

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680029170.6

[51] Int. Cl.

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月6日

[11] 公开号 CN 101237890A

[22] 申请日 2006.6.9

[21] 申请号 200680029170.6

[30] 优先权

[32] 2005.6.10 [33] JP [31] 170794/2005

[86] 国际申请 PCT/JP2006/311625 2006.6.9

[87] 国际公布 WO2006/132363 日 2006.12.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.2.5

[71] 申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 井川智之 龟冈大介

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 郭文洁 黄可峻

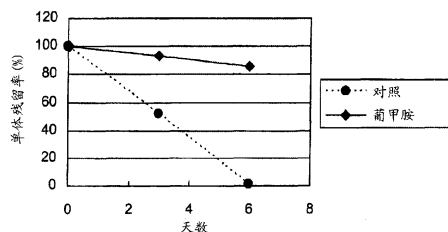
权利要求书 2 页 说明书 46 页 序列表 50 页  
附图 4 页

[54] 发明名称

含有葡甲胺的蛋白质制剂的稳定剂及其利用

[57] 摘要

本发明的课题在于提供使蛋白质稳定的方法、或者抑制蛋白质聚集的方法，这些方法包含将葡甲胺添加到蛋白质中的步骤。本发明还提供含有葡甲胺、使蛋白质稳定的药物，或者抑制蛋白质聚集的药物。并且本发明的课题还在于提供含有由于葡甲胺而稳定的抗体分子的药物组合物、该组合物的制备方法、以及含有该组合物的试剂盒。本发明人为解决上述课题，对于氨基糖的一种—葡甲胺的抗体稳定性效果进行了研究。结果发现，葡甲胺可用作抗体分子的稳定剂，也可用作冻干制剂的赋型剂。



1. 药物, 该药物含有葡甲胺, 可使蛋白质长期稳定。
2. 药物, 该药物含有葡甲胺, 可抑制蛋白质的聚集。
3. 权利要求 1 或 2 的药物, 其中, 蛋白质是抗体分子。
4. 权利要求 3 或 4 的药物, 其中, 抗体分子是全长抗体、片段化抗体、小分子抗体、修饰抗体或抗体类分子的任意一种。
5. 权利要求 1-4 中任一项的药物, 该药物的剂型是冻干制剂。
6. 权利要求 1-5 中任一项的药物, 其中, 葡甲胺是其盐或其衍生物。
7. 使蛋白质长期稳定的方法, 该方法包含向蛋白质中添加葡甲胺的步骤。
8. 抑制蛋白质聚集的方法, 该方法包含向蛋白质中添加葡甲胺的步骤。
9. 权利要求 7 或 8 的方法, 该方法是在长期低温保存条件下, 使蛋白质长期稳定或抑制蛋白质聚集的方法。
10. 权利要求 7 或 8 的方法, 该方法是在长期常温保存条件下, 使蛋白质长期稳定或抑制蛋白质聚集的方法。
11. 权利要求 7-10 中任一项的方法, 其中, 蛋白质是抗体分子。
12. 权利要求 11 的方法, 其中, 抗体分子是全长抗体、片段化抗体、小分子抗体、修饰抗体或抗体类分子的任意一种。
13. 权利要求 7-12 中任一项的方法, 该方法包含在添加葡甲胺的步骤之后将蛋白质冷冻干燥的步骤。
14. 权利要求 7-13 中任一项的方法, 其中, 葡甲胺是其盐或其衍生物。
15. 药物组合物, 该药物组合物添加了葡甲胺。
16. 权利要求 15 的药物组合物, 其特征在于: 该药物组合物的剂型是冻干制剂。
17. 权利要求 15 或 16 的药物组合物, 其中, 葡甲胺是其盐或其衍生物。
18. 含有抗体分子的药物组合物的制备方法, 该方法包含向含有抗体的组合物中添加葡甲胺的步骤。
19. 含有抗体分子的药物组合物的制备方法, 该方法包含以下(1)和(2)的步骤:

- (1) 将葡甲胺添加到含有抗体的组合物中的步骤;
- (2) 使(1)的混合物冷冻干燥的步骤。

20. 权利要求 18 或 19 的药物组合物的制备方法, 其中, 抗体分子是全长抗体、片段化抗体、小分子抗体、修饰抗体或抗体类分子的任意一种。

21. 权利要求 18-20 中任一项的制备方法, 其中, 葡甲胺是其盐或其衍生物。

## 含有葡甲胺的蛋白质制剂的稳定剂及其利用

### 技术领域

本发明涉及含有氨基糖的一种——葡甲胺的、使蛋白质稳定的药物及其应用。更具体地说，本发明涉及含有葡甲胺的、使抗体分子稳定的药物，以及使抗体分子稳定的方法，该方法包含添加葡甲胺的步骤。本发明还涉及含有通过葡甲胺而稳定化的抗体分子的药物组合物及其制备方法。

### 背景技术

对于生物药品的制剂化，需要的是可使作为药物使用的蛋白质稳定保存的制剂(非专利文献 1)。

已知通常的蛋白质降解的途径有：可溶性的多聚体的形成或者伴随沉淀、不溶物的生成等的蛋白质分子的物理性聚集的降解途径(非专利文献 2)；以及通过水解·脱酰胺反应、甲硫氨酸氧化反应等的化学修饰导致的降解途径(非专利文献 3)。在开发蛋白质作为药物时，必须提供将上述两种降解途径抑制到最小限度、在保存中不会发生其蛋白质的生物学活性降低的制剂。将上述降解途径抑制到最小限度的方法是进行溶液 pH 的最佳化、缓冲液·盐的种类和浓度、以及稳定剂的种类和浓度的最佳化。

已知可作为药物使用的抗体有全长抗体、片段抗体、小分子抗体、修饰抗体(抗体与其它蛋白质的融合蛋白以及抗体的缀合物)等。已知 IgG 的抗体制剂通常要求非常高浓度的制剂，因此制备非常困难(非专利文献 5)。为此，在缓冲溶液的种类和 pH 的最佳化之外，人们还对使抗体稳定进行了各种尝试。例如在 WO02/096457(专利文献 1)中公开了含有酸性成分的抗体高浓度稳定剂，为了使抗体稳定，使用  $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$  作为添加剂。还已知小分子抗体等容易发生聚集，稳定性非常低(非专利文献 8、9)，还已知 scFv 的单体非常容易聚集，在高浓度条件下单体聚集，形成二聚体(非专利文献 10)。因此，将这些抗体以溶液制剂的形式开发药物时，使抗体分子在溶液中稳定(即抑制聚集)是非常重要的课题。

通常，蛋白质通过冷冻干燥，比溶液状态更为稳定(聚集受到抑制)，

因此上述抗体制剂在溶液制剂化较为困难时可以考虑制成冻干制剂(非专利文献 11、12、13)。有报道称:在 IgG 抗体冷冻干燥时,蔗糖用作赋形剂很有效(非专利文献 14)。

目前葡甲胺是用作 X 射线造影剂(泛影葡胺)、MRI 造影剂(钆喷酸葡甲胺)等,目前尚未见到关于其可以使蛋白质稳定的效果的报道。

非专利文献 1: Nat. Rev. Drug Discov. 2005, 4(4), 298-306

非专利文献 2: Int. J. Pharm. 2005, 289, 1-30

非专利文献 3: Int. J. Pharm. 1999, 185, 129-188

非专利文献 4: J. Pharm. Sci. 2004, 93(6), 1390-1402

非专利文献 5: Pharmaceutical Research 1994, 11(5), 624-632

非专利文献 6: Clin. Chem. Lab. Med. 2000, 38(8):759-764

非专利文献 7: Journal of Immunological Methods, 111 (1988), 17-23

非专利文献 8: FEBS Letters Volume 360, Issue 3, 1995, 247-250

非专利文献 9: FEBS Letters, 1995, 441, 458-462

非专利文献 10: J. Mol. Biol. 2002, 320, 107-127

非专利文献 11: Pharm Biotechnol, 2002, 13, 109-33

非专利文献 12: Int. J. Pharm. 2000, 203(1-2), 1-60

非专利文献 13: Pharm. Res. 1997, 14(8), 969-75

非专利文献 14: J. Pharm. Sci. 2001, 90(3), 310-21

专利文献 1: WO02/096457

## 发明内容

本发明针对上述状况,其目的在于提供使蛋白质稳定的方法,该方法包含将作为氨基糖的一种的葡甲胺添加到蛋白质中的步骤。

更具体地说,本发明提供使抗体分子稳定的方法,该方法包含将葡甲胺添加抗体分子中的步骤;或者提供抑制抗体分子聚集的方法。本发明的课题还在于提供含有葡甲胺、使抗体分子稳定的药物,或者抑制抗体分子聚集的药物。本发明的目的又在于提供含有由葡甲胺稳定的抗体分子的药物组合物,该药物组合物的制备方法,以及含有该药物组合物的试剂盒。

本发明人为解决上述课题,对氨基糖的一种—葡甲胺的抗体稳定效

果进行了研究。

首先，本发明人使用 sc(Fv)<sub>2</sub> 形式的 hVB22B sc(Fv)<sub>2</sub>，研究了葡甲胺对聚集反应的抑制效果。结果表明，通过添加葡甲胺，单体的残留率大幅提高，可大幅抑制 hVB22B 的聚集反应。通过本研究，发现：对稳定性低的小分子抗体添加葡甲胺则可以显著提高稳定性。本研究首次表明，葡甲胺可用作蛋白质的稳定剂。

接着，对于葡甲胺对其它的 sc(Fv)<sub>2</sub> 分子以及全长抗体的稳定效果进行了研究。结果表明：通过添加葡甲胺，不仅对 sc(Fv)<sub>2</sub>，对于全长抗体的 IgG 等的抗体分子全体均具有抑制聚集化的效果。

与蔗糖相比，葡甲胺对于抑制聚集物（会合体）生成的效果在溶液制剂、冷冻干燥应激、冻干制剂中均很明显。另外，葡甲胺对于抗体浓度为 100 mg/ml 这样非常高浓度的制剂、不管是溶液状态还是冻干状态均显示高的稳定化效果。并且表明，通过添加葡甲胺，即使在低温下或常温下长期保存，也可以抑制抗体分子的聚集。

即，由本发明初次发现了葡甲胺可用作抗体分子的稳定剂，本发明人由此完成了本发明。

本发明更具体的提供以下的[1]-[21]。

[1] 药物，该药物含有葡甲胺，可使蛋白质长期稳定。

[2] 药物，该药物含有葡甲胺，可抑制蛋白质的聚集。

[3] [1]或[2]的药物，其中，蛋白质是抗体分子。

[4] [3]或[4]的药物，其中，抗体分子是全长抗体、片段化抗体、小分子抗体、修饰抗体或抗体类分子的任意一种。

[5] [1]-[4]中任一项的药物，该药物的剂型是冻干制剂。

[6] [1]-[5]中任一项的药物，其中，葡甲胺是其盐或其衍生物。

[7] 使蛋白质长期稳定的方法，该方法包含向蛋白质中添加葡甲胺的步骤。

[8] 抑制蛋白质聚集的方法，该方法包含向蛋白质中添加葡甲胺的步骤。

[9] [7]或[8]的方法，该方法是在长期低温保存条件下，使蛋白质长期稳定或抑制蛋白质聚集的方法。

[10] [7]或[8]的方法，该方法是在长期常温保存条件下，使蛋白质长期稳定或抑制蛋白质聚集的方法。

[11] [7]-[10]中任一项的方法，其中，蛋白质是抗体分子。

[12] [11]的方法，其中，抗体分子是全长抗体、片段化抗体、小分子抗体、修饰抗体或抗体类分子的任意一种。

[13] [7]-[12]中任一项的方法，该方法包含在添加葡甲胺的步骤之后将蛋白质冷冻干燥的步骤。

[14] [7]-[13]中任一项的方法，其中，葡甲胺是其盐或其衍生物。

[15] 药物组合物，该药物组合物添加了葡甲胺。

[16] [15]的药物组合物，其特征在于：该药物组合物的剂型是冻干制剂。

[17] [15]或[16]的药物组合物，其中，葡甲胺是其盐或其衍生物。

[18] 含有抗体分子的药物组合物的制备方法，该方法包含向含有抗体的组合物中添加葡甲胺的步骤。

[19] 含有抗体分子的药物组合物的制备方法，该方法包含以下(1)和(2)的步骤：

(1) 将葡甲胺添加到含有抗体的组合物中的步骤；

(2) 使(1)的混合物冷冻干燥的步骤。

[20] [18]或[19]的药物组合物的制备方法，其中，抗体分子是全长抗体、片段化抗体、小分子抗体、修饰抗体或抗体类分子的任意一种。

[21][18]-[20]中任一项的制备方法，其中，葡甲胺是其盐或其衍生物。

#### 附图简述

图 1 是表示葡甲胺对 hVB22B 的稳定化效果的图。

图 2 是表示葡甲胺对 sc(Fv)2 分子和全长抗体的稳定化效果的图。图中的数值表示溶液加速条件下聚集物的含有率(%)。

图 3 是表示 IgG 的溶液制剂化和冻干制剂化中葡甲胺的稳定性效果的图。

图 4 是表示单链双抗体(Single chain diabody)型 sc(Fv)2 在长期低温保存(-20℃、6 个月)下葡甲胺的稳定性效果的图。

图 5 是表示人源化双特异性抗体长期常温保存(25℃、2 个月)下葡甲胺的稳定性效果的图。

图 6 是表示单链抗体 sc(Fv)2 的制备过程的图。

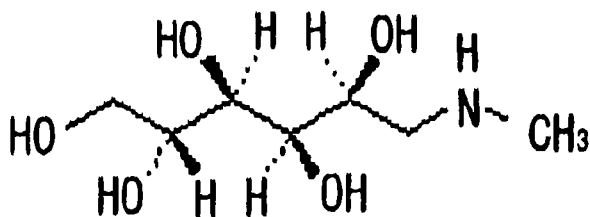
### 实施发明的最佳方式

本发明人在研究 sc(Fv)<sub>2</sub> 的稳定化制剂的过程中，发现了作为氨基糖的一种的新型稳定剂葡甲胺。并且发现该葡甲胺不仅可稳定小分子抗体 sc(Fv)<sub>2</sub>，也可以稳定全长抗体。并且发现：葡甲胺与在蛋白质药物制剂中通常作为稳定剂使用的蔗糖等糖或氨基糖相比，对于抗体分子等蛋白质或肽显示优异的稳定效果。本发明根据上述认识完成。

本发明涉及使蛋白质稳定的方法，该方法包含向蛋白质中添加葡甲胺。本发明的稳定化可以是长期稳定化。本发明中，“长期稳定化”如下定义。为小分子抗体的溶液制剂时，是指在 55℃ 下保存两周后聚集物的量为 35% 或以下，或者在 40℃ 下保存两周后聚集物的量为 10% 或以下、优选 7% 或以下，或者在 25℃ 下保存两个月后聚集物的量为 1% 或以下，或者在 -20℃ 保存六个月后聚集物的量为 2% 或以下、优选 1% 或以下。为除小分子抗体之外的全部抗体或者通常的蛋白质溶液制剂时，是指在 60℃ 下保存三周后聚集物的量为 20% 或以下、优选 10% 或以下，或者在 -20℃ 下保存六个月后聚集物的量为 2% 或以下、优选 1% 或以下。为 IgG、包括小分子抗体的所有抗体或者通常的蛋白质冻干制剂时，是指在 40℃ 下保存一个月后聚集物的量为 5% 或以下、优选 1% 或以下、进一步优选 0.5% 或以下。

本发明中，“葡甲胺”是别名为 N-甲基葡胺、化学式为 1-脱氧-1-甲基氨基-D-葡萄糖醇以及以下化学式所示的化合物。

[化 1]



1-脱氧-1-甲基氨基-D-葡萄糖醇

本发明中，“葡甲胺”包含葡甲胺衍生物或葡甲胺的盐等。葡甲胺衍生物或葡甲胺的盐可例举酰胺基泛影酸葡甲胺、泛影酸钠葡甲胺、钆喷

酸葡甲胺、钆特酸葡甲胺、碘他拉葡胺、碘托葡胺、钆贝葡胺、meglumine iodoxamate、氟尼辛葡甲胺、gastrografin (硫酸葡甲胺盐)等。但并不限于此。另外,上述葡甲胺的羟基、氨基等可以进行化学修饰,修饰所得的产物也包含在本发明的葡甲胺中。

本发明中,作为稳定化对象的药物组合物(蛋白质)可以是包括肽的蛋白质或者其它生物体高分子、合成高分子化合物、低分子化合物或它们的衍生物或其组合的复合物的任意形式。本发明的优选例子可例举抗体。

本发明中,作为稳定化对象的抗体可以使用公知的抗体,可以是全长抗体、片段化抗体、修饰抗体或小分子抗体的任意一种。

公知的全长抗体可例举 IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgD、IgE、IgM、IgY 等,其种类没有特别限定。全长抗体也包括双特异性 IgG 抗体(J Immunol Methods. 2001 Feb 1;248(1-2):7-15)。

另外,使用新型抗原、按照本领域技术人员公知的方法制备的抗体也可作为对象。具体来说,例如新型抗体的制备可如下进行。

使用新型抗原蛋白质或其片段作为致敏抗原,将其按照通常的免疫方法进行免疫,将所得的免疫细胞按照常规的细胞融合法与公知的亲代细胞融合,通过常规的筛选方法筛选单克隆的抗体生成细胞(杂交瘤)。抗原的制备可按照公知的方法例如使用杆状病毒的方法(WO98/46777等)等进行。杂交瘤的制备例如可按照 Milstein 等人的方法(Kohler, G.和 Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46)等进行。抗原的免疫原性低时,可以使其与白蛋白等具有免疫原性的巨大分子结合,进行免疫。然后使用反转录酶从杂交瘤的 mRNA 中合成抗体的可变区(V 区)的 cDNA,按照公知的方法对所得的 cDNA 的序列进行解读。

识别新型抗原的抗体只要可与新型抗原结合即可,没有特别限定,可以适当采用小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体、绵羊抗体、人抗体等。另外,为了使其对人的异种抗原性降低等,还可以使用人为改变的基因重组型抗体、例如嵌合抗体、人源化抗体等。这些改变抗体可以采用已知的方法制备。嵌合抗体是含有人以外的哺乳动物例如小鼠抗体的重链、轻链可变区与人抗体的重链、轻链恒定区的抗体等,可通过将编码小鼠抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,将其整合到表达载体中,导入宿主生成获得。

人源化抗体也称为重构人抗体,是将人以外的哺乳动物例如小鼠抗体的互补决定区(CDR)移植到人抗体的互补决定区所得,已知这是常规的基因重组方法。具体来说如下获得:设计将小鼠抗体的 CDR 与人抗体的支架区(FR)连接的 DNA 序列,通过 PCR 法,从制备为末端具有重叠部分的多个寡核苷酸中合成上述 DNA 序列。将所得的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接,整合到表达载体中,将其导入宿主,生产获得(参照欧洲专利申请公开号 EP239400、国际专利申请公开号 WO96-02576)。经由 CDR 连接的人抗体的 FR 可选择互补决定区可形成良好的抗原结合部位的支架区。还可根据需要置换抗体可变区中支架区的氨基酸,使重构人抗体的互补决定区形成适当的抗原结合部位(Sato, K. 等人., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

还已知人抗体的获得方法。例如体外用所需抗原或表达所需抗原的细胞对人淋巴细胞致敏,将致敏淋巴细胞与人骨髓瘤细胞、例如 U266 融合,可得到具有与抗原的结合活性的所需的人抗体(参照日本特公平 1-59878)。另外,还可以将具有人抗体基因的所有组成成分的转基因动物用所需抗原进行免疫,获得所需的人抗体(国际专利申请公开号 WO93/12227、WO92/03918、WO94/02602、WO94/25585、WO96/34096、WO96/33735)。并且还已知使用人抗体文库,通过淘选技术获得人抗体的技术。例如,以人抗体的可变区作为单链抗体(scFv),通过噬菌体展示法在噬菌体的表面表达,可选择与抗原结合的噬菌体。如果对所选择的噬菌体的基因进行分析,可以确定编码与抗原结合的人抗体可变区的 DNA 序列。如果了解了与抗原结合的 scFv 的 DNA 序列,则可以制备具有该序列的适当的表达载体,可以获得人抗体。这些方法是已知的,可以参考 WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388。

作为本发明的稳定化对象的抗体可以是片段化抗体或小分子抗体。它们可以是公知的抗体或新制备的抗体的任意一种。片段化抗体或小分子抗体包括全长抗体(例如全长 IgG)的一部分缺损的抗体片段,只要具有与抗原的结合能力即可,没有特别限定。抗体片段的具体例子例如有 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv (单链 Fv) (Huston, J. S. 等人., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-5883, Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Resenbug 和 Moore 编辑., Springer

Verlag, New York, 269-315 页, (1994)), VHH (camelid VH, J Biotechnol. 2001 Jun; 74(4):277-302.)或 sc(Fv)2 等, 优选 sc(Fv)2。为了获得上述抗体片段, 可以是将抗体用酶、例如木瓜蛋白酶、胰蛋白酶等进行处理, 生成抗体片段, 或者构建编码这些抗体片段的基因, 将其导入表达载体, 然后在适当的宿主细胞中表达(例如参照 Co, M. S.等人., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M.和 Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A.和 Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J.等人., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E.和 Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137)。

本发明中, 优选的小分子抗体是含有抗体的两个或以上 VH 以及两个或以上 VL, 这些各可变区可以直接或者经由接头等间接地结合的抗体。结合可以是共价键也可以是非共价键, 还可以是共价键与非共价键两者。进一步优选的小分子抗体是含有两个或以上 VH 和 VL 通过非共价键结合形成的 VH-VL 对的抗体。这种情况下, 优选小分子抗体中的一方的 VH-VL 对与另一方的 VH-VL 对之间的距离比全长抗体中的距离还短的抗体。

本发明中, 小分子抗体可例举 scFv、双抗体或 sc(Fv)2。scFv 是可变区与可变区通过接头等结合的片段。

双抗体是使两个 scFv 等(以下称为构成双抗体的片段)结合, 形成二聚体所得, 通常含有 2 个 VL 和 2 个 VH。构成双抗体的片段之间的结合可以是非共价键, 也可以是共价键, 优选非共价键。

构成双抗体的片段可以是将 VL 与 VH 结合的片段、将 VL 与 VL 结合的片段、将 VH 与 VH 结合的片段等, 优选将 VH 与 VL 结合的片段。构成双抗体的片段中, 对于将可变区与可变区结合的接头没有特别限定, 优选使用同一片段中可变区之间不发生非共价结合的程度的较短的接头。上述接头的长度可由本领域技术人员适当确定, 通常为 2-14 个氨基酸, 优选 3-9 个氨基酸, 特别优选 4-6 个氨基酸。这种情况下, 在同一片段上编码的 VL 与 VH 之间的接头短, 因此, 同一链上的 VL 与 VH 之间不发生非共价结合, 不形成单链 V 区片段, 因此形成与其它片段的非共价结合的二聚体。并且, 与双抗体制备同样的原理, 还可以使 3 个或以上构成双抗体的片段结合, 制备三聚体、四聚体等多聚体化的抗体。

sc(Fv)<sub>2</sub> 是两个重链可变区([VH])和两个轻链可变区([VL])通过接头结合、制成的单链多肽的抗体(Hudson 等人., J Immunol. Methods (1999) 231: 177-189)。该两个 VH 和 VL 可以来自不同的单克隆抗体。例如有: Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374 中公开的两种抗原、或者识别两种表位的双特异性 sc(Fv)<sub>2</sub>。sc(Fv)<sub>2</sub> 例如可通过接头等将两个 scFv(单链 Fv) (Huston, J. S. 等人., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883, Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Resenburt 和 Moore 编辑., Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994))结合来制备。接头可以使用可通过基因工程导入的任意的肽接头、或者合成化合物接头、例如 Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996 中所公开的接头等, 本发明中优选肽接头。肽接头的长度没有特别限定, 可根据目的由本领域技术人员适当选择, 通常为 1-100 个氨基酸, 优选 5-30 个氨基酸, 特别优选 12-18 个氨基酸(例如 15 个氨基酸)。

所结合的两个重链可变区和两个轻链可变区的顺序没有特别限定, 可以以任何顺序排列, 例如可以是以下配置。

[VH] 接头 [VL] 接头 [VH] 接头 [VL]  
 [VL] 接头 [VH] 接头 [VH] 接头 [VL]  
 [VH] 接头 [VL] 接头 [VL] 接头 [VH]  
 [VH] 接头 [VH] 接头 [VL] 接头 [VL]  
 [VL] 接头 [VL] 接头 [VH] 接头 [VH]  
 [VL] 接头 [VH] 接头 [VL] 接头 [VH]

本发明中, 优选具有[VH] 接头 [VL] 接头 [VL] 接头 [VH]配置的 sc(Fv)<sub>2</sub>。

重链可变区或轻链可变区的氨基酸序列可以置换、缺失、附加和/或插入。并且重链可变区与轻链可变区聚集时, 只要具有抗原结合活性, 可以使部分缺损, 也可以附加其它的多肽。可变区可以进行嵌合化或人源化处理。

本发明中, 将抗体的可变区结合的接头可以使用通过基因工程导入的任意的肽接头、或者合成化合物接头、例如 Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996. 中公开的接头。

本发明中优选的接头是肽接头。肽接头的长度没有特别限定, 可由本领域技术人员根据目标适当选择, 通常为 1-100 个氨基酸, 优选 3-50

个氨基酸，进一步优选 5-30 个氨基酸，特别优选 12-18 个氨基酸(例如 15 个氨基酸)。

肽接头的氨基酸序列例如可以是下述序列。

Ser

Gly•Ser

Gly•Gly•Ser

Ser•Gly•Gly

Gly•Gly•Gly•Ser(SEQ ID NO.: 41)

Ser•Gly•Gly•Gly(SEQ ID NO.: 42)

Gly•Gly•Gly•Gly•Ser (SEQ ID NO.: 43)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly(SEQ ID NO.: 44)

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(SEQ ID NO.: 45)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly(SEQ ID NO.: 46)

Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(SEQ ID NO.: 47)

Ser•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly•Gly (SEQ ID NO.: 48)

(Gly•Gly•Gly•Gly•Ser(SEQ ID NO.: 43))<sub>n</sub>

(Ser•Gly•Gly•Gly•Gly(SEQ ID NO.: 44))<sub>n</sub>

[n 为 1 或以上的整数]

合成化学物接头(化学交联剂)是肽的交联中通常使用的交联剂，例如 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、辛二酸二琥珀酰亚胺酯(DSS)、辛二酸双(磺基琥珀酰亚胺基酯)(BS3)、丙酸二硫代双(琥珀酰亚胺基酯)(DSP)、丙酸二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基酯)(DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(磺基-EGS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸盐(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸盐(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(BSO COES)、双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)等，这些交联剂是市售产品。

将四个抗体的可变区结合时，通常需要三个接头，可以使用完全相同的接头，也可以使用不同的接头。

sc(Fv)<sub>2</sub> 可按照本领域技术人员所周知的方法制备。例如将编码

sc(Fv)<sub>2</sub> 的 DNA 插入到的载体中, 在导入宿主细胞, 使 sc(Fv)<sub>2</sub> 表达, 回收表达产物, 由此可制备 sc(Fv)<sub>2</sub>。

该载体只要可稳定地保持插入的 DNA 即可, 没有特别限定, 例如如果宿主使用大肠杆菌, 则克隆载体优选 pBluescript 载体(Stratagene 制)等, 也可以利用市售的各种载体。在本发明的生产 sc(Fv)<sub>2</sub> 的目的中使用载体时, 表达载体特别有用。表达载体只要是在试管内、大肠杆菌内、培养细胞内、生物个体内表达 sc(Fv)<sub>2</sub> 的载体即可, 没有特别限定, 例如, 如果在试管内表达则优选使用 pBEST 载体(Promega 制), 如果在大肠杆菌中表达则优选使用 pET 载体(Invitrogen 制), 在培养细胞中表达则优选使用 pME18S-FL3 载体(GenBank 登录号 AB009864), 在生物个体中表达则优选使用 pME18S 载体(Mol Cell Biol. 8:466-472 (1988))等。本发明的 DNA 向载体中的插入可按照常规方法、例如通过使用限制酶切位点的连接酶反应进行(Current protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel 等人. (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11)。

上述宿主细胞没有特别限定, 可以根据目的使用各种宿主细胞。用于表达 sc(Fv)<sub>2</sub> 的细胞例如有细菌细胞(例如、链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌、枯草杆菌)、真菌细胞(例如酵母、曲霉)、昆虫细胞(例如果蝇 S2、草地贪夜蛾 SF9)、动物细胞(例如 CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、黑素瘤细胞)和植物细胞。载体向宿主细胞的导入例如可通过磷酸钙沉淀法、电脉冲穿孔法(Current protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel 等人. (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9)、脂转染法(GIBCO-BRL 制)、显微注射法等公知的方法进行。

将本发明的 sc(Fv)<sub>2</sub> 分泌到培养基中时, sc(Fv)<sub>2</sub> 的回收可以通过回收培养基来实施。当 sc(Fv)<sub>2</sub> 在细胞内生成时, 首先溶解该细胞, 然后回收 sc(Fv)<sub>2</sub> 组合物。

已知为了制备与某种多肽具有同等功能的多肽, 本领域的已知方法是向多肽中导入突变的方法。例如本领域技术人员使用位点专一性诱变法(Hashimoto-Gotoh, T.等. Gene 152, 271-275, (1995); Zoller, MJ, 和 Smith, M. Methods Enzymol. 100, 468-500, (1983); Kramer, W.等人., Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, (1984); Kramer, W.和 Fritz HJ, Methods Enzymol. 154, 350-367, (1987); Kunkel, TA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

82, 488-492, (1985); Kunkel, *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766, (1988))等, 将适当的突变导入本发明的抗体, 由此可制备与该抗体功能同等的抗体。氨基酸的突变还可以在自然界中产生。这样, 本发明的抗体的氨基酸序列中具有 1 个或多个氨基酸突变的氨基酸序列、与该抗体功能同等的抗体也包含在本发明的抗体中。

突变的氨基酸数目没有特别限定, 通常为 30 个氨基酸或以内, 优选 15 个氨基酸或以内, 进一步优选 5 个氨基酸或以内(例如 3 个氨基酸或以内)。突变的氨基酸残基中, 优选突变为可保留氨基酸支链性质的其它的氨基酸。例如作为氨基酸支链的性质。可列举疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、具有脂族支链的氨基酸(G、A、V、L、I、P)、具有含羟基支链的氨基酸(S、T、Y)、具有含硫原子支链的氨基酸(C、M)、具有羧酸和含酰胺的支链的氨基酸(D、N、E、Q)、具有含碱基支链的氨基酸(R、K、H)、具有含芳族支链的氨基酸(H、F、Y、W) (括号内均表示氨基酸的单字母标记)。还已知具有通过对氨基酸序列有 1 个或多个氨基酸残基缺失、附加和/或被其它氨基酸置换而修饰的氨基酸序列的多肽也可以保持其生物学活性(Mark, D. F. 等人., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5662-5666 (1984); Zoller, M. J. & Smith, M. *Nucleic Acids Research* 10, 6487-6500 (1982); Wang, A. 等人., *Science* 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. 等人., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6409-6413 (1982))。另外, 抗体的恒定区等的氨基酸序列也是本领域技术人员所公知的。

本发明中使用的抗体可以是修饰抗体, 修饰抗体可以是与聚乙二醇(PEG)、放射性物质、毒素等各种分子结合的缀合抗体。

修饰抗体除抗体缀合物之外, 还可以是抗体分子、抗体分子片段、抗体样分子与其它蛋白质·肽的融合蛋白。融合蛋白有: TNF $\alpha$  与 Fc 的融合蛋白(*Int J Clin Pract.* 2005 Jan;59(1):114-8)、或者 IL2 与 scFv 的融合蛋白(*J Immunol Methods.* 2004 Dec;295(1-2):49-56)等, 对此没有特别限定。

本发明中使用的抗体可以是抗体样分子。抗体样分子有 affibodies (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 18; 100(6):3191-6)和锚蛋白(*Nat Biotechnol.* 2004 May; 22(5):575-82), 对此没有特别限定。

上述抗体可根据本领域技术人员所公知的方法制备。具体来说, 将

作为目标的抗体的 DNA 整合到表达载体中。此时是整合到表达载体中，在表达控制区例如增强子、启动子的控制下进行表达。接着，通过该表达载体转化宿主细胞，使抗体表达。此时可以使用适当的宿主与表达载体的组合。

载体的例子有 M13 系载体、pUC 系载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script 等。在以 cDNA 亚克隆、切取为目的时，除上述载体外例如还有 pGEM-T、pDIRECT、pT7 等。

在为了生产抗体而使用载体时，表达载体特别有用。作为表达载体，例如以在大肠杆菌中表达为目的时，除了具有在大肠杆菌中扩增等上述特征之外，在宿主为 JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1-Blue 等大肠杆菌时，具有在大肠杆菌中有高效表达的启动子例如 lacZ 启动子(Ward 等. (1989) Nature 341:544-546; (1992) FASEB J. 6:2422-2427)、araB 启动子(Better 等. (1988) Science 240:1041-1043)、或者 T7 启动子等是不可缺少的。所述载体除上述载体之外，还有 pGEX-5X-1 (Pharmacia 制)、“QIAexpress system” (QIAGEN 制)、pEGFP 或 pET (这种情况下，宿主优选为表达 T7 RNA 聚合酶的 BL21)等。

载体中可以含有用于多肽分泌的信号序列。作为多肽分泌的信号序列，在大肠杆菌的周质中生产时，可以使用 pelB 信号序列(Lei, S. P. 等. J. Bacteriol. 169:4379 (1987))。载体向宿主细胞的导入例如可采用氯化钙法、电穿孔法进行。

除大肠杆菌之外，例如本发明的制备多肽的载体可以是来自哺乳动物的表达载体(例如 pcDNA3 (Invitrogen 制)或 pEGF-BOS (Nucleic Acids Res. (1990) 18(17):5322)、pEF、pCDM8)、来自昆虫细胞的表达载体(例如“Bac-to-BAC 杆状病毒表达系统”(GIBCO BRL 制)、pBacPAK8)、来自植物的表达载体(例如 pMH1、pMH2)、来自动物病毒的表达载体(例如 pSHV、pMV、pAdexLcw、)、来自反转录病毒的表达载体(例如 pZIPneo)、来自酵母的表达载体(例如“毕赤氏酵母表达试剂盒”(Invitrogen 制)、pNV11、SP-Q01)、来自枯草杆菌的表达载体(例如 pPL608、pKTH50)。

在目的是在 CHO 细胞、COS 细胞、NIH3T3 细胞等动物细胞中表达时，具有在细胞内表达所必须的启动子例如 SV40 启动子(Mulligan 等. (1979) Nature 277:108)、MMLV-LTR 启动子、EF1 $\alpha$  启动子(Mizushima 等. (1990) Nucleic Acids Res. 18:5322)、CMV 启动子等是不可缺少的，

进一步优选具有用于筛选对细胞转化的基因(例如可通过药物(新霉素、G418等)进行判别的抗药性基因)。具有上述特性的载体例如有 pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13等。

并且,在为了使基因稳定表达且扩增细胞内的基因拷贝数时,有向核酸合成途径缺损的 CHO 细胞中导入具有与其互补的 DHFR 基因的载体(例如 pCHOI 等),通过甲氨蝶呤(MTX)扩增的方法;另外,在以基因的瞬时表达为目的时,可以使用染色体上具有表达 SV40T 抗原的基因的 COS 细胞,通过具有 SV40 复制起点的载体(pcD 等)进行转化的方法。复制起点还可以使用来自多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒(BPV)等的复制起点。并且,为了在宿主细胞系内扩增基因拷贝数,表达载体可以含有氨基葡萄糖苷转移酶(APH)基因、胸苷激酶(TK)基因、大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Ecogpt)基因、二氢叶酸还原酶(dhfr)基因等作为选择性标志。

本发明中,将葡甲胺“添加”到蛋白质中是指使葡甲胺与蛋白质混合。本发明中,使葡甲胺与蛋白质混合可以是使蛋白质溶解于含有葡甲胺的溶液中。

本发明中,“稳定化”是指蛋白质保持天然状态或者具有活性的状态。

通过添加本发明的含有葡甲胺的稳定剂,如果蛋白质的活性比天然状态或者对照升高,或者在保存时由于聚集导致的活性降低更小,则均可视为蛋白质稳定化。作为蛋白质的具体例子,抗体分子的活性是否升高,这可在相同条件下通过测定目标活性来确认。作为稳定化目标的抗体分子可以是合成的抗体分子,也可以从生物体中分离。

本发明中,活性可以是结合活性、中和活性、细胞伤害活性、激动活性、拮抗活性、酶活性等任何活性,没有特别限定,优选为对生物体、组织、细胞、蛋白质、DNA、RNA 等的量和/或质的变化、影响的活性,特别优选激动活性。

激动活性是指抗体与受体等的抗原结合,使信号向细胞内传递等的、诱导一些生理活性变化的活性。生理学活性例如有生长活性、存活活性、分化活性、转录活性、膜传输活性、结合活性、蛋白质分解活性、磷酸化/脱磷酸化活性、氧化还原活性、转移活性、核酸分解活性、脱水活性、细胞死亡诱导活性、编程性细胞死亡诱导活性等,但并不限于此。

本发明中,对抗原没有特别限定,可以是任何抗原。抗原的例子有:受体、癌抗原、MHC 抗原、分化抗原等。受体的例子例如有:造血因子受体家族、细胞因子受体家族、酪氨酸激酶受体家族、丝氨酸/苏氨酸激酶受体家族、TNF 受体家族、G 蛋白质共轭受体家族、GPI 锚蛋白受体家族、酪氨酸磷酸酶受体家族、粘着因子家族、激素受体家族等受体家族的受体等。这些属于受体家族的受体及其特征存在于多种文献中,例如有: Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. *New Comprehensive Biochemistry Vol.18B "Hormones and their Actions Part II"* pp.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., New York, USA, Patthy L. (1990) *Cell*, 61: 13-14., Ullrich A., 等人. (1990) *Cell*, 61: 203-212., Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070., Miyajima A., 等人. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331., Taga T. and Kishimoto T. (1992) *FASEB J.*, 7: 3387-3396., Fantl WJ., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481., Smith CA., 等人. (1994) *Cell*, 76: 959-962., Flower DR. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234., 宫坂昌之监修, 细胞工学别册 ハンドブックシリーズ "粘着因子手册" (1994) (秀润社, 东京, 日本)等。

属于上述受体家族的具体的受体例如有人或小鼠红细胞生成素(EPO)受体、人或小鼠粒细胞集落刺激因子(G-CSF)受体、人或小鼠血小板生成素(TPO)受体、人或小鼠胰岛素受体、人或小鼠 Flt-3 配体受体、人或小鼠来自血小板的生长因子(PDGF)受体、人或小鼠干扰素 (IFN)- $\alpha$ 、 $\beta$  受体、人或小鼠瘦素受体、人或小鼠生长激素(GH)受体、人或小鼠白细胞介素(IL)-10 受体、人或小鼠胰岛素样生长因子(IGF)-I 受体、人或小鼠白血病抑制因子(LIF)受体、人或小鼠睫状神经营养因子(CNTF)受体等

(hEPOR: Simon, S. 等人. (1990) *Blood* 76, 31-35.; mEPOR: D'Andr ea, AD. 等人. (1989) *Cell* 57, 277-285.; hG-CSFR: Fukunaga, R. 等人. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 8702-8706.; mG-CSFR: Fukunaga, R. 等人. (1990) *Cell* 61, 341-350.; hTPOR: Vigon, I. 等人. (1992) 89, 5640-5644.; mTPOR: Skoda, RC. 等人. (1993) 12, 2645-2653.; hInsR: Ullrich, A. 等人. (1985) *Nature* 313, 756-761.; hFlt-3: Small, D. 等人. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 459-463.; hPD

GFR: Gronwald, RGK. 等人. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 3435-3439.; hI FN $\alpha$  /  $\beta$  R: Uze, G. 等人. (1990) Cell 60, 225-234. 以及 Novick, D. 等人. (1994) Cell 77, 391-400.)。

癌抗原是与细胞恶性化相伴表达的抗原，也称为肿瘤特异性抗原。细胞癌化时在细胞表面或蛋白质分子上表达的异常糖链也是癌抗原，特别称为癌糖链抗原。癌抗原的例子例如有 CA19-9、CA15-3、sialyl SSEA-1 (SLX) 等。

MHC 抗原大致分为 MHC-I 类抗原和 MHC-II 类抗原，MHC-I 类抗原中含有 HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G、-H，MHC II 类抗原含有 HLA-DR、-DQ、-DP。

分化抗原包含：

CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15s, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33, CD34, CD35, CD38, CD40, CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD64, CD69, CD71, CD73, CD95, CD102, CD106, CD122, CD126, CDw130。

测定活性变化所使用的检测指标只要是可测定量和/或质的变化的即可，均可使用。例如可以采用无细胞体系(无细胞测定)的指标、细胞体系(细胞测定)的指标、组织体系的指标、生物体系的指标。

无细胞体系的指标可以采用酶促反应或蛋白质、DNA、RNA 的量和/或质的变化。酶促反应例如可以采用氨基酸转移反应、糖转移反应、脱水反应、脱氢反应、底物切断反应等。也可以采用蛋白质的磷酸化、脱磷酸化、二聚体化、多聚体化、分解、离解等，或者 DNA、RNA 的扩增、切断、延伸。例如，可以以存在于信号传导途径下游的蛋白质的磷酸化作为检测指标。

细胞体系的指标可以采用细胞表型的变化、例如生成物质的量和/或质的变化、生长活性的变化、细胞数目的变化、形态的变化、特性的变化等。生成物质可以使用分泌蛋白、表面抗原、胞内蛋白、mRNA 等。形态的变化可以采用突起的形成和/或突起数目的变化、扁平度的变化、

伸长度/纵横比的变化、细胞大小的变化、内部结构的变化、作为细胞集团的异形性/均匀性、细胞密度的变化等。这些形态变化可以通过检测镜下的观察来确认。特性的变化可以采用锚定蛋白依赖性、细胞因子依赖性、激素依赖性、抗药性、细胞运动性、细胞游走活性、搏动性、细胞内物质变化等。细胞运动性有细胞浸润活性、细胞游走活性。细胞内物质的变化例如可采用酶活性、mRNA量、Ca<sup>2+</sup>或cAMP等细胞内信息传递物质、细胞内蛋白质质量等。细胞膜受体可以以受体的由刺激诱导的细胞生长活性的变化为指标。

组织体系的指标可以以所使用的组织的功能变化为检测指标。生物体系的指标可以采用组织重量变化、血液系统的变化、例如血细胞数目的变化、蛋白质的量或酶活性、电解质的量的变化、以及循环系统的变化例如血压、脉搏数的变化等。

作为测定这些检测指标的方法没有特别限定，可以采用吸光、发光、显色、荧光、放射活性、荧光偏振光度、表面等离子共振信号、时间分辨荧光光度、质量、吸收光谱、光散射、荧光共振能量转移等。这些测定方法对于本领域技术人员来说是周知的，可以根据目的适当选择。

例如吸收光谱可以通过通常使用的光度计或读板仪等，发光可通过发光计等，荧光可通过荧光计等测定。质量可使用质量分析仪测定。放射活性可根据放射线的种类使用 $\gamma$ 计数器等测定仪器、荧光偏振光度可使用BEACON(宝酒造)、表面等离子共振信号通过BIACORE、时间分辨荧光、荧光共振能量转移等可通过ARVO等测定。并且流式细胞仪等也可以用于测定。这些测定方法可以在一种测定方法中测定两种或以上的检测指标，为了简便，可以将两种或以上的测定同时和/或连续测定，由此可以测定更多的检测指标。例如可以将荧光和荧光共振能量转移同时通过荧光计测定。

本发明中，激动活性的测定可通过本领域技术人员公知的方法进行。例如如实施例所述，可以以细胞生长为指标，通过测定激动活性的方法进行判定。更具体地说，向显示激动依赖性生长的细胞中添加要测定激动活性的抗体并培养，然后根据WST-8等的存活细胞数，添加在特定的波长中呈现显色反应的试剂，测定吸光度，以所得吸光度为指标测定激动活性。

显示激动依赖性生长的细胞也可由本领域技术人员按照公知的方

法制备，例如抗原为发出细胞生长信号的受体时，可以使用表达该受体的细胞。或者抗原为不发出细胞生长信号的受体时，可以制备含有发出细胞生长信号的受体的胞内域和不发出细胞生长信号的受体的胞外域的嵌合受体，使该嵌合受体在细胞中表达。发出细胞生长信号的受体的例子例如有 G-CSF 受体、mpl、neu、GM-CSF 受体、EPO 受体、c-kit、FLT-3 等。表达受体的细胞例如有 BaF3、NFS60、FDCP-1、FDCP-2、CTLL-2、DA-1、KT-3。

本发明中，蛋白质“稳定化”是蛋白质的聚集反应受到抑制的状态，是指抑制在保存中产生的蛋白质聚集物的增加、和/或抑制保存中产生的蛋白质不溶性聚集物(沉淀物)的增加和/或保持蛋白质的功能，优选是指抑制保存中产生的蛋白质聚集物的增加。

本发明涉及抑制蛋白质聚集的方法，该方法包含向蛋白质中添加氨基糖的一种，即葡甲胺的步骤。更具体地说，涉及抑制抗体分子聚集的方法，该方法包含向抗体分子中添加葡甲胺的步骤。

本发明中，聚集是指蛋白质(抗体分子)不可逆或可逆地聚集，抗体形成的两个分子或以上的多聚体。聚集是否受到抑制，这可以通过本领域所公知的方法例如沉淀平衡法(超离心法)、渗透压法、光散射法、低角度激光光散射法、小角度 X 射线散射法、小角度中子散射法或凝胶过滤法等，测定抗体分子聚集物的含有率来进行。通过添加葡甲胺，如果保存时抗体聚集物含有率降低，则可以解释为聚集受到抑制。

抗体的聚集物含有率的测定方法如实施例所述，有使用 SEC (大小排阻层析)进行的方法，但并不限于这些方法。

本发明中，“使抗体分子稳定”是不管抗体浓度或状态，使溶液抗体制剂、冷冻干燥抗体制剂或喷雾干燥制剂中所含的抗体分子稳定。可以是使低温下或常温下长期保存的抗体分子稳定。本发明中，低温保存的一个例子可以是在 $-80^{\circ}\text{C}$ 至 $10^{\circ}\text{C}$ 下保存，冷冻保存也包括在保存形式中。低温的优选例子是 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $5^{\circ}\text{C}$ ，但并不限于该温度。本发明中，常温保存的一个例子是 $15^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$ 下的保存。常温的优选例子有 $25^{\circ}\text{C}$ ，但并不限于该温度。

溶液制剂化可以通过本领域所周知的方法实施。例如如非专利文献(J. Pharm. Sc, 2004, 93(6), 1390-1402)记载，通常可以采用利用 TFF 膜的膜浓缩法。

冷冻干燥可以根据本领域技术人员所周知的方法(Pharm. Biotechnol, 2002, 13, 109-33; Int. J. Pharm. 2000, 203(1-2), 1-60; Pharm. Res. 1997, 14(8), 969-75)实施。例如, 将溶液适量分注到冷冻干燥中使用的瓶等容器中, 在冷冻库或冷冻干燥库中进行, 或者浸泡到丙酮/干冰、液氮等冷介质中进行。

喷雾干燥制剂化可按照本领域技术人员所周知的方法实施(J. Pharm. Sci. 1998 Nov; 87(11):1406-11)。

关于溶液制剂化和冷冻干燥, 可以按照实施例所记载的方法进行, 但并不限于此。

本发明涉及含有氨基糖的一种一葡甲胺、使蛋白质稳定的药物, 或者是抑制蛋白质聚集的药物。更具体地说, 涉及含有葡甲胺、使抗体分子稳定的药物、或抑制抗体分子聚集的药物,

本发明还涉及含有葡甲胺、使抗体分子稳定的药物, 或者使冷冻干燥抗体制剂中所含的抗体分子稳定的药物。

本发明中, 药物中可以添加保存剂或稳定剂等制剂上可接受的载体。制剂上可接受是指其本身是具有稳定上述蛋白质作用的材料, 也可以是不具有稳定作用的材料, 是可以与上述药物一起给予的制剂上可接受的材料。可以是不具有稳定作用的材料, 也可以通过与葡甲胺联合使用、协同性或相加性地具有稳定效果的材料。

制剂上可接受的材料例如有灭菌水或生理盐水、稳定剂、赋形剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、螯合剂(EDTA等)、粘合剂等。

本发明中, 可以例举非离子表面活性剂作为表面活性剂, 其典型例子例如有: 单癸酸脱水山梨醇酯、单月桂酸脱水山梨醇酯、单棕榈酸脱水山梨醇酯等脱水山梨醇脂肪酸酯; 单癸酸甘油酯、单肉豆蔻酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯等甘油脂肪酸酯; 十甘油单硬脂酸酯、十甘油二硬脂酸酯、十甘油单油酸酯等聚甘油脂肪酸酯; 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单棕榈酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇三油酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇三硬脂酸酯等聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯; 聚氧乙烯山梨醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇四油酸酯等聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯; 聚氧乙烯甘油单硬脂酸酯等聚氧乙烯甘油脂肪酸酯; 聚乙二醇二硬脂酸酯等聚乙二醇脂肪酸酯; 聚氧乙烯月桂基醚等聚氧乙烯烷基醚; 聚

氧乙烯聚氧化丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯丙基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯鲸蜡基醚等聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚；聚氧乙烯壬基苯基醚等聚氧乙烯烷基苯基醚；聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯氢化蓖麻油等聚氧乙烯氢化蓖麻油；聚氧乙烯山梨醇蜜蜡等聚氧乙烯蜜蜡衍生物；聚氧乙烯羊毛脂等聚氧乙烯羊毛脂衍生物；聚氧乙烯硬脂酰胺等聚氧乙烯脂肪酰胺等具有 HLB 6-18 的表面活性剂等。

表面活性剂也可以是阴离子表面活性剂，其典型的例子例如有：鲸蜡基硫酸钠、月桂基硫酸钠、油基硫酸钠等具有碳原子数 10-18 的烷基的烷基硫酸盐；聚氧乙烯月桂基硫酸钠等环氧乙烷的平均加成摩尔数为 2-4、烷基的碳原子数为 10-18 的聚氧乙烯烷基醚硫酸盐；月桂基磺基琥珀酸酯钠等烷基的碳原子数为 8-18 的烷基磺基琥珀酸酯盐；天然系表面活性剂例如卵磷脂、甘油磷脂；鞘磷脂等的鞘磷脂；碳原子数为 12-18 的脂肪酸的蔗糖脂肪酸酯等。

可以将上述表面活性剂的一种或两种或以上组合添加到本发明的制剂中。本发明的制剂中使用的优选的表面活性剂是聚山梨醇 20、40、60 或 80 等聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯，特别优选聚山梨醇 20 和 80。也优选以泊洛沙姆(Pluronic F-68 (注册商标))为代表的聚氧乙烯聚氧化丙二醇。

表面活性剂的添加量根据所使用的表面活性剂的种类而不同，为聚山梨醇 20 或聚山梨醇 80 时，通常为 0.001-100 mg/ml，优选 0.003-50 mg/ml，进一步优选 0.005-2 mg/ml。

本发明中，缓冲剂可以例举磷酸、柠檬酸缓冲液、乙酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、磷酸钾、葡糖酸、辛酸、脱氧胆酸、水杨酸、三乙醇胺、富马酸等有机酸等，或者碳酸缓冲液、Tris 缓冲液、组氨酸缓冲液、咪唑缓冲液等。

还可以通过溶解于在溶液制剂领域中公知的水性缓冲液中制备溶液制剂。缓冲液的浓度通常为 1-500 mM，优选 5-100 mM，进一步优选 10-20 mM。

本发明的药物还可以含有其它的低分子量的多肽、血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白质、氨基酸、多糖和单糖等糖类、或碳水化合物、糖醇。

本发明中，氨基酸可以例举碱性氨基酸，例如有精氨酸、赖氨酸、

组氨酸、鸟氨酸等,或这些氨基酸的无机盐(优选盐酸盐、磷酸盐的形式,即磷酸氨基酸)。使用游离氨基酸时,优选的pH值通过添加适当的生理上可接受的缓冲物质例如无机酸、特别是盐酸、磷酸、硫酸、乙酸、甲酸或它们的盐来进行调节。此时,从可以获得稳定的冻干产物的角度看,磷酸盐的应用特别有利。制备物中实质上不含有有机酸例如苹果酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸等时,或者不存在对应的阴离子(苹果酸离子、酒石酸离子、柠檬酸离子、琥珀酸离子、富马酸离子等)时特别有利。优选的氨基酸有精氨酸、赖氨酸、组氨酸或鸟氨酸。还可以使用酸性氨基酸例如谷氨酸和天冬氨酸及其盐的形式(优选钠盐)、或者中性氨基酸例如异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸或丙氨酸,或者芳族氨基酸例如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸或衍生物N-乙酰基色氨酸。

本发明中,多糖和单糖等糖类或碳水化合物例如有葡聚糖、葡萄糖、果糖、乳糖、木糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、棉籽糖等。

本发明中,糖醇例如有甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇等。

制成注射水溶液时,例如有生理盐水、含有葡萄糖或其它辅助试剂的等渗液、例如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠,还可以结合使用适当的溶解助剂例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇、PEG等)、非离子性表面活性剂(聚山梨醇80、HCO-50)等。

还可以根据需要进一步含有稀释剂、溶解助剂、pH调节剂、无痛剂、含硫还原剂、抗氧化剂等。

本发明中,含硫还原剂例如有N-乙酰基半胱氨酸、N-乙酰基同型半胱氨酸、硫辛醇、硫二甘醇、硫代乙醇胺、硫甘油、硫代山梨醇、巯基乙酸及其盐、硫代硫酸钠、谷胱甘肽以及碳原子数1-7的硫代链烷酸等具有巯基的还原剂等。

本发明中,抗氧化剂例如有异抗坏血酸、二丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚、 $\alpha$ -生育酚、乙酸生育酚、L-抗坏血酸及其盐、L-抗坏血酸棕榈酸酯、L-抗坏血酸硬脂酸酯、亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、没食子酸三戊基酯、没食子酸丙酯或者乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、焦磷酸钠、偏磷酸钠等螯合剂。

还可根据需要封入微胶囊(羟甲基纤维素、明胶、聚[甲基丙烯酸甲酯]等的微胶囊)中,或者制成胶体药物传递系统(脂质体、白蛋白微球、

微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊等) (参照“Remington's Pharmaceutical Science 16th edition”, Oslo Ed., 1980 等)。并且将药物制成缓释性药剂的方法是公知的, 也可适用于本发明(Langer 等人., J. Biomed. Mater. Res. 1981, 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105; 美国专利第 3,773,919 号; 欧洲专利申请公开(EP) 58,481; Sidman 等人., Biopolymers 1983, 22: 547-556; 和 EP 第 133,988 号)。

本发明涉及含有通过氨基糖的一种, 即葡甲胺进行稳定的抗体分子的药物组合物。本发明涉及含有通过作为氨基糖的一种的葡甲胺使其聚集化得到抑制的抗体分子的药物组合物。本发明又涉及含有该药物组合物以及药学上可接受的载体的试剂盒。

本发明的药物组合物和试剂盒中除了上述稳定化抗体分子之外, 还可以含有制剂上可接受的材料。制剂上可接受的材料可例举上述内容。

本发明的药物组合物的形态(剂型)可以例举注射剂型、冻干剂型、溶液剂型或喷雾干燥剂型等, 但并不限于此。

本发明的制剂可以以通常密封、灭菌的塑料或玻璃制的瓶、安瓿瓶、注射器等规定容量的形状容器、以及瓶等大容量形状容器供给。从使用方便的角度考虑优选预充式注射器。

对患者给予可以是口服、非口服给予的任意形式, 优选非口服给予, 例如可以是注射给予。作为注射给予的例子, 例如可通过静脉内注射、肌肉注射、腹腔内注射、皮下注射等进行全身或局部给予。可根据患者的年龄、症状选择适当的给予方法。关于给予量, 例如对蛋白质、肽、抗体, 可以是每 1 kg 体重每次在 0.0001 mg-1000 mg 的范围选择。或者例如每位患者在 0.001-100000 mg/个体的范围选择给予量。但是, 本发明并不受这些给予量和给予方法等的限定。对于低分子的化合物, 成人的有效分量是每天在 0.1-2000 mg 的范围, 但本发明并不受这些给予量和给予方法等的限制。

本发明的冻干制剂或喷雾干燥制剂可以在使用前制成溶液制剂。因此, 本发明也提供含有本发明冻干制剂或者喷雾干燥制剂、以及药学上可接受的载体的试剂盒。药学上可接受的载体只要是可以使本发明的冻干制剂或者喷雾干燥制剂形成溶液制剂即可, 对载体的种类、是否有组合等均没有限制, 通过使用本发明的稳定剂作为药学上可接受的载体及其部分, 可以抑制溶液制剂中抗体分子的聚集。

本发明涉及含有抗体的药物组合物的制备方法，该方法包含向抗体中添加葡甲胺、使抗体分子稳定的步骤。还涉及含有抗体分子的药物组合物的制备方法，该制备方法包含向抗体中添加葡甲胺、抑制抗体分子聚集的步骤。另外，本发明还涉及含有抗体分子的药物组合物的制备方法，该方法包含(1)向抗体中添加葡甲胺的步骤，以及(2)将(1)的混合物制成溶液制剂的步骤。本发明又涉及含有抗体分子的药物组合物的制备方法，该方法包含以下步骤：(1)向抗体中添加葡甲胺的步骤；以及(2)将(1)的混合物冷冻干燥的步骤。

溶液制剂化以及冷冻干燥可按照上述方法进行。

本说明书中引用的所有的现有技术文献均作为参照援引到本说明书中。

## 实施例

以下通过实施例进一步说明本发明，但本发明并不受这些实施例的限定。

### [实施例 1] 葡甲胺对 hVB22B 的稳定效果的研究

使用纯化为高纯度的 sc(Fv)<sub>2</sub>, hVB22B sc(Fv)<sub>2</sub> u<sub>2</sub>-wz<sub>4</sub> (SEQ ID NO.1, 参照以下参考例), 对葡甲胺抑制聚集反应的效果进行研究。稳定性试验中的溶剂条件、hVB22B 浓度如下所示。

<稳定性试验条件>

对照: 20 mM 柠檬酸钠(pH 6.5)

葡甲胺: 20 mM 柠檬酸钠、pH 6.5、10%葡甲胺

hVB22B u<sub>2</sub>-wz<sub>4</sub>: 1.0 mg/ml

上述条件下, 在 55°C-3 天后和 6 天后, 使用 SEC (大小排阻层析), 测定单体残留率(单体残留率是热加速试验样品的单体峰面积相对于初期状态单体峰面积的%)。SEC 的分析条件如下所示。

<SEC 的分析条件>

柱: TSKgel Super2000sw (TOSOH)

洗脱液: 50 mM 磷酸钠、300 mM KCl, pH 7.0

流速: 0.2 ml/分钟

检测波长: 220 nm

SEC 的分析结果如图 1 所示。图 1 是在上述溶液条件下的初始、

55°C-3天后、6天后单体残留率随时间变化的图。

由以上结果表明，与对照比较，通过添加葡甲胺，单体残留率大幅提高，可大幅抑制 hVB22B 的聚集反应。通过本研究发现：通过向稳定性非常低的小分子抗体添加葡甲胺，可以显著提高其稳定性。本研究还首次表明，葡甲胺可用作蛋白质的稳定剂。

[实施例 2] 葡甲胺对其它的 sc(Fv)<sub>2</sub> 分子、以及全长抗体的稳定效果的研究

在[实施例 1]所示的 hVB22B 以外的 sc(Fv)<sub>2</sub>：以下所示的 mVB22B (SEQ ID NO.2, 以下参照参考例)、12E10 (SEQ ID NO.3、WO02/33072)、2D7 (SEQ ID NO. 4, 以下参照参考例)中，对葡甲胺的稳定化效果进行了研究。还对不是 sc(Fv)<sub>2</sub> 而是全长抗体 IgG1 的人源化抗 IL-6 受体抗体 (H 链-SEQ ID NO. 5、L 链-SEQ ID NO.6、WO92/19759)的稳定化效果进行了研究。稳定性试验中的溶剂条件、各抗体浓度如下。

<稳定性试验条件>

对照：20 mM 柠檬酸缓冲液，pH 6.5

葡甲胺：20 mM 柠檬酸缓冲液、10%葡甲胺，pH 6.5

mVB22B：28 µg/ml，40°C-1 周后、2 周后进行测定

2D7：59 µg/ml，40°C-1 周后、2 周后进行测定

12E10：10 µg/ml，55°C-1 周后、2 周后进行测定

IgG：6.84 mg/ml，60°C-1 周后、3 周后进行测定

在上述条件下实施热加速试验。

<SEC 的分析条件>

对于 mVB22B、2D7、12E10，在下述条件下进行分析。

柱：TSKgel Super2000SW (TOSOH)

洗脱液：50 mM 磷酸钠、300 mM KCl，pH 7.0

流速：0.2 ml/分钟

检测波长：220 nm

对于 IgG，在下述条件下进行分析。

柱：TSKgel G3000SWxl (TOSOH)

洗脱液：DPBS(-)

流速：0.5 ml/分钟

检测波长: 220 nm

图2表示在上述各溶液加速条件下的聚集物(aggregate)随时间变化。稳定性试验的结果显示, 不仅限于 sc(Fv)<sub>2</sub>、IgG, 在任何分子形式中添加葡甲胺, 都会抑制聚集物的生成。由以上结果表明, 通过添加葡甲胺, 不仅对 sc(Fv)<sub>2</sub>, 在全长抗体的 IgG 等抗体分子全体中都具有抑制聚集的效果。目前并未报道葡甲胺作为抗体分子稳定剂的作用, 本研究首次了解了葡甲胺可用作抗体分子的稳定剂。

[实施例3] 作为 IgG 的溶液稳定剂、冻干制剂的赋型剂的葡甲胺的研究研究了葡甲胺作为 IgG 的溶液制剂的稳定剂、或者作为冻干制剂的赋型剂的稳定化效果。使用通常的蔗糖作为 IgG 的稳定剂(赋型剂)的比较。有报道称蔗糖作为制剂的冻干制剂非常有效。用于试验的试样和稳定试验性条件如下所示。

<供给试验的试样>

试样 1: IgG 80mg/瓶、蔗糖 100 mg/瓶, 聚山梨醇 80 1mg/瓶, 磷酸钠盐 30  $\mu$ mol/瓶, pH 6.0

试样 2: IgG 80mg/瓶、蔗糖 70 mg/瓶, 聚山梨醇 80 1mg/瓶, 磷酸钠盐 30  $\mu$ mol/瓶, pH 6.0

试样 3: IgG 80mg/瓶、蔗糖 50 mg/瓶, 聚山梨醇 80 1mg/瓶, 磷酸钠盐 30  $\mu$ mol/瓶, pH 6.0

试样 4: IgG 80mg/瓶、葡甲胺 55 mg/瓶, 聚山梨醇 80 1mg/瓶, 磷酸钠盐 30  $\mu$ mol/瓶, pH 6.0

试样 5: IgG 80mg/瓶、葡甲胺 40 mg/瓶, 聚山梨醇 80 1mg/瓶, 磷酸钠盐 30  $\mu$ mol/瓶, pH 6.0

试样 6: IgG 80mg/瓶、葡甲胺 30 mg/瓶, 聚山梨醇 80 1mg/瓶, 磷酸钠盐 30  $\mu$ mol/瓶, pH 6.0

对于上述试样的冻干制剂, 将要 IgG 浓度为 40 mg/ml 的冷冻干燥前的溶液以各 2 ml 填充到瓶中, 使用架式冷冻干燥机进行包含下述条件的冷冻干燥。

\* 冷冻干燥条件

| 步骤名  | 温度               |
|------|------------------|
| 预备冷冻 | -50 $^{\circ}$ C |

一次干燥                    -20℃

二次干燥                    25→30℃

上述试样的溶液制剂是通过在每一瓶冻干制剂中添加 0.6 ml 注射水来制备。此时，IgG 的浓度约为 120 mg/ml。

<稳定性试验条件>

冷冻干燥前后：对冷冻干燥前的溶液和冷冻干燥制剂进行测定

冻干制剂：对 40℃-1 个月的保存试样进行测定

溶液制剂：对 25℃-2 周的保存试样进行测定

<SEC 的分析条件>

按照以下分析条件进行测定。

柱：TSKgel G3000SWxl (TOSOH)

洗脱液：pH 7.0 的磷酸缓冲液(含有 300 mmol/l 氯化钠和 0.05% 叠氮化钠的 pH 7.0 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液)

流速：1 ml/分钟

检测波长：280 nm

图 3 中表示与冷冻干燥前后(冷冻干燥前的溶液和冻干制剂)的聚集物含量有关的蔗糖和葡甲胺的比较，以及与制备冻干制剂、40℃-1 个月加速试验后聚集物含量相关的蔗糖和葡甲胺的比较，以及与溶液制剂中 25℃-2 周加速试验后聚集物含量相关的蔗糖和葡甲胺的比较。

在任何比较中，与蔗糖相比，葡甲胺均使聚集物含有率降低。由此发现，葡甲胺对于聚集物的生成的稳定化作用比蔗糖更大。该稳定化作用中可见葡甲胺的浓度依赖性，葡甲胺浓度越高则越可见高的稳定化作用。即，相对于冷冻干燥步骤中抗体的干燥应激，通过添加葡甲胺，葡甲胺浓度相关性地抑制冷冻干燥导致的聚集物的增加。同样也可抑制冻干制剂 40℃-1 个月保存导致的聚集化。还发现，对于浓度约为 120 mg/ml 的溶液制剂，同样也可抑制 25℃-2 周保存导致的聚集化。对于上述超过 100 mg/ml 的高浓度溶液制剂，不管是溶液状态还是冷冻干燥状态，葡甲胺与葡萄糖相比均具有高的稳定化效果。

[实施例 4] 在 hVB22B u2-wz4 在 -20℃ 下冷冻保存时葡甲胺的稳定化效果

按照本发明参考例 1-3、WO2005/056603 或 WO2005/056604 所示的

方法表达 hVB22Bu 2-wz4, 纯化单链双抗体型 sc(Fv)2。使用纯化的单链双抗体型 sc(Fv)2, 制备以下溶液条件的配方(F1 和 F2)。

F1: 10 mg/ml 单链双抗体型 sc(Fv)2

20 mM 组氨酸(pH 6.8)+150 mM NaCl+0.5 mg/ml 聚山梨醇 80

F2: 10 mg/ml 单链双抗体型 sc(Fv)2+150 mM 葡甲胺

20 mM 组氨酸(pH 6.8)+150 mM NaCl+0.5 mg/ml 聚山梨醇 80

将这些试样在-20℃下冷冻保存6个月。使用SEC(凝胶过滤色谱), 在以下的条件下对保存前的试样(初始)的聚集物含有率和在-20℃下保存6个月后的试样(-20℃·6个月)的聚集物的含有率进行分析。

液相色谱

柱: TSKgel G3000SWXL (東ソー)

移动相: 50 mM 磷酸缓冲液(pH 7.0)+300 mM 氯化钾

流速: 0.5 ml/分钟

检测: 220 nm

试样注入量: 10 μl

柱温: 室温

样品温度: 5℃

图4表示经SEC分析的保存前的试样和-20℃ 6个月保存后的试样的聚集物含有率。关于聚集物的增加量, -20℃·6个月后, 在不含有葡甲胺的F1中聚集物增加了4.8%, 而含有葡甲胺作为稳定剂的F2中聚集物的增加抑制为0.4%。本实施例显示, 葡甲胺在冷冻状态下也具有稳定蛋白质的作用。

[实施例5] 葡甲胺在人源化双特异性抗体 hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ 中的稳定效果

使用纯化的人源化双特异性抗体 hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ, 制备以下溶液条件的配方(AF1、AF2、AF3)。含有 hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ 的人源化双特异性抗体是 IgG4 型抗体, 是含有 SEQ ID NO.49 所示的第一 H 链的可变区(hA69-KQ)、SEQ ID NO.50 所示的第二 H 链的可变区(hB26 - PF)、以及与各 H 链共通的 SEQ ID NO.51 所示的 L 链的可变区(hAL-AQ)的抗体。

AF1: 20mM 组氨酸-HCl, 50mM NaCl, pH5.8, 120mg/ml

## hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ

AF2: 20mM 组氨酸-HCl, 50mM NaCl, pH5.8, 200mM 葡甲胺, pH5.8  
120mg/ml hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ

AF3: 20mM 组氨酸-HCl, 50mM NaCl, 200mM 精氨酸-HCl, pH5.8  
120mg/ml hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ。

将这些试样在 25℃ 下常温保存 2 个月。使用 SEC (凝胶过滤色谱), 在以下的条件下对保存前的试样(初始)的聚集物含有率和 25℃-2 个月保存后的试样(25℃-2M)的聚集物含有率进行分析。测定时, 使用 SEC 的移动相将 AF1、AF2、AF3 稀释为 1 mg/ml, 使用稀释的试样进行分析。

### 液相色谱

柱: TSKgel G3000SWXL (東ソー)

移动相: 50 mM 磷酸缓冲液(pH 7.0)+300 mM 氯化钾

流速: 0.5 ml/分钟

检测: 220 nm

试样注入量: 10  $\mu$ l (用移动相将 120 mg/mL 的溶液稀释为 1 mg/mL, 注入所得溶液)

柱温: 室温

样品温度: 5℃

图 5 中显示, 经 SEC 分析的保存前的试样和 25℃ · 2 个月后的试样的聚集物含有率。关于 25℃ · 6 个月的聚集物的增加量, 在不含有稳定剂的 AF1 中聚集物增加了 0.51%; 而在含有葡甲胺作为稳定剂的 AF2 中, 可以将聚集物的增加抑制为 0.26%; 含有精氨酸作为稳定剂的 AF3 中, 聚集物的增加为 0.27%, 与精氨酸比较, 葡甲胺具有同等或以上的稳定化效果。另外, 与实施例 3 同样, 在含有 120 mg/ml 的高浓度人源化双特异性抗体 hA69-KQ/hB26-PF/hAL-AQ 溶液中, 葡甲胺也显示具有稳定化效果。另外, 葡甲胺不仅对 IgG、sc(Fv)<sub>2</sub>, 在双特异性 IgG 中也显示具有稳定化效果, 因此可广泛用作蛋白质的稳定剂使用。

以下, 对于本发明的 sc(Fv)<sub>2</sub> 抗体(hVB22B、mVB22B、2D7)的制作方法给出了参考例, 但本发明并不限于这些参考例。

## [参考例 1] 抗人 Mpl 抗体的制备

### 1.1 表达 Mpl 的 BaF3 细胞株的构建

为了获得 TPO 依赖的生长性的细胞株, 构建了表达全长 Mpl 基因的 BaF3 细胞株。

通过 PCR 扩增全长人 Mpl cDNA (Palacios, R. 等人., Cell, 41, 727-734 (1985)) (GenBank#NM005373), 克隆到除去了 pCHOI(Hirata, Y. 等人., FEBS Letter, 356, 244-248 (1994))的 DHFR 基因表达区域、插入 HEF-VH-gyl (Sato, K. 等人., Mol Immunol., 31, 371-381 (1994))的新霉素抗性基因表达区域的表达载体 pCOS2 上, 构建 pCOS2-hMplfull。

使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 制), 从由食蟹猴骨髓细胞中提取的总 RNA 中克隆食蟹猴 Mpl cDNA (SEQ ID NO.7)。将所得食蟹猴 cDNA 插入到 pCOS2 中, 构建 pCOS2-猴 Mplfull。

通过 PCR 扩增全长小鼠 Mpl cDNA (GenBank#NM\_010823), 插入到 pCOS2 中, 构建 pCOS2-小鼠 Mplfull。

将制备的各载体(20  $\mu$ g)与悬浮在 PBS 中的 BaF3 细胞( $1 \times 10^7$  细胞/ml)混合, 加入到基因脉冲池 (Gene Pulser cuvettes)中, 使用 Gene Pulser II (Bio-Rad), 以 0.33 kV、950  $\mu$ FD 的容量施加脉冲。将通过电穿孔处理导入了基因的 BaF3 细胞加入到含有 1 ng/ml 小鼠干扰素 3(以下称为 mIL-3, Peprotech 制)、500  $\mu$ g/ml 遗传霉素 (Invitrogen 制)、10% FBS (Invitrogen 制)的 RPMI1640 培养基(Invitrogen 制), 进行筛选, 构建人表达 Mpl 的 BaF3 细胞株(以下称为 BaF3-人 Mpl)、猴表达 Mpl 的 BaF3 细胞株(以下称为 BaF3-猴 Mpl)和小鼠表达 Mpl 的 BaF3 细胞株(以下称为 BaF3-小鼠 Mpl)。筛选后使用含有 1 ng/ml rhTPO (R&D 制)、10% FBS 的 RPMI1640 培养基进行培养并保持。

## 1.2 表达 Mpl 的 CHO 细胞株的构建

为了获得使用流式细胞仪评价结合活性的细胞株, 进行表达全长 Mpl 基因的 CHO 细胞株的构建。

首先, 在 pCXN2 (Niwa, H. 等人., Gene, 108, 193-199 (1991))的 HindIII 位点插入 pCHOI 的 DHFR 基因表达区域, 制备表达载体 pXND3。以 pCOS2-hMplfull、pCOS2-猴 Mplfull 和 pCOS2-小鼠 Mplfull 为模板, 使用含有 His-tag 序列的引物, 通过 PCR 扩增, 将扩增得到的各 Mpl 基因克隆到 pCXND3 上, 构建 pCXND3-hMpl-His、pCXND3-猴 Mpl-His、pCXND3-小鼠 Mpl-His。

将制备的各载体(25  $\mu\text{g}$ )与悬浮于 PBS 中的 CHO-DG44 细胞( $1 \times 10^7$  细胞/ml)混合, 加入到基因脉冲池中, 使用 Gene Pulser II (Bio-Rad), 以 1.5 kV、25  $\mu\text{FD}$  的容量施加脉冲。将通过电穿孔处理导入了基因的 CHO 细胞加入到含有 500  $\mu\text{g/ml}$  遗传霉素、1xHT (Invitrogen 制)的 CHO-S-SFMII 培养基(Invitrogen 制), 进行筛选, 构建人表达 Mpl 的 CHO 细胞株(以下称为 CHO-人 Mpl)、猴表达 Mpl 的 CHO 细胞株(以下称为 CHO-猴 Mpl)和小鼠表达 Mpl 的 CHO 细胞株(以下称为 CHO-小鼠 Mpl)。

### 1.3 可溶型人 Mpl 蛋白质的制备

为了制备可溶型人 Mpl 蛋白质, 如下构建在昆虫细胞 Sf9 细胞中分泌生产的表达系统。

制备在人 Mpl 的胞外区(Gln26-Trp491)的下游附加 FLAG 标签的基因, 将该基因插入到 pBACSurf-1 转移质粒(Novagen 制)的 PstI-SmaI 位点, 制备 pBACSurf1-hMpl-FLAG。接着, 使用 Bac-N-Blue 转染试剂盒(Invitrogen 制), 将 4  $\mu\text{g}$  pBACSurf1-hMpl-FLAG 导入 Sf9 细胞中。培养三天后回收培养上清, 通过噬菌斑测定分离重组病毒。制备病毒悬液后感染 Sf9 细胞, 回收培养上清。

使用所得培养上清, 如下纯化可溶型人 Mpl 蛋白质。将培养上清吸附于 Q Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences 制), 然后使用 50 mM 磷酸钠缓冲液、0.01% (v/v)吐温 20、500 mM 氯化钠(pH 7.2)进行洗脱。将洗脱液吸附于 FLAG M2-琼脂糖(SIGMA-ALDRICH 制), 然后使用 100 mM 甘氨酸-盐酸、0.01% (v/v)吐温 20 (pH 3.5)洗脱。洗脱后立即用 1 M Tris-盐酸(pH 8.0)中和, 使用 PD-10 柱(Amersham Biosciences 制)进行 PBS(-)、0.01% (v/v)吐温 20 的置换。将纯化的可溶型 Mpl 蛋白质称为 shMpl-FLAG。

### 1.4 人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白的制备

人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白基因按照 Bennett 等人的方法(Bennett, B. D. 等人, J. Biol. Chem. 266, 23060-23067 (1991))制备。将编码人 Mpl 胞外区(Gln 26-Trp 491)的碱基序列与编码人 IgG- $\gamma$ 1 的 Fc 区(Asp216 下游区域)的碱基序列连接, 在连接部位附加 Bst EII 序列(氨基酸 Val-Thr)作为融合接头。信号序列使用人 IgG H 链可变区的信号肽 19 个氨基酸。将所

得的人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白基因克隆到 pCXND3 上, 构建 pCXND3-hMpl-Fc。

将制备的载体(25  $\mu\text{g}$ )与悬浮于 PBS 的 CHO-DG44 细胞( $1 \times 10^7$  细胞/ml)混合。加入到基因脉冲池中, 使用 Gene Pulser II (Bio-Rad), 以 1.5 kV、25  $\mu\text{FD}$  的容量施加脉冲。将通过电穿孔处理导入了基因的 CHO 细胞加入到含有 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  遗传霉素、1xHT 的 CHO-S-SFMII 培养基中, 进行筛选, 构建表达 shMPL-Fc 的 CHO 细胞株(CHO-hMpl-Fc)。

使用所得培养上清, 如下对人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白进行纯化。

将培养上清吸附于 Q 琼脂糖 Fast Flow (Amersham Biosciences)后, 使用 50 mM 磷酸钠缓冲液、0.01%(v/v)吐温 20、1 M 氯化钠(pH 7.6)进行洗脱, 将洗脱液吸附于 HiTrap 蛋白 G HP 柱(Amersham Biosciences), 然后用 0.1 M 甘氨酸-HCl、150 mM NaCl、0.01% (v/v) 吐温 20 (pH 2.7)洗脱。洗脱后立即用 1 M Tris-HCl (pH 8.0)中和。用 PD-10 columns (Amersham Biosciences), 进行 PBS(-)、0.01% (v/v) 吐温 20 的置换。将纯化的可溶型 Mpl 蛋白质称为 hMpl-Fc。

### 1.5 shMpl-FLAG 或 BaF3-人 Mpl 的免疫以及杂交瘤的筛选

使用 MRL/MpJUmmCrj-lpr/lpr 小鼠(以下称为 MRL/lpr 小鼠, 购自日本 Charles River), 从 8 周龄开始免疫。初次免疫是在 100  $\mu\text{g}/\text{只}$  的 shMPL-FLAG 中加入氟氏完全佐剂(H37Ra, Beckton Dickinson 制), 将乳化液皮下给予。追加免疫是在 50  $\mu\text{g}/\text{只}$  的 shMPL-FLAG 中加入氟氏不完全佐剂(Beckton Dickinson 制), 将乳化液皮下给予。共进行六次免疫, 然后对三只小鼠通过尾静脉内给予 50  $\mu\text{g}/\text{只}$  shMPL-FLAG 进行最终免疫。将小鼠骨髓瘤细胞 P3-X63Ag8U1(P3U1, 购自 ATCC)与小鼠脾脏细胞混合, 一边加入聚乙二醇 1500 (Roche Diagnostics 制)一边混合, 进行细胞融合。第二天使用 HAT 培养基进行筛选, 使用培养上清, 实施使用 shMPL-FLAG 或 hMpl-Fc 固相化的免疫板的 ELISA、以及以使用 BaF3-人 Mpl 的细胞生长活性为指标的筛选。将 BaF3-人 Mpl 以每只 Balb/c 小鼠  $1.0 \times 10^7$  个细胞、以 1 周至 5 个月的间隔腹腔内给予, 共免疫 11 次。同样通过细胞融合制备杂交瘤, 实施以使用 BaF3 人 Mpl 的细胞生长活性为指标的筛选。阳性克隆是通过极限稀释法进行单克隆化, 然后放大培养, 回收培养上清。

## 1.6 抗人 Mpl 抗体的分析

抗体浓度是使用山羊抗小鼠 IgG ( $\gamma$ ) (ZYMED 制)和碱性磷酸酶-山羊抗小鼠 IgG ( $\gamma$ ) (ZYMED 制)进行小鼠 IgG 的夹层 ELISA, 以等同同型的市售抗体作为标准品; 使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, USA)制备校正曲线, 进行抗体浓度的换算。

抗体的同型通过使用同型特异性第二抗体的抗原相关性 ELISA 确定。将 hMpl-Fc 用包被液(0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, (pH9.6), 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>)稀释, 浓度为 1  $\mu$ g/ml, 在 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜, 进行包被, 然后用稀释缓冲液(50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v)吐温 20, 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, 1% (w/v) BSA))进行封闭处理, 加入杂交瘤的培养上清, 在室温下放置 1 小时。用淋洗缓冲液(0.05% (v/v)吐温 20, PBS)清洗, 加入碱性磷酸酶标记的同型特异性第二抗体, 在室温下放置 1 小时。显色是使用将 SIGMA104 (Sigma-Aldrich)用底物缓冲液(50 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH9.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>)稀释为 1 mg/ml 所得, 通过 Benchmark Plus (Bio-Rad)测定 405 nm 的吸光度。

与 shMpl-FLAG 和 hMPL-Fc 的结合活性通过 ELISA 进行评价。包被纯化的 shMpl-FLAG 和 hMPL-Fc, 浓度为 1  $\mu$ g/ml, 然后用稀释缓冲液进行封闭处理。加入杂交瘤的培养上清, 在室温下放置 1 小时, 然后加入碱性磷酸酶标记的抗小鼠 IgG 抗体(Zymed), 与上述方法同样地进行显色。在室温下显色 1 小时后测定 405 nm 的吸光度, 用 GraphPad Prism 计算 EC<sub>50</sub> 值。

回收 CHO-人 Mpl 或 CHO-猴 Mpl, 悬浮于 FACS 缓冲液(1% FBS/ PBS)中, 使浓度为  $1 \times 10^6$  细胞/ml。分注到 Multiscreen (Millipore)中, 以 100  $\mu$ l/孔分注, 通过离心操作除去培养上清。加入稀释的培养上清, 浓度为 5  $\mu$ g/ml, 在冰上反应 30 分钟。将细胞用 FACS 缓冲液清洗一次, 添加 FITC 标记抗小鼠 IgG 抗体(Beckman Coulter 制), 在冰上反应 30 分钟。反应后以 500 rpm 离心 1 分钟, 除去上清, 悬浮于 400  $\mu$ l FACS 缓冲液中, 使用 EPICS ELITE ESP(Beckman Coulter 制)进行流式细胞术。通过前向散射光和侧向散射光的直方图在活细胞集团中设定阀。

抗体的激动活性使用显示 TPO 依赖性生长的 BaF3-人 Mpl 或 BaF3-猴 Mpl 进行评价。将各细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清(Invitrogen 制)的

RPMI1640 (Invitrogen 制)中,使其浓度为  $4 \times 10^5$  细胞/ml,以 60  $\mu$ l/孔分注到 96 孔板中,向各孔中加入 40  $\mu$ l rhTPO 和各种浓度的杂交瘤培养上清,在 37°C 下、5%CO<sub>2</sub> 的条件下培养 24 小时。以 10  $\mu$ l/孔加入细胞计数试剂 SF (Nacalai Tesque 制),培养 2 小时,然后用 Benchmark Plus 测定 450 nm 的吸光度(对照 655 nm),用 GraphPad Prism 计算 EC<sub>50</sub> 值。

由这些分析共得到了 163 个与人 Mpl 结合的小鼠单克隆抗体。

以下记载的抗人 Mpl 抗体中,TA136 由 BaF3-人 Mpl 免疫小鼠构建,除此之外的抗体由 shMpl-Flag 免疫小鼠构建。

### 1.7 抗人 Mpl 抗体的纯化

使用杂交瘤的培养上清,如下进行抗人 Mpl 抗体的纯化。

将培养上清吸附于 HiTrap 蛋白 G HP 柱(Amersham Biosciences),然后用 0.1 M 甘氨酸-盐酸(pH 2.7)洗脱。洗脱后立即用 1 M Tris-HCl (pH 9.0)中和,用 PBS 进行过夜透析,进行缓冲液置换。

### 1.8 抗人 Mpl 抗体 VB22B 的表位确定

利用抗人 Mpl 抗体 VB22B 可在蛋白质印迹中使用的性质,构建人 Mpl 的部分序列与 GST 的融合蛋白,进行 VB22B 表位分析。分别通过 PCR 扩增 MG1 (Gln26 -Trp491)、MG2 (Gln26-Leu274)的区域,克隆到 pGEX-4T-3 (Amersham 制)上,使其以 GST 融合蛋白的形式表达。将质粒 DNA 导入 DH5 $\alpha$  中,得到转化体,向对数生长期的转化体中加入 IPTG,浓度为 1 mM,由此诱导 GST 融合蛋白的表达,培养 2 小时后回收菌体。通过超声波破碎,用 XL-80 超速离心机(Beckman, 转子 70.1Ti)、以 35,000 rpm 离心 30 分钟,然后回收培养上清,使用 GST 纯化组件(Amersham 制)进行纯化。通过 10%-SDS-PAGE 进行分离,转印 PVDF 膜,进行使用 VB22B 小鼠抗体的蛋白质印迹。VB22B 识别 MG-1、MG-2,因此表明 VB22B 的表位在 Gln26-Leu274 的区域。

接着,制备 MG3 (Gln26-Ala189)、MG4 (Gln26-Pro106)、MG5 (Gln26-Glu259)、MG6 (Gln26-Gly245)的区域与 GST 的融合蛋白,同样进行蛋白质印迹,结果,VB22B 识别 MG5、MG6,但不识别 MG3、MG4,由此可以预想 VB22B 的表位存在于 Ala189-Gly245 的周围。再制备 MG7(Gln26-Ala231)、MG8(Gln26-Pro217)与 GST 的融合蛋白,进行评价,

结果, VB22B 识别 MG7, 但不识别 MG8, 由此显示 VB22B 的表位存在于 Gln217-Ala213 的附近。再确认 MG10 (Gln213-Ala231)与 GST 的融合蛋白的结合, 由此限定了 VB22B 的表位是 Gln213-Ala231 的 19 个氨基酸。

### 1.9 抗人 Mpl 抗体 VB22B 的抗原抗体反应的反应速度理论分析

利用抗人 Mpl 抗体 VB22B 与可溶型重组 Mpl 结合的性质, 对实施例 1.4 中所示的人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白与 VB22B IgG 的抗原抗体反应的速度进行理论分析。在 Biacore 2000 (Biacore)上设置传感芯片 CM5 (Biacore), 通过胺偶联法将人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白固定。接着使用 HBS-EP 缓冲液(Biacore)制备 1.25-20  $\mu\text{g/ml}$  的 VB22B IgG, 添加 2 分钟的 VB22B IgG, 获得结合区域, 然后再添加 2 分钟的 HBS-EP 缓冲液, 得到解离区域。在传感芯片上的与人 Mpl-IgG Fc 融合蛋白结合的 VB22B IgG 通过添加 15 秒钟 10 mM 氢氧化钠除去, 使传感芯片再生。使用 SBS-EP 缓冲液作为运行缓冲液, 流速为 20  $\mu\text{l/分钟}$ 。使用 BIAevaluation Version 3.1 软件(Biacore), 由在各浓度下得到的传感图谱(sensorgrams)计算反应速度常数。结果, VB22B IgG 的解离常数(KB)为  $1.67\pm 0.713\times 10^{-9}$  M。

### [参考例 2] 抗人 Mpl 单链抗体的制备

在取得的抗人 Mpl 抗体中, 对于结合活性和激动活性高的 23 种抗体通过基因工程方法构建单链抗体的表达体系。以下给出抗人 Mpl 抗体 VB22B 的单链抗体制备例。

### 2.1 抗人 Mpl 抗体可变区的克隆

使用由生产抗人 Mpl 抗体的杂交瘤提取的总 RNA, 通过 RT-PCR 法进行扩增。总 RNA 是使用 Rneasy Plant Mini 试剂盒(QIAGEN), 从  $1\times 10^7$  个细胞的杂交瘤中提取。

使用 1  $\mu\text{g}$  的总 RNA, 使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech), 使用与小鼠 IgG2b 恒定区序列互补的合成寡核苷酸 MHC-IgG2b (SEQ ID NO.8)或与小鼠  $\kappa$  链恒定区碱基序列互补的合成寡核苷酸 kappa (SEQ ID NO.9)扩增 5'末端一侧的基因片段。反转录反应在

42°C下进行 1 小时 30 分钟。

PCR 反应溶液(50 µl)的组成如下所示。

5 µl 的 10×Advantage 2 PCR 缓冲液

5 µl 的 10×通用引物 A Mix

0.2 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

1 µl 的 Advantage 2 聚合酶 Mix

(以上成分均为 CLONTECH 制)、

2.5 µl 反转录反应产物

10 pmol 合成寡核苷酸 MHC-IgG2b 或 kappa

反应温度条件如下。

94°C的初始温度 30 秒、

将 94°C/5 秒、72°C/3 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/5 秒、70°C/10 秒、72°C/3 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/5 秒、68°C/10 秒、72°C/3 分钟的循环进行 25 次、

最后在 72°C下将反应产物加热 7 分钟。

PCR 产物使用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN), 由琼脂糖凝胶中纯化, 然后克隆到 pGEM-T Easy 载体上(Promega)。再使用 ABI 3700 DNA 测序仪(Perkin Elmer 制造)确定碱基序列。

克隆的 VB22B H 链可变区(以下称为 VB22B-VH)的碱基序列 SEQ ID NO.10, 氨基酸序列表示为 SEQ ID NO.11, L 链可变区(以下称为 VB22B-VL)的碱基序列表示为 SEQ ID NO.12, 氨基酸序列表示为 SEQ ID NO.13。

## 2.2 抗人 Mpl 抗体双抗体表达载体的制备

编码 VB22B 单链 Fv(以下称为 VB22B 双抗体)的基因(该基因使用含有 5 个氨基酸的接头序列)如下构建: 分别使用 PCR 法, 对编码 VB22B-VH 的基因的 3' 末端和编码 VB22B-VL 的基因的 5' 末端上附加编码含(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub> 的接头的碱基序列的基因进行扩增, 再连接。

VB22B-VH 的正向引物 70·115HF (SEQ ID NO.14)设计成具有 EcoIR 位点, VB22B-VH 的反向引物 33·115HR (SEQ ID NO.15)设计成与编码 VB22B-VH 的 C 末端的 DNA 杂交、且具有与编码含(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub> 的接头的

碱基序列和与编码 VB22B-VL 的 N 末端的 DNA 杂交的碱基序列。VB22B-VL 的正向引物 33·115LF (SEQ ID NO.16)设计成具有编码 VB22B-VL 的 N 末端的碱基序列、以及编码含有(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>1</sub> 的接头的碱基序列、编码 VB22B-VH 的 C 末端的碱基序列。VB22B-VL 的反向引物 33·115LR (SEQ ID NO.17)设计成与编码 VB22B-VL 的 C 末端的 DNA 杂交、且具有编码 FLAG 标签(Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys /SEQ ID NO.18)的碱基序列、并具有 NotI 位点。

第一 PCR 中,如下合成含有 VB22B-VH 和接头序列、以及 VB22B-VL 和接头序列的两个 PCR 反应物。

PCR 反应溶液(50 μl)的组成如下所示。

5 μl 的 10×PCR 缓冲液

0.4 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

2.5 单位的 DNA 聚合酶 Takara Ex Taq

(以上成分均为宝酒造制)。

10 ng 含有 VB22B-VH 或 VB22B-VL 基因的 pGEM-T Easy 载体

10 pmol 合成寡核苷酸 70·115HF 和 33·115HR、或 33·115LF 和 33·115LR

反应温度条件如下。

94℃的初始温度 30 秒、

将 94℃/15 秒、70℃/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94℃/15 秒、70℃/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94℃/15 秒、68℃/2 分钟的循环进行 28 次、

最后在 72℃下将反应产物加热 5 分钟。

使用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN 制),从琼脂糖凝胶中纯化约 400bp 的 PCR 产物,使用各 PCR 产物的一部分如下进行第二 PCR。

PCR 反应溶液(50μl)的组成如下所示。

5 μl 的 10×PCR 缓冲液

0.4 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

2.5 单位的 DNA 聚合酶 Takara Ex Taq

(以上成分均为宝酒造制)。

1 μl 的第一 PCR 产物(2 种)

10 pmol 合成寡核苷酸 70·115HF、33·115LR  
反应温度条件如下。

94°C的初始温度 30 秒、

将 94°C/15 秒、72°C/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/15 秒、70°C/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/15 秒、68°C/2 分钟的循环进行 28 次、

最后在 72°C 下将反应产物加热 5 分钟。

使用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN), 从琼脂糖凝胶中纯化, 用限制酶 EcoII (宝酒造制)和限制酶 NotI (宝酒造制)消化, 然后使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)纯化, 克隆到 pCXND3 上, 制备 pCXND3-VB22B db。

### 2.3 抗人 Mpl 抗体 sc(Fv)2 表达载体的制备

为了制备表达含有来自 VB22B 的两个 H 链可变区和两个 L 链可变区的突变抗体[sc(Fv)2]的质粒, 使用上述的 pCXND3-VB22B db, 如下通过 PCR 法进行修饰。

首先, 对于在编码 VB22B-VH 的基因的 3'末端和编码 VB22B-VL 的基因的 5'末端附加编码含 15 个氨基酸的接头(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>的碱基序列得到的基是因分别用 PCR 法进行扩增, 通过连接构建的。该构建过程中, 新设计了三种引物。VB22B-VH 的正向引物 VB22B-fpvu (引物 A, SEQ ID NO.19)设计成在 5'末端具有 EcoIR 位点、VB22B db 的 Gln22 和 Leu23 变换为 PvuII 位点。VB22B-VH 的反向引物 sc-rL15 (引物 B, SEQ ID NO.20)设计成与编码 VB22B-VH 的 C 末端的 DNA 杂交,且具有编码含 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的接头的碱基序列、以及与编码 VB22B-VL 的 N 末端的 DNA 杂交的碱基序列。VB22B-VL 的正向引物 sc-fL15 (引物 C, SEQ ID NO.21)设计成具有编码 VB22B-VL 的 N 末端的碱基序列、以及编码含有 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的接头的碱基序列、编码 VB22B-VH 的 C 末端的碱基序列。

第一 PCR 中, 如下合成含有 VB22B-VH 和接头序列、VB22B-VL 和接头序列的两个 PCR 反应物。

PCR 反应溶液(50 μl)的组成如下所示。

5 μl 的 10×PCR 缓冲液

0.4 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

2.5 单位的 DNA 聚合酶 Takara Ex Taq

(以上成分均为宝酒造制)。

10 ngpCXND3-VB22B db

10 pmol 合成寡核苷酸 VB22B-fpvu、sc-rL15 或 sc-fL15、33·115LR  
(引物 D)

反应温度条件如下。

94°C 的初始温度 30 秒、

将 94°C/15 秒、72°C/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/15 秒、70°C/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/15 秒、68°C/2 分钟的循环进行 28 次、

最后在 72°C 下将反应产物加热 5 分钟。

使用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN 制), 从琼脂糖凝胶中纯化约 400 bp 的 PCR 产物, 使用各 PCR 产物的一部分如下进行第二 PCR。

PCR 反应溶液(50 $\mu$ l)的组成如下所示。

5  $\mu$ l 的 10 $\times$ PCR 缓冲液

0.4 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

2.5 单位的 DNA 聚合酶 Takara Ex Taq

(以上成分均为宝酒造制)。

1  $\mu$ l 的第一 PCR 产物(2 种)

10 pmol 合成寡核苷酸 70·115HF、33·115LR

反应温度条件如下。

94°C 的初始温度 30 秒、

将 94°C/15 秒、72°C/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/15 秒、70°C/2 分钟的循环进行 5 次、

将 94°C/15 秒、68°C/2 分钟的循环进行 28 次、

最后在 72°C 下将反应产物加热 5 分钟。

使用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN 制)从琼脂糖凝胶中纯化约 800 bp 的 PCR 产物, 然后用限制酶 EcoEI (宝酒造制)和限制酶 NotI (宝酒造制)消化, 使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN)纯化, 克隆到 pBacPAK9 (Clontech)上, 制备 pBacPAK9-scVB22B。

接着, 制备插入到 pBacPAK9-scVB22B 的 PvuII 位点的片段。即, 该片段是将编码 N 末端缺损的 VB22B-VH 和 VB22B-VL 用含(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的接头连接得到的氨基酸的基因进一步用编码 VB22B-VH 的 N 末端的基因和编码含(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的接头的碱基序列连接得到的片段, 是两末端为 PvuII 识别序列的片段。新设计两种引物, 使用 PCR 法制备该片段。目标片段的正向引物 Fv2-f (引物 E, SEQ ID NO.22)设计成在 5'末端具有 PvuII 位点, 并具有 VB22B-VH 的 5'末端一侧的序列。目标片段的反向引物 Fv2-r (引物 F, SEQ ID NO.23)设计成与编码 VB22B-VL 的 C 末端的 DNA 杂交, 且具有编码含有(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 的接头的碱基序列、以及与编码 VB22B-VH 的 N 末端的 DNA 杂交的碱基序列, 并且具有 PvuII 位点。以 pBacPAK9-scVB22B 为模板, 如下进行 PCR。

PCR 反应溶液(50 $\mu$ l)的组成如下所示。

5  $\mu$ l 的 10 $\times$ PCR 缓冲液

0.4 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

2.5 单位的 DNA 聚合酶 Takara Ex Taq

(以上成分均为宝酒造制)。

10  $\mu$ g 的 pBacPAK9-scVB22B

10 pmol 合成寡核苷酸 Fv2-f、Fv2-r

反应温度条件如下。

94 $^{\circ}$ C 的初始温度 30 秒、

将 94 $^{\circ}$ C/15 秒、72 $^{\circ}$ C/2 分钟的循环进行 5 次,

将 94 $^{\circ}$ C/15 秒、70 $^{\circ}$ C/2 分钟的循环进行 5 次,

将 94 $^{\circ}$ C/15 秒、68 $^{\circ}$ C/2 分钟的循环进行 28 次,

最后在 72 $^{\circ}$ C 下将反应产物加热 5 分钟。

使用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN), 从琼脂糖凝胶中纯化约 800 bp 的 PCR 产物, 然后克隆到 pGEM-T Easy 载体(Promega)上。确定碱基序列后, 用限制酶 PvuII (宝酒造制)消化, 回收目标片段。将 pBacPAK9-scVB22B 用限制酶 PvuII (宝酒造制)消化后, 将回收的片段连接, 制备 pBacPAK9-VB22B sc(Fv)2。将制备的载体用限制酶 EcoRI (宝酒造制)和限制酶 NotI (宝酒造制)消化后, 用 QIAquick Gel 提取试剂盒(QIAGEN)从琼脂糖凝胶中纯化约 1600 bp 的片段, 克隆到表达载体

pCXND3 中，制备 pCXND3-VB22B sc(Fv)2。

#### 2.4 使用动物细胞进行的抗人 Mpl 单链抗体的表达

使用 CHO-DG44 细胞进行的单链抗体稳定表达细胞株的制备如下进行。通过使用 Gene Pulser II (Bio-Rad)的电穿孔法导入基因。将表达载体(25  $\mu$ g)与 0.75 ml 悬浮于 PBS 中的 CHO-DG44 细胞( $1 \times 10^7$  细胞/ml)混合，将所得在冰上冷却 10 分钟，转移到脉冲池中，然后用 1.5 kV、25  $\mu$ FD 的容量给予脉冲。在室温下经过 10 分钟的恢复期，然后将电穿孔处理的细胞加入到含有 500  $\mu$ g/ml 遗传霉素的 CHO-S-SFMII 培养基 (Invitrogen)中进行筛选，构建表达 CHO 细胞株。VB22Bsc(Fv)2 是按照该方法制备稳定表达细胞株及其培养上清。

使用 COS7 细胞进行的单链抗体的瞬时表达如下进行。将表达载体 (10  $\mu$ g)与 0.75 ml 悬浮于 PBS 中的 COS7 细胞( $1 \times 10^7$  细胞/ml)混合，将所得在冰上冷却 10 分钟，转移到脉冲池中，然后用 1.5 kV、25  $\mu$ FD 的容量给予脉冲。在室温下经过 10 分钟的恢复期，然后将电穿孔处理的细胞加入到含有 10% FBS 的 DMEM 培养基 (Invitrogen)中，培养过夜，用 PBS 清洗，然后加入 CHO-S-SFMII 培养基，约培养 3 天。VB22B 双抗体按照该方法制备培养上清。

#### 2.5 培养上清中抗人 Mpl 单链抗体的定量

在 COS 细胞中瞬时表达的抗人 Mpl 单链抗体的培养上清中的浓度利用表面等离子共振测定。即，在 Biacore 2000 (Biacore 制)上设置传感芯片 CM5 (Biacore 制)，与抗 FLAG M2 单克隆抗体 (SIGMA-ALDRICH 制)结合。以流速 5 ml/秒流入适当浓度的样品，再流入 50 mM 二乙胺，使结合的抗体解离。测定流入样品时的质量变化，使用根据标准品的质量变化制备的校正曲线，计算浓度。双价小抗体的标准品是使用 db12E10 (参照 WO 02/33073、WO 02/33072)，sc(Fv)2 的标准品使用具有相同基因结构的 12E10 sc(Fv)2。

#### 2.6 抗人 Mpl 双抗体和单链抗体的制备

将表达 VB22B 双抗体的 COS7 细胞或 CHO 细胞的培养上清吸附于用 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05%吐温 20 平衡的抗 Flag

M2 亲和凝胶柱(Sigma-Aldrich), 用 100 mM 甘氨酸-HCl (pH 3.5)洗脱。洗脱组分立即用 1 M Tris-HCl (pH 8.0)中和, 然后用 HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences)柱进行凝胶过滤色谱。凝胶过滤色谱的缓冲液使用 PBS、0.01%吐温 20。

将表达 VB22B sc(Fv)2 的 COS7 细胞的培养上清以与双抗体纯化相同的条件进行纯化。大量制备时, 将 CHO 细胞的培养上清过用 20 mM 磷酸缓冲液(pH 6.8)平衡的 Macro-Prep 陶瓷羟基磷灰石 I 型(Bio-Rad)柱, 用 250 mM 磷酸缓冲液(pH 6.8)阶段性洗脱。洗脱的组分用超滤膜进行浓缩, 然后用 HiLoad 26/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences)柱进行凝胶过滤色谱, 分离分子量相当于约 40 kD-70 kD 的组分。将该组分吸附于用 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.05%吐温 20 平衡的抗 Flag M2 亲和凝胶柱, 用 100 mM 甘氨酸-HCl (pH 3.5)洗脱。洗脱组分立即用 1 M Tris-HCl (pH 8.0)中和, 用 HiLoad 26/60 Superdex 200 pg 柱进行凝胶过滤色谱。凝胶过滤色谱的缓冲液使用 20 mM 乙酸缓冲液(pH 6.0)、150 mM NaCl、0.01% 吐温 80。各纯化步骤中, 双抗体和 sc(Fv)2 的确认是采用 SDS-PAGE 和使用了抗 Flag 抗体(Sigma-Aldrich)的蛋白质印迹进行。分别将所分离的峰组分根据 Laemli 的方法进行电泳, 用考马斯亮蓝染色, 结果, 双抗体是在分子量约 29 kDa 处检测出单一条带, sc(Fv)2 是在分子量约 55 kDa 处检测出单一条带。

## 2.7 通过流式细胞仪对抗人 Mpl 单链抗体结合活性的评价

回收 CHO-人 Mpl、CHO-猴 Mpl、CHO-小鼠 Mpl, 悬浮于 FACS 缓冲液(1% FBS/PBS)中, 浓度为  $1 \times 10^6$  cells/mL。分注到 Multiscreen-HV 过滤板(Millipore)中, 浓度为 100  $\mu$ l/孔, 通过离心操作除去上清。加入适当浓度的双抗体或 sc(Fv)2, 在冰上反应 30 分钟。将细胞用 200 $\mu$ l 的 FACS 缓冲液清洗一次, 添加 10  $\mu$ g/ml 的抗 FLAG M2 单克隆抗体(Sigma-Aldrich), 在冰上反应 30 分钟。接着用 200  $\mu$ l FACS 缓冲液清洗细胞一次, 添加稀释 100 倍的 FITC 标记抗小鼠 IgG 抗体(Beckman Coulter), 在冰上反应 30 分钟。最后离心, 除去上清, 悬浮于 400  $\mu$ l FACS 缓冲液中, 用 EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter)供给流式细胞仪。通过前向散射光和侧向散射光的直方图在活细胞集团中设定阀(ゲート)。

使用纯化的 VB22B sc(Fv)2, 对与表达各种 Mpl 的 CHO 细胞的结合

活性进行评价。可以确认：对宿主细胞 CHO 和 CHO-小鼠 Mpl 不显示结合活性，但与 CHO-人 Mpl 和 CHO-猴 Mpl 特异性结合。该结合活性的倾向与 VB22B IgG 相同，因此可以推测抗体结合部位并未根据低分子化而变化。

## 2.8 抗人 Mpl 单链抗体的人源化

为了实施 VB22B sc(Fv)<sub>2</sub> 的人源化，由公开的 Kabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) 获得抗体的序列数据，分成 H 链可变区、L 链可变区进行同源性检索。结果可知，H 链可变区与 DN13 (Smithson S. L. 等人., Mol Immunol. 36, 113-124 (1999)) 具有高的同源性。还得知：L 链可变区与 ToP027 (Hougs L. 等人., J. Immunol. 162, 224-237 (1999)) 具有高同源性。制备将互补抗原决定区(以下称为 CDR) 移植到这些抗体的支架区(以下称为 FR) 得到的人源化抗体。使人源化抗体 sc(Fv)<sub>2</sub> 在 CHO-DG44 细胞中表达，进行使用 BaF3-人 Mpl 的激动活性评价。以激动活性为指标，向 FR 内加入氨基酸置换，制备与小鼠型 VB22B sc(Fv)<sub>2</sub> 具有同等的激动活性的人源化 VB22B sc(Fv)<sub>2</sub> 抗体。

具体来说，设计成将 50 个碱基左右的合成寡 DNA 杂交约 20 个碱基左右，将这些合成寡 DNA 通过 PCR 法进行扩增，制备编码各可变区的基因。使用这些基因，与实施例 2、3 的方法同样地制备 sc(Fv)<sub>2</sub>，克隆到表达载体 pCXND3 中，制备插入人源化 VB22B sc(Fv)<sub>2</sub> 的各表达载体 pCXND3-hVB22B p-z sc(Fv)<sub>2</sub>、pCXND3-hVB22B g-e sc(Fv)<sub>2</sub>、pCXND3-hVB22B e sc(Fv)<sub>2</sub>、pCXND3-hVB22B u2-wz4 sc(Fv)<sub>2</sub>、pCXND3-hVB22B q-wz5 sc(Fv)<sub>2</sub>。该质粒中所含有的 hVB22B p-z sc(Fv)<sub>2</sub> 的碱基序列如 SEQ ID NO.24 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO.25 所示；hVB22B g-e sc(Fv)<sub>2</sub> 的碱基序列如 SEQ ID NO.26 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO.27 所示；hVB22B e sc(Fv)<sub>2</sub> 的碱基序列如 SEQ ID NO.28 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO.29 所示；hVB22B u2-wz4 sc(Fv)<sub>2</sub> 的碱基序列如 SEQ ID NO.30 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；hVB22B q-wz5 sc(Fv)<sub>2</sub> 的碱基序列如 SEQ ID NO.31 所示，氨基酸序列如 SEQ ID NO.32 所示。小鼠型 VB22B sc(Fv)<sub>2</sub> 的碱基序列表示为 SEQ ID NO.33，氨基酸序列表示为 SEQ ID NO.2。与实施例 2.4 的方法同样在 CHO-DG44 细胞中表达，回收培养上清。人源化 VB22B sc(Fv)<sub>2</sub> 未附加 Flag 标签，

因此由培养上清进行纯化时,是利用实施例 1.8 记载的 VB22B 所识别的表位 MG10 (Gln213-Ala231)与 GST 的融合蛋白进行。MG10 与 GST 的融合蛋白的纯化是使用谷胱甘肽琼脂糖 4B (Amersham Biosciences),按照生产商的说明书进行纯化。并且将纯化的 MG10 与 GST 融合蛋白按照生产商的说明书固定在 HiTrap NHS-activated HP 柱(Amersham Biosciences)上,制备亲和柱。将人源化表达 VB22B sc(Fv)2 的 CHO 细胞的培养上清流入用 50 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.01% Tween 80 平衡的 MG10-GST 融合蛋白质固定化柱,使人源化 VB22B sc(Fv)2 吸附,用 100 mM 甘氨酸-HCl (pH3.5)、0.01%吐温 80 洗脱。洗脱组分立即用 1 M Tris-HCl (pH7.4)中和,使用 HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (Amersham Biosciences)柱进行凝胶过滤色谱。凝胶过滤色谱的缓冲液使用 20 mM 柠檬酸缓冲液(pH7.5)、300 mM NaCl 和 0.01%吐温 80。

#### [参考例 3] 2D7 sc(Fv)2 型双抗体表达载体的制备

如 WO2004/033499 所述,通过将 HLA I 型的抗体 2D7 单克隆抗体改变为将重链和轻链可变区用 5 mer 的接头连接而成的小分子抗体(2D7 双抗体),显示对骨髓瘤细胞的细胞死亡诱导活性急剧升高。因此,将 2D7 双抗体改变为被认为结构上比较稳定的 sc(Fv)2 型,与以往的双抗体(HL5)比较研究细胞死亡诱导活性。

首先,按照以下顺序制备编码 2D7 sc(Fv)2 的 DNA 表达载体,其中,2D7 抗体的重链可变区序列(VH)和轻链可变区序列(VL)排列成 VH-VL-VH-VL, 分别用 15 mer 的接头(GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer)连接而成。

以按照 WO2004/033449 记载的方法制备的、将 VH-VL 用 5 mer 接头(GlyGlyGlyGlySer)连接而成的 2D7 双抗体(HL5)表达载体为模板,通过引物 2D7DBH1 (SEQ ID NO.34)和引物 2D7PA2 (SEQ ID NO.35)进行 PCR 反应,扩增片段 A。同样,通过引物 2D7DPA3 (SEQ ID NO.36)和引物 2D7PA5 (SEQ ID NO.37)进行 PCR 反应,扩增片段 B。通过这里得到的片段 A 和片段 B 在同一个管内混合,进行 PCR 重组反应使片段 A 和片段 B 连接。由此得到在 N 末端含有 VH 的信号序列、VH-VL 用 15 mer 接头连接的 DNA 片段“2D7 双抗体 HL15-1”。

接着,以 2D7 双抗体(HL5)表达载体为模板,通过引物 2D7PA2 (SEQ

ID NO.35)进行 PCR 反应, 扩增片段 C。同样, 通过引物 D7PA3 (SEQ ID NO.36)和引物 2D7DBL2 (SEQ ID NO.39)进行 PCR 反应, 扩增片段 D。这里得到的片段 C 和片段 D 在同一个管内混合, 通过 PCR 重组反应使两个片段连接。通过该操作, VH-VL 通过 15 mer 的接头连接, 得到了在 C 末端含有 Flag-tag 区的 DNA 片段“2D7 双抗体 HL15-2”。

将上述反应得到的两个 DNA 片段、即“2D7 双抗体 HL15-1” DNA 片段和“2D7 双抗体 HL15-2” DNA 片段分别用 EcoRI-BamHI 和 BamHI-NotI 切断, 将两个 DNA 片段插入到预先用 EcoI-NotI 切断开裂的表达载体 pCXND3 中。分析插入的 DNA 碱基序列, 如目标所示, 确认编码信号-VH(15)VL(15)VH(15)VL-Flag 的 cDNA 插入到 pCXND3 的 EcoII-NotI 之间, 构建了 2D7sc(Fv)2 表达载体(pCXND3-2D7sc(Fv)2)。2D7sc(Fv)2 碱基序列表示为 SEQ ID NO.40、氨基酸序列表示为 SEQ ID NO.4。

#### [参考例 4] 生成表达 2D7 sc(Fv)2 的细胞株的建立

将 20  $\mu\text{g}$  用 PvuI 切断、形成直链的 pCXND3-2D7sc(Fv)2 抗体按照以下的电穿孔法导入到 CHO 细胞(DG44 细胞株)中。

用 CHO-S-SFM-II 培养基(Invitrogen)培养的 DG44 细胞用冰冷 PBS 清洗两次, 然后悬浮于 PBS 中, 使其浓度为  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。向其中混合 20  $\mu\text{g}$  上述质粒, 进行电脉冲(1.5 kV, 25  $\mu\text{FD}$ )。以适当的比例稀释细胞, 将细胞铺于 96 孔板上, 在添加了终浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 (Invitrogen)的 CHO-S-SFM-II 培养基中进行培养。将生长的单一集落挑取约 30 个克隆左右, 通过使用抗 FLAG 抗体(Sigma)的蛋白质印迹研究这些培养上清中的 2D7 sc(Fv)2 的表达量。表达最高的克隆在含有 5 nM MTX 的无核酸的 CHO-S-SFM-II 培养基(Invitrogen)中进行培养, 扩大培养规模, 将所得的细胞株作为高生产细胞株。

#### [参考例 5] 2D7 sc(Fv)2 的大量纯化

在 T-125 烧瓶中, 将次融合的 2D7 sc(Fv)2 高产量 CHO 细胞株转移到滚瓶(250 ml/瓶 CHO-S-SFM II 培养基), 使其浓度为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。在 37 $^{\circ}\text{C}$  下培养, 6 天后回收培养液。通过离心除去死细胞, 然后过 0.45  $\mu\text{m}$  的滤器, 将其用于纯化。

2D7 sc(Fv)2 的纯化如下进行。

首先，向用缓冲液 A (20 mM 磷酸钠 pH 6.8)平衡的羟基磷灰石柱 (micro prep Hydroxyapatite I, Bio-Rad)中加入回收的培养上清。用缓冲液 A 清洗柱，然后用缓冲液 C (250 mM 磷酸钠 pH 6.8)洗脱 2D7 sc(Fv)2。含有 2D7 sc(Fv)2 的组分用等量缓冲液 A 稀释，然后将其加入到抗-Flag M2 琼脂糖亲和柱中 (Bio-Rad)。将该柱用缓冲液 C (50 mM tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 0.01% 吐温 20)清洗，然后用缓冲液 D (100 mM 甘氨酸 H3.5, 0.01%吐温 20)洗脱 2D7 sc(Fv)2。将回收的样品立即用 Tris-HCl pH 8.0 中和，使终浓度为 25 mM。然后将该组分用 centriprep YM-10 (AMICON)浓缩，通过 Superdex200HR (26/60)柱 (Amersham Pharmacia) 进行凝胶过滤色谱纯化。

用含有 0.01%吐温 20 的 PBS 进行凝胶过滤色谱纯化。由高产量 2D7 sc(Fv)2 的 CHO 细胞株生产的小分子抗体几乎都是在分子量约 52 Kd 的位置具有洗脱峰，与同样在 52 Kd 洗脱的 2D7 双抗体的峰完全一致。

只回收由凝胶过滤色谱纯化分离的 52 Kd 的峰，将其作为 2D7 sc(Fv)2 蛋白标准品。将回收的样品的一部分进行 SDS 电泳和银染，确认目标蛋白以 100%的纯度纯化。回收的纯化标准品用 centriprep YM-10 (AMICON)浓缩。

### 产业实用性

通过使用含有本发明的葡甲胺的稳定剂，可以抑制抗体分子的聚集反应，可以使抗体分子以单体状态存在。将抗体作为药物开发时，为了使各抗体分子稳定存在，必须将制剂保存中的聚集反应限制到最小限度。本发明的稳定剂即使是要稳定的抗体为非常高浓度，也可以使抗体分子稳定、抑制聚集反应，因此在制备抗体制剂时非常有用。另外，本发明的含有葡甲胺的试剂在使抗体分子形成溶液制剂或者冻干制剂时也具有使抗体分子稳定的效果。或者对于制成冻干制剂时的冷冻干燥应激也具有使抗体分子稳定的效果。并且本发明的稳定剂对于全长抗体、片段抗体或小分子抗体等任何抗体均显示稳定效果，制备抗体制剂时可广泛应用。

本发明的含有通过葡甲胺稳定的抗体分子的药物组合物使抗体分子的修饰、聚集得到抑制，因此与以往的抗体制剂相比保存状态良好，

有望使保存时聚集导致的活性降低更小。

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> 含有葡甲胺的蛋白质制剂的稳定剂及其利用

<130> C1-A0509P

<150> JP 2005-170794

<151> 2005-06-10

<160> 51

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 505

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<223> 人工合成的 scFv 序列

<400> 1

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1                   5                   10                   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser  
                  20                   25                   30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                  35                   40                   45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe  
                  50                   55                   60

Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                  85                   90                   95

Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                  100                   105                   110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu  
130 135 140

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys  
145 150 155 160

Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln  
165 170 175

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu  
180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
195 200 205

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr  
210 215 220

Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys  
260 265 270

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr  
275 280 285

Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly  
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr  
305 310 315 320

Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr  
325 330 335

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala



Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Ser  
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60

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

Met Asp Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile  
 130 135 140

Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys  
 145 150 155 160

Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln  
 165 170 175

Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu  
 180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala  
 195 200 205

Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr  
 210 215 220

Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr  
 225 230 235 240

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

|   |     |  |     |  |     |
|---|-----|--|-----|--|-----|
|   | 245 |  | 250 |  | 255 |
| Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val |     |  |     |  |     |
|   | 260 |  | 265 |  | 270 |
| Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala |     |  |     |  |     |
|   | 275 |  | 280 |  | 285 |
| Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly |     |  |     |  |     |
|   | 290 |  | 295 |  | 300 |
| Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr |     |  |     |  |     |
|   | 305 |  | 310 |  | 320 |
| Asn Gly Lys Phe Arg Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser |     |  |     |  |     |
|   | 325 |  | 330 |  | 335 |
| Ser Thr Ala Tyr Met Asp Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala |     |  |     |  |     |
|   | 340 |  | 345 |  | 350 |
| Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp |     |  |     |  |     |
|   | 355 |  | 360 |  | 365 |
| Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly |     |  |     |  |     |
|   | 370 |  | 375 |  | 380 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala |     |  |     |  |     |
|   | 385 |  | 390 |  | 400 |
| Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys |     |  |     |  |     |
|   | 405 |  | 410 |  | 415 |
| Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr |     |  |     |  |     |
|   | 420 |  | 425 |  | 430 |
| Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg |     |  |     |  |     |
|   | 435 |  | 440 |  | 445 |
| Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly |     |  |     |  |     |
|   | 450 |  | 455 |  | 460 |
| Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp |     |  |     |  |     |
|   | 465 |  | 470 |  | 480 |

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe  
 485 490 495

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 500 505

<210> 3

<211> 501

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<223> 人工合成的 scFv 序列

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly  
 130 135 140

Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly

---

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 145   | 150 | 155 | 160 |
| Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys |     |     |     |
|   | 165 | 170 | 175 |
| Leu Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg |     |     |     |
|   | 180 | 185 | 190 |
| Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly |     |     |     |
|   | 195 | 200 | 205 |
| Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr |     |     |     |
|   | 210 | 215 | 220 |
| Arg Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly |     |     |     |
| 225   | 230 | 235 | 240 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val |     |     |     |
|   | 245 | 250 | 255 |
| Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu |     |     |     |
|   | 260 | 265 | 270 |
| Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp |     |     |     |
|   | 275 | 280 | 285 |
| Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr |     |     |     |
|   | 290 | 295 | 300 |
| Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 |
| Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Lys Leu |     |     |     |
|   | 325 | 330 | 335 |
| Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly |     |     |     |
|   | 340 | 345 | 350 |
| Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser |     |     |     |
|   | 355 | 360 | 365 |
| Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser |     |     |     |
|   | 370 | 375 | 380 |

Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser  
385 390 395 400

Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn  
405 410 415

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met  
420 425 430

Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser  
435 440 445

Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln  
450 455 460

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg Ser  
465 470 475 480

Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Asp Tyr Lys  
485 490 495

Asp Asp Asp Asp Lys  
500

<210> 4

<211> 495

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<223> 人工合成的 scFv 序列

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro 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 Asp Tyr  
20 25 30

Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

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

|   |     |             |
|---|-----|-------------|
| 50  | 55  | 60          |
| Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr |     |             |
| 65  | 70  | 75 80       |
| Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys |     |             |
|   | 85  | 90 95       |
| Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr |     |             |
|   | 100 | 105 110     |
| Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly |     |             |
|   | 115 | 120 125     |
| Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser |     |             |
|   | 130 | 135 140     |
| Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser |     |             |
|   | 145 | 150 155 160 |
| Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp |     |             |
|   | 165 | 170 175     |
| Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser |     |             |
|   | 180 | 185 190     |
| Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu |     |             |
|   | 195 | 200 205     |
| Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro |     |             |
|   | 210 | 215 220     |
| Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly |     |             |
|   | 225 | 230 235 240 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln |     |             |
|   | 245 | 250 255     |
| Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser |     |             |
|   | 260 | 265 270     |
| Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val |     |             |
|   | 275 | 280 285     |

Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro  
290 295 300

Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr  
305 310 315 320

Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser  
325 330 335

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp  
340 345 350

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly  
355 360 365

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val  
370 375 380

Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val  
385 390 395 400

Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe  
405 410 415

Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser  
420 425 430

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
435 440 445

Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala  
450 455 460

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser  
465 470 475 480

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
485 490 495

<210> 5

<211> 449

<212> PRT

<213> 智人

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
 1                   5                   10                   15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
                   20                   25                   30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp  
                   35                   40                   45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
                   50                   55                   60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65                   70                   75                   80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                   105                   110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                   115                   120                   125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
                   130                   135                   140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                   150                   155                   160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                   165                   170                   175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
                   180                   185                   190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
                   195                   200                   205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys



Lys

<210> 6  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> 智人

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe  
                   20                    25                    30

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
                   35                    40                    45

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asp Asn Ala Leu  
                   50                    55                    60

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 65                    70                    75                    80

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   85                    90

<210> 7  
 <211> 1924  
 <212> DNA  
 <213> 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)

&lt;220&gt;

<221> CDS  
 <222> (11).. (1918)

&lt;400&gt; 7

gaattccacc atg ccc tcc tgg gcc etc ttc atg gtc acc tcc tgc etc                    49  
                   Met Pro Ser Trp Ala Leu Phe Met Val Thr Ser Cys Leu  
                   1                    5                    10

|   |     |
|---|-----|
| ctc ctg gcc cct caa aac ctg gcc caa gtc agc agc caa gat gtc tcc<br>Leu Leu Ala Pro Gln Asn Leu Ala Gln Val Ser Ser Gln Asp Val Ser<br>15 20 25        | 97  |
| ttg ctg gcc tgg gac tca gag ccc ctg aag tgt ttc tcc cga aca ttt<br>Leu Leu Ala Ser Asp Ser Glu Pro Leu Lys Cys Phe Ser Arg Thr Phe<br>30 35 40 45     | 145 |
| gag gac ctc act tgc ttc tgg gat gag gaa gag gca gca ccc agt ggg<br>Glu Asp Leu Thr Cys Phe Trp Asp Glu Glu Glu Ala Ala Pro Ser Gly<br>50 55 60        | 193 |
| aca tac cag ctg ctg tat gcc tac ccg ggg gag aag ccc cgt gcc tgc<br>Thr Tyr Gln Leu Leu Tyr Ala Tyr Pro Gly Glu Lys Pro Arg Ala Cys<br>65 70 75        | 241 |
| ccc ctg agt tct cag agc gtg ccc cgc ttt gga acc cga tac gtg tgc<br>Pro Leu Ser Ser Gln Ser Val Pro Arg Phe Gly Thr Arg Tyr Val Cys<br>80 85 90        | 289 |
| cag ttt cca gcc cag gaa gaa gtg cgt ctc ttc tct ccg ctg cac ctc<br>Gln Phe Pro Ala Gln Glu Glu Val Arg Leu Phe Ser Pro Leu His Leu<br>95 100 105      | 337 |
| tgg gtg aag aat gtg ttc cta aac cag act cag att cag cga gtc ctc<br>Trp Val Lys Asn Val Phe Leu Asn Gln Thr Gln Ile Gln Arg Val Leu<br>110 115 120 125 | 385 |
| ttt gtg gac agt gta ggc ctg ccg gct ccc ccc agt atc atc aag gcc<br>Phe Val Asp Ser Val Gly Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ile Ile Lys Ala<br>130 135 140     | 433 |
| atg ggt ggg agc cag cca ggg gaa ctt cag atc agc tgg gag gcc cca<br>Met Gly Gly Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gln Ile Ser Trp Glu Ala Pro<br>145 150 155     | 481 |
| gct cca gaa atc agt gat ttc ctg agg tac gaa ctc cgc tat ggc ccc<br>Ala Pro Glu Ile Ser Asp Phe Leu Arg Tyr Glu Leu Arg Tyr Gly Pro<br>160 165 170     | 529 |
| aaa gat ctc aag aac tcc act ggt ccc acg gtc ata cag ttg atc gcc<br>Lys Asp Leu Lys Asn Ser Thr Gly Pro Thr Val Ile Gln Leu Ile Ala<br>175 180 185     | 577 |

|   |      |
|---|------|
| aca gaa acc tgc tgc cct gct ctg cag agg cca cac tca gcc tet gct<br>Thr Glu Thr Cys Cys Pro Ala Leu Gln Arg Pro His Ser Ala Ser Ala<br>190 195 200 205 | 625  |
| ctg gac cag tet cca tgt gct cag ccc aca atg ccc tgg caa gat gga<br>Leu Asp Gln Ser Pro Cys Ala Gln Pro Thr Met Pro Trp Gln Asp Gly<br>210 215 220     | 673  |
| cca aag cag acc tcc cca act aga gaa gct tca gct ctg aca gca gtg<br>Pro Lys Gln Thr Ser Pro Thr Arg Glu Ala Ser Ala Leu Thr Ala Val<br>225 230 235     | 721  |
| ggt gga agc tgc ctc atc tca gga ctc cag cct ggc aac tcc tac tgg<br>Gly Gly Ser Cys Leu Ile Ser Gly Leu Gln Pro Gly Asn Ser Tyr Trp<br>240 245 250     | 769  |
| ctg cag ctg cgc agc gaa cct gat ggg atc tcc ctc ggt ggc tcc tgg<br>Leu Gln Leu Arg Ser Glu Pro Asp Gly Ile Ser Leu Gly Gly Ser Trp<br>255 260 265     | 817  |
| gga tcc tgg tcc ctc cct gtg act gtg gac ctg cct gga gat gca gtg<br>Gly Ser Trp Ser Leu Pro Val Thr Val Asp Leu Pro Gly Asp Ala Val<br>270 275 280 285 | 865  |
| gca att gga ctg caa tgc ttt acc ttg gac ctg aag aat gtt acc tgt<br>Ala Ile Gly Leu Gln Cys Phe Thr Leu Asp Leu Lys Asn Val Thr Cys<br>290 295 300     | 913  |
| caa tgg cag caa gag gac cat gct agt tcc caa ggt ttc ttc tac cac<br>Gln Trp Gln Gln Glu Asp His Ala Ser Ser Gln Gly Phe Phe Tyr His<br>305 310 315     | 961  |
| agc agg gca cgg tgc tgc ccc aga gac agg tac ccc atc tgg gag gac<br>Ser Arg Ala Arg Cys Cys Pro Arg Asp Arg Tyr Pro Ile Trp Glu Asp<br>320 325 330     | 1009 |
| tgt gaa gag gaa gag aaa aca aat cca gga tta cag acc cca cag ttc<br>Cys Glu Glu Glu Glu Lys Thr Asn Pro Gly Leu Gln Thr Pro Gln Phe<br>335 340 345     | 1057 |
| tct cgc tgc cac ttc aag tca cga aat gac agc gtt att cac atc ctt<br>Ser Arg Cys His Phe Lys Ser Arg Asn Asp Ser Val Ile His Ile Leu<br>350 355 360 365 | 1105 |

|   |      |
|---|------|
| gtg gag gtg acc aca gcc ctg ggt gct gtt cac agt tac ctg ggc tcc<br>Val Glu Val Thr Thr Ala Leu Gly Ala Val His Ser Tyr Leu Gly Ser<br>370 375 380     | 1153 |
| cct ttc tgg atc cac cag gct gtg cgc ctc ccc acc cca aac ttg cac<br>Pro Phe Trp Ile His Gln Ala Val Arg Leu Pro Thr Pro Asn Leu His<br>385 390 395     | 1201 |
| tgg agg gag atc tcc age ggg cat ctg gaa ttg gag tgg cag cac cca<br>Trp Arg Glu Ile Ser Ser Gly His Leu Glu Leu Glu Trp Gln His Pro<br>400 405 410     | 1249 |
| tca tcc tgg gca gcc caa gag acc tgc tat caa ctc cga tac aca gga<br>Ser Ser Trp Ala Ala Gln Glu Thr Cys Tyr Gln Leu Arg Tyr Thr Gly<br>415 420 425     | 1297 |
| gaa ggc cat cag gac tgg aag gtg ctg gag ccg cct ctc ggg gcc cga<br>Glu Gly His Gln Asp Trp Lys Val Leu Glu Pro Pro Leu Gly Ala Arg<br>430 435 440 445 | 1345 |
| gga ggg acc ctg gag ctg cgc ccg cga tct cgc tac cgt tta cag ctg<br>Gly Gly Thr Leu Glu Leu Arg Pro Arg Ser Arg Tyr Arg Leu Gln Leu<br>450 455 460     | 1393 |
| cgc gcc agg ctc aat ggc ccc acc tac caa ggt ccc tgg agc tcg tgg<br>Arg Ala Arg Leu Asn Gly Pro Thr Tyr Gln Gly Pro Trp Ser Ser Trp<br>465 470 475     | 1441 |
| tcg gac cca gct agg gtg gag acc gcc acc gag acc gcc tgg att tcc<br>Ser Asp Pro Ala Arg Val Glu Thr Ala Thr Glu Thr Ala Trp Ile Ser<br>480 485 490     | 1489 |
| ttg gtg acc gct ctg ctg cta gtg ctg ggc ctc agc gcc gtc ctg ggc<br>Leu Val Thr Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly Leu Ser Ala Val Leu Gly<br>495 500 505     | 1537 |
| ctg ctg ctg ctg agg tgg cag ttt cct gca cac tac agg aga ctg agg<br>Leu Leu Leu Leu Arg Trp Gln Phe Pro Ala His Tyr Arg Arg Leu Arg<br>510 515 520 525 | 1585 |
| cat gcc ctg tgg ccc tca ctt cca gat ctg cac cga gtc cta ggc cag<br>His Ala Leu Trp Pro Ser Leu Pro Asp Leu His Arg Val Leu Gly Gln<br>530 535 540     | 1633 |

tac ctt agg gac act gca gcc ctg agt ccg ccc aag gcc aca gtc tca 1681  
 Tyr Leu Arg Asp Thr Ala Ala Leu Ser Pro Pro Lys Ala Thr Val Ser  
                   545                  550                  555

gat acc tgt gaa gaa gtg gaa ccc agc ctc ctt gaa atc ctc ccc aag 1729  
 Asp Thr Cys Glu Glu Val Glu Pro Ser Leu Leu Glu Ile Leu Pro Lys  
                   560                  565                  570

tcc tca gag agg act cct ttg ccc ctg tgt tcc tcc cag tcc cag atg 1777  
 Ser Ser Glu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Cys Ser Ser Gln Ser Gln Met  
                   575                  580                  585

gac tac cga aga ttg cag cct tct tgc ctg ggg acc atg ccc ctg tct 1825  
 Asp Tyr Arg Arg Leu Gln Pro Ser Cys Leu Gly Thr Met Pro Leu Ser  
 590                  595                  600                  605

gtg tgc cca ccc atg get gag tca ggg tcc tgc tgt acc acc cac att 1873  
 Val Cys Pro Pro Met Ala Glu Ser Gly Ser Cys Cys Thr Thr His Ile  
                   610                  615                  620

gcc aac cat tcc tac cta cca cta agc tat tgg cag cag cct tga 1918  
 Ala Asn His Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Tyr Trp Gln Gln Pro  
                   625                  630                  635

gtcgac 1924

<210> 8  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的序列

<400> 8  
 caggggccag tggatagact gatg 24

<210> 9  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的序列

<400> 9  
gctcactgga tggtaggaag atg 23

<210> 10

<211> 354

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 10

caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60

tcttgaagg cttctggcta tgcattcaact aactcctgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggaaagg gtcttgagtg gattggacgg atttatcctg gagatggaga aactatctac 180

aatgggaaat tcagggtcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggatatca gcagcctgac atctgaggac tctgaggtct acttctgtgc aagaggctat 300

gatgattact cgtttgetta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Ser  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe  
50 55 60

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

Met Asp Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
                                   85                                  90                                  95

Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                                   100                                  105                                  110

Leu Val Thr Val Ser Ala  
                                   115

<210> 12

<211> 336

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 12

gatattgtga tgactcagge tgcacctct atacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60

atctcctgta ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120

ttcctgcaga ggccaggcca gtctctcaa ctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180

tcaggagtcc cagataggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240

agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatat agaatacct 300

tttacgtteg gatcggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly  
   1                                  5                                  10                                  15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
                                   20                                  25                                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                                   35                                  40                                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

---

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

<210> 14  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 14  
 tagaattcca ccatggaatg gcctttgate 30

<210> 15  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 15  
 agcctgagtc atcacaatat ccgatccgcc tccacctgca gagacagtga ccagag 56

<210> 16  
 <211> 56  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 16  
 actctgtgca ctgtctctgc aggtggagge ggatcggata ttgtgatgac tcagge 56

<210> 17  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 17  
 attgcgcccg cttatcaactt atcgtcgtca tcctttagt cttttatttc cagcttggtc 60

<210> 18  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的 FLAG 标记序列

<400> 18  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

<210> 19  
 <211> 85  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 19  
 tagaattcca ccatggaatg gcctttgatc tttctcttcc tcctgtcagg aactgcaggt 60  
 gtccactccc aggttcaget gcagc 85

<210> 20  
 <211> 82  
 <212> DNA  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的引物序列

|   |  |    |
|---|--|----|
| <400> 20  |  |    |
| tggtcactgt ctctgcaggt ggtggtggtt cgggtggtgg tggttcgggt ggtggcggat |  | 60 |
| cggtatattgt gatgactcag gc   |  | 82 |
| <210> 21  |  |    |
| <211> 82  |  |    |
| <212> DNA   |  |    |
| <213> 人工的   |  |    |
| <220>   |  |    |
| <223> 人工合成的引物序列   |  |    |
| <400> 21  |  |    |
| tgagtcatca caatatecga tccgccacca cccgaaccac caccaccga accaccacca  |  | 60 |
| cctgcagaga cagtgaccag ag  |  | 82 |
| <210> 22  |  |    |
| <211> 25  |  |    |
| <212> DNA   |  |    |
| <213> 人工的   |  |    |
| <220>   |  |    |
| <223> 人工合成的引物序列   |  |    |
| <400> 22  |  |    |
| caggttcage tgcagcagtc tggac                                       |  | 25 |
| <210> 23  |  |    |
| <211> 81  |  |    |
| <212> DNA   |  |    |
| <213> 人工的   |  |    |
| <220>   |  |    |
| <223> 人工合成的引物序列   |  |    |
| <400> 23  |  |    |
| gtgcagctg aacctgcgat ccaccgcctc ccgaaccacc accaccgat ccaccacctc   |  | 60 |
| cttttatttc cagcttggtc c   |  | 81 |
| <210> 24  |  |    |

&lt;211&gt; 1572

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 24

atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag 60  
gtgcagctgg tgcagtctgg acctgagggt aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc 120  
tgcaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcttggatga actgggtgag gcagaggcct 180  
ggaaagggtc ttgagtggat gggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 240  
gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gggacgaat ccacgagcac agcctacatg 300  
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat 360  
gattactcgt ttgcttactg gggccagga accacggtca ccgtctcttc aggtgggtgt 420  
ggatccggag gtggtggatc ggggtgtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctgca 480  
ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 540  
ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tatttggtcc agcagaagcc agggcagtct 600  
ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag ggtccctga caggttcagt 660  
ggcagtggat caggcacagc ttttacctg aaaatcagca gactggagcc tgaggatggt 720  
ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tctctttta cgttcggcca agggaccaa 780  
ctggaaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggagcgg tggatcgcag 840  
gtgcagctgg tgcagtctgg acctgagggt aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc 900  
tgcaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcttggatga actgggtgag gcagaggcct 960  
ggaaagggtc ttgagtggat gggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 1020  
gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gggacgaat ccacgagcac agcctacatg 1080  
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat 1140  
gattactcgt ttgcttactg gggccagga accacggtca ccgtctcttc aggtgggtgt 1200

ggatccggag gtggtggate ggggtggtgga ggateggata ttgtgatgac tcagtctgca 1260  
 ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 1320  
 ctctctgata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc agcagaagcc agggcagtct 1380  
 ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggtcctga caggttcagt 1440  
 ggcagtggat caggcacagc ttttacctg aaaatcagca gaggggagc tgaggatggt 1500  
 ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tacccttta cgttcggcca agggacaaa 1560  
 ctggaaatca aa 1572

<210> 25  
 <211> 524  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 25

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 115   | 120 | 125 |
| Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly |     |     |
| 130   | 135 | 140 |
| Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala |     |     |
| 145   | 150 | 155 |
| 160   |     |     |
| Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg |     |     |
| 165   | 170 | 175 |
| Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp |     |     |
| 180   | 185 | 190 |
| Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met |     |     |
| 195   | 200 | 205 |
| Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser |     |     |
| 210   | 215 | 220 |
| Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val |     |     |
| 225   | 230 | 235 |
| 240   |     |     |
| Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| 320   |     |     |
| Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu |     |     |
| 325   | 330 | 335 |
| Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp |     |     |
| 340   | 345 | 350 |

Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
 355 360 365

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe  
 370 375 380

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met  
 405 410 415

Thr Gln Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser  
 420 425 430

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr  
 435 440 445

Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu  
 450 455 460

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu  
 485 490 495

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro  
 500 505 510

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 515 520

<210> 26

<211> 1572

<212> DNA

<213> 智人

<400> 26

atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg acctgagggt aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tcctggatga actgggtgag gcagaggcct 180

|  |      |
|--|------|
| ggaaagggtc ttgagtgggt tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat  | 240  |
| gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggaogaat ccacgagcac agcctacatg  | 300  |
| gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat  | 360  |
| gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacggtea cegtctcttc aggtggtggt  | 420  |
| ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctgca | 480  |
| ctctccctgc cegtacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggte tagtaagagt   | 540  |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tatttggtacc tgcagaagcc agggcagtct | 600  |
| ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt   | 660  |
| ggcagtggat caggcacagc ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt   | 720  |
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggacaaa   | 780  |
| ctggaaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggagcggg tggatcgcag  | 840  |
| gtgcagctgg tgcagtctgg acctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc | 900  |
| tgaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcttgatga actgggtgag gcagaggcct    | 960  |
| ggaaagggtc ttgagtgggt tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat  | 1020 |
| gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggaogaat ccacgagcac agcctacatg  | 1080 |
| gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat  | 1140 |
| gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacggtea cegtctcttc aggtggtggt  | 1200 |
| ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctgca | 1260 |
| ctctccctgc cegtacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggte tagtaagagt   | 1320 |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tatttggtacc tgcagaagcc agggcagtct | 1380 |
| ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt   | 1440 |
| ggcagtggat caggcacagc ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt   | 1500 |

ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggaccaa 1560

ctggaaatca aa 1572

<210> 27

<211> 524

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys  
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn  
65 70 75 80

Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala  
145 150 155 160

Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg

|   |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 165 |     | 170 |     | 175 |
| Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp |     |     |     |     |     |
|   | 180 |     | 185 |     | 190 |
| Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met |     |     |     |     |     |
|   | 195 |     | 200 |     | 205 |
| Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser |     |     |     |     |     |
|   | 210 |     | 215 |     | 220 |
| Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val |     |     |     |     |     |
| 225   |     | 230 |     | 235 | 240 |
| Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly |     |     |     |     |     |
|   | 245 |     | 250 |     | 255 |
| Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly |     |     |     |     |     |
|   | 260 |     | 265 |     | 270 |
| Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro |     |     |     |     |     |
|   | 275 |     | 280 |     | 285 |
| Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser |     |     |     |     |     |
|   | 290 |     | 295 |     | 300 |
| Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro |     |     |     |     |     |
| 305   |     | 310 |     | 315 | 320 |
| Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu |     |     |     |     |     |
|   | 325 |     | 330 |     | 335 |
| Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp |     |     |     |     |     |
|   | 340 |     | 345 |     | 350 |
| Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu |     |     |     |     |     |
|   | 355 |     | 360 |     | 365 |
| Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe |     |     |     |     |     |
|   | 370 |     | 375 |     | 380 |
| Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly |     |     |     |     |     |
| 385   |     | 390 |     | 395 | 400 |

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met  
 405 410 415

Thr Gln Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser  
 420 425 430

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr  
 435 440 445

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu  
 450 455 460

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 465 470 475 480

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu  
 485 490 495

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro  
 500 505 510

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 515 520

<210> 28

<211> 1572

<212> DNA

<213> 智人

<400> 28

atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagteccag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg acctgagggt aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcctggatga actggatcag gcagaggcct 180

ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 240

gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg 300

gagctgagca goctgagatc tgaggacaag gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat 360

gattactcgt ttgcttactg gggccaggga acctgtgtca cegtctcttc aggtggtggt 420

---

|  |      |
|--|------|
| ggatccggag gtggtggatc ggggtgggga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctgca  | 480  |
| ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt  | 540  |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tatttggtacc tgcagaagcc agggcagtct | 600  |
| ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggtcctga caggttcagt   | 660  |
| ggcagtggat caggcacage ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt   | 720  |
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggacaaa   | 780  |
| ctggaaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggaggcgg tggatcgag   | 840  |
| gtgcagctgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc  | 900  |
| tgcaaggctt ctggatacac cttcaccac tectggatga actggatcag gcagaggcct   | 960  |
| ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat  | 1020 |
| gggaaattea gggtcagagt cacgattacc geggacgaat ccacgagcac agcctacatg  | 1080 |
| gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat  | 1140 |
| gattactcgt ttgcttactg gggccagga accctggtca cegtctcttc aggtggtggt   | 1200 |
| ggatccggag gtggtggatc ggggtgggga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctgca  | 1260 |
| ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt  | 1320 |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tatttggtacc tgcagaagcc agggcagtct | 1380 |
| ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggtcctga caggttcagt   | 1440 |
| ggcagtggat caggcacage ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt   | 1500 |
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggacaaa   | 1560 |
| ctggaaatca aa  | 1572 |

<210> 29  
 <211> 524  
 <212> PRT  
 <213> 智人

&lt;400&gt; 29

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys  
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45

Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn  
65 70 75 80

Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala  
145 150 155 160

Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg  
165 170 175

Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp  
180 185 190

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met  
195 200 205

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
210 215 220

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val  
 225 230 235 240

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly  
 245 250 255

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro  
 275 280 285

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 290 295 300

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Ile Arg Gln Arg Pro  
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu  
 325 330 335

Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp  
 340 345 350

Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
 355 360 365

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe  
 370 375 380

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met  
 405 410 415

Thr Gln Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser  
 420 425 430

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr  
 435 440 445

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu

|  |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|
| 450  | 455 | 460 |     |
| Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser    |     |     |     |
| 465  | 470 | 475 | 480 |
| Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu    |     |     |     |
|  | 485 | 490 | 495 |
| Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro    |     |     |     |
|  | 500 | 505 | 510 |
| Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys                    |     |     |     |
|  | 515 | 520 |     |
| <210> 30   |     |     |     |
| <211> 1572   |     |     |     |
| <212> DNA  |     |     |     |
| <213> 智人   |     |     |     |
| <400> 30   |     |     |     |
| atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcag ctacagggtg ccagtcceag  |     |     | 60  |
| gtgcagctgg tgcagtcigg acctgagggt aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc   |     |     | 120 |
| tgcaaggett ctggatacac cttaccaaac tcctggatga actgggtgag gcagaggcct  |     |     | 180 |
| ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat  |     |     | 240 |
| gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg  |     |     | 300 |
| caactgagca gcctgagatc tgaggacaac gccgtgtatt actgtgcgag aggetatgat  |     |     | 360 |
| gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacggtea cegtctcttc aggtggtggt  |     |     | 420 |
| ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca |     |     | 480 |
| ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt  |     |     | 540 |
| ctcctgcata gtaatgcaa cacttacttg tattggttcc tgcagaagcc agggcagtct   |     |     | 600 |
| ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag ggtccctga caggttcagt   |     |     | 660 |
| ggcagtggat caggcacaga ttttacaactg aaaatcagca gaggagggc tgaggatggt  |     |     | 720 |

|   |      |
|---|------|
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggacaaaa | 780  |
| ctggaaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggaggcgg tggatcgag  | 840  |
| gtgcagctgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc  | 900  |
| tgcaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcttggatga actgggtgag gcagaggcct | 960  |
| ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat | 1020 |
| gggaaattca ggtcagagt cacgattacc gcggaogaat ccacagacac agcctacatg  | 1080 |
| caactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat | 1140 |
| gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacggtca cgtctcttc aggtggtggt  | 1200 |
| ggatccggag gtggtggatc ggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca  | 1260 |
| ctctcctgc cgtcacecc tggagagcgg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt   | 1320 |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgcagaagcc agggcagtet | 1380 |
| ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag ggtccctga caggttcagt  | 1440 |
| ggcagtggat caggcacaga ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatgtt  | 1500 |
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggacaaaa | 1560 |
| ctggaaatca aa   | 1572 |
| <210> 31  |      |
| <211> 1572  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> 智人  |      |
| <400> 31  |      |
| atggactgga cctggaggtt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag | 60   |
| gtgcagctgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg ggcctcagt gaaggtctcc  | 120  |
| tgcaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcttggatga actgggtgag gcagaggcct | 180  |
| ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat | 240  |

|  |      |
|--|------|
| gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg  | 300  |
| gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat  | 360  |
| gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacggcca ccgtctcttc aggtggtggt  | 420  |
| ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca | 480  |
| ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt  | 540  |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc agcagaagcc agggcaggct  | 600  |
| ccacggctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt   | 660  |
| ggcagtggat caggcacagc ttttacctg aaaatcagca gaggggagc tgaggatggt    | 720  |
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa taccctttta cgttcggcca agggacaaa   | 780  |
| ctggaaatca aaggaggtg tggatcgggt ggtggtggtt cgggaggcgg tggatcgcag   | 840  |
| gtgcagctgg tgcagctcgg acctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc  | 900  |
| tgaaggctt ctggatacac cttaccaaac tcttggatga actgggtgag gcagaggcct   | 960  |
| ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt taccctggag atggagaaac tatctacaat  | 1020 |
| gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg  | 1080 |
| gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat  | 1140 |
| gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacggcca ccgtctcttc aggtggtggt  | 1200 |
| ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca | 1260 |
| ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt  | 1320 |
| ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc agcagaagcc agggcaggct  | 1380 |
| ccacggctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt   | 1440 |
| ggcagtggat caggcacagc ttttacctg aaaatcagca gaggggagc tgaggatggt    | 1500 |
| ggggtttatt actgcatgca acatatagaa taccctttta cgttcggcca agggacaaa   | 1560 |

ctggaaatca aa

1572

<210> 32  
 <211> 524  
 <212> PRT  
 <213> 智人

&lt;400&gt; 32

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys  
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly  
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro  
 145 150 155 160

Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg  
 165 170 175

Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp  
 180 185 190

Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Met  
 195 200 205

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
 210 215 220

Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val  
 225 230 235 240

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly  
 245 250 255

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro  
 275 280 285

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 290 295 300

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro  
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu  
 325 330 335

Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp  
 340 345 350

Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu  
 355 360 365

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe  
 370 375 380

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
 385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met  
 405 410 415

Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 420   | 425 | 430 |
| Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr |     |     |
| 435   | 440 | 445 |
| Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu |     |     |
| 450   | 455 | 460 |
| Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser |     |     |
| 465   | 470 | 475 |
| Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu |     |     |
| 485   | 490 | 495 |
| Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro |     |     |
| 500   | 505 | 510 |
| Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys                 |     |     |
| 515   | 520 |     |

<210> 33  
 <211> 1572  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠

<400> 33  
 atggaatggc ctttgatett tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccaactccag 60  
 gttcagctgc agcagttctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc 120  
 tgcaaggctt ctggctatgc attcaactaac tcttgatga actgggtgaa gcagaggcct 180  
 ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 240  
 gggaaattca gggtaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300  
 gatatcagca gctgacatc tgaggactct ggggtctact tctgtgcaag aggctatgat 360  
 gattactcgt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtc ctgtctctgc aggtgggtgt 420  
 ggttcgggtg gtggtggttc ggggtggtgc ggatcggata ttgtgatgac tcaggctgca 480  
 ccctctatac ctgtcactcc tggagagtca gtatccatct cctgtaggtc tagtaagagt 540

---

ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgcagaggcc aggccagtct 600  
cctcaactcc tgatatatcg gatgtccaac cttgcctcag gagtcccaga taggttcagt 660  
ggcagtgggt caggaactgc tttcacactg agaatcagta gagtggagge tgaggatgtg 720  
gggtgtttatt actgtatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggatc ggggaccaag 780  
ctggaaataa aaggaggttg tggatcgggt ggtggtggtt cgggaggcgg tggatcgcag 840  
gttcagctgc agcagtctgg acctgagctg gtgaagcctg ggcctcagt gaagatttcc 900  
tgcaaggctt ctggctatgc attcactaac tcctggatga actgggtgaa gcagaggcct 960  
ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 1020  
gggaaattca ggttcaagge cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 1080  
gatatcagca gcttgacatc tgaggactct gcggtctact totgtgcaag aggctatgat 1140  
gattactcgt ttgcttactg gggccaaggg actctggtea ctgtctctgc aggtggtggt 1200  
ggttcgggtg gtggtggttc ggtggtggc ggatcggata ttgtgatgac tcaggctgca 1260  
ccctctatac ctgtcactcc tggagagtca gtatccatct cctgtaggtc tagtaagagt 1320  
ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgcagaggcc aggccagtct 1380  
cctcaactcc tgatatatcg gatgtccaac cttgcctcag gagtcccaga taggttcagt 1440  
ggcagtgggt caggaactgc tttcacactg agaatcagta gagtggagge tgaggatgtg 1500  
gggtgtttatt actgtatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggatc ggggaccaag 1560  
ctggaaataa aa 1572

<210> 34  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工的

<220>  
<223> 人工合成的引物序列

|   |    |
|---|----|
| <400> 34  |    |
| cctgaattcc accatgcgat ggagctggat ctttc                            | 35 |
| <210> 35  |    |
| <211> 48  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人工的   |    |
| <220>   |    |
| <223> 人工合成的引物序列   |    |
| <400> 35  |    |
| accgccagag ccacctccgc ctgaaccgcc tccacctgag gagactgt              | 48 |
| <210> 36  |    |
| <211> 57  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人工的   |    |
| <220>   |    |
| <223> 人工合成的引物序列   |    |
| <400> 36  |    |
| ttcaggcgga ggtggetctg gcggtggcgg aagccaaatt gttctcaccc agtcgcc    | 57 |
| <210> 37  |    |
| <211> 63  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人工的   |    |
| <220>   |    |
| <223> 人工合成的引物序列   |    |
| <400> 37  |    |
| accggatccg ccgccaccac tgccaccacc tccttttata tccaactttg tccccgagcc | 60 |
| gaa   | 63 |
| <210> 38  |    |
| <211> 50  |    |
| <212> DNA   |    |
| <213> 人工的   |    |
| <220>   |    |

## &lt;223&gt; 人工合成的引物序列

&lt;400&gt; 38

ggcggatccg gtggcgggtgg ctcacaggtc cagttgcage agtctggacc 50

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 68

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

## &lt;223&gt; 人工合成的引物序列

&lt;400&gt; 39

attgcggcgc cttatacactt atcgtcgtca tcctttagt cttttatctc caactttgtc 60

cccgagcc 68

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 1572

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (14)..(1561)

&lt;400&gt; 40

cctgaattcc acc atg cga tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca 49

Met Arg Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser

1

5

10

ata act gca ggt gtc cat tgc cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct 97

Ile Thr Ala Gly Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro

15

20

25

gag ctg gtg aag cct ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct 145

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

30

35

40

ggc tac acc ttc aca gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct 193

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro

45

50

55

60

|   |     |
|---|-----|
| gga cag gga ctt gaa tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act<br>Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr<br>65 70 75        | 241 |
| act gat tac aat gag aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac<br>Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp<br>80 85 90        | 289 |
| aaa tcc tcc agc aca gcc tac att ttg ctc agc age ctg acc tct gag<br>Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu<br>95 100 105      | 337 |
| gac tct gcg atg tat ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg<br>Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp<br>110 115 120     | 385 |
| ggc cag ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc<br>Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly<br>125 130 135 140 | 433 |
| gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga age caa att gtt ctc acc cag tgc<br>Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser<br>145 150 155     | 481 |
| cca gca atc atg tct gca tct cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc<br>Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys<br>160 165 170     | 529 |
| agt gcc age tca agt gta agt tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca<br>Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro<br>175 180 185     | 577 |
| ggc act ttt ccc aaa ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg get tct<br>Gly Thr Phe Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser<br>190 195 200     | 625 |
| gga gtc cct act cgc ttc agt ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct<br>Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser<br>205 210 215 220 | 673 |
| ctc aca atc age cga atg gag get gaa gat get gcc act tat tac tgc<br>Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys<br>225 230 235     | 721 |

|   |      |
|---|------|
| cag caa agg acg agt tat cca ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg | 769  |
| Gln Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu |      |
| 240 245 250   |      |
| <br>  |      |
| gag ata aaa gga ggt ggt ggc agt ggt ggc ggc gga tcc ggt ggc ggt | 817  |
| Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly |      |
| 255 260 265   |      |
| <br>  |      |
| ggc tca cag gtc cag ttg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct | 865  |
| Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro |      |
| 270 275 280   |      |
| <br>  |      |
| ggg gct tca gtg aag atg tct tgt aag gct tct ggc tac acc ttc aca | 913  |
| Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr |      |
| 285 290 295 300   |      |
| <br>  |      |
| gac tac ttt ata cac tgg gtg aaa cag agg cct gga cag gga ctt gaa | 961  |
| Asp Tyr Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu |      |
| 305 310 315   |      |
| <br>  |      |
| tgg att gga tgg att ttt cct gga gat gat act act gat tac aat gag | 1009 |
| Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Asp Thr Thr Asp Tyr Asn Glu |      |
| 320 325 330   |      |
| <br>  |      |
| aag ttc agg ggc aag acc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca | 1057 |
| Lys Phe Arg Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr |      |
| 335 340 345   |      |
| <br>  |      |
| gcc tac att ttg ctc agc agc ctg acc tct gag gac tct gcg atg tat | 1105 |
| Ala Tyr Ile Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr |      |
| 350 355 360   |      |
| <br>  |      |
| ttc tgt gta agg agt gac gac ttt gac tac tgg ggc cag ggc acc act | 1153 |
| Phe Cys Val Arg Ser Asp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr |      |
| 365 370 375 380   |      |
| <br>  |      |
| ctc aca gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc | 1201 |
| Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly |      |
| 385 390 395   |      |
| <br>  |      |
| ggt ggc gga agc caa att gtt ctc acc cag tog cca gca atc atg tct | 1249 |
| Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser |      |
| 400 405 410   |      |

gca tct cca ggg gag aag gtc acc ata acc tgc agt gcc agc tca agt 1297  
 Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser  
 415 420 425

gta agt tac atg cac tgg ttc cag cag aag cca ggc act ttt ccc aaa 1345  
 Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Phe Pro Lys  
 430 435 440

ctc tgg att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct act cgc 1393  
 Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg  
 445 450 455 460

ttc agt ggc agt gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc cga 1441  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg  
 465 470 475

atg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag caa agg acg agt 1489  
 Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ser  
 480 485 490

tat cca ccc acg ttc ggc teg ggg aca aag ttg gag ata aaa gac tac 1537  
 Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr  
 495 500 505

aag gat gac gac gat aag tga taa gcggcgcaa t 1572  
 Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 510

<210> 41  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的肽序列

<400> 41

Gly Gly Gly Ser  
 1

<210> 42  
 <211> 4  
 <212> PRT

---

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 42

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 43

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 44

Ser Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 46

Ser Gly Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的肽序列

<400> 48

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 49  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的序列

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Gln Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
           20                   25                   30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met  
           35                   40                   45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe  
           50                   55                   60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
           85                   90                   95

Ala Arg Gly Gly Gln Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr  
           100                   105                   110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
           115

<210> 50  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工的

<220>  
 <223> 人工合成的序列

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Asn  
20 25 30

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 51  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 人工合成的序列

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

---

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

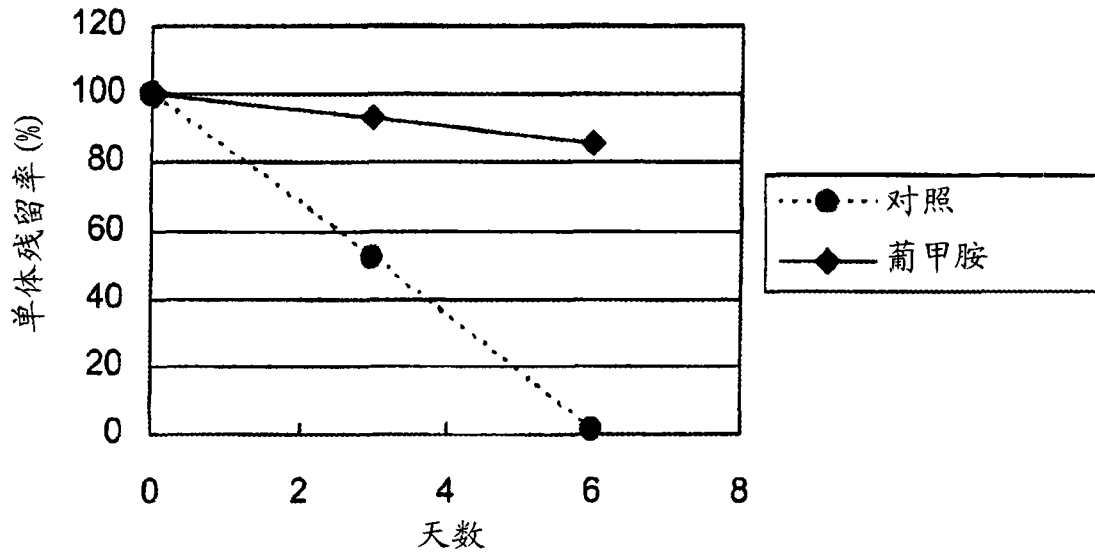


图 1

|         |              | 对照       | 葡甲胺 |    |
|---------|--------------|----------|-----|----|
| sc(Fv)2 | mVB22B       | 40°C- 1W | 13  | 4  |
|         |              | 40°C- 2W | 22  | 7  |
|         | 2D7          | 40°C- 1W | 1   | 0  |
|         |              | 40°C- 2W | 3   | 0  |
|         | 12E10        | 55°C- 1W | 62  | 25 |
|         |              | 55°C- 2W | 84  | 31 |
| IgG     | 人源化抗IL-6受体抗体 | 60°C- 1W | 2   | 1  |
|         |              | 60°C- 3W | 12  | 9  |

图 2

人源化抗IL-6受体抗体 80mg(116mg/mL)

|                            |    | 填充试剂  | 聚集物含有率(%) | 填充试剂 | 聚集物含有率(%) |      |
|----------------------------|----|-------|-----------|------|-----------|------|
| 冷冻干燥后                      |    | 100mg | 0.03      | 55mg | 0.00      |      |
|                            | 蔗糖 | 70mg  | 0.07      | 葡甲胺  | 40mg      | 0.03 |
|                            |    | 50mg  | 0.16      | 30mg | 0.06      |      |
|                            |    | 填充试剂  | 聚集物含有率(%) | 填充试剂 | 聚集物含有率(%) |      |
| 冻干制剂<br>40°C-1个月的<br>加速试验后 |    | 100mg | 0.54      | 55mg | 0.47      |      |
|                            | 蔗糖 | 70mg  | 0.99      | 葡甲胺  | 40mg      | 0.56 |
|                            |    | 50mg  | 1.57      | 30mg | 0.87      |      |
|                            |    | 填充试剂  | 聚集物含有率(%) | 填充试剂 | 聚集物含有率(%) |      |
| 溶液制剂<br>25°C-2周的<br>加速试验   |    | 100mg | 0.23      | 55mg | 0.15      |      |
|                            | 蔗糖 | 70mg  | 0.24      | 葡甲胺  | 40mg      | 0.19 |
|                            |    | 50mg  | 0.40      | 30mg | 0.24      |      |

图 3

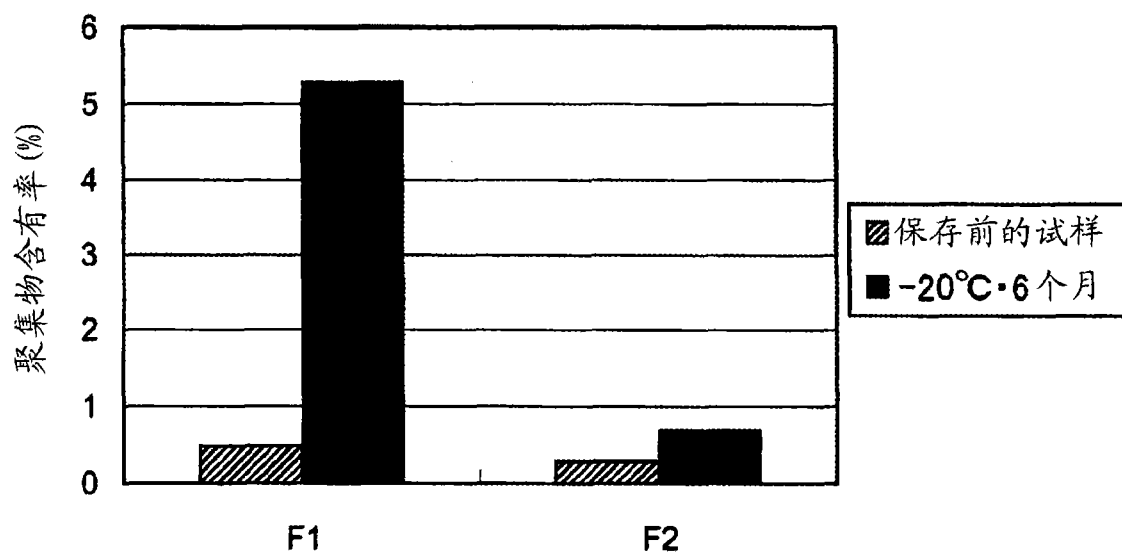


图 4

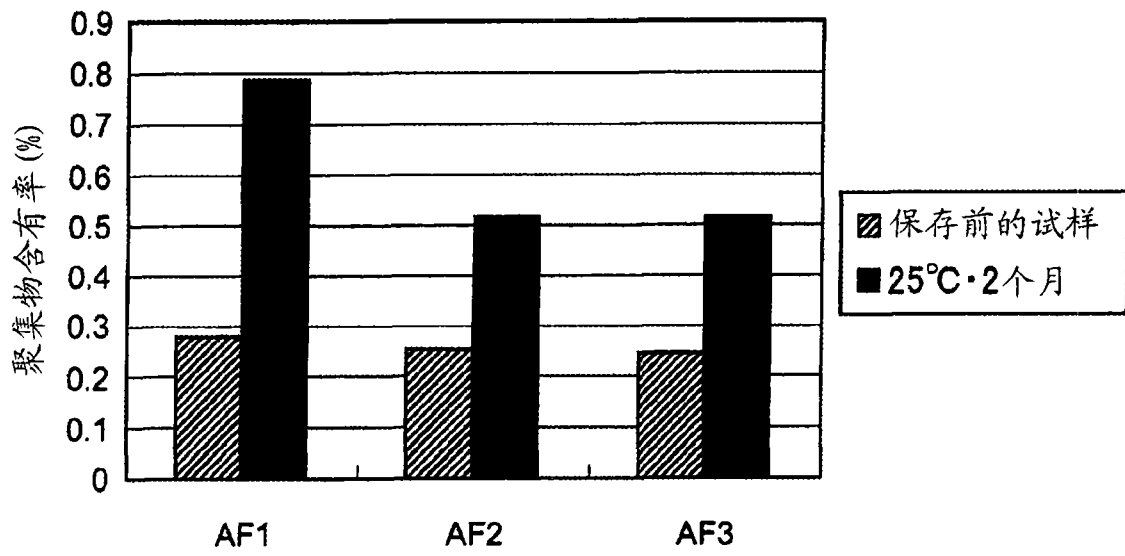


图 5

