

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/13

C12P 21/08 C12N 5/10

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99806658.3

[43]公开日 2001年7月11日

[11]公开号 CN 1303431A

[22]申请日 1999.4.2 [21]申请号 99806658.3

[30]优先权

[32]1998.4.3 [33]JP [31]91850/1998

[86]国际申请 PCT/JP99/01768 1999.4.2

[87]国际公布 WO99/51743 日 1999.10.14

[85]进入国家阶段日期 2000.11.27

[71]申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 佐藤功 安达秀树 藪田尚弘

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 陈 昕

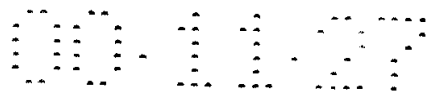
权利要求书 10 页 说明书 195 页 附图页数 35 页

[54]发明名称 抗人组织因子和人源化抗体以及人源化
抗体的制作方法

[57]摘要

抗 TF 的人源化抗体,是由下面的 A 和 B 构成的。其中 A. 是由(1) 小鼠抗组织因子(TF)单克隆抗体的 H 链 CDR 和人抗体的 H 链 FR 构成的 H 链 V 区、以及(2)含有人抗体 H 链 C 区构成的人源化 H 链;而 B. 由(1)小鼠抗组织因子(TF)单克隆抗体的 L 链 CDR 和人抗体的 L 链 FR 构成的 L 链 V 区、以及(2)含有人抗体 L 链 C 区构成的人源化 L 链构成。对将小鼠单克隆抗体的 CDR 移植到人抗体上制作人源化 V 区后,通过对其中的 FR 用同源性高的其它人抗体对应的 FR 进行置换而获得活性高的人源化抗体进行了探索。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权利要求书

1. 含有小鼠抗人组织因子 (TF) 单克隆抗体的重链 (H) 可变区 (V) 和人抗体 H 链恒定区 (C) 构成的嵌合 H 链, 该 H 链 V 区是含有下面任一个氨基酸序列的嵌合 H 链:

- (1) 序列号: 139 的氨基酸序列 (ATR-2)
- (2) 序列号: 140 的氨基酸序列 (ATR-3)
- (3) 序列号: 141 的氨基酸序列 (ATR-4)
- (4) 序列号: 142 的氨基酸序列 (ATR-5)
- (5) 序列号: 143 的氨基酸序列 (ATR-7)
- (6) 序列号: 144 的氨基酸序列 (ATR-8).

2. 权利要求 1 记载的嵌合 H 链, 其中上述的 H 链 V 区含有序列号 142 的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 记载的嵌合 H 链, 其中上述的 H 链 C 区是 C γ 1, C γ 2, C γ 3 或 C γ 4 区。

4. 权利要求 1~3 任一项记载的嵌合 H 链, 其中上述的 H 链 V 区含有序列号 142 的氨基酸序列, 而上述的 H 链 C 区是 C γ 4。

5. 含有小鼠抗人组织因子 (TF) 单克隆抗体的轻链 (L) V 区和人抗体 L 链 C 区构成的嵌合 L 链, 该 L 链 V 区是含有下面任一个氨基酸序列的嵌合 L 链:

- (1) 序列号: 145 的氨基酸序列 (ATR-2)
- (2) 序列号: 146 的氨基酸序列 (ATR-3)
- (3) 序列号: 147 的氨基酸序列 (ATR-4)
- (4) 序列号: 148 的氨基酸序列 (ATR-5)
- (5) 序列号: 149 的氨基酸序列 (ATR-7)
- (6) 序列号: 150 的氨基酸序列 (ATR-8).

6. 权利要求 5 记载的嵌合 L 链, 其中上述的 L 链 V 区含有序列号 148 的氨基酸序列。

7. 权利要求 5 或 6 记载的嵌合 L 链, 其中上述的 L 链 C 区是 C λ 或 C κ

区。

8. 权利要求 5~7 任一项记载的嵌合 L 链, 其中上述的 L 链 V 区含有序列号 148 的氨基酸序列, 而上述的 L 链 C 区是 C κ 。

9. 由权利要求 1~4 任一项记载的嵌合 H 链和权利要求 5~8 任一项记载的嵌合 L 链构成的人 TF 的嵌合抗体。

10. 由权利要求 4 记载的嵌合 H 链和权利要求 8 记载的嵌合 L 链构成的人 TF 的嵌合抗体。

11. 在小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 H 链 V 区互补性决定区 (CDR) 和人抗体 H 链 V 框架区 (FR) 构成的人源化 H 链 V 区中, 上述 CDR 含有如下氨基酸序列的人源化 H 链 V 区:

H-CDR1: Asp Tyr Tyr Met His (序列号: 133)

H-CDR2: Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr
Asp Pro Lys Phe Gln Gly (序列号: 134)

H-CDR3: Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr (序列号:
135)

12. 上述 FR 含有如下氨基酸序列的人源化 H 链 V 区:

H-FR1: Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu
Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys
Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys (序列号: 1
10)

H-FR2: 可为下面序列 (1) ~ (3) 中的任一个序列,

(1) Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
Gly (序列号: 111)

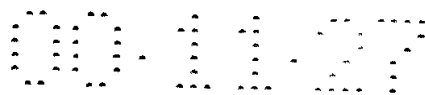
(2) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
Gly (序列号: 112)

(3) Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
Gly (序列号: 113)

H-FR3: 可为下面序列 (1) ~ (10) 中的任一个序列,

(1) Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala

- Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (序列号: 1 1 4)
- (2) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg (序列号: 1 1 5)
- (3) Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (序列号: 1 1 6)
- (4) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala
Val Tyr Phe Cys Ala Arg (序列号: 1 1 7)
- (5) Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala
Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
Val Tyr Phe Cys Ala Arg (序列号: 1 1 8)
- (6) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (序列号: 1 1 9)
- (7) Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala
Val Tyr Ser Cys Ala Arg (序列号: 1 2 0)
- (8) Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala
Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala
Ile Tyr Phe Cys Ala Arg (序列号: 1 2 1)
- (9) Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val
Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (序列号: 1 2 2)
- (10) Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr
Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp



Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg (序列号: 1 2 3
)

FR4: Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
Ser (序列号: 1 2 4)

13. 含有下列序列号给出的氨基酸序列的权利要求 11 或 12 记载的人源化 H 链 V 区: 序列号: 30 (版本 a); 序列号: 40 (版本 b); 序列号: 42 (版本 c); 序列号: 50 (版本 d); 序列号: 52 (版本 e); 序列号: 58 (版本 f); 序列号: 60 (版本 g); 序列号: 64 (版本 h); 序列号: 70 (版本 i); 序列号: 72 (版本 j); 序列号: 76 (版本 b1); 序列号: 78 (版本 d1); 序列号: 82 (版本 b3); 序列号: 84 (版本 d3)。

14. 含有序列号: 40 (版本 b) 的氨基酸序列的权利要求 11 ~ 13 中任一项记载的人源化 H 链 V 区。

15. 含有序列号: 70 (版本 i) 的氨基酸序列的权利要求 11 ~ 13 中任一项记载的人源化 H 链 V 区。

16. 在由小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 L 链 V 区 CDR 和人 L 链 V 区 FR 构成的人源化 L 链 V 区中, 上述 CDR 含有如下氨基酸序列的人源化 L 链 V 区:

L - C D R 1 : Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser
(配列番号: 1 3 6)

L - C D R 2 : Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp (序列号: 1 3
7)

L - C D R 3 : Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr (序列
号: 1 3 8)。

17. 权利要求 16 记载的人源化 L 链 V 区, 其中上述 FR 含有如下氨基酸序列:

L - FR1: Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
Cys (序列号: 1 2 5)

L - FR2: 可为下面序列 (1) ~ (3) 中的任一个序列,

(1) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

Ile Tyr (序列号: 1 2 6)

(2) Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu

Ile Tyr (序列号: 1 2 7)

(3) Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu

Ile Tyr (序列号: 1 2 8)

L-FR3: 可为下面序列 (1) ~ (3) 中的任一个序列,

(1) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (序列号: 1 2 9)

(2) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (序列号: 1 3 0)

(3) Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys (序列号: 1 3 1)

L-FR4: Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (序列号: 1 3 2)

18. 含有序列号: 93 (版本 a); 序列号: 99 (版本 b); 序列号: 101 (版本 c); 序列号: 107 (版本 b1); 序列号: 109 (版本 b2) 给出的氨基酸序列的权利要求 16 或 17 中任一项记载的人源化 L 链 V 区。

19. 含有序列号: 99 (版本 b) 的氨基酸序列的权利要求 16 ~ 18 中任一项记载的人源化 L 链 V 区。

20. 含有序列号: 109 (版本 b2) 的氨基酸序列的权利要求 16 ~ 18 中任一项记载的人源化 L 链 V 区。

21. 由含有权利要求 11 ~ 15 中任一项记载的人源化 H 链 V 区和人抗体 H 链 C 区构成的人 TF 的抗体的人源化 H 链。

22. 由含有权利要求 14 记载的人源化 H 链 V 区 (版本 b) 和人抗体 H 链 C 区构成的人 TF 的抗体的人源化 H 链。

23. 由含有权利要求 15 记载的人源化 H 链 V 区 (版本 i) 和人抗体 H 链

C 区构成的人 TF 的抗体的人源化 H 链。

24. 权利要求 21~23 中任一项记载的人源化 H 链, 其中上述人抗体的 H 链 C 区是 C γ 1, C γ 2, C γ 3 或 C γ 4 区。
25. 由含有权利要求 16~20 中任一项记载的人源化 L 链 V 区和人抗体 L 链 C 区构成的人 TF 的抗体的人源化 L 链。
26. 由含有权利要求 19 记载的人源化 L 链 V 区(版本 b)和人抗体 L 链 C 区构成的人 TF 的抗体的人源化 L 链。
27. 由含有权利要求 20 记载的人源化 L 链 V 区(版本 b2)和人抗体 L 链 C 区构成的人 TF 的抗体的人源化 L 链。
28. 权利要求 25~27 中任一项记载的人源化 L 链, 其中上述人抗体的 L 链 C 区是 C λ 或 C κ 区。
29. 由含有权利要求 21~24 中任一项记载的人源化 H 链和权利要求 25~28 中任一项记载的人源化 L 链构成的人 TF 的人源化抗体。
30. 由含有权利要求 22 记载的人源化 H 链(版本 b)和权利要求 26 记载的人源化 L 链(版本 b)构成的人 TF 的人源化抗体。
31. 由含有权利要求 23 记载的人源化 H 链(版本 i)和权利要求 26 记载的人源化 L 链(版本 b)构成的人 TF 的人源化抗体。
32. 由含有权利要求 23 记载的人源化 H 链(版本 i)和权利要求 27 记载的人源化 L 链(版本 b2)构成的人 TF 的人源化抗体。
33. 编码权利要求 1~4 中任一项记载的嵌合 H 链的 DNA。
34. 编码权利要求 2~4 中任一项记载的嵌合 H 链的 DNA。
35. 编码权利要求 5~8 中任一项记载的嵌合 L 链的 DNA。
36. 编码权利要求 6~8 中任一项记载的嵌合 L 链的 DNA。
37. 编码权利要求 11~15 中任一项记载的人源化 H 链 V 区的 DNA。
38. 编码权利要求 14 记载的人源化 H 链 V 区(版本 b)的 DNA。
39. 编码权利要求 15 记载的人源化 H 链 V 区(版本 i)的 DNA。
40. 编码权利要求 16~20 中任一项记载的人源化 L 链 V 区的 DNA。
41. 编码权利要求 19 记载的人源化 L 链 V 区(版本 b)的 DNA。
42. 编码权利要求 20 记载的人源化 L 链 V 区(版本 b2)的 DNA。

43. 编码权利要求 21~24 中任一项记载的人源化 H 链的 DNA。
44. 编码权利要求 22 或 24 记载的人源化 H 链 (版本 b) 的 DNA。
45. 编码权利要求 23 或 24 记载的人源化 H 链 (版本 i) 的 DNA。
46. 编码权利要求 25~28 中任一项记载的人源化 L 链的 DNA。
47. 编码权利要求 26 或 28 记载的人源化 L 链 (版本 b) 的 DNA。
48. 编码权利要求 27 或 28 记载的人源化 L 链 (版本 b2) 的 DNA。
49. 含有编码权利要求 33 记载的嵌合 H 链的 DNA 的表达载体。
50. 含有编码权利要求 34 记载的嵌合 H 链的 DNA 的表达载体。
51. 含有编码权利要求 35 记载的嵌合 L 链的 DNA 的表达载体。
52. 含有编码权利要求 36 记载的嵌合 L 链的 DNA 的表达载体。
53. 含有由编码权利要求 33 记载的嵌合 H 链的 DNA 和编码权利要求 35 记载的嵌合 L 链的 DNA 构成的表达载体。
54. 含有由编码权利要求 34 记载的嵌合 H 链的 DNA 和编码权利要求 36 记载的嵌合 L 链的 DNA 构成的表达载体。
55. 含有编码权利要求 43 记载的人源化 H 链的 DNA 的表达载体。
56. 含有编码权利要求 44 记载的人源化 H 链 (版本 b) 的 DNA 的表达载体。
57. 含有编码权利要求 45 记载的人源化 H 链 (版本 i) 的 DNA 的表达载体。
58. 含有编码权利要求 46 记载的人源化 L 链的 DNA 的表达载体。
59. 含有编码权利要求 47 记载的人源化 L 链 (版本 b) 的 DNA 的表达载体。
60. 含有编码权利要求 48 记载的人源化 L 链 (版本 b2) 的 DNA 的表达载体。
61. 含有由编码权利要求 43 记载的人源化 H 链的 DNA 和编码权利要求 46 记载的人源化 L 链的 DNA 构成的表达载体。
62. 含有由编码权利要求 44 记载的人源化 H 链 (版本 b) 的 DNA 和编码权利要求 47 记载的人源化 L 链 (版本 h) 的 DNA 构成的表达载体。
63. 含有由编码权利要求 45 记载的人源化 H 链 (版本 i) 的 DNA 和编码

- 权利要求 47 记载的人源化 L 链（版本 b）的 DNA 构成的表达载体。
64. 含有由编码权利要求 45 记载的人源化 H 链（版本 i）的 DNA 和编码权利要求 48 记载的人源化 L 链（版本 b2）的 DNA 构成的表达载体。
65. 通过含有由编码权利要求 49 记载的嵌合 H 链的 DNA 构成的表达载体和编码权利要求 51 记载的嵌合 L 链的 DNA 构成的表达载体转化的宿主。
66. 通过含有由编码权利要求 50 记载的嵌合 H 链的 DNA 构成的表达载体和编码权利要求 52 记载的嵌合 L 链的 DNA 构成的表达载体转化的宿主。
67. 通过权利要求 53 记载的表达载体转化的宿主。
68. 通过权利要求 54 记载的表达载体转化的宿主。
69. 通过含有编码权利要求 55 记载的人源化 H 链的 DNA 构成的表达载体和含有编码权利要求 58 记载的人源化 L 链的 DNA 构成的表达载体转化的宿主。
70. 通过含有编码权利要求 56 记载的人源化 H 链（版本 b）的 DNA 构成的表达载体和含有编码权利要求 59 记载的人源化 L 链（版本 b）的 DNA 构成的表达载体转化的宿主。
71. 通过含有编码权利要求 57 记载的人源化 H 链（版本 i）的 DNA 构成的表达载体和含有编码权利要求 59 记载的人源化 L 链（版本 b）的 DNA 构成的表达载体转化的宿主。
72. 通过含有编码权利要求 57 记载的人源化 H 链（版本 i）的 DNA 构成的表达载体和含有编码权利要求 6 记载的人源化 L 链（版本 b2）的 DNA 构成的表达载体转化的宿主。
73. 通过权利要求 61 记载的表达载体转化的宿主。
74. 通过权利要求 62 记载的表达载体转化的宿主。
75. 通过权利要求 63 记载的表达载体转化的宿主。
76. 通过权利要求 64 记载的表达载体转化的宿主。
77. 抗人 TF 的嵌合抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 65 记载的宿主，从该培养物中提取嵌合抗体。

78. 抗人 TF 的嵌合抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 66 记载的宿主，从该培养物中提取嵌合抗体。
79. 抗人 TF 的嵌合抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 67 记载的宿主，从该培养物中提取嵌合抗体。
80. 抗人 TF 的嵌合抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 68 记载的宿主，从该培养物中提取嵌合抗体。
81. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 69 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
82. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 70 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
83. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 71 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
84. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 72 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
85. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 73 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
86. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 74 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
87. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 75 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
88. 抗人 TF 的人源化抗体的制造方法，其特征是：培养权利要求 76 记载的宿主，从该培养物中提取人源化抗体。
89. 在使含有来自非人的互补决定区（CDR）以及来自天然人抗体的框架区（FR）的免疫原性降低的天然人源化抗体的制造方法，其特征为：
- （1）准备对目的抗原具有反应性的非人单克隆抗体，
 - （2）准备多个相对于上述（1）的单克隆抗体中 FR 的氨基酸序列具有高同源性的天然人抗体，
 - （3）通过对上述（2）中的一种类型天然人抗体的 4 个 FR 用上述（1）的非人的单克隆抗体的对应的 FR 置换后，制作第一人源化抗体，

(4) 对上述(3)中制作的人源化抗体与抗原的结合活性或中和抗原生物活性的能力进行测定,

(5) 通过使用(2)中准备的人源化抗体中的人抗体(与(3)中使用的抗体不同)相对应的FR对上述(3)制作的人源化抗体中的1~3个FR进行置换,制作第二人源化抗体。

(6) 对于上述(5)中制作的第二人源化抗体和上述(3)中得到的第一人源化抗体就它们对抗原的结合性、或中和抗原生物活性的能力进行比较,选择显示较高活性的人源化抗体,

(7) 就上述(6)中选择的人源化抗体实施(3)~(6)阶段操作,然后

(8) 反复进行(3)~(6)阶段操作直至获得具有与上述(1)中的非人单克隆抗体同等活性的人源化抗体为止。

90. 权利要求89记载的方法,其中上述目的抗原是人组织因子(TF)。

91. 利用权利要求89方法获得的人源化抗体。

92. 利用权利要求90方法获得的人源化抗体。

93. 由权利要求29~32和92中任一项记载的人源化抗体构成的弥散性血管内凝血综合症(DIC)治疗剂。

说明书

抗人组织因子的人源化抗体
以及人源化抗体的制作方法

技术领域

本发明涉及由小鼠抗人组织因子 (TF) 单克隆抗体的可变区 (V 区) 和人抗体的恒定区 (C 区) 构成的人/小鼠嵌合抗体、小鼠抗人组织因子 (TF) 单克隆抗体的轻链 (L 链) V 区和重链 (H 链) V 区的互补决定区 (CDR) 移植到人抗体形成的人源化 (humanized) 抗体、以及构成该抗体的 L 链或 H 链的 V 区的片段。另外本发明还涉及抗人 TF 的人源化抗体的制作方法。

另外本发明还涉及到编码上述的抗体、特别是编码该抗体 V 区片段的 DNA、以及编码含有 V 区的 L 链或 H 链的 DNA。本发明还涉及含有该 DNA 的重组载体、以及利用该载体转化的宿主。

另外本发明还涉及抗人 TF 的嵌合抗体以及人源化抗体的制造方法。本发明还涉及以抗人 TF 的人源化抗体为有效成分的医药组合物和弥散性血管内凝血综合症 (DIC) 治疗药物。

背景技术

组织因子 (TF) 是出现在细胞表面的凝血因子 VII 受体, 通过与凝血因子 VII 形成复合物, 在激活凝血因子 IX 以及因子 X 中起着必不可少的作用, 被认为是血液凝固反应的实质上的起始因子。

人们已经知道 TF 出现在构成血管的纤维母细胞和平滑肌细胞等细胞中, 在血管损伤时激活凝血系统, 起到止血的功能。

DIC 弥散性血管内凝血是由于血管内的凝血系统的激活, 全身性的主要在微血管内血栓多发的疾病。由于血小板和凝血因子被消耗后而降低, 往往发生与形成血栓的现象相反的出血现象。由于多发的微血栓引起重要脏器的微循环不良, 所以一旦出现这种症状, 往往留下不可逆的功能障碍, 由于 DIC 的预后为不良, 被认为是重要的疾病。

从厚生省特定疾病血液凝固异常症调查研究班平成 2 年度和 4 年度的研究报告书推定的基础疾病比例如下：造血系统恶性肿瘤约占 30%、实体癌约占 20%、感染症约占 15%、产科疾病约占 10%、肝病约占 6%、休克症约占 5%、心血管疾病约占 3%。而 DIC 的发病频率为：白血病约为 15%、恶性淋巴瘤高达 6~7%，而实体癌为 3%。

这些疾病总体来看会导致 DIC，其起因物质是共同的，即是 TF。就是说急性白血病和恶性淋巴瘤、实体癌中肿瘤细胞的 TF 的生成和表现的异常亢进，感染症（特别是革兰氏阴性菌性败血症）时单核细胞和血管内皮细胞中 TF 产生和表现的亢进，而重症肝炎是由于来自坏死的肝组织的 TF 流入血液中，大动脉瘤、心脏瘤和巨大血管瘤是由于在血管内皮形成 TF，而产科疾病（羊水栓塞和常位胎盘早期剥离）和手术、外伤和烧伤人们也认为 TF 流入血液中是 DIC 的致病机理。

原疾病（基础疾病）的治疗是第一位的，但实际上这并不容易。作为目前的 DIC 治疗方法有抗凝固疗法和补充疗法。成为抗凝固疗法中心的是肝素制剂（未分级肝素、低分子量肝素），也用合成蛋白分解酶抑制剂（甲磺酸加贝酯（mesilic acid gabexate）、甲磺酸萘莫司他（mesilic acid nafamostat）或浓缩血浆制剂（抗凝血酶 III、活化的蛋白 C 制剂）。作为补充疗法有浓缩血小板和新鲜冷冻血浆（补充纤维蛋白）、洗净红血球等。

然而就目前的治疗药来看，在有效性和副作用方面十分满意的还没有，从 DIC 中完全解脱几乎是不可能的，所以人们期待着使用治疗效果高，而副作用小的药剂。

作为新的 DIC 治疗的尝试使用血栓调节素、水蛭素、抗 PAF 剂。TFPI（组织因子通路抑制剂 Tissue Factor Pathway Inhibitor）或 FXa 选择性抑制剂作为可口服的抗凝固和抗血栓剂已引起人们的注目。而作为中和 TF 的活性的物质，在 WO88/07543 中是以小鼠抗人 TF 单克隆抗体，而在 WO968/40921 中是以人源化抗 TF 抗体公开的。

小鼠抗人 TF 单克隆抗体没有表现出伴随着在 DIC 中起主要药效的同时的出血倾向等，作为安全而有效的治疗药是有希望的。然而小鼠的单

克隆抗体在人中具有高度的免疫原性（有时也称为“抗原性”。），因此小鼠单克隆抗体对于人的医学疗法的价值受到限制。例如如果将小鼠抗体给予人，可能作为异物被代谢，在人体内小鼠抗体的半衰期比较短，不能充分发挥所期待的效果。另外对于给予的小鼠抗体产生的相应人抗小鼠抗体（HAMA）会引起血清病或其他的变态反应等，对患者不适合，会引起危险的免疫应答。因此不能经常将小鼠单克隆抗体给予人。

为了解决这些问题，开发了使并非来自人的抗体，例如来自小鼠的单克隆抗体的免疫原性降低的方法。其中一种方法是制作抗体的可变区（V区）来自原来的小鼠单克隆抗体，而恒定区（C区）来自适当的人抗体的嵌合抗体的方法。

由于得到的嵌合抗体含有完整的原来的小鼠抗体的可变区，可以预料具有与原来的小鼠抗体相同的特异性，可以结合抗原。另外，在嵌合抗体中实质上减少了来自人以外的氨基酸序列的比例，因此与原来的小鼠抗体的相比，可以预计其免疫原性降低了。但对小鼠可变区产生免疫应答的可能性也是存在的(LoBuglio, A., 等, 美国国家科学院院报, (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 86, 4220-4224, 1989)。

降低小鼠抗体免疫原性的第二种方法虽然更复杂些，然而有希望能进一步大幅度降低小鼠抗体的潜在的免疫原性。在该方法中，只将小鼠抗体的可变区中的互补决定区（complementarity determining region; CDR）移植到人可变区，制作“重构的”（reshaped）人可变区。而根据需要为了使重构的人可变区的 CDR 的结构更接近原来小鼠抗体的结构，有时将支持 CDR 的框架区（FR）的一部分氨基酸序列从小鼠抗体的可变区移植到人可变区。然后将这些人源化的重构人可变区与人恒定区连接。最终来自重构的人源化抗体的人以外的氨基酸序列的部分只是 CDR 和很少一部分 FR。CDR 通过超可变氨基酸序列构成，它们没有表现出种属特异的序列。

有关人源化抗体可参照如下文献: Riechmann, L. 等自然(Nature), 332, 323-327, 1988; Verhoeye, M. 等科学 (Science), 239, 1534-1536, 1998; Kettleborough, C. A. 等蛋白质工程 (Protein Engng.), 4, 773-783, 1991;

Maeda, H., 人抗体和杂交瘤 (Human Antibodies and Hybridoma), 2, 124-134, 1991; Corman, S. D. 等, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P. R., 生物/技术 Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M. S. 等, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 88, 2869-2873, 1991; Cater, P 等, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. 等免疫学杂志 (J. Immunol.), 148, 1149-1154, 1992; Sato, K., 等, 癌研究 (Cancer Res.), 53, 851-856, 1993.

若用以前的人源化技术, 在框架区 (FR) 的一部分含有由小鼠抗体的可变区移植到人可变区的氨基酸序列。因此在作为人的治疗药给药时, 虽然是可变区的一个至数个氨基酸, 但产生针对含有人体内不存在的氨基酸序列部位的抗体的危险性是存在的。为了避免这一危险性, 想出了第三种人源化技术。即关于为了保持三个 CDR 的立体构造所需要的四个 FR (FR1~4), 以一个 FR 作为一个单位, 用数据库中存在的用小鼠抗体的 FR 同源性高的人抗体的 FR 进行置换的方法。这种情况下, 从数据库中存在的抗体选择数种 FR, 通过依次进行置换 (改组, shuffle), 制备活性更高的人源化抗体。

通过这样的操作, 能够制作在可变区中除去 CDR 的 FR 含有全都来自人抗体的氨基酸序列的人源化抗体。因此载有小鼠 CDR 的人源化抗体应当没有象已经含有人 CDR 的人抗体那么强的免疫原性。

如前所述, 可以想象到人源化抗体从治疗目的看是有用的, 但在人源化抗体的制造方法中不存在对任意抗体都能普遍适用的统一的方法, 为了制作对特定抗原表现出充分的结合活性、中和活性的人源化抗体, 必需想各种办法 (例如参照 Sato, K. 癌研究 (Cancer Res.), 53, 851-856, 1993)。

发明的公开

本发明的目的在于提供由小鼠抗人组织因子 (TF) 单克隆抗体的可变区 (V 区) 和人抗体的恒定区 (C 区) 构成的人/小鼠嵌合抗体、小鼠抗人组织因子 (TF) 单克隆抗体的轻链 (L 链) V 区和重链 (H 链) V

区的互补决定区移植到人抗体形成的人源化 (humanized) 抗体、该抗体的 L 链和 H 链、以及构成该抗体的 L 链或 H 链的 V 区的片段。另外本发明的目的还在于提供抗人 TF 人源化抗体的制作方法。

另外本发明的目的还在于提供编码上述的抗体、特别是该抗体 V 区片段的 DNA、以及编码含有 V 区的 L 链或 H 链的 DNA; 提供含有该 DNA 的重组载体、以及利用该载体转化的宿主; 提供以抗人 TF 的人源化抗体为有效成分的医药组合物和弥散性血管内凝血综合症 (DIC) 治疗药物。

本发明人就上述课题进行了深入研究, 结果获得了小鼠抗人 TF 的单克隆抗体在人体内的免疫原性降低的抗体, 开发出了新的人源化抗体的制作方法, 从而完成了本发明。

就是说, 本发明涉及含有人抗体的 H 链 C 区以及小鼠抗人 TF 的单克隆抗体的 H 链 V 区片段的嵌合 H 链。作为 H 链 V 区, 可举出含有如序列号 9 所示氨基酸序列的片段, 作为 C 区如 C γ 4 区那样序列的片段。

另外本发明还涉及含有人抗体的 L 链 C 区以及小鼠抗人 TF 的单克隆抗体的 L 链 V 区片段的嵌合 L 链。作为 L 链 V 区可举出含有如序列号 15 所示的氨基酸序列的片段, 作为 L 链 C 区如 C κ 区那样序列的片段。

另外本发明还涉及含有上述嵌合 H 链和嵌合 L 链、抗 TF 的人小鼠嵌合单克隆抗体。

另外本发明还涉及含有人抗体的 H 链 V 区的框架区 (FR) 1~4、以及小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 H 链 V 区的互补决定区 (CDR) 1~3 的人源化抗体的 H 链 V 区的片段。作为 CDR1~3 可举出分别含有序列号 133~135 所示的各个氨基酸序列的片段。作为人抗体的 H 链 V 区的 FR1 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR1 的同源性在 40% 以上的人抗体 FR1, 作为 FR2 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR2 同源性在 40% 以上的人抗体 FR2, 作为 FR3 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR3 同源性在 40% 以上的人抗体 FR3, 作为 FR4 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR4 同源性在 40% 以上的人抗体 FR4。

优选的: 作为人抗体的 H 链 V 区的 FR1, 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR1 的同源性在 50% 以上的人抗体 FR1, 作为 FR2 可举出与小鼠

抗体的 H 链 V 区 FR2 同源性在 70% 以上的人抗体 FR2, 作为 FR3 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR3 同源性在 65% 以上的人抗体 FR3, 作为 FR4 可举出与小鼠抗体的 H 链 V 区 FR4 同源性在 80% 以上的人抗体 FR4. 举些具体的例子: 作为人抗体的 H 链 V 区的 FR1 如人抗体 L39130; 作为 FR2 如人抗体 L39130、人抗体 P01825 和人抗体 Z80844; 作为 FR3 如人抗体 L39130、人抗体 Z34963、人抗体 P01825、人抗体 M62723、人抗体 Z80844、人抗体 L04345、人抗体 S78322、人抗体 Z26827、人抗体 U95239 和人抗体 L03147; 作为 FR4 如人抗体 L39130.

优选的例子: 作为人抗体的 H 链 V 区的 FR1 如人抗体 L39130; 作为 FR2 如人抗体 L39130 以及人抗体 Z80844; 作为 FR3 如人抗体 Z34963、人抗体 M62723 和人抗体 U95239; 作为 FR4 如人抗体 L39130. 最理想的例子: 作为人抗体的 H 链 V 区的 FR1 如人抗体 L39130; 作为 FR2 如人抗体 L39130; 作为 FR3 如人抗体 Z34963 和人抗体 U95239; 作为 FR4 如人抗体 L39130.

另外本发明作为框架区中的编号来自 Kabat 的规定 (Kabat, E. A. 等、美国卫生部, 美国政府出版局 US Dept. Health and Human Services., US government Printing Offices, 1991).

另外本发明还涉及含有以序列号 30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82、84 表示的任一氨基酸序列的人源化抗体的 H 链 V 区的片段.

另外本发明还涉及含有人抗体的 L 链 V 区的框架区的 FR1~4、以及小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 L 链 V 区的互补决定区 CDR1~3 的人源化抗体的 L 链 V 区的片段. 作为 CDR1~3 可举出分别含有序列号 136~138 所表示的各个氨基酸序列的片段. 作为人抗体的 L 链 V 区的 FR1 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR1 的同源性在 40% 以上的人抗体 FR1, 作为 FR2 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR2 同源性在 40% 以上的人抗体 FR2, 作为 FR3 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR3 同源性在 40% 以上的人抗体 FR3, 作为 FR4 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR4 同源性在 40% 以上的人抗体 FR4.

优选的是：作为人抗体的 H 链 V 区的 FR1 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR1 的同源性在 75% 以上的人抗体 FR1，作为 FR2 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR2 同源性在 80% 以上的人抗体 FR2，作为 FR3 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR3 同源性在 70% 以上的人抗体 FR3，作为 FR4 可举出与小鼠抗体的 L 链 V 区 FR4 同源性在 80% 以上的人抗体 FR4。举些具体的例子：作为人抗体的 L 链 V 区的 FR1 如人抗体 Z37332；作为 FR2 如人抗体 Z37332 和人抗体 X93625；作为 FR3 如人抗体 Z37332、人抗体 S68699 和人抗体 P01607；作为 FR4 如人抗体 Z37332。更优选的例子：作为人抗体的 L 链 V 区的 FR1 如人抗体 Z37332；作为 FR2 如人抗体 X93625；作为 FR3 如人抗体 S68699；作为 FR4 如人抗体 Z37332。

另外本发明作为框架区中的编号来自 Kabat 的规定 (Kabat, E. A. 等、美国卫生部，美国政府出版局，US Dept. Health and Human Services. US government Printing Offices, 1991)。

另外本发明还涉及含有序列号 93、99、101、107 或 109 表示的氨基酸序列的人源化抗体的 L 链 V 区的片段。

另外本发明还涉及含有上述人源化抗体的 H 链 V 区的片段以及人抗体的 H 链 C 区的片段、抗人 TF 的人源化抗体的 H 链。其中作为 C 区可举出 C γ 4 区，作为来自人抗体的 FR1~4 可举出分别来自人抗体 L39130 (FR1)、人抗体 L39130 (FR2)、人抗体 Z34963 (FR3) 或人抗体 U95239 (FR3)、人抗体 L39130 (FR4) 的片段，而作为 CDR1~3 可举出分别含有序列号 133~135 所示的氨基酸序列的片段。

另外本发明还涉及含有上述人源化抗体的 L 链 V 区的片段以及人抗体的 L 链 C 区片段的抗 TF 的人源化抗体的 L 链。其中作为 C 区可举出 C κ 区，作为来自人抗体的 FR1~4 可举出分别来自人抗体 Z37332 (FR1)、人抗体 X93625 (FR2)、人抗体 S68699 (FR3)、人抗体 Z37332 (FR4) 的片段，而作为 CDR1~3 可举出分别含有序列号 136~138 所示的氨基酸序列的片段。

另外本发明还涉及含有上述人源化抗体的 L 链和 H 链的抗人 TF 的人

源化抗体。

另外本发明还涉及抗人 TF 的人源化抗体的制作方法。所谓人源化的制作方法是有关维持作为 H 链或 L 链的抗原识别部位的 CDR1~3 构造的 FR1~4 的选择方法。就是说将各个 FR 作为一个单位，选择多个与来自小鼠抗体的 FR 同源性高的人抗体的 FR，对这些 FR 依次进行置换（改组，shuffle），获得具有所期望的活性的人源化抗体的制作方法。

更详细讲，在本发明的人源化抗体的制造方法的一个例子，在使含有非来自人的互补决定区（CDR）以及来自天然人抗体的框架区（FR）的免疫原性降低的天然人源化抗体的制造方法中，其特征为：

- （1）准备对目的抗原具有反应性的非人单克隆抗体，
- （2）准备多个对上述（1）的单克隆抗体中的 FR 的氨基酸序列具有高同源性的人抗体，
- （3）对上述（2）中的一种类型人抗体的 4 个 FR 用上述（1）的非人的单克隆抗体相应的 FR 进行置换后，制作第一人源化抗体，
- （4）测定上述（3）中制作的人源化抗体与抗原的结合活性或中和抗原的生物活性的能力，
- （5）对上述（3）制作的人源化抗体中的 1~3 个 FR 利用（2）中准备的人源化抗体中的人抗体（与（3）中使用的抗体不同）相应的 FR 进行置换后，制作第二人源化抗体，
- （6）对上述（5）中制作的第二人源化抗体和上述（3）中得到的第一人源化抗体就有关对抗原的结合性、或中和抗原的生物活性的能力进行比较，选择显示最高活性的人源化抗体，
- （7）就上述（6）中选择的人源化抗体实施（3）~（6）阶段操作，
然后
- （8）反复进行（3）~（6）阶段操作直至获得与上述（1）中的非人单克隆抗体具有同等活性的人源化抗体为止。

如果能获得对人 TF 具有一定程度中和活性的人源化抗体，对其 H 链以及 L 链的 V 区的特定的 FR 进一步进行同源性的检索，可以进一步选择同源性高的人抗体。将得到的该人抗体加到上述（2）中的多个人抗体

中，反复进行（3）～（6）操作，可以获得具有所期望活性的人源化抗体。

另外本发明还涉及到编码小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 H 链的 V 区片段或 L 链 V 区片段的 DNA。作为 H 链的 V 区片段以及 L 链 V 区片段的氨基酸序列和 DNA 可举出分别含有序列号 9 或 15 表示的碱基序列的序列。

另外本发明还涉及编码上述嵌合 H 链或嵌合 L 链的 DNA。作为编码该 H 链的 DNA 如含有序列号 9 所示的碱基序列的序列，编码该 L 链的 DNA 如含有序列号 15 所示的碱基序列的序列。

另外本发明还涉及编码上述人源化抗体的 H 链 V 区片段或 L 链 V 区片段的 DNA。作为编码 H 链 V 区片段的 DNA 如含有序列号 29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81、83 表示的任一个碱基序列的 DNA，作为编码 L 链 V 区的 DNA 如含有序列号 92、98、100、106 或 108 表示的碱基序列的 DNA。

另外本发明还涉及编码人源化抗体的 H 链的 DNA。

另外本发明还涉及含有编码序列号 30、40、42、50、52、58、60、64、70、72、76、78、82 或 84 表示的任一种氨基酸序列的 DNA 的人源化抗体的 H 链的 DNA。作为该 DNA 可举出含有序列号 29、39、41、49、51、57、59、63、69、71、75、77、81、83 表示的任一个碱基序列的 DNA。

另外本发明还涉及编码上述人源化抗体的 L 链的 DNA。

另外本发明还涉及编码序列号 93、99、101、107 或 109 表示的氨基酸序列的人源化抗体的 L 链 DNA。作为该 DNA 可举出含有序列号 92、98、100、106 或 108 表示的碱基序列的 DNA。

另外本发明还涉及含有上述任一 DNA 的重组载体。

另外本发明还涉及利用上述重组载体转化的转化体。

另外本发明还涉及到抗人 TF 的嵌合抗体或人源化抗体的制造方法，其特征是：培养上述转化体，从得到的培养物提取抗人 TF 的嵌合抗体和人源化抗体。

另外本发明还涉及到以上述人源化抗体为有效成分的医药组合物或 DIC 治疗剂。

附图的简单说明

图 1 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化 a 版本/L 链嵌合抗体、以及 H 链嵌合/L 链人源化 a 版本抗体的抗原结合活性的图。

图 2 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化 a 版本/L 链嵌合抗体、以及 H 链嵌合/L 链人源化 a 版本抗体的对人 TF 的中和活性的图。

图 3 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化 a 版本/L 链人源化 a 版本抗体的抗原结合活性的图。

图 4 是比较小鼠抗 TF 单克隆抗体抗体 ATR-5、H 链嵌合/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 a/L 链人源化版本 a 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 5 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 a 抗体的抗原结合活性的图。

图 6 是测定 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 c/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 d/L 链嵌合抗体的抗原结合活性的图。

图 7 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 c/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 d/L 链嵌合抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 8 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 a 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 9 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链嵌合/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链嵌合/L 链人源化版本 c 抗体的抗原结合活性的图。

图 10 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链嵌合/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链嵌合/L 链人源化版本 c 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 11 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 c 抗体的抗原结合活性的图。

图 12 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 c 抗体对人 TF 的

中和活性的图。

图 13 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 d/L 链人源化版本 b 抗体的抗原结合活性的图。

图 14 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/ L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 d/ L 链人源化版本 b 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 15 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 e/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 e/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 e/人源化版本 b 抗体的抗原结合活性的图。

图 16 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 e/ L 链嵌合抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 17 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 g/L 链人源化版本 b 的抗原结合活性的图。

图 18 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 g/ L 链人源化版本 b 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 19 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b3/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 d3/L 链人源化版本 b 抗体的抗原结合活性的图。

图 20 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b3/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 d3/L 链人源化版本 b 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 21 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 i/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 j/L 链嵌合抗体的抗原结合活性的图。

图 22 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 j/L 链人源化版本 b 抗体的抗原结合活性的图。

图 23 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 i/L 链嵌合抗体、以及 H 链人源化版本 j/L 链嵌合抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 24 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 j/L 链人源化版本 b 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 25 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链嵌合/L 链人源化版本 b1 抗体、以及 H 链嵌合/L 链人源化版本 b2 抗体的抗原结合活性的图。

图 26 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链嵌合/L 链人源化版本 b1 抗体、以及 H 链嵌合/L 链人源化版本 b2 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 27 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b2 抗体的抗原结合活性的图。

图 28 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b2 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 29 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b1 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体的抗原结合活性的图。

图 30 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b1 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体对人 TF 的中和活性的图。

图 31 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体 d 的抗原结合活性的图。

图 32 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体对人 TF 的中和活性 (TF 的因子 Xa 生成抑制活性) 的图。

图 33 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体对人 TF 的中和活性 (因子 X 结合抑制活性) 的图。

图 34 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体对人 TF 的中和活性 (TF 的血浆凝固抑制活性) 的图。

图 35 是比较 H 链嵌合/L 链嵌合抗体、H 链人源化版本 b/L 链人源化版本 b 抗体、H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b 抗体、以及 H 链人源化版本 i/L 链人源化版本 b2 抗体对在各种条件下处理的 TF 的反应性的图。

发明的实施方案

以下详细地说明本发明。

1. 小鼠抗人 TF 的单克隆抗体的制作

小鼠抗人 TF 的单克隆抗体是通过从用抗原免疫动物得到的产生抗体细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合制作杂交瘤, 从得到的杂交瘤选择产生特异抑制 TF 活性的抗体的克隆制作的。

即、使从人胎盘纯化的 TF 作为抗原免疫的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合制作杂交瘤。在杂交瘤的筛选中, 抗体与 TF 的结合能力通过使用 TF 高表达细胞株 J82 的 Cell-ELISA, 以对凝血因子 X (Factor X: FX) 活化的抑制活性作为指标的测定系统对 TF 的中和能力进行测定的。其结果成功地建立了产生 6 种强烈抑制 TF/VIIa 复合物的 FX 活化的抗体的杂交瘤。

(1) 抗原的制作

作为用于免疫动物的 TF, 可以用通过重组 DNA 方法或化学合成制作的含有一部分 TF 氨基酸序列的肽、或来自人胎盘的 TF 等。例如可以使用按照 Ito 等人的方法 (Ito T. 等人, 生物化学杂志 (J. Biochem.) 114, 691-696, 1993) 从人胎盘纯化的 TF 作为抗原。

得到的人 TF 与佐剂混合, 用作抗原。作为佐剂有弗罗因德完全佐剂、弗罗因德的不完全佐剂等, 与它们中任一个混合都可以。

(2) 免疫和挑选产生抗体的细胞

将象上述那样得到的抗原免疫非人哺乳动物、例如小鼠、大鼠、马、

猴、家兔、山羊、绵羊等哺乳动物。免疫只要是已有的方法，任一方法都可以用，主要是通过静脉内注射、皮下注射、腹腔注射等方式进行。而免疫的间隔没有特别限定，间隔可从数日到数周，最好是在 4~21 日间隔内免疫。

最终免疫日后的 2~3 日后采集产生抗体的细胞。产生抗体的细胞有脾细胞、淋巴细胞、末梢血细胞，一般用脾细胞。抗原的免疫量，一次每只小鼠用 0.1~100 μ g。

(3) 抗体效价的测定

为了对免疫的动物的免疫应答水平进行确认，而从细胞融合处理后的细胞中选择目的杂交瘤，对免疫的动物的血中的抗体效价、或产生抗体的细胞的培养上清中的抗体效价进行测定。

作为检测抗体的方法有众所周知的技术、例如 EIA (酶免疫分析)、RIA (放射性免疫分析)、ELISA (酶联免疫吸附分析) 等方法。

(4) 细胞融合

作为与产生抗体细胞融合的骨髓瘤细胞可以使用取自小鼠、大鼠、人等各种动物的骨髓瘤细胞，本领域技术人员一般能获得的细胞株。作为使用的细胞株可以使用具有抗药性，具有在未融合状态不能在选择性培养基 (例如 HAT 培养基) 中生存、只有在融合状态能生存的性质的细胞株。一般使用抗 8-氮鸟嘌呤株，该细胞株是缺少次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶，不能在含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和脱氧胸腺嘧啶核苷 (HAT) 的培养基生存的细胞株。

骨髓瘤细胞最好使用众所周知的各种细胞株，例如，P3 (P3x 63 Ag 8.653) (免疫学杂志 (J. Immunol.), 123, 1548-1550, 1979), P3x 63 Ag 8.1 当代微生物学与免疫学论题 (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7, 1979), NS-1 (Kohler, G. 和 Milstein, C., 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.) 6, 511-519, 1976), MPC-11 (Margulies, D. H. 细胞 (Cell) 8, 405-415, 1976), SP2/0 (Shulman, M. 等, 自然 (Nature), 276, 269-270, 1978), FO (de St. Groth, S. F. 等, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods), 35, 1-21, 1980), S194 (Trowbride, I. S., 实验医

学杂志 (J. Exp. Med.), 148, 313-323, 1978), R210 (Galfre, G. 等自然 (Nature), 277, 131-133, 1979) 等细胞株。

产生抗体的细胞可从脾细胞、淋巴结细胞等获得。即从上述各种动物摘出或提取脾脏、淋巴结等, 并进行组织破碎。将得到的破碎物悬浮于 PBS、DMEM、RPMI1640 等培养基或缓冲液中, 用不锈钢筛过滤后, 通过离心制作产生抗体的目的细胞。

然后使上述骨髓瘤细胞与产生抗体细胞融合。

在 MEM、DMEM、RPMI1640 培养基等动物细胞培养用培养基中, 在有融合促进剂存在下、30~37℃ 温度条件下使骨髓瘤细胞与产生抗体细胞的混合比例为 1:1~1:10, 使这两种细胞接触 5 分钟来进行细胞融合。为了促进细胞融合, 可以使用平均分子量为 1000~6000 的聚乙二醇、聚乙烯醇或仙台病毒等融合促进剂或融合病毒。另外, 使用采用电刺激 (例如电穿孔) 的市售的细胞融合装置也可以使产生抗体细胞与骨髓瘤细胞融合。

(5) 杂交瘤的选择和克隆

从细胞融合处理后的细胞中对目的杂交瘤细胞进行筛选。其方法有利用在选择性培养基中进行细胞选择增殖的方法等。即将细胞悬浮液用适当的培养基稀释后, 铺在微量滴定板上, 各个孔中加入选择培养基 (HAT 培养基等), 以后适当地交换选择性培养基进行培养。其结果生存下来的细胞可以作为杂交瘤。

杂交瘤的筛选可以利用极限稀释法、荧光细胞激活分类器法等进行, 最终获得产生单克隆抗体的杂交瘤。

产生单克隆抗体的杂交瘤的选择可以将各种测定体系配合起来进行。例如, 将象 Cell-ELISA 那样的抗原识别测定体系或以 Factor Xa 活性为指标的 TF 中和活性测定体系、像血浆凝固抑制活性测定体系那样的中和活性测定体系配合起来可以获得具有所期望活性的产生单克隆抗体的杂交瘤。这样筛选可以获得象 ATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7 和 ATR-8 那样产生单克隆抗体的杂交瘤。

(6) 单克隆抗体的采集

从得到的杂交瘤采集单克隆抗体的方法有通常的细胞培养法或腹水形成法等方法。

在细胞培养法中，将杂交瘤在含有 10~20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基、DMEM 培养基或无血清培养基等动物细胞培养基中于通常的培养条件下（例如 37℃，5% CO₂ 浓度）培养 2~14 天，从其培养上清中获得抗体。

在腹水形成法中，向哺乳动物的腹腔内注射杂交瘤（该动物与骨髓瘤细胞来源的哺乳动物同种），使杂交瘤大量增殖。然后于 1~4 周后采集腹水或血清。

在上述抗体的采集方法中，需要对抗体进行纯化时，可以适当地选择硫酸盐析法、离子交换层析法、亲和层析法等众所周知的方法，或将这些方法配合起来进行纯化。

2. 编码小鼠抗人 TF 的单克隆抗体的 V 区的 DNA 的克隆

(i) mRNA 的制备

为了进行编码小鼠抗人 TF 的单克隆抗体的 H 链和 L 链 V 区的 DNA 的克隆，从收集的杂交瘤通过众所周知的方法，例如利用胍-超离心法（Chirgwin, J. M. 等人、生物化学 *Biochemistry*, (1979), 18, 5294-5299）、AGPC 法（Chomezynski, P 等人 (1987), 162, 16-159）等制备总 RNA，通过 mRNA 纯化试剂盒（Pharmacia Biotech）附带的寡聚（dT）-纤维素 span 柱等制备 mRNA。另外使用 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒（Pharmacia Biotech），不经过提取总 RNA 操作也可以制作 mRNA。

(ii) cDNA 的制备和扩增

从上述 (i) 中得到的 mRNA 使用逆转录酶分别合成 L 链和 H 链的 V 区中的 cDNA。cDNA 的合成可以使用与 Oligo-dT 引物或 L 链 C 区或 H 链 C 区进行杂交的适当的引物（例如试剂盒附带的 cDNA 合成引物）。

cDNA 合成反应是将上述 mRNA 与引物混合，在逆转录酶存在下例如于 52℃ 反应 30 分钟。

cDNA 的扩增是按照 L 链以及 H 链都使用 5'-Ampli FINDER RACE



试剂盒 (CLONTECH 公司) 的 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. 等美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. USA) 85, 8998-9002, 1988, Belyavsky, A. 等核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 17, 2919-2932, 1989) 通过 PCR (聚合酶链式反应) 实现的。即在上述合成的 cDNA 两条链的两端连接 cDNA 衔接物, 就编码 H 链 V 区和 L 链 V 区的片段的 DNA (以下也有时将编码 L 链 V 区的简称 A 略记为“L 链 V 区 DNA”或“编码 L 链 V 区的 DNA” (H 链 V 区也一样)) 进行 PCR。

作为扩增 H 链 V 区的 DNA 的引物, 例如对于 5'-端引物可以使用试剂盒附带的衔接引物 1, 对于 3'-端引物可以使用小鼠抗体的 H 链恒定区 MHC-G1 引物 (序列号 1) (ATR-2、ATR-3、ATR-4 和 ATR-5) (C γ 1 区) 或 MHC-G2a 引物 (序列号 2) (ATR-7 和 ATR-8) (C γ 2a 区) (S. T. Jones, 生物技术 (Biotechnology), 9, 88, 1991)。而作为扩增 L 链 V 区的 DNA 的引物, 例如对于 5'-端引物可以使用试剂盒附带的衔接引物 1, 对于 3'-端引物可以使用小鼠抗体的 L 链 κ 链恒定区 (C κ 区) 引物 (例如含有序列号 3 表示的碱基序列的 MKC 引物)。

(iii) DNA 的纯化和碱基序列的确定

就 PCR 产物按照众所周知的方法进行琼脂糖凝胶电泳, 切出目的 DNA 片段后, 进行 DNA 回收以及纯化, 然后与载体 DNA 连接。

DNA 的纯化可以用酚和氯仿萃取 (J. Sambrook 等, 《分子克隆实验手册》“Molecular Cloning”, 冷泉港实验室出版社 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 或使用市售的试剂盒进行纯化。对于将携带 DNA 片段的载体 DNA 可以使用众所周知的载体 (例如 pUC19、Bluescript 等)。

使用常用的连接试剂盒 (宝酒造制造) 连接上述 DNA 和上述载体, 获得重组载体。然后将获得的重组载体导入大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene), 挑选抗氨苄青霉素的菌落, 按照常规方法制备载体 DNA (J. Sambrook 等, 《分子克隆实验手册》“Molecular Cloning”, 冷泉港实验室出版社 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。目的 DNA 的碱基序列是在将上述载体 DNA 用限制酶消化后通过常用方法 (例如双脱氧法) 确定的 (J. Sambrook 等, 《分子克隆实验手册》“Molecular

Cloning”，冷泉港实验室出版社 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。在本发明中，可以使用自动碱基序列测定仪(DNA Sequencer 373A, Perkin-Elmer)。

(iv) 互补决定区 (CDR)

H 链 V 区和 L 链 V 区形成抗原结合部位，其整个构造相互具有类似性。即每 4 个框架区(FR)部分是通过 3 个超可变区、即互补决定区(CDR)连接的。FR 的氨基酸序列比较保守，而 CDR 区的氨基酸序列的变异性非常高 (Kabat, E. A. 等, 《有免疫学意义的蛋白质的序列》“Sequence of Proteins of Immunological Interest” 美国卫生部, US Dept. Health and Human Services, 1983)。

上述 4 个 FR 的许多部分都呈现 β -折叠片构造，结果 3 个 CDR 形成一个环。有时 CDR 也形成 β -折叠片的一部分。因此 3 个 CDR 通过 FR 在立体上相互保持在非常近的位置，于是 FR 与成对的区域的 3 个 CDR 共同形成抗原结合部位。

根据这样的事实，将小鼠抗人 TF 单克隆抗体的可变区的氨基酸序列套用到由 Kabat 等人制作的抗体的氨基酸序列数据库 (Kabat, E. A. 等, 《有免疫学意义的蛋白质的序列》“Sequence of Proteins of Immunological Interest” 美国卫生部, US Dept. Health and Human Services, 1983)，通过检索同源性可以找出 CDR 区。

CDR 区序列在制作人源化抗体时只要能保持对人 TF 的结合活性和中和活性的范围内，那么通过插入、置换或缺失形成的变体也包含在本发明内。例如与序列号 133-138 的各个 CDR 或与序列号 139-141, 143-144, 145-147 以及 149-150 的 V 区中的各个 CDR 区同源性为 90~100% 的序列。优选同源性为 95~100% 的序列，更优选的同源性为 98~100% 的序列。

3. 嵌合抗体的表达载体的制作

只要编码小鼠单克隆抗体的小鼠 L 链 (以下表示抗体的 L 链或 H 链时，关于小鼠的也可简写为“小鼠 L 链”，关于人抗体的 H 链简写为“人 H 链”) 以及 H 链 V 区的 DNA 片段能被克隆，将编码这些小鼠 V 区的

DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接使其表达，可得到嵌合抗人 TF 抗体。

制作嵌合抗体的基本方法包括将已经存在于克隆的 cDNA 中的小鼠前导序列和 V 区序列与编码已经存在于哺乳类细胞的表达载体中的人抗体 C 区的序列连接。或者是将已经存在于克隆的 cDNA 中的小鼠前导序列和 V 区序列与编码人抗体 C 区的序列连接后，与哺乳类细胞表达载体连接。

人抗体 C 区的片段可以作成任意的人抗体的 H 链 C 区以及人抗体的 L 链 C 区的片段，例如有关人 H 链的片段可举出 C γ 1、C γ 2、C γ 3 或 C γ 4，以及 L 链的片段可举出 C λ 或 C κ 等。

为了制造嵌合抗体，制作在有象增强子/启动子系列那样的表达调控区下含有编码小鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区 DNA 的表达载体，以及在有象增强子/启动子系列那样的表达调控区下含有编码小鼠 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 的单一的表达载体（例如，参照 WO94/11523）。然后用该表达载体同时转化象哺乳类细胞那样的宿主细胞，再将转化的细胞在体外或体内进行培养制造嵌合抗体（例如可参照 WO91/16928）。对于单一表达载体可以使用 IgG1 κ 型抗体表达载体 N5KG1（V）以及 IgG4 κ 型抗体表达载体 N5KG4P。

(i) 嵌合抗体 H 链的构建

嵌合抗体 H 链表达载体可以通过将编码小鼠 H 链 V 区的 cDNA 导入到含有编码人抗体的 H 链 C 区的 DNA 的适当的表达载体中得到。作为 H 链 C 区例如可以举出 C γ 1、C γ 2、C γ 3 或 C γ 4。

这里，在将编码小鼠 H 链 V 区的 cDNA 插入到表达载体时，利用 PCR 法可以向该 cDNA 导入适当的碱基序列。例如为了使该 cDNA 5' -末端含有适当的限制酶的识别序列，而使转录效率提高，可以使用使紧靠该 cDNA 的起始密码子处含有 Kozak 共有序列（Kozak, M. 等，分子生物学杂志（J. Mol. Biol.），196, 947-950, 1987）那样设计的 PCR 引物，以及使该 cDNA 3' -末端含有适当的限制酶的识别序列而设计的 PCR 引物，进行 PCR，将这些合适的碱基序列导入表达载体。

将这样构建的编码小鼠 H 链 V 区的 cDNA 用适当的限制酶处理后，插入到上述表达载体中，构建含有编码 H 链 C 区(C γ 1 或 C γ 4)的 DNA 的嵌合 H 链表达载体。

(ii) 含有编码嵌合抗体 L 链 κ 链的 cDNA 的表达载体的构建

嵌合抗体 L 链表达载体可以通过将编码小鼠 L 链 V 区的 cDNA 导入含有编码人抗体的 L 链 C 区的 DNA 的适当的表达载体中得到。作为 L 链 C 区例如 C κ 、C λ 区。

在构建含有编码小鼠 L 链 V 区的 cDNA 的表达载体时，利用 PCR 法可以向该 cDNA 导入适当的碱基序列。例如为了使 5' -末端含有适当的限制酶的识别序列，而使转录效率提高，可以使用含有 Kozak 共有序列那样设计的 PCR 引物，以及为了使 3' -末端含有适当的限制酶的识别序列那样设计的 PCR 引物，进行 PCR，将这些适当的碱基序列导入 cDNA。

将这样构建的编码小鼠 L 链 V 区的 cDNA 用适当的限制酶处理后，插入到上述表达载体中，构建含有编码 L 链 C 区(C κ 区)的 DNA 的嵌合 L 链表达载体。

4. 人源化抗体的制作

(1) 与人抗体同源性的检索

为了制作将小鼠单克隆抗体的 CDR 移植到人抗体的人源化抗体，希望小鼠单克隆抗体的 FR 和人抗体的 FR 之间存在很高的同源性。因此将小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 H 链和 L 链的 V 区与用 Data Bank 已经阐明构造的所有已知抗体的 V 区进行比较。另外同时与 Kabat 等人根据抗体的 FR 的长度、氨基酸的同源性等分类的抗体的亚类(人亚类 HSG: Human subgroup) (Kabat, E. A. 等、US Dept. Health and Human Services. US government Printing Offices, 1991) 进行比较。

对于人 H 链 V 区，根据 Kabat 等人进行的 HSG 分类可以分类为 HSGI~III, 例如，小鼠抗人 TF 单克隆抗体 ATR-5 的 H 链 V 区与 HSGI 的共有序列有 67.8% 的同源性。另外，人 L 链 κ 链 V 区根据 Kabat 等人进行的 HSG 分类可以分类为 HSGI~IV, 例如，小鼠抗人 TF 单克隆抗体 ATR-5 的 L 链 κ 链 V 区与 HSGI 的共有序列有 72.3% 的同源性。

按照以往的技术对小鼠抗体进行人源化时，根据需要，为了使人源化



V 区的 CDR 的构造更接近原来的小鼠抗体的构造, 有时将支持 CDR 的小鼠抗体的 V 区的 FR 的一部分氨基酸序列移植到人 V 区的 FR 上。然而有关应当将小鼠抗体的 V 区的 FR 中什么样的氨基酸移植到人抗体 V 区的 FR 上, 没有一定的规则。因此为了保持 CDR 的构造对必需的氨基酸进行特别确定需要作出更大的努力。

另外, 存在着对 FR 的一部分从小鼠抗体的 V 区移植到人 V 区的氨基酸序列产生人抗体的危险性。在本发明中, 由于将在人源化抗体中除去 CDR 的全部氨基酸序列作为来自人抗体的氨基酸序列, 所以就保持 CDR 的立体构造需要的 4 个 FR (FR1~4), 以一个 FR 作为单位, 检索与数据库中存在的鼠抗体的 FR 同源性高的人抗体的 FR。以下给出了有关单克隆抗体 ATR-5 的 H 链和 L 链的 V 区的各个 FR 与数据库进行同源性检索的结果。

表 1

FR 的 No	登记号	与小鼠抗体 H 链 V 区的 各个 FR 的同源性 (%)	序列号
H 链 FR1	L39130	53.0	110
H 链 FR2	L39130	92.9	111
	P01742	71.4	112
	Z80844	78.6	113
H 链 FR3	L39130	62.5	114
	Z34963	71.9	115
	P01825	53.1	116
	M62723	68.8	117
	Z80844	68.8	118
	L04345	65.6	119
	S78322	75.0	120
H 链 FR4	Z26827	56.3	121
	U95239	65.6	122
	L03147	65.6	123
	L39130	90.9	124

表 2

FR 的 No	登记号	与小鼠抗体 L 链 V 区的 各个 FR 的同源性 (%)	序列号
L 链 FR1	Z37332	78.3	125
L 链 FR2	Z37332	80.0	126
	S65921	80.0	127
	X93625	80.0	128
L 链 FR3	Z37332	71.9	129
	S68699	75.0	130
	P01607	71.9	131
L 链 FR4	Z37332	90.0	132

(2) 编码人源化抗体 V 区的 DNA 的设计

在编码人源化抗体 V 区的 DNA 设计中的第一阶段是选择作为设计基础的人抗体 V 区的各个 FR。而在 FR 改组中，需要在各个 FR 中选择变异高的人抗体 V 区 FR。

在本发明中，关于单克隆抗体 ATR-5 的 H 链，从与小鼠抗体 H 链整个 V 区和各个 FR 的同源性检索的结果，就 FR2 可以选择出 3 种，就 FR3 可以选择出 10 种人抗体 V 区 FR。关于 L 链从与小鼠抗体 L 链整个 V 区和各个 FR 的同源性检索的结果，就 FR2 可以选择出 3 种，就 FR3 可以选择出 3 种人抗体 V 区 FR。

对于人源化 H 链和 L 链 V 区，作为第一版本（版本 a: ver. a），可以选择分别与小鼠单克隆抗体 ATR-5 的 H 链和 L 链 V 区同源性高的人抗体 H 链和 L 链 V 区 L39130 和 Z37332。在制作这些人源化抗体时，为了容易进行 FR 改组可以在各 CDR 内部和 FR 的适当部位设计适当的限制酶识别部位。通过这样设计，很容易地只对任一个 FR 进行替换成为可能。



例如，人源化 H 链 CDR1 的限制酶 EcoT22I 识别部位、CDR2 的限制酶 Bal I 识别部位、CDR3 的限制酶 NcoI 识别部位和 FR3 的限制酶 XhoI 识别部位，例如，人源化 L 链 CDR1 的限制酶 AflII 识别部位、CDR2 的限制酶 SpeI 识别部位、CDR3 的限制酶 PstI 识别部位和 FR3 的限制酶 AccIII 识别部位。

以这样设计的版本 a 为基础，就各个 FR 进行 FR 改组，可以制作具有期望活性的人源化抗体。

(3) 人源化抗体 V 区片段的制作

对于本发明的人源化抗体，该抗体的 C 区以及 V 区的 FR 是来自人抗体的 FR，V 区的 CDR 来自小鼠抗体。对于本发明的人源化抗体的 V 区的片段，如果作为模板的人抗体的 DNA 片段能够得到的话，通过利用 PCR 的所谓 CDR 移植 (CDR-grafting) 手法可以制作。所谓 CDR 移植就是制作编码来自小鼠的 CDR 的 DNA 片段，改换为以此 DNA 片段为模板的人抗体的 CDR 的手法。

另外，如果作为模板的人抗体的 DNA 片段不能得到时，用 DNA 合成仪合成数据库注册的碱基序列，利用 PCR 法可以制作人源化抗体 V 区。另外，只注册了氨基酸序列数据的情况下，以该氨基酸序列为基础根据 Kabat, E. A. 等人报道 (US Dept. Health and Human Services, US government Printing Offices, 1991) 的抗体的密码使用频率，可以类推出整个碱基序列。用 DNA 合成仪合成该碱基序列，利用 PCR 法可以制作人源化抗体 V 区的片段。

(i) 编码人源化 H 链 V 区的 DNA 和表达载体的构建

在本发明中，从数据库中获得编码作为人源化抗体的模板的人抗体的 H 链 V 区的基因，用 DNA 合成仪合成编码人源化的 H 链 V 区的 DNA 的整个碱基序列，利用 PCR 法可以构建。例如，可以将具有与小鼠抗人 TF 单克隆抗体 ATR-5 的 H 链 V 区高同源性的 L39130 制作成人源化 H 链 V 区版本“a”。为了制作人源化 H 链 V 区版本“a”，例如，特别使用序列号 22~26 所示的 5 条引物以及序列号 27、28 所示的 2 条外部引物。

CDR 移植引物 hR5Hv1S (序列号 22)、hR5Hv2S (序列号 23)、



hR5Hv4S (序列号 24) 含有有意义 DNA 序列, 而 CDR 移植引物 hR5Hv3A (序列号 25) 和 hR5Hv5A (序列号 26) 含有反意义 DNA 序列, 而在各个引物的两端含有 18 - 35bp 的互补序列。将 hR5Hv1S 设计为含有 Kozak 共有序列 (Kozak, M, 等, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196, 947-950, 1987) 和 Sal I 识别部位, 将 hR5Hv5A 设计为含有 NheI 识别部位。而外部引物 hR5HPrS (序列号 27) 和 hR5HvPrA (序列号 28) 与 CDR 移植引物 hR5Hv1S 和 hR5Hv5A 具有同源性。

利用 PCR 法, 使 5 条引物组装, 合成全长的 cDNA, 再加入外部引物, 进行 DNA 扩增。所谓利用 PCR 法进行的组装指的是 hR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv4S、hR5Hv3A 和 hR5Hv5A 通过它们的互补序列进行退火, 合成全长人源化 H 链 V 区的 DNA。

人抗体 H 链 C 区可以是任意的人 H 链 C 区, 例如可以是人 H 链 C γ 1、C γ 2、C γ 3 或 C γ 4。

象上述那样构建的人源化抗体 H 链 V 区的 DNA 可以与任意人抗体 H 链 C 区、例如人 H 链 C 区 C γ 1 或 C γ 4 的 DNA 连接。就象在嵌合抗体 H 链的构建中叙述的那样, 用适当的限制酶处理后, 在象增强子/启动子体系那样的表达调控区下与编码人 H 链 C 区的 DNA 连接, 制作含有人源化 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 的表达载体。

(ii) 编码人源化 L 链 V 区的 DNA 以及表达载体的构建

在本发明中, 与编码 H 链 V 区的 DNA 一样, 从数据库中获得编码作为人源化抗体模板的人抗体的 L 链 V 区的基因, 用 DNA 合成仪合成编码人源化的 L 链 V 区的 DNA 的整个碱基序列, 利用 PCR 法可以构建。例如, 可以将具有与小鼠抗人 TF 单克隆抗体 ATR-5 的 L 链 V 区高同源性的 Z37332 制作成人源化 L 链 V 区版本 “a”。

为了制作人源化 L 链 V 区版本 “a”, CDR 移植引物 h5Lv1S (序列号 85)、h5Lv4S (序列号 86) 含有有意义 DNA 序列, 而 CDR 移植引物 h5Lv2A (序列号 87) 和 h5Lv5A (序列号 89) 含有反意义 DNA 序列, 而在各个引物的两端含有 20bp 的互补序列。将引物 h5Lv1S 设计为含有 Kozak 共有序列 (Kozak, M, 等人, 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol. 196, 947-950,

1987)) 和限制酶 Bgl II 识别部位, 将 h5Lv 5 A 设计为含有限制酶 Spl I 识别部位。而外部引物 h5LvS (序列号 90) 和 h5Lv5 A (序列号 91) 与 CDR 移植引物 h5Lv1S 和 h5Lv 5 A 具有同源性。

与人源化 H 链 V 区一样, 可以利用 PCR 法, 将 5 条引物组装合成全长的 cDNA, 再加入外部引物, 进行 DNA 扩增。

人抗体 L 链 C 区可以是任意的人 L 链 C 区, 例如可以是人 L 链 C λ 或 C κ 。

象上述那样构建的人源化抗体 L 链 V 区的 DNA 可以与任意人抗体 L 链 C 区、例如人 L 链 C 区 C κ 或 C λ 区的 DNA 连接。用适当的限制酶处理后, 在象增强子/启动子体系那样的表达调控区下与编码人 L 链 κ 链 C 区的 DNA 连接, 制作含有编码人源化 L 链 V 区和人 H 链 κ 链 C 区 DNA 的表达载体。

象上述那样, 即使制作了人源化抗体的 V 区片段, 该 V 区片段是否具有作为抗体的活性 (对抗原的结合活性、中和活性等) 也未必清楚。因此, 有必要通过与人源化 H 链的组合利用象 COS-7 那样的动物细胞表达, 研究有无活性。

(iii) 人源化抗体的 H 链和 L 链 V 区的 FR 改组

本发明人使含有制作的人源化 H 链和 L 链 V 区的人源化抗体在象 COS-7 那样的动物细胞中瞬时表达, 就抗原结合活性以及中和活性进行研究, 结果表明虽然有抗原结合活性和中和活性, 但与嵌合抗体相比较, 显得不高。

本发明人通过依次改组人源化 H 链和 L 链 V 区的各个 FR, 可以解决这个问题。在 FR 的改组中使用的人抗体可以从已有的数据库中选择。选择的人抗体的 FR 以数据库中已阐明的碱基序列为基础, 通过 DNA 合成仪可以合成。此时如前所述, 通过在 CDR 或 FR 附加设计的限制酶识别序列, 容易改组为上述制作的人源化抗体的 H 链和 L 链 V 区的 FR。通过考查这样制作的人源化抗体的活性, 可以获得有所期望的抗原结合活性和中和活性的人源化抗体。

例如, 可以将人源化抗体 V 区 H 链 FR3 改换为来自人抗体 Z34963

(GenBank, Borretzen M.等, 美国国家科学院学报(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) , 91, 12917-12921, 1994) 的 FR3。

FR-改组引物 F3RFFS (序列号 35) 和 F3RFBS (序列号 36) 含有有意义 DNA, F3RFFA (序列号 37) 和 F3RFBA (序列号 38) 含有反意义 DNA 序列。FR-改组引物 F3RFFS、F3RFBS、F3RFFA、F3RFBA 可以通过 DNA 合成仪合成。

使 F3RFFS 和 F3RFFA、F3RFBS 和 F3RFBA 退火, 分别用 Bal I 和 XhoI、NcoI 和 XhoI 消化。将它们导入通过 Bal I 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/CVIDEC (Bal I/NcoI) 中, 通过确认碱基序列可以得到含有正确序列的质粒。这样获得的含有人源化抗体 H 链的质粒命名为 hATR5Hvb/CVIDEC, hATR5Hva/CVIDEC 中含有的同源化 H 链定为版本“b”。其碱基序列和相应的氨基酸序列如序列号 39 所示, 版本“b”的氨基酸序列如序列号 40 所示。

同样, 有关从数据库选择出的来自其他人抗体 V 区 H 链和 L 链的 FR 也可以改组为同源化抗体 V 区 H 链和 L 链的 FR。

为了选择用于进行同源化抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 改组的更理想的人抗体, 可以象以下那样进行。即, 通过同源化抗体 H 链版本“b”和嵌合抗体 L 链的组合, 具有与嵌合抗体或小鼠抗体同等的中和活性。然而如果同源化抗体 H 链版本“b”和同源化抗体 L 链版本“a”组合, 中和活性将比嵌合抗体或小鼠抗体低。

这种情形下, 为了对 FR 进行改组, 选择作为候补的人抗体, 例如对同源化抗体 H 链版本“b”的 FR3 (登记号 No. Z34963: 序列号 115) 进行同源性检索, 可以选择与该序列同源性高的人抗体。例如这样选择的人抗体 H 链 V 区 FR3 可举出 U95239 (序列号 122) 和 L03147 (序列号 123)。

这样制作的人源化抗体 V 区 H 链氨基酸序列如表 3 和 4 所示, 而同源化抗体 V 区 L 链的氨基酸序列如表 5 所示。

表3

H链 V 区的氨基酸序列

	FR1		CDR1	FR2	CDR2	
	1	2	3	4	5	6
I39130(a)	123456789012345678901234567890	1234567890	12345	67890123456789	012A3456789012345	
Z34963(b)	QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGFNIK	DYYMH	WVKQRPQGQLEWIG	GNDPANGHSMYDPKFFQG		
M30885(c)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M62723(d)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Z80844(e)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L04345(f)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
S78322(g)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Z26827(h)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
U95239(i)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
L03147(j)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P01742(b1)	-----	-----	-----	--R-A--	--M-	-----
P01742(d1)	-----	-----	-----	--R-A--	--M-	-----
Z80844(b3)	-----	-----	-----	--R-A--	-----	-----
Z80844(d3)	-----	-----	-----	--R-A--	-----	-----

9 9 9 9

表 4
H 链 V 区的氨基酸序列 (续)

	FR3	CDR3	FR4
	7	8	9
	67890123456789012ABC345678901234	56789012	34567890123
I39130(a)	RAKLTAATSASIAYLEFFSSLTNEDSAVYYCAR	DSGYANDY	WGQGTLYTVSS
Z34963(b)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-----	-----	-----
M30885(c)	-VTMLVD--KNQFS-RL--V-AA-T-----	-----	-----
M62723(d)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS-----F----	-----	-----
Z80844(c)	-VSI--DE-TK--M-LN--RS--T--F----	-----	-----
L04345(f)	-VTI--DT-T-T--M-LR--RSD-T-----	-----	-----
S78322(g)	K-T--DE-S-T--MQL--RS-----S----	-----	-----
Z26827(h)	-VTMS-DK-S-A--QWT--KAS-T-I-F----	-----	-----
U95239(i)	-VTI--D--T-TVFM-L--RS--T-----	-----	-----
L03147(j)	-VTF--D--NT--M-LR--RSA-T-----	-----	-----
P01742(b1)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-----	-----	-----
P01742(d1)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS-----F----	-----	-----
Z80844(b3)	-VTI--D--TNT--M-L--RS--T-I-----	-----	-----
Z80844(d3)	-VTI--DE-T-T--M-L--RS-----F----	-----	-----

表 5
L 链 V 区的氨基酸序列

	FR1		CDR1	FR2		CDR2
	1	2	3	4	5	
	12345678901234567890123	45678901234	5678901234	567890123456789	0123456	
Z37332(a)	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTITC	KASQDIKSFLS	WYQQKPGKAPKLLIY	YATSLAD	
S68699(b)	-----	-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	-----	-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	-----	-----	-F-----S--T--	-----	
X93625(b2)	-----	-----	-----	-----E--S--	-----	
	FR3		CDR3	FR4		
	6	7	8	9	10	
	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567			
Z37332(a)	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQPEDFATYYC	LQHGESPYT	FGG	TKVEIK	
S68699(b)	-----	Y-----	-----	-----	-----	
P01607(c)	-----	Y-----	I-----	-----	-----	
S65921(b1)	-----	Y-----	-----	-----	-----	
X93625(b2)	-----	Y-----	-----	-----	-----	

象上述那样构建的人源化抗体 H 链和 L 链 V 区各个版本可以与任意的人抗体 H 链 C 区和 L 链 C 区连接, 例如可分别与人 H 链 C γ 4 和人 L 链 C κ 区的 DNA 连接。用适当的限制酶处理后, 在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控区下与编码人 H 链 C γ 4 和 L 链 C κ 区的 DNA 连接, 制作含有编码人源化 H 链和 L 链 V 区各版本的 DNA 与分别编码人 H 链 C γ 4 和人 L 链 C κ 区 DNA 的表达载体。

另外将象上述那样构建的编码人源化抗体 H 链和 L 链 C 区的 DNA 和人源化 L 链及人 L 链 C 区的 DNA 导入单一的表达载体 (例如参照 WO94/11523), 然后用该表达载体转化宿主细胞, 再将转化的宿主在体外或体内进行培养, 可以使其产生人源化抗体。

5. 嵌合抗体和人源化抗体的制造

为了制造嵌合抗体或人源化抗体, 将编码 H 链 V 区和 H 链 C 区的 DNA 以及编码 L 链 V 区和 L 链 C 区的 DNA 与单一载体连接, 转化适当的宿主细胞, 可以使其产生抗体。即为了表达嵌合抗体, 在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下, 将存在于克隆的 cDNA 中的编码小鼠前导序列和小鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA、以及编码小鼠前导序列和小鼠 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 导入单一的表达载体 (例如, 参照 WO94/11523)。

为了表达人源化抗体, 在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下, 将编码人源化 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA、编码人源化 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 导入单一的表达载体 (例如, 参照 WO94/11523)。然后用这些载体转化宿主细胞, 将被转化的宿主在体内或体外培养, 使其产生目的嵌合抗体或人源化抗体。

另外可以制作含有 H 链 V 区和 L 链 V 区的各 2 种表达载体。即、对于嵌合抗体来说, 制作在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下含有编码小鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 的表达载体, 以及制作在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下含有编码小鼠 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 的表达载体, 而对于人源化抗体, 制作在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下含有编码人源化 H 链 V 区和

人 H 链 C 区的 DNA 的表达载体, 以及制作在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下含有编码人源化 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 构成的表达载体。

或者, 对于嵌合抗体来说, 制作在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下含有编码小鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 以及编码小鼠 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 的表达载体; 而对于人源化抗体, 制作在象增强子/启动子系统那样的表达调控区的调控下含有编码人源化 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 以及编码人源化 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 构成的表达载体。

然后用这些表达载体同时转化象哺乳类细胞那样的宿主细胞, 再将转化的细胞在体外或体内进行培养制造嵌合抗体或人源化抗体 (例如可参照 WO91/16928)。

培养象上述那样用编码目的嵌合抗体或人源化抗体的基因转化的转化体, 产生的嵌合抗体或人源化抗体可以从细胞内或细胞外分离纯化至均一为止。

可以使用蛋白 A 琼脂糖柱对作为本发明目的蛋白质的嵌合抗体或人源化抗体进行分离纯化。此外, 也可以使用通常蛋白质分离纯化用的方法, 没有任何限制。例如对各种层析、超滤、盐析、透析等方法适当地选择、组合, 可以分离纯化嵌合抗体或人源化抗体。

为了制造抗人 TF 的本发明嵌合抗体或人源化抗体, 可以使用任何表达体系。例如, 使用真核细胞时, 可以有动物细胞 (例如建立的哺乳类细胞系)、真菌 (丝状菌) 细胞或酵母细胞等, 使用原核细胞时, 可以用细菌细胞 (例如大肠杆菌等) 等。本发明的嵌合抗体或人源化抗体优选在哺乳类细胞、例如 COS 细胞或 CHO 细胞中表达。

这样的情况下, 为了在哺乳类细胞中表达可以使用有用的常见的启动子。例如, 最好使用人巨细胞病毒前期 (human cytomegalovirus immediate early; HCMV) 启动子。含有 HCMV 启动子的表达载体的例子中有 HCMV - VH - VC γ 1, HCMV - VL - VCK 等, 包括来自 pSV2neo 的载体 (WO92-19759)。

此外作为可用于本发明的于哺乳动物细胞内进行基因表达的启动子，可以使用逆病毒、多瘤病毒、腺病毒、猿病毒 40 (SV40) 等病毒启动子和人多肽链延伸因子 1 α (HEF-1 α) 等来自哺乳动物细胞的启动子。例如，使用 SV40 启动子时，按照 Mulligan 等人的方法 ((自然 Nature), 277, 108, 1979)，而使用 HEF-1 α 启动子时，按照 Mizushima 等人的方法 (核酸研究 (Nucleic Acids Research), 18, 5322, 1990) 很容易实施。

作为复制原点可以使用来自 SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳头状瘤病毒 (BPV) 等的复制原点，而为了在宿主细胞系中扩增基因的拷贝数，表达载体可以含有作为选择标记的磷酸转移酶 APH (3') II 或 I (neo) 基因、胸腺嘧啶脱氧核苷激酶 (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。

6. 嵌合抗体和人源化抗体的抗原结合活性以及中和活性的评价

(1) 利用 ELISA 测定抗体浓度

获得的纯化抗体的浓度可以利用 ELISA 进行测定。

抗体浓度测定用的 ELISA 板按如下操作制备。向 ELISA 用 96 孔板 (例如 Maxisorp, NUNC) 的各个孔加入浓度为 1 μ g/ml 的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource) 100 μ l 进行固相化。

用 200 μ l 稀释的缓冲液 (以下称为 DB。例如 50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% 牛血清白蛋白 (BSA)、pH7.2) 封闭后，将表达嵌合抗体、或人源化抗体的 COS-7 细胞或 CHO 细胞的培养上清、或纯化的嵌合抗体、或人源化抗体阶段稀释后加到各个孔中。然后加入结合了碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG 抗体 100 μ l、加入 1mg/ml 的底物溶液 (Sigma104、对硝基苯磷酸、SIGMA)、然后用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 处的吸光度。作为浓度测定的标准可以用 IgG4 κ (The Binding Site)。

(2) 抗原结合能力的测定

按如下操作制备抗原结合测定用的 Cell ELISA 板。向细胞培养用 96 孔板中的 60 孔加入人膀胱癌细胞 J82 (ATCC HTB-1)，每孔细胞数为 1 \times 10⁶ 个。然后将培养板置于 CO₂ 培养箱中培养一天 (含有 10% 胎牛血

清 (GIBCO) 的 RPMI1640 培养基), 使细胞铺满。将培养基倒掉, 用 300 μ l 的 PBS 将各孔洗 2 次。向各孔加入 100 μ l 的含有 4% 多聚甲醛的 PBS (以下称之 PFA/PBS), 静置于冰上 10 分钟, 使细胞固相化。

将 PFA/PBS 倒掉, 用 300 μ l 的 PBS 将各孔洗 2 次, 用 200 μ l 的 DB 进行封闭。然后向各孔加入 100 μ l 含有嵌合抗体或人源化抗体的培养上清、或用 DB 阶段稀释后的纯化的嵌合抗体或人源化抗体, 于室温培养 2 小时, 用 RB 洗净后, 加入 100 μ l 的用 DB 稀释 1000 倍的结合了碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource)。于室温下培养 1 小时, 用 RB 洗净后, 加入底物溶液, 然后用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。

(3) 中和活性的测定

小鼠抗体、嵌合抗体和人源化抗体的中和活性可以通过以来自人胎盘的凝血酶、Thromborel S (Behringwerke AG) 对因子 Xa 的生成抑制活性为指标进行测定。即, 向 1.25mg/ml 的 Thromborel S 10 μ l 和稀释到适当浓度的抗体 10 μ l 加入缓冲液 (含有 5mM CaCl₂、0.1% 的 BSA) 60 μ l, 在 96 孔板中于室温反应 1 小时。

然后分别加入 3.245 μ g/ml 的人因子 X (セルサス实验室) 和 82.5ng/ml 的人因子 VIIa (Enzyme Research) 10 μ l, 于室温反应 1 小时。加入 10 μ l 的 0.5M EDTA 终止反应, 加入 50 μ l 发色底物溶液, 用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。以没有加抗体的 1 小时吸光度为 100% 活性, 通过从各个吸光度变化算出的残存活性 (%), 测定出中和活性。

发色底物溶液是按照附带的说明书溶解テストチ-ム发色底物 S-2222 (Chromogenix), 然后用精制水稀释 2 倍后, 以 1:1 比例与聚戊烯液 (0.6mg/ml hexadimethyline bromide, SIGMA) 混合制备的。

7. 通过人源化抗体和可溶性 TF 的相互作用解析反应动力学

利用 BIACORE 可以测定本发明的抗 TF 抗体的动力学参数、即解离常数 (KD)、解离速率常数 (kdiss) 和结合速率常数 (kass)。

将重组型蛋白 G 固相化于传感器芯片上, 使抗体与它结合, 作为抗原

可以使用纯化的重组型 TF (将 FLAG peptide tag 付在 1-219 的可溶性 TF 上) (以下称为可溶性 TF), 将制备成各种浓度的可溶性 TF 作为分析对象。通过从得到的传感图算出动力学参数 (解离速率常数 k_{diss} 和结合速率常数 k_{ass}), 可以求出解离常数。关于动力学的解析可以参考“用新型的基于生物传感器的分析体系对单克隆抗体-抗原相互作用进行动力学分析”“Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system” (karlsson, R. 等 (1991) 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 145, 229-240.) 等文献。

本发明的抗 TF 抗体解离常数 (KD) 越是小的值, 中和活性越好。在本发明的抗 TF 抗体中, KD 值在 2.30×10^{-8} [1/M] 以下比较好, 若是在 2.30×10^{-9} [1/M] 以下更好, 而在 1.17×10^{-9} [1/M] 以下最好。

而 KD 是由解离速率常数 (k_{diss}) 和结合速率常数 (k_{ass}) 2 个参数决定的 ($KD = k_{diss}/k_{ass}$)。因此如果 k_{diss} 的值小, 而 k_{ass} 值大, 显然 KD 值就变小了。

具体来说, 本发明的抗 TF 抗体, k_{diss} 的值如果在 9.52×10^{-3} [1/sec] 以下就可以。 k_{diss} 值在 9.52×10^{-4} [1/sec] 以下比较好, 最好是在 6.35×10^{-4} [1/sec] 以下。

而 k_{ass} 的值如果在 4.15×10^4 [1/M · sec] 以上就可以。 k_{ass} 值在 4.15×10^5 [1/M · sec] 以上比较好, 最好在 4.65×10^5 [1/M · sec] 以上。

再者 k_{diss} 的值如果在 9.52×10^{-3} [1/sec] 以下, 而 k_{ass} 的值在 4.15×10^4 [1/M · sec] 以上的抗体也是优选的。

具体来说, 本发明的抗 TF 抗体, KD 值处于 $1.09 \times 10^{-10} \sim 2.30 \times 10^{-8}$ [1/M] 范围, 优选处于 $1.09 \times 10^{-9} \sim 2.30 \times 10^{-9}$ [1/M] 范围内, 最优选处于 $1.09 \times 10^{-9} \sim 1.39 \times 10^{-8}$ [1/M] 范围内。

而 k_{diss} 值处于 $5.06 \times 10^{-4} \sim 9.52 \times 10^{-3}$ [1/sec] 范围, 优选处于 $5.06 \times 10^{-4} \sim 9.52 \times 10^{-4}$ [1/sec] 之内, 最优选为 $5.06 \times 10^{-4} \sim 6.49 \times 10^{-4}$ [1/sec]。

k_{ass} 的值处于 $4.15 \times 10^4 \sim 5.44 \times 10^5$ [1/M · sec] 范围, 优选处于 $4.15 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5$ [1/M · sec] 之内, 最优选为 $4.65 \times 10^5 \sim 5.44 \times 10^5$

[1/M · sec].

这些 KD 值、kdiss 值和 kass 值除了通过 BIACORE 以外也可以通过扫描图解析、或 BIACORE 等的表面プラズモン共振传感器芯片等得到，但优选利用 BIACORE 获得。

8. 人源化抗体对人 TF 反应性的测定

利用点印迹杂交法可以研究本发明的人源化抗体对非变性 TF、非还原下变性 TF、还原下变性 TF 的反应性。

TF 可以使用从人组织纯化的，或在 CHO 细胞等哺乳动物细胞中表达、纯化的 TF 等，进行研究。而变性剂可以用盐酸胍或 SDS 等代替尿素，还原剂也可以用 2-巯基乙醇等 SH 还原试剂代替 DTT。在人源化抗体的检测中可以使用用各种各样物质标记的抗人 IgG 抗体。这里所说的标记物质是指，例如放射性物质、生物素、FITC 等荧光物质、过氧化物酶和碱性磷酸酶等酶。本发明的抗 TF 抗体与非变性 TF、非还原下变性 TF 以及还原下变性 TF 均可发生反应。

9. 含有人源化抗体为有效成分的医药组合物和 DIC 治疗剂

为了确认抗人 TF 的人源化抗体的治疗效果，可以通过将人源化抗人 TF 抗体给予表现高 DIC 症状的动物，测定 DIC 的指标可以确认其治疗效果。

在本发明中使用的抗体是抗人 TF 的人源化抗体。该抗体是通过与人 TF 结合，中和人 TF 活性的抗体，其中优选人源化 ATR5 抗体。人源化 ATR5 抗体的制作方法在实施例中有记载。

本发明中使用的抗体通过将盐析法、使用 HPLC 等凝胶过滤法、使用蛋白 A 柱等亲和层析法等通常的纯化手段配合使用，可以纯化到高纯度。这样纯化的抗体利用放射免疫测定法 (RIA)、酶免疫测定法 (EIA、ELISA)、或荧光抗体法 (免疫荧光分析, Immunofluorescence Analysis) 等通常的免疫学上手段高精度地确认人 TF。

含有本发明的抗 TF 人源化抗体为有效成分的医药组合物和 DIC 治疗剂可以通过非口服方式经全身或局部给药。例如，可以选择点滴等静脉注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射，可以根据患者的年龄、症

状选择适当的给药方法。有效的给药量每一次每 1kg 体重可在 0.01mg 至 1000mg 的范围内选择。或者每个患者 10mg/body、优选选自 1~1000 mg/body 的给药量。

含有本发明的抗 TF 人源化抗体为有效成分的医药组合物和 DIC 治疗剂按照给药途径程序也可以是含有医药上容许的载体或添加剂的制剂。作为这样的载体和添加物的例子，如水、医药上容许的有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧乙烯聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、二甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白(HAS)、甘露醇、山梨醇、乳糖、容许作为医药添加物的表面活性剂等。使用的添加剂按照本发明的剂型从上述的添加剂中适当地选择一种或选择几种组合使用，并没有限定。

本发明可以提供抗人 TF 的亲抗体和人源化抗体以及人源化抗体的制作方法。这些抗体由于在人体内的抗原性低，作为治疗药物是有用的。

下面通过实施例更具体地说明本发明。

实施例 1. 编码小鼠抗人 TF 单克隆抗体的 V 区的 DNA 的克隆

(1) mRNA 的制备

使用 Quick Prep mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia Biotech) 由杂交瘤 ATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5 (IgG1 κ)、ATR-7 和 ATR-8 (IgG2a κ) 制备 mRNA。按照试剂盒附带的处方，将各个杂交瘤细胞在萃取缓冲液中完全匀浆破碎，使用寡聚 (dT) - 纤维素 span 柱纯化 mRNA，进行乙醇沉淀。将 mRNA 溶解于萃取缓冲液中。

(2) 编码小鼠抗体 V 区的基因的 cDNA 的制作和扩增

(i) H 链 V 区 cDNA 的克隆

编码小鼠抗人 TF 单克隆抗体 H 链 V 区的基因的克隆按照 5' - RACE 法 (Frohman, M. A. 等美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci.

USA) 85, 8998-9002, 1988, Belyavsky, A. 等, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 17, 2919-2932, 1989) 进行。在 5' - RACE 法中, 使用 Marathon cDNA 扩增试剂盒 (CLONTECH), 操作按照试剂盒附带的处方进行。

通过上述那样制备的 mRNA 大约 1 μg 作为模板, 加入试剂盒附带的 cDNA 合成引物, 与逆转录酶于 42℃, 反应 60 分钟, 进行朝向 cDNA 的逆转录。再通过用 DNA 聚合酶 I、DNA 连接酶、RNaseH 于 16℃ 下使其反应 1.5 小时, 用 T4 DNA 聚合酶于 16℃ 下使其反应 45 分钟, 合成双链 cDNA。用酚和氯仿萃取双链 cDNA, 通过乙醇沉淀回收。

通过用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 下反应过夜, 在双链 cDNA 的两端连接 cDNA 衔接头。反应混合液用 10mM Tricine-KOH (pH8.5)、0.1mM EDTA 溶液稀释 50 倍。以此为模板利用 PCR 扩增编码 H 链 V 区的基因。对于 5' - 端引物可以使用试剂盒附带的衔接头引物 1, 对于 3' - 端引物可以使用 MHC - G1 引物 (序列号 1) (ATR - 2、ATR - 3、ATR - 4 和 ATR - 5) 或 MHC - G2a 引物 (序列号 2) (ATR - 7 和 ATR - 8) (S. T. Jones, 等, 生物技术 (Biotechnology), 9, 88-89, 1991)。

针对 ATR - 2、3、4 和 5 抗体 H 链 V 区的 PCR 溶液 100 μl 中含有 120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM(NH)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造)、30 ~ 50pmole 的衔接头引物 1 和 MHC - G1 引物、以及连接了 cDNA 衔接头的 cDNA 的反应混合物 1 ~ 5 μl。

无论进行的那个 PCR 都使用热循环仪 480 (Perkin-Elmer), 进行 30 次循环, 每一温度循环为: 94℃ 30 秒钟、55℃ 30 秒钟、74℃ 1 分钟。

(ii) L 链 V 区 cDNA 的克隆

编码小鼠抗人 TF 单克隆抗体 L 链 V 区的基因的克隆按照 5' - RACE 法 (Frohman, M. A. 等, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85, 8998-9002, 1988, Belyavsky, A. 等, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.) 17, 2919-2932, 1989) 进行。在 5' - RACE 法中, 使用 Marathon cDNA 扩增试剂盒 (CLONTECH) 操作按照试剂盒附带的处方进行。通

过以上述那样制备的 mRNA 大约 $1\mu\text{g}$ 作为模板, 加入 cDNA 合成引物, 与逆转录酶于 42°C , 反应 60 分钟, 进行朝向 cDNA 的逆转录。

再通过用 DNA 聚合酶 I、DNA 连接酶、RNaseH 于 16°C 下使其反应 1.5 小时, 用 T4 DNA 聚合酶于 16°C 下使其反应 45 分钟, 合成双链 cDNA。用酚和氯仿萃取双链 cDNA, 通过乙醇沉淀回收。通过用 T4 DNA 连接酶于 16°C 下反应过夜, 在双链 cDNA 的两端连接 cDNA 衔接头。反应混合液用 10mM Tricine-KOH (pH8.5)、 0.1mM EDTA 溶液稀释 50 倍。以此为模板利用 PCR 扩增编码 L 链 V 区的基因。对于 $5'$ -端引物使用衔接头引物 1, 对于 $3'$ -端引物使用 MKC 引物 (序列号 3) (S. T. Jones, 等, 生物技术 (Biotechnology), 9, 88-89, 1991)。

PCR 溶液在 $100\mu\text{l}$ 中含有 120mM Tris-HCl (pH8.0)、 10mM KCl、 6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 0.1% Triton X-100、 0.001% BSA、 0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、 1mM MgCl_2 、2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造)、 $30\sim 50\text{pmole}$ 的衔接头引物 1 和 MKC 引物、以及连接了 cDNA 衔接头的 cDNA 的反应混合物 $1\mu\text{l}$ 。

PCR 使用热循环仪 480 (Perkin-Elmer), 进行 30 次循环, 每一温度循环为: 94°C 30 秒钟、 55°C 30 秒钟、 74°C 1 分钟。

(3) PCR 产物的纯化和片段化

用酚和氯仿萃取上述的 PCR 反应混合液, 通过乙醇沉淀回收扩增的 DNA 片段。通过限制酶 XmaI (New England Biolabs) 于 37°C 对 DNA 片段消化 1 小时。通过使用了 2% 到 3% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离 XmaI 消化混合物, 切出含有作为 H 链 V 区的大约 500bp 长、作为 L 链 V 区的大约 500bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片, 用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 10mM Tris-HCl (pH8.0)、 1mM EDTA 溶液 (以下称为 TE) $10\mu\text{l}$ 。

上述制备的含有编码小鼠 H 链 V 区和 L 链 V 区的基因的 XmaI 消化 DNA 片段和用 XmaI 消化制备的 pUC19 质粒载体用 DNA 连接试剂盒 ver. 2 (宝酒造), 按照附带的处方于 16°C 反应 1 小时, 进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞（日本基因，Nippongene）100 μ l 中，冰上静置 30 分钟，42℃ 静置 1 分钟。

然后加入 300 μ l 的高感受态肉汤（Hi-Competence Broth）（日本基因，Nippongene），于 37℃ 培养 1 小时后，将该大肠杆菌涂在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基（以下称为 LBA 琼脂培养基）（分子克隆实验手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）Sambrook 等，冷泉港实验室出版社 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）上，于 37℃ 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。

将该转化体在 3ml 或 4ml 含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基（以下称为 LBA 培养基）中于 37℃ 培养过夜，用 QIAprep Spin 质粒试剂盒（QIAGEN）从菌体级分中制备质粒 DNA，进行碱基序列的确定。

（4）编码小鼠抗体 V 区的 cDNA 的基因的碱基序列的确定

上述质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer），通过 DNA 测序仪 373A（Perkin-Elmer）确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物 M4（宝酒造）（序列号 4）和 M13 引物 RV（宝酒造）（序列号 5），通过确认两个方向的碱基序列确定序列。

将含有来自于这样得到的杂交瘤 ATR-2、ATR-3、ATR-4、ATR-5、ATR-7 和 ATR-8 的编码小鼠 H 链 V 区基因的质粒分别命名为 ATR-xHv/pUC19（x=2、3、4、5、7 或 8），而含有编码小鼠 L 链 V 区基因的质粒分别命名为 ATR-xLv/pUC19（x=2、3、4、5、7 或 8）。ATR-xHv/pUC19 中含有的编码各个小鼠抗体的 H 链 V 区的基因的碱基序列（包括相应的氨基酸序列）分别如序列号 6 到 11 所示，而 ATR-xLv/pUC19（x=2、3、4、5、7 或 8）中含有的编码各个小鼠抗体的 L 链 V 区的基因的碱基序列（包括相应的氨基酸序列）分别如序列号 12 到 17 所示。

实施例 2. 嵌合抗体的构建

制作将小鼠 ATR-5 抗体 V 区连接到人抗体 C 区的嵌合 ATR-5 抗体。通过将编码 ATR-5 抗体 V 区的基因连接到编码人抗体 C 区的表达

载体上构建嵌合抗体表达载体。

(1) 嵌合抗体 H 链 V 区的构建

为了与编码人抗体 H 链 C 区的表达载体连接, 利用 PCR 法对 ATR-5 抗体 H 链 V 区进行修饰。5' - 端引物 ch5HS (序列号 18) 与编码 V 区的 DNA 的 5' - 末端杂化, 而且设计成含有 Kozak 共有序列(Kozak. M. 等., 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196, 947-950, 1987) 和限制酶 Sal I 的识别序列。3' - 端引物 ch5HA (序列号 19) 与编码 J 区的 DNA 的 3' - 末端杂交, 而且设计成含有限制酶 Nhe I 的识别序列。

PCR 溶液 100 μ l 中含有 120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl_2 、2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造)、50pmole 的 ch5HS 引物和 ch5HA 引物、以及作为模板的 1 μ l 质粒 ATR5Hv/pUC19。PCR 使用 DNA 热循环仪 480 (Perkin-Elmer), 进行 30 次循环, 每一温度循环为: 94 $^\circ\text{C}$ 30 秒钟、55 $^\circ\text{C}$ 30 秒钟、74 $^\circ\text{C}$ 1 分钟。

用酚和氯仿萃取上述的 PCR 反应混合液, 通过乙醇沉淀回收扩增的 DNA 片段。通过限制酶 Nhe I (宝酒造) 于 37 $^\circ\text{C}$ 对 DNA 片段消化 1 小时。然后用限制酶 Sal I 于 37 $^\circ\text{C}$ 消化 1 小时。通过使用了 3% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离该消化混合物, 切出含有大约 450bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片, 用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 20 μ l TE 中。

关于克隆载体使用导入了限制酶 Nhe I、Sal I 以及 SpII、BglII 的识别序列的改变的 pUC19 载体 (以下称为 CVIDEC)。上述制备的含有编码小鼠 H 链 V 区的基因片段和通过 Nhe I 以及 Sal I 消化制备的 CVIDEC 载体用 DNA 连接试剂盒 ver. 2 (宝酒造), 按照附带的处方于 16 $^\circ\text{C}$ 反应 1 小时, 进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μ l 中, 冰上静置 30 分钟, 42 $^\circ\text{C}$ 静置 1 分钟。然后加入 300 μ l 的 Hi-Competence Broth (Nippongene), 于 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 小时后, 将该大肠杆

菌涂在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LBA 琼脂培养基上，于 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜，用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 从该菌体级分中制备质粒 DNA。

质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)，通过 DNA 测试仪 373A (Perkin-Elmer) 确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物 M4 (宝酒造) 和 M13 引物 RV (宝酒造)，通过确认两个方向的碱基序列确定序列。含有编码该 ATR-5 抗体 H 链 V 区的基因、5' - 端带有 SalI 识别序列和 Kozak 共有序列、3' - 端带有 Nhe I 识别序列的质粒命名为 chATR5Hv/ CVIDEC。

(2) 嵌合抗体 L 链 V 区的构建

为了与编码人抗体 L 链 C 区的表达载体连接，利用 PCR 法对 ATR-5 抗体 L 链 V 区进行修饰。5' - 端引物 ch5LS (序列号 20) 与编码 V 区的 DNA 的 5' - 末端杂交，而且设计成含有 Kozak 共有序列 (Kozak. M. 等., 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196, 947-950, 1987) 和限制酶 Bgl II 的识别序列。3' - 端引物 ch5LA (序列号 21) 与编码 J 区的 DNA 的 3' - 末端杂交，而且设计成含有限制酶 Spl I 的识别序列。

PCR 溶液 100 μ l 中含有 120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl₂、2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造)、50pmole 的 ch5LS 引物和 ch5LA 引物、以及作为模板的 1 μ l 质粒 ATR5Lv/pUC19。PCR 使用 DNA 热循环仪 480 (Perkin-Elmer)，进行 30 次循环，每一温度循环为：94 $^{\circ}$ C 30 秒钟、55 $^{\circ}$ C 30 秒钟、74 $^{\circ}$ C 1 分钟。

用酚和氯仿萃取上述的 PCR 反应混合液，通过乙醇沉淀回收扩增的 DNA 片段。利用限制酶 Spl II (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 对 DNA 片段消化 1 小时。然后用限制酶 Bgl II 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时。通过使用了 3% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离该消化混合物，切出

含有大约 400bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片，用乙醇使 DNA 片段沉淀后，溶解于 20 μ l TE 中。

上述制备的含有编码小鼠 L 链 V 区的基因片段和通过 SpII 以及 Bgl II 消化制备的 CVIDEC 载体用 DNA 连接试剂盒 ver. 2 (宝酒造)，按照附带的处方于 16 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μ l 中，冰上静置 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 静置 1 分钟。然后加入 300 μ l 的 Hi-Competence Broth (Nippongene)，于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时后，将该大肠杆菌涂在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LBA 琼脂培养基上，于 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜，用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。

质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)，通过 DNA 测序仪 373A (Perkin-Elmer) 确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物 M4 (宝酒造) 和 M13 引物 RV (宝酒造)，通过确认两个方向的碱基序列确定序列。含有编码该 ATR-5 抗体 L 链 V 区的基因、5' - 端带有 Bgl II 识别序列和 Kozak 共有序列、3' - 端带有 SpII 识别序列的质粒命名为 chATR5Lv/CVIDEC。

(3) 嵌合抗体表达载体的构建

用从 IDEV 社引入的抗体表达载体构建嵌合表达载体。在载体中使用了 IgG1 型抗体表达载体 N5KG1(V) 和 IgG4 型抗体表达载体 N5KG4P。通过在位于表达载体 N5KG1(V) 和 N5KG4P 的人抗体 H 链 C 区前面的 Sall-NheI 部位连接编码 ATR-5 抗体 H 链 V 区的基因，以及在位于人抗体 L 链 C 区前面的 Bgl II- SpII 部位连接编码 ATR-5 的 L 链 V 区的基因，制作嵌合 ATR-5 抗体表达载体。

(i) H 链 V 区的导入

质粒 chATR5Hv/CVIDEC 用限制酶 NheI (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 3 小时，然后用限制酶 Sall 于 37 $^{\circ}$ C 消化 3 小时。通过使用了 1.5% 的 NuSieve

GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离该消化混合物, 切出含有大约 450bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片, 用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 20 μ l TE 中。

N5KG1 (V) 和 N5KG4P 用限制酶 *Nhe*I (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 3 小时, 然后用限制酶 *Sal*I 于 37 $^{\circ}$ C 消化 3 小时。通过使用了 1.5% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离该消化混合物, 切出含有大约 9000bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片, 用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 60 μ l TE 中。

上述制备的含有编码 H 链 V 区的基因的 *Sal*I - *Nhe*I DNA 片段与 *Sal*I 和 *Nhe*I 消化的 N5KG1 (V) 或 N5KG4P 用 DNA 连接试剂盒 ver. 2 (宝酒造), 按照附带的处方于 16 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μ l 中, 冰上静置 30 分钟, 42 $^{\circ}$ C 静置 1 分钟。然后加入 300 μ l 的 Hi-Competence Broth (Nippongene), 于 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时后, 将该大肠杆菌涂在 100 μ g/ml 的 LBA 琼脂培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜, 得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 用 QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。将含有编码这些嵌合 ATR - 5 抗体 H 链的基因的质粒分别命名为 chATR5Hv/N5KG1 (V) 和 chATR5Hv/N5KG4P。

(ii) L 链 V 区的导入

质粒 chATR5Lv/CVIDEC 用限制酶 *Bgl* II (宝酒造) 和 *Spl* I (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1.5 小时。通过使用了 1.5% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离该消化混合物, 切出含有大约 400bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片, 用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 20 μ l TE 中。

质粒 chATR5Hv/N5KG1 (V) 和 chATR5Hv/N5KG4P 用限制酶 *Bgl* II (宝酒造) 和 *Spl* I (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1.5 小时。通过使用了 1.5% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC BioProducts) 的琼脂糖凝胶电泳分离该消化混合物, 切出含有大约 9400bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片。用

酚和氯仿萃取琼脂糖凝胶片，用乙醇使 DNA 片段沉淀后，溶解于 $20 \mu\text{l}$ TE 中。

上述制备的含有编码 L 链 V 区的基因的 $\text{Spl I} - \text{Bgl II}$ DNA 片段与 Spl I 和 Bgl II 消化的 $\text{chATR5Hv/N5KG1 (V)}$ 或 chATR5Hv/ N5KG4P 用 DNA 连接试剂盒 ver. 2 (宝酒造)，按照附带的处方于 16°C 反应 1 小时，进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) $100 \mu\text{l}$ 中，冰上静置 30 分钟， 42°C 静置 1 分钟。然后加入 $300 \mu\text{l}$ 的 Hi-Competence Broth (Nippongene)，于 37°C 培养 1 小时后，将该大肠杆菌涂在 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 LBA 琼脂培养基上，于 37°C 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。将该转化体在含有 $50 \mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 $2 \times \text{YT}$ 培养基 11 中，于 37°C 下培养过夜，用 Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。将含有编码这些嵌合 ATR-5 抗体的基因的质粒分别命名为 chATR5/N5KG1 (V) 和 chATR5/ N5KG4P 。

(4) 转染 COS-7 细胞

为了评价嵌合抗体的抗原结合活性和中和活性，使上述表达质粒转染 COS-7 细胞，使嵌合抗体瞬时表达。

采用 Gene Pulser 装置 (Bio Rad) 通过电穿孔将 chATR5/N5KG1 (V) 或 chATR5/ N5KG4P 导入 COS-7 细胞。向悬浮在グルベッコ PBS (-) (以下称为 PBS) 中的 0.78ml COS-7 细胞 (细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$) 加入质粒 $50 \mu\text{g}$ ，以 1500V ， $25 \mu\text{F}$ 的静电容量加脉冲。

于室温下经 10 分钟恢复期后，将电穿孔处理的细胞悬浮于含有 5% Ultra Low IgG 胎牛血清 (GIBCO) 的 DMEM 培养基 (GIBCO)，使用 10cm 培养皿，于 CO_2 培养箱中培养。经 24 小时培养后，抽滤除去培养上清，加入新的无血清培养基 HBCHO (ア-バインサイエンティフィック)。再培养 72 小时后，收集上清，经离心分离除去细胞碎片。

(5) 抗体的纯化

使用 rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) 按如下操作从 COS-7 细胞的培养上清纯化嵌合抗体。

将 1ml 的 rProtein A Sepharose Fast Flow 填充到柱子中，用 10 倍量的 TBS 洗，使柱子平衡。将 COS-7 细胞的培养上清加到已平衡好的柱子上，用 10 倍量的 TBS 洗柱子。

接下来用 13.5ml 的 2.5mM HCl (pH3.0) 洗，将吸附的抗体级分从柱子中洗脱下来，马上加 1.5ml 的 1M Tris-HCl (pH8.0) 中和洗脱液。

就纯化的抗体级分用 centriprep100 (Amicon) 进行 2 次超滤，将溶剂置换为含有 150mM NaCl 的 50mM Tris-HCl (pH7.6) (以下称为 TBS)，最终浓缩到大约 1.5ml。

(6) 稳定产生 CHO 的细胞株的确立

为了确立稳定生产嵌合抗体的细胞株，将上述表达质粒导入于 CHO-S-SFMII 无血清培养基 (GIBCO) 驯化的 CHO 细胞 (DG44) 中。

用限制酶 SspI (宝酒造) 切质粒 chATR5/N5KG1 (V) 或 chATR5/N5KG4P，使之成直链 DNA，用酚和氯仿萃取后，经乙醇沉淀回收 DNA。使用 Gene Pulser 装置 (Bio Rad) 通过电穿孔将成直链的 DNA 导入 DG44 细胞。向悬浮于 PBS 中的 0.78ml DG44 细胞 (细胞浓度为 1×10^7 /ml) 加入质粒 10 μ g，以 1500V，25 μ F 的静电容量加脉冲。

于室温下经 10 分钟恢复期后，将电穿孔处理的细胞悬浮于含有次黄嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷 (GIBCO) 的 CHO-S-SFMII 培养基 (GIBCO)。使用 2 块 96 孔板 (Falcon) 在 CO₂ 培养箱中培养。培养开始后第二天换成含有次黄嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷 (GIBCO) 和 500 μ g/ml 的 GENETICIN (G418 硫酸盐、GIBCO) CHO-S-SFMII 培养基 (GIBCO) 的选择培养基，选择导入了抗体基因的细胞。换成选择培养基后 2 周前后，于显微镜下观察细胞，确认细胞增殖正常后，通过后述的抗体浓度测定 ELISA 测定抗体产生量，挑选抗体产生量多的细胞。

实施例 3. 人源化抗体的构建

(1) 人源化抗体 H 链的构建

(i) 人源化 H 链版本 “a” 的构建

通过采用 PCR 法的 CDR 移植制作人源化 ATR-5 抗体 H 链。为了制作含有来自人抗体 L39130 (DDBJ, Gao L. 等人, 未发表, 1995) 的

FR 的人源化 ATR-5 抗体 H 链版本 “a”，使用了 7 个 PCR 引物。CDR 移植引物 hR5Hv1S（序列号 22）、hR5Hv2S（序列号 23）和 hR5Hv4S（序列号 24）含有有意义 DNA 序列，而 CDR 移植引物 hR5Hv3A（序列号 25）和 hR5Hv5A（序列号 26）含有反意义 DNA 序列，而且各个引物的两端含有 18-35bp 的互补序列。

将 hR5Hv1S 设计成含有 Kozak 共有序列（Kozak, M, 等人、分子生物学杂志（J. Mol. Biol.）196, 947-950, 1987）和 Sal I 识别部位，将 hR5Hv5A 设计为含有 NheI 识别部位。而外部引物 hR5HPrS（序列号 27）与 CDR 移植引物 hR5Hv1S 具有同源性，hR5HvPrA（序列号 28）与 CDR 移植引物 hR5Hv5A 具有同源性。

CDR 移植引物 hR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S 和 hR5Hv5A 以及外部引物 hR5HPrS 和 hR5HvPrA 是由 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。

PCR 使用 KOD DNA 聚合酶（东洋纺织制造），98 μ l 中含有 120mM Tris-HCl（pH8.0）、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）、1mM MgCl_2 、2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶（东洋纺织制造）、CDR 移植引物 hR5Hv1S、hR5Hv2S、hR5Hv3A、hR5Hv4S 和 hR5Hv5A 各 5pmole。使用附带的缓冲液，进行 5 次循环，每一温度循环为：94 $^\circ\text{C}$ 30 秒钟、50 $^\circ\text{C}$ 1 分钟、72 $^\circ\text{C}$ 1 分钟。再加入 100 pmole 的外部引物 hR5HPrS 和 hR5HvPrA，在 100 μ l 体系中进行 25 次同样温度循环。通过使用了 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖（FMC Bio. Products）的琼脂糖凝胶电泳分离经 PCR 扩增的 DNA 片段。

切出含有大约 430bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片，添加 3 倍量的 TE，经酚萃取、酚·氯仿萃取、氯仿萃取纯化 DNA。纯化的 DNA 用乙醇沉淀后，其中的三分之一溶解于 17 μ l 水。得到的 PCR 反应混合物经 NheI 和 SalI 消化，然后与经 NheI 和 SalI 消化制备的质粒载体 CVIDEC 使用 DNA 连接酶试剂盒 ver. 2（宝酒造），按照附带的处方进行连接反应。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞（Nippongene）100

μl 中，冰上静置 30 分钟， 42°C 静置 1 分钟。然后加入 $300\mu\text{l}$ 的 Hi-Competence Broth (Nippongene)，于 37°C 培养 1 小时后，将该大肠杆菌涂在 $100\mu\text{g/ml}$ LBA 琼脂培养基上，于 37°C 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37°C 培养过夜，用 QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) 制备质粒 DNA。

质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)，通过 DNA 测序仪 373A (Perkin-Elmer) 确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物 M4 (宝酒造) 和 M13 引物 RV (宝酒造)，通过确认两个方向的碱基序列确定序列。

为了确认在 EcoT22I 识别部位前或后的变异或缺失，连接含有各个正确序列的片段，再度对 CVIDEC 进行亚克隆，确定碱基序列。含有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hva/CVIDEC。序列号 29 给出了 hATR5Hva/CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本“a”的碱基序列和相应的氨基酸序列。版本“a”的氨基酸序列如序列号 30 所示。

(ii) 同源化 H 链版本“b”和“c”的构建

版本“b”和“c”是通过 FR 改组法将版本“a”的 FR3 置换为来自其它抗体的 FR3 制作的。在制作版本“b”时，为了将 FR3 置换为来自人抗体 Z34963 (DDBJ, Borretzen M. 等人、美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 01, 12917-12921)) 的 FR3，制作了 4 个编码 FR3 的 DNA 引物。FR 改组引物 F3RFFS (序列号 31) 和 F3RFBS (序列号 32) 含有有意义 DNA 序列，F3RFFA (序列号 33) 和 F3RFBA (序列号 34) 含有反有意义 DNA 序列。

F3RFFS 和 F3RFFA 相互含有互补序列，两端含有 Bal I 和 Xho I 的识别序列。在制作版本“c”时，为了将 FR3 置换为来自人抗体 P01825 (SWISS-PROT, Poljak R.J. 等人、生物化学 Biochemistry, 16, 3412-3420, 1977) 的 FR3，制作了 4 个编码 FR3 的 DNA 引物。FR 改组引物 F3NMFS (序列号 35) 和 F3NMBS (序列号 36) 含有有意义 DNA 序列，F3NMFA (序列号 37) 和 F3NMBA (序列号 38) 含有反意义 DNA 序列。F3RFBS

和 F3RFBA 相互含有互补序列，两端含有 XhoI 和 NcoI 的识别序列。

F3RFFS、F3RFBS、F3RFFA、F3RFBA、F3NMFS、F3NMBS、F3NMFA 和 F3NMBA 是由 Pharmacia Biotech 合成的。将 F3RFFS 和 F3RFFA、F3RFBS 和 F3RFBA 退火，分别用 Ball 和 XhoI、NcoI 和 XhoI 消化。将它们导入通过 Ball 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) 中，确定碱基序列。具有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hvb/CVIDEC。序列号 39 给出了质粒 hATR5Hvb/CVIDEC 中包含的人源化 H 链版本“b”的碱基序列以及相应的氨基酸序列。而序列号 40 给出了版本“b”的氨基酸序列。

将 F3NMFS 和 F3NMFA、F3NMBS 和 F3NMBA 退火，分别用 Ball 和 XhoI、NcoI 和 XhoI 消化。将它们导入通过 Ball 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI)，确定碱基序列。具有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hvc/CVIDEC。序列号 41 给出了质粒 hATR5Hvc/CVIDEC 中包含的人源化 H 链版本“c”的碱基序列以及相应的氨基酸序列。而序列号 42 给出了版本“c”的氨基酸序列。

(iii) 人源化 H 链版本“d”和“e”的构建

版本“d”和“e”是通过 FR 改组法将版本“a”的 FR3 置换为来自其它抗体的 FR3 制作的。在制作版本“d”时，为了将 FR3 置换为来自人抗体 M62723 (DDBJ, Pascual V. 等人, 临床研究杂志(J. Clin. Invest.), 86, 1320-1328, 1990) 的 FR3，制作了 4 个编码 FR3 的 DNA 引物。FR 改组引物 F3EPS (序列号 43) 含有有意义 DNA 序列，F3EPA (序列号 44) 含有反意义 DNA 序列，引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。

而外部引物 F3PrS (序列号 45) 含有有意义 DNA 序列，F3PrA (序列号 46) 与 FR 改组引物 F3EPS 和 F3EPA 有同源性，也可以用于其它的 FR3 的改组中。在制作版本“e”时，为了将 FR3 置换为来自人抗体 Z80844 (DDBJ, Thomsett AR. 等人, 未出版) 的 FR3，制作了 2 个编码 FR3 的 DNA 引物。FR 改组引物 F3VHS (序列号 47) 含有有意义 DNA 序列，F3VHA (序列号 48) 含有反意义 DNA 序列，引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。F3EPS、F3EPA、F3PrS、F3PrA、F3VHS 和 F3VHA

是由 Pharmacia Biotech 合成的。

PCR 使用 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造), 向 100 μ l 反应混合液加入 1 μ M 的 FR 改组引物 F3EPS 和 F3EPA, 或 F3VHS 和 F3VHA 各 5 μ l, 于 0.2mM dNTPs、1.0mM MgCl₂、2.5U 的 KOD DNA 聚合酶的条件下, 使用附带的缓冲液, 进行 5 次循环, 每一温度循环为: 94 $^{\circ}$ C 30 秒钟、50 $^{\circ}$ C 1 分钟、74 $^{\circ}$ C 1 分钟。再加入 100 pmole 的外部引物 F3PrS、F3PrA, 进行 25 次同样的温度循环。

通过使用了 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离经 PCR 扩增的 DNA 片段。切出含有 424bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片, 添加 3 倍量的 TE (ml/g), 经酚萃取、酚·氯仿萃取、氯仿萃取纯化 DNA 片段。纯化的 DNA 用乙醇沉淀后, 其中的三分之一溶解于 14 μ l 水中。得到的 PCR 反应混合物经 Ball 和 NcoI 消化, 然后导入经 Ball 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) 中, 确定碱基序列。

含有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5 Hvd/ CVIDEC 和 hATR5Hve/CVIDEC。序列号 49 给出了 hATR5 Hvd/ CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本 “d” 的碱基序列和相应的氨基酸序列, 序列号 50 给出了版本 “d” 的氨基酸序列, 序列号 51 给出了 hATR5Hve/CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本 “e” 的碱基序列和相应的氨基酸序列。序列号 52 给出了版本 “e” 的氨基酸序列。

(iv) 同源化 H 链版本 “f” 和 “g” 的构建

版本 “f” 和 “g” 是通过 FR 改组法将版本 “a” 的 FR3 置换为来自其它抗体的 FR3 制作的。为了在制作版本 “f” 时置换为来自人抗体 L04345 (DDBJ、Hillson JL., 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 178, 331-336, 1993) 的 FR3, 在制作版本 “g” 时置换为来自人抗体 S78322 (DDBJ、Bejcek BE. 等, 癌症研究 (Cancer Res.), 55, 2346-2351, 1995) 的 FR3, 各合成了两个编码 FR3 的 DNA 引物。版本 “f” FR 改组引物 F3SSS (序列号 53) 含有有意义 DNA 序列, F3SSA (序列号 54) 含有反意义 DNA 序列, 引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。



版本“g”FR改组引物 F3CDS (序列号 55) 含有有意义 DNA 序列, F3CDA (序列号 56) 含有反意义 DNA 序列, 引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。F3SSS、F3SSA、F3CDS、F3CDA 是由 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。PCR 使用 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造), 向 100 μ l 反应混合液中加入 1 μ M 的 FR 改组引物 F3SSS 和 F3SSA, 或 F3CDS 和 F3CDA 各 5 μ l, 于含有 0.2mM dNTPs、1.0mM MgCl₂、2.5U 的 KOD DNA 聚合酶的条件下, 使用附带的缓冲液, 进行 5 次循环, 每一温度循环为: 94 $^{\circ}$ C 30 秒钟、50 $^{\circ}$ C 1 分钟、74 $^{\circ}$ C 1 分钟。再加入 100 pmole 的外部引物 F3PrS、F3PrA, 进行 25 次同样的温度循环。

通过使用了 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离经 PCR 扩增的 DNA 片段。切出含有大约 424bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片, 添加 3 倍量 (ml/g) 的 TE, 经酚萃取、酚·氯仿萃取、氯仿萃取纯化 DNA 片段。纯化的 DNA 用乙醇沉淀后, 其中的三分之一溶解于 14 μ l 水中。得到的 PCR 反应混合物经 Ball 和 NcoI 消化, 然后导入经 Ball 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/ CVIDEC (Ball/NcoI) 中, 确定碱基序列。

具有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hvf/CVIDEC 和 hATR5Hvg/CVIDEC。序列号 57 和 58 给出了质粒 hATR5Hvf/CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本“f”的碱基序列和对应的氨基酸序列以及版本“f”的氨基酸序列。序列号 59、60 给出了 hATR5Hvg/CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本“g”的碱基序列和对应的氨基酸序列和版本“g”的氨基酸序列。

(v) 同源化 H 链版本“h”的构建

版本“h”是通过 FR 改组法将版本“a”的 FR3 置换为来自其它抗体的 FR3 制作的。在制作版本“h”时, 为了置换为来自人抗体 Z26827 (DDBJ、Van Der Stoep 等, 实验医学杂志 (J. Exp. Med.), 177, 99-107, 1993) 的 FR3, 各合成了两个编码 FR3 的 DNA 引物。版本“h”FR 改组引物 F3ADS (序列号 61) 含有有意义 DNA 序列, F3ADA (序列号 62) 含有反意义 DNA 序列, 引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。

F3ADS 和 F3ADA 是由 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。PCR 使用 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造), 向 100 μ l 反应混合液加入 1 μ M 的 FR 改组引物 F3ADS 和 F3ADA, 各 5 μ l, 在含有 0.2mM dNTPs、1.0mM MgCl₂、2.5U 的 KOD DNA 聚合酶的条件下, 使用附带的缓冲液, 进行 5 次循环, 每一温度循环为: 94 $^{\circ}$ C 30 秒钟、50 $^{\circ}$ C 1 分钟、74 $^{\circ}$ C 1 分钟。然后再加入 100 pmole 的外部引物 F3PrS、F3PrA, 进行 25 次同样的温度循环。通过使用了 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离经 PCR 扩增的 DNA 片段。

切出含有 424bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片, 添加 3 倍量 (ml/g) 的 TE, 经酚萃取、酚·氯仿萃取、氯仿萃取纯化 DNA 片段。纯化的 DNA 用乙醇沉淀后, 其中的三分之一溶解于 14 μ l 水中。得到的 PCR 反应混合物经 Ball 和 NcoI 消化, 然后导入经 Ball 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) 中, 确定碱基序列。具有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hvh/CVIDEC。序列号 63 给出了 hATR5Hvh/CVIDEC 中含有的人源化 H 链版本“h”的碱基序列和对应的氨基酸序列。而序列号 64 给出了版本“h”的氨基酸序列。

(vi) 人源化 H 链版本“i”和“j”的构建

版本“i”和“j”是通过 FR 改组法将版本“a”的 FR3 置换为来自其它抗体的 FR3 制作的。在制作版本“i”时, 为了置换为来自人抗体 U95239 (DDBJ、Manheimer-Lory AJ., 未出版) 的 FR3, 在制作版本“j”时为了置换为来自人抗体 L03147 (DDBJ、Collet TA. 等, 美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 89, 10026-10030, 1992) 的 FR3, 各合成了两个编码 FR3 的 DNA 引物。版本“i”FR 改组引物 F3MMS (序列号 65) 含有有意义 DNA 序列, F3MMA (序列号 66) 含有反意义 DNA 序列, 引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。

版本“j”FR 改组引物 F3BMS (序列号 67) 含有有意义 DNA 序列, F3BMA (序列号 68) 含有反意义 DNA 序列, 引物的 3' 末端含有 18bp 的互补序列。F3MMS、F3MMA、F3BMS、F3BMA 是由 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。PCR 使用 Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer), 向

100 μ l 反应混合液中加入 1 μ M 的 FR 改组引物 F3MMS 和 F3MMA、或 F3BMS 和 F3BMA 各 5 μ l。在含有 0.2mM dNTPs、1.5mM MgCl₂、2.5U 的 Amplo Taq Gold 的条件下，使用附带的缓冲液，进行 5 次循环，每一温度循环为：94 $^{\circ}$ C 30 秒钟、50 $^{\circ}$ C 1 分钟、74 $^{\circ}$ C 1 分钟。然后再加入 100 pmole 的外部引物 F3PrS、F3PrA，进行 25 次同样的温度循环。

通过使用了 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离经 PCR 扩增的 DNA 片段。切出含有 424bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片，添加 3 倍量 (ml/g) 的 TE，经酚萃取、酚·氯仿萃取、氯仿萃取纯化 DNA 片段。纯化的 DNA 用乙醇沉淀后，其中的三分之一溶解于 14 μ l 水中。得到的 PCR 反应混合物经 Ball 和 NcoI 消化，然后导入经 Ball 和 NcoI 消化制备的质粒 hATR5Hva/CVIDEC (Ball/NcoI) 中，确定碱基序列。

具有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hvi/CVIDEC 和 hATR5Hvj/CVIDEC。序列号 69 和 70 给出了 hATR5Hvi/CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本“i”的碱基序列和对应的氨基酸序列以及版本“i”的氨基酸序列。序列号 71 和 72 给出了 hATR5Hvj/CVIDEC 中含有的同源化 H 链版本“j”的碱基序列和对应的氨基酸序列和版本“j”的氨基酸序列。

(vii) 同源化 H 链版本“b1”和“d1”的构建

版本“b1”和“d1”是通过 FR 改组法将版本“b”和“d”的 FR2 置换为来自其它抗体的 FR2 制作的。为了置换为来自人抗体 P01742 (SwiSS-PROT, Cunningham BA. 等人, 生物化学 (Biochemistry), 9, 3161-3170, 1970) 的 FR2, 制作了二个编码 FR2 的 DNA 引物。FR 改组引物 F2MPS (序列号 73) 含有有意义 DNA 序列, F2MPA (序列号 74) 含有反意义 DNA 序列, 而相互具有互补序列, 两端含有 EcoT221 和 Ball 的识别序列。

F2MPS、F2MPA 是由 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。使 F2MPS 和 F2MPA 退火, 用 EcoT221 和 Ball 消化。将它们导入通过 EcoT221 和 Ball 消化制备的质粒 hATR5Hvb/CVIDEC (EcoT221/Ball) 和 hATR5Hvd/CVIDEC (EcoT221/Ball), 确定碱基序列。具有正确碱基序列的质

粒命名为 hATR5 Hvb1/ CVIDEC 和 hATR5 Hvd1/ CVIDEC。序列号 75 和 76 给出了质粒 hATR5 Hvb1/ CVIDEC 中包含的人源化 H 链版本“b1”的碱基序列以及对应的氨基酸序列以及版本“b1”的氨基酸序列。序列号 77 和 78 给出了质粒 hATR5 Hvd1/ CVIDEC 中包含的人源化 H 链版本“d1”的碱基序列以及对应的氨基酸序列以及版本“d1”的氨基酸序列。

(viii) 人源化 H 链版本“b3”和“d3”的构建

版本“b3”和“d3”是通过 FR 改组法将版本“b”和“d”的 FR2 置换为来自其它抗体的 FR2 制作的。为了置换为来自人抗体 Z80844 (DDBJ, Thomsett AR. 等人, 未出版) 的 FR2, 制作了二个编码 FR2 的 DNA 引物。FR 改组引物 F2VHS (序列号 79) 含有有意义 DNA 序列, F2VHA (序列号 80) 含有反意义 DNA 序列, 相互具有互补序列, 两端含有 EcoT221 和 Ball 的识别序列。F2VHS、F2VHA 是委托 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。

使 F2VHS 和 F2VHA 退火, 用 EcoT221 和 Ball 消化。将它们导入通过 EcoT221 和 Ball 消化制备的质粒 hATR5Hvb/CVIDEC (EcoT221/Ball) 和 hATR5 Hvd/ CVIDEC (EcoT221/Ball) 中, 确定碱基序列。具有正确碱基序列的质粒命名为 hATR5Hvb3/CVIDEC 和 hATR5Hvd3/CVIDEC。序列号 81 和 82 给出了质粒 hATR5Hvb3/CVIDEC 中包含的人源化 H 链版本“b3”的碱基序列以及对应的氨基酸序列以及版本“b3”的氨基酸序列。序列号 83 和 84 给出了质粒 hATR5Hvd3/CVIDEC 中包含的人源化 H 链版本“d3”的碱基序列以及对应的氨基酸序列以及版本“d3”的氨基酸序列。

(2) 人源化抗体 L 链 V 区的构建

(i) 版本“a”

通过采用 PCR 法的 CDR 移植制作人源化 ATR-5 抗体 L 链。为了制作含有来自人抗体 Z37322 (DDBJ, Welschof M 等人, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods) 179, 203-214, 1995) 的框架区的人源化抗体 L 链 (版本“a”), 使用了 7 个 PCR 引物。

CDR 移植引物 h5Lv1S (序列号 85) 和 h5Lv4S (序列号 86) 含有有意义 DNA 序列, 而 CDR 移植引物 h5Lv2A (序列号 87)、h5Lv3A (序列号 88) 和 h5Lv5A (序列号 89) 含有反意义 DNA 序列, 而且各个引物的两端含有 20bp 的互补序列。外部引物 h5LvS (序列号 90) 与 h5LvA (序列号 91) 与 CDR 移植引物 h5Lv1S 和 h5Lv5A 具有同源性。CDR 移植引物 h5Lv1S、h5Lv4S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv5A、h5LvS 和 h5LvA 是委托 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。

PCR 溶液, 100 μ l 中含有 120mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM KCl、6mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、0.2mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1mM MgCl_2 、2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶 (东洋纺织制造)、5pmole 的 CDR 移植引物 h5Lv1S、h5Lv2A、h5Lv3A、h5Lv4S、h5Lv5A。

PCR 使用热循环仪 480 (Perkin-Elmer), 通过 5 次循环, 每一温度循环为: 94 $^\circ\text{C}$ 30 秒钟、50 $^\circ\text{C}$ 1 分钟、74 $^\circ\text{C}$ 1 分钟, 对 5 条 CDR 移植引物进行组装。然后向该反应混合液中加入 100 pmole 的外部引物 h5LvS 和 h5LvA, 进行 25 次温度循环, 每一温度循环为: 94 $^\circ\text{C}$ 30 秒钟、52 $^\circ\text{C}$ 1 分钟、72 $^\circ\text{C}$ 1 分钟, 扩增制备的 DNA 片段。

通过使用了 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 反应混合液, 切出含有大约 400bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片, 用酚以及氯仿萃取琼脂糖凝胶片、用乙醇沉淀回收的 DNA。回收的 DNA 片段经 SphI 和 BglII 于 37 $^\circ\text{C}$ 下, 消化 4 小时。该消化混合物用酚及氯仿萃取, DNA 片段用乙醇沉淀后, 溶解于 10 μ l TE 中。使用 DNA 连接酶试剂盒 ver. 2 (宝酒造), 使含有上述那样制备的编码人源化抗体 L 链 V 区的基因的 SphI - BglII DNA 片段与经 SphI 和 BglII 消化制备的 CVIDEC 载体, 按照附带的处方于 16 $^\circ\text{C}$ 下使其反应 1 小时, 进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μ l 中, 冰上静置 30 分钟, 42 $^\circ\text{C}$ 静置 1 分钟。然后加入 300 μ l 的 Hi-Competence Broth (Nippongene), 于 37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 小时后, 将该大肠杆

菌涂在 100 μ g/ml LBA 琼脂培养基上，于 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜，用 QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。

质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)，通过 DNA 测序仪 373A (Perkin-Elmer) 确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物 M4 (宝酒造) 和 M13 引物 RV (宝酒造)，通过确认两个方向的碱基序列确定序列。含有编码该人源化抗体 L 链 V 区的基因，在 5' 端带有 BglII 识别序列和 Kozak 序列，3' 端带有 SplI 识别序列的质粒命名为 hATR5Lva/CVIDEC。序列号 92 给出了人源化 L 链版本“a”的碱基序列 (含有对应的氨基酸序列)。而序列号 93 为版本“a”的氨基酸序列。

(ii) 版本“b”和“c”

版本“b”和“c”是通过置换 (FR 改组) 版本“a”的 FR3 制作的。在制作版本“b”时，使用了来自人抗体 S68699 (DDBJ、Hougs L 等人，实验与临床免疫遗传学 (Exp. Clin. Immunogenet.) 10, 141-151, 1993) 的 FR3，在制作版本“c”时，使用了来自人抗体 P011607 (SWISS-PROT、Epp O 等人，生物化学 (Biochemistry) 14, 4943-4952, 1975) 的 FR3。

编码版本“b”的 FR3 的引物 F3SS (序列号 94) 和 F3SA (序列号 95)，或编码版本“c”的 FR3 的引物 F3RS (序列号 96) 和 F3RA (序列号 97) 相互含有互补序列，两端带有限制酶 KpnI 和 PstI 的识别序列。F3SS、F3SA、F3RS、F3RA 是委托 Pharmacia Biotech 合成和纯化的。将各 100pmole 的 F3SS 和 F3SA、或 F3RS 和 F3RA，通过于 96 $^{\circ}$ C 下处理 2 分钟，50 $^{\circ}$ C 下处理 2 分钟，使其退火，制作双链 DNA 片段。

该双链 DNA 片段先经限制酶 KpnI (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时，然后再经 PstI (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时。该消化混合物用酚及氯仿萃取，DNA 片段用乙醇沉淀后，溶解于 TE 中。

质粒 hATR5Lva/CVIDEC 先经限制酶 KpnI (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时，然后再经 PstI (宝酒造) 于 37 $^{\circ}$ C 消化 1 小时。该消化混合物通过使用了 1.5% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝

胶电泳分离，切出含有大约 3000bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片，用酚以及氯仿萃取琼脂糖凝胶片、用乙醇使 DNA 片段沉淀后，溶解于 TE 中。

使用 DNA 连接酶试剂盒 ver. 2 (宝酒造)，使含有上述那样制备的编码版本“b”或“c”的 FR 的 KpnI - PstI DNA 片段与经 KpnI 和 PstI 消化除去 FR3 的 hATR5Lva/CVIDEC 载体，按照附带的处方于 16℃ 下使其反应 1 小时，进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μl 中，冰上静置 30 分钟，42℃ 静置 1 分钟。然后加入 300 μl 的 Hi-Competence Broth (Nippongene)，于 37℃ 培养 1 小时后，将该大肠杆菌涂在 100 μg/ml LBA 琼脂培养基上，于 37℃ 下培养过夜，得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37℃ 培养过夜，用 QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。

质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)，通过 DNA 测序仪 373A (Perkin-Elmer) 确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物 M4 (宝酒造) 和 M13 引物 RV (宝酒造)，通过确认两个方向的碱基序列确定序列。

含有编码置换了这些人源化抗体 L 链版本“a”的 FR3 的版本“b”或“c”的基因的质粒分别命名为 hATR5Lvb/CVIDEC、hATR5Lvc/CVIDEC。序列号 98、99 给出了质粒 hATR5Lvb/CVIDEC 中含有的人源化 L 链版本“b”的碱基序列以及对应的氨基酸序列和版本“b”的氨基酸序列。序列号 100、101 给出了质粒 hATR5Lvc/CVIDEC 中含有的人源化 L 链版本“c”的碱基序列以及对应的氨基酸序列和版本“c”的氨基酸序列。

(iii) 版本“b1”和“b2”

版本“b1”和“b2”是通过置换版本“b”的 FR2 制作的。在制作版本“b1”时，使用了来自人抗体 S65921 (DDBJ, Tonge DW 等, 免疫学年鉴 (Year Immunol.) 7, 52-62, 1993) 的 FR2，在制作版本“b2”时，

使用了来自人抗体 X93625 (DDBJ, Cox JP 等人, 欧洲免疫学杂志 (Eur. J. Immunol.) 24, 827-836, 1994) 的 FR2。

编码版本“b1”的 FR2 的引物 F2SS (序列号 102) 和 F2SA (序列号 103), 或编码版本“b2”的 FR2 的引物 F2XS (序列号 104) 和 F2XA (序列号 105) 相互含有互补序列, 两端带有 Afl I 和 SpeI 的识别序列。F2SS、F2SA、F2XS、F2XA 是由 Pharmacia Biotech 合成。将各 100pmole 的 F2SS 和 F2SA、或 F2XS 和 F2XA, 于 96℃ 下处理 2 分钟, 50℃ 下处理 2 分钟, 使其退火, 制作双链 DNA 片段。

该双链 DNA 片段经限制酶 Afl II (宝酒造) 以及 SpeI (宝酒造) 于 37℃ 消化 1 小时。该消化混合物用酚及氯仿萃取, DNA 片段用乙醇沉淀后, 溶解于 TE 中。

质粒 hATR5Lvb/CVIDEC 经限制酶 Afl II (宝酒造) 以及 SpeI (宝酒造) 于 37℃ 消化 1 小时。该消化混合物通过使用了 1.5% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切出含有大约 3000bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片, 用酚以及氯仿萃取琼脂糖凝胶片、用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 TE 中。

使用 DNA 连接酶试剂盒 ver. 2 (宝酒造), 使含有上述那样制备的编码版本“b1”或“b2”的 FR2 的 Afl II - SpeI DNA 片段与经 AflII 以及 SpeI 消化除去 FR2 的 hATR5Lvb/CVIDEC 载体, 按照附带的处方于 16℃ 下使其反应 1 小时, 进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μl 中, 冰上静置 30 分钟, 42℃ 静置 1 分钟。然后加入 300 μl 的 Hi-Competence Broth (Nippongene), 于 37℃ 培养 1 小时后, 将该大肠杆菌涂在 100 μg/ml LBA 琼脂培养基上, 于 37℃ 下培养过夜, 得到大肠杆菌转化体。将该转化体在 3ml 的 LBA 培养基中于 37℃ 培养过夜, 用 QIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。

质粒中的 cDNA 编码区的碱基序列使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer), 通过 DNA 测序仪 373A (Perkin-Elmer) 确定。作为确定序列用的引物使用 M13 引物

M4 (宝酒造) 和 M13 引物 RV (宝酒造), 通过确认两个方向的碱基序列确定序列。

含有编码置换了这些人源化抗体 L 链版本 “b” 的 FR2 的版本 “b1” 或 “b2” 的基因的质粒分别命名为 hATR5Lvb1/CVIDEC、hATR5Lvb2/CVIDEC。序列号 106、107 给出了质粒 hATR5Lvb1/CVIDEC 中含有的 人源化 L 链版本 “b” 的碱基序列以及对应的氨基酸序列和版本 “b1” 的氨基酸序列。序列号 108、109 给出了质粒 hATR5Lvb2/CVIDEC 中含有的 人源化 L 链版本 “b2” 的碱基序列以及对应的氨基酸序列和版本 “b2” 的氨基酸序列。

(3) 人源化抗体表达载体的构建

(i) 人源化 H 链与嵌合 L 链的组合

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hva/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的 chATR-5 抗体表达质粒载体 chATR5/N5KG4P 制备的 chATR5/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHva-chLv/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的 chATR-5 抗体表达质粒载体 chATR5/N5KG4P 制备的 chATR5/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvb-chLv/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvc/CVIDEC、hATR5Hvd/CVIDEC 和 hATR5Lve/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA, 导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的 chATR-5 抗体表达质粒载体 chATR5/N5KG4P 制备的 chATR5/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒分别命名为 hHvc-chLv/N5KG4P、hHvd-chLv/N5KG4P、hHve-chLv/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvf/CVIDEC 和 hATR5Hvh/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA, 导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的 chATR-5 抗体表达质粒载体 chATR5/N5KG4P 制备的 chATR5/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒分别命名为 hHvf-

chLv/N5KG4P 和 hHvh-chLv/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvi/CVIDEC 及 hATR5Hvj/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA, 导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的 chATR-5 抗体表达质粒载体 chATR5/N5KG4P 制备的 chATR5/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒分别命名为 hHvi-chLv/N5KG4P 和 hHvj-chLv/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb1/CVIDEC 和 hATR5Hvd1/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA, 导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的 chATR-5 抗体表达质粒载体 chATR5/N5KG4P 制备的 chATR5/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒分别命名为 hHvb1-chLv/N5KG4P 和 hHvd1-chLv/N5KG4P。

(ii) 人源化 L 链和嵌合 H 链的组合

用抗体表达载体 N5KG4P, 通过与嵌合 H 链组合使人源化抗体表达, 进行人源化 L 链的评价。

质粒 hATR5Lva/CVIDEC、hATR5Lvb/CVIDEC、hATR5Lvc/CVIDEC、hATR5Lvb1/CVIDEC、hATR5Lvb2/CVIDEC 用限制酶 *BglII* (宝酒造) 及 *SplII* (宝酒造) 于 37℃ 消化 2~3 小时。该消化混合物通过使用了 1.5% 或 2% 的 NuSieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切出含有大约 400bp 长的 DNA 片段的琼脂糖凝胶片, 用酚以及氯仿萃取琼脂糖凝胶片、用乙醇使 DNA 片段沉淀后, 溶解于 TE 中。

使用 DNA 连接酶试剂盒 ver. 2 (宝酒造), 使含有编码上述各个版本人源化 L 链 V 区基因的 *SplII*-*BglIII* DNA 片段与经 *SplII* 以及 *BglIII* 消化的 chATR5Hv/ N5KG4P, 按照附带的处方于 16℃ 下使其反应 1 小时, 进行连接。

将该连接混合物加入到大肠杆菌 JM109 感受态细胞 (Nippongene) 100 μl 中, 冰上静置 30 分钟, 42℃ 静置 1 分钟。然后加入 300 μl 的 Hi-Competence Broth (Nippongene), 于 37℃ 培养 1 小时后, 将该大肠杆菌涂在 100 μg/ml LBA 琼脂培养基上, 于 37℃ 下培养过夜, 得到大肠杆

菌转化体。

将该转化体在 250ml 或 500ml 的 LBA 培养基中于 37℃ 培养过夜，用 Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) 从菌体级分制备质粒 DNA。导入了编码这些嵌合 H 链和人源化 L 链的基因的质粒分别命名为 chHv-hLva/N5KG4P、chHv-hLvb/N5KG4P、chHv-hLvc/N5KG4P、chHv-hLvb1/N5KG4P 和 chHv-hLvb2/N5KG4P。

(iii) 人源化 H 链和人源化 L 链的组合

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hva/CVIDEC，回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段，导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本“a”cDNA 序列的质粒 chHv-hLva/N5KG4P 制备的 hLva/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHva-hLva/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb/CVIDEC 及 hATR5Hvc/CVIDEC，回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段，导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本“a”cDNA 序列的质粒 chHv-hLva/N5KG4P 制备的 hLva/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvb-hLva/N5KG4P 和 hHvc-hLva/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb/CVIDEC、hATR5Hvd/CVIDEC 和 hATR5Hve/CVIDEC，回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段，导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本“b”cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb/N5KG4P 制备的 hLvb/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvb-hLvb/N5KG4P、hHvd-hLvb/N5KG4P 和 hHve-hLvb/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *SalI* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvf/CVIDEC、hATR5Hvg/CVIDEC 和 hATR5Hvh/CVIDEC，回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段，导入经 *NheI* 和 *SalI* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本“b”cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb/N5KG4P 制备的 hLvb/N5KG4P (*SalI*/*NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvf-hLvb/N5KG4P、hHvg-hLvb/N5KG4P 和 hHvh-hLvb/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *Sall* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvi/CVIDEC 和 hATR5Hvj/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *Sall* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本 “b” cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb/N5KG4P 制备的 hLvb/ N5KG4P (*Sall*/ *NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvi-hLvb/N5KG4P 和 hHvj-hLvb/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *Sall* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb1/CVIDEC 和 hATR5Hd1/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *Sall* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本 “b” cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb/N5KG4P 制备的 hLvb/ N5KG4P (*Sall*/ *NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvb1-hLvb/N5KG4P 和 hHvd1-hLvb/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *Sall* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb3/CVIDEC 和 hATR5Hd3/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *Sall* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本 “b” cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb/N5KG4P 制备的 hLvb/ N5KG4P (*Sall*/ *NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvb3-hLvb/N5KG4P 和 hHvd3-hLvb/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *Sall* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvb/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *Sall* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本 “b1” 和 “b2” cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb1/N5KG4P 和 chHv-hLvb2/N5KG4P 制备的 hLvb1/N5KG4P (*Sall*/ *NheI*) 和 hLvb2/N5KG4P (*Sall*/ *NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvb-hLvb1/N5KG4P 和 hHvb-hLvb2/N5KG4P。

用 *NheI* 和 *Sall* 消化含有 H 链 V 区的质粒 hATR5Hvi/CVIDEC, 回收人源化 H 链 V 区的 cDNA 片段, 导入经 *NheI* 和 *Sall* 消化的含有人源化 chATR-5 抗体 L 链版本 “b1” 和 “b2” cDNA 序列的质粒 chHv-hLvb1/N5KG4P 和 chHv-hLvb2/N5KG4P 制备的 hLvb1/N5KG4P (*Sall*/ *NheI*) 和 hLvb2/N5KG4P (*Sall*/ *NheI*)。这样制作的质粒命名为 hHvi-hLvb1/N5KG4P 和 hHvi-hLvb2/N5KG4P。

(4) 转染 COS-7 细胞

为了评价人源化抗体的抗原结合活性和中和活性, 使上述表达质粒在

COS-7 细胞中瞬时表达。

利用 Gene Pulser 装置 (Bio-Rad) 通过电穿孔将构建的表达质粒载体导入 COS-7 细胞。向悬浮在 PBS 中的 0.78ml COS-7 细胞 (细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$) 加入质粒 50 μg 或 20 μg , 以 1500V, 25 μF 的静电容量加脉冲。

于室温下经 10 分钟恢复期后, 将电穿孔处理的细胞悬浮于含有 5% Ultra Low IgG 胎牛血清 (GIBCO) 的 DMEM 培养基 (GIBCO), 使用 10cm 培养皿或 15cm 培养皿, 于 CO_2 培养箱中培养。经 24 小时培养后, 抽滤除去培养上清, 加入新的无血清培养基 HBCHO (ア-バインサイエンティフィック)。再培养 72 小时或 96 小时后, 收集上清, 经离心分离除去细胞碎片。

(5) 抗体的纯化

使用 AffiGel Protein A MAPSII 试剂盒 (Bio-Rad) 或 rProtein A Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) 从 COS-7 细胞的培养上清纯化抗体。使用 AffiGel Protein A MAPSII 试剂盒的纯化按照试剂盒附带的处方进行。使用 rProtein A Sepharose Fast Flow 的纯化按如下操作进行。

将 1ml 的 rProtein A Sepharose Fast Flow 填充到柱子中, 用 10 倍量的 TBS 洗使柱子平衡。将 COS-7 细胞的培养上清加到已平衡好的柱子上, 用 10 倍量的 TBS 洗柱子。接下来用 13.5ml 的 2.5mM HCl (pH3.0) 洗, 将吸附的抗体级分从柱子中洗脱下来, 马上加 1.5ml 的 1M Tris-HCl (pH8.0) 中和洗脱液。

就纯化的抗体级分用 centrprep30 或 100 (Amicon) 进行 2~3 次超滤, 将溶剂置换为 TBS, 最终浓缩到大约 1.5ml。

实施例 4. 抗体的定量和活性评价

(1) 利用 ELISA 测定抗体浓度

抗体浓度测定用的 ELISA 板按如下操作制备。对 ELISA 用 96 孔板 (Maxisorp, NUNC) 的各个孔用固相化缓冲液 (0.1M NaHCO_3 , 0.02% NaN_3 , pH9.6) (以下称为 CB) 配制成浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的山羊抗人

IgG 抗体 (BioSource) 100 μ l 进行固相化, 用 200 μ l 稀释的缓冲液 (50mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂, 0.1M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% NaN₃, 1% 牛血清白蛋白 (BSA), pH8.1) 封闭后, 将使抗体表达的 COS-7 细胞培养上清或纯化的抗体阶段稀释后加到各个孔中。

于室温培养 1 小时后, 用含有 0.05% Tween20 ダルベッコ PBS (以下称为 RB) 洗净后, 加入用 DB 稀释 1000 倍后的结合了碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource) 100 μ l。于室温培养 1 小时后, 用 DB 洗净后, 加入 Sigma104 (对硝基苯磷酸, SIGMA) 以浓度 1mg/ml 溶解于底物缓冲液 (50mM NaHCO₃, 10mM MgCl₂, pH9.8) 后配成的溶液 (以下称为底物溶液), 然后用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。作为浓度测定的标准可以用 IgG4 κ (The Binding Site)。

(2) 抗原结合能力的测定

按如下操作制备抗原结合测定用的 Cell ELISA 板。向细胞培养用 96 孔板中的 60 孔加入人膀胱癌细胞 J82 (ATCC HTB-1), 每孔细胞数为 1×10^6 个。然后将培养板置于 CO₂ 培养箱中培养一天 (含有 10% 胎牛血清 (GIBCO) 的 RPMI1640 培养基), 使细胞附着。倒掉培养基, 用 300 μ l 的 PBS 将各孔洗 2 次。向各孔加入 100 μ l 的含有 4% 的多聚甲醛的 PBS (以下称之 PFA/PBS), 静置于冰上 10 分钟, 使细胞固相化。

将 PFA/PBS 倒掉, 用 300 μ l 的 PBS 将各孔洗 2 次, 用 250 μ l 的 DB 进行封闭。然后向各孔加入用 DB 阶段稀释后的培养上清或纯化的抗体 100 μ l, 于室温培养 2 小时, 用 RB 洗净后, 加入 100 μ l 的用 DB 稀释 1000 倍的结合了碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource)。于室温下培养 1 小时, 用 RB 洗净后, 加入底物溶液, 然后用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。

(3) 中和活性的测定

小鼠抗体、嵌合抗体和人源化抗体的中和活性可以通过以来自人胎盘的凝血激酶、Thromborel S (Behringwerke AG) 对因子 Xa 的生成抑制活性为指标进行测定。即, 向 1.25mg/ml 的 Thromborel S 10 μ l 和稀释到适当浓度的抗体 10 μ l 中加入缓冲液 (含有 5mM CaCl₂, 0.1% 的 BSA

的 TBS) 60 μ l, 在 96 孔板中于室温反应 1 小时。然后分别加入 3.245 μ g/ml 的人因子 X (セルサス实验室) 和 82.5ng/ml 的人因子 VIIa (エンザイム・リサーチ) 10 μ l, 于室温反应 1 小时。

加入 10 μ l 的 0.5M EDTA 终止反应, 加入 50 μ l 发色底物溶液, 用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。没有加抗体的 1 小时的吸光度为活性 100%, 从各个吸光度变化算出残存活性 (%)。

发色底物溶液是按照附带的说明书溶解テストチーム发色底物 S-2222 (Chromogenix), 然后用精制水稀释 2 倍后, 以 1:1 比例与聚戊烯溶液 (0.6mg/ml ハキサジメチリンブロマイド、SIGMA) 混合制备的。

(4) 活性评价

(i) 人源化 H 链版本 “a” 和嵌合 L 链的组合

制作人源化 H 链版本 “a” 和嵌合 L 链组合的抗体 (a-ch), 通过 cell ELISA 研究抗原结合能力时发现, 抗体浓度高时, 对抗原的结合量降低 (图 1)。由于从 Fxa 产生抑制表现的抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体 (ch-ch) 比具有较弱的活性 (图 2)。因此人源化 H 链应当通过 FR 改组进行版本升级。这里所用的嵌合抗体是在 COS-7 细胞表达、纯化的抗体, 进行评价的抗体。

(ii) 人源化 L 链版本 “a” 和嵌合 H 链的组合

制作人源化 L 链版本 “a” 和嵌合 H 链组合的抗体 (ch-a), 通过 cell ELISA 研究抗原结合能力时, 确认具有嵌合抗体同等或以上的抗原结合能力 (图 1)。另外, 抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体比活性弱 (图 2)。因此人源化 L 链也应当通过 FR 改组进行版本升级。这里所用的嵌合抗体是在 COS-7 细胞表达、纯化的抗体, 进行评价的抗体。

(iii) 人源化 H 链版本 “a” 和人源化 L 链版本 “a” 的组合

制作人源化 H 链版本 “a” 和人源化 L 链版本 “a” 组合的抗体 (a-a), 通过 cell ELISA 研究抗原结合能力时, 抗体浓度高对抗原的结合量降低 (图 3)。另外, 由于从 Fxa 产生抑制表现的抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体比活性相当弱 (图 4)。因此人源化 H 链和 L 链也应当通过 FR

改组进行版本升级。这里所用的嵌合抗体是在 COS-7 细胞表达、纯化的抗体，进行了评价的抗体。

(iv) 人源化 H 链版本“b”、“c”以及“d”和人源化 L 链版本“a”的组合

通过 FR 改组制作使版本升级的人源化 H 链版本“a”和嵌合 L 链组合的抗体（分别为“b-ch”、“c-ch”和“d-ch”），通过 cell ELISA 研究抗原结合能力时，可以看到“d-ch”与嵌合抗体具有同等的抗原结合活性，而“b-ch”和“c-ch”表现出稍差的抗原结合活性（图 5, 6）。另外，抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体比“b-ch”大致相同，而“c-ch”和“d-ch”活性稍弱一些（图 7）。因此人源化 H 链版本“b”和“d”在人源化 H 链中被认为是表现高活性的版本。

(v) 人源化 H 链版本“b”和人源化 L 链版本“a”的组合

通过 FR 改组制作使版本升级的人源化 H 链版本“b”和人源化 L 链版本“a”组合的抗体（“b-a”），通过 cell ELISA 研究抗原结合能力时，抗体浓度高时，对抗原的结合量降低（图 5）。另外，抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体比，活性相当弱（图 8）。因此“b-a”是比“a-a”活性高的版本。而这里所用的嵌合抗体是在 COS-7 细胞表达、纯化的抗体，是进行了评价的抗体。

(vi) 人源化 L 链版本“b”、“c”和嵌合 H 链的组合

制作人源化 L 链版本“b”、“c”和嵌合 H 链组合的抗体（分别为“ch-b”“ch-c”）时，无论哪一种抗体都表现出与嵌合抗体同等活性（图 9 和 10）。因此版本“b”和“c”成了人源化抗体 L 链的候补。人们认为来自小鼠抗体的氨基酸残基数少一个的版本“b”在抗原性方面比版本“c”好。而这里所用的嵌合抗体是在 CHO 细胞 DG44 表达、纯化的抗体，进行了评价的抗体。在以下的评价中也用该抗体作为阳性对照。

(vii) 人源化 H 链版本“b”和人源化 L 链版本“b”以及“c”的组合

制作使人源化 H 链版本“b”与人源化 L 链版本“b”以及“c”组合的抗体（分别为“b-b”和“b-c”），测定抗原结合能力和抗原中和能力。无论那种抗体与抗原结合能力、抗原中和能力表现出的活性都比嵌合抗

体略差（图 11 和 12）。

（viii）人源化 H 链版本“b”以及“d”和人源化 L 链版本“b”的组合通过 FR 改组制作使版本升级的人源化 H 链和人源化 L 链版本“b”组合的抗体（分别为“b-b”和“d-b”），通过 cell ELISA 研究抗原结合能力时，可以看到“d-b”与嵌合抗体具有同等的抗原结合活性，而“b-b”在高浓度时表现出稍差的抗原结合活性（图 13）。另外，抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体比，“b-b”活性稍弱，而“d-b”与嵌合抗体相比活性相当弱（图 14）。因此可见“b-b”是抗原活性中和能力高的版本，而“d-b”是抗原结合能力高的版本。

（ix）人源化 H 链版本“e”与嵌合 L 链和人源化 L 链版本“b”的组合制作人源化 L 链版本“e”和嵌合 L 链以及人源化版本“b”组合的抗体（分别为“e-ch”和“e-b”）时，“e-ch”与嵌合抗体具有同等的抗原结合活性，而“e-b”抗体表达量非常低、而且抗原结合能力几乎丧失（图 15）。另外，“e-ch”的抗原中和能力与阳性对照的嵌合抗体比活性相当弱（图 16）。因此人们认为 H 链版本“e”与 L 链版本“b”的组合效果差。

（x）人源化 H 链版本“f”、“g”和“h”与人源化 L 链版本“b”的组合

制作人源化 H 链版本“f”、“g”和“h”与人源化 L 链版本“b”组合的抗体（分别为“f-b”、“g-b”和“h-b”）时，“f-b”和“h-b”的抗体抗体表达量非常低。而虽然也制作了版本“f”、“h”与嵌合 L 链组合的抗体，但没有表达。“g-b”低浓度即达到饱和，表现的抗原结合能力比嵌合抗体弱（图 17）。而“g-b”的抗原中和能力与嵌合抗体比，活性相当弱（图 18）。

（xi）人源化 H 链版本“b1”和“d1”与人源化 L 链版本“b”的组合

制作人源化 H 链版本“b1”和“d1”与人源化 L 链版本“b”组合的抗体（分别为“b1-b”和“d1-b”）时，无论那种抗体几乎都没有表达。而虽然也制作了它们与嵌合 L 链组合的抗体，但没有表达。

（xii）人源化 H 链版本“b3”和“d3”与人源化 L 链版本“b”的组合

制作人源化 H 链版本“b3”和“d3”与人源化 L 链版本“b”组合的抗体（分别为“b3-b”和“d3-b”）时，“d3-b”的抗原结合能力比嵌合抗体稍差，“b3-b”的抗原结合能力比嵌合抗体更差（图 19）。“b3-b”的抗原中和能力比“b-b”活性高，但不及嵌合抗体的活性，“d3-b”与“b-b”具有同等程度的活性（图 20）。

(xiii) 人源化 H 链版本“i”和“j”与嵌合 L 链以及人源化 L 链版本“b”的组合

制作人源化 H 链版本“i”和“j”与嵌合 L 链版本“b”组合的抗体（分别为“i-ch”和“j-ch”）、与人源化版本“b”组合的抗体（分别为“i-b”和“j-b”），测定抗原结合能力和抗原中和能力。无论那种抗体都表现出与嵌合抗体具有几乎同等的抗原结合活性（图 21、22）。可以确认“i-ch”具有比嵌合抗体活性高的抗原中和能力，“j-ch”的抗原中和能力的活性比嵌合抗体弱得多（图 23）。“i-b”与嵌合抗体具有同等程度的活性，而“j-b”与嵌合抗体比活性弱得多（图 24）。

(xiv) 人源化 H 链版本“b1”和“b2”

制作人源化 L 链版本“b1”和“b2”与嵌合 H 链组合的抗体（分别为“ch-b1”和“ch-b2”）、时，无论那种抗体都表现出与嵌合抗体具有同等的抗原结合活性（图 25）。关于抗原结合能力，“ch-b1”表现出与嵌合抗体同等的活性，而“ch-b2”在高浓度一侧可以看到一定程度超过嵌合抗体的活性（图 26）。版本“b1”和“b2”都可以成为人源化抗体 L 链的候补，但在具有更高活性这一点看，版本“b2”更好。

(xv) 人源化 H 链版本“b”和人源化 L 链版本“b2”的组合

制作人源化 H 链版本“b”和与人源化版本“b2”组合的抗体（“b-b2”），测定抗原结合能力和抗原中和能力。抗原结合能力比嵌合抗体稍差（图 27）。抗原中和能力超过“b-b”，不及“i-b”的活性（图 28）。

(xvi) 人源化 H 链版本“i”和人源化 L 链版本“b1”或“b2”的组合

制作人源化 H 链版本“i”与人源化 L 链版本“b1”或“b2”组合的抗体（分别为“i-b1”和“i-b2”），测定了抗原结合能力和抗原中和能力。“i-b2”的抗原结合能力大致与嵌合抗体同等，而“i-b1”稍差（图

29)。而“i-b1”和“i-b2”的抗原中和能力，其活性超过嵌合抗体和“i-b”，二者的强弱次序为“i-b2” > “i-b1”（图 30）。

实施例 5. CHO 细胞产生人源化抗体的制作和活性评价

（1）CHO 稳定产生细胞株的确立

为了确立稳定产生人源化抗体（b-b、i-b 和 I-b2）的细胞株，将抗体表达质粒导入于无血清培养基驯化的 CHO 细胞（DG44）中。

用限制酶 SspI（宝酒造）切质粒 DNA、hHvb-hLvb/N5KG4P、hHvi-hLvb/N5KG4P 和 hHvi-hLvb2/N5KG4P，使之成直链 DNA，用酚和氯仿萃取后，经乙醇沉淀回收 DNA。使用电穿孔装置（Gene Pulser；Bio Rad）将成直链的 DNA 导入 DG44 细胞。将 DG44 细胞悬浮于 PBS 中（细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ ），向大约 0.8ml 的该悬浮液中加入上述 DNA 10 ~ 50 μg ，以 1500V，25 μF 的静电容量加脉冲。

于室温下经 10 分钟恢复期后，将处理的细胞悬浮于含有次黄嘌呤、胸腺嘧啶脱氧核苷（GIBCO）（以下称为 HT）的 CHO-S-SFMII 培养基（GIBCO），然后加到 2 块 96 孔平底板（Falcon），每孔 100 μl ，在 CO_2 培养箱中培养。培养开始 8~9 小时后，加入含有 HT 和 1mg/ml 的 GENETICIN（GIBCO）的 CHO-S-SFMII 培养基（每孔 100 μl ），换成 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 GENETICIN 选择培养基，选择导入了抗体基因的细胞。每 3~4 日将 1/2 量的培养基换成新鲜的培养基，从换成选择培养基后大约 2 周的时间，其 4~5 日后回收观察到细胞正常增殖的孔的培养上清。通过上述的抗体浓度测定 ELISA 测定该培养上清中出现的抗体浓度，挑选出抗体产生量高的细胞。

（2）人源化抗体的大量纯化

将象上面那样挑选出的表达人源化抗体（“b-b”、“i-b”和“i-b2”）的 DG44 细胞株用 2L 摇瓶（CONING）在 500ml/瓶的 CHO-S-SFMII 培养基中培养数日后，回收培养液，加入新鲜的 CHO-S-SFMII 培养基，再培养。培养液通过离心分离除去细胞碎片，用 0.22 μm 或 0.4 μm 的过滤膜过滤。反复上述操作，分别得到总量约 2L 的培养上清。将得到的培养上清加到连有 Protein A 亲和柱（Poros）的 ConSep LC100 系

统 (Millipore) 纯化抗体。

(3) 通过 ELISA 测定抗体浓度

抗体浓度测定用的 ELISA 板按如下操作制备。向 ELISA 用 96 孔板 (例如 Maxisorp, NUNC) 的各个孔加入 CB 至浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource) $100 \mu\text{l}$ 进行固相化。用 $200 \mu\text{l}$ IDB 封闭后, 向各孔加入经 DB 阶段稀释的使抗体表达的 COS-7 细胞的培养上清或纯化的抗体。

于室温下培养 1 小时, 用 RB 洗净后, 然后加入用 DB 稀释了 1000 倍的结合了碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource) $100 \mu\text{l}$ 。于室温下培养 1 小时, 用 RB 洗净后, 加入 $100 \mu\text{l}$ 底物溶液, 然后用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。作为浓度测定的标准物可以用 IgG4 κ (The Binding Site)。

(4) 抗原结合能力的测定

按如下操作制备抗原结合测定用的 Cell ELISA 板。细胞使用人膀胱癌细胞 J82 (ATCC HTB-1)。将该细胞 1×10^6 个加入到细胞培养用 96 孔板中。然后将培养板置于 CO_2 培养箱中培养一天 (含有 10% 胎牛血清 (GIBCO) 的 RPMI1640 培养基), 使细胞铺满。将培养基倒掉, 用 PBS 将各孔洗 2 次。向各孔加入 $100 \mu\text{l}$ 的 PFA/PBS, 静置于冰上 10 分钟, 使细胞固相化。

将 PFA/PBS 倒掉, 用 $300 \mu\text{l}$ 的 PBS 将各孔洗 2 次, 用 $250 \mu\text{l}$ 的 DB 进行封闭。以上面测定结果为基础, 将纯化抗体从 $10 \mu\text{g/ml}$ 开始, 等比为 2 进行阶段稀释, 然后向各孔加入 $100 \mu\text{l}$ 稀释的抗体, 于室温培养 2 小时, 用 RB 洗净后, 加入 $100 \mu\text{l}$ 的用 DB 稀释 1000 倍的结合了碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG γ 抗体 (BioSource)。于室温下培养 1 小时, 用 RB 洗净后, 加入底物溶液 $100 \mu\text{l}$, 然后用微量板读数仪 (Bio-Rad) 测定 405/655nm 的吸光度。

(5) TF 中和活性 (抑制因子 Xa 产生的活性) 的测定

人源化抗体抑制因子 Xa 产生的活性可以通过以来自人胎盘的凝血激酶、Thromborel S (Behringwerke AG) 引起的抑制因子 Xa 产生的活性

为指标进行测定。即，向 5mg/ml 的 Thromborel S 10 μ l 和抗体 10 μ l 中加入缓冲液（含有 5mM CaCl₂、0.1% 的 BSA 的 TBS）60 μ l，在 96 孔板中于室温反应 1 小时。抗体用缓冲液从 200 μ g/ml 开始以公比为 5 那样进行阶段稀释。

然后分别加入 3.245 μ g/ml 的人因子 X（セルサス・ラボラトリーズ）和 82.5ng/ml 的人因子 VIIa（エンザイム・リサーチ）10 μ l，进一步于室温反应 45 分钟。加入 10 μ l 的 0.5MEDTA 终止反应。加入 50 μ l 发色底物溶液，用微量板读数仪（Bio-Rad）测定 405/655nm 的吸光度。于室温再反应 30 分钟，再次测定 405/655nm 的吸光度。以没有加抗体的 30 分钟吸光度为活性 100%，通过从各个吸光度变化算出残存活性（%）。

发色底物溶液是按照附带的说明书溶解テストチーム发色底物 S-2222（Chromogenix），以 1:1 比例与聚戊烯溶液（0.6mg/ml ハキサジメチリンブロマイド、SIGMA）混合制备的。

（6）TF 中和活性（因子 X 结合抑制活性）的测定

人源化抗体的因子 X 结合抑制活性是通过使用来自人胎盘的凝血激酶、Thromborel S（Behringwerke AG），预先形成 TF 和因子 VIIa 的复合物，以该复合物引起的因子 X 结合抑制活性为指标进行测定的。即，向 5mg/ml 的 Thromborel S 10 μ l 和 82.5ng/ml 的因子 VIIa（エンザイム・リサーチ）10 μ l 中加入缓冲液（含有 5mM CaCl₂、0.1% 的 BSA 的 TBS）60 μ l，在 96 孔板中于室温反应 1 小时。

加入抗体溶液 10 μ l，于室温下反应 5 分钟后，然后加入 3.245 μ g/ml 的人因子 X（セルサス・ラボラトリーズ）10 μ l，进一步于室温反应 45 分钟。而抗体溶液用缓冲液从 200 μ g/ml 开始以等比为 2 进行阶段稀释。加入 10 μ l 的 0.5M EDTA 终止反应。加入 50 μ l 发色底物溶液，用微量板读数仪（Bio-Rad）测定 405/655nm 的吸光度。于室温再反应 30 分钟，再次测定 405/655nm 的吸光度。以没有加抗体的 30 分钟内吸光度为活性 100%，通过从各个吸光度变化算出残存活性（%）。

发色底物溶液是按照附带的说明书溶解テストチーム发色底物 S-2222（Chromogenix），以 1:1 比例与聚戊烯溶液（0.6mg/ml ハキサジ

メチリンブロマイド、SIGMA) 混合制备的。

(7) TF 中和活性 (血浆凝固抑制活性) 的测定

人源化抗体的 TF 中和活性 (血浆凝固抑制活性) 是以使用来自人胎盘的凝血激酶、Thromborel S (Behringwerke AG) 的凝血酶原为指标进行测定的。即, 向样品杯中加入人血浆 (コスモ・バイオ) 100 μ l, 加入稀释为各种浓度的抗体 50 μ l, 于 37 $^{\circ}$ C 加温 3 分钟。然后加入预先于 37 $^{\circ}$ C 加温的 1.25mg/ml 的 Thromborel S 50 μ l, 使血浆开始凝固。该凝固时间通过连有 Amelung KC-10A (均自エム・シー・メディカル) 测定。

抗体用含有 0.1% 的 BSA 的 TBS (以下称为 BSA-TBS) 从 80 μ g/ml 开始以等比为 2 进行阶段稀释。以没加测定抗体的凝固时间为 100% 的 TG 血浆凝固活性, 通过画出 Thromborel S 浓度和凝固时间的检测曲线, 从添加了抗体时的各个凝固时间可以算出 TF 残存活性。

标准曲线是通过测定 Thromborel S 浓度和凝固时间作出的。向适当稀释的 Thromborel S 50 μ l 中加入 50 μ l 的 BSA-TBS, 于 37 $^{\circ}$ C 加温 3 分钟。然后加入预先于 37 $^{\circ}$ C 加温的人血浆 100 μ l, 开始凝固时开始测定凝固时间。Thromborel S 从 6.25 μ g/ml 开始以等比为 2 用含有 25mM 的 CaCl_2 のハックス缓冲液 (GIBCO) 阶段稀释。横轴为 Thromborel S 浓度, 纵轴为凝固时间作成对数图, 以此作为标准曲线。

(8) 活性评价

“b-b”、“i-b”和“i-b2”的人源化抗体都具有与嵌合抗体同等以上的活性 (图 31)。就因子 Xa 产生抑制活性、因子 X 结合抑制活性和血浆凝固抑制活性来说, “b-b”、“i-b”和“i-b2”的人源化抗体也都具有与嵌合抗体同等以上的活性, 按照“i-b2” > “i-b” > “b-b”的顺序活性依次增强 (图 32、33、34)。

实施例 6. 使用 BIACORE 对 TF 和抗 TF 抗体的相互作用中的反应动力学进行解析

利用 BIACORE 可以进行抗原抗体反应动力学的解析。将重组型蛋白 G 于传感器芯片固相化, 使抗体与它结合, 作为抗原可以使用纯化的重组型 TF (将 FLAG peptide tag 付在 1-219 上的可溶性 TF) (以下称为

可溶性 TF), 将制备成各种浓度的可溶性 TF 作为分析对象。通过从得到的传感图算出动力学参数 (解离速率常数 k_{diss} 和结合速率常数 k_{ass})。关于动力学的解析可以参考“采用新型的基于生物传感器的分析系统对单克隆抗体 - 抗原相互作用的动力学分析”“Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system” (Karlsson, R.等 (1991) 免疫法方法杂志 J. Immunol. Methods 145, 229-240.) 等文献。

(1) 蛋白 G 向传感器芯片的固相化

蛋白 G (ZYMED) 向传感器芯片 CM5 (BIACORE) 的固相化。

作为流动缓冲液使用 HBS - EP 缓冲液 (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mMEDTA, 0.05% 聚山梨醇酯 20 (v/v)) (BIACORE), 流速为 $5\mu\text{l}$ 。利用 $100\mu\text{l}$ 的 0.05M N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) / 0.2M 盐酸 N-乙基 - N' - (3 - 二甲基氨基丙基) - 碳二亚胺 (EDC) 的注入将传感器芯片 CM5 的羧甲基葡聚糖的羧基活化。然后注入 $10\mu\text{l}$ 的 $50\mu\text{g/ml}$ 蛋白 G, 反复进行 3 次进行固相化。蛋白 G 是通过溶解于 10mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 中使其浓度为 10mg/ml, 用 10mM 醋酸钠缓冲液 (pH4.0) 稀释成 $50\mu\text{g/ml}$ 来制备的。然后再注入 $100\mu\text{l}$ 的 1.0M 乙醇胺 - 盐酸 (pH8.5), 封闭过量的活性基团。再注入 $10\mu\text{l}$ 的 10mM 甘氨酸盐酸缓冲液 (pH2.5) 和 $10\mu\text{l}$ 的 10mM 盐酸, 洗去非共价结合的物质。添加到各个流式池中, 注入 $10\mu\text{l}$ 的 72nM 的人源化抗体版本“ib2”, 确认大约结合 1000RU。

(2) 固相化抗 TF 抗体与人 TF 的相互作用

人 TF 是通过使在氨基酸序列 1 - 219 的 C 末端连接了 FLAG 肽后的产物在 CHO 细胞中表达、纯化的。它可用作可溶性人 TF。

用 HBS - EP 作流动缓冲液, 流速为 $20\mu\text{L/分}$, 注入 $10\mu\text{l}$ 的 72nM 的抗体溶液, 使抗体固相化。用 HBS - EP 缓冲液稀释抗体。以 $30\mu\text{L/分}$ 的流速向固相化抗体注入各种浓度的可溶性人 TF 溶液 $40\mu\text{L}$, 分析以进行注入的 80 秒为结合相, 然后改换为 HBS - EP 缓冲液, 作为 120 秒的解离相。解离相结束后, 通过注入 $10\mu\text{L}$ 的 20mM 的盐酸, 使传感器芯片再生。将该结合、解离和再生作为分析的一个循环, 可以得到有关

各种抗体的传感图。而可溶性人 TF 溶液是用 HBS - EP 缓冲液，配成 250nM、125nM、62.5nM、31.3nM、15.6nM、7.81nM、3.91nM 各种浓度。空白用注入稀释用的 HBS - EP 缓冲液得到的传感图。

以上实验分别在流式池的 1~3 中进行的。

(3) 相互作用的动力学的解析

读入目的数据文件，就目的反应区域，以 HBS - EP 缓冲液的传感图作为基线，比较通过重叠画的反应曲线。再利用作为通过曲线拟合进行动力学参数(结合速率常数 k_{ass} 和解离速率常数 k_{diss})计算的 BIACORE 专用的解析应用程序的“BIAevaluation 2.1”(Pharmacia)，进行相互作用的动力学解析。而在求结合速率常数 k_{ass} 中，利用了解析模型 4 (BIAevaluation 2.1 A1~A5)。由从各个流动池算出的值可得到各种抗体的动力学参数。结果(从各个流动池算出的值的平均值 \pm 标准偏差)如表 6 所示。

表 6

嵌合以及人源化抗 TF 抗体的动力学参数 (n = 3)

	嵌合	b-b	i-b	i-b2
k_{diss} [$\times 10^{-4}$ 1/s]	5.06 ± 0.12	9.52 ± 0.22	6.49 ± 0.17	6.35 ± 0.15
k_{ass} [$\times 10^5$ 1/Ms]	4.65 ± 0.32	4.15 ± 0.27	4.67 ± 0.30	5.44 ± 0.36
KD [$\times 10^{-9}$ M]	1.09 ± 0.09	2.30 ± 0.15	1.39 ± 0.13	1.17 ± 0.11

实施例 7. 人源化抗 TF 抗体对人 TF 的反应性的测定

利用点印迹杂交法(《修订版用于分子生物学研究的蛋白质实验法》(羊土社)竹绳忠臣/编 p. 101)研究对非变性 TF、非还原 TF、非还原下变性 TF、还原下变性 TF 的反应性。TF 使用使细胞外区域带有的 FLAG 标记的 TF 在 CHO 细胞表达、纯化的 TF (shTF)。将 shTF 分别用以下 3 种缓冲液(缓冲液 A: 10mM Tris-HCl, pH8.0; 缓冲液 B: 10mM Tris-HCl, pH8.0, 8M 尿素; 缓冲液 C: 10mM Tris-HCl, pH8.0, 8M 尿素, 5mM

DTT) 稀释。用缓冲液 A 处理的为非变性的 TF, 用缓冲液 B 处理的为非还原下变性 TF, 还原下变性 TF 是用缓冲液 C 处理后制备的。各个样品于室温下处理 24 小时。处理后将样品印迹在硝基纤维素膜 (Bio-Rad) 上。样品分别取 0.5 μ l、1 μ l 和 2 μ l (3 μ g/ml) 点在膜上, 将膜风干。用 DB (50mM Tris-HCl, pH8.1, 0.15M NaCl, 1M MgCl₂, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.02% (w/v) NaN₃, 1% (w/v) BSA) 封闭。用含有人源化抗 TF 抗体的 DB 或 DB (对照) 使膜反应。用含有 0.05% (v/v) Tween 20 的 PBS 洗净后, 用含有过氧化物酶标记抗人 IgG 抗体 (DAKO) 的 DB 使其反应。用含有 0.05% (v/v) Tween 20 的 PBS 洗净后, 用 ECL Western 印迹试剂 (Amersham) 处理, 暴露于 X 光片 30 秒钟。

如图 35 所示那样嵌合抗 TF 抗体和人源化抗体 (版本 “bb” “ib” 和 “ib2”) 对非变性 TF、非还原下变性 TF、还原下变性 TF 都反应。

实施例 8. 在大鼠急性 DIC 模型中抗血栓作用的确证

关于抗 TF 抗体的抗血栓作用可以通过使用大鼠的组织促凝血酶原激酶诱发的 DIC 模型确认。即通过用 3 小时连续向 SD 系雄性大鼠静脉注射人组织促凝血酶原激酶溶液 (用量为 40mg/kg) 制作 DIC 模型。抗 TF 抗体 (嵌合和人源化抗 TF 抗体 i-b2) 分别以 0.2mg/kg 的用量在开始注射组织促凝血酶原激酶溶液前 5 分钟向静脉内注射。组织促凝血酶原激酶溶液连续注射结束 15 分钟后, 从腹部大动脉采集加柠檬酸的血液, 测定血小板数、活化部分组织促凝血酶原激酶时间 (aPTT)、纤维蛋白原浓度 (Fib)、可溶性纤维蛋白单体复合物 (sFMC) 浓度、凝血酶/抗凝血酶 III 复合物 (TAT) 浓度。

测定的结果如表 7 所示那样, 由于连续注入组织促凝血酶原激酶, 可以确认血小板减少、aPTT 延长、纤维蛋白原浓度减少、sFMC 和 TAT 浓度上升, 呈现明显的凝固亢进状态。与此相反, 嵌合和人源化抗体都大致同样强烈抑制这些变化。

这些结果表明: 人源化抗 TF 抗体作为抗血栓药是很有用的。

表 7

测定项目	没有注入组织促凝血酶原激酶的正常组	给予溶剂的对照组	给予嵌合抗体组	给予人源化抗体组
血小板数 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	115.5 \pm 11.8	82.9 \pm 14.3	100.7 \pm 12.9	96.1 \pm 13.3
aPTT(秒)	20.1 \pm 1.1	36.2 \pm 13.9	22.3 \pm 0.7 ^{a)}	21.8 \pm 1.3 ^{a)}
纤维蛋白原浓度(正常组为 100%)	100.0 \pm 4.2	64.8 \pm 20.0	101.0 \pm 6.6 ^{a)}	98.9 \pm 5.7 ^{a)}
sFMC 浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	74.2 \pm 5.5	3517 \pm 3645	129.9 \pm 46.8 ^{a)}	66.5 \pm 23.0 ^{a)}
TAT 浓度(ng/ml)	3.4 \pm 0.6	29.6 \pm 31.0	3.8 \pm 0.7 ^{b)}	4.2 \pm 0.9

(平均值 \pm 标准偏差)

相对于给予溶剂的对照组的有显著性差异: a): $p < 0.01$, b) $p < 0.05$

参考例 1. 抗 TF 单克隆抗体的制作

1. 人 TF 的纯化

从人胎盘纯化 TF 是按照 Ito 等人的方法 (Ito, T. 等人生物化学杂志 (J. Biochem.) 114, 691 - 696, 1993) 进行的。即将人胎盘在含有 10mM 氯化苯甲脒、1mM 苯甲磺酰氟、1mM 氟磷酸二异丙酯和 0.02% NaN_3 的 Tris 缓冲生理盐水 (TBS, pH7.5) 中匀浆后, 用冷丙酮对沉淀脱脂, 将得到的脱脂粉末悬浮于含有 2% Triton X-100 的上述缓冲液中, 将 TF 溶化。

使用 Concanavalin A-Sepharose 4B 柱 (Pharmacia) 和使 TF 抗体结合的 Sepharose 4B 柱 (Pharmacia) 进行亲和层析, 从上述的上清中得到纯化 TF。经超滤膜 (PM-10, Amicon) 浓缩, 作为纯化标准品于 4°C 下保存。

利用市售的抗 TF 单克隆抗体 (American Diagnostica) 和多克隆抗体 (American Diagnostica) 组合的夹心 (Sandwich) ELISA, 以重组型 TF 为标准对纯化标准品中的 TF 含量进行定量。

另外通过对使用 4-20% 浓度梯度的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 后的凝胶进行银染色, 对纯化标准品的纯度进行确认。

2. 免疫和杂交瘤的制作

将纯化人 TF (约 70 μg/ml) 与等量的 Freund 完全佐剂 (Difco) 混合后作为 TF, 以 10 μg/小鼠的量向 5 周龄的 Balb/c 系雄性小鼠 (日本 Charles River) 的腹部皮下进行免疫。于免疫后第 12、18 和 25 日, 使用与 Freund 不完全佐剂混合的 TF, 以 5 μg/小鼠的量向小鼠皮下进行追加免疫, 作为最终免疫, 于第 32 日以 5 μg/小鼠的量向腹腔内注入用 PBS 稀释的 TF 溶液。

最终免疫 3 日后, 从 4 只小鼠中制备脾细胞, 使用聚乙二醇法与细胞数为脾细胞数 1/5 的小鼠骨髓瘤细胞株 P3U1 融合。将融合细胞悬浮于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基 (以下称为 RPMI-培养基) (Lifetech oriental), 向 96 孔板 (每只小鼠 400 个孔) 加入细胞 (每孔约 400 个细胞)。融合后, 第 1、2、3、5 日, 通过将一半培养基换成含有 HAT (大日本制药) 和 condimed H1 (Boehringer Mannheim GmbH) 的 RPMI-1640 培养基 (以下称为 HAT-培养基) 进行杂交瘤的 HAT 选择。

利用下面的筛选法对选择的杂交瘤通过 2 次有限稀释克隆化。

有限稀释, 两块 96 孔板中每一孔接种 0.8 个细胞。对通过镜检能够确认是单一菌落的孔进行如下给出的 TF 结合活性和 TF 中和活性的测定, 选择克隆。得到的克隆从 HAT-培养基转到 RPMI-培养基中驯化, 在确认通过驯化抗体产生能力没有降低的基础上, 再次进行有限稀释, 进行完全的克隆化。通过以上操作, 能够确立能够产生强烈抑制 TF/因子 VIIa 复合物和因子 X 结合的 6 种抗体 (ATR-2、3、4、5、7 和 8) 的杂交瘤。

3. 腹水的制作和抗体的纯化

确立的杂交瘤的腹水的制作按照常规方法进行。即将在体外进行继代的杂交瘤 10^6 个移植到预先 2 次向腹腔注入矿物油的 Balb/c 系雄性小鼠的腹腔内。移植后 1~2 周从腹部肥大的小鼠回收腹水。

从腹水纯化抗体是使用配备了蛋白 A 柱(日本ガイシ)的 ConSepLC100 系统 (Millipore) 进行的。

4. Cell-ELISA

将通过对已知 TF 高表达的来自人膀胱癌细胞 J82 (Fair D. S. 等人, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 262, 11692-11698, 1987) 由 ATCC 导入, 在 RPMI-培养基中, 于 37℃、5% CO₂、100% 湿度条件下进行继代、维持。

按如下操作制作 Cell ELISA 用的板: 将 J82 细胞以 10⁵ 个/孔的浓度接种于 96 孔板中, 在上述条件下培养一天后, 除去培养基, 用磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 洗 2 次, 加入 4% 多聚甲醛溶液 (PFA), 通过在冰冷条件下静置 10 分钟, 进行固相化。除去 PFA, 用 PBS 洗净后, 加入含有 1% BSA 和 0.02% 叠氮钠的 Tris 缓冲液 (封闭缓冲液), 在使用之前保存在 4℃ 下。

Cell-ELISA 操作如下。即, 从上述制作的板中除去封闭液, 加入抗 TF 抗体溶液或杂交瘤培养上清, 于室温反应 1.5 小时。用含有 0.05% 的 Tween20 的 PBS 洗净后, 加入结合了碱性磷酸酶的山羊抗小鼠 IgG (H + L) (Zymed), 使其反应 1 小时, 洗净后, 加入浓度 1mg/ml 的对硝基苯磷酸二钠 (Sigma), 1 小时后, 通过测定在 405nm 的吸光度, 对结合于 J82 细胞的抗 TF 抗体量进行定量。

5. 以因子 Xa 活性为指标的 TF 中和活性测定体系

向含有 50 μl 的 5mM CaCl₂ 和 0.1% 牛血清白蛋白的 Tris 缓冲生理盐水 (TBS, pH7.6) 中加入 10 μl 来自人胎盘的凝血激酶溶液 (5mg/ml) (Thromborel S) (Boehring) 和 10 μl 因子 VIIa 溶液 (82.5ng/ml) (American Diagnostica), 于室温反应 1 小时, 使其形成 TF/因子 VIIa 复合物后, 添加 10 μl 稀释到指定浓度的抗 TF 抗体溶液或杂交瘤培养上清以及 10 μl 因子 X (3.245 μg/ml) (Celsus Laboratorise), 反应 45 分钟, 加入 10 μl 的 0.5M EDTA 终止反应。再加入 50 μl 2mM S-2222 (第一化学药品), 将 30 分钟内 405nm 吸光度变化作为 TF 的因子 Xa 产生活性。利用这一方法可以测定抑制 TF/因子 VIIa 复合物和因子 X 结

合的抗体的活性。

6. 血浆凝固抑制活性测定体系

使用市售的正常人血浆 (コージンバイオ), 该血浆 100 μl 与适当稀释的抗 TF 抗体溶液 50 μl 混合后, 于 37℃ 下反应 3 分钟, 添加 50 μl 来自人胎盘的凝血激酶溶液 (1.25mg/ml), 用血浆凝固时间测定装置 (CR-A:Amelung) 测定直至血浆凝固为止的时间。

7. 抗体同型的确定

关于杂交瘤的培养上清或纯化抗体使用小鼠单克隆抗体同型测定试剂盒 (Amersham 公司制造) 确认抗体同型, 结果如下所示。

表 8

抗 TF 单克隆抗体的免疫球蛋白同型

ATR - 2	IgG1, k
ATR - 3	IgG1, k
ATR - 4	IgG1, k
ATR - 5	IgG1, k
ATR - 7	IgG2a, k
ATR - 8	IgG2a, k

参考例 2. 可溶性 TF 的制作方法

可溶性 TF (shTF) 是按以下过程制作的。

将编码人 TF 的贯通区 (第 220 个氨基酸) 以下置换为 FLAG 肽 M2 的 TF 的基因插入到哺乳动物细胞用的表达载体 (新霉素抗性基因、含有 DHFR 基因) 中, 导入 CHO 细胞。人 TF 的 cDNA 序列以 James H. Morrissey 等人的报告 (细胞 (Cell) (1987) 50, 129 - 135) 为参考。序列号 151 给出了该可溶性人 TF 的基因序列和氨基酸序列。利用 G418 进行药剂选择、挑选表达细胞, 再用氨基蝶呤进行表达扩增, 确立 shTF 表达细胞。

将该细胞在无血清培养基 CHO - S - SFMII (GIBCO) 培养, 得到含

有 shTF 的培养上清。用同容量的 40mM Tris 盐酸缓冲液 (pH8.5) 稀释 2 倍, 加到用 20mM Tris 盐酸缓冲液 (pH8.5) 平衡的 Q-Sepharose Fast Flow 柱 (100mL, Pharmacia Biotech), 用含有 0.1M NaCl 的同样的缓冲液洗净后, 将 NaCl 的浓度调到 0.3M, 从柱子洗脱出 shTF。向得到的 shTF 加硫酸铵, 硫酸铵终浓度为 2.5M, 经离心 (10000rpm、20 分钟) 使杂蛋白沉淀。上清中加入 Butyl TOYOPEARL (30ml, TOSOH), 用含有 2.5M 的硫酸铵的 50mM Tris 盐酸缓冲液 (pH6.8) 洗净。于 50mM Tris 盐酸缓冲液 (pH6.8) 中, 使硫酸铵浓度由 2.5M 直线下降到 0M, 将 shTF 洗脱出来。含有 shTF 的峰级分用 Centri-Prep 10 (Amicon) 浓缩。将该浓缩液加到用含有 150mM NaCl 的 20mM Tris 盐酸缓冲液 (pH7.0) 平衡的 TSK gel G3000SWG 柱 (21.5 × 600mm, TOSOH), 回收 shTF 峰级分。对此级分用 0.22 μm 的过滤膜进行过滤灭菌, 作为可溶性人 TF (shTF)。样品的吸光度 280nm 的摩尔吸光系数为 $\epsilon = 40130$ 、分子量为 43210, 可算出样品的浓度。

序列表<223>记载的内容如下。

序列号: 1: 引物 MHC - G1

序列号: 2: 引物 MHC - G2a

序列号: 3: 引物 MKC

序列号: 4: M13 引物 M4

序列号: 5: M13 引物 RV

序列号: 6: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 2 的 H 链 V 区的氨基酸序列和编码它的碱基序列

序列号: 7: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 3 的 H 链 V 区的氨基酸序列和编码它的碱基序列

序列号: 8: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 4 的 H 链 V 区的氨基酸序列和编码它的碱基序列

序列号: 9: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 5 的 H 链 V 区的氨基酸序列和编码它的碱基序列

序列号: 10: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 7 的 H 链 V 区的氨基酸序列

和编码它的碱基序列

序列号: 11: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-8 的 H 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 12: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-2 的 L 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 13: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-3 的 L 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 14: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-4 的 L 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 15: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-5 的 L 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 16: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-7 的 L 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 17: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR-8 的 L 链 V 区的氨基酸序列
和编码它的碱基序列

序列号: 18: 引物 ch5HS

序列号: 19: 引物 ch5HA

序列号: 20: 引物 ch5LS

序列号: 21: 引物 ch5LA

序列号: 22: CDR 移植引物 hR5Hv1S

序列号: 23: CDR 移植引物 hR5Hv2S

序列号: 24: CDR 移植引物 hR5Hv4S

序列号: 25: CDR 移植引物 hR5Hv3A

序列号: 26: CDR 移植引物 hR5Hv5A

序列号: 27: 引物 hR5HvPrS

序列号: 28: 引物 hR5HvPrA

序列号: 29: 人源化 H 链 V 区版本“a”的氨基酸序列和编码它的碱基
序列

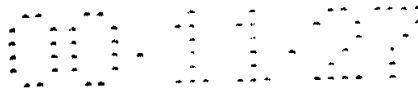
序列号: 30: 人源化 H 链 V 区版本“a”的氨基酸序列

序列号: 31: FR 改组引物 F3RFFS

- 序列号: 32: FR 改组引物 F3RFBS
- 序列号: 33: FR 改组引物 F3RFFA
- 序列号: 34: FR 改组引物 F3RFBA
- 序列号: 35: FR 改组引物 F3NMFS
- 序列号: 36: FR 改组引物 F3NMBS
- 序列号: 37: FR 改组引物 F3NMFA
- 序列号: 38: FR 改组引物 F3NMBA
- 序列号: 39: 人源化 H 链 V 区版本 “b” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 40: 人源化 H 链 V 区版本 “b” 的氨基酸序列
- 序列号: 41: 人源化 H 链 V 区版本 “c” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 42: 人源化 H 链 V 区版本 “c” 的氨基酸序列
- 序列号: 43: FR 改组引物 F3EPS
- 序列号: 44: FR 改组引物 F3EPA
- 序列号: 45: 引物 F3PrS
- 序列号: 46: 引物 F3PrA
- 序列号: 47: FR 改组引物 F3vHS
- 序列号: 48: FR 改组引物 F3vHA
- 序列号: 49: 人源化 H 链 V 区版本 “d” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 50: 人源化 H 链 V 区版本 “d” 的氨基酸序列
- 序列号: 51: 人源化 H 链 V 区版本 “e” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 52: 人源化 H 链 V 区版本 “e” 的氨基酸序列
- 序列号: 53: FR 改组引物 F3SSS
- 序列号: 54: FR 改组引物 F3SSA
- 序列号: 55: FR 改组引物 F3CDS
- 序列号: 56: FR 改组引物 F3CDA
- 序列号: 57: 人源化 H 链 V 区版本 “f” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列



- 序列号: 58: 人源化 H 链 V 区版本 “f” 的氨基酸序列
- 序列号: 59: 人源化 H 链 V 区版本 “g” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 60: 人源化 H 链 V 区版本 “g” 的氨基酸序列
- 序列号: 61: FR 改组引物 F3ADS
- 序列号: 62: FR 改组引物 F3ADA
- 序列号: 63: 人源化 H 链 V 区版本 “h” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 64: 人源化 H 链 V 区版本 “h” 的氨基酸序列
- 序列号: 65: FR 改组引物 F3MMS
- 序列号: 66: FR 改组引物 F3MMA
- 序列号: 67: FR 改组引物 F3BMS
- 序列号: 68: FR 改组引物 F3BMA
- 序列号: 69: 人源化 H 链 V 区版本 “i” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 70: 人源化 H 链 V 区版本 “i” 的氨基酸序列
- 序列号: 71: 人源化 H 链 V 区版本 “j” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 72: 人源化 H 链 V 区版本 “j” 的氨基酸序列
- 序列号: 73: FR 改组引物 F2MPS
- 序列号: 74: FR 改组引物 F2MPA
- 序列号: 75: 人源化 H 链 V 区版本 “b1” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 76: 人源化 H 链 V 区版本 “b1” 的氨基酸序列
- 序列号: 77: 人源化 H 链 V 区版本 “d1” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 78: 人源化 H 链 V 区版本 “d1” 的氨基酸序列
- 序列号: 79: FR 改组引物 F2VHS
- 序列号: 80: FR 改组引物 F2VHA
- 序列号: 81: 人源化 H 链 V 区版本 “b3” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列



- 序列号: 82: 人源化 H 链 V 区版本 “b3” 的氨基酸序列
- 序列号: 83: 人源化 H 链 V 区版本 “d3” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 84: 人源化 H 链 V 区版本 “d3” 的氨基酸序列
- 序列号: 85: FR 改组载体 Lv1S
- 序列号: 86: FR 改组载体 h5Lv4S
- 序列号: 87: FR 改组载体 h5Lv2A
- 序列号: 88: FR 改组载体 h5Lv3A
- 序列号: 89: FR 改组引物 h5Lv5A
- 序列号: 90: 引物 h5LvS
- 序列号: 91: 引物 h5LvA
- 序列号: 92: 人源化 L 链 V 区版本 “a” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 93: 人源化 L 链 V 区版本 “a” 的氨基酸序列
- 序列号: 94: FR 改组引物 F3SS
- 序列号: 95: FR 改组引物 F3SA
- 序列号: 96: FR 改组引物 F3RS
- 序列号: 97: FR 改组引物 F3RA
- 序列号: 98: 人源化 L 链 V 区版本 “b” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 99: 人源化 L 链 V 区版本 “b” 的氨基酸序列
- 序列号: 100: 人源化 L 链 V 区版本 “c” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 101: 人源化 L 链 V 区版本 “c” 的氨基酸序列
- 序列号: 102: FR 改组引物 F2SS
- 序列号: 103: FR 改组引物 F2SA
- 序列号: 104: FR 改组引物 F2XS
- 序列号: 105: FR 改组引物 F2XA
- 序列号: 106: 人源化 L 链 V 区版本 “b1” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 107: 人源化 L 链 V 区版本 “b1” 的氨基酸序列



- 序列号: 108: 人源化 L 链 V 区版本 “b2” 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 109: 人源化 L 链 V 区版本 “b2” 的氨基酸序列
- 序列号: 110: 人源化 H 链 V 区所有版本的 FR1 的氨基酸序列
- 序列号: 111: 人源化 H 链 V 区版本 “a” ~ “j” 的 FR2 的氨基酸序列
- 序列号: 112: 人源化 H 链 V 区版本 “b1” 及 “d1” 的 FR2 的氨基酸序列
- 序列号: 113: 人源化 H 链 V 区版本 “b3” 及 “d3” 的 FR2 的氨基酸序列
- 序列号: 114: 人源化 H 链 V 区版本 “a” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 115: 人源化 H 链 V 区版本 “b”、 “b1” 及 “b3” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 116: 人源化 H 链 V 区版本 “c” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 117: 人源化 H 链 V 区版本 “d”、 “d1” 及 “d3” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 118: 人源化 H 链 V 区版本 “e” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 119: 人源化 H 链 V 区版本 “f” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 120: 人源化 H 链 V 区版本 “g” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 121: 人源化 H 链 V 区版本 “h” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 122: 人源化 H 链 V 区版本 “i” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 123: 人源化 H 链 V 区版本 “j” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 124: 人源化 H 链 V 区所有版本的 FR4 的氨基酸序列
- 序列号: 125: 人源化 L 链 V 区所有版本的 FR1 的氨基酸序列
- 序列号: 126: 人源化 L 链 V 区版本 “a”, “b” 和 “c” 的 FR2 的氨基酸序列
- 序列号: 127: 人源化 L 链 V 区版本 “b1” 的 FR2 的氨基酸序列
- 序列号: 128: 人源化 L 链 V 区版本 “b2” 的 FR2 的氨基酸序列
- 序列号: 129: 人源化 L 链 V 区版本 “a” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 130: 人源化 L 链 V 区版本 “b”、 “b1” 及 “b2” 的 FR3 的

氨基酸序列

- 序列号: 131: 人源化 L 链 V 区版本 “c” 的 FR3 的氨基酸序列
- 序列号: 132: 人源化 L 链 V 区所有版本的 FR4 的氨基酸序列
- 序列号: 133: 人源化 H 链 V 区所有版本的 CDR1 的氨基酸序列
- 序列号: 134: 人源化 H 链 V 区所有版本的 CDR2 的氨基酸序列
- 序列号: 135: 人源化 H 链 V 区所有版本的 CDR3 的氨基酸序列
- 序列号: 136: 人源化 L 链 V 区所有版本的 CDR1 的氨基酸序列
- 序列号: 137: 人源化 L 链 V 区所有版本的 CDR2 的氨基酸序列
- 序列号: 138: 人源化 L 链 V 区所有版本的 CDR3 的氨基酸序列
- 序列号: 139: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 2 的 H 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 140: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 3 的 H 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 141: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 4 的 H 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 142: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 5 的 H 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 143: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 7 的 H 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 144: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 8 的 H 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 145: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 2 的 L 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 146: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 3 的 L 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 147: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 4 的 L 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 148: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 5 的 L 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 149: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 7 的 L 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 150: 小鼠抗 TF 单克隆抗体 ATR - 8 的 L 链 V 区的氨基酸序列
- 序列号: 151: 可溶性人 TF 的氨基酸序列和编码它的碱基序列
- 序列号: 152: 可溶性人 TF 的氨基酸序列

序列表

<110> 中外制药株式会社

<120> 抗人组织因子的人源化抗体以及人源化抗体的制作方法

<130> G821

<150> JP 10-91850

<151> 1998-04-03

<160> 152

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工合成序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物 MHC-G1 (Primer MHC-G1)

<400> 1

ggatcccggg ccagtggata gacagatg

28

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 MHC-G2a

<400> 2

ggatcccggg agtggataga ccgatgg

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 MKC

<400> 3

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg

27

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> M13 引物 M4

<400> 4

gttttcccag tcacgac

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> M13 引物 RV

<400> 5

caggaaacag ctatgac

17

<210> 6

<211> 411

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(441)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-2 的 H 链 V 区的核苷酸序列

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15

-10

-5

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

1

5

10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

15

20

25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
 Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 30 35 40 45
 gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
 50 55 60
 cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 65 70 75
 aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
 Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 95 100 105
 caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 411
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 7
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-peptide
 <222> (58)...(441)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-3 的 H 链 V 区的核苷酸序列

<400> 7

```

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt      48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly
      -15          -10          -5

gtc cac tct gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
      1          5          10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc      144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
      15          20          25

act gac tac aac atg tac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt      192
Thr Asp Tyr Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
      30          35          40          45

gag tgg att gga tat att gat cct tac aat ggt ggt act atc tac aac      240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn
      50          55          60

cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc      288
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
      65          70          75

aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc      336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80          85          90

tat tac tgt gca aga gga ggg gaa ggg tac tac ttt gac tac tgg ggc      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
      95          100          105

caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca      411
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110          115

```

<210> 8
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(408)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-4 的 H 链 V 区的核苷酸序列

<400> 8

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5

gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gct gag ctt gtg agg      96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
      1           5           10

cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa gct tct ggc ttc aac att      144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15           20           25

aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
      30           35           40           45

gag tgg att gga ttg att gat cct caa aat ggt aat act ata tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asp Pro Gln Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp
      50           55           60

```

ccg aag ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 65 70 75
 aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc 336
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gat aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 384
 Tyr Tyr Cys Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 408
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 9
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1)...(57)
 <220>
 <221> mat-peptide
 <222> (58)...(408)
 <223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-5 的 H 链 V 区的核苷酸序列

<400> 9
 atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

0119

gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg act aac ctt gtg agg	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Asn Leu Val Arg	
1 5 10	
cca ggg gcc tta gtc aag ttg tcc tgc aaa ggt tct ggc ttc aac att	144
Pro Gly Ala Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggt cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aag gcc agt ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
65 70 75	
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gct aga gac tcg ggc tat gct atg gac tac tgg ggt caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
gga acc tca gtc acc gtc tcc tca	408
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
110 115	

- <210> 10
- <211> 411
- <212> DNA
- <213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(411)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-7 的 H 链 V 区的核苷酸序列

<400> 10

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt	48
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys	
1 5 10	
cct ggg tct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc	144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe	
15 20 25	
cct gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt	192
Pro Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac	240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn	
50 55 60	
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc	288
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
65 70 75	
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc cta aca tct gag gac tct gca gtc	336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	

tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384

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

95 100 105

caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

110 115

<210> 11

<211> 411

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(411)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-8 的 H 链 V 区的核苷酸序列

<400> 11

atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act aca ggt 48

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Thr Gly

-15 -10 -5

gtc cac tct gac atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag 96

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys

1 5 10

cct ggg gct tca gtg aag gta tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

15 20 25

001127

act gac tac aac ata ttc tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt 192
Thr Asp Tyr Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
30 35 40 45
gag tgg att gga tat att gat cct tac act ggt ggt act ggc tac aac 240
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn
50 55 60
cag aag ttc aac gac aag gcc aca ttg act gtt gac aag tcc tcc agc 288
Gln Lys Phe Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
65 70 75
aca gcc ttc atg cat ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
Thr Ala Phe Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
80 85 90
tat tac tgt gca aga ggt ttc tac tat gat tac gac tgt tac tgg ggc 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly
95 100 105
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
110 115

<210> 12
<211> 375
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> sig-peptide
<222> (1)...(54)
<220>
<221> mat-peptide
<222> (55)...(375)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-2 的 L 链 V 区的核苷酸序列

<400> 12

```

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt      48
Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly
      -15          -10          -5

aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct      96
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
      1          5          10

ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt      144
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly
      15          20          25          30

aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc      192
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val
      35          40          45

ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc      240
Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
      50          55          60

agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta      288
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
      65          70          75

cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act      336
Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr
      80          85          90

ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa      375
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      95          100          105

```

<210> 13

<211> 375

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(54)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (55)...(375)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-3 的 L 链 V 区的核苷酸序列

<400> 13

```

atg ctc act cag ctc ctg gga tta ctg ctg ctc tgg ttt gca ggt ggt      48
Met Leu Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Ala Gly Gly
      -15          -10          -5
aaa tgt gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct      96
Lys Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser
      1           5           10
ctg gga gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att ggt      144
Leu Gly Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly
      15           20           25           30
aca tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag gtc      192
Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Val
      35           40           45
ctg att tat gct gca acc agc ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc      240
Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe
      50           55           60
agt ggt agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta      288
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu
      65           70           75

```

cag gct gaa gat ttt gta agt tat tac tgt caa caa ctt tac agt act 336

Gln Ala Glu Asp Phe Val Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr

80 85 90

ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 375

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

95 100 105

<210> 14

<211> 387

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(66)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (67)...(387)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-4 的 L 链 V 区的核苷酸序列

<400> 14

atg gac atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg 48

Met Asp Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp

-20 -15 -10

ttt cca ggt atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tcc 96

Phe Pro Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

-5 1 5 10

atg tat gcc tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt 144

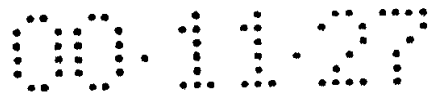
Met Tyr Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser

15 20 25

cag gac att aaa acc ttt tta agc tgg tac cag cag aaa cca tgg caa 192
 Gln Asp Ile Lys Thr Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Gln
 30 35 40
 tct cct aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc 240
 Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val
 45 50 55
 cca tca aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc 288
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr
 60 65 70
 atc agc agc ctg gag tct gac gat tca gca act tat tac tgt cta cag 336
 Ile Ser Ser Leu Glu Ser Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln
 75 80 85 90
 cat ggt gag agc ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa ctg gaa ata 384
 His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 95 100 105
 aaa 387
 Lys

<210> 15
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<220>
 <221> sig-peptide
 <222> (1)...(60)
 <220>
 <221> mat-peptide
 <222> (61)...(381)



<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-5 的 L 链 V 区的核苷酸序列

<400> 15

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20 -15 -10 -5

ggc atc aga tgt gac atc aag atg acc cag tct cca tcc tct atg tat 96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr
1 5 10

gca tcg ctg gga gag aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cag gac 144
Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
15 20 25

att aaa agc ttt tta agt tgg tac cag caa aaa cca tgg aaa tct cct 192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro
30 35 40

aag acc ctg atc tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc cca tca 240
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
45 50 55 60

aga ttc agt ggc agt gga tct ggg caa gat tat tct cta acc atc aac 288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn
65 70 75

aac ctg gag tct gac gat aca gca act tat tat tgt cta cag cat ggt 336
Asn Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
80 85 90

gag agc cag tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
95 100 105

<210> 16

<211> 393

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(394)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-7 的 L 链 V 区的核苷酸序列

<400> 16

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gaa	48
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu	
-15 -10 -5	
atc aac ggt gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgg gtt	96
Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val	
1 5 10	
acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc	144
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu	
15 20 25	
tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca	192
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro	
30 35 40 45	
ggc cag tct cca aag cgc ctg atc tat ctt gtg tct aaa ctg gac tct	240
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser	
50 55 60	
gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca	288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65 70 75	

ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 80 85 90
 tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 336
 Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105
 gaa ata aaa 393
 Glu Ile Lys
 110

<210> 17

<211> 393

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (58)...(393)

<223> 编码抗 TF 的小鼠单克隆抗体 ATR-8 的 L 链 V 区的核苷酸序列

<400> 17

atg agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cgg gat 48
 Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Asp
 -15 -10 -5
 atc aac ggt gat gtt gta ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt 96
 Ile Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
 1 5 10

acc att gga caa cca gcc tcc gtc tct tgc aag tca agt cag agc ctc 144
 Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 15 20 25
 tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca 192
 Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
 30 35 40 45
 ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 50 55 60
 gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgt 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 80 85 90
 tgg caa gat aca cat ttt ccg gac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 384
 Trp Gln Asp Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 95 100 105
 gaa ata aaa 393
 Glu Ile Lys
 110

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 ch5HS

<400> 18

gtctgtcgac ccaccatgaa atgcagctgg gtcac

35

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 ch5HA

<400> 19

tgttgctagc tgaggagacg gtgactga

28

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 ch5LS

<400> 20

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagtt

35

<210> 21

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 ch5LA

<400> 21

tgttcgtacg ttttatttcc agcttggt

28

<210> 22

<211> 104

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> CDF 移植引物 hR5Hv1S (CDR grafting primer hR5Hv1S)

<400> 22

ttctgtcgac ccacatgaa atgcagctgg gtcattttct toctgatggc agtggttaca 60

ggggttaact cacaggtgca gctggttgag totggagctg tgct 104

<210> 23

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> CDR 移植引物 (grafting primer) hR5Hv28

<400> 23

acaggtgcag ctggttgagt ctggagctgt gctggcaagg cctgggactt cogtgaagat 60

ctcctgcaag gcttccgat tcaacattaa agactactat atgcattg 108

<210> 24

<211> 108

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> CDR 移植引物 (grafting primer) hR5Hv4S

<400> 24

gaatggccat agtatgtatg acccgaaatt ccagggcagg gccaaactga ctgcagccac 60

atccgccagt attgcctact tggagttctc gagcctgaca aatgagga 108

<210> 25

<211> 110

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> CDR 移植引物 (grafting primer) hR5Hv3A

<400> 25

tcatacatac tatggccatt ogcaggatca ttcccaccaa tccattctag accctgtcca 60

ggcctctgtt ttaccoaatg catatagtag tctttaatgt tgaatccgga 110

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> CDR 移植引物 (grafting primer) hR5Hv5A

<400> 26

agaagctagc tgaggagacg gtgaccaggg tgccttgccc ccagtagtcc atggcatagc 60
ccgagtctct tgcacagtaa tagaccgacg aatcctcatt tgtcaggctc 110

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 hR5HvPrS

<400> 27

ttctgtcgac ccaccatga 19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 hR5HvPrA

<400> 28

agaagctagc tgaggagac 19

<210> 29

<211> 415

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (58)...(415)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“a”的核苷酸序列

<400> 29

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1           5           10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15          20          25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30          35          40          45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50          55          60

ccg aaa ttc cag ggc agg gcc aaa ctg act gca gcc aca tcc gcc agt      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser
      65          70          75

```

att gcc tac ttg gag ttc tcg agc ctg aca aat gag gat tct gcg gtc 336
 Ile Ala Tyr Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 415
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“o”的氨基酸序列

<400> 30

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

Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 31

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3RFFS

<400> 31

ttcttgcca tagtatgtat gaccgaaat tocagggccg agtcacaatc actgcagaca 60

catccacgaa cacagcctac atggagctct cgagtctgag 100

<210> 32

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3RFBS

<400> 32

ggagctctcg agtctgagat ctgaggacac agccatttat tactgtgcaa gagactcggg 60

ctatgccatg gttct

75

<210> 33

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3RFFA

<400> 33

ctcagactcg agagctccat gtagctgtg ttcgtggatg tgtctgcagt gattgtgact 60
cggcctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 34

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3RFBA

<400> 34

agaacctgg catagccoga gtctcttga cagtaataaa tggctgtgtc ctcagatctc 60
agactcgaga gctcc 75

<210> 35

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3NMFS

<400> 35

ttcttgcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggccg agtcacaatg ctggtagaca 60
catccaagaa ccagttctcc ctgaggctct cgagtgtgac 100

<210> 36

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3NMBS

<400> 36

gaggctctcg agtgtgacag ccgaggacac agccgtatat tactgtgcaa gagactcggg 60
ctatgcatg gttct 75

<210> 37

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3NMFA

<400> 37

gtcacactcg agagcctcag ggagaactgg ttcttggatg tgtotaccag cattgtgact 60
eggccctgga atttcgggtc atacatacta tggccaagaa 100

<210> 38

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3NMBA

<400> 38

agaacctg catagcccg gtctcttgca cagtaatata cggctgtgtc cggggctgtc 60

acactcgaga gcctc 75

<210> 39

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“b”的核苷酸序列

<400> 39

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
 1 5 10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “b” 的氨基酸序列

<400> 40

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

<210> 41

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“c”的核苷酸序列

<400> 41

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1           5           10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15          20          25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30          35          40          45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50          55          60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atg ctg gta gac aca tcc aag aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn
      65          70          75

cag ttc tcc ctg agg ctc tcg agt gtg aca gcc gcg gac aca gcc gta      336
Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
      80          85          90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95          100          105

```

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “b” 的氨基酸序列

<400> 42

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Leu Val 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 Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 43

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3EPS

<400> 43

```

ttcttgcca tagtatgtat gacccgaaat tccagggcag agtcacgatt actgcggacg      60
aatccacgag cacagcctac atggagctct cgagtctgag                                100

```

<210> 44

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3EPA

<400> 44

```

agaacctgg catagcccga gtctctcgca cagaaatata cggccgagtc ctcagatctc      60
agactcgaga gctcc                                                                75

```

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Primer F3PrS

<400> 45

ttcttgcca tagtatgtat

20

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> Primer F3PrA

<400> 46

agaacatgg catagccc

18

<210> 47

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3vHS

<400> 47

ttcttgcca tagtatgtat gaccogaaat tccagggcag agtctcgatt accgeggacg 60
agtcaacgaa gatagcctac atggagctca acagtctgag 100

<210> 48

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3vHA

<400> 48

agaaccatgg catagcccgga gtctctcgca cagaaataaa cggccgtgtc ctcagatctc 60

agactggttga gctcc 75

<210> 49

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本 “d” 的核苷酸序列

<400> 49

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

ggt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96
 Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
 1 5 10
 cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 cag aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90
 tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

- <210> 50
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“d”的氨基酸序列

<400> 50

```

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

```

<210> 51

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“e”的核苷酸序列

<400> 51

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1           5           10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15          20          25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
      30          35          40          45

gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50          55          60

ccg aaa ttc cag ggc aga gtc tcg att acc gcg gac gag tca acg aag      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys
      65          70          75

ata gcc tac atg gag ctc aac agt ctg aga tct gag gac acg gcc gtt      336
Ile Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
      80          85          90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95          100         105

```

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “e” 的氨基酸序列

<400> 52

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 53

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3SSS

<400> 53

ttottggcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggcag agtcacgatt accgoggaca 60

catccacgag cacagcctac atggagctca ggagcctgag 100

<210> 54

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3SSA

<400> 54

agaaccatgg catagcccga gtototogca cagtaataca cggccgtgtc gtcagatctc 60

aggctcctga gctcc 75

<210> 55

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3CDS

<400> 55

ttctttggcca tagtatgtat gaccgaaat tccagggcaa agccactctg actgcagacg 60
aatcctccag cacagcctac atgcaactct cgagcctacg 100

<210> 56

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3CDA

<400> 56

agaacctgg catagccga gtctcttgca caagaataga ccgcagagtc ctcagatogt 60
aggctcgaga gttgc 75

<210> 57

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“f”的核苷酸序列

<400> 57

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

<210> 58
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> 人源化 H 链 V 区的版本“f”的氨基酸序列

<400> 58
 Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115

<210> 59
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“g”的核苷酸序列

<400> 59

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aaa gcc act ctg act gca gac gaa tcc tcc agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser	
65 70 75	

aca gcc tac atg caa ctc tcg agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc 336

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

80

85

90

tat tct tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384

Tyr Ser Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

100

105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 60

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“g”的氨基酸序列

<400> 60

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 61

<211> 100

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3ADS

<400> 61

ttcttgcca tagtatgtat gaccgaaat tocagggcog cgtcaccatg tcagccgaca 60

agtctccag cgcgcctat ttacagtgga ccagccttaa 100

<210> 62

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3ADA

<400> 62

agaaccatgg catagccoga gtctctcgcg cagaaatata tggcgggtgc cgaggcctta 60

aggctgggtcc actgt

75

<210> 63
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链的版本“h”的核苷酸序列

<400> 63

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	

```

ccg aaa ttc cag ggc cgc gtc acc atg tca gcc gac aag tcc tcc agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser
      65              70              75

gcc gcc tat tta cag tgg acc agc ctt aag gcc tcg gac acc gcc ata      336
Ala Ala Tyr Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
      80              85              90

tat ttc tgc gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95              100             105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110              115

```

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “h” 的氨基酸序列

<400> 64

```

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

```


agaaccatgg catagcccga gtctctcgca cagtaataca cggccgtgtc ttcagatctc 60
 aggctgctca gttcc 75

<210> 67
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3BMS

<400> 67
 ttottggcca tagtatgtat gaccogaaat tccagggcag agtcacottt accgoggaca 60
 catccogcaa cacagcctac atggagttga ggagcctcag 100

<210> 68
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>
 <223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3BMA

<400> 68
 agaaccatgg catagcccga gtctctcgca caataataaa cagccgtgtc tgcagatctg 60
 aggtcctca actcc 75

<210> 69
 <211> 414
 <212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“i”的核苷酸序列

<400> 69

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aca tcg acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser	
65 70 75	

aca gtc ttc atg gaa ctg agc agc ctg aga tct gaa gac acg gcc gtg 336
 Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat tac tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

<210> 70

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “i” 的氨基酸序列

<400> 70

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

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 71

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“j”的核苷酸序列

<400> 71

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg 48

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly

-15

-10

-5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg 96

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg

1

5

10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile

15

20

25

aaa gac tac tat atg cat tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt cta 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gaa tgg att ggt ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acc ttt acc gcg gac aca tcc gcg aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc aga tct gca gac acg got gtt 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 tat tat tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“j”的氨基酸序列

<400> 72

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

001107

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

<210> 73

<211> 79

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2MPS

<400> 73

ttctatgcat tgggtgogcc aggctccagg acagggcctg gagtggatgg gagggaatga 60
 tctgagaat ggccattct 79

<210> 74

<211> 79

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2MPA

<400> 74

```
agaatggcca ttgcaggat cattccctcc catccactcc aggcctgtc ctggagcctg      60
gcgcacccaa tgcataaaa                                     79
```

<210> 75

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本 "b1" 的核苷酸序列

<400> 75

```
atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5
```

```
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1          5          10
```

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att 144
 Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 15 20 25
 aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg 192
 Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 30 35 40 45
 gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac 240
 Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
 50 55 60
 ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac 288
 Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
 65 70 75
 aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
 80 85 90
 tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc 414
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 110 115

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“b1”的氨基酸序列

<400> 76

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

<210> 77

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“d1”的核苷酸序列

<400> 77

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cgc cag gct cca gga cag ggc ctg	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg atg gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Met Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	
ccg aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc	288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser	
65 70 75	
aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val	
80 85 90	
tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
95 100 105	
ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc	414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser	
110 115	

<210> 78

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“d1”的氨基酸序列

<400> 78

```

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

```

<210> 79

<211> 79

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2VHS

<400> 79

ttctatgcat tgggtgcgac aggccctgg acaaggcctt gaggatg gagggaatga 60
tctggaat ggccatctt 79

<210> 80

<211> 79

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2VHA

<400> 80

aagatggcca ttcgaggat cattcoctcc aatccactca agcccttgc caggggctg 60
tgcacccaa tgcataaaa 79

<210> 81

<211> 414

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本 "b3" 的核苷酸序列

<400> 81

```

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg      48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
      -15          -10          -5

gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg      96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg
      1           5           10

cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att      144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile
      15          20          25

aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt      192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
      30          35          40          45

gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac      240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp
      50          55          60

ccg aaa ttc cag ggc cga gtc aca atc act gca gac aca tcc acg aac      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
      65          70          75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac aca gcc att      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile
      80          85          90

tat tac tgt gca aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95          100          105

```

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc

414

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

110

115

<210> 82

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“b3”的氨基酸序列

<400> 82

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

1

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115

<210> 83
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(57)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (58)...(414)

<223> 编码人源化 H 链 V 区的版本“d3”的核苷酸序列

<400> 83

atg aaa tgc agc tgg gtc atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
-15 -10 -5	
gtt aac tca cag gtg cag ctg ttg gag tct gga gct gtg ctg gca agg	96
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg	
1 5 10	
cct ggg act tcc gtg aag atc tcc tgc aag gct tcc gga ttc aac att	144
Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
15 20 25	
aaa gac tac tat atg cat tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt	192
Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	
30 35 40 45	
gag tgg att gga ggg aat gat cct gcg aat ggc cat agt atg tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp	
50 55 60	

O. 11. 27

```

cgc aaa ttc cag ggc aga gtc acg att act gcg gac gaa tcc acg agc      288
Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser
      65              70              75

aca gcc tac atg gag ctc tcg agt ctg aga tct gag gac tcg gcc gta      336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val
      80              85              90

tat ttc tgt gcg aga gac tcg ggc tat gcc atg gac tac tgg ggc caa      384
Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      95              100             105

ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca gct agc                                414
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110              115

```

<210> 84

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 "d3" 的氨基酸序列

<400> 84

```

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

```

001127

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115

<210> 85

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组载体 (shuffling vector) h5Lv1S

<400> 85

gtctagatct ccaccatgag ggcccctgct cagttttttg ggatcttggt gctctggtt 60
ccagggatcc gatgtgacat ccagatgacc cagtctcc 98

<210> 86

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组载体 (shuffling vector) h5Lv4S

<400> 86

ttggcagatg gggtoccatc aaggttcagt ggctccggat ctggtaccga tttcactctc 60
 accatctoga gtctgcaacc tgaagatddd gcaactta 98

<210> 87

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组载体 (shuffling vector) h5Lv2A

<400> 87

cttaagaagc ttttaatgac ctgtgaggcc ttgcacgtga tggtgactct gtctcctaca 60
 gatgcagaca gggaggatgg agactgggac atctggat 98

<210> 88

<211> 98

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组载体 (shuffling vector) h5Lv3A

<400> 88

gatgggaccc catctgcaa actagttgca taatagatca ggagcttagg ggctttccot 60
 ggctttctgct gataccaact taagaagctt ttaatgac 98

<210> 89

<211> 94

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组载体 (shuffling vector) h5Lv5A

<400> 89

tgttcgtaag tttgatctcc accttggctc ctccgcgaa cgtgtacggg ctctcaccaat 60
gctgcagaca gtagtaagtt gcaaaatctt cagg 94

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 h5LvS

<400> 90

gtctagatct ccaccatgag 20

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 引物 h5LvA

<400> 91

tgttcgtaag tttgatctc 19

<210> 92
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (61)...(381)

<223> 编码人源化 L 链 V 区的版本“a”的核苷酸序列

<400> 92

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20          -15          -10          -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          1          5          10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          15          20          25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          30          35          40

```

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240
 Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 45 50 55 60
 agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat ttc act ctc acc atc tcg 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt ctg cag cat ggt 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
 80 85 90
 gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 95 100 105

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本 "a" 的氨基酸序列

<400> 93

Asp Ile Gln 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 Asp Ile Lys Ser Phe
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 94

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3SS

<400> 94

gtctggtacc gattacactc tcaccatctc gagcctcag cctgaagatt ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

<210> 95

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3SA

<400> 95

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaaat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggg accagac 77

<210> 96

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F3RS

<400> 96

gtctggtacc gattacaactc tcaccatctc gagcctocag cctgaagata ttgcaactta 60

ctattgtctg cagaaca 77

<210> 97

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (shuffling primer) F3RA

<400> 97

tgttctgcag acaatagtaa gttgcaatat cttcaggctg gaggctcgag atggtgagag 60

tgtaatcggg accagac 77

<210> 98

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> 编码人源化 L 链 V 区的版本“b”的核苷酸序列

<400> 98

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca 48

Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro

-20 -15 -10 -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 96

Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

1 5 10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac 144

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

15 20 25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 192

Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

30 35 40

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca 240

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

45 50 55 60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tcg 288

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80 85 90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa

381

Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95

100

105

<210> 99

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本 “b” 的氨基酸序列

<400> 99

Asp Ile Gln 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 Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

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

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 100

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> 编码人源化 L 链 V 区的版本“c”的核苷酸序列

<400> 100

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20          -15          -10          -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          1          5          10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          15          20          25

att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          30          35          40

aag ctc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
          45          50          55          60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tog      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
          65          70          75

```

agc ctc cag cct gaa gat att gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt 336
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly

80 85 90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 381
 Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

95 100 105

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本 “c” 的氨基酸序列

<400> 101

Asp Ile Gln 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 Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 102

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2SS

<400> 102

gtctcttaag ttggtccag cagaaaccag ggaatctcc taagaccctg atctactatg 60
caactagtaa ca 72

<210> 103

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2SA

<400> 103

tgttactagt tgcatagtag atcagggctc taggagattt cactggtttc tgctggaacc 60
aacttaagag ac 72

<210> 104

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2XS

<400> 104

gtctcttaag ttggtatcag cagaaaccag agaaagcccc taagtcctg atctattatg 60
caactagtaa ca 72

<210> 105

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<223> FR 改组引物 (Shuffling primer) F2XA

<400> 105

tgttactagt tgcataatag atcagggact taggggcttt ctctggtttc tgctgatacc 60
aacttaagag ac 72

<210> 106

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mot-peptide

<222> (61)...(381)

<223> 编码人源化L链V区的版本“b1”的核苷酸序列

<400> 106

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20          -15          -10          -5

ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          1          5          10

gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          15          20          25

att aaa agc ttc tta agt tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct oct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
          30          35          40

aag acc ctg atc tac tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Thr Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
          45          50          55          60

agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tog      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
          65          70          75

agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
          80          85          90

gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          95          100          105

```

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本“b1”的氨基酸序列

<400> 107

```

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

```

<210> 108

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<220>

<221> sig-peptide

<222> (1)...(60)

<220>

<221> mat-peptide

<222> (61)...(381)

<223> 编码人源化 L 链 V 区的版本“b2”的核苷酸序列

<400> 108

```

atg agg gcc cct gct cag ttt ttt ggg atc ttg ttg ctc tgg ttt cca      48
Met Arg Ala Pro Ala Gln Phe Phe Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro
-20          -15          -10          -5
ggg atc cga tgt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct      96
Gly Ile Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
          1          5          10
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc acg tgc aag gcc tca cag gac      144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
          15          20          25
att aaa agc ttc tta agt tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct      192
Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro
          30          35          40
aag tcc ctg atc tat tat gca act agt ttg gca gat ggg gtc cca tca      240
Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
          45          50          55          60
agg ttc agt ggc tcc gga tct ggt acc gat tac act ctc acc atc tgg      288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
          65          70          75
agc ctc cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt ctg cag cat ggt      336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly
          80          85          90
gag agc ccg tac acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      381
Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          95          100          105

```

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化L链V区的版本“b2”的氨基酸序列

<400> 109

Asp Ile Gln 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 Asp Ile Lys Ser Phe

20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 110

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的所有版本的 FR1 的氨基酸序列

<400> 110

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

5

10

15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20

25

30

<210> 111

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“a”至“j”的氨基酸序列

<400> 111

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

5

10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“b1”至“d1”的 FR2 的氨基酸序列

<400> 112

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

5

10

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “b3” 和 “d3” 的 FR2 的氨基酸序列

<400> 113

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

5

10

<210> 114

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “a” 的 FR3 的氨基酸序列

<400> 114

Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr Leu Glu

5

10

15

Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 115

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “b”、“b1” 和 “b3” 的 FR3 的氨基酸序列

<400> 115

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “c” 的 FR3 的氨基酸序列

<400> 116

Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg

5

10

15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “d”、“d1” 和 “d3” 的 FR3 的氨基酸序列

<400> 117

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 118

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本 “e” 的 FR3 的氨基酸序列

<400> 118

Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Lys Ile Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 119

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“f”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 119

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 5 10 15
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 120

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“g”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 120

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 121

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“h”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 121

Arg Val Thr Met Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu Gln
 5 10 15
 Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“i”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 122

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe Met Glu
 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 123

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的版本“j”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 123

Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu

5

10

15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的所有版本的 FR4 的氨基酸序列

<400> 124

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

5

10

<210> 125

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的所有版本的 FR1 的氨基酸序列

<400> 125

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本“a”、“b”、“c”的 FR2 的氨基酸序列

<400> 126

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

5

10

15

<210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本“b1”的 FR2 的氨基酸序列

<400> 127

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本 “b2” 的 FR2 的氨基酸序列

<400> 128

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 129

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本 “a” 的 FR3 的氨基酸序列

<400> 129

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 130

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本“b”、“b1”和“b3”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 130

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 131

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的版本“c”的 FR3 的氨基酸序列

<400> 131

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的所有版本的 FR4 的氨基酸序列

<400> 132

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

5

10

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的所有版本的 CDR1 的氨基酸序列

<400> 133

Asp Tyr Tyr Met His

5

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的所有版本的 CDR2 的氨基酸序列

<400> 134

Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

5

10

15

Gly

<210> 135

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 H 链 V 区的所有版本的 CDR3 的氨基酸序列

<400> 135

Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

5

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的所有版本的 CDR1 的氨基酸序列

<400> 136

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser

5

10

<210> 137

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的所有版本的 CDR2 的氨基酸序列

<400> 137

Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

5

<210> 138

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<220>

<223> 人源化 L 链 V 区的所有版本的 CDR3 的氨基酸序列

<400> 138

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr

5

<210> 139

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-2 的 H 链 V 区的氨基酸序列

<400> 139

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

5

10

15

00.11.27

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Glu Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 140

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-3 的 H 链 V 区的氨基酸序列

<400> 140

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

5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

001127

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 141

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-4 的 H 链 V 区的氨基酸序列

<400> 141

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

001107

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Asp Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 142

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-5 的 H 链 V 区的氨基酸序列

<400> 142

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

5

10

15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 143

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-7 的 H 链 V 区的氨基酸序列

<400> 143

Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser

5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asp Tyr

20 25 30

Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 144

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-8 的 H 链 V 区的氨基酸序列

<400> 144

Asp Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Asn Ile Phe Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35

40

45

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

50

55

60

Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe

65

70

75

80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gly Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asp Cys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 145

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-2 的 L 链 V 区的氨基酸序列

<400> 145

```

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

```

<210> 146

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-3 的 L 链 V 区的氨基酸序列

<400> 146

```

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

```

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

<210> 147

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-4 的 L 链 V 区的氨基酸序列

<400> 147

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

001137

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-5 的 L 链 V 区的氨基酸序列

<400> 148

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Trp Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 149

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-7 的 L 链 V 区的氨基酸序列

<400> 149

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly

5

10

15

Gln Pro Ala Ser Val Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Asp

85

90

95

Thr His Phe Pro Asp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

<210> 150

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mouse)

<220>

<223> 小鼠抗 TF 的单克隆抗体 ATR-8 的 L 链 V 区的氨基酸序列

<400> 150

```

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

```

<210> 151

<211> 780

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<223> 编码可溶性人 TF 的 DNA (DNA coding for soluble human TF)

<400> 151

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc	48
Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val	
-30 -25 -20	
gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct	96
Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala	
-15 -10 -5 -1	
tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca	144
Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser	
1 5 10 15	
act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa	192
Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln	
20 25 30	
gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa	240
Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys	
35 40 45	
tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg	288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val	
50 55 60	
aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca	366
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala	
65 70 75 80	
ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac	384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn	
85 90 95	
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca	432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr	
100 105 110	
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa	480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu	
115 120 125	

gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg 528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
130 135 140
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tot 576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
145 150 155 160
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg 624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
165 170 175
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg 672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
180 185 190
att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag 720
Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
195 200 205
tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa gac tac aaa gac gat 768
Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp
210 215 220
gac gat aaa taa 780
Asp Asp Lys
225

<210> 152

<211> 259

<212> PRT

<220>

<223>可溶性人TF的氨基酸序列

<400> 152

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
 -30 -25 -20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
 -15 -10 -5 -1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 1 5 10 15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 20 25 30

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 35 40 45

Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 50 55 60

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

Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205

00-1107

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Asp Tyr Lys Asp Asp

210

215

220

Asp Asp Lys

225

说明书附图

图 1

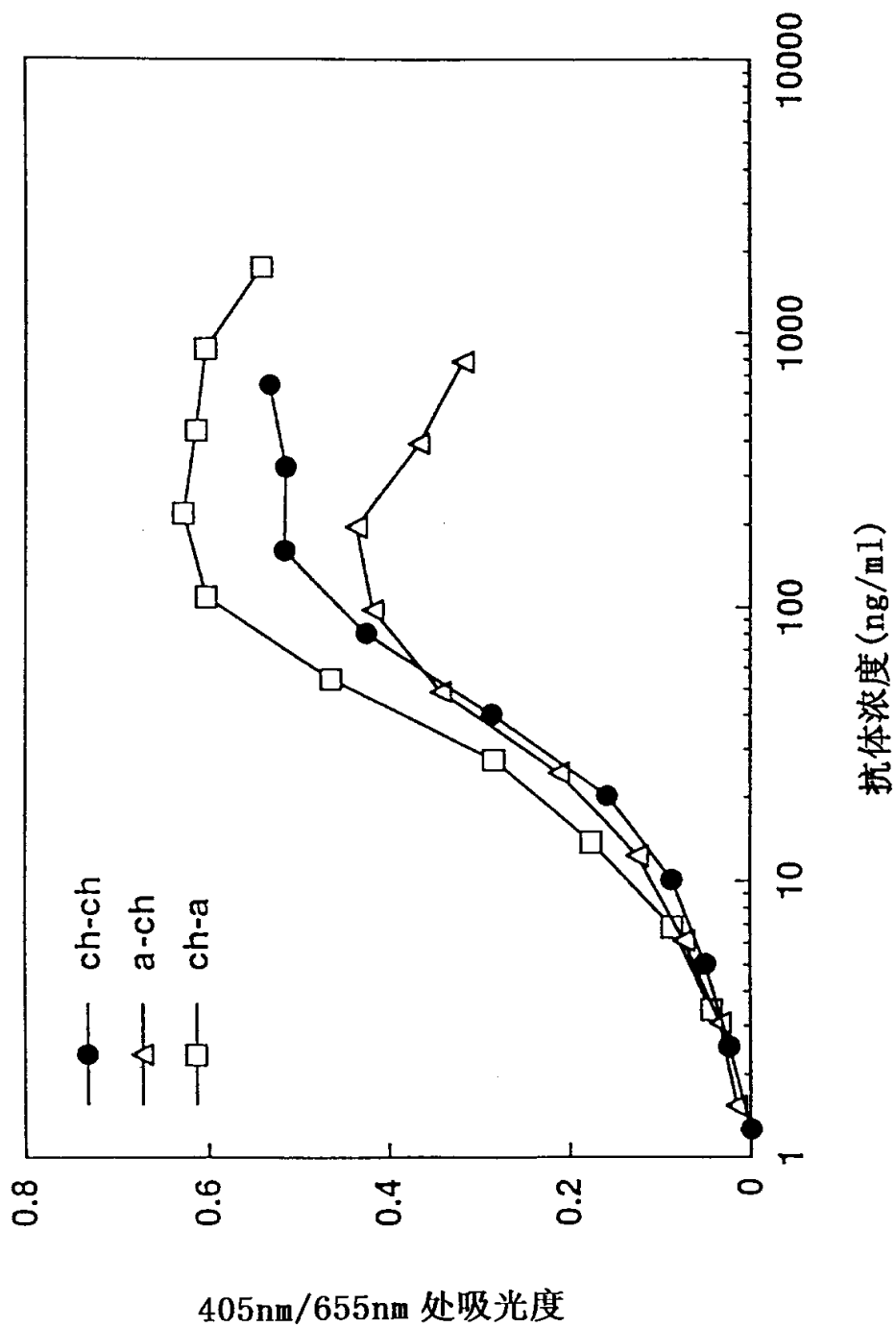


图 2

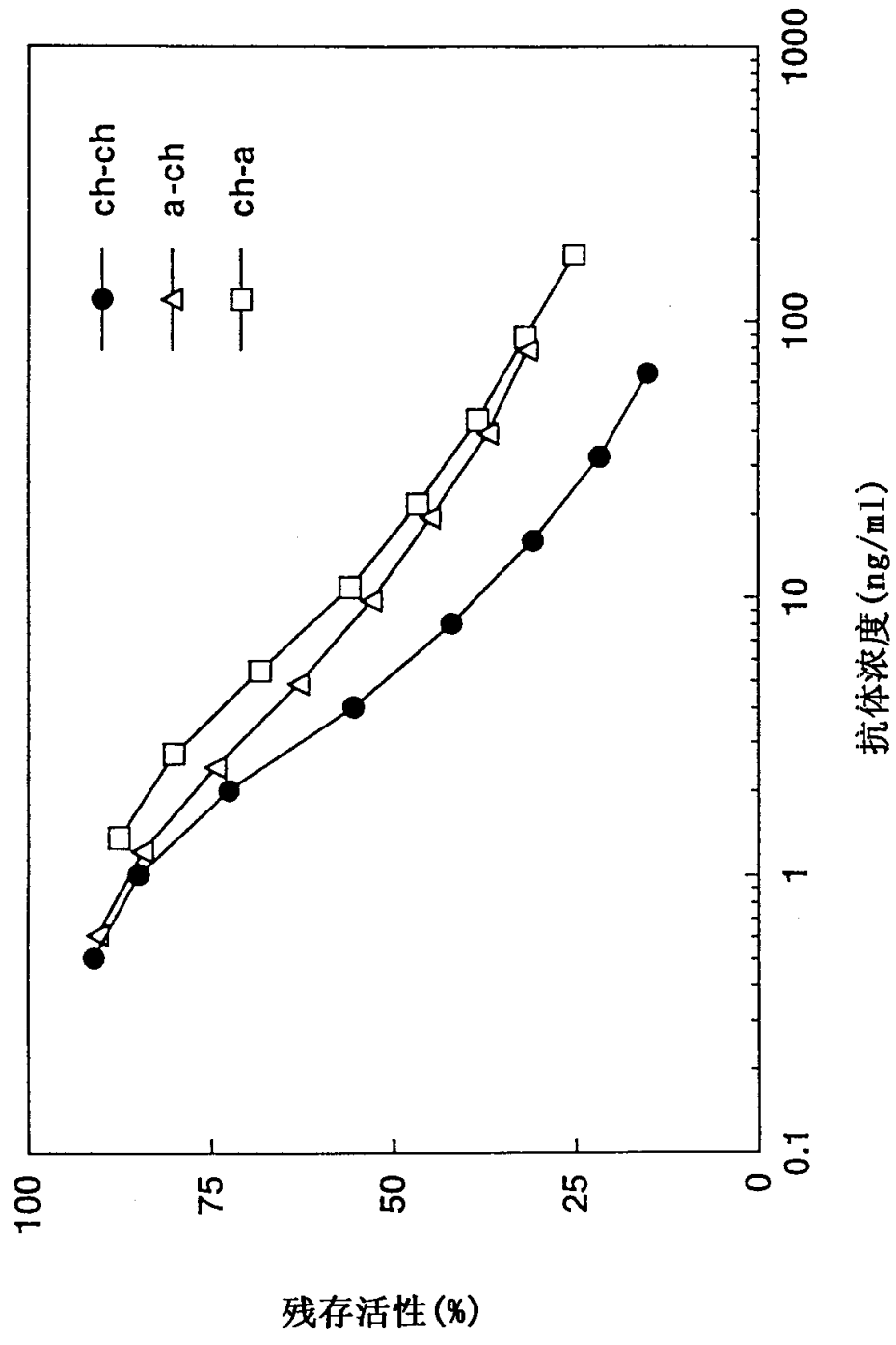


图 3

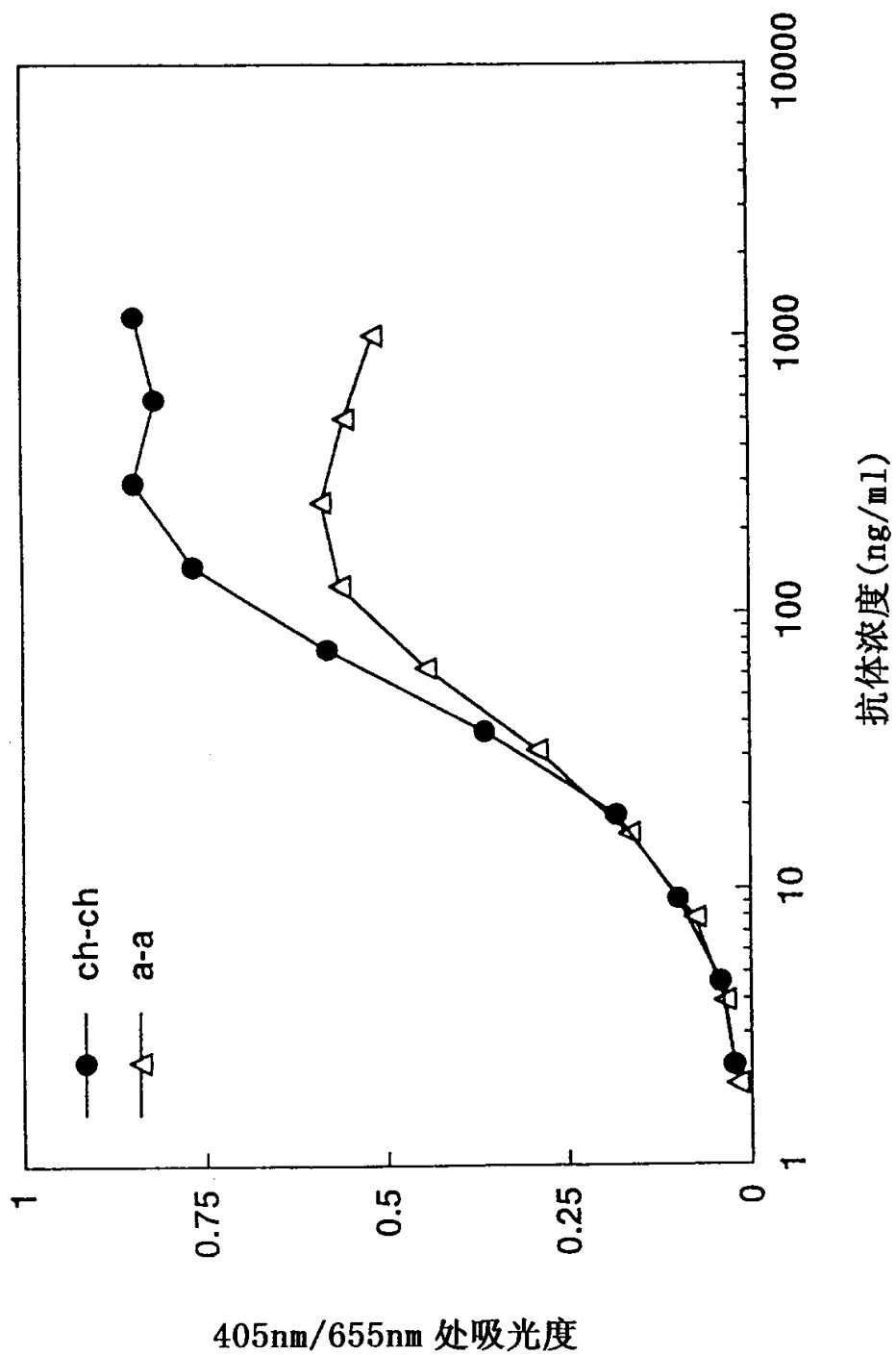


图 4

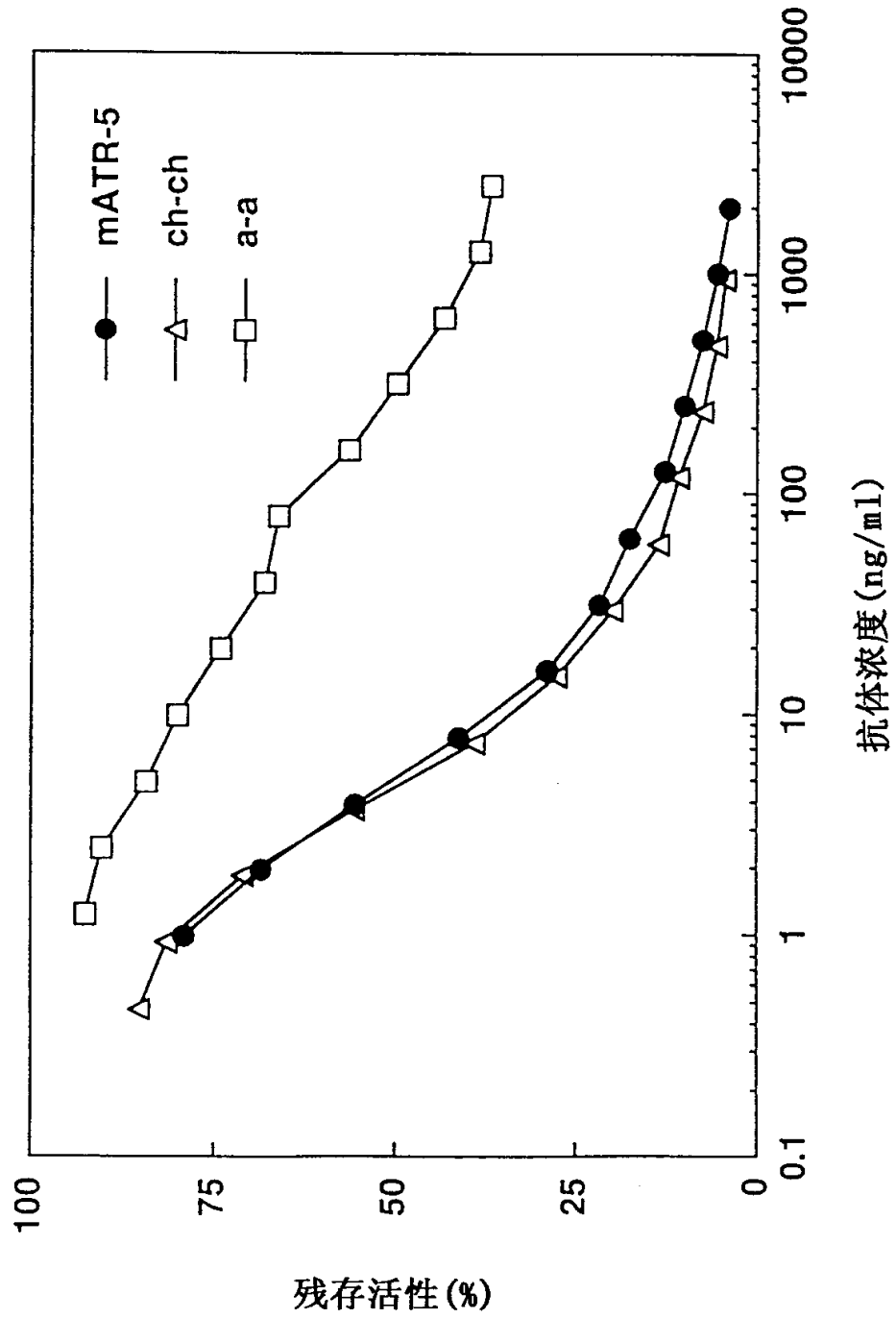


图 5

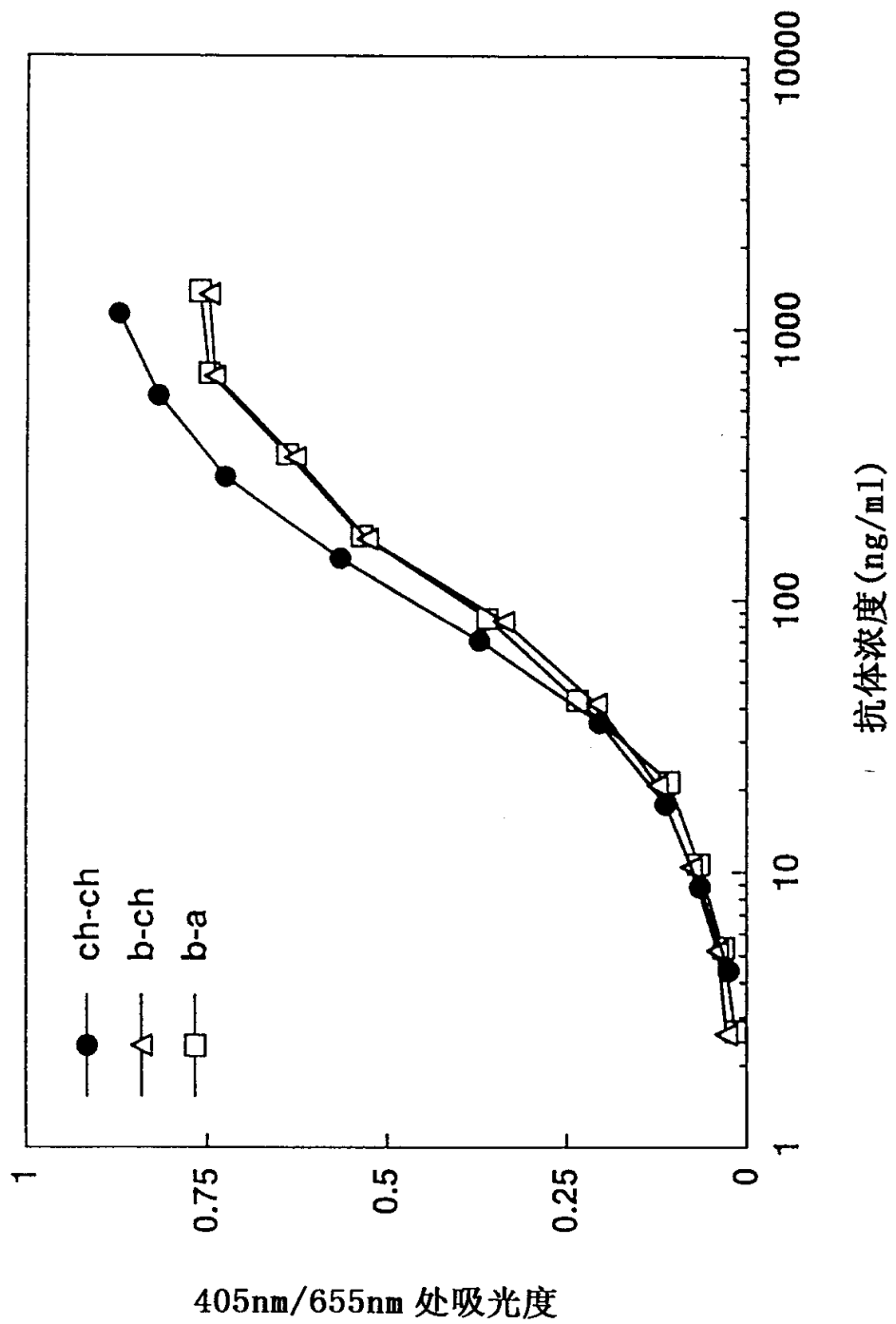


图 6

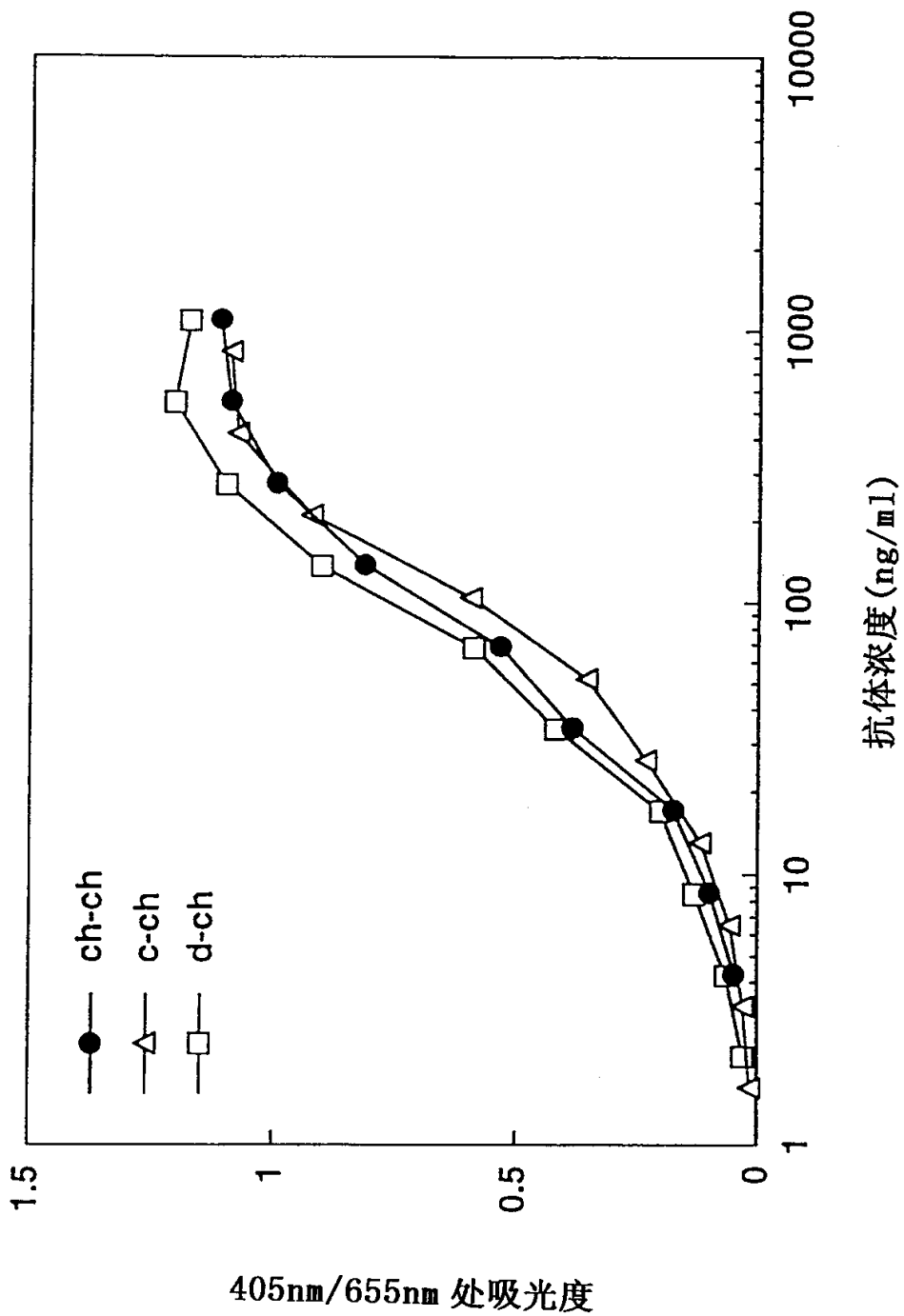


图 7

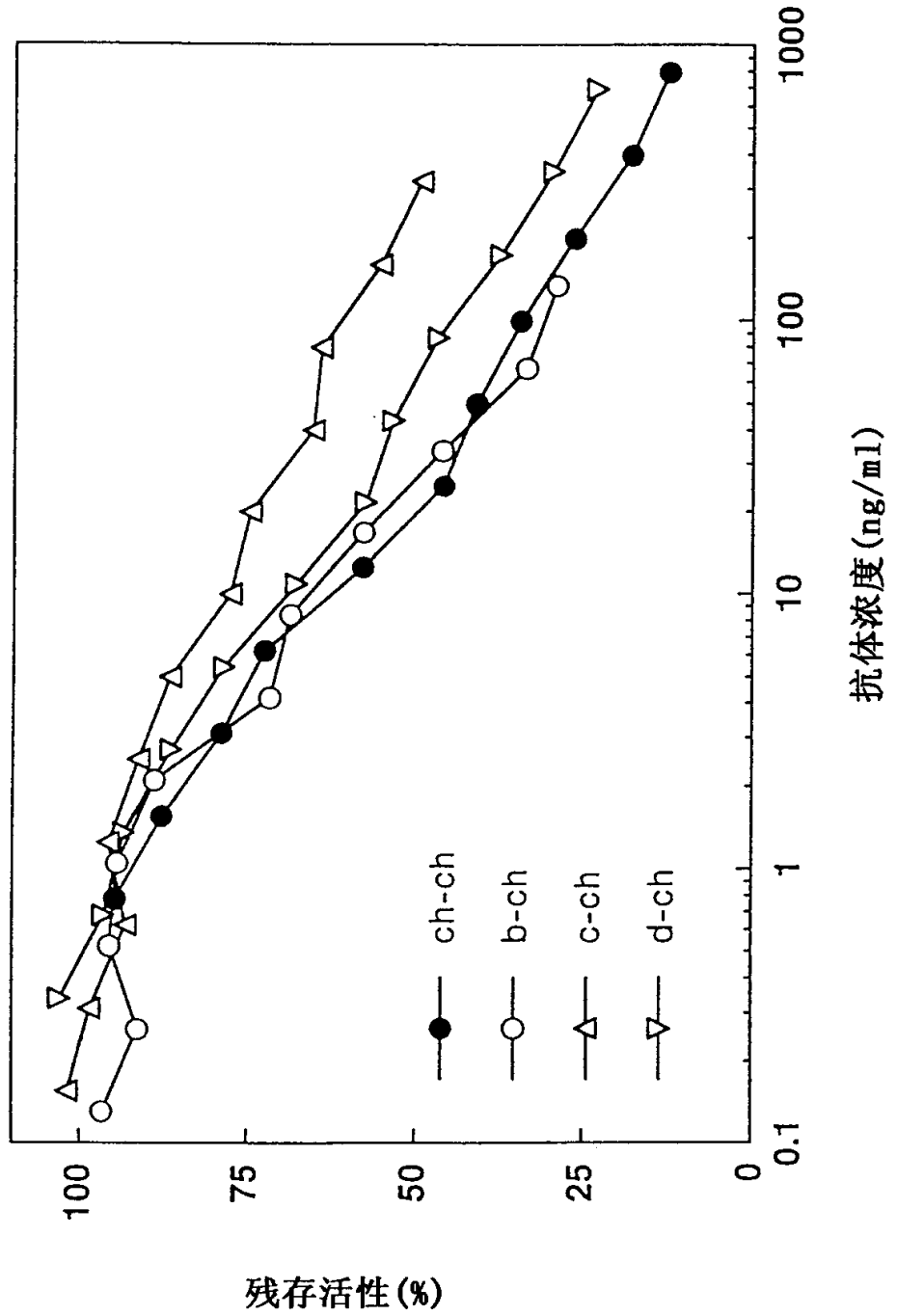


图 8

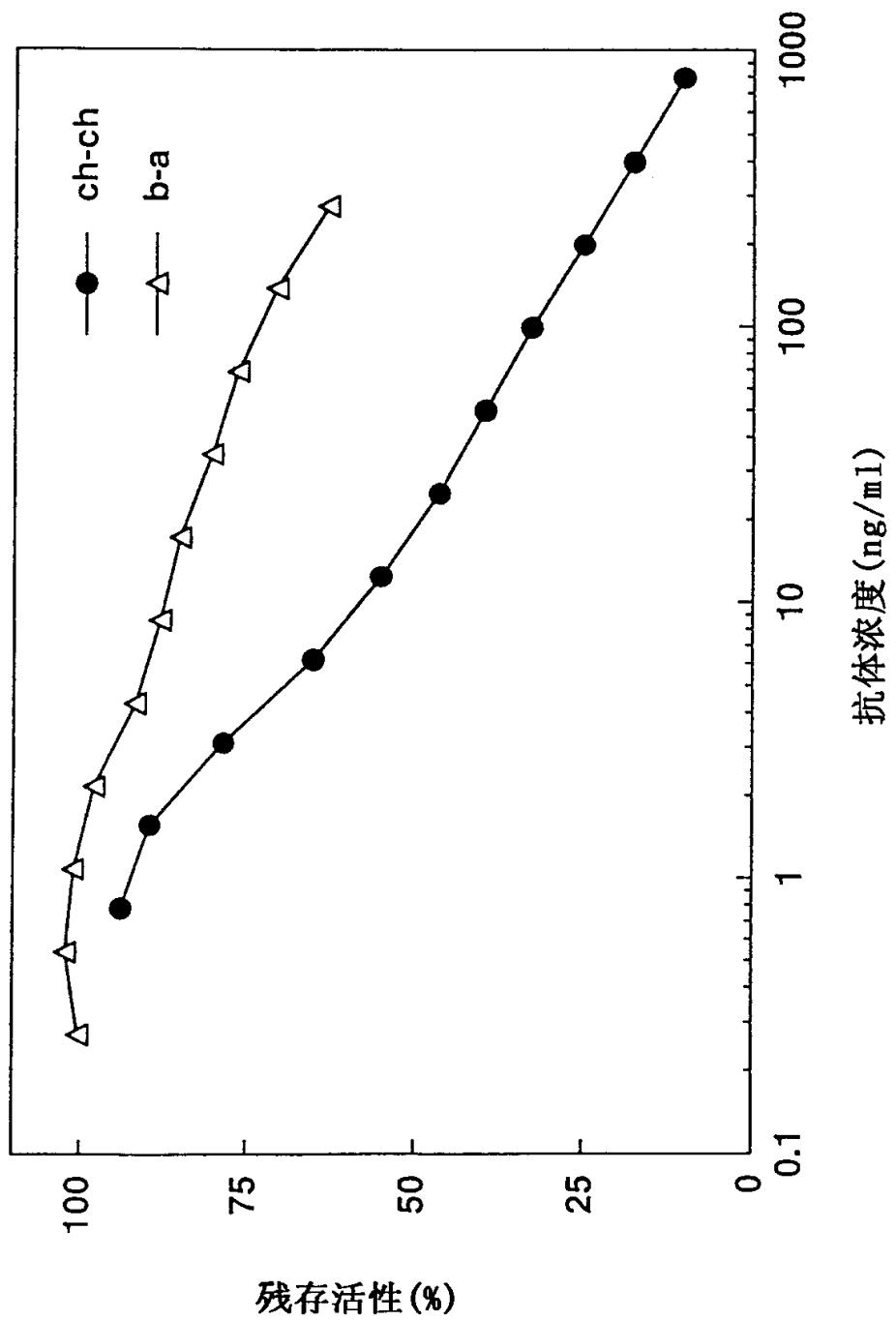


图 9

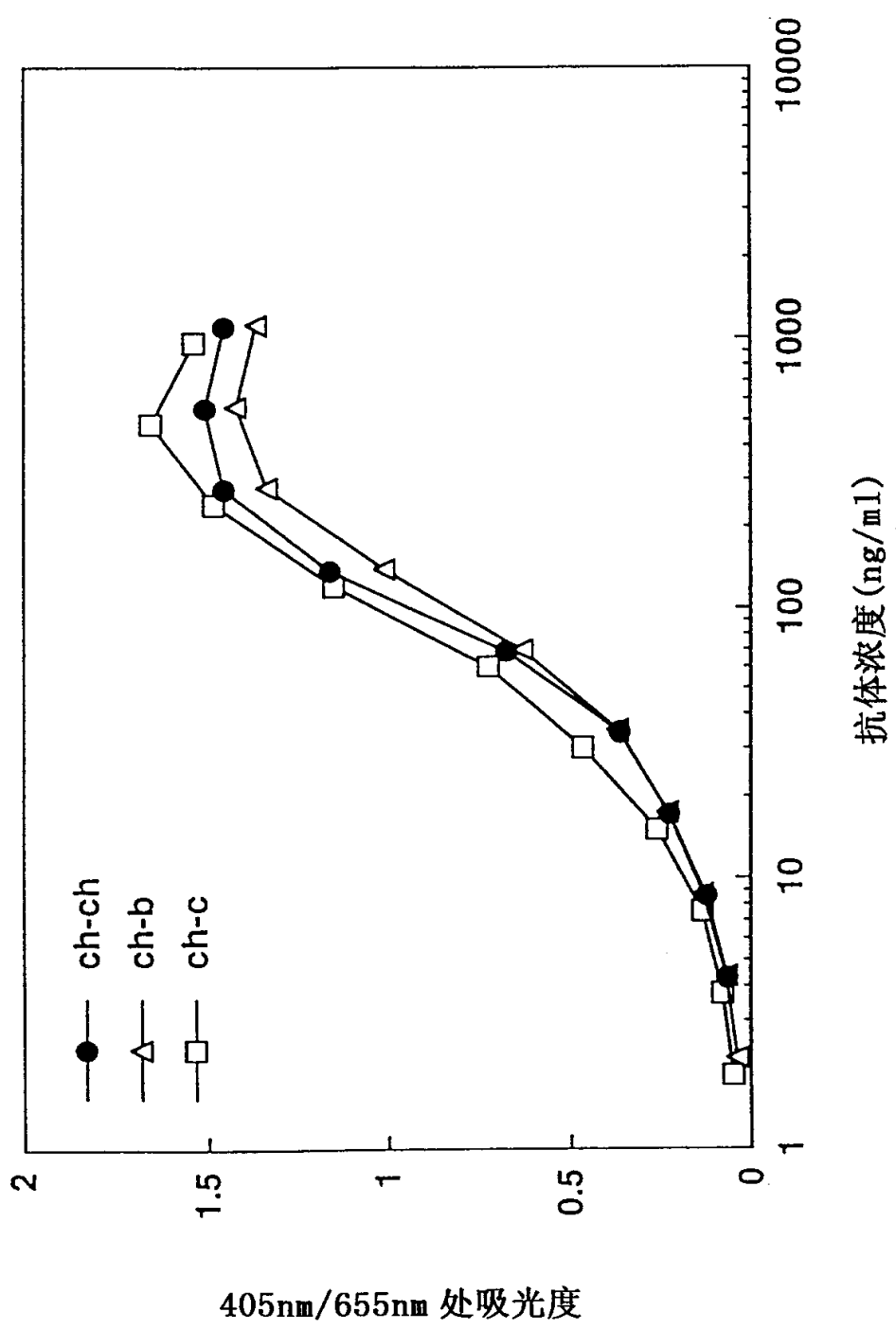


图 10

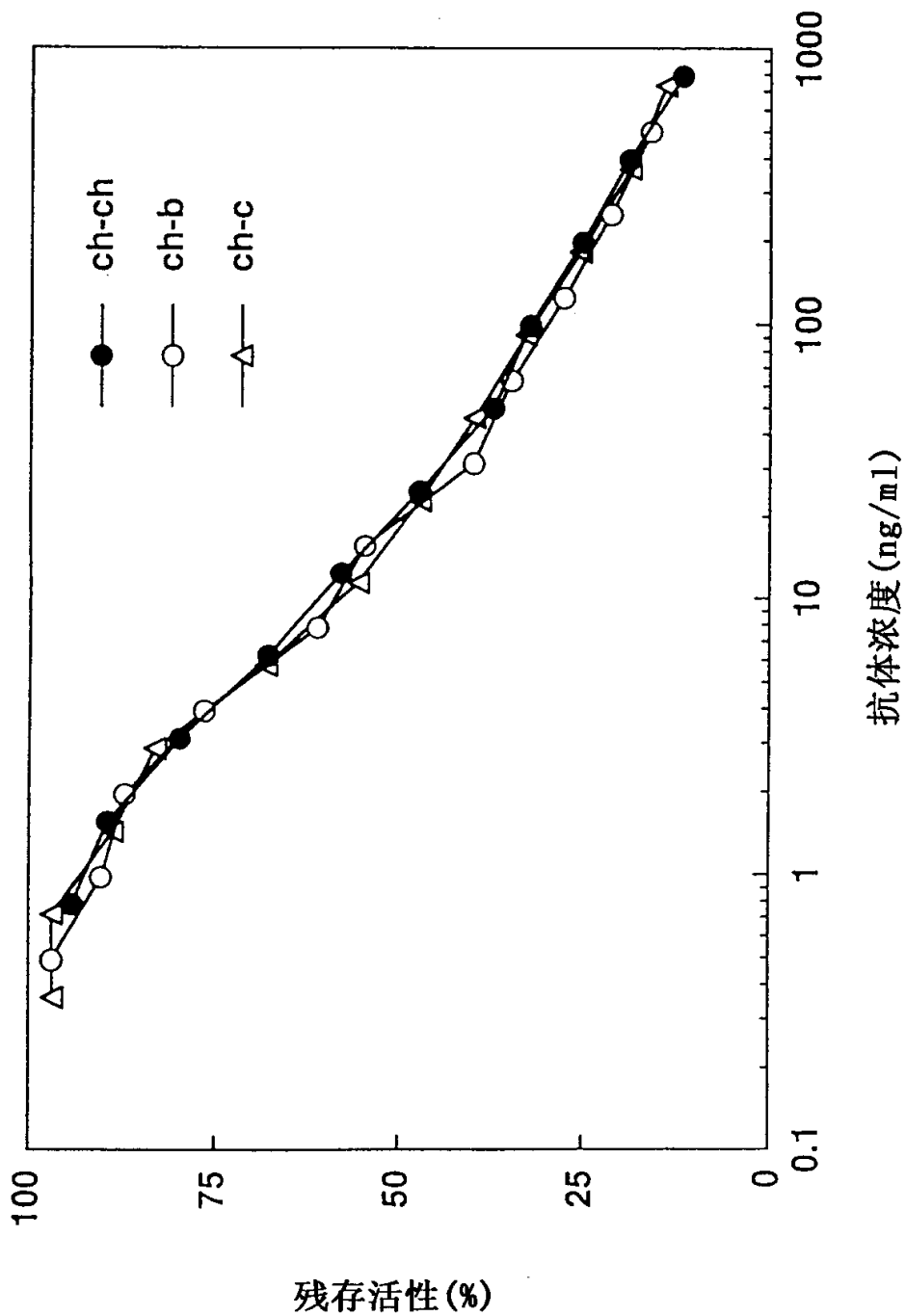


图 11

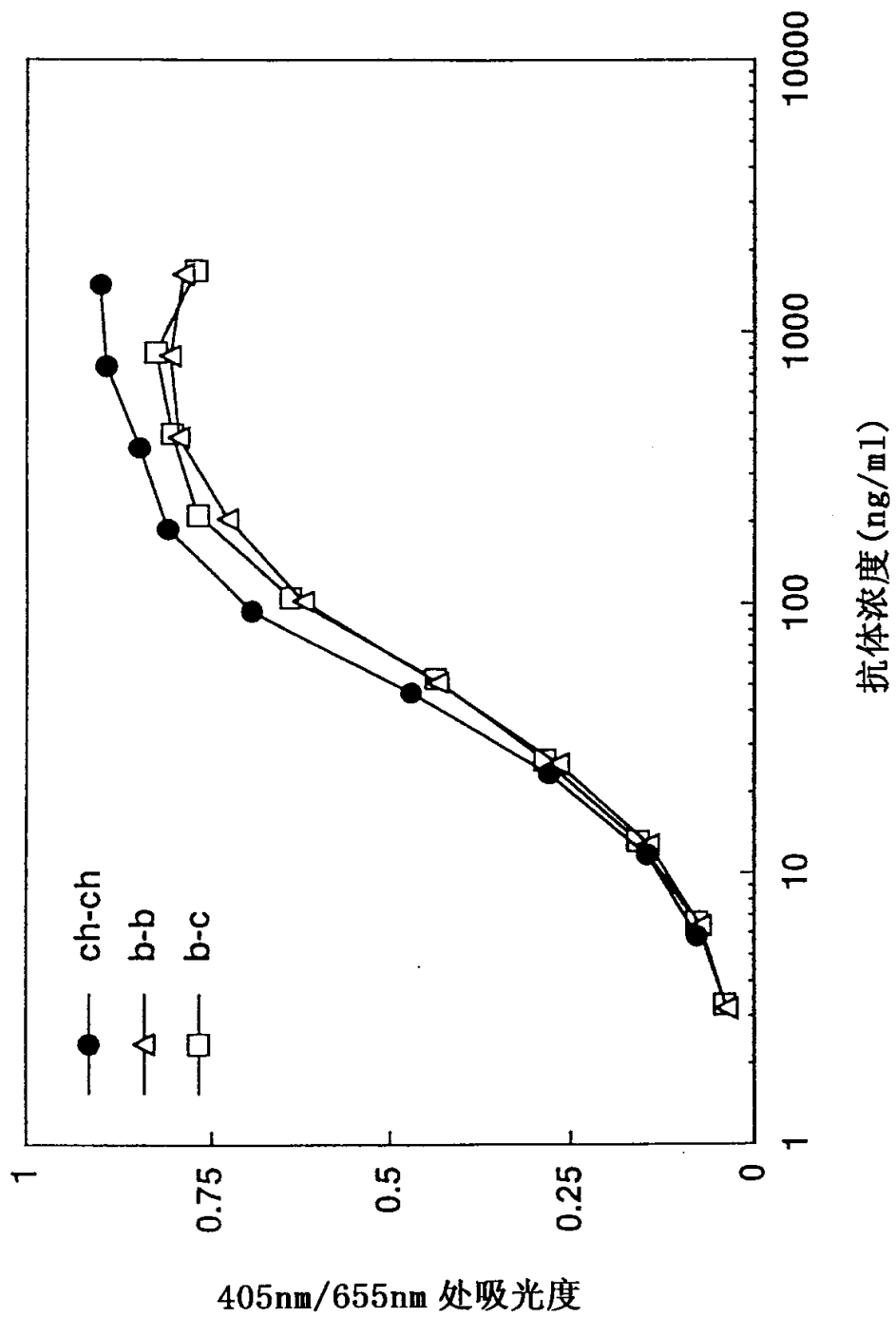


图 12

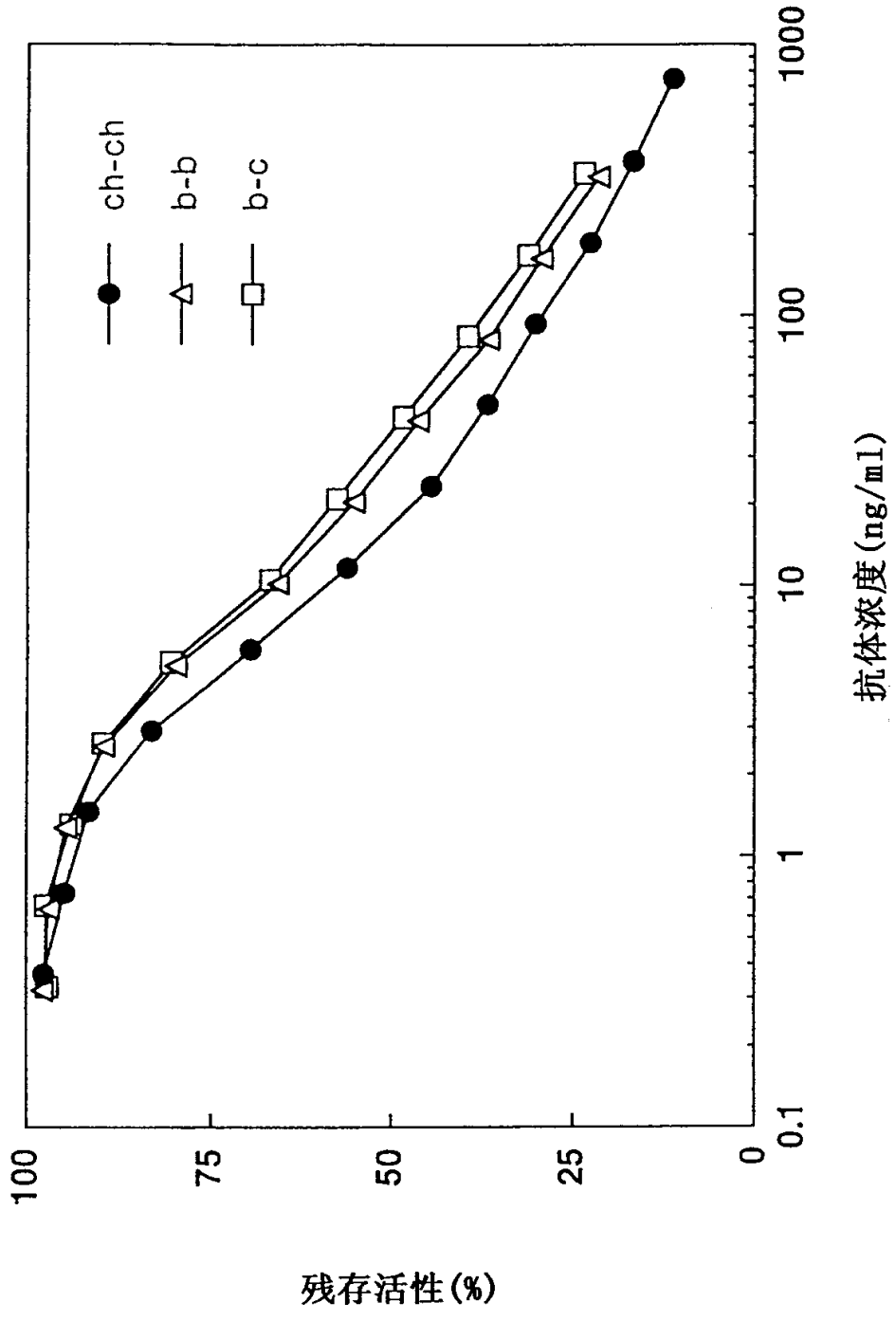


图 13

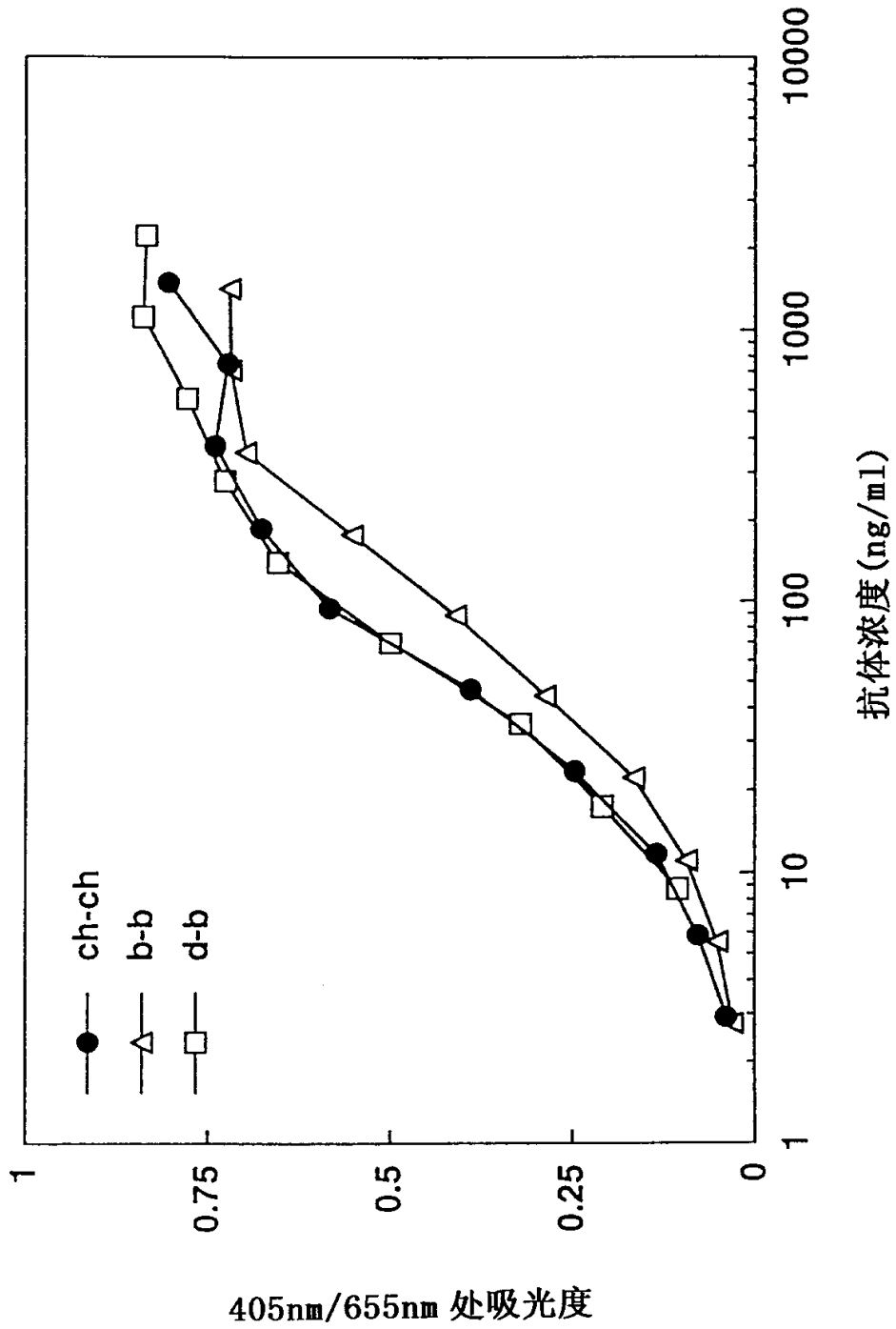


图 14

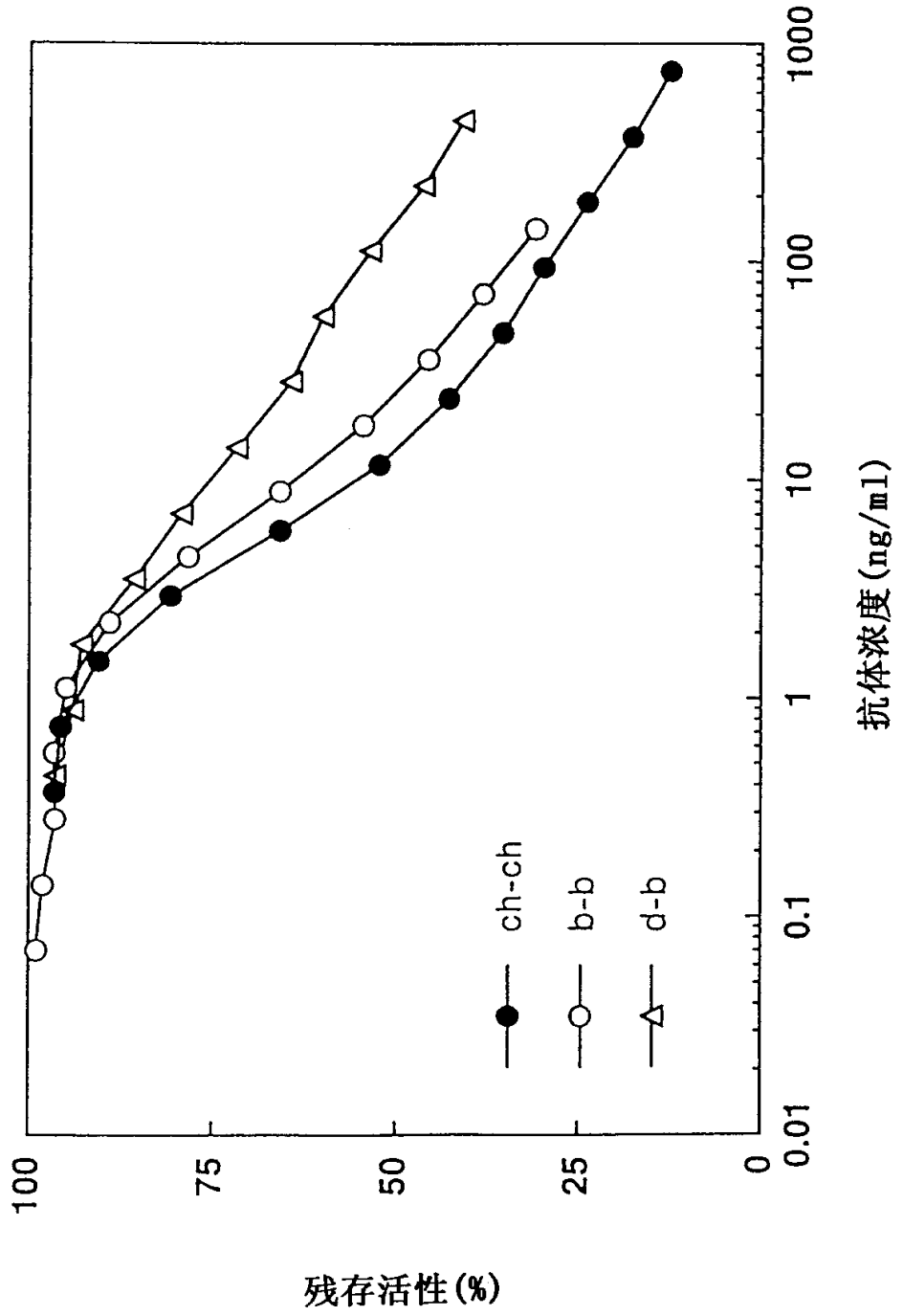


图 15

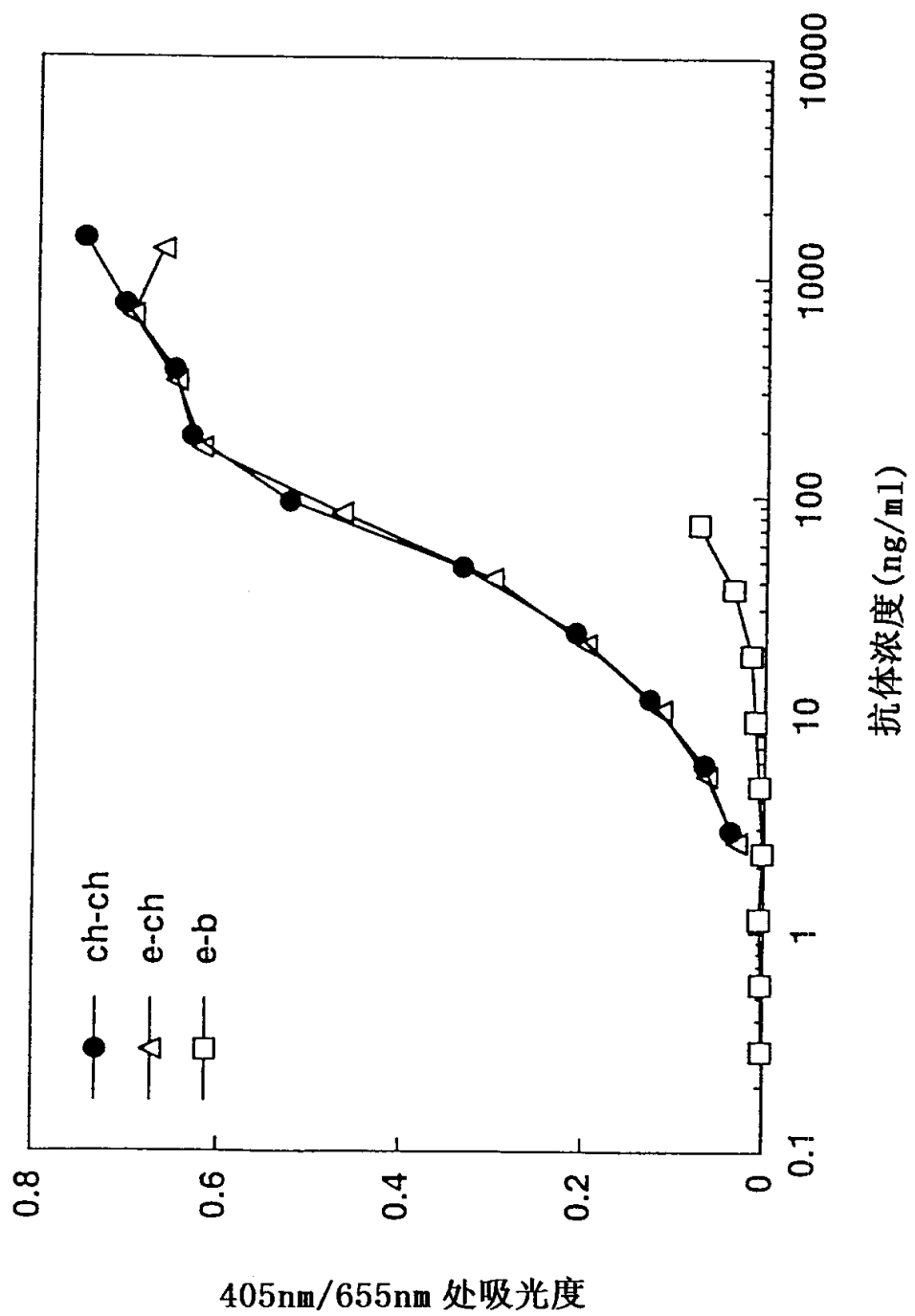


图 16

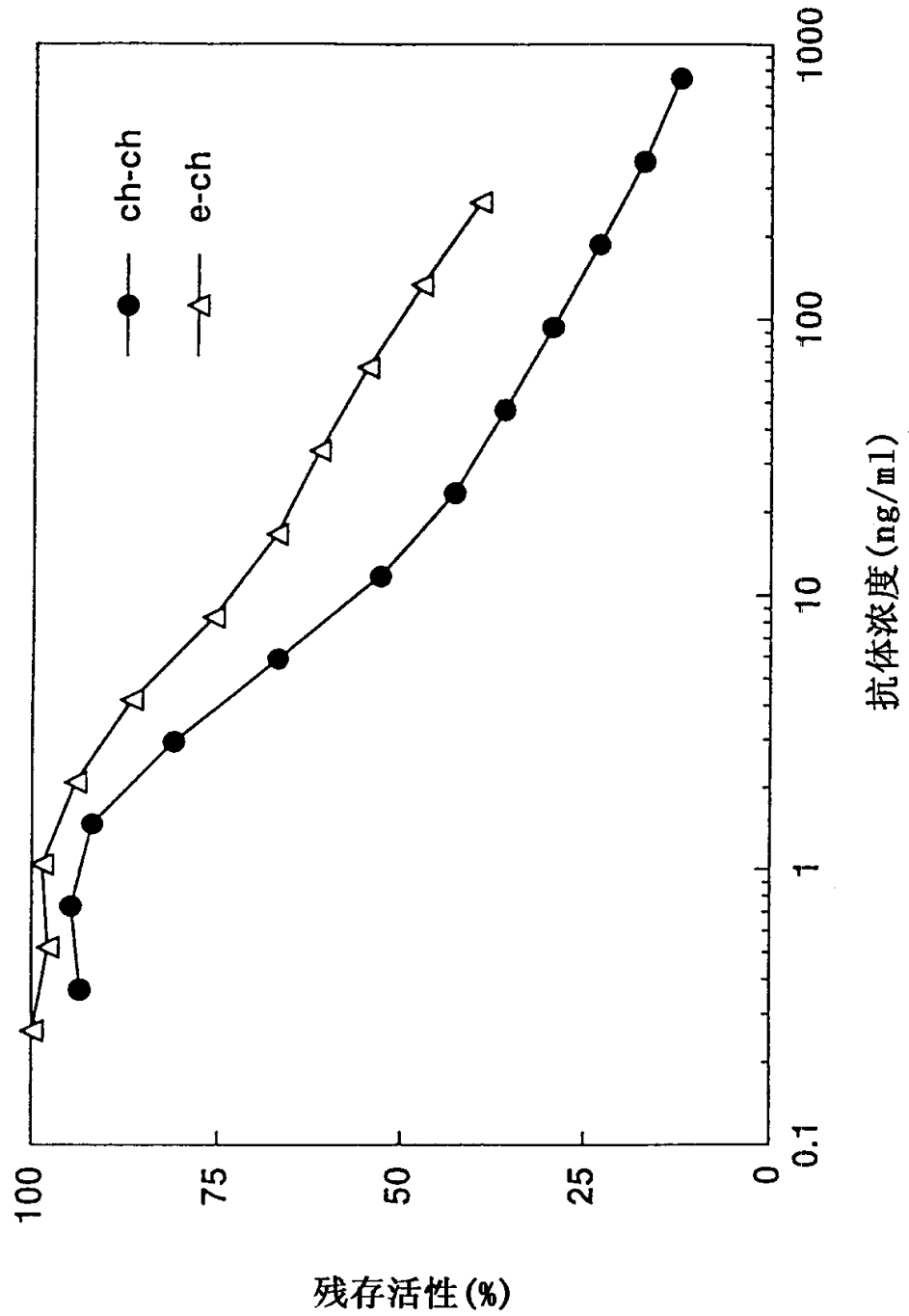


图 17

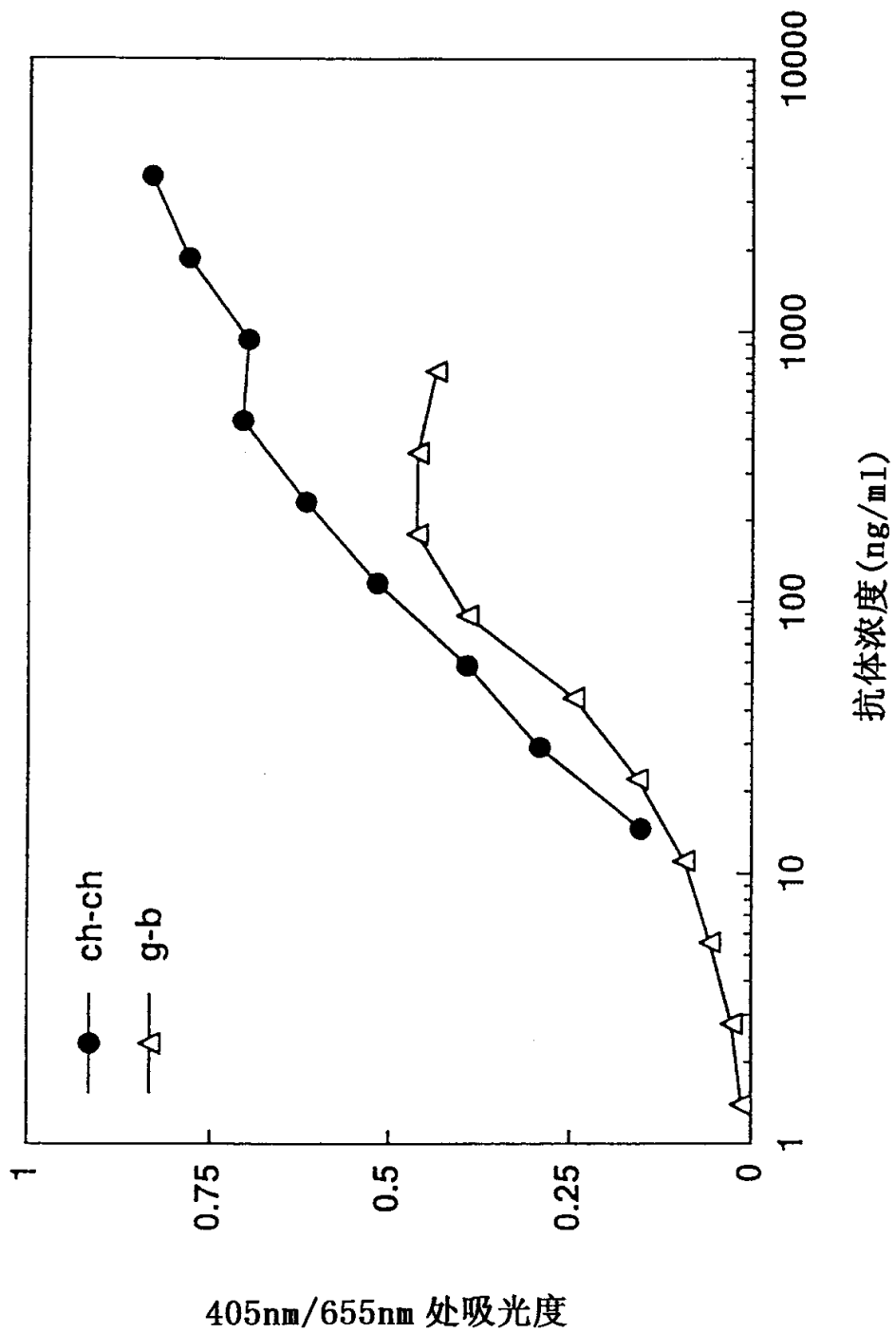


图 18

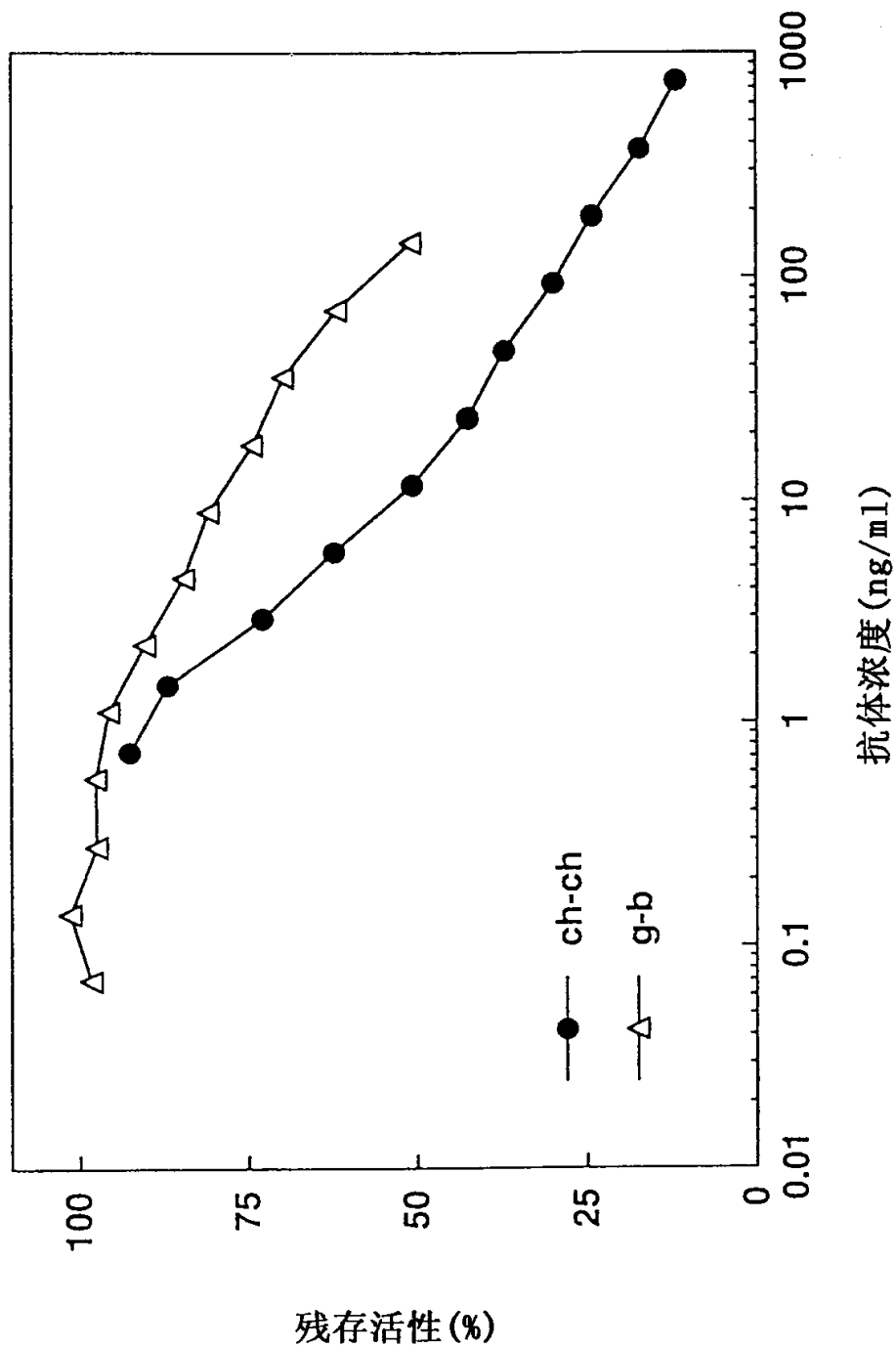


图 19

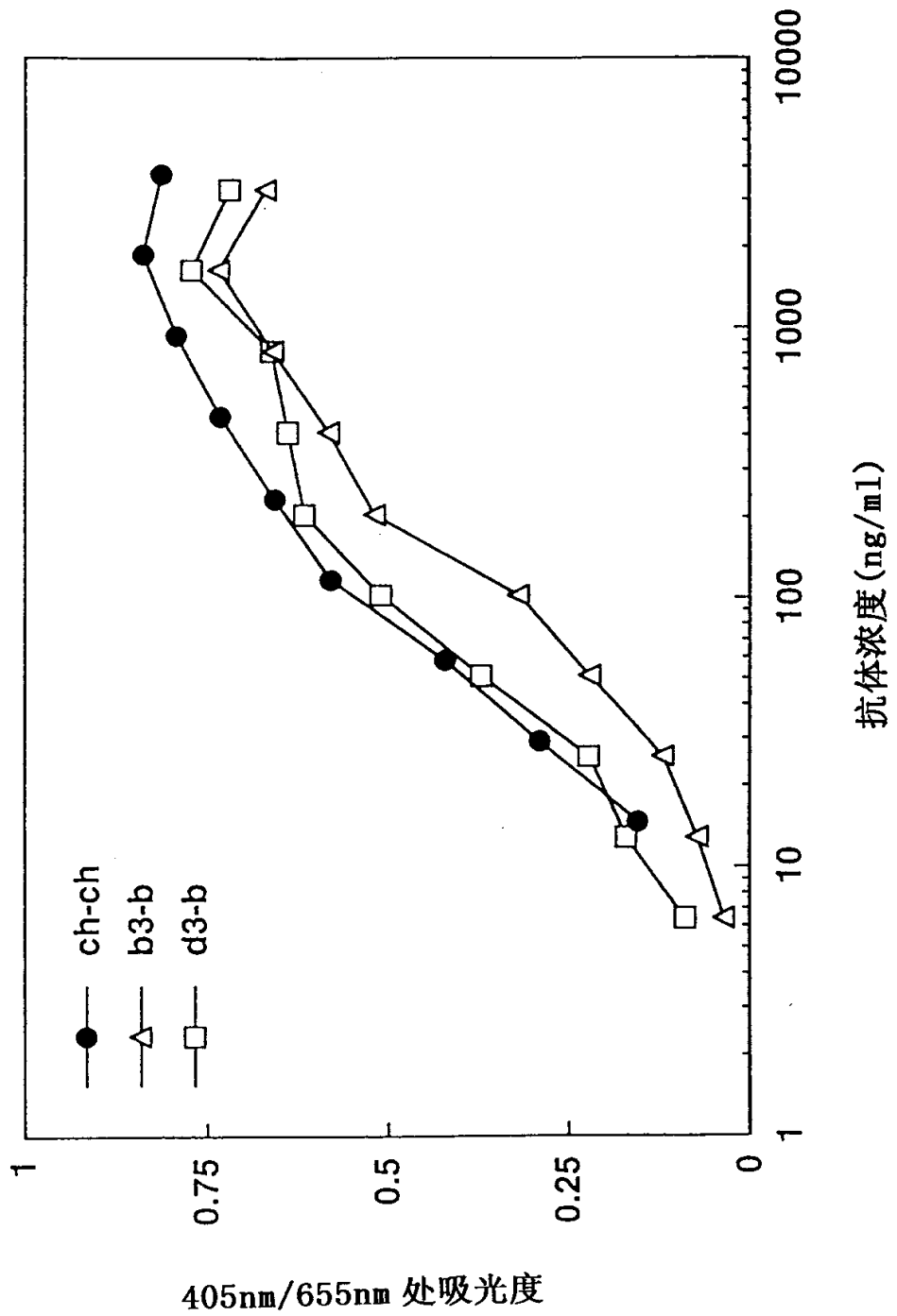


图 20

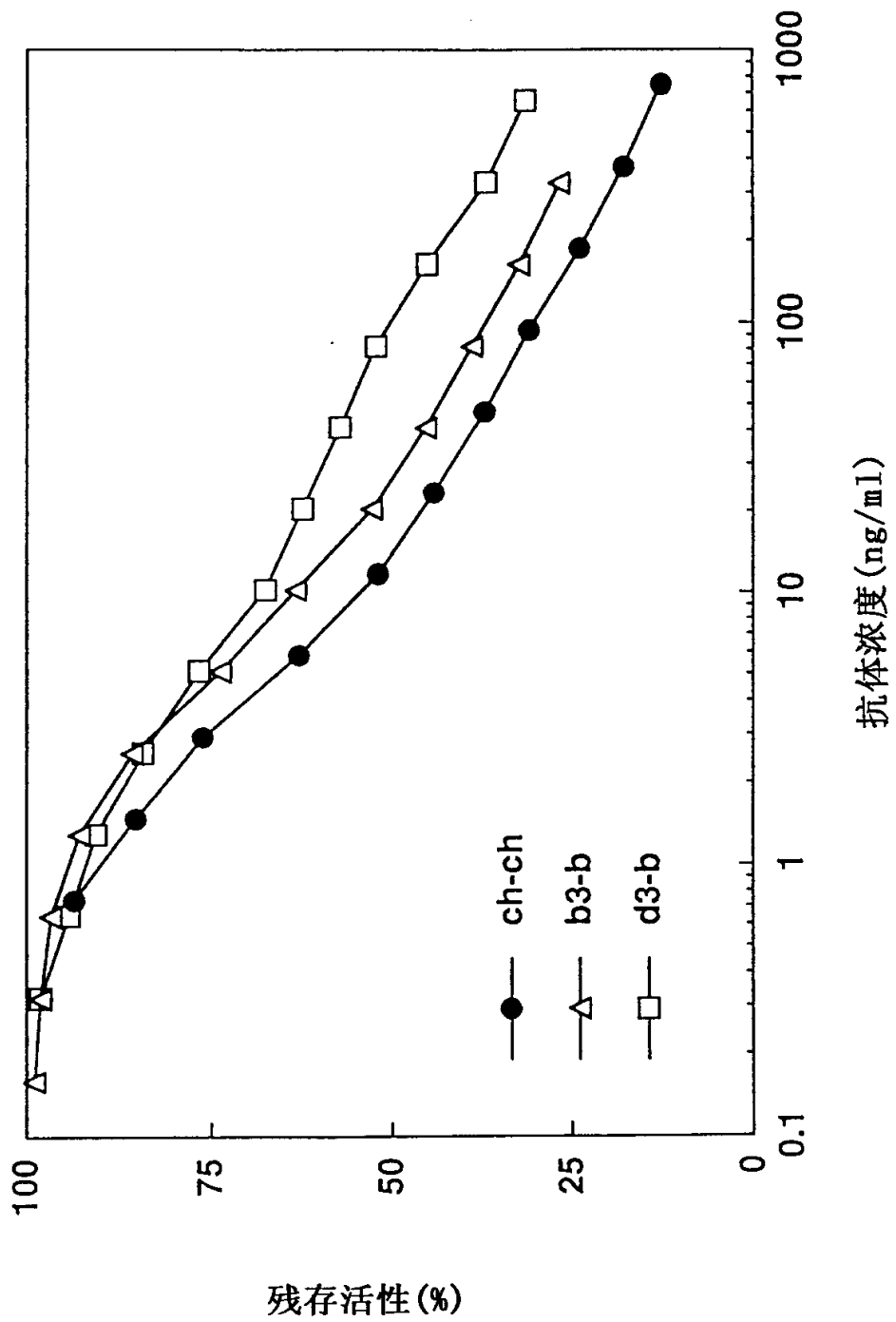


图 21

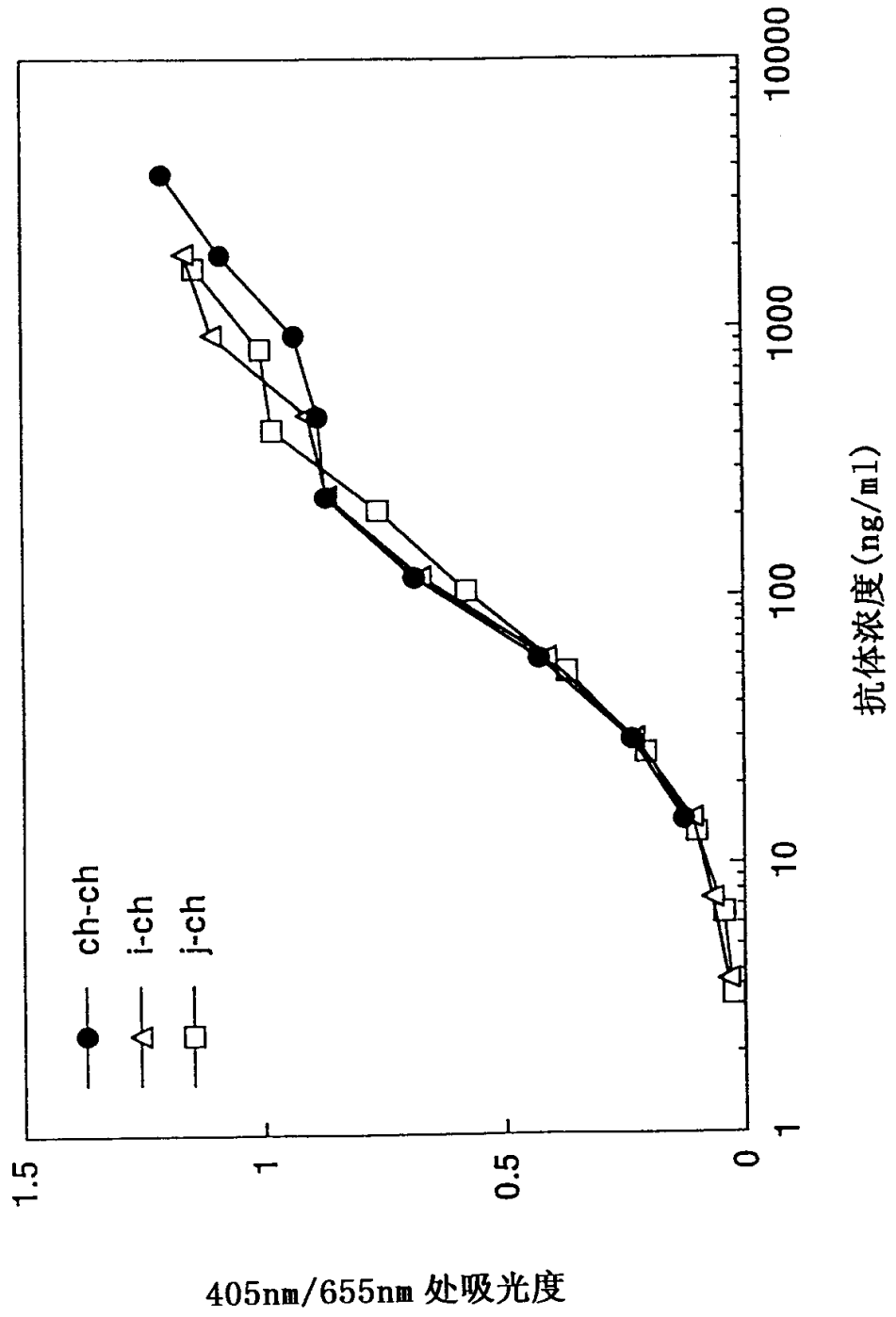


图 22

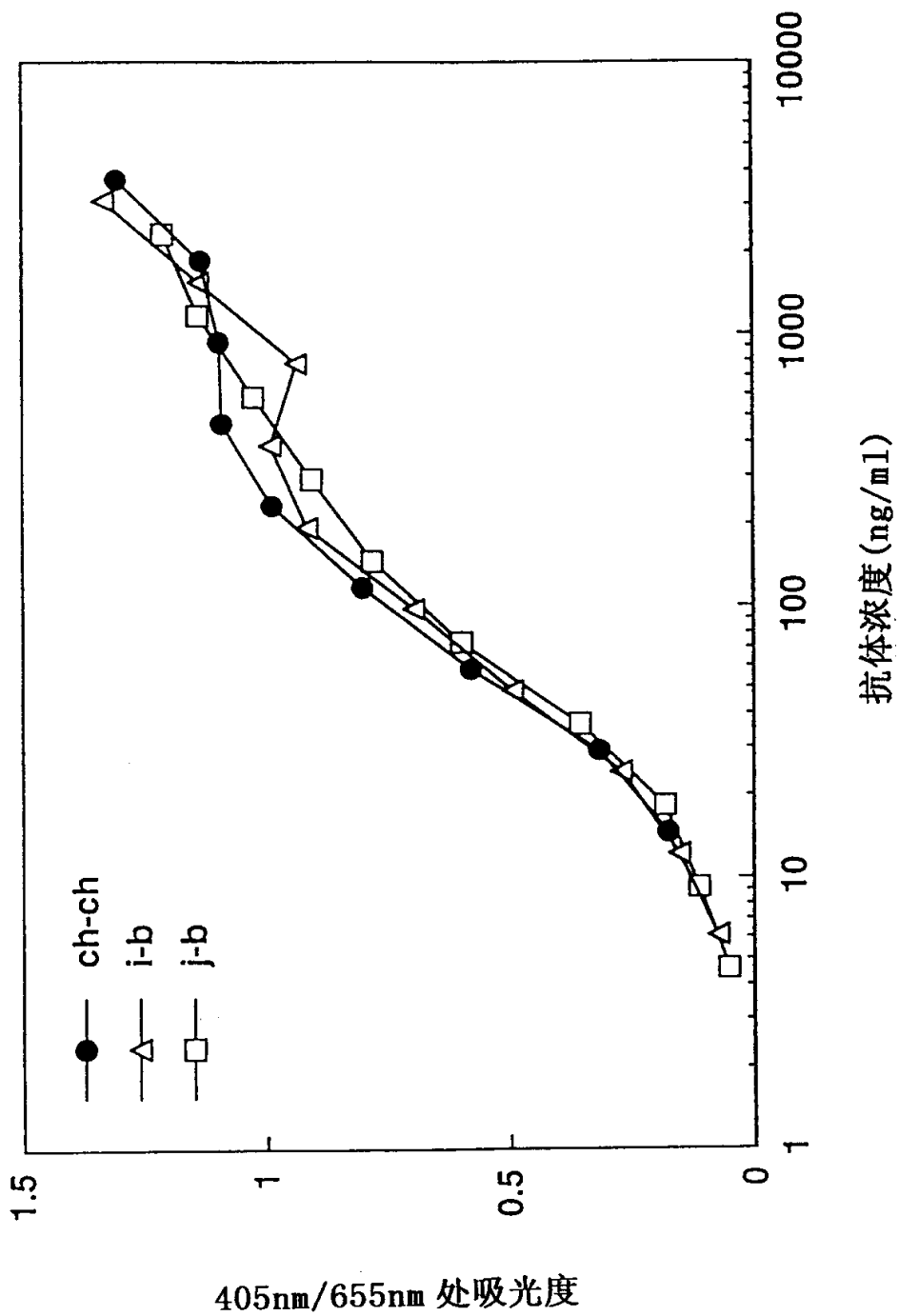


图 23

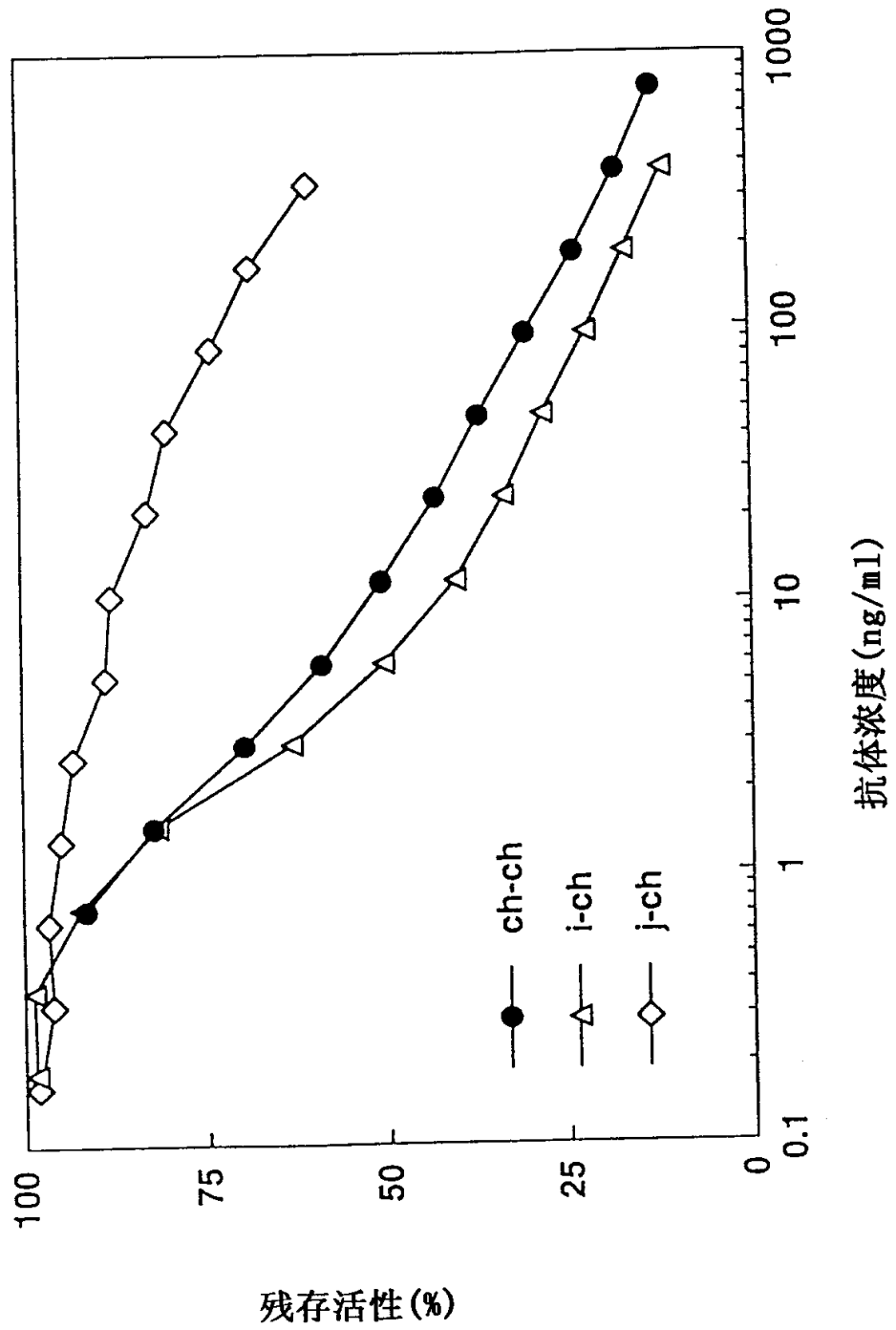


图 24

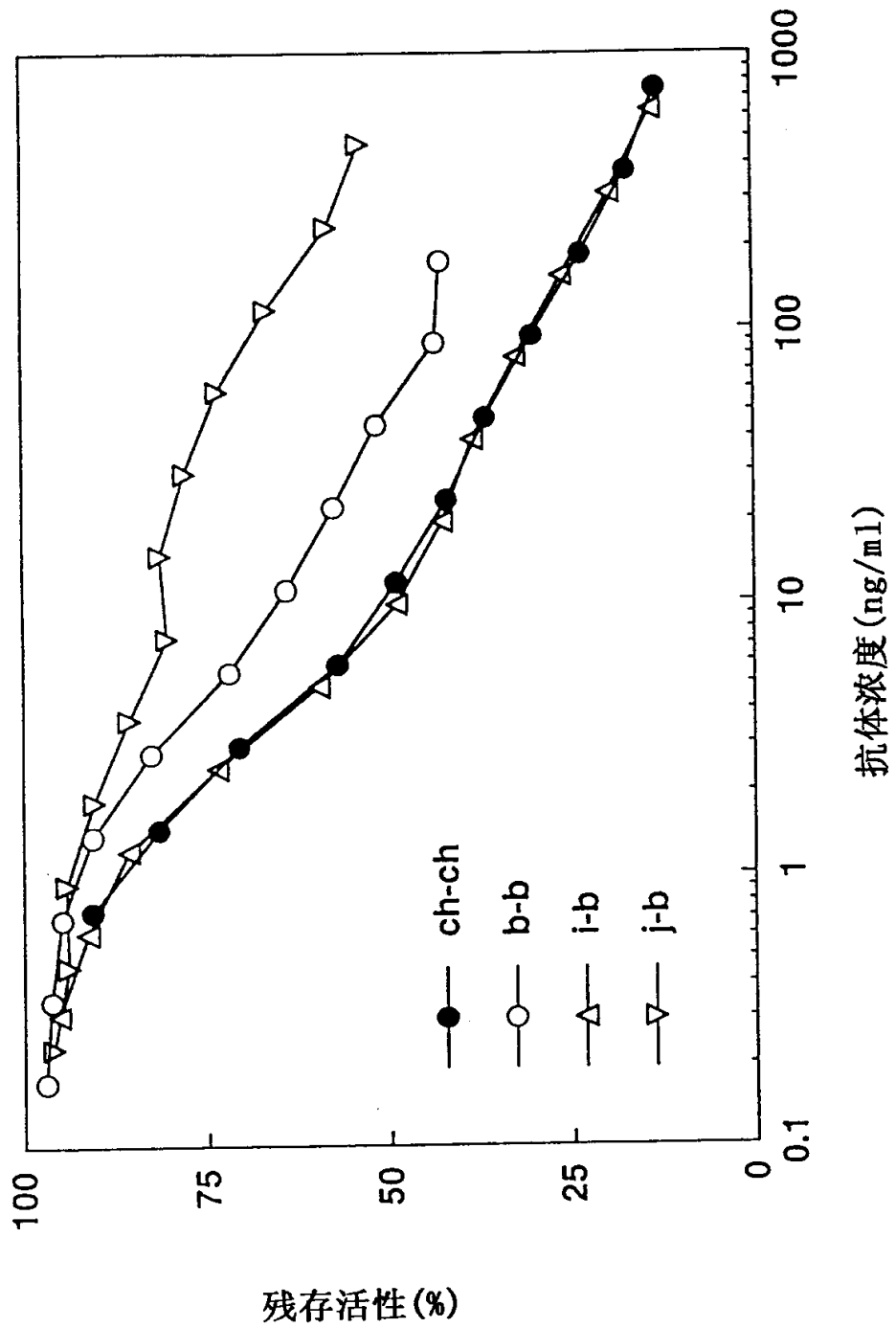


图 25

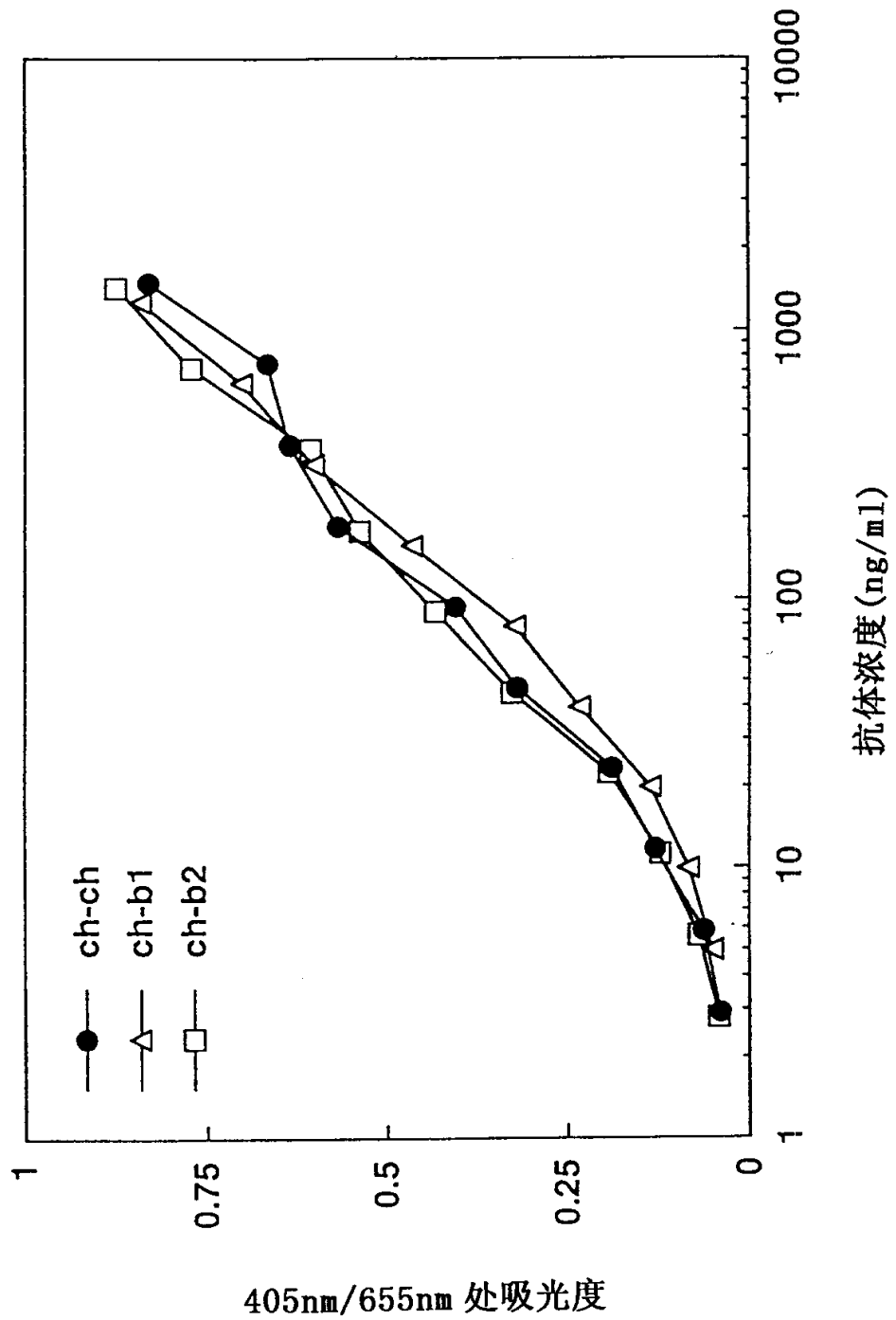


图 26

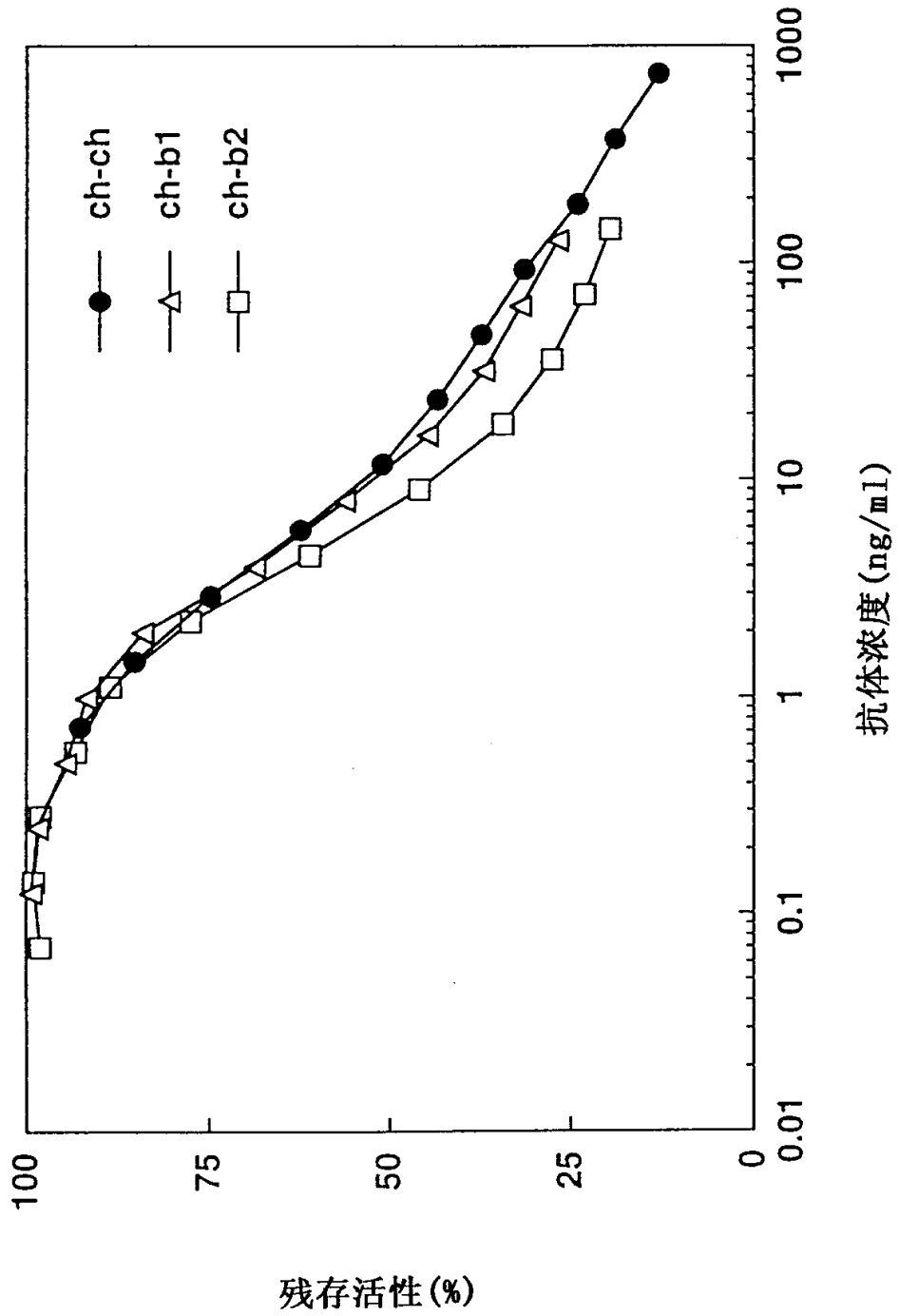


图 27

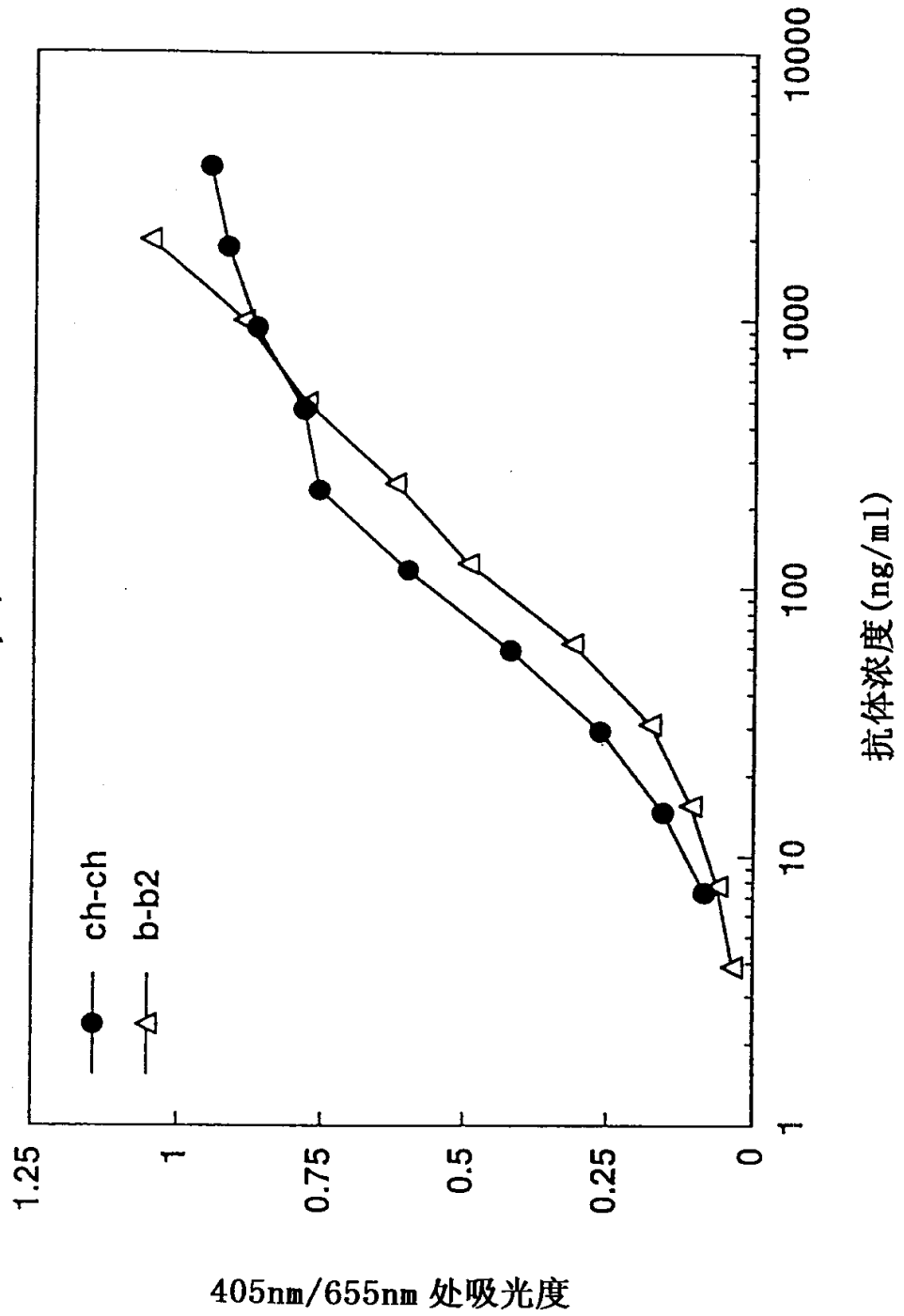


图 28

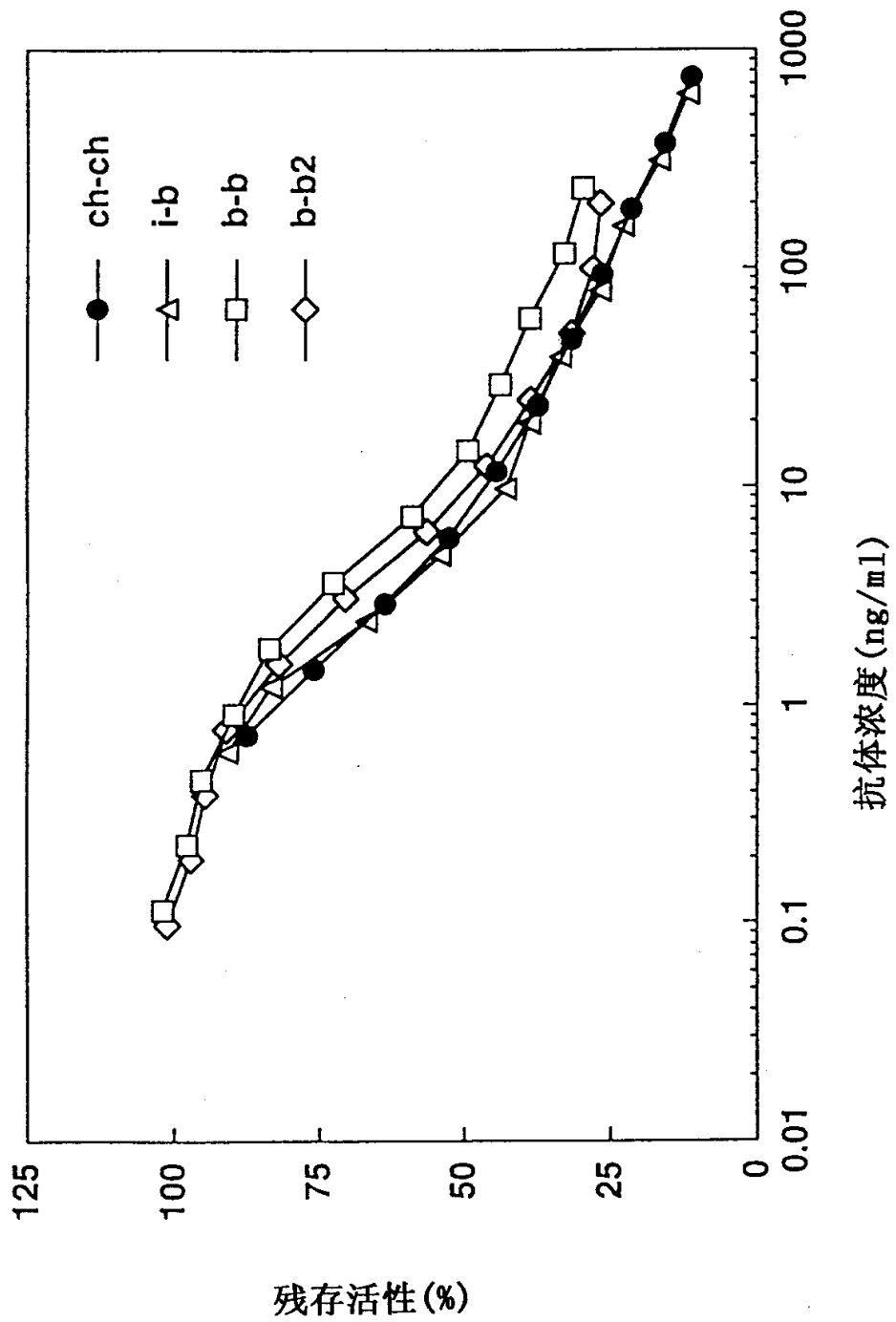


图 29

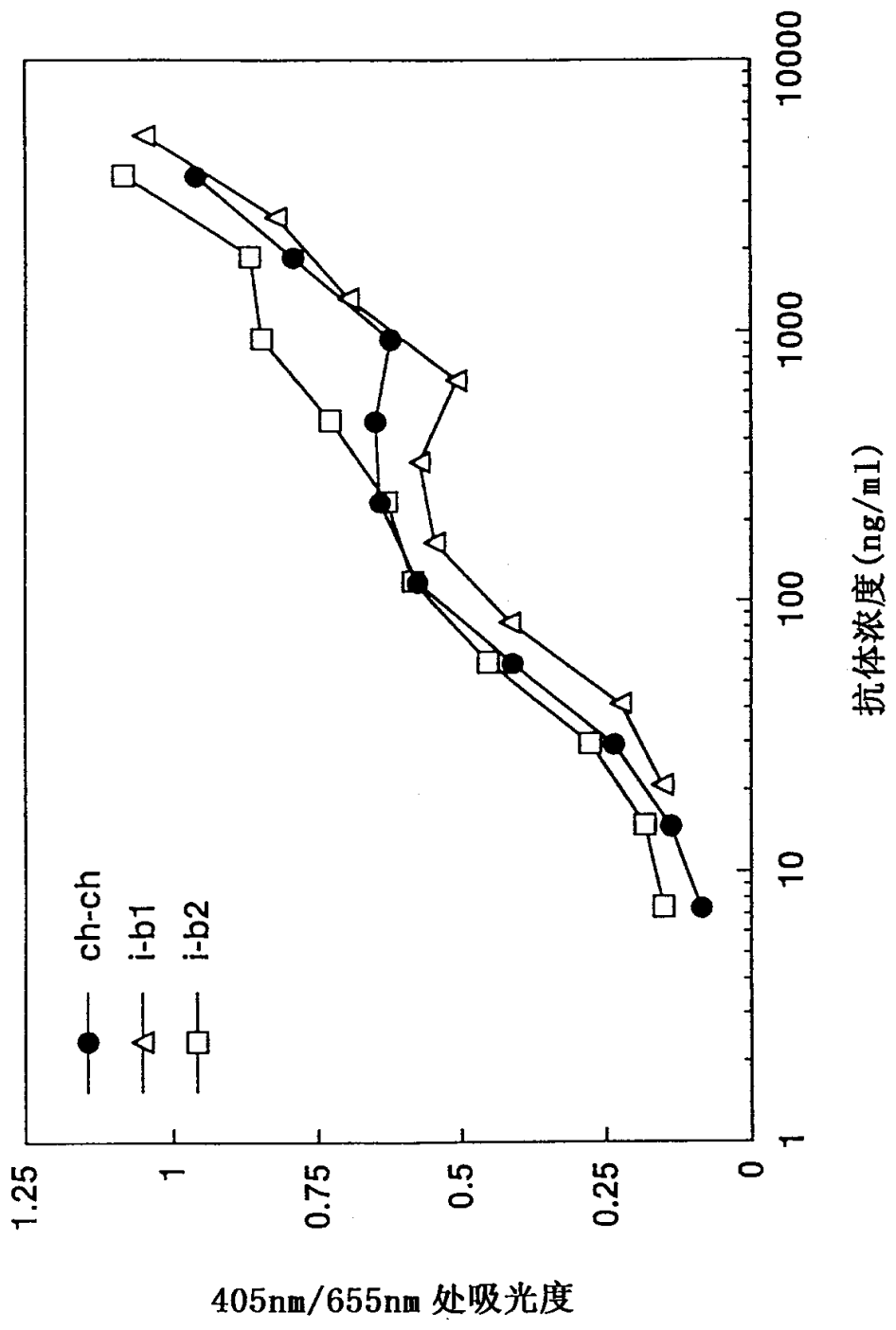


图 30

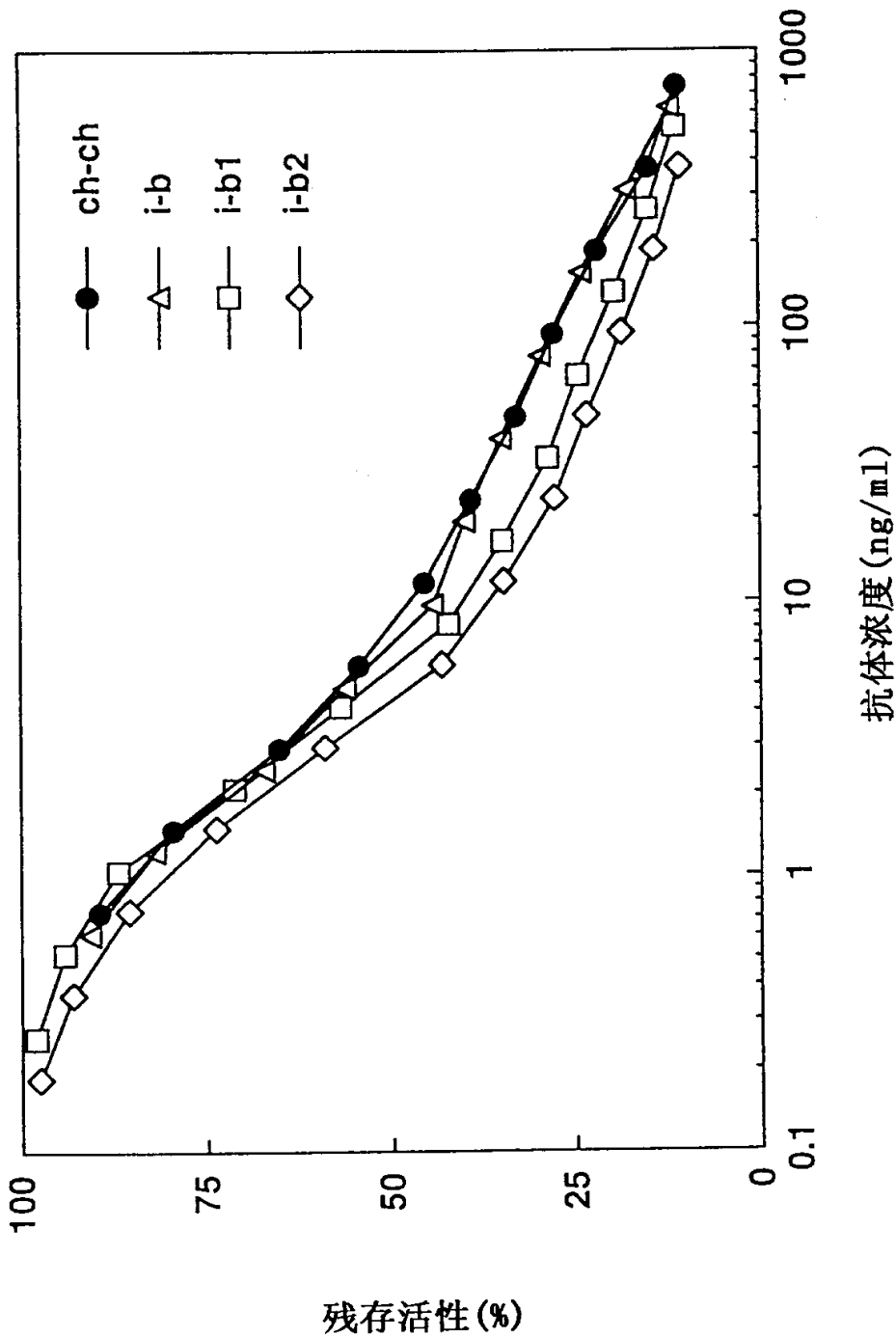


图 31

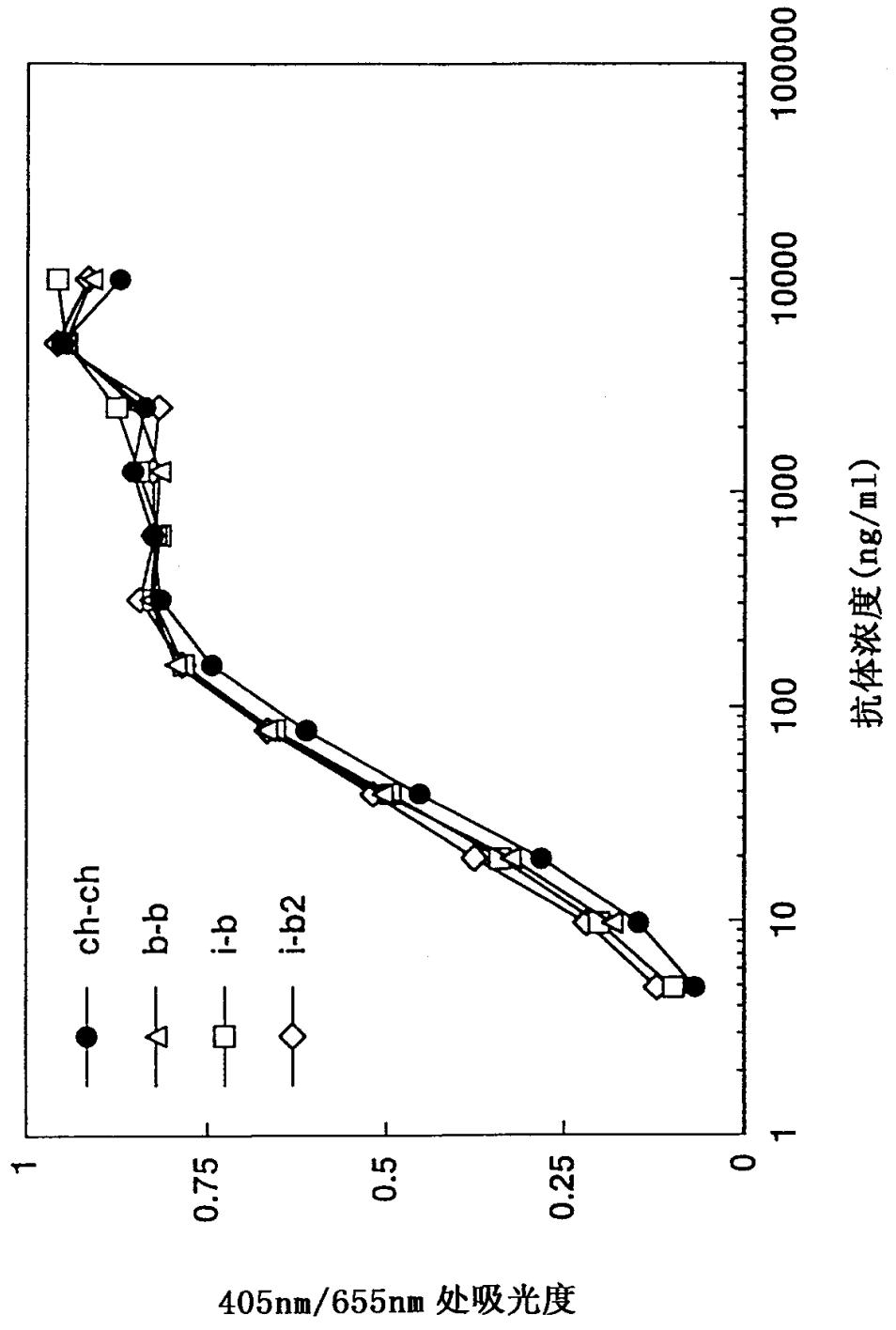


图 32

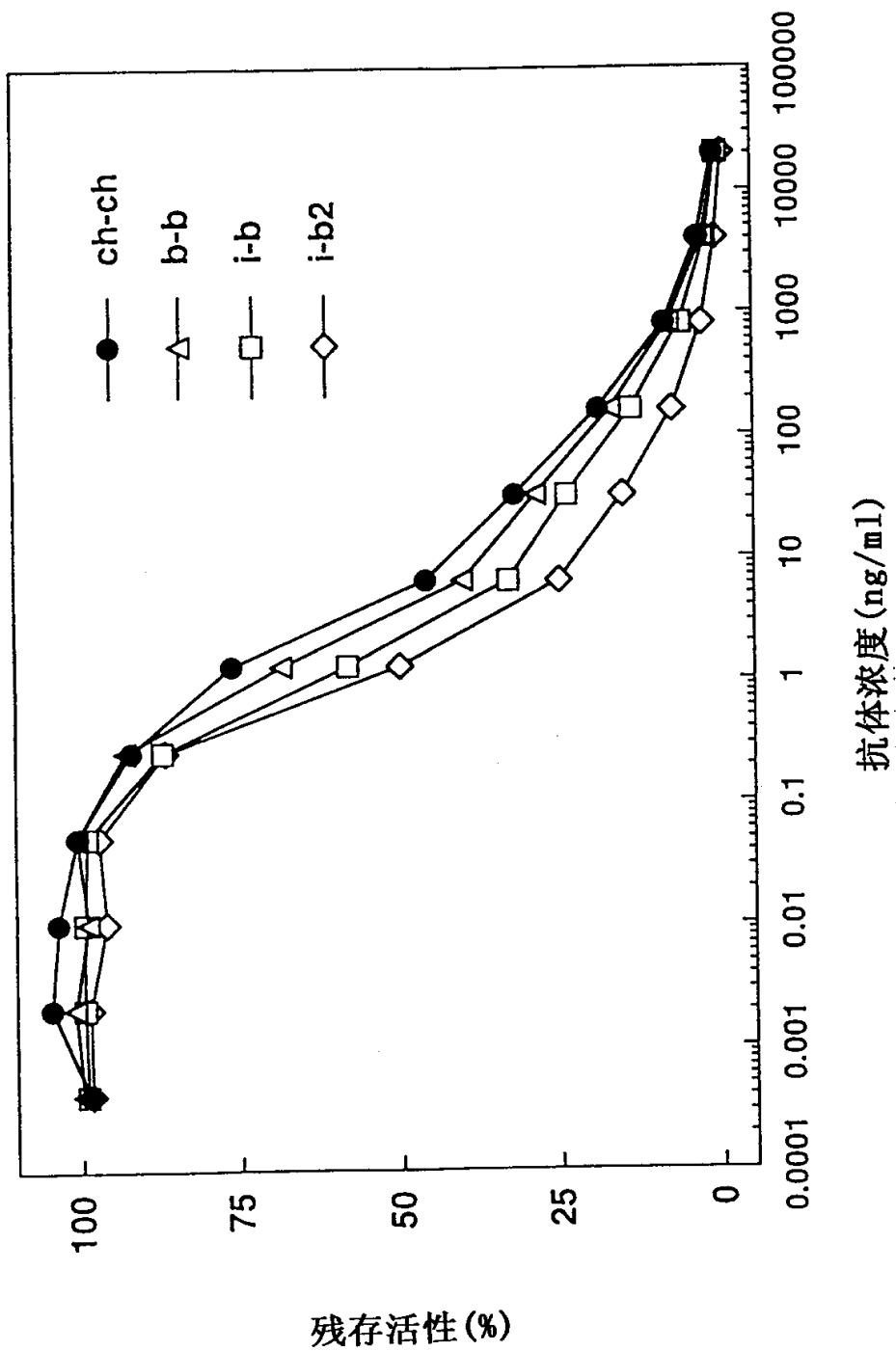


图 33

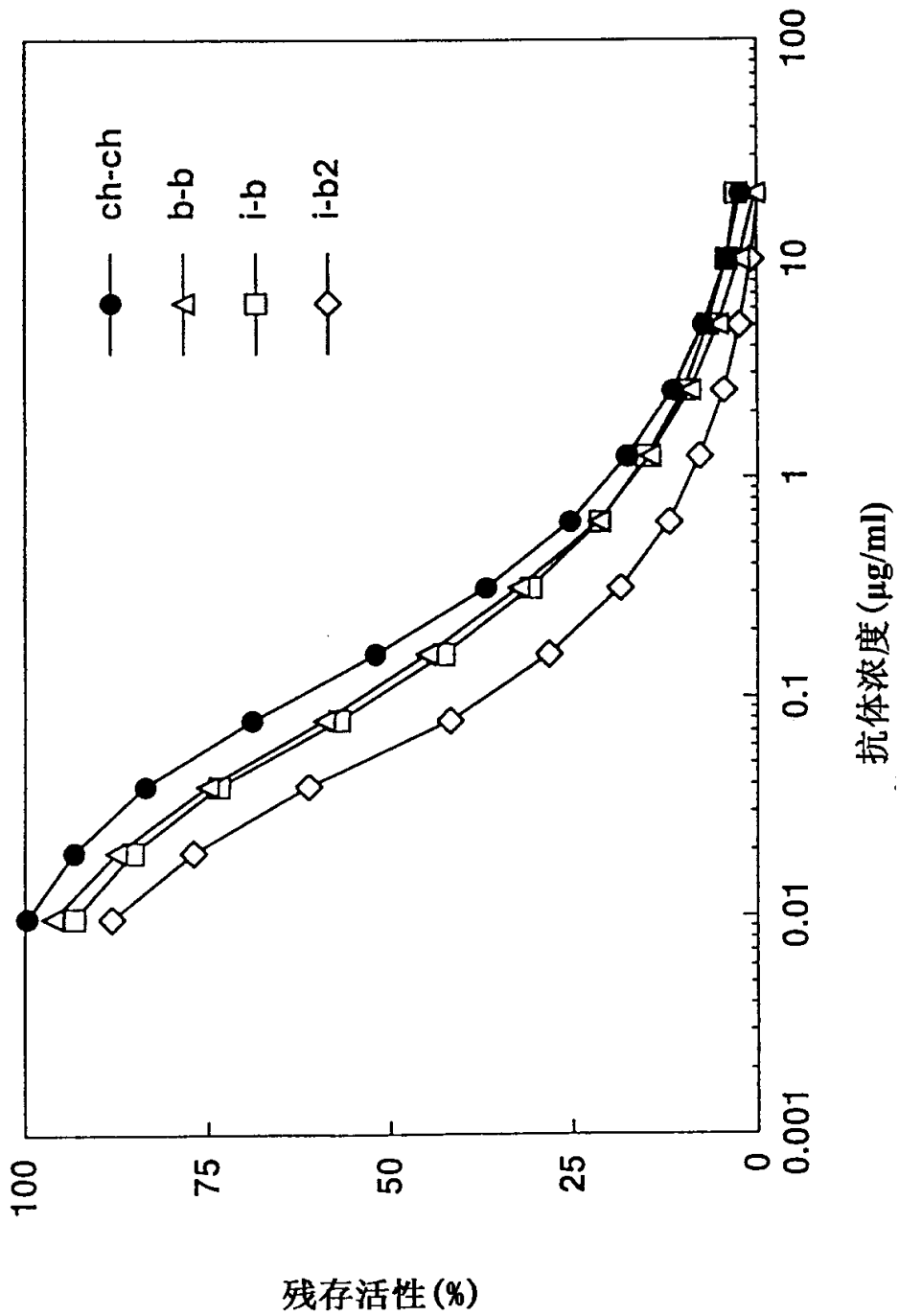


图 34

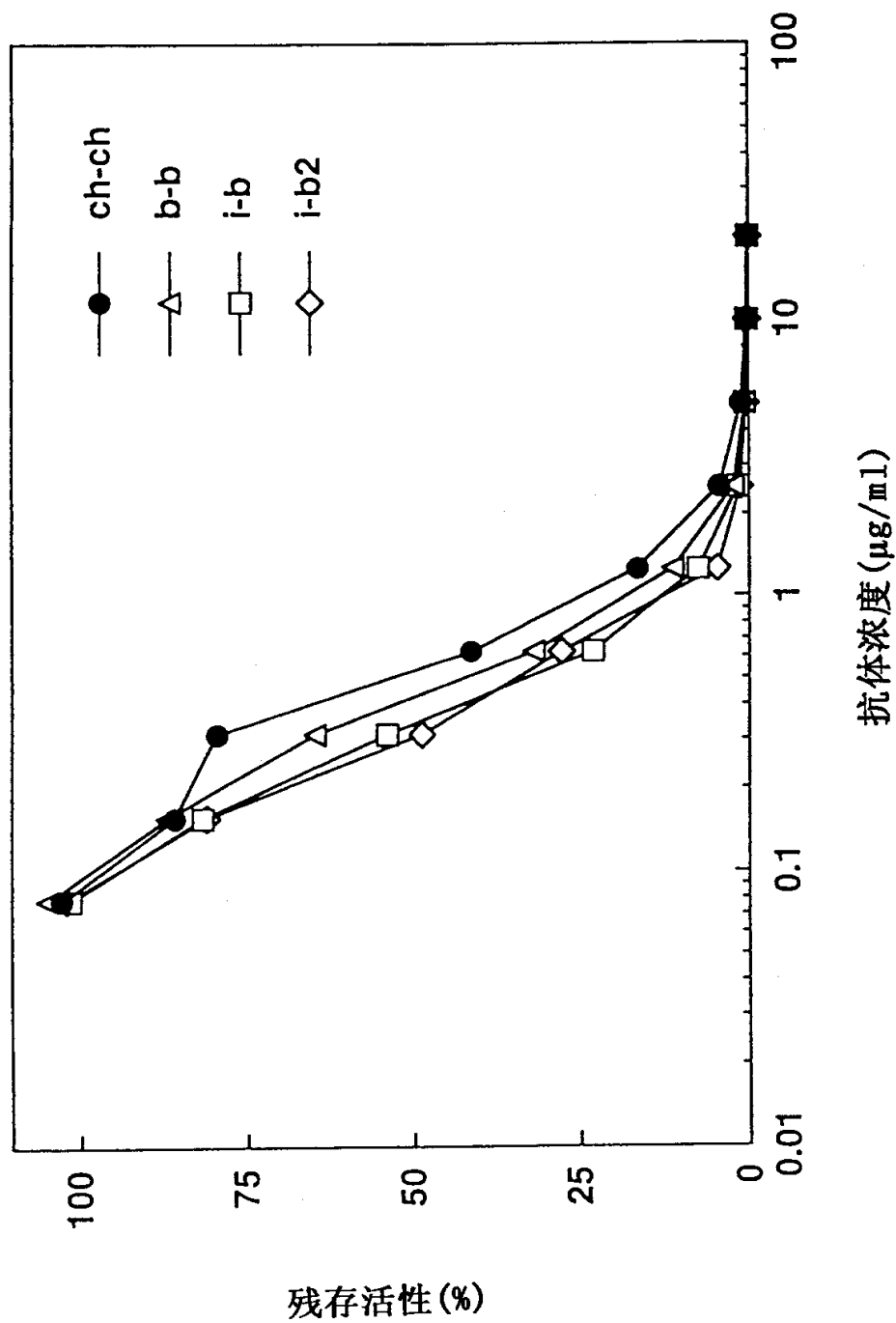


图 35

