

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98808431.7

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 6 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1260357C

[22] 申请日 1998.6.30 [21] 申请号 98808431.7

[30] 优先权

[32] 1997. 7. 2 [33] US [31] 08/887,352

[86] 国际申请 PCT/US1998/013410 1998.6.30

[87] 国际公布 WO1999/001556 英 1999.1.14

[85] 进入国家阶段日期 2000.2.22

[71] 专利权人 基因技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 H·B·洛曼 L·G·普雷斯塔

P·M·雅迪厄 J·洛

审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陈文青

权利要求书 3 页 说明书 116 页 附图 20 页

[54] 发明名称

改进的抗 IgE 抗体以及改进多肽的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种通过多步组合来调节多肽对靶分子亲和力的方法，该方法包括下列步骤：(1) 鉴定倾向于异构化的天冬氨酰基残基；(2) 以替换残基替代和筛选所得突变体对靶分子的亲和力。在一个较佳的实例中，替代残基的方法是用噬菌体展示的亲和力成熟法 (AMPD)。在另一个较佳的实例中，多肽是抗体，靶分子是抗原。在另一个较佳的实例中，抗体是抗 IgE，靶分子是 IgE。在另一个实例中，本发明涉及具有对 IgE 亲和力有所改进的抗 IgE 抗体。

(E25) - 链

DIQTLQIPES LAAVQVQVPT ITCRAHQVQ VQGVQVQVQV QVQVQVQV LIAVQVQV QVQVQVQV
KQVQVQVQV LIAVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV
QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV
QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV

(E26) - 链

EVQVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV

(E26) - 链

DIQTLQIPES LAAVQVQVPT ITCRAHQVQ VQGVQVQVQV QVQVQVQV LIAVQVQV QVQVQVQV
KQVQVQVQV LIAVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV
QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV
QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV

(E26) - 链

EVQVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV

(E27) - 链

DIQTLQIPES LAAVQVQVPT ITCRAHQVQ VQGVQVQVQV QVQVQVQV LIAVQVQV QVQVQVQV
KQVQVQVQV LIAVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV
QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV
QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV QVQVQVQV

(E27) - 链

EVQVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV
LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV LAAVQVQVQV

1. 一种制备经修饰多肽的方法，该多肽是抗 IgE 抗体，它不表现出天冬氨酰基异构化灭活，它对 IgE 靶分子有亲和力，该亲和力等于或大于未修饰的多肽，该方法包括下列步骤：

5 a) 鉴定所述多肽中倾向于异构化的天冬氨酰基残基，

b) 通过在编码所述多肽的基因中进行一个或多个密码子的取代、缺失或插入使多肽的氨基酸序列变化，用替换残基替代步骤 a) 中鉴定的天冬氨酰基残基，以制得一个结构上相关的多肽与噬菌体包被蛋白融合的文库，在含编码该多肽的 DNA 的噬菌体颗粒表面上展示各相关多肽的单拷贝，通过噬菌体展示用亲和力成熟来筛选每个多肽对靶分子的亲和力，和

10 c) 筛选天冬氨酰基残基已经改变且对靶分子的亲和力等于或高于未修饰多肽的已修饰多肽。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中未修饰的多肽是具有 SEQ ID NO: 13 和 14 所示的“e25”的轻链和重链的抗体。

15 3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中替换残基是轻链可变区 CDR1 残基 Asp32Glu, Gln27Lys 和 Ser28Pro。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中还包括其它替换残基，这些替换残基是重链可变区 CDR2 残基 Thr53Lys, Asp55Ser, Ser57Glu 和 Asn59Lys。

20 5. 一种经修饰的抗体，该抗体具有提高的抑制豚草诱导组胺释放的性能，该抗体是对未修饰的抗体采用权利要求 1 的方法而得到的。

6. 一种抗体分子，它包含 SEQ ID NO: 19 和 20 所示的“e26”的轻链序列和重链序列。

7. 一种 e26 抗体分子片段，它选自 SEQ ID NO: 19-20 所示的 F(ab) 片段、SEQ ID NO: 22 所示的 sFv 片段或 SEQ ID NO: 24-25 所示的 F(ab')₂。

25 8. 一种抗体分子，它包含 SEQ ID NO: 19 和 21 所示的“e27”的轻链序列和重链序列。

9. 一种 e27 抗体分子片段，它选自 SEQ ID NO: 19 和 21 所示的 F(ab) 片段、SEQ ID NO: 23 所示的 sFv 片段或 SEQ ID NO: 24 和 26 所示的 F(ab')₂。

10. 一种核酸分子，它包含编码 SEQ ID NO: 19 和 20 的“e26”序列的 DNA 序列。

30 11. 一种核酸分子，它编码选自 SEQ ID NO: 19-20 所示的 F(ab) 片段、SEQ ID NO: 22 所示的 sFv 片段或 SEQ ID NO: 24-25 所示的 F(ab')₂ 的 e26 抗体片段。

12. 一种核酸分子，它包含编码 SEQ ID NO: 19 和 21 的“e27”序列的 DNA 序

列。

13. 一种核酸分子，它编码选自 SEQ ID NO: 19 和 21 所示的 F(ab)、SEQ ID NO: 23 所示的 sFv 或 SEQ ID NO: 24 和 26 所示的 F(ab')₂ 的 e27 抗体片段。

14. 一种组合物，它包含药学上可接受的赋形剂和权利要求 6 或 8 所述的抗体分子或权利要求 7 或 9 所述的抗体片段分子。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物，它包含权利要求 6 所述的抗体分子。

16. 根据权利要求 14 所述的组合物，它包含权利要求 7 所述的抗体片段分子。

17. 根据权利要求 14 所述的组合物，它包含权利要求 8 所述的抗体分子。

18. 根据权利要求 14 所述的组合物，它包含权利要求 9 所述的抗体片段分子。

19. 权利要求 6 或 8 所述的抗体分子或权利要求 7 或 9 所述的抗体片段分子在制备用于减少或防止哺乳动物体内 IgE 介导产生组胺的药物中的用途。

20. 根据权利要求 19 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 6 所述的抗体分子。

21. 根据权利要求 19 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 7 所述的抗体片段分子。

22. 根据权利要求 19 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 8 所述的抗体分子。

23. 根据权利要求 19 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 9 所述的抗体片段分子。

24. 权利要求 6 或 8 所述的抗体分子或权利要求 7 或 9 所述的抗体片段分子在制备用于治疗 IgE 所介导的疾病的药物中的用途。

25. 根据权利要求 24 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 6 所述的抗体分子。

26. 根据权利要求 24 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 7 所述的抗体片段分子。

27. 根据权利要求 24 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 8 所述的抗体分子。

28. 根据权利要求 24 所述的用途，其中所述抗体分子为权利要求 9 所述的抗体片段分子。

29. 根据权利要求 24 所述的用途，所述疾病是变应性哮喘。

30. 根据权利要求 24 所述的用途，所述疾病是变应性关节炎。

31. 根据权利要求 24 所述的用途，所述疾病是食物过敏。

32. 根据权利要求 24 所述的用途，其中疾病是过敏反应。

改进的抗 IgE 抗体以及改进多肽的方法

5

发明背景

本发明设计免疫球蛋白 E(IgE)、IgE 拮抗剂、能结合人 IgE 的抗 IgE 抗体，以及一种改进多肽(包括抗 IgE 抗体)的方法。

10 IgE 是介导变应性应答(如广泛遭受的哮喘、食物过敏、I 型超敏反应和家族性(familiar)鼻炎)的免疫球蛋白家族中的一个成员。IgE 由 B 细胞或 B 淋巴细胞分泌并表达在细胞表面。IgE 通过其针对低亲和力 IgE 受体(称为 FcεRII)的 Fc 区域结合 B 细胞(以及单核细胞、嗜酸性粒细胞和血小板)。在哺乳动物接触变应原时，携带对抗原特异性的、表面结合的 IgE 抗体的 B 细胞被“激活”并发育成分泌 IgE 的浆细胞。然后，产生的变应原特异性的 IgE 通过血液循环，通过高亲和力受体(也称为 FcεRI)

15 结合到组织中肥大细胞以及血液中的嗜碱性粒细胞的表面上。从而，使肥大细胞和嗜碱性粒细胞对变应原致敏。随后与变应原的接触引起嗜碱性粒细胞和肥大细胞的 FcεRI 交联，从而导致释放出引起临床超敏反应和过敏症状的组胺、白细胞三烯和血小板激活因子、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞趋化因子和细胞因子 IL-3、IL-4、IL-5 和 GM-CSF。

20 病理学超敏症状的特征是，如果存在相当大量的变应原或如果体液和细胞免疫状态处于增强水平，对变应原的过度免疫应答将导致大量组织变化。

过敏性超敏反应的生理性变化可以包括肺细支气管和支气管强烈收缩、平滑肌收缩和毛细血管扩张。然而，该病征的诱因似乎是遗传因素和环境因素之间的相互作用而引起的。诱导过敏性超敏反应的常见环境性变应原见于花粉、食物、屋尘螨、

25 动物毛发皮屑、真菌孢子和昆虫毒液。特应性变应原与过敏性超敏反应有关，并诱导了诸如哮喘、变应性关节炎和结膜炎(枯草热)、湿疹、荨麻疹和食物过敏。然而，昆虫叮咬或非肠胃道药物治疗(parental medication)通常会激发过敏性休克，一种威胁生命的有害的过敏性反应。

最近，对 I 型超敏反应或过敏性超敏反应已经获得一种治疗方案，它试图阻断 IgE

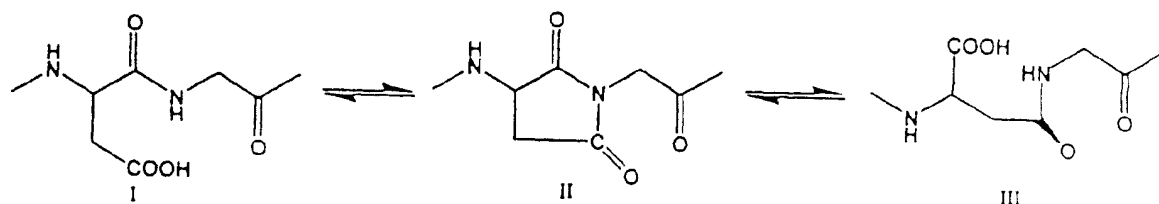
30 与嗜碱性粒细胞以及肥大细胞上发现的高亲和力受体(FcεRI)结合，从而防止组胺和其它过敏性因子的释放而导致产生病理状态。

1993 年 3 月 4 日公开的 WO93/04173 描述了人 IgE/IgG1 嵌合体，其中 IgG 1 残基被类似的 IgE 残基替代。申请人的待批申请 USSN 08/405,617 描述了人源化的抗 IgE

抗体, 其中用针对人 IgE 的鼠抗体(MaE11)来提供 CDR 区域代替到 IgG 1 免疫球蛋白框架(rhuMaE25)内。Reichman, L.等人(1988)Nature 332:323 和 Jones, P.T.等人(1986), Nature 321:522 中描述了人源化技术。

5 尽管已经建立了人源化的鼠抗体来提供抗 IgE 分子(它提供了与鼠 MaE11 相似的对 IgE 的亲和力, 而后者不会引发免疫原性应答(Shields 等人, (1995), Int. Arch. Allergy Immunol. 107:308-312)), 然而这仍然没有构建出对 IgE 的亲和力明确优于 MaE11 或鼠抗 IgE 的抗 IgE。

重组单克隆抗体将经历影响所有多肽或蛋白的降解反应, 例如天冬氨酸和天冬酰胺残基的异构化。如下图 A 所示, -Asp-Gly-序列中的天冬氨酸残基(I)能通过环状酰亚胺中间产物(II)异构化成异天冬氨酸(III)(Geiger & Clarke, J. Biol. Chem. 262:785-794(1987))。天冬氨酸(I)的羧酸侧链和毗邻甘氨酸的酰胺氮反应, 形成环状的天冬氨酸中间物(II), 进而形成-异天冬氨酸-甘氨酸-残基(III)。该反应的平衡、速率以及 pH 依赖性已经在通过反向高效液相层析分离的模型肽中进行了研究(Oliyai & Borchardt, Pharm Res. 10, 95-102(1993))。据信, 经历异构化作用的趋势还取决于含有-Asp-Gly-序列的分子部分的局部柔韧性(Geiger & Clarke, 同上)。



经历了天冬氨酸异构化的一种已知的抗体例子是称为 rhuMabE-25 的强效抗 IgE 抗体 E-25(E-25)。该行为可能自发产生, 也可以使 E25 于 37°C 培育 21 天来诱导产生。最后的结果是抗体多肽骨架中插入一个额外的甲基, 这能导致构型变化和结合亲和力减少。用带有 VL32-33 位的-c-Asp-Gly-以及-异-Asp-Gly-变体的 E-25 研究表明, 20 尽管用丙氨酸或甘氨酸替代残基 VL32 可以最大程度地减小异构化行为, 但是替代本身会导致结合力减少 3 倍。Cacia 等人, 同上。

因此, 迫切需要产生改进的多肽(包括抗体), 它不仅不表现出天冬氨酸异构化的“失活”行为, 而且应显示出与靶分子(例如抗原)的亲和力等于或大于未改进多肽 25 亲和力。

概述

本发明涉及通过多步组合来改进对靶分子有亲和力的多肽的方法, 该方法包括:
(1)鉴定易异构化的天冬氨酰残基; (2)用其它残基替代, 并筛选所产生的对靶分子有

亲和力的突变体。在一个较佳的实例中，替代残基的方法是用噬菌体展示亲和力成熟(affinity maturation)(AMPD)。在另一个较佳的实例中，多肽是抗体，靶分子是抗原。在另一个较佳的实例中，抗体是抗 IgE，靶分子是 IgE。

在还有一个更佳的实例中，本发明涉及一种改进抗 IgE 抗体 E-25 亲和力的方法，
5 该方法是用 Glu 取代 VL CDR-L1 残基 32Asp，以及将 VL CDR-L1 残基 27Gln, 28Ser 和 31Tyr 分别修饰成 Lys, Pro 和 Gly。在还有一个更佳的实例中，E-25 抗 IgE 抗体在 VH CDR2 残基中有额外的修饰：53Thr 变成 Lys, 55Asp 变成 Ser, 57Ser 变成 Glu，以及 59Asn 变成 Lys。

在另一个实例中，本发明涉及对 IgE 的亲和力有所改进的抗 IgE 抗体。

10 在一个较佳的实例中，抗 IgE 抗体包含重链和轻链残基，它们包含图 2 中标记为“e27”和“e26”的序列片段。或者，抗 IgE 抗体包含图 12 中标记为“E27”或“E26”的全长重链和轻链序列。

本发明还涉及一种具有药物用途的亲和力改进的抗 IgE 或其功能性片段的组合物。本发明还涉及包含亲和力改进的抗 IgE 抗体的产品。

15 在还有一个实例中，本发明涉及一种减少或抑制 IgE 介导组胺产生的方法。

在还有一个实例中，本发明还涉及一种治疗 IgE 介导疾病的方法，该方法是给予本发明的抗体或其功能性片段。

本发明的其它方面将从下列详细描述和权利要求中明显看出。

20 附图简述

图 1 是鼠抗体 MAE11、人重链亚型 III(humIII)以及轻链κ亚型 I(humκI)的共有序列以及片段 F(ab)-2(一种具有 CDR 残基、且某些框架残基被修饰成鼠残基的修饰的人抗体片段)之间 VH 和 VL 结构域的比较。

25 图 2 是 rhuMabe25, e426 和序列 e26 和 e27 之间轻链和重链 CDR 结构域之间的不同的比较。本文的残基编号是连续的，与 Kabat 等人的不同。还应注意，这些序列只是片段，而不是真实的全长重链和轻链残基。

图 3 是 FACS 为基础的试验，该图表明了受测试抗体抑制 FITC 偶联的 IgE 结合表达在 CHO 3D10 细胞上的高亲和力 FcεRI 受体α链的能力。图中示出了鼠单抗 MaE11(□)、阴性对照人源化的单抗 4D5(■)、F(ab)-2(○)、F(ab)-9(●)、F(ab)-11(△)
30 和 F(ab)-12(▲)的抑制百分数。数据点是三次实验的平均值，除单抗 mAb4D5 外，它是一次实验的数值。结果表明，MaE11 和测试的 F(ab)阻断了 FITC-IgE 与表达 FcεRI α链的 CHO 3D10 细胞的结合。

图 4 是 FACS 为基础的试验的图, 它测定了受测试抗体与 CHO 3D10 细胞上表达的高亲和力受体 FcεRI 的α亚基所载的 IgE 的结合。图中示出了鼠单抗 MaE11(○)、人源化变体 12(▲)、阳性对照鼠单抗 MaE1(●)、阴性对照抗体鼠 MOPC21(△)、以及阴性对照人源化单抗 4D5(□)的结合百分数。在算术/线性规模上, 0.1μg/ml 时的平均通道荧光数值为:MPOC21, 7.3; MaE1, 32.1; MaE11, 6.4; hu4D5, 4.7;和 huMaE11, 4.6。所有三种鼠单抗是鼠同种型 IgG1, 二种人源化单抗是人同种型 IgG1。数据点是三个实验的平均值。结果表明, MaE11 和 F(ab)-12 不结合载有 IgE 的表达 FcεRI α 链的 CHO 3D10 细胞。

图 5 是抗 IgE 对豚草诱导的组胺释放的抑制百分数的摩尔比。图中显示了 E-25(●)和 e-26(○)。结果表明, e26 的 F(ab)形式以剂量依赖方式很好地抑制了豚草诱导的组胺释放, 最大半数抑制的摩尔比为 44: 1(抗 IgE: RSIgE)。

图 6 示出了实施例 4 部分 II 中描述的各轮亲和力选择后的亲和力富集情况。图中显示了每一合并物的结合富集物与野生型之比(Emut/Ewt)。结果表明, VL 文库(用 "a" & "b"表示)连续展示了改进的相对富集, 在 5-6 轮富集后比野生型高大约 10 倍。另外, VH 文库("c"和"d")在约 3 轮后表现出提高大约 3 倍。注意, "a"对应于在 VL CDR-1 残基 27、28、30 和 31 位突变的 Fab-噬菌体文库, 而 "b"对应于 30、31、32 和 34 位突变, 而 "c"和"d"是在残基 101、102、103、105 和 107 有突变的独立 F(ab)文库。

图 7 显示了在最终变体的噬菌体 ELISA 竞争性研究中, 观察到的光密度对 IgE 竞争性抗体的浓度, 该最终的变体通过 e26 中 VL CDR1 突变和克隆 235-5.1、235-5.2、235-5.3 和 235-5.4 中 VH CDR2 突变组合而得, 分别重新命名为 e27, e695, e696 和 e697(如实施例 4 部分 V 所述)。

图 8 显示了各种浓度水平的 e25, e26 和 e27 抗 IgE 抗体在实施例 4 部分 VI 中描述的生物素平板试验中的 490nm 吸收值。

图 9 表示了 e25, e26 和 e27d F(ab)表观结合亲和力, 用 BIAcore TM-2000 表面等离子体激元(plasmon)共振系统来测定。将 PBS/Tween 缓冲液(0.05% Tween-20, 以磷酸盐缓冲液配)作 1.5 倍连续稀释的 F(ab)抗体片段, 于 25℃以 20 微升/分钟的流速注射在 IgE 芯片上。所示的平衡解离常数(Kd)从每个 Fab 变体观察到的 kon/koff 比值计算得到。

图 10 是质粒 p426 的序列表, 该质粒在实施例 4 中作为模板用来构建文库特异性终止模板。

图 11。A. 质粒 pDH188 插入物的框图, 它含有的 DNA 编码针对 HER-2 受体的 Fab 人源化抗体的轻链和重链(可变区和恒定区 1)。VL 和 VH 分别是轻链和重链

的可变区。 C_k 是人 κ 轻链的恒定区。 $CH1_{G1}$ 是人 $\gamma 1$ 链的第一恒定区。两个编码区均从细菌 *stII* 信号序列开始。

B. 含有 11A 所述插入物的整个质粒 pDH188 的示意图。在将质粒转化入大肠杆菌 SR101 细胞中并加入辅助噬菌体后, 质粒被包装入噬菌体颗粒中。这些颗粒中
5 一些展示了 Fab-p III 融合(其中 p III 是 M13 基因 III DNA 编码的蛋白质)。

图 12 表示抗 IgE 抗体 E25、E26 和 E27 的全长重链和轻链残基。

图 13 表示抗 IgE 抗体 e26 和 e27 的 F(ab)片段。

图 14 表示抗 IgE 抗体 e26 和 e27 的 sFV 片段。

图 15 表示抗 IgE 抗体 e26 和 e27 的 F(ab)'2 片段。

10 SEQ ID NO: 1 表示用于本发明的表达质粒 e426 的序列, 另如图 10 所示。

SEQ ID NO: 2 表示图 1 所示的 MaE11 的可变重链序列。

SEQ ID NO: 3 表示图 1 所示的 F(ab)-2 的可变重链序列。

SEQ ID NO: 4 表示图 1 所示的 humIII 的可变重链序列。

SEQ ID NO: 5 表示图 1 所示的 MaE11 的可变轻链序列。

15 SEQ ID NO: 6 表示图 1 所示的 F(ab)-2 的可变轻链序列。

SEQ ID NO: 7 表示图 2 所示的 humIII 的可变轻链序列。

SEQ ID NO: 8 表示图 2 所示的 e26 和 e27 的可变轻链序列。

SEQ ID NO: 9 表示图 2 所示的 e426 的可变轻链序列。

SEQ ID NO: 10 表示图 2 所示的 e25 的可变轻链序列。

20 SEQ ID NO: 11 表示图 2 所示的 e27 的可变重链序列。

SEQ ID NO: 12 表示图 2 所示的 e25, e26 和 e426 的可变重链序列。

SEQ ID NO: 13 表示图 12 所示的 e25 的全长可变轻链序列。

SEQ ID NO: 14 表示图 12 所示的 e25 的全长重链序列。

SEQ ID NO: 15 表示图 12 所示的 e26 的全长轻链序列。

25 SEQ ID NO: 16 表示图 12 所示的 e26 的全长重链序列。

SEQ ID NO: 17 表示图 12 所示的 e27 的全长轻链序列。

SEQ ID NO: 18 表示图 12 所示的 e27 的全长重链序列。

SEQ ID NO: 19 表示图 13 所示的 e26 和 e27 的可变轻链 Fab 片段。

SEQ ID NO: 20 表示图 13 所示的 e26 的可变重链 Fab 片段。

30 SEQ ID NO: 21 表示图 13 所示的 e27 的可变重链 Fab 片段。

SEQ ID NO: 22 表示图 14 所示的 e26 的 sFv 片段。

SEQ ID NO: 23 表示图 14 所示的 e27 的 sFv 片段。

SEQ ID NO: 24 表示图 15 所示的 e26 和 e27 的可变轻链 F(ab)'₂ 片段。

SEQ ID NO: 25 表示图 15 所示的 e26 的可变重链 F(ab)'₂ 片段。

SEQ ID NO: 26 表示图 15 所示的 e27 的可变重链 F(ab)'₂ 片段。

5

较佳实例详述

整篇本申请中提及的特定文献、专利申请和专利应被视为纳入本说明书作为参考。

定义：

整篇申请中采用的术语应被理解成具有本领域普通技术人员通常所知的典型的意义。然而，申请人希望给予下列术语如下特定定义：

10

术语“蛋白质”或“多肽”可互换使用。它们指通过肽键或酰胺键连接在一起的两个或多个氨基酸的链，无论是否经过翻译后修饰(例如，糖基化或磷酸化)。该定义范围中特别提到了抗体。

本发明的多肽可包含一个以上的亚基，每个亚基一条由分开的 DNA 序列编码。

15

关于抗体多肽序列的短语“基本上相同”应理解成，抗体表现出与参照多肽序列至少 70% 的序列相同(较佳的为 80%，更佳的 90%，最佳的为 95%)。关于核酸序列的短语应理解成，核苷酸序列表现出和参照核酸序列至少有约 85% 的序列相同(较佳的 90%，更佳的 95%，最佳的为 97%)。对于多肽，比较序列的长度通常至少为 25 个氨基酸。对于核酸，长度通常至少为 75 个核苷酸。

20

术语“相同性”或“同源性”应理解成是指，在序列排列对齐并引入空隙(如果需要)从而使整个序列达到最大的序列相同百分比之后，并且不考虑保守替代作为序列相同性的一部分时，候选序列中和与其比较的对应序列中残基相同的氨基酸残基的百分数。N 端或 C 端延伸或插入不应被理解成是减少了相同性或同源性。用于序列排列对比的方法和计算机程序是本领域所熟知的。用序列分析软件(例如，序列分析软件包，Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, WI 53705)可以测定序列相同性。该软件通过指定不同替代、缺失和其它修饰同源度来相容类似的序列。

25

术语“抗体”被最广义地使用，并且具体地包括：单克隆抗体(包括全长的单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、和抗体片段(例如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv)，只要它们表现出所需的生物活性。抗体(Ab)和免疫球蛋白(Ig)是具有相同结构性质的糖蛋白。抗体对特定抗原表现出结合特异性，而免疫球蛋白则包括抗体以及缺失抗原特异性的其它抗体样分子。后一类多肽(例如)由淋巴系统低水平产生，由

30

骨髓瘤高水平产生。

天然抗体和天然免疫球蛋白通常是约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端是恒定区。轻链的恒定区与重链的第一恒定区相对排列，轻链的可变区与重链的可变区相对排列。据信特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面(Clothia 等人, J. Mol. Biol. 186, 651-66,1985; Novotny 和 Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,4592-4596(1985))。

“分离的”抗体是经鉴定的和分离的和/或回收自产生它的环境组分的抗体。其产生环境中的污染性组分是会干扰抗体的诊断或治疗性用途的物质，可能包括酶、激素和其它蛋白质类或非蛋白质类溶质。在较佳的实例中，抗体纯化用至少三种不同方法测定：1)经 Lowry 法测定，按抗体重量计高于 95%，最好高于 99%；2)其纯度足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个 N 末端残基或内部氨基酸序列；或 3)用考马斯蓝或较佳的用银染法，在还原或非还原条件下作 SDS-PAGE 测定时达到均质。分离的抗体包括存在于重组细胞内的原位抗体，因为该抗体的天然环境的至少一种组分是不存在的。但是，通常，分离的抗体经至少一步纯化步骤制得。

“依赖于动物种类的抗体”，例如哺乳动物抗人 IgE 抗体，是这样一种抗体，它对来自第一种哺乳动物的抗原的结合亲和力比其对来自第二种哺乳动物的该抗原同源物更强。通常，依赖于动物种类的抗体“特异性结合”人抗原(即，结合亲和力(kd)数值不超过大约 1×10^{-7} ，较佳的不超过大约 1×10^{-8} ，最佳的不超过 $1 \times 10^{-9}M$)，但是对第二种非人哺乳动物抗原同源物的结合亲和力比其对人抗原的结合亲和力至少弱 50 倍、或至少弱约 500 倍、或至少弱约 1000 倍。依赖于动物种类的抗体可以上述的任何类型的抗体，但是较佳的是人源化抗体或人抗体。

术语“抗体突变体”指抗体的氨基酸序列变体，其中一个或多个氨基酸残基已被修饰。这些突变体与原氨基酸序列的相同性或相似性必定低于 100%，与抗体的重链或轻链可变区的氨基酸序列的氨基酸序列相同性或相似性至少为 75%，较佳的至少 80%，更佳的至少 85%，还要佳的至少 90%，最佳的至少 95%。由于本发明的方法同样适用于多肽、抗体和其片段，因此这些术语有时可互换。

在抗体可变区中术语“可变”指这样一个事实：可变区的某些部分在不同抗体序列中有很大的不同，这些部分用于每个特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，变异性并非均匀地分布在抗体可变区中。它集中在轻链和重链可变区中称为

互补决定区(CDR)(也称为超变区)的三个节段中。测定 CDR 至少有两种技术：(1)以物种交叉序列变异性为基础的方法(即，Kabat 等人，免疫学感兴趣的蛋白的测序(National Institute of Health, Bethesda, MD 1987))；和(2)以抗原-抗体复合物的晶体图学研究为基础的方法(Chothia, C.等人(1989)，Nature 342:877)。关于本申请人的抗 IgE 5 抗体，某些 CDR 是通过 Kabat 等人和 Chothia 等人的方法的组合来确定的。可变区中更高度保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各包含四个 FR 区，它们大多数采取 β 折叠构型，由三个形成环的 CDR 连接 β 折叠结构(在某些情况下形成 β 折叠的一部分)。每条链中的 CRD 通过 FR 区和另一条链的 CDR 紧密毗邻在一起，形成抗体的抗原结合部位(见 Kabat 等人)。恒定区不直接参与抗体和抗原的结合，但 10 是表现出不同效应功能，例如参与抗体的抗体依赖型细胞毒性。

术语“抗体片段”指全长抗体的一部分，通常是抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂ 和 Fv 片段。木瓜蛋白酶消化抗体产生了两个相同的抗原结合片段(称为 Fab 片段，每个片段有单个抗原结合部位)，以及一个残余的“Fc”片段(如此称呼是因为它很容易结晶)。用胃蛋白酶处理产生一个 F(ab')₂ 片段(它具有 15 两个能与抗原交联的抗原结合片段)以及一个残余的其它片段(称为 pFc')。其它片段可包括二抗体(diabody)、线性抗体、单链抗体分子和抗体片段形成的多特异性抗体。如本文所用的，关于抗体的术语“功能性片段”是指 Fv, F(ab)和 F(ab')₂ 片段。

“Fv”是最小的抗体片段，它含有全部抗原识别和结合位点。该区域由紧密、非共价关联的一个重链和一个轻链可变区的二聚物(VH-VL 二聚物)组成。在该构型 20 中，各可变区中的三个 CDR 相互作用，确定了 VH-VL 二聚物表面上的抗原结合位点。6 个 CDR 共同赋予抗体抗原结合特异性。然而，即使是单个可变区(或 Fv 的一半，只包含对抗原有特异性的三个 CDR)也能识别并结合抗原，只是其亲和力比整个结合位点低。

Fab 片段(还称为 F(ab))还含有轻链的恒定区和重链的第一个恒定区(CH1)。由于 25 在重链 CH1 区的羧基端增加了几个残基(包括来自铰链区的一个或多个半胱氨酸)，使 Fab'片段和 Fab 片段不相同。Fab'-SH 在本文命名为 Fab'，其中恒定区的半胱氨酸残基有一个游离的巯基。通过 F(ab')₂ 胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处二硫键的断裂，产生 Fab'片段。抗体片段的其它化学偶联方式也是已知的。

脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显 30 不同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。

根据其重链恒定区的氨基酸序列，“免疫球蛋白”可以分为不同的种类。主要有 5 类免疫球蛋白：IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM，其中一些还可进一步分成亚类(同种型)，

如 IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1 和 IgA-2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。用于本发明的较佳的免疫球蛋白是免疫球蛋白 E。

本文所用的术语“单克隆抗体”指从一群基本均一抗体获得的抗体，即该群体中包含的各个抗体是相同的，除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体是高特异性的，针对单个抗原位点。而且，与常规(多克隆)抗体制剂(通常是包括针对不同的决定簇(表位)的不同抗体)相反，每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体的优点还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。例如，用于本发明的单克隆抗体可用杂交瘤方法(由 Kohler 等人, *Nature*, 256:495(1975)首先提出)制得，或可用重组 DNA 方法(例如参见美国专利 No. 4,816,567)制得。用于本发明的单克隆抗体也可用例如 Clackson 等人, *Nature*, 352:624-628(1991)和 Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991)所述的技术从噬菌体抗体文库中分离获得。

本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)(其中重链和/或轻链的一部分与特定动物种类衍生的、或是属于特定的抗体类或亚类的抗体的对应序列相同或同源，而链的其余部分则与另一动物衍生的、或是属于另一抗体类或亚类的抗体的对应序列相同或同源)以及这些抗体的片段，只要这些片段具有所需的生物活性即可(US 4,816,567; Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984))。

“人源化”形式的非人(如鼠)抗体是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合性亚序列)，它们含有非人免疫球蛋白的最小序列。对于大多数情况，人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体)，其中受者的互补决定区(CDR)残基被非人(供者抗体)(例如有所需特异性、亲和力和活性的小鼠、大鼠或兔抗体)的 CDR 残基代替。在一些情况下，人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基被对应的非人残基代替。另外，人源化的抗体可包括既不存在于受者抗体、又不存在于导入的 CDR 或构架序列中的残基。作这些修饰能进一步提高和优化抗体性能。通常，人源化抗体包含了基本上所有的(至少一个、通常两个)可变区，其中所有或基本上所有的 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区，所有或基本上所有 FR 区是人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。人源化抗体最好还包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分，通常是人免疫球蛋白的 Fc 部分。更详细的情况参见 Jones 等人, *Nature*, 321:522-525(1986); Reichmann 等人, *Nature*, 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596(1992)。

“单链 Fv” 或“sFv”抗体片段包括抗体的 VH 和 VL 区，其中这些区在一条多肽链中。通常，Fv 多肽还包括 VH 和 VL 区间的多肽接头，该接头可使 sFv 形成结合抗原所需的结构。关于 sFv 综述可见 Pluckthun 在《单克隆抗体药理学》(The Pharmacology of Monoclonal antibodies), 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, New York, 269-315 页(1994)。

术语“二抗体”指有两个抗原结合位点的小抗体片段，该片段包括重链可变区(VH)与轻链可变区(VL)连接在同一多肽链(VH-VL)中。由于采用一个短得无法使同一链上两可变区间产生配对的接头，使此二区域与另一链中的互补区配对，形成了两个抗原结合位点。二抗体在例如 EP404,097; WO93/11161; 和 Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)中有更详细的描述。

术语“抗体的功能性片段或类似物”是指一种化合物具有与全长抗体相同的定性的生物活性。例如，抗 IgE 抗体的功能性片段或类似物是能结合 IgE 免疫球蛋白从而阻止或大大减少该分子结合高亲和力受体 FcεRI 的能力的片段或类似物。

术语“氨基酸”指所有天然存在的 L-α-氨基酸。氨基酸的确定见下文章节 A “抗体制备：(iv)突变型抗体的产生”中的描述。术语“氨基酸”变体指与天然的氨基酸序列相比其氨基酸序列有一些不同的分子。

“替代型”变体是指天然序列中的至少一个氨基酸残基被除去并在相同位置插入不同氨基酸的那些变体。替代可以是单个，即分子中只有一个氨基酸被替代，或可以是多个，即同一分子中有两个或多个氨基酸被替代。“插入型”变体是天然序列中在紧靠特定位置处的氨基酸插入一个或多个氨基酸的那些变体。紧靠一个氨基酸是指，与该氨基酸的α羧基或α氨基官能团相连。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中的一个或多个氨基酸被除去的那些变体。通常，缺失型变体在分子特定区域内有一个或两个氨基酸缺失。

术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养”可互换使用，所有这些命名均包括子代。也应理解，由于有意或无意的突变，所有子代也许在 DNA 内容上不精确相同。其包括了在原始转化细胞中筛选出具有相同功能或生物活性的突变型子代。

本发明所用的“宿主细胞”通常是原核或真核宿主。章节 B “载体、宿主细胞和重组方法：(vii)宿主细胞的选择和转化”中描述了合适的宿主细胞的例子。

“转化”指将 DNA 导入生物体内，从而使该 DNA 能复制成染色体外元件或整合到染色体内。

“转染”指宿主细胞摄取表达载体，不论是否实际上表达了任何编码序列。

术语“转染的宿主细胞”和“转化的”指将 DNA 导入细胞内。该细胞被称为

“宿主细胞”，它可以是原核或真核细胞。典型的原核宿主细胞包括各种大肠杆菌菌株。典型真核宿主细胞是哺乳动物细胞，例如中国仓鼠卵巢细胞或人源细胞。导入的 DNA 序列可以与宿主细胞种类相同或不同，或可以是杂交的 DNA 序列，含有一些外来 DNA 和一些同源 DNA。

5 术语“可复制的表达载体”和“表达载体”指一段 DNA 序列，通常是双链，其中可能插入了一段外来 DNA。外来 DNA 定义成异源 DNA，它不能在天然的宿主细胞中发现。载体用来将外来或异源 DNA 运输入合适的宿主细胞。一旦进入宿主细胞，载体能不依赖于宿主染色体 DNA 而独立复制，可能会产生几个拷贝的载体及其插入(外来)的 DNA。

10 术语“载体”指一种 DNA 构建物，它含有的 DNA 序列与能使 DNA 在合适宿主中表达的合适的控制序列操作性相连。这些控制序列包括实现转录的启动子、控制该转录的任选的操纵子序列、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列，以及控制转录和翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、或简单地是潜在的基因组插入物。一旦转化到合适宿主中，该载体能不依赖于宿主基因组进行复制和起作用，或在一些情况下，其本身整合入基因组中。在本说明书中，“质粒”和“载体”
15 有时可互换使用，因为质粒是目前最常用的载体形式。然而，本发明还包括起等价功能的其它形式的载体，它们是本领域中已知的。哺乳动物细胞培养表达的典型的表达载体例如以 pRK5(EP307,247), pSV16B(WO 91/08291)和 pVL1392(Pharmingen)为基础。

20 “脂质体”是由不同种类的脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小的囊泡，它可用来相哺乳动物输送药物(例如本文公开的抗体突变体，以及任选的一种化疗剂)。脂质体的组分通常排列成双层形式，其与生物膜的脂质排列相似。

表达“控制序列”指在特定宿主生物体中表达 DNA 序列所必需的操作性相连的编码序列。适用于原核生物的控制序列例如包括启动子，任选的操纵子序列、和
25 核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。

“分离的”核酸分子是经鉴定并与抗体核酸天然来源中通常与其伴随的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。一种分离的核酸分子与其天然发现的形式或环境中不同。因此，当其存在于天然细胞中时，分离的核酸分子能和核酸分子区分开来。然而，分离的核酸分子包括包含在通常表达抗体的细胞内的核酸分子(例如核酸
30 分子在与其天然细胞中不同的染色体位置上)。

当核酸和另一核酸序列置于功能上相关的位置时，则称核酸“操作性相连”。这可以是基因和调控序列，它们相连后允许在合适分子(转录激活蛋白)结合调控序列时

表达基因。例如，如果它表达成前蛋白(preprotein)参与多肽的分泌，则将前序列(presequence)或分泌性前导序列的 DNA 与多肽 DNA 操作性相连；如果它影响序列的转录，则启动子或增强子与编码序列操作性相连；或如果它影响序列的转录，则核糖体结合位点与编码序列操作性相连；或如果它放置的位置能促进翻译，则核糖体结合位点和编码序列操作性相连。通常，“操作性相连”指相连的 DNA 相连是毗邻的，就分泌性前导序列而言，是毗邻且在读框内的。然而，增强子不一定要毗邻。连接通过常规限制性位点处的连接来实现。如果这种位点不存在，则根据常规实践采用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

“处理”指治疗性处理和预防性措施。需要处理的患者包括已经患有疾病以及有待预防疾病的那些人。

“疾病”是可从本文多肽的处理获益的任何病征。这包括慢性和急性失调或疾病，包括使哺乳动物容易患该疾病的病理学症状。

本文所用的用于辅助治疗的术语“免疫抑制剂”指能抑制或掩蔽植入移植物的宿主的免疫系统的物质。这将包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达、或掩蔽 MHC 抗原的物质。这些抗原的例子包括 2-氨基-5-芳基-5-取代的嘧啶(见美国专利 4,665,077)、咪唑硫嘌呤(或环磷酰胺，在咪唑硫嘌呤有副反应的情况下)；溴隐亭(bromocryptine)；戊二醛(掩蔽了 MHC 抗原，如美国专利 No. 4,120,649 中所述)；针对 MHC 抗原和 MHC 片段的抗独特型抗体；环孢菌素 A；类固醇如糖皮质类固醇，例如强的松、甲基强的松和地塞米松；细胞因子或细胞因子受体拮抗剂，包括抗干扰素 γ 、 β 或 α 的抗体；抗肿瘤坏死因子 α 抗体；抗肿瘤坏死因子 β 抗体；抗白细胞介素-2 抗体和 IL-2 受体抗体；抗 L3T4 抗体；异源抗淋巴细胞球蛋白；pan-T 抗体，较佳的是抗 CD3 或抗 CD4/CD4a 抗体；含有 LAF-3 结合域的可溶性肽(WO 90/08187，1990 年 7 月 26 日公开)；链激酶；TGF- β ；链道酶；宿主的 RNA 或 DNA；FK506；RS-61443；脱氧精胍菌素；纳巴霉素；T 细胞受体(美国专利 5,114,721)；T 细胞受体片段(Offner 等人, Science 251:430-432(1991)；WO 90/11294；和 WO 91/01133)；和 T 细胞受体抗体(EP340,109)如 T10B9。这些试剂可同时给予，或和 CD11a 抗体分开给予，并采用和现有技术描述的相同或较少的剂量。较佳的辅助性免疫抑制剂将取决于许多因素，包括待处理疾病的类型(包括进行移植的类型)、以及患者的病史，但是总体上来说，优先选择环孢菌素 A、糖皮质类固醇(最佳的是强的松或甲基强的松)、OKT-3 单克隆抗体、咪唑硫嘌呤、溴隐亭、异源抗淋巴细胞球蛋白或它们的混合物。

术语“癌”或“癌的”是描述哺乳动物中典型特征为无控制性的细胞生长的生理性症状。癌症例子包括，但不局限于，癌、淋巴瘤、胚母细胞瘤、肉瘤和白血病。

更特定的癌症例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肠胃癌、胰癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳房癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝细胞瘤和各种类型的头颈癌。

- 5 需要治疗的“哺乳动物”指任何分类为哺乳动物的任何动物，包括人、家畜和农场动物、非人灵长类、以及动物园、运动场动物，或宠物，如狗、马、猫、奶牛等。

本文所用的术语“标记的表位”指多肽与“表位标记”融合。表位标记多肽具有足够的残基来提供一个表位，针对该表位能够制得抗体，但是该表位又短得足以
10 不干扰该多肽的活性。较佳的，表位标记也是相当独特的，从而使针对它的抗体基本上不会和其它表位发生交叉反应。合适的标记多肽通常具有 6 个氨基酸残基，通常在大约 8-50 个氨基酸残基之间(较佳的在大约 9-30 个残基之间)。例子包括：flu HA 标记多肽及其抗体 12CA5(Field 等人, Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165(1988)); c-myc 标记和针对它的 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体(Evan 等人, Mol. Cell.
15 Biol.5(12):3610-3616(1985)); 以及单纯性疱疹病毒糖蛋白 D(gD)标记及其抗体(Paborsky 等人, Protein Engineering 3(6):547-552(1990))。在某些实例中，表位标记是“补救受体结合表位”。

本文所用的术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子(如 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 或 IgG₄)Fc 区的一个表位，它负责提高 IgG 分子的体内血清半衰期。

- 20 术语“细胞毒剂”在此指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏的物质。该术语包括放射性同位素(例如 I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、和 Re¹⁸⁶)、化疗剂和毒素(例如来自细菌、真菌、植物或动物的酶促活性毒素或其片段)。

“化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂包括例如阿霉素(Adriamycin)、阿霉素(Doxorubicin)、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷(“Ara-C”)、环磷酰胺、塞替派、
25 Taxotere(docetaxel)、Bulsulfan、细胞毒素(cytosin)、红豆杉醇、甲氨蝶呤、顺氯铂、美法仑、长春碱、博来霉素、依托泊甙、异环磷酰胺、丝裂霉素 C、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞宾(vinorelbine)、卡铂、替尼泊甙、道诺霉素、洋红霉素、氨基蝶呤、更生霉素、丝裂霉素、Esperamicins(参见美国专利 4,675,187)、美法仑以及其它相关的氮芥。

- 30 本申请所用的术语“前体药物(prodrug)”指药学活性物质的前体或衍生形式，其对肿瘤细胞的细胞毒性低于亲代药物，并且能够被酶促激活或转化成较高活性的亲代形式。例如参见 Wilman, “癌症化疗中的前体药物”(Prodrugs in Cancer

Chemotherapy), Biochemical Society Transaction 14,375-382 页, 第 615 次会议, Belfast(1986)和 Stella 等人, “前体药物: 定靶药物释放的化学方法” (Prodrug: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery), Directed Drug Delivery, Borchardt 等编辑, 247-267 页, Humana Press(1985)。本发明的前体药物包括(但不限于): 含磷酸盐的前体药物、含硫代磷酸盐的前体药物、含硫酸盐的前体药物、含肽的前体药物、经 D-氨基酸修饰的前体药物、糖基化的前体药物、含 β 内酰胺的前体药物、含任选地取代的含苯氧基乙酰胺的前体药物或任选地含取代的苯乙酰胺的前体药物、5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿嘧啶前体药物, 它们可以被转化为细胞毒性更高的游离药物。可以衍生成为本发明所用前体药物形式的细胞毒性药物的例子, 包括但不限于前文所述的化疗剂。

本文所用的词语“标记”指直接或间接与抗体偶联的可检测化合物或组合物。标记自身可以被检测到(例如放射性同位素标记或荧光标记), 或者, 如果是酶标记, 它们可催化化合物或组合物底物发生可检测的化学转变。

本文所用的术语“固相”指本发明抗体可粘附于其上的非水性基质。固相的例子在此包括: 部分或完全由玻璃(例如可控多孔玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅氧烷形成的固相。在某些实例中, 根据上下文, 固相可能包括测试板的孔; 而在其它实例中, 可能是纯化柱(例如亲和层析柱)。该术语还包括分散的颗粒构成的不连续固相, 如美国专利 No. 4,275,149 中所述的。

本文所用的术语“抗人 IgE 抗体”指能结合人 IgE 从而抑制或大大减少该 IgE 与高亲和力受体 Fc ϵ RI 结合的抗体。较佳的该抗 IgE 抗体是 E-25。

本文所用的术语“IgE 介导的疾病”指特征为过量产生 IgE 和/或对免疫球蛋白 IgE 超敏的症状或疾病。它应被具体理解成包括与过敏性超敏反应和特异性过敏反应有关的, 例如包括: 哮喘、变应性关节炎和结膜炎(枯草热)、湿疹、荨麻疹和食物过敏。然而, 该术语的范围也包括通常由于蜜蜂或蛇叮咬或母代药物治疗引起的严重的过敏性休克的生理性症状。

“用噬菌体展示的亲和力成熟(AMPD)”在此指 Lowman 等人在 Biochemistry 30(45): 10832-10838(1991)中描述的方法, 另见 Hawkins 等人, J. Mol. Biol. 254:889-896(1992)。尽管不严格局限于下列描述, 该方法简单如下: 使几个超变区位点(例如 6-7 位点)突变, 产生在每个位点所有可能的氨基酸替代。以单价方式从丝状噬菌体颗粒中将如此产生的抗体突变体展示和包装作为每个颗粒的 M13 的基因 III 产物的融合物。表达不同突变体的噬菌体可以循环通过多轮的结合选择, 然后对展示高亲和力的那些突变体进行分离并测序。该方法在 WO 92/09690(1992 年 6 月 11 日授权)

中另有描述。Cunningham, B.C.等人在 EMBO J. 13(11), 2508-2515(1994)中描述包括合并亲和力展示的改进的方法。

该方法提供了选择新的结合性多肽的方法，该方法包括：a)构建一个可复制的表达载体，该载体包含编码多肽的第一基因，编码至少一部分天然或野生型噬菌体包被蛋白的第二基因(其中第一和第二基因是异源的)，以及与第一和第二基因操作性相连的转录调控元件，从而形成编码融合蛋白的基因融合物；b)在第一基因中一个或多个选定位置使载体突变，从而形成相关质粒的一个家族；c)用质粒转化合适的宿主细胞；d)用具有编码噬菌体包被蛋白基因的辅助噬菌体感染转化的宿主细胞；e)在适合形成重组噬菌粒(该噬菌粒含有质粒的至少一部分并能转化宿主)的条件下，培养转化的感染的宿主细胞，，调节该条件使少量噬菌粒颗粒在颗粒表面上展示一个以上拷贝的融合蛋白；f)使噬菌粒颗粒和靶分子接触，从而使噬菌粒颗粒的至少一部分结合靶分子；和 g)分开结合与未结合的噬菌粒颗粒。较佳的，该方法还包括用结合靶分子的重组噬菌粒颗粒转化合适的宿主细胞，并重复步骤 d)至 g)一次或多次。

另外，该方法包括由多个亚基组成的多肽，其中可复制表达载体包含的转录调控元件与编码感兴趣亚基的 DNA 操作性相连，将该亚基与噬菌体包被蛋白融合。

本文所用的术语“抗体噬菌体文库”指用于上述以及 Hawkins 等人, J. Mol. Biol. 254:889-896(1992)、以及 Lowman 等人, Biochemistry 30(45):10832-10838(1991)中描述的亲和力成熟方法的噬菌体文库。每个文库包含一个超变区(例如 6-7 个位点)所产生的所有可能的氨基酸替代。在丝状噬菌体颗粒中以单价形式将这样产生的抗体突变体展示成与包装入每个颗粒并在噬菌体外部表达的 M13 的基因 III 产物的融合物。

本文所用的术语“室温”或“环境温度”应为 23-25℃。

本文所用的术语“结合性多肽”指以可选择的亲和力结合靶分子的任何多肽。较佳的是，多肽将是最好含有超过约 100 个氨基酸残基的蛋白。通常，多肽是激素或抗体或其片段。

本文所用的术语“高亲和力”指在生理条件下，亲和常数(Kd)小于 10^{-5} ，较佳的是小于 10^{-7} M。

本文所用的术语“靶分子”指任何分子，不一定是蛋白质，希望针对该分子产生抗体或配体。然而，较佳的靶是蛋白，最佳的靶是抗原。然而，受体(例如激素受体)应特别包括在该术语范围内。

如本文所用的，免疫球蛋白氨基酸残基的所有编号(包括对应于 IgE、突变型 IgE 分子以及本文出现的嵌合 IgE 分子的特异性部分的肽的氨基酸编号)是根据 Kabat 等人, 感兴趣的免疫球蛋白蛋白的序列(National Institute of Health, Bethesda, MD 1987)中

的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统来进行编号的。

发明实施方式

I. 提高靶分子亲和力的方法

5 A. 可异构化的天冬氨酰残基的鉴定

在实施本发明时，容易异构化的可异构化天冬氨酰残基可用本领域普通技术人员已知的任何技术来鉴定。例如 Cacia 等人, *Biochemistry* 35, 1897-1903(1996)中描述了一种方法，其中在 37°C 培育抗 IgE 抗体 E-25(它含有-Asp-Gly-残基)21 天。对未经处理的和经蛋白酶处理的片段进行色谱和质谱分析，鉴定出异构化的-Asp-Gly-。由于已经报道天冬酰胺残基会发生异构化(T. Geiger 和 S. Clarker, *J. Biol. Chem.* 262(2), 785-794(1987))，本发明最好还进行系统性评价和改进含天冬酰胺残基的多肽。

B. 提高靶分子亲和力的替换残基的选择

本领域技术人员可以用许多技术来优化受体亲和力。通常，这些技术全部涉及感兴趣位点处的各种氨基酸残基的替代，然后筛选分析突变型多肽的受体亲和力。用于本发明的较佳的方法是采用噬菌体展示的亲和力成熟(Hawkins 等人, *J. Mol. Biol.* 254:889-896(1992); Lowman 等人, *Biochemistry* 30(45):10832-10838(1991))。简言之，使几个超变区位点(例如 6-7 个位点)发生突变，在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。从丝状噬菌体颗粒中以单价方式将如此产生的抗体突变体展示和包装作为每个颗粒中的 M13 的基因 III 产物的融合物。表达不同突变体的噬菌体可循环通过数轮结合选择，然后分离展示高亲和力的那些突变体并测序。

选择新的结合性多肽的方法宜采用结构上相关的多肽的文库。和噬菌体包被蛋白融合的结构上相关的多肽的文库通过诱变来产生，较佳的是，将单拷贝的每个相关多肽展示在含有编码该多肽的 DNA 的噬菌粒颗粒表面上。然后使这些噬菌粒颗粒接触靶分子，将对靶亲和力最高的那些颗粒与亲和力较低的颗粒分开。然后通过感染细菌宿主扩增高亲和力结合物，并重复竞争性结合步骤。重复该方法直至获得具有所需亲和力的多肽。

另外，还可使用多价噬菌体(McCafferty 等人, (1990), *Nature* 348, 552-554; Clackson 等人, (1991), *Nature* 352, 624-628)来表达随机的点突变(用易错 DNA 聚合酶)，以产生噬菌体抗体片段文库，然后通过对抗原的亲和力来筛选。Hawkins 等人, (1992), *J. Mol. Biol.* 254:889-896。

较佳的是，在亲和力成熟方法中，可复制表达载体是在转录调控元件牢牢控制，并调节培育条件使颗粒表面展示多拷贝融合蛋白的噬菌粒颗粒数量或数目低于 1%。

另外较佳的是，展示多拷贝融合蛋白的噬菌粒颗粒数量少于展示单拷贝融合蛋白的噬菌粒颗粒数量的 10%。最佳的该数量低于 20%。

通常，在本发明的方法中，表达载体还含有与编码多肽各亚基的 DNA 融合的分泌性信号序列，转录调控元件将是启动子系统。较佳的启动子系统选自：LacZ, λ_{PL} ,

5 TC, T7 聚合酶、色氨酸和碱性磷酸酶启动子以及它们的组合。

另外，第一基因通常编码哺乳动物蛋白，较佳的是，蛋白是抗 IgE 抗体。II.A." 抗体制备，(vi)多特异性抗体"部分中列举了其它抗体(但是应注意，该抗体不一定是多特异性的)。其它多肽包括人生长激素(hGH)、N-甲硫氨酰基人生长激素、牛生长激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素 A 链、胰岛素 B 链、胰岛素原、松弛素 A 链、松弛素 B 链、松弛素原、糖蛋白激素如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(THS)和促黄体素(LH)、糖蛋白激素受体、降钙素、胰高血糖素、因子 VIII、肺表面活性物质、尿激酶、链激酶、人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、铃蟾肽、因子 IX、凝血酶、造血生长因子、肿瘤坏死因子 α 和 β 、脑啡肽酶、人血清白蛋白、米勒抑制性物质、小鼠促性腺素相关肽、微生物蛋白，如 β 内酰胺酶、组织因子蛋白、抑制素、活化素、血管内皮生长因子、激素或生长因子的受体、整联蛋白、血小板生成素、蛋白 A 或 D、类风湿因子、神经生长因子(如 NGF- β)、血小板生长因子、转化生长因子(TGF)(如 TGF- α 和 TGF- β)、胰岛素样生长因子 I 和 II、胰岛素样生长因子结合蛋白、CD-4、DNA 酶、潜伏相关肽(latency associated peptide)、促红细胞生成素、骨诱导因子(osteoinductive factor)、干扰素(如干扰素 α 、 β 和 γ)、集落刺激因子(CSF)(如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF)、白细胞介素(IL)(如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4)、超氧化物歧化酶、衰变加速因子、病毒抗原、HIV 包膜蛋白如 GP120、GP140、心钠素 A、B 或 C、免疫球蛋白、和上述任一蛋白的片段。

较佳的是，第一基因编码的多肽具有一个或多个亚基，它含有大约 100 个以上的残基并折叠形成多个刚性二级结构，展示了多个氨基酸能和靶相互作用。较佳的是，第一基因将仅仅在对应于能和靶相互作用的氨基酸的密码子处发生突变，这样

25 将能保留刚性二级结构的完整性。

通常，本发明的方法采用的辅助噬菌体选自：M13KO7、M13R408、M13-VCS 和 Phi X 174。较佳的辅助噬菌体是 M13KO7，较佳的包被蛋白是 M13 噬菌体基因 II 包被蛋白。较佳的宿主是大肠杆菌，以及蛋白酶缺陷的大肠杆菌株。已经检测了本

30 发明方法选出的新的 hGH 变体。构建噬菌粒表达载体，该载体含有可抑制的终止密码子，其功能性地位于编码多肽以及噬菌体包被蛋白的核酸之间。

1. 展示在噬菌体表面上的多肽的选择

用重复的“多肽”选择循环来选出越来越高的结合亲和力，方法是用噬菌粒选择多个氨基酸变化，用多个循环选择来选择。在第一轮噬菌粒选择(涉及配体或抗体多肽中第一选择区的氨基酸)后，在配体的其它区域或氨基酸上进行其它轮噬菌粒选择。重复噬菌粒选择循环，直至获得所需的亲和性质。为了描述该方法，实施例 4 中噬菌体展示以循环方式进行。合并亲和力从不同 CDR 的组合突变等。

从上文可以理解，多肽结合结构域的氨基酸残基不是连续连接的，可能在多肽的不同亚基上。即，结合区域与结合位点处的特定二级结构(而不是一级结构)相符。因此，通常是将突变导入编码特定二级结构中从多肽内部指向外部的位点处氨基酸的密码子，因此它们有和靶相互作用的可能。

然而，选择作为针对靶分子的配体或抗体的通常不需要能和该靶结合。因此，例如，可选择糖蛋白激素如 TSH 作为 FSH 受体的配体，在本发明的方法中用突变型 TSH 分子的文库来产生新的候选药物。

因此，本发明考虑了结合靶分子的任何多肽，尤其是抗体。较佳的多肽是具有制药用途的那些多肽。抗体的例子在 II.A.“抗体的制备(iv)多特异性抗体”部分(注意，抗体不必是多特异性的)中有所描述。更佳的多肽包括：生长激素(包括人生长激素、脱-N-甲硫氨酰基人生长激素和牛生长激素)、甲状旁腺激素、促甲状腺激素、甲状腺素、胰岛素 A 链、胰岛素 B 链、松弛素原、小鼠促性腺素相关肽、微生物蛋白(如β内酰胺酶)、组织因子蛋白、抑制素、活化素、血管内皮生长因子、激素或生长因子的受体、整联蛋白、血小板生成素、蛋白 A 或 D、类风湿因子、神经生长因子(如 NGF-β)、血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子(如 aFGF 和 bFGF)、外皮生长因子、转化生长因子(TGF)(如 TGF-α和 TGF-β)、胰岛素样生长因子 I 和 II、胰岛素样生长因子结合蛋白、CD-4、DNA 酶、潜伏相关肽(latency associated peptide)、促红细胞生成素、骨诱导因子(osteoinductive factor)、例如，HIV 包膜蛋白的一部分、免疫球蛋白、和上述任一蛋白的片段。另外，例如多肽上的一个或多个预定的氨基酸残基可以被替代、插入或缺失，产生生物性能改进的产物。另外，还包括这些多肽的片段，尤其是生物学活性片段。本发明的其它更佳的多肽是人生长激素和心钠素 A、B 和 C、内毒素、枯草溶菌素、胰蛋白酶和其它丝氨酸蛋白酶。

另外较佳的多肽激素是如下定义的任何氨基酸序列，它们产生于第一细胞中，特异性结合同一类细胞上的受体(自分泌激素)或第二种细胞的受体(非自分泌)，并引起携带受体的细胞特征性生理应答。这些多肽激素是细胞因子、淋巴因子、神经营养激素和腺垂体多肽激素如生长激素、催乳素、胎盘催乳激素、促黄体素、促卵泡激素、β-促脂解素、γ-促脂解素和内啡肽、下丘脑释放抑制激素如促皮质素释放因子、

生长激素释放-抑制激素、生长激素-释放因子；和其它多肽激素如心钠素 A、B 或 C。

2. 获得编码所需多肽的第一基因(基因 1)

编码所需多肽(如抗体)的基因可用本领域已知的方法获得(大致参见, Sambrook 等人, 分子生物学实验指南, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989))。如果基因序列是已知的, 则可用化学方法合成编码基因的 DNA(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149(1963))。如果基因序列未知, 或如果该基因以前未被分离, 则可从 cDNA 文库(从表达所需基因的合适组织获得的 RNA 制得)或合适的基因组 DNA 文库克隆获得。然后用合适的探针分离基因。对于 cDNA 文库, 合适的探针包括单克隆或多克隆抗体(只要该 cDNA 文库是表达文库)、寡核苷酸、以及互补的或同源的 cDNA 或其片段。可用来从基因组 DNA 文库中分离感兴趣基因的探针包括: 编码相同或相似基因的 cDNA 或其片段、同源的基因组 DNA 或 DNA 片段、以及寡核苷酸。用 Sambrook 等人(同上)第 10-12 章描述的标准程序, 用所选探针筛选 cDNA 或基因组文库。

分离编码感兴趣多肽(例如抗体)的基因的另一种方法是用 Sambrook 等人(同上)14 章中描述的聚合酶链反应方法(PCR)。该方法需要采用与感兴趣基因杂交的寡核苷酸, 因此, 为了产生寡核苷酸, 必须知道该基因的至少一些 DNA 序列。

在分离得到基因后, 可将其插入扩增用合适载体(较佳的是质粒), 如 Sambrook 等人(同上)大致描述的那样。

3. 构建可复制的表达载体

尽管可获得几种类型的载体并可用来实施本发明, 但是质粒载体是此处所用的较佳的载体, 因为它们的构建相对容易, 并容易扩增。质粒载体通常含有各种组件, 包括启动子、信号序列、表型选择基因、复制起始位点、以及本领域普通技术人员所知的其它必需的组件。

原核载体中最常用的启动子包括: lacZ 启动子系统、碱性磷酸酶 phoA 启动子、噬菌体 λPL 启动子(温度敏感型启动子)、tac 启动子(受 lac 阻遏子调控的杂交的 trp-lac 启动子)、色氨酸启动子、以及噬菌体 T7 启动子。关于启动子的通常描述, 参见 Sambrook 等人(同上)第 17 章。尽管这些是最常用的启动子, 但是也可采用其它合适的微生物启动子。

用于实施本发明的较佳的启动子是能牢牢调控从而控制融合基因表达的那些启动子。如果表达不受控制, 在噬菌粒表面上将产生多拷贝的融合蛋白, 则可能靶和噬菌粒多点附着。认为该多点附着(也称为“亲合性”或“螯合效应”)会导致选出假的“高亲和力”多肽(由于展示在噬菌粒颗粒上的多拷贝融合蛋白相互紧密毗邻, 从

而“螯合”靶)。当发生多点附着时,有效或表现 Kd 可能和每一拷贝的展示的融合蛋白的单个 Kd 的乘积一样高。

通过牢牢调控融合蛋白的表达,从而使不超过少量(即少于约 1%)的噬菌粒颗粒含有多拷贝融合蛋白,就克服了“螯合效应”,使得能合适地选择高亲和力多肽。因此,根据启动子,调节宿主的培养条件使含有单拷贝融合蛋白的噬菌粒颗粒数最大,并使含有多拷贝融合蛋白的噬菌粒颗粒数最小。

用于实施本发明的较佳的启动子是 lacZ 启动子和 phoA 启动子。lacZ 启动子受 lac 阻遏蛋白 lac i 调控,因此融合基因的转录能通过调节 lac 阻遏蛋白的水平来加以控制。通过此描述方法,使含有 lac Z 启动子的噬菌粒在含有一拷贝 lac i 阻遏基因(lac Z 启动子的阻遏物)的细胞株中生长。含有 lac i 基因的典型的细胞株包括 JM 101 和 XL-1 blue。另外,宿主细胞可用含有阻遏物 lac i 和 lac Z 启动子的质粒共同转染。有时,上述两种技术可同时采用,即使含有 lac Z 启动子的噬菌粒颗粒在含有 lac i 基因的细胞株中生长,并用含有 lac Z 和 lac i 基因的质粒共转染细胞株。通常当希望表达一个基因时,在上述转染的宿主中加入一个诱导物如异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)。然而,在本发明中,该步骤被删除,以便(a)最大程度地减少每个噬菌粒数的基因 III 融合物的表达和(b)防止诱导物(如 IPTG)即使在低浓度下引起的较差的或不合适的噬菌粒包装。通常,在没有加入诱导物时,每个噬菌粒颗粒的融合蛋白数量高于 0.1(堆积(bulk)噬菌粒颗粒的融合蛋白数)。用来实施本发明的最佳的启动子是 pho A。认为该启动子受细胞中无机磷酸盐水平的调控,其中磷酸盐起下调启动子活性的作用。因此,通过损耗细胞中的磷酸盐,启动子的活性可以增加。通过使细胞在富含磷酸盐的培养基(如 2YT 或 LB)中生长来获得所需的结果,从而控制基因 III 融合物的表达。

用于实施本发明的载体中另一个有用的组件是信号序列。该序列通常位于紧靠编码融合蛋白基因的 5'端,因此将转录到融合蛋白的氨基端。然而,在某些情况下,已经证实该信号序列位于除编码待分泌蛋白的基因 5'端外的其它位置。该序列使其连接的蛋白靶向通过细菌细胞的内膜。编码信号序列的 DNA 可以从编码具有信号序列的蛋白的任何基因中以限制性内切核酸酶片段的形式获得。合适的原核信号序列可以从编码(例如)LamB 或 OmpF(Wong 等人, Gene 68;193(1983)), MalE, PhoA 的基因和其它基因获得。实施本发明的一种较佳的原核信号序列是大肠杆菌热稳定的肠毒素 II(STII)信号序列(如 Chang 等人, Gene 55:189(1987)中所述)。

用来实施本发明的载体的另一个有用的组件是表型选择基因。典型的表型选择基因是编码的蛋白能赋予宿主细胞抗生素抗性的那些基因。作为描述,为了该目的

可采用氨苄青霉素抗性基因(amp)和四环素(tet)抗性基因。

用 Sambrook 等人(同上)中描述的标准重组 DNA 程序制得包含上述组件以及编码所需多肽的基因(基因 1)的合适载体构建物。切割待组合而形成载体的分离的 DNA 片段、修饰并以特定次序和方向连接,产生所需的载体。

5 DNA 用合适缓冲液中的合适限制性反应酶切割。通常,在大约 20 微升的缓冲液中,将大约 1-2 单位的合适的限制性酶用于大约 0.2-1 μ g 的质粒或 DNA 片段。合适的缓冲液、DNA 浓度、以及培育时间和温度由限制性酶的生产商指定。通常,37 $^{\circ}$ C 培育 1 至 2 小时就足够了,但是有几种酶需要更高的温度。在培育后,用苯酚和氯仿混合液抽提消化溶液,除去酶和其它污染物,通过乙醇沉淀从水性组分中回收
10 DNA。

为了将 DNA 片段连接在一起形成功能性载体,DNA 片段的末端必须相互相容。在某些情况下,末端在内切核酸酶消化后直接相容。然而,可能需要将内切核酸酶消化通常产生的粘性末端首先转变成平头来使它们适用于连接。为了使末端变平,用合适的缓冲液以及 10 单位 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段(Klenow)在四种脱氧核苷三磷酸存在下 15 $^{\circ}$ C 处理 DNA 至少 15 分钟。然后用苯酚-氯仿抽提和乙醇沉淀纯化
15 DNA。

经切割的 DNA 片段可用 DNA 凝胶电泳来作大小来分离和选择。DNA 可以电泳通过琼脂糖或聚丙烯酰胺基质。基质的选择取决于待分离 DNA 片段的大小。在电泳后,用电泳洗脱从基质中抽提出 DNA,或如果已经用熔点低的琼脂糖作为基质,
20 则可融化琼脂糖并从中抽提出 DNA(如 Sambrook 等人(同上)6.30-6.33 章所述)。

将大约等摩尔量的待连接在一起的 DNA 片段(先用合适的限制性酶消化,使得待连接的每个片段的末端相容)放入溶液中。该溶液中还含有 ATP、连接酶缓冲液以及连接酶(如 T4 DNA, 10 单位/0.5 μ gDNA)。如果要将 DNA 片段连接入载体中,则首先用合适的限制性内切核酸酶切割使载体线性化。然后用碱性磷酸酶或小牛肠磷酸酶处理线性化的载体。磷酸化防止了连接步骤期间载体自身连接。
25

在连接后,将现在插入了外来基因的载体转化入合适的宿主细胞中。对于本发明来说,原核细胞是较佳的宿主细胞。合适的原核宿主细胞包括大肠杆菌株 M101、大肠杆菌株 294(ATCC 号 31,446)、大肠杆菌株 W3110(ATCC 号 27,325)、大肠杆菌 X1776(ATCC 号 31,537)、大肠杆菌 XL-1 Blue(stratagene)和大肠杆菌 B;然而,也可
30 采用大肠杆菌的其它许多菌株例如 HB101、NM522、NM538、NM539 以及其它许多种属的原核细胞。除了上述的大肠杆菌株系外,也可用杆菌如枯草芽胞杆菌、其它肠杆菌如鼠伤寒杆菌或粘质沙雷菌以及各种假单胞菌属作为宿主。

原核细胞的转化很容易用 Sambrook 等人(同上)1.82 章节描述的氯化钙方法来实现。或者,可用电穿孔来转化这些细胞(Neumann 等人, EMBO J. 1:841(1982))。通过在抗生素(通常是四环素(tet)或氨苄青霉素(amp))上的生长来选择转化的细胞,由于载体上存在的 tet 和/或 amp 抗性基因而赋予转化细胞抗性。

- 5 在选出转化的细胞后,使这些细胞在培养基中生长,然后分离质粒 DNA(或插入了外来基因的其它载体)。质粒 DNA 可用本领域已知的方法来分离。两种合适的方法是如 Sambrook 等人(同上)1.25-1.33 章节中描述的小规模 DNA 制备和大规模 DNA 制备方法。然后用本领域已知的方法(如 Sambrook 等人(同上)1.40 章节中描述的方法)纯化分离的 DNA。然后用限制性图谱和/或 DNA 测序分析该纯化的质粒 DNA。DNA
10 测序通常用 Messing 等人, Nucleic Acids Res. 9:309(1981)中的方法或用 Maxam 等人, Meth. Enzymol. 65:499(1980)中的方法来进行。

4. 基因融合

- 本发明的噬菌体亲和步骤打算将包括所需多肽的基因(基因 1)和第二个基因(基因 2)融合,从而在转录时产生融合基因。基因 2 通常是噬菌体的包被蛋白基因,较
15 佳的是噬菌体 M13 包被蛋白基因 III 或其片段。基因 1 和 2 的融合可通过将基因 2 插入含基因 1 质粒中特定位点内来实现,或通过将基因 1 插入含基因 2 质粒中特定位点内来实现。

- 将基因插入质粒内需要使质粒在插入基因的精确位置处切开。因此,在该位点必须有限制性内切核酸酶位点(较佳的是一个唯一的位点,这样质粒在被限制性内切
20 核酸酶消化时只有一个位置被切开)。如上所述对质粒进行消化、磷酸化和纯化。然后将两个 DNA 连接在一起,将基因插入该线性化质粒内。如果质粒的末端与待插入基因的末端相容,则实现连接。如果用相同的限制性酶切割质粒以及分离的待插入的基因,则用连接酶(如噬菌体 T4 DNA 连接酶)并在 ATP 和连接酶缓冲液存在下于 16
℃培育混合物 1-4 小时,就可将 DNA 直接连接在一起(如 Sambrook 等人(同上)1.68
25 章所述)。如果末端不相容,则必须首先用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段或噬菌体 T4 DNA 聚合酶将它们变成平头,这两种聚合酶均需要四种脱氧核糖核苷三磷酸来填平消化的 DNA 的悬垂的单链末端。或者,可以用核酸酶(如核酸酶 S1)或绿豆核酸酶将末端变平,这两种酶的功能是将 DNA 悬垂的单链切去。然后如上所述用连接酶重新连接 DNA。在某些情况下,可能不能将待插入基因的末端变平,因为这样会改变编
30 码区的读框。为了克服这个问题,可采用寡核苷酸接头。接头作为桥梁来连接质粒和待插入基因。这些接头可用标准方法合成制成双链或单链 DNA。接头的一个末端与待插入基因的末端相容;首先用上述连接方法连接接头和该基因。设计接头另一

末端使其和连接用质粒相容。在设计接头时，必须小心不要破坏待插入基因的读框或质粒中所含基因的读框。在某些情况下，可能需要设计接头，从而使它们编码氨基酸的一部分或编码一个或多个氨基酸。

在基因 1 和基因 2 之间可以插入终止密码子，例如终止密码子 UAG(琥珀)、
5 UAA(赭石)和 UGA(乳白)(Microbiology, Davis 等人, Harper & Row, New York, 1980, 237 页, 245-247 页以及 274 页)。终止密码子在野生型宿主细胞中的表达导致合成基因 1 蛋白产物而没有连接基因 2 蛋白。然而，在抑制性宿主细胞中的生长导致合成可检测量的融合蛋白。该抑制性宿主细胞含有 tRNA，该 tRNA 经修饰在 mRNA 的终止密码子位置中插入了一个氨基酸，从而导致产生可检测量的融合蛋白。这些抑
10 制性宿主细胞是众所周知的，并且在 Bullock 等人, BioTechnologies 5,376-379(1987)中有所描述，例如大肠杆菌抑制性菌株。可采用任何可接收的方法将终止密码子放入编码融合多肽的 mRNA 中。

在编码多肽的第一基因以及编码至少一部分噬菌体包被蛋白的第二基因之间可以插入可抑制密码子。或者，通过取代多肽中最后一个氨基酸三联体或噬菌体包被
15 蛋白中第一个氨基酸，将可抑制的终止密码子插入毗邻融合位点处。当含有可抑制密码子的噬菌粒在抑制性宿主细胞中生长时，它产生可检测量的含有多肽以及包被蛋白的融合多肽。当噬菌粒在非抑制性宿主细胞中生长时，由于插入的可抑制的三联体密码 UAG、UAA 或 UGA 的终止作用，合成的多肽基本上不和噬菌体包被蛋白融合。在无抑制性细胞中，由于不存在融合的噬菌体包被蛋白，合成的多肽从宿主
20 细胞中分泌出来(否则它会附着在宿主细胞上)。

5. 基因 1 在选定位置上的改变(突变)

编码所需多肽的基因 1 的一个或多个所选密码子可以改变。然而，对应于可异构化的天冬氨酸残基的密码子必须改变。改变定义为：编码多肽的基因中一个或多个密码子发生替代、缺失或插入，从而导致多肽的氨基酸序列与未改变的相同多肽
25 的天然序列相比有所改变。较佳的是，这种改变是用其它任何氨基酸代替分子一个或多个区域中的至少一个氨基酸。改变可用本领域已知的各种方法来产生。这些方法包括(但不局限于)寡核苷酸介导的诱变以及盒式诱变。

a. 寡核苷酸介导的诱变

寡核苷酸介导的诱变是用来制备基因 1 的替代型、缺失型和插入型变体的较佳
30 的方法。该技术是本领域所熟知的，如 Zoller 等人, Nucleic Acids Res 19:6487-6504(1987)所述。简言之，基因 1 这样来改变：使编码所需突变的寡核苷酸与 DNA 模板杂交，该模板是单链形式的质粒，含有基因 1 的未改变的或天然的 DNA 序列。

杂交后,用 DNA 聚合酶合成模板的整个第二条互补链,从而掺入了该寡核苷酸引物并编码基因 1 中所选的变化。

通常,采用的寡核苷酸的长度至少为 25 个核苷酸。最优的寡核苷酸是在突变的核苷酸编码两侧均有 12 至 15 个和模板完全互补的核苷酸。这确保寡核苷酸能与单链 DNA 模板分子合适地杂交。用例如 Crea 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5765(1978)中描述的本领域已知的技术很容易合成寡核苷酸。

DNA 模板只能用从噬菌体 M13 载体(通常获得的 M13mp18 和 M13mp19 载体是合适的)衍生的那些载体、或是含有单链噬菌体复制起点的那些载体来产生(如 Viera 等人, Meth. Enzymol. 153:3(1987)中所述)。因此,待突变的 DNA 必须插入这些载体之一内以便产生一个单链模板。单链模板的产生在 Sambrook 等人(同上)4.21-4.41 章节中有所描述。

为了改变天然的 DNA 序列,在合适的杂交条件下使寡核苷酸和单链模板杂交。然后加入 DNA 聚合酶(通常是 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段),用寡核苷酸作为合成引物,合成模板的互补链。这样形成了异源双链体,一条 DNA 链编码突变型基因 1,另一条链(原来的模板)编码天然的未改变的基因 1 的序列。然后将该异源双链体分子转化入合适的宿主细胞(通常是原核细胞如大肠杆菌 JM-101)。在细胞生长后,将它们接种到琼脂糖平板上,用 ^{32}P 放射性标记的寡核苷酸引物筛选,以鉴定含有突变 DNA 的细菌菌落。

可对上面描述的方法进行修改,从而产生一个同源双链体分子,其中质粒的两条链含有突变。修改如下:如上所述使单链寡核苷酸和单链模板退火。将三种脱氧核糖核苷酸(脱氧核糖腺苷酸(dATP)、脱氧核糖鸟苷酸(dGTP)和脱氧核糖胸苷酸(dTTP))和经修饰的硫代脱氧核糖胞苷酸(称为 dCTP-(aS), Amersham)合并。将该混合物加入模板寡核苷酸复合物中。在该混合物中加入 DNA 聚合酶后,产生了除突变碱基外与模板相同的 DNA 链。另外,这条新的 DNA 链将含有 dCTP-(aS)代替 dCTP,其作用是保护它以免限制性内切核酸酶消化。在异源双链体的模板链被合适的限制性酶切开后,可以用 ExoIII 核酸酶或其它合适的核酸酶消化模板链通过含有已诱变位点的区域。然后终止反应,留下只有部分单链的分子。然后用 DNA 聚合酶在所有四种脱氧核糖核苷三磷酸、ATP 以及 DNA 连接酶存在下形成完全双链的 DNA 同源双链体。然后可以如上所述将该同源双链体分子转化入合适的宿主细胞(如大肠杆菌 JM101)中。

一个以上氨基酸被替代的突变体可用几种方法来产生。如果氨基酸在多肽链中紧靠在一起,可用一条编码所有所需氨基酸替代的寡核苷酸同时进行突变。但是,

如果氨基酸相互之间相隔一定距离(相隔超过 10 个氨基酸),则更难产生一条编码所有所需变化的寡核苷酸。而是,可以用一种或两种替换方法。

第一种方法是,对于每个待替代的氨基酸各产生一条分开的寡核苷酸。然后使诸寡核苷酸和单链模板 DNA 同时退火,从模板上合成的第二链 DNA 将编码所有所需的氨基酸替代。另一种方法涉及用两轮或多轮诱变来产生所需的突变体。第一轮如单突变体所述那样:用野生型 DNA 作为模板,使编码第一个所需氨基酸替代的寡核苷酸和该模板退火,然后产生异源双链体 DNA 分子。第二轮诱变采用第一轮诱变中产生的突变的 DNA 作为模板。因此,该模板已经含有一个或多个突变。然后使编码其它所需氨基酸替代的寡核苷酸和该模板退火,现在得到的 DNA 链编码了第一和第二轮诱变的突变。该所需的 DNA 可用作第三轮诱变中的模板,如此类推。

b. 盒式诱变

该方法也是一种制备基因 1 的替代型、缺失型、和插入型变体的较佳的方法。该方法根据的是 Wells 等人, Gene 34:315(1985)中描述的方法。起始材料是包含基因 1 (待突变的基因)的质粒(或其它载体)。鉴定待突变的基因 1 中的密码子。在鉴定的突变位点的两侧必须有一个唯一的限制性内切核酸酶位点。如果没有这样的限制性位点存在,则可以用上述寡核苷酸介导的诱变方法来产生,以将它们导入基因 1 中合适的位置内。在限制性位点已经导入质粒内后,在这些位点切割质粒,使其线性化。用标准程序合成编码限制性位点之间 DNA 序列(但含有所需的突变)的双链寡核苷酸。分开合成两条链,然后用标准技术将它们杂交在一起。该双链寡核苷酸称为盒。该盒被设计成 3'和 5'端与线性化质粒末端两相容,这样它能直接连接质粒。现在该质粒含有基因 1 的突变的 DNA 序列。

6. 获得编码所需蛋白的 DNA

在另一个实例中,本发明包括产生含有一个或多个亚基的所需蛋白的变体。每个亚基通常由分开的基因编码。编码每个亚基的每个基因能用本领域已知的方法获得(例如见部分 II)。在某些情况下,可能需要用选自本文章节 II 中所述方法的分离技术来获得编码不同亚基的基因。

在构建含有一个以上亚基的感兴趣蛋白可复制表达载体时,所有亚基可由相同的启动子来调控(该启动子通常位于编码亚基的 DNA 的 5'),或每个亚基可以由相同的启动子来调控(该启动子通常位于编码亚基的 DNA 的 5'),或每个亚基可以由在载体中合适取向的分开的启动子来调控,使得每个启动子和待调控的 DNA 操作性相连。启动子的选择如上文章节 III 中所述那样进行。

在构建含有编码具有多个亚基的感兴趣蛋白的 DNA 的可复制表达载体时,读

者可参看图 11, 该图通过描述图示了该载体, 图中显示了编码抗体片段每个亚基的 DNA。该图大致表明, 感兴趣蛋白的一个亚基将和噬菌体包被蛋白(如 M13 基因 III)融合。该基因融合物通常含有其自身信号序列。分开的基因编码其它的亚基, 显然每个亚基通常都具有其自身的信号序列。图 11 还显示单个启动子能调控两个亚基的
5 表达。或者, 每个亚基可以受不同启动子独立调控。感兴趣蛋白亚基-噬菌体包被蛋白融合构建物可以如上文章节 IV 所述那样制得。

在构建所需多亚基蛋白变体家族时, 载体中编码各亚基的 DNA 可以在各亚基的一个或多个位置上发生突变。在构建多亚基抗体变体时, 较佳的诱变位点对应于编码位于轻链、重链或两条链互补决定区(CDR)内氨基酸残基的密码子。CDR 通常
10 指超变区。诱变编码感兴趣蛋白各亚基 DNA 的方法基本上如上文章节 V 所述那样进行。

7. 制备靶分子并和噬菌粒结合

靶蛋白(如受体)可以分离自天然来源, 或用本领域已知的程序用重组方法制得。通过描述, 糖蛋白激素受体可用 McFarland 等人, *Science* 245:494-499(1989)中描述的
15 技术制得, 大肠杆菌中表达的非糖基化形式如 Fuh 等人, *J. Biol. Chem.* 265:3111-3115(1990)中所述那样。其它受体可用标准方法制得。

纯化的靶蛋白可以和合适的基质(如琼脂糖珠、丙烯酰胺珠、玻璃珠、纤维素、各种丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸羟烷酯凝胶、聚丙烯酸和聚甲基丙烯酸共聚物、尼龙、中性和离子性载体等)连接。靶蛋白和基质的连接可用如 *Methods in Enzymol.*
20 44(1976)中描述的方法或本领域已知的其它方法来实现。

在靶蛋白连接基质后, 在适合噬菌粒颗粒的至少一部分与固定化靶标结合的条件下, 使固定化的靶标与噬菌体克隆文库接触。通常, 该条件(包括 pH、离子强度、温度等)将模拟生理条件。

对固定化靶标高亲和力的结合的噬菌粒颗粒(“结合物”)通过洗涤和低亲和力的那些分开。结合物可用各种方法从固定化靶标上解离下来。这些方法包括用各种
25 方法从固定化靶标上竞争性解离下来。这些方法包括用野生型配体的竞争性解离、改变 pH 和/离子强度以及本领域已知的方法。

用结合物和辅助噬菌体感染合适的宿主细胞, 在适合扩增噬菌粒颗粒的条件下培育该宿主细胞。然后收集噬菌粒颗粒, 重复该选择步骤一次或多次, 直至收集到
30 对靶分子具有所需亲和力的结合物。

任选地, 噬菌粒颗粒文库可以依次和多个固定化靶标接触, 以提高对特定靶标的选择性。例如, 通常的情况是, 配体(如 hGH)具有多个天然受体。在 hGH 的例子

中,生长激素受体和催乳素受体均结合 hGH 配体。可能希望使 hGH 对生长激素受体的选择性高于对催乳素受体的选择性。这可以这样实现:首先使噬菌粒颗粒文库接触固定化的催乳素受体,洗脱出对催乳素受体亲和力低(即低于野生型 hGH)的那些,然后使催乳素亲和力低的“结合物”或未结合物与固定化的生长激素受体接触,然后选择高亲和力的生长激素受体结合物。在这种情况下,对催乳素受体亲和力较

5 低的 hGH 突变体将具有治疗用途,即使其对生长激素受体的亲和力稍微低于野生型 hGH。相同的策略也可用来使特定激素或蛋白对其一级功能受体的选择性高于对其清除性受体的选择性。

在本发明的另一个实例中,可以获得一种改进的底物氨基酸序列。它们可用来为蛋白接头制得最佳的“切割位点”,或用于最佳的蛋白酶底物/抑制剂。在该实例

10 中,将固定化分子(如 hGH)受体、生物素-亲和素、或能和基质共价连接的分子通过一个接头和基因 III 融合。该接头的长度宜为 3-10 个氨基酸,它将作为蛋白酶的底物。噬菌粒将如上所述那样构建,其中使编码接头区域的 DNA 随机突变,以产生连接位点有不同氨基酸序列的随机化的噬菌粒颗粒文库。然后将该噬菌粒颗粒文库固

15 定在基质上,并接触所需的蛋白酶。在线性区域内具有所需蛋白酶的较佳底物氨基酸序列的噬菌粒颗粒将被洗脱出来,首先产生编码较佳接头的噬菌粒颗粒的富集合并物。然后使这些噬菌粒颗粒循环几次,产生编码共有序列的颗粒的富集合并物。

II. 抗体的产生

起始抗体可用本领域中可获得的技术或产生这种抗体的技术制得。产生抗体的

20 典型方法在下文中有更详细的描述。

抗体针对感兴趣的抗原。较佳的,抗原是在生物学上重要的多肽,将其抗体给予患某种疾病或失调的哺乳动物会导致在该哺乳动物体内产生治疗效果。然而,本发明还包括针对非多肽抗原(如肿瘤相关糖脂抗原,见美国专利 5,091,178)的抗体。

当抗原是多肽时,它可以是跨膜分子(如受体)或配体(如生长因子)。典型的抗原

25 包括:分子如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;胰高血糖素;凝血因子如蛋白 C;心钠素;肺表面活性物质;纤溶酶原激活剂,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂(tPA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子 α 和 β ;脑啡肽酶;RANTES 趋化因子(活化后可调节的、正常 T 细胞表达并分泌的因子);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白如人血清白蛋白;米勒抑制性物质;松弛素 A 链;松弛素 B 链;松弛素原;小鼠促性腺素

30 相关肽;微生物蛋白;如 β 内酰胺酶;DNA 酶;IgE,一种细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原(CTLA),如 CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生

长因子的受体；蛋白 A 或 D；类风湿因子、神经营养因子(如骨衍生神经神经营养因子 BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5 或-6(NT-3, NT-4, NT-5 或 NT-6)，或神经生长因子如 NGF- β 、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(如 aFGF 和 bFGF)；外皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)(如 TGF- α 和 TGF- β ，包括 TGF- β 1、
5 TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4 或 TGF- β 5)；胰岛素样生长因子 I 和 II(IGF-1 和 IGF-11)，des(1-3)-IGF-1(脑 IGF-1)；胰岛素样生长因子结合蛋白；CD-4 蛋白，如 CD3、CD4、CD8、CD9 和 CD20；促红细胞生成素；骨诱导因子(osteoinductive factor)；免疫毒素；骨形态发生蛋白(BMP)；干扰素如干扰素- α 、 β 和 γ ；集落刺激因子(CSF)，例如 M-CSF、GM-CSF 和 G-CSF；白细胞介素(IL)，如 IL-1 至 IL-10；超氧化物歧化酶；
10 T 细胞受体；表面膜蛋白；归巢受体；地址素；调控蛋白；整联蛋白如 CD11a, CD11b, CD11c, CD18 和 ICAM, VLA-4 和 VCAM；肿瘤相关抗原如 HER2、HER3 或 HER4 受体；上述任一肽的片段。

本发明包括的抗体的较佳分子靶包括 CD 蛋白，如 CD3、CD4、CD8、CD19、CD20 和 CD34；ErbB 受体家族成员，如 EGF 受体、HER2、HER3 或 HER4 受体；
15 细胞附着分子，如 LFA-1、Mac12、p150,95, VLA-4、ICAM-1、VCAM 和 α v/ β 3 整联蛋白，包括其 α 或 β 亚基(例如抗 CD11a、抗 CD18 或抗 CD11b 抗体)；生长因子如 VEGF；IgE；血型抗原；flk2/flk3 受体；肥胖(OB)受体；mpl 受体；CTLA-4；蛋白 C 等。一种特别佳的靶标是 IgE。

抗体针对从第一种哺乳动物衍生的抗原而产生。较佳的，第一种哺乳动物是人。
20 然而，也可考虑其它哺乳动物，如农场动物、宠物或动物园动物，例如在要用这种抗体用来治疗这些哺乳动物时。第一种哺乳动物的抗原可以从其天然来源分离获得，以便产生针对它的抗体。然而，如下所述，可用包含该抗原的细胞作免疫原来制备抗体。在其它实例中，抗原用重组方法或其它合成方法制得。选出的抗体通常对抗原有足够强的结合亲和力。例如，抗体可以不超过约 1×10^{-7} M(较佳的不超过 1×10^{-8} ，
25 最佳的不超过约 1×10^{-9} M)的结合亲和力(Kd)数值结合第一种哺乳动物的抗原。抗体亲和力例如可用饱和结合；酶联免疫吸附试验(ELISA)；以及竞争性试验(如 RIA)来测定。

另外，可对抗体作其它生物活性试验，例如来评价其作为治疗剂的效力。这些试验是本领域已知的，取决于靶抗原和抗体的预期用途。例子包括角化细胞单层粘
30 附试验和针对 CD11a 的混合淋巴细胞应答(MFR)试验(在下文实施例中有描述)；肿瘤生长抑制试验(如 WO98/06692 中描述的)；抗体依赖型细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CDC)试验(美国专利 5,500,362)；以及拮抗剂活性或血细胞生成试验

(见 WO95/27062)。

为了筛选能结合感兴趣抗原特定表位的抗体(例如封闭 MHM24 抗体结合的那些), 可进行如《抗体实验指南》Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 和 David Lane 编辑(1988)中描述的常规的交叉封闭试验。或者, 可进行如 Champe 等人, J. Biol. Chem.
5 270:1388-1394(1995)中描述的表位图谱, 来确定抗体是否结合感兴趣的表位。

然后测定抗体对动物种类的依赖性。用上述技术评估抗体对用来产生抗体的抗原的同系物(该同系物来自第二种哺乳动物)的结合亲和力。在较佳的实例中, 第二种哺乳动物是非人哺乳动物, 在临床前期研究中将抗体给予该动物。因此, 第二种哺乳动物可以是非人灵长类, 如恒猴、猕猴、狒狒、黑猩猩和短尾猿。在其它实例中,
10 第二种哺乳动物例如可以是啮齿类动物、猫或狗。通常, 依赖于动物种类的抗体对第二种非人哺乳动物抗原的结合亲和力比其对第一种哺乳动物抗原的结合亲和力至少弱大约 50 倍、或至少弱大约 500 倍或至少弱大约 100 倍。该结合亲和力通常是不能有效应用的依赖于动物种类的那类抗体对于第二种哺乳动物体内的临床前期研究。

15 尽管本发明中测定动物种类依赖性(以及评价具有改进性能的抗体突变体; 见下文)的较佳的方法是定量测定抗体结合亲和力, 但是在本发明的其它实例中, 除了或代之以结合亲和力测定外, 还评价了依赖于动物种类的抗体和抗体突变体的一种或多种生物性质。典型的这些生物试验如上所述。当这些试验指明了抗体的治疗效力时, 它们是特别有用的。通常, 在这些试验中显示出性能有所改进的抗体也会具有
20 增强的结合亲和力(但不一定)。因此, 在本发明的一个实例中, 当所选试验是结合亲和力试验以外的生物活性试验时, 采用第二种哺乳动物的“材料”(例如抗原、细胞、组织、器官或整个动物)时依赖于动物种类的抗体通常具有“生物活性”, 该活性的效果比其在采用来自第一种哺乳动物的制剂的对应试验中生物活性低至少约 50 倍, 或至少低 500 倍, 或至少低约 1000 倍。

25 然后改变依赖于动物种类的抗体, 以产生对第二种哺乳动物抗原的结合亲和力比依赖于动物种类的抗体更强的抗体突变体。较佳的是, 该抗体突变体对非人哺乳动物抗原的结合亲和力比依赖于动物种类抗体对抗原的结合亲和力强至少约 10 倍, 较佳的强至少约 20 倍、更佳的强至少约 500 倍, 有时至少强约 100 倍或 200 倍。所需的结合亲和力的增强将取决于依赖于动物种类的抗体的最初的结合亲和力。然而,
30 所用的试验是生物活性试验, 较佳的是抗体突变体在所选试验中的生物活性比依赖于动物种类的抗体在该试验的生物活性至少高大约 100 倍, 较佳的至少好约 20 倍, 更佳的至少好大约 50 倍, 有时至少好大约 100 倍或 200 倍。

为了产生抗体突变体，在依赖于动物种类的抗体的构架区残基中可以导入一个或多个氨基酸变化(例如替代)(例如替代被导入一个或多个变化中)，其结果是抗体突变体对第二种哺乳动物抗原的结合亲和力有所改进。用来修饰的构架区残基的例子包括：直接非共价结合抗原的残基(Amit 等人, Science 233:747-753(1986)); 与 CDR 5 构型相互作用或影响该构型的残基(Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)); 和/或参与 VL-VH 界面的残基(EP 239 400 B1)。在某些实例中，一个或多个这些构架区残基的修饰导致抗体针对第二种哺乳动物的抗原的结合亲和力有所增强。例如，在本发明的该实例中，约 1 至 5 个构架区残基可以改变。有时，这足以产生适合用于临床前期试验的抗体突变体，即使没有一个超变区残基发生改变。但是，抗体突变体通常将包括额外的超变区变化。

发生改变的超变区残基可以随机变化，尤其是当依赖于动物种类的抗体对第二种哺乳动物的初始结合亲和力是能容易筛选出随机产生的抗体突变体的那类亲和力。

下文描述了用来产生依赖于动物种类因而需要修饰的抗体技术：

15 A. 抗体的制备

(i) 抗原的制备

任选地偶联于其它分子的可溶性抗原或其片段，可用作产生抗体的免疫原。对于跨膜分子(如受体、这些受体的片段(例如受体的胞外结构域))可用作免疫原。或者，表达跨膜分子的细胞可用作免疫原。这些细胞可以从天然来源(例如癌细胞系)衍生获得，或可以是经重组技术表达跨膜分子的转化细胞。用来制备抗体的其它抗原及其形式对于本领域技术人员来说是显而易见的。

(ii) 多克隆抗体

多克隆抗体宜通过多次皮下(sc)注射或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在非人哺乳动物中产生。用双功能或衍生化试剂可以将相关抗原和在待免疫接种动物中有免疫原性的蛋白(例如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)偶联，这些衍生试剂例如是马来酰亚胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、N 羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、亚硫酰氯或 $R^1N=C=R$ (其中 R 和 R^1 是不同的烷基基团)。

用抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物：混合 100 微克或 5 微克蛋白或偶联物(分别针对家兔或小鼠)和 3 体积的弗氏完全佐剂，并将溶液注射入真皮内多个部位。1 个月后，用弗氏完全佐剂中肽或偶联物初始用量的 1/5 至 1/10 皮下多点注射加强免疫动物。7-14 天后，对动物取血，测定血清的抗体滴度。对动物加强免疫，

直至达到滴度平稳。较佳的是,用相同抗原、但偶联了不同蛋白和/或通过不同交联剂偶联的偶联物对动物加强免疫。偶联物还可在重组细胞培育蛋白融合物中制得。另外,可适当采用聚集试剂(如明矾)来增强免疫应答。

所选的哺乳动物抗体通常对抗原有足够强的结合亲和力。例如,抗体能以不高于大约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ (较佳的不高于大约 1×10^{-8} , 最佳的不高于大约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$) 的结合亲和力(Kd)数值结合人抗 IgE 抗原。抗体亲和力可用饱和结合; 酶联免疫吸附试验(ELISA)以及竞争性试验(例如放射性免疫试验)来测定。

为了筛选人抗 IgE 抗体,可以进行如《抗体实验指南》Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 和 David Lane 编辑(1988)中描述的常规的交叉连接试验。或者,可进行如 Champe 等人, J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)中描述的表位图谱来确定结合。

尽管测定多肽或抗体效力的较佳的方法是通过定量测定抗体结合亲和力,但是除了或代之以结合亲和力测定外,其它实例预计也能评价抗体的一种或多种性质。当这些试验指明了抗体的治疗效力时,它们是特别有用的。通常,在这些试验中显示出性能有所改进的抗体也会具有增强的结合亲和力(但不一定)。

(iii)单克隆抗体

单克隆抗体是识别单个抗原性位点的抗体。它们均一的特异性使得单克隆抗体比通常含有识别各种不同抗原性位点的抗体的多克隆抗体有用得多。

单克隆抗体可用杂交瘤方法(由 Kohler 等人, Nature, 256:495(1975)首先提出)制得,或可用重组 DNA 方法(例如参见美国专利 No. 4,816,567)制得。

在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物(如仓鼠或猕猴),以诱导淋巴细胞,而淋巴细胞产生或能产生特异性结合免疫接种用蛋白的抗体。或者,淋巴细胞可在体外受免疫。然后用合适的融合剂(如聚乙二醇)来融合淋巴细胞和骨髓瘤细胞,形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页(Academic Press, 1986))。

将这样制得的杂交瘤细胞接种到合适的培养基中,使其生长,该培养基中最好含有一种或多种抑制未融合亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),则杂交瘤培养基中通常加入了次黄嘌呤、氨基碟呤和胸苷(HAT 培养基),这些物质抑制了 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

较佳的骨髓瘤细胞是能有效融合、支持所选抗体生成细胞稳定而高水平产生抗体、且对诸如 HAT 培养基之类的培养基敏感的那些细胞。其中较佳的骨髓瘤细胞系

是小鼠骨髓瘤细胞系，如从 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤(购自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA)衍生的细胞系和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞(购自美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland USA)。另外，用来生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系也已有所描述(Kozbar, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur 等人, Monoclonal antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

测定杂交瘤细胞生长的培养液中是否有针对抗原的单克隆抗体产生。较佳的是，杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性宜通过免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA))来测定。

在鉴定出产生具有所需特异性、亲和性和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后，可通过有限稀释程序亚克隆该克隆，并用标准方法使其生长(Goding, 《单克隆抗体理论和实践》，59-103 页, Academic Press, 1986)。用于此目的的合适的培养基包括，例如，D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞可作为动物体内腹水肿瘤在体内生长。

用常规的免疫球蛋白纯化步骤(如蛋白 A-Sepharose, 羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析)，将亚克隆分泌的单克隆抗体适当地从培养基、腹水体液或血清中分离出来。

很容易分离获得编码单克隆抗体的 DNA 并用常规步骤对其测序(例如，用能与编码单克隆抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是此类 DNA 的较佳来源。一旦分离出后，可将 DNA 放入表达载体中，然后将该载体转移到宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞)中，在重组宿主细胞中获得合成的单克隆抗体。抗体的重组生产在下文有更详细地描述。

在另一个实例中，可以采用 McCafferty 等人, Nature, 348:552-554(1990)所述的技术从产生的抗体噬菌体文库中分离获得抗体或抗体片段。Clackson 等人, Nature, 352:624-628(1991)和 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)分别描述了用噬菌体文库来分离鼠和人抗体。以后的出版物描述了通过链改组(Marks 等人, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、以及组合性感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse 等人, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993))，来生产高亲和力(nM 范围)的人抗体。因此，这些方法是分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行的变化方案。

也可对 DNA 进行修饰，例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列来代替同

源的鼠序列(美国专利 No. 4,816,567; Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851(1984)), 或共价连接到免疫球蛋白多肽。

通常, 这些非免疫球蛋白多肽取代了抗体的恒定区, 或者它们取代了抗体中一个抗原结合位点的可变区, 产生了一个嵌合的二价抗体, 该抗体包含对一个抗原具有特异性的抗原结合位点和对一不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

(iv) 抗体突变体的产生

一旦鉴定并分离了依赖于动物种类的抗体, 它通常被用来产生抗体变体或突变体, 其中哺乳动物抗体中一个或多个超变区中的一个或多个氨基酸残基发生改变。或者, 或另外, 在哺乳动物抗体中可导入一个或多个构架区残基变化(例如替代), 而这些变化导致抗体突变体对人 IgE 的结合亲和力有所改进。用来修饰的构架区残基的例子包括: 直接非共价结合抗原的残基(Amit 等人, Science 233:747-753(1986)); 与 CDR 构型相互作用或影响该构型的残基(Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)); 和/或参与 VL-VH 界面的残基(EP 239 400 B1)。在某些实例中, 一个或多个这类构架区残基的修饰导致抗体针对人抗原的结合亲和力有所增强。例如, 在本发明的该实例中, 约 1 至 5 个构架区残基可以改变。有时, 这足以产生适合用于临床前期试验的抗体突变体, 即使没有一个超变区残基发生改变。但是, 抗体突变体通常将包括额外的超变区变化。

发生改变的超变区残基可以随机变化, 尤其是当依赖于动物种类的抗体的初始结合亲和力是能容易筛选出随机产生的抗体突变体的那些。

一种有用的产生抗体突变体的方法称为“丙氨酸扫描诱变”(Cunningham, B.C. 和 Wells, J.A. Science 244:1081-1085(1989); Cunningham, B.C.和 Wells, J.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6434-6437(1991))。在此, 用丙氨酸或聚丙氨酸残基取代一个或多个超变区残基, 来影响氨基酸和第二种哺乳动物抗原的相互作用。那些在功能上表现出对替代敏感的超变区残基再通过替换位点处引入进一步的或其他的突变来精制(refine)。这样, 尽管引入氨基酸序列变异的位点是预先确定的, 但是突变本身的性质不必预先确定。如本文所述, 筛选以这种方式产生的丙氨酸突变体是否有生物活性。用其它氨基酸可尝试类似的替代, 这取决于扫描残基能否赋予的所需的性能。

本发明还提供了更系统性的方法来鉴定待修饰的氨基酸残基。根据该方法, 鉴定处依赖于动物种类的抗体中涉及结合第一种哺乳动物抗原的超变区残基以及涉及结合第二种哺乳动物的该抗原同系物的那些超变区残基。为了实现这个目的, 可以用丙氨酸扫描依赖于动物种类的抗体的超变区残基, 测试每个丙氨酸突变体与第一和第二种哺乳动物抗原的结合。从而鉴定出涉及结合第一种哺乳动物(例如人)抗原的

超变区残基和涉及结合第二种哺乳动物(例如非人)此抗原同系物的那些超变区残基。较佳的是,选择明显参与结合第二种哺乳动物(如非人类哺乳动物)抗原、但不结合第一种哺乳动物(如人)抗原的那些残基作为修饰的候选物。在另一个实例中,选择明显参与结合第一和第二种哺乳动物抗原的那些残基来进行修饰。在还有一个但不是较

5 佳的实例中,选择参与结合人 IgE 抗原、但不结合同系的哺乳动物(非人)IgE 的那些残基进行修饰。这些修饰可包括残基缺失或毗邻感兴趣残基处插入一个或多个残基。然而,修饰通常涉及用另一氨基酸替代该残基。

通常,可以从表 A 标题“较佳的替代”中所示的那些保守性替代开始。如果这种替代导致生物活性(如结合亲和力)改变,那么可引入表 A 中“典型替代”所命名的

10 的、或如下文按氨基酸类型进一步描述的更充实的改变,然后筛选产物。

表 A
氨基酸残基的保守性替代

最初的残基	典型替代	较佳的替代	DNA 密码子
Ala (A)	val,leu,ile	val	GCA, GCC, GCG, GCU
Arg (R)	lys,gln,asn	lys	AGA,AGG,CGA,CGC,CGG,CGU
Asn (N)	gln,his,lys,arg	gln	AAC,AAU
Asp (D)	glu	glu	GAC,GAU
Cys (C)	ser	ser	UGC,UGU
Gln (Q)	asn	asn	CAA,CAG
Glu (E)	asp	asp	GAA,GAG
Gly (G)	pro,ala	ala	GGA,GGC,GGG,GGU
His (H)	asn,gln,lys,arg	arg	CAC,CAU
Ile (I)	leu,val,met,ala,phe, 正亮氨酸	leu	AUA,AUC,AUU
Leu (L)	正亮氨酸,ile,val, met,ala,phe	ile	UUA,UUG,CUA,CUC,CUG,CUU
Lys (K)	arg,gln,asn	arg	AAA,AAG
Met (M)	leu,phe,ile	leu	AUG
Phe (F)	leu,val,ile,ala,tyr	leu	UUC,UUU
Pro (P)	ala	ala	CCA,CCC,CCG,CCU
Ser (S)	thr	thr	AGC,AGU,UCA,UCC,UCG,UCU

Thr (T)	ser	ser	ACA,ACC,ACG,ACU
Trp (W)	tyr,phe	tyr	UGG
Tyr (Y)	trp,phe,thr,ser	phe	UAC,UAU
Val (V)	ile,leu,met,phe,ala, 正亮氨酸	leu	GUA,GUC,GUG,GUU

通过选择在下列方面效应明显不同的替代来在抗体生物性质中实现更充实的修饰：(a)维持替代区域中多肽骨架的结构，例如折叠或螺旋构型；(b)维持靶位置处分子的电荷或疏水性；或(c)维持侧链体积。根据共同的侧链性质，天然存在的残基被分成下列几类：

- (1)疏水的：正亮氨酸, met,ala,val,leu,ile;
- (2)中性亲水的：cys,ser,thr,asn,gln;
- (3)酸性的：asp,glu;
- (4)碱性的：his,lys,arg;
- (5)影响链取向的残基：gly,pro;和
- (6)芳香类的：trp,tyr,phe.

非保守性取代需要用这些类别中一类的某种氨基酸替换另一类的某种氨基酸。

编码氨基酸序列突变体的核酸分子可用本领域中已知的各种方法来制得。这些方法包括，但不局限于，对早期制得的突变体或非突变型依赖于动物种类的抗体进行寡核苷酸介导的(定点)诱变、PCR 诱变或盒式诱变。制备突变体的较佳的方法是定点诱变(见 Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488,1985)。

在某些实例中，抗体突变体只有单个超变区残基被替代，例如从大约 2 个到 515 个超变区替代。

通常，生物性质有所改进的抗体突变体的氨基酸序列和哺乳动物抗人 IgE 抗体重链或轻链可变区的氨基酸序列有至少 75%的氨基酸序列相同性或相似性(较佳的至少 80%，更佳的至少 85%，还要佳的至少 90%，最佳的为至少 95%)。该序列的相同性或相似性在此定义成：在序列排列对齐并引入空隙(如果需要)从而达到最大的序列相同百分比之后，候选序列中和依赖于动物种类的抗体残基中相同(即同一残基)或相似(即根据上文共同侧链性质的同一组中的氨基酸)的氨基酸残基百分数。

或者，抗体突变体可通过抗 IgE 抗体重链和轻链的 CDR 区域系统性突变来产生。产生这些抗体突变体的较佳的方法包括采用噬菌体展示的亲和力成熟(Hawkins 等人，

J. Mol. Biol. 254: 889-896(1992)和 Lowman 等人, Biochemistry 30(45):10832-10838(1991))。已经知道,噬菌体包被蛋白融合可用来关联展示的蛋白或肽的表型和编码它们的噬菌体颗粒基因型(Smith, Science 228:1315(1985); Scott 和 Smith, Science 249:386(1990); Cwirla 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8:309(1990); Devlin 等人, 5 Science 249:404(1990); Wells 和 Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 597(1997)中的回顾;美国专利 5,223,409(1990))。抗体的 F(ab)结构域也已经被展示在噬菌体上 (McCafferty 等人, Nature 348: 552(1990); Barbas 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978(1991); Garrard 等人, Biotechnol. 9:1373(1991))。

单价噬菌体展示包括将一组蛋白变体展示成和噬菌体包被蛋白的融合物,从而将变体的展示限制在仅仅几个噬菌体颗粒才有一个拷贝(Bass 等人, Proteins 10 8:309(1990))。以前已经通过连续应用诱变、单价噬菌体展示、功能性分析以及加入有利的突变而实现了亲和力成熟或改进了各种蛋白的平衡结合亲和力,例如以人生长激素(Lowman & Wells, J. Mol. Biol. 234:564-578(1993); 美国专利 5,534,617),或以抗体的 F(ab)结构域(Barbas 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3809(1994); Yang 等人, 15 J. Mol. Biol. 254:392(1995))为例子。

在噬菌体颗粒上可以构建许多(10^6)蛋白变体(它们在序列中不同的指定位置上有所不同)的文库。每一个颗粒含有编码该特定蛋白变体的 DNA。在亲和力纯化多轮后,用固定的抗原分离出个别噬菌体克隆,从它们的 DNA 推导出它们展示的蛋白的氨基酸序列。

20 (a)人源化和人抗体

人源化是一种制备嵌合抗体的技术,其中基本上不到一个完整的人可变区被非人种类的对应该序列替代。人源化抗体中导入了一个或多个非人源氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“导入的”残基,它们通常取自“导入的”可变区。人源化可基本上根据 Winter 及其合作者(Jones 等人, Nature, 321:522-525(1986); 25 Riechmann 等人, Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen 等人, Science, 239:1534-1536(1988))所述的方法来进行,用啮齿类互补决定区(CDR)或 CDR 序列来取代人抗体的对应序列。因此,这些“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 No. 4,816,567),其中基本上不到一个完整的人可变区被非人动物的对应序列取代。如本发明所实践的,人源化抗体有一些 CDR 残基以及可能还有一些 FR 残基被鼠抗体中类似部位的残基 30 取代。

选择人轻链和重链可变区用来制备人源化抗体对于降低抗原性来说是非常重要的。根据所谓的“最佳配合”方法,用已知的人可变区序列的整个文库来筛选啮齿

类抗体的可变区序列。然后,采用最接近啮齿类的人序列作为人源化抗体的人构架区(Sims 等人, J. Immunol., 151:2296(1993); Chothia 等人, J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。另一种方法采用衍生自所有人抗体轻链或重链特定亚组共有序列的特定构架。同一构架区可用于几个不同的人源化抗体(Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Presta 等人, J. Immunol., 151:2623(1993))。

更重要的是,抗体的人源化应保留对抗原的高亲和力以及其它有利的生物性能。为达到这一目的,一个较佳方法是,通过亲代序列和人源化序列的三维模型分析亲代序列和各种概念上(conceptual)的人源化产物来制得人源化抗体。根据具有相似序列的 F(ab)结构,分别从共有序列构建特定抗体结构域(例如 VH 和 VL 结构域)的模型。免疫球蛋白的三维模型是本领域技术人员通常能获得的和熟知的。可得到能描述和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。观察这些显示结果,就能分析残基在候选免疫球蛋白序列中可能起的作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合能力的残基。例如,在实施例 2 中制作片段 F(ab)-12 的模型时,用鼠 MAE11 作为模板来启发待修饰的 CDR 和构架残基的灵感,并结合分子模型来获得突变体序列。

可以提到的另一个例子是对照抗体 Mab4d5。在这里,以 Brookhaven 蛋白数据库的几个 Fab 结构为基础构建了该模型(条目 1FB4、2RHE、2MCP、3FAB、1FBJ、2HFL 和 1REI)。首先,选择 F(ab)片段 KOL(Marquart, M 等人, J. Mol. Biol. 141:369-391(1980))作为 VL 和 VH 结构域的模板,然后利用它们的主链原子坐标(INSIGHT 程序, Biosym Technologies)将另外的结构叠加在该结构上。利用类似的程序和技术来制作所需抗体的模型。

采用分子模型的一种典型分析可如下进行:对每个给定的残基位置计算各叠加结构中模板 C α 和类似物 C α 之间的距离。通常,如果对于给定的残基而言,所有(或几乎所有)的 C α -C α 距离均小于等于 1Å,那么该位置被包括在共有结构内。在某些情况下,β折叠构架残基将满足这些标准,而 CDR 环却不能。对每个这些选定残基计算个别 N、C α 、C 和 O 以及 C β 原子的平均坐标,用商业上可获得的程序(例如 DISCOVER 程序(Biosym Technologies))和 AMBER 力场通过 50 轮能量减到最小法的校正所得到的与非标准键几何结构的偏差(Weiner, S,J,等人, J. Amer. Chem. Soc. 106:765-784(1984)),然后固定 C α 坐标。然后将高度保守残基的侧链(例如二硫键桥半胱氨酸残基)掺入所得的共有结构中。然后,掺入特定抗体 VL 和 VH 结构域的序列,以 CDR 残基为开始,用 Chothia 等人(Chothia, C.等人, Nature 342:877-883(1989))的 CDR 构型列表作为指南。根据 Fab 晶体结构、旋转异构体文库(Ponder, J.W. &

Richards, F.M., J. Mol. Biol. 193:775-791(1987))以及填充因素来选择侧链构型。由于 VH-CDR3 不可能用上述标准来指定, 因此可以用 INSIGHT 程序搜寻大小相似的环来产生模型, 用堆积和溶剂接触因素(solvent exposure consideration)来衍生, 或用其它常规的和商业上能获得的技术来产生。较佳的是使该模型经历能量减到最小法 5000 5 轮。

这样, 可以从接受序列和导入序列选择获得构架残基并组合, 从而获得所需的抗体性能, 例如对靶抗原的亲和力提高。通常, CDR 残基直接并最基本地参与影响抗原结合。在实施例 2 中产生 F(ab)-12 时采用了该技术, 其中使用了鼠 CDR 残基的组合, 与分子模型结合产生人源化的鼠抗 IgE 抗体片段。

10 另外, 现在已经可以生产能在免疫后产生人抗体全部组成但不产生内源性免疫球蛋白的转基因动物(例如小鼠)。例如, 已经描述了嵌合的和种系突变型小鼠中抗体重链连接区(JH)纯合缺失导致内源性抗体产生完全被抑制。将人种系免疫球蛋白阵列转移到这些种系突变型小鼠中会在抗原攻击时导致产生人抗体。Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551(1993); Jakobovits 等人, Nature 362:255-258(1993); 15 Bruggermann 等人, Year in Immunol. 7:33(1993);和 Duchosal 等人, Nature 355:258(1992)。人抗体也可从噬菌体展示文库衍生获得(Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol. 227:381(1991); Marks 等人, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991); Vaughan 等人, Nature Biotech 14(1996))。

(b) 额外的修饰

20 在产生抗体突变体后, 测定该分子相对于依赖于动物种类的抗体的生物活性。如上所述, 这可能包括测定抗体的结合亲和力和/或抗体的其它生物活性。在本发明的一个较佳的实例中, 如上制得一组抗体突变体, 并筛选其对第二种哺乳动物抗原的结合亲和力。对从该初次筛选选出的一种或多种抗体突变体任选地进行一个或多个生物活性试验, 以确认具有增强的结合亲和力的抗体突变体确实可用于(例如)临床 25 前期研究。在较佳的实例中, 抗体突变体保留了结合第一种哺乳动物抗原的能力, 此结合亲和力与依赖于动物种类的抗体相似。这可通过避免改变参与抗人抗体结合抗原的可变区残基来实现。在其它实例中, 抗体突变体对第一种哺乳动物(抗原)的结合亲和力明显改变(例如对该抗原的结合亲和力最好是比依赖于动物种类的抗体好, 但也可能比它差)。

30 可对这样选出的抗体作进一步修饰, 这通常取决于抗体的预期用途。这些修饰可包括进一步改变氨基酸序列、与异源多肽融合和/或共价修饰(如下文所述的)。关于氨基酸序列变化, 上文描述了典型的修饰。例如, 未参与维持抗体突变体合适构

型的任何半胱氨酸残基也可以被替代(通常被丝氨酸替代),以改进分子的氧化稳定性并防止异常的交联。相反,(a)抗体中可以加入半胱氨酸键以改进其稳定性(特别是当抗体是抗体片段(如 Fv 片段)时)。另一类氨基酸突变体具有改变的糖基化方式。这可通过抗体中发现的一个或多个糖部分缺失,和/或加入抗体中不存在的一个或多个糖基化位点来实现。抗体的糖基化通常是 N 或 O 相连。N 相连指糖部分连接在天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸以及天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是糖部分酶促连接到天冬酰胺侧链上的识别序列。因此,多肽中这些三肽序列的存在产生了一个潜在的糖基化位点。O 相连的糖基化是指,糖通过醚氧连接;例如,N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、岩藻糖或木糖与羟基氨基酸(最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但是也可使用 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸)键合。在抗体中加入糖基化位点可通过改变氨基酸序列,从而使其含有一个或多个上述三肽序列(对于 N 相连的糖基化位点来说)来方便地实现。改变还可通过在原来抗体序列中加入或代之以一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来制得(对于 O 相连的糖基化位点来说)。

(v) 抗体片段

制备抗体片段的各种技术已经发展起来。在传统上,这些片段是通过完整抗体的蛋白酶消化来获得的(例如参见, Morimoto 等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992)和 Brennan 等人, *Science*, 229:81(1985))。然而,现在这些片段可用重组宿主细胞来直接制得。例如,如上所述,抗体片段可从抗体噬菌体文库中分离获得。或者,可从大肠杆菌中直接回收得到 F(ab')₂-SH 片段,并化学交联形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。根据另一种方法, F(ab') 片段可直接从重组宿主细胞培养中分离获得。制备抗体片段的其它方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。在其它实例中,所选抗体是单链 Fv 片段(scFv)。(PCT 专利申请 WO 93/16185)。

(vi) 多特异性抗体

多特异性抗体对至少两种不同抗原有结合特异性。尽管这些分子通常只结合两种抗原(即为双特异性抗体, BsAb),但是具有额外特异性的抗体如三特异性抗体也包括在本文所用的该表达含义内。BsAb 的例子包括一个臂针对某肿瘤细胞抗原、另一个臂针对细胞毒性触发分子的那些抗体,如抗 FcγRI/抗 CD15、抗 p185^{HER2}/FcγRIII (CD16)、抗 CD3/抗恶性 B 细胞(1D10)、抗 CD3/抗 p185^{HER2}、抗 CD3/抗 p97、抗 CD3/抗肾细胞癌、抗 CD3/抗 OVCAR-3、抗 CD3/L-D1(抗结肠癌)、抗 CD3/抗促黑素细胞激素类似物、抗 EGF 受体/抗 CD3、抗 CD3/抗 CAMA1、抗 CD3/抗 CD19、抗 CD3/MoV18、抗神经细胞粘附分子(NCAM)/抗 CD3、抗叶酸结合蛋白(FBP)/抗 CD3、

抗泛(pan)癌相关抗原(AMOC-31)/抗 CD3；一个臂特异性结合肿瘤抗原、一个臂结合毒素的双特异性抗体，如抗皂草素/抗 ID-1、抗 CD22/抗皂草素、抗 CD7/抗皂草素、抗 CD38/抗皂草素、抗 CEA/抗蓖麻蛋白 A 链、抗 CD22/抗皂草素、抗 CD7/抗皂草素、抗 CD38/抗皂草素、抗 CEA/抗蓖麻蛋白 A 链、抗干扰素- α (IFN- α)/抗杂交瘤独特型、抗 CEA/抗长春花生物碱；转变酶激活前体药物的双特异性抗体，如抗 CD30/抗碱性磷酸酶(催化 丝裂霉素磷酸前体药物变成丝裂霉素醇)；可用作纤溶剂的双特异性抗体，如抗纤维蛋白/抗组织型纤溶酶原激活剂(tPA)、抗纤维蛋白/抗尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)、用来将免疫复合物靶向细胞表面受体的双特异性抗体，例如抗低密度脂蛋白(LDL)/抗 Fc 受体(如 Fc γ RI、Fc γ RII 或 Fc γ RIII)、用来治疗感染性疾病的 5 双特异性抗体，如抗 CD3/抗单纯疱疹病毒(HSV)、抗 T 细胞受体：CD3 复合物/抗流感病毒、抗 Fc γ RI/抗 HIV、用来体外或体内肿瘤检测的双特异性抗体，如抗 CEA/抗 EOTUBE、抗 CEA/抗 DPTA、抗 p185^{HER2}/抗半抗原；作为疫苗佐剂的双特异性抗体；以及用作诊断工具的双特异性抗体，如抗家兔 IgG/抗转铁蛋白、抗辣根过氧化物酶(HRP)/抗激素、抗抑生长素/抗 P 物质、抗 HRP/抗 FITC、抗 CEA/抗 β 半乳糖苷酶。三特异性抗体的例子包括：抗 CD3/抗 CD4/抗 CD37、抗 CD3/抗 CD5/抗 CD37 10 和抗 CD3/抗 CD8/抗 CD37。双特异性抗体可以制成全长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

制备双特异性抗体的方法是该领域中已知的。制备全长双特异性抗体的传统方法是 20 根据两个具有不同特异性的免疫球蛋白重链-轻链对共同表达(Millstein 等人, Nature, 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤(四杂交物)可能产生 10 种不同抗体分子的混合物，其中只有一种有正确的双特异性结构。正确分子的纯化通常采用亲和层析方法，这是相当费力的，且产物得率很低。WO93/08829 以及 Traunecker 等人, EMBO J. 10:3655-3659(1991)公开了类似的方法。

根据不同的方法，使具有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合位点)与 25 免疫球蛋白恒定区序列融合。最好与免疫球蛋白重链恒定区融合，至少包括部分铰链区、CH2 和 CH3 区。最好是至少在一个融合物中有含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及免疫球蛋白轻链(如果需要)的 DNA 插入分开的表达载体中，并且共同转染入合适的宿主生物体中。在构建时采用不相等比例的三种多肽链来提供最优得率的实例中，这为调节三个多肽片段相互比 30 例提供了很大的灵活性。然而，当至少两个多肽链以相等比例表达导致高产率，或比例无关紧要时，可以将两个或所有三个多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

在该方法的一个较佳实例中，双特异性抗体由一个臂中具有第一结合特异性的

杂交免疫球蛋白重链和另一臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现这种不对称的结构有利于将所需的双特异性抗体从不需要的免疫球蛋白链组合物中分离出来,因为免疫球蛋白轻链只存在于双特异性分子的一半中,这提供了容易分离的方式。该方法公开在 WO94/04690 中。关于产生双特异性抗体的更
5 详细的情况例如可参见 Suresh 等人, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)。

根据 WO96/27011 中描述的另一种方法,一对抗体分子间的界面可经工程改造成使得从重组细胞培养中回收获得的异二聚物达到最大的百分数。较佳的界面包含抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中,第一抗体分子界面上的一个或多个氨基酸小侧链被较大的侧链(如酪氨酸或色氨酸)代替。通过用较小的侧链(如丙
10 氨酸或苏氨酸)来代替大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上形成与大侧链大小相同或相似的补偿“空穴”。这样就提供了一个使得异二聚物的产率高于其它不需要产物(如均二聚物)的方法。

双特异性抗体包括交联的或“异偶联”的抗体。例如,异偶联物中的一个抗体可以与亲和素结合,另一个与生物素结合。例如,已有建议用这种抗体来使免疫系
15 统细胞靶向不需要的细胞(美国专利 No. 4,676,980)以及用来治疗 HIV 感染(WO91/00360、WO92/200373 和 EP03089)。异偶联抗体可用任何方便的交联方法来制得。合适的交联剂是本领域中已知的,美国专利 No. 4,676,980 中公开了合适的交联剂以及许多交联技术。

从抗体片段制备双特异性抗体的方法在文献中也已有所描述。例如,可通过化学键来制备双特异性抗体。Brennan 等人, *Science*, 229:81(1985)描述了这样一种方法,
20 其中将完整的抗体蛋白水解断裂成 $F(ab')_2$ 片段。在二巯基复合试剂亚砷酸钠存在下还原这些片段,使连位(vincinal)二巯基稳定,并防止分子间形成二硫键。然后将产生的 Fab' 片段转变成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后,通过巯基乙胺还原将一个 Fab' -TNB 衍生物重新转变成 Fab' -巯基,再与另一个 Fab' -TNB 衍生物等摩尔量混
25 合形成双特异性抗体。制得的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

最近的进展实现了从大肠杆菌中直接回收获得可化学交联形成双特异性抗体的 Fab' -SH 片段。Shalaby 等人, *J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992)描述了完全人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的制备过程。使各 Fab' 片段分别从大肠杆菌中分泌出来,然后在体外进行定向化学交联,形成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能结合过
30 度表达 ErbB2 受体的细胞和正常的人 T 细胞,并触发人细胞毒性淋巴细胞对人乳房肿瘤靶的裂解活性。

直接从重组细胞培养制备和分离双特异性抗体片段的各种方法已有描述。例如,

利用亮氨酸拉链可制得双特异性抗体。Kostelny 等人, J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合,使 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两个不同抗体的 Fab' 部分连接。在铰链区还原抗体均二聚物,形成单体,然后重新氧化形成抗体异二聚物。该方法也可用来制备抗体均二聚物。Hollinger 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)中描述的“二抗体”技术为制备双特异性抗体片段提供了另一种机制。这些片段包括通过一个接头将重链可变区(VH)连接到轻链可变区(VL),该接头非常短,使得同一链上的两个结构域之间不能发生配对。因此,一个片段上的 VH 和 VL 结构域被迫与另一片段上的互补 VL 和 VH 结构域配对,从而形成了两个抗原结合位点。采用单链 Fv(sFv)二聚物制备双特异性抗体片段的另一种策略也已有报道。见 Gruger 等人, J. Immunol., 152:5368(1994)。

也可考虑采用具有两价以上的抗体。例如,可制得三特异性抗体。Tutt 等人, J. Immunol. 147:60(1991)。

(vii)效应器功能的工程改造

在效应器功能方面可能希望改进本发明的抗体,以增强抗体(例如)结合 IgE 的效果。例如,可在 Fc 区域中引入半胱氨酸残基,从而在该区域中形成链间二硫键。这样制得的均二聚抗体可能有改进的内化能力和/或提高的补体介导细胞杀伤能力和依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)。参见 Caron 等人, J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922(1993)。或者,可将抗体工程改造成具有双 Fc 区,从而可能增强的补体裂解和 ADCC 能力。见 Stevenson 等人, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。

(viii)免疫偶联物

本发明还涉及包含与细胞毒性制剂偶联的本文所述抗体的免疫偶联物,细胞毒性制剂例如是化疗剂、毒素(如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)、或放射活性同位素(即放射偶联物)。

用来产生这些免疫偶联物的化疗剂在上文已有描述。可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自绿浓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、 α -八叠球菌、*Aleurites fordii* 蛋白、香石竹(dianthin)蛋白、*Phytolacca americana* 蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、momordica charantia 抑制剂、箭毒素、巴豆毒素、sapaonaria officinalis 抑制剂、gelonin、mitogellin、局限曲霉素、酚霉素、伊诺霉素和 tricothecenes。各种放射性核素可用来制备放射性偶联的抗体。例子包括 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

抗体与细胞毒性剂的偶联物可用各种双功能蛋白偶联剂制得,偶联剂例如是 N-

琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(iminothiolane,IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚氨酸二甲酯(dimethyl adipimidate)HCL)、活性酯(如辛二酸琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、二叠氮化合物(如二-对-(叠氮苯甲酰基)己二胺)、二重氮衍生物(如二-对-(重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯 2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可根据 Vitetta 等 Science 238:1098(1987)所述的那样制备蓖麻毒素免疫毒素。C-14 标记的 1-异硫氰酸基苯基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用来偶联放射性核苷酸与抗体的典型的螯合剂。见 WO94/11026。

在另一个实例中,抗体可以与“受体”(如链霉亲和素)偶联,用来预先靶向肿瘤,其中将抗体-受体偶联物给予患者,然后用清除剂从循环中除去未结合的偶联物,再给予与细胞毒性试剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(如亲和素)。

(ix)免疫脂质体

本文公开的抗体突变体也可配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体的制备方法是本领域中已知的,如 Epstein 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwang 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980);和美国专利 No. 4,485,045 和 4,544,545。美国专利 No. 5,013,556 中公开了循环时间增加的脂质体。

特别有用的脂质体可通过反向蒸发方法用包含卵磷脂、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂类组合物制得。将脂质体挤压通过限定孔径的滤膜,获得有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可如 Martin 等人, J. Biol. Chem. 257: 286-288(1982)中所述的那样通过二硫键互换反应与脂质体偶联。脂质体中可以任选地含有化疗剂(如阿霉素)。见 Gabizon 等人, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)。

(x) 依赖于抗体的酶介导的前体药物治疗(ADEPT)

将抗体与激活前体药物的酶(能将前体药物(如肽基化疗剂, 见 WO81/01145)转变成有活性的抗癌药)偶联, 本发明的抗体还可用于 ADEPT。例如参见 WO88/07378 和美国专利 No. 4,975,278。

用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶成分, 包括能作用于前体药物将其转变成更具活性和细胞毒性形式的酶。

用于本发明方法的酶包括(但不限于): 用于将含磷酸酯的前体药物转变成游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含硫酸酯的前体药物转变成游离药物的芳基硫酸酯酶; 用于将无毒性 5-氟胞嘧啶转变成抗癌药物(5-氟尿嘧啶)的胞嘧啶脱氨酶; 用于将含肽前体药物转变成游离药物的蛋白酶, 如锯齿(serratia)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L); 用于转变含 D-氨基酸取代基的

前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶；用于将糖基化前体药物转变成游离药物的糖断裂酶，如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶；用于将 β -内酰胺衍生的药物转变成游离药物的 β -内酰胺酶；以及用于将胺基氮分别经苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶，如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者，可用具有酶活性的

5 抗体(也称为抗体酶(abzyme))将本发明的前体药物转变成游离的活性药物(Massey, Nature 328:457-458(1987))。抗体-抗体酶偶联物可如本文所述的那样制得，以将抗体酶递送至肿瘤细胞群中。

利用本领域已知的技术(如用上述的异双功能交联剂)使本发明的酶与抗体突变体共价结合。或者，利用本领域中熟知的重组 DNA 技术(Neuberger 等人, Nature, 10 312:604-608(1984))，可以构建出融合蛋白，它包含本发明抗体的至少抗原结合区和与之相连的本发明酶的至少一个功能活性部分。

(xi)抗体补救性受体结合表位融合

在本发明的某些实例中，可能希望采用抗体片段而不是完整的抗体，例如来提高肿瘤穿透(penetration)。在这种情况下，可能希望对抗体片段进行修饰，以提高其

15 血清半衰期。例如，这可通过在抗体片段中掺入补救受体结合表位来实现(例如，通过抗体片段中合适区域内的突变，或通过在其末端中掺入此表位，然后通过 DNA 或肽合成融合入抗体片段末端或中部)。

较佳的，补救受体结合表位宜构成一个区域，其中 Fc 区的一个或两个环的任何一个或多个氨基酸残基被转移到抗体片段的类似位置上。更佳的是，Fc 区中一个或两个环的三个或更多残基被转移。还要佳的是，此表位取自(例如 IgG 的)Fc 区中 CH2 区，并被转移到抗体 CH1、CH3 或 VH 区、或一个以上的此类区域中。或者，此表位取自 Fc 区的 CH2 区，并被转移到抗体片段的 C_L 区或 V_L 区或这两者中。

20

(xii)抗体的其它共价修饰

抗体的共价修饰包括在本发明的范围内。它们可以通过化学合成制得或通过抗体的酶促或化学断裂制得(如果适用的话)。通过使抗体所靶向的氨基酸残基和能与所选侧链或 N 或 C 端残基反应的有机衍生剂反应，将抗体其它类型的共价修饰导入该分子内。

25

最通常是使半胱氨酰残基与 α -卤代乙酸酯(以及对应的胺)(如氯乙酸或氯乙酰胺)起反应，产生羧甲基或羧基酰胺基甲基衍生物。半胱氨酰残基还可通过和下列物质反应来衍生：溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基 2-吡啶基二硫化物、对-氯汞基苯甲酸、2-氯汞基-4-硝基苯酚、或氯-7-硝基苯并-2- -1,3-二唑。

30

组氨酰基残基通过和二乙基焦碳酸(diethylpyrocarbonate)在 pH5.5-7.0 下反应来衍生, 因为该试剂对组氨酰基侧链有相对特异性。还可用于对溴苯甲酰甲基化溴; 该反应宜在 pH6.0 的 0.1M 卡可酸钠中进行。

赖氨酰基和氨基端残基和琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。这些试剂的衍生处理具有逆转赖氨酰基残基电荷的效应。衍生处理含 α 氨基的残基的其它合适试剂包括亚氨酸酯, 如吡啶亚氨酸甲酯(methyl picolinimide)、吡哆醛磷酸、吡哆醛、氯氢硼化物、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的和乙醛酸反应。

精氨酰基残基通过与一种或几种常规试剂反应来修饰, 它们是苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和水合茚三酮。精氨酸残基的衍生处理需要反应在碱性条件下进行, 因为胍官能团的 pK_a 高。另外, 这些试剂可以和赖氨酸基团以及精氨酸的 ϵ 氨基基团反应。

酪氨酰基残基的特异性修饰可以这样进行, 特别感兴趣的是通过和芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应将光谱标记导入酪氨酰基残基内。最常见的是, 分别用 N-乙酰咪唑和四硝基甲烷来形成 O-乙酰酪氨酰基种类和 3-硝基衍生物。用 ^{125}I 或 ^{131}I 使酪氨酰基残基碘化, 来制备用于放射性免疫试验的标记蛋白。

羧基侧基团(天冬氨酰基或谷氨酰基)通过和碳化二亚胺($\text{R-N}=\text{C}=\text{C-R}'$)反应来选择性修饰, 其中 R 和 R' 是不同的烷基基团, 例如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳化二亚胺或 1-乙基-(4-氮-4,4-二甲基苯基)碳化二亚胺。另外, 天冬氨酰基和谷氨酰基残基通过和铵离子反应转变成天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基残基。

谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基有时会脱酰胺化, 分别变成对应的谷氨酰基和天冬氨酰基。这些残基在中性或碱性条件下脱酰胺。这些残基的脱酰胺形式在本发明的范围内。

其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链 α 氨基的甲基化(T.E. Creighton, 《蛋白质结构和分子性质》, W.H. Freeman & Co. San Francisco, 79-86 页(1983))、N 端胺的乙酰化、以及任一 C 端羧基的酰胺化。

其它类型的共价修饰包括用化学和酶方法偶联糖苷于抗体。这些程序的优点在于, 它们不需要在宿主细胞中产生具有 N 或 O 相连糖基化能力的抗体。根据采用的偶联方式, 糖可以和下列物质连接: (a)精氨酸和组氨酸; (b)游离的羧基; (c)游离的巯基, 如半胱氨酸的巯基; (d)游离的羟基, 如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的羟基; (e)芳族残基, 如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸中的芳族残基; 或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法在 1987 年 9 月 11 日公开的 WO 87/05330 中, 以及 Aplin 和 Wriston, CRC

Crit. Rev. Biochem., 259-306(1981)中有所描述。

除去抗体中的糖部分可用化学方法或酶方法来实现。化学去糖基化需要抗体接触化合物三氟甲烷磺酸或等价的化合物。该处理导致大多数或除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺)外所有的糖均断裂,同时保持抗体完整。Hakimuddin 等人, Arch. Biochem. Biophys. 259:52(1987)以及 Edge 等人, Anal. Biochem. 118:131(1981)中描述了化学去糖基化。酶法断裂抗体上的糖部分可以用 Thotakura 等人, Meth. Enzymol. 138:350(1987)中描述的各种外切和内切糖苷酶来实现。

抗体的其它类型的共价修饰包括以美国专利 No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 或 4,179,337 中描述的方式连接抗体和各种非蛋白类聚合物之一(例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)。

B. 载体、宿主细胞和重组方法

本发明还提供了编码本文公开的抗体突变体的分离的核酸、包含该核酸的载体和宿主细胞, 以及用来制备该抗体突变体的重组方法。

抗体突变体的重组生产方法是, 分离获得编码抗体的核酸并插入可复制的载体中作进一步克隆(DNA 扩增)或表达。编码单克隆抗体突变体的 DNA 很容易分离并用常规步骤来测序(如, 利用能特异性结合编码抗体突变体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。可采用许多种载体。载体组件通常包括(但不限于)下列中的一种或多种: 信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

(i)信号序列组件

本发明的抗体突变体不仅可以通过重组方法直接制得, 还可以制成和异源多肽(最好是信号序列, 或成熟蛋白或多肽的 N 端有特异性断裂位点的其它多肽)的融合多肽。所选的异源信号序列最好是能被宿主细胞识别并加工(如被信号肽酶断裂)的序列。由于原核宿主细胞不能识别和加工天然的抗体信号序列, 所以用例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定肠毒素 II 前导序列的原核生物信号序列来代替抗体信号序列。对于酵母菌分泌, 天然的信号序列可以用例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括酵母菌属和克鲁维酵母属 α 因子前导序列)或酸性磷酸酶前导序列、*C. albicans* 葡糖淀粉酶前导序列或 WO90/13646 中描述的信号取代。在哺乳动物细胞中表达时, 可采用哺乳动物信号序列以及病毒分泌性前导序列(如单纯疱疹 gD 信号)。

将该前体区域的 DNA 与读框中编码抗体突变体的 DNA 相连。

(ii)复制起点组件

表达和克隆载体均含有能使该载体在一种或多种所选宿主细胞中复制的核酸序列。通常，在克隆载体中，该序列是能使载体不依赖宿主染色体 DNA 独立复制的序列，它包括复制起点或自主复制序列。对于各种细菌、酵母和病毒的这些序列是熟知的。质粒 pBR322 的复制起点适用于大多数革兰阴性细菌，2 μ 质粒(复制)起点适用于酵母，各种病毒(复制)起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)可用于哺乳动物细胞中克隆载体。通常，哺乳动物表达载体不需要复制组件起点(通常用 SV40 起点只是因为它含有早期启动子)。

(iii) 选择基因组件

表达和克隆载体可以含有选择基因(也称为可选择标记物)。典型的选择基因编码出的蛋白：(a)提供了对抗生素或其它毒素(如氨苄青霉素、新霉素、氨基碟呤或四环素)的抵抗力；(b)弥补了营养缺陷型；或(c)提供了不能从复合培养基获得的关键的营养物，如编码杆菌 D-丙氨酸消旋酶的基因。

筛选方案的一个例子采用药物来使宿主细胞生长停滞。异源基因成功转化的那些细胞产生了抵抗药物的蛋白，从而在筛选方案中存活下来。这些显性选择例子采用的药物是新霉素、霉酚酸和潮霉素。

用于哺乳动物的合适的可选择标记的另一个例子是能鉴定感受态细胞摄取抗体突变体核酸的那些标记物，如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 I 和 II(较佳的是灵长类金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如，将所有转化体培养在含氨基碟呤(Mtx，一种 DHFR 的竞争性拮抗剂)的培养基中，首先鉴定出 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时，合适的宿主细胞是 DHFR 活性缺失的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

或者，使细胞在含有针对可选择标记物的选择剂(如氨基糖苷抗生素，如卡那霉素、新霉素或 G418)的培养基中生长，可选择出转化或共转化了编码抗体、野生型 DHFR 蛋白和另一可选择标记物(如氨基葡萄糖 3'-磷酸转移酶(APH))的 DNA 序列的宿主细胞(尤其是含有内源 DHFR 的野生型宿主细胞)。见美国专利 No. 4,965,199。

适用于酵母的选择基因是酵母质粒 Yrp7 中的 *trp1* 基因(Stinchcomb 等人, Nature, 282:39(1979))。*trp1* 基因为不能在色氨酸中生长的酵母突变株(例如，ATCC No. 44076 或 PEP4-1)提供了选择标记物。Jones, Genetics, 85:12(1977)。酵母宿主细胞基因组中的 *trp1* 损毁为在没有色氨酸存在下生长时检测转化提供了有效的环境。同样，*Leu2*-缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)可用已知携带 *Leu2* 基因的质粒来弥补。

此外，从 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 获得的载体可用来转化克鲁维酵母属酵母。另

外,已经报道了在 *K. lactis* 中大规模制备重组小牛凝乳酶的表达系统(Van den Berg, Bio/Technology, 8:135(1990))。利用克鲁维酵母属工业菌株来分泌成熟的重组人血清白蛋白的稳定多拷贝表达载体也已被公开。Fleer 等人, Bio/Technology, 9:968-975(1991)。

5 (iv)启动子组件

表达和克隆载体通常含有被宿主生物体识别并与抗体核酸操作性相连的启动子。适用于原核宿主的启动子包括 *phoA* 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(*trp*)启动子系统和杂交的启动子如 *tac* 启动子。然而,其它已知的细菌启动子也是适用的。用于细菌系统的启动子还含有与编码抗体的 DNA 操作性相连的 Shine-Dalgarno(SD)序列。

真核细胞的启动子序列也是已知的。基本上所有的真核基因在转录起始位点上游约 25-30 碱基处有富含 AT 的区域。在许多基因的转录起始点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT 区,其中 N 可以是任何核苷酸。大多数真核基因的 3'端是 AATAAA 序列,它可能是在编码序列的 3'端加入 polyA 尾区的信号。所有这些序列均能适当地插入真核表达载体中。

用于酵母宿主细胞的合适的启动子序列例子包括:3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶(如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、果糖磷酸激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶)的启动子。

其它酵母启动子(是可诱导的启动子,其额外优点是转录受生长条件的控制)是下述酶的启动子区:是醇脱氢酶 2、同种细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮新陈代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和利用麦芽糖和半乳糖的酶。用于酵母表达的合适的载体和启动子在 EP73,657 中有进一步的描述。酵母增强子还可与酵母启动子一起使用有好处。

25 通过从病毒(如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最佳的猴病毒 40(SV40))基因组获得的启动子,从异源哺乳动物启动子(如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子),从热休克启动子,可以控制载体在哺乳动物宿主细胞中的抗体转录,只要这些启动子与宿主细胞系统相容。

30 可以另含 SV40 病毒复制起点的 SV40 限制性片段的形式方便地获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子。人巨细胞病毒的立即早期启动子可以 HindIII E 限制性片段的形式方便地获得。美国专利 No. 4,419,446 中公开了用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳

动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 No. 4,601,978 中描述了该系统的一种改进方案。另外，人 β -干扰素 cDNA 可在单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子控制下，在小鼠细胞中表达。另外，Rous 肉瘤病毒的长末端重复序列可用作启动子。

(v)增强子元件组件

5 在载体中插入增强子序列通常能增强编码本发明抗体的 DNA 在高级真核细胞的转录。现已从哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)知道了许多增强子序列。但是，通常采用的是真核细胞病毒的增强子。例子包括复制起始区(bp100-270)晚期侧(late side)上的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起始区晚期侧上的多瘤增强子和腺病毒增强子。另见 Yaniv, Nature, 297:17-18(1982)关于激活真核启动子的增强元件部分。增强子可剪接入载体中抗体编码序列的 5'或 3'位上，但是较佳的是在启动子的 5'位。

(vi)转录终止组件

15 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或其它多细胞生物的真核细胞)的表达载体还含有转录终止和 mRNA 稳定化所需的序列。这些序列通常从真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5'端(有时是 3')非翻译区获得。这些区域含有的核苷酸片段转录成编码抗体的 mRNA 非翻译部分的聚腺苷酸化片段。一种有用的转录终止组件是牛生长激素聚腺苷酸化区域。见 WO94/11026 和该文公开的表达载体。

(vii)宿主细胞的选择及转化

20 用于克隆或表达本文所述的载体中 DNA 的合适宿主细胞是上述的原核细胞、酵母或高级真核细胞。用于此目的的合适的原核细胞包括真细菌类，如革兰阴性或革兰阳性菌，例如肠杆菌科如埃希杆菌属(如大肠杆菌、肠杆菌、欧文菌、克雷伯杆菌)、沙门菌属(如，鼠伤寒沙门菌)、沙雷菌属(如，粘质沙雷菌属)、志贺菌属，和杆菌属(如枯草芽胞杆菌和蕨样芽胞杆菌(如 DD266,710, 1989 年 4 月 12 日公开的蕨样芽胞杆菌 41P))、假单胞菌(如绿脓假单胞菌)和链霉菌。一个较佳的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC 31446)，但是其它菌株如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31537)和大肠杆菌 W3110(ATCC 27325)也是适用的。这些例子只用于描述，没有限制性。

30 除了原核细胞外，真核微生物如丝状真菌或酵母也是适于用作编码抗体载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母菌(即常见的面包酵母)是低级真核宿主微生物中最为常见的。然而，通常可得到和采用其它许多种、属和菌株，裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母属宿主，如乳克鲁维酵母(*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克曼氏克鲁维

酵母(*K. wicheramii*)(ATCC 24,178)、*K. waltii*(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*)(ATCC 36,906)、*K. thermotolerans*和马克斯克鲁维酵母(*K. marxianus*);
5 *yarrowia*[EP 402,226]; 巴士德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 念珠菌属:
Trichoderma reesia[EP 244,234]; 粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*); 许旺酵母属
(*Schwanniomyces*)如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*); 和丝状真菌如链孢
霉属(*Neurospora*)、青霉菌属(*Penicillium*)、*Tolypocladium* 和曲霉属(*Aspergillus*)如构
巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞从多细胞生物获得。理论上, 任何高级真
核细胞培养均可工作, 无论是脊椎动物还是无脊椎动物培养。无脊椎动物细胞的例
10 子包括植物和昆虫的细胞, Luckow 等人, Bio/Technology 6, 47-55(1988); Miller 等人,
Genetic Engineering, Setlow 等人编辑, 第 8 卷, 277-279 页(Plenum publishing 1986);
Mseda 等人, Nature 315,592-594(1985)。各种杆状病毒株和变体和对应的来自宿主如
草地夜蛾、埃及伊蚊、白纹伊蚊、黑尾果蝇和家蚕的相应的允许昆虫细胞已被鉴定。
感兴趣的特定细胞系是昆虫细胞系 sf9。用于转染的各种病毒株(例如, 苜蓿丫纹夜
15 蛾(*Autographa californica*)NPV 的 L-1 变体和家蚕的 Bm-5 株)是公众可获得的, 这些
病毒可用作本发明中所述的病毒, 尤其可用于转染草地夜蛾细胞。另外, 也可用棉、
玉米、土豆、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养作为宿主。

然而, 最感兴趣的是脊椎动物细胞, 且脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁
殖已经成为常规手段。见《组织培养》, Academic Press, Kruse 和 Patterson 编辑(1973)。
20 有用的哺乳动物宿主细胞系例子是: SV40 转化的猴肾细胞 CV1 系 (COS-7, ATCC
CRL1651); 人胚肾细胞系(293 或在悬浮培养中生长的 293 亚克隆细胞, Graham 等
人, J. Gen. Virol. 36:59(1977)); 乳仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL10); 中国仓鼠卵巢
细胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)); 小鼠足
细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980)); 猴肾细胞(CV1 ATCC CCL70);
25 非洲绿猴细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL2);
犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL34); 水牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL
1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL75); 人肝细胞(Hep G2, HB8065); 小鼠乳房肿瘤
(MMT060562, ATCC CCL51); TRI 细胞(Mather 等人, Annals N.Y. Acad. Sci.,
383:44-68(1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 和人肝癌细胞系(Hep G2)。

30 为了生产抗体用上述表达或克隆载体转化宿主细胞, 并将宿主细胞培养在常规
的营养培养基中, 培养基经适当变化以适合诱导启动子、选择转化子或扩增编码所
需序列的基因。

(viii)培养宿主细胞

用来生产本发明抗体突变体的宿主细胞可在各种培养基中培养。商业上可获得的培养基如 Ham's F10(Sigma)、极限必需培养(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、和 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM, Sigma)适用于培养宿主细胞。此外, Ham
5 等人, Meth. Enz., 58:44(1979), Barnes 等人, Anal. Biochem., 102:255(1980), 美国专利 No. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 或 5,122,469; WO87/00195; 或美国专利 Re. 30,985 中所述的任一培养基可用作(本发明)宿主细胞的培养基。所有这些培养基中可以按需添加入激素和/或其它生长因子(如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如 X 氯化物, 其中 X 是钠、钙、镁; 和磷酸盐)、缓冲剂(如 HEPES)、核苷
10 酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如 GENTAMYCIN™药)、微量元素(定义为最终浓度通常在微摩尔范围内的无机化合物)以及葡萄糖或等价能源。另外也可加入合适浓度的本领域技术人员已知的其它必需补充物。培养条件, 如温度、pH 等, 与前述选择宿主细胞表达时所用条件一样, 这对本领域普通技术人员来说是显而易见的。

(ix)抗体纯化

15 当采用重组技术时, 抗体突变体可产生在细胞内(周质空间内)或被直接分泌到培养基中。如果抗体突变体产生在细胞内, 则第一步是(例如)通过离心或超离心除去宿主细胞或裂解片段的颗粒碎片。Carter 等人, Bio/Technology 10:163-167(1992)描述了分泌入大肠杆菌周质空间的抗体的分离过程。简言之, 在乙酸钠(pH3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟(PMSF)存在下冻融细胞浆状物约 30 分钟。离心除去细胞碎片。若抗
20 体突变体被分泌到培养基中, 则通常首先用商业上购得的蛋白浓缩滤膜(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤装置)浓缩该表达系统的上清液。在前述任何步骤中均可加入抑制蛋白水解的蛋白酶抑制剂(如 PMSF), 还可加入抗生素来防止外来污染物的生长。

例如, 可用羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化从细胞中制得的抗体组合物, 其中亲和层析是较佳的纯化方法。蛋白 A 作为亲和配体的合适性取决于抗体突变体中免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用来纯化以人 γ 1、 γ 2 或 γ 4 重链为基础的抗体(Lindmark 等人, J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983))。对于所有小鼠同种型和人 γ 3, 建议采用蛋白 G(Guss 等人, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。用作亲和配体附着的基质通常是琼脂糖, 但是也可采用其它基质。机械上稳定的基质(如
30 控制孔径的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)能达到比琼脂糖更快的流速, 操作时间更短。当抗体突变体包含 CH3 区时, 可用 Bakerbond ABXTM 树脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)来纯化。根据待回收的抗体突变体, 还可采用其它蛋白纯化方法,

如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反向 HPLC、硅胶层析、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的肝素 SEPHAROSE™层析、聚焦层析、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

在初步纯化后, 可对包含感兴趣的抗体突变体和污染物的混合物进行低 pH 疏水作用层析, 采用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液, 最好是在低盐浓度(如约 0-0.25M 盐浓度)下进行。

C. 药物制剂

将具有所需纯度的多肽与本领域中采用的任选的“药学上可接受”的载体、赋形剂或稳定剂(所有这些均称为“赋形剂”, 例如缓冲剂、稳定化剂、防腐剂、等渗剂、非离子性洗涤剂、抗氧化剂和其它杂类添加剂)混合, 制成多肽或抗体的水性溶液形式的治疗剂或冻干制剂保藏(见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. 编辑(1980))。这些添加剂必须在所采用的剂量和浓度下对接受者没有毒性。

缓冲剂有助于维持 pH 在大致为生理条件的范围内。它们的浓度最好在大约 2mM 至 50mM 内。适用于本发明的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐, 例如柠檬酸盐缓冲液(例如柠檬酸钠-柠檬酸二钠混合物, 柠檬酸-柠檬酸三钠混合物, 柠檬酸-柠檬酸钠等)、琥珀酸盐缓冲液(例如琥珀酸-琥珀酸钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲液(例如酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠等)、延胡索酸盐缓冲液(例如延胡索酸-延胡索酸钠混合物)、延胡索酸盐缓冲液(例如延胡索酸-延胡索酸钠混合物、延胡索酸-延胡索酸二钠混合物、延胡索酸单钠-延胡索酸二钠混合物等)、葡萄糖酸盐缓冲液(例如葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲液(例如草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲液(例如乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)、以及乙酸盐缓冲液(例如乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。因此, 还提出了磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三乙胺盐如(Tris)。

加入防腐剂以阻止微生物生长, 加入量在 0.2-1%(w/v)范围内。用于本发明的合适的防腐剂包括苯酚、苄醇、间甲酚、对羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苯基氯化铵、亚苄基野芹(benzalconium)卤化物(例如氯化物、溴化物、碘化物)、氯化己烷双胺、对羟苯甲酸烷酯(如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯)、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇和 3-戊醇。

等渗剂有时称为“稳定剂”, 其存在是为了确保本发明的液体组合物的等渗性, 包括多羟基糖醇, 较佳的是三羟或更多羟基的糖醇, 例如甘油、丁四醇、阿糖醇、

木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。多元醇存在的量在 0.1-25%(重量)之间, 较佳的在 1-5%之间(将其它成分的相对量考虑在内)。

稳定剂指广义的赋形剂, 其功能从填充剂到使治疗剂溶解或有助于防止变性或粘附在容器壁上的添加剂。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇(如上所述); 氨基酸, 如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯基丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等, 有机糖或糖醇, 如乳糖、海藻糖、木蔗糖、甘露糖、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇(myoinisitol)、半乳糖醇、甘油等, 包括环多醇如环己六醇; 聚乙二醇; 氨基酸聚合物; 含硫还原剂, 如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠; 低分子量多肽(即小于 10 个残基); 蛋白质, 如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 如聚乙烯吡咯烷酮单糖、如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖; 二糖如乳糖、麦芽糖、蔗糖和三糖如蜜三糖; 多糖如葡聚糖。稳定剂的含量范围为每份重量活性蛋白中有 0.1-10,000 重量份。

非离子表面活性剂或洗涤剂(也称为“润湿剂”)的存在有助于溶解治疗剂以及保护治疗剂避免受搅动引起的凝集, 它还允许制剂接触遭受应力的剪切表面而不会引起蛋白变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80 等)、polyoxamer (184,188 等)、Pluronic®多元醇、聚氧乙烯山梨糖醇单醚(吐温®-20、吐温®-80 等)。非离子性表面活性剂的含量约为 0.05 毫克/毫升至 1.0 毫克/毫升, 较佳的约 0.07 毫克/毫升至约 0.2 毫克/毫升。

其它各种赋形剂包括填充剂(如淀粉)、螯合剂(如 EDTA)、抗氧化剂(如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素 E)和共溶剂。

本文的制剂还含有待治疗特定病征所需的多种活性化合物, 较佳的是相互间没有不利影响的有互补活性的那些化合物。例如, 可能还希望提供一种免疫抑制剂。这种分子宜以组合形式存在, 其量对期望目的有效。

活性组分还可包裹在(例如)通过团聚技术或界面聚合制得的微胶囊中, 例如分别在羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊中, 在胶态药物递送系统(例如, 脂质体、白蛋白微珠、微乳剂(microemulsion)、纳颗粒和纳胶囊)或巨乳剂(macroemulsion)中。这些技术公开在 Osol, A.编辑的 Remington's Pharmaceutical Sciences 16 版(1980)中。

用于体内给药的制剂必须无菌。这很容易通过无菌滤膜过滤来实现。

可以制得缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体突变体的固体疏水聚合物半渗透基质, 其中基质是成形制品, 如薄膜或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、

水凝胶(例如, 聚-(甲基丙烯酸 2-羟基乙酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 No. 3,773,919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸乙酯的共聚物、不能降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和 leuprolide 乙酸酯组成的可注射的微珠)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管诸如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸的聚合物能持续释放分子 100 天以上, 但是某些水凝胶释放蛋白的时间却较短。当胶囊化的抗体长时间停留在体内时, 它们会由于暴露在 37°C 水分下而变性或凝聚, 从而导致生物活性损失, 且免疫原性可能会改变。可以根据涉及的机理来设计合理策略以稳定化。例如, 如果发现凝聚的机理是通过硫代-二硫键互换而形成了分子间 S-S 键, 则可通过修饰巯基残基、自酸性溶液中冻干、控制湿度程度、采用合适的添加剂和开发特殊的聚合物基质组合物来达到稳定化。

在治疗特定疾病或状况中, 治疗性多肽、抗体或其片段的有效量将取决于疾病或状况的性质, 并且能用标准临床技术来测定。在可能的时候, 希望首先在体外测定本发明药物组合物的剂量反应曲线, 然后在人体内测试前在有用的动物模型系统中测定。然而, 根据本领域常规知识, 有效促进感觉神经元存活的药物组合物可提供在大约 5 至 20ng/ml 之间的局部治疗剂浓度, 较佳的在大约 10-20ng/ml 之间。在本发明的另一个具体实例中, 有效促进视网膜神经元生长和存活的药物组合物可提供在大约 10-100ng/ml 之间的局部治疗剂浓度。

在一个较佳的实例中, 通过皮下注射给予治疗性多肽、抗体或其片段的水溶液。每剂的范围在大约 0.5 微克至 50 微克/千克体重, 或更佳的, 在 3 微克至 30 微克/千克体重。

皮下给药的剂量方案可以从一周一次到每日一次, 这取决于许多临床因素, 包括疾病类型、疾病严重程度以及患者对治疗剂的敏感程度。

D. 抗体突变体的非治疗性应用

本发明的抗体突变体可用作亲和纯化试剂。在该方法中, 用本领域已知的方法将抗体固定在固相(如 Sephadex 树脂或滤纸)上。使固定的抗体突变体与含待纯化抗原的样品接触, 然后用合适的溶剂洗涤载体, 除去样品中除与固定化抗体突变体结合的抗原外基本上所有的物质。最后, 用另一合适的溶剂(如甘氨酸缓冲液 pH5.0)洗涤, 将抗原从抗体突变体上释放下来。

抗体突变体也可用于诊断试验, 例如检测具体细胞、组织或血清中感兴趣抗原的表达。

对于诊断性应用, 抗体突变体通常用可检测物质作标记。可采用许多标记, 它们通常分成下列几类:

(a)放射性同位素, 如 ^{36}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 。抗体突变体可根据(例如)《现代免疫学方法》(Current Protocols in Immunology), 第 1 和 2 卷, Coligen 等编辑, Wiley-Interscience, New York, Pubs., (1991)中所述的方法用放射性同位素作标记, 放射活性可用闪烁计数来测定。

5 (b)荧光标记, 例如可采用稀土螯合剂(铈螯合剂)或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺、藻红蛋白和 Texas 红。例如可用《现代免疫学方法》(同上)所述的方法来偶联荧光标记和抗体突变体。荧光可用荧光计来定量分析。

(c)可采用各种酶-底物标记, 美国专利 No. 4,275,149 综述了其中的一些标记。酶通常能催化显色底物发生化学变化, 该变化可用各种方法来测定。例如, 酶可以
10 催化底物, 使其发生能用分光光度计来测定的颜色变化。或者, 酶可以改变底物的荧光或化学发光。定量测定荧光变化的方法如上所述。化学发光底物通过化学反应被电激发, 然后可发射可测定(例如通过化学发光计)的光或提供能量给荧光接受器。酶标记的例子包括萤光素酶(如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶; 美国专利 No. 4,737,456)、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶(如辣根
15 过氧化物酶(HRPO))、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如, 葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。O'Sullivan 等人在《酶学方法》(Method in Enzym.) (J. Langone & H. Van Vunakis 编辑), Academic press, New York, 73:147-166(1981)的“制备酶抗体偶联物用于酶免疫试验的方法”(Method for the
20 Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay)中描述了偶联酶和抗体的方法。

酶-底物组合的例子包括, 例如:

(i)辣根过氧化物酶(HRPO)和作为底物的过氧化氢酶, 其中过氧化氢酶氧化染料前体(如邻苯二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));

25 (ii)碱性磷酸酶(AP)和作为显色底物的对硝基苯磷酸; 以及

(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)和显色底物(如对硝基苯- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物 4-甲基伞形基- β -D-半乳糖苷酶。

本领域技术人员还可采用其它各种酶-底物组合。关于这些组合的综述参见美国专利 No. 4,275,149 和 4,318,980。

30 有时, 标记可以间接地与抗体突变体偶联。本领域技术人员应该知道实现这一目的的各种方法。例如, 抗体突变体可以与生物素偶联, 而上述三大类标记则与亲和素偶联, 或两者互换。生物素选择性地结合亲和素, 从而通过这一间接的方式将

标记和抗体突变体偶联起来。另外，为了间接地偶联标记和抗体突变体，可使抗体突变体与小的半抗原(如洋地黄毒苷(digloxin))偶联，而上述不同类型的标记中的一种则与抗半抗原抗体突变体(如抗洋地黄毒苷抗体)偶联。这样，就间接地将标记和抗体突变体偶联起来。

- 5 在本发明的另一个例子中，不必对抗体突变体作标记，它的存在可用与抗体突变体结合的标记的抗体来检测。

本发明的抗体可用于任何已知的测试方法，如竞争性结合试验，直接和间接夹心试验和免疫沉淀试验。Zola, 《单克隆抗体技术手册》(Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques), 147-158 页(CRC Press, Inc. 1987)。

- 10 竞争性结合试验取决于标记的标准品与测试样品竞争结合有限量抗体突变体的能力。试样中抗原的量与结合抗体的标准品的量成反比。为了测定已结合标准品的量，抗体通常在竞争前后为不溶性的。这样就能方便地将已结合抗体的标准品和测试样品从仍未结合的标准品和测试样品中分离出来。

- 15 夹心试验包括采用两种抗体，每种抗体能结合待检测蛋白的不同的免疫原性部分或表位。在一个夹心试验中，待分析的测试样品与固定在固相载体上的第一抗体结合，然后，第二抗体与测试样品结合，从而形成了不溶性的三组分复合物。例如见美国专利 No. 4,376,110。第二抗体本身可用可检测物质标记(直接夹心试验)，或可利用标记了可检测物质的抗免疫球蛋白抗体来测定(间接夹心试验)。例如，一类夹心试验是 ELISA 试验，在该种情况下，可检测物是酶。

- 20 对于免疫组织化学，肿瘤样品可以是新鲜的或冷冻的，或可包埋在石蜡中并用防腐剂(例如福尔马林)来固定。

抗体也可用于体内诊断试验。通常，抗体用放射性核素(如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S)标记，这样通过免疫闪烁显影可确定肿瘤的位置。

E. 诊断用试剂盒

- 25 为方便起见，本发明的多肽或抗体可以试剂盒形式提供，即将预定剂量的试剂与进行诊断试验的说明书组合包装。当抗体突变体用酶作标记时，试剂盒将包括酶所需的底物和辅因子(如提供可检测发色团或荧光团的前体底物)。另外，还可包括其它添加剂，如稳定剂、缓冲液(如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以差别很大，溶液中提供的试剂浓度能使试验灵敏度基本达到最优。特别是，试剂
30 可以干粉形式(通常是冻干的)提供，包括在溶解时能提供浓度合适的试剂溶液的赋形剂。

F. 多肽或抗体的体内应用

预计本发明的多肽或抗体可用来治疗哺乳动物。在一个实例中，将抗体给予非人哺乳动物以获得(例如)临床前期数据。待处理的典型的非人哺乳动物包括非人灵长类、狗、猫、啮齿类动物和其它能进行临床前期研究的哺乳动物。这些哺乳动物可以是已经建立的待用抗体治疗疾病的动物模型、或可用来研究感兴趣抗体的毒性的动物模型。在每个实例中，可在哺乳动物中进行剂量逐步增加的研究。

抗体或多肽可通过任何合适的方法给予，这些方法包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、和鼻内给药，如果需要局部免疫抑制治疗，可以是病变区内给药。肠胃外灌输包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下给药。另外，抗体突变体可通过脉冲灌输、特别是减少的抗体突变体剂量来适当地给予。较佳的，药剂通过注射给予，更佳的是静脉内或皮下注射给予，这部分取决于给药是瞬时性还是慢性的。

为了预防或治疗疾病，抗体或多肽的合适剂量取决于待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和病程、给予抗体突变体是出于预防目的还是治疗目的、以往的治疗、患者的临床史以及对抗体突变体的反应、和主治医师的判断。抗人 IgE 抗体可以通过一次或连续治疗适当地给予患者。

根据疾病的类型和严重程度，大约 1 微克/千克至 150 毫克/千克(例如 0.1-20 毫克/千克)抗体或多肽是给予患者的初始候选剂量，无论是通过一次或多次分开的给药还是连续灌输。根据上述因素，典型的每日剂量可能在大约 1 微克/千克至 100 毫克/千克或以上的范围内。对于超过几天或更长时间内的重复给药，根据病征，应维持治疗直至疾病症状受到所需的抑制。然而，可采用其它剂量方案。这种治疗的进程很容易用常规技术和试验来监测。一种典型的抗 LFA-1 或抗 ICAM-1 抗体的剂量方案公开在 WO 94/04188 中。

抗体突变体组合物将以良好的医学实践相一致的方式配制、服药或给药。在本文上下文中考虑的因素包括待处理的特定的疾病、待处理的特定的哺乳动物、患者个体的临床状况、病因、输递试剂的部位、给药方法、给药方案以及医生所知的其它因素。所给予抗体突变体的“治疗有效量”将由这些考虑因素决定，并且是预防、改进或治疗疾病或失调所需的最少量。抗体突变体不需要、但可任选地和目前使用的一种或多种试剂配制在一起，以预防或治疗所讨论的疾病。其它这些试剂的有效量取决于制剂中抗人 IgE 的量、疾病或治疗的类型、以及上述的其它因素。这些试剂的用量和给药途径通常和上文所用的相同，或者约为上文所用剂量的 1-99%。

G. 产品

在本发明另一个实例中，提供了一种含有用于治疗上述疾病的物质的产品。产品包括一个容器和一个标签。合适的容器包括，例如，瓶、小瓶、注射管和试管。

容器可用诸如玻璃或塑料之类的各种物质制成。容器中盛放了可有效治疗病征的组合物，还可以含有一个无菌入口(例如，容器可以是盛静脉内注射用溶液的袋或有可用皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的活性剂是抗体突变体。容器上的或附带的标签标明该组合物可治疗所选病征。产品还可包含第二个容器，该容器含有药

5 学上可接受的缓冲液，如磷酸缓冲盐溶液、Ringer's 溶液和葡萄糖溶液。它还可包括从商业和用户立场上所需的其它物质，包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和装有使用说明书的包装。

通过描述(而非限定)方式提供下列实施例。

10 实施例

实施例 1

针对 IgE 的单克隆抗体的制备

制备能阻断 IgE 结合 FcεRI 的 8 种单克隆抗体(MAE10-MAE17)。用分离的抗 IgE 抗体(Genentech MAE1)作亲和层析，从 U266B1 细胞(ATCC TIB 196)上清液制得针对

15 IgE 的单克隆抗体。对于 MAE12，对 5 只 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠足垫用 10 微克纯化的 IgE(Ribi 佐剂配制)免疫。在初次免疫后第一和第三周以相同方式进行注射。最后一次注射三天后，取出腹股沟和腿弯部淋巴结合并，使这些组织通过钢网纱制得单细胞悬液。使细胞在含 50%w/v 聚乙二醇 4000 的高葡萄糖(DMEM)中和小鼠骨髓瘤 P3X63-Ag8.653(ATCC CRL 1580)以 4: 1 的比例融合。对于 MAE14、MAE15 和

20 MAE13 以类似方式进行免疫，不同的是：对于 MAE13，每次注射用 30 微克 IgE，测定 IgE 片段 315-347(Kabat)作为融合前强化；对于 MAE10 和 MAE11，以两剂 100 微克皮下注射，最后一次用 50 微克强化，用脾细胞进行融合。

然后将融合细胞以 2×10^5 /孔的密度接种到 96 孔组织培养板中。24 小时后加入 HAT 选择性培养基(次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸苷，Sigma，#H0262)。在接种的 1440 个

25 孔中，365 个孔在 HAT 选择后含有生长的细胞。

融合后 15 天，用酶联免疫吸附试验(ELISA)测试上清中是否存在对人 IgE 特异的抗体。ELISA 如下进行，所有培育在室温下进行。用 50mM pH9.6 碳酸钠缓冲液配制的 1 微克/毫升大鼠抗小鼠 IgG(Boehringer Mannheim，#605-500)包被测试板(Nunc Immunoplate)2 小时，然后用磷酸盐缓冲液(PBS)含 0.5%牛血清白蛋白封闭 30

30 分钟，然后用含 0.05%吐温 20 的 PBS(PBST)洗涤四次。加入测试的上清液，振摇培育 2 小时，然后用 PBST 洗涤四次。加入 0.5 微克/毫升人 IgE(如上所述从 U266 细胞纯化获得)，振摇培育 1 小时，然后用 PBST 洗涤四次。加入稀释度为 1:2500 的辣根

5 过氧化物酶偶联的山羊抗人 IgE(Kirkegarrrd & Perry Labs, #14-10-04, 0.5 毫克/毫升), 培育 1 小时, 然后用 PBST 洗涤四次。加入 100 微升/孔含 10 毫克邻苯二胺二盐酸盐 (Sigma, #P8287) 和 10 微升 30% 过氧化氢(配制在 25 毫升 pH5.0 磷酸柠檬酸缓冲液中), 培育 15 分钟, 使板孔显色。加入 100 微升/孔 2.5M 硫酸终止反应。用自动化 ELISA 平板读数仪读取 490nm 吸收值。对于 MAE12, 测试了 365 份上清液, 其中 100 份对人 IgE 有特异性。在筛选其它抗体时, 获得了相似的 IgE 特异性频率。本文描述的所有单克隆抗体均是 IgG1 同种型, 除了 MAE17(是 IgG2b 同种型)和 MAE14(是 IgG2a 同种型)外。

10 在细胞为基础的平板试验中进一步测试各 IgE 特异性抗体, 选出以抑制 IgE 结合 FcεRI 的方式结合 IgE、且不能结合 FCEH 结合的 IgE 的抗体。下表 1 和 2 中列出了这些试验的结果。

表 1

鼠抗 HuIgE 单克隆抗体性能的归纳

单抗	免疫原	方案/剂量(克)	B 细胞来源	同种型	结合 FcεRI-结合的 IgE ¹	PBL 组胺释放 ² (EC50)	阻断 FcR1 ³ (EC50)的量
MaE1	PS IgE	3x50	淋巴结	IgG1	0.05 克/毫升	1 克/毫升	0.3 克
MaE10	U266 IgE	2x100, 1x50	脾	IgG1	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	2.5 克
MaE11	U266 IgE	2x100, 1x50	脾	IgG1	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	0.6 克
MaE12	U266 IgE	3x30	淋巴结	IgG1	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	0.8 克
MaE13	U266 IgE	3x30	淋巴结	IgG1	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	0.6 克
MaE14	U266 IgE	5x50	淋巴结	IgG2a	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	2.5 克
MaE15	U266 IgE	5x50	淋巴结	IgG1	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	0.6 克
MaE16	rHIgE aa315-547	5x1	淋巴结	IgG1	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	0.7 克
MaE17	rHIgE aa315-547	5x1	淋巴结	IgG2b	在 10 克/毫升下不结合	>100 克/毫升	>5.0 克

表 2

鼠抗 HuIgE 的归纳(续)

单抗	结合 U266BL 上的膜 IgE(EC50) ⁴	结合 FcεRII(CD23) 上的 IgE(EC50) ⁵	阻断 1 微克 IgE 结合 FcεRII 的量 (EC50) ⁶	体外 IgE 合成的抑制 ⁷	IgE8 的亲合常数 (Kd)
MaE1	0.4 微克/毫升	0.05 微克/毫升	>100 微克	(-)	5.4×10^{-8}
MaE10	0.5 微克/毫升	在 10 微克/毫升下没有结合	2.5 微克	(-)	7×10^{-9}
MaE11	0.15 微克/毫升	在 10 微克/毫升下没有结合	0.6 微克	(+)	3×10^{-8}
MaE12	>10 微克/毫升	1 微克/毫升	5.0 微克	(-)	4×10^{-7}
MaE13	1 微克/毫升	在 10 微克/毫升下没有结合	0.7 微克/毫升	(++)	5×10^{-8}
MaE14	6 微克/毫升	在 10 微克/毫升下没有结合	2.5 微克/毫升	(±)	1.4×10^{-8}
MaE15	6 微克/毫升	在 10 微克/毫升下没有结合	0.6 微克/毫升	(±)	7×10^{-8}
MaE16	10 微克/毫升	<0.05 微克/毫升	5 微克	(+)	ND
MaE17	10 微克/毫升	在 10 微克/毫升下没有结合	5 微克	(++)	ND

1. 用于分析鼠抗人 IgE 单克隆抗体的 FACS 为基础的试验。结合 CHO 3D10(FcεRI α+)上的 IgE 的鼠抗人 IgE 单克隆的筛选

5 a. 使 5×10^5 细胞/每份样品的 CHO 3D10 细胞(FcεRI α链稳定转染子, Hakimi 等人, J. Biol. Chem. 25: 22079)与配制在 100 微升 FACS 缓冲液(0.1%BSA, 10mM 叠氮钠, PBS 配, pH7.4)中的 10 微克/毫升的 U266 IgE 标准品(批号 13068-46)4℃培育 30 分钟, 然后用 FACS 缓冲液洗涤一次。使等份负载了 IgE 的细胞与 50 微克/毫升多克隆 FITC 偶联的家兔抗人 IgG(Accurate Chem. Co. AXL-475F, 批号 16)4℃培育 30
10 分钟, 然后用 FACS 缓冲液洗涤三次, 测定 IgE 结合的量。

 b. 使载有 IgE 的细胞与鼠抗人 IgE 杂交瘤上清液(鼠 IgG 的浓度在 1 至 20 微克/毫升之间)4℃培育 30 分钟, 然后用 FACS 缓冲液洗涤一次。用 10 微克/毫升 Genetech 的单克隆抗人 IgE(MaE1)作为结合的阳性对照。用 10 微克/毫升不识别 IgE 的 Genetech 的单克隆(MAD6P)作为阴性对照。

c. 如下所述检测单克隆抗体与 CHO 细胞上人 IgE 的结合：使细胞和 20 微克/毫升偶联 FITC、亲和纯化的 $F(ab')_2$ 山羊抗小鼠 IgG (Organon Teknica, #10711-0081) 4℃ 培育 30 分钟，然后用 FACS 缓冲液洗涤三次。将细胞加入含 2 微克/毫升碘化丙锭 (Sigma, #P4170) 的 400 微升缓冲液中，对死亡细胞染色。

5 d. 在 Becton Dickinson FACSCAN 流式细胞计上分析细胞。设定正向光散射器和 90 度侧向散射门，分析细胞均质群。不分析排除碘化丙锭染色的死亡细胞。将不结合 CHO 3D10 细胞上 IgE 的杂交瘤上清液作为进一步筛选的候选物。

2. 外周血嗜碱细胞释放组胺。从正常献血者获得肝素化血液，1: 4 稀释在改进的 Tyrodes 缓冲液(25mM Tris, 150mM NaCl, 10mM $CaCl_2$, $MgCl_2$, 0.3 毫克/毫升 HAS, pH7.35)中，然后和 1nM 人 IgE(ND) 4℃ 培育 60 分钟。然后将细胞加入含有鼠单克隆抗 IgE 抗体(10 毫克/毫升)或多克隆抗人抗血清(作为阳性对照)的 Tyrodes 缓冲液中，37℃ 培育 30 分钟。沉淀细胞，使上清液中的组胺乙酰化，用 RIA 试剂盒(AMAC, Inc. Webrook, Main)测定组胺含量。测定受几轮冻融的细胞的总组胺。

15 3. 阻断 FITC 偶联的 IgE 与 $Fc\epsilon RI$ α 链的结合。研究抗体对 IgE 结合的效应，方法是在含 0.1% BSA 和 10mM 叠氮钠的 PBS(pH7.4)中预先 37℃ 培育 FITC 标记的 IgE 和各种 MaE 抗体 30 分钟，然后 4℃ 培育混合物和 5×10^5 3D10 细胞 30 分钟。然后洗涤细胞三次，测定 475 纳米下的平均通道荧光值。用不阻断 IgE 结合 $Fc\epsilon RI$ α 链的鼠抗人 IgE 单抗(Mae1)作为对照。

4. 分析鼠抗人 IgE 与膜 IgE 阳性 B 细胞 U266 的结合。

20 a. 将 U266 B1 细胞(膜 IgE 阳性)培养在添加了 15% 热灭活胎牛血清(Hyclone, #A-1111-L)、青霉素、链霉素(100 单位/毫升)和 L-谷氨酰胺(2mM)的基础培养基中。

b. 将细胞(5×10^5 /等份)培育在含 10、5、1、0.5 和 0.1 微克/毫升鼠抗人 IgE 单抗的 100 微升 FACS 缓冲液中，在 96 孔圆底微量滴定板中冰上培育 30 分钟，然后用 FACS 缓冲液洗涤两次。用 Genentech 的单克隆 MAE1 作为阳性对照。

25 c. 将细胞培育在含 50 微克/毫升(1: 20 原液)偶联 FITC 的 $F(ab')_2$ 亲和纯化的山羊抗小鼠 IgE(Organon Teknica, #1711-0084)的 100 微升 FACS 缓冲液中，于冰上培育 30 分钟，然后用 FACS 缓冲液洗涤三次。将细胞加入含有 2 微克/毫升碘化丙锭的 400 微升 FACS 缓冲液中，对死亡细胞染色。

5. 对 $Fc\epsilon RII$ (CD23)+B 细胞 IM9 进行 FACS 为基础的结合试验。

30 a. 将 IM9 人 B 细胞骨髓瘤(ATCC CCL 159 Ann. N.Y. Acad. Sci. 190:221-234(1972))维持在含有 10% 热灭活胎牛血清、青霉素、链霉素(100 单位/毫升)和 L-谷氨酰胺(2mM)的 GIF 基础培养基中。

- b. 将细胞(5×10^5 等份)培育在含 2 微克/毫升 U266 IgE 标准品的 100 微升 FACS 缓冲液中, 在 96 孔微量滴定板中 4°C 培育 30 分钟, 然后用 FACS 缓冲液洗涤两次。将细胞培育在单独缓冲液或含有 2 微克/毫升人 IgG1(Behring Diagnostics, 目录号 400112, 批号 801024)的缓冲液中作为对照。
- 5 c. 然后使细胞和 0.1-10 微克/毫升的鼠抗人 IgE 单克隆抗体于冰上培育 30 分钟。用 Genetech 单克隆抗体 MAE1 作为阳性对照。
- d. 然后在含有 50 微克/毫升偶联 FITC 的 F(ab')_2 山羊抗小鼠 IgG(Organon Teknika, #1711-0084)的 100 微升 FACS 缓冲液中 4°C 培育细胞 30 分钟, 然后用 FACS 缓冲液洗涤三次。
- 10 e. 然后将细胞加入含 2 微克/毫升碘化丙锭的 400 微升缓冲液中, 对死亡细胞染色。
- f. 在 Becton Dickenson FACSCAN 流式细胞计上分析细胞。设定正向光散射器和 90° 度侧向散射器门, 分析细胞均质群, 分析排除被碘化丙锭染色的死亡细胞。相对于单用 FITC 家兔抗人 IgE 染色的细胞分析 FITC 阳性细胞(IgE 结合)。
- 15 g. 用 10 微克/毫升的 Becton Dickinson 鼠单抗 Leu20(抗-CD23) 4°C 染色细胞等份 30 分钟, 然后洗涤两次, 作为测定各实验中 IM9 细胞表面 CD23 水平的阳性对照。然后使细胞和 50 微克/毫升偶联 FITC 的 F(ab')_2 亲和纯化的山羊抗鼠 IgG 一起培育。
6. 抗体阻断偶联 FITC 的 IgE 与低亲和力 IgE 受体的结合
- 在 FACSCAN 流式细胞计上用流式细胞计数法分析 40nM FITC 标记的 IgE 与 B 淋巴母细胞 IM-9 上表达的低亲和力 IgE 受体(CD23 或 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$)的结合。研究抗体对 FITC IgE 结合的效应, 方法是在含 0.1% BSA 和 10mM 叠氮钠的 PBS(pH7.4)中预先 37°C 培育 FITC IgE 和 0.1-10 微克/毫升鼠抗人抗体 30 分钟, 然后 4°C 培育混合物与 5×10^5 细胞 30 分钟。然后洗涤细胞三次, 测定 475 纳米下的平均通道荧光值。
7. IgE 体外试验方法
- 25 a. 从正常献血者分离外周血单核细胞。
- b. 用 PBS 充分洗涤细胞, 尽可能多的除去血小板。
- c. 计数单核细胞, 重悬于培养基中至 1×10^6 细胞/毫升。培养基是具有青霉素、链霉素、15% 马血清、IL-2(25U/毫升)和 IL-4(20ng/毫升)的 DMEM 混合液。
- d. 在第 0、5 和 8 天加入适当浓度的抗体。
- 30 e. 在 24 孔 Falcon 组织培养板中培育培养物 14 天。
- f. 在第 14 天, 取出上清液, 用 IgE 特异性 ELISA 方法测定 IgE 浓度。
8. 用平衡结合(Scatchard)分析测定鼠单克隆抗体对人 IgE 的亲合常数(kd)。

a. RIA 缓冲液中的 IgE(用氯胺 T 方法碘化 ND 和 PS 同种异型,用 PD10 sephadex G25 柱(Pharmacia, #17-0851-01)与游离的 ^{125}I Na 分离), 缓冲液为: PBS, 0.5%牛血清白蛋白(Sigma, #A-7888)、0.05%吐温 20(Sigma, #P-1379)、0.01%硫柳汞(Sigma, #T-5125), pH7.4。用 50%三氯乙酸沉淀了大约 78-95%的柱后计数, 碘化 IgE 制备物的比活在 1.6-13 μCi /微克范围内(假定计数效率为 70%)。

b. 将固定浓度的 ^{125}I (约 5×10^4 cpm)加入不同浓度(1-200nM)的未标记的 IgE 中(在 12 $\times$ 75 毫米聚丙烯试管, RIA 缓冲液最终体积为 0.1 毫升)。然后加入含鼠抗人 IgE 单抗(20mM 最终浓度)的 0.1 毫升 RIA 缓冲液至最终试验体积为 0.2 毫升。

c. 25 $^{\circ}\text{C}$ 培育样品 16-18 小时并持续搅拌。

10 d. 如下分离结合的和游离的 ^{125}I IgE: 加入偶联于 CNBr 活化 Sepharose 4B(Pharmacia, #17-0430-01)和载体蛋白 A sepharose(Repligen, #IPA 300)珠上的亲和纯化的山羊抗小鼠 IgG(Boehringer Mannheim, #605-208)的 0.3 毫升混合物(以 RIA 缓冲液配), 25 $^{\circ}\text{C}$ 培育 1 至 2 小时并持续搅拌。然后加入 RIA 缓冲液(1 毫升), 400 $\times$ g 离心试管 5 分钟。然后计数样品以确定总计数。用巴斯德移液管小心吸出上清液, 对样品重新计数, 计算出结合的和游离的计数对比。

15 e. 用 NIH 的 P. Munson 编写的配体程序为基础的 Fortran 程序(scanplot)进行 Scatchard 分析。Scatplot 采用质量作用方程式配合结合数作为用 Rodbard 型回归分析总数的函数。

20

实施例 2

人源化 MaE11 的制备

引言:

下列实施例描述人源化 MaE11 的各种制备, 其中通过定点诱变修饰残基, 获得 12 个抗 IgE MaE11 变体[F(ab)1-12]。用 F(ab)12 的残基作为模板, 产生 rhuMaE25 或 E25(1992 年 8 月 4 日提交的申请 PCT/US92/06860 中描述的一种高效抗 IgE 抗体)。

方法:

如图 1 所示, 从 pUC119-为基础的质粒 pAK2(Carter 等人(1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285)中含有人 k 亚型 I 轻链和人亚型 III 重链(VH-CH1)的含脱氧尿嘧啶模板, 通过定点诱变(Kunken, T.A.(1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488)修饰了鼠抗人 IgE 单抗 MaE11, 获得变体 F(ab)-1。F(ab)-2 从 F(ab)-1 模板构建得到, 而其它所有人源化 F(ab)变体从 F(ab)-2 模板构建得到。将质粒转化入大肠杆菌 JM101 中, 用于制备双链和单链 DNA(Messing, J.(1979), Recomb. DNA Tech. Bull. 2:43; Ausuble

30

等人,《现代分子生物学方法》,第1单元(1997))。用双脱氧法对全部轻链和重链残基测序。然后,将编码轻链和重链的DNA亚克隆到大肠杆菌F(ab)表达载体pAK19(Carter等人,(1992),*Biotechnology* 10:163)中。此衍生物缺少形成F(ab')₂片段中重链间二硫键的铰链半胱氨酸。与全长IgG抗体相反,F(ab)片段有助于分析较大量的变体,因为可采用大肠杆菌表达(而不是哺乳动物细胞)培养技术。这些单个变体在1993年3月4日公开的申请WO 93/04173中有所描述。一旦确定了最佳变体,可将其随后亚克隆到编码全长人IgG1的质粒中(见下文)。

将表达质粒转化入大肠杆菌MM294株(Meselon, M 和 R. Yuan(1968), *Nature* 217:1110)中,使单菌落在5毫升2YT培养基-羧苄青霉素(100微克/毫升)中37℃生长5-8小时。然后将5毫升培养物加入到100毫升AP5培养基-羧苄青霉素(100微克/毫升)中,使其在500毫升摇瓶中37℃生长16小时。4000xg离心培养物,除去上清液。冷冻1小时后,将沉淀其重悬于5毫升冰冷的10mM Tris, 1mM EDTA和50微升0.1M 胍脒(Sigma, St. Louis)中,加入后者是为了抑制蛋白水解。在冰上轻微振摇1小时后,10000xg离心样品15分钟。将上清液加入蛋白A-Sepharose CL-4B(Pharmacia)柱(0.5毫升床体积)中,然后用10毫升3M氯化钾溶液/100毫升Tris(pH8.0)洗涤,再用2.5毫升100mM乙酸(pH2.8)洗脱到1M Tris(pH8.0)(0.5毫升)中。

然后用Centricon-30(Amicon)使F(ab)缓冲液交换成PBS,并浓缩至最终体积为0.5毫升。对每个F(ab)片段进行SDS-PAGE以确认纯度。用0.1% ϵ_{280} 为1.0来测定F(ab)浓度。用纯化的F(ab)-2的氨基酸分析得到的蛋白浓度以及该样品的A₂₈₀来确定消光系数。

用液相色谱/质谱法直接分析所选F(ab)片段,以确认其分子量。将样品注入压缩的毛细管液相色谱系统(Henzel, W.J.等人(1990), *Anal. Biochem.* 187:228),用Sciex API 3质谱仪直接分析。将人生长激素较高的电荷状态(m.w.22,256.2)(用和样品所用相同的仪器参数获得)来标定。

为了产生全长人IgG1版的人源化MaE11,将重链和轻链分开亚克隆到以前描述的pPK质粒(Gorman, C.M.等人,(1990), *DNA Protein Eng. Tech.* 2:3)中。用高效的方法(Graham等人,同上; Gorman, C.M., *Science* 221:551),将合适的重链和轻链质粒(取决于所希望的序列变化)共转染到腺病毒转化的人胚肾细胞系(称为293细胞, Graham, F.L.等人(1977), *J. Gen. Virol.* 36:59)中。将培养基变成无血清并每天收获培养基至第5天。用蛋白A-Sepharose CL-4B(Pharmacia)从合并的上清液中纯化抗体。通过G25凝胶过滤将洗脱抗体的缓冲液交换成PBS,用Centriprep-30或Centricon-100(Millipore)进行超滤浓缩,并4℃保藏。用总IgG结合ELISA测定抗体浓度。结

果显示在表 4 中。

可溶性受体试验:

用 0.05 毫升含 FcεRI α链 IgG 嵌合受体的包被缓冲液(50mM 碳酸盐、碳酸氢盐, pH9.6)于 4-8℃包被 96 孔试验板(Nunc)12 小时。吸出孔中液体, 加入 250 微升封闭缓冲液(PBS, 1%BSA, pH7.2), 4℃培育 1 小时。在分开的试验板中, 用试验缓冲液(0.5%BSA 和 0.05%吐温 20, PBS, pH7.2)以 1: 4 的稀释度将样品和参照鼠 MaE11 从 200 微克/毫升滴定到 0.001 微克/毫升, 加入相同体积的 10ng/毫升生物素化 IgE(O-Shannessy, D.J.等人(1984), Immunol. let. 8:273), 然后 25℃培育平板 2-3 小时。用 PBS 和 0.05%吐温 20(Sigma)洗涤 FcεRI 包被的孔三次, 从样品孔中转移 50 微升, 25℃搅拌培育 30 分钟。每孔加入 50 微升链霉亲和素-HRP(500 微克/毫升, Sigma)溶液(1: 5000 稀释在试验缓冲液中), 然后搅动培育平板 15 分钟, 如前所述那样洗涤。每孔加入 50 微升微孔过氧化物酶底物(Microwell Peroxidase Substrate)(Kirkgaard & Perry Laboratories), 显色 30 分钟, 加入等体积 1N HCl 终止反应, 在 450 纳米下测定吸收值。用 Kaleidagraph 数据分析应用软件(Synergy Software)通过非线性四参数曲线匹配绘制抑制百分数对封闭抗体浓度, 计算 50%抑制时的浓度。结果显示在表 3 中。

FACS 为基础的结合同试验:

用流式细胞计测定抗体抑制偶联 FITC(Goding, J.W.(1976), J. Immunol. Methods 13:215)的 IgE 结合 CHO 3D10 细胞上表达的高亲和力 FcεRI 受体α链(Hakimi, J.等人, (1990), J. Biol. Chem. 265:22079)的能力。使 FITC 偶联的 IgE(40nM)在 FACS 缓冲液(PBS, 0.1%BSA, 和 10mM 叠氮钠, pH7.4)中和抗体($0.3-1.0 \times 10^{-6}$ M)预先 37℃培育 30 分钟。然后 4℃培育混合物和 5×10^5 CHO CD10 细胞 30 分钟。用 FACS 缓冲液洗涤细胞三次, 在 FACScan 流式细胞计(Becton Dickinson)上 475 纳米下测定平均通道荧光值。用不阻断 IgE 结合 FcεRI α链的鼠抗人 IgE 单抗作为阳性对照, 不识别 IgE 的鼠单抗 MOPC21(Cappel)作为阴性对照。结果显示在图 3 中。

抗体和载有 IgE 的 FcεRI 结合:

使抗体与 CHO 3D10 细胞上表达的 FcεRI α亚基所结合的人 IgE(10 微克/毫升人 IgE) 4℃结合 30 分钟。洗涤细胞三次, 然后用不同浓度的鼠抗人 IgE 单抗 MaE1 或 MaE11 或人源化单抗变体 12[F(ab)12]培育 30 分钟。用 MOPC21(鼠 IgG1)作为鼠单抗对照, 而用人源化 4D5 单抗(Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285(1992), 人 IgG1)作为 F(ab)12 的对照。鼠单抗的结合用 FITC 偶联的 F(ab')₂ 山羊抗小鼠 IgE(10 微克/毫升)检测。人源化单抗用 FITC 偶联的 F(ab')₂ 山羊抗人 IgG(50 微克/毫升)检测,

它已经 IgE 柱亲和纯化而最大程度地减少了与 IgE 的交叉反应性。图 4 中描述了该结果。

鼠和人源化 F(ab') 的计算机图表模型

用图 1 的 F(ab) VL 和 VH 结构域序列构建鼠 MaE11 VL-VH 结构域的计算机图表模型。随后用该模型来确定那些构架残基应被掺入人源化抗体导致产生 F(ab)-2。还构建人源化变体的模型来验证鼠构架残基的正确选择。如 Carter 等人(1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285; Eigenbrot, C.等人(1993), J. Mol. Biol. 229: 969 中描述的那样构建模型。

10 结果:

人源化 MaE11 抗体的设计:

人源化抗体的此次研究采用人共有序列。这与采用接近感兴趣鼠 Ig 的人序列的其它人源化技术相反。Shearman, C.W.等人(1991), J. Immunol. 147:4366; Kettleborough, C.A.等人(1991), Protein Eng. 4:773; Tempest, P.R.等人, (1991), Biotechnology 9:266; Co. M.S.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869; Routledge, E.G.(1991), Eur. J. Immunol. 21:2717。此人共有序列包括以人 VH 亚型 III 和 VLk 亚型 I 为基础的构架(如 Kabat 等人(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, National Institute of Health, Bethesda, MD 中所述)。如 Kabat(同上)所述的那样, 将 6 个 CDR 移植到人 IgG 1 构架上, 产生 F(ab)-1。所有的构架残基保留为人的残基。该变体最好描述成直率的“CDR 交换”。F(ab)-1 未显示出对 IgE 结合受体有可检测的抑制作用(表 3)。这类“CDR 交换”的变体不能结合其抗原在以前已有报道。(Carter 等人, 同上; Tempest 等人, 同上)。注意到表 3 中没有描述 F(ab)-1 的确切序列, 但是, 该序列可通过用 MaE11 鼠 Kabat CDR 残基替代对应人残基(用括号表示)来推断。图 1 中的右侧和左侧括号表明了 Kabat CDR, 而 Chothia CDR 用下划线表示。

25 为了帮助解释和减少混淆, 用正常字体书写人残基, 而鼠残基用斜体表示。在表示残基替代时, 第一个残基是被取代的残基, 第二个残基是插入的残基, 数字是天然序列的 Kabat 编号。

F(ab)-2 变体根据的是分子模型。在该分子中, 将几个鼠构架残基掺入人构架中。在 F(ab)-2 中, 采用 Kabat 等人(同上, 根据种间序列差异)提供的 CDR 定义(除 CDR-H1 和 CDR-H2 外)。

根据序列差异的 CDR-H1 定义(Kabat 等人, 同上)与根据抗原-抗体复合物的晶体学研究的定义(Chothia, C.等人(1989), Nature 342:877)有明显不同(图 1)。因此, 对

CDR-H1 重新定义以包括两者, 即人残基 26-35。

根据序列差异的 CDR-H2 定义(Kabat 等人)所含有的残基比根据抗体-抗原晶体结构的残基(Chothia 等人)多[见图 1: Kabat CDR 用括号表示, Chothia CDR 用下划线表示]。由于对抗体人残基 60-65 没有发现表明抗体-抗原接触的晶体结构, 因此修
5 饰 CDR-H2, 使其包括两种定义的混合, 即包括人残基 50-58。结果, 在 F(ab)-2 中, 用较短版本的 CDR-H2 与 F(ab)-1 比较。

结果, 产生人到鼠残基变化最少的 F(ab)-2, 认为这些变化是维持结合所需的。产生其它 10 个变体, 以便测试包埋残基对 CDR 构型的影响, 并评价有意义构架残基的分子模型的预定效应, 和检查其它感兴趣的残基。

10 为了测试包埋残基对 CDR 构型的影响, 构建 F(ab)-3 和 F(ab)-7, 其中将鼠残基变回人残基。如表 4(F(ab)-3 和 F(ab)-4)所示, VL4 和 VL33 处侧链对结合的影响最小, 可能对人源化抗体中的 CDR-L1 的构型影响最小。

模型提示, 构架残基 VH24 可能影响 CDR-L1 构型, VH37 能影响 VL-VH 界面。然而, 在 VH24[F(ab)-5]或 VH37[F(ab)-7]处替代成人残基显示结合能力减少得最少。
15 相反, 用人 Leu[F(ab)-6]代替构架位置 VH78 处的鼠 *Phe* 会引起结合明显减少。该模型表明, 该残基影响 CDR-H1 和/或 CDR-H2 的构型。

F(ab)-9 至 F(ab)-12 检查了人残基被鼠残基取代的情况。所有这四种变体均显示出结合比 F(ab)-2 有大幅提高(见表 3、4 和图 3)。在显示出结合比 F(ab)-2 高 5 倍的 F(ab)-9 中, 将 CDR-H2 中的两个残基(如 Kabat 等人, 同上所定义的)变成鼠残基: Ala
20 VH 60 *Asn* 和 Asp H61 *Pro*。Pro 替代能改变 CDR-H2 构型和/或刚性, *Asn* H60 预计包埋在 VL-VH 界面, 可能与 Asp VL1 相互作用。

表现出结合比 F(ab)-2 大大提高的 F(ab)-10 是这样一种变体, 其中 VL 和 VH 结构域中的所有包埋残基(定义成可及表面积低于游离氨基酸的 5%的残基)是鼠 MaE11 的残基。实际上, F(ab)-10 可被认为是鼠 MaE11, 其中只有 VL 和 VH 中外露的非 CDR
25 残基被变成了人残基。

为了确定 F(ab)-10 的结合性提高是由于一个或几个残基, 产生变体 F(ab)-11 和 F(ab)-12。用 F(ab)-9(并非 F(ab)-2)作为基本模板来制备这些变体, 因为它表现出结合提高 5 倍。模型表明, VH63 和 VH67 处的侧链能影响 CDR-H2 的构型。如 Kabat 等人(同上)所确定的那样(但并非如 Chothia 等人(同上)所确定的那样), 认为 VH63 是
30 CHR-H2 的一部分。VH67 是两种定义中的一个构架残基。在 F(ab)-11 中, VH63 和 VH67 分别是鼠残基 *Leu* 和 *Ile*。在 F(ab)-12 中, 只有 VH67 被变成鼠 *Ile*。

在可溶性受体试验(表 4)和细胞为基础的试验(表 4, 图 3)中, F(ab)-11 和 F(ab)-

12 均表现出至少和 F(ab)-10 一样佳、比 F(ab)-9 更佳的结合。这表明，F(ab)-10 的结合提高并不是由于 VH 结构域内部重包装入鼠残基所致，而是仅仅受一个残基(即 VH67)的影响。

- 5 构建 F(ab)-8，用鼠 *Gly* 取代人 VL 55 残基 *Glu*，并在 VL57 处将 *Gly* 类似地替代成 *Glu*。F(ab)-2 采用人残基，而 F(ab)-8 的这些位置替代为鼠残基。从表 3 可迅速归纳出，这些残基的替代对受体结合没有影响。

表 3
人源化 Mae11 变体

变体	从 F(ab)-2 变化 ^(a)		50%抑制时的浓度(ng/ml) 平均值,标准偏差 ^(b)	$\frac{F(ab)-X}{F(ab)-2}$	$\frac{F(ab)-X}{MaE11}$
	VL	VH			
F(ab)-1	<i>Leu 4 Met</i> <i>Arg 24 Lys</i> <i>Glu 55 Gly</i> <i>Gly 57 Glu</i>	<i>Val 24 Ala</i> <i>Ile 37 Val</i> <i>Thr 57 Ser</i> <i>Ala 60 Asn</i> <i>Val 63 Leu</i> <i>Gly 65 Asn</i> <i>Phe 78 Leu</i>	> 100,000	> 16.0 ^(c)	> 560
F(ab)-2	-	-	6083, 1279	1.0	34
F(ab)-3	<i>Leu 4 Met</i> <i>Met 33 Leu</i>	--	9439, 508	1.6	53
F(ab)-4	<i>Leu 4 Met</i>	--	6770, 349	1.1	3.8
F(ab)-5	--	<i>Val 24 Ala</i>	9387, 733	1.6	52
F(ab)-6	--	<i>Phe 78 Leu</i>	17,537, 4372	2.9	24
F(ab)-7	--	<i>Ile 37 Val</i>	8622, 107	1.4	48
F(ab)-8	<i>Glu 55 Gly</i> <i>Gly 57 Glu</i>	--	5799, 523	1.0	32
F(ab)-9	--	<i>Ala 60 Asn</i> <i>Asp 61 Pro</i>	1224, 102	0.20	6.8
F(ab)-10	<i>Ala 13 Val</i> <i>Val 19 Ala</i> <i>Val 58 Ile</i> <i>Leu 78 Val</i> <i>Val 104 Leu</i>	<i>Val 48 Met</i> <i>Ala 49 Gly</i> <i>Ala 60 Asn</i> <i>Val 63 Leu</i> <i>Phe 67 Ile</i> <i>Ile 69 Val</i> <i>Met 82 Leu</i> <i>Leu 82c Ala</i>	842, 130	0.14	4.7
F(ab)-11	--	<i>Ala 60 Asn</i> <i>Asp 61 Pro</i> <i>Val 63 Leu</i> <i>Phe 67 Ile</i>	416, 66	0.07	2.3
F(ab)-12	--	<i>Ala 60 Asn</i> <i>Asp 61 Pro</i> <i>Phe 67 Ile</i>	501, 84	0.08	2.8
MaE11	--	--	179, 63	0.03	1.0

(^a)鼠残基用斜体字表示；残基数根据 Kabat 等人的编号。

(^b)三个可溶性受体试验的平均值和标准偏差

(^c)F(ab) X/F(ab)-2 比值大于 16 指，该变体即使在采用最高 F(ab)浓度下也不表现

5 出结合。

用经测定结合性最接近鼠 MaE11 的 F(ab)变体，即 F(ab)-2、F(ab)-9、F(ab)-10 和 F(ab)-12,来产生全长 IgG 1 分子。这些分子相对于 F(ab)-2 或 MaE11 的结合与 F(ab) 片段表现的结合性相当。表 4 中报道了这些结果。

表 4

人源化 MaE11 IgG 1 变体

全长变体	50%抑制时的浓度(ng/ml)平 均值，标准偏差(^a)	变体 X IgG1-2(^b)	变体 X MaE11
IgG1-2	7569,1042	1.0	16.9
IgG1-9	3493,1264	0.46	7.8
IgG1-10	1118,172	0.15	2.5
IgG1-12	1449,226	0.19	3.2
MaE11	449,53	0.06	1.0

MaE11 与载有 IgE 的 FcεRI 的结合

鼠 MaE11 阻止游离的 IgE 与肥大细胞上的 FcεRI 结合，但是不通过结合载有 IgE 的 FcεRI 触发组胺释放。如图 4 所示，鼠 MaE11 和人源化变体 12(IgG 1-12)以及阴

15 性同种型对照抗体 MOPC21 和阴性同种型对照人源化 4D5(Carter 等人，同上)不结合 CHO 3D10 细胞上载有 IgE 的 FcεRI。相反，结合 IgE 但不阻止 IgE 结合 FcεRI 的鼠 MaE1 能结合载有 IgE 的 FcεRI。与人 IgG1 对照(人源化 4D5)不同的是，鼠 IgG1 同种型(用 MOPC21 表示)对这些细胞表现出约 10%的非特异性本底结合。MaE11 不产生高于 MOP21 对照的染色，人源化变体 12 不产生高于人源化 4D5 对照的染色(图 4)。

20 部分丙氨酸扫描 IgE 结合中重要的 CDR 残基：

MaE11 CDR 的序列表明带电荷残基占优势(图 1)。CDR-L1 含有三个 Asp 残基，而 CDR-L3 具有 His, Glu 和 Asp。CDR-H3 具有三个 His 残基。鼠和人源化 MaE11 模型说明了所有这些带电荷残基在空间上毗邻(未显示)。相反，CDR-H2 中单独的 Asp54 在空间上与其它带电荷残基分开。用定点诱变(Kunkel, T.A.(1985), Proc. Natl.

25 Acad. Sci. USA 82:488)以丙氨酸代替这些带电荷残基的每一个，产生变体。在 CDR-

L1 中，改变三个 Asp 残基中的一个(Asp VL32b)变化就有效地废除了 IgE 结合[F(ab)-16;表 5]，而替代其它 Asp 残基有最小的影响[F(ab)-14;F(ab)-15]。在 CDR-L3 中同时将 Glu VL93 和 Asp VL94 变为丙氨酸也减少了结合，但是没有达到和 VL32b 处取代相同的程度。CDR-H3 中的三个 His 各单独替代成 Ala 导致结合稍有提高[F(ab)-21]，
5 或结合减少三倍[F(ab)-20 和 F(ab)-21]。然而，同时改变三个 His 残基消除了结合[F(ab)-19]。尽管不容易确定带电荷残基是否参与直接结合 IgE 或为其各自 CDR 提供了某种构型稳定性，但是变体 F(ab)-13 至 F(ab)-22 表明，CDR-L1 和 CDR-H3 是 IgE 结合中重要的决定簇。

表 5
人源化 Mae11 F(ab) CDR 残基变体

变体	从 F(ab)-2 变化 ^(a)		50%抑制时的浓度(ng/ml) 平均值,标准偏差 ^(b)	$\frac{F(ab)-X}{F(ab)-2}$
	VL	VH		
F(ab)-2	--	--	6083, 1279	1.0
F(ab)-13	<i>Asp 30 Ala</i> <i>Asp 32 Ala</i> <i>Asp 32b Ala</i>	--	> 100,000	> 16.0 ^(c)
F(ab)-14	<i>Asp 30 Ala</i>	--	3452, 183	0.57
F(ab)-15	<i>Asp 32 Ala</i>	--	6384, 367	1.0
F(ab)-16	<i>Asp 32b Ala</i>	--	> 100,000	> 16.0
F(ab)-17	<i>Glu 93 Ala</i> <i>Asp 94 Ala</i>	--	17,456, 7115	2.9
F(ab)-18	--	<i>Asp 54 Ala</i>	2066, 174	0.34
F(ab)-19	--	<i>His 97 Ala</i> <i>His 100a Ala</i> <i>His 100c Ala</i>	> 100,000	> 16.0
F(ab)-20	--	<i>His 97 Ala</i>	19,427, 8360	3.2
F(ab)-21	--	<i>His 100a Ala</i>	2713, 174	0.45
F(ab)-22	--	<i>His 100c Ala</i>	15,846, 8128	2.6

^(a)鼠残基用斜体字表示；残基数根据 Kabat 等人的编号。

5 ^(b)三个可溶性受体试验的平均值和标准偏差

^(c)F(ab) X/F(ab)-2 比值大于 16 指，该变体即使在采用最高 F(ab)浓度下也不表现出结合。

归纳和结论

从 MaE11 产生功能性人源化鼠抗 IgE 抗体涉及将几个鼠构架残基替代入人构架残基中。另外，带电荷 CDR 的图谱表明，这些残基中有一些对于抗体-IgE 相互作用很重要。

5 变体 F(ab)-1 至 F(ab)-12 表明构架残基可能对抗体功能有明显影响，这与以前的研究(Carter 等人，同上；Shearman, C.W.等人(1991)，J. Immunol. 147:4366; Kettleborough, C.A.等人(1991), Protein Eng. 4:773; Tempest, P.R. (1991), Biotechnology 9:266)一致。在考虑其中只有 6 个鼠 CDR 残基被移植到人构架残基上的直率 CDR 交换的 F(ab)-1 时，特别强调这一点。对此，可能的解释包括 CDR-H2。VH63 和 VH67
10 位包埋的疏水性残基能影响 CDR-H2 的构型。产生在 VH63 和 H67 位置含有四种组合的诸变体，即分别是鼠 Leu 和 Ile[MaE11 和 F(ab)-11]，Val 和 Phe[F(ab)-2]、Leu 和 Phe[F(ab)-1]和 Val 和 Ile[F(ab)-12]。从这四种变体的结合数据清楚地推断表明，重要的残基是 VH67，它必须是鼠 Ile，以便提供和鼠 MaE11 相当的亲和力。在 F(ab)-1 中，该残基是人 Phe。

15 在保留成人残基的 F(ab)-1 中的 12 个残基[与 F(ab)-2 比较]中，将 8 个残基分开变成其它变体中的鼠残基。三个变化对结合没有影响：VL4[F(ab)-4]；VL55 和 VL57[F(ab)-8]。两个残基替代(VH60 和 VH61[F(ab)-9])提高了结合，而三个减少了结合：VH24[F(ab)-5]；VH37[F(ab)-7]和 VH78[F(ab)-6]。

用 Padlan(Padlan, E.A. (1991), Mol. Immunol. 28:489)提出的假设设计变体 F(ab)-
20 10，他提出鼠抗体免疫原性可通过只改变外露的构架残基来降低。在该变体中，VL 和 VH 结构域的疏水性内部，换句话说，变体是 VL 和 VH 中仅仅外露构架残基被改变成人序列的鼠 MaE11。尽管 F(ab)-10 表现出结合能力与鼠 MaE11 接近，但是单个氨基酸区域的变化(VH67 从人变为鼠)使结合能力有同样的提高[F(ab)-12,IgG1-12]。

表现出结合能力与鼠 MaE11 相当、且要求变化最少的人源化变体是 F(ab)-12。
25 该变体只有 5 个人构架残基被小鼠残基取代(VL4、VH24、VH37、VH67 和 VH78)。用分子模型测定这四个残基。为了提高最初的变体 F(ab)-2 的结合能力，用分子模型将第 5 个残基 VH67 以及 CDR-H2 残基 VH60 和 VH61 包括在内。

实施例 3

组胺释放试验

30

引言：

这是一个大鼠肥大细胞组胺试验(RMCHA)，它根据抗体阻断变应原致敏的 RBL

48 细胞释放组胺的能力来定量测定重组人源化单克隆抗 IgE 抗体的生物活性。另外, 该测定在与人体内相似的生理条件下进行。RBL 48 细胞系从母代大鼠肥大细胞系 RBL 2H3 衍生获得, 随后转染了高亲和力人 IgE 受体(FcεRI)α亚基。Gilfillan A.M.等人, J. Immunol. 149(7):2445-2451(1992)。

5 方法:

使 RBL 48 细胞(Gilfillan 等人,同上)在润湿的 5%CO₂ 培养箱(Fischer, #610 型)于 T175 组织培养瓶(Falcon #3028)内 sIMDM(Iscove 改进的 Dulbecco 培养基, 其中添加了 10%胎牛血清, 2mM 谷氨酰胺, 和 500 微克/毫升活性遗传霉素(Gibco, #860-1811)) 中 37℃生长。收获细胞, 方法是使细胞和 PBS/0.05%胰蛋白酶/0.53mM EDTA 的 4 毫升溶液 37℃接触 2 分钟, 然后离心(400xg, 10 分钟)并重悬于新鲜 sIMDM 中。用血细胞计数器(Reichert-Jung)计数悬浮液中的细胞, 调节细胞至 0.4×10^6 细胞/毫升。然后在 96 孔 U 型组织培养板(Linbro)60 孔内以 100 微升/孔(40,000 细胞/孔)的密度接种细胞, 然后在湿润的 5%CO₂ 培养箱中 37℃培养 24 小时。在用 200 微升/孔 sIMDM 通过吸放洗涤一次后, 使细胞和 90 微升/孔含豚草特异性 IgE(RSIgE, 10ng/ml, 23.48ng/ml 总 IgE, 1.43%豚草特异性人血浆, North American Biological, 批号 #42-365054)的试验稀释液(sIMDM, 3U/ml 肝素钠)预先培育 30 分钟。

在预培育期后, 将 10 微升/孔的抗 IgE 抗体(稀释在试验稀释液中, 0.06-39.4 微克/毫升)或试验稀释液(用于总组胺释放、本底和豚草对照)加入细胞中, 在 5%CO₂ 培养箱中 37℃培育平板 24 小时。培育后, 抽吸细胞, 用 200 微升/孔的 sIMDM 洗涤 3 次。在洗涤后, 用 100 微升/孔的(1)0.5%氟溶液(用于总组胺释放)、(2)组胺释放缓冲液(HRB、50%D₂O, 0.8% NaCl, 1.3mM CaCl₂, sIMDM, 或(3)豚草抗原(NIH #A-601-903A-185, 0.1 微克/毫升, 以 HRB 配)37℃培育细胞 30 分钟, 将其置于冰上终止反应。(100%D₂O=100%D₂O, 0.8%NaCl, 1.3mM CaCl₂)。

4℃、900xg(2460rpm)离心平板 5 分钟, 收获上清液, 1/80 稀释在 PBS 中(对于组胺释放对照, 1/1000 稀释在 PBS 中), 用组胺酶免疫试验试剂盒(Immunotech #1153)测定组胺。将上清液(100 微升/孔)转移到含有酰化粉末(每一试剂盒)的酰化试管中并和 50 微升酰化缓冲液(每一试剂盒)室温下反应 30 分钟。然后将酰化的组胺(50 微升/孔)转移到偶联平板(每一试剂盒)中, 和 200 微升/孔组胺-乙酰胆碱酯酶偶联物(每一试剂盒)4℃培育 18 小时。

30 在该培育后, 对孔作印迹, 并用 4X 300 微升/孔洗涤缓冲液(Immunotech 试剂盒, #1153)洗涤来除去不结合的偶联物。加入显色底物(乙酰基硫胆碱、二硫硝基苯甲酸酯, 200 微升/孔, 每一试剂盒), 于暗处室温培育 30 分钟。加入终止溶液(50 微升/孔,

每一试剂盒)终止反应,在 SLT 340 ATTC 平板读数仪上测定 405 纳米的吸收值和 620 纳米的参比值。从组胺标准曲线(得自酶免疫试验试剂盒,AMAC)看出,吸收强度和组胺浓度(用 nM 表示)呈反比。从组胺浓度数据计算总组胺释放百分数,用 100%总组胺释放计算抑制百分数。结果显示在图 5 中。

5 归纳和结论:

抗 IgE 摩尔比对豚草诱导组胺释放的抑制百分数的图线表明,e26 抗体的 F(ab)形式所具有的豚草诱导组胺释放性能优于 e25 抗体的 F(ab)形式。E26 以依赖于剂量的方法抑制豚草诱导的组胺释放,半数最大抑制摩尔比为 44:1(抗 IgE:RSIgE)。相反,e25 只在非常高的摩尔比(在 200:1 至 1550:1 抗 IgE:RSIgE 之间)抑制豚草诱导的组胺释放。e25 曲线的半数最大抑制摩尔比估计在 400:1 至 500:1 之间。因此,根据半数最大抑制摩尔比值数据(它是分子结合亲和力的一个衡量标准),e26 分子与 RSIgE 的结合比 e25 分子好 10 倍。

实施例 4

15 噬菌体展示实施例

引言:

该实施例描述了通过单价噬菌体展示产生特异性亲和力改进的抗 IgE 抗体,以及选择衍生自 E25 人源化抗 IgE 抗体的 F(ab)片段(Presta 等人,J. Immunol. 151:2623(1993))。

20 方法:

1. 构建单价 F(ab)-噬菌体文库

构建了几个 F(ab)文库。用已知的技术(例如参见 Bass 等人,Proteins 8:309(1990)),使含有 VL 替代 D32E(以消除 IsoAsp 异构化)的 e25 变体与噬菌体 M13g3p 的 C 端结构域融合,作为起始载体。该质粒称为 p426,显示于图 10 中。首先,用“野生型”F(ab)-噬菌体 p426 作为模板来构建文库特异性“终止”模板。通过导入终止密码子(TAA 或 TGA),使原来的分子灭活,从而减少构建文库时诱变步骤(Lowman & Wells, Methods: Comp. Methods Enzymol. 3:205(1991))中的本底效应和模板特异性(杂交)偏性(bias)。用单链模板定向诱变和表 10 列出的寡核苷酸构建这些模板(Kunkel 等人, Methods Enzymol. 204:125(1991))。

30 随后,将这些终止模板用于第二轮诱变,采用表 11 列出的寡核苷酸来产生在每个指定 CDR 区域中的文库。用 NNS 简并密码子在每个指定 CDR 区域内产生所有 20 种氨基酸。(核苷酸碱基用单字母 IUPAC 名称表示;N=A、G、C 或 T;S=G 或 C)。

用 32 种不同的可能密码子在每个随机化位置用 NNS 简并密码子产生所有 20 种氨基酸。琥珀终止密码子(TAG)在这里采用的抑制系统(即, *supE* 抑制株 XL-1 Blue)中编码 Gln; Bullock 等人, *Biotechnology* 5, 376(1987)。存在于重链抗体结构域和噬菌体上 g3p 结构域之间的琥珀密码子允许噬菌体展示的融合蛋白只表达在大肠杆菌琥珀抑制株中, 而用相同构建物可在大肠杆菌非抑制株中获得可溶性 F(ab)蛋白(Lowman 等人, *Biochemistry* 30:10832(1991); Lowman 和 Wells, *Methods Comp. Methods. Enzymol.* 3:205(1991); Hoogenboom 等人, *Nucl. Acids Res.* 19:4133(1991))。然而, 本领域技术人员显然还可采用用于其它大肠杆菌噬菌体表达系统的其它终止密码子。

用电穿孔将随机诱变反应产物转化到大肠杆菌细胞(Stratagene,XL-1 blue 中, 使细胞和 M13K07 辅助噬菌体 37℃ 生长过夜而扩增(Vierra 和 Messing, *Methods Enzymol.* 153:(1987))。

表 10

用于第一轮诱变的终止模板寡核苷酸

寡核苷酸 序列号	区域	序列
HL-208	VL1	ACC TGC CGT GCC AGT TAA TAA GTC TAA TAA GAA GGT GAT AGC TAC
HL-209	VH3	GCC AGT CAG AGC GTC TAA TAA TAA GGT TGA AGC TAC CTG AAC TGG T
HL-210	VH3	TGT GCT CGA GGC AGC TAA TAA TAA GGT TAA TGG TAA TTC GCC GTG TGG GG
HL-220	VL2	G AAA CTA CTG ATT TAC TAA TAA TAA TAA CTG GAG TCT GGA GTC
HL-221	VL3	CT TAT TAC TGT CAG CAA AGT TAA TAA TAA CCG TAA ACA TTT GGA CAG GGT ACC
HL-222	VH1	G TCC TGT GCA GTT TCT TAA TAA TAA TAA TAA TCC GGA TAC AGC TGG
HL-223	VH1	GCC TAC TCC ATC ACC TAA TAA TAA AGC TGA AAC TGG ATC CGT CAG
HL-224	VH2	GG GTT GCA TCG ATT TAA TAA TAA GGA TAA ACT TAA TAT AAC CCT AGC CTC AAG
HL-225	VL1	AAG CCG GTC GAC AGG TAA TAA GAT TAA TAC TAA AAC TGG TAT CAA CAG

表 11
用于第二轮诱变的文库特异的简并寡核苷酸

HL-212	VL1	ACC TGC CGT GCC AGT NNS NNS GTC NNS NNS GAA GGT GAT AGC TAC
HL-213	VH3	GCC AGT CAG AGC GTC NNS NNS NSS GGT NNS AGC TAC CTG AAC TGG
HL-214	VH3	TGT GCT CGA GGC AGC NNS NNS NNS GGT NNS TGG NNS TTC GCC GTG TGG GG
HL-231	VL2	G AAA CTA CTG ATT TAC NNS NNS NNS NNS CTG GAG TCT GGA GTC
HL-232	VL3	CT TAT TAC TGT CAG CAA AGT NNS NNS NNS CCG NNS ACA TTT GGA CAG GGT ACC
HL-233	VH1	G TCC TGT GCA GTT TCT NNS NNS NNS NNS NNS TCC GGA TAC AGC TGG
HL-234	VH1	GTT TCT GGC TAC TCC ATC ACC NNS NNS NNS AGC NNS AAC TGG ATC CGT CAG
HL-235	VH1	GG GTT GCA TCG ATT NNS NNS NNS GGA NNS ACT NNS TAT AAC CCT AGC GTC AAG
HL-236	VL1	AAG CCG GTC GAC AGG NNS NNS GAT NNS TAC NNS AAC TGG TAT CAA CAG

II. 噬菌体结合选择

5 为了亲和选择噬菌体颗粒展示的 F(ab)变体，用氯化钠/聚乙二醇(NaCl/PEG)沉淀从大肠杆菌培养上清液制得噬菌体。将噬菌体悬浮于 PBS 缓冲液中，然后稀释到含有 0.05%吐温™-20，以及作为阴性对照的非展示噬菌体的马血清(目录号 A-3311-D, Hyclone, Logan, UT)中。作为阳性对照，使“野生型” e426 F(ab)-噬菌体与非展示噬菌体混合并进行模拟选择。

10 用 50mM 碳酸钠缓冲液(pH9.6)配制的 2 微克/毫升 IgE(人 IgE; Genentech 批号 # 9957-36)包被 Maxisorp 96 孔板(Nunc)4℃过夜。然后除去 IgE 溶液，使平板和马血清封闭溶液(没有吐温™-20)一起室温下培育 2 小时。

除去封闭溶液，将噬菌体溶液在平板上室温培育 1 小时。然后，除去噬菌体溶液，用 PBS/吐温™-20(0.05%)缓冲液洗涤平板 10 次。在孔中加满 PBS/吐温，使其再
15 培育 10 分钟，然后再洗平板 10 次。

用 20mM HCl 洗脱保持结合平板的 F(ab)噬菌体，用 pH8 的 Tris-HCl 中和，然后如上所述用辅助噬菌体增殖。连续洗脱等份噬菌体，和新鲜的 XL-1 Blue 细胞混

合, 接种到合适的抗生素平板上, 计数展示 F(ab)(抗羧苄青霉素; CFUa)或不展示 F(ab)(氯霉素; CFUc)的洗脱噬菌体的 CFU 数(菌落形成单位数)。每一轮展示 F(ab)相对不展示 F(ab)噬菌体的富集数(Emut)计算成洗脱合并物的(CFUa/CFUc)除以起始合并物的(CFUa/CFUc)。野生型对照噬菌体的富集数(Ewt)以相同方式计算。

5 随后如上所述进行亲和选择, 只是在前 10 次洗涤后每一轮的培育时间增加。为了比较在增加严谨性的条件下每轮之间的噬菌体选择效率, 将每一轮的富集系数标准化成野生型对照的富集系数。图 6 显示了每一合并物的结合性富集与野生型的结合性富集之比(Emut/Ewt)。由于在平衡时高亲和力变体结合 IgE 平板的组分应比低亲和力变体多, 因此亲和力较高的变体应被更有效地回收, 因此展示出更高的相对富集。实际上, VL1 文库显示了逐次改进的相对富集, 在 5-6 轮选择后相对富集比野生型高大约 10 倍。通过这一衡量标准, VL1 文库显示出其亲和力相对于野生型的改进程度高于 VH3 文库。两组 CDR 文库之间结果的不一致性可能反映出 VL1 为抗原结合提供了更多的能量。或者, e25 的 VH3 CDR 可能已经比 VL1 CDR 更优化适合 IgE 结合, 从而允许 VL1 通过侧链替代在结合相互作用中提供更高的相对改进。

15 DNA 测序表明, 第一 VL CDR1 文库的大多数 F(ab)噬菌体变体(随机化位置 27、28、39 和 31)具有保守的野生型残基 D30, 和优选突变的 Y31G(表 15, 其中第 3 轮的克隆命名为 212-3.x, 从第 6 轮的克隆命名为 212-6.x)。尽管在 Q27 和 S28 位观察到各种替代, 但是在 6 轮选择后噬菌体合并物中主要是含有 Q27K 和 S28P 的一种克隆。该克隆还含有较佳的残基 D30 和 G31, 这提示这种侧链组合对于 IgE 结合可能是最优的。

在第 2 个 VL CDR1 文库(随机化位置 30、31、32 和 34)中, 大多数选择子具有保守的野生型残基 D30 和 E32; 在测序的克隆中只观察到野生型 D34。在该文库, 在 Y31 位发现了各种残基类型。在两个克隆 213-6.7 和 213-6.8 中发现了额外的一个乱真的突变 G33S(表 15)。

25 3 轮选择后 VH CDR3 文库的克隆的序列分析表明, 该文库已经基本上集中成一个克隆, 即 214-3.1, 它在 101-103 位具有野生型残基, 并有替代 H105T 和 H107Y(表 15)。

IV. 所选 F(ab)克隆的噬菌体 ELISA 试验

30 为了评价噬菌体结合选择的结果, 将噬菌体转染入大肠杆菌 XL-1 Blue 细胞中, 在液体培养中增殖或接种到含抗生素平板上。从这些平板随机挑取克隆进行测序和用竞争性噬菌体-ELISA 进行结合分析。(Cunningham 等人, EMBO J. 13:2508(1994); Lowman, 《分子生物学方法》第 87 卷第 24 章, Cabilly 编著, Humana Press Inc. Totawa,

NJ(1997))。

为了评价相对的 IgE 结合亲和力，如上所述将噬菌体在包被 IgE 的平板上滴定，使展示 F(ab)的浓度标准化。预先混合噬菌体和连续稀释的 IgE，然后加到包被 IgE 的平板上，室温培育 1 小时。然后用 PBS/吐温洗涤平板 10 次，加入辣根过氧化物酶和山羊抗家兔的偶联物混合的家兔抗噬菌体抗体溶液。室温培育 1 小时后，用显色底物邻苯二胺(Sigma)使平板显色。加入 1/2 体积的 2.5M 硫酸，终止反应，在分光光度平板读数仪上测定 490 纳米下的光密度。使 4 参数曲线与每一数据组匹配，测得每一变体的 IC50(Lowman, 《分子生物学方法》，同上)。根据其 IC50 与起始噬菌体 e426 的 IC50 的比值确定每一克隆噬菌体变体的相对结合亲和力(表 15-16)。

10 在一些情况下，全部测试给定轮选择的噬菌体合并物，以估计对 IgE 的群体平均相对亲和力[IC50(野生型)/IC50(突变型)]。例如，VL CDR1 文库残基 32、33、35 和 37 表明在 5 轮选择后亲和力只比 e426 提高了 3.6 倍，即使该文库的亲代变体(e426)表现出亲和力提高 25 倍。因此，不再继续研究这些特定残基的 VL-CDR1 文库。另一方面，VH CDR2 噬菌体合并物显示出亲和力比其亲代 e426 噬菌体提高 6.2 倍。

15 还产生了 CDR 结构域 VL CDR2 残基 54-57 以及 VL CDR3 残基 96-98、99 和 100 的噬菌体文库。然而，这些位置上的氨基酸替代不能产生超过 e426 的富集。针对 VH CDR1 残基 26-30 产生的噬菌体文库产生的富集也不超过 e26，并且发现主要是污染性 e26 噬菌体。这表明在最初文库中没有变体的亲和力高于 e26。

表 15 中报道了 CDR 结构域 VL CDR1 残基 27、28、30、31、32、34 以及 VH CDR1 20 残基 101、102、103、105 和 107 的噬菌体文库，而表 16 中报道了 VH CDR2。在表 15 和 16 中，对未表现出亲和力显著高于 e26 的克隆文库不作继续研究，也不测定结合性能提高系数。

表 15
IgE 结合性能选择(产生)的 F(ab)-噬菌体克隆

噬菌体克隆	VL CDR1 残基						VH CDR3 残基					结合性能提高倍数(噬菌体 ELISA)
	27	28	30	31	32	34	101	102	103	105	107	
e426	Q	S	D	Y	E	D	H	Y	F	H	H	-1-
212-3.1(x2)	M	R	Y	G	--	--	--	--	--	--	--	未测定
212-3.2	A	Y	N	G	--	--	--	--	--	--	--	3.5
212-3.3	G	G	Y	G	--	--	--	--	--	--	--	6.9
212-3.5	M	G	E	A	--	--	--	--	--	--	--	未测定

212-6.1	E	Q	D	W	--	--	--	--	--	--	--	23
212-6.2	E	R	E	S	--	--	--	--	--	--	--	未测定
212-6.4	E	H	D	W	--	--	--	--	--	--	--	23
212-6.5	S	N	S	G	--	--	--	--	--	--	--	未测定
212-6.6	K	E	D	S	--	--	--	--	--	--	--	未测定
212-6.7(x8)(e26)	K	P	D	G	--	--	--	--	--	--	--	25
212-6.15	R	P	D	T	--	--	--	--	--	--	--	未测定
212-6.16	R	S	D	G	--	--	--	--	--	--	--	未测定
212-6.17	V	T	H	S	--	--	--	--	--	--	--	未测定
213-3.1	--	--	D	D	C	D	--	--	--	--	--	未测定
213-3.2	--	--	H	D	S	D	--	--	--	--	--	未测定
213-3.3	--	--	D	W	Q	D	--	--	--	--	--	8.8
213-3.4	--	--	G	D	H	D	--	--	--	--	--	3.7
213-6.1	--	--	E	R	W	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.3(x2)	--	--	D	T	E	D	--	--	--	--	--	14
213-6.4	--	--	D	W	E	D	--	--	--	--	--	20
213-6.7G33S	--	--	H	N	E	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.8G33S	--	--	Y	S	N	D	--	--	--	--	--	14
213-6.9	--	--	W	G	E	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.11	--	--	Y	S	E	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.12	--	--	E	R	D	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.13	--	--	H	E	E	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.14	--	--	D	K	K	D	--	--	--	--	--	未测定
213-6.15	--	--	D	R	Q	D	--	--	--	--	--	15
214-3.1(x5)	--	--	--	--	--	--	H	Y	F	T	Y	2.7
214-3.6	--	--	--	--	--	--	H	Y	F	S	R	未测定

表 16

VH CDR2 噬菌体克隆

噬菌体 克隆	VH CDR2 残基					结合性能 提高倍数
	53	54	55	57	59	
e426	T	Y	D	S	N	-1-
235-5.1	K	Y	S	E	K	未测定*
235-5.2	K	W	H	E	M	未测定*
235-5.3	K	W	W	E	A	未测定*
235-5.4	H	Y	A	R	K	未测定*
235-5.5	K	Y	H	G	A	未测定*

*注意：估计群体平均相对噬菌体亲和力比 e426 高 6.2 倍。

5 V. 噬菌体筛选得到的组合突变

蛋白质中不同位点处突变通常展示出对蛋白功能的加和效应(Wells, Biochemistry 29:8509(1990))。因此，组合上述初始噬菌体文库的几个突变，以改进与 IgE 的结合。

10 为了减小提高抗 IgE 抗体免疫原性的可能性，需要使 E-25 的突变程度减小到最低程度。因此，只采用在独立测定时展示出亲和力提高程度最大的噬菌体变体的突变。另外，给定噬菌体克隆被观察到的频率可能与表达水平和/或蛋白水解稳定性有关(Lowaman & Wells, 1991,同上)。从 VL1 文库选择一个特定克隆 212-6.7，重新命名为 e26，因为它在噬菌体-ELISA 试验中表现出亲和力比 e426 高 25 倍(表 17)。

15 VH CDR2 文库也表现出亲和力比 e426 有所改进，虽然测得的这一提高是对合并噬菌体测定而言为 6.2 倍。该合并噬菌体亲和力表明合并物中的至少一些成员具有改进的结合亲和力，而不必测定所有单个成员的亲和力。用合并噬菌体还能鉴定在给定轮后亲和力增强了多少，是否应继续亲和力选择(即一旦合并物的亲和力达到最大值，随后轮选择不可能提供额外的富集)。因此，合并物亲和力数据是一种非常

20 有用的筛选工具。

显然，VH CDR2 区域中的突变可以和 VL CDR1 中的那些突变加和起作用，因为在晶体结构和分子模型中，VH CDR2 环远离 VL CDR1 环。

然而，由于这些突变的一些组合可能不相容，我们测试了四个不同的组合突变体：e26 与克隆 235-5.1、235-5.2、235-5.3 和 235-5.4 中发现的突变组合(表 17)。这些构建物用 e26 F(ab)噬菌体作为模板，用编码 VH2 突变的诱变性寡核苷酸通过 Kunkel 诱变(Kunkel 等人, Methods Enzymol. 204:125(1991))来制得。

用噬菌体 ELISA 试验(Lowman, 《分子生物学方法》第 87 卷, Cabilly 编辑, Humana Press Inc., Totawa, NJ(1997))比较 e26 中 VL CDR1 突变和克隆 235-5.1、235-5.2、235-5.3 和 235-5.4 中 VH CDR2 突变的组合形成的最终变体。还制得可溶性 F(ab)蛋白, 在生物素-IgE 平板试验中比较, 报道在下表 17 和图 7 中。

5

表 17

F(ab)片段	IC50(nm)	相对亲和力(提高倍数)
e426	1.5	-1-
e26	0.17	8.9
e26(e26+235-5.1)	0.040	38
e695(e26+235-5.2)	0.050	31
e696(e26+235-5.3)	0.063	24
e697(e26+235-5,4)	0.066	23

VI. 生物素平板试验(FcεRI-IgG 嵌合体竞争试验)

引言: 本实施例的目的是为了比较在抗 IgE F(ab)和生物素-IgE 同时加入包被 IgE 受体嵌合体的平板中时, 不同的抗 IgE F(ab)是如何与固定化高亲和力 IgE 受体 IgG 嵌合体, 竞争结合溶液相内生物素化的人 IgE。随着抗 IgE F(ab)浓度的增加, 能结合平板上受体的生物素 IgE 的量减少, 产生低的光密度值(经分光光度计测得)。

10

通过加入等份 100 微升的 1 微克/毫升原液(以 50nm 碳酸钠缓冲液(pH9.6)配), 用 100 微克/孔的 FcεRI-IgG(Haak-Frendsho 等人, J. Immunol. 151, 352(1993)(Genentech, 批号 # 2148-74(6.4 毫克/毫升))4℃包被 Nuc maxisorp 平板(目录号 F96)12 至 24 小时。

15

用 ELISA 洗涤缓冲液(0.05%聚山梨醇酯 20(Sigma), 以 PBS 配制, pH7.4)洗涤平板 3 次, 通过和 200 微升 ELISA 试验缓冲液(Tris 缓冲盐溶液, pH4.45, 含 0.5%RIA 级牛血清白蛋白, Sigma; 0.05%聚山梨醇酯 20 和 4mM EDTA)一起培育 60 分钟进行封闭。用洗涤缓冲液洗 3 次后, 将 100 微升连续 2 倍稀释的试验缓冲液中初始浓度为 200nM 的抗 IgE F(ab)加入 ELISA 平板中一式三份。用 Titertek®多通道移液管进行稀释。将试验缓冲液(100 微升, 0.5 毫克/毫升原液 1/500 稀释)配的生物素化 IgE 加入所有孔内, 在微轨道摇动器(Bellco)上 25℃培育混合物 60 分钟。从 U266B1 骨髓瘤(ATCC TIB196)培养上清液中亲和纯化出 IgE, 用生物胞素酰肼生物素化(O'Shannessy 等人, Immunol Lett. 8:273(1984); Pierce Chemical)。用洗涤缓冲液洗涤样品 5 次, 结合的 IgE 用 1:3000 的 100 微升过氧化物酶偶联的链霉亲和素(Zymed)检测

20

90 分钟。然后用洗涤缓冲液再洗 6 次, 加入 100 微升底物溶液(400 微克/毫升邻苯二

25

胺二盐酸盐和 4mM H_2O_2 ，以 PBS 配制)，培育 6 分钟。然后用 4.5M 硫酸(100 微升)终止反应，在 Uvmax 微量板读数仪(Molecular Devices)上读取 490 纳米吸收值。图 8 中绘出了 e25、e26 和 e27 F(ab)抗体片段不同 F(ab)浓度水平的吸收值。

结论：图 8 中曲线表明，E26 和 E27 对高亲和力受体的亲和力高于 E25，E27 显示出最高的亲和力。

VII. 可溶性 F(ab)蛋白的 BIAcore 试验

从用 BIAcoreTM-2000 表面等离子体共振系统(BIAcore, Inc.)测得的缔合和解离速率常数计算出几种 F(ab)片段的受体结合亲和力(Lofas & Johnson, J. Chem. Soc. Commun. 21, 1526-1528(1990))。根据生产商(BIAcore)说明书，用 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化生物传感器芯片来共价连接 IgE。将 IgE 稀释到 10nM 乙酸钠缓冲液(pH4.5)中，再将其进一步稀释成大约 30 微克/毫升，然后注射在芯片上，获得 800-12400 固定化物质响应单位(RU)的信号，由于 RU 中的信号与固定化物质的质量成比例，这表示基质上的固定化 IgE 密度范围约为 0.4-6.5 皮摩尔/平方厘米。最后，注射 1M 乙醇胺作为封闭剂。用 4.5M $MgCl_2$ 再生。

为了动力学测定，在 25°C 以 20 微升/毫升的流速将 1.5 倍连续稀释的 F(ab)抗体片段(以 PBS/吐温缓冲液配制(0.05%吐温-20，磷酸盐缓冲液配制))注射到 IgE 芯片上[图 9]。

将解离数据与单点(one-site)模型匹配，以获得 $k_{off} \pm s.d.$ (测定值的标准偏差)。计算每一缔合曲线的拟一级速率常数(k_s)，绘成蛋白浓度函数以获得 $k_{on} \pm s.e.$ (匹配值的标准误差)。从 SPR 测定值计算 Fab:IgE 结合的平衡解离常数 $K_d(k_{off}/k_{on})$ 。在不存在实验人为现象(如解离的 F(ab)重新结合)时，观察到的离去速度不依赖于 F(ab)浓度。同样，由于平衡解离常数 K_d 与 k_{off} 成反比，假定所有变体的缔合速率(k_{on})是恒定的，则可以估计亲和力提高倍数。表 18 中显示了离去速率以及计算出的解离半衰期。

表 18
解离动力学

F(ab)	$K_{off} \times 10^{-4}(\text{秒}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{分钟})$	提高倍数
e25	22±4	5.3	-1-
e26	3.6±0.2	41	7.7
e27(E26+235-5.1)	0.98	118	22
e695(E26+235-5.2)	0.94	122	23
e696(E26+235-5.3)	1.4	83	16
e697(E26+235-5.4)	1.5	77	15

WIII. F(ab)表达和纯化

5 在大肠杆菌菌株 34B8 中表达抗 IgE F(ab) E-25(Presta 等人, J. Immunol. 151:2623-2632(1993))和衍生自 p426 的噬菌粒中的变体(图 10)。37℃培育含 50 微克/毫升羧苄青霉素的 2YT 培养基中的牙签培养物(10 毫升)8 小时, 然后转移到 1 升含 50 微克/毫升羧苄青霉素的修饰的 AP-5 中, 37℃培育 24 小时。4℃、7000rpm 离心 500 毫升瓶中培养物 15 分钟。 -20℃冷冻沉淀至少 3 小时。将每 500 毫升沉淀悬浮于
10 12.5 毫升冰冷的 25%蔗糖(用 4℃、含 1mM 胍脒的 50mM Tris pH8.0 配制)中。4℃搅拌 3 小时, 使悬浮液溶解。4℃、18000rpm 离心悬浮液 15 分钟, 用蛋白 G(Pharmacia)亲和层析纯化上清液中表达的 F(ab)。用 10mM Tris(pH6.7)和 1mM EDTA(pH8.0)的溶液洗柱, 用 2.5 倍柱体积的 100mM 乙酸(pH3.0)洗脱 F(ab), 立即用 0.5 体积的 1M Tris pH8.0 返回中性 pH。用 centricon 30 microcentrator(Amicon)浓缩洗脱液并用 PBS 交换
15 缓冲液。用分光光度计(Beckman DU 64)测定 280nm 下吸收值, 以确定蛋白浓度, 在 5%β-巯基乙醇的还原条件下用 4-20% SDS PAGE 凝胶(Novex)评价样品纯度。

IX. 结果和结论:

噬菌体-ELISA 竞争性实验的结果表明, 尽管 e26 F(ab)-噬菌体的亲和力比 e426
20 提高约 9 倍, 但是组合变体 e695、e696 和 e697 比 e426-噬菌体提高 20-40 倍。噬菌体衍生的突变的叠加组合能产生具有类似改进的亲力的抗体变体。

当在生物素-IgE 平板试验中测试 F(ab)可溶性蛋白时, e26 F(ab)和 e27 F(ab)在抑制 IgE 结合 FcεRI-IgG 方面分别比 e25 提高大约 10 倍和 30 倍。BIAcore 分析的离速率测定支持了这些相对亲和力。特别是, e26 和 e27 显示出离去速率比 e25 低 7.7
25 倍和 22 倍。更长的半衰期意味着, IgE 被“占据”或不能更长时间地结合高亲和力

受体，因此导致抗 IgE 治疗剂的效能提高。

因此，平衡和动力学结合数据均支持了这样一个结论，即 e26 和 e27 F(ab)与 IgE 的结合分别比 e25 牢固大约 10 倍和 30 倍。含有相应 F(ab)突变的全长抗体(IgG)预计将展示出和 e25 IgG 相似的相对亲和力。

序列表

(1) 一般信息:

5 (i) 申请人: Genentech, Inc.

(ii) 发明名称: 改进的抗 IgE 抗体以及改进多肽的方法

(iii) 序列数目: 26

10

(iv) 通信地址:

(A) 地址: Genentech, Inc.

(B) 街道: 1 DNA Way

(C) 城市: South San Francisco

15

(D) 州: California

(E) 国家: USA

(F) ZIP: 94080

(v) 计算机可读形式:

20

(A) 记录介质类型: 3.5 英寸, 1.44 Mb 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容型

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: WinPatin (Genentech)

25

(vi) 本申请资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类:

30

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: Svoboda, Craig G.

(B) 登记号: 39,044

(C) 参考/案卷号: P1123PCT

35

(ix) 通讯信息:

(A) 电话: 650/225-1489

(B) 电传: 650/952-9881

(2) SEQ ID NO:1 的信息:

40

(i) 序列特征:

(A) 长度: 6127 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑结构: 环状

45

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:

GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC 50

50

TCATTGCTGA GTTGTTATTT AAGCTTGCCC AAAAAGAAGA AGAGTCGAAT 100

GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT 150
 TCGCAATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG 200
 5 GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCTGA CGACGATACG 250
 GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAGTA 300
 AAAAGTTAAT CTTTTCAACA GCTGTCATAA AGTTGTCACG GCCGAGACTT 350
 10 ATAGTCGCTT TGTTTTATT TTTAATGTA TTTGTAATA GAATTCGAGC 400
 TCGGTACCCG GGGATCCTCT CGAGGTTGAG GTGATTTTAT GAAAAAGAAT 450
 15 ATCGCATTC TTCTGCATC TATGTTGTT TTTCTATTG CTACAAACGC 500
 GTACGCTGAT ATCCAGCTGA CCCAGTCCCC GAGCTCCCTG TCCGCCTCTG 550
 TGGGCGATAG GGTACCATC ACCTGCCGTG CCAGTCAGAG CGTCGATTAC 600
 20 GAAGGTGATA GCTACCTGAA CTGGTATCAA CAGAAACCAG GAAAAGCTCC 650
 GAAACTACTG ATTTACGCGG CCTCGTACCT GGAGTCTGGA GTCCCTTCTC 700
 25 GCTTCTCTGG ATCCGGTTCT GGGACGGATT TCACTCTGAC CATCAGCAGT 750
 CTGCAGCCAG AAGACTTCGC AACTTATTAC TGTCAGCAAA GTCACGAGGA 800
 TCCGTACACA TTTGGACAGG GTACCAAGGT GGAGATCAAA CGAACTGTGG 850
 30 CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAAATCT 900
 GGAACTGCTT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC 950
 35 CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG 1000
 AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC 1050
 ACCCTGACGC TGAGCAAAGC AGACTACGAG AACACAAAG TCTACGCCTG 1100
 40 CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA 1150
 GGGGAGAGTG TTAAGCTGAT CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCCTAGT 1200
 45 ACGCAAGTTC ACGTAAAAAG GGTATCTAGA GGTGAGGTG ATTTTATGAA 1250
 AAAGAATATC GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT TCTATTGCTA 1300
 CAAACGCGTA CGCTGAGGTT CAGCTGGTGG AGTCTGGCGG TGGCCTGGTG 1350
 50 CAGCCAGGGG GCTCACTCCG TTTGTCCTGT GCAGTTTCTG GCTACTCCAT 1400

CACCTCCGGA TACAGCTGGA ACTGGATCCG TCAGGCCCCG GGTAAGGGCC 1450
 TGGAATGGGT TGCATCGATT ACGTATGACG GATCGACTAA CTATAACCCT 1500
 5 AGCGTCAAGG GCCGTATCAC TATAAGTCGC GACGATTCCA AAAACACATT 1550
 CTACCTGCAG ATGAACAGCC TGCCTGCTGA GGACACTGCC GTCTATTATT 1600
 GTGCTCGAGG CAGCCACTAT TTCGGTCACT GGCACTTCGC CGTGTGGGGT 1650
 10 CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCGGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT 1700
 CTTCCCCCTA GCACCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGGC ACAGCGGCC 1750
 15 TGGGCTGCCT GGTCAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG 1800
 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCG CTGTCCTACA 1850
 GTCCTCAGGA CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA 1900
 20 GCTTGGGCAC CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACA GCCCAGCAAC 1950
 ACCAAGGTGG ACAAGAAAGT TGAGCCCAA TCTTGTGACA AACTCACAC 2000
 25 CTAGAGTGGC GGTGGCTCTG GTTCCGGTGA TTTTGATTAT GAAAAGATGG 2050
 CAAACGCTAA TAAGGGGGCT ATGACCGAAA ATGCCGATGA AAACGCGCTA 2100
 CAGTCTGACG CTAAAGGCAA ACTTGATTCT GTCGCTACTG ATTACGGTGC 2150
 30 TGCTATCGAT GGTTTCATTG GTGACGTTTC CGGCCTTGCT AATGGTAATG 2200
 GTGCTACTGG TGATTTTGCT GGCTCTAATT CCCAAATGGC TCAAGTCGGT 2250
 35 GACGGTGATA ATCACCTTT AATGAATAAT TTCCGTCAAT ATTTACCTTC 2300
 CCTCCCTCAA TCGGTTGAAT GTCGCCCTTT TGTCTTAGC GCTGGTAAAC 2350
 CATATGAATT TTCTATTGAT TGTGACAAAA TAACTTATT CCGTGGTGTC 2400
 40 TTTGCGTTTC TTTTATATGT TGCCACCTTT ATGTATGTAT TTTCTACGTT 2450
 TGCTAACATA CTGCGTAATA AGGAGTCTTA ATCATGCCAG TTCTTTTGGC 2500
 45 TAGCGCCGCC CTATACCTTG TCTGCCTCCC CGCGTTGCGT CGCGGTGCAT 2550
 GGAGCCGGGC CACCTCGACC TGAATGGAAG CCGGCGGCAC CTCGCTAACG 2600
 GATTACACAC TCCAAGAATT GGAGCCAATC AATTCTTGCG GAGAACTGTG 2650
 50 AATGCGCAA CCAACCCTTG GCAGAACATA TCCATCGCGT CCGCCATCTC 2700

CAGCAGCCGC ACGCGGCGCA TCTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGCCACGGG 2750
TGGCATGAT CGTGCTCTG TCGTTGAGGA CCCGGCTAGG CTGGCGGGGT 2800
5 TGCCTTACTG GTTAGCAGAA TGAATCACCG ATACGCGAGC GAACGTGAAG 2850
CGACTGCTGC TGCAAAACGT CTGCGACCTG AGCAACAACA TGAATGGTCT 2900
TCGGTTTCCG TGTTTCGTAA AGTCTGGAAA CGCGGAAGTC AGCGCCCTGC 2950
10 ACCATTATGT TCCGGATCTG CATCGCAGGA TGCTGCTGGC TACCCTGTGG 3000
AACACCTACA TCTGTATTAA CGAAGCGCTG GCATTGACCC TGAGTGATTT 3050
15 TTCTCTGGTC CCGCCGCATC CATAACGCCA GTTGTTTACC CTCACAACGT 3100
TCCAGTAACC GGGCATGTTC ATCATCAGTA ACCCGTATCG TGAGCATCCT 3150
CTCTCGTTTC ATCGGTATCA TTACCCCAT GAACAGAAAT TCCCCTTAC 3200
20 ACGGAGGCAT CAAGTGACCA AACAGGAAAA AACCGCCTT AACATGGCCC 3250
GCTTTATCAG AAGCCAGACA TTAACGCTTC TGGAGAACT CAACGAGCTG 3300
25 GACGCGGATG AACAGGCAGA CATCTGTGAA TCGCTTCACG ACCACGCTGA 3350
TGAGCTTTAC CGCAGGATCC GGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTTAAA 3400
ATTCGCGTTA AATTTTGTG AAATCAGCTC ATTTTTAAC CAATAGGCCG 3450
30 AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGGTTG 3500
AGTGTTGTTC CAGTTTGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC 3550
35 CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCTATGGC CCACTACGTG 3600
AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA 3650
AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC 3700
40 GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA 3750
GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC 3800
45 GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCC GGATCCTGCC TCGCGGTTT 3850
CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGTCCCG GAGACGGTCA 3900
CAGCTTGCT GTAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG 3950
50 TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG 4000

CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT 4050
ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGC GTAAGGA 4100
5 GAAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG 4150
CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT 4200
AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG 4250
10 CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCG GTTGCTGGCG 4300
TTTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCAGAAA ATCGACGCTC 4350
15 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC 4400
CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC 4450
GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG 4500
20 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTGTTGCG TCCAAGCTGG 4550
GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT 4600
25 AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC 4650
AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA 4700
CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA 4750
30 TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG 4800
TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG 4850
35 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT 4900
TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA 4950
AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT 5000
40 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT 5050
TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT 5100
45 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA 5150
CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG 5200
CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC 5250
50 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC 5300

```

AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT 5350
AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTGCA GGCATCGTGG TGTCACGCTC 5400
5  GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG 5450
TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT 5500
CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGCCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT 5550
10 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTAGTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT 5600
CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG 5650
15 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAACA CGGATAATA CCGCGCCACA 5700
TAGCAGAACT TAAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA 5750
AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT 5800
20 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG 5850
GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA 5900
25 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC 5950
ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA 6000
GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC 6050
30 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACCTA TAAAAATAGG 6100
CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAA 6127

```

35 (2) SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 121 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

40 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:

```

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
45 1 5 10 15
Gln Ser Leu Ser Leu Ala Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30
50 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
35 40 45

```

Leu Glu Trp Met Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser
 5 65 70 75
 Gln Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asp
 80 85 90
 10 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105
 Trp His Phe Ala Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 110 115 120
 15 Ser
 121

(2) SEQ ID NO:3 的信息:

20

(i) 序列特征:

(A) 长度: 121 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:3:

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

121

(2) SEQ ID NO:4 的信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 121 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:4:

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

15 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa
20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

20 Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Asn Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr
50 55 60

25 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75

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

30 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Arg Phe Phe Xaa Xaa
95 100 105

Xaa Xaa Xaa Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
110 115 120

35 Ser
121

(2) SEQ ID NO:5 的信息:

40

(i) 序列特征:

(A) 长度: 111 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

45

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:5:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

50 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
20 25 30

```

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
      35              40              45

5   Gln Pro Pro Ile Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser
      50              55              60

Glu Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
      65              70              75
10  Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Phe
      80              85              90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly
15      95              100             105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      110 111

```

20 (2) SEQ ID NO:6 的信息:

```

(i) 序列特征:
    (A) 长度: 111 氨基酸
    (B) 类型: 氨基酸
25    (D) 拓扑结构: 线性

```

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:6:

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
30   1           5           10           15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
      20           25           30

35  Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
      35           40           45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
      50           55           60
40  Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
      65           70           75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
45      80           85           90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
      95           100          105

50  Thr Lys Val Glu Ile Lys
      110 111

```

(2) SEQ ID NO:7 的信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 111 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:7:

```

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
    1             5             10             15

    Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
                20             25             30
15 Ile Ser Xaa Xaa Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35             40             45

    Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
20                50             55             60

    Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65             70             75

25 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80             85             90

    Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
                95             100            105
30 Thr Lys Val Glu Ile Lys
                110 111

```

(2) SEQ ID NO:8 的信息:

35

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 114 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

40

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:8:

```

45 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
    1             5             10             15

    Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
                20             25             30

    Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50                35             40             45

    Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser

```

	50	55	60
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
	65	70	75
5	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
	80	85	90
	Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly		
10	95	100	105
	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
	110	114	

15 (2) SEQ ID NO:9 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 114 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

20 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:9:

25	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
	1	5	10 15
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp		
	20	25	30
30	Tyr Glu Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly		
	35	40	45
	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser		
	50	55	60
35	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe		
	65	70	75
	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr		
40	80	85	90
	Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly		
	95	100	105
45	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		
	110	114	

(2) SEQ ID NO:10 的信息:

50 (i) 序列特征:

(A) 长度: 114 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:10:

```

5   Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
    1             5             10             15

    Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
                20             25             30
10   Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35             40             45

    Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
15             50             55             60

    Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65             70             75

20   Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80             85             90

    Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
                95             100            105

25   Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
                110            114

```

(2) SEQ ID NO:11 的信息:

30

(i) 序列特征:

(A) 长度: 114 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

35

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:11:

```

    Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
    1             5             10             15
40   Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
                20             25             30

    Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
45             35             40             45

    Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr
                50             55             60

50   Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
                65             70             75

```

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

5 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
95 100 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly
110 114

10 (2) SEQ ID NO:12 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 114 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

15 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:12:

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

25 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60

30 Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
95 100 105

40 Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly
110 114

(2) SEQ ID NO:13 的信息:

45 (i) 序列特征:

(A) 长度: 218 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

50 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:13:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

	1	5	10	15
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp			
		20	25	30
5	Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
		35	40	45
	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser			
10		50	55	60
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
		65	70	75
15	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr			
		80	85	90
	Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly			
		95	100	105
20	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
		110	115	120
	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
25		125	130	135
	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val			
		140	145	150
30	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
		155	160	165
	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
		170	175	180
35	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
		185	190	195
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
40		200	205	210
	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
		215	218	

45 (2) SEQ ID NO:14 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 451 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

50 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:14:

	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
	260	265 270
5	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	275	280 285
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
	290	295 300
10	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
	305	310 315
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	320	325 330
15	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
	335	340 345
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
20	350	355 360
	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
	365	370 375
25	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
	380	385 390
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
	395	400 405
30	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
	410	415 420
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
35	425	430 435
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	440	445 450
40	Lys	
	451	

(2) SEQ ID NO:15 的信息:

- 45 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 218 氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑结构: 线性
- 50 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:15:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

	1	5	10	15
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp			
		20	25	30
5	Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
		35	40	45
	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser			
10		50	55	60
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
		65	70	75
15	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr			
		80	85	90
	Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly			
		95	100	105
20	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
		110	115	120
	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
25		125	130	135
	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val			
		140	145	150
30	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
		155	160	165
	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
		170	175	180
35	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
		185	190	195
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
40		200	205	210
	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
		215	218	

45 (2) SEQ ID NO:16 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 451 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

50 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:16:

	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
	260	265 270
5	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	275	280 285
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
	290	295 300
10	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
	305	310 315
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	320	325 330
15	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
	335	340 345
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
20	350	355 360
	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
	365	370 375
25	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
	380	385 390
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
	395	400 405
30	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
	410	415 420
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
35	425	430 435
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	440	445 450
40	Lys	
	451	

(2) SEQ ID NO:17 的信息:

- 45 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 218 氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑结构: 线性

- 50 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:17:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

	1	5	10	15
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp			
		20	25	30
5	Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
		35	40	45
	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser			
10		50	55	60
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
		65	70	75
15	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr			
		80	85	90
	Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly			
		95	100	105
20	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
		110	115	120
	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
25		125	130	135
	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val			
		140	145	150
30	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
		155	160	165
	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
		170	175	180
35	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
		185	190	195
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
40		200	205	210
	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
		215	218	

45 (2) SEQ ID NO:18 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 451 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

50 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
	260	265 270
5	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	
	275	280 285
	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
	290	295 300
10	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	
	305	310 315
	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	
	320	325 330
15	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
	335	340 345
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
20	350	355 360
	Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	
	365	370 375
25	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
	380	385 390
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp	
	395	400 405
30	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
	410	415 420
	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
35	425	430 435
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	440	445 450
40	Lys	
	451	

(2) SEQ ID NO:19 的信息:

- 45 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 218 氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑结构: 线性
- 50 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:19:

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

	1	5	10	15
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp			
		20	25	30
5	Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
		35	40	45
	Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser			
10		50	55	60
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
		65	70	75
15	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr			
		80	85	90
	Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly			
		95	100	105
20	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
		110	115	120
	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
25		125	130	135
	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val			
		140	145	150
30	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
		155	160	165
	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
		170	175	180
35	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
		185	190	195
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
40		200	205	210
	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
		215	218	

45 (2) SEQ ID NO:20 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 229 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

50 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:20:

(A) 长度: 229 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:21:

[illegible]

229

(2) SEQ ID NO:22 的信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 248 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:22:

```

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

15 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
    20             25             30

    Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
    35             40             45

20 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
    50             55             60

    Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
25             65             70             75

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

30 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
    95             100            105

    Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
    110            115            120

35 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
    125            130            135

    Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
40             140            145            150

    Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val
    155            160            165

45 Asp Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    170            175            180

    Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu
    185            190            195

50 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
    200            205            210

```

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 215 220 225

5 Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 230 235 240

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 245 248

10 (2) SEQ ID NO:23 的信息:

(i) 序列特征:
 (A) 长度: 248 氨基酸
 15 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线性

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:23:

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

25 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 35 40 45

30 Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr
 50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
 95 100 105

40 Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 110 115 120

45 Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
 125 130 135

Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 140 145 150

50 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val
 155 160 165

```

      Asp Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
                170                      175                      180

      Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu
5          185                      190                      195

      Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
                200                      205                      210

10     Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
                215                      220                      225

      Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
                230                      235                      240
15
      Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                245                      248

```

(2) SEQ ID NO:24 的信息:

```

20     (i) 序列特征:
          (A) 长度: 218 氨基酸
          (B) 类型: 氨基酸
          (D) 拓扑结构: 线性

```

```

25     (xi) 序列描述: SEQ ID NO:24:

```

```

      Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
      1             5             10             15
30
      Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Pro Val Asp
                20             25             30

      Gly Glu Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35          35             40             45

      Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
                50             55             60

40     Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65             70             75

      Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80             85             90
45
      Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
                95             100            105

      Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
50          110            115            120

      Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser

```

	125	130	135
	Val Val Cys Leu	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val	
	140	145	150
5	Gln Trp Lys Val	Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	
	155	160	165
	Ser Val Thr Glu	Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
10	170	175	180
	Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	
	185	190	195
15	Tyr Ala Cys Glu	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	
	200	205	210
	Lys Ser Phe Asn	Arg Gly Glu Cys	
	215	218	

20

(2) SEQ ID NO:25 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 233 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

25

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:25:

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

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
125 130 135

5 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
140 145 150

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
155 160 165

10 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
170 175 180

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
15 185 190 195

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
200 205 210

20 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
215 220 225

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
230 233

25

(2) SEQ ID NO:26 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 233 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(D) 拓扑结构: 线性

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:26:

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

40 Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr
45 50 55 60

Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75

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

	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Ser	His	Tyr	Phe	Gly	His	
						95				100					105	
5	Trp	His	Phe	Ala	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
						110				115					120	
	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	
						125				130					135	
10	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	
						140				145					150	
	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
15						155				160					165	
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	
						170				175					180	
20	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
						185				190					195	
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
						200				205					210	
25	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
						215				220					225	
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys								
30						230									233	

鼠MaE11、F(ab)-2，人重链亚型III（humIII）和轻链k亚型I（humkI）的
共有序列的氨基酸序列

VH结构域

	10	20	30	40	
MaE11	DVQLQESGPG * * *	LVKPSQSLSL * * *	ACSVT <u>GYSITS</u> * * *	[<u>GYSWN</u>]WIRQF *	
F(ab) - 2	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVS <u>GYSITS</u> * ****	[<u>GYSWN</u>]WIRQA * * * *	
humIII	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS <u>GFTF-S</u>	[<u>DYAMS</u>]WVRQA	
	49	60	70	80	
MaE11	PGNKLEWMG ** **	[SITYD <u>GSS</u> NYN PSLKN]RISVT * * * * *		RDTSQNQFFL * * * *	
F(ab) - 2	PGKGLEWVA	[SITYD <u>G</u> STNYA DSVKG]RFTIS * * * * *		RDDSKNTFYL	
humIII	PGKGLEWVA	[VIS <u>N</u> GSDTYA DSVKG]RFTIS		RDDSKNTLYL	
	82abc	90	100abcd	103	113
MaE11	KLNSATAEDTATY ** ** *		YCAR [<u>GSHYFGHW</u> HEAV] * *	WGAGTTVT	VSS
F(ab) - 2	QMNSLRAEDTAVY		YCAR [<u>GSHYFGHW</u> HEAV] * * * * *	WGQGLVT	VSS
humIII	QMNSLRAEDTAVY		YCAR [<u>D</u> SREF-----DV]	WGQGLVT	VSS

VL结构域

	10	20	30	32abcd	40
MaE11	DIQLTQSPAS *	LAVSLGQRAT * * * *	ISC [KASOSVD YDGDSYMN] * *		WYQQKP
F(ab) -2	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC [RASOSVD YDGDSYMN] *****		WYQQKP
humk1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITC [RASOSVD IS - -SYLN]		WYQQKP
	49	60	70		80
MaE11	GQPPILLIY * * *	[AASYLGS] EIPA * * * *	RFSGSGSGTD		FTLNIHPVEE * * * * *
F(ab) -2	GKAPKLLIY	[AASYLES] GVPS *	RFSGSGSGTD		FTLTISSLQP
humkI	GKAPKLLIY	[AASSLES] GVPS	RFSGSGSGTD		FTLTISSLQP
	88	97	107		
MaE11	EDAATFYC * *	[QQSHEDPYT]	FGAGTKLEIK * *		
F(ab) -2	EDFATYYC	[QQSHEDPYT] *****	FGQGTKVEIK		
humk1	EDFATYYC	[QQYNSLPYT]	FGQGTKVEIK		

图 1

抗Ige变体

	10	20	30	40
e27	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKPVD	GEGDSYLNWY
e26	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASKPVD	GEGDSYLNWY
e426	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASOSVD	YEGDSYLNWY
e25	DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASOSVD	YDGDSYMNWY
	CDR-L1			
	50	60	70	80
e27	QOKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e26	QOKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e426	QOKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
e25	QOKPGKAPKL	LIYAASYLES	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS
	CDR-L2			
	90	100	110	
e27	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e26	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e426	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
e25	SLQPEDFATY	YCOOSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTV
	CDR-L3			
	10	20	30	40
e27	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e26	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e426	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
e25	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ
	CDR-H1			
	50	60	70	80
e27	APGKGLEWVA	SIKYSGETKY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e26	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e426	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
e25	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY	NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY
	CDR-H2			
	90	100	110	
e27	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
e26	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
e426	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
e25	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHEAV	WGQG
	CDR-H3			

图

2

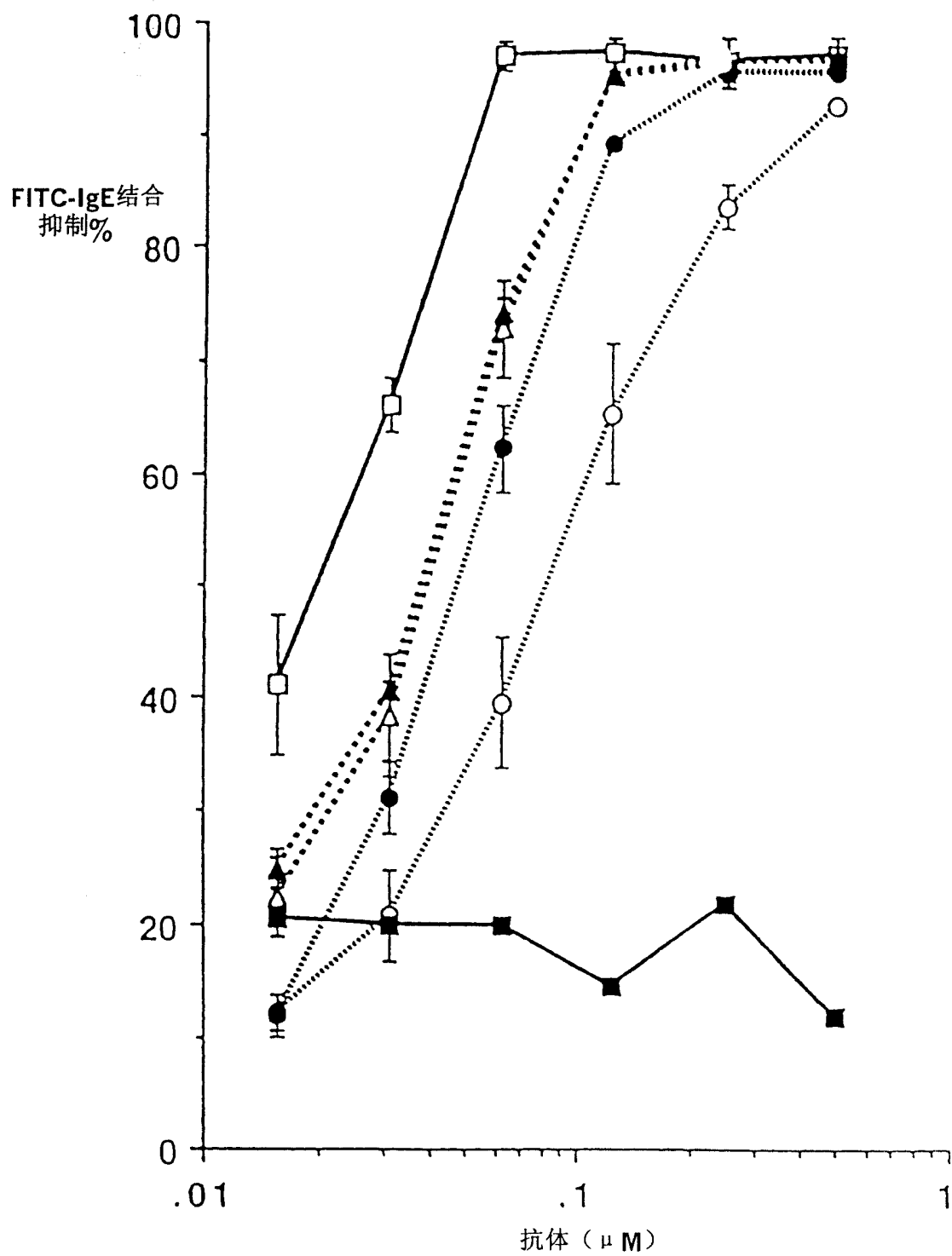


图 3

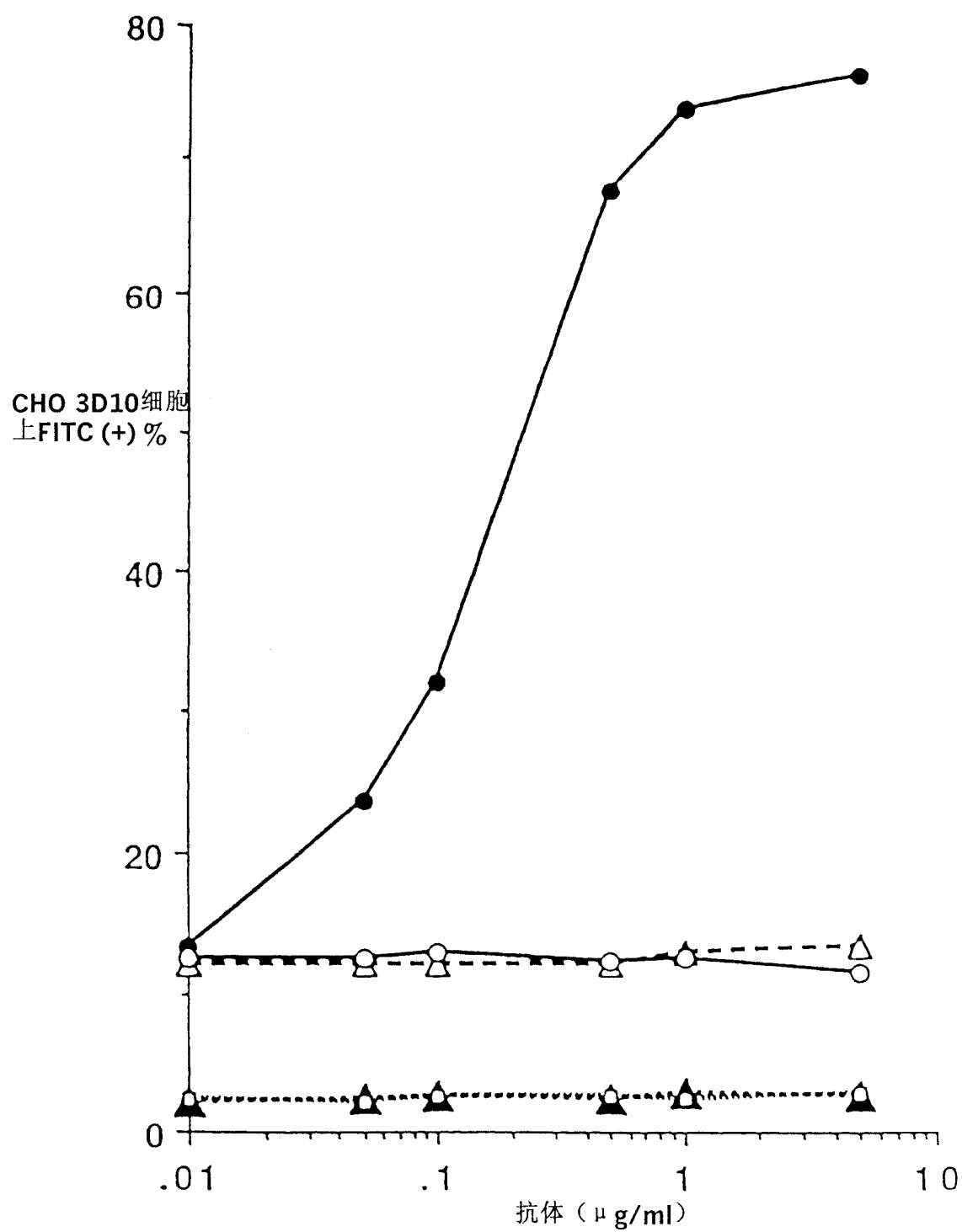


图 4

组胺释放试验

- e25或e26的Fab形式

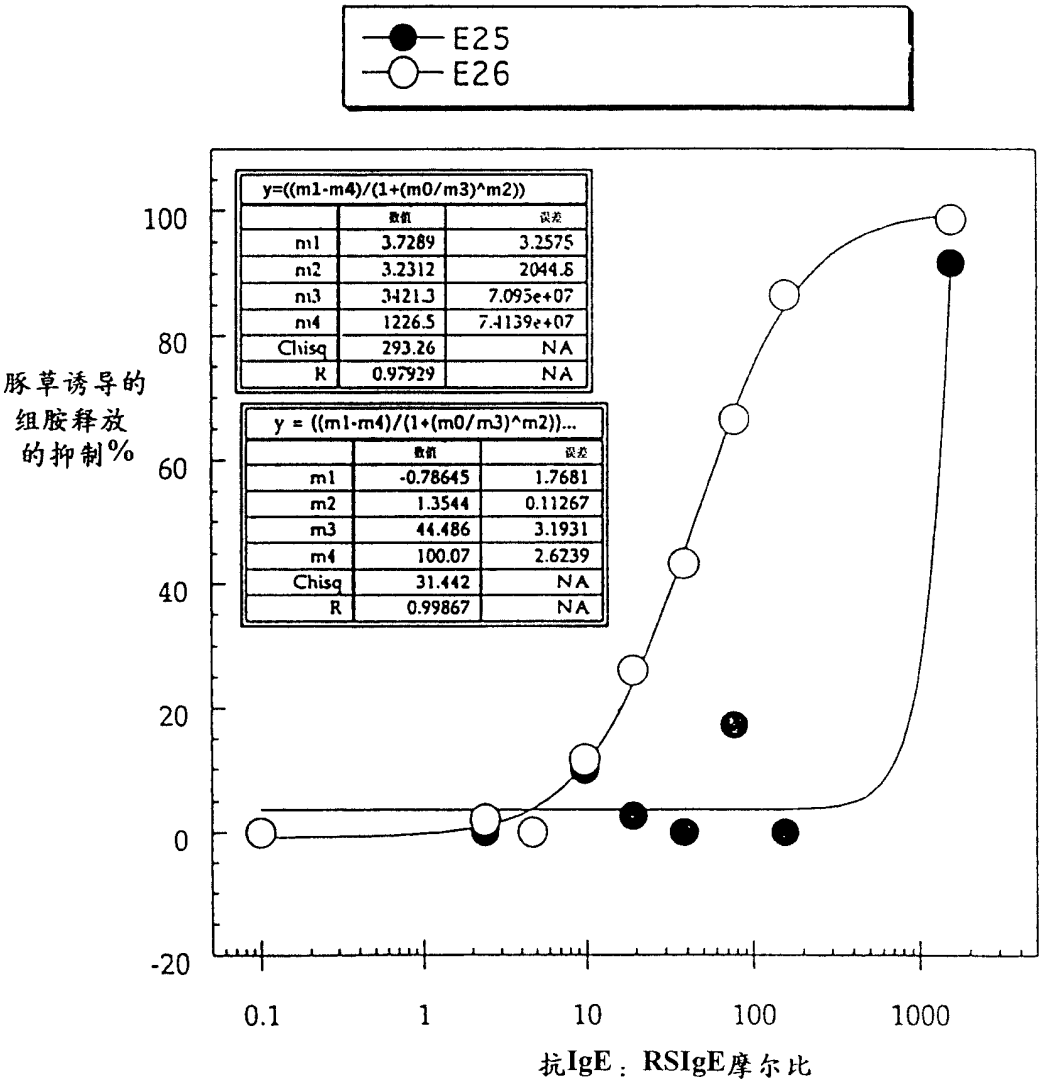


图 5

噬菌体富集

- 文库: a, b 为 VL1; c, d 为 VH3
- 6轮选择
- 所有均表明富集高于e426

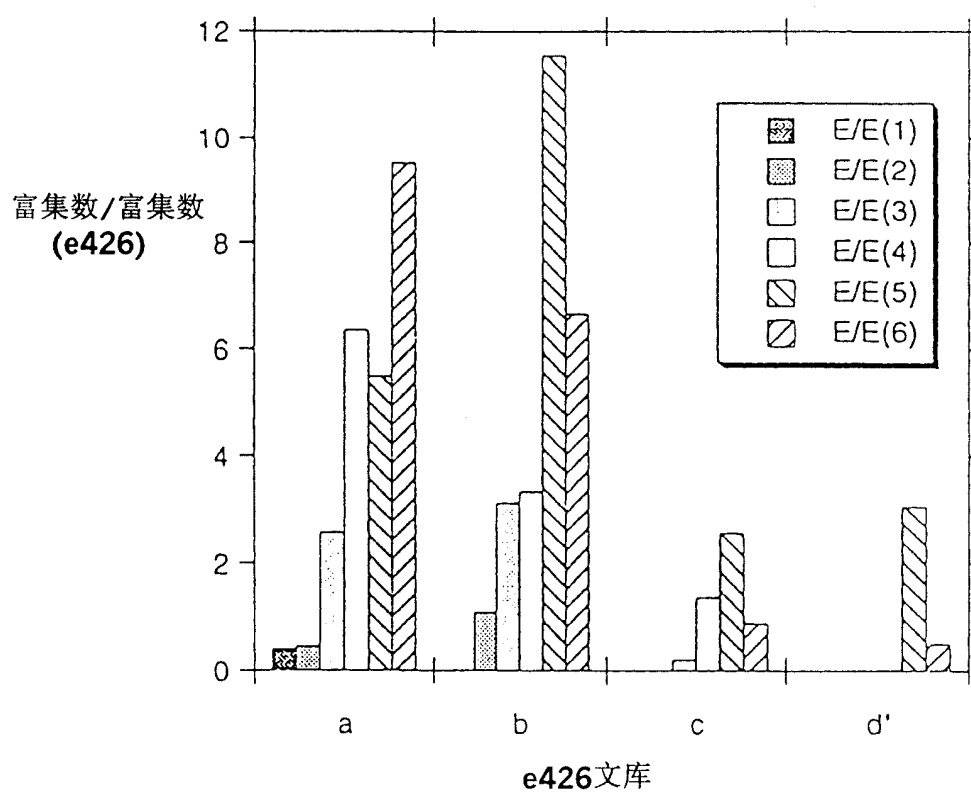


图 6

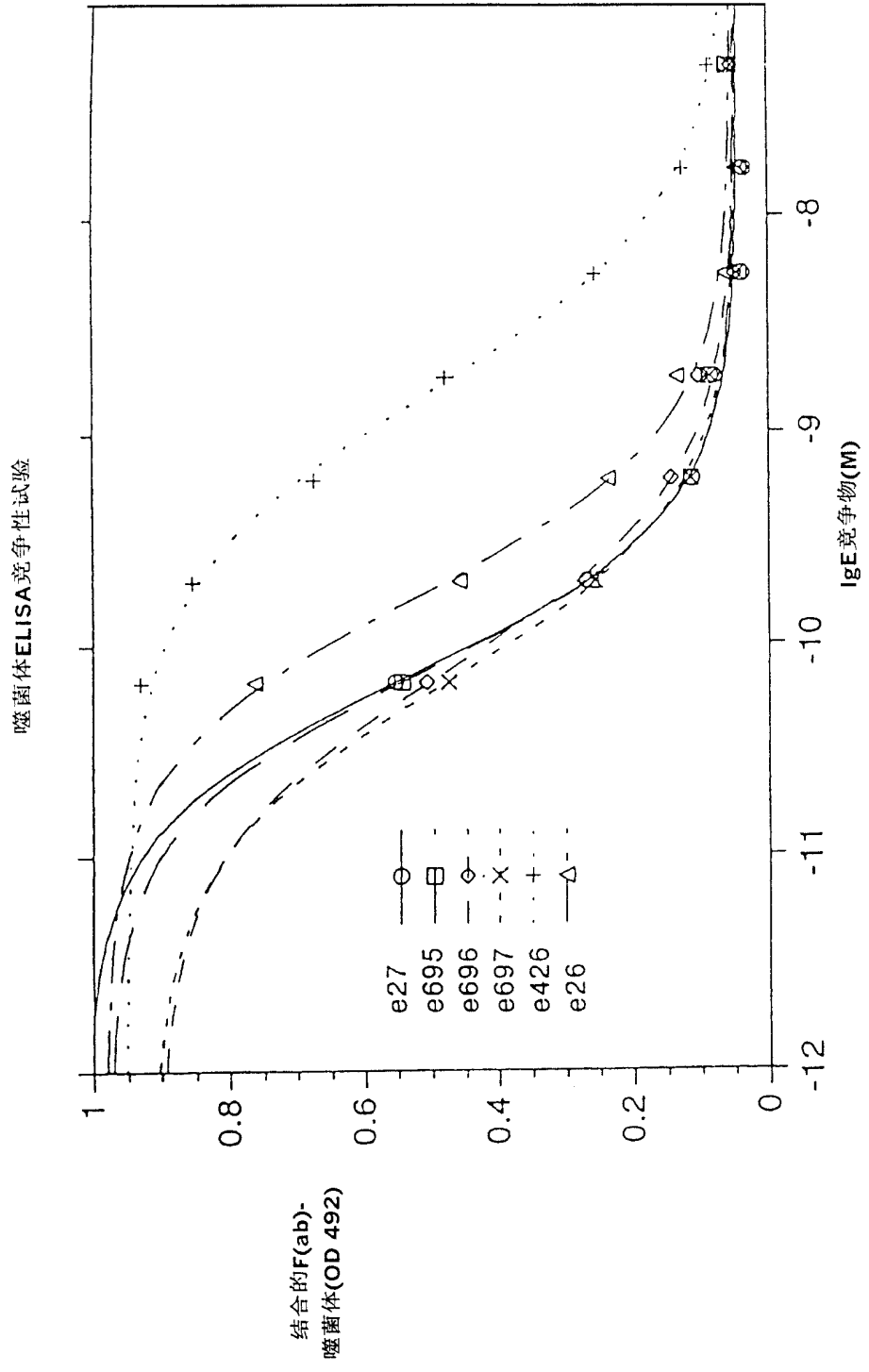


图 7

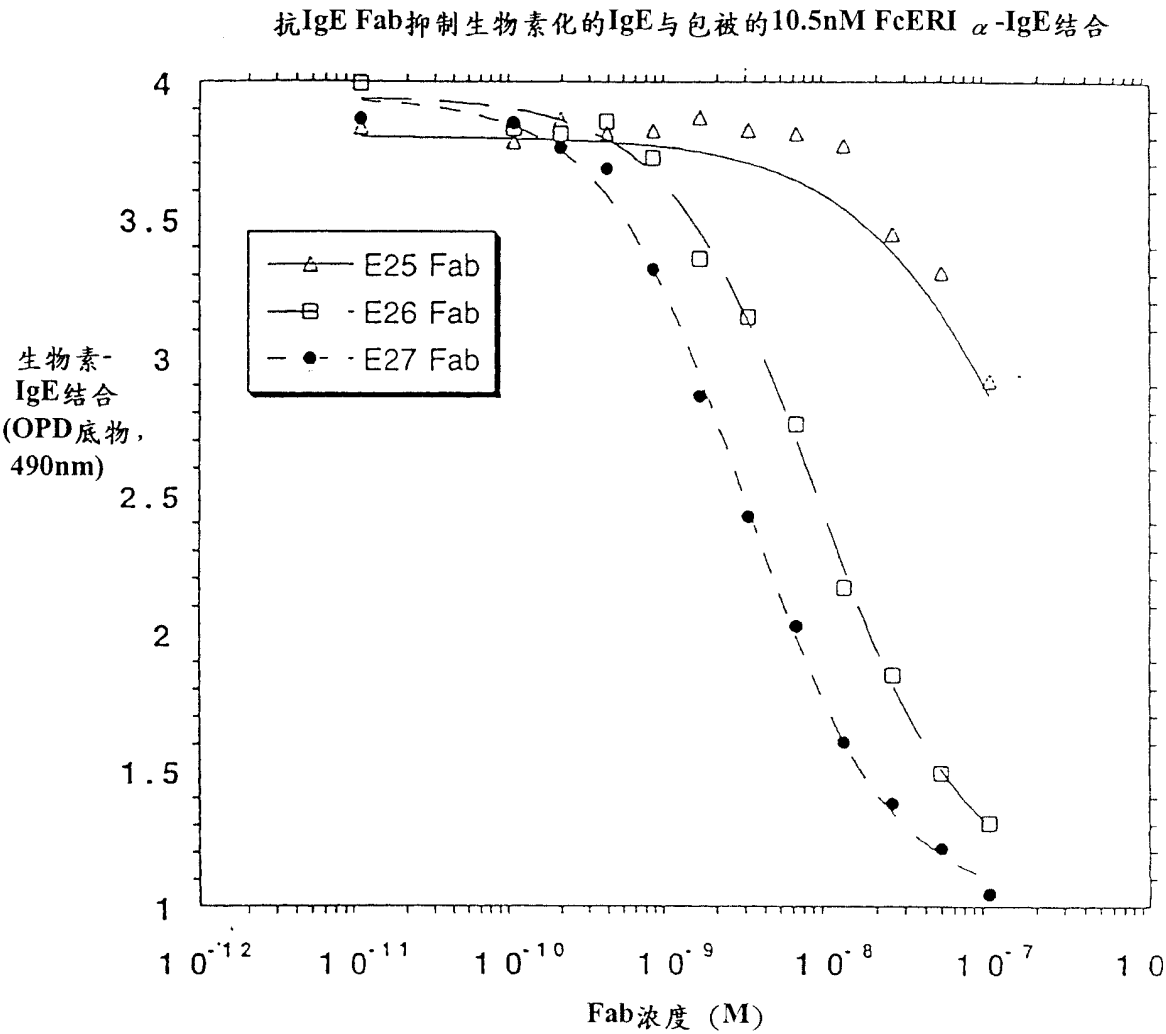


图 8

Fab表观结合亲和力 (BIAcore)

条件: 固定化IgE;
200nM Fab和1.5×连续稀释

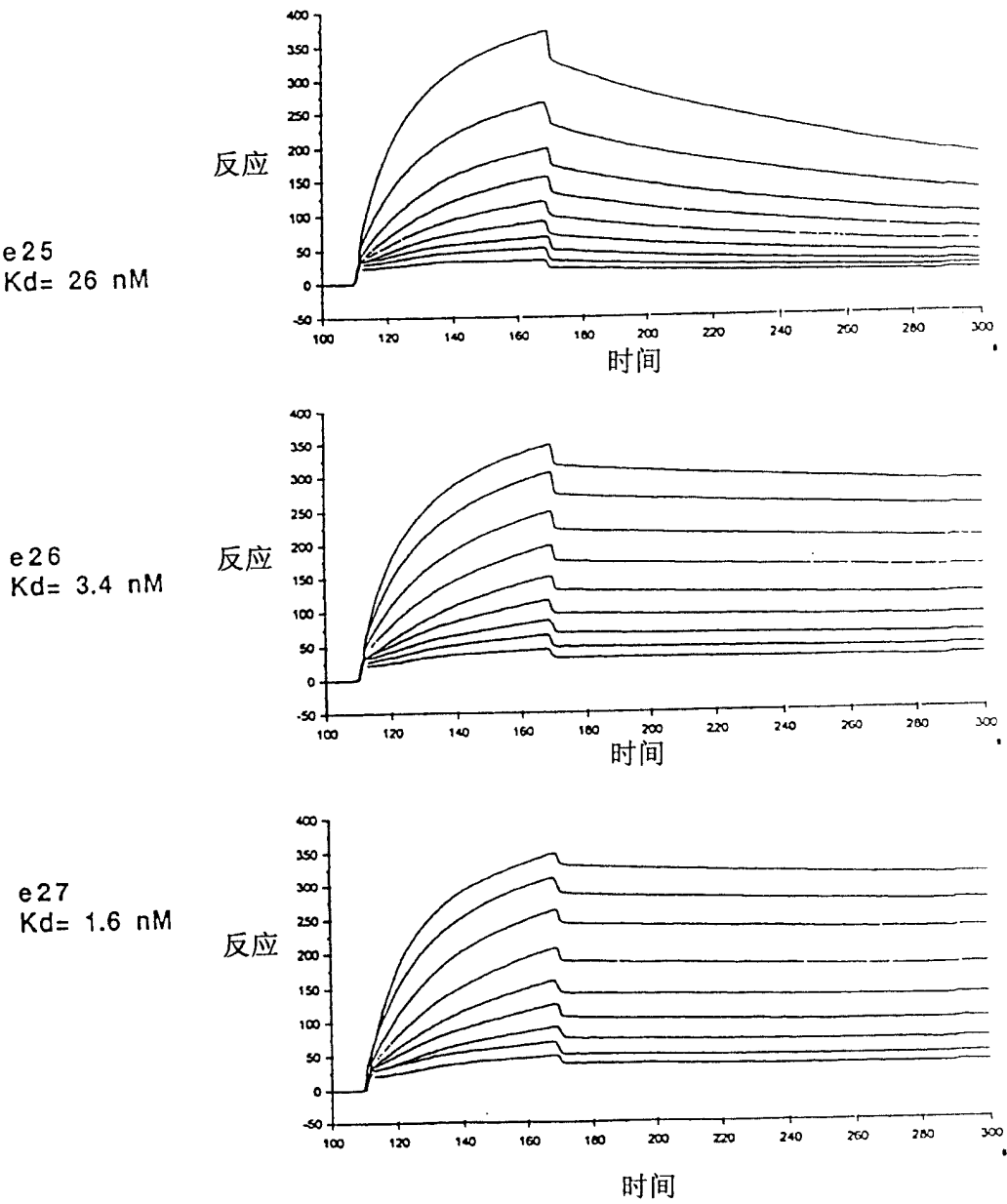


图 9

1 GAATTCAACT TCTCCATACT TTGGATAAGG AAATACAGAC ATGAAAAATC TCATTGCTGA GTTGTTATTT AAGCTTGCCC AAAAAAGA AGAGTCGAAT
 CTTAAGTTGA AGAGGTATGA AACCTATTCC TTTATGTTCTG TACTTTTATG AGTAACGACT CAACAATRAA TTCGAACGGG TTTTCTTCT TCTCAGCTTA
 101 GAACTGTGTG CGCAGGTAGA AGCTTTGGAG ATTATCGTCA CTGCAATGCT TCGCATATG GCGCAAAATG ACCAACAGCG GTTGATTGAT CAGGTAGAGG
 CTTGACACAC GCGTCCATCT TCGAAACCTC TAATAGCAGT GACGTTACGA AGCGTTTATC TGGTTGTGCG CAACTAACTA GTCCATCTCC
 201 GGGCGCTGTA CGAGGTAAAG CCCGATGCCA GCATTCCTGA CGAGCATACG GAGCTGCTGC GCGATTACGT AAAGAAGTTA TTGAAGCATC CTCGTCAAGTA
 CCCGCGACAT GCTCCATTTC GGGCTACGGT CGTAAGSACT GCTGCTATGC CTCGACGACG CGCTAATGCA TTTCTTCAAT AACTTCGTAG GAGCAGTCAT
 301 AAAAGTTAAT CTTTTCAACA GCTGTCAATA AGTTGTCAAG GCGAGACTTT ATAGTCGCTT TGTTTTATTT TTTTAAATGA TTTGTAACTA GAAATTCGAGC
 TTTTCAATTA GAAAAGTTGT CGACAGTATT TCAACAGTGC CGGCTCTGAA TATCAGCGAA ACAAAAATAA AAAATTACAT AAACATTGAT CTTAAGCTCG
 401 TCGGTACCCG GGGATCCTCT CGAGGTTGAG GTGATTTTAT GAAAAAGAAT ATCGCATTTT TCTTGTGATC TATGTTGCTT TTTTCTATTG CTACAAACGC
 AGCCATGGGC CCCTAGGAGA GCTCCAACCT CACTAAATA CTTTTCTTA TAGCGTAAAG AAGAACGTAG ATACAAGCAA AAAAGATTAAC GATGTTTGCG
 501 GTACGCTGAT ATCCAGCTGA CCCAGTCCCC GAGTCCCTG TCGGCGATAG GGTCAACATC ACCTGCCGTG CCAGTCAGAG CGTCGATTAC
 CATGCGACTA TAGGTCGACT GGTGAGGGG CTCGAGGGAC AGCGGGAGAC ACCGCTATC CCAGTGGTAG TGGACGGCAC GGTCAGTCTC GCAGCTAATG
 1 AlaAsp IleGlnLeuT hrGlnSerPr oSerSerLeu SerAlaSerV alGlyAspAr gValThrIle ThrCysArgA laSerGlnSe rValAspTyr
 轻链开始
 601 GAAGGTGATA GCTACCTGAA CTGGTATCAA CAGAAACCAG GAAAAGCTCC GAACTACTG ATTTACGGCG CCTCGTACCT GGAGTCTGGA GTCCCTTCTC
 CTTCCACTAT CGATGGACTT GACCATAGTT GTCTTTGGTC CTTTTCGAGG CTTTGTATGAC TAAATGCGCC GGAGCATGGA CCTCAGACCT CAGGGAAGAG
 33 GluGlyAspS erTyrLeuAs nTrpTyrGln GlnLysProG lylsAlaPr oLysLeuLeu IleTyrAlaA laSerTyrLe uGluSerGly ValProSerArg
 701 GCTTCTCTGG ATCCGGTTCT GGGACGGATT TCACCTCTGAC CATCAGCAGT CTGCAGCCAG AAGACTTCGC AACTTATTAC TGTCAAGCAA GTCACGAGGA
 CGAAGAGACC TAGGCCAAGA CCTGCGCTAA AGTGAGACTG GTAGTCGTCA GACGTCGGTC TTCTGAAGCG TTGATAATAG ACAGTCGTTT CAGTGTCTCT
 67 PheSerGl ySerGlySer GlyThrAspP heThrLeuTh rIleSerSer LeuGlnProG luAspPheAl aThrTyrTyr CysGlnGlnS erHisGluAsp
 801 TCCGTACACA TTTGGACAGG GTACCAAGGT GGAGATCAAA CGAAGTGTGG CTGCACCATC TGTCTTTCATC TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT
 AGGCATGTGT AAACCTGTCC CATGGTTCCA CCTCTAGTTT GCTTGACACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG AAGGCGGTA GACTACTCGT CAACTTTAGA
 100 ProTyrThr PheGlyGlnG lyThrLysVa lGluileLys ArgThrVala laAlaProSe rValPheile PheProProS erAspGluGl nLeuLysSer
 901 GGAAGTGTCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG ATACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG
 CCTTGACGAA GACACACAC GGACGACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCCACC TATTGCGGA GTTAGCCCA TTGAGGGTCC
 133 GlyThrAlaS erValValCy sLeuLeuAsn AsnPheTyrP roArgGluAl aLysValGln TrpLysVala spAsnAlaLe uGlnSerGly AsnSerGlnGlu



10A

1001 AGAGTGTAC AGAGCAGGAC AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGC TGAGCAAAAGC AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG
 TCTCACAGTG TCTCGTCCCTG TCGTTCCTGT CGTGGATGTC GGAATCGTCG TGGGATCGCG ACTCGTTTCG TCTGATGCTC TTTGTGTTTC AGATGCGGAC
 167 SerValTh rGluGlnAsp SerLysAsps erThrTyrSe rLeuSerSer ThrLeuThrL euSerLysAl aAspTyrGlu LyshisLysV alTyrAlaCys
 1101 CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGTCGCC CGTCACAAAG AGTTTCNACA GGGGAGAGTG TTAAGCTGAT CCTCTACGCC GGACGCATCG TGGCCCTAGT
 GCITTCAGTG GTAGTCCCGG ACTGAGCGG GCAGTGTTC TCGAAGTTGT CCCCTCTCAC AATTCGACTA GGAGATGCGG CCTGCGTAGC ACCGGGATCA
 200 GluValThr HisGlnGlyL euSerSerPr oValThrLys SerPheAsnA rgGlyGluCy soc*
 轻链末尾
 1201 ACGCAAGTTC ACGTAAAG GGTATCTAGA GGTGAGGTG ATTTATGAA AAAGAATATC GCATTTCTTC TTGCATCTAT GTTCGTTTTT TCTATTGCTA
 TGGCTTCAAG TGCAATTTTC CCATAGATCT CCACTCCAC TAAATACTT TTTCTTATAG CGTAAAGAA AACGTAGATA CAAGCAAAA AGATAACGAT
 1301 CAACACGCGTA CGCTGAGGTT CAGCTGGTGG AGTCTGGCGG TGGCCTGGTG CAGCCAGGGG GCTCACTCCG TTTGTCTCTGT GCAGTTTCTG GCTACTCCAT
 GTTTGGCGCAT GCGACTCCAA GTCGACCACC TCAGACCGCC ACCGGACCAC GTCGGTCCCG CGAGTGAGGC AAACAGGACA CGTCAAGAC CGATGAGGTA
 1 GluVal GlnLeuValG luSerGlyG l yGlyLeuVal GlnProGlyG lySerLeuAr gLeuSerCys AlaValserg lyTyrSerile
 重链开始
 1401 CACCTCCGGA TACAGCTGGA ACTGGATCCG TCAGGCCCCG GGTAAAGGCC TGGATGGGT TGCATCGATT ACGTATGACG GATCGACTAA CTATAACCTT
 GTGGAGGCTT ATGTCGACCT TGACCTAGGC AGTCGGGGC CCATTCGGG ACCTTACCCA ACGTAGCTAA TGCATACTGC CTAGCTGATT GATATTGGGA
 30 ThrSerGly TyrSerTrpA snTrpIleAr gGlnAlaPro GlyLysGlyL euGluTrpVa lAlaSerile ThrTyrAspG lySerThrAs nTyrAsnPro
 1501 AGCGTCAAGG GCGGTATCAC TATAAGTCGC GACGATTCCA AAAACACATT CTACTGTCAG ATGAACAGCC TGGCTGCTGA GGACACTGCC GTCTATTATT
 TCGCAGTTCC CGGCATAGTG ATATTACGG CTGCTAAGGT TTTGTGTAA GATGACGTC TACTTGTCGG ACGCAGGACT CCTGTGACGG CAGATAATAA
 63 SerValLysG lyArgilleTh rIleSerArg AspAspSerL ysAsnThrPh eTyrLeuGln MetAsnSerL euArgAlaGl uAspThrAla ValTyrTyrCys
 1601 GTGCTCGAGG CAGCCACTAT TTCGGTCACT GGCACCTTCG CGTGTGGGT CAAGGAACCC TGGTCACCGT CTCCTCGGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT
 CACGAGCTCC GTCGGTGATA AAGCCAGTGA CCGTGAAGCG GCACACCCCA GTTCCTTGG ACCAGTGGCA GAGGAGCCCG AGGTGGTTCC CGGGTAGCCA
 97 AlaArgGl ySerHisTyr PheGlyHisT rpHisPheAl aValTrpGly GlnGlyThrL euValThrVa lSerSerAla SerThrLysG lyProSerVal
 1701 CTTCCCCCTA GCACCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGC ACAGCGGCC CTGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCG TACTTCCCG AACCGGTGAC GGTGTCTGCG
 GAAGGGGAT CGTGGGAGGA GGTCTCTGTG GAGACCCCGG TGTCCCGGG ACCCGACGGA CCAGTTCTCTG ATGAAGGGC TTGGCCACTG CCACAGCACC
 130 PheProLeu AlaProSerS erLysSerTh rSerGlyGly ThrAlaAlaL euGlyCysLe uValLysAsp TyrPheProG luProValTh rValSerTrp
 1801 AACTCAGGCG CCTGACCAG CGGCGTGAC ACCTTCCCG CTGTCCTACA GTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA
 TTGAGTCCCG GGGACTGGTC GCCGCACGTG TGGAGGGCC GACAGGTCT CAGAGTCTCT GAGATGAGG AGTCGTGCA CCACCTGGCAC GGGAGGTCTG
 163 AsnSerGlyA laLeuThrSe rGlyValHis ThrPheProA laValLeuG l nSerSerGly LeuTyrSerL euSerSerVa lValThrVal ProSerSerSer



10B

1901 GCTTGGGC CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACAA GCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAAGT TGAGCCCAAA TCTTGTGACA AAACCTCACAC
 CGAACCCGTG GGTCTGGATG TAGACGTTGC ACTTAGTGTG CGGGTCGTTG TGGTCCACC TGTTCTTCA ACTCGGTTT AGAACACTGT TTTGAGTGTG
 197 LeuGlyTh rGlnThrTyr IleCysAsnV alAsnHisLy sProSerAsn ThrLysVala sPLysLysVa lGluProLys SerCysAspL ysThrHisThr
 重链末尾
 2001 CTAGAGTGGC GGTGGCTCTG GTTCCGGTGA TTTTCATTAT GAAAAGATGG CAACGCTAA TAAGGGGGCT ATGACCGAAA ATGCCGATGA AAACGGGCTA
 GATCTACCG CCACCGAGAC CAAGGCCACT AAACTAATA CTTTCTACC GTTTGCGATT ATTCCTCCGA TACTGGCTTT TACGGCTACT TTTGCGCGAT
 230 AM*SerGly GlyGlySerG lySerGlyAs pPheAspTyr GluLysMeta laAsnAlaAs nLysGlyAla MetThrGluA snAlaAspGl uAsnAlaLeu
 与g3p C-端结构域融合
 2101 CAGTCTGACG CTAAAGGCAA ACTTGATTCT GTCGCTACTG ATTACGGTGC TGCTATCGAT GGTTCATTG GTGACGTTTC CGGCCTTGCT AATGGTAATG
 GTCAGACTGC GATTTCCGTT TGAAC TAAGA CAGCGATGAC TAATGCCACG ACATAGCTA CCAAAGTAAC CACTGCAAAAG GCCGGAACGA TTACCATTTAC
 263 GlnSerAspA laLysGlyLy sLeuAspSer valalaThra sPTyrGlyAl aIaIleAsp GlyPheIleG lyAspValse rGlyLeuAla AsnGlyAsnGly
 2201 GTGCTACTGG TGATTTTGCT GGCTCTAANT CCCAAATGGC TCAAGTCGGT GACGGTGATA ATTACCTTT AATGAATAAT TTCCGTCAAT ATTTACCTTC
 CACGATGACC ACTAAACGA CCGAGATTAA GGGTTTACCG AGTTCAGCCA CTGCCACTAT TAAGTGAAA TTACTTATTA AAGGCAGTTA TAAATGGAAG
 297 AlaThrGl yAspPheAla GlySerAsnS erGlnMetal aGlnValGly AspGlyAspA snSerProLe uMetAsnAsn PheArgGlnT yrLeuProSer
 2301 CCTCCCTCAA TCGGTTGAAT GTCGCCCTTT TGCTTTTAGC GCTGTAAAC CATATGAATT TTCTATTGAT TGTGACAAA TAACTTTATT CCGTGGTGTG
 GGAGGGAGTT AGCCAACTTA CAGCGGAAA ACAGAAATCG CGACCATTTG GTATACTTAA AAGATACTA ACACGTGTTT ATTTGATAA GGCACCACAG
 330 LeuProGln SerValGluC ysArgProPh eValPheSer AlaGlyLysP roTyrGluPh eSerIleAsp CysAspLysI leAsnLeuPh eArgGlyVal
 2401 TTTGCGTTTC TTTTATATGT TGCCACCTTT ATGTATGTAT TTTCTACGTT TGCTAACATA CTGCGTAATA AGGAGTCTTA ATCATGCCAG TTCTTTTGGC
 AAACGCAAG AAATATACA ACGGTGAAA TACATACATA AAAGATGCAA ACGATTGTAT GACGCATTAT TCCTCAGAAAT TAGTACGCTC AAGAAAAACCG
 363 PheAlaPheL euLeuTyrVa lAlaThrPhe MetTyrValP heSerThrPh eAlaAsnIle LeuArgAsnL ysGluSerOC *
 g3p 结构域末尾
 2501 TAGCGCGGCC CTATACCTTG TCTGCCTCCC CGGTTGCGT CGCGGTGCGT GGAGCCGGGC CACCTCGACC TGAATGGAAG CCGGCGGCAC CTCGCTAACG
 ATCGCGCGG GATATGGAAC AGACGGAGGG GCGCAACGCA CCGCCACGTA CCTCGGCCCG GTGGAGCTGG ACTTACCCTT GCCCGCCGTG GAGCGATTGC
 2601 GATTCAACCAC TCCAAGAAIT GGAGCCAATC AATTCCTTGG GAGNACTGTG AATGCGCAAA CCAACCTTG GCAGAACATA TCCATCGCGT CCGCCATCTC
 CTAAGTGGT AGGTTCTTAA CCTCGGTTAG TTAAGAACGC CTCTTGACAC TTACGCGTTT GGTGGGAAC CGTCTGTAT AGGTAGCGCA GCGCGTAGAG
 2701 CAGCAGCCGC ACGCGGCGCA TCTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGCCACGGG TGCGCATGAT CGTGCTCCTG TCGTTGAGGA CCCGGCTAGG CTGGCGGGGT
 GTCGTGGCG TCGCGCGCGT AGAGCCCGTC GCAACCCAGG ACCGTGCCC ACGGTACTA GCACGAGGAC AGCAACTCCT GGGCCGATCC GACCGCCCCA

图 10C

2801 TGCCTTACTG GTTAGCAGAA TGAATCACC GAACTGTAAG CGACTGCTGC TGCAGACCTG AGCAACAACA TGAATGCTCT
 ACGGAATGAC CAATCGTCTT ACTTAGTGGC TATGCGCTCG CTTGCACTTC GCTGACGACG ACGTTTGGCA GACGCTGGAC TCGTTGTGTG ACTTACCAGA

 2901 TCGGTTTCCG TGTTCGTAA AGTCTGGAAA CGCGGAAGTC AGCGCCTGC ACCATTATGT TCCGGATCTG CATCGCAGGA TGCTGCTGGC TACCCTGTGG
 AGCCAAAGC ACAAGCAAT TCAGACCTTT GCGCCTTCAG TCGCGGGACG TGGTAATACA AGGCCTAGAC GTAGGCTCCT ACGACGACCG ATGGGACACC

 3001 AACACCTACA TCTGTATTAA CGAAGCGCTG GCATTGACCC TGAGTGATTT TTCTCTGGTC CGGCCGCATC CATACCGCCA GTTGTTTACC CTCACAACGT
 TTGTGGATGT AGACATAAT GCTTCGGAC CGTAACCTGG ACTCACTAAA AAGAGACCAG GCGGCGGTAG GTATGCGGT CAACAATGG GAGTGTTCGA

 3101 TCCAGTAACC GGGCATGTT ATCATCAGTA ACCCGTATCG TGAGCATCCT CTCTCGTTTC ATCGGTATCA TTACCCCTCAT TTAACGCTTC TCCCCCTTAC
 AGGTCAATTGG CCCGTACAG TAGTAGTCAT TGGGCATAGC ACTCGTAGGA GAGAGCAAAG TAGCCATAGT AATGGGGGTA CTTGTCTTTA AGGGGAATG

 3201 ACGGAGGCAT CAAGTGACCA AACAGGAAAA AACCGCCCTT AACATGGCCC GCTTTATCAG AAGCCAGACA TTAACGCTTC TGGAGAACT CAACGAGCTG
 TGCCTCCGTA GTTCACTGGT TTGTCCCTTT TTGGCGGGAA TTGTACCAGG CGAATAGTC TTCGGTCTGT AATGCGAAG ACCCTTTGA GTTGCTCGAC

 3301 GACGCGGATG AACAGGCAGA CATCTGTGAA TCGCTTCAG ACCACGCTGA TGAGCTTTAC CGCAGGATCC GGAATTTGTA AACGTTAATA TTTTGTAA
 CTGCGCCTAC TTGTCCGTCT GTAGACACTT AGCGNAGTGC TGSTGCGACT ACTGAAATG CCGTCTCTAGG CCTTTAACAT TTGCAATTAT AAAACAATTT

 3401 ATTGCGGTTA AATTTTGT TTATCAGCTC AATTTTAAAC CAATAGGCCG AATCGGCCA AATCCCTTAT AATCAAAAG AATAGACCGA GATAGGTTG
 TAAGCGCAAT TTAAAAACAA TTTAGTCGAG TAAAAAATG GTTATCCGCG TTTAGCCGTT TTAGGGAATA TTAGTCTTTC TTATCTGGCT CTATCCCAAC

 3501 AGTGTGTTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGCGAAAA CCGTCTATCA GGGCTATGGC CCACTACGTG
 TCACAAACAG GTCAAAACCTT GTTCTCAGGT GATAATTTCT TGCACTGAG GTTGCACTTT CCGCTTTT GGCAGATAGT CCCGATACCG GGTGATGCAC

 3601 AACCATCACC CTAATCAAGT TTTTGTGGGT CGAGGTGCGG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAGGGAG CCCCAGATT AGAGTTGAC GGGGAAAGCC
 TTGGTAGTGG GATTAGTTCA AAAAACCCCA GCTCCACGCG ATTTCTGTAT TTAGCCTTGG GATTTCCTC GGGGGCTAAA TCTCGAACTG CCCCCTTCGG

 3701 GCGGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGAAGNA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GCGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCAACGCTGC GCGTAACCCAC CACACCCGCC
 CCGCTTGCAC CGCTCTTCC TTCCCTTCTT TCGCTTTCTT CGCCCGCGAT CCGCGGACCG TTCACATCGC CAGTGCAGC CGCATTTGGT GTGTGGGCGG

 3801 GCGCTTAATG CCGCGCTACA GCGCGCGTCC GGATCCTGCC TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
 CGCGAATTAC GCGGCGATGT CCGCGCGCAG CCTAGGACGG AGCGCGCAAA GCCACTACTG CCACCTTTGG AGACTGTGTA CGTCGAGGGC CTCTGCCAGT

 3901 CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGCGGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
 GTCGAACAGA CATTCGCCTA CGGCCCTCGT CTGTTCCGGC AGTCGCCAC AGCCGCCAC AGCCCGCGT CGGTACTGGG TCAGTGCATC



10D

4001 CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA
 GCTATCGCCT CACATATGAC CGAATTGATA CGCCGTAGTC TCGTCTAACA TGACTCTCAC TGCGTATACG CCACACTTTA TGCGGTGTCT ACGCATTCCT
 4101 GAAATACCG CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGGTG CGTCTGGTGC TTGCGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
 CTTTATATGGC GTAGTCCGCG AGAAGGCGAA GGAGCGAGTG ACTGAGCGAC GCGAGCCAGC AAGCCGACGC CGCTCGCCAT AGTCGAGTGA GTTTCGGCCA
 4201 AATACGGTTA TCCACAGNAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAGGGCCA GCAAAAGGCC AGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
 TTATGCCAAT AGGTGCTTAA GTCCCTTATT GCGTCTTTTC TTGTACACTC GTTTCGGGT CGTTCGGG TCCTTGGCAT TTTTCGGCG CAACGACCGC
 4301 TTTTTCCTA GGCTCCGCC CCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGCGTTTC
 AAAAAGGTAT CCGAGGCGGG GGGACTGCTC GTAGTGTTTT TAGCTGGAG TTCAGTCTCC ACCGCTTTGG GCTGTCTGA TATTTCTATG GTCCGCAAAAG
 4401 CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCTT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGCGC TTTCTCATAG
 GGGGACCTTC GAGGGAGCAC GCGAGAGGAC AAGCTGGGA CGCGAATGG CCTATGGACA GCGGGAAGG GGAAGCCCT TCGCACCGCG AAAGAGTATC
 4501 CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGA GTTCGTTGCG TCCAAGCTGG GCTGTGTCGA CGAACCCGCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGCT
 GAGTGGACA TCCATAGAGT CAAGCCACAT CCAGCAAGCG AGTTTCGACC CGACACACGT GCTTGGGGG CNAGTGCGG TGGCGACGCG GAATAGGCCA
 4601 AACTATCGTC TTGAGTCAA CCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTTGCTA
 TTGATAGCAG AACTCAGGT GGGCCATTCT GTGCTGAATA GCGTGACC GCGTGCTGA CCATTGTCTG ATCTGTCTG CTCCATACAT CCGCCACGAT
 4701 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTAG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTGTTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGA AAAGAGTTGG
 GTCTCAAGAA CTTACACCAC GGAATGATGC CGATGTGATC TTCTGTGTCAT AAACCATAGA CCGGAGACGA CTTGCGTCAA TGGAAAGCCTT TTTCTCAACC
 4801 TAGTCTTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTT TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
 ATCAGAGAACT AGGCCGTTT TTTGGTGGG ACCATCGCCA CCMAAAAAA AAACGTTGCT CGTCTAATGC GCGTCTTTT TTCTTAGAGT TCTTCTAGGA
 4901 TTGATCTTTT CTACGGGTC TGACGCTCAG TGGACGAAA ACTCAGTTA AGGGATTTT GTCATGAGAT TATCAAAAAA GATCTTCACC TAGATCCTTT
 AACTAGAAAA GATGCCCCAG ACTGCGAGTC ACCTTGCTTT TGAGTGCAAT TCCCTAAAAA CAGTACTCTA ATAGTTTTTC CTAGAAGTGG ATCTAGGAAA
 5001 TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACTA TCTCAGCGAT
 ATTAAATTT TACTTCAAAA TTTAGTTAGA TTTTATATAT ACTCATTTGA ACCAGACTGT CAATGGTTAC GAATAGTCA CTCCGTGGAT AGAGTCGCTA
 5101 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGTGC AATGATACCG
 GACAGATAAA GCAAGTAGGT ATCAACGAC TGAGGGGCGAG CACATCTATT GATGCTATGC CCTCCCGAAT GGTAGACCG GGTACGACG TTAATATGGC



10E

5201 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGAAGGGGC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
 GCTCTGGGTG CGAGTGGCCG AGGTCTAAAT AGTCGTTATT TGGTCGGTCG GCCTTCCCGG CTCGCGTCTT CACCAGGACG TTGAAATAGG CGGAGGTAGG

 5301 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAACTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCACA ACCTTGTTC CATTGCTGCA GGCATCGTGG TGTACGCTC
 TCAGATAATT AACACGGCC CTTGATCTC ATTCAATCAAG CCGTCAATTA TCAACGGCT TGCAACAACG GTAACGACGT CCGTAGCACC ACAGTCCGAG

 5401 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGGCAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT
 CAGCAAAACCA TACCGAAGTA AGTCGAGGCC AAGGTTGCT AGTCCGCTC AATGTACTAG GGGGTACAAC ACCTTTTTTC GCCAATCGAG GAAGCCAGGA

 5501 CCGATCGTTG TCAGAAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TGTTTATCAC CATAATTCTC TTACTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 GGCTAGCAAC AGTCTTCATT CAACCGCGCT CACAATAGTG AGTACCATAA CCGTCGTGAC GTATTAAAGAG AATGACAGTA CCGTAGGCAT TCTACGAAAA

 5601 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAACA CCGGATAATA CCGCGCCACA
 GACACTGACC ACTCATGAGT TGGTTCAGTA AGACTCTTAT CACATACGCC GCTGGCTCAA CGAGAACGGG CCGCAGTTGT GCCCTATTAT GCGCGGTGT

 5701 TAGCAGAACT TTAAAAGTGC TCATCATTGG AAAAGTTCT TCGGGGGGAA AACTCTCAAG GATCTTACC GTGTTGAGAT CCAGTTTCGAT GTAACCCACT
 ATCGTCTTGA AATTTTCACG AGTAGTAACC TTTTGCAAGA AGCCCCGCTT TTGAGAGTTC CTAGAATGGC GACAACCTTA GGTCAAGCTA CATTGGGTGA

 5801 CGTGCAACCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCG AAAAAAGGA ATAAGGCGCA
 GCACGTGGGT TGACTAGAAG TCGTAGAATA TGAAGTGGT CGCAAGACC CACTCGTTTT TGTCCTTCCG TTTTACGGCG TTTTTCCTT TATTCCCGCT

 5901 CACGGAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA
 GTGCCCTTAC AACTTATGAG TATGAGAAGG AAAAAGTTAT AATAACTTCG TAAATAGTCC CAATAACAGA GTACTCGCT ATGTATAAAC TTACATAAAT

 6001 GAAAAATAAA CAATATAGGG TTCCGGGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCAIT ATTATCATGA CATTAAACCTA TAAAAATAGG
 CTTTTTATT GTTTATCCCC AAGGCGCGTG TAAAGGGGCT TTTACCGGTG GACTGCAGAT TCTTTGGTAA TAATAGTACT GTAATTGGAT ATTTTATCC

 6101 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TCTTCAA
 GCATAGTGT CCGGAAAGC AGAAGTT



10F

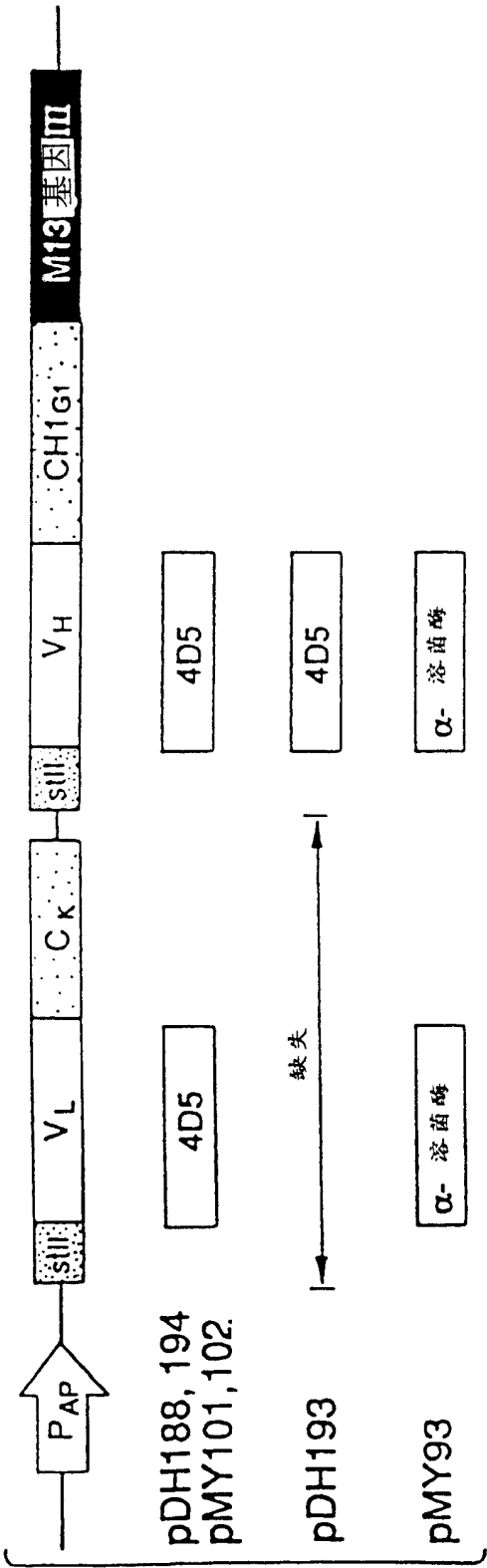


图 11A

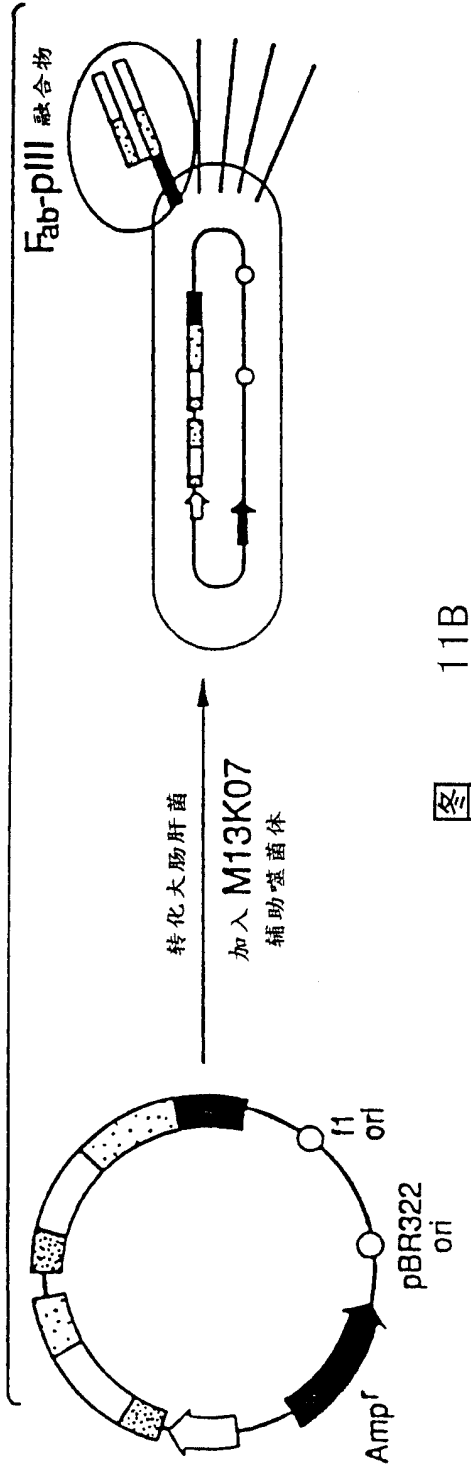


图 11B

(E25) - 轻链

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQSD YDGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLEG GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLsKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E25) - 重链

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGs HYFGHWHFAV WGQGTlTVs SASTKGPSVF PLAPSSKSTs
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(E26) - 轻链

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASKPVD GEGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLEG GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLsKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E26) - 重链

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGs HYFGHWHFAV WGQGTlTVs SASTKGPSVF PLAPSSKSTs
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

(E27) - 轻链

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLEG GVPSRFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLsKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

(E27) - 重链

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGs HYFGHWHFAV WGQGTlTVs SASTKGPSVF PLAPSSKSTs
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

图 12

F(ab)片段轻链**E26**

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QOKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

E27

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QOKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

重链**E26**

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGLTVTS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHT

E27

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGLTVTS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHT

 13

sFV片段

E26

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY
NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTTLVTVS
SEGGGSEGGG SEGGGSDIQL TQSPSSLSAS VGDRVITTCR ASKPVDGEGD SYLNWYQQKP
GKAPKLLIYA ASYLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SHEDPYTFGQ
GTKVEIKR

E27

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY
NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTTLVTVS
SEGGGSEGGG SEGGGSDIQL TQSPSSLSAS VGDRVITTCR ASKPVDGEGD SYLNWYQQKP
GKAPKLLIYA ASYLESGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SHEDPYTFGQ
GTKVEIKR

图

14

F(ab')₂ 片段轻链**E26**

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

E27

DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASKPVD GEGDSYLNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES
 GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

重链**E26**

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SITYDGSTNY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTTLVTVS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKHTC PPC

E27

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY
 NPSVKGRITI SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYYCARGS HYFGHWHFAV WGQGTTLVTVS
 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
 SGLYSLSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKHTC PPC

图 15