

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00806200.5

C07K 16/28  
 C12N 5/10 C12N 15/62  
 C12N 15/13 G01N 33/68  
 G01N 33/577 A61K 39/395  
 A61K 35/12 A61P 35/00  
 A61P 7/06 A61P 3/00  
 A61P 37/00 A61P 25/00  
 [11] 公开号 CN 1360596A

[43] 公开日 2002 年 7 月 24 日

[22] 申请日 2000.2.9 [21] 申请号 00806200.5

[30] 优先权

[32] 1999.2.12 [33] US [31] 09/249,011

[32] 1999.6.24 [33] US [31] 09/339,596

[86] 国际申请 PCT/US00/03303 2000.2.9

[87] 国际公布 WO00/47625 英 2000.8.17

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.12

[71] 申请人 遗传研究所有限公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 M·S·科 M·瓦斯奎茨 B·卡雷诺

A·C·塞尔尼克 M·科林斯

S·戈尔德曼 G·S·格雷 A·奈特

D·奥哈拉 B·鲁普

G·M·维尔德曼 G·瓦纳

S·弗里德里希

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 姜建成

权利要求书 7 页 说明书 102 页 附图页数 33 页

[54] 发明名称 与 B7 分子发生反应的人源化免疫球蛋白  
及应用该免疫球蛋白的治疗方法

[57] 摘要

本发明涉及人源化抗 B7-2 抗体和人源化抗 B7-1 抗体,其中每种抗体均包含一个非人来源的可变区,以及至少人来源免疫球蛋白的一部分。本发明还涉及自身免疫病、移植排斥、炎症失调和传染病等多种疾病的治疗方法,给病人投的药物是人源化抗 B7-2 抗体和/或人源化抗 B7-1 抗体。

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

## 权 利 要 求 书

1. 一种与 B7 分子有结合特异性的人源化免疫球蛋白，所述免疫球蛋白包括一个非人来源的抗原结合区以及人来源免疫球蛋白的至少一部分。

5 2. 权利要求 1 的人源化免疫球蛋白，其中所述 B7 分子是 B7-1 和/或 B7-2。

3. 一种包括人源化 B7-1 抗体和人源化 B7-2 抗体的药用组合物。

4. 一种包括能编码人源化 B7-1 抗体和/或人源化 B7-2 抗体的核酸的宿主细胞。

10 5. 一种与 B7-1 分子有结合特异性的人源化免疫球蛋白，所述免疫球蛋白包括一个非人来源的抗原结合区以及人来源免疫球蛋白的至少一部分。

6. 权利要求 5 的人源化免疫球蛋白，其中所述人来源免疫球蛋白部分来自于人恒定区。

15 7. 权利要求 6 的人源化免疫球蛋白，其中所述人恒定区包括一个 IgG 恒定区。

8. 权利要求 7 的人源化免疫球蛋白，其中所述人恒定区包括的一个突变能降低该免疫球蛋白的效应子功能。

20 9. 权利要求 8 的人源化免疫球蛋白，其中所述人恒定区包括一个 IgG2 恒定区，234 位的缬氨酸由丙氨酸取代，和/或 237 位的甘氨酸由丙氨酸取代。

10. 权利要求 7 的人源化免疫球蛋白，其中所述 IgG 恒定区选自 IgG4 恒定区和 IgG2 恒定区。

25 11. 权利要求 5 的人源化免疫球蛋白，其中所述抗原结合区来自啮齿类动物。

12. 权利要求 5 的人源化免疫球蛋白，其中所述抗原结合区包括一个啮齿类动物来源的互补性决定区，人来源的免疫球蛋白部分来自人构架区。

30 13. 权利要求 12 的人源化免疫球蛋白，其中所述互补性决定区来自 1F1 单克隆抗体。

14. 一种对 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白，来自由 ATCC 保藏的细胞系，Accession No. PTA-263。

15. 一种对 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白轻链, 包括鼠 1F1 抗体轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及一个人轻链构架区。

16. 权利要求 15 的人源化免疫球蛋白轻链, 其中所述轻链包括一个 SEQ ID NO: 28 的可变区。

5 17. 一种包括选自以下核酸的分离核酸:

a) SEQ ID NO: 27,

b) 编码 SEQ ID NO: 28 的氨基酸序列的核酸,

c) 在严格杂交条件下能与 a) 或 b) 的核酸杂交的核酸, 以及

d) 与 a) 或 b) 核酸互补的核酸。

10 18. 一种与 B7-1 有特异性的人源化免疫球蛋白重链, 包括 1F1 抗体重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及一个人重链构架区。

19. 权利要求 18 的人源化免疫球蛋白重链, 其中所述重链包括一个 SEQ ID NO: 26 的可变区。

20. 一种包括选自以下核酸的分离核酸:

15 a) SEQ ID NO: 25,

b) 编码 SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列的核酸,

c) 在严格杂交条件下能与 a) 或 b) 的核酸杂交的核酸, 以及

d) 与 a) 或 b) 核酸互补的核酸。

20 21. 一种包括编码权利要求 5 中人源化免疫球蛋白的核酸的宿主细胞。

22. 一种编码人源化免疫球蛋白轻链或重链的融合基因, 包括:

a) 第一种核酸序列, 编码来自鼠 1F1 单克隆抗体的抗原结合区; 以及

25 b) 第二种核酸序列, 编码人来源免疫球蛋白恒定区的至少一部分。

23. 一种抑制有 B7-1 受体的第一种细胞与有 B7-1 的第二种细胞之间发生相互作用的方法, 包括让所述第一种细胞接触有效量的权利要求 5 的人源化免疫球蛋白。

30 24. 一种治疗有移植器官、移植组织或移植细胞的个体的方法, 包括投药治疗有效量的权利要求 5 的人源化抗体。

25. 一种治疗由 B7-1 调节的疾病的方法, 包括投药治疗有效量的权利要求 5 的人源化抗体。

26. 一种制备与 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的方法，所述免疫球蛋白包括一个非人来源的抗原结合区，以及人来源免疫球蛋白的至少一部分，该方法包括以下步骤：

a) 鉴定与 B7-1 有结合特异性的非人来源抗体的互补性决定区；

5 b) 获得一种人抗体，该抗体的构架区氨基酸序列适合于 (a) 中鉴定的互补性决定区的嫁接，以及

c) 将 (a) 的互补性决定区嫁接到 (b) 中人抗体的构架区中，

其中，制备与 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白。

27. 一种鉴定样品中 B7-1 存在与否的方法，包括以下步骤：

10 a) 让所述样品与 B7-1 特异的人源化抗体充分接触，以便形成 B7-1 与抗 B7-1 抗体之间的复合物，以及

b) 检测所述复合物存在与否。

28. 一种与 B7-2 分子有结合特异性的人源化免疫球蛋白，所述免疫球蛋白包括一个非人来源的抗原结合区以及人来源免疫球蛋白的至少一部分。

29. 权利要求 28 的人源化免疫球蛋白，其中所述人来源免疫球蛋白部分来自人恒定区。

30. 权利要求 29 的人源化免疫球蛋白，其中所述人恒定区包括一个 IgG 恒定区。

20 31. 权利要求 30 的人源化免疫球蛋白，其中所述人恒定区包括的一个突变能降低免疫球蛋白的效应子功能。

32. 权利要求 31 的人源化免疫球蛋白，其中所述人恒定区包括一个 IgG2 恒定区，234 位的缬氨酸由丙氨酸取代，和/或 237 位的甘氨酸由丙氨酸取代。

25 33. 权利要求 30 的人源化免疫球蛋白，其中所述 IgG 恒定区选自 IgG4 恒定区和 IgG2 恒定区。

34. 权利要求 28 的人源化免疫球蛋白，其中所述抗原结合区来自啮齿类动物。

30 35. 权利要求 28 的人源化免疫球蛋白，其中所述抗原结合区包括一个啮齿类动物来源的互补性决定区，而人来源的免疫球蛋白部分来自人构架区。

36. 权利要求 35 的人源化免疫球蛋白，其中所述互补性决定区来

自 3D1 单克隆抗体。

37. 一种对 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白，来自由 ATCC 保藏的细胞系，Accession No. CRL-12524。

38. 一种对 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白轻链，包括鼠 3D1 抗体轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及一个人轻链构架区。

39. 权利要求 38 的人源化免疫球蛋白轻链，其中所述轻链包括一个 SEQ ID NO: 8 的可变区。

40. 一种包括选自以下核酸的分离核酸：

- a) SEQ ID NO: 7,
- b) 编码 SEQ ID NO: 8 氨基酸序列的核酸，
- c) 在严格杂交条件下能与 a) 或 b) 的核酸杂交的核酸，以及
- d) 与 a) 或 b) 的核酸互补的核酸。

41. 一种与 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白重链，包括 3D1 抗体重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 以及一个人重链构架区。

42. 权利要求 41 的人源化免疫球蛋白重链，其中所述重链包括一个 SEQ ID NO: 6 的可变区。

43. 一种包括选自以下核酸的分离核酸：

- a) SEQ ID NO: 5,
- b) 编码 SEQ ID NO: 6 氨基酸序列的核酸，
- c) 在严格杂交条件下能与 a) 或 b) 核酸杂交的核酸，以及
- d) 与 a) 或 b) 核酸互补的核酸。

44. 一种包括编码权利要求 28 中人源化免疫球蛋白的核酸的宿主细胞。

45. 一种编码人源化免疫球蛋白轻链或重链的融合基因，包括：

- a) 第一种核酸序列，编码来自鼠 3D1 单克隆抗体的抗原结合区；以及
- b) 第二种核酸序列，编码人来源免疫球蛋白恒定区的至少一部分。

46. 一种抑制有 B7-2 受体的第一种细胞与有 B7-2 的第二种细胞之间发生相互作用的方法，包括让所述第一种细胞接触有效量权利要求 28 的人源化免疫球蛋白。

47. 一种治疗有移植器官、移植组织或移植细胞的个体的方法，

包括投药治疗有效量的权利要求 28 的人源化抗体。

48. 一种治疗由 B7-2 调节的疾病的方法，包括投药治疗有效量的权利要求 28 的人源化抗体。

49. 一种制备与 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的方法，  
5 所述免疫球蛋白包括一个非人来源的抗原结合区，以及人来源免疫球蛋白的至少一部分，该方法包括以下步骤：

a) 鉴定与 B7-2 有结合特异性的非人来源抗体的互补性决定区；

b) 获得一种人抗体，该抗体的构架区氨基酸序列适合于 (a) 中鉴定的互补性决定区的嫁接，以及

10 c) 将 (a) 的互补性决定区嫁接到 (b) 中人抗体的构架区中，  
其中，制备与 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白。

50. 一种鉴定样品中 B7-2 存在与否的方法，包括以下步骤：

a) 让所述样品与 B7-2 特异的人源化抗体充分接触，以便形成 B7-2 与抗 B7-2 抗体之间的复合物，以及

15 b) 检测所述复合物存在与否。

51. 一种将细胞移植到需要它的个体上的方法，包括

a) 从供体获得细胞，

b) 让所述细胞与对 B7-1 特异的免疫球蛋白、对 B7-2 特异的免疫球蛋白和来自所述个体的细胞接触足够长的一段时间，以便诱导耐  
20 受性，从而获得一种混合物，以及

c) 将所述混合物导入所述受体中。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述供体细胞来自骨髓或血液。

53. 权利要求 51 的方法，其中所述受体细胞是淋巴细胞。

54. 权利要求 51 的方法，其中所述时间是大约 12 小时到大约 96  
25 小时之间。

55. 权利要求 54 的方法，其中所述时间是大约 36 小时到大约 48 小时之间。

56. 权利要求 55 的方法，其中所述受体的疾病选自：增生病、贫血症、先天性代谢障碍、先天性免疫缺陷病以及骨髓相位异常综合症。

30 57. 权利要求 56 的方法，其中所述增生病选自：白血病、淋巴瘤以及癌症。

58. 权利要求 57 的方法，其中所述贫血症选自于：镰状细胞贫血、

地中海贫血以及再生障碍性贫血。

59. 权利要求 51 的方法，包括给所述个体投以一种用于调节免疫反应的药物。

60. 权利要求 59 的方法，其中所述药物选自：氨甲蝶呤、纳巴霉素、环孢菌素、类固醇、CD40 途径抑制剂、移植补救途径抑制剂、IL-2 受体拮抗物及其类似物。

61. 一种治疗移植受体或预防移植受体发生移植排斥的方法，包括给受体投以有效量的对 B7-1 特异的免疫球蛋白和有效量的对 B7-2 特异的免疫球蛋白。

62. 权利要求 61 的方法，还包括投以一种选自以下的组合物：钙调磷酸酶抑制剂、类固醇、能阻断免疫细胞生长的免疫抑制剂、氨甲蝶呤、CD40 途径抑制剂、移植补救途径抑制剂、IL-2 受体拮抗物及其类似物。

63. 权利要求 62 的方法，其中所述钙调磷酸酶抑制剂是环孢菌素 A 或 FK506。

64. 权利要求 62 的方法，其中所述类固醇是甲基强的松或强的松。

65. 权利要求 62 的方法，其中所述能阻断免疫细胞生长的免疫抑制剂是纳巴霉素。

66. 权利要求 61 的方法，其中所述对 B7-1 特异的免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 到大约 25mg/kg 之间，而所述对 B7-2 特异的免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 到大约 25mg/kg 之间。

67. 权利要求 66 的方法，其中所述对 B7-1 特异的免疫球蛋白和对 B7-2 特异的免疫球蛋白是在受体接受移植的当天就投药的。

68. 权利要求 67 的方法，其中所述对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 到大约 25mg/kg 之间，对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 到大约 25mg/kg 之间，受体接受移植的当天就投药。

69. 权利要求 68 的方法，其中在受体接受移植之后所述对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白和对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白还要定期投药。

70. 权利要求 69 的方法，其中在受体接受移植之后所述对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白和对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白至少还要

每周投药一次。

71. 权利要求 70 的方法，其中所述对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 到大约 5mg/kg 之间，对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 到大约 5mg/kg 之间，受体接受移植之后至少每周投药一次。

72. 一种治疗患有选自自身免疫病、传染病、炎性失调、系统性红斑性狼疮、糖尿病、胰岛炎、哮喘、关节炎、炎性肠道疾病、炎性皮炎和多发性硬化等疾病的个体的方法，包括投以治疗有效量的对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白和/或投以治疗有效量的对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白。

73. 一种调节有移植器官、移植组织、移植细胞等的个体的免疫应答的方法，包括投以有效量的存在于载体中的对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白和有效量的对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白。

74. 权利要求 73 的方法，包括投以用于调节有移植器官、移植组织、移植细胞等的个体的免疫应答的药物，其中所述药物选自：氮甲蝶呤、纳巴霉素、环孢菌素、类固醇、CD40 途径抑制剂、移植补救途径抑制剂、IL-2 受体拮抗物及其类似物。

75. 一种减轻哺乳动物对抗原的抗体应答的方法，包括在存在所述抗原的情况下给个体投以有效量的对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白和/或有效量的对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白。

76. 权利要求 75 的方法，还包括给所述个体投以所述抗原。

77. 权利要求 75 的方法，其中所述抗原选自：破伤风类毒素、因子 VIII、因子 IX、胰岛素、生长激素和基因递载体。

78. 对 B7-1 和/或 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的用途，用于治疗自身免疫病、传染病、炎性失调、系统性红斑性狼疮、糖尿病、胰岛炎、哮喘、关节炎、炎性肠道疾病、炎性皮炎和多发性硬化，包括权利要求 1 的组合物。

79. 对 B7-1 和/或 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的用途，可用于生产药剂，可用于给个体移植细胞、组织或器官。

80. 在有抗原的情况下对 B7-1 和/或 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的用途，可用于生产用于降低哺乳动物中对抗原的抗体应答药剂。

# 说明书

## 与 B7 分子发生反应的人源化免疫球蛋白 及应用该免疫球蛋白的治疗方法

### 5 相关申请

本申请是提交于 1999 年 6 月 24 日的 09/339596 号申请的后续部分申请，后者是提交于 1999 年 2 月 12 日的 09/249011 号申请的后续部分申请。后两个申请的所有内容在此引入作为参考。

### 发明背景

10 抗原特异 T-细胞的激活以及免疫应答的起始，首先依赖于 T-细胞受体 (TCR) 复合物与抗原呈递细胞 (APC) 上的多肽/主要组织相容性复合体 (MHC) 之间的相互作用。B7 分子 B7-1 和 B7-2 位于 APCs 上。T-细胞的激活以及随后的免疫应答调控，需要一种“共刺激”信号，这种信号是由 APC 上的 B7-1 和 B7-2 与 T-细胞上的配体 CD28 和 CTLA4  
15 相互作用产生的。B7-1 和 B7-2 途径，亦即 B7: CD28/CTLA4 途径，需要调节。还需要开发受此途径影响的疾病的治疗方法。

### 发明概述

本发明涉及与 B7 分子有结合特异性的人源化免疫球蛋白。本发明尤其包括一种对 B7-1 和 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白，其中的免疫球蛋白包括一个非人来源（如啮齿类动物）的抗原结合区，以及至少人来源的一部分（如人的恒定区 IgG 恒定区和/或人的构架区）。一个实施方案中，人源化抗 B7-2 免疫球蛋白或人源化抗 B7-1 免疫球蛋白的人的恒定区，还包含一种能降低人源化免疫球蛋白效应子功能的突变。本文所述的人源化 B7-2 免疫球蛋白与鼠 3D1 竞争结合  
25 B7-2。同样，本文所述的人源化 B7-1 免疫球蛋白与鼠 1F1 竞争结合 B7-1。特定实施方案中，人源化 B7-2 免疫球蛋白的抗原结合区来自于 3D1 单克隆抗体，而人源化 B7-1 免疫球蛋白的抗原结合区来自于 1F1 单克隆抗体。

30 本发明中的人源化免疫球蛋白可以包含一个人来源的恒定区以及一个抗原结合区。其中的非人来源的抗原结合区包含一个或多个啮齿类动物来源（例如，源于 3D1 单克隆抗体）的与 B7-2 结合的互补性决定区 (CDRs)，或者包含一个或多个啮齿类动物来源（例如，源于 1F1

单克隆抗体)的与 B7-1 结合的 CDRs。人来源的免疫球蛋白部分来自于人的一个构架区 (FR)。

人源化 B7-2 抗体的抗原结合区还可以包括一条轻链以及一条重链，其中的轻链和重链都有三个来自于 3D1 抗体的 CDRs。人源化 B7-2 抗体轻链的 FR 可来自于人 H2F 抗体轻链，而重链可来自于人 I2R 抗体重链。一个特定实施方案中，本发明中与 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白，来自于由美国典型培养物保藏中心 (A. T. C. C.) (Accession No. CRL-12524) 保藏的细胞系。

人源化 B7-1 抗体的抗原结合区可以包括一条轻链以及一条重链，其中的轻链和重链都有三个来自于 1F1 抗体的 CDRs。人源化 B7-1 轻链和重链的 FR 可来自于人 III-2R 抗体的轻链和重链。一个特定实施方案中，本发明中与 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白，来自于由美国典型培养物保藏中心 (A. T. C. C.) (Accession No. PTA-263) 保藏的细胞系。

本发明也包括一个与 B7-1 或 B7-2 有特异结合性的免疫球蛋白，包括一条重链和/或一条轻链。一个实施方案中，人源化免疫球蛋白与 B7-2 有结合特异性，轻链包含至少一个与 B7-2 结合的非人来源抗体的 CDR (例如 CDR1、CDR2 以及 CDR3) 以及一个人来源的轻链的 FR (如 H2F 抗体)；重链包含至少一个与 B7-2 结合的非人来源抗体的 CDR (例如 CDR1、CDR2 以及 CDR3) 以及一个人来源的重链的 FR (如人 I2R 抗体)。另一实施方案中，人源化免疫球蛋白与 B7-1 有结合特异性，轻链和/或重链包含至少一个与 B7-1 结合的非人来源抗体的 CDR (例如 CDR1、CDR2 以及 CDR3) 以及一个来自于人轻链和/或重链的 FR (如 III-2R)。免疫球蛋白还可包含轻链或重链 CDR1、CDR2 以及 CDR3，其氨基酸序列如本文所披露，或者和本文所列氨基酸序列基本一样，这样的抗体能与 B7-2 或 B7-1 特异结合。本发明也涉及人源化免疫球蛋白轻链和人源化免疫球蛋白重链。本发明也涉及分离的核酸，这些核酸包括编码本发明人源化免疫球蛋白 (如一种单链抗体) 的序列。本发明还涉及分离的核酸，这些核酸包括编码 B7-2 或 B7-1 人源化免疫球蛋白轻链或重链的序列。

本发明的一个实施方案是一种与 B7-2 有结合特异性的人源化免疫球蛋白轻链，包括鼠 3D1 抗体轻链 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，以及一种

人轻链 FR (如 H2F 抗体)。同样, 本发明还包括一种包含鼠 1F1 抗体轻链 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的与 B7-1 有结合特异性的人源化 B7-1 免疫球蛋白轻链, 还包括一种人轻链 FR (如 III-2R 抗体)。另一实施方案是一种人源化 B7-2 或 B7-1 免疫球蛋白轻链, 该免疫球蛋白轻链包括图 2B (SEQ ID NO: 8) 所示的一个可变区或图 7B (SEQ ID NO: 28) 所示的可变区。本发明也涉及一种分别编码对 B7-2 或 B7-1 特异的人源化可变轻链的分离核酸, 包括图 2B (SEQ ID NO: 7) 或图 7B (SEQ ID NO: 27) 所示的核酸序列; 也涉及一种分别编码图 2B (SEQ ID NO: 8) 或图 7B (SEQ ID NO: 28) 所示氨基酸序列的核酸序列; 还涉及在严格杂交条件下能与以上序列杂交的一种核酸序列或能与以上序列互补的一种核酸序列。

本发明的另一实施方案是一种对 B7-2 特异并包括 3D1 抗体重链 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 以及一种人重链 FR (如 I2R 抗体) 的人源化免疫球蛋白。同样, 本发明还涉及一种对 B7-1 特异并包括 1F1 抗体重链 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 以及一种人重链 FR (如 III-2R 抗体) 的人源化免疫球蛋白重链。本发明涉及一种包括图 2A (SEQ ID NO: 6) 或图 7A (SEQ ID NO: 26) 所示可变区的人源化免疫球蛋白。本发明还涉及一种编码对 B7-2 特异的人源化可变重链的分离核酸序列, 该序列包括图 2A (SEQ ID NO: 5) 所示的一种核酸序列; 还涉及一种编码图 2A (SEQ ID NO: 6) 所示氨基酸序列的分离核酸序列; 还涉及在严格杂交条件下能与以上序列杂交的核酸序列或能与以上序列互补的核酸序列。本发明涉及一种编码对 B7-1 特异的人源化可变重链的分离核酸序列, 该序列包括图 7A (SEQ ID NO: 25) 所示的核酸序列; 还涉及一种编码图 7A (SEQ ID NO: 26) 所示氨基酸序列的分离核酸序列; 还涉及在严格杂交条件下能与以上序列杂交的核酸序列或能与以上序列互补的核酸序列。

本发明的一个实施方案尤其是一种与 B7-2 特异结合的人源化免疫球蛋白, 该免疫球蛋白包含一条包括来自于鼠 3D1 抗体三条轻链 CDRs 在内的人源化轻链, 以及一条来自于人免疫球蛋白轻链的轻链可变区构架序列, 以及一条包括来自于鼠 3D1 抗体三条重链 CDRs 在内的人源化重链, 以及一条来自于人免疫球蛋白重链的重链可变区构架序列。鼠 3D1 抗体中还可以有一个成熟轻链可变结构域, 如图 1B (SEQ ID NO:

4) 所示的成熟轻链可变结构域; 抗体中还可以有一个成熟重链可变结构域, 如图 1A (SEQ ID NO: 2) 所示的成熟重链可变区。

本发明的另一实施方案是一种与 B7-1 特异结合的人源化免疫球蛋白, 该免疫球蛋白包含一条包括来自于鼠 1F1 抗体三条轻链 CDRs 在内的人源化轻链, 以及一条来自于人免疫球蛋白轻链的轻链可变区构架序列, 以及一条包括来自于鼠 1F1 抗体三条重链 CDRs 在内的人源化重链, 以及一条来自于人免疫球蛋白重链的重链可变区构架序列。同样, 鼠 1F1 抗体中还可以有一个成熟轻链可变结构域, 如图 6B (SEQ ID NO: 24) 所示的成熟轻链可变结构域; 抗体中还可以有一个成熟重链可变结构域, 如图 6A (SEQ ID NO: 22) 所示的成熟重链可变区。

本发明包括一个包含融合基因的表达载体, 其融合基因编码人源化 B7-1 和/或 B7-2 免疫球蛋白轻链和/或重链。融合基因包括编码来自于对 B7-2 和/或 B7-1 有结合特异性的非人抗体的轻链和/或重链的 CDR (如, 分别是鼠 3D1 或 1F1 抗体), 和一个人来源轻链和/或重链的 FR 的核苷酸序列。

本发明也涉及一种包含本发明核酸的宿主细胞, 包括一种或多种包含本发明核酸的构建体。一个实施方案中, 本发明包括的宿主细胞包含编码一条人源化 B7-2 免疫球蛋白轻链的第一种 B7-2 重组核酸, 还包含编码一条人源化 B7-2 免疫球蛋白重链的第二种 B7-2 重组核酸。第一种 B7-2 核酸包含编码至少一个来自于鼠 3D1 抗体轻链的 CDR 和一个人来源轻链的 FR 的核酸序列。第二种 B7-2 核酸包含编码至少一个来自于鼠 3D1 抗体重链的 CDR 和一个来自于人重链的 FR 的核酸序列。另一实施方案中, 本发明包括的宿主细胞包含编码一条人源化 B7-1 免疫球蛋白轻链的第一种 B7-1 重组核酸, 还包含编码一条人源化 B7-1 免疫球蛋白重链的第二种 B7-1 重组核酸。第一种 B7-1 核酸包含编码至少一个来自于鼠 1F1 抗体轻链的 CDR 和一个来自于人来源轻链的 FR 的核酸序列。第二种 B7-1 核酸包含能编码至少一个来自于鼠 1F1 抗体重链的 CDR 和一个来自于人来源重链的 FR 的核酸序列。正如本文所述, 本发明还涉及一种宿主细胞, 该宿主细胞内包含一种能编码人源化 B7-1 和/或 B7-2 免疫球蛋白的载体或核酸。

正如本文所述, 本发明还涉及制备人源化免疫球蛋白的方法, 包括在适合表达人源化免疫球蛋白的条件下保持能编码对 B7-2 或 B7-1

特异的人源化免疫球蛋白的宿主细胞，其中，能表达出人源化免疫球蛋白链（一条或多条）并有人源化免疫球蛋白产生。该方法还包括人源化 B7-1 或 B7-2 免疫球蛋白的分离步骤。

正如本文所述，本发明包括能抑制有 B7-2 受体的第一种细胞与有 B7-2 的第二种细胞之间相互作用的方法，包括让第二种细胞接触有效量的人源化 B7-2 免疫球蛋白。正如本文所述，本发明还包括能抑制有 B7-1 受体的第一种细胞与有 B7-1 的第二种细胞之间相互作用的方法，包括让第二种细胞接触上有效量的人源化 B7-1 免疫球蛋白。因此，本发明还涉及抑制 B7-1 受体和 B7-2 受体与 B7-1 配体和 B7-2 配体发生相互作用的方法，包括让有 B7-1 受体和 B7-2 受体的细胞接触一定量的抗 B7-1 免疫球蛋白和抗 B7-2 免疫球蛋白。所以，本发明涉及多种治疗方法。正如本文所述，本发明包括一种能调节个体（如病人）免疫应答或者能治疗有移植器官、移植组织、移植细胞等个体的方法，包括在有或无载体存在的情况下，给个体投以有效量的人源化 B7-1 和 /或 B7-2 免疫球蛋白，其中能调节个体的免疫应答。本发明涉及急性 15 和 /或慢性移植排斥的治疗方法，例如能更长时间（如数日、数月或数年）的治疗。正如本发明所述，本发明还涉及调节 B7-2 和 /或 B7-1 分子来治疗疾病（如自身免疫病、传染病、炎症失调、系统性红斑性狼疮、糖尿病、哮喘、胰岛炎、关节炎、炎性肠道疾病、炎性皮炎和多发性硬化）的方法，包括在有或没有载体存在的情况下给个体（如病人）投以有效量（如治疗上的有效量）的 B7-2 和 /或 B7-1 人源化免疫球蛋白。因此，正如本文所述，本发明包括一种包含 B7-1 和 /或 B7-2 人源化免疫球蛋白的药用组合物。

本发明也包括从对 B7-2 特异的鼠抗体中制备对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白的方法，和 /或从对 B7-1 特异的鼠抗体中制备对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白的方法。以上方法包括鉴定或确定与 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的非人来源（如来自鼠的）抗体的 CDRs；获得可用于移植 CDRs 的有构架区氨基酸序列的人抗体，以及将非人来源抗体的 CDRs 移植到人抗体 FR 上。

本发明还涉及鉴定样品中有或无 B7-2 和 /或 B7-1 的方法。该方法包括获得待测样品，让样品与对 B7-1 和 /或 B7-2 特异的人源化抗体或其片段充分接触，以便能够分别形成 B7-2 和 /或 B7-1 与抗 B7-2 抗体

和/或抗 B7-1 抗体之间的复合物；以及检测有无复合物形成。复合物的存在表明样品中有 B7-2 和/或 B7-1。

5 本发明涉及有病个体的治疗方法，包括给病人投以一定量（如治疗有效量）的对 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白和/或一定量（如治疗有效量）的对 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白。本文所述疾病包括自身免疫病、传染病、哮喘、炎症失调、系统性红斑性狼疮、糖尿病、胰  
10 岛炎、关节炎、炎性肠道疾病、炎性皮炎以及多发性硬化。该方法也涉及调节有移植器官、移植组织、移植细胞等的个体的免疫应答，包括给个体投以有效量的与 B7-1 结合的人源化免疫球蛋白和或有效量的与 B7-2 结合的人源化免疫球蛋白。该方法还包括给有移植器官、移植组织、移植细胞等的个体投以用于调节其免疫应答的药物。例如，这些药物可以是氨甲蝶呤、纳巴霉素（rapamycin）、环孢菌素、类固醇、抗 CD40 途径抑制剂（如抗 CD40 抗体、抗 CD40 配体抗体以及 CD40 途径的小分子抑制剂）、移植补救途径抑制剂（如 mycophenolate mofetil  
15 （MMF）、IL-2 受体拮抗剂（如 Hoffmann-la Roche .Inc. 公司的 Zeonpax®，以及 Novartis Inc. 的 Simulet）及其类似物。这些药物可以在人源化免疫球蛋白投药之前投药或者与其一起投药，或者在人源化免疫球蛋白投药之后投药。

20 本发明还涉及给所需个体移植细胞（如骨髓细胞、血细胞、血液组分以及其它细胞）的方法，包括从供体获得细胞（如骨髓细胞、或血细胞或血液组分），以及让这些细胞与对 B7-1 特异的免疫球蛋白和/或对 B7-2 特异的免疫球蛋白以及受体细胞接触，以便获得它们的混合物。免疫球蛋白和受体细胞需要维持一段时间，该时间应该足以诱导耐受性。然后将混合物（指的是骨髓组分或血细胞组分）导入到个体  
25 中。受体细胞可以是淋巴细胞（如能表达 1 类抗原（MHC I）的淋巴细胞或外周血淋巴细胞（PBL））。除用受体细胞外，本方法还包括利用能表达 MHC I 类抗原、B7-1 和/或 B7-2 分子的组织、器官或细胞。这些细胞可以工程化，用来表达受体分子。来自供体的细胞可以是骨髓细胞或者是血液的细胞/组分（如干细胞或未成熟细胞）。B7 免疫球蛋白与供体骨髓细胞和受体细胞之间的接触应该能维持一段时间，这段时间足可以诱导耐受诱导的产生（如约 1-96 小时，优选约 36-48 小时）。  
30 需移植的个体的疾病可受益于骨髓移植或可通过移植骨髓来治疗。这

些疾病包括的例子有增生病（如白血病、淋巴瘤和癌）、贫血症（如镰状细胞贫血症、地中海贫血症以及再生障碍性贫血）、先天性代谢缺陷、先天性免疫缺陷病以及骨髓相位异常综合症（MDS）。该方法还包括给  
5 个体投以用于调节免疫应答的药物（如氨甲蝶呤，纳巴霉素，环孢菌素，类固醇，抗 CD40 途径抑制剂如抗 CD40 抗体、抗 CD40 配体抗体以及 CD40 途径的小分子抑制剂，移植补救途径抑制剂如 mycophenolate mofetil（MMF），IL-2 受体拮抗剂如 Hoffmann-la Roche Inc. 公司的 Zeonpax®以及 Novartis Inc. 的 Simulet，或者其类似物）。

本发明尤其包括给有病（例如，增生病如白血病、淋巴瘤、癌，  
10 贫血症如镰状细胞贫血症、地中海贫血症以及再生障碍性贫血，先天性代谢缺陷，先天性免疫缺陷病，以及骨髓相位异常综合症），用骨髓移植治疗的个体移植骨髓的方法，其中包括从供体中获得骨髓，以及让骨髓与对 B7-1 特异的免疫球蛋白和/或对 B7-2 特异的免疫球蛋白以及  
15 与受体细胞（如淋巴细胞）接触。骨髓、免疫球蛋白和受体细胞的接触应该能够维持足够长的时间（如，约 1-96 小时，优选约 36-48 小时），以足以诱导耐受性。该方法也包括再次给个体导入处理过的骨髓。该方法还包括给个体投以用于调节免疫应答的药物（如氨甲蝶呤，纳巴霉素，环孢菌素，类固醇，抗 CD40 途径抑制剂如抗 CD40 抗体、抗 CD40  
20 配体抗体以及 CD40 途径的小分子抑制剂，移植补救途径抑制剂如 mycophenolate mofetil（MMF），IL-2 受体拮抗剂如 Hoffmann-la Roche Inc. 公司的 Zeonpax®以及 Novartis Inc. 的 Simulet，或者其类似物）。

本发明也包括通过给受体投以有效量的对 B7-1 特异的免疫球蛋白和/或有效量的对 B7-2 特异的免疫球蛋白以便治疗移植受体或抑制移植受体的移植排斥的方法。对 B7-1 特异的免疫球蛋白的投药量在大约  
25 1mg/kg 与大约 100mg/kg 之间，而对 B7-2 特异的免疫球蛋白的投药量在大约 1mg/kg 与大约 100mg/kg 之间。可以在受体接受移植的当天就投给对 B7-1 和 B7-2 特异的免疫球蛋白（如投药量可以在大约 1mg/kg 与大约 25mg/kg 之间），也可以在受体接受移植之后再定期（如每天一次、每周一次或每月一次）投药（如投药量可以在大约 1mg/kg 与大约  
30 5mg/kg 之间）。本方法还包括投以用于治疗移植排斥的组合物，如钙调磷酸酶抑制剂（环孢菌素 A 或环孢菌素 FK506），类固醇（如甲基强的松或强的松），或者能阻止免疫细胞生长的免疫抑制剂（如纳巴霉素），

抗 CD40 途径抑制剂 (如抗 CD40 抗体、抗 CD40 配体抗体以及 CD40 途径的小分子抑制剂), 移植补救途径抑制剂 (如 mycophenolate mofetil (MMF)), IL-2 受体拮抗剂 (如 Hoffmann-la Roche Inc. 公司的 Zeonpax®以及 Novartis Inc. 的 Simulet), 或者其类似物。如上文所述, 5 本发明也涉及给需要移植的个体移植细胞、组织或器官的方法; 还涉及给个体投以有效量的对 B7-1 特异的免疫球蛋白和有效量的对 B7-2 特异的免疫球蛋白。

本发明也包括在有抗原存在的情况下, 通过给个体投以有效量的对 B7-1 特异的免疫球蛋白和/或有效量的对 B7-2 特异的免疫球蛋白以 10 减弱哺乳动物对抗原产生的抗体应答。该方法还包括给个体投以抗原 (如破伤风类毒素、因子 VIII、因子 IX、胰岛素、生长激素或基因送递载体)。抗原可以以多肽形式或以核酸形式投药 (如通过腺伴随病毒 (AAV)、反转录病毒、裸 DNA 载体等送递的基因治疗方法)。

本发明的优点包括能够对 B7 共刺激途径进行调节或调整。用人源 15 化抗 B7-2 抗体和/或抗 B7-1 抗体对该共刺激途径进行操作, 提供了多种疾病的治疗方法。人源化抗 B7-2 抗体和/或抗 B7-1 抗体保持了同对应的鼠抗体一样对各个 B7 分子的特异性, 但与对应的鼠抗体相比, 人源化抗体对人的免疫原性降低而且有更长的半衰期。因此, 本发明在用于治疗免疫相关疾病/失调或 B7-2 和/或 B7-1 发挥重要功能的疾病 20 方面是有利的。本发明尤其涉及自身免疫病的治疗方法, 涉及调节有移植器官、移植组织或移植细胞的个体的免疫应答。

#### 附图简述

从以下对本发明优选实施方案更具体的描述中, 就能看出本发明 25 中前述内容和其它实施方案、特征以及其优点, 伴随的图表可以说明这一点。

图 1A 是鼠 3D1 抗体重链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列表 (分别为 SEQ ID NOS: 1 和 2), 其中 CDRs (CDR1、CDR2、CDR3) 的氨基酸序列下有下列线, 而成熟重链的第一个氨基酸下有双下列线。

图 1B 是鼠 3D1 抗体轻链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列表 30 (分别为 SEQ ID NOS: 3 和 4), 其中 CDRs (CDR1、CDR2、CDR3) 的氨基酸序列下有下列线, 而成熟轻链的第一个氨基酸下有双下列线。

图 2A 是人源化 3D1 抗体重链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序

列表（分别为 SEQ ID NOS: 5 和 6），其中 CDRs（CDR1、CDR2、CDR3）的氨基酸序列下有下列线，而成熟重链的第一个氨基酸下有双下划线。

图 2B 是人源化 3D1 抗体轻链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列列表（分别为 SEQ ID NOS: 7 和 8），其中 CDRs（CDR1、CDR2、CDR3）的氨基酸序列下有下列线，而成熟轻链的第一个氨基酸下有双下划线。

图 3 表示竞争性结合分析法分析的结果的曲线图。该曲线表示出鼠或人源化抗人 B7-2 mAbs 与表面能表达 rhB7-2（CHO/hB7-2）的 CHO 竞争结合分析的结果。在有放射性标记示踪的鼠抗人 B7-2 mAb 存在下，浓度逐渐升高的非标记竞争抗体与 CHO/hB7-2 细胞一起温浴，对结合态/游离态抗体的比例进行了测定。

图 4 表示鼠或人源化抗人 B7-2 mAbs 与 CHO/hB7-2 细胞直接结合分析的结果的曲线图。浓度逐渐升高的放射形标记的抗体与 CHO 或 CHO/hB7-2 细胞一起温浴，对与 CHO/hB7-2 细胞结合的特异抗体的量进行了测定。

图 5 表示用 T 细胞增殖分析法分析的结果的曲线图。将浓度逐渐升高的鼠或人源化抗人 B7-2 mAbs 加到用 PMA 和 CHO/hB7-2 细胞刺激的 CD28<sup>+</sup> 人 T 细胞中，测定了这些 mAbs 对 T 细胞增殖的抑制作用。

图 6A 是鼠 1F1 抗体重链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列列表（分别为 SEQ ID NOS: 21 和 22），其中 CDRs（CDR1、CDR2、CDR3）的氨基酸序列下有下列线，而成熟重链的第一个氨基酸下有双下划线。

图 6B 的鼠 1F1 抗体轻链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列列表（分别为 SEQ ID NOS: 23 和 24），其中 CDRs（CDR1、CDR2、CDR3）的氨基酸序列下有下列线，而成熟轻链的第一个氨基酸下有双下划线。

图 7A 是人源化 1F1（huF1）抗体重链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列列表（分别为 SEQ ID NOS: 25 和 26），其中 CDRs（CDR1、CDR2、CDR3）的氨基酸序列下有下列线，而成熟重链的第一个氨基酸下有双下划线。

图 7B 是人源化 1F1（huF1）抗体轻链可变区的核酸序列和氨基酸序列的序列列表（分别为 SEQ ID NOS: 27 和 28），其中 CDRs（CDR1、CDR2、CDR3）的氨基酸序列下有下列线，而成熟轻链的第一个氨基酸下有双下划线。

图 8 是竞争性结合分析法分析结果的曲线图。该曲线表示鼠或人

源化抗人 B7-1 mAbs 与用 rhB7-1 (CHO/ hB7-1) 转染的 CHO 竞争结合的分析结果。在有放射性标记示踪的人源化 1F1 存在下, 浓度逐渐升高的非标记竞争抗体与 CHO/hB7-1 细胞一起温浴, 对结合态/游离态抗体的比例进行了测定。

5 图 9A 是用斯卡查德分析法对鼠 1F1 抗体与用 rhB7-1 转染的 CHO 竞争结合分析结果的曲线图。将放射性标记鼠 1F1 抗体与用 rhB7-1 转染的 CHO 细胞一起温浴, 对结合态/游离态放射活性的比例进行了测定。

图 9B 是用斯卡查德分析法对人源化 1F1 抗体与用 rhB7-1 转染的 CHO 细胞结合分析结果的曲线图。将放射性标记人源化 1F1 抗体与用  
10 rhB7-1 转染的 CHO 细胞一起温浴, 对结合态/游离态放射活性的比例进行了测定。

图 10 是鼠或人源化抗人 B7-1 mAbs 与表面能表达 rhB7-1 (CHO/ hB7-1) 的 CHO 竞争结合分析结果的曲线图。在有放射性标记示踪鼠抗人 B7-1 mAb 的存在下, 浓度逐渐升高的非标记竞争抗体与 CHO/hB7-1  
15 细胞一起温浴, 对结合态/游离态抗体的比例进行了测定。

图 11 是表示鼠或人源化抗人 B7-1 mAbs 与 CHO/hB7-2 细胞直接结合分析结果的曲线图。浓度逐渐升高的放射性标记的抗体与 CHO 或 CHO/hB7-1 细胞一起温浴, 对与 CHO/hB7-1 细胞结合的特异抗体的量进行了测定。

20 图 12 表示 T 细胞增殖分析法分析结果的曲线图。将浓度逐渐升高的鼠或人源化抗人 B7-1 mAbs 加到用 PMA 和 CHO/hB7-1 细胞刺激的 CD28<sup>+</sup> 人 T 细胞中, 对这些 mAbs 对 T 细胞增殖的抑制作用进行了测定。

图 13 是表示单向混合淋巴细胞反应 (MLR) 分析法分析结果的曲线图。向由人效应器 PBLs 和刺激物 PBLs 组成的混合物中加入固定浓  
25 度的鼠或人源化抗人 B7-2 (同型 IgG2. M3) 或人 CTLA4Ig, 在第 3、4、5 天通过加入放射性标记的胸苷检测效应器 PBLs 的增殖情况。

图 14 是表示用来自初级 MLR 的 PBLs 作为效应器并用来自同一个体或不同个体的初级 MLR 的 PBLs 作为刺激物, 进行单向次级 MLR 分析的结果的曲线图。仅将人源化抗人 B7-1 mAb 加到初级 MLR 之中。在第  
30 3、4、5 天通过加入放射性标记的胸苷检测在次级 MLR 中效应器 PBLs 的增殖情况。

图 15 是表示用来自初级 MLR 的 PBLs 作为效应器并用来自同一个

体或不同个体的初级 MLR 的 PBLs 作为刺激物，进行单向次级 MLR 分析的结果的曲线图。仅将人源化抗人 B7-2 mAb (同型 IgG2.M3) 加到初级 MLR 之中。在第 3、4、5 天通过加入放射性标记的胸苷检测在次级 MLR 中效应器 PBLs 的增殖情况。

5 图 16 是表示用来自初级 MLR 的 PBLs 作为效应器并用来自同一个体或不同个体的初级 MLR 的 PBLs 作为刺激物，进行单向次级 MLR 分析的结果的曲线图。仅将人源化抗人 B7-1 和抗 B7-2 mAbs (同型 IgG2.M3) 加到初级 MLR 之中。在第 3、4、5 天通过加入放射性标记的胸苷检测在次级 MLR 中效应器 PBLs 的增殖情况。

10 图 17 是表示用 PBLs 作为效应器并用扩散的“B”PBL 作为刺激物，进行单向初级 MLR 分析的结果的曲线图。用人源化抗 B7-2 mAb、人源化抗 B7-1 mAb、组合的人源化抗 B7-1 与人源化抗 B7-2 mAbs、 $10\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、 $20\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、或者对照 Ig 分别对效应器和刺激物进行处理。在第 3、4、5 天通过加入放射性标记的胸苷检测培养物的增殖情况。

15 图 18 是表示用 PBLs 作为效应器并用扩散的“C”PBL 作为刺激器，进行单向初级 MLR 分析的结果的曲线图。用人源化抗 B7-2 mAb、人源化抗 B7-1 mAb、人源化抗 B7-1 与人源化抗 B7-2 mAbs、 $10\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、 $20\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、或者对照 Ig 分别对效应器和刺激物进行治疗。在第 3、4、5 天通过加入放射性标记的胸苷检测培养物的增殖情况。

20 图 19 是表示用来自于“B”刺激器初级 MLR (见图 17) 和新鲜“B”刺激物作为效应器，进行单向次级 MLR 分析的结果的曲线图。用人源化抗 B7-2 mAb、人源化抗 B7-1 mAb、组合的人源化抗 B7-1 与人源化抗 B7-2 mAbs、 $10\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、 $20\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、或者仅有初级 MLR 的对照 Ig 分别对效应器和刺激物进行处理。次级 MLR 中不再加入其它物质。在第 3、4、5 天和第 6 天通过加入放射性标记的胸苷检测培养物的增殖情况。

25 图 20 是表示用来自“B”刺激器初级 MLR (见图 17) 和新鲜“C”刺激物作为效应器，进行单向次级 MLR 分析的结果的曲线图。用人源化抗 B7-2 mAb、人源化抗 B7-1 mAb、组合的人源化抗 B7-1 与人源化抗 B7-2 mAbs、 $10\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、 $20\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、或者仅有

初级 MLR 的对照 Ig 分别对效应器和刺激物进行处理。次级 MLR 中不再加入其它物质。在第 3、4、5 天和第 6 天通过加入放射性标记的胸苷检测培养物的增殖情况。

5 图 21 是表示用来自“B”刺激物初级 MLR (见图 17) 和新鲜“B”或新鲜“C”刺激物作为效应器, 进行单向次级 MLR 分析的结果的曲线图。用人源化抗 B7-2 mAb、人源化抗 B7-1 mAb、组合的人源化抗 B7-1 与人源化抗 B7-2 mAbs、 $10\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、 $20\mu\text{g/ml}$  CTLA4 Ig、或者仅有初级 MLR 的对照 Ig 分别对效应器和刺激物进行处理。次级 MLR 中不再加入其它物质。在第 3、4、5 天和第 6 天通过加入放射性标记的胸苷检测培养物的增殖情况。图 21 是将图 19 和图 20 编辑后的结果。

10 图 22 是表示在破伤风类毒素免疫的非类人灵长类中抗破伤风应答(效价的对数值)的曲线图。用纯化的破伤风类毒素免疫 Cynomolgus 猴之后, 再用人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体治疗 Cynomolgus 猴。在 26 周之内, 对血清抗破伤风抗体的效价(IgM & IgG)每周检测一次。

15 图 23 是表示在破伤风类毒素免疫的非类人灵长类中抗破伤风应答(效价的对数值)的曲线图。在第 0 天用破伤风类毒素免疫 Cynomolgus 猴, 并在第 0 天分别用单一静脉注射剂量的人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体的混合物、或者用载体治疗 Cynomolgus 猴。在第 14 周时, 在不再用人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体治疗的情况下, 用破伤风类毒素对动物进行第二次免疫。在 18 周之内, 对血清抗破伤风抗体的效价(IgM & IgG)每周检测一次。

20 图 24 是表示在破伤风类毒素免疫的非人灵长类中抗破伤风应答(效价的对数值)的曲线图。在第 0 天用破伤风类毒素免疫 Cynomolgus 猴, 并在第 0 天分别仅用单一静脉注射剂量的人源化抗 B7-1 抗体或者用载体治疗 Cynomolgus 猴。在第 14 周时, 在不再用人源化抗 B7-1 抗体治疗的情况下, 用破伤风类毒素对动物进行第二次免疫。在 18 周之内, 对血清抗破伤风抗体的效价(IgM & IgG)每周检测一次。

25 图 25 是表示在破伤风类毒素免疫的非人灵长类中抗破伤风应答(效价的对数值)的曲线图。在第 0 天用破伤风类毒素免疫 Cynomolgus 猴, 并在第 0 天分别仅用单一静脉注射剂量的人源化抗 B7-2 抗体或者用载体治疗 Cynomolgus 猴。在第 14 周时, 在不再用人源化抗 B7-2 抗

体治疗的情况下，用破伤风类毒素对动物进行第二次免疫。在 18 周之内，对血清抗破伤风抗体的效价 (IgM & IgG) 每周检测一次。

图 26 的棒状图显示出各个治疗组 (各组设计如下: 第 1 组: 载体对照, 第 2-4 组分别是 10、1、0.1mg/kg h1F1, 第 5-7 组分别是 10、1、0.1mg/kg h3D1, 第 8-11 组分别是 10、1、0.1 或 0.01mg/kg h1F1 与 h3D1 的混合物) 在抗破伤风抗体效价曲线 (效价的对数值) 之下的面积。用破伤风类毒素免疫 Cynomolgus 猴, 并分别用单一静脉注射剂量的人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体的混合物、仅用人源化抗 B7-1 抗体或仅用人源化抗 B7-2 抗体、或者用载体治疗 Cynomolgus 猴 (各组 n=3)。计算 0-14 周之内的曲线下面积 (AUC) 值。在计算破伤风效价曲线的 AUCs 之前, 将所有破伤风的效价校准到零基线。通过每一组中能产生可检测抗体效价的动物数量的分数对上述 AUC 值进行加权, 计算出每一组中响应动物的数量。

图 27 是表示在投以 10mg/kg 的静脉剂量之后不同时间内血清中抗 B7-1 和抗 B7-2 mAbs (同型 IgG2.M3) 浓度的曲线图。

图 28 是表示接受肾异移植的猕猴在 1 年后的存活百分比的曲线图。这些猕猴分别用人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体的混合物、仅用人源化抗 B7-1 抗体或仅用人源化抗 B7-2 抗体、或者用载体治疗。人源化抗体的初始剂量是 20mg/kg, 接着的剂量是 5mg/kg, 随后在 60-80 天之间的每周剂量是 5mg/kg。

#### 发明详述

本发明涉及与 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白, 包括一个非人来源的抗原结合区以及人来源的免疫球蛋白的至少一部分。人源化免疫球蛋白与 B7-2 或 B7-1 结合时的亲和性至少大约为  $10^7 M^{-1}$ , 优选至少  $10^8 M^{-1}$ , 更优选至少  $10^9 M^{-1}$ 。一个实施方案中, 人源化免疫球蛋白包括一个与 B7-2 或 B7-1 结合的非人来源抗原结合区, 以及一个来自于人恒定区的恒定区。人恒定区的构架区 (FR) 中可以有非人残基。另一个实施方案中, 与 B7-2 或 B7-1 结合的人源化免疫球蛋白包括非人来源的互补性决定区 (一个或多个) 和来自于人的可变构架区 (一个或多个), 还可以选择性地包括一个来自于人的恒定区。免疫球蛋白的 FR 区可以选择性地包括非人来源的残基。例如, 人源化免疫球蛋白可以包括一条重链和一条轻链, 其中的轻链包括一个与 B7-

2 结合的非人来源抗体的互补性决定区以及一个来自于人轻链的构架区，而其中的重链包括一个与 B7-2 结合的非人来源抗体的互补性决定区以及一个来自于人重链的构架区。另一个例子中，人源化免疫球蛋白可以包括一条重链和一条轻链，其中的轻链包括一个与 B7-1 结合的非人来源抗体的互补性决定区以及一个来自于人轻链的构架区，而其中的重链包括一个与 B7-1 结合的非人来源抗体的互补性决定区以及一个来自于人重链的构架区。同样，本发明可以单独或以功能组合的方式包括轻链、重链、可变区、可变轻链以及可变重链。

5 本发明涉及的一种人源化 B7-2 抗体由鼠 B7-2 抗体制取产生，与鼠 B7-2 抗体的结合特异性基本一样，但在灵长类（如人）中的免疫原性却有所降低。同样，本发明也涉及的一种人源化 B7-1 抗体由鼠 B7-1 抗体制取产生，与鼠 B7-1 抗体的结合特异性基本一样，但在灵长类（如人）中的免疫原性却有所降低。人源化 B7-2 抗体或 B7-1 抗体的结合亲和性可以比鼠抗体的小，可以基本与其一样，也可以比其更强。见图 3、4、8、9A 和 9B。

10 天然存在的免疫球蛋白都有一个共同的核心结构，由两条相同的轻链（大约 24kD）和两条相同的重链（大约 55 或 70kD）形成四聚体。已知每条链的氨基末端部分是可变（V）区，也就是“抗原结合”区，这与每条链其余部分中较保守的恒定（C）区截然不同。轻链可变区中的 C-末端部分是 J 区。重链可变区中除 J 区外，还有一个 D 区。免疫球蛋白中大多数氨基酸的变动局限在 V 区中三个不连续部位，也就是高变区或互补性决定区（CDRs），它们直接参与抗原的结合。抗体中与抗原结合的部分是可变区。恒定区有多种功能，如能与吞噬细胞、胎盘细胞、肥大细胞等上的 Fc 受体相结合。轻链和重链各有一个可变区和一个恒定区。因此，本发明涉及与 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白。人源化 B7-1 免疫球蛋白或人源化 B7-2 免疫球蛋白包括一条轻链和一条重链，其中由两条轻链和两条重链形成四聚体。

15 20 25 30 可变区还形成两种类型的区，一个是构架区（FR），一个是互补性决定区（CDR）。CDRs 是高变区，包含免疫球蛋白之间变化的大多数氨基酸序列。由氨基末端开始，CDRs 分别是 CDR1、CDR2 和 CDR3。见图 1A-1B、2A-2B、6A-6B 以及 7A-7B。CDRs 由较为保守的 FRs 连接起来。由氨基末端开始，这些 FRs 分别是 FR1、FR2、FR3 和 FR4。Kabat 等人

(Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991); Kabat, E.A. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, Second Edition, Holt, Rinehart and Winston, New York (1976); Kabat E.A. Sequences of Immunoglobulin Chains: Tabulation and Analysis of Amino Acid Sequences of Precursors, V-regions, C-regions, J-Chains and  $\beta$  2-Microglobulin, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, (1979); Kabat, E. A. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, Holt, Rinehart and Winston, New York(1968); Kabat, E. A. Experimental Immunochemistry, Second Edition, Springfield, Thomas (1967).) 对 CDR 的位置和 FR 的位置以及编号系统进行了定义。在对免疫球蛋白人源化的过程中, 将非人来源的对 B7-2 或 B7-1 有特异性的抗体的一个或多个 CDRs 嫁接到人抗体的 FRs 上。此外, 可以根据本文所述方法制取某些非人构架替代物。最终的人源化抗体中有来自于非人, 如鼠的 CDRs, 以及来自于人抗体中的 FRs, 因此, 人源化抗体保持了对 B7-1 或 B7-2 的抗原特异性和亲和性。

本发明也涉及一条 B7-1 或 B7-2 人源化免疫球蛋白轻链, 或者一条 B7-1 或 B7-2 人源化免疫球蛋白重链。一个实施方案中, 本发明涉及一条包括一个或多个非人来源轻链 CDRs (如 CDR1 (SEQ ID NO: 16)、CDR2 (SEQ ID NO: 18) 和/或 CDR3 (SEQ ID NO: 20)) 的人源化 B7-2 轻链以及一个人轻链构架区 (见图 2B)。另一个实施方案中, 本发明涉及一条包括一个或多个非人来源重链 CDRs (如 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 12) 和/或 CDR3 (SEQ ID NO: 14)) 的人源化 B7-2 重链以及一个人重链构架区 (见图 2A)。CDRs 可来自于非人免疫球蛋白, 如对 B7-2 特异的 3D1 抗体的鼠重可变区链 (如 SEQ ID NO: 1, 见图 1A) 和轻可变区链 (如 SEQ ID NO: 3, 见图 1B)。

另一个实施方案中, 本发明涉及一条包括一个或多个非人来源轻链 CDRs (如 CDR1 (SEQ ID NO: 36)、CDR2 (SEQ ID NO: 38) 和/或 CDR3 (SEQ ID NO: 40)) 的人源化 B7-1 轻链以及一个人轻链构架区 (见图 7B)。本发明还涉及一条包括一个或多个非人来源重链 CDRs (如

CDR1 (SEQ ID NO: 30)、CDR2 (SEQ ID NO: 32) 和/或 CDR3 (SEQ ID NO: 34)) 的人源化 B7-1 重链以及一个人重链构架区 (见图 7A)。CDRs 可来自于非人免疫球蛋白, 如对 B7-1 特异的 1F1 抗体的鼠重可变区链 (如 SEQ ID NO: 21, 见图 6A) 和轻可变区链 (如 SEQ ID NO: 23, 见图 6B)。

本发明也包括由 A.T.C.C. (10801 University Boulevard, Manassas, VA 02110-2209, 于 1998, 05, 05, 且 A.T.C.C. No: CRL-12524) 所保藏的细胞系表达的人源化抗 B7-2 抗体。将由 A.T.C.C. 保藏、能表达人源化抗 B7-2 抗体的细胞系命名为重组 CHO 细胞系 (PA-CHO-DUKX-1538), 该细胞系能表达 IgG2.M3 同型人源化抗 B7-2 (CD86) 单克隆抗体 (#HF2-3D1)。

本发明也包括由 A.T.C.C. (10801 University Boulevard, Manassas, VA 02110-2209, 于 1999, 01, 22, 且 A.T.C.C. No: PTA-263) 所保藏的细胞表达的人源化抗 B7-1 抗体。将由 A.T.C.C. 保藏、能表达人源化抗 B7-1 抗体的细胞系命名为重组 CHO 细胞系 (PA-CHO-DUKX-1538), 该细胞系能表达人源化抗 B7-1 (CD80) 单克隆抗体 (#1F1)。

依据同型重链的不同, 可将人免疫球蛋白分成类和亚类。其中的类包括 IgG、IgM、IgA、IgD 以及 IgE, 它们的重链分别是  $\gamma$  型、 $\mu$  型、 $\alpha$  型、 $\delta$  型或  $\epsilon$  型。亚类包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2, 它们的重链分别是  $\gamma$  1 型、 $\gamma$  2 行、 $\gamma$  3 型、 $\gamma$  4 型、 $\alpha$  1 型和  $\alpha$  2 型。选定的类或亚类人免疫球蛋白分子可能包含一条  $\kappa$  轻链或一条  $\lambda$  轻链。可参照: Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp.41-50, W.B. Saunders Co, Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2<sup>nd</sup> Ed., Chapter 4, pp.45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA(1984)。

术语“HF2.3D1”和“3D1”是指对 B7-2 特异的鼠免疫球蛋白。术语“人源化 HF2.3D1”、“人源化 3D1”、“hu3D1”、“h3D1”、“B7-2 人源化免疫球蛋白”或“人源化 B7-2 免疫球蛋白”指的是对人 B7-2 特异的人源化免疫球蛋白 (如鼠抗人 B7-2 抗体)。术语“1F1”或“鼠 1F1”是指对 B7-1 特异的鼠免疫球蛋白。术语“人源化 1F1”、“hu1F1”、“h1F1”、

“B7-1 人源化免疫球蛋白”或“人源化 B7-1 免疫球蛋白”指的是对人 B7-1 特异的人源化免疫球蛋白（如鼠抗人 B7-1 抗体）。术语“B7 分子”是指 B7-1 分子和 B7-2 分子。术语“B7 抗体”指的是抗人 B7-1 抗体和抗人 B7-2 抗体。

5 术语“免疫球蛋白”或“抗体”包括整个抗体及其生物学功能性片段。生物学功能性片段至少保留了相应的全长抗体的一种抗原结合功能，优选保留了抑制 B7-2 或 B7-1 与其一个或多个受体（如 CD28、CTLA4）之间发生相互作用的能力。一个优选实施方案中，生物学功能性片段能抑制 B7-2 和/或 B7-1 的结合，对共刺激途径进行调控。可使  
10 用的生物学功能性抗体片段的例子中包括能与 B7-2 或 B7-1 结合的片段，如单链抗体、Fv、Fab、Fab'以及 F(ab')<sub>2</sub> 片段。可以用酶促裂解或重组技术产生出这些片段。例如，可以用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶分别裂解产生 Fab 片段或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。抗体也可以多种截短形式用抗体基因来实现。在这些抗体基因中，在天然终止位点上游引入了一个或多个终止密码子。例如，可以将编码 F(ab')<sub>2</sub> 片段重链的嵌合基因设计成能编码重链 CH1 域和铰链区的 DNA 序列。本发明包括的单链抗体（如单链 FV）中既包括部分重链也包括部分轻链。  
15

本文用到的术语“人源化免疫球蛋白”是指一种包括不同来源免疫球蛋白的免疫球蛋白部分，其中至少有一部分来源于人。例如，人  
20 源化抗体包括的部分可以来自于有必需特异性的非人来源，如鼠的免疫球蛋白，和来自于人来源的免疫球蛋白序列（如嵌合免疫球蛋白）。可以通过传统技术（如合成）将这些部分化学连接在一起，或者通过遗传工程技术制备一条连续性多肽（例如，编码嵌合抗体蛋白部分的基因表达以后产生出一条连续多肽链）。本发明另一个人源化免疫球蛋白例子是包含一条或多条免疫球蛋白链的免疫球蛋白，它包括非人来源抗体的一个 CDR 以及来自于人来源的轻链和/或重链的一个构架区（如有构架变化或无构架变化的 CDR 嫁接抗体）。嵌合或 CDR 嫁接单链抗体也包括在术语“人源化免疫球蛋白”之中。有关单链抗体的知识，可  
25 参见：Cabilly et al., 美国专利 No.4816567; Cabilly et al., 欧洲专利 No.0125023 B1; Boss et al., 美国专利 No.4816397; Boss et al., 欧洲专利 No.0125023 B1; Neuberger, M. S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., 欧洲专利 No.0194276 B1; Winter, 美国  
30

专利 No. 5225539; Winter, 欧洲专利 No. 0239400 B1; Padlan, E. A. et al., 欧洲专利 Application No. 0519596 A1. 也请参照: Ladner et al., 美国专利 No. 4946778; Huston, 美国专利 No. 5476786; 以及 Bird, R. E. et al., Science, 242: 423-426(1988).

5 正如在本发明中作为例子用的抗体所体现的, 术语“人源化免疫球蛋白”也指包括一个人构架以及至少一个来自于非人抗体的 CDR, 其中的任何一个恒定区基本上都与入免疫球蛋白恒定区相同, 如至少 60-90%相同, 优选至少 95%相同。因此, 人源化免疫球蛋白中, 除可能的 CDRs 外的所有部分, 基本上都与一种或多种天然人免疫球蛋白序列的  
10 对应部分相同。在有些人源化免疫球蛋白中, 在人构架区中除了有来自于非人来源抗体的 CDRs 外, 还可能包括其它非人残基。

设计人源化免疫球蛋白可以按如下进行。当一个氨基酸属于以下类型时, 所用的人源化免疫球蛋白(受体免疫球蛋白)的构架氨基酸将用来自于有 CDR 的非人免疫球蛋白(供体免疫球蛋白)的构架氨基  
15 酸来取代:

- (a) 对于人免疫球蛋白的同一位置来说, 受体免疫球蛋白人构架区中的氨基酸是非正常氨基酸, 而对于人免疫球蛋白的同一位置来说, 供体免疫球蛋白中的对应氨基酸是典型氨基酸;
- 20 (b) 该氨基酸所在位置与其中一个 CDRs 紧密相邻; 或者
- (c) 该氨基酸能够以三级结构免疫球蛋白模式与 CDRs 相互作用(参照: Queen et al., op. cit. 以及 Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2869(1991)).

对于人源化免疫球蛋白制备方法的详细描述, 请参照: Queen et  
25 al., op. cit 以及美国专利 5585089, 5693762 以及 5530101.

通常情况下, 人源化抗体的 CDR 区与它来源的对应鼠抗体 CDR 基本上相同, 更优选相同。虽然通常情况下并不需要, 但有时也可能在不会显著影响所得人源化免疫球蛋白结合亲和性的前提下, 可以将 CDR 残基中的一个或多个保守性氨基酸替换掉。偶然情况下, CDR 区的替换  
30 作用也能增强免疫球蛋白的结合亲和性。

除了前面讨论特定氨基酸的替换作用之外, 人源化免疫球蛋白的构架区与它来源的人抗体构架区通常基本相同, 更优选相同。当然,

构架区中的许多氨基酸对抗体特异性或亲和性的直接贡献很小或者根本没有。因此，在不显著改变所得人源化免疫球蛋白的特异性或亲和性的情况下，构架中残基的许多单一的保守替换作用是可以忍受的。

人源化 B7-2 免疫球蛋白的抗原结合区（非人部分）可以来自于对 B7-2 有特异性（如 3D1 抗体）或对 B7-1 有特异性（如 1F1 抗体）的非人来源的免疫球蛋白，即供体免疫球蛋白。例如，人源化 B7-2 抗体的一个适用的抗原结合区可以来自于 HF2. 3D1 单克隆抗体，这是一种鼠抗人 B7-2 抗体。美国专利申请流水号 No. 08/101624 提交于 1993 年 7 月 26 日，08/109393 提交于 1993 年 8 月 19 日，而题为“B7-2: CTLA4/CD28 反受体”的 08/147773 提交于 1993 年 11 月 3 日。也请参照：Freeman, et al., WO 95/03408, “B7-2: CTLA4/CD28 反受体”，公开于 1995 年 2 月 2 日。人源化 B7-1 抗体的一个适用的抗原结合区可以来自于 1F1 单克隆抗体，这是一种鼠抗人 B7-1 抗体。其它 B7-2 或 B7-1 特异抗体来源可来自于非人资源，如啮齿类动物（如鼠和大鼠）、家兔、猪、山羊或非人灵长类（如猴）或 camelid 动物（如骆驼和骆马）。

此外，也可制备出其它多克隆或单克隆抗体（如 Kohler et al., Nature, 256: 495-497(1975); Harlow et al., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor, NY); 以及 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2(Supplement 27, Summer'94), Ausubel et al., Eds. (John Wiley & Sons: New York, NY), Chapter 11(1991)），如能与象鼠 HF2. 3D1 或 1F1 抗体一样或类似地与抗原决定部位结合的抗体。例如，抗体可以在一个适当的动物如小鼠、大鼠、家兔、绵羊或 camelid 中针对某一种适宜免疫原产生。可用作免疫原（如 DNA 或多肽免疫原）的合适例子如有 B7-2 或 B7-1 的细胞、包含有 B7-2 或 B7-1 的 B7-2 或 B7-1 免疫原性片段的膜部分以及与合适载体缀合的 B7-2 或 B7-1 多肽。可以分离得到抗体生成细胞（如淋巴细胞），如可以从免疫动物的淋巴结或脾中分离抗体生成细胞。这些细胞随后与适当的无限增殖化细胞（如骨髓瘤细胞）融合，形成杂交瘤。用选择培养技术可以分离得到融合细胞。可以用合适的分析法，如 ELISA 筛选出能产生有所要特异性抗体的细胞。也可从抗体文库，如包括非人 Fab 分子的噬菌体文库中得到对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的非人来源的免疫球蛋白。可以用其它技术制备人源化免疫球蛋白。

5 在一个实施方案中，人源化免疫球蛋白的抗原结合区包括一个非人来源的 CDR。该实施方案中对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白包括至少一个非人来源的 CDR。例如，CDRs 可来自于非人来源免疫球蛋白的轻链可变区和重链可变区，因此，一个人源化 B7-2 免疫球蛋白基本上包括来自于一个或多个非人来源免疫球蛋白的重链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 10)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 12) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 14) 氨基酸序列和/或轻链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 16)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 18) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 20) 氨基酸序列，所得人源化免疫球蛋白对 B7-2 有结合特异性。CDRs 也可来自于对 B7-1 特异的非人来源免疫球蛋白的轻链可变区和重链可变区。人源化 B7-1 免疫球蛋白基本上包括来自于一个或多个非人来源免疫球蛋白的重链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 30)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 32) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 34) 氨基酸序列和/或轻链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 36)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 38) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 40) 氨基酸序列，所得人源化免疫球蛋白对 B7-1 有结合特异性。所选链的所有三个 CDRs 可能与供体对应链的 CDRs 基本相同，轻链和重链中的所有三个 CDRs 优选与对应供体链的 CDRs 基本相同。B7-2 重链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 9)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 11) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 13) 和/或 B7-2 轻链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 15)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 17) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 19) 的核酸序列可用于将 CDRs 嫁接到人构架上。此外，B7-1 重链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 29)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 31) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 33) 和/或 B7-1 轻链 CDR1 (如 SEQ ID NO: 35)、CDR2 (如 SEQ ID NO: 37) 和/或 CDR3 (如 SEQ ID NO: 39) 的核酸序列可用于将 CDRs 嫁接到人构架上。

25 另一个实施方案中，本发明涉及包含一条重链和一条轻链的人源化免疫球蛋白，该蛋白对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性。轻链可以包括一个与 B7-2 或 B7-1 结合、来自于非人来源抗体的 CDR 以及一个来自于人来源轻链的 FR。例如，轻链包含的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列如下面所列或者其氨基酸序列同下面所列基本相同，所以抗体能特异结合 B7-2: CDR1 KSSQSLNSRTRENYLA (SEQ ID NO: 16), CDR2 WASTRES (SEQ ID NO: 18), CDR3 TQSYNLYT (SEQ ID NO: 20)。重链可以包括一个与 B7-2 结合、来自于非人来源抗体的 CDR 以及一个来自

于人来源重链的 FR。例如，B7-2 重链包含的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列如下面所列或者其氨基酸序列同下面所列基本相同，所以抗体能特异结合 B7-2：重链：CDR1 DYAIQ (SEQ ID NO: 10)，CDR2 VINIYYDNTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 12)，CDR3 AAWYMDY (SEQ ID NO: 14)。

对 B7-1 特异的轻链包含的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列如下面所列或者其氨基酸序列同下面所列基本相同，所以抗体能特异结合 B7-1：CDR1 SVSSSISSSNLH (SEQ ID NO: 30)，CDR2 GTSNLAS (SEQ ID NO: 32)，CDR3 QQWSSYPLT (SEQ ID NO: 34)。重链可以包括一个与 B7-1 结合、来自于非人来源抗体的 CDR 以及一个来自于人来源重链的 FR。对 B7-1 特异的轻链包含的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列如下面所列或者其氨基酸序列同下面所列基本相同，所以抗体能特异结合 B7-1：CDR1 DYMH (SEQ ID NO: 36)，CDR2 WIDPENGNTLYDPKFQG (SEQ ID NO: 38)，CDR3 EGLFFAY (SEQ ID NO: 40)。

本发明的一个实施方案是一种能特异结合 B7-2 的人源化免疫球蛋白，包括一条人源化轻链，包括来自于鼠 3D1 抗体的三个轻链 CDRs 以及来自于人免疫球蛋白轻链的一个轻链可变区构架序列。发明还包括一条 B7-2 人源化重链，它包括来自于鼠 3D1 抗体的三个重链 CDRs 以及来自于人免疫球蛋白重链的一个重链可变区构架序列。鼠 3D1 抗体还可以有一个如图 1B (SEQ ID NO: 4) 所示的成熟轻链可变结构域，以及一个如图 1A (SEQ ID NO: 2) 所示的成熟重链可变结构域。

本发明的另一个实施方案是一种能特异结合 B7-1 的人源化免疫球蛋白，包括一条人源化轻链，包括来自于鼠 1F1 抗体的三个轻链 CDRs 以及来自于人免疫球蛋白轻链的一个轻链可变区构架序列。发明还包括一条 B7-1 人源化重链，它包括来自于鼠 1F1 抗体的三个重链 CDRs 以及来自于人免疫球蛋白重链的一个重链可变区构架序列。鼠 1F1 抗体还可以有一个如图 6B (SEQ ID NO: 24) 所示的成熟轻链可变结构域，以及一个如图 6A (SEQ ID NO: 22) 所示的成熟重链可变结构域。

人源化免疫球蛋白或免疫球蛋白链中来自于人的部分可以来自于任一种合适的人免疫球蛋白或免疫球蛋白链。例如，一个人恒定区或其部分（如果有的话），可以来自于  $\kappa$  轻链或  $\lambda$  轻链和/或人抗体的  $\gamma$ （如  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ ）重链、 $\mu$  重链、 $\alpha$ （如  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ）重链、

5  $\delta$  重链或  $\epsilon$  重链，包括等位变体。可以选择特定的恒定区，如 IgG2 或 IgG4、其变体或其部分，制作出效应子功能。例如，一个突变恒定区，即“变体”，可以引入到融合蛋白中去，以将融合蛋白与 Fc 受体的结合作用和/或其固定补体的能力降低到最小程度（请参照：Winter et al., 美国专利 No. 5648260 & 5624821; GB 2209757B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, December 22, 1994）。此外，可创造一个突变 IgG2 Fc 结构域，该结构域与天然 Fc 区相比，能降低促有丝分裂反应（参照：Tso et al., 美国专利 No. 5834597，其内容在此完整引入作为参考）。见实施例 3 中对人源化抗 B7-2 抗体  
10 进行的突变，并请见实施例 10 中对人源化抗 B7-1 抗体进行的突变。

如果有 FRs 的话，FRs 优选来自于与抗原结合区供体的类似或等价区有序列同一性的人抗体可变区。人源化免疫球蛋白中人来源的部分中的 FRs 的来源包括人可变共有序列（参照：Kettleborough, C.A. et al., Protein Engineering 4: 773-783(1991); Queen et al., 美国专利 Nos: 5585089, 5693762 & 5693761）。例如，用于获得非人部分  
15 的抗体或可变区的序列可以与 Kabat 等所述的人序列（Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office(1991)）相比较。一个优选实施方案中，来自于人可变区的人源化免疫球蛋白链的 FRs 与非人供体（如鼠 HF2.3D1 抗体或 1F1 抗体）可变区的总的序列同一性至少是 60%，优选至少 80%。例如，鼠 HF2.3D1 轻链可变构架区与鼠 H2F 轻链可变构架区之间的总的序列同一性是 82.5%，而鼠 HF2.3D1 重链可变构架区与人 I2R 重链可变构架区之间的总的序列同一性是 62.5%。而在 B7-1 抗体中，  
20 鼠 1F1 轻链可变构架区与人源化 III-2R 轻链可变构架区之间总的序列同一性是 69%，而与鼠 III-2R 重链可变构架区之间总的序列同一性是 79%。

在提及两种核酸或两种多肽（如编码人源化免疫球蛋白的 DNAs 或人源化免疫球蛋白的氨基酸序列）时提到的“基本上相同”这一短语，  
30 指的是用以下序列比较方法和/或用肉眼观察时，两个或多个序列或亚序列的核苷酸或氨基酸残基的相似性至少是 80%，更优选 90-95% 或更高。通常认为这些“基本上相同”的序列是同源的。“基本上相同”优

选比较的序列长度至少大约 50 个残基，更优选至少 100 个残基的序列，最优选至少 150 个残基的序列。如下文所述，任何两种抗体序列只能通过 Kabat 的编号方法这一种方式来比较排列。因此对于抗体来说，同一性百分比的意义既独特又确定。

5 免疫球蛋白成熟重链和轻链的可变区中的氨基酸分别记作 Hx 和 Lx，其中的数字 x 表示根据 Kabat 方法、Sequence of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987&1991) 所确定的氨基酸的位置。Kabat 列举出每一种亚类抗体的多种氨基酸序列，列举了该亚类中在每一个残基位点上通常出现最多的氨基酸。Kabat 使用一种方法所列序列中每个氨基酸的残基编号。通过考虑抗体在 Kabat 中的某一共有序列问题，也可将 Kabat 方法扩展到本纲要中并不包括的其它抗体。使用 Kabat 编号方法不难确定出不同抗体中同等位置的氨基酸。例如，在人抗体 L50 位的氨基酸占据了鼠抗体中 L50 氨基酸的同等位置。

15 已知基本的抗体结构单位包括一个四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成，每对多肽链都有一条“轻”链（大约 25kDa）和一条“重”链（大约 50-70kDa）。每条链的氨基末端部分包括一个大约 100-110 个或更多个氨基酸组成的可变区，主要负责抗原识别。将每条链的羧基末端部分定义为恒定区，主要负责效应子功能。每条轻/重链对的可变区形成抗原结合部位。因此，一个完整的抗体有两个结合位点。

20 轻链分为  $\kappa$  或  $\lambda$  型。重链分为  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  或  $\epsilon$  型，分别将抗体同型定义为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。轻链和重链中的可变区和恒定区由一个大约 12 个或更多氨基酸的“J”区连接，重链还包括一个大约 10 个或更多氨基酸的“D”区。请参照：Fundamental Immunology. Paul, W., ed, .3<sup>rd</sup> ed. Raven Press, N.Y., 1993, Ch. 9.

25 轻链和重链的可变区中，从 N-末端到 C-末端，包括有交替出现的构架和 CDRs: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。各区中氨基酸的排列与 Kabat 的定义（1987&1991）、同上和/或 Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917(1987)以及 Chothia et al., Nature 342: 878-883(1989)中的定义相一致。

30 一个实施方案中的人源化免疫球蛋白包括至少一个来自于人来源抗体一条或多条连的 FRs。因此，FR 可以包括一个来自于人来源的一

个或多个抗体的 FR1、FR2、FR3 和/或 FR4。一条选定的人源化链中的人部分优选包括来自于人来源可变区（如来自于人免疫球蛋白和来自人共有序列）的 FR1、FR2、FR3 和/或 FR4。一个优选实施方案中，B7-2 轻链可变区的 FRs 来自于 H2F 人抗体，而 B7-2 重链可变区的 FRs 来自于 I2R 人抗体。B7-1 轻链和重链可变区的 FRs 来自于 III-2R 抗体。

本发明中用的非人来源和人来源的免疫球蛋白部分的序列与产生它的免疫球蛋白或免疫球蛋白部分或其变体的序列相同。所述变体中包括因添加、缺失或替换某一个或多个残基造成的突变体。如上文所示，非人来源的 CDRs 与非人供体的 CDRs 基本一样，而优选与非人供体的 CDRs 相同。正如本文所述，FR 的变化，如将人来源的 FR 的一个残基替换成供体对应位置中的残基。FR 中可以有一个或多个突变，包括缺失、插入和替换一个或多个氨基酸。在实施例 2 中人源化 HF2.3D1 抗体和实施例 9 中对人源化 1F1 抗体的设计中，对几种替换作用进行了描述。对于特定的人源化抗体或人源化链来说，其构架突变可按照此处所述进行设计。优选 B7-2 和 B7-1 人源化免疫球蛋白分别结合 B7-2 和 B7-1，结合的亲和力与非人供体相近或比非人供体好。可以通过多种适当方法产生变体，包括对非人供体或受体人链进行诱变。

本发明中的人源化免疫球蛋白对人 B7-2 或 B7-1 有结合特异性，并包括能与 B7-2 或 B7-1 的决定簇结合的人源化免疫球蛋白（包括片段）。在一个优选实施方案中，本发明人源化免疫球蛋白至少有鼠 HF2.3D1 或 1F1 抗体的一种功能特性，如结合功能（如对 B7-2 或 B7-1 有特异性，有相同或相近的表位特异性）和/或抑制功能（如能抑制有 CD28 或 CTLA4 的细胞与 B7-2 或 B7-1 配体相结合）。因此，优选的人源化免疫球蛋白有鼠 HF2.3D1 或 1F1 抗体的结合特异性，有鼠 HF2.3D1 或 1F1 抗体的表位特异性（如能分别与鼠 HF2.3D1 或 1F1、嵌合 HF2.3D1 或 1F1 抗体或者人源化 HF2.3D1 或 1F1 竞争结合 B7-2 或 B7-1）和/或抑制功能。

可以通过标准免疫学方法将对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的结合功能缺失掉，例如可以用能检测人源化免疫球蛋白与 B7-2 或 B7-1 之间形成复合物的方法（如包括 B7-2 或 B7-1 的膜部分或人淋巴细胞系，或者包含能表达 B7-2 或 B7-1 的核酸的重组宿主细胞）。

在鉴定和/或分离有所需特异性的人源化免疫球蛋白（如从文库中鉴定、分离）的流程中，可以用结合和/或附着分析法或者其它适当方法（如能检测有 B7-2 或 B7-1 受体的细胞与 B7 分子之间附着作用的分析法，或者其它适当方法）。

5 本发明中用到的非人来源和人来源的免疫球蛋白部分包括轻链、重链以及部分轻链和重链。可以从免疫球蛋白中获得或衍生以上免疫球蛋白部分（如从头合成某一部分），或者产生并表达编码有所要特性（如能结合 B7-2 或 B7-1、序列同一性）的免疫球蛋白或其链的核酸。可以用合成的和/或重组核酸所制备的能编码所需人源化链的基因（如  
10 cDNA）产生出包括有所需部分（如抗原结合区、CDR、FR、C 区）的人源化免疫球蛋白。制备部分链时，可以在所需位置引入一个或多个终止密码子。例如，使用 PCR 诱变方法来改变已知 DNA 序列，即可构建出能编码新设计人源化可变区的核酸序列（参照：Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res. 17: 5404(1989)）。编码新 CDRs 的 PCR 引物可以与以  
15 同一或很相近的人可变区为基础的以前的人源化可变区的 DNA 模板杂交（Sato, K., et al., Cancer Research 53: 851-856(1993)）。如果一段相似的 DNA 序列不能用作模板，那么可以从合成的寡核苷酸构建出包括能编码可变区序列的核酸（参照：Kolbinger, F., Protein Engineering 8: 971-980(1993)）。也可以在核酸中引入一段编码信号  
20 肽的序列（如在合成时引入，在载体中插入）。当天然信号肽序列不能用时，可以使用另一抗体的信号肽序列（参考：Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4: 773-783(1991)）。使用这些方法、本文所述方法或其它适当方法很容易产生出变体。一个实施方案中，可以对克隆的可变区进行诱变，可以筛选出能编码具有所需特异性变体的序列  
25 （如可从噬菌体文库从筛选；参照：Krebber et al., U.S. 5514548; Hoogengoom et al., W093/06213, 1993 年 4 月 1 日公布））。

核酸及包括这些核酸的构建体：

30 本发明还涉及分离的和/或重组（如包括基本纯净的）核酸，这些核酸包括编码本发明人源化 B7-1 或 B7-2 免疫球蛋白或人源化 B7-1 或 B7-2 免疫球蛋白轻链或重链的序列。

本文中所说的“分离的”核酸是指从它们所来源的基因组 DNA 或

细胞 RNA 核酸中分离所得的核酸（如当核酸存在于细胞中或核酸混合物如文库中时），包括用本文所述方法或其它适当方法获得的核酸，其中包括基本纯净的核酸、用化学合成产生的核酸、用组合的生物方法和化学方法产生的核酸，以及分离出的重组核酸（参照：Daugherty, B. L., et al., *Nucleic Acids Res.*, 19(9): 2471-2476 (1991); Lewis, A. P. & J. S. Crowe, *Gene*, 101: 297-302 (1991)）。

本文中所述“重组”核酸是指用重组 DNA 方法产生出的核酸，包括那些用依赖于人工重组的流程如聚合酶链式反应（PCR）和/或使用限制性酶将核酸克隆到载体（如质粒）上所产生的核酸。“重组”核酸还指的是那些因为通过细胞天然机制而发生重组事件而产生的核酸，但这些核酸是在核酸引入到细胞中后经过了选择以便使所需的重组事件有可能发生。

本发明也更特别涉及分离的和/或重组核酸，核酸中包括分别编码人源化 HF2. 3D1 或 1F1 免疫球蛋白的核苷酸序列，亦即“人源化 3D1”或“人源化 1F1”（如本发明中其非人部分来自于鼠 HF2. 3D1 或 1F1 单克隆抗体的人源化免疫球蛋白）或其链。一个实施方案中，轻链中包括来自于 HF2. 3D1 或 1F1 抗体轻链的三个互补性决定区，而重链中包括来自于 HF2. 3D1 或 1F1 抗体重链的三个互补性决定区。这样的核酸包括，如，（a）包括能编码包括人源化 HF2. 3D1 或 1F1 免疫球蛋白重链可变区氨基酸序列的多肽序列的核酸（如，图 2A 中的 SEQ ID NO: 5 或图 7A 中的 SEQ ID NO: 25），（b）包括能编码包括人源化 HF2. 3D1 或 1F1 免疫球蛋白轻链可变区氨基酸的多肽序列的核酸，（如，图 2B 中的 SEQ ID NO: 7 或图 7B 中的 SEQ ID NO: 27）（c）包括能编码人源化 HF2. 3D1 或 1F1 免疫球蛋白重链或轻链可变区至少功能部分序列的核酸（如包括所述链的足以发挥人源化免疫球蛋白的抗原结合功能的部分）。因为遗传密码有简并性，所以可以制备多种编码特多肽的核酸。一个实施方案中，核酸中包括的可变区核苷酸序列与图 2A 和/或图 2B 和/或图 7A 或图 7B 中所列相同或与所列基本相同，其中包括双链或单链多核苷酸。如上所述，符合这些标准的分离的和/或重组核酸可以包括能编码与人源化 HF2. 3D1 或人源化 1F1 抗体或其变体的序列相同的核酸序列的核酸。

本发明的核酸可用来产生对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化

免疫球蛋白。例如，可以将编码本发明人源化免疫球蛋白的核酸（如 DNA）引入到合适的构建体（如载体）中，进一步对该序列进行操作或在适当宿主细胞中生产编码的多肽。

5 对 B7-2 和/或 B7-1 有特异性的人源化免疫球蛋白的生产方法：

本发明的另一方面涉及对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的制备方法。如通过在适当宿主细胞中表达一种或多种编码对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的重组核酸，可以获得人源化免疫球蛋白。

10 本发明还提供了适合于表达对 B7-2 和/或 B7-1 有特异性的人源化免疫球蛋白的构建体或表达载体。可以将构建体导入到适当宿主细胞中，可以在培养基中产生并维持能表达本发明人源化免疫球蛋白的细胞。合适的宿主细胞可以是原核细胞，包括细菌细胞如 *E. coli*、*B. subtilis* 和其它合适细菌，或者是真核细胞，如真菌细胞或酵母细胞（如 *Pichia pastoris*、*Aspergillus species*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosacharomyces pombe*、*Neurospora crassa*），或者是其它低等真核细胞和高等真核生物细胞，如来自昆虫的细胞（如 Sf9 昆虫细胞（W094/26087, O'Connor, published November 24, 1994））。合适的宿主细胞也可来自于植物、转基因动物或哺乳动物（如 COS 细胞、NSO 细胞、SP2/0、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）、HuT 78 细胞、293 细胞）（可参照：Ausubel, F.M., et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc.）1993）。

25 可以用如下方法产生出能产生对 B7-2 和/或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白的宿主细胞。例如，可以将编码所要人源化免疫球蛋白所有或部分编码序列的核酸插入到核酸载体中，如 DNA 载体如质粒、病毒或其它适当的表达单位。许多载体是适用的，包括能维持单拷贝或多拷贝的载体，或者那些可以整合到宿主细胞染色体中的载体。

30 合适的表达载体可以包含多个组分，包括但不限于以下一个组分或多个组分：一个复制起始点；一个选择性标记基因；一个或多个表达调控元件，如一个转录调控元件（如启动子、增强子、终止子），和/或一个或多个翻译信号；一个有膜导向或有分泌作用的信号序列或前

导序列。构建体中的信号序列由载体或其它来源提供。例如，免疫球蛋白的转录信号和/或翻译信号可以指导表达。

为使基因在合适宿主细胞中表达，需要有启动子的存在。启动子可以是组成型或者是诱导型的。例如，可以将启动子可操作地连接到  
5 编码人源化免疫球蛋白或免疫球蛋白链的核酸上，以便能够指导所编码多肽的表达。可以选用多种适合于原核宿主（如用在 *E. coli* 中的 lac、tac、T3 及 T7 启动子）及真核宿主（如酵母乙醇脱氢酶（ADH）以及 SV40、CMV）的合适启动子。

此外，表达载体通常包括一个选择性标记，用于选择带有载体的  
10 宿主细胞，如果是可复制表达载体，将还包括一个复制起始点。编码能赋予抗生素抗性或抗药性的产物的基因是常用的选择性标记，可用在原核细胞（如  $\beta$ -内酰胺酶基因（氨苄青霉素抗性）和 Tet 基因（四环素抗性））和真核细胞（如新霉素（G418 或基因菌素）、gpt（霉酚酸）、氨苄青霉素以及潮霉素抗性基因）中。多种宿主中二氢叶酸还原酶标  
15 记基因可以用氨甲蝶呤选择。酵母中通常选用能编码宿主营养缺陷型标记基因产物的基因（如 LEU2、URA3 以及 HIS）作为选择性标记。也可以考虑使用病毒（如杆状病毒）载体或噬菌体载体以及能整合到宿主细胞基因组中去的载体，如逆转录病毒载体。本发明也涉及携带这些表达载体的细胞。

20 例如，可以用适合于所选宿主的方法（如转化、转染、电穿孔、感染），将编码对 B7-2 或 B7-1 有结合特异性的人源化免疫球蛋白重链和轻链的核酸（如一种或多种核酸）或者包含这些核酸的构建体（如一个或多个构建体）导入到合适的宿主细胞，以便核酸可操作地与一个或多个表达调控元件连接（如在载体中、由细胞中过程产生的构建  
25 体中、整合到宿主细胞基因组中）。可以在适合于表达的条件下维持宿主细胞（如在有诱导物存在的情况下、附加有合适盐类、生长因子、抗生素、营养性添加物等的适当培养基），由此产生出所编码的多肽。如果需要的话，可以从宿主细胞、培养基或乳中将编码蛋白（如人源化 HF2.3D1 或 1F1 抗体）分离出来。该过程包括在转基因动物的宿主  
30 细胞中表达（参照：如 W092/03918, GenPharm International, 1992 年 3 月 19 日公开）。

可以产生融合蛋白，在融合蛋白中人源化免疫球蛋白或免疫球蛋

白链在融合蛋白的 N-端部位、C-端部位或中间部位与非免疫球蛋白部分（如该部分天然情况下并不出现在免疫球蛋白中）相连。例如，一些实施方案中，可以将编码免疫球蛋白序列的核酸插入到合适的表达载体中，如 pET 载体（如 pET-15b 载体, Novagen）、噬菌体载体（如 pCANTAB 5E, Pharmacia）或其它载体（如 pRIT2T Protein A 融合载体, Pharmacia）。所得构建体可以导入到合适的宿主细胞中进行表达。融合蛋白一旦表达，即可用适当亲和性基质将融合蛋白从细胞溶胞物中分离或纯化出来（参照：Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., eds., Vol.2, Suppl.26, pp.16.4.1-10 16.7.8(1001))）。

#### 治疗方法及组合物:

T-细胞有两种类型：辅助 T-细胞和细胞毒性 T-细胞。辅助 T-细胞能识别与主要组织相容性复合体（MHC）相偶连的抗原。抗原呈递细胞将抗原内化，并重新表达具有 MHC 分子的抗原。一旦识别抗原，细胞因子就开始分泌。细胞因子的分泌将激活 B-淋巴细胞、细胞毒性 T-细胞、吞噬细胞及其它细胞。然而，细胞因子的分泌和细胞的增殖需要的不单单是抗原的识别。T-细胞的完全激活需要第二个信号即“共刺激信号”。这些共刺激信号有起始、维持及调节激活级联的作用。其中一个重要的共刺激途径叫作 B7: CD28/CTLA4 途径。

B7: CD28/CTLA4 途径涉及两个共刺激配体，B7-1（CD80）和 B7-2（CD86）。抗原呈递细胞上的 B7-1 和 B7-2 配体各自与 T-细胞上的两个受体 CD28 和 CTLA4 结合。

B7 多肽、B7-1（CD80）和 B7-2（CD86）的表达受到严格调节（Linsley, PS et al., Immunity 1: 793-801(1994)）。除了树突细胞外，未被刺激的呈递抗原细胞通常不表达 B7-1 和 B7-2。树突细胞、表皮朗格汉斯细胞、B 细胞以及巨噬细胞在激活后，将对 B7-2 和 B7-1 的表达进行正调节。此外，B7-2 可以在粒性白细胞和 T-细胞分子上表达，而 B7-1 可以在成纤维细胞和 T-细胞分子上表达（Reiser, et al., New England J. of Med., 335: 18, 1369-1377, 1371(1996)）。

在大多数免疫应答中，B7-2 的诱导比 B7-1 的诱导提前，并能上升

到更高水平。B7-2 也影响白细胞介素-4 (IL-4) 的产生以及 2 型辅助细胞的产生。在没有 CD4 T 细胞的情况下, B7 分子 (B7-1 和 B7-2) 也负责共刺激 CD8 T 细胞, CD4 T 细胞在产生对黑素瘤的疫苗的过程中有协助作用。B7 分子能共刺激天然杀伤细胞和  $\gamma/\delta$  T 细胞。因此, B7 分子调控作用对抗肿瘤免疫和抗微生物免疫有协助作用。

B7: CD28/CTLA4 途径参与多种疾病, 包括传染病、哮喘、自身免疫病、炎症失调的发病, 移植器官的排斥作用以及移植物抗宿主疾病。该途径也参与刺激免疫系统的预防及其机制。用编码共刺激物如 B7 的基因进行的转染作用, 可用于产生抗肿瘤和抗病毒疫苗。B7 分子也参与自身免疫病如系统性红斑性狼疮、糖尿病、哮喘、胰岛炎、关节炎、炎性肠道疾病、炎性皮炎 (如牛皮癣和遗传过敏性皮炎) 以及多发性硬化 (Reiser, et al., New England J. of Med., 335(18): 1369(1996))。因此, 本发明包括本文所述疾病的治疗方法, 包括给患者投以与 B7-1 和/或 B7-2 结合的免疫球蛋白。免疫球蛋白在投药时要用治疗有效量, 免疫球蛋白可以以载体的形式投药。

治疗患病个体就是要减轻或缓和与疾病相关的一种或多种症状。治疗有移植排斥的个体, 意味着减轻或缓和与移植排斥相关的一种或多种症状 (如发热、肾机能丧失、膨胀肾、T 细胞/APC 细胞攻击排斥)。抑制个体疾病就是抑制疾病的一种或多种症状的发生。抑制移植排斥意味着降低与移植排斥并发的一种或多种免疫应答。

因此, 对 B7 分子的功能进行调整或影响, 可能对治疗有本文所述疾病的个体会有帮助。对 B7 的调整作用, 对治疗有免疫相关疾病或自身免疫病及有 B7-2 和/或 B7-1 参与的失调的个体也会有用。对 B7-2 或 B7-1 的调整作用, 也可用于治疗 IL-4 相关或受 IL-4 影响和/或 2 型辅助细胞产生相关或受其影响的疾病。这些失调/疾病可以用对 B7-2 和/或 B7-1 特异的抗体治疗。该抗体优选为对 B7-2 或 B7-1 特异的人源化抗体。共投药抗 B7-2 抗体、抗 B7-1 抗体, 包括其嵌合形式和人源化形式和/或对应于受体 CD28 和 CTLA4 的抗体, 对治疗这些疾病会有帮助。

除了本文所述的疾病外, 能与 B7-1 和/或 B7-2 结合的免疫球蛋白可以投药给有移植组织、移植器官或移植细胞的人。对 B7 途径的抑制可以预防或减轻移植组织、移植器官或移植细胞的排斥作用。本发明

涉及长期性（如几天、几个月、几年）地治疗急性和/或慢性移植排斥。急性移植排斥通常发生在移植的前几个星期之内，而慢性排斥通常发生在前几周之后。本文中描述了抗 B7-1 抗体和抗 B7-2 抗体的投药量。

5 本发明尤其涉及治疗移植受体或预防移植排斥的方法。该方法包括为了预防移植后的排斥作用而投以足够量的人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体。移植的可以是细胞、组织或器官。抗体的投药可以在移植之前和/或移植之后，也可以在移植时投药。抗体以剂量的形式投药（如大约在 1mg/kg 和大约 100mg/kg 之间）。具体地讲，在移植当天服用较大剂量的抗体（例如，大约 1-25 mg/kg），而在移植之后，  
10 定期服用较小剂量的抗体（例如，大约 1-5 mg/kg）。值得注意的是，这样的投药使针对移植排斥的免疫应答发生显著降低，甚至能彻底预防免疫应答的发生。请参照实施例 22 和 23。

治疗方法中也涉及与人源化抗 B7-2 抗体和人源化抗 B7-1 抗体一起共投药其它标准治疗药物（如用于调整有移植器官、组织、细胞等的个体免疫应答的药物）。这样的药物包括氨甲蝶呤、能阻止免疫细胞生长或抑制细胞周期前进的免疫抑制剂（如纳巴霉素）、类固醇（如强的松或其衍生物）、钙调磷酸酶抑制剂（如环孢菌素或 FK506）、抗 CD40 途径抑制剂（如抗 CD40 抗体、抗 CD40 配体抗体以及 CD40 途径的小分子抑制剂）、移植补救途径抑制剂（如 mycophenolate mofetil (MMF)）、  
15 IL-2 受体拮抗剂（如 Hoffmann-la Roche Inc. 公司的 Zeonpax® 以及 Novartis, Inc. 公司的 Simulet）及其类似物，或者是未来发展起来的移植排斥药物。本文所述数据表明，当环孢菌素 A、强的松以及纳巴霉素这些化合物中任何一种与人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体一起投药时，环孢菌素 A、强的松以及纳巴霉素预防移植排斥方面  
25 尤其有效。这些化合物的投药量有所不同。投药量取决于个体中这些化合物的血清浓度。血清浓度越高，所需剂量就越低；而血清浓度越低，所需剂量就越高。例如，当和人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体一起投药时，环孢菌素 A 的投药量可以在大约 150ng/ml 到大约 100mg/ml 之间（如 200-300ng/ml），强的松的投药量可以在大约  
30 0.2mg/kg 到大约 2.0mg/ml 之间，甲基强的松的投药量可以在大约 0.2mg/kg 到大约 2.0mg/kg 之间，而纳巴霉素的投药量可以在大约 0.5mg/kg 到大约 2.0mg/kg 之间。

本发明包括给需要移植的个体移植细胞（如血细胞或血液组分，或骨髓）的体内方法。例如，需要如此移植的个体有能用这样的移植治疗的疾病（例如，增生病如白血病、淋巴瘤、癌，贫血症如镰状细胞贫血症、地中海贫血症和再生障碍性贫血，先天性代谢失调，先天性免疫缺陷病，以及骨髓相位异常综合症）。该方法包括从供体获得细胞。供体骨髓通常既包括未成熟淋巴细胞又包括成熟淋巴细胞。除骨髓细胞外，来自供体的血细胞还可以是干细胞或未成熟的血细胞。供体细胞优选来自但并不限于与病人/受体有相似特性的人（如供体的骨髓与病人的骨髓相匹配）。通过分析确定受体是否与病人相匹配的特性有 1 类 MHC 和 2 类 MHC（如 HLA-A、HLA-B 和/或 HLA-DR）。该方法包括让细胞（如骨髓或其它血液组分）接触对 B7-1 特异的免疫球蛋白和/或对 B7-2 特异的免疫球蛋白以及受体细胞（如来自于病人的淋巴细胞），以便获得被称为“治疗细胞”的混合物。抗体的用量取决于细胞的数目。细胞量越多，需要的抗体就越多；细胞量越少，需要的抗体就越少。本文所述实验中每种抗体的用量均为 10mg/ml，超出 10-100 倍。本实施方案中抗 B7-1 抗体和/或抗 B7-2 抗体的用量应该足以诱导无应变性的产生，如大约 0.01-10mg/ml。供体细胞、免疫球蛋白和受体细胞的接触时间要长到足以诱导耐受性（如大约 1-96 小时，优选大约 36-48 小时）。耐受性诱导（如，无应变性）是指用 B7-1 抗体和/或 B7-2 抗体治疗后诱导的对抗原反应性的丧失，于是 T-细胞不再对抗原充分或完全应答。参照实施例 18。受体细胞（如外周血淋巴细胞（PBL）、或表达 I 类抗原（MHC-1）的淋巴细胞）扩散后能抑制细胞分裂。受体细胞的取代物可以是能表达 MHC I 类抗原及 B7-1 和/或 B7-2 分子的组织、器官或工程细胞。该方法还包括将混合物（如治疗细胞）或治疗骨髓导入到病人体内。该治疗方法的目的是预防移植物抗宿主疾病。例如，治疗骨髓中的细胞对受体同种抗原产生耐受性，于是就减少或根除了移植物抗宿主疾病发生，并能增强骨髓（如干细胞）的移植能力。因此，本发明的方法包括治疗、预防或帮助预防移植物抗宿主疾病。抗 B7-1 抗体和抗 B7-2 抗体降低了受体对供体骨髓或供体细胞的排斥作用。然而，本方法能够在不显著损害病人对其它外源细胞和抗原进行检测和产生免疫应答能力的情况下减少排斥反应的发生。所以，这些方法使得移植成为受体特异性，并使得在不损害移植物的情况下

能对外源抗原产生排斥。参照实施例部分。

5 本发明也涉及通过给个体投以人源化抗 B7-1 抗体和/或人源化抗 B7-2 抗体来降低个体对抗原的抗体应答。抗体可以在有抗原存在时投药。抗原可以是生长因子、凝血因子、细胞因子、趋化因子、基因治疗载体或激素。例如，抗原尤其可以是破伤风类毒素、因子 VIII、因子 IX、胰岛素、生长激素或基因输送载体。抗原可以以多肽形式或以核酸形式（例如，基因通过腺伴随病毒、反转录病毒、裸露 DNA 载体等送递）投药。抑制抗体对其抗原的应答对治疗许多疾病有帮助，例如血友病患者对服用的因子 VIII 或因子 IX 产生抗体应答，因此导致了血液凝固问题。本文所述数据表明，给个体投以有效量的人源化抗 B7-1 抗体和/或人源化抗 B7-2 抗体及模型抗原破伤风类毒素后抑制了对破伤风类毒素的抗体应答。抗体可以与抗原一起投药，或者在服用抗原前后及时投药（如之前不久即投药或之后马上投药），以便赋予个体想要的效果，如抑制抗体应答。人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体可以在服用抗原大约 3 周（抗体半衰期）之内投药，例如在投以抗原之前大约 14 天和投以抗原之后大约 2 天之间投药。人源化抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-2 抗体的投药量在大约 0.01mg/kg 和 10mg/kg 之间。

15 本发明涉及有或没有载体的含有一种人源化抗 B7-1 抗体和/或人源化抗 B7-2 抗体的药用组合物。一个优选实施方案是投以注射形式或胶囊形式的 B7-1 和/或 B7-2 免疫球蛋白。注射形式尤其可以是静脉注射或皮下注射。术语“药用载体”或“载体”指的是通常所用的相对惰性和无毒性的赋形剂或给药组合物。典型的载体包括碳酸钙、蔗糖、右旋糖、甘露糖、清蛋白、淀粉、纤维素、硅胶、聚乙二醇（PEG）、干脱脂乳、米粉、硬脂酸镁等等。在 Remington's Pharmaceutical Sciences (17<sup>th</sup> Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) 中描述了适用的制剂和附加载体。

25 适用载体（如药用载体）也包括但不限于无菌水，盐溶液（如林格液），乙醇，聚乙二醇，明胶，糖类如乳糖、直链淀粉或淀粉，硬脂酸镁，滑石粉，硅酸，粘性石蜡，脂肪酸酯，羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）等。这些制剂可以灭菌，如果需要的话，还可以和辅助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐类、缓冲液、颜料和/或芳香物质等并不与免疫球蛋白发生有害反应的

辅助剂一起混合。需要的时候，制剂还可以和其它活性物质如能降低代谢降解作用的酶抑制剂混合使用。载体（如药用载体）是优选的，但在投以免疫球蛋白时并非是必要的。

5 为了肠胃外的使用，尤其适用的是注射的无菌溶液，优选油溶液或水溶液，还有悬浮液、乳液或植入剂，包括栓剂。用于肠胃外给药的载体尤其包括右旋糖的水溶液、盐水、纯水、乙醇、甘油、丙二醇、花生油、芝麻油、聚氧化乙烯-聚氧化丙烯嵌段聚合物等。壶腹、小瓶及注射器是方便的单位剂量。

10 本发明的免疫球蛋白的投药可以是经静脉内的、经肠胃外的、经肌内的、经皮下的、经口的、经鼻的，可以通过吸入、植入、注射或栓剂方式投药。为了赋予想要的效果，组合物可以以单一剂量方式或长期多剂量形式投药。

15 免疫球蛋白的实际有效量可以根据所用的特异免疫球蛋白、设计的特定组合物、投药方式以及病人的年龄、体重、状况和紊乱或疾病的严重程度等有所不同。正如本文所用，有效量的 B7-1 免疫球蛋白和/或 B7-1 免疫球蛋白能调整或抑制 B7/CD28/CTLA4 途径。本文对特定病人的剂量进行了描述，其剂量由本领域中的熟练人员通过传统方法来决定（如用合适的传统药物方案）。

20 人源化 B7-1 抗体、人源化 B7-2 抗体和/或其它药物的投药可以是同时性的或顺序性的。这些化合物或组合物可以在其之前、在其之后或同时投药。所以，本文所用术语“共投药”的意思是，人源化 B7-1 抗体和/或 B7-2 抗体和/或其它组合物在投药时能治疗本文所述疾病或能诱导耐受性（如氨甲蝶呤，纳巴霉素，环孢菌素，类固醇，抗 CD40 途径抑制剂如抗 CD40 途径抗体、抗 CD40 配体抗体和 CD40 途径的小分子抑制剂，移植补救途径抑制剂如 mycophenolate mofetil (MMF)，IL-2 受体拮抗剂如 Hoffmann-la Roche Inc. 公司的 Zeonpax® 以及 Novartis, Inc. 公司的 Simulet 及其类似物）。本发明的方法不限于抗体或组合物的投药次序，只要它们投药及时接近能产生所要的效果就行。

30 本发明也涉及用人源化抗 B7-2 抗体或抗 B7-1 抗体分别确定 B7-2 或 B7-1 存在、不存在或水平的方法。B7-2 或 B7-1 存在或不存在可以用分析法（如 ELISA、放射免疫测定法（RIA）、FACS 或免疫组织化学）

进行检测。该分析法可以是直接进行检测也可以是间接进行检测（如竞争性分析法）。

例如，为了在适当样品中用 ELISA 分析法鉴定 B7-2 或 B7-1 存在或不存，方法中包括将适当样品与含有作为检测器的人源化或鼠抗 B7-2 抗体或抗 B7-1 抗体的组合物（如生物素化的抗 B7-2 或 B7-1 mAb 和 HRP-链霉亲和素或 HRP 缓合的抗 B7-2 或 B7-1 mAb）以及，在其上面结合有（直接或间接）抗 B7-2 或 B7-1 捕捉抗体的固相支持物（如微量滴定板）混合。在适合于抗 B7-2 抗体或抗 B7-1 抗体与 B7-2 或 B7-1 之间形成复合物的条件下，检测（器）抗体可以分别与不同的 B7-2 或 B7-1 的表位结合，而捕获抗体识别 B7-2 或 B7-1 的表位。方法还包括对样品中复合物的形成进行鉴定。

也可以用放射免疫测定法或荧光分析法鉴定 B7-2 或 B7-1 的存在与否。例如，可以用免疫结合分析法评估 B7-2 或 B7-1 的存在与否，包括获得样品，在适合于形成标记复合物的条件下让样品与含有抗 B7-2 或 B7-1 抗体（如含有放射性标记或荧光标记的人源化或鼠抗 B7-2 或 B7-1 抗体；或包括一个第二个抗体结合位点的人源化或鼠抗 B7-2 或 B7-1 抗体，而第二个抗体包含放射性标记或荧光标记）的组合物接触，其量优选超过需要结合 B7-2 或 B7-1 的量。方法中还包括鉴定（检测或测定）样品中复合物的形成。同样，使用本发明中的人源化抗 B7-1 或 B7-2 抗体，通过荧光激发细胞分类（FACS）分析法或组织的组织化学分析法鉴定 B7-1 或 B7-2 的存在、不存在或水平。

## 实施例

现在将通过以下实施例阐明本发明，这些实施例并没有要限制的意思。

### 实施例 1: 鼠 3D1 可变区 cDNA 的克隆和测序:

从杂交瘤细胞中分离的 mRNA，通过锚式 PCR (Co et al., J Immunol. 148: 1149(1992)) 方法克隆出了鼠 3D1 (亦即 HF2.3D1) 重链可变区和轻链可变区 cDNA。所用 5' 引物与加到 cDNA 上的聚-dG 尾退火，而 3' 引物与恒定区退火。随后将扩增出的基因片段插入到质粒 pUC18 中。从多个独立克隆中对  $V_L$  和  $V_H$  cDNA 进行了核苷酸序列的鉴定。

对于轻链，鉴定出的两种独立序列都与鼠轻链可变区序列同源。但是其中一种序列是没有功能的，因为丢失了一个核苷酸导致 V-J 结合处发生移码，该序列被鉴定为无效等位基因。另一个序列是典型的功能型鼠  $\kappa$  链可变区。图 1A-1B 中显示出重链和功能型轻链的可变区 cDNA 序列以及其翻译氨基酸序列。鼠  $V_L$  序列属于 Kabat 氏鼠  $\kappa$  链亚类 I。鼠  $V_H$  序列属于 Kabat 氏重链亚类 II (A)。

#### 实施例 2: 人源化 3D1 可变区的设计:

为了保留人源化抗体中鼠抗体的结合亲和性，参照了 Queen 等的一般性程序 (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 (1989), 美国专利 Nos. 5585089 & 5693762, 其内容在此完整引入作为参考)。在保留高结合亲和性时构架残基的选择至关重要。原则上讲, 任一人抗体的构架序列都可以作为 CDR 嫁接的模板; 然而研究表明, 直接将 CDR 替换到构架中可能会导致严重失去对抗原的结合亲和性 (Tempest et al., Biotechnology 9: 266(1992); Shalaby et al., J. Exp. Med. 17: 217(1992))。人抗体与其来源的鼠抗体的同源性越高, 人构架将畸变引入到鼠 CDRs 中的可能性就越小, 而畸变将降低亲和性。鉴于序列同源性, 选择 I2R 提供人源化 3D1 重链的构架, 而选择 H2F 提供人源化 3D1 轻链可变区 (Manheimer-Lory, A. et al., J. Exp. Med. 174(6): 1639-52(1991))。其它高度同源人抗体链也适合于提供人源化抗体构架, 尤其是由 Kabat 定义的人亚类 4 的  $\kappa$  轻链以及人亚类 1 的重链。

为了降低轻链和重链两链组装时发生不相容性的可能性, 通常选择来自同一人抗体的重链和轻链提供构架序列。I2R 抗体显示出与 3D1 重链和轻链的高度同源性, 因此可以用于提供起始人源化抗体模型的构架。然而, 与其它任何构架包括 I2R 相比, 3D1 轻链可变区显示出与 H2F 构架有显著更高程度的同源性。因此, 选择 H2F 提供人源化 3D1 轻链可变区的构架, 而选择 I2R 提供重链可变区的构架。

可以用电脑程序 ABMOD 和 ENCODE (Levitt et al., J. Mol. Biol. 168: 595(1983)) 构建一个 3D1 可变域分子模型, 可以用该分子模型定位 3D1 构架中与 CDRs 距离足够近的有可能与 CDRs 发生相互作用的氨基酸。为了设计人源化 3D1 重链可变区和轻链可变区,

将鼠 3D1 重链中的 CDRs 嫁接到人 I2R 重链构架区中，而将鼠 3D1 轻链的 CDRs 嫁接到人 H2F 轻链构架区中。在电脑模型显示出的与 CDRs 显著临近的构架位置处，将鼠抗体的氨基酸替换成人来源的构架氨基酸。对于人源化 3D1 抗体，替换发生在重链的残基 27、30、48、67、68、70 和 72 以及轻链残基 22 处。此外，将很少发生在人抗体数据库位置处的构架残基在同样位置替换成人共有氨基酸。对于人源化 3D1，替换发生在重链残基 113 处和轻链残基 3 处。

图 2A-2B 中显示了人源化 3D1 抗体重链可变区和轻链可变区的序列。然而，许多可能与 CDR 接触的残基可以替换成其它氨基酸，替换后抗体仍能保留对抗原的基本亲和性。表 1 列举出构架处多个适合的可替换的氨基酸 (LC=轻链, HC=重链)。表中指明的位置是从成熟链第一个氨基酸起氨基酸的编号，成熟链的第一个氨基酸由双下划线显示出 (图 2A-2B)。例如，位置 LC-22 即是从双下划线天冬氨酸 D 开始数起的第 22 个氨基酸 (或者从起始密码子起第 42 个氨基酸)。

15

表 1. 氨基酸的替换和/或可变换的氨基酸

位置	人源化 3D1	可替换氨基酸
LC-22	S	N
HC-27	Y	G
HC-30	T	S
HC-48	I	M
HC-67	K	R
HC-68	A	V
HC-70	M	I
HC-72	V	A

同样，在不使人源化抗体的亲和性或非免疫原性发生显著丢失的情况下，人源化 3D1 重链和轻链中许多并不与 CDRs 接触的构架残基可以替换成来自 I2R 和 H2F 构架、来自其它人抗体、来自鼠 3D1 抗体或来自其它鼠抗体中对应位置的氨基酸。表 2 列举出构架中多个适于替换成其它氨基酸附加位置。

表 2. 构架区氨基酸的替换和/或可变换的氨基酸

位置	人源化 3D1	可替换氨基酸
LC-3	V	Q
HC-113	T	I

5 选择各种可替换氨基酸可以产生出多种人源化 3D1, 这些不同版本的人源化 3D1 在其亲和性、特异性、非免疫原性、容易制备和其它合意特性等方面可以有不同的组合。因此上表中的例子只是用来举例说明, 而没有限制的意思。

10 实施例 3: 人源化 3D1 的构建:

如上文所述一旦人源化可变区氨基酸序列设计好后, 就要构建编码这些序列的基因, 包括信号肽、剪接供体信号以及合适的限制位点 (图 2A-2B)。用 8 种长度为大约 65-80 个碱基的互相重叠的合成寡核苷酸构建和扩增轻链可变区基因和重链可变区基因 (参照 He et al.,  
 15 J. Immunol. 160: 1029(1998))。寡核苷酸退火配对后, 用 DNA 聚合酶 I 的 klenow 片段延伸产生出四个双链片段。所得片段变性、退火后, 用 Klenow 延伸产生两个片段。这些片段变性、退火配对后再次延伸, 产生出一个全长基因。所得产物通过聚合酶链式反应 (PCR) 用 Taq 聚合酶扩增, 扩增产物通过胶纯化、用 Xba I 消化、再用胶纯化后, 将其  
 20 亚克隆到 pVk 的 Xba I 位点上以便表达轻链, 而将其克隆到 pVg4 或 pVg2.M3 上以便表达重链。以前已经对表达  $\kappa$  轻链的 pVk 载体进行了描述 (参照: Co et al., J. Immunol. 148: 1149(1992))。表达  $\gamma 4$  重链的 pVg4 载体的构建是通过用人 g4 恒定区基因 (Ellison & Hood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1984(1982)) 的大约 2000bp 的片段取  
 25 代 pVg1 中包含  $\gamma 1$  恒定区基因的 Xba I -BamH I 片段 (参照: Co et al., J. Immunol. 148: 1149(1992))。而人 g4 恒定区基因从  $\gamma 4$  基因 C<sub>H</sub>1 外显子前的 HindIII 位点一直延伸到紧接  $\gamma 4$  基因 C<sub>H</sub>4 外显子的 Nsi I 位点之后 270bp。Cole 等 (Cole et al., J. Immunol. 159: 3613(1997)) 对表达  $\gamma 2$  重链的 pVg2.M3 载体进行了描述。通过将人野生型 IgG2 中

234 位和 237 位的氨基酸 Val 和 Gly 替换成 Ala 而突变产生了 pVg2.M3。这种变体对其 Fc 受体的相互作用减弱了，所以有最低程度的抗体效应子活性。

5 通过核苷酸测序以及限制酶切作图对最终质粒的结构进行了核实。所有 DNA 操作都是按照本领域中熟练人员熟知的标准方法进行的。

制备两个人源化 3D1 抗体、IgG4 和 IgG2.M3 作比较研究。将轻链和相应的重链质粒转染到鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581) 中，以构建一个能产生人源化 3D1 抗体 (3D1 抗体 IgG4 或 IgG2.M3) 的细胞系。同样也用本领域熟知的方法用质粒转染 CHO 细胞。转染之前用限制性内切核酸酶将包含重链的质粒以及包含轻链的质粒线性化。κ 链和 γ 2 链的线性化用 Fsp I；γ 4 链的线性化用 BstZ17 I。在 PBS 中，将大约 20 μg 轻链质粒和重链质粒转染到  $1 \times 10^7$  个细胞中。根据厂商的指导手册用基因脉冲发生器 (BioRad) 在 360V 和 25 μFD 容量下通过电穿孔方法实现转染。每次转染后的细胞在四个 96 孔组织培养板上铺平板，两天后使用选择培养基 (DMEM, 10%FCS,  $1 \times$  HT 增补物 (Sigma), 0.25mg/ml 黄嘌呤, 1 μg/ml 霉酚酸)。

大约两周之后，出现的克隆用 ELISA 筛选抗体的产生。高产克隆中抗体的制备方法是，让细胞在正常培养基 (DMEM 和 10%FCS) 上生长到铺满，然后培养基替换成无血清培养基 (杂交瘤 SMF; Gibco)，一直培养到培养物中抗体效价达到最大为止。培养物上清液通过蛋白 A-Sepharose 柱 (Pharmacia)；用 0.1M 甘氨酸, 100mM NaCl, pH3 洗脱抗体，中和后换成磷酸缓冲盐溶液 (PBS)。通过在丙烯酰胺胶上分析抗体鉴定抗体的纯度，由  $OD_{280}$  读数确定抗体的浓度，假定 1.0mg 抗体蛋白的  $OD_{280}$  读数为 1.4。

25

实施例 4: 人源化抗 B7-2 抗体的亲和性:

竞争性结合测定:

用竞争性结合测定法检测鼠和人源化 3D1 抗体与 B7-2 抗原的相对亲和性。将未标记的人源化或鼠 3D1 抗体的三倍系列稀释液与固定量放射性碘化鼠 3D1 抗体 (包含 2%胎牛血清的 PBS 中 40000-50000cpm/检测) 混合。

30

随后加入  $1 \times 10^5$  个表达细胞表面 rhB7-2 (CHO/hB7-2) 的 CHO 细

胞，混合物（总体积 200  $\mu$ l）在轻微振荡的情况下于 4 $^{\circ}$ C 培育 2hr。然后将细胞-抗体悬浮液转移到包含 100  $\mu$ l 的 80%二丁基氨甲酰苯甲酸-20%橄榄油的 Sarstedt Micro Tubes (part#72.702) 中。用微量离心机离心后，将 Sarstedt 管放置到干冰中静置数分钟。检测细胞结合态  $^{125}$ I 的方法是，将每支管（包含细胞沉淀）的尖端剪切到闪烁瓶中并在  $\gamma$  计数器中计数。根据 Berzofsky 和 Berkower (J.A. Berzofsky & J. Berkower, in *Fundamental Immunology* 9ed. W.E. Paul, Raven Press (New York), 595 (1984)) 的方法对结合态和游离态数值进行鉴定，并用其比例对非标记竞争抗体浓度进行作图。

10

细胞系：

能在膜表面表达 hB7-2 的重组中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系是从用 B7-2 cDNA 序列转染且有 G418 抗性的细胞中克隆来的。用鼠抗 B7 抗体和 FACS 分析法对存在选择压的情况下细胞经过多次传代后 CHO 表面表达的 hB7-2 进行了检测。

15

$^{125}$ I 标记的抗 hB7 mAb 的制备及其特性：

根据厂商的指导手册 (Amersham Corp., Arlington Hts, IL), 通过与  $^{125}$ I-Bolton-Hunter 试剂反应用  $^{125}$ I 标记抗 hB7 抗体。用 NAP-25 柱将蛋白与游离试剂分离开来。使用 HPLC 大小排阻柱核实抗体是否保留了完整性而未聚集成团，并用该柱测定抗体相对由非标记抗体制备的标准的蛋白浓度。通常得到的标记是 4-8 微居里/毫克蛋白，或者抗体分子中大约 30-60% 标记上了。

20

25 结果：

图 3 中表示竞争性结合曲线。每一数据点代表的是三次重复测定的平均值。结果显示出人源化 IgG4 和人源化 IgG2.M3 抗人 B7-2 抗体都与鼠抗 B7-2 抗体一样有着相似的高结合亲和性 (大约  $1 \times 10^9 M^{-1}$ )，这表明人源化 3D1 中没有丢失对 B7-2 的亲和性。鼠抗 B7-2 抗体和人源化抗 B7-2 抗体都能高亲和性地识别细胞表面表达的 hB7-2。

30

实施例 5. 人源化抗 B7 mAbs 与 CHO/hB7 细胞的直接结合：

## 细胞结合测定:

结合测定开始时以 10000 CHO/hB7-2 细胞/孔的密度将细胞铺到 96 孔组织培养平板上。两天后, 贴壁细胞用包含脱脂奶粉蛋白(用于封闭非特异性结合)和叠氮钠(用于预防细胞将抗体内化)的测定缓冲液轻柔漂洗。对于直接结合测定来说, 在测定缓冲液中将  $^{125}\text{I}$  标记的抗 B7 抗体( $^{125}\text{I}$ -鼠抗 B7-2; 826cpm/fmol; 人源化抗人 B7-2, 883cpm/fmol) 进行系列稀释并在细胞上温浴过夜, 使抗体与细胞表面的 B7-2 结合并达到平衡。将未结合的抗体从细胞上轻柔漂洗下来, 用  $^{125}\text{I}$  闪烁体和光检测器系统对结合态  $^{125}\text{I}$  标记抗体进行检测。与 CHO 细胞的非特异性结合可以以与每一稀释相同的方式进行检测, 而能表达 B7-1 分子的细胞不能被测试抗体识别。

## 结果:

图 4 中显示出直接结合图。用 Graphpad PrismJ 软件分析表明, 扣除掉非特异性结合后三份孔的平均值符合双曲线饱和曲线。对应于半-最大结合的浓度定为抗体的  $K_D$ , 表明鼠和人源化抗 B7-2 mAbs 对 B7-2 有相似的、高的结合亲和性 ( $\sim 10^{-9}\text{m}$ )。鼠抗 B7-2 mAbs 和人源化抗 B7-2 mAbs 都能高亲和性地与细胞表面表达的 B7-2 结合。

## 20 实施例 6: 人源化抗 B7 mAbs 与蛋白配体的结合:

### 用 BIACORE®测定亲和性:

用 BIACORE®生物传感器 (BIACORE®; Uppsalla, Sweden) 检测鼠抗 B7-2 抗体和人源化抗 B7-2 人抗体与人 B7-2Ig 的结合动力学。将人 B7-2Ig (hB7-2Ig) 固定到 BIACORE®生物传感器芯片的葡聚糖基质上。分别在 200、100、50 和 20nM 浓度检测人源化和鼠抗人 B7-2。每种稀释在每次操作时检测 4 次, 共进行三次不同操作。用 Surface Plasmon Resonance (SPR) 在实际时间对抗人 B7-2 抗体结合进行检测, 并在 BIA 评估软件 (3.1 版本) 中用二价结合模型进行全面分析。要检测每一样品的缔合常数 ( $k_a$ )、解离常数 ( $k_d$ ) 以及平衡解离常数 ( $K_D$ )。

30

## hB7-2Ig 的制备:

从培养分泌 hB7-2Ig 的工程化 CHO 细胞的培养基中得到可溶性

hB7-2Ig. 重组 hB7-2Ig 的衍生方式是, 将对应于 B7-2 基因的胞外域的 DNA 编码序列与人 IgG1 重链的铰链-CH2-CH3 结构域融合。用蛋白 A 从培养基中纯化重组 hB7-2Ig。

5 结果:

表 3 列出来自鼠和人源化抗人 B7-2 mAbs 的平均值。用 SPR 测定的鼠和人源化抗人 B7-2 mAbs 的结合常数结果表明, 鼠和人源化抗 B7-2 mAbs 形式相似, 且鼠抗 B7-2 mAbs 与固定化 hB7-2Ig 的结合常数比人源化抗 B7-2 与固定化 hB7-2Ig 的结合常数稍微高些。计算出鼠抗 B7-2 mAb 有大约 2.8 倍更高的亲和性, 这显示出在人源化过程中鼠和人源化抗 B7-2 mAbs 之间有实际差异但差异轻微。产生这种结果的另一种可能性可能是在抗体的制备、加工和分析过程中出现技术性变异的缘故。正如实施例 4、5 和 7 所示, 在基于细胞的测定中没有观察到人源化 hB7-2 有什么差异。

15

表 3: 由 BIACORE®测定的抗 B7-2 mAbs 的亲和性

mAb	平均 $K_D$
鼠抗 B7-2	$1.8 \times 10^{-9}M$
人源化抗 B7-2	$5.1 \times 10^{-9}M$

实施例 7. 由人源化抗 B7-2 产生对 T 细胞共同刺激的抑制作用。

20 CD28<sup>+</sup>T 细胞/CHO-B7 增殖测定

按本文所述分离 CD28<sup>+</sup>T 细胞漂洗一次后重悬浮在 RPMI 完全培养基中, 补加 2ng/ml PMA (Calbiochem) 使细胞密度达到  $5 \times 10^5$  细胞/毫升。将 CD28<sup>+</sup>T 细胞 (100  $\mu$ l,  $5 \times 10^4$  个细胞) 加到抗体/CHO/hB7-2 混合物中 (见下文), 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下温浴 3 天, 采用脉冲方式用 1uCi 的 [<sup>3</sup>H]-胸苷 (NEN, Boston, MA) 检测培养最后 6 小时的 T 细胞增殖情况。在过滤器上收集细胞, 用闪烁计数器测定掺入的放射性活度。

25

材料:

参照文献 (June et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4472-4481 (1987)) 所述, 用免疫吸收方法通过负选择方式从人外周血淋巴细胞中分离 CD28<sup>+</sup> 人 T 细胞。通过 leukopheresis 从健康人供体中获得裸外壳, 通过密度梯度离心分离外周血淋巴细胞 (PBL)。用塑料吸收方法将单核  
5 细胞从 PBL 中去除掉。用 CD11、CD20、CD16 和 CD14 的抗体 (这套抗体将覆盖所有的 B 细胞、单核细胞、大颗粒淋巴细胞以及 CD28<sup>+</sup> T 细胞) 通过负选择并用羊抗鼠免疫球蛋白包裹的磁性颗粒通过磁珠分离方法从非贴壁细胞中分离 CD28<sup>+</sup> T 细胞。

组织培养平板在无 Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 的磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 并有 0.5mM  
10 EDTA 存在的溶液中温浴, 使 CHO/hB7-2 细胞从组织培养平板上解吸下来, 经过漂洗后用新配制的低聚甲醛固定。

于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下, 在 100 μl RPMI 完全培养基 (于微量滴定板 (平底, 96 孔, Costar, Cambridge, MA) 中: RPMI1640 培养基, 10% 胎牛血清 (FBS), 100U/ml 青霉素, 100 μg/ml 链霉素) 中将各种浓度  
15 的抗 B7-2 抗体 (各双份) 温浴 1 小时。

结果:

图 5 显示出由鼠和人源化抗 B7-2 mAbs 产生对 CD28<sup>+</sup> T 细胞增殖的抑制作用结果。两种抗体都展示出对由 B7-2 驱动的 T 细胞增殖的剂量  
20 依赖性抑制作用, 二者的 IC<sub>50</sub> (抑制浓度的 50%; 50%抑制最大 T 细胞增殖所需的抗体量) 值相近, 分别是 72pm (鼠抗 hB7-2) 和 50pm (人源化抗 hB7-2)。这表明两种抗体是相近的, 在抑制 B7-2 T 细胞刺激信号方面都非常有效。这说明高亲和性抗 B7-2 mAbs 可以通过抑制 (如预防) 人 T 细胞的激活作用和/或增殖作用封闭 B7-2 的功能性。这些 mAbs  
25 在用于体内抑制 T 细胞应答方面有可能表现出相近的能力。

实施例 8: 鼠 1F1 可变区 cDNA 的克隆和测序

鼠 1F1 重链和轻链可变区 cDNA 是利用锚式 PCR 从分离自杂交瘤的 mRNA 中克隆来的 (Co et al., J. Immunol. 148: 1149 (1992))。所用 5'  
30 引物与加到 cDNA 上的 poly-dG 尾退火, 而 3' 引物与恒定区退火。随后将扩增出的基因片段插入到质粒 pUC19 中。对于 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> cDNA, 均从数个独立克隆中鉴定其核苷酸序列。对于重链, 鉴定出一个单一序列,

为典型的鼠重链可变区。对于轻链鉴定出两种序列，它们都与鼠轻链可变区同源。但是其中的一种序列是没有功能的，因为丢失了一个核苷酸而导致 V-J 结合处发生了一个移码，确定为非有效等位基因。另一种序列是典型的功能型鼠  $\kappa$  链可变区。在图 6A 和 6B 中，分别显示出重链可变区的 cDNA 序列和功能型轻链可变区的 cDNA 序列，以及翻译出的氨基酸序列。鼠  $V_H$  属于 Kabat 氏重链亚类 II (C)。鼠  $V_K$  序列属于 Kabat 氏鼠  $\kappa$  亚类 IV。

### 实施例 9: 人源化 1F1 可变区的设计

为了保留人源化抗体中鼠抗体的结合亲和性，参照了 Queen 等的一般性程序 (Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029(1989), 美国专利 Nos. 5585089 & 5693762)。在保留高结合亲和性方面构架残基的选择至关重要。原则上讲，任何一个人抗体的构架序列都可以作为 CDR 嫁接的模板；然而研究表明，直接将 CDR 替换到构架中可能会导致严重失去对抗原的结合亲和性 (Tempest et al., Biotechnology 9: 266(1992); Shalaby et al., J. Exp. Med. 17: 217(1992))。人抗体与其来源的鼠抗体的同源性越高，人构架将畸变引入到鼠 CDRs 中的可能性就越小，而畸变将降低亲和性。鉴于与 Kabat 抗体序列数据库中的序列同源性 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5<sup>th</sup> ed., U. S. Department of Health and Human Services(1991))，选择 III-2R (Manheimer-Lory, A. et al., J. Exp. Med. 176: 309(1992)) 既提供人源化 1F1 重链可变区的构架，也提供人源化 1F1 轻链可变区的构架。其它高度同源人抗体链也适合于提供人源化抗体构架，尤其是由 Kabat 定义的人亚类 4 的  $\kappa$  轻链以及人亚类 1 的重链。

为了降低轻链和重链两链组装时发生不相容性的可能性，通常选择来自同一个人抗体的重链和轻链提供构架序列。III-2R 抗体显示出与 1F1 重链和轻链的高度同源性，因此可以选其提供人源化抗体的构架。人源化 1F1 重链可变域中 87 个构架残基有 69 个残基与鼠 1F1 重链构架 69 个残基相同，即 79% 序列同一性。人源化 1F1 轻链可变域中 80 个构架残基有 55 个残基与鼠 1F1 轻链构架 55 个残基相同，即 69% 序列同一性。

可以用电脑程序 ABMOD 和 ENCODE ( Levitt et al. , J.Mol.Biol.168: 595(1983)) 构建一个 1F1 可变域分子模型, 可以用该分子模型定位 1F1 构架中与 CDRs 距离足够接近的有可能与 CDRs 发生相互作用的氨基酸。为了设计人源化 1F1 重链可变区和轻链可变区, 将鼠 1F1 重链中的 CDRs 嫁接到人 III-2R 重链构架区中, 而将鼠 1F1 轻链的 CDRs 嫁接到人 III-2R 轻链构架区中。在电脑模型显示出的与 CDRs 显著临近的构架位置处, 将鼠抗体的氨基酸替换成人来源的构架氨基酸。对于人源化 1F1 抗体, 替换发生在重链的残基 1、24、27、28、29、30、48、67 和 68 以及轻链残基 47 和 72 处。此外, 将很少发生在人抗体数据库位置处的构架残基在同样位置替换成人共有氨基酸。对于人源化 1F1, 替换发生在重链残基 16、74 以及 113 处和轻链残基 44 处。总之人源化 1F1 重链可变域有 88 残基与人 III-2R 重链可变区域相同, 而人源化 1F1 轻链可变域有 88 残基与 III-2R 轻链可变区域相同。

图 7A 和图 7B 中显示了人源化 1F1 抗体重链可变区和轻链可变区的序列。然而, 许多可能与 CDR 接触的残基可以替换成其它氨基酸, 替换后抗体仍能保留对抗原的基本亲和性。表 4 列举出构架上多个适合的可替换的氨基酸位置 (LC=轻链, HC=重链)。

表 4.

位置	人源化 1F1	可替换氨基酸
HC-1	E	Q
HC-24	P	A
HC-27	F	G, Y
HC-28	N	T
HC-29	I	F
HC-30	K	S, T
HC-48	I	M
HC-67	K	R
HC-68	A	V
HC-72	Y	F

同样，在不使人源化抗体的亲和性或非免疫原性发生显著丢失的情况下，人源化 1F1 重链和轻链中许多并不与 CDRs 接触的构架残基可以替换成来自于 III-2R 构架、来自于其它人抗体、来自于鼠 1F1 抗体或来自于其它鼠抗体中对应位置的氨基酸。表 5 列举出构架中多个适于替换成其它氨基酸附加位置。

表 5.

位置	人源化 1F1	可替换氨基酸
HC-16	A	S
HC-74	T	K
HC-113	T	I
LC-44	A	S, V

选择各种可替换氨基酸可以产生出多种人源化 1F1，这些不同版本的人源化 1F1 在其亲和性、特异性、非免疫原性、容易制备和其它合意特性等方面可以有不同的组合。因此上表中的例子只是用来举例说明，而没有限制的意思。

#### 15 实施例 10: 人源化 1F1 的构建

一旦人源化可变区氨基酸序列设计好后，就要构建编码这些序列的基因，包括信号肽、剪接供体信号以及合适的限制位点（图 7A 和图 7B）。用 8 种长度为大约 65-80 个碱基的互相重叠的合成寡核苷酸构建和扩增重链可变区基因和轻链可变区基因（参照 He et al., J. Immunol. 160: 1029(1998)）。寡核苷酸退火配对后，用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段延伸，产生出四个双链片段。所得片段变性、退火配对后，用 Klenow 延伸，产生两个片段。这些片段变性、退火配对后再延伸，产生出一个全长基因。所得产物通过聚合酶链式反应（PCR）用 Taq 聚合酶扩增，扩增产物通过胶纯化、用 Xba I 消化、再用胶纯化后，将其亚克隆到 pVg2.M3 的 Xba I 位点上，以便表达重链，而将其克隆到 pVk 上，以便表达轻链。以前已经对表达人  $\gamma$  2 重链的 pVg2.M3 载体进行了描述（参照：Co et al., J. Immunol. 159: 3613(1997)）。

通过将野生型人  $\gamma 2$  恒定区中 234 位和 237 位的氨基酸 Val 和 Gly 替换成 Ala 而突变产生了 pVg2.M3 质粒中人  $\gamma 2$  恒定区。这种变体对其 Fc 受体的相互作用减弱了，所以有最低程度的抗体效应子活性。Cole 等 (Cole et al., J. Immunol. 148: 1149(1992)) 对表达人  $\kappa$  轻链的 pVk 载体进行了描述。

通过核苷酸测序以及限制酶切作图对最终质粒的结构进行了核实。所有 DNA 操作都是按照本领域中熟练人员熟知的标准方法进行的。

制备人源化 1F1 抗体的 IgG2.M3 形式进行结合研究。用轻链和重链质粒转染鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581) 以构建一个能产生人源化 1F1 抗体的细胞系。转染之前用限制性内切核酸酶将重链质粒以及轻链质粒线性化。 $\gamma 2$  重链质粒和  $\kappa$  轻链质粒的线性化用 Fsp I。在 PBS 中将大约  $40 \mu\text{g}$  重链质粒和  $20 \mu\text{g}$  轻链质粒转染到  $1 \times 10^7$  个细胞中。根据制造商的指导手册用基因脉冲发生器 (BioRad) 在 360V 和  $25 \mu\text{FD}$  容量下通过电穿孔方法实现转染。每次转染后的细胞在四个 96 孔组织培养板上铺平板，两天后使用选择培养基 (DMEM, 10%FCS, 1 x HT 增补物 (Sigma),  $0.25\text{mg/ml}$  黄嘌呤,  $1 \mu\text{g/ml}$  霉酚酸)。

大约两周之后，出现的克隆用 ELISA 筛选抗体的产生。高产克隆中抗体的制备方法是，让细胞在正常培养基 (DMEM+10%FCS) 上生长到铺满，然后培养基替换成无血清培养基 (杂交瘤 SMF; Gibco)，一直培养到培养物中抗体效价达到最大为止。培养物上清液通过蛋白 A-Sepharose 柱 (Pharmacia); 用  $0.1\text{M}$  甘氨酸,  $100\text{mM}$  NaCl, pH3 洗脱抗体，中和后换成磷酸缓冲盐溶液 (PBS)。通过在丙烯酰胺胶上分析鉴定抗体的纯度，由  $\text{OD}_{280}$  读数确定抗体的浓度，假定  $1.0\text{mg}$  抗体蛋白的  $\text{OD}_{280}$  读数为 1.4。

按照如上所述方法也能获得并纯化出 IgG4 形式的人源化 1F1 抗体。

为使基因能在 CHO 细胞中高水平表达，将完整人源化人 1F1 (h1F1) 和人 3D1 (h3D1) 的轻链基因和重链基因分别单独亚克隆到选择性、扩增性表达载体 pED 中 (Kaufman R. J., et al., Nucl. Acids. Res. 19: 4485-4490(1991))。对来自于 pED 的表达质粒进行测序，确保其能编码适当的 h1F1 和 h3D1 轻链和重链。研究发现 IgG2m3 CH3 结构域的次末端氨基酸是丝氨酸，而在所有公开发表的 IgG2 和 IgG1 序列的这一

位置是甘氨酸残基。在 pED 的表达构建体中，丝氨酸用更为常见的甘氨酸代替。将 h1F1 轻链和重链表达质粒 ( pED. 1F1v2KA 和 pED. 1F1v2G2m3gly ) 线性化后共转染到 CHO PA-DUKX. 153.8 细胞系中，而 CHO PA-DUKX. 153.8 细胞系未转染前要在无血清悬浮培养基中生长以进行预适应 ( Sinacore M. S. et al., Biotechnol. Bioeng. 52: 518-528(1996) )。能表达 h3D1 的细胞系的产生方式同上，用线性化的质粒 pED. 3D1KA 和 pED. 3D1G2m3gly 转染细胞系。这两种情况之中，轻链和重链基因稳定整合到 CHO 细胞的基因组中，随后用氨甲蝶呤选择并扩增，就产生出重组 h1F1 细胞系或 h3D1 细胞系。表达抗 B7-1 或 B7-2 的 CHO 细胞系在无血清生长培养基中进行培养，用蛋白酶 A-Sapharose 层析法从条件化培养上清液中纯化分泌出的抗体。结合态抗体在酸性缓冲液中洗脱后中和到 pH7.0。将纯化好的抗体的缓冲液换成 PBS 并无菌过滤。

#### 15 实施例 11: 人源化 1F1 的特性

通过与放射性碘化人源化 1F1 抗体的竞争性结合分析，来检测鼠 1F1 抗体和人源化 1F1 抗体对 B7-1 抗原的亲合性。在包含 2%胎牛血清、0.1%叠氮化钠的 PBS 中，将三倍连续稀释的非标记鼠 1F1 抗体或人源化 1F1 抗体与固定量的放射性碘化人源化 1F1 抗体 ( 40000-50000cpm/实验 ) 混合。随后加入能表达细胞表面 rhB7-1 的  $3 \times 10^4$  个 CHO 细胞，混合物 ( 总体积 200  $\mu$ l ) 于 4 $^{\circ}$ C 培育 2 小时并轻柔振荡。然后将细胞-抗体悬浮液转移到包含 100  $\mu$ l 80%二丁基邻苯二甲酸-20%橄榄油的 Sarstedt 氏微量管 ( part#72.702 ) 中。微量离心机中离心后，将 Sarstedt 管置入干冰中数分钟。检测细胞结合态  $^{125}$ I 的方法是，将每支 ( 包含细胞沉淀 ) 管的尖端剪切到闪烁瓶中并在  $\gamma$ 计数器中计数。根据 Berzofsky 和 Berkower ( J.A.Berzofsky & J.Berkower, in Fundamental Immunology, W.E.Paul, Raven Press, New York, pp. 595-644(1984) ) 的方法测定结合态和游离态计数并用其比例对非标记竞争抗体浓度进行作图。

30 图 8 中表示竞争性结合曲线。每一数据点代表的是三次重复测定的平均值。结果显示出 IgG2.M3 抗体与鼠抗体一样有着相近的结合亲和性 ( 大约  $1 \times 10^9 M^{-1}$  )，这表明人源化 1F1 没有丧失亲和性。

用放射性标记抗体结合的 Scatchard 分析法对鼠 1F1 抗体和人源化 1F1 抗体对 B7-1 抗原的亲合性进行核实。在包含 2%胎牛血清、0.1%叠氮化钠的总体积为 200  $\mu$ l 的 PBS 中，将 2 倍连续稀释的放射性标记鼠 1F1 抗体或人源化 1F1 抗体与表达细胞表面 rhB7-1 的  $5 \times 10^4$  个 CHO 细胞一起培养。混合物于 4 $^{\circ}$ C 培育 6 小时并轻柔振荡。然后将细胞-抗体悬浮液转移到包含 100  $\mu$ l 80%二丁基邻苯二甲酸-20%橄榄油的 Sarstedt 氏微量管 (part#72.702) 中。微量离心机中离心后，将 Sarstedt 管置入干冰中数分钟。检测细胞结合态  $^{125}$ I 的方法是，将每支 (包含细胞沉淀) 管的尖端剪切到闪烁瓶中并在  $\gamma$  计数器中计录数值。按照 Scatchard 的方法 (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660(1949)) 测定结合态和游离态计数并用其比例对结合态抗体浓度进行作图。

图 9A 和 9B 中显示出 Scatchard 曲线。每一数据点代表的是三次重复测定的平均值。结果显示出 IgG2.M3 抗体与鼠抗体一样有着相近的结合亲和性 (大约  $1 \times 10^9 M^{-1}$ )，这证了人源化 1F1 没有丧失亲和性。

#### 实施例 12: 人源化抗 B7-1 单克隆抗体的亲和性:

##### 竞争性结合测定:

用竞争性结合测定法检测鼠抗 B7-1 (1F1) 抗体和人源化抗 B7-1 (1F1) 抗体与 B7-1 抗原的相对亲和性。将未标记鼠抗 B7-1 mAbs 或人源化抗 B7-1 mAbs 的三倍连续稀释液与固定量放射性标记鼠抗 B7-1 mAb ( $^{125}$ I-抗 B7-1, 2800cpm/fmol; 包含 2%胎牛血清的 PBS 中 40000-50000cpm/检测) 混合。随后加入  $1 \times 10^5$  个表达细胞表面 rhB7-1 的 CHO/hB7-1 细胞，混合物 (总体积 200  $\mu$ l) 在轻微振荡的情况下于 4 $^{\circ}$ C 培育 2hrs。然后将细胞-抗体混合物转移到包含 100  $\mu$ l 的 80%二丁基氨甲酰苯甲酸-20%橄榄油的 Sarstedt 微量管 (part#72.702) 中。用微量离心机离心后，将 Sarstedt 管放置到干冰中静置数分钟。检测细胞结合态  $^{125}$ I 标记的 mAb 的方法是，将每支包含细胞沉淀的管的尖端剪切到闪烁瓶中并在  $\gamma$  计数器中计录数值。测定结合态和游离态计数。用结合态计数对非标记竞争 mAbs 浓度进行作图。

##### CHO/hB7-1 细胞系:

能在其表面表达 hB7-1 的重组中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系是从用 B7-1 cDNA 序列和 G418 抗性标记转染的 CHO 细胞中克隆来的。用鼠抗 B7-1 mAb 和 FACS 分析法对存在选择压的情况下细胞经过多次传代后 hB7-1 在 CHO 细胞表面的稳定表达进行了核实。

5

<sup>125</sup>I 标记的抗 hB7-1 mAbs 的制备:

根据厂商的指导手册 (Amersham Corp., Arlington Hts, IL), 通过与 <sup>125</sup>I-Bolton-Hunter 试剂反应而将鼠和人源化抗 hB7 mAbs 用 <sup>125</sup>碘标记上。用 NAP-25 柱将蛋白与游离试剂分离开来。使用 HPLC 大小排阻层析证实抗体标记后保留了完整性及聚集状态, 并用该柱测定抗体蛋白浓度。通常得到的标记是 4-8 微居里 <sup>125</sup>I/μg mAb, 估计出抗体分子中大约有 30-60% 标记上了。鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 的比活性分别是 2800cpm/fmol 和 950cpm/fmol。

10

15 结果:

图 10 中用图解表示法显示出竞争性结合数据。每一数据点代表的是三次重复测定的平均值。结果显示出人源化抗 B7-1 mAbs 和其来源的鼠抗 B7-1 mAbs 都与 B7-1 有着相当高的亲和性 (大约  $1 \times 10^9 M^{-1}$ ), 这表明人源化抗 B7-1 mAb 没有丢失亲和性。鼠抗 B7-1 和人源化抗 B7-1 都能相近地和有效地与标记的鼠抗 B7-1 mAb 竞争性地结合细胞表面表达的 hB7-1。

20

实施例 13: 人源化抗 B7-1 mAb 与 B7-1 的直接结合:

细胞结合测定:

结合鉴定法开始时在完全培养基中以 10000 细胞/孔密度将 CHO/hB7-1 细胞铺到 96 孔组织培养平板上, 平板于 37°C 温浴两天后, 贴壁细胞用测定缓冲液 (包含脱脂奶粉和叠氮钠的 PBS) 轻柔漂洗。在测定缓冲液中将 <sup>125</sup>I 标记的鼠和人源化抗 B7-1 抗体进行系列稀释并和细胞于 4°C 温浴过夜, 使结合达到平衡。用测定缓冲液通过一系列轻柔漂洗将未结合的抗体从细胞上去除下来, 用 <sup>125</sup>I 闪烁体和光检测器系统对结合态 <sup>125</sup>I 标记抗体进行检测。除了靶 CHO 细胞表达既未与鼠抗 B7-1 mAbs 结合也未与人源化抗 B7-1 mAbs 结合的 hB7-2 外, 与 CHO 细胞

30

的非特异性结合可以以与以上所述每一标记抗体稀释相同的方式进行检测。

结果:

5 图 11 中用图解的方式显示出直接结合实验的结果。用 Graphpad PrismJ 软件扣除掉非特异性结合后的三次重复测定孔的平均值符合双曲线饱和结合曲线。结合常数 ( $K_D$ ) 确定为对应于结合位点半-最大饱和和抗体浓度, 表明鼠抗体和人源化抗体这两种抗体都对 B7-1 有相近的和高度的亲和性 (大约  $10^{-9}M$ )。鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 都能识别细  
10 胞表面表达的人 B7-1。

实施例 14: 鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 与蛋白配体的结合:

用 BIACORE®测定亲和性:

用 BIACORE®生物传感器 (BIACORE®; Uppsalla, Sweden) 检测  
15 鼠抗 B7-1 抗体和人源化抗 B7-1 单克隆抗体与人 B7-1Ig (hB7-1Ig) 蛋白的结合动力学。将人 B7-1Ig 固定到 BIACORE®生物传感器芯片的葡聚糖基质上。分别用 200、100、50 和 20nM 浓度的固定化 hB7-1Ig 检测人源化和鼠抗 B7-1 mAbs。每种 mAb 稀释在一轮测定中检测 4 次, 共进行三轮独立测定作。用 Surface Plasmon Resonance (SPR) 在实  
20 际时间对抗人 B7-1Ig 结合进行检测, 并在 BIA 评估软件 (3.1 版本) 中用二价结合模型进行全面分析。测定每一样品的缔合常数 ( $k_a$ )、解离常数 ( $k_d$ ) 以及平衡解离常数 ( $K_D$ )。

表 6 列出测定的鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 的平均值。用 SPR 检测的鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 的结合常数结果表明, 鼠和人源化抗 B7-1  
25 mAbs 形式相似, 且鼠抗 B7-1 mAbs 与 hB7-1Ig 蛋白的结合亲和性比人源化抗 B7-1 mAbs 与 hB7-1Ig 蛋白的结合亲和性稍微高些。鼠抗 B7-1 mAb 有大约 5 倍更高的结合亲和性, 这显示出在人源化过程中鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 之间有实际差异但差异轻微。此外, 在抗体的制备、加工和分析过程中出现的技术性波动可以对这些细微差异作出解释。正  
30 如实施例 12、14 和 19 所示, 在细胞结合测定和功能性测定中, 没有观察到鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 有什么差异。

表 6. 由 BIACORE®测定的抗 B7-1 mAbs 的亲合性

mAb	平均 $K_D$	标准误差
鼠抗 B7-1	$5.6 \times 10^{-10}M$	$1.9 \times 10^{-10}M$
人源化抗 B7-1	$2.8 \times 10^{-9}M$	$1.2 \times 10^{-9}M$

5 hB7-1Ig 的制备:

从培养分泌 hB7-1Ig 的工程化 CHO 细胞的培养基中得到可溶性 hB7-1Ig. 重组 hB7-1Ig 的衍生方式是, 将编码 hB7-1 基因的胞外域的 DNA 序列与人 IgG1 重链的铰链-CH2-CH3 结构域融合. 用蛋白 A 层析法从培养基中纯化重组蛋白.

10

实施例 15. 由人源化抗 B7-1 mAbs 对 T 细胞共同刺激的抑制作用.

CD28<sup>+</sup>T 细胞/CHO-B7 增殖测定

按本文所述分离 CD28<sup>+</sup>T 细胞漂洗一次后重悬浮在补加 2ng/ml PMA(Calbiochem)的 RPMI 完全培养基中, 使细胞密度达到  $5 \times 10^5$  细胞/毫升. 将 CD28<sup>+</sup>T 细胞 (100  $\mu$ l,  $5 \times 10^4$  个细胞) 加到抗体/CHO/hB7-1 细胞混合物中 (见下文), 于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下温浴 3 天, 采用脉冲方式用 1 $\mu$ Ci 的 [<sup>3</sup>H]-胸苷 (NEN, Boston, MA) 检测培养的最后 6 小时 T 细胞的增殖情况. 在过滤器上收集细胞, 用闪烁计数器测定掺入的放射性活度.

20

材料:

按参照文献 (June et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4472-4481 (1987)) 所述, 用免疫吸附方法通过负选择方式从人外周血淋巴细胞中分离 CD28<sup>+</sup>人 T 细胞. 简言之, 通过 leukophoresis 从健康人供体中获得裸外壳, 通过密度梯度离心分离外周血淋巴细胞 (PBL). 用塑料吸附单核细胞将其从 PBLs 中去除掉. 用 CD11、CD20、CD16 和 CD14 的抗体 (这套抗体将覆盖所有的 B 细胞、单核细胞、大颗粒淋巴细胞以及 CD28<sup>+</sup>T 细胞) 通过负选择并用羊抗鼠免疫球蛋白包裹的磁珠通过磁珠分离方法从非贴壁细胞中分离 CD28<sup>+</sup>T 细胞.

组织培养平板在无  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的磷酸缓冲盐溶液并有 0.5mM EDTA 存在的溶液中温浴，使 CHO/hB7-1 细胞从组织培养平板上解吸下来，细胞经过漂洗后用新配制的低聚甲醛固定。

5 在微量滴定板（平底，96 孔，Costar, Cambridge, MA）中，在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、在 100  $\mu\text{l}$  的 RPMI 完全培养基（RPMI1640, 10% FBS, 100U/ml 青霉素, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素）中将各种浓度的抗 B7-1 抗体（各双份）与  $1 \times 10^4$  CHO/hB7-1 细胞一起温浴 1 小时。

结果:

10 图 12 显示出鼠和人源化抗 B7-1 mAbs 对人 CD28<sup>+</sup>T 细胞增殖的抑制作用结果。两种单克隆抗体都表现出对由 B7-1 驱动的 T 细胞剂量依赖性抑制作用，二者的  $\text{IC}_{50}$ （抑制浓度的 50%；50%抑制最大 T 细胞增殖所需的抗体量）值相近，分别是 110pm（人源化抗 hB7-1）和 220pm（鼠抗 hB7-1）。这表明两种抗体是相近的，它们在抑制 B7-1 T 细胞共同刺激信号方面都非常有效。这说明高亲和性抗 B7-1 mAbs 可以通过抑制或预防人 T 细胞的激活作用和/或增殖作用来封闭 B7-1 的功能性。15 这些 mAbs 在用于体内抑制 T 细胞应答方面有可能表现出相近的能力。

实施例 16. 抗 B7-1 和抗 B7-2 mAbs 对混合淋巴细胞反应的抑制作用

20 混合淋巴细胞反应 (MLR): 在 5% $\text{CO}_2$  中于 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下，将人正常外周血淋巴细胞 (PBL) (效应器) 与扩散的 (2500cGy) 正常供体 PBL (刺激物) 在包含 5% 热灭活人 AB 血清的 RPMI 中一起培养，终浓度为  $10^6$  个细胞/ml。这时，分别单加入鼠抗 hB7-1 抗体或鼠抗 B7-2 抗体 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、二者一块加入 (浓度均为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、并与 CTLA4Ig (10 或 25 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 比较。在微量滴定板中分三份培养细胞，终体积为 200  $\mu\text{l}$ 。培养 16 小时后，用 [ $^3\text{H}$ ]-胸苷掺入法对增殖情况进行评估。用来自于初级 MLRs 的细胞作为效应器进行次级 MLR 反应。这些细胞经过漂洗、过夜培养后，用同种或不同种的第三部分刺激物 PBLs 进行重刺激。次级 MLRs 中不加入抑制剂。

30

结果:

在有 B7 抑制剂 (抗 B7、CTLA4Ig) 存在或没有其存在的情况下进

行初级单向 MLRs 反应后, 所得检测结果如图 13 所示。培养 3、4 或 5 天后对增殖情况进行测定。

在初级 MLR 中, 单独附加抗 B7-1 mAb 并没有产生抑制效果, 这表明抗 B7-1 mAb 在驱动效应器 T 细胞的增殖反方面对 B7-1 的作用微不足道。单独的抗 B7-2 在所有检测的日子里都能抑制 T 细胞增殖, 抑制水平与人 CTLA4Ig (hCTLA4Ig) 的抑制水平相当, 已经知道的是后者这种重组蛋白既与 B7-1 结合又与 B7-2 结合。抗 B7-1 和抗 B7-2 一起是 T 细胞增殖最有效的抑制剂, 在检测的所有时间都能彻底抑制 T 细胞的增殖。抗 B7-1 和抗 B7-2 一起所具有的抑制 T 细胞增殖的卓越能力表明, 与 hCTLA4Ig 相比抗 B7 mAbs 对 B7-1 和 B7-2 有更高的亲和性。抗 B7-1 和抗 B7-2 mAbs 一起与单独的抗 B7-2 相比, 前者是更好的 T 细胞增殖抑制剂, 这就证明要想彻底抑制 T 细胞的应答需要封闭两种刺激受体。这些结果表明, 彻底封闭 B7-1 和 B7-2 共同刺激物就能更彻底地去除掉 MLR 中的同种异体应答。因此, 这些结果说明既包括抗 B7-1 抗体又包括抗 B7-2 抗体的治疗方法比单独使用其中一种抗体更为有效, 尤其是当两种共刺激分子都有功能时。虽然说本文所述的效应器/刺激物对单独由 B7-1 引起的抑制作用并不敏感, 但是某些效应器/刺激物对确实显示出了适度 (0-50%) 的抗 B7-1 敏感性。

为了确定在初级 MLR 中用抗 B7 mAbs 治疗是否能导致 T 细胞产生低反应性或无应变性, 用来自初级 MLR 的效应 T 细胞在次级 MLR 中进行检测, 其中的刺激物要么来自与初级 MLR 相同的供体, 要么来自第三种。图 14 中显示出, 没有免疫抑制的情况下, 当次级 MLR 中检测时, 来自初级 MLR 的效应 T 细胞仅用抗 B7-1 mAbs 治疗后既表现出对起始致敏细胞有完全增殖应答也能对第三种细胞表现完全增殖应答, 这表明仅用抗 B7-1 mAb 处理以封闭 B7-1 受体的方法对这些应答的 T 细胞没有持久效果。这和当仅用抗 B7-2 处理初级 MLR 时在次级 MLR 中看到的对初级刺激物的应答能力丧失的结果完全不同。图 15 中的结果表明来自初级 MLR 的效应 T 细胞仅用抗 B7-2 治疗并不能对在初级 MLR 中用的同种刺激物作出应答, 但却保留了对第三种不相关的刺激物作出正常的增殖应答, 这说明用抗 B7-2 处理后这些效应 T 细胞对起始次级 PBLs 产生耐受性, 而且这种耐受性对于初级 MLR 中的刺激物抗原是特异性的。有这种效应器/刺激物对存在时, 仅用抗 B7-2 治疗后将对刺激细

胞产生耐受性；然而，用其它效应器/刺激物对时，耐受性的诱导可能并不彻底。

图 16 表明，来自初级 MLR 的效应物 T 细胞用抗 B7-1 和抗 B7-2 处理后，并不能对在初级 MLR 中用的同种刺激物作出应答，但却保留了对第三种不相关的刺激物作出正常的增殖应答。这说明用抗 B7-1 和抗 B7-2 一起处理后，这些效应 T 细胞对起始次级 PBLs 产生耐受性。由这种效应器/刺激物对获得的结果对于其它效应器/刺激物对来说是典型的，因为诱导耐受性是必需的。

10 实施例 17: 用人源化抗 B7-1 和抗 B7-2 处理对初级 MLR 和次级 MLR 的抑制作用

摘要:

研究抗 B7 mAbs 对初级 MLRs 的抑制作用，研究抗 B7 mAbs 对特异性耐久低反应性或“耐受性”以及次级 MLRs 的诱导作用。初级 MLRs 分别用单个抗 B7 mAbs 或联合的抗 B7 mAbs 或用 CTLA4Ig 处理，在第 3、4 和第 5 测定增殖。联合的抗 B7-1+抗 B7-2 mAbs 和 CTLA4Ig 能抑制增殖，而单个的抗 B7 mAbs 没有多大效果。将来自初级 MLRs 的细胞（处理 48 个小时后）放到无抑制剂的次级 MLRs 细胞中。来自于用联合的抗 B7 mAbs 或 CTLA4Ig 处理的初级 MLRs 中的细胞对次级 MLRs 中的起始刺激物有极微弱的应答，而用培养基或单个抗 B7 mAbs 处理的细胞能够正常应答。所有情况的细胞都对第三种刺激物产生了正常应答，因而证明对于用联合抗 B7 mAbs 或用 CTLA4Ig 治疗的细胞来说，在初级 MLRs 中看到的低反应性既具有特异性又具有持久性。

25

材料与方法:

实验设计:

细胞:

30 效应器“A”细胞是从新抽取的血液中制备而来的 PBLs。用菲可梯度离心法纯化 PBLs，用培养基漂洗两次后，将细胞重悬在培养基中，细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。起始刺激物“B”细胞是从 leukophoresis

中制备而来的 PBLs。用菲可分离法纯化细胞，再用培养基漂洗两次。对于初级 MLR，将细胞重悬在培养基中，细胞浓度为  $2 \times 10^6$  个/ml，而对于次级 MLR，将细胞重悬在培养基中时细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。第三部分刺激物“C”细胞是从 leukophoresis 中制备而来的 PBLs。用菲可分离法纯化细胞，再用培养基漂洗两次。将细胞重悬在培养基中，细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。“B”刺激物和“C”刺激物这两种 PBLs 来源于两种遗传上有差异的人供体。

#### 培养基:

10 RPMI 1640, 含有 2mM 谷氨酰氨、10mM HEPES、10%热灭活的人 AB 血清、100U/ml 青霉素、 $100 \mu\text{g/ml}$  硫酸链霉素和  $5 \mu\text{g/ml}$  硫酸庆大霉素。

#### 实验物品:

15 对照 Ig 是嵌合型 mAb, 其可变域来自于鼠抗 HIV 包膜蛋白 mAb, 而其恒定域来自于人 IgG1。所有的抗体、CTLA4Ig 和对照 Ig 的溶液都是按以下浓度制备在培养基中的: 抗 B7-1 ( $40 \mu\text{g/ml}$ ), 抗 B7-2 ( $40 \mu\text{g/ml}$ ), 抗 B7-1+抗 B7-2 (均为  $40 \mu\text{g/ml}$ ), CTLA4Ig ( $40 \mu\text{g/ml}$ ), 对照 Ig ( $40 \mu\text{g/ml}$ )。

20

#### 初级 MLR 的方法:

#### 进行以下内容:

- 以 3.5Gy 扩散“B”细胞 (刺激物)
- 在 96 孔“U”底微量滴定板上, 混合  $50 \mu\text{l}$  的扩散“B”细胞 +  $50 \mu\text{l}$  抗体、CTLA4Ig、对照 Ig 或培养基。总体积= $100 \mu\text{l}$ , 包括  $1 \times 10^5$  个 B 细胞 (刺激物) 和  $2 \times$  终浓度的抑制剂。冰上静置 30 分钟。
- 加入  $100 \mu\text{l}$  的“A”细胞 (效应器)
- 于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  中温浴
- 于第 2、3 和第 4 天, 加入  $1 \mu\text{Ci}$  的  $[^3\text{H}]$ -胸苷, 继续过夜温浴
- 收获细胞, 并用闪烁记数方法测定掺入的放射性。于第 3、4 和第 5 天报告结果。

30

偶联初级/次级 MLR 的方法:

进行以下操作内容:

- 以 3.5Gy 扩散 “B” 细胞 (刺激物)
- 5     • 大量初级 MLR. 于 T-25 瓶中, 混合 2.5ml 的扩散 “B” 细胞 ( $2 \times 10^6$  个/ml)+2.5ml 抗体、CTLA4Ig、对照 Ig 或培养基. 总体积=5ml, 其中包括  $1 \times 10^6$  个/ml “B” 细胞 (刺激物) 和  $2 \times$  终浓度的抑制剂. 冰上静置 30 分钟.
- 加入 5ml “A” 细胞 (效应器). 在 T-25 瓶中总体积=10ml
- 10    • 于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  中温浴 ~ 48 小时
- 用菲可梯度离心法收集细胞, 用冰预冷的培养基漂洗两次后重新悬浮在培养基中, 细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml. 冰上静置 8 小时. 用冰预冷的培养基漂洗两次后重新悬浮在培养基中, 细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml.
- 15     • 以 3.5Gy 扩散 “C” 细胞 (第三部分刺激物). 以 3.5Gy 扩散 “B” 细胞 (起始刺激物). “B” 细胞和 “C” 细胞浓度均为  $1 \times 10^6$  个/ml.
- 在 96 孔 “U” 底微量滴定板上, 混合  $100 \mu\text{l}$  的扩散 “B” 细胞或扩散 “C” 细胞和  $100 \mu\text{l}$  来自大量 MLR 的细胞.
- 于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  中温浴
- 20     • 于第 2、3 和第 4 天, 加入  $1 \mu\text{Ci}$  的  $[^3\text{H}]$ -胸苷, 继续过夜温浴
- 收获细胞, 并用闪烁记数方法测定掺入的放射性. 于第 3、4、5 和第 6 天报告结果.

25 结果:

用一个效应器和两个不同刺激物进行的初级 MLRs 分别用单个抗 B7 mAbs、联合抗 B7 mAbs、CTLA4Ig 或对照 Ig 处理, 于第 3、4、和第 5 天测定培养物的增殖情况. 单一的抗 B7-1 对增殖有极其微弱的抑制效果 (1-35%). 单一的抗 B7-2 对增殖有中等程度的抑制效果 (30-50%).

30 联合的抗 B7 mAbs 或 CTLA4Ig 对增殖有最大程度的抑制作用 (86-92%, 抗 B7 mAbs; 82-91%, CTLA4Ig; 图 17 和图 18).

在用其中一种刺激物且包含抑制剂的初级 MLRs 中, 温浴 48 小时

后漂洗细胞、静置、然后置于无抑制剂的培养基中用起始刺激物和第三部分刺激物的次级 MLR 中。于第 3、4、5 和第 6 天检测培养物的增殖情况(图 19 和图 20)。图 21 中汇集了来自次级 MLR 实验的数据结果。

5 考查来自最高增殖应答的数据而不考虑最高增殖数据出现的时间, 以下是对于来自于初级 MLR 的细胞的起始刺激物和第三部分刺激物的应答情况, 初级 MLR 仅用抗 B7-1 处理过:

表 7

初级 MLR 中的处理	对起始刺激物的应答 (%)	对第三部分刺激物的应答 (%)
培养基	100	100
抗 B7-1	70	89
抗 B7-2	47	89
抗 B7-1+抗 B7-2	15	89
CTLA4Ig 10	19	90
CTLA4Ig 20	17	95
对照 Ig	99	105

10

用联合抗 B7 mAbs 或 CTLA4Ig 处理初级 MLRs 时, 产生的细胞在次级 MLR 中对同样的刺激物的增殖情况难于控制。单用一种抗 B7 mAbs 没有多大效果。不考虑初级 MLR 中的处理, 来自所有处理情况的细胞都能对第三部分细胞正常应答, 这说明用联合抗 B7 mAbs 或 CTLA4Ig 15 处理能导致特异性、持久性的低反应性或无反应性。

#### 结论:

20 联合使用人源化抗 B7 mAbs h1F1 和 3D1 能抑制初级 MLRs。这种抑制作用是特异的和持久的, 同时, 来自用联合抗 B7 mAbs 处理的初级 MLR 的效应器对没有抑制剂存在时次级 MLR 中同样的刺激物几乎没有应答。来自用联合抗 B7 mAbs 处理的初级 MLR 的效应器能对次级 MLR 中第三部分刺激物正常应答。联合的抗 B7 mAbs 在抑制初级应答和次级应答方面与 CTLA4Ig 一样有效。单个的抗 B7 mAbs 在抑制初级 MLR

方面效果甚微，而用单个的抗 B7 mAbs 处理并不会导致次级 MLR 中出现无应变性。

5 实施例 18: 在非人灵长类中抗 B7 mAbs 对免疫应答的抑制作用；抗破伤风应答的抑制作用

摘要:

抗 B7 mAbs 抑制初级抗体应答和次级（回忆）抗体应答的能力是在非人灵长类破伤风免疫模型中检测的。在第 0 天和 6 个星期后的第 42 天用破伤风类毒素分别免疫四个同龄组 cynomolgus 猴 (n=3)。对抗破伤风效价每周评估一次。第 0 天用单一 10mg/kg 剂量联合的人抗 B7-1 抗体 (h1F1) 和人抗 B7-2 抗体 (h3D1) 投药的治疗组中，抗破伤风抗体应答显著受到抑制，其中，在免疫 6 周内 6 只治疗动物中有 0 只产生出显著效价。此外，在用联合抗体第 0 天治疗过的动物中，不论第 42 天是否接受盐水或另一剂量的 h1F1 和 h3D1，对第 42 天破伤风抗原的攻击都没有产生应答。第 0 天接受盐水和仅在 42 天接受 h1F1 和 h3D1 的动物中，对破伤风二次抗体应答的平均效价比盐水对照同龄组中观察到的平均效价要低。所有用 h1F1 和 h3D1 治疗的同龄组动物，在最后一次剂量 112 天之后，h1F1 和 h3D1 血清水平低于检测极限时用第三剂量破伤风抗原进行二次免疫。在这一时间点处，动物通过产生抗破伤风抗体应答的动力学与初级抗体应答或次级抗体应答相近。这些资料表明，通过用抗 B7-1 抗体和抗 B7-2 抗体封闭 B7-1 和 B7-2 的方法对共同刺激的抑制作用，既能明显抑制对破伤风的初次抗体应答，又能减轻二次抗体应答。此外，这些结果显示能恢复免疫抑制，表明在该研究中不能获得对破伤风的长期耐受性。

25

材料与方法:

待测物品和对照物品:

抗 B7-1 (h1F1):

用慢速静脉灌注的方法给非人灵长类投药抗 B7-1 抗体。研究中，每个治疗组种的每个动物于第 0 天和/或第 42 天接受 10mg/kg 的抗 B7-1 抗体。

30

抗 B7-2 (h3D1):

用慢速静脉灌注的方法给非人灵长类投药抗 B7-2 抗体。研究中，每个治疗组种的每个动物于第 0 天和/或第 42 天接受 10mg/kg 的抗 B7-2 抗体。

5

盐水对照组:

用慢速静脉灌注的方法给非人灵长类投药盐水 (9% 注射用 NaCl)。研究中，盐水对照组和 B 组及 C 组的每个动物于第 0 天和/或第 42 天接受 15ml 盐水。

10

纯化的破伤风类毒素抗原:

于第 0 天投药破伤风类毒素抗原 (University of Massachusetts Medical Center, Biologic Laboratories)。在投药盐水或抗体 90 分钟之后，通过肌肉注射 10 限制量絮状沉淀单位 (LfU) 并通过皮内 (ID) 注射 1Lf 单位去免疫所有动物。第 42 天，在投药盐水或抗体 90 分钟之后，用肌肉注射 10Lf 单位去免疫所有动物。于第 84 天，通过皮内 (ID) 注射 1Lf 单位去注射所有动物，以检测破伤风特异的迟发型超敏反应 (DTH)。在上一次剂量 (第二次免疫) 112 天之后，通过肌肉注射 10Lf 单位第三次免疫治疗组 B、C 和治疗组 D 中的动物。

20

实验设计:

将首次用于破伤风实验的 12 只 4-6kg 的雄性 *Cynomolgus* 猕猴 (*Macaca fascicularis*) 分成四个实验组，每组 3 只动物:

25 A 组; 于第 0 天和第 42 天通过肌肉注射方法用 10Lf 单位 (絮状沉淀单位) 使之免疫 (对照)。

B 组; 于第 0 天肌肉注射 10Lf 单位破伤风类毒素至少 90 分钟之前，通过静脉注射方式接受人源化抗 B7-1 (1F1) 和人源化抗 B7-2 (3D1) 各 10mg/kg; 于第 42 天和第 112 天仅用破伤风类毒素免疫 (不用 mAb 预治疗) (用初次免疫对共同刺激进行封闭)。

30

C 组; 于第 0 天接受仅用破伤风类毒素的免疫 (不用 mAb 预治疗);

于第 42 天和第 154 天肌肉注射 10Lf 单位破伤风类毒素至少 90 分钟之前, 通过静脉注射方式接受人源化抗 B7-1 和人源化抗 B7-2 各 10mg/kg (通过二次免疫进行共刺激封闭)。

- 5 D组; 于第 0 天肌肉注射 10Lf 单位破伤风类毒素至少 90 分钟之前, 通过静脉注射方式接受人源化抗 B7-1(1F1)和人源化抗 B7-2(3D1) 各 10mg/kg; 于第 42 天肌肉注射 10Lf 单位破伤风类毒素至少 90 分钟之前, 通过静脉注射方式接受人源化抗 B7-1 和人源化抗 B7-2 各 10mg/kg, 并于第 154 天接受一次仅用破伤风类毒素的免疫 (不用 mAb 预治疗) (用初次免疫和二次免疫对共同刺激进行封闭)。
- 10

所有分组都于第 0 天和第 42 天接受破伤风免疫。B、C、D 组在给药抗 B7 后的第 112 天接受第三次免疫 (表 8)。

15 表 8. 治疗组

分组 N=3/组	第 0 天 1° 破 伤风免疫	第 42 天 2° 破 伤风免疫	3° 破伤风免 疫
A 盐水对照	盐水	盐水	无
B 1° 免疫后投 药抗 B7	静 脉 注 射 10mg/kg 大剂 量抗 B7-1/B7- 2	盐水	第 112 天
C 2° 免疫后投 药抗 B7	盐水	静 脉 注 射 10mg/kg 大剂 量抗 B7-1/B7- 2	第 154 天
D 1° 和 2° 免疫 后投药抗 B7	静 脉 注 射 10mg/kg 大剂 量抗 B7-1/B7- 2	静 脉 注 射 10mg/kg 大剂 量抗 B7-1/B7- 2	第 154 天

所有分组于第 0 天和第 42 天都要接受破伤风免疫。B、C 和 D 组在给药抗 B7 后的第 112 天接受第三次免疫。

#### 5 抗破伤风抗体的 ELISA:

在 96 孔 ELISA 板上覆盖  $4\mu\text{g/ml}$  的破伤风类毒素。对血清样品进行 4-log 滴定研究，开始用 1: 100。用联合的单克隆抗人 IgG 和多克隆羊抗猕猴 IgM HRP-偶联的抗体一起检测与破伤风结合的 Ab，随后用底物 TNB 显色。

10

#### 结果与讨论:

图 22 中表示在用破伤风类毒素免疫和用联合的 B7-1 和 B7-2 mAbs 一起治疗的猴中抗破伤风 IgM+IgG 应答情况。

通过静脉注射的方法给 cynomolgus 猴投药盐水或 10mg/kg 抗 B7-1 抗体 (h1F1) 和 10mg/kg 抗 B7-2 抗体 (h3D1) 的混合物。在注射抗体或盐水 90 分钟后，用 10Lf 单位的纯化破伤风类毒素通过肌肉注射方法和 1Lf 单位的破伤风类毒素通过皮内注射方法免疫每只动物。每周测定一次抗破伤风抗体的效价。盐水对照组中，抗破伤风抗体的效价对数平均值在第 14 天时升高至基线之上，第 49 天达到峰值，随后整个研究过程中都能保持在基线之上 (图 22)。在第 0 天接受 h1F1 和 h3D1 混合物的分组 (B 组和 D 组) 中，6 只治疗动物中有 0 只动物在第 42 天具有明显抗破伤风抗体效价。B 组动物中，一旦于第 42 天用破伤风类毒素重新攻击，不管是否接受附加抗 B7 抗体，对破伤风的抗体应答均不能上升到显著水平 (图 22)。血清学分析显示血清中高水平 h1F1 和 h3D1 (平均血清浓度  $>10\text{ mg/ml}$ ) 仍能保持到第 42 天。D 组动物用破伤风类毒素二次免疫之前，第 42 天再接受灌注的 h1F1 和 h3D1 混合物。该组中的所有 3 只动物的抗破伤风效价在整个研究过程中都保持在可检测极限之下。仅于第 0 天接受盐水和第 42 天接受 h1F1 和 h3D1 的 C 组动物，与盐水对照组 (A 组) 的初级抗破伤风抗体应答相近。然而，C 组二次应答中观察到的平均抗体效价，比 A 组二次应答中观察到的平均抗体效价要低 (图 22)。

25  
30

h1F1 和 h3D1 的血清浓度在整个研究过程中都受到监控，当血清浓

度在可检测极限之下时用破伤风类毒素对 B、C 和 D 组进行第三次免疫。每组动物在上一次灌注抗 B7 抗体 112 天后进行再次免疫，且不再接受抗 B7 抗体治疗。看起来，在该时间点时所有分组中的动物应答产生的抗破伤风抗体的动力学与二次抗体应答相近。

5

结论:

这些资料显示，通过用抗 B7-1 抗体和抗 B7-2 抗体封闭 B7-1 和 B7-2 对共刺激的抑制作用，既能够显著抑制对破伤风的初次抗体应答，也能够降低二次抗体应答。此外，这些结果还显示了对免疫抑制的恢复，这表明在本研究中不能获得对破伤风的长期耐受性。

因此，在投药抗 B7 抗体的同时并接触一种新的抗原（破伤风免疫），就能对产生新的抗体应答有预防作用，并能减轻对同一抗原二次应答的强度。由于许多疾病状态的恶化都是由这些抗体的产生造成的，因此用混合的抗 B7 mAbs 就能预防这些抗体的产生。其中一种疾病状态是在血友病病人中对投药的因子 VIII 或因子 IX 产生出抑制物抗体，因此就降低了这些救命化合物的有效性。用抗 B7 mAbs 治疗血友病病人能预防或降低抑制物抗体的形成。

实施例 19: 破伤风类毒素攻击的 cynomolgus 猴模型中，抗 B7-1 (h1F1) 和抗 B7-2 (h3D1) 以混合或单独形式分别以 0.01、0.1、1 或 10mg/kg 剂量投药时的药物动力学

摘要:

在 cynomolgus 猴免疫模型中，对各种剂量的单独抗 B7-1 抗体或抗 B7-2 抗体、或混合的抗 B7-1 抗体或抗 B7-2 抗体抑制对破伤风初级应答和二次（回忆）应答的能力进行了检测。分别给 cynomolgus 猴（总 n=33）投药单一静脉剂量 10、1、0.1 或 0.01mg/kg h1F1 和 h3D1 的混合物，仅投药 10、1 或 0.1mg/kg 的 h1F1 或 h3D1，或投药载体对照。所有动物在投药 h1F1 和 3D1 一个小时后，均用纯化的破伤风类毒素进行免疫。为了检测出动物们是否恢复了正常免疫功能，当 h1F1 和 3D1 的水平降至可检测水平之下时，于第 14 周用破伤风类毒素再一次免疫动物。

在用单一静脉剂量的 10 或 1mg/kg h1F1 和 3D1 的混合物投药后，观察到对初次抗破伤风抗体应答的完全抑制，而 0.1mg/kg 的剂量仅仅导致不完全抑制。在抑制抗破伤风抗体应答方面，仅用 h1F1 治疗或仅用 h3D1 治疗都不如用同等量 h1F1 和 h3D1 的混合物治疗来得有效。在 h1F1 和 h3D1 浓度跌至检测极限 (<50ng/ml) 之下后用破伤风类毒素进行二次免疫，所有分组中所有的动物都产生出高的抗破伤风抗体效价。这表明，暂停用 h1F1 和 3D1 治疗正常免疫功能得到恢复，本研究中没有获得对破伤风的长期耐受性。

10 材料与方法:

根据表 9, 于第 0 天给动物投以单一静脉注射剂量的待测或对照(载体)物品。用注射泵装置以 0.1ml/min/kg (最大给药速度为 1ml/min/kg) 通过外周静脉灌注待测或对照物品。于第 0 天 t=1 小时, 所有动物通过肌肉注射接受 10Lf 单位 (絮凝极限) 的纯化破伤风类毒素 (Maccachusetts Biologic Laboratories, Umass, Jamaica Plain, MA) 并通过皮内注射接受 10Lf 单位的纯化破伤风类毒素。于 t=14 周时, 所有动物通过肌肉注射接受 10Lf 单位的纯化破伤风类毒素并通过皮内注射接受 10Lf 单位的纯化破伤风类毒素以进行第二次免疫。给药后, 在长达 3024 个小时 (126 天) 的特定时间点用静脉穿刺的方法收集血样。用 ELISA 测定法检测抗破伤风抗体 (IgM 和 IgG) 的血清水平。

表 9 分组及其剂量水平

分组	动物只数	抗体剂量水平 (mg/kg)	投以的待测物
1	3	0	载体
2	3	10	h1F1
3	3	1	h1F1
4	3	0.1	h1F1
5	3	10	h3D1
6	3	1	h3D1
7	3	0.1	h3D1

8	3	10 <sup>a</sup>	h1F1 和 h3D1
9	3	1 <sup>a</sup>	h1F1 和 h3D1
10	3	0.1 <sup>a</sup>	h1F1 和 h3D1
11	3	0.01 <sup>a</sup>	h1F1 和 h3D1

抗破伤风抗体的形成:

5 免疫后 14 天所有用载体治疗的动物都开始产生出可检测的抗破伤风抗体效价 (表 10, 图 23、24 和图 25)。在 14 周的观察期内, 用两种最高剂量 (10mg/kg 或 1mg/kg) 的混合 h1F1 和 h3D1 能够完全抑制所有动物中可检测抗体效价的形成。在用 0.1mg/kg 治疗的动物中, 观察到抗体应答的部分抑制, 三只动物中的一只动物产生出可检测的抗体效价。所有用 0.01mg/kg 的 h1F1 和 h3D1 的混合物治疗的动物都产生出可检测的抗体效价; 然而, 当这样的效价与载体对照组中观察的效价相比时其在数值上要低些, 表明对抗体应答有一定的抑制作用。

10

表 10 在用 h1F1 和 h3D1 治疗的过程中  
用破伤风类毒素进行初次攻击后  
产生出可检测抗破伤风抗体的 cynomolgus 猴的数目

分组	治疗	产生可检测抗破伤风抗体效价动物的数目
1	载体对照	3
2	10mg/kg h1F1	1
3	1mg/kg h1F1	3
4	0.1mg/kg h1F1	2
5	10mg/kg h3D1	1
6	1mg/kg h3D1	1
7	0.1mg/kg h3D1	3
8	10mg/kg h1F1 和 h3D1	0
9	1mg/kg h1F1 和 h3D1	0
10	0.1mg/kg h1F1 和 h3D1	1

11	0.01mg/kg h1F1 和 h3D1	3
----	--------------------------	---

综合考虑 0.1、1 和 10mg/kg 剂量组，单用 h1F1（图 24）或 h3D1（图 25）治疗都不如用 h1F1 和 h3D1 混合物有效（图 23）。单用 h1F1 治疗（第 2、3 和 4 组）使 6/9（66%）的动物产生出可检测抗破伤风抗体应答。单用 h3D1 治疗（第 5、6 和 7 组）使 5/9（55%）的动物产生出可检测的抗体，而用混合的 h1F1 和 h3D1 治疗（第 8、9 和 10 组）后仅仅有 1/9（11%）的动物有可检测的抗体。第 11 组并不包括在这些比较之中，因为 h1F1 和 h3D1 并不是分别以 0.01mg/kg 的剂量单独投药的。

在 1 和 10mg/kg 剂量下，在用混合的 h1F1 和 h3D1 治疗的动物中没有一只动物产生出抗破伤风抗体应答；而在这两种剂量情况下，在单用 h1F1 或 h3D1 治疗的动物中却产生出可检测的抗体。当用 0.1mg/kg 剂量治疗动物时，所有三个治疗组的动物都产生出可检测的抗破伤风抗体；然而，混合物治疗组中的出现率（1/3）比单用 h1F1（2/3）或 h3D1（3/3）的治疗组中的出现率低。

图 26 显示出各个治疗组抗破伤风抗体效价曲线下部的面积（AUC）。这些 AUC 值是用图 23、24 和图 25 中所示抗体效价曲线计算出来的。从低 0 周到 14 周计算 AUC 值。为了解释各组中对应动物的数目，通过各组能产生可检测抗体效价动物数目的分数来加权这些 AUC 值。这些图表显示出在 14 周观察期的整个过程中抗体效价的累积量或抗体应答的强度。用 10mg/kg 或 1mg/kg 的 h1F1 和 h3D1 混合物治疗的动物相对于对照组显示出对抗体应答 100% 的抑制作用（AUC=0）。相对于对照组来说，用 0.1 或 0.01mg/kg 的 h1F1 和 h3D1 混合物治疗（第 10 组和第 11 组）分别抑制抗体应答 78% 或 86%（AUC=402 或 253 Log 效价·hr）。相对于对照组来说，在单用 h1F1 或 h3D1 治疗（第 2-7 组）的动物中抗体应答被抑制在 8.6% 到 99% 之间（AUC=1640 或 5.04 Log 效价·hr）。这些资料表明在抑制抗破伤风抗体应答方面，单用 h1F1 或 h3D1 治疗并不象用同等剂量 h1F1 和 h3D1 混合物治疗一样有效。

投药 h1F1 和 h3D1 14 周后用破伤风类毒素再次免疫后，所有分组中所有动物都产生出高抗破伤风抗体效价（>3 log 效价），表明在暂停

用 h1F1 和 h3D1 治疗后恢复了正常的免疫功能，而且在本研究中对破伤风没有获得长期的耐受性。用 10mg/kg 的 h1F1 和 h3D1 混合物治疗的动物，在免疫后 14 天产生出有可检测抗体效价的延迟型抗体应答，与初次抗体应答相似，这表明对第一次免疫的应答已被完全阻断。所有其它动物免疫 7 天后都显示出升高的抗体效价，这与记忆应答相似而不是与初次应答相似。

#### 结论:

在单一静脉注射剂量的 10 或 1mg/kg 的 h1F1 和 h3D1 混合物治疗后，观察到初次抗破伤风抗体应答的完全抑制，而 0.1mg/kg 的剂量仅仅导致部分抑制。在抑制抗破伤风抗体应答方面，单用 h1F1 或 h3D1 治疗并不象用同等剂量 h1F1 和 h3D1 混合物治疗一样有效。在 h1F1 和 h3D1 浓度跌至可检测极限之下后用破伤风类毒素进行二次免疫，所有分组中的所有动物都产生出高抗破伤风抗体效价。这表明在暂停用 h1F1 和 h3D1 治疗后恢复了正常的免疫功能。

#### 实施例 20: 非人灵长类中抗 B7 抗体的血清半衰期。

在非人灵长类中检测鼠抗 hB7-1 和鼠抗 B7-2 mAbs 的血清半衰期和靶细胞饱和作用。给 3 只 cynomolgus 猴投药抗 hB7-1 和抗 B7-2 mAbs 混合物，对于每种抗体的剂量是 2、8、或 20mg/kg 体重。分析这些猴中抗体与 PBMC (增生性血单核细胞) 的结合情况、血清 mAb 浓度以及灵长类抗鼠抗体 (PAMA) 应答 (表 11)。用流式细胞仪 (FACS) 检测 PBMC 饱和作用，其中，从 mAb 给药的灵长类的血液中分离的 PBMC 用羊抗鼠 Ig-PE (活体内%) 显色，或者是 PBMC 先与抗 hB7-1 和抗 B7-2 mAbs 反应，随后再用羊抗鼠 Ig-PE (来自活体%) 检测。于多个时间点用 (活体内%/来自活体%)  $\times 100$  计算出 PBMC 的饱和水平。研究表明，抗 hB7-1 和抗 B7-2 mAbs 的 PBMC 饱和作用分别在 4-6 天 (mAbs @ 2mg/kg)、6-8 天 (mAbs @ 8mg/kg) 和 13-20 天 (mAbs @ 20mg/kg) 之间降至 80% 以下，取决于 mAb 的剂量。循环 B7<sup>+</sup>细胞的数目并没有明显的降低，虽然并不曾进行直接测定。

采用特异的 ELISA 检测抗 hB7-1 和抗 hB7-2 mAbs 的血清半衰期，对于每一种 mAb 用 hB7-1Ig 或 hB7-2Ig 作为靶而用羊抗鼠 Ig HRP/ABTS

检测。这些分析法对于抗 hB7-1 和抗 hB7-2 的灵敏性分别是 400ng/ml 和 200mg/ml。使用市售试剂盒检测 PAMA 应答。两种抗 hB7 mAbs 的血清浓度和 PAMA 应答分别以单用每种抗体水平的方式显示。在所有三种剂量水平进行测定时，两种抗体在大约 48 小时内展示的血清半衰期相当。在所有的剂量和待测时间，通过可比较因素发现，升高抗体剂量能提高血清抗体浓度。当剂量为 20mg/kg 时，发现在给药后的第 6 天每种抗体都有 >30 μg/ml 的循环抗体水平。

对抗 hB7-1 和抗 hB7-2 mAbs 的 PAMA 应答低下，在血清抗体水平下降到 10 μg/ml 以下后的第 10 天才开始变得可以测量。

10 对用 10mg/kg 的人源化抗 B7-2 抗体进行一次性给药的 Cynomolgus 猴 (n=6)，检测其人源化抗人 B7-2 和 B7-1 抗体的血清半衰期。通过特异的 ELISA 用 HRP-抗人 IgG2 和 ABTS 检测每种抗体的血清浓度。

图 27 显示出 Cynomolgus 猴中在给药后自始至终的 42 天过程中人源化抗 B7-2 mAbs 和人源化抗 B7-1 mAbs 的血清浓度。

15 Cynomolgus 猴中，人源化抗 B7-2 和人源化抗 B7-1 mAbs 的血清半衰期，与投以相同剂量的鼠抗人 B7-2 和鼠抗人 B7-1 mAbs 大约两天后的值相比，前者更为延长些。这说明人源化抗人 B7 mAbs 在循环中滞留的时间比鼠抗 B7 抗体的滞留时间要长。

20 表 11. 灵长类临床前研究结果

时间	剂量 @ 2mg 各 mAb/kg			剂量 @ 8mg 各 mAb/kg			剂量 @ 20mg 各 mAb/kg		
	抗 hB7-2	PAMA	PBL 饱和	抗 hB7-2	PAMA	PBL 饱和	抗 hB7-2	PAMA	PBL 饱和
(天)	μg/ml	ng/ml	%	μg/ml	ng/ml	%	μg/ml	ng/ml	%
0	BQL	负值	0	BQL	负值	0	BQL	负值	0
0.167	61	NT		206	NT		580	NT	
0.5	59	NT	100	229	NT	25	570	NT	65
1	52	NT		227	NT		527	NT	
3	52	NT	100	230	NT	100	548	NT	100
5	50	NT		139	NT		464	NT	
8	44	NT		169	NT		412	NT	

24 (1D)	26	NT	70	103	NT	100	286	NT	80
48 (2D)	15	NT	100	59	NT	100	196	NT	100
96 (4D)	2.4	NT	75	18	NT	100	83	NT	100
144 (6D)	BQL	NT	95	3.9	NT	100	32	NT	100
192 (8D)	BQL	NT	65	BQL	NT	100	13	NT	100
240 (10D)	BQL	NT		BQL	NT		3.9	NT	
312 (13D)	BQL	负值	5	BQL	负值	55	BQL	负值	80
480 (20D)		2908	10		4080	10		517	20
684 (27D)		1260			1460			1094	
816 (34D)									

BQL=低于可测定极限; NT=未测定

实施例 21. 超抗原 (中毒性休克综合症毒素-1; TSST-1) 对特异 T 细胞应答的抑制作用

- 5 通过投药  $10^8$  个人 PBLs 使人淋巴细胞“居住”在糖尿病小鼠 (NODscid mouse) 中。28 天后, 在有或没有用人 B7-1 抗体和人 B7-2 抗体的混合物治疗的情况下 (500mg; 静脉注射) 用 TSST-1 治疗 (10mg, 腹膜内注射)。再过 14 天后, 用对人 CD45、CD4 和人 V $\beta$  2-TCR 特异的抗体通过 FACS 对腹膜腔内人淋巴细胞、T 细胞和 TSST-1 特异的 T 细胞 (V $\beta$  2-TCR 细胞) 的存在与否进行测定。
- 10

表 12

加入物		人 T 细胞 (%)	
TSST-1	抗-B7-1+抗 B7-2	合计	Vβ 2 <sup>+</sup>
-	-	10.2	3.9
+	-	27.4	12.0
+	+	23.4	3.8

5 结果:

表 12 显示出 hu-NODscid 小鼠腹腔内所有的人 T 细胞的比例以及 V<sub>β</sub> 2<sup>+</sup>-TCRT 细胞 (TSST-1 特异的) 的比例。用 TSST-1 治疗极大地提高了 huNOD-scid 小鼠中人 T 细胞和 TSST-1 特异的人 T 细胞 (V<sub>β</sub> 2<sup>+</sup>) 的百分比。用抗人 B7-1 抗体和抗人 B7-2 抗体治疗适度地减弱了所有的人 T 细胞应答, 并完全抑制了 TSST-1 特异的人 T 细胞的扩展。这表  
10 明抗人 B7 抗体能有效抑制人 T 细胞超抗原介导的应答。

实施例 22: 对抗 B7 抗体 h1F1(抗 B7-1)和 h3D1(抗 b7-2)在 Cynomolgus 猴生命保障肾移植模型中作用的评估

15

摘要:

本研究的目的是对单克隆抗体 h1F1 (抗 B7-1) 和 3D1 (抗 B7-2) 在 Cynomolgus 猴生命保障肾移植模型中的作用兼容性进行评估。当这些抗体以单一治疗的方式给药以及与常规免疫抑制剂如环孢菌素 A (CsA)、纳巴霉素和类固醇一起给药时评估这些抗体的作用和兼容性。  
20

24 只雄性 Cynomolgus 猴接受了血型兼容的、混合淋巴细胞反应 (MLR) 失谐的肾异源移植。在 6 个治疗组中对受体连续进行研究, 包括实施后 (poDay) 前 56 天混合使用免疫抑制剂之后, 没有其它附加治疗的情况下再接着研究后面的 65-66 天 (连续期最长总计 119-120  
25 天):

- 1组根据 A 程序接受混合抗 B7 抗体: h1F1 20mg/kg+h3D1 20mg/kg 预处理, 然后用 h1F1 5mg/kg+h3D1 5mg/kg 进行后治疗, h1F1 5mg/kg+h3D1 5mg/kg 每 7 天重复一次, 直到 poDay 56 为止; 给药 9 次.

5

- 2组根据 B 程序接受混合抗 B7 抗体: h1F1 5mg/kg+h3D1 5mg/kg 预处理, 随后立即用 h1F1 10mg/kg+h3D1 10mg/kg 进行后治疗, 在 poDay3 时再进行一次后治疗, 然后从 poDay 7 开始以一周为间隔每种抗体进行 8 次连续 5mg/kg 剂量的治疗, 到 poDay 56 时结束.

10

- 3组根据 A 程序+微乳环孢菌素 CsA 接受混合抗 B7 抗体, 剂量设计为: 使得从 poDay 0 到 poDay 14 达到 24-小时波谷水平浓度 200-300ng/ml, 然后从 poDay 15 到 poDay 56 的最后一次剂量减少剂量以达到 24-小时 CsA 波谷水平 150-250ng/ml.

15

- 4组根据 A 程序并加上渐减的类固醇剂量接受混合抗 B7 抗体(h1F1 和 h3D1): 甲基强的松龙 2mg/kg 静脉注射进行后治疗, 然后在 poDay 2 时每日一次, 随后强的松 0.5mg/kg 以每三天减少 0.05mg/kg 的方式直到达到 0.2mg/kg, 0.2mg/kg 一直持续到 poDay 56.

20

- 5组根据 A 程序并加上纳巴霉素接受混合抗 B7 抗体 (h1F1 和 h3D1): 纳巴霉素 1mg/kg 后治疗, 到 poDay 13 的过程中每天接受一次, 随后以每天一次 0.5mg/kg 的剂量一直持续到 poDay 56.

25

- 6组接受微乳状 CsA, 剂量设计为: 使得从 poDay 0 到 poDay 14 达到 24-小时波谷水平浓度 200-300ng/ml, 然后从 poDay 15 到 poDay 56 的最后一次剂量减少剂量以达到 24-小时 CsA 波谷水平 150-250ng/ml.

30

- 7组从 poDay 0 到 poDay 13 接受 1mg/kg 的纳巴霉素, 然后从 poDay 14 一直到 poDay56 为止以 0.5mg/kg 的剂量给药.

如果动物中肌酸酐水平上升到 8.0mg/dl 以上，就使动物在 poDay120 之前安乐死。肌酸酐水平上升到 8.0mg/dl 以上是终极肾排斥的证明。

5 表 13 中列出了移植、治疗过的 cynomolgus 猴的存活情况。

表 13. 移植、治疗过的 cynomolgus 猴的存活及其诊断

治疗组	治疗程序 抗 B7-1+抗 B7-2/其 它疗法	存活情况 (poDay) *
历史对照	无	10
1	程序 A/无	9, 48, 119, 119
2	程序 B/无	12, 14, 18, 120
3	程序 A/CsA	96, 119, 119, 119
4	程序 A/类固醇	6, 77, 111, 119
5	程序 A/纳巴霉素	69, 73, 81, 114
6	无 mAbs/CsA	22, 25, 38, 71
7	无 mAbs/纳巴霉素	11, 18, 27, 35

\*每种研究方案中，宰杀存活 119/120 天的肾脏受体。

10

该项研究的结果表明非人灵长类肾同种异体移植受体用 B7-1 和 B7-2 单克隆抗体的混合物治疗，能导致长期的移植存活。在 50%的分组 1 动物中治疗终止后直到 66 天仍能观察到移植存活。与此形成对照的是，根据程序 B 在 1 组中用抗体给药，并不能充分克服所治疗动物中 3/4 动物的早期急性排斥事件，该组中只有一只动物存活了 120 天。联合用程序 A 和微乳 CsA 治疗能够使所有动物长期存活，并且没有迹象证明 CsA 对前面说明的抗体效能有拮抗免疫抑制效应。4 组中，用高剂量类固醇和抗体共投药时并不能拮抗该非人灵长类模型中对抗体的免疫抑制效应。5 组中，用纳巴霉素和抗体共投药时并不能拮抗该非人灵长类模型中对抗体的免疫抑制效应。6 组中仅用 CsA 治疗导致多个肾脏受体发生早期排斥。该治疗组所得结果比从仅用抗 B7 抗体治疗 (1

20

组)或用混合抗体+CsA 治疗(4组)的动物中所得结果要差。7组中仅用纳巴霉素治疗导致所有肾脏受体发生早期排斥。该治疗组所得结果比从仅用抗 B7 抗体治疗(1组)或用混合抗体+纳巴霉素治疗(5组)的动物中所得结果要差。

5 因此,单克隆抗体 h1F1 和 h3D1 在避免非人灵长类生命保障肾移植模型中的早期终极排斥方面是有效的。抗体可以与其它免疫抑制剂相容,而且通过与微乳状 CsA、纳巴霉素或类固醇混合使用它们的作用似乎增强了。

10 下面的研究分成两个阶段进行。第一个阶段的目的是,确定新的免疫抑制抗体 h1F1 和 h3D1 在作为对生命保障模型中接受肾移植的 cynomolgus 猴的单一治疗时的作用。移植动物在没有同时进行免疫抑制治疗时,将在移植的 10 天之内排斥移植物。该项研究计划检验两种不同的抗体疗法程序。两种程序中 poDay 56 之后都要停止用抗体治疗,直到出现移植排斥时或直到第 119-120 天时再接着进行。

15 该研究的第二阶段计划检测的内容是: a)当 h1F1 和 h3D1 与 CsA、纳巴霉素或类固醇一起给药时, h1F1 和 h3D1 是否拮抗 CsA、纳巴霉素或类固醇的免疫抑制效应,从而导致缩短的移植存活;或者 b)在用 CsA、纳巴霉素或类固醇和抗体同时治疗(从 poDay 0 到 poDay 56)的过程中或紧接着所有免疫抑制治疗都终止之后(>poDay 56), CsA、纳巴霉  
20 素或类固醇是否拮抗 h1F1 和 h3D1 的免疫抑制效能。

材料与方法:

动物:

25 本研究中用的动物是体重在 5 到 8kg 之间的雄性 cynomolgus 猴, *Macaca fascicularis*。这些动物经过血型定型。供体猴和受体猴配对的基础是, ABO 血型匹配、负交互匹配以及在二向 MLR 中刺激指数至少为 2.5。

待测物品和对照物品:

30 h1F1 和 h3D1:

抗 B7 抗体是用与注射泵相连结的注射器投药的。h1F1 和 h3D1 总是同时一块混合给药,通过外周静脉导管的最大灌注速度为

1mg/kg/min.

抗体的投药根据的是每组确定好的不同方案进行的。

微乳状 CsA (Neoral):

5 微乳状 CsA (Neoral; 100mg/ml (Novartis)) 于室温下保存, 避免光照。将在所需剂量 (以 mg/kg 计) 基础上计算出的 Neoral 的体积直接抽吸到最小的合适注射器中, 给药时不进行任何稀释直接通过鼻胃管进入胃中。

甲基强的松龙和强的松:

10 甲基强的松龙 (Solu-Medrol, Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI) 以瓶装的方式供货, 所带的无菌水用于重建, 重建时按照厂家说明进行。重建后药物要冷冻保存, 重建 48 小时之后应该丢弃。

15 强的松 (Mutual Pharmaceutical Co., Inc., Philadelphia, PA) 以片剂的方式供货 (5mg)。片剂溶于无菌水中, 每一片片剂用 5ml 水溶解, 溶液终浓度为 1mg/ml。每天给药结束后要将剩余的药物丢弃掉。

实验设计:

在生命保障模型中总共有 24 只猴子接受了单侧肾移植。

20

1 组: h1F1 和 h3D1 单一治疗 (程序 A):

1 组根据程序 A 接受混合抗 B7-1 抗体+抗 B7-2 抗体的单一治疗: h1F1 20mg/kg+h3D1 20mg/kg 进行预治疗, 然后是 h1F1 5mg/kg+h3D1 5mg/kg 进行后治疗, h1F1 5mg/kg+h3D1 5mg/kg 每 7 天重复一次直到  
25 poDay 56.

2 组: h1F1 和 h3D1 单一治疗 (程序 B):

程序 A 与程序 B 之间的主要区别是, 在程序 B 中将首次预治疗剂量从 20mg/kg 减少到 5mg/kg, 随后的后治疗剂量从 5mg/kg 提高到 10mg/kg, 在 poDay 3 附加 10mg/kg 的剂量。剩余的后治疗剂量程序与  
30 程序 A 相同。因此, 对于每只动物, 无论是程序 A 还是程序 B, 在整个后治疗过程中所给抗体的总量是相同的。

3 组: h1F1 和 h3D1 (程序 A) +CsA:

在 3 组中, 伴随着抗体治疗(程序 A)的是每日口服一次微乳状 CsA. 3 组根据程序 A+微乳状 CsA 接受抗体, 计划的剂量是从 poDay 0 到 poDay 14 达到 24-小时波谷水平浓度 200-300ng/ml, 随后从 poDay 15 到 poDay 56 的最后一次用药以减少的剂量方式达到 24-小时波谷水平 150-250ng/ml.

在通过管饲法短时间酮亚胺镇静后, 用管饲法每日投药一次微乳状 CsA. 对 CsA 的 24-小时波谷水平每周检测三次, 调整每日剂量以适应目标 CsA 波谷水平. 为预防体重过度丢失或当认为肾功能损伤与 CsA 波谷水平有关时, 改变附加的 CsA 剂量.

4 组: h1F1 和 h3D1 (程序 A) +类固醇:

4 组根据 A 程序并加上渐减剂量的类固醇接受 h1F1 和 h3D1: 甲基强的松龙 2mg/kg 静脉注射进行后治疗, 然后在 poDay 2 时每周一次, 随后强的松 0.5mg/kg 以每三天减少 0.05mg/kg 的方式直到达到 0.2mg/kg, 0.2mg/kg 一直持续到 poDay 56.

动物在后治疗的前 3 天 (poDay 0 一直到 poDay 2) 接受以 2mg/kg 剂量静脉大量给药的方式的投药. 从 poDay 3 到 poDay 56, 通过管饲法以渐减程序 (参照图 4) 给酮亚胺镇静的动物投药强的松, 开始时剂量为 0.5mg/kg, 结束时的剂量为 0.2mg/kg.

5 组: h1F1 和 h3D1 (程序 A) +纳巴霉素:

5 组根据 A 程序并加上纳巴霉素投药 h1F1 和 h3D1: 纳巴霉素 1mg/kg 后治疗, 到 poDay 13 的过程中每天接受一次, 随后以每天一次 0.5mg/kg 的剂量一直持续到 poDay 56.

6 组: 仅用 CsA:

6 组接受微乳状 CsA, 剂量设计为: 使得从 poDay 0 到 poDay 14 达到 24-小时波谷水平浓度 200-300ng/ml, 然后从 poDay 15 到 poDay 56 的最后一次用药以减少的剂量达到 24-小时 CsA 波谷水平 150-250ng/ml.

在用管饲法进行短时间酮亚胺镇静之后, 用微乳状 CsA 每天投药一次. 对 CsA 的 24-小时波谷水平每周检测三次, 调整每日剂量以适应目标 CsA 波谷水平. 为预防体重过度丢失或当认为肾功能损伤与 CsA 波谷水平有关时, 改变附加的 CsA 剂量.

7 组: 纳巴霉素

在用管饲法进行短时间酮亚胺镇静之后，用纳巴霉素每天投药一次。7组从 poDay 0 到 poDay 13 接受 1mg/kg 的纳巴霉素，然后从 poDay 14 一直到 poDay 56 以 0.5mg/kg 的剂量给药。

## 5 结果与讨论:

历史对照组: 肾移植, 不经治疗

历史对照组的数据显示, 接受肾移植而不经治疗的 cynomolgus 猴到移植后 10 天为止, 无一例外地排斥移植的肾脏。

1 组: 根据程序 A 使用 h1F1 和 h3D1 的单一治疗:

10 根据程序 A 用混合的抗 B7-1+抗 B7-2 mAbs 治疗的 4 只动物中有 2 只动物将功能性同种异体移植一直保持到了研究结束 (120 天), 而另外 2 只在治疗过程中 (第 9 天和第 48 天) 排斥移植来的肾脏。根据程序 A 治疗的 4 个肾脏受体中有 3 个比历史对照保留移植肾脏的时间更长些, 显示出抗 B7 治疗在预防移植肾脏的排斥方面的作用。

15 2 组: 根据程序 B 使用 h1F1 和 h3D1 的单一治疗:

与 1 组不同的是, 在根据程序 B 用抗 B7 抗体治疗的 4 只动物中只有 1 只动物在 poDay 18 后还保留了功能性肾移植。但是, 该动物一直将功能性同种异体移植保持到了研究结束 (120 天)。这些数据表明, 根据程序 A 用抗 B7 mAbs 治疗比根据程序 B 治疗的动物在对肾脏排斥  
20 的免疫抑制方面更为有效。这样的结果可能是因为在根据程序 A 治疗的动物中在移植之后更为提前地出现了更高浓度的抗 B7 mAbs。

3 组: 根据程序 A+微乳状 CsA 用 h1F1 和 h3D1 治疗:

根据程序 A 用抗 B7 mAbs 并结合 CsA 治疗的所有动物都极大地延缓了移植肾脏的排斥, 4 只动物中有 3 只动物将功能性同种异体移植保  
25 持到了研究的结束 (poDay 119)。这些结果比仅用抗 B7 mAbs 治疗 (1 组) 或仅用 CsA 治疗 (6 组) 获得的结果要好, 证明在用抗 B7 mAbs 和用 CsA 治疗之间不存在拮抗作用, 而且用这些药剂共治疗对延迟器官排斥提供了额外的好处。

4 组: 根据程序 A+甲基强的松龙/强的松用 h1F1 和 h3D1 治疗:

30 在用复合的抗 B7 mAbs+类固醇治疗的 4 只动物中, 有 1 只动物将移植的肾脏一直保留到研究结束 (poDay 119)。剩下的 3 个肾脏受体, 其中的 2 只动物表现出对移植的肾脏有延迟的排斥作用。第三只猴子

因为输尿管坏死的缘故，所以过早地（poDay 6）排斥了移植而来的肾脏，输尿管的坏死可能与高剂量的类固醇有关。综合一下考虑，这些资料表明复合的抗 B7 mAbs+类固醇在预防移植肾脏的排斥方面是有效的，而且这些药剂的复合使用并不是禁忌的。

5 5组：根据程序 A+纳巴霉素用 h1F1 和 h3D1 治疗：

根据程序 A+纳巴霉素用 h1F1 和 h3D1 治疗的所有 4 只动物都将功能性肾同种异体移植保留到了超出治疗期，持续时间从 69-114poDay。这说明用复合的抗 B7 mAbs+纳巴霉素治疗在延迟器官排斥方面是有益的，而且对仅用抗 B7 mAbs 治疗没有拮抗作用。

10 6组：仅用 CsA 治疗：

所有仅用 CsA 治疗的 4 只动物都对移植来的肾脏产生了排斥，4 只动物中有 3 只在用 CsA 治疗的过程中就产生了排斥。这些结果比用复合的抗 B7 mAbs+CsA 治疗的动物获得的结果要差。

7组：仅用纳巴霉素治疗：

15 所有仅用纳巴霉素治疗的 4 只动物在治疗期就对移植的肾脏产生了排斥。

结论：

20 本研究的目的是评估新的单克隆抗体 h1F1 和 h3D1 在生命保障非人灵长类移植模型中的作用和相容性。通过评估终极急性排斥和最终同种异体移植（动物）存活的发生率对抗体的作用作出评定。所用模型中，预计未经治疗的动物中终极排斥作用发生在移植后的 10 天之内。在总计 7 个不同的治疗组中检测抗体的相容性和作用。在越是靠后的分组中治疗的结果成为研究的进展，是在前面分组结果基础上进行的。

25

效能评估：

1组：h1F1 和 h3D1 单一治疗（程序 A）：

30 第 1 个治疗组中的动物仅用 h1F1 和 h3D1 治疗，56 天时间内每周给药一次，不加入附加的免疫抑制药物进行治疗。结果显示用 h1F1 和 h3D1 单一治疗能预防该组 4 只动物中的 2 只发生终极急性排斥作用，并且另一只动物中终极排斥的发生一直延迟到 poDay 48。在其中一只猴子中，抗体的投药并不能比历史对照组中所见到的更能延长移植存

活。

## 2 组: h1F1 和 h3D1 单一治疗 (程序 B):

为了预防在 poDay 5 到 poDay 7 之间 1 组中所见到的早期急性排斥事件的发生, 2 组中抗体投药的方法和程序有了一些改动。该组中预  
5 治疗剂量从每种抗体 20mg/kg 减少到每种抗体 5mg/kg, 而首次后治疗  
剂量从每种抗体 5mg/kg 增加到每种抗体 10mg/kg。因此, 预处理投药  
时抗体的总量从 25mg/kg 减少到 15mg/kg。在 poDay 3 这一天给一次  
额外的剂量 10mg/kg。这样, 1 组和 2 组中投药程序完全相同。

4 只动物中的 3 只动物没有从首次排斥事件中恢复过来。只有一只  
10 动物存活过了整个随后的研究期。这说明了在预处理期和后治疗期过  
程中服抗体时间和剂量的关键性方面。预处理剂量的减少有可能导致  
更强有力的排斥应答, 而在 poDay 3 这一天给一次额外剂量的投药并  
没有影响到该结果。

在 1 组和 2 组中都有未经额外免疫抑制治疗却能长期存活的动物。

15 直接比较按照程序 A (1 组) 和程序 B (2 组) 的移植结果, 发现  
还是应该赞成程序 A。下面的两个分组根据程序 A 用复合抗体投药。

## 3 组: h1F1 和 h3D1 (程序 A) +CsA:

在 3 组中用微乳状 CsA 投药, 使用 CsA 的目的是提供 24-小时波谷  
水平 200-300mg/kg。该组中的所有动物都存活了很长时间 (>56 天),  
20 而且 4 只动物中有 3 只动物直到随后的研究期结束都没有产生终末急  
性排斥的迹象。因此, 抗 B7 抗体或 CsA 都没有对另外一个的作用有负  
面影响。该组中正中的存活期是 119 天, 而平均存活期是 113 天, 这  
和 1 组中的存活长度 (正中: 84 天; 平均: 74 天) 相比, 即使不比后  
者长的话, 至少应该一样的好。另外一个治疗组中受体仅用微乳状 CsA  
25 (6 组) 治疗, 其给药量是为了达到与 3 组相近的波谷水平 (治疗 56  
天), 该治疗组结果显示所有移植受体都排斥移植来的肾脏, 而且 4 只  
中有 3 只在治疗的整个过程中都有排斥。

组合使用单克隆抗体和微乳状 CsA 就能避免早期急性排斥事件的发生。

## 30 4 组: h1F1 和 h3D1 (程序 A) +类固醇:

4 组中组合的 h1F1 和 h3D1 是与渐减剂量的类固醇同时投药的。该  
模型中仅用类固醇的单一治疗通常并不能足以预防终极同种异体移植

排斥作用。该组中选择高剂量的类固醇是为了确定类固醇或抗体是否能彼此影响另外一个的效力。4 只用复合抗 B7 mAbs+类固醇治疗的动物中有 1 只动物一直将移植的肾脏保留到了研究的结束 (poDay 119)。剩下的三个肾脏受体中, 有两个表现出对移植肾脏的延缓排斥。第三只猴子因为输尿管坏死的缘故, 所以过早地 (poDay 6) 排斥了移植来的肾脏, 输尿管的坏死可能与高剂量的类固醇有关。

在该分组中, 好象共投药高剂量的类固醇对抗体的作用并没有任何负面影响。还不清楚的是, 抗体的投药对类固醇的免疫抑制作用是否有影响, 因为在非类人灵长类肾移植模型中还没有有关用类似的类固醇作单一治疗时的资料。

5 组: 根据程序 A+纳巴霉素用 h1F1 和 h3D1 治疗:

根据程序 A+纳巴霉素用 h1F1 和 h3D1 治疗的所有 4 只动物都将功能性肾同种异体移植保留到了超过治疗期, 持续时间从 69-114poDay。这说明用复合的抗 B7 mAbs+纳巴霉素治疗在延迟器官排斥方面是有益的, 而且对仅用抗 B7 mAbs 治疗没有拮抗作用。另外一个治疗组中受体仅用纳巴霉素治疗 (7 组), 其给药量是为了达到与 5 组相近的波谷水平, 该治疗组结果显示所有的 4 个移植受体在治疗期内都排斥移植来的肾脏。

6 组: 仅用 CsA 治疗:

所有仅用 CsA 治疗的 4 只动物都对移植来的肾脏产生了排斥, 4 只动物中有 3 只在用 CsA 治疗的过程中就产生了排斥。这些结果比用复合的抗 B7 mAbs+CsA 治疗的动物获得的结果要差。

7 组: 仅用纳巴霉素:

所有仅用纳巴霉素治疗的 4 只动物在治疗期就对移植的肾脏产生了排斥。这些结果比用复合的抗 B7 mAbs 和纳巴霉素治疗的动物获得的结果要差 (5 组)。

实施例 23: 用 B7-1 和 B7-2 的单克隆抗体诱导治疗能延缓非人灵长类中肾同种异体移植排斥作用的开始

摘要:

该项研究中, 对单用单克隆抗体抗 B7-1 (h1F1) 或抗 B7-2 (h3D1) 投药以及用二者组合投药时延缓猕猴急性肾同种异体移植排斥作用开

始的能力进行了检测。最持久的效果是由于同时阻断两个 B7 配体所致。作用机制中并不包括 T 细胞或 B 细胞的全面衰竭。

材料与amp;方法:

## 5 实验设计:

MHC 的定型和供体-受体选择:

供体-受体组合的选择基础是 II 类主要组织相容性复合体 (MHC) 遗传上的不相同性。这是通过进行变性梯度凝胶电泳分析并对主要组织相容性复合体抗原 HLA-DRB 的第二个外显子直接测序来确定的。用混合淋巴细胞反应 (MLR) 鉴定法于体外对所有供体-受体对中受体对供体的 T 细胞反应性进行核实。对每只动物都要检测, 看其是否是潜在的供体, 以确定出移植的最高效应器对。

肾的同种异体移植:

按照先前所述进行肾的同种异体移植 (Knechtle SJ, et al., Transplantation, 63: 1-6(1997); Kirk AD, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 94: 8789-8794(1997); Kirk AD, et al., Nature Medicine, 5: 686-693(1999) )。简言之, 从 LABS of Virginia, Inc. 公司 (Yemassee, SC) 获得杂交繁殖的幼年猕猴 (年龄从 18-36 个月, 雄性), 对猕猴免疫缺陷病毒和疱疹 B 病毒的血清反应是阴性。

所有步骤都是在总体麻醉的情况下进行的。肾的移植是在由 MHC 分析法鉴定的遗传上截然不同的供体-受体之间进行的。在器官收获和移植的过程中动物要用肝素治疗 (100 单位/kg)。在进行同种异体移植时, 使用标准微血管技术使供体肾动脉和受体末端主动脉接合, 并使供体肾静脉和受体大静脉接合。随后进行初级输尿管新腔膀胱手术。在关闭之前完成两侧天然肾的切除。7-10 天后去除皮肤缝合线。

抗 B7-1 抗体和/或抗 B7-2 抗体按照下文详述的剂量静脉投药。在肾衰竭时对动物进行安死术, 肾衰竭的鉴定方法是血清肌酸酐水平上升或体重下降了移植前体重的 15%, 这和 AAALAC 标准一致。对于所有被宰杀的动物, 要在尸体剖检时进行彻底的总体分析和组织病理学分析。

结果与讨论:

I 组: 对照动物:

5 只动物接受肾同种异体移植，不接收任何预防排斥的治疗。所有 5 只动物都因为急性排斥而在 8 天之内失去移植物（表 14，图 28）。

II 组：仅用 h1F1 单一治疗：

2 只动物仅用 h1F1 进行治疗（表 14，图 28）。在移植重新灌注之前抗体开始以 20mg/kg 的剂量给药。随后给药的剂量为 5mg/kg，每 7 天给药一次，直到发生排斥为止。这 2 只动物的移植存活期有轻微的延长，其排斥发生在第 8 天和第 9 天。

III 组：仅用 h3D1 单一治疗：

2 只动物仅用 h3D1 进行治疗（表 14，图 28）。在移植重新灌注之前抗体开始以 20mg/kg 的剂量给药。随后给药的剂量为 5mg/kg，每 7 天给药一次，直到发生排斥为止。这 2 只动物的移植存活期有最低程度的延长，其排斥发生在第 8 天和第 28 天。

IV 组：用 h1F1 和 h3D1 一起进行组合治疗：

4 只动物同时用 h1F1 和 h3D1 进行治疗（表 14，图 28）。在移植重新灌注之前抗体开始以 20mg/kg 的剂量给药。其中 1 只动物（AT48）在移植后即刻以 5mg/kg 的剂量给药。所有动物都是在固定时期内或直到排斥发生之前每 7 天一次以 5mg/kg 的剂量给药。IV 组的 4 只中的 3 只动物，安排其抗体于 60 天后停止投药。有 1 只动物给药 80 多天（AC2B）。所有动物都有延长的移植物存活期，分别是 47 天、67 天、227 天和 >365 天。有 1 只动物在移植后一年的时间仍能存活的很好，并且没有发生过排斥。不宰杀这只动物；然而出于本研究的目的，终止了监测。发生排斥的动物在宰杀前大约一周其肌酸酐水平开始超过基线。

与 I 组相比，同时接收 h1F1 和 h3D1 组合治疗的动物显著延长了同种异体移植的功能（ $p=0.016$ ）。与两个单一治疗组相比，组合组中存活期的延长也显著提高了。

表 14. 猕猴的存活及其诊断情况

移植日期	分组	治疗	受体	存 活 ( poDay )
12/1/96	I	无	X9X	5
11/30/96	I	无	1FE	7
11/15/96	I	无	T4T	7
4/2/97	I	无	95052	8
5/3/99	I	无	AT5H	8
11/2/98	II	h1F1	AC74	9
2/10/99	II	h1F1	2WN	8
2/3/99	III	h3D1	AT5J	8
2/16/99	III	h3D1	2WF	28
10/26/98	IV	h1F1+h3D1	AC2B	>365 <sup>a</sup>
10/28/98	IV	h1F1+h3D1	AC8V	47
3/1/99	IV	h1F1+h3D1	AT5P	67 <sup>b</sup>
3/2/99	IV	h1F1+h3D1	AT48	227 <sup>b</sup>

5 <sup>a</sup>手术后治疗 80 天

<sup>b</sup>手术后治疗 60 天

显示出了所有移植动物的治疗方案和结果。

10 人源化抗体给药的起始剂量是 20mg/kg, 随后是 5mg/kg, 然后在 60-80 天之间每周给药一次, 剂量是 5mg/kg. 动物 AT48 在移植后也即刻接收 5mg/kg 的剂量。

本文所引用的所有参考文献、专利和/或专利申请的内容在此完整引入作为参考。

15 虽然本发明以有关其优选实施方案的方式特异显示出来并加以描述, 但是, 对于本领域的熟练人员来说, 不难理解的是: 在不违反在

附加权利要求中包括的本发明范围的情况下，形式和细节上可以有多种不同形式的变动。

## 序列表

<110> Genetics Institute, Inc.  
Co, Man Sung  
Vasquez, Maximiliano  
Carreno, Beatriz  
Celniker, Abbie Cheryl  
Collins, Mary  
Goldman, Samuel  
Gray, Gary S.  
Knight, Andrea  
O'Hara, Denise  
Rup, Bonita  
Veldman, Geertruida M.

<120> 与B7分子发生反应的人源化免疫球蛋白反应用该免疫球蛋白的治疗方法

<130> 1290.1019003

<140> PCT/US00/03303

<141> 2000-02-09

<150> 09/249,011

<151> 1999-02-12

<150> 09/339,596

<151> 1999-06-24

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自细胞混合物

<221> CDS

<222> (1)...(405)

<400> 1

```
atg ggt tgg aac tgt atc atc ttc ttt ctg gtt aca aca gct aca ggt      48
Met Gly Trp Asn Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Thr Thr Ala Thr Gly
  1                5                10                15

gtg cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct ggg cct gag ctg gtg agg      96
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg
      20                25                30
```

cct ggg gaa tca gtg aag att tcc tgc aag ggt tcc ggc tac aca ttc 144  
Pro Gly Glu Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45  
act gat tat gct ata cag tgg gtg aag cag agt cat gca aag agt cta 192  
Thr Asp Tyr Ala Ile Gln Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu  
50 55 60  
gag tgg att gga gtt att aat att tac tat gat aat aca aac tac aac 240  
Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Ile Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn  
65 70 75 80  
cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gta gac aaa tcc tcc agc 288  
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
85 90 95  
aca gcc tat atg gaa ctt gcc aga ttg aca tct gag gat tct gcc atc 336  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile  
100 105 110  
tat tac tgt gca aga gcg gcc tgg tat atg gac tac tgg ggt caa gga 384  
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Trp Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
115 120 125  
acc tca gtc acc gtc tcc tca 405  
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
130 135

<210> 2

<211> 135

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自细胞混合物

<400> 2

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

<210> 3  
 <211> 396  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

<221> CDS  
 <222> (1)...(396)

<400> 3  
 atg gat tca cag gcc cag gtt ctt ata ttg ctg ctg cta tgg gta tct 48  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15  
 ggt acc tgt ggg gac att gtg ctg tca cag tct cca tcc tcc ctg gct 96  
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala  
 20 25 30  
 gtg tca gca gga gag aag gtc act atg agc tgc aaa tcc agt cag agt 144  
 Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 ctg ctc aac agt aga acc cga gag aac tac ttg gct tgg tac cag cag 192  
 Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Glu Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60  
 aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg atc tac tgg gca tcc act agg 240  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 65 70 75 80  
 gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga tct ggg aca gat 288  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95  
 ttc act ctc acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat 336  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 tac tgc acg caa tct tat aat ctt tac acg ttc gga ggg ggg acc aag 384  
 Tyr Cys Thr Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 ctg gaa ata aaa 396  
 Leu Glu Ile Lys  
 130

<210> 4  
 <211> 132  
 <212> 蛋白质  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

<400> 4  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Glu Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95  
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Thr Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Ile Lys  
 130

<210> 5  
 <211> 405  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(405)

<400> 5  
 atg ggt tgg aac tgt atc atc ttc ttt ctg gtt acc aca gct aca ggt 48  
 Met Gly Trp Asn Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Thr Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 gtg cac tcc cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30  
 cct ggg agc tca gtg aag gtg tcc tgc aaa gct tcc ggc tac aca ttc 144  
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 act gat tat gct ata cag tgg gtg aga cag gct cct gga cag ggc etc 192  
 Thr Asp Tyr Ala Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 gag tgg att gga gtt att aat att tac tat gat aat aca aac tac aac 240  
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Ile Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 cag aag ttt aag ggc aag gcc aca atg act gta gac aag tcg acg agc 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
 85 90 95

aca gcc tat atg gaa ctt agt tct ttg aga tct gag gat acg gcc gtt 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
                   100                                  105                                  110

tat tac tgt gca aga gcg gcc tgg tat atg gac tac tgg ggt caa ggt 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Trp Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   115                                  120                                  125

acc ctt gtc acc gtc tcc tca 405  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   130                                  135

<210> 6  
 <211> 135  
 <212> 蛋白质  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

<400> 6  
 Met Gly Trp Asn Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Thr Thr Ala Thr Gly  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
                   20                                  25                                  30  
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                   35                                  40                                  45  
 Thr Asp Tyr Ala Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
   50                                  55                                  60  
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Ile Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser  
                   85                                  90                                  95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
                   100                                  105                                  110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ala Trp Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   115                                  120                                  125  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
   130                                  135

<210> 7  
 <211> 396  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

<221> CDS  
 <222> (1)...(396)

<400> 7  
 atg gat tca cag gcc cag gtt ctt ata ttg ctg ctg cta tgg gta tct 48  
 Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
   1                                  5                                  10                                  15



Tyr Cys Thr Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Val Glu Ile Lys  
 130

<210> 9  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化鼠抗人B7-2重链CDR1

<221> CDS  
 <222> (1)...(15)

<400> 9  
 gat tat gct ata cag 15  
 Asp Tyr Ala Ile Gln  
 1 5

<210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化鼠抗人B7-2重链CDR1

<400> 10  
 Asp Tyr Ala Ile Gln  
 1 5

<210> 11  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人源化鼠抗人B7-2重链CDR2

<221> CDS  
 <222> (1)...(51)

<400> 11  
 gtt att aat att tac tat gat aat aca aac tac aac cag aag ttt aag 48  
 Val Ile Asn Ile Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

ggc 51  
 Gly

<210> 12  
<211> 17  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2重链CDR2

<400> 12  
Val Ile Asn Ile Tyr Tyr Asp Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2重链CDR3

<221> CDS  
<222> (1)...(21)

<400> 13  
gcg gcc tgg tat atg gac tac  
Ala Ala Trp Tyr Met Asp Tyr  
1 5

21

<210> 14  
<211> 7  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2重链CDR3

<400> 14  
Ala Ala Trp Tyr Met Asp Tyr  
1 5

<210> 15  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2轻链CDR1

<221> CDS  
<222> (1)...(51)

<400> 15  
aaa tcc agt cag agt ctg ctc aac agt aga acc cga gag aac tac ttg 48  
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Glu Asn Tyr Leu  
1 5 10 15  
gct 51  
Ala

<210> 16  
<211> 17  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2轻链CDR1

<400> 16  
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Glu Asn Tyr Leu  
1 5 10 15  
Ala

<210> 17  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2轻链CDR2

<221> CDS  
<222> (1)...(21)

<400> 17  
tgg gca tcc act agg gaa tct 21  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 18  
<211> 7  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2轻链CDR2

<400> 18  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 19  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2轻链CDR3

<221> CDS  
<222> (1)...(24)

<400> 19  
acg caa tct tat aat ctt tac acg 24  
Thr Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr  
1 5

<210> 20  
<211> 8  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-2轻链CDR3

<400> 20  
Thr Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr  
1 5

<210> 21  
<211> 405  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 来自细胞混合物

<221> CDS  
<222> (1)...(405)

<400> 21  
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48  
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
1 5 10 15

gtc aat tca gag gtt cac ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg 96  
Val Asn Ser Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg  
20 25 30

cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa cct tct ggc ttc aac att 144  
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Pro Ser Gly Phe Asn Ile  
35 40 45

aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 192

Lys	Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu		
	50					55					60						
gag	tgg	att	gga	tgg	att	gat	cct	gag	aat	ggt	aat	act	cta	tat	gac		240
Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asn	Thr	Leu	Tyr	Asp		
	65				70					75					80		
ccg	aag	ttc	cag	ggc	aag	gcc	agt	ata	aca	gca	gac	aca	tcc	tcc	aac		288
Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn		
				85					90						95		
aca	gcc	tac	ctg	cag	ctc	agc	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	act	gcc	gtc		336
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			100					105					110				
tat	tac	tgt	gct	aga	gag	ggg	ctt	ttt	ttt	gct	tac	tgg	ggc	caa	ggg		384
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Leu	Phe	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
		115					120					125					
act	ccg	gtc	act	gtc	tct	gca											405
Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ala											
	130					135											

<210> 22  
 <211> 135  
 <212> 蛋白质  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

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

<210> 23  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 来自细胞混合物

<221> CDS

<222> (1)...(390)

<400> 23

atg gat ttt cat gtg cag att ttc agc ttc atg cta atc agt gtc aca 48  
Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr  
1 5 10 15

gtc ata ttg tcc agt gga gaa att gtg ctc acc cag tct cca gca ctc 96  
Val Ile Leu Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu  
20 25 30

atg gct gca tct cca ggg gag aag gtc acc atc acc tgc agt gtc agc 144  
Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser  
35 40 45

tca agt ata agt tcc agc aac ttg cac tgg tac cag cag aag tca gaa 192  
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu  
50 55 60

acc tcc ccc aaa ccc tgg att tat ggc aca tcc aac ctg gct tct gga 240  
Thr Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
65 70 75 80

gtc cct gtt cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg acc tct tat tct ctc 288  
Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
85 90 95

aca atc agc agc atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgt caa 336  
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
100 105 110

cag tgg agt agt tac cca ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag 384  
Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu  
115 120 125

ctg aaa 390  
Leu Lys  
130

<210> 24

<211> 130

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自细胞混合物

<400> 24

Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr  
1 5 10 15  
Val Ile Leu Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu  
20 25 30



tat tac tgt gct aga gag ggg ctt ttt ttt gct tac tgg ggc caa ggt 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Phe Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
           115                                  120                                  125

acc ctg gtc act gtc tct tca 405  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           130                                  135

<210> 26  
 <211> 135  
 <212> 蛋白质  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

<400> 26  
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly  
 1                  5                                  10                                  15  
 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
           20                                  25                                  30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Phe Asn Ile  
           35                                  40                                  45  
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50                                  55                                  60  
 Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Leu Tyr Asp  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser  
           85                                  90                                  95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
           100                                  105                                  110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Phe Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
           115                                  120                                  125  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           130                                  135

<210> 27  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 来自细胞混合物

<221> CDS  
 <222> (1)...(390)

<400> 27  
 atg gat ttt cat gtg cag att ttc agc ttc atg cta atc agt gtc aca 48  
 Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr  
 1                  5                                  10                                  15  
 gtc ata ttg tcc agt gga gat att cag atg acc cag tct cca tca tcc 96  
 Val Ile Leu Ser Ser Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
           20                                  25                                  30

ctg tct gca tct gta ggg gat agg gtc acc atc acc tgc agt gtc agc 144  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser  
35 40 45  
tca agt ata agt tcc agc aac ttg cac tgg tac cag cag aag cca ggc 192  
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
50 55 60  
aag gcc ccc aaa ccc ttg att tat ggc aca tcc aac ctg gct tct gga 240  
Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
65 70 75 80  
gtc cct agt cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg acc gat tat act ctc 288  
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu  
85 90 95  
aca atc agc agc ttg cag cct gaa gat gtt gcc act tat tac tgt caa 336  
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
100 105 110  
cag tgg agt agt tac cca ctc acg ttc ggt caa ggg acc aag gtg gag 384  
Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
115 120 125  
atc aaa 390  
Ile Lys  
130

<210> 28  
<211> 130  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 来自细胞混合物

<400> 28  
Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr  
1 5 10 15  
Val Ile Leu Ser Ser Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
20 25 30  
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser  
35 40 45  
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
50 55 60  
Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
65 70 75 80  
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu  
85 90 95  
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
100 105 110  
Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu  
115 120 125  
Ile Lys  
130

<210> 29  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1重链CDR1

<221> CDS  
<222> (1)...(15)

<400> 29  
gac tac tat atg cac  
Asp Tyr Tyr Met His  
1 5

15

<210> 30  
<211> 5  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1重链CDR1

<400> 30  
Asp Tyr Tyr Met His  
1 5

<210> 31  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1重链CDR2

<221> CDS  
<222> (1)...(51)

<400> 31  
tgg att gat cct gag aat ggt aat act cta tat gac ccg aag ttc cag  
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15

48

ggc  
Gly

51

<210> 32  
<211> 17  
<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化鼠抗人B7-1重链CDR2

<400> 32

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Leu Tyr Asp Pro Lys Phe Gln  
1 5 10 15  
Gly

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化鼠抗人B7-1重链CDR3

<221> CDS

<222> (1)...(21)

<400> 33

gag ggg ctt ttt ttt gct tac  
Glu Gly Leu Phe Phe Ala Tyr  
1 5

21

<210> 34

<211> 7

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化鼠抗人B7-1重链CDR3

<400> 34

Glu Gly Leu Phe Phe Ala Tyr  
1 5

<210> 35

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化鼠抗人B7-1轻链CDR1

<221> CDS

<222> (1)...(36)

<400> 35

agt gtc agc tca agt ata agt tcc agc aac ttg cac

36

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His  
1 5 10

<210> 36  
<211> 12  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1轻链CDR1

<400> 36  
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His  
1 5 10

<210> 37  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1轻链CDR2

<221> CDS  
<222> (1)...(21)

<400> 37  
ggc aca tcc aac ctg gct tct  
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

21

<210> 38  
<211> 7  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1轻链CDR2

<400> 38  
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

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

<220>  
<223> 人源化鼠抗人B7-1轻链CDR3

<221> CDS

<222> (1)...(27)

<400> 39

caa cag tgg agt agt tac cca ctc acg  
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

27

<210> 40

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化鼠抗人B7-1轻链CDR3

<400> 40

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

# 说 明 书 附 图

## 3D1重链可变区序列

```

                                     30                                     60
ATG GGT TGG AAC TGT ATC ATC TTC TTT CTG GTT ACA ACA GCT ACA GGT GTG CAC TCC CAG
M  G  W  N  C  I  I  F  F  L  V  T  T  A  T  G  V  E  S  Q
                                     90                                     120
GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGG CCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG GAA TCA GTG AAG ATT TCC
V  Q  L  Q  C  S  G  P  E  L  V  R  P  G  E  S  V  K  I  S
                                     150                                     180
TGC AAG GGT TCC GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATA CAG TGG GTG AAG CAG AGT CAT
C  K  G  S  G  Y  T  F  T  D  V  A  I  Q  W  V  K  Q  S  E
                                     CDR1
                                     210                                     240
GCA AAG AGT CTA GAG TGG ACT GGA GTT ATT AAT ATT TAC TAT GAT AAT ACA AAC TAC AAC
A  K  S  L  E  W  I  G  V  I  N  I  Y  Y  E  N  T  N  Y  M
                                     CDR2
                                     270                                     300
CAG AAG TTT AAG GGC AAG GCC ACA ATT ACT GTA GAC AAA TCC TCC ACC ACA GGC TAT ATG
Q  K  E  K  G  K  A  T  M  T  V  D  K  S  S  S  T  A  Y  M
                                     330                                     360
GAA CTT GCC AGA TTG ACA TCT GAG GAT TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA AGA GCG GCC TGG
E  L  A  R  L  T  S  E  E  S  A  E  Y  Y  C  A  E  A  A  W
                                     CDR3
                                     390
TAT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
Y  M  E  Y  W  G  C  G  T  S  V  T  V  S  S
    
```

图 1A

3D1轻链可变区序列

	30	60
ATG GAT TCA CAG GCC CAG GTT CTT ATA TTG CTG CTG CTA TGG GTA TCT GGT ACC TGT GGG		
M D S Q A Q V L I L L L L W V S G T C G		
	90	120
GAC AAT GTG CTG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACT		
<u>D</u> I V L S Q S P S S L A V S A G E K V T		
	150	180
ATG AGC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG CTC AAC AGT AGA ACC CGA GAG AAC TAC TTG GCT		
M S C <u>K S E C S L L N S P T R E M Y L A</u>		
	210	240
TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG	CDR1	
W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y <u>W A S C E</u>		
	270	300
GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC		
<u>E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T</u>	CDR2	
	330	360
ATC AGC AGT GTG CAG GGT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TCC AGG GAA TCT TAT AAT CTT		
I S S V Q A E D L A V Y Y C <u>T C S Y N L</u>		
	390	420
TAC ACC TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA	CDR3	
<u>Y T F G G G T K L E I K</u>		

图 1B

Hu3D1重链可变区序列

```

                                30                                60
ATG GGT TGG AAC TGT ATC ATC TTC TTT CTG GTT ACC ACA GCT ACA GGT GTG CAC TCC CAG
M  G  W  N  C  I  I  F  F  L  V  T  T  A  T  G  V  E  S  Q
                                90                                120
GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG AGC TCA GTG AAG GTG TCC
V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V  S
                                150                                180
TGC AAA GCT TCC GGC TAC ACA TTC ACT GAT TAT GCT ATA CAG TGG GTG AGA CAG GCT CCT
C  K  A  S  G  Y  T  F  T  D  V  A  I  Q  W  V  R  Q  A  P
                                CDR1
                                210                                240
-GGA CAG GGC CTC GAG TGG AAT GGA GTT ATT AAT ATT TAC TAT GAT AAT ACA AAC TAC AAC
G  Q  G  L  E  W  I  G  V  I  N  I  Y  Y  D  N  T  N  Y  N
                                CDR2
                                270                                300
CAG AAG TTT AAG GGC AAG GGC ACA ATG ACT GTA GAC AAG TCG ACG AGC ACA GCC TAT ATG
Q  K  F  K  G  K  A  T  M  T  V  D  K  S  T  S  T  A  Y  M
                                350                                380
GAA CTT AGT TCT TTG AGA TCT GAG GAT ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCA AGA GCG GCC TGG
E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  A  A  W
                                CDR3
                                390
TAT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC CTT GTC ACC GTC TCC TCA
Y  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S

```

图 2A

Hu3D1轻链可变区序列

```

                                30                                60
ATG GAT TCA CAG GCC CAG GTT CTT ATA TTG CTG CTG CTA TGG GTA TCT GGC ACC TGT GGG
M D S Q A Q V L I L L L L W V S G T C G

                                90                                120
GAC AAT GTG CTG ACA CAG TCT CCA GAT TCC CTG GCT GTA AGC TTA GGA GAG AGG GCC ACT
D I V L T Q S P D S L A V S L G E R A T

                                150                                180
ATT AGC TGC AAA TCC AGT CAG AGT CTG CTC AAC AGT AGA ACC CGA GAG AAC TAC TTG GCT
I S C K S S Q S L L N S R T R E N Y I A
                                CDR1

                                210                                240
TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG CCT CCT AAA CTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG
W Y Q Q K F G Q P P K L L I Y W A S T R
                                CDR2

                                270                                300
GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
E S G V F D R F S G S G S G T D F T L T

                                330                                360
ATC AGC AGT CTG CAG GCT GAA GAC GTG GCA GTT TAT TAC TGC ACC CAA TCT TAT AAT CTT
I S S L Q A E D V A V Y Y C T O S Y N L
                                CDR3

                                390
TAC ACC TTC GGA CAG GGG ACC AAG GTG GAA ATA AAA
Y T F G Q G T K V E I K

```

图 2B

抗B7.2mAbs的竞争结合测定

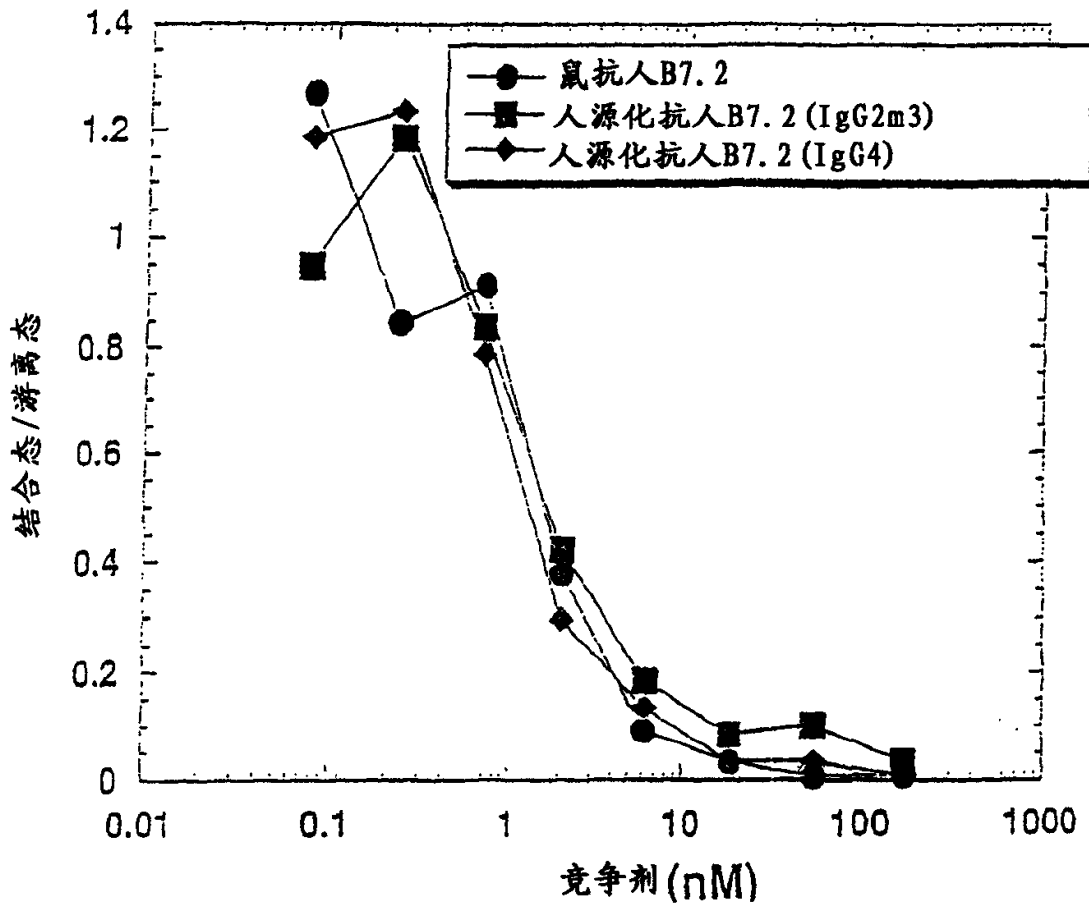


图 3

抗B7.2mAbs的直接结合测定

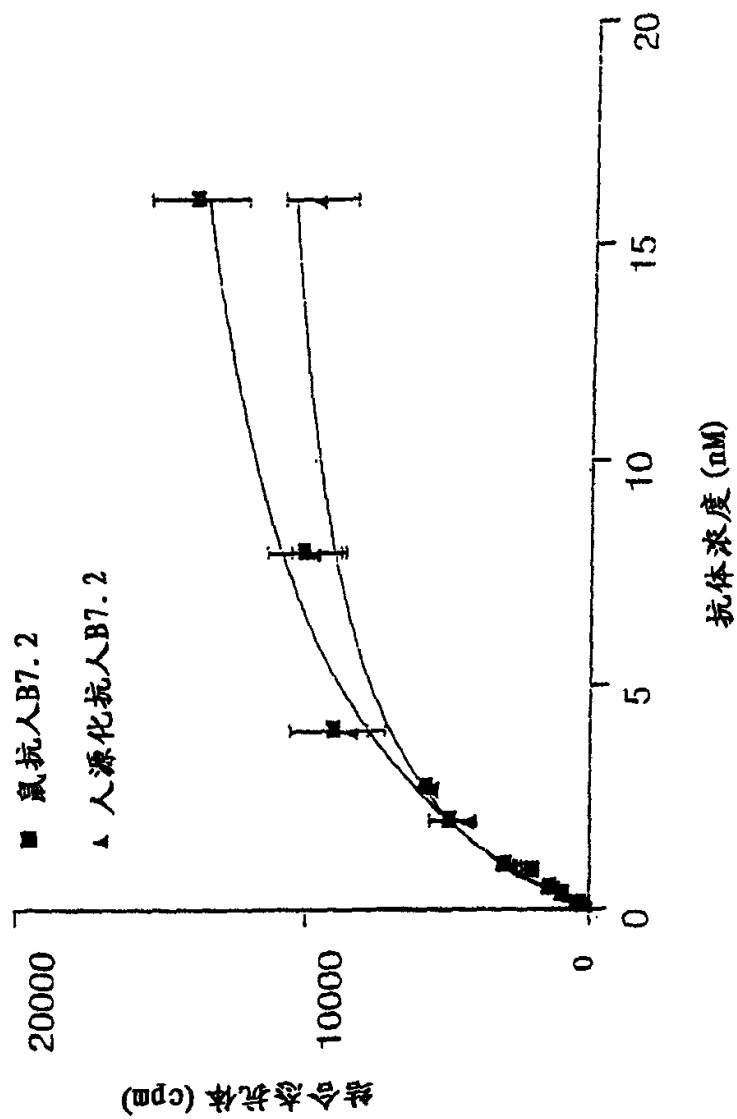


图 4

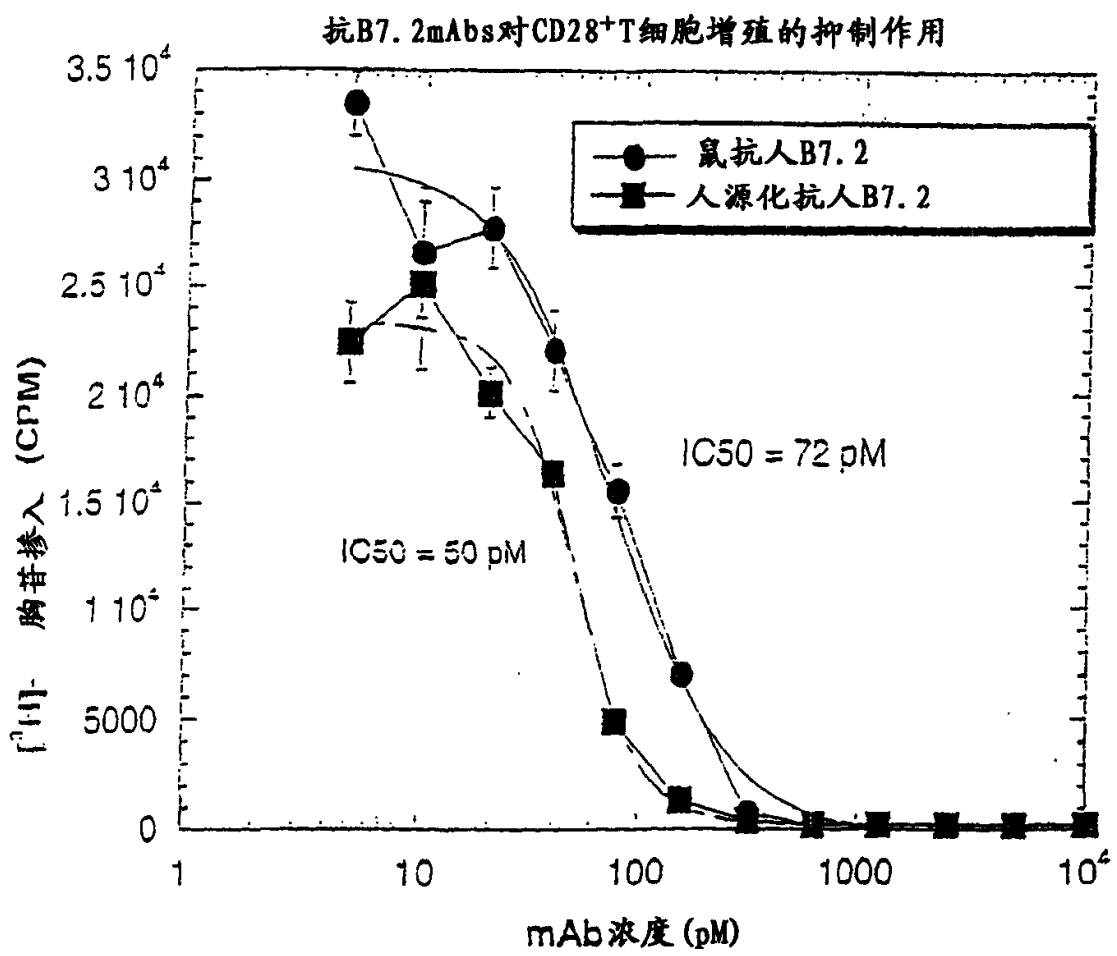


图 5

1F1重链可变区序列

ATG	AAA	TGC	AGC	TGG	GTC	ATC	TTC	TTC	30	CTG	ATG	GCA	GTG	GTT	ACA	GGG	GTC	AAT	TCA	60	GAG						
M	K	C	S	W	V	I	F	F		L	M	A	V	V	T	G	V	N	S		E						
GTT	CAC	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	90	CTT	GTG	AGG	CCA	GGG	GCC	TTA	GTC	AAG	TTG	120	TCC						
V	H	L	Q	Q	S	G	A	E		L	V	R	P	G	A	L	V	K	L		S						
TGC	AAA	CCT	TCT	GGC	TTC	AAC	ATT	AAA	150	GAC	TAC	TAT	ATG	CAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	180	CCT						
C	K	P	S	G	F	N	I	K		<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	W	V	K	Q	R		F						
										CDR1																	
GAA	CAG	GGC	CTG	GAG	TGG	ATT	GGA	TGG	210	ATT	GAT	CCT	GAG	AAT	GGT	AAT	ACT	CTA	TAT	240	GAC						
E	Q	G	L	E	W	I	G	<u>W</u>		<u>I</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>		<u>D</u>						
										CDR2																	
CCG	AAG	TTC	CAG	GGC	AAG	GCC	AGT	ATA	270	ACA	GCA	GAC	ACA	TCC	TCC	AAC	ACA	GCC	TAC	300	CTG						
<u>P</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	K	A	S	I		T	A	D	T	S	S	N	T	A	Y		I						
CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	330	ACT	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCT	AGA	GAG	GGG	360	CTT						
Q	L	S	S	L	T	S	E	D		T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>E</u>	<u>G</u>		<u>L</u>						
TTT	TTT	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG	ACT	390	CCG	GTC	ACT	GTC	TCT	GCA												
<u>F</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	W	G	Q	G	T		P	V	T	V	S	A												

图 6A

1F1轻链可变区序列

ATG	GAT	TTT	CAT	GTG	CAG	ATT	TTC	AGC	TTC	ATG	CTA	ATC	AGT	GTC	ACA	GTC	ATA	TTG	TCC	30	60
M	D	F	H	V	Q	I	F	S	F	M	L	I	S	V	T	V	I	L	S		
AGT	GGA	GAA	ATT	GTG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA	CTC	ATG	GCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	90	120
S	G	E	I	V	L	F	Q	S	P	A	L	M	A	A	S	P	G	E	K		
GTC	ACC	ATC	ACC	TGC	AGT	GTC	AGC	TCA	AGT	ATA	AGT	TCC	AGC	AAC	TTG	CAC	TGG	TAC	CAG	150	180
V	T	I	T	C	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>		
CAG	AAG	TCA	GAA	ACC	TCC	CCC	AAA	CCC	TGG	ATT	TAT	GGC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	210	240
Q	K	S	E	T	S	P	K	P	W	I	Y	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	G		
GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACC	TCT	TAT	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	AGC	270	300
V	P	V	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	I	T	I	S	S		
ATG	GAG	GCT	GAA	GAC	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGT	CAA	CAG	TGG	AGT	AGT	TAC	CCA	CTC	ACG	330	360
M	E	A	E	D	A	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>T</u>		
TTC	GGT	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG	CTG	AAA											390	
F	G	A	G	T	K	L	E	L	K												

图 6B

Hu1F1重链可变区序列

ATG	AAA	TGC	AGC	TGG	GTC	ATC	TTC	TTC	CTG	ATG	GCA	GTG	GTT	ACA	GGG	GTC	AAT	TCA	GAG	30	60
M	K	C	S	W	V	I	F	F	L	M	A	V	V	T	G	V	N	S	E		
GTT	CAG	CTG	GTG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	GTT	AAG	AAG	CCA	GGG	GCC	TCA	GTC	AAG	GTG	TCC	90	120
V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S		
TGC	AAA	CCT	TCT	GGC	TTC	AAC	ATT	AAA	GAC	TAC	TAT	ATG	CAC	TGG	GTG	AGG	CAG	GCG	CCT	150	180
C	K	P	S	G	F	N	I	K	<u>D</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	<u>H</u>	W	V	R	Q	A	P		
										CDR1											
GGA	CAG	GGC	CTC	GAG	TGG	ATT	GGA	TGG	ATT	GAT	CCT	GAG	AAT	GGT	AAT	ACT	CTA	TAT	GAC	210	240
G	Q	G	L	E	W	I	G	<u>W</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>P</u>	<u>E</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>		
										CDR2											
CCG	AAG	TTC	CAG	GGC	AAG	GCC	ACT	ATA	ACT	GCA	GAC	ACA	TCC	ACC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	270	300
<u>P</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	K	A	T	I	T	A	D	T	S	T	S	T	A	Y	M		
GAG	CTG	AGC	AGC	CTG	AGA	TCT	GAG	GAC	ACT	GCC	GTC	TAT	TAC	TGT	GCT	AGA	GAG	GGG	CTT	330	360
E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>E</u>	<u>G</u>	<u>L</u>		
										CDR3											
TTT	TCT	GCT	TAC	TGG	GGC	CAA	GGT	ACC	CTG	GTC	ACT	GTC	TCT	TCA	390						
<u>F</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>Y</u>	W	G	C	G	T	L	V	T	V	S	S							

图 7A

Hu1F1轻链可变区序列

```

ATG GAT TTT CAT GTG CAG ATT TTC AGC TTC ATG CTA ATC AGT GTC ACA GTC ATA TTG TCC 60
M D F H V Q I F S F M L I S V T V I L S

AGT GGA GAT ATT CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCA TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGG GAT AGG 90
S G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R

GTC ACC ATC ACC TGC AGT GTC AGC TCA AGT ATA AGT TCC AGC AAC TTG CAC TGG TAC CAG 150
V T I T C S V S S S I S S S N L H W Y Q 180

CAG AAG CCA GGC AAG GCC CCC AAA CCC TTG ATT TAT GGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA 210
Q K P G K A P K P L I Y G T S N L A S G 240
                                CDR1

GTC CCT AGT CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC GAT TAT ACT CTC ACA ATC AGC AGC 270
V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S 300
                                CDR2

TTG CAG CCT GAA GAT GTT GCC ACT TAT TAC TGT CAA CAG TGG AGT AGT TAC CCA CTC ACG 330
L Q P E D V A T Y Y C Q Q W S S Y P L T 360
                                CDR3

TTC GGT CAA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA 390
P G Q G T K V E I K

```

图 7B

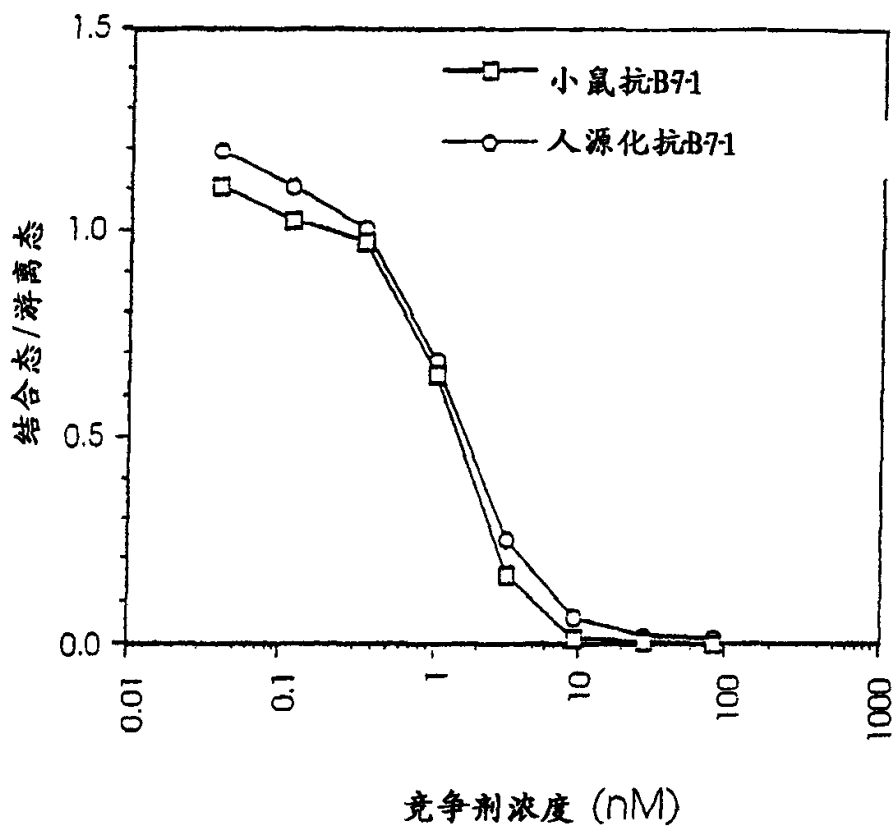


图 8

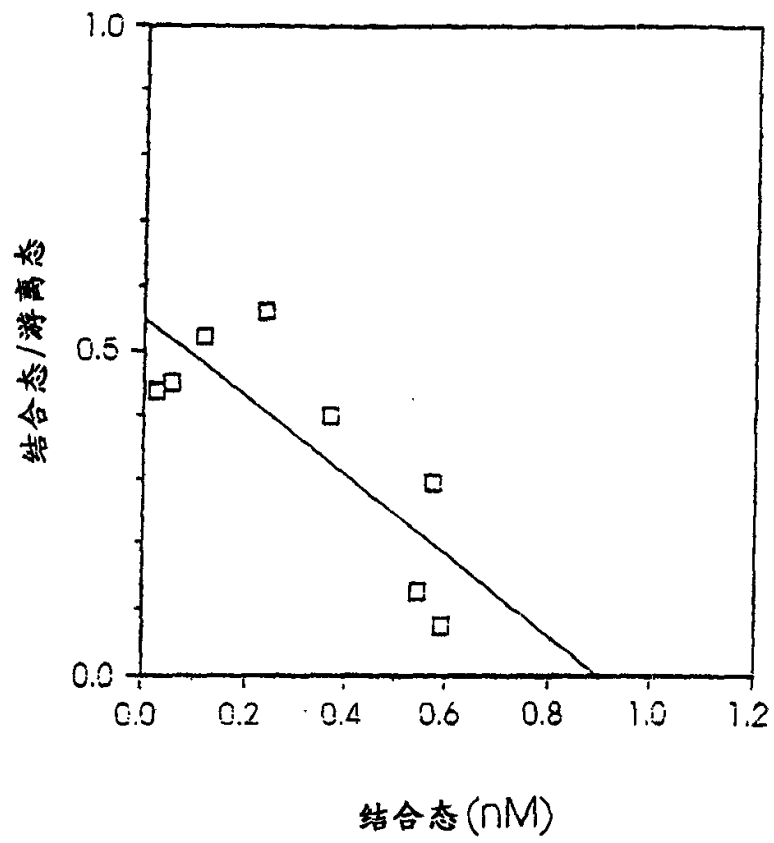


图 9A

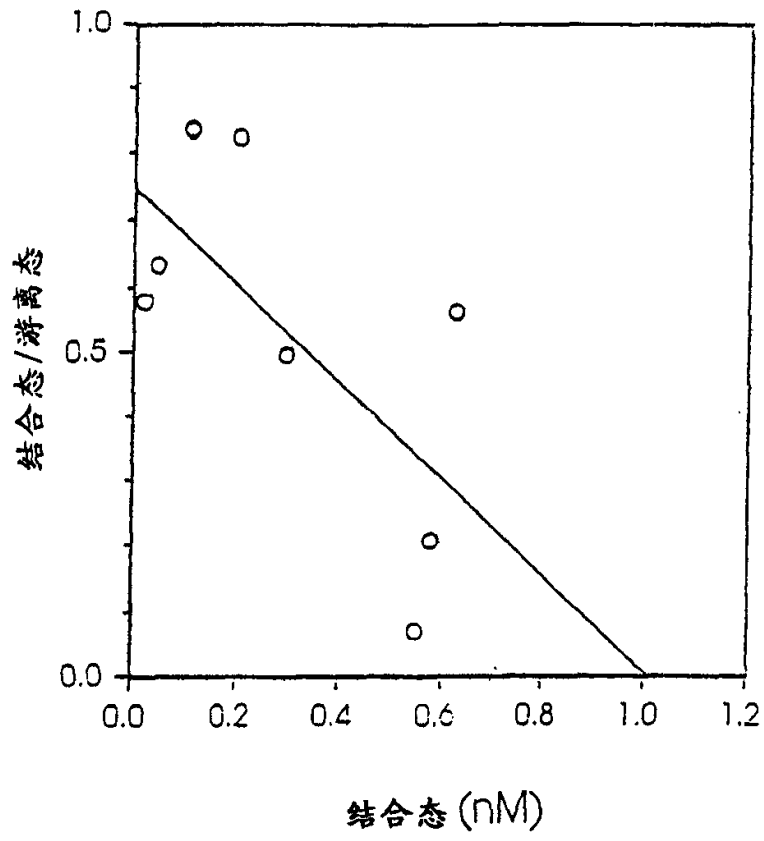


图 9B

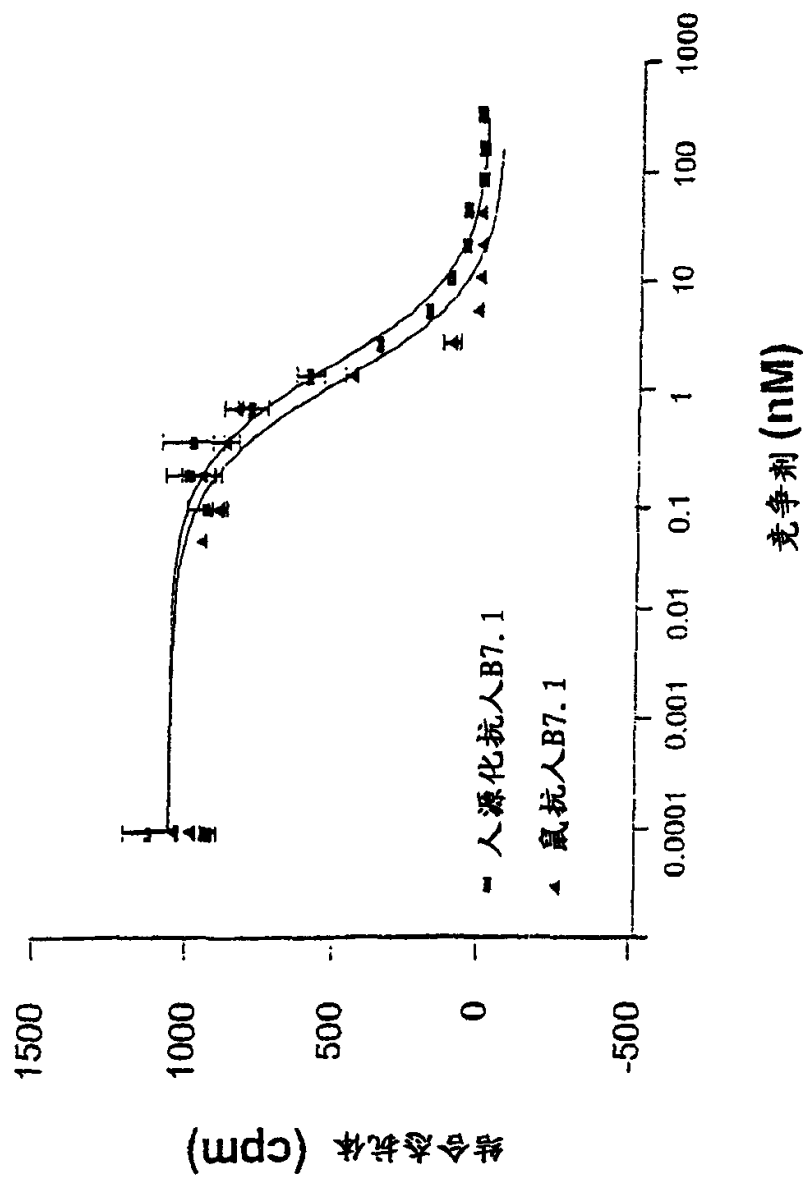


图 10

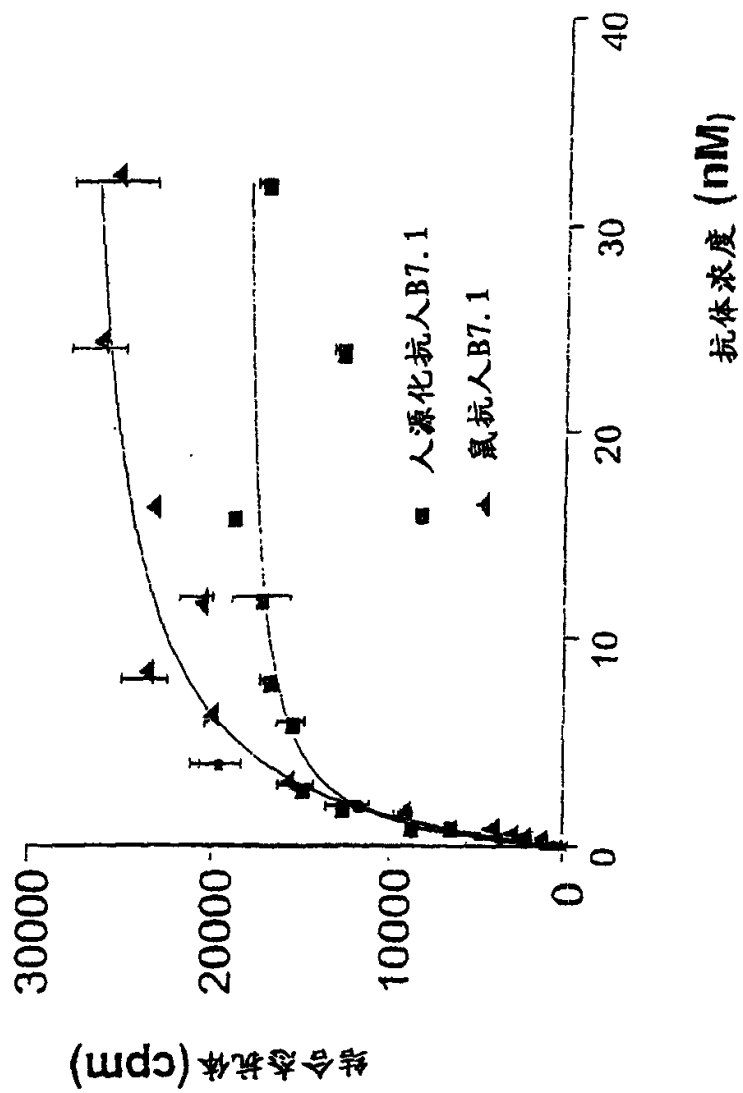


图 11

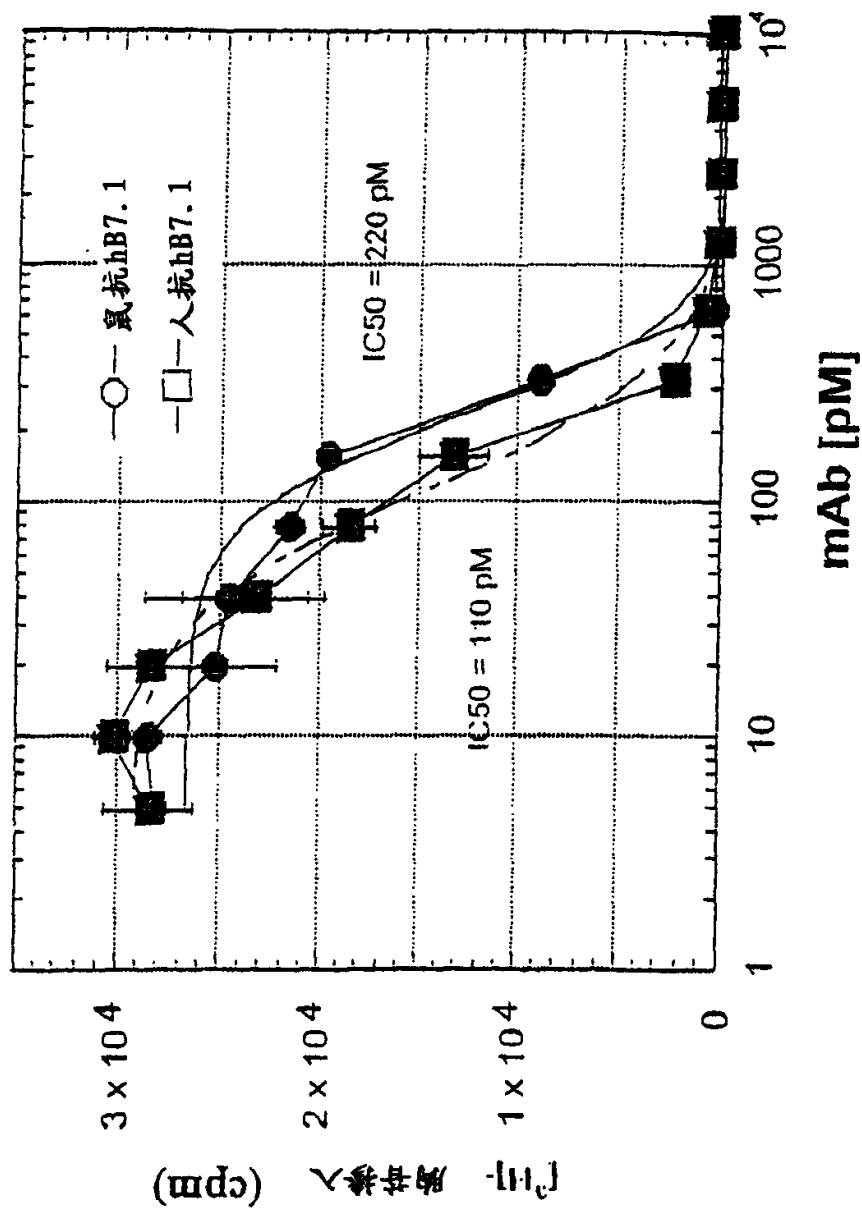


图 12

抗B7抗体和CTLA4Ig对混合淋巴细胞反应的抑制作用

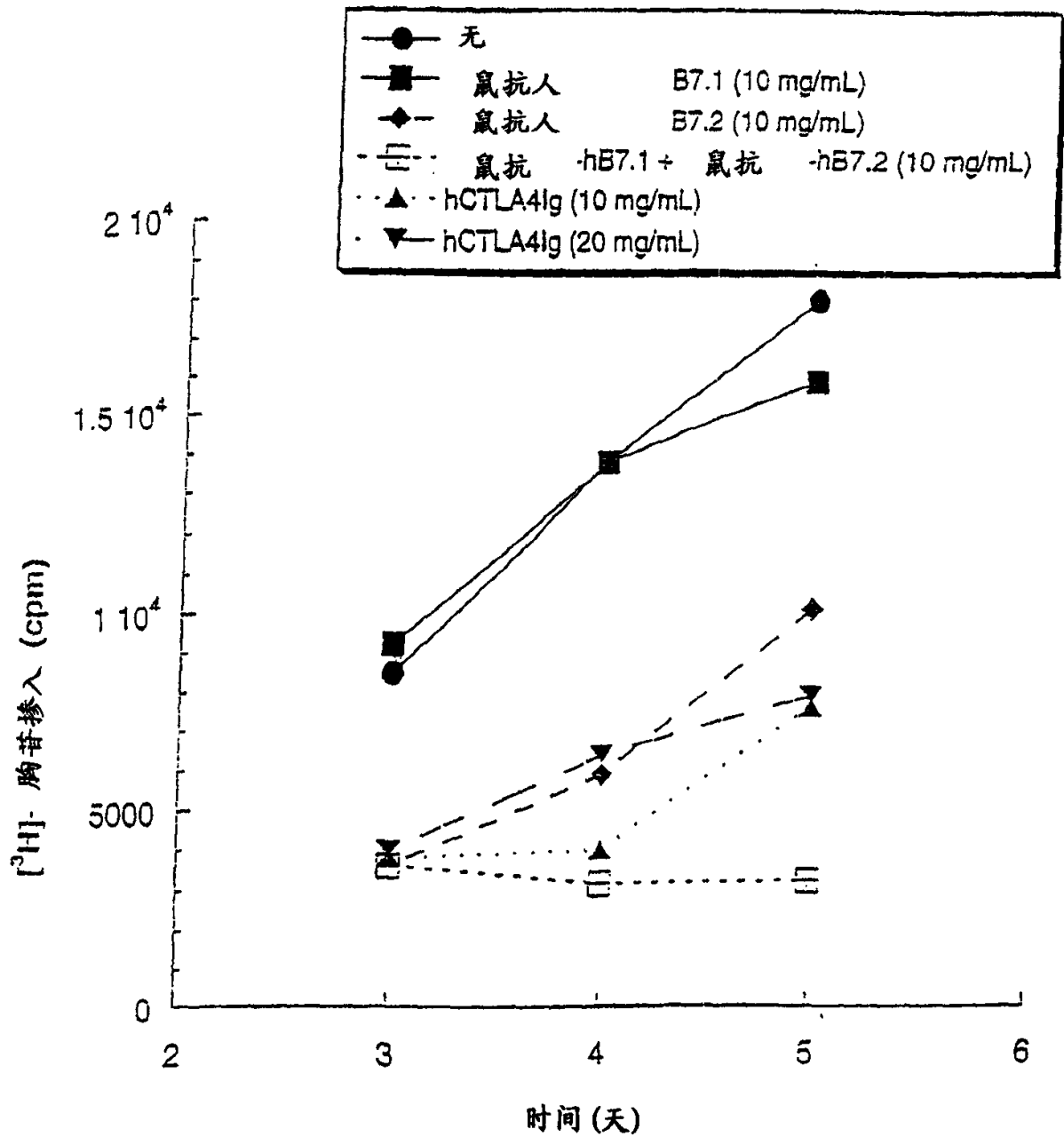


图 13

用鼠抗人B7.1治疗的次级MLR 初级MLR

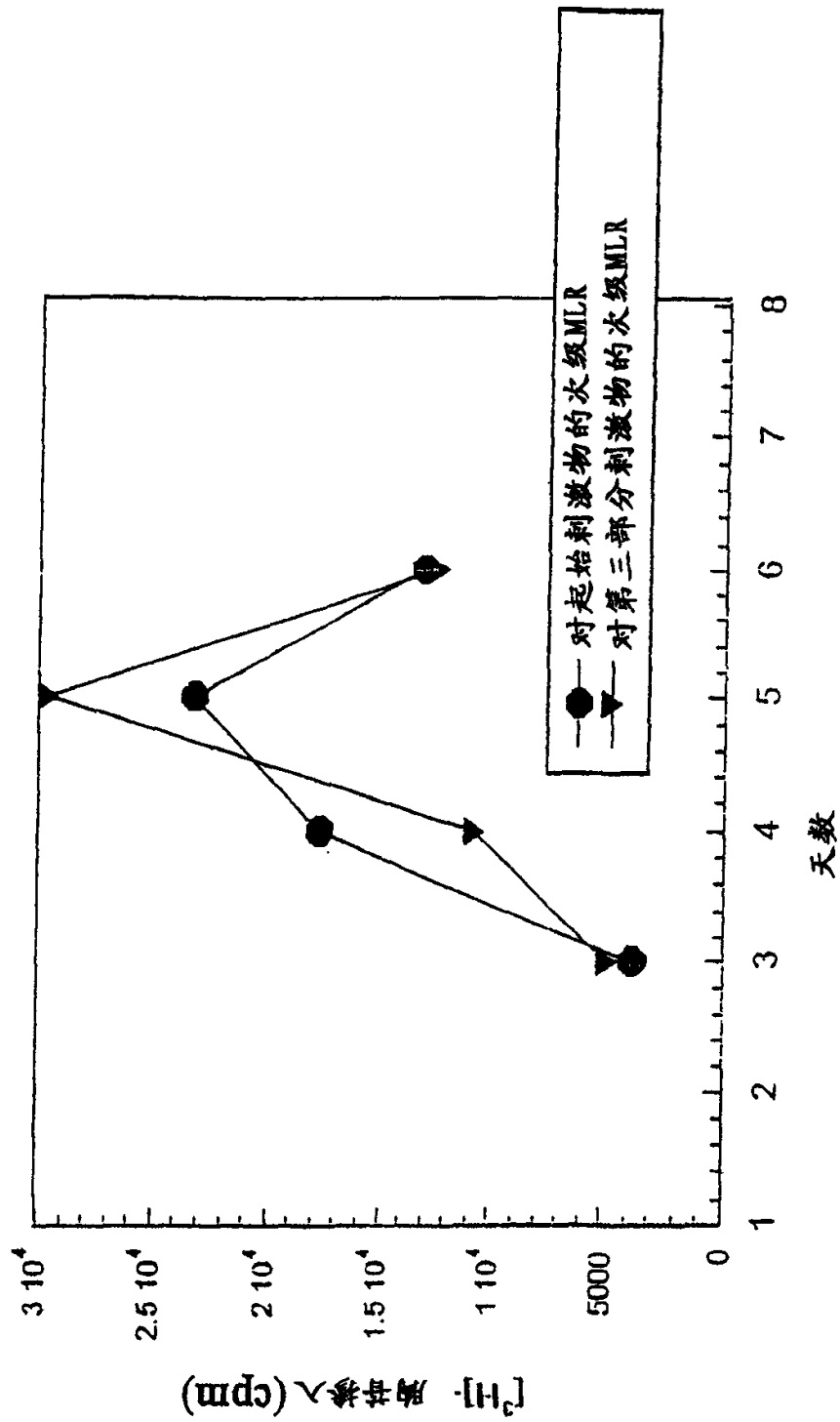


图 14

用鼠抗人B7.2治疗的次级MLR、初级MLR

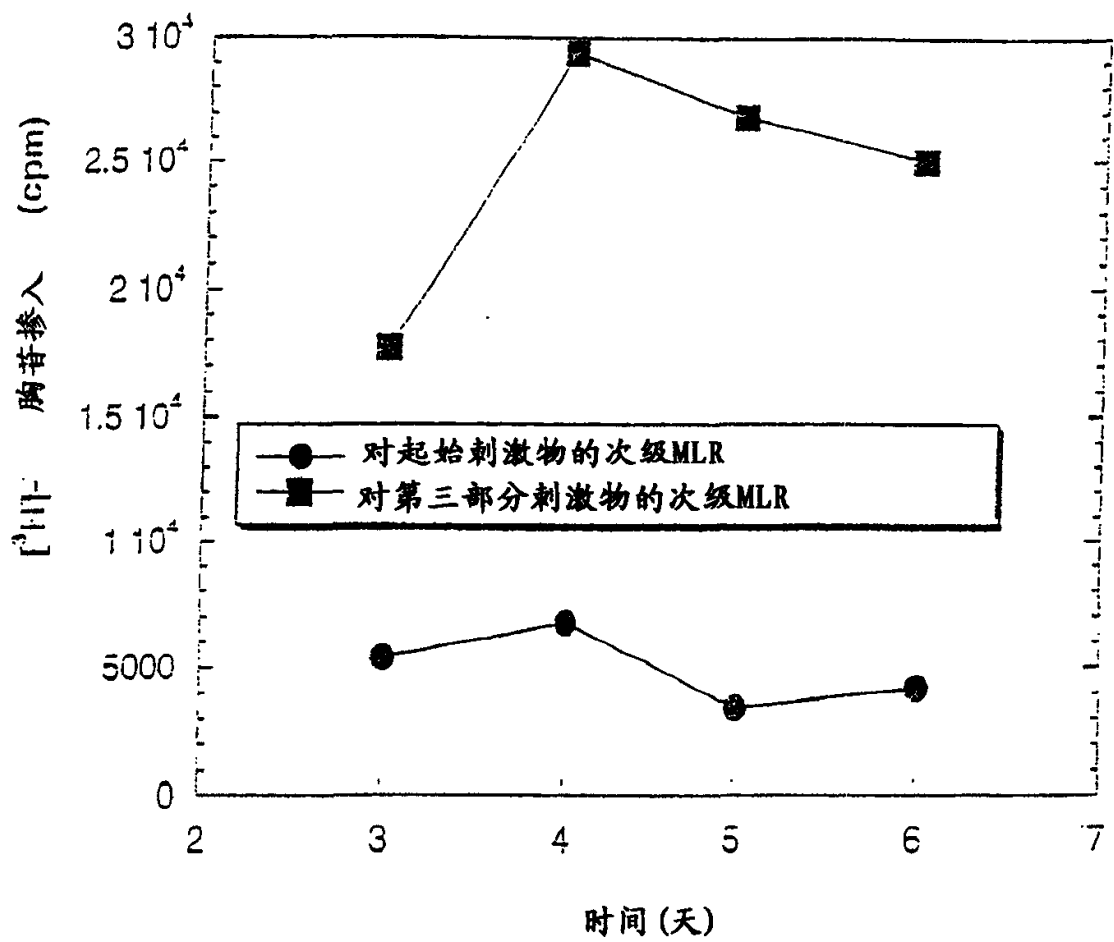


图 15

用鼠抗人B7.1 + 鼠抗人B. 7. 2治疗的次级MLR 初级MLR

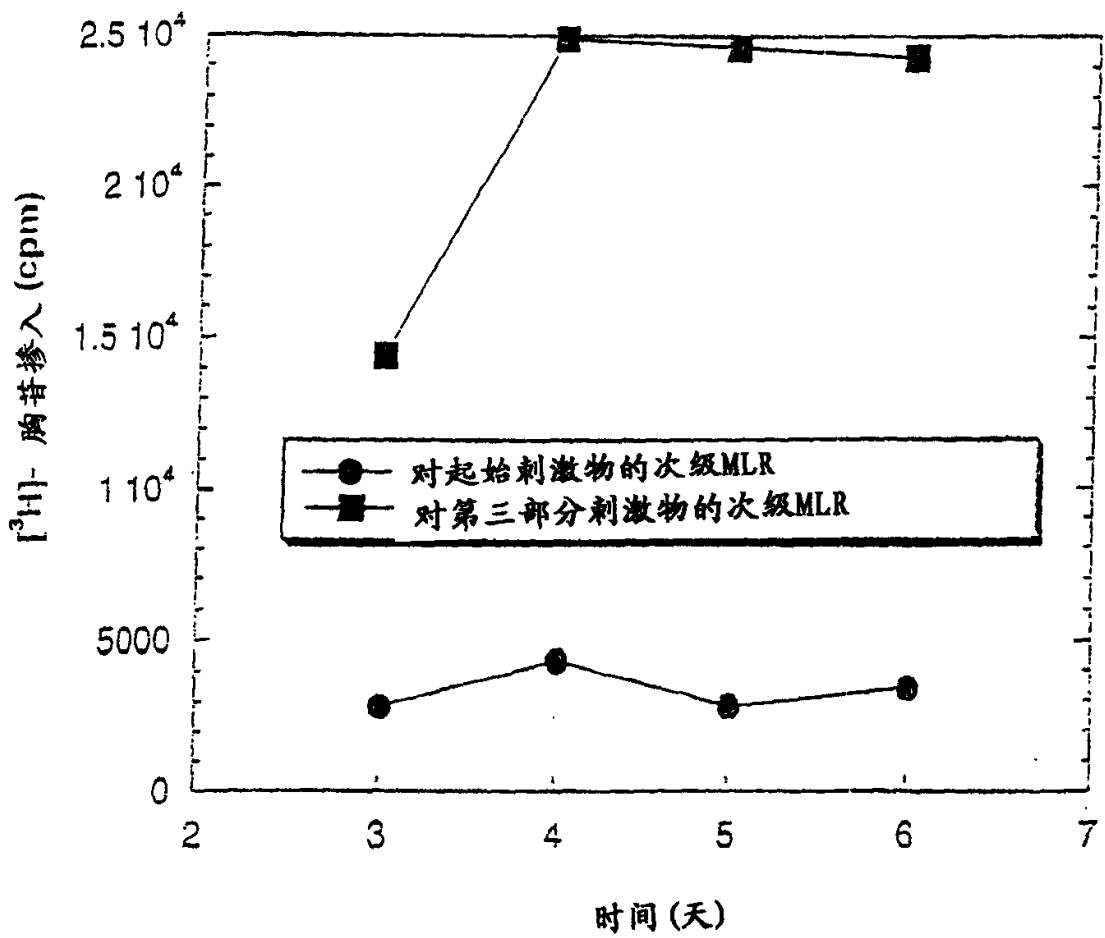


图 16

初级MLR-效应器对"B"刺激物

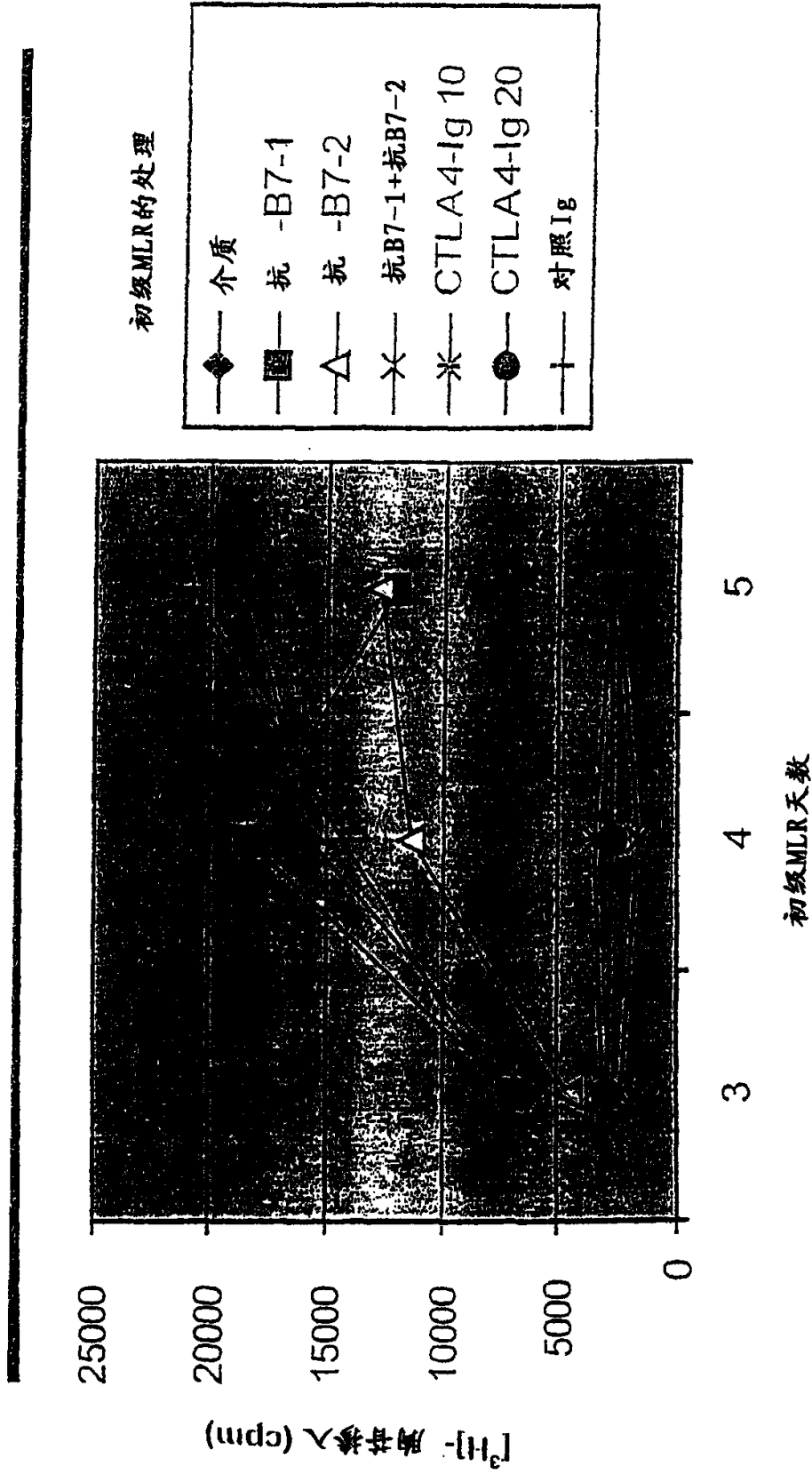


图 17

初级MLR-效应器对"C"刺激物

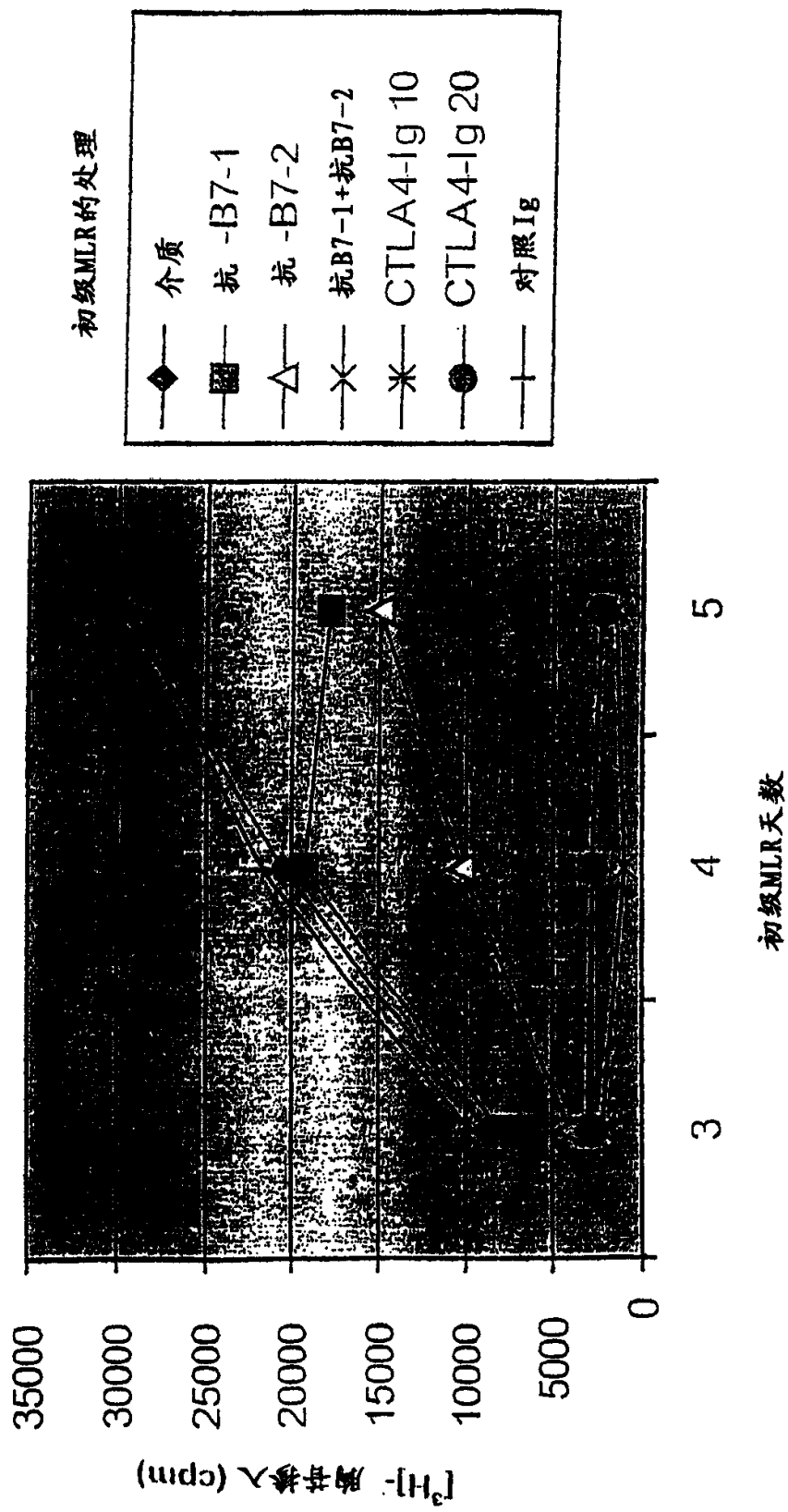


图 18

次级MLR-"B"初级MLR中的效应器对"B"刺激物

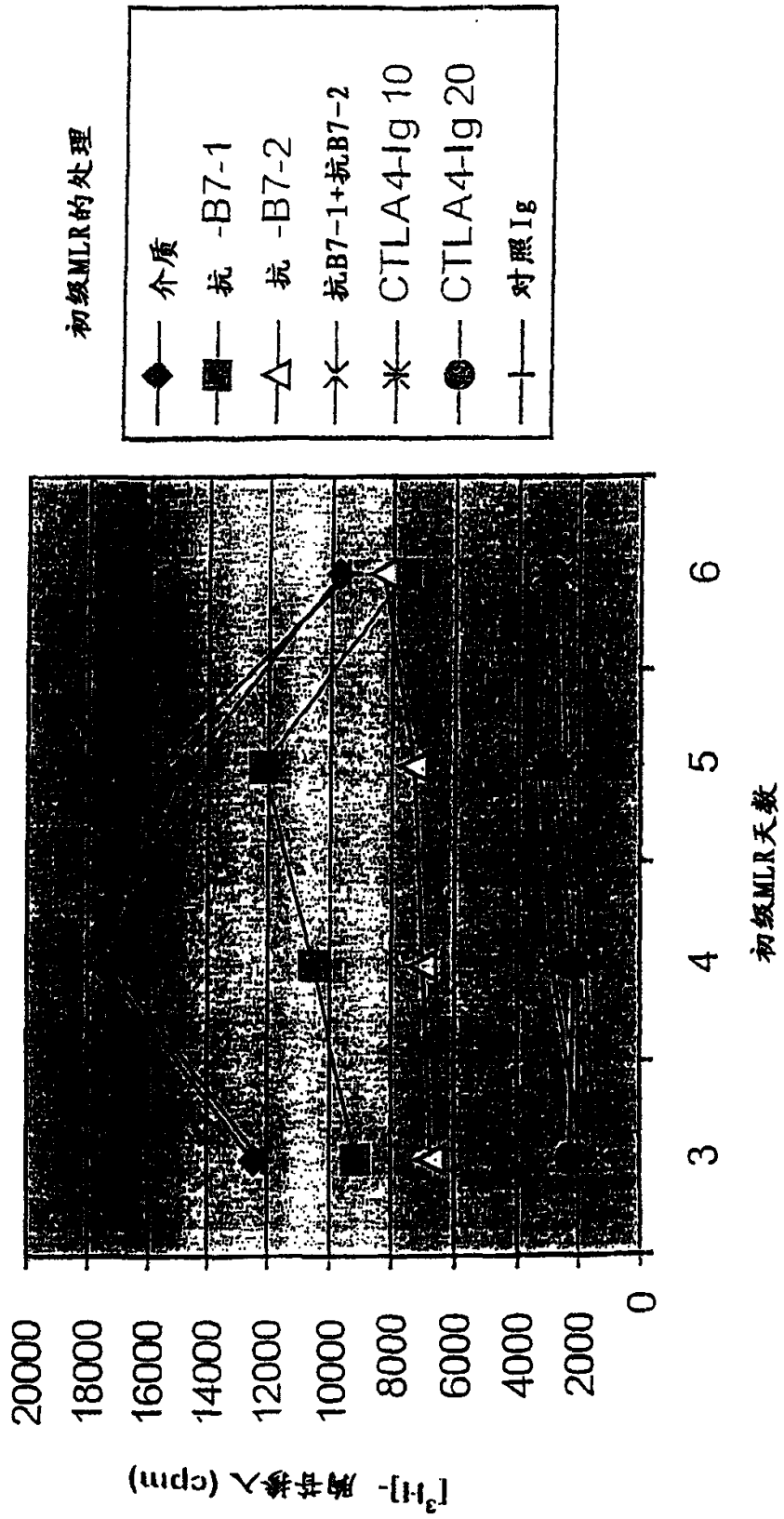


图 19

次级MLR-"B"初级MLR中的效应对"C"刺激物

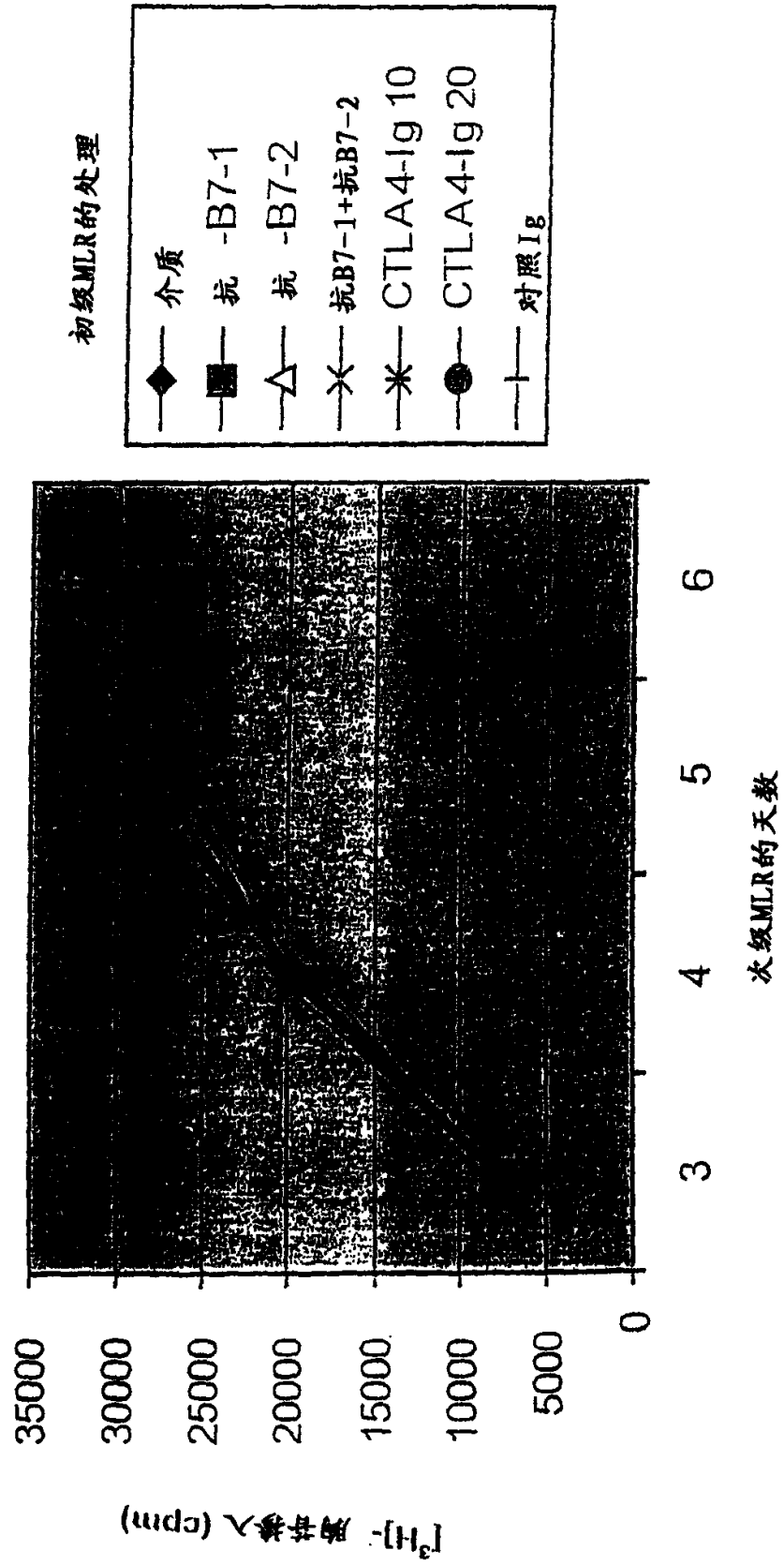


图 20

次级MLR-"B"初级MLR中的效应器对"B" & "C"刺激物

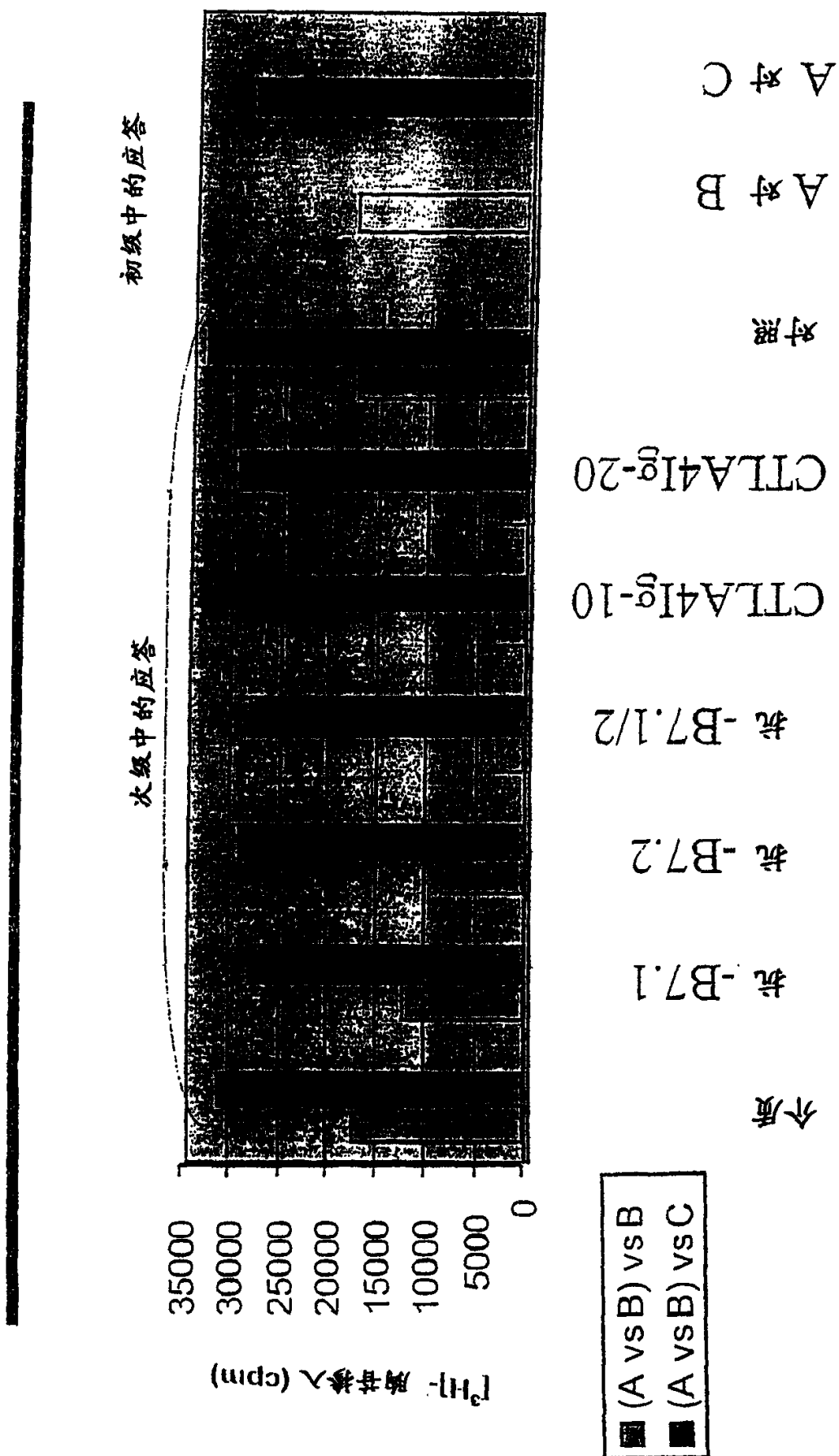
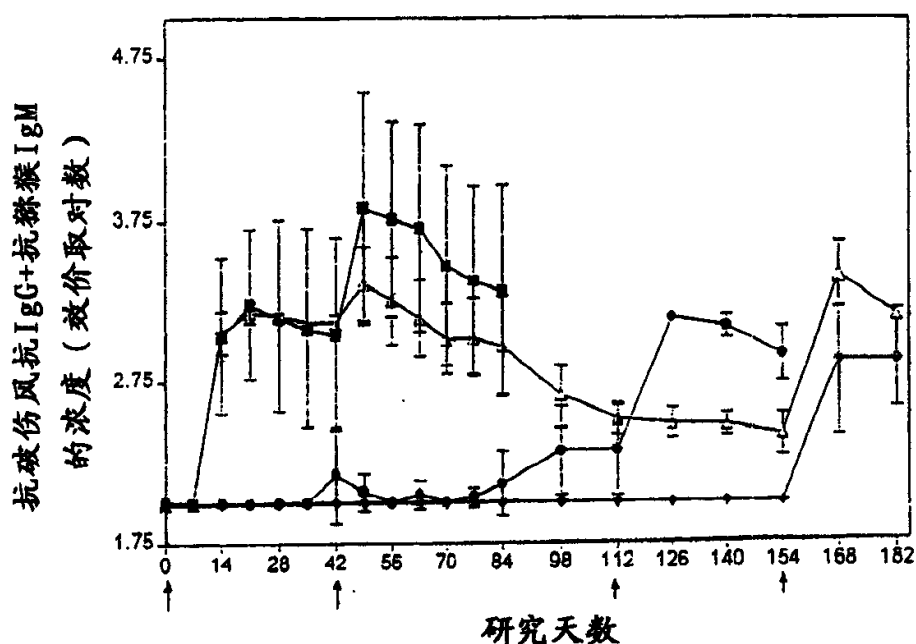


图 21

在用破伤风类毒素攻击 (1° 和 2° 免疫和第3次攻击) 后  
 在用抗B7.1和抗B7.2治疗期间Cynomolgus猴中抗破伤  
 风类毒素抗体的浓度



- A组 (盐水对照)
- B组 (于第0天 10 mg/kg αB7 )
- C组 (于第42天 10 mg/kg αB7 )
- D组 (于第0天和第42天 10 mg/kg αB7)

所有分组都在第0天和第42天接受10LFU肌肉注射的破伤风类毒素,接受1LFU皮内注射的破伤风类毒素。

B、C、D组在上一次B7 注射后的第112天接受10LFU肌肉注射的破伤风类毒素。

所有组于第84天皮内注射1LFU的破伤风类毒素,以检测破伤风特异的DTH反应。

图 22

Cynomolgus猴接受破伤风类毒素初次免疫和二次免疫  
 后用单一静脉注射剂量的h1F1和h2D1混合物治疗后血  
 清抗破伤风抗体的效价

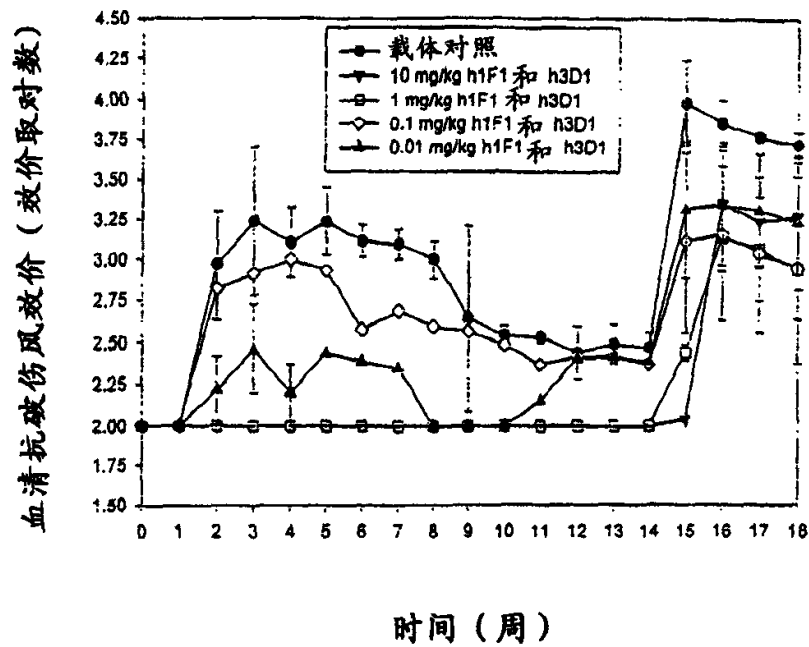


图 23

Cynomolgus猴接受破伤风类毒素初次免疫和二次免疫后仅用单一静脉注射剂量的h1F1治疗后血清抗破伤风抗体的效价

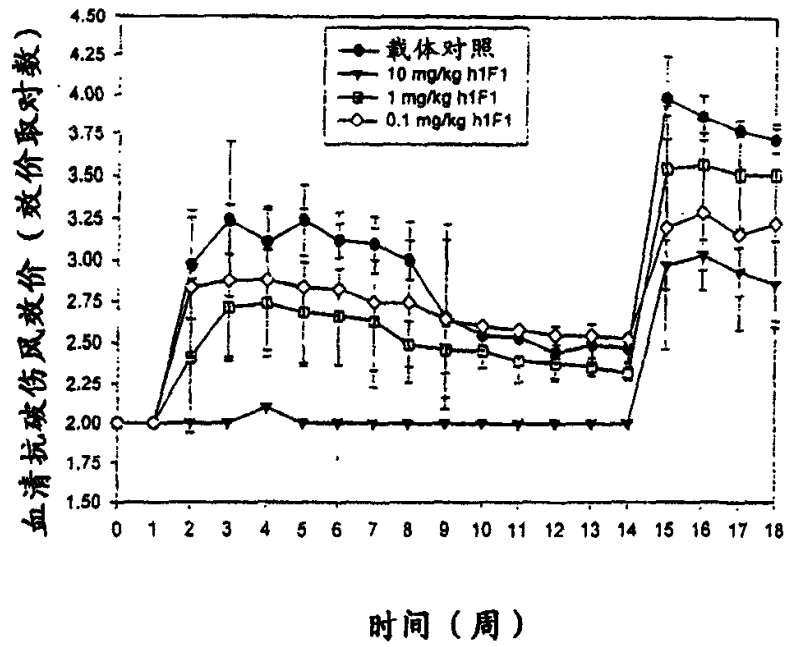


图 24

Cynomolgus猴接受破伤风类毒素初次免疫和二次免疫后仅用单一静脉注射剂量的h3D1治疗后血清抗破伤风抗体的效价

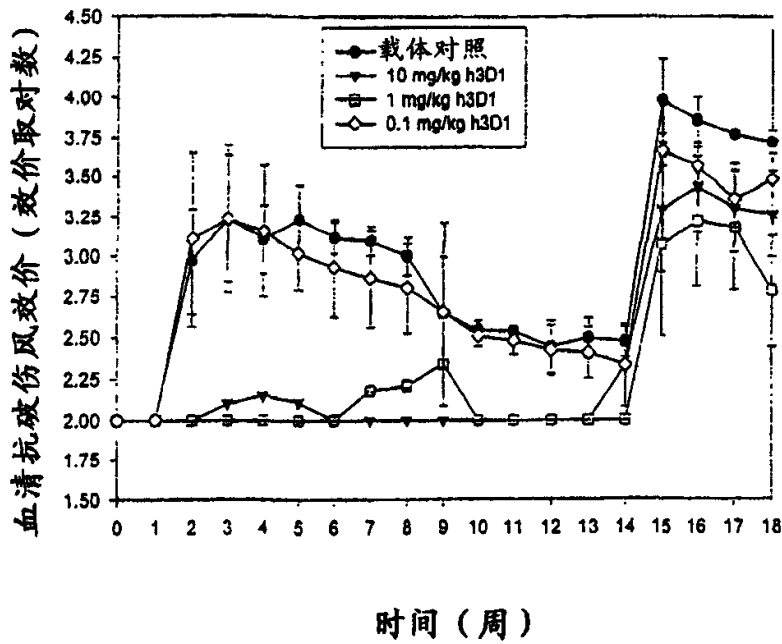


图 25

破伤风类毒素进行初次免疫后用h1F1和h3D1治疗  
所得的破伤风效价曲线下部的面积

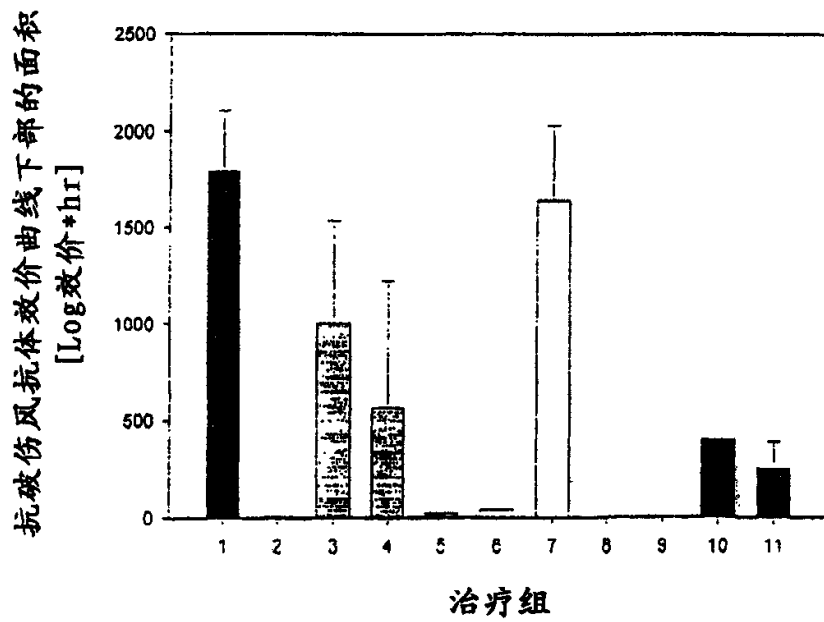
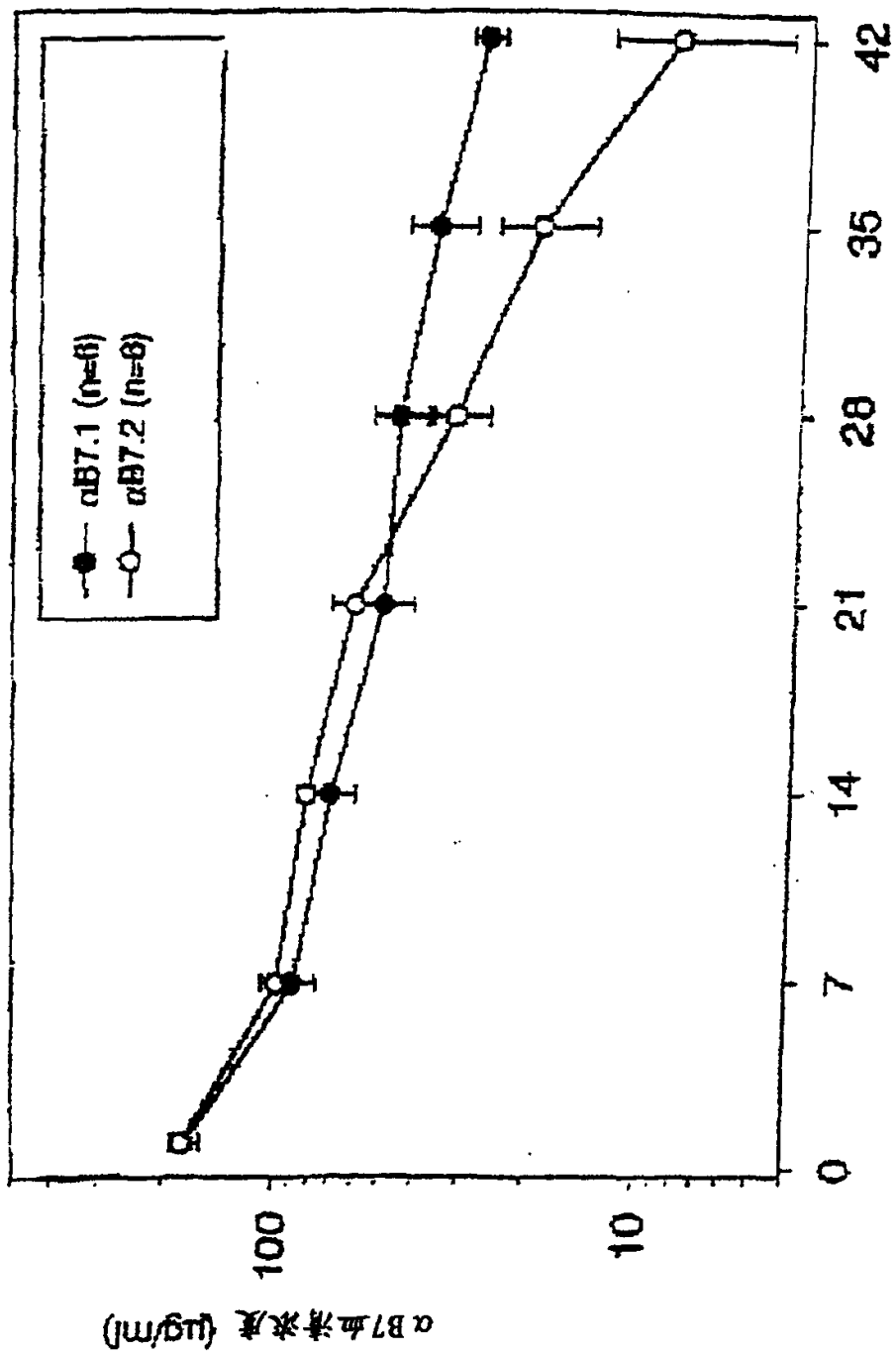


图 26

使用单一静脉注射剂量的10mg/kg后初次破伤风免疫Cynomolgus猴模型  
 $\alpha$ B7.1和 $\alpha$ B7.2的血清浓度



时间(天)

图 27

### 猕猴平均存活曲线

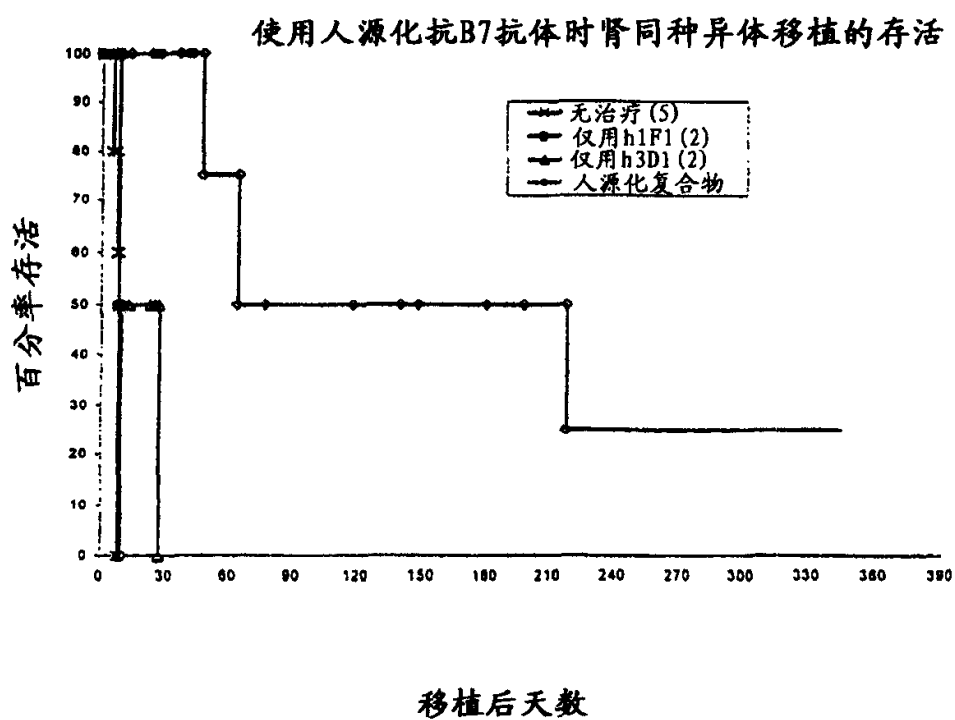


图 28

专利名称(译)	与B7分子发生反应的人源化免疫球蛋白及应用该免疫球蛋白的治疗方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1360596A</a>	公开(公告)日	2002-07-24
申请号	CN00806200.5	申请日	2000-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	遗传研究所有限公司		
申请(专利权)人(译)	遗传研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	遗传研究所有限公司		
[标]发明人	MS科 M瓦斯奎茨 B卡雷诺 AC塞尔尼克 M科林斯 S戈尔德曼 GS格雷 A奈特 D奥哈拉 B鲁普 GM维尔德曼 G瓦纳 S弗里德里希		
发明人	M·S·科 M·瓦斯奎茨 B·卡雷诺 A·C·塞尔尼克 M·科林斯 S·戈尔德曼 G·S·格雷 A·奈特 D·奥哈拉 B·鲁普 G·M·维尔德曼 G·瓦纳 S·弗里德里希		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/436 A61K31/519 A61K31/573 A61K35/14 A61K35/28 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/00 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37 /02 A61P37/06 C07K16/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 G01N33 /533 G01N33/534 G01N33/535 C12N15/62 C12N15/13 G01N33/68 G01N33/577 A61K35/12 A61P1/00		
CPC分类号	A61K39/395 C07K2316/52 C07K16/2827 C07K2319/00 C07K2317/52 A61K2039/505 C07K2319/30 C07K2317/24 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/18 A61P3/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61K2300/00		
代理人(译)	罗宏 姜建成		
优先权	09/249011 1999-02-12 US 09/339596 1999-06-24 US		

摘要(译)

本发明涉及人源化抗B7 - 2抗体和人源化抗B7 - 1抗体,其中每种抗体均包含一个非人来源的可变区,以及至少人来源免疫球蛋白的一部分。本发明还涉及自身免疫病、移植排斥、炎症失调和传染病等多种疾病的治疗方法,给病人投的药物是人源化抗B7 - 2抗体和/或人源化抗B7 - 1抗体。

