

[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 97197221.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100406562C

[22] 申请日 1997.8.6 [21] 申请号 97197221.4

[30] 优先权

[32] 1996.8.15 [33] US [31] 08/700,737

[86] 国际申请 PCT/US1997/013884 1997.8.6

[87] 国际公布 WO1998/006248 英 1998.2.19

[85] 进入国家阶段日期 1999.2.11

[73] 专利权人 千禧药品公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 保罗·D·波纳斯

道格拉斯·J·伦格勒

S·特伦·琼斯 沃特·纽曼

卓思·塞尔丹哈 玛丽·M·班第哥

[56] 参考文献

WO94177828A2 1994.8.18

WO9519790A1 1995.7.27

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书 9 页 说明书 97 页 附图 19 页

[54] 发明名称

与 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白相作用的人化免疫球蛋白

[57] 摘要

本发明涉及具有对 $\alpha 4 \beta 7$ 整联蛋白结合特异性的人化免疫球蛋白，包括非人源的抗原结合区域(例如，啮齿类起源的)和至少一部分的人源免疫球蛋白(例如，人构架区，人恒定区)。在一个实施方案中，人化的免疫球蛋白可以鼠 Act-1 竞争对 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的结合。在一个优选的实施方案中，人化的免疫球蛋白的抗原结合区包括鼠 Act-1 抗体的重链和轻链的各自互补性决定区。本发明进一步涉及人化的免疫球蛋白的轻链和重链，包括编码本发明的人化免疫球蛋白或免疫球蛋白链的序列的核酸(例如，单链抗体)，包括本发明的核酸的构建物，包括本发明的核酸的宿主细胞，用于制备人化的免疫球蛋白。人化的免疫球蛋白可以用于对人体疾病的诊断和治疗，例如，控制淋巴细胞对黏膜组织的渗入(包括征集和/或积累)。

1. 一种选择性地结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，所述的人化免疫球蛋白或抗原结合片段包括非人源互补决定区（CDRs）和由人源重链和轻链衍生而来的重链和轻链框架区。
2. 根据权利要求 1 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，人化免疫球蛋白进一步包括人恒定区。
3. 根据权利要求 2 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，人恒定区是 γ 类型的。
4. 根据权利要求 1 的所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，CDRs 是啮齿类源的。
5. 根据权利要求 4 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，CDRs 来自于鼠 Act-1 单克隆抗体。
6. 根据权利要求 1 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中所述的免疫球蛋白或抗原结合片段包括轻链和重链，

所述轻链包括互补决定区（CDR1，CDR2 和 CDR3），该互补决定区具有如下所示氨基酸序列：

轻链： CDR1 SEQ ID NO:12 的氨基酸 44-59

CDR2 SEQ ID NO:12 的氨基酸 75-81

CDR3 SEQ ID NO:12 的氨基酸 114-122；和衍生自人源轻链可变区的框架区；

所述重链包括互补决定区（CDR1，CDR2 和 CDR3），该互补决定区具有如下所示氨基酸序列：

重链： CDR1 SEQ ID NO:15 的氨基酸 50-54

CDR2 SEQ ID NO:15 的氨基酸 69-85

CDR3 SEQ ID NO:15 的氨基酸 118-129；和衍生自人源重链可变区的框架区。

7. 根据权利要求 6 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，所述人源轻链的可变区是 SEQ ID NO: 8 的可变区。
8. 根据权利要求 6 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，所述人源重链的可变区是 SEQ ID NO: 10 的可变区。
9. 根据权利要求 7 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，所述人源重链的可变区是 SEQ ID NO: 10 的可变区。
10. 根据权利要求 6 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，轻链包括 SEQ ID NO: 21 的可变区，重链包括 SEQ ID NO: 19 的可变区。
11. 根据权利要求 6 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，所述的免疫球蛋白或抗原结合片段能与鼠 Act-1 竞争结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白。
12. 根据权利要求 6 所述的人化免疫球蛋白或其抗原结合片段，其中，所述免疫球蛋白或抗原结合片段具有鼠 Act-1 单克隆抗体的表位特异性。

13. 权利要求 1 所述人化抗体或抗原结合片段的人化免疫球蛋白轻链或其片段，其中所述轻链或片段具有一种氨基酸序列，该氨基酸序列包括至少一种 SEQ ID NO: 12 轻链可变区的功能部分。
14. 根据权利要求 13 所述的人化免疫球蛋白轻链或其片段，其中，所述的轻链或片断具有包括信号肽 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列。
15. 一种人化免疫球蛋白轻链或其片段，其中，所述的人化免疫球蛋白轻链或片段包括鼠 Act-1 单克隆抗体轻链的互补决定区，CDR1，CDR2 和 CDR3 和人源轻链框架区，所述互补决定区包括如下所示氨基酸序列，以至于包括所述轻链或其片段的抗体选择性地结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白：
- 轻链： CDR1 SEQ ID NO:12 的氨基酸 44-59
CDR2 SEQ ID NO:12 的氨基酸 75-81
CDR3 SEQ ID NO:12 的氨基酸 114-122。
16. 根据权利要求 15 所述的人化免疫球蛋白轻链或片段，其中，所述人框架区由 SEQ ID NO: 8 的轻链可变区衍生而来。
17. 根据权利要求 15 所述的人化免疫球蛋白轻链或片段，其中，所述人化免疫球蛋白轻链或片段包括 SEQ ID NO: 21 的可变区。
18. 一种被分离的核酸，包括编码权利要求 13-17 任意一种所述的人化免疫球蛋白轻链或片段的核苷酸序列。
19. 根据权利要求 18 所述的被分离的核酸，其中，所述的核苷酸序列包括编码 SEQ ID NO: 20 可变区的核苷酸序列。

20. 一种表达载体,其中包括编码权利要求 13-17 任意一种所述的人化免疫球蛋白轻链或其片段的融合基因。
21. 根据权利要求 20 的表达载体,其中,所述的融合基因包含 SEQ ID NO: 20 的可变区编码序列。
22. 权利要求 1 所述的人化抗体或抗原结合片段的人化免疫球蛋白重链或其片段,其中所述重链或片段具有一种氨基酸序列,该氨基酸序列包括至少一种 SEQ ID NO: 15 重链可变区的功能部分。
23. 根据权利要求 22 所述的人化免疫球蛋白重链或其片段,其中,所述的重链或片断具有包括信号肽 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列。
24. 一种人化免疫球蛋白重链或其片段,其中,所述的人化免疫球蛋白重链或片段包括鼠 Act-1 单克隆抗体的重链的互补决定区, CDR1, CDR2 和 CDR3, 和人源重链框架区,所述的互补决定区包括如下所示的氨基酸序列,以至于包括所述重链或其片段的抗体选择性结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白:
- 重链: CDR1 SEQ ID NO:15 的氨基酸 50-54
 CDR2 SEQ ID NO:15 的氨基酸 69-85
 CDR3 SEQ ID NO:15 的氨基酸 118-129。
25. 根据权利要求 24 所述人化免疫球蛋白重链或片段,其中,所述的人框架区由 SEQ ID NO:10 可变区衍生而来。
26. 根据权利要求 24 所述的人化免疫球蛋白重链或片段,其中,所述的人化免疫球蛋白重链或片段包含 SEQ ID NO: 19 的可变区。

-
27. 一种被分离的核酸，包括编码权利要求 22-26 任意一种所述的人化免疫球蛋白重链或片段的核苷酸序列。
 28. 根据权利要求 27 所述的被分离的核酸，其中，所述的核苷酸序列包括编码 SEQ ID NO: 18 可变区的核苷酸序列。
 29. 一种表达载体，其中包括编码权利要求 22-26 中任意一种人化免疫球蛋白重链或其片段的融合基因。
 30. 根据权利要求 29 的表达载体，其中，所述的融合基因包含 SEQ ID NO:18 的可变区编码序列。
 31. 包括权利要求 20 所述表达载体的宿主细胞。
 32. 包括权利要求 21 所述表达载体的宿主细胞。
 33. 包括权利要求 29 所述表达载体的宿主细胞。
 34. 包括权利要求 30 所述表达载体的宿主细胞。
 35. 一种制备人化免疫球蛋白轻链、人化免疫球蛋白轻链片段的方法，包括，在适合人化免疫球蛋白轻链表达的条件下培养权利要求 31 中的宿主细胞，由此表达、制备人化免疫球蛋白轻链或人化免疫球蛋白轻链片段。
 36. 根据权利要求 35 所述的方法，进一步包括分离人化免疫球蛋白轻链或人化免疫球蛋白轻链片段的步骤。

37. 一种制备人化免疫球蛋白轻链、人化免疫球蛋白轻链片段的方法，包括，在适合人化免疫球蛋白轻链表达的条件下培养权利要求 32 中的宿主细胞，由此表达、制备人化免疫球蛋白轻链或人化免疫球蛋白轻链片段。
38. 根据权利要求 37 所述的方法，进一步包括分离人化免疫球蛋白轻链或人化免疫球蛋白轻链片段。
39. 一种制备人化免疫球蛋白重链、人化免疫球蛋白重链片段的方法，包括，在适合人化免疫球蛋白重链表达的条件下培养权利要求 33 中的宿主细胞，由此表达、制备人化免疫球蛋白重链或人化免疫球蛋白重链片段。
40. 根据权利要求 39 所述的方法，进一步包括分离人化免疫球蛋白重链或人化免疫球蛋白重链片段的步骤。
41. 一种制备人化免疫球蛋白重链、人化免疫球蛋白重链片段的方法，包括，在适合人化免疫球蛋白重链表达的条件下培养权利要求 34 中的宿主细胞，由此表达、制备人化免疫球蛋白重链或人化免疫球蛋白重链片段。
42. 根据权利要求 41 所述的方法，进一步包括分离人化免疫球蛋白重链或人化免疫球蛋白重链片段的步骤。
43. 一种宿主细胞，包括编码人化免疫球蛋白轻链或其片段的第一重组核酸，和编码人化免疫球蛋白重链或其片段的第二重组核酸，其中，包含所述的轻链或其片段和所述重链或其片段的抗体或抗原结合片段选择性地结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白，

所述第一核酸包括编码衍生自鼠 Act-1 单克隆抗体轻链的 CDR 和衍生自人源轻链框架区的核苷酸序列；以及

所述第一核酸包括编码衍生自鼠 Act-1 单克隆抗体重链的 CDR 和衍生自人源重链框架区的核苷酸序列。

44. 根据权利要求 43 的宿主细胞，其中：

所述的第一核酸包括编码三个互补决定区，CDR1，CDR2 和 CDR3 的核苷酸序列，具有如下所示氨基酸序列：

轻链： CDR1 SEQ ID NO:12 的氨基酸 44-59
CDR2 SEQ ID NO:12 的氨基酸 75-81
CDR3 SEQ ID NO:12 的氨基酸 114-122；和一种衍生自人源轻链可变区的框架区；和

所述的第二核酸包括编码三个互补决定区，CDR1，CDR2 和 CDR3 中的至少一种的核苷酸序列，具有如下所示氨基酸序列：

重链： CDR1 SEQ ID NO:15 的氨基酸 50-54
CDR2 SEQ ID NO:15 的氨基酸 69-85
CDR3 SEQ ID NO:15 的氨基酸 118-129；和一种衍生自人源重链可变区的框架区。

45. 一种制备人化免疫球蛋白或其抗原结合片段的方法，包括，在适合人化免疫球蛋白或其抗原结合片段表达的条件下培养权利要求 43 或 44 所述的宿主细胞，由此表达人化免疫球蛋白链并且制备人化免疫球蛋白或抗原结合片段，和任选的分离。

46. 根据权利要求 45 的方法，进一步包括分离所述的人化免疫球蛋白或抗原结合片段。

47. 一种体外抑制携带 $\alpha 4 \beta 7$ 的第一细胞和携带其配体的第二细胞的相互作用的方法，包括使足量的所述第一细胞和权利要求 1-14 中任意一种人化免疫球蛋白或抗原结合片段相结合，来抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白与其配体的结合。

-
48. 权利要求 1-12 中任意一种人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制备用于抑制黏膜组织的淋巴细胞渗透作用的药物中的应用。
49. 一种药物组合物，包括权利要求 1-12 中任意一种人化免疫球蛋白或抗原结合片段和适宜的载体。
50. 根据权利要求 1-12 中所述的任意一种人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制造用于治疗炎症疾病的药物中的应用。
51. 权利要求 1-12 中任意一种的人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制造用于治疗与组织的淋巴细胞渗透性联系在一起的疾病的药物中的应用，其中，所述疾病是胆囊炎、胆管炎、边周性胆囊炎、乳腺炎、慢性鼻窦炎、胰脏炎、胰岛素依赖型糖尿病。
52. 权利要求 1-12 中任意一种的人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制造治疗肠炎症疾病的药物中的应用。
53. 根据权利要求 52 的应用，其中，所述的肠炎症疾病选自由溃疡性结肠炎和 Crohn's 病组成的组。
54. 权利要求 10 的人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制造治疗肠炎症疾病的药物中的应用。
55. 权利要求 10 的人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制造治疗溃疡性结肠炎和 Crohn's 病的药物中的应用。
56. 根据权利要求 50 的应用，其中，所述疾病选自由慢性支气管炎、气喘和移植排异反应所组成的组。
57. 根据权利要求 56 的应用，其中所述疾病是移植排异反应。

-
- 58.** 一种药物组合物，包括对包括重链和轻链的 $\alpha 4 \beta 7$ 整合单位具有结合特异性的人源化免疫球蛋白或抗原结合片断，和一种药学上可接受的介质或载体，其中所述重链包括 SEQ ID NO:19 的可变区，所述轻链包括 SEQ ID NO:21 的可变区。
- 59.** 权利要求 1-16 任意一项所述的人化免疫球蛋白或抗原结合片段在制备用于抑制携带 $\alpha 4 \beta 7$ 的第一细胞和携带其配体的第二细胞结合的药物中的应用。

与 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白相作用的人化免疫球蛋白

技术领域

本发明涉及人化免疫球蛋白。

背景技术

整合蛋白受体对于调节淋巴细胞循环和向炎症部位富集十分重要[Carlos, T.M. and Harlan, J.M., Blood, 84:2068-2101 (1994)]。人类 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白有多个配体,其中一个表达肠系膜淋巴节和派伊尔氏淋巴集结与高级内皮小静脉的黏膜血管地址素 MAdCAM-1[Berlin, C., et al., Cell 74:185-195 (1993); Erle, D.J., et al., J. Immunol. 153:517-528 (1994)] [Streeter, P.R., et al., Nature 331:41-46 (1988)]。因而, $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白作为一种受体,调控淋巴细胞迁向肠黏膜淋巴样组织[Schweighoffer, T., et al., J. Immunol. 151:717-729 (1993)]。另外, $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白还同纤连蛋白和血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 相互作用。

肠炎症疾病 (IBD), 诸如溃疡性结肠炎和阶段性回肠炎 (Crohn's 病), 都是涉及胃肠道炎症的消耗性和进行性疾病, 。仅在美国就有大约 200 万患者, 症状包括腹痛、痉挛、腹泻和直肠出血。对 IBD 的治疗包括消炎药物 (如皮质类固醇和磺胺沙利比林), 免疫抑制药物 (如 6-巯基嘌呤、环孢霉素和硝基咪唑硫嘌呤) 以及外科手术 (如结肠切除术)。参见 Podolsky, New Engl. J. Med., 325:928-937 (1991) and Podolsky, New Engl. J. Med., 325:1008-1016 (1991) 。

抗人 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白抗体, 例如鼠单克隆抗体(mAb Act-1), 干扰 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白结合到黏膜地址素细胞黏附分子-1 (MAdCAM-1) 的过程, 后者出现在黏膜淋巴结的高级内皮小静脉。Act-1最早由Lazarovits, A.I., et al., J. Immunol. 133:1857-1862(1984), 从被人破伤风毒特异性T淋巴细胞免疫的老鼠分离出来, 并被报道为是一种鼠IgG1/ κ 型抗体。最近的研究 [Schweighoffer, T., et al., J. Immunol. 151:717-729 (1993)]显示, 该抗体能够与特异性表达 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的人记忆CD4+T淋巴细胞的亚单位相结合。然而, 利用鼠抗体来治疗人类疾病存在严重的问题, 它们对于人体来讲具有高度的免疫原性, 能迅速诱发人体抗鼠抗体的免疫应答(HAMA), 削弱其治疗效果, 也不能连续给药。HAMA反应能快速清除鼠抗体, 大大限制其疗效。

因此, 需要有改进的方法来治疗肠炎症疾病。

本发明的概述

本发明涉及具有 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白特异结合属性的人化免疫球蛋白, 该蛋白包括非人源抗原结合区(如啮齿类)和至少一部分人源免疫球蛋白(如人类框架区、人类 λ 型恒定区)。在一个实施方案中, 这里所描述的人化免疫球蛋白将和鼠 Act-1 或 LDP-02 (见实施例 4) 竞争结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白。在优选的实施方案中, 人化免疫球蛋白的抗原结合区最好来源于 Act-1 单克隆抗体[如 LDP-02, 其是包含轻链可变区和重链可变区的一种免疫球蛋白, 分别见图 11 (SEQ ID NO: 19) 和图 12 (SEQ ID NO: 21)]。

例如，人化免疫球蛋白可以包括含非人源互补决定簇（CDR）的抗原结合区和从人源框架区（FR）衍生的框架区。一方面，这个有 $\alpha 4 \beta 7$ 结合特性的人化免疫球蛋白包括轻链和重链，轻链包括从结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的非人源抗体衍生的 CDR，和从人源轻链衍生的 FR（例如，GM607'CL），重链包括从结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的非人源抗体衍生的重链和从人源重链衍生的 FR（如 21/28'CL）。另一方面，轻链含有三个来自于 Act-1 抗体轻链的 CDR，重链则含有三个来自于 Act-1 抗体重链的 CDR。

本发明也涉及人化免疫球蛋白的轻链（如 Act-1 抗体轻链的 CDR1、CDR2、CDR3 和人类轻链的 FR）和人化免疫球蛋白的重链（如 Act-1 抗体重链的 CDR1、CDR2、CDR3 和人类重链的 FR）。在优选的实施方案中，本发明涉及本文所描述的人化重链和轻链[例如，含有如图 7 所示轻链的可变区（SEQ ID NO: 12）的人化轻链，含有如图 9 所示重链的可变区（SEQ ID NO: 15）的人化重链，含有如图 12 所示轻链的可变区（SEQ ID NO: 21）的人化轻链，含有如图 11 所示重链的可变区（SEQ ID NO: 19）的人化重链]。本发明也包括那些含有一个或多个个人化轻链和/或重链的人化免疫球蛋白。

本发明不仅涉及分离到的编码人化免疫球蛋白轻链（SEQ ID NO: 20）的核酸或编码重链（SEQ ID NO: 18）的核酸，而且还涉及分离到的编码人化免疫球蛋白（如单一链抗体）的核酸。例如，本发明提供了编码人化免疫球蛋白轻或重链的融合基因，这些链又由第一核酸序列和第二核酸序列组成，第一序列编码鼠源 Act-1 单克隆抗体的抗原结合区，第二序列至少编码人源免疫球蛋白恒定区的一部分。

本发明还涉及编码有 $\alpha 4 \beta 7$ 结合特异性的人化免疫球蛋白或者它的一条链的核酸构建物。例如，本发明提供了含融合基因的表达载体，该融合基因编码人化免疫球蛋白轻链，包括对从与 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白有结合特异性的非人源抗体的轻链衍生的 CDR 进行编码的核苷酸序列和衍生自人源轻链的框架区。这类构建物的另一个实例是这样的表达载体，其包括编码人化免疫球蛋白重链的融合基因，该融合基因包括对从与对 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白有结合特异性的非人源抗体重链衍生的 CDR 进行编码的核苷酸序列，以及从人源重链衍生的框架区。

本发明还涉及含有本发明核酸序列的宿主细胞，其包括一个或一个以上的含有本发明核酸的构建物。在一个实施方案中，本发明涉及一种包含有编码人化免疫球蛋白轻链的第一重组核酸和编码人化免疫球蛋白重链的第二重组核酸的宿主细胞，所述的第一核酸包括编码鼠源 Act-1 抗体轻链 CDR 和人源轻链框架区的核苷酸序列，所述的第二核酸包括编码鼠源 Act-1 抗体重链 CDR 和人源重链框架区的核苷酸序列。

本发明也提供了一种制备人化免疫球蛋白的方法，该方法包括在适于表达人化免疫球蛋白的条件下培养宿主细胞，使人化免疫球蛋白链得到表达，使人源免疫球蛋白被产生。该方法还可以包括人化免疫球蛋白的分离步骤。

本发明的人化免疫球蛋白的免疫原性比它们对应的鼠源或其他非人源对应体的要小得多。因此，本文中所描述的人源免疫球蛋白能够用来治疗人体疾病，例如，用来控制淋巴细胞返回到黏膜淋巴样组织，从而减轻消化道的炎症反应。

本发明还涉及本发明的人化免疫球蛋白在诊断或治疗（包括预防）中的应用。在一个实施方案中，本发明将人化免疫球蛋白用于组织淋巴细胞渗透性疾病的治疗，例如，治疗炎症疾病，包括胃肠道淋巴细胞渗透性疾病（包括消化道内皮），其他的黏膜组织，或表达 MAdCAM-1 分子的组织。在特别优选的实施方案中，这种人化免疫球蛋白还可以用于治疗肠炎（IBD），例如溃疡性结肠炎和 Crohn's 病。

另一方面，本发明涉及本发明的人化免疫球蛋白在制造可治疗组织淋巴细胞滤过性疾病的药物中的应用，例如，治疗炎症疾病，包括胃肠道淋巴细胞渗透性疾病，其他的黏膜组织，或者表达 MAdCAM-1 分子的组织。在特别优选的实施方案中，本发明涉及本发明的人化免疫球蛋白在制造用于治疗肠炎（IBD），例如溃疡性结肠炎或 Crohn's 病等药物中的应用。

附图简要说明

图 1 说明了一致的 DNA 序列（SEQ ID NO: 1）及其编码的氨基酸序列（SEQ ID NO: 2），包括由多个独立的鼠重链可变区克隆确定的可变区。

图 2 说明了核酸序列（SEQ ID NO: 3）及其编码的氨基酸序列（SEQ ID NO: 4），包括由独立的鼠重链可变区克隆 H2B#34 所确定的可变区中的一部分。

图 3 说明了核酸序列（SEQ ID NO: 5）及其编码的氨基酸序列（SEQ ID NO: 6），包括由多个独立的鼠轻链可变区克隆确定的可变区。标出了为了克隆化而引入 KasI 位点的两突变位点。

图 4A 是一个荧光图，说明鼠 Act-1mAb 和鼠同型不相关对照抗体（MOPC21；IgG1，Kappa）对表达 $\alpha 4 \beta 7$ 的 HuT78 细胞的染色能力。

图 4B 是一个荧光图，说明三种物质对表达 $\alpha 4 \beta 7$ 的 HuT78 细胞的染色能力，（i）嵌和的 Act-1 抗体，（ii）人同型不相关对照抗体（IgG1，Kappa），（iii）COS-7 细胞上清液。

图 5 排列比较了鼠 Act-1 轻链可变区（“Act-1，vl”）（SEQ ID NO: 7）和人 GM 607'CL 轻链可变区（SEQ ID NO: 8）的氨基酸序列。竖线表示相同的氨基酸，相似的氨基酸则根据相似程度分别用 4 或 2 点来表示，框起来并标记上的是 CDR，每个残基按序列编号。

图 6 排列比较了鼠 Act-1 重链可变区（“Act-1，vh”）（SEQ ID NO: 9）和人 21/28'CL 重链可变区（SEQ ID NO: 10）的氨基酸序列。竖线表示相同的氨基酸，相似的氨基酸则根据相似程度分别用 4 或 2 点来表示，框起来并标记上的是 CDR，每个残基按序列编号。

图 7 说明了鼠 Act-1 轻链上紧连于信号肽的可变区的核酸序列（SEQ ID NO: 11）及其编码的氨基酸序列（SEQ ID NO: 12）。

图 8 说明了成熟的人 GM607' CL 抗体 Kappa 轻链可变区的核酸序列（SEQ ID NO: 13）及其编码的氨基酸序列（SEQ ID NO: 8）。

图 9 说明了鼠 Act-1 抗体重链可变区的核酸序列及氨基酸序列。该序列连接于可编码鼠 Act-1 重链信号肽的核酸序列，形成一混合序列（SEQ ID NO: 14 和 15）。(扩增重链的引物来源于退化

序列,信号肽的氨基酸序列来源于引物,下游序列和别的信号肽序列。这里所示的信号肽可能与 Act-1 杂合体的不相同)。

图 10 说明了人 21/28' CL 抗体重链可变区的核酸序列及氨基酸序列。该序列连接于编码人 HG3' CL 抗体 V_H 信号肽的核酸序列。[Rechavi, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80:855-859 (1983)], 从而形成一混合序列(SEQ ID NOS: 16 和 17)。

图 11 说明了带有重链信号肽的人化 Act-1 抗体(LDP-02)重链一部分的核酸序列[(SEQ ID NO:18) 和氨基酸序列(SEQ ID NO: 19)]。

图 12 说明了带有轻链的信号肽的人化 Act-1 抗体(LDP-02)轻链一部分的核酸序列[(SEQ ID NO:20) 和氨基酸序列(SEQ ID NO: 21)]。

图 13 说明了分别被标识为 L1-L6 (SEQ ID NOS:22-27)和 H1-H10(SEQ ID NOS:28-37)的两组具有重叠且互补的寡聚核苷酸序列。前者编码人化 Act-1 免疫球蛋白(LDP-02)的轻链,后者编码人化 Act-1 免疫球蛋白的重链。

图 14 是一个荧光图,说明用构建的鼠-人 Act-1 免疫球蛋白,人化 Act-1 免疫球蛋白或一不相关的人同型对照抗体(IgG1, Kappa),对 HuT-78 细胞的染色效果。

图 15 说明了用流式细胞光度计对 HuT-78 细胞进行的滴定生物素化鼠 Act-1 和人化 Act-1(LDP-02/3A9/L0T#1, 实施例 4) 的结果。

图 16 是个图表, 说明与对照的鼠 IgG1 或人 IgG1 相比, 鼠 Act-1 或人化 Act-1 免疫球蛋白(LDP-02/3A9/L0T#1, 实施例 4)对生物素化鼠 Act-1 结合的竞争性抑制。

图 17 是个图表, 说明分别在 5 种分子存在下, 人周边周血单核细胞在溶胞中同位素 ^{51}Cr 检测的结果, (a) CAMPATH-1H, (b) CAMPATH-1G, (c) 人 IgG1, (d)LDP-02/3A9/Lot#1 (实施例 4) 或(e)LDP-01 (人化抗 CD18, Fc 突变); 分别于 5 种浓度 50, 25, 5, 2.5, 和 $0.5\mu\text{g/ml}$ 。

图 18A-18B 是图表, 说明鼠 Act-1 (图 18A), 鼠 IgG1(图 18A), LDP-02/3A9/Lot#1 (图 18B) 或人 IgG1 (图 18B) 对 $\alpha 4 \beta 7$ 携带细胞 (RPMI 8866) 与构建的人 MAdCAM-1-Ig (免疫粘附) 的吸附过程的抑制作用。

图 19 比较了 4 种方法对 HuT-78 细胞的染色效果, (a)LDP-02 (Fc 突变), (b)在轻链 (MV4) 有单突变, 在重链有双突变 (R38K, A40R) 的 LDP-02 (Fc 突变) 的衍生体, (c)不相关的人同型对照抗体 (IgG1, kappa)。

本发明的详细叙述

本发明涉及了对 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白有结合特性的人化免疫球蛋白, 它包括非人源抗原结合区和至少一部分人源免疫球蛋白。优选地, 人化免疫球蛋白对 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的亲合度至少要有 10^7M^{-1} , 以 10^8M^{-1} 为较好, 以 10^9M^{-2} 为更好。在一个实施方案中, 人化免疫球蛋白包含有结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的非人源抗原结合区和人源恒定区。在另一个实施方案中, 与 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白结合的人化免疫球蛋白, 包含非人源互补决定区和一个人源可变框架区, 还可以有或没有人源恒定区。例如, 这种人化免疫球蛋白

白可以包括重链和轻链，其中的轻链包括从结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的非人源抗体衍生的互补决定区和人源轻链衍生的框架区，重链包括结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的非人源抗体衍生的互补决定区和人源重链衍生的框架区。

本发明也涉及了人化免疫球蛋白的轻链和人化免疫球蛋白的重链。在一个实施方案中，本发明涉及包含有非人源轻链 CDR（一个或多个 CDR）和人轻链框架区的人化轻链。在另一个实施方案中，本发明涉及包含有非人源重链 CDR（一个或多个 CDR）和人重链框架区的人化免疫球蛋白重链。CDR 可来自于非人免疫球蛋白。

天然的免疫球蛋白都有一相同的核心结构，里面由两条相同的轻链（约 24KD）和两条相同的重链（约 55 或 70KD）形成一个四聚体。每条链的 N 端被认定为可变区(V)，并能够同各条链其他部分更加保守的恒定区(C)相区别。轻链可变区 C 端部分称为 J 区，此外，重链可变区内,除 J 区，还有一 D 区。免疫球蛋白中绝大部分氨基酸序列变化限于 V 区的三个位点，称为高度可变区和互补决定区（CDR），该区直接涉及与抗原的结合。从 N 端数，分别被标记为 CDR1、CDR2、CDR3，CDR 由更保守的框架区维持位置。从 N 端数，框架区分别被标记为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。这些 CDR 和 FR 区的位置及其编号，最早由 Kabat et al 定义。[Kabat, E.A.et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991); 又见表 3 和 4]。

人免疫球蛋白能被划分为几个类和几个亚类,根据重链的类型,分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。它们各自的重链分别为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ϵ 型。亚类包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2,各自的重链分别为 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 型。某一类或某一亚类人免疫球蛋白分子可能含有一个 κ 或者 λ 轻链。参见, Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M.J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W.B. Saunders Co, Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)。

这里用的术语“免疫球蛋白”包括完整的抗体和其有生物活性的片段。这种生物活性片段至少保留有相对应完整长度抗体所具有的一种抗原结合功能(如对 Act-1 抗体 $\alpha 4 \beta 7$ 的特异性),最好保留有抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 与一个或多个它的配体(如 MAdCAM-1, 纤连蛋白)相互作用的能力。在特别优选的实施方案中,生物活性片段能够抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 结合到黏膜地址素(MAdCAM-1)上面。可以使用的生物活性抗体片段的例子包括能结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的片段,例如,单一链抗体, Fv、Fab、Fab'和 F(ab')₂ 片段。这些片段能通过酶切或者重组技术来获得,例如,用木瓜蛋白酶切和胃蛋白酶切分别可制备 Fab 和 F(ab')₂ 片段。抗体也能以多种截断形式被制备,即使用将一个或多个终止子导入到天然停止位置的上游的抗体基因。例如,编码 F(ab')₂ 片段重链的嵌合基因,能被设计成包含编码 CH₁ 域和重链铰链区的 DNA 序列。

术语“人化免疫球蛋白”是指一种免疫球蛋白,包括不同来源的免疫球蛋白的局部,其中至少有一部分来源于人。例如,人化免疫球蛋白可以包括有必需特异性的非人源免疫球蛋白部分,如老鼠,以及人源免疫球蛋白序列(如嵌合的免疫球蛋白),

运用传统技术（如合成）连接而成，或者运用遗传工程技术，将其作为一连续相邻的多肽来制备（如对编码嵌合抗体的 DNA 进行表达来产生出连续的多肽链）。本发明的人化免疫球蛋白的另一个实例是，包括一个或多个免疫球蛋白链，该免疫球蛋白链包括从非人源抗体衍生的 CDR 和由人源轻/重链衍生的框架区（例如，有或没有框架改变的 CDR 移植抗体）。人化免疫球蛋白这个术语也包括嵌合的或者 CDR 移植的单链抗体。参见，Cabilly et al., 美国专利号 4,816,567; Cabilly et al., 欧洲专利号 0,125,023 B1; Boss et al., 美国专利号 4,816,397; Boss et al., 欧洲专利号 0,120,694 B1; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., 欧洲专利号 0,194,276 B1; Winter, 美国专利号 5,225,539; Winter, 欧洲专利号 0,239,400 B1; Padlan, E.A. et al., 欧洲专利申请 0,519,596 A1。又参见 Ladner et al., 美国专利号 4,946,778; Huston, 美国专利号 5,476,786; 及 Bird, R.E. et al., *Science*, 242:423-426 (1988)等，关于单链抗体的描述。

人化免疫球蛋白（非人部分）的抗原结合区，可以来自于具有与 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白特性结合的非人源免疫球蛋白（称作为供体免疫球蛋白）。例如，合适的抗原结合区可以来源于鼠 Act-1 单克隆抗体[Lazarovits, A.I. et al., *J. Immunol.*, 133(4): 1857-1862 (1984)]；参见实施例 1-3]。其他来源包括非人源特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的抗体，例如啮齿类（小鼠、鼠）、兔、猪、山羊或非人灵长目（猴子）。其它的多克隆、单克隆抗体也能制备，例如，和 Act-1 抗体结合到同样或相似的抗原决定部位的抗体。[e.g. Kohler et al., *Nature*, 256:495-497 (1975); Harlow et al., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor, NY); and *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2 (Supplement 27, Summer '94), Ausubel et al., Eds. (John Wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11 (1991)]。

哺乳动物（例如，小鼠、大鼠、兔、羊）对一个恰当的免疫原能产生抗体。例如， $\alpha 4 \beta 7$ 携带细胞，含有 $\alpha 4 \beta 7$ 的膜片段， $\alpha 4 \beta 7$ 免疫原片段，一个 $\beta 7$ 肽段共价连接上一个合适的载体，都是所述的恰当的免疫原。从接受过免疫的动物的淋巴结或脾脏都能分离到抗体生成细胞（例如淋巴细胞）。将这些细胞与某种合适的永生细胞（如骨髓瘤细胞株）进行细胞融合，形成杂合子。用选择性的培养技术能将融合细胞分离出来，用适当的检测（如 ELISA）能挑选出产生所需特异性抗体的细胞。具有与 $\alpha 4 \beta 7$ 特异性结合的非人源免疫球蛋白也能从抗体文库中获得（例如，具有非人源 Fab 分子的噬菌体文库）。

在一个实施方案中，人化免疫球蛋白的抗原结合区包括非人源 CDR。在这个实施方案里，与 $\alpha 4 \beta 7$ 特异性结合的人化免疫球蛋白至少带有一个非人源 CDR。例如，这些 CDR 能来源于非人源免疫球蛋白轻链和重链的可变区，这样，人化免疫球蛋白实质上就包括一个或多个非人源免疫球蛋白的重链 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 和/或轻链 CDR1、CDR2 和/或 CDR3。所生成的人化免疫球蛋白因而具有与 $\alpha 4 \beta 7$ 结合的特异性。特定链上全部三个 CDR 最好和对应的供体链的 CDR 实质相同，而且，每条轻链和重链各自的 CDR 都能与对应的供体链的实质相同则会更好。

人化免疫球蛋白的部分或非人源免疫球蛋白链，可来自于任何合适的人的免疫球蛋白或免疫球蛋白链。例如，人恒定区或其片段可以来自于人类抗体的 κ 或 λ 型轻链，和/或 γ （如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ ）、 μ 、 α （如 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ）、 δ 或 ϵ 型重链，包括各自的等位变种。可以对特定的恒定区（例如 IgG1）、变种或恒定区局部等进行筛选来筛选效应器功能。例如，突变的恒定区（变种）能被融入一个融合蛋白，降低其对 Fc 受体的结合和/或固定互补体的功能（参见，实施例 3；还可以参见，Winter et al., GB

2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, December 22, 1994)。

如果存在的话,人框架区(例如轻链可变区的)最好来源于人抗体可变区,后者同抗原结合区供体的类似物或相应区域具有序列同源性。人化免疫球蛋白中人源部分的框架区的其他来源包括人可变的共有序列[参见,实施例2;又参见,Kettleborough, C.A. et al., Protein Engineering 4:773-783 (1991); Carter et al., WO 94/04679, 1994年3月3日发表]。例如,用来获得非人源部分的抗体或可变区的序列可以与 Kabat, E.A.所描述的人类序列相比较[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]。在优选的实施方案中,人化免疫球蛋白链的框架区来自于拥有至少65%,最好70%的与非人供体序列同源的人类可变区(例如,小鼠 Act-1)。人源部分也可来自于一种人抗体,在特定区域(如 FR)和非人源供体的对应区域(如 FR)相比,至少拥有65%,最好70%的序列同源。例如,在实施例2中,在鼠 Act-1 和人 GM607'CL 轻链可变区之间总体序列同源程度是71.4%,鼠 Act-1 和人 21/28'CL 重链可变区之间是68.1%。

在一个实施方案中,人化免疫球蛋白包括的框架区(FR)中至少要有一个是来自于人源抗体的单个链或多个链。因此,FR包括来自一个或一个以上的人抗体源的FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4。特定人化链的人源部分最好包括人源可变区的FR1、FR2、FR3和FR4(例如,来自人化免疫球蛋白链,来自一种人类共同序列)。

在本发明中使用的人源的合非人源的免疫球蛋白部分与他们各自母体的或他们的各变种的免疫球蛋白或免疫球蛋白部分具有序列同源。这些变种包括那些由于在一个或多个位点发生添加、缺失或替换而形成的各种突变体。如上述，非人源 CDR 实质上和其母体是相同的，最好是完全一致。如实施例 2 所述，人源框架区可能发生变化，在某个位点上被非人源供体的相应位点所替换。框架区可能发生一个或多个突变，包括缺失、插入和单或多氨基酸的替换。一些这样的替换模式见实施例 2 中人化 Act-1 抗体的替换模式。对于某特定的人化抗体或抗体链，框架突变可按本文所属设计。人化免疫球蛋白最好有与非人源供体相似的或更好的 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白亲合性。有多种方法可以制备变种，包括非人源供体部分发生突变或者人源受体部分发生突变。

本发明的人化免疫球蛋白具有人 $\alpha 4 \beta 7$ 结合特性，并且包括对异二聚体中 $\alpha 4$ 和/或 $\beta 7$ 链的决定簇有结合能力的人化免疫球蛋白（包括片段）。在优选的实施方案中，本发明的人化免疫球蛋白最好具有至少一种属于鼠 Act-1 抗体特性的功能，例如，结合功能（例如，具有对 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的特异结合性，具有相同或相似的抗原决定部位特性），和/或抑制功能（在体内和/或体外对 $\alpha 4 \beta 7$ 依赖性黏附的抑制能力，例如，抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 结合于 MAdCAM-1，或者抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 携带细胞结合于它的配体）。因此，优选的人化免疫球蛋白具有鼠 Act-1 抗体的结合特性，抗原决定部位特性[能同鼠 Act-1，一种嵌合的 Act-1 抗体（见实施例 1），或者同人化 Act-1（LDP-02）竞争结合 $\alpha 4 \beta 7$ （例如，在一个携带 $\alpha 4 \beta 7$ 细胞上）]，和/或抑制功能。

具有与 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白特异结合性的人化免疫球蛋白的结合功能，可以通过标准免疫学实验来检测，例如，用来指示人化免疫球蛋白和 $\alpha 4 \beta 7$ 形成复合物的检测[例如，包括 $\alpha 4 \beta 7$ 的膜

片段， $\alpha 4 \beta 7$ 的携带细胞，如人淋巴细胞（ $CD4^+ \alpha 4^{hi}$ ， $\beta 1^{lo}$ 亚单位的淋巴细胞），包括编码对 $\alpha 4 \beta 7$ 进行表达的 $\alpha 4$ 和/或 $\beta 7$ 的核酸的人淋巴细胞株或重组宿主细胞）。

对具有所需特性的人化免疫球蛋白的鉴别和/或分离的方法（如从一个文库中）还包括结合和/或黏附实验等等，（如，一种方法是检测 $\alpha 4 \beta 7$ 携带细胞黏附于它的一个配体[例如第二个表达 MAdCAM，嵌合的 MAdCAM-Ig 的细胞]，或者其它的适宜的方法。

本发明中用到的人源和非人源免疫球蛋白部分，包括轻链，重链和轻重链的一部分。这些免疫球蛋白部分可以取自或衍生自免疫球蛋白（如从头合成某一部分），或由对具有所需要的性质（例如，对 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的结合，序列相似性）的免疫球蛋白或其链进行编码的核酸来产生合表达而获得。具有人源和非人源特定部位（例如，抗原结合区，CDR，FR，C 区）的人化免疫球蛋白，可以通过合成和/或重组核酸构建相应编码功能的基因（cDNA）来获得，为得到一条链的片段，需要将一个或多个终止子导入到预期的位点。例如，利用 PCR 突变技术改变现有 DNA 序列，使构建出的 DNA 能够编码新设计的人化可变区 [Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res. 17:5404(1989)]。基于相同的或非常相似的人可变区，编码新 CDR 的 PCR 引物能和人化可变区的 DNA 模板杂交 [Sato, k., et al., Cancer Research 53:851-856 (1993)]。如果没有相似的 DNA 序列作为模板，则需要合成一段寡聚核苷酸来产生能编码可变区序列的核酸 [Kolbinger, F., Protein Engineering 8:971-980(1993)]。编码信号肽的一段序列也能掺入该核酸（例如，合成或掺入一个载体）。如果无法得到天然信号肽段，也可以用其他抗体的信号肽 [Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4:773-783 (1991)]。通过这些方法，本文中所描述的

方法和其他可行的方法，都可以制备出变体（见实施例5）。在一个实施方案中，克隆的可变区可以发生突变，从中筛选出对具有所需要的特异性的变体进行编码的核酸序列（如，从一个噬菌体文库，Krebber, et al., U.S. 5,514,548; Hoogenboom et al., WO 93/06213, 发表于1993年4月1日）。

核酸及其含有这些核酸的构建物

本发明涉及分离的和/或重组的（包括高纯度）编码人化免疫球蛋白或编码轻、重链的核酸。

这里所指“分离的”核酸是指从基因组DNA或细胞RNA中分离出来的核酸（它存在于细胞内或基因文库），包括用下述方法或其他方法获得的核酸：化学合成、联合使用生物的和化学的方法、重组核酸并被分离[参见 Daugherty, B.L. et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A.P. and J.S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)]。

这里所指“重组的”核酸是指用重组DNA技术制备的核酸，包括依靠人为重组方法获得的核酸，例如，多聚酶链反应（PCR）和/或用限制性内切酶克隆到载体中。“重组”核酸也指细胞里以天然机理发生重组事件而获得的核酸，但需要将经设计的核酸导入细胞，以筛选出期望的重组事件。

本发明还特别涉及分离的和/或重组的编码人化Act-1免疫球蛋白（例如本发明中含有鼠Act-1单克隆抗体源非人部分的人化免疫球蛋白）及其链的核酸。在一个实施方案里，轻链包括衍生自Act-1抗体轻链源三个互补决定区，重链包括衍生自Act-1抗体重链源三个互补决定区。这种核酸包括，（a）编码具有人化Act-1免疫球蛋白重链可变区的氨基酸序列的多肽的核酸

[例如, 图 11 中的重链可变区 (SEQ ID NO: 19), 图 9 中的重链可变区 (SEQ ID NO: 15)], (b) 编码具有人化 Act-1 免疫球蛋白轻链可变区的氨基酸序列的多肽的核酸[例如, 图 12 中的轻链可变区 (SEQ ID NO: 21), 图 7 中的轻链可变区 (SEQ ID NO: 12)], (c) 编码人化 Act-1 免疫球蛋白轻或重链可变区中至少一个功能部分的核酸(例如, 人化免疫球蛋白中足够结合抗原的部分)。由于遗传密码的简并性, 编码特定多肽的可能有多种核酸。在一个实施方案里, 核酸中所包含的可变区序列被描述或实质上被描述于图 11 (SEQ ID NO: 18), 或者被描述或实质上被描述于图 12 (SEQ ID NO: 20), 包括双链或单链聚核苷酸。[尽管有多种图能够描述比可变区大得多的多肽(例如, 包括信号肽编码序列或恒定区编码序列的一部分), 特定图中可变区的图例说明意味着包括图示序列的可变区部分]。符合这些标准的分离的和/或重组的核酸, 包括那些能够编码与上面讨论的人化 Act-1 抗体或它的变种的序列相等的序列的核酸。

本发明中的核酸可以用来制备特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的人化免疫球蛋白。例如, 编码本发明中人化免疫球蛋白的核酸 (DNA) 可以被整合到一合适结构中(如一个载体), 进一步操纵其序列或者在合适的宿主细胞内表达所编码的多肽。

特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的人化免疫球蛋白的制备方法

本发明的另一方面涉及特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的人化免疫球蛋白的制备方法。例如, 在合适的宿主细胞里, 对编码特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的人化免疫球蛋白的一个或多个重组核酸进行表达, 从而获得人化免疫球蛋白。

本发明也提供了适于特异结合人化免疫球蛋白表达的构建物或表达载体。构建物可以被导入一合适的宿主细胞，产生能表达人化免疫球蛋白的细胞，并可以在培养基中生长和维持。合适的宿主细胞可以是原核生物，包括细菌，例如大肠杆菌 (*E. coli*)、苏云金杆菌 (*B. subtilis*) 和/或其他合适的细菌，或者真核生物，例如真菌或酵母细胞 (如 *Pichia pastoris*, *Aspergillus species*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*)，或者其他低级真核细胞，以及高级真核细胞，例如昆虫细胞[如 sf9 昆虫细胞 (WO 94/26087, O'Connor, 1994 年 11 月 24 日发表)]或哺乳动物细胞[如 COS 细胞，NSO 细胞，SP2/0，中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)，HuT78 细胞，293 细胞]。[见 Ausubel, F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc., (1993)]。

产生特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的人化免疫球蛋白的宿主细胞，可以如下述制备。例如，含有对所需的人化免疫球蛋白的全部或部分编码序列的核酸可以被插入到一核酸载体中，例如 DNA 载体，如质粒，病毒或其他适于表达的复制子。有多种载体可供选择，包括单拷贝或多拷贝载体，或者整合到宿主细胞染色体中的载体。

合适的表达载体可以包含许多组成部分，包括但不限于下述成分中的一个或几个成分：复制起点；可选择的标记基因；一个或多个表达调控因子，例如，转译控制因子 (如启动子，增强子，终止子)，和/或一个或多个翻译信号；用于膜靶向或膜分泌的信号序列或前导序列。在一个构建物中，信号序列可以由载体提供，也可以有其他来源，例如，免疫球蛋白的转译和/或翻译信号可以用来指导表达。

合适的宿主细胞含有用于表达的启动子，启动子可以是组成型，也可以是诱导型，例如，将启动子可工作地连接到编码人化免疫球蛋白或免疫球蛋白链的核酸上，从而指导多肽的表达。对于原核细胞（例如，适合大肠杆菌的启动子有 lac、tac、T3、T7）和真核细胞（适合真核细胞的酵母乙醇脱氢酶（ADH1）、SV40、CMV）都有多种启动子可供选择。

此外，典型的表达载体包括有可供筛选的标记物，用来筛选带有载体的宿主细胞，如果是复制表达载体，则包括起源和复制区段。对具有抗生素或药物抗性的产物进行编码的基因通常用作可筛选的标记物，并且可以用于原核细胞（例如， β -内酰胺酶基因（抗青霉素），抗四环素的 Tet 基因）和真核细胞[例如，新霉素（G418 或遗传霉素），gpt（霉菌酚酸），青霉素或潮霉素抗性基因]。二氢叶酸还原酶标记基因允许通过二氢叶酸在多种宿主细胞中进行筛选。编码营养缺陷型标记物的基因（例如 LEU2，URA3，HIS3）是酵母菌常用的筛选标记。倍受关注的载体还有病毒（如杆状病毒）、噬菌体和能够整合到宿主基因组中的载体，如逆转录病毒。本发明也涉及带有这些表达载体的细胞。

例如，通过某种适合待筛选宿主细胞的方法（如转化、转染、电渗透、传染），可以将编码特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 人化免疫球蛋白重链和轻链的核酸，或构建物（一个或多个构建物）导入合适的宿主细胞，以便这些核酸能够可工作地连接到一个或多个表达控制因子上（例如，在载体中，在细胞内的过程所创造的构建物中的核酸被整合到宿主细胞基因组中）。宿主细胞在适于表达的条件下生长（例如，存在诱导物，存在含有适当盐、生长因子、抗生素、营养补充物等的培养基），从而生产出所编码的多肽。如果需要，还可以从中（宿主细胞、培养液、奶汁）分离出所编码

的蛋白（如人化 Act-1 抗体）。此过程包括在转基因动物宿主细胞中的表达（见 WO92/03918, GenPharm International, 1992 年 3 月 19 日发表）。

可以制备融合蛋白，其中，人化免疫球蛋白或免疫球蛋白链在 N 端、C 端或融合蛋白的中间位置，连接到一个非免疫蛋白部分上（天然情况下，免疫球蛋白没有此部分）。例如，一些实施例是将免疫球蛋白基因插入一合适的表达载体，如 pET 载体（pET-15b, Novagen），噬菌体载体（pCANTAB 5E, Pharmacia），或别的载体（pRIT2T 蛋白 A 融合载体，Pharmacia）。所得到的构建物被导入到合适的宿主细胞中进行表达。表达后，利用恰当的亲合基质从细胞溶胞物中分离或纯化融合蛋白{见 Current Protocols in Molecular Biology [Ausubel, F.M. et al., eds., vol 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1 – 16.7.8 (1991)]}。

治疗方法及组合物

本发明提供了人化免疫球蛋白，它们能够（1）在体外和/或在体内结合 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白；和/或（2）调节 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的活性或功能，例如（a）结合功能（ $\alpha 4 \beta 7$ 结合 MAdCAM-1，纤连蛋白和/或 VCAM-1 的能力）和/或（b）淋巴细胞渗透功能，包括富集和/或聚集于组织（抑制淋巴细胞迁向内皮黏膜组织的能力）。优选的是，人化免疫球蛋白能够在体外和/或在体内选择性结合 $\alpha 4 \beta 7$ ，以及抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 介导的反应。在一个实施方案里，人化免疫球蛋白可以同 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白结合，抑制了 $\alpha 4 \beta 7$ 与它的配体中的一个或一个以上的结合（例如，MAdCAM-1，VCAM-1，纤连蛋白），从而抑制组织的淋巴细胞渗透（包括组织中淋巴细胞的富集和/或集中），最好具有选择性。在体外和/或在体内，此人化免疫球蛋白能够抑制在黏膜组织中 $\alpha 4 \beta 7$ 携

带细胞与肠内皮细胞的细胞黏附作用，这些黏膜组织包括消化道相关组织、淋巴样器官或淋巴细胞（尤其是 T 细胞或 B 细胞）。在一个最佳实施例中，人化免疫球蛋白（例如，Act-1）可以抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 与 MAdCAM-1 和/或纤连蛋白的反应。

本发明的人化免疫球蛋白在科研、诊断和治疗等诸多领域都是十分有价值的。例如，它们能够用来探测、分离和/或纯化 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白或它的变种（例如，采用亲和纯化法或其他方法），能用来研究 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的结构（如构型）与功能。

本发明的人化免疫球蛋白也可以用于诊断（在体外）或者在治疗（包括预防）中调节 $\alpha 4 \beta 7$ 的功能。

本发明的人化免疫球蛋白可用于检测和/或测量样品中 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的水平（例如，组织或体液，例如炎症渗出液、血液、血清、肠液，携带 $\alpha 4 \beta 7$ 的细胞等）。例如，从个体获得样品（组织和/或体液），用合适的免疫学方法检测和/或测量 $\alpha 4 \beta 7$ 的表达，这些方法包括酶联免疫吸附实验（ELISA），化学发光实验，放射免疫实验和免疫组织学等。在一种实施方案中，提供了检测样品内 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的方法，该方法包括，在适于人化免疫球蛋白特异结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的条件下，将样品与本发明的人化免疫球蛋白相接触，检测所形成的抗体- $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白复合物。在应用该方法时，可以用人化免疫球蛋白来区分正常组织与炎症组织（人体的）的 $\alpha 4 \beta 7$ 活性和/或表达（免疫组织学的角度），从而发现 IBD 或其他疾病与 $\alpha 4 \beta 7$ 表达增加（受感染组织的）之间的联系。本发明的人化免疫球蛋白能用来评价正常组织和炎症组织中 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的存在情况，从而对疾病的发生、疾病进程 和/或者抗 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白治疗炎症的疗效等进行评价。

本发明人化免疫球蛋白也能用来调节[例如抑制(减弱或防止)] $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白的结合功能和/或淋巴细胞(如淋巴细胞、单核细胞)渗透功能。例如,对于组织淋巴细胞(如淋巴细胞、单核细胞)渗透性疾病(包括组织中淋巴细胞的富集和/或积聚),尤其是表达 MAdCAM 分子的组织,可以用抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 与其配体(一个或多个配体)结合的人化免疫球蛋白来治疗,为达到治疗效果,将有效剂量的本发明的人化免疫球蛋白提供给个体(例如,哺乳动物,如人或别的灵长目动物)。可用此法治疗的炎症疾病包括在下列组织的淋巴细胞渗透性疾病:胃肠道(包括肠内皮)、其他黏膜组织、或表达 MAdCAM-1 分子的组织(如肠相关组织,包括大小肠黏膜固有层的小静脉;和哺乳动物腺体(乳腺))。相似地,因淋巴细胞与表达 MAdCAM-1 细胞(如内皮细胞)结合而导致的组织淋巴渗透性疾病,也可根据本发明来治疗。

在特别优选的实施方案中,此法能用于治疗炎性肠道疾病(IBD),例如溃疡性结肠炎、Crohn's 病、回肠炎、腹腔疾病、非热带性口炎性腹泻、关节病血清反应阴性肠病、显微性或胶原性结肠炎、嗜酸性胃肠炎、直肠结肠切除及回肠吻合术后直肠瓣间小囊炎症。

胰腺炎和胰岛素依赖型糖尿病也可以用此法治疗。据报道,不仅 BALB/c 和 SJL 老鼠,而且 NOD(非肥胖性糖尿病)老鼠的外分泌胰管也能表达 MAdCAM-1,在胰岛素疾病早期,NOD 老鼠炎症胰岛内皮上诱导出 MAdCAM-1,其中以地址素为主[Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92:2509-2515 (1993)]。此外,表达 $\alpha 4 \beta 7$ 的淋巴细胞在胰岛上聚集, $\alpha 4 \beta 7$ 介导的淋巴细胞与发炎胰岛管的结合也与 MAdCAM-1 有关[Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92:2509-2515 (1993)]。

可以用本发明的方法治疗的黏膜组织炎症疾病包括：乳腺炎（哺乳动物腺体）、胆囊炎、胆管炎或边周性胆囊炎（胆管和肝脏周围组织）、慢性支气管炎、慢性鼻窦炎、气喘和移植排异反应（例如在胃肠道上）。象 Crohn's 病一样，炎症常常扩散到黏膜表面以外，类似地，导致间隙纤维变性、过敏性肺炎、胶原疾病、肉样瘤病和其他自发疾病的慢性肺部炎症，也能用此法治疗。

人化免疫球蛋白要以能达到抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 结合其配体的有效剂量 给药。在治疗中，有效剂量可以达到所需要的治疗（包括预防）效果（例如，足够减轻或防止 $\alpha 4 \beta 7$ 参与的结合和/或信号的剂量，从而抑制淋巴细胞黏附和渗透和/或伴发的细胞反应）。人化免疫球蛋白可以是单剂量或者是多份剂量。剂量可以根据本领域熟知的方法来确定，并且受下列因素影响：个体年龄、敏感性、耐受性、身体状况。抗体的合适剂量可以是 0.1 毫克/公斤体重到 10 毫克/公斤体重。

根据本方法，人化免疫球蛋白可以单独给药，或者搭配给药，可以在给其他药物之前、同时或之后给药。在一种实施方案里，给药的是多于一种的抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 结合其配体的人化免疫球蛋白。在另一实施方案里，可抑制淋巴细胞结合内皮上配体的单克隆抗体，包括抗 MAdCAM-1、抗 VCAM-1、抗 ICAM-1 抗体，与人化免疫球蛋白配合给药。在另外的一种实施方案中，一种额外的药物活性成分与人化免疫球蛋白配合给药（例如消炎化合物硫酸沙利比林、非甾体消炎药或类固醇消炎药）。

可以有多种给药途径，它们包括但并不仅限于：肠胃外给药（静脉内、动脉内、肌肉内、皮下注射），口服给药（饮食），局部给药，吸入给药（支气管内、鼻内或口腔吸入给药、鼻内滴

注)，或者直肠给药，具体途径视疾病和治疗条件定。肠胃外给药是最佳给药途径。

根据不同的给药途径来选择不同的药物剂型（溶液、乳剂）。适宜的含有人化抗体的组合物可以用生理学可接受的载体来制备。对于溶液和乳剂，适用的载体包括水或醇/水溶液、乳浊或悬浮液，包括盐水和缓冲液。肠胃外给药所用载体包括氯化钠溶液，Ringer's 葡萄糖，糖盐水，乳糖化 Ringer's 或者固定油。静脉内给药所用载体可以包括多种添加剂，保存剂，或液体，营养剂或电解补充剂（见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition Mack Publishing Co., PA, 1985）。吸入给药可以将药物溶解，再装入一种合适的喷雾器中（例如，雾化器，喷洒器，和压力气溶胶喷雾器）。

实施例

本发明由下列实施例予以进一步说明，但它们不是要限制本发明的。

如实施例 1 所描述，进行了鼠 Act-1 抗体的纯化和序列分析。编码鼠 Act-1 抗体轻重链可变区的 cDNA 被 PCR 扩增且测序。用蛋白质测序测得 Act-1 kappa 轻链可变区（V_L）的氨基酸序列，发现它和 V_L 基因 DNA 序列衍生出的氨基酸序列完全一致。同样，绝大部分重链可变区（V_H）的氨基酸序列也已测知，并且和 V_H 基因 DNA 序列衍生出的氨基酸序列一致。这些结果说明从杂交细胞株中克隆到正确的鼠 Act-1 可变区基因功能性嵌合 Act-1 抗体被产生，证实了克隆到正确的基因。特别值得注意的是，编码鼠 Act-1 轻链可变区和重链可变区的 DNA 分别与人 kappa 轻链恒定区 DNA 和人 γ -1 或 γ -4 重链恒定区 DNA 相连。嵌合的

抗体也被用于和人化 Act-1 mAb (变形的 Act-1 mAb LDP-02) 之间的比较分析。

为制备良好结合 $\alpha 4 \beta 7$ 的人化 Act-1 抗体, 设计出变形的人可变区 (实施例 2)。为方便设计, 建立了一个鼠 Act-1 可变区的分子模型。鼠 Act-1 抗体中直接参与抗原结合的区域, 互补决定区或 CDR 被移植到特定的人可变区中。在人可变区框架区 (FR) 上制造少量位点的氨基酸改变。这种改型的人 Act-1 可变区在特定人轻链可变区 FR 上有单个氨基酸改变, 在特定人重链可变区 FR 上有 5 个氨基酸改变, 每个改变都是将人型转变成鼠型。

如实施例 3 所描述, 对改型的人 Act-1 可变区进行编码的 DNA 被构建, 并连接于人恒定区 DNA 序列, 所生成的核酸被用来制备人化 Act-1 免疫球蛋白。人化 Act-1 抗体在哺乳细胞里表达 (实施例 3), 和鼠 Act-1 抗体比较, 测其与人 $\alpha 4 \beta 7$ 的结合 (实施例 4)。如表 5 所示, 人化 Act-1 抗体保留了鼠 Act-1 也有的抗原决定部位结合特异性, 而且与天然的鼠抗体相比, 还表现出意外的增强的亲合性。

在设计中鉴别出几个人化 Act-1 抗体的变种 (实施例 2 和 5)。例如, 可以在如下的一个或一个以上位点发生额外的改变: 轻链突变体 M4V (位点 4 的 Met $\rightarrow$ Val 突变), 重链突变体 R38K (位点 38 的 Arg $\rightarrow$ Lys 突变), 重链突变体 A40R (位点 40 的 Ala $\rightarrow$ Arg 突变)。此外, 重链突变体 I73T (位点 73 的 Ile $\rightarrow$ Thr 回复突变), 在位点 73 保留原存在于人框架区同样位点的苏氨酸。既能够在单一链上制造一个或多个位点改变, 又能够在多条链上制造多种位点改变。

实施例1 Act-1 V_H和 V_L区的克隆及鼠-人 Act-1 嵌合 免疫球蛋白的构建和表达

Act-1 V_H和 V_L区的克隆

根据制造商实验手册上的方法，利用 TRIzol 试剂（Gibco/BRL）从产 Act-1 单克隆抗体的杂种细胞提取 RNA [Lazarovits, A. I. et al., J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984) ; provided by A. I., Lazarovits and R.B., Colvin)]。

根据制造商的实验手册用 Ig-引物试剂盒（Novagen）对重链和轻链可变区基因进行 PCR 扩增，简述之，1.5 μg RNA 逆转录为 cDNA，反应体系中包括 2.0 μl 5X MMLV 缓冲液(5X=250mM Tris-HCl, pH 8.3, 25°C, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 1.0 μl 100mM DTT (二硫苏糖醇), 0.5 μl 10mM dNTP 混合液(dATP、dCTP、dTTP、dGTP 各 10mA), 0.5 μl 寡聚 dT(1 μg/μl), 0.25 μl 乙酰 BSA(4mg/ml), 1.0 μl 适用的 Ig-3' 引物(10 pmol/μl), 0.5 μl MMLV 逆转录酶(200 单位/μl)和无 RNase 水，总体积为 10 μl。混合物于 37°C 温育 5 分钟，42°C 下 30 分钟，99°C 下 5 分钟，每个 Ig-3' 引物在单独的反应中使用。

根据制造商的实验手册，可变区在逆转录材料中被扩增，简述之，8 μl 的逆转录材料同下列物质混合：4 μl 2.5mM dNTP, 5 μl 10X 反应缓冲液(10X=100mM Tris-HCl, pH8.8, 25°C, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100), 2.5 μl Ig-5' 前导引物(10 pmol/μl)(每个引物在独立的反应中使用), 0.25 μl (1.25 单位)AmpliTaq[®] DNA 多聚酶(Perkin-Elmer), 用水补足到 50 μl。

以 MuIgV_H5'-A, MuIgV_H5'-B, MuIgkV_L5'-A 和 MuIgkV_L5'-B 为引物的扩增反应，其循环参数分别为：94°C 1 分钟，50°C 1

分钟，72°C 2 分钟，循环 35 次，然后 72°C 延续 6 分钟。所有其他 5'端引物的扩增反应同样适用该条件，除了退火温度上升为 60°C。

不管是用 MuIgGV_H3'-2 或 MuIgMV_H3'-1 作 3'端引物，还是用 MuIgV_H5'-B 或 MuIgV_H5'-E 作 5'端引物，都能成功扩增重链可变区。用 MuIgkV_L3'-1 作 3'端引物和用 MuIgkV_L5'-G 作 5'端引物可以成功扩增出轻链可变区。

引物序列如下：

MuIgGV_H3'-2 (SEQ ID NO: 56):

5'-CCC AAG CTT CCA GGG RCC ARK GGA TAR ACI GRT GG

MuIgMV_H3'-1 (SEQ ID NO: 57):

5'-CCC AAG CTT ACG AGG GGG AAG ACA TTT GGG AA

MuIgV_H5'-B (SEQ ID NO: 58):

5'-GGG AAT TCA TGR AAT GSA SCT GGG TYW TYC TCT T

MuIgV_H5'-E (SEQ ID NO: 59):

5'-ACT AGT CGA CAT GAA GWT GTG GBT RAA CTG GRT

MuIgkV_L3'-1 (SEQ ID NO: 60):

5'-CCC AAG CTT ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA

MuIgkV_L5'-G (SEQ ID NO: 61):

5'-ACT AGT CGA CAT GGA TTT WCA RGT GCA GAT TWT CAG CTT

用琼脂糖凝胶纯化出扩增片段，用 Ig-Prime 试剂盒将之共价结合到 pT7Blue T 载体中（Novagen），根据制造商的实验手册，用此共价连接混合物转化试剂盒中提供的 NovaBlue 细胞。

用 T7 启动子引物和 U-19mer 引物，对包含合适尺寸插入的白色集落进行测序。退火发生在插入位的对面，正好在 pT7Blue 载体多克隆位点的外面。根据制造商的实验手册，用测序酶 T7DNA 多聚酶试剂盒（USB/Amersham Life Science）在仪器小制备量 DNA 上测序。

多个独立的重链可变区克隆的共同 DNA 序列（SEQ ID NO: 1）及其编码的氨基酸序列（SEQ ID NO: 2），被示于图 1。简并引物导致序列中某些简并，起始密码是核苷酸 13-15 编码的 Met，预测的先导物多肽酶切割位点位于核苷酸 67-69 编码的 Ser 和核苷酸 70-72 编码的 Gln 之间（核苷酸 13-69 编码前导肽）。本图中，鼠恒定区的一部分起始于由残基 433-435 编码的 Ala。

多个独立的轻链可变区克隆的 DNA 序列（SEQ ID NO: 5）及氨基酸序列（SEQ ID NO: 6），示于图 3。不同于重链可变区，被扩增序列并不简并，可能因为所用引物并非很简并，以及可变区仅由单一的引物对扩增而来。

嵌合重链基因的构建

构建了嵌合性鼠-人重链基因，人重链恒定区的来源是一个含有野生型人 $\gamma 1$ 恒定区的克隆（由 Herman Waldmann 博士提供（牛津大学））；被标为 3818 的构建物包括整合在 pEE6 表达载体（Celltech）的人化抗 CD18 重链基因，对应于人化 CD18 重链基因同一区域的恒定区被克隆到 pEE6.hCMV 中，具体如 Sims, M.J. et al., J. Immunol., 151(4): 2296-2308 (1993) and WO93/02191, 1993 年 2 月 4 日所述，这些文献的教导都通过在此引述而全部合并于本文。用 HindIII 和 EcoRI 酶解，可以从表达载体上释放出人化抗 CD18 抗体重链可变区和恒定区（野生型 $\gamma 1$ ）的序列，回收 1.421bp 含有重链基因的片段，亚克隆到 pCR-

Script™ (Stratagene)的 Hind III 和 EcoRI 位点，形成一个称为 pCR-CD18H 的质粒。在抗-CD18 重链基因可变区和恒定区之间的连接部位有一个 SpeI 限制性酶切点，用 HindIII 和 SpeI 酶切 pCR-CD18H，释放出重链可变区，此区由如下述制备的鼠 Act-1 可变区替代。

合成出两个引物，使整合入新的限制性内切酶位点，引物是：

5'端引物 (SEQ ID NO: 41)：

Hind III

5'-T[AA GCT T]CC GCC ATG GGA TGG AGC

3'端引物 (SEQ ID NO: 42)：

Spe I

5'-GGT GAC [ACT AGT] GCC TTG ACC CCA G

黑体印刷的核苷酸说明与模板序列不同，被标为 H2B#34 的带有如图 2 中的核酸序列 (SEQ ID NO: 3) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4) 的独立的鼠 Act-1 重链克隆，可作为模板，在上述 5' 和 3' 端引物作用下，可扩增鼠可变区，同时在起始密码 5' 端导入一个 HindIII 位点，在 J 区 3' 端导入一个 SpeI 位点。PCR 片段被直接亚克隆到 pCR-Script™，形成 pCR-mACT1HV 质粒，正确的序列得到证实。通过 HindIII 和 SpeI 酶能从 pCR-mACT1HV 上释放出片段，再插入 pCR-CD18H 的 HindIII 和 SpeI 位点，替代抗 CD18 可变区形成 pCR-mhACT1Hchi。用 HindIII 和 EcoRI 释放出嵌合的重链基因 (鼠 Act-1 可变区加上人 γ 1 恒定区)，再克隆回到 pEE6hCMV-B 载体，包括 hCMV 启动子，形成了一个名为 pEE6mhACT1Hchi 的构建物。

嵌合性轻链基因的构建

以类似重链的方式构建了嵌合性鼠-人轻链基因。然而，对于嵌合性轻链，导入了一个新的限制性酶切位点 *KasI* 到构建物中，是以一条名为 KG#87 的鼠 Act-1 轻链可变区克隆为模板对一个可变区片段进行 PCR 扩增，以包含有人化抗 CD18 kappa 轻链基因的结构体为模板读 kappa 轻链恒定区进行 PCR 扩增，从而获得此位点[由 Herman Waldmann 博士提供（牛津大学），3819 构建物包含有存在于 pEE12 表达载体的人化抗 CD18 轻链]。恒定区对应于 Sims, M.J. 所描述克隆于 pEE12 的人化 CD18 轻链基因的恒定区[Sims, M.J. et al., J.Immunol., 151(4):2296-2308 (1993) 和 WO 93/02191, 1993 年 2 月 4 日发表]。

可变区引物为：

5'端引物（SEQ ID NO: 43）

HindIII

5'-T[AA GCT T]CC GCC ATG AAG TTG CCT

3'端引物（SEQ ID NO: 44）

Kas I

5'-[GGC GCC] GCA TCA GCC CGT TTT

黑体印刷的核苷酸说明与模板的序列不同，编码区内两位点的核苷酸改变，位点 423T→G，位点 426A→G，在图 3 中产生了 *KasI* 位点，它们是静息的，不改变氨基酸序列。

kappa 恒定区的引物为:

5'端引物 (SEQ ID NO: 45)

Kas I

5'-C[GG CGC C]AT CTG TCT TCA TC

3'端引物 (SEQ ID NO: 46)

HindIII

5'-[AAG CTT] CTA ACA CTC TCC

轻链可变区和恒定区分别在各自的模板和引物下进行扩增,PCR产物分别被亚克隆到 pCR-Script™中以确证序列。用 Hind III 和 Kas I 酶解从载体上释放出每个片段,经凝胶纯化后共价整合到 3819pEE12 表达载体的 HindIII 位点,已经事先用 HindIII 酶解从该载体释放出人化抗 CD18 轻链基因,最后所得构建物命名为 pEE12mhACT1Lchi。

嵌合性免疫球蛋白的表达

为组建包括嵌合重链和轻链基因的表达载体,用 Bgl II 和 BamHI 酶从 pEE6 表达载体上 (pEE6mhACT1Hchi) 释放出整个重链基因加 CMV 启动子,该片段再共价整合到 pEE12 轻链基因表达载体 (pEE12mhACT1Lchi) 的 BamHI 位点,得到了包含嵌合轻链基因和嵌合重链基因的命名为 pEE12mhLHchi 的单一质粒,这两条基因都分别受到 CMV 启动子的转译调控。

pEE6hCMV-B 和 pEE12 表达载体和 Celltech 公司的谷氨酸合成酶基因扩增系统,已在前面描述过[见,WO 86/05807 (Celltech), WO 87/04462 (Celltech), WO 89/01036 (Celltech), EP 0 323 997 B1

(Celltech), 和 WO 89/10404 (Celltech), 这些有关的教导都通过在此引述而全部合并于本文]。

为短暂地表达嵌合的抗体, 可以通过电渗透将 $20\text{ }\mu\text{g}$ pEE12mhLHchi 转染 COS-7 细胞 (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852), 用胰蛋白酶-EDTA 处理从组织培养瓶中收集对数期的 COS-7 细胞。对细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤一次, 用 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 洗涤一次, 将细胞分散于浓度为 $1.5 \times 10^7\text{ cells/ml}$ 的 HBSS 中, 取 0.8 ml HBSS 即有 1.2×10^7 个细胞与 $20\text{ }\mu\text{g}$ 质粒 DNA 混合, 于室温孵育 10 分钟, 将此 DNA/细胞混合液转入 0.4 cm 电渗透试管, 用 Bio-Rad GenePulser 供以 250 伏特, $960\text{ }\mu\text{F}$ 的电流, 电渗透后于室温孵育 10 分钟, 再将细胞转入 20 ml 培养基中 (Dulbecco's 改良型 Eagle's 培养基 (DMEM) +10%FCS), 于 162 cm^2 的组织培养瓶 (Costar) 中培养。5 天后, 收集细胞培养液的上清液, 测试其对表达 $\alpha 4 \beta 7$ 的 HuT78 细胞的染色能力, HuT78 细胞 (一种人类 T 细胞株) 由 American Type Culture Collection 提供 (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, Assession No. ATCC 71B 161)。

$100\text{ }\mu\text{l}$ 的被瞬间转化的 COS-7 细胞培养上清液, 不成功转染的 COS-7 细胞培养上清液, 纯化的鼠 Act-1 抗体 ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$), 或各自纯化的鼠 (鼠 IgG1, kappa (MOPC21), $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, 来自 Sigma) 和人 (人 IgG1, $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 来自 Sigma) 型不相关的同型对照抗体, 在冰上和 1×10^5 HuT78 细胞一起孵育 30 分钟, 用含有 2% 小牛血清 (FCS) 和 0.01% 叠氮化钠 (FACS 缓冲液) 的冰冻的 PBS 缓冲液洗涤细胞两次, 在冰上和恰当的荧光辅助抗体孵育 30 分钟[连有 AffiniPure F(ab')₂ 片段山羊抗-鼠 IgG(H+L) 的荧光 FITC 或者连有 AffiniPure F(ab')₂ 片段山羊抗-人 IgG(H+L)

的荧光 FITC(Jackson Immno Research)]。30 分钟后,用 FACS 缓冲液洗涤细胞两次,再溶解于 300ml 的同种缓冲液中,用 Becton Dickinson FACscan 细胞流计分析细胞。图 4A 表示和鼠同型不相关对照抗体 MOPC21 (IgG1, kappa) 相比,对鼠 Act-1 mAb 的染色。图 4B 表示和人同型不相关对照抗体 (IgG1, kappa) 以及不成功转染的 COS-7 细胞上清比较,嵌合的 Act-1 抗体对 HuT78 细胞的染色。因此,和鼠 Act-1 抗体相比,此嵌合的抗体对 HuT78 细胞的染色是类似的。总的来说,这些数据说明我们成功地克隆及表达了正确的鼠 Act-1 可变区。

氨基酸序列分析

对纯化的鼠 Act-1 重轻链进行氨基酸序列分析,以证实从杂合子中分离到的轻重链可变区 cDNA 的特性,对轻链进行的实验是这样的:

在氮气保护下,0.3M 硼酸钠,0.15M 氯化钠溶液,37°C 下 2 个小时,用 2 mM DTT 降解鼠 Act-1 (5mg/ml),加入碘化乙酰胺,溶液浓度调为 10mM,室温下保持 4 小时,非变性条件下的 SDS-PAGE 电泳分析结果证实了此蛋白被定量降解。蛋白质溶液进一步在 PBS 中透析,取一部分透析干净的样品过 Superdex 75 柱 (16/60,Pharmacia) (run 1),重链和轻链都从同一柱上通过二者洗脱,体积一样,说明两链依然相连。另一份样品用 8M 尿素处理,在变性条件下 (6M 尿素) 过 superdex 75 柱 (run2),二者还是在柱中一起洗脱,可能是由于没有打开折叠的缘故。SDS-PAGE 电泳分析证实,从两种凝胶过滤洗脱下来的两样品中都有全部两条链的存在。对这些样品进行 N 端测序 (Commonwealth Biotechnologies, Inc.), 结果如下:

样品 2: DVVVVTQTPLSLPVSFDGQV (SEQ ID NO: 47)

样品 1: DVVVVTQTPLSL (SEQ ID NO: 48)

所得序列与从 DNA 推导出的成熟的轻链 N 端序列相一致, 这里以及其他的分析重链序列的尝试, 说明重链 N 端可能被封闭了, 因此, 对重链进行了内部肽段的氨基酸序列分析。

用木瓜蛋白酶切割以简化抗体 F(ab)₂' 片段的氨基酸测序。pH3.0, 0.1M 柠檬酸钠, 37° C 下 2 个小时, 在抗体:木瓜蛋白酶为 1:200 的比例下, 用木瓜蛋白酶切割鼠 Act-1, 通过 SDS-PAGE 分析来评价反应是否结束, 用蛋白质 G 和蛋白质 A 柱纯化蛋白质。依上述方法将样品降解并烷基化, 用制备型 SDS-PAGE(15%)将重链和轻链分开, 切割重链片段, 并在 1ml 0.1% SDS 和缓冲液中电泳 2 小时。对样品用 2ng Asp-N 蛋白质内切酶切割样品 30 分钟, 片段用 SDS-PAGE(17.5%)分离。降解产物在 0.1M Hepes, PH8.0, 0.1%SDS 中被动洗脱过夜, 并进行 N 端测序 (Commonwealth Biotechnologies, Inc.)。

从 17Kda 片段得到的序列为 DY AIDYWG (SEQ ID NO: 49), 存在于重链克隆中(图 1, 序列 AIDY 对应于 JH4 区的起始位)。

实施例 2 鼠 Act-1 可变区的分子模型

为帮助设计 CDR-移植的可变区, 建立起一个鼠 Act-1 可变区的分子模型, 利用已建立的同源性建模方法, 模型化类似于免疫球蛋白的确定特性的蛋白质结构, 在 UNIX 操作系统下用 Silicon Graphics IRIS 4D 工作站建立分子模型, 使用分子模型软件包 QUANTA (Polygen Corp., Waltham, MA) 和 Brookhaven 蛋白质晶体图谱数据库。第一步, 依据类似的, 明确了结构的免疫

球蛋白可变区 FRs, 模型化一种新型可变区的框架区 (FRs)。由于相同的氨基酸侧链被维系在原来的方位, 因此就可以象在鼠 Act-1 抗体中那样, 利用最大重叠过程以保持 χ 转角, 从而替换突变的侧链。绝大多数新型可变区 CDR 的建模都是基于典型的 CDR 结构[Chothia, C., and A.M. Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987); Chothia, C., et al., Nature 342:877-883(1989); Tramontano. A., et al., J. Mol. Biol. 215:175-182(1990); Chothia, C., et al., J. Mol. Biol. 227:799-817(1992)]。而在重链可变区 CDR3 的情况下, 却没有已知的典范结构, 只能是根据存在于任何结构的蛋白质的类似环结构, 来建立 CDR 环的模型。最后, 为了缓解不需要的原子接触以及优化范德华力和静电作用, 如同在 QUANTA 中所做的, 通过 CHARMM 势能使模型能量最小化[Brooks, B.R., J. Comp. Chem. 4:187-217 (1983)]。

对于鼠 Act-1 可变区, 是根据鼠单克隆抗体 4-4-20 Fab 片段 FR, 来建立轻链可变区 FR 的模型[Herron, J.N., et al., Proteins. Structure, Function and Genetics 5:271-280 (1989)]。根据鼠单克隆抗体 D11.15 Fab 片段的 FR 来建立重链可变区的 FR 的模型[Chitarra, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:7711-7715(1993)]。建模所基于的鼠 Act-1 抗体和可变区之间不同的那些氨基酸侧链被替换掉, 然后通过排列于残基 35-39, 43-47, 84-88 和 98-102 之间的空间[其定义如 Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office(1991)], Fab 4-4-20 抗体的轻链被添加到 D11.15 轻链上面, 从而将这两个异源可变区(4-4-20Kappa 轻链可变区和 D11.15 重链可变区) 安排到各自正确的方位。

Chothia, C.等人认为, mAb Act-1 轻链可变区的 CDR1(L1)适用于 L1 典范亚群 4[Chothia,C.et al., Nature 342:877-883(1989)]。鼠 Fab 4-4-20(见上述)的 L1 环与典型的亚群 4, 在氨基酸长度上相同, 氨基酸序列上相似, 二者也匹配。因此, 基于 Fab 4-4-20 的 L1 环, 对 L1 环建模。同样地, mAb Act-1 轻链可变区的 CDR2(L2)和 CDR3(L3)既匹配各自的典范亚群 1 环结构, 又匹配各自对应的 Fab 4-4-20 CDR, 因此, 基于 Fab 4-4-20 的 CDR L2 和 L3, 模型化 Act-1 Kappa 轻链可变区的 L2 和 L3 环。

mAb Act-1 重链可变区的 CDR1(H1)适合 Chothia, C.定义的 H1 典范亚群 1[Chothia,C.et al., Nature 342:877-883(1989)],相对应的鼠 mAb D11.15(见上述)H1 环也是这样。而且 mAb D11.15 CDR1 环与 mAb Act-1 H1 在长度上相同, 在氨基酸序列上十分类似。因此, 如同轻链的情况, 基于重链可变区 CDR1 环对该环建模。很难定义重链可变区 (H2) 的 CDR2, 但其似乎对应于 H2 典范亚群 2。再者, D11.15 抗体的 H2 环也匹配相同的典范亚群, 在氨基酸序列上类似, 因此可以基于 D11.15 的 H2 环, 对 mAb Act-1 的 H2 环建模。

如上所讨论的, 重链可变区 CDR3 是高度可变的, 不能划分出可鉴定的结构群组。为建立 H3 环的模型, 鉴定出有相同长度和类似氨基酸序列的环, 最好是从其他抗体上找, 并以此为基础去建立模型。有三种环在环大小上匹配 Act-1 CD3, 分别来自于三种抗体, 在测试全部三个环结构对模型的空间不适应之后, 选出人抗体 Pot 的 H3 环[Fan, Z.C., et al., J. Mol. Biol.228:188-207(1992)]来建立 mAb Act-1 H3 环的模型。调节了整个模型的明显空间不适应后, 按照在 QUANTA 上所做的, 将模型能量最小化。

CDR—移植可变区的设计

设计 CDR—移植可变区的第一步是选取充当人可变区基础的人轻链和重链可变区。测试并比较了两种人可变区的选择方法，一种方法是，从人可变区不同亚类的共同序列中选择人可变区[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]。比较啮齿类轻重链可变区与人共同序列，最相似的人轻、重链共同序列从6个人 λ 轻链可变区亚群、4个人Kappa轻链可变区亚群、3个人重链可变区亚群中挑选出来[见 Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4:773-783(1991)]。另一种方法是从所有已发表的人可变区序列中挑选人可变区[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]。比较啮齿类与人的轻、重链可变区氨基酸序列，挑选出那些与啮齿类可变区有较高相似性的人可变区。利用来源于同一种人抗体的轻、重链可变区，以保证两可变区能够较好地相互组合[Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:10029-10033(1989)]。然而这里所讲的被挑选为模板的人轻重链可变区来源于两种不同的人的抗体，这样一来，挑选出与啮齿类可变区有更高相似性的人可变区是可能的。有许多成功的CDR-移植抗体范例是基于来自两个不同人抗体的可变区。研究得最好的一个例子就是改型的人CAMPATH-1抗体[Riechmann, L., et al., Nature 332:323-327(1988)]。

为设计改型的人Act-1可变区，将鼠Act-1可变区与鼠和人可变区的所有亚群的共同序列进行比较[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S.

Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]。结果概括于表 1 和表 2。

鼠 ACT-1 轻链可变区最类似于鼠 Kappa 轻链亚群 II 的共同序列，总体一致性是 83.9%，在 FR 中的一致性为 87.5%(表 1)。对于人抗体序列，鼠 ACT-1 轻链可变区最类似于人 Kappa 轻链亚群 II 的共同序列，总体一致性是 72.3%，在 FR 中的一致性为 78.8%(表 1)。

表 1.鼠 Act-1Kappa 轻链可变区与鼠、人 Kappa 轻链可变区亚群共同序列的比较

比较鼠 ACT-1 Kappa 轻链可变区与鼠、人 Kappa 轻链可变区不同亚群的共同序列的氨基酸序列，分别都连同或不连同 CDR 一起比较，列出了有最高相似性鼠和人亚群之间的相同性百分比以及相似性百分比。

人或鼠 可变区	Kabat 亚群	完全可变区 或仅 FR	相似百分比	相同百分比
鼠	II	完全	91.07	83.93
		仅 FR	95.00	87.50
人	II	完全	83.93	72.32
		仅 FR	90.00	78.75

鼠 ACT-重链可变区最类似于鼠重链亚群 II B 的共同序列，总体一致性是 83.5%，在 FR 中的一致性为 94.3%(表 2)。对于人抗体序列，鼠 ACT-1 重链可变区最类似于人重链亚群 I 的共同序列，总体一致性是 68.6%，在 FR 中的一致性为 75.9%(表 2)。

结果证实，鼠 ACT-1 可变区是十分典型的鼠可变区，同样也说明，人可变区亚群能充当人可变区模板的良好来源和 CDR-移植的受体。

表 2 鼠.ACT-1 重链可变区与鼠、人 重链可变区亚群共同序列的比较

比较鼠 ACT-1 重链可变区与鼠、人 重链可变区不同亚群的共同序列的氨基酸序列，分别都连同或不连同 CDR 一起比较，列出了有最高相似性鼠和人亚群的相似百分比以及相同百分比。

人或鼠 可变区	Kabat 亚群	完全可变区 或仅 FR	相似百分比	相同百分比
鼠	IIB	完全	89.26	83.47
		仅 FR	95.40	94.25
人	I	完全	81.82	68.60
		仅 FR	85.06	75.86

也比较了鼠 ACT-1 可变区与全部已记录的鼠和人可变区范例中的个别序列[Kabat,E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991); UW GCG package (University of Wisconsin)]。对于人抗体序列，鼠 ACT-1 轻链可变区十分类似于人 Kappa 轻链可变区的序列，后者源于人抗体 GM607'CL[Klobeck, H.-G., et al, Nature, 309:73-76(1984)]。图 5 排列出鼠 ACT-1 轻链可变区 (SEQ ID NO: 7) 和人 GM607' CL 轻链可变区 (SEQ ID NO: 8) 的氨基酸序列，

正如我们所料，人 GM607'CL 轻链可变区是人 Kappa 轻链可变区亚群 II 中的一员。鼠 ACT-1 和人 GM607'CL 轻链可变区之间的总体序列相同性是 71.4%。鼠 ACT-1 重链可变区十分类似于人抗体 21/28'CL 重链可变区的序列 [Dersimonian, H., et al., J. Immunol., 139:2496-2501(1987)]。图 6 排列出鼠 ACT-1 重链可变区 (SEQ ID NO: 9) 和人 21/28'CL 重链可变区 (SEQ ID NO: 10) 的氨基酸序列，正如我们所料，人 21/28'CL 重链可变区是人 Kappa 轻链可变区亚群 II 中的一员，鼠 ACT-1 和人 GM607'CL 轻链可变区之间的总体序列相同性是 68.1%。根据这些比较，人 GM607'CL 轻链可变区被挑选为设计改型人 ACT-1 轻链可变区的模板，人 21/28'CL 重链可变区被挑选为设计改型人 ACT-1 重链可变区的模板。

设计过程的第二步，将啮齿类 CDR 插入选定的人轻、重链可变区。由 Kabat 定义的 [Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)] 整个啮齿类 CDR 连到人 FR 上面，形成一个简单的 CDR-移植。某些情况下，在简易 CDR 移植中被人化的啮齿类抗体，表现出对抗原很低或没有结合。研究人 FR 氨基酸序列很重要，以决定是否氨基酸残基可能在影响同抗原的结合，或者是直接通过与抗原的作用，或间接地通过改变 CDR 环的位置。

第三步，决定出改变人 FR 中哪些氨基酸残基，来获得良好的抗原结合性。在此阶段，啮齿类可变区模型在设计中十分有用。同样有用的还有 Chothia 所定义的 CDR 典范结构 [Chothia, C., et al., Nature 342:877-883(1989)]。在人化可变区中保留任何属于典范结构的啮齿类氨基酸残基是十分重要的。比较将被人化的啮齿类抗体序列与其他啮齿类抗体的相似序列，能够帮助确定在特

定位点是否有异常或者稀有氨基酸。这将暗示着那个位点的啮齿类氨基酸在抗原结合中发挥重要作用。通过研究啮齿类可变区模型，可能预测特定位点上的氨基酸是否影响与抗原的结合。当个别抗体的可变区被用作设计的基础，那么我们建议，比较这个人序列与此类人可变区亚群中的共同序列，标出任何显著不寻常的氨基酸。大多数情况下，人FR中的少量氨基酸被认为将发生改变，改变成啮齿类可变区在那个位点上的氨基酸。

表3和表4概括出改型的人ACT-1可变区如何被设计出来的。表3列出了设计改型人mAb ACT-1 V_L区所用的氨基酸序列，第4栏列出了将被人化的鼠ACT-1轻链可变区的氨基酸序列（SEQ ID NO: 7），第5栏列出了鼠ACT-1可变区所属于的鼠可变区亚群的一致序列（SEQ ID NO: 50）（鼠K-II），第6栏列出了最类似鼠ACT-1可变区的人可变区亚群的一致序列（SEQ ID NO: 51）（人κ-II），第7栏列出了充当模板的人可变区氨基酸序列（GM607'CL）（SEQ ID NO: 8），第8栏列出了所设计的改型人ACT-1可变区（SEQ ID NO: 52）的氨基酸序列（ACT-1 RHV_κ）。表4列出了设计改型人MAB ACT-1 V_H区所用的氨基酸序列，第4栏列出了将被人化的鼠ACT-1重链可变区的氨基酸序列（SEQ ID NO: 9），第5栏列出了鼠ACT-1可变区所属于的鼠可变区亚群的一致序列（SEQ ID NO: 53）（鼠II B），第6栏列出了最类似鼠ACT-1可变区的人可变区亚群的一致序列（SEQ ID NO: 54）（人I型），第7栏列出了充当模板的人可变区氨基酸序列（21/28'CL）（SEQ ID NO: 10），第8栏列出了所设计的改型人ACT-1可变区（SEQ ID NO: 55）的氨基酸序列（ACT-1 RHV_H）。表3和表4中倒数第二列，说明在鼠ACT-1和选定的人FR之间不同的FR残基位点（表面的或内藏的），最后一栏列出可变区此位点的有关评述。

表 3 所用符号：(*) 不变残基（在列 5 和列 6 中），如 Kabat 共同序列所定义的（指 Kabat 亚类中有 95%或更高的出现率）[Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)], 或者 CDR 环典范结构的一部分（在列 8 中），如 Chothia 所定义的[Chothia,c., et al., Nature 342:877-883(1989)]CDR 典范结构的一部分；黑体，表示 FR 和 CDR 中人类氨基酸残基被对应的鼠残基替换的位点；下划线，表示 FR 中人类残基不同于鼠的位点；(Δ)，表示人 FR 中的变化次数；（鼠 Ab ACT-1），表示鼠 ACT-1 抗体 V_L 区的氨基酸序列；（鼠 κ-II），属于亚群 II 的鼠 Kappa VL 区的一致序列（Kabat,E.A, et al., Supra）；（人 κ-II），属于亚群 II 的人 V_L 区的共同序列（Kabat, E.A, et al.,通上）；(GM607'CL)，表示人 GM607' CL 抗体的氨基酸序列[Klobeck,H.-G., et al., Nature 309:73-76(1984)]；(表面的或内藏的)，表示在全部两条抗体可变区链上氨基酸与其他残基的相对位置；（ACT-1 RHV_κ），表示变型人 mAb ACT-1 V_L 区的氨基酸序列。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
1	1	FR1	D	D*	D*	D	D		
2	2		V	V	I*	I	V	包埋	对 L1 环 (Δ1) 的典型 AA。
3	3		V	V	V*	V	V		
4	4		V	M	M	M	M	包埋	包埋在 L1 和 L2 之间。 V=9/245, M=202/245 在鼠κ-II 中。M=42/45, V 未见于人κ-II。如果结合的不好, 考虑在下次时改变为 Val。
5	5		T	T*	T*	T	T		
6	6		Q	Q*	Q*	Q	Q		
7	7		T	T	S	S	S	表面	结合位点的远端。T=164/245 在鼠κ-II 中。T=10/37, S=27/37 在人κ-II 中。
8	8		P	P	P*	P	P		
9	9		L	L	L*	L	L		

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
10	10	I	S	S	S*	S	S		
11	11	I	L	L	L*	L	L		
12	12	I	P	P	P	P	P		
13	13	I	V	V*	V*	V	V		
14	14	I	S	S	T*	T	T	表面	结合位点的远端。S=151/248 在鼠κ-II 中。T 自己 (30/30) 见于人κ-II 中。
15	15	I	F	L	P	P	P	表面	结合位点的远端。F=9/253 在 鼠κ-II 中, F 未见于人κ-II 中。 P=29/31 在人κ-II 中。
16	16	I	G	G*	G*	G	G		
17	17	I	D	D	E	E	E	表面	结合位点的远端。E=18/30, D 未见于人κ-II 中。
18	18	I	Q	Q	P*	P	P	表面	结合位点的远端并在转折处。F 自身 (31/31) 见于人κ-II 中。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat #	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _κ	表面或包埋	评价
19	I	V	A	A*	A	A	包埋	指向核心, 但为标准的鼠向人的变化。V=66/253 在鼠κ-II 中。A 自身 (30/30) 见于人κ-II 中。
20	I	S	S*	S*	S	S		
21	I	I	I*	I*	I	I		
22	I	S	S*	S*	S	S		
23	FR1	C	C*	C*	C	C		
24	CDR ₁	R	R	R	R	R		
25	I	S	S*	S*	S	S		对 L1 环的典型 AA。
26	I	S	S*	S*	S	S		对 L1 环的典型 AA。
27	I	Q	Q	Q	Q	Q		对 L1 环的典型 AA。
27A	I	S	S	S	S	S		对 L1 环的典型 AA。
27B	I	L	L	L*	L	L		对 L1 环的典型 AA。
27C	I	A	V	L	L	A		对 L1 环的典型 AA。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
27D	31		K	H	H	H	K		对 L1 环的典范 AA。
27E	32		S	S	S	S	S		对 L1 环的典范 AA。
27F			-	-	X	-	-		
28	33		Y	N	D	N	Y		对 L1 环的典范 AA。
29	34		G	G*	G	G	G		对 L1 环的典范 AA。
30	35		N	N	N	Y	N		对 L1 环的典范 AA。
31	36		T	T*	N	N	T		对 L1 环的典范 AA。
32	37		Y	Y*	Y*	Y	Y		对 L1 环的典范 AA。
33	38		L	L*	L*	L	L		对 L1 环的典范 AA。
34	39	CDR1	S	E	N	D	S		堆积 AA。非正常 (117/1365)。A, H 和 N 最常见于此。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat #	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
35	40	FR2	W	W*	W	W		
36	41		Y	Y	Y	Y		堆积 AA。最常见的 AA。
37	42		L	L*	L	L		
38	43		H	Q*	Q	Q	包埋	堆积 AA。H 是非正常的 (3I/1312)。Q 是最常见的 AA (1158/1312)。H=6/225, Q=219/225 在鼠κ-II 中。Q=15/17, H 未见于人κ-II 中。
39	44		K	K	K	K		
40	45		P	P*	P	P		
41	46		G	G*	G	G		
42	47		Q	Q*	Q	Q		
43	48		S	S*	S	S		
44	49		P	P*	P	P		堆积 AA。最常见的 AA。
45	50		Q	Q	Q	Q		

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat #	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
46	51	L	L	L	L	L		堆积 AA。最常见的 AA。
47	52	L	L*	L	L	L		
48	53	I	I*	I*	I	I		对 L2 环的典范 AA。
49	54 FR2	Y	Y	Y*	Y	Y		
50	55 CDR2	G	K	L	L	G		对 L2 环的典范 AA。
51	56	I	V	V	G	I		对 L2 环的典范 AA。
52	57	S	S*	S*	S	S		对 L2 环的典范 AA。
53	58	N	N	N	N	N		
54	59	R	R	R*	R	R		
55	60	F	F	A	A	F		
56	61 CDR2	S	S*	S*	S	S		
57	62 FR3	G	G*	G*	G	G		
58	63	V	V*	V*	V	V		
59	64	P	P	P*	P	P		

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位（续）。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
60	65		D	D*	D	D	D		
61	66		R	R*	R	R	R		
62	67		F	F*	F*	F	F		
63	68		S	S	S*	S	S		
64	69		G	G*	G	G	G		对 L2 环的典范 AA。
65	70		S	S*	S*	S	S		
66	71		G	G*	G*	G	G		
67	72		S	S*	S	S	S		
68	73		G	G*	G	G	G		
69	74		T	T*	T*	T	T		
70	75		D	D	D	D	D		
71	76		F	F*	F*	F	F		对 L1 环的典范 AA。
72	77		T	T*	T*	T	T		
73	78		L	L*	L*	L	L		
74	79		K	K	K	K	K		

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat #	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _κ	表面或包埋	评价
75	I	I	I*	I*	I	I		
76	I	S	S	S	S	S		
77	I	T	R*	R	R	R	表面	结合位点的远端。T=6/221, R=211/221 在鼠 κ-II 中。R=11/12, T 未见于人 κ-II 中。
78	I	I	V	V*	V	V	包埋	指向核心, 但为标准的鼠向人的改变。I=6/213, V=195/213 在鼠 κ-II 中。V 自身 (12/12) 见于人 κ-II 中。
79	I	K	E	E	E	E	表面	结合位点的远端。K=20/215, E=191/215 在鼠 κ-II 中。E=9/12, K 自己未见于人 κ-II 中。
80	I	P	A*	A	A	A	表面	结合位点的远端。P=6/183, A=175/183 在鼠 κ-II 中。P=1/12, A=11/12 在人 κ-II 中。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _κ	表面或 包埋	评价
81	86		E	E*	E	E	E		
82	87		D	D*	D	D	D		
83	88		L	L	V*	V	V	半包埋	结合点的远端。V 自身 (12/12) 见于人 κ-II 中。
84	89		G	G*	G*	G	G		
85	90		M	V	V*	V	V	半包埋	结合点的远端。M=6/212, V- 196/212 在鼠 κ-II 中。V 自身 (12/12) 见于人 κ-II 中。
86	91		Y	Y*	Y*	Y	Y		
87	92		Y	Y	Y*	Y	Y		堆积 AA。最常见的 AA。
88	93	FR3	C	C*	C*	C	C		
89	94	CDR3	L	F	M*	M	L		堆积 AA。L 是非正常的 (93/1238)。Q 是最常见的 AA (654/1238)。
90	95		Q	Q*	Q	Q	Q		对 L3 环的典范 AA。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ -II	人 κ -II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV κ	表面或 包埋	评价
91	96		G	G	A	A	G		对 L3/堆积 AA 的典范。第三 种最常见的 AA。
92	97		T	T	L	L	T		对 L3 环的典范 AA。
93	98		H	H	Q	Q	H		对 L3 环的典范 AA。
94	99		Q	V	X	T	Q		对 L3 环的典范 AA。
95	100		P	P*	P	P	P		对 L3 环的典范 AA。
95A			-	P	R*		-		
95B			-	-	-		-		
95C			-	-	-		-		
95D			-	-	-		-		
95E			-	-	-		-		
95F			-	-	-		-		
95F			-	-	-		-		
96	101		Y	Y	X	Q	Y		堆积 AA。第二种最常见 AA。

表 3.在变形的人 mAb Act-1 V_L 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
97	102	CDR3	T	T*	T*	T	T		对 L3 环的典范。
98	103	FR4	F	F*	F*	F	F		堆积 AA。最常见的 AA。
99	104	I	G	G*	G*	G	G		
100	105	I	G	G	Q	Q	Q	半包埋	结合点的远端。Q=12/13, G=1/12 在人κ-II 中。
101	106	I	G	G*	G*	G	G		
102	107	I	T	T*	T*	T	T		
103	108	I	K	K*	K	K	K		
104	109	I	L	L*	V	V	V	半包埋	结合点的远端。L=5/14, V=9/14 在人κ-II 中。
105	110	I	E	E*	E	E	E		
106	111	I	I	I	I*	I	I		
106A		I	-	-	-	-	-		
107	112	FR4	K	K*	K	K	K		

表 4 所用符号: (*) 不变残基 (在列 5 和列 6 中), 如由 Kabat 的共同序列所定义 (指 Kabat 亚类中有 95% 或更高的出现率) [Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)], 或者如在列 8 中由 Chothia 定义的 (Chothia, c., et al., Nature 342:877-883(1989)) CDR 典范结构的一部分; (黑体) 表示在 FR 和 CDR 中人类氨基酸残基被对应的鼠残基替换的位点; (下划线) 表示 FR 中人类残基不同于鼠的位点; (Δ) 表示人 FR 中的变化次数; (鼠 Ab ACT-1) 表示鼠 ACT-1 抗体 V_L 区的氨基酸序列; (鼠 II B) 表示属于亚群 II B 的鼠 V_H 区的共同序列 (Kabat, E.A., et al., Supra); (人 I) 表示属于亚群 I 的人 V_H 区的共同序列 (Kabat, E.A., et al., Supra); (人抗体 21/28'CL 的氨基酸序列 (Dersimonian, H., et al., J. Immunol., 139:2496-2501(1987))); (表面的或内藏的) 表示在全部两条抗体可变区链上氨基酸与其他残基的相对位置; (Act-1 RH V_H) 表示变型人 mAb Act-1 V_H 区的氨基酸序列。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
1	1	FR1	Q	Q	Q	Q	Q		
2	2		V	V*	V	V	V		
3	3		Q	Q*	Q*	Q	Q		
4	4		L	L*	L*	L	L		
5	5		Q	Q	V	V	V	表面	结合点的远端。Q=135/143 在 鼠 IIB 中。V=49/53, Q=1/53 在人 I 中。
6	6		Q	Q	Q	Q	Q		
7	7		P	P	S*	S	S	半包 埋	结合点的远端。P=102/150 在 鼠 IIB 中。P 未见于人 I 中。
8	8		G	G*	G*	G	G		
9	9		A	A	A	A	A		
10	10		E	E	E	E	E		
11	11		L	L*	V	V	V	表面	结合点的远端。V=50/54, L =4/54 在人 I 中。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
12	12		V	V*	K	K	K	包埋	指向核心, 但为标准的鼠向人的改变。K=41/55, V=3/55 在人 I 中。
13	13		K	K	K*	K	K		
14	14		P	P*	P*	P	P		
15	15		G	G*	G*	G	G		
16	16		T	A	A	A	A	表面	结合点的远端。T=12/139, A=117/139 在鼠 IIB 中。T=1/52, A=23/52 在人 I 中。
17	17		S	S*	S*	S	S		
18	18		V	V*	V	V	V		
19	19		K	K	K	K	K		

表 4. 在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
20	20		L	L	V	V	Y	包埋	指向核心, 但为标准的鼠向人的改变。L=138/179 在鼠 IIB 中。V=36/52, L=1/52 在人 I 中。
21	21		S	S*	S	S	S		
22	22		C	C*	C*	C	C		
23	23		K	K*	K	K	K		
24	24		G	A*	A	A	G	包埋	对 H1 环的典范 AA。G 未见于鼠 IIB 中。G=12/51, A=34/51 在人 I 中。
25	25		Y	S*	S*	S	S	表面	偏离结合点, 并好象不与抗原结合。Y=1/185 在鼠 IIB 中。S=48/50, Y 未见于人 I 中。
26	26		G	G*	G*	G	G		对 H1 环的典范 AA。
27	27		Y	Y	Y	Y	Y		对 H1 环的典范 AA。
28	28		T	T	T	T	T		对 H1 环的典范 AA。
29	29		F	F*	F*	F	F		对 H1 环的典范 AA。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
30	30	FR1	T	T	T	T	T		对 H1 环的典范 AA。
31	31	CDR1	S	S	S	S	S		对 H1 环的典范 AA。
32	32		Y	Y	Y	Y	Y		对 H1 环的典范 AA。
33	33		W	W	A	A	W		
34	34		M	M	I	M	M		对 H1 环的典范 AA。
35	35		H	H	S	H	H		堆积 AA。最常见 AA。
35A			-	-	-	-			
35B		CDR1	-	-	-	-			
36	36	FR2	W	W*	W*	W	W		
37	37		V	V	V	V	V		堆积 AA。最常见 AA。
38	38		K	K	R*	R	R	包埋	指向核心, 但为标准的鼠向人的改变。K=177/188 在鼠 IIB 中。R=48/49, K 未见于人 I 中。然而, Lys 可能堆积 H2 环, 因此, 如果结合不好, 则考虑在第二次时进行与 A40R 相关的改变。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
39	39	I	Q	Q	Q*	Q	Q		堆积 AA。最常见 AA。
40	40	I	R	R	A	A	A	包埋	指向核心, 但为标准的鼠向人 改变。R=160/177 在鼠 IIB 中。 A=37/49, R=0/49 在人 I 中。 然而, Arg 可能堆积 H2 环, 因此, 如果结合不好, 则考虑 在第二次时进行与 A38K 相关 的改变。
41	41	I	P	P	P	P	P		
42	42	I	G	G	G	G	G		
43	43	I	Q	Q	Q	Q	Q		
44	44	I	G	G	G	R	R	包埋	指向核心但为标准的鼠向人 改变。G=43/48, R=5/48 在 人 I 中。
45	45	I	L	L*	L*	L	L		堆积 AA。最常见的 AA。
46	46	I	E	E*	E*	E	E		
47	47	I	W	W*	W*	W	W		堆积 AA。最常见的 AA。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ -II	人 κ -II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
48	48	I	I	I*	M	M	I	包埋	Ile 支持 H2 环并在其下(Δ 2)。Met =41/48, Ile=1/48 在人 I 中。
49	49	FR2	G	G*	G	G	G		
50	50	CDR2	E	R	W	W	E		
51	51	I	I	I	I	I	I		
52	52	I	D	D	N	N	D		
52A	53	I	P	P*	P	A	P		对 H2 环的典范 AA。
52B		I	-	-	Y	-			
52C		I	-	-	-	-			
53	54	I	S	N	G	G	S		对 H2 环的典范 AA。
54	55	I	E	S	N	N	E		对 H2 环的典范 AA。
55	56	I	S	G	G	G	S		对 H2 环的典范 AA。
56	57	I	N	G	D	N	N		
57	58	I	T	T	T	T	T		

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
58	59	I	N	N	N	K	N		
59	60	I	Y	Y	Y	Y	Y		
60	61	I	N	N	A	S	N		
61	62	I	Q	E	Q	Q	Q		
62	63	I	K	K*	K	K	K		
63	64	I	F	F*	F	F	F		
64	65	I	K	K	Q	Q	K		
65	66	CDR2	G	S	G	G	G		
66	67	FR3	K	K*	R	R	R	表面	结合点的远端。R=39/49, K 未见于人 I 中。
67	68	I	A	A*	V	V	V	半包埋	结合点的远端。V=45/48, A 未见于人 I 中。
68	69	I	T	T*	T	T	T		
69	70	I	L	L*	I	I	L	包埋	Leu 支持 H2 并在其下(Δ3)。Ile =26/49, Leu=1/49 在人 I 中。
70	71	I	T	T*	T	T	T	包埋	

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-I	鼠κ-II	人κ-II	GM1 607 CL	Act-I 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
71	72	I	V	V	A	R	V	包埋	对 H2 环的典型 AA。
72	73	I	D	D*	D	D	D		
73	74	I	I	K	T	T	I	表面	在 H2 后并直接参与 Ag 结合 (Δ5)。Ile 未见于鼠 IIB 或人 I 中。T=21/49 在人 I 中。
74	75	I	S	S	S*	S	S		
75	76	I	S	S*	T	A	A	表面	结合点的远端。T=26/50， A=4/50，S 未见于人 I 中。
76	77	I	S	S	S	S	S		
77	78	I	T	T*	T	T	T		
78	79	I	A	A	A	A	A		
79	80	I	Y	Y*	Y	Y	Y		
80	81	I	M	M	M	M	M		
81	82		Q	Q	E	E	E	半包 埋	结合点的远端。Q=163/194 在 鼠 IIB 中。E=35/50，Q=11/50 在人 I 中。
82	83		L	L*	L	L	L		

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠 κ-II	人 κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
82A	84		S	S	S	S	S		
82B	85		S	S	S	S	S		
82C	86		L	L*	L*	L	L		
83	87		T	T*	R	R	R	表面	结合点的远端。R=33/51, T=4/51 在人 I 中。
84	88		S	S*	S	S	S		
85	89		E	E	E	E	E		
86	90		D	D*	D*	D	D		
87	91		S	S*	T	T	T	表面	结合点远端。T=48/51, S=2/51 在人 I 中。
88	92		A	A*	A	A	A		
89	93		V	V*	V	V	V		
90	94		Y	Y*	Y*	Y	Y		
91	95		Y	Y	Y	Y	Y		堆积 AA。最常见的 AA。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或包埋	评价
92	96	I	C	C*	C*	C	C		
93	97	I	A	A	A*	A	A		堆积 AA。最常见 AA。
94	98	FR3	R	R	R	R	R		对 H1 环的典范 AA。
95	99	CDR3	G	Y	A	G	G		包埋 AA, 在此位点的第二种最常见的残基--良好。
96	100	I	G	Y	P		G		
97	101	I	Y	Y	G	-	Y		
98	102	I	D	G	Y	-	D		
99	103	I	G	G	G	G	G		
100	104	I	W	S	S	-	W		
100A	105	I	D	S	G		D		
100B	106	I	Y	X	G	-	Y		
100C	107	I	A	X	G	-	A		
100D	108	I	I	V	C	-	I		堆积 AA。I=26/1211。F 和 M 是最常见的。

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位（续）。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
100E			-	Y	Y	-			
100F			-	X	R	Y			
100G			-	-	G	Y			
100H			-	Y*	D	G			
100I			-	W	Y	S			
100J			-	Y	X	G			
100K			-	F	F	S			
101	109		D	D	D	N	D		
102	110	CDR3	Y	Y	Y	Y	Y		
103	111	FR4	W	W*	W*	W	W		堆积 AA。最常见 AA。
104	112		G	G*	G	G	G		
105	113		Q	Q	Q	Q	Q		
106	114		G	G*	G*	G	G		

表 4.在变形的人 mAb Act-1 V_H 区的设计中所使用的氨基酸序列的对位 (续)。

Kabat	#	FR 或 CDR	鼠 Act-1	鼠κ-II	人κ-II	GM 607 CL	Act-1 或 RHV _K	表面或 包埋	评价
107	115		T	T*	T	T	T		
108	116		S	T	L	L	L	表面	结合点的远端。T=88/149 在鼠 IIB 中。L=25/39, T=7/39 在人 I 中。
109	117		V	V	V*	V	V		
110	118		T	T*	T	T	T		
111	119		V	V*	V	V	V		
112	120		S	S*	S*	S	S		
113	121	FR4	S	S	S*	S	S		

为设计改型的人 ACT-1 轻链可变区（表 3），人 FR 中的 1 个残基被改为鼠相应位点的氨基酸，改变发生在 FR1 的位点 2[Kabat,E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]。具体地讲，人 GM607'CL 轻链可变区中的异亮氨酸被改为鼠 ACT-1 轻链可变区中的丙氨酸。kappa 轻链可变区的该位点被视为对于维持 L1 环方位和结构十分关键的位点之一 [Chothia, C., et al., Nature 342:877-883(1989)]，也即“典范的氨基酸”之一。由于其在环构型上的重要性，这些鼠框架区残基通常保留在改型可变区中。

在 FR1 的位点 4 中，鼠型是一个丙氨酸，人型是一个甲硫氨酸，由 Val 变成 Met 都不是剧烈的改变，因为两种氨基酸都是非极性憎水的残基，因此人序列中的 Met 被用于改型人 ACT-1 可变区中。然而，模型显示，Val 被埋于 L1 和 L2 环之间，当埋于旦白质时，Val 的平均体积为 142 埃³，而 Met 约为 171 埃³，更大的 Met 残基可能会导致 L1 和 L2 环全部或其中之一发生构型变化。通过在改型人 ACT-1 轻链可变区位点 4 引入改变，由 Met 变成 Val，可以提高它的抗原结合性。

为设计改型的人 ACT-1 重链可变区（表 4），人 FR 中的 5 个残基被改为鼠相应位点的氨基酸。FR1 的位点 24 和 FR3 的位点 71[Kabat,E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)]，存在于鼠序列的氨基酸残基被保留在改型人 ACT-1 重链可变区中，因为这两个氨基酸分别是 H1 环和 H2 环典范结构的一部分 [Chothia,C.,et al., Nature,342:877-883(1989)]。由于这些位点发生任何氨基酸改变都将破坏 H1 环和 H2 环的堆积和最终结构，因此这些关键位点的鼠型残基都被保留到人化重链可变区中。

在 FR2 的位点 48, 人序列的 Met 被改变成原存在于鼠 ACT-1 序列中的异亮氨酸。Met 替换成异亮氨酸是不寻常的。更重要的是, 模型显示异亮氨酸被埋在 H2 环的内部。结果是, 在这个内藏位点发生的改变可能影响 H2 环的结构, 进而干扰了抗原结合。

在 FR3 的位点 69, 人序列的异亮氨酸被改变成原存在于鼠 Act-1 序列中的亮氨酸。尽管 Leu 替换 Ile 并非是不寻常的, 模型显示 Leu 被埋在 H2 环内部, 因此象位点 48 那样, 此位点的改变将影响 H2 环的构象, 破坏抗原结合性。

最后, 在 FR3 的位点 73, 人序列的苏氨酸被改变成原存在于鼠 Act-1 序列中的异亮氨酸。在鼠亚群 II B 或人亚群 I 中, 以前从未见过 FR3 上此位点是个 Ile [Kabat,E.A., et al.,Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)], 这意味着此位点的 Ile 可能在抗原结合上发挥重要作用。

模型中, 位点 73 的 Leu 呈现在临近抗原结合位的表面上, 根据 $\alpha 4 \beta 7$ 整合蛋白上配体的大小和方位, 它可能直接参与抗原结合。然而, 做为一个表面残基位点, 如果鼠型氨基酸未被包括在改型人抗体中, 该抗体作为一个整体将有很低的免疫原性。在改型抗体的派生物中, 异亮氨酸将被人型 Thr 替代, 重新测试新形成的结构体, 以确定第二次改变是否将保持类似的抗原结合水平。

除了在最初改型人 ACT-1 重链可变区设计中人 FR 的 5 个变化外, 还有 2 个其他的改变, 可能增强其抗原结合性, 模型显示残基鼠 mAb Act-1 重链可变区的 38Lys 和 40Arg 被置于 H2 环的内部, 并且堆积在 CDR2 中 63Phe 的旁边 (表 4 的编号)。然而, 这些残基也是位于重链可变区的核心部位, 如果它们被用来替换对应的人型氨基酸 (38Arg 和 40Ala), 它们可能带来其他的可能是不良的效果。因此,

FR2 中位点 38 和 40 的改变未被包括进改型人的 mAb Act-1 重链可变区中。但是，这两个修改的全部或之一可以被用在改型重链上以提高抗原结合性。

结论：

建立鼠 Act-1 可变区的模型，主要基于已知结构的其他抗体可变区。该模型被用来设计人化 Act-1 可变区，特别值得注意的是，在改型的人可变区中保留了抗原结合位点。

设计了改型的人 Act-1 轻链可变区或改型的人 Act-1 重链可变区（表 3 和表 4）。改型的人 Act-1 轻链可变区是基于鼠 Act-1 轻链可变区的 CDR 和人 GM607' CL 抗体轻链可变区的 FR。在人 FR 的位点 2 有一个氨基酸改变。改型的人 Act-1 重链可变区是基于鼠 Act-1 重链可变区的 CDR 和人 21/28' CL 抗体重链可变区 FR 的。在人 FR 的位点 24、48、69、71、73 分别有 5 个氨基酸改变。

此外，在设计改型人 Act-1 可变区的其它版本时，Kappa 轻链 FR1 的位点 4 和重链 FR2 的位点 38、40 都应当特别考虑。由于重链 FR3 的位点 73 在抗体的表面，因此也被认为参与由鼠型到人型氨基酸的回复突变。

实施例 3：对改型可变区进行编码的核酸的构建

从生化方面（部分氨基酸测序）和功能方面（嵌合抗体对 HuT78 细胞的染色）证实克隆到正确的重链和轻链可变区之后，如上述设计了改型的氨基酸序列。接下来设计并制备编码改型抗体链的基因。

人化 ACT-1 的设计、构建和表达

测定实施例 2 所述的人化抗体的一级氨基酸序列后, 该序列逆翻译成简并的核酸序列, 利用 MacVector (Kodak, Scientific Imaging Systems) 4.5.3 版, 分析潜在的限制性内切酶位点, 选择出整合有限制性内切酶位点, 而且保留一级氨基酸序列的核酸。图 11 列出重链核酸序列 (SEQ ID NO: 18) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 19), 图 12 列出轻链核酸序列 (SEQ ID NO: 20) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 21), 同时标出用于亚克隆的限制性内切酶位点。

依照下法, 构建人化 Act-1 重、轻链可变区。利用 Applied Biosystem DNA Synthesizer Model 392(图 13) 合成轻链重迭互补寡聚核苷酸 L1-L6 (SEQ ID NO: 22-27) 和重链的 H1-H10 (SEQ ID NO: 28-37)。在 55 摄氏度去保护过夜, 在 Speed-Vac 上干燥, 重溶于 100ml 水中, 在 Bio-Spin6 柱上脱盐 (Bio-Rad)。在 260 nm 测量吸收值来测定寡聚核苷酸的浓度, 用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化核酸。

这些寡聚核苷酸各自 100 μ g 混合于 2 倍体积的染色液 (95% 甲酰胺, 20mM EDTA, 0.05 溴酚兰, 0.05% 三甲苯胺 FF), 65 摄氏度加热 2 分钟, 250V, 在 1X TBE 电泳 3 小时, 用溴化乙锭染色, 紫外灯下显色, 将有正确长度的寡聚核苷酸切除下来, 置于试管, 用水和电解质透析, 用苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1, V/V) (Gibco/BRL) 抽提寡聚核苷酸两次, 加入 0.1 倍体积 3M 醋酸钾 (pH6) 和 2 倍体积冷乙醇使沉淀, 离心, 用 70% 乙醇洗涤一次, 真空干燥, 溶于 50 μ l 水中。

将等摩尔的 (大约 100 μ g, 50 μ l 水中) 纯化核酸与等体积的 (100 μ l) 2X 退火缓冲液 (2X=1M NaCl, 40mM Tris-HCl, pH2.5, 2mM EDTA) 混合, 使互补的寡聚核苷酸退火。95 摄氏度 10 分钟, 使变

性，然后在 65 摄氏度温育 8 小时。照上述方法用乙醇沉淀退火寡聚核苷酸，再溶于 40 μ l 水中。

加入 2 μ l 大片段 DNA 多聚酶 I (Klenow)，5 μ l 2.5mM dNTP 和 5 μ l 10x 缓冲液 (10X=10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH7.9, 25 摄氏度)，补足体积到 52 μ l，使退火寡聚核苷酸延长。室温下温育 1 小时，再加入 1 μ l dNTP 和 1 μ l Klenow，37 摄氏度温育半小时。请注意重链片段 A 不必进行延长。

通过 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳，从单链、未退火的核酸中纯化出退火的、延长的片段，溴乙锭染色，紫外光显色，切下正确长度的片段，如上述透析回收核酸，用苯酚/氯仿/异戊醇洗涤两次，乙醇沉淀，溶解于 10 μ l 水中。

三个轻链片段 (LA、LB&LC) 和五个重链片段 (被称为 HA-HE) 独立地共价连入 pCR-Script™，除了如以下所述之外，按照操作手册用 pCR-Script 试剂盒 (Stratagene) 转化 XL-1 蓝超级感受态细胞。用 pCR-LA 和 pCR-LB 片段转化 DM1 (Gibco/BRL) 感受态细胞，以避免 Dcm 甲基化酶，后者可封闭限制性内切酶 Msc I 对 DNA 的降解。挑选白色集落，根据实验手册用测序酶 T7 DNA 多聚酶试剂盒对小制备量 DNA 测序。在插入位对面退火的 T3 和 T7 启动子，被用于测序。

利用合成过程中已整合到序列中的限制性位点，编排人化重链可变区和轻链可变区片段的亚克隆。重链片段 HA-HD 在每个序列的末端包括一个额外的 Age I 限制性位点，从而可以如下述进行按顺序的对这些片段的亚克隆。

用限制性内切酶 Spe I 和 Age I 降解 pCR-HA 和 pCR-HB 的小制备量 DNA。DNA 曾经被 1%琼脂糖凝胶电泳过。从胶上回收 141bp 片段 HB，在 Spe I 和 Age I 位点整合到 pCR-HA，形成 pCR-HAB，接下来，利用 Xba I 和 Age I 从 pCR-HC 上释放 112bp 片段 HC，在 Xba I

和 Age I 位点整合到 pCR-HAB, 形成质粒 pCR-AC。利用片段 HD 的限制性质位点 Nhe I 和 Age I 以及片段 E 的 Bst II 和 Age I, 将片段 HD (141bp) 和 HC (130bp) 整合到一个测序质粒中, 这个最后得到的包含 pCR-Script 中全部五个重链可变区片段的质粒, 称为 pCR-HAE。所有的降解都是利用小制备量 DNA, 在 37 摄氏度温育至少 2 个小时, 除了对 BstE II 之外, 它的最佳培养温度在 65 摄氏度。16 摄氏度过夜进行共价连结, 利用 T4 DNA 连接酶和 1: 10 载体, 按比例整合, 次日转化到 DH5 α 亚克隆感受态细胞 (Gibco/BRL)。

用 Hind III 和 Age I 降解 pCR-HAE, 释放出 pCR-Script™ 的 Act-1 人化重链可变区。用该 411bp 片段替换 pEE6mhACT1Hchi(实施例 1) 的鼠可变区序列, 该质粒已被 Hind III 和 Age I 降解, 生成 pEE6hCMV-B 里的人化 Act-1 重链。最后得到的质粒为 pEE6hACT1H, 通过测序确定正确的 DNA 序列。

用 BspE I 和 Msc I 降解 pCR-Script™ 的轻链片段 A, 所得 153bp 片段被用于替换 pCR-Script™ 中鼠轻链可变区的 BspE I 到 Msc I 部分, 这个质粒为 pCR-LhAmBC。Msc I 和 Nru I 降解的轻链片段 B、Nru I 和 kas I 降解的轻链片段 C, 被整合到 pCR-LhAmBC 的 Msc I 和 Kas I 位点, 替换所剩下的鼠序列。降解、连接和转化过程如前述, 除了最后一次转化之外, 所有转化都用 DM1 感受态细胞。

用 Hind III 和 Kas I 降解 pCR-Script™ 的人化轻链可变区和质粒 pEE12mhACT1Lchi (实施例 1)。通过凝胶纯化 360bp 轻链可变区片段和 315bp 轻链恒定区, 共价连入 pEE12 的 Hind III 位点, 形成 pEE12hACT1L, 测序以证实正确的方位和核苷酸序列。

根据构建嵌合抗体的同样方法 (见实施例 1, 嵌合免疫球蛋白的表达), 构建一个包含人化重、轻链基因的表达载体。唯一不同的是, 由于人化重链可变区有一额外的 Bgl II 位点, 当用 Bgl II 切割时, 只

进行部份降解以生成正确的片段，含有人化重链和人化轻链基因的载体，被标为 pEE12hACT1LH。

根据构建嵌合抗体的同样方法（见实施例 1，嵌合免疫球蛋白的表达），临时表达全部人化抗体和细胞染色。图 14 显示，同不相关同型对照抗体（IgG1, Kappa）相比，用鼠-人嵌合性 Act-1 抗体或人化 Act-1 抗体对 HuT78 细胞的染色结果。

将 pEE12hACT1LH 用电穿孔法渗透到 NSO 细胞中，形成稳定的 NSO 细胞转染体，即一个骨髓瘤细胞株（Methods in Enzymol. 73 (B):3-46 (1981);European Collection of Animal Cell Cultures, PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, U.K., ECACC No.85110503）。

在 NSO 细胞中的稳定表达

用 Sal I 限制性内切酶降解 40 μ g 稳定转染体 pEE12hACT1LH，使成线状，该酶切割构建物中细菌质粒部分。用乙醇加 1/10 体积的醋酸钠溶液中沉淀线性 DNA，70%乙醇洗涤，干燥，重新溶解于无菌水中。

呈指数生长的 NSO 细胞生长于非选择性培养基 Dulbecco's Modified Eagles' Medium(高葡萄糖)，2 mM L-谷酰胺，没有丙酮酸钠，4500 mg/L 葡萄糖，25 mM HEPES 缓冲液（GIBCO/BRL, Catalog NO. 12430-021），加上 10%小牛血清（Gibco/BRL, Catalog NO. 16000-044）。离心收集 NSO 细胞，洗涤，再溶于冷 PBS，以便在加入 DNA 后，细胞浓度为 10^7 cells/ml。将线状质粒 DNA（40 μ g）加入到冰上电渗透管的 10^7 细胞中。细胞和 DNA 温和地混匀，避免产生气泡，在冰上保留 10 分钟，擦干管外部，用 Gene Pulser(Bio-Rad)两次连续的 1500V，3 μ f 脉冲进行处理。在将管子置于冰中 10 分钟。

将转染细胞移到 96 孔盘中, 50 μl 非选择性培养液中分别三种浓度, 3×10^5 , 7.5×10^4 和 1.5×10^4 细胞 / ml, 37 摄氏度下温育 24 小时。随后在全部孔中都加入 150 μl 选择性培养基[无谷酰胺 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基, 4500 mg/L 葡萄糖, 4 mg/L 的醇盐酸, 110mg/L 丙酮酸钠, 无硝酸铁, 无 L-谷酰胺 (JRH BioSciences, Catalog No.51435-78P)], 加上 1X GS 补充物(50X GS 补充物由 JRH Bioscience 提供, Catalog No. 58672-77P), 加上 10%透析小牛血清 (Gibco/BRL, Catalog No. 26300-061)。置于培养箱中, 直到出现实质性的细胞死亡和出现生存集落的分离。一旦出现谷酰胺不依赖性转染体集落, 便筛选单集落的孔洞, 收集进行组织培养的上清液, 按下述用 ELISA 检测人 IgG 的分泌情况。后面研究将要用的产抗体克隆 3A9, 也通过这种方法获得。类似上述方法进行第二次转染, 不同的是筛选指标为 L-甲硫氨酸 sulphoximine(MSX, 一种谷酰胺合成酶抑制剂)。

用检测人 IgG 分泌的 ELISA 普查阳性集落。将 100 μl 浓度为 2.5 mg/ml pH9.5 溶于碳酸盐缓冲液中的 AffiniPure F(ab')₂ 片段驴抗人 IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch Laboratories)涂于 ELISA 板上, 在 4 摄氏度过夜, 用 PBS 吐温 20 洗涤板四次, 用 200 μl PBS、1%BSA 于 37 摄氏度 2 个小时, 封闭 ELISA 板, 洗涤后, 和 100 μl 稳定转染的 NSO 上清液一起 37 摄氏度温育 15 分钟, 溶于 PBS 1%BAS 的 1mg/ml 人 IgG1 Kappa 溶液用作标准品。新鲜的 NSO 培养基 (DME+GS 补充物) 作为阴性对照。洗涤板, 并和以 0.5 μl /ml 溶于 PBS (无 Ca^{2+} / Mg^{2+}) 的连有过氧化物酶的 100 μl 的 AffiniPure F(ab')₂ 片段驴抗人 IgG(H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 在 37 摄氏度温育 15 分钟。5mg O 一二盐酚苯二胺 (OPD) 药片 (Sigma) 溶解于 12 ml 柠檬酸缓冲液 (0.1M, pH5.0), 然后加入 12 μl 30%过氧化氢。洗涤除去次要抗体, 加入 100 μl 溶有 OPD 的基质。用 12.5%硫酸中止反应, 在 Dynatech Plate Reader 上于 490 nm 检测板子。通过限制稀释度为 2、1 和 0.5 cells/孔, 克隆阳性孔。当来自单一克隆的全部孔, 经 ELISA 检测为抗体产生阳性时, 可以认为克隆到了该细胞株。

用蛋白质 A 亲和层析[Poros A/M 4.6/100mm, 5 mL/min, 利用 Bio-Cad 工作站 (Perseptive Biosystems, Inc.)]从过渡的细胞培养上清或从稳定的细胞转染体培养液纯化人化 Act-1 抗体。柱子用 PBS 平衡, 经 0.2 微米过滤器过滤的细胞培养上清液上柱, 每次所给上柱量依据抗体浓度不同而不同, 通常上柱抗体量不超过 15 mg, 洗脱速度 5 ml/min。结合后, 第一次用 PBS 洗柱子, 至 $OD_{280nm}=0$ 。然后用至少 50 倍柱体积的量洗第二次, 接着用 0.1M 醋酸钠, pH5.0 洗脱柱子, 最后用 0.1M 柠檬酸钠, pH3.5 洗脱。洗脱液按每 5 毫升一收集, 用 200 μ l, 1.5M Na_2CO_3 pH12 调 pH 中性。合并含抗体部份后, 通过超滤浓缩至期望的浓度 (centricon, 30,000 KDa cut off, Amicon)。

Fc—突变的变种的构建

构建了一种无 Fc 结合 (Fc—突变) 的人化 Act—1 抗体。该抗体和人化 Act—1 抗体有相同的可变区(图 11 和图 12), 有相同的人 IgG1 恒定区, 不同的是在 IgG1 重链恒定区还有两个氨基酸的替换, 这样设计是为了取消 FcR 识别和 Fc 结合性能 ($Leu^{235}-Ala^{235}, Gly^{237}-Ala^{237}$)。按如下构建 Fc—突变衍生体的重链的编码核酸。称为 3678 的构建物 (由 Herman Waldmann 博士提供, 牛津大学) 在 pEE12 载体中编码人化抗—CD18 抗体的轻链和重链[WO 93/02191 (发表于 February 4, 1993) ; Sims, M.J., et al, J, Immunol 151(4):2296—2308(1993)], 但是在 IgG1 重链恒定区还通过位点定向的突变导入了两个氨基酸替换 ($Leu^{235}-Ala^{235}, Gly^{237}-Ala^{237}$), 用 Age I 和 Ecor I 将之降解, 释放包含有 γ 恒定区突变体的 900bp 片段。该片段被用来替换 pEE6hACT1H 中在 Age I/EcoR I 位点的重链野生型 γ -1 恒定区, 生成 pEE6hACT1H/FCmut。在用类似方法构建包含两个链的其他构建物时, 要制备包含有改型轻链基因和 Fc—突变改型重链基因的单结构体 (pEE12hACT1LH/FCmut)。

实施例 4: 人化 ACT-1 抗体 LDP-O2 的特性描述

起始的特性研究是利用 pEE12hACT1LH/FCmut 过渡转染的 COS-7 细胞所产生的抗体来进行的。如上述制备和纯化此抗体，在下面被称为“1°HUM ACT-1”，后面带有组号。

利用如上述制备的（用线性 pEE12hACT1LH/FCmut 转染的）鼠细胞株 NSO 稳定的转染体所产生的抗体，进行额外的检测。该抗体制备在下面被称为“LDP—02/3A9/Lot 1”。

“LDP—02/3A9/Lot #1”抗体所用在下述研究包括：SDS—PAGE，Western 杂交分析，等电聚焦，氨基酸组成分析，品系杂交，滴定，互补介入溶胞检测，ADCC 检测，结合抑制检测。“1°HUM ACT-1 Lot #7”被用于亲合检测#1-2，1°HUM ACT-1 #8-9 用于亲合检测#3-5 和 C1q 结合试验。

A、物理、化学性质；

1.SDS-PAGE

为帮助确立特征，首先描述第一个制备样品的特性并评估纯度，分别在降解的和不降解的条件下进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），考马斯亮兰染色。

将 80 μ l, 0.82 mg/ml LDP-02/3A9/Lot#1 加到一个微管中，抗体溶于柠檬酸缓冲液，与 160 μ l Tris 缓冲液（0.5 mM, pH 8.8）交换三次，交换后样品的最终体积为 135 μ l，蛋白质浓度为 0.486 mg/ml，分别用降解的和不降解的缓冲液稀释 2 倍，蛋白质浓度为 0.243 mg/ml。将 13 μ l 的 0.243 mg/ml 等份试样溶液内（含 3.16 μ g 蛋白质），装入 SDS 凝胶的样品道里，进行 SDS-PAGE 电泳，对照品包括 Mark 12 分子重量标准物（Novex, #L5677）。

在非降解条件下，LDP-02/3A9/Lot#1 表现出一条主要条带，分子量略低于 200,000 道尔顿，几个次要组份在 116,300-200,000 道尔顿之间，另外三个次要组份分子量大约为 97,400 道尔顿、略大于 55,400 道尔顿的组份、和略小于 31,000 道尔顿的组份。用激光光密度仪扫描凝胶，定量分析各染上色的条带，计算各自百分比（表 5），结果显示分子量约为 200,000 的主要组份占有所有染色条带的 84.4%。该主要组份代表的是完整的抗体分子，分子量 55,000 和 31,000 的组份则分别代表单一的重链和轻链。

在降解条件下，电泳凝胶上有两个主要组份，一个约为 55,400 道尔顿，代表全部条带的 68.6%，第二个略低于 31,000 道尔顿，代表 30.5%的比例（表 5），这两个分子量同免疫球蛋白 G 的重链、轻链的相吻合，这些数据说明，样品中大约 99%要么是完整的抗体，要么包含抗体的轻链或重链。除两个主要条带外，还发现有一个略小于 66,300 道尔顿的次要组份。

从这个分析来看，与完整的免疫球蛋白 G 相吻合的高分子量种类作为主要条带而存在于 LDP-02/3A9/Lot#1 中。其中还有多个次要条带。在降解条件里，有两个主要条带，他们的电泳特征和免疫球蛋白 G 的轻链、重链相同。

表 5
纯化数据简表
考马斯亮蓝，非降解条件

样品	条带	面积百分比（主要成分）
LDP-02/3A9/Lot #1	5	84.4%

纯化数据简表
考马斯亮蓝，降解条件

样品	条带	低分子量面积 百分比	低分子量面积 百分比
LDP-02/3A9/Lot #1	9	68.6%	30.5%

2. Western 杂交分析

对样品和标准物按如上所述的 SDS-PAGE 进行分析。简述之，以 4-20%Tris—甘氨酸凝胶分析非降解和降解的样品。Novex Mark 12 分子量标准物也在胶上跑，两种样品，2.1 μ l 和 4.5 μ l，它们的 0.2143 mg/ml 等份试样溶液，分别含有 0.51 μ g 和 1.09 μ g 蛋白质的样品，分别装上 SDS 凝胶。

SDS-PAGE 电泳后，根据 Novex Western Transfer Apparatus 指导，将样品蛋白从凝胶转到硝酸纤维素膜上。所用转移缓冲液是 1X Tris—甘氨酸溶于 2%甲醇的溶液。约 2 小时后，从转移仪器上取出硝酸纤维素斑点，浸于 DDI 水中。然后，在 Tris 缓冲液（20mM）中 37 摄氏度，35 分钟封闭斑点，缓冲液中含有 3%明胶和 0.1%吐温 20。取出斑点，用 Tris 缓冲液洗涤两次。用 20mM Tris—3%BSA 溶液稀释山羊抗鼠 IgG 抗体溶液 1000 倍，生成山羊抗鼠 IgG 溶液，将之加到斑点上，2-8 摄氏度温育过夜。然后，用 Tris 缓冲液洗涤斑点，每 5 分钟换一次溶液，共换 4 次。用 20mM Tris—3%BSA 溶液稀释连接碱性磷酸酶的抗山羊 IgG 5000 倍，加到斑点中，于室温保持 2 小时，用 Tris 缓冲液洗涤，每 5 分钟换一次，共换四次缓冲液。往斑点上一次加入 10 ml BCIP/NBT(5-溴-4-氯-3'-磷酸吲哚 p-甲苯胺盐/氯化氮蓝四唑)，搅拌，室温下反应。将斑点浸于 Tris 缓冲液终止反应，用山羊抗一人 IgG 代替山羊抗一鼠 IgG，重复上述操作。

用抗一鼠 IgG 试剂，在非降解和降解条件下，都能在硝酸纤维素斑点上找到 0.51 μg 和 1.09 μg 的 IgG 样品。这些条带的密度随浓度升高而升高。在非降解条件，能发现一个比 20,000 道尔顿标记物略快的主要条带。还有几个轻微弱的条带，其中两个跑得比主要条带慢，三个比主要条带快。在降解条件下，发现两个对应于免疫球蛋白 G 重链和轻链的条带。

在非降解和降解条件下，利用抗一人 IgG 试剂，能在硝酸纤维素斑点中清楚地找到 0.51 μg 和 1.09 μg 的 IgG 样品。这些条带的密度随浓度升高而升高。在非降解条件下，发现一个略小于 200,000 道尔顿的主要条带。用抗鼠 IgG 能检测到斑点上的几个微弱条带。当用抗人 IgG 检测，免疫染色的密度强于所有条带。还检测到在其他斑点不能发现的额外的条带，这可能是因为这些条带对应于 IgG 片段，但缺乏能被抗鼠 IgG 所识别的表位。在降解条件下，检测到对应于免疫球蛋白 G 重链的一条带。因为抗体是对人 IgG 的 Fc 部分为特异性的，所以没找到轻链。几个次要条带，用抗鼠 IgG 不能被发现，而用抗人 IgG 却能发现。这种差异可能是因为有缺乏与抗鼠 IgG 结合的表位的 IgG 片段。

3、等电聚焦

对 LDP-02/3A9/Lot#1 进行等电聚焦 (IEF)，用考马斯亮兰染色，将 LDP-02/3A9/Lot#1 的实验结果和一起聚焦的 IEF 标准物进行比较。

将 80 μl ，浓度为 0.82 mg/ml 的 LDP-02/3A9/Lot#1 加到微管中。含有抗体的柠檬酸缓冲液与 160 μl 的 Tris 缓冲液 (0.5 mM, PH8.8) 交换三次，最后样品体积为 135 μl ，最终浓度计算为 0.486 mg/ml。用 2X IEF 样品缓冲液稀释溶液两倍，浓度变为 0.243 mg/ml。取该溶液

13 μl，内含 3.16 μg 蛋白质，装入 IEF 胶中。对照物包括 IEF 标准物 pI 3.6-9.3（Sigma,Cat#1-3018）。

根据标准物绘制标准图谱，8 种 IEF 标准物的平均泳动距离对各自的 pI 值。对应这些数据的曲线的负性斜率为 0.03459，截距 8.91857， $R^2=0.99206$ 。

表 6 包括 6 个 IEF 标准品和 LDP-02/3A9/Lot#1 的平均泳动距离，也包括计算出来的 LDP-02/3A9/Lot/的 pI 值。

利用标准图的曲线参数，计算 LDP-02/3A9/Lot#1 的 5 个条带大约 pI 值为：7.88，7.95，8.09，8.26 和 8.43，以 pI8.09 的峰最为显著（表 6），这个主要峰的 pI 和基于氨基酸一级序列推算的 pI7.91 相适应。

表 6

<u>标准</u>	<u>泳动距离*</u>	<u>pI¹</u>
凝集素	3.3 mm	8.8
凝集素	9.5 mm	8.6
凝集素	17.88 mm	8.2
肌红蛋白	59.3 mm	6.8
碳酸酐酶 I	74.0 mm	6.6
碳酸酐酶 II	92.5 mm	5.9
β-乳球蛋白 A	105.8 mm	5.1
胰蛋白酶抑制物	122.0 mm	4.6

<u>样品</u>	<u>泳动距离</u>	<u>pI¹</u>
LDP-02/3A9/Lot#1 (带 1)	14.0 mm	8.43
LDP-02/3A9/Lot#1 (带 2)	19.0 mm	8.26
LDP-02/3A9/Lot#1 (带 3)	24.0 mm	8.09
LDP-02/3A9/Lot#1 (带 4)	28.0 mm	7.95
LDP-02/3A9/Lot#1 (带 5)	30.0 mm	7.88

* 平均值

¹ 基于标准曲线 (pI 对泳动距离), 其中:

样品 pI = 截距 - 斜率 (样品泳动距离)

4. 氨基酸组成分析

进行了氨基酸组成分析, 并确定了 LDP-02/3A9/LOT #1 的蛋白质含量、氨基酸组成、和其特性。

取出三份 45 μ l 样品进行水解, 用 6N HCL 蒸汽于 165°C 水解 60 分钟。做为对照, 在水解试管中, 还包含一种标准蛋白质, 其已经与 LDP-02/3A9/LOT #1 一起被水解。在分析 LDP-02/3A9/Lot#1 之前和之后, 色谱分析氨基酸标准品。蛋白质标准包括以牛血清白蛋白作为蛋白质标准 (Tektagen Solution Control: 310:197A), 而氨基酸标准品是氨基酸水解混合液 (Tektagen Solution Control: 310:199A)。

实验方法包括用离子交换 HPLC 分析再溶解的蛋白质水解液或游离氨基酸溶液, 过柱后与茚三酮反应显色, 双波长测定吸收值, 分析氨基酸标准得到一校正表, 与之对照计算在两种波长的吸收。

表 7 列出了氨基酸组成，LDP-02/3A9/LOT #1 的蛋白质浓度为 0.709 mg/ml。对缺乏定量的 W 和 C 进行修正，蛋白质浓度被校正为 0.740 mg/ml，数据和相关计算概括于表 8。

对于 LDP-02/3A9/LOT #1，用 6N HCL 蒸汽在 165°C 水解一个时间点（60 分钟）。从标准蛋白（BSA）得来的校正因子，被运用于蛋白质含量的确定（表 8）。

在这种实验条件下，由于存在一个共同洗脱的半胱氨酸峰，因此脯氨酸的摩尔百分比，可能略有提高（表 7）。脯氨酸定量的准确性具有样品依赖性，基于样品水解物中半胱氨酸的含量。对于此分析，已经利用 BSA 校正因子，对脯氨酸含量进行了校正（表 8），校正的准确性具有样品依赖性，基于 BSA（6.0%）中和样品中半胱氨酸的相对量。

以相对百分比（频度或摩尔百分比）表示的预测的 LDP-02 氨基酸组成，基于重链和轻链的核苷酸序列（预测的%），真实的氨基酸分析结果（真实的%）被列于表 9，比较预测值与真实值，便得出很好的相关系数，除脯氨酸之外，其已经在前面有叙述，由于共同洗脱的半胱氨酸峰而使脯氨酸值偏高。

表 7

样品	LDP-02/3A9/LOT #1 没有校正	LDP-02/3A9/LOT #1 有 BSA 校正系数	LDP-02/3A9/LOT #1 有 W/C ¹ 和 BSA 校正系数
AA	%摩尔	%摩尔	%摩尔
N/D	9.1	9.0	8.6
T	6.5	7.5	7.2
S	9.2	13.3	12.7
Q/E	11.4	11.3	10.8
P	8.2	9.8	9.4
G	7.8	7.4	7.1
A	5.9	5.8	5.6
V	10.2	9.5	9.1
M	0.3	0.7	0.7
I	2.5	2.6	2.5
L	8.2	7.9	7.6
Y	5.2	5.0	4.8
F	3.4	3.4	3.3
H	2.2	2.2	2.1
K	7.0	6.9	6.6
R	2.9	2.9	2.8
总和:	100		

¹ 相关因子为 0.958, 基于 W 和 C 含量分别为 1.8%和 2.4%。

表 8: 蛋白质含量确定

AA	平均 nmole	² 校正因子	校正的 nmole	残基 MW	实测量(ng)
N/D	5.954	0.991	5.900	115.1	679
T	4.243	1.156	4.905	101.1	496
S	6.054	1.448	8.766	87.1	764
Q/E	7.436	0.991	7.369	128.1	944
P	5.365	0.830	4.453	97.1	432
G	5.080	0.951	4.831	57.1	276
A	3.884	0.983	3.818	71.1	271
V	6.681	0.930	6.213	99.1	616
M	0.221	2.433	0.538	131.2	71
I	1.606	1.036	1.664	113.2	188
L	5.379	0.961	5.169	113.2	585
Y	3.374	0.954	3.219	163.2	525
F	2.229	0.992	2.211	147.2	325
H	1.442	0.981	1.415	137.2	194
K	4.616	0.984	5.542	125.2	582
R	1.922	1.005	1.392	156.2	302
	每个柱注入的总量 (ng) :				7250
	重新配置的体积 (μl) :				220
	³ 水解总量 (ng) :				31900
	水解总量 (μg) :				31.9
	原始样品量 (μl) :				45
	稀释样品体积 (μl) :				45
	水解的等份试样值 (μl) :				45
	蛋白质浓度 (mg/ml) :				0.709
	以 W/C 校正后的\\蛋白质浓度 (mg/ml) :				0.740

¹ 蛋白质含量不对半胱氨酸和胰蛋白胍校正。

² 对每一个检测的氨基酸都用 BSA 校正因子来校正。

³ 总水解的 ng = (总注入的 ng x 重新配制的体积) / 注入的体积 (50μl)。

表 9:氨基酸组分

氨基酸样品	氨基酸	号	预测%	实测%
A	Ala	68	5.06	5.6
C	Cys	32	2.38	---
D	Asp	56	4.17	---
E	Glu	68	5.06	---
F	Phe	40	2.98	3.3
G	Gly	90	6.70	7.1
H	His	28	2.08	2.1
I	Ile	30	2.23	2.5
K	Lys	96	7.14	6.6
L	Leu	98	7.29	7.6
M	Met	10	0.74	0.7
N	Asn	50	3.72	---
P	Pro	94	6.99	9.4
Q	Gln	64	4.76	---
R	Arg	36	2.68	2.8
S	Ser	170	12.65	12.7
T	Thr	100	7.44	7.2
V	Val	126	9.38	9.1
W	Trp	24	6.98	---
Y	Tyr	64	4.76	4.8
N/D	Asn/Asp	106	7.89	8.6
Q/E	Gln/Glu	132	9.82	10.8

5. MALDI-TOF MS 分析

用 MALDI-TOFMS 分析 LDP-02/3A9/LOT #1, 得到分子量。检测到一个集中于 149,808Da 的主要峰。集中于 74,927Da 的峰代表主要峰中的+2 离子种类。应当注意到+2 离子物质并不精确地是 M+H 离子的一半, 这个细微偏差在 $\pm 0.2\%$ 之间, 可能是由于实验不准确所导致。

根据预测的抗体一级序列, 预期的分子量为 147,154Da, 与实测的 IgG 分子量相差 2,654Da, 这最可能是由于分子内糖基化造成的, 这个差异值说明分子糖基化水平约为 1.8%。

B. 亲合力

首先用人源 HUT-78 细胞在细胞流计上滴定 LDP-02/3A9/LOT #1 和鼠 Act-1(Lot#2)。简述之, 1.0×10^6 HUT-78 细胞溶于 100 μ l 生物素化鼠 Act-1(Lot#2)、生物素化鼠 IgG1(Lot#1, LeukoSite, Inco,)、生物素化 LDP-02/3A9/LOT #1 溶液, 或者溶解于生物素化人 IgG(Jackson ImmunoResearch Avondale PA Lot 25794), 4°C 20 分钟, 此后移走抗体。除非特别声明, 全部试剂稀释于 0.15M PBS/1.0%FCS/0.1%叠氮化钠。两种抗体的各种浓度包括 30 μ g/ml (仅限于鼠 Act-1)、15 μ g/ml、7.5 μ g/ml, 随后各自按 1: 10 稀释。移走主要抗体后, 将细胞溶解于 100 μ l 按 1:200 稀释的链霉菌素藻红蛋白的溶液 (Dako Corp Carpinteria, CA)。用 200 μ l 的 PBS 洗涤, 将细胞重新溶解于 0.5 ml 的 PBS/1%福尔马林溶液, 冷藏直至进行分析。在 FACSscan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) 上分析样品, 用 488 nm 激光激发藻红蛋白。对每个样品, 最少分析 10000 个细胞, 计算半峰平均频道荧光 (MFC), 所有样品重复操作两次。

滴定研究显示, 用鼠 ACT-1 和 LDP-02/3A9/LOT #1 (图 15), 在大约 1.0 μ g/ml 的浓度, 能有最大荧光。对于能达到 MFC 的浓度,

LDP-02 比鼠 ACT-1 更低 (生物素化鼠 ACT-1 Lot#2 是 0.1 $\mu\text{g/ml}$, LDP-02/3A9/Lot#是 0.02 $\mu\text{g/ml}$)。

利用细胞统计以及 LDP-02、鼠 ACT-1 抗体对人源 HUT78 细胞结合的交叉竞争,相对评价亲合力(和特异性)。简述之, 1.0×10^6 HuT-78 细胞溶解于 100 μl 的 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 带有不同浓度非连结 1° HUM ACT-1 或带有非连结 ACT-1 的生物素化鼠 ACT-1 (LOT#2) 溶液, 4°C 20 分钟, 取出抗体。在另一个独立实验里, 所用溶液是 100 μl 的 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 带有不同浓度非连结鼠 ACT-1 (LOT#2) 和非连结 LDP-02/3A9/LOT #1 的生物素化 LDP-02/3A9/LOT #1 溶液。维持稳定的生物素化抗体的浓度, 是在如上述相同条件下导致染色 HUT-78 细胞有 MCF 值的那个浓度。除了特别声明, 所有试剂均稀释于 0.15M PBS/1.0%FCS0.1% 叠氮化钠。两种抗体浓度在半对数增长范围内波动, 从 $2 \times 10^{-6}\text{M}$ 到 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 。移去主要抗体后, 将细胞溶于 100 μl 按 1: 200 稀释的链霉菌素藻红旦白溶液(Dako Corp Carpinteria,CA)。用 200 μl 的 PBS 洗涤后, 再溶于 0.5 ml 的 PBS/1%福尔马林, 冰箱冷藏直至分析。在 FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose,CA) 上分析样品, 用 488 nm 波长激光激发藻红旦白。对每个样品最少分析 10000 个细胞, 计算 MCF。每个样品重复操作两次, IC_{50} 是生物素化同型抗体中导致 MCF 减半的非结合抗体的浓度。

对 LDP-02(1°HUM ACT-1)和鼠 ACT-1 之间进行 5 次独立的交叉竞争实验, 从而估计其亲合力。当用生物素化鼠 ACT-1 当作实验中保持稳定的抗体, 统计出来 LDP-02($5.43 \pm 0.86\text{nM}$)的平均 IC_{50} 值 (± 1 SEM) 比鼠 ACT-1 ($7.94 \pm 1.17\text{nM}$; $P=0.02$ 双尾 t 实验: 两个成对样品的平均值) 的要低。而不相关的人 IgG1 或鼠 IgG1 没有竞争效果 (全部实验概括于表 10, 一个实验列于图 16)。相似地, 当生物素化 LDP-02/3A9/LOT #1 用作实验中稳定抗体, 需要有比 LDP-02/3A9/LOT #1 更高浓度的非结合鼠 Act-1, 从 HuT-78 细胞膜竞争 LDP-02 ($\text{IC}_{50}=6.3\text{nM}$ 对 4.3nM)。在每一个实验里, LDP-02 的 IC_{50} 比鼠 ACT-1

的要低，这些结果说明 LDP-02 对鼠 ACT-1 所识别的配体有特异性，它的亲合性优于鼠抗体的。

表 10
鼠 ACT-1 和人化 ACT-1 (LDP-02) 亲和性分析

实验	抗体	Lot#	IC ₅₀ (nM)
#			
1	ACT-1 (鼠)	2	7.57
2		2	10.95
3		2	6.02
4		2	4.91
5		2	10.24
		平均值±SEM	7.94±1.17
1	LDP-02 (人化)	7	4.34
2		7	6.13
3		8/9	4.71
4		8/9	3.53
5		8/9	8.44
		平均值±SEM	5.43±0.86

P=0.02
Two-tail t-Test: Paired Two Sample for Means

C. 种类交叉反应性

用细胞流计来衡量种类交叉反应性。将 100 μl 抽自于人、狗、猫、豚鼠或老鼠的 EDTA-抗凝集血加到 FACS 管中。移走血浆，将血细胞层重新溶于 100 μl 生物素 LDP-02/3A9/LOT #1、不相关生物素化人 IgG(Jackson Immuno Research, Avondale,PA)、生物素化鼠 ACT-1

LOT#2、或不相关生物素化鼠 IgG1(Dako Corp., Carpinteria, CA), 终浓度为 15 $\mu\text{g/ml}$ 。除了特别声明, 全部试剂均稀释于 0.15 M PBS/1%FCS/0.1%叠氮化钠。样品和抗体一起在 4°C 保持 20 分钟, 洗除抗体。细胞和 100 μl 按 1:200 稀释的链霉菌素藻红蛋白溶液(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)在 4°C 保持 20min。按照实验手册用一种商业溶胞试剂 FACS 溶胞液(Becton Dickinson, San Jose CA)溶胞红细胞。用 PBS 洗涤后, 将细胞再溶于 0.5 ml PBS/1%福尔马林, 冰箱冷藏直至进行分析。在 FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) 上分析样品, 用 488 nm 波长激光激发藻红蛋白。对每个样品最少分析 10000 个细胞, 淋巴细胞捕获门被置于前方, 90 度的光散参数。

生物素化 LDP-02/3A9/LOT #1 以一种异源染色识别人淋巴细胞的一个亚群, 该模式类似于鼠 ACT-1 的, 不同于人或鼠同型对照物。此外, 检测狗的或猫的淋巴细胞时, LDP-02/3A9/LOT #1 和鼠 ACT-1 都有一种类似于人淋巴细胞的异源染色模式, 在这种条件下, LDP-02/3A9/LOT #1 或鼠 ACT-1 不能识别豚鼠或老鼠的淋巴细胞。

D. C1q 结合

根据上述方法, 用细胞流计评价 LPD-02 结合人补体 C1q 的能力 [Sims, M.J. et al., J.Immunol.151:2296-2308(1993)]。根据标准 Ficoll 密度分离法, 分离人边周血单核细胞(PBMCs)。用 10%普通的兔血清/PBS 封闭 375000 个细胞, 4°C 下 10 分钟。冲洗后, 细胞与 100 μl 下列物质温育: (a) CAMPATH-IH (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.); (b) 人 IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), (c) LDP-01[CD-18 抗体的衍生物, 描述于 WO 93/02191 (1993 年 2 月 4 日发表), 以及 Sims, M.J., et al., J. Immunol. 151(4): 2296-2308(1993), 在 IgG1 重链恒定区有两个位点的氨基酸替换($\text{Leu}^{235} \rightarrow \text{Ala}^{235}$ 和 $\text{Gly}^{237} \rightarrow \text{Ala}^{237}$), 也叫作“FcRmut CD18”, Therapeutic Antibody Center,

Cambridge, U.K.], 或 (d) LDP-02(1°C hum ACT-1 Lot#8/9)浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$, 4°C 下 20min。CAMPATH-1H 作为一种阳性对照, LDP-01 和人 IgG1 作为阴性对照, 全部试剂均用 2%BSA/PBS 稀释, 2%BSA/PBS 也作为一种阴性对照物单独加入。洗除抗体, 将细胞重溶于 50 μl 人补体 C1q (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 10 $\mu\text{g/ml}$ 4°C 下 30min。然后洗涤细胞, 重悬浮于 200 μl 的 FITC-结合兔抗一人 C1q (Dako Corp., Carpinteria, CA) 抗体, 浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$, 4°C 下 20min。用 200 μl 的 PBS 洗涤后, 再溶于 0.5ml 的 PBS/1%福尔马林, 冻箱冷藏直至分析。在 FACScan (Becton Dickinson Corp., San Jose, CA) 上分析样品, 用 488 nm 波长激光激发藻红蛋白。对每个样品最少分析 10000 个细胞, 记算平均频道荧光 (MCF)。

人 PBM 与 CAMPATH-1H 结合的人 C1q 一起温育, 导致 MCF 有一个显著漂移, 而 PBMC 与 LDP-01、BSA 或人 IgG 一起温育所诱导的染色模式都相似, 都有低背景染色。PBMC 与 LDP-02 预先温育所形成的染色模式和阴性对照的相同, 说明在这种条件下 LDP-02 不结合 C1q。

E 补体介导的溶胞

如前述方法, 检测 LDP-02/3A9/Lot#1 参与补体介导细胞溶胞的能力 (Bindon, C.I., et al. Transplantation, 40: 538-544 (1985))。无菌收集肝素化人血, 收集血浆并立即置于冰上。在一层 Ficoll-Hypaque 上, 密度 1.077 g/ml, 离心 15 分钟, 分离边周血单核细胞 (PBMC), 用完全培养液洗涤两次, 培养基包括 RPMI1640/10%FCS/100U/ml 青霉素/100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素/2.0Mml L-谷酰胺。将 2 千 5 百万个细胞在含 150 μCi ^{51}Cr 铬酸钠的无菌盐水中 37°C 温育 1 小时 (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE)。用培养液洗涤两次, 重新悬浮成 $10^6/\text{ml}$ 。将 50 μl 该悬浮液 (5.0×10^4 个细胞) 加到 U 形底微滴度盘的孔中, 盘中有 100 μl 下列物质之一(a) CAMPATH-1H (Therapeutic Center,

Cambridge, U.K.), (b) CAMPATH-1G (Therapeutic Center, Cambridge, U.K.), (c) 人 IgG1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), (d) LDP-02/3A9/Lot#1, 或 (e) LDP-01 (FcRmut CD18, Therapeutic Antibody Center, Cambridge, U.K.), 浓度分别为 50, 25, 5, 2.5, 和 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。CAMPATH-1 抗体作为阳性对照, 人 IgG1 和 LDP-01 作为阴性对照。额外的孔包含溶于含有 100 μl 0.1% Triton-X-100 的完全培养基中的细胞。同 Triton-X-100 温育的细胞被用来测量总放射性, 而无抗体的对照孔被用来测定自发的放射性。室温下温育 15 分钟后, 50 μl 自体血浆作为补体来源, 加到每个孔中, 终浓度为 20%。37°C 下温育 45 分钟, 100g 离心 2 分钟, 收集 100 μl 上清液, 用 Cobra II gamma Counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL) 测定放射性, 每个样品重复操作 2 次, 利用公式计算 ^{51}Cr 的特异放射性百分比:

$$\text{特异放射性} = (\text{实验} - \text{自发性}) \times 100\% / (\text{总体} - \text{自发性})$$

如以前所报道[Bindon et al Transplantation 40:538-544(1985)], CAMPATH-1H 和 CAMPATH-1G 以一种剂量依赖性方式诱导出高达 35% 的人 PBMC 补体介导溶胞。此外, 人 IgG1 和 LDP-01 对照物不诱导任何可检测到的细胞溶胞, LDP-02 在高于和包括 25 $\mu\text{g/ml}$ 的任何试验浓度下不参与细胞溶胞作用 (图 17)。

F. 抗体依赖性的细胞介导细胞毒作用 (ADCC)

人 CD3+ 胚细胞被用作靶细胞, 来测量 LDP-02 参与 ADCC 作用的能力。CD3+ 胚细胞于外包被抗 CD3 抗体 RT66 的 24 孔板上产生的, RT66 在 PBS 中稀释成 5 $\mu\text{g/ml}$ 。在一层 1.077 g/ml Ficoll-Hypaque 上离心 15 分钟分离 PBMC 细胞, 洗涤, 重溶于完全培养基, 这些操作如前面所述。将 2 百万个细胞加到 24 孔板的每个孔中, 37°C 5%CO₂, 温育 4 天。将细胞转入培养瓶中, 37°C 5%CO₂ 培养, 培养基含有 10 单位/毫升的人重组 IL-2 (Genzyme Corp., Cambridge, MA)。

三天后, 10×10^6 CD3 胚细胞在含 $150 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ 铬酸钠的无菌盐水 (E.I. du Pont de Nemours & Co. Inc., Wilmington, DE; Lot#95M682) 中温育于 37°C 45 分钟。用完全培养液洗涤两次, 重悬浮成 2×10^5 cells/ml, 取 $50 \mu\text{l}$ 悬液 (10,000 个细胞) 加到 U 形底 96 孔微滴定板的孔中, 孔中含有 $50 \mu\text{l}$ CAMPATH-1H (Therapeutic Antibody Center, Cambridge, UK) 或 LDP-02/3A9/Lot#1, 终浓度为 50, 5, 2.5, 0.5, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。细胞与抗体在室温下温育 30 分钟, 效应细胞 (效应器: 靶=50: 1) 加到每个孔中, 效应细胞是来自不同供体的 0.5×10^6 个新分离的 PBMC' (ficoll-hypaque 梯度, 在 37°C 用完全培养基洗两次)。额外的孔中, 加入在培养基中的 $100 \mu\text{l}$ 5% Triton-x-100 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)。用与 Triton-x-100 温育的细胞测量总放射性, 而无抗体与效应细胞的对照被用来测量自发放射性。室温下 $100g$ 离心 2 分钟, 37°C 5% CO_2 温育 20 小时, 此后, 将细胞转移到 V 形底 96 孔板上, 室温下沉淀。收集 $100 \mu\text{l}$ 上清液, 用 Cobra II gamma counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL) 测定放射性。每个样品重复操作 2 次, 利用公式计算 ^{51}Cr 的特异放射性百分比。

特异放射性 = (实验 - 自发性) $\times 100\%$ / (总体 - 自发性)

如以前所证实的 [Sims, M.J. et al., J. Immunol., 151(4): 2296-2308 (1993)], CAMPATH-1H 以一种剂量依赖性方式参与 ADCC, 在浓度 $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$ 诱导大约 30% 特定的 ^{51}Cr 放射性。在任何检测浓度的包含 LDP-02 的孔中未检测到任何特定放射性。

G. 对粘附 MAdCAM-1 的抑制作用

用荧光标记的 $\alpha 4 \beta 7$ + RPMI 8866 细胞 (人 B 淋巴细胞) 和嵌合的 MAdCAM-1 来测量 LDP-02 抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 粘附 MAdCAM-1 过程的能力, 嵌合的 MAdCAM-1 包括人 MAdCAM-1 的整个胞外区域融合于人

IgG1 Fc 区域（来自于同一构建物的恒定区，被用于 Fc—突变 LDP-02 的恒定区）。

1. 嵌合 MAdCAM-IgG 的构建

人 MAdCAM-1 克隆 pcDhuMAd4[在 pCDNA3 中的克隆 4 cDNA; Shyjan, A.M. et al., J. Immunol., 156: 2851-2857 (1996), 该文献通过在此引述而全文合并于本文]被用作人 MAdCAM-胞外区域 PCR 扩增的模板，该区域与人 IgG1 恒定区融合[国际申请号：PCT/US96/02153 (WO96/24673)，1996 年 2 月 12 日申请，是 1995 年 9 月 1 日申请的美国专利申请 08/523, 004 的后续申请，该后续申请又是 1995 年 2 月 10 日申请的美国专利 08/386, 857 的后续申请]。为构建 MAdCAM-IgG 嵌合体，合成出包含人 MAdCAM-1 编码序列的 5 端（ATG 密码子，黑体）的引物 HUMADIG4/2 (SEG 1D NO: 62)。

HindIII

5'-GGAAAGCTTCCACCAT**AT**GGATTTCGGACTGGCCC-3'

这个 5' 端引物和 3' 引物 HUMAD1G3 结合扩增出编码人 MAdCAM-1 整个胞外部分的区域。3' 端引物 HUMAD1G3 (SEQ 1D NO: 63) 有下列序列；

SpeI

5'-GGACTAGTGGTTTGGACGAGCCTGTTG-3'

在引物上设计有 5' 端的 Hind III 位点和 3' 端的 Spe I 位点。使用 Invitrogen(San Diego,CA)的 PCR 试剂盒和这些引物，PCR 扩增 MAdCAM 片段。用 HindIII 和 Spe I 降解扩增产物，生成克隆用末端，利用 Glassmax DNA 分离系统 (Gibco,Bethesda,MD) 凝胶电泳纯化。

用 SpeI 和 EcoRI 从构建物上切下包含 CH1, H (铰链), CH2 和 CH3 区的约 1Kb 左右的片段，该构建物编码含有 Fc—突变人恒定区

的人免疫球蛋白重链。该构建物中人恒定区对应于 CAMPATH-1H 重链的 PCR 扩增产物[Reichmann, L. et al., Nature, 322:323-327 (1988), Sims, M.J. et al. (J. Immunol., 151:2296-2308 (1993) and Waldmann et al. (WO 93/02191, 1993 年 2 月 4 日 (23 页), 这些文献都通过在此引述而全文合并于本文]。通过寡聚核苷酸直接突变, 在构建物恒定区设计了突变 ($\text{Leu}^{235}-\text{Ala}^{235}$, $\text{Gly}^{237}-\text{Ala}^{237}$), 减少了对人 $\text{Fc}\gamma$ 受体的结合。因此在 MAdCAM-Ig 融合子中除了引入了 $\text{Leu}^{235}-\text{Ala}^{235}$, $\text{Gly}^{237}-\text{Ala}^{237}$ 突变外, 含有 Spe I—EcoRI 恒定区[Sims et al. J. Immunol., 151:2296-2308 (1993) and Waldmann et al. (WO 93/02191)]。

用 Glassmax DNA 分离系统 (Gibco, Bethesda, MD) 凝胶电泳分离编码 Fc—突变 IgG1 恒定区的 1kb 的 Spe I—EcoRI 片段。恒定区片段和包含 MAdCAM 整个胞外区的 HindIII—SpeI 片段整合到 HindIII、EcoRI 酶切过的 pEE12 载体上[Stephens, P.L. and M.L. Cockett, Nucl. Acids Res., 17:7110 (1989) and Bebbington, C.R. and C.C.G. Hentschel, 1987, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells, (Academic Press, N.Y.)]。得到细菌 DH10B 株的转化子, 集落生成后, 用限制性内切酶图谱分析微小质粒。编码含有 MAdCAM-1 整个胞外区融合蛋白的构建物 (构建物 HuMAd Ig21) 与 Fc—突变 IgG1 恒定区融合, 在整个 MAdCAM-1 部分进行测序, 以确证各部分之间正确的融合, 以及 PCR 过程未引入突变。这个构建体在 NSO 细胞里生长, 通过标准蛋白质 A 亲和层析纯化产物。

2. 粘附实验

用碳酸盐缓冲液稀释嵌合 MAdCAM-1 至 $2.5 \mu\text{g/ml}$, pH9.5, 取 $50 \mu\text{l}$ 涂在一个高结合性平底 96 孔板 (Costar) 上, 37°C 保持 1 小时, 在一个微板自动清洗器上 (Bio-Tek Instruments, Winooski VT) 用洗涤缓冲液 (50mM Tris HCl, 0.14 M NaCl, 1 mM MnCl_2 , pH7.2) 洗涤孔穴。用稀释于 PBS 的 $100 \mu\text{l}$ 的 10%FBS 封闭, 37°C , 1.5 小时。

首先用 20 ml 的 PBS (4°C) 洗涤 RPMI 8866 细胞[一种表达 $\alpha 4 \beta 7$ (而不是 $\alpha 4 \beta 1$) 的人 B 淋巴细胞 (Erle,D.J,et al,J, Immunol,153:517(1994); 由 Erle 博士赠送)], 重溶于 PBS 浓度成为 4.0×10^6 cells/ml。BCECF (2',7'-双-(2-羧乙基)-5-(和 6)-羧基荧光素, 乙酰氧基酯; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 溶解于 DMSO 成 50 $\mu\text{g/ml}$, 再加入到细胞悬液中, 最终稀释度为 1: 500, 37°C 温育 30min 后, 用检测缓冲液洗涤细胞 (HBSS 和 2% 小牛血清, 25 mM HEPES, 青霉素/链霉素, PH7.2), 在 V 形底 96 孔板的每一个孔中加入 50,000 个细胞。细胞再溶解于 100 μl 下列物质之一: (a) 鼠 Act-1; (b) 鼠 IgG1(Sigma Chemical, Co.,St,Louis,MO); (c) LDP-02/3A9/Lot#1; (d) 人 IgG1(Sigma Chemical Co., st, Louis ,MO), 浓度为 15.0-0.00075 $\mu\text{g/ml}$ 在检测缓冲液中, 室温下温育 10min。洗涤外覆 MAdCAM-1 的板, 除去封闭缓冲液, 将这些荧光标记的 RPMI 8866 细胞加到每个孔中。板置于 40RPM 的平板振荡器上 (New Brunswick, Scientific Co., Inc, Edison ,NJ), 室温下 30min, 用铝箔包裹。未被结合的细胞通过一次洗涤便可除去, 接下来, 在荧光聚焦分析仪上 (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME) 测量荧光强度 (485 nm 激发, 535 nm 读数)。通过公式, 根据相对荧光单位计算出每孔中结合细胞的百分比。

$$\text{结合细胞}\% = (\text{洗涤前 RFU} / \text{洗涤后 RFU}) \times 100$$

LDP-02 和鼠 Act-1 都以一种剂量依赖性方式抑制 RPMI 8866 细胞对人 MAdCAM 的粘附 (图 18A-18B)。半抑制粘附浓度 (IC_{50}) 相对类似于鼠 Act-1 的 (0.0018 $\mu\text{g/ml}$) 和 LDP-02 的 (0.0014 $\mu\text{g/ml}$), 因此, LDP-02 起码和鼠 Act-1 一样能够抑制 $\alpha 4 \beta 7$ 介导的对 MAdCAM-1 的粘附。

实施例 5 额外的人化抗体

如上所述，实施例 2 中的改型抗体的多个变种能够提高其亲合性和/或降低抗原性。这样的构建物包括但不限于下列一种或一种以上的突变：轻链的 M4V 的突变，重链的 R38K 突变，重链 A40R 突变，重链 I73T 回复突变。突变可以是单个发生（例如，一条链上一个突变），也可以是联合发生。

例如，图 19 所示的是用改型抗体（在实施例 2 中设计的）或用在轻链上有一个额外突变（MV4）和在重链上有两个额外突变（R38K，A40R）的衍生体对 HuT78 染色的结果。这两种抗体有相似的染色模式（图 19）。根据实验手册用转化子位点直接突变试剂盒（Clontech）改变核苷酸序列，从而形成突变。用克隆到 pCR-Script™ 的可变区片段制造出在重链和轻链可变区都有突变。顺式寡核苷酸 ScaI/Stu I(Clontech)用于顺式寡聚核苷酸。突变寡聚核苷酸（SEQ ID NO: 38-40）的序列如下：

H/R38K （SEQ ID NO: 38）

5'-C TGG CCA ACG

H/I73T (SEQ ID NO: 39)

5'-CAC ATT GAC TGT AGA CAC TTC CGC TAG CAC AGC C

L/M4V (SEQ ID NO: 40)

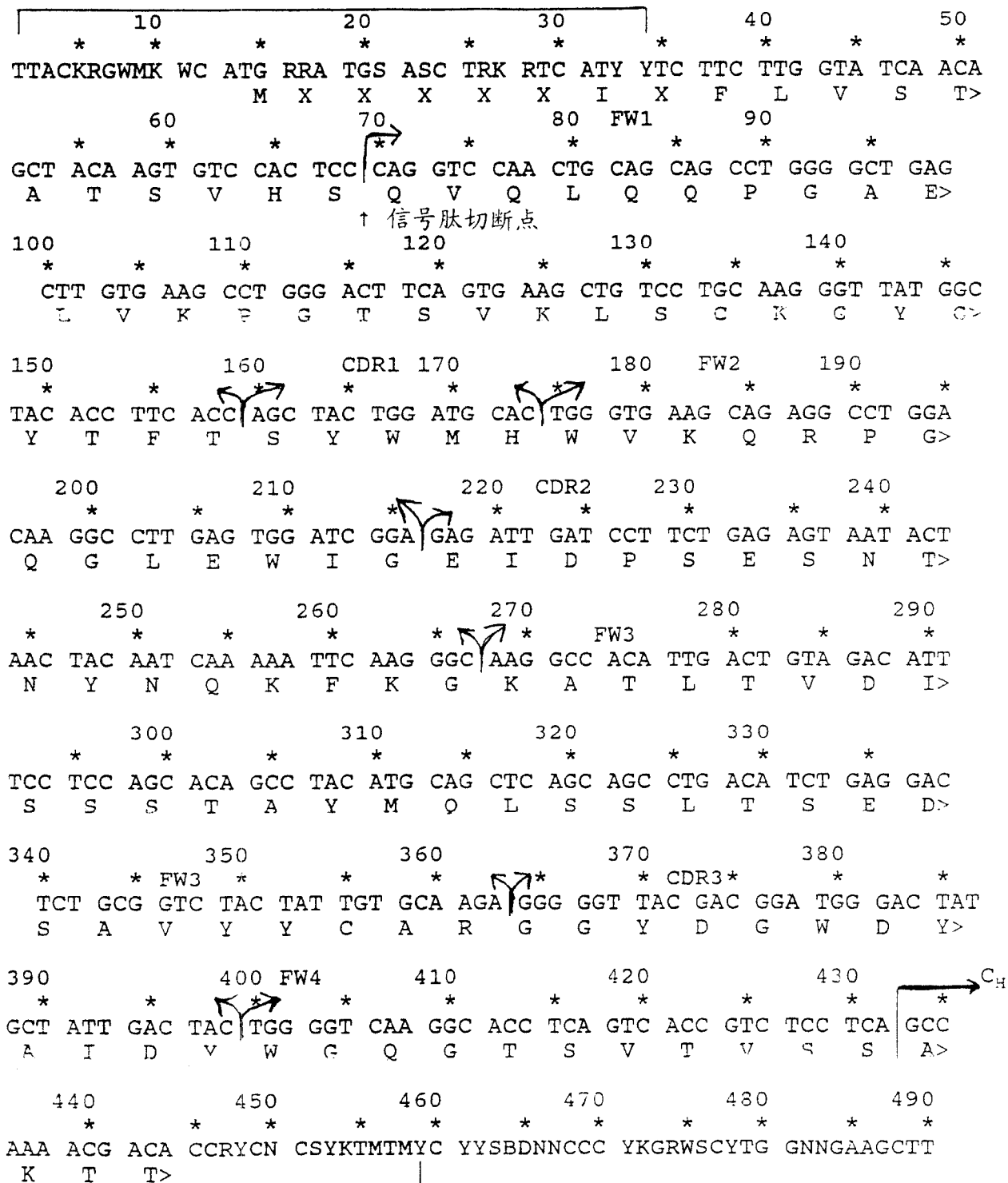
5'-CCG GAG GTG ATG TTG TGG TGA CTC

对于其他的操作，包括亚克隆到表达载体 pEE6hcMV-B 和 pEE12，构建包含重链和轻链基因的表达质粒等，都如对主要的改型抗体的描述。瞬间转染和细胞染色也都如对主要的改型抗体的描述。

等同原则

本领域的技术人员们都知道或者都能够肯定，使用不超过常规的实验方法，都可以获得本发明的许多其他等价方案。这些等价也能够达到本项发明同样的效果，这些等价方法也被包括在下面的权利要求中。

5'引物区



3'引物区

GGGA

图 1

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
TTACTTGACG ACTCGGG ATG GGA TGG AGC TAT ATC ATC TTC TTC TTG GTA TCA
      M   G   W   S   Y   I   I   F   F   L   V   S>

      60      70      80      90      100
      *      *      *      *      *
ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT
      T   A   T   S   V   H   S   Q   V   Q   L   Q   Q   P   G   A>

      110     120     130     140
      *      *      *      *
GAG CTT GTG AAG CCT GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GGT TAT
      E   L   V   K   P   G   T   S   V   K   L   S   C   K   G   Y>

150      160      170      180      190
      *      *      *      *      *
GGC TAC ACC TTC ACC AGC TAC TGG ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT
      G   Y   T   F   T   S   Y   W   M   H   W   V   K   Q   R   P>

      200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
GGA CAA GGC CTT GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT
      G   Q   G   L   E   W   I   G   E   I   D   P   S   E   S   N>

      250     260     270     280     290
      *      *      *      *      *
ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC
      T   N   Y   N   Q   K   F   K   G   K   A   T   L   T   V   D>

      300     310     320     330     340
      *      *      *      *      *
ATT TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG
      I   S   S   S   T   A   Y   M   Q   L   S   S   S   L   T   S   E>

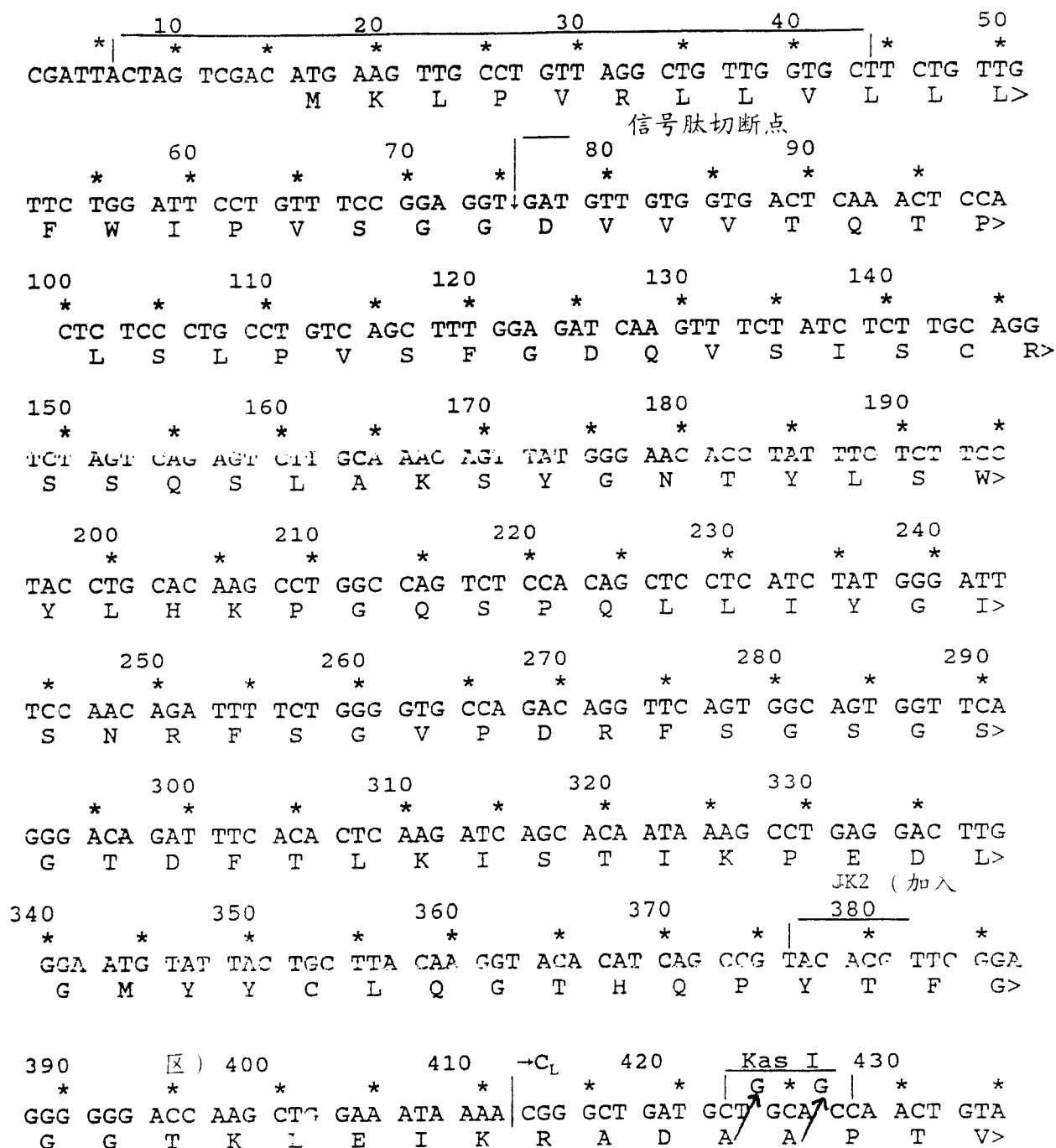
      350     360     370     380
      *      *      *      *
GAC TCT GCG GTC TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC
      D   S   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   Y   D   G   W   D>

390      400      410      420
      *      *      *      *
TAT GCT ATT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACA TCA GTC ACC
      Y   A   I   D   Y   W   G   Q   G   T   S   V   T>

```

图 2

5'引物区



3'引物区

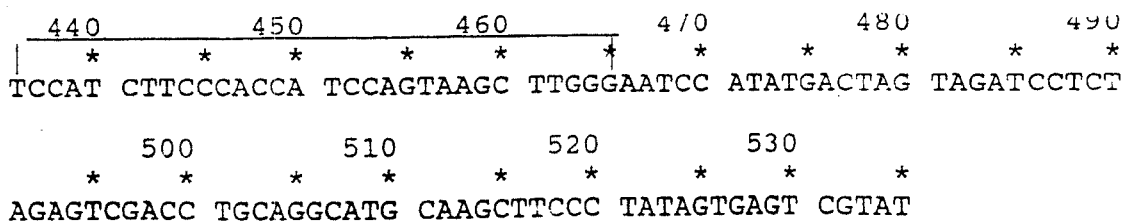


图 3

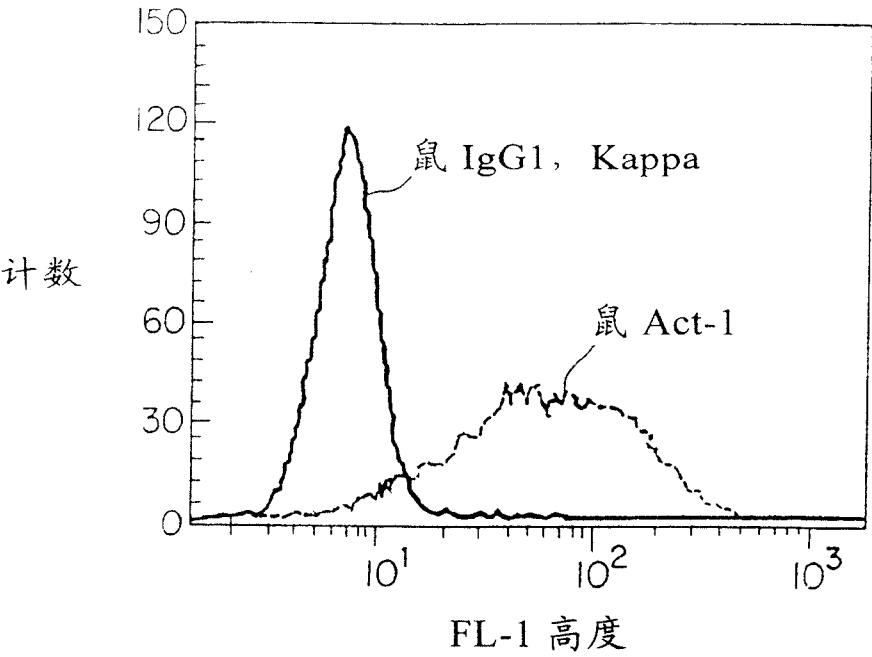


图 4A

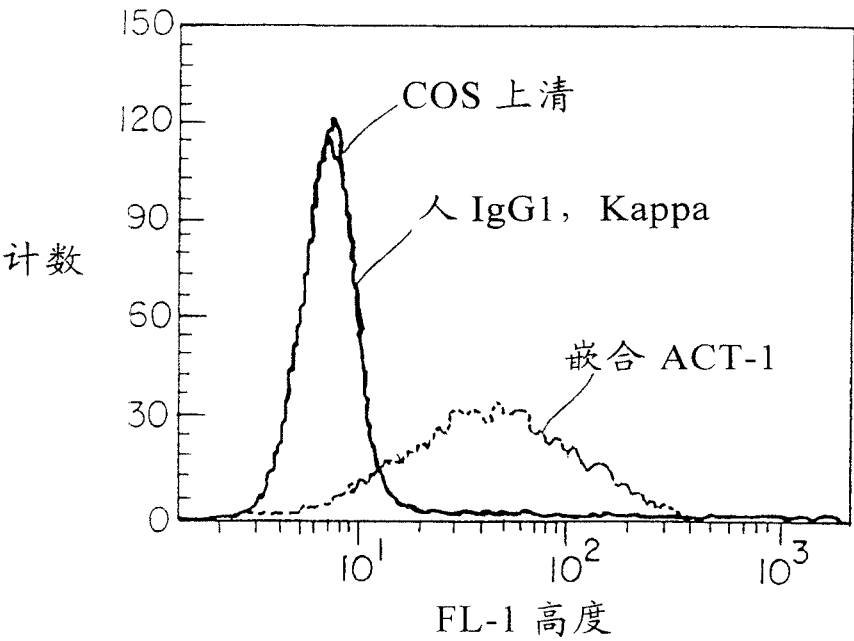


图 4B

百分相似: 82.143 百分相同: 71.429

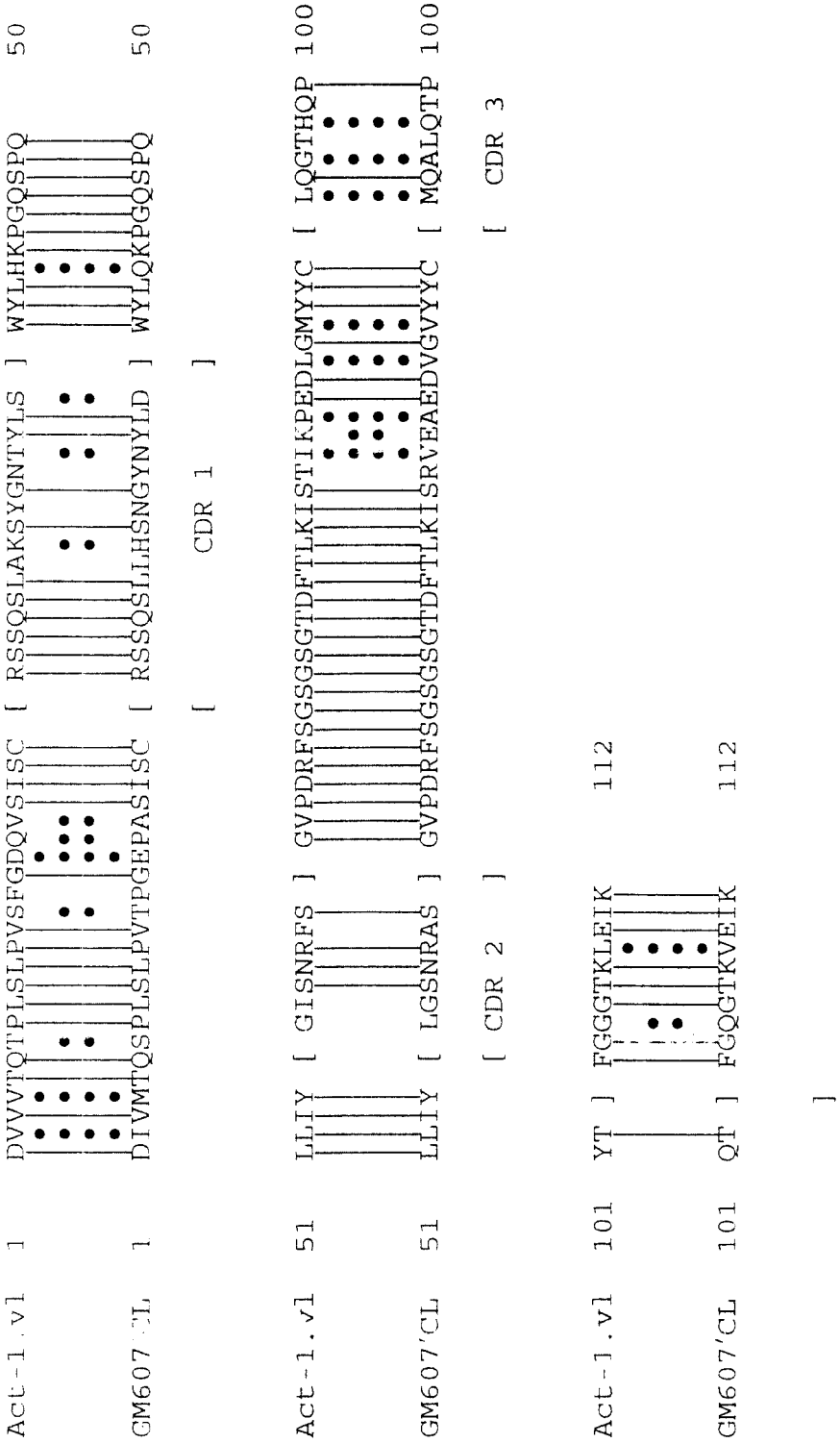


图 5

百分相似: 82.353 百分相同: 68.067

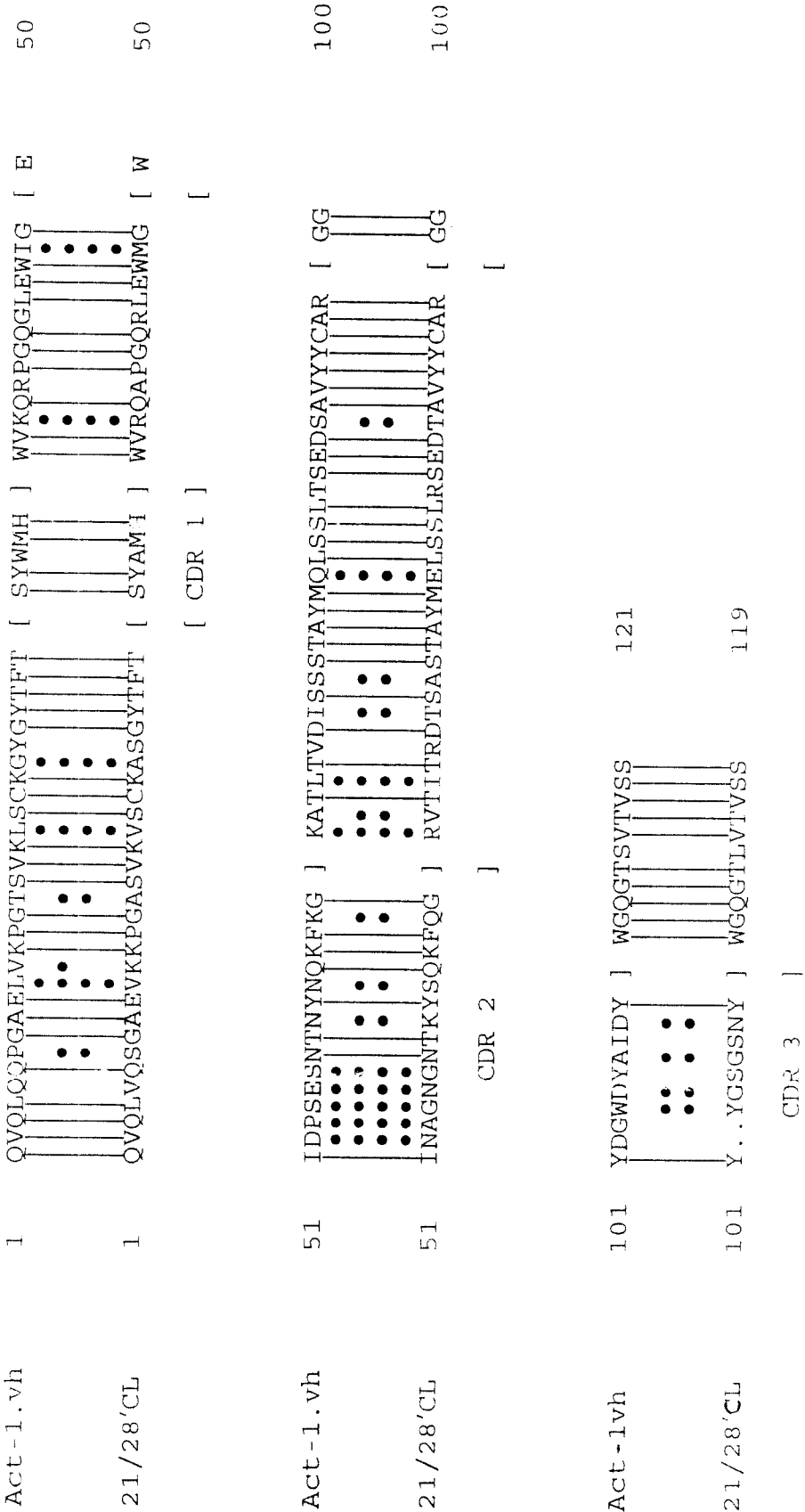


图 6

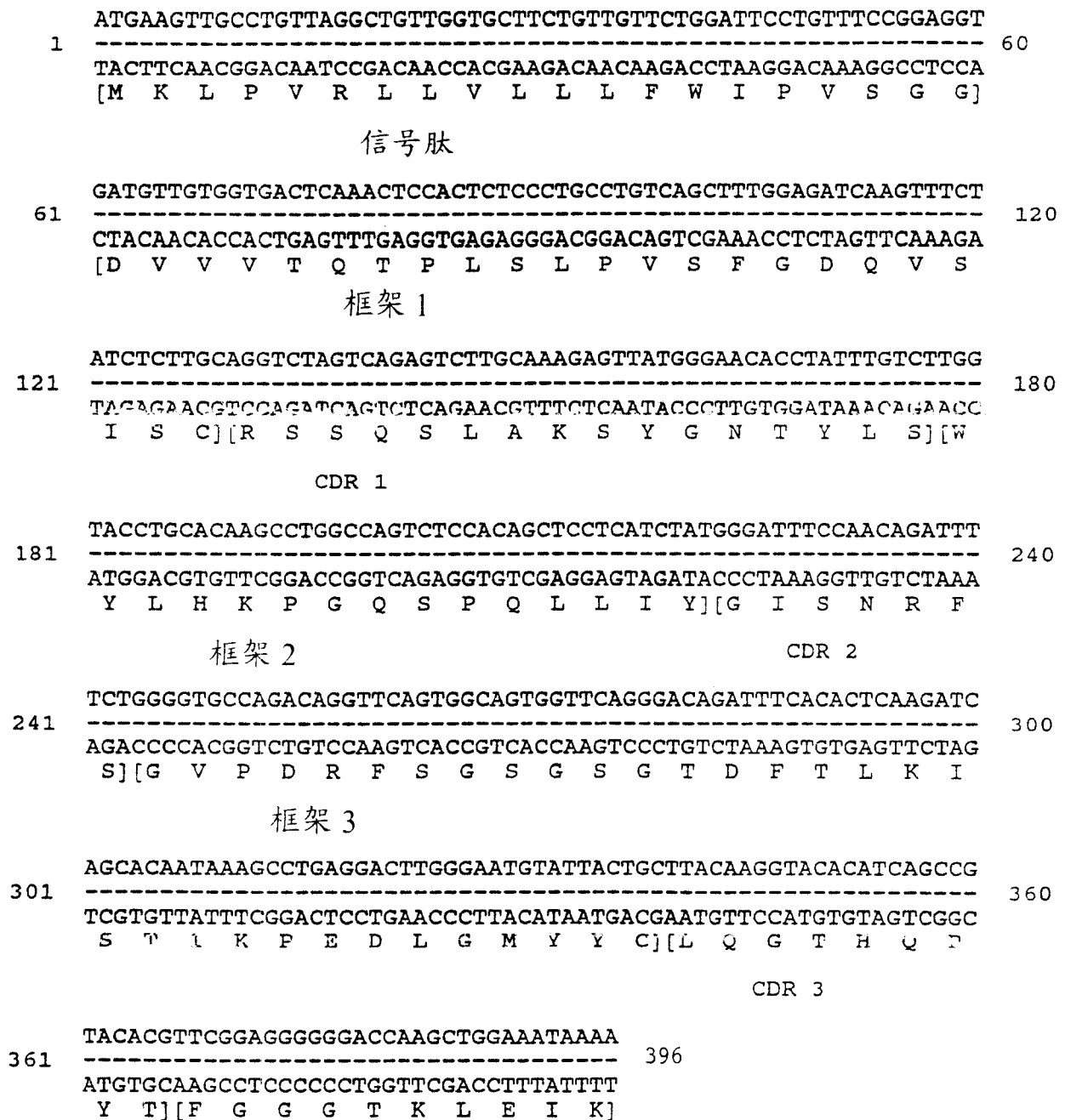


图 7

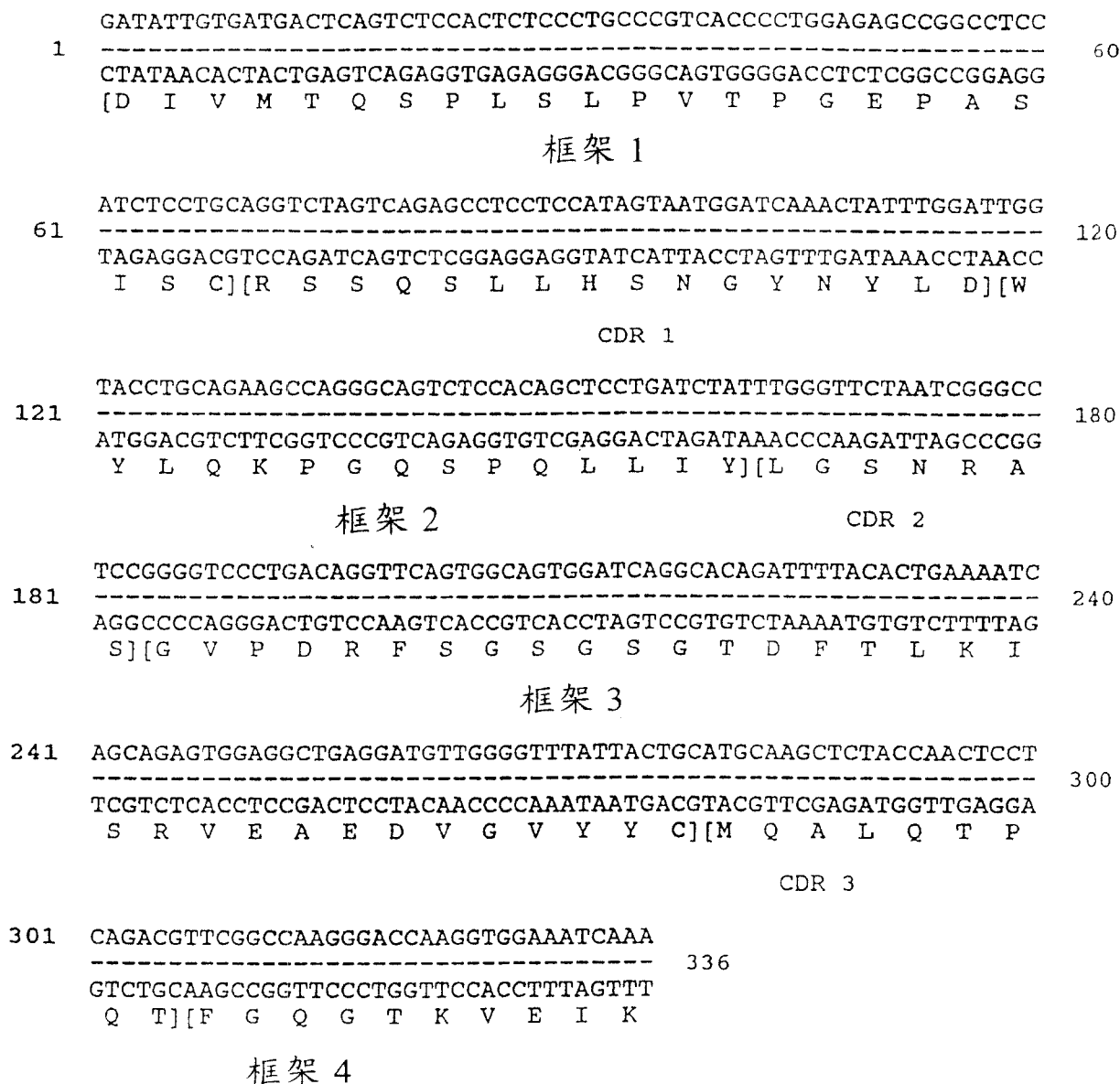


图 8

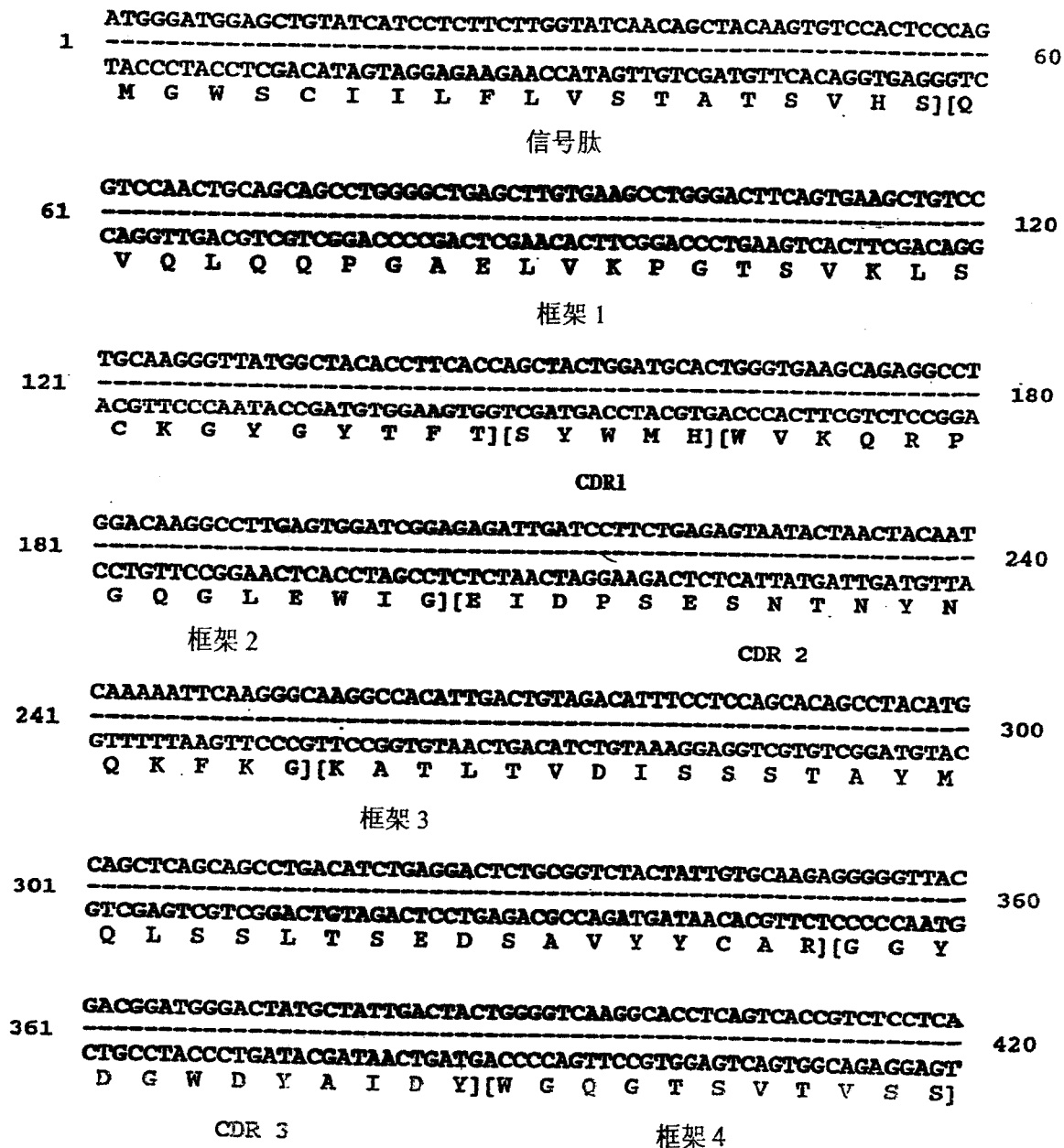


图 9

冬 10

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT
M   K   C   T   W   V   I   L   F   L   V   S   T   A   T   S>
      *      *      *      *
      50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG
V   H   S   Q   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K>
      *      *      *      *      *
      100     110     120     130     140
      *      *      *      *      *
CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC
P   G   A   S   V   K   V   S   C   K   G   S   G   Y   T   F>
      *      *      *      *      *
      150     160     170     180     190
      *      *      *      *      *
ACC AGC TAC TGG ATG CAT TGG GTG AGG CAG GCG CCT GGC CAA CGT CTA
T   S   V   W   M   H   W   V   R   Q   A   P   G   Q   R   L>
      *      *      *      *      *
      200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *
GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT
E   W   I   G   E   I   D   P   S   E   S   N   T   N   Y   N>
      *      *      *      *      *
      250     260     270     280     290
      *      *      *      *      *
CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC ACA TTG ACT GTA GAC ATT TCC GCT AGC
Q   K   F   K   G   R   V   T   L   T   V   D   I   S   A   S>
      *      *      *      *      *
      300     310     320     330
      *      *      *      *
ACA GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACT GCG GTC
T   A   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T   A   V>
      *      *      *      *      *
      340     350     360     370     380
      *      *      *      *      *
TAC TAT TGT GCA AGA GGG GGT TAC GAC GGA TGG GAC TAT GCT ATT GAC
Y   Y   C   A   R   G   G   Y   D   G   W   D   Y   A   I   D>
      *      *      *      *      *
      390     400     410     420     430
      *      *      *      *      *
TAC TGG GGT CAA GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG
Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K>
      *      *      *      *      *
      440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *
GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG
G   P   S   V   F   P   L   A   P   S   S   K   S   T   S   G>
      *      *      *      *      *
      490     500     510     520
      *      *      *      *
GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG
G   T   A   A   L   G   C   L   V   K   D   Y   F   P   E   P>
      *      *      *
      530     540
      *      *      *
GTG ACG GTG TCG
V   T   V   S>

```

信号肽切断点

Xba I

Nhe I

BstE II

恒定

region

*Age I

图 11

```

      10      20      30      40
      *      *      *      *
ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT CCT
M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  L  L  F  W  I  P>
      50      60      70      80      90
      *      *      *      *      *
GTT TCC GGA GGT GAT GTT GTG ATG ACT CAA AGT CCA CTC TCC CTG CCT
V  S  G  G  D  V  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P>
      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *
GTC ACC CCT GGA GAA CCA GCT TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT
V  T  P  G  E  P  A  S  I  S  C  R  S  S  Q  S>
      150      160      170      180 Asp 718 190
      *      *      *      *      *
CTT GCA AAG AGT TAT GGG AAC ACC TAT TTG TCT TGG TAC CTG CAG AAG
L  A  K  S  Y  G  N  T  Y  L  S  W  Y  L  Q  K>
      200      210      220      230      240
      *      *      *      *      *
CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT
P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  G  I  S  N  R  F>
      250      260      270      280
      *      *      *      *
TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F>
      290      300 NruI      310      320      330
      *      *      *      *      *
ACA CTC AAG ATC TCG CGA GTA GAG GCT GAG GAC GTG GGA GTG TAT TAC
T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y>
      340      350      360      370      380
      *      *      *      *      *
TGC TTA CAA CCT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA CAG GGG ACC AAC
C  L  Q  G  T  H  Q  P  Y  T  F  G  Q  G  T  K>
      390      400      410 Kas I
      *      *      *      *
GTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCG GCG CC
V  E  I  K  F  A  D  A  A  P>

```

信号肽切断点

图 12

轻链寡核苷酸：	双链片段	
L1 5'- TTT CCG GAG GTG ATG TTG TGA TGA CTC AAA GTC CAC TCT CCC TGC CTG TCA CCC CTG GAG AAC CAG CTT CTA TCT CTT GCA GGT CTA GTC AGA G		LA
L2 5'- ACT GGC CAG GCT TCT GCA GGT ACC AAG ACA AAT AGG TGT TCC CAT AAC TCT TTG CAA GAC TCT GAC TAG ACC TGC AAG AGA TAG AAG CTG GTT C		
L3 5'- CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGT TC		LB
L4 5'- ACT CGC GAG ATC TTG AGT GTG AAA TCT GTC CCT GAA CCA CTG CCA CTG AAC CTG TCT GGC ACC CCA GAA AAT CTG TTG GAA ATC		
L5 5'- TCT CGC GAG TAG AGG CTG AGG ACG TGG GAG TGT ATT ACT GCT TAC AAG GTA CAC ATC AGC CGT ACA C		LC
L6 5'- ATG GCG CCG CAT CAG CCC GTT TTA TTT CCA CCT TGG TCC CCT GTC CGA ACG TGT ACG GCT GAT GTG TAC CTT GTA AGC AGT AAT AC		
重链寡核苷酸	双链片段	
H1 5'- ATA AGC TTC GCC ATG AAA TGC ACC TGG GTC ATT CTC TTC TTG GTA TCA ACA GCT ACA AGT GTC CAC TCC CAG GTC CAA CTA GTG CAC CGG TTA		HA
H2 5'- TAA CCG GTG CAC TAG TTG GAC CTG GGA GTG GAC ACT TGT AGC TGT TGA TAC CAA GAA GAG AAT GAC CCA GGT GCA TTT CAT GGC GAA GCT TAT		
H3 5'- CAA CTA GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTT AAG AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG GTG TCC TGC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTC ACC AGC		HB
H4 5'- TAA CCG GTA CTC TAG ACG TTG GCC AGG CGC CTG CCT CAC CCA ATG CAT CCA GTA GCT GGT GAA GGT GTA GCC AGA ACC CTT GCA GGA C		
H5 5'- CGT CTA GAG TGG ATC GGA GAG ATT GAT CCT TCT GAG AGT AAT ACT AAC TAC AAT CAA AAA TTC AAG GGA CGC GTC A		HC
H6 5'- TAA CCG GTG TGC TAG CGG AAA TGT CTA CAG TCA ATG TGA CGC GTC CCT TGA ATT TTT GAT TGT AGT TAG TAT TAC T		
H7 5'- CCG CTA GCA CAG CCT ACA TGG AGC TCA GCA GCC TGA GAT CTG AGG ACA CTG CGG TCT ACT ATT GTG CAA GAG GGG GTT ACG ACG GAT G		HD
H8 5'- TCA CCG GTG CGG TGA CCA GGG TGC CTT GAC CCC AGT AGT CAA TAG CAT AGT CCC ATC CGT CGT AAC CCC CTC TTG CAC AAT AGT AGA C		
H9 5'- CTG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA G		HE
H10 5'- TCA CCG GTT CGG GGA AGT AGT CCT TGA CCA GGC AGC CCA GGG CCG CTG TGC CCC CAG AGG TGC TCT TGG AGG AGG GTG CCA GGG G		

图 13

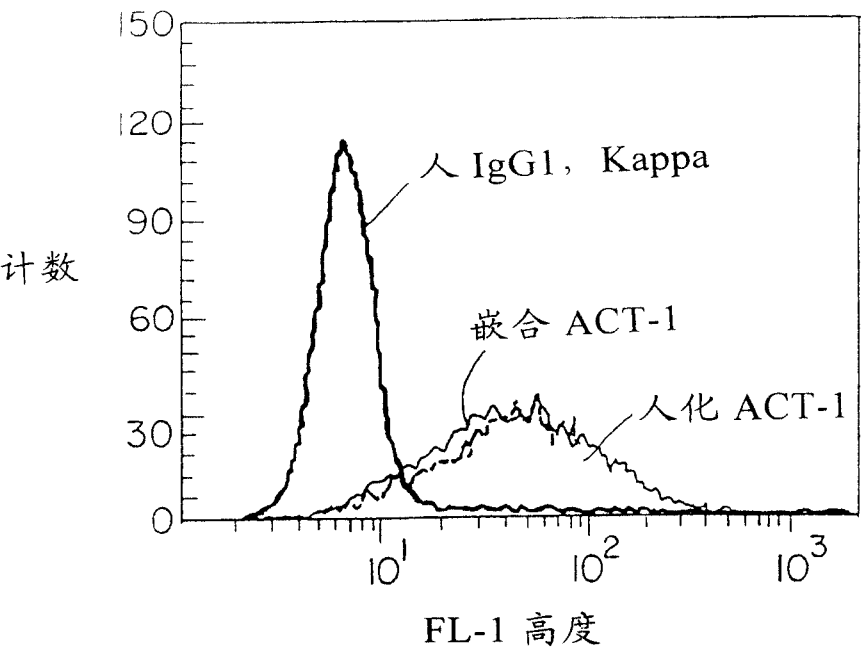


图 14

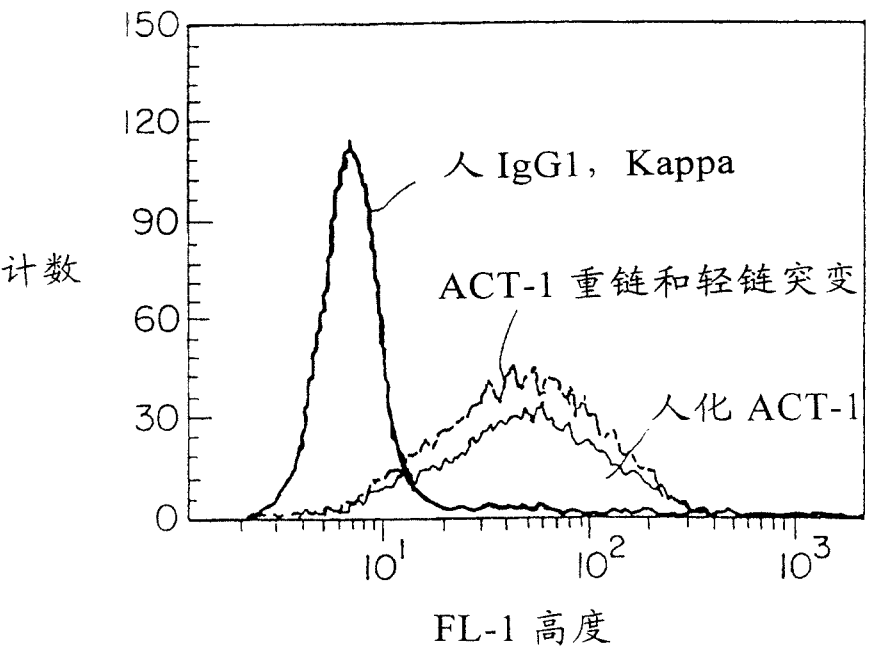


图 19

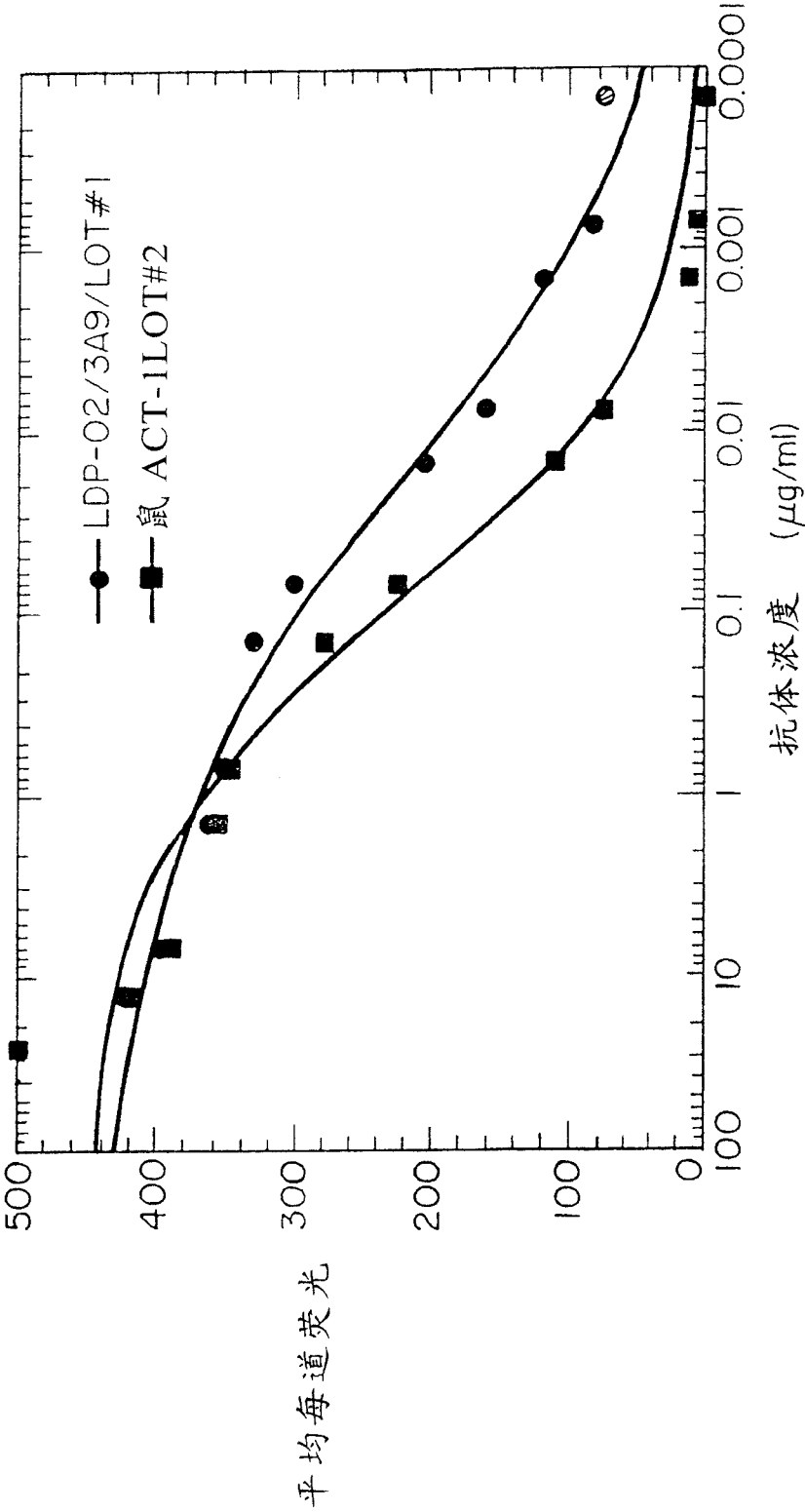


图 15

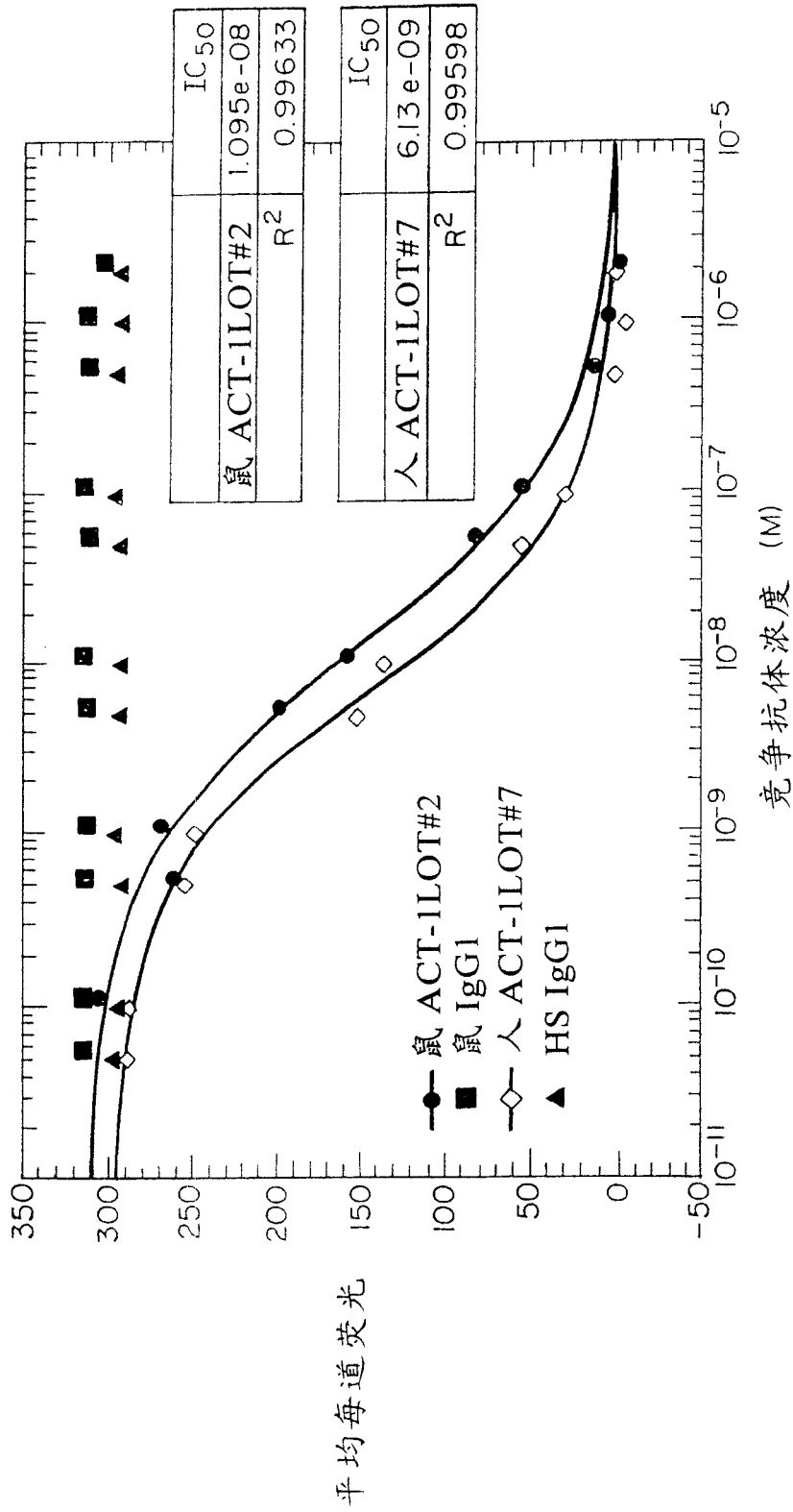


图 16

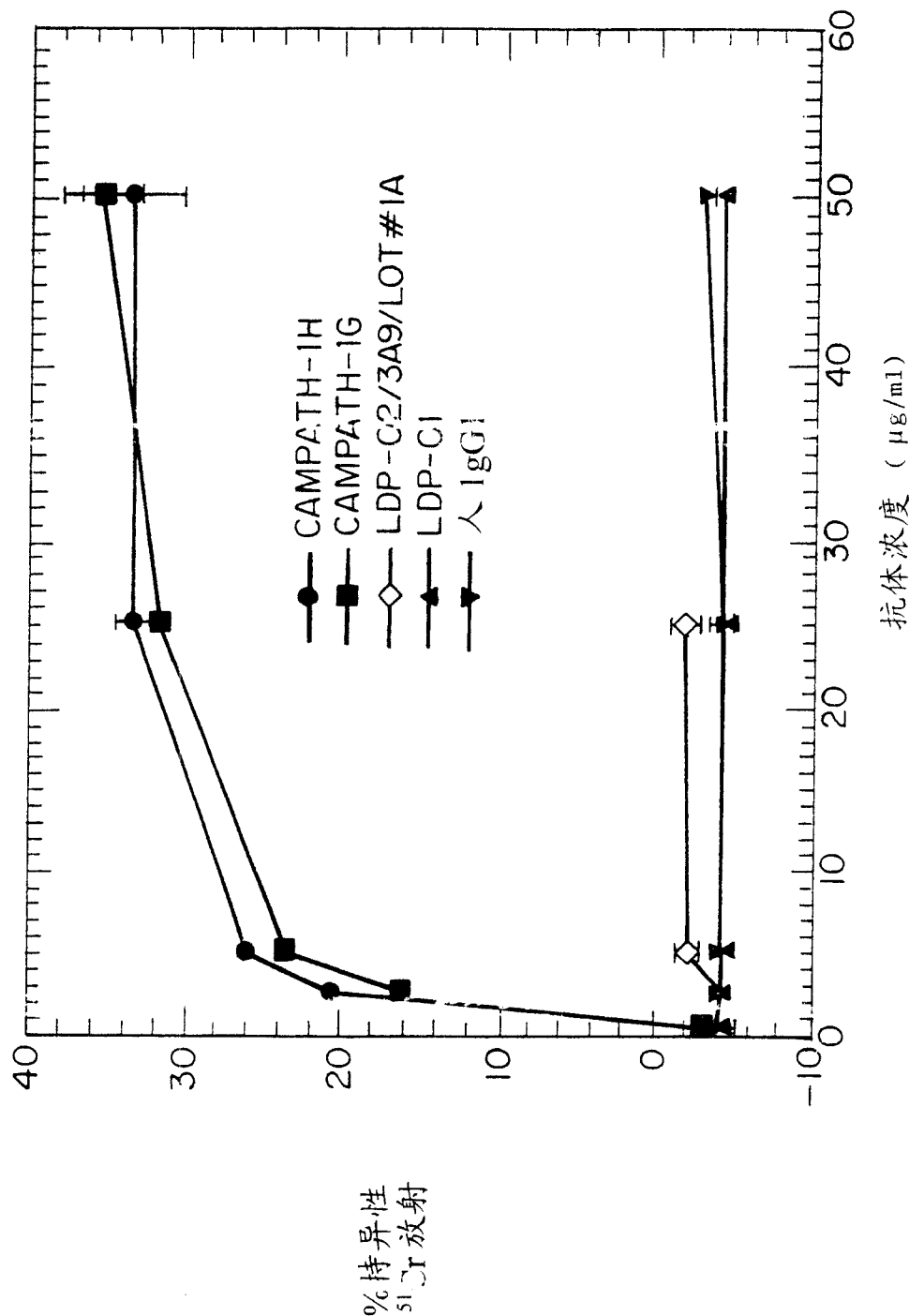


图 17

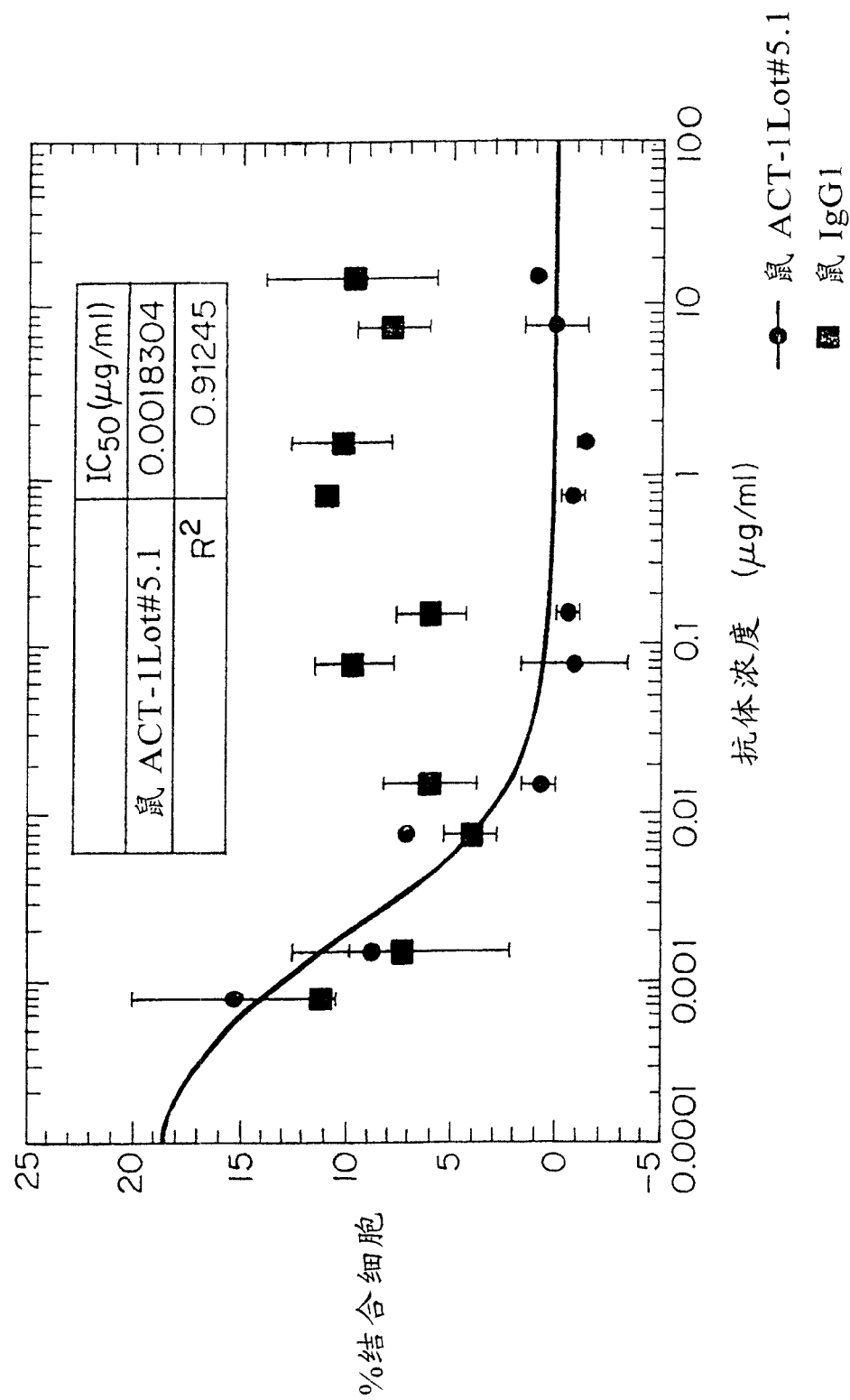


图 18A

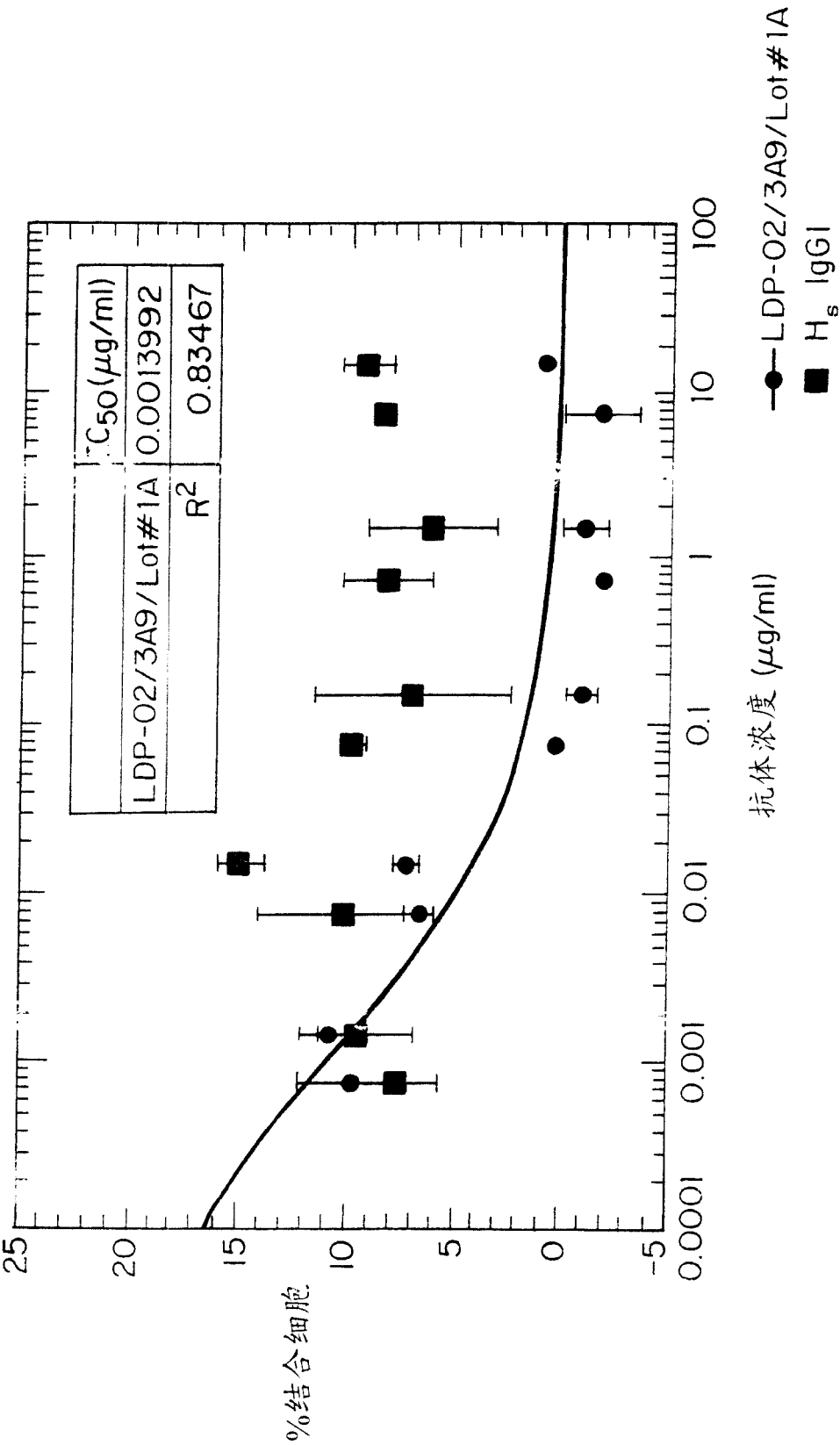


图 18B