

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 16/18

A61K 39/395 C12N 5/12

C12N 15/12

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00807770.3

[43]公开日 2002 年 6 月 5 日

[11]公开号 CN 1352650A

[22]申请日 2000.3.17 [21]申请号 00807770.3

[30]优先权

[32]1999.3.19 [33]US [31]60/125299

[86]国际申请 PCT/US00/07349 2000.3.17

[87]国际公布 WO00/56771 英 2000.9.28

[85]进入国家阶段日期 2001.11.19

[71]申请人 史密丝克莱恩比彻姆公司

地址 美国宾夕法尼亚州

共同申请人 史密丝克莱恩比彻姆有限公司

[72]发明人 Y·S·侯 S·D·霍尔梅斯

A·H·泰勒

S·S·阿布德尔－梅圭德

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 42 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 用于治疗 IL-18 介导疾病的重组 IL-18 拮抗物

[57]摘要

本发明提供了源于高亲和性中和单克隆抗体的嵌合、人源化或其它 IL-18 单克隆抗体,含有该抗体的药物组合物以及治疗和诊断方法。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种啮齿类中和单克隆抗体, 特异于人 IL-18, 并具结合亲和性, 其特征在于解离常数等于或小于约 $3.9 \times 10^{-11} \text{M}$.

2. 权利要求 1 的单克隆抗体, 为大鼠单克隆抗体.

5 3. 权利要求 1 的单克隆抗体, 为小鼠单克隆抗体.

4. 权利要求 2 的单克隆抗体, 含轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 和重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 9.

5. 权利要求 3 的单克隆抗体, 含轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 17 和重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 25.

10 6. 权利要求 2 的单克隆抗体, 含轻链氨基酸序列 SEQ ID NO: 33 和重链氨基酸序列 SEQ ID NO: 41.

7. 权利要求 1 的单克隆抗体, 具 2C10、14B7 或 13G9 的鉴别特征.

8. 产生权利要求 4 单克隆抗体的杂交瘤.

15 9. 产生权利要求 5 单克隆抗体的杂交瘤.

10. 产生权利要求 6 单克隆抗体的杂交瘤.

11. 具细胞系 19522C10(2)F2(1)A1、195214B7(1)H10 及 187413G9(3)F12 的鉴别特征的杂交瘤.

20 12. 中和 Fab 片段或其 F(ab')_2 片段, 由删除权利要求 1 中单克隆抗体 Fc 区得到.

13. 包括重链和轻链的一种修饰抗体, 其重链和轻链框架区来自至少一个选定的抗体, 且各链互补决定区氨基酸序列得自权利要求 1 的单克隆抗体.

25 14. 一种免疫球蛋白轻链互补决定区 (CDR), 其氨基酸序列选自如下序列:

(a) SEQ ID NO: 3

(b) SEQ ID NO: 5

(c) SEQ ID NO: 7

(d) SEQ ID NO: 19

30 (e) SEQ ID NO: 21

(f) SEQ ID NO: 23

(g) SEQ ID NO: 35

(h) SEQ ID NO: 37

(i) SEQ ID NO: 39

15. 一种免疫球蛋白重链互补决定区 (CDR)，其氨基酸序列选自如下序列：

5 (a) SEQ ID NO: 11

(b) SEQ ID NO: 13

(c) SEQ ID NO: 15

(d) SEQ ID NO: 27

(e) SEQ ID NO: 29

10 (f) SEQ ID NO: 31

(g) SEQ ID NO: 43

(h) SEQ ID NO: 45

(i) SEQ ID NO: 47

15 16. 编码权利要求 14 中免疫球蛋白互补决定区 (CDR) 的一种核酸分子。

17. 编码权利要求 15 中免疫球蛋白互补决定区 (CDR) 的一种核酸分子。

18. 一种药物组合物，含权利要求 13 中的修饰抗体和药学上可接受的载体。

20 19. 处理自身免疫疾病相关症状的一种方法，包括向需要病人施用权利要求 13 中的修饰抗体的有效量之步骤。

20. 权利要求 19 的方法，其中该病为多发性硬化。

21. 权利要求 19 的方法，其中该病为类风湿性关节炎或者 I 型或胰岛素依赖性糖尿病。

25 22. 权利要求 19 的方法，其中该病为炎性肠病。

23. 权利要求 19 的方法，其中该病为牛皮癣。

24. 分离的一段核酸序列，选自如下：

(a) 编码权利要求 13 中修饰抗体的一段核酸序列

(b) 互补于 (a) 的一段核酸序列；及

30 (c) (a) 或 (b) 的一个片段或类似物，编码一个蛋白，其特征在于对人白细胞介素-18 具特异性；
其中该序列可选地含限制位点。

25. 评估人体内有无人 IL-18 的一种方法，包括从病人获取生物体液样品，使权利要求 1 中单克隆抗体接触此样品以至能形成 IL-18/单克隆抗体复合物，并检测该 IL-18/单克隆抗体复合物的存在与否。

- 5 26. 辅助诊断自身免疫疾病的一种方法，步骤包括：根据权利要求 25 中的方法测定病人样品中人 IL-18 的量，并将其与正常人群人 IL-18 平均量比较，由此病人的人 IL-18 量显著升高，即为自身免疫疾病的指示。

说明书

用于治疗 IL-18 介导疾病的重组 IL-18 拮抗物

发明领域

- 5 本发明涉及诊断和治疗 IL-18 介导疾病的抗体和修饰抗体，更具体地是单抗，Fab，嵌合及人源化抗体。

发明背景

人白细胞介素-18 近来被鉴定为一种细胞因子，它是作为无生物活性的 193 氨基酸前体蛋白被合成的 (Ushio 等, J. Immunol. 156: 4274, 1996)。受 caspase-1 或 caspase-4 作用，前体蛋白裂解，释放出 156 氨基酸的成熟蛋白 (Gu 等, Science 275: 206, 1997; Ghayur 等, Nature 386: 619, 1997)，其生物活性包括共同刺激 T 细胞增殖，增强 NK 细胞的细胞毒性，诱导 NK 细胞和 T 细胞产生 IFN- γ ，和加强 T 辅助细胞 1 (Th1) 分化 (Okamura 等, Nature 378: 88, 1995; Ushio 等, J. Immunol. 156: 4274, 1996; Micallef 等, Eur. J. Immunol. 26: 1647, 1996; Kohno 等, J. Immunol. 158: 1541, 1997; Zhang 等, Infect. Immunol. 65: 3594, 1997; Robinson 等, Immunity 7: 571, 1997)。此外，IL-18 高效诱导人单核细胞促炎介体，包括 IL-8，肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和前列腺素 E₂ (PGE₂) (Ushio, S. 等, J. Immunol. 156: 4274-4279, 1996; Puren, A. J. 等, J. Clin. Invest. 10: 711-721, 1997; Podolin 等, J. Immunol. submitted, 1999)。

此前克隆的 IL-1 受体相关蛋白 (IL-1 RrpX Parnet 等, J. Biol. Chem. 271: 3967, 1996) 近来被鉴定为 IL-18 受体 (Kd=18nM) (Torigoe 等, J. Biol. Chem. 272: 25737, 1997) 的一个亚基。IL-18 受体的另一个亚基与 IL-1 受体辅助蛋白具有同源性，并称为 AcPL (辅助蛋白类)。IL-18 诱导的 NF- κ B 和 JNK 激活需 IL-1 Rrp 和 AcPL 二者的表达 (Born 等, J. Biol. Chem. 273: 29445, 1998)。除 NF- κ B 和 JNK 外，IL-18 信号也可经 IL-1 受体相关激酶 (IRAK)，p56lck (LCK) 和促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) (Micallef 等, Eur. J. Immunol. 26: 1647, 1996; Matsumoto 等, Biophys Biochem. Res. Comm. 234: 454, 1997; Tsuji-Takayama 等, Biochem. Biophys. Res.

Comm. 237: 126, 1997) 传递。

产生促炎细胞因子如 IFN- γ , IL-2 和 TNF- β (Mosmann 等, J. Immunol. 136: 2348, 1986) 的 Th1 细胞参与介导许多自身免疫疾病, 包括多发性硬化 (MS)、类风湿关节炎 (RA)、I 型或胰岛素依
5 赖性糖尿病 (IDDM)、炎性肠病 (IBD) 和牛皮癣 (Mosmann and Sad, Immunol. Today 17: 138, 1996)。因此, 预期促 Th1 细胞因子如 IL-18 的拮抗将抑制疾病发展。IL-18 特异单抗可用作拮抗物。

IL-18 在自身免疫疾病发展中的作用已证实。相应地, 证实了非
10 肥胖性糖尿病 (NOD) 小鼠发病前, 胰脏中 IL-18 表达迅速而显著增加 (Rothe 等, J. Clin. Invest. 99: 469, 1997)。类似地, 已表明类风湿关节炎病人滑液中 IL-18 水平明显升高 (Kawashima 等, Arthritis and Rheumatism 39: 598, 1996)。进而证实服用 IL-18 加重实验小鼠变态反应性脑脊髓炎 (EAE) 的临床症状, EAE 是一种 Th1 介导的自身免疫疾病, 为多发性硬化模型。此外, 已表明中和
15 抗大鼠 IL-18 抗血清可预防雌路易斯大鼠患 EAE (Wildbaum 等, J. Immunol. 161: 6368, 1998)。由此, IL-18 是发展自身免疫新疗法的理想靶标。

Taniguchi 等, J. Immunol. Methods 206: 107 记述了 7 个小
鼠和 6 个大鼠抗人 IL-18 单抗, 它们结合于 4 个不同的抗原位点。一个
20 小鼠单抗 (#125-2H) 和 6 个大鼠单抗抑制 IL-18 诱导 KG-1 细胞产生 IFN- γ , 这些大鼠单抗的中和活性比 #125-2H 低 10 倍。如蛋白质印迹分析显示, 3 个小鼠单抗但无一大鼠单抗, 与膜结合人 IL-18 强烈反应。此外, 还记述了用 #125-2H 和大鼠单抗检测人 IL-18 的酶联免疫吸附实验 (ELISA)。

25 欧洲专利申请 EP0712931 公开了两个小鼠抗人 IL-18 单抗 H1 (IgG1) 和 H2 (IgM)。如蛋白质印迹分析显示, 此二单抗均与膜结合人 IL-18 反应, 而不与膜结合人 IL-12 反应。H1 在免疫亲和层析中用于纯化人 IL-18, 在 ELISA 中用于测量人 IL-18。H2 在放免实验中用于测量人 IL-18。

30 中和 IL-18 抗体可在缓解人自身免疫疾病及相关症状上有潜在应用。因此, 本领域需要高度亲和 IL-18 的拮抗物, 如人白细胞介素-18 的中和单克隆抗体, 这将减弱 Th1 分化和增殖及自身免疫疾病和

相关症状。

发明概述

首先，本发明提供啮齿类（如大鼠和小鼠）特异于人白细胞介素 18 的中和单克隆抗体，它具有结合亲和性，其特征在于等于或小于约 3.9×10^{-11} M 的解离常数，见详述部分。这些单克隆抗体的示例有大鼠单克隆抗体 2C10 和大鼠及小鼠单克隆抗体如 14B7 和 13G9。本发明还有关淋巴细胞杂交瘤，如 19522C10(2)F2(1)A1, 195214B7(1)H10 和 187413G9(3)F12。

其次，本发明提供特异于人白细胞介素-18 的中和 Fab 片段或其 $F(ab')_2$ 片段，这些片段可由删除本发明中啮齿类中和单克隆抗体的 Fc 区得到。

再次，本发明提供特异于人白细胞介素-18 的变体抗体及其编码核酸，它包括源于非人中和单克隆抗体 (mAb) 的互补决定区 (CDR)，该单抗特征在于对人白细胞介素-18 等于或小于约 3.9×10^{-11} M 的解离常数。当变体抗体为人源化抗体时，编码来自非人免疫球蛋白互补决定区 (CDR) 的序列插入至第一免疫球蛋白配偶体，其中第一免疫球蛋白配偶体互补决定区 (CDR) 的至少一个且优选全部由非人单克隆抗体的 CDR 置换。优选地，第一免疫球蛋白配偶体也与第二免疫球蛋白配偶体有效地连接，这包括免疫球蛋白恒定链的全部或一部分。

又次，本发明提供来自非人中和单克隆抗体 (mAbs) 的 CDR，其特征在于对人白细胞介素 18 等于或小于约 3.9×10^{-11} M 的解离常数，及编码此 CDR 的核酸分子。

又次，还提供嵌合抗体，它含来自非人中和单克隆抗体的人重链和轻链恒定区及重链和轻链可变区，其特征在于对人白细胞介素 18 等于或小于约 3.9×10^{-11} M 的解离常数。

又次，本发明提供一种药物组合物，它含上述修饰抗体之一（或更多）及药学上可接受的载体。

又次，本发明提供一种疗法，通过服用本发明中药物组合物之有效量来治疗人 Th1 过量相关的异常，如自身免疫疾病。

又次，本发明提供修饰抗体（如工程抗体、CDR、Fab 片段或其 $F(ab')_2$ 片段）重组生产的方法及有用组分，这些修饰抗体来自非人中和单克隆抗体 (mAbs)，其特征在于对人 IL-18 等于或小于约 3.9

$\times 10^{-11}$ M 的解离常数。这些组分包括编码人 IL-18 的分离核酸序列，和含受控于选定调控序列之核酸序列的重组质粒，这些调控序列能指导重组质粒转染的宿主细胞（优选哺乳类）表达。生产方法包括培养本发明中的转染宿主细胞系等，以至在该细胞中表达修饰抗体，优选人源化抗体并分离其中表达产物。

又次，本发明提供一种诊断人 Th1 过量产生相关病变的方法，它包括从病人取得生物体液样品，使本发明的抗体和修饰抗体与此样品接触以至形成 IL-18/抗体（单克隆或修饰）复合物，并检测该 IL-18/抗体复合物的存在与否。

本发明的其他方面和优点将在详述部分和优选实施方案中进一步阐明。

附图简述

图 1 [SEQ ID NOS: 1 和 2] 示大鼠抗体 2C10 的轻链可变区。图 1 含双链序列数据。框盒部分示 CDR's [SEQ ID NOS: 3-8]。黑体部分示简并引物序列。

图 2 [SEQ ID NOS: 9 和 10] 示大鼠抗体 2C10 的重链可变区。图 2 含双链序列数据。框盒部分示 CDR's [SEQ ID NOS: 11-16]。黑体部分示简并引物序列。

图 3 [SEQ ID NOS: 17 和 18] 示小鼠抗体 13G9 的轻链可变区。图 3 含双链序列数据。框盒部分示 CDR's [SEQ ID NOS: 19-24]。黑体部分示简并引物序列。

图 4 [SEQ ID NOS: 25 和 26] 示小鼠抗体 13G9 的重链可变区。图 4 含双链序列数据。框盒部分示 CDR's [SEQ ID NOS: 27-32]。黑体部分示简并引物序列。

图 5 [SEQ ID NOS: 33 和 34] 示大鼠抗体 14B7 的轻链可变区。图 5 含双链序列数据。框盒部分示 CDR's [SEQ ID NOS: 35-40]。黑体部分示简并引物序列。

图 6 [SEQ ID NOS: 41 和 42] 示大鼠抗体 14B7 的重链可变区。图 6 含双链序列数据。框盒部分示 CDR's [SEQ ID NOS: 43-48]。黑体部分示简并引物序列。

发明详述

本发明提供各种抗体和修饰抗体及其片段，其特征在于人 IL-18

结合特异性，中和活性，和对人 IL-18 高亲和性，例见大鼠单克隆抗体 2C10，小鼠单克隆抗体 13G9 和大鼠单克隆抗体 14B7。本发明抗体的制备是由传统的杂交瘤技术来产生新的中和抗体。这些产品作为治疗和药物组合物用于治疗 IL-18 介导疾病，如自身免疫疾病，包括多发性硬化（MS）、类风湿关节炎、（RA）I 型或胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）、炎性肠病（IBD）和牛皮癣（Mosmann and Sad, Immunol. Today 17: 138, 1996）。这些产品还用于由测量（如酶联免疫吸附实验（ELISA））人内源 IL-18 水平或来自体内激活细胞释放的 IL-18 来诊断 IL-18 介导的症状。

10 I 定义

“修饰抗体”指由修饰免疫球蛋白编码区编码的蛋白质，可由选定宿主细胞表达获得。这些修饰抗体为工程抗体（如嵌合或人源化抗体）或免疫球蛋白恒定区全部或部分缺失的抗体片段，如 F_v，Fab，F(ab)₂ 等。

15 “修饰免疫球蛋白编码区”指编码本发明中修饰抗体的核酸序列。当修饰抗体为 CDR 移植或人源化抗体时，来自非人免疫球蛋白的互补决定区（CDR）的编码序列被插入至含人可变构架序列的第一免疫球蛋白配偶体。可选地，第一免疫球蛋白配偶体可有效地连于第二免疫球蛋白配偶体。

20 “第一免疫球蛋白配偶体”指编码人框架区或人免疫球蛋白可变区的核酸序列，其中天然（或天然发生）CDR 编码区由供体抗体的 CDR 编码区置换。人可变区可以是免疫球蛋白重链，轻链（或二链），类似物或其功能片段。这些位于抗体（免疫球蛋白）可变区内的 CDR 区可由技术上已知的方法测定。如 Kabat 等（重要免疫蛋白序列，第 4 版，美国卫生与民政部，国立卫生研究院（1987））公开了定位 CDR 的规则。此外，还有用于鉴定 CDR 区/结构的计算机程序。

25 “中和”指抑制 IL-18 活性的抗体，二者结合可阻止人 IL-18 与其特异受体结合，或结合后抑制 IL-18 经由其受体的信号途径。单抗中和指它在 IL-18 中和实验中被测为 90%有效，优选 95%有效和最优 100%有效地抑制 IL-18 活性，见例 1 和表 I。

术语“高亲和性”指抗体的结合亲和性特征在于光生物传感分析测定的对人 IL-18 的 K_d 等于或小于 3.9×10^{-11} M（见例 2 和表 I）。

“对人 IL-18 结合特异性”指对人 IL-18 的亲合性高于对小鼠或其他 IL-18。

“第二免疫球蛋白配偶体”指另一核苷酸序列，它编码的蛋白或多肽中，第一免疫球蛋白配偶体已框内融合或通过可选的传统连接序列融合（即有效连接）。优选地，这是一个免疫球蛋白基因。第二免疫球蛋白配偶体可包括为相同（即同源——第一和第二修饰抗体来源相同）或另外（即异源）抗体编码完整恒定区的核酸序列。它可为免疫球蛋白重链或轻链（或二链作为单一多肽的一部分）。第二免疫球蛋白配偶体不限于特殊免疫球蛋白类别或同型。此外，第二免疫球蛋白配偶体可含一部分免疫球蛋白恒定区，如见于 Fab, F(ab)₂ 者（即相应人恒定区或框架区的一个分离部分）。此第二免疫球蛋白配偶体也可含暴露于宿主细胞外表面的膜内在蛋白编码序列，如噬菌体展示文库的一部分，分析或诊断检测蛋白的编码序列，如辣根过氧化物酶，β-半乳糖苷酶等。

术语 Fv, Fc, Fd, Fab 或 F(ab)₂ 按其标准含义使用（例见 Harlow 等，抗体实验手册，冷泉港实验室（1988））。

“工程抗体”此处指一类修饰抗体，即全长合成抗体（如与一抗体片段相对的嵌合或人源化抗体），其中选定受体抗体轻链和/或重链可变区的一部分由对选定抗原决定基具特异性的一或多个供体抗体的类似部分所置换。例如，这些分子可含特征在于一条人源化重链与一条未经修饰的轻链（或嵌合轻链）相联的抗体，反之亦然。工程抗体的特征也可以是受体抗体轻链或重链可变域框架区编码核酸序列的修饰，来保留供体抗体结合特异性。这些抗体可包括由此处所述供体抗体 CDR 对受体抗体一或多个（优选全部）CDR 的置换。

“嵌合抗体”指一类工程抗体，它含来自供体抗体的天然可变区（轻链和重链）并与来自受体抗体轻链和重链恒定区相缔合。

“人源化抗体”指一类工程抗体，其 CDR 来自非人供体免疫球蛋白，此分子其余免疫球蛋白源的部分来自一（或多）个人免疫球蛋白。此外，构架支持残基可变动以保留结合亲和性（例见 Queen 等，Proc. Natl Acad Sci USA, 86: 10029-10032 (1989)，Hodgson 等，Bio/Technology, 9: 421 (1991)）。

术语“供体抗体”指抗体（单克隆或重组），将其可变区，CDR，

或其他功能片段或其类似物的核酸序列贡献给第一免疫球蛋白配偶体，从而提供修饰免疫球蛋白编码区并导致表达修饰抗体，它具有供体抗体的抗原特异性和中和活性特征。适用于本发明的一个供体抗体是记作 2C10 的非人（即大鼠）中和单克隆抗体。抗体 2C10 定义为高亲和性，人 IL-18 特异的（即不识别小鼠 IL-18）同型 IgG_{LK} 中和抗体，它分别在适当小鼠 IgG 恒定区具有 SEQ ID NO:1 的可变轻链 DNA 序列和 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，及 SEQ ID NO:9 可变区重链 DNA 序列和 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。

术语“受体抗体”指与供体抗体异源的（单克隆或重组）抗体，它将其重链和/或轻链框架区和/或其重链和/或轻链恒定区编码核酸序列的全部（或任一部分，但优选全部）贡献给第一免疫球蛋白配偶体。优选人抗体为受体抗体。

“CDR”定义为抗体互补决定区氨基酸序列，是免疫球蛋白重链和轻链的超变区。例见 Kabat 等重要免疫蛋白序列，第 4 版，美国卫生与民政部，国立卫生研究院（1987）。免疫球蛋白可变区有三个重链和三个轻链 CDR（或 CDR 区）。因此，“CDR”用于此处指全部三个重链 CDR 或全部三个轻链 CDR（或全部重链和全部轻链 CDR）。

CDR 为抗体结合抗原或抗原决定基提供大部分接触残基。本发明中的 CDR 来自供体抗体可变重链和轻链序列，并包括天然 CDR 的类似物，该类似物共享或保留与其来源供体抗体同样的抗原结合特异性和/或中和能力。

共享抗原结合特异性或中和能力指，例如，尽管单抗 2C10 的特征在于一定水平的抗原亲和性，2C10 核酸序列编码的 CDR 在适当的结构环境中可有或更低或更高的亲和性。

预期 2C10 的 CDR 在此环境仍将识别与 2C10 相同的抗原决定基。2C10 的轻链 CDR 的示例有：

SEQ ID NO: 3;

SEQ ID NO: 5;

SEQ ID NO: 7;

2C10 重链 CDR 的示例有：

SEQ ID NO: 11;

SEQ ID NO: 13;

及 SEQ ID NO: 15.

“功能片段”为部分重链或轻链可变序列（例如，免疫球蛋白可变区氨基或羧基端的少量删除），保留与其来源抗体相同的抗原结合特异性和/或中和能力。

5 “类似物”是至少有一个氨基酸被修饰的氨基酸序列，该修饰可是化学的或若干氨基酸（即不多于 10 个）的替换或重排，该修饰允许氨基酸序列保留未经修饰序列的生物特性，如抗原特异性和高亲和性。例如，（沉默）突变可由替换构建，这时 CDR 编码区内或附近制造了特定限制酶限制位点。

10 类似物也可是等位变异。“等位变异或修饰”是本发明氨基酸或多肽序列的编码核酸序列的改变。此变异或修饰可以是由于遗传密码简并或可以是蓄意设计来提供所需特性的。这些变异或修饰可以或不导致被编码氨基酸序列的改变。

术语“效应剂”指非蛋白载体分子，可由传统方法联结修饰抗体和/或供体抗体的天然或合成轻链或重链或其他片段。此非蛋白载体可包括用于诊断领域的常规载体，如聚苯乙烯或其他塑料珠，如用于 BIAcore[Pharmacia]系统的多糖，或其他医用且人畜安全的非蛋白质。其他效应剂可包括用于络合重金属原子或放射性同位素的大环分子。这些效应剂可用于提高修饰抗体的半衰期，如聚乙二醇。

20 II 高亲和性的 IL-18 单克隆抗体

为用于构建本发明的抗体，修饰抗体和片段，非人物种（如，牛，羊，猴，鸡，啮齿类（如小鼠和大鼠）等）将用来生产所需的免疫球蛋白和天然人 IL-18 或其多肽抗原决定基。传统杂交瘤技术用于提供分泌 IL-18 非人单抗的杂交瘤细胞系。然后用 IL-18 包被的 96 孔板
25 筛选结合的杂交瘤，述于实施例部分，或用生物素化的 IL-18 结合链霉亲和素包被的板。

本发明中高亲和性中和单抗的一个例子是单抗 2C10，一种可用于发展嵌合或人源化抗体的大鼠抗体，详述于实施例。2C10 单抗的特征在于对人 IL-18 的 K_d 约为 $3.9 \times 10^{-11} M$ 的抗原结合特异性。此单抗的特征在于同型 IgG_{LK}。
30

另一所需供体单抗为小鼠单抗 13G9。此该单抗的特征在于同型 IgG_{LK}。该单抗对 IL-18 的解离常数约为 $12 \times 10^{-9} M$ 。

另一所需供体单抗为大鼠单抗 14B7。此单抗对 IL-18 的解离常数约为 $1.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 。14B7 的特征也在于同型 IgG_{LK}。

本发明不限于 13G9, 2C10, 14B7 或其超变 (即 CDR) 序列的应用。因此, 任何其他特征在于对人 IL-18 的解离常数等于或小于 $3.9 \times 10^{-11} \text{M}$ 的相应高亲和性 IL-18 抗体和相应的抗 IL-18 CDR 均可被取代。下述供体抗体鉴定为 13G9, 2C10, 14B7, 此定义只为图解和叙述简明。

III 抗体片段

本发明还包括来自针对人 IL-18 的单抗的 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段的应用。这些片段用作体内针对 IL-18 和 Th1 介导症状的保护剂或体外 IL-18 的部分诊断。Fab 片段含重链氨基端部分和完整的轻链; F(ab')₂ 片段由二个 Fab 片段通过二硫键键合而成。单抗 13G9、2C10、14BF 和其他类似的高亲和性 IL-18 结合抗体提供了 Fab 片段和 F(ab')₂ 片段的来源, 这可由传统方法得到, 如以相应蛋白水解酶, 木瓜蛋白酶和/或胃蛋白酶裂解单抗, 或通过重组方法得到。这些 Fab 和 F(ab')₂ 片段本身可用作治疗剂、预防剂或诊断剂, 并作为含可变区和 CDR 序列的序列供体用于形成述于此的重组或人源化抗体。

Fab 和 F(ab')₂ 片段构建可通过重组噬菌体库 (例见 Winter 等, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)) 或通过免疫球蛋白链改组 (例见 Marksets 等, Bio/Technology, 10:779-783 (1992), 全文引作参考), 其中来自选定抗体 (如 13G9) 的 Fd 或 V_H 免疫球蛋白可结合轻链免疫球蛋白的全部组分, V_L (或 V_K) 来形成新的 Fab, 反之, 选定抗体的轻链免疫球蛋白可结合全部重链免疫球蛋白, V_H (或 Fb), 来形成新的 Fab。

IV 目的抗 IL-18 氨基酸和核苷酸序列

单抗 2C10 或上述其他抗体可贡献序列, 如可变重链和/或轻链多肽序列、框架序列、CDR 序列、功能片段及其类似物和其编码核酸序列, 用于设计和获得各种修饰抗体, 其特征不在于供体抗体的抗原结合特异性。

作为一例, 本发明提供 IL-18 单抗 2C10 的可变轻链和可变重链序列及其衍生序列。

本发明中编码可变轻链和重链多肽序列的核酸序列或其片段还

用于在 CDR 或框架区编码核酸序列内引入特异突变, 及将所得修饰或融合核酸序列整合至表达质粒。

考虑到遗传密码的简并性, 可构建各种编码序列来编码本发明的可变重链和轻链氨基酸序列, CDR 编码序列、功能片段及其类似物, 它们共享供体抗体的抗原特异性。本发明中分离的编码可变链肽序列或 CDR 的核苷酸序列或其片段, 当有效结合第二免疫球蛋白偶联体时, 可用于产生本发明的修饰抗体, 如嵌合或人源化抗体, 或其他工程抗体。

应注意除述于此的编码修饰抗体和抗体一部分的分离核苷酸序列外, 本发明中还包括其他这样的核苷酸序列, 如互补于天然 CDR 编码序列的或互补于 CDR 编码区周围经修饰的人框架区的序列。有用的 DNA 序列包括在严紧杂交条件下 (见 T. Maniatis 等, 分子克隆, (实验室手册), 冷泉港实验室 (1982), 387-389 页) 与这些 DNA 序列杂交的那些序列。这样严紧杂交条件的一个例子是于 65℃ 在 4 × SSC 杂交, 然后于 65℃ 在 0.1 × SSC 洗涤一小时。另一严紧杂交条件的例子是于 42℃ 在 50% 甲酰胺和 4 × SSC。优选地, 这些杂交 DNA 序列至少约 18 核苷酸长, 即约一个 CDR 大小。

V 修饰免疫球蛋白分子和修饰抗体

修饰免疫球蛋白分子可编码修饰抗体, 它包括如嵌合抗体和人源化抗体的工程抗体。理想的修饰免疫球蛋白编码区含 CDR 编码区, 其编码的多肽具 IL-18 抗体的抗原特异性, 优选地, 如本发明提供的高亲和性抗体, 被插入至第一免疫球蛋白偶联体 (人框架区或人免疫球蛋白可变区)。

优选地, 第一免疫球蛋白偶联体有效地连接于第二免疫球蛋白偶联体, 第二免疫球蛋白偶联体定义于上, 可含序列编码感兴趣的第二抗体区, 如 Fc 区。第二免疫球蛋白偶联体还可含编码另一免疫球蛋白的序列, 轻链或重链恒定区与其框内融合或由连接序列融合。针对 IL-18 功能片段或其类似物的工程抗体, 可设计为诱导与相同抗体的增强结合。

第二免疫球蛋白偶联体也可结合以上定义的效应剂, 包括非蛋白载体分子, 第二免疫球蛋白偶联体可由传统方式与其有效连接。

第二免疫球蛋白伴侣如抗体序列和效应剂之间的融合或连接, 可

通过任何适当的方式，如传统的共价键或离子键、蛋白融合，或异源双功能交联剂，如碳二亚胺、戊二醛等。这些技术已知并详述于传统的化学和生物化学教材中。

此外，仅为第二免疫球蛋白偶联体和效应剂之间提供理想空间的传统连接序列，也可被构建至修饰免疫球蛋白编码区。这些连接序列的设计已为本领域的技术人员所熟知。

另外，本发明中的分子信号序列可经修饰增强表达。

示例修饰抗体含可变重链和/或轻链多肽或蛋白序列，它对单抗 2C10，如 V_H 和 V_L 链的抗原特异性。本发明中又一理想修饰抗体的特征在于其氨基酸序列，含至少一个、优选全部大鼠抗体分子 2C10 重链和/或轻链可变区 CDR，而其余部分源于人，或功能片段或其类似物。

在另一实施方案中，本发明的工程抗体可结合其他因子。例如，重组 DNA 技术过程可用于生产本发明的工程抗体，其中完整抗体分子的 Fc 片段或 CH2 CH3 域已由酶或其他可检测的分子（即多肽效应剂或报告分子）所置换。

第二免疫球蛋白偶联体也可有效连接于非免疫球蛋白多肽、蛋白或其含 CDR 的异源序列片段，如具大鼠 2C10 的抗原特异性的序列。产物蛋白表达时可既显示抗 IL-18 抗原特异性，又可显示非免疫球蛋白的特征。该融合偶联体特征可以是，例如功能特征，如另一结合或受体域，或若该融合偶联体本身即为一种治疗蛋白，可以为其他治疗特征或其他抗原特征。

本发明的另一理想蛋白可含完整的抗体分子，具全长重链和轻链，或其任意分离片段，如 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段，重链双体或其任意最小重组片段，如 Fv 或单链抗体（SCA）或具与选定供体单抗如单抗 2C10 相同特异性的任何其他分子。此蛋白可以修饰抗体形式或其未融合形式应用。

无论何时第二免疫球蛋白偶联体源于供体抗体之外的抗体，如免疫球蛋白构架或恒定区的任意同型或类别，即得到一个工程抗体。工程抗体所含免疫球蛋白（Ig）恒定区和可变框架区来自单一来源，如受体抗体，和供体抗体的一个或多个（优选全部）CDR，如此处所述的抗 IL-18 抗体。此外，受体单抗轻链和/或重链可变域框架区核苷

酸或氨基酸水平或供体 CDR 区的修饰，如删除、替换或添加，可用来保留供体抗体抗原结合特异性。

这样的工程抗体设计为利用 IL-18 单抗（可选如所述经修饰的）可变重链和/或轻链之一（或二者）或者一或多个以下鉴定的重链或轻链 CDR，这些工程抗体预期将被中和，即它们如期阻断结合 IL-18 蛋白受体，它们还阻断或防止 IL-18 依赖细胞的增殖。

这样的工程抗体可包括含选定人免疫球蛋白或亚型框架区的人源化抗体，或含与 IL-18 抗体功能片段融合的人重链和轻链恒定区的嵌合抗体。适宜的人（或其他动物）受体抗体可由同源与供体抗体的核苷酸和氨基酸序列选自传统数据库，如 KABAT® 数据库，Los Alamos 数据库，和瑞士蛋白数据库。特征在于与供体抗体框架区同源（基于氨基酸）的人抗体可适于为供体 CDR 插入提供重链恒定区和/或重链可变框架区。能给出轻链恒定区或可变框架区的适宜受体抗体可以类似方式选择。应注意，不要求受体抗体重链和轻链源于同一受体抗体。

理想地，异源框架区和恒定区选自人免疫球蛋白类别和同型，如 IgG（亚型 1 至 4），IgM，IgA 和 IgE。然而受体抗体不必只包括人免疫球蛋白蛋白序列。例如，可构建一个基因，其中编码部分人免疫球蛋白链的 DNA 序列融合编码非免疫球蛋白氨基酸序列，如多肽效应剂或报告分子的 DNA 序列。

特别理想的人源化抗体将含 2C10 的 CDR 插入至选定的人抗体序列框架区。为中和人源化抗体，IL-18 抗体重链和/或轻链可变区的一个，两个或优选地三个 CDR 被插入至选定人抗体序列框架区，取代后者抗体的天然 CDR。

优选地，在人源化抗体，人重链和轻链可变域已被一或多个 CDR 置换所工程化。用全部六个 CDR 或少于六个 CDR 的各种组合是可能的。优选地，全部六个 CDR 被取代。用人受体抗体未经修饰的轻链作轻链，而只在人重链取代 CDR 是可能的。或者，可依赖于传统抗体数据库从另一人抗体选择兼容的轻链。工程抗体的其余部分可源于任意适宜的受体人免疫球蛋白。

人源化工程抗体优选地具有天然人抗体或其片段的结构，并具备有效治疗应用，如治疗 IL-18 介导的人炎症疾病或诊断应用所需的若

于特性组合。

另一例，工程抗体可含 2C10 可变轻链区和 13G9 可变重链区的 CDR。产物人源化抗体的特征在于与单抗 2C10 相同的抗原结合特异性和亲和性。

5 本领域的技术人员将理解工程抗体可由可变域氨基酸变化进一步修饰而不必影响供体抗体（即一种类似物）的特异性和高亲和性。预期重链和轻链氨基酸可由可变域构架或 CDR 或二者上的其他氨基酸所替换。

10 此外，可改变恒定区来增强或减弱本发明分子的选择特性。例如，二聚化，与 Fc 受体结合，或结合并激活互补的能力（例见 Angal 等，Mol. Immunol. 30:105-108(1993)；Xu 等，J. Biol. Chem. 269:3469-3474(1994)；Winter 等，EP 307,434-B）。

15 作为嵌合抗体的修饰抗体与上述人源化抗体不同，在于它提供完整非人供体抗体重链和轻链可变区，包括构架区及人免疫球蛋白二链的恒定区。预期相对于本发明人源化抗体保留额外的非人类序列的嵌合抗体可诱发人显著的免疫反应。

这样的抗体可用于 IL-18 介导疾病的预防和治疗，讨论如下。

VI 修饰抗体和工程抗体的生产

20 优选地，单抗 2C10 或其他适宜供体单抗的可变轻链和/或重链序列和 CDR 及其编码序列，用来构建本发明的修饰抗体。优选地人源化抗体，过程如下。相同或类似的技术也可用于得到本发明的其他实施方案。

25 生产选定供体单抗如大鼠抗体 2C10 的杂交瘤，按传统方式克隆，并由本领域技术人员熟知的技术，如 Sambrook 等记述的技术（分子克隆，（实验室手册），第二版，冷泉港实验室（1989）），得到其重链和轻链可变区 DNA。可用多核苷酸引物和逆转录酶得到 2C10 含至少 CDR 编码区的可变重链和轻链区、受体单抗轻链和/或重链可变域构架区的那些所需部分，来保留供体单抗结合特异性，及源于人免疫球蛋白的抗体链的其余免疫球蛋白来源部分。使用已知数据库并
30 与其他抗体比较，鉴定了 CDR 编码区。

然后可制备大鼠/人嵌合抗体并测定结合力。此嵌合抗体含完整非人供体抗体 V_H 和 V_L 区，结合人 Ig 恒定区的两链。

人源化抗体可来源于嵌合抗体，或者优选地，由将把重链和轻链的供体单抗 CDR 编码区适当地插入至被选定的重链和轻链构架中而合成的。或者，本发明的人源化抗体可用标准诱变技术制备。因此，所得的人源化抗体含人框架区和供体单抗 CDR 编码区。其次是构架残基的调整。所得的人源化抗体可在重组宿主细胞如 COS, CHO 或骨髓瘤细胞中表达。其他的人源化抗体可用此技术在别的合适的 IL-18 特异的、中性的、高亲和的及非人的抗体中制备。

常规的表达载体或重组质粒由将修饰抗体编码序列置于与常用调控序列有效联结而成，这些调控序列能控制其在宿主细胞中的复制、表达和/或分泌。调控序列包括启动子序列，如 CMV 启动子及来自其他已知抗体的信号序列。类似地，也可生成另一表达载体，它具有编码互补抗体轻链或重链的 DNA 序列。优选地，就编码序列和可选择标记而言，除了尽可能保证每一多肽链被功能表达外，后一表达载体与前一表达载体是相同的。或者，修饰抗体重链和轻链编码序列可定位在一个单一载体上。

由常规技术，选定宿主细胞可被第一和第二载体（或由单一载体简单转染）共转染形成本发明转染中的宿主细胞，它包括重组或合成的轻链和重链，可由常规技术培养转染细胞来生产本发明的工程抗体。含重组重链和/或轻链缔合的人源化抗体由合适的方法如 ELISA 或 RIA 在培养物中筛选到。类似的常规技术可用于构建本发明的其他修饰抗体和分子。

本领域技术人员可选用用于本发明方法和构建部分克隆和亚克隆步骤的适宜载体。例如，可用常用的 pUC 系列克隆载体。所用载体 pUC19 是来自供应商，如 Amersham (Buckinghamshire, 英国) 或 Pharmacia (Uppsala, 瑞典)。另外，易于复制的，具有多克隆位点和可选择基因（如抗生素抗性）的，且易于操作的任何载体都可用于克隆。因此，克隆载体的选择不是本发明的一个限制因素。

类似地，根据本发明，工程抗体表达中使用的载体可由本领域的技术人员从常规载体中选择。这些载体还含在选定的宿主细胞中指导异源 DNA 序列复制和表达的选定调控序列（如 CMV 启动子）。这些载体含上述的编码工程抗体或免疫球蛋白编码区的 DNA 序列。另外，这些载体可包括因方便操作而插入了理想的限制位点的选定免疫球蛋

白序列。

5 这些表达载体的特征也在于适于扩增异源 DNA 序列的基因，如哺乳动物二氢叶酸还原酶基因 (DHFR)。其他优选的载体序列包括 poly A 信号序列，如源于牛生长激素 (BGH) 和 β -珠蛋白启动子 (β -glopro)，用于此的表达载体可由本领域的技术人员熟知的技术合成。

10 这些载体的成分如复制子、选择基因、增强子、启动子、信号序列等，可从商业或自然界中获得，也可由用于指导选定宿主的重组 DNA 产物的表达和/或分泌的已知程序合成。本领域中已知的许多用于哺乳动物、细菌、昆虫、酵母和真菌表达其他的适宜表达载体也可为此而选用。

15 本发明也包括由重组质粒转化的细胞系。该重组质粒含其工程抗体或修饰免疫球蛋白分子的编码序列。用于这些克隆质粒的克隆及其他操作的宿主细胞也是常用的。然而，最理想地，来自大肠杆菌不同株细胞被用于克隆载体复制和本发明的修饰抗体构建中的其他步骤。

20 用于本发明工程抗体或修饰抗体表达的适宜宿主细胞或细胞系优选地是哺乳细胞，如 CHO、COS、成纤维细胞（如 3T3）和骨髓细胞，更优选地是 CHO 或骨髓细胞，人细胞可被选用。因此，可用人细胞，因而能用人糖苷化模型修饰分子。或，也可用其他真核细胞株。合适哺乳动物细胞的选用及转化、培养、扩增、筛选及产物形成和纯化的方法在技术上已知。例见以上引用的 Sambrook 等。

25 可证明细菌细胞适于作为本发明重组 Fabs 表达的宿主细胞（例见 Plückthun, A., Immunol. Rev., 130:151-188 (1992)）。然而，由于细菌细胞表达蛋白有非折叠或非正确折叠的形式或非糖苷化形式的趋向，细菌细胞表达的任何重组 Fab 必须检测其抗原结合能力的存留。如果细菌细胞表达的分子以正确折叠的方式产生，该细菌细胞将应是理想的宿主。如用于表达的大肠杆菌不同株在生物技术领域已知为宿主细胞。芽孢杆菌、链丝菌及其他杆菌等菌株也可用于此方法中。

30

需要时，本领域技术人员熟知的酵母细胞株也适于用作宿主细胞，也可以是昆虫细胞，如果蝇和鳞翅目昆虫及病毒表达系统，例见

Miller 等, Genetic Engineering, 8: 277-298, Plenum Press(1986) 及其引用文献。

5 本发明载体构建的常用方法, 本发明宿主细胞所需的转化方法及从此宿主细胞生产修饰抗体的必需培养方法都是常规技术。同样, 本发明的修饰抗体一旦产生, 就可从细胞培养物中根据本领域标准程序纯化, 标准操作步骤包括硫酸铵沉降、亲和柱、柱层析、凝胶电泳等。这些技术是本领域的熟知技术且不限制本发明。

10 而人源化抗体表达的另一方法可利用转基因动物的表达, 如述于美国专利号 4873316 的方法。这涉及到一个用动物酪蛋白启动子的表达系统, 该启动子若转基因导入哺乳动物, 可使雌性动物在奶中产生期望的重组蛋白。

15 工程抗体一旦用适宜方法表达出, 即可用合适的检测方法在体外被检测到。目前常用的 ELISA 检测方法可用于评估工程抗体对 IL-18 的定性及定量结合。另外, 在人临床研究以估计体内工程抗体的持久性之前, 其他体外方法也可用来验证其中和功效。

20 所述制备人源化抗体的一般程序后, 本领域技术人员也可以由从其他供体 IL-18 抗体, 可变区序列及此处所述 CDR 多肽来构建人源化抗体。工程抗体也可由工程抗体受体接受者潜在识别为“自我”的可变区构架产生。不需要对接受者大幅度提高免疫原性, 对可变区框架少量的修饰可使抗原结合能力大大的提高, 这些工程抗体能有效地治疗人 IL-18 介导疾病, 还可以用于这类疾病的诊断。

VII 治疗/预防应用

25 本发明还关于治疗患自身免疫相关症状, 如 MS 的一种方法, 它包括服用有效量的抗体, 包括一或多个述于此的工程抗体或修饰抗体或其片段。

使用本发明的分子诱导的治疗反应由与人 IL-18 结合并随后阻断 Th1 刺激而产生。这样, 当制备和构建适于治疗应用时, 本发明的分子对患自身免疫疾病, 如但不限于 MS、RA、IDDM、IBM 和牛皮癣的那些人非常理想。

30 本发明的修饰抗体抗体及其片段还可用于偶联其他抗体特别是人单抗, 它们与特定症状相关的标记(抗原决定基)反应, 这些抗体是针对所述症状产生的。

本发明的治疗剂据信治疗自身免疫病约 2 日至 6 个月是理想的，或根据自身免疫症状调整。如当治疗 MS 或类似症状时，可以需更长期的治疗。治疗剂量和持续时间与本发明的分子在人体循环中相对持续时间有关，并由本领域技术人员依受治疗症状和病人的健康状况来调整。

本发明治疗剂的服用方式可以是将药剂送达受治者的任何适当途径。本发明的修饰抗体，抗体工程抗体及其片段和药物组合物对肠胃外服用，即皮下、肌肉、静脉，鼻内尤其有用。

本发明的治疗剂可制备为药物组合物，其中含本发明工程（如人源化）抗体的有效量，作为药学上可接受载体的活性成分。在本发明的预防剂中，最好是含工程抗体的水悬液或溶液，优选地缓冲至生理 pH，便于注射的形式。肠胃外服用的组分一般包括本发明的工程抗体的溶液或其混合物，溶于药学上可接受的载体，优选水相载体，可采用各种水相载体，如 0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸等。这些溶液无菌且一般无微粒物质。这些溶液可由常规已知的灭菌技术（如过滤）消毒。组分含所需的药学上可接受的辅助物质来接近生理条件，如 pH 调节和缓冲剂等。本发明的抗体在此药剂中的浓度可变化很大，即从重量百分浓度约 0.5%，通常或至少约 1% 到多至 15% 或 20%，并主要根据液体体积、粘性等选定，取决于选定的特定的服用方式。

这样本发明的药物组合物的肌肉注射液可制为含 1mL 无菌缓冲水和约 1ng 至约 100mg，如约 50ng 至约 30mg 或更优选地，约 5mg 至约 25mg 本发明的工程抗体。类似地，本发明的药物组合物的静脉注射液可制为含约 250mL 无菌林格液和约 1 至约 30，和优选 5mg 至约 25mg 本发明的工程抗体，制备肠胃外服用组合物的实际方法已众所周知，或将为本领域技术人所理解，并详述于文献中，如 Remington 药学科学第 15 版，Mack 出版公司，Easton，宾西法尼亚。

药物制备中，本发明的治疗剂宜以单位剂量提供。相应的治疗有效剂量易于由本领域技术人员决定。为有效治疗人或其他动物炎症疾病，每 70kg 体重约 0.1mg 至约 20mg 本发明的蛋白或抗体剂量应肠胃外服用，优选静脉或肌肉注射。必要时，此剂量可由医生在治病中的适当时间间隔重复使用。

本发明的修饰抗体和工程抗体也可用于诊断方法，如确定 IL-18

介导疾病或此类疾病的跟踪治疗。作为诊断剂，这些抗体可被常规地标记，用于 ELISA 或其他常规测试方式来测量血清中、胞浆中或其他相应组织或培养人细胞释放的 IL-18 水平。修饰抗体应用的测试实质上是常规的，并不限制在此公开的内容。

5 这样，本发明的一个实施方案关于辅助诊断自身免疫疾病和与病人过量 Th1 T 细胞产生相关的其他症状的一种方法。其步骤包括确定取自病人的样品（胞浆或组织）中人 IL-18 的量，并将其与正常人群人 IL-18 平均量相比较，由此病人样品中 IL-18 量显著升高，即为自身免疫疾病和与过量 Th1 T 细胞产生相关的其他症状的指标。

10 述于此的抗体、修饰抗体及其片段可冻干保存，并于用前用合适的载体重配。此技术已证实对常见免疫球蛋白有效，且可采用已知的冻干和重构技术。

以下实例解释本发明的各方面，包括示范工程抗体的构建及其在适宜载体或宿主细胞表达，这些实例并不限制本发明的范围。所有氨基酸示为传统的三字或单字符。所有必需限制酶，质粒及其他试剂和材料除非标明，均由商业来源获得。所有通用克隆流程和其他重组 DNA 方法学操作均依上面引用的 T. Maniatis 等，或其第二版（1989），同一出版商 Sambrook 等编。

例 1 IL-18 单抗的生产

20 A. 单克隆抗体生产

小鼠（Balb/c 和 C57BL/6 F1 杂种）或大鼠（Sprague Dawley）以 30 μ g 重组 IL-18 佐剂免疫，4 周后继以 30 μ g IL-18 佐剂。在对 IL-18 血清抗体滴度好的基础上，动物接受 10-30 μ g IL-18（i. p. 盐水）进一步免疫。最后一次免疫后三天行脾脏切除术，小鼠或大鼠脾细胞用于以标准过程（H. Zola 编，单克隆抗体，CRC 出版公司，1987）制备杂交瘤。由有限稀释法克隆阳性杂交瘤。

B. 单抗纯化

按厂商说明，用 ProsepA（Bio Processing, Consett, 英国）层析法分别纯化单抗。单抗由 SDS-PAGE 检测为 >95% 纯。

30 C. 单抗同型化

所有大鼠和小鼠单抗由商品试剂盒（Zymed, Amersham）同型化，且为 IgG 1 κ 。

例 2 测试

A. IL-18 的生物素化

用购自分子探针公司的试剂盒以 10: 1 生物素试剂比例将 IL-18 生物素化。生物素化不影响 IL-18 的生物活性。

5 B. 杂交瘤筛选测试

以链霉亲和素 ($2\mu\text{g}/\text{mL}$, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ PBS) 包被 96 孔板, 4°C 孵育过夜。吸取溶液, 以 $250\mu\text{L}/\text{孔}$ 1% 牛血清清蛋白 (BSA) 于 TBS 缓冲液 (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.02% Kathon, pH7.4) 中封闭非特异结合位点, 室温 5-60 分钟。此后的每一步, 板以洗涤缓冲液 (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% Kathon, pH7.4) 洗涤 4 次。每孔中加入 $100\mu\text{L}$ 测试缓冲液 (0.5% BSA, 0.05% 牛 γ -球蛋白, 0.01% Tween 40, $20\mu\text{M}$ 二乙烯三胺基戊乙酸于 TBS 缓冲液) 中的生物素 IL-18 ($100\text{ng}/\text{mL}$), 板于室温振荡孵育 30min。然后每孔加入 $50\mu\text{L}$ 杂交瘤培养基和 $50\mu\text{L}$ 测试缓冲液, 室温振荡孵育 60min。然后每孔加 $100\mu\text{L}$ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ Eu^{3+} 标记的测试缓冲液中的抗小鼠或抗大鼠抗体。最后加入 $200\mu\text{L}/\text{孔}$ 增强剂 (Wallac), 室温孵育 5min, 测量时间分辨荧光。计数 $>100\text{K}$ 的杂交瘤扩增至 24 孔板。

15 C. 免疫测试

为确定抗 IL-18 单抗的特异性, 以生物素 IL-18 如上包被, 阻断并孵育涂板产生的 96 孔板。所有以下孵育均于室温振荡培养箱中操作。洗涤孔道后, 加入 $50\mu\text{L}$ IL-18 ($3\mu\text{g}/\text{mL}$) 或测试液和 $50\mu\text{L}$ 单抗, 并孵育 60min。洗涤后, 加入 $100\mu\text{L}$ $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ Eu^{3+} 标记的抗小鼠或抗大鼠抗体 60min, 抗体溶于测试缓冲液, 洗涤后加入 $100\mu\text{L}/\text{孔}$ 增强剂 (Wallac), 并室温孵育 5min, 测定时间分辨荧光。所有阳性杂交瘤都显示与 IL-18 结合的移位。

25 D. 中和测试

来自健康供体的 PBMC 以 Ficol-Paque (Pharmacia) 梯度分离, 并在 96 孔板中培养于 10% FBS DMEM/F12 培养基上, 其中含 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA (Sigma) 及 IL-18 ($5\text{ng}/\text{mL}$) 和/或单抗。 37°C 、5% CO_2 、90% 湿度培养 18h 后, 取 $25\mu\text{L}$ 培养基并以免疫测试测定 γ -干扰素 (IFN γ) 浓度。三次实验的平均结果见表 I。

30 E. 单克隆抗体的亲和性测定

在 BIAcore 光生物传感器 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, 瑞典) 上以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速测定纯化单抗的亲合性。动力学数据以前述关系 (Karlsson 等, *J. Immunol. Meth.*, 145:229-240 (1991) 并在文献全文引用) 评估。单抗 (用含 10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.01% Tween-20, pH7.4 的 HBS 缓冲液稀释) 注射于兔抗小鼠 IgG Fc 或羊抗大鼠 IgG Fc 表面后以缓冲液漂洗并记录 RU。然后 IL-18 (以 HBS 缓冲液稀释) 注射 180 秒后用缓冲液漂洗 500 秒并记录 RU。注射 0.1M 磷酸使传感器芯片表面再生。用 BIAcore 软件计算结合开率 (K_{ass}) 和关率 (K_{diss}), 计算得平衡常数 (K_D), 对单抗 13G9 为 $12 \times 10^{-9}\text{M}$, 对单抗 2C10 为 $3.9 \times 10^{-11}\text{M}$, 对单抗 14B7 为 $1.5 \times 10^{-10}\text{M}$, 见表 I。

F. 单克隆抗体抗原决定基分析

纯化单抗抗原决定基分析于 BIAcore 上测定。用 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速, 第一单抗 (用 HBS 缓冲液稀释) 注射于兔抗小鼠 IgG Fc 或羊抗大鼠 IgG Fc 表面, 然后注射 IL-18 240 秒, 阻断单抗 48 秒, 并注射第二单抗 240 秒。每次注射后, 注射 0.1M 磷酸使其表面再生, 并记录 RU。发现单抗 13G9、2C10 和 14B7 具相似或重叠的抗原决定基。

表 I 单抗与人 IL-28 作用的亲和与中和活性

单抗	Kd (pM) ^a	中和 IC50 (nM) ^b
2C10 (大鼠)	39	0.1
14B7 (大鼠)	150	0.2
13G9 (小鼠)	12000	3.0

a. 由光生物传感器 (BIAcore) 分析测定 (25 $^{\circ}\text{C}$)

b. 5ng/mL 人 IL-18 对 PMBC 中 IFN γ 产生的抑制 (nM)

例 3 CDR 序列

基因克隆和序列分析

用简述于下的标准分子生物学方法, 由杂交瘤细胞克隆可变重链和轻链基因。据厂商说明, 用 TRIzol 试剂 (Life Technologies, 目录号 15596-026) 从杂交瘤细胞分离总 RNA。据厂商说明, 用 RT-PCR 试剂盒 (Boehringer Mannheim, 目录号 1483-188), 以 poly dT 寡核苷酸为引物进行 RNA 逆转录。第一链 cDNA 合成后, 用 3' 恒定

区特异引物和简并 5' 引物 PCR 扩增重链和轻链 V 区。简并 5' 引物序列设计为编码以前测定的可变重链和轻链区 N 端氨基酸序列。多个克隆的全长序列来自每一次 PCR 扩增, 并进行排列比较以获得共有序列。据此, 重链和轻链 DNA 序列的前 17 碱基来自 PCR 引物, 而翻译的蛋白序列为原本的。

杂交瘤抗体 2C10、13G9 和 14B7 的核苷酸序列和推断的氨基酸序列见图 1-6。各图中, CDR 及其编码核酸序列列于框内。简并引物序列为黑体。

序列表

<110> S. D. 霍尔梅斯 (Holmes, Stephen D.)
Y. S. 候 (Ho, Yen Sen)
A. H. 泰勒 (Taylor, Alexander)
S. S. 阿布德尔 - 梅圭德 (Abdel-Meguid, Sherin S.)

<120> 用于治疗IL-18介导疾病的重组IL-18拮抗物

<130> P50897

<140> 60/125,299

<141> 1999-03-19

<160> 48

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)

<220>

<221> CDS

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (324)$

<223> 轻链V区

<400> 1

gac att caa atg acc cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

gaa act gtc tcc atc gaa tgt ctg gca agt gag gac ata tac act tat 96
Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr
20 25 30

tta aca tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct caa ctc ctg atc 144
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45

tat ggt gca aat aag ttg caa gat ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc 192
 Tyr Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggc aca cag tat tct ctc aag atc agc ggc ata caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Gly Ile Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat gaa ggg gat tat ttc tgt cta cag ggt tcc aag ttt ccg ctc 288
 Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu
 85 90 95

acg ttc ggt tct ggg acc aag ctg gag atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 2

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

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

<210> 3
<211> 33
<212> DNA
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(33)
<223> VK2C10 轻链 CDR I

<400> 3
ctg gca agt gag gac ata tac act tat tta aca 33
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 4
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Thr Tyr Leu Thr
1 5 10

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
<223> VK2C10 轻链 CDR II

<400> 5
ggt gca aat aag ttg caa gat 21
Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 6
Gly Ala Asn Lys Leu Gln Asp
1 5

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(27)
<223> VK2C10 轻链 CDR III

<400> 7
cta cag ggt tcc aag ttt ccg ctc acg
Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu Thr
1 5

27

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 8
Leu Gln Gly Ser Lys Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 9
<211> 378
<212> DNA
<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(378)

<223> 重链V区

<400> 9

gag gtc cag cta cag cag tct ggg gct gag ctt gtg aga cct ggg acc	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr	
1 5 10 15	

tct gtg aag tta tct tgc aaa gtt tct ggc gaa ata agt aca gga tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Gly Glu Ile Ser Thr Gly Tyr	
20 25 30	

tat ttc cac ttt gtg agg cga agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg ata	144
Tyr Phe His Phe Val Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	

gga agg att gat cct gag gat gat agt act aaa tat gct gag agg ttc	192
Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe	
50 55 60	

aaa gac agg gcg acg ctc act gca caa aca tcc tcc aac aca gcc tac	240
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Gln Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	

ctg aac ctc agc agc ctg acc tct gag gac act gca act tat ttt tgt	288
Leu Asn Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys	
85 90 95	

acc aca tgg cgg ata tac cga gat agt tct ggc cgc ccc ttc tat gtt	336
Thr Thr Trp Arg Ile Tyr Arg Asp Ser Ser Gly Arg Pro Phe Tyr Val	
100 105 110	

atg gat gcc tgg ggt caa gga gct tca gtc act gtc tcc tca	378
Met Asp Ala Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser	
115 120 125	

<210> 10

<211> 126

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 10

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

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

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

<223> VH2C10 重链 CDR I

<400> 11

gga tac tat ttc cac

Gly Tyr Tyr Phe His

1

5

15

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 12

Gly Tyr Tyr Phe His

1 5

<210> 13

<211> 51

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

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

<223> VH2C10 重链 CDR II

<400> 13

agg att gat cct gag gat gat agt act aaa tat gct gag agg ttc aaa 48

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe Lys

1 5 10 15

gac 51

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 14

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Asp Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Arg Phe Lys

1 5 10 15

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

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

<223> VH2C10 重链 CDR III

<400> 15

tgg	cgg	ata	tac	cga	gat	agt	tct	ggc	cgc	ccc	ttc	tat	gtt	atg	gat	48
Trp	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Phe	Tyr	Val	Met	Asp	
1				5				10					15			

gcc 51

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 16

Trp	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Phe	Tyr	Val	Met	Asp
1				5				10					15		

<210> 17

<211> 342

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(342)

<223> 轻链V区

<400> 17

gac	gtt	gtt	atg	act	caa	act	cct	ctc	tcc	ctg	cct	gtc	agt	ctt	gga	48
Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	
1				5				10					15			

gat	caa	gcc	tcc	atc	tct	tgc	aga	tct	agt	cag	agc	ctt	gta	cac	agt	96
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	
			20					25					30			

aat	gga	aac	acc	tat	tta	cat	tgg	tac	ctg	cag	aag	cca	ggc	cag	tct	144
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45			

cca	aag	ctc	ctg	atc	tac	aaa	gtt	tcc	aac	cga	ttt	tct	ggg	gtc	cca	192
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
			50					55					60			

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggt aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

aca cat gtt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata 336
 Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

aaa cgg 342
 Lys Arg

<210> 18
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 18
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg

<210> 19
 <211> 48

<212> DNA
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(48)
<223> VK13G9 轻链 CDR I

<400> 19
aga tct agt cag agc ctt gta cac agt aat gga aac acc tat tta cat 48
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 20
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
<223> VK13G9 轻链 CDR II

<400> 21
aaa gtt tcc aac cga ttt tct 21
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 22

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(30)

<223> CK13G9 轻链 CDR III

<400> 23

tct caa agt aca cat gtt cct ccg tac acg

30

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 24

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 25

<211> 369

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(369)

<223> 重链V区

<400> 25

caa gtt act ctt aag gag tct ggc cct ggg ata ttg aag ccc tca cag 48
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tct ctg agc act tct 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

ggg atg ggt att gcc tgg gtt cgt cag cct tca ggg aag ggt ctg gag 144
 Gly Met Gly Ile Ala Trp Val Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

tgg ctg gca gac att tgg tgg gat gat aat aag tat tat aat cca tcc 192
 Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

ctg gag agc cag ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga aac cag gta 240
 Leu Glu Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 65 70 75 80

ttc ctc acg atc acc agt gtg gac act gca gat tct gcc act tat tac 288
 Phe Leu Thr Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

tgt gct cgt cat cat tac gac ggt agt agc ctc ctg cct atg gac tac 336
 Cys Ala Arg His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 123

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 26

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(48)

<223> VH13G9 重链 CDR II

<400> 29

gac att tgg tgg gat gat aat aag tat tat aat cca tcc ctg gag agc	48
Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser	
1 5 10 15	

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 30

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Asn Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser	
1 5 10 15	

<210> 31

<211> 39

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(39)

<223> VH13G9 重链 CDR III

<400> 31

cat cat tac gac ggt agt agc ctc ctg cct atg gac tac	39
His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr	
1 5 10	

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

```

<400> 32
His His Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Leu Pro Met Asp Tyr
1          5          10

<210> 33
<211> 324
<212> DNA
<213> 褐家鼠 ( Rattus norvegicus)

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(324)
<223> 轻链V区

<400> 33
gat att caa atg acg cag tct cca gct tcc ctg tct gca tct ctg gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1          5          10          15

gaa act gtc tcc atc gaa tgt cta gca agt gag gac ata tac agt tat      96
Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr
          20          25          30

tta gca tgg tat caa cag aag cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
          35          40          45

tat gcc aca aaa agg ttg caa gat ggg gtc cca tca cgg ttc agt ggc      192
Tyr Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

agt gga tct ggc aca cag tat tct ctc aaa ata agc gac atg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Asp Met Gln Pro
          65          70          75          80

gaa gat gaa ggg gat tat ttc tgt cta cag aat tcc aag ttt ccg gtc      288
Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val
          85          90          95

acg ttc ggt tct ggg acc aag ctg gag atc aaa cgg      324
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

<210> 34
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Ser Ile Glu Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Asp Met Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 35
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)
 <223> VK14B7 轻链 CDR I

<400> 35
 cta gca agt gag gac ata tac agt tat tta gca
 Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

33

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 36
 Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)
 <223> CK14B7 轻链 CDR II

<400> 37
 gcc aca aaa agg ttg caa gat 21
 Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp
 1 5

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 38
 Ala Thr Lys Arg Leu Gln Asp
 1 5

<210> 39
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(27)
 <223> VK14B7 轻链 CDR III

<400> 39
 cta cag aat tcc aag ttt ccg gtc acg 27

Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr
 1 5

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 40

Leu Gln Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr
 1 5

<210> 41
 <211> 368
 <212> DNA
 <213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(368)
 <223> 重链V区

<400> 41

gag gtt cag ctt cag cag tct ggg gct gag ctt gtg aga cct ggg acc 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15

tct gtg aag ttt tct tgc aaa gtt tct ggc gat acc cct aca aca tac 96
 Ser Val Lys Phe Ser Cys Lys Val Ser Gly Asp Thr Pro Thr Thr Tyr
 20 25 30

tac gtg cac ttt gtg aga caa agg cct gga cag ggt ctg gaa tgg ata 144
 Tyr Val His Phe Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

gga agg att gat cct gag gat act agt act aaa tat gct gag aag ttc 192
 Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asp Thr Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

aga aat aag gcg aca ttc act gca gat cca tcc tcc aac aca gcc tac 240

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

cta aac ctc agc agc ctg acc cct gag gac act gca acc tat ttt tgt 288
Leu Asn Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

acc ata atg cgg tac cat agt acc tat agg gtc tat gtt atg gat ttc 336
Thr Ile Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
100 105 110

tgg ggt caa gga act gca gtc act gtc tcc tc 368
Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser
115 120

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 42

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

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

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

<223> VH14B7 重链 CDR I

<400> 43

aca tac tac gtg cac

15

Thr Tyr Tyr Val His

1

5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 44

Thr Tyr Tyr Val His

1

5

<210> 45

<211> 51

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

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

<223> VH14B7 重链 CDR II

<400> 45

agg att gat cct gag gat act agt act aaa tat gct gag aag ttc aga

48

Arg Ile Asp Pro Glu Asp Thr Ser Thr Lys Tyr Ala Glu Lys Phe Arg

1

5

10

15

aat

51

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 46

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

<210> 47

<211> 42

<212> DNA

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(42)

<223> VH14B7 重链 CDR III

<400> 47

atg cgg tac cat agt acc tat agg gtc tat gtt atg gat ttc 42
Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 48

Met Arg Tyr His Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Val Met Asp Phe
1 5 10

说明书附图

Vk2c10

																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					</
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

VH2C10

1	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	15
	GAG	GTC	CAG	CTA	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAG	CTT	GTG	AGA	CCT	GGG	
	CTC	CAG	GTC	GAT	GTC	GTC	AGA	CCC	CGA	CTC	GAA	CAC	TCT	GGA	CCC	
16	T	S	V	K	L	S	C	K	V	S	G	E	I	S	T	30
	ACC	TCT	GTG	AAG	TTA	TCT	TGC	AAA	GTT	TCT	GGC	GAA	ATA	AGT	ACA	
	TGG	AGA	CAC	TTC	AAT	AGA	ACG	TTT	CAA	AGA	CCG	CTT	TAT	TCA	TGT	
CDRI																
31	G	Y	Y	F	H	F	V	R	R	R	P	G	Q	G	L	45
	GGA	TAC	TAT	TTC	CAC	TTT	GTG	AGG	CGA	AGG	CCT	GGA	CAG	GGT	CTG	
	CCT	ATG	ATA	AAG	GTG	AAA	CAC	TCC	GCT	TCC	GGA	CCT	GTC	CCA	GAC	
CDRII																
46	E	W	I	G	R	I	D	P	E	D	D	S	T	K	Y	60
	GAA	TGG	ATA	GGA	AGG	ATT	GAT	CCT	GAG	GAT	GAT	AGT	ACT	AAA	TAT	
	CTT	ACC	TAT	CCT	TCC	TAA	CTA	GGA	CTC	CTA	CTA	TCA	TGA	TTT	ATA	
61	A	E	R	F	K	D	R	A	T	L	T	A	Q	T	S	75
	GCT	GAG	AGG	TTC	AAA	GAC	AGG	GCG	ACG	CTC	ACT	GCA	CAA	ACA	TCC	
	CGA	CTC	TCC	AAG	TTT	CTG	TCC	CGC	TGC	GAG	TGA	CGT	GTT	TGT	AGG	
76	S	N	T	A	Y	L	N	L	S	S	L	T	S	E	D	90
	TCC	AAC	ACA	GCC	TAC	CTG	AAC	CTC	AGC	AGC	CTG	ACC	TCT	GAG	GAC	
	AGG	TTG	TGT	CGG	ATG	GAC	TTG	GAG	TCG	TCG	GAC	TGG	AGA	CTC	CTG	
91	T	A	T	Y	F	C	T	T	W	R	I	Y	R	D	S	105
	ACT	GCA	ACT	TAT	TTT	TGT	ACC	ACA	TGG	CGG	ATA	TAC	CGA	GAT	AGT	
	TGA	CGT	TGA	ATA	AAA	ACA	TGG	TGT	ACC	GCC	TAT	ATG	GCT	CTA	TCA	
CDRIII																
106	S	G	R	P	F	Y	V	M	D	A	W	G	Q	G	A	120
	TCT	GGC	CGC	CCC	TTC	TAT	GTT	ATG	GAT	GCC	TGG	GGT	CAA	GGA	GCT	
	AGA	CCG	GCG	GGG	AAG	ATA	CAA	TAC	CTA	CGG	ACC	CCA	GTT	CCT	CGA	
121	S	V	T	V	S	S										126
	TCA	GTC	ACT	GTC	TCC	TCA										
	AGT	CAG	TGA	CAG	AGG	AGT										

Vk13g9

```

1   D   V   V   M   T   Q   T   P   L   S   L   P   V   S   L   15
    GAC GTT GTT ATG ACT CAA ACT CCT CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT
    CTG CAA CAA TAC TGA GTT TGA GGA GAG AGG GAC GGA CAG TCA GAA

                                CDR I
16  G   D   Q   A   S   I   S   C   R   S   S   Q   S   L   V   30
    GGA GAT CAA GCC TCC ATC TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA
    CCT CTA GTT CGG AGG TAG AGA ACG TCT AGA TCA GTC TCG GAA CAT

                                CDR II
31  H   S   N   G   N   T   Y   L   H   W   Y   L   Q   K   P   45
    CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA
    GTG TCA TTA CCT TTG TGG ATA AAT GTA ACC ATG GAC GTC TTC GGT

                                CDR III
46  G   Q   S   P   K   L   L   I   Y   K   V   S   N   R   F   60
    GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT
    CCG GTC AGA GGT TTC GAG GAC TAG ATG TTT CAA AGG TTG GCT AAT

61  S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   75
    TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGT ACA GAT
    AGA CCC CAG GGT CTG TCC AAG TCA CCG TCA CCT AGT CCA TGT CTA

76  F   T   L   K   I   S   R   V   E   A   E   D   L   G   V   90
    TTC ACA CTC AAG ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT
    AAG TGT GAG TTC TAG TCG TCT CAC CTC CGA CTC CTA GAC CCT CAA

                                CDR III
91  Y   F   C   S   Q   S   T   H   V   P   P   Y   T   F   G   105
    TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCT CCG TAC ACG TTC GGA
    ATA AAG ACG AGA GTT TCA TGT GTA CAA GGA GGC ATG TGC AAG CCT

106 G   G   T   K   L   E   I   K   R   114
    GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG
    CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCC

```

VH13G9

1	Q	V	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	K	P	S	15
	CAA	GTT	ACT	CTT	AAG	GAG	TCT	GGC	CCT	GGG	ATA	TTG	AAG	CCC	TCA	
	GTT	CAA	TGA	GAA	TTC	CTC	AGA	CCG	GGA	CCC	TAT	AAC	TTC	GGG	AGT	
16	Q	T	L	S	L	T	C	S	F	S	G	F	S	L	S	30
	CAG	ACC	CTC	AGT	CTG	ACT	TGT	TCT	TTC	TCT	GGG	TTT	TCT	CTG	AGC	
	GTC	TGG	GAG	TCA	GAC	TGA	ACA	AGA	AAG	AGA	CCC	AAA	AGA	GAC	TCG	
31	T	S	G	M	G	I	A	W	V	R	Q	P	S	G	K	45
	ACT	TCT	GGT	ATG	GGT	ATT	GCC	TGG	GTT	CGT	CAG	CCT	TCA	GGG	AAG	
	TGA	AGA	CCA	TAC	CCA	TAA	CGG	ACC	CAA	GCA	GTC	GGA	AGT	CCC	TTC	
46	G	L	E	W	L	A	D	I	W	W	D	D	N	K	Y	60
	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG	GCA	GAC	ATT	TGG	TGG	GAT	GAT	AAT	AAG	TAT	
	CCA	GAC	CTC	ACC	GAC	CGT	CTG	TAA	ACC	ACC	CTA	CTA	TTA	TTC	ATA	
61	Y	N	P	S	L	E	S	Q	L	T	I	S	K	D	T	75
	TAT	AAT	CCA	TCC	CTG	GAG	AGC	CAG	CTC	ACA	ATC	TCC	AAG	GAT	ACC	
	ATA	TTA	GGT	AGG	GAC	CTC	TCG	GTC	GAG	TGT	TAG	AGG	TTC	CTA	TGG	
76	S	R	N	Q	V	F	L	T	I	T	S	V	D	T	A	90
	TCC	AGA	AAC	CAG	GTA	TTC	CTC	ACG	ATC	ACC	AGT	GTG	GAC	ACT	GCA	
	AGG	TCT	TTG	GTC	CAT	AAG	GAG	TGC	TAG	TGG	TCA	CAC	CTG	TGA	CGT	
91	D	S	A	T	Y	Y	C	A	R	H	H	Y	D	G	S	105
	GAT	TCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGT	GCT	CGT	CAT	CAT	TAC	GAC	GGT	AGT	
	CTA	AGA	CGG	TGA	ATA	ATG	ACA	CGA	GCA	GTA	GTA	ATG	CTG	CCA	TCA	
106	S	L	L	P	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	120
	AGC	CTC	CTG	CCT	ATG	GAC	TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	TCA	GTC	ACC	
	TCG	GAG	GAC	GGA	TAC	CTG	ATG	ACC	CCA	GTT	CCT	TGG	AGT	CAG	TGG	
121	V	S	S													
	GTC	TCC	TCA													
	CAG	AGG	AGT													

Vk14B7

```

      1 0                      30
1  D  I  Q  M  T  Q  S  P  A  S  L  S  A  S  L  15
   GAT ATT CAA ATG ACG CAG TCT CCA GCT TCC CTG TCT GCA TCT CTG
   CTA TAA GTT TAC TGC GTC AGA GGT CGA AGG GAC AGA CGT AGA GAC

      50                      7 0          CDR I          90
16 G  E  T  V  S  I  E  C  L  A  S  E  D  I  Y  30
   GGA GAA ACT GTC TCC ATC GAA TGT CTA GCA AGT GAG GAC ATA TAC
   CCT CTT TGA CAG AGG TAG CTT ACA GAT CGT TCA CTC CTG TAT ATG

      1 10                      13 0
31 S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  K  S  P  Q  45
   AGT TAT TTA GCA TGG TAT CAA CAG AAG CCA GGG AAA TCT CCT CAG
   TCA ATA AAT CGT ACC ATA GTT GTC TTC GGT CCC TTT AGA GGA GTC

      150          CDR II          1 70
46 L  L  I  Y  A  T  K  R  L  Q  D  G  V  P  S  60
   CTC CTG ATC TAT GCC ACA AAA AGG TTG CAA GAT GGG GTC CCA TCA
   GAG GAC TAG ATA CGG TGT TTT TCC AAC GTT CTA CCC CAG GGT AGT

      19 0                      210
61 R  F  S  G  S  G  S  G  T  Q  Y  S  L  K  I  75
   CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGC ACA CAG TAT TCT CTC AAA ATA
   GCC AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCG TGT GTC ATA AGA GAG TTT TAT

      2 30                      25 0                      270
76 S  D  M  Q  P  E  D  E  G  D  Y  F  C  L  Q  90
   AGC GAC ATG CAA CCT GAA GAT GAA GGG GAT TAT TTC TGT CTA CAG
   TCG CTG TAC GTT GGA CTT CTA CTT CCC CTA ATA AAG ACA GAT GTC

      CDR III          2 90                      31 0
91 N  S  K  F  P  V  T  F  G  S  G  T  K  L  E  105
   AAT TCC AAG TTT CCG GTC ACG TTC GGT TCT GGG ACC AAG CTG GAG
   TTA AGG TTC AAA GGC CAG TGC AAG CCA AGA CCC TGG TTC GAC CTC

106 I  K  R  108
    ATC AAA CGG
    TAG TTT GCC

```

图 5

VH14B7

```

      1 0      30
1  E V Q L Q Q S G A E L V R P G 15
   GAG GTT CAG CTT CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTT GTG AGA CCT GGG
   CTC CAA GTC GAA GTC GTC AGA CCC CGA CTC GAA CAC TCT GGA CCC

      50      7 0      90
16 T S V K F S C K V S G D T P T 30
   ACC TCT GTG AAG TTT TCT TGC AAA GTT TCT GGC GAT ACC CCT ACA
   TGG AGA CAC TTC AAA AGA ACG TTT CAA AGA CCG CTA TGG GGA TGT

      CDR I      1 10      13 0
31 T Y Y V H F V R Q R P G Q G L 45
   ACA TAC TAC GTG CAC TTT GTG AGA CAA AGG CCT GGA CAG GGT CTG
   TGT ATG ATG CAC GTG AAA CAC TCT GTT TCC GGA CCT GTC CCA GAC

      150      1 70 CDR II
46 E W I G R I D P E D T S T K Y 60
   GAA TGG ATA GGA AGG ATT GAT CCT GAG GAT ACT AGT ACT AAA TAT
   CTT ACC TAT CCT TCC TAA CTA GGA CTC CTA TGA TCA TGA TTT ATA

      19 0      210
61 A E K F R N K A T F T A D P S 75
   GCT GAG AAG TTC AGA AAT AAG GCG ACA TTC ACT GCA GAT CCA TCC
   CGA CTC TTC AAG TCT TTA TTC CGC TGT AAG TGA CGT CTA GGT AGG

      2 30      25 0      270
76 S N T A Y L N L S S L T P E D 90
   TCC AAC ACA GCC TAC CTA AAC CTC AGC AGC CTG ACC CCT GAG GAC
   AGG TTG TGT CGG ATG GAT TTG GAG TCG TCG GAC TGG GGA CTC CTG

      2 90      31 0
91 T A T Y F C T I M R Y H S T Y 105
   ACT GCA ACC TAT TTT TGT ACC ATA ATG CGG TAC CAT AGT ACC TAT
   TGA CGT TGG ATA AAA ACA TGG TAT TAC GCC ATG GTA TCA TGG ATA

      CDR III      330      3 50
106 R V Y V M D F W G Q G T A V T 120
   AGG GTC TAT GTT ATG GAT TTC TGG GGT CAA GGA ACT GCA GTC ACT
   TCC CAG ATA CAA TAC CTA AAG ACC CCA GTT CCT TGA CGT CAG TGA

121 V S 122
    GTC TCC TC
    CAG AGG AG

```

专利名称(译)	用于治疗IL - 18介导疾病的重组IL - 18拮抗物		
公开(公告)号	CN1352650A	公开(公告)日	2002-06-05
申请号	CN00807770.3	申请日	2000-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司		
申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司 史密丝克莱恩比彻姆有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	史密丝克莱恩比彻姆公司 史密丝克莱恩比彻姆有限公司		
[标]发明人	YS候 SD霍尔梅斯 AH泰勒		
发明人	Y·S·候 S·D·霍尔梅斯 A·H·泰勒 S·S·阿布德尔-梅圭德		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P1/04 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 C07K16/24 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/12 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577 C07K16/18 C12N5/12		
CPC分类号	C07K16/244 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/00 A61P37/02		
代理人(译)	姜建成		
优先权	60/125299 1999-03-19 US		
其他公开文献	CN1246335C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了源于高亲和性中和单克隆抗体的嵌合、人源化或其它IL - 18单克隆抗体,含有该抗体的药物组合物以及治疗和诊断方法。

		Vk2c10	
1	D I Q 1 0 T Q S P A S 30 L S A S L 15	GAC ATT CAA ATG ACC CAG TCT CCA GCT TCC CTG TCT GCA TCT CTG	CTG TAA GTT TAC TGG GTC AGA GGT CGA AGG GAC AGA CGT AGA GAC
		CDRI	
16	G E T V S I E C 7 0 L A S E D i Y 30	GGA GAA ACT GTC TCC ATC GAA TGT CTG GCA AGT GAG GAC ATA TAG	CCT CTT TGA CAG AGG TAG CTT ACA GAC CGT TCA CTC CTG TAT ATG
31	T Y L T W Y 1 10 Q K P G K 13 0 S P Q 45	ACT TAT TTA ACA TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA TCT CCT CAA	TGA ATA AAT TGT ACC ATA GTC GTC TTT GGT CCC TTT AGA GGA GTT
		CDRII	
46	L L I Y 150 A N K L Q D 1 70 V P S 60	CTC CTG ATC TAT GGT GCA AAT AAG TTG CAA GAT GGG GTC CCA TCA	GAG GAC TAG ATA CCA CGT TTA TTC AAC GTT CTA CCC CAG GGT AGT
61	R F S 19 0 S G S T G T 210 Q Y S L K I 75	CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGC ACA CAG TAT TCT CTC AAG ATC	GCC AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCG TGT GTC ATA AGA GAG TTC TAG
76	S G I Q P E D E G D Y F C 220 L Q 90	AGC GGC ATA CAA CCT GAA GAT GAA GGG GAT TAT TTC TGT CTA CAG	TGG CCG TAT GTT GGA CTT CTA CTT CCC CTA ATA AAG ACA GAT GTC
		CDRIII	
91	G S K F F L T F G S T K L E 105	GGT TCC AAG TTT CCG CTC ACG TTC GGT TCT GGG ACC AAG CTG GAG	CCA AGG TTC AAA GGC GAG TGC AAG CCA AGA CCC TGG TTC GAC CTC
106	I K R 108	ATC AAA CCG	TAG TTT GCC