



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102702359 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

- (21) 申请号 201110343406. 6 *C12N 15/13* (2006. 01)
- (22) 申请日 2004. 07. 29 *C12N 15/63* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *C12N 5/10* (2006. 01)
 - PCT/US04/02892 2004. 02. 02 US *A61K 39/395* (2006. 01)
 - PCT/US04/02894 2004. 02. 02 US *A61P 37/08* (2006. 01)
- (62) 分案原申请数据 *A61P 11/06* (2006. 01)
 - 200480041292. 8 2004. 07. 29 *A61P 11/02* (2006. 01)
 - A61P 17/00* (2006. 01)
- (83) 生物保藏信息 *G01N 33/53* (2006. 01)
 - PTA-5680 2003. 12. 03 *G01N 33/577* (2006. 01)
 - PTA-5679 2003. 12. 03
 - PTA-5678 2003. 12. 03
- (71) 申请人 泰勒公司
- 地址 美国德克萨斯
- (72) 发明人 桑贾亚·辛格 黄丹阳
- 锡·钟·迈克尔·冯
- (74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
- 72002
- 代理人 左路

- (51) Int. Cl.
- C07K 16/42* (2006. 01)
- C12N 15/11* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 30 页
序列表 32 页 附图 21 页

(54) 发明名称
新的 IgE 表位的鉴别

(57) 摘要

本发明涉及衍生自 IgE 的 CH3 结构域的新的肽表位, 这些肽表位被特异性结合 IgE 的高亲和力抗体识别。这些新的肽可用于对对象进行主动免疫, 所述主动免疫通过将这些肽给予对象而在对象体内产生高亲和力抗体实现; 这些新的肽还可用于对对象进行被动免疫, 所述被动免疫通过在非人宿主体内产生特异性结合 IgE 的这些区域的高亲和力抗 IgE 抗体实现。

1. 一种分离的抗体,其特异性结合氨基酸序列中的表位,所述表位选自下组:
Leu Pro ArgAla Leu XaaArg Ser Xaa ;
Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr ;
His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr ;或者
Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr。
2. 权利要求 1 的抗体,其进一步包含一种标记。
3. 权利要求 1 或 2 的抗体,其中所述抗体是:
 - a) 嵌合抗体,
 - b) 单链抗体,
 - c) Fab 片段,
 - d) F(ab') 片段,
 - e) 人抗体,或者
 - f) 人源化抗体。
4. 权利要求 1-3 任一项的抗体,其中所述抗体是多克隆抗体。
5. 权利要求 1-3 任一项的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
6. 一种组合物,其包含权利要求 1-5 任一项的抗体及一种生理学可接受的载体、稀释剂、稳定剂和 / 或赋形剂。
7. 一种制备抗体的方法,所述方法包括:
 - a) 用包含抗 -IgE 表位的多肽在激发抗体应答的条件下免疫动物,其中所述表位由以下氨基酸序列组成:
Leu Pro Arg Ala Leu Xaa Arg Ser Xaa ;
Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr ;
His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr ;或者
Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr,
 - b) 从所述动物分离抗体,和
 - c) 鉴别特异性结合步骤 (a) 的多肽的抗体。
8. 一种可通过权利要求 7 的方法获得的抗体。
9. 一种组合物,其包含权利要求 8 的抗体及一种生理学可接受的载体、稀释剂、稳定剂和 / 或赋形剂。
10. 一种制备单克隆抗体的方法,所述方法包括:
 - a) 用包含抗 -IgE 表位的多肽在激发抗体应答的条件下免疫动物,其中所述表位由以下氨基酸序列组成:
Leu Pro Arg Ala Leu Xaa Arg Ser Xaa ;
Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr ;
His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr ;或者
Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr,
 - b) 从所述动物分离产生抗体的细胞,
 - c) 将所述产生抗体的细胞与永生化的细胞融合,形成产生单克隆抗体的杂交瘤细胞,
 - d) 培养所述杂交瘤细胞,以及

- e) 从培养物中分离与步骤 (a) 的多肽特异性结合的单克隆抗体。
11. 一种可通过权利要求 10 的方法获得的单克隆抗体。
 12. 一种组合物,其包含权利要求 11 的单克隆抗体及一种生理学可接受的载体、稀释剂、稳定剂和 / 或赋形剂。
 13. 权利要求 1-5 任一项的抗体,其中所述抗体是通过筛选 Fab 表达文库分离的。
 14. 权利要求 1-5 任一项的抗体,其中所述抗体是通过筛选组合免疫球蛋白文库分离的。
 15. 编码权利要求 1-5,8,11,13 或 14 任一项的抗体的分离的核酸。
 16. 包含权利要求 15 的分离的核酸的载体。
 17. 包含权利要求 16 的载体的分离的宿主细胞。
 18. 一种包含权利要求 1-5,8,11,13 或 14 任一项的抗体的试剂盒。
 19. 权利要求 1-5,8,11,13 或 14 任一项的抗体在制备用于治疗患有 IgE 介导的疾病或病变或者具有患上 IgE 介导的疾病或病变风险的哺乳动物的药物中的应用。
 20. 权利要求 19 的应用,其中所述 IgE 介导的疾病或病变是变态反应、哮喘、变应性鼻炎、特应性皮炎、风疹、或湿疹。
 21. 权利要求 19 或 20 的应用,其中所述哺乳动物是人。

新的 IgE 表位的鉴别

[0001] 本申请为申请日为 2004 年 7 月 29 日、申请号为 200480041292.8、发明名称为“新的 IgE 表位的鉴别”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 交叉相关申请

[0003] 本申请要求申请日为 2004 年 2 月 2 日的 PCT 申请 PCT/US04/02892 和 PCT/US04/02894 的优先权,这些 PCT 申请并入本文作参考。

[0004] 发明背景

[0005] 变态反应 (allergy) 是由对外源因素如变应原 (allergen) 过大的免疫应答所诱导的过敏状态。特征在于与变应原接触后立即发生变态反应的速发型超敏反应 (I 型) 是由 B 细胞介导的,并且基于抗原-抗体反应。迟发型超敏反应是由 T 细胞介导的,并且基于细胞免疫性机制。近年来,术语“变态反应”越来越成为 I 型超敏反应的同义词。

[0006] 速发型超敏反应是基于 B 细胞产生 E 型免疫球蛋白 (IgE 抗体) 的一种应答,所述 B 细胞暴露于变应原而分化为分泌抗体的浆细胞。IgE 诱导的反应是在变应原进入机体的部位,即在粘膜表面和 / 或在局部淋巴结,发生的局部事件。局部产生的 IgE 首先使得局部肥大细胞敏感,即 IgE 抗体将其恒定区与肥大细胞表面上的 Fc ϵ 受体结合,然后“溢出 (spill-over)” IgE 进入循环并与整个机体的循环中的嗜碱细胞和组织固定的肥大细胞上的受体结合。当结合的 IgE 随后与变应原接触时, Fc ϵ 受体通过变应原的结合而交联,导致细胞脱粒并释出许多变态反应介质,如组胺、前列腺素、白细胞三烯等等。这些物质的释放造成速发型超敏反应的典型临床症状,所述临床症状即呼吸道或肠道平滑肌收缩、小血管扩张及其对水和血浆蛋白的通透性增加、粘液分泌 (导致例如变态反应性鼻炎、特应性湿疹和哮喘)、以及对皮肤神经末梢的刺激导致瘙痒和疼痛。另外,基于与变应原二次接触的反应是加强的,因为在首次与变应原接触后,通过在细胞表面上表达 IgE,一些 B 细胞形成表面 IgE 阳性 B 细胞 (sIgE⁺B 细胞) 的“记忆库 (memory pool)”。

[0007] IgE 有两种主要受体:高亲和力受体 Fc ϵ RI 和低亲和力受体 Fc ϵ RII。Fc ϵ RI 主要在肥大细胞和嗜碱细胞表面表达,但在人朗格汉斯细胞、树突细胞和单核细胞上也发现低水平的 Fc ϵ RI,在此其发挥 IgE-介导的变应原呈递作用。另外,有报道在人嗜酸性粒细胞和血小板上发现 Fc ϵ RI (Hasegawa, S. et al., Hematopoiesis, 1999, 93 :2543-2551)。在 B 细胞、T 细胞或嗜中性粒细胞上未发现 Fc ϵ RI。Fc ϵ RI 在朗格汉斯细胞和皮肤树突细胞上的表达对于变应性个体中 IgE 结合的抗原呈递在功能上和生物学上都是重要的 (Kluba1 R. et al., J. Invest. Dermatol. 1997, 108 (3) :336-42)。

[0008] 低亲和力受体 Fc ϵ RII (CD23) 是一种凝集素样分子,包含三个相同的亚基,其具有从细胞质膜伸出的长 α -螺旋卷曲茎结构 (stalk) 延伸的头结构 (head structure) (Dierks, A. E. et al., J. Immunol. 1993, 150 :2372-2382)。在与 IgE 结合的基础上, Fc ϵ RII 与 B 细胞上的 CD21 结合,参与 IgE 合成的调节 (Sanon, A. et al., J. Allergy Clin. Immunol. 1990, 86 :333-344, Bonnefoy, J. et al., Eur. Resp. J. 1996, 9 :63s-66s)。Fc ϵ RII 长期以来被认为用于变应原呈递 (Sutton and Gould, 1993, Nature, 366 :421-428)。与上皮细胞上的 Fc ϵ RII 结合的 IgE 导致特异性快速变应原呈递 (Yang, P. P., J. Clin. Invest.,

2000, 106 :879-886)。Fc ϵ RII 存在于一些细胞类型上,包括B细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、天然杀伤细胞、T 细胞、滤泡树突细胞和朗格汉斯细胞。

[0009] 已经鉴别了与 Fc ϵ RI 和 Fc ϵ RII 相互作用的 IgE 分子上的结构实体。诱变研究表明 CH3 结构域介导 IgE 与 Fc ϵ RI (Presta et al., J. Biol. Chem. 1994, 269 :26368-26373 ; Henry A. J. et al., Biochemistry, 1997, 36 : 15568-15578) 和 Fc ϵ RII (Sutton and Gould, Nature, 1993, 366 :421-428 ; Shi, J. et al., Biochemistry, 1997, 36 :2112-2122) 的相互作用。高亲和力和低亲和力受体的结合位点均沿着经由两个 CH3 结构域的中心旋转轴而对称定位。Fc ϵ RI 结合位点位于接近 CH2 结构域连接处的外侧的 CH3 结构域中,而 Fc ϵ RII 结合位点位于 CH3 的羧基末端。

[0010] 治疗变态反应的一个有希望的概念包括应用单克隆抗体,所述抗体是 IgE 同种型特异性的,并因此能结合 IgE。这个方案基于通过减量调节 IgE 免疫应答而对变态反应进行抑制,所述免疫应答是诱导变态反应最早出现的事件并使得变态反应状态得以维持。由于其他抗体类别的应答不受影响,因此得以实现对变态反应症状的即时和长期作用。对人嗜碱细胞密度的早期研究示出患者血浆中 IgE 水平与每个嗜碱细胞的 Fc ϵ RI 受体数目之间的关系 (Malveaux et al., J. Clin. Invest., 1978, 62 :176)。他们注意到变态反应和非变态反应人中的 Fc ϵ RI 密度为每个嗜碱细胞 10^4 - 10^6 个受体。后来示出用抗 IgE 治疗变态反应疾病使得循环中 IgE 的数量降低至治疗前水平的 1% (MacGlashan et al., J. Immunol., 1997, 158 :1438-1445)。MacGlashan 分析了得自用完整抗 IgE 抗体 (其结合在患者血清中循环的游离 IgE) 治疗的患者的血清。他们报道了降低患者的循环 IgE 水平导致嗜碱细胞表面上存在的受体数目降低。因此,他们设想嗜碱细胞和肥大细胞表面上的 Fc ϵ RI 的密度受到循环 IgE 抗体水平的直接或间接调节。

[0011] 最近, WO 99/62550 公开了 IgE 分子及片段的应用,这些 IgE 分子及片段结合 Fc ϵ RI 和 Fc ϵ RII 的 IgE 结合位点以阻断 IgE 与受体的结合。然而,对这些变态反应疾病的不具有有害副作用的有效治疗方法还很有限。治疗变态反应疾病的一种治疗方法包括使用人源化抗 IgE 抗体治疗变应性鼻炎和哮喘 (Corne, J. et al., J. Clin. Invest. 1997, 99 : 879-887 ; Racine-Poon, A. et al., Clin. Pharmacol. Ther. 1997, 62 :675-690 ; Fahy, J. V. et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1997, 155 :1824-1834 ; Boulet, L. P. et al., Am. J. Resp. Crit. Care Med., 1997, 155 :1835-1840 ; Milgrom, E. et al., N. Engl. J. Med., 1999, 341 : 1966-1973)。这些临床数据表明抑制 IgE 与其受体的结合是治疗变态反应疾病的一种有效方法。

[0012] 适合作为抗变态反应剂的抗体应与分化为产生 IgE 的浆细胞的表面 IgE 阳性 B 细胞反应,由此可用于功能性地消除那些 B 细胞。然而,原则上 IgE 的抗体也可以通过交联 Fc ϵ 受体而诱导从 IgE 敏化的肥大细胞中释放介质,由此拮抗对血清 IgE 和 sIgE⁺B 细胞水平发挥的有益作用。开发抗 IgE 治疗的一种潜在危险问题是治疗性抗体与已经与高亲和力受体结合的 IgE 的结合引起 IgE 交联并激发组胺释放导致潜在的过敏反应的可能性。

[0013] 因此,可用于治疗变态反应的抗体必须不能与敏化的肥大细胞和嗜碱细胞上结合的 IgE 反应,但应该保留识别 sIgE⁺B 细胞的能力。这种 IgE 同种型特异性抗体已经由 Chang 等 (Biotechnology 8, 122-126 (1990)) 在欧洲专利 No. EP0407392 及一些美国专利例如美国专利 No. 5, 449, 760 中描述。

[0014] 用于产生抗 IgE 抗体的肽也具有诱导致敏抗体的危险。如果在免疫期间产生的抗体结合与高亲和力 IgE 受体结合的 IgE,或是通过其他机制,在主动免疫期间抗 IgE 抗体的产生也许能以与被动给予抗 IgE 抗体同样的方式激发组胺释放。

[0015] 因此,需要特异性结合 IgE 但不结合已经与其高亲和力受体结合的 IgE 的较高亲和力的非致敏抗体,以及不诱导致敏抗体的用于主动免疫的肽。本发明人鉴别了 IgE 的特异性表位,其以高亲和力结合抗体但不结合肥大细胞或嗜碱细胞上的 IgE。这些特异性表位接下来可用于产生特异性肽,以用于主动免疫以产生仅与 IgE 的结合受体的区域结合的 IgE 抗体,从而保证所述抗体与已经与受体结合的 IgE 不交联,并因此是非致敏性的。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及衍生自 IgE 的 CH3 结构域的新的肽表位。这些肽表位被特异性结合 IgE 的高亲和力抗体识别。可以通过给予哺乳动物这些新的肽以在体内产生高亲和力抗体而将这些新的肽用于哺乳动物的主动免疫亲和力。所述肽表位也可用于在非人宿主体内产生特异性结合这些 IgE 区域的高亲和力抗 IgE 抗体,并使用所得抗体被动免疫哺乳动物。

[0018] 本发明的一种免疫原(表位 A,图 11)包含如下氨基酸序列:

[0019] Asn Pro Arg Gly Val Ser Xaa Tyr Xaa XaaArg Xaa(SEQ ID NO. 72)

[0020] 表位 A 的一个实例是:

[0021] Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro(SEQ ID NO. 73)

[0022] 另一种免疫原(表位 B,图 11)包含如下氨基酸序列:

[0023] Leu Pro Arg Ala Leu Xaa Arg Ser Xaa(SEQ ID NO. 74)。

[0024] 表位 B 的例子包括:

[0025] Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr(SEQ ID NO. 75)

[0026] His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr(SEQ ID NO 76)

[0027] Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr(SEQ ID NO 77)。

[0028] 在 SEQ ID NO :72 或 SEQ ID NO :74 中,Xaa 可以是任何氨基酸。

[0029] 这些肽可包含在组合物中,所述组合物包含至少一种所述肽及一种生理学可接受的载体、稀释剂、稳定剂或赋形剂,以及一种免疫原性载体。所述免疫原性载体可以是例如 BSA、KLH、破伤风类毒素和白喉类毒素。本发明还涉及编码 SEQ ID NO. 72-77 的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、及含有所述载体的细胞。

[0030] 本发明还涉及特异性结合表位 A 和 / 或表位 B 的抗体。本发明还涉及一种产生特异性结合表位 A 和 / 或表位 B 的抗体的方法。

[0031] 本发明涉及给予患有 IgE 介导的疾病或病变的对象包含 SEQ ID NO :72 和 / 或 SEQ ID NO :74 的肽。

[0032] 本发明涉及给予患有 IgE 介导的疾病或病变的哺乳动物用包含 SEQ ID NO :72 和 / 或 SEQ ID NO. 74 的肽产生的高亲和力抗体。所述高亲和力抗体可以是人抗体、人源化抗体或者嵌合抗体。所述抗体可以是多克隆抗体或者单克隆抗体。这种 IgE 介导的疾病或病变包括例如哮喘、特应性皮炎、风疹、变应性鼻炎和湿疹。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 噬菌体载体,是抗体克隆和筛选中所用的噬菌体载体的示意图。

[0035] 图 2 是用于产生抗体变体的寡核苷酸的示意图。

[0036] 图 3A TES-C21 和模板比对, 示出鼠抗 IgE 抗体 TES-C21 的轻链与组合的人模板 L16 和 JK4 的对比。

[0037] 图 3B TES-C21 和模板比对, 示出 TES-C21 的重链与组合的人模板 DP88 和 JH4b 的对比。

[0038] 图 4 高亲和力候选物的构架序列, 示出与亲代 TES-C21 相比具有高亲和力的构架残基变体的列表。

[0039] 图 5 ELISA 滴定曲线, A 和 B 示出与亲代 TES-C21 的 Fab 和阴性对照组 (5D12) 相比, 克隆 4、49、72、78 和 136 的 ELISA 滴定曲线。

[0040] 图 6 抑制测定, 示出与亲代 TES-C21 和阴性对照抗体相比, 克隆 2C、5A 和 5I 的抑制测定。

[0041] 图 7 得自文库的高亲和力候选物列表, 示出具有导致对 IgE 具有更高亲和力的有益突变组合的克隆的序列。

[0042] 图 8A 和 8B 示出克隆 136、1、2、4、8、13、15、21、30、31、35、43、44、53、81、90 和 113 的完整轻链可变区的构架序列。

[0043] 图 9A 和 9B 示出 35 个克隆的完整重链可变区的构架序列。

[0044] 图 10A-F 示出克隆 136、2C、5I、5A、2B 和 1136-2C 的完整重链和轻链序列。

[0045] 图 11 人 IgE 的 CH3 区域氨基酸序列, 示出入 IgE 的 CH3 区域氨基酸序列并标出表位“A”和表位“B”。

[0046] 图 12 表位 B 的肽扫描, 示出用于鉴别表位 B 的重叠肽。

[0047] 图 13 表位 A 的丙氨酸扫描, 示出表位 A 的结合区中重要残基的鉴别。

[0048] 图 14 表位 B 的丙氨酸扫描, 示出表位 B 的结合区中重要残基的鉴别。

[0049] 1. 图 15 western 印迹分析, 示出结合突变肽的 MAb 的 western 印迹分析。

[0050] 图 16 转基因小鼠中的抗 IgE 应答, 示出在表达人 IgE 的转基因动物中抗 IgE 抗体的产生。

[0051] 发明详述

[0052] 定义

[0053] 本申请中使用的术语具有本领域技术人员通常和典型理解的含义。然而申请人希望如下术语具有下文特定的解释。

[0054] 关于抗体链多肽序列的短语“基本上相同”可以解释为抗体链与参考多肽序列呈现至少 70% 或者 80% 或者 90% 或者 95% 的序列相同性。关于核酸序列该术语可以解释为核苷酸的序列与参考核酸序列呈现至少大约 85% 或者 90% 或者 95% 或者 97% 序列相同性。

[0055] 术语“相同性”或者“同源性”应解释为在对序列进行排列对比并导入缺口 (如果需要达到完整序列的最大百分比相同性)、并且不认为任何保守取代是序列相同性的一部分之后, 候选序列中与其相对比的相应序列的残基相同的氨基酸残基的百分比。N 或 C 末端延伸或者插入均不认为降低相同性或同源性。本领域熟知进行序列排列对比的方法和计算机程序。序列相同性可以使用序列分析软件测定。

[0056] 术语“抗体”以最广泛的含义应用, 并且特别涵盖单克隆抗体 (包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和多重特异性抗体 (例如双特异性抗体)。抗体 (Ab) 和免疫球蛋白 (Ig)

是具有相同结构特征的糖蛋白。尽管抗体呈现对特异性靶的结合特异性,但是免疫球蛋白包括抗体及缺乏靶特异性的其它抗体样分子。天然抗体和免疫球蛋白通常是大约 150,000 道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每个重链在一端具有一个可变区(V_H),随后是一些恒定区。每个轻链在一端具有一个可变区(V_L),在另一端具有一个恒定区。“高亲和力”抗体是指具有至少 10^{-10} 、优选 10^{-12} 结合亲和力的那些抗体。

[0057] 如本文所用,“抗人 IgE 抗体”是指以抑制或者大大降低 IgE 与高亲和力受体 $Fc \epsilon RI$ 结合的方式结合人 IgE 的抗体。

[0058] 关于抗体的可变区中的术语“可变”是指可变区的某些部分在抗体的序列中广泛不同,并且是每个特定抗体与其特定靶的结合和特异性所依据的。然而,可变性在抗体的可变区中不是均匀分布的。其集中在称作互补决定区(CDR)的三个节段中,CDR 也称作超变区,它们在轻链和重链可变区中均存在。可变区的较高度保守的部分称作构架(FR)。天然重链和轻链的可变区各自包含四个 FR 区,主要是采取 β -折叠构型,由三个 CDR 相连,形成环与 β -折叠结构相连,在一些情况中这些环构成 β -折叠结构的一部分。每条链中的 CDR 均通过 FR 区紧密连接在一起,并且与其它链的 CDR 一起形成抗体的靶结合位点(见 Kabat 等所述)。如本文所用,除非特别指出,免疫球蛋白氨基酸残基的编号根据 Kabat 等的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统进行(Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987)。

[0059] 术语“抗体片段”是指全长抗体的一部分,通常是靶定结合区或者可变区。抗体片段例如包括 Fab, Fab' , $F(ab')$ 和 Fv 片段。短语抗体的“功能片段或者类似物”是具有与全长抗体同样性质的生物学活性的化合物。例如,抗 IgE 抗体的功能片段或类似物是以阻止或大大降低 IgE 免疫球蛋白分子结合高亲和力受体 $Fc \epsilon RI$ 的能力的方式结合 IgE 免疫球蛋白。如本文所用,关于抗体的“功能片段”是指 Fv、 $F(ab)$ 和 $F(ab')$ 片段。“Fv”片段是含有完整靶识别和结合位点的最小抗体片段。这个区域由紧邻的非共价结合的一个重链和一个轻链可变区组成的二聚体(V_H - V_L 二聚体)组成。在这种构型中,每个可变区的三个 CDR 互相作用而限定了 V_H - V_L 二聚体表面上的靶结合位点。总之,六个 CDR 使抗体具有靶结合特异性。然而,即使一个单一可变区(或者仅包含特异于靶的三个 CDR 的 Fv 的一半)也具有识别和结合靶的能力,但是亲和力比完整的结合位点低。“单链 Fv”或者“sFv”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单多肽链中。通常地, Fv 多肽进一步包含在 V_H 和 V_L 结构域之间的一个多肽接头,其使得 sFv 形成用于靶结合的期望的结构。

[0060] Fab 片段含有轻链的恒定区和重链的第一个恒定区(CH1)。 Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于在重链 CH1 结构域的羧基末端加上几个残基、包括来自抗体绞链区的一或多个半胱氨酸。 $F(ab')$ 片段是通过裂解 $F(ab')$ 胃蛋白酶消化产物的绞链半胱氨酸的二硫键而产生的。本领域技术人员已知抗体片段的其它化学偶联方式。

[0061] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指得自一群基本同源的抗体的抗体,即包含除了可能以很小量存在的天然发生的突变之外是相同的各个抗体。单克隆抗体是针对单一靶位点的高度特异性的抗体。另外,与常规的(多克隆)抗体制备物(其典型包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)相反,每个单克隆抗体均针对靶上的一个单一决定簇。除了其

特异性之外,单克隆抗体的优势是可以通过杂交瘤培养而合成,不被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示抗体得自基本上同质的抗体群的这一特征,而不是指需要通过任何特殊方法产生该抗体。例如,本发明使用的单克隆抗体可以通过使用熟知的技术分离自噬菌体抗体文库。根据本发明使用的亲代单克隆抗体可以通过由 Kohler 和 Milstein, Nature 256, 495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法产生,或者可以通过重组方法产生。

[0062] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如抗体的 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 片段或者其它结合靶的亚序列)。一般而言,人源化抗体包含基本上全部的至少一个、典型两个可变区,其中所有或者基本上所有 CDR 区域均相应于非人免疫球蛋白的那些区域,并且所有或者基本上所有 FR 区域是人免疫球蛋白共有序列的那些区域。人源化抗体也可以包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),典型是所选择的人免疫球蛋白模板的至少一部分免疫球蛋白恒定区。

[0063] 术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”包括后代。也应理解由于有意或无意的突变导致所有后代的 DNA 内容不必完全相同。本发明包括具有与在最初转化细胞中筛选的相同的功能或者生物学性质的变体后代。本发明使用的“宿主细胞”通常是原核宿主或者真核宿主。

[0064] “用 DNA 转化细胞生物体”是指将 DNA 导入生物体中,由此该 DNA 可以作为染色体外元件或者通过染色体整合而复制。“用 DNA 转染细胞生物体”是指细胞或者生物体摄取 DNA 例如表达载体,而无论任何编码序列事实上是否被表达。术语“转染的宿主细胞”和“转化的宿主细胞”是指其中导入了 DNA 的细胞。所述细胞称为“宿主细胞”,其可以是原核细胞或者真核细胞。典型的原核宿主细胞包括大肠杆菌的各种菌株。典型的真核宿主细胞是哺乳动物如中国仓鼠卵巢细胞或者人源细胞。导入的 DNA 序列可以来自与宿主细胞相同的物种或者来自与宿主细胞不同的物种,或者可以是杂交体 DNA 序列,含有一些外源和一些同源 DNA。

[0065] 术语“载体”是指一种 DNA 构建体,其含有与能使得所述 DNA 在合适宿主中表达的合适的控制序列可操纵地连接的 DNA 序列。这些控制序列包括进行转录的启动子、任选控制这种转录的操纵子、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列、以及控制转录和翻译终止的序列。所述载体可以是质粒、噬菌体颗粒,或者仅仅是潜在的基因组插入体。一旦转化进合适的宿主,所述载体可以复制并且与宿主基因组无关地发挥功能,或者在一些情况中整合进基因组中。在本说明书中,“质粒”和“载体”有时可以互换使用,因为质粒是载体最常用的形式。然而,本发明包括发挥同样功能的其它形式载体,这些形式为本领域所已知或者变得为本领域所已知。

[0066] “控制序列”是指在特定的宿主生物体中表达可操纵地连接的编码序列所必需的 DNA 序列。适于原核生物的控制序列例如包括启动子、任选地操纵子序列、及核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。如果其作为参与所述多肽分泌的前蛋白而被表达,则前序列(presequence)或者分泌前导序列的 DNA 可以可操纵地与多肽的 DNA 连接;如果其影响该序列的转录,则启动子或者增强子是与编码序列可操纵地连接;或者如果其影响该序列的转录,则核糖体结合位点是与编码序列可操纵地连接;或者如果其被定位在可以促进翻译的位置,则核糖体结合位点是与编码序列可操纵地连接。通常地,

“可操纵地连接”是指连接的 DNA 序列是连续的,并且在分泌前导序列的情况中是连续的并且是解读状态 (in reading phase)。然而,增强子不必是连续的。

[0067] 进行治疗的“哺乳动物”是指归类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜和农场动物、非人灵长类动物、及动物园动物、运动动物,或者宠物如狗、马、猫、牛等等。

[0068] 在本文就多肽而言所用术语“表位标记的”是指与“表位标记”融合的一种多肽。所述表位标记多肽具有足够的残基以提供可以针对其产生抗体的表位,然而不是足够短的由此不干扰多肽的活性。所述表位标记优选也是相当独特的,由此抗体基本不与其它表位交叉反应。合适的标记多肽通常具有至少 6 个氨基酸残基,通常具有大约 8-50 个氨基酸残基(优选大约 9-30 个残基)。实例包括 flu HA 标记多肽及其抗体 12CA5(Field et al.,Mol Cell. Biol. 8 :2159-2165(1988));c-myc 标记及针对其的 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体(Evan et al.,Mol Cell. Biol. 5(12) :3610-3616(1985));及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标记及其抗体(Paborsky et al.,Protein Engineering 3(6) :547-553(1990))。在某些实施方案中,所述表位标记可以是 IgG 分子的 Fc 区域的表位(例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4),其引起增加 IgG 分子的体内血清半衰期。

[0069] 本文所用术语“标记”是指一种可检测的化合物或者组合物,其可以与分子或蛋白质例如抗体直接或者间接缀合。所述标记可以是自身可检测的(例如放射性同位素标记或者荧光标记),或者在酶标记的情况中可以催化可被检测的底物化合物或者组合物的化学改变。

[0070] 如本文所用,“固相”是指本发明抗体可以附着的非水相基质。本发明涵盖的固相例如包括部分或者全部由玻璃(例如可控孔度玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅酮形成的那些固相。在某些实施方案中,根据文章的前后关系,所述固相可以包含测定平板的孔;在其它实施方案中,所述固相可以是纯化柱(例如亲和层析柱)。

[0071] 如本文所用,术语“IgE 介导的病症”是指特征在于免疫球蛋白 IgE 的过量产生和/或超敏感性的病变或疾病。特别地,该术语可以解释为包括与致敏的超敏感性和特异反应性过敏相关的病变,例如包括哮喘、变应性鼻炎和结膜炎(枯草热)、湿疹、风疹、特应性皮炎和食物过敏。由例如蜜蜂叮刺、蛇咬伤、食物或者药物所致的过敏性休克的严重生理学病变也涵盖在这个术语的范围内。

[0072] 抗体的产生

[0073] 起始或者“亲代”抗体可以使用本领域已有的用于产生这些抗体的技术制备。这些技术是熟知的。产生起始抗体的示例性方法在如下章节中更详细描述。这些描述是产生或选择亲代抗体的另外的可供选择的方法,而不是为了限制可以产生这种分子的方法。

[0074] 抗体的结合亲和力在产生本发明的高亲和力抗体之前确定。另外,对抗体可以进行其它生物学活性分析,例如评价作为治疗剂的效力。这些分析为本领域所已知并依赖于所述抗体的靶位和被指定的用途。

[0075] 为了筛选结合特定表位的抗体(例如阻断 IgE 与其高亲和力受体结合的那些抗体),可以进行常规的交叉阻断分析,如进行在 Antibodies :A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988))中所述的分析。或者,可以进行表位定位以确定抗体结合相应表位的部位。任选地,抗体对于用于产生该抗体的靶

的类似物（所述类似物来自不同物种）的结合亲和力可以使用本领域已知的技术确定。在一个实施方案中，在临床前研究中其它物种是给予所述抗体的非人哺乳动物。因此，所述物种可以是非人灵长类动物，如恒河猴、猕猴、狒狒、黑猩猩、和短尾猿。在其它实施方案中，所述物种例如可以是啮齿动物、猫或者狗。

[0076] 所述亲代抗体根据本发明加以改变，以产生与亲代抗体相比对于靶具有较高或者较强结合亲和力的抗体。抗体特异性得自在抗体与其靶之间形成的独特界面，所述表面彼此互补产生独特的吻合（Jones, S. & Thornton, J. M. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 13-20）。通过进一步改良沿着这个界面的接触面，整体的亲和力可以由于促进结合配体的缔合所需的能量较低而增加。

[0077] 抗体的结合表面通常由 6 个互补决定区（CDR）组成，它们是从核心伸出的环形。CDR 由具有结合特异性靶的独特序列的氨基酸组成。为了增加抗体与其抗原的亲和力，这些氨基酸周围的环境必须通过导入或改良各种非共价力而变得更加有利，其最终降低相互作用的能量而产生较高的亲和力。

[0078] 范德华力是在两个电中性分子之间发生的非共价相互作用（Voet, D. & Voet, J. G. (1990) Biochemistry John Wiley and Sons, NY, NY）。通过从永久或诱导的偶极子产生的静电相互作用，两个表面之间可以发生缔合。这些偶极子可以沿着 α 螺旋的末端或者接近极性氨基酸存在。通过增加沿着结合界面的范德华力的数量，可以产生更有利的缔合。

[0079] 导入氢键也将增加抗体与其抗原之间相互作用的特异性。参与氢键的通常的供体和受体是氮、氧和硫原子，氨基酸主要是由它们组成的（见 Voet, et al., 如前所述）。氢键往往是仅交叉很短的距离（通常为 2.7-3.1 Å），因此结合配体必须紧密接近以发生这些相互作用。因此，可以改良亲和力的一种方式是将潜在供体和受体分子紧密接触以建立氢键。

[0080] 最后，改良疏水相互作用也可以增加两个结合配体之间的有利能量学。接近于结合表面的非极性残基应该由其它非极性残基围绕，并因此在有利的环境中存在。通过非极性侧链的充分埋藏，相互作用的能量学对于强结合界面是有利的。

[0081] 稳定蛋白质-蛋白质界面的相互作用降低维持这些接触的能量消耗，并因此增加了整体亲和力。通过改良接近结合界面的各个氨基酸周围的环境，可以产生导致更高结合亲和力的更有利的环境。因此，通过导入有利的接触及通过进一步互补而改良界面，则抗体和抗原之间的整体结合相互作用会大大改善。

[0082] 所得高亲和力抗体与亲代抗体对于靶的结合亲和力相比，优选地高出至少大约 10 倍，或者高出至少大约 20 倍，或者高出至少大约 500 倍，或者可以是高出 1000-5000 倍。需要的或希望的结合亲和力的增强程度依赖于亲代抗体的最初结合亲和力。

[0083] 一般地，从亲代抗体中产生高亲和力抗体的方法包括如下步骤：

[0084] 1. 获得或者选择结合感兴趣的靶的包含重链和轻链可变区的亲代抗体。这可以通过传统的杂交瘤技术、噬菌体展示技术或者产生靶特异性抗体的任何其它方法实现。

[0085] 2. 选择与亲代构架序列接近的构架序列，优选人模板序列。这个模板可以基于例如其相当的全长、CDR 的大小、位于构架和 CDR 之间接合处的氨基酸残基、整体同源性等加以选择。选择的模板可以是一个以上序列的混合物，或者可以是共有模板。

[0086] 3. 通过在每个及每个可能的 CDR 位置产生随机氨基酸取代产生克隆文库。也可以

用所有可能的氨基酸随机取代人构架模板中的氨基酸,例如邻近 CDR 或者影响结合或者折叠的氨基酸,产生构架取代的文库。这些构架取代可以针对其对靶结合和抗体折叠的潜在作用进行评价。构架中氨基酸的取代可以与 CDR 中氨基酸取代同时或相继进行。一种产生变体文库的方法是通过寡核苷酸合成。

[0087] 4. 构建包含步骤 (3) 中产生的重链和 / 或轻链变体的表达载体,这些变体可包含如下化学式:

[0088] FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4(I) 和 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4(II), 其中 FRL1、FRL2、FRL3、FRL4、FRH1、FRH2、FRH3 和 FRH4 代表在步骤 3 中选择的构架模板轻链和重链序列的变体,CDR 代表亲代抗体 CDR 的变体 CDR。含有这些轻链和重链序列的载体的一个实例如图 1 所示。

[0089] 5. 筛选针对特异性靶的克隆文库,并筛选结合靶的那些克隆以改良结合亲和力。可以选择与亲代分子相比以更高的亲和力结合的那些克隆。最佳的高亲和力候选物与亲代抗体相比具有最大的结合亲和力,优选高出 20、100、1000 或者 5000 倍。如果选择的变体含有某些不希望的氨基酸,如已经导入的糖基化位点或者潜在的免疫原性位点,则那些氨基酸可以用更有利的氨基酸残基置换,并重新评价结合亲和力。

[0090] 技术人员也可以使用这个方法从完全的人亲代抗体中通过仅随机取代 CDR 区域而留下人构架整体来产生高亲和力抗体。

[0091] 由于改良的高产量筛选技术和例如图 1 所示的载体,技术人员可以迅速并有效地筛选在给定的 CDR 和 / 或构架区中所有位点的全面的取代文库。通过在所有位置同时随机取代所有氨基酸,技术人员能筛选显著增加亲和力的可能组合,这类组合由于例如协同作用而不能通过单个取代被预见或鉴别。

[0092] 亲代抗体制备

[0093] 靶制备

[0094] 可溶的靶或其片段可以用作产生抗体的免疫原。所述抗体是针对感兴趣的靶所产生的。优选地,所述靶是生物学重要的多肽,并且将所述抗体给予患有疾病或功能失调的哺乳动物可以在该哺乳动物中产生治疗益处。然而,可以针对非多肽靶产生抗体。在所述靶是多肽时,其可以是一种跨膜分子(例如受体)或者配体例如生长因子。本发明的一种靶是 IgE。完整细胞可用作产生抗体的免疫原。所述靶可以是重组产生的或者使用合成方法产生。所述靶也可以分离自天然来源。

[0095] 用于产生本发明抗体的抗原可包括本发明的多肽及其片段,包括表位 A 和 / 或 B。用于免疫动物的多肽可以通过标准重组方法、化学合成方法或者纯化方法获得。如本领域所熟知,为了增加免疫原性,抗原可以与一种载体蛋白缀合。通常使用的载体包括但非限于匙孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白(BSA)和破伤风类毒素。然后将偶联的肽用于免疫动物(例如小鼠、大鼠或者兔)。除了这些载体之外,熟知的佐剂可以与抗原一起给予以促进强免疫应答的诱导。

[0096] 多克隆抗体

[0097] 多克隆抗体通常是在非人哺乳动物中通过多次皮下(sc)或者腹膜内(ip)注射与佐剂组合的相关靶而产生的。本领域熟知多种能激发免疫学应答的药剂。

[0098] 通过将蛋白质或缀合物(分别对于兔或者小鼠)与弗氏完全佐剂组合,并皮内注

射该溶液,而对动物针对靶、免疫原性缀合物或者衍生物进行免疫。一个月后,将动物在多个部位皮下注射于弗氏不完全佐剂中的 1/5-1/10 原始量的肽或者缀合物而加强免疫。7-14 天后,从该动物引流血液,分析血清抗体效价。对动物持续加强免疫直至效价处于稳定状态。

[0099] 选择的哺乳动物抗体通常与靶具有足够强的结合亲和力。例如,所述抗体可以结合人抗 IgE 靶,结合亲和力 (Kd) 数值为大约 1×10^{-8} M。抗体亲和力可以通过饱和结合、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和竞争测定 (例如放射性免疫测定) 而确定。

[0100] 为了筛选与感兴趣的靶结合的抗体,可以进行常规的交联测定,如可以进行 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) 所述的测定。或者,可以进行表位定位确定结合,例如 Champe et al. *J. Biol. Chem.* 270 :1388-1394 (1995) 所述。

[0101] 单克隆抗体

[0102] 单克隆抗体是识别单一抗原性位点的抗体。其一致的特异性使得单克隆抗体比多克隆抗体更有用,多克隆抗体通常含有识别多种不同抗原性位点的抗体。单克隆抗体可以使用首先由 Kohler et al., *Nature*, 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法产生,或者可以通过重组 DNA 方法产生。

[0103] 在杂交瘤方法中,将小鼠或者其它合适的宿主动物如啮齿类动物 如上述进行免疫,以激发产生或者能产生特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可以在体外进行免疫。然后将淋巴细胞与骨髓瘤细胞使用合适的融合剂如聚乙二醇融合,形成杂交瘤细胞 (Goding, *Monoclonal Antibodies :Principals and Practice*, pp. 590-103 (Academic Press, 1986))。

[0104] 将由此制备的杂交瘤细胞接种在合适的培养基中并在其中生长,所述培养基中优选含有抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活的一或多种物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则杂交瘤的培养基典型包括阻止 HGPRT 缺陷的细胞生长的次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (HAT 培养基)。优选的骨髓瘤细胞是有效融合、支持选择的产生抗体的细胞稳定高水平地产生抗体、并且对培养基如 HAT 培养基敏感的那些骨髓瘤细胞。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系已经针对人单克隆抗体的产生而被描述 (Kozbar, *J. Immunol.* 133 :3001 (1984) ;Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0105] 在鉴别了产生希望的特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可以通过限制稀释程序将克隆进行亚克隆并通过标准方法生长 (Goding, *Monoclonal Antibodies :Principals and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1986))。对于此目的,合适的培养基包括。由亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化方法从培养基中适当分离,所述方法例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或者亲和层析。

[0106] 编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规方法分离和测序 (例如使用能特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。所述杂交瘤细胞作为这种 DNA 的来源。分离后,可以将 DNA 置于表达载体中,然后转移至宿主细胞例如大肠杆菌细胞、NS0

细胞、中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或者骨髓瘤细胞中,以在重组的宿主细胞中合成单克隆抗体。所述 DNA 也可以例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源鼠序列 (美国专利 No. 4, 816, 567; Morrison et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 81 :6851(1984)) 或者通过与免疫球蛋白多肽共价结合而被修饰。

[0107] 人源化抗体

[0108] 人源化是一种产生嵌合抗体的技术,其中充分小于完整的人可变区的部分被非人物种的相应序列取代。人源化抗体具有导入其中的来自非人物种的一或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称作“引入”残基,其典型取自“引入的”可变区。人源化基本上可以通过 Winter 及其同事 (Jones et al, Nature 321 :522-525(1986) ;Riechman et al., Nature332 :323-327(1988) ;Verhoeyens et al., Science 239 :1534-1536(1988)) 的方法,通过用非人 CDR 或者 CDR 序列取代人抗体中相应序列进行 (见例如美国专利 No. 4, 816, 567)。如本发明所实践,人源化抗体可以具有由鼠抗体中相似位点的残基取代的一些 CDR 残基和一些 FR 残基。

[0109] 用于产生人源化抗体的人可变区 (轻链和重链) 的选择对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最佳吻合”方法,将非人抗体的可变区序列与已知的人可变区序列的文库进行对比。然后最接近非人亲代抗体的人序列被公认为是人源化抗体的人构架 (Sims et al., J. Immunol. 151 :2296(1993) ;Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 :901(1987))。另一种方法使用衍生自一特殊亚组轻链或重链的所有人抗体的共有序列的特定构架。相同的构架可用于一些不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992) ;Presta et al., J. Immunol. 151 :2623(1993))。

[0110] 抗体片段

[0111] 已经开发了产生抗体片段的各种技术。传统上,这些片段是通过蛋白酶解完整的抗体产生的 (见例如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117(1992) 和 Brennan et al., Science 229 :81(1985))。然而,这些片段现在可以通过重组宿主细胞而直接产生。例如,抗体片段可以分离自抗体噬菌体文库。或者, F(ab')₂-SH 片段可以直接回收自大肠杆菌并被化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology 10 :163-167(1992))。根据另一种方法, F(ab')₂ 片段可以直接分离自重组宿主细胞培养物。本领域技术人员已知产生抗体片段的其它方法。在其它实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv) (PCT 专利申请 WO 93/16185)。

[0112] 高亲和力抗体的制备

[0113] 一旦已经鉴别并分离了亲代抗体,亲代抗体的一或多个可变区中的一或多个氨基酸残基可以被改变。或者另外,在亲代抗体中可以取代一或多个构架残基,这样该抗体例如对于人 IgE 的结合亲和力得以改良。待修饰的构架区残基例如包括与靶非共价直接结合的残基 (Amit et al. Science 233 :747-753(1986)) ;与 CDR 的构象相互作用 / 影响 CDR 的构象的那些 (Chothia et al. J. Mol. Biol. 196 :901-917(1987)) ;和 / 或参与 VL-VH 界面的残基 (EP 239400B1)。在某些实施方案中,一或多个这种构架区残基的修饰导致抗体与感兴趣的靶的结合亲和力增强。

[0114] 抗体的生物学性质的修饰可以通过选择其对维持如下方面的作用显著不同的取代而实现,例如维持 (a) 取代区域中多肽主链的结构,例如折叠或者螺旋构象 ;(b) 分子在

靶位点的电荷或疏水性,或者(c)侧链的体积。非保守取代需要将这些类别之一的一个成员用另一类别的成员置换。

[0115] 编码氨基酸序列变体的核酸分子是通过本领域已知的多种方法制备的。这些方法包括但非限于寡核苷酸介导的(或者定向)诱变、PCR诱变、及先前制备的变体或者非变体形式的物种依赖性抗体的盒式诱变。产生变体的优选方法是寡核苷酸介导的合成。在某些实施方案中,例如在大约2-15种高变区取代中,抗体变体仅具有一个单一的高变区残基被取代。

[0116] 产生变体文库的一种方法是寡核苷酸介导的合成方法,如图2所示。大约100个核苷酸的三种寡核苷酸的每一种均可以合成为跨越全部轻链或者重链可变区。每种寡核苷酸可包含:(1)由三联体 $(NNK)_{20}$ 产生的一段60个氨基酸的序列,其中N是任何核苷酸,K是G或者T;(2)在每个末端与接下来的寡核苷酸或者与载体序列重叠的大约15-30个核苷酸。基于PCR反应中这三种寡核苷酸的退火,聚合酶将充填相反的链,产生完整的双链重链或者轻链可变区序列。三联体的数目可以调节为任何长度的重复,并且可以选择其在寡核苷酸内的位置以便仅取代在给定的CDR或者构架区中的氨基酸。通过使用 (NNK) ,所有二十个氨基酸在编码的变体中的每个位置均是可能的。5-10个氨基酸(15-30个核苷酸)的重叠序列不被取代,但是这可以选择位于构架的堆积区内,或者可以通过分离的或随后的合成循环进行取代。合成寡核苷酸的方法为本领域所熟知,也可以商购。从这些寡核苷酸中产生抗体变体的方法也为本领域所熟知,例如PCR。

[0117] 在其序列中随机位置不同的重链和轻链变体的文库可以在任何表达载体中构建,所述载体如噬菌体,特别是图1所示的载体,其均含有编码特殊重链和轻链变体的DNA。

[0118] 在产生抗体变体之后,确定变体相对于亲代抗体的生物学活性。如上所述,这包括确定变体对于靶的结合亲和力。有许多高产量的方法以快速筛选抗体变体结合感兴趣的靶的能力。

[0119] 然后对选自这种初始筛选的一或多种抗体筛选其相对于亲代抗体增强的结合亲和力。一种常用的确定结合亲和力的方法是使用BIAcore™表面等离子共振系统(BIAcore, Inc.)评价结合和解离速度常数。根据厂商(BIAcore)指导,激活生物传感器芯片以与靶共价偶联。然后将靶稀释并注射到芯片上以获得一个信号,所述信号以固定物质的应答单位(RU)表示。由于RU中的信号与固定物质质量成比例,因此这代表了基质上固定的靶的密度范围。解离数据符合单一位点模型,获得 $k_{off} \pm s. d.$ (测定的标准偏差)。对于每个结合曲线计算假一级速度常数(k_s),并作为蛋白质浓度的函数绘图,获得 $k_{on} \pm s. e.$ (吻合的标准误差)。从SPR测定中计算结合的平衡解离常数 K_D ,表示为 k_{off}/k_{on} 。由于平衡解离常数 K_D 与 k_{off} 成反比,因此通过假定结合速率(k_{on})对于所有变体都是恒定的,可以估算亲和力的改善。

[0120] 所得具有高亲和力的候选物可任选进行一或多种进一步的生物学活性测定,以证实具有增强的结合活性的抗体变体仍保留希望的治疗性质。例如,在抗IgE抗体的情况中,可以筛选阻断IgE与其受体结合并且抑制组胺释放的那些抗体。最佳的抗体变体保留以显著高于亲代抗体的结合亲和力结合靶的能力。

[0121] 如此选择的抗体变体通常根据抗体的指定用途而可以进行进一步修饰。这些修饰可包括进一步改变氨基酸序列,与异源多肽融合和/或如下文描述的那些共价修饰。例

如,不参与维持抗体变体的适当构象的任何半胱氨酸残基均可以被取代(通常由丝氨酸取代),以改良分子的氧化稳定性并阻止异常的交联。相反,半胱氨酸键可以加入抗体中,以改良其稳定性(特别是在抗体是一种抗体片段如 Fv 片段的情况下)。

[0122] 载体

[0123] 本发明还提供了编码本发明揭示的抗体变体的分离的核酸,包含所述核酸的载体和宿主细胞,及产生所述抗体变体的重组技术。为了重组产生抗体变体,分离编码其的核酸并插入到可复制的载体中以进一步克隆(DNA的扩增)或表达。编码抗体变体的DNA易于使用常规方法分离及测序(例如通过使用能特异性结合编码抗体变体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0124] 许多载体是可获得的。载体成分通常包括但非限于如下一或多种成分:信号序列、复制起点、一或多个标记基因、增强子元件、启动子、及转录终止序列。

[0125] 图1所示噬菌体表达载体由常用的M13载体和M13的自身基因III病毒分泌信号组成,以快速分泌并筛选具有适当结合特异性和最小亲和力标准的变体Fab。这种载体不使用完整基因III序列,因此在细菌细胞表面上不展示,但Fab仍分泌进周质间隙中。或者,Fab可以在细胞质中表达并被分离。重链和轻链均具有其自己的病毒分泌信号,但是从一个单一的强的可诱导的启动子中依赖性表达。

[0126] 图1所示载体还提供了一个His标记和一个myc标记以易于纯化以及检测。本领域技术人员意识到Fab可以独立地从单独的启动子中表达或者分泌信号不需要是选择的病毒序列,而可以是适于抗体片段从选择的宿主细胞中分泌的原核或真核信号序列。也应意识到重链和轻链可以位于不同的载体。

[0127] A:信号序列成分

[0128] 本发明的抗体变体可以重组产生。所述变体还可以表达为与异源多肽融合的融合多肽,所述异源多肽优选是信号序列或者在成熟蛋白质或多肽的N末端具有特异性切割位点的其它多肽。优选所选择的异源信号序列是由宿主细胞识别并加工的(即由信号肽酶裂解)。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,信号序列可以由选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp或者热稳定的肠毒素II前导序列的原核信号序列取代。或者在图1的载体的情况中,选择的信号序列是来自基因III的病毒信号序列。对于酵母分泌,天然信号序列可以由例如酵母转化酶前导序列、 α -因子前导序列(包括酵母(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母(*Kluyveromyces*) α -因子前导序列)、或者酸性磷酸酶前导序列、白假丝酵母(*C. albicans*)葡糖淀粉酶前导序列,或者例如WO 90/13646所述信号取代。在哺乳动物细胞表达中,可利用可获得的哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列例如单纯疱疹gD信号。这种前体区域的DNA符合读框地与编码抗体变体的DNA连接。

[0129] B:复制起点的成分

[0130] 载体通常含有使得其在一或多种选择的宿主细胞中复制的核酸序列。通常地,这个序列是使得所述载体不依赖于宿主染色体DNA而复制的序列,并且包括复制起点或者自主复制序列。各种细菌、酵母和病毒的这些序列是熟知的。来自质粒pBR322的复制起点适于大多数革兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适于酵母,各种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)用于哺乳动物细胞中的载体。通常地,复制起点的成分对于哺乳动物表达载体无要求(可典型地使用SV40起点,只是因为其含有早期启动子)。

[0131] C:选择基因成分

[0132] 载体可含有一个选择基因,也称作选择标记。典型的选择基因编码这样的蛋白质,所述蛋白质(a)授予抗生素或其它毒素例如氨基青霉素、新霉素、氨基嘌呤或者四环素抗性,(b)互补营养缺陷,或者(c)提供从复合培养基中不可得到的关键营养素,例如编码芽孢杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0133] 一种选择方案的实例是利用药物阻滞宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生授予药物抗性的蛋白质,并因此在选择方案中存活。这种显性选择的实例是使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0134] 另一种适于哺乳动物细胞的选择标记的实例是使得可以鉴别细胞摄取抗体核酸的能力的那些标记,如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白I和II(优选灵长类动物金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等等。

[0135] 例如,用DHFR选择基因转化的细胞首先通过在含有氨基嘌呤(Mtx,DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体而鉴别。当应用野生型DHFR时,合适的宿主细胞是缺乏DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0136] 或者,用编码抗体、野生型DHFR蛋白及其它选择标记如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞(特别是含有内源DHFR的野生型宿主),可以通过在含有对于选择标记的选择剂如氨基糖苷类抗生素例如卡那霉素、新霉素或者G418的培养基中的细胞生长而选择(美国专利No. 4,965,199)。

[0137] 用于酵母中的合适选择基因是酵母质粒Yrp7上存在的trp1基因(Stinchcomb et al., Nature 282:39(1979))。trp1基因提供了用于缺乏在色氨酸中生长能力的酵母变体株的选择标记,这样的酵母变体株例如ATCC No. 44076或者PEP4-1. Jones, Genetics 85:12(1977)所述。酵母宿主细胞基因组中trp1损伤的存在提供了通过在没有色氨酸的情况下生长而检测转化的有效环境。相似地,Leu2-缺陷的酵母株(ATCC20,622或者38,626)是通过携带Leu2基因的已知质粒互补的。

[0138] D:启动子成分

[0139] 表达和克隆载体通常含有由宿主生物体识别的并且与抗体核酸可操纵地连接的启动子。适用于原核宿主的启动子包括phoA启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统、和杂交体启动子如tac启动子。然而,其它已知细菌启动子也是适合的。用于细菌系统的启动子也可以含有与编码抗体的DNA可操纵地连接的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0140] 已知真核细胞的启动子序列。事实上所有真核基因均具有一个富含AT的区域,位于转录起始位点上游大约25-30个碱基处。在许多基因的转录起始处上游70-80个碱基发现的另一个序列是CNCAAT区域,其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'末端是AATAAA序列,其可能是在编码序列的3'末端加上聚A尾部的信号。所有这些序列均适合插入真核表达载体中。

[0141] 与酵母宿主一起使用的合适启动子序列的实例包括如下酶的启动子:3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶,如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶和葡糖激酶。

[0142] 其它酵母启动子（具有通过生长条件控制转录的额外优势的可诱导启动子）是醇脱氢酶 2、细胞色素 C (isocytochrome C)、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶及用于麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区域。用于酵母表达中的合适载体和启动子在 EP 73, 657 中进一步描述。酵母增强子与酵母启动子一起使用也是有利的。

[0143] 在哺乳动物宿主细胞中从载体中的抗体转录由例如得自病毒的基因组的启动子控制（所述病毒例如是多瘤病毒、鸟痘病毒、腺病毒（如腺病毒 2）、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒、最优选猿猴病毒 40 (SV40)）、由得自异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子控制、由热休克启动子控制，提供的这些启动子与宿主细胞系统是相容的。

[0144] SV40 病毒的早期和晚期启动子便利地作为也含有 SV40 病毒复制起点的 SV40 限制片段而获得。人巨细胞病毒的立即早期启动子便利的作为 HindIII E 限制片段而获得。在哺乳动物宿主中使用牛乳头瘤病毒作为载体表达 DNA 的一个系统在美国专利 No. 4, 419, 446 中描述。对这个系统的修改在美国专利 No. 4, 601, 978 中描述。或者，人 β -干扰素 cDNA 已经在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下在小鼠细胞中表达。或者，劳斯肉瘤病毒长末端重复可以用作启动子。

[0145] E:增强子元件成分

[0146] 编码本发明的抗体的 DNA 由高等真核细胞的转录通常通过在载体中插入增强子序列而增加。目前从哺乳动物基因中已知许多增强子序列（球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素）。然而，典型地，可以使用来自真核细胞病毒的增强子。所述增强子例如包括在复制起点晚期侧 (bp 100-270) 的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点晚期侧的多瘤病毒增强子及腺病毒增强子。见 Yaniv, Nature 297:17-18(1982) 对于增强激活真核细胞启动子的元件的描述。所述增强子可以在载体 5' 或 3' 位置接合抗体编码序列，但优选位于启动子的 5' 位置。

[0147] F:转录终止成分

[0148] 用于真核宿主细胞（酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或者其它多核生物体的有核细胞）中的表达载体也可以含有转录终止必需的和稳定 mRNA 必需的序列。这些序列通常可以从真核细胞或病毒 DNA 或者 cDNA 的 5'（偶尔从 3'）未翻译区中获得。这些区域含有在编码所述抗体的 mRNA 的未翻译部分中作为聚腺苷酸化片段转录的核苷酸片段。一种有用的转录终止成分是牛生长激素聚腺苷酸化区域。见例如 W094/11026 所述。

[0149] 宿主细胞的选择和转化

[0150] 在本发明的载体中克隆或表达 DNA 的合适宿主细胞是原核细胞、酵母、或高等真核细胞。对于此目的，合适的原核细胞包括革兰氏阴性和革兰氏阳性生物，例如肠细菌科如大肠杆菌 (E. coli)、肠杆菌属 (Enterobacter)、欧文氏菌属 (Erwinia)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、变形菌属 (Proteus)、沙门氏菌 (Salmonella)、沙雷氏菌 (Serratia) 和志贺氏菌 (Shigella)，以及芽孢杆菌 (Bacilli)、假单胞菌 (Pseudomonas) 和链霉菌 (Streptomyces)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC 31, 446)，其它菌株如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31, 537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC 27, 325) 也是合适的。这些只是举例说明而无限制之意。

[0151] 除了原核细胞之外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是抗体编码载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是最常用的低等真核宿主微生物。然而,许多其它菌属、菌种和菌株也是可以获得并在本文中利用的,如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*); 假丝酵母 (*Candida*); 木霉 (*Trichoderma*); 粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*); 和丝状真菌例如链孢霉 (*Neurospora*), 青霉 (*Penicillium*), 弯颈霉 (*Tolyocladium*), 及曲霉 (*Aspergillus*) 宿主, 如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

[0152] 表达糖基化的抗体的合适宿主细胞衍生自多细胞生物体。原则上,任何高等真核细胞培养物均可以使用,无论其得自脊椎动物还是无脊椎动物培养物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞, Luckow et al., *Bio/Technology* 6, 47-55 (1988); Miller et al., *Genetic Engineering*, Setlow et al. eds. Vol. 8, pp. 277-279 (Plenum publishing 1986); Mseda et al., *Nature* 315, 592-594 (1985)。从宿主如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、伊蚊 *Aedes* (蚊)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 中已经鉴别了许多杆状病毒毒株及变体和相应的认可的昆虫宿主细胞。可以公开获得用于转染的许多病毒株,例如苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* NPV) 的 L-1 变体和家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* NPV) 的 Bm-5 毒株,这些病毒在此可用作本发明的病毒,特别用于草地贪夜蛾细胞的转染。另外,棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草等植物细胞培养物也用作宿主。

[0153] 本领域已知脊椎动物细胞和脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的增殖。见 *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse and Patterson, eds. (1973) 所述。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是猴肾细胞系、人胚胎肾细胞系、幼仓鼠肾细胞、中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))、小鼠支持 (sertoli) 细胞、人宫颈癌细胞 (HELA)、犬肾细胞、人肺细胞、人肝细胞、小鼠乳腺肿瘤细胞及 NS0 细胞。

[0154] 将宿主细胞用上述载体转化以产生抗体,并在为了适于诱导启动子、选择转化体或者扩增编码所希望的序列的基因而修改的常规营养培养基中培养。

[0155] 用于产生本发明的抗体变体的宿主细胞可以在各种培养基中培养。可商购的培养基如 Ham' s F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和 Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外, Ham et al., *Meth. Enzymol.* 58:44 (1979)、Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)、美国专利 Nos. 4, 767, 704, 4, 657, 866, 4, 560, 655, 5, 122, 469, 5, 712, 163、或者 6, 048, 728 所描述的任何培养基均可以用作宿主细胞的培养基。任何这些培养基均可以根据需要补加激素和/或其他生长因子(如胰岛素、运铁蛋白或者表皮生长因子)、盐(如 X-氯化物,其中 X 是钠、钙、镁;及磷酸盐)、缓冲液(如 HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如 GENTAMYCIN. TM. 药物)、微量元素(通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、及葡萄糖或者等同的能量源。也可以包括本领域技术人员已知适当浓度的任何其它必需的补充物。培养条件如温度、pH 等是先前所用的为了对表达选择宿主细胞的那些条件,这些为本领域技术人员所熟知。

[0156] 抗体纯化

[0157] 当使用重组技术时,抗体变体可以在细胞内、在周质间隙产生,或者直接分泌进培养基中。如果抗体变体是在细胞内产生,作为第一步,可以例如通过离心或超滤除去宿主细胞或者裂解片段的微粒碎片。Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167(1992) 描述了一种分离分泌进大肠杆菌周质间隙中的抗体的方法。简而言之,将细胞糊浆在存在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟(PMSF) 的情况下解冻大约 30 分钟。细胞碎片可以通过离心除去。在抗体变体分泌进培养基的情况下,通常首先使用可商购的蛋白质浓缩过滤器浓缩这种表达系统的上清,例如使用 Amicon 或者 Millipore Pellicon 超滤装置过滤。在前述任何步骤中均可包括蛋白酶抑制剂如 PMSF,以抑制蛋白水解,并且可以包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0158] 从细胞中制备的抗体组合物可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析进行纯化,其中亲和层析作为优选的纯化技术。蛋白 A 作为亲和配体的适宜性依赖于抗体变体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 IgG1、IgG2 或者 IgG4 重链的抗体(Lindmark et al., *J. Immunol Meth.* 62:1-13(1983))。蛋白 G 被推荐用于所有小鼠同种型和人 IgG3(Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575(1986))。亲和配体所附着的基质通常是琼脂糖,但是也可以利用其它基质。机械稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯可以达到比琼脂糖所可以达到的更快的流速和更短的加工时间。当抗体变体包含 CH3 结构域时,Bakerbond ABXTM 树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) 可用于纯化。基于要回收的抗体变体,也可以使用其它蛋白质纯化技术,如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、二氧化硅上的层析、肝素上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的 SEPHAROSE™ 层析、色谱聚焦、SDS-PAGE 以及硫酸铵沉淀。

[0159] 任何初步纯化步骤之后,可使用 pH 在约 2.5-4.5 之间的洗脱缓冲液对包含感兴趣的抗体变体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析,优选在低盐浓度(例如约 0-0.25M 盐)下进行。

[0160] 药物配制品

[0161] 可以制备所述多肽或抗体的治疗性配制品,以作为冻干的配制品或者水溶液形式贮存,所述制备通过将具有希望纯度的多肽任选地与本领域典型应用的“药理学可接受的”载体、赋形剂或者稳定剂(所有这些均称为赋形剂)混合而进行。例如,缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子去污剂、抗氧化剂及其它各种各样的添加剂(见 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, A. Osol, Ed. (1980) 所述)。这些添加剂在应用的剂量和浓度范围对受体必须是无毒性的。

[0162] 缓冲剂帮助维持 pH 在接近生理学条件的范围内。它们优选以大约 2mM-50mM 的浓度范围存在。对于本发明的应用合适的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐,如柠檬酸盐缓冲液(例如柠檬酸一钠和柠檬酸二钠的混合物、柠檬酸和柠檬酸三钠的混合物、柠檬酸和柠檬酸一钠的混合物等等)、琥珀酸盐缓冲液(例如琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等等)、酒石酸盐缓冲液(例如酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等等)、延胡索酸盐缓冲液(例如延胡索酸-延胡索酸一钠混合物等等)、延胡索酸盐缓冲液(例如延胡索酸-延胡索酸一钠混合物、延胡索酸-延胡索酸二钠混合物、延胡索酸一钠-延胡索酸二钠混合物

等等)、葡糖酸盐缓冲液(例如葡糖酸-葡糖酸钠混合物、葡糖酸-氢氧化钠混合物、葡糖酸-葡糖酸钾混合物等等)、草酸盐缓冲液(例如草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等等)、乳酸盐缓冲液(例如乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等等)和乙酸盐缓冲液(例如、乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等等)。另外,还可以提到的有磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐如 Tris。可以加入防腐剂以阻止微生物生长,防腐剂可以以 0.2% -1% (w/v) 范围的量加入。用于本发明的合适的防腐剂包括苯酚、苯甲醇、间甲苯酚、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苄基氯化铵、苯二甲烷铵 (benzalconium) 卤化物(例如,氯化物、溴化物、碘化物)、氯化己烷双胺、羟苯甲酸烷基酯如羟苯甲酸甲酯或羟苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和 3-戊醇。

[0163] 可以加入有时也称作“稳定剂”的等渗剂 (isotonicifier) 以保证本发明的液体组合物的等渗性,等渗剂包括多羟基糖醇,优选三羟基或更多羟基糖醇,如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0164] 稳定剂是指一类赋形剂,在功能上它们的范围从填充剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附于容器壁的添加剂,典型的稳定剂可以是多羟基糖醇(如上所述);氨基酸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、鸟氨酸、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等,有机糖或糖醇,如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、myoinisitol、半乳糖醇、甘油等,包括环醇如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂,如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、巯基甘油、 α -单巯基甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(即 < 10 个残基);蛋白质如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;单糖,如木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖;二糖如乳糖、麦芽糖、蔗糖以及三糖如棉子糖;多糖如葡聚糖。稳定剂可以以每重量份活性蛋白质 0.1-10000 重量份的量存在。

[0165] 可以加入非离子表面活性剂或去污剂(也称为“湿润剂”)以助于溶解治疗剂和保护治疗蛋白质抗搅拌引起的聚集,其也使得配制品能暴露于加压的剪切面而不引起蛋白质变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等)、polyoxamer(184、188等)、Pluronic®多元醇、聚氧乙烯山梨糖醇酐单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)。非离子表面活性剂可以以约 0.05mg/ml 至约 1.0mg/ml、优选地约 0.07mg/ml 至约 0.2mg/ml 的范围存在。

[0166] 另外的辅助性赋形剂包括填充剂(例如淀粉)、螯合剂(例如EDTA)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E)和共溶剂。如果被治疗的特定适应症需要,本发明的配制品还可以含有一种以上的活性化合物,优选地是具有互补活性的彼此不负面影响的活性化合物。例如,进一步提供一种免疫抑制剂可能是所希望的。这些分子合适地以有效用于所计划目的的量组合存在。活性成分也可以被捕获在微囊中,所述微囊通过在胶态药物输送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米包囊)或粗乳状液(macroemulsion)中例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备,例如分别为羟甲基纤维素或明胶微囊以及聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊()。这些技术在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osal, Ed. (1980) 中公开。要用于体内给药的配制品必须是无菌的。这可以容易地例如通过无菌滤膜过滤而实现。可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包

括含有抗体变体的固体疏水聚合物的半通透基质,所述基质呈成型物体形式,例如膜或微囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利 3,773,919)、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、非降解性乙烯-乙酸乙烯酯、降解性乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)、以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的聚合物能释放分子超过 100 天,但是某些水凝胶释放蛋白质时间较短。当包裹化抗体在体内保留长时间时,它们可能会由于在 37°C 暴露于湿环境而变性或聚集,从而导致生物学活性丧失和免疫原性可能发生变化。根据所涉及的机制可以设计合理的策略以进行稳定化。例如,如果发现聚集机制通过硫代-二硫化物交换形成分子间 S-S 键,则可以通过修饰巯基、从酸性溶液中冻干、控制水分含量、使用合适的添加剂及开发特异性聚合物基质组合物而实现稳定。

[0167] 在治疗特定病症或病变中有效的治疗性多肽、抗体或其片段的量根据所述病症或病变的性质而决定,并且可以通过标准临床技术确定。如果可能,希望首先在体外确定本发明的药物组合物剂量应答曲线,然后在人体实验之前用于有用的动物模型系统。

[0168] 在一个优选的实施方案中,治疗性多肽、抗体或其片段的水溶液通过皮下注射给予。剂量均为大约 0.5 μg-50 μg/kg 体重,更优选大约 3 μg-30 μg/kg 体重。

[0169] 皮下注射给药的时间表根据许多临床因素而可以是一个月一次至一天一次,所述临床因素包括疾病类型,疾病的严重程度,以及对象对于治疗剂的敏感性。

[0170] 抗体变体的应用

[0171] 本发明的抗体变体可以用作亲和纯化剂。在这个过程中,使用本领域熟知的方法将抗体固定在固相如 SEPHADEX™ 树脂或者滤纸上。将固定的抗体变体与含有要纯化的靶的样品接触,之后用合适的溶剂洗涤该支持物,这样基本上除去了样品中除了要纯化的靶之外所有材料,所述靶结合在固定的抗体变体上。最后,将支持物用另外的合适溶剂如甘氨酸缓冲液洗涤,这将从抗体变体中释出所述靶。

[0172] 所述变体抗体也可以用于透析测定,例如检测感兴趣的靶在特定细胞、组织或血清中的表达。对于诊断性应用,所述抗体变体典型地用可检测的组分标记。许多标记可以利用。量化荧光变化的技术如上所述。化学发光底物通过化学反应而变为电激发态,然后可以发射可测定的光线(例如使用化学发光计测定)或者为荧光受体提供能量。酶标记的实例包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利 No. 4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮(dihydrophthalazinediones)、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等等。将酶与抗体缀合的技术在 O' Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (Ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166(1981) 中描述。

[0173] 有时,所述标记与抗体变体间接缀合。技术人员明白有各种技术可以达到这个目的。例如,抗体变体可以与生物素缀合,并且上述三种标记的广泛的种类均可以与抗生物素蛋白缀合,反之亦然。生物素选择性结合抗生物素蛋白,由此标记以这种间接方式与抗体变

体缀合。或者,为了达到标记与抗体变体的间接缀合,将所述抗体变体与小的半抗原(例如地高辛)缀合,及将上述一种不同类型标记与抗半抗原抗体变体(例如抗地高辛抗体)缀合。因此可以达到标记与抗体变体的间接缀合。

[0174] 在本发明的另一个实施方案中,抗体变体不需要标记,其存在可以使用结合抗体变体的被标记的抗体检测。

[0175] 本发明的抗体可以在任何已知测定方法中应用,如竞争性结合测定,直接和间接夹心测定,和免疫沉淀测定。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0176] 竞争性结合测定依赖于标记的标准物与测试样品竞争结合有限量的抗体变体。测试样品中靶的量与结合抗体的标准物的量成反比。为了便于确定与抗体结合的标准物的量,所述抗体在竞争之前或之后通常是不溶解的。结果,结合该抗体的标准物和测试样品可以方便地从未结合的标准物和测试样品中分离。

[0177] 夹心测定包括使用两种抗体,每种抗体均能结合不同的免疫原性部分或者表位或者待检测的蛋白质。在夹心测定中,待分析的测试样品由固定在固体支持物上的第一种抗体结合,之后第二种抗体与测试样品结合,由此形成不可溶的三部分复合物。见例如美国专利 No. 4, 376, 110 所述。第二种抗体本身可用一种可检测的组分标记(直接夹心测定),或者可以使用经可检测的组分标记的抗免疫球蛋白抗体测定(间接夹心分析)。例如,一种类型的夹心测定是 ELISA 测定,其中可检测的组分是一种酶。

[0178] 对于免疫组织化学方法,肿瘤样品可以是新鲜的或者是冷冻的或者可以包埋在石蜡中并且用防腐剂例如福尔马林固定。

[0179] 所述抗体也可以用于体内诊断测定。通常地,将所述抗体变体用一种放射性核素(如 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P 或者 ^{35}S) 标记,以便可以使用免疫成像法(immunoscintigraphy) 定位肿瘤。例如,本发明的高亲和力抗 IgE 抗体可以用于检测例如哮喘患者肺中存在的 IgE 的量。

[0180] 本发明的抗体可以在试剂盒中提供,所述试剂盒即附有进行诊断测定的说明书的包装好的预定量的试剂组合。在抗体变体用酶标记的情况中,所述试剂盒可包括所述酶所需要的底物和辅因子(例如提供可检测生色团或荧光团的底物前体)。另外,可以包括其它的添加剂如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以广泛变化以使试剂在溶液中的浓度能充分优化检测的灵敏度。

[0181] 特别地,试剂可以以包括赋形剂的干粉形式提供,通常是冻干的,其在溶解后将提供具有合适浓度的试剂溶液。

[0182] 抗体的体内应用

[0183] 应理解的是本发明的抗体可用于治疗哺乳动物。在一个实施方案中,抗体被给予非人哺乳动物以用于例如获得临床前数据。被治疗的举例性非人哺乳动物包括非人灵长类、狗、猫、啮齿类和其它进行临床前研究的哺乳动物。这些哺乳动物可以是要用抗体治疗的疾病的已建立的动物模型,或者可以被用于研究感兴趣抗体的毒性。在这些实施方案的每一种中,可以在哺乳动物上进行剂量逐步增加研究。抗体或多肽通过任何合适方式被给药,包括胃肠外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内,并且如果需要用于局部免疫抑制治疗,可以损害内给药。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。另外,抗体变体合

适地以脉冲输注方式给药,特别是其中抗体变体剂量逐渐下降。优选地,通过注射给药,最优选通过静脉内或皮下注射给药,这一点部分取决于给药是短期还是长期。

[0184] 为了预防或治疗疾病,抗体或多肽的合适剂量取决于要治疗的疾病的类型、疾病的严重性和病程、抗体变体的给予是用于预防目的还是治疗目的、先前的治疗、患者的临床历史以及对抗体变体的应答、以及主治医生的判断。本发明的非常高亲和力的抗人 IgE 抗体可以被适当地一次给予患者或者在一系列治疗中给予患者。

[0185] 根据疾病的类型和严重性,约 0.1mg/kg 至 150mg/kg (例如 0.1-20mg/kg) 抗体是给予患者的最初候选剂量,例如可以一或多次分别给药或者通过连续输注给药。典型的日剂量可以从约 1mg/kg 至 100mg/kg 或更高,这取决于上述因素。对于在几天或更长时间内的重复给药,根据症状,可以持续治疗直至产生所希望的对疾病症状的抑制。但是,其它剂量方案也是可用的。这一治疗的进程可以容易地通过常规技术和检测进行监控。抗 LFA-1 或抗 ICAM-1 抗体的一种举例性剂量方案在 WO 94/04188 中公开。

[0186] 抗体变体组合物可以以与良好医学实践相一致的方式配制、确定剂量和给药。在此需要考虑的因素包括被治疗的特定病症、被治疗的特定哺乳动物、各个患者的临床情况、导致病症的因素、给予药剂的部位、给药方法、给药时间表、及医疗从业人员已知的其它因素。给予的抗体变体的“治疗有效量”通过这些考虑的事项而决定,并且是预防、减轻或者治疗疾病或病症所需的最小量。所述抗体变体不需要是,但任选地与目前用于防止或者治疗所考虑的病症的一或多种药剂一起配制。这些其它药剂的有效量依赖于配制品中存在的抗体量、治疗的病症的类型、及其它前面所讨论的因素。这些药剂通常以同样剂量应用,并且与所用给予途径一致,或使用之前应用剂量的 1-99%。

[0187] 识别 IgE 作为其靶的本发明的抗体可用于治疗“IgE 介导的病症”。这些病症包括如哮喘、变应性鼻炎及结膜炎(枯草热)、湿疹、风疹、特应性皮炎和食物过敏。由例如蜜蜂叮咬、蛇咬伤、食物或药物所致的过敏性休克这些严重生理病变也涵盖在本发明的范围内。

[0188] 抗体表位定位(MAPPING)

[0189] 术语“表位”是指抗原上 B 和 / 或 T 细胞应答的位点。B 细胞表位可以从连续的氨基酸中形成,或者从由于蛋白质三级折叠导致邻近的不连续氨基酸中形成。从连续氨基酸中形成的表位在暴露于变性溶剂时仍典型地保留,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理后典型地不再存在。一个表位在一个独特空间构象中典型包括至少 3 个、更常见地包括至少 5 个或者 8-10 个氨基酸。识别相同表位的抗体可以在简便的免疫测定中鉴别,所述免疫测定示出一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力。

[0190] 本发明的高亲和力抗体 IgE 的结合位点的表位定位包括对于结合的 Western 印迹分析、IgE 的 CH3 结构域的肽扫描、示出结合的区域丙氨酸扫描、IgG1 的相应区域的氨基酸置换及定向诱变。

[0191] IgE 的完整 CH3 结构域的肽扫描需要 73 个重叠肽。每个肽均进行本发明的标记的抗 IgE 抗体的结合,以确定阻断 IgE 与其高亲和力受体结合的 IgE 的特异表位。所述肽扫描在 IgE 上鉴别了是潜在的抗 IgE MAb 接触位点的两个肽,称作表位 A 和表位 B (见图 11 所示)。尽管表位 A 和表位 B 序列在线性序列中间隔大约 80 个氨基酸,但是它们在 IgE 的三维结构中的位置彼此紧密相邻。这两个表位均是表面暴露的,它们与 IgE 的 Fc ϵ RI 结合位点重叠,并且在这两个肽中,均有带正电荷的 Arg 残基和疏水性残基 Pro。图 12 例证了使

用肽扫描通过 ELISA 确定的表位 B 的结合区域。

[0192] 通过丙氨酸扫描诱变确定这些表位中对于结合高亲和力抗体关键的氨基酸残基 (Cunningham et al., " High-Resolution Epitope Mapping of hGH-Receptor Interactions by Alanine-Scanning Mutagenesis" Science244 :1081-1085)。用丙氨酸取代表位 A 和表位 B 的每个残基,并确定高亲和力单克隆抗体的结合 (见下文实施例 12 和图 13 和 14)。

[0193] 主动和被动免疫

[0194] 本发明还涉及药物组合物,例如疫苗,其包含本发明的肽免疫原分子 (包括 SEQ ID NO :72 和 / 或 SEQ ID NO :74) 和稀释剂、赋形剂、佐剂或者载体。本发明进一步涉及本发明的免疫原的制备方法,包括将本发明的至少一种肽与能激发对抗所述肽的免疫应答的一种成分共价偶联。

[0195] 本发明还涉及上述免疫原性肽用作药物在例如治疗 IgE 介导的疾病或病变如变态反应和特应性皮炎中的应用。

[0196] 本发明还涉及一种针对 IgE 介导的疾病或病变如变态反应和特应性皮炎对哺乳动物进行免疫的方法,包括给予需要这种治疗的患者治疗有效量的上述免疫原性肽。

[0197] 虽然本发明的免疫原性肽基本上不能介导非细胞溶解性组胺释放,但其能激发与表位 A 和 / 或表位 B 的靶氨基酸序列具有强血清学交叉反应性的抗体。

[0198] 肽的初期剂量 (例如大约 0.2mg-5mg) 可以例如通过肌肉注射给予,随后在 14-28 天后重复给予同样剂量 (加强)。给予的剂量当然要根据患者的年龄、体重和一般状况而定。免疫可以是主动免疫或者被动免疫。在主动免疫中,对象接受本发明的免疫原性肽,抗 IgE 应答由对象的免疫系统主动诱导。

[0199] 主动免疫优选用于人体,但也可以相似处理其它哺乳动物物种,例如狗。本文中术语“免疫原性载体”包括具有在宿主动物中独立激发免疫应答性质的那些材料,其可以与多肽通过在多肽中的游离羧基、氨基或羟基与免疫原性载体材料上相应基团之间形成肽或酯键而直接共价偶联,或者由通过常规的双功能连接基团的键合而共价偶联,或者与多肽形成融合蛋白。

[0200] 这些免疫原性载体的实例包括:白蛋白,如 BSA;球蛋白;甲状腺球蛋白;血红蛋白;血蓝蛋白 (特别是匙孔瓣血蓝蛋白 [KLH]);从蛔虫中提取的蛋白质,例如 J. Immunol. 111[1973]260-268、J. Immunol. 122[1979]302-308、J. Immun. 98[1967]893-900、Am. J. Physio. 199[1960]575-578 所描述的那些蛔虫提取物或其纯化产物;聚赖氨酸;聚谷氨酸;赖氨酸-谷氨酸共聚物;含有赖氨酸或鸟氨酸的共聚物;等等。疫苗已经使用白喉类毒素或者破伤风类毒素作为免疫原性载体材料而产生 (Lepow M. L. et al., J. of Infectious Diseases150[1984]402-406;Coen Beuvery, E. et al., Infection and Immunity 40 [1983]39-45),这些毒素材料也可以用于本发明中。结核菌素的纯化的蛋白质衍生物 (PPD) 特别优选用于主动免疫方案中,因为:(1) 其自身不诱导 T 细胞应答 (即其是有效的 T 细胞半抗原),但作为完整加工的抗原起作用并因此由 T 细胞识别;(2) 已知其在连锁识别模式中是最强力的半抗原载体之一;(3) 其可用于人体而不用进一步测试。

[0201] 本发明还涉及编码本发明的肽的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体、及携带所

述载体的细胞。另外,主动免疫可以通过给予编码本发明的肽的多核苷酸而实现。本领域已知适于这种治疗的载体,包括例如腺病毒载体。

[0202] 被动免疫是通过给予患有 IgE 介导的疾病或病变的患者本发明的抗 IgE 抗体而实现。

[0203] 这些抗体可以通过给予非人哺乳动物本发明的免疫原性肽并收集所得抗血清而制备。通过重复注射一段时间可以获得改良的效价。对于可用于激发抗体的哺乳动物物种无特殊限制;通常优选使用兔或豚鼠,但是也可以使用马、猫、狗、山羊、猪、大鼠、牛、绵羊等等。在最后一次给予之后经过 1-2 周后收集被免疫的动物的血液,离心该血液并从血液分离血清,由此获得抗体。单克隆抗体可例如是人或鼠抗体。

[0204] 当对对象进行免疫时,本发明的抗体可以通过例如肌肉注射导入哺乳动物中。然而,可以使用任何形式的抗体给予方式。可以使用可为对象接受的并且不具有不利副作用的任何常规液体或固体运载体。处于生理 pH 值(例如大约 pH 6.8-7.2,优选大约 pH 7.0)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)可以单独或者与合适的佐剂一起用作运载体,所述佐剂如基于氢氧化铝的佐剂。

[0205] 提供如下实施例说明本发明而无限制之意。

实施例

[0206] 实施例 1:抗 IgE 鼠 MAbs TES-C21 的人源化

[0207] 将鼠 mAb TES-C21 的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的序列与得自公开数据库的人抗体生殖系序列相对比。当决定如上述步骤 1 所述的模板时,采用一些标准,包括全长、构架内相似 CDR 位置、整体同源性、CDR 的大小等等。整体考虑所有这些标准可以选择最佳的人模板,如 TES-C21MAb 重链和轻链序列与代表性人模板序列之间的序列排列对比所示,如图 3A 和 3B 所示。

[0208] 在这种情况下,使用一种以上的人构架模板设计这种抗体。对于 V_H 链选择的人模板是 DP88(1-95 位氨基酸残基)与 JH4b(103-113 位氨基酸残基)的组合(见图 3B)。对于 V_L 链选择的人模板是 L16(VK 亚组 III, 1-87 位氨基酸残基)与 JK4(98-107 位氨基酸残基)的组合(见图 3A)。鼠序列与人模板之间的构架同源性对于 V_H 为大约 70%,对于 V_L 为大约 74%。

[0209] 一旦选择了模板,则通过如上所述和图 2 所示的 DNA 合成和重叠 PCR 方法构建 Fab 文库。所述文库由用分别选择的人模板 DP88/JH4b 和 L16/JK4 合成的 TES-C21CDR 组成。文库的复杂性为 4096($= 2^{12}$)。编码部分 V_H 和 V_L 序列的重叠核苷酸是在大约 63-76 个核苷酸范围合成的,具有 18-21 个核苷酸重叠。

[0210] 对 V_L 和 V_H 基因进行 PCR 扩增,使用含有特异于构架区 FR1 的序列和退火结合到前导序列(Gene III)末端的突出序列的生物素酰化的正向引物和来自保守的恒定区(C_K 或者 $CH1$)的反向引物在标准 PCR 条件下进行。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳纯化,或者通过商购的 PCR 纯化试剂盒纯化,以除去未掺入的生物素酰化的引物和非特异性 PCR。

[0211] 在用 ddH₂O 调节为 20 μ L 的总体积中使用 2 μ g PCR 产物、1 μ L T4 多核苷酸激酶(10 单位/ μ L)、2 μ L 10 \times PNK 缓冲液、1 μ L 10mM ATP 对 PCR 产物进行 5'磷酸化。在 37 $^{\circ}$ C 温育 45 分钟及在 65 $^{\circ}$ C 热变性 10 分钟后,加入 ddH₂O 将反应体积调节为 200 μ L 以进行下一

步骤。

[0212] 将 100 μ L 链霉抗生物素包被的磁珠用 200 μ L 2x B&W 缓冲液洗涤两次,重悬于 200 μ L 2x B&W 缓冲液中。将磷酸化的 PCR 产物与珠混合,在室温 (RT) 轻轻摇动温育 16 分钟。

[0213] 将珠沉积并用 200 μ L 2x B&W 缓冲液洗涤两次。未生物素酰化的 ssDNA (负链) 用 300 μ L 新鲜制备的 0.15M NaOH 在室温轻轻摇动洗脱 10 分钟。再一次 NaOH 洗脱可略增加产量 (任选)。将洗脱物离心以除去任何微量的珠。

[0214] 通过加入 1 μ L 糖原 (10mg/mL)、1/10 体积的 3M NaOAc (pH 5.2) 和 2.5 体积的 EtOH 从上清中沉淀 ssDNA。然后将沉淀的 ssDNA 用 70% EtOH 洗涤,随后冻干 3 分钟并溶解于 20 μ L ddH₂O 中。通过在具有 DNA 标准物的溴化乙啶 (EtBr) 琼脂糖平板上点样 (spotting) 或者通过测定 OD₂₆₀ 对 ssDNA 进行量化。

[0215] 实施例 2 :V_H 和 V_L 克隆进噬菌体表达载体

[0216] 通过杂交诱变将 V_H 和 V_L 克隆进噬菌体表达载体中。尿苷酸化的模板通过用基于 M13 的噬菌体 (噬菌体表达载体 TN003) 感染 CJ236 大肠杆菌菌株 (dut⁻ung⁻) 而制备。

[0217] 将如下成分 [200ng 尿苷酸化的噬菌体载体 (8.49kb);92ng 磷酸化单链 H 链 (489 个碱基);100ng 磷酸化单链 L 链 (525 个碱基);1 μ L 10x 退火缓冲液,用 ddH₂O 将体积调节为 10 μ L] 通过将温度维持在 85°C 5 分钟 (变性)、然后在 1 小时之中梯度降至 55°C 的 PCR 进行退火 (插入体与载体为大约 8 倍摩尔比率)。将样品在冰上冷激。

[0218] 向退火产物中加入如下成分:1.4 μ L 10x 合成缓冲液、0.5 μ L T4DNA 连接酶 (1 单位/ μ L)、1 μ L T4 DNA 聚合酶 (1 单位/ μ L),随后在冰上温育 5 分钟,在 37°C 温育 1.5 小时。然后将产物经乙醇沉淀,溶解于 10 μ L ddH₂O 或 TE 中。

[0219] 将 DNA 用 1 μ L XbaI (10 单位/ μ L) 消化 2 小时,在 65°C 加热失活 20 分钟。将消化的 DNA 通过电穿孔转染进 50 μ L 电感受态 DH10B 细胞中。所得噬菌体通过在 37°C 在 XL-1Blue 细菌菌苔上生长过夜而确定效价。对克隆进行测序以确定其组成。

[0220] 实施例 3 :深孔培养以进行文库筛选

[0221] A :铺板噬菌体文库

[0222] 将噬菌体文库在 LB 培养基中稀释以达到每个平板希望的噬菌体数目。将高效价的噬菌体与 200 μ L XL-1B 细胞培养物混合。混合 3mLLB 上层琼脂,倒入 LB 平板上,在室温静置 10 分钟。将该平板在 37°C 温育过夜。

[0223] B :噬菌体洗脱

[0224] 将 100 μ L 噬菌体洗脱缓冲液 (10mM Tris-Cl, pH7.5, 10mM EDTA, 100mM NaCl) 加入无菌 U 形底 96 孔平板的每个孔中。将来自过夜文库平板的单一噬菌体噬斑用过滤移液管尖移至孔中。将该噬菌体洗脱平板在 37°C 温育 1 小时。温育后将平板在 4°C 贮存。

[0225] C :深孔平板培养

[0226] 将来自 50mL 培养物的 XL1B 细胞以 1 : 100 稀释度加入 2xYT 培养基中。将细胞在 37°C 在摇床中生长直至 A₆₀₀ 达到 0.9-1.2。

[0227] C :在深孔平板中用噬菌体感染

[0228] 当细胞达到合适 OD 时,向 XL1B 培养物中加入 1M IPTG (1 : 2000)。IPTG 的终浓度为 0.5mM。将 750 μ L 细胞培养物移至 96 孔深孔平板 (Fisher Scientific) 的每个孔中。

每个孔接种 25 μ L 洗脱的噬菌体。将该深孔平板置于摇床中 (250rpm), 在 37°C 温育过夜。

[0229] D: 制备上清以进行 ELISA 筛选

[0230] 在温育后, 将深孔平板使用 Beckman JA-5.3 平板转子在 3, 250rpm 离心 20 分钟。从每个孔中提取 50 μ L 上清进行 ELISA。

[0231] E: 15mL XL-1 细胞液态培养物的接种

[0232] 将 XL-1 在 37°C 在摇床 (250rpm) 中于含有 10 μ g/mL 四环素的 2 \times YT 中生长直至 $A_{600} = 0.9$ 至 1.2。加入终浓度为 0.5mM 的 IPTG, 将 15mL 培养物移至 50mL 锥形管中以鉴定每个克隆。对细胞接种 10 μ L 来自高效价 (效价 = 约 10^{11} pfu/mL) 原种的噬菌体并在 37°C 温育 1 小时。将细胞在室温摇动生长过夜。

[0233] F: 可溶的 Fab 从周质中的分离

[0234] 将细胞在 IEC 离心机中以 4, 500rpm 离心 20 分钟而沉淀。除去培养基并将沉淀重悬于 650 μ L 重悬缓冲液 (50mM Tris, pH 8.0, 含有 1mM EDTA 和 500mM 蔗糖) 中, 进行涡旋 (vortex), 置于冰上轻轻摇动 1 小时。细胞碎片通过在 4°C 以 9, 000rpm 离心 10 分钟而除去。收集含有可溶的 Fab 的上清并在 4°C 贮存。

[0235] 实施例 4: 构架修饰

[0236] 在构架中上述潜在的关键位置有 12 个鼠/人变偶残基 (wobble residue)。V_H 中第 73 位在人源化文库中保持是鼠苏氨酸残基, 因为确定这个位置影响结合。然而, 注意在 VH73 的苏氨酸是生殖系 VH 亚组 1 和 2 中共有的人残基。

[0237] 在 TES-C21 序列和人模板之间不同的构架残基被如上述进行随机取代, 然后评价其对靶结合及抗体折叠的潜在影响。鉴别可以影响结合的潜在构架残基。在这种情况下, 所述残基是 V_H 中的第 12、27、43、48、67、69 位残基, V_L 中的第 1、3、4、49、60、85 位残基 (Kabat 编号系统) (见图 4)。随后表明只有 V_H 区域中第 27 和第 69 位残基显著影响结合 (克隆号 1136-2C)。

[0238] 使用的初级筛选是使用培养基的单点 ELISA (SPE) (如下述)。所述初级筛选选择了结合抗体的靶分子的克隆。选择提供了与亲代分子相比相等或更好信号的克隆进行下一轮的筛选。

[0239] 在第二轮筛选中, 将各个噬菌体在 15ml 细菌培养物中生长, 并将周质制备物用于 SPE 和 ELISA 滴定测定。对在这个测定中保持较高结合的克隆进行进一步鉴定。一旦所有所选择的初级克隆均经过了这一过程, 对最高的 10-15% 克隆进行测序并根据序列对克隆进行排列。将每个序列组的代表序列彼此相互对比并选择最佳克隆。对这些选择的克隆的序列进行组合, 并评价各种组合的作用。

[0240] 将构建的文库进行 ELISA 筛选以改良与重组人 IgE, SE44 的结合。分离结合亲和力高于鼠 TES-C21 Fab 的克隆并测序, 对克隆 ID#4、49、72、76 和 136 进一步鉴定。克隆 4、49、72、78 和 136 的 ELISA 滴定曲线示于图 5A 和 5B, 表明其亲和力与亲代 TES-C21 相似。这些克隆与鼠 TES-C21 竞争结合人 IgE, 表明在人源化处理期间结合表位没有改变。人源化的 Fab 不结合结合在 Fc ϵ RI 上的 IgE, 提示当其构建进二价 IgG 中时, 人源化抗体与受体交联导致组胺释放是不太可能的

[0241] 人源化克隆 136 保留 5 个鼠重链构架残基 (= 94.3% 人 V_H 构架同源性), 以及对于亲和力成熟选择的 100% 人轻链构架。本文表明了人源化 Fab 对 IgE 结合 Fc ϵ RI 的抑制

作用(图6)。

[0242] 实施例5:用于筛选抗IgE的单点ELISA方案

[0243] 将平板用于碳酸盐包被缓冲液中的 $2\mu\text{g/mL}$ 绵羊抗人Fd在 4°C 包被过夜。除去包被溶液,将平板用在 37°C 用 $200\mu\text{L/孔}$ 3%BSA/PBS封闭1小时。用PBS/0.1%TWEEN(PBST)洗涤平板4次后,加入 $50\mu\text{L/孔}$ Fab样品(即含有高效价噬菌体和分泌的Fab的上清或者DMB封闭的周质prep,或者15mL prep)。将平板在室温温育1小时,随后用PBST洗涤4次。加入 $50\mu\text{L/孔}$ 生物素酰化的SE44(在0.5%BSA/PBS中稀释的 $0.015\mu\text{g/mL}$),然后加入0.05%TWEEN®。将平板在室温温育2小时,用PBST洗涤4次。加入 $50\mu\text{L/孔}$ 链霉抗生物素HRP(在0.5%BSA/PBS中1:2000稀释)及加入0.05%TWEEN®,将平板在室温温育1小时。将平板用PBST洗涤6次。加入 $50\mu\text{L/孔}$ TMB底物(sigma)显色,然后加入 $50\mu\text{L/孔}$ 0.2M H_2SO_4 终止。

[0244] 实施例6:ELISA滴定:抗IgE

[0245] 将平板用于碳酸盐包被缓冲液中的 $0.25\mu\text{g/mL}$ (对于纯化的Fab为 $0.1\mu\text{g/mL}$)SE44在 4°C 包被过夜。除去包被溶液,将平板用 $200\mu\text{L/孔}$ 3%BSA/PBS在 37°C 封闭1小时。

[0246] 将平板用PBS/0.1%TWEEN®(PBST)洗涤4次。加入 $50\mu\text{L/孔}$ Fab(来自15mL周质prep),所加入的Fab从1:2稀释开始,在0.5%BSA/PBS和0.05%TWEEN®20中系列稀释3次。将平板在室温温育2小时。

[0247] 将平板用PBST洗涤4次,加入 $50\mu\text{L/孔}$ 于0.5%BSA/PBS和0.05%TWEEN®20中1:1000($0.8\mu\text{g/mL}$)稀释的生物素-绵羊抗人Fd。将平板在室温再次温育2小时。

[0248] 在用PBST洗涤4次后,加入于0.5%BSA/PBS和0.05%TWEEN®20中1:2000稀释的 $50\mu\text{L/孔}$ Neutra-抗生物素蛋白-AP($0.9\mu\text{g/mL}$),将平板在室温温育1小时。

[0249] 将平板用PBST洗涤4次,加入 $50\mu\text{L/孔}$ pNPP底物显色,加入 $50\mu\text{L/孔}$ 3M NaOH终止显色。在405nm或410nm读数每孔的吸光度。

[0250] 实施例7:亲和纯化M13噬菌体表达的可溶Fab的方案

[0251] A:第一天

[0252] 将两个含有10mg/mL四环素的500mL培养物($2\times\text{YT}$)接种5mL过夜原种XL1B并在 37°C 生长直至 $A_{600} = 0.9-1.2$ 。加入IPTG至浓度为0.5mM。然后将每个细胞培养物用 $200\mu\text{L}$ 噬菌体感染,在 37°C 摇动温育1小时。感染后,将细胞在 25°C 摇动生长过夜。

[0253] B:第二天

[0254] 将细胞在250mL离心管中在 4°C 以 $3500\times g$ 离心30分钟。吸出培养基并将沉淀重悬于共12-15mL的裂解缓冲液(缓冲液A+蛋白酶抑制剂混合物)中。

[0255] 缓冲液A(1升):

[0256] 50mM NaH_2PO_4 6.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (或者6g NaH_2PO_4)

[0257] 300mM NaCl 17.54g NaCl

[0258] 10mM 咪唑 0.68g 咪唑(MW 68.08)

[0259] 使用NaOH将pH调节为8.0。

[0260] 裂解缓冲液:

[0261] 将 25mL 缓冲液 A 与一片完全蛋白酶抑制剂混合物 (Roche, Basel, Switzerland) 混合。

[0262] 将重悬的细胞移至 50mL 锥形管中, 使用 100 μ l 100mg/mL 溶菌酶通过将该管翻转几次直至混合物作为团滴一起运动 (由于裂解所致) 而将细胞裂解。将细胞在冰上进行超声处理, 随后加入 10 μ l DNase I (大约 1000 单位), 在 4°C 轻轻摇动 30 分钟。细胞碎片通过在 4°C 使用 50mL 离心管以 12000 \times g 离心 30 分钟而沉淀。将上清移至新的锥形管中, 在 4°C 贮存。

[0263] 使用 Ni-NT 琼脂糖 (Qiagen, Valencis, CA) 根据厂商指导纯化可溶的 Fab。将裂解物与 Ni-NTA 混合并加样于柱中。收集流出物进行 SDS-PAGE 分析。将柱用 20mL 缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 15mM 咪唑, 用 NaOH 将 pH 调节为 8.0) 洗涤, 随后用 20mL 的 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM 咪唑洗涤。Fab 用 500 μ l 洗脱缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 450mM 咪唑, 用 NaOH 将 pH 调节为 8.0) 洗脱 6 次, 并通过 SDS PAGE 分析。将柱级分在 4°C 贮存。通过 SDS-PAGE 分析柱级分, 选择具有最大量 Fab 的级分并在 PBS 中在 4°C 透析。

[0264] 实施例 8 : 可溶的受体测定

[0265] 将适于 ELISA 的 96 孔测定平板用 0.05mL 0.5 μ g/mL Fc ϵ RI α -链受体包被缓冲液 (50mM 碳酸盐 / 碳酸氢盐, pH 9.6) 在 4-8°C 包被 12 小时。抽吸所述孔, 并加入 250 μ l 封闭缓冲液 (PBS, 1% BSA, pH 7.2), 在 37°C 温育 1 小时。在一个单独的测定平板中, 样品和参考 TES-C21MAb 通过用测定缓冲液 (0.5% BSA 和 0.05% Tween 20, PBS, pH 7.2) 以 1 : 4 稀释而从 200 μ g/mL 至 0.001 μ g/mL 进行滴定, 加入等体积的 100ng/mL 生物素酰化的 IgE, 并将平板在 25°C 温育 2-3 小时。将 Fc ϵ RI 包被的孔用 PBS 和 0.05% TWEEN 20 洗涤 3 次, 从样品孔移出 50 μ l, 在 25°C 搅动温育 30 分钟。将于测定缓冲液中以 1 : 2000 稀释的 50 μ l/孔的 1mg/mL 链霉抗生物素-HRP 搅动温育 30 分钟, 然后将平板如前述洗涤。加入 50 μ l/孔的 TMB 底物显色。反应通过加入等体积的 0.2M H₂SO₄ 而终止, 在 450nm 测定吸光度。

[0266] 实施例 9 : 抗体与荷载 IgE 的 Fc ϵ RI 的结合

[0267] 结合与 Fc ϵ RI 的 α 亚基缔合的人 IgE 的抗体通过与 10 μ g/mL 人 IgE 在 4°C 预温育 30 分钟而确定。将平板洗涤 3 次, 随后与不同浓度的鼠抗人 IgE MAb E-10-10 或者人源化的 Fab 变体温育 1 小时。使用生物素标记的抗人 Fd 抗体, 随后通过 SA-HRP 检测 Fab 的结合。鼠 MAb E-10-10 通过山羊抗鼠 Ig FcHRP- 缀合的 Ab 进行检测。

[0268] 实施例 10 : 克隆鉴定

[0269] 测定每个候选物的结合亲和力, 并对阳性克隆进行测序。对在 CDR 区域中具有增加结合亲和力的有益突变的抗体变体进一步鉴定。测定包括 Biacore 测定, IgE 与其受体结合的抑制, 及受体结合的 IgE 的交联。

[0270] 产生了一个变体文库。经论证具有改良的亲和力的各种 CDR 的氨基酸序列示于表 1。图 7 示出具有取代的组合的高亲和力候选物。

[0271] 表 1

[0272]

CDRL1:		CDRH1:	
P RASQSIGTNIH	SEQ ID NO 5	P MYWLE	SEQ ID NO 15
#1 RASRSIGTNIH	SEQ ID NO 6	#1 WYWLE	SEQ ID NO 16
#2 RASQRIGTNIH	SEQ ID NO 7	#2 YYWLE	SEQ ID NO 17
CDRL2:		CDRH2:	
P YASESIS	SEQ ID NO 8	P EISPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 18
#1 YAYESIS	SEQ ID NO 9	#1 EIEPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 19
#2 YASESIY	SEQ ID NO 10	#2 EIDPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 20
#3 YASESDS	SEQ ID NO 11	#3 EISPDTFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 21
#4 YASESES	SEQ ID NO 12	#4 EISPETFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 22
CDRL3:		#5 EISPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 23
P QQSDSWPTT	SEQ ID NO 13	#6 EIEPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 24
#1 AASWSWPTT	SEQ ID NO 14	#7 EIDPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 25
		CDRH3:	
		P FSHFSGSNYDYFDY	SEQ ID NO 26
		#1 FSHFSGMNYDYFDY	SEQ ID NO 27
		#2 FSHFSGQNYDYFDY	SEQ ID NO 28
		#3 FSHFTGSNYDYFDY	SEQ ID NO 29

[0273] P = 亲代

[0274] 19 个重链变体示于图 9, 35 个轻链变体示于图 8。对 3 个候选物进一步鉴定结合亲和力, 这些候选物示于表 2。

[0275] 表 2 结合亲和力

[0276]

Mab	K_D	结合亲和力的增加倍数
TES-C21	614 ± 200pM	
MAb 1 (CL-5A)	0.158pM	3886
MAb 2 (CL-2C)	1.47 ± 0.5pM	417
MAb 3 (CL-5I)	3.2 ± 2.2pM	191

[0277] 实施例 11 : 抗 IgE 抗体及 HRP 缀合的表达和纯化

[0278] 产生了高亲和力 MAb 候选物。为了产生完整的抗 IgE MAb, 将重链和轻链可变区从噬菌体载体模板中经 PCR 扩增, 并在 CMV 启动子表达下单独亚克隆进 H- 和 L- 链表达载体中。构建 6 个完整抗体克隆, 如图 10A-F 所示。通过本领域熟知的电穿孔技术将合适的重链和轻链质粒共转染进小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 中。见例如 Liou et al. J Immunol. 143(12) : 3967-75(1989) 所述。使用蛋白 A 琼脂糖凝胶 (Pharmacia) 从单一稳定细胞系上清中纯化抗体。抗体的浓度使用分光光度计在 280nm 以及 FCA 检测 (IDEXX) 确定。

[0279] 用过氧化物酶缀合试剂盒 (Zymed Labs, San Francisco, CA) 根据厂商方案用辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合纯化的抗体。每种缀合的抗 IgE MAb 的效价用 ELISA 经单克隆人 IgE (SE44) 包被的平板确定。

[0280] 下面的培养物已经被保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture

Collection, 10801 University Boulevard, Manassas Va. 20110-2209 USA (ATCC) :

[0281]

杂交瘤	ATCC 编号	保藏日期
抗 IgE CL-2C	PTA-5678	2003 年 12 月 3 日
抗 IgE CL-5A	PTA-5679	2003 年 12 月 3 日
抗 IgE CL-5I	PTA-5680	2003 年 12 月 3 日

[0282] 本保藏是根据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约及其细则（布达佩斯条约）的相关规定进行的。这保证了从保藏之日起保持该活培养物 30 年。在布达佩斯协议的范围下，通过 ATCC 可以获得该生物体，这保证了在相关的美国专利授权之后，公众可以永久地、不受限制地获得该培养物的后代。

[0283] 本申请的受让人已经同意如果当在合适条件下培养的被保藏培养物死亡或丢失或被损害时，在被通知后将迅速地用相同培养物的活体样品代替。保藏菌株的获得并不作为在违反任何政府主管部门根据其专利法所赋予的权利下实施本发明的许可。

[0284] 上面所写的说明书据信足以使得本领域技术人员能够实施本发明。本发明并不受所保藏的培养物的范围的限定，因为所保藏的实施方式只是用作举例说明本发明的一个方面，任何功能上等价的培养物都在本发明的范围之内。本文的保藏材料不构成对本文所含的所写的描述不足以能实践本发明的任何方面（包括本发明的最佳模式）的承认，它也不被用于将本权利要求书的范围限定到本文所呈现的特定的举例说明。事实上，通过上面的描述，对本发明的各种除了本文所示的和所述以外的修饰对于本领域人员将是显而易见的，并且都在附录的权利要求书的范围之内。

[0285] 实施例 12 : 人 IgE 的高亲和力结合表位的定位

[0286] A : 肽合成和抗 IgE 结合测定

[0287] 研究示出 IgE 通过 C_H3 结构域结合其受体。由于本发明的 HA 抗-IgE 抗体非常有效地阻断 IgE 与其受体结合，使用涵盖全部 CH3 结构域的肽对表位进行定位。首先，制备两个 V5 标记的肽，一个包含人 IgE 的全部恒定区，一个仅包含人 IgE 的 C_H2-C_H3 区域。这两个肽通过在体外转录-翻译而表达，并用于 Western 印迹测定以检测 HA 抗 IgE Mab 结合。CL-2C 和 CL-5I Mab 均能结合完整的人 IgE 以及这两个肽。

[0288] 为了更特异性地定位表位，合成包含人 IgE 的第 141-368 位氨基酸残基（包括全部的 C_H3 结构域）的 73 个重叠肽。每个肽均由 12 个氨基酸残基组成，在之前的肽的 3' 末端重叠 3 个氨基酸。用芴甲氧羰基 (fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc) 氨基酸在纤维素膜上合成 SPOT 膜。将该膜在甲醇中漂洗，然后在 TBS (pH 7.5) 中洗涤 3 次 10 分钟。在封闭溶液 (5% 牛奶或者于 TBS 中的 3% BSA) 中温育过夜后，将于封闭溶液中稀释的 HRP 标记的抗 IgE Mab 与该膜温育 3 小时。在 TBS-TWEEN[®] 中洗涤 3 次 15 分钟后，使用 SuperSignal HRP 底物 (Pierce) 通过化学发光暴露于 BioMax MS 胶片 (Kodak) 希望的时间而测定 IgE 反应性。

[0289] 实验结果表明 HA 抗 IgE Mab 结合 IgE 的 C_H3 部分中的两个区域，以如下两个肽序列表示 ;NPRGVSAYLSRP (表位 A) 和 HPHLPRALMRST (表位 B) (见图 12)。与表位 A 的结合比与表位 B 的结合弱几倍。

[0290] B : 丙氨酸扫描诱变

[0291] 沿着在 IgG1 中发现的那些肽的取代氨基酸进行丙氨酸扫描，以确定哪些氨基酸

对于 HA 抗 IgE MAb 与这些肽的结合是关键。经确定对于 HA 抗 IgE MAb 结合是重要的氨基酸使用体外诱变方法在 IgE 的 ϵ 链中置换。这个研究中还使用如前所述的覆盖 C ϵ 2 和 C ϵ 3 区域的另一种肽（见图 13 和 14）。

[0292] 使用对于人 IgE 氨基酸残基的 EU 编号方案。使用聚合酶链反应（PCR）扩增 IgE 的全部 Fc 区域，及仅含有 CH2-CH3 结构域的截短形式的 IgE Fc。将 DNA 产物直接克隆进 pcDNA3 表达载体（Invitrogene, Carlsbad, CA）中，使用 TOPO cloning（Invitrogene, Carlsbad, CA）进行。

[0293] 使用重叠 PCR（Ho et al., 1989）在 IgE-Fc 中进行诱变。将 DNA 产物通过琼脂糖凝胶电泳纯化，用合适的限制酶消化，并亚克隆进 pcDNA3 表达载体中。对于每个变体构建体，对 PCR 扩增的区域使用双脱氧核苷酸方法从 DNA 的两个链中完全测序。重组人 IgE Fc 及其突变体使用基于网状细胞裂解物的体外转录和翻译偶联系统（Promega, Madison, WI）表达。

[0294] 将得自这个体外转录和翻译偶联系统的裂解物（10 μ l 反应混合物）进行 SDS-PAGE（12%），然后移至硝化纤维素膜上。将该膜用于 Tris 缓冲盐水（TBS）中的 5% 奶粉溶液封闭，随后用初级抗体抗 IgE MAb 染色。特异性反应条带使用与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人 IgG Fc（Jackson Labs, Bar Harbor, Maine）检测，免疫反应性条带使用 SuperSignal Western 印迹检测试剂盒（Pierce）观测。抗 V5 抗体用作阳性对照，检测在这些肽的 C 末端导入的 V5 标记。抗 V5 抗体的 Western 印迹表明所有肽均在几乎相等的水平表达。令人感兴趣地，HA 抗 IgE MAb 能结合在表位 A 具有突变的肽，但它们不结合在表位 B 具有突变的肽，这表明这第二个位点对于结合更重要（见图 15）。

[0295] 实施例 13：使用表位 B 的免疫原性肽对转基因小鼠的主动免疫

[0296] 使用组成型表达人 IgE 的转基因小鼠论证表位 B 的人免疫原性肽的抗体的主动产生。化学合成两个融合肽，每个肽均包含本发明的免疫原性肽、半胱氨酸残基和 KLH。肽 1 的序列是：

[0297] (KLH-Cys)-Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr,

[0298] 肽 2 的序列是：

[0299] Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr-(Cys-KLH)。

[0300] 将转基因小鼠经皮下注射 200 μ L 的 PBS pH 7.4 中于完全弗氏佐剂（Difco Laboratories, Detroit, MI）中的 20 μ g 免疫原性肽。间隔 2 周，为小鼠二次皮下注射于不完全弗氏佐剂中的 20 μ g 的肽免疫原。然后，在两周后及在处死前 3 天，为小鼠再次腹膜内注射于 PBS 中的 20 μ g 相同免疫原。收集血清并测试特异于表位 B 的抗 IgE 抗体的存在。如图 16 所示，所述肽在这些转基因小鼠中激发抗 IgE 抗体。

[0301] 本领域技术人员使用不超过常规实验将意识到或者能确定本文所描述的本发明的特殊实施方案的许多等价物。这种等价物涵盖在如下权利要求书中。

[0001]

序列表

<110> 泰勒公司
 <120> 新的IgE表位的鉴别
 <130> TNX-1030
 <150> PCT/US04/02892
 <151> 2004-02-02
 <150> PCT/US04/02894
 <151> 2004-02-02
 <150> US60/444,229
 <151> 2003-02-01
 <160> 77
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Murine
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> TES-C21 LIGHT CHAIN
 <400> 1

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

[0002]

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Human

<220>
 <221> misc_feature
 <223> L16/-JK4 human light chain consensus sequence template

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> MURINE

<220>
 <221> misc_feature
 <223> TES-C21 Heavy Chain

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

[0003]

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

<210> 4
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Human

<220>
 <221> misc feature
 <223> DP88/JH4b human heavy chain consensus sequence template

<400> 4

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35				40						45				
Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					

[0004]

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Leu Val Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TES-C21 CDRL1 SEQUENCE (TABLE 1)

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRL1 VARIANT SEQUENCE #1 (TABLE 1)

<400> 6

Arg Ala Ser Arg Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRL1 VARIANT SEQUENCE #2 (TABLE 1)

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Gly Thr Asn Ile His

[0005]

1	5	10
<210>	8	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	ARTIFICIAL	
<220>		
<223>	TES-C21 CDRL2 SEQUENCE (TABLE 1)	
<400>	8	
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser		
1	5	
<210>	9	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	ARTIFICIAL	
<220>		
<223>	CDRL2 VARIANT #1 (TABLE 1)	
<400>	9	
Tyr Ala Tyr Glu Ser Ile Ser		
1	5	
<210>	10	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	ARTIFICIAL	
<220>		
<223>	CDRL2 VARIANT #2 (TABLE 1)	
<400>	10	
Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Tyr		
1	5	
<210>	11	
<211>	7	
<212>	PRT	
<213>	ARTIFICIAL	
<220>		
<223>	CDRL2 VARIANT #3 (TABLE 1)	
<400>	11	
Tyr Ala Ser Glu Ser Asp Ser		
1	5	

[0006]

```

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRL2 VARIANT #4 (TABLE 1)

<400> 12

Tyr Ala Ser Glu Ser Glu Ser
1          5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TES-C21 CDRL3 (TABLE 1)

<400> 13

Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr
1          5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRL3 VARIANT (TABLE)

<400> 14

Ala Ala Ser Trp Ser Trp Pro Thr Thr
1          5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TES-C21 CDRH1

<400> 15

Met Tyr Trp Leu Glu
1          5

```

[0007]

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRH1 VARIANT #1 (TABLE 1)

<400> 16

Trp Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRH1 #2 (TABLE 1)

<400> 17

Tyr Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> TES-C21 CDRH2 (TABLE 1)

<400> 18

Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> CDRH2 VARIANT #1 (TABLE 1)

<400> 19

[0008]

Glu Ile Glu Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH2 VARIANT #2 (TABLE 1)

<400> 20

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

Ala

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH2 VARIANT #3 (TABLE 1)

<400> 21

Glu Ile Ser Pro Asp Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH2 VARIANT #4 (TABLE 1)

<400> 22

Glu Ile Ser Pro Glu Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

[0009]

Ala

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH2 VARIANT #5 (TABLE 1)

<400> 23

Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH2 VARIANT #6 (TABLE 1)

<400> 24

Glu Ile Glu Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CDRH2 VARIANT #7 (TABLE 1)

<400> 25

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

Ala

[0010]

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> FRL1 VARIANT 136

<400> 30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 31
<211> 23
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> FRL1 VARIANT 1

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 32
<211> 23
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> FRL1 VARIANT 2

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 33
<211> 23

[0012]

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> FRL1 VARIANT 4

<400> 33

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 34
<211> 23
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> FRL1 VARIANT 13

<400> 34

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 35
<211> 23
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> FRL1 VARIANT 18

<400> 35

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 36
<211> 23
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

[0013]

<220>

<223> FRL1 VARIANT 25

<400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL1 VARIANT 27

<400> 37

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL2 VARIANT 136

<400> 38

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRL2 VARIANT 1

<400> 39

~~Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15~~

[0014]

<210> 40
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRL3 VARIANT 136

<400> 40

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRL3 VARIANT 1

<400> 41

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRL3 VARIANT 13

<400> 42

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 43

[0015]

<211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRL3 VARIANT 18

<400> 43

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRL4 VARIANT

<400> 44

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 45
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRH1 VARIANT 136

<400> 45

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 46
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRH1 VARIANT 2

[0016]

<400> 46

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANT 136

<400> 47

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANT 2

<400> 48

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH2 VARIANT 8

<400> 49

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

[0017]

<220>

<223> FRH2 VARIANT 21

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANT 136

<400> 51

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANT 1

<400> 52

Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 53

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> FRH3 VARIANT 43

<400> 53

~~Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15~~

[0018]

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 54
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRH3 VARIANT 103

<400> 54

Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> FRH4 VARIANT 136

<400> 55

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 56
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Bacteriophage M13mp18

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Gene III signal Sequence

<400> 56

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

[0019]

<210> 57
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> LIGHT CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE 136

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 58
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> LIGHT CHAIN CONSTANT REGION OF CLONE 136

<400> 58

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

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

[0020]

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> HEAVY CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE 136

<400> 59

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

[0021]

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CONSTANT REGION OF HUMAN IgG1

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

~~Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu~~
~~165 170 175~~

[0022]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 61
<211> 107
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-2C

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn

[0023]

	20		25		30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	35		40		45
Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser	65		70		75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr		85		90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100		105		
<210> 62					
<211> 123					
<212> PRT					
<213> ARTIFICIAL					
<220>					
<223> HEAVY CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-2C					
<400> 62					
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser	1	5	10		15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr		20	25		30
Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met	35		40		45
Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	50		55		60
Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65		70		75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		85		90	95

[0024]

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> LIGHT CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-5I

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 64
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> HEAVY CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-5I

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser

[0025]

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

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> LIGHT CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-5A

<400> 65

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn
			20					25					30		

Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

[0026]

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> HEAVY CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-5A

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Glu Pro Gly Thr Glu Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

[0027]

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> LIGHT CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-2B

<400> 67

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 68

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> HEAVY CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-2B

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

[0028]

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> LIGHT CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-1136-2C

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0029]

<210> 70
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> HEAVY CHAIN VARIABLE REGION OF CLONE CL-1136-2C

<400> 70

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val
 20 25 30

[0030]

Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala
 35 40 45

Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg
 50 55 60

Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp
 65 70 75 80

Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu
 85 90 95

Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser
 100 105

<210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> PEPTIDE DERIVED FROM CH3 DOMAIN OF IGE

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 72

Asn Pro Arg Gly Val Ser Xaa Tyr Xaa Xaa Arg Xaa
 1 5 10

<210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>

[0031]

His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr
1 5 10

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PEPTIDE DERIVED FROM CH3 DOMAIN OF IGE

<400> 77

Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr
1 5 10

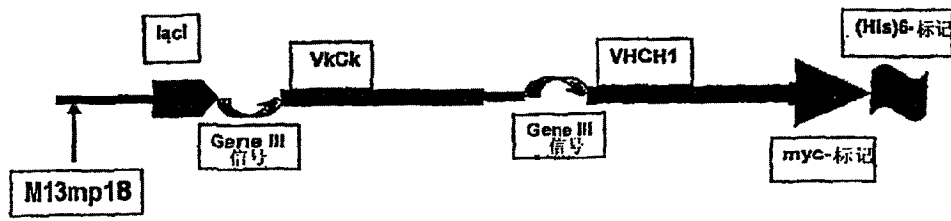


图 1

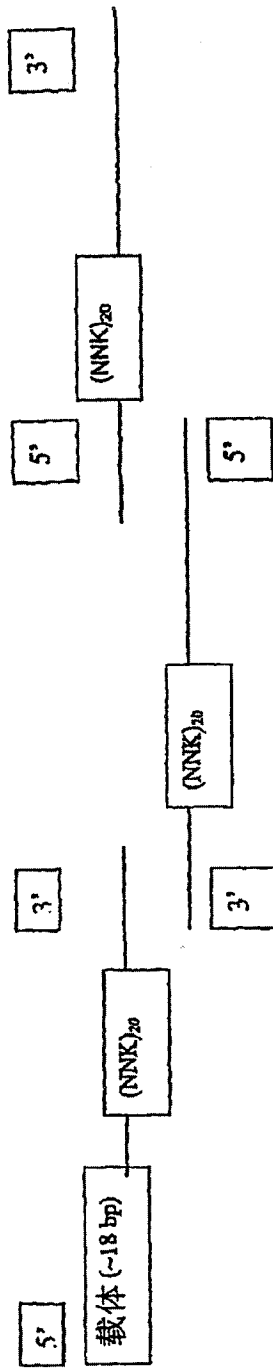


图 2

A. 轻链 (VK) (下划线: Kabat CDR; 粗体/斜体: Chothia CDR) (TES-C21 轻链-SEQ ID NO 1 L16JK4-SEQ ID NO2)

Mu TES-C21 D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S F S C R A S Q S I G T N I H W Y Q Q
L16 VK E V M T A T L R A S Q S V S S N L A

TES-C21 R T D G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S R F S G S G S G T E F T L N I N
L16 VK K P G Q A Y G A S T R A T A

TES-C21 S V E S E D I A D Y Y C Q Q S D S W P T T F G G G T K L E I K
L16 VK-JK4 L Q F V Q Q Y N N W P L T V

B. 重链 (VH)
TES-C21 重链-SEQ ID NO 3 DP88/JH4b-SEQ ID NO 4

Murine TES-C21 Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K T T G Y T F S M Y W L E W V
DP88 VH V V K S V A S G S Y A I S

TES-C21 K Q R P G H G L E W V G E I S P G T F T T N Y N E K F K A K A T F T A D T
DP88 VH R A Q M G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V I K

TES-C21 S S N T A Y L Q L S G L T S E D S A V Y F C A R F S H F S G S N Y D Y F D Y
DP88 VH T S M E S R T

TES-C21 103 110 113
DP88-JH4b W G Q G T S L T V S S L Y

图 3

VK 位置 小鼠	1	3	4	49	60	85	VH 位置 小鼠	12	27	43	48	67	69
1 (克隆编号)	D	L	M	K	S	V		M	Y	H	M	A	F
2	D	V	L	K	S	V		K	Y	Q	M	V	F
4	D	L	L	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
8	D	L	L	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
13	D	V	L	K	S	D		K	Y	Q	M	V	F
15	D	L	M	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
16	D	L	M	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
18	D	L	M	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
21	D	L	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
23	D	L	L	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
25	D	L	M	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
27	D	L	M	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
30	D	V	L	Y	A	D		K	Y	Q	M	V	F
31	D	V	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
33	D	V	L	Y	A	V		K	Y	Q	M	V	F
35	D	V	M	Y	A	D		K	Y	Q	M	V	F
38	D	V	M	K	A	D		K	Y	Q	M	V	F
43	D	V	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
44	D	V	L	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
45	D	V	M	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
46	D	V	L	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
48	D	V	M	K	A	D		M	Y	Q	M	V	F
49	D	V	M	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
50	D	L	L	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
52	D	L	L	Y	A	D		K	Y	Q	M	V	F
53	D	L	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
56	D	L	M	Y	S	V		M	Y	H	M	V	F
58	D	V	M	K	S	V		M	Y	H	M	V	F
61	D	V	M	K	S	V		M	Y	H	M	V	F
63	D	V	M	K	S	V		M	Y	H	M	V	F
64	D	V	M	K	S	D		M	Y	Q	M	V	F
68	D	V	L	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
70	D	V	L	Y	A	D		K	Y	Q	M	V	F
72	D	V	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
75	D	L	L	K	S	V		K	Y	Q	M	V	F
76	D	L	M	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
78	D	V	M	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
81	D	V	L	K	S	D		M	Y	Q	M	V	F
83	D	V	L	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
86	D	L	M	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
89	D	L	M	Y	A	V		M	Y	H	M	V	F
90	D	L	M	Y	A	D		K	Y	H	M	V	F
93	D	L	M	Y	A	V		M	Y	H	M	V	F
103	D	L	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
109	D	L	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
114	D	L	L	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
124	D	V	L	Y	S	V		K	Y	Q	M	V	F
126	D	V	M	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
135	D	V	L	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
136	D	V	M	Y	S	V		M	Y	H	M	V	F
152	D	V	L	Y	S	V		M	Y	H	M	V	F
153	D	L	L	Y	S	V		K	Y	Q	M	V	F
157	D	L	M	Y	S	D		K	Y	Q	M	V	F
1136-2C	E	V	M	Y	S	D		K	Y	Q	M	V	F

*P= 亲代序列 ; T= 人模板序列 粗体示出的氨基酸是鼠残基

图 4

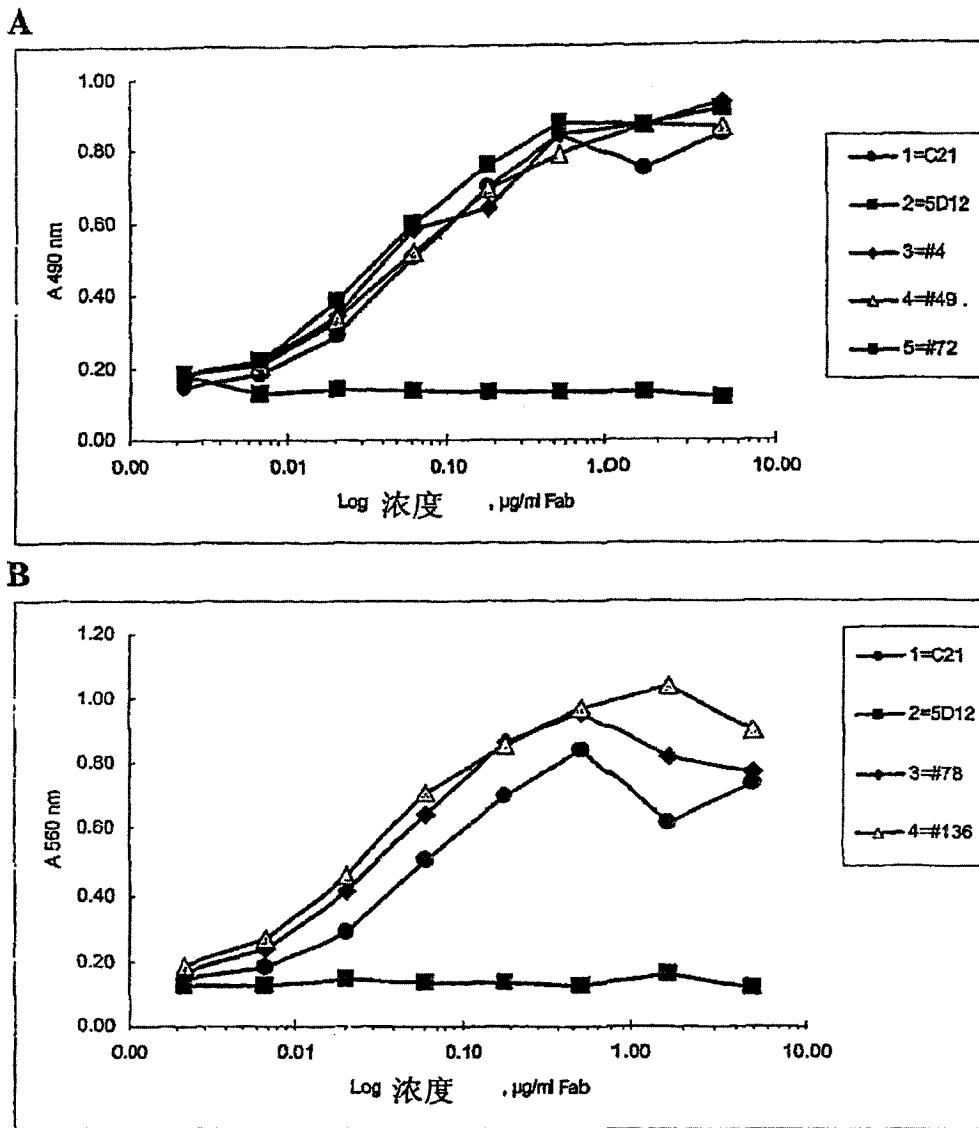


图 5

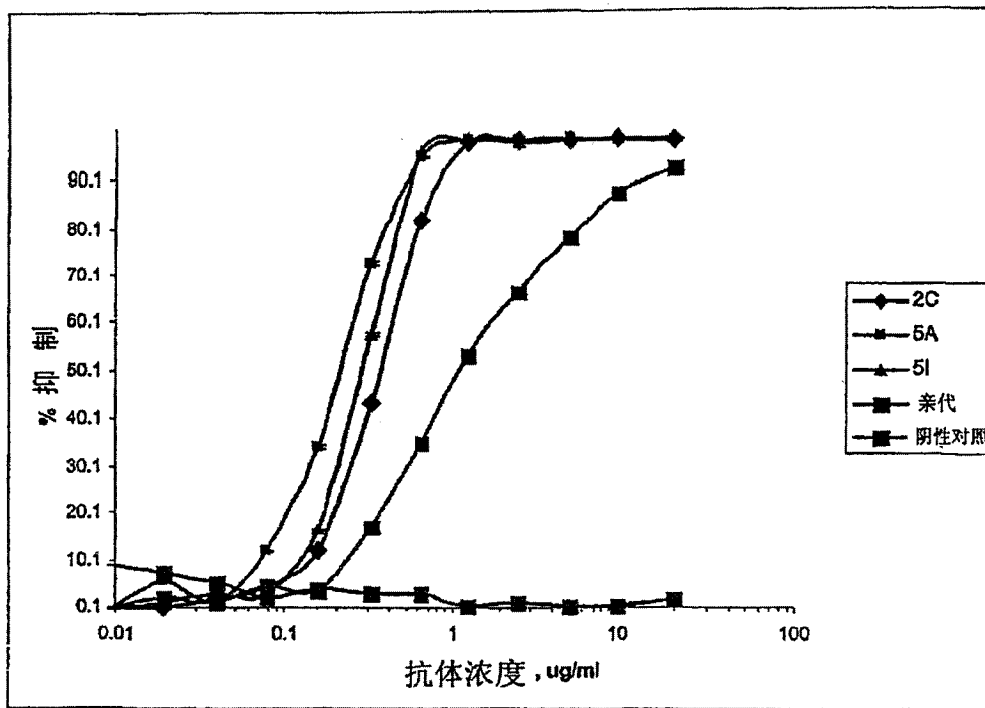


图 6

克隆	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
136	RASRSIG	YASE	QQSASW	MYWLE	EISPGTFTINYNEKF	FSHFSGSNYDY
L3-9	wt	wt	QQSWSW	wt	wt	wt
CL-2	wt	wt	QQSWSW	YWLE	wt	wt
R5-E	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	wt	wt
R87-	wt	wt	QQSWSW	wt	EIEPGTFTINYNEKF	wt
CL-2	wt	wt	QQSWSW	wt	EIDPGTFTINYNEKF	wt
R2-C	wt	wt	QQSWSW	YWLE	EIEPGTFTINYNEKF	wt
CL-2	wt	wt	QQSWSW	YWLE	EIDPGTFTINYNEKF	wt
CL-2	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EIEPGTFTINYNEKF	wt
CL-2	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EIDPGTFTINYNEKF	wt
CL-3	wt	wt	QQSWSW	wt	EISPETFTINYNEKF	wt
R47-	wt	wt	QQSWSW	wt	EISPDFTFTINYNEKF	wt
CL-3	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EISPETFTINYNEKF	wt
R3-A	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EISPDFTFTINYNEKF	wt
CL-3	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EISPETFTINYNEKF	wt
CL-3	wt	wt	QQSWSW	YWLE	EISPDFTFTINYNEKF	wt
R5-K	wt	wt	QQSWSW	wt	EISPGTFETINYNEKF	wt
CL-4	wt	wt	QQSWSW	YWLE	EISPGTFETINYNEKF	wt
R5-D	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EISPGTFETINYNEKF	wt
CL-5	wt	wt	QQSWSW	wt	EIEPGTFETINYNEKF	wt
CL-5	wt	wt	QQSWSW	wt	EIDPGTFETINYNEKF	wt
CL-5	wt	wt	QQSWSW	YWLE	EIEPGTFETINYNEKF	wt
CL-5	wt	wt	QQSWSW	YWLE	EIDPGTFETINYNEKF	wt
R5-H	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EIEPGTFETINYNEKF	wt
R5-N	wt	wt	QQSWSW	YYWLE	EIDPGTFETINYNEKF	wt

得自亲代氨基酸序列的改变以粗体表示

图 7

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GOAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFGSGSGSTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SDSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 57)

恒定区 Ck

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYIEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC (SEQ ID NO 58)

重链 (IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS MYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
 ISPGTFTTNY NEKFKARVTE TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGITLVV VSS (SEQ ID NO 59)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EYTCVVVDVDS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10A

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQOKP GOAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFGSGSGSTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 61)

恒定区 Ck

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC (SEQ ID NO 58)

重链 (IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH(2C)

QQQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
 IDPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGLVT VSS (SEQ ID NO 62)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP
 KSCDKHTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVDS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTLC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFCFSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10B

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 63)

恒定区 Ck (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSFYSLSST LTLISKADY EK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

重链 (IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH (5I)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS MYWLEWVROA PGHGLEWMGE
 IDPGTFETNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGLVT VSS (SEQ ID NO 64)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP
 KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFCFV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10C

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYQCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 65)

恒定区 Ck (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVOW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

重链 (IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH(5A)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
 IEPGTETINY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO 66)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKQVEP
 KSCDKHTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSPFLY SKLTVDKSRW
 QOGNVPFCSV MREALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10D

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 67)

恒定区 Ck (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

重链 (IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH (2B)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS YWLEWVRQA PGHGLEWMGE
 IDPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGLVT VSS (SEQ ID NO 68)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP
 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGTSFELY SKLTVDKSRW
 QQGNVVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10E

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKQ GQAPRLLIYY
 ASESISGIPA RPSGSGSGTE FTLTISLQSE EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
 GTKVEIK (SEQ ID NO 69)

恒定区 Ck (SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLNN FYPREKVVQW KVDNALQSGN
 SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK HKVYAACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

重链 (IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 (VH)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWEWVRQA PGQGLEWMGE
 ISPSTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFGSGNYDYP DYWGQGTLVV VSS (SEQ ID NO 70)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKQVEP
 KSCDKHTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSD
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNQK
 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTRKQVSLTC
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10F

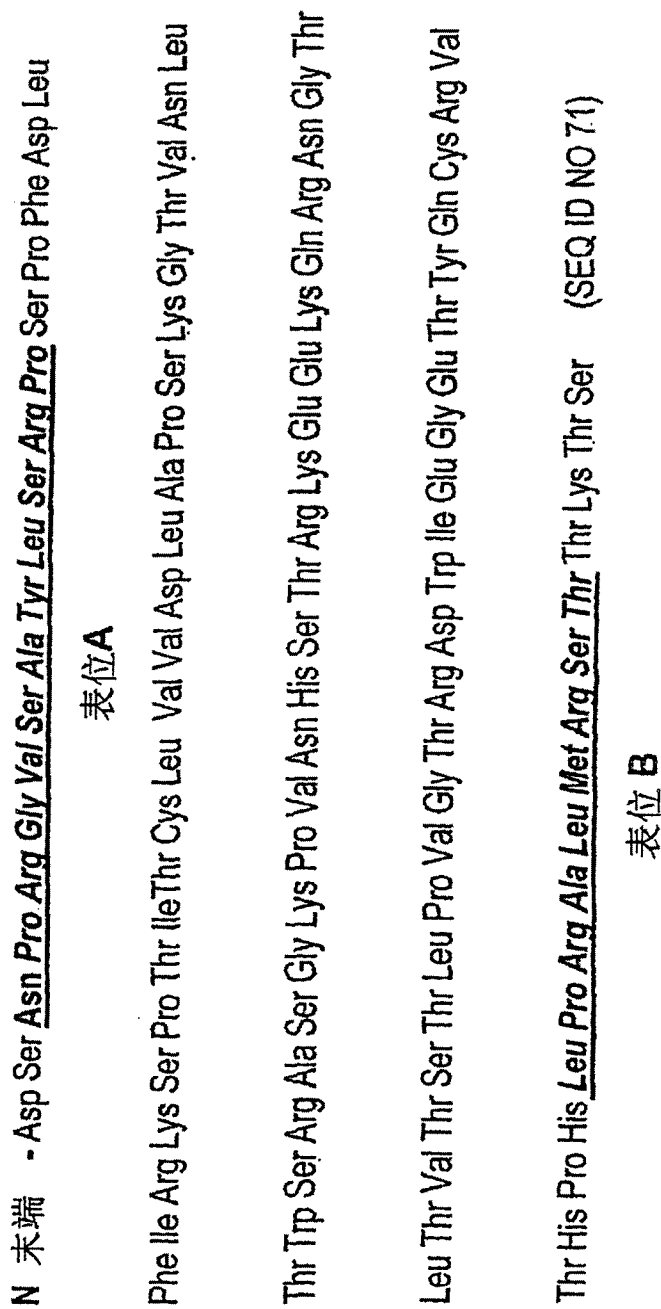


图 11

			抗体结合
	肽序列		
53	YQCRVTHPHLPR		-
54	RVTHPHLPRALM		++
55	HPHLPRALMRST		+++
56	LPRALMRSTTKT		+++
57	ALMRSTTKTSGP		-
	共有	<u>LPRALMRST</u>	

图 12

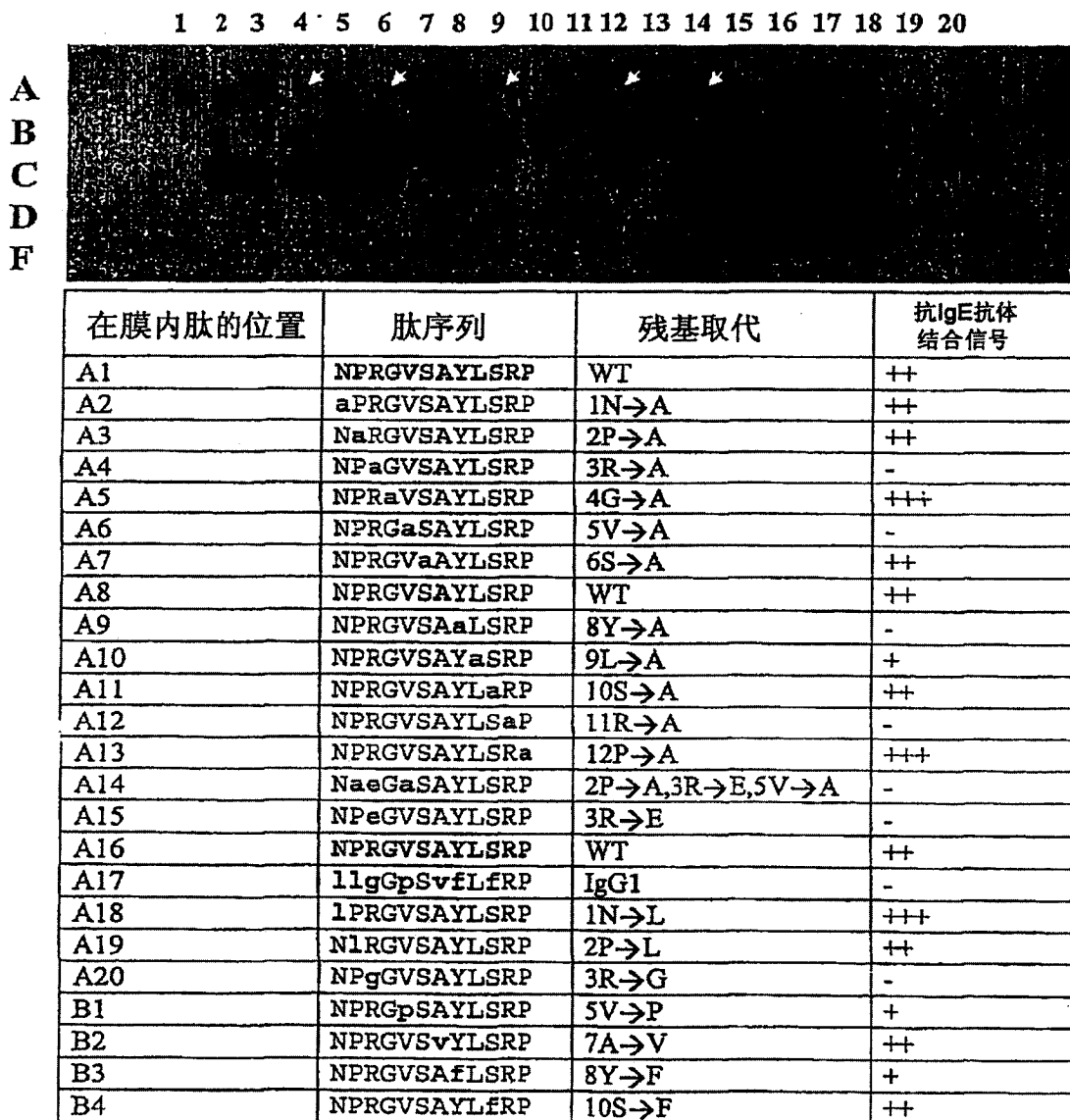


图 13

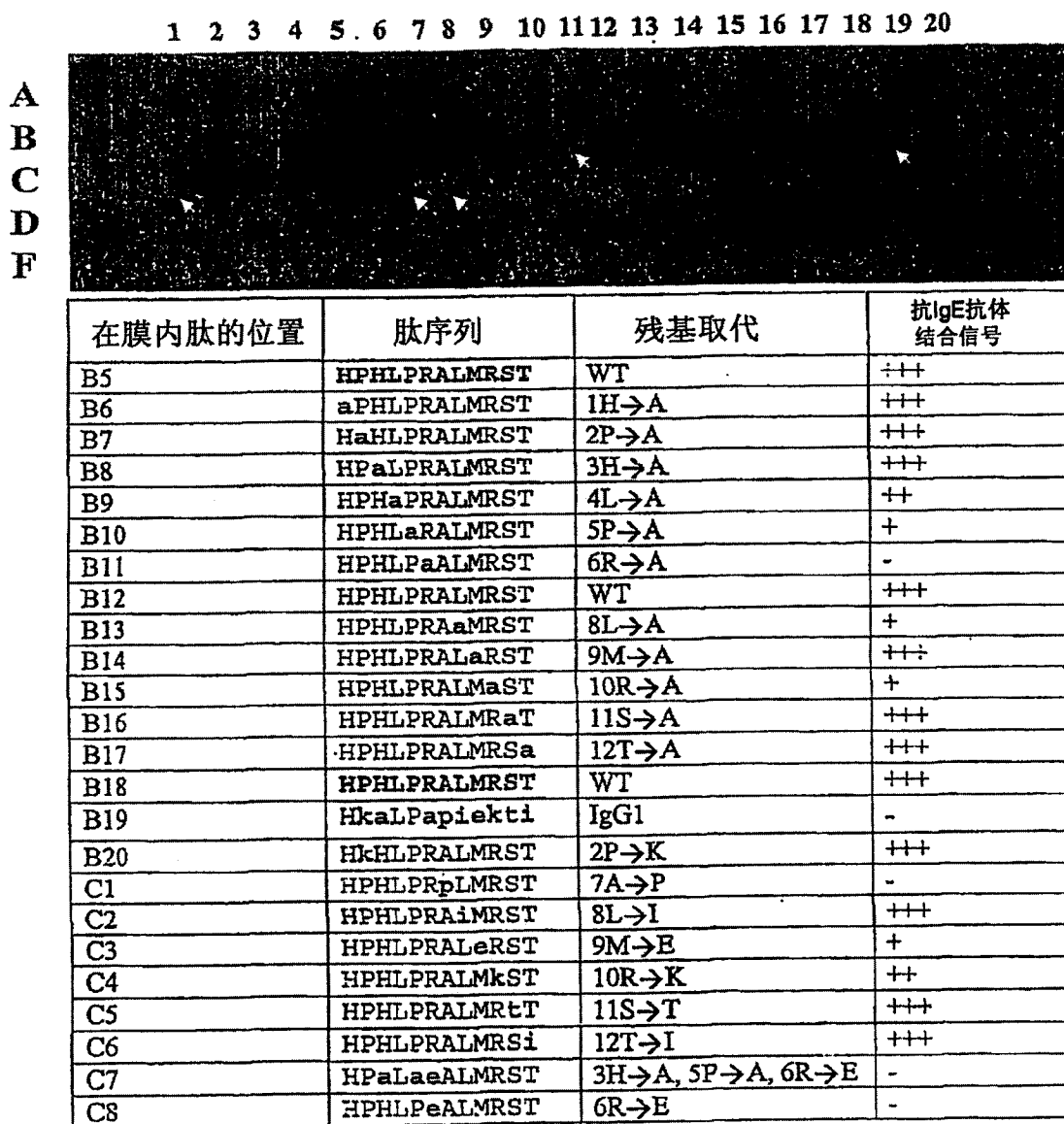


图 14

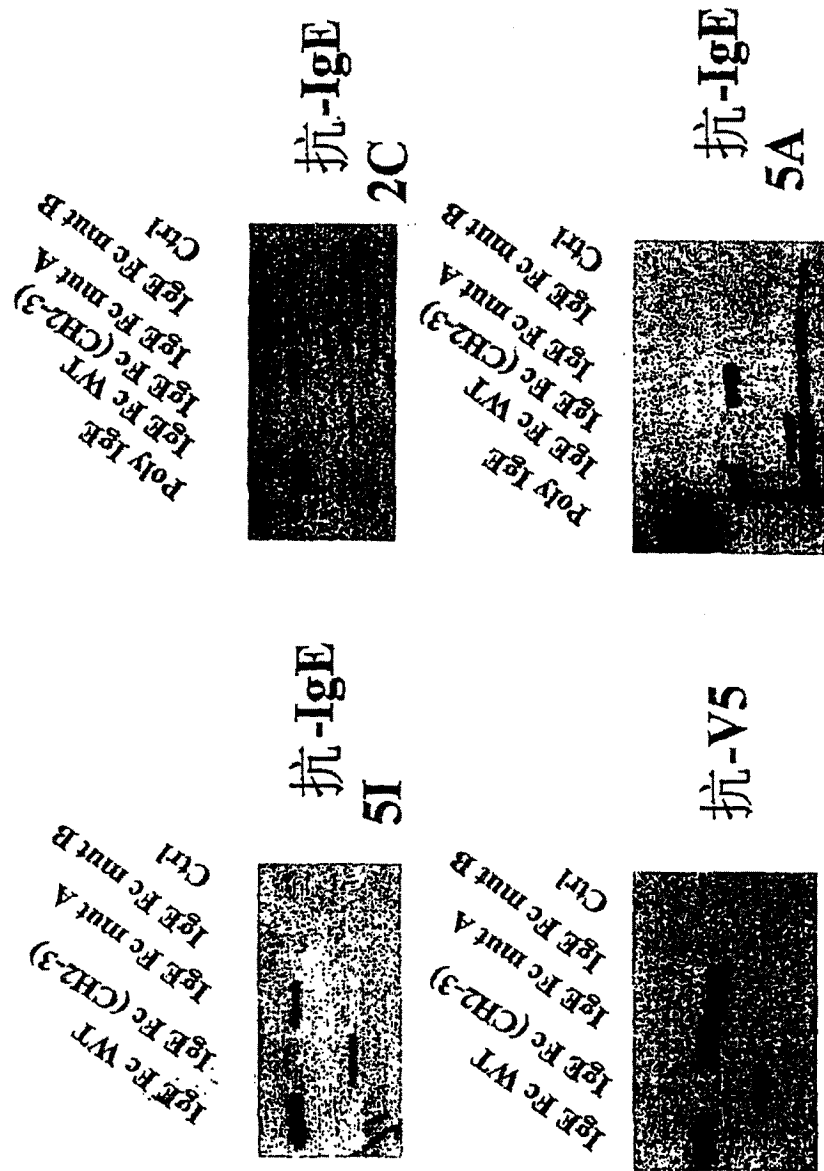


图 15

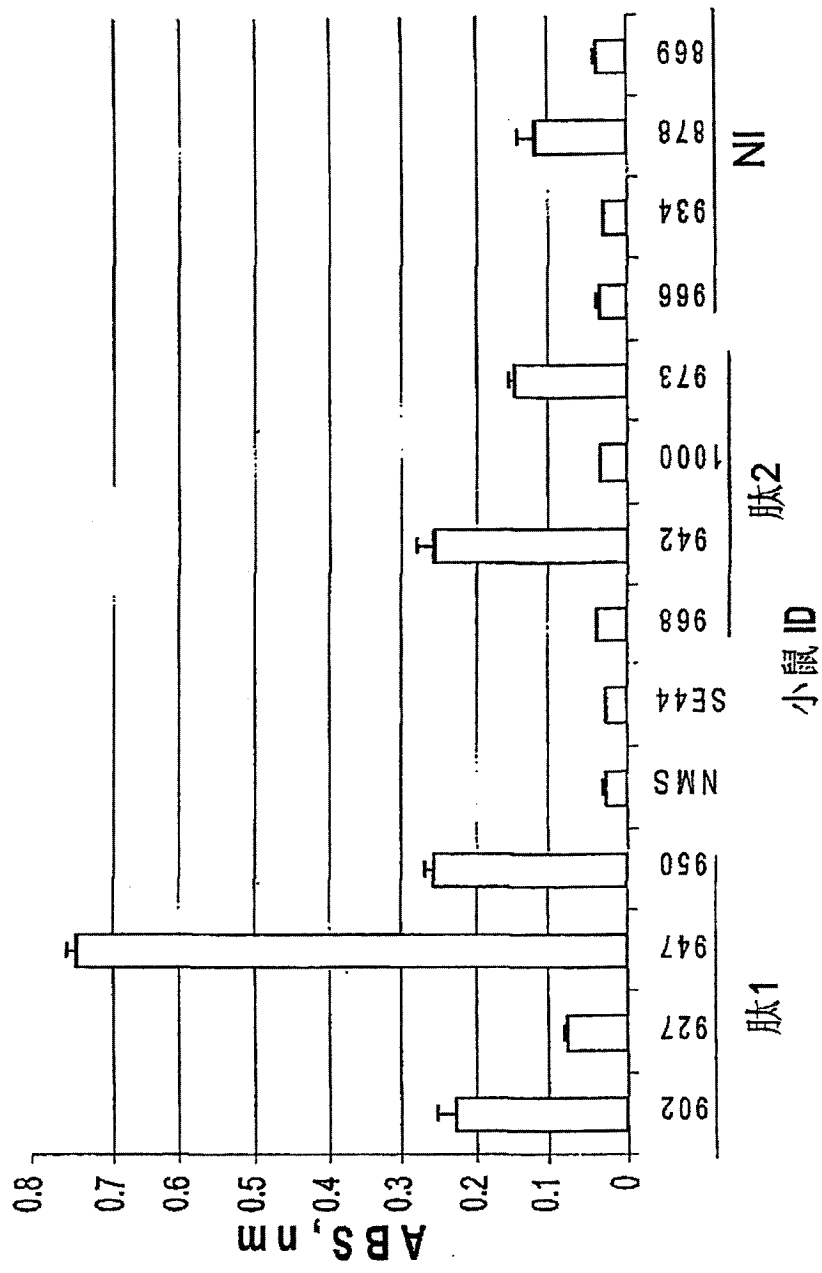


图 16

专利名称(译)	新的IgE表位的鉴别		
公开(公告)号	CN102702359A	公开(公告)日	2012-10-03
申请号	CN201110343406.6	申请日	2004-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	泰勒公司		
申请(专利权)人(译)	泰勒公司		
当前申请(专利权)人(译)	泰勒公司		
[标]发明人	桑贾亚辛格 黄丹阳 锡钟迈克尔冯		
发明人	桑贾亚·辛格 黄丹阳 锡·钟·迈克尔·冯		
IPC分类号	C07K16/42 C12N15/11 C12N15/13 C12N15/63 C12N5/10 A61K39/395 A61P37/08 A61P11/06 A61P11/02 A61P17/00 G01N33/53 G01N33/577 A61K39/00		
CPC分类号	A61K39/0008 C07K2317/567 C07K16/4291 A61K39/0005 A61K2039/505 C07K2317/55 C07K2317/24 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/04 A61P37/04 A61P37/08		
优先权	PCT/US2004/002892 2004-02-02 WO PCT/US2004/002894 2004-02-02 WO		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及衍生自IgE的CH3结构域的新的肽表位，这些肽表位被特异性结合IgE的高亲和力抗体识别。这些新的肽可用于对对象进行主动免疫，所述主动免疫通过将这些肽给予对象而在对象体内产生高亲和力抗体实现；这些新的肽还可用于对对象进行被动免疫，所述被动免疫通过在非人宿主体内产生特异性结合IgE的这些区域的高亲和力抗IgE抗体实现。

CDR1		CDR1	
P PASLQWYLI	SEQ ID NO 6	YH-WLS	SEQ ID NO 7
F TQWRKQNH	SEQ ID NO 8	YH-WYF	SEQ ID NO 9
45 RASQKSTNI	SEQ ID NO 7	42 YYYLE	SEQ ID NO 8
CDR2			
P YADTIS	SEQ ID NO 5	YKQDIFINRNRKNS	SEQ ID NO 10
F YVSEIS	SEQ ID NO 9	F FIDRITTRNFKTKA	SEQ ID NO 11
F YVSEIV	SEQ ID NO 10	WYDQVHINRNRKNS	SEQ ID NO 12
F YVPRF	SEQ ID NO 11	A1 DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 13
F YVSEK	SEQ ID NO 12	A1 DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 14
CDR3			
YDSDKQK	SEQ ID NO 13	A1 DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 15
YDSDKQK	SEQ ID NO 14	F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 16
CDR4			
F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 15	F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 17
F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 16	F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 18
F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 17	F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 19
F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 18	F DSRDITRNRKTKA	SEQ ID NO 20