



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580019492.8

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1997893A

[22] 申请日 2005.4.15

[21] 申请号 200580019492.8

[30] 优先权

[32] 2004.4.16 [33] US [31] 60/563,193

[86] 国际申请 PCT/US2005/012881 2005.4.15

[87] 国际公布 WO2005/108989 英 2005.11.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.14

[71] 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 阿南·丘恩撒拉派 Y-J·G·孟
洪圭熙

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

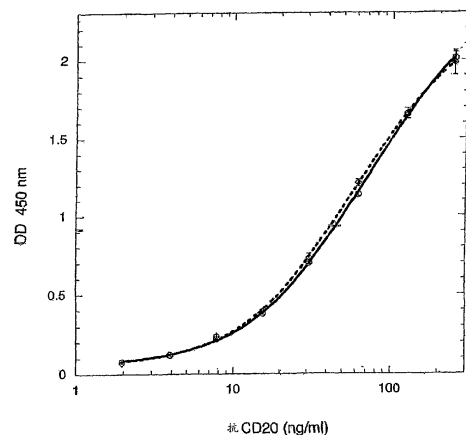
权利要求书 5 页 说明书 46 页 附图 22 页

[54] 发明名称

抗体测定法

[57] 摘要

患者血流或其它生物学样品中的目标抗体的存在和数量可以充当重要的临床或其它分析或诊断工具。开发了 ELISA 方法，和用于这类测定法的试剂盒，以及抗独特型抗体和生产它们的杂交瘤，以检测来自例如动物模型和人类患者的生物学样品中的抗体水平。



1. 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法, 用于特异性检测生物学样品中结合细胞表面多跨膜蛋白的目标抗体, 所述细胞表面多跨膜蛋白包含少于约 75 个氨基酸的间插胞外域, 该方法包括: (a) 将生物学样品与捕捉剂接触并温育, 其中所述捕捉剂是结合目标抗体独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体独特型的抗独特型抗体, 从而结合样品中存在的任何目标抗体, 并(b) 将样品, 及由此将任何结合的目标抗体, 与结合目标抗体的可检测抗体相接触, 并利用对于可检测抗体的检测手段测量结合捕捉剂的任何目标抗体的水平。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述目标抗体是单克隆抗体。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述目标抗体是人源化抗体。

4. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述目标抗体是鼠源抗体。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法, 其中所述可检测抗体是结合目标抗体独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体独特型的可检测抗独特型抗体。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法, 其中所述生物学样品分离自人类受试者。

7. 权利要求 1-5 任一项的方法, 其中所述生物学样品分离自小鼠受试者。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法, 其中所述测量步骤还包括利用标准曲线来测定与已知水平相比目标抗体的水平。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法, 其中所述生物学样品是血浆、血清或尿液。

10. 权利要求 9 的方法, 其中所述样品是血清。

11. 权利要求 1-10 任一项的方法, 其中所述蛋白质是 CD20。

12. 权利要求 1-11 任一项的方法, 其中所述目标抗体是人源化 2H7 抗体。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述目标抗体是完整抗体或抗体片段, 其包含可变轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
 NLAGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTK
 VEIKR (SEQ ID NO:1);

和可变重链序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
 GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 VVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:2)。

14. 权利要求 12 的方法, 其中所述目标抗体是完整抗体, 其包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
 NLAGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNREGC (SEQ ID NO:3);

和重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
 GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 VVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO:4)。

15. 权利要求 12 的方法, 其中所述目标抗体是完整抗体, 其包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
 NLAGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA

LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3);

和重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO:5).

16. 权利要求 1-15 任一项的方法, 其中所述捕捉剂是单克隆抗体。

17. 权利要求 1-16 任一项的方法, 其中所述捕捉剂是鼠源抗体。

18. 权利要求 1-17 任一项的方法, 其中所述捕捉剂是抗体 8A3 或抗体 8C5。

19. 权利要求 1-18 任一项的方法, 其中所述捕捉剂和可检测抗体是相同的。

20. 权利要求 19 的方法, 其中抗体 8A3 用作捕捉剂和可检测抗体。

21. 权利要求 1-18 任一项的方法, 其中所述捕捉剂和可检测抗体是不同的。

22. 权利要求 21 的方法, 其中抗体 8C5 用作捕捉剂而抗体 8A3 用作可检测抗体。

23. 权利要求 1-22 任一项的方法, 包括下列步骤: (a)将生物学样品与固定于固体支持物上的捕捉剂相接触并温育以使用捕捉剂结合样品中存在的任何目标抗体; (b)将生物学样品与结合任何存在的目标抗体的固定化捕捉剂分开; (c)将结合任何存在的目标抗体的固定化捕捉剂与针对目标抗体的可检测抗独特型抗体相接触, 所述可检测抗体结合目标抗体的独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型; 并(d)利用对于可检测抗体的检测手段测量结合捕捉剂的任何目标抗体的水平。

24. 权利要求 23 的方法，其中将所述固定化捕捉剂包被在微量滴定板上。

25. 权利要求 23 或 24 的方法，其中所述可检测抗体可直接检测。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述可检测抗体通过荧光或比色试剂放大。

27. 权利要求 25 的方法，其中将所述可检测抗体生物素化而所述检测手段是亲合素或链霉亲合素- β -辣根过氧化物酶。

28. 权利要求 1-27 任一项的方法，其是基于细胞的。

29. 抗体 8A3，其分别包含 SEQ ID NO:7 和 9 作为重链和轻链，且可从 ATCC 保藏号为 PTA-5914 的杂交瘤 8A3.10 获得。

30. 权利要求 29 的抗体，其偶联有可检测标记物。

31. 抗体 8C5，其可从 ATCC 保藏号为 PTA-5915 的杂交瘤 8C5.1 获得。

32. 权利要求 31 的抗体，其偶联有可检测标记物。

33. 杂交瘤 8C5.1 或 8A3.10，其 ATCC 保藏号分别为 PTA-5915 或 PTA-5914。

34. 免疫测定试剂盒，用于特异性检测生物学样品中结合细胞表面多跨膜蛋白的目标抗体，所述细胞表面多跨膜蛋白包含少于约 75 个氨基酸的间插胞外域，该试剂盒包含：(a) 装有抗独特型抗体作为捕捉剂的容器，所述抗独特型抗体结合目标抗体的独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型；(b) 装有可检测抗独特型抗体的容器，所述可检测抗独特型抗体结合目标抗体的独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型；和(c) 检测所述目标抗体的说明书。

35. 权利要求 34 的试剂盒，可用于 ELISA 方法来检测目标抗体。

36. 权利要求 34 或 35 的试剂盒，还包含捕捉剂的固体支持物。

37. 权利要求 34-36 任一项的试剂盒，其中所述捕捉剂固定在固体支持物上。

38. 权利要求 34-37 任一项的试剂盒，其中所述捕捉剂包被在微量滴定板上。

39. 权利要求 34-38 任一项的试剂盒，还包含对于所述可检测抗体而言的检测手段。

40. 权利要求 39 的试剂盒，其中所述检测手段是亲合素或链霉亲合素-辣根过氧化物酶。

41. 权利要求 34-40 任一项的试剂盒，还包含纯化的目标抗体作为标准品。

42. 权利要求 34-41 任一项的试剂盒，其中所述捕捉剂和可检测抗体是单克隆抗体。

43. 权利要求 34-42 任一项的试剂盒，其中所述捕捉剂和可检测抗体是相同的。

44. 权利要求 34-42 任一项的试剂盒，其中所述捕捉剂和可检测抗体是不同的。

45. 权利要求 34-44 任一项的试剂盒，其中所述蛋白质是 CD20。

46. 权利要求 34-45 任一项的试剂盒，其中所述目标抗体是人源化抗体。

47. 权利要求 34-46 任一项的试剂盒，其中所述目标抗体是人源化 2H7 抗体。

抗体测定法

相关申请

本申请是按照 37 CFR 1.53(b)(1)提交的非临时性申请，按照 35 USC 119(e)要求 2004 年 4 月 16 日提交的临时申请 60/563193 的优先权，将其内容收入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及基于使用抗独特型抗体的高通量测定法，用于检测针对具有小胞外域的跨膜抗原的抗体，诸如用于量化血清中的人源化抗 CD20 抗体进行临床研究。

发明背景

跨膜蛋白延伸穿过脂双层，它们部分蛋白体在两侧，具有疏水区和亲水区。通常，跨膜蛋白具有其胞质域和胞外域，由多肽链的跨膜区段隔开。跨膜区段接触脂双层的疏水环境且主要由具有非极性侧链的氨基酸残基构成。大部分跨膜蛋白糖基化。寡糖链通常存在于胞外域中。另外，细胞溶胶的还原性环境阻止胞质侧膜上半胱氨酸残基之间链内（和链间）二硫键(S-S)的形成。这些二硫键确实在胞外侧形成，例如在 N-末端结构域和胞外域之间。

众所周知跨膜蛋白难以结晶进行 X-射线结构研究。折叠后的三维结构对于这些蛋白质的分离形式非常不确定。因而，在使用完整跨膜蛋白作为靶标来分离在体外将会结合它的分子的尝试中这些特征提出了问题。

G 蛋白偶联受体(GPCR)是在细胞信号转导过程中发挥重要作用的跨膜蛋白超家族。GPCR 介导对于极其多种信号分子的细胞反应，包括激素、神经递质和局部介质。信号分子的结构和功能有所不同，包括蛋白质和小肽，以及氨基酸和脂肪酸衍生物。见 Watson 和 Arkininstall 的综述，The G-Protein Linked Receptor Facts Book (Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London, San Diego, New York: 1994); Proudfoot 等人，Nature

Review Immunology, 2:106-115 (2002); 和 Ji 等人, J. Biol. Chem., 273:17299-17302 (1998)。

例如, 最近发现激素松驰素的受体(LGR7 和 LGR8)为 G 蛋白偶联受体(Hsu 等人, Science, 295:671-674 (2002))。松驰素是在妊娠期间对于生殖和其它组织的生长和重塑重要的激素。Hsu 等人证明两种孤儿异源三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白)受体, LGR7 和 LGR8, 能够通过腺苷 3',5'-一磷酸(cAMP)依赖性途径介导松驰素的作用, 所述途径不同于结构相关的胰岛素和胰岛素样生长因子的途径。这些松驰素受体暗示在生殖、脑、肾、心血管和其它功能中发挥作用。

尽管结合它们的信号分子在化学和功能上是多样的, 但所有 GPCR 都共有结构相似性, 即多肽链来回穿过脂双层多次, 例如七次, 形成由三个胞外环和三个胞内环连接的七个跨膜结构域。

CCR5 和 CXCR4 都是作为 GRCP 超家族成员的趋化因子受体。CCR5 是几种 CC 趋化因子诸如 MIP-1 α (也称作 GOS19、LD78、pAT464 基因产物、TY5(鼠)和 SIS α (鼠))、MIP-1 β (也称作 Act-2、G-26、pAT744 基因产物、H-400(鼠)和 hSIS γ (鼠)) 和 RANTES (激活后受调控, 正常 T 细胞表达和分泌, 或 CCL5)的受体 (Cocchi 等人, Science, 270:1811-1815 (1995)和 Mellado 等人, Annu. Rev. Immunol., 19:397-421 (2001))。CXCR4 (以前也称作 LESTR 或融合素)是具有 C-X-C 基序的人趋化因子受体, 且在白细胞中高度表达 (Loetscher 等人, J. Biol. Chem., 269:232-237 (1994))。淋巴细胞化学引诱物基质细胞衍生因子-1 (或 SDF-1) 或 CXCL12 是 CXCR4 的配体 (Bleul 等人, Nature, 382:829-833 (1996))。CXCR4 充当 HIV-1 的共同受体 (Feng, Science, 272:872-877 (1996))。其表达还与癌症相关, 包括前列腺癌 (Taichman 等人, Cancer Res., 62:1832-1837 (2002)) 和乳腺癌转移 (Muller 等人, Nature, 410:50-56 (2001)和 Moore, Bioassays, 23:674-676 (2001))。由这些趋化因子受体生成的抗体随后也能用于预防和/或治疗 HIV 感染、癌症和其它与异常趋化因子活性相关的疾病。针对 CCR5 和 CXCR4 的人单克隆单链抗体分别可用于抑制外周血单核细胞的 HIV 感染和乳腺癌细胞的趋化性。

人 CCR5 的氨基酸序列具有七个跨膜结构域, 由作为胞外环的环 2、4 和 6 及作为胞内环的环 1、3 和 5 连接。在 Blanpain 等人, J. Biol. Chem., 274:

34719-34727 (1999)中提供了人 CCR5 的二级结构模型。

除了 CCR5 和 CXCR4 之外,趋化因子受体或趋化因子受体样孤儿受体的例子还包括但不限于 CCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR8、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、STRL33/BONZO 和 GPR15/BOB (Berger 等人, AIDS, 11, Suppl. a: S3-S16(1997)和 Dimitrov, Cell, 91:721-730 (1997))。每一种或一组这些 HIV 共同受体能够介导不同 HIV 病毒株侵入宿主细胞。

趋化因子超家族包括两个主要分支: α -趋化因子(或 CXC 趋化因子)和 β -趋化因子(CC 趋化因子)。 α -趋化因子分支包括蛋白质诸如 IL-8、嗜中性粒细胞激活肽-2 (NAP-2)、黑素瘤生长刺激性活性 (MGSA/gro 或 GROA) 和 ENA-78, 每一种都主要对嗜中性粒细胞具有吸引性和激活性作用。 β -趋化因子分支的成员影响其它细胞类型诸如单核细胞、淋巴细胞、嗜碱细胞和嗜曙红细胞 (Oppenheim 等人, Annu. Rev. Immunol., 9:617-648 (1991); Baggiolini 等人, Adv. Immunol., 55:97-179 (1994); Miller 和 Krangel, Crit. Rev. Immunol., 12:17-46 (1992); Jose 等人, J. Exp. Med., 179:881-118 (1994); Ponath 等人, J. Clin. Invest., 97:604-612 (1996)), 且包括蛋白质诸如单核细胞趋化蛋白质 1-4 (MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 MCP-4)、RANTES 和巨噬细胞炎性蛋白 (MIP-1 α 、MIP-1 β)。最近, 鉴定了一类新的膜结合趋化因子, 命名为 CX3C 趋化因子 (Bazan 等人, Nature, 385:640-644 (1997))。趋化因子能介导一组对白细胞的促炎作用, 诸如触发趋化作用、脱粒作用、脂质介质的合成和整联蛋白激活 (Oppenheim 等人, Annu. Rev. Immunol., 9:617-648 (1991); Baggiolini 等人, Adv. Immunol., 55:97-179 (1994); Miller 和 Krangel, Crit. Rev. Immunol., 12:17-46 (1992))。最近, 证明某些 β -趋化因子在体外抑制人 T 细胞系的 HIV-1 感染 (Cocchi 等人, Science, 270:1811-1815 (1995))。

趋化因子结合七次跨膜 (7TMS) G 蛋白偶联受体 (Murphy, Annu. Rev. Immunol., 12:593-633 (1994))。一些已知的 CC 或 β -趋化因子受体包括结合 MIP-1 α 和 RANTES 的 CCR1 (Neote 等人, Cell, 72:415-425 (1993); Gao, J. Exp. Med., 177:1421-1427 (1993)); 结合包括 MCP-1、MCP-2、MCP-3 和 MCP-4 的趋化因子的 CCR2 (Charo 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2752-2756 (1994); Myers 等人, J. Biol. Chem., 270:5786-5792 (1995); Gong 等人, J. Biol. Chem., 272:11682-11685 (1997); Garcia-Zepeda 等人, J. Immunol., 157:5613-

5626 (1996))；结合包括 eotaxin、RANTES 和 MCP-3 的趋化因子的 CCR3 (Ponath 等人, J. Exp. Med., 183:2437-2448 (1996))；已发现响应 MCP-1、MIP-1 α 和 RANTES 而发信号的 CCR4 (Power 等人, J. Biol. Chem., 270:19495-19500 (1995))；和已证明响应 MIP-1 α 、MIP-1 β 和 RANTES 而发信号的 CCR5 (Boring 等人, J. Biol. Chem., 271(13):7551-7558 (1996); Raport, J. Biol. Chem., 271:17161-17166 (1996); 和 Samson 等人, Biochemistry, 35:3362-3367 (1996))。

CCR2 在几种白细胞亚组的表面上表达, 且好象由于编码羧基末端区的 mRNA 的可变剪接而以两种少许不同的形式 (CCR2a 和 CCR2b) 表达 (Charo 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2752-2756 (1994))。MCP-1 作用于单核细胞、淋巴细胞和嗜碱细胞, 诱导趋化作用、颗粒释放、呼吸爆发及组胺和细胞因子释放。研究表明 MCP-1 与疾病的病理相关, 诸如类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、肉芽肿病和多发性硬化 (Koch, J. Clin. Invest., 90:772-79 (1992); Hosaka 等人, Clin. Exp. Immunol., 97:451-457 (1994); Schwartz 等人, Am. J. Cardiol., 71(6):9B-14B (1993); Schimmer 等人, J. Immunol., 160:1466-1471 (1998); Flory 等人, Lab. Invest., 69:396-404 (1993); Gong 等人, J. Exp. Med., 186:131-137 (1997))。此外, CCR2 可充当 HIV 的共同受体 (Connor 等人, J. Exp. Med., 185:621-628 (1997))。因而, CCR2 受体拮抗剂可能代表一类新的重要治疗剂。

CD20 是 33-36kDa 的非糖基化膜蛋白, 作为不同的可变剪接变体存在于正常和恶性 B 细胞上。它具有四个跨膜疏水区及胞内末端和约 42 个氨基酸的短间插胞外环 (Tedder 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:208-212 (1988); Einfeld 等人, EMBO, 7:711-717 (1988))。嵌合抗 CD20 抗体, rituximab (RITUXAN®) 已经用于在非何杰金氏淋巴瘤患者中损耗 B 细胞作为标准疗法的一部分。它在治疗有些自身免疫病中也是有效的 (Boye 等人, Annals of Oncology, 14:520-535 (2003); Von Schilling 等人, Seminars in Cancer Biology, 13:211-222 (2003); Kneitz 等人, Immunobiology, 206:519-527 (2002))。优选人源化抗体进行 B 细胞相关紊乱的长期治疗, 因为它不大可能引发免疫反应 (Boye 等人, 同上; Maeda 等人, International Journal of Hematology, 74:70-75 (2001))。不过, CD20 中两个跨膜区之间的小胞外环难以以其天然构象表达, 就像许多 CXC 趋化因子和 CC 趋化因子受体一样。

通常，市场上对于高浓度、高分子量分析物的免疫测定法以分析物的多价为依据。最后，通过凝聚（在浊度或比浊测定中）、沉淀（径向免疫扩散）或夹心免疫测定法诸如 ELISA，由某种交联检测所述分析物。

美国公开号 US 20020142356 提供了用于获得针对特异于高浓度、高分子量靶抗原的抗体的抗独特型单克隆抗体群的方法，其中所述抗独特型抗体群对于特异于所述靶抗原的选定抗体具有广泛的结合亲和力，且其中能够选择一小组所述抗独特型抗体群，它们对于特定应用具有所需亲和力。美国公开号 US 20020142356 涉及抗原的竞争性免疫测定法，使用抗体作为涂层并使用抗独特型抗体作为检测，反之亦然。公开了使用抗独特型抗体作为代用抗原的其它参考文献包括 Losman, Cancer Research, 55 (23 suppl S): S5978-S5982 (1995); Becker, J. of Immunol. Methods, 192(1-2):73-85 (1996); Baral, International J of Cancer, 92(1):88-95 (2001); 和 Kohen, Food and Agriculture Immunology, 12(3):193-201 (2000)。

对于各种抗原的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 包括基于比色法、化学发光和荧光测定法的测定法。ELISA 已经成功用于测定血浆和尿液样品中低量的药物和其它抗原性成分，不包括任何提取步骤，且实施简单。用于检测蛋白质抗原的抗体的 ELISA 常常利用短合成肽与微量滴定板塑料表面的直接结合。由于它们的合成性质及利用高效液相层析的有效纯化方法，所述肽一般非常纯。短肽的缺点是它们通常呈现线性的，而非构象性或间断的表位。为了呈现构象性表位，利用长肽或完整天然蛋白质。蛋白质抗原直接结合板的疏水性聚苯乙烯支持物可导致所结合蛋白质的部分或全部变性及其构象性表位的丧失。用介导抗原固定 (捕捉 ELISA) 的抗体包被板可避免这种效应。不过，过表达的重组蛋白常常是不可溶的，且在要分析针对构象性表位的抗体时需要在变性条件下纯化和复性。利用重组融合蛋白作为包被蛋白质的通用 ELISA 见例如美国公开号 US 20030044870。

之前报道过利用活悬浮细胞的基于细胞的 ELISA 方法用于筛选杂交瘤或用于检测针对细胞表面抗原的抗体 (Posner 等人, J. Immunol. Methods, 48: 23 (1982); Morris 等人, Hum. Immunol., 5:1 (1982); Grunow 等人, J. Immunol. Meth., 171:93 (1994))。洗涤步骤利用离心。还描述了利用甲醛或戊二醛固定的悬浮液 (Walker 等人, J. Immunol. Meth., 154:121 (1992); Smith 等人, BioTechniques, 22:952 (1997); Yang 等人, J. Immunol. Meth., 277:87 (2003))

或粘附细胞 (Smith 等人, 同上) 以及非固定干燥细胞 (Arunachalam 等人, J. Immunol. Meth., 135:181 (1990); Schlosser 等人, J. Immunol. Meth., 140:101 (1991)) 的简易细胞 ELISA (CELISA) 方法 (Sedgwick 和 Czerkinsky, J. Immunol. Meth., 150:159 (1992)) 用于检测针对细胞表面抗原的抗体或表征细胞表面分子。不使用活细胞, 固定或干燥可能引发 CD20 上表位的变化 (Baron 等人, Scand. J. Immunol., 6:385 (1977); Schlosser 等人, 同上; Sedgwick 和 Czerkinsky, 同上)。

此外, Meng 等人, "Measuring CD20 binding for humanization of anti-CD20 antibody", FASEB Journal, volume 18, No. 4, A59, program no. 85.8 (2004) 公开了对人源化抗体特异的抗独特型抗体可以以 ELISA 方式用于测量抗体的血清浓度进行临床研究, 但是不含细节。Hong 等人, J. Immunol. Meth., 294:189-197 (2004) 公开了用于针对 CD20 的人源化抗体的基于活细胞和抗独特型抗体的定量 ELISA。

由于许多抗原诸如具有天然构象的 CD20 和趋化因子受体的可溶性胞外域不可作为捕捉剂用于测量选定样品中结合这类结构域的抗体的浓度, 所以需要测量结合这类蛋白质的抗体的浓度。还需要检测生物学样品中针对这类细胞表面蛋白质的人源化抗体, 而不必同样检测针对或不针对这类细胞表面蛋白质的某些其它抗体, 特别是在临床样品中。

发明概述

因此, 本发明正如要求保护的。在一个实施方案中, 提供了酶联免疫吸附测定 (ELISA) 方法, 用于特异性检测生物学样品中结合细胞表面多跨膜蛋白的目标抗体, 所述细胞表面多跨膜蛋白包含少于约 75 个氨基酸的间插胞外域 (intervening extracellular domain), 该方法包括: (a) 将生物学样品与捕捉剂接触并温育, 其中所述捕捉剂是结合目标抗体独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体独特型的抗独特型抗体, 从而结合样品中存在的任何目标抗体, 并 (b) 将样品, 及由此将任何结合的目标抗体, 与结合目标抗体的可检测抗体相接触, 并利用对于可检测抗体的检测手段 (detectable means) 测量结合捕捉剂的任何目标抗体的水平。所述捕捉剂不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型, 从而使得目标抗体能够区别于样品中存在的这类抗体。优选地, 所述测定法是基于细胞的。

优选地，所述目标抗体是单克隆抗体，更优选人源化抗体或鼠源抗体。

在另一个优选的实施方案中，所述可检测抗体是结合目标抗体独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体独特型的可检测抗独特型抗体。所述捕捉剂和可检测抗体可以是相同或不同的。

在另一个优选的方面，所述生物学样品分离自人类受试者或小鼠受试者。所述生物学样品优选为血浆、血清或尿液，最优选血清。

进一步优选的是这样的方法，其中所述测量步骤还包括利用标准曲线来测定与已知水平相比目标抗体的水平。

在另一个优选的方面，所述蛋白质是 CD20 而所述目标抗体是人源化 2H7 抗体。这类人源化目标抗体优选为完整抗体或抗体片段，其包含可变轻链序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
NLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTK
VEIKR (SEQ ID NO:1);

和可变重链序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSNSYWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:2)。

当人源化 2H7 抗体为完整抗体时，优选地是它包含轻链氨基酸序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
NLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3);

和重链氨基酸序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSNSYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO: 4)

或重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)。

在另一个优选的方面,所述捕捉剂是单克隆抗体,优选鼠源抗体,更优选抗体 8A3 或抗体 8C5。这些抗体具有同种型 IgG29。在这类优选的方面,抗体 8A3 可用作捕捉剂和可检测抗体,或者抗体 8C5 用作捕捉剂而抗体 8A3 用作可检测抗体。

在又一个优选的实施方案中,所述测定方法包括下列步骤:(a)将生物学样品与固定于固体支持物上的捕捉剂相接触并温育以便使用捕捉剂结合样品中存在的任何目标抗体;(b)将生物学样品与结合任何存在的目标抗体的固定化捕捉剂分开;(c)将结合任何存在的目标抗体的固定化捕捉剂与针对目标抗体的可检测抗独特型抗体相接触,所述可检测抗体结合目标抗体的独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型;并(d)利用对于可检测抗体的检测手段测量结合捕捉剂的任何目标抗体的水平。

在这类方法中,优选将所述固定化捕捉剂包被在微量滴定板上。还优选的是其中所述可检测抗体可直接检测,和/或其中所述可检测抗体通过荧光或比色试剂放大。在另一个实施方案中,将所述可检测抗体生物素化而所述检测手段是亲合素或链霉亲合素-辣根过氧化物酶(HRP)。

在又一方面,本发明提供了抗体 8A3,它分别包含 SEQ ID NO:7 和 9

作为重链和轻链，且可从 ATCC 保藏号为 PTA-5914 的杂交瘤 8A3.10 获得或生产。

在又一个实施方案中，本发明提供了抗体 8C5，它可从 ATCC 保藏号为 PTA-5915 的杂交瘤 8C5.1 获得或生产。

这两种抗体都可偶联可检测标记物。

在另一方面，本发明提供了分别以 ATCC 保藏号 PTA-5915 或 PTA-5914 保藏的杂交瘤 8C5.1 或 8A3.10。

在又一个实施方案中，本发明提供了免疫测定试剂盒，用于特异性检测在生物学样品中结合细胞表面多跨膜蛋白的目标抗体，所述细胞表面多跨膜蛋白包含少于约 75 个氨基酸的间插胞外域，该试剂盒包含：(a) 装有抗独特型抗体作为捕捉剂的容器，所述抗独特型抗体结合目标抗体的独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型；(b) 装有可检测抗独特型抗体的容器，所述可检测抗独特型抗体结合目标抗体的独特型但不结合样品中结合所述蛋白质的至少一种其它抗体的独特型；和(c) 检测所述目标抗体的说明书。

优选地，所述试剂盒可用于检测目标抗体的 ELISA 方法，更优选基于细胞的 ELISA 方法。另外，在一个优选的实施方案中，所述试剂盒还包含捕捉剂的固体支持物，其中优选将捕捉剂固定于固体支持物上，诸如包被在微量滴定板上。所述试剂盒还可包含对于可检测抗体的检测手段，诸如亲合素或链霉亲合素-HRP。所述试剂盒还可包含纯化的目标抗体作为标准品。在其它优选的实施方案中，所述捕捉剂和可检测抗体是单克隆抗体，且它们可以是相同或不同的。所述蛋白质优选是 CD20，而所述目标抗体优选是人源化抗体，更优选人源化 2H7 抗体。

本文的方法使用特异性抗独特型抗体作为包被和检测剂来解决特异性检测针对具有小胞外域的细胞表面蛋白质的抗体的问题。它优选以基于细胞的形式，更优选利用活细胞，仍更优选活悬浮 WIL2 细胞或活粘附经转染中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。所述测定法能克服来自其它抗体的干扰以降低非特异性粘连和背景。它代表了生物学样品，特别是血清中抗体的清洁的，可重复的测定法，具有高通量从而可以一次运行许多样品，正如通过使用一块板的自动化 ELISA。

附图简述

图 1A 和 1B 显示了嵌合抗 CD20 IgG (实线) 和人源化抗 CD20 IgG (虚线) 在悬浮 WIL2 结合测定 (图 1A) 和贴壁 2H3 CHO 克隆结合测定 (图 1B) 中的滴定曲线。WIL2 和 CHO 结合测定的背景读数 (OD 450nm) 分别为 0.064 ± 0.003 和 0.116 ± 0.003 。对于 WIL2 和 2H3 结合测定计算的人源化抗 CD20 IgG 的相对活性分别为 0.68 ± 0.04 和 0.70 ± 0.02 (n=2)。

图 2 显示了 RITUXAN® 结合具有不同 CD20 表达的 CHO 克隆 (表 1) 的滴定曲线。比较也包括克隆 3G8, 其具有很少的 CD20 表达 (与克隆 4H10 的 9.8 相比平均荧光为 0.5)。所述测定利用悬浮形式的 300,000 细胞/孔进行。克隆 4H10 的背景读数 (OD 450nm) 为 0.016 ± 0.001 (n=2)。

图 3A 和 3B 显示了抗独特型抗体 8C5 (图 3A) 和 8A3 (图 3B) 的特异性。将连续稀释的人源化抗 CD20 IgG、HERCEPTIN® (Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992))、抗血管内皮生长因子 (VEGF) (Presta 等人, *Cancer Res.*, 57:4593-4599 (1997))、E25 (Presta 等人, *J. Immunology*, 151:2623-2632 (1993))、RITUXAN® 和正常人 IgG (Zymed, South San Francisco, CA) 在 8C5 或 8A3 包被的 ELISA 板上温育并利用山羊抗人 IgG Fc-HRP 检测结合的抗体。背景读数 (OD 450nm) 为 0.012 ± 0.001 (n=2)。

图 4A 和 4B 显示了利用抗独特型抗体 8C5 进行包被和生物素化 8A3 进行检测的 ELISA。图 4A 显示了缓冲液 (实线) 或 20% 人血清 (虚线) 中人源化抗 CD20 IgG 的滴定曲线。在缓冲液或 20% 人血清中的背景读数 (OD 450nm) 分别为 0.020 ± 0.004 和 0.015 ± 0.003 (n=3)。图 4B 显示了在缓冲液 (实线) 或在 10% 小鼠血清 (虚线) 中亲本鼠抗 CD20 的滴定曲线。在缓冲液或 10% 小鼠血清中的背景读数 (OD 450nm) 分别为 0.057 ± 0.004 和 0.018 ± 0.001 (n=2)。

图 5A-5E 显示了抗体 8A3 的氨基酸和核苷酸序列, 其中图 5A 显示 MAb 8A3 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:6), 图 5B 显示不含 23 个氨基酸的信号序列的 MAb 8A3 的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:7), 图 5C 显示 MAb 8A3 的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:8), 图 5D 显示不含 23 个氨基酸的信号序列的 MAb 8A3 的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:9), 而图 5E 显示编码 MAb 8A3 轻链和重链的核苷酸序列, 其中核苷酸残基 40 是轻链信号序列的开始

(SEQ ID NO:10)。

图 6A 是比较鼠 2H7 (SEQ ID NO:11)、人源化 2H7.v16 变体 (SEQ ID NO:12)和人 κ 轻链亚组 I (SEQ ID NO:13)每种的轻链可变区(V_L)氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7.v16 的 V_L 的 CDR 如下: CDR1 (SEQ ID NO:14)、CDR2 (SEQ ID NO:15)和 CDR3 (SEQ ID NO:16)。

图 6B 是比较鼠 2H7 (SEQ ID NO:17)、人源化 2H7.v16 变体 (SEQ ID NO:18)和人重链亚组 III 共有序列 (SEQ ID NO:19)每种的重链可变区(V_H)氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7.v16 的 V_H 的 CDR 如下: CDR1 (SEQ ID NO:20)、CDR2 (SEQ ID NO:21)和 CDR3 (SEQ ID NO:22)。

在图 6A 和图 6B 中,将每条链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 包括在括弧中,侧翼为框架区 FR1-FR4, 如图所示。2H7 指鼠 2H7 抗体。两行序列之间的星号表示两种序列之间不同的位置。残基编号是根据 Kabat 等人,《Sequences of Immunological Interest》,第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 插入显示为 a、b、c、d 和 e。

图 7A 和 7B 显示了 2H7.v16 的轻链氨基酸序列, 其中图 7A 显示包含 DIQ 之前的头 19 个氨基酸的完整轻链, 它是在成熟多肽链中不存在的分泌信号序列(SEQ ID NO:23), 而图 7B 显示成熟多肽轻链(SEQ ID NO:24)。

图 8A 和 8B 显示了 2H7.v16 的重链氨基酸序列, 其中图 8A 显示包含 EVQ 之前的头 19 个氨基酸的完整重链, 它是在成熟多肽链中不存在的分泌信号序列(SEQ ID NO:25), 而图 8B 显示成熟多肽重链(SEQ ID NO:26)。将图 6B 中的 V_H 序列(SEQ ID NO:18)与完整重链序列相比对, 人 $\gamma 1$ 恒定区来自 SEQ ID NO:25 中的氨基酸位置 114-471。

图 9A 和 9B 显示了 2H7.v31 的重链氨基酸序列, 其中图 9A 显示包含 EVQ 之前的头 19 个氨基酸的完整重链, 它是在成熟多肽链中不存在的分泌信号序列(SEQ ID NO:27), 而图 9B 显示成熟多肽重链(SEQ ID NO:28)。轻链与 2H7.v16 的相同 (见图 7)。

图 10 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:12)和人源化 2H7.v138 变体(SEQ ID NO:33)的轻链氨基酸序列的序列比对。

图 11 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:18)和人源化 2H7.v138 变体(SEQ ID NO:34)的重链氨基酸序列的序列比对。

图 12 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:18)和人源化 2H7.v511 (SEQ ID NO:)的轻链氨基酸序列的序列比对,其中残基全部利用 EU 编号系统进行编号。对于 EU 抗体, v16 和 v511 在可变区的位置 30 上有一处删除;所以, v16/v511 的连续编号 S30 指定为位置 31 (EU)。

图 13 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:18)和人源化 2H7.v511 (SEQ ID NO:)的重链氨基酸序列的序列比对,其中残基全部利用 EU 编号系统进行编号。在可变区中,与 EU 抗体相比, v16 和 v511 具有 5 个残基的一处插入,指定为 104a-e。第一恒定区, CH1, 开始于位置 118 (EU)。

图 14 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:18)和人源化 2H7.v511 (SEQ ID NO:38)的轻链氨基酸序列的序列比对,其中残基利用 Kabat 编号系统进行编号。注意 v16 和 v511 在 Kabat 位置 31 上具有一处删除;所以连续编号的残基 Y31 指定为 Y32 (Kabat)。

图 15 是比较人源化 2H7.v16 变体(SEQ ID NO:18)和人源化 2H7.v511 (SEQ ID NO:39)的重链氨基酸序列的序列比对,其中可变区残基(1-113)利用 Kabat 编号系统进行编号。恒定区残基(118-447)利用 EU 编号系统进行编号。

图 16 显示了小鼠血清中的三种小鼠 2H7 变体 (v16、v96 和 v327) 在利用 MAb 85C 作为包被抗体和生物素化 MAb 8A3 (8A3-bio)作为检测抗体的本文基于抗独特型抗体的 ELISA 中的标准曲线。

图 17 显示了小鼠血清中的四种人源化 2H7 变体 (v16、v114、v488 和 v511) 在利用 MAb 85C 作为包被抗体和生物素化 MAb 8A3 (8A3-bio)作为检测抗体的本文基于抗独特型抗体的 ELISA 中的标准曲线。

优选实施方案的详述

I. 定义

术语“包含少于约 75 个氨基酸的间插胞外域(ECD)的细胞表面多跨膜蛋白”指具有穿越膜的结构域的蛋白质,且只有一个短胞外域可用于生成抗体。“短”一般意为约 20 到少于约 75 个氨基酸的范围,更优选约 20 到约 50 个氨基酸。多跨膜指蛋白质中多于两个跨膜结构域。这类蛋白质的例子包括但不限于 G 蛋白偶联受体,诸如激素松驰素的受体(例如 LGR7 和 LGR8)和趋化因子受体,和符合以上蛋白质定义的 B 细胞表面标记,诸如 CD20 抗原 (CD20)。

术语“趋化因子”指在哺乳类生物体中表达的所有已知的趋化细胞因子，其介导白细胞补充和渗透到组织中。术语“趋化因子”包括但不限于 C、CC、CXC 和 CXXXC 趋化细胞因子家族的所有哺乳动物成员，在本领域基于其中半胱氨酸残基的分布而进行分类。作为本领域中的例子，短语“趋化因子受体”指与一种或多种趋化因子相互作用的跨膜蛋白。“趋化因子受体”的种类包括但不限于在本领域中归入 CR、CCR、CXCR 和 CXXXCR 的所有趋化因子受体。术语“细胞因子”指本领域已知的，结合细胞表面上的细胞外受体并由此介导细胞功能的所有细胞因子，包括但不限于 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 和 IL-13。趋化因子受体的例子包括白介素-8 (IL-8)、RANTES (激活后受调控的，正常 T 细胞表达的，且假定分泌的)、巨噬细胞炎性蛋白-1 (MIP-1)、CCR1、CCR2、CCR2B、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CCR11、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、CX3CR1、XCR1、孤儿趋化因子受体 GPR-9-6、血小板因子 4 (PF4)、单核细胞趋化和激活因子 (MCAF) 和嗜中性粒细胞激活蛋白-2 (NAP-2) 的那些受体，它们具有小间插 ECD。

本文的“B 细胞表面标志”或“B 细胞表面抗原”是在 B 细胞表面上表达的抗原，它能够用结合它的拮抗剂靶向且还符合上文对于多跨膜蛋白的标准。例示性的 B 细胞表面标志包括 CD10、CD19、CD20、CD21、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85 和 CD86 白细胞表面标志。(介绍见 The Leukocyte Antigen Facts Book, 第 2 版, Barclay 等人编, (Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York: 1997)。)其它 B 细胞表面标志包括 RP105、FcRH2、CD79A、C79B、B 细胞 CR2、CCR6、CD72、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA 和 239287_at。与哺乳动物的其它非 B 细胞组织相比，特别感兴趣的 B 细胞表面标志优选在 B 细胞上表达，且可以在前体 B 细胞和成熟 B 细胞上表达。

“CD20”抗原或“CD20”是在超过 90%来自外周血或淋巴组织的 B 细胞表面上发现的约 35kDa 非糖基化磷蛋白。CD20 存在于正常 B 细胞及恶

性 B 细胞上,但在干细胞上不表达。文献中 CD20 的其它名称包括“B 淋巴细胞限制抗原”和“Bp35”。例如,Clark 等人,PNAS (USA), 82:1766 (1985) 中介绍了 CD20 抗原。

对于治疗目的来说“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物,包括人、家畜和农场动物,及动物园、运动或宠物动物,诸如犬、马、猫、绵羊、猪、牛等。优选地,哺乳动物是人。

术语“癌症”、“癌性的”和“恶性的”指或描述哺乳动物中特征通常是不受调控的细胞生长的病理状况。癌症的例子包括但不限于癌瘤,包括腺癌、淋巴瘤、母细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病。这类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、何杰金氏和非何杰金氏淋巴瘤、胰癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝脏癌诸如肝的癌和肝癌、膀胱癌、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌诸如肾细胞癌和威尔姆斯氏瘤、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌和各种类型的头颈癌。本文中进行治疗的优选癌症为乳癌、结肠癌、肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、淋巴瘤诸如非何杰金氏淋巴瘤、和黑素瘤。

术语“趋化因子介导的疾病”指可通过趋化因子受体拮抗剂治疗或预防或改善其症状的疾病。这类疾病包括例如银屑病、特应性皮炎、哮喘、慢性阻塞性肺紊乱、成人呼吸病、关节炎、炎性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、感染性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性败血症、中毒性休克综合征、中风、心肾再灌注损伤、肾小球肾炎、血栓症、阿尔茨海默氏病、移植物抗宿主反应、同种异体移植排斥、疟疾、急性呼吸窘迫综合征、延迟型过敏、动脉粥样硬化、脑心局部缺血、骨关节炎、多发性硬化、再狭窄、血管发生、骨质疏松、龋齿、呼吸病毒、疱疹病毒、肝炎病毒、HIV、卡波西氏肉瘤相关病毒、脑膜炎、囊性纤维化、早产(pre-term labor)、咳嗽、瘙痒症(pruritis)、多器官机能障碍、外伤、拉伤、扭伤、挫伤、银屑病关节炎、疱疹、脑炎、CNS 脉管炎、外伤性脑损伤、CNS 肿瘤、蛛网膜下出血、术后创伤、间质性肺炎、超敏反应、晶体诱导型关节炎、急性和慢性胰腺炎、急性酒精性肝炎、坏死性小肠结肠炎、慢性鼻窦炎、血管发生性眼病、眼炎、早熟型视网膜病、糖尿病性视网膜病、湿型黄斑变性、角膜新血管形成、多肌炎、血管炎、痤疮、胃和十二指肠溃疡、乳糜泻、食管炎、舌

炎、气流阻塞、气道高反应性、支气管扩张、细支气管炎、梗阻性细支气管炎、慢性支气管炎、肺源性心脏病、呼吸困难、肺气肿、呼吸过度、充气过度、低氧血、氧过多诱导的炎症、缺氧、外科性肺容量减少、肺纤维化、肺动脉高压、右心室肥大、与持续不卧床腹膜透析相关的腹膜炎、粒细胞埃里希体病、节结病、小气道病、通气与灌注比值失调、哮喘、感冒、痛风、乙醇性肝病、狼疮、灸疗(burn therapy)、牙周炎、移植再灌注损伤、早期移植、类风湿性关节炎(所有类型)和癌症。炎性肠病包括急性和慢性炎性肠病,而 HIV 包括 AIDS。可联合针对趋化因子受体的抗体用于治疗这类疾病的例示性药物包括美国公开号 US 20040053953 中公开的那些。

术语“检测”以最广义使用来包括靶分子的定性和定量测量。在一方面,利用本文所描述的检测方法仅仅来鉴定生物学样品中目标抗体的存在。在另一方面,利用所述方法来测试样品中目标抗体是否以可检测的水平存在。在又一方面,可利用所述方法量化样品中目标抗体的数量并进一步比较来自不同样品的抗体水平。

术语“目标抗体”指结合本文所述蛋白质的抗体。这类抗体优选为单克隆抗体,更优选啮齿类,例如鼠源抗体或人源化抗体,仍更优选人源化抗体。这类抗体的例子包括如下抗体或其功能片段,其结合哺乳动物 CC 趋化因子受体(CCR),诸如 C 趋化因子受体 2(也称作 CCR2、CKR-2、MCP-1RA 或 MCP-1RB)或受体一部分(例如抗 CCR2)。例如,这类抗体可具有对人或恒河猴 CCR2 或其部分的特异性和/或阻断配体(例如 MCP-1、MCP-2、MCP-3 或 MCP-4)结合受体和抑制与配体结合受体相关的功能(例如白细胞交通(trafficking))。这类抗体优选是鼠源单克隆抗体(MAb) LS132.1D9 (1D9)或能与 1D9 竞争结合人 CCR2 或人 CCR2 一部分的抗体,诸如美国专利 6,696,550 中描述的人源化抗体。实例还包括结合趋化因子受体 CCR3 或 CCR10 的抗体,其制备在美国专利 6,692,922 中有描述。另一个例子是针对趋化因子受体 GPR-9-6 的抗体,诸如 MAb 3C3,其选择性地与 GPR-9-6 转染子反应(见美国专利 6,689,570)。其它例子为特异性结合和/或调节趋化因子受体的一种拓扑型而非该受体的第二拓扑型的抗体,如例如美国公开号 US 20040018563 中所描述的。另一个例子是分离的异质抗白细胞受体 IgM 抗体,其至少靶向 CCR5、CCR3、CXCR4 和/或 CCR2B,如美国专利 6,610,834 中所描述的。其它例子是完全人的抗 CD3 抗体,诸如美国公开号

US 20030216551 中公开的 fhCD3mAb, 当体内施用时它干扰哺乳动物趋化因子受体的体内作用。另外的例子是针对 CXCR4 的单克隆人源抗体, 其能够抑制 HIV 感染和人乳癌细胞的趋化性, 诸如结合人 CXCR4 环 6 的抗体, 例如 Ab124 和 Ab125, 如美国专利公开号 US 20030206909 中所描述的。本文最优选的目标抗体是人源化 2H7 抗体。

术语“生物学样品”指可能含有目标抗体的所有生物学物质。样品可以是生物学液体, 诸如全血或全血组分, 包括红细胞、白细胞、血小板、血清和血浆、腹水、尿液、玻璃体液、淋巴液、滑液、滤泡液、精液、羊水、乳汁、唾液、痰、泪液、汗液、粘液、脑脊液, 和其它可能含有目标分析物的身体组分, 以及组织培养物培养基和组织提取物诸如匀浆组织, 和细胞提取物。优选地, 样品是来自任何动物的身体样品, 但优选来自哺乳动物, 更优选来自人类受试者, 例如在测量临床样品中的抗体诸如人源化抗体时, 或小鼠受试者, 例如在测量小鼠样品, 特别是血清中的亲本小鼠抗体时。最优选地, 这类生物学样品来自临床患者。本文优选的生物学样品是血清、血浆或尿液, 更优选血清, 最优选来自临床患者的血清。

术语“捕捉剂”或“包被抗体”指这样的抗独特型抗体或这类抗体的混合物, 其结合目标抗体的独特型且能够结合并捕获生物学样品中的目标抗体, 从而在适当的条件下可将捕捉剂和目标抗体的复合物与剩余样品分开。抗独特型抗体是结合关联抗体, 在本案中为目标抗体的 V_H 和/或 V_L 结构域的抗体。通常, 通过用目标抗体免疫哺乳动物诸如小鼠并生成杂交瘤并从衍生自杂交瘤的一组抗体中选择那些在测定中给出最清楚信号的抗体来制备这类抗独特型抗体, 无论是用作捕捉剂或可检测抗体。通常, 捕捉剂是固定化的或可固定的。优选地, 这类抗独特型抗体是单克隆抗体, 更优选啮齿类抗体, 仍更优选鼠或大鼠抗体, 最优选鼠源抗体。

术语“可检测抗体”指这样的抗独特型抗体或这类抗体的混合物, 其结合目标抗体的独特型且能够直接地通过由检测手段扩增的标记物进行检测, 或间接地通过例如经过标记的另一种抗体进行检测。对于直接标记, 一般将抗体偶联可通过一些手段检测的模块。优选的可检测抗体是生物素化抗体。优选的这类抗独特型抗体是单克隆抗体, 更优选啮齿类抗体, 仍更优选鼠或大鼠抗体, 最优选鼠源抗体。

术语“检测手段”指通过信号报告随后在本文的测定中读出用来检测

可检测抗体的存在的模块或技术。它包括扩增固定化标记物诸如捕获到微量滴定板上的标记物的试剂。优选地，所述检测手段是亲合素或链霉亲合素-HRP。

术语“抗体”在本文中以最广义使用并具体覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体（如双特异性抗体）、及抗体片段，只要它们显示所需生物学活性。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选包含其抗原结合或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

为了本文的目的，“完整抗体”指包含重链和轻链可变区及 Fc 区的抗体。

“天然抗体”通常是由两条相同的轻链（L）和两条相同的重链（H）构成的约 150,000 道尔顿的异型四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接，而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链中有所变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变区（V_H），接着是多个恒定区。每条轻链在一端具有一个可变区（V_L），而另一端是一个恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区排列在一起，而轻链的可变区与重链的可变区排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指由基本上同质的抗体群获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变以外。单克隆抗体是高度特异的，即针对单一抗原性位点。另外，与通常包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制品不同，每种单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性以外，单克隆抗体的优越性体现在可以通过杂交瘤培养合成它们而不受其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体由基本上同质的抗体群获得的特征，并不解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如，依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler 等人, Nature, 256:495 (1975) 描述的杂交瘤法来制备，或者可通过重组 DNA 法来制备（参见例如美国专利 4,816,567）。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson 等人, Nature, 352:624-628 (1991) 和 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) 中描述的技术由噬菌体抗体库分离。

本文的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白），其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及这类抗体的片段，只要它们展示所需生物学活性（美国专利 4,816,567; Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本文感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物（如旧大陆猴类(Old World Monkey)，诸如狒狒、恒河猴或猕猴）的可变区抗原结合序列及人恒定区序列的“灵长类化(primatized)”抗体（美国专利 5,693,780）。

非人源（如鼠源）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人源免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人源免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替代的免疫球蛋白。在有些情况中，将人源免疫球蛋白的框架区（FR）残基用相应的非人源残基替代。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常，人源化抗体将包含基本上不少于至少一个、通常两个如下可变区，其中所有或基本上所有的高变环对应于非人源免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有的 FR 是人源免疫球蛋白序列的 FR。任选的是，人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区（Fc），通常是人源免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等人, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 等人, Nature, 332:323-329 (1988); 及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)。

术语“可变的”指可变区中的某些部分在不同抗体的序列中差异广泛且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而，变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链可变区中称作高变区的三个区段。可变区中更加高度保守的部分称作框架区（FR）。天然重链和轻链的可变区都包含四个 FR，它们大多采取 β -折叠构象，通过形成环状连接且在某些情况中形成 β -折叠结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过 FR 非常接近的保持在一起，并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成（参见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of*

Immunological Interest》, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合, 但展示多种效应物功能, 诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 中抗体的参与。

用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段, 称作“Fab”片段, 各自具有一个抗原结合位点, 和一个残余“Fc”片段, 其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段, 它具有两个抗原结合位点且仍能使抗原交联。

“Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。正是在这种构造中, 每个可变区的三个高变区相互作用而在 V_H-V_L 二聚体的表面上确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而, 即使是单个可变区 (或只包含对抗原特异的三个高变区的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 尽管亲和力低于完整的结合位点。

Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区 (CH1)。Fab' 片段因在重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基而与 Fab 片段有所不同, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。在本文中 Fab'-SH 是其中恒定区的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的 Fab' 的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为成对 Fab' 片段生成的, 在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

来自任何脊椎动物物种的抗体 (免疫球蛋白) 的“轻链”, 根据其恒定区的氨基酸序列, 可归入两种截然不同类型中的一种, 称作 κ 和 λ 。

根据其重链恒定区的氨基酸序列, 可将抗体归入不同的类别。完整抗体有五种主要的类别: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中有些可进一步分为亚类 (同种型), 如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgA2。将与不同抗体类别对应的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域, 其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选地, 该 Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头, 使得 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun, 《*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*》, 第 113 卷,

Rosenburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 269-315, 1994.

术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变区中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3) 以及重链可变区中的 31-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3); Kabat 等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) 和/或来自“高变环”的残基(例如轻链可变区中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3) 以及重链可变区中的 26-32 (H1)、53-55 (H2) 和 96-101 (H3); Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987)。“框架”或“FR”残基指本文中定义的高变区残基以外的可变区残基。

结合 CD20 抗原的抗体的例子包括: 现在称作“rituximab” (“RITUXAN®”) 的“C2B8” (美国专利 5,736,137); 称作“Y2B8”或“Ibritumomab Tiuxetan”ZEVALIN®的钷[90]标记 2B8 鼠抗体 (美国专利 5,736,137); 鼠 IgG2a“B1”, 也称作“Tositumomab”, 任选用 ¹³¹I 标记以产生 “¹³¹I-B1”抗体 (碘 I131 tositumomab, BEXXAR™) (美国专利 5,595,721); 鼠单克隆抗体“1F5” (Press 等, *Blood*, 69(2):584-591 (1987)和“框架修补”或人源化 1F5 (WO 03/002607, Leung,S.); ATCC 保藏物 HB-96450); 鼠 2H7 和嵌合 2H7 抗体(美国专利 5,677,180); 人源化 2H7; huMax-CD20(Genmab, 丹麦); AME-133 (Applied Molecular Evolution); 和可从国际白细胞分类研究组 (International Leukocyte Typing Workshop) 获得的单克隆抗体 L27、G28-2、93-1B3、B-C1 或 NU-B2 (Valentine 等人,《Leukocyte Typing III》, McMichael 编, 第 440 页, 牛津大学出版社, 1987)。

术语“rituximab”或“RITUXAN®”在本文中针对 CD20 抗原的基因工程嵌合鼠/人单克隆抗体, 在美国专利 5,736,137 中称作“C2B8”, 包括该抗体保持结合 CD20 能力的片段。

纯粹为了本文的目的, “人源化 2H7”指结合人 CD20 的人源化抗体, 或其抗原结合片段, 其中所述抗体在体内有效损耗灵长类 B 细胞, 所述抗体在重链可变区(V_H)中至少包含来自抗人 CD20 抗体的 CDR3 序列 SEQ ID NO:22 (图 6B) 和基本上人重链亚组 III (V_HIII) 的人共有框架 (FR) 残基。在一个优选的实施方案中, 这种抗体还包含重链 CDR1 序列 SEQ ID NO:20

和 CDR2 序列 SEQ ID NO:21, 更优选还包含轻链 CDR1 序列 SEQ ID NO:14、CDR2 序列 SEQ ID NO:15、CDR3 序列 SEQ ID NO:16 和基本上人轻链 κ 亚组 I (V κ I) 的人共有框架 (FR) 残基, 其中 V_H 区可连接人 IgG 链恒定区, 其中该区可以是例如 IgG1 或 IgG3。在一个优选的实施方案中, 这类抗体包含 V_H 序列 SEQ ID NO:18 (v16, 如图 6B 所示), 任选还包含 V_L 序列 SEQ ID NO:12 (v16, 如图 6A 所示), 它可在重链中具有氨基酸替代 D56A 和 N100A 以及在轻链中具有 S92A (v.96)。更优选的这类抗体是 2H7.v16, 其分别具有轻链和重链氨基酸序列 SEQ ID NO:26 和 28, 如图 7B 和 8B 所示。另一种优选的实施方案是所述抗体为分别具有轻链和重链氨基酸序列 SEQ ID NO:26 和 30 的 2H7.v31, 如图 7B 和 9B 所示。本文的抗体还可在 Fc 区中包含至少一个提高 ADCC 和/或 CDC 活性的氨基酸替代, 诸如其中氨基酸替代是 S298A/E333A/K334A 的抗体, 更优选具有重链氨基酸序列 SEQ ID NO:28 的 2H7.v31 (如图 9B 所示)。任何这些抗体都还可在 Fc 区中包含至少一个降低 CDC 活性的氨基酸替代, 例如至少包含替代 K322A。优选的是, 这类抗体为与 RITUXAN® 相比具有 ADCC 活性提高至少 10 倍的 2H7.v114 或 2H7.v115。

优选的人源化 2H7 为这样的完整抗体或抗体片段, 其包含轻链可变区序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:1);

和重链可变区序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYNSNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:2)。

当人源化 2H7 抗体是完整抗体时, 优选地它包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3);

和重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
 GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 VVYYSNSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO:4)

或重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
 GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
 RVVYYSNSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKA
 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)。

术语“说明书”用于指在治疗性产品的商业包装中通常包括的说明书，其包含关于有关这类治疗性产品使用的适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

II. 实施本发明的方式

本文描述的测定法是利用抗独特型抗体作为目标抗体的捕捉剂和可检测抗体的 ELISA。优选地，所述 ELISA 是基于细胞的。在所述测定的第一步中，将怀疑含有或含有目标抗体的生物学样品与捕捉（或包被）抗体相接触并温育，使得所述捕捉抗体捕获或结合目标抗体，使得它能够在检测步骤中检测到。所述检测步骤包括使用可检测抗独特型抗体，它在接触任

何结合的目标抗体时结合所述目标抗体，如果存在的话，并使用检测手段来检测抗体上的标记物，及由此目标抗体的存在或存在的数量。

在一个更优选的实施方案中，所述测定利用下列步骤。

第一步

在本文所述测定法的第一步中，将怀疑含有或含有本文定义的目标抗体的生物学样品与固定化捕捉（或包被）剂相接触并温育，所述捕捉（或包被）剂是针对目标抗体的抗独特型抗体。这些抗体优选为单克隆抗体，且可以来自任何物种，但优选地它们是啮齿类，更优选鼠或大鼠，仍更优选鼠源，最优选衍生自本文鉴定的杂交瘤的 MAb 8A3 或 8C5。MAb 8A3 分别包含 SEQ ID NO:7 和 9 作为重链和轻链。因此，在一个具体的优选实施方案中，所述固定化抗独特型抗体是鼠单克隆抗体，最优选 MAb 8C5 或 8A3。固定通常通过在测定流程之前通过吸附到不溶于水的基质或表面上（美国专利 3,720,760）或是非共价或共价偶联（例如使用戊二醛或碳二亚胺交联，有或无事先用例如硝酸和还原剂活化支持物，如美国专利 3,645,852 或 Rotmans 等人, *J. Immunol. Methods*, 57:87-98 (1983)中所述）使捕捉剂不溶解，或在其之后，例如通过免疫沉淀来完成。

用于固定的固相可以是任何惰性支持物或载体，其是本质上不溶于水的且可用于免疫测定，包括例如表面、颗粒、多孔基质等形式的支持物。常用支持物的例子包括小片、SEPHADEX®凝胶、聚氯乙烯、塑料珠，及由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等等制造的测定板和试管，包括 96 孔微量滴定板，以及微粒材料，诸如滤纸、琼脂糖、交联右旋糖苷和其它多糖。或者，不溶于水的反应性基质，诸如氰-溴化物活化的碳水化合物和美国专利 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 和 4,330,440 中描述的反应性底物可适当地用于捕捉剂固定。在一个优选的实施方案中，所述固定化捕捉剂包被在微量滴定板上，且具体而言所用的优选固相是多孔微量滴定板，它可用于同时分析几个样品。最优选的是 MICROTTEST™或 MAXISORP™96 孔 ELISA 板，诸如作为 NUNC MAXISORB™或 IMMULON™出售的板。

将固相用如上定义的捕捉剂包被，根据需要其可通过非共价或共价相互作用或物理连接进行连接。附着技术包括美国专利 4,376,110 及其引用的参考文献中所描述的技术。如果是共价的，将板或其它固相与交联剂和捕

捉剂一起在本领域众所周知的条件下温育，如室温 1 小时。

将捕捉剂附着到固相底物上的常用交联剂包括例如 1,1-二(重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羧基琥珀酰亚胺酯，例如与 4-叠氮水杨酸的酯、同型双功能酰亚胺酯，包括二琥珀酰亚胺酯诸如 3,3'-二硫代二(琥珀酰亚胺丙酸酯)和双功能马来酰亚胺诸如二-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷。衍生剂，诸如 3-((p-叠氮苯基)二硫代)丙酰亚胺甲酯产生能够在光存在时形成交联的光可活化的中间产物。

如果使用 96 孔板，优选通常在缓冲液诸如 0.05M 碳酸钠中稀释的捕捉剂混合物，通过在约 4-20°C，更优选约 4-8°C 和在约 8-12，更优选约 9-10，最优选约 9.6 的 pH 温育至少约 10 小时，更优选至少过夜来包被它们。如果希望更短的包被时间，可以使用具有硝化纤维素滤膜底部的 96 孔板 (Millipore MULTISCREEN™) 或在 37°C 包被。可以远在测定本身之前对板进行堆积和包被，随后可以以人工、半自动化或自动化方式，诸如通过使用机器人技术来同时对几个样品进行所述测定。

随后通常用封闭剂处理经过包被的板，所述封闭剂非特异性地结合并饱和结合位点以防止游离配体与板的孔上多余位点的不希望的结合。为此目的适合的封闭剂的例子包括例如明胶、牛血清清蛋白、卵清蛋白、酪蛋白和脱脂乳。封闭处理通常在周围温度条件进行约 1-4 小时，优选约 1.5 到 3 小时。

包被和封闭后，将适当稀释的标准品（纯化的目标抗体）或待分析生物学样品加到固定相上。优选的稀释率为约 5-15%，优选约 10%，以体积计。可用于此目的稀释的缓冲液包括：(a)含 0.5% BSA、0.05% TWEEN 20™ 去污剂 (P20)、0.05% PROCLIN™300 抗生素、5mM EDTA、0.25% 3-((3-胆氨基丙基)二甲氨基)-1-丙烷磺酸 (CHAPS) 表面活性剂、0.2% β-γ 球蛋白和 0.35M NaCl 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)；(b)含 0.5%牛血清清蛋白 (BSA)、0.05% P20 和 0.05% PROCLIN™300 的 PBS pH7；(c)含 0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN™300、5mM EDTA 和 0.35M NaCl 的 PBS pH6.35；(d)含 0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN™300、5mM EDTA、0.2% β-γ 球蛋白和 0.35M NaCl 的 PBS；和(e)含 0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN™300、5mM EDTA、0.25% CHAPS 和 0.35M NaCl 的 PBS。对于本文所述测定来说缓冲液(a)是优选的缓冲液，因为它在每个标准品之间具

有最佳区别以及最大信噪比。PROCLIN™300 充当防腐剂，而 TWEEN 20™ 充当去污剂以消除非特异性结合。添加的缓冲液(a)的 EDTA 和盐用来降低较之其它缓冲液，包括缓冲液(b)的背景。

所用捕捉剂的量足够大以便与标准品相比给出良好的信号，但与样品中目标抗体的最大预期水平相比并非摩尔数过量。对于足够的灵敏度一说，优选的是添加的生物学样品的量使得固定化捕捉剂处于适当稀释样品后生物学样品中预期游离目标抗体最大摩尔浓度的摩尔数过量之中。这种预期水平主要依赖于正在分析的具体生物学样品中游离目标抗体的浓度水平与患者临床状况之间的任何已知相关性。因而，例如，成人患者可能在他/她的血清中具有相当高的游离目标抗体的最大预期浓度，而基于所给的剂量儿童将预期在他/她的血清中具有较低的游离目标抗体浓度。

尽管捕捉剂的浓度一般将由目标抗体的目标浓度范围所决定，考虑了生物学样品的任何必要稀释，但捕捉剂的终浓度通常将凭经验来确定以便在目标范围上使所述测定的灵敏度最大化。不过，作为一般性的指导方针，摩尔数过量适当地小于任何适当稀释样品后生物学样品中目标抗体最大预期摩尔浓度的约十倍。

选择样品和固定化捕捉剂的温育条件以使所述测定的灵敏度最大化并使解离最小化，并确保样品中存在的任何目标抗体结合所述固定化捕捉剂。优选地，温育在相当恒定的温度进行，范围从约 0°C 到约 40°C，优选在室温或左右。温育时间一般不超过约 10 小时。优选地，温育时间从约 0.5 到 3 小时，更优选约 1.5-3 小时，于室温或左右，以使目标抗体与捕捉剂的结合最大化。如果加入蛋白酶抑制剂以预防生物学液体中的蛋白酶降解目标抗体的话，温育期可以更长。

在此阶段，温育混合物的 pH 通常将在约 4-9.5 的范围内，优选地在约 6-9 的范围内，更优选约 7-8。选择温育缓冲液的 pH 以维持显著水平的捕捉剂特异性结合要捕获的目标抗体。在此步骤中可以使用多种缓冲液来达到并维持所需 pH，包括硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、TRIS-HCl 或 TRIS-磷酸盐、醋酸盐、巴比妥等等。采用的具体缓冲液对于本发明并不是关键性的，但在个别测定中一种缓冲液可能比另一种要优选。

任选的第二步

在本文所述测定方法的任选但优选的第二步中，将生物学样品与固定

化捕捉剂分开（优选通过洗涤）以除去未捕获的目标抗体。用于洗涤的溶液一般是具有确定 pH 的缓冲液（“洗涤缓冲液”），利用上文对于温育步骤描述的考虑因素和缓冲液，具有约 6-9 的优选 pH 范围。可以进行三次或更多洗涤。洗涤温度一般从冷冻室到中等温度，在测定期间保持恒温，一般从约 0-40°C，更优选约 4-30°C。例如，可在洗涤前将洗涤缓冲液在储存器中于 4°C 置于冰里，并且可以对此步骤使用洗板仪。如果担心捕获的目标抗体可能在接下来的步骤中在某种程度上解离的话，在此阶段还可以加入交联剂或其它合适的试剂以使现在结合的目标抗体共价附着于捕捉剂。

第三步

在下一步中，将固定化捕捉剂及存在的任何结合的目标抗体与可检测抗体相接触，优选在约 20-40°C，更优选约 36-38°C 的温度，二者接触的精确温度和时间主要取决于所用的检测手段。例如，在将 4-甲基伞形酰- β -半乳糖苷（MUG）、链霉亲合素-HRP 或链霉亲合素- β -半乳糖苷酶用作检测手段时，优选将接触进行过夜（例如约 15-17 个小时或更长）以将信号扩大到最大。尽管所述可检测抗体可以是多克隆或单克隆抗体，优选地它是单克隆抗体，更优选啮齿类，仍更优选鼠源，仍然还要更优选 MAb 8A3 或 8C5，最优选 MAb 8A3，以降低背景噪音。另外，优选的可检测抗体可直接检测，优选是生物素化的。生物素化标记物的检测手段优选亲合素或链霉亲合素-HRP，而所述检测手段的读取优选是荧光测定法或比色法。

优选地，在洗涤板后，向其中加入相对于预期的（如上所述）游离目标抗体最大浓度来说摩尔数过量的抗体。这种抗体（可直接或间接检测）优选为单克隆抗体，尽管可以采用任何抗体。抗体的亲和力必须足够高从而能够检测到少量的游离目标抗体，但不能太高而引起目标抗体从捕捉剂上被拉下。

在测定中可以使用相同的抗独特型抗体进行包被和检测，或者可以使用不同的抗体进行包被和检测。优选它们的选择使得背景噪音最小化。

第四步

在测定方法的最后一步中，利用对于可检测抗体的检测手段来测量现在结合到捕捉剂上的来自样品的任何游离目标抗体的水平。如果生物学样品来自临床患者，那么所述测量步骤优选包括将作为以上三个步骤的结果发生的反应与标准曲线进行比较以确定与已知量比较的目标抗体的水平。

加到固定化捕捉剂上的抗体将是直接标记的，或在洗去多余的第一种抗体后，通过添加摩尔数过量的第二种经标记的抗体来进行间接检测，所述第二种经标记的抗体针对第一种抗体的动物物种的 IgG。在后一种间接测定中，将经过标记的针对第一种抗体的抗血清加到样品中从而原位产生经标记抗体。

用于第一种或第二种抗体的标记物是任何可检测的官能团，它不干扰目标抗体与抗独特型抗体的结合。合适标记物的例子是那些已知用于免疫测定的多种标记物，包括可直接检测的模块，诸如荧光染料、化学发光剂和放射性标记物，以及诸如酶的模块，其必须反应或衍生化以进行检测。这类标记物的例子包括放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 、荧光团诸如稀土螯合剂或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹酰、伞形酮、荧光素酶例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利 4,737,456)、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、HRP、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，与酶偶联，所述酶用过氧化氢氧化染料前体，诸如 HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶、生物素(可通过例如亲合素、链霉亲合素、链霉亲合素-HRP 和链霉亲合素- β -半乳糖苷酶用 MUG 进行检测)、自旋标记物、噬菌体标记物、稳定的自由基等等。优选的标记物是生物素而优选的检测手段是亲合素或链霉亲合素-HRP。

已有常规方法将这些标记物共价结合到蛋白质或多肽上。例如，可使用偶联剂诸如二醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺、二酰亚胺盐/酯、二重氮化联苯胺等等用上述荧光剂、化学发光剂和酶标记物来对抗体进行标记。见例如美国专利 3,940,475(荧光计)和 3,645,090(酶); Hunter 等人, *Nature*, 144: 945 (1962); David 等人, *Biochemistry*, 13:1014-1021 (1974); Pain 等人, *J. Immunol. Methods*, 40:219-230 (1981); 和 Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407-412 (1982)。本文最优选的标记物是生物素，使用链霉亲合素-HRP 作为检测手段。

对于免疫测定技术领域的普通技术人员来说，将这类标记物，包括酶偶联到抗体上是标准的操作流程。见例如 O'Sullivan 等人, "Method for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay", 在 *Methods in Enzymology* 中, J.J. Langone 和 H. Van Vunakis 编, Vol. 73

(Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166。

加入最后的经标记抗体后，通过洗涤去除多余的未结合经标记抗体和随后利用适于所述标记物的检测方法测量所附着标记物的量，并将测得的量与生物学样品中目标抗体的量相关联来确定所结合抗体的量。例如，对于酶来说，显色和测量的色量将是存在的目标抗体量的直接测量。具体而言，如果 HRP 是标记物，利用底物 OPD 在 490nm 吸光度检测颜色。

在一个实施例中，在针对第一种未标记抗体的酶标记第二种抗体从固定相上洗下后，通过将固定化捕捉剂与酶的底物一起温育来对颜色或化学发光显色并测量。随后通过与平行实施的标准目标抗体生成的颜色或化学发光相比较来计算目标抗体的浓度。

抗体生产

下面是关于用于生产根据本发明使用的抗独特型抗体的例示技术的介绍。

(i) 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能剂或衍生剂，例如马来酰亚胺苯甲酰琥珀酰琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中 R 和 R^1 是不同的烃基，将相关抗原与在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的，如匙孔蛾血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

通过将例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或偶联物 (分别用于兔或小鼠) 与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和，并将溶液皮内注射于多个部位，由此将动物针对抗原、免疫原性偶联物、或衍生物进行免疫。一个月后，通过多个部位的皮下注射，用弗氏完全佐剂中肽或偶联物初始量的 1/5-1/10 对动物进行强化。7-14 天后，采集动物的血液，并测定血清的抗体效价。对动物进行强化直到效价达到稳定。优选的是，将动物用相同抗原的但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行强化。偶联物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。此外，适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫反应。

(ii) 单克隆抗体

单克隆抗体是由基本上同质的抗体群获得的，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以很少量存在的可能的天然存在突变外。如此，修饰语“单克隆”表示抗体的特征即不是分立的抗体的混合物。

例如，单克隆抗体可通过最初由 Kohler 等人, *Nature*, 256:495 (1975)描述的杂交瘤方法来制备，或者可通过重组 DNA 方法来制备（美国专利 4,816,567）。

在杂交瘤方法中，如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物，诸如仓鼠，以引发生成或能够生成特异结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。或者，可在体外免疫淋巴细胞。然后，使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，形成杂交瘤细胞（Goding, 《Monoclonal Antibodies: Principles and Practice》, 59-103, Academic Press, 1986）。

将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养，该培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT 或 HPRT），那么杂交瘤培养基通常将含有阻止缺乏 HGPRT 的细胞生长的次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷（HAT 培养基）。

优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持选择的抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些细胞中，优选的骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系，诸如可从 Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California USA) 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的衍生系，及可从 American Type Culture Collection (Manassas, Virginia USA) 获得的 SP-2、P3X63Ag.U.1 或 X63-Ag8-653 细胞。用于生成人源单克隆抗体的人源骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述（Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur 等人, 《Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications》, 51-63, Marcel Dekker Inc., New York, 1987）。

可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对目标抗体的单克隆抗体的生成。优选的是，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射免疫测定法（RIA）或 ELISA，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。当用作捕捉剂和/或可检测抗体时，还对这类克隆筛选在测定中产生最小背景噪音的那些。

单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson 等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980)的 Scatchard 分析来测定。

在鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 该克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆, 并使用标准方法进行培养 (Goding, 《Monoclonal Antibodies: Principles and Practice》, 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外, 杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

可通过常规免疫球蛋白纯化流程, 诸如例如蛋白 A-SEPHAROSE™琼脂糖层析、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析, 将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分离。

利用杂交瘤技术的一种具体制备技术包括例如通过在足垫或脾中注射佐剂诸如单磷酸脂质 A/海藻糖二霉菌酸酯(dicorynomycolate)中的抗体或作为目标抗体与匙孔蛾血蓝蛋白 (KLH) 或与鲎血蓝蛋白的偶联物, 对小鼠诸如 CAF1 小鼠或 Balb/c 进行免疫。根据需要进行多次注射。处死小鼠并将从经免疫小鼠, 尤其是那些具有高滴度的小鼠获得的腭淋巴结或脾细胞与鼠源骨髓瘤细胞系诸如 SP2/0 或 P3X63Ag.U.1(美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)) 融合。

对所得杂交瘤筛选对目标抗体而非结合不同抗原的其它抗体具有结合亲和力的抗体。这种筛选可通过常规 ELISA 进行, 筛选结合固定化目标抗体的抗体的分泌, 或筛选抑制活性超过约 95%的的 IgG 的生成 (抑制目标抗体结合蛋白质抗原)。这种筛选定义了一组具有正常或较高反应性以及目标抗体的选择性的抗体。可以进行进一步的选择来鉴定那些具有 ELISA 尤其优选的特性的抗体。用于选择优选的抗独特型抗体的标准包括它应当以相对高的亲和力 ($K_d < \text{约 } 10^{-8}\text{M}$) 结合目标抗体, 且它与目标抗体的结合应当和与分析物跨膜蛋白的结合是互相排斥的。它还应当提供具有最少背景噪音的最清楚测定结果。

可以使用 BIACORE™仪器用表面激元共振对阳性克隆进行重新筛选以测量抗独特型抗体对于目标抗体的亲和力 (如其解离速率(off-rate)所反映的) 和结合的互斥性。可以将兔抗小鼠 IgG(Fc)固定到生物传感器表面上并用于捕捉来自杂交瘤培养物上清液的抗独特型抗体。单独的或在存在 0.9nM C-反应性蛋白 (CRP) 时将 0.2nM 的目标抗体注射到固定化抗独特型抗体

的表面并比较相对质量积聚。通过有限稀释克隆选定的杂交瘤细胞以获得所需克隆。随后可以从这些克隆纯化和分离所述抗独特型抗体。对于制备抗独特型抗体的例子见美国公开号 US 20020142356, 以及 Durrant 等人, Int. J. Cancer, 1:92(3):414-20 (2001)和 Bhattacharya-Chatterjee, Curr. Opin. Mol. Ther., 3(1):63-9 (2001)。

还可以重组生产单克隆抗体。编码单克隆抗体的 DNA 易于通过常规方法分离并测序 (例如使用能够特异结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。以杂交瘤细胞用作这类 DNA 的优选来源。一旦分离, 可将 DNA 置于表达载体中, 然后将该表达载体转染到宿主细胞中, 诸如不另外产生免疫球蛋白的大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞, 以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性文章包括 Skerra 等人, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)和 Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)。

在另一个实施方案中, 可从使用 McCafferty 等人, Nature, 348:552-554 (1990)中描述的技术构建的噬菌体抗体文库中分离抗体或抗体片段。Clackson 等人, Nature, 352:624-628 (1991)和 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续出版物描述了通过链改组 (Marks 等人, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等人, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)), 生成高亲和力 (nM 范围) 的人抗体。因此, 这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替换方法。

还可以修饰 DNA, 例如通过替代即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠序列 (美国专利 4,816,567; Morrison 等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), 或通过将非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价接合。

许多可用于实施本发明的方法, 不论是否在本文中详细描述, 都是分子生物学、生物化学、免疫学和医学领域技术人员熟知的。一旦鉴定了目标抗体, 生成抗独特型抗体将在本领域普通技术人员的技术范围之内。

试剂盒

为了便利起见，可以将本发明的测定方法以试剂盒的形式提供。这类试剂盒是包装好的组合，其包括下列基本成份：

(a) 由针对目标抗体的抗独特型抗体构成的捕捉剂，其中所述抗体特异性结合目标抗体上的两种不同结合位点；

(b) 可检测的（经过标记的或未经标记的）抗独特型抗体，其特异性结合目标抗体上的两种不同结合位点；和

(c) 关于如何使用这些试剂实施所述测定方法的说明书。

这些基本成分在上文进行了定义。

优选地，所述试剂盒还包含捕捉剂的固体支持物，其可以作为分开的元件提供或者捕捉剂已经固定于其上。因此，所述试剂盒中的捕捉抗体可以固定在固体支持物上，或者它们可以固定在这样的支持物上，所述支持物是试剂盒所包括的或者与试剂盒分开提供。优选地，将捕捉剂包被在微量滴定板上。所述可检测抗体可以是直接进行检测的经过标记的抗体，或是通过在不同物种中产生的针对未标记抗体的经标记抗体进行检测的未经标记的抗体。当标记物是酶时，所述试剂盒通常将包括底物和酶所需要的辅助因子；当标记物是荧光团时，所述试剂盒通常将包括提供可检测发色团的染料前体；而当标记物是生物素时，所述试剂盒通常将包括亲合素诸如亲合素、链霉亲合素或偶联有 HRP 或 β -半乳糖苷酶的链霉亲合素及 MUG。

在一个优选的具体实施方案中，所述捕捉剂是单克隆抗体，优选啮齿类，更优选鼠或大鼠，仍更优选鼠源，最优选 MAb 8A3 或 MAb 8C5。同样在优选的实施方案中，所述可检测抗体是生物素化单克隆抗体，所述单克隆抗体是啮齿类，更优选鼠或大鼠，仍更优选鼠源，仍然还要更优选 MAb 8A3 或 MAb 8C5，最优选 MAb 8A3。优选地，在这种试剂盒中将捕捉剂进行固定。

所述试剂盒通常还包含目标抗体作为标准品（例如纯化的目标抗体），以及其它附加物，诸如稳定剂、洗涤和温育缓冲液等等。

目标抗体的标准品的例子是单克隆抗体，更优选人源化抗体，仍更优选人源化 2H7 抗体，诸如可从 Genentech 公司（South San Francisco, California）获得的抗体。

将以预定的比例提供所述试剂盒的组分，各种试剂的相对数量适当变

化以提供这样的试剂溶液浓度，基本上使得测定的灵敏度最大化。具体而言，可以将试剂作为干粉提供，通常是冻干的，包括赋形剂，其在溶解后将提供具有适合浓度的试剂溶液来混合待测样品。

III. 实验性实施例

现在将参照附图对本发明的上述和其它特征作更加具体的描述，权利要求中也会指出。下面描述的具体实施方案是以例示的方式提供的，并不意味着视为对本发明范围的限定。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是可对本发明进行许多修改，而不背离本发明的精神和本质特征。下面的实施例意在例示现在对于实施本发明已知的实施方案，但本发明并不视为受限于这些实施例。特此收入本文所有引用的公开内容作为参考。

实施例 1

材料和方法

抗 CD20 抗体

利用 Genentech 公司的人 IgG₁ 框架由小鼠抗人 CD20 抗体生成全长嵌合抗体和人源化抗 CD20 抗体变体。将它们在 293 细胞中表达并如前所述利用蛋白质 A 柱纯化 (Presta 等人, *Cancer Res.*, 同上)。亲本鼠源抗体、人源化变体 h2H7.v16 (SEQ ID NO:12) 和人 κ 轻链亚组 I 或人重链共有序列亚组 III 的各自轻链和重链可变区 (V_L 和 V_H) 的氨基酸序列见图 6A 和 6B。

表达 CD20 的 CHO 克隆

如 Meng 等人, *Gene*, 242:201-207 (2000) 中所述, 将人 CD20 cDNA (Genentech 公司) 在 *SpeI* 位点亚克隆到经修饰的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 内含子载体中。将 CHO K1 DUX B11 (DHFR-) 细胞 (Columbia University) 在添加了 2mM L-谷氨酰胺、10 μ g/ml 甘氨酸、15 μ g/ml 次黄嘌呤、5 μ g/ml 胸苷、100 单位/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 5% 胎牛血清 (FBS) (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) 的 50:50 F12/DMEM 培养基中在加湿的 5% CO₂ 培养箱中于 37°C 培养。根据制造商的说明书用 POLYFECT™ 转染系统 (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA) 以 4 μ g/ml 线性化质粒载体转染 100mm 直径板中的 CHO 细胞。将经过转染的 CHO 细胞在添加了 2mM L-谷氨酰胺、100 单位/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 5% 经过透析过的 FBS 的 50:50 F12/DMEM 培养基中培养。如 Meng 等人, 同上所述通过反复的荧

光激活细胞分选器 (FACS) 分选获得具有不同 CD20 表达水平的克隆, 其中使用 5 μ g/ml RITUXAN® 随后是异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联的山羊抗人 IgG Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 进行染色。通过在 25nM 甲氧喋呤中培养克隆 2H3 细胞获得了克隆 C12M。

WIL2 结合测定

将人 B-类成淋巴细胞 WIL2-S 细胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) 在添加了 2mM L-谷氨酰胺、20mM HEPES pH7.2 和 10% 热灭活 FBS 的 RPMI 1640 中在加湿的 5% CO₂ 培养箱中于 37°C 培养。用含 1% FBS 的 PBS (测定缓冲液) 洗涤它们并以 250,000-300,000 细胞/孔接种 96 孔圆底板 (Nunc, Roskilde, Denmark)。将 100 μ l 测定缓冲液中的标准品 (15.6-1000ng/ml 嵌合抗 CD20 IgG 的两倍连续稀释液) 和样品 (2.7-2000ng/ml 人源化抗 CD20 IgG 的三倍连续稀释液) 加到板中。将所述板于冰上温育 45 分钟。为了除去未结合的抗体, 将 100 μ l 测定缓冲液加到孔中。将板离心并除去上清液。将细胞用 200 μ l 测定缓冲液再洗涤两次。向板中加入 HRP 偶联的山羊抗人 IgG Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 来检测结合的抗体。在冰上温育 45 分钟后, 洗涤细胞并加入底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。加入 1M 磷酸终止反应。在 TITERTEK™ stacker 读取器 (ICN, Costa Mesa, CA) 上读取 450nm 的吸光度。用四参数回归曲线适配程序 (KALEIDAGRAPH™ 软件, Synergy Software, Reading, PA) 拟合滴定曲线。计算标准品滴定曲线中点的吸光度 (mid-OD)。测定标准品和样品在此 mid-OD 的相应浓度 (KALEIDAGRAPH™ 软件)。将标准品的 mid-OD 浓度除样品的 mid-OD 浓度来计算相对活性。利用 STATVIEW™ 程序 (SAS Institute, Cary, NC) 计算 ANOVA 分析的变异系数 (CV)。显示值为平均值 \pm 标准偏差。图中的误差条为标准偏差。

CHO 结合测定

除非另外提及, 与 WIL2 结合测定类似进行该测定。对于悬浮形式来说, 使用非酶细胞解离溶液 (Sigma, St. Louis, MO) 分离 CHO 细胞。对于贴壁形式来说, 将 2H3 CHO 细胞在平底 96 孔细胞培养板 (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin, NJ) 中培养且在测定当天为 80-90% 汇合。对所述测定使用生长培养基以便细胞保持贴壁在板上。在温育步骤之间通过向

板中加入生长培养基并轻弹板以去除洗涤缓冲液来洗涤细胞。

Scatchard 分析

使用乳过氧化物酶方法 (13.7mCi/mg) 将 RITUXAN® (Genentech Inc., South San Francisco, CA 和 IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA; Reff 等人, Blood, 83:435-445 (1994)) 碘化。对于贴壁形式来说, 将 CHO 细胞以 50,000 细胞/孔接种 24 孔板。培养两天后, 向细胞中加入 0.4ml F12/DMEM 50:50、2% FBS (结合缓冲液) 中的 0.2nM 经标记 RITUXAN® 和 2.5 倍连续稀释的未标记 RITUXAN® (10-1000nM)。在冰上温育两小时后, 用结合缓冲液洗涤细胞并用胰蛋白酶-EDTA (CLONETICS®, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD) 分离并在伽马计数器 (Packard Instrument Company, Perkin-Elmer, Downers Grove, IL) 中计数。通过对未接受 RITUXAN® 的对照孔中的细胞计数来确定用于数据分析的每孔细胞数。对于悬浮形式来说, 用非酶细胞解离溶液 (Sigma) 分离细胞。如上所述将经过标记的和未经标记的 RITUXAN® 抗体与 300,000 细胞一起在 1.5ml 锥形试管中温育。将细胞离心并用 0.8ml FBS 洗涤。将它们悬浮于 0.5ml PBS 并如上所述计数。利用根据 LIGAND™ 程序 (Munson 和 Rodbard, Anal. Biochem., 107:220-239 (1980)) 编写的 NEW LIGAND™ 程序 (Genentech, Inc.) 计算受体的结合常数和数目。

特异性抗独特型抗体的生成

通过在 Balb/c 小鼠 (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) 的足垫里注射单磷酸脂质 A/海藻糖二霉菌酸酯 (dicorynomycolate) 佐剂 (Corixa, Hamilton, MT) 中的 0.5µg 人源化抗 CD20 IgG (图 6 中所示的 2H7.v16) 11 次, 生成针对人源化抗 CD20 抗体的单克隆抗体。将来自具有高滴度的小鼠的脾淋巴结与 P3X63Ag.U.1 骨髓瘤细胞 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)) 相融合。对于产生对人源化抗 CD20 Ig 而非 HERCEPTIN® 具有结合亲和力的抗体的杂交瘤细胞, 通过有限稀释进行克隆, 得到克隆 8C5 和 8A3。这些杂交瘤, 称作 8C5.1 和 8A3.10, 保藏于 ATCC, 保藏号分别为 PTA-5915 和 PTA-5914, 分别产生这些抗体。图 5 中提供了抗体 8A3 的序列。

量化抗 CD20 抗体的 ELISA

MAXISORP™96 孔微孔板 (Nunc, Roskilde, Denmark) 用 50mM 碳酸盐

缓冲液 pH9.6 中的 0.25 μ g/ml 抗独特型抗体 8C5 于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。用 PBS 中的 0.5%牛血清清蛋白、10ppm PROCLIN 300TM (Supelco, Bellefonte, PA) 封闭板。向板中加入含 0.5%牛血清清蛋白、0.05% POLYSORBATE 20TM 非离子型表面活性剂、5mM EDTA、0.25% CHAPS、0.2%牛 γ -球蛋白 (Sigma, St. Louis, MO) 和 0.35N NaCl 的 PBS (样品缓冲液) 中的人源化抗 CD20 IgG 或亲本小鼠抗 CD20 IgG 标准品 (2.0-250ng/ml, 2 倍连续稀释)。于室温温育 2 小时后, 通过加入生物素化 8A3 及随后的链霉亲和素-HRP (Amdex, Copenhagen, Denmark) 来检测与板结合的抗体。将板显色并如上所述拟合标准品的滴定曲线。使用落入标准曲线范围内的数据点来计算样品中的抗 CD20 抗体浓度。使用合并的小鼠或人血清 (Golden West Biologicals Inc., Temecula, CA) 来研究血清效应。

结果

用于测量人源化抗 CD20 抗体的相对结合亲和力的细胞结合测定

开发了 WIL2 结合测定法来测量人源化抗 CD20 抗体变体的相对结合亲和力, 因为 CD20 是多跨膜蛋白且无法获得天然的可溶性 CD20 胞外。在这种测定法中, 将 WIL2 细胞与连续稀释的抗 CD20 抗体一起温育并利用抗人 IgG Fc-HRP 检测结合的抗 CD20 抗体。通过加入洗涤缓冲液, 离心细胞并除去洗涤缓冲液在温育步骤之间洗涤细胞。这种测定法是定量的和可重复的。图 1A 中显示了衍生自相同亲本小鼠抗体的人源化抗 CD20 IgG 和嵌合抗 CD20 抗体的代表性滴定曲线。在 12 次独立的一式两份的测定中对这种人源化抗 CD20 IgG 进行测定, 对于嵌合抗 CD20 IgG 的相对结合活性为 0.63 ± 0.08 。测定间和测定内 CV 分别为 11.2% 和 8.77%。

还评估了利用粘附经转染 CHO 细胞的细胞结合测定法以便简化洗涤步骤并提高测定通量。图 1B 中显示了结合高表达 CHO 克隆 2H3 的嵌合抗 CD20 IgG 和人源化抗 CD20 IgG 的代表性滴定曲线。信号比利用 WIL2 细胞 (图 1A) 获得的低, 不限于任何一种理论, 可能是由于贴壁形式所用的细胞少两倍。在 WIL2 和 CHO 2H3 结合测定中测定了几种人源化抗体变体并获得了相似的结果。由于扩增细胞以获得高表达克隆需要花费时间, 因此测试了获得良好滴定曲线所需的最小 CD20 分子数/细胞。通过 FACS 分选获得表达不同水平 CD20 的 CHO 克隆。对选定的克隆评估与 RITUXAN[®] 的结合 (图 2) 并通过 Scatchard 分析进行分析 (表 1)。

利用贴壁细胞形式对克隆 2H3 评估的 CD20 分子数为 1.2 百万个/细胞。利用悬浮细胞形式对 WIL2 和克隆 2H3 评估的 CD20 分子数分别为 1.0 和 0.16 百万个/细胞。对 2H3 CHO 和 WIL2 细胞评估的结合亲和力分别为 8.6 和 3.9nM(表 1)。这些亲和力接近对人 SB 细胞评估的 RITUXAN®的 5.2nM 结合亲和力 (Reff 等人, 同上)。表达少至 33,000 CD20 分子/细胞的 CHO 克隆 4H10 在结合测定中给出良好的滴定曲线(表 1 和图 2)。这种表达水平是在 Daudi 细胞上发现的 60,000 CD20 分子/细胞表达的两倍之内(Bubien 等人, *J. Cell. Biol.*, 121:1121-1132 (1993)) 且可能通常足以用于评估抗 CD20 抗体。

表 1: 表达 CD20 的细胞的 Scatchard 分析 (n = 3)

形式	克隆	CD20 拷贝 ^a (百万/细胞)	标准误差 (百万/细胞)	Kd (nM)	标准误差 (nM)
贴壁	2H3	1.22	0.06	12.0	1.0
	1H6	1.28	0.05	11.5	0.8
	6D7	0.189	0.007	5.97	0.40
	C12M	1.31	0.06	13.7	1.0
	4H10	0.0332	0.0050	5.50	1.10
悬浮	2H3	1.00	0.08	8.57	0.97
	WIL2	0.163	0.012	3.91	0.40

^a假定一个抗体结合一个 CD20 分子而计算的。

用于测量人源化抗 CD20 抗体血清浓度的抗独特型抗体结合测定

为了测量人源化抗 CD20 抗体的血清浓度进行临床研究, 开发了牵涉高通量测定的备选方法, 利用针对人源化抗 CD20 抗体 2H7.v16 的特异性抗独特型抗体, 因为并不需要天然 CD20 分子。抗体 8C5 和 8A3 阻断人源化 2H7 (2H7.v16) 和嵌合 2H7 抗 CD20 抗体而非 RITUXAN®与 WIL2 细胞的结合。在包被到板上后, 它们结合人源化抗 CD20 IgG (2H7.v16 和 2H7.v31 - 序列见图 6 和 8), 但不结合 HERCEPTIN®、E25 和抗 VEGF, 它们是使用相同人 IgG₁ 框架人源化的。它们还显示不结合 RITUXAN®和稍微结合 (<50,000 倍) 正常人 IgG (图 3)。使用 8C5 进行包被和生物素化 8A3 进行检测的 ELISA 良好地耐受 20% 人血清。在 20% 人血清中 3.9-250ng/ml 人源化抗 CD20 IgG 的回收率为 93-117% (图 4A)。所以, 这种测定法在对于人血清中的人源化

抗 CD20 IgG 来说具有 20ng/ml 的灵敏度且可用于支持临床研究。

抗独特型抗体 8C5 和 8A3 还识别用于人源化的亲本小鼠抗 CD20 抗体。亲本小鼠抗 CD20 IgG 在使用 8C5 进行包被和生物素化 8A3 进行检测的 ELISA 中给出良好的滴定曲线。在 10%小鼠血清中 2.0-250ng/ml 小鼠抗 CD20 IgG 的回收率为 97-109% (图 4B)。利用与亲本小鼠抗 CD20 抗体具有相同可变区的小鼠抗 CD20 IgG 评估了所述测定的可重复性。将样品缓冲液中的高、中和低对照的冷冻小样与标准品一起进行测定, 它们的浓度分别为 96.1 ± 6.5 、 17.4 ± 1.2 和 2.26 ± 0.69 ng/ml。缓冲液中高、中和低对照的百分比 CV 对于测定间来说分别为 4.56、7.06 和 29.3, 对于测定内来说分别为 7.05、2.58 和 13.8 (n=12)。低对照具有接近最低标准品的浓度 2.0ng/ml 的浓度且具有较高测定变差。

讨论

为了量化人源化抗 CD20 抗体的血清浓度用于临床研究, 测定人血清对 WIL2 和 CHO 结合测定的作用。在 WIL2 结合测定中, 存在 10%人血清给出等同于 100ng/ml 人源化抗 CD20 IgG 的背景并降低了信号。在 CHO 结合测定中, 它并未给出显著的背景但大大降低了信号。在利用 WIL2 细胞的膜制品进行包被的 ELISA 中也看到了信号降低。不限于任何一种理论, 这种信号降低可能是由于血清中的循环人 CD20 (Manshoury 等人, *Blood*, 101: 2507-2513 (2003))。存在 10%小鼠血清并不显著影响 WIL2 结合测定。16-1000ng/ml 人源化的抗 CD20 IgG 在 10%小鼠血清中的回收率为 75-102%。由于不必使用天然 CD20 分子, 使用针对 CD20 胞内域的抗体(克隆 1H1 (FB1), BD PharMingen, San Diego, CA) 来捕捉溶解的 WIL2 细胞中的 CD20, 但是这并未导致足够的测定灵敏度。

作为备选的, 改进的方法, 开发了使用特异性抗独特型抗体, 即 8C5 进行包被和生物素化 8A3 进行检测的 ELISA, 用于量化人血清中的人源化抗 CD20 抗体(图 4A)。由于抗体 8C5 具有对正常人 IgG 的微弱亲和力(图 3A)且人 IgG 以高浓度存在于人血清中, 所以在使用抗人 IgG Fc-HRP 进行检测时 20%人血清给出等同于 4ng/ml 人源化抗 CD20 IgG 的背景。所以, 使用生物素化 8A3 进行检测对于降低血清背景是重要的。溶液中的检测抗体 8A3 与包被在板上的 8C5 竞争与人源化抗 CD20 IgG (v.16)的结合。不过, 由于 IgG 具有两个结合位点且能同时结合一个 8C5 和一个 8A3, 所以人源

化抗 CD20 IgG 在这种 ELISA 中给出良好的滴定曲线。与用 1 μ g/ml 包被相比, 用 0.25 μ g/ml 8C5 包被给出较高的信号。不限于任何一种理论, 认为在较低的包被密度下, 人源化抗 CD20 IgG 更有可能只以一个结合位点结合 8C5 包被的板, 容许另一个结合位点结合检测抗体 8A3。利用 8C5 进行包被和生物素化 8A3 进行检测的 ELISA 还可用于测量小鼠血清中的亲本小鼠抗 CD20 抗体进行异种移植或其它小鼠研究 (图 4B)。利用抗小鼠 Fc-HRP 进行检测的 WIL2 结合测定法不能用于此目的, 因为 10% 小鼠血清给出高背景。

通过这种 ELISA 测量与亲本小鼠抗 CD20 抗体具有相同可变区的小鼠抗 CD20 抗体的血清浓度。结果与通过较不灵敏的 ELISA 获得的相一致, 后者利用 8A3 Fab 进行包被和抗小鼠 IgG Fc-HRP 进行检测, 后一种抗体不与包被抗体竞争。这种小鼠抗 CD20 抗体也在使用 8A3 进行包被和生物素化 8A3 进行检测的 ELISA 中给出良好的滴定曲线。所以, 有可能开发只使用一种特异性抗独特型抗体的对于抗 CD20 抗体的 ELISA, 对二者都获得相似的结果。

实施例 2

可以采用实施例 1 中给出的 ELISA 来检测针对趋化因子受体的抗体。这将会可用于例如检测临床样品中针对趋化因子受体的人源化抗体, 其中对临床患者施用人源化抗体以治疗趋化因子介导的紊乱。因而, 通过将在单磷酸脂质 A/海藻糖二霉菌酸酯(dicorynomycolate)佐剂 (Corixa, Hamilton, MT) 中配制的 0.5 μ g 1D9 或美国专利 6,696,550 中描述的能与 1D9 竞争结合人 CCR2 的人源化抗体注射到 Balb/c 小鼠 (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) 足垫中 11 次, 生成针对鼠 MAb LS132.1D9 (1D9) 或人源化抗体的抗独特型单克隆抗体。将来自具有高滴度的小鼠的腭淋巴结与 P3X63Ag.U.1 骨髓瘤细胞 (美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)) 相融合。对于产生对用作免疫原的 1D1 或人源化抗体而非与 1D1 相同亚类的其它小鼠抗体或利用相同框架人源化、针对不同表位或抗原的其它人源化抗体具有结合亲和力的抗体的杂交瘤细胞, 通过有限稀释进行克隆以获得合适的克隆。利用实施例 1 中公开的基本 ELISA 方法, 从所述克隆分离来自这些克隆的, 对用作免疫原的 1D1 或人源化抗体是抗独特型的

抗体，并在含有或怀疑含有用作免疫原的 1D1 或人源化抗体的生物学样品中用作包被和检测手段。

或者，利用如上所述的技术将选择性与 GPR-9-6 转染子反应的 MAb 3C3（见美国专利 6,689,570）用于免疫 balb/c 小鼠以获得针对 MAb 3C3 的抗独特型抗体，随后在所述测定中将其用作包被和检测剂。

总之，已经开发了基于抗独特型抗体的测定法用于测量生物学样品诸如血清中目标抗体例如人源化抗体及其亲本小鼠抗体或衍生自亲本抗体的嵌合鼠/人抗体的浓度。这种基于抗独特型抗体的方法一般可用于检测和测量生物学样品中针对具有小间插胞外域的细胞表面跨膜蛋白诸如 CD20 和趋化因子受体的抗体或抗体浓度。

实施例 3

人源化抗体的制备

人源化 2H7 抗体可包含下列 CDR 序列中的一种、两种、三种、四种、五种或六种：

CDR L1 序列 RASSVSYXH，其中 X 是 M 或 L (SEQ ID NO:29)，例如 SEQ ID NO:14 (图 6A)，

CDR L2 序列 SEQ ID NO:15 (图 6A)，

CDR L3 序列 QQWXFNPPT，其中 X 是 S 或 A (SEQ ID NO:30)，例如 SEQ ID NO:16 (图 6A)，

CDR H1 序列 SEQ ID NO:20 (图 6B)，

CDR H2 序列 AIYPGNGXTSYNQKFKG，其中 X 是 D 或 A (SEQ ID NO:31)，例如 SEQ ID NO:21 (图 6B)和

CDR H3 序列 VVYYSXXYWYFDV，其中位置 6 上的 X 是 N、A 或 Y，而位置 7 上的 X 是 S 或 R (SEQ ID NO:32)，例如 SEQ ID NO:22 (图 6B)。

以上 CDR 序列一般存在于人轻链和重链可变区框架序列内，诸如基本上为人轻链 κ 亚组 I ($V_L I$) 的人共有 FR 残基和基本上为人重链亚组 III ($V_H III$) 的人共有 FR 残基。

可以将可变重链区连接人 IgG 链恒定区，其中该区可以是例如 IgG1 或 IgG3。还可见 WO 2004/056312 (Lowman 等人)。

在一个优选的实施方案中，这类抗体包含 SEQ ID NO:18 的重链可变区

序列 (v16, 如图 6B 所示), 任选还包含 SEQ ID NO:12 的轻链可变区序列 (v16, 如图 6A 所示), 其任选包含重链中的氨基酸替代 D56A 和 N100A 和轻链中的 S92A (v96)。优选地, 所述抗体是完整抗体, 其分别包含 SEQ ID NO:3 和 4 或 5 的轻链和重链氨基酸序列。优选的人源化 2H7 抗体是 ocrelizumab。本文的抗体还可在 Fc 区中包含至少一个提高 ADCC 活性的氨基酸替代, 诸如位置 298、333 和 334 上的氨基酸替代, 优选 S298A、E333A 和 K334A, 使用重链残基的 EU 编号。另一种优选的实施方式是抗体为 2H7.v138, 其分别包含 SEQ ID NO:33 和 34 的轻链和重链氨基酸序列, 如图 10 和 11 所示, 两图是这些序列与 2H7.v16 的相应轻链和重链氨基酸序列的比对。或者, 这类优选的完整人源化 2H7 抗体是 2H7.v477, 其具有 2H7.v138 的轻链和重链序列, 除了重链位置 434 上的氨基酸替代, 例如 N434W, 它提高抗体的 FcRn 结合和血清半寿期。任何这些抗体还可在 Fc 区中包含至少一个提高 CDC 活性的氨基酸替代, 例如至少包含位置 326 上的替代, 优选 K326A。见美国专利 6,528,624B1 (Idusogie 等人)。

一些优选的人源化 2H7 变体是那些包含 SEQ ID NO:12 的轻链可变区和 SEQ ID NO:18 的重链可变区的变体, 包括那些在 Fc 区 (如果存在的话) 中有或无替代的变体, 以及那些包含在 SEQ ID NO:18 中具有变化 N100A; 或 D56A 和 N100A; 或 D56A、N100Y 和 S100aR 的重链可变区; 及在 SEQ ID NO:12 中具有变化 M32L; 或 S92A; 或 M32L 和 S92A 的轻链可变区的变体。

在本发明的一些优选实施方案的总结中, 基于 2H7.v16 的变体的可变区将具有 v16 的氨基酸序列, 除了下文表 2 所列氨基酸替代的位置上。除非另外指定, 2H7 变体将具有与 v16 相同的轻链。

表 2: 2H7 变体

2H7 版本	重链 (V _H) 变化	轻链 (V _L) 变化	Fc 变化
16 用于参比			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A

115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	-	S298A, E333A, K334A, K326A

特别优选的人源化 2H7 是如下完整抗体或抗体片段，其包含轻链可变区序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
 NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTK
 VEIKR (SEQ ID NO:12);

和重链可变区序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
 GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 VVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVVSS (SEQ ID NO:18)。

当所述人源化 2H7 抗体是完整抗体时，它可以包含轻链氨基酸序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
 NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTK
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3);

和重链氨基酸序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
 GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
 VVYYSNSYWFYFDVWGQGTLLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK

TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO:4)

或重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:5)。

在另一个优选的实施方案中，完整的人源化 2H7 抗体包含轻链氨基酸
序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:35);

和重链氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSASYWFYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (SEQ ID NO:36)。

在另一个优选的实施方案中,人源化 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:37 的轻链可变区序列和 SEQ ID NO:18 的重链可变区序列,其中所述抗体还包含 CDR H2 中的 D56A 氨基酸替代,而 CDR H3 中的 N100 用 Y 或 W 替代,其中 SEQ ID NO:37 具有序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:37)。

在这最一种人源化 2H7 抗体的实施方案中, N100 用 Y 替代。在另一个实施方案中, N100 用 W 替代。另外,在又一个实施方案,所述抗体包含 CDR H3 中的替代 S100aR, 优选还在 Fc 区中包含至少一个提高 ADCC 和/或 CDC 活性的氨基酸替代, 诸如包含 IgG1 Fc 其中包含氨基酸替代 S298A、E333A、K334A 和 K326A 的抗体。或者,所述抗体包含 CDR H3 中的替代 S100aR, 优选还在 Fc 区包含至少一个提高 ADCC 但降低 CDC 活性的氨基酸替代, 诸如至少包含氨基酸替代 K322A 的抗体, 以及还包含氨基酸替代 S298A、E333A、K334A 的抗体。

在一个优选的实施方案中,所述抗体包含 2H7.v511 轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:38);

和 2H7.v511 重链:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

LSPGK (SEQ ID NO:39)。关于这些链与 2H7.v16 轻链和重链序列的序列比对分别见图 12-15，采用 EU 或 Kabat 编号。

实施例4

已经将本文的基于抗独特型抗体的测定法用于测量小鼠血清中小鼠 2H7 的其它变体，例如 v96 和 v327。对于这些实验的典型 ELISA 标准曲线显示于图 16 中，与 v16 相比较。如实施例 3 的表 2 所示，与 v16 相比，v96 在其重链中有 D56A、N100A，在其轻链中有 S92A。版本 327 与 v16 相比，在其轻链中有 N94I。如上面实施例 1 中所述利用与实施例 1 中相同的抗独特型抗体进行这种测定。图 16 中所示标准曲线显示所述测定法成功且灵敏地用于测量小鼠血清中的这三种抗体。没有进行 ELISA 来测量小鼠 IgG，因为它也将检测小鼠血清中的内源性小鼠 IgG。

这种测定法还用于测量小鼠血清中的人源化 2H7。例如，利用如实施例 1 中所述的测定法，使用抗体 8C5 作为包被/捕获抗体和生物素化抗体 8A3 作为检测抗体，与 v16 一起测量人源化 2H7 变体 v114（实施例 3 的表 2 中）、v488（重链：N100D、K326A、S298A、E233A、K234A 对 v16）和 v511（实施例 3 的表 2 中）。如图 17 所示，对于这些实验的典型 ELISA 标准曲线表明对于 v16 和 v114 的测定比对于 v488 和 v511 的那些测定更加灵敏。为此目的，对于这后两种版本除了基于抗独特型抗体的 ELISA 之外还使用了 ELISA 来测量小鼠血清中的人 IgG。

预计基于抗独特型抗体的 ELISA 在测量人血清/血浆中的人源化 2H7 v488 和 v511 中将更加灵敏，以支持利用针对 v488 和 v511 的不同抗独特型抗体的临床试验，所述抗体可分别使用 v488 或 v511 作为抗原通过与实施例 1 中相同或本质上相同的材料和方法来制备。

IV. 细胞系的保藏

将下列杂交瘤细胞系保藏在位于 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S.A. 的美国典型培养物保藏中心 (ATCC)，给与编号：

<u>杂交瘤</u>	<u>ATCC 编号</u>	<u>保藏日期</u>
8C5.1	PTA-5915	2004-04-15
8A3.10	PTA-5914	2004-04-15

(这些杂交瘤分别对应于克隆 8C5 和 8A3。)

这些保藏是在国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约(布达佩斯条约)下进行的。这保证了从保藏之日起保持活培养物 30 年。根据布达佩斯条约的条款, ATCC 使这些生物可以获得, 并服从 Genentech 公司和 ATCC 之间的协议, 这份协议保证, 在公布相关美国专利或向公众公开任何美国或外国专利申请后, 无论哪个在先, 公众可以永久且无条件的获得这些培养物的后代, 并保证根据 35 USC §122 和按照其专员规则(包括特别涉及 886 OG 638 的 37 CFR §1.14) 授权的美国专利和商标专员决定的个人可以得到后代。本发明的受让人声明所述保藏是在布达佩斯条约的条款之下进行的且符合 37 CFR §1.808(b), 由保藏者对于公众获得保藏材料施加的任何限制都将在专利授权之后不可逆地去除。

本发明的受让人同意, 当在合适的条件下培养时, 如果保藏的培养物死亡或丢失或被破坏, 他们将立即公告用同一培养物的活样品替换。保藏株的可获得性不能理解为许可在违反任何政府当局根据其专利法授予的权利的情况下实施本发明。进行这些保藏并不是承认所述保藏物是实施本发明所必需的。

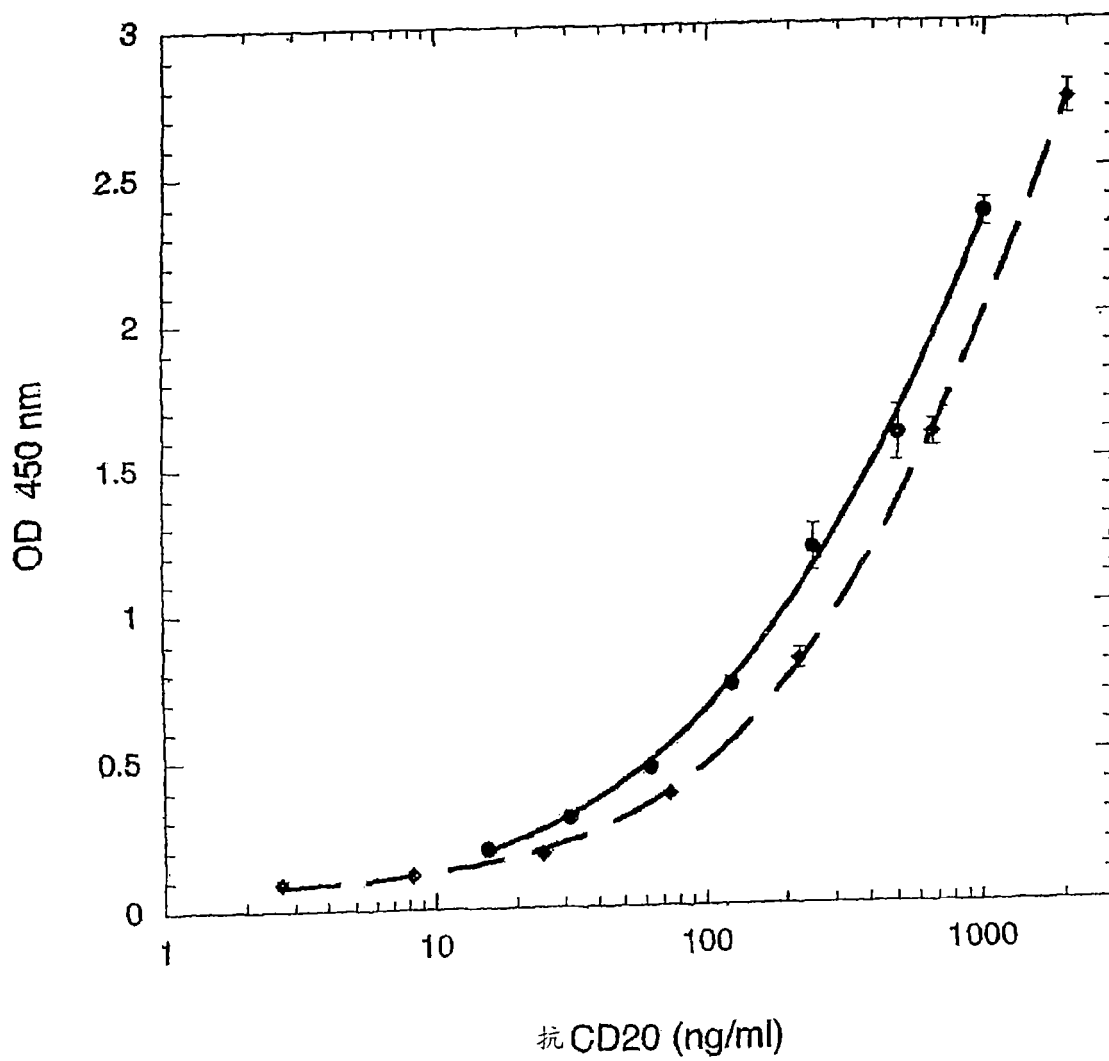


图 1A

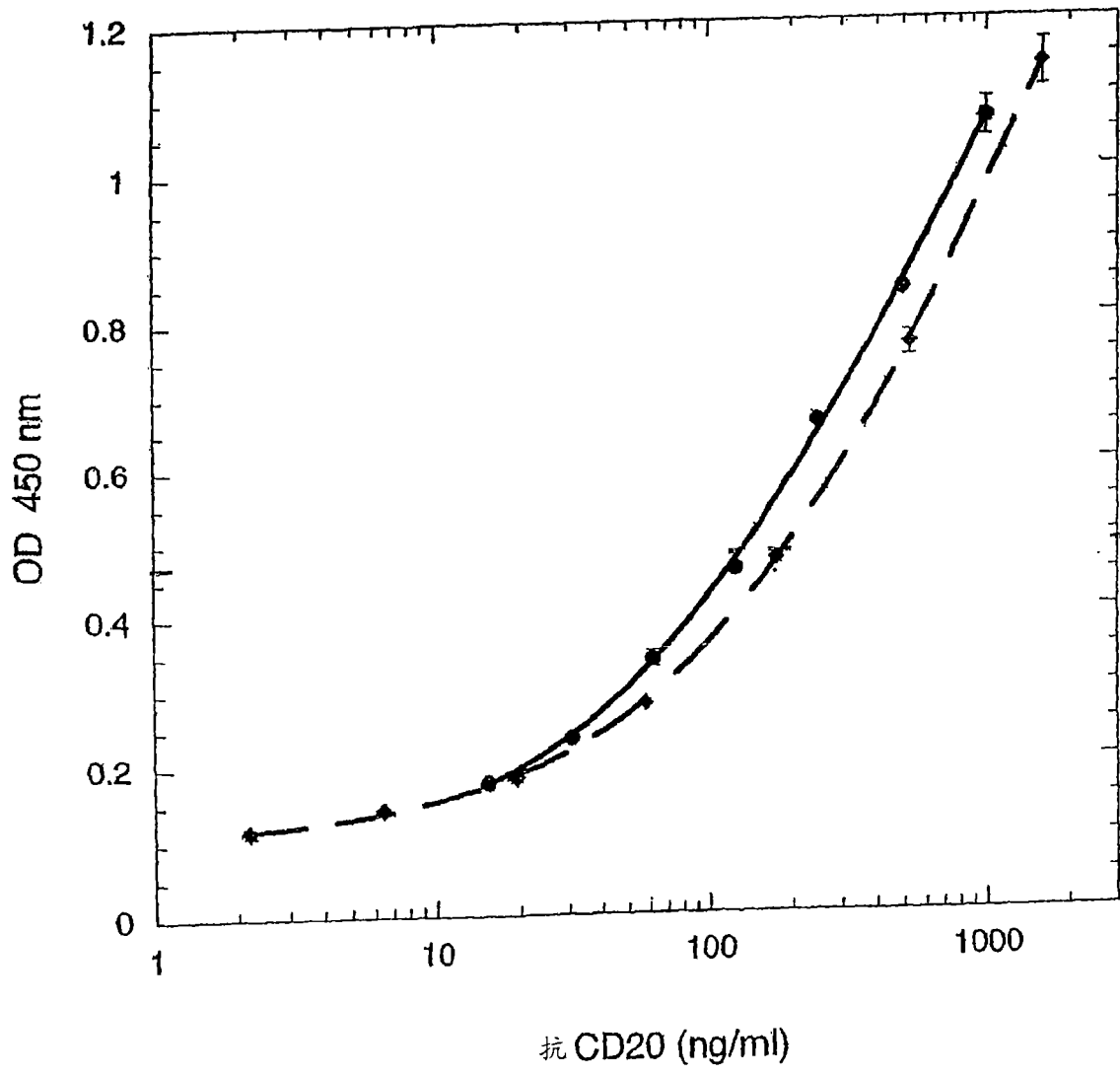


图 1B

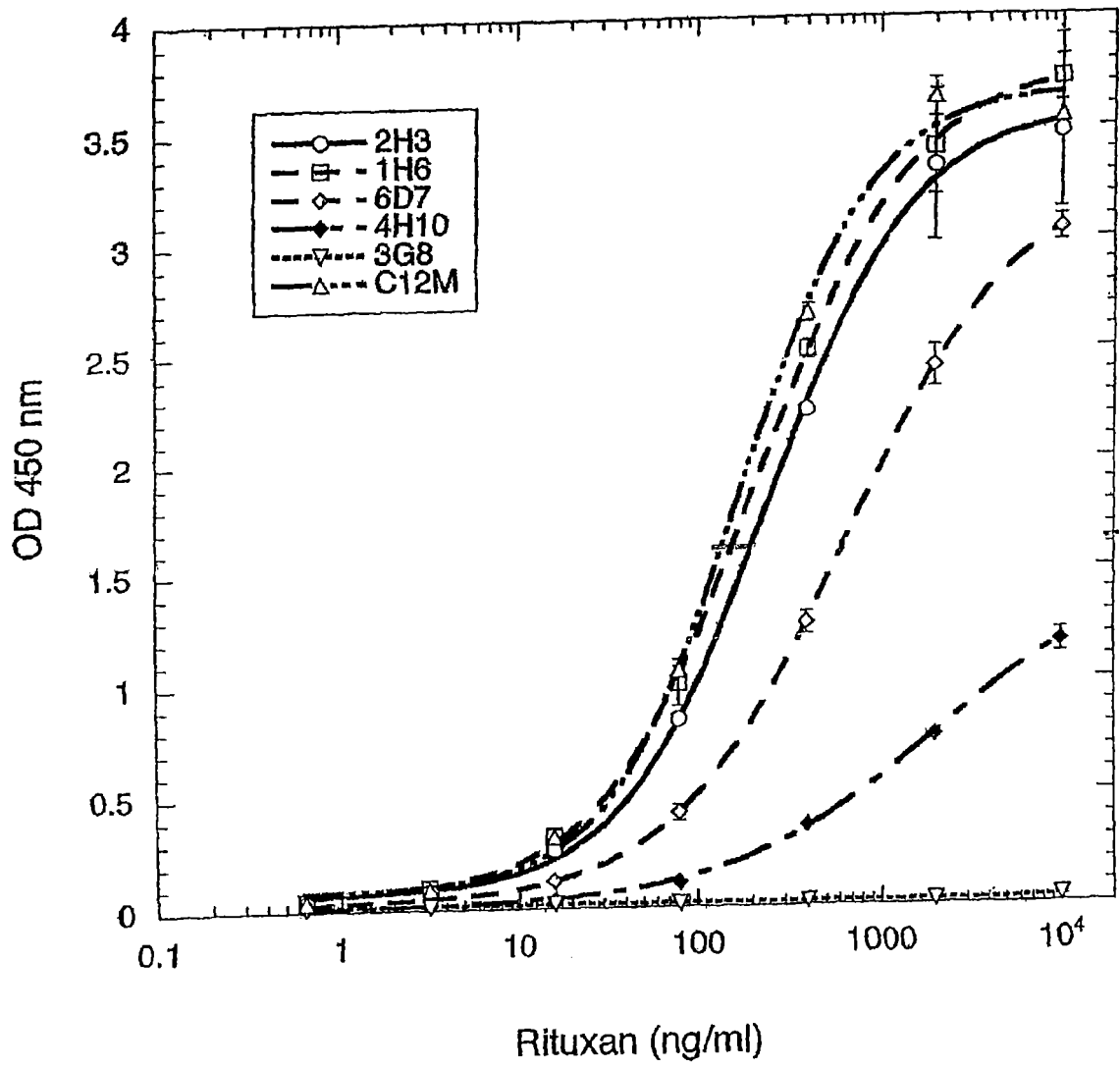


图 2

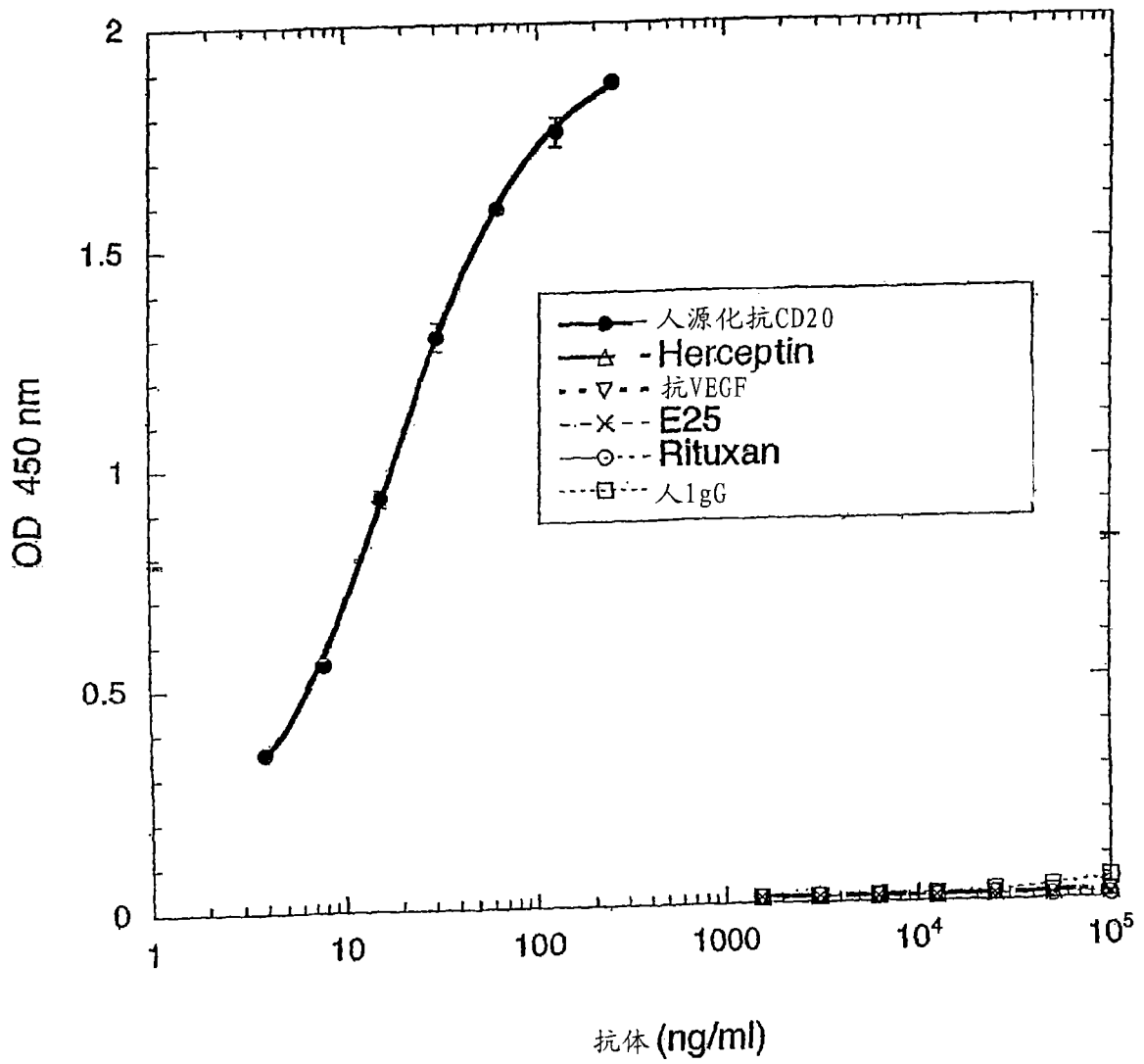


图 3A

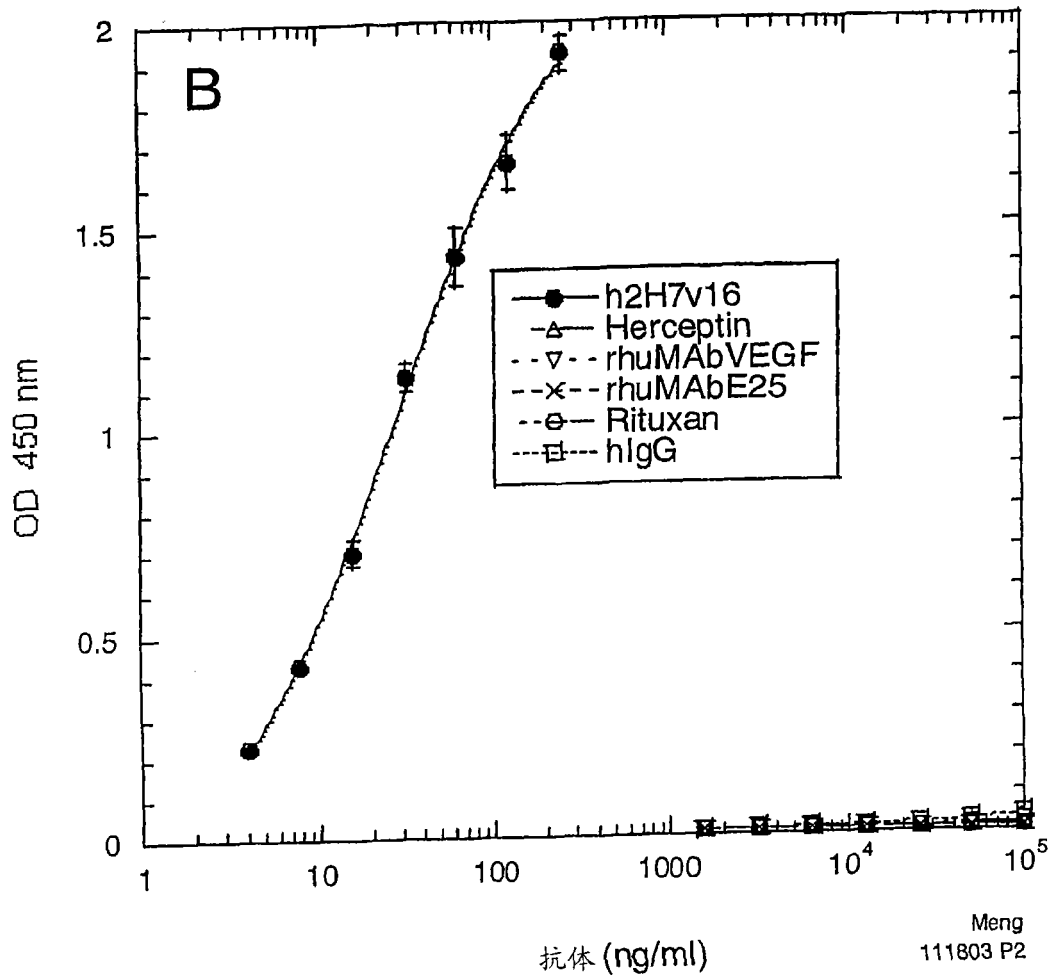


图 3B

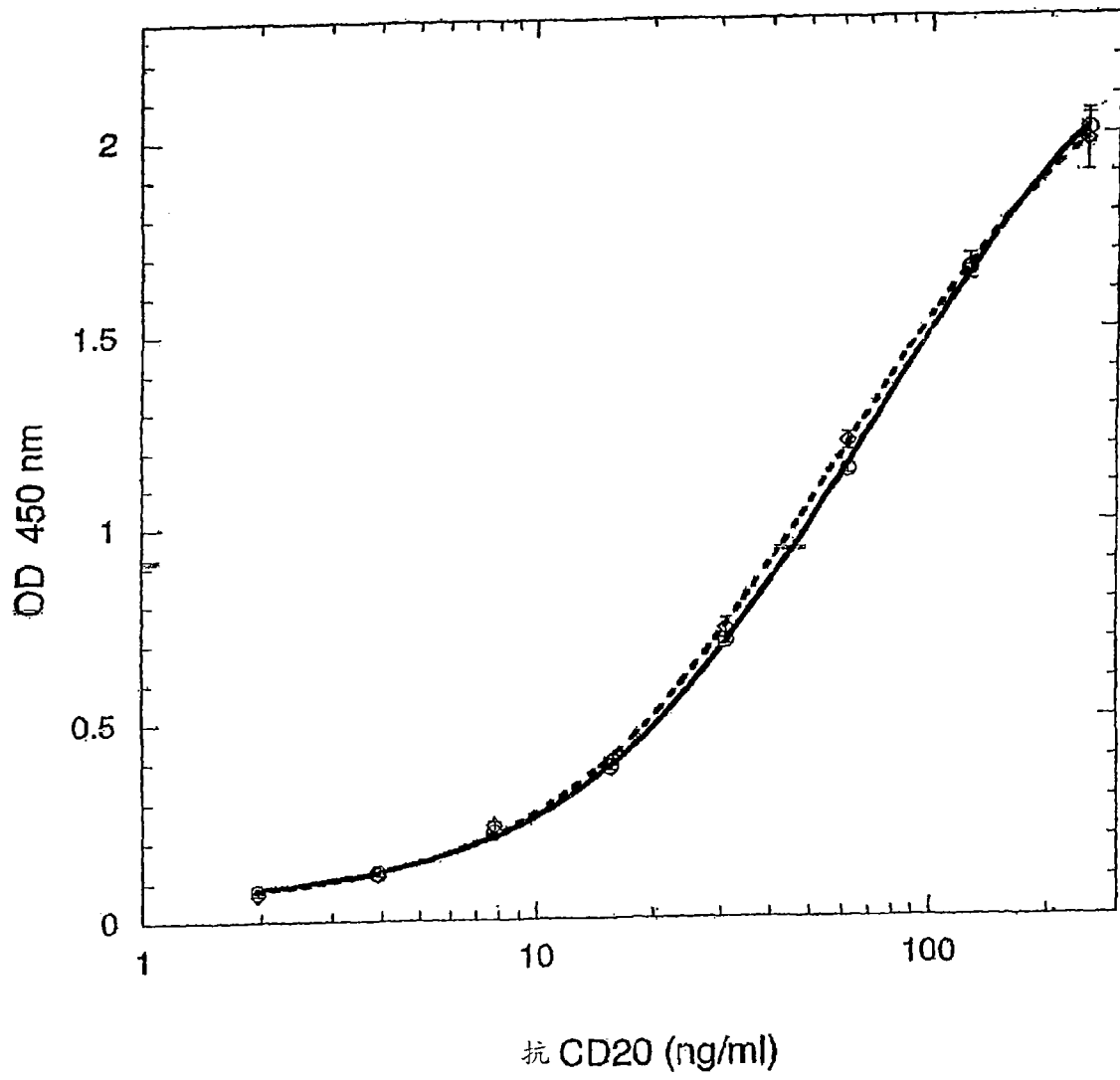


图 4A

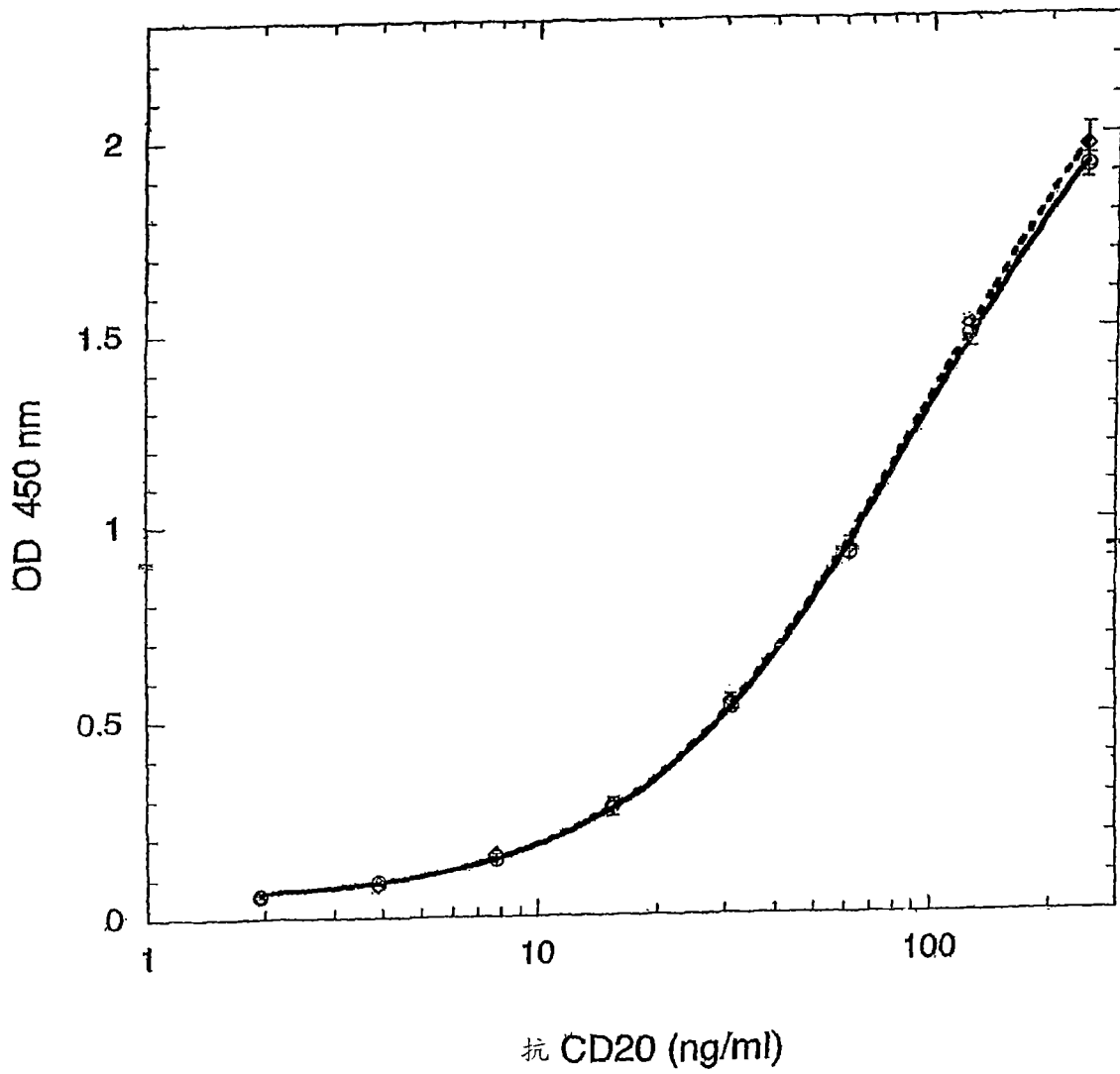


图 4B

(MAb 8A3重链氨基酸序列)

MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYAQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYNFTTYWMHWKQRPGQGLE
WIGYINPSTDYTEYNQKFKYKATLTADKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARWWDYDWYFDVWGAGTFL
TVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTO (SEQ ID NO:6)

图 5A

(不含信号序列的MAb 8A3重链氨基酸序列)

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYNFTTYWMHWKQRPGQGLEWIGYINPSTDYTEYNQKFKYKAT
LTADKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARWWDYDWYFDVWGAGTFLTVSSASTKGPSVFFLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKEPKSCDKHTHTO (SEQ ID NO:7)

图 5B

(MAb 8A3轻链氨基酸序列)

MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYADIVMTQSQEFMSTSVGDRVSVTCKASQTVDTNVAWYQQKLGQSPKP
LIYSASYRCGVPDRFTGSGSRTDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQYHSFPWTFGGGKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECO (SEQ ID NO:8)

图 5C

(不含信号序列的MAb 8A3轻链氨基酸序列)

DIVMTQSQEFMSTSVGDRVSVTCKASQTVDTNVAWYQQKLGQSPKPLIYSASYRCGVPDRFTGSGSRT
DFTLTITNVQSEDLAEYFCQQYHSFPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGECO (SEQ ID NO:9)

图 5D

(编码Mab 8A3轻链和重链的核苷酸序列,其中核苷酸残基40是轻链信号序列的开始)

```

ACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCTAGAATTATGAAGAAGAATATTGCGTTCCTACTTGCC
TCTATGTTTGTCTTTTCTATAGCTACAAACGCGTATGCTGATATCGTGATGACCCAGTCTCAAGAATTC
ATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGACTGTGGATACTAATGTA
GCCTGGTATCAACAGAACTAGGGCAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTGTAGT
GGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTCGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAATGTGCAG
TCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGAGCAATATCACAGTTTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGTACC
AAGGTGGAGATCAAACGAACGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTG
AAATCTGGAAC TGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC
GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAAGCTGAT
CCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCCTAGTACGCAACTAGTCGTAAAAAGGGTATCTAGAGGTTGAGGT
GATTTTATGAAAAAGAAATATCGCATTTCTTCTTGCATCTATGTTGTTTTTCTATTGCTACAAACGCG
TACGCTCAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCC
TGCAAGGCTTCTGGCTACAAC TTTACTACCTACTGGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGT
CTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCACTGATTATACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGTACAAG
GCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATTCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGAC
TCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGTGGGATTACGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACC
CCTACTCAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCC
TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATAA
CCACCGCATGCGACGGCCCTAGAGTCCCTAACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTTTATTGTTAACTC
ATGTTTGACAGCTTATCATMGATAAACNTTTATGCGGTAGTTATC

```

(SEQ ID NO:10)

图 5E

轻链可变区序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20	30 40	
2H7	QIVLSQSPAILASAPGKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
	* * * * *		
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
	FR2	CDR2	FR3
	50	60	70 80
2H7	GSSPKPWIY	[APSNLAS]	GVPARFSGSGSGTISYSLTISRVEA
	** *		* *** ****
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	[APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
	*	* * *	
hum KI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
		CDR3	FR4
		90	100
2H7	EDAATYYC	[QWSFNPPT]	FGAGTKLELKR
	*		* * *
hu2H7.v16	EDFATYYC	[QWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR
		**** *	
hum KI	EDFATYYC	[QYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR

图 6A

重链可变区序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20	30 40	
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNNH]	WVKQT
	*** ** * * * ** *		***
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNNH]	WVRQA
		* * * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2	CDR2	FR3
	50 a 60	70 80	
2H7	PRQGLEWIG [AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM	
	** *	** ** ** ** *	
hu2H7.v16	PGKGLEWVG [AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL	
	* * ***** * * *****	* *	
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL	
	CDR3	FR4	
	abc 90	100abcde 110	
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR [VVYYSNSYWFYFDV]	WGTGTLTVTVSS	
	** ** * *	* *	
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR [VVYYSNSYWFYFDV]	WGQGLTVTVSS	
		***** ** *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLY---DY]	WGQGLTVTVSS	

图 6B

MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP
S NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLISKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23);

图 7A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:24)

图 7B

MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEW
VGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:25)

图 8A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKG
RFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:26)

图 8B

MGWSCILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEW
VGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:27)

图 9A

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKG
RFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
AATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

图 9B

v16和v138轻链比对(连续编号):

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16.light	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP				

hu2H7.v138.light	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP				
	10	20	30	40	50
hu2H7.v16.light	60	70	80	90	100
	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSENPPTFGQG				

hu2H7.v138.light	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG				
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16.light	110	120	130	140	150
	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD				

hu2H7.v138.light	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD				
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16.light	160	170	180	190	200
	NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL				

hu2H7.v138.light	NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL				
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16.light	210				
	SSPVTKSFNRGEC				

hu2H7.v138.light	SSPVTKSFNRGEC				
	210				

图 10

v16和v138重链比对(连续编号):

	10	20	30	40	50
hu2H7.v16.heavy	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA				

hu2H7.v138.heavy	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
hu2H7.v16.heavy	IYPGNGDTSYNQFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVV				

hu2H7.v138.heavy	IYPGNGATSYNQFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVV				
	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	150
hu2H7.v16.heavy	YYSNSYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL				
	*** *****				
hu2H7.v138.heavy	YYSASYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL				
	110	120	130	140	150
	160	170	180	190	200
hu2H7.v16.heavy	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT				

hu2H7.v138.heavy	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT				
	160	170	180	190	200
	210	220	230	240	250
hu2H7.v16.heavy	QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP				

hu2H7.v138.heavy	QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP				
	210	220	230	240	250
	260	270	280	290	300
hu2H7.v16.heavy	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ				

hu2H7.v138.heavy	KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ				
	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350
hu2H7.v16.heavy	YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE				
	** *****				
hu2H7.v138.heavy	YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPRE				
	310	320	330	340	350
	360	370	380	390	400
hu2H7.v16.heavy	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP				

hu2H7.v138.heavy	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP				
	360	370	380	390	400
	410	420	430	440	450
hu2H7.v16.heavy	PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				

hu2H7.v138.heavy	PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK				
	410	420	430	440	450

图 11

轻链比对

	1	31
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQOKPGKAPKPLIYAP	
	*****	*****
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYLHWYQOKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
	*****	*****
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFRSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	*****	*****
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	*****	*****
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

图 12

重链比对

```

1
hu2H7.v16      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHW
                *****
hu2H7.v511     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHW

37
hu2H7.v16      VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
                *****
hu2H7.v511     VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL

87              104abcde              117
hu2H7.v16      RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVVSS
                *****
hu2H7.v511     RAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGLVTVVSS

118
hu2H7.v16      ASTKGPSVFPLAPS
                *****
hu2H7.v511     ASTKGPSVFPLAPS

132
hu2H7.v16      SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
                *****
hu2H7.v511     SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

182
hu2H7.v16      LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
                *****
hu2H7.v511     LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

232
hu2H7.v16      PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
                *****
hu2H7.v511     PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

282
hu2H7.v16      VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
                *****
hu2H7.v511     VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAP

332
hu2H7.v16      IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
                *****
hu2H7.v511     IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

382
hu2H7.v16      ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA
                *****
hu2H7.v511     ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA

432              447
hu2H7.v16      LHNHYTQKSLSLSPGK
                *****
hu2H7.v511     LHNHYTQKSLSLSPGK
    
```

图 13

轻链比对

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	*****	*****
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
	*****	*****
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	

hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	

hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

图 14

重链比对

```

1
hu2H7.v16      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW
                *****
hu2H7.v511     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW

37              52a              82abc
hu2H7.v16      VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
                *****
hu2H7.v511     VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL

83              100abcde              113
hu2H7.v16      RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGLVTVSS
                *****
hu2H7.v511     RAEDTAVYYCARVVYYSRYWFYFDVWGQGLVTVSS

118
hu2H7.v16      ASTKGPSVFPLAPS
                *****
hu2H7.v511     ASTKGPSVFPLAPS

132
hu2H7.v16      SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
                *****
hu2H7.v511     SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

182
hu2H7.v16      LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
                *****
hu2H7.v511     LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA

232
hu2H7.v16      PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
                *****
hu2H7.v511     PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

282
hu2H7.v16      VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
                *****
hu2H7.v511     VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP

332
hu2H7.v16      IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
                *****
hu2H7.v511     IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV

382
hu2H7.v16      ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
                *****
hu2H7.v511     ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA

432              447
hu2H7.v16      LHNHYTQKSLSLSPGK
                *****
hu2H7.v511     LHNHYTQKSLSLSPGK

```

图 15

小鼠2H7变体在基于抗独特型抗体的ELISA中的标准曲线
8C5 包被 + 2H7 + 8A3-bio

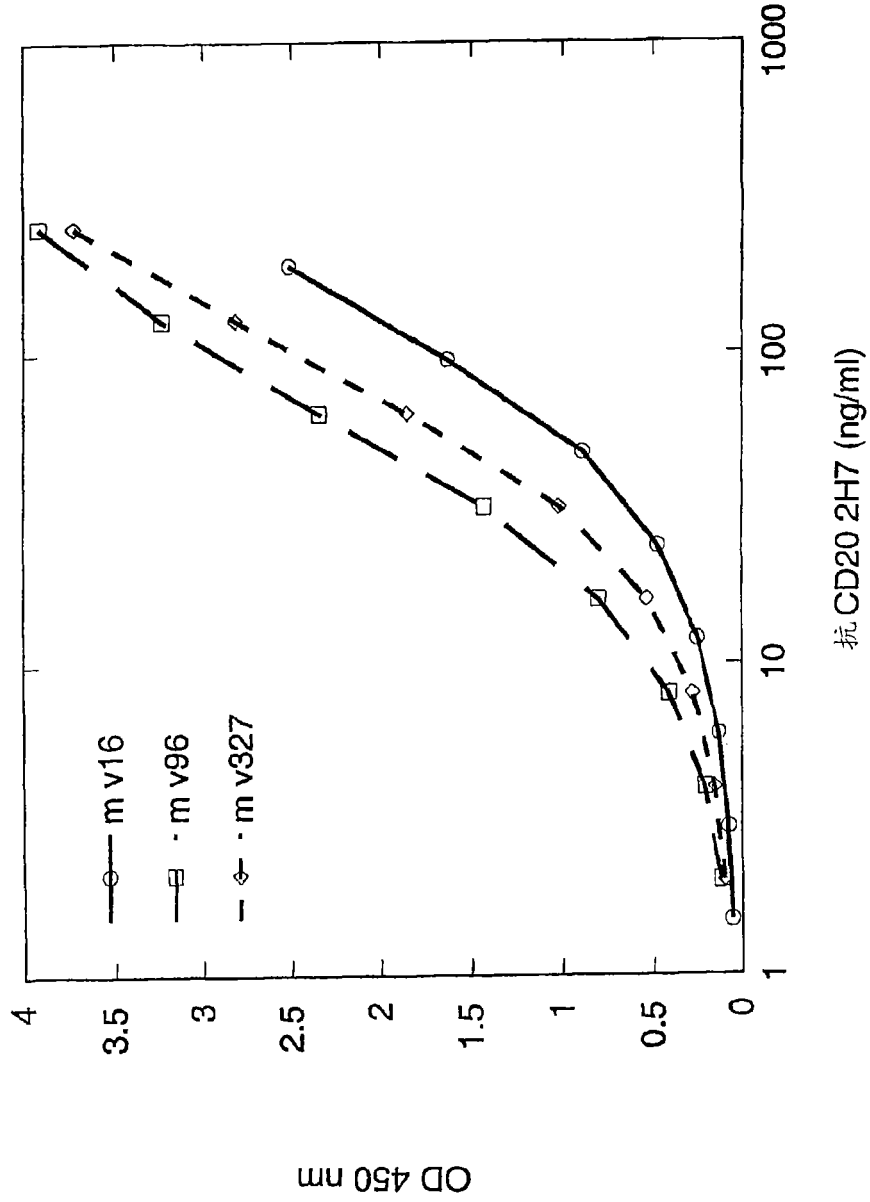


图 16

人源化2H7变体在基于抗独特型抗体的ELISA中的标准曲线
8C5 包被 + 2H7 + 8A3-bio

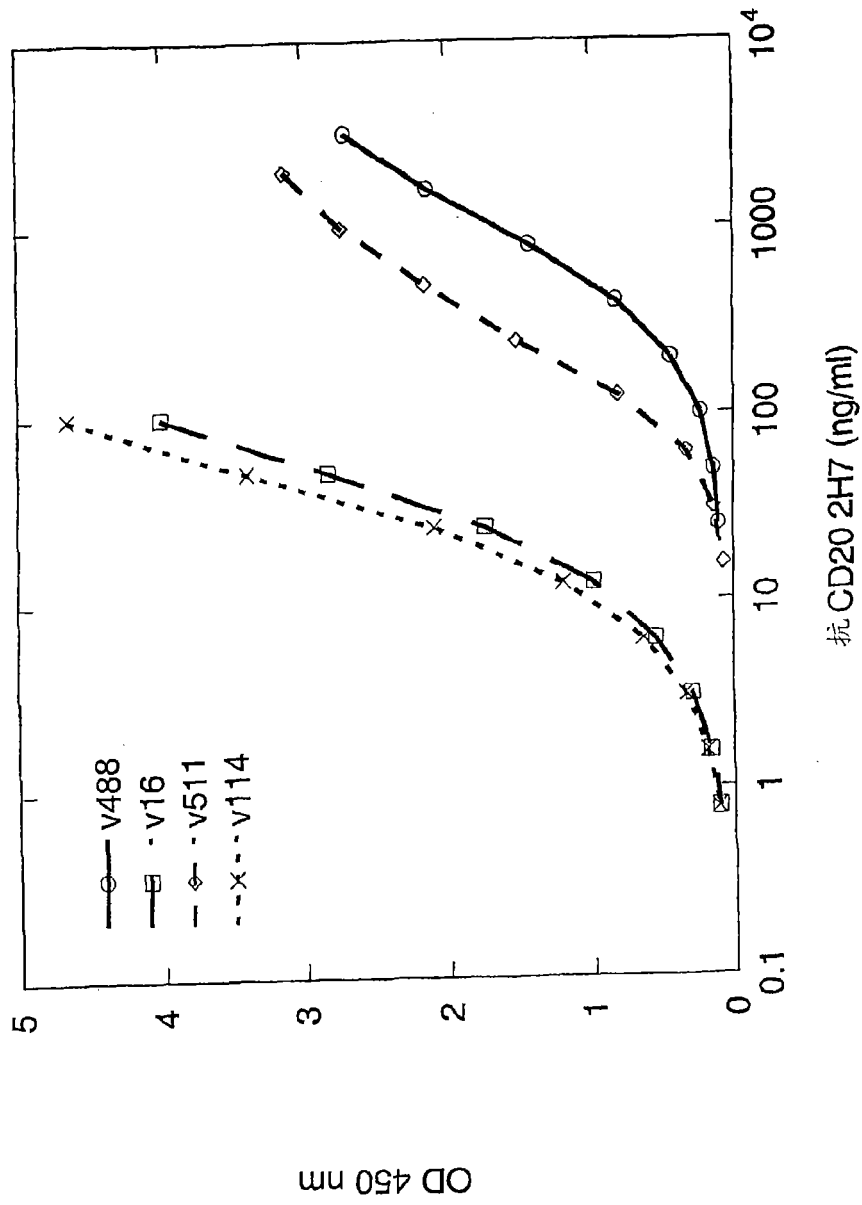


图 17

专利名称(译)	抗体测定法		
公开(公告)号	CN1997893A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200580019492.8	申请日	2005-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
[标]发明人	阿南丘恩撒拉派 Y JG孟 洪圭熙		
发明人	阿南·丘恩撒拉派 Y - J·G·孟 洪圭熙		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C07K16/42 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/686 G01N2333/70578 G01N2333/70532 C07K16/2896 C07K2317/92 G01N2333/715 G01N2333/726 G01N2333/70596 C07K16/4258 C07K2317/55 C07K2317/24		
优先权	60/563193 2004-04-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

患者血流或其它生物学样品中的目标抗体的存在和数量可以充当重要的临床或其它分析或诊断工具。开发了ELISA方法，和用于这类测定法的试剂盒，以及抗独特型抗体和生产它们的杂交瘤，以检测来自例如动物模型和人类患者的生物学样品中的抗体水平。

