



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101134779 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 13

(21) 申请号 200710085290. 4

*A61P 35/00* (2006. 01)

(22) 申请日 2003. 05. 02

*G01N 33/53* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*C12Q 1/68* (2006. 01)

0210121. 0 2002. 05. 02 GB

(56) 对比文件

(62) 分案原申请数据

CN 1351259 A, 2002. 05. 29,

03815043. 3 2003. 05. 02

审查员 吴永庆

(73) 专利权人 UCB 制药公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 A · G · 波普勒维尔 S · P · 蒂克尔

H · M · 拉迪曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 梁谋

(51) Int. Cl.

*C07K 16/28* (2006. 01)

*C12N 15/13* (2006. 01)

*C12N 15/85* (2006. 01)

*C12N 5/10* (2006. 01)

*A61K 39/395* (2006. 01)

*A61K 31/7088* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图 19 页

(54) 发明名称

人 CD22 特异性抗体及其治疗和诊断应用

(57) 摘要

本发明公开了含有至少一个 CDR 的抗体分子, 所述 CDR 源自对人 CD22 具有特异性的小鼠单克隆抗体。本发明也公开了一种其中所述 CDR 中至少一个为修饰 CDR 的 CDR 移植抗体。本发明还公开了编码所述抗体分子的链的 DNA 序列、载体、转化宿主细胞以及所述抗体分子在治疗由表达 CD22 的细胞介导的疾病中的用途。

1. 一种对人 CD22 具有特异性的抗体分子,所述抗体分子包含其中可变区包含 CDR 的重链,所述 CDR 具有如下序列:CDR-H1 的 SEQ ID NO:1;CDR-H2 的图 6 的 gH7 的残基 50-66,以及 CDR-H3 的 SEQ ID NO:3;以及包含其中可变区包含 CDR 的轻链,所述 CDR 具有如下序列:CDR-L1 的 SEQ ID NO:4、CDR-L2 的 SEQ ID NO:5,以及 CDR-L3 的 SEQ ID NO:6。

2. 权利要求 1 的抗体分子,所述抗体分子是 CDR 移植抗体分子。

3. 权利要求 2 的抗体分子,其中所述可变区包含人受体构架区和非人类供体 CDR。

4. 权利要求 3 的抗体分子,其中所述重链可变区的人受体构架区基于 SEQ ID NO:21 和 22,并且在根据 Kabat 编号的位置 1、28、48、71 和 93 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:8 中位置 1、28、48、72 和 97 的残基。

5. 权利要求 4 的抗体分子,所述抗体分子还在根据 Kabat 编号的位置 67 和 69 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:8 中位置 68 和 70 的残基。

6. 权利要求 3-5 中任一项的抗体分子,其中所述轻链可变区的人受体构架区基于 SEQ ID NO:17 和 18,并且在根据 Kabat 编号的位置 2、4、37、38、45 和 60 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:7 中位置 2、4、42、43、50 和 65 的残基。

7. 权利要求 6 的抗体分子,所述抗体分子还在根据 Kabat 编号的位置 3 包含供体残基,所述供体残基是 SEQ ID NO:7 中该位置的残基。

8. 权利要求 3 的抗体分子,其中所述重链可变区的人受体构架区基于 SEQ ID NO:21 和 22,并且在根据 Kabat 编号的位置 1、28、48、71 和 93 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:8 中位置 1、28、48、72 和 97 的残基;所述轻链可变区的人受体构架区基于 SEQ ID NO:17 和 18,并且在根据 Kabat 编号的位置 2、4、37、38、45 和 60 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:7 中位置 2、4、42、43、50 和 65 的残基。

9. 权利要求 3 的抗体分子,其中所述重链可变区的人受体构架区基于 SEQ ID NO:21 和 22,并且在根据 Kabat 编号的位置 1、28、48、71、93、67 和 69 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:8 中位置 1、28、48、72、97、68 和 70 的残基;所述轻链可变区的人受体构架区基于 SEQ ID NO:17 和 18,并且在根据 Kabat 编号的位置 2、4、37、38、45 和 60 包含供体残基,所述供体残基分别是 SEQ ID NO:7 中位置 2、4、42、43、50 和 65 的残基;

所述抗体分子还在根据 Kabat 编号的位置 3 包含供体残基,所述供体残基是 SEQ ID NO:7 中该位置的残基。

10. 一种对人 CD22 具有特异性的抗体分子,所述抗体分子具有包含 SEQ ID NO:28 中位置 21 至 239 的残基的轻链,以及包含 SEQ ID NO:30 中位置 20 至 466 的残基的重链。

11. 权利要求 10 的抗体分子,所述抗体分子具有由 SEQ ID NO:28 中位置 21 至 239 的残基组成的轻链,以及由 SEQ ID NO:30 中位置 20 至 466 的残基组成的重链。

12. 一种对人 CD22 具有特异性的抗体分子,所述抗体分子具有包含 SEQ ID NO:28 中位置 21 至 239 的残基的轻链,以及包含 SEQ ID NO:30 中位置 20 至 467 的残基的重链。

13. 权利要求 12 的抗体分子,所述抗体分子具有由 SEQ ID NO:28 中位置 21 至 239 的残基组成的轻链,以及由 SEQ ID NO:30 中位置 20 至 467 的残基组成的重链。

14. 一种对人 CD22 具有特异性的抗体分子,所述抗体分子具有包含在哺乳动物细胞中表达 SEQ ID NO:29 所得的氨基酸序列的轻链,以及包含在哺乳动物细胞中表达 SEQ ID NO:31 所得的氨基酸序列的重链。

15. 权利要求 14 的抗体分子,所述抗体分子具有由在哺乳动物细胞中表达 SEQ ID NO : 29 所得的氨基酸序列组成的轻链,以及由表达 SEQ ID NO :31 所得的氨基酸序列组成的重链。

16. 一种 DNA 序列,所述 DNA 序列编码权利要求 1-15 中任一项的抗体分子的重链和 / 或轻链。

17. 一种克隆载体或表达载体,所述载体包含权利要求 16 的 DNA 序列。

18. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含权利要求 17 的克隆载体或表达载体。

19. 权利要求 1-15 中任一项的对人 CD22 具有特异性的抗体分子或权利要求 16 的 DNA 序列在制备用于治疗由表达 CD22 的细胞介导的疾病的药物中的用途。

20. 权利要求 19 的用途,其中所述疾病是恶性淋巴瘤。

21. 权利要求 20 的用途,其中所述恶性淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤。

22. 一种治疗或诊断组合物,所述组合物包含权利要求 1-15 中任一项的抗体分子或权利要求 16 的 DNA 序列。

23. 权利要求 22 的治疗或诊断组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

24. 权利要求 22 或权利要求 23 的治疗或诊断组合物,所述组合物还包含抗 T 细胞、抗 IFN  $\gamma$  或抗 LPS 抗体或者非抗体成分。

25. 一种制备权利要求 1-15 中任一项的抗体分子的方法,所述方法包括:在适合导致由编码所述抗体分子的 DNA 表达蛋白质的条件下,培养权利要求 18 的宿主细胞,然后分离所述抗体分子。

26. 一种制备权利要求 22-24 中任一项的治疗或诊断组合物的方法,所述方法包括将权利要求 1-15 任一项的抗体分子与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体混合在一起。

## 人 CD22 特异性抗体及其治疗和诊断应用

[0001] 本申请是专利申请号为 03815043.3、国际申请日为 2003 年 5 月 2 日（国际申请号为 PCT/GB2003/001934）、发明名称为“人 CD22 特异性抗体及其治疗和诊断应用”的发明专利申请的分案申请。

### [0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及一种对 B 淋巴细胞抗原（CD22）的抗原决定簇具有特异性的抗体分子。本发明也涉及所述抗体分子的治疗用途和制备所述抗体分子的方法。

### 背景技术

[0004] 在天然抗体分子中，有两条重链和两条轻链。每条重链和每条轻链在其 N- 末端有一个可变区。每个可变区由 4 个构架区（FR）和交互的 3 个互补性决定区（CDR）组成。通常可变区的残基按照 Kabat 等发明的系统编号。该系统是美国健康与人类服务部 NIH USA 的 Kabat 等于 1987 年在“Sequence of Proteins of Immunological Interest”中提出（在下文简称为“Kabat 等（参见上文）”）。除非另有说明，否则在本说明书中使用该编号系统。

[0005] Kabat 残基命名经常与氨基酸残基的线性编号不一致。无论是构架区还是 CDR，实际的线性氨基酸序列可能比严格的 Kabat 编号含有较少或额外的氨基酸，这些较少或额外的氨基酸对应于基本可变区结构中截短的或插入的结构组分。对于给定的抗体，通过与具有“标准”Kabat 编号序列的抗体序列中的同源残基比对，可确定残基的正确 Kabat 编号。

[0006] 根据 Kabat 编号，重链可变区的 CDR 位于残基 31-35（CDR-H1）、残基 50-65（CDR-H2）和残基 95-102（CDR-H3）中。

[0007] 根据 Kabat 编号，轻链可变区的 CDR 位于残基 24-34（CDR-L1）、残基 50-56（CDR-L2）和残基 89-97（CDR-L3）中。

[0008] 欧洲专利申请 EP-A-0239400 描述了 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody）的构建，该申请公开了一种其中使用长的寡核苷酸通过定点诱变将小鼠单克隆抗体的 CDR 移植到人免疫球蛋白可变区的构架区的方法。CDR 决定抗体的抗原结合特异性并且是可变区的构架区上携带的相对短的肽序列。

[0009] 最早有关通过 CDR 移植的人源化（humanising）单克隆抗体的工作，是在识别合成抗原例如 NP 的单克隆抗体上进行。然而，Verhoeyen 等（Science, 239, 1534-1536, 1988）和 Riechmann 等（Nature, 332, 323-324, 1988）分别描述了其中通过 CDR 移植使识别溶菌酶的小鼠单克隆抗体和识别人 T 细胞上的抗原的大鼠单克隆抗体人源化的实例。

[0010] Riechmann 等发现在 CDR 移植物中，单独 CDR 的转移（如 Kabat 等定义（Kabat 等（参见上文）和 Wu 等，J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970））不足以提供令人满意的抗原结合活性。已发现许多构架残基必须改变以便使它们与供体构架区的那些残基相对应。国际专利申请号 W090/07861 描述了用于选择需要改变的构架残基的建议标准。

[0011] 已公开了许多讨论 CDR 移植抗体的综述，包括 Vaughan 等（Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998）。

[0012] 恶性淋巴瘤是一类变化较多的肿瘤。大多数情况发生在老年人中。目前在美国有 200,000 位至 250,000 位患者患有非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkins Lymphoma) (NHL)。在美国该病是增长第二快的癌症,以每年新增约 55,000 例的速度增加。该病的发生率增长已不能简单地通过老龄人口增长和暴露在已知危险因素中来解释。

[0013] 淋巴瘤的分类比较复杂,近十年已有进展。在 1994 年采用了修订的欧洲-美国淋巴瘤 (REAL) 分类法。该分类法将 B 细胞淋巴瘤 (最常认定的)、T 细胞淋巴瘤和不能分类的原发性淋巴瘤归入公认的亚型。在平常的实践中,依据它们的一般组织学外观而将 NHL 分为低度、中度和高度的分类法充分反映了它们的临床特征。

[0014] NHL 主要影响淋巴结,但在个别患者中,肿瘤可累及其它解剖学部位,例如肝、脾、骨髓、肺、肠和皮肤。该疾病通常表现为无痛的淋巴结肿大。结外淋巴瘤 (extranodal lymphoma) 最常见影响肠,尽管实际上每种器官的原发性淋巴瘤已有记载。全身症状包括发热、盗汗、乏力和体重减轻。

[0015] 直到最近,完全根据疾病解剖学范围的 Ann Arbor 分类系统成为 NHL 治疗的主要决定因素。通过结合另外的预后指征,包括年龄、血清乳酸脱氢酶水平和表现情况,可提炼这些信息。即便如此,Ann Arbor 分类系统的知识与肿瘤的组织学和免疫学亚型一起仍然是治疗的主要决定因素。

[0016] 低度 NHL 具有无痛的病程,患者平均存活 8-10 年。目前可采用的治疗对存活几乎没有影响,尽管局部疾病的放疗和全身症状的化疗改善了患者的生活质量。组合化疗可预备用于复发的疾病。中度疾病和尤其高度疾病非常具有攻击性并易于扩散。该级别的疾病需要紧急治疗。在患有非常严重疾病的患者中,放射治疗可为治疗的有效组成。已采用许多不同的化疗方案,并且可在超过一半的患者中获得长期无病的幸存者。对于患有复发性或顽固性疾病的患者,最初采用干细胞支持的大剂量治疗,但是现在在一线治疗中逐渐发现一个空间用于患有低危险性疾病的患者。在近年,采用渐趋攻击性治疗方法的趋势,必须平衡许多 NHL 患者中一般老年患者和相对体弱的患者,并且需要使治疗毒性与每位患者疾病的个体预后相配。

[0017] 需要更有效并且更易耐受的改进的治疗。最新采用的药物包括逐渐加至组合中的新细胞毒性药物,并采用基于抗体的治疗。

[0018] 非霍奇金淋巴瘤包括各种各样的 B 细胞淋巴瘤。因此,B 细胞抗原是抗体治疗的合适靶。

[0019] CD22 为 135kDa 膜糖蛋白,并且属于称为唾液酸粘附素的唾液酸结合蛋白家族。其在 B 细胞发育早期的细胞质中检测到,与 IgD 同时出现在细胞表面,并且存在于大多数成熟 B 细胞上。表达随 B 细胞活化而增加。CD22 随终末分化而丧失,一般报道在浆细胞上并不存在。因此,该内化抗原存在于前 B 细胞和成熟 B 细胞的表面,而在干细胞或浆细胞上不存在。

[0020] 在人类中存在两种 CD22 同种型。其主要形式 (CD22  $\beta$ ) 在胞外区含有 7 个免疫球蛋白样 (Ig 样) 结构域。CD22  $\alpha$  变异体缺乏 Ig 样结构域 4 并可具有截短的胞质结构域。已表明阻断 CD22 粘着至单核细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和红细胞上的抗体在第 1 或第 2 Ig 样结构域内结合。

[0021] 一旦连接 B 细胞抗原受体并与 L $\gamma$ k、Syk 和磷脂酰肌醇 3-激酶缔合,CD22 的胞质

结构域则酪氨酸被磷酸化。CD22 的功能是负调节 B 细胞活化的阈值。它通过与带有适当唾液酸糖缀合物 (sialoglycoconjugates) 的细胞相互作用也可介导细胞粘着。

[0022] CD22 在包括 NHL、急性成淋巴细胞性白血病 (B-ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (B-CLL) 和尤其是急性非淋巴细胞性白血病 (ANLL) 在内的大多数 B 细胞白血病和淋巴瘤中表达。

[0023] 现有技术已描述了抗 CD22 的单克隆抗体。WO 98/41641 描述了在  $V_H44$  和  $V_L100$  上具有半胱氨酸残基的重组抗 CD22 抗体。WO96/04925 描述了抗 CD22 抗体 LL2 的  $V_H$  区和  $V_L$  区。US5686072 描述了抗 CD22 和抗 CD19 免疫毒素的组合。WO 98/42378 描述了裸抗 CD22 抗体在治疗 B 细胞恶性肿瘤中的用途。

[0024] 最近,许多基于抗体的疗法或者被许可,例如 Rituxan(一种未标记的 CD20 特异性嵌合人  $\gamma 1(+m \gamma 1V$  区)),或者对该疾病正在进行临床试验。对临床医师和患者来说,这些依赖或者补体介导或者 ADCC 介导的 B 细胞的杀伤或放射性核素(例如  $^{131}I$  或  $^{90}Y$ ) 的使用,已涉及到制备和使用的难题。需要治疗 NHL 并且能反复使用并可容易而有效制备的抗体分子。也需要对 CD22 有高亲和力而对人体有低免疫原性的抗体分子。

## 发明内容

[0025] 第一方面,本发明提供一种对人 CD22 具有特异性的抗体分子,所述抗体分子包含其中可变区包含 CDR(如 Kabat 等定义(参见上文))的重链,所述 CDR 具有如下给出的序列:对于 CDR-H1 在图 1 中的 H1(SEQ ID NO:1);对于 CDR-H2 在图 1 中的 H2(SEQ ID NO:2),或已去除潜在糖基化位点的 H2,或其中位置 60(根据 Kabat 编号系统)的赖氨酸残基已被其它氨基酸取代的 H2,或其中已去除糖基化位点和位置 60 的活性赖氨酸的 H2;或对于 CDR-H3 在图 1 中的 H3(SEQ ID NO:3)。

[0026] 本发明第一方面的抗体分子包含至少一个选自重链可变区的 H1、H2 和 H3(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3)的 CDR。优选所述抗体分子在重链可变区包含至少两个且更优选所有这三个 CDR。

[0027] 本发明的第二方面,提供一种对人 CD22 具有特异性的抗体分子,所述抗体分子包含其中可变区包含 CDR(如 Kabat 等定义(参见上文))的轻链,所述 CDR 具有如下给出的序列:对于 CDR-L1 在图 1 中的 L1(SEQ ID NO:4)、对于 CDR-L2 在图 1 中的 L2(SEQ ID NO:5)或对于 CDR-L3 在图 1 中的 L3(SEQ ID NO:6)。

[0028] 本发明第二方面的抗体分子包含至少一个选自轻链可变区的 L1、L2 和 L3(SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6)的 CDR。优选所述抗体分子在轻链可变区包含至少两个且更优选所有这三个 CDR。

[0029] 优选本发明的第一和第二方面的抗体分子分别具有互补轻链或互补重链。

[0030] 优选本发明的第一或第二方面的抗体分子包含其中可变区包含 CDR(如 Kabat 等定义(参见上文))的重链,所述 CDR 具有如下给出的序列:对于 CDR-H1 在图 1 中的 H1(SEQ ID NO:1),对于 CDR-H2 在图 1 中的 H2(SEQ ID NO:2)、或已去除潜在糖基化位点的 H2、或其中位置 60(根据 Kabat 编号系统)的赖氨酸残基已被其它氨基酸取代的 H2、或其中已去除糖基化位点和位置 60 的活性赖氨酸的 H2,或对于 CDR-H3 在图 1 中的 H3(SEQ ID NO:3);和其中可变区包含 CDR(如 Kabat 等定义(参见上文))的轻链,所述 CDR 具有如下给出的

序列:对于 CDR-L1 在图 1 中的 L1(SEQ ID NO:4)、对于 CDR-L2 在图 1 中的 L2(SEQ ID NO:5) 或对于 CDR-L3 在图 1 中的 L3(SEQ ID NO:6)。

[0031] 上述 SEQ ID NO:1-6 和图 1 中给出的 CDR 源自小鼠单克隆抗体 5/44。

[0032] 小鼠 5/44 抗体可变区的全序列示于图 2(轻链)(SEQ ID NO:7) 和图 3(重链)(SEQ ID NO:8)。该小鼠抗体在下面也被称为“供体抗体”或“鼠单克隆抗体”。

[0033] 本发明的第一或第二方面的第一个可供选择的优选实施方案为具有分别如图 2(SEQ ID NO:7) 和图 3(SEQ ID NO:8) 所示的轻链可变区序列和重链可变区序列的小鼠单克隆抗体 5/44。5/44 的轻链恒定区为 K, 而重链恒定区为 IgG1。

[0034] 在第二个可供选择的优选实施方案中, 根据本发明第一和第二方面中任一方面的抗体为嵌合小鼠/人抗体分子, 在本文称为嵌合 5/44 抗体分子。该嵌合抗体分子包含小鼠单克隆抗体 5/44 的可变区(SEQ ID NO:7 和 8) 和人恒定区。优选嵌合 5/44 抗体分子在轻链中包含人 C $\kappa$  结构域(Hieter 等, Cell, 22, 197-207, 1980; Genbank 登记号 J00241) 并且在重链中包含人  $\gamma$ 4 结构域(Flanagan 等, Nature, 300, 709-713, 1982), 任选位置 241 的丝氨酸残基被脯氨酸残基取代。

[0035] 优选本发明的抗体包含其中可变区包含作为 CDR-H2(如 Kabat 等定义(参见上文))的 H2' 的重链, 其中已去除潜在的糖基化位点序列并且意想不到地提高了嵌合 5/44 抗体对 CD22 抗原的亲和力, 并且优选其作为 CDR-H2 具有如 H2'(SEQ ID NO:13) 给出的序列。

[0036] 另外, 本发明的抗体可包含其中可变区包含作为 CDR-H2(如 Kabat 等定义(参见上文))的 H2'' 的重链, 其中位置 60 的赖氨酸残基被导致保守取代的其它氨基酸取代, 所述赖氨酸残基在 CDR-H2 中处于暴露的位置并被认为是有可能与缀合剂(conjugation agents) 反应导致抗原的结合亲和力降低。优选 CDR-H2 具有如 H2''(SEQ ID NO:15) 给出的序列。

[0037] 另外, 本发明的抗体可包含其中可变区包含作为 CDR-H2(如 Kabat 等定义(参见上文))的 H2''' 的重链, 其中潜在的糖基化位点序列和位置 60 的赖氨酸残基被其它氨基酸所取代。优选 CDR-H2 具有如 H2'''(SEQ ID NO:16) 给出的序列。

[0038] 在第三个可供选择的优选实施方案中, 根据本发明第一和第二方面的任一方面的抗体为 CDR 移植抗体分子。本文所用的术语“CDR 移植抗体分子”是指其中重链和/或轻链含有一个或多个 CDR(如果需要, 可包括修饰 CDR) 的抗体分子, CDR 来自移植到受体抗体(例如人抗体)的重链和/或轻链可变区构架的供体抗体(例如鼠单克隆抗体)。

[0039] 优选该类 CDR 移植抗体具有包含人受体构架区以及一个或多个上述供体 CDR 的可变区。

[0040] 当移植 CDR 时, 可以使用任何合适的与 CDR 所来源的供体抗体类别/类型有关的受体可变区构架序列, 包括鼠构架区、灵长类构架区和人构架区。可用于本发明的人构架的实例有 KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY 和 POM(Kabat 等(参见上文))。例如 KOL 和 NEWM 可用于重链, REI 可用于轻链, EU、LAY 和 POM 既可用于重链也可用于轻链。或者, 可以使用人种系序列。优选的轻链的构架区为如图 5(SEQ ID NO:17) 所示的人种系亚型序列(DPK9+JK1)。优选的重链的构架区为如图 6(SEQ ID NO:21) 所示的人亚型序列(DP7+JH4)。

[0041] 在本发明的 CDR 移植抗体中, 优选作为受体供体使用具有与供体抗体的链同源的链的抗体。受体重链和轻链不必源自同一抗体, 并且如果需要可包含具有源自不同链的

构架区的混合链。

[0042] 另外,在本发明的 CDR 移植抗体中,构架区不必具有与受体抗体的那些序列完全相同的序列。例如,罕见残基可变为更经常出现的该受体链类别或类型的残基。或者,可改变在受体构架区所选的残基以便它们对应于在供体抗体的相同位置存在的残基或对应于在供体抗体的相同位置存在的残基的保守取代的残基。应最小限度的保持这些使供体抗体的亲和力恢复必需的改变。在 WO 91/09967 中提出可能需要改变在受体构架区选择残基的方案。

[0043] 优选在本发明的 CDR 移植抗体分子中,如果受体轻链具有人亚型 DPK9+JK1 序列(如图 5 所示)(SEQ ID NO:17(DPK9) 加 SEQ ID NO:18(JK1)),那么轻链的受体构架区在位置 2、4、37、38、45 和 60 包含供体残基并可另外在位置 3 包含供体残基(根据 Kabat 等(参见上文))。

[0044] 优选在本发明的 CDR 移植抗体分子中,如果受体重链具有人 DP7+JH4 序列(如图 6 所示)(SEQ ID NO:21(DPK7) 加 SEQ ID NO:22(JH4)),那么重链的受体构架区在位置 1、28、48、71 和 93 包含除一个或多个供体 CDR 外的供体残基,并可另外在位置 67 和 69 包含供体残基(根据 Kabat 等(参见上文))。

[0045] 供体残基是来自供体抗体的残基,即 CDR 最初来源的抗体。

[0046] 优选本发明的抗体包含其中可变区包含作为 CDR-H2(如 Kabat 等定义(参见上文))的 H2' 的重链,其中为提高嵌合 5/44 抗体对 CD22 抗原的亲和力而去除潜在的糖基化位点序列,并优选其作为 CDR-H2 具有如 H2'(SEQ ID NO:13)给出的序列。

[0047] 另外,本发明的抗体可包含其中可变区包含作为 CDR-H2(如 Kabat 等定义,(参见上文))的 H2'' 的重链,其中位置 60 的赖氨酸残基被其它氨基酸所取代,所述赖氨酸残基位于 CDR-H2 内暴露的位置并认为其有可能与缀合剂反应,从而导致抗原结合亲和力下降。优选 CDR-H2 具有如 H2''(SEQ ID NO:15)给出的序列。

[0048] 另外,本发明的抗体可包含其中可变区包含作为 CDR-H2(如 Kabat 等定义,(参见上文))的 H2''' 的重链,其中潜在的糖基化位点序列和位置 60 的赖氨酸残基被其它氨基酸所取代。优选 CDR-H2 具有如 H2'''(SEQ ID NO:16)给出的序列。

[0049] 本发明的抗体分子可包含:具有全长重链和轻链的完全抗体分子;其片段,例如 Fab、修饰的 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 或 Fv 片段;轻链或重链单体或二聚体;单链抗体,例如其中重链可变区和轻链可变区通过肽接头连接的单链 Fv。同样,重链可变区和轻链可变区可与其它抗体结构域适当组合。

[0050] 本发明的抗体分子可具有连接其上的效应分子或报道分子。例如,用于螯合其可具有通过共价桥连结构连接其上的重金属原子或毒素(例如蓖麻毒蛋白)的大环。或者,可采用重组 DNA 技术方法,制备其中完全免疫球蛋白分子的 Fc 片段(CH2 区、CH3 区和铰链区)、CH2 区和 CH3 区或 CH3 区已被功能性非免疫球蛋白(例如酶或毒素分子)置换或者通过肽键与其连接的抗体分子。

[0051] 本发明抗体分子的结合亲和力优选至少  $0.85 \times 10^{-10} \text{M}$ 、更优选至少  $0.75 \times 10^{-10} \text{M}$ 、最优选至少  $0.5 \times 10^{-10} \text{M}$ 。

[0052] 优选本发明的抗体分子包含轻链可变区 5/44-gL1(SEQ ID NO:19)和重链可变区 5/44-gM7(SEQ ID NO:27)。这些轻链可变区序列和重链可变区序列分别示于图 5 和图 6。



[0053] 本发明也涉及对 CD22 具有改进的亲和本发明抗体分子的变异体。这些变异体可通过包括以下的许多亲和力成熟方案获得:CDR 突变 (Yang 等, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995)、链改组 (Marks 等, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、大肠杆菌 (E. coli) 增变株的应用 (Low 等, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996)、DNA 改组 (Patten 等, Curr. Opin. Biotechnol, 8, 724-733, 1997)、噬菌体展示 (Thompson 等, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) 和性 PCR (Cramer 等, Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan 等 (参见上文) 讨论了这些亲和力成熟的方法。

[0054] 本发明也提供编码本发明抗体分子的重链和 / 或轻链的 DNA 序列。

[0055] 优选所述 DNA 序列编码本发明抗体分子的重链或轻链。

[0056] 本发明的 DNA 序列也可包含合成 DNA (例如通过化学方法制备的合成 DNA)、cDNA、基因组 DNA 或它们的任何组合。

[0057] 本发明也涉及包含一个或多个本发明 DNA 序列的克隆载体或表达载体。优选所述克隆载体或表达载体包含两种分别编码本发明抗体分子的轻链和重链的 DNA 序列。

[0058] 可以构建载体的常规方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员熟知的。在这一方面,可以参考“Current Protocol in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (编著), Wiley Interscience, 纽约以及 ColdSpring Harbor Publishing 出版的 Maniatis Manual。

[0059] 通过本领域技术人员熟知的方法,可获得编码本发明抗体分子的 DNA 序列。例如,根据确定的 DNA 序列或根据相应的氨基酸序列,可按需要合成编码部分或全部抗体重链和轻链的 DNA 序列。

[0060] 编码受体构架序列的 DNA 是本领域技术人员十分容易获得的并可根据它们的已知氨基酸序列容易地合成。

[0061] 可以用标准分子生物学技术来制备编码本发明抗体分子的 DNA 序列。采用寡核苷酸合成技术,可以完全或部分合成所需要的 DNA 序列。适当时,也可以使用定点诱变和聚合酶链式反应 (PCR) 技术。

[0062] 可以使用任何合适的宿主细胞 / 载体系统来表达编码本发明抗体分子的 DNA 序列。细菌 (例如大肠杆菌) 和其它微生物系统可部分用来表达 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段、尤其是 Fv 片段和单链抗体片段 (例如单链 Fv) 等抗体片段。真核宿主细胞 (例如哺乳动物宿主细胞) 表达系统可用于制备包括完全抗体分子在内的较大抗体分子。合适的哺乳动物宿主细胞包括 CHO 细胞、骨髓瘤细胞或杂交瘤细胞。

[0063] 本发明也提供一种制备本发明抗体分子的方法,所述方法包括:在适合导致由编码本发明抗体分子的 DNA 表达蛋白质的条件下,培养含有本发明载体的宿主细胞,然后分离所述抗体分子。

[0064] 所述抗体分子可以仅包含重链多肽或轻链多肽,在这种情况下,只需用重链多肽或轻链多肽编码序列转染宿主细胞。为制备既包含重链又包含轻链的产物,可以用两种载体转染细胞系,第一种载体编码轻链多肽,而第二种载体编码重链多肽。或者,可以使用一种载体,该载体包括编码轻链多肽和重链多肽的序列。

[0065] 本发明也提供一种治疗或诊断组合物,所述组合物包含本发明的抗体分子以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0066] 本发明也提供一种制备治疗或诊断组合物的方法,所述方法包括将本发明的抗体

分子与药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体混合在一起。

[0067] 在所述治疗或诊断组合中,所述抗体分子可以是唯一的活性成分,或者可以同时包含其它活性成分,包括其它抗体成分(例如抗 T 细胞、抗 IFN  $\gamma$  或抗 LPS 抗体)或者非抗体成分(例如黄嘌呤)。

[0068] 优选所述药用组合物包含治疗有效量的本发明的抗体。本文所用的术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防目标疾病或病症或者表现出可检测的治疗或预防效果需要的治疗药物的量。就任何抗体而言,开始在细胞培养测定或在动物模型(通常用啮齿动物、兔、狗、猪或灵长类动物)阶段可估算出治疗有效剂量。也可以使用动物模型确定合适的浓度范围和给药途径。然后可利用这些资料确定用于人的有效剂量和给药途径。

[0069] 用于人患者的准确的有效量将取决于疾病状态的严重程度、患者的一般健康情况、年龄、体重和性别、饮食、给药时间和频率、联合用药、反应灵敏度和耐受性/对治疗的反应。该有效量可通过常规实验方法确定并且在临床医师的判断范围之内。一般而言,有效剂量为 0.01mg/kg 至 50mg/kg,优选 0.1mg/kg 至 20mg/kg,更优选约 15mg/kg。

[0070] 组合物可单独给予患者或与其它药剂、药物或激素联合给药。

[0071] 本发明的抗体分子给予的剂量取决于待治疗病症的性质、恶性淋巴瘤或白血病的分级以及抗体分子是用于预防还是用于治疗现有的病症。

[0072] 给药频率将取决于抗体分子的半寿期及其作用持续时间。如果抗体分子的半寿期短(例如 2-10 小时),则可能需要每天给予 1 个或多个剂量。另一方面,如果抗体分子的半寿期长(例如 2-15 天),则可能只需要每天、每周、甚至每 1 或 2 个月给予 1 个剂量。

[0073] 药用组合物也可含有用于抗体给药的药学上可接受的载体。所述载体自身不应该诱导对接受组合物的个体有害的抗体产生并且不应该有毒。合适的载体可以为大的代谢慢的大分子,例如蛋白质、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物和失活的病毒颗粒。

[0074] 可以使用药学上可接受的盐,例如无机酸盐(如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐)或有机酸盐(如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐和苯甲酸盐)。

[0075] 治疗组合物中的药学上可接受的载体可另外含水、盐水、甘油和乙醇等液体。另外,在这些组合物中可以含有润湿剂、乳化剂或 pH 缓冲物质等辅料。这些载体能使药用组合物配制成供患者摄取的片剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、液体制剂、凝胶剂、糖浆剂、膏剂和混悬剂。

[0076] 优选的给药形式包括例如经注射或输注等适合肠胃外给药的形式,例如经快速浓注或连续输注。其中当产品用于注射或输注时,可采用混悬剂、溶液剂或在油性或水性介质中的乳剂形式并且可含配方剂,例如悬浮剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。或者,抗体分子可为临用前用合适的无菌液体重建的干品形式。

[0077] 一旦配成,本发明的组合物可直接给予患者。待治疗的患者可以为动物。然而,优选组合物适合给予人患者。

[0078] 可经以下的任何途径给予本发明的药用组合物,包括但不限于口、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、经皮(例如参见 W098/20734)、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、阴道内或直肠途径。也可以使用 Hypospray 给予本发明的药用组合物。这些治疗组合物一般可配制成为液体溶液剂或混悬剂的可注射形式。适用于液体溶媒中的溶液

剂或混悬剂的固体形式,也可在注射前配制。

[0079] 组合物的直接给药一般通过注射、皮下、腹膜内、静脉内或肌内、或给予组织细胞间隙来实现。也可将组合物给至损伤部位。给药治疗可为单剂量方案或多剂量方案。

[0080] 可理解为所述组合物中的活性成分为抗体分子。这样,它在胃肠道内容易降解。因此,如果组合物通过采用胃肠道的途径给药,该组合物将需要含有保护抗体免受降解的试剂,但是一旦被胃肠道吸收,它会释放抗体。

[0081] 在 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Company, N J, 1991) 中详细讨论了药学上可接受的载体。

[0082] 也设想可通过采用基因治疗来给予本发明的抗体。为实现这一点,将编码所述抗体分子的重链和轻链且处于合适的 DNA 组分控制之下的 DNA 序列引入患者体内,以便抗体链由所述 DNA 序列表达并且在原位装配。

[0083] 本发明也提供用于治疗由表达 CD22 的细胞介导的疾病的本发明抗体分子。

[0084] 本发明还提供本发明抗体分子在制备用于治疗由表达 CD22 的细胞介导的疾病的药物中的用途。

[0085] 本发明的抗体分子可用于其中需要降低表达存在于人或动物体内的 CD22 的细胞水平的任何疗法。这些表达 CD22 的细胞可在体内循环或以不必要的高水平集中位于体内特殊部位。例如,在 B 细胞淋巴瘤和白血病中,表达 CD22 的细胞水平升高。本发明的抗体分子可用于治疗由表达 CD22 的细胞介导的疾病。

[0086] 优选本发明的抗体分子用于恶性淋巴瘤和白血病、最优选用于治疗 NHL。

[0087] 本发明也提供一种治疗患有表达 CD22 的细胞介导的疾病或处于 这些疾病危险之中的人或动物患者的方法,所述方法包括将有效量的本发明的抗体分子给予所述患者。

[0088] 本发明的抗体分子也可用于诊断,例如用于涉及表达 CD22 的细胞的疾病状态的体内诊断和成像。

[0089] 附图说明

[0090] 仅通过以下实施例并参考以下的附图说明进一步描述本发明,其中:

[0091] 图 1 表示小鼠单克隆抗体 5/44 的 CDR 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:1-6);

[0092] 图 2 表示小鼠单克隆抗体 5/44 轻链可变区的全序列;

[0093] 图 3 表示小鼠单克隆抗体 5/44 重链可变区的全序列;

[0094] 图 4 表示 CDR-H2 中的糖基化位点和活性赖氨酸的去除策略:糖基化位点和活性赖氨酸的去除—使 cH 载体中的 CDR-H2 突变的 PCR 策略;

[0095] 图 5 表示 5/44 轻链序列的移植设计;

[0096] 图 6 表示 5/44 重链序列的移植设计;

[0097] 图 7 表示载体 pMRR14 和 pMRR10.1;

[0098] 图 8 表示嵌合 5/44 突变体的 Biacore 测定结果;

[0099] 图 9 表示用于 5/44g H1 和 gL1 基因装配的寡核苷酸;

[0100] 图 10 表示中间载体 pCR2.1(544gH1) 和 pCR2.1(544gL1);

[0101] 图 11 表示用于制备其它移植物的寡核苷酸盒;

[0102] 图 12 表示荧光标记的小鼠 5/44 抗体和移植变异体之间的竞争测定;和

[0103] 图 13 表示移植重链和移植轻链的全部 DNA 序列和蛋白质序列。

[0104] 具体实施方式

[0105] 实施例 1:各代候选抗体

[0106] 一系列的抗 CD22 抗体是采用以下的选择标准从杂交瘤中选出的:与 Daudi 细胞结合,在 Daudi 细胞上内化,与外周血单核细胞(PBMC)结合,在 PBMC 上内化,亲和力(大于  $10^{-9}$ M),小鼠  $\gamma$  1 和产率。5/44 是作为优选的抗体而被选出的。

[0107] 实施例 2:嵌合 5/44 抗体分子的基因克隆和表达

[0108] 5/44 杂交瘤细胞的制备及其 RNA 制备

[0109] 杂交瘤 5/44 是用 CD22 蛋白免疫小鼠后通过常规杂交瘤技术产生的。RNA 是采用 RNEasy 试剂盒(Qiagen, Crawley, UK;目录号 74106)从 5/44 杂交瘤细胞制备的。如下所述,将所获得的 RNA 逆转录成 cDNA。

[0110] CD22 在 NHL 肿瘤上的分布

[0111] 使用 5/44 抗 CD22 单克隆抗体进行免疫组织化学研究,来检查染色的发生率和分布。在该项研究中包括对照抗 CD20 抗体和抗 CD79a 抗体,以确定肿瘤的 B 细胞区。

[0112] 共研究了 50 个肿瘤,并且采用 Working Formulation 和 REAL 分类系统将这些肿瘤如下分类:

[0113] • 7 个 B 成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤(高/I)

[0114] • 4 个 B-CLL/小淋巴细胞性淋巴瘤(低/A)

[0115] • 3 个淋巴浆细胞样瘤(lymphoplasmacytoid)/免疫细胞瘤(低/A)

[0116] • 1 个外套细胞淋巴瘤(中/F)

[0117] • 14 个滤泡性中心细胞淋巴瘤(低至中/D)

[0118] • 13 个弥散性大细胞淋巴瘤(中至高/G,H)

[0119] • 6 个不能分类的淋巴瘤(K)

[0120] • 2 个 T 细胞淋巴瘤

[0121] 用  $0.1 \mu\text{g/ml}$  的 5/44 抗体,有 40 个 B 细胞淋巴瘤对 CD22 抗原呈阳性,并且当将浓度提高至  $0.5 \mu\text{g/ml}$  时,又有 6 个呈阳性。对于剩下的 2 个 B 细胞瘤来说,在  $0.1 \mu\text{g/ml}$  时呈阴性,剩余的组织不足以用较高浓度测试。然而,用另一种 Celltech 抗 CD22 抗体 6/13 进行的平行试验给出比 5/44 更强的染色,结果所有 48 个 B 细胞淋巴瘤对 CD22 的染色呈阳性。

[0122] 因此,可以推断 CD22 抗原在 B 细胞淋巴瘤上广泛表达并因此为 NHL 的免疫疗法提供了一个合适的靶。

[0123] 5/44V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 的 PCR 克隆

[0124] 使用逆转录酶合成编码 5/44 重链可变区和轻链可变区的 cDNA 序列,产生存在于总 RNA 中的 mRNA 的单链 cDNA 拷贝。然后采用特定的寡核苷酸引物,通过聚合酶链式反应(PCR),使用 cDNA 为模板用于扩增鼠 V 区序列。

[0125] a) cDNA 合成

[0126] 在含有以下试剂的  $20 \mu\text{l}$  反应体积中合成 cDNA:50mM Tris-HCl(pH8.3)、75mM KCl、10mM 二硫苏糖醇、3mM MgCl<sub>2</sub>、脱氧核糖核苷三磷酸各 0.5mM、20 单位 RNAsin、75ng 随机六核苷酸引物、 $2 \mu\text{g}$  5/44RNA 和 200 单位莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶。42℃保温 60 分钟后,通过 95℃加热 5 分钟终止该反应。

[0127] b)PCR

[0128] 使用对重链和轻链具有特异性的引物组合,将 cDNA 的等分样品进行 PCR。将设计成与信号肽的保守序列一起退火的简并引物库用作正向引物。所有这些序列都依次含有一个自其 5' 端 7 个核苷酸开始的限制位点 ( $V_L$  SfuI;  $V_H$  HindIII)、使所获得的 mRNA 最佳翻译的序列 GCCGCCACC (SEQ ID NO:50)、一个起始密码子和基于已知小鼠抗体的前导肽序列的 20-30 个核苷酸 (Kabat 等, Sequence of proteins of immunological interest, 第 5 版, 1991, U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health (美国健康与人类服务部, 公共健康服务, 国家健康协会))。

[0129] 将 3' 引物设计成跨越该抗体的构架 4J-C 接点并含有酶 BsiWI 的限制位点, 以使  $V_L$  PCR 片段的克隆容易进行。重链 3' 引物为设计成跨越该抗体 J-C 接点的混合物。该 3' 引物包括 ApaI 限制位点, 以使克隆容易进行。该引物的 3' 区含有基于在已知的小鼠抗体中发现的那些序列的混合序列 (Kabat 等, 1991, 参见上文)

[0130] 上述引物组合能使  $V_H$  和  $V_L$  的 PCR 产物直接克隆到合适的表达载体中 (参见下文), 从而制备嵌合 (小鼠-人) 重链和轻链, 并用于这些在哺乳动物细胞中表达的基因制备所需同种型的嵌合抗体。

[0131] 按以下方法进行用于 PCR 的保温 (100  $\mu$ l): 每份反应物含有 10mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5mM  $MgCl_2$ 、50mM KCl、0.01% w/v 明胶、脱氧核糖核苷三磷酸各 0.25mM、10pmole 5' 引物混合物、10pmole 3' 引物、1  $\mu$ l cDNA 和 1 单位 Taq 聚合酶。将反应物在 95°C 保温 5 分钟然后经过以下循环: 94°C 1 分钟、55°C 1 分钟和 72°C 1 分钟。30 个循环后, 通过琼脂糖凝胶电泳分析每份反应物的等分样品。

[0132] 对于重链 V 区来讲, 扩增的 DNA 产物只有当在构架 I 的起始位点内退火的引物库取代信号肽引物库时才能获得。将片段克隆到 DNA 测序载体中。测定 DNA 序列并翻译以给出推导出的氨基酸序列。该推导出的序列可通过参照通过实验确定的 N 端蛋白质序列来证实。图 2 和图 3 分别表示小鼠单克隆抗体 5/44 的成熟轻链 V 区和重链 V 区的 DNA/蛋白质序列。

[0133] c)PCR 片段的分子克隆

[0134] 然后将鼠 V 区序列克隆到表达载体 pMRR10.1 和 pMRR14 (图 7) 中。这些是用于分别含有编码人 K 轻链和人  $\gamma$ -4 重链恒定区的 DNA 的轻链和重链表达的载体。使用 SfuI 和 BsiWI 限制位点, 通过限制性消化并与测序载体连接, 将所述  $V_L$  区亚克隆到表达载体中, 产生质粒 pMRR10 (544cL)。使用 5' 引物通过 PCR 扩增重链 DNA 引入信号肽, 由于这在所述克隆策略—使用来自不同的近交 (in-house) 杂交瘤 (称为 162) 的小鼠重链抗体前导序列并没有获得。该 5' 引物具有以下的序列:

[0135] 5' GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGATTCTCTCTCGTGTTCTGGCACTCATTCTCAAGGG AGTGCAGTGTGAGGTGCAGCTCGTCGAGTCTGG<sup>3'</sup> (SEQ ID NO:51)。

[0136] 反向引物与用于最初的  $V_H$  基因克隆的引物相同。将所得 PCR 产物用酶 HindIII 和 ApaI 消化, 然后将其亚克隆, 并确证其 DNA 序列, 产生质粒 pMRR14 (544cH)。将这两种表达载体瞬时共转染到 CHO 细胞中, 产生嵌合 c5/44 抗体。按照生产商的方案 (InVitrogen:LifeTechnology, Groningen, The Netherlands. 目录号 11668-027), 使用 Lipofectamine 试剂, 完成这一步。

[0137] 糖基化位点和活性赖氨酸的去除

[0138] 在 CDR-H2 中观察到一个潜在的 N- 联糖基化位点序列, 该序列具有氨基酸序列 N-Y-T (图 3)。对 5/44 及其片段 (包括 Fab) 进行的 SDS-PAGE、蛋白质印迹法和凝胶糖染色法表明该位点的确糖基化 (未显示)。另外, 在 CDR-H2 内暴露的位置观察到赖氨酸残基, 其通过提供与可以缀合抗体的试剂缀合的额外位点, 有可能降低所述抗体的结合亲和力。

[0139] 一个 PCR 策略是用于在 CDR-H2 序列中引入氨基酸取代, 以去除糖基化位点和 / 或活性赖氨酸, 如图 4 所示。使用编码突变 N55Q、T57A 或 T57V 的正向引物来去除所述糖基化位点 (图 4), 并产生含有取代 K60R 的第 4 个正向引物, 以去除所述活性赖氨酸残基 (图 4)。在这些 PCR 扩增的每一个中都使用构架 4 反向引物。PCR 产物用酶 XbaI 和 ApaI 消化并插入到 pMRR14 (544ch) (也用 XbaI 和 ApaI 切割) 中, 产生编码这些突变体的表达质粒。N55Q、T57A 和 T57V 突变通过远离共有序列 N-X-T/S 处改变氨基酸序列可去除所述糖基化位点, 同时 K60R 突变导致潜在的活性赖氨酸被带同样正电荷的残基精氨酸取代。将所得 cH 变异质粒与 cL 质粒一起共转染, 产生已表达嵌合抗体变异体。

[0140] 嵌合基因活性的评价

[0141] 瞬时转染到 CHO 细胞后, 对所得嵌合基因的活性进行评价。

[0142] c) 通过 BiaCore 分析测定亲和力常数

[0143] 采用 BIA 技术, 对嵌合 5/44 或其变异体与 CD22-mFc 构建体结合的亲和力进行研究, 其中所述嵌合 5/44 或其变异体的糖基化位点或活性赖氨酸已被去除。结果示于图 8。所有结合测定都在 BIAcore™ 2000 仪器 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, 瑞典) 中进行。通过固定化抗小鼠 Fc 捕获 CD22mFc, 进行该项测定。该抗体存在于可溶相中。将样品、标准品和对照 (50  $\mu$ l) 注射到固定化抗小鼠 Fc 上, 然后注射到可溶相中的抗体上。每个循环之后, 所述表面用 50  $\mu$ l 的 40mM HCl 以 30  $\mu$ l/min 再生。运用 BIAevaluation 3.1 软件 (Pharmacia), 进行动力学分析。

[0144] 与嵌合 5/44 相比, 构建体 T57A 中糖基化位点的去除导致缔合速率 (on-rate) 稍微加快而解离速率 (off-rate) 显著减慢, 得到的亲和力改进约为 5 倍。N55Q 突变对亲和力没有影响。该结果是意想不到的, 因为这表明糖本身的去除对结合没有明显的影响 (如同 N55Q 改变一样)。仅在 T57A 改中观察到改进的亲和力。一种可能的解释是, 无论是否存在糖, 位置 57 的苏氨酸对结合都产生负面影响, 所述结合在苏氨酸转变成丙氨酸时去除。丙氨酸较小是重要的并且苏氨酸的负面影响与其大小有关的假设, 可以从使用 T57V 突变得到的结果得到支持: 57 位被缬氨酸取代并不好 (结果未显示)。

[0145] 通过 K60R 突变去除赖氨酸对亲和力无影响, 即引入精氨酸消除了潜在的活性位点而不影响亲和力。

[0146] 因此, 用于去除糖基化位点和用于去除活性赖氨酸的突变均包括在人源化设计中。

[0147] 实施例 2 : 5/44 的 CDR 移植

[0148] 上面已经描述了 5/44 抗体重链可变区和轻链可变区基因的分子克隆及其制备嵌合 (小鼠 / 人) 5/44 抗体的用途。小鼠 5/44  $V_L$  区和  $V_H$  区的核苷酸序列和氨基酸序列分别示于图 2 和图 3 (SEQ ID NO : 7 和 SEQ ID NO : 8)。按照 Adair 等 (WO 91/09967) 的方法, 本实施例描述了将 5/44 抗体 CDR 移植到人构架上, 以降低人体内的可能免疫原性。

[0149] 5/44 轻链的 CDR 移植

[0150] 蛋白质序列与来自人亚型 I  $\kappa$  轻链 V 区的共有序列比对表明有 64% 序列同一性。因此,为构建 CDR 移植轻链,所选的受体构架区对应于人 VK 亚型 I 种系 012,DPK9 序列的那些序列。构架 4 受体序列来源于人 J 区种系序列 JK1。

[0151] 鼠 5/44 构架区的氨基酸序列与受体序列的比较在图 5 给出,并显示在供体链和受体链之间有 27 处不同。在每个位置,对鼠源残基通过对堆积 (packing) 或在  $V_H/V_L$  界面产生影响而直接或间接对抗原结合产生贡献的可能性进行分析。如果认为一个鼠源残基重要并且与人源残基在大小、极性或电荷方面明显不同,那么就该保留鼠源残基。基于此分析,构建了两种具有 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20 (图 5) 给出的序列的 CDR 移植轻链。

[0152] 5/44 重链的 CDR 移植

[0153] 采用与用于轻链描述的方案相同的策略,完成 5/44 重链的 CDR 移植。发现 5/44 重链的 V 区与属于亚型 I 的人重链同源 (70% 序列同一性),因此用人亚型 I 种系构架 VH1-3,DP7 的序列作为受体构架。构架 4 受体序列来源于人 J 区种系序列 JH4。

[0154] 5/44 重链与构架区的比较示于图 6,其中可以发现 5/44 重链与受体序列在位置 22 不同。分析这些序列中的任何序列可能对抗原结合的贡献,从而构建了 5 种具有以下给定序列的 CDR 移植重链:SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:27 (图 6)。

[0155] 用于移植序列的基因的构建

[0156] 将基因设计成编码移植序列 gH1 和 gL1,并设计和构建系列重叠寡核苷酸 (图 9)。采用 PCR 装配技术来构建 CDR 移植 V 区基因。配制 100  $\mu$ l 含有以下组分的反应体积:10mM Tris-HCl (pH8.3)、1.5mM  $MgCl_2$ 、50mM KCl、0.001% 明胶、脱氧核糖核苷三磷酸各 0.25mM、“内部”引物 (T1、T2、T3、B1、B2、B3) 各 1 pmole、“外部”引物 (F1、R1) 各 10 pmole 和 1 单位 Taq 聚合酶 (AmpliTaq, Applied BioSystems, 目录号 N808-0171)。PCR 循环参数为 94°C 1 分钟、55°C 1 分钟和 72°C 1 分钟,30 个循环。然后将反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,切下电泳条带,使用 QIAGEN 离心柱 (QIAquick 凝胶提取试剂盒,目录号 28706) 进行回收。用 30  $\mu$ l 体积洗脱 DNA。然后按照生产商的说明,将 gH1 和 gL1 DNA 的等分样品 (1  $\mu$ l) 克隆到 InVitrogen TOPOTA 克隆载体 pCR2.1 TOP0 (目录号 K4500-01) 中。该非表达载体用作克隆中间体,以便于对大量克隆进行测序。使用载体特异性引物,通过 DNA 测序来鉴定含有 gH1 和 gL1 的正确克隆,产生质粒 pCR2.1 (544gH1) 和 pCR2.1 (544gL1) (图 10)。

[0157] 使用寡核苷酸盒置换法来产生人源化移植体 gH4、gH5、gH6 和 gH7 以及 gL2。图 11 表示寡核苷酸盒的设计。为构建每种变异体,用所示的限制性酶 (对于重链而言为 XmaI/SacII,对于轻链而言为 XmaI/BstEII) 切下载体 (pCR2.1 (544gH1) 或 pCR2.1 (544gL1))。将大载体片段用琼脂糖凝胶电泳纯化并用于与寡核苷酸盒连接。这些盒由 2 种互补寡核苷酸 (如图 11 所示) 组成,在 200  $\mu$ l 体积 (12.5mM Tris-HCl (pH7.5)、2.5mM  $MgCl_2$ 、25mM NaCl、0.25mM 二硫赤藓糖醇) 中以 0.5pmole/ $\mu$ l 的浓度混合。通过在水浴 (500ml 体积) 中加热至 95°C 达 3 分钟,然后让反应物慢慢冷却至室温,完成退火。将已退火的寡核苷酸盒用水稀释 10 倍,然后将其连接到合适的切割载体中。用 DNA 测序来证实正确的序列,产生质粒 pCR2.1 (5/44-gH4-7) 和 pCR2.1 (5/44-gL2)。然后将这些经证实的移植序列亚克隆到表达载体 pMRR14 (重链) 和 pMR10.1 (轻链) 中。

[0158] CDR 移植序列的 CD22 结合活性

[0159] 在各种组合中,将编码移植变异体的载体与原始嵌合抗体链一起共转染到 CHO 细胞中。在竞争测定中,比较原始小鼠 5/44 抗体的结合对与 Ramos 细胞(得自 ATCC,一种表达表面 CD22 的伯基特淋巴瘤成淋巴细胞性人细胞系)结合的竞争的结合活性。该测定被认为是比较移植物与细胞表面 CD22 结合的能力的最佳方法。结果示于图 8。正如所见到的,在任何移植物之间存在非常小的差异,在竞争抗鼠亲代方面所有都表现出比嵌合体更有效。在 CDR-H3(gH5 和 gH7) 末端引入 3 个额外的人源残基并不会明显影响结合。

[0160] 选择与最少数量的鼠源残基结合的移植物即 gL1gH7。轻链移植物 gL1 有 6 个供体残基。残基 V2、V4、L37 和 Q45 是潜在的重要堆积残基。残基 H38 位于  $V_H/V_L$  界面。残基 D60 为靠近 CDR-L2 的表面残基并且可直接对抗原结合作出贡献。这些残基中,V2、L37、Q45 和 D60 存在于来自其它亚型的人  $\kappa$  基因的种系序列。重链移植物 gH7 有 4 个供体构架残基(根据 CDR 移植中使用的结构定义(参见 Adair 等(1991,WO 91/09967),残基 R28 被认为是 CDR-H1 的一部分)。残基 E1 和 A71 为靠近 CDR 的表面残基。残基 I48 为潜在的堆积残基。残基 T93 存在于  $V_H/V_L$  界面。这些残基中,E1 和 A71 存在于人亚型 I 的其它种系基因中。残基 I48 存在于人种系亚型 4 中,而 T73 存在于人种系亚型 3 中。

[0161] 轻链和重链两者的全部 DNA 序列和蛋白质序列,包括由载体提供的恒定区基因内的内含子的大致位置,如图 13 所示,并分别在 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:28 中给出(对于轻链)以及分别在 SEQ ID NO:31 和 SEQ ID NO:30 中给出(对于重链)。

[0162] 从这些载体中切下编码这些轻链和重链基因的 DNA。重链 DNA 在 5' HindIII 位点消化,然后用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段处理,产生 5' 平端。在 3' EcoRI 位点切割,产生重链片段,然后通过琼脂糖凝胶纯化。同样,产生轻链片段,在 5' SfuI 位点平端化并用 3' EcoRI 位点。将这两个片段克隆到基于 DHFR 的表达载体中并用来在 CHO 细胞中产生稳定的细胞系。

[0163] 序 列 表

[0164] <110> 细胞技术研究及开发有限公司 (Celltech R&D Limited)

[0165] <120> 生物制品

[0166] <160>51

[0167] <170>SeqWin99, version 1.02

[0168] <210>1

[0169] <211>5

[0170] <212>PRT

[0171] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)

[0172] <220>

[0173] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 CDR-H1

[0174] <400>1

[0175]

Asn Tyr Trp Ile His

1

5

[0176] <210>2



- [0177] <211>17  
[0178] <212>PRT  
[0179] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0180] <220>  
[0181] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 CDR-H2  
[0182] <400>2  
[0183]  
Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys  
1 5 10 15  
Gly  
[0184] <210>3  
[0185] <211>12  
[0186] <212>PRT  
[0187] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0188] <220>  
[0189] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 CDR-H3  
[0190] <400>3  
[0191]  
Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10  
[0192] <210>4  
[0193] <211>16  
[0194] <212>PRT  
[0195] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0196] <220>  
[0197] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 CDR-L1  
[0198] <400>4  
[0199]  
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser Tyr Gly Asn Thr Phe Leu Ser  
1 5 10 15  
[0200] <210>5  
[0201] <211>7  
[0202] <212>PRT  
[0203] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0204] <220>  
[0205] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 CDR-L2  
[0206] <400>5  
[0207]  
Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

[0208] <210>6  
[0209] <211>9  
[0210] <212>PRT  
[0211] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0212] <220>  
[0213] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 CDR-L3  
[0214] <400>6  
[0215]

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr  
1 5

[0216] <210>7  
[0217] <211>113  
[0218] <212>PRT  
[0219] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0220] <220>  
[0221] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44VL 区  
[0222] <400>7  
[0223]

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

Arg

[0224] <210>8  
[0225] <211>121  
[0226] <212>PRT  
[0227] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)  
[0228] <220>  
[0229] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44VH 区  
[0230] <400>8

[0231]

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

[0232] &lt;210&gt;9

[0233] &lt;211&gt;13

[0234] &lt;212&gt;PRT

[0235] &lt;213&gt; 人工序列

[0236] &lt;220&gt;

[0237] &lt;223&gt;cH

[0238] &lt;400&gt;9

[0239]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asn | Asn | Tyr | Thr | Thr | Tyr | Lys | Arg | Asn | Leu | Lys | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     |     | 10  |     |

[0240] &lt;210&gt;10

[0241] &lt;211&gt;13

[0242] &lt;212&gt;PRT

[0243] &lt;213&gt; 人工序列

[0244] &lt;220&gt;

[0245] &lt;223&gt;N55Q

[0246] &lt;400&gt;10

[0247]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asn | Gln | Tyr | Thr | Thr | Tyr | Lys | Arg | Asn | Leu | Lys | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     |     | 10  |     |

[0248] &lt;210&gt;11

[0249] &lt;211&gt;13

- [0250] <212>PRT  
[0251] <213> 人工序列  
[0252] <220>  
[0253] <223>T57A  
[0254] <400>11  
[0255]  
Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly  
1 5 10  
[0256] <210>12  
[0257] <211>13  
[0258] <212>PRT  
[0259] <213> 人工序列  
[0260] <220>  
[0261] <223>T57V  
[0262] <400>12  
[0263]  
Gly Asn Asn Tyr Val Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys Gly  
1 5 10  
[0264] <210>13  
[0265] <211>17  
[0266] <212>PRT  
[0267] <213> 人工序列  
[0268] <220>  
[0269] <223>CDR-H2 (T57A)H'  
[0270] <400>13  
[0271]  
Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Lys Arg Asn Leu Lys  
1 5 10 15  
Gly  
[0272] <210>14  
[0273] <211>13  
[0274] <212>PRT  
[0275] <213> 人工序列  
[0276] <220>  
[0277] <223>K60R  
[0278] <400>14  
[0279]  
Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys Gly  
1 5 10  
[0280] <210>15

- [0281] <211>17  
 [0282] <212>PRT  
 [0283] <213> 人工序列  
 [0284] <220>  
 [0285] <223>CDR-H2 (K60R)H”  
 [0286] <400>15  
 [0287]  
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 [0288] <210>16  
 [0289] <211>17  
 [0290] <212>PRT  
 [0291] <213> 人工序列  
 [0292] <220>  
 [0293] <223>CDR-H2 (T57A K60R)H””  
 [0294] <400>16  
 [0295]  
 Gly Ile Asn Pro Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Arg Asn Leu Lys  
 1 5 10 15  
 Gly  
 [0296] <210>17  
 [0297] <211>70  
 [0298] <212>PRT  
 [0299] <213> 人 (Homo sapiens)  
 [0300] <220>  
 [0301] <223>DPK9  
 [0302] <400>17  
 [0303]  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
 20 25 30  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 35 40 45  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
 50 55 60  
 [0304]  
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 65 70

[0305] &lt;210&gt;18

[0306] &lt;211&gt;11

[0307] &lt;212&gt;PRT

[0308] &lt;213&gt; 人 (Homo sapiens)

[0309] &lt;220&gt;

[0310] &lt;223&gt;JK1

[0311] &lt;400&gt;18

[0312]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | Arg |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

[0313] &lt;210&gt;19

[0314] &lt;211&gt;113

[0315] &lt;212&gt;PRT

[0316] &lt;213&gt; 人工序列

[0317] &lt;220&gt;

[0318] &lt;223&gt;gL1

[0319] &lt;400&gt;19

[0320]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Gln | Val | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Ala | Asn | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Tyr | Gly | Asn | Thr | Phe | Leu | Ser | Trp | Tyr | Leu | His | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Gly | Ile | 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 | Pro | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Leu | Gln | Gly |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

[0321]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | His | Gln | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |
| Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

[0322] &lt;210&gt;20

[0323] &lt;211&gt;113

[0324] &lt;212&gt;PRT

[0325] &lt;213&gt; 人工序列

[0326] &lt;220&gt;

[0327] &lt;223&gt;gL2

[0328] &lt;400&gt;20

[0329]

```

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

```

Arg

[0330] &lt;210&gt;21

[0331] &lt;211&gt;80

[0332] &lt;212&gt;PRT

[0333] &lt;213&gt; 人 (Homo sapiens)

[0334] &lt;220&gt;

[0335] &lt;223&gt;DP7

[0336] &lt;400&gt;21

[0337]

```

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

```

[0338] &lt;210&gt;22

[0339] &lt;211&gt;11

[0340] &lt;212&gt;PRT

[0341] <213> 人 (Homo sapiens)

[0342] <220>

[0343] <223> JH4

[0344] <400> 22

[0345]

```

      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      1              5              10

```

[0346] <210> 23

[0347] <211> 121

[0348] <212> PRT

[0349] <213> 人工序列

[0350] <220>

[0351] <223> gH1

[0352] <400> 23

[0353]

```

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

```

[0354]

```

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

```

[0355] <210> 24

[0356] <211> 121

[0357] <212> PRT

[0358] <213> 人工序列

[0359] <220>

[0360] <223> gH4

[0361] <400> 24

[0362]



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

[0363]

Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
100 105 110  
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

[0364] &lt;210&gt;25

[0365] &lt;211&gt;121

[0366] &lt;212&gt;PRT

[0367] &lt;213&gt; 人工序列

[0368] &lt;220&gt;

[0369] &lt;223&gt;gH5

[0370] &lt;400&gt;25

[0371]

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

[0372] <210>26

[0373] <211>121

[0374] <212>PRT

[0375] <213> 人工序列

[0376] <220>

[0377] <223>gH6

[0378] <400>26

[0379]

[0388]

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Glu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0389] &lt;210&gt;28

[0390] &lt;211&gt;239

[0391] &lt;212&gt;PRT

[0392] &lt;213&gt; 人工序列

[0393] &lt;220&gt;

[0394] &lt;223&gt; 移植轻链的全序列

[0395] &lt;400&gt;28

[0396]

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

[0397]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Ser | Asp | Glu | Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Leu | Asn | Asn | Phe | Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp |
|     |     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asn | Ala | Leu | Gln | Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Lys | Asp | Ser | Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| Ala | Asp | Tyr | Glu | Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Gly | Leu | Ser | Ser | Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |

[0398] &lt;210&gt;29

[0399] &lt;211&gt;781

[0400] &lt;212&gt;DNA

[0401] &lt;213&gt; 人工序列

[0402] &lt;220&gt;

[0403] &lt;223&gt; 移植轻链的全部 DAN 序列

[0404] &lt;400&gt;29

[0405]

```

ttcgaagccg ccaccatgaa gttgcctggt aggctgttgg tgcttctggt gttctggatt 60
cctgcttccc ggggtgacgt tcaagtgacc cagagcccat ccagcctgag cgcattctgta 120
ggagaccggg tcaccatcac ttgtagatcc agtcagagtc ttgcaaacag ttatgggaac 180
acctttttgt cttggtatct gcacaaacca ggtaaagccc cacaattgct catctacgga 240
atctctaaca gatttagtgg tgtaccagac aggttcagcg gttccggaag tggtagtgat 300
ttcaccctca cgatctcgtc tctccagcca gaagatttcg ccacttatta ctgtttacaa 360
ggtacacatc agccgtacac attcggtcag ggtactaaag tagaaatcaa acgtacggta 420
gcggcccatc ctgtcttcac cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc 480
tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg 540
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac 600
agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa 660
gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac 720
aggggagagt gttagaggga gaagtgcccc cacctgctcc tcagttccag cctgggaatt 780
c

```

781

[0406] &lt;210&gt;30

[0407] &lt;211&gt;467

[0408] &lt;212&gt;PRT

[0409] &lt;213&gt; 人工序列

[0410] &lt;220&gt;

[0411] <223> 移植重链的全序列

[0412] <400>30

[0413]

```

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

```

[0414]

|        |                      |
|--------|----------------------|
| [0415] | <210>31              |
| [0416] | <211>2160            |
| [0417] | <212>DNA             |
| [0418] | <213> 人工序列           |
| [0419] | <220>                |
| [0420] | <223> 移植重链的全部 DNA 序列 |
| [0421] | <400>31              |
| [0422] |                      |

```

aagcttgccg ccaccatgga cticggattc tctctcgtgt tcctggcact cattctcaag 60
ggagtgcagt gtgaggtgca attggtccag tcaggagcag aggttaagaa gcctggtgct 120
tccgtcaaag tttcgtgtaa ggctagcggc tacaggttca caaattattg gattcattgg 180
gtcaggcagg ctccgggaca aggcctggaa tggatcggtg gcattaatcc cggaataaac 240
tacgtacat ataggagaaa attccagggc agagttacga tgaccgcgga cacctccaca 300
agcactgtct acatggagct gtcattctctg agatccgagg acaccgcagt gtactattgt 360
actagagaag gctacggtaa ttacggagcc tggttcgcct actggggcca ggtacccta 420
gtcacagtct cctcagcttc taaaaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc 480
aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt 600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag 780
ccctcctgcc tggacgcacc ccggtgtgc agccccagcc cagggcagca aggcattgcc 840
catctgtctc ctcaccgga ggctctgac caccctcctc atgccaggg agagggtctt 900
ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc ccaggccctg 960
cgcatacagg ggcaggtgtc gcgtcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg 1020
ccctgacct aagccaccc caaaggccaa actctccact cctcagctc agacaccttc 1080
tctctccca gatctgagta actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatggtcccc 1140
catgccacc atgccagggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 1200
ggtgccttag agtagcctgc atccaggga aggcctcagc cgggtgctga cgcattccacc 1260
tccatctctt cctcagcacc tgagtctctg gggggaccat cagtcttctt gtcccccca 1320
aaacccaagg acactctcat gatctcccg accctgagg tcacgtgctt ggtggtggac 1380
gtgagccagg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 1440
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1500
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac 1560
aaaggcctcc cgtctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gaccacggg 1620
gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct cgccccacc tctgccctgg gagtgaccgc 1680
tgtgccaacc tetgtcccta cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca cctgcccc 1740
atcccaggag gagatgacca agaaccagg cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1800
ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1860
cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaggc taaccgtgga 1920
caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggtctgca 1980
caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaatgagtgc cagggccggc 2040
aagccccgc tccccgggt ctcggggctc gcgaggatg cttggcacgt acccgtcta 2100
catacttccc aggcaccag catggaaata aagcaccac cactgcctg gctcgaatc 2160

```

[0423] &lt;210&gt;32

[0424] &lt;211&gt;94

[0425] &lt;212&gt;DNA



- [0426] <213> 人工序列
- [0427] <220>
- [0428] <223>544gH1 T1
- [0429] <400>32
- [0430]
- |                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| agtgtaggt gcaattggc cagtcaggag cagaggtaa gaagcctggt gcttccgtca | 60 |
| aagtttcgtg taaggctagc ggctacaggt tcac                          | 94 |
- [0431] <210>33
- [0432] <211>96
- [0433] <212>DNA
- [0434] <213> 人工序列
- [0435] <220>
- [0436] <223>544gH1 T2
- [0437] <400>33
- [0438]
- |                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| gtggcattaa tcccgggaat cagtacacta catataaaag aaatctaaag ggcagagcaa | 60 |
| cgctgaccgc ggacacctcc acaagcactg tctaca                           | 96 |
- [0439] <210>34
- [0440] <211>95
- [0441] <212>DNA
- [0442] <213> 人工序列
- [0443] <220>
- [0444] <223>544gH1 T3
- [0445] <400>34
- [0446]
- |                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| agagaaggct acggtaatta cggagcctgg ttgcctact ggggccaggg taccctagtc | 60 |
| acagtctcct cagcttctac aaagggccca agaaa                           | 95 |
- [0447] <210>35
- [0448] <211>94
- [0449] <212>DNA
- [0450] <213> 人工序列
- [0451] <220>
- [0452] <223>544 gH1 B1
- [0453] <400>35
- [0454]
- |                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| ggaccaattg cacctcacac tgcactccct tgagaatgag tgccaggaac acgagagaga | 60 |
| atccgaagtc catggtggcg gcaagctttt attc                             | 94 |
- [0455] <210>36
- [0456] <211>97

- [0457] <212>DNA  
[0458] <213> 人工序列  
[0459] <220>  
[0460] <223>544gH1 B2  
[0461] <400>36  
[0462]  
gattcccggg attaatgcca ccgatccatt ccaggccttg tcccggagcc tgcctgaccc 60  
aatgaatcca ataatttgtg aacctgtagc cgctagc 97  
[0463] <210>37  
[0464] <211>93  
[0465] <212>DNA  
[0466] <213> 人工序列  
[0467] <220>  
[0468] <223>544gH1 B3  
[0469] <400>37  
[0470]  
cgtaattacc gtagccttct ctagtacaat agtacactgc ggtgtcctcg gatctcagag 60  
atgacagctc catgtagaca gtgcttgtgg agg 93  
[0471] <210>38  
[0472] <211>21  
[0473] <212>DNA  
[0474] <213> 人工序列  
[0475] <220>  
[0476] <223>544gH1 F1  
[0477] <400>38  
[0478]  
gaataaaagc ttgccgccac c 21  
[0479] <210>39  
[0480] <211>22  
[0481] <212>DNA  
[0482] <213> 人工序列  
[0483] <220>  
[0484] <223>544gH1 R1  
[0485] <400>39  
[0486]  
tttcttgggc cctttgtaga ag 22  
[0487] <210>40  
[0488] <211>87  
[0489] <212>DNA

- [0490] <213> 人工序列
- [0491] <220>
- [0492] <223>544 gL1 T1
- [0493] <400>40
- [0494]
- gcttcccggg gtgacgttca agtgaccag agcccatcca gcctgagcgc atctgtagga 60
- gaccgggtca ccatcattg tagatcc 87
- [0495] <210>41
- [0496] <211>90
- [0497] <212>DNA
- [0498] <213> 人工序列
- [0499] <220>
- [0500] <223>544 gL1 T2
- [0501] <400>41
- [0502]
- tatctgcaca aaccaggtaa agccccacaa ttgtctatct acggaatctc taacagattt 60
- agtgggtgtac cagacaggtt cagcggttcc 90
- [0503] <210>42
- [0504] <211>91
- [0505] <212>DNA
- [0506] <213> 人工序列
- [0507] <220>
- [0508] <223>544gL1 T3
- [0509] <400>42
- [0510]
- agatttcgcc acttattact gtttacaagg tacacatcag ccgtacacat tcggtcaggg 60
- tactaaagta gaaatcaaac gtacggcgtg c 91
- [0511] <210>43
- [0512] <211>88
- [0513] <212>DNA
- [0514] <213> 人工序列
- [0515] <220>
- [0516] <223>544gL1 B1
- [0517] <400>43
- [0518]
- gaacgtcacc ccgggaagca ggaatccaga acaacagaag caccaacagc ctaacaggca 60
- acttcatggt ggcgggttcg aatcatcc 88
- [0519] <210>44
- [0520] <211>88

- [0521] <212>DNA  
[0522] <213> 人工序列  
[0523] <220>  
[0524] <223>544gL1 B2  
[0525] <400>44  
[0526]  
ctttacctgg tttgtgcaga taccaagaca aaaaggtggtt cccataactg tttgcaagac 60  
tctgactgga tctacaagtg atggtgac 88  
[0527] <210>45  
[0528] <211>90  
[0529] <212>DNA  
[0530] <213> 人工序列  
[0531] <220>  
[0532] <223>544gL1 B3  
[0533] <400>45  
[0534]  
aacagtaata agtggcgaaa tcttctggct ggagagacga gatcgtgagg gtgaaatcag 60  
taccacttcc ggaaccgctg aacctgtctg 90  
[0535] <210>46  
[0536] <211>20  
[0537] <212>DNA  
[0538] <213> 人工序列  
[0539] <220>  
[0540] <223>544gL1 F1  
[0541] <400>46  
[0542]  
ggatgattcg aagccgccac 20  
[0543] <210>47  
[0544] <211>21  
[0545] <212>DNA  
[0546] <213> 人工序列  
[0547] <220>  
[0548] <223>544gL1 R1  
[0549] <400>47  
[0550]  
gcacgccgta cgtttgattt c 21  
[0551] <210>48  
[0552] <211>339  
[0553] <212>DNA  
[0554] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)

[0555] <220>

[0556] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 VL 的 DNA 序列

[0557] <400>48

[0558]

```
gatgttgtgg tgactcaaac tccactctcc ctgcctgtca gctttggaga tcaagtttct 60
atctctttgca ggtctagtca gagtcttgca aacagttatg ggaacacctt tttgtcttgg 120
tacctgcaca agcctggcca gtctccacag ctctcatct atgggatttc caacagattt 180
tctgggggtgc cagacaggtt cactggcagt gggtcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcacaataa agcctgagga cttgggaatg tattactgct tacaaggtag acatcagccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgt 339
```

[0559] <210>49

[0560] <211>363

[0561] <212>DNA

[0562] <213> 小家鼠 (Mus. musculus)

[0563] <220>

[0564] <223> 小鼠单克隆抗体 5/44 VH 的 DNA 序列

[0565] <400>49

[0566]

```
gaggtccaac tgcagcagtc tgggactgta ctggcaaggc ctggggcttc cgtgaagatg 60
tcttgcaagg cttctggcta caggtttacc aactactgga ttcactgggt aaaacagagg 120
cctgggcagg gtctagaatg gattggtggt attaatcctg gaaataatta tactacgtat 180
aagaggaact tgaagggcaa ggccacactg actgcagtca catccgccag cactgcctac 240
atggacctca gcagcctgac aagtgaggac tctgcggtct attactgtac aagagagggc 300
tatggtaact acggggcctg gtttgcttac tggggccagg ggactctggt caccgtctcc 360
tca 363
```

[0567] <210>50

[0568] <211>9

[0569] <212>DNA

[0570] <213> 人工序列

[0571] <220>

[0572] <223> 寡核苷酸引物内的序列

[0573] <400>50

[0574]

gccgccacc

9

[0575] <210>51

[0576] <211>101

[0577] <212>DNA

[0578] <213> 人工序列

[0579] <220>

[0580] <223>5' 寡核苷酸引物

[0581] <400>51

[0582]

```
gcgcgcaagc ttgccgccac catggacttc ggattctctc tcgtgttcct ggcactcatt    60
ctcaagggag tgcagtgtga ggtgcagctc gtcgagtctg g                                101
```

|    |                   |               |
|----|-------------------|---------------|
| H1 | NYWIIH            | (SEQ ID NO:1) |
| H2 | GINPGNNYTTYKRNLKG | (SEQ ID NO:2) |
| H3 | EGYGNYGAWFAY      | (SEQ ID NO:3) |
| L1 | RSSQSLANSYGNTFLS  | (SEQ ID NO:4) |
| L2 | GISNRFS           | (SEQ ID NO:5) |
| L3 | LQGTHQPYT         | (SEQ ID NO:6) |

图 1 :小鼠单克隆抗体 5/44 的 CDR 序列

```

      10      20      30      40      50
GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT
CTA CAA CAC CAC TGA GTT TGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TCG AAA CCT CTA GTT CAA
D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V>

      60      70      80      90      100     110
TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT GGG AAC ACC TTT TTG
AGA TAG AGA ACG TCC AGA TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA CCC TTG TGG AAA AAC
S I S C R S S Q S L A N S Y G N T F L>

      120     130     140     150     160     170
TCT TGG TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC
AGA ACC ATG GAC GTG TTC GGA CCG GTC AGA GGT GTC GAG GAG TAG ATA CCC TAA AGG
S W Y L H K P G Q S P Q L L I Y G I S>

      180     190     200     210     220
AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
TTG TCT AAA AGA CCC CAC GGT CTG TCC AAG TGA CCG TCA CCA AGT CCC TGT CTA AAG
N R F S G V P D R F T G S G S G T D F>

      230     240     250     260     270     280
ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA
TGT GAG TTC TAG TCG TGT TAT TTC GGA CTC CTG AAC CCT TAC ATA ATG ACG AAT GTT
T L K I S T I K P E D L G M Y Y C L Q>

      290     300     310     320     330
GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT
CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCA
G T H Q P Y T F G G G T K L E I K R>
```

图 2 :5/44VL 的 DNA/ 蛋白质序列



```

      10      20      30      40      50
GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG
CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K>

      60      70      80      90      100      110
ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA
TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT
M S C K A S G Y R F T N Y W I H W V K>

      120      130      140      150      160      170
CAG AGG CCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT
GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA CCT TTA TTA ATA
Q R P G Q G L E W I G G I N P G N N Y>

      180      190      200      210      220
ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC
TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CGG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CGG
T T Y K R N L K G K A T L T A V T S A>

      230      240      250      260      270      280
AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC
TCG TGA CGG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CGC CAG ATA ATG
S T A Y M D L S S L T S E D S A V Y Y>

      290      300      310      320      330      340
TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGG
ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CGG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC
C T R E G Y G N Y G A W F A Y W G Q G>

      350      360
ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA
TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT
T L V T V S S>

```

图 3:5/44VH 的 DNA/ 蛋白质序列

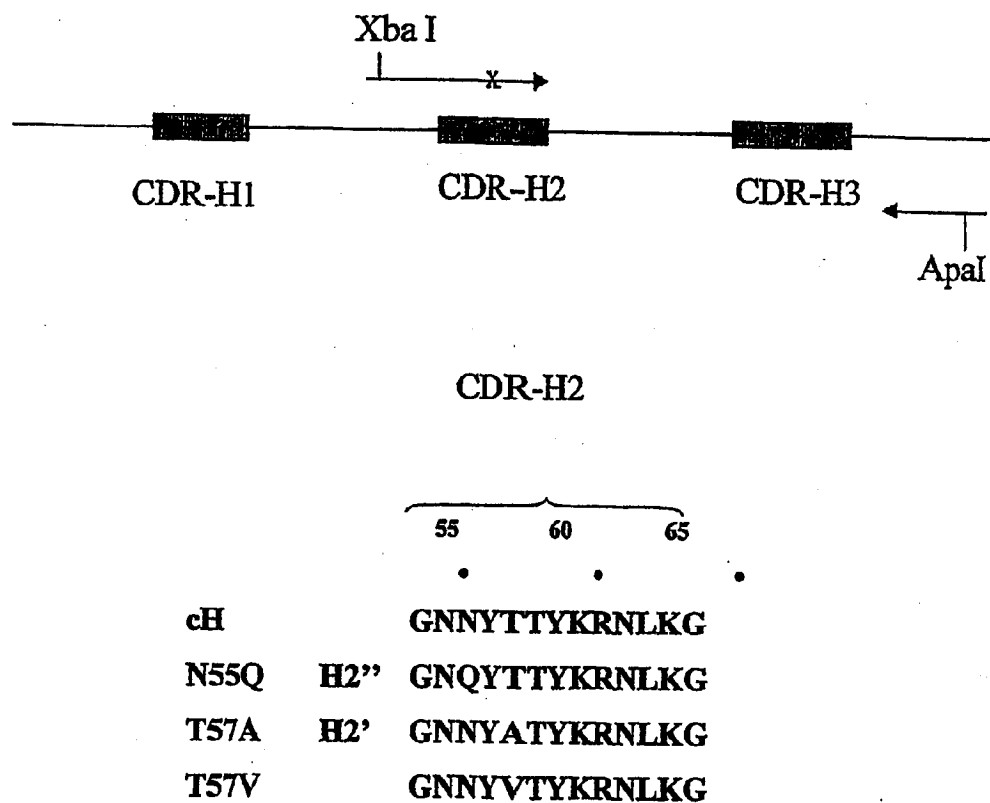


图 4

|                |                                          |                  |                 |
|----------------|------------------------------------------|------------------|-----------------|
|                | 10                                       | 20               | 40              |
| V <sub>L</sub> | DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISC                  | RSSQSLANSYGNTFLS | WYLHKPGQSPQLLIY |
|                |                                          |                  |                 |
| DPK9           | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC                  |                  | WYQOKPGKAPQLLIY |
|                |                                          |                  |                 |
| gL1            | DVQVTQSPSSLSASVGDRVITTC                  | RSSQSLANSYGNTFLS | WYLHKPGKAPQLLIY |
| gL2            | DVVVTQSPSSLSASVGDRVITTC                  | RSSQSLANSYGNTFLS | WYLHKPGKAPQLLIY |
|                | 60                                       | 70               | 80              |
| V <sub>L</sub> | GISNRFS GVPDRFTGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYC | LQGTHQPYT        |                 |
|                |                                          |                  |                 |
| DPK9           | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC          |                  |                 |
|                |                                          |                  |                 |
| gL1            | GISNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC  | LQGTHQPYT        |                 |
| gL2            | GISNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC  | LQGTHQPYT        |                 |
|                | 100                                      |                  |                 |
| V <sub>L</sub> | FGGGTKLEIKR                              |                  |                 |
|                |                                          |                  |                 |
| JK1            | FGQGTKVEIKR                              |                  |                 |
|                |                                          |                  |                 |
| gL1            | FGQGTKVEIKR                              |                  |                 |
| gL2            | FGQGTKVEIKR                              |                  |                 |

DPK-9 是人种系受体构架序列。

垂直线表示在鼠源残基和人源残基之间存在不同。

下划线的序列表示保留在移植物中的供体残基。

CDR 以蓝色表示(对于 DPK-9 未显示)。

移植物 gL1 有 6 个供体构架残基, gL2 有 7 个。

图 5

|                |                                      |                                  |                    |                 |         |
|----------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------|---------|
|                | 10                                   | 20                               | 30                 | 40              | 50      |
| V <sub>H</sub> | EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYRFT       | NYWIIH                           | WVKQRPQGQGLEWIG    | GINP            |         |
|                |                                      |                                  |                    |                 |         |
| DP7            | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT        |                                  | WVRQAPGQGLEWMG     |                 |         |
|                |                                      |                                  |                    |                 |         |
| gH1            | <u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYRFT</u> | NYWIIH                           | WVRQAPGQGLEWIG     | GINP            |         |
| gH4,5,6,7      | <u>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYRFT</u> | NYWIIH                           | WVRQAPGQGLEWIG     | GINP            |         |
|                | 60                                   | 70                               | 80                 | 90              | 100     |
| V <sub>H</sub> | GNNYTTYKRNLKG                        | KATLTAVTSASTAYMDLSSLTSEDSAVYYCTR | EGYGNYG            |                 |         |
|                |                                      |                                  |                    |                 |         |
| DP7            | KFQG                                 | RVTMT                            | RDTSSTVYME         | SSLRSEDTAVYYCAR |         |
|                |                                      |                                  |                    |                 |         |
| gH1            | GNNYTTYKRNLKG                        | <u>RATLTADTSTSTVYME</u>          | SSLRSEDTAVYYCTR    | EGYGNYG         |         |
| gH4            | GNNYATYRRNLKG                        | <u>RATLTADTSTSTVYME</u>          | SSLRSEDTAVYYCTR    | EGYGNYG         |         |
| gH5            | GNNYATYRRNLKG                        | RVTMT                            | <u>ADTSTSTVYME</u> | SSLRSEDTAVYYCTR | EGYGNYG |
| gH6            | GNNYATYRRKFQG                        | <u>RATLTADTSTSTVYME</u>          | SSLRSEDTAVYYCTR    | EGYGNYG         |         |
| gH7            | GNNYATYRRKFQG                        | RVTMT                            | <u>ADTSTSTVYME</u> | SSLRSEDTAVYYCTR | EGYGNYG |
|                | 110                                  |                                  |                    |                 |         |
| JH4            | WGQGT                                | LVTVSS                           |                    |                 |         |
| V <sub>H</sub> | AWFAY                                | WGQGT                            | LVTVSS             |                 |         |
| gH1            | AWFAY                                | WGQGT                            | LVTVSS             |                 |         |
| gH4,5,6,7      | AWFAY                                | WGQGT                            | LVTVSS             |                 |         |

DP7 是人种系受体构架序列。

垂直线表示在鼠源残基和人源残基之间存在不同。

下划线的序列表示保留在移植物中的供体残基。

CDR 以蓝色表示(对于 DP7 未显示)。

移植物 gH4 和 gH6 有 6 个供体构架残基, 移植物 gH5 和 gH7 有 4 个。

图 6

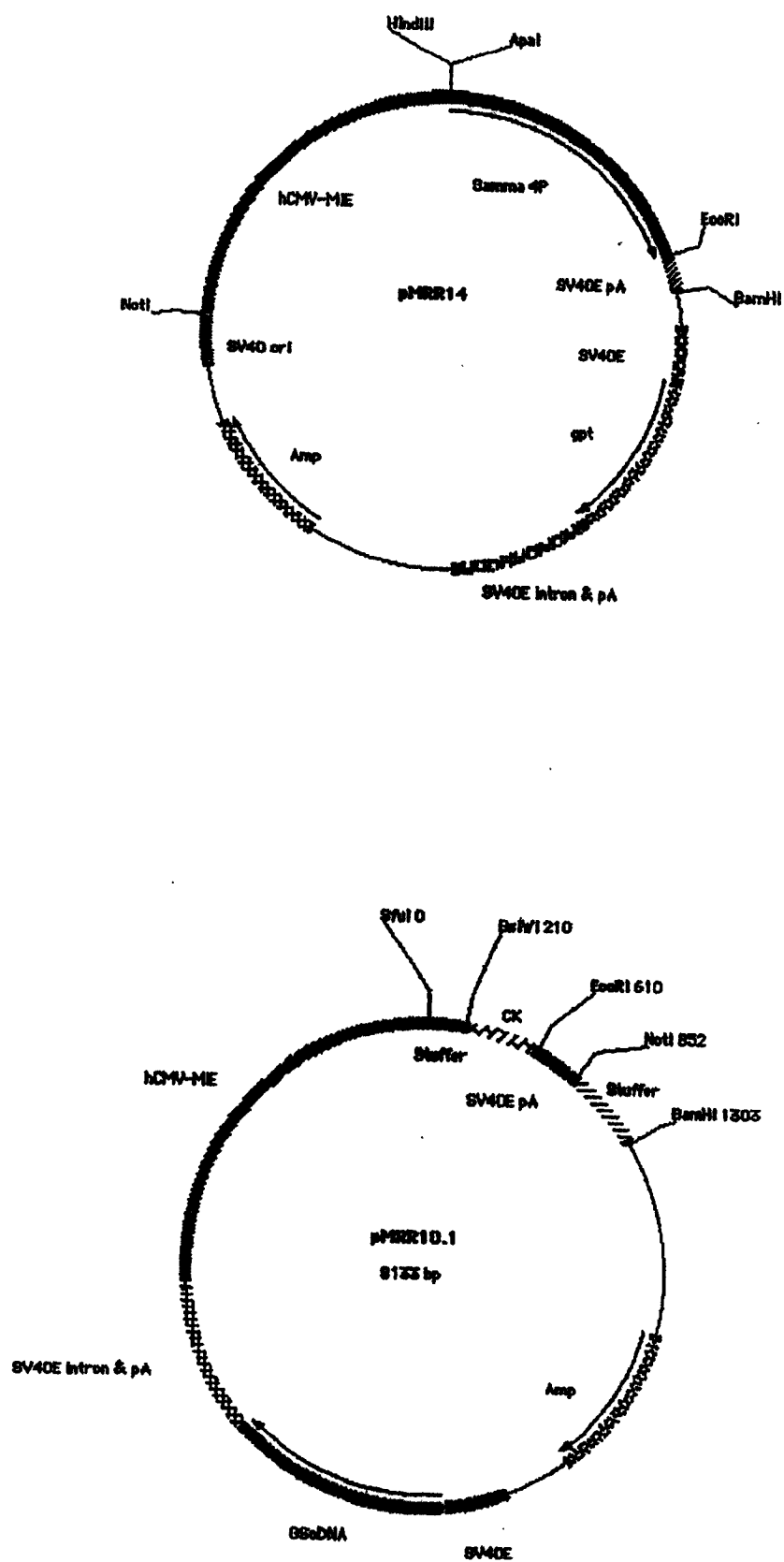


图 7 :pMRR14 和 pMRR10.1 的图谱

| <b>5/44</b> | <b>Ka e<sup>5</sup></b> | <b>Kd e<sup>-4</sup></b> | <b>KD e<sup>-10</sup></b> | <b>~KD nM</b> |
|-------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| <b>cLcH</b> | <b>2.9</b>              | <b>1.14</b>              | <b>3.93</b>               | <b>0.4</b>    |
| <b>N55Q</b> | <b>5.81</b>             | <b>1.9</b>               | <b>3.27</b>               | <b>0.3</b>    |
| <b>T57A</b> | <b>7.8</b>              | <b>0.51</b>              | <b>0.66</b>               | <b>0.07</b>   |
| <b>K60R</b> | <b>4.95</b>             | <b>1.01</b>              | <b>2.04</b>               | <b>0.2</b>    |

图 8 :嵌合 5/44 和突变体的 Biacore 测定

**重链****544gH1 T1**

AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTCA  
AAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTAC

**544gH1 T2**

GTGGCATTAAATCCCGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA  
ACGCTGACCGCGGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

**544gH1 T3**

AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCCGCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGTC  
ACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

**544 gH1 B1**

GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG  
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

**544 gH1 B2**

GATTCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCCTTGTCCTGGAGCCTGCCTGACCC  
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

**544gH1 B3**

CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCCTCGGATCTCAGAG  
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

**544gH1 F1**

GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

**544gH1 R1**

TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

图9:用于 5/44gH1 和 gL1 基因装配的寡核苷酸

轻链

## 544 gL1 T1

GCTTCCC GG GTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGGA  
GACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

## 544 gL1 T2

TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATT  
AGTGGTGTACCAGACAGGTTTCAGCGGTCC

## 544gL1 T3

AGATTTCCGCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTGGGTCAGGG  
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

## 544gL1 B1

GAACGTCACCCCGGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG  
CAACTTCATGGTGGCGGCTTCGAATCATCC

## 544gL1 B2

CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCATAACTGTTTGCAAGAC  
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

## 544gL1 B3

AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAGGGTGAAATCA  
GTACCACTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

## 544gL1 F1

GGATGATTCTGAAGCCGCCAC

## 544gL1 R1

GCACGCCGTACGTTTGATTTC

图 9(续)



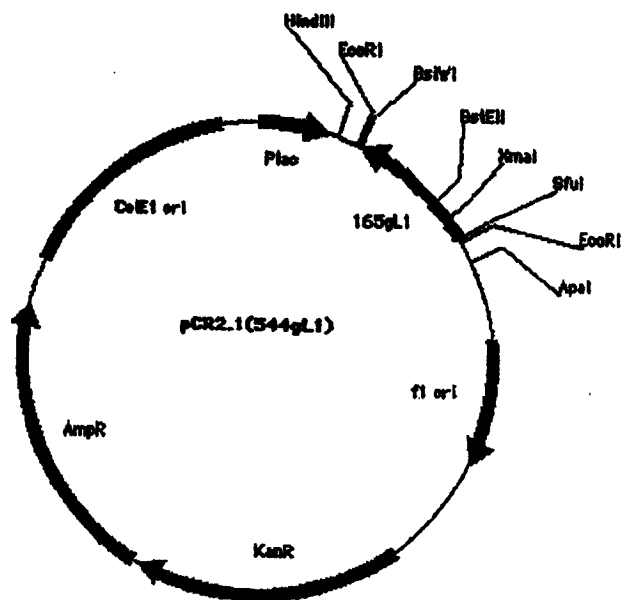
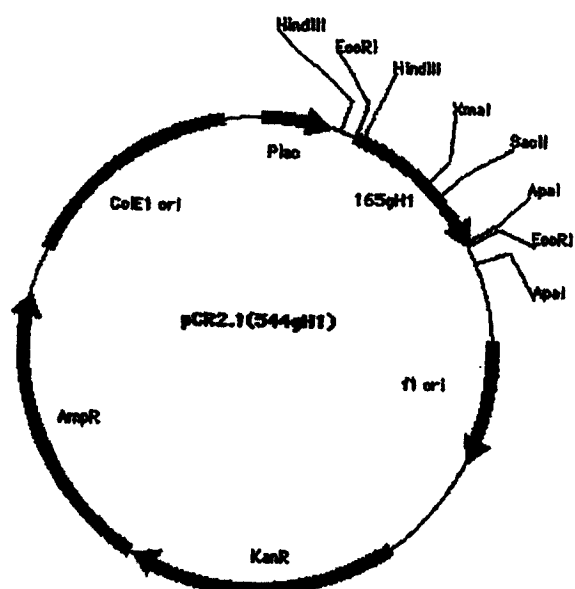


图 10 :中间载体 pCR2. 1 (544gH1) 和 pCR2. 1 (544gL1) 的质粒图谱

pH4

|             |                                                                            |    |    |    |    |              |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|--------------|
| <u>XmaI</u> | 10                                                                         | 20 | 30 | 40 | 50 | <u>SacII</u> |
| CC          | GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC |    |    |    |    |              |
|             | C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG      |    |    |    |    |              |
| P           | G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A                                      |    |    |    |    |              |

pH5

|             |                                                                            |    |    |    |    |              |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|--------------|
| <u>XmaI</u> | 10                                                                         | 20 | 30 | 40 | 50 | <u>SacII</u> |
| CC          | GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC |    |    |    |    |              |
|             | C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG      |    |    |    |    |              |
| P           | G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A                                      |    |    |    |    |              |

pH6

|             |                                                                            |    |    |    |    |              |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|--------------|
| <u>XmaI</u> | 10                                                                         | 20 | 30 | 40 | 50 | <u>SacII</u> |
| CC          | GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC |    |    |    |    |              |
|             | C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG      |    |    |    |    |              |
| P           | G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A                                      |    |    |    |    |              |

pH7

|             |                                                                            |    |    |    |    |              |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|--------------|
| <u>XmaI</u> | 10                                                                         | 20 | 30 | 40 | 50 | <u>SacII</u> |
| CC          | GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC |    |    |    |    |              |
|             | C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG      |    |    |    |    |              |
| P           | G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A                                      |    |    |    |    |              |

p12

|             |                                                                                    |    |    |    |    |    |               |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|---------------|
| <u>XmaI</u> | 10                                                                                 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | <u>BstEII</u> |
| C           | CGG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CGG    |    |    |    |    |    |               |
|             | CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG |    |    |    |    |    |               |
| S           | R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T                                        |    |    |    |    |    |               |

图 11 :用于制备其它移植物的寡核苷酸盒

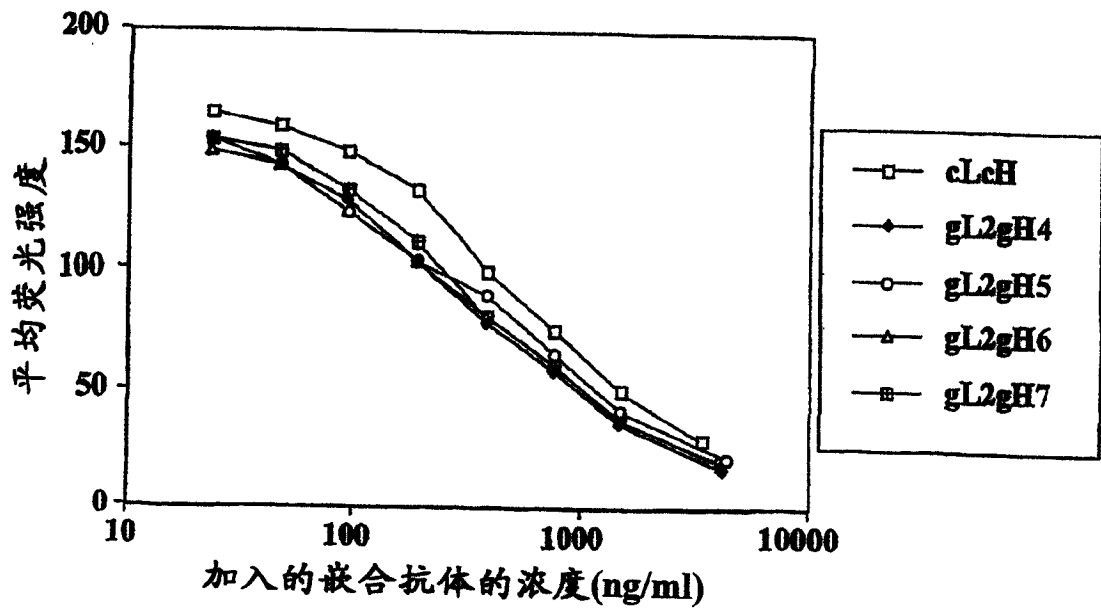
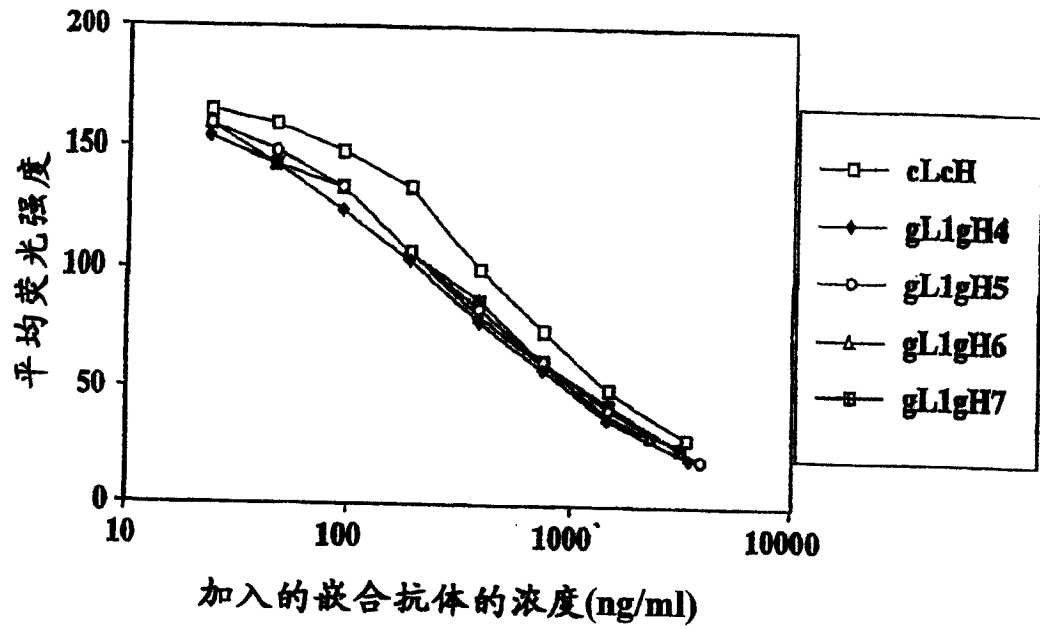


图 12: 竞争测定, 荧光标记的小鼠 5/44 抗体与移植变异体的竞争结合

## a) 重链

```

      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M   D   F   G   F   S   L   V   F   L   A   L   I   L   K>

      70      80      90      100     110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
G   V   Q   C   E   V   Q   L   V   Q   S   G   A   E   V   K   K   P   G>

120      130      140      150      160      170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
A   S   V   K   V   S   C   K   A   S   G   Y   R   F   T   N   Y   W   I>

      180      190      200      210      220      230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
R   W   V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   I   G   G   I   N   P>

      240      250      260      270      280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CGC
G   N   N   Y   A   T   Y   R   R   K   F   Q   G   R   V   T   M   T   A>

290      300      310      320      330      340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D   T   S   T   S   T   V   Y   M   E   L   S   S   L   R   S   E   D   T>

      350      360      370      380      390      400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CGG ACC AAG CGG ATG
A   V   Y   Y   C   T   R   E   G   Y   G   N   Y   G   A   W   F   A   Y>

      410      420      430      440      450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AAG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AAG CAG
W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V>

460      470      480      490      500      510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AAG TCC TCG TGG AAG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG
F   P   L   A   P   C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C>

```

图 13:移植重链和移植轻链的全部 DNA 序列

```

520      530      540      550      560      570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CCG GAC
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L>

580      590      600      610      620      630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L>

640      650      660      670      680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AAG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N>

690      700      710      720      730      740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AAG GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGG
V D H K P S N T K V D K R V>

750      760      770      780      790      800      810
AGCACAGGGA GGGAGGGTGT CTGCTGGAAG CCAGGCTCAG CCCTCCTGCC TGGACGCACC CCGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCCTCCACA GACGACCTTC GGTCCGAGTC GGGAGGACGG ACCTGCGTGG GGCCGACACG

820      830      840      850      860      870      880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCTCTGAC CACCCACTC
TCGGGGTCGG GTCCCTCTGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCCT CCGGAGACTG GTGGGGTGAG

890      900      910      920      930      940      950
ATGCCAGGG AGAGGGTCTT CTGGATTTT CCACCAAGCT CCGGGCAGCC ACAGGCTGGA TGCCCTTACC
TACGGGTCCC TCTCCAGAA GACCTAAAA GGTGGTCCGA GGCCCGTCGG TGTCCGACCT ACGGGGATGG

960      970      980      990      1000      1010      1020
CCAGGCCCTG CGCATACAGG GGCAGGTGCT GCGCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCCCTG
GCTCCGGGAC GCGTATGTCC CGGTCCAGCA CGCGAGTCTG SACGGTTCTC GGTATAGGCC CTCTGGGAC

1030      1040      1050      1060      1070      1080      1090
CCCCTGACCT AAGCCACCC CAAGGCCAA ACTCTCCACT CCTCAGCTC AGACACCTTC TCTCCTCCCA
GGGACTGGA TTCCGGTGGG GTTCCSGTT TGAGAGGTGA GGGAGTCGAG TCTGTGGAAG AGAGGAGGGT

1100      1110      1120      1130      1140      1150
GATCTGAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGAGACG T CTC AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
E S K Y G P P C P P>

```

图 13(续)

```

1160      1170      1180      1190      1200      1210      1220
TGC CCA GGT AAGCCACCC AGGCTCGCC CTCCAGCTCA AGGCGGACA GGTGCCCTAG AGTAGCCTGC
ACG GGT CCA TTCGTTGGG TCCGAGCGG GAGGTGGGT TCCGCCCTGT CCACGGGATC TCATCGGACG
C   P>

      1230      1240      1250      1260      1270      1280
ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CCGGTGCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA GCA CCT GAG TTC
TAGGTCCCTG TCCGGGGTCG GCCCAOGACT GCGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CGT GGA CTC AAG
                                     A   P   E   F>

1290      1300      1310      1320      1330      1340
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
L   G   G   P   S   V   F   L   F   P   P   K   P   K   D   T   L   M   I>

      1350      1360      1370      1380      1390      1400
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
S   R   T   P   E   V   T   C   V   V   V   D   V   S   Q   E   D   P   E>

      1410      1420      1430      1440      1450
GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
V   Q   F   N   W   Y   V   D   G   V   E   V   H   N   A   K   T   K   P>

1460      1470      1480      1490      1500      1510
CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
R   E   E   Q   F   N   S   T   Y   R   V   V   S   V   L   T   V   L   H>

      1520      1530      1540      1550      1560      1570
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
Q   D   W   L   N   G   K   E   Y   K   C   K   V   S   N   K   G   L   P>

      1580      1590      1600      1610      1620      1630
TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGCGAGGGC
AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCACC CTGGGTGCCC CACGCTCCCG
S   S   I   E   K   T   I   S   K   A   K>

      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700
CACATGGACA GAGGTAGCT CGGCCACCC TCTGCCCTGG GAGTGACGCG TGTGCCAACC TCTGTCCCTA
GTGTACCTGT CTCCAGTGA GCCGGGTGGG AGACGGGACC CTCACCTGGG ACACGGTTGG AGACAGGGAT

```

图 13(续)

```

      1710      1720      1730      1740      1750
CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG
GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC
  G  Q  P  R  E  P  Q  V  Y  T  L  P  P  S  Q  E  E  M>

      1760      1770      1780      1790      1800      1810
ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC
TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG
  T  K  N  Q  V  S  L  T  C  L  V  K  G  F  Y  P  S  D  I>

      1820      1830      1840      1850      1860      1870
GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG
  A  V  E  W  E  S  N  G  Q  P  E  N  N  Y  K  T  T  P  P>

      1880      1890      1900      1910      1920
GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC
CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG
  V  L  D  S  D  G  S  F  F  L  Y  S  R  L  T  V  D  K  S>

      1930      1940      1950      1960      1970      1980
AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
  R  W  Q  E  G  N  V  F  S  C  S  V  M  H  E  A  L  H  N>

      1990      2000      2010      2020      2030      2040
CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC
GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCGGCCG
  H  Y  T  Q  K  S  L  S  L  S  L  G  K  *>

      2050      2060      2070      2080      2090      2100      2110
AAGCCCCCGC TCCCGGGCT CTGGGGTCTG CGCGAGGATG CTGGCACGT ACCCGTCTA CATACTTCCC
TTGGGGGGCG AGGGGCCCGA GAGCCCCAGC GCGCTCCTAC GAACCGTSCA TGGGGCAGAT GTATGAAGGG

      2120      2130      2140      2150      2160
AGGCACCCAG CATGGAAATA AAGCACCCAC CACTGCCCTG GCTCGAATTC
TCGTGGGTC GTACCTTAT TTCTGGGTG GTGACGGGAC CGAGCTTAAG

```

图 13(续)

图 13 (续)

## b) 轻链

```

      10          20          30          40          50          60
TTCGAAGCCG CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT
AAGCTTCGGC GGTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA
      M   K   L   P   V   R   L   L   V   L   L   L   F   W   I>

      70          80          90          100         110
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA
P   A   S   R   G   D   V   Q   V   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S>

120          130          140          150          160          170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA
V   G   D   R   V   T   I   T   C   R   S   S   Q   S   L   A   N   S   Y>

180          190          200          210          220          230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG
G   N   T   F   L   S   W   Y   L   H   K   P   G   K   A   P   Q   L   L>

240          250          260          270          280
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT
I   Y   G   I   S   N   R   F   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   G>

290          300          310          320          330          340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA
S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

350          360          370          380          390          400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT
Y   Y   C   L   Q   G   T   H   Q   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   V>

410          420          430          440          450
GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC
E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E>

460          470          480          490          500          510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CCG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT
Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R>

```



520                      530                      540                      550                      560                      570  
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG  
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC  
E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E>

580                      590                      600                      610                      620                      630  
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG  
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC  
S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T>

640                      650                      660                      670                      680  
CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG  
GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC  
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q>

690                      700                      710                      720                      730                      740  
GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG AGGGA  
CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT  
G L S S P V T K S F N R G E C \*>

750                      760                      770                      780  
GAAGTCCCC CACCTGCTCC TCAATTCCAG CCTGGGAATT C  
CTTCACGGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCOCTTAA G

图 13(续)