

(此處由本局於收  
文時黏貼條碼)

761286

# 發明專利說明書

公告本

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

修正  
補充  
99年5月4日

※申請案號：95111734

※申請日期：95年03月31日

※IPC分類：

C12N 15/29 (2006.01)  
A61K 34/395 (2006.01)  
A61P 7/00 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)

## 一、發明名稱：

(中) 抗CD20單株抗體  
(英)

## 二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 生物醫藥股份有限公司  
(英) BIOMEDICS INC.

代表人：(中) 1. 中村徹雄  
(英) 1. NAKAMURA, TETSUO

地 址：(中) 日本國東京都中央區豐海町四番一八號  
(英) 4-18, Toyomi-cho, Chuo-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中英) 日本 JAPAN

## 三、發明人：(共 4 人)

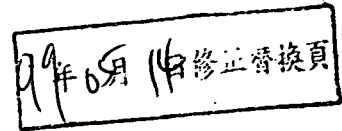
1. 姓 名：(中) 沼崎正德  
(英) NUMAZAKI, MASANORI  
國 籍：(中) 日本  
(英) JAPAN

2. 姓 名：(中) 中村徹雄  
(英) NAKAMURA, TETSUO  
國 籍：(中) 日本  
(英) JAPAN

3. 姓 名：(中) 白田定和  
(英) USUDA, SADAKAZU  
國 籍：(中) 日本  
(英) JAPAN

4. 姓 名：(中) 艾托多 帕德蘭  
(英) PADLAN, EDUARDO A.  
國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.



#### 四、聲明事項:

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☐ 主張國際優先權:

【格式請依: 受理國家(地區); 申請日; 申請案號數 順序註記】

1. 日本 ; 2005/03/31 ; 2005-103093 ☒ 有主張優先權
2. 日本 ; 2005/12/28 ; 2005-378466 ☒ 有主張優先權

## 五、中文發明摘要

發明之名稱：抗 CD20 單株抗體

本發明提供一種藉由結合於細胞表面的 CD20 抗原，誘導出特異性生物學反應之單株抗體。選殖對於 CD20 抗原的細胞外表位具有強結合親合性，且具有細胞增殖阻礙活性等生物學活性之單株抗體。且藉由嵌合體化或人類化該單株抗體而開發出對於與 B 細胞相關疾病之治療藥。

## 六、英文發明摘要

發明之名稱：

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

(1)

## 九、發明說明

### 【發明所屬之技術領域】

本發明系關於對於人類 CD20 抗原之單株抗體，再藉由基因重組以嵌合抗 CD20 單株抗體及人類化抗 CD20 單株抗體、或彼等任一作為有效成分的對 B 細胞性腫瘤或免疫疾病之治療藥。

### 【先前技術】

作為辨識 CD20 抗原的單株抗體，已知 B1、2B8(嵌合抗體名為 rituximab)、1F5、2H7 等。其中美國 IDEC Pharmaceuticals Corporation 開發的嵌合抗 CD20 單株抗體之 rituximab 為低惡性度非何杰金氏淋巴瘤 (Non-Hodgkin's Lymphoma) 之標準治療藥劑，其他亦發現對於有關 B 細胞的多數免疫疾病具有治療效果。例如，對於可能與慢性淋巴性白血病等惡性腫瘤以外，自身免疫溶血性貧血症、特發性血小板減少症、紫斑病等病原性自身抗體有關之自身免疫疾病、慢性關節風濕或泛發性硬化症之發炎性疾病具有效果(非專利文獻 14~17)。

CD20 為表現於 B 淋巴細胞表面之分子，發現於末梢血、脾臟、扁桃、骨髓中之正常 B 細胞等以外之幾乎所有惡性腫瘤 B 細胞中。該分子由 297 胺基酸所成，4 次貫通細胞膜，細胞內具有 C 末端、N 末端之雙方，第 3 次與第 4 次膜貫通區域間具有不含糖鏈之 43 個胺基酸殘基所成唯一暴露於細胞外之環(非專利文獻 1、9)。CD20 分子一

(2)

般以 4 量體的形式存在，且可與其他微量成分形成複雜的複合體(非專利文獻 18)。CD20 蛋白質為，除沒有對細胞外之分泌或切斷以外，幾乎無藉由抗體結合之細胞內吸收，故對於經抗體的標識細胞而言細胞傷害性機構可發揮效果(非專利文獻 1~3)。

即使分子尺寸較為小，CD20 有著作為細胞外的複合體之表現型態的影響而具有多樣化的表位，與此結合的抗體有著各種相異的生物學反應。例如，B 細胞受體之向下調節、MHC 級 II 抗原或黏著分子的表現增加、hyper-cross-linking 下的  $\text{Ca}^{2+}$  釋出活化、與淋巴細胞功能相關之抗原 1 非依賴性同型黏著之阻礙、細胞凋亡誘導或相反地促進細胞增殖等非常相異的活性(非專利文獻 4~13)代表性抗 CD20 抗體之 rituximab、B1、1F5、2H7 中，其特性及生物學功能為相異，僅定義結合於 CD20 之單株抗體，無法特定其生物學性質。

構成 CD20 的細胞外區域之分子為不溶性。來自細胞溶解物或基因重組蛋白質之 CD20 分子可使用界面活性劑或強鹼而使得可溶化，如此處理條件下難以維持自然之立體結構。因此，可使用作為欲得到抗體的免疫源之 CD20 陽性 B 細胞株，難以得到免疫刺激性較弱的成熟抗體產生細胞克隆。

2005 年至今，作為治療藥劑被認可的抗 CD20 單株抗體僅為老鼠/人類的嵌合之 rituximab。與異種動物的嵌合分子因具有抗原性，可不適用於一般治療藥上，但抗

(3)

CD20抗體因具有標的性地除去含正常細胞的所有 B 細胞之性質，故幾乎無抗原性。然而，雖僅為數百分比之可能性，但有著治療期間誘發中和抗體之事例報告，故由隨著投予量或期間可更提高其可能性來看，可望開發出具有與人類相近的序列之人類化抗體或人類抗體。嵌合抗體之另一缺點為，血中半衰期較為短， $\beta$  半衰期僅為 3 ~ 4 天。對於 Rituximab 的復發低惡性度 NHL 之美國臨床試驗的效率為單獨投予下 50% 弱，顯示 rituximab 無效或效果差的病患為 50% 以上。中惡性度 NHL 時的效果更低微 30% 程度(非專利文獻 14)。因此，必須追究患者反應之相異原因、背景之同時可望開發出具有優良效果的抗體。

非專利文獻 1：Leukocyte Fact Book 2nd Edition, Academic Press

非專利文獻 2：Stashenko P et al., J Immunol 1980;125 : 1678-85

非專利文獻 3：Anderson KC et al., Blood 1984 ; 63 : 1424-33

非專利文獻 4：Shan D et al., Blood 1998 ; 91 : 1644-52

非專利文獻 5：Flieger D et al., Cell Immunol 2000;204:55-63

非專利文獻 6：Mathas S et al., Cancer Res 2000 ; 60:7170-6

非專利文獻 7：Cardarelli PM et al., Cancer Immunol Immunother 2002;51:15-24

非專利文獻 8：Pedersen IM et al., Blood 2002;99:1314-9

非專利文獻 9：Deans JP et al., Immunol 2002;107:176-82

(4)

非專利文獻 10：Golay JT et al., J. Immunol 1992; 149:300-8

非專利文獻 11：Bourger I et al., Eur J Immunol 1993; 23:768-71

非專利文獻 12：White MW et al., J Immunol 1991; 146:846-53

非專利文獻 13：Shan D et al., Cancer Immunol Immunother  
2000; 48:673-83

非專利文獻 14：Coiffer B et al., Blood 1998; 92:1927-32

非專利文獻 15：Edward JC et al., Rheumatology (Oxford) 2001  
; 40:205-11

非專利文獻 16：Zaja F et al., Haematologica 2002; 87:189-95

非專利文獻 17：Perrotta S et al., Br J Haematol 2002; 116:465-7

非專利文獻 18：Polyak MJ et al., Blood 2002; 99:3256-62

#### 【發明內容】

本發明的課題為提供一種比過去抗 CD20 單株抗體治療藥更優良之具有生物學功能的單株抗體。

本發明者藉由任意組合融合將複數的 CD20 抗原陽性 B 細胞株、基因工學之人類 CD20 抗原表現於細胞膜上的哺乳動物細胞、及 GST(glutathione S-transferase) 蛋白質之人類 CD20 蛋白質作為免疫源，可得到對於人類 CD20 抗原為特異性結合之來自老鼠的抗 CD20 單株抗體。其中有些於未存在效應子細胞下於體外 CD20 表現細胞培養中，具有含細胞凋亡之直接性細胞增殖阻礙活性。又，與細胞凋亡等細胞增殖阻礙活性的有無無關，含其他選出的來自老鼠之抗 CD20 單株抗體，具有藉由嵌合化具有效

(5)

果之補體或抗體依賴性之細胞障礙性。其中被判斷為最具可望生物學活性之抗體的胺基酸序列經人類化後可作為治療藥使用的抗 CD20單株抗體。藉此完成本發明。

本發明為提供以下者。

(1)一種來自老鼠的抗 CD20單株抗體，其特徵為具有效應子細胞非存在下之人類 CD20抗原表現細胞培養中，對於該人類 CD20抗原表現細胞含有細胞凋亡的增殖阻礙活性。

(2)如(1)之抗 CD20單株抗體，其中 H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域胺基酸序列各為序列號碼 1及 7、序列號碼 2及 8、或序列號碼 15及 17。

(3)一種雜交瘤，其特徵為產生如(1)或(2)所記載的抗 CD20單株抗體者。

(4)一種嵌合抗 CD20單株抗體，其特徵為融合如(2)之抗 CD20單株抗體之可變區域胺基酸序列、與人類免疫球蛋白恆定區域胺基酸序列者。

(5)一種抗 CD20單株抗體，其特徵為使用如(2)之抗 CD20單株抗體之可變區域 CDR 的胺基酸序列、與人類免疫球蛋白之胺基酸序列經人類化者。

(6)如(5)之人類化抗 CD20單株抗體，其中 H 鏈可變區域胺基酸序列的 L 鏈可變區域胺基酸序列的組合各為序列號碼 19及 23、序列號碼 19及 24、序列號碼 19及 25、序列號碼 19及 26、序列號碼 20及 23、序列號碼 20及 24、序列號碼 20及 25、序列號碼 20及 26、序列號碼 21及 23、序列

(6)

號碼 21 及 24、序列號碼 21 及 25、序列號碼 21 及 26、序列號碼 22 及 23、序列號碼 22 及 24、序列號碼 22 及 25、序列號碼 22 及 26。

(7) 如 (4) 至 (6) 中任一項之抗 CD20 單株抗體，其中人類補體存在下對於 CD20 抗原表現細胞具有細胞障礙性者。

(8) 一種哺乳動物細胞，其特徵為插入編碼如 (4) 至 (7) 中任一項之抗 CD20 單株抗體的胺基酸序列之鹼基序列。

(9) 如 (8) 之哺乳動物細胞，其為 CHO 細胞。

(10) 一種來自老鼠的抗 CD20 單株抗體，其特徵為 H 鏈可變區域胺基酸序與 L 鏈可變區域胺基酸序列的組合為各序列號碼 3 及 9、序列號碼 4 及 10、序列號碼 5 及 11、序列號碼 6 及 12、或序列號碼 16 及 18。

(11) 一種雜交瘤，其特徵為產生如 (10) 之抗 CD20 單株抗體。

(12) 一種嵌合抗 CD20 單株抗體，其特徵為融合如 (10) 所記載的抗 CD20 單株抗體之可變區域胺基酸序列、與人類免疫球蛋白恆定區域胺基酸序列者。

(13) 一種抗 CD20 單株抗體，其特徵為使用如 (12) 之抗 CD20 單株抗體之可變區域 CDR 的胺基酸序列、與人類免疫球蛋白之胺基酸序列經人類化者。

(14) 如 (12) 或 (13) 之人類化抗 CD20 單株抗體，其中人類補體存在下對於 CD20 抗原表現細胞具有細胞障礙性者。

(15) 一種哺乳動物細胞，其特徵為插入編碼如 (12) 至 (14) 中任一項之抗 CD20 單株抗體的胺基酸之鹼基序列。

(7)

(16)如(15)之哺乳動物細胞，其為CHO細胞。

(17)一種診斷藥，其特徵為如(1)、(4)~(7)、(10)及(12)~(14)中任一項之抗CD20單株抗體為有效成分者。

(18)一種治療藥，其特徵為如(4)至(7)及(12)至(14)中任一項之抗CD20單株抗體作為有效成分者。

實施發明的最佳型態

本發明中所謂的「抗體」之用語表示抗體全體及構成此之H鏈及L鏈、及這些片段。

本發明係關於結合於細胞膜上的人類CD20抗原，期待誘導出治療效果之具有生物學活性之抗CD20單株抗體。

本發明的第1型態之抗體為，對於細胞膜上的人類CD20抗原以特異性結合之單株抗體，無須藉助效應子細胞而於人類CD20抗原表現細胞培養中，含有對於該人類CD20抗原表現細胞為細胞凋亡之增殖阻礙活性之抗體。此原來為來自老鼠的抗CD20單株抗體，更含有將這些經嵌合化或人類化之抗CD20單株抗體。這些抗體為，無須藉助效應子細胞而可於體外人類CD20抗原表現細胞培養中，含有對於該CD20抗原表現細胞為細胞凋亡之直接性增殖阻礙活性。這些經嵌合化或人類化的抗CD20單株抗體具有補體依賴性及/或抗體依賴性之細胞障礙性。

對於細胞膜上的CD20抗原之結合性，將SB細胞或Raji細胞等CD20表現細胞附著於培養皿上，使作為被驗體的單株抗體進行反應後以Cell ELISA進行調查。然而

(8)

，這些細胞的 CD20 抗原之表現量因未充分，故反應性並未敏銳。因此，本發明開發出將藉由基因重組大量表現 CD20 的 CHO 細胞 (CD20/CHO 細胞) 附著於培養皿中，使作為被驗體的單株抗體反應之方式的 Cell ELISA。對於本發明的預備試驗，使用 CD20/CHO 細胞的 Cell ELISA 於單株抗體的反應性試驗中，顯示與使用 SB 細胞或 Raji 細胞之 Cell ELISA 相同圖形，且確認出其敏銳度 (實施例：CD20/CHO Cell ELISA 選殖法的確立，參照表 1)。

於效應子細胞非存在下之體外人類 CD20 抗原表現細胞培養中之直接性細胞增殖阻礙性的測定，可使用一般測定方法 (Miyamoto T et al. Avian Dis. Vol 46(1), 10-16) 進行。又，細胞凋亡誘導能以使用流動細胞計數器 (Annexin V/PI staining) 之試驗方法進行測定。

第 1 形態的抗體例子中，含有 H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域胺基酸序列的組合各為序列號碼 1 及 7、序列號碼 2 及 8、或序列號碼 15 及 17 所規定的老鼠抗 CD20 單株抗體、再將彼等經嵌合化或人類化之抗 CD20 單株抗體。這些抗體為無須藉助效應子細胞，於體外人類 CD20 抗原表現細胞培養中，含有對於該 CD20 抗原表現細胞為細胞凋亡之直接性增殖阻礙活性。這些亦可具有補體依賴性及 / 或抗體依賴性之細胞障礙性。本發明中亦含有插入對應產生來自老鼠抗體之雜交瘤、及嵌合抗體或人類化抗體之胺基酸序列的鹼基序列之哺乳動物細胞 (實施例中為 CHO 細胞)。

(9)

所謂嵌合化爲藉由融合來自老鼠的單株抗體之 H 鏈可變區域胺基酸序列與人類免疫球蛋白 H 鏈恆定區域胺基酸序列、L 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域胺基酸序列與人類免疫球蛋白 L 鏈恆定區域胺基酸序列而進行(Ishida T et al. Nippon Rinsho Vol 60, No3, 439-444)、人類化爲使用來自老鼠的單株抗體之可變區域 CDR 胺基酸序列與人類免疫球蛋白之胺基酸序列所設計出。作爲治療藥之較佳人類化抗 CD20單株抗體爲藉由與各種經設計的抗體特性作比較而選出(Padlan EA, Mol Immunol Vol 28, No4/5, 489-498; Wu TT and Kabat EA, Mol Immunol Vol 29, No 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J Vol 9, 133-139)。

嵌合化或人類化之抗體 CD20單株抗體爲更於補體依賴性細胞障礙性(CDC)及效應子細胞存在下具有抗體依賴性細胞障礙性(ADCC)。對於有關這些 CDC 及 ADCC 之試驗方法可使用一般使用的方法(Manches O et al., Blood 2003; 101(3): 949-54; Idusogie EE et al., J Immunol 2000; 164: 4178-4184)。

具體的人類化抗 CD20單株抗體之例子爲，H 鏈可變區域胺基酸序列的 L 鏈可變區域胺基酸序列的組合各爲序列號碼 19及 23、序列號碼 19及 24、序列號碼 19及 25、序列號碼 19及 26、序列號碼 20及 23、序列號碼 20及 24、序列號碼 20及 25、序列號碼 20及 26、序列號碼 21及 23、序列號碼 21及 24、序列號碼 21及 25、序列號碼 21及 26、

(10)

序列號碼 22 及 23、序列號碼 22 及 24、序列號碼 22 及 25、序列號碼 22 及 26。

本發明的第 2 形態之抗體為對於細胞膜上的人類 CD20 抗原可特異性結合之來自老鼠的單株抗體，但未顯示含細胞凋亡之增殖阻礙活性或其活性並不高者。然而，這些來自老鼠的抗體可藉由嵌合化或人類化可獲得 CDC 或 ADCC 活性。這些細胞障礙活性亦為重要的生物學上的活性，因此第 2 型態的抗 CD20 單株抗體亦可作為治療藥劑之較佳候補用藥。

第 2 型態的抗體例子中，H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域胺基酸序列的組合為各序列號碼 3 及 9、序列號碼 4 及 10、序列號碼 5 及 11、序列號碼 6 及 12、或序列號碼 16 及 18 之來自老鼠抗 CD20 單株抗體，更含有這些經嵌合化或人類化之抗 CD20 單株抗體。本發明中亦含有插入對應產生該來自老鼠的抗體之雜交瘤、及該嵌合抗體及該人類化抗體之胺基酸序列的鹼基序列之哺乳類動物細胞（實施例中為 CHO 細胞）。

對於細胞膜上的 CD20 抗原之結合性判斷法、增殖阻礙、細胞凋亡、ADCC、CDC 等各種試驗法、及嵌合或人類化抗體的製作法等與第 1 型態的抗體時相同之方法。

作為第 1 型態及第 2 型態之抗體所記載的嵌合抗 CD20 單株抗體或人類化抗 CD20 單株抗體可期待同時作為具有優良效果之與 B 細胞性惡性腫瘤及 B 細胞或產生 B 細胞的抗體相關之免疫性疾病的治療藥。本發明以提供一種

(11)

經嵌合或人類化之抗 CD20單株抗體之任一、較佳爲人類化抗 CD20單株抗體作爲有效成分之治療藥劑的開發爲目的。作爲對象疾病可舉出非何杰金氏淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病、慢性關節風濕、自身免疫溶血性貧血症、特發性血小板減少症紫斑病、全身性紅斑性狼瘡、抗磷脂質抗體症候群、雪庫林症候群、克隆症、強皮症、泛發性硬化症、I 型糖尿病等。

本發明的來自老鼠的單株抗體以下述方法製得。

作爲敏化免疫抗原，可使用表現人類 CD20抗原的細胞株之 SB 細胞、Raji 細胞或表現人類 CD20抗原之 CHO 細胞的組合。又，作爲融合 GST 的人類 CD20蛋白質 (GST-CD20)亦可作爲補足性敏化抗原使用。

產生單株抗體之雜交瘤的製作爲，可進行(1)對被免疫動物之動物(老鼠)進行免疫、(2)由被免疫的動物上調製出淋巴球、(3)母細胞的調製、(4)淋巴球與母細胞的細胞融合、(5)篩選、及(6)選殖之一連串處理(Ailsa M. Campbell(著)，大澤 利昭(譯)生化學實驗法；單株抗體，東京化學同人，1989年)。於細胞表面的 CD20抗原以特異性結合之抗 CD20單株抗體的選殖爲，將 CD20/CHO 細胞固定於培養皿中，於 Cell ELISA 中與被驗體的單株抗體反應而進行。表現載體可使用販買品，但由必須於 CHO 細胞上高密度地表現 CD20抗原之觀點來看以使用哺乳動物細胞高表現載體 pNOW(專利第 3582965 號公報)爲

(12)

佳。單株抗體的選擇標準為，與陽性對照組相比較，顯示同程度以上之反應性者。

嵌合化及人類化抗體之製作可使用一般的基因重組法。例如表現載體使用於產生抗體時隨機排列2組多重選殖點，且使用事先插入人類 H 鏈及 L 鏈的恆定區域基因之 pNOW-Ab(圖 1)。

### 【實施方式】

#### 實施例 1

對於 CD20 抗體的單株抗體之製作，嵌合化及人類化，以及所得之抗體特性的相關試驗依據實施例作說明。

#### (1) 老鼠敏化用免疫抗原的製作

使用編碼人類 CD20 全分子之基因為特異性之序列號碼 13 所記載的 5' 引子及序列號碼 14 所記載的 3' 引子，由 cDNA 基因庫中切出人類 CD20 基因 (Multiple Choice cDNA human spleen, Origene Technologies, Inc. 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, MD 20850)。具體為使用圖 3 記載的引子。CD20 基因為插入哺乳動物細胞用高表現載體之 pNOW-Ag(圖 2)後，轉移感染至宿主細胞的 CHO 細胞。藉由 FACS 分析，建立於細胞表面高表現 CD20 分子之重組 CHO 細胞(CD20/CHO 細胞)。且，以 FITC 標識抗 CD20 單株抗體染色時，與 SB 細胞比較下螢光強度為 5 倍以上者作為高表現者。補足性免疫原之 GST-CD20 為，使

(13)

用 pGEX-4T2載體於 CD20細胞外區域的 43個胺基酸之 N 末端使 GST 融合而製得 (G et al. AM, Electrophoresis Vol 20(2) : 344-348)。

## (2)免疫原的調製

SB 細胞或 Raji 細胞使用添加 10% FCS 的 RPMI1640 培養基進行培養。CD20/CHO 細胞為，使用添加 800  $\mu$ g/lm 的 G418之 CHO-S-SFM II 培養基 (GIBCO, Cat. No. 12052-098)進行培養。離心分離 (1100rpm, 5分鐘)這些培養液後，細胞中加入 Dulbecco's PBS(-)使其懸浮後再次進行離心分離。該洗淨操作再次重複進行，細胞中加入生理食鹽水後調製之懸浮液 (每 1ml 之細胞數為  $1 \sim 3 \times 10^7$ ) 使用於免疫步驟。將插入 GST-CD20的 pGEX-4T2導入 E. coli 勝任細胞中。該勝任細胞於培養後被溶解，GST-CD20可由溶解細胞經粗純化後加入 0.1N 氫氧化鈉後溶化。

## (3)免疫及細胞融合

被免疫動物為使用 7~11週齡的 Balb/c 系雌性老鼠。SB 細胞、Raji 細胞及 CD20/CHO 細胞中任一細胞作種種日數間隔下重複 2~3次的投予後，選出相異的細胞抗原 (SB 細胞、Raji 細胞或 CD20/CHO 細胞)使用於最終免疫上。投予的細胞數皆為每隻老鼠為  $1 \sim 3 \times 10^7$ 個。又，一部份的老鼠例子中，使用 GST-CD20進行補足免疫。最終免疫 3天後取出脾臟細胞，懸浮於 RPMI 培養基後，於

(14)

PEG-1500的存在下進行與老鼠骨髓瘤(NS-1)之融合反應(Oi, V. T. et. Herzenberg, 1980, in: Selected Methods in Cellular Immunology; Mishell B et al (Freeman and Co. San Francisco, CA)p.351.)。

#### (4)CD20/CHO Cell ELISA 篩選法之確立

使用各附著 SB 細胞、Raji 細胞、CD20/CHO 細胞及 CD20的 CHO 母株之 96 格板，使幾個來自老鼠的抗 CD20 單株抗體與 2B8 進行反應。這些 Cell ELISA 對於抗體濃度顯示相同傾向，亦判斷出抗體之間及對照組之相對比較。由 CD20 CHO 細胞 ELISA 之附著於板上的細胞表面之抗原密度較高得知，即使被檢抗體樣品為較低濃度，亦可顯示可充分檢側水準的吸光度，其為敏銳測定系統。具體測定結果如表 1 所示。

(15)

表1 SB Cell ELISA、Raji Cell ELISA 及 CD20/CHO Cell ELISA之比較

| 抗體      | Raji Cell ELISA (A492) |       |       |       |       | SB Cell ELISA (A492) |       |       |       |       |
|---------|------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
|         | 1000                   | 320   | 100   | 32    | 10    | 3                    | 1000  | 320   | 100   | 32    |
| 1K1228  | 1.683                  | 1.170 | 0.678 | 0.326 | 0.148 | nt                   | 1.265 | 0.931 | 0.452 | 0.192 |
| 1K1257  | 1.775                  | 1.263 | 0.782 | 0.445 | 0.177 | 0.096                | 1.509 | 1.143 | 0.570 | 0.276 |
| 1K1402  | 1.228                  | 0.525 | 0.214 | 0.102 | 0.061 | 0.049                | 0.763 | 0.400 | 0.152 | 0.095 |
| 1K1422  | 0.748                  | 0.277 | 0.121 | 0.057 | 0.046 | 0.049                | 0.403 | 0.147 | 0.071 | 0.039 |
| 1K1428  | 1.196                  | 0.514 | 0.222 | 0.104 | 0.067 | 0.057                | 1.111 | 0.509 | 0.252 | 0.108 |
| 1K1436A | 0.887                  | 0.376 | 0.191 | 0.105 | 0.058 | 0.058                | 0.959 | 0.445 | 0.264 | 0.120 |
| 2B8     | 0.329                  | 0.121 | 0.055 | 0.038 | 0.034 | 0.046                | 0.337 | 0.091 | 0.045 | 0.038 |
| NC      | 0.035                  |       |       |       |       |                      | 0.028 |       |       |       |

| 抗體      | CD20/CHO Cell ELISA (A492) |       |       |       |       | CHO Cell ELISA (母株) (A492) |       |       |       |       |
|---------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
|         | 1000                       | 320   | 100   | 32    | 10    | 3                          | 1000  | 320   | 100   | 32    |
| 1K1228  | 3.056                      | 2.704 | 2.091 | 1.275 | 0.572 | 0.265                      | 0.081 | 0.040 | 0.038 | 0.034 |
| 1K1257  | 3.184                      | 2.576 | 1.924 | 1.223 | 0.604 | 0.271                      | 0.095 | 0.053 | 0.038 | 0.039 |
| 1K1402  | 1.877                      | 1.574 | 1.486 | 0.824 | 0.389 | 0.174                      | 0.385 | 0.170 | 0.085 | 0.063 |
| 1K1422  | 2.230                      | 1.327 | 0.842 | 0.238 | 0.105 | 0.068                      | 0.164 | 0.088 | 0.046 | 0.047 |
| 1K1428  | 2.544                      | 2.448 | 2.190 | 0.967 | 0.463 | 0.283                      | 0.564 | 0.213 | 0.091 | 0.056 |
| 1K1436A | 2.432                      | 2.369 | 2.278 | 1.101 | 0.559 | 0.286                      | 0.375 | 0.153 | 0.072 | 0.043 |
| 2B8     | 2.293                      | 1.664 | 1.090 | 0.561 | 0.174 | 0.089                      | 0.056 | 0.040 | 0.045 | 0.035 |
| NC      | 0.070                      |       |       |       |       |                            | 0.029 |       |       |       |

(5)藉由 Cell ELISA 之篩選

使用附著 CD20/CHO 細胞或 CHO 細胞 (CD20母株) 之 96 格板進行 Cell ELISA，選出產生對 CD20 為特異性反應之抗體的格子。陽性對照組為使用 2B8，陰性對照組使用對人類 CD3 抗原之老鼠單株抗體 (BD PharMingen 公司)。具體為附著於 Poly-L-Lysine cote 96 格板子 (旭德克諾格拉

(16)

絲，Cat. No. 11-023-018)之 CD20/CHO 細胞或 CHO 細胞(母株)使用於 Cell ELISA。各格子中放入  $150\mu\text{l}$  的遮蔽液(0.2% -Galatine, 0.5% -BSA 之 PBS 溶液)，於  $37^{\circ}\text{C}$  下靜置 1 小時。使用  $150\text{Mm-NaCl}$ ，0.05% -Tween20 水溶液洗淨板子 5 次後， $100\mu\text{l}$  的的樣品(培養澄清液之稀釋液)放入各格子中，於  $37^{\circ}\text{C}$  下進行 1 小時的 1 次反應。洗淨後，將  $100\mu\text{l}$  的標識抗體之稀釋液〔HRP 標識抗老鼠 IgG(H+L) 兔子抗體(Jackson Lab. Code No. 315-035-003)、或 HRP 標識抗老鼠 IgG( $\text{Fc}\gamma$ ) 兔子抗體(Jackson Lab. Code No. 315-035-008)〕加入各格子中，於  $37^{\circ}\text{C}$  下進行 1 小時的 2 次反應。1 次、2 次的反應液調製為使用與遮蔽液相同者。洗淨後， $100\mu\text{l}$  的發色液(OPD)放入各格子中經 30 分鐘後，加入  $50\mu\text{l}$  的  $4\text{N-H}_2\text{SO}_4$  使反應停止，測定 A492。結果為選出與 2B8 同程度者或顯示顯著高反應性之格子。

#### (6)選殖(cloning)

進行臨界稀釋法。將細胞撒在 96 格板中進行培養後，對於 1 菌落的格子培養澄清液而言，進行 CD20/CHO 細胞的 Cell ELISA，選出特異抗體產生克隆。

#### (7)純化抗體的調製

將特異抗體的產生克隆以添加 10% FCS 之 RPMI1640 培養基進行培養，細胞密度為  $5\times 10^5/\text{ml}$  左右時，培養基換成無血清培養基 ASF-104N(味之素)再進行培養。經 2~

(17)

4天後離心分離培養液並回收培養澄清液，使用 proteinG 管柱進行純化，將溶離出的單株抗體溶液以 150mM-NaCl 進行透析。以 0.2  $\mu$  m 的過濾器進行過濾滅菌，得到試驗抗體(抗人類 CD20單株抗體)

使用 CD20/CHO Cell ELISA 法選出具有可與陽性對照組匹敵之結合親合性之單株抗體克隆。對於這些抗體的可變區域決定出基因序列，結果鑑定出胺基酸序列。代表性抗體的 H 鏈 V 區域及 L 鏈 V 區域之序列為序列號碼 1及 7、序列號碼 2及 8、序列號碼 3及 9、序列號碼 4及 10、序列號碼 5及 11、序列號碼 6及 12、序列號碼 15及 17、序列號碼 16及 18(圖 4)。對於這些克隆之生物性特定進行調查。

#### 生物學特性試驗(1)細胞凋亡誘導試驗

使用流動細胞計數機(Annexin V/PI staining)測定試驗抗體的凋亡誘導能。陽性對照組使用 2B8，陰性對照組使用對人類 CD3之老鼠單株抗體(BD PharMingen 公司)。操作順序如下所示。

使用 MEBCYTOApoptosis Kit(MBL, Cat. No. 4700, Lot. 20)進行。

Raji 細胞經離心後，懸浮於含有 10% FCS(非動化)(ICN, Cat. No. 2916754, Lot. 8005C)之新鮮 PRMI1640培養基(Sigma, Cat. No. R8758, Lot. 44K2416)，於 12 格板的各格子中放入  $5 \times 10^5$  細胞/ml 密度之 1ml 培養液。各抗體

(18)

使用 12 格，添加各抗體至最終濃度為  $2\ \mu\text{g/ml}$  或  $4\ \mu\text{g/ml}$ 。  
(3 格  $\times$  2 種濃度  $\times$  2 時間點，共 12 格)

開始培養後第 1 天及第 2 天後，回收含有  $2 \times 10^5$  個程度細胞之培養液，離心後以 PBS 洗淨 1 次。其次加入  $85\ \mu\text{l}$  Binding buffer 使其懸浮。再加入  $10\ \mu\text{l}$  的 AnnexinV-FITC 與  $5\ \mu\text{l}$  的 PI 後充分混合，經遮光於室溫下反應 15 分鐘。使用流動細胞計數機 (FACS Calibur, Becton Dickinson) 進行測定，以 CellQuest (Becton Dickinson) 進行解析。

代表性 8 種類的來自老鼠的抗 CD20 單株抗體與陽性對照組 (2B8)、陰性對照組 (抗 CD3 抗體) 之測定結果如圖 5 所示。一般 2B8 的細胞凋亡誘導能會提高，但具有 H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域各為序列號碼 2 及 8 之胺基酸序列的克隆 (1K1791) 與此比較亦觀察到顯著的高細胞凋亡誘導能。H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域各為序列號碼 1 及 7 (1K1422)、或序列號碼 15 及 17 (1K0924) 之克隆亦觀察到明顯的細胞凋亡所引起的細胞死亡。

## 生物學特性試驗 (2) 細胞增殖阻礙試驗

將  $5 \times 10^4$  個 / ml 的 Raji 細胞懸浮液以添加 10% FCS 之 RPMI1640 培養基調製，於 96 格板上各放入  $100\ \mu\text{l}$  / 格子進行培養。經 24 小時後，添加  $50\ \mu\text{l}$  / 格子之各抗體溶液至  $0.01\ \mu\text{g/ml}$ 、 $0.1\ \mu\text{g/ml}$  及  $1\ \mu\text{g/ml}$  後繼續培養。添加抗體

(19)

後 72 小時後加入  $10 \mu\text{l}$ /格子的發色色素 Cell Counting Kit-8(同仁化學 Cat. No. 343-07623, Lot. SG076)，再培養 4 小時後以波長  $492\text{nm}$  測定其吸光度。圖 6 表示代表性 8 個來自老鼠的抗 CD20 單株抗體與陽性對照組 (2B8) 之活細胞數測定值對陰性對照組 (100%) 之比率。細胞增殖阻礙效果可由與陰性對照組比較中減少的活細胞數比率推測出。1K0924、1K1422、1K1791 及陽性對照組之 2B8 中觀察到顯著的細胞增殖阻礙，特別為 1K1791 更為顯著。此傾向與細胞凋亡誘導試驗的結果一致。

#### 嵌合抗體之製作

將各來自老鼠的抗體之 H 鏈及 L 鏈可變區域基因，插入人類免疫球蛋白 H 鏈及 L 鏈 ( $\kappa$ ) 恆定區域基因作為卡匣而預先具有 CHO 細胞用高表現載體 pNOW-Ab。轉移感染該表現載體於 CHO 細胞，選出各克隆中生產性高者。

#### 對於嵌合抗體的 CD20 抗原之結合性試驗

製成的 8 個嵌合抗 CD20 單株抗體藉由 CD20/CHO Cell ELISA 法，對人類 CD20 抗原之反應性作調查。陽性對照組使用 rituximab(c2B8)。試驗結果如表 2 所示。Cell ELISA 測定值 (A492) 反映出結合性的強度。c1K0924 及 c1K1422 的親合性與對照組相比有稍低的傾向，除此以外幾乎相等或顯示更高親合性。

(20)

表2 抗CD20 螯合抗體之CD20/CHO Cell ELISA 試驗

| 抗體      | CD20/CHO Cell ELISA (A492) |       |       |       |       |       |
|---------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | 抗體濃度(ng/ml)                |       |       |       |       |       |
|         | 100                        | 32    | 10    | 3     | 1     | 0     |
| c1K0924 | 1.423                      | 0.724 | 0.391 | 0.186 | 0.094 | 0.032 |
| c1K1228 | 2.226                      | 1.580 | 0.701 | 0.289 | 0.120 | 0.032 |
| c1K1402 | 2.449                      | 1.621 | 0.737 | 0.349 | 0.116 | 0.032 |
| c1K1422 | 1.919                      | 0.912 | 0.357 | 0.151 | 0.077 |       |
| c1K1712 | 2.292                      | 1.683 | 0.793 | 0.359 | 0.145 |       |
| c1K1736 | 2.428                      | 1.548 | 0.748 | 0.320 | 0.122 |       |
| c1K1782 | 2.101                      | 1.017 | 0.505 | 0.169 | 0.074 |       |
| c1K1791 | 2.231                      | 1.458 | 0.745 | 0.276 | 0.108 |       |
| c2B8    | 2.147                      | 1.143 | 0.536 | 0.226 | 0.088 |       |

### 嵌合抗體的 CDC 試驗

對於所製成的 8 個嵌合抗 CD20 單株抗體之 CDC 活性作調查。陽性對照組使用 rituximab(c2B8)。標的細胞使用 RC-K8(高知大學醫學部)。作為所使用的培養基使用 RHB(基礎培養基：RPMI-1640，添加物：0.1% BSA、20mM HEPES(pH 7.2)、2mM 麩胺酸、盤尼西林 G 100 unit/ml、鏈黴素 100  $\mu$ g/ml)。標的細胞為以 RHB 洗淨後，再懸浮至  $10^6$  cells/ml。將對各被驗嵌合抗體及 rituximab 調製出相異濃度的 50  $\mu$ l 溶液、50  $\mu$ l 的販賣的人類補體(Quidel, San Diego, CA、Cat. A113)之 4 倍稀釋溶液、及 50  $\mu$ l 的  $10^6$  cells/ml 的細胞懸浮液，加至平底 96 洞的組織培養用培養皿(黑色)之各格子中。該 150  $\mu$ l/格中的抗體濃度之設定為 0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml。欲促進補體介在性細胞溶解，於 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的條件下進行 2 小時恆溫培養。添加 50  $\mu$ l 的 Alamer blue(未稀釋，Accumed International 之處方、Biosource、Cat.

(21)

DAL1100)，再於相同條件下反應一晚。將培養皿於室溫下 10 分鐘後使其冷卻，使用螢光微盤測定儀 (microplatereader)，以 530nm 激起，以 590nm 測定下讀取螢光度，結果以螢光強度 (RFU) 表示。CDC 活性的比率如下式子計算出。

$$\% \text{CDC 活性} = 100 \times \{ \text{RFU}(\text{無添加抗體}) - \text{RFU}(\text{添加抗體}) / \{ \text{RFU}(\text{無添加抗體}) - \text{RFU}(\text{添加 Triton X-100}) \}$$

結果如圖 7 所示。c1K1712 以外，幾乎與陽性對照組之 C2B2 相同程度或顯示更高的 CDC 活性。

#### 人類化抗體之製作

以來自老鼠的抗 CD20 單株抗體 1K1791 之可變區域 CDR 為準進行人類化之設計。藉著由胺基酸序列進行結構解析且改變設計方式，製作出 H 鏈及 L 鏈之各 4 種類的人類化序列 (Padlan EA, Mol Immunol Vol 28, No 4/5, 489-498; Wu TT and Kabat EA, Mol Immunol Vol 29, No 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J Vol 9, 133-139)。  
以 H 鏈與 L 鏈各 4 種類之所有組合製作成抗體。這些胺基酸序列為序列號碼 19 及 23、序列號碼 19 及 24、序列號碼 19 及 25、序列號碼 19 及 26、序列號碼 20 及 23、序列號碼 20 及 24、序列號碼 20 及 25、序列號碼 20 及 26、序列號碼 21 及 23、序列號碼 21 及 24、序列號碼 21 及 25、序列號碼

(22)

碼 21 及 26、序列號碼 22 及 23、序列號碼 22 及 24、序列號碼 22 及 25、序列號碼 22 及 26(圖 8A 及 圖 8B)。

這些 H 鏈可變區域 4 種類與 L 鏈可變區域 4 種類之胺基酸序列由人類基因序列中使用頻率最高的 DNA(鹼基)序列取代，且考慮到該鹼基中幾個對宿主 CHO 細胞之適應性下而不改原變原本的胺基酸(Kim CH et al., Gene 1997; 15; 199(1-2): 293-301)。作為具體的胺基酸序列所對應之胺基酸序列，各為對應序列號碼 19 使用序列號碼 27、對應序列號碼 20 使用序列號碼 28、對應序列號碼 21 使用序列號碼 29、對應序列號碼 22 使用序列號碼 30、對應序列號碼 23 使用序列號碼 31、對應序列號碼 24 使用序列號碼 32、對應序列號碼 25 使用序列號碼 33、對應序列號碼 26 使用序列號碼 34(圖 8A 及 圖 8B)。且該鹼基序列為不改變對應彼等之胺基酸序列下可使用其他鹼基進行取代。

H 鏈可變區域(鹼基序列號碼 27~30)及 L 鏈可變區域(鹼基序列號碼 31~34)之總計 8 種類的鹼基序列經合成後(寶酒造股份有限公司)、插入具有多重選殖點(muticloning site)之哺乳動物細胞用表現載體 pNOW-Ab。這些插入人類化抗體基因之該表現載體轉移感染至 CHO 細胞中，對於各克隆選出生產性高者。

人類化抗體之生物學特性試驗      細胞增殖阻礙試驗

將  $5 \times 10^4$  個/ml 的 Raji 細胞懸浮液以添加 10% FCS 之

(23)

RPMI1640培養基調製，於96格板上各放入100  $\mu$  l/格子進行培養。經24小時後，添加50  $\mu$  l/格子之各抗體溶液至0.5  $\mu$  g/ml 後繼續培養。添加抗體後72小時後加入10  $\mu$  l/格子的發色色素 Cell Counting Kit-8(同仁化學 Cat. No. 343-07623, Lot. SG076)，再培養4小時後以波長492nm測定其吸光度。圖9表示代表性16種類來自1K1791的人類化抗體中15種類(27克隆)與陽性對照組 c2B8(rituximab 之另一名稱)之活細胞數測定值對陰性對照組(100%)之比率。細胞增殖阻礙效果可由與陰性對照組比較中減少的活細胞數比率推測出，本試驗中觀察到所有克隆之增殖阻礙效果。

且，本發明的說明書及圖表所記載的單株抗體名與序列號碼可參考如下。

(24)

表 3

| 老鼠抗體名  | H 鏈可變區域 | L 鏈可變區域 | 螯合抗體名   | 人類化可變區域<br>(H 鏈/L 鏈)                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------|---------|---------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1K1422 | 序號號碼 1  | 序號號碼 7  | c1K1422 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1K1791 | 序號號碼 2  | 序號號碼 8  | c1K1791 | 序號號碼 19 及 23<br>序號號碼 19 及 24<br>序號號碼 19 及 25<br>序號號碼 19 及 26<br>序號號碼 20 及 23<br>序號號碼 20 及 24<br>序號號碼 20 及 25<br>序號號碼 20 及 26<br>序號號碼 21 及 23<br>序號號碼 21 及 24<br>序號號碼 21 及 25<br>序號號碼 21 及 26<br>序號號碼 22 及 23<br>序號號碼 22 及 24<br>序號號碼 22 及 25<br>序號號碼 22 及 26 |
| 1K1712 | 序號號碼 3  | 序號號碼 9  | c1K1712 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1K1402 | 序號號碼 4  | 序號號碼 10 | c1K1402 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1K1736 | 序號號碼 5  | 序號號碼 11 | c1K1736 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1K1782 | 序號號碼 6  | 序號號碼 12 | c1K1782 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1K0924 | 序號號碼 15 | 序號號碼 17 | c1K0924 |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 1K1228 | 序號號碼 16 | 序號號碼 18 | c1K1228 |                                                                                                                                                                                                                                                              |

(25)

產生這些單株抗體之雜交瘤可依所產生的抗體名稱命名，依據布達佩斯條約，2006年3月28日於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄存中心(地址：郵遞區域號碼305-8566 日本國茨城縣筑波市東一丁目1番地1中央第6)進行以下寄存號碼之國際寄存。1K1422：FERM BP-10587、1K1791：FERM BP-10591、1K1712：FERM BP-10588、1K1402：FERM BP-10586、1K1736：FERM BP-10589、1K1782：FERM BP-10590、1K0924：FERM BP-10584、1K1228：FERM BP-10585。

產業上可利用性

本發明提供一種可適用於治療藥劑之具有生物學活性之單株抗體。

#### 【圖式簡單說明】

〔圖1〕表示重組抗體表面用載體 pNOW-Ab 的結構。

〔圖2〕表示蛋白質表現用載體 pNOW-Ag 的結構。

〔圖3〕表示人類 CD20基因選殖用引子序列。

〔圖4〕表示來自老鼠抗 CD20單株抗體可變區域 H 鏈及 L 鏈之胺基酸序列。

〔圖5〕表示來自老鼠抗 CD20單株抗體之細胞凋亡試驗結果。

〔圖6〕表示藉由來自老鼠抗 CD20單株抗體之細胞

(26)

增殖障礙試驗結果。

〔圖 7〕表示藉由嵌合抗 CD20 單株抗體之補體依賴性細胞障礙性試驗結果。

〔圖 8A〕表示人類化抗 CD20 單株抗體可變區域 H 鏈及 L 鏈之胺基酸序列、及對應這些的鹼基序列。

〔圖 8B〕表示人類化抗 CD20 單株抗體可變區域 H 鏈及 L 鏈之胺基酸序列、及對應這些的鹼基序列。

〔圖 9〕表示藉由人類化抗 CD20 單株抗體之細胞增殖阻礙試驗結果。

序列表

<110> BioMedics Inc.

<120> 抗CD20單株抗體

<130> C6084-PGT

<150> JP 2005-103093

<151> 2005-03-31

<150> JP 2005-378466

<151> 2005-12-28

<160> 34

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 小老鼠(Mus Musculus)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> 小老鼠

<400> 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Glu |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Thr | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Phe |

1  
 5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Ser Tyr  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 35  | 40  | 45  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Gly | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asn | Gly | Asp | Thr | Ser | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |  |  |  |  |
| 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Lys | Gly | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |  |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |  |  |  |  |
| Met | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |  |  |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |  |  |  |  |
| Ala | Arg | Phe | Tyr | Tyr | Tyr | Gly | Ser | Met | Gly | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |  |
| Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |

<210> 5  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| <400> 5 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gln     | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Pro | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |  |  |  |  |
| 1       |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |  |  |  |  |
| Ser     | Val | Lys | Met | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Thr | Tyr |  |  |  |  |
|         |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn     | Leu | His | Trp | Val | Lys | Gln | Thr | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |  |  |  |  |
|         | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly     | Gly | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asn | Gly | Asp | Thr | Ser | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |  |  |  |  |
| 50      |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Lys     | Val | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Asn | Thr | Ala | Tyr |  |  |  |  |
| 65      |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |  |  |  |  |
| Met     | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |  |  |
|         |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |  |  |  |  |
| Ala     | Arg | Trp | Ile | Tyr | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Glu | Gly | Thr | Leu | Asp | Tyr | Trp |  |  |  |  |
|         |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |  |  |  |
| Gly     | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|         | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |

<210> 6  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

|         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| <400> 6 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gln     | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Ala | Lys | Pro | Gly | Ala |  |  |  |  |
| 1       |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |  |  |  |  |
| Ser     | Val | Lys | Met | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr |  |  |  |  |
|         |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |  |  |  |  |
| Trp     | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |  |  |  |  |
|         | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly     | Tyr | Ile | Thr | Pro | Ser | Thr | Gly | Tyr | Thr | Asp | Tyr | Asn | Lys | Lys | Phe |  |  |  |  |

50 55 60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Gly Pro Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 7  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

<400> 7  
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Asp Tyr Cys His Gln Trp Thr Ser Asn Pro Cys Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 8  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

<400> 8  
 Ser Thr Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn Thr Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu

85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 9  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

<400> 9  
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 10  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

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

<210> 11  
 <211> 106

<212> PRT

<213> 小老鼠

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 小老鼠

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 引子

35

<210> 14

&lt;211&gt; 29

**<212> DNA**

### 〈213〉 人造序列

**<220>**

〈223〉 引子

<400> 14

gctctagatt aaggagagct gtcattttc

29

<210> 15

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

〈213〉 小老鼠

**<400> 15**

[illegible]

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 119

<212> PRT

〈213〉 小老鼠

&lt;400&gt; 16

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Pro | Gly | Ala | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Thr | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asn | Leu | His | Trp | Val | Lys | Gln | Thr | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Val | Trp | Ile |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Ala | Ile | Tyr | Pro | Gly | Asn | Gly | Asp | Thr | Ser | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |  |  |  |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Arg | Gly | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Ile | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Tyr |  |  |  |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |  |
| Met | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |  |  |  |  |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |  |
| Ala | Arg | Tyr | Tyr | Tyr | Gly | Tyr | Asp | Ala | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |  |  |  |
| Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |

<210> 17  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

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

<210> 18  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65  |     | 70  |     | 75  |     | 80  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Glu | Asp | Val | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Gly | Asn | Thr | Val | Pro |
|     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Leu | Thr | Phe | Gly | Ser | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys |     |     |     |     |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 19  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

|       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> | 19  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln   | Ile | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Ser | Glu | Leu | Lys | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1     |     | 5   |     |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser   | Val | Lys | Val | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Asn | Phe |
|       |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly   | Val | Asn | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Met |
|       | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly   | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly | Glu | Pro | Ser | Tyr | Ala | Gln | Gly | Phe |
|       | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Thr   | Gly | Arg | Phe | Val | Phe | Ser | Leu | Asp | Ala | Ser | Val | Ser | Thr | Ala | Tyr |
| 65    |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |     |
| Leu   | Gln | Ile | Ser | Ser | Leu | Lys | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys |
|       |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr   | Arg | Arg | Thr | Asn | Tyr | Tyr | Gly | Thr | Ser | Tyr | Tyr | Tyr | Ala | Met | Asp |
|       |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Tyr   | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |     |     |     |
|       |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 20  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> 小老鼠

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

100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 21  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 小老鼠

<400> 21  
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe  
20 25 30  
Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Gln Gly Phe  
50 55 60  
Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Thr Arg Arg Thr Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 22  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 小老鼠

<400> 22  
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe  
20 25 30  
Gly Val Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45  
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Asp Asp Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Ala Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ser Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Thr Arg Arg Thr Asn Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp  
100 105 110  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 23  
<211> 159  
<212> PRT  
<213> 小老鼠

<400> 23

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Thr | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Asp | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Leu | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Arg | Ala | Thr | Ile | Asn | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Val | Ser | Asn | Asp |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Val | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Tyr | Phe | Ala | Ser | Asn | Arg | Tyr | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Tyr | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Glu | Asp | Val | Ala | Val | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Asp | Tyr | Ser | Ser | Pro | Leu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Phe | Gly | Ala | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Cys | Ala | Gly | Cys | Ala |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Cys | Cys | Cys | Cys | Cys | Thr | Gly | Ala | Cys | Cys | Thr | Thr | Cys | Gly | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Cys | Gly | Cys | Cys | Gly | Gly | Cys | Ala | Cys | Cys | Ala | Ala | Gly | Cys | Thr | Gly |
|     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gly | Ala | Gly | Ala | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly | Cys | Gly | Thr | Ala | Cys | Gly |     |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     |

<210> 24  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 小老鼠

<400> 24

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

100

105

<210> 25  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 小老鼠

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

<210> 26  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 小老鼠

<400> 26  
Ser Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Glu Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
20 25 30  
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80  
Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu  
85 90 95  
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105

<210> 27  
<211> 403  
<212> DNA  
<213> 小老鼠

<400> 27

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| actagttgca gtcctatatt gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggcagcga | 60  |
| gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaaggt gagctgcaag gccagcggct acaccttcac | 120 |
| caacttcggc gtgaactggg tgcgccaggc ccccggaag ggcctggagt ggatgggctg  | 180 |
| gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cgcccagggc ttcaccggcc gcttcgctt  | 240 |
| cagcctggac gccagcgtga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga | 300 |
| caccgccacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc | 360 |
| catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc                   | 403 |

<210> 28

<211> 403

<212> DNA

<213> 小老鼠

<400> 28

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| actagttgca gtcctatatt gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggcagcga | 60  |
| gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaaggt gagctgcaag gccagcggct acaccttcac | 120 |
| caacttcggc gtgaactggg tgaagcaggc ccccggaag ggcctgaagt ggatgggctg  | 180 |
| gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cgccgacgac ttcaagggcc gcttcgcctt | 240 |
| cagcctggac gccagcggca gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga | 300 |
| catggccacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc | 360 |
| catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc                   | 403 |

<210> 29

<211> 403

<212> DNA

<213> 小老鼠

<400> 29

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| actagttgca gtcctatatt gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggcagcga | 60  |
| gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaaggt gagctgcaag gccagcggct acaccttcac | 120 |
| caacttcggc gtgaactggg tgcgccaggc ccccggaag ggcctgaagt ggatgggctg  | 180 |
| gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cgcccagggc ttcaccggcc gcttcgcctt | 240 |
| cagcctggac gccagcgtga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga | 300 |
| caccgccacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc | 360 |
| catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc                   | 403 |

<210> 30

<211> 403

<212> DNA

<213> 小老鼠

<400> 30

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| actagttgca gtcctatatt gggttctttc tcagatccag ctggtgcaga gcggccccga | 60  |
| gctgaagaag cccggcgcca gcgtgaagat cagctgcaag gccagcggct acaccttcac | 120 |
| caacttcggc gtgaactggg tgaagcaggc ccccggaag ggcctgaagt ggatgggctg  | 180 |
| gatcaacacc tacaccggcg agcccagcta cgccgacgac ttcaagggcc gcttcgcctt | 240 |

cagcctggac gccagcgtga gcaccgccta cctgcagatc agcagcctga aggccgagga 300  
caccagcacc tacttctgca cccgccgcac caactactac ggcaccagct actactacgc 360  
catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtctcg agc 403

<210> 31  
<211> 340  
<212> DNA  
<213> 小老鼠

<400> 31  
ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccgac agcctggccg tgagcctggg 60  
cgagcgcgcc accatcaact gcaagagcag ccagagcgtg agcaacgacg tggcctggta 120  
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggt gctgatctac ttgccagca accgctacag 180  
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcaccc tgaccatcag 240  
cagcctgcag gccgaggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagccccct 300  
gaccttcggc gccggcacca agctggagat caagcgtacg 340

<210> 32  
<211> 340  
<212> DNA  
<213> 小老鼠

<400> 32  
ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccgac ttcttgagcg ccagcgtggg 60  
cgaccgcgtg accatcacct gcaaggccag ccagagcgtg agcaacgacg tggcctggta 120  
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggt gctgatctac ttgccagca accgctacac 180  
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcaccc tgaccatcag 240  
cagcctgcag gccgaggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagccccct 300  
gaccttcggc gccggcacca agctggagat caagcgtacg 340

<210> 33  
<211> 340  
<212> DNA  
<213> 小老鼠

<400> 33  
ccgcggtgcc agaagcaccg tgatgaccca gagccccgac agcctggccg tgagcctggg 60  
cgagcgcgcc accatcaact gcaagagcag ccagagcaac agcaacgacg tggcctggta 120  
ccagcagaag cccggccaga gcccgaaggt gctgatctac ttgccagca accgctacag 180  
cggcgtgccc gaccgcttca gcggcagcgg ctacggcacc gacttcaccc tgaccatcag 240  
cagcctgcag gccgaggacg tggccgtgta cttctgccag caggactaca gcagccccct 300  
gaccttcggc gccggcacca agctggagct gaagcgtacg 340

<210> 34  
<211> 340  
<212> DNA  
<213> 小老鼠

&lt;400&gt; 34

|             |            |            |             |            |            |     |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| ccgcggtgcc  | agaagcaccg | tgatgaccca | gagccccgac  | agcctggccg | tgagcctggg | 60  |
| cgagcgcggtg | accatcaact | gcaaggccag | ccagagcggtg | agcaacgacg | tggcctggta | 120 |
| ccagcagaag  | cccggccaga | gccccaaagt | gctgatctac  | ttcgccagca | accgctacac | 180 |
| cggcgtgccc  | gaccgcttca | gcggcagcgg | ctacggcacc  | gacttcacct | tcaccatcag | 240 |
| cagcgtgcag  | gccgaggacg | tggccgtgta | cttctgccag  | caggactaca | gcagccccct | 300 |
| gaccttcggc  | gccggcacca | agctggagct | gaagcgtacg  |            |            | 340 |

## 第095111734號專利申請案中文申請專利範圍修正本

民國 101 年 6 月 28 日修正

## 十、申請專利範圍

1.一種來自老鼠的抗 CD20單株抗體，其特徵為具有效應子細胞非存在下之人類 CD20抗原表現細胞培養中，對於該人類 CD20抗原表現細胞含有細胞凋亡的增殖阻礙活性者，且其為 H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域胺基酸序列各為序列號碼 2及 8、或序列號碼 1及 7者。

2.一種雜交瘤，其特徵為產生如申請專利範圍第 1項之抗 CD20單株抗體者。

3.一種嵌合抗 CD20單株抗體，其特徵為融合如申請專利範圍第 1項之抗 CD20單株抗體之含有所有 CDR 的可變區域胺基酸序列、與人類免疫球蛋白恆定區域胺基酸序列者。

4.一種抗 CD20單株抗體，其特徵為使用如申請專利範圍第 1項之抗 CD20單株抗體之所有可變區域 CDR 的胺基酸序列、與人類免疫球蛋白之胺基酸序列經人類化者。

5.如申請專利範圍第 4項之人類化抗 CD20單株抗體，其中 H 鏈可變區域胺基酸序列與 L 鏈可變區域胺基酸序列的組合各為序列號碼 19及 23、序列號碼 19及 24、序列號碼 19及 25、序列號碼 19及 26、序列號碼 20及 23、序列號碼 20及 24、序列號碼 20及 25、序列號碼 20及 26、序列號碼 21及 23、序列號碼 21及 24、序列號碼 21及 25、序列

|                 |
|-----------------|
| 101年06月28日修正替換頁 |
|-----------------|

號碼 21 及 26、序列號碼 22 及 23、序列號碼 22 及 24、序列號碼 22 及 25、或是序列號碼 22 及 26。

6. 如申請專利範圍第 3 項至第 5 項中任一項之抗 CD20 單株抗體，其中人類補體或效應子細胞存在下對於 CD20 抗原表現細胞具有細胞障礙性者。

7. 一種哺乳動物細胞，其特徵為插入編碼如申請專利範圍第 3 項至第 6 項中任一項之抗 CD20 單株抗體的胺基酸序列之鹼基序列。

8. 如申請專利範圍第 7 項之哺乳動物細胞，其為 CHO 細胞。

9. 一種診斷藥，其特徵為將如申請專利範圍第 1 及 3～6 項中任一項之抗 CD20 單株抗體作為有效成分者。

10. 一種治療藥，其特徵為將如申請專利範圍第 3～6 項中任一項之抗 CD20 單株抗體作為有效成分者。

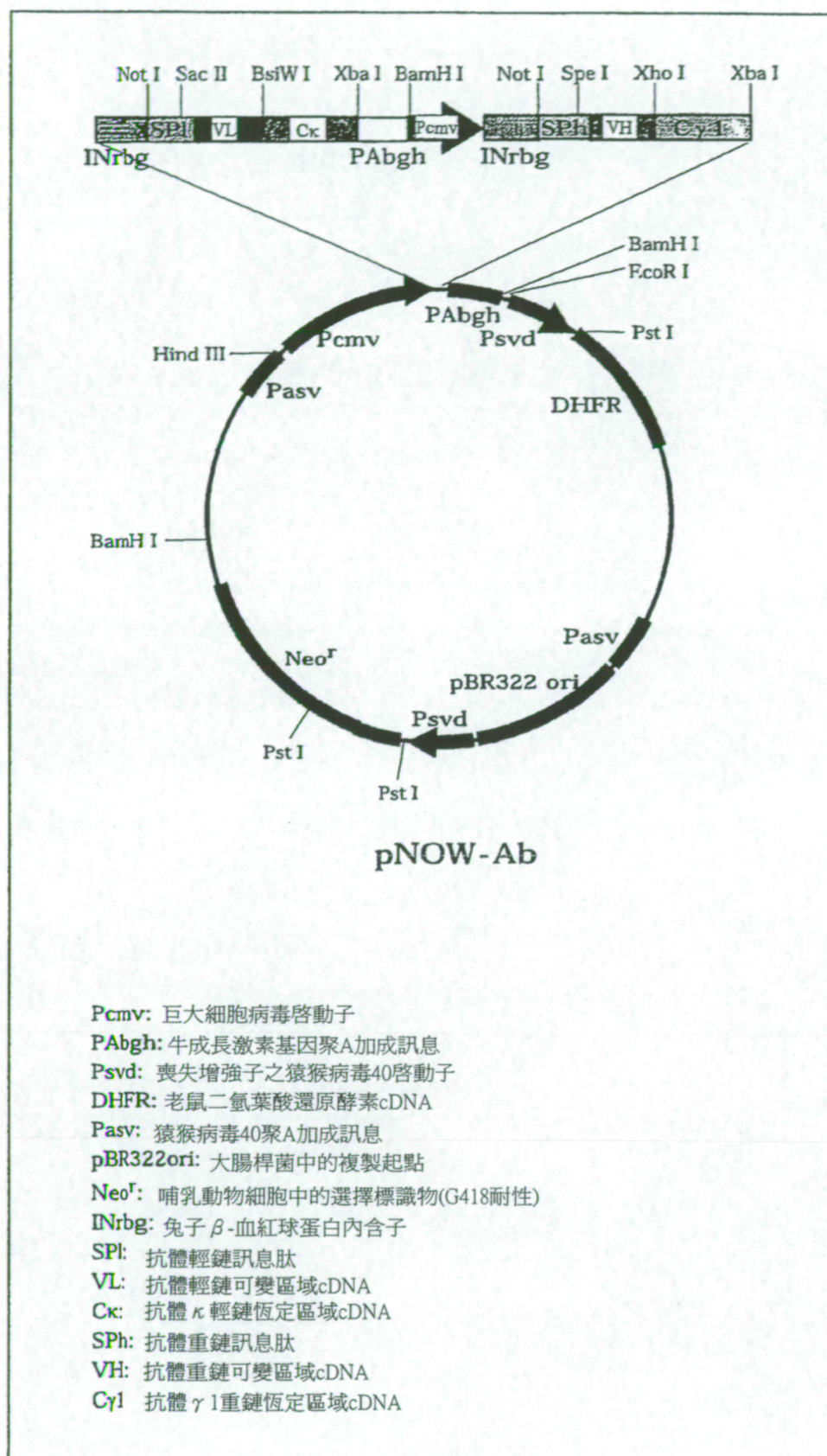


圖 1

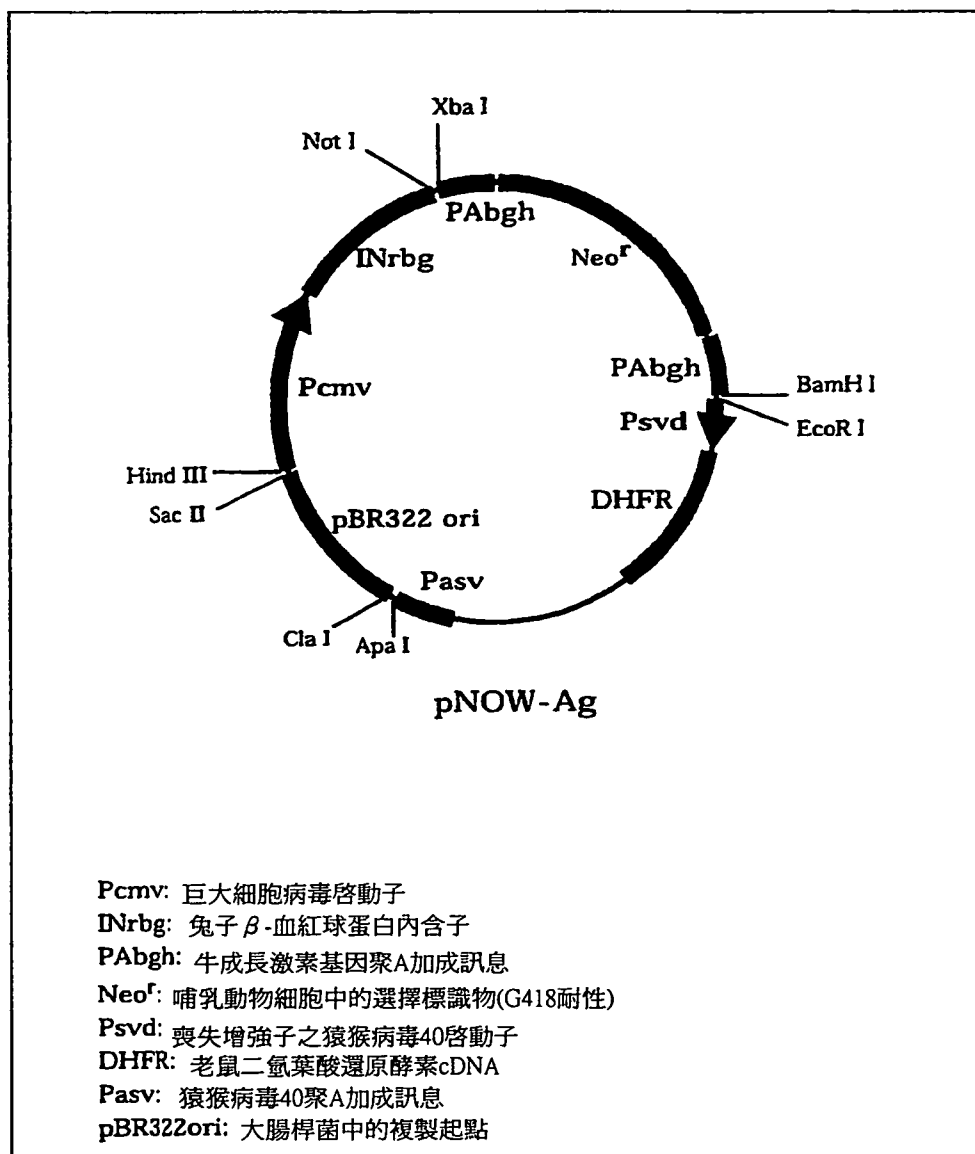


圖2

Human CD20 5' primer (( 序列號碼13 )  
 hCD20-S-GK-Not aatgcggccgccaccatgacaacaccagaaattc  
 Human CD20 3' primer (( 序列號碼14 )  
 hCD20-E-Xba gctctagattaaggagagctgtcattttc

圖3

1K1422 H鏈V區域序列(序列號碼1 )  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCRASGYTFITNYNMHWIKQTPGQGLEWIGAIYPGSGDTSYNRKFKGKATLTADTS  
 SSTAYMQFSSLTSADSAVYYCARFTYTYGGTYGAMDYWGQGTSTVTVSL

1K1791 H鏈V區域序列(序列號碼2 )  
 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFITNFGVNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPSYADDFKGRFAPSLEAS  
 ANTAYLQINNKNDDMSTYFCTRRITNYGYTSYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

1K1712 H鏈V區域序列(序列號碼3 )  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTSYNLHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGSGDTSYNQFKGKATLTADKS  
 SNTAYMQLNSLTSEDSAVYCCARSAMISTGNWYFDYWGQGTTLTVSS

1K1402 H鏈V區域序列(序列號碼4 )  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQFKGKATLTADKS  
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARFYTYGSMGAMDYWGQGTSTVTVSS

1K1736 H鏈V區域序列(序列號碼5 )  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFITNYNLHWVKQTPGQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQFKVKATLTADKS  
 SNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWYTYGNYEGTLDYWGQGTSTVTVSS

1K1782 H鏈V區域序列(序列號碼6 )  
 QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFITSYNMHWVKQRPQGLEWIGYITPSTGYTDYNNKFKDKATLTADRS  
 SSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARSGPYFDVWGAGTTVTVSS

1K1422 L鏈V區域序列(序列號碼7 )  
 QIVLTQSPPIIMASLGEITLTCSASSRVSYMLWYQQKSGTSPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTIS  
 SVEAEDAADYYCHQWTSNPCTFGGGTKLEIK

1K1791 L鏈V區域序列(序列號碼8 )  
 STVMTQTPKFLLVSAQDRVTITCKASQSVSNDAVWYQQKPGQSPKVLIIYFASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTTI  
 NTVQAEDLAVYFCQDYSSPLTFGAGTKLELK

1K1712 L鏈V區域序列(序列號碼9 )  
 QIVLSQSPAILSPGKVTMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS  
 RVEAEDTATYYCQWTFNPPTFGSGTKLEIK

1K1402 L鏈V區域序列(序列號碼10 )  
 QIVLSQSPAILSPGKVTMTCRASSSVSYMHYQQKPGSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIT  
 RVEAEDAATYYCQWTFNPPTFGAGTKLELK

1K1736 L鏈V區域序列(序列號碼11 )  
 QIVLSQSPAILSSSPGKVTMTCRASSSVSYMLWYQQKPGSSPEPIYATSNLASGVPARFSGGSGSGTSYSLTIS  
 RVEAEDAATYYCQWTFNPPTFGGGTKLEIK

1K1782 L鏈V區域序列(序列號碼12 )  
 DILLTQSPAILFVSPGERVSLSCRASQNGTSHWYQQRTNGSPRLLIKYASESFSGIPSRFSGSGSGTDFTLSI  
 NSVESEDIADYYCQSNWPPTFGSGTKLEIK

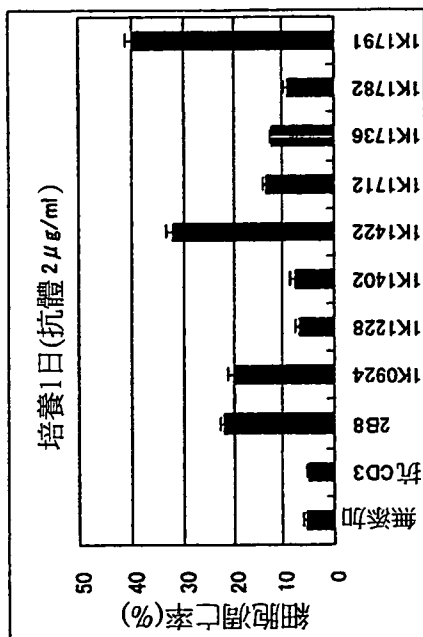
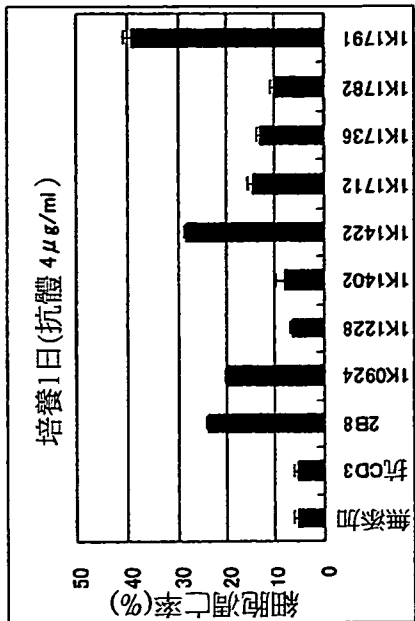
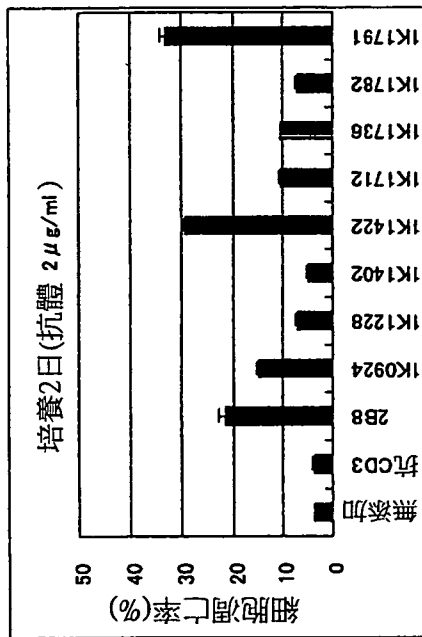
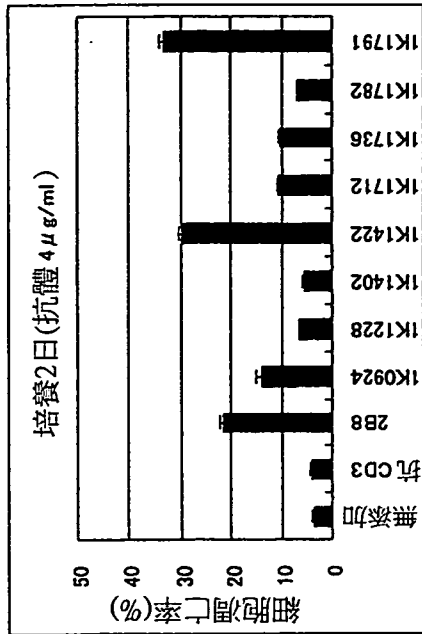
1K0924 H鏈V區域序列(序列號碼15 )  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFITSYNIHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKGKATLTSDKS  
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARMSTMITGFDYWGQGTTLTVSS

1K1228 H鏈V區域序列(序列號碼16 )  
 QVQLQQPGAELVKPGASVKVSKASGFTFTSYNLHWVKQTPGQGLVWIGAIYPGNGDTSYNQKFRGKATLTADIS  
 SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYYGYDAMDYWGQGTSTVTVSS

1K0924 L鏈V區域序列(序列號碼17 )  
 QIVLSQSPAILSPGKVTMTCRASSSVSYMHYQQRPQSSPKPIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYFYFTIS  
 RVEAEDAATYYCQWNSNPPTHGGGTKLEIK

1K1228 L鏈V區域序列(序列號碼18 )  
 EIILTQSPITMAASPGEKITITCSASSISSYLRWYQQKPGFSPKVLIIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIG  
 TMEAEDVATYYCQQGNTVPLTFGSGTKLEIK

圖5



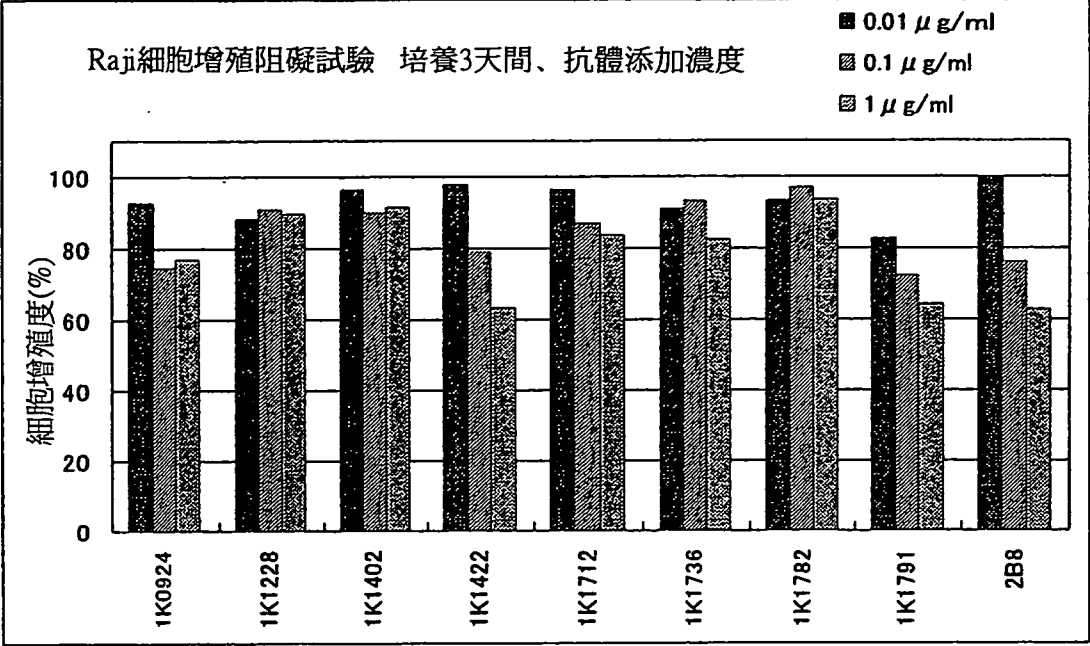


圖6

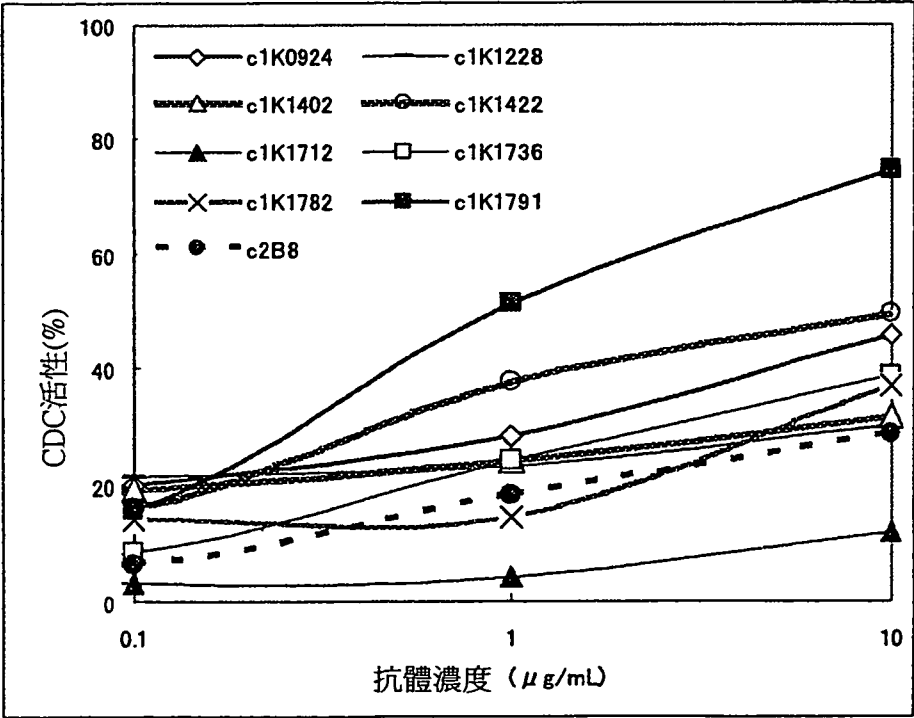


圖7

人類化抗體H鏈V區域序列 (abbH1791) (序列號碼19)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLEWMGW INTYTGEPSY  
AQGFTGRFVF SLDASVSTAY LQISLKAED TATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV  
TVSS

人類化抗體H鏈V區域遺傳因子序列例 (abbH1791) (序列號碼27)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC  
CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG  
CCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAGCTACGCCCA  
GGGCTTCAACGGCGCTTCGTGTTAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT  
GAAGGCCGAGGACACCGCACTACTTCTGCACCGCGCCGACCACTACTACGGCACCAGCTACTACTAAGC  
CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

人類化抗體H鏈V區域序列 (fraH1791) (序列號碼20)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSY  
ADDFKGRFAF SLDASASTAY LQISLKAED MATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV  
TVSS

人類化抗體H鏈V區域遺傳因子序列例 (fraH1791) (序列號碼28)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC  
CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA  
GCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAGCTACGCCGA  
CGACTTCAAGGGCGCTTCGCCTTACGCTGGACGCCAGCGCCAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT  
GAAGGCCGAGGACATGGCCACTACTTCTGCACCGCGCCGACCACTACTACGGCACCAGCTACTACTAAGC  
CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

人類化抗體H鏈V區域序列 (sdrH1791) (序列號碼21)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSY  
AQGFTGRFAF SLDASVSTAY LQISLKAED TATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV  
TVSS

人類化抗體H鏈V區域遺傳因子序列例 (sdrH1791) (序列號碼29)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC  
CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG  
CCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAGCTACGCCCA  
GGGCTTCAACGGCGCTTCGCCTTACGCTGGACGCCAGCGTGAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT  
GAAGGCCGAGGACACCGCACTACTTCTGCACCGCGCCGACCACTACTACGGCACCAGCTACTACTAAGC  
CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

人類化抗體H鏈V區域序列 (venH1791) (序列號碼22)

QIQLVQSGPE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSY  
ADDFKGRFAF SLDASVSTAY LQISLKAED TSTYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGQGTTV  
TVSS

人類化抗體H鏈V區域遺傳因子序列例 (venH1791) (序列號碼30)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCGAGCTGAAGAAGCC  
CGGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA  
GCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAGCTACGCCGA  
CGACTTCAAGGGCGCTTCGCCTTACGCTGGACGCCAGCGTGAGCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT  
GAAGGCCGAGGACACCGCACTACTTCTGCACCGCGCCGACCACTACTACGGCACCAGCTACTACTAAGC  
CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

圖 8A

人類化抗體L鏈V區域序列 (abbL1791) (序列號碼23)  
 STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYSGVPD  
 RFSGSGYGT DFTLTISLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK  
 人類化抗體L鏈V區域遺傳因子序列例(abbL1791) (序列號碼31)  
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGCCAC  
 CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC  
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG  
 CACCGACTTCACCGTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA  
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

人類化抗體L鏈V區域序列 (fraL1791) (序列號碼24)  
 STVMTQSPSF LSASVGRVT ITCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYTGVPD  
 RFSGSGYGT DFTLTISLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK  
 人類化抗體L鏈V區域遺傳因子序列例 (fraL1791) (序列號碼32)  
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTTCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAACCCTGAC  
 CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC  
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG  
 CACCGACTTCACCGTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA  
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

人類化抗體L鏈V區域序列 (sdrL1791) (序列號碼25)  
 STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYSGVPD  
 RFSGSGYGT DFTLTISLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK  
 人類化抗體L鏈V區域遺傳因子序列例 (sdrL1791) (序列號碼33)  
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGGCCAC  
 CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCAACAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC  
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG  
 CACCGACTTCACCGTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA  
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

人類化抗體L鏈V區域序列 (venL1791) (序列號碼26)  
 STVMTQSPDS LAVSLGERVT INCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYTGVPD  
 RFSGSGYGT DFTLTISVQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK  
 人類化抗體L鏈V區域遺傳因子序列例 (venL1791) (序列號碼34)  
 CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGTGAC  
 CATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCC  
 CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGGCGTGCCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG  
 CACCGACTTCACCTTACCATCAGCAGCGTGACGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA  
 CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

圖 8B

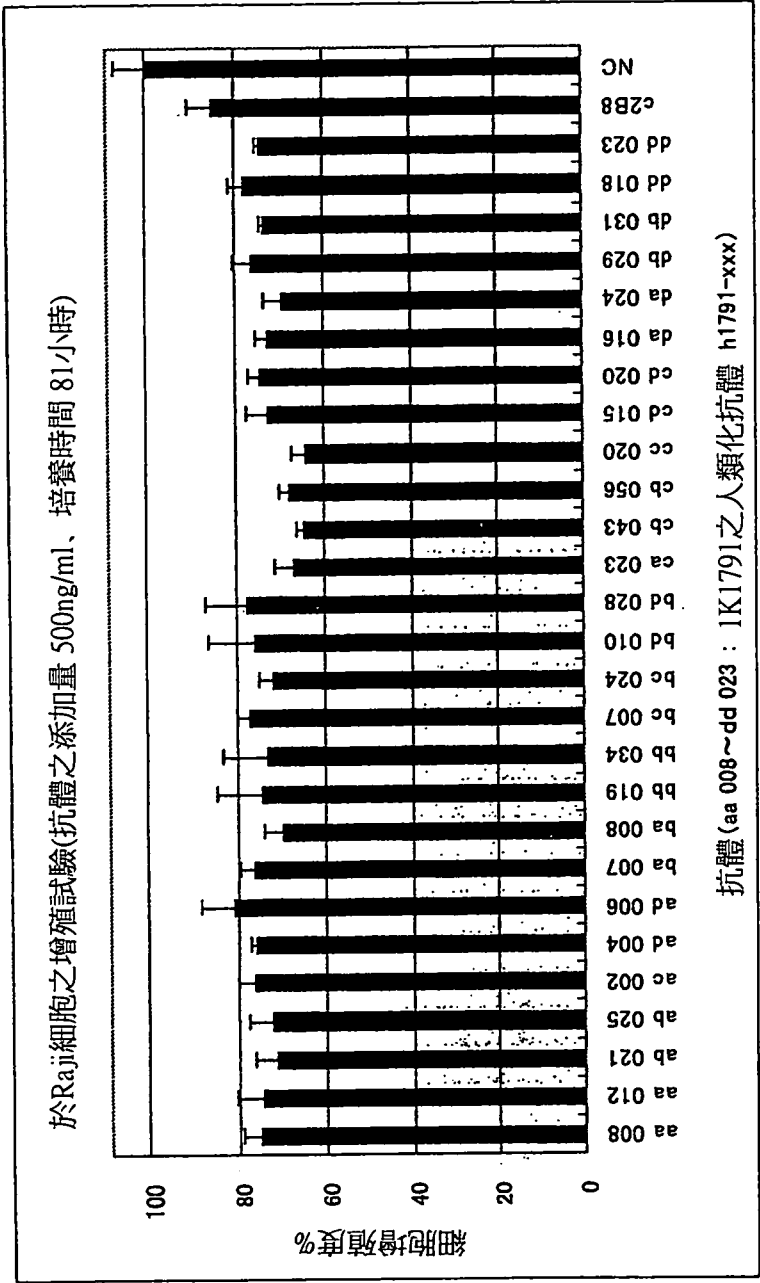


圖9