

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410079889.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
C12N 5/08 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年5月27日

[11] 授权公告号 CN 100491398C

[22] 申请日 2004.9.24

[21] 申请号 200410079889.3

[73] 专利权人 金立德

地址 台湾省新竹市

共同专利权人 许淑菁

[72] 发明人 金立德 许淑菁

[56] 参考文献

CN1315869A 2001.10.3

WO03059379A2 2003.7.24

CN1414976A 2003.4.30

WO03015812A 2003.2.27

审查员 于群

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 周长兴

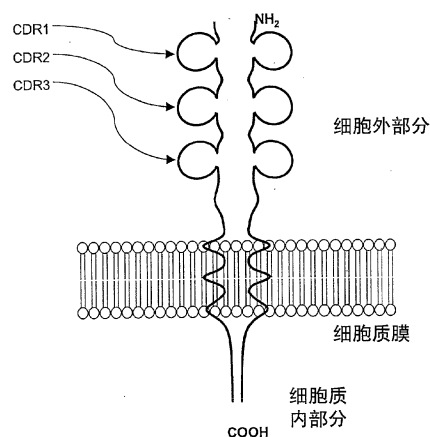
权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 4 页

[54] 发明名称

制造具有生物受体协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂的人类抗体方法

[57] 摘要

本发明是关于一种针对特定的生物生理受体来发展并取得该生物受体的协同剂、拮抗剂与反向协同剂的方法；以电脑资讯设计合成免疫原，于体外作用于人类淋巴细胞族群；本发明适用的受体为人类 CD152，特别是可分别引发抗体以作为拮抗剂、反向协同剂与协同剂的 CDR1、CDR2 与 CDR3 区域；本发明亦包括一种确认可作为受体的体外协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂的抗体药理学功效的方法。



1. 一种制造人类 CD152 受体抗体的方法，其中该抗体对受体具有协同剂、拮抗剂或反向协同剂的特性，包含有下列步骤：

(a)利用该受体的各细胞外部位的生物资讯学特征定义出该受体各别细胞外部位的多肽片段；

(b)将该多肽片段与一 T 辅助细胞抗原决定位偶合，所产生的复合多肽至少含有一 T 辅助细胞抗原决定位；

(c)制备一具有该偶合片段氨基酸序列的免疫原；

(d)以该免疫原进行体外刺激人类淋巴细胞；

(e)鉴别并筛选产生可辨识该受体的抗体的人类淋巴细胞；以及

(f)收集该抗体。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中与该细胞外部位相符合的该多肽片段氨基酸序列由 SEQ ID Nos: 2 至 7 中任一所述氨基酸序列组成。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中该 T 辅助细胞抗原决定位的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，其中该受体各细胞外部位的生物资讯学特征为疏水性、变动性或表面可能性。

5. 一种结合于偶合片段的抗体，其中该偶合片段由一 T 辅助细胞抗原决定部位及相符于 CD152 受体各细胞外部位的多肽片段组成；其中：

该 T 辅助细胞抗原决定位的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；该多肽片段氨基酸序列由 SEQ ID Nos: 2 至 7 中任一所述氨基酸序列组成。

6. 一种鉴别作为受体的体外协同剂、拮抗剂或反向协同剂的人类 CD152 受体抗体药理功效的方法，包含有下列步骤：

(a)提供一人类淋巴细胞、一分裂促进剂、一配体及选择性地多株活化剂；

(b)将该分裂促进剂或多株活化剂加入个别容器并增加配体浓度，形成一混合物；

(c)提供含一分裂促进剂的第一控制组培养基，与含一受体天然协同剂

的第二控制组培养基；

(d)将人类淋巴细胞培养于该第一控制组培养基、该第二控制组培养基及该复数个配体与分裂促进剂混合物中；

(e)决定各培养基及各混合物中人类淋巴细胞程序性凋亡与/或复制活化的程度；以及

(f)利用该混合物配体浓度增加的程序性凋亡与/或复制活化程度决定配体对受体的效用。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，其中该人类淋巴细胞为周边血液单核细胞。

8. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，其中该分裂促进剂或多株活化剂为植物血凝素、洋刀豆血球凝集素 A、美洲商陆分裂促进剂、12-十四酸佛波脂-13-乙酸盐或超抗原，以单独或混合方式使用。

9. 一种制备人类 CD152 受体抗体的方法，该抗体可辨识生理上的受体，包含有下列步骤：

(a)提供人类淋巴细胞；

(b)取依生物资讯学特征设计的合成抗原，在体外对该淋巴细胞进行免疫反应；

(c)加入 Epstein-Barr 病毒于该免疫淋巴细胞；

(d)鉴别 Epstein-Barr 病毒感染乏细胞所产生可辨识该受体的抗体；以及

(e)筛选步骤(d)所产生抗体的药理学功能。

## 制造具有生物受体协同剂、拮抗剂与/或 反向协同剂的人类抗体方法

### 技术领域

本发明是关于一种制造完全人类抗体的方法，其抗体具有该受体的协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂等性质。

### 背景技术

一般而言，药物必须到达体内细胞表面受体位置，才可与药物分子作用。药物与受体的交互作用或结合的结果可能会活化受体或阻断受体，因此在药物动力学中，一组药物或配体具有相同或相似生理效用的称为协同剂(agonist)。同理，当一药物的功效相反于其它药物或配体时，则被称为拮抗剂(antagonist)。而当一配体对于同一受体的作用相反于协同剂时，此配体被称为反向协同剂(inverse agonist)。

人类抗体已经成功地作为各种疾病的治疗药物，特别是如呼吸融合病毒(respiratory syncytial virus, RSV)等的传统感染性疾病。虽然临床上尚未完全使用，但近来仍有些报告揭示了少数具有药物动力学活性的抗体。如WO00/32231、美国专利第 5,811,097 号、美国专利第 5,855,887 号与美国专利第 6,051,227 号揭示了抗小鼠 CD152(杀手 T 淋巴细胞抗原-4, CTLA-4)的鼠源单株抗体，是将小鼠 CD152 与人类 IgG1 的融合蛋白免疫仓鼠。由于 CD152 隶属于称为 CD28 共激(costimulation)受体超家族的免疫调控受体，具有负向调节抗体及细胞免疫反应的作用，故将对此受体专一的抗体注入带有肿瘤的小鼠后，实验鼠会产生抗肿瘤免疫反应，进而抑制肿瘤生长(Leach 等人, Science 271: 1734, 1996)。此种“CTLA-4(抗体)阻断”的概念来自于 CD152 的负向功能可被抗体阻断，因此抗体可作为拮抗剂，活化了既有但微弱的抗肿瘤免疫反应。

现今已有的抗人类 CD152 人类单株抗体仅可作为拮抗阻断剂，于临床应用上有所限制。本发明公开对 CD152 受体具有不同结合及讯息传递

能力的人类抗体分子合成方法，同时揭示以体外试验方式针对 T 细胞反应来筛选此类分子的方法，以利于治疗、预防及疫苗接种等各种应用。

### 发明内容

本发明可针对特定受体或受体的特定部位制造人类抗体，且于日后使用于人类不会产生如人抗小鼠过敏反应等副作用；本发明同时提供一种简易、有效的方法，可针对特定人类 CD152 受体制造协同剂、拮抗剂及反向协同剂，且过敏反应较其它方式所产生的抗体为少，并可辨识人类 CD152 的至少三种不同抗原区；此外，本发明亦提供一种方法，以确认可作为受体的体外协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂的抗体的药理学功效；本发明还提供一种以电脑资讯建构及预测抗原决定部位氨基酸序列的方法，以诱导抗体反应。

本发明包括一种鉴别作为受体的体外协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂抗体药理功效的方法，包含有下列步骤：

- (a)提供人类淋巴细胞、分裂促进剂、配体及多株活化剂；
  - (b)将分裂促进剂或多株活化剂加入个别容器并增加配体浓度，形成一混合物；
  - (c)提供一含分裂促进剂的第一控制组培养基，与含一受体天然协同剂的第二控制组培养基；
  - (d)将人类淋巴细胞培养于该第一控制组培养基、该第二控制组培养基及该数个配体与分裂促进剂混合物中；
  - (e)决定各培养基及各混合物中人类淋巴细胞凋亡与/或分化的程度；
- 以及
- (f)利用该混合物配体浓度增加的程序性细胞死亡(凋亡)与/或分化程度决定配体对受体的效用。

此外，本发明进一步提供一种产生人类抗体的方法，此抗体可辨识至少三种不同的人类 CD152 抗原位置。因此，以一抗原免疫淋巴细胞并以重组的 CD152 抗原来筛选受免疫的淋巴细胞，即可获得辨识生理上完整受体的完全人类抗体。任何人可利用常见的延长抗体生产能力的公知技术，如：经由 EB 病毒的转形或与异骨髓瘤细胞融合以形成三元融合瘤

(trioma)细胞,使其可长久存活并稳定地产生抗体。或者可应用各种基因重组方法,使此类抗体于细菌、酵母菌或哺乳类细胞中生产。

因此,本发明的又提供了一种制备可辨识生理受体的完全人类抗体的方法,其步骤包含有:

- (a)使用一源自静息(未受抗原刺激)人类捐赠者的淋巴细胞;
- (b)以电脑辅助的生物资讯设计出抗原进行体外免疫该淋巴细胞;
- (c)加入 EB 病毒于该免疫淋巴细胞;
- (d)确认 EB 病毒感染的细胞所产生可辨识该受体的抗体; 以及
- (f)筛选步骤(d)所产生抗体的药理学功能。

本方法还可于步骤(b)之前加入一步骤(a1),由淋巴细胞中移除  $CD8^+$  及  $CD56^+$  细胞。 $CD8^+$  及  $CD56^+$  细胞的移除可依据任何已建立的公知技术,如可利用特定的  $CD8$  及  $CD56$  抗体来移除这类细胞。在一实施例中,这些抗体可连接于磁珠。另外,本方法可于步骤(d)后另外包含一步骤(e),形成一三元融合瘤细胞或基因重组免疫球蛋白以获得完全的人类单株抗体。其中多株抗体可利用本发明方法进行制备。

本发明中,抗体辨识抗原较佳为具有  $Kd$  值约 100nM 或更小、约 30nM 或更小、约 10nM 或更小、约 3nM 或更小,或约 1nM 或更小的抗原;抗体为 IgG 抗体,较佳为 IgG1 及 IgG4。

确认或筛选方法亦可使用其它分裂促进剂或多株活化剂,例如洋刀豆血球凝集素 A(concanvalin A, ConA)、美洲商陆分裂促进剂(Pokeweed mitogen, PWM)、12-十四酸佛波脂-13-乙酸盐(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)及超抗原如葡萄球菌肠毒素 A(SEA),以取代或用于与其中的植物血凝素(phycohemagglutinin, PHA)接合。本发明同时提供一包含抗体的药物组成物,其可包含药学上可接受载体或佐剂。

#### 附图说明

图 1A 表示 T 细胞表面上  $CD152$  受体的同源二聚体蛋白质结构与三个类似免疫球蛋白 CDR 区的相对位置。

图 1B 是转译于 cDNA(基因库编号 L15006,NCBI 蛋白质编号 P16410)的人类  $CD152$  氨基酸序列。星号显示成熟多肽、膜间区及胞内区的起点。

CDR1、CDR2 与 CDR3 类似区以方框表示。

图 2A、2B 与 2C 分别描述人类 CD152 的 CDR1 与相连区的疏水性、链变动性与表面可能性。图 2D、2E 与 2F 分别描述 CDR2 与相连区的疏水性、链变动性与表面可能性。

图 2G、2H 与 2I 分别描述 CDR3 与相连区的疏水性、链变动性与表面可能性。箱型区指 CDR 类似区，其氨基酸序列显示于下方。箭头标示出所预测氨基酸组成的链结构。

图 3 显示 PHA 刺激的人类 PBMC 细胞分化(□)与凋亡(■)的反应情形。图 3A、3B、3C、3D 与 3E 分别为 PHA 单独刺激(1.25、5 及 20  $\mu$ /ml)、1.25  $\mu$ g/ml PHA 伴随交联性 CD80(0.2、1 及 5  $\mu$ g/ml)、抗-CDR1、抗-CDR2 及抗-CDR3 抗体(0.1、1 及 10  $\mu$ g/ml)所得的结果。

#### 具体实施方式

除非另有指明，本发明所使用的名词定义如下：

配体是指结合至另一分子的化合物，例如受体蛋白；

受体是指与细胞外生理讯号作用并转换为细胞内部效应的蛋白；

完全人类抗体是指一抗体仅含有人类序列；

静息(naïve)人类捐赠者是指未暴露于所欲抗原的人，其血液可作为免疫细胞或因子的来源，静息捐赠者血液测不到抗原的循环抗体，典型的静息人类捐赠者为健康正常的捐血人，其 HIY 抗体侦测为持续阴性；以抗原免疫细胞或动物是指将细胞或动物暴露于抗原的动作，细胞或动物可以任何方式进行免疫，只要细胞或动物接触到抗原即可。

体外定位免疫是指体外淋巴细胞刺激过程，以达到对所欲蛋白片段的抗体反应，依据合成的异质偶合决定部位免疫原，其含有 T 细胞与 B 细胞抗原决定部位的多肽，可引发体液免疫反应以对抗整个蛋白；

治疗或改善疾病或医疗状况是指减少或消除疾病或医学上的症状，或缓和疾病/医疗状况的进程；

预防疾病或医学症状是指检测一不具疾病或医学症状的受测者，其中，最后受测者未发展成带有该疾病/医学状况，或者疾病/医疗状况仅些许发展。

有效量是指一药剂的量足以达到所欲效用，以抗体的治疗或改善一疾病而言，一有效量意谓足以降低或消除疾病症状或缓和疾病进程的抗体量；

协同剂是一配体具有与另一天然发生的内生性配体或配体族群相同或相似效用者的；

拮抗剂是一配体或药物的作用阻断一协同剂者；

反向协同剂是指一配体，其产生的效用相反于协同剂却可占用相同的受体；

受体阻断是指利用药理拮抗剂结合至受体来阻断天然内生性配体(如荷尔蒙或神经传导因子)结合至受体后所发生的效用。

样本是指分装物或物质、材料或族群的代表部分，一样本可为水、污物、油、砂、血液、生物组织、尿液或粪便的样本；

生物样本是指由生物性受测者如动物、植物或微生物所收集到的样本。

本发明亦包括药物组成物，包含可作为活性成份的一或多种抗体，并配合药学上可接受载体或佐剂。在制备本发明组成物方面，活性成分/抗体通常与佐剂混合、以佐剂稀释或以载体包封，其型式可制成胶囊、小袋、纸样或其它容器。

当药学上可接受的佐剂为一稀释剂时，可为固体、半固体或液体材料，并作为活性成分的溶媒、载体或媒介。因此，本组成物可为溶液(尤指无菌的可注射溶液)、药片、药丸、粉末、锭剂、小袋、胶囊、酏剂、悬液、乳液、糖浆、气雾剂(如固体或液体媒介)、含有如10%重量百分比抗体的药膏、软或硬凝胶胶囊、栓剂及无菌包装粉末等形式。

适用佐剂的某些范例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻多醣、黄着胶粉、凝胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、无菌水、糖浆、甲基纤维素。本组成可还包括：润滑剂例如滑石粉、硬脂酸镁及矿物油；保湿剂；乳化剂及悬浮剂；防腐剂如甲基-与丙基羟苯酸酯；甘味剂；以及调味剂。本发明组成物可配置为供应病患投药后的快速、缓慢或延迟释放其活性成分，其方式如公知技术中所示。

本发明新组成物的液体形式可配置成口服或注射给药,包括水溶液(例如 PBS)、适当调味糖浆、水性或油性悬液,及经调味的乳液,其含有可食用油如玉米油、棉籽油、芝麻油、椰子油、或花生油,以及酞剂与类似的药学上溶媒。本发明的其它适用配,方可见于雷氏药学大全(*Remington's Pharmaceutical Science*)。

下列范例只是用来对本发明作说明,非做为局限本发明范畴。例如,类似的研究亦针对其它 CD28 受体超家族成员及其如 CD28 异型(CD28i)、可诱发的共激蛋白(ICOS)、B 与 T 淋巴细胞衰减蛋白(BTLA)及程序细胞死亡蛋白-1(PD-1)。同样地,亦可应用于其它受体家族,包括离子通道、G-蛋白偶合受体、酪氨酸激酶连接受体及转录因子等。

表一:

多肽	本发明多肽的氨基酸序列	
	氨基酸序列	SEQ ID NO
TT	N'-QYIKANSKFIGITEL-C'	1
CDR1(ext)	N'-EYASPGKATEVRVTV-C'	2
CDR2(ext)	N'-AATYMMGNELTFLDD-C'	3
CDR3(ext)	N'-KVELMYPPPYLIG-C'	4
TT-CDR1(ext)	N'-QYIKANSKFIGITELEYASPGK ATEVRVTV-C'	5
TT-CDR2.(ext)	N'-QYIKANSKFIGITELAATYMM GNELTFLDD-C'	6
TT-CDR3(ext)	N'-QYIKANSKFIGITELKVELMY PPPYLIG-C'	7

### 实施例一、多肽抗原的制备

人类 CD152 受体的整体结构绘于图 1A。符合于人类 CD152 的氨基酸序列则列于图 1B。由整合科学文献所得的资讯,CDR3 区与天然 CD80 及 CD86 配体之间的重要关联性因而建立。另外的证据显示,位于 CDR1 区的氨基酸扮演某种与 CD80/CD86 作用的角色。然而,CDR2 的协同剂结合机制至今却尚未被完整探讨。

想要引发可结合至本体蛋白的抗体,所使用蛋白的多肽必须具有类似其构造的特性。因此,CDR1、CDR2 与 CDR3 区的完整序列被保留下来以设计合成的免疫原。此外,延长每个 CDR 多肽部分以符合前述抗原决定部位模式。作为一有效免疫原,若欲实际使用所产生的抗体,则此多肽

必须选自蛋白的易构区(accessible region)。蛋白的易构区为暴露于结构外侧的部位。由于这些区域与水溶液环境接触,故经常为亲水性。而后人们使用 GeneWork<sup>®</sup>软件(IntelliGenetics)建立疏水性绘图以决定延长方向。链变动性或表面可能性亦以 GeneWork<sup>®</sup>计算,而 CDR 附近区域亦视为多肽设计的二级参数(图 2)。

经运算后所得的高分 CDR 多肽用于连接破伤风毒素“辅助”序列,其氨基酸位置为 830-844(SEQ ID N0: 1)。

#### 实施例二、抗 CD152 人类抗体的产生

健康血液捐赠者经 HIV-1/2、HTLV-I/II、HCV、HbsAg 筛选为阴性,并含有正常量的丙胺酸转移酶(ALT)的血液,来自中华血液基金会台南捐血中心(台南,台湾)。周边血单核细胞(PBMC)以密度离心(400xg)方式分离于 Ficoll-Paque(Amersham Biosciences);细胞随后以 PBS 洗涤两次并以 100xg 离心收集。

所得 PBMC 首先以 CD45RO MACS 微珠(Miltenyi Biotec)进行磁标定,再以 VarioMACS(Miltenyi Biotec)进行分离。在磁标定后,将细胞通过分离管柱,其置于强力永久磁铁上。通磁管柱的基质可产生高阶磁场。磁标定细胞会停留于管柱内并滤出未标定细胞。在管柱磁场解除后,冲提出细胞。冲提出的 CD45RO<sup>+</sup>细胞以 100xg 离心取得并立即使用。将 CD45RO<sup>+</sup>T-细胞培养于组织培养瓶中,其密度为  $2 \times 10^6$  细胞/mL RPMI-1640(HyQ<sup>TM</sup>, HyClone),并补充 1x 非必需氨基酸(Life Technologies)、10%人类血清、50  $\mu$  m/ml 庆大霉素/卡那霉素(China Chemical & Pharmaceutical)、50  $\mu$  M 2-乙基硫醇及 10  $\mu$  g/ml 美洲商陆分裂促进剂(PWM, Sigma)。培养 24 小时后,细胞以 400xg 离心并移出。最后,收集上清液以制备 CD45RO<sup>+</sup>T-细胞替代因子,以 0.45mm 滤膜过滤并于-20 $^{\circ}$ C 冷冻储存。

将 PBMC 以磁性细胞去除法去除细胞毒性族群,以体外抑制免疫反应。胶体超磁性微珠结合至单株抗小鼠 CD8 与抗 CD56 抗体(Miltenyi Biotec)的用法如前述。细胞毒性细胞去除的 PBMC 于体外以二步骤免疫法进行免疫作用:初级免疫作用,是将细胞培养于含 10nM 多肽抗原的培养基 6 天,亦即 TT-CDR1<sub>(ext)</sub>、TT-CDR2<sub>(ext)</sub>与 TT-CDR3<sub>(ext)</sub>于含 50  $\mu$  M 2-乙基硫醇、10%热去活化人类血清、0.05ng/mlrIL2(Calbiochem)及 25%

(v/v)CD45RO<sup>+</sup>T 细胞替代因子, 在第 7 天收取初级免疫细胞并以 40% Ficoll- Paque 离心; 针对次级免疫反应, 将  $3 \times 10^7$  个细胞与多肽抗原混合于事先以  $5 \mu\text{g/ml}$  的 CD40L(CD154, Vinci-Biochem)固定隔夜的培养瓶; 再以含有 5% 人类血清、 $50 \mu\text{M}$  2-乙基硫醇及  $10 \text{ nM}$  多肽抗原的培养基培养细胞 3-5 天。

体外免疫的细胞随后以 EB 病毒感染: 将  $10^7$  个淋巴细胞于  $37^\circ\text{C}$  下培养 2 小时, 以 1ml 含 EB 病毒的上清液进行再悬浮, 此上清液源自产生 EB 病毒的狨猴细胞株 B95-8(ATCC CRL 1612)。将感染的细胞以  $10^5$ /孔的数量种于 96 孔盘并加入丝裂霉素(Kyowa Hakko Kogyo)处理的 PBMC 以作为喂养细胞( $10^4$ /孔)。

抗体专一性 ELISA 的进行, 首先于室温下以  $1 \mu\text{g/ml}$  BHK 细胞表现的重组人类 CD152(CTLA-4)- $\mu\text{Ig}$  融合蛋白(Ancell Corporation)、 $1 \mu\text{g/ml}$  单株鼠类 IgG2a(Ancell)、 $10 \mu\text{g/ml}$  的牛血清白蛋白(BSA, Sigma)或破伤风类毒素(ADImmune Corporation)隔夜涂覆于微量滴定盘。将培养的上清液以含  $0.5 \text{ M}$  氯化钠及  $0.1\%$  Tween-20 的  $10 \text{ mM}$  磷酸钠缓冲液,  $\text{pH } 8.0$  稀释至所欲浓度。涂覆的滴定盘以稀释的培养基上清液进行培养, 洗涤后以过氧化酶标定的山羊抗体辨识人类 IgG(Zymed Laboratories), 并加入  $100 \mu\text{l}$  色原基质邻-苯二胺(OPD, Sigma)显影 15 min; 30min 后加入  $1 \text{ M}$  硫酸停止反应, 于  $490 \text{ nm}$  吸光值下判读结果。

以上述固态 ELISA 确认 EB 病毒感染的淋巴细胞所释出可能的抗-CD152 抗体。每孔所含淋巴细胞的专一性抗体生成量的积分, 是以下列标准进行: (a)重组人类 CD152- $\mu\text{Ig}$  融合蛋白的 OD 值至少为阴性对照组 OD 值的五倍; 以及(b)反应性指数(RI) $>2$ , 其中  $\text{RI} = [\text{OD}_{\text{CD152-}\mu\text{Ig}} - \text{OD}_{\text{培养基控制组}}] / [\text{OD}_{\text{鼠类 IgG2a}} - \text{OD}_{\text{培养基控制组}}]$ 。

含淋巴细胞的孔若于上述分析中呈阳性, 则收集其上清液, 并以 ELISA 定量及标准化以进一步研究。CDR 区反应性的确认是利用个别多肽进行 ELISA 竞争反应。这些培养孔以限数稀释法转殖并冷冻保存。

实施例三、改变抗 CD152 抗体的能力以诱发细胞凋亡及细胞分化并与天然协同剂相比较

不同抗-CD152 人类抗体结合位置的确认是将合成的多肽相应于一级

烷基胺衍生的纤维素膜(Rapp Polymere GmbH)。为进一步评估不同抗-CD152 抗体与较佳的天然协同剂 CD80 的药理学效用, 进行人类周边淋巴细胞体外植物血凝素刺激后的细胞生长及 PBMC 培养。简单而言, 准备平底的 96 孔微量滴定盘并加入 50  $\mu$ l 细胞悬浮液( $10^5$  个细胞)、60  $\mu$ l 含 PHA 培养基(培养的最终浓度为 1.25  $\mu$ g/ml, Amersham Biosciences AB)、40  $\mu$ l 自体血浆及 50  $\mu$ l RPMI-1640 培养基, 其含抗-CD152 抗体或单体的人类 CD80-muIg 融合蛋白(Ancell)浓度范围由 0.2 至 5  $\mu$ g/ml。在 CD80 刺激反应中, 加入 5  $\mu$ g/ml 山羊抗小鼠 IgG2a(Southern Biotechnology Associates)以提供交联形式的讯号。培养的总容积为 200  $\mu$ l。培养于 37 $^{\circ}$ C 的 5%CO<sub>2</sub> 潮湿环境中达 96h。在收集前 204 小时, 每孔加入 50  $\mu$ l 含 0.5  $\mu$  Ci 的氘化胸腺嘧啶的培养基(TRA 306, Amersham, 特定活性 2 Ci/mol)。以玻璃纤维滤膜配合半自动多重收集器(PHD, Cambridge Technology Inc.) 收集培养基。细胞结合 [<sup>3</sup>H]-胸腺嘧啶的决定是以 LKB 液体闪烁计数器进行计数。在有些培养中, 末期以锥虫蓝(Trypan blue)染剂进行细胞存活率的测量。进行相同的三重复培养, 并以三者的中间值进行运算。

评估细胞凋亡百分比, 是将细胞以 200xg 离心, 再悬浮于冰冷的 80% 酒精并且剧烈震荡混合直到最终密度  $1 \times 10^6$ /ml。将细胞培养于 4 $^{\circ}$ C 至少 30min。酒精固定的细胞随后离心并于 1 ml 碘化丙啶(PI, Sigma)染剂(PBS 0.15M pH7.4、0.1% Triton X-100、0.1mM EDTA 二钠盐、50  $\mu$ g/ml RNase A 及 50  $\mu$ g/ml PI)中进行再悬浮。样本于室温下黑暗保存直到分析, 并于 24 小时内进行。细胞核内的 DNA 量以碘化丙啶染色及 FACScan 细胞仪配合 Lysis H software(Becton Dickinson)决定。凋亡细胞的决定是利用流式细胞仪测量碘化丙啶染色后的次双套 DNA 百分比。

提供一盘抗-CD152 的人类抗体, 以决定这些配体在 PHA 活化下对人类 T 细胞的功用, 可产生中度细胞分化与细胞凋亡(图 3A)。交联的 CD80 所诱发的细胞凋亡并未观察到有明显细胞分化(图 3B)。类似地, 含 CDR3 的多肽免疫原所诱发的抗体亦引发快速的细胞死亡而非分化, 因而确认了协同剂活性(图 3E)。CDR1 诱发的人类抗体的刺激作用明显降低, 但未完全去除 PHA 驱动力的细胞死亡(图 3C)。当 PHA 活化的 PBMC 单独与 CDR2 诱发人类抗体培养时, 可观察到高度且具再现性的细胞分化情形, 且 PHA

造成的细胞死亡可完全去除(图 3D)。由抗-CDR2 诱发的细胞分化所造成 CD152 的驱动情形类似于 5ng/ml IL-2 处理情形，并造成典型凋亡细胞形态变化现象的消失(如，细胞膜泡沫化与细胞不完整及核形成小泡)。

上述实施例仅是为了方便说明而举例而已，本发明所主张的权利范围自应以申请专利范围所述为准，而非仅限于上述实施例。

## 序 列 表

- <110> Chin, Li-Te  
Hsu, Shu-Ching
- <120> 具有协同剂、拮抗剂或反向协同剂特性的人类抗体制造方法
- <130> P7226/0600
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 破伤风毒素
- <220>  
<221> 多肽  
<222> (1)..(15)
- <300>  
<301> Stephane Demotz, Antonio Lanzavecchia, Ulrich Eisel, Heiner Niemann, Christian Widmann, and Giampietro Corradin  
<302> 描述多种 DR-限制的 T 细胞抗原决定部位  
<306> 394-402  
<307> 1989-01-15  
<313> (1)..(15)
- <400> 1
- Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu  
1                    5                    10                    15
- <210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 现代人
- <220>  
<221> 多肽

<222> (1)..(15)

<400> 2

Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val  
1                   5                   10                   15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 现代人

<220>

<221> 多肽

<222> (1)..(15)

<400> 3

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp  
1                   5                   10                   15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 现代人

<220>

<221> 多肽

<222> (1)..(15)

<400> 4

Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly  
1                   5                   10                   15

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> 合成 CDR 多肽并用于制备相合的抗原决定部位以连接源自破伤风病毒“TT”序列。

<220>

<221> 多肽

<222> (1)..(30)

<400> 5

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Glu  
1                   5                   10                   15

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val  
                  20                   25                   30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> 合成 CDR 多肽并用于制备相合的抗原决定部位以连接源自破伤风病毒“TT”序列。

<220>

<221> 多肽

<222> (1)..(30)

<400> 6

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Ala  
1                   5                   10                   15

Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp  
                  20                   25                   30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工合成

<220>

<223> 合成 CDR 多肽并用于制备相合的抗原决定部位以连接源自破伤风病毒“TT”序列。

<220>

<221> 多肽

<222> (1)..(30)

<400> 7

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Lys  
1                   5                   10                   15

Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly  
                  20                   25                   30

<210> 8

<211> 223

<212> PRT

<213> 现代人

<220>

<221> 多肽

<222> (1)..(223)

<300>

<308> P16410

<309> 2004-03-15

<313> (1)..(223)

<400> 8

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala  
1                   5                   10                   15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro  
                  20                   25                   30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala  
                  35                   40                   45

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

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln  
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr  
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val  
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile  
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly  
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser  
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe  
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys  
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu  
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn  
210 215 220

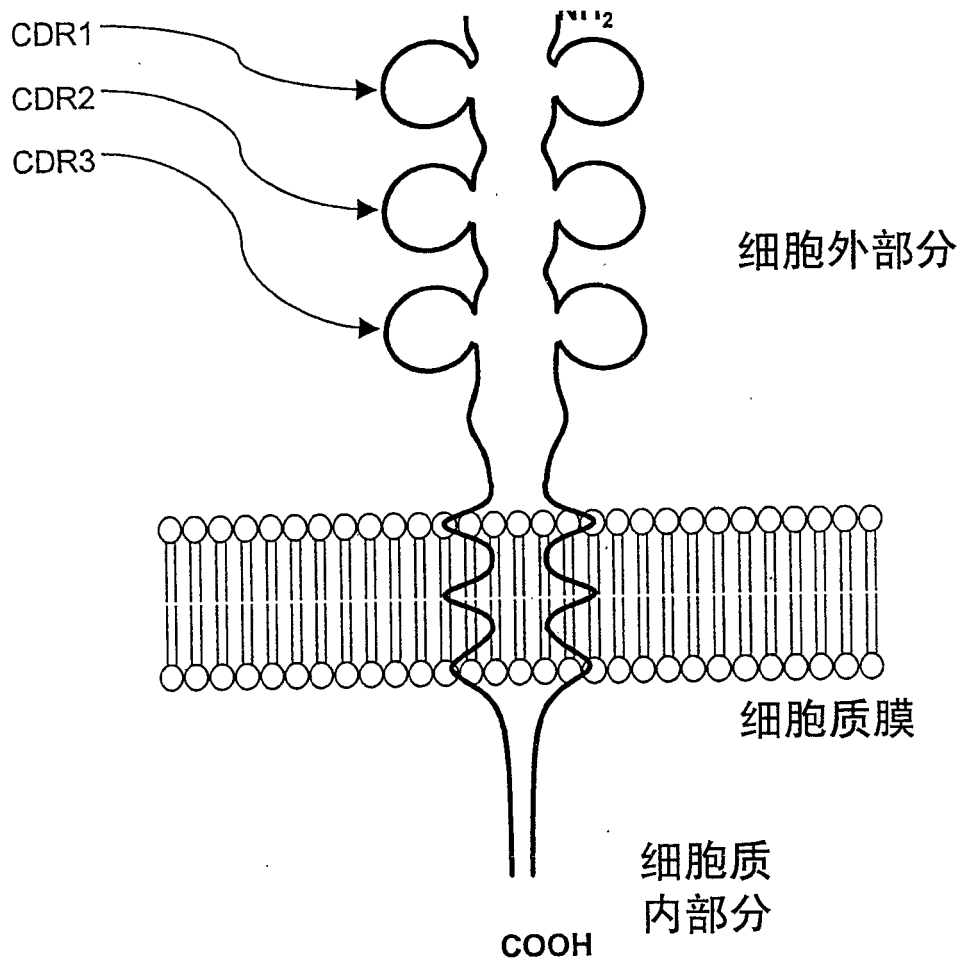


图 1A

1 MACLGFQRHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS 50  
51 RGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD 100  
101 SICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPY LGIGNGTQIY 150  
151 VIDPEPCPDS DFLLWILAAV SSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLETTGV 200  
201 YVKMPPEPE CEKQFPYFI PIN 223

图 1B

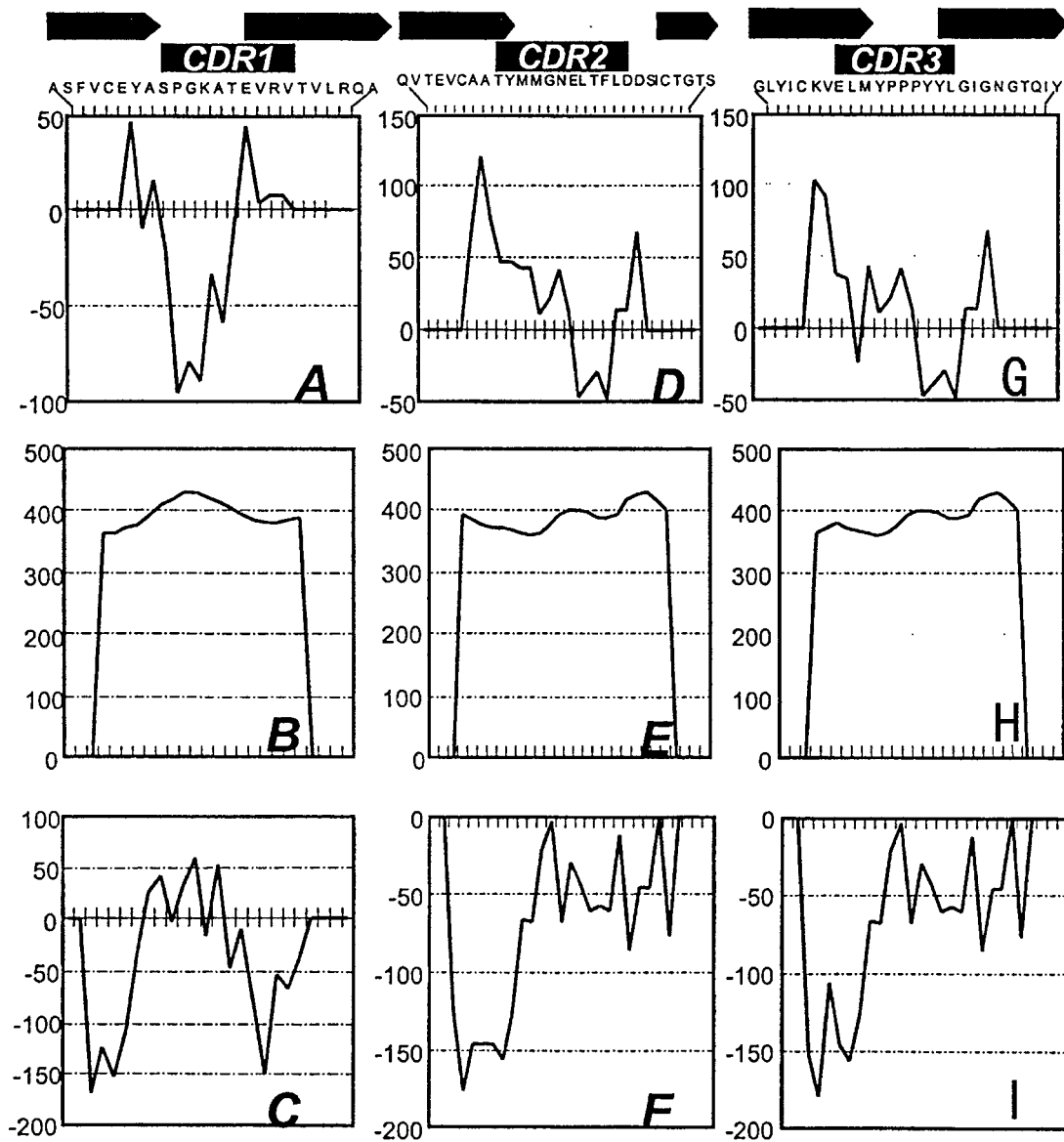


图 2

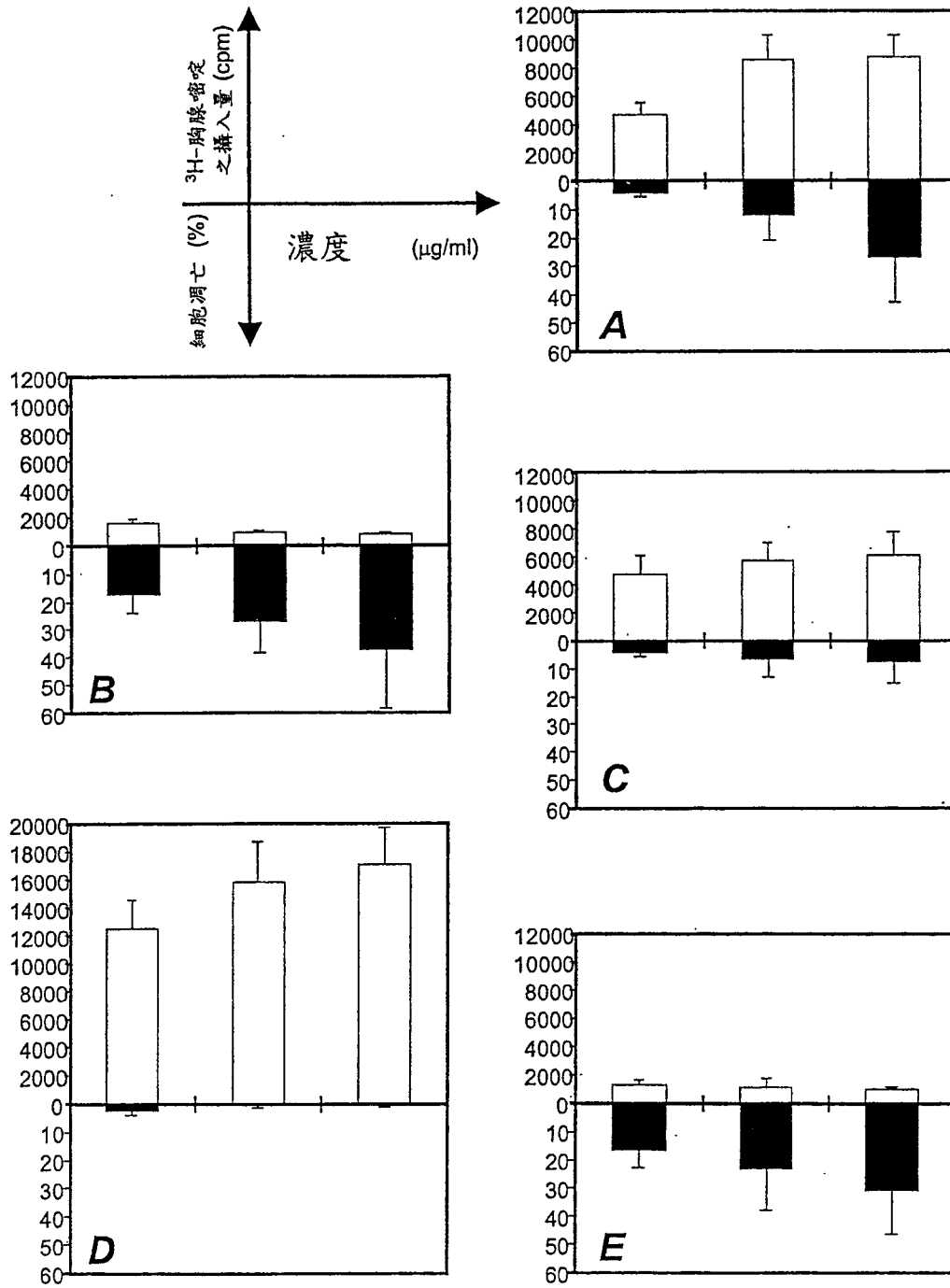


图 3

专利名称(译)	制造具有生物受体协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂的人类抗体方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN100491398C</a>	公开(公告)日	2009-05-27
申请号	CN200410079889.3	申请日	2004-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	金立德 许淑菁		
申请(专利权)人(译)	金立德 许淑菁		
当前申请(专利权)人(译)	金立德 许淑菁		
[标]发明人	金立德 许淑菁		
发明人	金立德 许淑菁		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 A61P35/00 C12N5/08 G01N33/53		
代理人(译)	周长兴		
审查员(译)	于群		
其他公开文献	CN1752106A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明是关于一种针对特定的生物生理受体来发展并取得该生物受体的协同剂、拮抗剂与反向协同剂的方法；以电脑资讯设计合成免疫原，于体外作用于人类淋巴细胞族群；本发明适用的受体为人类CD152，特别是可分别引发抗体以作为拮抗剂、反向协同剂与协同剂的CDR1、CDR2与CDR3区域；本发明亦包括一种确认可作为受体的体外协同剂、拮抗剂与/或反向协同剂的抗体药理学功效的方法。

