。利用体内模型来分析灵长类和两种不同形式 PRIMATIZED® 的抗 CD23 抗体的抑制 IgE 产生的能力。

之所以使用改进的 SCID 小鼠模型, 是因为人们熟知: 由人外周血单核细胞 (hu-PBMC-SCID) 重建的、严重的合并免疫缺陷型 scid/scid (SCID) 小鼠 C.B.-17 (Bosma 等, 自然, 301: 527 (1983)) 可以产生大量的人免疫球蛋白 (Ig) (Mosier 等, 自然, 335: 256 (1988); Mosier 等, 临床免疫学杂志, 10: 185 (1990); Abedi 等, 免疫学杂志, 22: 823 (1992); 和 Mazingue 等, 欧洲免疫学杂志, 21: 1763 (1991))。在 hu-PBMC-SCID 小鼠中产生的占优的同型人免疫球蛋白 (Ig) 是 IgG。一般, 发现 IgM、IgA 和 IgE 同型处于非常低的或不可检测的水平, 除非 PBMC 是得自具有某些自身免疫病或者变应性疾病的供体。也有人报导:

可以用某种细胞因子操作 hu-PBMC SCID 小鼠模型来产生大量的非 IgG 同型, 包括 IgE (Kilchherr 等, 细胞免疫学, 151: 241 (1993); Spiegelberg 等, 临床研究杂志, 93: 711 (1994); 和 Carballido 等, 免疫学杂志, 155: 4162 (1995))。只要引导供体的体内抗原, hu-PBMC-SCIDs 也可用来产生抗原特异性的 Ig。

因此, 本发明者的目标聚焦在建立合适的产生人 IgE 的 hu-PBMC-SCID 小鼠模型, 其中该模型能检验用来治疗与 IgE 有关的疾病(如变应性疾病)包括主题抗 CD23 抗体在内的治疗剂)的疗效。

材料和方法:

下列材料和方法用于如下所述的 hu-PBMC-SCID 小鼠模型中。

SCID 小鼠: C.B.-17 scid/scid 免疫缺陷小鼠得自 Taconic (C.B.-17/IcrTac-scidfDF), 并将其保持在 IDEC 药物的动物设备中。将小鼠关在有灭菌床的灭菌的微型围栏装置中。按照负责生命科学国家研究会的实验动物资源委员会的全体委员规定的“实验动物照料与利用指导”(实验动物照料与利用指导, DHHS 出版号 (NIH) 86-23, Bethesda, MD, NIH, 1985)进行动物研究。

人 PBMC: 由通过制造厂商 (Sigma 诊断学目录#1077-1) 推荐的 Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077) 的离心, 自取自血库的 buffy 涂层中分离得到 PBMCs。收获梯度界面的淋巴细胞制剂, 并用 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) (Bio-Whittaker 目录#10-527F) 洗涤三次。对于每一实验, 从两个单独的供体中获得 PBMCs, 并分别体外培养之。使 PBMCs 以 $1-3 \times 10^6$ 个细胞/ml 浓度再悬浮在包含 5 %FCS 和 1000 IU/ml IL-4 (Genzyme 公司目录#2181-01) 的 1 % HB101 冻干补料 (Irvine 科学目录 #T000 & T151) 的 HB 基础培养基中, 并在 37°C 下用 5% CO₂ 温育 48 小时。温育之后, 收获、集中不同 buffy 涂层的细胞, 并用它来重建 SCID 小鼠。

体内分析条件

在第 0 天给小鼠组 (每组四至五只) 腹膜内 (i. p.) 注射在 200-300 μ l HBSS 中的 $50-60 \times 10^6$ 个淋巴细胞。对于接受抗 CD23 抗体的组, 在第 0 天, 在 i. p. 注射之前混合 PBMCs 和抗 CD23 抗体 (200-400 μ g/小鼠), 在第 7 天进行第二次注射。在第 0 至第 5 天之间, 所有小鼠都接受 5000 IU/小鼠的 IL-4 i. p. 注射。没有注射抗体的组作为对照组。在第 14 天、

第 21 天、第 28 天和第 35 天，使小鼠从眶后静脉出血，并由 ELISA 分析血清的 IgG 和 IgE。

图 8 显示：在 SCID 小鼠模型中，灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 5E8 在抑制 IL-4 诱导的体内 IgE 产生方面是有效的。

PRIMATIZED®抗人 CD23 单克隆抗体的克隆和表达

为了克隆灵长类免疫球蛋白可变区，利用微型 FastTrackmRNA 试剂盒 (Invitrogen 目录#K1520-02)，按照制造厂商提出的方法，从大约 2×10^6 个得自灵长类异种杂交瘤 (分泌抗人 CD23 单克隆抗体 6G5 和 5E8) 的细胞中单独分离出聚腺苷酸化 RNA。

按照常规方法，利用 cDNA 循环试剂盒 (Invitrogen 目录#L1310-01) 由聚腺苷酸化 RNA 合成第一支 cDNA 链。

然后利用基于不同共有家族的人免疫球蛋白选择的 PCR 引物，通过 PCR 从 cDNA 分离出 6G5 和 5E8 的轻链和重链可变区。选择 5' 引物，该引物对应于轻链和重链可变区的前导序列的开端，同时选择 3' 引物，该引物对应于 J 区 (用于 PCR 扩增 6G5 的 λ 轻链可变区、5E8 的 κ 轻链可变区和 5E8 的重链可变区的具体引物列于表 1-3 中)。按照标准方法进行 PCR (在 94°C 下 1 分钟、在 54°C 下 1.5 分钟和在 72°C 下 2 分钟，一共在热启动 100 管 (Gibco BRL 目录#10332-013) 中循环 30 次)。在 $50 \mu\text{l}$ 反应物中建立 PCR，该反应物包含取自 $80 \mu\text{l}$ cDNA (得自 2×10^6 细胞) 的 $5 \mu\text{l}$ 作为模板、 $2 \mu\text{l}$ 5 nM dNTP、 $1 \mu\text{l}$ Taq 聚合酶、 $5 \mu\text{l}$ Taq 聚合酶缓冲液、 $2 \mu\text{l}$ 5' 引物 ($25 \text{ pmoles}/\mu\text{l}$)、 $2 \mu\text{l}$ 3' 引物 ($25 \text{ pmoles}/\mu\text{l}$) 和 $36 \mu\text{l}$ 水。(Taq 聚合酶和缓冲液得自 Stratagene 目录#600131、dNTP 得自 Boehringer Mannheim 目录#1581295)。

A) 质粒 N5LG1+6G5 和 N5LG4P+6G5 的构建

1) 由 PCR 克隆灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 6G5 的轻链可变区

得自灵长类单克隆抗体 6G5 cDNA 的轻链可变区的第一次 PCR 扩增产物显示出与 λ 轻链可变区原位一致的条带。这些带出现在所有利用三种不同的早期前导序列引物的反应中。(参见表 1-3)。然而，由于 PCR 产物带的强度比较大，认为利用引物 745 (第 2 家族) 得到的 PCR 产物更具特异性。

利用 Qiaquick 凝胶抽提试剂盒 (Qiagen 目录#28704) 分离这一 PCR 产物。用 Bgl II 和 Avr II 限制性内切酶消化纯化的 PCR 片段，并且

使其与用同样的限制性内切酶消化的哺乳动物表达载体 N5LG1 连接。然后在 14℃ 下温育包含得自 50 微升 PCR 反应物的纯化 PCR 产物、100mg N5LG1 载体、2 微升 10x 连接缓冲液 (NEB 目录#202S) 和 2 微升 T4 连接酶 (NEB 目录#202S) 的 20 微升连接混合物一夜。

哺乳动物表达载体 N5LG1 包含在哺乳动物细胞中提供四种单独蛋白质的表达的遗传序列 (例如调节序列、编码序列)。它们是:

(i) 具有人 λ 轻链恒定区和插入轻链可变区的唯一限制性内切酶位点的部分免疫球蛋白轻链;

(ii) 具有人 γ 1 链恒定区编码序列和插入重链可变区的唯一限制性内切酶位点的部分免疫球蛋白重链;

(iii) 用于选择掺入质粒和具有抗抗生遗传霉素 (Gibco BRL 目录 #10131-1209) 抗性的细胞的新霉素磷酸转移酶基因; 和

(iv) 鼠二氢叶酸还原酶基因 (DHFR), 在存在氨甲蝶呤 (MTX, Sigma 目录 #A-6770) (Reff 等, 血液, 83: 433-445 (1994)) 的情况下培养细胞时, 进行选择与基因组扩增。

连接之后, 利用 Pme I 限制性内切酶消化混合物, 该限制性内切酶消化亲本 N5LG1 质粒, 但不消化连接到 6G5 的轻链可变区上的 N5LG1 质粒。消化之后, 按如下方法将混合物转化为 Epicurian coli[®] XL1-Blue 感受态细胞 (Stratagene 目录 #200249)。

混合 100 微升感受态细胞与 10 μ l 上述连接混合物, 在冰上放置 30 分钟, 然后在 45℃ 下加热 30 秒。将这一混合物在冰上放置 2 分钟, 然后加入预热至室温的 900 μ l SOC。 (SOC 是 LB 肉汤 Gibco BRL 目录 #10855-013, 其中加入 0.02 M MgCl₂、0.02 M MgSO₄ 和 0.02 M D-葡萄糖)。在 37℃ 下温育 1 小时之后, 以 4000 g 离心混合物 1 分钟, 并弃去 800 μ l 上清液。将混合物的余下部分平板接种在包含 50 μ g/ml 氨苄青霉素 (Amp, Gibco BRL 目录 #13075-015) 的 LB 琼脂 (Gibco BRL 目录 #12945-044) 平皿上。利用 Wizard[®] Miniprep DNA 纯化系统 (Promega 目录 #A7510) 从生长在 Amp 平板上的大肠杆菌单个菌落中分离质粒 DNA。

然后利用 Bgl II 和 Avr II 的消化, 其后进行琼脂糖凝胶电泳以鉴定分离得到的质粒 DNA。400 bp 的乙锭染色的 DNA 带表明可能成功克隆了轻链可变区。

为了确定这是免疫球蛋白轻链可变区, 利用具有测序引物 607 和 GE 108 的测序酶 7-Deaza-dGTP DNA 测序试剂盒(USB 目录#70990)进行测序。(参见表 4 中的测序引物)。

利用 λ 轻链家族 2 的早期前导序列的 5'引物(引物 745)和 3'丁区引物 926, 对得自灵长类单克隆抗体 6G5 的 cDNA 的轻链进行第二次独立的 PCR 扩增。(参见表 1-3 中的用于 6G5 的 λ 轻链可变区的 PCR 的引物)。利用源 TA 克隆试剂盒(Invitrogen 目录#K2000-01), 将分离的 PCR 产物(参见以上技术)克隆到 TA 载体上。在用 EcoR I 限制性内切酶消化之后, 在琼脂糖凝胶电泳下检查分离得到的微量制备 DNA (参见以上技术)。然后利用 Sp6 和 M13 (-40) 正向引物(参见表 4 中的测序引物)测序(如前所述)所产生的包含在 TA 载体中的 PCR 产物。所产生的轻链序列与得自第一次 PCR 的轻链序列相同。灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 6G5 的轻链可变区的完整序列如下所述。

灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 6G5 前导序列的轻链可变区

```
Met Ala Trp Thr Leu Leu Leu Val Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr
ATG GCC TGG ACT CTG CTC CTC GTC ACC CTC CTC ACT CAG GGC ACA
      -1
Gly Ser Trp Ala
GGA TCC TGG GCT
```

成熟蛋白质(计数是 Kabat)

构架 1

1 9 11
Gln Ser Ala Pro Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly
CAG TCT GCC CCG ACT CAG CCT CCC TCT GTG TCT GGG TCT CCT GGA

20 23
Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys
CAG TCG GTC ACC ATC TCC TGC

CDR 1

24 27 27A 27B 27C 28 34
Thr Gly Thr Ser Asp Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
ACT GGA ACC AGC GAT GAC GTT GGT GGT TAT AAC TAT GTC TCC

构架 2

35 40 49
Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr
TGG TAC CAA CAC CAC CCA GGC AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT

CDR2

50 56
Asp Val Ala Lys Arg Ala Ser
GAT GTC GCT AAG CGG GCC TCA

构架 3

57 60 70
Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala
GGG GTC TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC

80
Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
TCC CTG ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT

88
Tyr Cys
TAC TGT

CDR 3

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|
| 89 | 90 | | | | | | 95 | 95A | | 96 | 97 |
| Cys | Ser | Tyr | Thr | Thr | Ser | Ser | Thr | Leu | Leu | | |
| TGT | TCA | TAT | ACA | ACC | AGT | AGC | ACT | TTG | TTA | | |

构架 4

| | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| 98 | | 100 | | | | | | | 106 | 106A | 107 |
| Phe | Gly | Arg | Gly | Thr | Arg | Leu | Thr | Val | Leu | Gly | |
| TTC | GGA | AGA | GGG | ACC | CGG | TTG | ACC | GTC | CTA | GGT | |

2) 由 PCR 克隆灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 6G5 的重链可变区

利用前述的成套的早期前导序列引物和 3'J 区引物 GE244 进行得自灵长类单克隆抗体 6G5 的 cDNA 的重链可变区的第一次 PCR 扩增。这些引物显示在如下的表 1-3 中。这一反应产生 350 个碱基的 PCR 产物。用 Nhe I 和 Sal I 消化这一 350 个碱基的产物(如上所述纯化),使其与 N5LG1 连接,并用与在第一次 PCR 扩增中相同的核酸内切酶消化之。利用与克隆轻链相同的技术,将所产生的连接混合物转入宿主细胞。然后分离包含 350 个碱基的 PCR 产物的质粒 N5LG1 并测序(利用测序引物 266 和 268)。(这些测序引物在表 4 中给出)。

测序揭示: PCR 产物仅仅包含部分重链可变区,并且在氨基末端含有缺失(序列始于构架 2 的,第 36 个密码子)。

实施第二次独立的 PCR 反应,以利用家族 1 的 5'早期前导序列(MB1503)和 3'J'区引物 GE244 来扩增和分离灵长类单克隆抗体 6G5 的重链可变区。(这些引物也包含在表 1-3 中)。然后利用与前述相同的技术,将所产生的 PCR 产物克隆进入 N5LG1。发现它的序列与第一次 PCR 产物一致。

因此,为了克隆包括缺失的 5'末端的 6G5 的整个重链可变区,将新的更长 3'引物(MB1533)用于与家族 1 5'引物(MB1503)的第三次独立的 PCR 反应,其中该新引物包含 CDR3 和 6G5 重可变链的构架 4 区。(这些引物也包含在表 1-3 中)。

PCR 之后,在琼脂糖凝胶上观察到 420 个碱基的更大的 PCR 产物。

按照如前所述方法分离这一 PCR 产物，并将其克隆进入 TA 载体。然后对所产生的包含在 TA 载体中的 PCR 产物进行测序。测序揭示：这一 DNA 包含整个重链可变区，并且 3'部分与前两次 PCR 反应得到的部分克隆的重链可变区的 3'部分一样。

利用与第三次 PCR 扩增相同的引物进行第四次独立的 PCR。其结果产生得到 PCR 产物，如前所述一样，该产物得到分离并被克隆进入 TA 载体。发现第四次独立的 PCR 产物的序列与第三次 PCR 扩增得到的一致。这一包含灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 6G5 的重链可变区的序列描述如下。

灵长类单克隆抗体抗人 CD23 6G5 的重链可变区
前导序列

```
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCA GCT CCC AGA
      -1
Trp Val Leu Ser
TGG GTC CTG TCC
```

成熟蛋白质(计数是 Kabat)

构架 1

```

1                               10
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Lys Pro Ser
CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA GTG GTG AAG CCT TCG
      20                               30
Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC GCT GTC TCT GGT GGC TCT GTC AGC
      CDR 1
31                               35 35a
Ser Ser Asn Trp Trp Thr
AGT AGT AAC TGG TGG ACC
```

构架 2

```

36          40          49
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGA

```

CDR2

```

50          52 52A 53          60
Arg Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
CGT ATC TCT GGT AGT GGT GGG GCC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC
65
Lys Ser
AAG AGT

```

构架 3

```

66          70          80
Arg Val Ile Ile Ser Gln Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
CGA GTC ATC ATT TCA CAA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG
82 82a 82b 82c 83          90
Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
AAC CTG AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT
94
Ala Arg
GCC AGA

```

CDR 3

```

95          100 100a 100b 100c 100d 101 102
Asp Trp Ala Gln Ile Ala Gly Thr Thr Leu Gly Phe
GAT TGG GCC CAA ATA GCT GGA ACA ACG CTA GGC TTC

```

构架 4

```

103          110          113
Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

3) 哺乳动物表达载体的构建

为了将克隆的 6G5 的重链可变区插入哺乳动物表达载体中,用 Nhe I 和 Sal I 消化 TA 载体中的重链可变区(在第三次独立的 PCR 中得到),并将其克隆进入 N5LG1 载体,该载体用相同的限制酶消化,并且该载体已经含有轻链可变区。所产生的哺乳动物表达载体命名为 N5LG1+6G5。

为了构建 N5LG4P+6G5 载体,分别利用 Bgl II 和 Avr II 以及 Nhe I 和 Sal I 消化来将轻链和重链可变区与 N5LG1+6G5 分离。除人 γ 1 恒定区为人 γ 4 恒定区(其在绞链区中包含丝氨酸至脯氨酸的突变)所置换以便增加免疫球蛋白的稳定性和改善体内(“p”突变)药物动力学外,哺乳动物表达载体 N5LG4P 载体与以上所描述的 N5LG1 载体一样。首先将轻链可变区克隆进入质粒,同时利用前述技术将重链可变区克隆进入包含轻链可变区的载体中。这一哺乳动物的表达载体命名为 N5LG4P+6G5。

B. 质粒 N5KG4P+5E8、N5KG1+5E8、N5KG4P+5E8N⁻和 N5KG1+5E8N⁻的构建。

1. 由 PCR 克隆灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 5E8 的轻链可变区

利用一套 κ 早期前导序列引物和 3'J 区引物 GE204,进行得自 5E8 cDNA 的轻链可变区的第一次 PCR 反应。(参见在表 1-3 中的用于 5E8 的 κ 轻链可变区的 PCR 的引物)。获得 420 个碱基的 PCR 产物。用 Bgl II 和 BsiW I 限制性内切酶消化分离得到的 420 个碱基的 PCR 产物,将其克隆进入哺乳动物表达载体 N5KG4P 中,并利用 GE108 和 377 引物(其包含在表 4 中)测序。哺乳动物表达载体 N5KG4P 与载体 N5LG4P 一样,所不同的是 N5KG4P 包含替代人 λ 轻链恒定区的人 κ 轻链恒定区。这一具有 420 个多核苷酸的 DNA 的测序揭示:它含有整个 κ 轻链可变区。

利用 5'家族 1 引物 GE201 和 3'引物 GE204,进行轻链可变区的第二次独立的 PCR。(参见表 1-3 中的用于 5E8 的 κ 轻链可变区的 PCR 的引物)。(利用前述方法)将分离得到的 PCR 产物克隆进入 TA 载体,并利用 Sp6 和 T7 启动子引物测序。测序揭示:这一 PCR 产物与得自第一次 PCR 的 PCR 产物一样。灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 5E8 的轻链可变区的整个序列如下所述。

灵长类单克隆抗体抗人 CD23 5E8 的轻链可变区
前导序列

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu
 ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTT CTG CTC

-1

Trp Leu Pro Gly Ala Arg Cys
 TGG CTC CCA GGT GCC AGA TGT

成熟蛋白质(计数是 Kabat)

构架 1

1 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTA
 20 23
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC

CDR 1

24 30 34
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Tyr Leu Asn
 AGG GCA AGT CAG GAC ATT AGG TAT TAT TTA AAT

构架 2

35 40 49
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT

CDR2

50 56
 Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 GTT GCA TCC AGT TTG CAA AGT

构架 3

```

57           60           70
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAG TTC

```

```

80
Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
ACT CTC ACC GTC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCG ACT TAT

```

```

88
Tyr Cys
TAC TGT

```

CDR 3

```

89  90           97
Leu Gln Val Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
CTA CAG GTT TAT AGT ACC CCT CGG ACG

```

构架 4

```

98       100           107
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

2) 由 PCR 克隆灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 5E8 的重链可变区

利用一套 5'早期前导重链序列引物和 3'引物 GE210, 进行 5E8 的重链可变区的第一次 PCR。(参见表 1 中的用于 6G5 和 5E8 的重链可变区的 PCR 的引物)。在家族 3 引物反应中出现 420 个碱基的 PCR 产物。纯化 PCR 产物, 然后用 *Nhe* I 和 *Sal* I 消化之, 并将其克隆进入哺乳动物表达载体 N5KG4P 载体中(如前所述)。利用 268 和 928 引物(参见表 4 中的测序引物)对 PCR 产物进行测序。

利用家族 3 5'引物 GE207 和 3'引物 GE210, 进行 5E8 的重链可变区的第二次独立的 PCR。(参见表 1-3 中的用于 6G5 和 5E8 的重链可变区的 PCR 的引物)。利用与前述相同的技术将分离得到的 PCR 产物克隆

进入 TA 载体，并利用 Sp6 和 T7 引物测序。测序揭示：在密码子 91 的 TAC 变成 TGC。

为了在 91 位确定适当的密码子，利用与第二次 PCR 相同的引物(参见以上描述)进行第三次独立的 PCR。将 PCR 产物再一次克隆进入 TA 载体，并利用 Sp6 和 T7 引物测序。发现该序列与在第一次 PCR 中得到的重链可变序列一样。因此，在第二次独立的 PCR 产物中的 91 位的 TGC 明显是在 PCR 期间误引入的结果。灵长类单克隆抗人 CD23 抗体 5E8 的重链可变区的这一整个序列描述如下。

灵长类单克隆抗体抗人 CD23 5E8 的重链可变区
前导序列

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Pro Leu Leu Lys
ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT CCT CTT TTG AAA
-1
Gly Val Gln Cys
GGT GTC CAG TGT
```

成熟蛋白质(计数是 Kabat) 构架 1

```
1 10
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Lys Pro Gly
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGC GGC TTG GCA AAG CCT GGG
20 30
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Thr
GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGC GCA GCC TCC GGG TTC AGG TTC ACC
```

CDR 1

```
31 35 35a 35b
Phe Asn Asn Tyr Tyr Met Asp
TTC AAT AAC TAC TAC ATG GAC
```

构架 2

36 40 49
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ser
 TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG CAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA

CDR2

50 52 52A 53 60
 Arg Ile Ser Ser Ser Gly Asp Pro Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
 CGT ATT AGT AGT AGT GGT GAT CCC ACA TGG TAC GCA GAC TCC GTG
 65
 Lys Gly
 AAG GGC

构架 3

66 70 80
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Asn Asn Thr Leu Phe Leu
 AGA TTC ACC ATC TCC AGA GAG AAC GCC AAC AAC ACA CTG TTT CTT
 82 82a 82b 82c 83 90
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTC TAT TAC TGT
 94
 Ala Ser
 GCG AGC

CDR 3

95 100 101
 Leu Thr Thr Gly Ser Asp Ser
 TTG ACT ACA GGG TCT GAC TCC

构架 4

103 110 113
 Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 TGG GGC CAG GGA GTC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

3) 哺乳动物表达载体的构建

用 Nhe I 和 Sal I 消化 N5KG4P 中的重链可变区, 纯化之, 并将其克隆进入 N5KG4P, 该 N5KG4P 包含 5E8 的轻链可变区。然后用如前所述的限制性内切酶消化这一质粒。这一过程产生包含 5E8 的轻链和重链可变区的载体。这一载体命名为 N5KG4P+5E8。然后将 5E8+N5KG4P 的重链和轻链可变区插入到哺乳动物表达载体 N5KG1 中, 以产生 N5KG1+5E8 载体。

4) 由位点特异性诱变改变灵长类单克隆抗体 5E8 的重链可变区中的一个氨基酸和哺乳动物表达载体的构建

基于 5E8 重链可变区的序列, 在天冬酰胺密码子 75 处存在免疫球蛋白的潜在的糖基化位点。这一潜在的糖基化位点对应于保守天冬酰胺连接的具有下列三肽序列的糖基化基元: (Asn)-(除脯氨酸外的任何氨基酸)-(丝氨酸或苏氨酸)。因此, 通过以赖氨酸(发现其存在于许多人免疫球蛋白的这一位置上)置换天冬酰胺密码子 75 来产生 5E8 的糖基化突变体, 其中由于这一糖基化基元的修饰使得该突变体不能在这一位置被糖基化。用下列方法实现位点特异性诱变。

利用 N5KG4P+5E8 作为模板和 3'引物(对应于密码子 71 至 79), 进行第一次 PCR, 其中的 3'引物在密码子 75 处含有突变(AAC 变成 AAG)、引物 MB1654 和前导序列(引物 MB1650)之起始处的 5'引物。(参见如表 5 所述的用于产生重链可变区 5E8 的糖基化突变体的 PCR 引物)。

利用 5'引物(对应于密码子 71 至 79)在相同模板上进行第二次 PCR, 其中该 5'引物包含相同突变(引物 MB1653)和得自构架 4 末端的 3'引物(引物 MB1651)。(参见表 5 中的用于产生 5E8 的重链可变区的糖基化突变体的 PCR 引物)。

分离这两种 PCR 产物, 并以相等的摩尔比率混合。然后通过利用第一次和第二次 PCR 产物的混合物作为模板, 用第一次 PCR 的 5'引物(MB1650)和第二次 PCR 的 3'引物(MB1651)的, 进行第三次独立的 PCR。(参见表 5 中的用于产生重链可变区的糖基化突变体的 PCR 引物)。发现在第三次 PCR 中得到的 PCR 产物含有 5E8 的重链可变区编码区, 其中的天冬酰胺 75 已经改变成为赖氨酸。

纯化第三次 PCR 产物, 用限制性内切酶 Sal I 和 Nhe I 消化之, 并将其克隆进入仅仅包含轻链可变区的 N5KG4P 中。测序 PCR 产物以确

认它包含突变的重链可变区。这一哺乳动物的表达质粒命名为 N5KG4P+5E8N-。

为了构建 N5KG1+5E8N-，分别用 Bgl II 和 BsiW I 以及 Nhe I 和 Sal I 消化得自 N5KG4P-5E8N-的轻链和重链可变区。首先将轻链可变区克隆，然后将重链可变区插入到哺乳动物表达质粒 N5KG1 中，以产生质粒 N5KG1+5E8N-。

表 1

用于 5E8 的 κ 轻链可变区的 PCR 的引物

| 名称 | 轻链 VK-早期前导序列 5' (Bgl II) | 家族 |
|-------|--|----|
| | -22 -21 -20 -19 -18 -17 -16 -15 -14 | |
| GE201 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG 3' | 1 |
| GE200 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG AGG CTC CCT GCT CAG 3' | 2 |
| GE202 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG GAA (A/G)CC CCA GC(T/G) CAG 3' | 3 |
| GE203 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG GTG TTG CAG ACC CAG GTC | |
| | 3'4 | |
| | 113 112 111 110 109 108 107 106 105 104 103 | |
| GE204 | 5' GG TGC AGC CAC <u>CGT AGC</u> TTT GAT (C/T)TC CA(G/C) | |
| | CTT 3' | |

轻链 VK-3'引物 (BsiW I)

表 2

用于 6G5 的 λ 轻链可变区的 PCR 的引物

| 名称 | 轻链 V1-早期前导序列 5' (Bgl II) | 家族 |
|-----|---|----|
| | -20 -19 -18 -17 -16 -15 | |
| 744 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG (G/A)CC TG(G/C) TCC CCT CT 3' | 1 |
| 745 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG GCC TGG (A/G)CT C(T/C)G CT 3' | 2 |
| 910 | 5' AT CAC <u>AGA TCT</u> CTC ACC ATG GC(A/C) TGG A(T/C)C CCT CTC 3' | 3 |

轻链 V1-3'引物 (Avr II)

110 109 108 107 106 105 104
 926 5' (AC)10 CTT GGG CTG ACC TAG GAC GGT 3'

表 3

用于 6G5 和 5E8 的重链可变区的 PCR 的引物

| 名称 | 重链早期前导序列 5' (Sal I) | 家族 |
|--------|--|----|
| | -20 -19 -18 -17 -16 -15 | |
| MB1503 | 5' GCG ACT AAG <u>TCG ACC</u> ATG GAC TGG ACC TGG 3' | 1 |
| MB1502 | 5' GCG ACT AAG <u>TCG ACC</u> ATG AAA CAC CTG TGG 3' | |
| | 2,4 | |
| GE207 | 5' GCG ACT AAG <u>TCG ACC</u> ATG GAG TTT GGG CTG AGC 3' | 3 |
| GE208 | 5' GCG ACT AAG <u>TCG ACC</u> ATG GGG TCA ACC GCC ATC 3' | 5 |
| GE209 | 5' GCG ACT AAG <u>TCG ACC</u> ATG TCT GTC TCC TTC CTC 3' | 6 |

重链 3'引物 (Nhe I)

120 119 118 117 116 115 114 113 112 111
 110
 GE244 5' GC CAG GGG GAA GAC CGA TGG GCC CTT GGT GCT AGC TGA GGA GAC GG
 3'
 GE210 5' GA TGG GCC CTT GGT GCT AGC TGA GGA GAC GG
 3'

MB1533 5' GGT GCT AGC TGA GGA GAC
 GGT

109 108 107 106 105 104 103 101 100 99
 GAC CAG GAC TCC CTG GCC CCA GAA GCC TAG 3'

表 4 测序引物

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|----|
| Sp6 primer | 5' AT TTA GGT GAC ACT ATA | 3' |
| M13 (-40) Forward Primer | 5' GTT TTC CCA GTC ACG A | 3' |
| T7 Promoter Primer | 5' AT ATA CGA CTC ACT ATA GGG | 3' |
| GE 108 Primer | 5' CCG TCA GAT CGC CTG GAG ACG CCA | 3' |
| 377 Primer | 5' GCA GTT CCA GAT TTC AAC TG | 3' |
| 607 PRIMER | 5' CCA GGC CAC TGT CAC GGC TTC | 3' |
| 266 PRIMER | 5' CAG AGC TGG GTA CGT CCT CA | 3' |
| 268 PRIMER | 5' GCC CCC AGA GGT GCT CTT GG | 3' |
| 876 PRIMER | 5' ACA CAG ACC CGT CGA CAT GG | 3' |
| 928 PRIMER | 5' GCT CTC GGA GGT GCT CCT GG | 3' |

表 5 用于产生 5E8 的重链可变区的糖基化突变体的 PCR 引物

| | | | | | | | | | | | |
|---------|-------|-----|-----|--------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | Sal I | -20 | -19 | -18 | -17 | -16 | | | | | |
| MB 1650 | 5' | ACA | GAC | <u>CCG TCG ACC</u> | ATG | GAG | TTT | GGG | CTG | 3' | |
| | | | | Nhe I | | | | | | | |
| | | 118 | 117 | 116 | 115 | 114 | 113 | 112 | 111 | 110 | |
| MB 1651 | 5' | CCC | CTT | GGT | <u>GCT AGC</u> | TGA | GGA | GAC | GGT | 3' | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | |
| MB 1653 | 5' | AGA | GAG | AAC | GCC | AAG | AAC | ACA | CTG | TTT | 3' |
| | | | | | | | | | | | |
| | | 79 | 78 | 77 | 76 | 75 | 74 | 73 | 72 | 71 | |
| MB 1654 | 5' | AAA | CAG | TGT | GTT | CTT | GGC | GTT | CTC | TCT | 3' |

C) 构建 γ -3 载体

存在大量将鼠抗体转化为嵌合体的方法，在该嵌合体中重链和轻链恒定区为人形式所取代或者其中除 CDRs (互补决定区) 外的所有重链和轻链恒定区为它们的人等同物所取代。(参见 King 等, 生物化学杂志, 281: 317-23, 1992; Queen

等, 美国科学院院报, 86(24):10029-33, 1989; Love 等, 酶学方法, 178:515-27, 1989; Hutzell 等, 癌症研究, 51:181, 1991; Chiang 等, 生物技术, 7(4):360-6, 1989; Heinrich 等, 免疫学杂志, 143: 3589, 1989; Hardman 等, Int. J. Cancer, 44:424, 1989; Orlandi 等, 美国科学院院报, 86(10): 3833-6, 1989)。

此外, 前几段特别地显示: 通过利用 PCR 扩增编码轻链和重链可变区的 DNA, 以及克隆这些区进入表达载体或者编码适当的人恒定区结构域的载体, 可以实现表达 PRIMATIZED® γ -1 和 γ -4 抗体的载体的构建。因此, 很显然, 只要能得到适当的哺乳动物表达载体, 可以制备编码其它人恒定区的类似结构, 该结构还包括能插入源于灵长类抗体的扩增的可变区 DNA 的克隆位点。

以下也应该是明显的: 可以设计用于扩增可变区 DNA 的 PCR 引物, 以顺应取决于所用载体的各种限制性克隆位点。

编码人免疫球蛋白 IgG3 恒定区结构域的载体在本领域中是可获得的, 并且可以用于构建本发明的 PRIMATIZED® 抗体。例如, Co 等利用表达人轻链和重链恒定区的不同载体, 构建嵌合抗体和人源化抗体并提供人 γ -1 和 γ -3 重链载体。为了克隆感兴趣抗体的可变区片段进入这些载体, XbaI 限制酶切位点一般恰好分别定位在轻链和重链的 J_{K4} 和 J_{H3} 内含子片段的恒定区之前 (Co 等, 1996, 癌症研究, 56: 1118-1125; Co 等, 1992, 免疫学杂志, 148: 1149-1154)。

因此, 通过设计结合了 XbaI 限制酶切位点或者创建作为 XbaI 限制酶相同的单链突出端 (即 NheI、SpeI) 的位点的 PCR 引物, 可以利用在 Co 等的文献中所描述的载体使灵长类抗体的可变区与人 γ -3 个恒定区结构域连接起来。此外, 接头或者适配器可以用来促进克隆。

也有可能利用 DNA 合成技术构建 cDNA 形式的人 γ -3 恒定区, 并将其插入本文所述的 N5KG1 载体以替代 NheI 和 BamHI 位点之间的人 γ -1 恒定区。也有本领域中描述的其它 γ -3 载体, 这取决于哪些限制酶切位点最便于克隆感兴趣的特定可变区, 并且这些载体之任一都可以用于构建和表达本发明的 γ -3 抗体。(参见, 例如, Parren 等, 1992, 免疫学杂志, 148 (3): 695-701; Steplewski 等, 1988, 美国科学院院报, 85: 4852-4856 和美国专利 4,975,369), 以上文献被收作本文参考文献)

D) PRIMATIZED® 抗体的变异

本发明也包括含有恒定区突变、取代或者缺失的 PRIMATIZED® 抗体。可以利用如上所述用于糖基化突变体的定点诱变技术构建这样的突变，该技术是本领域技术人员所熟知的。

设计本发明的突变抗体，其目的是在治疗效率水平上(即在 FcR 结合方面)建立所需的改变。然而，应该将其理解为：在抗体恒定区中的任何突变都不应改变为 γ -1 或者 γ -3 恒定区结构域所介导的基本效应子功能。也可能通过诱变改变其它亚型的 γ 抗体，以便它们具有与包含 γ -1 或 γ -3 结构域的抗体类似的效应子功能。本发明也包含这样的抗体。

例如，与 FcR 结合和与 Clq 补体组分的相互作用有关的 IgG 恒定区的片段得到鉴定，并且已确定出能增加或者减少结合亲和性的突变。正如美国专利 5,648,260 (收作本文参考文献)中所公开的，在将人 IgG3 恒定区的 Leu 235 改变为 Glu 可破坏人 Fc γ R1 受体的突变体的相互作用。在绞连结区中的邻近或者相邻位点上的突变(即由 Ala 置换 234、235、236 或者 237 号残基)表明：残基 234、235、236 和 237 的改变至少影响对 Fc γ R1 受体的亲和性。

同样地，在美国专利 5,348,876 (也收作本文参考文献)中显示：通过减少人 IgG3 恒定区的绞链区长度和改变这一区的氨基酸顺序，可以进一步改善 Clq 结合和补体介导的细胞溶解。事实上，所述变体比野生型 IgG3 结合更多的 Clq 并且比 IgG1 结合多得多的 Clq。

因此，在本领域中清楚的是：突变可以用来产生具有减弱的对人 Fc 受体亲和性的治疗抗体，或许用于治疗更为轻度的内科病。此外，可以确定能增加效应子功能活性的突变，由此而产生用于治疗用途的更强形式。应该理解的是，可以设想在药效方面建立改变的基因序列的操作，并且该设想处于本发明的精神和范围之内。

E) 在中国仓鼠卵巢细胞中表达 PRIMATIZED® 抗体

为了分离 PRIMATIZED® 抗体，利用下列方案在中国仓鼠卵巢细胞中表达编码抗体的载体。

利用 WIZARD® Maxipreps DNA 纯化系统(Promega 目录#A7421)纯化大规模质粒 DNA。用 Ssp I 和 BspLU11 I 消化纯化的 DNA，以乙醇沉淀一次，并将其再悬浮于无菌 TE 中。

然后利用电穿孔法将纯化的、内切核酸酶限制的质粒 DNA 引入中国仓鼠卵巢(CHO)二氢叶酸还原酶负 DG44 细胞中。所利用的电穿孔法技

术描述如下。

在一支适当大小的无菌 Corning 管中,以 1000 rpm 旋转大约 1.6×10^8 个 CHO 细胞 1 分钟。除去培养基,并用 15 毫升无菌的冰镇的 SBS (无菌蔗糖缓冲液是 272 mM 蔗糖、7 mM pH 7.4 磷酸钠、1 mM $MgCl_2$) 洗涤细胞,并以 1000 rpm 旋转 5 分钟。除去 SBS,并利用新鲜的冰镇的无菌 SBS 悬浮细胞,其细胞浓度为每 ml 1×10^7 个细胞,并将其在冰上放置 15 分钟。打开 BTX 600 电穿孔仪,并用将其预置为 230 伏特,将最大电压旋钮设定在 500 伏特/电容和电阻。电容设置在 400 微法拉第,而电阻则设置在 13 欧姆(设置 R1)。

然后将质粒 DNA (4 μ g DNA 或者 2 μ g DNA)和 0.4 ml 细胞 (4×10^6 个细胞)放置在 BTX 0.4 ml 样品池(BTX 目录#620)中。通过把样品池放入 BTX 600 支架上并按下自动充电和脉冲钮来冲击细胞。用每一哺乳动物表达质粒进行大约 20 次单独的电穿孔。

冲击之后,将样品池在环境温度下放置十五分钟。使得自每个样品池的细胞和 DNA 再悬浮于 20 ml 不包含任何次黄嘌呤或者胸苷(Gibco BRL 目录#31033-012)的、HT 补料(100X 补料是 10 mM 次黄嘌呤钠、1.6 mM 胸苷 Gibco BRL 目录#11067-014)已加入其中的 CHO-SSFMI 中。然后将单一的电穿孔样品池中的细胞平板接种到 96 孔平板(200 μ l/孔)上,并放置在 37 $^{\circ}$ C CO_2 温箱中。2 或 3 天后,通过加入 400 mg/ml Geneticin[®] (G418, Gibco BRL 目录#10131-019)将培养基改变成为上述培养基来开始选择。在 37 $^{\circ}$ C 下培育细胞,同时每 3-5 天改变细胞培养基一次。在 16 天后 G418 抗性克隆出现于孔中,由 ELISA 分析上清液的抗体表达。然后个别地扩增最高表达的克隆。按照如下描述的方法纯化单克隆抗体。

免疫球蛋白 ELISA

在 4 $^{\circ}$ C 下,用 200 ng 未标记的山羊抗人 IgG 抗体以 100 μ l/孔涂布平板(Immulon 2, Dynatech 实验室,公司目录#011-010-3455)一夜。利用 20 ml 未标记的山羊抗人 IgG/10 mls 涂布缓冲液/平板(Boehringer Mannheim Ab 目录#605 400)实现这一过程。(1:500 稀释大约 1 mg/ml 母液)。然后从平板上除去涂布缓冲液,并用纸巾干燥之。然后每孔加入 100 微升稀释缓冲液。

然后以 100 μ l/孔双份地将抗体溶液和标准(100 ng/ml-2.5 ng/ml)

直接加入 100ml 稀释缓冲液中。抗体溶液和标准包含在稀释缓冲液中。然后在 37°C 下温育所产生的溶液至少 1 小时。

温育之后，除去每个平板的内含物，并用自来水洗涤平板 5 次。然后在纸巾上干燥平板。

平板干燥之后，然后以 100 μ l/孔加入第二种抗体。该第二种抗体是山羊抗人 κ -HRPO (以 1/10,000 稀释液或 1 μ l Ab/10 mls 稀释缓冲液/平板加入，可获自 Southern Biotechnology Associates, Inc. 目录#2060-05) 或者山羊抗人 λ -HRPO (以 1/20,000 稀释液或 1 μ l Ab/20 mls 稀释缓冲液/2 平板加入，可获自 Southern Biotechnology Associates, Inc. 目录#2070-05)。

使抗体和平板内含物在 37°C 下温育 1 小时。温育之后除去每个平板的内含物。用自来水再一次洗涤平板五次，并干燥所洗涤的平板。然后以 100 μ l/孔的量将 HRPO 底物 (TMB Microwell-两个组分) 加入到干燥的平板中。(5 ml TMB 过氧化物酶底物+5 ml 过氧化物酶溶液 B/平板 (Kirdgaard 和 Perry Labs, TMB Microwell 两种组分试剂目录#50-76-00))。

当最弱的标准 (2.5 ng/ml) 在背景之上可见时，通过每孔加入 100 微升 2M H_2SO_4 来停止反应。然后利用平板读数仪 (例如 Molecular Devices Emax 精密微型平板读数仪, 设定波长为 OD 450 和 OPT2 (OD 540)) 读取平板中的孔的光密度。

ELISA 缓冲液

涂布缓冲液

碳酸钠 0.8 克/升

碳酸氢钠 1.55 克/升

用大约 1ml 1N HCl 调整 pH 值至 9.5

稀释缓冲液

溶在 PBS 中的 5gm/L 0.5 % 脱脂干牛奶加上 100 mg/L 0.01 % 硫柳汞

利用上述测定得到的 ELISA 值的例子说明如下。

| 标准 | OD 450 | OD 450 | 平均 |
|-----------|--------|--------|-------|
| 100 ng/ml | 0.805 | 0.876 | 0.841 |
| 50 ng/ml | 0.395 | 0.472 | 0.434 |

| | | | |
|-----------|-------|-------|-------|
| 25 ng/ml | 0.213 | 0.252 | 0.233 |
| 10 ng/ml | 0.089 | 0.105 | 0.097 |
| 5 ng/ml | 0.054 | 0.055 | 0.055 |
| 2.5 ng/ml | 0.031 | 0.035 | 0.033 |
| 0 ng/ml | 0.004 | 0.006 | 0.005 |

稀释缓冲液中的标准

适当地稀释母液 AB (在生理盐水中无菌过滤, 由 OD 测定蛋白质), 从而得到 1 mg/ml.

实例:

嵌合的猴/人抗 CD4 (CE9.1) 是 4.18 mg/ml

24 μ l 上述溶液倒入 76 μ l 稀释缓冲液是 1 mg/ml

50 μ l 储液 Ab (1 mg/ml) 注入 450 μ l 稀释缓冲液 (D.B.) 是 100 μ g/ml

50 μ l 上述混合物注入 450 μ l D.B 是 1 μ g/ml

200 μ l 上述混合物注入 1.8 mls D.B 是 1 μ g/ml

1 ml 上述混合物注入 9 mls D.B 是 100 ng/ml*

5 ml 上述混合物注入 5 ml D.B 是 50 ng/ml *

5 ml 上述混合物注入 5 ml D.B 是 25 ng/ml *

4 ml 上述混合物注入 6 ml D.B 是 10 ng/ml *

5 ml 上述混合物注入 5 ml D.B 是 5 ng/ml *

5 ml 上述混合物注入 5 ml D.B 是 2.5 ng/ml *

*用于 ELISA 中的标准

由 A 蛋白纯化抗体

方法

离心培养物上清液以除去细胞和碎片。然后通过 0.2 μ m 滤器过滤离心获得物。然后制备 A 蛋白琼脂糖凝胶快速流柱 (重组 A 蛋白琼脂糖凝胶快速流 (floe)) (Pharmacia Biotech 目录 #71-5000-09), 并利用 PBS (pH 7.4) 平衡之。

然后以适当流速 (例如 2 ml/min) 将上清液加样到柱上。加样之后, 以 10 柱量 PBS (pH 7.4) 洗涤柱。利用洗脱缓冲液 (0.2 M 乙酸, 0.1 M pH 3.5 甘氨酸) 以 1 ml/min 流速从柱上洗脱抗体。然后收集包含 100 μ l Tris 的 1 ml 组分/管。然后在 280 nm 读取分光光度计吸收率。然后收集抗

体组分, 并由 PBS (pH 7.9) 透析一夜。然后由通过 0.22 μm 膜的过滤来灭菌透析物, 并将其存储在 -20°C 下。

测定结果

纯化如上所述的 PRIMATIZED® 人 γ -4 抗人 CD23 抗体, 并测定它们的诱导 IgE 体外抑制活性。这些结果包含在图 3 和 5 中。利用如上所述的体外 IL-4 TgE 测定实现这一步骤。

这些测定结果令人诧异地表明: 两种人 γ -4 抗人 CD23 抗体都不具有与对应的灵长类抗人 CD23 抗体那样的活性, 即它们并不明显地抑制诱导体外 IgE 产生。

然而, 由于灵长类 5E8 和 p5E8G4P 在重链可变区有一个潜在的天冬酰胺连接的糖基化位点, 因此调查在这一位点上的糖基化效应。(发现: 这两种抗体在这一位点上都含有 N-连接的低聚糖。(数据没有显示))。因此, 为了阻止糖基化, 将糖基化位点中的天冬酰胺改变为赖氨酸以便消除糖增加。这一变异的抗体命名为 p5E8G4PN⁻。测定结果显示: 在 IL-4 IgE 测定中, 这一抗体表现出与 p5E8G4P 相同的行为(参见图 3), 并且也显示出相同的对人 CD23 的表观亲和性 K_d 。(参见图 4)。因此, 这些结果表明: 与灵长类 5E8 抗体相比较, 自 5E8 γ 4 PRIMATIZED® 抗体中观察到的 IgE 抑制作用的区别并不能归因于糖基化区别。

然后利用本质上相同的方法表达三种灵长类抗体 (p5E8G4P、p5E8G4PN⁻和 p6G5G4P) 作为人 γ -1 形式。发现分别被命名为 p5E8G1、p5E8G1N⁻和 p6G5G1 的所有三种人 γ -1 抗人 CD23 抗体在体外 IL-4/IgE 测定中都具有活性(图 3 和 5)。

发现在 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (P[T, t) 一条尾部+0.0055) 和 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (P[T<t) 一条尾部+0.0019) 浓度下从统计学上讲, p5E8G1 比 p5E8G4P 具有更大的抑制性。此外, 在 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (P[T<t) 一条尾部+0.0392) 和 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (P[T<t) 一条尾部+0.0310) 浓度下, 从统计学上讲, p5E8G1N⁻ 比 p5E8G4PN⁻ 具有更大的抑制性(图 3)。

同样地, p6G5G1 在 3 mg/ml 下能完全抑制诱导 IgE 产生, 而 p6G5G4P 不能。(这些结果显示在图 5 中)。

因此, 这些结果表明: 活性 Fc 区, 尤其是人 γ -1 的, 对于诱导抗人 CD23 抗体的 IgE 抑制作用是十分重要的。这些结果也表明: 包含人 γ -3 恒定区的人抗 CD23 抗体对于诱导 IgE 抑制作用来说也是重要的,

因为 γ -3 恒定区结合到同样与 γ -1 结合的相同的 Fc γ R 受体上, 并且很有可能介导相同的结果。

实施例 2

为了证实我们的关于 Fc 效应子部分涉及抗人 CD23 抗体的 IgE 抑制作用的假说, 将也显示出体外抑制 IgE 的第三种灵长类抗体(命名为 2C8)转化成为 F (ab')₂。利用与前述相同的 IL-4/IgE 测定来确定 IgE 抑制活性。

材料

下列材料用于这一实施例。

ImmunoPure F (ab')₂ 制备试剂盒(Pierce 目录#44888)

消化缓冲液: 20 mM 乙酸钠缓冲液, pH 4.5

0.1 M 柠檬酸, pH 3.0 (以 NaOH 调整 pH 值)

在水中的 0.1 %叠氮化钠

透析袋; 截断分子量 50,000 (Spectra Por 目录#132 128)

能保持 37°C 的振荡水浴

聚苯乙烯培养管, 17×100 mm (Fisher 目录#14-956-6B)

BCA 蛋白质测定(Pierce 目录#23224)

Centricon-50 浓缩器(Amicon 目录#4225)

固定化胃蛋白酶的平衡

将 0.25 ml 50 %匀浆固定化胃蛋白酶加入至 17×100 mm 试管(0.125 ml 凝胶)中。然后加入 4 ml 消化缓冲液。利用血清分离器分离胃蛋白酶和缓冲液。然后弃去缓冲液, 并再用另一 4 ml 缓冲液重复洗涤过程。然后使固定化胃蛋白酶再悬浮于在 0.5 ml 消化缓冲液中。

固定化 A 蛋白柱的制备

将 A 蛋白 AffinityPak®(柱和 ImmunoPure 结合以及洗脱缓冲液回至室温。

2C8 的 F (ab')₂ 片段的制备

利用抗体领域所熟知的方法制备 2C8 的 F (ab')₂ 片段。本发明者选择利用市售试剂盒, 即 ImmunoPure F (ab')₂ 制备试剂盒(Pierce 目录#44888), 并利用制造厂商的方案。

将 10 mg 冻干 2C8 抗体溶于 1 ml 消化缓冲液(20 mM 乙酸钠缓冲液,

pH 4.5)中。然后将 1 ml 包含抗体的样品加入装有固定化胃蛋白酶的试管中。

然后在 37°C 下在高速度振荡水浴中(以高速度)温育抗体和固定化胃蛋白酶 4 小时, 注意温育期间保持混合恒定。

然后利用血清分离器从固定化胃蛋白酶凝胶上回收所产生的溶解的 F (ab')₂ 和 Fc 片段以及未消化的 IgGs。然后将粗消化物倾入一支干净的试管中。

为了提高 F (ab')₂ 片段回收率, 优选 1.5 ml ImmunoPure IgG 结合缓冲液洗涤固定化胃蛋白酶。然后将洗液加入粗消化物中。

然后利用 A 蛋白柱回收抗体片段。通过打开固定化 A 蛋白柱实现这一步骤。注意避免气泡进入凝胶。弃去储液(含有 0.02 %叠氮化钠)。

然后利用 12 ml 结合缓冲液(包含在 ImmunoPure 制备试剂盒中)平衡固定化 A 蛋白柱。然后将柱转移到包含在试剂盒(标记的" F (ab')₂ ")中的 17×100 mm 试管中, 以收集洗脱物。

然后将 3 ml 粗消化物施用于柱中, 并使之完全流入凝胶中。AffinityPak™ 柱的利用是当水平达到顶层半熔玻璃质时使这些柱自动停止流动所需的。

然后利用 6 ml 结合缓冲液洗涤柱。然后收集含有 F (ab')₂ 片段的洗脱物。这一洗脱物也含有不再结合 A 蛋白(不结合 A 蛋白柱)的小 Fc 片段。然而, 其大部分为透析所除去。

利用具有 50,000 截断分子量的透析袋, 通过采用包含 F (ab')₂ 的洗脱物和用 pH 7.4 磷酸缓冲盐水透析洗脱物来实现透析, 以除去小 Fc 片段污染物(Spectra Pur. 目录#132 128)。

由此产生具有 0.707 的 280 nm 光密度(6 ml)的 F (ab')₂ 组分。在透析和用 Centricon-50 浓缩器(Amicon 目录#4225)浓缩之后, 利用 BCA 蛋白质测定(Pierce 目录#23224)分析 2C8 F (ab')₂ 产物的蛋白质含量。发现蛋白质含量为每毫升 3.76 mg。

分析 2C8 F (ab')₂ 的 IgE 抑制活性, 发现它在与前述相同的体外分析中本质上不能抑制 IgE 产生。这些结果包含在图 6 中。事实上, 发现 F (ab')₂ 拮抗诱导 IgE 对单克隆抗体 2C8 的抑制效应。这些结果显示在图 7 中。

实施例 3

在前述的 SCID 小鼠模型中,评价灵长类单克隆 6G5 的 PRIMATIZED® $\gamma 1$ 和 $\gamma 4P$ 形式对诱导体内 IgE 产生的抑制作用的效应。发现 p5E8G1N- 在抑制诱导 IgE 方面与灵长类 5E8 同样有效。(参见图 8 和 9)。尽管灵长类 6G5 和 PRIMATIZED p6G5G4P 在体内抑制诱导 IgE 方面都不是有效的,但 PRIMATIZED p6G5G1 能抑制诱导 IgE 产生。(参见图 9 和 10)。这些结果进一步证实我们的结论:活化 Fc 区对抗人 CD23 抗体有效地抑制诱导 IgE 产生的能力来说是重要的。

建议的机理

虽然本发明的结果结论性地显示:活化 Fc 区对抗人 CD23 抗体有效地抑制诱导 IgE 产生的能力来说是重要的,但是其分子机理还没有得到阐明。然而,可以提出以下几个假设。

首先,它可以是:本发明的抗 CD23 抗体可以起到触发与由交联 B 细胞受体和抗 BCR $\gamma-1$ 抗体触发的途径类似的信号转导途径。假设:在这一情况下由 Fc γ RII 和相同 B 细胞上的表面 Ig (B 细胞受体)的共连接产生的抗原受体信号传递的负调节可导致 Ig 表达的负调节。(D'Ambrosia 等, 1995, 科学, 268: 293-297; Ono 等, 1997, 细胞, 90: 293-301)。事实上, CD23 在表达 B 细胞的 IgE 的表面上得到正调节,因此这是可能的: CD23 和 Fc γ RNII-B 受体经由 $\gamma-1$ 恒定区的共连接产生类似的信号转导途径。

此外,当 Fc 区与另一细胞类型(即杀伤 T 细胞)上的合适 Fc γ R 受体相互作用时,通过交联 B 细胞上的表面 IgE,可以发生对诱导 IgE 表达的抑制,其中所说的另一类型细胞可以“指令”B 细胞经历编程性细胞死亡或者以其它一些方式(即吞噬)导致细胞死亡。例如,美国专利 5,543,144 (收作本文参考文献)提出类似用抗 IgE 抗体抑制表达 IgE 的 B 细胞的机理。正如其中所讨论的,某些 IgG 亚型的抗体,如小鼠 IgG2a 以及人 IgG1 和 IgG3,可以介导由某些携带 Fc 受体的吞噬白细胞实现的 ADCC (抗体依赖性细胞毒性)。例如,将 OKT3(即对人 T 细胞表面抗原专一的小鼠 IgG2a 单克隆抗体)(它是 FDA 批准销售的第一种作为治疗剂的单克隆抗体产物)施用于患者身上,以提供血液中的 T 细胞的迅速耗竭和诱导免疫抑制状态(用于肾移植)。(Russell, P. S. 等, Transpl. Proc. 17: 39-41 (1985))。以 5 mg/天/受治疗者的剂量使用 OKT3 可

以完全耗尽循环的 T 细胞。美国专利号 5,543,144 中描述的单克隆抗体,尤其是小鼠 γ 2a 抗体形式或者携带人 γ -1 或 γ -3 链的人或人源化抗体,被建议用来以类似方式由 ADCC 机理耗尽表达 IgE 的 B 细胞。

无论利用抗 CD23 抗体抑制 IgE 表达的实际分子机理是什么,很明显,抗 CD23 抗体的 Fc 区以及因此而形成的效应子功能都是重要的因素。正如前述的,由于补体在本发明的体外分析中并不出现,该现象很有可能涉及一或多个 Fc γ R 受体。一旦相关的分子成分得到鉴定和牵涉到细胞内部的分子(在信号转导路径中牵涉到该分子),那么就有可能设计出也可用来抑制诱导 IgE 表达的其它治疗方法。

应用

由于它们的有效地抑制 IgE 产生的能力,包含人 γ -1 恒定区的主题抗人 CD23 抗体和那些也可以构建的包含 γ -3 的抗体在治疗任何有关疾病(其中对 IgE 产生的抑制作用是治疗上所需的)方面都是有效的。例如,这样的疾病包括变应性疾病、自身免疫疾病和炎性疾病。

通过施用包含人 γ -1/ γ -3 恒定区的主题抗 CD23 抗体有可能达到治疗目的的具体疾病包括下列: 变应性支气管肺曲霉病, 变应性鼻炎和结膜炎 自身免疫溶血性贫血, 黑棘皮症, 变应性接触性皮炎, Addison 疾病, 特应性皮炎, 斑形脱发, 全身脱毛, 淀粉样变性, 过敏性紫癜, 过敏性反应, 再生障碍性贫血, 血管性水肿(遗传性), 血管性水肿(原发性), 关节强硬脊椎炎, 动脉炎(颅), 动脉炎(巨细胞), 动脉炎(Takayasu), 动脉炎(暂时的), 哮喘, 毛细血管扩张紊乱, 自身免疫卵巢炎, 自身免疫睾丸炎, 自身免疫内分泌失调, Behcet 疾病, Berger 疾病, Buerger 疾病, 支气管炎, 大疱天疱疮, 念珠菌病(慢性粘膜和皮肤的), Caplan 综合症, 后心肌梗塞综合症, 后心包造口术综合症, 心炎, Celiac 口炎性腹泻, Chagas 疾病, Chediak-Higashi 综合症, Churg-Strauss 疾病, Cogan 综合症, 冷凝集素疾病, CREST 综合症, Crohn 疾病, 冷球蛋白血症, 隐源性纤维化肺泡炎, 皮炎性疱疹(Dermatitis herpetiformis), 皮炎, 糖尿病, Diamond-Blackfan 综合症, DiGeorge 综合症, 盘状红斑狼疮(Discoid lupus erythematosus), 嗜酸细胞性筋膜炎, 巩膜外层炎, Drythema elevatum diutinum, 边缘性红斑, 多形性红斑, 结节性红斑, 家族性地中海发热, Felty 综合症, 肺纤维变性, 肾小球性肾炎(过敏性), 肾小球性肾炎(自身免疫), 肾小球性

肾炎(后链球菌), 肾小球性肾炎(移植后), 肾小球病(膜性的), Goodpasture 综合症, 移植物-与-宿主疾病, 粒细胞减少(免疫介导), 环韧带肉芽肿, 肉芽肿病(变应性), 肉芽肿肌炎, Grave 疾病, Hashimoto 甲状腺炎, 新生儿溶血病, 血色病(原发性), Henoch-Schoenlein 紫癜, 肝炎(慢性活性和慢性进行性), 组织细胞增多症 X, 嗜酸细胞增多综合症, 原发性血小板减少紫癜, 约伯综合症, 青少年皮炎, 青少年类风湿关节炎(青少年慢性关节炎), Kawasaki 疾病, 角膜炎, 干燥性角结膜炎, Landry-Guillain-Barre-Strohl 综合症, 麻风病(麻风瘤), Loeffler 综合症, 狼疮, Lyell 综合症, Lyme 疾病, 淋巴瘤样肉芽肿病, 肥大细胞增生病(系统性), 混合结缔组织疾病, 多发性单神经炎, Muckle-Wells 综合症, 粘膜与皮肤的淋巴结综合症, 粘膜与皮肤的淋巴结综合症, 多中心性网状组织细胞瘤病, 多发性硬化, 重症肌无力, 蕈样肉芽肿, 坏死性脉管炎(系统性), 肾病综合症, 重叠综合症, 脂膜炎, 阵发性冷血红蛋白尿, 阵发性夜间血红蛋白尿, 类天疱疮, 天疱疮, 红斑天疱疮, 叶状天疱疮, 普通天疱疮, 饲养者疾病, 肺炎(超敏反应), 结节性多动脉炎, 风湿性多肌痛, 多肌炎, 多神经炎(原发性), 葡萄牙家族多神经病, 预惊厥/惊厥, 原发性胆汁性肝硬化, 进行性系统性硬化(硬皮病), 牛皮癣, 牛皮癣关节炎, 肺部肺泡蛋白沉积, 肺部纤维变性(Raynaud 现象/综合症), Reidel 甲状腺炎, Reiter 综合症, 复发性 polychondritis, 风湿热, 类风湿性关节炎, 肉样瘤病, 巩膜炎, 硬化性胆管炎, 血清病, Sezary 综合症, Sjogren 综合症, Stevens-Johnson 综合症, Still 疾病, 亚急性硬化性全脑炎, 交感性眼炎, 系统性红斑狼疮, 移植排斥, 溃烂结肠炎, 未分化结缔组织疾病, 荨麻疹(慢性), 荨麻疹(冷性), 葡萄膜炎, 白斑, Weber-Christian 疾病, Wegener 肉芽肿病, Wiskott-Aldrich 综合症。

在这些疾病中, 可通过施用抗 CD23 抗体治疗的或呈现的优选症状包括变应性鼻炎和结膜炎、特应性皮炎、湿疹、约伯综合症、哮喘、变应性疾病和慢性炎性疾病和病症, 包括 CLL 慢性淋巴细胞白血病, 其典型地具有高水平的膜 CD23 和高循环水平的 sCD23 的特点(Sarfati 等, 血液, 71: 94-98 (1988))。

用于产生疗效的抗体的量可以由本领域一般技术人员所熟知的技术确定。抗体一般由标准技术用在药学上可接受的缓冲液中提供, 并可

以经由任何所需的途径施用。由于本发明抗体的功效和人对它们的耐受性，可能以重复施用这些抗体以对抗人体内的各种疾病或者疾病状态。

本领域技术人员能够通过常规实验确定：多少有效的、无毒性的抗体量能够治疗变应性疾病和炎性疾病。然而，一般地，一个有效剂量是每天每千克体重大约 0.05 至 100 mg 抗体。

可以按照前述的治疗方法，以足以在治疗或预防水平上产生效应的剂量，向人或者其它动物施用本发明的抗体。可以通过按照已知技术使本发明抗体与常规药学上可接受的载体或者稀释剂混合来制备的常规剂量形式，向这样的人或者其它动物施用本发明的抗体。本领域技术人员应该认识到：药学上可接受的载体或者稀释剂的形式和特性是按要与之混合的有效成分的量、施用途径和其它众所周知的变化来规定的。

本发明抗体的施用途径可以是口服、肠胃外、吸入或者局部。这儿所用的术语肠胃外包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道或者腹膜内施用。静脉内形式的肠胃外施用一般是优选的。

肠胃外施用和口服施用本发明化合物，以便预防性或者治疗性诱导免疫抑制的每日剂量方案为每天每千克体重大约 0.05-100 mg，优选大约为 0.5-10 mg。

也可以通过吸入来施用本发明抗体。“吸入”意指鼻内和口部吸入施用。可以用常规技术制备用于这样的施用的剂量形式，如气雾剂形式或者计量供给的剂量吸入器。所使用的本发明化合物的优选剂量一般为大约 10-100 mg。

也可以局部施用本发明抗体。局部施用意指非全身性施用，包括外部施用本发明的抗体(或片段)化合物于表皮、口腔前庭上和滴注这样的抗体于耳、眼和鼻中，其中它并不大量地进入血流中。全身施用意指口服、静脉内、腹膜内和肌内施用。当然，达到治疗或者预防效果所需的抗体的量将随以下几个因素而变化：所选择的抗体、所治疗的疾病的性质和严重程度以及接受治疗的动物，并且最终地取决于医生的判断力。本发明抗体的合适的局部剂量一般为每日每千克体重大约 1 至 100 mg。

配方

尽管可以单独施用抗体或其片段，但优选将它作为药物配方。对于局部施用来说，活性成分可以占 0.001 % 至 10 % w/w，例如占制剂重量的 1 %-2 %，虽然它可以包含高达 10 % w/w 的活性成分，但是优选不超过 5 % w/w，更优选为制剂重量的 0.1 %-1 % w/w。

本发明的局部配方包含与其一或多个可接受的载体结合在一起的有效成分和可选择的任何其它治疗成分。载体必须是在与配方中的其它成分可兼容性方面“可接受的”，并且不会有害于其受体。

适合于局部施用的配方包括适合于穿过皮肤到达需要治疗的部位的液体或者半液态制剂(如涂抹剂、洗剂、乳膏、软膏或者糊剂)和适合于施用到眼、耳或鼻中的滴液。

本发明的滴液可以包括无菌的水性或油性溶液或者悬浮液，并可以通过将活性成分溶解在杀菌和/或杀真菌剂和/或任何其它合适的防腐剂的合适水溶液(优选包含表面活性剂)中来制得。然后可以由过滤澄清所产生的溶液，将其转移到合适的容器中，然后密封并由加压灭菌器灭菌或者在 90-100℃ 下保持半小时。此外，可以通过过滤灭菌溶液，并用无菌技术将其转移到容器中。适合于包含在滴液中的杀菌和杀真菌剂的例子是硝酸苯汞或者乙酸苯汞(0.002%)、氯化苯甲烃铵(0.01%)和乙酸洗必太(0.01%)。适合于油性溶液的制剂的溶剂包括甘油、稀释的乙醇和丙二醇。

本发明的洗剂包括那些适合于施用在皮肤或者眼睛中的洗液。眼睛洗剂可以包含可选择地含有杀菌剂的无菌水溶液，并可以用那些类似于制备滴液的方法制得。施用于皮肤上的洗剂或者涂抹剂也可以包括加速干燥和使皮肤降温的试剂(如乙醇或丙酮)和/或增湿剂(如甘油)或者油(如蓖麻油或者花生油)。

本发明的乳膏、软膏或者糊剂是外敷的活性成分的半固态形式的制剂。可以借助于合适的机械，通过将细分或磨碎形式的活性成分单独或在溶液或水悬浮液或无水液体中与油脂或非油脂基底混合制备。基底可以包括烃(如硬、软或液状石蜡，甘油，蜂蜡，金属肥皂)，胶浆，天然来源的油(如杏仁、玉米、花生(arachis)、蓖麻或橄榄油)，羊毛脂肪或其衍生物，或者混有醇(如丙二醇或者大粒凝胶)的脂肪酸(如硬脂酸或油酸)。制剂可以结合任何合适的表面活性剂，如阴离子、阳离子或者非离子表面活性剂，如山梨聚糖氨基酯或其聚氧化乙烯衍生

物。也可以包括悬浮剂，如天然树脂、纤维素衍生物或无机材料(如二氧化硅(siliceous silicas))和其它成分(如羊毛脂)。

本领域技术人员将认识到本发明的抗体或其片段的最适剂量或单个剂量的范围将由以下因素确定：所治疗的疾病的性质和严重程度，施药的形式、途径和部位以及所治疗的具体动物；并且将认识到可以用常规技术确定这样的最佳治疗方法。本领域技术人员还可以理解，可以由本领域技术人员利用治疗测定检验的常规方法确定最适治疗方法(即对于给定天数，每天施用的本发明的抗体或其片段的剂量数量)。

无需进一步的详细说明，可以认为：本领域技术人员可以利用前述说明最大限度地利用本发明。因此，下列实施例应当被视为仅仅是说明性例子，而不在任何方面限制本发明的范围。

胶囊组合物

通过用 50 mg 本发明的粉状的抗体或其片段、100 mg 乳糖、32 mg 滑石粉和 8 mg 硬脂酸镁填充标准拼合式硬明胶胶囊，来制备本发明的荚膜形式的药物组合物。

肠胃外注射的组合物

通过在 10k 体积的丙二醇和水中搅拌 1.5k 重量的本发明抗体或其片段，来制备本发明的适合于注射施用的形式的药物组合物。由过滤灭菌溶液。

软膏组合物

本发明的抗体或其片段 10 g.

白色软石蜡 100.0 g.

将本发明抗体或其片段分散在小量载体中，以产生平滑的均相产物。然后用该分散体填充可挤压的金属管。

局部乳膏组合物

本发明的抗体或其片段 1.0 g.

Polawax GP200 20.0 g.

无水羊毛脂 2.0 g.

白蜂蜡 2.5 g.

羟基苯甲酸甲酯 0.1 g.

蒸馏水 100.0 g.

在 60℃ 下共同加热 polawax、蜂蜡和羊毛脂。加入羟基苯甲酸甲

酯溶液，同时利用高速搅拌完成匀浆。然后使温度降至 50°C。然后加入本发明的抗体或其片段并完全分散之，以慢速搅拌使组合物冷却。

局部洗液组合物

本发明的抗体或其片段 1.0 g.

山梨聚糖一月桂酸酯 0.6 g. Polysorbate 20 0.6 g.

Cetostearyl alcohol 1.2 g. 甘油 6.0 g. 羟基苯甲酸甲酯 0.2 g.

B.P. 纯化水 100.00 ml. (B.P.=英国药典)

将羟基苯甲酸甲酯和甘油溶解于 70 ml 75°C 的水中。在 75°C 下共同融化山梨聚糖一月桂酸酯、polysorbate 20 和 cetostearyl alcohol，并将其加入至水溶液中。匀化所产生的乳剂，用连续搅拌使之冷却，加入本发明的抗体或其片段作为在余下的水中的悬浮物。搅拌整个悬浮液直到匀化。

滴眼剂组合物

本发明的抗体或其片段 0.5 g.

羟基苯甲酸甲酯 0.01 g.

羟基苯甲酸丙酯 0.04 g.

100.00 ml B.P. 纯化水。

将羟基苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯溶解 70 ml 75°C 的纯化水中，并使所产生的溶液冷却。然后加入本发明的抗体或其片段，同时由通过膜滤器(0.22 μm 孔径)的过滤来给溶液灭菌，并且无菌地包装到合适的无菌容器中。

吸入施用的组合物

对于具有 15-20 ml 容量的气雾剂容器：混合 10 mg 本发明的抗体或其片段与 0.2-0.5k 润滑剂(如 polysorbate 85 或油酸)，并分散这样的混合物于推进剂(如氟利昂，优选为混合有(1,2-二氯四氟乙烷)和二氯氟甲烷)中，并放入适应于鼻内或口部吸入施用的适当的气雾剂容器中。具有 15-20 ml 容量的气雾剂容器中的吸入施用的组合物：在乙醇(6-8 ml)中溶解 10 mg 本发明的抗体或其片段，加入 0.1-0.2k 润滑剂，如 polysorbate 85 或油酸；同时分散这样的混合物于推进剂(如氟利昂，优选为混合有(1,2-二氯四氟乙烷)和二氯氟甲烷)中，并放入适应于鼻内或口部吸入施用的适当的气雾剂容器中。

可肠胃外施用的抗体组合物

本发明的抗体和药物组合物特别有用于肠胃外施用，即皮下注射、肌肉注射或静脉注射。肠胃外施用的组合物一般包含本发明的溶于可接受载体(优选为含水载体)中的抗体溶液或其鸡尾酒。可以使用各种含水载体，例如水、缓冲水、0.4k 盐水(生理盐水)、0.3%甘氨酸和类似之物。利用生理盐水是优选的。这些溶液是无菌的并且常常是无颗粒状物质的。可以由常规的、众所周知的灭菌技术给这些溶液灭菌。如果需要接近生理学条件，组合物可以含有药学上可接受的辅助物质，如 pH 值调节剂和缓冲剂等等。在这样的药物配方中，本发明的抗体或其片段的浓度可以广泛地变化。这样的浓度的选择将主要基于流体体积、粘性等等，并按照所选择的具体施用方式进行选择。一般地，合适的静脉内注射液浓度为大约每毫升 1 至 100 mg。

因此，本发明的静脉内注射的药物组合物可以包含 10 mL 含有 40-50 mg 本发明的抗人 CD23 抗体的生理盐水。用于制备可肠胃外施用的组合物的方法是本领域所熟知的，或对本领域技术人员来说是显而易见的，并且这些方法在有关文献中已有更详细的描述，例如，Remington 药物科学，第 15 版，Mack 出版公司，Easton，宾夕法尼亚，该文献被收作本文的参考文献。

本发明的抗体可以冻干存储，并可在利用之前重建于合适的载体中。业已证实该技术对于常规免疫球蛋白是有效的，并可以使用本领域熟知的冻干和重建技术。

取决于所需结果，可以施用本发明的药物组合物以预防和/或治疗疾病。在治疗应用中，以足以医治或至少部分地阻止疾病及其并发症的量，施用组合物于已患有疾病的患者。在预防应用中，施用包含本发明抗体或其鸡尾酒的组合物于不处于发病状态的患者，以提高患者的抗性。

可以用主治医生所选择的剂量水平和形式一次或多次施用药物组合物。在任何情况下，本发明的药物组合物都应该提供足以有效地治疗患者的量的主题抗 CD23 抗体。

也应该注意到：本发明的抗体可以用于设计和合成与抗体具有相同治疗作用的肽或非肽化合物(模拟物)。参见，例如，Saragovi 等，科学，253: 792-795 (1991)。

通过以上说明可以了解：虽然在文中出于说明目的对本发明的具体

实施方案进行了说明，但是可以在不偏离本发明的范围的前提下进行各种修饰。因此，本发明不为后附的权利要求所限制。

序 列 表

<110> REFF, MITCHELL E.
KLOETZER, WILLIAM S.
NAKAMURA, TAKEHIKO

<120> γ -1 和 γ -3 抗人 CD23 单克隆抗体及其作为治疗剂的用途

<130> 037003-0275470

<140> 09/019,441

<141> 1998-02-05

<150> 08/803,085

<151> 1997-02-20

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(57)

<223> 前导序列

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(390)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(390)

<400> 1

```

atg gcc tgg act ctg ctc ctc gtc acc ctc ctc act cag ggc aca gga      48
Met Ala Trp Thr Leu Leu Leu Val Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
          -15                -10                -5

tcc tgg gct cag tct gcc ccg act cag cct ccc tct gtg tct ggg tct      96
Ser Trp Ala Gln Ser Ala Pro Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser
          -1   1                5                10

cct gga cag tcg gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc gat gac gtt      144
Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asp Asp Val
          15                20                25

```

ggt ggt tat aac tat gtc tcc tgg tac caa cac cac cca ggc aaa gcc 192
 Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala
 30 35 40 45

ccc aaa ctc atg att tat gat gtc gct aag cgg gcc tca ggg gtc tct 240
 Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ala Lys Arg Ala Ser Gly Val Ser
 50 55 60

gat cgc ttc tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc 288
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile
 65 70 75

tct ggg ctc cag gct gag gac gag gct gat tat tac tgt tgt tca tat 336
 Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr
 80 85 90

aca acc agt agc act ttg tta ttc gga aga ggg acc cgg ttg acc gtc 384
 Thr Thr Ser Ser Thr Leu Leu Phe Gly Arg Gly Thr Arg Leu Thr Val
 95 100 105

cta ggt 390
 Leu Gly
 110

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<400> 2

Met Ala Trp Thr Leu Leu Leu Val Thr Leu Leu Thr Gln Gly Thr Gly
 -15 -10 -5

Ser Trp Ala Gln Ser Ala Pro Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser
 -1 1 5 10

Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asp Asp Val
 15 20 25

Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala
 30 35 40 45

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ala Lys Arg Ala Ser Gly Val Ser
 50 55 60

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

Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr
 80 85 90

Thr Thr Ser Ser Thr Leu Leu Phe Gly Arg Gly Thr Arg Leu Thr Val
 95 100 105

Leu Gly
110

<210> 3
<211> 423
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(57)
<223> 前导序列

<220>
<221> mat_peptide
<222> (58)..(423)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(423)

<400> 3

```

atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctc ctg gtg gca gct ccc aga tgg      48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
                    -15                      -10                      -5

gtc ctg tcc cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga gtg gtg aag      96
Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Lys
                    -1   1                      5                      10

cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ggc tct gtc     144
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Val
                    15                      20                      25

agc agt agt aac tgg tgg acc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag gga     192
Ser Ser Ser Asn Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
                    30                      35                      40                      45

ctg gag tgg att gga cgt atc tct ggt agt ggt ggg gcc acc aac tac     240
Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Asn Tyr
                    50                      55                      60

aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc atc att tca caa gac acg tcc aag     288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Gln Asp Thr Ser Lys
                    65                      70                      75

aac cag ttc tcc ctg aac ctg aac tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc     336
Asn Gln Phe Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
                    80                      85                      90

gtg tat tac tgt gcc aga gat tgg gcc caa ata gct gga aca acg cta     384
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Trp Ala Gln Ile Ala Gly Thr Thr Leu
                    95                      100                      105

```

ggc ttc tgg ggc cag gga gtc ctg gtc acc gtc tcc tca
 Gly Phe Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

423

<210> 4
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<400> 4

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 -15 -10 -5
 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Val Val Lys
 -1 1 5 10
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Val
 15 20 25
 Ser Ser Ser Asn Trp Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 30 35 40 45
 Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ala Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Gln Asp Thr Ser Lys
 65 70 75
 Asn Gln Phe Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 80 85 90
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Trp Ala Gln Ile Ala Gly Thr Thr Leu
 95 100 105
 Gly Phe Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

<210> 5
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(66)
 <223> 前导序列

<220>


```

<221> mat_peptide
<222> (67)..(387)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(387)

<400> 5

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctt ctg ctc tgg      48
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
      -20                      -15                      -10

ctc cca ggt gcc aga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc      96
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
      -5                      -1  1                      5                      10

ctg tct gca tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgc agg gca agt     144
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
                      15                      20                      25

cag gac att agg tat tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca gga aaa     192
Gln Asp Ile Arg Tyr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
                      30                      35                      40

gct cct aag ctc ctg atc tat gtt gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc     240
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
                      45                      50                      55

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gag ttc act ctc acc     288
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
                      60                      65                      70

gtc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gcg act tat tac tgt cta cag     336
Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
      75                      80                      85                      90

gtt tat agt acc cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc     384
Val Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
                      95                      100                      105

aaa                                                                    387
Lys

<210> 6
<211> 129
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工
      序列以加快克隆

<400> 6

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
      -20                      -15                      -10

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

```

```

      -5          -1  1          5          10
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
                15          20          25
Gln Asp Ile Arg Tyr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
                30          35          40
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
                45          50          55
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
                60          65          70
Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
                75          80          85          90
Val Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
                95          100          105

```

Lys

<210> 7
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(57)
 <223> 前导序列

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (58)..(411)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(411)

<400> 7

```

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt cct ctt ttg aaa ggt   48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Pro Leu Leu Lys Gly
                -15          -10          -5
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg ggc ggc ttg gca aag   96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Lys
                -1  1          5          10
cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgc gca gcc tcc ggg ttc agg ttc   144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe
                15          20          25

```

```

acc ttc aat aac tac tac atg gac tgg gtc cgc cag gct cca ggg cag 192
Thr Phe Asn Asn Tyr Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
 30                      35                      40                      45

ggg ctg gag tgg gtc tca cgt att agt agt agt ggt gat ccc aca tgg 240
Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Ser Ser Gly Asp Pro Thr Trp
                      50                      55                      60

tac gca gac tcc gtg aag ggc aga ttc acc atc tcc aga gag aac gcc 288
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala
                      65                      70                      75

aac aac aca ctg ttt ctt caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg 336
Asn Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
                      80                      85                      90

gct gtc tat tac tgt gcg agc ttg act aca ggg tct gac tcc tgg ggc 384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Thr Thr Gly Ser Asp Ser Trp Gly
 95                      100                      105

cag gga gtc ctg gtc acc gtc tcc tca 411
Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
110                      115

```

<210> 8

<211> 137

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 成熟肽来源于 Old World monkey (短尾猴); 前导序列是人工序列以加快克隆

<400> 8

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Pro Leu Leu Lys Gly
                      -15                      -10                      -5

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Lys
  -1  1                      5                      10

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe
  15                      20                      25

Thr Phe Asn Asn Tyr Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln
  30                      35                      40                      45

Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Ser Ser Gly Asp Pro Thr Trp
                      50                      55                      60

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala
                      65                      70                      75

Asn Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
  80                      85                      90

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Leu Thr Thr Gly Ser Asp Ser Trp Gly
  95                      100                      105

```

Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 9
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 9
atcacagatc tctcaccatg gacatgaggg tccccgctca g 41

<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 10
atcacagatc tctcaccatg aggctccctg ctca g 35

<210> 11
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 11
atcacagatc tctcaccatg gaarccccag ckca g 35

<210> 12
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 12
atcacagatc tctcaccatg gtgttgca gcccaggtc 38

<210> 13
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 13

ggtgcagcca ccgtagcttt gatytcacac tt

32

<210> 14

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 14

atcacagatc tctcaccatg rccctgstccc ctct

34

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 15

atcacagatc tctcaccatg gcctgggctc yget

34

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 16

atcacagatc tctcaccatg gcmtggaycc ctctc

35

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 17

cttgggctga cctaggacgg t

21

<210> 18

<211> 30

| | |
|--------------------------------------|----|
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 人工序列的描述: 引物 | |
| <400> 18 | |
| gcgactaagt cgaccatgga ctggacctgg | 30 |
| <210> 19 | |
| <211> 30 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 人工序列的描述: 引物 | |
| <400> 19 | |
| gcgactaagt cgaccatgaa acacctgtgg | 30 |
| <210> 20 | |
| <211> 33 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 人工序列的描述: 引物 | |
| <400> 20 | |
| gcgactaagt cgaccatgga gtttgggctg agc | 33 |
| <210> 21 | |
| <211> 33 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 人工序列的描述: 引物 | |
| <400> 21 | |
| gcgactaagt cgaccatggg gtcaaccgcc atc | 33 |
| <210> 22 | |
| <211> 33 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 人工序列的描述: 引物 | |
| <400> 22 | |
| gcgactaagt cgaccatgtc tgtctccttc ctc | 33 |

<210> 23
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 23

gccaggggga agaccgatgg gcccttggtg ctagctgagg agacgg

46

<210> 24
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 24

gatgggccct tgggtgctagc tgaggagacg g

31

<210> 25
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 25

ggtgctagct gaggagacgg tgaccaggac tccctggccc cagaagccta g

51

<210> 26
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 26

atntaggtga cactata

17

<210> 27
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

<400> 27

gttttcccag tcacga

16

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 28

atatacgact cactataggg

20

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 29

ccgtcagatc gcctggagac gccca

24

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 30

gcagttocag atttcaactg

20

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 31

ccaggccact gtcacggctt c

21

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 32

 cagagctggg tacgtcctca 20

 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 33

 gccccagag gtgctcttg 20

 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 34

 acacagacc gtcgacatgg 20

 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 35

 gctctcggag gtgctcctgg 20

 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列的描述: 引物

 <400> 36

 acagaccgt cgaccatgga gtttgggctg 30

<210> 37
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 37

ccccttggtg ctagctgagg agacggt

27

<210> 38
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 38

agagagaacg ccaagaacac actgttt

27

<210> 39
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 39

aaacagtgtg ttcttgccgt tctctct

27

抗人CD23单克隆抗体对IL-4诱导的IgE产生的影响

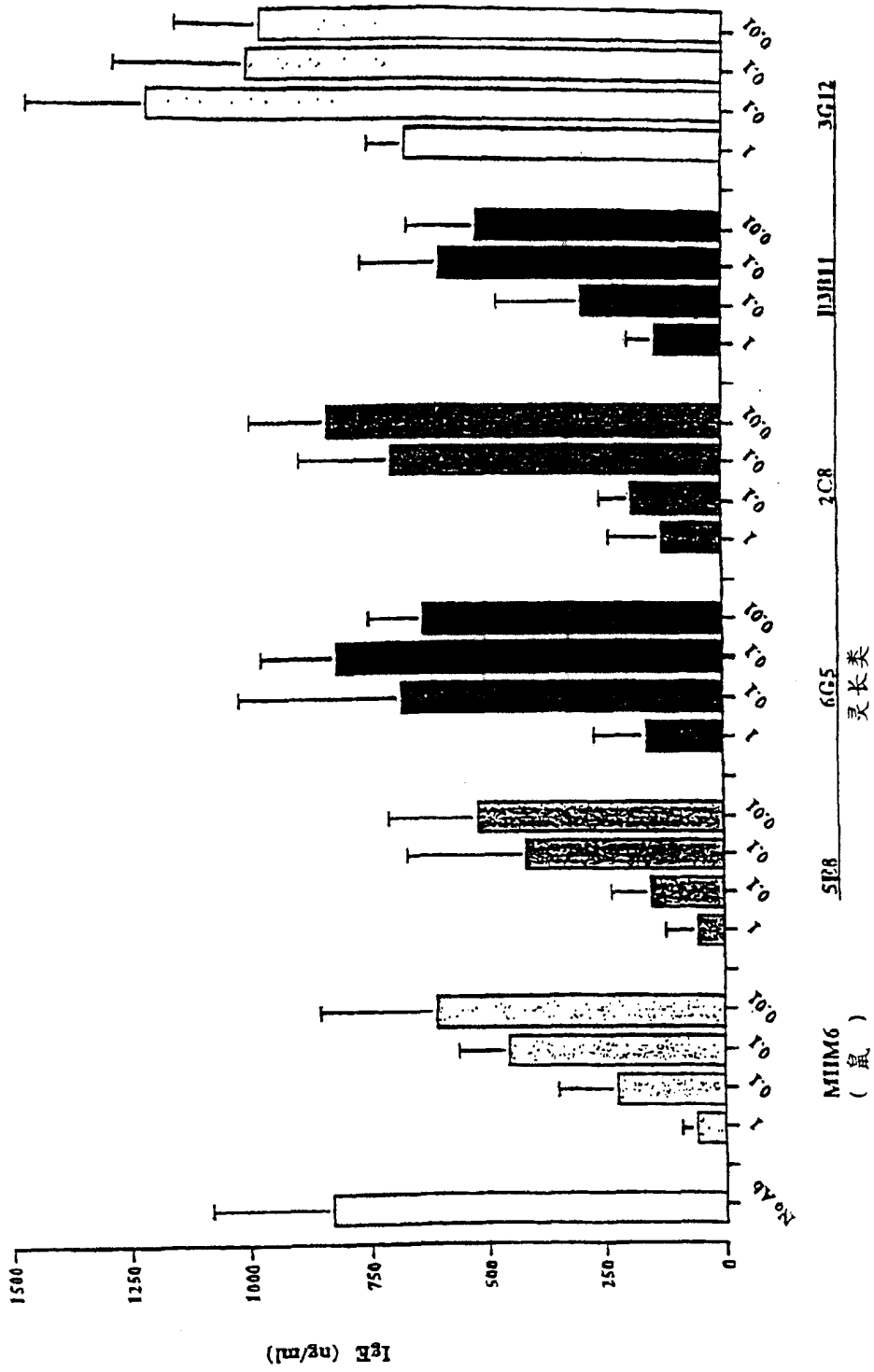


图 1

抗人 CD23 抗体的竞争性 FACSscan 分析

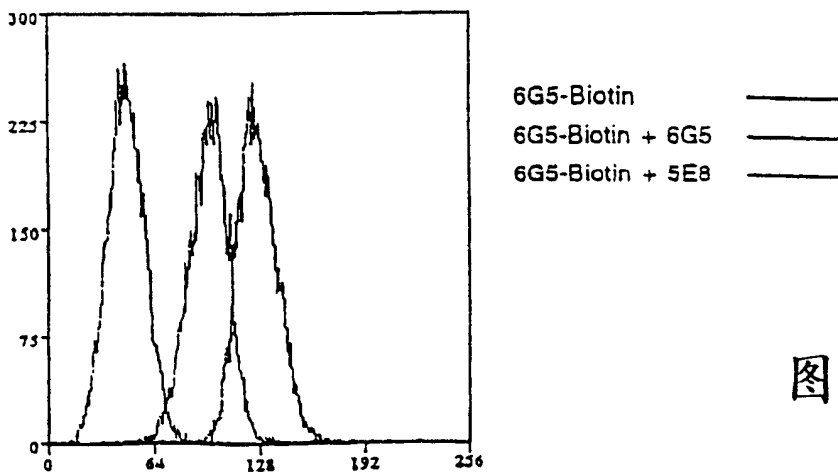
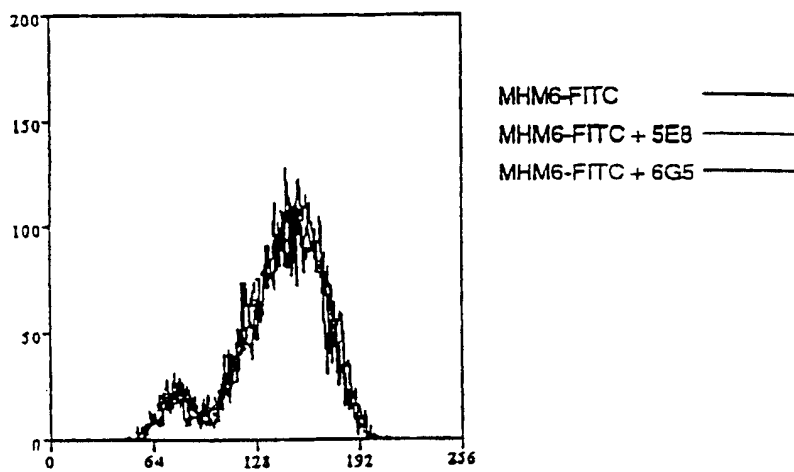
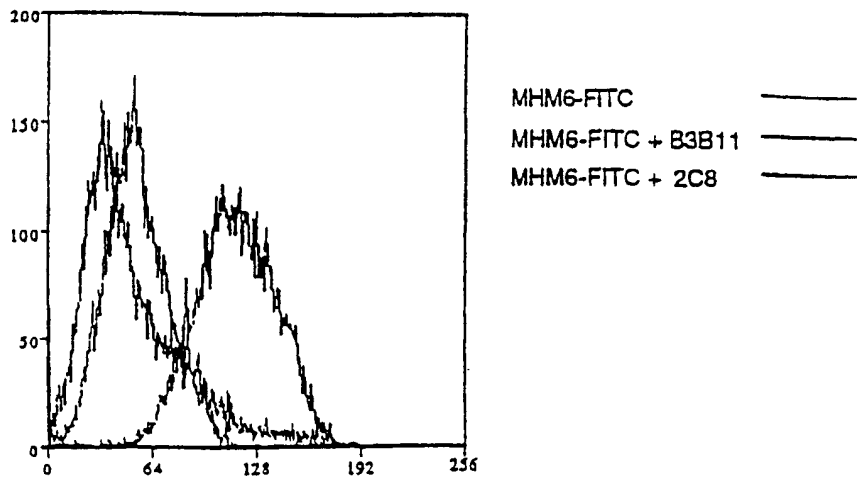
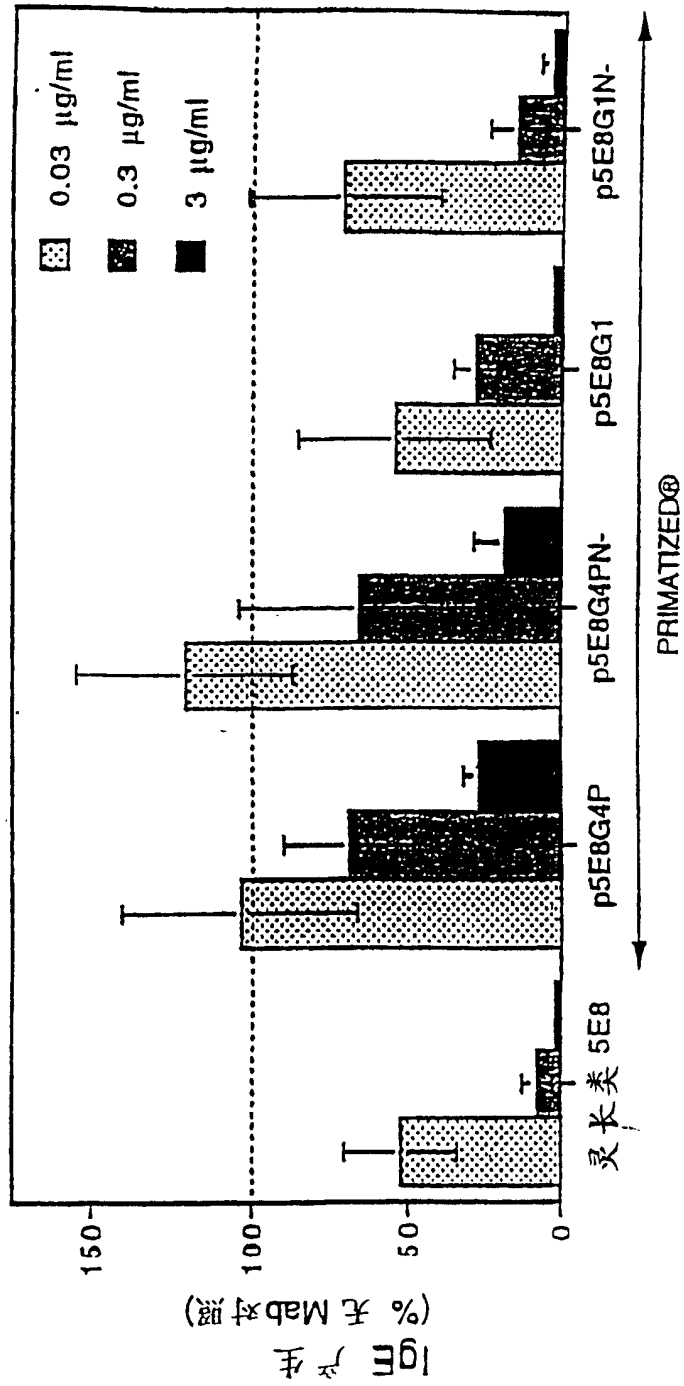


图 2

灵长类 5E8 和 5E8 的 PRIMATIZED® 形式对 IL4 诱导的 IgE 产生的影响



Mab

图 3

灵长类单克隆抗体 5E8 和 5E8 的 PRIMATIZED® 的体外 Mab 研究的总结

| 抗体 | 明显的 Kd (nM) | 体外 IgE 抑制 |
|-----------|--------------------|-----------|
| 灵长类 5E8 | 0.5, 1.5, 1.8, 4.4 | +++ |
| p5E8G4P | 0.3, 1.0 | + |
| p5E8G4PN- | 0.3 | + |
| p5E8G1 | 0.7 | +++ |
| p5E8G1N- | 0.7 | +++ |


 PRIMATIZED®

图 4

灵长类 6G5 和 PRIMATIZED® 形式 6G5 对 IL-4 诱导的 IgE 产生的影响

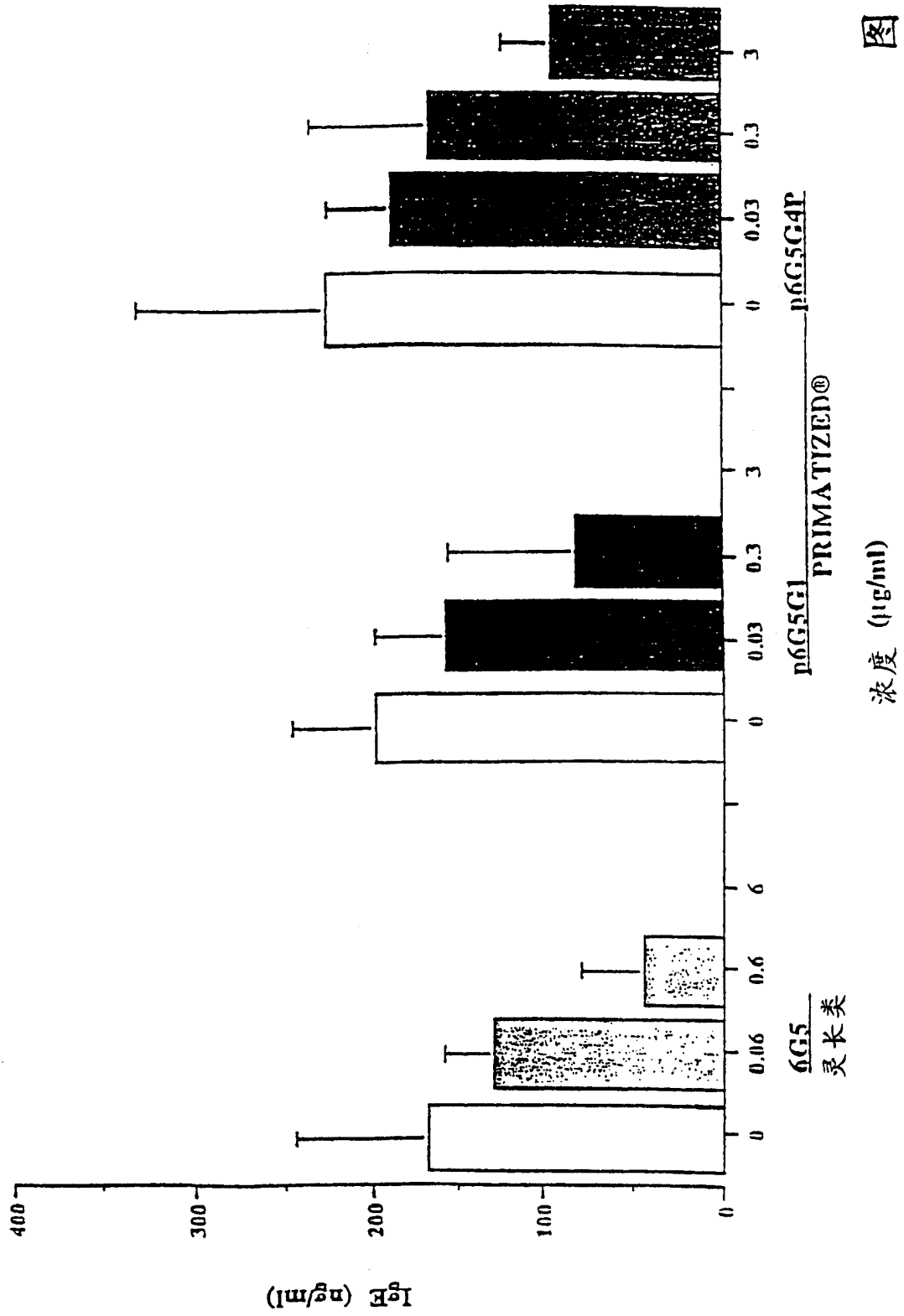


图 5

灵长类抗人 CD23 单克隆抗体 2C8 和 2C8 F(ab')₂ 对 IL-4
诱导的 IgE 产生的影响

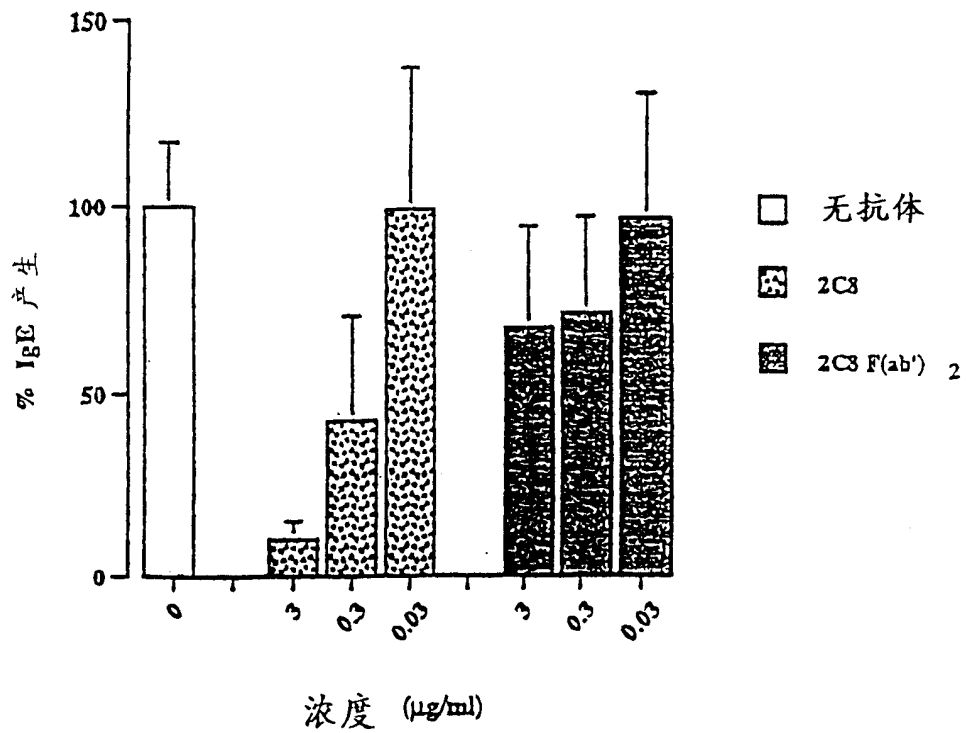


图 6

2C8 F(ab')₂ 拮抗完整的 IgE 产生的 2C8 抑制作用

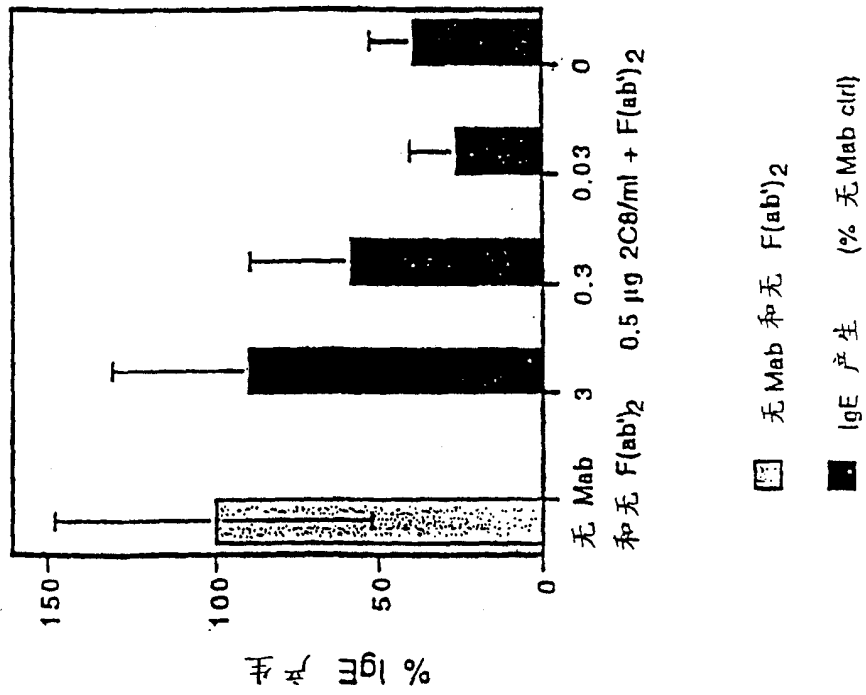


图 7

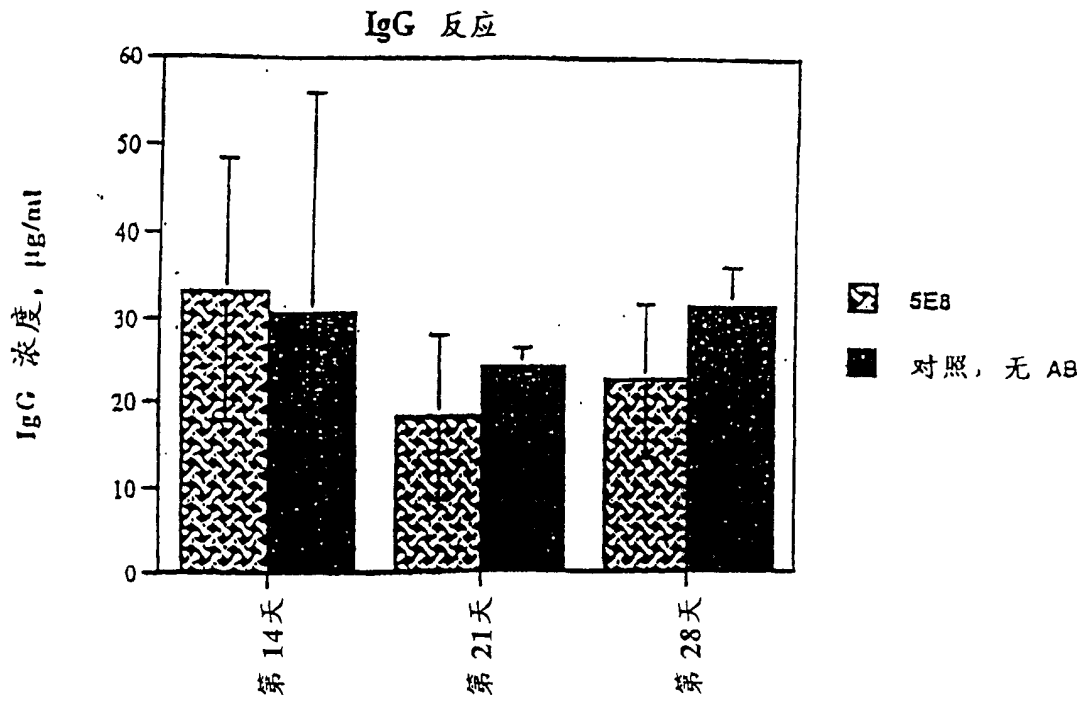
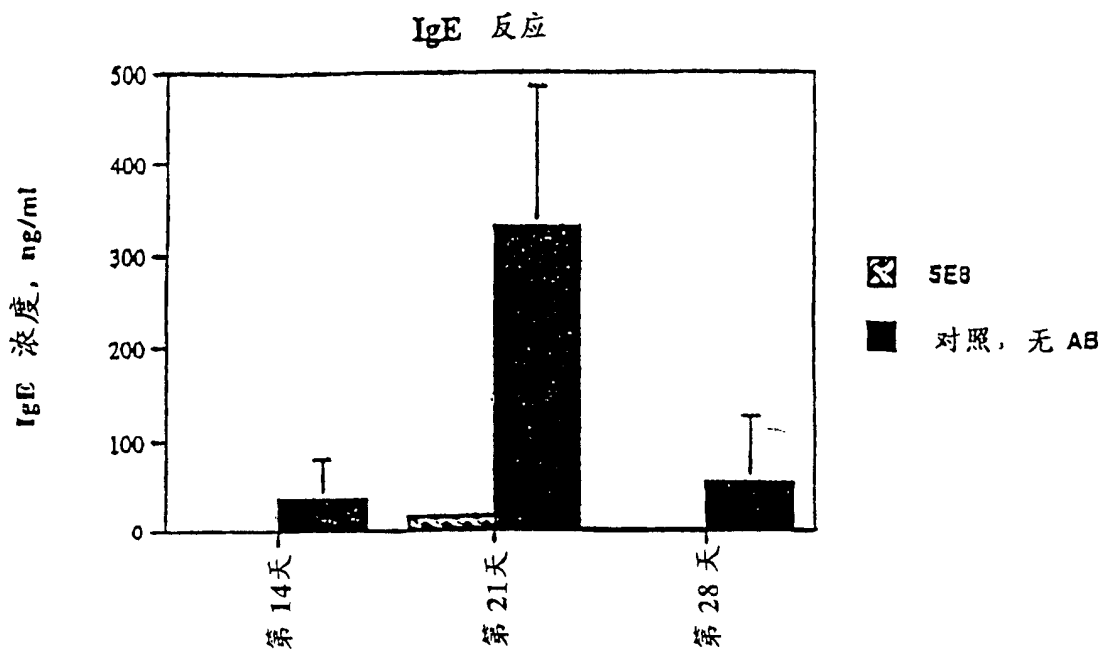


图 8



灵长类 6G5 和 PRIMATIZED® p6G5G4P 在 hu-SCID 鼠模型中对 IgG 和 IgE 产生的影响的比较 (SCID24: 400 μ g \times 2)

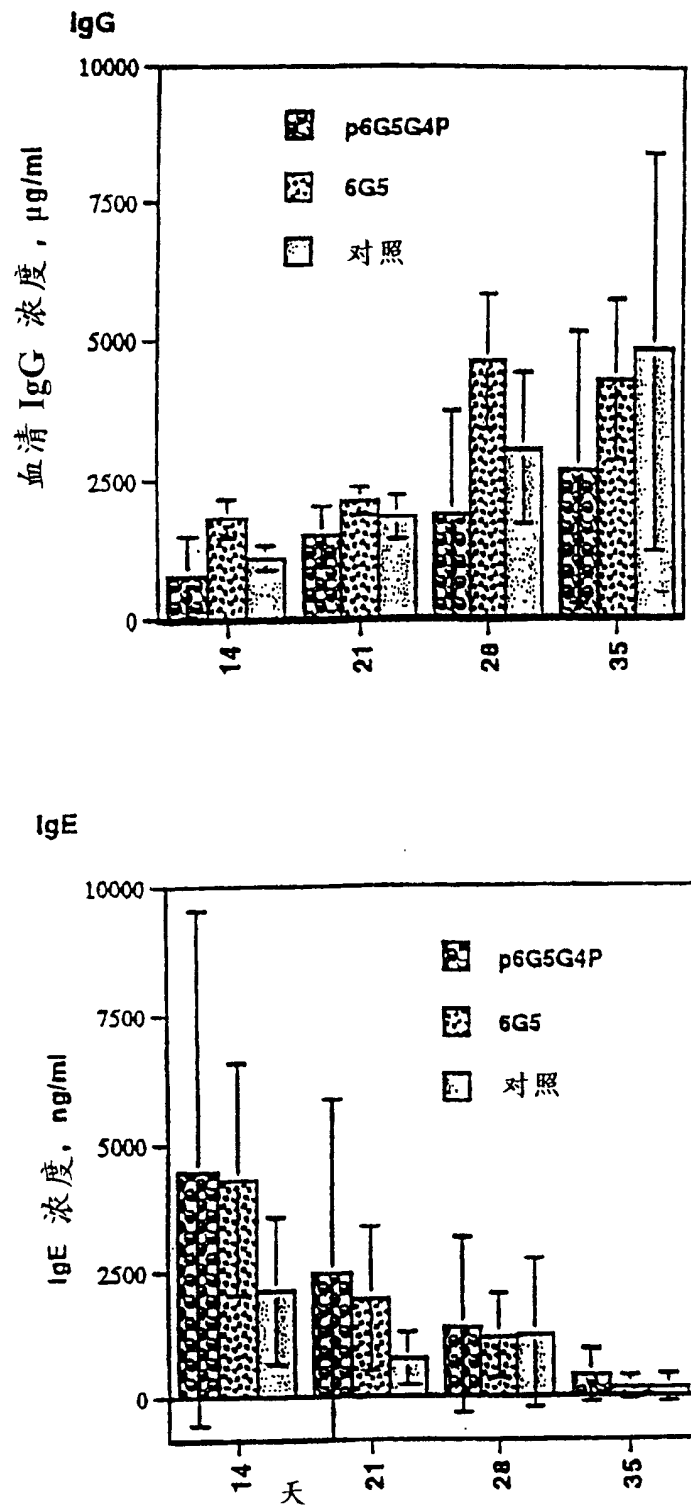


图 9

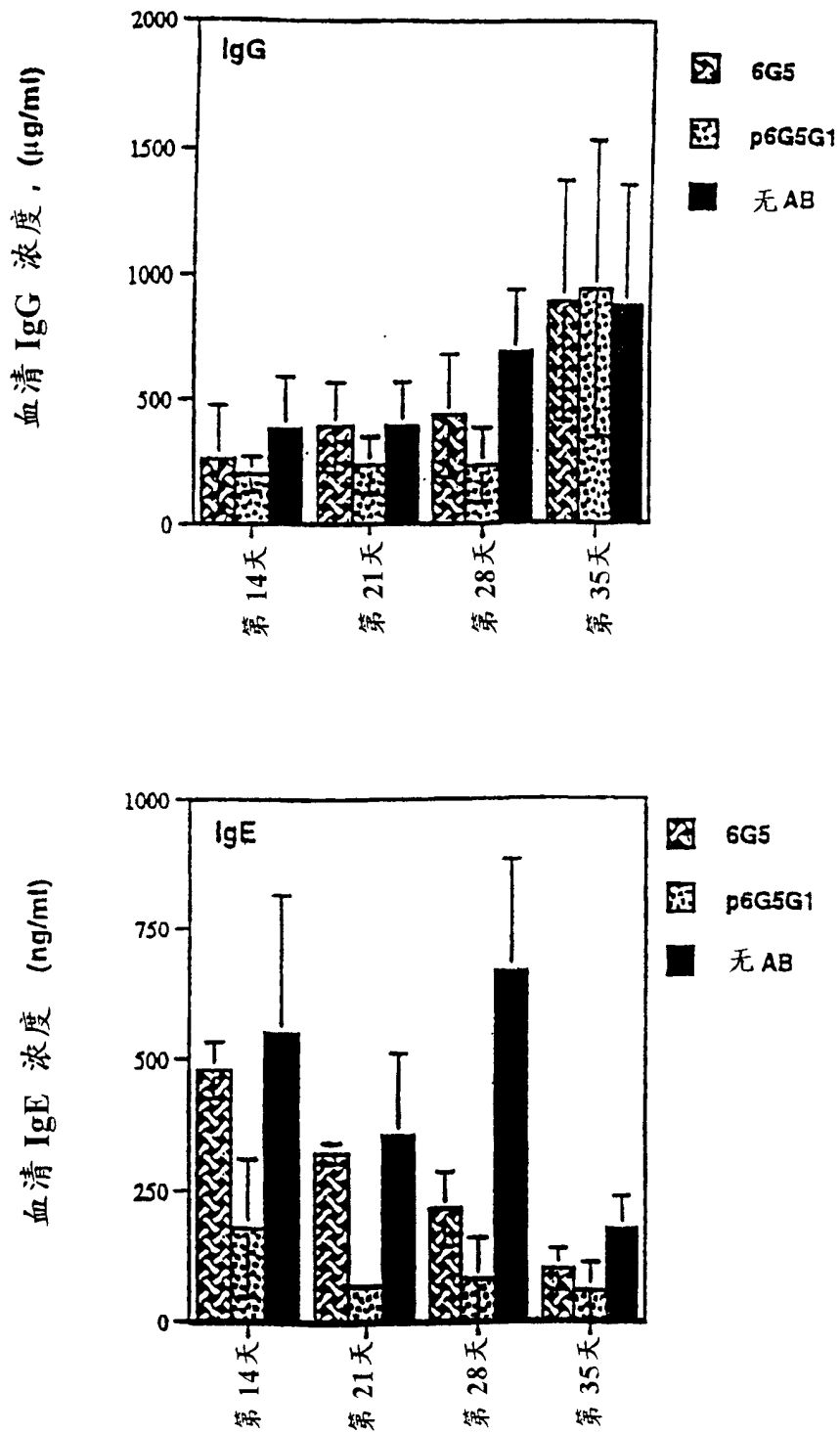


图 10