



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1771338 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 17

(21) 申请号 200480007011. 7

C12P 21/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 02. 02

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/444, 229 2003. 02. 01 US

(56) 对比文件

CN 1268176 A, 2000. 09. 27, 全文.

US 6172213 B1, 2001. 01. 09, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005. 09. 15

审查员 幸颖

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/002894 2004. 02. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02004/070011 EN 2004. 08. 19

(73) 专利权人 唐纳士公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 桑贾耶·辛格 凯瑟琳·福斯特

赫伦·吴

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 王允方

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 27 页

序列表 32 页 附图 16 页

(54) 发明名称

高亲和力抗人类 IgE 抗体

(57) 摘要

本发明涉及高亲和力人类单克隆抗体, 尤其那些针对免疫球蛋白 E (IgE) 的同型决定子的高亲和力人类单克隆抗体, 以及这些抗体的直接等效物及衍生物。这些抗体可以一比原始亲代抗体高至少 100 倍的亲和力与其各自的靶相结合。这些抗体可用于诊断、预防和治疗疾病。

1. 一种可变轻链区,其包含一具有式 FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 的氨基酸序列,其中 FRL1 由 SEQ ID NO:30 至 37 中的任一个组成;CDRL1 由 SEQ ID NO:5 至 7 中的任一个组成;FRL2 由 SEQ ID NO:38 至 39 中的任一个组成;CDRL2 由 SEQ ID NO:8 至 12 中的任一个组成;FRL3 由 SEQ ID NO:40 至 43 中的任一个组成;CDRL3 由 SEQ ID NO:13 或由 QQSWPTT 组成的氨基酸序列组成;而 FRL4 由 SEQ ID NO:44 组成。

2. 如权利要求 1 所述的可变轻链区,其包含 SEQ ID NO:57、61、63、65、67 和 69 中的任一个。

3. 如权利要求 1 所述的可变轻链区,其进一步包含一恒定区。

4. 如权利要求 3 所述的可变轻链区,其中所述恒定结构域具有 SEQ ID NO:58。

5. 如权利要求 2 所述的可变轻链区,其进一步包含一恒定区。

6. 如权利要求 5 所述的可变轻链区,其中所述恒定区具有 SEQ ID NO:58。

7. 如权利要求 1 所述的可变轻链区,其进一步包含一信号肽。

8. 如权利要求 7 所述的可变轻链区,其中所述信号肽具有 SEQ ID NO:56。

9. 一种可变重链区,其包含一具有式 FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 的氨基酸序列,其中 FRH1 由 SEQ ID NO:45 至 46 中的任一个组成;CDRH1 由 SEQ ID NO:15 至 17 中的任一个组成;FRH2 由 SEQ ID NO:47 至 50 中的任一个组成;CDRH2 由 SEQ ID NO:18 至 25 中的任一个组成;FRH3 由 SEQ ID NO:51 至 54 中的任一个组成;CDRH3 由 SEQ ID NO:26 至 29 中的任一个组成;而 FRH4 由 SEQ ID NO:55 组成。

10. 如权利要求 9 所述的可变重链区,其包含 SEQ ID NOs:59、62、64、66、68 和 70 中的任一个。

11. 如权利要求 9 所述的可变重链区,其进一步包含一恒定区的至少 CH1 结构域。

12. 如权利要求 11 所述的可变重链区,其包含一恒定区的 CH1、CH2 和 CH3 结构域。

13. 如权利要求 11 所述的可变重链区,其中所述恒定区来自一 IgG 抗体。

14. 如权利要求 13 所述的可变重链区,其中所述 IgG 抗体为一 IgG1 抗体、一 IgG2 抗体、一 IgG3 抗体或一 IgG4 抗体。

15. 如权利要求 13 所述的可变重链区,其中所述恒定结构域具有 SEQ ID NO:60。

16. 如权利要求 10 所述的可变重链区,其进一步包含一恒定区。

17. 如权利要求 16 所述的可变重链区,其中所述恒定结构域具有 SEQ ID NO:60。

18. 如权利要求 9 所述的可变重链区,其进一步包含一信号肽。

19. 如权利要求 18 所述的可变重链区,其中所述信号肽具有 SEQ ID NO:56。

20. 一种包含如权利要求 1 所述的可变轻链区的抗体或抗体片段,其中所述抗体特异性地与 IgE 结合。

21. 一种包含如权利要求 9 所述的可变重链区的抗体或抗体片段,其中所述抗体特异性地与 IgE 结合。

22. 如权利要求 20 所述的抗体,其包含一如权利要求 9 所述的重链区。

23. 如权利要求 22 所述的抗体,其包含一具有 SEQ ID NO:57 中所示氨基酸序列的可变轻链区和一具有 SEQ ID NO:59 中所示氨基酸序列的可变重链区。

24. 如权利要求 23 所述的抗体,其进一步包含一恒定轻链区和一恒定重链区。

25. 如权利要求 24 所述的抗体,其中所述恒定轻链区具有 SEQ ID NO:58 中所示氨基

酸序列并且所述恒定重链区具有 SEQ ID NO :60 中所示氨基酸序列。

26. 如权利要求 22 所述的抗体,其包含一具有 SEQ ID NO :61 中所示氨基酸序列的可变轻链区和一具有 SEQ ID NO :62 中所示氨基酸序列的可变重链区。

27. 如权利要求 26 所述的抗体,其进一步包含一恒定轻链区和一恒定重链区。

28. 如权利要求 27 所述的抗体,其中所述恒定轻链区具有 SEQ ID NO :58 中所示氨基酸序列并且所述恒定重链区具有 SEQ ID NO :60 中所示氨基酸序列。

29. 如权利要求 26 所述的抗体,其由一细胞产生。

30. 如权利要求 22 所述的抗体,其包含一具有 SEQ ID NO :63 中所示氨基酸序列的可变轻链区和一具有 SEQ ID NO :64 中所示氨基酸序列的可变重链区。

31. 如权利要求 30 所述的抗体,其进一步包含一恒定轻链区和一恒定重链区。

32. 如权利要求 31 所述的抗体,其中所述恒定轻链区具有 SEQ ID NO :58 中所示氨基酸序列并且所述恒定重链区具有 SEQ ID NO :60 中所示氨基酸序列。

33. 如权利要求 30 所述的抗体,其由一细胞产生。

34. 如权利要求 22 所述的抗体,其包含一具有 SEQ ID NO :65 中所示氨基酸序列的可变轻链区和一具有 SEQ ID NO :66 中所示氨基酸序列的可变重链区。

35. 如权利要求 34 所述的抗体,其进一步包含一恒定轻链区和一恒定重链区。

36. 如权利要求 35 所述的抗体,其中所述恒定轻链区具有 SEQ ID NO :58 中所示氨基酸序列并且所述恒定重链区具有 SEQ ID NO :60 中所示氨基酸序列。

37. 如权利要求 34 所述的抗体,其由一细胞产生。

38. 如权利要求 22 所述的抗体,其包含一具有 SEQ ID NO :67 中所示氨基酸序列的可变轻链区和一具有 SEQ ID NO :68 中所示氨基酸序列的可变重链区。

39. 如权利要求 38 所述的抗体,其进一步包含一恒定轻链区和一恒定重链区。

40. 如权利要求 39 所述的抗体,其中所述恒定轻链区具有 SEQ ID NO :58 中所示氨基酸序列并且所述恒定重链区具有 SEQ ID NO :60 中所示氨基酸序列。

41. 如权利要求 22 所述的抗体,其包含一具有 SEQ ID NO :69 中所示氨基酸序列的可变轻链区和一具有 SEQ ID NO :70 中所示氨基酸序列的可变重链区。

42. 如权利要求 41 所述的抗体,其进一步包含一恒定轻链区和一恒定重链区。

43. 如权利要求 42 所述的抗体,其中所述恒定轻链区具有 SEQ ID NO :58 中所示氨基酸序列并且所述恒定重链区具有 SEQ ID NO :60 中所示氨基酸序列。

44. 一种组合物,其包含一治疗有效量的如权利要求 20 或 21 所述的抗体和一医药上可接受的载剂。

45. 如权利要求 20 或 21 所述的抗体,其进一步连接至一标记。

46. 一种诊断试剂盒,其包含一如权利要求 20 或 21 所述的抗体。

47. 一种载体,其包含一编码如权利要求 22 所述的抗体的核酸。

48. 一种包含如权利要求 47 所述的载体的细胞。

49. 如权利要求 48 所述的细胞,其中所述细胞为权利要求 29、33 或 37 中任一项所述的细胞。

50. 一种产生抗体的方法,其包括:将如权利要求 48 所述的细胞在适合于产生抗体的条件下培养,和分离所生成的抗体。

51. 一种如权利要求 22 所述的抗体在制备供测量个体体内 IgE 水平用的药物上的用途。

52. 一种如权利要求 22 所述的抗体在制备供诊断与个体体内异常 IgE 水平相关的疾病用的药物上的用途。

53. 如权利要求 52 所述的用途,其中所述与异常 IgE 水平相关的疾病为哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、荨麻疹或异位性皮炎。

54. 一种如权利要求 22 所述的抗体在制备供治疗与个体体内异常高 IgE 水平相关的疾病用的药物上的用途。

55. 如权利要求 54 所述的用途,其中所述疾病为哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、荨麻疹、异位性皮炎或食物过敏。

高亲和力抗人类 IgE 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及高亲和力人类单克隆抗体,尤其那些针对免疫球蛋白 E(IgE) 的同型决定子的高亲和力人类单克隆抗体,以及这些抗体的直接等效物及衍生物。这些抗体可以一比原始亲代抗体高至少 100 倍的亲和力与其各自的靶相结合。这些抗体可用于诊断、预防和治疗疾病。

背景技术

[0002] 过敏为一种由对一异源物质(例如过敏原)的过度免疫反应引发的超敏状态。速发型(I型)超敏反应的特征为与过敏原接触后立即出现过敏反应,其通过B细胞介导并且是基于抗原-抗体反应。迟发型超敏反应通过T细胞介导并且是基于细胞免疫机理。近些年来,术语“过敏”变得越来越与I型超敏反应具有相同含义。

[0003] 速发型超敏反应这一反应是基于由B细胞产生免疫球蛋白E类的抗体(IgE抗体)这一现象,当B细胞与过敏原接触时其会分化成抗体分泌浆细胞。IgE引发反应是一发生在过敏原进入身体的位置(即粘膜表面及/或局部淋巴结)处的局部事件。局部产生的IgE将首先敏化局部肥大细胞,即IgE抗体的恒定区与肥大细胞表面上的Fc ϵ 受体结合,然后“溢出”的IgE进入循环系统并整个身体中的循环嗜碱性粒细胞及组织固定的肥大细胞二者上的受体结合。当所结合的IgE随后与过敏原接触时,Fc ϵ 受体通过过敏原的结合而被交联,造成细胞脱粒并释放许多过敏介质,例如组胺、前列腺素、白细胞三烯等。这些物质的释放导致速发型超敏反应的典型临床症状,即呼吸道或肠道平滑肌收缩,小血管扩张且其对水及血浆蛋白质的通透性增加,分泌粘液并从而导致例如过敏性鼻炎,变应性湿疹及哮喘,以及刺激皮肤神经末端从而导致瘙痒及疼痛。另外,当第二次与过敏原接触时反应加剧,这是因为某些B细胞在第一次与过敏原接触后通过在细胞表面上表达IgE而形成表面IgE阳性B细胞(sIgE+B细胞)的“记忆池”。

[0004] 有两大类IgE受体,即高亲和力受体Fc ϵ RI及低亲和力受体Fc ϵ RII。Fc ϵ RI主要在肥大细胞及嗜碱性粒细胞的表面上表达,但在人类朗格汉斯细胞、树突细胞及单核细胞上亦有少量表达,其中Fc ϵ RI在IgE介导的过敏原呈现中起作用。另外,已报导在人类嗜伊红细胞及血小板存在Fc ϵ RI(Hasegawa, S. 等人, Hematopoiesis, 1999, 93 :2543-2551)。在B细胞、T细胞或嗜中性粒细胞的表面上未发现Fc ϵ RI。The expression of Fc ϵ RI在朗格汉斯细胞及皮肤树突细胞上的表达在功能及生物学上对于过敏性个体中的IgE结合抗原的呈现均较为重要(Kluba1R. 等人, J. Invest. Dermatol. 1997, 108(3) :336-42)。

[0005] 低亲和力受体Fc ϵ RII(CD23)为一凝集素样分子,其包含三个完全相同的亚单位,该些亚单位具有自细胞质膜的 α 螺旋卷曲柄延伸的头结构(Dierks, A. E. 等人, J. Immunol. 1993, 150 :2372-2382)。当与IgE结合时,Fc ϵ eRII与B细胞上参与调节IgE合成的CD21联合(Sanon, A. 等人, J. Allergy Clin. Immunol. 1990, 86 :333-344, Bonnefoy, J. 等人, Eur. Resp. J. 1996, 9 :63s-66s)。人们早已认识到Fc ϵ RII对于过敏原呈现的作用(Sutton及Gould, 1993, Nature, 366 :421-428)。与上皮细胞上的Fc ϵ RII结合的IgE负责

特定及迅速的过敏原呈现 (Yang, P. P., J. Clin. Invest, 2000, 106 :879-886)。FcεRII 存在于数种细胞类型上,包括 B 细胞、嗜伊红细胞、血小板、天然杀伤细胞、T 细胞、滤泡树突细胞及朗格汉斯细胞。

[0006] 已鉴别出 IgE 细胞上与 Fc ε RI 及 Fc ε RII 相互作用的结构实体。诱变研究已显示,CH3 结构域同时介导 IgE 与 Fc ε RI 的相互作用 (Presta 等人, J. Biol. Chem. 1994, 269 : 26368-26373 ;Henry A. J. 等人, Biochemistry, 1997, 36 :15568-15578) 及与 Fc ε RII 的相互作用 (Sutton 及 Gould, Nature, 1993, 366:421-428 ;Shi, J. 等人, Biochemistry, 1997, 36 : 2112-2122)。这两种高及低亲和力受体的结合位点沿一穿过两个 CH3 结构域的中心旋转轴对称分布。Fc ε RI 结合位点位于 CH3 结构域中接近 CH2 结构域接点的外侧上,而 Fc ε RII 结合位点位于 CH3 的羧基端上。

[0007] 一种前景良好的治疗过敏的概念涉及施用单克隆抗体,这些单克隆抗体具 IgE 同种型特异性,因此能结合 IgE。该方法是基于通过减量调节 IgE 免疫反应来抑制过敏反应,而 IgE 免疫反应是引发过敏的最早事件并维持过敏状态。由于不影响其他类抗体的反应,因此可以对过敏症状达成一迅速并持久的影响。关于人类嗜碱性粒细胞密度的早期研究显示,患者血浆中 IgE 的水平与每一嗜碱性粒细胞上 Fc ε eRI 受体的数量之间有关联 (Malveaux 等人, J. Clin. Invest, 1978, 62 :176)。他们注意到,过敏性及非过敏性个体中的 Fc ε RI 密度介于每一嗜碱性粒细胞 104 至 106 个受体之间。后来证明,用抗 IgE 剂治疗过敏性疾病可将循环 IgE 的量降低至治疗前水平的 1% (MacGlashan 等人, J. Immunol., 1997, 158 :1438-1445)。MacGlashan 对从用全抗 IgE 抗体治疗的患者中获得的血清进行分析,其中全抗 IgE 抗体可结合在患者血清中循环的游离 IgE。他们报导,降低患者体内循环 IgE 的水平可导致嗜碱性粒细胞表面上的受体数量减少。因此,他们猜测,嗜碱性粒细胞及肥大细胞表面上 Fc ε RI 的密度直接或间接由循环 IgE 抗体的水平调节。

[0008] 最近, WO 99/62550 揭示使用 IgE 分子及片段,其结合至 Fc ε RI 及 Fc ε RII IgE 结合位点,从而阻断 IgE 与受体的结合。然而,对这些过敏性疾病的治疗不具有有害副作用的有效治疗方法仍极为有限。一种治疗过敏性疾病的方法涉及使用人源化抗 IgE 抗体来治疗过敏性鼻炎及哮喘 (Come, J. 等人, J. Clin. Invest. 1997, 99 :879-887 ;Racine-Poon, A. 等人, Clin. Pharmacol. Ther. 1997, 62 :675-690 ;Fahy, J. V. 等人, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1997, 155 :1824-1834 ;Boulet, L. P. 等 人, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 1997, 155 : 1835-1840 ;Milgrom, E. 等人, N. Engl. J. Med., 1999, 341 :1966-1973)。这些临床数据表明,抑制 IgE 与其受体的结合是一种治疗过敏性疾病的有效方法。

[0009] 适合作为抗过敏剂的抗体应与可分化成产生 IgE 的血浆细胞的表面 IgE 阳性 B 细胞反应,因此其可用于在功能上消除那些 B 细胞。然而, IgE 抗体原则上亦可通过交联 Fc ε 受体引发 IgE 敏化的肥大细胞释放介体,从而拮抗施加于血清 IgE 及 sIgE+B 细胞水平上的有益作用。因此,适合于治疗过敏的抗体必须能与敏化肥大细胞及嗜碱性粒细胞上结合的 IgE 反应,但亦能保持识别 sIgE+B 细胞的能力。

[0010] 此等 IgE 同种型特异性抗体已由 Chang 等人 (Biotechnology 8, 122-126 (1990))、欧洲专利第 EP0407392 号及数个美国专利例如美国专利第 5, 449, 760 号阐述。然而,由于所揭示的抗体不是来自人类,因此作为异源蛋白质的免疫原性导致其不适合用于人类。这一缺点有可能通过将 (例如) 一啮齿动物抗 IgE 单克隆抗体转化成一嵌合抗体而降低,其

中该嵌合抗体将啮齿动物抗体的可变结构域与人类抗体的恒定结构域结合在一起。该方法保留了啮齿动物亲代抗 IgE 抗体的抗原结合位点,同时赋予人类同种型及效应功能。嵌合抗体的免疫原性可通过下述方法降低,即将啮齿动物超变区(亦称为互补决定区(CDR))嫁接到人类轻和重链可变区结构域的骨架,产生重构人类抗体。该技术涉及将那些存在于“一般的”人类重及轻链可变结构域中的序列用抗原特异性啮齿动物 CDR 序列取代或重组嫁接(美国专利第 6,180,370 号)。

[0011] 天然完整的免疫球蛋白或抗体包含一通常呈 Y 形的四聚体分子,该四聚体分子在每一上臂的末端具有一抗原结合位点。一抗原结合位点由一轻链的可变结构域结合一重链的可变结构域而组成。更具体而言,一抗体的抗原结合位点主要由一重链可变结构域(VH)的 3 个 CDR 和轻链可变结构域(VL)的 3 个 CDR 形成。在 VL 及 VH 二者中,CDR 均与 4 个骨架区(FR)交替出现,形成一具有以下通式的多肽链

[0012] (i)FR 1-CDR 1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4(I),

[0013] 其中该多肽链阐述为在 N 末端开始并在 C 末端结束。VH 与 VL 的 CDR 亦分别称为 H1、H2、H3 和 L1、L2、L3。FR 或 CDR 构成成份通常是通过比较在同一物种中获得的多个抗体的氨基酸序列来确定且一般鉴定规则在业内为人习知(“Sequences of proteins of immunological interest”, Kabat E. A. 等人, US department of health and human service, Public health service, National Institute of Health)。

[0014] 一轻链可变结构域对结合力的影响与相关重链可变结构域对结合力的影响相比较小,并且单独的重链可变结构域自身即具有一抗原结合活性。这些分子通常称为单结构域抗体(Ward, E. S. 等人, Nature 341, 544-546(1989))。

[0015] 这些 CDR 形成环,其在这些结构域内与一 β 片状骨架相连接。环的氨基酸序列与结构间的关系可以用一个规则结构模型描述(Chothia 等人, Nature 342, 887-883(1989))。根据此模型,抗体的每一超变区仅具有几个主链构造或“规则结构”。这些构造通过在 CDR 中和(对于某些环而言)在骨架区中特定位点处存在几个关键氨基酸残基来确定。

[0016] 在不同的免疫球蛋白中具有相同构造的超变区在这些位点处具有相同或非常相似的氨基酸残基。

[0017] 人们已对单克隆抗体实施 CDR 嫁接,产生结合亲和力显著低于啮齿动物 CDR 供体抗体的人源化人类抗体。各种发现已经显示,除了 CDR 转移外,在某些情况下可能需要在人类序列骨架内进行变化,以在 CDR 嫁接产品中提供满意的抗原结合活性。Queen 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989))揭示,一鼠科动物抗 -Tac 单克隆抗体的 CDR 可嫁接到一人类骨架中。该些人类骨架经选择,以最大化与鼠科动物序列的同源性。作者使用鼠科动物亲代抗体的计算机模型来确定位于 FR 内的其接近程度足以与这些 CDR 或抗原相互作用的氨基酸残基。将这些残基突变成在鼠科动物序列中发现的残基。此人源化抗 -Tac 抗体仅具有一约为该鼠科动物抗 -Tac 抗体的 1/3 的亲和力,并且此抗体人类特征的维持也颇成问题。

[0018] 治疗 IgE 水平极高的疾病可能需要一具较高亲和力的抗体,以降低免疫原性的风险,并将临床适应症扩展至具有极高 IgE 水平的疾病,例如异位性皮炎。因此,人类期望获得一人源化程度更高且对 IgE 的亲和力更高的抗 IgE 抗体。本发明中的抗体为一抗人类

IgE 抗体,其具有超高亲和力且更高程度的人类序列同源性,从而降低免疫原性风险。

[0019] 因此,人们需要更高亲和力人源化抗体,这些更高亲和力人源化抗体应能降低治疗疾病所需抗体的量,从而降低由药物免疫原性对患者造成的潜在副作用并降低患者的花费。此外,本发明提高识别出高亲和力抗体的可能性。

发明内容

[0020] 本发明涉及由一亲代抗体产生的高亲和力抗体,尤其是极高亲和力抗 IgE 抗体。这些高亲和性抗体可以一比原始亲代抗体高至少 20 倍的结合亲和力与靶抗原决定部位结合,其中亲和力的增加为高约 100 倍至约 5000 倍。

[0021] 本发明还涉及一种自一亲代抗体分子制造此类高亲和力抗体的方法,其係将人源化与亲合力成熟的一非人类抗体结合于一与其它方法相比可显著增强结合亲和力的快速高效方法中。此方法涉及,通过产生一经随机取代的 CDR 及 / 或骨架区的文库来同时或顺次修饰亲代抗体分子的 CDR 和骨架区,及筛选高亲和力分子。

[0022] 本发明一实施例

附图说明

[0023] 图 1 是用于抗体克隆和筛选的噬菌体载体的示意图。

[0024] 图 2 是用于产生抗体变体的寡核苷酸的示意图。

[0025] 图 3A 绘示鼠科动物抗 -IgE 抗体 TES-C21 的轻链与 L16 和 JK4 组合人类模板的比较情况。

[0026] 图 3B 绘示 TES-21 的重链与组合人类模板 DP88 和 JH4b 的比较情况。

[0027] 图 4 展示与亲代 TES-21 比较具高亲和力的骨架残基变体表。

[0028] 图 5A 及 B 绘示纯系 4、49、72、78、及 136 的 ELISA 滴定曲线,此是与 TES-C21 的亲代 Fab 及阴性对照 (5D12) 相比较。

[0029] 图 6 绘示对纯系 2C、5A、及 51 的抑制分析,此是与亲代 TES-21 和一阴性对照抗体相比较。

[0030] 图 7A 绘示具有一可导致甚至更高 IgE 亲和力的有益突变组合的纯系的序列。

[0031] 图 8A 和 8B 绘示纯系 136、1、2、4、8、13、15、21、30、31、35、43、44、53、81、90 和 113 的整个轻链可变区的骨架序列。

[0032] 图 9A 和 9B 绘示 35 个纯系的整个重链可变区的骨架序列。图 10A 至 F 绘示纯系 136、2C、5I、5A、2B、及 1136-2C 的完整重链和轻链序列。

[0033] 图 10A 至 F 绘示纯系 136、2C、5I、5A、2B 及 1136-3C 的完整重及轻链序列。

具体实施方式

[0034] 整个本申请案中所用术语应理解为具有所属领域的技术人员习知的通常及典型意义。然而,本申请案的申请者期望下列术语具有如下所定义的特定定义。

[0035] 短语“实质上相同的”就一抗体链多肽序列而言可解释为与参考多肽序列相比显示至少 70%、或 80%、或 90%或 95%的序列一致性的抗体链。该术语就一核酸序列而言可解释为与参考核酸序列相比显示至少约 85%、或 90%、或 97%的序列一致性的核酸序列。

[0036] 术语“一致性”或“同源性”应理解为指在比对序列并引入空位（若需要）以达到整个序列的最高百分比一致性后，候选序列中与拟比较对应序列的残基相同的氨基酸残基的百分比，其中不将任何保守取代视为序列一致性的一部分。N-或C-末端延伸或插入均不应理解为降低一致性或相同性。用于比对的方法及计算机程序在业内众所周知。序列一致性可使用序列分析软件测量。

[0037] 术语“抗体”以广义使用，并且具体而言涵盖单克隆抗体（包含全长单克隆抗体）、多克隆抗体和多特异性抗体（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。尽管抗体可对于一特定靶展示结合特异性，但免疫球蛋白既包括抗体亦包括其他缺乏靶特异性的抗体样分子。天然抗体和免疫球蛋白通常为约 150,000 道尔顿的四聚体糖蛋白，由两条相同的轻（L）链和两条相同的重（H）链组成。每一条重链在一端均具有一可变结构域（VH），后接多个恒定结构域。每一条轻链均在一端具有一可变结构域（VL）并在其另一端具有一恒定结构域。

[0038] 本文所用“抗人类 IgE 抗体”指一以可抑制或实质降低人类 IgE 与高亲和力受体 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 结合的方式结合至人类 IgE 的抗体。术语“可变”在抗体可变结构域之语境中指此一事实，即抗体之间的这些可变结构域的某些部分在序列上极为不一致，并用于每一特定抗体对其特定靶的结合及特异性。然而，此可变性在抗体的所有可变区域中并非均匀分布。其集中于三个在轻链和重链可变结构域中均存在的片段中，这些片段称为互补决定区（CDR），又称为超变区。可变结构域中保守程度更高的部分称为骨架（FR）。天然重链和轻链的可变结构域各包括 4 个主要采用 β -薄片构造的 FR 区，其由三个 CDR 连接，形成环连接，在某些情况下形成 β -薄片结构的一部分。每一链中的 CDR 皆借助 FR 区紧密地结合在一起并与其他链的 CDR 一起促成抗体的靶结合位点的形成（参见 Kabat 等人）。除非另有说明，否则本文所用免疫球蛋白氨基酸残基编号乃依照 Kabat 等人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）。

[0039] 术语“抗体片段”指一全长抗体的一部分，通常指靶结合或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、 F(ab')_2 和 Fv 片段。短语一抗体的“功能片段或类似物”是具有与全长抗体一样的定性生物活性的化合物。例如，抗 IgE 抗体的一功能片段或类似物是一可与一 IgE 免疫球蛋白结合以便可防止此分子具有与该高亲和力受体 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 结合的能力或实质降低该能力的化合物。本文所用“功能片段”就抗体而言是指 Fv、F(ab) 和 F(ab')_2 片段。一“Fv”片段是最小的抗体片段，其包含一完整的靶识别和结合位点。此区域由一个重链可变结构域与一个轻链可变结构域呈紧密非共价联接的二聚体（VH-VL 二聚体）组成。每一可变结构域的三个 CDR 即是以该构造相互作用，从而在该 VH-VL 二聚体的表面上界定一靶结合位点。这六个 CDR 共同赋予了此抗体靶结合特异性。然而，即使一单个可变结构域（或仅包含三个对一靶具特异性的 CDR 的半个 Fv）亦具有识别和与靶结合的能力，但其亲和力以比整个结合位点要低。“单链 Fv”或“sFv”抗体片段包括一抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域呈一单多肽链形式。一般而言，Fv 多肽进一步包含一位于 VH 和 VL 结构域之间的多肽连接体，该连接体能使 sFv 形成期望的靶结合结构。Fab 片段包含轻链的恒定结构域及重链的第一恒定结构域（CH1）。Fab' 片段因在重链 CH1 结构域的羧基端增加了几个残基而与 Fab 片段不同，这些残基包括一或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。F(ab') 片段

是由在 $F(ab')_2$ 胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键断裂而产生。抗体片段的其他化学结合已为所属领域的技术人员习知。

[0040] 本文所用术语“单克隆抗体”指一自一群实质上同源的抗体获得的抗体,即,构成该抗体群的单个抗体除了可能含有天然发生的可少量存在的突变外完全相同。单克隆抗体具高度特异性,其针对一单个靶位点。而且,与通常包括针对不同决定子(抗原决定部位)的不同抗体的传统(多克隆)抗体制品相反,每一单克隆抗体皆针对靶上的一单个决定子。除其特异性外,单克隆抗体的优势在于其可通过杂交瘤培养合成,不受其他免疫球蛋白的污染。修饰词“单克隆的”表明该抗体是自一实质上同源的抗体群获得的特性,不能理解为需要借助任一特殊方法来生产该抗体。例如,用于本发明的单克隆抗体可使用习知技术自噬菌体抗体文库分离得到。依照本发明使用的亲代单克隆抗体可通过由 Kohler 和 Milstein(Nature 256, 495, 495(1975)) 最先阐述的杂交瘤方法制得,或可通过重组方法制得。

[0041] 非人类(例如鼠科动物)抗体的“人源化”形式为嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如, F_v 、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 或抗体的其他靶结合序列),其包含最低限度的源自非人类免疫球蛋白的序列。一般而言,人源化抗体包含实质上全部的至少一个且通常两个可变结构域,其中全部的或实质上全部的 CDR 区对应于一非人类免疫球蛋白的 CDR 区,且全部的或实质上全部的 FR 区为人类免疫球蛋白共有序列的 FR 区。人源化抗体也可包括一免疫球蛋白恒定区(F_c)(通常为一所选人类免疫球蛋白模板的恒定区)的至少一部分。

[0042] 术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”包括子代。也应了解,所有子代的 DNA 含量可能因特意的或无意的突变而不精确相同。当在最初转化的细胞中筛选时具有相同功能或生物学特性的变异子代可包括在内。本发明所用的“宿主细胞”通常为原核宿主或真核宿主。

[0043] 用 DNA “转化”一细胞有机体意指将 DNA 引入一有机体中,使该 DNA 可作为一个染色体外因子或借助染色体整合而复制。用 DNA “转染”一细胞有机体是指细胞或有机体接纳 DNA(例如,一表达载体),无论事实上是否有任何编码序列被表达。术语“经转染的宿主细胞”和“经转化的细胞”是指一将 DNA 引入其中的细胞。该细胞称为“宿主细胞”,并且其可为原核细胞或真核细胞。典型的原核宿主细胞包括多种大肠杆菌菌株。典型的真核宿主细胞为哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或人源细胞。所引入的 DNA 序列可能来自与宿主细胞相同的物种或来自一与宿主细胞不同的物种,或其可为一含有一些外来 DNA 和一些同源 DNA 的杂合 DNA 序列。

[0044] 术语“载体”意指一种 DNA 构筑体,其包含一可以操作方式连接至一能够影响该 DNA 在一适宜宿主细胞中表达的控制序列的 DNA 序列。此类控制序列包括影响转录的启动子、控制此转录的可选操纵序列、编码适合的 mRNA 核糖体结合位点的序列和控制转录与转译的终止的序列。所述载体可为一质粒、一噬菌体微粒或仅为潜在的基因组插入体。一旦转化到一适合的宿主中,该载体可不受宿主基因组限制而进行复制并行使作用,或在某些情况下可整合进基因组本身中。在本说明书中,由于质粒是载体的最常用形式,因此“质粒”和“载体”有时可互换使用。然而,本发明意欲涵盖可起到等效作用并已经或正在为业内人士所了解的其他载体形式。

[0045] 表述“控制序列”指一以可操作方式连接的编码序列在一特定宿主有机体内表达

所必需的 DNA 序列。举例而言,适于原核生物的控制序列包括启动子、视情况操纵序列及核糖体结合位点。人们已经知道,真核细胞可利用启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。若前序列或分泌前导序列的 DNA 表达为一参与一多肽分泌的前蛋白,则该前序列或分泌前导序列 DNA 能以可操作方式连接至此多肽的 DNA;若一启动子或增强子可影响一编码序列的转录,则此启动子或增强子能以可操作方式连接至该编码序列;或者,若一核糖体结合位点可影响一编码序列的转录,则该核糖体结合位点能以可操作方式连接至该编码序列;或者,若一核糖体结合位点之位置可促进转译,则该核糖体结合位点能以可操作方式连接至一编码序列。一般而言,“以可操作方式连接”指被连接的 DNA 序列是连续的,并且当为一分泌前导序列时是既连续又处于阅读状态。然而,增强子则无需是连续的。用于治疗目的的“哺乳动物”指任何归为哺乳动物的动物,包括人类、家畜及饲养动物、非人类灵长类动物,以及动物园中的动物、运动场上的动物或宠物,例如狗、马、猫、牛等等。

[0046] 术语“抗原决定部位标记的”当用于多肽语境中时指一与“抗原决定部位标签”融合的多肽。该抗原决定部位标签多肽具有足够多的残基以提供一可制造针对其的抗体的抗原决定部位,但却足够短而不会干扰多肽的活性。该抗原决定部位标签最好也是相当独特,这样抗体基本不会与其他抗原决定部位发生交叉反应。适合的标签多肽一般具有至少 6 个氨基酸残基并通常介于约 8 至 50 个氨基酸残基之间(较佳介于约 9 至 30 个残基之间)。实例包括流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5(Field 等人, Mol Cell Biol. 8: 2159-2165(1988));c-myc 标签和针对其的 8F9、3C7、6E10、G4、B 7 和 9E10 抗体(Evan 等人, Mol Cell Biol. 5(12):3610-3616(1985));及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体(Paborsky 等人, Protein Engineering 3(6):547-553(1990))。在某些实施例中,该抗原决定部位标签可为一 IgG 分子(例如, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)Fc 区的抗原决定部位,其中 Fc 负责增加 IgG 分子的体内血清半衰期。

[0047] 本文所用词语“标记”指一可直接或间接地与一分子或蛋白质(例如,抗体)结合的可检测到的化合物或组合物。该标记自身可检测到(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或当为酶标记时可催化一可检测的基质化合物或组合物的化学改变。

[0048] 本文所用“固相”指一本发明抗体可粘附于其上的非水性基质。本文所涵盖固相的实例包括那些部分或完全由玻璃(例如,可控孔径玻璃)、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固相。在某些实例中,视上下文而定,固相可包括分析板孔;在其他实施例中其可为一提纯柱(例如,一亲和色谱柱)。

[0049] 本文所用术语“IgE-介导的病症”指一种状况或疾病,其特征在于免疫球蛋白 IgE 超量产生及/或对 IgE 具有超敏性。特定言之,其应理解为包括与过敏性超敏反应和变应性过敏有关的状况,包括(例如):哮喘、过敏性鼻炎和结膜炎(干草热)、湿疹、荨麻疹、异位性皮炎和食物过敏。由(例如)蜜蜂蜇、蛇咬、食物或药物引起的过敏性休克这一严重的生理学状况也涵盖于此术语范围内。

[0050] 抗体的产生

[0051] 起始或“亲代”抗体可用业内现有的用于产生此类抗体的技术制得。这些技术众所周知。产生起始抗体的例示性方法在随后部分中有更详尽的阐述。这些阐述内容是制备或选择一亲代抗体的可能替代方法,而绝非限制产生此一分子的方法。

[0052] 该抗体的结合亲和力在产生一本发明高亲和力抗体前确定。并且,此抗体可经受

其他生物学活性测定,例如,以便评价作为治疗剂的效力。此等测试在业内已知并取决于此抗体的靶和期望用途。

[0053] 为筛选出结合至一特定抗原决定部位(例如,那些可阻断 IgE 结合至其高亲和力受体的抗原决定部位)的抗体,可实施一常规阻断测试,例如阐述于“Antibodies :A Laboratory Manual”(Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988))中的常规阻断测试。或者,也可实施抗原决定部位作图以确定抗体与一相关抗原决定部位相结合的位置。视情况,可使用业内熟知的技术评价抗体对用来产生此抗体的靶同源物(其中该同源物来自一不同物种)的结合亲和力。在一实施例中,该其它物种为一将在临床前研究中将该抗体授予其的非人类哺乳动物。因此,该物种可为一非人类灵长类动物,例如恒河猴、猕猴、狒狒、黑猩猩和短尾猿。在其他实施例中,该物种可为(例如)一啮齿动物、猫或狗。此亲代抗体可依照本发明经改变而产生一比亲代抗体具有更高或更强靶结合亲和力的抗体。所得高亲和力抗体的靶结合亲和力优选比亲代抗体靶结合亲和力高至少约 10 倍或至少约 20 倍或至少约 500 倍或可能高 1000 至 5000 倍。需要或期望的结合亲和力增强的程度将取决于亲代抗体的初始结合亲和力。

[0054] 一般而言,自一亲代抗体制备高亲和力抗体的方法包括以下步骤:

[0055] 1. 获得或选择一可结合至相关靶的亲代抗体,其应包含重链和轻链可变结构域。此可通过传统杂交瘤技术、噬菌体展示技术、或任一其他可产生靶特异性抗体的方法完成。

[0056] 2. 选择一序列与亲代骨架序列接近的骨架序列,较佳为一人类模板序列。该模板的选择可基于(例如)其相对总长度、CDR 大小、位于骨架与 CDR 之间连接点处的氨基酸残基、总体同源性等。所选模板可为多个序列的混合体或可为共有模板。

[0057] 3. 通过在各个和所有可能的 CDR 位置进行随机氨基酸取代产生一纯系文库。亦可用所有可能的氨基酸随机取代人类骨架模板中(例如)毗邻 CDR 或可影响结合或折叠的氨基酸,产生一骨架取代文库。可估计这些骨架取代对靶结合和抗体折叠的潜在影响。骨架中的氨基酸取代可与 CDR 中的氨基酸取代同时进行或顺次进行。一种用来产生变体文库的方法是寡核苷酸合成。

[0058] 4. 构建一包含步骤(3)中产生的重链和/或轻链变体的表达载体,其包括式:FRH 1-CDRH 1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4(I)及 FRL 1-CDRL 1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4(II),其中 FRL 1、FRL2、FRL3、FRL4、FRH1、FRH2、FRH3 及 FRH4 代表步骤 3 中所选骨架模板轻链和重链序列的变体,并且 CDR 代表亲代抗体 CDR 的变体 CDR。一含有此等轻链和重链序列的载体实例绘示于图 1 中。

[0059] 5. 针对该特定靶筛选纯系文库,对那些可与该靶结合的纯系进行筛选以确定其是否具有提高的结合亲和力。选出那些具有比亲代分子高的结合亲和力的纯系。最佳高亲和力候选者与亲代抗体比较应具有尽可能高的结合亲和力,优选为比后者高 20 倍、100 倍、1000 倍或 5000 倍。若所选变体包含某些非期望的氨基酸,例如一已被引入的糖基化位点或一潜在的免疫原性位点,则可用更有利的氨基酸残基取代那些氨基酸,并重新评估结合亲和力。

[0060] 通过保持人类骨架区不动,仅随机地取代 CDR 区,也可使用此方法自一全人类亲代抗体产生高亲和力抗体。

[0061] 改良的高容量筛选技术及载体(例如图 1 中所载体)使得技术人员可迅速并高效地对一给定 CDR 和/或骨架区中所有位点处的综合取代文库进行筛选。通过同时随机地取

代所有位点的所有氨基酸,能够筛选出原来不能由单个取代预见或识别的因(例如)协同作用而显著增强亲和力的可能组合。

[0062] 亲代抗体制备

[0063] A. 靶制备

[0064] 可溶性靶或其片段可用作产生抗体的免疫原。抗体针对相关靶。较佳地,靶为一生物学上重要的多肽,并且将抗体授予一患有疾病或病症的哺乳动物后可在此动物体内产生治疗益处。然而,抗体可针对非多肽靶。当靶为一多肽时,其可为一跨膜分子(例如受体)或配体,例如一生长因子。本发明的一靶为 IgE。全细胞可用作免疫原来制备抗体。靶可以重组方式制备或使用合成方法制造。靶亦可自一天然来源分离出来。

[0065] 对于跨膜分子,例如受体,其片段(例如,一受体的细胞外结构域)可用作免疫原。或者,表达该跨膜分子的细胞可用作免疫原。这些细胞可源自一天然来源(例如,肥大细胞系)或可为已通过重组技术转化而表达该跨膜分子的细胞。所属领域的技术人员将明了其他靶及其用于制备抗体的形式。

[0066] B. 多克隆抗体

[0067] 多克隆抗体通常在非人类哺乳动物中通过多次皮下或腹腔内注射与一佐剂联合的相应靶而产生。将相应靶与一欲免疫物种内具免疫原性的蛋白质(例如钥孔虫凝血兰素(keyhole limpet hemocyanin))结合较为有用。众多可引起一免疫学反应的因子为业内人员所熟知。

[0068] 可通过将该蛋白质或结合物(分别对于兔子或小鼠而言)与弗罗因德氏(Freud's)完全佐剂组合并将该溶液以皮内方式注射使动物对靶、免疫原性结合物或衍生物免疫。一个月后,通过多位点皮下注射对这些动物追加 1/5 到 1/10 的最初量的溶于弗罗因德氏完全佐剂中的肽或结合物。7 到 14 天后,抽取这些动物的血液并对血清进行抗体滴度分析。对这些动物追加上述溶液直至滴度达到稳定状态。

[0069] 所选择的哺乳动物抗体通常会具有一足够强的靶结合亲和力。例如,该抗体可以约 1×10^{-8} M 的结合亲和力(Kd)值与人类抗 IgE 靶结合。抗体亲和力可通过饱和结合法、酶联免疫吸附分析(ELISA)和竞争分析(例如,放射免疫测定)测定。

[0070] 为筛选可与相关靶结合的抗体,可实施一常规交叉测试,例如 Antibodies(A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 及 David Lane, 1988)中所述测试。或者,可实施抗原决定部位作图(例如,如 Champe 等人在 J. Biol. Chem. 270: 1388-1394(1995)中所阐述)以测定结合情况。

[0071] C. 单克隆抗体

[0072] 单克隆抗体是识别一单抗原位点的抗体。其一致的特异性使单克隆抗体比多克隆抗体更有用,而多克隆抗体通常含有可识别多个不同抗原位点的抗体。单克隆抗体可使用首先由 Kohler 等人在 Nature(256:495, 1975)中阐述的杂交瘤方法制备,或可使用重组 DNA 方法制备。在杂交瘤方法中,如上所述免疫一小鼠或其他合适的宿主动物(例如一啮齿动物)以诱发可产生或能够产生特异性地与免疫所用蛋白质相结合的抗体的淋巴细胞。或者,也可以在体外对淋巴细胞进行免疫。随后使用一适合的融合剂(例如,聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成一杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 590-103(Academic Press, 1986))。

[0073] 将如此制备的杂交瘤细胞在一适宜的培养基中接种并生长,该培养基中较佳含一或多种可抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)这一酶,则用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤及胸苷(HAT 培养基)、可防止 HGPRT 缺乏细胞的生长的物质。较佳骨髓瘤细胞是那些可高效融合、支持所选抗体产生细胞以稳定的高水平产生抗体且对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的细胞。已有人阐述,可使用人类骨髓瘤及小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系产生人类单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol. 133 :3001(1984); Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63(Marcel Dekker 公司, 纽约, 1987))。

[0074] 在鉴别出可产生具有期望特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可通过有限稀释程序将这些纯系加以亚克隆并用标准方法加以培养(Goding, Monoclonal Antibodies :Principals and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适用于此目的的培养基包括。适宜情况为,由这些亚纯系分泌的单克隆抗体通过传统免疫球蛋白纯化程序(例如,蛋白质 A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法)自培养基中分离出来。

[0075] 编码单克隆抗体的 DNA 可使用传统程序容易地分离出来并测序(例如,通过使用能特异性地与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞可作为此类 DNA 的一种来源。分离后,可将此 DNA 置于表达载体中,随后将表达载体转移至宿主细胞(例如大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞)中,以在这些重组宿主细胞中实现单克隆抗体的合成。亦可通过(例如)用人类重链及轻链恒定结构域的编码序列来代替同源鼠科动物序列(美国专利第 4,816,567 号;Morrison 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81 :6851(1984))或通过共价地连接至免疫球蛋白多肽来修饰 DNA。

[0076] D. 人源化抗体

[0077] 人源化是一种制造嵌合抗体的技术,其中,实质上少于一个完整的人类可变结构域的部分已由来自一非人类物种的对应序列取代。人源化抗体中引入一或多个来自一非人类来源的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常称为“引入”残基,其通常取自一“引入”可变结构域。人源化基本上可依照 Winter 和合作者(Jones 等人, Nature 321 :522-525(1986); Riechman 等人, Nature 332 :323-327(1988); Verhoeyens 等人, Science 239 :1534-1536(1988))的方法实施,用非人类 CDR 的或 CDR 序列取代人类抗体中的对应序列(参见,例如,美国专利第 4,816,567 号)。如本发明中所实施,人源化抗体中的一些 CDR 残基和一些 FR 残基可由鼠科动物抗体中类似位点的残基取代。

[0078] 欲用于制备人源化抗体的人类可变结构域的选择(包括轻链和重链两者)对于降低抗原性非常重要。根据所谓“最恰当”方法,将一非人类抗体可变结构域的序列与一习知人类可变结构域序列文库相比较。然后将与非人类亲代抗体的序列最接近的人类序列视为此人源化抗体的人类骨架(Sims 等人, J. Immunol. 151 :2296(1993); Chothia 等人, J. Mol. Biol. 196 :901(1987))。另一方法使用一源自一特定轻链或重链亚型的所有人类抗体的共有序列的特定骨架。该同一骨架可用于数种不同的人源化抗体(Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992); Presta 等人, J. Immunol. 151 :2623(1993))。

[0079] E. 抗体片段

[0080] 人们已经开发了多种制备抗体片段的技术。传统上,这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化获得(参见,例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等人,Science 229:81(1985))。然而,这些片段如今可通过重组宿主细胞直接制备。举例而言,这些抗体片段可以从一抗体噬菌体文库中分离得到。或者,F(ab')₂-SH片段可以直接从大肠杆菌重新获得并用化学方法偶联以形成F(ab')₂片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。依照另一方法,F(ab')₂片段可直接自重组宿主细胞培养物中分离得到。所属领域的技术人员应明了其他制备抗体片段的方法。在其他实施例中,所选抗体是一单链Fv片段(scFv)。(PCT专利申请案WO 93/16185)。

[0081] 高亲和力和抗体的制备

[0082] 当亲代抗体已经识别并分离出来后,改变此亲代抗体的一或多个可变结构域中的一或多个氨基酸残基。或者,或另外,可将一或多个骨架残基的取代引入该亲代抗体,其中这些取代可导致抗体(例如对人类IgE的)结合亲和力增强。欲修饰骨架区残基的实例包括那些以非共价方式直接与靶结合的残基(Amit等人,Science 233:747-753(1986));与CDR相互作用/影响CDR构造的残基(Chothiau等人,J. Mol. Biol. 196:901-917(1987));和/或参与形成VL-VH接合部位的残基(EP 239400 B1)。在某些实施例中,对一或多个此骨架区残基加以修饰可导致抗体对相关靶的结合亲和力增强。

[0083] 对抗体生物学特性的修饰可通过选择对于保持下列特征的作用显著不同的取代:(例如)(a)取代区域中多肽主链的结构,例如,呈一薄片或螺旋状构造形式;(b)靶位点处分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的大小。非保守性取代将需要将这些种类之一调换成另一种类。

[0084] 编码氨基酸序列变体的核酸分子可通过多种业内熟知的方法制备。这些方法包括(但不限于)该物种依赖性抗体的一早期制备变体或非变体形式的寡核苷酸介导的(或定位)诱变、PCR诱变及盒式诱变。产生变体的较佳方法是一寡核苷酸介导的合成。在某些实施例中,该抗体变体将仅有单个超变区残基受到取代,例如自约2至约15个超变区取代。

[0085] 一种产生变体文库的方法是根据图2中所述方案通过由寡核苷酸介导的合成来达成。可跨越整个轻链或重链可变区合成三种各具有约100个核苷酸的寡核苷酸。每一寡核苷酸可包含:(1)一段60个氨基酸长的序列,由三联体(NNK)20生成,其中N为任一核苷酸且K为G或T,和(2)与下一寡核苷酸或与每一末端载体序列重叠的一约15至30个核苷酸的重叠序列。当在一PCR反应中将这三个寡核苷酸退火时,聚合酶将填充入相反链中,产生一完整的双链重链或轻链可变区序列。三联体的数目可调整至任一重复长度,并且其在寡核苷酸中的位置可经选择以便仅取代一给定CDR或骨架区中的氨基酸。通过使用(NNK),所有二十种氨基酸皆可能位于被编码变体中的每一位置。5至10个氨基酸(15至30个核苷酸)的重叠序列将不会被取代,但此可经选择落入此骨架的堆叠区内,或可通过一单独的或随后的合成操作加以取代。合成寡核苷酸的方法为业内人员所熟知,并且也可以购得。自这些寡核苷酸产生抗体变体的方法为业内人员所熟知,例如,PCR。

[0086] 重链和轻链变体(在其序列的任意位置处不同)的文库可在任一表达载体中构建,例如一噬菌体,特别是图1的载体,每一皆含有一编码一特定重链和轻链变体的DNA。

[0087] 抗体变体产生后,测定变体相对于亲代抗体的生物学活性。如上文所述,此涉及测定变体对靶的结合亲和力。现有多种高效方法可用来快速筛选抗体变体结合至相关靶的能力。

[0088] 随后对从这次最初筛选得到的一或多种抗体变体实施相对于亲代抗体结合亲和力增强的筛选。一测定结合亲和力的常用方法是使用一 BIAcore™ 表面胞质团共振系统(BIAcore 公司)评估结合和解离速率常数。依照制造商的(BIAcore)说明,将一生物传感器芯片激活用于靶的共价偶联。然后将靶稀释并注射至芯片上以获得固定化材料的响应单元(RU)中的一信号。由于该 RU 中的信号与固定化材料的质量成比例,所以这样就可以表现基质上固定化靶密度的范围。将解离数据拟适至一单位点模型以获得 $k_{off} \pm s.d$ (测量值的标准偏差)。计算每一结合曲线的准一级速度常数(k_s),并标绘为一蛋白质浓度的函数以获得 $k_{on} \pm s.e$ (拟合标准误差)。结合的平衡解离常数(K_d')可自 SPR 测量值计算得出,以 k_{off}/k_{on} 表示。由于平衡解离常数 K_d 与 k_{off} 成反比,因此可假定结合速度(k_{on})是一对所有变体皆适用的常数来估算亲和力提高情况。

[0089] 视情况可对所得具有高亲和力的候选者实施一或多种额外的生物学活性测试以证实该(等)具有增强的结合亲和力的抗体变体仍旧保留着期望的治疗特性。举例而言,对于抗 IgE 抗体,可筛选那些阻断 IgE 与其受体结合并抑制组胺释放的变体。最佳抗体变体可保持以一显著高于亲代抗体的结合亲和力与靶结合的能力。

[0090] 视抗体的预期用途而定,经常可对如此选择的抗体变体进行进一步修饰。此等修饰可包括进一步改变氨基酸序列、融合至异源多肽和/或共价修饰,例如那些在下文详细阐述者。举例而言,通常用丝氨酸取代任何不参与维持抗体变体的正确构象的半胱氨酸残基,以提高分子的氧化稳定性并阻止异常交联。相反地,可将一或多个半胱氨酸键添加至抗体中以提高其稳定性(特别地在该抗体为一抗体片段例如 Fv 片段的情况下)。

[0091] 载体

[0092] 本发明也提供编码如本文所揭示抗体的单独核酸、包含该核酸的载体及宿主细胞、和用于制造该抗体变体的重组技术。对于该抗体变体的重组制造,需将编码该抗体变体的核酸分离出来并将其插入一可复制载体中用以进一步克隆(扩增 DNA)或用以表达。编码单克隆抗体的 DNA 可使用传统程序容易地分离出来并测序(例如,通过使用能特异性地与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因结合的寡核苷酸探针)。

[0093] 有多种载体可以利用。载体部分一般包括(但不限于)下列中的一或多种:一信号序列、一复制起点、一或多种标记基因、一增强子元件、一启动子和一转录终止序列。

[0094] 图 1 中描绘的噬菌体表达载体由一通用 M13 载体和 M13 自身的基因 III 病毒分泌信号组成,该信号可用于快速分泌并筛选具有适当结合特异性和最低亲和力标准的变体 Fab。此载体不使用完整的基因 III 序列,因此在细菌细胞的表面上没有展示,而是将这些 Fab 分泌至细胞周质间隙中。或者,这些 Fab 可在细胞质中表达并分离出来。此重链和轻链各自具有其自己的病毒分泌信号,但却以依赖方式自单个强诱导型启动子表达。

[0095] 图 1 中载体也可以提供一组氨酸标签和一 myc 标签,以便于纯化及检测。所属领域的技术人员应认识到,Fab 可自不同的启动子独立表达,或该分泌信号无需是所选病毒序列,但可以是一适合于自所选宿主细胞分泌抗体片段的原核或真核信号序列。亦应了解,重链和轻链可存在于不同的载体上。

[0096] A. 信号序列部分

[0097] 本发明的抗体变体可以重组方式制备。该变体也可以表达为一与一异源多肽融合的融合多肽,该异源多肽较佳为一信号序列或其他在成熟蛋白质或多肽的 N 末端具有一特定切割位点的多肽。所选异源信号序列较佳为一被宿主细胞识别和加工(即由信号肽酶分割)的序列。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,可用一选自(例如)碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或热稳定肠毒素 II 前导序列的组群的原核信号序列取代该信号序列。或当为图 1 的载体时,所选信号序列为一得自基因 III 的病毒信号序列。对于酵母菌分泌,该天然信号序列可用(例如)酵母菌转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括酵母属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) α 因子前导序列)、或酸性磷酸酯酶前导序列、白色念珠菌(*C. albicans*) 葡萄糖淀粉酶引导部分、或 WO 90/13646 中阐述的一信号取代。在哺乳动物细胞表达中,可利用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。此前导区的 DNA 在阅读框内可连接至编码该抗体变体的 DNA 上。

[0098] B. 复制起点部分

[0099] 载体通常含有一可使该载体在一或多个所选宿主细胞内复制的核酸序列。一般而言,此序列能使该载体独立于宿主染色体 DNA 复制,并包括复制起点或自主复制序列。对于多种细菌、酵母菌、和病毒,这些序列众所周知。来自质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数格兰氏阴性细菌,2 μ 质粒起点适合于酵母菌,而多种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)适用于哺乳动物细胞中的载体。一般而言,哺乳动物表达载体不需要复制起点部分(通常可使用 SV40 起点,此仅是因为其含有早期启动子)。

[0100] C. 选择基因部分

[0101] 载体可含有一选择基因,也称为一可选标记。典型选择基因可编码具有以下性质的蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其他毒素(例如,氨苄西林(ampicillin)、新霉素、氨甲蝶呤或四环素)的抗性,(b) 补足营养缺陷型不足,或(c) 供给从复合培养基中无法获得的关键营养素,例如,编码杆菌的 D- 丙氨酸消旋酶的基因。

[0102] 一选择方案的实例使用一药物阻止一宿主细胞的生长。那些用一异源基因成功转化的细胞可产生一提供抗药性的蛋白质并因此在选择方案中存活下来。此优势选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0103] 适合于哺乳动物细胞的另一可选标记实例是那些能鉴别有能力吸收抗体核酸的细胞的可选标记,例如,DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I 和 -II(较佳为灵长类动物金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0104] 例如,用 DHFR 选择基因转化的细胞可首先通过在一含有氨甲蝶呤(Mtx)(DHFR 的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体识别。当采用野生型 DHFR 时,一适当的宿主细胞为缺乏 DHFR 活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0105] 或者,用编码抗体、野生型 DHFR 蛋白和另一可选标记物(例如氨基葡萄糖苷 3' - 磷酸转移酶(APH))的 DNA 转化或共转化的宿主细胞(特别是包含内源性 DHFR 的野生型宿主细胞)可通过在一含有该可选标记的选择剂(例如一氨基糖苷类抗生物素,例如,卡那霉素、新霉素、或 G418)的培养基上进行细胞培养来选择。(美国专利第 No. 4, 965, 199 号)。

[0106] 一适用于酵母菌的选择基因是位于酵母菌质粒 Yrp7 中的 trp1 基因(Stinchcomb

等人, Nature 282 :39 (1979))。该 trp1 基因可为一缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母菌变体菌株 (例如, ATCC 号 44076 或 PEP4-1) 提供一选择标记。Jones, Genetics 85 :Z 12 (1977 年)。于是酵母菌宿主细胞基因组中 trp1 损伤的存在可提供一有效环境以检测不存在色氨酸时的生长导致的转化。同样地, Leu2 缺乏的酵母菌株 (ATCC 20,622 或 38,626) 可通过已知具有 Leu2 基因的质粒补足。

[0107] D. 启动子部分

[0108] 表达和克隆载体通常包含一可被宿主有机体识别并以可操作方式连接至抗体核酸的启动子。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、一色氨酸 (trp) 启动子系统和杂合启动子 (例如 tac 启动子)。然而, 其他已知细菌启动子也是适合的。用于细菌系统中的启动子也可以含有一以可操作方式与编码该抗体的 DNA 相连接的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0109] 已知真核细胞的启动子序列。事实上, 所有真核基因皆具有一 AT- 富集区, 其位于转录起始位点上游约 25 到 30 个碱基处。在许多基因的转录起始点上游 70 到 80 个碱基处发现的另一序列为一 CNCAAT 区, 其中 N 可以是任一核苷酸。在大多数真核基因的 3' 末端是一 AATAAA 序列, 该序列可为向该编码序列的 3' 末端添加 poly A 尾的信号。所有这些序列皆可适合地插入真核表达载体中。

[0110] 用于酵母菌宿主的适宜启动子序列实例包括 3-磷酸甘油酸酯激酶或其他糖酵解酶 (例如, 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-磷酸甘油酸酯变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、及葡糖激酶) 的启动子。其他酵母菌启动子是具有通过培养条件控制转录的额外优势的诱导型启动子, 其为醇脱氢酶 2、异构细胞色素 C、酸性磷酸酯酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。在酵母菌表达中使用的适宜载体和启动子在 EP 73,657 中有进一步阐述。酵母菌增强子与酵母启动子一起使用也较为有利。

[0111] 抗体从哺乳动物细胞中的载体转录可 (例如) 用下列启动子控制: 从病毒例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒 (例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、鸟类肉瘤病毒、巨细胞病毒、一逆转录病毒、肝炎-B 病毒及最佳地猿猴病毒 40 (SV40) 基因组获得的启动子; 从异源性哺乳动物启动子 (例如, 肌动蛋白启动子或一免疫球蛋白启动子) 获得的启动子; 从热激启动子获得的启动子, 前提条件是这些启动子皆与宿主细胞系统相容。

[0112] SV40 病毒的早期和晚期启动子可方便地以亦含有 SV40 病毒复制起点的 SV40 限制性片段形式获得。人类巨细胞病毒的立即早期启动子可方便地以一 HindIII E 限制性片段形式获得。一使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主内表达 DNA 的系统揭示于美国专利第 4,419,446 号中。该系统的一修改形式阐述于美国专利第 4,601,978 号中。或者, 人类 β -干扰素 cDNA 已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得到表达。或者, 劳斯肉瘤病毒 (rous sarcoma virus) 长端重复序列可用作启动子。

[0113] E. 增强子元件部分

[0114] 高等真核细胞对编码本发明抗体的 DNA 的转录通常可通过将一增强子序列插入载体中而增强。如今已知许多来自哺乳动物基因 (球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素) 的增强子序列。然而, 通常, 人们会使用一来自真核细胞病毒的增强子。实例

包括：在复制起点迟侧上的 SV40 增强子 (bp100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点迟侧上的多瘤病毒增强子、和腺病毒增强子。关于用于激活真核启动子的增强元件，也可参见 Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)。此增强子可在抗体编码序列的 5' 或 3' 位处剪接至载体中，但较佳位于距启动子位点 5' 处。

[0115] F. 转录终止部分

[0116] 在真核宿主细胞（酵母菌、真菌、昆虫、植物、动物、人类细胞或来自其他多细胞有机体的有核细胞）中所用表达载体亦可包含终止转录和稳定 mRNA 所需的序列。这些序列通常可自真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' 和（偶而）3' 未转译区获得。这些区域含有转录为编码抗体的 mRNA 未转译部分中多腺苷酸化片段的核苷酸节段。一有用的转录终止部分为牛生长激素多腺苷酸化区。参见，例如，WO 94/11026。

[0117] 宿主细胞的选择和转化

[0118] 在本文中，用于克隆或表达载体中 DNA 的适合的宿主细胞是原核细胞、酵母菌细胞或高等真核细胞。适用于此目的的原核生物包括格兰氏阴性菌和格兰氏阳性菌，举例而言，肠细菌，例如大肠杆菌、肠杆菌、欧文氏菌 (*Erwinia*)、克雷白氏杆菌 (*Klebsiella*)、变形菌 (*Proteus*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia*)、和志贺氏杆菌 (*Shigella*)，以及杆菌、假单胞菌和链霉菌。一较佳的大肠杆菌克隆宿主为大肠杆菌 294 (ATCC 31,446)，但其他菌株例如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC27,325) 也是适合的。这些实例具有例示性而不具有限制性。

[0119] 除原核生物外，例如丝状真菌或酵母菌等真核微生物也是抗体编码载体的适宜克隆或表达宿主。在低等真核宿主微生物中最常使用的是酿酒酵母。然而，多种其他属、种和菌株也是通常可得到并可用于本发明中，例如，稷酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母属；念珠菌属；木霉属；粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)；及丝状真菌，例如，脉孢菌 (*Neurospora*)、青霉菌 (*Penicillium*)、弯颈霉 (*Tolypocladium*) 和曲霉 (*aspergillus*) 宿主，例如，构巢曲菌 (*A.nidulans*) 和黑曲霉菌 (*A.niger*)。

[0120] 适合于表达糖基化抗体的宿主细胞可从多细胞有机体获得。原则上，任何高等真核细胞培养物均可行，无论其是得自脊椎动物还是非脊椎动物培养物。非脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞，Luckow 等人，Bio/Technology6,47-55 (1988)；Miller 等人，Genetic Engineering, Setlow 等人，eds. Vol. 8, pp. 277-279 (Plenum publishing 1986)；Mseda 等人，Nature 315,592-594 (1985)。已鉴别出大量杆状病毒株和变体及得自宿主（例如草地黏虫 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、伊蚊 (*Aedes*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇)、和家蚕 (*Bombyx mori*)) 的相应许可性昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒株可公开获得，例如，苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株，并且这些病毒可依照本发明用作本文中的病毒，尤其是用于草地黏虫细胞的转染。并且，棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养物亦可用作宿主。

[0121] 脊椎动物细胞及在培养物（组织培养物）中增殖脊椎动物细胞已经成为一常规程序。参见 Tissue Culture, Academic Press, Kruse 和 Patterson, eds. (1973)。有用哺乳动物宿主细胞系的实例为猴肾脏细胞；人类胚胎肾脏细胞系；幼小仓鼠肾脏细胞；中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠塞

尔托利 (sertoli) 细胞 ; 人类子宫颈癌细胞 (HELA) ; 犬肾脏细胞 ; 人类肺细胞 ; 人类肝脏细胞 ; 小鼠乳腺癌 ; 和 NS0 细胞。

[0122] 宿主细胞可用上述用于产生抗体的载体转化,并在传统的营养培养基中培养,该营养培养基修饰为适合于诱导启动子、选择转化体、或扩增编码期望序列的基因。

[0123] 用于产生本发明抗体变体的宿主细胞可在多种培养基中培养。市售培养基例如 Ham' s F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium) (DMEM, Sigma) 均适合于培养宿主细胞。另外, Ham 等人, Meth. Enzymol. 58 :44 (1979), Barnes 等人, Anal. Biochem. 102 :255 (1980), 美国专利第 4,767,704 号 ; 第 4,657,866 号 ; 第 4,560,655 号 ; 第 5,122,469 号 ; 第 5,712,163 号 ; 或第 6,048,728 中所述培养基的任一种均可用作这些宿主细胞的培养基。必要时这些标记中的任一种皆可补充有激素和 / 或其他生长因子 (例如胰岛素、铁传递蛋白、或表皮生长因子)、盐 (例如 X-氯化物,其中 X 为钠、钙、镁 ; 和磷酸盐)、缓冲液 (例如 HEPES)、核苷酸 (例如腺苷和胸苷)、抗生素 (例如 GENTAMYCIN. TM. 药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔级的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或一等效能量源。任一其它需要的补充物亦均可以所属领域技术人员熟知的恰当浓度加入。培养条件,例如温度、pH 值和诸如此类,是先前选择用于表达的宿主细胞时所用条件,并被所属领域的技术人员所了解。

[0124] 抗体纯化

[0125] 当使用重组技术时,抗体变体可在细胞周质间隙中以细胞内方式产生,或直接分泌至培养基中。如果此抗体变体是以细胞内方式产生,作为一第一步骤,这些微粒碎片-宿主细胞或分解的片段可通过 (例如) 离心或超滤方法除去。Carter 等人, Bio/Technology 10 :163-167 (1992) 阐述一用于分离分泌到大肠杆菌细胞周质间隙的抗体的方法。简言之,在存在醋酸钠 (pH3.5)、EDTA 和苯基甲基磺酰基氟化物 (PMSF) 下经约 30 分钟将胞浆解冻。细胞碎片可通过离心法除去。当此抗体变体分泌在培养基中时,通常首先使用一市售蛋白质浓缩过滤器 (例如,一 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤装置) 浓缩取自该表达系统的上清液。在任一前述步骤中皆可加入一蛋白酶抑制剂 (例如 PMSF) 以抑制蛋白质水解,并且可加入抗生素以防止外来污染物的生长。

[0126] 由这些细胞制备的抗体组合物可使用 (例如) 羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳法、透析法及亲和色谱法进行纯化,其中亲和色谱法为首选纯化技术。蛋白质 A 作为一亲和配体的适宜性取决于该抗体变体中所含的任一免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白质 A 可用于纯化基于人类 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链的抗体 (Lindmark 等人, J. Immunol Meth. 62 :1-13 (1983))。蛋白质 G 被推荐用于所有小鼠同种型并用于人类 IgG3 (Guss 等人, EMBO J. 5 :1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质最经常为琼脂糖,但也可利用其他基质。物理性质稳定的基质 (例如可控孔径玻璃或聚 (苯乙烯二乙烯基) 苯) 可达成比琼脂糖更高的流速和更短的处理时间。当该抗体变体包含一 CH3 结构域时,可使用 Bakerbond ABXTM 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) 进行纯化。视欲复原的抗体变体而定,亦可使用其他蛋白质纯化技术,例如,在一离子交换柱上分级分离、乙醇沉淀法、反相 HPLC、硅胶色谱法、肝素色谱法、在阴离子或阳离子交换树脂 (例如一聚天冬氨酸柱) 上的 SEPHAROSE™ 色谱法、色谱聚焦法、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀法。

[0127] 在任一初步纯化步骤后,可使用一 pH 值介于约 2.5 至 4.5 之间的洗脱缓冲液对包含相关抗体变体和污染物的混合物进行低 pH 值疏水相互作用色谱,较佳 在低盐浓度(例如,从约 0 至 0.25M 盐)下实施。

[0128] 医药配方

[0129] 多肽或抗体的治疗配方可通过将具有期望纯度水平的多肽与业内通常采用的可选“医药上可接受的”载剂、赋形剂或稳定剂(其皆称为“赋形剂”)混合制备,以作为冻干配方或水溶液贮存。例如缓冲剂、稳定剂、保存剂、等渗剂、非离子型去污剂、抗氧化剂和其他杂类添加剂。(参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, A. Osol, Ed. (1980))。此等添加剂在所采用剂量和浓度下必须对接受者是无毒的。

[0130] 缓冲剂有助于将 pH 值保持于接近生理状态的范围内。其较佳以一约 2mM 至约 50mM 的浓度存在。适用于本发明的缓冲剂包括有机和无机酸两者及其盐,例如柠檬酸盐缓冲液(例如,柠檬酸单钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸单钠混合物,等等),琥珀酸盐缓冲液(例如,琥珀酸-琥珀酸单钠混合物、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),富马酸盐缓冲液(例如,富马酸-富马酸单钠混合物,等等),富马酸盐缓冲液(例如,富马酸-富马酸单钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸单钠-富马酸二钠混合物,等等),葡萄糖酸盐缓冲液(例如,葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物,等等),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)和醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠混合物、醋酸-氢氧化钠混合物,等等)。另外,可能提到磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液和三甲胺盐缓冲液,例如 Tris 缓冲液。

[0131] 可添加保存剂以延迟微生物生长,并且其可以 0.2% 至 1% (w/v) 的量添加。适用于本发明的保存剂包括苯酚、苄醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苯基氯化铵、苯扎卤铵(例如,苯扎氯铵、苯扎溴铵、苯扎碘铵)、氯化六甲双铵、对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和 3-戊醇。

[0132] 亦可添加有时称为“稳定剂”的等渗剂,以确保本发明液体组合物的等渗性,且其包括多羟基糖醇,较佳为三羟基或更多羟基糖醇,例如甘油、赤藓醇、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇。

[0133] 稳定剂指一大类赋形剂,其具有自疏松剂至可溶解治疗剂或有助于防止变性或防止粘附至容器壁的添加剂的功能。典型稳定剂可为多羟基糖醇(如上文所列举);氨基酸例如精氨酸、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、等等,有机糖或糖醇,例如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、卫矛醇、甘油及其类似物,包括环醇例如环己六醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫的还原剂,例如脲、谷胱甘肽、硫辛酸、巯基醋酸钠、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量的多肽(即 < 10 残基);蛋白质例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮单糖,例如木糖、甘露糖、果

糖、葡萄糖；二糖例如乳糖、麦芽糖、蔗糖；和三糖例如棉子糖；多糖例如葡聚糖。以每份重量活性蛋白质计，稳定剂可以自 0.1 至 10,000 份重量的量存在。

[0134] 可添加非离子型表面活性剂或去污剂（亦称作“湿润剂”）以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白质防止搅动引起的聚合，其亦可允许此配方暴露于降低的剪切面作用力下而不会引起蛋白质变性。适合的非离子型表面活性剂包括聚山梨醇酯（20、80，等等）、泊洛沙姆（polyoxamers）（184、188、188 等等）、Pluronic. RTM. 聚醇、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚（Tween. RTM. -20、Tween. RTM. -80，等等）。非离子型表面活性剂可以自 0.05mg/ml 至约 1.0mg/ml 且较佳约 0.07mg/ml 至约 0.2mg/ml 的量存在。

[0135] 额外杂类赋形剂包括疏松剂（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。本文配方亦可按需要含有一种以上用于所治疗的特定适应症的活性化合物，较佳为那些相互间不会产生不利影响的具有补充活性的化合物。举例而言，人们可能期望进一步提供一免疫抑制剂。适宜情况为，这些分子以对达成预期目的有效的量联合存在。这些活性成份亦可装入分别通过（例如）凝聚技术或通过接口间聚合制备的微胶囊中，例如，羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚甲基丙烯酸甲酯微胶囊，这些活性成份位于胶质药物输送系统（例如，脂质体、白蛋白微球体、微滴乳液、奈米颗粒及奈米胶囊）或粗滴乳液中。这些技术在 Remington's Pharmaceutical Sciences（第 16 版，A. Osol, Ed. (1980)）中揭示。

[0136] 用于体内投药的配方必须是无菌的。此可（例如）通过滤过一无菌过滤膜容易地达成。也可以制备成缓释制剂。缓释制剂的适宜实例包括含有该抗体变体的固态疏水聚合物的半渗透性基质，该等基质呈成形物件形式，例如，膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶（例如，聚（甲基丙烯酸-2-羟乙基酯）、或聚（乙烯醇））、聚交酯（美国专利第 3,773,919 号）、L-谷氨酸和 L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林（leuprolideacetate）组成的可注射微球体）、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管例如乙烯-醋酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸等聚合物可使分子持续释放超过 100 天，但某些水凝胶释放蛋白质时间较短。当装入胶囊的抗体长时间停留在体内时，在 37℃ 下暴露于潮湿环境中会使其变性或聚集，导致生物活性损失并可能改变免疫原性。依据所涉及机制可设计出合理的策略以保持稳定性。举例而言，若发现聚集机制是通过硫代-二硫化物互换形成份子间 S-S 键，则稳定性可藉由修饰巯基残基、自酸溶液冻干、控制水分含量、使用适当的添加剂和形成特定聚合物基质组合物而达成。

[0137] 在一特定病症或病情的治疗中有效的治疗性多肽、抗体或其片段的数量将视病症或病情的性质而定并可通过标准临床技术确定。可能时，人们希望在本发明医药组合物用于人体测试前能测定其剂量反应曲线，首先是在活体外测定，然后是在有用动物模型系统中测定。

[0138] 在一较佳实施例中，治疗性多肽、抗体或其片段的水溶液通过皮下注射施用。每一给药剂量为从约 0.5 μg 至约 50 μg/kg 体重，或更佳为从约 3 μg 至约 30 μg/kg 体重。

[0139] 皮下投予的给药方案可视多种临床因素（包括疾病类型、疾病严重程度和患者对此治疗剂的敏感性）从每月一次到每天一次变化。

[0140] 抗体变体的用途

[0141] 本发明的抗体变体可用作亲和力纯化剂。在此过程中,用业内熟知方法将这些抗体固定于固相例如 SEPHADEX™ 树脂或滤纸上。使该固定化抗体变体与一含有欲纯化靶的样品接触,并随后用一适合的溶剂洗涤该支持体,此将除去实质上所有除欲纯化靶以外的材料,靶结合至该固定化抗体变体上。最后,用另一适合的溶剂(例如甘氨酸缓冲液)洗涤支持体,将靶从该抗体变体上释放出来。

[0142] 这些变体抗体也可用在诊断检验中,例如用于检测一相关靶在特定细胞、组织或血清中的表达。对于诊断应用,该抗体变体通常用一可检测部分加以标记。可利用多种标记。用于定量荧光变化的技术在上文中有阐述。化学发光基质可通过化学反应处于电激发状态,随后发射出可测量(例如,使用化学发光计)的光或向一荧光受体提供能量。酶标记的实例包括荧光素酶(例如,萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;美国专利第 4,737,456 号)、荧光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶(例如辣根过氧化物酶(HRPO))、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、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(例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。使酶结合至抗体的技术阐述于 O' Sullivan 等人, *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。

[0143] 有时,标记不直接与所述抗体变体结合。所属领域的技术人员应了解有多种技术可达成此目的。举例而言,该抗体变体可与生物素结合,并且上文所述三大类标记中的任一种标记皆可与抗生物素蛋白结合,或反之亦然。生物素可选择性地与抗生物素蛋白结合,因此,该标记可以此间接方式与抗体变体结合。或者,为了使此标记与此抗体变体间接结合,可将抗体变体与少量半抗原(例如地高辛(digloxin))结合并将上述不同类型标记中的一种标记与一抗半抗原抗体变体(例如,抗地高辛抗体)结合。由此,可达成标记与抗体变体的间接结合。

[0144] 在本发明的另一实施例中,所述抗体变体无需标记,该抗体变体的存在可使用一可与该抗体变体结合的经标记抗体检测。

[0145] 本发明抗体可用于任一熟知试验方法中,例如,竞争性结合试验、直接和间接夹心试验和免疫沉淀试验。Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press 公司 1987)。

[0146] 竞争性结合试验依靠一经标记标准样品与测试样品竞争与一有限数量的抗体变体结合的能力。测试样品中靶的数量与同抗体结合的标准样品的数量成反比。为易于测定结合的标准样品量,通常在竞争结合之前或之后使抗体不溶解。因此,结合至抗体的标准样品和测试样品可方便地与保持未结合状态的标准样品和测试样品分离。

[0147] 夹心测试涉及使用两种抗体,每一种都能够结合至一不同的免疫原部分、或抗原决定部位或欲检测的蛋白质。在夹心测试中,欲分析的测试样品被一固定在固体支持体上的第一抗体结合,并随后使一第二抗体结合至此测试样品上,由此形成一不可溶解的三部分复合物。参见(例如)美国专利第 4,376,110 号。该第二抗体自身可用一可检测部分标记(直接夹心测试)或可使用一用可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体测量(间接夹心测试)。举例而言,一类夹心测试为一 ELISA 测试,在此情况下该可检测部分为一酶。

[0148] 对于免疫组织化学而言,此肿瘤样品可为新鲜的或冻结的,或可嵌入石蜡 中并用一保存剂(例如福尔马林)固定。

[0149] 该些抗体也可用于活体内诊断测试。一般而言,将抗体变体用一放射性核苷酸(例如,. sup. 111 In、. sup. 99Tc、. sup. 14C、. sup. 131I、. sup. 3H、. sup. 32P 或 . sup. 35S)标记,以便肿瘤可使用免疫闪烁照像法定位。举例而言,一本发明高亲和力抗 IgE 抗体可用于检测存在于(例如)哮喘患者肺内的 IgE 数量。

[0150] 本发明抗体可以一试剂盒的形式提供,即,包含预定量试剂与实施此诊断测试的说明书的成套组合。当抗体变体用一酶标记时,该试剂盒可包含酶所需的底物和辅因子,例如,一能提供可检测到的发色团或荧光团的底物前体。另外,可包括其他添加剂,例如,稳定剂、缓冲剂(例如封阻缓冲剂或溶胞缓冲剂)和诸如此类。各种不同试剂的相对数量可有较大变化以提供这些试剂可充分最佳化测试敏感性的溶液浓度。具体而言,这些试剂可作为一包含赋形剂且通常冻干的干燥粉末提供,其溶解后可提供一具有适当浓度的试剂溶液。

[0151] 抗体的活体内用途

[0152] 本发明涵盖,本发明抗体可用于治疗一哺乳动物。在一实施例中,举例而言,为了获得抗体的临床前数据而将其施用至一非人类哺乳动物。欲治疗的例示性非人类哺乳动物包括非人类灵长类动物、狗、猫、啮齿动物和其他在体内实施临床前研究的哺乳动物。这些哺乳动物可为建立的用于一欲用该抗体治疗的疾病的动物模型,或其可用于研究所述相关抗体的毒性。在这些实施例的每一个中,均可对哺乳动物实施剂量递增研究。

[0153] 该抗体或多肽可通过任一适合的方式(包括非经肠、皮下、腹腔内、肺内、和鼻内)施用,并且,若期望,对于局部免疫抑制治疗时,可采用病变内方式用药。非经肠输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹腔内、或皮下施用。另外,适宜情况为,该抗体变体可通过脉冲输注方式(特别是以渐低的抗体变体剂量)恰施用。较佳地,此定量给药应部分地视施药期的长短而通过注射(最好是通过静脉内或皮下注射)施用。

[0154] 对于预防或治疗疾病,该抗体或多肽的适当剂量应视下列因素而定:欲治疗疾病的类型、疾病的严重程度和病程、施用该抗体变体的目的是预防还是治疗、先前治疗、患者的临床史和对此抗体变体的反应以及主治医师的判断力。适宜情况为,本发明此具极高亲和力的抗人类 IgE 抗体一次性施用至患者或经一系列治疗施用。

[0155] 根据疾病的类型和严重程度,不管是通过(例如)一次或多次分开投药还是通过连续输注投药,授予患者的抗体初始候选剂量均为约 0.1mg/kg 至 150mg/kg(例如 0.1 至 20mg/kg)。视上文提及的因素,典型日剂量为约 1mg/kg 到约 100mg/kg 或更高。对于历经数天或更长时间的重复投药,根据病情,治疗应保持到出现想要的疾病症状抑制状况为止。然而,也可以使用其他剂量方案。该治疗的进度可容易地通过常规技术和测试方法加以监测。一抗-LFA-1 或抗 ICAM-1 抗体的例示性定量给药方案揭示于 WO 94/04188 中。

[0156] 该抗体变体组合物应以与良好的医疗实践相一致的方式加以调配、确定剂量、给药。在这方面,需考虑因素包括:所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病情、病症起因、试剂的递送位点、投药方法、投药时间安排及医务人员熟知的其他因素。欲施用的抗体变体的“治疗有效量”应由这些需考虑的因素决定,并且是预防、减缓或治疗疾病或病症所需的最小数量。该抗体变体无需但可视情况用一或多种当前用于预防或治疗所讨论病症的试剂加以调配。这些其他试剂的有效量取决于抗体在配方中的含量、病症或

治疗的类型及上文所讨论的其他因素。这些试剂通常以与先前相同的剂量使用并使用先前所用投药途径或以约 1 至 99% 的之前所采用剂量使用。

[0157] 可将 IgE 识别为其靶的本发明抗体可用于治疗“IgE 介导的病症”。这些病症包括（例如）：哮喘、过敏性鼻炎和结膜炎（干草热）、湿疹、荨麻疹、异位性皮炎和食物过敏。由（例如）蜜蜂蜇、蛇咬、食物或药物引起的过敏性休克这一严重生理学状况也涵盖于本发明范围内。

[0158] 实例

[0159] 提供下列实例以进行举例说明而并非加以限制。

[0160] 实例 1 抗 IgE 鼠科动物 MAbs TES-C21 的人源化

[0161] 将鼠科动物 mAb TES-C21 的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 的序列与可在公共文库中获得的人类抗体种系序列相比较。当选定一如上文步骤 1 中所述模板时需使用多个标准,包括全长、在骨架中的类似 CDR 位置、总同源性、CDR 大小等。同时考虑所有这些标准可提供一选择最佳人类模板的结果,如图 3A 和 3B 中所示的在 TES-C21MAb 重链和轻链序列与相应人类模板序列间序列之间的比对中所示。

[0162] 在此情况下,使用一个以上的人类骨架模板来设计此抗体。所选用于 VH 链的人类模板为 DP88(aa 残基 1 至 95) 和 JH4b(aa 残基 103 至 113) 的组合(参见图 3B)。所选用于 VL 链的人类模板为 L16(VK 亚型 III, aa 残基 1 至 87) 和 JK4(aa 残基 98 至 107) 的组合(参见图 3A)。该鼠科动物与人类模板间的骨架同源性对于 VH 为约 70%,对于 VL 为约 74%。

[0163] 模板选定后,通过 DNA 合成和重叠 PCR 构建一 Fab 文库,如上文所述和图 2 中所绘示。该文库由用相应所选人类模板 DP88/JH4b 和 L16/JK4 合成的合成 TES-C21CDR 组成。此文库的复杂度为 4096(= 2¹²)。编码部分 VH 和 VL 序列的重叠核苷酸可合成为其中有 18 至 21 个核苷酸重叠的约 63 至约 76 个核苷酸。

[0164] VL 和 VH 基因的 PCR 扩增可在标准 PCR 条件下使用一包含骨架区 FR1 特定序列和退火至该前导序列(基因 III)末端的悬垂序列的生物素化正向引物和一来自保守的恒定区(Ck 或 CH1)的反向引物实施。通过琼脂糖凝胶电泳或用市售 PCR 纯化试剂盒纯化该 PCR 产物以除去未并入的生物素化引物和非特异性 PCR 产物。

[0165] 用 2 μg PCR 产物、1 μL 的 T4 多核苷酸激酶(10 单位/μL)、2 μL 的 10x PNK 缓冲液、1 μL 的 10mM ATP,以用 ddH₂O 调整的 20 μL 的总体积实施 PCR 产物的 5' - 磷酸化。在 37°C 下培养 45 分钟后,在 65°C 热变性 10 分钟,通过添加 ddH₂O 将反应物体积调整至 200 μL 用于下一步骤。

[0166] 用 200 μL 2x B&W 缓冲液将 100 μL 用抗生蛋白链菌素包覆的磁珠洗涤两次,并重新悬浮于 200 μL 2xB&W 缓冲液中。将该磷酸化的 PCR 产物与磁珠混合,并在室温(RT)下在缓缓摇动的情况下培养 16 分钟。

[0167] 使这些磁珠沉积,并用 200 μL 2xB&W 缓冲液洗涤两次。在缓缓摇动的情况下用 300 μL 新制备的 0.15M NaOH 在 RT 下对该非生物素化的 ssDNA(负链)洗提 10 分钟。一第二次 NaOH 洗提可略微增加产量(可选)。离心洗提液以除去所有痕量磁珠。

[0168] 通过添加 1 μL 糖原(10mg/mL)、1/10 体积的 3M NaOAc(pH 为 5.2) 和 2.5 体积的 EtOH 使该 ssDNA 从上清液中沉淀出来。然后用 70% 的 EtOH 洗涤沉淀的 ssDNA,随后实施冻

干处理 3 分钟并溶解于 20 μ L ddH₂O 中。通过使用 DNA 标准样品在溴化乙锭 (EtBr) 上点样或通过测量 OD₂₆₀ 对该 ssDNA 进行定量。

[0169] 实例 2VH 和 VL 克隆至噬菌体表达载体中

[0170] 通过杂交诱变将 VH 和 VL 克隆至一噬菌体表达载体中。通过用基于 M13 的噬菌体 (噬菌体表达载体 TN003) 感染 CJ236 大肠杆菌株 (dut-ung-) 制备尿苷化模板。

[0171] 通过 PCR 对下列组份 [200ng 尿苷化噬菌体载体 (8.49kb); 92ng 磷酸化单链 H 链 (489 碱基); 100ng 磷酸化单链 L 链 (525 碱基); 1 μ L 10X 退火缓冲液; 用 ddH₂O 将体积调整至 10 μ L] 实施退火 (以约 8 倍摩尔比插入至载体中), 其中先使温度在 85°C 保持 5 分钟 (变性), 再经 1 小时逐渐降至 55°C。将样品在冰上冷冻。

[0172] 向退火产物中添加以下组份: 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 T4DNA 聚合酶 (1 单位 / μ L), 随后在冰上培养 5 分钟, 并在 37°C 下培养 1.5 小时。然后使此产物在乙醇中沉淀, 并溶解于 10 μ L ddH₂O 或 TE 中。

[0173] 用 1 μ L XbaI (10 单位 / μ L) 将 DNA 消化 2 小时, 并在 65°C 下热灭活 20 分钟。通过电穿孔法将消化的 DNA 转染至 50 μ L 电感受态 DH10B 细胞中。通过 在 37°C 下在 XL-1Blue 菌苔上生长过夜测定所得噬菌体的浓度。对纯系实施测序以确定成份。

[0174] 实例 3 用于文库筛选的深孔培养

[0175] A. 平板培养噬菌体文库

[0176] 在 LB 培养基中稀释该噬菌体文库以得到期望的噬斑数 / 板。将高滴定度的噬菌体与 200 μ L XL-1B 细胞培养物混合。将 3mL LB 顶层琼脂混合, 倒至一 LB 平板上, 使其在室温下静置 10 分钟。将板在 37°C 下培养过夜。

[0177] B. 噬菌体洗提

[0178] 将 100 μ L 噬菌体洗提缓冲液 (10mM Tris-Cl, pH7.5, 10mM EDTA, 100mM NaCl) 添加至一无菌 U 形底 96 孔板的每一孔中。用一过滤吸管端将一得自该过夜文库平板的单个噬菌体噬斑转移至一孔内。将此噬菌体洗提板在 37°C 下培养 1 小时。培养结束后, 将此板在 4°C 下贮存。

[0179] C. 深孔板培养

[0180] 以 1 : 100 稀释度将得自 50mL 培养物的 XL1B 细胞添加至 2xYT 培养基中。使这些细胞在 37°C 下在一振荡器内生长, 直至 A₆₀₀ 介于 0.9 至 1.2 之间。

[0181] D. 在深孔板中用噬菌体感染

[0182] 当这些细胞达到适当的 OD 后, 将 1M IPTG (1 : 2000) 添加至该 XL1B 培养物中。IPTG 的最终浓度为 0.5mM。将 750 μ L 细胞培养物转移至一 96 孔深孔板 (Fisher Scientific) 的每一孔中。每一孔皆用 25 μ L 经洗提的噬菌体接种。将该深孔板置于振荡器内 (250rpm) 并在 37°C 下培养过夜。

[0183] E. 制备用于 ELISA 筛选的上清液

[0184] 培养结束后, 使用 Beckman JA-5.3 板旋转器将深孔板以 3, 250rpm 离心 20 分钟。从每一孔中取出 50 μ L 上清液用于 ELISA。

[0185] F. 15ml XL-1 细胞液体培养物的接种

[0186] 使 XL-1 在 37°C 下在含 10 μ g/mL 四环素的 2xYT 中在振荡器 (250rpm) 中生长直至 A₆₀₀ = 0.9 至 1.2。对于每一欲定性的纯系而言, 皆以一 0.5mM 的终浓度添加 IPTG, 并将

15mL 培养物转移至一 50 毫升锥形管内。用取自高滴定度原液（滴定度=约 1011 pfu/mL）的 10 μ L 噬菌体对这些细胞进行接种，并在 37°C 下培养 1 小时。在摇动的情况下使这些细胞在室温下生长过夜。

[0187] G. 自细胞周质分离可溶 Fab

[0188] 在一 IEC 离心机内以 4,500rpm 对细胞团粒化 20 分钟。除去培养基，将团粒重新悬浮于 650 μ L 悬浮缓冲液（50mM Tris, pH 为 8.0, 含 1mM EDTA 和 500mM 蔗糖）中，加以涡旋，并置于冰上轻轻地摇动 1 小时。在 4°C 下以 9,000rpm 离心 10 分钟除去细胞碎片。将含可溶 Fab 的上清液收集起来并在 4°C 下贮存。

[0189] 实例 4 骨架修饰

[0190] 在骨架中上述可能的潜在关键部位有 12 个鼠科动物 / 人类摆动残基。VH 中的位置 73 在人源化文库中保持为鼠科动物残基苏氨酸，这是因为已确定此位置会影响结合。然而，应注意，在 VH 73 处的苏氨酸为人类种系 VH 亚型 1 和 2 中的一常见人类残基。

[0191] 对在 TES-C21 序列与人类模板之间不同的骨架残基按上文所述实施随机取代，并随后测定其对靶结合和抗体折叠的潜在影响。确定可能已影响该结合的潜在骨架残基。在此情况下，它们是 VH 中的残基 12、27、43、48、67、69 和 VL 中的残基 1、3、4、49、60、85（Kabat 编号系统）。（参见图 4）后来证明，仅位置 27 和 69 对 VH 区（纯系编号 1136-2C）中的结合有显著影响。

[0192] 所用初步筛选为一使用培养基的单点 ELISA (SPE)（参见下文所述）。该初步筛选将与该抗体的靶分子结合的纯系选择出来。将给出与亲代分子相等或比亲代分子好的信号的纯系选出用于下一轮筛选。

[0193] 在第二轮筛选中，使单个噬菌体在一 15mL 的细菌培养物中生长，并将细胞周质制品用于 SPE 和 ELISA 滴定测试。进一步确定在此测试中保持高亲和力的纯系的性质。当全部经选择的初步纯系处理完成后，对上部 10 至 15% 的纯系进行测序，并且依照序列布置这些纯系。将各序列组的代表相互进行比较，选出最佳的纯系。将这些所选纯系的序列组合起来，并评价各种不同组合的影响。

[0194] 就与重组人类 IgE (SE44) 的改良结合，用 ELISA 法对所构建的文库实施筛选。将结合亲和力大于鼠科动物 TES-C21Fab 的纯系分离出来并测序。进一步确定标识号为 4、49、72、76 和 136 的纯系的性质。纯系 4、49、72、78 和 136 的 ELISA 滴定曲线示于图 5A 和 5B 中，表明它们的亲和力与亲代 TES-C21 相似。这些纯系与鼠科动物 TES-C21 竞争与人类 IgE 的结合，说明此结合抗原决定部位在该人源化过程没发生改变。该人源化 Fab 未结合至 Fc ϵ RI 结合 IgE 上，表明当这些人源化抗体构建入二价 IgG 时不太可能与此受体交联而导致组胺释放。

[0195] 人源化纯系 136 保留了 5 个鼠科动物重链骨架残基（= 94.3% 人类 VH 骨架同源性），其中通过亲和力成熟选择— 100% 的人类轻链骨架。人源化 Fab 展示出对 IgE 与 Fc ϵ RI 结合的抑制（图 6）。

[0196] 实例 5 用于筛选抗 IgE 的单点 ELISA 方案

[0197] 在 4°C 下用在碳酸盐涂覆缓冲液中的 2 μ g/mL 羊抗人 Fd 涂覆平板。除去涂覆溶液，并在 37°C 下用 200 μ L/ 孔的 3% BSA/PBS 将平板封阻 1 小时。用 PBS/0.1% TWEEN ® (PBST) 将板洗涤 4 次后，添加 50 μ L/ 孔的 Fab 样品（即，包含高滴定度噬菌体和所分泌 Fab

或自 DMB 套组 (DMB block) 获得的细胞周质制品的上清液, 或 15mL 制品)。将板在室温下培养 1 小时, 随后用 PBST 洗涤 4 次。50 μ L/ 孔的生物素化的 SE44 (0.015 μ g/mL) 用 0.5% BSA/PBS 稀释, 并随后添加 0.05% TWEEN $\text{\textcircled{R}}$ 。然后将板在室温下培养 2 小时, 并用 PBST 洗涤 4 次。添加 50 μ L/ 孔的 StreptAvidin HRP 以 1 : 2000 稀释于 0.5% BSA/PBS 和 0.05% TWEEN $\text{\textcircled{R}}$ 中的稀释液, 并将板在室温下培养 1 小时。用 PBST 将板洗涤 6 次。添加 50 μ L/ 孔的 TMB 底物 (sigma) 以显色, 并随后通过添加 50 μ L/ 孔的 0.2M H₂SO₄ 使其停止。

[0198] 实例 6ELISA 滴定: 抗 IgE

[0199] 在 4°C 下将板用溶于碳酸盐涂覆缓冲液中的 0.25 μ g/mL (用于经纯化的 Fab 0.1 μ g/mL) SE44 涂覆过夜。除去涂覆溶液, 并在 37°C 下用 200 μ L/ 孔的 3% BSA/PBS 将板封阻 1 小时。

[0200] 用 PBS/.1% TWEEN $\text{\textcircled{R}}$ (PBST) 将板洗涤 4 次。添加 50 μ L/ 孔的 Fab (取自 15mL 细胞周质制品), 以 1 : 2 的稀释液开始, 并用 0.5% BSA/PBS 和 .05% TWEEN $\text{\textcircled{R}}$ 20 系列稀释 3 倍。将板在室温下培养 2 小时。

[0201] 用 PBST 将板洗涤 4 次, 并添加 50 μ L/ 孔 1 : 1000 (0.8 μ g/mL) 溶于 0.5% BSA/PBS 和 0.05% TWEEN $\text{\textcircled{R}}$ 20 中的生物素 - 羊抗人 Fd 稀释液。将板在室温下再次培养 2 小时。

[0202] 用 PBST 洗涤 4 次后, 添加 50 μ L/ 孔的以 1 : 2000 (0.9 μ g/mL) 溶于 0.5% BSA/PBS 和 0.05% TWEEN $\text{\textcircled{R}}$ 20 中的 Neutra-avidin-AP 溶液, 并将板在室温下培养 1 小时。

[0203] 用 PBST 将板洗涤 4 次。通过添加 50 μ L/ 孔的 pNPP 底物使其显色。添加 50 μ L/ 孔的 3M NaOH 使显色停止。在 405nm 或 410nm 处读取各孔的吸光度。

[0204] 实例 7M13 噬菌体表达的可溶 Fab 的亲和力纯化方案

[0205] 第 1 天

[0206] 用 5mL 过夜原液 XL1B 对两份含 10mg/mL 四环素的 500mL 培养物 (2xYT) 进行接种, 并使其在 37°C 下生长至 A₆₀₀ = 0.9 至 1.2。添加 IPTG, 至浓度为 0.5mM。然后, 用 200 μ L 噬菌体 / 培养物感染细胞培养物, 并在摇动的情况下在 37°C 下培养 1 小时。感染后, 将细胞在 25°C 下在摇动的情况下生长过夜。

[0207] 第 2 天

[0208] 在 4°C 下在 250mL 离心管内以 3500xg 使细胞团粒化 30 分钟。吸出培养基, 并将团粒重新悬浮于共 12 至 15mL 的溶胞缓冲液 (缓冲液 A+ 蛋白酶抑制剂混合物) 中。

[0209] 缓冲液 A : (1 升)

[0210] 50mM NaH₂PO₄ 6.9g NaH₂PO₄H₂O (或 6g NaH₂PO₄)

[0211] 300mM NaCl 17.54g NaCl

[0212] 10mM 咪唑 0.68g 咪唑 (MW 68.08)

[0213] 用 NaOH 将 pH 值调整至 8.0

[0214] 溶胞缓冲液 :

[0215] 25mL 缓冲液 A 与一 Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Switzerland) 片剂混合。

[0216] 将重新悬浮的细胞转移至一 50mL 锥形管内, 并用 100 μ L 100mg/mL 的溶菌酶通过多次倒置锥形管使其溶解, 直至此混合物移动到一起成为一团状物 (由于溶胞作用)。在

冰上对细胞实施超声处理,随后添加 10 μ L 脱氧核糖核酸酶 (DNase) (约 1000 单位) 并在 4°C 下轻轻摇动 30 分钟。使用 50mL 离心管,在 4°C 下通过以 12000xg 离心将碎片团粒化 30 分钟。将上清液转移至一新的锥形管内并在 4°C 下贮存。

[0217] 依照厂商规程使用 Ni-NT 琼脂糖 (Qiagen, Valencis, CA) 纯化可溶的 Fab。将溶胞产物与 Ni-NTA 混合并装入一柱中。收集流出物用于 SDS-PAGE 分析。用 20mL 缓冲液 (50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、15mM 咪唑,用 NaOH 将 pH 调整至 8.0) 洗涤此柱,随后再用一含有 50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、20mM 咪唑的 20mL 洗液洗涤。用 6 $\times$ 500 μ L 洗提缓冲液 (50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、450mM 咪唑,用 NaOH 将 pH 调整至 8.0) 洗提 Fab,并用 SDS-PAGE 分析。将柱馏分贮存在 4°C 下。用 SDS-PAGE 分析柱馏分,并选择具有最高量 Fab 的馏分在 4°C 下在 PBS 中透析。

[0218] 实例 8 可溶解受体测试

[0219] 在 4 至 8°C 下用 0.05mL 0.5 μ g/mL Fc ϵ RI α -链受体涂覆缓冲液 (50mM 碳酸盐/二碳酸盐, pH 值为 9.6) 涂覆适于 ELISA 的一 96 孔测试板 12 小时。将这些孔抽空,并添加 250 μ L 封阻缓冲液 (PBS, 1% 的 BSA, pH 为 7.2), 并在 37°C 下培养 1 小时。在一单独的测试板中,通过按 1 : 4 用测试缓冲液 (0.5% BSA 和 0.05% Tween 20、PBS, pH 为 7.2) 稀释的稀释液将这些样品和参照物 TES-C21MAb 自 200 μ g/mL 滴定至 0.001 μ g/mL, 并添加等体积的 100ng/mL 生物素化 IgE, 将板在 25°C 下培养 2 至 3 小时。用 PBS 和 0.05% TWEEN 20 将这些经 Fc ϵ RI 涂覆的孔洗涤 3 次, 从样品孔中转移出 50 μ L 并在 25°C 下搅动培养 30 分钟。50 μ L/ 孔的 1mg/mL Streptavidin-HRP (按 1 : 2000 稀释于测试缓冲液中) 搅动培养 30 分钟, 然后按先前方法洗涤此板。添加 50 μ L/ 孔的 TMB 底物并显色。通过添加等体积的 0.2M H₂SO₄ 使反应停止, 并在 450nm 处测量吸光度。

[0220] 实例 9 抗体与载有 IgE 的 Fc ϵ RI 的结合

[0221] 结合至与 Fc ϵ RI 的 α 亚单位相关联的人类 IgE 的抗体可通过用 10 μ g/mL 人类 IgE 在 4°C 预培养 30 分钟来测定。将板洗涤 3 次, 随后用变化浓度的鼠科动物抗人类 IgE mAb E-10-10 或该人源化 Fab 变体培养 1 小时。Fab 的结合可用一生物素标记的抗人 Fd 抗体并随后用 SA-HRP 检测。鼠科动物 ab E10-10 通过与山羊抗鼠科动物 IgFc HRP 结合 Ab 检测。

[0222] 实例 10 纯系分析

[0223] 测试每一候选纯系的结合亲和力, 并对阳性纯系进行测序。进一步测定在 CDR 区具有可增加结合亲和力的有益突变的抗体变体的性质。测试包括: Biacore 分析; IgE 与其受体结合的抑制; 和结合有受体的 IgE 的交联。

[0224] 构建一变体文库。各种展示出改良亲和力的 CDR 的氨基酸序列描绘于表 1 中。图 7 列示具有取代组合的高亲和力侯选者。

[0225] 表 1

[0226]

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 QQSWSWPTT	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

[0227] P = 亲代

[0228] 图 9 中列出 19 种重链变体, 图 8 中列出 35 种轻链变体。进一步测定 3 种候选者的结合亲和力和性质, 并将其示于表 2 中。

[0229] 表 2 结合亲和力

[0230]

MAb	Kd	亲和力增加倍数
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

[0231] 实例 11 抗 IgE 抗体的表达和纯化及 HRP- 结合

[0232] 产生高亲和力候选 MAb。为产生完整的抗 IgE MAb, 将重链和轻链可变区序列自噬菌体载体模板进行 PCR 扩增并在一 CMV 启动子作用下分别亚克隆至重链和轻链表达载体中。构建 6 个全抗体纯系, 这些纯系描述于图 10A 至 F 中。通过业内熟知技术用电穿孔法将适合的重链和轻链质粒共转染至小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 中。参见, 例如, Liou 等人, J Immunol. 143(12):3967-75(1989)。使用蛋白 A- 琼脂糖 (Pharmacia) 将抗体自单个稳定细胞系上清液中纯化出来。使用 280nm 下之分光光度计及 FCA 测试 (IDEXX) 测定该抗体的浓度。

[0233] 使用过氧化物酶试剂盒 (Zymed Labs, San Francisco, CA) 依照厂商规程用辣根过氧化物酶 (HRP) 结合纯化的抗体。用涂覆有一单克隆人 IgE (SE44) 的板使用 ELISA 测定每一结合的抗 IgE MAb 的滴定度。

[0234] 以下培养物已经存放于 American Type Culture Collection 中, 10801 University Boulevard, Manassas Va. 20110-2209US (ATCC) :

[0235]

杂交瘤	ATCC 编号	存放日期
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-51	PTA-5680	2003 年 12 月 3 日

[0236] 该存放按照国际认可的用于专利程序目的的布达佩斯微生物存放条约及其下的条例 (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder) (布达佩斯条约) 的规定进行。此可确保一活培养物自存放之日起可保持 30 年。此有机体可在布达佩斯条约的条款下通过 ATCC 获得, 其可确保在有关美国专利发布后公众可持久并且无限制地获得此培养物的子代。

[0237] 本专利申请案的受让人已经同意, 如果所存放的培养物在适合的条件培养时死亡或丢失或遭到破坏, 将在得到通知时迅速用相同培养物的活样品将其取代。不应将所贮存株系的可获得性理解为允许违反任一政府的权力机构依照其专利法赋予的权利而实践本发明。

[0238] 上述书面说明书被视为足以能使所属领域的技术人员实践本发明。本发明的范围并不受限于所存放的培养物, 因为这些所存放的实施例皆意欲阐释示本发明的一方面, 任何功能相当的培养物皆涵盖于本发明的范围内。本文材料的存放并非等同于承认本文所含的说明不足以使本发明任一方面 (包括其最佳模式) 得以实施, 也不可将其理解为将权利要求书的范围限制至其描述的具体阐释。实际上, 所属领域的技术人员通过上文的说明将明了除那些本文所展示及所阐述实施例外, 本发明各种修改形式, 该等修改形式皆涵盖于随附权利要求书的范围内。

[0239] 所属领域的技术人员使用常规实验即可识别或能确定本文所述的本发明具体实施例的许多等效物。这些等效物均意欲涵盖在下述权利要求书的范围内。

序列表

<110> 唐纳士公司 (Tanox, Inc.)

<120> 高亲和力抗人类 IgE 抗体

<130> TNX-1010 (1) PCT

<150> 60/444, 229

<151> 2003-02-01

<160> 70

<170> PatentIn Version 3.2

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 鼠科动物

<220>

<221> misc_feature

<223> TES-C21 轻链

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

<210>2

<211>107

<212>PRT

<213> 人类

<220>

<221>misc_feature

<223>L16/-JK4 人类轻链共有序列模板

<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> 鼠科动物

<220>

<221>misc_feature

<223>TES-C21 重链

<400>3

```

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

```

$\langle 210 \rangle_5$

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>TES-C21CDRL1 序列 (表 1)

<400>5

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His

1 5 10

<210>6

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL1 变体 序列 #1 (表 1)

<400>6

Arg Ala Ser Arg Ser Ile Gly Thr Asn Ile His

1 5 10

<210>7

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL1 变体 序列 #2 (表 1)

<400>7

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Gly Thr Asn Ile His

1 5 10

<210>8

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>TES-C21 CDRL2 序列 (表 1)

<400>8

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210>9

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL2 变体 #1 (表 1)

<400>9

Tyr Ala Tyr Glu Ser Ile Ser

1 5

<210>10

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL2 变体 #2 (表 1)

<400>10

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Tyr

1 5

<210>11

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL2 变体 #3(表 1)

<400>11

Tyr Ala Ser Glu Ser Asp Ser

1 5

<210>12

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL2 变体 #4(表 1)

<400>12

Tyr Ala Ser Glu Ser Glu Ser

1 5

<210>13

<211>9

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>TES-C21 CDRL3(表 1)

<400>13

Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr

1 5

<210>14

<211>9

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRL3 变体（表）

<400> 14

Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> TES-C21 CDRH1

<400> 15

Met Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> CDRH1 变体 #1 (表 1)

<400> 16

Trp Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> CDRH1 #2 (表 1)

<400> 17

Tyr Tyr Trp Leu Glu
1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> TES-C21 CDRH2 (表 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> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #1(表 1)

<400>19

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> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #2(表 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> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #3(表 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> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #4(表 1)

<400>22

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

<210>23

<211>17

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #5(表 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> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #6(表 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> 人工的

<220>

<223>CDRH2 变体 #7(表 1)

<400>25

Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala

<210>26

<211>14

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>TES-C21CDRH3(表 1)

<400>26

Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1	5	10
---	---	----

<210>27

<211>14

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH3 变体 #1(表 1)

<400>27

Phe Ser His Phe Ser Gly Met Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210>28

<211>14

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH3 变体 #2(表 1)

<400>28

Phe Ser His Phe Ser Gly Gln Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210>29

<211>14

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>CDRH3 变体 #3(表 1)

<400>29

Phe Ser His Phe Thr Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210>30

<211>23

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL2 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL2 变体 1

<400>39

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys

1	5	10	15
---	---	----	----

<210>40

<211>32

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>FRL3 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL3 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL3 变体 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

<211>32

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>FRL3 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRL4 变体

<400>44

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

<210>45

<211>30

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>FRH1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH1 变体 2

<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> 人工的

<220>

<223>FRH1 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH2 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH2 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH2 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH3 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH3 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH3 变体 43

<400>53

Arg Val 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>54

<211>32

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223>FRH3 变体 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> 人工的

<220>

<223>FRH4 变体 136

<400>55

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210>56

<211>19

<212>PRT

<213> 细菌噬菌体 M13mp18

<220>

<221>misc_feature

<223> 基因 III 信号序列

<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

<210>57

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 136 的轻链可变区

<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
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr		80
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	

<210>58

<211>106

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 136 的轻链恒定区

<400>58

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
1	5	10
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		15
20	25	30
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
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		80
85	90	95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
100	105	

<210>59

<211>123

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 136 的重链可变区

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

<210>60

<211>330

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人类 IgG1 的恒定区

<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	
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>人工的

<220>

<223> 纯系 CL-2C 的轻链可变区

<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
			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>62

<211>123

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-2C 的重链可变区

<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	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>63

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-5I 的轻链可变区

<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> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-5I 的重链可变区

<400>64

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	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> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-5A 的轻链可变区

<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					

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> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-5A 的重链可变区

<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

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-2B 的轻链可变区

<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> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-2B 的重链可变区

<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			
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> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-1136-2C 的轻链可变区

<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		

<210>70

<211>123

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 纯系 CL-1136-2C 的重链可变区

<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							

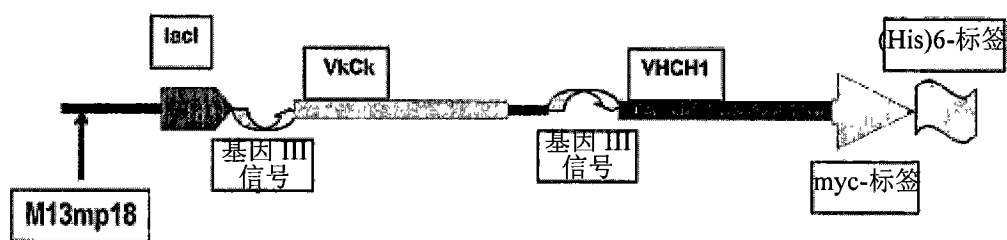


图 1 噬菌体载体

图 2

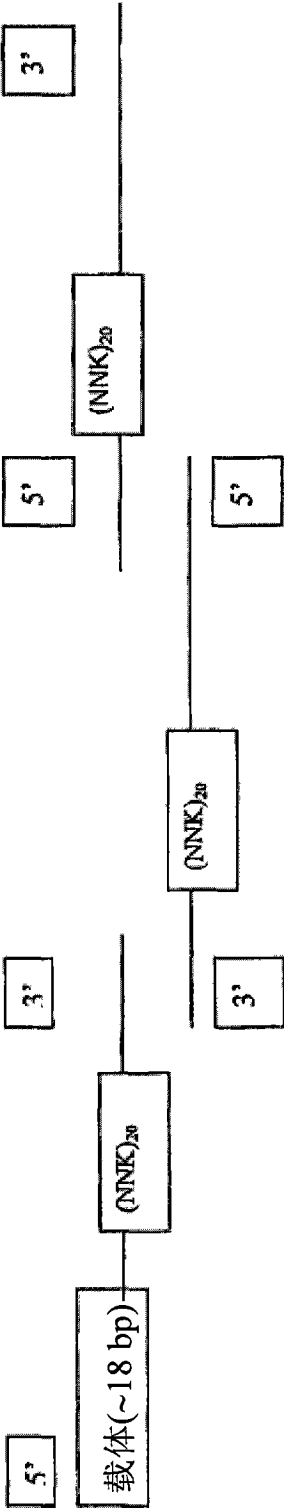


图 3 TES-C21 和模板比较

A. 轻链 (V_K) (下划线部分: Kabat CDR, Bold/Italic: Chothia CDR) (TES-C21 轻链—SEQ ID NO 1 L16/JK4-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	10	20	30
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 I 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	40	50	60
L16 VK	K P G Q A Y G A S T R A T A			70
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 T K L E I K	80	90	100
L16 VK-JK4	L Q F V Q Q Y N N W P L T V			107
B. 重链 (V _H)				
TES-C21 重链—SEQ ID NO 3	DP88/JH4b—SEQ ID NO 4			
鼠科动物 DP88 VH	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 N L E W V	1	10	20
	V V V K S V V A S G S Y A I S			30
TES-C21	K Q R P G H G L E W V G E I S P G T P T T N Y N E K F K A K A T F T A D T	40	50	60
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			70
TES-C21	S S N T A Y L Q L S G L T S R D S A V Y F C A R F S H F S G S N Y D Y F D Y	80	82a b c 83	90
DP88 VH	T S M E S R T Y - - - - - Y F D Y			95
TES-C21	W G Q G T S L T V S S	103	110	113
DP88-JH4b	L V			

VK 位置 小鼠类	1 D E	3 L V	4 L M	49 K Y	60 S A	85 D V	VH 位置 小鼠类	12 M K	27 Y G	43 H Q	48 V M	67 A V	69 F I
1 (纯系 ID)	D	L	M	K	S	V		M	Y	H	M	A	F
2	D	V	L	K	A	V		K	Y	Q	M	V	F
4	D	L	L	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
8	D	V	L	Y	S	V		M	Y	Q	M	V	F
13	D	V	L	K	A	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	L	K	S	D		M	Y	Q	M	V	F
21	D	V	L	Y	A	V		M	Y	H	V	V	F
23	D	L	L	K	A	D		M	Y	Q	M	V	F
25	D	V	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
27	D	L	M	Y	A	D		M	Y	Q	M	V	F
30	E	V	L	Y	A	D		K	Y	Q	M	V	F
31	E	V	L	Y	A	V		M	Y	H	V	V	F
33	E	V	L	Y	A	V		K	Y	Q	M	V	F
35	E	V	M	Y	A	D		K	Y	H	M	V	F
38	E	V	M	K	A	D		K	Y	Q	M	V	F
43	E	V	L	Y	S	V		M	Y	H	M	V	I
44	E	V	L	Y	A	D		M	Y	H	M	V	I
45	E	V	M	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
46	E	V	L	K	S	V		M	Y	H	M	V	F
48	E	V	M	Y	A	D		M	Y	H	M	V	F
49	E	V	M	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
50	D	L	L	Y	A	D		M	Y	H	M	V	F
52	D	L	L	Y	A	D		K	Y	Q	M	V	F
53	D	V	L	Y	S	V		M	Y	H	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	L	K	S	V		K	Y	Q	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		K	Y	Q	M	V	F
75	D	L	L	K	S	V		K	Y	Q	M	V	F
76	D	V	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	E	V	L	K	A	D		M	Y	H	M	V	F
86	E	L	M	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
89	E	L	M	Y	A	V		M	Y	H	M	V	F
90	D	V	M	Y	A	D		K	Y	H	M	V	F
93	D	L	M	K	A	V		M	Y	Q	M	V	F
103	D	V	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	I
109	D	L	L	K	S	V		M	Y	Q	M	V	F
114	D	L	L	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
124	D	V	L	Y	S	D		K	Y	Q	M	V	F
126	D	V	M	Y	A	V		M	Y	Q	M	V	F
135	D	V	L	K	S	V		M	Y	Q	M	V	F
136	E	V	M	Y	A	V		M	Y	H	M	V	F
152	E	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 = 人类模板序列; 以粗体列出的氨基酸为鼠科动物残基

图 4 高亲和力候选者的骨架序列

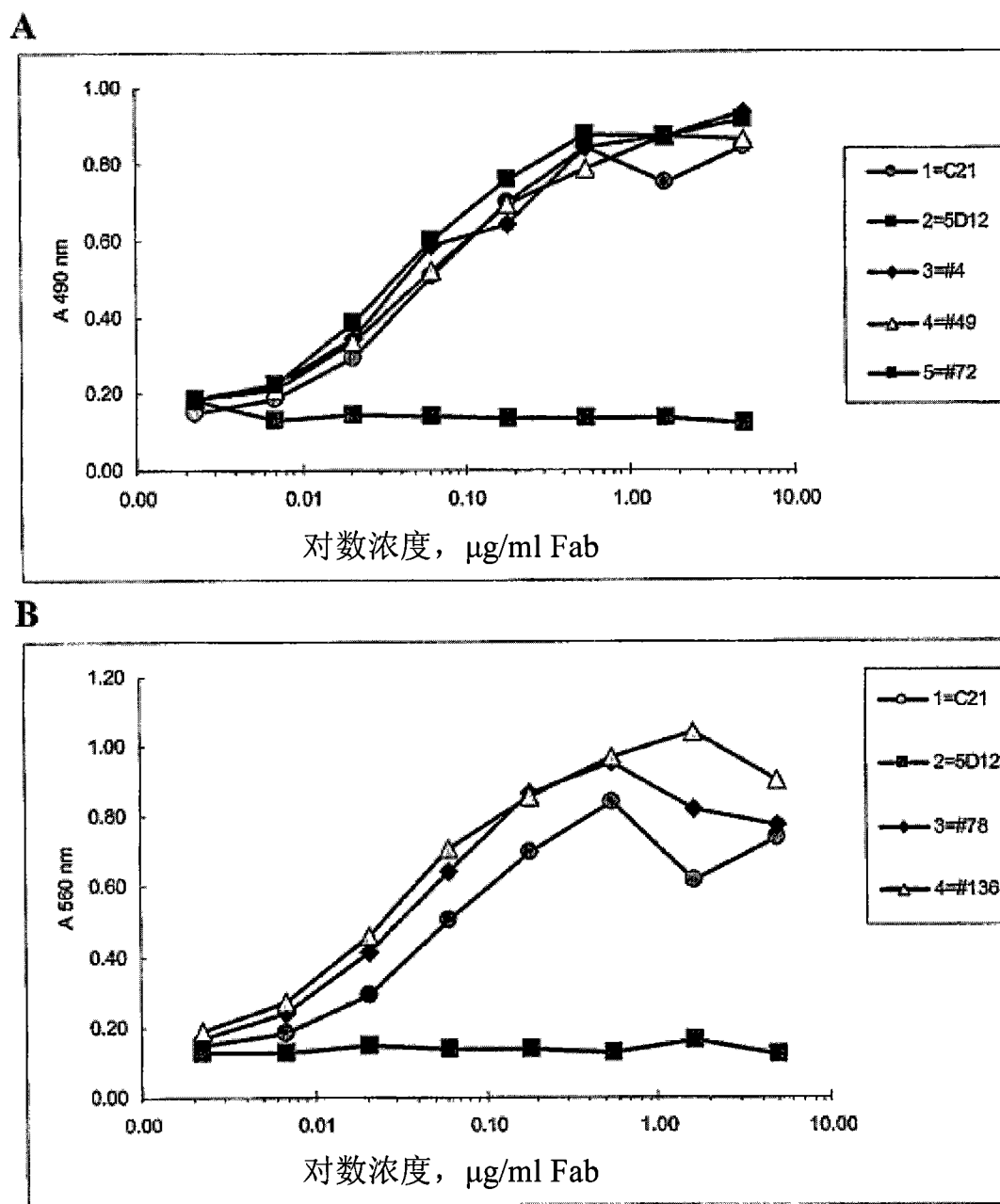
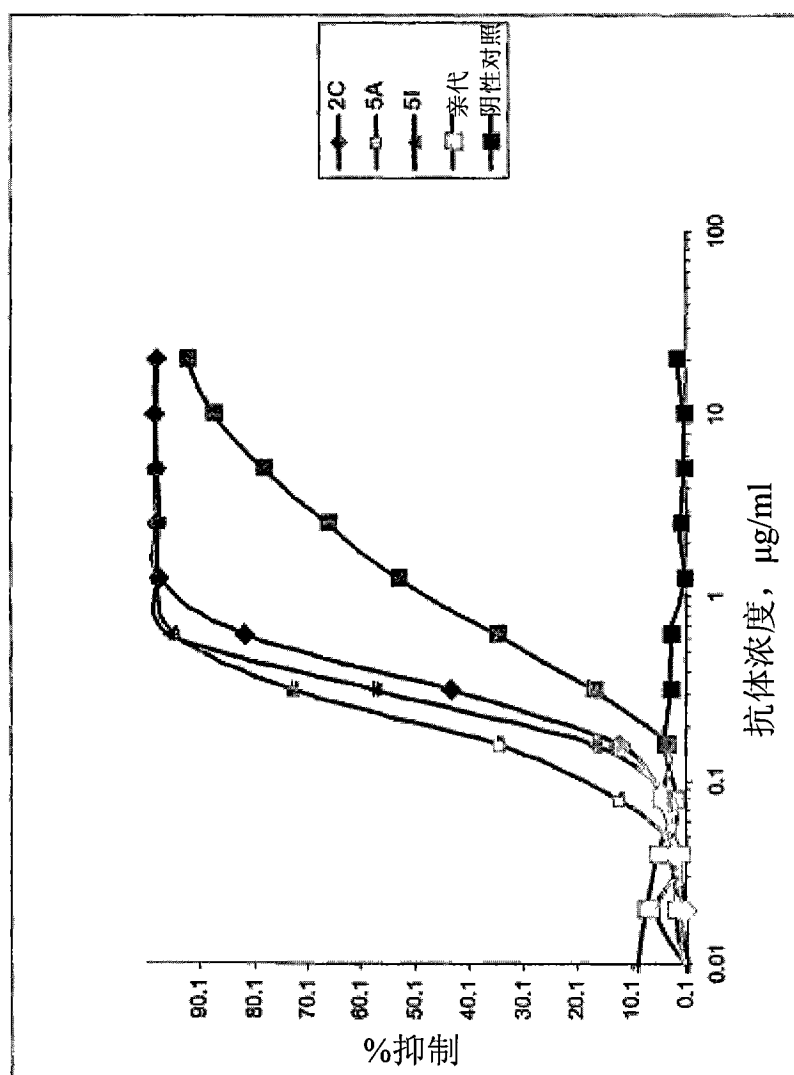


图 5ELISA 滴定曲线

图6 抑制试验



文库中的高亲和力候选者列表

纯系	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
136	RASRSIGTNIH	YASESIS	QQSDSWPTT	MYWLE	EISPGTFTINYNEKFA	FSHFSGSNYDYFDY
L3-9	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	wt	wt
CL-2G	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	wt	wt
R5-E	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	wt	wt
R87-E	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EIEPGTFTINYNEKFA	wt
CL-2I	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EIDPGTFTINYNEKFA	wt
R2-C	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EIEPGTFTINYNEKFA	wt
CL-2C	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EIDPGTFTINYNEKFA	wt
CL-2H	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EIEPGTFTINYNEKFA	wt
CL-2B	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EIDPGTFTINYNEKFA	wt
CL-3A	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EISPGTFTINYNEKFA	wt
R47-E	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EISPDFTFTINYNEKFA	wt
CL-3G	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EISPGTFTINYNEKFA	wt
R3-A	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EISPDFTFTINYNEKFA	wt
CL-3C	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EISPGTFTINYNEKFA	wt
CL-3E	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EISPDFTFTINYNEKFA	wt
R5-K	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EISPGTFTINYNEKFA	wt
CL-4B	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EISPGTFTINYNEKFA	wt
R5-D	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EISPGTFTINYNEKFA	wt
CL-5G	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EIEPGTFTINYNEKFA	wt
CL-5I	wt	wt	QQSDSWPTT	wt	EIDPGTFTINYNEKFA	wt
CL-5A	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EIEPGTFTINYNEKFA	wt
CL-5H	wt	wt	QQSDSWPTT	WYWLE	EIDPGTFTINYNEKFA	wt
R5-H	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EIEPGTFTINYNEKFA	wt
R5-N	wt	wt	QQSDSWPTT	YVWLE	EIDPGTFTINYNEKFA	wt

亲代氨基酸序列的变化用粗体列出。

图 7

57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500	1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513	1514	1515	1516	1517	1518	1519	1520	1521	1522	1523	1524	1525	1526	1527	1528	1529	1530	1531	1532	1533	1534	1535	1536	1537	1538	1539	1540	1541
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

图 8B

VH 比对

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SDSWPTTFGG
GTKVEIK (SEQ ID NO 57)

恒定区 Ck

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLSKADYEK 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 NEKFARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGTLLV VSS (SEQ ID NO 59)

恒定区 CH1-3(IgG1)

(SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10A Mab136 的多肽序列

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYVCQQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK (SEQ ID NO 61)

恒定区 Ck

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC (SEQ ID NO 58)

重链(IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH(2C)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
IDPGTFTTNY NEKFKAQVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFGGSNYDYF DYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO 62)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10B MA b CL-2C 的多肽序列

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

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

恒定区 Ck

(SEQ ID NO 58)

TVAAPSVEFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPBREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC

重链(IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH(5I)

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

恒定区 CH1-3(IgG1)

(SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFPP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPFV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFCFSCV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10C MA b CL-5I 的多肽序列

轻链

信号肽

MENSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

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

恒定区 Ck

(SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC

重链(IgG1)

信号肽

MENSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH(5A)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
IEPGTETTNV NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFGSGSNYDYF DYWGQGTLLV VSS (SEQ ID NO 66)

恒定区 CH1-3(IgG1)

(SEQ ID NO 60)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYPPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
KSCDKHTTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

图 10D MAb CL-5A 的多肽序列

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 KDSTYSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
 FNRGEC

重链(IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH(2B)

QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS YYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
 IDPGFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
 HFSGSNYDYF DYWGQGTLLVT VSS (SEQ ID NO 68)

恒定区 CH1-3(IgG1) (SEQ ID NO 60)

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

图 10E MAbs CL-2B 的多肽序列

轻链

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 Vk

EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RPSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYQCQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK (SEQ ID NO 69)

恒定区 Ck

(SEQ ID NO 58)

TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC

重链(IgG1)

信号肽

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO 56)

可变区 VH

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGQGLEWMGE
ISPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO 70)

恒定区 CH1-3(IgG1)

(SEQ ID NO 60)

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

图 10F MAb CL-1136-2C 的多肽序列

专利名称(译)	高亲和力抗人类IgE抗体		
公开(公告)号	CN1771338B	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	CN200480007011.7	申请日	2004-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	唐纳士公司		
申请(专利权)人(译)	唐纳士公司		
当前申请(专利权)人(译)	唐纳士公司		
[标]发明人	桑贾耶辛格 凯瑟琳福斯特 赫伦吴		
发明人	桑贾耶·辛格 凯瑟琳·福斯特 赫伦·吴		
IPC分类号	C12Q1/70 G01N33/53 C12P21/08 A61K39/395 C07K16/00 C07K16/42		
CPC分类号	C07K2317/24 G01N33/6854 C07K2317/55 C07K16/18 Y10S435/81 C07K2317/565 C07K16/005 C07K16/4291 C07K2317/567 G01N2800/24 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/04		
优先权	60/444229 2003-02-01 US		
其他公开文献	CN1771338A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及高亲和力人类单克隆抗体，尤其那些针对免疫球蛋白E(IgE)的同型决定子的高亲和力人类单克隆抗体，以及这些抗体的直接等效物及衍生物。这些抗体可以一比原始亲代抗体高至少100倍的亲和力与其各自的靶相结合。这些抗体可用于诊断、预防和治疗疾病。

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 EISPDFTTNYNEKFKA	SEQ ID NO 21
#4 YASESES	SEQ ID NO 12	#4 EISPETFITNYNEKFKA	SEQ ID NO 22
CDRL3:		#5 EISPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 23
P QQSQDSWPTT	SEQ ID NO 13	#6 EIEPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID NO 24
#1 QQSWSWPTT	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