



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101809162 B

(45) 授权公告日 2013.06.05

(21) 申请号 200880109196.0

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2008.09.26

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/30 (2006.01)

2007-256063 2007.09.28 JP

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12N 1/21 (2006.01)

2010.03.29

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/002690 2008.09.26

(56) 对比文件

(87) PCT申请的公布数据

W02009/041062 JA 2009.04.02

WO 2007005612 A2, 2007.01.11,

JP 2006067913 X, 2008.06.12,

WO 2006046751 A1, 2006.05.04,

JP 2028200 A, 1990.01.30,

CN 1678911 A, 2005.10.05,

(73) 专利权人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

审查员 许欣嘉

(72) 发明人 井川智之 仓持太一 白岩宙丈

角田浩行 桔达彦 石黑敬弘

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军

(51) Int. Cl.

C12P 21/08 (2006.01)

权利要求书1页 说明书47页

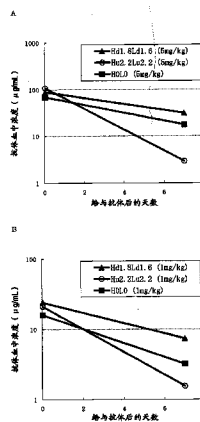
序列表27页 附图8页

(54) 发明名称

血浆中动力学被改善的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体

(57) 摘要

本发明提供控制磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的血浆中半衰期的方法, 含有血浆中半衰期被控制的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体作为有效成分的药物组合物, 以及该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体及含有该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体作为有效成分的药物组合物的制备方法。公开了通过改变露出在磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体表面的氨基酸残基来控制磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的血浆中半衰期的方法, 通过改变该氨基酸残基而得到的血浆中半衰期被控制的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体, 含有该抗体作为有效成分的药物组合物, 以及上述药物组合物的制备方法。



1. 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体,其中,包含序列号 27 表示的重链可变区及序列号 29 表示的轻链可变区。
2. 如权利要求 1 所述的抗体,所述抗体具有人抗体的恒定区。
3. 如权利要求 2 所述的抗体,其中,所述恒定区由序列号 32 或序列号 33 表示的序列组成。
4. 如权利要求 1 ~ 3 中任一项所述的抗体,是与所述抗体的 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体。
5. 一种组合物,所述组合物含有权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的抗体及药学上允许的载体。
6. 一种癌症治疗剂,所述癌症治疗剂含有权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的抗体作为有效成分,所述癌症为肝癌。
7. 一种核酸,所述核酸编码构成权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的抗体的多肽。
8. 一种宿主细胞,所述宿主细胞保持有权利要求 7 所述的核酸。
9. 如权利要求 8 所述的宿主细胞,其中,宿主细胞为岩藻糖转运体缺失的动物细胞、岩藻糖基转移酶缺失的动物细胞、或改变复合糖支链修饰的动物细胞。
10. 一种抗体的制备方法,所述制备方法包括:将权利要求 8 或 9 所述的宿主细胞进行培养的步骤,及从细胞培养物中回收多肽的步骤。

血浆中动力学被改善的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体

技术领域

[0001] 本申请要求基于日本专利申请 2007-256063 号(2007 年 9 月 28 日申请)的优先权,将其公开的全部内容包括附图及表作为参照引入本说明书。

[0002] 本发明涉及改善磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的血浆中(血中)动力学的方法,含有血浆中动力学被改善的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体作为有效成分的药物组合物及其制备方法。

背景技术

[0003] 由于抗体在血浆中的稳定性高、副作用少,所以将其作为药品使用备受瞩目。在多种抗体的同种型中,大量 IgG 同种型的治疗用抗体已经上市,目前也有多种治疗用抗体正处于开发中(非专利文献 1、非专利文献 2、非专利文献 3)。已知磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体通过对肝癌细胞和肺癌细胞发挥细胞毒性来显示抗肿瘤效果(专利文献 1)。还已知结合有磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体与细胞毒性物质的药物结合抗体对肝癌、卵巢癌、黑素瘤等发挥抗肿瘤效果(非专利文献 4)。

[0004] 另外,作为第二代治疗用抗体的制作技术,还开发了增强效应子功能等的技术。例如已知一种通过氨基酸取代来增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)的技术,所述氨基酸取代是将构成 IgG 同种型抗体(以下称作 IgG 抗体)的 Fc 区的氨基酸取代为其他不同的氨基酸(非专利文献 5)。由岩藻糖转运体缺失的 CHO 细胞产生的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体中,岩藻糖不与结合有磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的结合糖链中的支链结合,该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体与在其结合糖链的支链中含有岩藻糖的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体相比,ADCC 活性显著地增大,认为作为治疗用抗体的抗肿瘤效果高(专利文献 2)。

[0005] 进而,除上述增强效应子功能等技术之外,还报道了通过对构成抗体的 Fc 区的氨基酸进行氨基酸取代来增加或减少抗体的血浆中半衰期的技术(非专利文献 6、非专利文献 7)。通过将延长抗体的血浆中半衰期的技术用于治疗用抗体,可以期待被给与的治疗用抗体的给与量的减少和给与间隔的延长,进而可以提供一种低成本、便利性高的治疗用抗体。

[0006] 具体而言,可以通过对构成 IgG 抗体的 Fc 区的氨基酸进行氨基酸取代来延长血浆中半衰期,所述氨基酸取代产生 IgG 抗体对已知作为 IgG 抗体的补救受体的新生儿 Fc 受体(neonatal Fc receptor)的亲和性提高的效果。另外,还已知通过对构成抗体恒定区的 CH1、CH2、CH3 各区进行改组(shuffling)来延长血浆中半衰期的技术(非专利文献 8)。但是,由于 IgG 抗体恒定区的氨基酸序列在人体中保存,所以对构成恒定区的氨基酸进行导入的具有上述人工氨基酸取代的抗体可能会引起在人体内显示出如免疫原性(抗原性)之类的副作用。因此,优选仅有少量的氨基酸进行了氨基酸取代。

[0007] 作为对构成 IgG 抗体可变区(也被称作 V 区)的氨基酸进行氨基酸取代的技术,报道了下述技术,包括:人源化技术(非专利文献 9),构成用于增强结合活性的互补性决定

区 (CDR) 的氨基酸经氨基酸取代而引起亲和力成熟 (affinity maturation) (非专利文献 10), 构成构架区 (FR) 的氨基酸经氨基酸取代而引起物理化学的稳定性提高 (非专利文献 11)。即, 与构成恒定区 (也被称作 C 区) 的氨基酸的氨基酸取代不同, 构成可变区的氨基酸的氨基酸取代是为了增强抗体对抗原的结合活性等功能和提高稳定性等特性而通常采用的方法。由于构成人源化抗体 CDR 的氨基酸序列来自于人以外的动物种类的氨基酸序列, 所以认为通过对该序列中的氨基酸进行人工氨基酸取代与其他区域序列中的氨基酸取代相比, 产生免疫原性的风险低。另外, 对于构成人源化抗体 FR 的氨基酸序列进行人工氨基酸取代, 如果取代的结果得到的构成 FR 的氨基酸序列与 Kabat 数据库 (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) 及 IMGT 数据库 (<http://imgt.cines.fr/>) 等中公开的多种构成人抗体 FR 的氨基酸序列中的任一种相同, 则认为由该取代产生免疫原性的风险小。进而, 从 Kabat 数据库及 IMGT 数据库等中公开的多种构成人抗体 FR 的氨基酸序列中再次选择与取代的结果得到的构成 FR 的氨基酸序列非常相似的人抗体序列, 由此可以降低免疫原性 (专利文献 3)。

[0008] 另一方面, 仅已知上述提高 IgG 抗体的血浆中半衰期的方法是利用构成作为恒定区一部分的 Fc 区的氨基酸进行氨基酸取代的方法, 至今为止尚未报道通过构成可变区的氨基酸的氨基酸取代来提高 IgG 抗体的血浆中半衰期的方法, 认为所述可变区中由上述氨基酸取代引起的免疫原性的风险小。作为上述理由, 可以举出认为 IgG 抗体的血浆中半衰期在很大程度上依赖于对作为 IgG 抗体的补救受体的新生儿 Fc 受体的结合和抗原依赖性的消失 (非专利文献 12), 可变区的功能和特性不会对血浆中半衰期产生很大影响。

[0009] 另外, 报道了下述技术: 通过将 IgG 抗体进行琥珀酰化来对 IgG 抗体进行阴离子化, 使其等电点 (pI) 降低的技术 (非专利文献 13); 或者通过用多胺修饰 IgG 抗体来对 IgG 抗体进行阳离子化, 使其 pI 升高的技术 (非专利文献 14), 但经修饰的 IgG 抗体的血浆中半衰期均未增大, 其血浆中半衰期反而缩短。即, 无法实现利用上述 IgG 抗体的化学修饰而改变其 pI 来延长 IgG 抗体的血浆中半衰期。

[0010] 非专利文献 1: Janice M. Reichert, Clark J. Rosensweig, Laura B. Faden, and Matthew C. Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1073-8;

[0011] 非专利文献 2: Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008, *Eur J Pharm Biopharm.* (2005) 59 (3), 389-96

[0012] 非专利文献 3: Janice M. Reichert and Viia E. Valge-Archer, Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Disc.* (2007) 6, 349-356

[0013] 非专利文献 4: Albina Nesterova, Paul J. Carter and Leia M. Smith, Glypican Glypican-3 as a Novel Target for an Antibody 3 as a Novel Target for an Antibody-Drug Conjugate, AACR Abstract No. 656 (2007), Los Angeles, CA April 11, 4-18

[0014] 非专利文献 5: Kim S.J., Park Y., Hong H.J., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies, *Mol Cells* (2005) 20 (1), 17-29

[0015] 非专利文献 6: Hinton PR., Xiong JM., Johlf s MG., Tang MT., Keller S., Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life, J

Immunol. (2006) 176(1), 346-56

[0016] 非专利文献 7 :Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober RJ., Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, Nat. Biotechnol. (1997) 15(7), 637-40

[0017] 非专利文献 8 :Zuckier LS., Chang CJ., Scharff MD., Morrison SL., Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to in vivo half-life, Cancer Res. (1998) 58(17), 3905-8

[0018] 非专利文献 9 :Tsurushita N., Hinton PR., Kumar S., Design of humanized antibodies :from anti-Tac to Zenapax, Methods (2005) 36(1), 69-83

[0019] 非专利文献 10 :Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R. R., Takeuchi T., Lerner RA., Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102(24), 8466-71

[0020] 非专利文献 11 :Ewert S., Honegger A., Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications :CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering, Methods (2004) 34(2), 184-99

[0021] 非专利文献 12 :Lobo ED., Hansen RJ., Balthasar JP., Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics, J Pharm Sci. (2004) 93(11), 2645-68

[0022] 非专利文献 13 :Yamasaki Y, Sumimoto K, Nishikawa M, Yamashita F, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y., Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors :importance of molecular size and negative charged density for in vivo recognition by receptors, Pharmacol. Exp. Ther. (2002) 301(2), 467-77

[0023] 非专利文献 14 :Poduslo JF, Curran GL., Polyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers, Neurochem. (1996) 66(4), 1599-609

[0024] 非专利文献 15 :Ghetie V, Ward ES., FcRn :the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. Immunol Today. (1997) 18(12), 592-8

[0025] 非专利文献 16 :He XY., Xu Z., Melrose J., Mallowney A., Vasquez M., Queen C., Vexler V., Klingbeil C, Co MS, and Berg EL, Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin, J. Immunol. (1998), 160(2), 1029-35

[0026] 非专利文献 17 :Katayose Y., Kudo T., Suzuki M., Shinoda M, Saijyo S, Sakurai N, Saeki H, Fukuhara K, Imai K, Matsuno S, MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies :inhibition of xenografted human bile duct carcinoma growth, Cancer Res. (1996) 56(18), 4205-12

[0027] 非专利文献 18 :Binz HK, Amstutz P, Pluckthun A., Engineering novel binding

- proteins from nonimmunoglobulin domains, *Nat. Biotechnol.* (2005) 23(10), 1257-68
- [0028] 非专利文献 19 :Gobburu JV, Tenhoor C, Rogge MC, Frazier DE Jr, Thomas D, Benjamin C, Hess DM, Jusko WJ., Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys, *J Pharmacol Exp Ther.* (1998) 286(2), 925-30
- [0029] 非专利文献 20 :Kashmiri SV, Shu L, Padlan EA, Milenic DE, Schlom J, Hand PH., Generation, characterization, and in vivo studies of humanized anticarcinoma antibody CC49, *Hybridoma* (1995) 14(5), 461-73
- [0030] 非专利文献 21 :Graves SS, Goshorn SC., Stone DM., Axworthy DB, Reno JM, Bottino B, Searle S, Henry A, Pedersen J, Rees AR, Libby RT., Molecular modeling and preclinical evaluation of the humanized NR-LU-13 antibody, *Clin. Cancer Res.* (1999) 5(4), 899-908
- [0031] 非专利文献 22 :Couto JR, Blank EW, Peterson JA., Ceriani RL., Anti-BA46 monoclonal antibody Mc3: humanization using a novel positional consensus and in vivo and in vitro characterization, *Cancer Res.* (1995) 55(8) 1717-22
- [0032] 非专利文献 23 :Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, McKeever K, Sliwkowski MX, Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab, *Cancer Immunol Immunother.* (2006) 55(6), 717-27
- [0033] 非专利文献 24 :W. Y. K. Hwang, J. C. Almagro, T. N. Buss, P. Tanand J. Foote. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization, *Methods* (2005) 36, 35-42
- [0034] 非专利文献 25 :Ono K, Ohtomo T., Yoshida K, Yoshimura Y., Kawai S., Koishihara Y, Ozaki S, Kosaka M, Tsuchiya M., The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity, *Mol. Immunol.* (1999) 36(6), 387-395
- [0035] 非专利文献 26 :Dall'Acqua WF, Damschroder MM, Zhang J, Woods RM, Widjaja L, Yu J, Wu H., Antibody humanization by framework shuffling, *Methods* (2005) 36(1), 43-60
- [0036] 非专利文献 27 :Vaisitti T, Deaglio S, Malavasi F., Cationization of monoclonal antibodies: another step towards the "magic bullet"? , *J. Biol. Regul Homeost. Agents* (2005) 19(3-4), 105-12
- [0037] 非专利文献 28 :Pardridge WM, Buciak J, Yang J, Wu D, Enhanced endocytosis in cultured human breast carcinoma cells and in vivo biodistribution in rats of a humanized monoclonal antibody after cationization of the protein, *J Pharmacol Exp Ther.* (1998) 286(1), 548-54
- [0038] 非专利文献 29 :Links Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol.* (2001) 13(12), 1551-9

- [0039] 专利文献 1 :W02003/000883 公报
[0040] 专利文献 2 :W02006/067913 公报
[0041] 专利文献 3 :W01999/018212 公报
[0042] 专利文献 4 :W02004/035752 公报

发明内容

[0043] 本发明是鉴于上述情况而完成的,本发明的目的在于提供控制磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的血浆中半衰期的方法,血浆中半衰期被控制的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体及含有其作为有效成分的药物组合物,以及它们的制备方法。本发明的进一步的目的在于通过控制具有细胞毒性的抗体的血浆中半衰期来控制该抗体的细胞毒性的方法,细胞毒性被控制的抗体及含有其作为有效成分的药物组合物,以及它们的制备方法。

[0044] 本发明人等对控制以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期的方法进行了深入研究。结果,本发明人等发现可以通过改变在构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的可变区及恒定区的氨基酸残基中露出在该抗体分子表面的氨基酸残基并控制抗体分子的表面电荷,来控制以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期。具体而言,在构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的可变区及恒定区的氨基酸残基中,鉴定特定的氨基酸残基,所述特定的氨基酸残基以不影响抗体对抗原的结合活性等抗体所具有的功能和结构的方式控制抗体分子表面的电荷,从而控制以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期。进而,本发明人等确认了如上所述地控制血浆中半衰期的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体实际上保持对抗原的结合活性。进而,本发明人等确认了通过控制以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期,以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的发挥细胞毒性的抗体所具有的对癌细胞的肿瘤增殖抑制效果增大,从而完成了本发明。

[0045] 本发明涉及通过改变露出在以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体表面的氨基酸残基来控制该抗体的血浆中半衰期的方法,通过改变氨基酸残基而得到的血浆中半衰期被控制的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体,含有该抗体作为有效成分的药物组合物,以及上述药物组合物的制备方法。更具体而言,

[0046] [1] 一种血浆中动力学被控制的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的制备方法,所述制备方法包括下述各阶段:

[0047] (a) 将保持编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的核酸的宿主细胞在该核酸表达的条件下进行培养,其中,所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体具有被改变的氨基酸序列,通过所述氨基酸序列的改变使能露出在抗体表面的至少一个氨基酸残基的电荷改变,

[0048] (b) 从该宿主细胞的培养物中回收磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体;

[0049] [2] 如 [1] 所述的方法,其中,上述血浆中动力学的控制是指血浆中半衰期、血浆中平均滞留时间、血浆中清除率中的任一参数增加或减少; [3] 如 [1] 所述的方法,其中,氨基酸残基电荷的改变是通过氨基酸取代而进行的;

[0050] [4] 如 [1] 所述的方法,其中,能够露出在上述磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体表面的氨基酸残基位于磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体中的 FcRn 结合区之外的区域;

[0051] [5] 如 [4] 所述的方法,其中,上述 FcRn 结合区包含 Fc 区;

[0052] [6] 如 [4] 所述的方法,其中,上述 FcRn 结合区包含 Kabat 编号中的 EU 序号为 250、253、310、311、314、428、435、436 的氨基酸残基;

[0053] [7] 如 [1] 所述的方法,其中,磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为 IgG 抗体;

[0054] [8] 如 [1] ~ [7] 中任一项所述的方法,其中,上述电荷被改变的氨基酸残基为重链可变区或轻链可变区中的氨基酸残基;

[0055] [9] 如 [8] 所述的方法,其特征在于,上述磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为包含来自人以外的动物的互补性决定区 (CDR)、来自人的构架区 (FR) 及人恒定区的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体,氨基酸残基电荷的改变是从抗体的 CDR 或 FR 中的能够露出在抗体表面的至少一个氨基酸残基取代为具有与该氨基酸残基不同的电荷的氨基酸残基;

[0056] [10] 如 [9] 所述的方法,其特征在于,上述氨基酸残基的电荷的改变为:

[0057] (1) 序列号 1 表示的重链可变区中的以下任一种或一种以上发生取代;

[0058] (a) 作为第 43 号氨基酸残基的 Q 取代为 K、

[0059] (b) 作为第 52 号氨基酸残基的 D 取代为 N、

[0060] (c) 作为第 107 号氨基酸残基的 Q 取代为 R、

[0061] 及 / 或

[0062] (2) 序列号 7 表示的轻链可变区中的以下任一种或一种以上发生取代;

[0063] (d) 作为第 17 号氨基酸残基的 E 取代为 Q、

[0064] (e) 作为第 27 号氨基酸残基的 Q 取代为 R、

[0065] (f) 作为第 105 号氨基酸残基的 Q 取代为 R;

[0066] [11] 如 [9] 所述的方法,其特征在于,上述氨基酸残基的电荷的改变为

[0067] (1) 序列号 1 表示的重链可变区中的以下任一种或一种以上发生取代;

[0068] (a) 作为第 19 号氨基酸残基的 K 取代为 T、

[0069] (b) 作为第 43 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、

[0070] (c) 作为第 62 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、

[0071] (d) 作为第 63 号氨基酸残基的 K 取代为 S、

[0072] (e) 作为第 65 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、

[0073] (f) 作为第 66 号氨基酸残基的 G 取代为 D、

[0074] 及 / 或

[0075] (2) 序列号 7 表示的轻链可变区中的以下任一种或一种以上发生取代;

[0076] (g) 作为第 24 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、

[0077] (h) 作为第 27 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、

[0078] (i) 作为第 79 号氨基酸残基的 K 取代为 T、

[0079] (j) 作为第 82 号氨基酸残基的 R 取代为 S、

[0080] (k) 作为第 112 号氨基酸残基的 K 取代为 E;

[0081] [12] 如 [11] 所述的方法,其特征在于,还包括以下的改变:

[0082] 序列号 31 表示的重链恒定区中的以下任一种或一种以上发生取代;

[0083] (a) 作为第 151 号氨基酸残基的 H 取代为 Q、

[0084] (b) 作为第 157 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、

[0085] (c) 作为第 238 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、

- [0086] (d) 作为第 239 号氨基酸残基的 D 取代为 E、
- [0087] (e) 作为第 241 号氨基酸残基的 L 取代为 M、
- [0088] (f) 作为第 302 号氨基酸残基的 Q 取代为 E；
- [0089] [13] 如 [9] ~ [12] 中任一项所述的方法,其中,上述磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为与其 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体；
- [0090] [14] 一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体,所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体是根据 [1] ~ [13] 中任一项所述的方法制备得到的；
- [0091] [15] 一种血浆中动力学被控制的抗体的制备方法,所述制备方法包括下述各阶段：
- [0092] (a) 将保持编码抗体的核酸的宿主细胞在该核酸表达的条件下进行培养,其中,该抗体具有被改变的氨基酸序列,通过所述氨基酸序列的改变使位于抗体中的 FcRn 结合区之外的恒定区的氨基酸残基的电荷改变,
- [0093] (b) 从该宿主细胞的培养物中回收抗体；
- [0094] [16] 如 [15] 所述的方法,其中,上述血浆中动力学的控制是指血浆中半衰期、血浆中平均滞留时间、血浆中清除率中任一参数的增加或减少；
- [0095] [17] 如 [15] 所述的方法,其中,氨基酸残基的电荷的改变是通过氨基酸取代而进行的；
- [0096] [18] 如 [17] 所述的方法,其中,抗体为 IgG 抗体；
- [0097] [19] 如 [18] 所述的方法,其中,抗体为 IgG1；
- [0098] [20] 如 [17] 所述的方法,其特征在于,上述氨基酸残基的电荷的改变为将 IgG1 抗体的一个或一个以上的氨基酸残基取代为与 IgG4 抗体对应的一个或一个以上的氨基酸残基；
- [0099] [21] 如 [15] ~ [20] 中任一项所述的方法,其中,上述 FcRn 结合区包含 Kabat 编号中的 EU 序号为 250、253、310、311、314、428、435、436 的氨基酸残基；
- [0100] [22] 如 [20] 所述的方法,其特征在于,上述氨基酸残基的电荷的改变是指序列号 31 表示的重链恒定区中的以下任一种或一种以上的取代；
- [0101] (a) 作为第 151 号氨基酸残基的 H 取代为 Q、
- [0102] (b) 作为第 157 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、
- [0103] (c) 作为第 238 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、
- [0104] (d) 作为第 239 号氨基酸残基的 D 取代为 E、
- [0105] (e) 作为第 241 号氨基酸残基的 L 取代为 M、
- [0106] (f) 作为第 302 号氨基酸残基的 Q 取代为 E；
- [0107] [23] 如 [15] ~ [22] 中任一项所述的方法,其中,抗体为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体；
- [0108] [24] 一种包含来自人以外的动物的互补性决定区 (CDR)、来自人的构架区 (FR) 及人恒定区的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的稳定化方法,所述稳定化方法包括下述各阶段：
- [0109] (a) 将保持编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的核酸的宿主细胞在该核酸表达的条件下进行培养,其中,该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体具有被改变的氨基酸序列,所述氨基酸序列的改变是指通过改变至少一个氨基酸残基而引起 T_m 值增大,

- [0110] (b) 从该宿主细胞的培养物中回收抗体；
- [0111] [25] 如 [24] 所述的方法，其特征在于，氨基酸残基存在于其重链或轻链的 FR1 区及 / 或 FR2 区；
- [0112] [26] 如 [25] 所述的方法，其特征在于，将重链 FR2 区的氨基酸残基取代为 VH4 亚类的 FR2 区的氨基酸残基；
- [0113] [27] 如 [25] 所述的方法，其特征在于，将轻链 FR2 区的氨基酸残基取代为 VK3 亚类的 FR2 区的氨基酸残基；
- [0114] [28] 如 [24] ~ [27] 中任一项所述的方法，其特征在于，上述氨基酸残基的改变为
- [0115] (1) 对序列号 1 表示的构成重链可变区的氨基酸残基进行以下任一种或一种以上的取代；
- [0116] (a) 作为第 37 号氨基酸残基的 V 取代为 I、
- [0117] (b) 作为第 40 号氨基酸残基的 A 取代为 P、
- [0118] (c) 作为第 48 号氨基酸残基的 M 取代为 I、
- [0119] (d) 作为第 51 号氨基酸残基的 L 取代为 I、
- [0120] 及 / 或
- [0121] (2) 对序列号 7 表示的构成轻链可变区的氨基酸残基进行以下任一种或一种以上的取代；
- [0122] (e) 作为第 42 号氨基酸残基的 L 取代为 Q、
- [0123] (f) 作为第 48 号氨基酸残基的 S 取代为 A、
- [0124] (g) 作为第 50 号氨基酸残基的 Q 取代为 R；
- [0125] [29] 一种细胞毒性被控制的抗体的制备方法，所述制备方法包括下述各阶段：
- [0126] (a) 将保持编码抗体的核酸的宿主细胞在该核酸表达的条件下进行培养，其中，该抗体具有被改变的氨基酸序列，通过所述氨基酸序列的改变使能够露出在具有细胞毒性的抗体表面的至少一个氨基酸残基的电荷发生改变，
- [0127] (b) 从该宿主细胞的培养物中回收抗体；
- [0128] [30] 如 [29] 所述的方法，其中，氨基酸残基的电荷的改变是通过氨基酸取代而进行的；
- [0129] [31] 如 [29] 所述的方法，其中，能够露出在上述抗体表面的氨基酸残基位于抗体中的 FcRn 结合区之外的区域；
- [0130] [32] 如 [31] 所述的方法，其中，上述 FcRn 结合区包含 Fc 区；
- [0131] [33] 如 [31] 所述的方法，其中，上述 FcRn 结合区包含 Kabat 编号中的 EU 序号为 250、253、310、311、314、428、435、436 的氨基酸残基；
- [0132] [34] 如 [29] 所述的方法，其中，抗体为 IgG 抗体；
- [0133] [35] 如 [29] ~ [34] 中任一项所述的方法，其中，上述电荷被改变的氨基酸残基为恒定区的氨基酸残基；
- [0134] [36] 如 [29] ~ [34] 中任一项所述的方法，其中，上述电荷被改变的氨基酸残基为重链可变区或轻链可变区的氨基酸残基；
- [0135] [37] 如 [36] 所述的方法，其特征在于，上述抗体为包含来自人以外的动物的互补性决定区 (CDR)、来自人的构架区 (FR) 及人恒定区的抗体，氨基酸残基的电荷的改变是指

从抗体的 CDR 或 FR 中的能够露出在抗体表面的至少一个氨基酸残基取代为具有与该氨基酸残基不同的电荷的氨基酸残基；

[0136] [38] 如 [37] 所述的方法,其特征在于,上述氨基酸残基的电荷的改变为

[0137] (1) 序列号 1 表示的重链可变区中以下任一种或一种以上发生取代；

[0138] (a) 作为第 19 号氨基酸残基的 K 取代为 T、

[0139] (b) 作为第 43 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、

[0140] (c) 作为第 62 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、

[0141] (d) 作为第 63 号氨基酸残基的 K 取代为 S、

[0142] (e) 作为第 65 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、

[0143] (f) 作为第 66 号氨基酸残基的 G 取代为 D、

[0144] 及 / 或

[0145] (2) 序列号 7 表示的轻链可变区中的以下任一种或一种以上发生取代；

[0146] (g) 作为第 24 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、

[0147] (h) 作为第 27 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、

[0148] (i) 作为第 79 号氨基酸残基的 K 取代为 T、

[0149] (j) 作为第 82 号氨基酸残基的 R 取代为 S、

[0150] (k) 作为第 112 号氨基酸残基的 K 取代为 E；

[0151] [39] 如 [38] 所述的方法,其特征在于,进一步包括以下的改变：

[0152] 序列号 31 表示的重链恒定区中的以下任一种或一种以上发生取代，

[0153] (a) 作为第 151 号氨基酸残基的 H 取代为 Q、

[0154] (b) 作为第 157 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、

[0155] (c) 作为第 238 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、

[0156] (d) 作为第 239 号氨基酸残基的 D 取代为 E、

[0157] (e) 作为第 241 号氨基酸残基的 L 取代为 M、

[0158] (f) 作为第 302 号氨基酸残基的 Q 取代为 E；

[0159] [40] 如 [36] 所述的方法,其特征在于,上述抗体为包含来自人以外的动物的互补性决定区 (CDR)、来自人的构架区 (FR) 及人恒定区的抗体,氨基酸残基的电荷的改变是指将在抗体恒定区中的能够露出在抗体表面的至少一个氨基酸残基取代为具有与该氨基酸残基不同的电荷的氨基酸残基；

[0160] [41] 如 [40] 所述的方法,其特征在于,所述取代为序列号 31 表示的重链恒定区中的以下任一种或一种以上的取代；

[0161] (a) 作为第 151 号氨基酸残基的 H 取代为 Q、

[0162] (b) 作为第 157 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、

[0163] (c) 作为第 238 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、

[0164] (d) 作为第 239 号氨基酸残基的 D 取代为 E、

[0165] (e) 作为第 241 号氨基酸残基的 L 取代为 M、

[0166] (f) 作为第 302 号氨基酸残基的 Q 取代为 E；

[0167] [42] 如 [37] ~ [41] 中任一项所述的方法,其中,抗体为与上述抗体的 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体；

- [0168] [43] 一种抗体,所述抗体是根据 [29] ~ [42] 中任一项所述的方法制备得到的;
- [0169] [44] 如 [43] 所述的抗体,所述抗体为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体;
- [0170] [45] 一种抗体,所述抗体包含重链可变区及 / 或轻链可变区,
- [0171] 所述重链可变区进行了下述取代,
- [0172] (1) 在序列号 1 表示的重链可变区的氨基酸序列中进行以下任一种或一种以上的取代:
- [0173] (a) 作为第 19 号氨基酸残基的 K 取代为 T、
- [0174] (b) 作为第 43 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、
- [0175] (c) 作为第 62 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、
- [0176] (d) 作为第 63 号氨基酸残基的 K 取代为 S、
- [0177] (e) 作为第 65 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、
- [0178] (f) 作为第 66 号氨基酸残基的 G 取代为 D、
- [0179] 所述轻链可变区进行了下述取代,
- [0180] (2) 在序列号 7 表示的轻链可变区的氨基酸序列中进行以下任一种或一种以上的取代:
- [0181] (g) 作为第 24 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、
- [0182] (h) 作为第 27 号氨基酸残基的 Q 取代为 E、
- [0183] (i) 作为第 79 号氨基酸残基的 K 取代为 T、
- [0184] (j) 作为第 82 号氨基酸残基的 R 取代为 S、
- [0185] (k) 作为第 112 号氨基酸残基的 K 取代为 E;
- [0186] [46] 如 [45] 所述的抗体,其中,包含序列号 3 表示的重链可变区及序列号 9 表示的轻链可变区;
- [0187] [47] 如 [45] 所述的抗体,其中,包含序列号 5 表示的重链可变区及序列号 11 表示的轻链可变区;
- [0188] [48] 如 [45] 所述的抗体,其中,包含序列号 27 表示的重链可变区及序列号 28 表示的轻链可变区;
- [0189] [49] 如 [45] 所述的抗体,其中,包含序列号 27 表示的重链可变区及序列号 29 表示的轻链可变区;
- [0190] [50] 如 [45] ~ [49] 中任一项所述的抗体,所述抗体具有人抗体的恒定区;
- [0191] [51] 如 [50] 所述的抗体,其中,上述恒定区包含序列号 32 或序列号 33 表示的序列;
- [0192] [52] 一种抗体,所述抗体包含重链可变区及 / 或轻链可变区,
- [0193] 所述重链可变区进行了下述取代,
- [0194] (1) 在序列号 1 表示的重链可变区的氨基酸序列中进行以下任一种或一种以上的取代:
- [0195] (a) 作为第 43 号氨基酸残基的 Q 取代为 K、
- [0196] (b) 作为第 52 号氨基酸残基的 D 取代为 N、
- [0197] (c) 作为第 107 号氨基酸残基的 Q 取代为 R、
- [0198] 所述轻链可变区进行了下述取代,

- [0199] (2) 在序列号 7 表示的轻链可变区的氨基酸序列中进行以下任一种或一种以上的取代：
- [0200] (d) 作为第 17 号氨基酸残基的 E 取代为 Q、
- [0201] (e) 作为第 27 号氨基酸残基的 Q 取代为 R、
- [0202] (f) 作为第 105 号氨基酸残基的 Q 取代为 R；
- [0203] [53] 如 [52] 所述的抗体，其中，包含序列号 4 表示的重链可变区及序列号 10 表示的轻链可变区；
- [0204] [54] 如 [52] 所述的抗体，其中，包含序列号 6 表示的重链可变区及序列号 12 表示的轻链可变区；
- [0205] [55] 如 [52] ~ [54] 中任一项所述的抗体，所述抗体具有人抗体的恒定区；
- [0206] [56] 一种抗体，其中，序列号 31 表示的重链恒定区的氨基酸序列中具有以下任一种或一种以上的取代：
- [0207] (a) 作为第 151 号氨基酸残基的 H 取代为 Q、
- [0208] (b) 作为第 157 号氨基酸残基的 K 取代为 Q、
- [0209] (c) 作为第 238 号氨基酸残基的 R 取代为 Q、
- [0210] (d) 作为第 239 号氨基酸残基的 D 取代为 E、
- [0211] (e) 作为第 241 号氨基酸残基的 L 取代为 M、
- [0212] (f) 作为第 302 号氨基酸残基的 Q 取代为 E；
- [0213] [57] 一种抗体，所述抗体包含序列号 33 表示的重链恒定区；
- [0214] [58] 如 [45] ~ [57] 中任一项所述的抗体，所述抗体是与上述抗体的 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体；
- [0215] [59] 一种组合物，所述组合物含有 [45] ~ [58] 中任一项所述的抗体及药学上允许的载体；
- [0216] [60] 一种癌症治疗剂，所述癌症治疗剂含有 [45] ~ [58] 中任一项所述的抗体作为有效成分；
- [0217] [61] 如 [60] 所述的癌症治疗剂，其中，所述癌症为肝癌；
- [0218] [62] 一种核酸，所述核酸编码构成 [45] ~ [58] 中任一项所述的抗体的多肽；
- [0219] [63] 一种宿主细胞，所述宿主细胞保持 [62] 所述的核酸；
- [0220] [64] 如 [63] 所述的宿主细胞，其中，宿主细胞为岩藻糖转运体缺失的动物细胞、岩藻糖基转移酶缺失的动物细胞或改变复合糖支链 (complex branched sugar chain) 修饰的动物细胞；
- [0221] [65] 一种抗体的制备方法，所述制备方法包括：将 [63] 或 [64] 所述的宿主细胞进行培养的步骤；及从细胞培养物中回收多肽的步骤。

附图说明

[0222] [图 1] 图 1 为 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的由 DSC(差示扫描量热计)测定得到的图表。

[0223] [图 2] 图 2 为高 pI 等电点电泳中的 H0L0 抗体及 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的电泳图。泳道 1 及 4 表示 pI 标志物的电泳图，泳道 2 表示 H0L0 抗体的电泳图、泳道

3 表示 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的电泳图。数字表示 pI 标志物分子的 pI 值, 箭头表示该 pI 值的标志物分子的电泳迁移率。

[0224] [图 3] 图 3 为低 pI 等电点电泳中的 H0L0 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的电泳图。泳道 1 及 4 表示 pI 标志物的电泳图, 泳道 2 表示 H0L0 抗体的电泳图, 泳道 3 表示 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的电泳图。数字表示 pI 标志物分子的 pI 值, 箭头表示该 pI 值的标志物分子的电泳迁移率。

[0225] [图 4] 图 4 为表示利用使用了 H15L4 抗体及 H0L0 抗体的竞争性 ELISA 得到的对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合亲和性的图。黑色菱形表示 H0L0 抗体的结合亲和性, 灰色四边形表示 H15I4 抗体的结合亲和性。

[0226] [图 5] 图 5 为表示利用使用了 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 H0L0 抗体的竞争性 ELISA 得到的对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合亲和性的图。黑色菱形表示 H0L0 抗体的结合亲和性, 灰色四边形表示 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的结合亲和性。

[0227] [图 6] 图 6 为表示利用使用了 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体及 H0L0 抗体的竞争性 ELISA 得到的对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合亲和性的图。黑色菱形表示 H0L0 抗体的结合亲和性, 灰色四边形表示 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的结合亲和性。

[0228] [图 7] 图 7 表示 H0L0 抗体、Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体在人肝癌移植小鼠模型中的抗肿瘤效果。图 7A 表示以 5mg/kg 的给与量对该模型给与各受试抗体时 H0L0 抗体、Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体在人肝癌移植小鼠模型中的抗肿瘤效果。黑色菱形表示媒介物的给与效果, 黑色三角形表示 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的给与效果, 白色空心圆表示 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的给与效果, 及黑色四边形表示 H0L0 抗体的给与效果。图 7B 表示以 1mg/kg 的给与量对该模型给与各受试抗体时 H0L0 抗体、Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体在人肝癌移植小鼠模型中的抗肿瘤效果。黑色菱形表示媒介物的给与效果, 黑色三角形表示 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的给与效果, 白色空心圆表示 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的给与效果, 及黑色四边形表示 H0L0 抗体的给与效果。

[0229] [图 8] 图 8 表示 H0L0 抗体、Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体在人肝癌移植小鼠模型中的抗体血浆中浓度。图 8A 表示以 5mg/kg 的给与量对该模型给与各受试抗体时 H0L0 抗体、Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体在人肝癌移植小鼠模型中的被给与的抗体的血浆中浓度。黑色三角形表示 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的血浆中浓度, 白色空心圆表示 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的血浆中浓度, 及黑色四边形表示 H0L0 抗体的血浆中浓度。图 8B 表示以 1mg/kg 的给与量对该模型给与各受试抗体时 H0L0 抗体、Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体及 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体在人肝癌移植小鼠模型中的抗肿瘤效果。黑色三角表示 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体的血浆中浓度, 白色空心圆表示 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的血浆中浓度, 及黑色四边形表示 H0L0 抗体的血浆中浓度。

[0230] [图 9] 图 9 表示各受试抗体对人肝癌细胞株 Hep G2 细胞产生的 ADCC 活性。黑色三角表示由 Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) 抗体产生的 ADCC 活性,白色空心圆表示由 Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) 抗体产生的 ADCC 活性,及黑色四边形表示由 H0L0 抗体产生的 ADCC 活性。

[0231] [图 10] 图 10 为表示利用使用了 H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体的竞争性 ELISA 得到的对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合亲和性的图。黑色圆形表示 H0L0 抗体的结合活性,白色空心圆表示 Hd1.8Ld1.6 抗体的结合活性,黑色四边形表示 pH7pL14 抗体的结合活性,及白色空心四边形表示 pH7pL16 抗体的结合活性。

[0232] [图 11] 图 11 表示 H0L0 抗体、pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体的人肝癌移植小鼠模型中的抗肿瘤效果。*表示 H0L0 抗体的抗肿瘤效果、白色空心圆表示 Hd1.8Ld1.6 抗体的抗肿瘤效果、黑色四边形表示 pH7pL14 抗体的抗肿瘤效果、及白色空心四边形表示 pH7pL16 抗体的抗肿瘤效果。

[0233] [图 12] 图 12 表示 H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体、pH7pL16 抗体及 pH7M85pL16 在小鼠中的抗体血浆中浓度。*表示 H0L0 抗体在小鼠中的抗体的血浆中浓度,白色空心圆表示 Hd1.8Ld1.6 抗体在小鼠中的抗体的血浆中浓度,黑色四边形表示 pH7pL14 抗体在小鼠中的抗体的血浆中浓度,白色空心四边形表示 pH7pL16 抗体在小鼠中的抗体的血浆中浓度,及黑色三角表示 pH7M85pL16 抗体在小鼠中的抗体的血浆中浓度。

[0234] [图 13] 图 13 表示 H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体、pH7pL16 抗体对人肝癌细胞株 Hep G2 细胞产生的 ADCC 活性。黑色圆形表示由 H0L0 抗体产生的 ADCC 活性,白色空心圆表示由 Hd1.8Ld1.6 抗体产生的 ADCC 活性,黑色四边形表示由 pH7pL14 抗体产生的 ADCC 活性,及白色空心四边形表示由 pH7pL16 抗体产生的 ADCC 活性。

[0235] [图 14] 图 14 为表示利用使用了 H0L0 抗体、H0M85L0 抗体、pH7pL16 抗体及 pH7M85pL16 抗体的竞争性 ELISA 得到的对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合亲和性的图。黑色三角形表示 H0L0 抗体产生的结合活性,黑色四边形表示 H0M85L0 抗体产生的结合活性,*表示 pH7pL16 抗体产生的结合活性,及白色空心菱形表示 pH7M85pL16 抗体产生的结合活性。

[0236] [图 15] 图 15 表示 pH7pL16 抗体及 pH7M85pL16 抗体对人肝癌细胞株 Hep G2 细胞产生的 ADCC 活性。白色空心四边形表示由 pH7pL16 抗体产生的 ADCC 活性,黑色三角形表示由 pH7M85pL16 抗体产生的 ADCC 活性。

具体实施方式

[0237] 本发明提供对以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中动力学进行控制的方法。作为本发明的方法的优选实施方式,包括改变能够露出在以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体表面的至少一个氨基酸残基的电荷的方法。即,改变以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的氨基酸残基的电荷,使其等电点 (pI) 变化,由此可以控制该抗体的血浆中动力学。血浆中动力学被控制的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体与未被控制的抗体相比,其对癌细胞可以发挥更优异的抗肿瘤活性。

[0238] 多种抗体的同种型中,IgG 抗体由于其分子量非常大,所以它的主要代谢途径不是利用肾排泄的途径。已知由于具有 Fc 区作为其分子的一部分的 IgG 抗体通过在血管等内皮

细胞中表达的新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的补救途径进行再循环,所以具有长的生物体内半衰期。认为 IgG 抗体主要通过内皮细胞中的代谢途径被代谢 (非专利文献 16)。即,认为通过被内皮细胞非特异性摄取的 IgG 抗体与 FcRn 结合, IgG 抗体被再循环,而无法结合的 IgG 抗体被代谢。其 Fc 部分被改变使其对 FcRn 的结合性降低的 IgG 抗体的血浆中半衰期变短。相反地为了提高对 FcRn 的结合性而改变构成 IgG 抗体的 Fc 区的氨基酸残基,由此可以延长 IgG 抗体的血浆中半衰期 (非专利文献 16 及非专利文献 29)。如上所述,现有 IgG 抗体的血浆中动力学的控制方法如下进行:通过改变构成 Fc 区的氨基酸残基来改变对 FcRn 的结合性。作为上述氨基酸残基,具体而言可以举出基于 Kabat 编号的氨基酸残基的 H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435, H436。除此之外,作为其改变对象,还可以举出间接作用于 IgG 抗体与 FcRn 之间相互作用的氨基酸残基的 H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415, H433。上述氨基酸残基分别对应例如序列号 30 中的第 130、133、190、191、194、308、315、316 号氨基酸残基,以及第 134、135、137、168、176、187、189、195、295、313 号氨基酸残基;及序列号 31 中的第 133、136、193、194、197、311、318、319 号氨基酸残基,以及第 137、138、140、171、179、190、192、198、298、316 号氨基酸残基。但是,如下述实施例所示,表明在本发明中以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期在很大程度上依赖于 pI。即,表明可以以不改变下述氨基酸残基的方式控制以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期,所述氨基酸残基是构成 FcRn 结合区的氨基酸残基,其改变可能引起获得免疫原性,具体而言是基于 Kabat 编号的氨基酸残基的 H250、H253、H310、H311、H314、H428、H435、H436 和 H254、H255、H257、H288、H296、H307、H309、H315、H415、H433 等。另外,意外的令人惊奇的结果是:除上述 H250、H253、H310、H311、H314、H428、H435、H436 和 H254、H255、H257、H288、H296、H307、H309、H315、H415、H433 等氨基酸残基之外的改变,产生 pI 值降低的效果,同时从对 FcRn 的结合性的观点考虑也产生一定效果。

[0239] 本发明人等不希望被特定的理论所束缚,目前如下考虑。认为向内皮细胞的非特异性的 IgG 抗体的摄取速度依赖于带有负电荷的细胞表面与 IgG 抗体的物理化学的电荷相互作用。因此,认为通过降低 (升高) IgG 抗体的 pI 使电荷相互作用减小 (增大),引起其向内皮细胞的非特异性摄取减少 (增大),结果可以通过减少 (增大) 内皮细胞中的代谢来控制血浆中动力学。需要说明的是,此处所谓电荷相互作用的减小是指用斥力表示的库仑力的增大。认为由于抗体与内皮细胞的细胞表面负电荷之间的电荷相互作用是物理化学的相互作用,所以该相互作用不主要依赖于构成抗体的氨基酸序列本身。因此,本发明中发现的血浆中动力学的控制方法不仅适用于特定抗体或磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体,还可以广泛适用于任意抗体或磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体。

[0240] 使用 IgG 抗体作为本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体时,只要是 IgG 型抗体分子即可,可以为任意亚型,也可以为双特异性的 IgG 抗体。本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体为双特异性抗体时,该抗体还可以对该抗体结合的抗原 (为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的情况下为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 分子) 和除该抗原之外的抗原的表位特异性结合。例如作为除该抗原之外的抗原,为了募集 NK 细胞、细胞毒性 T 细胞、LAK 细胞等,所以可以优选利用与上述细胞特异性结合的表面抗原。利用下述双特异性抗体对胆管癌发挥由 LAK 细胞产生的细胞毒性,所述双特异性抗体是由识别作为腺癌相关抗原的 MUC1 的抗体 MUSE11 和识别 LAK 细胞表面抗原的抗体 OKT3 制作得到的 (非专

利文献 17)。可以优选使用本发明提供的血浆中动力学被改善的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体来代替上述识别 MUC1 的抗体 MUSE11。另外,作为本发明提供的双特异性的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体,还可以优选使用识别结合有该抗体的抗原(为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的情况下为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 分子)的不同表位的抗体。另外,即使为抗体分子,在为如 scFv 和 Fab 之类以肾排泄为其主要代谢途径的低分子抗体的情况下,也无法如上所述通过 pI 来控制其抗体的血浆中动力学。但是,本发明只要为不以肾排泄为主要代谢途径的 Fc 结合蛋白质即可,可以使用任意抗体分子型。例如可以举出 scFv-Fc、dAb-Fc、Fc 融合蛋白质等。由于这些分子的主要代谢途径不是利用肾排泄的代谢,所以可以根据本发明中发现的方法通过改变 pI 来控制上述分子的血浆中动力学。本发明可以适用的抗体分子也可以为抗体样分子。抗体样分子是指通过与靶分子结合发挥功能的分子(非专利文献 18),例如可以举出 DARPin、Affibody、Avimer 等。

[0241] 本发明中“血浆中动力学被控制”是指将构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的氨基酸在改变前与改变后的抗体血浆中动力学进行比较,血浆中动力学向所期望的方向改变。即,期望延长以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期时,“血浆中动力学的控制”是指延长该抗体的血浆中半衰期。期望缩短以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中半衰期时,“血浆中动力学的控制”是指缩短该抗体的血浆中半衰期。

[0242] 本发明中以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的血浆中动力学是否向所期望的方向改变,即血浆中动力学是否如所期望那样地被控制,例如可以通过采用小鼠、大鼠、兔、犬、猴等进行动力学试验,进行适当评价。另外,更具体而言,本发明中的“血浆中半衰期的延长”或“血浆中半衰期缩短”可以通过除如血浆中半衰期之类参数之外,血浆中平均滞留时间或血浆中清除率等任一种参数来把握(《药物动力学实践的分析》(南山堂))。例如可以根据体内动力学分析软件 WinNonLin (Pharsight) 附带的说明书,进行非房室(Noncompartmental)分析,由此利用上述参数适当评价本发明提供的“血浆中动力学的控制”。

[0243] 本发明中“能够露出在表面的氨基酸残基”通常是指位于构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多肽表面的氨基酸残基。“位于多肽表面的氨基酸残基”是指其侧链能够与溶剂分子(通常多指水分子)接触的氨基酸残基,无需其全部侧链均与溶剂分子接触,即使在其侧链的一部分与溶剂分子接触的情况下,也规定该氨基酸残基为位于表面的氨基酸残基。本领域技术人员可以通过使用了市售软件的同源建模等,制作多肽和抗体的同源模型。基于该同源模型,可以适当选择位于构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多肽表面的氨基酸残基作为“位于多肽表面的氨基酸残基”。

[0244] 本发明中“能够露出在表面的氨基酸残基”没有特别限定,但优选位于以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体中的 FcRn 结合区之外的氨基酸残基。上述 FcRn 结合区可以优选举出例如 Fc 区,更具体而言可以举出由基于 Kabat 编号的氨基酸残基的 H250, H253, H310, H311, H314, H428, H435, H436 中的一个以上的氨基酸残基构成的区域。除此之外,还可以举出间接作用于 IgG 抗体与 FcRn 之间的相互作用的氨基酸残基如 H254, H255, H257, H288, H296, H307, H309, H315, H415, H433 作为其改变对象。上述氨基酸残基分别对应例如序列号 30 中的第 130、133、190、191、194、308、315、316 号氨基酸残基,以及第 134、135、137、

168、176、187、189、195、295、313 号氨基酸残基；及序列号 31 中的第 133、136、193、194、197、311、318、319 号氨基酸残基，以及第 137、138、140、171、179、190、192、198、298、316 号氨基酸残基。

[0245] 根据本发明，以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体中应改变电荷的氨基酸残基优选为构成抗体的重链（也称作 H 链）可变区或轻链（也称作 L 链）可变区的氨基酸残基。作为该可变区，具体而言可以举出互补性决定区（CDR）、构架区（FR）。

[0246] 对本领域技术人员来说，抗体可变区中的表面氨基酸残基可以通过采用同源建模等制作得到的同源模型进行适当选择。即，可以从基于 Kabat 编号的氨基酸残基如 H1、H3、H5、H8、H10、H12、H13、H15、H16、H19、H23、H25、H26、H39、H42、H43、H44、H46、H68、H71、H72、H73、H75、H76、H81、H82b、H83、H85、H86、H105、H108、H110、H112 中适当选择抗体可变区中的表面氨基酸残基。例如序列号 1 表示的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的重链 FR 中，可以举出以第 1、3、5、8、10、12、13、15、16、19、23、25、26、39、42、43、44、46、69、72、73、74、76、77、82、85、87、89、90、107、110、112、114 号氨基酸残基作为表面氨基酸，但本发明并不限于此。另外，重链 CDR 中的表面氨基酸残基可以根据同样的同源模型进行选择。即，基于 Kabat 编号的氨基酸残基如 H97 基本露出在全部抗体的表面。例如，序列号 1 表示的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的重链 CDR 中的第 101 号丝氨酸与该氨基酸残基对应。作为序列号 1 表示的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的重链 CDR 中的其他氨基酸残基，可以优选举出第 52、54、62、63、65、66 号氨基酸残基。

[0247] 在轻链 FR 中，可以从基于 Kabat 编号的氨基酸残基如 L1、L3、L7、L8、L9、L11、L12、L16、L17、L18、L20、L22、L38、L39、L41、L42、L43、L45、L46、L49、L57、L60、L63、L65、L66、L68、L69、L70、L74、L76、L77、L79、L80、L81、L85、L100、L103、L105、L106、L107 中适当选择抗体可变区中的表面氨基酸残基。例如可以举出以序列号 7 表示的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体 1、3、7、8、9、11、12、16、17、18、20、22、43、44、45、46、48、49、50、54、62、65、68、70、71、73、74、75、79、81、82、84、85、86、90、105、108、110、111、112 作为表面氨基酸，但本发明并不限于此。另外，轻链 CDR 中的表面氨基酸残基可以通过采用与确定重链 CDR 中的表面氨基酸残基的同源模型同样的同源模型进行选择。作为序列号 7 表示的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的轻链 CDR 中的氨基酸残基，可以优选举出第 24、27、33、55、59 号氨基酸残基。

[0248] 本发明提供的方法中的氨基酸残基的“改变”具体而言是指将原有氨基酸残基取代之为其他氨基酸残基，使原有氨基酸残基缺失，附加新的氨基酸残基等，优选是指将原有氨基酸残基取代之为其他氨基酸残基。即，本发明中的“氨基酸残基的电荷的改变”优选是指氨基酸取代。

[0249] 为了对本发明提供的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体进行上述“氨基酸残基的电荷的改变”，例如优选将选自序列号 1 表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的重链可变区中第 19、43、52、54、62、63、65、66、107 号氨基酸残基中的至少一个氨基酸残基的电荷改变。另外，例如优选将选自序列号 7 表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的轻链可变区中第 17、24、27、33、55、59、79、82、105、112 号氨基酸残基中的至少一个氨基酸残基的电荷改变。只要能够获得作为目标的血浆中动力学的控制效果，则无需改变上述氨基酸残基中除该电荷被改变的氨基酸残基之外的氨基酸残基，但可以进行适当改变使之具有与

被适当改变的氨基酸残基同种的电荷或不具有电荷。

[0250] 已知在氨基酸中存在带有电荷的氨基酸。通常,作为带有正电荷的氨基酸(正电荷氨基酸),已知赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。作为带有负电荷的氨基酸(负电荷氨基酸),已知天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)等。已知除此之外的氨基酸为不具有电荷的氨基酸。

[0251] 作为上述“被改变的氨基酸残基”,优选从包含在以下(a)或(b)中任一组中的氨基酸残基中适当选择,但并不特别限定于所述氨基酸。

[0252] (a) 谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)

[0253] (b) 赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)

[0254] 需要说明的是,在原有(改变前)氨基酸残基已经具有电荷的情况下,改变其使之成为不具有电荷的氨基酸残基也是本发明的优选实施方式之一。即,作为本发明中的改变,可以举出:(1)从具有电荷的氨基酸取代为不具有电荷的氨基酸;(2)将具有电荷的氨基酸取代为具有与该氨基酸相反电荷的氨基酸;(3)从不具有电荷的氨基酸取代为具有电荷的氨基酸。

[0255] 在本发明中,优选改变构成抗体的氨基酸残基使以磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体为代表的抗体的等电点(pI)变化。另外,存在多个被改变的氨基酸残基时,用于改变的氨基酸残基中可以含有少量不具有电荷的氨基酸残基。

[0256] 作为本发明提供的磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体中的“氨基酸残基的电荷的改变”的优选例,可以举出以下改变。作为增加pI值的改变,例如可以进行序列号1表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体的重链可变区中Q43K、D52N、Q107R中的至少一个的取代,特别优选改变为序列号4或序列号6表示的氨基酸序列。另外,例如可以进行序列号7表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体的轻链可变区中E17Q、Q27R、Q105R中的至少一个的取代,特别优选改变为序列号10或序列号12表示的氨基酸序列。另一方面,作为减小pI值的改变,可以进行序列号1表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体的重链可变区中K19T、Q43E、G62E、K63S、K65Q、G66D中的至少一个的取代,特别优选改变为序列号3、序列号5、序列号27表示的氨基酸序列。另外,例如可以进行序列号7表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖3抗体的轻链可变区中R24Q、Q27E、K79T、R82S、K112E中的至少一个的取代,特别优选改变为序列号9、序列号11、序列号28或序列号29表示的氨基酸序列。进而,作为减小pI值的改变,可以举出重链恒定区中基于Kabat编号特定的氨基酸残基如H268、H274、H355、H356、H358、H419中的至少一个的取代。上述取代例如可以举出以下取代作为优选例,即,序列号31表示的重链恒定区的将作为第151号氨基酸残基的H取代为Q、将作为第157号氨基酸残基的K取代为Q、将作为第238号氨基酸残基的R取代为Q、将作为第239号氨基酸残基的D取代为E、将作为第241号氨基酸残基的L取代为M、将作为第302号氨基酸残基的Q取代为E等中的一种或一种以上的取代。上述取代的结果构筑人抗体的IgG1恒定区与IgG4恒定区的嵌合体。即,通过该取代,可以不影响被改变的抗体的免疫原性地制作具有所期望pI的抗体。

[0257] 本发明中用于改变的氨基酸残基的数量没有特别限定,例如改变抗体的可变区时,为了不降低对抗原的结合活性或者为了提高免疫原性,优选改变用于实现作为目标的被控制的血浆中动力学所需最低限的氨基酸残基。另外,还可以优选适当组合引起对抗原

的结合活性增大的氨基酸残基的改变、和引起免疫原性降低的氨基酸残基的改变。

[0258] 可以采用公知的方法对抗体的抗原结合活性进行测定。例如可以采用 ELISA (酶联免疫吸附测定法)、EIA (酶免疫测定法)、RIA (放射免疫测定法) 或荧光免疫法等。一般的教科书如“Antibodies A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988”中记载了上述方法。

[0259] 作为测定抗体对细胞的结合活性的方法,例如可以举出 Antibodies A Laboratory Manual. (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) 中的 359-420 页中记载的方法。即,可以根据以细胞作为抗原的 ELISA 或 FACS (荧光激活细胞分选术) 的原理进行评价。在 ELISA format 中,通过比较由酶反应产生的信号水平,定量评价抗体对细胞的结合活性。即,将受试抗体加到固定化有各过量表达的细胞的 ELISA 板上,利用识别受试抗体的酶标志抗体,检测与细胞结合的抗体。或者在 FACS 中,制备受试抗体的稀释系列,确定抗体对各过量表达的细胞的结合效价 (titer),由此可以比较其对细胞的结合活性。

[0260] 可以通过 FACS format 测定在细胞表面上表达的抗原与对应于该抗原的抗体之间的结合,所述细胞不与 ELISA 板等载体结合并悬浮于缓冲液等中。作为用于上述测定的流式细胞仪,例如可以举出 FACSCanto™ II, FACS Aria™, FACS Array™, FACS Vantage™ SE, FACSCalibur™ (以上 BD Biosciences) 和 EPICS AL TRA HyPerSort, Cytomics FC 500, EPICS XL-MCL ADC, EPICS XL ADC, Cell Lab Quanta/Cell LabQuanta SC (以上 Beckman Coulter) 等。

[0261] 作为受试磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体对抗原的结合活性的优选测定方法之一例,可以举出使表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的细胞与受试抗体反应,用识别受试抗体的经 FITC 标记的二抗对细胞进行染色后,采用 FACSCalibur (BD) 进行测定,利用 CELL QUEST 软件 (BD) 解析其荧光强度的方法。根据本方法,用特异性识别受试抗体的经 FITC 标记的二抗对表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的细胞表面上的与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 结合的受试抗体进行染色后,采用 FACSCalibur 进行测定,此时利用 CELL QUEST 软件解析其荧光强度,将根据上述方法得到的几何平均值 (受试 Geo-Mean 值) 与利用对照抗体得到的对照 Geo-Mean 值进行比较,由此可以进行判断。求出 Geo-Mean (几何平均值) 的计算式记载在 CELL QUEST 软件用户指南 (BD biosciences 公司) 中。

[0262] 另外,为了不增加给与了抗体的人的体内免疫原性,被改变的氨基酸序列优选为人序列 (来自人的天然抗体中发现的序列),但本发明并不限于此。进而,在除使等电点改变而进行导入的改变之外的位置可以优选导入突变,使改变后多个 FR (FR1、FR2、FR3、FR4) 分别成为人序列。如上所述地将各 FR 取代为人序列的方法在非专利文献 25 中被报道。另外,为了改变抗体的等电点,也可以改变成其他的人 FR 使各 FR 的电荷变化 (例如也可以将 FR3 与其他的人 FR 交换,使抗体的等电点降低)。上述人源化方法在非专利文献 26 中被报道。

[0263] 另外,在通过仅改变表面电荷无法实现作为目标的被控制的血浆中动力学评价的情况下,通过反复进行表面电荷的改变和血浆中动力学的评价,能够适当取得显示出作为目标的被控制的血浆中动力学的所期望的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体。

[0264] 非专利文献 16 中表明,将抗 E, P- 选择蛋白抗体的嵌合抗体 (IgG4) 如 chimeric EP5C7. g4 与人源化抗体 (IgG4) 如 HuEP5C7. g4 的猕猴中的血浆中动力学进行比较,二者的

血浆中动力学等同。另外,非专利文献 19 中表明,将抗 CD154 抗体的嵌合型抗体如 ch5d8 与人源化抗体如 Hu5c8 的短尾猴中的血浆中动力学进行比较,二者的血浆中动力学等同。非专利文献 20 中表明,嵌合抗体 cCC49 与人源化抗体 HuCC49 的小鼠中的血浆中动力学等同。另外,非专利文献 21 及非专利文献 22 中,表明在小鼠的评价中小鼠抗体与人源化抗体的血浆中动力学·分布等同,由于小鼠 Fc 及人 Fc 均与小鼠 FcRn 交差反应,所以认为同一嵌合抗体与同一人源化抗体的血浆中动力学·分布等同。如上述例子所示,具有相同 CDR 的嵌合抗体与人源化抗体之间的血浆中动力学等同。即,在根据非专利文献 7 等中举出的公知方法进行人源化的情况下,与嵌合抗体相比,血浆中动力学等同,无法利用公知方法制作血浆中动力学被控制的人源化抗体。

[0265] 相对于此,利用本发明中发现的方法,对以嵌合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的嵌合抗体进行人源化时,除通过对能够露出在该嵌合抗体表面的氨基酸残基进行改变之外,改变该嵌合抗体的 pI,由此可以制作与该嵌合抗体相比血浆中动力学被控制的(即,延长其血浆中半衰期,或者短缩其血浆中半衰期)以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体。为了控制血浆中动力学,能够露出在用于以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体表面的氨基酸的改变可以与抗体的人源化同时进行,或者使用以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体作为起始材料,改变能够露出在其表面的氨基酸残基,由此进一步改变人源化抗体的 pI。

[0266] 非专利文献 23 中记载了利用相同人抗体的 FR 序列进行人源化的 3 种人源化抗体 trastuzumab、bevacizumab、pertuzumab 的血浆中动力学基本等同。即,利用相同 FR 序列进行人源化时,血浆中动力学基本等同。根据本发明中发现的方法,除上述人源化步骤之外,对能够露出在以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体表面的氨基酸残基进行改变,除此之外改变抗体的 pI,由此可以控制以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体血浆中浓度。

[0267] 另外,本发明的方法还可以适用于人抗体。对能够露出在由人抗体文库和产生人抗体的小鼠等制作得到的以人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人抗体表面的氨基酸残基进行改变,除此之外,改变人抗体的 pI,由此可以制作与最初制作的人抗体的血浆中动力学相比,其血浆中动力学被控制的(即,延长其血浆中半衰期,或者短缩其血浆中半衰期)以人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人抗体。

[0268] 通过减小抗体所具有的 pI 值,延长抗体的血浆中半衰期。已知与之相反地通过增大抗体的 pI 值,短缩血浆中半衰期,提高抗体的组织迁移性(非专利文献 27 及 28)。但是,该抗体由于免疫原性增加,此外对细胞内的内在化活性也增大,所以为了适用于下述抗体需要进一步改良,所述抗体通过细胞毒性等机制产生抗癌效果,因为对细胞内的内在化活性是发挥 ADCC 和 CDC 活性等活性的障碍。即,对于通过细胞毒性等机制产生抗癌效果的抗体来说,所述细胞毒性是由于对细胞内的内在化活性是发挥 ADCC 和 CDC 活性等活性的障碍,尚不清楚究竟抗体 pI 值的增加还是减小会引起肿瘤抑制效果的增强。在本发明中,制作其 pI 值减小的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的改变抗体和其 pI 值增加的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的改变抗体,比较研究二者的抗肿瘤效果,由此验证何种改变会引起高的肿瘤抑制效果。结果令人惊奇的是:pI 值减小的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体对肝癌发挥更优异的效果。

[0269] 本发明中的“磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体”中包含下述抗体：如上所述将氨基酸残基的电荷被改变的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体用作起始材料，通过构成该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的氨基酸残基的取代、缺失、附加及 / 或插入等得到的其氨基酸序列被进一步改变的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体。另外，本发明中的“磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体”中还包含通过氨基酸残基的取代、缺失、附加及 / 或插入、或嵌合化和人源化等，将氨基酸序列被改变的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体用作起始材料，得到的构成该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的氨基酸残基的电荷被进一步改变的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体。

[0270] 作为以提高本发明提供的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的特性为目的的改变示例，优选举出以提高抗体的稳定性为目的的改变（以下，称作稳定性的改变）。水溶液中的抗体在天然状态与失活变性状态两种状态之间被平衡化。如热力学第二法则（ $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ ）所示，天然状态的稳定性依赖于体系的吉布斯自由能的变化 ΔG 、及其细分如焓的变化 ΔH （归因于多肽链中的疏水性相互作用和氢键等的变化）与熵的变化 ΔS （归因于溶剂化作用与立体结构自由度的变化）的平衡。正值 ΔG 是指蛋白质的天然状态比蛋白质的变性状态更稳定， ΔG 显示出较大的正值时，蛋白质的天然状态的稳定性进一步增大。为了使蛋白质变性，需要破坏有助于其稳定化的力。例如通过将蛋白质溶液露出在高温下，立体结构的自由度增大，削弱有助于蛋白质稳定化的因素，由此会引起蛋白质的热变性，但在上述情况下， $-T \Delta S$ 项支配变性。由蛋白质的热变性导致的折叠（unfolding）蛋白质的 ΔH 可以如本说明书中记载的实施例中具体记载地那样，利用 DSC (differential scanning calorimetry；差示扫描量热测定法) 直接进行测定。蛋白质的热变性过程中的 DSC 曲线以夹着被称作变性中点 (T_m) 的受试蛋白质中固有的温度的方式形成吸热峰。通过对该峰进行积分，可以得到变性焓变化。通常， T_m 值是热稳定性的指标之一。也可以通过 DSC 测定蛋白质产生热变性时的热容变化 (ΔC_p)。随着热变性产生的热容变化主要归因于：蛋白质以天然状态存在时未露出在分子表面的氨基酸残基随着蛋白质的变性而露出于溶剂分子中，结果引起水合。

[0271] 如上所述，本发明提供的方法中的氨基酸残基的“改变”具体而言是指将原有氨基酸残基取代为其他氨基酸残基，使原有氨基酸残基缺失，附加新的氨基酸残基等，但优选是指将原有氨基酸残基取代为其他氨基酸残基。即，为了改变本发明中的抗体稳定性，优选采用利用氨基酸取代进行的改变。对构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的氨基酸残基进行稳定性的改变，结果抗体的上述 T_m 值增大。即，上述 T_m 值优选用作对以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体进行了稳定性改变的指标。

[0272] 为了对本发明提供的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体进行上述“稳定性的改变”，例如优选将选自序列号 1 表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的重链可变区中第 37、40、48、51 号氨基酸残基中的至少一个氨基酸残基进行改变。另外，例如优选将选自序列号 7 表示的构成人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的轻链可变区中第 2、25、42、48、50、83、84 号氨基酸残基中的至少一个氨基酸残基进行改变。上述氨基酸残基中，除进行了该稳定性改变的氨基酸残基之外的氨基酸残基只要可以得到所期望的 T_m 值即可，无需对其进行改变，但可以适当改变使之具有与用于适当改变的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的 T_m 值同等程度的 T_m 值，或具有其以上的 T_m 值。

[0273] 稳定性的改变可以通过将用于改变的构成以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体

为代表的抗体的各氨基酸残基随机改变而实现。另外,还可以通过将用于改变的构成以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体的氨基酸序列的一部分取代为下述氨基酸序列来进行稳定性的改变,所述氨基酸序列为构成高 Tm 值的已知抗体的氨基酸序列,并且从与用于该改变的以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体的氨基酸序列的一部分与抗体的立体结构有关的观点考虑为相对应的序列。被取代的氨基酸残基的位置没有限定,但可以优选改变 FR 中的氨基酸残基。另外,也可以为 CDR 中的氨基酸残基,只要不伴有对抗原的结合活性降低即可,可以进行适当改变。另外,被改变的氨基酸残基的数量没有特别限定,也可以通过将 FR 的特定片段取代为所期望的片段来进行。该片段的取代可以通过改变全部 FR 中 FR1、FR2、FR3、FR4 各片段,或者将一个或一个以上各片段的改变进行组合来进行。

[0274] 改变 FR 片段时,可以举出以重链或轻链的 FR2 为优选例。例如可以举出以下改变作为优选的具体例,所述改变包括:将具有序列号 1 表示的 VH1b 亚类的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体重链的 FR2 改变为 VH4 亚类的氨基酸残基的改变,即将第 37 号缬氨酸取代为异亮氨酸的 V37I,同样地进行 A40P、M48I、L51I 的改变。另外,例如可以举出以下改变作为优选的具体例,所述改变包括:将具有序列号 7 表示的 VK2 亚类的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体轻链的 FR2 区改变为 VK3 亚类的改变,即 L42Q、S48A、Q50R 的改变,进而相当于改变 FR1 的生殖系细胞序列的 V2I 的改变。

[0275] 构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的氨基酸残基的取代、缺失、附加及 / 或插入、以及人源化、嵌合化等氨基酸序列的改变均可以根据本领域技术人员公知的方法适当进行。同样地制作本发明提供的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体作为重组抗体时,可以适当进行构成抗体的可变区及恒定区的氨基酸残基的取代、缺失、附加及 / 或插入。

[0276] 本发明中的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体也可以优选使用小鼠抗体、人抗体、大鼠抗体、兔抗体、山羊抗体、骆驼抗体等来自任何动物的抗体。进而,也可以优选使用例如嵌合抗体,其中人源化抗体等其氨基酸序列被取代的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的改变的抗体。另外,也可以优选使用结合了各种分子的抗体修饰物。

[0277] “嵌合抗体”是指组合来自不同动物的序列制作得到的抗体。例如可以优选举出由小鼠抗体的重链、轻链可变区与人抗体的重链、轻链恒定区构成的抗体。嵌合抗体的制作方法是公知的。例如将编码抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 以符合读框的方式 (in-frame) 进行融合,将得到的重组 DNA 参入通常使用的表达载体中。可以通过培养导入了该载体的宿主细胞,从其培养液中适当取得或分离嵌合抗体。

[0278] 人源化抗体也被称作重构 (reshaped) 人抗体,是从人以外的哺乳动物、例如小鼠等分离得到的抗体的互补性决定区 (CDR:complementarydetermining region) 与人抗体构架区 (FR:frame work region) 连结而得到的抗体。编码人源化抗体的 DNA 序列可以通过将多个寡核苷酸用作模板的重叠 PCR 反应进行合成。重叠 PCR 反应的材料、其实施方法记载在 W098/13388 等中。编码本发明的人源化抗体可变区的 DNA 通过重叠 PCR 由多个寡核苷酸得到,所述寡核苷酸以使之具有互相重叠的核苷酸序列的方式被制作,将上述 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 以符合读框方式进行连结,使之形成密码子序列。然后,将上述被连结的 DNA 插入表达载体中使该 DNA 表达,将其导入宿主内。

[0279] 用于鉴定 CDR 的方法是公知的 (Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., Nature (1989) 342, 877)。另外, 上述通常的基因重组方法也是公知的 (参见欧洲专利申请公开号 EP 125023 号公报、W096/02576 号公报)。通过采用上述公知的方法, 例如确定从小鼠抗体等非人动物中取得的抗体的 CDR 后, 构筑编码该 CDR 与人抗体的 FR 连结的重组抗体的 DNA。选择通过 CDR 连结的人抗体的 FR, 使 CDR 形成良好的抗原结合部位。如果需要, 可以适当改变抗体可变区中的 FR 的氨基酸残基, 使重构人抗体的 CDR 形成合适的抗原结合部位 (Sato et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-6)。作为用于改变的 FR 中的氨基酸残基, 包含用非共价键与抗原直接结合的残基 (Amit et al., Science (1986) 233, 747-53)、影响或作用于 CDR 结构的残基 (Chothia et al., J. Mol. Biol. (1987) 196, 901-17) 及与 VH-VL (重链可变区 - 轻链可变区) 相互作用有关的残基 (EP239400 号专利公报)。

[0280] 利用插入了该 DNA 的通常使用的表达载体经转化或转导而产生的宿主细胞所产生的、该 DNA 编码的人源化抗体可以通过培养该宿主细胞, 从该培养液中分离而得到。

[0281] 本发明提供的抗体为嵌合抗体、人源化抗体或人抗体时, 作为该抗体的恒定区, 优选使用来自人抗体的恒定区。例如本发明提供的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为嵌合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体、人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体或人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体时, 作为该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的恒定区, 优选使用来自人抗体的恒定区。例如作为重链恒定区, 可以优选使用 C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4; 作为轻链恒定区, 可以分别优选使用 C κ 、C λ 。另外, 为了改善以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体或其产生的稳定性, 可以适当修饰人抗体恒定区。本发明提供的以嵌合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的嵌合抗体优选由从人以外的哺乳动物取得的抗体可变区与人抗体恒定区构成。另一方面, 人源化抗体优选由从人以外的哺乳动物中取得的抗体的 CDR、人抗体的 FR 及恒定区构成。例如, 人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体优选由从人以外的哺乳动物中取得的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的 CDR、人抗体的 FR 及恒定区构成。另外, 人抗体优选由从人中取得的抗体的 CDR、人抗体的 FR 及恒定区构成。例如人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体优选由从人中取得的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的 CDR、人抗体的 FR 及恒定区构成。人抗体的恒定区由与 IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD 及 IgE 等同种型抗体对应的固有氨基酸序列构成。作为本发明提供的人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的恒定区, 还可以优选使用属于任意同种型抗体的恒定区。优选使用人 IgG 的恒定区, 但不限于此。此外, 作为以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体或以人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人抗体的 FR, 对使用的人抗体的 FR 也没有特别限定, 还优选使用属于任意同种型的抗体的 FR。

[0282] 以降低免疫原性为目的, 也可以通过采用与非专利文献 25 中记载的方法类似的方法, 将构成 FR 的氨基酸残基的全部或一部分取代为生殖系细胞的序列。基于所谓生殖系细胞的序列的免疫原性低的合理预测, 通过比对, 对构成人源化抗体的 FR 的氨基酸序列与生殖系细胞的氨基酸序列进行比较 (Abhinandan K. R. and Martin C. R., J. Mol. Biol., (2007) 369, 852-862)。在不失去对抗原的结合性的范围内, 该比较中可以将构成不同人源化抗体的 FR 的氨基酸残基取代为生殖系细胞的序列中的氨基酸残基。作为具体例, 可以举出在序列号 1 表示的构成重链可变区的氨基酸残基中, 将第 70 号的 L 取代为 I, 将第 87 号

的 T 取代为 R, 将第 97 号的 T 取代为 A 的改变。另外, 可以举出序列号 7 表示的构成轻链可变区的氨基酸残基中, 将第 25 号的 S 取代为 A 的改变等。

[0283] 本发明提供的被改变的嵌合抗体、人源化抗体、及人抗体的可变区及恒定区仅限于对抗原显示出结合特异性, 可以优选对构成用于改变的抗体可变区及 / 或恒定区的一个或一个以上的氨基酸进行缺失、取代、插入及 / 或附加等。特别是本发明提供的被改变的嵌合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体、人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体及人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的可变区及恒定区仅限于对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 分子显示出结合特异性, 可以优选对构成用于改变的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的可变区及 / 或恒定区的一个或一个以上的氨基酸进行缺失、取代、插入及 / 或附加等。

[0284] 由于利用来自人的序列的嵌合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体、人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体及人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体中人体内的免疫原性降低, 所以认为将其用作以治疗为目的的对人给与的治疗用抗体时有用。

[0285] 作为本发明的方法中的突变导入前编码抗体的重链或轻链的基因序列, 可以使用已知的序列, 除此之外, 可以根据本领域技术人员公知的方法, 取得抗体基因的新型序列。该基因优选从例如抗体文库中取得。进而, 该基因也可以采用 RT-PCR 法等公知的方法进行克隆而得到, 所述 RT-PCR 法将产生单克隆抗体的杂交瘤的 mRNA 用作模板。

[0286] 对于抗体文库已经公知多种抗体文库。另外, 由于抗体文库的制作方法也是公知的, 所以本领域技术人员可以获得或制作合适的抗体文库。例如作为优选的抗体文库, 可以举出 Clackson et al., Nature(1991)352,624-8、Marks et al., J. Mol. Biol. (1991)222, 581-97、Waterhouses et al., Nucleic Acids Res. (1993)21,2265-6、Griffiths et al., EMBO J. (1994)13,3245-60、Vaughan et al., Nature Biotechnology(1996)14,309-14 及日本特表平 20-504970 号公报等文献中公开的噬菌体抗体文库。除此之外, 优选使用真核细胞中制作文库的方法 (W095/15393 号说明书) 和脂质体提示法 (ribosome display) 等公知的方法。进而, 将人抗体文库用于起始材料, 利用淘选 (panning) 取得人抗体的技术对本领域技术人员来说是公知的。即, 利用噬菌体呈现法, 以符合读框的方式融合人抗体的重链及轻链可变区的单链抗体 (scFv) 在噬菌体表面被表达。通过选择与抗原结合的噬菌体, 从该噬菌体中分离编码与抗原结合的 scFv 的基因。通过鉴定该基因序列, 可以决定编码与作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 结合的人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体重链及轻链可变区的 DNA 序列。通过将具有该序列的抗体基因插入合适的表达载体中, 在如下所述合适的宿主细胞中表达, 由此可以适当取得人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体。上述方法已经是公知的, 可以举出 W092/01047、W092/20791、W093/06213、W093/11236、W093/19172、W095/01438、W095/15388 中公开的方法。

[0287] 从产生抗体的杂交瘤中取得编码该抗体的基因的方法, 特别是从产生抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 单克隆抗体的杂交瘤中取得编码该磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的基因的方法基本上可以采用公知的技术。以下进行详细描述, 简单而言, 采用通常的免疫方法利用所期望的作为致敏性抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 对动物进行免疫后, 将从该动物得到的免疫细胞供给于与利用通常细胞融合法得到的公知的母细胞的细胞融合中。根据通常的筛选法, 筛选产生单克隆抗体的细胞 (杂交瘤), 将从被选择的杂交瘤中取得的 mRNA 用作模板, 通过逆转录酶合成磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体可变区 (V 区) 的 cDNA。优选以符合读框的

方式将该 cDNA 与编码所期望的抗体恒定区 (C 区) 的 DNA 进行融合, 由此, 取得磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体基因。

[0288] 更具体而言, 可以优选举出以下示例, 但本发明并不限于这些例子。为了得到本发明提供的抗体而使用的致敏性抗原可以为具有免疫原性的完全抗原, 也可以为含有不显示免疫原性的半抗原等不完全抗原。例如可以优选使用磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的全长蛋白、或其部分多肽或肽等。可以举出序列号 13 表示的可溶型 GPC3 核心多肽作为其优选具体例。除此之外, 已知由多糖类、核酸、脂质等构成的物质也作为抗原发挥作用, 本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体结合的抗原不特别限定于上述物质的实施方式。抗原的制作优选根据本领域技术人员公知的方法进行, 例如优选能够采用利用杆状病毒 (baculovirus) 的方法 (例如 W098/46777 等) 等。抗原的免疫原性低时, 优选利用与白蛋白等具有免疫原性的超大分子结合的该抗原对动物进行免疫。另外, 致敏性抗原为贯通磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 之类细胞膜的分子时, 如果需要优选将该分子细胞外区域的多肽片段用作致敏性抗原。或者优选将在细胞表面上表达该分子的细胞用作致敏性抗原。进而, 致敏性抗原为不溶性分子时, 优选通过将该分子与其他水溶性分子结合进行可溶化, 将该可溶化后的结合分子用作致敏性抗原。

[0289] 以产生磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的细胞为代表的产生抗体的细胞是通过利用上述合适的致敏性抗原对动物进行免疫而得到的。或者通过在体外对可以产生抗体的淋巴细胞进行免疫, 能够取得以产生磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的细胞为代表的产生抗体的细胞。作为被免疫的动物, 可以使用各种脊椎动物、哺乳动物。特别是通常使用啮齿类、兔类、灵长类动物作为被免疫的动物。可以举出小鼠、大鼠、仓鼠等啮齿类; 兔等兔类; 短尾猴、猕猴、狒狒、黑猩猩等猿等灵长类动物。除此之外, 还已知在其基因组上保持有人抗体基因所有组成成分的转基因动物, 通过使用上述动物, 优选可以得到人抗体 (参照 W096/34096: Mendez et al., Nat. Genet. (1997) 15, 146-56)。优选例如在体外利用所期望的抗原或表达所期望抗原的细胞将人淋巴细胞致敏后, 将其与人骨髓瘤细胞、例如 U266 进行细胞融合, 由此可以得到对该抗原具有结合活性的所期望的人抗体来代替上述转基因动物的使用 (参见日本特公平 1-59878 号公报)。另外, 优选通过对在其基因组上保持有人抗体基因的所有组成成分的转基因动物用所期望的抗原进行免疫 (参见 W093/12227、W092/03918、W094/02602、W096/34096、W096/33735), 可以取得所期望的以人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人抗体。

[0290] 动物的免疫可以如下进行, 例如将致敏性抗原用磷酸盐缓冲液 (PBS) 或生理盐水等适当稀释、混悬, 如果需要将其与佐剂混合, 由此进行乳化后, 用该致敏性抗原对动物腹膜内或皮下进行注射。之后, 优选每隔 4 ~ 21 日多次给与与弗式不完全佐剂混合而得到的致敏性抗原。确认在被免疫的动物中产生相对于致敏性抗原的抗体可以如下进行: 采用通常使用的方法例如酶联免疫吸附分析 (ELISA)、流式细胞术 (FACS) 等公知的分析法, 测定该动物对致敏性抗原的血清中的抗体效价。

[0291] 可以使用用于细胞融合的通常使用的融合剂 (例如聚乙二醇), 将从被所期望的致敏性抗原免疫的动物或淋巴细胞得到的产生磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合, 从而制作杂交瘤 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 59-103)。杂交瘤的制作可以优选根据例如米尔斯坦等

人的方法 (G. Kohler and C. Milstein, *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46) 等进行。通过将利用上述方法制作得到的杂交瘤细胞进行培养·增殖, 取得由该杂交瘤产生的与磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 特异性结合的单克隆抗体。可以根据免疫沉淀、放射免疫分析 (RIA)、酶联免疫吸附分析 (ELISA)、流式细胞术 (FACS) 等公知的分析法, 适当测定该单克隆抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合特异性。之后, 如果需要优选利用有限稀释法等方法, 对杂交瘤进行亚克隆, 分离由该杂交瘤产生的单克隆抗体, 所述杂交瘤是测定了所期望的特异性、亲和性或活性的产生磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的杂交瘤。

[0292] 然后, 编码被选择抗体的基因可以使用能够与该基因特异性结合的探针 (例如与编码抗体恒定区的序列互补的寡核苷酸等), 从上述杂交瘤或产生抗体的细胞 (致敏淋巴细胞等) 进行克隆。另外, 能够利用将从杂交瘤或产生抗体的细胞 (致敏淋巴细胞等) 取得的 mRNA 用作模板的 RT-PCR 法进行克隆。免疫球蛋白基于其不同的结构及功能, 可以分为五种不同的类型 IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM。进而, 各类型分成几种亚类 (同种型) (例如 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4; IgA1 及 IgA2 等)。根据本发明提供的抗体可以为来自属于上述任一类型及亚类的抗体, 不限于任一类型及亚类, 但可以举出属于 IgG 类型的抗体作为特别优选的抗体。

[0293] 编码构成以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体重链及轻链的氨基酸序列的基因可以通过基因工程学方法进行适当改变。例如通过改变编码构成小鼠抗体、大鼠抗体、兔抗体、仓鼠抗体、绵羊抗体、骆驼抗体等抗体的氨基酸序列的核酸残基, 可以适当制作以降低对人的异种免疫原性等为目的的进行了人为改变的基因重组抗体, 例如以嵌合磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的嵌合抗体、以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体等。嵌合抗体是由来自人以外的哺乳动物、例如来自小鼠的抗体重链、轻链可变区和人抗体重链、轻链的恒定区构成的抗体, 例如可以如下得到: 将编码来自于小鼠的抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连结, 将其参入表达载体中, 将得到的重组载体导入宿主后, 将其进行表达。人源化抗体也被称作重构 (reshaped) 人抗体, 是将来自人以外的哺乳动物例如小鼠等中分离得到的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体互补性决定区 (CDR; complementary determining region) 与人抗体构架区以符合读框的方式连结, 使之形成密码子序列而得到的抗体。编码上述人源化抗体的 DNA 序列可以通过将多个寡核苷酸用作模板的重叠 PCR 反应而合成。重叠 PCR 反应的材料、其实施方法记载在 W098/13388 等中。

[0294] 编码本发明的以基因重组磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的基因重组抗体可变区的 DNA 可以通过重叠 PCR 由多个寡核苷酸得到, 所述多个寡核苷酸以使之具有互相重叠的核苷酸序列的方式被制作, 将上述 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 以符合读框的方式连结, 使之形成密码子序列。然后, 将如上所述被连结的 DNA 插入表达载体中使该 DNA 表达, 将其导入宿主内。由该 DNA 编码的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体通过对该宿主进行培养来表达。表达了以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体可以从该宿主的培养液等中适当纯化 (参见 EP239400; W096/02576) 得到。经 CDR 连结的以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的 FR 可以选择互补性决定区形成对抗原具有良好的抗原结合部分。可以根据需要, 可以通过适当取代改变构成抗体可变区的 FR 的氨基酸残基, 所述抗体是以重构人抗体的互补性决定区形成对抗原具有合适的抗原结合部分的方

式选择得到的 (K. Sato et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

[0295] 除上述人源化的改变之外,可以进行下述改变,例如用于改善与以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体所识别的抗原的结合性等抗体的生物学特性的改变。本发明中的改变可以优选通过位点专一诱变(例如参见 Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488)、PCR 诱变、盒式诱变等方法进行。通常,构成其生物学特性被改善的改变抗体的氨基酸序列相对于构成用于改变的抗体(即作为改变抗体基础的抗体)的氨基酸序列,具有 70%以上、较优选 80%以上、更优选 90%以上(例如 95%以上、97%、98%、99%等)的同一性及/或类似性。在本说明书中,序列的同一性及/或类似性是指根据需要对序列进行比对及导入间隙使序列同一性取得最大值后,与构成作为改变抗体基础的抗体的氨基酸残基同一(相同残基)或类似(基于一般氨基酸侧链的特性,分成同类的氨基酸残基)的氨基酸残基的比例。通常,天然氨基酸残基基于其侧链的性质可以分为下述组:(1) 疏水性:丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸及亮氨酸;(2) 中性亲水性:天门冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、苏氨酸及丝氨酸;(3) 酸性:天冬氨酸及谷氨酸;(4) 碱性:精氨酸、组氨酸及赖氨酸;(5) 影响链取向的残基:甘氨酸及脯氨酸;以及(6) 芳香性:酪氨酸、色氨酸及苯基丙氨酸。

[0296] 另外,作为以增强抗体功能为目的的改变,例如还可以举出提高以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体所发挥的细胞毒性作为具体实施方式之一。作为细胞毒性,例如可以举出依赖抗体的细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity:ADCC)、依赖补体的细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity: CDC)等作为优选例。在本发明中, CDC 活性是指由补体系统产生的细胞毒性。另一方面, ADCC 活性是指在靶细胞的细胞表面抗原上附着有特异性抗体时,将其 Fc 部分与带有 Fc γ 受体的细胞(免疫细胞等)通过 Fc γ 受体进行结合,对靶细胞产生伤害的活性。受试抗体是否具有 ADCC 活性,或是否具有 CDC 活性可以根据公知的方法进行测定得到(例如 *Current protocols in Immunology*, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc., (1993) 等)。

[0297] 具体而言,首先进行效应细胞、补体溶液、靶细胞的制备。

[0298] (1) 效应细胞的制备

[0299] 从 CBA/N 小鼠等中取出脾脏,在 RPMI1640 培养基 (Invitrogen) 中将脾脏细胞分离。用含有 10% 胎牛血清 (FBS、HyClone) 的同一培养基清洗后,将细胞浓度调制为 5×10^6 细胞 /ml,由此可以制备效应细胞。

[0300] (2) 补体溶液的制备

[0301] 将幼兔补体 (CEDARLANE) 用含有 10% FBS 的培养基 (Invitrogen) 稀释 10 倍,可以制备补体溶液。

[0302] (3) 靶细胞的制备

[0303] 将使结合有受试抗体的抗原蛋白质表达的细胞与 0.2mCi 的铬 [^{51}Cr] 酸钠 (GE Healthcare Bioscience) 一同在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中于 37°C 下培养 1 小时,由此可以对该靶细胞进行放射性标记。作为使结合有受试抗体的抗原蛋白质表达的细胞,可以利用下述细胞:用编码结合有受试抗体的抗原蛋白质的基因经转化而得到的细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、乳癌细胞、子宫癌细胞、肝癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞、胃癌细胞

胞、膀胱癌细胞及大肠癌细胞等。放射性标记后,将该细胞用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基清洗 3 次,将细胞浓度调制为 2×10^5 细胞 /ml,由此可以制备该靶细胞。

[0304] ADCC 活性或 CDC 活性可以根据下述方法进行测定。测定 ADCC 活性时,在 96 孔 U 底板 (Becton Dickinson) 上加入靶细胞和受试抗体各 $50 \mu\text{l}$,在冰上反应 15 分钟。之后,将加入了 $100 \mu\text{l}$ 效应细胞的反应混合液在二氧化碳培养箱内培育 4 小时。受试抗体的最终浓度可以在 0 至 $10 \mu\text{g/ml}$ 范围内适当使用。该培养后回收 $100 \mu\text{l}$ 上清液,用 γ 计数器 (COBRA IIAUTO-GAMMA、MODEL D5005、Packard 仪器公司) 测定该上清液所具有的放射活性。细胞毒性 (%) 可以使用得到的放射活性的值基于 $(A-C)/(B-C) \times 100$ 计算式计算而得到。A 表示使用各受试抗体的试样时的放射活性 (cpm),B 表示使用加入了 1% NP-40 (nacalaitesque) 的试样时的放射活性 (cpm),C 表示使用仅含有靶细胞的试样时的放射活性 (cpm)。

[0305] 另一方面,测定 CDC 活性时在 96 孔平底板 (Becton Dickinson) 上加入靶细胞和受试抗体各 $50 \mu\text{l}$,在冰上反应 15 分钟。之后,将加入了 $100 \mu\text{l}$ 补体溶液的反应混合液在二氧化碳培养箱内培养 4 小时。受试抗体的最终浓度可以在 0 至 $3 \mu\text{g/ml}$ 的范围内适当使用。培养后,回收 $100 \mu\text{l}$ 上清液,用 γ 计数器测定该上清液所具有的放射活性。细胞毒性可以与测定 ADCC 活性同样地进行计算。

[0306] 另一方面,测定由抗体结合产生的细胞毒性时,在 96 孔平底板 (Becton Dickinson) 上加入靶细胞和受试抗体结合物各 $50 \mu\text{l}$,在冰上反应 15 分钟。将该板在二氧化碳培养箱内培养 1 至 4 小时。抗体的最终浓度可以在 0 至 $3 \mu\text{g/ml}$ 的范围内适当使用。培养后,回收 $100 \mu\text{l}$ 上清液,用 γ 计数器测定该上清液所具有的放射活性。细胞毒性可以与测定 ADCC 活性同样地进行计算。

[0307] 如上所述,例如以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的重链及轻链可变区通常由 3 个 CDR 和 4 个 FR 构成。作为本发明的优选实施方式中用于“改变”的氨基酸残基,例如可以从构成 CDR 或 FR 的氨基酸残基中适当选择。构成 CDR 的氨基酸残基的改变有时会引起该改变中的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体对抗原的结合活性的降低。因此,本发明中构成用于“改变”的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的氨基酸残基没有特别限定,但优选从构成 FR 的氨基酸残基中适当选择。在确认该改变不会引起改变中的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体对抗原的结合活性的降低的情况下,即使为位于 CDR 的氨基酸残基的改变,也可以适当选择该氨基酸残基。

[0308] 另外,对本领域技术人员来说,可以利用 Kabat 等公共数据库等适当取得下述氨基酸序列:所述氨基酸序列是构成抗体可变区的 FR 的氨基酸序列,且在人或小鼠等生物体中确实存在。

[0309] 在本发明的优选实施方式中,利用本发明的方法提供血浆中动力学被控制的以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体。该以人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人源化抗体例如为包含来自人以外的动物互补性决定区 (CDR)、来自人的构架区 (FR) 及人恒定区的人源化抗体,所述人源化抗体是 CDR 或 FR 中能够露出在抗体表面的至少一个氨基酸残基与原有抗体的 CDR 或 FR 相对应位置的氨基酸残基相比具有不同的电荷,所述人源化抗体与具有相同恒定区的嵌合抗体相比血浆中动力学被控制。

[0310] 进而,在本发明的优选实施方式中,利用本发明的方法提供血浆中动力学被控制的以人磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的人抗体。该人抗体例如为包含来自人的互补

性决定区 (CDR)、来自人的构架区 (FR) 及人恒定区的人抗体,所述人抗体是 CDR 或 FR 中能够露出在抗体表面的至少一个氨基酸残基与原有抗体的 CDR 或 FR 相对应的位置的氨基酸残基相比具有不同电荷,所述人抗体与具有相同恒定区的嵌合抗体相比血浆中动力学被控制。

[0311] 上述人恒定区优选是指包含野生型人 Fc 区的区域,但也可以优选使用被改变的 Fc。作为上述“被改变的 Fc”,可以包含构成该 Fc 的氨基酸残基被改变的 Fc,另外也可以包含对该 Fc 部分进行的修饰被改变的 Fc。可以优选举出附加在该 Fc 部分上的糖链修饰的样式的改变,作为上述修饰的改变的具体例。在本说明书中,可以举出作为参考实施例具体公开的“与抗体 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体”作为上述优选的具体例。

[0312] “与抗体 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体”是指与作为对照的抗体相比时,结合的岩藻糖量明显少,优选无法检测的抗体。通常在 N-糖苷结合糖链上附加有岩藻糖,所述 N-糖苷结合糖链与存在于构成一分子抗体的两分子重链的 Fc 区的两处糖链结合部位结合。本发明中“与抗体 Fc 区结合的岩藻糖含量降低的抗体”是指以上述通常抗体为对照并进行比较时,具有岩藻糖的含量为对照抗体所具有的总糖链的含量的 50% 以下、优选 25% 以下、更优选 10% 以下、特别优选 0% 以下的抗体。岩藻糖的含量可以采用下述参考实施例中具体公开的解析方法进行测定。降低了该岩藻糖含量的抗体的制作方法包括本发明的参考实施例中记载的方法,除此之外例如还可以优选举出利用缺失岩藻糖基转移酶的动物细胞进行制作的方法 (Biotechnol Bioeng. (2004), 87 (5), 614-22)、利用复合糖支链修饰被改变的动物细胞进行制作的方法 (Biotechnol Bioeng. (2006) 93 (5), 851-61) 等作为示例。另外,作为以除动物细胞之外的细胞作为宿主细胞的方法,也可以优选举出利用植物细胞进行制作的方法 (Nature Biotechnology (2006) 24, 1591-7) 或利用酵母细胞进行制作的方法 (Nature Biotechnology (2006) 24, 210-5) 等。

[0313] 作为本发明的制备方法的优选实施方式,是血浆中动力学被控制的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的制备方法,包括:(a) 改变编码包含该氨基酸残基的多肽的核酸,使能够露出在以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体表面的至少一个氨基酸残基的电荷发生改变;(b) 培养宿主细胞,使 (a) 中被改变的核酸表达;(c) 从宿主细胞培养物中回收以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体。

[0314] 本发明的上述方法中,“改变核酸”是指改变核酸序列,从而形成与通过本发明中的“改变”所导入的氨基酸残基相对应的密码子。更具体而言,是指改变构成用于改变的密码子的核酸,使相当于改变前的氨基酸残基的密码子成为因改变而导入的氨基酸残基的密码子。通常是指进行基因操作或突变处理来取代构成密码子的核酸中的至少一个碱基,从而形成编码目的氨基酸残基的密码子。即,用编码因改变而导入的氨基酸残基的密码子取代编码用于改变的氨基酸残基的密码子。上述核酸的改变可以采用本领域技术人员公知的技术例如位点专一诱变 (site-specific mutagenesis) 法、PCR 诱导导入法等适当进行。

[0315] 另外,本发明中的核酸通常被保持(插入)合适的载体中,并被导入宿主细胞。作为该载体,只要稳定地保持插入的核酸即可,没有特别限定,例如如果宿主使用大肠杆菌,则作为克隆用载体可以优选使用 pBluescript 载体 (Stratagene) 等,也可以使用市售的各种载体。为了生产本发明的多肽而使用载体时,表达载体是特别有用的。作为表达载体,只要是在试验管内、大肠杆菌内、培养细胞内、生物体个体内表达多肽的载体即可,没有

特别限定,例如如果为试验管内表达则优选 pBEST 载体 (Promega);如果为大肠杆菌则优选 pET 载体 (Invitrogen);如果为培养细胞则优选 pME18S-FL3 载体 (GenBank Accession No. AB009864);如果为生物体个体则优选 pME18S 载体 (Mol Cell Biol. (1988)8,466-472) 等。将本发明的 DNA 插入载体可以根据通常的方法进行,优选例如通过利用限制酶切位点的连接酶反应来进行 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley&Sons, Section 11.4-11.11)。

[0316] 作为上述宿主细胞,没有特别限定,可以根据目的使用各种宿主细胞。作为用于表达多肽的细胞,例如可以举出细菌细胞(例子:链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌、枯草杆菌)、真菌细胞(例子:酵母、曲霉菌)、昆虫细胞(例子:果蝇 S2、秋粘虫 SF9)、动物细胞(例子:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes 黑素瘤细胞)及植物细胞。将载体导入宿主细胞可以采用例如磷酸钙沉淀法、电脉冲穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley&Sons. Section 9.1-9.9)、脂质转染法、显微注射法等公知的方法进行。

[0317] 为了将宿主细胞中表达的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体向小泡腔、细胞周质空间或细胞外环境分泌,可以优选将适当的分泌信号参入目标抗体。上述信号可以优选使用与作为目标的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体结合的抗原所特有的内因性信号,或异种信号。

[0318] 上述制备方法中的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的回收在本发明的抗体分泌到培养基中时,利用培养基的回收进行。本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体在细胞内被产生时,其细胞首先被溶解,之后回收该抗体。

[0319] 为了将从重组细胞培养物中回收的本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体进行纯化,可以优选使用下述公知的方法,所述方法包括:硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阳离子或阴离子交换色谱法、磷酸纤维素层析、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟磷灰石层析及凝集素层析。

[0320] 另外,本发明涉及含有抗体(例如 IgG 抗体)及药学上允许的载体的组合物(药物),所述抗体是利用本发明的方法血浆中动力学被控制的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体药物。

[0321] 本发明中药物组合物通常是指用于疾病的治疗或预防、或者检查·诊断的药物。

[0322] 本发明的药物组合物可以根据本领域技术人员公知的方法进行适当地制剂化。例如可以以水或与以除此之外的药学上可以允许的液体形成的无菌溶液、或以混悬液制剂的注射剂的形态按照非口服形式进行使用。例如可以将其与药理学上允许的载体或介质,具体而言灭菌水或生理盐水、植物油、乳化剂、混悬剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、媒介物、防腐剂、粘合剂等适当进行组合,以通常认为的制药实践中要求的单位用量形态将其进行混合,由此可以适当进行制剂化。设定上述制剂中的有效分量,使之可以得到指示范围内适当的用量。

[0323] 用于注射的无菌组合物可以使用注射用蒸馏水之类的媒介物采用通常的制剂实践适当进行处方。

[0324] 作为注射用水溶液,例如可以举出含有生理盐水、葡萄糖和其他辅助剂(例如 D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠)的等渗溶液。可以优选同时使用适当的助溶

剂,例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇、聚乙二醇等)、非离子型表面活性剂(聚山梨酸酯 80(TM)、HCO-50 等)。

[0325] 作为油状液,可以举出芝麻油、豆油;作为助溶剂,可以优选同时使用苯甲酸苄酯及/或苄醇。另外,可以优选配合缓冲剂(例如磷酸盐缓冲液及乙酸钠缓冲液)、安抚剂(例如盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如苄醇及苯酚)、抗氧化剂。通常上述制备的注射液填充在合适的安瓿中。

[0326] 本发明的药物组合物优选可以通过非口服给与进行给与。例如可以以注射剂型、经鼻给与剂型、经肺给与剂型、经皮给与型的组合物的方式适当进行制备。例如可以通过静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等适当进行全身给与或局部给与。

[0327] 给与方法可以根据患者的年龄、症状适当选择。含有抗体或编码抗体的多核苷酸的药物组合物的给与量可以适当设定为例如每一次对每 1kg 体重给与 0.0001mg 至 1000mg 范围。另外,可以设定或调制为例如对每个患者给与 0.001 ~ 100000mg 的给与量,本发明并不限于上述数值。给与量及给与方法根据患者的体重、年龄、症状等有所改变,本领域技术人员可以考虑这些条件设定合适的给与量及给与方法。

[0328] 另外,本发明提供编码利用本发明的方法血浆中动力学被控制的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体(例如人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体等)的核酸。进而,运送该核酸的载体也包含在本发明中。

[0329] 进而,本发明提供含有上述核酸的宿主细胞。该宿主细胞的种类没有特别限定,例如可以举出大肠杆菌等细菌细胞和各种动物细胞等。该宿主细胞可以优选用于制备和表达本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的产生系统。即,本发明提供产生系统,所述产生系统用于制备使用该宿主细胞的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体。作为该产生系统,可以优选使用体外及体内的产生系统。作为体外的产生系统中使用的宿主细胞,优选使用真核细胞及原核细胞。

[0330] 作为用作宿主细胞的真核细胞,例如可以举出动物细胞、植物细胞、真菌细胞。作为动物细胞,可以优选举出哺乳动物类细胞,例如 CHO(J. Exp. Med. (1995) 108,945)、COS、HEK293、3T3、骨髓瘤、BHK(幼仓鼠肾)、HeLa、Vero 等;两栖动物类细胞,例如爪蟾卵母细胞(Valleet al., Nature(1981) 291, 338-340);及昆虫细胞,例如 Sf9、Sf21、Tn5。在本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的表达中,优选使用 CHO-DG44、CHO-DX11B、COS7 细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞。在利用动物细胞进行的以大量表达为目的的情况下,特别优选使用 CHO 细胞作为宿主细胞。例如优选通过采用磷酸钙法、二乙氨基乙基葡聚糖法、利用阳离子脂质体 DOTAP(Boehringer Mannheim) 的方法、电穿孔法、脂质转染法等方法,将重组载体等导入宿主细胞。

[0331] 作为植物细胞,已知例如来自普通烟草(*Nicotiana tabacum*)的细胞及浮萍(*Lemna minor*)作为蛋白质生产系统,利用对上述细胞进行愈伤组织培养的方法,可以产生本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体。作为真菌细胞,利用酵母例如酵母(*Saccharomyces*)属的细胞(酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)等)及丝状真菌,例如曲霉(*Aspergillus*)属的细胞(黑曲霉(*Aspergillus niger*)等)的蛋白质表达系统是公知的,可以将其用作产生本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的宿主细胞。

[0332] 使用原核细胞时,优选使用利用细菌细胞的产生系统。作为细菌细胞,除上述大肠杆菌 (*E. coli*) 之外,已知利用枯草杆菌 (*B. subtilis*) 的产生系统,上述细菌细胞均可以优选用于产生本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体。

[0333] 为了利用本发明的宿主细胞产生以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体,进行宿主细胞的培养,所述宿主细胞是利用含有编码本发明的抗体的多核苷酸的表达载体经转化而得到的,在该培养中编码以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多核苷酸被表达。培养可以优选根据公知的方法进行。例如将动物细胞用作宿主时,作为培养液例如可以优选使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。此时,优选同时使用 FBS、胎牛血清 (FCS) 等血清辅助液。另外,可以通过无血清培养来培养细胞。根据宿主细胞培养时可以优选在 pH 约为 6~8 的条件下进行培养。培养通常在约 30~40℃ 下,进行约 15~200 小时,根据需要可以进行培养基的交换、通气、搅拌。

[0334] 另一方面,作为在体内产生本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的系统,例如可以优选采用使用动物的产生系统和使用植物的产生系统。即,在上述动物或植物中导入编码本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多核苷酸,在动物或植物体内产生本发明的抗体并将其回收。本发明中的“宿主”中包含上述动物、植物。

[0335] 使用动物作为宿主时,可以采用使用哺乳类动物、昆虫的产生系统。作为哺乳类动物,优选使用山羊、猪、绵羊、小鼠、牛等 (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications(1993))。另外,使用哺乳类动物时,也可以使用转基因动物。

[0336] 例如编码本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多核苷酸以与基因形成融合基因的方式进行制备,所述基因编码如山羊 β -酪蛋白之类在乳汁中特异地产生的多肽。然后,将含有上述融合基因的多核苷酸片段注入山羊胚胎中,将该胚胎移植到雌性山羊中。可以从接受胚胎的山羊所生育的转基因山羊或其子孙产生的乳汁中,得到作为目标的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体。为了增加由该转基因山羊产生的含有以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的乳汁量,可以对该转基因山羊适当给与激素 (Ebert et al., Bio/Technology(1994)12,699-702)。

[0337] 另外,作为产生本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的昆虫,例如可以使用蚕。使用蚕时使用杆状病毒感染蚕,所述杆状病毒是将编码作为目标的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多核苷酸插入到该病毒基因组上而形成的。由该被感染的蚕的体液得到作为目标的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体 (Susumu et al., Nature(1985)315,592-4)。

[0338] 进而,将植物用于产生本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体时,作为植物例如可以使用烟草。使用烟草时,将编码作为目标的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的多核苷酸插入到植物表达用载体例如 pMON 530 中,结果得到的重组载体可以被导入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 之类的杆菌中。用该杆菌感染烟草例如普通烟草 (*Nicotiana tabacum*) (Ma et al., Eur. J. Immunol.(1994)24,131-8),可以从被感染的烟草的叶中得到所期望的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体。另外,可以用同样的杆菌感染浮萍 (*Lemnaminor*),从经克隆化的被感染的浮萍细胞中得到所期望的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体 (Cox KM et al. Nat. Biotechnol.(2006)24(12),1591-7)。

[0339] 如上所述得到的本发明的以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体从宿主细胞内或细胞外（培养基、乳汁等）中被分离，实质上作为纯粹且均匀的抗体被纯化。抗体的分离、纯化可以优选采用通常多肽的纯化中使用的分离、纯化方法，但并不限于此。例如可以适当选择、组合柱色谱法、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂萃取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳法、透析、重结晶等，对抗体进行适当的分离及纯化。

[0340] 作为色谱法，例如可以举出亲合色谱法、离子交换色谱法、疏水色谱法、凝胶过滤色谱法、反相色谱法、吸附色谱法等 (Strategies for Protein Purification and Characterization :A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al, (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press)。上述色谱法可以利用液相色谱法例如 HPLC、FPLC 等液相色谱法进行。作为用于亲合色谱法的色谱柱，可以举出蛋白 A 色谱柱、蛋白 G 色谱柱。例如作为使用蛋白 A 的色谱柱，可以举出 Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia 制) 等。

[0341] 本发明的另一个优选实施方式为血浆中动力学被控制的以本发明的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的制备方法，所述制备方法包括：如上所述培养本发明的宿主细胞，从该细胞的培养物中回收以磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体为代表的抗体的步骤。

[0342] 需要说明的是，本说明书引用的所有现有技术文献作为参照引入本说明书中。

[0343] 以下具体地说明本发明，但本发明不限于下述实施例。

[0344] 实施例

[0345] [实施例 1]

[0346] (1) 人源化 H0L0 抗体的点突变基因的制作

[0347] 以编码磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的基因为起始材料，所述磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体包含 WO2006/046751 中公开的人源化 GC33 抗体的 CDR，制作各种点突变基因。合成基于包含改变部位的正义链及反义链的序列进行设计的寡 DNA。利用市售的 QuikChange 定点突变试剂盒 (Stratagene)，制作多个点突变基因。点突变基因的制作按照以下条件利用 PCR 法进行。将由 10ng 模板质粒、10pmol 正义链及反义链的合成寡 DNA、试剂盒中所添加的 10×Buffer、dNTP 混合物及 Pfu turbo DNA 聚合酶形成的反应混合物在 950℃ 下加热 30 秒后，进行 18 次由 95℃ 下 30 秒、55℃ 下 1 分钟、68℃ 下 4 分钟构成的 PCR 反应循环。将添加到试剂盒中的 DpnI 加到反应混合物中后，在 37℃ 下继续进行 1 小时利用限制性内切酶进行的限制性内切酶酶切消化反应。利用该反应液 DH5 α 感受态细胞 (TOYOBO) 被转化，结果得到转化体。将基于由该转化体分离得到的质粒 DNA 的碱基序列的确定，确认导入了点突变的点突变基因在动物细胞中可以表达插入基因的表达载体中进行克隆。通过具有如下所示构成的改变，取得改变基因。

[0348] 人源化 H0L0 抗体及其点突变改变抗体的瞬时表达通过利用聚乙烯亚胺 (Polysciences Inc.) 的瞬时表达来进行。将用胰蛋白酶 EDTA (invitrogen) 剥离的 HEK293 细胞接种到 10cm² 的培养皿中，使之成为 6×10⁶ cells/10mL。次日，根据生产厂家说明书将 SFMII 培养基及聚乙烯亚胺与 H 链表达质粒 DNA 及 L 链表达质粒 DNA 混合后，将该混合液在室温下静置 10 分钟。将全部混合液滴入如上所述接种了 HEK293 细胞的培养皿中。在约 72 小时后利用 rProteinA sepharose™ Fast Flow (GEHealthcare)，按照说明书进行从被

回收的培养上清液中,纯化表达的人源化 H0L0 抗体及其点突变改变抗体。

[0349] (1-1) 人源化 H0L0 抗体 T_m 值的改变

[0350] 由以一定程序化的加热速度加热受试试样溶液后得到的温度记录图 (C_p 对 T) 中的变性峰的顶点确定热变性中间温度 (T_m)。如下所述地进行 DSC 测定用试样溶液的制作,由此测定人源化 H0L0 抗体的 T_m 值。首先,以含有 150mmol/l 氯化钠的 20mol/l 乙酸钠缓冲溶液 (pH 为 6.0) 为透析外液,相对于透析外液将被封入透析膜中的相当于 50-100 μg 量的抗体溶液透析一昼夜。之后,使用试样溶液作为 DSC 测定用试样溶液,所述试样溶液是利用透析外液将其抗体浓度调制为 50-100 μg/ml 而得到的。

[0351] 将合适的 DSC 装置例如 DSC-II (Calorimetry Sciences Corporation) 优选用于上述实验。将利用上述方法制作得到的试样溶液及对照溶液 (透析外液) 充分脱气后,将各受试样品封入热量计单元中,在 40°C 下进行热充分的平衡化。然后,在 40°C ~ 100°C 下以约 1K/ 分钟的扫描速度进行 DSC 扫描。该测定结果表示为作为温度函数的变性峰的顶点。进行参考了非专利文献 (Rodolfo 等, Immunology Letters (1999), 47-52) 的 Fab 区的峰归属,算出人源化 H0L0 抗体的热变性中间温度。作为具体例在图 1 中表示了由 Hspu2. 2Lspu2. 2 (Hu2. 2Lu2. 2) 抗体的 DSC (差示扫描量热计) 测定得到的图表。

[0352] 基于利用上述记载的方法算出的、含有序列号 1 表示的 H 链及序列号 7 表示的 L 链的人源化 H0L0 抗体的 T_m 值为 76.6°C,但作为现有抗体举出的 Synagis 及 Herceptin 的 T_m 值分别计量为 85.4°C 及 81.8°C。因此,可知人源化 H0L0 抗体的 T_m 值低于现有抗体的 T_m 值。

[0353] 因此,以提高上述 T_m 值为目的,制作人源化 H0L0 抗体的改变抗体。对于序列号 1 表示的 H0L0 抗体 H 链的 FR2 进行 V37I、A40P、M48I、L51I 的改变制作 H15 (序列号 2),其中将上述 VH1b 亚类改为 VH4 亚类。上述 T_m 值被改善为 79.1°C。对于序列番号 7 表示的 H0L0 抗体 L 链的 FR2 进行将 VK2 亚类改变为 VK3 亚类的 L42Q、S48A、Q50R 的改变,及将 FR1 的 V2 取代为作为生殖系细胞序列 I 的 V2I 的改变,从而制作 L4 (序列号 8)。各抗体 T_m 值的测定根据上述记载的方法进行。结果,测定 H15L0 及 H0L4 的 T_m 值分别为 79.2°C 及 77.2°C,与作为 H0L0 的 T_m 值的 76.6°C 相比进一步得到改善。将上述两种改变体组合得到的 H15L4 抗体的 T_m 值被改善为 80.5°C。

[0354] (1-2) 人源化 H0L0 抗体 pI 值的改变

[0355] 通过减少抗体所具有的 pI 值延长抗体的血浆中半衰期。相反通过增大抗体的 pI 值改善抗体的组织迁移性。不清楚具有治疗癌效果的抗体的 pI 值的增加还是减少会引起肿瘤抑制效果的增强。因此,制作 pI 值减少的人源化 H0L0 抗体的改变抗体与 pI 值增加的人源化 H0L0 抗体的改变抗体,比较研究两者的抗肿瘤效果,由此验证上述哪种改变会引起高的肿瘤抑制效果。

[0356] 各抗体的 pI 值基于利用等电点电泳进行的分析而算出。该电泳如下进行。利用盒式快速电泳系统 (PhastSystem Cassette) (Amersham Bioscience 公司制),使用具有以下组成的膨润液将 Phast-Gel Dry IEF (Amersham Bioscience) 凝胶膨润 60 分钟左右。

[0357] (a) 高 pI 用膨润液的组成:

[0358] 1.5ml 10% 丙三醇

[0359] 100 μl Pharmalyte 8-10.5 for IEF (Amersham Bioscience)

[0360] (b) 低 pI 用膨润液的组成：

[0361] 1.5ml 精制水

[0362] 20 μ l Pharmalyte 8-10.5for IEF(Amercham Bioscience)

[0363] 80 μ l Pharmalyte 5-8forIEF(Amercham Bioscience)

[0364] 将约 0.5 μ g 抗体用于膨润后的凝胶,利用根据以下程序控制的快速电泳系统(Amercham Bioscience)进行等电点电泳。在下述程序中的步骤 2 阶段中将样品添加到凝胶中。作为 pI 标志物,可以使用 pI 校正用试剂盒 (Calibration Kit for pI) (Amercham Bioscience)。

[0365] 步骤 1 :2000V、2.5mA、3.5W、15 $^{\circ}$ C、75Vh

[0366] 步骤 2 :200V、2.5mA、3.5W、15 $^{\circ}$ C、15Vh

[0367] 步骤 3 :2000V、2.5mA、3.5W、15 $^{\circ}$ C、410Vh

[0368] 电泳后用 20% TCA 对凝胶进行固定化后,使用蛋白银染色试剂盒 (Silver staining Kit,protein) (Amercham Bioscience) 根据附在试剂盒中的说明进行银染色。染色后以 pI 标志物所具有的已知等电点为基准,算出作为受试试样的各抗体的等电点。图 2 及图 3 中分别表示高 pI 等电点电泳的电泳图及低 pI 等电点电泳的电泳图。

[0369] (a)pI 值增加的改变

[0370] 制作 Hspu2.2(Hu2.2) (序列号 6),所述 Hspu2.2(Hu2.2) 在 H15 中进一步进行了 Q43K、D52N、Q107R 的改变。另外制作 Lspu2.2(Lu2.2) (序列号 12),所述 Lspu2.2(Lu2.2) 在 L4 中进行了 E17Q、Q27R、Q105R 及 S25A 的改变,所述 S25A 的改变是将 CDR2 的 S25 取代为存在于大多生殖系细胞中的 A。计量作为由 Hspu2.2(Hu2.2) 及 Lspu2.2(Lu2.2) 组成的抗体的 Hspu2.2Lspu2.2(Hu2.2Lu2.2) 抗体 Tm 值、pI 值,分别为 Tm 值 76.8 $^{\circ}$ C、pI 值 9.6。由于 H0L0 抗体的 pI 值为 8.9,所以 Hspu2.2Lspu2.2(Hu2.2Lu2.2) 抗体的 pI 值增大 0.7。

[0371] (b)pI 值减少的改变

[0372] 制作 Hspd1.8(Hd1.8) (序列号 5),所述 Hspd1.8(Hd1.8) 在 H15 中进一步进行 K19T、Q43E、K63S、K65Q、G66D 的改变。制作 Lspd1.6(Ld1.6) (序列号 11),所述 Lspd1.6(Ld1.6) 在 L4 中进行 Q27E 的改变,将作为构成 L4 的 FR3 的 79-84 序列的 KISRVE 改为 TISSLQ,与对 Lspu2.2(Lu2.2) 的改变同样地进行 S25A 的改变。对作为由 Hspd1.8(Hd1.8) 及 Lspd1.6(Ld1.6) 组成的抗体的 Hspd1.8Lspd1.6(Hd1.8Ld1.6) 的 pI 值进行计量为 7.4。由于 H0L0 抗体的 pI 值为 8.9,所以 Hspd1.8Lspd1.6(Hd1.8Ld1.6) 抗体的 pI 值减少 1.5。

[0373] (2) 利用竞争性 ELISA 对 H0L0 抗体的点突变改变抗体的结合活性的评价

[0374] 利用竞争性 ELISA 对 (1) 中纯化得到的 H0L0 抗体及其点突变改变抗体进行评价。将制作得到的 1 μ g/ml 可溶型 GPC3 核心多肽 (序列号 13) 加入到 96 孔板中,使每个孔为 100 μ l。将该板在 4 $^{\circ}$ C 下静置一夜,将可溶型 GPC3 核心多肽固相化在该板上。利用 Skan WASHER400 (MolecularDevices) 将固相化在该板上的可溶型 GPC3 核心多肽用清洗缓冲液清洗 3 次,加入 200 μ l 封闭缓冲液,在 4 $^{\circ}$ C 下进行封闭 30 分钟以上。然后,利用 Skan WASHER400,将该可溶型 GPC3 核心多肽经固相化且被封闭的板用清洗缓冲液清洗 3 次。之后,将各种浓度的 H0L0 抗体或其点突变改变抗体与最终浓度为 0.3 μ g/ml 的被生物素化的 H0L0 抗体各 100 μ l 混合,将混合得到的 200 μ l 混合液加入到每张板的每个孔中。H0L0 抗

体的生物素化利用生物素标记试剂盒 (Roche) 按照试剂盒生产厂家说明书进行。将该板在室温下静置 1 小时后,利用 Skan WASHER400 (MolecularDevices) 用清洗缓冲液清洗 5 次。将向每一个孔中加入了 100 μ l 用基质缓冲液稀释至 20,000 倍的碱性磷酸酯酶标记山羊抗链霉亲和素 (Goat antistreptavidin Alkaline phosphatase) (ZYMED) 的该板在室温下静置 1 小时后,利用 Skan WASHER400 将其用清洗缓冲液清洗 5 次。使用基质缓冲液制备磷酸酯酶基质 (Sigma) 使之成为 1mg/ml,在每一个孔中加入 100 μ l 静置 1 小时。利用 Benchmark Plus (BIO-RAD),采用 655nm 的对照吸光度,测定各孔中的反应液在 405nm 处的吸光度。

[0375] 如图 4 所示,可知 H15L4 抗体对抗原的结合活性基本与用于改变的 H0L0 抗体的结合活性等同。另外,如图 5 所示可知 Hspu2. 2Lspu2. 2 (Hu2. 2Lu2. 2) 抗体对抗原的结合活性与用于改变的 H0L0 抗体的结合活性基本等同。进而,如图 6 所示可知 Hspd1. 8Lspd1. 6 (Hd1. 8Ld1. 6) 抗体对抗原的结合活性与用于改变的 H0L0 抗体的结合活性基本等同。

[0376] [参考实施例 2]CHO 细胞中的岩藻糖转运体基因的破坏

[0377] (1) 靶载体的构筑

[0378] (1-1)K01 载体的制作

[0379] 使用 pcDNA3. 1/Hygro (Invitrogen),用引物 Hyg5-BH 和 Hyg3-NT 通过进行 PCR 在 Hygromycin 耐性基因 (Hygr) 的起始密码子 5' 侧附加 BamHI 位点和 TGCGC 序列,得到与岩藻糖转运基因的起始密码子 5' 侧相同的序列,在含有至 SV40polyA 附加信号为止的区域的 3' 侧附加 NotI 位点,切除 Hygr。

[0380] 正向引物

[0381] Hyg5-BH 5' -GGATCCTGCGCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (序列号 14)

[0382] 反相引物

[0383] Hyg3-NT 5' -GCGGCCGCTATTCCTTTGCCCTCGGACG-3' (序列号 15)

[0384] 岩藻糖转运体的靶载体 ver. 1 (以下称作 K01 载体) 如下构筑,即在 pMC1DT-A 载体 (Yagi T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 9918-22) 中分别插入岩藻糖转运体的 5' 侧 (序列号 16 表示的碱基序列的从 No. 2,780 的 SmaI 至 No. 4,232 的 BamHI)、3' 侧 (从 No. 4,284 至 No. 10,934 的 SacI) 及 Hygr 片段。作为载体的特征,由于不在 Hygr 上附加启动子,所以进行同源重组时利用岩藻糖转运体的启动子使 Hygr 表达。但是,即使通过同源重组仅将一个拷贝的载体导入细胞中,Hygr 也不一定会表达,直到获得对潮霉素 B 的耐性的程度。需要说明的是,用 NotI 切割 K01 载体,将其导入细胞中。认为通过导入 K01 载体,岩藻糖转运体会缺失含有起始密码子的外显子 1 的 41 个碱基对,使其失去功能。

[0385] (1-2)pBSK-pgk-1-Hygr 的制作

[0386] 利用 EcoRI-PstI 从 pKJ2 载体 (Popo H, Biochemical Genetics (1990) 28, 299-308) 中切除小鼠 pgk-1 基因的启动子,将其克隆在 pBluescript (Stratagene) 的 EcoRI-PstI 位点上,由此制作 pBSK-pgk-1。关于 Hygr,使用 pcDNA3. 1/Hygro,用引物 Hyg5-AV 和 Hyg3-BH 通过进行 PCR 在 Hygr5' 侧附加 EcoT22I 位点和 Kozak 序列,在含有至 SV40polyA 附加信号为止的区域的 3' 侧附加 BamHI 位点,切除 Hygr。

[0387] 正向引物

[0388] Hyg5-AV5' -ATGCATGCCACCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (序列号 17)

[0389] 反向引物

[0390] Hyg3-BH5' -GGATCCCAGGCTTTACTTTATGCTTC-3' (序列号 18)

[0391] 将上述 Hygr (EcoT22I-BamHI) 片段插入到 pBSK-pgk-1 的 PstI-BamHI 位点中, 制作 pBSK-pgk-1-Hygr。

[0392] (1-3)K02 载体的制作

[0393] 岩藻糖转运体的靶载体 ver. 2 (以下称作 K02 载体) 如下构筑: 在 pMC1DT-A 载体中分别插入岩藻糖转运体的 5' 侧 (序列号 16 表示的碱基序列的从 No. 2, 780 的 SmaI 至 No. 4, 232 的 BamHI)、3' 侧 (从 No. 4, 284 至 No. 10, 934 的 SacI) 及 pgk-1-Hygr 片段。与 K01 载体不同, K02 载体由于在 Hygr 上附加有 pgk-1 基因的启动子, 即使通过同源重组仅将一个拷贝的载体导入细胞中, 也会获得对潮霉素 B 的耐性。需要说明的是, 用 NotI 切割 K02 载体将其导入细胞中。认为通过导入 K02 载体岩藻糖转运体会缺失含有起始密码子的外显子 1 的 46 个碱基对, 使其失去功能。

[0394] (1-4)pBSK-pgk-1-Puror 的制作

[0395] 用 PstI 和 BamHI 切割 pPUR 载体 (BD Biosciences), 将被切除的片段 (Puror) 插入 pBSK-pgk-1 的 PstI-BamHI 位点中, 制作 pBSK-pgk-1-Puror。

[0396] (1-5)K03 的制作

[0397] 岩藻糖转运体的靶载体 ver. 3 (以下称作 K03 载体) 如下构筑, 即在 pMC1DT-A 载体中分别插入岩藻糖转运体的 5' 侧 (序列号 16 表示的碱基序列的从 No. 2, 780 的 SmaI 至 No. 4, 232 的 BamHI)、3' 侧 (从 No. 4, 284 至 No. 10, 934 的 SacI) 及 pgk-1-Puror 片段。而且, 预先在 pgk-1-Puror 的 3' 末端附加与如下所示的筛选用引物结合的序列。需要说明的是, 用 NotI 切割 K03 载体, 将其导入细胞中。认为通过导入 K03 载体, 岩藻糖转运体会缺失含有起始密码子的外显子 1 的 46 个碱基对, 使其失去功能。

[0398] 反向引物

[0399] RSGR-A5' -GCTGTCTGGAGTACTGTGCATCTGC-3' (序列号 19)

[0400] 使用以上 3 种靶载体, 尝试破坏岩藻糖转运体基因。

[0401] (2) 载体对 CHO 细胞的导入

[0402] 将 HT Supplement (100×) (Invitrogen) 和青霉素-链霉素 (Invitrogen) 以相对于 CHO-S-SFMII HT- 的容量分别为 1/100 的量加入到 CHO-S-SFMII HT- (Invitrogen) 中。使其为培养用的培养基 (以下称作 SFMII (+)) 对 CHO 细胞的 DXB11 细胞株进行继代培养, 进而, 还用上述 SFMII (+) 进行基因导入后的培养。将 8×10^6 个 CHO 细胞悬浮在 0.8ml Dulbecco's 磷酸缓冲液 (以下简称作 PBS。Invitrogen) 中。在上述细胞悬浮液中加入 30 μ g 靶载体, 将细胞悬浮液转移至 GenePulser Cuvette (4mm) (BioRad) 中。在冰上放置 10 分钟后, 利用 GENE-PULSER II (BioRad) 在 1.5kV、25 μ FD 的条件下, 通过电穿孔法将载体导入细胞中。导入载体后, 将细胞悬浮在 200ml SFMII (+) 培养基中, 并且在 20 片 96 孔平底板 (Iwaki) 上按照 100 μ l/孔接种细胞。将板在二氧化碳培养箱内在 37°C 下培养 24 小时后, 添加药物。

[0403] (3) 剔除 (Knockout) 的第一阶段

[0404] 将 K01 载体或 K02 载体分别导入 CHO 细胞中, 从导入载体 24 小时后利用潮霉素 B (Invitrogen) 进行选择。将潮霉素 B 用 SFMII (+) 进行溶解, 使之为 0.3mg/ml, 将其按照

100 μ l/孔进行添加。

[0405] (4) 利用 PCR 进行的同源重组体的筛选

[0406] (4-1) PCR 用样品的制备

[0407] 同源重组体利用 PCR 法进行筛选。将筛选中使用的 CHO 细胞在 96 孔平底板中进行培养, 除去培养上清液后, 按照 50 μ l/孔加入细胞溶解用缓冲液, 在 55 $^{\circ}$ C 下加热 2 小时, 然后通过 95 $^{\circ}$ C 下加热 15 分钟使蛋白水解酶 K 失活, 将其作为 PCR 的模板。细胞溶解用缓冲液如下构成: 每一个孔中 5 μ l 110 \times LA 缓冲液 II (由 Takara LA Taq 提供)、2.5 μ l 110% NP-40 (Roche)、4 μ l 蛋白水解酶 K (20mg/ml、Takara) 及 38.5 μ l 蒸馏水 (Nacalai Tesque)。

[0408] (4-2) PCR 的条件

[0409] PCR 反应混合物如下构成: 1 μ l 上述 PCR 样品、5 μ l 110 \times LA 缓冲液 II、5 μ l $MgCl_2$ (25mM)、5 μ l dNTP (2.5mM)、2 μ l 引物 (各 10 μ M)、0.5 μ l LA Taq (5IU/ μ l) 及 29.5 μ l 蒸馏水 (总体积为 50 μ l)。在导入了 K01 载体的细胞筛选中使用 TP-F4 和 THygro-R1 作为 PCR 引物, 在导入了 K02 载体的细胞筛选中使用 TP-F4 和 THygro-F1 作为 PCR 引物。

[0410] 导入了 K01 载体的细胞的 PCR 如下: 在 95 $^{\circ}$ C 下预热 1 分钟, 进行在 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒、60 $^{\circ}$ C 下 30 秒及 60 $^{\circ}$ C 下 2 分钟的扩增循环共 40 个循环, 以及在 72 $^{\circ}$ C 下再次加热 7 分钟。在导入了 K02 载体的细胞筛选中, 在 95 $^{\circ}$ C 下预热 1 分钟, 进行在 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒、及 70 $^{\circ}$ C 下 3 分钟的扩增循环共 40 个循环, 以及在 70 $^{\circ}$ C 下再次加热 7 分钟。

[0411] 引物如下所述, 在引起同源重组的细胞样品中, 对于 K01 载体 DNA 扩增约 1.6kb, 对于 K02 DNA 扩增约 2.0kb。引物 TP-F4 设定在载体外侧、且 5' 侧岩藻糖转运体的基因组区域, THygro-F1 及 THygro-R1 设定在载体内的 Hygr 中。

[0412] 正向引物 (K01, K01)

[0413] TP-F45' -GGAATGCAGCTTCCTCAAGGGACTCGC-3' (序列号 20)

[0414] 反向引物 (K01)

[0415] THygro-R15' -TGCATCAGGTCGGAGACGCTGTCTGAAC-3' (序列号 21)

[0416] 反向引物 (K02)

[0417] THygro-F15' -GCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGC-3' (序列号 22)

[0418] (5) PCR 筛选结果

[0419] 解析导入了 K01 载体的 918 个细胞, 其中认为是同源重组体的细胞有 1 个 (同源重组效率约为 0.1%)。另外, 解析导入了 K02 载体的 537 个细胞, 其中认为是同源重组体的细胞有 17 个 (同源重组效率约为 3.2%)。

[0420] (6) Southern 印记解析

[0421] 进而, 还利用 Southern 印记法进行确认。按照标准方法从培养后的细胞中制备 10 μ g 基因组 DNA, 进行 Southern 印记。使用以下二种引物通过 PCR 法从序列号 16 中所示的碱基序列的 No. 2, 113-No. 2, 500 区域中制备 387bp 探针, 将其用于利用 Southern 印记法的确认。用 Bgl II 切割基因组 DNA。

[0422] 正向引物

[0423] Bgl-F: 5' -TGTGCTGGGAATTGAACCCAGGAC-3' (序列号 23)

[0424] 反向引物

[0425] BgI-R :5' -CTACTTGTCTGTGCTTTCTTCC-3' (序列号 24)

[0426] 通过利用 BgI II 进行的切割,从岩藻糖转运体的染色体中出现约 3.0kb 的谱带,从用 K01 载体引起同源重组的染色体中出现约 4.6kb 的谱带,从用 K02 载体引起同源重组的染色体中出现约 5.0kb 的谱带。分别将利用 K01 载体引起同源重组的一种细胞及利用 K02 载体引起同源重组的 7 种细胞用于实验。将用 K01 载体唯一获得的细胞命名为 5C1,但通过之后的解析可知其由多个细胞群构成,所以用有限稀释进行克隆化,将其用于之后的实验。另外,将用 K02 载体获得的一个细胞命名为 6E2。

[0427] (7) 剔除的第二阶段

[0428] 对利用 K01 载体及 K02 载体进行的同源重组成功的细胞,使用三种载体,尝试确立岩藻糖转运体基因完全缺失的细胞株。载体与细胞的组合如下所述。方法 1 :K02 载体与 5C1 细胞 (K01)、方法 2 :K02 载体与 6E2 细胞 (K02)、方法 3 :K03 载体与 6E2 细胞 (K02)。将载体分别导入上述细胞中,从导入载体 24 小时后用潮霉素 B、嘌呤霉素 (Nacalai Tesque) 开始进行选择。在方法 1 中使潮霉素 B 的最终浓度为 1mg/ml,在方法 2 中使其最终浓度为 7mg/ml。进而,在方法 3 中添加潮霉素 B 使其最终浓度为 0.15mg/ml,添加嘌呤霉素使其最终浓度为 8 μ g/ml。

[0429] (8) 利用 PCR 的同源重组体的筛选

[0430] 样品制作如上所述。方法 1 相关的筛选中同时进行检测用上述 K01 载体及 K02 载体引起同源重组的细胞的 PCR。关于方法 2,设计下述 PCR 引物。在序列号 16 所示的碱基序列 No. 3,924-3,950 的区域处设定 TPS-F1,在碱基序列 No. 4,248-4,274 的区域处设定 SHygro-R1。通过该 PCR 引物,因 K02 载体引起缺失的岩藻糖转运体的基因区域扩增 350bp。因此,方法 2 中的 PCR 筛选中,认为未扩增 350bp 的细胞为岩藻糖转运体基因完全缺失的细胞。PCR 的条件如下:在 95 $^{\circ}$ C 下预热 1 分钟,进行在 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒、在 70 $^{\circ}$ C 下 1 分钟的扩增循环共 35 个循环,以及在 70 $^{\circ}$ C 下再次加热 7 分钟。

[0431] 正向引物

[0432] TP_s-F1 :5' -CTCGACTCGTCCCTATTAGGCAACAGC-3' (序列号 25)

[0433] 反向引物

[0434] SHygro-R1 :5' -TCAGAGGCAGTGGAGCCTCCAGTCAGC-3' (序列号 26)

[0435] 关于方法 3,将 TP-F4 用作正向引物,将 RSGR-A 用作反向引物。PCR 的条件如下:在 95 $^{\circ}$ C 下预热 1 分钟,进行在 95 $^{\circ}$ C 下 30 秒、在 60 $^{\circ}$ C 下 30 秒、在 72 $^{\circ}$ C 下 2 分钟的扩增循环共 35 个循环,以及在 72 $^{\circ}$ C 下再次加热 7 分钟。由 K03 载体引起同源重组的细胞样品中,DNA 扩增约 1.6kb。通过上述 PCR,检测由 K03 载体引起同源重组的细胞,同时也确认由 K02 载体引起同源重组的细胞的残留情况。

[0436] (9) PCR 筛选结果

[0437] 用方法 1 解析 616 个细胞,其中认为是同源重组体的细胞有 18 个(同源重组效率为 2.9%)。用方法 2 解析 524 个细胞,其中认为是同源重组体的细胞有 2 个(同源重组效率约为 0.4%)。进而,用方法 3 解析细胞 382 个,其中认为是同源重组体的细胞有 7 个(同源重组效率约为 1.8%)。

[0438] (10) Southern 印记解析

[0439] 按照上述方法进行解析。结果发现,可以解析的细胞中岩藻糖转运体的基因完全

缺失的细胞有一个。在第一阶段的剔除中,PCR 与 Southern 印记的解析结果一致,但在上述第二阶段的剔除中,解析结果不一致。

[0440] (11) 岩藻糖的表达解析

[0441] 进而,对用 PCR 判断为同源重组体的 26 个细胞中的岩藻糖的表达进行解析。在冰冷冷却下,用 100 μ l 含有 5 μ g/ml Lens culinaris Agglutinin, FITC Conjugate (Vector Laboratory)、2.5% FBS 和 0.02% 叠氮钠的 PBS (以下称作 FACS 溶解液) 将 1×10^6 个细胞染色 1 小时。之后,用 FACS 溶解液清洗细胞 3 次,利用 FACSCalibur (Becton Dickinson) 进行测定。结果表明, Southern 印记解析中判断为岩藻糖转运体的基因完全缺失的细胞只有 FTP-KO 株,岩藻糖的表达降低。

[0442] [参考实施例 3] 来自 FTP-KO 株的产生抗体的细胞的确立和由该细胞产生的抗体的纯化

[0443] 在 SFMII (+) 培养基中制备最终浓度为 1mg/ml 的潮霉素 B,对实施例 1 中得到的岩藻糖转运体缺失细胞株 (FTP-KO 细胞、克隆名称 3F2) 进行继代培养。将 8×10^6 个 3F2 悬浮在 0.8ml Dulbecco's 磷酸缓冲液中。在细胞悬浮液中加入 25 μ g 人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体表达载体,将细胞悬浮液转移至 Gene Pulser Cuvette 中。在冰上放置 10 分钟后,用 GENE-PULSER II 在 1.5kV、25 μ FD 的条件下,利用电穿孔法将载体导入细胞。导入载体后,将细胞悬浮在 40ml SFMII (+) 培养基中,将细胞按照 100 μ l/孔接种至 96 孔平底板 (Iwaki 公司) 中。将板在二氧化碳培养箱内在 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 小时后,添加 Geneticin (Invitrogen),使其终浓度为 0.5mg/ml。测定对药物产生耐性的细胞的抗体产生量,分别确立产生人源化磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体的细胞株。

[0444] 从抗体表达株中回收培养上清液,使用 P-1 泵 (Pharmacia),将其用于 Hitrap rProtein A (Pharmacia) 柱。将柱用结合缓冲液 (20mM 磷酸钠 (pH7.0)) 清洗后,将结合的抗体用洗脱缓冲液 (0.1M 甘氨酸 - 盐酸 (pH2.7)) 洗脱。将洗脱液立即用中和缓冲液 (1M Tris-HCl (pH9.0)) 中和。用 DC protein assay (BIO-RAD) 选择并汇集 (pool) 抗体的洗脱成分后,用 Centriprep-YM10 (Millipore) 浓缩该洗脱成分至 2ml 左右。然后,将该浓缩液用于凝胶过滤,所述凝胶过滤使用含有 150mM 氯化钠的 20mM 乙酸缓冲液 (pH6.0) 进行平衡化而得到的 Superdex200 26/60 (Pharmacia)。回收洗脱液的单体成分中的峰,将该成分用 Centriprep-YM10 浓缩。使用 MILLEX-GW 0.22 μ m Filter Unit (Millipore) 过滤该浓缩液后,将其在 4 $^{\circ}$ C 下保存。基于 280nm 波长处测定得到的吸光度,由摩尔吸光系数进行换算,确定经纯化的抗体的浓度。

[0445] [参考实施例 4] 与由 FTP-KO 细胞产生的人源化抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 抗体结合的糖链的解析

[0446] (1) 2-氨基苯甲酰胺标志糖链 (2-AB 标记的糖链) 的制备

[0447] 使 N-糖苷酶 F (Roche diagnostics) 作用于本发明的产生 FTP-KO 细胞的抗体、及作为对照试样的产生 CHO 细胞的抗体,由此使与抗体结合的糖链从蛋白质中游离 (Weitzhandler M. et al., Journal of Pharmaceutical Sciences (1994) 83(12), 1670-5)。在使用乙醇的脱蛋白质操作之后 (Schenk B. et al., The Journal of Clinical Investigation (2001), 108(11), 1687-95), 将游离的糖链浓缩干固,然后利用 2-氨基吡啶进行荧光标记 (Bigge J. C. et al., Analytical Biochemistry (1995) 230(2), 229-238)。通

过使用纤维素筒的固相萃取,将得到的 2-AB 标记的糖链进行脱试剂后进行离心分离,将其浓缩,作为经纯化的 2-AB 标记的糖链用于以后的解析。然后,通过将 β -半乳糖苷酶(生化学工业)作用于纯化的 2-AB 标记的糖链,制备 agalactosyl 2-AB 标记的糖链。

[0448] (2) 利用正向 HPLC 对 agalactosyl 2-AB 标记的糖链的分析

[0449] 利用上述方法,以从本发明的产生 FTP-KO 细胞的抗体、及作为对照试样的产生 CHO 细胞的抗体中游离的糖链为起始材料制作得到的 agalactosyl 2-AB 标记的糖链通过利用氨基柱 TSKgel Amide-80(东曹)的正向 HPLC 进行分析,比较其色谱图。在产生 CHO 细胞的抗体中,G(0) 以其糖链的主要成分的形式存在,基于由峰面积比得到的计算结果未附加岩藻糖的 G(0)-Fuc 占全部糖链中的 4%左右。另一方面,在产生 FTP-KO 细胞的抗体中,G(0)-Fuc 为主要成分,由任一种产生株产生的抗体中,如果基于由峰面积比得到的计算结果,则全部糖链中的 90%以上以未附加岩藻糖的糖链的形式存在。

[0450] [表 1]

[0451] 由 agalactosyl 2-AB 标记的糖链的正向 HPLC 分析推定得到的各糖链的相对比

[0452]

| 糖链名称 | CHO | FTP-KO-a | FTP-KO-b | FTP-KO-c |
|----------|-------|----------|----------|----------|
| G(0)-Fuc | 4.0% | 92.4% | 92.5% | 93.2% |
| G(0) | 96.0% | 7.6% | 7.5% | 6.8% |

[0453] [实施例 5] 人源化 H0L0 抗体及其点突变改变抗体的稳定性表达株的确立

[0454] 将编码作为用实施例 1 中记载的方法制作得到的 H0L0 抗体的改变抗体的 Hspu2. 2Lspu2. 2(Hu2. 2Lu2. 2) 抗体和 Hspd1. 8Lspd1. 6(Hd1. 8Ld1. 6) 抗体、或用于其改变的 H0L0 抗体的基因克隆到表达载体上。在进行克隆化时,将编码 H 链及 L 链的各基因分别插入不同的表达载体中,使编码构成抗体 H 链及 L 链的各基因表达。选择二种表达载体,使上述编码 H 链及 L 链的各基因形成所期望的组合,将上述表达载体用 PvuI 切割后,利用电穿孔将其导入参考实施例 2 中制作的 FTP-KO 株中。

[0455] 使用 Gene Pulser II(Bio Rad 公司制)进行利用电穿孔的稳定地生产 H0L0 抗体及其改变抗体的转导株的制作。将用于构成所期望的 H 链及 L 链的组合的 H 链、L 链表达质粒 DNA 各 10 μ g 与混悬于 PBS 中的 CHO 细胞 (1×10^7 细胞/ml)0.75ml 混合,将混合液在冰上静置 10 分钟。将混合液转移至 Gene Pulser II 用试管中,之后以 25 μ FD 的电容对其施加 1.5kV 的电脉冲。将施加了脉冲的混合液在室温下静置 10 分钟后,将其混悬于 CHO-S-SFMII/1% HT/1% PS 培养基中。在 96 孔培养板的各孔中分别注入用同一培养基制作得到的以 5、10、50 倍稀释的各混悬液 100 μ l。将该板在维持 5%二氧化碳浓度的二氧化碳培养箱中培养 24 小时。之后,添加 Geneticin(GIBCO)使其最终浓度为 500 μ g/ml、添加 Zeocin(Invitrogen)使其最终浓度为 600 μ g/ml,将在各孔中添加了上述溶液的该板再培养 2 周。将显示出 Geneticin 及 Zeocin 耐性的转导细胞的菌落在含有 500 μ g/ml Geneticin(GIBCO)及 600 μ g/ml Zeocin(Invitrogen)的同一培养基中进行继代培养,由此进一步对其选择。使用 BiacoreQ(BIACORE),评价上述被选择的该转导细胞的培养上清液中的抗体浓度,由此确立高度表达所期望的抗体的转导株。培养上清液中抗体浓度

的测定基于 BiacoreQ(BIACORE) 中提供的生产厂家说明书进行。将被确立的细胞株在含有 500 μ g/ml Geneticin(Invitrogen) 及 600 μ g/ml Zeocin(Invitrogen) 的 CHO-S-SFMII 培养基 (Invitrogen) 中进行培养, 将通过合适时间的培养得到的培养上清液回收。使用 rProteinA-Sepharose 柱 (GE Healthcare), 纯化回收的培养上清液。利用 Amicon Ultra-4(MILLIPORE) 将纯化后的抗体进行浓缩后, 用 PD-10Desalting 柱 (Amersham Biosciences) 将浓缩液置换为含有 200mM NaCl 的 20mM 乙酸缓冲液 (pH 为 6.0)。将纯化后的抗体用于 ND-1000 分光光度计 (NanoDrop) 或分光光度计 DU-600 (BECKMAN), 测定其在 280nm 处的吸光度。通过基于使用该测定值的 RACE 法的计算方法, 算出上述抗体的浓度。

[0456] [实施例 6] 使用体内模型的人源化 H0L0 抗体及其点突变改变抗体的药效试验

[0457] (1) 用于移植到体内模型的细胞株的维持

[0458] 使用 Hep G2 细胞 (ATCC)。将 Hep G2 细胞在含有 10% FBS、1mmol/l MEM Sodium Pyruvate(Invitrogen)、1mmol/l MEM Non-Essential Amino Acid(Invitrogen) 的 Minimum Essential Medium Eagle 培养基 (SIGMA) (以下称作继代用培养基) 中进行继代培养并维持。

[0459] (2) Hep G2 细胞移植小鼠模型的制作

[0460] 使用以 1 : 1 的比例含有继代培养用培养基与 MATRIGEL Matrix (BD Bioscience) 的溶液, 制备 Hep G2 细胞的细胞悬浮液, 使之成为 5×10^7 细胞 /ml。向 SCID 小鼠 (雄性、5 周龄) (日本 CLEA) 的腹部皮下移植 100 μ l 该细胞悬浮液 (5×10^6 细胞 / 小鼠), 并且在细胞移植的前一天预先向所述 SCID 小鼠的腹膜内给与 100 μ l 抗脱唾液酸 GM1 抗体 (和光纯药, 将 1 安瓿中的内容物用 5ml 该溶液溶解)。肿瘤体积使用下述公式算出, 在肿瘤体积的平均值达到 130-330mm³ 的时刻判断完成模型。

[0461] 公式: 肿瘤体积 = 长径 \times 短径 \times 短径 / 2

[0462] (3) 含有各受试抗体的给与试样的制备

[0463] 在该给与当天, 使用生理盐水制备含有 H0L0 抗体、Hu2. 2Lu2. 2 抗体、Hd1. 8Ld1. 6 抗体等各抗体的给与试样, 使之成为 0.5mg/ml (5mg/kg 给与组) 或 0.1mg/ml (1mg/kg 给与组)。

[0464] (4) 含有抗体的给与试样的给与

[0465] 从移植 HepG2 细胞后 27 日开始, 对 (2) 中制作得到的小鼠模型以 10ml/kg 的给与量通过尾静脉给与上述 (3) 中制作得到的给与试样, 每周一次、共三周。作为阴性对照同样地以 10ml/kg 的给与量通过尾静脉给与生理盐水, 每周一次、共三周。以 5 只为 1 组, 对各组均给与含有各受试抗体的给与试样。与给与基本同时地从各组中的 3 只个体中采集静脉血, 将其用作测定各抗体的小鼠血浆中浓度的受试物质。具体而言, 在初次给与后 0.5 小时、第二次刚给与前的两个时间点, 从足背静脉进行采血。通过肝素处理进行 20 μ l 容量的采血, 利用离心分离制备血浆。

[0466] (5) 各受试抗体的抗肿瘤效果的评价

[0467] 通过测定从给与给与试样的最终日开始一周后的肿瘤体积, 评价人肝癌移植小鼠模型中的各受试抗体的抗肿瘤效果。结果, 如图 7 所示 Hspd1. 8Lspd1. 6 (Hd1. 8Ld1. 6) 抗体中存在药效增强的倾向, Hspu2. 2Lspu2. 2 (Hu2. 2Lu2. 2) 抗体中存在药效减弱的倾向。

[0468] (6) 各受试抗体的血浆中浓度

[0469] 小鼠血浆中受试抗体的浓度利用基于实施例 1 中记载的 ELISA 法的方法进行测定。制作以血浆中浓度计为 12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 $\mu\text{g/ml}$ 的标准曲线试样。将标准曲线试样及适当稀释成所期望的浓度的小鼠血浆受试试样注入到将 soluble Glypican-3core(中外制药社制)固相化的 Immuno Plate(Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)) 中,将该板在室温下静置 1 小时。之后,依次注入 Goat Anti-Human IgG-BIOT(Southern Biotechnology Associates) 及 Streptavidin-alkaline phosphatase conjugate(Roche Diagnostics), 将 BluePhosMicrowell Phosphatase Substrates System(Kirkegaard&Perry Laboratories) 用作基质,进行显色反应。使用酶标仪测定反应液在 650nm 处的吸光度,由此算出各孔中反应液的显色。基于由各标准曲线试样的吸光度制作的标准曲线,使用解析软件 SOFTmax PRO(Molecular Devices),算出小鼠血浆中的抗体浓度。

[0470] 给与 30 分钟及 7 日后的小鼠血浆中浓度如图 8 所示。在受试抗体的任一给与量下,如果受试抗体的 pI 进一步降低,则表示给与 7 日后小鼠血浆中的抗体浓度升高。

[0471] [实施例 7] 将人外周血单核细胞用作效应细胞的各受试抗体的 ADCC 活性

[0472] 将人外周血单核细胞(以下称作人 PBMC)用作效应细胞,如下所述地测定各受试抗体的 ADCC 活性。

[0473] (1) 人 PBMC 溶液的制备

[0474] 使用预先注入了 200 μl 1000 单位/ml 肝素溶液(Novo 肝素注射 5 千单位, Novo Nordisk)的注射器,从属于中外制药株式会社的健康志愿者(成年男性)采集外周血 50ml。将使用 PBS(-) 稀释至 2 倍的该外周血进行 4 等分,将其加入预先注入 15ml Ficoll-Paque PLUS 并且进行了离心操作的 Leucosep 淋巴细胞分离管(Greinerbio-one)中。将注入了该外周血的分离管以 2150rpm 的速度在室温下进行离心分离 10 分钟后,收集单核细胞成分层。用含有 10% FBS 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(SIGMA)(以下称作 10% FBS/D-MEM)清洗该各分层中含有的细胞 1 次后,将该细胞悬浮在 10% FBS/D-MEM 中,使其细胞密度达到 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 。将该细胞悬浮液作为人 PBMC 溶液用于以后的实验。

[0475] (2) 靶细胞的制备

[0476] 将 Hep G2 细胞从培养皿中剥离,将其接种到 96 孔 U 底板上,使其为 1×10^4 细胞/孔。将该板在 5%二氧化碳培养箱中于 37°C 下培养一夜。次日,向该板的各孔中加入 5.55MBq 的 Cr-51,将该板在 5%二氧化碳培养箱中于 37°C 下培养 3 小时。以存在于该板的各孔中的 Hep G2 细胞为靶细胞,以后测定 ADCC 活性时进行使用。

[0477] 3) 铬释放试验(ADCC 活性)

[0478] 以利用铬释放法的特异性铬释放率来评价 ADCC 活性。用培养基清洗(2)中制备得到的靶细胞,分别添加以各浓度(0、0.004、0.04、0.4、4、40 $\mu\text{g/ml}$)制备得到的 H0L0 抗体, Hu2.2Lu2.2 抗体, Hd1.8Ld1.6 抗体等各抗体各 100 μl 。将该板在室温下反应 15 分钟后,除去抗体溶液。然后在各孔中加入继代用培养基各 100 μl ,将该板在 5%二氧化碳培养箱中于 37°C 下培养 1 小时。向各孔中加入(1)中制备得到的人 PBMC 溶液各 100 μl (5×10^5 细胞/孔),将该板在 5%二氧化碳培养箱中于 37°C 下静置 4 小时后,进行离心分离操作。利用 γ 计数器,测定该板的各孔中的 100 μl 培养上清液的放射活性。基于下式,求出特异性铬释放率。

[0479] 特异性铬释放率 (%) = (A-C) × 100 / (B-C)

[0480] 在上式中, A 表示各孔中的 100 μl 培养上清液的放射活性 (cpm) 的平均值。另外, B 表示在靶细胞中添加 100 μl 2% NP-40 水溶液 (NonidetP-40、Nacalai Tesque) 及 50 μl 10% FBS/D-MEM 培养基的孔中 100 μl 培养上清液的放射活性 (cpm) 的平均值。进而, C 表示在靶细胞中添加 150 μl 10% FBS/D-MEM 培养基的孔中的 100 μl 培养上清液的放射活性 (cpm) 的平均值。以三份进行试验, 算出反映各受试抗体的 ADCC 活性的上述试验中的特异性铬释放率 (%) 的平均值及标准偏差。

[0481] (4) 各受试抗体 ADCC 活性的评价

[0482] 评价通过各受试抗体人 PBMC 发挥的 ADCC 活性, 结果确认全部受试抗体具有 ADCC 活性。上述结果示于图 9。对各浓度下的各受试抗体显示出的特异性铬释放率进行显著性检验, 结果确认在全部抗体浓度下, 各受试抗体显示出的特异性铬释放率在各受试抗体之间无显著性差异。统计解析中使用 SAS 临床前软件包 (SAS Institute Inc.)。基于以上结果, 表明上述 pI 被改变的各受试抗体的 ADCC 活性之间不存在差异。

[0483] [实施例 8] 点突变 pI 改变抗体的制作和该抗体的特征

[0484] (1) 用于 pI 降低的改变位点的选定

[0485] 为了进一步提高 Hd1. 8Ld1. 6 抗体的肿瘤抑制效果, 进行可以降低可变区 pI 的改变位点的研究。结果发现可以降低可变区 pI 的氨基酸残基, 该残基归纳于表 2 (重链) 及表 3 (轻链)。上述改变中, 作为 pI 降低的具体例, 可以举出 pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体。各 pI 改变抗体的制作如下所述地进行。

[0486] 改变部位的制作通过采用 PCR 的 Assemble PCR 进行。合成基于含有改变部位的正义链及反义链的序列设计得到的寡 DNA。将含有改变部位的反义链寡 DNA 和插入进行改变的基因的载体的正义链寡 DNA、含有改变部位的正义链寡 DNA 和插入进行改变的基因的载体的反义链寡 DNA 分别进行组合, 使用 PrimeSTAR (TAKARA) 进行 PCR, 由此制作 2 个含有改变部位的片段 5' 末端和 3' 末端。通过将上述 2 个片段用 Assemble PCR 进行连结, 制作各突变体。

[0487] 将制作得到的突变体插入动物细胞中可以表达插入基因的表达载体中, 得到的表达载体的碱基序列可以采用本领域技术人员公知的方法确定。基于质粒 DNA 的碱基序列的确定, 将确认为导入了点突变的点突变基因克隆到动物细胞中可以表达插入基因的表达载体中。抗体的表达、纯化等方法使用实施例 1 记载的方法或基于上述方法的方法进行。

[0488] 以 Hd1. 8 为起始物质, 将存在于 Hd1. 8CDR1 中的基于 kabat 编号的第 61 号谷氨酰胺 (Q) 取代为谷氨酸 (E), 制作 pH7 (序列号 27)。以 Ld1. 6 为出发物质, 将存在于 Ld1. 6CDR1 中的基于 kabat 编号的第 24 号精氨酸 (R) 取代为谷氨酰胺 (Q), 将存在于 FR2 及 FR3 中的第 37 号谷氨酰胺 (Q) 取代为亮氨酸 (L)、第 43 号丙氨酸 (A) 取代为丝氨酸 (S)、第 45 号精氨酸 (R) 取代为谷氨酰胺 (Q)、第 74 号苏氨酸 (T) 取代为赖氨酸 (K)、第 77 号丝氨酸 (S) 取代为精氨酸 (R)、第 78 号亮氨酸 (L) 取代为缬氨酸 (V)、第 79 号谷氨酰胺 (Q) 取代为谷氨酸 (E), 制作 pL14 (序列号 28)。

[0489] 以 pL14 为起始物质, 将存在于 pL14FR4 中的基于 kabat 编号的第 104 号亮氨酸 (L) 取代为缬氨酸 (V)、第 107 号赖氨酸 (K) 取代为谷氨酸 (E), 制作 pL16 (序列号 29)。

[0490] (2) 点突变 pI 改变抗体的 pI 值的测定

[0491] 根据实施例 1 中记载的或基于实施例 1 的方法,通过使用 PhastGel IEF 4-6.5 (GE Healthcare) 的电泳,测定 Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体的 pI 值。测定 Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体的 pI 值分别为 7.47、7.07 及 6.52,可知 pH7pL14 抗体、pH7pL16 抗体的 pI 值比 Hd1.8Ld1.6 抗体的 pI 值分别减少 0.4、0.95。

[0492] (3) 点突变 pI 改变抗体的 T_m 值的测定

[0493] 基于实施例 1 中记载的方法,使用 VP-DSC (Micro Cal) 测定由 Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体得到的 Fab 的 T_m 值。此时,使用 PBS 作为透析外液。另外,制备抗体浓度为 25-100 μg/ml 的溶液,作为 DSC 测定用试样溶液。将 DSC 扫描设定为在 20°C ~ 115°C 下、约 4K/分钟的扫描速度,通过 DSC 扫描测定对照溶液(透析外液)及 DSC 测定用试样溶液。测定 Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体的 Fab 热变性中间温度分别为 77.5°C、78.0°C 及 74.7°C。

[0494] (4) 利用竞争性 ELISA 进行的点突变 pI 改变抗体对抗原的结合活性的评价

[0495] 用实施例 1 中记载的方法,测定各点突变 pI 改变抗体对作为抗原的磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合活性(图 10)。表明 pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合活性与 H0L0 抗体基本等同。

[0496] [实施例 9] 使用 FTP-KO 株的各点突变 pI 改变抗体的制作

[0497] 使用聚乙烯亚胺 (Polysciences Inc.),将含有编码实施例 8 中制作得到的各点突变 pI 改变抗体的基因的载体导入参考实施例 2 中制作得到的 FTP-KO 株的细胞内,由此该改变抗体表达。使用 rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences),从上述细胞的培养上清液中纯化该改变抗体。将经纯化的抗体溶液用实施例 5 中记载的方法进行制作,测定上述抗体浓度。

[0498] [实施例 10] 使用体内模型的人源化 GC33 抗体及各点突变 pI 改变抗体的药效试验

[0499] (1) 用于移植到体内模型的细胞株的维持

[0500] 使用 Hep G2 细胞 (ATCC)。将 Hep G2 细胞在含有 10% FBS、1mmol/l MEM Sodium Pyruvate (Invitrogen)、1mmol/l MEM Non-Essential Amino Acid (Invitrogen) 的 Minimum Essential Medium Eagle 培养基 (SIGMA) (以下称作继代用培养基) 中进行继代培养并维持。

[0501] (2) Hep G2 细胞移植小鼠模型的制作

[0502] 使用以 1 : 1 的比例含有继代培养用培养基与 MATRIGEL Matrix (BD Bioscience) 的溶液,制备 Hep G2 细胞的细胞悬浮液,使之成为 5×10^7 细胞/ml。向 SCID 小鼠(雄性、5 周龄)(日本 CLEA)的腹部皮下移植 $100 \mu\text{l}$ 该细胞悬浮液 (5×10^6 细胞/小鼠),并且在细胞移植的前一天预先向所述 SCID 小鼠的腹膜内给与 $100 \mu\text{l}$ 抗脱唾液酸 GM1 抗体(和光纯药,将 1 安瓿中的内容物用 5ml 该溶液溶解)。肿瘤体积使用下述公式算出,在肿瘤体积的平均值达到 400mm^3 的时刻,判断完成模型。

[0503] 公式: 肿瘤体积 = 长径 × 短径 × 短径 / 2

[0504] (3) 含有各受试抗体的给与试样的制备

[0505] 在给与当天使用生理盐水制备含有 H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6、pH7pL14、pH7pL16 的各抗体的给与试样,使之成为 0.1mg/ml (1mg/kg 给与组)。

[0506] (4) 含有抗体的给与试样的给与

[0507] 从移植 Hep G2 细胞后 34 日开始,对 (2) 中制作得到的小鼠模型按照 10ml/kg 的给与量通过尾静脉给与上述 (3) 中制备得到的给与试样,每周一次、共五周。作为阴性对照,同样地按照 10ml/kg 的给与量通过尾静脉给与生理盐水,每周一次、共五周。以 5 只为 1 组,对各组均给与含有各受试抗体的给与试样的。与给与基本同时地从各组中的 3 只个体中采集静脉血,将其用作测定各抗体的小鼠血浆中浓度的受试物质。具体而言,在初次给与后 0.5 小时、第三次刚给与前的两个时间点,从足背静脉进行采血。通过肝素处理进行 20 μ l 容量的采血,利用离心分离制备血浆。

[0508] (5) 各受试抗体的抗肿瘤效果的评价

[0509] 通过测定从给与给与试样的最终日开始一周后的肿瘤体积,评价人肝癌移植小鼠模型中的各受试抗体的抗肿瘤效果。上述结果如图 11 所示,确认在 pH7pL14 抗体及 pH7pL16 抗体中存在药效强于 H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6 抗体的倾向。

[0510] [实施例 11] 使用体内模型的人源化 GC33 抗体及各点突变抗体的 PK 试验

[0511] (1) 含有各受试抗体的给与试样的制备

[0512] 在给与当日,使用生理盐水制备含有 H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体、pH7pL16 抗体、pH7M85pL16 抗体等各抗体的给与试样,使之成为 0.5mg/ml (给与 5mg/kg)。

[0513] (2) 含有抗体的给与试样的给与

[0514] 对 C.B-17/Icr-scid 小鼠,按照 10ml/kg 的给与量通过尾静脉给与上述 (1) 中制备得到的给与试样。以 3 只为 1 组,对各组均给与含有各受试抗体的给与试样。为了测定各抗体的小鼠血浆中浓度,采集小鼠的静脉血作为受试物质。具体而言,在初次给与后 0.5 小时、2 小时、8 小时、24 小时、72 小时、168 小时 7 个时间点,从足背静脉进行采血。通过肝素处理进行 20 μ l 容量的采血,利用离心分离制备血浆。

[0515] (3) 各受试抗体的血浆中浓度

[0516] 小鼠血浆中受试抗体的浓度利用基于实施例 6 中记载的 ELISA 法的方法进行测定。制作以血浆中浓度计为 12.8、6.4、3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 μ g/ml 的标准曲线试样。将标准曲线试样及适当稀释成所期望的浓度的小鼠血浆受试试样注入到将 soluble Glypican-3core(中外制药社制)固相化的 Immuno Plate(Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup(Nalge nunc International)) 中,将该板在室温下静置 1 小时。之后,依次注入 Goat Anti-Human IgG-BIOT(Southern Biotechnology Associates) 及 Streptavidin-alkaline phosphatase conjugate(Roche Diagnostics),将 BluePhosMicrowell Phosphatase Substrates System(Kirkegaard&Perry Laboratories) 用作基质,进行显色反应。使用酶标仪,测定反应液在 650nm 处的吸光度,由此算出各孔中反应液的显色。基于由各标准曲线试样的吸光度制作的标准曲线,使用解析软件 SOFTmax PRO(Molecular Devices),算出小鼠血浆中的抗体浓度。

[0517] 给与后的小鼠血浆中浓度如图 12 所示。表明如果受试抗体的 pI 降低,则小鼠血浆中的抗体浓度升高。

[0518] [实施例 12] 将人外周血单核细胞用作效应细胞的各受试抗体的 ADCC 活性

[0519] 将人外周血单核细胞(以下称作人 PBMC)用作效应细胞,如下所述地测定各受试抗体的 ADCC 活性。

[0520] (1) 人 PBMC 溶液的制备

[0521] 使用预先注入了 200 μ l 1000 单位/ml 肝素溶液 (Novo 肝素注射 5 千单位, Novo Nordisk) 的注射器, 从属于中外制药株式会社的健康志愿者 (成年男性) 采集外周血 50ml。将使用 PBS(-) 稀释至 2 倍的该外周血进行 4 等分, 将其加入预先注入 15ml Ficoll-Paque PLUS 并且进行了离心操作的 Leucosep 淋巴细胞分离管 (Greinerbio-one) 中。将注入了该外周血的分离管以 2150rpm 的速度在室温下进行离心分离 10 分钟后, 收集单核细胞成分层。用含有 10% FBS 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA) (以下称作 10% FBS/D-MEM) 清洗该各分层中含有的细胞 1 次后, 将该细胞悬浮在 10% FBS/D-MEM 中, 使其细胞密度达到 5×10^6 /ml。将该细胞悬浮液作为人 PBMC 溶液用于以后的实验。

[0522] (2) 靶细胞的制备

[0523] 将 Hep G2 细胞从培养皿中剥离, 将其接种到 96 孔 U 底板上, 使其为 1×10^4 细胞/孔。将该板在 5% 二氧化碳培养箱中于 37°C 下培养一夜。次日, 向该板的各孔中加入 5.55MBq 的 Cr-51, 将该板在 5% 二氧化碳培养箱中于 37°C 下培养 3 小时。以存在于该板的各孔中的 Hep G2 细胞为靶细胞, 以后测定 ADCC 活性时使用。

[0524] (3) 铬释放试验 (ADCC 活性)

[0525] 通过利用铬释放法的特异性铬释放率来评价 ADCC 活性。用培养基清洗 (2) 中制备得到的靶细胞, 以各浓度 (0、0.004、0.04、0.4、4、40 μ g/ml) 制备得到的 H0L0 抗体, H0L0 抗体、Hd1.8Ld1.6 抗体、pH7pL14 抗体、pH7pL16 抗体等各抗体各 100 μ l 分别进行添加。将该板在室温下反应 15 分钟后, 除去抗体溶液。然后, 在各孔中加入继代用培养基各 100 μ l, 将该板在 5% 二氧化碳培养箱中于 37°C 下培养 1 小时。向各孔中加入 (1) 中制备得到的人 PBMC 溶液各 100 μ l (5×10^5 细胞/孔), 将该板在 5% 二氧化碳培养箱中于 37°C 下静置 4 小时后, 进行离心分离操作。利用 γ 计数器, 测定该板的各孔中的 100 μ l 培养上清液的放射活性。基于下式求出特异性铬释放率。

[0526] 特异性铬释放率 (%) = $(A-C) \times 100 / (B-C)$

[0527] 在上式中, A 表示各孔中的 100 μ l 培养上清液的放射活性 (cpm) 的平均值。另外, B 表示在靶细胞中添加 100 μ l 2% NP-40 水溶液 (NonidetP-40, Nacalai Tesque) 及 50 μ l 10% FBS/D-MEM 培养基的孔中的 100 μ l 培养上清液的放射活性 (cpm) 的平均值。进而, C 表示在靶细胞中添加 150 μ l 10% FBS/D-MEM 培养基的孔中的 100 μ l 培养上清液的放射活性 (cpm) 的平均值。以三份进行试验, 算出反映各受试抗体的 ADCC 活性的上述试验中的特异性铬释放率 (%) 的平均值及标准偏差。

[0528] (4) 各受试抗体 ADCC 活性的评价

[0529] 评价通过各受试抗体人 PBMC 发挥的 ADCC 活性, 结果确认全部受试抗体具有 ADCC 活性。上述结果示于图 13。对各浓度下的各受试抗体显示出的特异性铬释放率进行显著性检验, 结果确认在全部抗体浓度下各受试抗体显示出的特异性铬释放率与对照组的 H0L0 抗体相比无显著性差异。统计解析中使用 SAS 临床前软件包 (SAS Institute Inc.)。基于以上结果, 表明上述 pI 被改变的各受试抗体的 ADCC 活性之间不存在差异。

[0530] [实施例 13] 使恒定区 pI 值降低的改变体的制作与评价

[0531] (1) 用于降低恒定区的 pI 值的改变位点的选定

[0532] 提供 IgG1 Δ GK (序列号 32), 所述 IgG1 Δ GK 为在具有序列号 31 中记载的氨基酸序

列的 IgG1 恒定区中缺失基于 EU 编号的第 446 号 Gly 及第 447 号 Lys 的 IgG1 恒定区。通过缺失上述 2 个氨基酸,可以降低最初来自抗体的重链末端恒定区的异质性。

[0533] 将 IgG1 Δ GK 的一部分氨基酸残基取代为与其 EU 编号对应的人 IgG4 恒定区序列的氨基酸残基,由此进行降低恒定区的 pI 值的改变。具体而言,将 IgG1 Δ GK 的基于 EU 编号的第 268 号组氨酸 (H) 取代为 IgG4 序列的谷氨酰胺 (Q)、将第 274 号赖氨酸 (K) 取代为谷氨酰胺 (Q)、将第 355 号精氨酸 (R) 取代为谷氨酰胺 (Q)、将第 356 号天冬氨酸 (D) 取代为谷氨酸 (E)、将第 358 号亮氨酸 (L) 取代为蛋氨酸 (M)、将第 419 号谷氨酰胺 (Q) 取代为谷氨酸 (E)。上述突变仅使用能够成为 T-cell 表位的来自人恒定区的序列的 9 ~ 12 个氨基酸,因此认为免疫原性风险低。上述六处改变被导入 IgG1 Δ GK 中,制作 M85 (序列号 :33)。

[0534] 通过将上述恒定区 M85 与可变区 pH7 及 H0 进行组合,制作 pH7M85 (序列号 :34) 及 HOM85 (序列号 :35)。使用 HOM85 或 pH7M85 作为 H 链,使用 L0 或 pL16 作为 L 链,制作 HOM85L0 抗体及 pH7M85pL16 抗体。另外,一同制作实施例 1 及实施例 8 中制作得到的恒定区与作为 IgG1 的 H0L0 抗体及 pH7pL16 抗体。使用 FTP-KO 株或 HEK293 细胞,进行 HOM85L0, pH7M85pL16, H0L0, pH7pL16 的表达与纯化,用实施例 1 或 9 中记载的方法进行制作。

[0535] (2) 恒定区 pI 改变抗体的 pI 值的测定

[0536] 基于实施例 1 中的方法,使用 PhastGel IEF 4-6.5 (GE Healthcare),采用与实施例 1 等同的电泳条件,测定 H0L0 抗体、HOM85L0 抗体、pH7pL16 抗体、pH7M85pL16 抗体的 pI 值。测定 H0L0 抗体、HOM85L0 抗体、pH7pL16 抗体及 pH7M85pL16 抗体的 pI 值分别为 8.85、8.16、6.52 及 5.78。表明恒定区的改变不影响抗体的免疫原性,有助于进一步降低其 pI 值。

[0537] (3) 利用竞争性 ELISA 进行的恒定区 pI 改变抗体的结合活性的评价

[0538] 根据实施例 1 中记载的方法测定各恒定区 pI 改变抗体对抗原的结合活性 (图 14)。表明 H0L0 抗体、HOM85L0 抗体、pH7pL16 抗体、pH7M85pL16 抗体对磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的结合活性基本等同。

[0539] [实施例 14] 将恒定区 pI 改变抗体的人外周血单核细胞用作效应细胞的 ADCC 活性

[0540] 采用基于实施例 12 中记载的方法的方法,测定 pH7pL16 抗体和 pH7M85pL16 抗体的 ADCC 活性。上述结果示于图 15。对各浓度下的各受试抗体显示出的特异性铬释放率进行显著性检验,结果确认在全部抗体浓度下各受试抗体显示出的特异性铬释放率在受试抗体之间无显著性差异。统计解析中使用 SAS 临床前软件包 (SAS Institute Inc.)。基于以上结果,表明 pH7pL16 抗体与其恒定区被改变的 pH7M85pL16 抗体的 ADCC 活性之间不存在差异。

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

<210>3

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 H 链

<400>3

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

<210>4

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 H 链

<400>4

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

115

<210>5

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 H 链

<400>5

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

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

<210>8

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 L 链

<400>8

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

<210>9

<211>112

<212>PRT

<213> 人工抗体

<220>

<223> 人源化抗体 L 链

<400>9

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

<210>10

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 L 链

<400>10

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

<210>11

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 L 链

<400>11

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

<210>12

<211>112

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化抗体 L 链

<400>12

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

<210>13

<211>545

<212>PRT

<213> 人类

<400>13

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
 1 5 10 15
 Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
 20 25 30
 Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
 35 40 45
 Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
 50 55 60
 Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
 65 70 75 80
 Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
 85 90 95
 His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
 100 105 110
 Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
 115 120 125
 Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Ash
 130 135 140
 Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn
 145 150 155 160
 Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly
 165 170 175
 Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met
 180 185 190
 Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala
 195 200 205
 Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe
 210 215 220
 Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr
 225 230 235 240
 Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val
 245 250 255
 Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp
 260 265 270

Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg
 275 280 285
 Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His
 290 295 300
 Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr
 305 310 315 320
 Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala
 325 330 335
 Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala
 340 345 350
 His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile
 355 360 365
 Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr
 370 375 380
 Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
 405 410 415
 Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
 420 425 430
 Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
 435 440 445
 Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
 450 455 460
 Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
 465 470 475 480
 Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
 485 490 495
 Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
 500 505 510
 Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
 515 520 525
 His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His
 530 535 540
 His
 545
 <210>14
 <211>32
 <212>DNA

| | |
|--|------|
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>14 | |
| ggatcctgcg catgaaaaag cctgaactca cc | 32 |
| <210>15 | |
| <211>29 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>15 | |
| gcggccgcct attcctttgc cctcggacg | 29 |
| <210>16 | |
| <211>10939 | |
| <212>DNA | |
| <213> 中国仓鼠 | |
| <400>16 | |
| gagctcaatt aaccctcact aaagggagtc gactcgatcc ttacagaaa acttgcaaac | 60 |
| cctcttggag tagaaaagta gtagtatctg acacaagtat cagcaaatg caaacttctc | 120 |
| cccatccca gaaaaccatt ataaaaacc ccatatctta tgcccaactg tagtgatata | 180 |
| ttatztatga ttattataaaa ctgcttaag gattcagaaa gcaaagtcag ccttaagcta | 240 |
| tagagaccag gcagtcagtg gtggtacaca cctttaatcc caggactcag gattaagaag | 300 |
| tagacggacc tctgttagtt caagtctacc attacctaca caagagtga gagtaaccga | 360 |
| tctcatgcct ttgateccag cagctgggat catgtgcatt caatcccagc attcgggagt | 420 |
| tatataagac aggagcaagg tctcagagct ggcatcatt ctccagccac attgaggata | 480 |
| ggaaaacatt gaagtgtcag gatgctgagg agaggcagca gtttgaggtt tggtagaacc | 540 |
| aggatcacct tttagtctga ggtagagtaa gaactgtggc tggctgcttt gcttttctga | 600 |
| tcttcagctt gaagcttgaa ctccaatatt tgtctctggg tctattatta tcatgttaca | 660 |
| cctaacttta aagctgattt acgcaagaca gttgtaggtg gacctttctt tctgcccac | 720 |
| cagttccca ataaactgaca cggagactca atattaatta taaatgattg gtaataagct | 780 |
| cagtcttggt actggctaac tcttacattt taaattaact catttccatc ctttacttg | 840 |
| ctgccatgtg gttcatggct tgttcaagtc ctgcttcttc tgtctctggc tggtgatgcc | 900 |
| tctggttctg ccctttatcc cagaattctc ctagtctggc tctcctgccc agctatagge | 960 |
| cagtcagctg ttattataacc aatgagaata atacatattt atagtgtaca aagattgctc | 1020 |
| ctcaacacce aattttttat gtgcaacctg agaactctgga ctcatgccc tcatgettgc | 1080 |
| agaggggca cccttacc caaagccacc ttctagccc tgttgctttt gtttttgag | 1140 |
| acaggttcca ctatgtagcc caggctggcc tcaaactgac cattctcctg cctaaacctc | 1200 |
| ccgaacactg gaattatagt caaggcctac ctgccctggc attttcacac ttttatctcc | 1260 |

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| tggtgagtc | cattgacttt | acactcatca | aggttgaacc | agttggagtt | taattacagt | 1320 |
| gccaatcgca | ctgaatccca | cataatcaaa | caacttcaag | gaagcaaaaa | accagttttt | 1380 |
| cctgaagate | aatgtcagct | tgectgatte | agaatagacc | cccgaaaaaa | ggcaaatgct | 1440 |
| tgataacca | tttcttetta | ttgttcaate | ccctgctgct | gtgtgtaage | tcctgagaaa | 1500 |
| ggacagtaag | gggacattca | tgatcagaga | aagagcccca | actccccccc | cagccccacc | 1560 |
| cccaccctgt | ccacagtctg | ttggtttggg | ttccccctgg | ctgacaccca | gaaatcacia | 1620 |
| cataatcacc | taggtcactg | taacaagttc | ctttctggaa | aatgctacaa | atgatattgg | 1680 |
| taacatgagt | aatgaataat | gcctggagtc | caactccctt | gtgaccacag | aatgttttcc | 1740 |
| gtgggtgctc | ccttccccag | ctgcaggcct | gacatgtacc | ttaaaaagcc | tcccctggag | 1800 |
| gacagaatth | tgtgggtact | atagtgttct | cacaaatact | tcccctaata | cccttactta | 1860 |
| gttaccataa | ataacatgca | gcccctgggtg | aggcacacag | ggctccaatg | tacagcttct | 1920 |
| cagacactgc | aggaaccttc | ctctccta | gcagcactgg | tctcttcagg | ctggacagca | 1980 |
| ggaaccata | ccactccaat | cctagtgtgg | agtagagctg | tctacgaaaa | ccagcagatc | 2040 |
| tatagctaaa | tgtgtttcaa | ttttatgctt | tgacaaattg | tactgacccc | acccccacc | 2100 |
| cttccccctt | gctgtgctgg | gaattgaacc | caggaccttg | tgcattgccag | gcaagtactc | 2160 |
| taacactgag | ctatagcccc | aatctttcat | ccaagtctct | atgtgtgccc | acactcgctt | 2220 |
| tttattttga | gacaaaaggt | tcttattttg | agataaggtc | tcactatggt | gccttgactt | 2280 |
| tttttttttt | ttttttttga | acttttgacc | ttcctacctc | agctgagact | acaagtcttt | 2340 |
| taccatcagg | cccggctgat | ggtaaaataa | cagtatttga | aatagtttaa | acacatcatc | 2400 |
| ttaatggtca | accacacaat | ttccgaaatg | ttgctggctc | agtctggggc | aaacctgtcc | 2460 |
| gcccacaat | tggtgctagg | aagaaagcac | agacaagtag | ccctcccagc | tcaggagtaa | 2520 |
| aagacctgga | gggggtggcc | cacttcggtc | aagttcacgg | gatggggagg | ggtaccctcc | 2580 |
| tccagtagtg | gtggatattg | gcagttcctc | caccgacgcc | ctctggaagc | acctgcttgg | 2640 |
| accgcaaag | ccaggaatgc | agcttctca | agggactcgc | cagcgagggt | aacaggacag | 2700 |
| aggcgtccca | agagggtg | ggcggaaggg | ggaagacagg | gtcggcctta | gatagggcaa | 2760 |
| agggccttct | ggctgtgttc | ccggggtaac | cgccccacca | cgcttgagc | ccgactggc | 2820 |
| gagcgatggg | gacagcgagc | aggaagtcgt | actggggagg | gccgcgtagc | agatgcagcc | 2880 |
| gagggcgggc | ctgccaggta | caccgagggg | caccgcgggg | gtgagcgcca | ggtccctgaa | 2940 |
| ccagccaggc | ctccagagcc | gagtcggcg | gaccgacggt | acgttctgga | atgggaaggg | 3000 |
| atccgggaca | ccgaattgct | gcattgaggg | gctcagaggt | tctgatgtgg | gagtccagaa | 3060 |
| agggttttat | ctaccggagg | tgatgtgact | tccggcctct | ggaagtgctg | ttggagtctc | 3120 |
| tgggaccttg | ggtcctctcg | actaggtttg | gaaggggtga | aataggggta | gggagaaagg | 3180 |
| agaggactgc | agcaatgtct | tcccgaacga | cctgggttcg | ggaggggtcg | aagacaagg | 3240 |
| ggctgttttg | gggggtcttc | agacgcggag | gggtgttatt | ctattttctg | ggaagatggt | 3300 |
| gtcgatgcac | ttgaccaagt | ctagtcgata | tgaagaggct | aggggaacag | acagtgagag | 3360 |
| aggatggtgg | agggagtggc | agaacccttc | cagaaactgg | gagaggctct | agcactgca | 3420 |
| acccttccc | tggcctccgg | ggagtcccag | aagagggcag | gaccatggac | acaggtgcat | 3480 |
| tcgtgccggc | gcgctccggc | ctggcgaagg | tgcgcgctct | tggaggccgc | gggagggcca | 3540 |
| gacgcgcgcc | cggagagctg | gccctttaag | gctaccggga | ggcgtgtcag | gaaatgcgcc | 3600 |

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| ctgagcccg | ccctcccga | acgcggccc | agacctggca | agctgagacg | gaactcggaa | 3660 |
| ctagcacteg | gctcgggce | teggtagge | cttgcgccc | ccatgcctct | gtcattgccc | 3720 |
| ctcgggccc | ctccctgaac | ctccgtgacc | gccctgcagt | cctccctccc | ccccttcgac | 3780 |
| tcggcggg | cttccggg | ctcccgcage | ccgccctcca | cgtagccca | acctccctct | 3840 |
| cggcgctcc | cttcccacgc | ggtecccgc | ctgtttttt | ctcctccacc | ctgcccttct | 3900 |
| gtccctctcc | cttcttttct | ccccctgact | cgteccctatt | aggcaacage | ccctgtggtc | 3960 |
| cagccggcca | tggtgtcaa | ggctcacacc | cttagctagg | ccccttctcc | cttccctggg | 4020 |
| tcttgtctca | tgacccctg | ccccgccc | gagcgagcgc | gatgtggage | agtgcctctg | 4080 |
| gcaagcagaa | cttcacccaa | gccatgtgac | aattgaaggc | tgtaccccca | gaccctaaca | 4140 |
| tcttggagcc | ctgtagacca | gggagtgtct | ctggccgtgg | ggtgacctag | ctcttctacc | 4200 |
| accatgaaca | gggcccctct | gaagcggctc | aggatcctgc | gcatggcgct | gactggaggc | 4260 |
| tccactgcct | ctgaggagc | agatgaagac | agcaggaaca | agccgtttct | gctcggggc | 4320 |
| ctgcagatcg | cgctggctgt | ctctctctac | tgggtcacct | ccatctccat | ggtattcctc | 4380 |
| aacaagtacc | tgctggacag | cccctccctg | cagctggata | cccctatctt | ctcactttc | 4440 |
| taccaatgcc | tggtgacctc | tctgctgtgc | aaggccctca | gactctggc | cacctgctgc | 4500 |
| cctggcaccg | ttgacttccc | caccctgaac | ctggacctta | aggtggccc | cagcgtgctg | 4560 |
| ccactgtcgg | tagtcttcat | tggcatgata | agtttcaata | acctctgcct | caagtacgta | 4620 |
| ggggtggcct | tctacaacgt | ggggcgctcg | ctcaccaccg | tgttcaatgt | gcttctgtcc | 4680 |
| tacctgctgc | tcaaacagac | cacttcttcc | tatgccctgc | tcacatgtgg | catcatcatt | 4740 |
| ggtgagtggg | gcccgggggc | tgtgggagca | ggatgggcat | cgaactgaag | ccctaaaggt | 4800 |
| caacactgta | ggtaccttta | cttactgtcc | caggctccct | gcatcagcag | ttacaggaag | 4860 |
| agccctgtag | aaaacaaata | acttcttctt | ggtcattcaa | caagttagg | accagccag | 4920 |
| ggtgaaaata | atgttagcag | caactacagc | aaagatggct | ctcgccactt | gcatgattaa | 4980 |
| aatgtgccag | gtactcagat | ctaagcattg | gatccacatt | aactcaacta | atccctatta | 5040 |
| caaggtaaaa | tatatccgaa | ttttacagag | ggaaaaccaa | ggcacagaga | ggctaagtag | 5100 |
| cttgaccagg | atcacacagc | taataatcac | tgacatagct | gggatttaaa | cataagcagt | 5160 |
| tacctcata | gatcacacta | tgaccaccat | gccactgttc | cttctcaaga | gttccaggat | 5220 |
| cctgtctgtc | cagttctctt | taaagaggac | aacacatctg | acattgctac | cttgaggtaa | 5280 |
| catttgaaat | agtgggtaga | catatgtttt | aagttttatt | cttacttttt | atgtgtgtgt | 5340 |
| gtttgggggg | ccaccacagt | gtatgggtgg | agataagggg | acaacttaag | aattggtcct | 5400 |
| ttctcccacc | acatgggtgc | tgaggcttga | actcaggctca | tcaggattgg | cacaaatccc | 5460 |
| tttaccact | gagccatttc | actgggtccaa | tatatgtgtg | cttttaagag | gctttaacta | 5520 |
| tttcccaga | tgtgaatgtc | ctgctgatca | ttatcccctt | ttaccggaa | gccctctggg | 5580 |
| aggtgccate | cctgtggctg | tctgcataca | aatggggaaa | ctgcaactca | gagaaacaag | 5640 |
| gctacttggc | agggccccac | aagtaagata | ggctgggatg | ccatcccaga | ctggccacac | 5700 |
| tccttgccct | gtgcttcaag | ccagtttact | ttgttccctgc | ccattggaag | ttagcatgtt | 5760 |
| gcagtcaaac | acaataacta | caggccaaaa | gtgctttta | attaaagtca | gatgaacttt | 5820 |
| taaacatcca | gagctctca | actgcaggag | ttacaacctg | attctgcaac | catctttgca | 5880 |
| gtgcccggta | gtcatatgta | gctagaggct | cttggctagg | acagcatgtg | ttaggaaaca | 5940 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| tctggccctg | agatcattga | attgagtgac | tgctgggtga | caaagaccaa | ggcatccgtt | 6000 |
| ccctgagagt | cctgggcaag | cagcaatgtg | accttcattt | gtacctactc | aggttcttta | 6060 |
| tctgtcctgt | ttgacctact | tagtctctc | tggtgtctca | gaggcccagg | ctgggtactc | 6120 |
| tggatgtcag | gatcaggcca | atgcgcacat | ctgccctaga | aatgtccccc | tggttgagca | 6180 |
| gctcctgaat | ccatcggtaa | agggtctgga | ccagggagga | gtcagataaa | aagctgacag | 6240 |
| cactggggga | ctccatgggg | aactcccacc | tgccccca | catccatcct | aagagaactg | 6300 |
| gtattccttg | tttctctttt | gtctacaag | gcaccctggg | atcccacttc | agtcctccag | 6360 |
| ccttgccagg | gtagagggc | atgagcctcc | ttgtggggaa | tttagatgca | agaaggtaca | 6420 |
| gtcactagag | aacctgagct | cagatcccca | aagtaaccag | tacctgatag | tgaggcagct | 6480 |
| gagaaccgca | gcagcctgcc | tgagtggctg | aactctgcgg | cctccggaac | tggcccaac | 6540 |
| tgttgggtct | cctcttctt | cctcctgtga | gggaggggccc | atctctgata | agtgtctgtg | 6600 |
| ggactctaga | gtagggagga | ggaggagcaa | tctaagcagg | ccttactgag | aagtccttgc | 6660 |
| tggcatgtgg | ctgcctgagg | agtacagact | gggaacaccc | atgtgaatga | gtaaggtttt | 6720 |
| tcctgaaggc | catggggagc | cacggaggaa | aatcatttta | gttacaagac | aaagagtaga | 6780 |
| ttggttaaca | tgggagcaag | gacatggccc | caattttcat | agatgaagga | aattggaact | 6840 |
| cagagaggtt | aagtaacttc | tcccaaatag | ctcagcttca | aaatcacaga | acagtcagag | 6900 |
| tctagatctc | tctgatgcct | gtgatggctc | tgccattcca | tgttgctgat | ccctgtggca | 6960 |
| tcagtaagcc | tctaccttgt | gggaatgcag | gatctaaatg | aagagaggaa | gtgctggccc | 7020 |
| catgctgtgg | tctggaaagc | tatgcaggct | ctttgagcag | agagtgaccc | acaagtgaat | 7080 |
| agagtcctat | gagactcaaa | gcaacatcca | cccttaagca | gctctaacca | aatgctcaca | 7140 |
| ctgagggagc | caaagccaag | ttagagtctc | gtgcttgccc | aaggctcactt | tgccctggccc | 7200 |
| tcctcctata | gcaccctgtg | tatcttatag | ccctcattac | agtgattaca | attataatta | 7260 |
| gagaggtaac | agggccacac | tgctcttaca | cattcccctg | ctagattgta | gctgggagag | 7320 |
| ggggagatgt | aggtggctgg | gggagtggga | gggaagatgc | agattttcat | tctgggctct | 7380 |
| actccctcag | ccattttttg | gtgtgggagt | tagacttttg | atatgttgat | gatgaggtaa | 7440 |
| gggccacaga | acagtctgaa | ctgtggtatc | agaatcctgt | ccctctccct | ctctcctcat | 7500 |
| ccctcttcac | cttgctactc | ctctgtctgc | tacaggtggg | ttctggctgg | gtatagacca | 7560 |
| agagggagct | gagggcaccc | tgctccctcat | aggcaccatc | ttcgggggtgc | tggccagcct | 7620 |
| ctgcgtctcc | ctcaatgcca | tctataccaa | gaaggtgctc | ccagcagtgg | acaacagcat | 7680 |
| ctggcgccta | accttctata | acaatgtcaa | tgccctgtgtg | ctcttcttgc | ccctgatggg | 7740 |
| tctgtgggt | gagctccgtg | ccctccttga | ctttgtctcat | ctgtacagtg | cccacttctg | 7800 |
| gctcatgatg | acgctgggtg | gcctcttcgg | ctttgccatt | ggctatgtga | caggactgca | 7860 |
| gatcaaatte | accagtcccc | tgaccacaaa | tgtatcaggc | acagccaagg | cctgtgcgca | 7920 |
| gacagtgctg | gccgtgctct | actatgaaga | gactaagagc | ttcctgtggg | ggacaagcaa | 7980 |
| cctgatgggtg | ctgggtggct | cctcagccta | tacctgggtc | aggggctggg | agatgcagaa | 8040 |
| gaccaagag | gaccccagct | ccaaagaggg | tgagaagagt | gctattgggg | tgtgagcttc | 8100 |
| ttcagggacc | tgggactgaa | cccaagtggg | gcctacacag | cactgaaggc | ttcccatgga | 8160 |
| gctagccagt | gtggccctga | gcaatactgt | ttacatcctc | cttggaatat | gatctaagag | 8220 |
| gagccagggt | ctttcttggg | aatgtcagaa | agctgccaaa | tctcctgtct | gccccatctt | 8280 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------|
| gttttgggaa | aaccctacca | ggaatggcac | ccctacctgc | ctcctcctag | agcctgtcta | 8340 |
| cctccatate | atctctgggg | ttgggaccag | ctgcagcctt | aaggggctgg | attgatgaag | 8400 |
| tgatgtette | tacacaaggg | agatgggttg | tgatcccact | aattgaaggg | atttgggtga | 8460 |
| ccccacacct | ctgggatcca | gggcaggtag | agtagtagct | taggtgctat | taacatcagg | 8520 |
| aacacctcag | cctgcctttg | aagggagtg | ggagcttggc | caagggagga | aatggccatt | 8580 |
| ctgccctctt | cagtgtggat | gagtatggca | gacctgttca | tggcagctgc | accctggggt | 8640 |
| ggctgataag | aaaacattca | cctctgcatt | tcatatttgc | agctctagaa | cgggggagag | 8700 |
| ccacacatct | tttacgggtt | aagtaggggtg | atgagctcct | ccgcagtccc | taaccccagc | 8760 |
| tttacctgcc | tggettccct | tggcccagct | acctagctgt | actccctttc | tgtactcttc | 8820 |
| tcttctccgt | catggcctcc | cccaacacct | ccatctgcag | gcaggaagtg | gagtccactt | 8880 |
| gtaacctctg | ttcccatgac | agagcccttt | gaatacctga | accctcatg | acagtaagag | 8940 |
| acatttatgt | tctctggggc | tggggctgaa | ggagcccact | ggttctcact | tagcctatct | 9000 |
| ggctcctgtc | acaaaaaaaa | aaaaagaaaa | aaaaaaagca | taaaccaagt | tactaagaac | 9060 |
| agaagttggt | ttataacgtt | ctggggcagc | aaagcccaga | tgaagggacc | catcgacct | 9120 |
| ctctgtccat | atcctcatgc | tgcagaagta | caggcaagct | cctttaagcc | tcatatagga | 9180 |
| acactagcct | cactcatgag | ggttttactc | catgacctgt | caacctcaaa | gccttcaaca | 9240 |
| tgaggactcc | aacgtaaatt | tggggacaga | agcactcaga | ccatacccca | gcaccacacc | 9300 |
| ctcctaacct | cagggtagct | gtcattctcc | tagtctctcc | tcttgggcct | ttagaacccc | 9360 |
| catttccttg | gggtaatgtc | tgatgttttt | gtccctgtca | taaaaagatg | gagagactgt | 9420 |
| gtccagcctt | tgattectac | ttectacaat | cccaggttct | aatgaagttt | gtggggcctg | 9480 |
| atgccctgag | ttgtatgtga | tttaataata | aaaaagcaag | atacagcatg | tgtgtggact | 9540 |
| gagtgagggc | cacagggatc | taaaagccaa | gtgtgagggg | accagctac | agcaggcagc | 9600 |
| atcctgagcc | tggaatctct | tcaggacaag | aattctccat | atacctacct | actctgggga | 9660 |
| gtaggtggcc | agagttcaag | cttcccttag | taccaactac | cactggctgt | gctcttactg | 9720 |
| aaggcagaca | tggcactgag | tgctgtccat | ctgtcactca | tctccacagc | cattcctaata | 9780 |
| gtgtgggggtg | ggagccatca | ccaaacccca | ttttcagata | aggacacagg | ctcagagagg | 9840 |
| cttgtgtgga | gaaaagtagc | agcagaattc | agagagctgg | gtctcctgca | gcaccttgga | 9900 |
| ctgccagcag | ccacagtgct | tgteacacag | cacatactca | aaagaatgcc | agccccctca | 9960 |
| gcctagagtg | cctggccttt | ctttcagatg | aggaagaggg | tcaaagctgt | tagcttgccc | 10020 |
| accatatgac | cacatacatg | accaacagct | tgagggaggg | aggattactg | tggtcccag | 10080 |
| cctgagaggt | gggacacca | aatgtattag | gtccttgaat | cagggtgac | cttgtgattc | 10140 |
| agtcactcct | accagaatgc | tggggaatgg | ggatgcaaaa | ggcaaaggag | gctttctaag | 10200 |
| gtgtgggtgta | agatagggat | ttctgcttcc | atgtacacct | gtgagcagag | taggaaggcc | 10260 |
| ctgtggagaa | tatatccac | aaaccagtag | cccttccctg | cagtgggtga | atactgccac | 10320 |
| cctatacccc | tatgcaaggc | cagtagaacc | accacacca | caacatctag | agaaattaca | 10380 |
| ggtcactctta | agcctctaaa | ttgtggagaa | actcgacatg | cgcacgattc | ctaacctget | 10440 |
| agcctaggggt | gcggggtgga | taatttaagg | aaactgggggt | ttcttataga | atcgaggget | 10500 |
| ccatgaagtc | accctgacaa | gaggtcagca | atagccagca | gcagtggcta | ctcctaagcc | 10560 |
| tccagacaga | gcacctgtg | aatgtacctt | attctcacat | ctgggtgtct | ataggtgtga | 10620 |

| | |
|--|-------|
| ctgggtcaga tgtcaccag gccattgcaa tgggccctta gcccacatggg gtgttgggat | 10680 |
| agcagccaag cagctcccat gctgagatac tgccctgcagt agactgatgg ataagaaaac | 10740 |
| aaggcccaaa atgtttttett tccagacttg atctttcttt gttcaaaaat gctgttttcc | 10800 |
| cttaaacttg cccaaacceca ttgttttgca gttgaggaaa ataaggcata gaaagattaa | 10860 |
| aggaagtttc tgaggttaca gagcaaagta ctggcttcac ctgaaataga caggtgtgcc | 10920 |
| ctgatcctga tttgagctc | 10939 |
| <210>17 | |
| <211>33 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>17 | |
| atgcatgcca ccatgaaaaa gcctgaacte acc | 33 |
| <210>18 | |
| <211>28 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>18 | |
| ggatcccagg ctttacactt tatgcttc | 28 |
| <210>19 | |
| <211>25 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>19 | |
| gctgtctgga gtactgtgca tctgc | 25 |
| <210>20 | |
| <211>27 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>20 | |
| ggaatgcage ttctcaagg gactcgc | 27 |
| <210>21 | |

| | |
|-------------------------------|----|
| <211>27 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>21 | |
| tgcatcaggt cggagacgct gtcgaac | 27 |
| <210>22 | |
| <211>27 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>22 | |
| gcactcgtcc gagggcaaag gaatagc | 27 |
| <210>23 | |
| <211>24 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>23 | |
| tgtgctggga attgaaccca ggac | 24 |
| <210>24 | |
| <211>22 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>24 | |
| ctacttgtct gtgctttctt cc | 22 |
| <210>25 | |
| <211>27 | |
| <212>DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> 引物 | |
| <400>25 | |
| ctcgactcgt ccctattagg caacagc | 27 |

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

<210>29

<211>112

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>被改变的抗体

<400>29

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

<210>30

<211>327

<212>PRT

<213>人类

<400>30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Set Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 245 | | 250 | | 255 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn | | | | | |
| | 260 | | 265 | | 270 |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe | | | | | |
| | 275 | | 280 | | 285 |
| Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn | | | | | |
| | 290 | | 295 | | 300 |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | | | | | |
| 305 | | 310 | | 315 | 320 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | | | | | |
| | 325 | | 330 | | |
| <210>32 | | | | | |
| <211>328 | | | | | |
| <212>PRT | | | | | |
| <213> 人工序列 | | | | | |
| <220> | | | | | |
| <223> 被改变的抗体 | | | | | |
| <400>32 | | | | | |
| Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys | | | | | |
| 1 | 5 | | 10 | | 15 |
| Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr | | | | | |
| | 20 | | 25 | | 30 |
| Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser | | | | | |
| | 35 | | 40 | | 45 |
| Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser | | | | | |
| | 50 | | 55 | | 60 |
| Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr | | | | | |
| 65 | | 70 | | 75 | 80 |
| Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys | | | | | |
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro | | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys | | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp | | | | | |
| 145 | | 150 | | 155 | 160 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu | | | | | |

165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210>33

<211>328

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 被改变的抗体

<400>33

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

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 85 | | 90 | | 95 |
| Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys | | | | | |
| | 100 | | 105 | | 110 |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro | | | | | |
| | 115 | | 120 | | 125 |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys | | | | | |
| | 130 | | 135 | | 140 |
| Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp | | | | | |
| 145 | | 150 | | 155 | 160 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu | | | | | |
| | 165 | | 170 | | 175 |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu | | | | | |
| | 180 | | 185 | | 190 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn | | | | | |
| | 195 | | 200 | | 205 |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly | | | | | |
| | 210 | | 215 | | 220 |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | 240 |
| Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr | | | | | |
| | 245 | | 250 | | 255 |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn | | | | | |
| | 260 | | 265 | | 270 |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe | | | | | |
| | 275 | | 280 | | 285 |
| Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn | | | | | |
| | 290 | | 295 | | 300 |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | | | | | |
| 305 | | 310 | | 315 | 320 |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro | | | | | |
| | 325 | | | | |

<210>34

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 被改变的抗体

<400>34

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

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr | | | |
| | 20 | 25 | 30 |
| Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile | | | |
| | 35 | 40 | 45 |
| Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe | | | |
| | 50 | 55 | 60 |
| Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210>35

<211>443

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 被改变的抗体

<400>35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

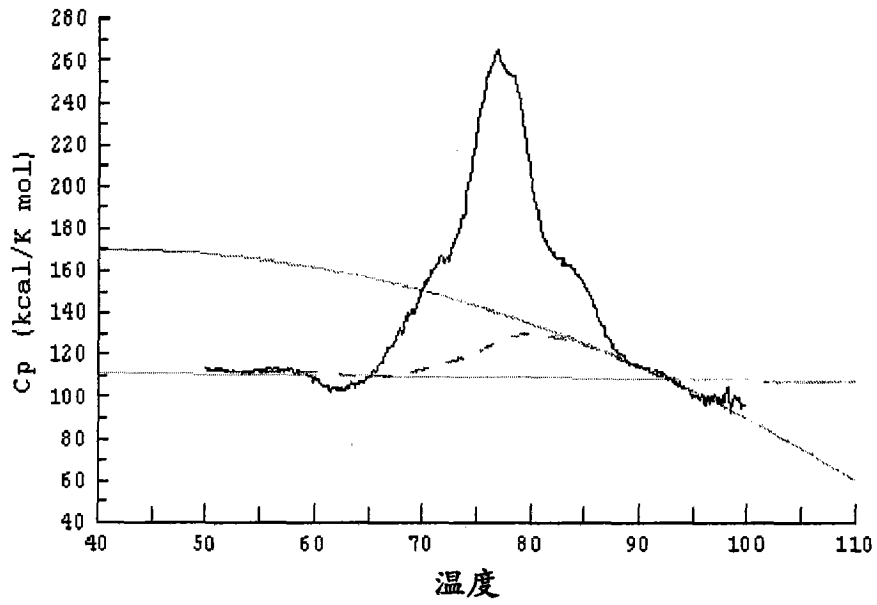


图 1

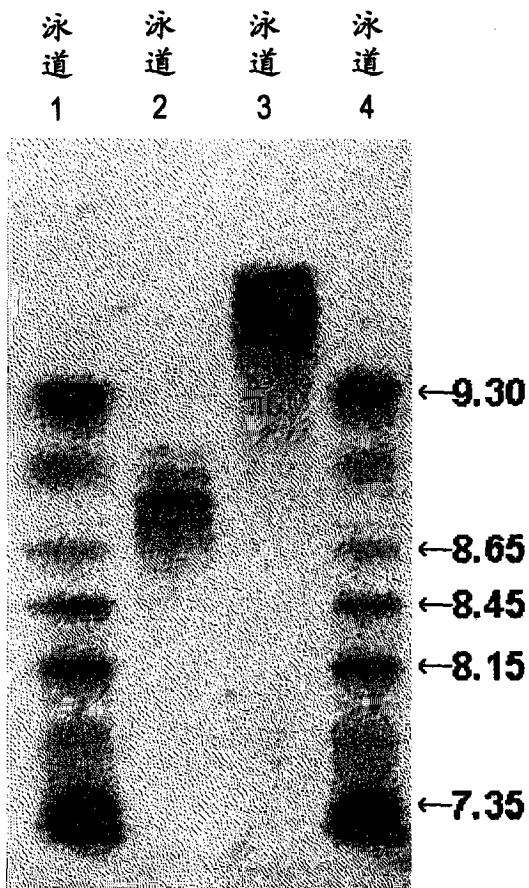


图 2

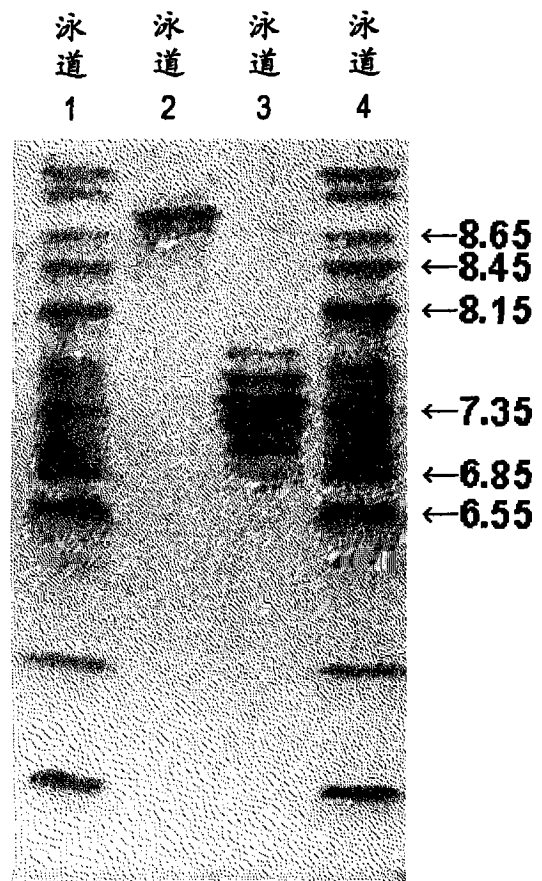


图 3

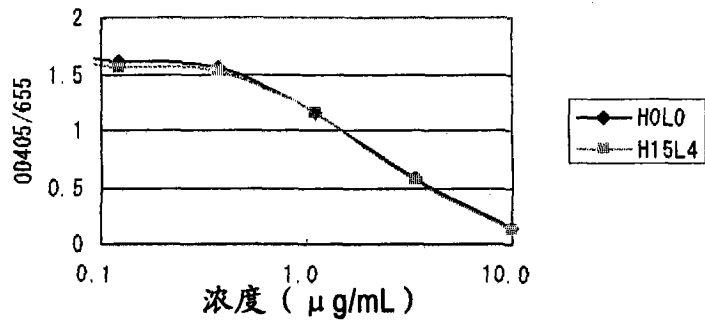


图 4

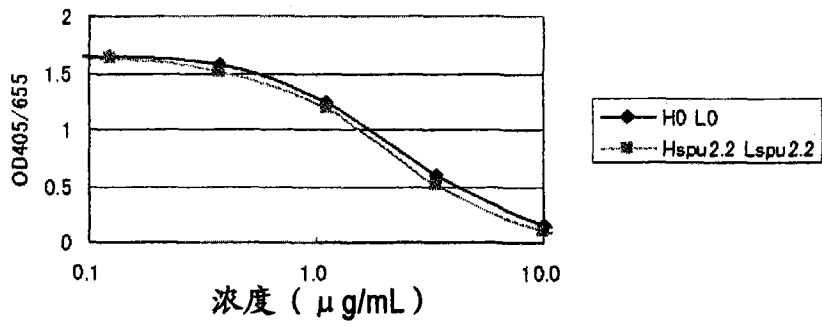


图 5

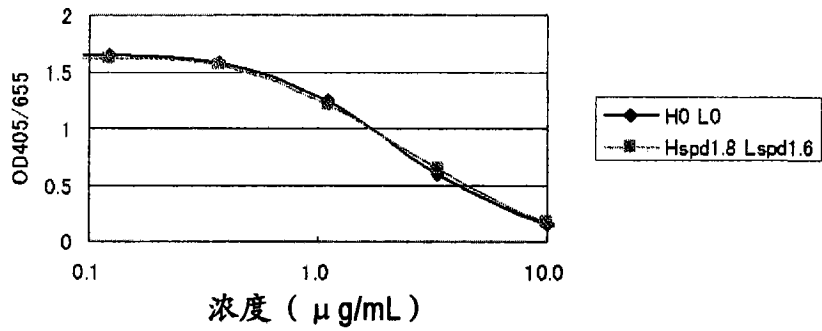
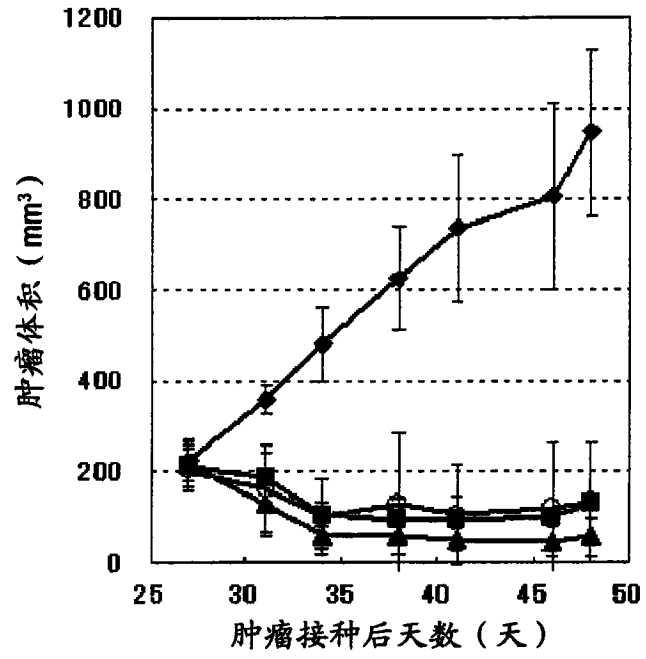


图 6

A



B

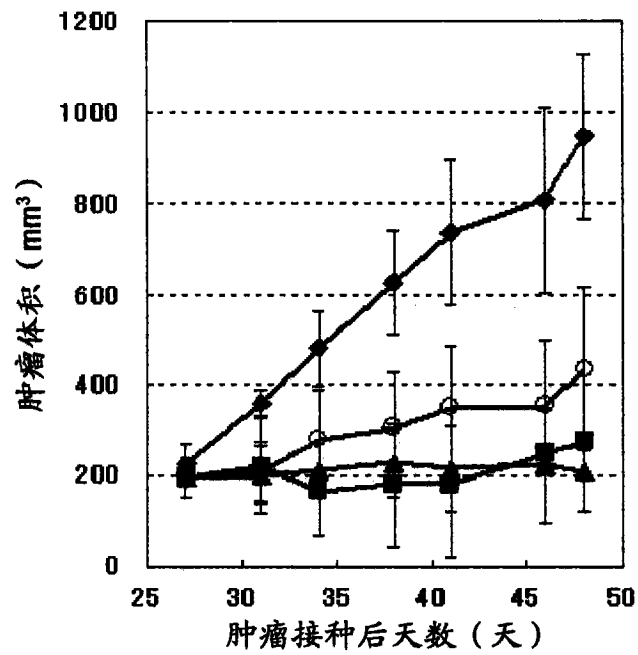


图 7

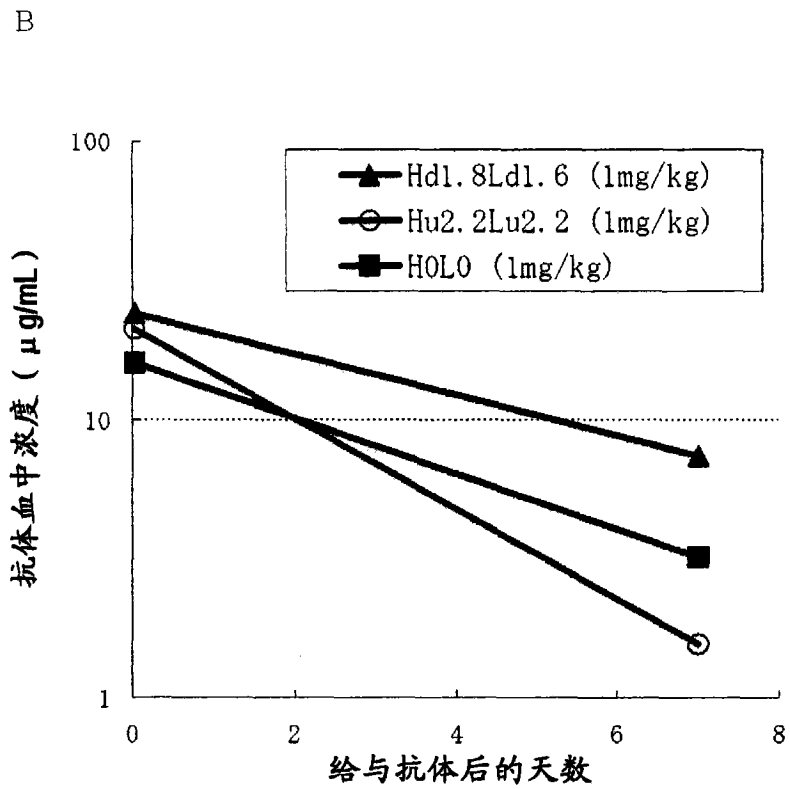
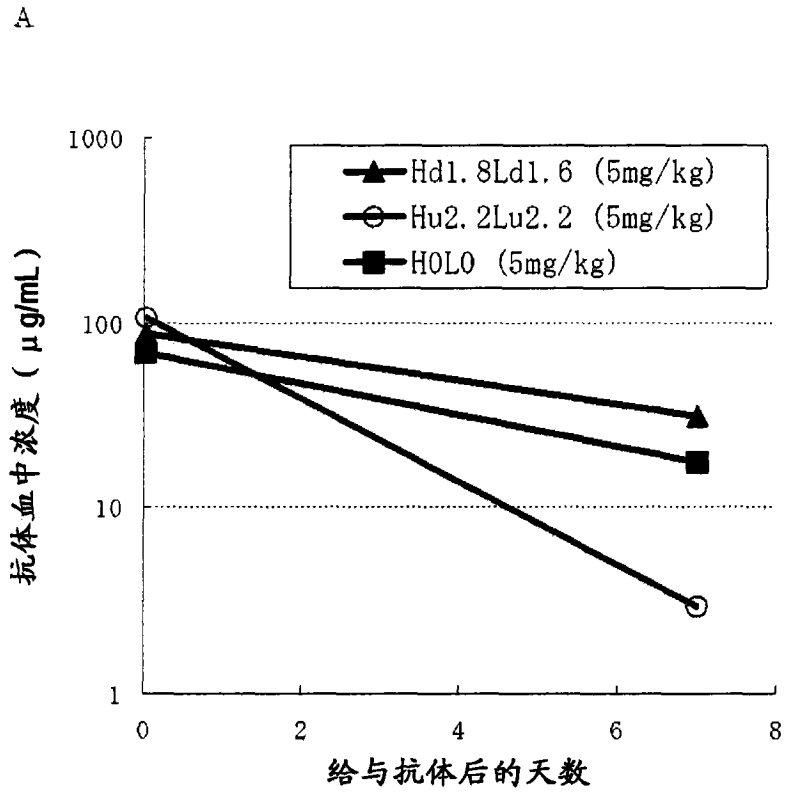


图 8

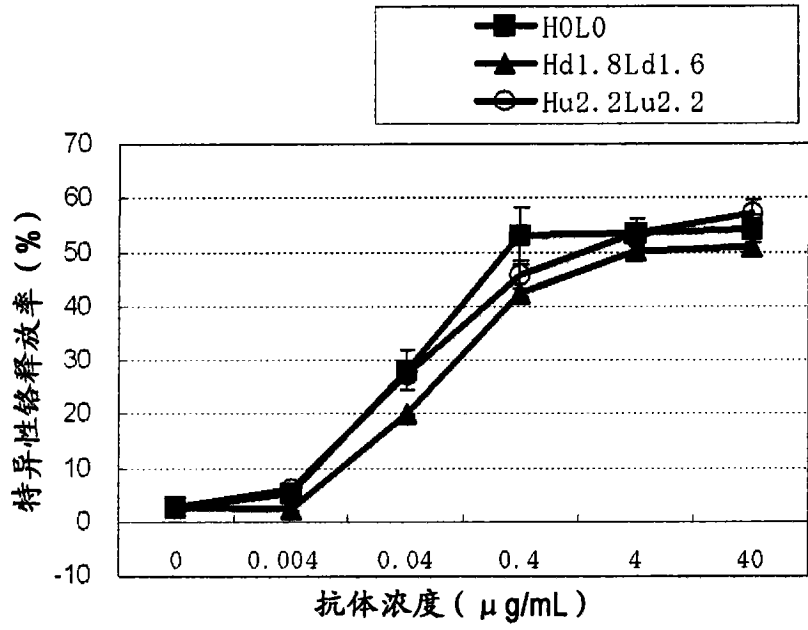


图 9

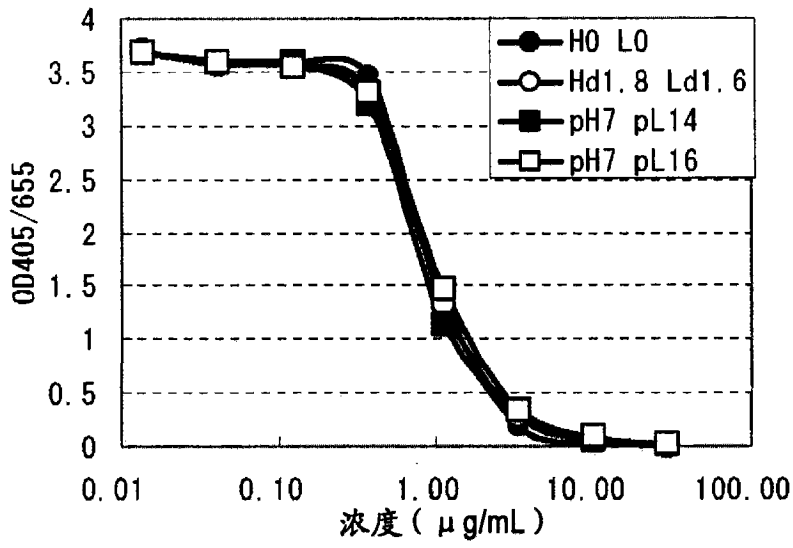


图 10

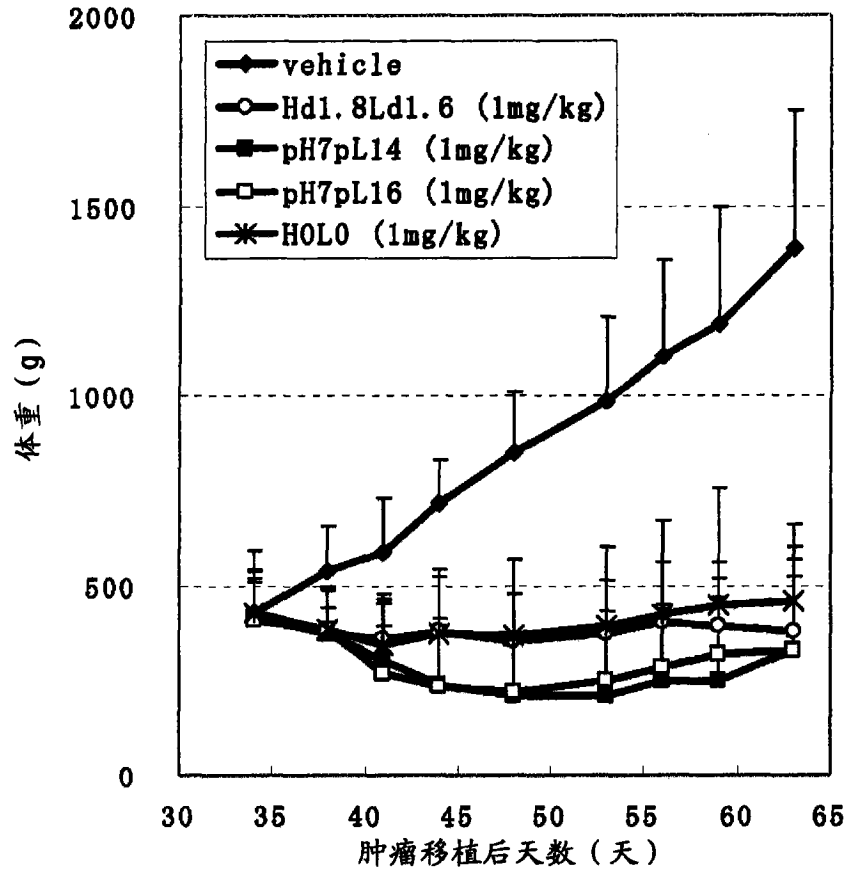


图 11

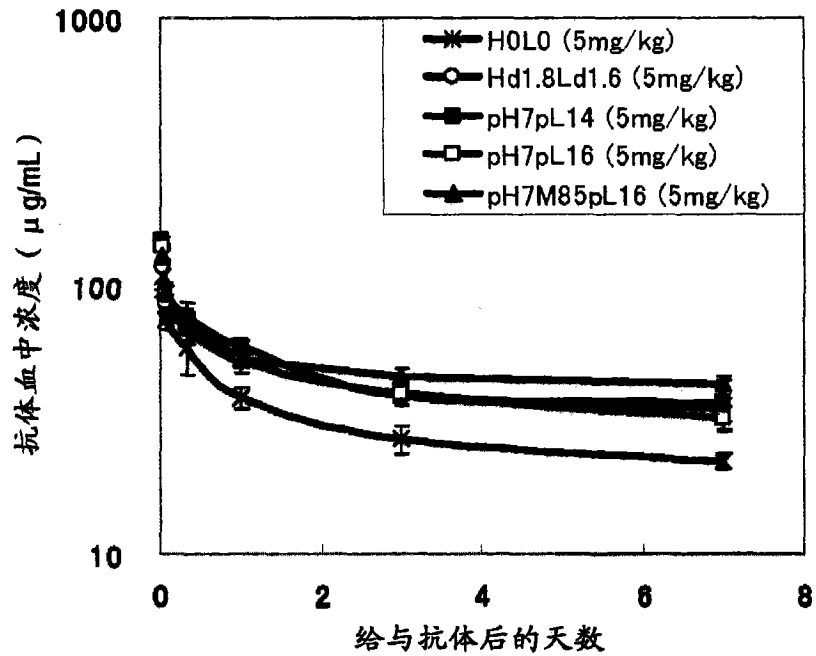


图 12

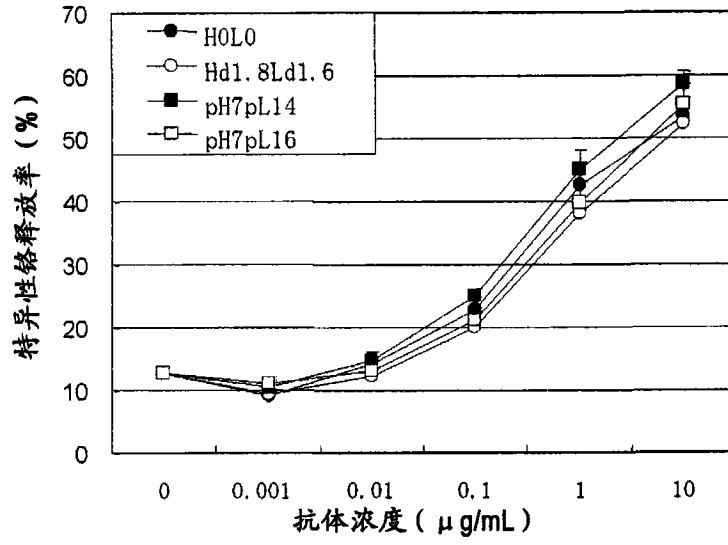


图 13

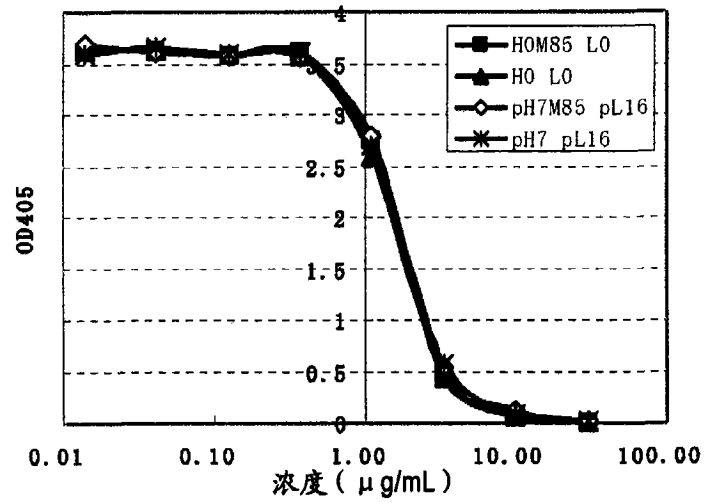


图 14

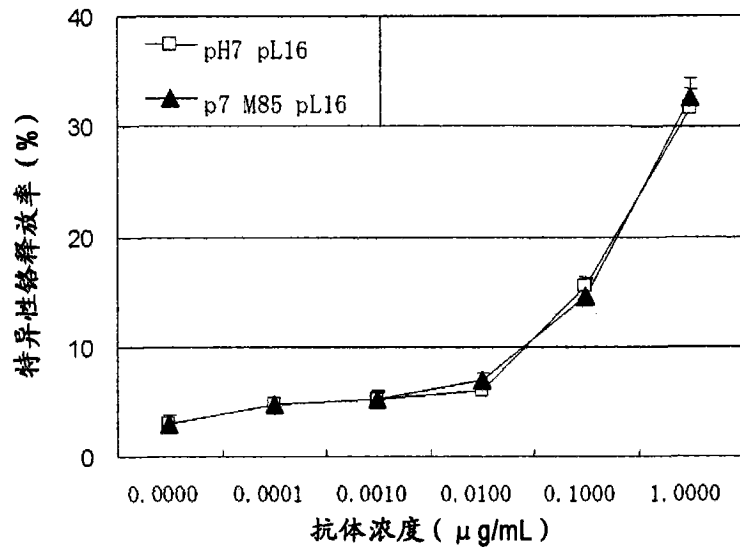


图 15