

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 21/04

C12N 5/12

C07K 16/00

A61K 39/395



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03820721.4

[43] 公开日 2005 年 10 月 5 日

[11] 公开号 CN 1678625A

[22] 申请日 2003.7.1 [21] 申请号 03820721.4

[30] 优先权

[32] 2002. 7. 1 [33] US [31] 60/392,993

[32] 2002. 10. 9 [33] US [31] 60/417,372

[86] 国际申请 PCT/US2003/020762 2003.7.1

[87] 国际公布 WO2004/002431 英 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.1

[71] 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 埃伦·加伯 肯尼思·西蒙

乔斯·萨尔达纳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 36 页 序列表 21 页
附图 6 页

[54] 发明名称 人源化抗淋巴毒素 β 受体的抗体

[57] 摘要

本发明涉及对淋巴毒素 β 受体(LT- β -R)特异的人源化抗体,产生这些抗体的细胞系,由抗体制得的免疫化学制剂和使用该抗体的诊断方法。本发明也涉及在治疗方法中单独或联合化学治疗剂使用该抗体。

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

1. 一种人源化抗-淋巴毒素- β 受体(LT- β -R)抗体, 其轻链互补决定区由SEQ ID NO:1中的24至34, 50至56和89至97位的氨基酸残基限定, 其重链互补决定区由SEQ ID NO:2中的31至35, 50至65和95至102位的氨基酸残基限定, 所述抗体至少包括轻链的一个以下残基: Y36, S49, T63 和F87; 或重链的至少一个以下残基: Y27, T30, I48, A67, L69和F91(常规Kabat编号)。
2. 一种抗体, 其结合与权利要求1所述人源化抗体相同的淋巴毒素- β 受体表位。
3. 一种人源化抗-淋巴毒素- β 受体(LT- β -R)抗体, 所述抗体的轻链互补决定区由SEQ ID NO:1中的24至34, 50至56和89至97位的氨基酸残基限定, 所述抗体的重链互补决定区由SEQ ID NO: 2中的31至35, 50至65和95至102位的氨基酸残基限定, 该抗体的轻链包括残基Y36, S49和F87(常规Kabat编号)。
4. 一种人源化抗-淋巴毒素- β 受体(LT- β -R)抗体, 所述抗体的轻链互补决定区由SEQ ID NO:1中的24至34, 50至56和89至97位的氨基酸残基限定, 所述抗体的重链互补决定区由SEQ ID NO: 2中的31至35, 50至65和95至102位的氨基酸残基限定, 该抗体的重链包括残基Y27和T30(常规Kabat编号)。
5. 权利要求1所述抗体, 所述抗体包括由SEQ ID NO:6的氨基酸残基1至107限定的轻链可变区序列。
6. 权利要求1所述抗体, 所述抗体包括由SEQ ID NO:14的氨基酸残基1至113限定的重链可变区序列。
7. 权利要求5所述抗体, 所述抗体进一步包括由SEQ ID NO:14的氨基酸残基1至113限定的重链可变区序列。
8. 权利要求1所述抗体, 所述抗体包括由SEQ ID NO:15的氨基酸残基1至214限定的轻链区序列。
9. 权利要求1所述抗体, 所述抗体包括由SEQ ID NO:16的氨基酸残基1至442限定的重链区序列。
10. 权利要求1所述抗体, 所述抗体包括由SEQ ID NO:15的氨基酸残基1至214限定的轻链区序列, 和由SEQ ID NO:16的氨基酸残基1至442限定的重链区序列。

11. 一种抗体,其包含与细胞系:克隆3D9(ATCC 专利保藏号PTA-4726,保藏于2002年9月27日)产生的抗体相同的重链和轻链多肽序列。
12. 一种产生权利要求1-11中任一所述抗体的细胞。
13. 权利要求1-11中任一项所述的抗体,所述抗体基本上保留了亲本抗体的结合特性。
14. 权利要求1至11中任一项所述抗体,所述抗体进一步与一种细胞毒部分连接。
15. 权利要求1-11中任一项所述的抗体,所述抗体进一步与一种化疗药连接。
16. 一种包含权利要求1-11中任一项所述抗体和一种药学可接受载体的组合物。
17. 一种治疗或减轻人体内瘤形成的进展、严重性或影响的方法,包括向所述人体内施用权利要求16所述组合物。
18. 一种减少人体内肿瘤体积的方法,包括向所述人施用权利要求16所述组合物。
19. 一种分离的核苷酸,包括由细胞系:克隆3D9(ATCC 专利保藏号PTA-4726,保藏于2002年月27日)产生的抗体的轻链的编码序列。
20. 一种分离的核苷酸,包括由细胞系:克隆 3D9(ATCC 专利保藏号PTA-4726,保藏于2002年9月27日)产生的抗体的重链的编码序列。
21. 一种分离的核苷酸,包括SEQ ID NO:5的残基1至107的编码序列。
22. 一种分离的核苷酸,包括SEQ ID NO:13的残基1至113的编码序列。
23. 一种包括权利要求21所述核苷酸的表达载体。
24. 一种包括权利要求22所述核苷酸的表达载体。
25. 一种包括权利要求23或24之一所述表达载体的细胞。
26. 细胞系:克隆 3D9(2002年9月27日保藏于ATCC,专利保藏号PTA-4726)的细胞。
27. 一种前述任一权利要求所述的抗体,所述抗体是一种抗原结合片段。
28. 权利要求27所述抗体,所述片段选自Fab片段、Fab' 片段、F(ab)₂片段或F_v 片段。
29. 前述任一权利要求所述抗体或抗原结合片段,所述抗体与聚乙二醇

或清蛋白偶联。

30. 前述任一权利要求所述抗体或抗原结合片段,所述抗体的恒定区域被修饰,使得相对于未修饰抗体至少一项恒定区-介导的生物效应子功能减弱。

5 31. 前述任一权利要求所述抗体或抗原结合片段,包括具有改变了的效应子功能的Fc区域。

32. 一种由3D9(ATCC保藏号PTA-4726)组成的杂交瘤细胞。

33. 权利要求32所述的杂交瘤细胞,所述杂交瘤细胞产生人源化抗体,或它们的抗原结合部分。

10 34. 一种轻链,包括来自SEQ ID NO: 1的互补决定区(CDR)和可变区框架氨基酸残基Y36, S49和F87(Kabat编号系统),该轻链的剩余部分来自人抗体。

35. 一种重链,包括来自SEQ ID NO: 2的互补决定区(CDR)和可变区框架残基Y27和T30(Kabat编号系统),该重链的剩余部分来自人抗体。

15 36. 一种包括权利要求34所述轻链和权利要求35所述重链,或所述抗体的结合抗原片段的人源化抗体。

37. 权利要求36所述抗体,该抗体与淋巴毒素- β 受体(LT- β -R)结合。

38. 一种人源化抗体,包括来自SEQ ID NO: 1所示BHA10可变轻链序列的CDR。

20 39. 一种人源化抗体,包括来自SEQ ID NO: 2所示BHA10可变重链序列的CDR。

40. 一种与LT- β -R特异性结合的人源化抗体或它们的抗原结合片段,包括可变区,该可变区包括与来自小鼠BHA10抗体CDR相应的CDR。

41. 权利要求40所述的片段,该片段是Fab片段。

25 42. 一种治疗或减轻患者癌症的方法,包括向患者施用有效量的前述任一权利要求所述人源化抗体。

43. 一种治疗或减轻患者实体瘤的方法,包括向患者施用有效量的前述任一权利要求所述的人源化抗体。

30 44. 权利要求43所述的方法,所述实体瘤选自非小细胞肺癌(NSCLC),结肠癌(CRC),乳腺癌,前列腺癌,胃癌,皮肤癌,胃癌,食道癌和膀胱癌构成的组。

人源化抗淋巴毒素 β 受体的抗体

5 相关申请

本申请要求在先提交的美国临时申请 60/392993(2002.7.1 提交)和美国临时申请 60/417372(2002.10.9 提交)的优先权。以上涉及的申请的全部内容引入此处作为参考。

10 发明领域

本发明涉及免疫学以及癌症的诊断和治疗领域。尤其涉及抗淋巴毒素 β (LT- β -R)特异性的人源化抗体,产生这种抗体的细胞系,由该抗体构成的免疫化学制剂和使用该抗体的诊断方法。本发明也涉及在治疗方法中单独或联合化学治疗剂使用该抗体。

15

发明背景

淋巴毒素 β 受体(此处称为 LT- β -R)是肿瘤坏死因子家族的一个成员,它对免疫系统的发展和对许多细胞包括滤泡树突细胞的免疫体系和许多基质细胞类型的功能保持起了很好的作用(Matsumoto 等, *Immunol. Rev.* 20 156:137 (1997)。LT- β -R 的已知配体包括 LT α 1/ β 2 和称为 LIGHT 的第二配体(Mauri 等 *Immunity* 8:21 (1998))。LT- β -R 的活性已经显示可诱导某些体内癌细胞系的程序性死亡(PCT/US96/01386)。使用与 LT- β -R 结合并对被实验者具有最小免疫原性的特异性人源化抗 LT- β -R 抗体,将对治疗或减轻被实验者(例如人)体内瘤形成的进展(advancement)、严重性或影响起作用。

25

发明简述

本发明提供了特异性抗淋巴毒素 β 受体(LT- β -R)的人源化抗体,产生这种抗体的细胞系,由这种抗体制备的免疫化学制剂和使用这种抗体的诊断方法。本发明也涉及在治疗方法中单独或联合化学治疗剂使用该抗体。特别地,本发明包括特异性与 LT- β -R(如,人 LT- β -R)结合的人源化抗体。该抗体包括由 SEQ ID NO: 1 的氨基酸残基 24 至 34, 50 至 56 和 89 至 97 限定

的轻链互补决定区,和/或由 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 31 至 35, 50 至 65 和 95 至 102 限定的重链互补决定区,此外在它的轻链上包含至少一个(如 1, 2, 3 或 4 个)以下的残基: Y36, S49, T63 和 F87; 或在它的重链上包含至少一个(如 1, 2, 3, 4, 5 或 6 个)以下的残基: Y27, T30, I48, A67, L69 和 F91(常规 Kabat 编号)。本发明的另一个实施方式包括能与上述抗体所结合的表位相同的 LT- β -R 表位结合的抗体。

在一个实施方式中,本发明的人源化抗体包括由 SEQ ID NO:6 的氨基酸残基 1 至 107 限定的轻链可变区序列和/或由 SEQ ID NO:14 的氨基酸残基 1 至 113 限定的重链可变区序列。该人源化抗体也可包括与如下抗体,即 CHO 细胞系表达版本 4 huBHA10: “克隆 3D9” (ATCC 专利保藏号 PTA-4726, 保藏于 2002 年 9 月 27 日)产生的抗体,如实施例 7 所述同样的重和/或轻链多肽序列。含有版本 4huBHA10 的克隆 3D9 于 2002 年 9 月 27 日被保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 给予登记号为 PTA-4726。该保藏遵照在国际承认用于专利程序微生物保藏的布达佩斯条约的规定。该保藏仅对本领域技术人员提供方便。

在另一个实施方式中,本发明的人源化抗体基本保持了亲本抗体例如小鼠单克隆抗体 BHA10(WO96/22788 中描述)的结合性质。在其中一个实施方式中,本发明的人源化抗体以功能性亲和力结合 LT- β -R, 例如约 1 pM 至约 10 pM, 或约 10 pM 至约 20 pM, 或约 20 pM 至约 30 pM, 或约 30 pM 至约 40 pM, 或约 40 pM 至约 50 pM, 或约 50 pM 至约 60 pM, 或约 60 pM 至约 70 pM, 或约 70 pM 至约 80 pM, 或约 80 pM 至约 90 pM 的功能性亲合力(functional affinity), 其中功能性亲和力通过 BIACORE(即利用非标记试剂的表面等离子体共振), 或竞争性结合测定法测定。

在另一个实施方式中,本发明的人源化抗体被连结到细胞毒部分或毒素如蓖麻毒蛋白 A 链或假单胞菌属细菌的毒素(*Pseudomonas toxin*)上, 形成免疫毒素的形式。本发明的人源化抗体也可被连结到化疗药上(如羟基柔红霉素(adriamycin), 5-氟尿嘧啶, 长春碱, 放线菌素 D, 表鬼白毒吡喃葡萄糖苷(etoposide), 顺铂(Cisplatin), 氮甲喋呤, DM1 和阿霉素(doxorubicin))。或者, 本发明的抗体被可检测性标记(如连结到一可检测性的部分上, 如放射性同位素)。本发明也包括联合治疗, 例如被连结到细胞毒部分或毒素上的本发

明的人源化抗体与结合到本发明中与化疗药连结的人源化抗体联合应用。

本发明进一步包括一种适合施药于具有表达 LT β R 的肿瘤的哺乳动物(如人)的组合物,该组合物包括 a)单独的抗 LT β R 抗体或免疫毒素或化疗药形式的人抗 LT β R 抗体,和 b)细胞毒因子,以分别能有效减少施药哺乳动物肿瘤体积的量存在。细胞毒因子可包括,例如 TNF- α , TNF- β , IL-1, INF- γ , IL-2。或者,细胞毒因子(cytotoxic factor)可以是化疗药。该化疗药可包括,如羟基柔红霉素,5-氟尿嘧啶,长春碱,放线菌素 D,表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷,顺铂,氮甲喋呤,DM1 和阿霉素。

在一个实施方式中,本发明的抗体可以是任何同种型(如具有两个全长的轻链和两个全长的重链)和亚类(如 IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 和 IgA2)的完整抗体;或者,它可以是完整抗体的抗原结合部分(例如 Fab, F(ab')₂ 和 Fv)。

本发明还包括一种含有药学可接受载体的组合物;一种包含 SEQ ID NO:5 编码序列的分离核苷酸;一种包含 SEQ ID NO:13 编码序列的分离核苷酸;一种含有由克隆 3D9 (ATCC 专利保藏号 PTA-4726, 保藏于 2002 年 9 月 27 日)细胞系产生的抗体轻链的编码序列的分离核苷酸;一种含有由克隆 3D9 (ATCC 专利保藏号 PTA-4726, 保藏于 2002 年 9 月 27 日)细胞系产生的抗体重链的编码序列的分离核苷酸;一种含有 SEQ ID NO:5 的残基 1 至 107 的编码序列的分离核苷酸;和一种含有 SEQ ID NO:13 的残基 1 至 120 的编码序列的分离核苷酸。

本发明还包括产生人抗-LT β R 抗体细胞系的细胞,包括如,细胞系:克隆 3D9 (ATCC 专利保藏号 PTA-4726)。在一个实施方式中,该细胞系产生约 250mg/L 至约 300mg/L 的所述抗体,或者该细胞系产生约 300mg/L 至约 350mg/L 的所述抗体,或者该细胞系产生约 350mg/L 至约 400mg/L 的所述抗体,或者该细胞系产生约 400mg/L 至约 450mg/L 的所述抗体,或者该细胞系产生约 450mg/L 至约 500mg/L 的所述抗体,或者该细胞系产生约 500mg/L 至约 550mg/L 的所述抗体,或者该细胞系产生约 550mg/L 至约 600mg/L 的所述抗体。由细胞系产生的抗体浓度以 10 天分批培养的收获效价测定。

本发明还提供了一种治疗或减弱被实验者(如人)体内瘤形成的进展、严重性或影响的方法,包括给被实验者施用有效量的本发明抗体。组合物的

有效量可以以一或多剂量给药。在另一实施方式中，本发明提供了一种治疗或减少被实验者(如人)体内瘤的增长、严重性或影响的方法，包括给被实验者施用有效量的本发明抗体和细胞毒因子。该细胞毒因子可包括例如 TNF- α , TNF- β , IL-1, INF- γ , IL-2。或者该细胞毒因子可以是一种化疗药。该化疗药包括，如羟基柔红霉素，5 氟尿嘧啶，长春碱，放线菌素 D，表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷，顺铂，氮甲喋呤，DM1 和阿霉素。

本发明也描述了本发明抗体的抗原结合片段。在本发明的一个实施方式中，该片段选自 Fab 片段，Fab' 片段，F(ab)₂ 片段和 F_v 片段。

在另一实施方式中，本发明的抗体或抗原结合片段接合到聚乙二醇或清蛋白(albumen)上。在另一实施方式中，本发明的抗体恒定区被修饰，使得相对于未修饰抗体至少一个恒定区-介导的生物效应子功能减少。在另一实施方式中，本发明的抗体或抗原结合片段包括具有改变了效应子功能的 Fc 区域。

本发明也描述了由 3D9(ATCC 保藏号 PTA-4726)组成的杂交瘤细胞。在一个实施方式中，本发明的杂交瘤细胞产生了一种人源化抗体或它们的抗原结合部分。

在另一实施方式中，本发明提供了一种轻链，包括来自单克隆抗体 BHA10 的互补决定区(CDR)和可变区框架的氨基酸残基 Y36, S49 和 F87 (Kabat 编号系统)，轻链的其余部分来自人抗体。在另一实施方式中，本发明提供了一种重链，包括来自单克隆抗体 BHA10 的互补决定区(CDR)和可变区框架的氨基酸残基 Y27 和 T30(Kabat 编号系统)，重链的其余部分来自人抗体。在另一实施方式中，本发明的人源化抗体包括所述重链和轻链。

在一个实施方式中，本发明的人源化抗体结合到淋巴毒素- β 受体(LT- β -R)上。

本发明还提供了一种包括来自 SEQ ID NO: 1 所示 BHA10 可变轻链序列 CDR 的人源化抗体。在另一实施方式中，本发明提供了一种包括来自 SEQ ID NO: 2 所示 BHA10 可变重链序列的人源化抗体。

本发明描述了一种特异性结合 LT- β -R 的人源化抗体或它们的抗原结合片段，它包括可变区，该可变区含有与来自小鼠 BHA10 抗体的 CDR 相应的 CDR。在一个实施方式中，该片段是 Fab 片段。

在另一实施方式中，本发明描述了一种治疗或减轻患者癌症的方法，

包括给患者施用有效量本发明的人源化抗体。本发明也描述了一种治疗或减轻患者实体瘤的方法，包括给患者施用有效量本发明的人源化抗体。在本发明的一个实施方式中，实体瘤选自非小细胞肺癌(NSCLC)，结直肠癌(CRC)，乳腺癌，前列腺癌，胃癌(gastric cancer)，皮肤癌，胃癌(stomach cancer)，食道癌或膀胱癌。

附图简述

图 1 显示了不同版本(version)的人 BHA10(版本 2-4)对 IL-8 的对 A375 细胞的激动作用(agonism)的比较。IL-8 检测按实施例 5 所述方法进行。实心正方形：嵌合 BHA10；空心圆圈：版本 2；实心圆圈：版本 3；空心圆圈：版本 4；空心三角形：huCBE11(阳性对照)。

图 2 显示了与 HT29 细胞结合的纯化的人 BHA10 抗体版本 2-4 的 FACS 分析结果。FACS 分析按实施例 8 所述方法进行。实心正方形：嵌合 BHA10；空心圆圈：版本 2；实心圆圈：版本 3；空心圆圈：版本 4；空心三角形：huCBE11(阳性对照)；十字形：M92(抗-CD40L 抗体)(阴性对照)。

图 3 说明了 pKJS077 的质粒图。该质粒含有轻链#2 和新霉素抗性基因。该轻链表达盒包含人 CMV 的立即早期启动子和第一内含子(含有小的缺失)，以及人生长激素聚腺苷酰化序列。

图 4(A)显示了编码轻链#2 的核苷酸序列(可变区 - 单下划线；恒定区 - 双下划线)(SEQ ID NO:59)，图 4(B)显示了相应的氨基酸序列(可变区 - 单下划线；恒定区 - 双下划线)(SEQ ID NO: 60)。

图 5 说明了 pKJS078 的质粒图。该质粒包括重链#3 和 DHFR 基因。该重链表达盒含有重链 CMV 立即早期启动子盒第一内含子(含有小的缺失)，以及人生长激素聚腺苷酰化序列。

图 6(A)显示了编码重链#3 的核苷酸序列(可变区 - 单下划线；恒定区 - 双下划线)(SEQ ID NO: 61)，图 6(B)显示了相应的氨基酸序列(可变区 - 单下划线；恒定区 - 双下划线)(SEQ ID NO: 62)。

发明详述

序列识别号

说明书中所指的核苷酸和氨基酸序列被注明以下序列识别号。

- SEQ ID NO:1 - 小鼠 BHA10 轻链可变(VH)区的氨基酸序列。
- SEQ ID NO:2 - 小鼠 BHA10 重链可变(VL)区的氨基酸序列。
- SEQ ID NO:3 - 人源化的 BHA10 轻链可变区(版本 1 - VL # 1)的核苷酸序列。
- 5 SEQ ID NO:4 - 人源化的 BHA10 轻链可变区(版本 1 - VL # 1)的氨基酸序列。
- SEQ ID NO:5 - 人源化的 BHA10 轻链可变区(版本 2 - VL # 2)的核苷酸序列。
- SEQ ID NO:6 - 人源化的 BHA10 轻链可变区(版本 2 - VL # 2)的氨基酸
- 10 序列。
- SEQ ID NO:7 - 人源化的 BHA10 轻链可变区(版本 3 - VL # 3)的核苷酸序列。
- SEQ ID NO:8 - 人源化的 BHA10 轻链可变区(版本 3 - VL # 3)的氨基酸序列。
- 15 SEQ ID NO:9 - 人源化的 BHA10 重链可变区(版本 1 - VH # 1)的核苷酸序列。
- SEQ ID NO:10 - 人源化的 BHA10 重链可变区(版本 1 - VH # 1)的氨基酸序列。
- SEQ ID NO:11 - 人源化的 BHA10 重链可变区(版本 2 - VH # 2)的核苷
- 20 酸序列。
- SEQ ID NO:12 - 人源化的 BHA10 重链可变区(版本 2 - VH # 2)的氨基酸序列。
- SEQ ID NO:13 - 人源化的 BHA10 重链可变区(版本 3 - VH # 3)的核苷酸序列。
- 25 SEQ ID NO:14 - 人源化的 BHA10 重链可变区(版本 3 - VH # 3)的氨基酸序列。
- SEQ ID NO:15 - 轻链 # 2 的氨基酸序列(包括 VL # 2 和人昵嵊春愣 $\cap$ $\emptyset$)。
- SEQ ID NO:16 - 重链 # 3 的氨基酸序列(包括 VH # 3 和人 IgG1 重链恒
- 30 定区)。
- SEQ ID NO:17 至 SEQ ID NO:58 - 各种引物

SEQ ID NO:59 - 轻链 # 2 的核苷酸序列(包括 VL # 2 和人 κ 轻链恒定区)加上起始密码子和信号序列。

SEQ ID NO:60 - 轻链 # 2 的氨基酸序列(包括 VL # 2 和人 κ 轻链恒定区)加上起始密码子和信号序列。

- 5 SEQ ID NO:61 - 重链 # 3 的核苷酸序列(包括 VH # 3 和人 IgG1 重链恒定区)加上起始密码子和信号序列。

SEQ ID NO:62 - 重链 # 3 的氨基酸序列(包括 VH # 3 和人 IgG1 重链恒定区)加上起始密码子和信号序列。

定义

- 10 此处交替使用的术语“人源化抗体”或“重构抗体”是指包括至少一种来自非-人源典型地为鼠科动物，亲本抗体的人源化免疫球蛋白或抗体链(也即，至少一种人源化的轻链或重链)，它保持或基本保持了亲本抗体的抗原结合性质，但优选在人体内具有较少的免疫原性。术语“人免疫球蛋白链”或“人抗体链”(即“人免疫球蛋白轻链”或“人免疫球蛋白重链”)指具有可变区的免疫球蛋白或抗体链(即分别为轻链或重链)，该可变区包括基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非-人源免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDR)(如至少一个 CDR，优选两个 CDR，更优选三个 CDR)，并进一步包括恒定区(例如，如果是轻链，它们的至少一个恒定区或其部分，如果是重链，优选三个恒定区)。

- 20 术语“区”可指抗体链或抗体链功能域的一部分(例如重链或轻链的一部分或恒定区或可变区的一部分，正如此处所限定的)，以及所述链或功能域更分散的部分。例如，轻链和重链或轻链和重链可变区包括散布在“框架区”或“FR”的“互补决定区”或“CDR”，如此处所限定的。

- 25 此处使用的术语互补决定区(CDR)指共同决定天然免疫球蛋白结合位点的天然 Fv 区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列，正如 Kabat 等在 Sequence of Proteins of Immunological Interest(第 5 版，美国健康和公共事业部，美国政府印刷局，1991)所描述的。

此处使用的术语框架区(FR)指在 CDR 之间插入的氨基酸序列。这部分抗体用以将 CDR 保持在适当的方向上(允许 CDR 结合抗原)。

- 30 此处使用的术语恒定区(CR)指具有效应子功能的抗体分子部分。典型地，非-人源(例如鼠)恒定区被人恒定区取代。目标嵌合抗体或人源化抗体

的恒定区典型地来自人免疫球蛋白。重链恒定区可以选自五种同型的任一种： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。进一步，各种亚类的重链(如重链的 IgG 亚类)是造成效应子功能不同的原因，因此通过选择想要的重链恒定区，可以产生想要的效应因子功能。优选的重链区是 $\gamma 1$ (IgG1)， $\gamma 3$ (IgG3)和 $\gamma 4$ (IgG4)。更优选
5 $\gamma 1$ (IgG1)同型的 Fc 区。恒定区的轻链可以是 κ 或 λ 型，优选为 κ 型。在一个实施方式中，轻链恒定区是人 κ 恒定区(Heiter 等 (1980) *Cell* 22:197-207)，重链恒定链的是人 IgG1 恒定链(Ellison 等 (1982) *Nucleic Acids Res.* 10:4076-4079)。

此处使用的术语嵌合抗体指含有来自第一物种的可变区和来自第二物种恒定区的一种抗体。典型的嵌合抗体包含人和鼠抗体片段，通常是人恒定区和鼠可变区。

免疫球蛋白或抗体可以单体或多聚体形式存在，例如 IgM 抗体以五聚体的形式存在和/或 IgA 抗体以单体、二聚体或多聚体的形式存在。术语“片段”指抗体或抗体链的一部分，与完整或完全抗体或抗体链相比，它含有较
15 少的氨基酸残基。片段可以通过化学或酶处理一段完整或完全抗体或抗体链获得。片段也可通过重组方法获得。典型的片段包括 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc 和/或 Fv 片段。术语“抗原结合片段”指能结合抗原或能与完整抗体(即衍生所述片段的完全抗体)竞争结合抗原(即特异性结合)的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。

20 结合片段通过重组 DNA 技术或通过酶或化学分裂完整的免疫球蛋白产生。结合片段包括 Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, 单链和单链抗体。除了“双特异性”或“双功能”免疫球蛋白或抗体之外，免疫球蛋白或抗体被认为各自具有相同的结合位点。“双特异性”或“双功能抗体”是一种具有两个不同重/轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可通过各种方法
25 生产，包括融合杂交瘤细胞或连接 Fab' 片段。参见，如 Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny 等, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)。

此处使用的术语免疫原性指，当向受体给药时，靶蛋白或治疗部分引起免疫反应(体液或细胞免疫反应)的能力的度量。本发明涉及受检者人源化
30 抗体的免疫原性。

减少免疫原性的人源化抗体是指相对于亲本抗体，如鼠抗体，显示出

减少的免疫原性。

人源化抗体基本上保留亲本抗体的结合特性指能特异性结合抗原的人源化抗体，所述抗原被用来产生这种人源化抗体的亲本抗体识别。优选地，所述人源化抗体显示与亲本抗体相同的或基本上相同的抗原结合亲和力。

- 5 理想地，所述抗体的亲和力不少于亲本抗体亲和力的 10%，更优选地，不少于约 30%，最优选地，其亲和力不少于亲本抗体的 50%。检测抗原结合亲和力的方法是本领域公知的，包括半数最大(half-maximal)结合检测，竞争性检测和 Scatchard 分析。合适的抗原结合检测也在本申请中描述。

- “回复突变”是一种引入编码人源化抗体的核苷酸序列的突变，该突变
10 产生于与亲本抗体氨基酸相应的氨基酸(例如供体抗体，例如鼠抗体)。亲本抗体残基的某些框架残基在本发明抗体人源化的过程中可被保留，以便基本保留亲本抗体的结合特性，而同时使产物抗体的免疫原性最小化。在本发明的一个实施方式中，亲本抗体是鼠源的。例如，回复突变使人框架残基变成亲本鼠的残基。可以回复突变的框架残基的例子包括但不限于，规范残基(canonical residues)，界面填充残基(interface packing residues)，与结合位点邻近的特殊亲本残基，在“Vernier Zone”的残基(形成 CDR 停驻的平台)的残基(Foote & Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 224, 487-499)和与 CDR H3 邻近的残基。
15

- 此处使用的术语“保守改变”指构象上或抗原上基本中性的改变，与天然蛋白质相比，它们在突变体多肽的三级结构产生很小的变化，或在突变体多肽的抗原决定基上产生很小的变化。当涉及本发明的抗体或抗体片段时，保守改变意指氨基酸的替换不会导致抗体不能结合目标受体。本领域普通技术人员可预测进行哪些氨基酸取代可以使构象上或抗原上高几率地保持中性。这种教导可由例如 Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 和
25 Bowie 等 (1990) *Science* 247:1306-1310 提供。被认为影响保持构象上和抗原上中性的可能性的因素包括但不限于：(a)疏水氨基酸的取代很少有可能影响抗原性，因为疏水残基更可能位于蛋白质的内部；(b)相似的生物化学取代很少有可能影响构象，因为取代的氨基酸在结构上模拟了天然氨基酸；(c)进化保守序列的改变有可能对构象有不利影响，因为这种保守意味着氨基酸序列可能具有功能上的重要性。本领域普通技术人员使用公知检测方法能评价蛋白构象的改变，例如但不限于微量补体固定法(microcomplement
30

fixation method)(Wasserman 等(1961) J. Immunol. 87:290-295; Levine 等(1967) Meth. Enzymol. 11:928-936), 并通过使用构象依赖的单克隆抗体结合研究(Lewis 等 (1983) Biochem. 22:948-954)。

此处使用的术语“治疗组合物”指直接或间接改善疾病症状的组合物。

5 也即, 施用该组合物减轻了疾病或紊乱的至少一种症状。

当用于描述本发明的抗体时, 术语“特异性”表示本发明抗体的可变区识别并结合到一系列一个或多个受体上(即, 根据可测量的结合亲和力差异, 能从其它多肽中辨别出 LT- β -R, 尽管 LT- β -R 与该多肽之间可能存在局部的序列相同, 同源或相似性)特异性抗体可能也对其它蛋白质(如, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白 A 或在 ELISA 技术中的其它抗体)有影响, 10 通过与该抗体可变区外部序列的相互作用, 尤其在该分子的恒定区。确定本发明抗体结合特异性的筛选检测是本领域公知的且常规操作。这种检测的综合论述参见 Harlow 等(Eds.), ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL; 冷泉港实验室; 冷泉港, 纽约, 1988, 第 6 章。本发明也包括识别并结合 LT- β -R 15 的片段的抗体, 只要该抗体对 LT- β -R 有特异性。本发明的抗体可使用本领域公知的和常规操作方法产生。此处使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指一种抗体分子群, 它仅含有一种能与 LT- β -R 的特殊表位发生免疫反应或结合的抗原结合位点。单克隆抗体组合物典型地显示了对 LT- β -R 特殊表位的单一结合亲和力, 通过它进行免疫反应。为了制备直接 20 针对 LT- β -R 或其衍生物、片段、类似物或同系物的单克隆抗体, 可以使用通过连续细胞系培养提供抗体分子产物的任何技术。这种技术包括但不限于杂交瘤细胞技术(参见 Kohler & Milstein (1975) *Nature* 256:495-497); trioma 技术; 人 B 细胞杂交瘤技术(参见 Kozbor, 等(1983) *Immunol. Today* 4:72)和 EBV 杂交瘤技术来产生人单克隆抗体(参见 Cole, 等., 1985 In: 25 MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)。

实践本发明可采用人单克隆抗体, 并可通过使用人杂交瘤细胞(参见 Cote 等(1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030)或通过用体外 EB 病毒(参见 Cole 等 (1985) : MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, 30 Alan R. Liss, Inc., 77-96 页)转化人 B 细胞来产生。本发明的嵌合和人源化的单克隆抗体可通过本领域公知的重组 DNA 技术产生, 例如使用以下文献描

述的方法: PCT 国际申请 PCT/US86/02269; 欧洲专利申请 184,187; 欧洲专利申请 No. 171,496; 欧洲专利申请 No. 173,494; PCT 国际公布 WO 86/01533; 美国专利 No. 4,816,567; 欧洲专利申请 No. 125,023; Better 等(1988) *Science* 240:1041-1043; Liu 等 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu 5 等 (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun 等 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura 等 (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood 等 (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw 等 (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi 等 (1986) *BioTechniques* 4:214; U.S. Pat. No. 5,225,539; Jones 等 (1986) *Nature* 10 321:552-525; Verhoeyan 等 (1988) *Science* 239:1534 和 Beidler 等 (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060。

本发明涉及结合人 LT- β -R 的人源化单克隆抗体和利用该抗体的诊断方法, 以及它们作为治疗剂的用途。本发明进一步涉及编码所述人源化抗体的核苷酸序列, 和它们在重组细胞中的表达。更特别地, 本发明涉及来自小鼠 BHA10 的与人 LT- β -R 特异性结合的人源化抗体。 15

鼠 BHA10(mBHA10)是从被人 LT- β -R-Ig 融合蛋白免疫的鼠中分离出的一种鼠 IgG1, κ 抗体(Browning 等, *J. Immunol.* 154: 33 (1995))。它的分离和抗肿瘤性质已被描述(Browning 等 *J. Exp. Med.* 183:867 (1996))。本发明申请人根据布达佩斯协议的规定, 已将产生 mBHA10 的杂交瘤细胞系贮存于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 并给予 ATCC 保藏号 HB11795(PCT/US96/01386)。 20

申请人也已说明与各种激动剂抗 LT- β -R 抗体与 LT- β 受体的交联可使 LT- β 受体活化(即, 可模仿天然配体的效果)(PCT/US96/01386)。在各种 LT- β 受体被表达的体内肿瘤模型中, 受体活化反过来已显示抑制肿瘤的生长。 25 LT- β 受体已经显示被表达于许多癌细胞, 包括例如非小肺癌细胞(NSCLC), 结直肠癌细胞(CRC), 乳腺癌细胞以及前列腺、胃(gastric)、皮肤、胃、食道和膀胱癌细胞上。

激动剂 LT- β -R 抗体抑制的肿瘤的非限制性实例包括以下实体瘤: HT29 结肠腺癌, HT3 宫颈癌, A375 黑色素瘤, MDA-231 乳腺癌和早期结肠肿瘤。 30 因此, 此处描述的激动剂 LT- β -R 抗体, 尤其是人源化抗体, 它们的性质使得它们用于治疗需要 LT- β -R 活化和/或调变 LT- β -R/ LT- β -R 配体相互作用

的疾病，包括如治疗或减少受检者(例如人)体内瘤的增长、严重性或影响。

人源化 mBHA10 单克隆抗体包括需要基本上保留此处描述的 mBHA10 单克隆抗体结合特性的模拟分析和回复突变。

5 鼠可变区的模拟分析:

CDR 包含最有可能结合抗原的残基,并必须被保留在重构抗体中。CDR 由 Kabat 等, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, 美国健康和公共事业部, 美国政府印刷局, 1991 公开的序列限定。CDR 属于规范类型(Chothia 等, 1989 *Nature*, 342, 877-883), 其关键残基很大程度上决定 CDR 环的结构豫象。这些残基在重构抗体中几乎总是保留。mBHA10 轻链可变区的多肽序列如下所示, 根据 Kabat 编号系统用下划线标出 CDR 和残基位置序号:

```

1 DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVG INVAWYQQKP
15 41 GQSPKSLISS ASYRYSGVPD RFTGSGSGTD FTLTITNVQS
81 EDLAEYFCQQ YDTYPFTFGS GTKLEIK
(SEQ ID NO:1)

```

mBHA10 重链可变区的多肽序列如下所示, 根据 Kabat 标号系统用下划线标出 CDR 的和残基位置序号(包括粗体的氨基酸 52a(pro), 82a(ser), 82b(ser), 82c(leu), 且在位置 100 没有氨基酸):

```

1 QVQLQSGPE LVKPGASVRI SCKASGYTFT TYYLHWVKQR
aa52a
41 PGQGLEWIGW IYPGNVHAQYN EKFKGKATLT ADKSSSTAYM
aa82a-82c aa100
81 QLSSLTSEDSAIY FCARSWEGF* PYWGQGTTVT VSS
(SEQ ID NO:2)

```

25 用 FASTA 程序比较 mBHA10 的可变轻链和重链与鼠和人亚类的共有序列(Johnson, G., Wu, T. T. Kabat 数据库及其应用: 未来趋势 氨基酸研究 29, 205-206, 2001; Wu 和 Kabat, *J. Exp. Med.* 132:211-250 (1970)). mBHA10

可变轻链是鼠戥类轻链的一员，具有 63.7%、超过 113 个氨基酸的同一性，mBHA10 可变重链是鼠 IIb 亚类的一员，具有 73.2%、超过 127 个氨基酸的同一性。可变重链与人的 I 亚类相比较具有 62%、超过 129 个氨基酸的同一性。

- 5 本发明的互补决定区(CDR)划分为规范(canonical class)类。L1 环分到规范类 2(11 个残基的环)，L2 分到类 1(7 个残基)，L3 分到类 1(9 个残基)。H1 环分到类 1(5 个残基)允许 Leu34。H2 和 H3 环不属于规范类。这些类型中起重要作用的规范残基列于下表 1。

表 1
L1 类 22(I) 25(A) 29(I) 33(L) 71(Y)
L2 类 148(I) 51(A) 52(T) 64(G)
L3 类 190(Q) 95(P)
H1 类 124(A) 26(G) 27(F) 29(F) 34(M) 94(R)
H2 非规范类
H3 非规范类

10

在可变轻链和重链之间的界面上的残基已被限定(Chothia 等, 1985 *J. Mol. Biol.*, 186, 651-663)。它们通常在重构抗体中被保留。在 mBHA10 中，在界面处的个别残基是不同寻常的，即可变轻链的酪氨酸 36 和苯丙氨酸 87 以及可变重链的苯丙氨酸 91。

- 15 在 1999 年 9 月版的 Kabat 数据库[NCBI, NIH]中，通过分析所有鼠和人的可变链序列确定不同寻常的框架残基。mBHA10 特异性的差异被认为可指示体细胞突变，如果该差异接近结合位点，该突变增强了结合亲和力。轻链上发现的不同寻常的框架残基为 Y36, S49, T63 和 F87, 重链上的为 Y27, T30, I48, A67, L69 和 F91。

20 模拟可变区的结构

本发明的轻链和重链相对非-冗余数据库(non-redundant database)排列，以确定用于构建轻链和重链三维模型的结构框架。利用 BLAST，发现该轻链与鼠 Fab 片段(12E8)具有 85% 的同一性，发现该重链与鼠 IGGA2 的 Fab 片段(1PLGH)具有 81% 的同一性。利用分子模型包装 Sybyl (Tripos Inc.)，分

别用 12E8 的轻链和 1PLGH 的重链构建该轻链和重链的三维结构。在控制台(console)评估该模型的结构完整性,并发现是合理的。

重构可变区的设计

利用种系匹配选择人源受体框架以“接受”mBHA10 的 CDR(Rosok 等
5 *J. Biol. Chem* (1996) 271:22611-22618)。使用软件程序 IgBLAST 搜索来自 NCBI, ENTRZ (国家卫生研究所)种系数据库和非-丰余数据库。基于序列同一性和可能的回复突变进行人源受体框架的选择。

对可变轻链(VL),人源框架最终选自种系序列 L1/L15 和 J1(Bentley 等
(1983) *Cell* 32:181-189; Cox 等 (1994) *Eur. J. Immunol.*, 24:827-836 和
10 Heiter 等 (1982) *J. Biol. Chem.* 257:1516-1522),对可变重链(VH),选自种系序列 1-69/J6(Tomlinson 等 (1992) *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 and Mattila 等 (1995) *Eur. J. Immunol.*, 25:2578-2582)。人源 VL 和 VH 框架与鼠源序列相比,有 21 个残基不同。

人源框架的回复突变

15 在人源单克隆抗体中,最不可预料的步骤是从亲本抗体中识别需要被保留的关键框架残基(即在本实例中,亲本抗体是鼠源的),因为这些关键框架残基基本上保留了与亲本抗体的结合特性,同时使产物抗体的潜在免疫原性最小化。保留与结合位点邻近的规范残基、界面填充残基和不同寻常的鼠源残基尤为重要。此外,还要考虑“Vernier Zone”的残基(形成 CDR 停
20 驻的平台)(Foote & Winter, 1992 *J. Mol. Biol.* 224, 487-499)和与 CDR H3 接近的残基。回复到亲本抗体的突变(即从人源框架的残基回复突变到鼠源)在此处是指回复突变。

已制得重构可变轻链(VL #)的三个版本和重构可变重链(VH #)的三个版本。通常,第一版本含有最多的回复突变,第三版本包含有最少的回复
25 突变(即多数“人源化”)。本发明涉及来自 mBHA10 的人源化抗体,其含有以任意组合的选自下述可变轻链(即 VL#1,VL#2 或 VL#3)的轻链可变区和选自下述可变重链(即 VH#1, VH#2 或 VH#3)的重链可变区。

重构可变轻链的回复突变:

36F(苯丙氨酸)→ Y(酪氨酸)这是一个界面填充残基。它在可变轻链构
30 建物的 VL # 1 和 VL # 2 中从苯丙氨酸回复突变为酪氨酸,但是在可变轻链构建物的 VL # 3 中保留了苯丙氨酸。

49Y(酪氨酸) → S(丝氨酸)该位置接近 CDR，在鼠源和人源框架中都是不同寻常的。在所有三个可变轻链构建物中都从酪氨酸回复突变为丝氨酸。

63S(丝氨酸) → T(苏氨酸)该位置接近 CDR。仅在可变轻链构建物的 VL # 1 中由丝氨酸回复突变为苏氨酸。

- 5 **87Y(酪氨酸) → F(苯丙氨酸)**这是一个界面填充残基，在人源框架中是不同寻常的。在可变轻链构建物的 VL # 1 和 VL # 2 中从酪氨酸回复突变为苯丙氨酸，但在 VL#3 中保留了酪氨酸。

重构可变重链中的回复突变：

- 10 **27G(甘氨酸) → Y(酪氨酸)**这是一个在所有三个版本中回复突变为鼠残基的规范残基。

30S(丝氨酸) → T(苏氨酸)该位置接近 CDR，可影响构象。在可变重链构建物的所有三个版本中从丝氨酸回复突变为苏氨酸。

- 15 **48M(甲硫氨酸) → I(异亮氨酸)**该位置接近 CDR。在可变重链构建物的 VH # 1 和 VH # 2 中由甲硫氨酸回复突变为异亮氨酸，但在 VH # 3 中不突变。

67V(缬氨酸) → A(丙氨酸)该位置接近 CDR，在人源框架中是不同寻常的。在重链可变区构建物的 VH # 1 和 VH # 2 中由缬氨酸回复突变为丙氨酸，但在 VH # 3 中不突变。

- 20 **69I(异亮氨酸) → L(亮氨酸)**该位置接近 CDR，在人源框架中是不同寻常的。在可变重链构建物的 VH # 1 由异亮氨酸回复突变为亮氨酸，但在 VH # 2 和 VH # 3 中不突变。

91Y(酪氨酸) → F(苯丙氨酸)这是一个界面填充残基。在可变重链构建物的 VH # 1 中由酪氨酸回复突变为苯丙氨酸，但在 VH # 2 和 VH # 3 中不突变。

- 25 可变轻链和重链的不同版本的氨基酸和核苷酸序列如下：

重构可变轻链

BHA10 的重构可变轻链 - 可变轻链 - 版本 1(VL # 1)：

```

1   GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCAGTAGGAGACAGGGTCACC 60
    D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

61  ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTATTAACGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCA 120
    I T C K A S Q N V G I N V A W Y Q Q K P
                                aa36
121 GGAAGGCTCCTAAATCACTGATTTCTCGGCCTCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTTCT 180
    G K A P K S L I S S A S Y R Y S G V P S
                                aa49
181 AGATTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT 240
    R F T G S G S G T D F T L T I S S L Q P
                                aa63
241 GAAGACTTCGCAACCTATTTCTGTGAGCAATATGACACCTATCCATTCACGTTCCGGCCAG 300
    E D F A T Y F C Q Q Y D T Y P F T F G Q
                                aa87
301 GGTACCAAGGTGGAGATCAAA 321
    G T K V E I K

```

SEQ ID NO:3-代表上述重构 VL#1 的核苷酸序列。

SEQ ID NO:4-代表上述重构 VL#1 的氨基酸序列。

5

BHA10 的重构可变轻链—可变轻链-版本 2(VL#2):

```

1   GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCAGTAGGAGACAGGGTCACC 60
    D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

61  ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTATTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA 120
    I T C K A S Q N V G I N V A W Y Q Q K P
                                aa36
121 GGAAGGCTCCTAAATCACTGATTTCTCGGCCTCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTTCC 180
    G K A P K S L I S S A S Y R Y S G V P S
                                aa49
181 AGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCT 240
    R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

241 GAAGACTTCGCAACCTATTTCTGTGAGCAATATGACACCTATCCATTCACGTTCCGGCCAG 300
    E D F A T Y F C Q Q Y D T Y P F T F G Q
                                aa87
301 GGTACCAAGGTGGAGATCAAA 321
    G T K V E I K

```

SEQ ID NO:5-代表上述重构 VL#2 的核苷酸序列。

10

SEQ ID NO:6-代表上述重构 VL#2 的氨基酸序列。

BHA10 的重构可变轻链—可变轻链版本 3(VL#3):

```

1   GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCAGTAGGAGACAGGGTCACC 60
    D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

61  ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTATTAATGTAGCCTGGTTCCAACAGAAACCC 120
    I T C K A S Q N V G I N V A W F Q Q K P

121 GGGAAGGCTCCTAAATCACTGATTTCTCCTCGGCCTCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTTCT 180
    G K A P K S L I S S A S Y R Y S G V P S
                                aa49
181 AGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT 240
    R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

241 GAAGACTTCGCAACCTATTACTGTCAGCAATATGACACCTATCCATTACGTTTCGGCCAG 300
    E D F A T Y Y C Q Q Y D T Y P F T F G Q

301 GGTACCAAGGTGGAGATCAAA 321
    G T K V E I K

```

SEQ ID NO:7-代表上述重构 VL#3 的核苷酸序列。

SEQ ID NO:8-代表上述重构 VL#3 的氨基酸序列。

5

重构可变重链:

BHA10 的重构可变重链-可变重链-版本 1 (VH#1)

```

1   CAGGTCCAAGTGGTGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGGTG 60
    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V

61  TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTCACAACCTACTATTTGCACTGGGTGAGGCAGGCC 120
    S C K A S G Y T F T T Y Y L H W V R Q A
                                aa27    aa30
121 CCTGGACAGGCACTTGAGTGGATTGGATTTATCCTGGAAATGTTTCATGCTCAGTAC 180
    P G Q G L E W I G W I Y P G N V H A Q Y
                                aa48
181 AATGAGAAGTTCAGGGCAGGGCCACACTGACAGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTAC 240
    N E K F K G R A T L T A D K S T S T A Y
                                aa67    aa69
241 ATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAAGATACTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCCTGG 300
    M E L S S L R S E D T A V Y F C A R S W
                                aa91
301 GAAGGTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA 348
    E G F P Y W G Q G T T V T V S S

```

10

SEQ ID NO:9-表示上述重构 VH#1 的核苷酸序列。

SEQ ID NO:10-表示上述重构 VH#1 的氨基酸序列(Kabat 编号系统, 包括 52a 位置的脯氨酸, 82a 位置的丝氨酸, 82b 位置的丝氨酸, 82c 位置的亮氨酸和 100 位置的缺失氨基酸)。

15

BHA10 的重构可变重链—可变重链版本 2(VH#2)

```

1   CAGGTCCAAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGGTG 60
    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V

61  TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTTCAACCTACTATTTGCACTGGGTGAGGCAGGCC 120
    S C K A S G Y T F T T Y Y L H W V R Q A
                aa27      aa30
121 CCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATTTATCCTGGAAATGTTTCATGCTCAGTAC 180
    P G Q G L E W I G W I Y P G N V H A Q Y
                aa48
181 AATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACAATCACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTAC 240
    N E K F K G R A T I T A D K S T S T A Y
                aa67
241 ATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAAGATACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCCTGG 300
    M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S W

301 GAAGGTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA 348
    E G F P Y W G Q G T T V T V S S

```

SEQ ID NO:11-表示上述重构 VH#2 的核苷酸序列。

5 SEQ ID NO:12-表示上述重构 VH#2 的氨基酸序列(Kabat 编号系统, 包括 52a 位置的脯氨酸, 82a 位置的丝氨酸, 82b 位置的丝氨酸, 82c 位置的亮氨酸和 100 位置的缺失氨基酸)。

BHA10 的重构可变重链—可变重链-版本 3(VH#3)

```

1   CAGGTCCAAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGGTG 60
    Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V

61  TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACTTTTCAACCTACTATTTGCACTGGGTGAGGCAGGCC 120
    S C K A S G Y T F T T Y Y L H W V R Q A
                aa27      aa30
121 CCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGGAAATGTTTCATGCTCAGTAC 180
    P G Q G L E W M G W I Y P G N V H A Q Y

181 AATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACAATCACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTAC 240
    N E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y

241 ATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAAGATACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCCTGG 300
    M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S W

301 GAAGGTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA 348
    E G F P Y W G Q G T T V T V S S

```

10

SEQ ID NO:13-表示上述重构 VH#3 的核苷酸序列。

SEQ ID NO:14-表示上述重构 VH#3 的氨基酸序列。(Kabat 编号系统, 包括 52a 位置的脯氨酸, 82a 位置的丝氨酸, 82b 位置的丝氨酸, 82c 位置的亮氨酸和 100 位置的缺失氨基酸)。

15 用上述可变轻链和重链构建人源化 BHA10 抗体, 进一步描述见实施例 4。例如, 按照实施例 4 所述方法构建版本 4 人源化 BHA10 抗体(“版本 4 人

BHA10”), 使用含有#2 轻链的表达载体 pKJS49 结合含有#3 重链的表达载体 pKJS46。版本 4 人 BHA10 的轻链和重链的氨基酸和核苷酸序列如下所示：

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASONVG INVAWYQQKP GKAPKSLISS
      aa36      aa49
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLT I S SLQP EDFATYFCQQ YDTYPFTFGQ
      aa87
GTKVEIK{RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN
RGEC} (SEQ ID NO: 15)
```

5

上述 SEQ ID NO:15-代表版本 4 人 BHA10 的氨基酸序列。下划线部分为 CDR；粗体部分为回复突变 Y36, S49 和 F87；括号内为人κ恒定区(Kabat 编号系统)。

```
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT TYYLHWVRQA PGQGLEWMGW
      aa27 aa30
IYPGNVHAQY NEKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSWEGF
PYWGQGT TVTVSS {ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG}
(SEQ ID NO: 16)
```

10

上述 SEQ ID NO:16 表示人 BHA10 重链版本 4 的氨基酸序列。下划线部分是 CDR；粗体部分是回复突变 Y27 和 T30；括号内部分是人 IgG1 恒定区(Kabat 编号系统)。

15

其它人源化抗体包括此处描述可制得的重构轻链可变区和重链可变区的不同型。例如，可制得包括人源恒定轻链(非限定性的例子包括人κ恒定区)和人源恒定重链(非限定性的例子包括人 IgG1 恒定区)结合任一重构可变轻链(VL # 1, VL # 2 或 VL # 3)和重构可变重链(VH # 1, VH # 2 或 VH # 3)的抗体。

20

本发明进一步涉及重构 VH 和 VL 序列的等效体或变异体，如含有一个

或多个保守氨基酸的取代物，它们基本上不影响 LT- β -R 结合。含有人源可变重链和轻链序列的人源化 LT- β -R 抗体可以通过重组的方法获得，如实施例所述。

在另一实施方式中，涉及本发明抗体的免疫化学衍生物包括，例如 1) 免疫毒素(抗体和细胞毒部分的结合物)，2) 标记衍生物(即放射性标记的，酶标记或荧光标记的)，所述标记提供了鉴别包含标记抗体的免疫复合物的方法。

细胞毒部分可以是细胞毒类药物，或是细菌或植物来源的酶活性毒素，或是这种毒素的酶活性片段。这里使用的酶活性毒素和片段是白喉 A 链，白喉毒素的非结合活性片段，外毒素 A 链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))，蓖麻毒素(ricin)A 链，abrin A 链，蕨莲根毒素(modeccin) A 链， α -八叠球菌，Aleurites fordii proteins，dianthin proteins，美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI, PAPII 和 PAP-S)，momordica charantia inhibitor，麻疯树毒蛋白(curcin)，巴豆毒蛋白(croton)，sapaonaria officinalis inhibitor，gelonin，mitogellin，局限曲菌素(restrictocin)，酚霉素和伊诺霉素。选择性地，该抗体与小分子抗癌药偶联。

单克隆抗体的结合物利用各种双官能蛋白偶合剂制得。这种试剂的例子包括 SPDP, IT, 亚氨基酯类的双官能衍生物如二甲基乙二酰亚胺 HCl, 活性酯如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯，醛如戊二醛，二叠氮基化合物如二(p-叠氮苯甲酰)己二胺，二重氮基衍生物如二-(p-重氮苯甲酰)-乙二胺，二异氰酸盐如甲代亚苯基 2, 6-二异氰酸盐和二-活性氟化合物如 1,5-二氟-2,4-二硝苯基。毒素的赖氨酸(lysine)部分可与抗体的 Fab 片段连接。

治疗癌症的细胞毒放射性药品可以通过将放射性同位素(如 I, Y, Pr)结合到抗体上制得。此处使用的术语“细胞毒部分”意指包括这种同位素。在另一实施方式中，细胞毒药被装入脂质体中，脂质体被涂上特异性结合生长因子受体的抗体。由于存在很多受体位点，该方法使得大量药物传输到正确的细胞类型中。

化学改性

在一些实施方式中，本发明的抗体和抗体片段可被化学改性，以产生想要的效果。例如，本发明的抗体 PEG 化(pegylation)和抗体片段可进行任何本领域公知的 PEG 化反应，如下述参考文献中所述：Focus on Growth

Factors 3:4-10 (1992); EP 0154316; 和 EP0401384(均全文引入此处作为参考)。优选地,可通过与反应性的聚乙二醇分子(或类似的反应性水溶性的多聚体)的酰化反应或烷基化反应进行PEG化。优选的用于本发明抗体和抗体片段的PEG化的水溶性多聚体是聚乙二醇(PEG)。此处所用的“聚乙二醇”意指包括任何形式的PEG,所述PEG已被用于衍生其它蛋白质,如单(Cl-CIO)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇。

制备本发明PEG化的抗体和抗体片段的方法通常包括以下步骤:(a)在抗体或抗体片段开始连接到一个或多个PEG基团的条件下,该抗体或抗体片段与聚乙二醇,如PEG的反应性酯或醛衍生物反应,(b)获得反应产物。对于本领域普通技术人员,选择最佳的反应条件或基于已知参数和想要结果的酰化反应是明显的。

PEG化抗体或抗体片段可通常被用于治疗病症,所述病症可能被减轻或调整,通过施用这里描述的抗体和抗体片段。通常,相对于非PEG化的抗体和抗体片段,PEG的抗体和抗体片段具有增强的半衰期。该PEG化的抗体和抗体片段可以单独施用,共同施用或与其它药物组合物联合施用。

在本发明的另一实施方式中,利用本领域公知的技术将抗体或它们的抗原结合片段与清蛋白偶联。

本发明的另一实施方式中,抗体或它们的片段被改性以减少或消除潜在的糖基化作用位点。这种改性抗体通常被归为“去糖基化”抗体。为了改善抗体或其抗原结合片段的结合亲和力,可改变抗体的糖基化位点,如通过突变(如定点突变)。“糖基化位点”指被真核细胞识别的氨基酸残基,真核细胞作为糖残基连接位置。被碳水化合物,如寡糖连接的氨基酸典型地为天冬酰胺(N-结合),丝氨酸(O-结合)和苏氨酸(O-结合)残基。为了鉴别抗体或抗原结合片段中潜在的糖基化作用位点,测定该抗体的序列,如通过利用公众可获得的数据库,如由生物序列分析中心提供的网站(参见<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> 测知 N-结合糖基化作用位点)以及<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> 预测 O-结合糖基化作用位点)。其它改变抗体糖基化作用位点的方法在US专利6,350,861和5,714,350中已描述。

在本发明的另一实施方式中,抗体或它们的片段可被改变,其中抗体的恒定区域被改性,使得相对于非改性抗体,至少一个恒定区-介导的生物

学效应功能减弱。为了修饰本发明的抗体,使得它表现出减弱的与Fc受体的结合力,该抗体免疫球蛋白的恒定区部分可在特定的对Fc受体(FcR)相互反应必需的区域突变(参见,如Canfield, S.M.和S.L. Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483-1491; 和Lund, J. 等 (1991) *J. of Immunol.* 147:2657-2662)。

- 5 抗体FcR结合力的减少也可减少依赖FcR相互反应的其它效应功能,如调理作用和吞噬作用和抗原依赖性细胞毒作用。

用途

本发明的抗体和标记抗体可用于各种免疫成像或免疫测定步骤,用来检测患者体内癌症的存在,或监控已诊断有癌症的患者体内癌症的状态。

- 10 当用来监控癌症状态时,需使用定量免疫测定方法。如果周期性进行这种监控检测,并比较结果,可确定出关于患者肿瘤负荷的增加或减少。通常施用的检测技术包括直接和间接分析。如果样品包括癌细胞,标记抗体会结合到这些细胞上。冲洗组织或细胞,除去非结合标记抗体,可读出该组织样品中标记的免疫复合物的存在。在间接检测中,组织或细胞样品与非
- 15 标记单克隆抗体培养。然后用抗单克隆抗体的标记抗体(如,标记的抗鼠源抗体)处理样品,清洗,读出三元络合物的存在。

对于诊断应用,该抗体典型地以试剂盒形式分配。这些试剂盒典型地包括:在适当容器中的标记或非标记形式的抗体,间接检测需要的温育试剂,和依赖标记性质的底物或衍生试剂。

- 20 在另一实施方式中,本发明的抗体具有治疗疾病或病症的用途,所述疾病或病症中,LT- β -R的活化作用在治疗上是有利的。这种病症包括但不限于治疗、预防或减少肿瘤的发展、严重性或影响。

- 25 本发明的一个实施方式为治疗哺乳动物(即人)体内与不希望有的细胞增值相关的病症的方法,通过向哺乳动物施用治疗有效量的包含本发明人源化LT- β -R抗体的组合物。

- 30 本发明的另一实施方式提供了一种治疗哺乳动物(即人)体内过量表达LT- β -R实体瘤(即癌)的方法,包括向所述哺乳动物施用有效量的结合LT- β -R的人源化LT- β -R抗体,以减少肿瘤体积。癌细胞的增殖由LT- β -R调整的例子可通过体外测量LT- β -R水平和/或表达在肿瘤组织文库中的LT- β -R配体(即LT α 1 β ₂或LIGHT)的信息来筛选。本发明涉及的肿瘤类型包括但不限于非小细胞肺癌(NSCLC),结肠直肠癌(CRC),乳腺癌以及前列腺、胃、

皮肤、胃、食道和膀胱癌。

本发明的人源化抗体用于治疗与不希望有的细胞增殖相关病症，尤其是肿瘤治疗，它有利地抑制了肿瘤生长，例如经检测肿瘤体积减少，约 10%，20%，30% 或 40%以上，最好约 50% 以上。通过筛选获得该人源化抗体(参见，如实施例 10 的论述)。例如，本发明的人源化抗体可基于减少的肿瘤体积相对于处理的癌细胞的比值来筛选(如大于约 10%，20%，30%，40% 或 50%)。

本发明也提供了包含本发明人源化抗体和药学可接受赋形剂的药物组合物。适当的载体，以及它们的剂型公开于 Remington' Pharmaceutical Sciences,第 16 版, 1980, Mack Publishing Co., Oslo 等出版。用于该剂型的典型的药学可接受的盐 可使得该剂型等渗。载体的实例包括缓冲液例如盐水、Ringer 溶液和葡萄糖溶液。溶液的 pH 优选约 5-约 8，更优选约 7.4-约 7.8。进一步，载体包括持续释放制剂，如固体疏水聚合体的半透性基质，该基质是成形的物质形式，如脂质体，薄膜或微粒。对本领域技术人员明显的是，一些载体可更优选使用，根据如给药途径和施用的药物组合物浓度。

可通过注射(如静脉、腹膜、皮下、肌肉)完成给药，或通过其它方法例如确保以有效形式传到血流中的灌输法。

本发明的人源化抗体可以有效剂量给药，来治疗特殊的临床病症(即减轻或消除患者肿瘤负荷的量)。它们通常是肠道外给药，如果可能，在靶细胞位点或静脉内给药。对给定的应用确定优选的药物剂型和治疗有效量标准是本领域技术人员公知的。该剂量和剂量方案是基于病症的性质(即癌的性质)，特殊免疫毒素(如果使用)的性状，例如它的治疗指数，患者和患者的病史。有效量的范围在例如约 0.05 至约 100 mg/kg 体重/天。更优选，约 0.05mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1mg, 2 mg, 3 mg, 4mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg 或 25 mg/kg 体重/天。或者约 0.05 至约 100 mg，更优选，约 0.05mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1mg, 2 mg, 3 mg, 4mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg 或 25 mg/kg 体重/周。或者约 0.05 至约 100 mg，更优选，约 0.05mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1mg, 2 mg, 3 mg, 4mg, 5 mg, 6

mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg 或 25 mg/kg 体重/2 周。或者约 0.05 至 约 100 mg, 更优选, 约 0.05mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1mg, 2 mg, 3 mg, 4mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg 或 25 mg/kg 体重/3 周。或者约 0.05 至 约 100 mg, 更优选, 约 0.05mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1mg, 2 mg, 3 mg, 4mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg 或 25 mg/kg 体重/4 周。

另一实施方式中, 处理肿瘤细胞, 通过 1)给患者施用本发明的人源化抗体和 2)化学治疗剂。化学治疗剂的实例包括但不限于顺铂, 红豆杉醇 (taxol), camptosar, 羟基柔红霉素(dox), 5-FU, gemcitabine, DM-1 (来自 Immunogen), 长春花碱, 放线菌素 D, 表鬼白毒吡喃葡萄糖苷, 氨甲喋呤和阿霉素。本领域普通技术人员会考虑到一些变量, 以确定治疗剂方案和个体的给药剂量, 包括如, 给药途径和患者的临床病症。在一个实施方式中, 本发明的抗体被设计在化学治疗剂或放射治疗存在下给药。在另一实施方式中, 按照与化学疗法或放射治疗联合使用的说明配制和包装本发明抗体, 或与化学疗法或放射治疗联合使用销售或宣传本发明抗体。

除非另有说明, 本发明实例使用本领域技术人员公知的常规细胞生物学、细胞培养、微生物、重组 DNA、蛋白质化学和免疫学技术。这些技术在文献中都有公开。参见如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版 (Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编), 冷泉港实验室印刷, 1989; *DNA Cloning*, 卷 I 和 II (D.N. Glover 编), 1985; *Oligonucleotide Synthesis*, (M.J. Gait 编), 1984; U.S. 专利 No. 4,683,195 (Mullis 等.); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames 和 S.J. Higgins, 编), 1984; *Transcription and Translation* (B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编), 1984; *Culture of Animal Cells* (R.I. Freshney 编). Alan R. Liss, Inc., 1987; *Immobilized Cells and Enzymes*, IRL Press, 1986; *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal), 1984; *Methods in Enzymology*, 卷 154 和 155 (Wu 等编), 学术出版社, 纽约; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller 和 M.P. Calos 编), 1987, 冷泉港实验室; *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer 和 Walker, 编), 学术出版社, 伦敦, 1987; *Handbook of Experiment Immunology*, 卷 I-IV (D.M. Weir 和 C.C. Blackwell 编), 1986; *Manipulating the Mouse*

Embryo, 冷泉港实验室印刷, 1986。

以下实施例用来说明本发明, 不应作为对本发明的限制。

实施例

5 实施例 1: *muBHA10* 可变区的克隆:

使用 Qiagen Rneasy 小型试剂盒由 BHA10 小鼠杂交瘤细胞(ATCC 保藏号 HB-11795)制备全细胞 RNA, 根据厂商推荐的步骤。编码重链和轻链可变区的 cDNA 由全细胞 RNA 克隆, 通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR), 第一股 cDNA 使用 GIBCO BRL 上标前置放大系统 (SuperScript Preamplification System), 根据厂商推荐的步骤, 由随机六聚体启动。

用于鼠 BHA10 免疫球蛋白重链可变区 PCR 扩增的引物是: 5' TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGC CCT TGG CCC C 3' (SEQ ID NO: 17) 和 5' AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G 3' (S=C/G, M=A/C, R=A/G, W=A/T) (SEQ ID NO: 18)。含有信号序列的该 BHA10 轻链可变区由以下引物扩增:

15 5' ACT AGT CGA CAT GGG CWT CAA GAT GGA GTC ACA K WY YCW GG 3' (K=G/T, W=A/T, 和 Y=C/T) (SEQ ID NO: 19) , 5' GTT AGA TCT CCA GCT TGG TCC C 3' (SEQ ID NO: 20)。PCR 在 94℃进行 3 分钟热启动, 然后用 Clontech 的 AdvanTaq DNA 聚合酶循环 35 次: 在 94℃变性 1 分钟, 50℃退火 1 分钟, 68℃延伸 2 分钟, 然后最后在 68℃延伸 7 分钟。使用 Qiagen

20 Qia 快速凝胶提取试剂盒凝胶-纯化 PCR 产物, 根据厂商推荐的步骤。纯化的 BHA10 PCR 产物被亚克隆到 Invitrogen 的 pCR2.1-TOPO 克隆载体上, 利用它们的 TOPO TA 克隆试剂盒, 根据厂商推荐的步骤。重链 RT-PCR 亚克隆被命名为 pAND138。轻链 RT-PCR 亚克隆被命名为 pAND145。来自多个独立亚克隆的插入片段被测序。除了 PCR 引物中简并位置, 独立亚克隆的

25 插入片段的序列是相同的。被 cDNA 序列从被信号序列扩增的 PCR 产物预测的成熟轻链的 N 端氨基酸序列恰好与来自 Edman 降解(DIVMTQSQKF) (SEQ ID NO: 21)的纯化真实的 BHA10 轻链的 N 端氨基酸相匹配。成熟重链残基 1-16 的预期序列与由 (deblocked) 纯化的 BHA10 重链 ([Q] VQLQQSGPELVKPGA) (SEQ ID NO: 22)的 Edman 降解确定的相匹配。

30 可变区序列的 Blast 分析证实了它们的免疫球蛋白的同一性(identity)。BHA10 的重链可变区是鼠亚类 II(B)的一员。Tucker 等 *Science*

206:1299-1303 (1979)。BHA10 轻链可变区是小鼠 κ 亚类(subgroup)I 的一员。Kabat 等(1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest. 第 5 版, 美国健康与公共事业部。BHA10 小鼠轻链可变区和重链可变区的预测氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 1 和 2 中显示。

5

实施例 2: chBHA10 的构建与表达:

编码小鼠 BHA10 重链和轻链可变区的 cDNA 被用来构建表达小鼠-人嵌合体(chBHA10)的载体, 所述嵌合体中鼠 BHA10 的可变区与人 IgG1(Ellison 等 (1982) Nucleic Acids Res. 10:4071-4079) 和 κ 恒定区(Heiter 等 (1980) Cell 22:197-207)连接。为了构建重链嵌合体, 来自 BHA10 重链亚克隆 pAND138 的 0.32 kb 的部分 PstI-BstEII 片段被亚克隆到来自 5a8 重链质粒 pLCB7 (5a8 是一种分子水平上克隆的 CD4-特异性的 mAb - ATCC 保藏号 HB-10881))脱去磷酸的 2.82kb PstI-BstEII 的载体片段上, 以在 5'端加入小鼠重链信号序列, 在鼠 BHA10 重链可变区的 3'端加入剪接供体部位。该质粒称为 pAND146, 其重链成熟 N 端被重构, 使得与纯化的真正的 BHA10 重链的 N 末端序列(QVQLQSGP) (SEQ ID NO: 23)相匹配。合成的质粒 pAND146 中的重链序列由 DNA 序列测定证实。含有人 IgG1 恒定区的来自质粒 pAND146 的 0.43kb 的 NotI-HindIII 重链可变区和来自质粒 pEAG964 的 1.21kb 的 HindIII-NotI 片段被亚克隆到 pCEP4 (Invitrogen) EBV 表达载体-衍生质粒 pCH269 的 NotI 位点, 产生质粒 pAND147。

为了构建轻链嵌合体, 来自 BHA10 轻链可变区质粒 pAND145 的 0.42kb 的 EcoRI 片段被亚克隆到线性化的, 磷酸化的 pUC-衍生克隆载体 pNN09 的 EcoRI 位点。该步骤在合成的质粒 AND149 中, 加入了侧翼 NotI 位点。质粒 pAND149 中的轻链序列由 DNA 的测序确定。含有人 κ 轻链恒定区的来自 pAND149 的 0.45 kb NotI-BglII 轻链可变区片段和来自质粒 pEAG963 的 0.68 kb BclI-NotI 片段被亚克隆到 pCEP4 (Invitrogen) EBV 表达载体-衍生质粒 pCH269, 产生质粒 pAND151。

表达载体(chBHA10 重链载体 pAND147 和 chBHA10 轻链载体 pAND151)被联合转染到 293-EBNA 细胞, 检测转染细胞的抗体分泌和特异性。空载体-转染细胞, 或用 EBV 表达载体联合转染表达 hu5c8(分子水平上克隆的 CD154-特异性 mAb)的细胞, 以及 huCBE11 的细胞(LT- β -R-特异性

mAb(已给予 ATCC 专利保藏号 PTA-3357))作为对照。来自全细胞溶解产物和条件培养基的蛋白质 A 免疫沉淀反应的蛋白质印迹分析(用抗-人源重链和轻链抗体显色)证明嵌合 BHA10-转染细胞合成和有效分泌抗体重链和轻链的水平与 hu5c8-或 huCBE11-转染细胞相似。来自转染细胞的 LT- β -R 表达 HT-29 细胞条件培养基染色的 FACS 分析证明,嵌合 BHA10 抗体结合和产生的染色图谱与 muBHA10 和 huCBE11 的相似,而来自模拟的和 hu5c8-转染细胞的条件培养基缺少 LT- β -R 在 HT-29 细胞上的染色。从大规模瞬时转染产生的嵌合 BHA10 被纯化,并被证明 LT- β -R 在 HT-29 细胞上染色,其表现 Kd 值(apparent k_d)明显地高于 huCBE11 大约两倍,与检测的 muCBE11 和 muBHA10 的相对亲和力相一致(Browning 等, *J. Exp. Med.* 183:867, 1996)。

实施例 3 : 重构 BHA10 可变区的构建:

BHA10 的轻链可变区与人 κ I (Hieter 等 (1980) *Cell* 22:197-207) 相应,重链可变区与人重链亚类 I(Ellison 等 (1982) *Nucleic Acids Res.* 10:4071-4079)相应。使用程序 IgBLAST 通过与人的种系序列进行同源匹配来选择人源受体框架 Sato 等 *Mol. Immunol.* 31:371-381 (1994):人 L1/L15/J1 (Bentley 等 (1983) *Cell* 32:181-189; Cox 等 (1994) *Eur. J. Immunol.*, 24:827-836 和 Heiter 等 (1982) *J. Biol. Chem.* 257:1516-1522) 对于轻链,和人 1-69/J6 (Tomlinson 等 (1992) *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 和 Mattila 等 (1995) *Eur. J. Immunol.*, 25:2578-2582) 对于重链。设计各重构可变轻链和可变重链的三个版本。通常第一个版本包含最多的回复突变的鼠源供体序列,第三个模型含有最少的鼠源供体序列(即最多“人源化”)。

BHA10 可变区是通过结合单一位点消除(USE)和快速突变构建的,快速诱变使用 Clontech 的转化突变和 Stratagene 的快速突变试剂盒(Stratagene's Quikchange mutagenesis kits),根据厂商推荐的步骤进行。嵌合 BHA10 可变区质粒 pAND146 和 pAND149 被用作起始模板。用于框架改变的诱变引物(FR)如下所述。使用人源受体框架的 cDNA 序列,通过沉默突变引入,以产生限制性位点改变,使得易于识别突变质粒。突变质粒通过筛选引物的限制性位点改变来识别。合成质粒的可变区 cDNA 序列由 DNA 测序确定。

基于质粒的各种 BHA10 和相应的表达载体在下表 2 中描述。

重构可变重链(VH)

可变重链(版本 1)最初突变通过 USE 突变, 使用 pAND146 模板, 该模板带有去除了 StuI 限制性位点的框架 2(FR2)引物 5' GCA CTG GGT GAG
5 GCA GGC CCC TGG ACA GGG ACT TG 3' (SEQ ID NO: 24), 产生了质粒 pKJS030。该质粒随后进行两轮快速突变(Quikchange mutagenesis), 使用寡
对 5' CCC AGG TCC AAC TGG TGC AGT CTG GAG CTG AGG 3' (SEQ ID
NO: 25)和它的框架 1(FR1)的互补体(Complement)和 5' GAA GTT CAA GGG
CAG GGC CAC ACT GAC AGC AGA CAA ATC CAC CAG CAC AGC CTA
10 CAT GGA GCT CAG CAG CCT GAG GTC TGA AGA TAC TGC GGT CTA
TTT CTG TGC AAG ATC C 3' (SEQ ID NO: 26)和它的框架 3(FR3)的互补
体, 每对删除 PstI 位点。合成的重构可变重链(VH # 1)质粒标记为 pKJS036。

可变重链(版本 2)使用经单轮 USE 突变的 pAND146 模板, 使用删除
EcoRV 和 PstI 位点的框架 1 引物 5' CAG GTC CAA CTG GTG CAG TCT
15 GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCA GTG AAG GTG TCC
TGC AAG GC 3' (SEQ ID NO: 27); 删除 StuI 位点的框架 2 引物 5' GCA CTG
GGT GAG GCA GGC CCC TGG ACA GGG ACT TG 3' (SEQ ID NO: 28); 产
生 SacI 位点的框架 3 引物 5' GAA GTT CAA GGG CAG GGC CAC AAT CAC
TGC AGA CAA ATC CAC CAG CAC AGC CTA CAT GGA GCT CAG CAG
20 CCT GAG GTC TGA AGA TAC TGC GGT CTA TTA CTG TGC AAG ATC C
3' (SEQ ID NO: 29)。合成的重构可变重链(VH # 2)质粒标记为 pKJS031。

可变重链(版本 3)最初突变通过 USE 突变, 使用 pAND146 模板, 该模
板带有删除了 EcoRV 和 PstI 位点的框架 1 引物 5' CAG GTC CAA CTG GTG
CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCA GTG AAG
25 GTG TCC TGC AAG GC 3' (SEQ ID NO: 30), 和产生 SacI 位点的框架 3 引物
5' GAA GTT CAA GGG CAG GGT CAC AAT CAC TGC AGA CAA ATC
CAC CAG CAC AGC CTA CAT GGA GCT CAG CAG CCT GAG GTC TGA
AGA TAC TGC GGT CTA TTA CTG TGC AAG ATC C 3' (SEQ ID NO: 31),
产生质粒 pKJS032。质粒 pKJS032 然后被用来作为快速突变(Quikchange
30 mutagenesis)的模板, 使用框架 2 引物对 5' GGC CCC TGG ACA GGG ACT
TGA GTG GAT GGG ATG GAT TTA TCC TGG 3' (SEQ ID NO: 32)和它的互

补体, 导致 HpaII 位点缺失。合成的重构可变重链(VH # 3)质粒被标记为 pKJS037。

人 BHA10 重链的表达载体如下制备: 将来自 pKJS036, pKJS031 或 pKJS037 的 0.425kb NotI-HindIII 重链可变区框架和来自质粒 pEAG964 含有人 IgG1 恒定区的 1.21kb HindIII-NotI 片段亚克隆到 pCEP4 EBV 表达载体-
5 衍生的质粒 pCH274 的 NotI 位点, 产生重链表达载体 pKJS044(重链 # 1 表达载体), pKJS045(重链 # 2 表达载体)和 pKJS046(重链#3 表达载体)。

重构可变轻链 (VL)

可变轻链(版本 1)最初在模板质粒 pAND149 上经 USE 突变, 用框架 1
10 引物 5' GAT GGA GAC ATT CAG ATG ACC CAG TCT CCT AGC TCC CTG
TCC GCC TCA GTA GGA GAC AGG GTC ACC ATC ACC TGC AAG GC 3'
(SEQ ID NO: 33), 引入 XmaI 位点的框架 2 引物 5' GTA GCC TGG TTC CAA
CAG AAA CCC GGG AAG GCT CCT AAA TCA C 3' (SEQ ID NO: 34), 引入
XbaI 位点的 5' 框架 3 引物 5' CAG TGG AGT CCC TTC TAG ATT CAC
15 AGG CAG 3' (SEQ ID NO: 35), 和引入 PstI 位点的 3' 框架 3 引物 5' CTC
ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAC TTC GCA ACC TAT TTC
TGT CAG C 3' (SEQ ID NO: 36)。合成的质粒标记为 pKJS033。质粒 pKJS033
含有框架 2 内不需要的残基, 因而使用第二框架 2 引物对 5' GGG TAT TAA
TGT AGC CTG GTA TCA ACA GAA ACC AGG GAA GGC TCC 3' (SEQ ID
20 NO: 37) 和它的互补体进行快速突变, 去除了 XmaI 位点并加入了 BclI 位
点。质粒 pKJS033 也经一轮附加快速突变, 使用框架 4 引物对 5' CCT ATC
CAT TCA CGT TCG GCC AGG GTA CCA AGG TGG AGA TCT AAC AAG
GGC G 3' (SEQ ID NO: 38)和它的互补体, 引入单一 KpnI 位点。这些反应产
生了质粒 pKJS038。质粒 pKJS038 中包含框架 2 内的错误, 因而使用第三
25 框架 2 引物对 5' CCC TGG TTT CTG TTG ATA CCA GGC AAC GTT AAT
ACC CAC 3' (SEQ ID NO: 39) 及其互补体进行一轮附加的快速突变, 导致
BclI 位点缺失。合成的重构可变轻链(VL # 1)标记为 pKJS051。

可变轻链版本 2 最初在模板质粒 pAND149 上经 USE 突变, 使用框架 1
引物 5' GAT GGA GAC ATT CAG ATG ACC CAG TCT CCT AGC TCC CTG
30 TCC GCC TCA GTA GGA GAC AGG GTC ACC ATC ACC TGC AAG GC 3'
(SEQ ID NO: 40), 加入 XmaI 位点的框架 2 引物 5' GTA GCC TGG TTC CAA

CAG AAA CCC GGG AAG GCT CCT AAA TCA C 3' (SEQ ID NO: 41), 加入 XbaI 位点的 5' 框架 3 引物 5' CAG TGG AGT CCC TTC TAG ATT CAG CGG CAG TGG ATC 3' (SEQ ID NO: 42), 和加入 PstI 位点的 3' 框架 3 引物 5' CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAC TTC GCA ACC TAT TTC TGT CAG C 3' (SEQ ID NO: 43)。得到的质粒标记为 pKJS034。质粒 pKJS034 包含框架 3 和框架 2 中不需要的突变。通过连续数轮的快速突变, 使用删除了 PstI 位点的新的 3' 框架 3 引物对 5' GCT GAC AGA AAT AGG TTG CGA AGT CTT CAG GCT GGA GGC TGC TGA TGG 3' (SEQ ID NO: 44)及其互补体; 和删除了 XbaI 位点的新的 5' 框架 3 引物 5' GGT ACA GTG GAG TCC CTT CCA GAT TCA GCG GCA GTG GAT CTG GG 3' (SEQ ID NO: 45)及其互补体, 质粒 pKJS034 中的框架 3 突变被修正。pKJS034 中框架 2 的错误然后被另一轮突变来修正, 使用引物对 5' GGG TAT TAA TGT AGC CTG GTA TCA ACA GAA ACC AGG GAA GGC TCC 3' (SEQ ID NO: 46)及其互补体, 该引物对删除了 XmaI 位点并加入 BclI 位点。质粒 pKJS034 然后经受最后一轮的快速突变, 使用引入 KpnI 位点的框架 4 引物对 5' CCT ATC CAT TCA CGT TCG GCC AGG GTA CCA AGG TGG AGA TCT AAC AAG GGC G 3' (SEQ ID NO: 47)及其互补体, 合成的重构可变轻链(VL # 2)质粒标记为 pKJS039。

可变轻链版本 3 最初在模板质粒 pAND149 上经 USE 突变, 使用框架 1 引物 5' GAT GGA GAC ATT CAG ATG ACC CAG TCT CCT AGC TCC CTG TCC GCC TCA GTA GGA GAC AGG GTC ACC ATC ACC TGC AAG GC 3' (SEQ ID NO: 48), 引入 XmaI 位点的框架 2 引物 5' GTA GCC TGG TTC CAA CAG AAA CCC GGG AAG GCT CCT AAA TCA C 3' (SEQ ID NO: 49), 引入 XbaI 位点的 5' 框架 3 引物 5' CAG TGG AGT CCC TTC TAG ATT CAG CGG CAG TGG ATC 3' (SEQ ID NO: 50), 和引入 Pst I 位点的 3' 框架 3 引物 5' CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAC TTC GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA TAT G 3' (SEQ ID NO: 51), 产生 pKJS035。质粒 pKJS035 经单轮快速突变, 使用引入新 KpnI 位点的框架 4 引物对 5' CCT ATC CAT TCA CGT TCG GCC AGG GTA CCA AGG TGG AGA TCT AAC AAG GGC G 3' (SEQ ID NO: 52)及其互补体。合成的重构可变轻链(VL # 3)质粒标记为 pKJS040。

人 BHA10 轻链的表达载体如下制备：将含有人胚膜春愕口 睦醋
ÔpKJS051, pKJS039 或 pKJS040 的 0.453 kb NotI-BglII 轻链可变区片段和
来自质粒 pEAG963 的 0.678 kb BclI-NotI 片段，亚克隆到 pCEP4 EBV 表达
载体-衍生的质粒 pCH274 的 NotI 位点，产生轻链表达载体 pKJS048(轻链
5 # 1 表达载体), pKJS049(轻链 # 2 表达载体)和 pKJS050(轻链 # 3 表达载体)。

实施例 4: 重构人源化 BHA10 抗体(版本 1, 2, 3 和 4)的构建与表达:

将上述各种表达载体配对，列于下述表 2，并联合转染到 293-EBNA 细
胞中。版本 1 的人 BHA10 含有 pKJS44 对(重链 # 1 表达载体)和 pKJS48(轻
10 链 # 1 表达载体); 版本 2 的人 BHA10 含有 pKJS45 对(重链 # 2 表达载体)
和 pKJS49(轻链 # 2 的表达载体); 版本 3 的人 BHA10 含有 pKJS46 对(重链
3 表达载体)和 pKJS50(轻链 # 3 的表达载体); 版本 4 的人 BHA10 含有
pKJS46 对(重链 # 3 的表达载体)和 pKJS49(轻链 # 2 表达载体)。所述载体联
合转染到 293-EBNA 细胞中，检测这些转染细胞的抗体分泌和特异性。条
15 件培养基的蛋白质印迹分析(检测抗-人重链和轻链抗体)证明了与嵌合
BHA10-转染细胞相比，人 BHA10-转染细胞具有相似的合成和有效分泌重
链与轻链的水平。来自转染细胞的条件培养基染色的 LT-β-R-表达 HT-29 细
胞的 FACS 分析证明了版本 3 人 BHA10 mAb 结合少于与嵌合 BHA10 相似
的版本 2 人 BHA10(图 3)。混合和竞争联合转染暗示，这种减少起因于版本
20 3 的可变轻链(VL # 3)(图 2)与版本 2 的可变轻链的两个框架残基：残基 36
和 87 的不同。然后，版本 4 人 BHA10 通过将 pKJS46(重链 # 3 表达载体)
和 pKJS49(轻链 # 3 表达载体)配对来构建。

用嵌合 BHA10 和人 BHA10 版本 1-4 对 293-EBNA 细胞的联合转染按
比例增加，并收获培养基。在蛋白质 A-琼脂糖上纯化抗体，分析纯化的 mAbs
25 的活性。结合淋巴毒素-β的受体通过细胞系 HT29 的蛋白质 A-纯化抗体的
FACS 分析来确定。

实施例 5: IL-8 - A375 细胞上的激动作用:

A375 细胞以 10^5 /ml 涂布于 96 孔板上，该板含有可溶性抗体或捕获了
30 山羊抗人 IgG Fc 的抗体(Jackson 免疫研究实验室)。培养板过夜培养。以图
1 显示的指定浓度测定来自用 BHA10 变异体转染的 293-E 细胞的蛋白质-A

纯化抗体。蛋白质 A 纯化的 hu-CBE11 用来作为阳性对照。A375 细胞上的 IL-8 激动作用(agonism)显示于图 1。生物活性的排列顺序为嵌合 BHA10 = 版本 4 人 BHA10 = 版本 2 人 BHA10 > 版本 3 人 BHA10。因为版本 4 人 BHA10 比版本 2 更加人源化, 所以它被选择为产生稳定的 CHO 细胞系。

5

实施例 6: 版本 4 人 BHA10 的稳定的 CHO 表达载体的构建:

人 BHA10 版本 4 的 EBV 表达载体(轻链 # 2 表达载体: pKJS049; 重链 # 3 表达载体: pKJS046)被联合转染到 293-EBNA 细胞中, 检测转染细胞的抗体分泌。条件培养基的蛋白质印迹分析证实转染细胞的合成和有效分泌重链和轻链。EBV 载体含有外来的 5'和 3'UTR 和分离免疫球蛋白可变区和恒定区的内含子, 稳定的 CHO 表达载体需要 cDNA。因此 cDNA 由 RT-PCR 克隆。

来自瞬时联合转染人 BHA10 表达细胞的全细胞 RNA 用 Qiagen Rneasy 小型试剂盒制备, 根据厂商推荐的步骤。编码重链和轻链的 cDNA 从全细胞 RNA 由 RT-PCR 克隆, 使用 Amersham-Pharmacia 第一链 cDNA 合成试剂盒, 根据厂商推荐的步骤, 利用 5' CGG ATC CTC AAC CGG GAG ACA GGG AGA GGC T 3' (SEQ ID NO: 53)启动重链和 5' CGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA A 3' (SEQ ID NO: 54)启动轻链。对于人 BHA10 免疫球蛋白重链 cDNA 的 PCR 扩增, 使用的引物是 5' GCT AGC GGA TCC ACC ATG GAC TGG ACC TGG 3' (SEQ ID NO: 55)(加入 BamHI 位点和紧靠起始物甲硫氨酸 5'端的 ACC, 加入 Kozak 信号)和 5' CGG ATC CTC AAC CGG GAG ACA GGG AGA GGC T 3' (SEQ ID NO: 56)(基因水平上删除了重链 C 端赖氨酸残基并加入紧靠终止密码子 3'端的 BamHI 位点)。人 BHA10 免疫球蛋白轻链 cDNA 的 PCR 扩增引物是 5' CCC TTA GGA TCC ACC ATG GGC TTC AAG ATG GAG 3' (SEQ ID NO: 57)(加入 BamHI 位点和紧靠起始物甲硫氨酸 5'端的 ACC, 加入 Kozak 信号)和 5' CGG ATC CCT AAC ACT CTC CCC TGT TGA A 3' (SEQ ID NO: 58)(加入紧靠终止密码子 3'端的 BamHI 位点)。cDNA 在 95℃经 2.5 分钟的 PCR 热启动; 用 Advantage TaqDNA 聚合酶(Clontech)循环 10 次: 在 94℃变性 0.5 分钟, 55℃退火 0.75 分钟, 68℃延伸 1 分钟; 然后在 68℃最终延伸 5 分钟。第二次扩增使用初反应液中取出的 10μl 样品和 Pfu DNA 聚合酶(Stratagene): 94℃变性 0.5 分钟, 50℃退

火 0.75 分钟, 72℃延伸 1 分钟, 然后在 72℃最终延伸 10 分钟。PCR 产物用 Qiagen Qiaquick 凝胶提取试剂盒进行凝胶纯化, 根据厂商推荐的步骤。纯化的 PCR 产物亚克隆到 Invitrogen 的 pCR4TOPO 克隆载体上, 根据厂商推荐的步骤。纯化的 PCR 产物亚克隆到 Invitrogen 的 pCR4TOPO 克隆载体上, 根据厂商推荐的 TOPO 克隆步骤。多个单独亚克隆的插入片段被测序。确定为轻链 cDNA 亚克隆的序列标记为 pKJS072。确定为重链 cDNA 亚克隆的序列标记为 pKJS071。

来自 pKJS072 的 726bpBamHI 轻链 cDNA 片段被亚克隆到来自 hu5c8 轻链表达载体 pXLC2 的磷酸化的 6.19kbBamHI 载体片段上, 制备含有 neo- 的人 BHA10 轻链表达 pKJS077(图 3)。该质粒含有 BHA10 的版本 4 的轻链和新霉素抗性基因。该轻链表达盒含有人 CMV 立即早期启动子和第一个内含子(包含小的缺失), 以及人生长激素多聚腺苷化序列。

类似的, 来自 pKJS071 的 1404bpBamHI 重链 cDNA 片段被亚克隆到磷酸化的 BamHI-线性化化 pV80 上, 制备含有 dhfr 的人 BHA10 重链载体 pKJS078(图 5)。该质粒含有 BHA10 版本 4 的重链和 dhfr 基因。重链表达盒包含人 CMV 立即早期启动子和第一内含子(包含小的缺失)以及人生长激素多聚腺苷化序列。dhfr 表达盒含有 SV40 早期启动子和 SV40 多聚腺苷化序列。

表达载体被联合转染到 COS 细胞中, 检测转染细胞的抗体分泌和特异性(空载体或 M92 载体作为阴性对照)。条件培养基的蛋白质印迹分析(随着抗人-重链和轻链抗体显色)证明了转染细胞合成并有效分泌重链和轻链, 在 FACS 分析中, 来自人 BHA10 转染细胞的条件培养基特异性染色了表达 LT-β-R 的 HT-29 细胞。

25 实施例 7 : 表达版本 4 人 BHA10 的 CHO 细胞系:

表达版本 4 人 BHA10 的质粒 pKJS077 和 pKJS078 被转染到 CHO 细胞中。

实施例 8 : 抗体亲和力测定:

30 用含有 5mM EDTA 的 PBS 处理 30 分钟以获得 HT29 细胞, 然后剧烈搅动。细胞被分布到圆底 96 孔板内, 以 2.5×10^5 细胞/孔的密度。按照指定

的稀释度将 BHA10 变异体转染的 293-E 细胞上清液加到孔中, 总体积为 100 μ l, 4 $^{\circ}$ C 培养 1 小时。用 FACS 缓冲液(含有 5% FBS 的 PBS)清洗孔两次, 用 1:100 稀释度的 PE-结合抗人重链和轻链抗体(Jackson 免疫研究实验室)培养 1 小时。然后用 FACS 缓冲液清洗细胞 3 次, 并重悬于 100 μ l 含有 1.0% 多聚甲醛的 PBS 中。然后转移样品到 FACS 中便于分析。以图 2 显示的指示浓度, 测定来自 BHA10 变异体转染的 293-E 细胞的蛋白质 A 纯化抗体。分别用蛋白质 A-纯化的 CBE11 和 5C8(抗 CD40L 抗体)的研究曲线作为阳性和阴性对照。结合亲和力的排列顺序为嵌合 BHA10 = 版本 4 人 BHA10 = 版本 2 人 BHA10 > 版本 3 人 BHA10。

10

实施例 9: *WiDr* 细胞的细胞毒性:

用 *WiDr* 结肠癌细胞检测细胞毒性, 利用抗人 IgG Fc 包被孔上的可溶抗-LT- β -R 抗体证明本发明的抗-LT- β -R 抗体增加了对癌细胞的细胞毒性。*WiDr* 细胞以 6×10^4 /ml 的浓度与 80 单位/ml 的 huIFN- γ 置于 96 孔板中, 板中含有包被所述的可溶性抗体或包被有捕获山羊抗人 IgG Fc(Jackson 免疫研究实验室)。培养该板 5 天。加入 MTT 4 小时, 用 10mM 的 HCl 溶液中的 10% 的 SDS 过夜培养溶解得到的沉淀物, 微量板读出器中读出 OD 值。

实施例 10 : 人 BHA10 预处理减慢 *WiDr* 肿瘤的生长:

向 6 周大的裸鼠腹膜内注射 100 μ g 的抗-LFA3 抗体(1E6), 100 μ g 的抗-LT- β -R 抗体(即重构人 BHA10)或不注射(对照)。然后向这些动物皮下注射 1×10^6 的 *WiDr* 结肠癌细胞。重构人 BHA10 处理后的鼠每周用 100 μ g 抗体再处理, mBHA 动物仅在第 14 天再处理。每周测量肿瘤大小和计算出肿瘤的体积。当动物的肿瘤达到 2.0 cm³ (直径 16 mm)时, 处死动物, 它们的死亡记录到存活图表中。用重构人 BHA10 预处理期望可减慢裸鼠 *WiDr* 肿瘤的生长。

实施例 11: 减慢预先种植的 *WiDr* 肿瘤的生长并增加长有 *WiDr* 肿瘤的裸鼠的存活率:

10^6 的 *WiDr* 细胞在裸鼠皮下预先预先种植 10 天。每周向鼠体内皮下注射 PBS 或重构人 BHA10, 或隔周注射 mBHA10。从测量的宽度和长度计算

肿瘤重量，处死肿瘤大小超过 2000mg 的动物，在处死时的肿瘤重量进行统计学的平均计算。肿瘤重量使用以下公式计算： $(\text{宽度} \times \text{长度})/2 = \text{肿瘤重量}(\text{mg})$ 。本发明重构人 BHA10 抗体可减慢体内预先生长的(pre-grown)肿瘤的生长。另外，使肿瘤生长并按上述处理后，测量动物的存活百分数。

- 5 本发明的重构人 BHA10 抗体可诱导延长鼠体内预先种植的肿瘤的存活率。

表 2

	说明
VH#1 (pKJS036)	版本 1 可变重链(包括回复突变 Y27, T30, I48, A67, L69 和 F91)
VH#2 (pKJS031)	版本 2 可变重链(包括回复突变 Y27, T30, I48 和 A67)
VH#3 (pKJS037)	版本 3 可变重链(包括回复突变 Y27 和 T30)
VL#1 (pKJS051)	版本 1 可变轻链(包括回复突变 Y36, S49, T63 和 F87)
VL#2 (pKJS039)	版本 2 可变轻链(包括回复突变 Y36, S49 和 F87)
VL#3 (pKJS040)	版本 3 可变轻链(包括回复突变 S49)
#1 重链(pKJS044)	版本 1 重链(包括 VH#1 和 人 IgG1 重链恒定区)
#2 重链(pKJS045)	版本 2 重链(包括 VH#2 和 人 IgG1 重链恒定区)
#3 重链(pKJS046)	3 型重链(包括 VH#3 和人 IgG1 重链恒定区)
#1 轻链(pKJS048)	版本 1 轻链(包括 VL#1 和 轻链人κ恒定区)
#2 轻链(pKJS049)	版本 2 轻链(包括 VL#2 和轻链人κ恒定区)
#3 轻链(pKJS050)	版本 3 轻链(包括 VL#3 和轻链人κ恒定区)
版本 1 人 BHA10	版本 1 人 BHA10 包括#1 重链和#1 轻链
版本 2 人 BHA10	版本 2 人 BHA10 包括 #2 重链和#2 轻链
版本 3 人 BHA10	版本 3 人 BHA10 包括#3 重链和#3 轻链
版本 4 人 BHA10	版本 4 人 BHA10 包括#3 重链 和#2 轻链
pKJS077	#2 轻链
pKJS078	#3 重链

对于本领域技术人员来说,对本发明的各种多肽、组合物和方法所进行各种修饰和改变都不脱离本发明的精神。因此本发明覆盖了该发明的修

5 饰和改变,只要这些改变在所述权利要求及它们的等同物的范围内。此处所引用的所有公开物和专利文献,以及原文出现的图和序列表,都全文引入作为参考,如同它们分别引入本发明作参考。

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司 (Biogen, Idec MA Inc.)

<120> 人源化抗淋巴瘤毒素 β 受体的抗体

<130> BINA156PC

<150> 60/392993

<151> 2002-07-01

<150> 60/417372

<151> 2002-10-09

<160> 62

<170> FastSEQ for Windows Version4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

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

<210> 3

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (321)

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 1

<400> 3

```

gac att cag atg acc cag tct cct agc tcc ctg tcc gcc tca gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15

gac agg gtc acc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt att aac 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn
      20      25      30

gtt gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg aag gct cct aaa tca ctg att 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35      40      45

tcc tcg gcc tcc tac cgg tac agt gga gtc cct tct aga ttc aca ggc 192
Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
      50      55      60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80

gaa gac ttc gca acc tat ttc tgt cag caa tat gac acc tat cca ttc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Pro Phe
      85      90      95

acg ttc ggc cag ggt acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105

```

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 1

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 2

<221> CDS

<222> (1)... (321)

<400> 5

```

gac att cag atg acc cag tct cct agc tcc ctg tcc gcc tca gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1           5           10           15

gac agg gtc acc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt att aat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn
      20           25           30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg aag gct cct aaa tca ctg att 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
      35           40           45

tcc tcg gcc tcc tac cgg tac agt gga gtc cct tcc aga ttc agc ggc 192
Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctc cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65           70           75           80

gaa gac ttc gca acc tat ttc tgt cag caa tat gac acc tat cca ttc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Pro Phe
      85           90           95

acg ttc ggc cag ggt acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100           105

```

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 2

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 3

<221> CDS

<222> (1)... (321)

<400> 7

```

gac att cag atg acc cag tct cct agc tcc ctg tcc gcc tca gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15

gac agg gtc acc atc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt att aat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn
             20             25             30

gta gcc tgg ttc caa cag aaa ccc ggg aag gct cct aaa tca ctg att     144
Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
             35             40             45

tcc tcg gcc tcc tac cgg tac agt gga gtc cct tct aga ttc agc ggc     192
Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
             50             55             60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
             65             70             75             80

gaa gac ttc gca acc tat tac tgt cag caa tat gac acc tat cca ttc     288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Pro Phe
             85             90             95

acg ttc ggc cag ggt acc aag gtg gag atc aaa                        321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
             100             105

```

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 3

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变重链, 版本 1

<221> CDS

<222> (1)... (348)

<400> 9

```

cag gtc caa ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

tca gtg aag gtg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttc aca acc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

tat ttg cac tgg gtg agg cag gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga tgg att tat cct gga aat gtt cat gct cag tac aat gag aag ttc 192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

aag ggc agg gcc aca ctg aca gca gac aaa tcc acc agc aca gcc tac 240
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctc agc agc ctg agg tct gaa gat act gcg gtc tat ttc tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

gca aga tcc tgg gaa ggt ttt cct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc 336
Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

acc gtc tcc tca 348
Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 10

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变重链，版本 1

<400> 10

```

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

```

<210> 11

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变重链, 版本 2

<221> CDS

<222> (1)... (348)

<400> 11

cag gtc caa ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg tcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1 5 10 15	

tca gtg aag gtg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttc aca acc tac	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr	
20 25 30	

tat ttg cac tgg gtg agg cag gcc cct gga cag gga ctt gag tgg att	144
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

gga tgg att tat cct gga aat gtt cat gct cag tac aat gag aag ttc	192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	

aag ggc agg gcc aca atc act gca gac aaa tcc acc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

atg gag ctc agc agc ctg agg tct gaa gat act gcg gtc tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

gca aga tcc tgg gaa ggt ttt cct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc	336
Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	
100 105 110	

acc gtc tcc tca	348
Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成的人源化的 BHA10 可变重链, 版本 3

<221> CDS

<222> (1)... (348)

<400> 13

cag gtc caa ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag cct ggg tcc	48
Gln Val Gln Leu Val Ser Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1 5 10 15	

tca gtg aag gtg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttc aca acc tac	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr	
20 25 30	

tat ttg cac tgg gtg agg cag gcc cct gga cag gga ctt gag tgg atg	144
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	

gga tgg att tat cct gga aat gtt cat gct cag tac aat gag aag ttc	192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	

aag ggc agg gtc aca atc act gca gac aaa tcc acc agc aca gcc tac	240
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

atg gag ctc agc agc ctg agg tct gaa gat act gcg gtc tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	

gca aga tcc tgg gaa ggt ttt cct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc	336
Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	
100 105 110	

acc gtc tcc tca	348
Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 14

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr	
20 25 30	

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

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

Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	
100 105 110	

Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223>人工合成的人源化的 BHA10 可变轻链, 版本 4

<400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 16
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223>人工合成的人源化的 BHA10 可变重链, 版本 3

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

```

      165      170      175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
      180      185      190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
      195      200      205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
      210      215      220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225      230      235      240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
      245      250      255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
      260      265      270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
      275      280      285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290      295      300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305      310      315      320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
      325      330      335

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

```

<210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 17
 tgaggagacg gtgaccgtgg cccttgcccc c

31

<210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<221> misc-feature

<222> 5,15
 <223> S = Cys 或 Gly

<221> misc-feature
 <222> 6
 <223> M = Ala 或 Cys

<221> misc-feature
 <222> 8
 <223> R = Ala 或 Gly

<221> misc-feature
 <222> 20
 <223> W = Ala 或 Thr

 <400> 18
 aggtsmarct gcagsagtcw gg 22

 <210> 19
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <221> misc-feature
 <222> 35
 <223> K = Gly 或 Thr

 <221> misc-feature
 <222> 17, 35
 <223> W = Ala 或 Thr

 <221> misc-feature
 <222> 36, 37

 <223> Y = Cys 或 Thr

 <400> 19
 actagtcgac atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g 41

 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 20
 gttagatctc cagcttggtc cc 22

 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠

 <400> 21
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe
 1 5 10

 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小鼠

 <400> 22
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro
1 5

<210> 24
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 24
gcactgggtg aggcaggccc ctggacaggg acttg 35

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 25
cccagggtcca actgggtgcag tctggagctg agg 33

<210> 26
<211> 112
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 26
gaagttcaag ggcagggcca cactgacagc agacaaatcc accagcacag cctacatgga 60
gctcagcagc ctgaggctctg aagatactgc ggtctatttc tgtgcaagat cc 112

<210> 27
<211> 71
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 27
caggtccaac tgggtgcagtc tggagctgag gigaagaagc ctgggtcctc agtgaagggtg 60
tcctgcaagg c 71

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 28
gcactgggtg aggcaggccc ctggacaggg acttg 35

<210> 29
<211> 112
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 29
 gaagttcaag ggcagggcca caatcactgc agacaaatcc accagcacag cctacatgga 60
 gctcagcagc ctgaggctcg aagatactgc ggtctattac tgtgcaagat cc 112

<210> 30
 <211> 71

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 30
 cagggtccaac tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaagggtg 60
 tcctgcaagg c 71

<210> 31
 <211> 112
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 31
 gaagttcaag ggcaggggtca caatcactgc agacaaatcc accagcacag cctacatgga 60
 gctcagcagc ctgaggctcg aagatactgc ggtctattac tgtgcaagat cc 112

<210> 32
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 32
 ggccccigga cagggacttg agtggatggg atggatttat cctgg 45

<210> 33
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 33
 gatggagaca ttcagatgac ccagtcctct agtcacctgt ccgcctcagt aggagacagg 60
 gtcacatca cctgcaaggc 80

<210> 34
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 34
 gtagcctggt tccaacagaa acccggaag gctcctaaat cac 43

<210> 35
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	引物	
<400>	35	
cagtggagtc ccttctagat tcacaggcag		30
<210>	36	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	36	
ctcaccatca gcagcctgca gcctgaagac ttcgcaacct atttctgtca gc		52
<210>	37	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	37	
gggtattaat gtagcctggt atcaacagaa accagggaag gctcc		45
<210>	38	
<211>	52	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	38	
cctatccatt cacgttcggc cagggtacca aggtggagat ctaacaaggc cg		52
<210>	39	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	39	
ccctggtttc tgttgatacc aggcaacgtt aatacccac		39
<210>	40	
<211>	80	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
gatggagaca ttcagatgac ccagttctcct agctccctgt ccgcctcagt aggagacagg	60	
gtcaccatca cctgcaaggc	80	
<210>	41	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 引物

<400> 41
gtagcctggt tccaacagaa acccggaag gctcctaaat cac 43

<210> 42

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 42
cagtggagtc ctttctagat tcagggcag tggatc 36

<210> 43

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 43
ctcacatca gcagcctgca gcctgaagac ttcgcaacct atttctgtca gc 52

<210> 44

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 44
gctgacagaa ataggttgcg aagtcttcag gctggaggct gctgatgg 48

<210> 45

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 45
ggtacagtgg agtcccttcc agattcagcg gcagtggatc tggg 44

<210> 46

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 46
gggtattaat gtagcctggt atcaacagaa accaggaag gctcc 45

<210> 47

<211> 52

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 47
 cctatccatt cacgttcggc cagggtaacca aggtggagat ctaacaaggg cg 52

 <210> 48
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 48
 gatggagaca ttcagatgac ccagttcct agctccctgt ccgcctcagt aggagacagg 60
 gtcacatca cctgcaaggc 80

 <210> 49
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 49
 gtagcctggg tccaacagaa acccggaag gctcctaaat cac 43

 <210> 50
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 50
 cagtggagtc cttctagat tcagcggcag tggatc 36

 <210> 51
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 51
 ctacacatca gcagcctgca gcctgaagac ttcgcaacct attactgica gcaatatg 58

 <210> 52
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 52
 cctatccatt cacgttcggc cagggtaacca aggtggagat ctaacaaggg cg 52

 <210> 53
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 53

cggatcctca accgggagac agggagaggc t 31

<210> 54
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 54
cggatcccta acactctccc ctgttgaa 28

<210> 55
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 55
gctagcggat ccacatgga ctggacctgg 30

<210> 56
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 56
cggatcctca accgggagac agggagaggc t 31

<210> 57
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 57
cccttaggat ccacatggg cttcaagatg gag 33

<210> 58
<211> 28
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<223> 引物

<400> 58
cggatcccta acactctccc ctgttgaa 28

<210> 59
<211> 717
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的 BHA10, 轻链, 版本 2

<221> CDS
<222> (1)... (716)

<400> 59

atg ggc ttc aag atg gag tca cag tct ctg gtc ttt gta tac atg ttg Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ser Leu Val Phe Val Tyr Met Leu 1 5 10 15	48
ctg tgg ttg tct ggt gtt gat gga gac att cag atg acc cag tct cct Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro 20 25 30	96
agc tcc ctg tcc gcc tca gta gga gac agg gtc acc atc acc tgc aag Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys 35 40 45	144
gcc agt cag aat gtg ggt att aat gta gcc tgg tat caa cag aaa cca Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 50 55 60	192
ggg aag gct cct aaa tca ctg att tcc tcg gcc tcc tac cgg tac agt Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 65 70 75 80	240
gga gtc cct tcc aga ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 85 90 95	288
ctc acc atc agc agc ctc cag cct gaa gac ttc gca acc tat ttc tgt Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys 100 105 110	336
cag caa tat gac acc tat cca ttc acg ttc ggc cag ggt acc aag gtg Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 115 120 125	384
gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro 130 135 140	432
tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu 145 150 155 160	480
aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn 165 170 175	528
gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser 180 185 190	576
aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala 195 200 205	624
gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly 210 215 220	672
ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230 235	717

<210> 60

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化 BHA10, 轻链, 版本 2

<400> 60

```

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ser Leu Val Phe Val Tyr Met Leu
 1           5           10           15
Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
 20           25           30
Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys
 35           40           45
Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50           55           60
Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Ser Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 65           70           75           80
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85           90           95
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys
 100          105          110
Gln Gln Tyr Asp Thr Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115          120          125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130          135          140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145          150          155          160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165          170          175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180          185          190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195          200          205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210          215          220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225          230          235

```

<210> 61

<211> 1392

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化 BHA10, 重链, 版本 3

<221> CDS

<222> (1)... (1392)

<400> 61

```

atg gac tgg acc tgg agg gtc ttc tgc ttg ctg gct gta gca cca ggt   48
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
 1           5           10           15

gcc cac tcc cag gtc caa ctg gtg cag tct gga gct gag gtg aag aag   96
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20           25           30

cct ggg tcc tca gtg aag gtg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttc   144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35           40           45

aca acc tac tat ttg cac tgg gtg agg cag gcc cct gga cag gga ctt   192
Thr Thr Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50           55           60

gag tgg atg gga tgg att tat cct gga aat gtt cat gct cag tac aat   240
Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn
 65           70           75           80

gag aag ttc aag ggc agg gtc aca atc act gca gac aaa tcc acc agc   288

```

Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
				85					90					95		
aca	gcc	tac	atg	gag	ctc	agc	agc	ctg	agg	tct	gaa	gat	act	gcg	gtc	336
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			
tat	tac	tgt	gca	aga	tcc	tgg	gaa	ggg	ttt	cct	tac	tgg	ggc	caa	ggg	384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Trp	Glu	Gly	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
		115					120					125				
acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	432
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		130				135					140					
ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	480
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
145					150					155					160	
ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	528
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
				165					170					175		
aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	576
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
			180					185					190			
cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	624
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
		195					200					205				
agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	672
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
		210				215					220					
agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aaa	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aag	720
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
225					230					235					240	
act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	768
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
				245					250					255		
tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	816
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
			260					265					270			
cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	864
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
		275					280					285				
cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	912
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		290				295					300					
gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	960
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
305					310					315					320	
gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	1008
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
				325					330					335		
tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	1056
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
			340					345					350			

```

acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc 1104
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc 1152
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag 1200
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ttg 1248
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag 1296
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag 1344
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccc ggt 1392
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455 460

```

<210> 62
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人源化 BHA10, 重链, 版本 3

```

<400> 62
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1 5 10 15
Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45
Thr Thr Tyr Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val His Ala Gln Tyr Asn
65 70 75 80
Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Glu Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
130 135 140
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
145 150 155 160
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
165 170 175
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
180 185 190
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
210 215 220

```

```

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
225                230                235                240
Thr His Thr Cys Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu 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 His Glu Asp
275                280                285
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290                295                300
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 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 Ala Leu Pro Ala Pro 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 Arg Asp Glu Leu 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 Lys Leu Thr Val Asp Lys
420                425                430
Ser Arg Trp Gln Gln 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 Pro Gly
450                455                460

```

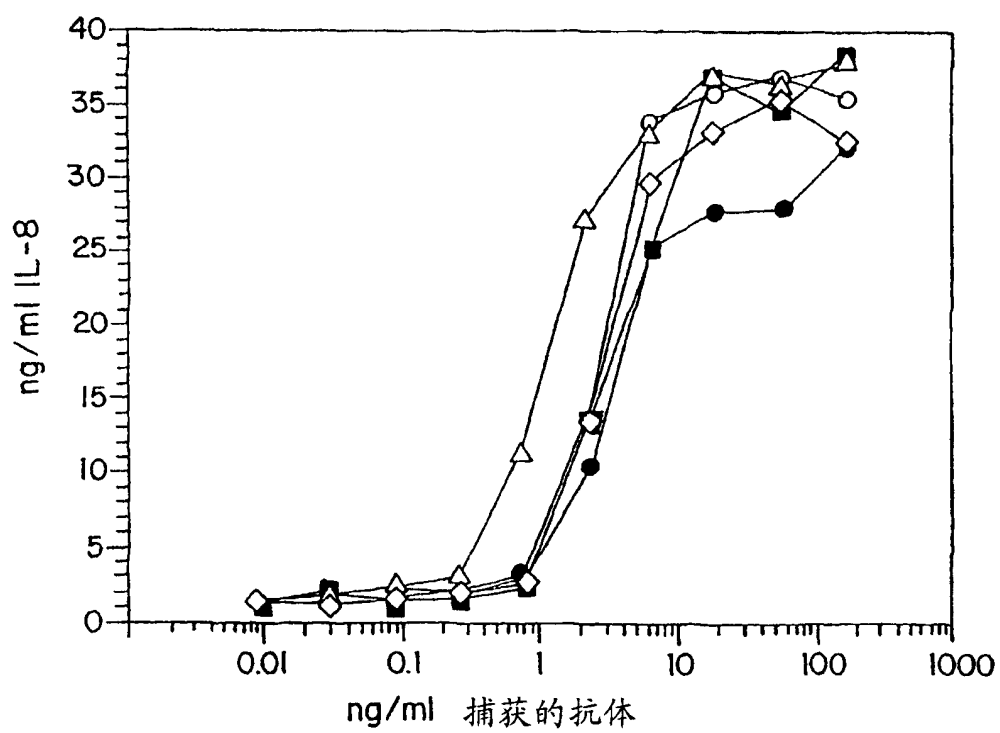


图 1

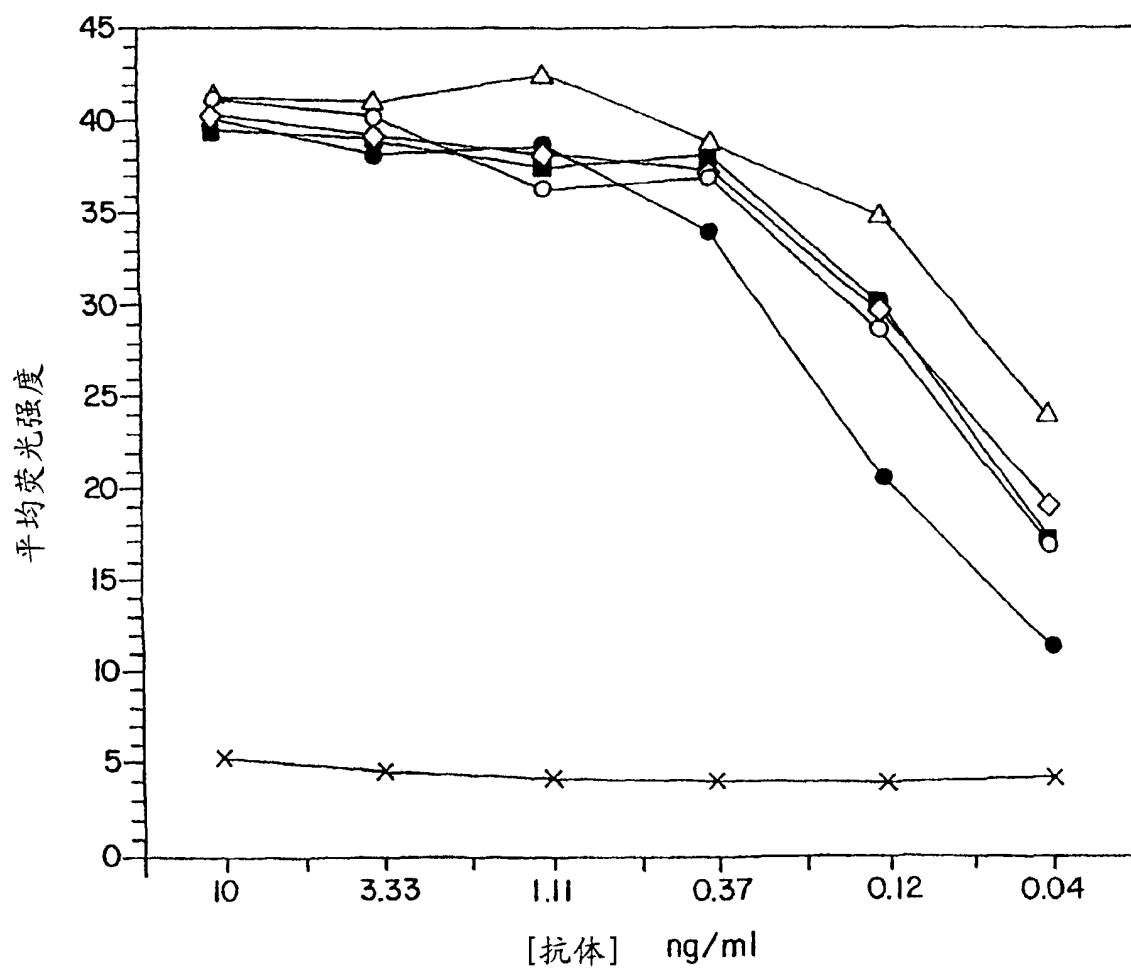


图 2

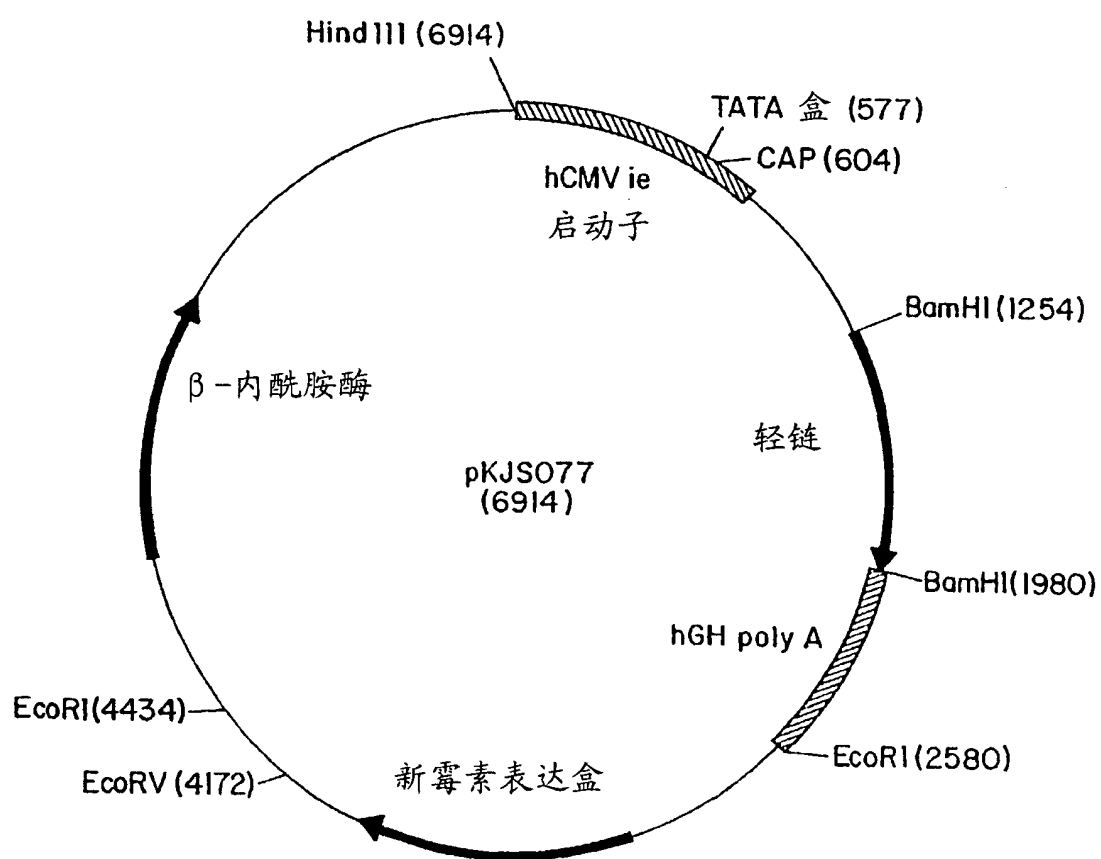


图 3

1 ATGGGCITCAAGATGGAGTCACAGTCTCTGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGTCTGGTGTGATG
71 GAGACATTCAGATGACCCAGTCTCCTAGCTCCCTGTCCGCCTCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACCTG
141 CAAGGCCAGTCAGAAFGTGGGTATTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAGGCTCCTAAATCA
211 CTGATTTCTCGGCCTCTACCGGTACAGTGGAGTCCCCTCCAGATTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAG
281 ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCTGAAGACTTCGCAACCTATTTCTGTCAGCAATATGACAC
351 CTATCCATTCAGTTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
421 ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
491 ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
561 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
631 GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
701 ACAGGGGAGAGTGTTAG

图 4A

1 MGFKMESQSL VFVYMLLWLS GVDGDIQMTQ SPSSLSASVG DRVTITCKAS QNVGINVAWY QQKPGKAPKS
71 LISSASYRYS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY FCQQYDTYPE TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
141 IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLSKADY
211 EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

图 4B

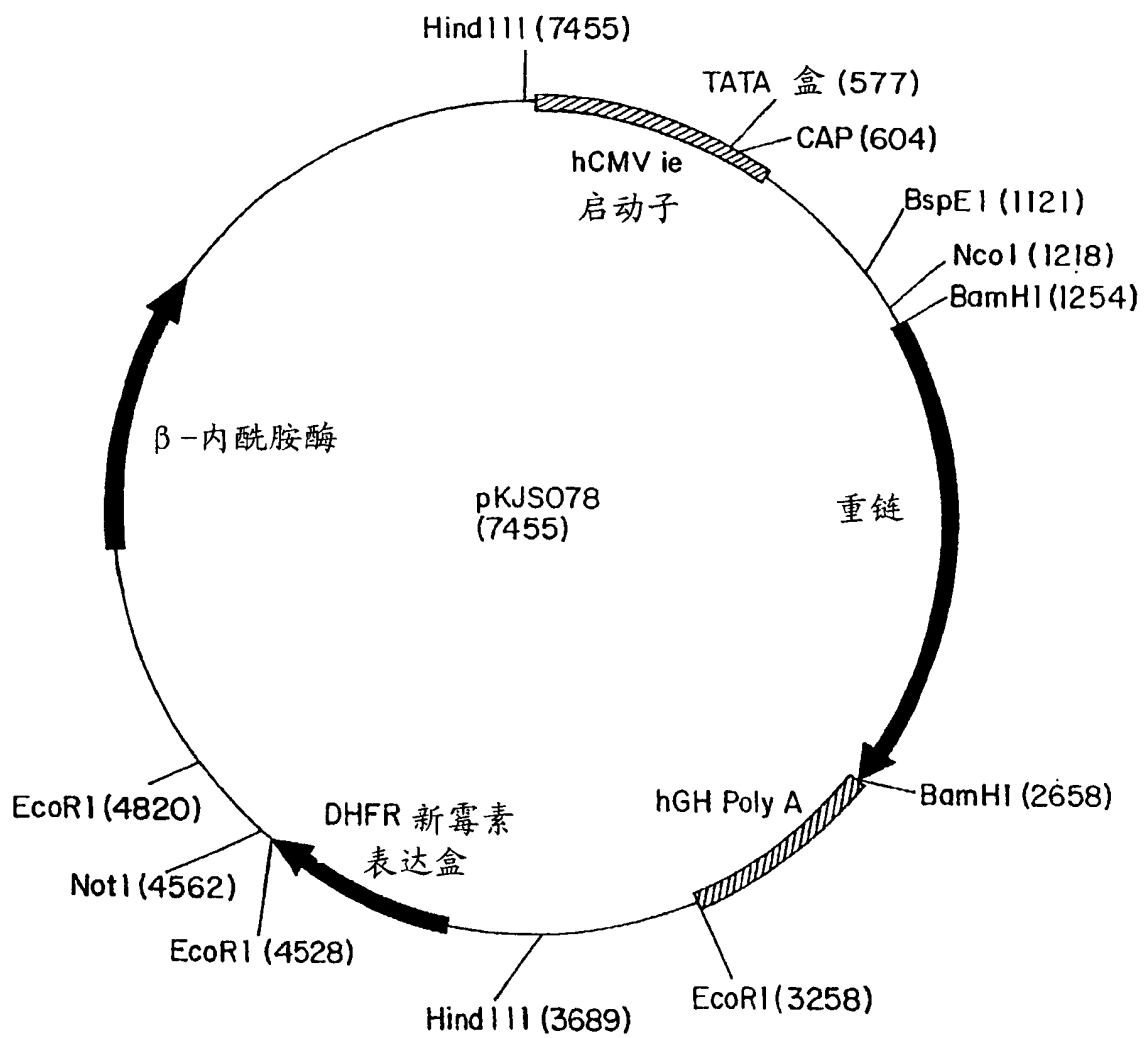


图 5

1 ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCTGTAGCACCAGGTGCCCACTCCCAGGTCCAACCTGG
 71 TGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAC
 141 TTTACAACTACTATTTGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGATGGATT
 211 TATCCTGGAAATGTTTCATGCTCAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACAATCACTGCAGACAAAT
 281 CCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGGTCTGAAGATACTGCGGTCTATTACTGTGCAAG
 351 ATCCTGGGAAGGTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC
 421 CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
 491 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACAC
 561 CTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGC
 631 TTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG
 701 AGCCCAAATCTTGTGACAAGACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
 771 AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG
 841 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
 911 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCT
 981 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC
 1051 GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGIGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
 1121 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGT
 1191 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
 1261 TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
 1331 CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGT

图 6A

1 MDWTWRVFCL LAVA PGAHSQ VQLVQSGAEV KKP GS SVKVS CKASGYTFTT YYLHWV RQAP GQGLEWMGWI
 71 YPGNVHAQYN EKFKGRVTIT ADKSTSTSYM ELSSL RSEDV AVYYCARSWE GFPYWG QGTT VTVSSASTKG
 141 PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVS WNSGA LTSGVHTFPA VLQSSG LYSL SSVVTVPSSS
 211 LGTQTYI CNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK THTCP PCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 281 VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYN STYRV VSVLTVLHQD WLNKGE YKCK VSNKALPAPI
 351 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDI AVEWE SNGQPE NNYK TTPPVLDSDG
 421 SFFLYSKLTV DKSRWQOGNV FSCSVMEAL HNHYT QKSLS LSPG

图 6B