

[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 96196145.7

[51] Int. Cl.

C12N 5/12 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100379855C

[22] 申请日 1996.6.6 [21] 申请号 96196145.7

[30] 优先权

[32] 1995.6.7 [33] US [31] 487,550

[86] 国际申请 PCT/US1996/010053 1996.6.6

[87] 国际公布 WO1996/040878 英 1996.12.19

[85] 进入国家阶段日期 1998.2.6

[73] 专利权人 生物基因 IDEC 公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 D·R·安德尔森 P·布雷姆斯

N·汉娜 W·S·余斯托斯基

审查员 郭晓勇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 15 页

[54] 发明名称

人 B7.1 和/或 B7.2 特异的猴源单克隆抗体灵长动物化形式,药用组合物

[57] 摘要

本发明涉及猕猴抗人 B7.1 和 B7.2 抗体的鉴定,该抗体是通过筛选噬菌体展示库或用 B7.1 和/或 B7.2 免疫的猴的 B 淋巴细胞所获得的猴异种杂交瘤而得到的。更具体地说,本发明提供了四种能抑制 B7:CD28 通路并因此能作为有效的免疫抑制剂而发挥作用的猴源单克隆抗体 7B6、16C10、7C10、20C9。本发明进一步提供了三种灵长动物化抗体的轻链和重链的完整 DNA 和氨基酸序列,这三种抗体为灵长动物化的 7C10、灵长动物化的 7B6 和灵长动物化的 16C10,它们均来源于与 B7.1 结合和可能与 B7.2 结合的那些猴源单克隆抗体。这些灵长动物化的和猴源抗体可以用作特异的免疫抑制剂,如用于治疗自身免疫病和预防器官移植排斥。

1. 一种特异地与人 CD80 抗原结合的单克隆抗体或其片段, 该抗体或其片段含有选自以下的轻链和重链可变区多肽序列:

分别示于图 8a 和 8b 的抗体 7C10 的轻链和重链可变区多肽序列;

分别示于图 9a 和 9b 的抗体 7B6 的轻链和重链可变区多肽序列; 和

分别示于图 10a 和 10b 的抗体 16C10 的重链和轻链可变区多肽序列。

2. 一种特异地与人 CD80 抗原结合的单克隆抗体或其片段, 该抗体或其片段具有含有选自以下的轻链和重链可变区多肽序列之抗体的表位特异性:

分别示于图 8a 和 8b 的抗体 7C10 的轻链和重链可变区多肽序列;

分别示于图 9a 和 9b 的抗体 7B6 的轻链和重链可变区多肽序列; 和

分别示于图 10a 和 10b 的抗体 16C10 的重链和轻链可变区多肽序列。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的单克隆抗体, 该抗体含有人抗体轻链的轻链恒定区和人抗体重链的重链恒定区。

4. 权利要求 3 的单克隆抗体, 该抗体含有选自人 γ 1 恒定区、人 γ 4 恒定区和人 γ 4 PE 恒定区的重链恒定区。

5. 权利要求 1-4 任何一项的单克隆抗体, 该抗体是一种排除抗体。

6. 权利要求 1-4 任何一项的单克隆抗体, 该抗体是一种非排除抗体。

7. 权利要求 1 或权利要求 2 的抗体片段, 该抗体片段是 Fab₂、Fab 或 Fv 片段。

8. 重组核酸, 该重组核酸含有编码权利要求 1 的特异地与人 CD80 抗原结合的抗体或其片段的轻链和重链可变区多肽序列的核苷酸序列。

9. 权利要求 8 的重组核酸, 该重组核酸含有选自以下的核苷酸序列:

图 8a 和 8b 中所示的核苷酸序列;

图 9a 和 9b 中所示的核苷酸序列; 和

图 10a 和 10b 中所示的核苷酸序列。

10. 产生权利要求 3-7 任何一项的抗体或其片段的培养细胞。

11. 权利要求 10 的培养细胞, 该细胞是 CHO 转染瘤。

12. 权利要求 10 的培养细胞, 该细胞产生一种嵌合抗体, 该嵌合抗体特异地与人 CD80 抗原结合, 并且含有人抗体轻链的轻链恒定区和人抗体重链的重链恒定区, 还含有选自以下的可变区多肽序列:

分别示于图 8a 和 8b 的抗体 7C10 的轻链和重链可变区多肽序列;

分别示于图 9a 和 9b 的抗体 7B6 的轻链和重链可变区多肽序列；和
分别示于图 10a 和 10b 的抗体 16C10 的重链和轻链可变区多肽序列。

13. 一种适合治疗或预防可通过抑制 B7:CD28 通路而被治疗或预防的疾病或病症的药用组合物，该组合物包括权利要求 1-7 任何一项的特异地与人 CD80 抗原结合的抗体或其片段。

14. 权利要求 13 的药用组合物，该组合物适合治疗或预防可通过免疫抑制而被治疗或预防的疾病或病症。

15. 权利要求 1-7 任何一项的抗体或其片段在制备适合治疗或预防可以通过抑制 B7:CD28 通路而被治疗或预防的疾病或病症的药用组合物中的应用。

16. 权利要求 15 的应用，其中所述药用组合物适合治疗或预防可通过免疫抑制而被治疗或预防的疾病或病症。

17. 权利要求 15 或权利要求 16 的应用，其中所述药用组合物适合治疗或预防选自自身免疫病、移植物抗宿主疾病、移植器官或组织排斥、感染性疾病、炎症性疾病或 B 细胞淋巴瘤的疾病或病症。

18. 权利要求 17 的应用，其中所述药用组合物适合治疗或预防移植物抗宿主疾病或移植器官或组织排斥，其中所述移植物或移植器官或组织选自肾、心脏、肺、骨髓、皮肤和角膜。

19. 权利要求 15 或权利要求 16 的应用，其中所述药用组合物适合治疗或预防选自以下的疾病或病症：AIDS、桥本氏甲状腺炎、重症肌无力、眼色素层炎、肾病综合症、特应性皮炎、接触性皮炎、脂溢性皮炎、湿疹性皮炎、扁平苔癣、天疱疮、大疱性天疱疮、表皮松解的大疱形成、荨麻疹、血管神经性水肿、脉管炎、红斑、皮肤嗜曙红细胞增多症、斑秃、可逆性气道阻塞性疾病、偏头痛、湿疹、鼻炎、其它过敏性疾病、增生性疾病、高增生性疾病和与肠炎相关的疾病，包括腹腔疾病、直肠炎、嗜曙红细胞增多性胃肠炎、肥大细胞病、节段性回肠炎和溃疡性结肠炎。

20. 权利要求 17 的应用，其中所述药用组合物适合治疗或预防选自以下的疾病或病症：特发性血小板减少性紫癜、红斑狼疮、系统性红斑狼疮、I 型糖尿病、类风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化和再生障碍性贫血。

人 B7.1 和/或 B7.2 特异的猴源单克隆抗体 灵长动物化形式，药用组合物

发明领域

本发明涉及制备和鉴定抗人 B7，即人 B7.1 和人 B7.2，的新型单克隆抗体和它们的灵长动物化形式。更具体地说，本发明涉及抗人 B7，即人 B7.1 和人 B7.2，的猕猴抗体的生产和鉴定，这些抗体是通过筛选噬菌体展示库和用 B7 免疫的猴的 B 淋巴细胞所获得的猴异种杂交瘤来进行制备的。

本发明进一步涉及与人 B7，即人 B7.1 和 B7.2 结合的灵长动物化的特异抗体以及它们相应的氨基酸和核酸序列。

再者，本发明涉及含有抗人 B7.1 和/或人 B7.2 的特异猴源单克隆或灵长动物化抗体的药用组合物以及它们通过调节 B7:CD28 通路而作为免疫抑制剂的应用，例如，用于治疗自身免疫病和预防器官移植排斥。

发明背景

长期以来人们一直在关注免疫学、血液学和肿瘤学之间的临床交叉。许多血液学家或肿瘤学家治疗的疾病在病理生理上或含有自身免疫成份或含有免疫缺陷成分，这已导致血液学家广泛采用免疫抑制剂，而肿瘤学家一直在寻找能增强内源性抗肿瘤免疫的免疫佐剂。到目前为止，这些治疗通常包括非特异方式的免疫抑制和免疫激活。除了这些治疗的功效有限之外，伴随它们的非特异性毒性作用也限制了它们的总体效果。因此，人们一直在寻找另外的策略。

人们阐明了正迅速增多的细胞表面分子的功能作用已极大地推动了免疫学与临床血液学和肿瘤学的结合。在免疫和造血系统的细胞上已鉴定出近 200 种细胞表面抗原（Schlossman SF, Boumsell L, Gilks JM, Harlan T, Kishimoto, C, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein RL, Springer TA, Tedder TF, Todd RF:CD 抗原（1993），《血液》（Blood）83: 879, 1994）。这些抗原代表细胞系限制的和参与多种过程的更广泛分布的分子，这些过程包括细胞识别、粘附、增殖的诱导和维持、细胞因子分泌、效应功能、甚至细胞死亡。认识了这些分子的功能属性已促

使人们进行操纵免疫应答的新尝试。尽管涉及细胞粘附和抗原特异性识别的分子以前一直被认为是免疫治疗的目标,但近来人们的注意力集中于细胞表面分子的一亚群,称之为共刺激分子 (Bretscher P: “21年后淋巴细胞激活的双信号模型”《今日免疫学》(Immunol. Today) 13: 73 (1992); Jenkins MK, Johnson JG: “参与 T - 细胞共刺激的分子”《免疫学现代观念》(Curr Opin Immunol) 5: 351 1993; Geppert T, Davis L. Gur H. Wacholtz M. Lipsky P: “参与 T 细胞激活的辅助细胞信号”《免疫学综述》(Immunol Rev) 117: 5, (1990); Weaver CT, Unanue ER: “抗原递呈细胞的共刺激功能”《今日免疫学》(Immunol Today) 11:49, (1990); Stennam RM, Young JW: “来自抗原递呈细胞的信号”《现代免疫学观念》(Curr Opin Immunol) 3: 361, (1991))。共刺激分子不能启动但是能够产生和放大抗原特异的 T 细胞应答和效应功能 (Bretscher P: “21年后淋巴细胞激活的双信号模型”《今日免疫学》(Immunol. Today) 13: 73 (1992); Jenkins MK, Johnson JG: “参与 T 细胞共刺激的分子”《现代免疫学观念》(Curr Opin Immunol) 5: 351 (1993); Geppert T, Davis L. Gur H. Wacholtz M. Lipsky P: “参与 T 细胞激活的辅助细胞信号”《免疫学综述》(Immunol Rev) 117: 5, (1990); Weaver CT, Unanue ER: “抗原递呈细胞的共刺激功能”《今日免疫学》(Immunol Today) 11:49, (1990); Stennam RM, Young JW: “来自抗原递呈细胞的信号”《现代免疫学观念》(Curr Opin Immunol) 3: 361, (1991); June CH, Bluestone JA, Linsley PS, Thompson CD: “CD28 受体在 T 细胞激活中的作用”《今日免疫学》(Immunol Today) 15: 321, (1994)。

近来,一个称为 B7: CD28 的特异的共刺激通路由于它在 B 和 T 细胞的激活中发挥重要作用,几个不同的研究小组已对其进行了研究 (June CH, Bluestone JA, Linsley PS, Thompson CD: “CD28 受体在 T 细胞激活中的作用”《今日免疫学》(Immunol Today) 15: 321, (1994); June CH Ledbetter JA: “CD28 受体在 T 细胞对抗原的应答中的作用”

《免疫学年度综述》(Annu Rev Immunol) 11: 191 (1993); Schwartz RH: “T 淋巴细胞的共刺激: CD28、CTLA - 4、和 B7/BB1 在白细胞介素 2 产生和免疫治疗中的作用”《细胞》(Cell) 71: 1065, (1992))。自从 4 年前发现了这个配体: 受体通路后,已积累了大量证据表明 B7:CD28 相互作用在决定免疫反应性与无反应性方面代表一个关键接

合点。(June CH, Bluestone JA: Linsley PS, Thompson CD: “ CD28 受体在 T 细胞激活中的作用” 《今日免疫学》 (Immunol Today) 15: 321, (1994); June CH Ledbetter JA: “ CD28 受体在 T 细胞对抗原的应答中的作用” 《免疫学年度综述》 (Annu Rev Immunol) 11: 191 (1993); Schwartz RH: “ T 淋巴细胞的共刺激: CD28、CTLA-4、和 B7/BB1 在白细胞介素 2 的产生和免疫治疗方面的作用” 《细胞》 (Cell) 71: 1065, (1992); Cohen J: “发动对有害免疫应答的靶攻击” (新闻; 评论) 《科学》 (Science) 257: 751, (1992); Cohen J: “作为 T 细胞 ‘共刺激因子’ 的一种新蛋白引人注目” (新闻; 评论) 《科学》 (Science) 262 页: 844 卷, (1993))。

特别是, 人 B7 抗原, 即人 B7.1 和 B7.2, 的作用已被报道是在 T 细胞激活中发挥共刺激作用。

1. B7.1 和 B7.2 在 T 细胞激活中的共刺激作用

精确发生一次有效的免疫应答依赖于 T 细胞和抗原递呈细胞之间的一系列特异相互作用。尽管该过程中所必需的第一步依赖于 MHC II 类分子存在的情况下抗原与 T 细胞受体结合 (Lane, P. J. L., F. M. McConnell, G. L. Schieven, E. A. Clark, 和 J. A. Ledbetter, (1990), “ II 类分子在人 B 细胞激活中的作用” 《免疫学杂志》 (The Journal of Immunology), 144:3684-3692), 但是该相互作用本身不足以诱导一次对已知抗原的持久应答所必要的所有事件 (Schwartz, R. H. (1990), “ T 淋巴细胞克隆性无反应的一种细胞培养模型” 《科学》 (Science), 248:1349; Jenkins, M. K. (1992). “细胞分裂在诱导克隆性无反应中的作用” 《今日免疫学》, 13:69; Azuma, M., M. Catabyab, D. Buck, J. H. Phillips, 和 L. L. Lanier, (1992). “ CD28 参与一种人自然杀伤白血病细胞系所介导的非 MHC 限制性细胞毒。” 《免疫学杂志》 (The Journal of Immunology), 149: 1556-1561; Azuma, M., M. Catabyab, D. Buck, J.H. Phillips, 和 L. L. Lanier, (1992). “ CD28 与 B7 相互作用共刺激产生由静止的小 T 淋巴细胞所介导的原发同源异体增殖应答和细胞毒。” 《实验医学杂志》 (J. Exp. Med.), 175: 353-360)。

与表达在抗原递呈细胞上的 B7.1 (CD80) 和 B7.2 (CD86) 一起作用, 某些其它共刺激分子的参与是必要的 (Norton, S. D., L. Zuckerman, K. B. Urdahl, R. Shefner, J. Miller, 和 M. K. Jenkins. (1992),

“CD28 的配体, B7, 通过提供给 T 细胞一种共刺激信号而增加 IL-2 的产生”《免疫学杂志》(The Journal of Immunology), 149: 1556-1561)。“CD28 和 CTLA-4 的同源二聚体在 T 细胞上表达”(June, C. H., J. A. Ledbetter, P.S. Linsley, 和 C. B. Thompson, (1990), “CD28 受体在 T 细胞激活中的作用”《今日免疫学》(Immunology Today) 11:211-216; Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle, 和 J. A. Ledbetter, (1991), “CTLA-4 是 B 细胞激活抗原 B7 的又一个受体”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 174: 561), 它们是持久免疫应答所必须的主要共刺激分子对 (Azuma, M., H. Yssel, J. H. Phillips, H. Spits, 和 L. L. Lanier, (1993), “B7/BB1 在激活的 T 淋巴细胞上的功能性表达”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 177: 845-850; Freeman, G. J., A. S. Freeman, J. M. Segil, G. Lee, J.F. Whitman, 和 Lm. Nadler, (1989), “B7, 一个只表达于激活的和赘生性 B 细胞上的免疫球蛋白超家族的新成员”。《免疫学杂志》(The Journal of Immunology), 143: 2714-2722; Hathcock, K. S., G. Laslo, H. B. Dickler, J. Bradshaw, P. Linsley, 和 R. J. Hodes, (1993), “共刺激 T 细胞激活的另一种 CTLA-4 配体的鉴定”《科学》(Science), 262: 905-911; Hart, D. N. J., G. C. Starling, V. L. Calder, 和 N. S. Fernando, (1993)。“B7/BB1 是在人树突状细胞上由活化所诱导的一种白细胞分化抗原”《免疫学》(Immunology), 79: 616-620)。在体外可以证实缺乏这些共刺激信号将导致 T 细胞激活通路不能得以进行, 并且引起对特异抗原不发生应答或无反应性的形成。(参见, 如, Harding, F.A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. M. Raulet, 和 J. P. Allison, (1992)。“CD28 介导的信号传导共同刺激鼠 T 细胞并阻止在 T 细胞克隆中诱导无反应性。”《自然》(Nature), 356: 607-609; Gimmi, C. D., G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. Gray, 和 L. M. Nadler, (1993)。“人 T 细胞克隆无反应性是在缺乏 B7 共刺激的情况下由抗原递呈所诱导的。”《国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci.), 90: 6586-6590; Tan, P., C. Anasetti, J. A. Hansen, J. Melrose, M. Brunvand, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, 和 P. S. Linsley, (1993), “在人 T 淋巴细胞中通过阻断 CD28 与它的自然配体 B7/BB1 之间的相互作用来诱导异体抗原特异的低应答。”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 177: 165-173)。体内耐受的形成成为免疫抑制和器官移植排斥的有效治

疗以及自身免疫病的治疗提供了一种机制。使用 CTLA4-Ig 后这种耐受情况已在实验模型中获得 (Lenschow, D. J., Y. Zeng, R. J. Thistlethwaite, A. Montag, W. Brady, M. G. Gibson, P. S. Linsley, 和 J. A. Bluestone, (1992), “ CTLA-4 Ig 所引起的异种胰岛移植物的长期存活。”《科学》(Science), 257: 789-795)。

尽管 B7.1 以 200Nm 的解离常数 (Kd) 与 CD28 结合, 而与 CTLA-4 以高 20 倍的亲和力结合, 但 B7.1 和 B7.2 分子均能与 CD28 或 CTLA-4 结合 (Linsley, P. S., E. A. Clark, 和 J.A. Ledbetter, (1990), “T 细胞抗原 CD28 通过与活化抗原 B7/BB-1 相互作用而介导与 B 细胞的粘附。”《国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci.), 87: 5031-5035; Linsley 等, (1993), “ CD28 受体在 T 细胞对抗原的应答中的作用, ”《免疫学年度综述》(Annu. Rev. Immunol.) 11: 191-192; Linesley 等, (1993), “ B7/BB1 与 CD28 结合诱导 CD28 合成的短暂下调和延长的对 CD28 信号传导的无应答, ”《免疫学杂志》(The Journal of Immunology), 150: 3151-3169)。B7.2 表达于活化的 B 细胞和干扰素诱导的单核细胞, 但不表达于静止的 B 细胞 (Freeman, G.J., G. S. Gray, C.D. Gimmi, D.B. Lomarrd, L-J. Zhou, M. White, J. D. Fingerioth, J.G. Gribben, 和 LM. Nadler, (1991)。 “人 B 淋巴细胞活化抗原 B7 的鼠同源物的结构、表达和 T 细胞共刺激活性, ”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 174: 625-631)。另一方面, B7.2 以极低水平组成性表达于静止的单核细胞、树突状细胞和 B 细胞, 并且它在活化的 T 细胞、NK 细胞和 B 淋巴细胞上的表达增加 (Azuna, M. D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Phillips, L. L. Lanier, 和 C. Somoza, (1993), “ B70 抗原是 CTLA-4 和 CD28 的又一配体, ”《自然》(Nature), 366: 76-79)。尽管 B7.1 和 B7.2 可以在同一类型细胞上表达, 但它们在 B 细胞上的表达以不同的动力学来进行 (Lenschow, D. J., G. H. Su, L. A. Zuckerman, N. Nabavi, C. L. Jellis, G. S. Gray, J. Miller, 和 J. A. Bluestone, (1993), “ CTLA-4 另一种配体的表达和功能意义, ”《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 90: 11054-11058; Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, J. G. Gribben, J. Daley, G. Gray, 和 L. M. Nadler, (1993), “活化的人 B 淋巴细胞表达三种共刺激 T 细胞激活的 CTLA-4 对应受体。”《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 90: 11059-11063)。在 RNA 水平的进一步分析已

经证实 B7.2 mRNA 是组成性表达的, 而 B7.1 mRNA 在激活后 4 小时可以检测到, 并且在刺激后 24 小时才能检测到最初低水平的 B7.1 蛋白 (Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, J. G. Gribben, J. Daley, G. Gray, 和 L. M. Nadler, (1993), “活化的人 B 淋巴细胞表达三种共刺激 T 细胞激活的 CTLA-4 对应受体,” 《美国国家科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 90: 11059-11063)。因此, B 细胞激活后, CTLA-4/CD28 对应受体可在不同时期进行表达。

B7.1 和 B7.2 不同时间的表达提示这两种分子与 CTLA-4 和/或 CD28 之间的相互作用向 T 细胞传递不同的但是相关的信号 (LaSalle, J. M., P. J. Tolentino, G. J. Freeman, L. M. Nadler, 和 D. A. Hafler, (1992), “在应答超抗原刺激的反应中 CD28 和 T 细胞抗原受体的信号传导协同调节白细胞介素 2 基因的表达,” 《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 176: 177-186; Vandenberghe, P., G. J. Freeman, L. M. Nadler, M. C. Fletcher, M. Kamoun, L. A. Turka, J. A. Ledbetter, C. B. Thompson, 和 C. H. June, (1992), “抗体和 B7/BB1 介导的 CD28 受体结合能够诱导人 T 细胞的酪氨酸磷酸化作用,” 《实验医学杂志》(The Journal of Experimental Medicine), 175: 951-960)。T 细胞表面 CTLA-4 和 CD28 的确切信号传导功能目前是未知的 (Janeway, C. A., Jr. 和 K. Bottomly, (1994), “淋巴细胞应答的信号和标志,” 《细胞》(Cell), 76: 275-285)。然而, 可能是一套受体为 T 细胞激活提供起始刺激信号, 而第二套提供持久的信号使通路进一步被激活和使克隆性扩增得以发生 (Linsley, P. S., J. L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, C. Anasetti, 和 N. K. Balle, (1992), “活化 T 淋巴细胞上 CTLA-4 和 CD28 的共表达和功能协作,” 《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 176: 1595-1604)。目前的数据支持 Jenkins 和 Schwartz 所提出来的双信号假说 (Schwartz, R. H., (1990), “T 淋巴细胞克隆性无反应的一种细胞培养模型,” 《科学》(Science), 248: 1349; Jenkins, M. K., (1992), “细胞分裂在诱导克隆性无反应中的作用,” 《今日免疫学》(Immunology Today), 13: 69), 即 TCR 和共刺激信号两者对 T 细胞扩增、淋巴因子分泌和效应功能的完全发挥都是必要的 (Greenen, V. 和 G. Kroemer, (1993), “细胞免疫耐受的多种途径,” 《今日免疫学》(Immunology Today) 14: 573)。缺乏第二种信号的传递会导致 T 细胞不能分泌 IL-2 并且使细胞对抗原

不发生应答。

在结构上, B7.1 和 B7.2 都含有细胞外的免疫球蛋白超家族 V 和 C 类似的结构域, 一段疏水的跨膜区和一个胞浆内尾部 (Freeman, G. J., J. G. Gribben, V. A. Boussiotis, J. W. Ng, V. Restivo, Jr., L. A. Lombard, G. S. Gray, 和 L. M. Nadler, (1993), “克隆 B7-2: 共同刺激人 T 细胞增殖的一种 CTLA-4 对应受体,” 《科学》(Science), 262: 909)。B7.1 和 B7.2 都被高度糖基化。B7.1 是 44-54KD 的包括一段 223 个氨基酸组成的胞外区、一段 23 个氨基酸组成的跨膜区和一段 61 个氨基酸组成的胞浆内尾部的糖蛋白。B7.1 含有 3 个潜在的蛋白激酶磷酸化位点。(Azuma, M., H. Yssel, J. H. Phillips, H. Spits, 和 L. L. Lanier, (1993), “B7/BB1 在活化的 T 淋巴细胞上的功能性表达,” 《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 177: 845-850)。B7.2 是一个 306 个氨基酸组成的膜结合糖蛋白。它包括一段 220 个氨基酸组成的胞外区, 一段 23 个氨基酸组成的疏水的跨膜区和一段 60 个氨基酸组成的胞浆内尾部 (Freeman, G. J., A. S. Freedman, J. M. Segil, G. Lee, J. F. Whitman, 和 LM. Nadler, (1989), “B7, 只表达在活化的和赘生性 B 细胞上的免疫球蛋白超家族的一名新成员,” 《免疫学杂志》(The Journal of Immunology), 143: 2714-2722)。尽管 B7.1 和 B7.2 基因二者都定位在染色体上的同一区域 (Freeman, G. J., D. B. Lombard, C. D. Gimmi, S. A. Brod, L. Lee, J. C. Laning, D. A. Hafler, M. E. Dorf, G. S. Gray, H. Reiser, C. H. June, C. B. Thompson, 和 L. M. Nadler, (1992), “CTLA-4 和 CD28 mRNA 共同表达于激活后的大多数 T 细胞上,” 《免疫学杂志》(The Journal of Immunology), 149: 3795-3801; Schwartz, R. H., (1992), “T 淋巴细胞的共刺激: CD28、CTLA-4 和 B7/BB1 的作用,” Selvakumar, A., B. K. Mohanraj, R. L. Eddy, T. B. Shows, P. C. White, C. Perrin, 和 B. Dupont, (1992), “编码 B 淋巴细胞活化抗原 S7 的人基因的基因组成和染色体定位” 《免疫遗传学》(Immunogenetics), 36: 175-181), 但这两个抗原没有很高水平的同源性。B7.1 和 B7.2 之间总的同源性是 26%, 而鼠 B7.1 与人 S7 之间的同源性是 27% (Azuma, M., H. Yssel, J. H. Phillips, H. Spits, 和 L. L. Lanier, (1993), “B7/BB1 在活化 T 淋巴细胞上的功能性表达,” 《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 177: 845-850; Freeman, G. J., A. S. Freedman, J. M. Segil, G. Lee, J. F. Whitman, 和 LM.

Nadler, (1989); “B7, 只表达于活化的和赘生性B细胞上的免疫球蛋白超家族的一名新成员,”《免疫学杂志》(The Journal of Immunology), 143: 2714-2722)。尽管将人B7.1、人B7.2和鼠B.1的序列进行排列并没有显示长的同源性延伸区域,但是已知这三个分子都与人CTLA-4和CD28结合。这样,很可能这三个分子共有一段在顺序上或构象上相同的,或非常同源的区域。该区域可组成B7.1和B7.2分子与它们对应受体的结合点。针对这些表位所制备的抗体能够潜在地抑制B7与它在T细胞上的对应受体之间的相互作用。更进一步,与B7.1和B7.2分子上的该区域交叉反应的抗体与分别抗B7.1或B7.2的抗体相比,将有潜在的实用优点。

2. 阻断B7/CD28的相互作用

阻断B7/CD28之间的相互作用提供了诱导特异性免疫抑制的可能性,这种免疫抑制有潜力用于产生长期持续的抗原特异的治疗效果。已经证实抗B7.1或B7.2的抗体能阻断T细胞的激活过程,这可通过体外抑制IL-2的产生来测定(DeBoer, M., P. Parren, J. Dove, F. Ossendorp, G. van der Horst, 和 J. Reeder, (1992), “一种新的抗B7单克隆抗体的功能特征,”《欧洲免疫学杂志》(Eur. Journal of Immunology), 22: 3071-3075; Azuma, M., H. Yssel, J. H. Phillips, H. Spits, 和 L. L. Lanier, (1993), “B7/BB1在活化的T淋巴细胞上的功能性表达,”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 177: 845-850)。然而,已经证明不同的抗体在它们的免疫抑制力方面是不同的,这可能反映了它们的亲和力或表位特异性。CTLA-4/Ig融合蛋白和抗CD28 Fabs已被证明对下调IL-2的产生具有相似的效果。

体内施用可溶性的CTLA-4/Ig融合蛋白已被证明能抑制小鼠体内T细胞依赖的抗体应答(Linsley, P.S., J. L. Greene, P. Tan, J. Bradshaw, J. A. Ledbetter, C. Anasetti, 和 N. K. Damle, (1992), “活化的T淋巴细胞上CTLA-4和CD28的共表达和功能协作,”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 176: 1595-1604; Lin, H., S. F. Builing, P. S. Linsley, R. O. Wei, C. D. Thompson, 和 L.A. Turka, (1993), “由CTLA-4-Ig加供体特异的运输所诱导的长期接受主要组织相容性复合体不匹配的心脏异体移植植物,”《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 178: 1801),并且更进一步讲,更大的剂量也能够抑制再次免疫的应答,这证明了这种方法用于治疗抗

体介导的自身免疫病的可行性。另外, CTLA-4/Ig 通过直接抑制 T 细胞和 B7.1/B7.2 抗原递呈细胞之间的相互作用而能够预防小鼠体内胰岛细胞的排斥 (Lenschow, D. J., G. H. Su, L. A. Zuckerman, N. Nabavi, C. L. Jellis, G. S. Gray, J. Miller, 和 J. A. Bluestone, (1993), “ CTLA-4 另一个配体的表达和功能意义, ” 《美国国家科学院院刊》 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 90: 11054-11058)。在这种情况下, 可获得供体特异的长期耐受。

3. 用于抗体筛选的重组噬菌体展示技术

到目前为止, 与 B7.1 和 B7.2 交叉反应的单克隆抗体尚未见报道。正如所提及的, 这样的抗体作为免疫抑制剂将有可能是非常可取的。噬菌体展示技术正开始替代传统的用于分离免疫应答中所产生的抗体的方法, 因为这样可以获得比用传统方法所可能获得的更大比例的免疫库。这种情况的部分原因是由于 PEG 融合的无效性、染色体的不稳定、以及与异种杂交瘤制备有关的大量组织培养和筛选。相比之下, 噬菌体展示技术依赖于有可能捕获与某一已知抗原的应答有关的整个免疫球蛋白基因库的分子技术。

该技术由 Barber 等人所述, 《美国国家科学院院刊》 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 88:7978-7982, (1991)。基本上, 免疫球蛋白重链基因经 PCR 扩增并克隆进含有编码丝状噬菌体 M13 的次要衣壳蛋白基因的一个载体, 克隆是以重链融合蛋白得以构建的方式进行。重链融合蛋白与轻链基因一起在噬菌体 M13 组装的时候掺入 M13 的噬菌体颗粒中。每一个重组噬菌体在它的基因组中都包含一个在噬菌体表面展示的不同抗体 Fab 分子的基因。在这些基因库中, 可以克隆和展示 10^6 以上的不同抗体。噬菌体库在抗原包被的微量培养孔中进行淘筛, 非特异的噬菌体被冲洗掉, 并且与抗原结合的噬菌体得到洗脱。分离来自抗原特异性克隆的基因组并切除基因 III, 这样抗体可以可溶性 Fab 形式进行表达用于进一步的鉴定。一旦筛选出一个作为潜在治疗候选者的一价 Fab, 就能方便地转换成一个完整的抗体。以前所述的用于将 Fab 序列转换成为完整抗体的表达系统是 IDEC's 哺乳动物表达载体 NEOSPLA。该载体包含人 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ 恒定区基因。用 NEOSPLA 载体转染 CHO 细胞, 经扩增后, 这个载体系统已被报道能提供非常高的表达水平 ($>30\text{pg}/\text{细胞}/\text{天}$)。

4. 灵长动物化的抗体

另一种制备重组抗体的高效方法由 Newman 所发表, (1992), 《生物技术》(Biotechnology), 10: 1455-1460。更具体而言, 该技术能够制备包含猴可变区和人恒定区的灵长动物化的抗体。该参考文献在此全文引入作为参考。再者, 该技术也见于在 1995. 1. 25 提交的普通转让的美国申请号 08/379,072, 它是在 1992. 7.10 提交的美国系列号 07/912,292 的继续申请, 系列号 07/912,292 是在 1992. 3. 23 提交的美国系列号 07/856,281 的部分继续申请, 最终系列号 07/856,281 是在 1991. 7. 25 提交的美国系列号 07/735,064 的部分继续申请。08/379,072 和母申请在此全文引入作为参考。

该技术对抗体进行修饰, 这样当它们用于人时不会作为异种抗原而排斥。该技术依赖于用人抗原或受体对南美猴进行免疫。发展这种技术是用来制备抗人细胞表面抗原的高亲和力的单克隆抗体。

以前已有报道采用这种方法制备的抗体能表现出对人的效应功能, 免疫原性降低, 并且血清半衰期长。该技术依赖于这个事实, 即南美猴在种系发生上是与人相似的, 尽管存在这个事实, 但是它们仍然将许多人的蛋白质识别为异物, 因而引发免疫应答。而且, 因为南美猴在种系发生上是与人接近的, 所以在这些猴中所产生的抗体已发现与在人体内产生的抗体具有高度的氨基酸同源性。事实上, 当对猕猴免疫球蛋白轻链和重链的可变区基因进行测序后, 人们发现每个基因家族的序列与人的对应基因具有 85-89 % 的同源性 (Newman 等, (1992), 同上)。用这种方法产生的第一个抗体, 抗 - CD₄ 抗体, 与人免疫球蛋白框架区的共有序列具有 91-92 % 的同源性。Newman 等, 《生物技术》(Biotechnology), 10: 1458-1460, (1992)。

人 B7 抗原特异的单克隆抗体以前已在文献中有报道。例如, Weyl 等, 《人类免疫学》(Hum. Immunol), 31 (4), 271-276, (1991) 描述了利用自然的和突变的抗原性变体来测定的抗 HLA-B-27 的人单克隆抗体的表位定位图。再者, Toubert 等, 《临床实验免疫学》, (Clin. Exp. Immunol.), 82 (1), 16-20, (1990) 描述了也与 35KD 的细菌外膜蛋白发生反应的一种 HLA-B27 单克隆抗体的表位定位图。再一篇, Valle 等, 《免疫学》(Immunol.), 69 (4), 531-535, (1990) 描述了一种属于 IgG1 亚类、能识别表达于活化的 B 细胞和 HTLV-1 转化的 T 细胞上的 B7 抗

原的单克隆抗体。进一步, Toubert 等,《免疫学杂志》(J. Immunol.), 141 (7), 2503-9, (1988) 描述了 HLA-B27 和 HLA-B7 抗原的表位定位图,是通过在大肠杆菌中制备的这两个等位基因的杂合基因所构建的区域内重组体来进行的。

一些研究者一直认为 B7 抗原的高表达与自身免疫病相关。例如, Ionesco-Tirgoviste 等,《相关医学》(Med. Interre), 24 (1), 11-17, (1986) 报道在 I 型胰岛素依赖型糖尿病患者中 B7 抗原的表达增加。再者, 已有人报道 B7 抗原在银屑病患者的皮肤树突状细胞上有表达。(Nestle 等, 《临床研究杂志》(J. Clin. Invest.) 94 (1), 202-209, (1994))。

进一步说,在文献中已有人报道利用亲和纯化的可溶性 HLA-B7 来抑制抗 HLA-B7 异体反应性的 CTL。(Zavazava 等《移植》(Transplantation), 51 (4), 838-42, (1991))。再者,已有人报道 B7 受体的可溶性配体, CTLA-4-Ig 在动物模型中阻断 B7 活性(参见,如 Lenschow 等,《科学》(Science), 257, 789, 7955 (1992))的应用以及能够抑制 B7 的一种 B7-1-Ig 融合蛋白质的应用。

发明概述和目的

本发明的目的之一是制备并鉴定抗人 B7 抗原,更具体地说是抗人 B7.1 抗原和/或人 B7.2 抗原的新型猕猴抗体。

更具体地说,本发明的目的之一是制备并鉴定抗人 B7 抗原,即人 B7.1 和人 B7.2 抗原,的新型猕猴抗体,该目的是通过筛选噬菌体展示库和/或利用人 B7 抗原,即,人 B7.1 或 B7.2 抗原免疫的猴 B 淋巴细胞所获得的猴异种杂交瘤而达到的。

本发明的另一特定目的是提供抗 - B7 猴源单克隆抗体和其灵长动物化形式的抗体,这些抗体能特异地与人 B7.1 和/或 B7.2 抗原结合,抑制活化 T 细胞的 B7/CD86 通路和 B7 刺激,因而能抑制 IL-2 的产生和 T 细胞增殖,并作为有效的免疫抑制剂发挥作用。

本发明的另一目的是提供抗人 B7.1 和抗人 B7.2 猴源单克隆抗体和其灵长动物化形式的抗体,这些抗体能抑制供体脾细胞培养物中抗原驱动的应答,如抗原特异性 IgG 应答、IL-2 产生和细胞增殖。

本发明的另一特定目的是鉴定人 B7.1 和人 B7.2 抗原特异的一些特定的猴源单克隆抗体和具有诸如亲和力、免疫抑制活性等有利特性的它们的灵长动物化形式的抗体,它们作为治疗剂是有效的。更具体地说,

这些猴源抗体和它们灵长动物化的形式可被用作诸如免疫抑制剂之类，即用来阻断抗原驱动的免疫应答，治疗诸如银屑病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、I型糖尿病、特发性血小板减少性紫癜（ITP）等自身免疫病，以及预防器官移植排斥。

本发明的另一目的是提供含有一种或多种人B7抗原，即，人B7.1和/或B7.2抗原，特异的猴源单克隆抗体，或它们灵长动物化形式的抗体的药用组合物，该组合物中还包括一种制药上可接受的载剂或赋形剂。这些组合物将被用作，例如，免疫抑制剂，以治疗诸如特发性血小板减少性紫癜（ITP）和系统性红斑狼疮（SLE）等自身免疫病，阻断抗原驱动的免疫应答，以及预防移植受者中的器官移植排斥。

本发明的另一目的是通过使用治疗上有效量的与B7抗原即人B7.1和/或B7.2抗原特异结合的一种或多种猴或灵长动物化的单克隆抗体来提供新的治疗方法。这样的治疗方法有助于治疗通过抑制B7:CD28通路可以治疗的疾病，如，特发性血小板减少性紫癜（ITP）、系统性红斑狼疮（SLE）、I型糖尿病、银屑病、类风湿性关节炎、多发性硬化病、再生障碍性贫血等自身免疫病，该方法也有助于预防在移植病人中的排斥。

本发明还有另一目的是提供至少表达人B7.1和/或B7.2抗原特异的猴源单克隆抗体的重链和轻链可变区的转染子，例如，CHO细胞。

本发明的另一目的是提供编码人B7.1和/或B7.2抗原特异的猴源单克隆抗体的重链和/或轻链可变区的核酸序列，以及用于表达灵长动物化抗体、含有这些核酸序列的表达载体。

定义

对以下术语下定义，目的是更明确地理解本发明。

排除抗体（Depleting antibody）——一种杀伤活化的B细胞或其它抗原递呈细胞的抗体。

非排除抗体（Non-depleting antibody）——一种阻断B7与T细胞激活配体CD28和CTLA-4之间共刺激作用的抗体。这样，它使抗原递呈细胞无反应但并不消除它们。

灵长动物化抗体——一种重组抗体，它是生物工程制备的，含有一种猴源抗体，尤其是南美猴抗体，的重链和轻链可变区，并且含有人恒定区序列，优选人免疫球蛋白 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ 的恒定区（或PE变体）。这种抗

体的制备描述于 Newman 等, (1992), “用于免疫治疗人类疾病的重组抗体的灵长动物化: 一种抗人 CDH 的猕猴/人嵌合抗体” 《生物技术》 (Biotechnology), 10: 1458-1460; 也见于普通转让的 08/379,072, 二者在此全文引入作为参考。已有人报道这些抗体与人源抗体的同源性程度高, 即 85-90%, 能表现出对人的效应功能, 其免疫原性降低, 以及可能与人抗原具有高亲和力。

B7 抗原 — 本申请中的 B7 抗原包括例如人 B7、 B7.1 和 B7.2 抗原。这些抗原能与 CD28 和/或 CTLA-4 结合。这些抗原在 T 细胞的激活过程中发挥共刺激作用。再者, 所有这些 B7 抗原都包含细胞外的免疫球蛋白超家族 V 和 C 相似的区域、一段疏水的跨膜区和一个胞浆内尾部。(参见, Freeman 等, 《科学》 (Science) 262: 909, (1993)), 并且都是高度糖基化的。

抗 - B7 抗体 — 是一些抗体, 优选猴源单克隆抗体或其灵长动物化形式的抗体, 这些抗体以足够的亲和力与诸如人 B7.1 和/或 B7.2 抗原等人 B7 抗原特异地结合, 以阻断 B7:CD28 之间的相互作用, 并因此诱发免疫抑制。

附图简述

图 1 示出含有根据猕猴免疫球蛋白序列所设计的引物的 pMS 载体, 它用于筛选针对 B7 所制备的在丝状噬菌体表面展示的重组免疫球蛋白库。

图 2 示出用于表达人 B7.1 抗原特异的本文的灵长动物化抗体的 NEOSPLA 表达载体。

图 3 示出抗已转染的 CHO 细胞表面 B7.1 的猴抗 - B7.1 血清滴度。

图 4 示出存在未标记 SB7 和 Mab L307.4 鼠抗 - B7.1 抗体的情况下, SB7.1 亲和纯化的猴源抗体与放射标记的 sB7.1 结合的抑制情况。

图 5 示出通过与亲和纯化的 SB7.1 竞争性结合, 放射标记的猴 135 和 L3707.4 抗 - B7.1 抗体与 B7 阳性的人 SB 细胞结合的抑制。

图 6 示出通过与未标记的 SB7.1 鼠抗 - B7.1 抗体 (L307.4) 和猴 1127 亲和纯化的血清抗体竞争性结合, 放射性标记的 B7-Ig 结合于活化的人外周血 T 细胞的抑制。

图 7 示出在混合淋巴细胞培养中抗 - B7.1 亲和纯化的猴血清抗体对 IL-2 蛋白的抑制。

图 8a 描述了 7C10 轻链的一种灵长动物化形式的氨基酸和核酸序列。

图 8b 描述了 7C10 重链的一种灵长动物化形式的氨基酸和核酸序列。

图 9a 描述了 7B6 轻链的一种灵长动物化形式的氨基酸和核酸序列。

图 9b 描述了 7B6 重链的一种灵长动物化形式的氨基酸和核酸序列。

图 10a 描述了 (16C10) 灵长动物化轻链的氨基酸和核酸序列。

图 10b 描述了 (16C10) 灵长动物化重链的氨基酸和核酸序列。

发明详述

如上所述, 本发明涉及制备与人 B7.1 和/或人 B7.2 抗原特异结合的新型猴源单克隆抗体, 以及它们衍生的灵长动物化的抗体。这些抗体对人 B7.1 和/或 B7.2 具有高亲和力, 因而可以作为抑制 B7:CD86 通路的免疫抑制剂。

优选通过筛选噬菌体展示库或利用 B7 (如, 人 B7.1 和/或 7.2) 免疫的猴的 B 淋巴细胞所制备的猴异种杂交瘤来实现猴源单克隆抗体的制备。

正如所提及的, 用于制备抗 - B7 抗体的第一种方法包括重组噬菌体展示技术。该技术总体上如上所述。

基本上, 该技术包括构建在丝状噬菌体表面展示的抗 B7 抗原的重组免疫球蛋白库, 以及筛选那些分泌与 B7.1 和/或 B7.2 抗原具有高亲和力的抗体的噬菌体。正如以上所提及的, 优选选择与人 B7.1 和 B7.2 都结合的抗体。为达到这个方法的要求, 本发明已为猴文库构建了一个独特的能降低重组的可能性和改善稳定性的文库。 pMS 这个载体将在下面的内容中详述, 见图 1。

基本上, 为采用噬菌体展示技术用于猕猴文库, 该载体含有特异的引物以利于 PCR 扩增猴免疫球蛋白的基因。这些引物的设计依据那些在发展灵长动物化技术时所获得的猕猴序列和包括人序列的数据库。

适合的引物公开于普通转让的 08/379,072 , 在此将它引入作为参考。

第二种方法涉及人 B7 抗原，优选人 B7.1 和 B7.2 抗原，对猴即猕猴进行免疫。猕猴用于制备单克隆抗体的内在优点如上所述。尤其是，这种猴，即南美猴，可以针对人抗原或受体进行免疫。再者，根据 Newman 等人所述的方法，所获得的抗体可用于制备灵长动物化的抗体，Newman 等，《生物技术》(Biotechnology), 10, 1455-1460, (1992), 以及 Newman 等，普通转让的 1995. 1. 25 提交的美国系列号 08/379,072，在此全文引入它们作为参考。

从南美猴中获得这些抗体的重要有利条件是这些猴能识别许多人类蛋白质作为异物，因而为抗体的形成提供了条件，这些抗体中有一些对所需要的人抗原，比如，人细胞表面蛋白质和受体，有高的亲和力。另外，因为它们在种系发生上与人接近，所以所产生的抗体与人体内产生的抗体相比，表现出高度的氨基酸同源性。正如以上所提及的，当对猕猴免疫球蛋白的轻链和重链可变区基因进行测序后，人们发现每个基因家族的序列与人的相应序列有 85-88 % 的同源性 (Newman 等, (1992), 同上)。

基本上，对南美猕猴施用人 B7 抗原，如，人 B7.1 和/或人 7.2 抗原，从它们体内分离出 B 细胞，比如，对动物进行淋巴结活检来分离，然后在聚乙二醇 PEG 的介导下 B 淋巴细胞与 KH6/B5 (小鼠×人) 异种杂交瘤细胞进行融合。然后鉴定出那些分泌与诸如人 B7.1 和/或人 7.2 抗原等人 B7 抗原结合的抗体的异种杂交瘤。

与 B7.1 和 B7.2 都能结合的抗体是所期望的，因为这种抗体有可能用于抑制 B7.1 和 B7.2 以及其它 B7 与它们对应受体，即人 CTLA-4 和 CD28，之间的相互作用。抗这些表位的抗体可抑制人 B7.1 与人 B7.2 与它们的 T 细胞对应受体之间的相互作用。这有可能提供协同效果。

然而，只与一种人 B7 抗原、 B7.1 抗原或 B7.2 抗原结合的那些抗体也是非常期望的，因为这些分子共同参与 T 细胞激活、克隆性扩增、淋巴因子 (IL-2) 分泌，以及对抗原的应答。若人 B7.1 与 B7.2 均能与 人 CTLA-4 和 CD28 结合，那么有可能潜在存在至少一个共同的或同源的能产生猕猴抗体的区域 (可能是一个共同的构象表位或一些表位)。

发明人选用人 B7.1 抗原来免疫猕猴，所使用的是在 CHO 细胞中产生的并利用 L307.4 - 琼脂糖凝胶亲和柱通过亲和层析所纯化的可溶性重组 B7.1 抗原。然而，人 B7 抗原，人 B7.1 抗原或人 B7.2 抗原的特定

来源不是关键的，只要它具有足够的纯度，能够引起对所施用的特定 B7 抗原以及可能对其它 B7 抗原的特异抗体应答就行了。

目前已克隆并测序了人 B7 抗原，人 B7.1 抗原（也称之为 CD80）和人 B7.2 抗原（也称之为 CD86）的基因，因此能方便地通过重组的方法进行制备。

优选所施用的人 B7 抗原，人 B7.1 抗原和/或人 B7.2 抗原将以可溶性形式进行使用，比如，去掉了跨膜和胞浆区，因而只剩下细胞外区，即细胞外超家族 V 和 C 相似区域，的 B7，B7.1 或 B7.2 基因的表达产物。（参见，如，Grumet 等，《人类免疫学》（Hum. Immunol.），40 (3), 228-234 页，1994，该文叙述人 B7 可溶性形式的表达，在此将它全文引入作为参考）。

在能够引起特异性抗体产生的条件下，用 B7，B7.1 和/或 B7.2 抗原，优选其可溶性形式，对猕猴进行免疫。优选，可溶性的人 B7，B7.1 或 B7.2 抗原与一种佐剂联合使用，比如，弗氏完全佐剂（CFA）、明矾、皂素、或其它的已知佐剂，以及这些佐剂的组合等。一般地，这种情况需要间隔数月重复免疫，比如，通过反复注射的方法。举例说明，可溶性 B7.1 抗原与佐剂联合使用，同时间隔 3 或 4 个月进行加强免疫是有效的，最终产生含有与人 B7.1 抗原结合的抗体的血清。

免疫后，通过对免疫的动物进行淋巴结活检等方式收集 B 细胞，然后在聚乙二醇的介导下与 KH6/B5（小鼠×人）异种杂交瘤细胞进行融合。制备这种异种杂交瘤的方法是已知的，并可见于 1995. 1. 25 Newman 等人提交的美国系列号 08/379,072，在此引入作为参考。

然后鉴定那些能分泌与人 B7，B7.1 和/或 B7.2 结合的抗体的异种杂交瘤。这可通过已知的技术来完成。举例说明，可利用酶或放射性核素标记的人 B7，B7.1 和/或 B7.2 抗原，通过 ELISA 或放射免疫试验来进行测定。

然后将分泌对人 B7，B7.1 和/或 B7.2 抗原有所需特异性的抗体的细胞系进行亚克隆直到单克隆。

在本发明中，发明人筛选纯化的抗体以测定它们与以下抗原结合的能力：在 ELISA 试验中的可溶性 B7.1 抗原包被的培养板，抗原阳性的 B 细胞，和在细胞表面表达人 B7.1 抗原的 CHO 转染瘤细胞（transfectomas）。另外，筛选抗体以了解它们阻断 B 细胞/T 细胞相

互作用的能力，这可通过混合淋巴细胞反应中 IL-2 的产生和氙标记的胸苷的摄取来测定，同时可利用 ^{125}I 放射标记的可溶性 B7.1 (SB7.1) 测定 B7 的结合。

另外，测定那些来自猕猴的亲纯化抗体以了解它们对表达 B7.1/Ig 融合蛋白的 CHO 转染子的反应性，以及对表达人 B7.2 抗原的 CHO 细胞的反应性。这些结果表明 B7.1 免疫血清与 B7.2 转染瘤细胞结合。抗体与 B7.2 抗原结合可利用可溶性 B7.2-Ig 试剂来证实。正如在实施例中所讨论的，这可通过从 CHO 转染瘤细胞中制备和纯化足够量的 B7.2-Ig 以制备 B7.2-Ig - 琼脂糖凝胶亲和柱来完成。与 B7.2 交叉反应的那些抗体将与 B7.2 - Ig - 琼脂糖凝胶柱相结合。

然后，能表达与人 B7 抗原，B7.1 抗原和/或 B7.2 抗原特异结合的抗体的细胞系被用于克隆可变区序列以制备灵长动物化的抗体，基本上如下所述，Newman 等, (1992)，同上，以及 Newman 等, 1995. 1. 25 提交的美国系列号 379,072，二者均在此引入作为参考。基本上，该过程包括从细胞中提取 RNA，转换成 cDNA、然后用 Ig 特异的引物通过 PCR 进行扩增。合适的引物描述于 Newman 等, 1992, 同上，以及美国系列号 379,072。（参见，尤其是美国系列号 379,072 的图 1）。

所克隆的猴可变区基因然后插入到含有人重链和轻链恒定区基因的表达载体中。优选采用 IDEC, Inc. 的称为 NEOSPLA 的一个专利表达载体来进行。该载体见于图 2，并包括巨细胞病毒的启动子/增强子、小鼠 β 珠蛋白的主要启动子、SV40 的复制起点，牛生长激素多聚腺苷酸序列、新霉素磷酸转移酶的外显子 1 和外显子 2、人免疫球蛋白 κ 或 λ 恒定区、二氢叶酸还原酶基因、人免疫球蛋白 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ PE 恒定区和前导序列。人们发现该载体在融合有猴可变区基因，转染 CHO 细胞后，在含 G418 的培养基中筛选并在含氨甲喋呤的培养基中扩增的情况下，能够非常高水平地表达灵长动物化的抗体。

举例说明，以前已公开发表，该表达系统能制备对 CD4 和其它的细胞表面受体具有高亲和力 ($K_d \leq 10^{-10}\text{M}$) 的灵长动物化抗体。另外，已发现这些抗体表现出与原来的猴源抗体相同的亲和力、特异性和功能活性。这个载体系统基本上公开于普通转让的美国系列号 379,072，在此将它引入作为参考，以及 1993. 11. 3 提交的美国系列号 08/149,099，也在此全文引入作为参考。该载体系统是为高水平表达而准备的，即 >

30 pg/细胞/天。

正如以下所讨论的，发明人已选出四种最重要的与 B7.1 抗原特异结合、也可能与 B7.2 抗原结合的候选猴源单克隆抗体。这些猴源单克隆抗体在此命名为 7B6、16C10、7C10 和 20C9。

正如以下更详细的讨论，对这些抗体进行评定以了解它们阻断 B 细胞/T 细胞之间相互作用的能力，这可通过混合淋巴细胞反应中 IL-2 的产生和氚标记的胸苷的摄取来测定。为了进行测定 T 细胞结合的 T 细胞结合实验，在存在 PHA 刺激物的情况下培养人外周血淋巴细胞 3 - 6 天。B7 的结合利用 ^{125}I 放射标记的可溶性 B7.1 来进行放射测定。所观察到的结果表明所有这些抗体以高亲和力与 B7.1 抗原结合，并有效地阻断 B 细胞/T 细胞之间的相互作用，这可通过混合淋巴细胞培养的 IL-2 分泌减少以及增殖减弱来证明。

这些特定猴源单克隆抗体的特性概括如下：

1. 为了证明猴抗体阻断 CTLA4-Ig 之间物理的相互作用的能力，将不同浓度的猴抗 B7.1 抗体和未标记的 CTLA4-Ig 与放射标记的 CTLA-Ig ^{125}I 一起共孵。抑制实验的结果显示了猴源抗体的 IC50（引起 50 % 抑制的抑制物的浓度）为：

a:	7C10:	0.39 $\mu\text{g}/\text{Ml}$
b:	16C10:	1.60 $\mu\text{g}/\text{Ml}$
c:	20C9:	3.90 $\mu\text{g}/\text{Ml}$
d:	7B6:	39.0 $\mu\text{g}/\text{Ml}$

2. Scatchard 分析表明猴抗体与 B7-Ig 包被的培养板结合的表观亲和常数（Kd）大约为：

a:	7C10	$6.2 \times 10^{-9}\text{M}$
b:	16C10	$8.1 \times 10^{-9}\text{M}$
c:	7B6:	$10.7 \times 10^{-9}\text{M}$
d:	20C9:	$16.8 \times 10^{-9}\text{M}$

3. 在混合淋巴细胞反应实验（MLR）中体外检测这些抗体。MLR 表明 4 种抗 - B7.1 抗体都能抑制 IL-2 的产生，但抑制程度不同，如以下 Ibgo 值所示：

a:	7B6:	5.0 $\mu\text{g}/\text{M}$
b:	16C10:	<0.1 $\mu\text{g}/\text{M}$

c: 20C9: 2.0 μ g/M

d: 7C10: 5.0 μ g/M

4. 检测猴抗 - B7.1 抗体与人外周血淋巴细胞 (PBL) 上 B7 分子结合的能力。FACS 分析表明所有的这 4 种猴源抗体都检测为阳性。
5. 通过 FACS 分析检测猴源抗体 16C10、7B6、7C10 和 20C9 的 C1q 结合。结果表明 7C10 猴 Ig 与 B7.1 CHO - 转染的细胞孵育后表现出强的 C1q 结合。16C10 是阳性的, 然而 20C9 和 7B6 猴源抗体是阴性的。
6. 为了选出一种动物模型用于病理毒理研究, 用不同品种的动物血检测猴源抗体。结果表明猴抗 - B7.1 抗体与人、黑猩猩、以及可能与狒狒有交叉反应。

根据这些特性, 可以看出, 16C10, 7C10 和 20C9 三种猴源单克隆抗体具有最有利的特性, 同时 16C10 和 7C10 比 20C9 更好一点。

采用以上所述的以及在普通转让的美国系列号 08/379,072 中所述的技术, 发明人已经克隆了 7C10、7B6 和 16C10 的可变区, 并提供了 7C10 轻链、7C10 重链、7B6 轻链、7B6 重链、16C10 轻链和 16C10 重链的灵长动物化形式的氨基酸和核酸序列。这些氨基酸和核酸序列可见于图 8a 和 8b、9a 和 9b、以及 10a 和 10b。人 γ 1 恒定区的 DNA 和氨基酸序列可见于 08/379,072。

正如以上所讨论的, 优选采用 NEOSPLA 表达载体表达这些灵长动物化抗体, 该载体如图 2 所示, 基本上被描述于普通转让的 08/379,072 和 08/149,099, 这两个申请在此引入作为参考。

正如以上所提及的, 本文的灵长动物化抗体优选包含人免疫球蛋白的 γ 1 或 γ 4 恒定区, 同时优选在两位置突变以形成 γ 4 PE 的 γ 4。 γ 4 PE 突变型包含两个突变, 在 CH2 区引入一个谷氨酸以消除残留的 FCR 结合, 和在铰链区一个脯氨酸的替代, 目的是增强重链二硫键的稳定性。(参见, Alegre 等,《免疫学杂志》(J. Immunol.), 148, 3461-3468, (1992); 和 Angel 等,《分子免疫学》(Mol. Immunol.), 30, 105-108, (1993), 二者在此引入作为参考)。

本文的灵长动物化抗体是含有 $\gamma 1$ 、 $\gamma 4$ 还是 $\gamma 4$ PE 恒定区主要依赖于作为治疗目标的特定疾病。优选，制备和检测针对特定疾病目标的排除和非排除性的灵长动物化 IgG1 和 IgG4 抗体。

已经知道本文的猴源单克隆抗体的结合和功能特性，这些抗 - B7.1 单克隆抗体和它们灵长动物化的形式应该非常适合作为治疗试剂，用于阻断 B7:CD28 之间的相互作用，因而提供免疫抑制效果。尤其是，已知它们与 B7.1 抗原的高亲和力和通过混合淋巴细胞培养中 IL-2 与氘标记的胸苷的摄取所测定的阻断 B 细胞/T 细胞相互作用的能力，以及它们通过减少抗原特异的 IgG 应答、IL-2 产生与细胞增殖所显示的有效抑制供体脾细胞培养中抗原驱动的应答的能力，所以这些猴源单克隆抗体和它们的灵长动物化形式应该能作为调节 B7:CD28 通路的有效免疫抑制剂来发挥作用。这对于治疗许多治疗时需要诱发免疫抑制以抑制不必要的抗原特异性 IgG 应答的疾病，如自身免疫病来说，是有意义的，对预防器官排斥和移植物抗宿主的疾病来说也是有意义的。基本上，在对治疗时需要 B7:CD28 通路抑制的任一种疾病进行治疗时，本文的抗体将是有益的。

本文的抗 - B7.1 抗体的主要治疗适应症包括，以举例的方式说明，自身免疫病，如特发性血小板减少性紫癜（ITP）、系统性红斑狼疮（SLE）、1 型糖尿病、多发性硬化、再生障碍性贫血、银屑病和类风湿性关节炎。

本文的抗 - B7.1 抗体的另一有效治疗适应症是用于预防器官移植和骨髓移植（BMT）中的移植物抗宿主疾病（GVHD）。本文的抗体也可用于诱导宿主对供体 - 特异性同种异型抗原的耐受，并因此有利于移植和降低移植物排斥的发生率。在同种异体心脏移植的鼠模型中，人们已证实静脉内给予 CTLA4-Ig 可以诱导免疫抑制或者甚至诱导对同种异型抗原的耐受。（Lin 等，《实验医学杂志》（J. Exp. Med.），178: 1801, 1993; Torka 等，《美国国家科学院院刊》（Proc. Natl. Acad. Sci., USA），89:11102, 1992）。预期本文的灵长动物化抗 - B7.1 抗体将表现出相似的或更高的活性。

用上述方法或通过相当的技术所制备的抗体可以通过亲和和大小排阻层析的联合使用来纯化，然后用于功能性生物学试验的鉴定。这些试验包括测定特异性和结合亲和力，以及与所表达的独特型有关的效应

功能, 如, ADCC 或补体结合。这种抗体可以作为被动或主动的治疗试剂来治疗人类的许多疾病, 包括 B 细胞淋巴瘤、包括 AIDS 在内的感染性疾病、自身免疫病和炎性疾病以及和移植有关的疾病。这些抗体或以它们天然的形式或作为抗体/螯合物、抗体/药物或抗体/毒素复合物的一部分来进行使用。另外, 完整的抗体或抗体的片断 (Fab₂, Fab, Fv) 可以被用作造影剂或在主动免疫治疗中作为潜在的疫苗或免疫原以诱发抗 - 独特型应答。

有效引起治疗效果的抗体量可以通过本领域中普通技术人员所熟知的标准技术进行测定。通常溶于某种制药上可接受的缓冲液的抗体可通过标准技术供给, 并且可采用任一所需要的途径进行使用。因为申请专利的本抗体的功效和人对它们的耐受, 所以有可能反复使用这些抗体以在人体内治疗各种疾病或疾病状态。

本发明的抗 - B7.1 抗体 (或它们的片断) 能够有效诱导免疫抑制, 即诱导人或动物免疫系统的抑制。因此本发明涉及在有需要的人或其它的动物体内预防性或治疗性诱导免疫抑制的一种方法, 它是通过对这种人或其它动物使用有效的、无毒剂量的本发明的这种抗体而实现的。

本发明中的复合物诱导免疫抑制的能力已在用于检测这方面的标准试验中得到证实, 这些试验比如, 混合淋巴细胞反应试验或通过胸苷摄取进行的测定 T - 细胞增殖抑制的试验。

本发明的抗体能用来诱导免疫抑制这个事实表明, 它们应当有助于治疗或预防排斥或抗移植器官或组织 (如, 肾、心、肺、骨髓、皮肤、角膜等); 治疗或预防自身免疫性、炎性、增生性或过度增生性疾病, 以及免疫介导的疾病的皮肤表现 (这种疾病如, 类风湿性关节炎、红斑狼疮、系统性红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎、多发性硬化、重症肌无力、1 型糖尿病、眼色素层炎、肾病综合症、银屑病、特应性皮炎、接触性皮炎和更严重的湿疹性皮炎、皮脂溢性皮炎、扁平苔癣、天疱疮、大疱性天疱疮、表皮松解的大疱形成、荨麻疹、血管神经性水肿、脉管炎、红斑、皮肤嗜曙红细胞增多症、斑秃等); 治疗可逆性气道阻塞性疾病、肠炎和过敏 (如, 腹腔疾病、直肠炎、嗜曙红细胞增多性胃肠炎、肥大细胞病、节段性回肠炎和溃疡性结肠炎) 以及与食物有关的过敏 (如, 偏头痛、鼻炎和湿疹)。

本领域中技术熟练的人通过常规实验将能够确定抗体有效的无毒性的剂量以实现诱导免疫抑制的目的。然而，有效量通常是每天每公斤体重大约 0.05 ~ 100 毫克。

本发明中的抗体（或它们的片断）也应有助于治疗哺乳动物的肿瘤。更具体地说，它们可能有助于减少肿瘤的大小、抑制肿瘤的生长和/或延长荷瘤小鼠的生存期。相应地，本发明也涉及治疗人或其它动物肿瘤的一种方法，通过给这种人或动物使用有效的、无毒性剂量的抗体来实现该治疗。本领域中技术熟练的人通过常规实验将能够确定抗-B7 抗体有效的、无毒性的剂量以达到治疗癌症的目的。然而，预期通常的有效量为每天每公斤体重大约 0.05 ~ 100 毫克。

根据以上所提及的治疗方法，本发明中的抗体可以以足以产生这种治疗或预防效果的剂量施用于人或其它动物。本发明的这种抗体可以一种常规药剂的形式施用于这种人或其它动物，这种药剂形式是根据已知的技术通过组合本发明的抗体和一种常规的制药上可接受的载剂或稀释剂来进行制备的。本领域中的技术人员将认识到制药上可接受的载剂或稀释剂的形式和特性取决于将被组合的活性成分的量、给药途径和其它众所周知的变量。

本发明抗体（或它们的片断）的给药途径可为口服、非肠道用药、吸入或局部用药。此处所用的术语非肠道用药包括静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、直肠或阴道用药。通常优选非肠道用药中的皮下和肌肉内形式。

使用本发明的组合物预防性或治疗性诱导免疫抑制，或治疗癌症的非肠道用药和口服的日常剂量通常为每天每公斤体重大约 0.05 ~ 100 毫克，但优选 0.5 ~ 10 毫克。

本发明的抗体也可以通过吸入进行用药。通过“吸入”是指鼻内或口腔内吸入用药。对于这种用药方式，可通过常规技术制备适当药剂形式，比如气雾制剂或定量的吸入剂。优选本发明的组合物将被使用的剂量通常为大约 10 ~ 100 毫克。

本发明的抗体也可以局部使用。局部用药是指非全身用药，并包括本发明的抗体（或它的片断）复合物外在应用于表皮、口腔和将这种抗体滴入耳、眼和鼻，以及它没有明显地进入血流的应用部位。全身用药是指口腔、静脉内、腹腔内和肌肉内用药。当然，达到治疗或预防效果

所需要的抗体的量将随着所选用的抗体、所治疗疾病的性质和严重程度以及正在接受治疗的动物而变化，并且最终是在医生的判断下而确定。通常本发明抗体局部用药的适当剂量将是每天每公斤体重大约 1 ~ 100 毫克。

制剂

当一种抗体或它的片断有可能单独使用时，优选将它制成一种药用制剂的形式。对局部用药来说，活性成分可能占 0.001% ~ 10% w/w, 比如，1% ~ 2% 的制剂量，尽管它可以占制剂的 10 % w/w 这么多的量，但优选不超过制剂的 5 % w/w，而且更优选占制剂重量的 0.1% ~ 1% w/w。

本发明局部应用的制剂包括与一种或多种可接受的载剂组合在一起的一种活性成分以及任选的任何一种其它的治疗性成分。制剂中载剂必须是“可接受的”其含义是与制剂中的其它成分相容并且对受体无害。

适合局部用药的制剂包括那些适合通过皮肤渗透到需要治疗的部位的液体或半液体制剂，比如擦剂、洗剂、软膏、油膏或糊膏，以及适合用于眼、耳或鼻的滴剂。

根据本发明制备的滴剂可以包括水状或油状的无菌溶液或悬液，并可通过在含有杀细菌性和/或杀真菌性试剂和/或任何其它合适防腐剂的适当水溶液中溶解活性成分来进行制备，并且优选包括一种表面活性剂。所制备的溶液然后过滤使澄清，转入一种合适的容器中，随后密封容器并通过高压或在 90 - 100 °C 保持半小时来除菌。另一种选择方法，溶液通过过滤除菌并通过一种无菌技术转移到容器中。适合包含在滴剂中的杀细菌性或杀真菌性试剂的实例是硝酸苯汞或乙酸苯汞（0.002%）、氯化苯甲烃铵（0.01 %）和乙酸洗必太（0.01%）。适合用于制备一种油溶液的溶剂包括甘油、稀释的乙醇和丙二醇。

根据本发明制备的洗剂包括那些适合用于皮肤或眼的制剂。一种眼用洗剂可包括含或不含杀菌剂的一种无菌水性溶液，并可通过类似于制备滴剂的方法来进行制备。用于皮肤的洗剂或擦剂也可包含一种促进干燥并使皮肤清凉的试剂，如乙醇或丙酮，以及/或包含一种保湿剂（moisturizer），如甘油或诸如蓖麻油或花生油等一种油。

根据本发明所制备的软膏、油膏或糊膏是含活性成分的半固体的外用制剂。它们的制备方法包括：在适当机器的帮助下，将精细分离的或粉末形式的活性成分，单独或以溶于一种水性或非水性流体的溶液或悬液的形式，与一种脂肪或非脂肪主剂进行混合。主剂可包括诸如硬、软或液体石蜡，甘油，蜂蜡，金属皂等碳氢化合物；一种粘胶；诸如杏仁、玉米、花生、蓖麻或橄榄油等一种天然油；羊毛脂或它的衍生物，或与诸如丙二醇或聚乙二醇等一种醇类混合的一种脂肪酸，如硬脂酸或油酸。该制剂可以包含任何一种适当的表面活性剂，如一种阴离子、阳离子表面活性剂，或非离子型表面活性剂如山梨聚糖酯或它的聚氧乙烯衍生物。制剂也可包含悬浮剂，如天然树胶、纤维素衍生物或含硅土等无机材料，以及包含羊毛脂等其它成分。

本文的抗 - B7.1 抗体或它的片断也可以与调节 B7:CD28 通路的其它成分联合使用。以举例的方式说明，这些成分包括 IL-7 和 IL-10 等细胞因子， CTL4-Ig、可溶性 CTLA-4 以及抗 CD28 抗体及其片断。

本领域中技术熟练的人将认识到本发明中的一种抗体或它的片断对每个个体剂量的最适量和剂量范围（ spacing ）将取决于所治疾病的性质和程度、用药的形式、途径和部位、以及正接受治疗的特定动物，并且这种最适量可通过常规技术进行确定。本领域中的技术人员也将明白治疗的最佳程序，即，在特定的天数内每天所给予的本发明中一种抗体或它的片断的剂数，这可利用治疗测定试验的常规过程由本领域的技术人员进行确定。

虽然没有进一步的详细说明，但可以相信本领域的技术人员根据前面的描述可以最大程度地利用本发明。因此，以下的制剂被解释为仅仅是举例说明性的实施方案，而不是以任何方式对本发明范围进行限制。

胶囊组合物

本发明的一种胶囊形式的药用组合物由以下方法制备：用 50mg 粉末形式的本发明中的一种抗体或它的片断、100mg 乳糖、32mg 滑石粉和 8mg 硬脂酸镁共同填充一种标准的两部分组成的硬明胶胶囊。

可注射的非肠道用组合物

本发明的一种以适合注射用药形式使用的药用组合物由以下方法制备：将本发明的抗体或它的片断按 1.5 % 的重量搅拌于 10 % 体积的丙二醇水溶液中。过滤除菌。

油膏组合物

本发明的抗体或它的片断 1.0g。

白色的软石蜡至 100g。

本发明的抗体或它的片断分散于小体积的载剂中以制备调匀的、均一的制品。然后用该分散剂填充可折叠的金属管。

局部软膏组合物

本发明的抗体或它的片断 1.0g。

Polawax GP200 20.0g。

无水羊毛脂 2.0g。

白蜂蜡 2.5g。

羟基苯甲酸甲酯 0.1g。

蒸馏水至 100.0g。

polawax、蜂蜡和羊毛脂于 60 °C 在一起加热。加入羟基苯甲酸甲酯溶液并高速搅拌使之均匀。然后使温度降至 50 °C。然后加入本发明的抗体或它的片断并彻底分散混匀，随后低速搅拌使组合物冷却。

局部洗剂组合物

本发明的抗体或它的片断 1.0g。

山梨聚糖单月桂酸酯 (Sorbitan Monolaurate) 0.6g。

Polysorbate 20 0.6g。

十六硬脂醇 (Cetostearyl Alcohol) 1.2g。

甘油 6.0g。

羟基苯甲酸甲酯 0.2g。

纯化的水 B.P. 至 100-00 ml。 (B.P. = 英国药典)

在 75 °C 羟基苯甲酸甲酯和甘油溶于 70ml 水中。山梨聚糖单月桂酸酯、 Polysorbate 20 和十六硬脂醇于 75 °C 一起溶化并加入到水溶液中。持续搅拌使所形成的乳浊液均匀并冷却，然后本发明的抗体或它的片断加入到剩余体积的水中成为一种悬液。搅拌整个的悬液直至它变得均匀。

滴眼剂组合物

本发明的抗体或它的片断 0.5g。

羟基苯甲酸甲酯 0.01g。

羟基苯甲酸丙酯 0.04g。

纯化的水 B.P.至 100-00 ml。

羟基苯甲酸甲酯和丙酯在 75 °C 溶于 70ml 纯水中, 然后使所形成的溶液冷却。随后加入本发明的抗体或它的片断, 溶液通过滤膜 (0.022 μ m 孔径) 进行过滤除菌, 并无菌包装于适当的消毒容器中。

通过吸入用药的组合物

在有 15 - 20ml 容积的气雾剂容器中: 10mg 本发明的抗体或它的片断与 0.2 - 0.5% 的诸如 Polysorbate 85 或油酸等润滑剂混合, 并在氟里昂等推进剂, 优选在 (1, 2 二氯四氟乙烷) 和二氟氯甲烷的混合物中分散混匀, 然后将它们置入一种适合于经鼻或经口吸入用药的适当气雾剂容器中。

通过吸入用药的组合物

在有 15 - 20ml 容积的气雾剂容器中: 10mg 本发明的抗体或它的片断溶解于乙醇中 (6 ~ 8ml), 加入 0.1 - 0.2% 的诸如 Polysorbate 85 或油酸等润滑剂; 然后在氟里昂等推进剂中, 优选在 (1, 2 二氯四氟乙烷) 和二氟氯甲烷的混合物中分散混匀, 并将它们置入一种适合于经鼻或经口吸入用药的适当气雾剂容器中。

本发明中的抗体和药用组合物尤其有利于非肠道用药, 即皮下、肌肉内或静脉内。适合非肠道用药的组合物通常包括一种含有本发明的抗体或它的片断的溶液, 或一种溶于可接受的载剂, 优选一种水性载剂的混合剂。可以使用多种水性载剂, 如水、缓冲水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸等。这些溶液是无菌的并且通常不含颗粒物质。可采用常规的、众所周知的消毒技术对这些溶液消毒。组合物可以包含制药上可接受的为达到近似的生理状态所需要的辅助物质, 如 Ph 调节或缓冲剂等。在这类药用制剂中本发明中的抗体或它的片断的浓度可在很大范围内变动, 即从低于约 0.5%, 通常是或至少是 1 % 左右, 到高达 15 或 20 % 的重量百分数, 并且根据所选择的特定用药方式, 主要依据流体体积、粘性等来进行选择。

因此, 可以制备适合肌肉注射的本发明的药用组合物, 使之包含 1 Ml 无菌缓冲水, 和 50mg 本发明的抗体或它的片断。类似地, 可以制备适合静脉内输注的本发明的药用组合物, 使之包含 250ml 无菌 Ringer's 液, 和 150mg 本发明的抗体或它的片断。用于制备可以非肠道用药的

组合物的实际方法是众所周知的或对本领域的技术人员是明白易懂的，并且更详细的描述见于，如，《雷明顿制药科学》（Remington's Pharmaceutical Science），第15版，Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania，在此引入作为参考。

本发明的抗体（或其片断）可以冻干保存，然后在使用前重悬于一种适当载剂中。已经证实该技术对传统的免疫球蛋白是有效的，并且可以利用本领域中已知的冻干和重建技术。

根据要达到的结果，本发明的药用组合物可用于预防性和/或治疗性处理。在治疗性应用中，给正患某种疾病的病人使用足以治愈或至少部分治愈该疾病和它的并发症剂量的组合物。在预防性应用中，给尚未患某种疾病的病人使用包含该抗体或它的一种混合剂的组合物以增强病人的抵抗力。

在施治医生所选择的剂量水平和用药途径下，可以一次或多次使用药用组合物。在任何一种情况下，本发明的药用组合物应提供足以有效治疗病人量的本发明的已有改变的抗体（或它的片断）。

也应该注意到本发明的抗体可用于设计和合成那些与抗体一样在治疗中是有益的肽或非肽化合物（模拟物）。参见，如，Saragovi等，《科学》（Science），253, 792-795, (1991)。

为了进一步举例说明本发明，提供以下实施例。这些实施例无意，也不应把它们解释为对本发明进行进一步限制。

实施例 1

在丝状噬菌体表面展示的重组免疫球蛋白库最初是由以下两篇文献所述的：McCafferty等，《自然》（Nature），348:552-554, 1990 和 Barbas等，《美国国家科学院院刊》（Proc. Natl. Acad. Sci., USA）88:7978-7982, 1991。利用该技术，已从免疫人重组库中分离出高亲和力抗体（Barbas等，《美国国家科学院院刊》（Proc. Natl. Acad. Sci., USA）589:10164-10168, 1992）。尽管所用的噬菌体展示概念基本上类似于Barbas, 1991, 同上文献所述的概念，但该技术已发生了以下改变，用一种猴库独特的载体进行替换以降低重组的可能性和增加稳定性。图1的该载体，pMS含有单一的乳糖启动子/操纵子，用于有效转录和翻译多顺反子的重链和轻链猴DNA。该载体含有两个不同的前导

序列, 轻链的 omp A (Movva 等, 《生物和化学杂志》(J. Bio. Chem.), 255: 27-29, (1980)), 和重链 Fd 的 pel B (Lei, 《细菌学杂志》(J. Bact.), 4379-109: 4383 (1987))。这两个前导序列都被翻译成疏水的信号肽, 它们引导重链和轻链克隆的产物分泌到周质中。在周质的氧化环境中, 这两条链折叠并形成二硫键以组成稳定的 Fab 片断。我们从噬菌粒 bluescript 中得到载体的主要组成部分。(Stratagene, La Jolla, CA)。它含有 β -内酰胺酶的编码基因, 该酶使携带 pMS DNA 的细菌能够抗氨苄青霉素(羧苄青霉素)。我们从 bluescript 中也得到了多拷贝质粒 ColE1 的复制起点以及丝状噬菌体 f1 的复制起点。噬菌体 f1 的复制起点(所谓的基因内区)传递信号, 通过病毒的酶分子起始单链 pMS DNA 的复制, 起始衣壳的合成和终止 RNA 的合成。pMS DNA 的复制和组装进噬菌体颗粒中需要必须由辅助噬菌体所提供的病毒蛋白质。我们采用了尤其适合该过程的辅助噬菌体 VCSM13, 因为它也含有一个编码卡那霉素抗性的基因。通过将卡那霉素和羧苄青霉素加入到生长培养基中来筛选用 VCSM13 和 pMS 转化的细菌。细菌将最终产生含 pMS 或 VCSM13 基因组的丝状噬菌体颗粒, 辅助噬菌体的包装比 pMS 的包装效率低, 这会产生主要含有重组 pMS 噬菌体的混合噬菌体群。噬菌体的尾端选取每个尾端特异的次要蛋白。此处尤其感兴趣的是在噬菌体的每个尾端有 3 ~ 5 拷贝的基因 III 的产物。基因 III 的产物含有 406 个氨基酸残基, 并且它是噬菌体通过 F 菌毛感染大肠杆菌所必须的。重链的前两个区域, 可变区和 CH1 区, 与基因 III 蛋白质羧基端的一半相融合。该重组菌毛蛋白质在 pel B 前导序列的引导下, 被分泌到周质中, 它在此积聚并在组装入噬菌体的衣壳中之前与轻链形成二硫键。再者, 另一个载体含有构建在基因 III 下游的一段 FLAG 序列。FLAG 是在 Fd 蛋白的羧基端进行表达的一段 8 个氨基酸的多肽。我们正利用商品化的单克隆抗 - FLAG M2 通过 ELISA 进行噬菌体 Fab 的纯化和检测 (Brizzard, 《生物技术》(Bio Techniques), 16 (4): 730-731, (1994))。

构建了载体 pMS 之后, 我们用对照抗体基因检测它表达噬菌体结合的 Fab 的能力。我们将一种抗 - 破伤风类毒素抗体, (从 Dr. Carlos Barbas 得来), 克隆进 pMS 并转化 XLI-blue 菌。我们用 VCSM13 共转染细胞并制备展示抗 - 破伤风类毒素抗体的噬菌体。我们进行效率测定实验, 在实验中, 抗 - 破伤风类毒素噬菌体与携带一种不相关抗体的噬

菌体按 1:100,000 的比例混合。我们用 50 μ l 这种混合的噬菌体对抗原(破伤风类毒素)包被的聚苯乙烯培养板进行了三次淘筛。非粘附的噬菌体被冲洗掉,而粘附的噬菌体用酸进行洗脱。将洗脱的噬菌体用于感染一份新鲜的 XL1-blue 细菌,并加入辅助噬菌体。过夜扩增后,制备噬菌体并于抗原包被的培养板上再次淘筛。经过三次淘筛后,我们能够证实我们已成功地富集了抗-破伤风类毒素的噬菌体。本技术的成功也依赖于制备可溶性 Fabs 的能力,它用于鉴定最终的淘筛产物。这可通过用限制性酶 *Nhe* I 从 pMS DNA 中切去基因 III 并随后再连接来完成。基因 III 被切去之后, Fab 不再展示在噬菌体表面但在周质间隙积聚。从表达可溶性 Fab 的细菌中准备溶解物并且利用 ELISA 检测对抗原的特异性。检测到了高水平表达的可溶性 Fab。

为了改造噬菌体展示技术以适合猕猴文库的应用,我们设计了特异的引物用于 PCR 扩增猴免疫球蛋白基因。这些引物依据于当我们在发展 PRIMATIZED™ 抗体技术时所获得的猕猴序列(参见, 08/379,072, 在此引入作为参考)以及包含人序列的数据库。(Kabat 等, (1991), “免疫学感兴趣蛋白质的序列”, 美国健康和人类服务部, 国立卫生研究院)。

我们设计了三套引物以覆盖猕猴库的扩增。我们的第一套引物是为了扩增重链 VH 和 CH1 (Fd) 区而设计的。它包括一个 3' CH1 区引物和框架 1 区结合的 6 个 5' VH 家族特异的引物。我们的第二套引物是用于扩增完整的 λ 链, 它覆盖了许多 λ 链亚群。它包括一个 3' 引物和框架 1 区结合的 3 个 5' 简并引物。我们的第三套引物是为了扩增 κ 链各亚群而设计的。它包括一个 3' 引物和五个 VK 框架 1 区引物。采用每一套引物时, 使 PCR 参数最佳化以从每一引物对中获得足够强的信号, 这样可获得文库克隆的丰富材料。最近我们利用这些最佳化的 PCR 条件在我们的 pMS 载体中构建了猕猴混合文库。从 CD4 免疫的猴中进行骨髓活检作为免疫球蛋白 RNA 的来源。文库包含大约 10^6 个成员并且正在抗原包被的培养孔上进行淘筛以获得特异性结合者。

实施例 2

制备 B7/CTLA-4 试剂

我们已制备了许多试剂用于以下目的: 免疫猴、体外进行结合和功

能试验、筛选异体杂交瘤和淘筛噬菌体库。表 1 列出每一种试剂和它的预期目的。B7.1 的情况中, 从 SB 细胞中提取出 RNA 并用逆转录酶转成 cDNA。用 B7.1 特异的引物 PCR 扩增 cDNA 第一链并克隆进 IDEC's NEOSPLA 哺乳动物表达载体。CHO 细胞用 B7.1 NEOSPLA DNA 进行转染, 并鉴定出表达膜结合 B7.1 的细胞克隆。B7.1 融合蛋白以类似的方法制备, 但 PCR 扩增的 B7.1 基因被克隆进含有人 CH2 和 CH3 的免疫球蛋白基因的 NEOSPLA 盒载体。用 B7.1/Ig NEOSPLA DNA 转化 CHO 细胞并扩增分泌 B7.1/Ig 融合蛋白的稳定克隆。总体上, 以相似的方法制备 B7.2 和 CTLA4 试剂, 但对 B7.2 来说, RNA 是从已用抗 - Ig 和 IL-4 刺激 24 小时的人脾细胞中分离, 而对 CTLA4 构建物来说, 基因的来源是 PHA 激活的人 T 细胞。

表 1

试剂	目的	CHO 表达
可溶性 B7.1	免疫, 免疫实验	已完成
B7.1 转染子	筛选, ELISA	已完成
B7.1/Ig 融合蛋白	抑制研究, 淘筛	已完成
B7.2 转染子	筛选, ELISA	已完成
B7.2/Ig 融合蛋白	抑制研究, 淘筛	将完成
CTLA4 转染子	抑制研究	将完成
CTL4/Ig	抑制研究	将完成

特意制备这些试剂, 以及抗 B7.1 (L3074) (Becton Dickinson, 1994) 和抗 B7.2 (Fun-1 (Engel 等《血液》(Blood), 84, 1402-1407, (1994)) 单克隆抗体与纯化的羊和兔抗血清, 是为了检测猴源 Fab 片断, 获得以上试剂、抗体和血清的有利于鉴定那些具有所需特性的抗体。

实施例 3

研究南美猴中对可溶性和细胞结合人 B7.1 的免疫应答。

为了评估制备抗人 B7.1 抗原的猴源抗体的可行性，我们首先利用 L307.4 - 琼脂糖凝胶亲和柱通过亲和层析从 CHO 细胞培养基中纯化了重组 SB7.1。然后将 SB7.1 和佐剂注射入 5 只成年南美猴。加强免疫 3 到 4 个月 after，检测 SB7.1 或人 SB 细胞免疫的猴的血清以测定抗原的结合的情况。

从 SB7.1 免疫的 5 只猴和 B7.1 阳性的人 SB 细胞免疫的另外 3 只动物中取血清，检测它们抗表达于转染 CHO 细胞的膜结合 B7.1 的抗体滴度。结果总结于图 3，5 只用亲和纯化的 SB7.1 免疫的猴中有 4 只产生超过 1:5000 的抗体滴度。用含有细胞结合 B7.1 的 SB 细胞来免疫的 3 只动物表达较低的抗体滴度，为 1:1400 ~ 1:2800。

实施例 4

我们用 SB7.1 - 琼脂糖凝胶从所有 8 只免疫的猴血清中纯化抗体，并检测它们结合以下抗原的能力：1) ELISA 中 SB7.1 包被的培养板；2) 抗原阳性的 B 细胞和 3) B7.1 CHO 转染瘤细胞。另外，评估它们阻断 B 细胞相互作用的能力，这可通过混合淋巴细胞反应 (MLR) 中 IL-2 产生和氙标记的胸苷的摄取来测定。对于 T - 细胞结合实验，人血沉棕黄层的外周血淋巴细胞在存在 PHA 刺激物的情况下，培养 3 - 6 天。B7 结合是用 ^{125}I - 放射标记的可溶性 B7.1 (SB7.1) 通过放射实验进行测定的。

实施例 5

猴源抗体与放射标记的 SB7.1 的直接结合

^{125}I - 放射标记的 SB7.1 在 4、1 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的溶液中检测与抗 - B7.1 抗体的结合。示于表 2 的结果表明大多数 SB7.1 免疫的猴所产生的抗体能以浓度依赖的方式与亲和纯化的 ^{125}I -SB7.1 结合。为了评估与标记的 SB7.1 结合的特异性，用来源于两只动物的抗体进行未标记 SB7.1 的竞争实验。从猴 1133 和 1144 中亲和纯化的抗体以 400ng/孔的量包被于微孔培养板中。亲和纯化的未标记 SB7.1 (500 和 100ng/孔) 被用作竞争剂。示于图 4 的结果证实了 SB7.1 制品有效抑制 ^{125}I -SB7.1 与抗体的结合。

表 2
SB7-I¹²⁵ 与 SB7-Sepharose 亲和柱
亲和纯化的猴源抗体结合

抗体	猴编号							
($\mu\text{g/ml}$)	769	908	1133	1135	1137	1139	1144	1146
4	175	213	9,056	12,771	4,318	226	5,781	108
1	106	142	6,569	7,940	3,401	110	3,901	80
0.25	95	104	1,803	2,673	1,219	100	1,186	94

数据是两次试验的平均值并表示为 SB7-I¹²⁵ 结合的 cpm。

实施例 6

放射标记的亲和纯化猴源抗体与 B7⁺细胞的直接结合和 SB7.1 的抑制

比较来源于猴 PRI135 的亲和纯化的放射标记猴抗 - B7.1 抗体和放射标记的 L307.4 MAb 与 B7 阳性的人 SB 细胞的直接结合。加入未标记的 SB7.1 (0.002 - 20 $\mu\text{g/ml}$) 来与这两种标记的抗体进行竞争性结合, 这作为一个特异性对照。我们证实了猴源抗体能与细胞结合的 B7.1 结合并受 SB7.1 的抑制, 如图 5 所示。用 SB7.1 可观察到高至 90 % 的抑制。

实施例 7

放射标记的 B7-Ig 融合蛋白与活化的 T 细胞直接结合并受到亲和纯化的猴源抗体的抑制。

人外周血 T 淋巴细胞被激活 3 - 6 天并检测与 ¹²⁵I-B7.1-Ig 的直接结合。因为 Fc 受体在活化的人 T 细胞上的上调作用, 所以有必要在 B7-Ig 加入到这些细胞中之前, 将这些细胞与热 - 凝聚的预先免疫的免疫球蛋白预先共同孵育以阻断 Fc 结合位点。试验中包括用 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞所做的背景对照以修正背景结合。图 6 表明用亲和纯化的猴抗体在浓度为 200 ~ 8 $\mu\text{g/ml}$ 时可获得 ¹²⁵I-B7.1-Ig 融合蛋白与活化 T 细胞结合的抑制。被用作对照的未标记 SB7.1 和 L307.4 MAb 也能够有效抑制 B7.1-Ig 融合蛋白与细胞的结合。

实施例 8

在混合淋巴细胞反应中猴抗 - B7 抗体对 IL-2 产生的抑制

阻断 CD28/B7 之间的相互作用将会抑制 T 淋巴细胞产生 IL-2。示于图 7 的实验中, 从用 SB7.1 免疫的两只猴 (猴 1137 和 1135) 和用 B7 阳性 SB 细胞免疫的一只猴 (猴 1146) 中亲和纯化猴抗体, 评估它们在抑制混合淋巴细胞反应 (MLR) 中人 T 细胞激活的能力, 这可通过抑制 IL-2 的产生来测定。该实验的结果表明: 来自猴 1146 和 1137 的亲和纯化的抗 - B7.1 抗体当以 50 μ g/ml 的浓度加入时, 会抑制 IL-2 产生。由于缺乏材料, 所以未评估猴 1135 抗体两个最高浓度的抑制情况, 然而它在低浓度时表现出明显的抑制。鼠 Mab L307.4 在 10 μ g/ml 的浓度时是具有抑制性的。在这些浓度下所检测的其它猴血清是阴性的 (未示出数据)。这些结果证实至少三只用可溶性和膜结合的 B7 抗原形式所免疫的猴可产生具有免疫抑制力的 B7 - 阻断抗体。

实施例 9

研究 B7.1 免疫的猴血清与 B7.2 抗原的交叉反应性

制备的抗 B7.1 抗体将被检测与 B7.2 的交叉反应性。从 B7.1 免疫的血清中用 B7.1 亲和纯化抗体, 用该抗体所获得的初步结果提供了与 B7.2 转染的 CHO 细胞结合的提示性证据 (未表示出)。这些数据应该用可溶性 B7.2 Ig 试剂进行证实。我们将通过在 B7.1 Ig - 琼脂糖凝胶上进行亲和层析首先从 B7.1 免疫的动物中纯化出另外的猴源抗体。然后我们将从 CHO 细胞中制备和纯化足够量的 B7.2 Ig 以制备 B7.2 Ig - 琼脂糖凝胶亲和柱。我们将通过与 B7.2Ig - 琼脂糖凝胶柱的结合而从 B7.1 特异的抗体群中筛选出那些与 B7.2 交叉反应的抗体。任何所鉴定出的交叉反应性抗体将通过以下方法被进一步鉴定: 直接与 B7.1 和 B7.2 都转染的 CHO 细胞结合以及 B7.1Ig 对与 B7.2 转染的细胞结合的抑制。

实施例 10

制备噬菌体展示库

从 B7.1 和 B7.2 免疫的猴中制备重组噬菌体展示库。免疫后 7 - 12 天进行淋巴结和骨髓活检以收集 RNA 丰富的 B 细胞和浆细胞。采用 Chomczynski《分析生物化学》(Anal. Biochem.), 162 (1), 156-159, (1987)

所描述的方法,从淋巴细胞中分离出 RNA。利用寡聚 dT 引物和逆转录酶将 RNA 转成 cDNA, cDNA 第一链被分成几份,并且用上述的几套 κ 、 λ 和重链 Fd 引物和 pfu 聚合酶 (Stratagene, San Diego) 或 Taq 聚合酶 (Promega, Madison) 进行 PCR 扩增。收集重链 PCR 扩增的产物,用 Xho VSpe I 限制性酶切割并克隆进 pMS 载体中。随后,收集轻链 PCR 产物,用 Sac I/Xba I 限制性酶切割,并进行克隆以制备重组文库。用文库 DNA 转化 XLI-Blue 大肠杆菌并用 VCSM13 超感染以制备噬菌体展示抗体。文库在 B7.1 或 B7.2 抗原包被的聚苯乙烯培养孔上淘筛四次。分析每一次淘筛中的单个噬菌体克隆。分离出 pMS 载体 DNA 并切去基因 III。制备可溶性 Fab 片断并在 ELISA 中检测与 B7.1 和 B7.2 的结合。

实施例 11

噬菌体 Fab 片断的鉴定

鉴定猴源噬菌体 Fab 片断的特异性和它们阻断 B7.1-Ig 和 B7.2-Ig 与 CTLA-4-Ig 或 CTLA-4 转染的细胞之间结合的能力。4 次淘筛的第一次淘筛之后,也鉴定噬菌体片断与用来免疫的不同种类 B7 的交叉反应性以筛选出高亲和力的片断。从在 B7.1 或 B7.2 抗原包被的表面进行的 4 次淘筛中鉴定出 Fab 片断,通过感染和生长于大肠杆菌 24 小时发酵培养物中进行扩增。通过 Kodak FLAG 与抗-FLAG 亲和柱结合来纯化这些片断。用山羊抗猴 Fab 抗体或与辣根过氧化物酶结合的抗 FLAG MAb,通过一种基于 ELISA 的直接结合的改良 Scatchard 分析来检测纯化的噬菌体 Fabs 的亲和力 (Kato 等,《化学和生物工程杂志》(J. Chem. BioEng.), 76: 451-454, (1993))。抗猴 Fab 试剂将用人重链恒定区 Ig 吸附以除去任何与 B7-Ig 的交叉反应性。测定了与 B7.1-Ig 或 B7.2-Ig 包被的培养板的直接结合之后,计算出每一片断的 Kd 值。

实施例 12

阻断 CTLA-4/B7 结合的噬菌体 Fab 片段

选择在最低浓度最有效阻断 B7-Ig 结合的 Fab 片断作为主要的候选者。筛选是通过竞争性抑制 ^{125}I -B7-Ig 与 CTLA-4-Ig 或 CTLA-4 转染的细胞之间的结合来进行的。另外的筛选标准包括,阻断混合淋巴细胞反应 (MLR),它是通过抑制应答细胞中 ^3H -胸苷的摄取 (Azuma 等,

《实验医学杂志》(J. Exp. Med.), 177: 845-850,; Azuma 等, 《自然》(Nature), 301: 76-79, (1993)) 以及用 IL-2 试验试剂盒直接分析 IL-2 的产生来测定的。选出三或四个在抑制 MLR 和 CTLA-4 结合试验中最有效的候选片断, 以克隆进用于转染 CHO 细胞和表达猴/人嵌合抗体的上述哺乳动物表达载体中。

实施例 13

制备猴异种杂交瘤

从现有的针对 B7.1 和/或 B7.2 的血清检测为阳性的免疫动物中, 制备分泌单克隆抗体的猴异种杂交瘤。对一种或两种抗原表现出阳性的动物进行淋巴结活检。杂交瘤制备的方法类似于已建立的用于制备猴抗 - CD4 抗体的方法 (Newman, 1992 (同上篇文献))。具有高血清滴度的猴将在麻醉下切除许多腹股沟淋巴结。从组织中冲洗出淋巴细胞并在聚乙二醇 (PEG) 的介导下与 KH6/B5 异种杂交瘤细胞融合 (Carrol 等, 《免疫学方法杂志》(J. Immunol. Meth.), 89: 61-72, (1986))。在 H.A.T 培养基中筛选杂交瘤并在 96 孔培养板中反复亚克隆使之稳定。

筛选与 B7.2 交叉反应的 B7.1 抗原特异的猴源单克隆抗体。利用 ^{125}I -B7-Ig 结合试验将鉴定猴源抗 - B7 抗体阻断 B7/CTLA-4 结合的特性。通过 ^3H - 胸苷的摄取和直接测定 IL-2 的生产所测定的 MLR 的抑制被用来筛选出三个候选者。当重复了所有的功能性研究后, 两个候选者将进行 II 期研究并表达于 CHO 细胞。为了达到建立一种用于体内药理学研究的动物模型的目的, 抗 - B7 抗体将在几种动物品系的细胞上进行测定。动物模型的建立将会使已选定的临床指征的临床前研究得以进行。

实施例 14

正如以上所讨论的, 采用上述异种杂交瘤的方法, 已鉴定出四个主要的猴抗 - B7.1 抗体: 16C10、7B6、7C10 和 20C9。这些抗体的特征鉴定如下:

为了证明猴源抗体阻断 CTLA4-Ig 之间物理的相互作用的能力, 将不同浓度的猴抗 B7.1 抗体和未标记的 CTLA4-Ig 与放射标记的 CTLA4-Ig 125 一起共孵。抑制实验的结果表明了猴源抗体的 IC₅₀ (引起 50 %

抑制的抑制物浓度) 为:

a: 7C10:	0.39 μ g/Ml
b: 16C10:	1.60 μ g/Ml
c: 20C9:	3.90 μ g/Ml
d: 7B6:	39.0 μ g/Ml

Scatchard分析表明猴源抗体与 B7-Ig 包被的培养板结合的表观亲和常数 (Kd) 大约为:

a: 7C10	6.2 $\times 10^{-9}$ M
b: 16C10	8.1 $\times 10^{-9}$ M
c: 7B6:	10.7 $\times 10^{-9}$ M
d: 20C9:	16.8 $\times 10^{-9}$

在混合淋巴细胞反应实验 (MLR) 中体外检测这些抗体。 MLR 表明这 4 个抗-B7.1 抗体在不同的程度上抑制 IL-2 的产生:

a: 7B6:	5.0 μ g/Ml
b: 16C10:	0.1 μ g/Ml
c: 20C9:	2.0 μ g/Ml
d: 7C10:	5.0 μ g/Ml

检测这些猴源抗 - B7.1 抗体与人外周血淋巴细胞 (PBL) 上的 B7 结合的能力。 FACS 分析表明这 4 个猴源抗体都检测为阳性。

通过 FACS 分析检测猴源抗体 16C10、 7B6、 7C10 和 20C9 的 CIq 结合。结果表明 7C10 猴 Ig 与 B7.1 CHO - 转染细胞共孵后表现出高强度的与人 CIq 结合。 16C10 为阴性, 与 20C9 和 7B6 猴源抗体相同。

实施例 15

利用引入作为参考的普通转让的美国系列号 08/379,072 的灵长动物化抗体的方法, 以及利用示于图 2 的 NEOSPLA 载体系统, 克隆了 7C10、 7B6 和 16C10 的重链和轻链的可变区, 并且利用 NEOSPLA 载体系统已在 CHO 细胞中合成了它们的灵长动物化形式。灵长动物化 7C10 的轻链和重链、 7B6 的轻链和重链和 16C10 的轻链和重链的氨基酸和核酸序列分别示于图 8a、 8b、 9a、 9b、 10a 和 10b。

已知这些抗体可能具有低的抗原性以及人体效应的功能, 预期这些灵长动物化的抗体将非常适合作为治疗试剂。事实上, 最近已经证实灵

长动物化的 16C10 表现出人 C1₉ 结合功能, 但 16C10 却没有。

本领域中的技术人员将会认识到或能够仅利用常规实验确定许多等价于此处所述的本发明的特定实施方案的对应方案。下列权利要求意在包括这些等价方案。

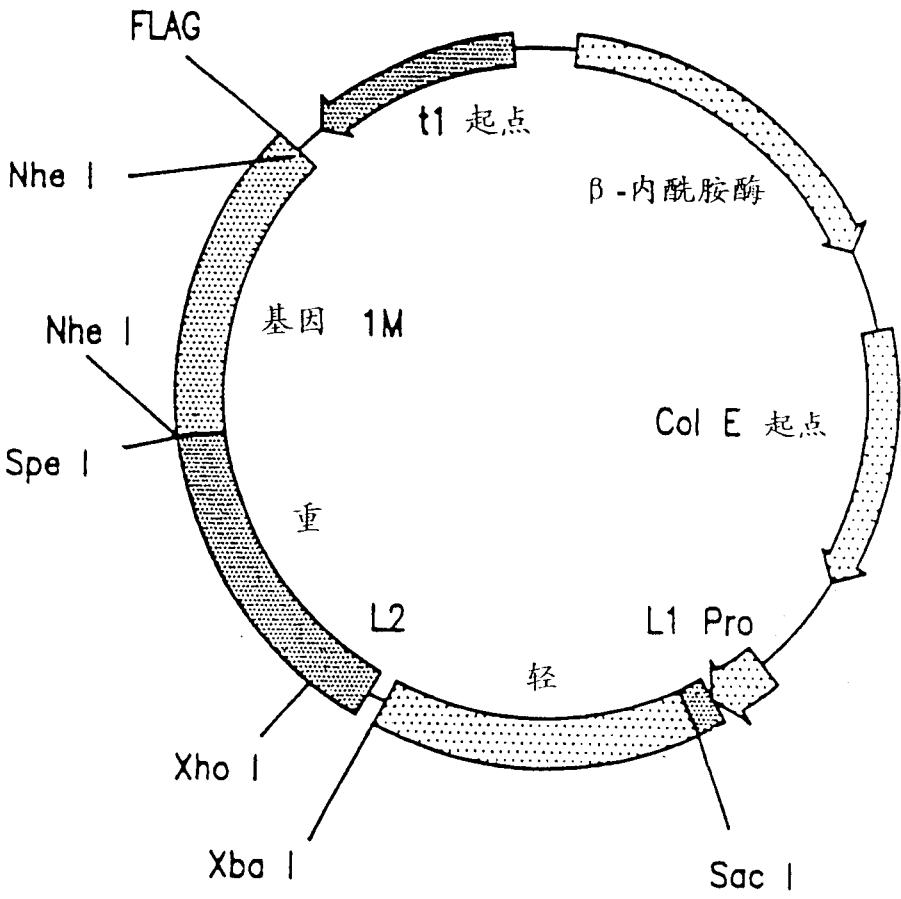


图 1

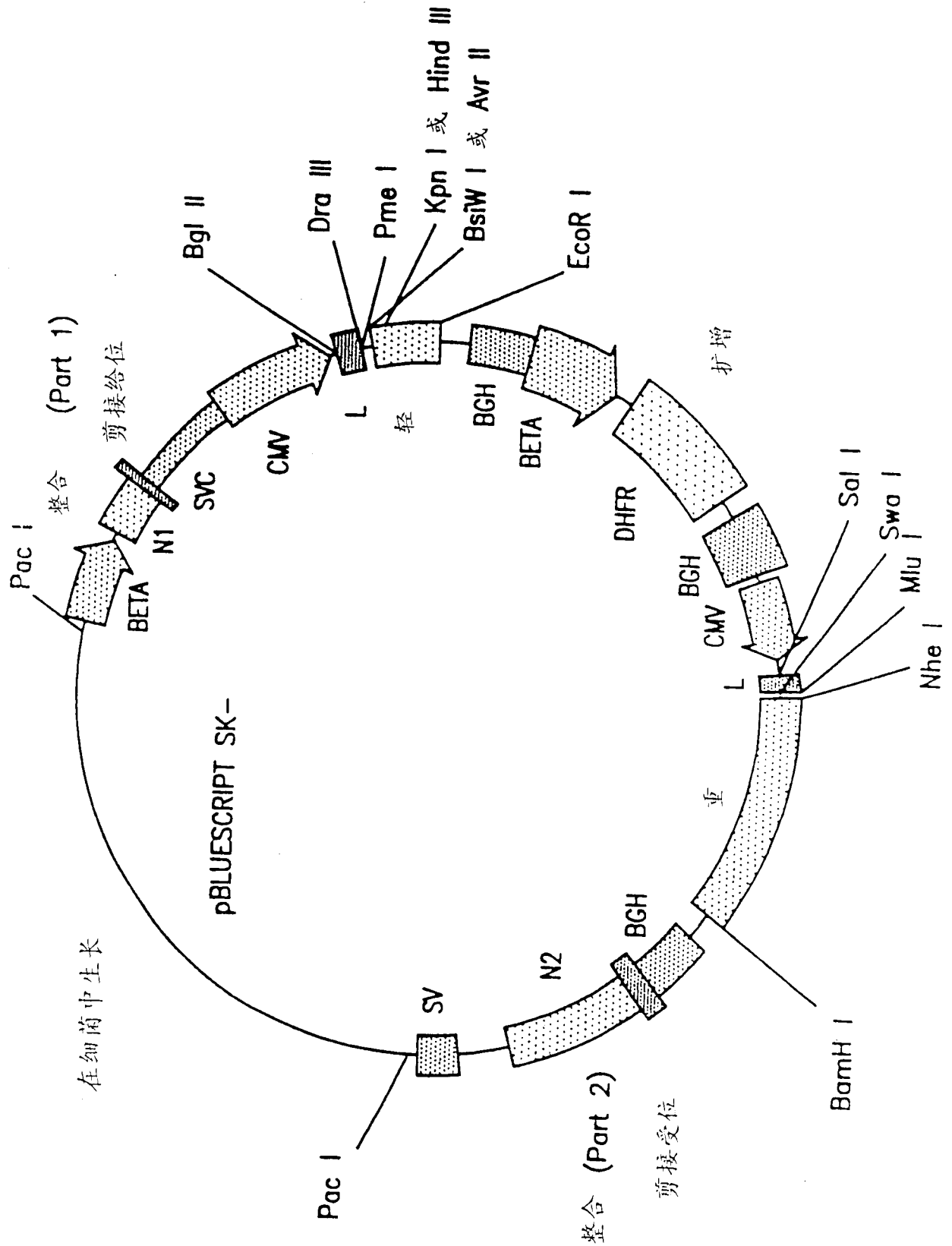
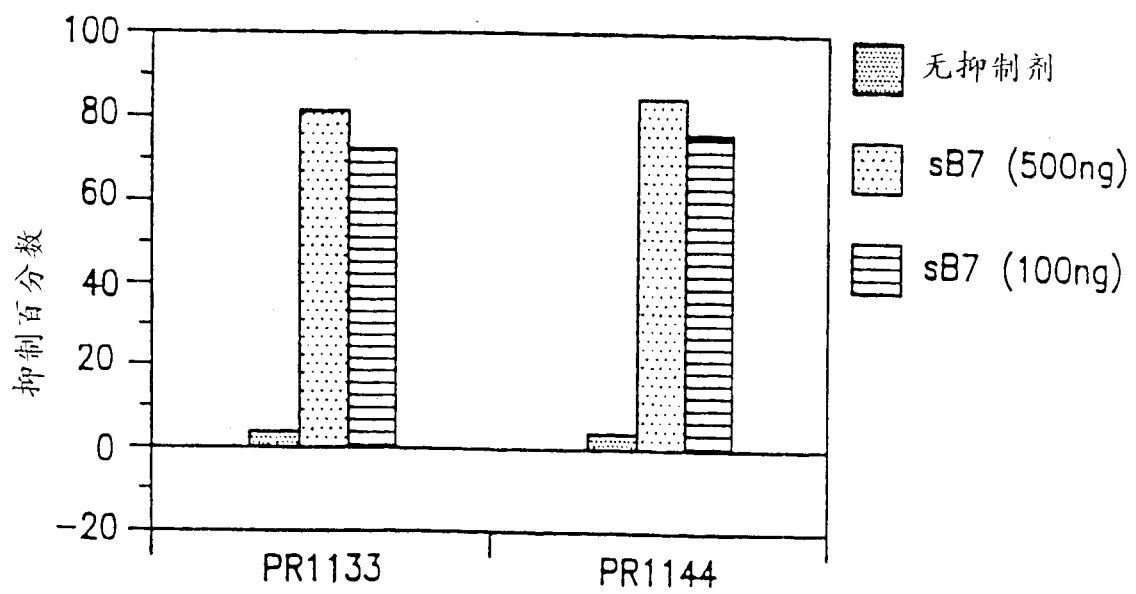
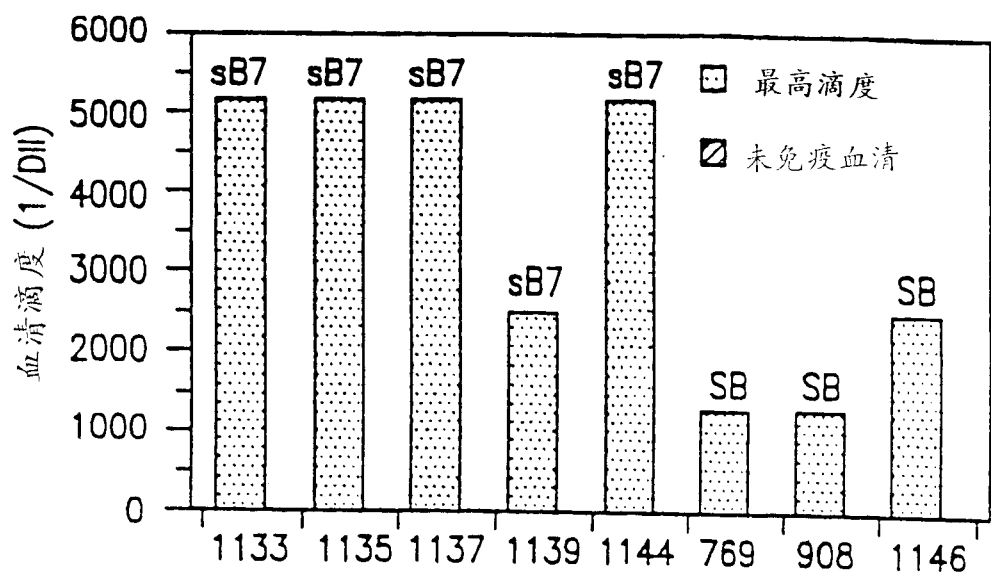


图 2



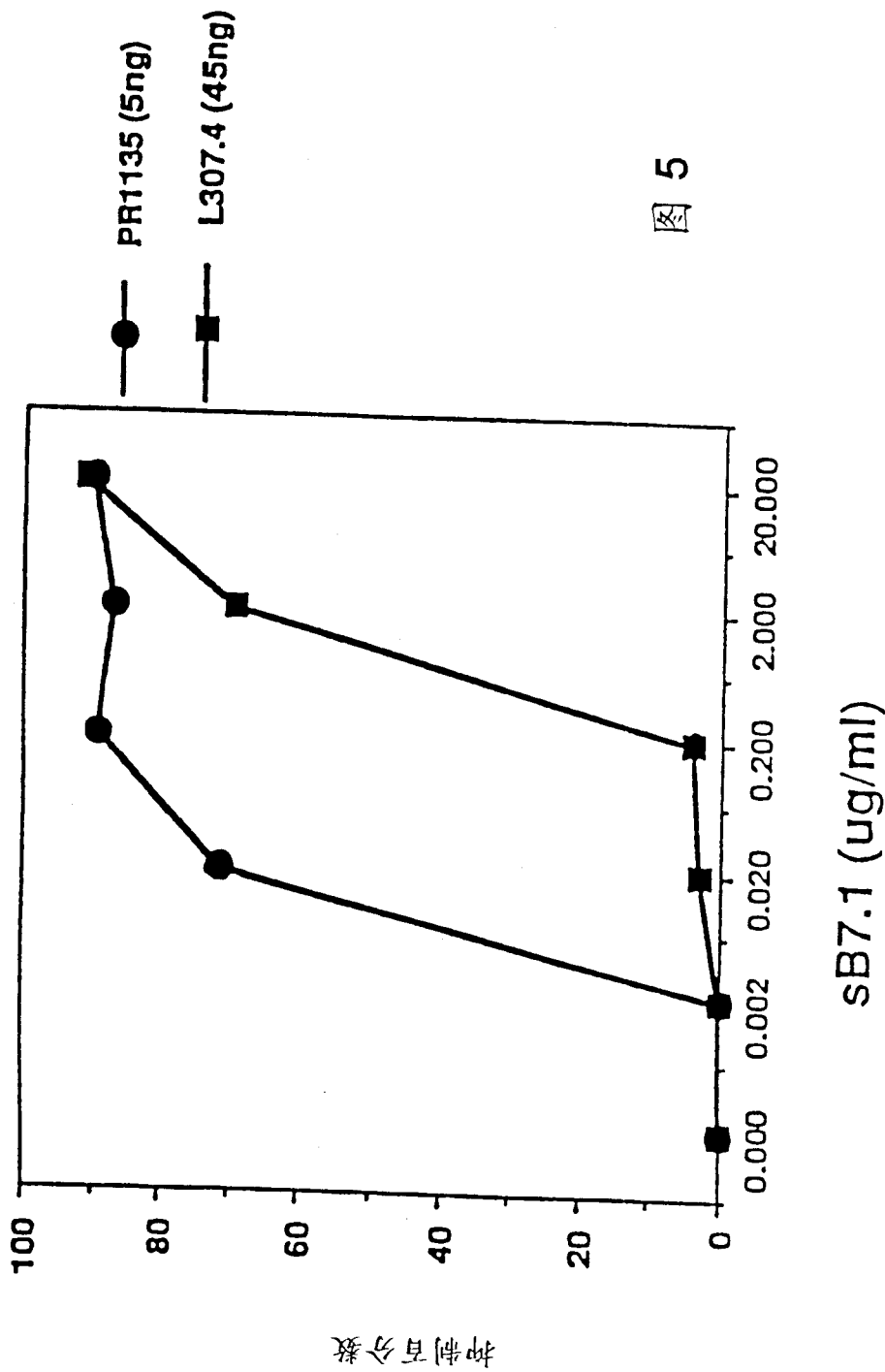


图 5

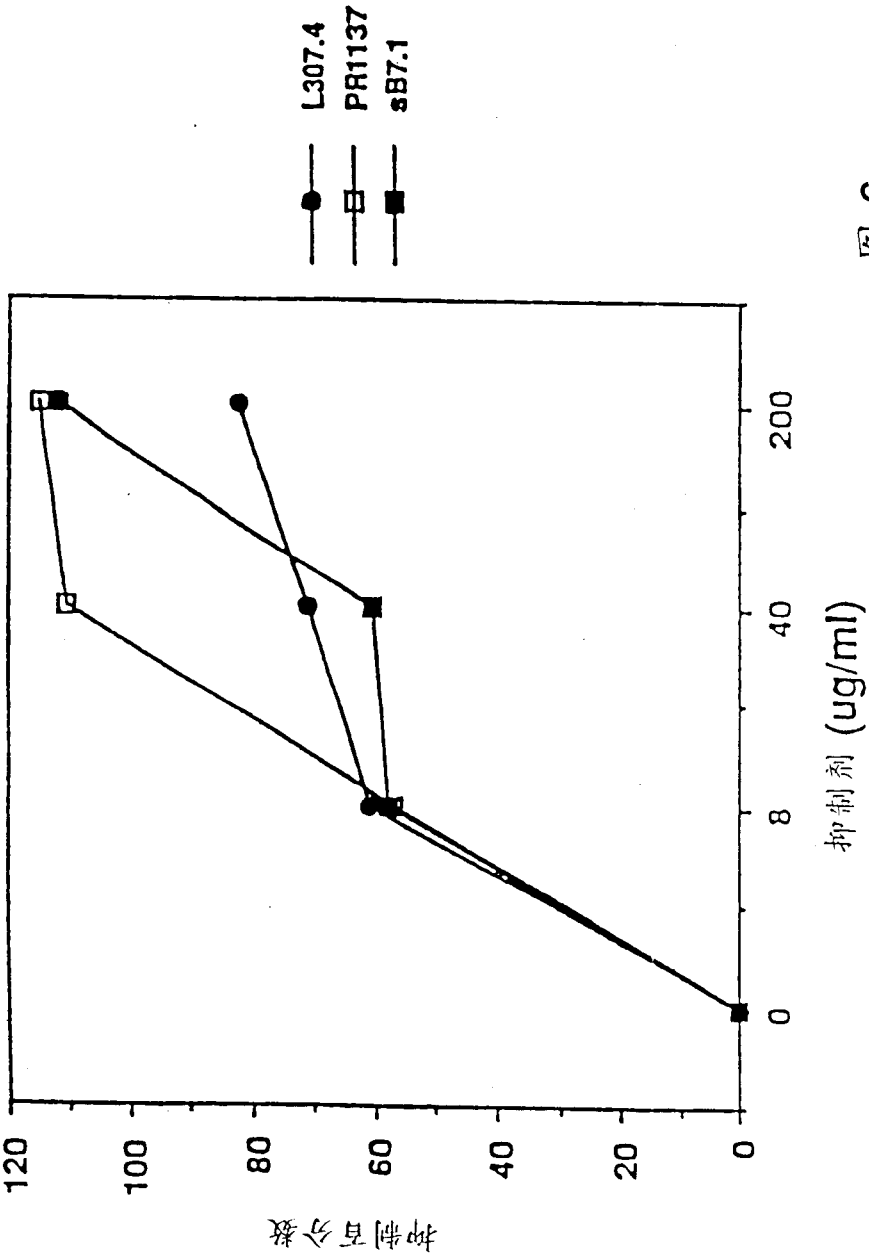


图 6

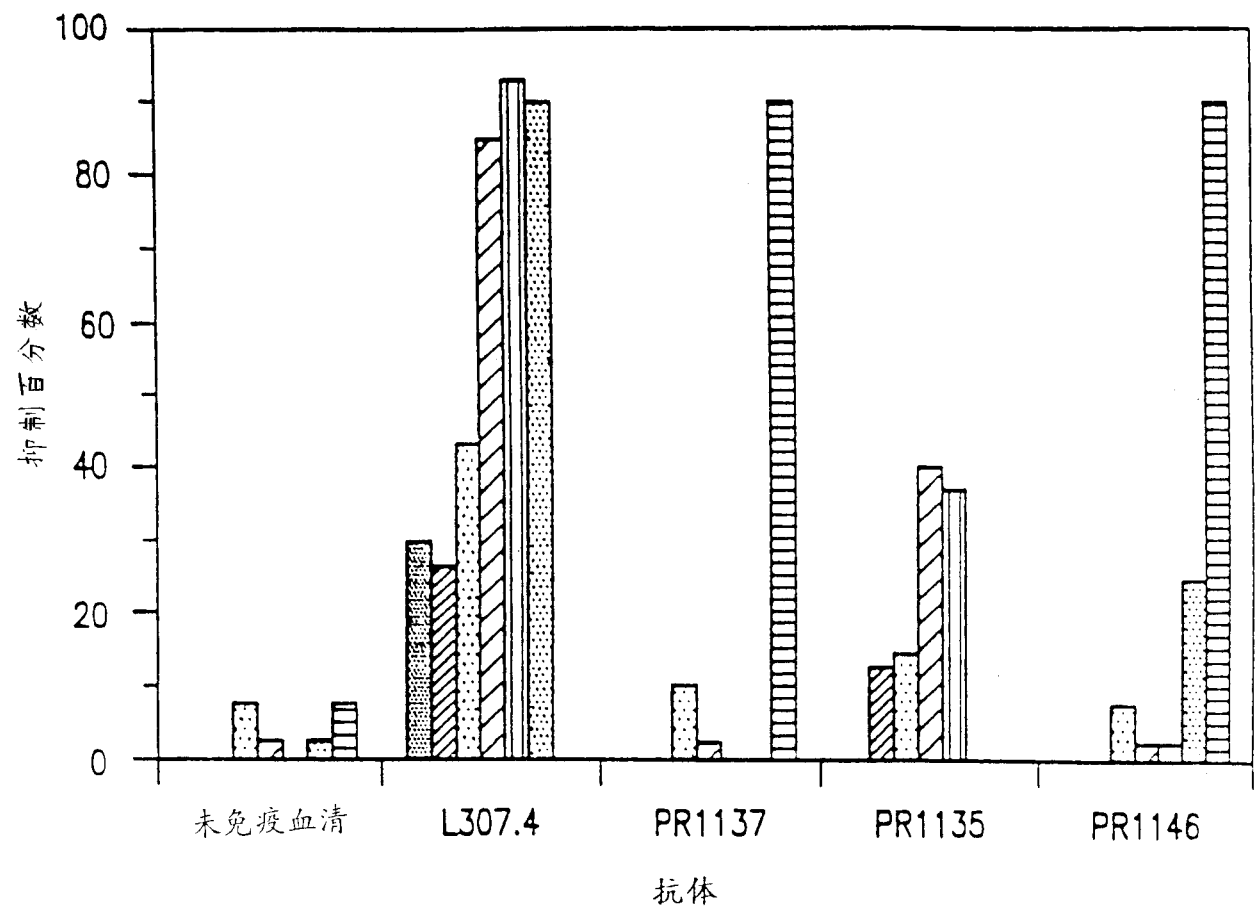
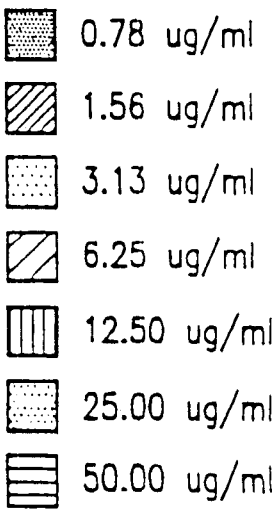


图 7



读框 1	M	R	V	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	W	L	P	G	A	R
	ATG	AGG	GTC	CCC	GCT	CAG	CTC	CTG	GGG	CTC	CTG	CTG	CTC	TGG	CTC	CCA	GGT	GCA	CGA
			9			18			27			36			45			54	
C	A	Y	E	L	T	Q	P	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	R
TGT	GCC	TAT	GAA	CTG	ACT	CAG	CCA	CCC	TCG	GTG	TCA	GTG	TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	AGG
	63			72		81			90			99			108			117	
T	C	G	G	D	N	S	R	N	E	Y	V	H	W	Y	Q	Q	K	P	A
ACC	TGT	GGG	GGA	GAC	AAC	AGT	AGA	AAT	GAA	TAT	GTC	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	CCA	GCG
	126			135		144			153			162			171			180	
A	P	I	L	V	I	Y	D	D	S	D	R	P	S	G	I	P	E	R	F
GCC	CCT	ATA	CTG	GTC	ATC	TAT	GAT	GAT	AGT	GAC	CGG	CCC	TCA	GGG	ATC	CCT	GAG	CGA	TTC
	189			198		207			216			225			234			243	
G	S	K	S	G	N	T	A	T	L	T	I	N	G	V	E	A	G	D	E
GGC	TCC	AAA	TCA	GGG	AAC	ACC	GCC	ACC	CTG	ACC	ATC	AAC	GGG	GTC	GAG	GCC	GGG	GAT	GAG
	252			261		270			279			288			297			306	
D	Y	Y	C	Q	V	W	D	R	A	S	D	H	P	V	F	G	G	G	T
GAC	TAT	TAC	TGT	CAG	GTG	TGG	GAC	AGG	GCT	AGT	GAT	CAT	CCG	GTC	TTC	GGA	GGA	GGG	ACC
	315			324		333			342			351			360			369	
V	T	V	L	G	Q	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S	S
GTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TCG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC	TCT
	378			387		396			405			414			423			432	
E	L	Q	A	N	K	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A
GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	TTC	TAC	CCG	GGA	GCC
	441			450		459			468			477			486			495	
T	V	A	W	K	A	D	S	S	P	V	K	A	G	V	E	T	T	T	P
ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA	CCC
	504			513		522			531			540			549			558	
K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W
AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG	TGG
	567			576		585			594			603			612			621	
S	H	R	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G	S	T	V	E	K	T	V
TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	GAG	AAG	ACA	GTG
	630			639		648			657			666			675			684	
P	T	E	C	S															
CCT	ACA	GAA	TGT	TCA	TGA														
	693			702															

图 8a

读框 1	M	K	H	L	W	F	F	L	L	L	V	A	A	P	R	W	V	L	S	
	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCT	CCC	AGA	TGG	GTC	CTG	TCC	
			9			18			27			36			45			54		
Q	V	K	L	Q	Q	W	G	E	G	L	L	Q	P	S	E	T	L	S	R	T
CAG	GTG	AAG	CTG	CAG	CAG	TGG	GGC	GAA	GGA	CTT	CTG	CAG	CCT	TCG	GAG	ACC	CTG	TCC	CGC	ACC
	63			72			81			90			99			108			117	
C	V	V	S	G	G	S	I	S	G	Y	Y	Y	W	T	W	I	R	Q	T	P
TGC	GTT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	TAC	TAC	TAC	TGG	ACC	TGG	ATC	CGC	CAG	ACC	CCA
	126			135			144			153			162			171			180	
G	R	G	L	E	W	I	G	H	I	Y	G	N	G	A	T	T	N	Y	N	P
GGG	AGG	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGC	CAT	ATT	TAT	GGT	AAT	GGT	GCG	ACC	ACC	AAC	TAC	AAT	CCC
	189			198			207			216			225			234			243	
S	L	K	S	R	V	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	F	F	L	N	L
TCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATT	TCA	AAA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TTC	CTG	AAC	TTG
	252			261			270			279			288			297			306	
N	S	V	T	D	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	P	R	P	D	C
AAT	TCT	GTG	ACC	GAC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GGC	CCT	CGC	CCT	GAT	TGC
	315			324			333			342			351			360			369	
T	T	I	C	Y	G	G	W	V	D	V	W	G	P	G	D	L	V	T	V	S
ACA	ACC	ATT	TGT	TAT	GGC	GGC	TGG	GTC	GAT	GTC	TGG	GGC	CCG	GGA	GAC	CTG	GTC	ACC	GTC	TCC
	378			387			396			405			414			423			432	
S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G
TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TCC	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG
	441			450			459			468			477			486			495	
G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TCC	TGG
	504			513			522			531			540			549			558	
N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L
AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC
	567			576			585			594			603			612			621	
Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC
	630			639			648			657			666			675			684	
N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S	C	D
AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GCA	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC
	693			702			711			720			729			738			747	
K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC	TTC	CTC
	756			765			774			783			792			801			810	
F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V
TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC	GTG	GTG
	819			828			837			846			855			864			873	
V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG
	882			891			900			909			918			927			936	

图 8 b-1

H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V
CAT	AAT	GCC	AAG	ACA	AAG	CCG	CGG	GAG	GAG	CAG	TAC	AAC	AGC	ACG	TAC	CGT	GTG	GTC	AGC	GTC
945				954			963			972			981			990			999	
L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
CTC	ACC	GTC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTG	AAT	GGC	AAG	GAG	TAC	AAG	TGC	AAG	GTC	TCC	AAC	AAA
1008				1017			1026			1035			1044			1053			1062	
A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q
GCC	CTC	CCA	GCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	GCC	AAA	GGG	CAG	CCC	CGA	GAA	CCA	CAG
1071				1080			1089			1098			1107			1116			1125	
V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
GTG	TAC	ACC	CTG	CCC	CCA	TCC	CGG	GAT	GAG	CTG	ACC	AAG	AAC	CAG	GTC	AGC	CTG	ACC	TGC	CTG
1134				1143			1152			1161			1170			1179			1188	
V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N
GTC	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	AGC	GAC	ATC	GCC	GTG	GAG	TGG	GAG	AGC	AAT	GGG	CAG	CCG	GAG	AAC
1197				1206			1215			1224			1233			1242			1251	
N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
AAC	TAC	AAG	ACC	ACG	CCT	CCC	GTG	CTG	GAC	TCC	GAC	GGC	TCC	TTC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC
1260				1269			1278			1287			1296			1305			1314	
T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A
ACC	GTG	GAC	AAG	AGC	AGG	TGG	CAG	CAG	GGG	AAC	GTC	TTC	TCA	TGC	TCC	GTG	ATG	CAT	GAG	GCT
1323				1332			1341			1350			1359			1368			1377	
L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K					
CTG	CAC	AAC	CAC	TAC	ACG	CAG	AAG	AGC	CTC	TCC	CTG	TCT	CCG	GGT	AAA	TGA				
1386				1395			1404			1413			1422			1431				

图 8 b-2

读框 1

M	S	L	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	C	V	P	G	S	S
ATG	AGC	CTC	CCT	GCT	CAG	CTC	CTC	GGG	CTG	CTA	TTG	CTC	TGC	GTC	CCC	GGG	TCC	AGT
		9			18			27			36			45			54	
G	E	V	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	I	T	P	G	E	P
GGG	GAA	GTT	GTG	ATG	ACT	CAG	TCT	CCA	CTG	TCC	CTT	CCC	ATC	ACA	CCT	GGA	GAG	CCG
63				72			81			90			99			108		117
I	S	C	R	S	S	Q	S	L	K	H	S	N	G	D	T	F	L	S
ATC	TCC	TGT	AGG	TCT	AGT	CAA	AGC	CTT	AAA	CAC	AGT	AAT	GGA	GAC	ACC	TTC	CTG	AGT
126				135			144			153			162			171		180
Q	Q	K	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	D
CAG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAA	CCT	CCA	AGG	CTC	CTG	ATT	TAT	AAG	GTT	TCT	AAC	CGG	GAC
189				198			207			216			225			234		243
V	P	D	R	F	S	G	S	G	A	G	T	D	F	T	L	K	I	S
GTC	CCA	GAC	AGA	TTC	AGC	GGC	AGT	GGG	GCA	GGG	ACA	GAT	TTC	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC
252				261			270			279			288			297		306
E	A	E	D	V	G	V	Y	F	C	G	Q	G	T	R	T	P	P	T
GAG	GCT	GAA	GAT	GTT	GGG	GTT	TAT	TTC	TGC	GGG	CAA	GGT	ACA	AGG	ACT	CCT	CCC	ACT
315				324			333			342			351			360		369
G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	P	I	P
GGG	GGG	ACC	AAG	GTG	GAA	ATC	AAA	CGT	ACG	GTG	GCT	GCA	CCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC
378				387			396			405			414			423		432
S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F
TCT	GAT	GAG	CAG	TTG	AAA	TCT	GGA	ACT	GCC	TCT	GTT	GTG	TGC	CTG	CTG	AAT	AAC	TTC
441				450			459			468			477			486		495
R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q
AGA	GAG	GCC	AAA	GTA	CAG	TGG	AAG	GTG	GAT	AAC	GCC	CTC	CAA	TCG	GGT	AAC	TCC	CAG
504				513			522			531			540			549		558
V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L
GTC	ACA	GAG	CAG	GAC	AGC	AAG	GAC	AGC	ACC	TAC	AGC	CTC	AGC	AGC	ACC	CTG	ACG	CTG
567				576			585			594			603			612		621
A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S
GCA	GAC	TAC	GAG	AAA	CAC	AAA	GTC	TAC	GCC	TGC	GAA	GTC	ACC	CAT	CAG	GGC	CTG	AGC
630				639			648			657			666			675		684
V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	.								
GTC	ACA	AAG	AGC	TTC	AAC	AGG	GGA	GAG	TGT	TGA								
693				702			711			720								

图 9a

读框 1	M	G	W	S	L	I	L	F	L	V	A	V	A	T	R	V	Q	C		
	ATG	GGT	TGG	AGC	CTC	ATC	TTG	CTC	TTC	CTT	GTC	GCT	GTT	GCT	ACG	CGT	GTC	CAG	TGT	
			9			18			27			36			45			54		
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	V	S
GAG	GTG	CAA	CTG	GTG	GAG	TCT	GGG	GGA	GGC	TTG	GTC	CAG	CCT	GGC	GGG	TCC	CTG	AGA	GTC	TCC
	63			72			81			90			99			108			117	
C	A	V	S	G	F	T	F	S	D	H	Y	M	Y	W	F	R	Q	A	P	G
TGT	GCA	GTC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT	GAC	CAC	TAC	ATG	TAT	TGG	TTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG
	126			135			144			153			162			171			180	
K	G	P	E	W	V	G	F	I	R	N	K	P	N	G	G	T	T	E	Y	A
AAG	GGG	CCG	GAA	TGG	GTA	GGT	TTC	ATT	AGA	AAC	AAA	CCG	AAC	GGT	GGG	ACA	ACA	GAA	TAC	GCC
	189			198			207			216			225			234			243	
A	S	V	K	D	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	S	I	A	Y	L	Q
GCG	TCT	GTG	AAA	GAC	AGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAT	GAT	TCC	AAA	AGC	ATC	GCC	TAT	CTG	CAA
	252			261			270			279			288			297			306	
M	S	S	L	K	I	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	T	S	Y	I	S	H
ATG	AGC	AGC	CTG	AAA	ATC	GAG	GAC	ACG	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	ACT	ACA	TCC	TAC	ATT	TCA	CAT
	315			324			333			342			351			360			369	
C	R	G	G	V	C	Y	G	G	Y	F	E	F	W	G	Q	G	A	L	V	T
TGT	CGG	GGT	GGT	GTC	TGC	TAT	GGA	GGT	TAC	TTC	GAA	TTC	TGG	GGC	CAG	GGC	GCC	CTG	GTC	ACC
	378			387			396			405			414			423			432	
V	S	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T
GTC	TCC	TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TGG	GTC	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC
	441			450			459			468			477			486			495	
S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V
TCT	GGG	GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTC	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG
	504			513			522			531			540			549			558	
S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
TGG	TGG	AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTC	CTA	CAG	TCC	TCA
	567			576			585			594			603			612			621	
G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y
GGA	CTC	TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC
	630			639			648			657			666			675			684	
I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S
ATC	TGC	AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GCA	GAG	CCC	AAA	TCT
	693			702			711			720			729			738			747	
C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V
TGT	GAC	AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTC
	756			765			774			783			792			801			810	
F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C
TTC	CTC	TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTC	ACA	TGC
	819			828			837			846			855			864			873	
V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V
GTG	GTG	GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTC	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG
	882			891			900			909			918			927			936	

图 9 b-1

```

E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC
 945          954          963          972          981          990          999

S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC
1008          1017          1026          1035          1044          1053          1062

N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA
1071          1080          1089          1098          1107          1116          1125

P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T
CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC
1134          1143          1152          1161          1170          1179          1188

C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG
1197          1206          1215          1224          1233          1242          1251

E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S
GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC ACC
1260          1269          1278          1287          1296          1305          1314

K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H
AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
1323          1332          1341          1350          1359          1368          1377

E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA
1386          1395          1404          1413          1422          1431

```

图 9 b-2

读框 1	M	R	V	P	A	Q	L	L	G	L	L	L	L	W	L	P	G	A	R	
	ATG	AGG	GTC	CCC	GCT	CAG	CTC	CTG	GGG	CTC	CTG	CTG	CTC	TGG	CTC	CCA	GGT	GCA	CGA	
			9			18			27			36			45			54		
C	E	S	V	L	T	Q	P	P	S	V	S	G	A	P	G	Q	K	V	T	I
TGT	GAG	TCT	GTC	CTG	ACA	CAG	CCG	CCC	TCA	GTG	TCT	GGG	GCC	CCA	GGG	CAG	AAG	GTC	ACC	ATC
	63			72			81			90			99			108			117	
S	C	T	G	S	T	S	N	I	G	G	Y	D	L	H	W	Y	Q	Q	L	P
TCG	TGC	ACT	GGG	AGC	ACC	TCC	AAC	ATT	GGA	GGT	TAT	GAT	CTA	CAT	TGG	TAC	CAG	CAG	CTC	CCA
	126			135			144			153			162			171			180	
G	T	A	P	K	L	L	I	Y	D	I	N	K	R	P	S	G	I	S	D	R
GGA	ACG	GCC	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GAC	ATT	AAC	AAG	CGA	CCC	TCA	GGA	ATT	TCT	GAC	CGA
	189			198			207			216			225			234			243	
F	S	G	S	K	S	G	T	A	A	S	L	A	I	T	G	L	Q	T	E	D
TTC	TCT	GGC	TCC	AAG	TCT	GGT	ACC	GCG	GCC	TCC	CTG	GCC	ATC	ACT	GGG	CTC	CAG	ACT	GAG	GAT
	252			261			270			279			288			297			306	
E	A	D	Y	Y	C	Q	S	Y	D	S	S	L	N	A	Q	V	F	G	G	G
GAG	GCT	GAT	TAT	TAC	TGC	CAG	TCC	TAT	GAC	AGC	AGC	CTG	AAT	GCT	CAG	GTA	TTC	GGA	GGA	GGG
	315			324			333			342			351			360			369	
T	R	L	T	V	L	G	Q	P	K	A	A	P	S	V	T	L	F	P	P	S
ACC	CGG	CTG	ACC	GTC	CTA	GGT	CAG	CCC	AAG	GCT	GCC	CCC	TGG	GTC	ACT	CTG	TTC	CCG	CCC	TCC
	378			387			396			405			414			423			432	
S	E	E	L	Q	A	N	K	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G
TCT	GAG	GAG	CTT	CAA	GCC	AAC	AAG	GCC	ACA	CTG	GTG	TGT	CTC	ATA	AGT	GAC	TTC	TAC	CCG	GGA
	441			450			459			468			477			486			495	
A	V	T	V	A	W	K	A	D	S	S	P	V	K	A	G	V	E	T	T	T
GCC	GTG	ACA	GTG	GCC	TGG	AAG	GCA	GAT	AGC	AGC	CCC	GTC	AAG	GCG	GGA	GTG	GAG	ACC	ACC	ACA
	504			513			522			531			540			549			558	
P	S	K	Q	S	N	N	K	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q
CCC	TCC	AAA	CAA	AGC	AAC	AAC	AAG	TAC	GCG	GCC	AGC	AGC	TAC	CTG	AGC	CTG	ACG	CCT	GAG	CAG
	567			576			585			594			603			612			621	
W	K	S	H	R	S	Y	S	C	Q	V	T	H	E	G	S	T	V	E	K	T
TGG	AAG	TCC	CAC	AGA	AGC	TAC	AGC	TGC	CAG	GTC	ACG	CAT	GAA	GGG	AGC	ACC	GTG	GAG	AAG	ACA
	630			639			648			657			666			675			684	
V	A	P	T	E	C	S														
GTG	GCC	CCT	ACA	GAA	TGT	TCA	TGA													
	693			702			711													

图 10 a

读框 1	M	K	H	L	W	F	F	L	L	L	V	A	A	P	P	R	W	V	L	S
	ATG	AAA	CAC	CTG	TGG	TTC	TTC	CTC	CTC	CTG	GTG	GCA	GCT	CCC		AGA	TGG	GTG	CTG	TCC
			9			18			27			36				45			54	
Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	T
CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TGG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TGG	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC
	63			72			81			90			99			108			117	
C	A	V	S	G	G	S	I	S	G	G	Y	G	W	G	W	I	R	Q	P	P
TGC	GCT	GTG	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	GGT	GGT	TAT	GGC	TGG	GGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CCC	CCA
	126			135			144			153			162			171			180	
G	K	G	L	E	W	I	G	S	F	Y	S	S	S	G	N	T	Y	Y	N	P
GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	AGT	TTC	TAT	AGT	AGT	AGT	GGG	AAC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCC
	189			198			207			216			225			234			243	
S	L	K	S	Q	V	T	I	S	T	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L
TCC	CTC	AAG	AGT	CAA	GTG	ACC	ATT	TCA	ACA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG
	252			261			270			279			288			297			306	
N	S	M	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	D	R	L	F	S	V
AAC	TCT	ATG	ACC	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GTG	AGA	GAT	CGT	CTT	TTT	TCA	GTT
	315			324			333			342			351			360			369	
V	G	M	V	Y	N	N	W	F	D	V	W	G	P	G	V	L	V	T	V	S
GTT	GGA	ATG	GTT	TAC	AAC	AAC	TGG	TTC	GAT	GTG	TGG	GGC	CCG	GGA	GTG	CTG	GTG	ACC	GTG	TCC
	378			387			396			405			414			423			432	
S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G
TCA	GCT	AGC	ACC	AAG	GGC	CCA	TGG	GTG	TTC	CCC	CTG	GCA	CCC	TCC	TCC	AAG	AGC	ACC	TCT	GGG
	441			450			459			468			477			486			495	
G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
GGC	ACA	GCG	GCC	CTG	GGC	TGC	CTG	GTG	AAG	GAC	TAC	TTC	CCC	GAA	CCG	GTG	ACG	GTG	TGG	TGG
	504			513			522			531			540			549			558	
N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L
AAC	TCA	GGC	GCC	CTG	ACC	AGC	GGC	GTG	CAC	ACC	TTC	CCG	GCT	GTG	CTA	CAG	TCC	TCA	GGA	CTC
	567			576			585			594			603			612			621	
Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
TAC	TCC	CTC	AGC	AGC	GTG	GTG	ACC	GTG	CCC	TCC	AGC	AGC	TTG	GGC	ACC	CAG	ACC	TAC	ATC	TGC
	630			639			648			657			666			675			684	
N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	A	E	P	K	S	C	D
AAC	GTG	AAT	CAC	AAG	CCC	AGC	AAC	ACC	AAG	GTG	GAC	AAG	AAA	GCA	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC
	693			702			711			720			729			738			747	
K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	GCA	CCT	GAA	CTC	CTG	GGG	GGA	CCG	TCA	GTG	TTC	CTC
	756			765			774			783			792			801			810	
F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V
TTC	CCC	CCA	AAA	CCC	AAG	GAC	ACC	CTC	ATG	ATC	TCC	CGG	ACC	CCT	GAG	GTG	ACA	TGC	GTG	GTG
	819			828			837			846			855			864			873	
V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
GTG	GAC	GTG	AGC	CAC	GAA	GAC	CCT	GAG	GTG	AAG	TTC	AAC	TGG	TAC	GTG	GAC	GGC	GTG	GAG	GTG

图 10 b-1

882	891	900	909	918	927	936
H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V						
CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC						
945 954 963 972 981 990 999						
L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K						
CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA						
1008 1017 1026 1035 1044 1053 1062						
A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q						
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GTC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG						
1071 1080 1089 1098 1107 1116 1125						
V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L						
GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG						
1134 1143 1152 1161 1170 1179 1188						
V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N						
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC						
1197 1206 1215 1224 1233 1242 1251						
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L						
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC						
1260 1269 1278 1287 1296 1305 1314						
T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A						
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT						
1323 1332 1341 1350 1359 1368 1377						
L H N H Y T Q K S L S L S P G K .						
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA						
1386 1395 1404 1413 1422 1431						

图 10 b -2