



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 94194971.0

[43]公开日 1997年2月12日

[11] 公开号 CN 1142855A

[22]申请日 94.11.21

[30]优先权

[32]93.12.8 [33]GB[31]9325182.5

[86]国际申请 PCT/IB94/00387 94.11.21

[87]国际公布 WO95/16038 英 95.6.15

[85]进入国家阶段日期 96.8.7

[71]申请人 T细胞科学公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 林毅然

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

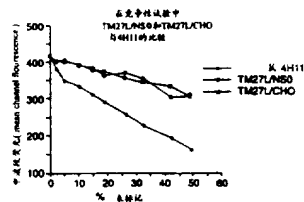
代理人 巫肖南

权利要求书 3 页 说明书 58 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 人源化抗体及其用途

[57]摘要

本发明涉及人源化抗体或其结合蛋白，它能够结合到显示出特殊可变β链的T细胞上，尤其是可以结合到那些表现出人Vβ5.2和/或5.3以及Vβ8.1的T细胞亚群上。本发明还涉及这种抗体的制备，含有此抗体的药物组合物以及该抗体在医疗中尤其对自身免疫病的治疗中的应用。



K.AH11 $y = 383.85 - 5.0535x$ $R^2 = 0.985$
 TM27LMSO $y = 415.77 - 2.3218x$ $R^2 = 0.839$
 TM27LJCHO $y = 415.84 - 2.1880x$ $R^2 = 0.987$

| UGAL | % 人源化抗体 | K.AH11 | TM27LMSO | TM27LJCHO |
|-------|---------|---------|----------|-----------|
| 5.000 | 50.000 | 148.887 | 383.853 | 298.873 |
| 3.750 | 42.800 | 181.330 | 298.887 | 328.217 |
| 2.500 | 35.300 | 213.823 | 348.859 | 342.587 |
| 1.875 | 27.300 | 251.783 | 387.840 | 358.120 |
| 1.250 | 20.000 | 288.863 | 388.857 | 374.063 |
| 0.938 | 15.000 | 308.113 | 388.878 | 378.773 |
| 0.625 | 11.100 | 333.177 | 388.880 | 386.823 |
| 0.312 | 5.800 | 348.280 | 488.485 | 451.287 |
| 0.156 | 3.000 | 388.880 | 488.113 | 482.853 |
| 0.000 | 0.000 | 417.787 | 417.787 | 417.787 |

权 利 要 求 书

1、一种人源化抗体或其结合蛋白，其氨基酸序列包含基本上来自一种单克隆抗体的全部或部分 CDR 以及也来自所说单克隆抗体的选定可变构架残基，所说单克隆抗体对选定的 T 细胞亚群具有特异性，所说人源化抗体或其结合蛋白能结合到所说选定的 T 细胞亚群上，其结合亲和力至少与所说单克隆抗体表现出的相当。

2、如权利要求 1 的人源化抗体或其结合蛋白，它含有下列氨基酸序列的全部或部分：

10 TM27 V_K

1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQTPGKAPKLLIYY 50

51 TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQYSKLPRTFGQ 100

15 101 GTKLQIT 107

3、如权利要求 2 的人源化抗体或其结合蛋白，它进一步含有下列序列的全部或部分：

20 TM27 V_H

1 QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLTAYGVNWRPPGRGLEWLG 50

51 IWGDGNTDYN SALKSRVTMLKDT SKNQKSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV 100

101 TATLYAMDYWGQGS LVTVSS 120

25

4、如权利要求 1 的人源化抗体或其结合蛋白，它含有下列序列的全部或部分：

TM29 V_K

30 1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVN YIYWYQQTPGKAPKLLIYYT 50

51 SNLAPGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYCQQFTSSPFTFGQGT 100

101 KLQIT 106

5 5、如权利要求4的人源化抗体或其结合蛋白，它进一步含有下列序列的全部或部分：

TM29 VH

1 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTF SNFGMHWVRQAPGKGLEWVAY

10 51 ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTGVYFCARRG

101 EGAM DYWGQGTPVTVSS

6、如权利要求1至5中任一项的人源化抗体，其为完整的Ig。

7、如权利要求6的人源化抗体，其为同种型IgG2a。

15 8、如权利要求6或7的人源化抗体，其中Ig恒定区中的一个或多个残基被改变以改变所述恒定区的效应子功能。

9、如权利要求1至8中任一项的人源化抗体或其结合部分由重组DNA技术产生。

20 10、生产如权利要求1至9中任一项的人源化抗体或其结合蛋白的方法，此方法包括：

a)分离编码至少一个基本上来自鼠单克隆抗体的CDR的第一DNA序列，所述单克隆抗体对T细胞的选定亚群具有特异性；

b)将所述第一DNA序列克隆到适当载体中；

c)通过诱变引入选定的人构架氨基酸，因而形成CDR-移植构建体；

25 d)用步骤c)中所说的构建体转化宿主细胞；和

e)培养如此转化的所述宿主细胞以产生所述人源化抗体或其结合蛋白。

11、如权利要求10的方法，其中该宿主细胞是CHO细胞。

12、根据权利要求1至9中任一项的人源化抗体或其结合蛋白在治疗中的应用。

30 13、一种药物组合物，它含有根据权利要求1至9中任一项的人源化抗体或其结合蛋白以及药用可接受的赋形剂。

14、治疗 Crohn 氏病的方法，包括给需要这种治疗的病人施用有效量的根据权利要求 4 至 7 中任一项的人源化抗体或其结合蛋白。

15、治疗 MS 的方法，包括给需要这种治疗的病人服用有效量的根据权利要求 2、3、6 或 7 中任一项的人源化抗体或其结合蛋白。

说明书

人源化抗体及其用途

5 本发明涉及人源化抗体及其结合蛋白，它能够结合到显示出特殊可变 β 链的T细胞上，尤其是可以结合到表达人V β 5.2和/或5.3以及V β 8.1的T细胞亚群上。本发明还涉及这种抗体的制备，含有此抗体的药物组合物以及此抗体在医疗中尤其对自身免疫病的治疗中的应用。

在免疫系统中，T细胞对于效应机制(effector mechanism)的分化和调节起着关键性作用(Paul et al., (1987)Science 195:1293 - 1300)。由于不适当的免疫调节可导致自身免疫，因而T细胞对抗原和主要组织相容性分子的共同识别必须是特异性的并且应被精确调节。几个实验室已研究了涉及免疫调节不当的疾病，如自身免疫以及某些形式的免疫缺损。在这些疾病的病理中涉及到了T细胞。

15 已报道特定T细胞受体复合物的克隆或寡克隆扩充存在几种情况。最明显的例子是可导致T细胞白血病或淋巴瘤的恶性病变。对于T细胞白血病或淋巴瘤而言，由于T细胞受体被稳定地重排并呈现于细胞表面，T细胞受体即成为独特的肿瘤标记物。涉及到特定T细胞受体复合物的另一种情况是器官移植的受体，其T淋巴细胞具有T细胞受体，使他们可以攻击供体个体(如骨髓移植供体)的MHC分子。

更为重要的是：几个研究小组已报道了在某些自身免疫情况下选择性T细胞抗原受体V区域基因的使用。例如，Grunwald等人已注意到与肉样瘤病患者的外周血淋巴细胞相比，在支气管小泡灌注法中，V α 2.3基因产物优先在CD4 + T细胞中表达(Grunwald et al., (1992) Eur. J. Immunol. 22:129)。
25 在Kawasaki病中还注意到：此病一开始，V β 2和V β 8 T细胞即优先扩充(Abe et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4066)。

在此方面还广泛研究了类风湿性关节炎。几个研究者已注意到T细胞亚群的优先扩充，例如：DerSimonian et al., (1993) J. Exp. Med. 177:1623(在CD8 + 外周血T淋巴细胞中具有V α 12.1的T细胞的优先扩充)；Stamenkovic et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1179(由Southern印迹分析得知生长于IL2中的浸润滑液膜的T细胞是寡克隆的)；Paliard et al., (1991) Science

253:34(假设超级抗原激活包括自身反应性 T 细胞的 V β 14 + T 细胞, 此 T 细胞克隆扩充并迁移至类风湿性关节炎患者的滑液中); Howell et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10921(特别注意到 V β 3.14 和 17 T 细胞 V 区域基因在类风湿性关节炎患者滑液 IL 2R + 细胞中的使用); Uematsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8534(表明寡克隆 T 细胞 V 区域基因在单个 RA 患者滑液 T 细胞中的使用); 以及国际专利申请 NO.WO 90/06758(涉及 RA 中的 V β 3.9 和 10)。

还广泛研究了肠炎病。几个研究小组已注意到扩充的 T 细胞群或优先的 T 细胞受体 V 区域基因的使用, 例如: Posnett et al., (1990) J. Clin. Invest. 85:1770; Spencer et al., (1991) J. Clin. Pathol. 44:915; Trejdosiewicz et al., (1991) Clin. Exp. Immunol. 84:440; 和 Van kerckhove et al., (1992) J. Exp. Med. 175:57。另外一些研究小组已报道了优先的 T 细胞 V 基因在麻风杆菌(*Mycobacterium leprae*)中的使用(Van Shooten et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11244; Wang et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:188。)

对于人而言, 已发现炎症组织中 V β 8.1 T 细胞的扩充与几种自身免疫病相关, 包括 Crohn 氏病(Posnett et al., (1990) J. Clin. Invest. 85:1770 - 1776)、Kawasaki 病(Abe et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4066 - 4070 和 Abe et al., (1993) J. Exp. Med. 177:791 - 796)以及类风湿性关节炎(Brennan et al., (1988) Clin. Exp. Immunol. 73:417 - 423)。

另一种已被广泛研究的自身免疫病是多发性硬化病(MS)。MS 是一种免疫介导的疾病, 其特征在于中枢神经系统单核细胞浸润和脱髓鞘。尽管仍不知道 MS 的病理, 但此疾病进程中涉及到遗传和环境因素。遗传因素的主要元素包括此疾病与特定 II 类主要组织相容性复合体(MHC)单倍型有关, 具体地说是与 HLA - DR21 和 DQW1 有关(Terasaid et al., (1976) Science 193:1245 - 1247; HO et al., (1982) Immunogenetics 15:509 - 517; Spielman et al., (1982) Epidemiol. Rev. 4:45 - 65; Francis et al., (1986) Lancet 1:211; Elian et al., (1987) Disease Markers 5:89 - 99; Urban et al., (1988) Cell 54:577 - 592, Vandenbark et al., (1989) Nature 341: 541 - 544; Howell et al., (1989) Science 246:668 - 670)。

已表明从 MS 患者的脑脊髓液中分离的 T 细胞可利用有限套 V 区域基

因。MS 患者体内激活髓鞘碱性蛋白特异性 T 细胞的实验表明，此疾病病理中涉及 MBP 反应性 T 细胞(Wucherpfennig et al., (1990) Science 248:1016 - 1019)。用 T 细胞受体 V β 引物进行 cDNA 的聚合酶链式反应(PCR)扩增以测定 MBP 反应性 T 细胞系对 TCR V β 的使用时，发现优先使用有限数量的 V β 基因(Wucherpfennig et al.,(1990)(文献同上) - V β 17 以及较小程度上 V β 12 经常被用于识别人自身抗原 MBP 的优势免疫区域); Oksenberg et al., (1993) Nature 362:68。一些研究的结果也暗示在 MS 脑病灶中只有有限的 T 细胞受体 V α 基因表达(Oksenberg et al., (1990) Nature 345:344 - 346)。使用定量 PCR 和单克隆抗体(mAb)染色进行的 T 细胞全部组成成分分析表明：与对照相比，分离自 MS 患者的髓鞘碱性蛋白(MBP)特异性 T 细胞主要使用 V β 5.2 和/或 5.3(Oksenberg et al., (1993)(文献同上)(在具有某种 HLA 表型病人的脑中检测到重排的 V β 5.2 基因)和 Kotzin et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9196(在 MS 患者的 MBP 特异性克隆中发现偏向于使用 β 链可变区 5.2 以及较小程度地使用 V β 6.1)。

15 目前，对于 MS 没有已知的有效治疗方法。(Harrison's Principles of Internal Medicine, 12 th ed. Wilson et al., McGraw Hill. Inc. 1991)。目前的治疗致力于改善急性病情、防止疾病复发或恶化以及缓解症状。

然而，已发现小鼠 V β 8.2 可变区基因的表达与实验变应性脑脊髓炎 (EAE) - 一个人 MS 的小鼠模型相关。已阐明用鼠 V β 8.2 特异性单克隆抗体治疗可预防和减轻病情(Achaorbea et al., (1988) Cell 54:263 和 Urban et al., (1988) Cell 54:577)。因此很需要开发适于治疗这种疾病的抗体或“抗体样”分子。

抗体一般包括两条以二硫键相连接的重链以及与每条重链的 N - 末端相联的轻链。每条重链的 N - 末端有一可变区，在其另一端紧跟着一个恒定区。每条轻链的 N - 末端也有一可变区，紧随其后的是一恒定区。每对轻链和重链的可变区形成了抗原结合位点。轻链和重链上的可变区具有相同的一般性结构，每个区域包含四个区的构架，其序列相对保守，这四个区由三个互补性决定区(CDR)连接。这四个构架具有类似 β - 片层的构象，CDR 形成了连接 β - 片层构建的环。构架区域使 CDR 靠得很近从而形成抗原结合位点。

30 参考 Kabat 计数系统(Kabat et al., (1987) “ Sequences of Proteins of Immunological Interest ”, US Dept. of Health and Human Services , US

Government Printing Office), 并结合 WO 91/09967 中所述的 X - 射线晶体学可测定抗体的 CDR 和构架区域。

5 为了产生可靶向特异性抗原的抗体, 通常使用 Kohler 和 Milstein 的方法 (kohler et al., (1976) Nature 256:495 - 497)。此方法一般包括用抗原免疫小鼠, 将来自免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 并从产生的杂交瘤中选择出一个或多个可分泌特异于靶抗原的单克隆抗体的杂交瘤。

在治疗中适合使用这种 mAb(单克隆抗体), 但是这种 mAb 基本上来源于鼠, 因此它们自身对人而言也是一种抗原。如果将这种 mAb 重复给人施用, 人的免疫系统会对小鼠 mAb 产生应答, 因此会使之变得无效。

10 因此, 最初由 Winter 和他的同事们建议(例见 Reichmann et al., (1988) Nature 332:323 - 327 和 Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534 - 1536)应将小鼠 mAb 的 CDR 移植到人构架上以产生 CDR 移植抗体。该抗体具有供体小鼠 mAb 的结合特性以及受体人构架的人相容性。

15 然而, 抗体分子的功能取决于它的三维结构, 而其三维结构反过来又取决于它的一级氨基酸序列。改变抗体的氨基酸序列会反过来影响其活性。同样, 抗体片段不能维持结合活性所必需的适当的三维结构。另外, 编码抗体的 DNA 序列中的变化会影响含有此 DNA 序列的细胞表达、分泌或装配抗体的能力。很难限定含有 CDR 的准确的残基, 而且也没有必要象 Kabat 计数系统中所限定的那样, 与高变区中所有残基相对应。有一些关键性的构架残基
20 对于 CDR 为与抗原相互作用进行的定位至关重要, 或者它们涉及重链和轻链之间的相互作用。有必要改变某些构架残基以使它们在某些位置与供体残基对应, 从而提供在特征上较少“人化”的 CDR 移植抗体。

已公开了多种建议, 可用于鉴定需要改变成供体残基的 CDR 和构架残基, 以产生有用的 CDR 移植抗体(例见, Queen et al., WO 90/07861; Kurrle
25 et al., Ep - A - 0 403 156; Adair et al., WO 91/09967; Queen et al., WO 92/11018; 和 Bendig et al., WO 92/01568)。从这些文献中可看出, 在任何具体情况下要产生有用的 CDR 移植抗体都是不容易的。

30 尽管在努力产生特异性 CDR 移植抗体的过程中本来存在的问题, 在较优选的实施方案中本发明人仍成功地产生了 CDR 移植抗体。此抗体基于人构架区并具有某 T 细胞亚群特有的可变 β 链区域特异性的抗原结合位点。令人奇怪的是, 本发明的人源化抗体与其鼠原型相比, 表现出同样好或更好的

与靶 T 细胞的结合亲和性。本申请要求保护的抗体或其部分提供了另一个优点，即它们比其鼠原型的免疫原性更低，因此当用于治疗时可减少对病人的有害反应。

5 本发明涉及对某些 T 细胞亚群具有选择结合特异性的人源化抗体，此抗体对于它们与这些亚群的结合高度敏感，并显示出该结合的特异性和亲和力如果不比原型 mAb 的更好，也是可与之相当。此人源化抗体的 CDR 区域的大部分来源于原型 mAb。本发明还涉及利用新的编码某些高变和构架残基的 cDNA，并将它们移植到人重链和人轻链构架中，以制备所述人源化抗体的方法。其它实施方案包括药物组合物以及使用这些抗体的治疗方法。

10 在一个特别优选的实施方案中，通过 CDR 移植将小鼠 mAb 的某些 CDR 和选定的构架残基移植到 KOL 重链和 REI 轻链构架来使识别人 V β 8.1 的小鼠 mAb，16G8，进行人源化。在具有 Neo 和 DHFR 选择性标记的哺乳动物细胞表达载体中分别编码人源化重链(IgG1)和轻链(K)的 cDNA 被传染进 DHFR⁻中国仓鼠成纤维细胞(CHO)细胞系中，然后进行选择 and 扩增。被称作
15 “TM29”的分泌出的人源化 mAb 保持了对人 TCR V β 8.1 的特异性，其亲和力与原型小鼠 mAb(16G8)的相当。本发明的抗体表明抗-TCR 抗体的人源化是可以实现的，同时还可保持正确的亚群特异性和亲和力。

本发明其它的实施方案包括将这些人源化抗体用作治疗剂以治疗人自身免疫疾病，尤其是 Crohn 氏病。

20 在本发明的另一个特别优选的实施方案中，通过将 CDR 移植到 NEWM 重链和 REI 轻链构架中可使识别人 V β 5.2 和 5.3 的小鼠 mAb，TM23，人源化。在具有 Neo 和 DHFR 选择性标记的哺乳动物细胞表达载体中分别编码人源化重链(IgG1)和轻链(K)的 cDNA 被转染进 DHFR⁻中国仓鼠成纤维细胞(CHO)细胞系中，然后进行选择 and 扩增。将分泌出的人源化 mAb 称作
25 “TM27”，它保持了对人 TCR V β 5.2 和 5.3 的特异性，其亲和力如果不比原型小鼠 mAb(TM23)的更好，也与之相当。本发明其它的实施方案包括将 TM27 用作治疗剂以治疗人 MS。

图 1 表示 TM27 的各种可变轻链序列和重链序列；

图 2 表示 TM29 的各种可变轻链序列和重链序列；

30 图 3 表示将 TM27 L/NSO 和 TM27 L/CHO 与 4H11 相比较的竞争性试验的结果；和

图 4 表示图 3 所示实验的 Scatchard 图。

本发明说明书中所用的某些术语的定义如下：

在本申请中，术语“抗体”被用来描述 Ig 或其任何片段、轻链或重链单体或二聚体、以及单链抗体，例如其重链和轻链可变区由肽接头连接的单链 Fvs，无论所述抗体是天然的或是通过重组 DNA 技术或其它方式产生的或其它，只要这样的抗体包括至少一个抗原结合位点。抗体的其余部分不必仅包含衍生于 Ig 的蛋白质序列。例如，可构建一个基因，其中编码人部分 Ig 链的 DNA 序列与编码多肽效应或报道分子之氨基酸序列的 DNA 序列融合。因此“抗体”包含杂合抗体(见下文)。

10 本文所用术语“结合蛋白”指的是具有来自抗体或抗体的联合的特定氨基酸序列的构建体，所说序列所形成的空间构型可以形成至少一个抗原结合位点。

略语“mAb”用来表示杂交瘤或其衍生的细胞系所产生的单克隆抗体。

15 术语“重组抗体”被用来描述由涉及使用重组 DNA 技术的方法所产生的抗体。

术语“CDR”或“互补性决定区”指的是在三维空间并列排列以形成抗原结合表面的抗体重链或轻链可变区的那些部分。

20 术语“嵌合抗体”被用来描述一种抗体，其可变区作为一个整体来自于第一种哺乳动物的抗体，并已融合到不同种哺乳动物抗体的至少一个恒定区上。

术语“CDR - 移植”被用来描述一种抗体或其部分，其 CDR 基本上来自第一种哺乳动物的抗体，并被移植到基本上来自第二种哺乳动物的可变构架区。所说构架区中的某些选定氨基酸也可以来自所说第一种哺乳动物。

25 术语“杂合抗体”被用来描述一种蛋白质，它至少含有 Ig 的结合部分，该部分通过肽键结合到至少部分其它蛋白质上。应说明的是某些本领域技术人员也会使用“嵌合”一词来描述这种构建体，但在本说明书中这种构建体是指杂合抗体，术语嵌合抗体表示上文限定的意义。

30 术语“人源化抗体”被用来描述一种抗体，其来自于第一种哺乳动物抗体的一个或两个可变区中具有至少一个，优选两个或三个 CDR，应理解为它也包括与某些高变氨基酸序列结合的某些选定构架氨基酸。抗体剩下的 Ig 衍生部分来自一个或多个不同的抗体。可使用重组 DNA 技术或通过肽合成

来制备可变区。

“表达载体”包括能够表达其中所含 DNA 序列的载体，即编码序列可操作地与能影响它们表达的其它序列相连接。有效表达载体的一个有用的，但不总是必需的(即昆虫细胞)要素是标记物编码序列，即编码能产生表型特征 5 的蛋白质的载体序列(例如新霉素抗性、甲硫氨酸 Sulfoximine 抗性或色氨酸原养型)，从而使那些含有这些蛋白质的细胞易被鉴别出。简而言之，“表达载体”是一功能性限定，当其用于特定序列时，此术语还包括能影响特定所含 DNA 密码子表达的任何 DNA 序列。目前，这种载体通常的形式是质粒，因此“质粒”和“表达载体”经常互换使用。然而本发明意欲包括可行使等 10 同功能的其它形式的表达载体，它们在本技术领域时常成为公知，包括逆转录病毒、腺病毒、体外系统(Baranov et al., (1989) Gene 84:2:463)等等。

上文已提到，当 DNA 序列被可操纵地连接到表达控制序列上(所处位置可确保表达控制序列的功能)之后，即可在宿主细胞中表达。这些表达载体在 15 宿主生物体中一般可复制，或以附加体的形式或成为宿主染色体 DNA 的整合部分。

“重组宿主细胞”指的是已被使用重组 DNA 技术构建的载体转化的细胞。借助这种转化，宿主细胞可产生有效量的所需产物，而不是由非转化宿主所期望产生的较少量的、或往往少于检测量的所需产物。由重组宿主细胞产生的本发明抗体和结合蛋白的量可用于进行另外的实验或者为商业可接受 20 的量，例如约 100 克或更多。

在描述从重组宿主中分离抗体或其结合蛋白的方法时，除非另有详细说明，术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用以表示抗体的来源。换句话说，从“细胞”中回收意味着或者从旋转下来的全部细胞中，或者从含有培养基和悬浮细胞的细胞培养物中，或者对骨髓瘤细胞系而言，还可以从腹水 25 培养物中回收。

本发明的人源化抗体或其结合蛋白所具有的氨基酸序列包含基本上来自单克隆抗体的其 CDR 的全部或部分，所说单克隆抗体对 T 细胞的选定亚群，尤其是 V β 8.1 亚群或 V β 5.2/5.3 亚群具有特异性。在优选的实施方案中，单克隆抗体来源于鼠。在优选的实施方案中，抗体或其部分的可变区的 30 构架氨基酸序列基本上来源于人，因此有了术语“人源化抗体”。据信当将抗体用于治疗病人时，此“人源化”可用来降低抗体的免疫原性。本文优选使

用的是重链 NEWM 或 KOL 人构架区以及轻链 REI 人构架区。保留的某些选定构架残基是鼠的而不是人的。据信这样对使该分子获得适当的三维结构是必需的。从而增加它对特异性 T 细胞亚集的结合特异性和亲和力。

5 只要能维持对 T 细胞选定亚群的结合特异性和亲和力, 根据本发明教导所制备的人源化抗体的任何部分(这里指广泛意义上的抗体)均属本发明构思的范围。因此, 本发明范围中还明确地包括衍生于所说抗体的结合蛋白。保留了这些能力的其它片段也是如此, 至少在某种程度上适于治疗用途, 如下文所述。

本领域技术人员通过使用常规的结合试验可检测根据本文教导制得的多种构建体的结合参数, 该试验是用被击靶的特异性 T 细胞或呈现出选定可变区的 T 细胞受体蛋白进行的。例如, 可进行与原型 mAb 结合到多种细胞系的竞争结合试验, Scatchard 分析及类似分析并将之与原型 mAb 所得结果相比较。另外, 也可借助多种动物模型系统, 如那些下文中将要描述的或者也可借助临床试验研究以估计根据本发明制得的构建体的治疗效力。应理解
15 即使当构建体与靶抗原的结合模式不同于原型 mAb, 此构建体也可以是很合适的治疗剂。

在特别优选的实施方案中, 人源化抗体或其结合蛋白的氨基酸序列含选自下列各组的可变轻链的全部或部分:

TM29 轻链

20

```
1   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVNYIYWYQQTPGKAPKLLIYYT   50
51  SNLAPGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYCOOFTSSPFTFGQG  100
101 TKLQIT                                                    106
```

TM27 轻链

25

```
1   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQTPGKAPKLLIYY   50
51  TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYCQYQYSKLPRTFGQ  100
101 GTKLQIT                                                    107
```

或它与选自下列各组的可变重链的全部或部分的联合:

30

TM29 重链

1 EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAY 50
 51 ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDN SKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARRG 100
 101 EGAMDYWGQGTPVTVSS 117

TM27 重链

5

1 QVQLQESGPGLV RPSQTL SLTCTVSGFSLTAYGVN WVRQPPGRGLEWVGM 50
 51 IWGDGNTDYN SALKSRVTMLKDT SKNQKSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV 100
 101 TATLYAMDYWGQGS LVTVSS 120

单个 CDR 附近选定的构架残基对于支撑 CDR 的三维结构至关重要
 10 (Foote and Winter (1992) J.Mol.Biol.224: 487 - 499)。因此，在某些较优选的
 实施方案中，设计了经修饰的重链。首次在残基 66 至 69 所包括在范围以及
 残基 73 处，用鼠序列 Leu - Ser - Ile - Ser(66 - 69)和 Asp(73)取代了人的
 相应部分序列。

在其它优选的实施方案中分别在第 78 和 79 位提供了鼠残基缬氨酸和苯
 15 丙氨酸，或在第 92 位提供了鼠精氨酸。

图 1 举例说明了这些取代，CDR 以黑体并划线表示。这些优选的抗体
 构建体(包括其结合蛋白)结合到 V β 5.2/5.3 上。

通过修饰重链残基 23 和 24 可提供本文其它优选的抗体及其结合蛋白，
 在这些位置处，鼠相应部分的序列 Ala - 被取代。其它构建体表明残基 75
 20 可以是鼠脯氨酸残基，或者残基 88、89 和 91 分别为丙氨酸、甲硫氨酸或酪
 氨酸。这些抗体构建体及其结合蛋白结合到 V β 8.1 T 细胞上，图 2 对此有
 更完整的描述。

本文特别优选使用的是 CDR - 移植抗体，它实质上含有与 TM27 重链
 相连接的 TM27 轻链，其中残基 48 或者是鼠亮氨酸或者是异亮氨酸。也特别
 25 优选的是实质上含有与 TM29 重链相连接的 TM29 轻链的 CDR - 移植抗体。

通过使用多种技术，在被转染细胞，如优选在酵母、昆虫、CHO 或骨
 髓瘤细胞中表达，可产生本发明的人源化抗体或其结合蛋白，最优选的宿主
 细胞是 CHO 宿主细胞。

为了设计根据本发明的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白，首先必需确定
 30 具有所需结合特性的抗体的可变区序列。这种 DNA 序列的适当细胞来源包
 括鸟类、哺乳动物或其它脊椎动物，例如鸡、小鼠、大鼠和兔，优选小鼠细

胞。使用本领域公知的技术，由各自的 mRNA 合成重链和轻链的 cDNA，再由此确定可变区序列(V_H 和 V_L)，然后使用 Kabat 法(文献同上)确定高变区序列。通过使用 X - 射线晶体学或分子造型技术的结构分析可测定 CDR。然后可构建含有对应于高变区的所有残基以及某些选自构架区的残基的复合 CDR。所得复合 CDR 作为“抗原结合位点”可被转移，而抗体的剩余部分如需构建成完整的 Ig，则应包括重链和轻链恒定区以及其余的构架残基。后一部分可以不同类的人抗体为基础。

恒定区可选择成具有所需的效应子功能(effector function)，该效应子功能适合于如此构建的抗体的预期用途。例如，人 IgG 同种型 IgG₁ 和 IgG₃ 对于补体固定和细胞介导的裂解有效。为了其它的目的，其它同种型，如 IgG₂ 和 IgG₄，或其它类，如 IgM 和 IgE 也可能会更合适。

为了给人治疗，特别适于使用人同种型以降低治疗过程中的抗球蛋白反应。可根据公知的方法制备优选与其可变区构架区域相连接的人恒定区 DNA 序列。例如可使用 Burroughs Wellcome Ltd 的 CAMPATH 1H。

本发明的优选实施方案提供了某些 CDR - 移植抗体，它们含有对人类构架区域(也即可变区 CDR 的外围)经选定的修饰，从而得到具有令人满意的结合亲和力的 CDR - 移植抗体。这种结合亲和力优选约为 $10^5 \cdot M^{-1}$ 至 $10^{12} \cdot M^{-1}$ ，更优选至少约为 $10^8 \cdot M^{-1}$ 。最优选此结合亲和力约等于或大于原型抗体的结合亲和力(在较优选的情况下，此原型抗体为鼠抗体)。

在构建本发明的 CDR - 移植抗体的过程中，可通过诱变来改变 V_H 和/或 V_L 基因片段。本领域技术人员能够理解可用类似的方法改变编码抗体 Fc 部分或其它区域所含氨基酸残基或序列的那些核苷酸(例见 PCT/US 89/00297)。

只要能保留合适的阅读框架，则修饰方法包括增加、缺失或非保守性地替换有限数目的核苷酸或保守性地替换很多核苷酸。

可使用替换、缺失、插入或任何亚联合(Subcombination)来得到最终的构建体。因为有 64 个可能的密码子，但仅有 20 个已知的氨基酸。在此意义上遗传密码有简并性，不同的密码子可产生相同的氨基酸。然而对每个氨基酸而言密码是精确的，因此每个氨基酸至少有一个密码子，即每个密码子产生一单个氨基酸而不是其它。很显然，在转译过程中需保留适当的阅读框架以使最终产生的多肽得到适当的氨基酸序列。

在已知序列中预定的氨基酸位点增加、缺失或替换的技术是已知的。这些技术包括寡核苷酸介导的定点诱变以及 PCR。

寡核苷酸定点诱变实质上包括使编码所需突变的寡核苷酸与含有需突变区域的单链 DNA 杂交，并使用该单链作为模板以使寡核苷酸延伸从而产生含有突变的链。多种形式的此项技术被描述于 Zoller and Smith, (1982) *Nuc. Acids Res.* 10:6487、Norris et al., (1983) *Nuc. Acids Res.* 11:5103, Zoller and Smith, (1984) *DNA* 3:479, Kramer et al., (1982) *Nuc. Acids Res.* 10:6475。

PCR 实质上包括使用序列特异性寡核苷酸体外指数扩增 DNA。如有需要，寡核苷酸可带入序列变化。Mullis and Faloona. (1987) *Meth. Enz.* 155:335 中描述了 PCR 技术。使用 PCR 诱变的例子描述于 Higuchi et al., (1988) *Nuc. Acids Res.* 16:7351, HO et al., (1989) *Gene.* 77:51, HO et al., *Engineering Hybridization Restriction Genes Without the Use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension*; Horton et al., (1989) *Gene* 77:61。

从多种不同的多核苷酸(基因组 DNA、cDNA、RNA 或合成寡核苷酸)中可形成能最终表达所需抗体或其结合蛋白的本发明核苷酸序列。目前，优选多核苷酸序列含有 cDNA 和基因组 DNA 的融合。多核苷酸序列可编码多种 Ig 组分(例如 V、J、D 和 C 区域)。可使用多种不同的技术来构建它们。目前最常见的生产方法是将适当的基因组和 cDNA 序列相结合，但也可使用 cDNA 序列(见 EP - A - 0 239 400 和 Reichmann et al., (1988) *Nature* 332:323)。

US - A - 4 816 567 中描述了某此适当的表达载体和宿主细胞。

本文公开的载体和方法适用于广范围的原核和真核宿主细胞。

当然，一般来说克隆 DNA 序列以用于构建本发明所用的载体时优选使用原核生物，例如多种大肠杆菌(*E.coli*)质粒克隆载体特别有用，如 Stratagene(San Diego California)的 Bluescript M13 载体可以用；pUC19c、Genbank Accession # VB0026、pBR322(下文中将描述)等等也可以用。当然这些例子只为了说明而不是限定范围。

原核生物还可以用来表达。可以使用上述 *E.coli* 菌株、如枯草芽孢杆菌(*Bacillus Subtilis*)的杆菌以及其它肠细菌，如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)或粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)以及多种假单胞菌。

一般来说，将含有来自与宿主细胞相容物种的复制子和控制序列的质体

载体与这些宿主一起使用。载体普遍携有复制位点以及标记序列，该标记序列能给转化细胞提供表型选择。例如，典型地，可使用来自 *E.coli* 种的质粒 pBR322 的(Bolivar et al., (1977) *Gene* 2:95)多种衍生物之一来转化 *E.coli*。pBR322 含有氨苄西林和四环素抗性基因，因此提供了鉴别转化细胞的简单方式。pBR322 质粒，其衍生物或其它微生物质粒也可含有，或经修饰以含有启动子，它可被微生物利用以表达重组蛋白质。常用于重组 DNA 构建体的那些启动子包括乳糖启动子系统(Chang et al., (1978) *Nature* 275:615 ; Itakura et al., (1978) *Science* 198:1056 ; Goedell et al., (1979) *Nature* 281:544)和色氨酸(trp)启动子系统(Goedell et al., (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057 和 EP - A - 0 036 776)。尽管这些是最常用的，已发现和使用其它微生物启动子，已公开了涉及它们核苷酸序列的细节，熟练技术人员能够将它们连接到质粒载体上并具有功能(Siebenlist et al., (1980) *Cell* 20:269)。

除原核生物以外，还可使用真核微生物，如酵母培养物。在真核微生物中，尽管通常使用各种其它菌株，但最常用的是啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通的面包酵母。为了在糖酵母中表达，例如常可使用质粒 YRp7(Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39 ; Kingsman et al., (1979) *Gene* 7:141 ; Tschemper et al., (1980) *Gene* 19:157)。此质粒已含有 *trp1* 基因，它可为缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株，例如 ATCC No.44076 或 PEP4 - 1 提供选择性标记(Jones, (1977) *Genetics* 8:85:12)。通过在缺乏色氨酸的情况下生长，作为酵母宿主细胞基因组特征的 *trp1* 损伤的存在为检测转化子提供了有效的环境。

酵母载体中适当的启动序列包括 3 - 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子，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、果糖磷酸激酶、葡萄糖 - 6 - 磷酸异构酶、3 - 磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡糖异构酶和葡糖激酶(Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149; Holland et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900)。在构建适当表达质粒的过程中，还需将与这些基因相关的终止序列连接到表达载体中需表达序列的 3' 末端，以使 mRNA 聚腺苷酸化并且终止。具有由生长条件控制转录的附加优势的其它启动子是乙醇脱氢酶 2、同种细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶和上述甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(一个负责麦芽糖和半乳糖利用的酶)的启动子区域。含有与酵母相容的启动子、复制起点和

终止序列的任何质粒载体都是适用的。

除了微生物外，得自多细胞生物体的细胞培养物也可以用作宿主。原则上，无论来自脊椎动物或无脊椎动物生物体的任何这种细胞培养物都可以使用。但迄今为止，人们兴趣最大的是脊椎动物细胞。近年来培养物(组织培养)中脊椎动物细胞的繁殖已成为常规方法(Kruse and Patterson, (1973) Tissue Culture, Academic Press)。这种有用的宿主细胞系的例子有 VERO、HeLa、中国仓鼠卵巢(CHO)、W138、BHK、COS - 7、MDCK 和骨髓瘤、gs 骨髓瘤(可从 Celltech, Slough, U.K. 得到)细胞系。这种细胞的表达载体可包括(如有必要)适当的复制起点、以及位于需表达基因前面的启动子、和任何必需的核糖体结合位点、RNA 剪接位点、聚腺苷酸位点和转录终止序列。

为了在哺乳动物细胞中使用，表达载体上的控制功能常由病毒材料提供。例如，常用的启动子来自人巨细胞病毒(HCMV)、多瘤病毒、腺病毒 2 以及，最经常地来自猴病毒 40(SV40)。SV40 病毒的早期和晚期启动子特别有用，因为两者也含有 SV40 病毒的复制起点的片段可容易地从病毒中获得(Fiers et al., (1978) Nature 273:113)。另外，也可以并经常需要使用正常地与所需基因序列相关的启动子或控制序列，前提条件是这种控制序列与宿主细胞系统相容。

复制起点有两种方式提供，一种是通过载体的构建使其包含一个外源性起点，如来自 SV40 或其它病毒(如多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)的复制起点；另一种是由宿主细胞染色体复制机制提供。如果载体整合进宿主细胞染色体，则经常后一种就足够了。

可通过公知的方法将含有所需 DNA 片段(例如重链和轻链编码序列和表达控制序列)的载体转移到宿主细胞中，所用方法根据细胞宿主的类型而不同。例如，对于原核细胞常使用氯化钙转染法，而对于其它细胞宿主可使用磷酸钙处理、脂质转染法或电穿孔法(Maniatis et al., (1990) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press)。

一旦表达，可根据本领域中的标准方法纯化本发明构建体，所述方法包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析和凝胶电泳(Scopes, (1982) Protein Purification, Springer Verlag, NY)。通过本领域已知的技术可确定如此表达的构建体的结合亲和力，这一点在本说明书实施例部分将更全面地举例说明。

对于药用而言，基本上纯化的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白优选至少为 90 至 95 % 均质、更优选 98 至 99 % 或更高的均质性。一旦部分纯化或纯化至所需均质，CDR - 移植抗体即可用于诊断或治疗(包括体外)或者用于开发和用于测定方法、免疫荧光染色等等(Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) 5 Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY).

本发明的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白的典型用途是治疗 T 细胞介导的疾病，例如，适于治疗的典型疾病包括自身免疫病，如 I 型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、Crohn 氏病和重症肌无力。

本发明 T 细胞抗体的治疗作用的前提是特定免疫相关疾病与特殊 T 细胞 10 抗原受体 V 区基因产物的优选表达或特殊 T 细胞抗原受体 V 基因的扩充使用之间的联系。T 细胞抗原受体 V 区是有用的，部分是因为它可通过利用 T 细胞抗原受体的特异性治疗来调节个体中的免疫应答。具体地说，特殊可变区基因座位的存在或表达已表明它与特殊的免疫相关疾病有关。通过确定与特定免疫疾病相关的特定 V 区基因座位，人们可通过抑制携该特殊 V 区的 T 15 细胞的攻击来对患者进行治疗。

本发明中的术语“治疗”，包括对疾病的“预防”、“抑制”或“治疗”这几种情况。“预防”是在疾病诱发之前施用保护性的组合物。因此，例如在动物模型 EAE 中，在注射致脑炎原诱导脑炎之前，成功施用保护性组合物可产生对脑炎的“预防”。

20 “抑制”是在疾病诱发之后，但在有临床表现之前施用此组合物。再如 EAE 的例子，在注射致脑炎原之后，但在神经学症状出现之前，成功地施用保护性组合物即为对疾病的“抑制”。

“治疗”是在疾病表现出来之后，施用保护性组合物。在 EAE 例子中，注射致脑炎原并出现临床症状之后，成功地施用保护性组合物即为对疾病的 25 “治疗”。

可用来筛查抗体或其结合蛋白抗疾病保护或治疗疾病的效力的动物模型系统已经存在。Knight et al., (1978) J. Exp. Med. 147:1653 和 Reinersten et al., (1978) New Eng. J. Med. 299:515 公开了在易感性小鼠中试验全身性红斑狼疮(SLE)。如 Lindstrom et al., (1988) Adv. Immunol., 42:233 - 284 中描述， 30 通过用来自另一物种的可溶性 AChR 蛋白诱导疾病，可在 SJL/J 雌性小鼠中试验重症肌无力(MG)。如 Stuart et al., (1984) Ann. Rev.Immunol. 42:233 - 284

中的描述，通过注射 II 型胶原可在小鼠易感品系中诱导关节炎。如 Van Eden et al., (1988) Nature 331: 171 - 173 中的描述，通过注射分枝杆菌热激蛋白可在易感大鼠中诱导辅助性关节炎(adjutant arthritis)。如 Maron et al., (1980) J. Exp. Med. 152: 1115 - 1120 中的描述，通过施用甲状腺球蛋白可在小鼠中诱导甲状腺炎。依赖胰岛素的糖尿病(IDDM)可以自然发生也可以如 Kanasawa et al., (1984) Diabetologia 27:113 中所描述的，在小鼠某些品系中诱导此病。小鼠和大鼠中的 EAE 可作为人 MS 的模型。在此模型中，可按 Paterson, (1986) Textbook of Immunopathology (Mischer et al., eds.) Grune and Stratton, New York, pp 179 - 213; McFarlin et al., (1973) Science 179:478 - 480; and Satoh et al., (1987) J. Immunol. 138:179 - 184 中的描述，通过施用髓鞘碱性蛋白来诱导脱髓鞘病。

本发明的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白也可与其它抗体联合使用，尤其是能与对此病有关之人细胞上的其它标记反应的 mAb。例如，适当的 T 细胞标记可包括那些被划分在所谓的“分化簇”中的成员，“分化簇”是由第一次国际白细胞分化专题讨论会(Bernhard et al., (1984)Leukocyte Typing, Springer Verlag, NY)命名的。

通常，本发明的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白可以纯化的形式与药学上适当的载体一起被使用。一般，这些载体包括水或醇/水溶液、乳剂或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。非肠道载体包括氯化钠溶液，林格(Ringer's)葡萄糖、葡萄糖和氯化钠以及乳酸林格氏溶液。如有必要保持悬浮液中的复合体，则适当的生理上可接受的佐剂可选自如羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、明胶和藻酸盐的增稠剂。

静脉内载体包括液体和营养补充剂以及电解质补充剂，如那些以林格葡萄糖为基础的补充剂。也可加入防腐剂和 其它添加剂，如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体(Mack, (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 th Edition)。

本发明的构建体可用作单独施用的组合物，或用作与其它药剂联合施用的组合物。这些包括多种免疫治疗药物，如环孢菌素、氨甲蝶呤、阿霉素或顺氯氨铂、以及免疫毒素。药物组合物可包括多种细胞毒剂或其它试剂与本发明的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白，或者甚至与根据本发明的构建体以及具有不同特异性的 CDR - 移植抗体相联合的“鸡尾酒剂”。

根据本发明的药物组合物的给药途径可以是本领域普通技术人员普遍知道的任何一种。

对于包括而不局限于免疫疗法的治疗方法而言，可根据标准技术将本发明的 CDR - 移植抗体或其结合蛋白施用给任何病人。可以通过任何适当的方式给药，包括非肠道、静脉内、肌内、腹膜内给药，或者也可以通过用导管直接灌注给药。给药的剂量和频率依据年龄、性别、病人状态、同时服用的其它药物、不良反应和临床医师考虑到的其它因素而定。

本发明的构建体在使用之前可冻干保藏并在适当载体中重新构成。此技术对常规的免疫球蛋白效果很好，可使用本领域已知的冻干和重新构成技术。本领域普通技术人员应懂得冻干和重新构成可导致抗体活性不同程度的丧失(对常规的免疫球蛋白而言，IgM 抗体比 IgG 抗体活性丧失得更多)，使用时调整剂量水平进行补偿。

服用含本发明 CDR - 移植抗体或其鸡尾酒剂的组合物可预防和/或治疗疾病。在某些治疗应用中，将选定细胞群体足以实行至少部分抑制、调制、杀伤或一些其它可测量的参数的量，定义为“治疗有效剂量”。达到此剂量所需的量依据疾病的严重程度和病人自身免疫系统的总体状况而定，但通常为每千克体重 0.005 至 5.0 mg CDR - 移植抗体或其结合蛋白，更常使用的剂量是 0.05 至 2.0 mg/kg/剂。对于预防应用而言，可以类似或略低的剂量服用含有本发明构建体或其鸡尾酒剂的组合物。

含有根据本发明的构建体的组合物在预防和治疗情况下，用于辅助改变、灭活、杀伤或除去哺乳动物选定 T 细胞靶群。

在另一实施方案中，用本文所述的构建体可在体外有选择地从异质细胞群体中杀伤、排除或者有效地除去靶细胞群体。根据标准技术，将哺乳动物血液在体外与 CDR - 移植抗体或其结合蛋白混合，借此可杀死或者除去血液中不需要的细胞，然后将血流输回哺乳动物中。

除了治疗用途外，此构建体还可用于其它情况。在一个实施方案中，本发明抗体或其结合蛋白可用于研究用途。本发明的 T 细胞受体结合蛋白或抗体也可用于关于 T 细胞受体的结构和功能的研究。除了作为特定形式 T 细胞受体的底物或结合区外，这些抗体构建体也可作为构象研究的工具以阐明 T 细胞受体不同部分的天然构型。在另一实施方案中，T 细胞抗体或其结合蛋白可用作诊断探针。在一个特定的实施方案中，本发明的构建体可用于测定

生物样品中某一 T 细胞 V 区亚族的量或其存在。 Rittershaus 在 WO 92/08981(公开于 1992 年 5 月 26 日, 题为“使用总白细胞表面抗原的治疗和诊断方法”)中描述了一个这种试验。照此, 本发明根据检测生物样品中 T 细胞抗原受体特定亚群, 提供了诊断如 MS 的免疫相关疾病的方法。

5 可根据本领域已知的技术标记 CDR - 移植抗体或其结合蛋白。此构建体也适于其它体内目的。例如, 它们可用于外周血细胞的选择性细胞治疗, 其中仅需要消除靶 T 淋巴细胞, 或者类似地用于消除细胞培养物中不需要的 T 淋巴细胞。

下列实施例将更具体地描述本发明, 不应认为是对本发明的限制。

10

实施例 1

TM27 - 工作概况

1. 用 T 细胞白血病细胞系 HPB - All 免疫 BALB/c 小鼠(腹膜内一次, 静脉
 - 15 内两次)。
 2. 从这些小鼠中收获脾细胞, 并与小鼠骨髓瘤无限增殖细胞系 P3X53AG8.653 融合。
 3. 在 HAT 培养基中选择适当的克隆。
 4. 通过免疫沉淀放射性标记的 HPB - ALL 以筛选如此选定的适于结合的克
 - 20 隆。
 5. 通过有限稀释进行亚克隆。
 6. 通过 PBL 刺激和 CD3 调节研究检查特异性。
 7. 将分泌适当抗体的杂交瘤称为 4H11。
 8. 从此克隆中得到 RNA, 并分离 mRNA。制备此 mRNA 的 cDNA。
 - 25 9. 测定 cDNA 的序列并检查准确度。
 10. 将分离出的 cDNA(H 和 K)克隆进 M 13 载体。
 11. 如实施例 2 中所述, 通过诱变引入选定的人构架区域。
 12. 从 NS0 转染子中纯化人源化抗体(每个约 1 mg)以进行初步评价。
- 已制备了五个不同的 TM27:

30 TM27L: 重链的第 48 位为亮氨酸。

TM27I: 重链的第 48 位为异亮氨酸。

TM27.1:KS 变成 VF(78 - 79)。

TM27.2:VTML/T 变成 LSIS/N (66 - 69/73)。

TM27.3:V 变成 R(92)。

5 详细的实验描述

概述

此方案的目的是使鼠抗人 TCR(T 细胞受体)V β 5.2/5.3 单克隆抗体 (TM23)人源化以产生适于过程展开(process development)的表达人源化抗体的细胞系。此人源化抗 TCR V β 5.2/5.3 单克隆抗体是 TM27。

鼠抗体

通过将小鼠骨髓瘤细胞系 P3X63AG8.653 与来自经 T 细胞白血病细胞系 HPB - ALL 免疫的 Balb/c 小鼠的脾细胞融合, 产生 4H11 杂交瘤。此杂交瘤可表达对人 T 细胞受体(TCR)V β 5.2 和 5.3 具有特异性的单克隆抗体 TM23。同种型是 IgG2a/Kappa。

人源化

从使用小鼠 IgG2a 和 Kappa 特异性 3'末端引物构建出的 4H11 cDNA 文库中分离编码 TM23 重链和轻链的 cDNA。通过 DNA 测序和内部氨基酸测序证实分离出的 cDNA 克隆。根据保守的小鼠构架序列的排列鉴别重链和轻链的 CDR(互补决定区)。使用 PCR 分离出 L、V、(D)、J(L、前导序列; V、可变区; D、多变区; J、连接区)DNA 片段并克隆进 CHO 细胞表达载体 pTCSLC \times DHFR 和 pTCSLCg1NeoAp 中以表达小鼠 V/人 C 嵌合抗体, 所述载体分别携有人 Kappa 和 IgG1 恒定区 cDNA。

根据由 cDNA 克隆推导出的氨基酸序列之间的比较, 发现 TM23 重链属于 Kabat 亚组 IB。V κ 序列属于 Kabat V κ V。因此, 选择了人 NEWM 和 REI 构架以分别使重链和轻链人源化。将重排的 V(D)J 片段(除了部分 5'V 和 3'J)克隆进 M13 载体中以产生完整的基因组 L - V(D)J 构建体, 所述载体的基因组构型中携有前导和内含子序列。

骨髓瘤的表达

经诱变构建了 CDR - 移植 V(D)J 区后, 将 DNA 片段克隆到分别携有人 Kappa 和 IgG1 恒定区的骨髓瘤表达载体上。构建出具有多种突变的五个人源化重链。将五个重链构建体中的每一个与人源化轻链一起共转染到 NS0 骨髓瘤细胞系中。从扩充的人 IgG1/ κ 阳性转染子的细胞培养上清液中纯化人源化抗体以作评价。结果表明, 具有最少的小鼠氨基酸序列的 TM27L 对 V β 5.3 T 细胞的染色如果不比其它人源化抗体更好, 也和它们一样好。因此选择 TM27L 作进一步开发, 并称之为 TM27。

10 CHO 细胞表达

通过 PCR 从骨髓瘤构建体中分离 TM27 的重链和轻链前导区和 V 区, 以 cDNA 构型将之克隆到如上所述的 CHO 细胞表达系统 pTCSLCg1NeoAp⁻ (重链)和 pTCSLC_rDHFR(轻链)中。选择 CHO 细胞转染子, 克隆人 IgG1/ κ 阳性细胞。扩充产量最高者之一, TM27L - 662 - 35, 以建立细胞库并制备少量人源化 Ab(抗体)。在此方案整个过程中已鉴定了 CHO 表达的 TM27 抗体, 它与来自骨髓瘤细胞系的那些以及亲代 TM23 是相当的。同时, 扩充并克隆了 CHO 细胞克隆以增加抗体的表达, CHO 细胞克隆表明此品系适于改良生产能力。

20 详细描述

用 HPB - ALL 免疫 BALB/c 小鼠

将得自 Dr.Michael Brenner (Harvard Medical School)的人 T 细胞白血病 HPB - ALL 细胞(3×10^7)的 β F1(抗 - 人 β 链 T 细胞受体恒定区单克隆抗体)免疫沉淀物与完全弗氏(Freund's)佐剂相混合并腹腔内注射(i.p.)到 BALB/c 小鼠体内。5 周后, 连续 3 天用盐水中的 3×10^7 个细胞加强免疫, 第一次为 i.p., 后两次为静脉内(i.v.)。

脾细胞与 P3X63AG8.653 融合

最后一次 i.v.加强免疫后 3 天, 用已有技术完成融合。使用 50 % 聚乙二醇 1500(BDH、Dorset、England)将 5 倍过量的脾细胞与 P3X63Ag8.653 细胞(小鼠骨髓瘤, 得自 BALB/c 小鼠的不分泌 Ig 的细胞系, ATCC CRL 1580)

融合。

融合细胞的 HAT 选择

5 将融合细胞铺敷于每孔含 2×10^5 BALB/c 胸腺细胞作为饲养细胞的 96 孔培养板中，并在含有 15 % FBS(胎牛血清)和 HAT(6M 次黄嘌呤、50 mM 氨基蝶呤和 2 mM 胸苷)的 RPMI - 1640 培养基中选择。于 37 °C、5 % CO₂ 中，将细胞温育于潮湿空气中。

杂交瘤的筛选

10 13 至 14 天后，通过 ¹²⁵I - 放射性标记的 HPB - ALL 细胞的免疫沉淀和 ELISA 筛选出具有生长细胞的孔。在免疫沉淀的条件下，CD3 分子从 TCR α 和 β 链上分离下来。在 T - 75 三角锥瓶中扩充与 HPB - ALL 反应的杂交瘤以进一步克隆。

15 目的杂交瘤的克隆

通过有限稀释克隆对 HPB - ALL TCR(T 细胞抗原受体)具有特异性的杂交瘤。将细胞铺敷于细胞密度范围为 2 至 0.015 细胞/孔的 2 倍系列稀释 96 孔培养板中，选择产率最高生长最好的集落并将上述步骤重复两次。两次附加选择循环之后鉴定出最终集落之一 4H11。由克隆 4H11 表达的 mAb 免疫沉淀的分子与用 β F1 mAb 沉淀的 TCR α 和 β 链相同， β F1 mAb 可与 TCR β 链的恒定区反应。结果提示此 mAb 对 HPB - ALL T 细胞表达的 TCR β 链具有特异性。为方便起见将此抗体称作 TM23。

对来自杂交瘤 4H11 的单克隆抗体 TM23 的鉴定

25 使用商品试剂盒(Zymed, South San Francisco, CA)进行 TM23 mAb 的同种型测定，结果表明它是小鼠 IgG2a/ κ 同种型。

30 为了证实 TM23 mAb 的抗 - TCR 反应性，可筛选其共调节 HPB - ALL 细胞表面的 CD3 分子的能力。目前的研究表明，将细胞与抗 - TCR mAb 一起预保温时，TCR α 或者 β 链的 mAb 可共调节细胞表面的 CD3。当 HPB - ALL 细胞与 TM23 一起预保温时，与在未处理细胞中所见的 Leu - 4 反应性相比，它与抗 - CD3 mAb Leu - 4 的反应性显著降低。

检测正常人 PBL(外周血淋巴细胞)与 TM23 的反应性。所研究的 PBL T 细胞中, 有 1.6 % 至 3.0 % 与 TM23 反应。此结果是用几种其它 mAb 所得的结果的典型代表, 这些 mAb 显示与特异性 V 区决定簇反应。

5 为了测定 TM23 是否与 1C1(一种与人 V β 5.2 和 5.3 亚族反应的 mAb)(Boylston, et. al., 1986 J.Immunol. 137:741)结合的表位相同, 我们研究了一个 mAb 阻碍其它 mAb 结合的能力。当 HPB - ALL 细胞首先与 TM23 一起保温时, 与荧光素偶联的 1C1 的结合受到抑制。当细胞首先与 1C1 一起保温时, 对 TM23 的结合也会受到抑制。此结果暗示 TM23 和 1C1 结合到相同或紧邻的表位上。

10 为了进一步估计 TM23 和 1C1 是否具有类似的反应性, 通过用其它 mAb 刺激可得到 PBL 细胞系。然后检查每个细胞系与各个 mAb 的反应性。当通过用 TM23 刺激确立了一个 PBL 细胞系时, 1C1 和 4H11 都可与类似百分数的细胞反应。用 1C1 刺激的 PBL 细胞系所得结果一样。

15 4H11 细胞培养物的培养

在添加了 1 % 胎牛血清、100 μ /ml 青霉素、100 μ /ml 链霉素和 12.5 mM 谷氨酰胺的 DMEM/F12 培养基(1:1)中培养并扩充 4H11 克隆 TM23.1 7 - 31 - 91。

编码 TM23 重链和轻链之 cDNA 的制备

20 经离心分离约 10^8 个 4H11 细胞并用冰冷的 PBS 洗涤一次。使用 Promega RNAGents 总 RNA 分离试剂盒(Promega, Cat # Z5110)制备总 RNA。使用 Promega PolyAtract mRNA 分离系统(Promega Cat # Z5200)制备 Poly(A)⁺ RNA。使用 BRL SuperScript 试剂盒(BRL Cat # 82Y8SA)制备小鼠 IgG2a 和 κ 特异性 cDNA 文库。此试剂盒中具有 IgG2a 引物

25 5'ATATGCGGCCGCTCATTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTTAGT
3'

和 κ 引物

5'ATATGCGGCCGCTTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAAT
3'。

30 这两个引物含有 Xho I 限制性酶切位点及分别与小鼠 IgG2a 和 κ 编码区的 3'末端互补的序列。将 cDNA 克隆到由试剂盒提供的质料 pSPORT 中并通

过电穿孔将之转化到 E.coli DH5 α 感受态细胞中。选择携有正确大小的插入片段的质粒克隆以测定其序列。

编码 TM23 重链和轻链的 cDNA 克隆的鉴定

5 使用具有 DNA 插入片段 5'端 T7 引物的测序试剂盒(USB Cat # 70770)对小量制备的具有正确大小插入片段的质粒 DNA(轻链克隆# 1、6、19、20、25 和 26;重链克隆# 4、9、11、15、22 和 34)进行双链 DNA 测序。轻链克隆# 6、20 和 25 以及重链克隆# 34 的序列表明它们是小鼠 Ig 克隆。轻链克隆# 6、20 和 25 具有相同的序列, #6 具有点突变且为无功能的克隆。

10 使用 κ

5' GACATTGATGTCTTTGGGGTAGAAGTTGTT 3'

和 IgG2a

5' GGTCACTGGCTCAGGGAAATAACCCTTGAC 3'

15 恒定区特异性引物测定克隆# 20 和 34 的序列。此结果也表明克隆# 6 是无功能的克隆, 克隆# 20 和 34 分别是轻链的重链的正确克隆。从这两个克隆中推导出的 cDNA 和氨基酸序列示于图 1。

20 由于 N - 末端的封闭, 可对分离自聚丙烯酰胺凝胶的经 CNBr 切割的肽片段进行微量氨基酸测序。得自此方法的内部 V 区氨基酸序列与从 cDNA 序列推导出的氨基酸序列是一致的。此结果证实了分离出的 cDNA 克隆就是编码 TM23 重链和轻链的那些。

根据 Kabat 和 Wu(文献同上)的方法鉴定重链和轻链的 CDR, 即图 1 中划线部分。

H 和 L 链 V 区 DNA 的 PCR 分离和 DNA 测序

25 嵌合 TM23 抗体的产生

鼠 VH DNA 和 NK DNA 的分离

将 TM23 重链和轻链可变区适于插入表达载体中。通过 PCR 从 TM23 Mu VH. MuIgG2a 中扩增编码 TM23 鼠 VH 的 DNA 序列, 此 PCR 使用含有限制性酶 PstI 位点的寡核苷酸引物 VH1BACK。

30 (5' AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3')

及也含有 BstEII 位点的寡核苷酸引物 VH1FOR

5' TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG 3'

M 代表 C 或 A、S 代表 C 或 G、R 代表 A 或 G、W 代表 A 或 T。将这些位点分别引入 TM23VH DNA 的 5'和 3'末端。用 PstI 和 BstEII 切割扩增的 DNA 并连接到用相同酶切割的载体 M 13 VHPCR1 双链复制型(RF)DNA 的 5 PstI 和 BstEII 位点。

M13 VHPCR1 是 M13 噬菌体载体, 它衍生于 M13 - HuVHNP(Jones et al., (1986) nature 321:522 - 525)并含有免疫球蛋白启动子、信号序列和适当的剪接位点(Orlandi et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833 - 3837)。

将连接过的 DNA 转化进感受态 E.coli 菌株 TG1(K12, Δ (lac - pro), 10 supE, thi, hsd D5 [F' tra D36, pro^{A+B+}, LacO^q, LacZ M 15]。从所得重组噬菌体噬斑中制备单链 DNA。

通过 PCR 从 TM23 MuVK. MuCK 中扩增编码 TM23 鼠 VK 的 DNA 序列, 此 PCR 使用含有 PvuII 位点的寡核苷酸引物 VK1BACK

5' GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCA 3'

15 以及含有 BglII 位点的寡核苷酸引物 VK1FOR

5' GTTAGATCTCCAGCTTGGTCCC 3'

并联合使用了经设计以除去 CDR3 中 HindIII 位点的两个重叠内部引物, 即寡 943

5' CCGAGGAAGTTTACTATACTG 3'

20 和寡 944

5' GAGTATAGTAAACTTCCTCGG 3'

(Horton et al., (1990)). 从而在 TM23 VK DNA 的 5'和 3'末端引入 PvuII 和 BglII 位点。用 PvuII 和 BglII 消化经扩增的 DNA, 并连接到被 PvuII 和 BclI 切割过的 M13 VKPCR1 上。用酶 BglII 和 BclI 切割 DNA 以产生可连接在一起的 25 相容粘性末端。

M13VKPCR1 含有与 M13 VHPCR1 相同的启动子、信号序列和剪接位点(Orlandi et al., (1989))。

将连接过的 DNA 转化到 E.coli TG1 中并从所得的重组噬菌体噬斑中制备单链 DNA。

30 得到大小正确的 PCR 产物。VH 为 359 个碱基对(bp), VK 为 288 bp。将 VH DNA 插入载体 M13VHPCR1 中, 得到 M 13 TM23 MuVH。将 VK

DNA 插入载体 M 13 VKPCR1 中可得到 M 13 TM23MuVK。

DNA 序列的确证

5 已确证克隆了正确的 DNA 序列，而且 PCR 没有引入假突变。通过使用 T7 DNA 聚合酶或测序酶的双脱氧法(Sanger et al., 1977)得到了整个 823 碱基对(bp)VH 区的单链 M 13 噬菌体 DNA 序列，该区域包括启动子、信号序列、剪接位点和 5'、3'非翻译序列。

如上所述，通过双脱氧法得到了整个 630 碱基对(bp)VK 区的单链 M 13 噬菌体 DNA 序列，该区域包括信号序列，剪接位点和 5'、3'非翻译序列。

10 已鉴定了具有适于插入表达载体的 TM 23 VH 所需序列的 DNA 克隆，选中其中之一#2 以作进一步研究。将 VH 插入表达载体需引入必需的限制性位点，这会导致 N - 末端的一个氨基酸发生改变；即第 5 位的赖氨酸(K)变为谷氨酰胺(G)以及 C - 末端的一个氨基酸发生改变，即第 108 位的丝氨酸(S)变为苏氨酸(T)。

15 已鉴定了具有适于插入表达载体的 TM23 VK 所需序列的 DNA 克隆。选中其中之一#4 以作进一步研究。除去 Hind III 位点，CDR3 的氨基酸序列不会改变，但将 VK 插入表达载体需引入必要的限制性位点，由于使用了引物，会导致 N - 末端的三个氨基酸发生变化；即第 4 位的甲硫氨酸(M)变为亮氨酸(L)、第 7 位的苏氨酸(T)变为丝氨酸(S)、第 8 位的苏氨酸(T)变为脯氨酸(P)
20 以及 C - 末端的一个氨基酸发生变化，即第 105 位的缬氨酸(V)变为谷氨酰胺(E)。

将 V 区 DNA 片段克隆进 M 13 载体

25 将已克隆的鼠可变区转移到含有人恒定区基因的表达载体上，用于随后在哺乳动物细胞内表达抗体。

选择 IgG 同种型以供人源化

对于 TM27 而言需选择人 IgG1 同种型是由于下列原因：

1. IgG1 具有介导 ADCC(依赖抗体的细胞毒性)和 CDC(依赖补体的细胞
30 毒性)的能力，因此它对于减量调节 V β 5.2/5.3 T 细胞更加有效；和
2. 在 Ab 人源化中更经常地使用 IgG1。

CDR 移植的人构架选择

人源化 TM23 抗体的产生

人源化 TM23 可变区序列的设计

- 5 选择人构架序列以接受 TM23 CDR，确定在人构架中必须被取代的必需的鼠残基。在计算机的帮助下，将 TM23 VH 和 VK 的氨基酸序列与其它鼠抗体的已知序列以及人抗体 VH 和 VK 序列进行比较。

10 使用了来自 DNASTAR Ltd. London W 13 9BL，UK 的程序 ALLIGN，在 Compaq 386 信息处理机上运行此程序。通过使用 Lipman - Pearson 和 Needleman - Wunsch 法，ALLIGN 列出了两个蛋白质序列。首先用 Lipman - Pearson 法测定了有最大同源性的区域，然后用 Needleman - Wunsch 法提供此序列的最终排列。

15 然后检查所得的排列结果，需格外注意某些因素，如 CDR 的长度和被认为对于支持 CDR 的构象至关重要的残基，如第 71 位和 94 位，以及与 CDR 相近的残基(Tramontano et al., (1990); Foote and Winter, (1992))。

通过与 Kabat 亚组的共有序列相比较，将 TM23 鼠 VH 分配到 Kabat 亚组 VK V 内。对于 TM23 构架中的这些亚组而言，没有不同寻常的氨基酸序列。

20 人抗体 NEWM 和 REI 分别为 VH 和 VK 提供了构架序列。对 VH 来说，除使用了 CDR 外，还使用了鼠残基 27 至 30 这一段以及残基 71。据认为这些构架残基对于支持 CDR 的构象至关重要(Foote and Winter, (1992))。根据是否有庞大的侧链(赖氨酸或精氨酸)或较小的侧链(缬氨酸或丙氨酸)存在，残基 71 可固定 CDR1 和 CDR2 的相对位置(Tramontano et al., (1990))。因此如同在 TM23 VH 中一样，用赖氨酸取代 NEWM VH 中的缬氨酸 71。残基 25 27 至 30 形成了部分结构性的而不是高变的如 Chothia 和 Lesk(1987)所限定的抗原结合环。构架残基 47 至 49 对于抗体结构也很重要(Foote and Winter, (1992))。因此构建了两个可任选其一的人源化重链：一个与 NEWM 中相同，第 48 位为异亮氨酸(I)；一个在第 48 位是亮氨酸(L)以使来自鼠 VH 的残基 47 至 49 得到保留。实施例 2 中显示了鼠 VH 序列与其人源化变体之间的比较。

30 为 TM23 VK 选定的人 REI 构架没作改变，实施例 2 中还显示了鼠 VK 序列与人源化变体之间的比较。

哺乳动物表达载体 pTCSNeo 的描述

质粒 pTCSNeo 含有唯一的 XhoI 克隆位点，此处插入了目的基因。由位于腺病毒 2 主要晚期启动子(Ad2 MLP)上游的 SV40 增强子的调节序列控制着该插入基因的转录。 Ad2 MLP 自身位于腺病毒三重前导序列的上游。该插入基因的两侧为鼠免疫球蛋白 Kappa(Ig κ)位于 3'末端的聚腺苷酸化信号。新霉素抗性基因(Neo^r)使哺乳动物细胞可以被选择。此质粒还提供了细菌复制起点和 β - 内酰胺酶基因(Amp^r)。

10 表达载体 pTCSLNeo 的构建

将两个互补寡核苷酸退火并连接到已被 XhoI 消化并用 dT 补平的 pTCSNeo 上，这两个寡核苷酸是，反义。

5'CGACATCGATGATATCGAATTCGCGGCCCGCCAGCTGGGGCCCT -
CTAGAC 3'

15 和有义

5' CGAGTCTAGAGGGCCCCAGCTGGCGGCCCGCGAATTCGATATC -
ATCGATG 3'

所得质粒 pTCSLNeo 具有由方向为 5' XhoI/XbaI/ApaI/PvuII/NotI/EcoRI/EcoRV/ClaI 3'的多个限制性酶切位点组成的多接头，便于插入目的基因并表达。 neo^r 基因也可被改换为其它选择性标记基因。

表达载体 pTCSLDHFR*的构建

经限制性酶 HindIII 和 BamHI 消化除去 pTCSLNeo 中的 neo^r 基因，并用鼠突变 DHFR(二氢叶酸还原酶)(DHFR*)基因片段重接连接，此片段是经用 HindIII 和 BamHI 消化得自 Dr.Paul Berg(Department of Biochemistry, Stanord University Medical School)的质粒 PSV2 - DHFR*而产生的。

质粒 pSV184 H - Neo/DNS - V * C * 的描述

质粒 PSV 184 Δ H - Neo/DNS - V * C *(得自 Dr.Lee Herzenberg, Stanford University Medical School - 参见 Jeffery Dargl 的论文、第 48 - 67 页) 是小鼠 V 和人 C 嵌合构建体，其中分离自 Dansyl Chloride 特异性鼠杂交瘤的

重排 κ 链 V-J 区基因片段与人基因组 C κ 片段(pSV 184 Δ H-Neo-C κ)融合。

通过 PCR 法分离人 kappa 链恒定区

使用含有人 Kappa 链恒定区的未经消化的质粒 pSV 184 Δ H - Neo/DNS - V κ C κ)pSVHuK), 用两个引物(一个正向、一个反向)进行 PCR 以分离恒定区。从操纵子得到寡聚体(引物)。PCR 反应的试剂来自带有 AmpliTaq 的 GeneAmp DNA 扩增试剂盒(Perkin - Elmer Cetus)。在三种不同浓度的 Mg^{2+} 中建立 PCR 反应。在 1 % 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物的等分试样。选择来自第一 Mg^{2+} (浓度为 1.5 mM)样品中的 PCR 产物, 将跨越 C 区的引物设计成含有限制性酶切位点以便于克隆。因此扩增的 DNA 可被 EcoRI 消化(在 3'末端)。位于 5'末端的位点(PvuII)不被消化。接着在 1 % 琼脂糖凝胶上电泳消化的 DNA 片段, 切下 300 bp 的带。从凝胶中抽提 DNA, 在 1 % 琼脂糖凝胶上分析小的等分试样以测定其质和量。该 300 bp 的带显得清晰, 估计其 DNA 总量为约 140 ng。

15

将人 Kappa 链恒定区克隆进 pBS KS $^+$ 载体并测序

使用 T4 DNA 连接酶, 将经 EcoRI 消化的人 Kappa 链恒定区的 DNA 片段插入已被 SmaI 和 EcoRI 消化的载体 pBS KS $^+$ 中。用该连接混合物转化 E.coli DH 5 α 感受态细胞。挑选单菌落并用来接种 24 份液体培养基。从每份培养物中制备 DNA。用 PvuII(C κ 的 5'末端)和 EcoRI(C κ 的 3'末端)消化每个 DNA 样品, 并在 2 % 琼脂糖凝胶上分析。由于将较低分子量的带(300 bp)分离出来有困难, 故仅用 PuvII 消化 DNA 样品, 在 2 % 琼脂糖凝胶上分析过后, 24 个中有 19 个的 C κ 插入是正确的。选择样品#1 - 5(19 个正确样品中的)进行测序。测序使用的是 T7 和 T3 引物(其序列是横跨载体中插入物两侧的序列)。其它测序试剂来自 Sequenase Version 2.0 试剂盒(USB)。经证实样品# 5 具有人 Kappa 链恒定区的正确序列。

25

将人 Kappa 链恒定区克隆进哺乳动物表达载体 pTCSLDHFR*以成为 pTCSL C κ DHFR*

30

使用 PvuII 和 EcoRI 限制性酶, 从 pBS KS 载体(样品# 5)中分离人 Kappa 链恒定区。然而, 由于前述的带分离存在的困难, 故需用构建体 pBS/人 C κ

进行第二次消化。第二次消化涉及 EcoRI 和 XbaI(位于 PvuII 位点的 5'侧), 产生约 300 bp 的片段。接着用凝胶纯化此片段, 并经 PvuII 消化以除 C_x 5'末端残留的载体小片段。凝胶纯化此最终的片段, 并在 1% 琼脂糖凝胶上分析以定性并估量。C_x DNA 表现为约 280 bp 处的清晰的带, 估计其总量为约 135 ng。

5 由于表达载体 pTCSLDHFR* 中三个 EcoRI 位点的存在, 经测定只有克隆在 PvuII 位点才最好。由于 C_x DNA 是经 PvuII - EcoRI 消化制备的, 故应使用 Klenow 片段修复 EcoRI 末端(以形成平末端), 将经修复的平末端 C_x DNA 连接到已被 PvuII 消化并经磷酸酶处理(使用牛小肠磷酸酶)过的 pTCSLDHFR* 载体上。用此连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。挑选单个菌落, 并用来接种 24 份液体培养基。从每份中制备 DNA。用 PvuII 和 HindIII 消化所有的 DNA 样品。并在 1% 琼脂糖凝胶上分析。经测定 24 个样品中有 5 个含有方向正确的 C_x 插入。选择样品# 7 继续实验。

15 用野生型 DHFR 基因取代突变的 DHFR* 基因

为了在 CHO(dhfr⁻) DUX B11 细胞中使载体 pTCSLC_x DHFR* 能够表达, 用 DHFR 基因取代 DHFR* 基因。用限制性酶 Hind III 和 BglII 消化得自 pTCSLC_x DHFR* 样品# 7 的 DNA 以及 pSV 2 - DHFR(该质粒来自 Dr. Paul Berg, Department of Biochemistry, Stanford University Medical School)以分离各自的基因片段。通过分析确定了 pTCSLC_x DHFR* 载体中另外的 BglII 位点也除去了部分 poly A 位点, 这会影响到载体的功能。因此, 使用 HindIII 和 BamHI 重复消化。用磷酸酶处理载体的(DHFR*)pTCSLC_x 部分。然后用凝胶纯化两个分离片段(pTCSLC_x 和 DHFR)并在 1% 琼脂糖凝胶上分析以定性并定量。两条带都显得清晰, 且浓度相近, 为 ~ 40 - 50 ng/ml。使用 T₄ DNA 连接酶将 DHFR 基因连接到 pTCSLC_x 载体上。用此连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落, 并用来接种 24 份液体培养基。从每份中制备 DNA。用 HindIII 和 BamHI 限制性酶消化以分析 DNA。在 24 份培养物中, 有 23 个具有显示出 DHFR 基因插入 pTCSLC_x 载体的正确的带。选择样品# 22 以供进一步使用。

30

体外诱变以构建具有人构架的 CDR - 移植 V 区

人源化可变基因的构建

通过 M 13 VHPCR1 模板的定点诱变构建人源化 VH 基因, 所述模板含有具有人骨髓瘤蛋白 NEWM 的构架区的合成 VH 基因(见 Jones et al., 1986). 从生长于 dut⁻、ung⁻ E. coli 菌株 RZ 1032 的 M 13 VHPCR1 中制备单链模板 DNA, 以使模板 DNA 在胸腺嘧啶的地方含有尿嘧啶。合成诱变的寡核苷酸引物以编码 TM23 CDR, 并与位于任一侧的侧翼序列有大约 15 bp 的精确配对。如果 TM23 CDR 序列与模板序列配对, 使用较短的寡核苷酸引物。所使用的引物是 CDR1

5' TGGCTGTCTCACCCAGTTTACACCATAGGCGGTTAATGAGAAG -
10 CCAGACACGG 3'

CDR2

5'TGCTGGTGTCTCCTTTCAGCATTGTCACTCTGGATTTGAGAGCTG -
AATTATAGTCTGTATTTCCATCACCCCATATCATTCCAA^{T/C} -
CCACTCAAGACC 3'

15 和 CDR3

5' CCAGTAGTCCATAGCATAGAGGGTAGCCGTAACCCTATCTCTT -
GCACAATAATAG 3'

CDR 的寡核苷酸引物在 3'端延伸以包括第 27 至 30 位的必需残基。为 CDR2 制备混合的寡核苷酸, 在 CDR 的 3'端延伸, 在 VH 碱基数 402 处为 G 或 T 20 以提供 2 个任选的密码子从而使 VH 的第 48 位变成 L 或 I。在 37 °C 下, 在 50 μl 总体积中用 5 单位 T4 多核苷酸激酶将寡核苷酸(每份 10 pmol)磷酸化 1 小时。通过加热至 90 °C 达 30 秒、快速冷至 70 °C 并缓慢冷至 37 °C, 以在 20 μl 的总体积内将 1 pmol 每种诱变引物和 1 pmol V 基因 3'端的 M 13 测序引物退火至 0.5 μg 模板上。然后加入 T7 DNA 多聚酶和 T4 DNA 连接酶, 室 25 温下保温 1 小时以延伸并连接该退火的引物。在 37 °C 下用 1 单位尿嘧啶 DNA 糖基化酶处理 DNA 达 1 小时以除去含有尿嘧啶的模板 DNA, 使突变链保持原样。通过 PCR 扩增此 DNA, 再通过琼脂糖凝胶电泳分析以检查正确大小的 DNA 是否产生。用 HindIII 和 BamHI 切割 DNA, 并连接到 M 13 mp19 的 HindIII 和 BamHI 位点。

30 类似地, 通过诱变 M 13 噬菌体模板构建改造的 TM 23 VK 基因(TM23 HuVK), 所述模板含有 VK 基因的 DNA 序列, 它具有人 Bence - Jones 蛋白

REI 的构架区。它来自用于构建嵌合轻链的 M 13 VKPCR1，其中已除去了用于克隆的 PvuII 和 BclI 限制性酶切位点。所使用的引物是 CDR1

5'TCTGCTTGGTACCAGTTTAAATAATTGCTAATGCCCTGACTTGCAC
TACAGGTGATGGTC 3'

5 CDR2

5' TCTGCTTGGCACACCTGAGTGTAACCTTGATGTGTAGTAGA -
TCAGCAGCTT 3'

和 CDR3

10 5' CCCTTGGCCGAACGTCCGAGGAAGTTTACTATACTGCTGGCAG -
TAGTAG 3'

得到了预期大小的 PCR 产物，两个 VH 为 823 bp，VK 为 620 bp，将这些 PCR 产物克隆进 M 14 mp19 载体中。

人源化可变区 DNA 序列的证实

15 已证实插入了所需 CDR，没有假突变发生，并已构建出正确的人源化的 VH 和 VK 基因。使用 T7 DNA 聚合酶或测序酶，通过双脱氧法测定完整可变区的序列。将所得序列与设计的序列相比较。选择具有两个 VH 的预期序列的克隆，将这些克隆称作 M13 TM23 NMVH 和 M13 TM23 NMVHL。选择具有重构 VK 的预期序列的克隆# 11，并称之为 M13 TM23 HuVK。

20

将重排 V 区克隆进骨髓瘤表达载体中

(将人源化的 TM23 可变区克隆进表达载体中)

25 将经克隆的人源化可变区转移到含有人恒定区基因的表达载体中以随后在哺乳动物细胞中表达抗体。以 HindIII 至 BamHI 的片段形式从 M13 TM23NMVH 和 M13 TM23NMVHL 中分离两个人源化 VH 基因并连接到重链表达载体 pSVgpt.HuIgG1 的 HindIII 和 BamHI 位点。

以 HindIII 至 BamHI 的片段形式从 M13 TM23HuVK 中分离人源化 VK 基因并连接到轻链表达载体 pSVhvg.HuCK 的 HindIII 和 BamHI 位点。

30 限制性酶切分析表明，两个可供选择的人源化 VH 被正确插入到重链载体中，得到质粒 pSVgpt TM23NMVH.HuIgG1 和 pSVgpt NMVHL.HuIgG1。

同样，人源化 VK 正确插入到轻链载体中，得到质粒 pSVhyg TM23

HuVK.HuCK。

将 H 和 L 链构建体转染到 NS0 细胞中

人源化重和轻链基因的共转染

- 5 将人源化表达质粒转移到哺乳动物细胞系 NS0 和 P3 - 8.653F8879 中。
使用与转染嵌合表达质粒相同的方法，将人源化表达质粒共染到 NS0 和 P3 - 8.653F8879 细胞中。

该两个人源化重链质粒 pSVgptTM23NMVH. HuIgG1 和 pSVgpt NMVHL. HuIgG1 中的每一个可与人源化轻链质粒 pSVhygTM23 HuVK.HuCK 一起共转染以产生可表达两个可供选择的人源化抗体 TM23 HuVH/HuVK 和 TM23 HuVHL/HuVK 的细胞系。这些表达质粒也可以联合嵌合表达质粒一起共转染以产生能表达杂合抗体 TM23HuVH/MuVK、TM23HuVHL/MuVK 和 TM23MuVH/HuVK 的细胞系。这些杂合抗体为找出人源化抗体中重链或轻链的任何结合缺陷的原因提供了重要的工具。

- 15 转染后 14 天，对所有不同的质粒组合而言，都可看到 NS0 细胞集落。从所有接种的培养板中只得到一个 P3 - 8.653F8879 细胞的单个集落，因此它们被放弃。

人 IgG1/Kappa 阳性克隆的选择

20 产生人抗体的细胞的选择

分离可产生人源化和杂合嵌合/人源化抗体的 NS0 细胞系。通过 ELISA 从含有细胞集落的孔中筛选上清液样品。

TM23 HuVH/HuVK：从培养物上清液的 ELISA 读数最高的 4 个孔中选择 NS0 细胞；D5、D10、C6 和 E11。D5 孔含有 2 个可见集落，其它孔含有一个。然而，从这些孔中产生的细胞系未必是克隆的。培养这些孔中的细胞系，在液氮中冷冻成 TM23 HuVH/HuVK D5、D10、C6 和 E11。

TM23 HuVHL/HuVK：从培养物上清液的 ELISA 读数最高的 4 个孔中选择 NS0 细胞，B2、B7、D8 和 E9。E9 孔含有 2 个可见集落，其它孔含有一个。然而，从这些孔中产生的细胞系未必是克隆的。培养这些孔中的细胞系，在液氮中冷冻成 TM23 HuVHL/HuVK B2、B7、D8 和 E9。

TM23 HuVH/MuVK：从培养物上清液的 ELISA 读数最高的 4 个孔中选

择 NS0 细胞; D9、E6、F10 和 G10。F19 孔和 G10 孔含有 2 个可见集落, 其它孔含有一个。然而, 从这些孔中产生的细胞系未必是克隆的。培养这些孔中的细胞系, 在液氮中冷冻成 TM23 HuVH/MuVK D9、E6、F10 和 G10。

5 TM23 HuVHL/MuVKL: 从培养物上清液的 ELISA 读数最高的 4 个孔中选择 NS0 细胞; B8、C6、D2 和 D8。C6 孔和 D8 孔含有 2 个可见集落, 其它孔含有一个。然而, 从这些孔中产生的细胞系未必是克隆的。培养这些孔中的细胞系, 在液氮中冷冻成 TM23 HuVHL/MuVK B8、C6、D2 和 D8。

10 TM23 MuVH/MuVK: 从培养物上清液的 ELISA 读数最高的 4 个孔中选择 NS0 细胞; B9、G4、G6 和 G11。所有孔至少含有 4 个可见集落。从这些孔中产生的细胞系未必是克隆的。培养这些孔中的细胞系, 在液氮中冷冻成 TM23 MuVH/HuVK B9、G4、G6 和 G11。

15 合成 cDNA 第一链以供 CHO 细胞表达
胞质 RNA 的制备

制备 RNA 以供逆转录。通过在 37 °C 快速解冻从液氮中回收一管 NS0 TM23 HuVHL/HuVK 细胞。用 10 ml 添加了抗生素和 5 % 无 γ 球蛋白的胎牛血清(无 GG - FBS)的 Dulbecco 氏经修饰 Eagle 氏培养基/Ham 氏
20 F12(DMEM/F12)逐步稀释细胞。在 1500 rpm 下离心细胞 5 分钟, 除去培养基并重新悬浮于 75 cm² 三角锥瓶中的 20 ml 新鲜培养基中。将培养物扩充至 175 cm² 三角锥瓶中的 30 ml 培养基内。离心收集生长活跃的细胞, 用冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗三次。使用 Favoloro et al.(1980)的方法从此细胞中制备胞质 RNA。得到了总量为 350 μ g 的胞质 RNA。

25

cDNA 的合成

制备了 VH 和 VK 区的 cDNA 第一链。在含有 5 μ g RNA、250 μ M 脱氧核苷三磷酸(dNTP)、15 单位核糖核酸酶抑制剂(Pharmacia RNAGuard)和 25 pM 寡核苷酸引物的反应中合成可变区的 cDNA 第一链, 对 VH 而言, 引
30 物是寡 1109。

5' GGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGG -

TGACC 3'

对 VK 而言, 引物是寡 1095

5' AGATTCAGCTGCTCATCAGATGGCGGGAAGATGAAGACA -
GATGG 3'

- 5 将反应物加热至 70 °C 达 10 分钟, 再缓慢冷却至 37 °C。加入 100 单位 Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶, 在 37 °C 下温育反应 30 分钟。

通过 PCR 扩增该 cDNA, 此 PCR 使用了上述引物并联合使用了 VH 所需的寡 1096

10 5' GCCGCTCGAGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTT -
CTTGGTAG 3'

以及 VK 所需的寡 1094

5'GCCGCTCGAGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCT
TGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGACATCCAGATGACCCAGA
G 3'

- 15 通过琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物, 此 PCR 产物为预期大小(大约 450 个碱基对), 从凝胶中纯化 DNA 带。

限制性酶消化

- 20 消化 PCR 产物以克隆到 CHO 载体中。用 XhoI 和 ApaI 消化 VH PCR 产物。用 XhoI 和 PvuII 消化 VK PCR 产物。在 0.8 % 琼脂糖凝胶上电泳经消化的 DNA 样品。观察到了预期大小(450 bp)的带。

通过 PCR 扩增 V_H [TCS]从 cDNA 中分离 V 区(V_H)[TCS 和 S]和 V_κ [S])

- 25 得到了 TM27 V_κ 和 TM27 V_H 的 cDNA 第一链样品以及用于通过 PCR 扩增这些分子的寡核苷酸引物。使用 Taq 聚合酶进行 PCR, 此 PCR 使用了 TM27 V_H cDNA 及适当引物。在琼脂糖凝胶上电泳此产物, 并使用 GeneClean II 试剂盒(Biol01)纯化。估计回收率为 1.5 ng/ml。

- 30 用 pSR1Neo4H11(轻链)和 pBJ14H11(重链)转染 COS 细胞以分离 C 区 cDNA 如 Lin, et al., (1990) Science 249:677 中的描述, 哺乳动物表达载体 pSR1Neo 和 pBJ1 是 pcDL - SRa296(Takebe, et al., (1988) Mol. Cell Biol.

8:466)的衍生物,其中位于SR α 启动子与SV40聚腺苷酸化位点之间的XhoI位点被多接头取代以便于基因克隆,此多接头含有下列限制性位点: 5' XhoI/XbaI/SfiI/NotI/EcoRI/EcoRV/HindIII/ClaI 3'。在pSR1Neo中,氨苄西林抗性基因和SR α 启动子之间插入了新霉素抗性基因。首先将编码TM23重链之前导区和V - D - J区的cDNA与基因组重链恒定区融合,接着插入到经XhoI和NotI切割的pBJ1载体中以产生pBJ14H11(重链)。类似地,首先将编码前导区和V - J区的轻链cDNA与基因组 κ 片段融合,接着插入到经XhoI/NotI切割的pSR1Neo中以产生pSR1Neo4H11(轻链)。然后将这两个质粒pBJ14H11(重链)和pSR1Neo4H11(轻链)共转染到COS - 7细胞(一种用SV40转化的非洲绿猴肾细胞系, ATCC CRL 1651)中以瞬时表达。

人IgG1恒定区的分离

通过使用IgG1恒定区引物的PCR,由分离自被转染的COS细胞中的poly(A)⁺RNA制备人IgG1恒定区cDNA,所述引物包括:正向引物

15 5' GCGTGACAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC 3'
和反向引物

5' GCGTGACAAGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGG -
CTCTT 3'

将3'端具有EcoRI(编码区的侧翼),5'端具有ApaI(编码区内)的PCR恒定区DNA片段克隆到pBS KS⁺质粒中,用于亚克隆和测序。使用与恒定区内部引物互补的T3和T7引物,测定整个恒定区的序列。然后将具有正确序列的克隆亚克隆进质粒pTCSLNeo中以产生pTCSLCg1Neo。

质粒pTCSLCg1Neo的构建

25 使用限制性酶EcoRI和ApaI切割pBS KS⁺中具有正确序列的IgG1Cg1克隆,并连接到用相同酶消化过的pTCSNeo中。将所得质粒pTCSLCg1Neo用于进一步修饰以产生pTCSLCgNeo Apa^r。

消除pTCSLCg1Neo中的ApaI位点以产生pTCLCg1Neo Apa^r

pTCSLCg1Neo CHO表达载体中含有两个限制性酶ApaI的位点:一个位点位于多接头区内,用来插入需克隆的片段;另一个位点就位于Neo^r基因的3'侧。为了简化随后的克隆步骤,除去Neo^r附近的ApaI位点。用ApaI部分

消化 pTCSLC_g1Neo；在琼脂糖凝胶上电泳小量等分样品以检查线性分子(即只在两个 ApaI 位点中的一个处被切割的质粒)的存在。然后用 T4 DNA 聚合酶处理经消化的物质，它可选择性地除去因 ApaI 所致的单链伸出，而不会消化双链 DNA。然后通过连接使质粒重新环化，并转化到 E.coli HB101 感受态细胞中。挑选出 30 个转化子，用来接种液体培养基。从每个培养物中制备 DNA，用 ApaI 消化，在琼脂糖凝胶上电泳。不幸的是这些消化物中的质粒 DNA 被降解了。在 30 个样品中的 21 个中重复 ApaI 消化，两个分离物(# 4 和 12)表现出被 ApaI 线性化，而所有其它样品都在两个位点处被切割。然后用 ApaI 和 HindIII 消化这两个候选克隆以测定哪个 ApaI 位点仍存在。在此试验中，pTCSLC_g1NeoApa^r 分离物# 12 中 neo^r 3'侧的 ApaI 位点按需要已被消除。进行另外的限制性消化以确证此分离物的结构。

将经 PCR 分离的人 Kappa 和重链 V 区分别克隆到 CHO 载体 pTCSLC_rDHFR 和 pTCSLC_g1Neo Apa^r 上。

15

将 TM27 V_r 片段克隆到 pTCSLC_rDHFR 上

凝胶纯化 TM27 Kappa 链 V 区的 cDNA，用适当的限制性酶消化。在 1 % 琼脂糖凝胶上分析小量等分 DNA 样品以估计量并证实其性质。在约 800 bp 处观察到一个多余(污染)带，估计为 1.25 ng/ml。将 V 区连接到已经限制性酶 XhoI 和 PvuII 消化并经磷酸酶处理的 pTCSLC_rDHFR 载体中。用该连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。转化子菌落的产量非常低。挑选单菌落以接种 12 份液体培养基。从每份培养物中制备 DNA，用 XhoI 和 PvuII 消化并在 1 % 琼脂糖凝胶上分析。有两个阳性样品# 3 和# 4。测定每个阳性样品的序列。

25

将 TM27 V_H 片段克隆进 pTCSLC_g1Neo Apa^r

凝胶纯化相当于 TM27 V_H 区的 PCR 产物，用适当的限制性酶(XhoI 和 ApaI)消化。然而，因为已注意到 ApaI 消化不完全，故应重复消化。在琼脂糖凝胶上分析小量等分样品以估计量并证实其性质。估计相当于 V_H 区的带浓度为 0.4 ng/ml。与 V_r 片段的情况一样，在 ~ 800 bp 处观察到多余的带，这表明此物质的纯度也不是预期纯度。将 V_H 区连接到已经限制性酶 XhoI 和

5 Apal 消化并经磷酸酶处理过的 pTCSLC_g1NeoApa⁻ 载体中。用该连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。得到很少的转化子。挑选 6 个菌落以接种液体培养基。从每份培养物中制备少量 DNA，用 XhoI 和 EcoRI 消化并在琼脂糖凝胶上分析。从首次连接中回收一个候选克隆，
10 pTCSLHuV_H4HCg1NeoApa⁻ (分离物# 6)。为了得到更多的候选克隆(在随后的试验中单个分离物# 6 不含有正确序列的情况下)，还需建立另外的连接。该连接使用了 1)V_H PCR 产物，已在低熔点琼脂糖上重新纯化除去了高分子量的污染带，和 2)使用 cDNA 和引物合成的 V_H PCR 产物。从这些连接反应中分析了 8 个其它转化子，回收的 5 个候选克隆是：分离物# 9、10、11、
15 12 和 14。

测定已克隆 V 区的两条链的序列以证实预期的 DNA 序列

15 从 Operon Research 得到为便于载体 pTCSLC_g1NeoApa⁻ 和 pTCSLC_κDHFR 中所插入的 V 区 DNA 测序分析而设计的引物。正向引物位于 pTCS 载体序列中，可用于测定插入 pTCSLC_g1NeoApa⁻ 和 pTCSLC_κDHFR 载体中的 V 区序列。反向引物位于 C_κ或 C_g1 序列中，可用于分别测定 V_κ和 V_H 插入片段的序列。

人 Kappa 链 V 区的双链测序

20 测定来自 TM23(# 3 和# 4)的两个样品的两条链的序列。使用引物 HUCK 5PR，经过限制性酶位点(3' - 5'; PvuII - XhoI)，完整测定了反向链的序列。使用两个不同的引物，pTCSFOR 和 pTCSFWD 测定了正向链的序列。通过联合每个引物产生的序列得到经过限制性酶位点(5' - 3'; XhoI - PvuII)的全长序列。已发现正向链中存在小区域的压缩(compression)现象，使用可缓解
25 这种压缩现象的引物或测序列方法都不能解决这一问题。然而，已证明反向链此区域的序列是正确的。样品# 3 和# 4 似乎具有正确的序列，故选择样品# 4 以转染哺乳动物细胞。

TM27 gamma 链 V 区的双链测序

30 完整地测定 pTCSLHuV_H4HCg1NeoApa⁻ 中 V_H 片段(分离物# 6 和 9)两条链的序列。分离物# 6 的人源化 V_H 片段与经过编码区的预期序列相吻合，意

料之外影响表达的是第 - 2 位(相对于起始的 ATG)有一个单个碱基的替换(C 变成 T)。分离物# 9 的 V_H 片段的编码区内含有两个替换。未测定其它四个候选克隆的序列。

5 用 TM27 和对照质粒共转染 COS 和 CHO 细胞

受体细胞是 CHO dhfr⁻ DUX B11 和 COS - 1。CHO DUX B11 细胞系得自 Biogen Inc。为了转染 CHO, 需用限制性酶 AatII 消化以使 5 微克 TM27 质粒 pTCSLHuV_H4HC_gDHFR(分离物# 4)、pTCSLHuV_H4HC_g1NeoApa⁻(分离物# 6)和载体 pTCSLDHFRApa⁻和 pTCSLNeoApa⁻线性化。将含有 TM27 10 的质粒(称作“TM27L”)共沉淀于乙醇中并重新悬浮于水中。类似地, 将载体质粒(称作“对照”)共沉淀并重新悬浮于水中。使用 BioRad 基因脉冲仪在 250 v、960 mF 下通过电穿孔将每种共沉淀质粒转染到 10⁷ 个 CHO 细胞中。选择前, 在添加有胸苷、腺苷和脱氧腺苷的 α 极限必需培养基(α MEM)(非选择性培养基)中将经转染的细胞培养两天。

15 为了转染 COS, 将 5 微克未被切割的 TM27L 质粒和载体质粒共沉淀于乙醇中并重新悬浮于水中。通过电穿孔将质粒染到 4.1 × 10⁶ COS 细胞中。在 Dulbecco 氏改良 Eagle 培养基(DMEM)中培养经转染的细胞两天, 然后收集上清液以检测。

20 通过人 IgG1 ELISA 和染色分析 COS 转染子的上清液

通过对细胞培养物上清液进行人 IgG1 ELISA 试验可测量 COS 细胞的人 IgG 产生。用 PBS 中的小鼠抗 - 人 IgG1 Fc 抗体包被微量滴定板并在封闭缓冲液(于 PBS 中的 1% BSA)中封闭之。以 100 μl 样品的量加入上清液, 检测封闭缓冲液中必要时适当的上清液。用与辣根过氧化物酶 - 偶联的山羊抗人 Ig κ 抗体和 OPD(邻苯二胺)检测被捕促的 IgG。得自被 TM27L 转染之 COS 25 细胞的上清液表现出 95 ng/ml 人 IgG 的水平。检测不到来自受对照质粒转染之 COS 细胞的人 IgG。对来自受 TM27L 转染之 COS 细胞且被浓缩 ~ 6 倍的上清液进行流式细胞计量术。如中波段荧光所示, HPB 细胞上的染色强度比 ~ 2.5 mg/ml 的纯化 TM27L(纯化自 NSO 细胞)所得数据约低 9 倍。Jurkat 30 细胞上的染色为背景水平。

选择 CHO 转染子

通过在缺乏核苷酸供给(以选择 pTCSLHuV_r4HC_rDHFR 上的 DHFR^r)并含有遗传霉素(G 418: 以选择 pTCSLHuV_H4HC_g1NeoApa^r 上的 neo^r)的 α MEM 培养基中选择 CHO 转染子。将细胞以 2.0×10^5 个细胞/ml 的浓度铺敷于 24 孔培养板中。

通过人 IgG1 ELISA 分析 CHO 转染子的上清液

在选择性培养基中培养 12 天后, 收获铺满孔中的上清液, 并用人 IgG1/κ ELISA 检验。TM27L 上清液中的浓度范围为 182 - 236 ng/ml, 大多数 > 200 ng/ml。在对照上清液中检测不到人 IgG1/κ。在 T25 三角锥瓶中扩充来自 12 个高产 TM27 孔中的细胞。将单个小管作为候补培养物冷冻并贮存于液氮中。在 T25 三角锥瓶中扩充来自两个对照孔的细胞并进行冷冻。

CHO 转染子的首次有限稀释铺敷

为了在 96 - 孔培养板中进行有限稀释铺敷, 选择了四个高产孔: 孔 #1B1(232.6 ng/ml)、1D6(233.3 ng/ml)、2B2(235.5 ng/ml) 和 2C1(236.0 ng/ml)。对于每个孔而言, 设置了含选择性培养基的三块培养板: 一个为 1 个细胞/孔, 两个为 0.5 个细胞/孔。

用人 IgG1/κ ELISA 筛选得自首次克隆循环的上清液。将 90 个高产孔中的细胞扩充到 24 孔培养板中并使之生长至汇合状态。通过人 IgG1/κ ELISA 以及流式细胞计量术检测 12 个这种培养物的上清液。用人 IgG1/κ ELISA 测得的浓度范围为 211 - 1048 ng/ml。所有样品都使 HPB 细胞得以染色(中波段荧光范围为 46.5 至 169.9), 但未染 Jurkat 细胞。扩充 6 个高产克隆并冷冻(作为候补)于液氮中。从中选择两个最高产克隆(1B1 - C7 和 2B2 - H9)以继续进行随后的克隆循环。

将两个对照构建体的初级培养物在 96 孔培养板中进行一轮有限稀释铺敷。从每种中选出一个克隆并扩充之。检测其上清液, 人 IgG1/κ ELISA 未检测到信号(第 640 - 83 页)。在液氮中冷冻并保存细胞。

将未克隆培养物扩充至滚瓶(roller bottle)规模以纯化抗体

扩充两个初级培养物(1B1 和 2B2)以产生足够的物质供 TM27 抗体的纯

化。将细胞扩充至 2 升滚瓶中使之适应低血清浓度(通过含 10 % 血清的 T25 → 含 10 % 血清的 T75 → 含 5 % 血清的 3 × T75 → 含 1 % 血清的 3 × 2L 瓶)(第 640 - 24 页)。第一天设置 2 升瓶, 第 2、5 和 8 天饲养(用含 1 % 血清的新鲜培养基替换 1/2 体积)。第 10 天首次收获, 第 12 天二次收获, 第 15 天三次收获。离心收获到的上清液, 贮藏于 - 20 °C 直至纯化。

在 A 蛋白柱上纯化抗体

合并得自 2B2 培养物上清液(总体积为 2.7 升)并通过 0.22 微米尼龙膜过滤。人 IgG1 ELISA 表明起始物质的总量为 1090 mg。在 Prosep - A(A 蛋白)柱上纯化抗体, 用 pH 5.0、4.0 和 3.0 的 0.1 M 柠檬酸盐洗脱。将洗脱液透析到 PBS 中。用人 IgG1 ELISA 测量洗脱级分中的纯化抗体的量。pH 为 3.0 的级分含有大多数纯化抗体, 而 pH 为 4.0 的级分中仅发现少量纯化抗体, 重复人 IgG1 ELISA 以得到更精确的浓度测量值, TM27 的总产量(pH 3.0 与 pH 4.0 的级分相加)为 960 mg。

15

来自 NS0 转染子培养物上清液的抗体的 A 蛋白纯化

如上所述, 在 A 蛋白柱上纯化来自 NS0 转染子培养物上清液中的抗体。

来自 NS0 骨髓瘤细胞系的 TM27 抗体的鉴定

20 将 A 蛋白柱层析从 NS0 转染子的培养物上清液中纯化 TM27 mAb, 并用于染色 HPB - ALL 细胞(V β 5.2)和作为阴性对照的 Jurkat(V β 8.1)细胞, 和小鼠 mAb, TM23, 和嵌合 TM27 作比较。TM27 对 HPB - ALL 染色呈阳性, 但不染 Jurkat。

25 为了测定 TM27 的特异性, 用 TM27 染色正常的 PBL T 细胞以和 TM23 mAb 比较。TM27 和 TM23 mAb 都染色 ~ 3.0 % 的总人 PBL T 细胞。建立竞争性试验, 其中在不同浓度的未标记 4H11 或 TM27 mAb 中加入固定浓度的经 FITC 标记的 TM 23 mAb。然后用该抗体混合物染色 HBP - ALL 细胞。未标记的 TM23 和 TM27 两者都阻断了 FITC 标记的 TM23 染色。为了测定 TM27 是否能与 CD3 抗原共调节, 将 HPB - ALL 细胞与不同浓度的 TM27 30 或 TM23 mAb 一起保温过夜, 再用抗 - CD3 mAb 染色。结果表明 TM27 和 TM23 能导致 TCR/CD3 复合体的胞吞作用。

进行 Scatchard 分析以测量 TM27 在 HPB - ALL 细胞上的结合亲和力。在 Scatchard 和竞争性(与 TM23 mAb)试验中, 结果表明, TM27 大致保留了相同的亲和力($k_d = 2.0 \times 10^{-8} \cdot M^{-1}$), 可与 4H11 mAb 很好地竞争。

5 在竞争性试验中, 将 TM27L/NS0 和 TM27L/CHO 与 4H11 进行比较, 结果示于图 3。进行 Scatchard 分析, 结果示于图 4。

CHO 转染子的第二次有限稀释铺敷

如上建立有限稀释铺敷。用人 IgG1 ELISA 筛选孔。将来自每种(1B1 - C7 和 2B2 - H9)6 个孔的细胞扩充至 24 孔培养板中并通过人 IgG1 ELISA 分析。扩充得自每种的两个最高产克隆并冷冻于液氮中。选择得自每种的最
10 高产克隆以供进行最后一轮亚克隆。

CHO 转染子的第三次有限稀释铺敷

如上建立有限稀释铺敷。用人 IgG1 ELISA 筛选孔。将来自每种(1B1 - C7 和 2B2 - H9)6 个孔的细胞扩充至 24 孔培养板中并通过人 IgG1 ELISA 检测。将来自每种的三个最高产克隆扩充至 T25 三角锥瓶中并冷冻于液氮中。将来自每种的单个克隆扩充至 T75 三角锥瓶中。此时, 从培养基中除去遗传霉素, 因而放弃对 neo^r 的选择。保留对 DHFR 的选择。用人 IgG1 ELISA 测定上清液。1B1 - C7 克隆产生 $4.69 \text{ mg}/10^6 \text{ 细胞/天}$ 。2B2 - H9 克隆产生 2.65
15 $\text{mg}/10^6 \text{ 细胞/天}$ 。因此选择 C7 分离物作为最终的克隆, 将 H9 分离物称作候补充克隆。
20

冷冻细胞贮存物的制备

将以上选择出的最终克隆扩充至 5 个 T225 三角锥瓶中以提供足够数目的细胞来建立冷冻细胞贮存库。从这些三角锥瓶中收获细胞并合并。合并的
25 悬浮液含有 98.3 % 活细胞。总的活细胞数为 1.58×10^8 , 足以制备 2×10^6 细胞/小管的 72 个小管所需细胞数。冷冻细胞并称之为“TM27L - 662 - 35”。另外, 将候补的 H9 克隆扩充至一个 T225 三角锥瓶中以建立小的冷冻细胞库。从这些三角锥瓶中收获的细胞有 97.3 % 是活的。悬浮液含有足够的
30 细胞以制备 2×10^6 细胞/小管的 9.7 小管细胞(第 662 - 89 页)。在液氮中冷冻细胞并称之为“TM27L - 662 - 89”。

检验从冷冻贮存中复活的细胞

生存力和支原体检验

- 5 使一管冷冻细胞贮存物 TM27L - 662 - 35 解冻并在 α MEM 中恢复。通过台盼蓝染色测定的细胞存活为 88 %。使用 Bionique Testing Laboratories 试剂盒检测此小管中生长的汇合培养物的支原体污染情况。试验检测结果为无污染。另外，解冻一管冷冻细胞贮存物 TM27L - 662 - 89。经台盼蓝染色测定的细胞存活为 93.8 %。如上所述检测此小管中生长的汇合培养物的支原体污染情况，此试验未检测到污染。将这两个培养物扩充至 T75 三角锥瓶中，用人 IgG1 ELISA 检测细胞培养物上清液。TM27L - 662 - 35 克隆产生 $3.24 \mu\text{g}/10^6$ 细胞/天，TM27L - 662 - 89 克隆产生 $2.52 \mu\text{g}/10^6$ 细胞/天。在第二次测定中，TM27L - 662 - 35 产生了 $3.03 \mu\text{g}/10^6$ 细胞/天，TM27L - 662 - 89 产生 $2.74 \mu\text{g}/10^6$ 细胞/天。

15

以滚瓶规模表达 TM27L - 662 - 35 以纯化抗体

- 扩充 TM27L - 662 - 35 培养物以产生足够的物质供 TM27L 抗体纯化。将细胞扩充至 2 升滚瓶中，并使之适应低血清浓度(通过含 10 % 血清的 T25 \rightarrow 含 10 % 血清的 T75 \rightarrow 含 5 % 血清的 $3 \times$ T75 \rightarrow 含 1 % 血清的 $3 \times$ 2L 瓶)。在第一天设置 2 升瓶，第 2、5、7 和 9 天饲养(用含 1 % 血清的新鲜培养基替换 1/2 体积)。第 12 天首次收获，第 14 天第二次收获，第 16 天三次收获。旋转收获到的上清液，过滤并贮藏于 -70°C 直至纯化。

在 A 蛋白柱上纯化抗体

- 25 合并得自 TM27L - 662 - 35 培养物的上清液，总体积为 5.1 升。使抗体结合剂 Prosep - A(A 蛋白)柱上并用 pH 5.0 和 3.0 的 0.1M 柠檬酸盐洗脱。将 pH 为 3.0 的洗脱液透析到 PBS 中。通过人 IgG1/Kappa ELISA 测量起始物质和洗脱级分中的纯化抗体的量。pH 为 3.0 的级分大致含有 3.9 mg 抗体/25 ml。在 Centriprep - 30 浓缩器(Amicon)上浓缩该材料。重复人 IgG1/Kappa ELISA。TM27L 的总产量为 ~ 3.2 mg，其浓度为 1.6 mg/ml。
- 30

纯化抗体的初次鉴定

对 ~ 2.5 mg 得自 pH 3.0 和 pH 4.0 级分之每一种的材料和纯化自 NS0 细胞的 TM27 进行流式细胞计量术。如下所述测量由中波段荧光(mean channel fluorence)所示的 HPB 细胞上的染色强度: pH 3.0 级分为 283.46; pH 4.0 级分为 321.98; 来自 NS0 之 TM27 为 506.79。对所有样品而言, Jurkat 细胞上的染色为背景水平。

实施例 2

10 CDR - 移植的 TM27 抗体的序列与人构架盒(Human Framework Cassettes)的比较

TM27 V κ

1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNYLNWYQTPGKAPKLLIYY 50
 REI =====Q===D=IK=====E
 15 TM23 =====TT=====L=====S=====K=DGTV=====
 WAL =====R===S=====S=====K=====A

51 TSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDIATYYCQQYSKLPRTFGQ100
 REI A=N=QA=====QS=Y====
 TM23 =====SL===N=E=====G
 WAL A===Q===T=====F=L=====S=====T= I=====

20 101 GTKLQIT 107
 REI =====
 TM23 ===VE=K
 WAL ==RIE=K

TM27 VH

25 1* QVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGFSLTAYGVNWRPPGRGLEWIGM 50
 NEWM ====EQ=====STFSNDYYT=====Y
 TM23 ====K=====A===S==I=====K====L==
 HIL ==K=VGA=G=V=Q=GRS=RIS=IA===TFSN==MH====A==K====VAV

30

51 IWGDGNTDYNSALKSRVTMLKDTSKNOKSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV100
 NEWM VFYH=TS=DTTPLR=====LV=====NL
 TM23 =====LSIS==N==S=VF=KMN=LQTD===R=====
 HIL ==YN=S=Y=GDSV=G=F=ISR=N==RTIYMZ===LRTE===V=====PD

5

R
 101 TATLYAMDYWGQGS�VTYSS 120
 NEWM AGCIDV =====V==
 TM23 =====TS==V==
 HIL IL=AFSF=====VL==V==

10

*HuVHL 在# 48 具有 L

TM27L: 重链的第 48 位为亮氨酸。

TM27I: 重链的第 48 位为异亮氨酸。

15 TM27.1: KS 变为 VF(78 - 79)

TM27.2: VTML/T 变为 LSIS/N (66 - 69/73)。

TM27.3: V 变为 R(92)。

实施例 3

20

TM23 的 Scatchard 分析

| 实验 | Kd | 受体/细胞 |
|------------|------------|---------|
| 617:096 | 3.27e - 8M | 3.04 e5 |
| 617:115 | 2.30e - 8M | 2.43 e5 |
| 25 617:119 | 2.46e - 8M | 2.46 e5 |

平均值

$$kd = 2.52(\pm 0.67)e - 8M$$

$$\text{受体/细胞} = 2.64 e5$$

TM27 的 Scatchard 分析

| 实验 | Kd | 受体/细胞 |
|-----------|------------|---------|
| 30 613:78 | 1.48e - 8M | 3.31 e4 |

613:82 1.14e - 8M 2.47 e4

平均值

kd = 1.31(± 0.24)e - 8M

受体/细胞 = 2.89 e4

5

实施例 4

TM27I 工作概况

COS/CHO 中的 TM27I(48):

- 10 · 从 HSO 生产细胞系的 CDR - 移植 V 区制备 cDNA, 经 PCR 扩增, 测序。
· 以 cDNA 构型将 DNA 片段克隆到 pTCSLNeo 中。
· 将此质粒与 pTCSLDHFRTM27 一起共转染到 COS 和 CHO 中。
· COS 细胞上清液的人 IgG1/κ 表达的阳性 ELISA 结果表明质粒构建体良好。
- 15 · 选择 CHO 细胞转染子, 扩充并克隆之。一次克隆后将细胞冷冻于液氮中。

实施例 5

得自 16G8 cDNA 的氨基酸序列数据

20 重链

25

30

10 20 30 40 50
 * * * * *
 TTRAP RSSHS VISTE HRPLT MDSRL NLVFL VLILK GVQCD VQLVE SGGGL

 5 60 70 80 90 100
 * * * * *
 VQPGG SRKLS CAASG FTFSN FGMHW VRQAP DKGLE WWAYI SSGSS TIYYA

 110 120 130 140 150
 * * * * *
 DTLKG RFTIS RDNPK NTLFL QMTSL RSEDY AMYYC ARRGE GAMDY WQOQT

 10 160 170
 * *
 SVTVS SAKTT PPSVY PLAPG

轻链

15
 10 20 30 40 50
 * * * * *
 ISQGT KFKYT MDFQV QIFSF LLISI SVVMS RGENV LTQSP AIMS SA SLGK

 20 60 70 80 90 100
 * * * * *
 VTMSC RASSS VNYIY WYQQK SDASP KLWIY YTSNL APGVP TRFSG SGSGN

 110 120 130 140 150
 * * * * *
 SYSLT ISSME GEDAA TYQCQ QFTSS PFTFG SGTCL EIKRA DAAPT VSIFP

25 153
 *
 PSS

蛋白质序列数据:

30 H=DVQLVE?GGGLVQPG
 L=ENVLTQ

实施例 6

TM29 的工作概况

- 基本上按实施例 1 的方法制备杂交瘤, 分离 cDNA(示于实施例 5)
- 5 ·将分离出的 cDNA(H 和 κ)(来自 16G8 杂交瘤)克隆到 M13 载体中。
- 通过诱变引入人构架(VH_{KOL}/VK_{REI})。
- 将 CDR - 移植 V 区克隆到骨髓瘤表达载体中。
- 从 NS0 转染子中纯化人源化抗体(每个约 1 mg)以初步评价。

已制备了四种不同的 TM29:

- 10 TM29
 - TM29.1: SS 变为 AA(23 - 24)。
 - TM27.2: S 变为 P(75)。
 - TM27.3: GV/F 变为 AM/Y (92 - 93/95)。

15 实验详述 - TM29

通过 PCR 法分离人 kappa 链恒定区

- 使用未经消化的质粒 pSV184 DH - Neo/DNS - V \times C \times (含有人 Kappa 链恒定区的 pSVHuK)进行具有两个引物(一个正向, 一个反向)的 PCR 以分离
- 20 恒定区。寡聚体(引物)得自 Operon。PCR 反应试剂来自具有 AmpliTaq 的 Gene Amp DNA 扩增试剂盒(PerKin - Elmer Cetus)。在三种不同浓度的 Mg^{2+} 中建立 PCR 反应。在 1 % 琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物的等分试样。选择来自第一 Mg^{2+} 样品(浓度为 1.5 mM)的 PCR 产物。将位于 C 区侧翼的引物设计成含有限制性酶切位点以供克隆。因此可用 EcoRI 消化(在 3'末端)扩增的 DNA。
 - 25 5'末端的位点(PvuII)不被消化。然后在 1 % 琼脂糖凝胶上电泳经消化的 DNA 片段, 切下 300 bp 的带。从凝胶中抽提 DNA, 并在 1 % 琼脂糖凝胶上分析小等分试样以测定质和估计量。300 bp 的带显得清晰, 估计 DNA 总量为 ~ 140 ng。

30 将人 Kappa 链恒定区克隆进 pBS KS⁺ 载体并测序

使用 T4 DNA 连接酶, 将已被 EcoRI 消化的人 Kappa 链恒定区的 DNA

片段插入到已被 SmaI 和 EcoRI 消化的载体 pBS KS⁺ 中。用此连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落用于接种 24 份液体培养基。从每份培养物中制备 DNA。用 PvuII(C_x 的 5'末端)和 EcoRI(C_x 的 3'末端)消化每个 DNA 样品, 并在 2% 琼脂糖凝胶上分析。由于分离较低范围的带(300 bp)有困难, 故仅用 PvuII 消化 DNA 样品。在 2% 琼脂糖凝胶上分析之后, 24 个样品中有 19 个 C_x 插入是正确的。选择样品# 1 - 5(19 个正确样品中的)测定序列, 所使用的引物是 T7 和 T3 引物(其序列在载体中位于插入物的侧翼)。其它测序试剂来自 Sequenase Version 2.0 试剂盒(USB)。样品# 5 经证实具有人 Kappa 链恒定区的正确序列。

10

将人 Kappa 链恒定区克隆到哺乳动物表达载体 - pTCSLDHFR* 以成为 pTCSLC_xDHFR*。

15 使用 PvuII 和 EcoRI 限制性酶从 pBS KS⁺ 载体(样品# 5)中分离人 kappa 链恒定区。然而, 因为如前述的带分离存在的问题, 故需对构建体 pBS/人 C_x 进行第二次消化。第二次消化涉及 EcoRI 和 XbaI(位于 PvuII 位点的 5'侧), 产生了 ~ 300 bp 的片段。然后将此片段经过凝胶纯化, 并经 PvuII 消化以除去 C_x 5'末端残留的载体小片段。凝胶纯化最终的片段, 然后在 1% 琼脂糖凝胶上分析质并估计量。C_x DNA 显示出清晰的带, 约为 280 bp, 估计其总量为 ~ 135 ng。

20

由于表达载体 pTCSLDHFR* 中存在三个 EcoRI 位点, 故在 PvuII 位点处克隆量最佳方案。既然 C_x DNA 是经 PvuII - EcoRI 消化制备的, 故可使用 Klenow 片段修复 EcoRI 末端(以形成平头)。将经修复的平头 C_x DNA 连接到 pTCSLDHFR* 载体中, 此载体已被 PvuII 消化并经磷酸酶(使用牛小肠磷酸酶)处理过。用此连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞, 挑选单菌落用于接种 24 份液体培养基。从每份中制备 DNA。用 PvuII 和 HindIII 消化所有的 DNA 样品, 并在 1% 琼脂糖凝胶上分析。经测定 24 份样品中有 5 个含有正确方向的 C_x 插入。选择样品# 7 以继续实验。

25

用野生型 DHFR 基因取代突变的 DHFR* 基因

30

为了在 CHO(dhfr⁻)DUX B11 细胞中使载体 pTCSLC_xDHFR* 得以表达, 用 DHFR 基因取代 DHFR* 基因。用限制性酶 HindIII 和 BglII 消化来自 pTCSL

C, DHFR*样品# 7 的 DNA 以及来自 pSV2 - DHFR(此质粒得自 Dr. Paul Berg, Department of Biochemistry, Stanford University Medical School)的 DNA, 从而分离出各个基因片段。通过分析可确定 pTCSLC, DHFR*载体中的附加 BglII 位点去掉了部分 polyA 位点, 它干扰载体的功能。因此使用
5 HindIII 和 BamHI 重复消化。用磷酸酶处理载体的(DHFR*)pTCSLC, 部分。然后凝胶纯化两个分离的片段(pTCSLC, 和 DHFR), 在 1% 琼脂糖凝胶上分析质并估计量, 两条带都显得清晰, 估计浓度类似, 约为 40 - 50 ng/ml。使用 T4 DNA 连接酶将 DHFR 基因连接到 pTCSLC, 载体上。用该连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。挑选单菌落用于接种 24 份液体培养基。从每
10 份中制备 DNA。用 HindIII 和 BamHI 限制性酶消化来分析 DNA。24 个培养物中有 23 个具有显示出 DHFR 基因插入 pTCSLC, 载体的正确带, 选择样品# 22 供进一步使用。

将经 PCR 分离的人 Kappa 链 V 区克隆到 CHO 载体 pTCSLC, DHFR 中

15 用凝胶纯化 16G8 Kappa 链 V 区的 cDNA 并用适当的限制性酶消化。在 1% 琼脂糖凝胶上分析 DNA 样品的小等分试样以估计量并证实质。在 ~ 800 bp 处观察到多余(污染)的带。估计其浓度为 1.25 ng/ml。将 V 区连接到已被限制性酶 XhoI 和 PvuII 消化并经磷酸酶处理过的 pTCSLC, DHFR 载体中。用此连接混合物转化 E.coli DH5 α 感受态细胞。产生的转化子菌落非常少。
20 挑选单菌落并用于接种 12 份液体培养基。从每份中制备 DNA。用 XhoI 和 PvuII 消化并在 1% 琼脂糖凝胶上分析。有 4 个阳性样品: # 1、# 4、# 7 和 # 10。测定每个阳性样品的序列。将经 PCR 分离出的 TM29 γ 链 V 区克隆到 CHO 载体 pTCSLC_g1NeoApa。

25 人 kappa 链 V 区的双链测序

测定 16G8 的 4 个样品(#1、#4、#7 和 #10)的双链序列。使用引物 HUCK5PR, 经过限制性酶切位点(3' - 5'; PvuII - XhoI), 完整地测定反向链的序列。样品# 1 和 # 4 似乎都具有正确的序列, 样品# 7 未被测序, 样品# 10 具有错误的序列。对于样品# 1 和 # 4 而言, 使用两个不同的引物, pTCSFOR
30 和 pTCSFWD 测定正向链的序列。联合每个引物测出的序列即可得到经过限制性酶切位点(5' - 3'; XhoI - PvuII)的全长序列。已发现正向链中存在小区

域的压缩现象，使用可缓解这种压缩现象的引物或测序方法都不能解决这一问题。然而，已证明反向链此区域的序列是正确的。样品# 1 和# 4 似乎都具有正确的序列。故选择样品# 4 以转染哺乳动物细胞。

5 将 TM29 轻链和重链质粒共转染到 COS 和 CHO 细胞中

在 TM29 轻链和重链质粒共转染过程中，使用了 Cos - 1 和 CHO (dhfr⁻) DUX B11 细胞。CHO DUX B11 细胞系得自 Biogen. Inc, 它最初来自 Dr. Lawrence Chaisin(Columbia University)。

为了转染 Cso - 1 细胞，将 5 mg 每种未消化的 TM29 质粒(分别为 pTCSLHuV_κ16GC_κDHFR 和 pTCSLHuV_H16GC_g1Neo Apa⁻; TM29 - 4 和 TM29 - 26)沉淀于乙醇中并重悬浮于 H₂O 中，浓度为 1 mg/ml。然后使用 BioRad 基因脉冲仪在 250 V、960 mFD 条件下，通过电穿孔将上述质粒共转染到 3.8 × 10⁶ 个细胞中。将经转染的细胞重新悬浮于 Dulbecco 氏改进的 Eagle 培养基(DMEM)中，并培养 3 天。制备对照载体质粒(pTCSLDHFRApa⁻和 pTCSLNeoApa⁻)并按照与 TM29 质粒类似的方法共转染。重新悬浮后来被转染的细胞，并按照与经 TM29 转染的 Cos 细胞类似的方法培养。

为了转染 CHO DUX B11 细胞，需用限制性酶 AatII 消化 5 mg 每种 TM29 质粒(如上所述)以产生 DNA 的线形片段。在乙醇中沉淀此片段并以 1 mg/ml 的浓度重新悬浮于 H₂O 中。然后如上所述通过电穿孔将质粒共转染到 5 × 10⁶ 个细胞中。将经转染的细胞重新悬浮于添加了胸苷、腺苷和脱氧腺苷的 α 极限必需培养基(α MEM)(非选择性培养基)中并培养 3 天。制备对照载体质粒(如上所述)并按照与 TM29 质粒类似的方法共转染。重新悬浮后来被转染的细胞，并按照与被 TM29 转染的 CHO 细胞类似的方法培养。

25 通过人 IgG₁ κ ELISA 分析经 TM29 转染的 Cos 细胞上清液

培养了 3 天后，经 TM29 转染的 COS 细胞似乎已铺满。因此，收集上清液，弃去细胞。使用人 IgG₁ κ ELISA 测定培养物上清液中由细胞产生的人 IgG。用已包被于 96 - 孔培养板的小鼠抗 - 人 IgG₁ Fc 抗体捕捉上清液中的 IgG，通过与辣根过氧化物酶 - 偶联的山羊抗 - 人 Ig κ 抗体以及用邻苯二胺(OPD)而产生的颜色变化来检测。将光密度测量值与已知浓度的纯化的人 IgG₁ κ 抗体所形成的曲线进行比较即可测定上清液中 IgG 的浓度。经 TM29

转染的 COS 细胞上清液产生的人 IgG 浓度为 201.3 ng/ml，经对照 DNA 转染的 COS 细胞上清液产生的人 IgG 浓度为 0 ng/ml。

选择经 TM29 转染的 CHO 细胞

- 5 培养了 3 天后，经 TM29 转染的 CHO 细胞似乎已铺满。因此，用 0.25 % 胰蛋白酶(于 Hank's 平衡盐溶液中)处理此细胞以使它们从培养三角锥瓶上解离下来。收集细胞，离心以除去上清液。将细胞沉淀物以 2×10^5 细胞/ml 的浓度重新悬浮于 α MEM 选择培养基中，并以 1 ml/孔的量铺敷于 24 孔培养板中。 α MEM 选择培养基具有双重选择能力，它缺乏核苷酸的供给，并用透析过的 FBS 取代了 FBS 以选择 pTCSLHuV κ 16GC κ DHFR 上的 DHFR^r，并加入遗传霉素(G - 418)以选择 pTCSLHuV_H16GC_g1NeoApa^r 上的 neo^r。
- 10

通过人 IgG₁ κ ELISA 和流式细胞计量术分析经 TM29 转染的 CHO 细胞上清液

- 15 在选择培养基中培养 14 天后，从每孔中收集经 TM29 转染的 CHO 细胞上清液，并使用人 IgG₁ κ ELISA 检测。经 TM29 转染的 CHO 细胞上清液中人 IgG 浓度范围为 144.6 ng/ml - 291.9 ng/ml，平均浓度为 240.5 ng/ml。经对照 DNA 转染的 CHO 细胞上清液中人 IgG 的浓度为 0 ng/ml。

- 20 通过流式细胞计量术检测经 TM29 转染的 CHO 细胞的 3 个高产孔的上清液(2C3、2C4、2B6)以及一个经对照 DNA 转染的 CHO 细胞孔的上清液(3D4)。3 个 TM 29 样品，2C3、2C4 和 2B6 正染了 Jurkat 细胞(中波段荧光范围为 186.61 - 290.01)，但未正染 HPB 细胞(中波段荧光范围为 11.77 - 13.82)。对照样品 3D4 未正染 Jurkat 细胞(中波段荧光为 11.96)。

- 25 通过有限稀释克隆经 TM29 转染的 CHO 细胞

- 选择经 TM29 转染的 CHO 细胞的 3 个最高产孔(2C3、291.9 ng/ml；2C4、289.7 ng/ml；2B6、289.5 ng/ml)以供有限稀释克隆。对于每个孔而言，在 α MEM 选择培养基中稀释细胞浓度，并以 2 个细胞/孔、1 个细胞/孔、和 0.5 个细胞/孔的量铺敷于 96 孔培养板中。克隆 10 天后，在 2C3、2C4 和 2B6 的每个 0.5 个细胞/孔培养板中的许多孔内观察到集落生长。因此，收集每个 0.5 个细胞/孔培养板的所有孔的上清液，并使用人 IgG₁ κ ELISA 检测。表现
- 30

出细胞生长的所有孔在 ELISA 中为阳性。选择总数为 24 的高产孔(2C3 为 10 个, 2B6 为 14 个)以扩充至 24 孔培养板中并生长至铺满。从每孔中收集上清液, 使用人 IgG₁ × ELISA 检测。人 IgG 浓度范围为 0.7 mg/ml - 4.8 mg/ml, 平均浓度为 2.9 mg/ml。然后用流式细胞计量术检测经 TM29 转染的 CHO 克隆的 6 个高产孔的上清液(1C7、1D9、1G2、2G1、2G10、2H2a)。所有 6 个样品都正染了 Jurkat 细胞(中波段荧光范围为 313.68 - 356.87), 但未正染 HPB 细胞(中波段荧光范围为 7.59 - 8.16)。将 6 个样品中的每一个扩充至 25 cm² 三角锥瓶中, 在液氮中冷冻并贮存。选择了 3 个高产孔(2C3 - 1G2、2C3 - 2G10、2C3 - 2H2a)用以亚克隆。

10 通过与 TM29 孔类似的有限稀释, 克隆经对照 DNA 转染的 CHO 细胞的一个孔(3D4)。将细胞浓度稀释至低于所需浓度的 10 倍, 克隆 10 天后观察不到集落生长。因此, 从冷却小管(3D4)开始重新培养。使用此新培养物重复有限稀释克隆。克隆 16 天后, 选择 0.5 个细胞/孔培养板的最大程度铺满的孔中的 6 个(1B5、1C11、1D6、2E7、2F3、2F9)以扩充到 24 孔培养板中。15 随后将每个孔扩充到 25 cm² 三角锥瓶中, 再扩充到 75 cm² 三角锥瓶中以生长至铺满。从每个三角锥瓶中收集上清液, 并使用人 IgG₁ × ELISA 检测。人 IgG 的浓度为 0 ng/ml。然后在液氮中冷冻并保存每个三角锥瓶。

将未克隆的经 TM29 转染的 CHO 细胞培养物扩充至滚瓶规模(roller bottle scale)

20 选择经 TM29 转染的 CHO 细胞的 3 个最高产孔(2C3, 291.9 ng/ml; 2C4, 289.7 ng/ml; 2B6, 289.5 ng/ml)以作为未克隆培养物扩充到 25 cm² 三角锥瓶中。此时, 在液氮中冷冻并贮存一小管各种 TM29 培养物(以及一小管经对照 DNA 转染的 CHO 细胞培养物)。再将各个未克隆培养物扩充至 75 cm² 三角锥瓶中。25 从一个 75 cm² 三角锥瓶中将每个培养物扩充至 3 个 75 cm² 三角锥瓶, 同时使 α MEM 培养基中的血清浓度从 10 % 降低至 5 %。然后将 2C3 和 2B6 的每个 75 cm² 三角锥瓶扩充至 2 升滚瓶中。在液氮中冷冻并保存 2C4 的所有 3 个 75 cm² 三角锥瓶。一旦培养物在滚瓶中, α MEM 培养基中的血清浓度从 5 % 降至 1 %。培养 9 天后, 2B6 瓶似乎已铺满, 而 2C3 瓶似乎为 ~ 25 30 % 铺满。在第 9、14 和 16 天, 收集所有 2B6 和 2C3 瓶的上清液, 然后弃去细胞。将收集到的上清液离心, 贮存于 - 20 °C 中。使用人 IgG₁ × ELISA 检

测 2B6 和 2C3 的各 3 个经收集上清液之每一个的等分试样。经测定 2B6 的人 IgG 总量为 820 mg； 2C3 为 1923 mg。

通过有限稀释亚克隆经 TM29 转染的 CHO 细胞克隆

- 5 选择经 TM29 转染的 CHO 细胞克隆之三个最高产孔(2C3 - 1G2、 4.8 mg/ml； 2C3 - 2H2a、 4.1 mg/ml； 2C3 - 2G10、 4.0 mg/ml)以进行有限稀释亚克隆。亚克隆 14 天后，在 1G2、 2G10 和 2H2a 的每个 0.5 个细胞/孔培养板中的许多孔内观察到集落生长。因此，收集那些有集落生长的孔中的上清液，使用人 IgG₁ × ELISA 检测。表现出细胞生长的所有孔在 ELISA 中为阳性，可产生 100 % 的克隆效率。选择总数为 24 的高产孔(2H2a 2 个, 2G10 5 个, 1G2 17 个)以扩充至 24 孔培养板中并生长至铺满。从每孔中收集上清液，使用人 IgG₁ × ELISA 检测。人 IgG 浓度范围为 1.2 mg/ml - 9.2 mg/ml，平均浓度为 4.2 mg/ml。通过流式细胞计量术检测经 TM29 转染的 CHO 亚克隆的 4 个高产孔的上清液(2G5、 2H12、 1H6、 2E9)。所有 4 个样品都正染
- 10 Jurkat 细胞(中波段荧光范围为 211.51 - 292.45)，但不能正染 HPB 细胞(中波段荧光范围为 8.36 - 8.80)。将 4 个样品中的每一个扩充至 25 cm² 的三角锥瓶中。

通过有限稀释第二次亚克隆经 TM29 转染的 CHO 细胞克隆

- 20 根据 ELISA 和流式细胞计量术的联合结果，选择两个最好的经 TM29 转染的 CHO 细胞克隆(2C3 - 1G2 - 2G5 和 2C3 - 1G2 - 1H6)以通过有限稀释进行第二次亚克隆。此时，在液氮中冷冻并保存一管各种克隆(以及一管 2C3 - 1G2 - 2H12 和 2C3 - 1G2 - 2E9 中的每一种)。亚克隆 12 天后，在 2G5 和 1H6 的每个 0.5 个细胞/孔培养板中的许多孔内观察到集落生长。因此，收集那些具有集落生长的孔中的上清液，并使用人 IgG₁ × ELISA 检测。表现出细胞生长的所有孔在 ELISA 中为阳性，产生了 100 % 的克隆效率。选择总数为 24 的高产孔(2G5 为 20 个， 1H6 为 4 个)以扩充至 24 孔培养板(# 646 - 101)并生长至铺满。从每孔中收集上清液，使用人 IgG₁ × ELISA 检测。由于检测中所用的人 IgG₁ × 标准的活性丧失，因此未能测定未知样品的浓度。
- 25 因此通过光密度测定高产孔。选择 6 个最高产孔(2G5 为 5 个， 1H6 为 1 个)以扩充至 25 cm² 三角锥瓶中，然后扩充至 75 cm² 三角锥瓶中并生长至铺满。
- 30

从每个三角锥瓶中收集上清液，使用人 IgG₁ ELISA 检测。人 IgG 浓度范围为 14.6 mg/ml - 21.2 mg/ml，平均浓度为 18.6 mg/ml。通过流式细胞计量术检测经 TM29 转染的 CHO 亚克隆的 6 个三角锥瓶的上清液(1B5、1D1、1F11、2B10、2F5、2F9)(# 646 - 122)。所有 6 个样品都正染 Jurkat 细胞(中波段荧光范围为 304.51 - 383.00)，但不能正染 HPB 细胞(中波段荧光范围为 8.67 - 10.25)。

经 TM29 转染的 CHO 细胞克隆的冷冻细胞贮存物的制备

选择用于制备冷冻细胞贮存物的经 TM 29 转染的 CHO 细胞克隆是 2C3 - 1G2 - 1H6 - 2F5。将此克隆从一个 75 cm² 三角锥瓶扩充至 5 个 225 cm² 三角锥瓶中以提供足够量的细胞来建立冷冻细胞库用于研究。根据 SOP TMB1 - 001.00 来制备冷冻细胞库。用胰蛋白酶处理细胞，从每个三角锥瓶中收集细胞并合并。发现合并的细胞悬浮液中含有 3.2 × 10⁸ 个细胞，其中有 99 % 存活。制备 72 个小管，每个在 1 ml 体积中含有 2 × 10⁶ 个细胞。此克隆的所有小管被称作 TM29 - 646 - 132。

实施例 7

CDR - 移植的 TM29 抗体序列与其它构架区序列的比较

TM29 Vk

20

```

1   DIQMTOSPSSLSASVGDVRTITCRASSSVNYIYWYOOTPGKAPKLLIYYT 50
REI  =====Q==QDI IK=LN=====EA
16G8 ENVL====AIM===L=EK==MS=====KSDAS===W====
HIC  E=VL====GTI=I=P=ERA==S====O==SSYIA====K==Q==R====GA

```

25

```

51  SNLAPGVPSRFSCSGSGTDYFTFTISSLQPEDIATYYCQQFTSSPFTFGQGT100
REI  ===QA=====YQ=L=Y=====
16G8=====T=====NS=SL====MEG==A=====S==
HIC  =SR=T=I=D=====DF=L===RL E=X=F=V=====YG===W=====

```

30

```

101  KLQIT 106
REI  =====
16G8 ==E=K
HIC  =VE=K

```

TM29 VH

1 EVOLVESGGGVVOPGRSLRLSCSSSGFTFSNFGMHVROAPGKGLEWVAY
 KOL Q=====IF=SYA=Y=====I
 5 16G8 D=====L====G=RK====AA=====D=====
 WEA Q====D====L=E====G=====A===== =AND=N=====LSF

51 ISSGSSTIYYADTLKGRFTISRDNKNTLFLOMDSLRLPEDTGVYFCARRG
 KOL =WDDG=DQH===SV=====D=
 16G8 =====P=====T====S====AM=Y=====
 WEA =GGSG=====SV=====NB===S=Y===S====A====A=YY== ==

10

101 EGAM DYWGOGTPVTVSS
 KOL GHGFCSSASC FGP=====

16G8 =====S=====

WEA WLL N =====L=====

- 15 TM29: 具有第一种型式的序列
- TM29.1: SS 变为 AA(23 - 24)
- TM29.2: S 变为 P(75)
- TM29.3: GV/F 变为 AM/Y(92 - 93/95)

20 实施例 8

TM29 mAb 的 Scatchard 分析

在三个独立的实验中进行 TM29 和 16G8 抗体的 Scatchard 分析。下表显示了每个实验测得的 Kd 值

| 25 | 实验 | TM29(kd M ⁻¹) | 16G8(kd M ⁻¹) |
|----|-----|---------------------------|---------------------------|
| | 1 | 1.45 × 10 ⁻⁹ | 2.86 × 10 ⁻⁹ |
| | 2 | 1.65 × 10 ⁻⁹ | 2.65 × 10 ⁻⁹ |
| | 3 | 1.15 × 10 ⁻⁹ | 2.44 × 10 ⁻⁹ |
| | 平均值 | 1.42 × 10 ⁻⁹ | 2.65 × 10 ⁻⁹ |

30

实施例 9

嵌合 TM29 的工作概况

COS 和 CHO 中的嵌合体:

- '以 cDNA 构型将 V(D)J 区 cDNA 克隆到 CHO 细胞表达载体 pTCSLNeo(H) 和 TCSLDHFR(K) 中。
- '将表达质粒共转染到 COS 和 CHO 中。
- 'COS 细胞上清液中的 Ab 浓度为 ~ 35 ng/ml。
- '分析 CHO 细胞转染子(通过 FACS 和 ELISA), 克隆一次, 用 MTX(20 nM、100 nM 和 500 nM)扩增。
- 10 '未经扩增的 CHO 细胞克隆的抗体浓度为 ~ 3 μ g/ml, 它正染 Jurkat 细胞, 在液氮中冷冻未经扩增的克隆。

实施例 10

15 在 COS 和 CHO 细胞中表达嵌合的 16G8

16G8 嵌合体

在 CDR - 移植构建体所用的相同表达载体中, 轻链和重链构建体含有具有人恒定区的完整的小鼠 V 区: pTCSDHFR 连结 pTCSNeo 连结 - 该构建体具有双重选择能力。

20

COS 细胞转染子 - ~ 35 ng/ml

CHO 细胞转染子 - 16 个阳性孔/54 个孔

| | | <u>ng/ml</u> | <u>校正量</u> |
|----|-----|--------------|------------------|
| 25 | 1A1 | 151.6 | |
| | 1A6 | 166.6 | |
| | 1B3 | 107.2 | |
| | 1B6 | 179.6 | |
| | 1D2 | 101.0 | |
| 30 | 1D5 | 215.1 | * 2.2 μ g/ml |
| | 2A4 | 199.8 | |

| | | | | |
|----|---|-------|---|----------------|
| | 2B1 | 184.5 | | |
| | 2B2 | 213.8 | * | 2.1 μ g/ml |
| | 2B4 | 130.6 | | |
| | 2C2 | 119.6 | | |
| 5 | 2C6 | 214.4 | * | 2.1 μ g/ml |
| | 2D3 | 216.6 | * | 2.2 μ g/ml |
| | 2D6 | 139.7 | | |
| | 3A1 | 198.7 | | |
| | 3A2 | 172.2 | | |
| 10 | 全部扩充到 25 cm ² 三角锥瓶中 进行流式细胞计量术 | | | |

实施例 11

15 TM29 的工作概况

TM29

COS/CHO 中的 TM29:

从 NSO 生产细胞系的 CDR - 移植 V 区中制备 cDNA, 经 PCR 扩增, 测序。

20 以 cDNA 的构型将 DNA 片段克隆到 pTCSLNeo(H)和 pTCSLDHFR(κ)中。

将质粒共转染到 COS 和 CHO 中。

COS 细胞的上清液含有 ~ 2 μ g/ml Ab。

在克隆和扩增之前, CHO 细胞转染子分泌 ~ 3 μ g/ml Ab, 上清液可正染 Jurkat 细胞。克隆 3 次后制备未扩增的 Ab 最佳产生者的细胞库。

25 在不同浓度的 MTX 中扩增 CHO 细胞系。

实施例 12

在 4H11 - FITC 中比较 TM27L、TM27I 和 TM23

30 竞争性试验

实验 1:

TM23 斜率/TM27L 斜率 = 1.56

TM23 斜率/TM27I 斜率 = 2.04

5 实验 2:

TM23 斜率/TM27L 斜率 = 1.82

TM23 斜率/TM27I 斜率 = 2.44

与 TM23 相比, TM27L 和 TM27I 的值都 < 3 倍。

10 实施例 13

TM27 的氨甲喋呤扩增

产率(微克/10⁶ 个细胞/天)

氨甲喋呤水平(nM)

| | | | 0 | 20 | 100 | 10 - 200 | 20 - 200 |
|----|----|-------|------|-----|------|----------|----------|
| 15 | C7 | *7/30 | 27 | nd | nd | nd | 265.8 |
| | | *7/22 | 3.5 | nd | 19.2 | 14.7 | 34.2 |
| | | 7/6 | 2.6 | nd | nd | 9.1 | nd |
| | | 6/25 | 2 | 4.8 | 4.5 | nd | nd |
| | | 6/18 | 3 | 8.9 | nd | nd | nd |
| 20 | H9 | *7/30 | 22.7 | nd | nd | nd | 181.9 |
| | | *7/22 | 3.9 | nd | 9.4 | 11.6 | 34.4 |
| | | 6/25 | 1.5 | 1.8 | 4.7 | 3.6 | nd |
| | | 6/18 | 1.8 | 1.5 | nd | nd | nd |

* 没有试验之间的比较。

25 nd = 未测

试验内相对值(Intra - assay relative value)

| | | | 0 | 20 | 100 | 20 - 200 | 20 - 200 |
|----|----|-------|---|-----|-----|----------|----------|
| | C7 | *7/30 | 1 | nd | nd | nd | 9.8 |
| | | *7/22 | 1 | nd | 5.5 | 4.2 | 9.8 |
| 30 | | 7/6 | 1 | nd | nd | 3.5 | nd |
| | | 6/25 | 1 | 2.4 | 2.3 | nd | nd |

| | | | | | | | |
|----|------------|-------|----------|---------|-----|----------|----------|
| | | 6/18 | 1 | 3.0 | nd | nd | nd |
| H9 | | *7/30 | 1 | nd | nd | nd | 8.0 |
| | | *7/22 | 1 | nd | 2.4 | 3.0 | 8.8 |
| | | 6/25 | 1 | 1.2 | 3.1 | 2.4 | nd |
| 5 | | 6/18 | 1 | 0.8 | nd | nd | nd |
| | 情况(status) | | | | | | |
| | | | 0 | 20 | 100 | 10 - 200 | 20 - 200 |
| C7 | 8/11 | fm | fm,s,sf4 | fm | fm | fm | fm,s* |
| H9 | 8/11 | fm | 丢弃 | fm,s,f2 | fm | fm | fm,s* |

10 解释:

fm = 冷冻一管混合培养物

s = 通过一次有限稀释来进行的次级培养

s* = 进行中的首次有限稀释

f# = 每个#孔冷冻一管

15 nd = 未测

说明书附图

| | | | | | | |
|-----------|---|----|----|----|----|-----|
| TM23 VL | DIQMTQTSSLSASLGDVRTISCSASQGISNLYLNWYQKPDGTVKLLIYY | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| TM27 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQGISNLYLNWYQQT PGKAPKLLIYY | * | * | * | * | * |
| | | | | | | |
| | TSSLHSGVPSRFSGGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQYKLPRTFGQ | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| | <u>TSSLHSGVPSRFSGGSGTDYFTTISLLOPEDIATYYCQYKLPRTFGQ</u> | * | * | * | * | * |
| | | | | | | |
| | CDR2 | | | | | |
| | 107 | | | | | |
| | * | | | | | |
| | GTKVEIK | | | | | |
| | GTKLQIT | | | | | |
| | | | | | | |
| TM23 VH | QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTAYGVNWRQPPGKGLEWLG | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| TM27L VH | QVQLQESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTAYGVNWRQPPGKGLEWLG | * | * | * | * | * |
| TM27I VH | =====AYGN=====I=M | | | | | |
| TM27.1 VH | =====AYGN=====L=M | | | | | |
| TM27.2 VH | =====AYGN=====L=M | | | | | |
| TM27.3 VH | =====AYGN=====L=M | | | | | |
| | | | | | | |
| | CDR3 | | | | | |
| | CDRI | | | | | |

图 1

60 70 80 90 100
 * * * * *
 IWGDGNTDYN**SALK**RLSI SKD**NSKSQVFLKMNSLQ**TD**DDTARY**Y**CA**DRV
 IWGDGNTDYN**SALK**SRV**TMLKDTSKNQKSLRLSSVT**A**ADTAVYY**CA**DR**DRV
 IWGDGNTDYN**SALK**=====DRV
 IWGDGNTDYN**SALK**=====V**F**=====DRV
 IWGDGNTDYN**SALK**==**LSIS**==**T**=====DRV
IWGDGNTDYN**SALK**=====R=====DRV

CDR2

110 120
 * *

TATLY**AMDY**WGQ**TSVT**VSS
 TATLY**AMDY**WGQ**SLVT**VSS
 TATLY**AMDY**=====
 TATLY**AMDY**=====
 TATLY**AMDY**=====
TATLY**AMDY**=====

CDR3

图 1 (续)

16G8 VL ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSVNYIYWYQOKSDASP^{*}KLWIYYT 10 20 30 40 50
 * * * * *
 TM29 VL DIQMTQSPSSLSASV^{*}GDRVTITCRASSVNYIYWYQQT^{*}PGKAPKLLIYYT
CRASSVNYIYWYQQT
 CDR1

60 70 80 90 100
 * * * * *
 SNLAPGVPTFRFSGSGNSYSLTISMEGEDAATYCCQ^{*}FTSSPFTFGSG
 SNLAPGVPSRFSGSGGTDYFTISSLQPEDIAATYCCQ^{*}FTSSPFTFGQG
FTSSPFTFGQG

CDR3

CDR2

2

106
 *

TKLEIK

TKLQIT

16G8 VH DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPDKGLEWVAY 10 20 30 40 50
 TM29 VH EVQLVESGGGVQPGRSLRSLSCSSGFTFSNFGMHWVRQAPDKGLEWVAY
 * * * * *
 TM29.1 VH -----AA-----NFGMH-----Y
 TM29.2 VH -----NFGMH-----Y
 TM29.3 VH -----NFGMH-----Y
-----NFGMH-----Y
 CDR1

60 70 80 90 100
 * * * * *
 ISSGSS^{TIYYAD}TLKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMY^{YCARRG}
 ISSGSS^{TIYYAD}TLKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMY^{YCARRG}
 ISSGSS^{TIYYAD}TLKG-----P-----AM=Y==RG
 ISSGSS^{TIYYAD}TLKG-----P-----AM=Y==RG
ISSGSS^{TIYYAD}TLKG-----P-----AM=Y==RG

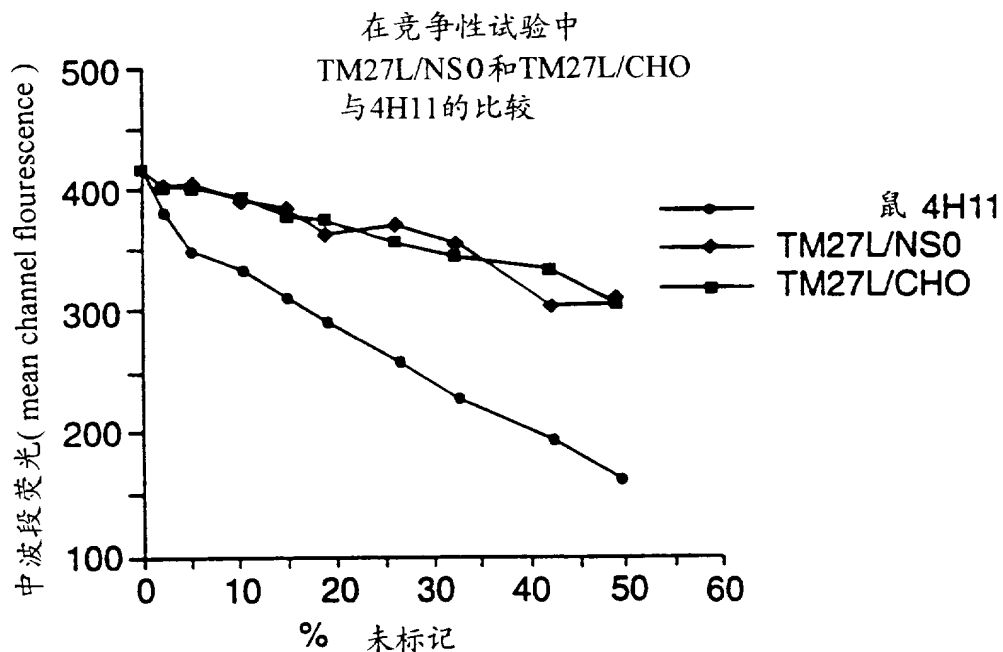
CDR2

110 117
 * *

EGAMDYWGQGT^{SVTVSS}
 EGAMDYWGQGT^{PVTVSS}
 EGAMDY-----
 EGAMDY-----
EGAMDY-----
 CDR3

图 2 (续)

图 3



鼠4H11 $y = 393.85 - 5.0535x$ $R^2 = 0.985$

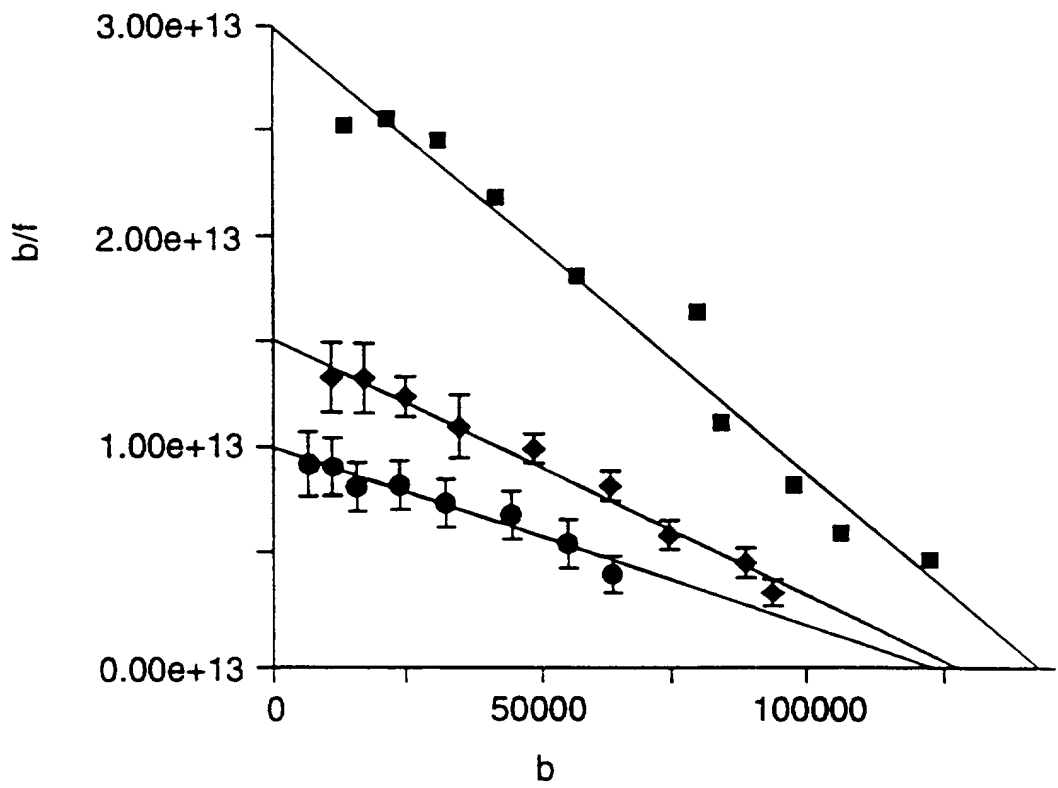
TM27L/NS0 $y = 415.77 - 2.3218x$ $R^2 = 0.939$

TM27L/CHO $y = 415.64 - 2.1880x$ $R^2 = 0.987$

| UG/ML | % 未标记的 | 鼠4H11 | TM27L/NS0 | TM27L/CHO |
|-------|--------|---------|-----------|-----------|
| 5.000 | 50.000 | 149.687 | 303.633 | 299.073 |
| 3.750 | 42.900 | 181.330 | 296.867 | 328.207 |
| 2.500 | 33.300 | 219.803 | 349.850 | 342.667 |
| 1.875 | 27.300 | 251.783 | 367.640 | 358.120 |
| 1.250 | 20.000 | 288.993 | 360.657 | 374.003 |
| 0.938 | 15.800 | 308.113 | 380.870 | 378.773 |
| 0.625 | 11.100 | 333.177 | 388.950 | 395.623 |
| 0.312 | 5.900 | 349.383 | 405.483 | 401.297 |
| 0.156 | 3.030 | 380.860 | 400.113 | 402.853 |
| 0.000 | 0.000 | 417.797 | 417.797 | 417.792 |

图 4

TM27 SCATCHARD 分析 — HPB 细胞



| | K_d (nM) |
|------------|------------|
| ● TM27 CH0 | 12.3 |
| ◆ TM27 NS0 | 8.2 |
| ■ 4H11 | 4.5 |