

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199722.5

C07K 16/18  
C07K 16/46 C12N 15/13  
C12N 15/62 C12N 5/16  
C12P 21/02 C12P 21/08  
A61K 39/395  
//(C12P21/02, C12  
R1:91)

[43]公开日 1999 年 12 月 8 日

[11]公开号 CN 1237983A

[22]申请日 97.9.24 [21]申请号 97199722.5

[30]优先权

[32]96.9.26 [33]JP [31]255196/96

[32]97.7.24 [33]JP [31]214168/97

[86]国际申请 PCT/JP97/03382 97.9.24

[87]国际公布 WO98/13388 日 98.4.2

[85]进入国家阶段日期 99.5.14

[71]申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 佐藤功 若原裕二 藪田尚弘

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 王维玉 王达佐

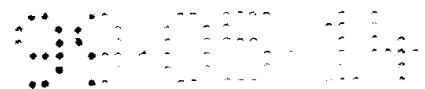
权利要求书 9 页 说明书 147 页 附图页数 31 页

[54]发明名称 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体

[57]摘要

本发明公开了一种抗人副甲状腺激素相关肽的抗体,编码该抗体的 DNA,包含该 DNA 的重组载体,该载体转化的转化体,制备该抗体的方法,以及该抗体的应用。

ISSN 1008-4274



## 权 利 要 求 书

---

1. 包含人抗体 L 链 C 区和鼠抗人副甲状腺激素相关蛋白单克隆抗体 L 链 V 区的嵌合 L 链。

5

2. 按照权利要求 1 的嵌合 L 链,其中 L 链 V 区包括如 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

3. 按照权利要求 1 的嵌合 L 链,其中 C 区是 C $\lambda$  链。

10

4. 包含人抗体 H 链 C 区和鼠抗人副甲状腺激素相关蛋白单克隆抗体 H 链 V 区的嵌合 H 链。

5. 按照权利要求 4 的嵌合 H 链,其中 H 链 V 区包括如 SEQ ID NO: 46 所示的氨基酸序列。

15

6. 按照权利要求 4 的嵌合 H 链,其中 C 区是 C $\gamma$ 1 链。

7. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的嵌合单克隆抗体,包含权利要求 1-3 之一的嵌合 L 链和权利要求 4-6 之一的嵌合 H 链。

20

8. 包含人源化抗体 L 链 V 区的多肽,其具有人抗体 L 链 V 区的框架区 1-4 和鼠抗人副甲状腺激素相关蛋白单克隆抗体 L 链 V 区的互补决定区 1-3。

25

9. 按照权利要求 8 的多肽,其中互补决定区 1-3 分别包括如 SEQ ID NO: 59-61 所示的氨基酸序列。

10. 按照权利要求 8 所示多肽,其中所述框架区 1-3 分别来源于人抗体 HSU03868 框架区 1-3,所述框架区 4 来源于人抗体 S25755 的框架

30

区 4。

11. 按照权利要求 8 的多肽，其中所述框架区 1-3 基本上分别与人抗体 HSU03868 框架区 1-3 相同，所述框架区 4 基本上与人抗体 S25755 的框架区 4 相同。

12. 按照权利要求 8 的多肽，其中框架区按照 Kabat 定义的 36 位和 49 位氨基酸分别为酪氨酸和天冬氨酸。

13. 按照权利要求 12 的多肽，包括如 SEQ ID NO： 48-51 之一所示的氨基酸序列。

14. 按照权利要求 8 的多肽，其中框架区按照 Kabat 定义的 45 位和 87 位氨基酸分别为赖氨酸和异亮氨酸。

15. 按照权利要求 14 的多肽，包括如 SEQ ID NO： 52-55 之一所示的氨基酸序列。

16. 包含人源化抗体 H 链 V 区的多肽，其具有人抗体 H 链 V 区的框架区 1-4 和抗人副甲状腺激素相关蛋白鼠单克隆抗体 H 链 V 区的互补决定区 1-3。

17. 按照权利要求 16 的多肽，其中互补决定区 1-3 分别包括如 SEQ ID NO： 62-64 所示的氨基酸序列。

18. 按照权利要求 16 的多肽，其中所述框架区 1-4 来源于人亚群 III 的人抗体的框架区 1-4。

19. 按照权利要求 16 的多肽，其中所述框架区 1-4 分别来源于人抗体 S31679 的框架区 1-4。

20. 按照权利要求 16 的多肽, 其中所述框架区 1-4 基本上分别与人抗体 S31679 的框架区 1-4 相同。

5           21. 包含人源化抗体 H 链 V 区的多肽, 其包括如 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列。

22. 抗人副甲状腺激素相关蛋白人源化抗体的 L 链, 包括人抗体 L 链 C 区的多肽和权利要求 8-15 之一的多肽。

10

23. 按照权利要求 22 的人源化抗体 L 链, 其中 C 区是 C $\lambda$  链, 所述框架区 1-3 基本上分别与人抗体 HSU03868 的框架区 1-3 相同, 所述框架区 4 基本上与人抗体 S25755 的框架区 4 相同, 互补决定区 1-3 分别包括如 SEQ ID NO: 59-61 所示的氨基酸序列。

15

24. 抗人副甲状腺激素相关蛋白人源化抗体的 H 链, 其包括人抗体 H 链 C 区的多肽和权利要求 16-21 之一的多肽。

20

25. 按照权利要求 24 的人源化抗体 H 链, 其中 C 区是 C $\lambda$  1 链, 所述框架区 1-4 分别来源于人抗体 HSGIII 的框架区 1-4, 互补决定区 1-3 分别包括如 SEQ ID NO: 62-64 所示的氨基酸序列。

26. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的人源化抗体, 包括权利要求 22 或 23 的人源化抗体 L 链和权利要求 24 或 25 的人源化抗体 H 链。

25

27. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体, 其解离常数为  $1.86 \times 10^{-7}$  [M]或更低。

30

28. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体, 其解离率常数为  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec]或更低。

29. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体，其结合率常数为  $6.55 \times 10^4$  [l/M.Sec]或更高。

5            30. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体，其解离率常数为  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec]或更低，结合率常数为  $6.55 \times 10^4$  [l/M.Sec]或更高。

31. 按照权利要求 27 的抗体，其中解离常数通过表面胞质团共振传感器测定。

10

32. 按照权利要求 28 或 30 的抗体，其中解离率常数通过表面胞质团共振传感器测定。

15

33. 按照权利要求 29 或 30 的抗体，其中结合率常数通过表面胞质团共振传感器测定。

34. 按照权利要求 27 的抗体，其中解离常数为  $1.02 \times 10^{-11}$  -  $1.86 \times 10^{-7}$  [M]。

20

35. 按照权利要求 27 的抗体，其中解离常数为  $1.02 \times 10^{-10}$  -  $1.86 \times 10^{-8}$  [M]。

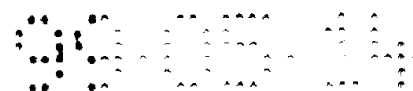
36. 按照权利要求 27 的抗体，其中解离常数为  $1.34 \times 10^{-10}$  -  $3.58 \times 10^{-10}$  [M]。

25

37. 按照权利要求 28 的抗体，其中解离率常数为  $7.38 \times 10^{-6}$  -  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec]。

30

38. 按照权利要求 28 的抗体，其中解离率常数为  $7.38 \times 10^{-5}$  -  $1.22 \times 10^{-2}$  [l/Sec]。



39. 按照权利要求 28 的抗体, 其中解离率常数为  $1.66 \times 10^{-4}$ - $3.16 \times 10^{-4}$  [l/Sec]。

5 40. 按照权利要求 28 的抗体, 其中解离率常数为  $2.32 \times 10^{-4}$  [1/Sec]。

41. 按照权利要求 29 的抗体, 其中结合率常数为  $6.55 \times 10^4$ - $1.24 \times 10^7$  [l/M.Sec]。

10 42. 按照权利要求 29 的抗体, 其中结合率常数为  $6.55 \times 10^5$ - $1.24 \times 10^6$  [l/M.Sec]。

43. 按照权利要求 29 的抗体, 其中结合率常数为  $7.23 \times 10^5$ - $1.03 \times 10^6$  [l/M.Sec]。

44. 按照权利要求 29 的抗体，其中结合率常数为  $1.03 \times 10^6$  [l/M.Sec]。

45. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体, 其解离率常数为  $2.32 \times 10^{-4} - 3.16 \times 10^{-4}$  [l/Sec], 结合率常数为  $0.883 \times 10^6 - 1.03 \times 10^6$  [l/M.Sec]。

46. 按照权利要求 27-45 之一的抗体，其中抗体是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或灵长类化抗体。

25 47. 包括编码抗人副甲状腺激素相关蛋白鼠单克隆抗体L链V区的碱基序列的DNA。

48. 按照权利要求 47 的 DNA, 其中 L 链 V 区包括如 SEQ ID NO: 45 所示的氨基酸序列。

49. 按照权利要求 47 的 DNA，其中编码 L 链 V 区的碱基序列如 SEQ ID NO：65 所示。

5 50. 包含编码抗人副甲状腺激素相关蛋白鼠单克隆抗体 H 链 V 区的碱基序列的 DNA。

51. 按照权利要求 50 的 DNA，其中 H 链 V 区包括如 SEQ ID NO：46 所示的氨基酸序列。

10 52. 按照权利要求 50 的 DNA，其中编码 H 链 V 区的碱基序列如 SEQ ID NO：57 所示。

53. 编码权利要求 1-3 之一的嵌合 L 链的 DNA。

15 54. 按照权利要求 53 的 DNA，其中编码嵌合 L 链的 DNA 包括如 SEQ ID NO：65 所示的碱基序列。

55. 编码权利要求 4-6 之一的嵌合 H 链的 DNA。

20 56. 按照权利要求 55 的 DNA，其中编码嵌合 H 链的 DNA 包括如 SEQ ID NO：57 所示的碱基序列。

57. 包含编码权利要求 8-15 之一多肽的碱基序列的 DNA。

25 58. 按照权利要求 57 的 DNA，包括如 SEQ ID NO：66-74 所示之一的碱基序列。

59. 包含编码权利要求 16-21 之一多肽的碱基序列的 DNA。

30 60. 按照权利要求 59 的 DNA，包括如 SEQ ID NO：58 所示的碱

基序列。

61. 编码权利要求 22 或 23 人源化抗体 L 链的 DNA 。

5           62. 人源化抗体 L 链的 DNA ， 包括编码 SEQ ID NO： 47-55 所示之一氨基酸序列的碱基序列。

63. 按照权利要求 62 的 DNA ， 其中人源化抗体 L 链的 DNA 包括 SEQ ID NO： 66-74 所示之一的碱基序列。

10

64. 编码权利要求 24 或 25 人源化抗体 H 链的 DNA 。

65. 人源化抗体 H 链的 DNA ， 包括编码 SEQ ID NO： 56 所示氨基酸序列的碱基序列。

15

66. 按照权利要求 65 的 DNA ， 其中人源化抗体 H 链的 DNA 包括 SEQ ID NO： 58 所示的碱基序列。

67. 包含权利要求 47-66 之一 DNA 的重组载体。

20

68. 用权利要求 67 的重组载体转化的转化体。

69. 制备抗人副甲状腺激素相关蛋白嵌合抗体的方法，包括用包含权利要求 47-49 之一， 53 和 54 DNA 的表达载体和包含权利要求 50-52，  
25   55 和 56 之一 DNA 的表达载体转化转化体，培养该转化体，从得到的培养物中收集抗人副甲状腺激素相关蛋白的嵌合抗体。

70. 制备抗人副甲状腺激素相关蛋白嵌合抗体的方法，包括用包含权利要求 57， 58 和 61-63 之一 DNA 的表达载体和包含权利要求 59，  
30   60 和 64-65 之一 DNA 的表达载体转化转化体，培养该转化体，从得到

的培养物中收集抗人副甲状腺激素相关蛋白的嵌合抗体。

71. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的人源化抗体作为有效成分的药物组合物。

5

72. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的人源化抗体作为有效成分的高钙血症抑制剂。

73. 抗人副甲状腺激素相关蛋白的人源化抗体作为有效成分的恶性肿瘤相关高钙血症抑制剂。

10

74. 按照权利要求 73 的高钙血症抑制剂，其中恶性肿瘤至少选自下述组中的癌症之一：胰腺癌、肺癌、咽癌、喉癌、舌癌、齿龈癌、食道癌、胃癌、胆管癌、乳腺癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌和前列腺癌，以及恶性淋巴瘤。

15

75. 包括权利要求 27-46 之一抗体作为有效成分的药物组合物。

76. 包括权利要求 27-46 之一抗体作为有效成分的高钙血症抑制剂。

20

77. 包括权利要求 27-46 之一抗体作为有效成分的恶性肿瘤相关高钙血症抑制剂。

78. 按照权利要求 77 的高钙血症抑制剂，其中恶性肿瘤至少选自下述癌症之一：胰腺癌、肺癌、咽癌、喉癌、舌癌、齿龈癌、食道癌、胃癌、胆管癌、乳腺癌、肾癌、膀胱癌、子宫癌和前列腺癌，以及恶性淋巴瘤。

25

79. 抗人副甲状腺激素相关蛋白人源化抗体作为有效成分的低磷

30

血症改善药物。

80. 按照权利要求 79 的低磷血症改善药物，其中低磷血症是低磷性佝偻病。

5

81. 按照权利要求 79 的低磷血症改善药物，其中低磷血症是低磷性维生素-D 抗性佝偻病。

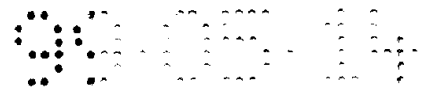
10

82. 权利要求 27-46 之一的抗体作为有效成分的低磷血症改善药物。

83. 按照权利要求 82 的低磷血症改善药物，其中低磷血症是低磷性佝偻病。

15

84. 按照权利要求 82 的低磷血症改善药物，其中低磷血症是低磷性维生素-D 抗性佝偻病。



## 说明书

### 抗人副甲状腺激素相关蛋白的抗体

5

#### 技术领域

本发明涉及包括抗副甲状腺激素相关蛋白的鼠单克隆抗体可变区（V区）和人抗体恒定区（C区）的人/鼠嵌合抗体，抗副甲状腺激素相关蛋白（PTHrP）的鼠单克隆抗体V区轻链（L链）和重链（H链）的互补决定区移植到人抗体上的人源化抗体，所述抗体的L链和H链，以及含构成所述抗体L链或H链V区的多肽。

10

15

本发明还涉及编码上述抗体尤其是其V区的碱基序列的DNA，以及编码V区的L或H链的DNA。本发明进一步涉及含所述DNA的重组载体和所述载体转化的宿主。

20

另外，本发明涉及制备抗PTHrP嵌合和人源化抗体的方法。并且本发明涉及包括抗PTHrP抗体作为有效成分的高钙血症抑制剂或低磷酸盐血症促进剂的药剂组合物。

#### 发明背景

25

与恶性肿瘤有关的高钙血症是在5%到20%的恶性肿瘤病人中发现的严重并发症，它被认为是恶性肿瘤的最终症状，因为如果保留该症状不治疗的话它必然导致死亡。高钙血症的控制极大程度地影响病人的预测和QOL（生命质量）；因此，它将在临床上起重要作用。

30

通常，恶性肿瘤病人的高钙血症粗略地分为HHM（恶性体液性高钙血症），其基于产生肿瘤的体液性骨重吸收因子，和LOH（局部溶骨性高钙血症），其基于转移或渗透到骨的肿瘤的局部活性。HHM中，认为骨吸收或骨硬化被促进从而增加钙的流动并产生高钙血症同时伴

随肾钙排泄能力的降低（S. Wada 和 N. Nagata, 国际医学, 69, 644-648）。

据认为血清钙浓度超过 12 毫克/dl 时表现出高钙血症的症状; 因为其症状: 厌食 (食欲不振), 恶心和呕吐在恶性肿瘤病人的早期是非特异性症状。当高钙血症恶化, 由于肾小管远侧的损伤造成水浓缩能力的降低导致多尿, 厌食的恶心并伴随由于水摄入缺乏导致的脱水。

Moseley, J. M. 等发现类似副甲状腺激素 (PTH) 的物质副甲状腺激素相关蛋白 (此后用作 “PTHrP”) 是一类与恶性肿瘤有关的高钙血症中导致 HHM 的体液因子: 美国国家科学院年报 (1987) 84, 5048-5052。

因此, 分离了编码 PTHrP 的基因 (Suva, L. J. 等, 科学 (1987) 237, 893), 并且该分析说明了由于基因的交替拼接产生具有 139、141 和 173 个氨基酸的三种人 PTHrP, 这是由于具有完全结构的 PTHrP(1-139) 的限制性降解各种片段都出现在血液中: Baba, H., 临床钙 (1995) 5, 229-223。PTHrP 中, N 末端 13 个氨基酸中的 8 个氨基酸与 PTH 的相应部位等同, 推测其 14 到 34 位的氨基酸位点也与 PTH 类似具有立体结构; 因此, PTHrP 和 PTH 至少在 N 末端区与共同的 PTH/ PTHrP 受体结合: Jueppner, H. 等, 科学 (1991) 254, 1024-1026; Abou-Samra, A-B. 等, 美国国家科学院年报 (1992) 89, 2732-2736。

有报道大量肿瘤组织产生 PTHrP, 还曾阐述不仅在肿瘤中, 胎儿以及成人的各种正常组织也产生 PTHrP, 包括皮肤、中枢神经系统、子宫、胎盘、哺乳期乳腺、甲状腺、副甲状腺、肾上腺、肝、肾和膀胱: Burtis, W. J., 临床化学 (1992) 38, 2171-2183; Stewart, A.F. 和 Broadus, A. E., 临床内分泌学杂志 (1991) 71, 1410-1414。另外, 认为 PTHrP 对胎儿到新生儿期比在母亲中维持更高浓度的钙的代谢调节

起重要作用。

5 目前已知 PTH/PTHrP 受体主要存在于骨和肾中 (C. Shigeno, 临床钙 (1995) 5, 355-359), 其通过 PTHrP 与受体的结合激活多数胞间信号传送系统。其中之一是腺苷酸环化酶, 另一个磷脂酶 C。腺苷酸环化酶的激活增加了胞间 cAMP 的浓度从而激活蛋白激酶 A。磷脂酶 C 分解 4,5-二磷酸酯酰肌醇产生肌醇 1,4,5-三磷酸酯和二酯酰甘油。G 蛋白也参与这些信号传送系统: Coleman, D. T.等, 副甲状腺激素活性的生化机理, “副甲状腺素” (Bilezikian, J. P.等), Raven Press, New York (1994) 239 页。

通过这些信号传导系统, PTHrP 导致 HHM 中观察到的高钙血症、低磷酸盐血症, 肾磷酸盐重吸收能力的降低, 肾 cAMP 排泄的增加等。

15 因此, 曾经阐述 PTHrP 与恶性肿瘤有关的高钙血症密切相关。治疗恶性肿瘤相关高钙血症时, 曾使用降血钙素、类固醇药物、消炎痛、无机磷酸盐、二磷酸盐等, 还曾使用体液置换。然而, 这些药物连续使用后发现其作用降低, 表现出严重副作用, 或其药理作用的缓慢表达; 因此十分期望使用具有较高治疗作用和较低副作用的试剂或药物。

20 另一方面, Kukreja, S. C.等报道了一种新的治疗恶性肿瘤相关高钙血症的方法: 当对人肺或喉癌细胞移植产生高钙血症的无胸腺鼠以抗 PTHrP 的中和抗血清给药时, 血钙浓度和尿 cAMP 水平降低: 临床研究杂志 (1988) 82, 1798-1802。Kanji Sato 等报道当对移植产生 PTHrP 的人肿瘤的裸鼠使用抗 PTHrP (1-34) 抗体给药时, 高钙血症缓解, 鼠的存活时间显著延长: J. Bone & Mine. Res. (1993) 8, 849-860。另外, 日本未审专利申请 (公开号为 4-228089) 公开了抗人 PTHrP (1-34) 的鼠/人嵌合抗体。

30 鼠单克隆抗体在人体中具有高度免疫原性 (有时也用作“抗原

性”），其限制了鼠单克隆抗体在人体中的药物治疗价值。例如，当给人使用鼠抗体给药时，它可能被作为外源物质代谢掉；因此，鼠抗体在人体中的半衰期相对较短，其期望作用就不能有效表达。另外，抗给药的鼠抗体的人抗鼠抗体（HAMA）可能导致对病人不利和危险的免疫反应，例如血清疾病和其它过敏反应。因此，不能频繁地对人使用鼠单克隆抗体给药。

为了解决这些问题，已经研究出了降低非人来源的抗体，例如，来源于鼠的单克隆抗体的免疫原性的方法。方法之一是制备嵌合抗体，其中可变区（V区）来源于鼠单克隆抗体，恒定区（C区）来源于合适的人抗体。

由于产生的嵌合抗体具有原始鼠抗体的完整可变区，可以认为该嵌合抗体S具有与原始鼠抗体相同的特异性的抗原结合。进一步，这样的嵌合抗体具有的来源于非人动物的氨基酸序列的比例实质上降低；因此，与原始鼠抗体相比，该单克隆抗体同等程度与其抗原结合，而免疫原性降低，但是仍然可能产生对鼠可变区产生一些免疫应答：LoBuglio, A. F. 等人，美国科学院年报，86, 4220-4224, 1989。

降低鼠抗体的免疫原性的第二个方法还更复杂，但是预期可进一步大大地降低鼠抗体的潜在免疫原性。这种方法中，仅仅鼠抗体可变区的互补决定区（CDR）移植到人抗体可变区从而产生“改造”的人可变区。如果需要，鼠抗体可变区中支持CDR的框架区（FR）的部分氨基酸序列可以移植到人抗体可变区，以使改造的人可变区CDR结构更接近来原始鼠抗体的类似结构。

然后，这些人源化的改造的人抗体可变区与人恒定区组合。在最后的改造的人源化抗体中，来源于非人氨基酸序列的部分仅仅是CDR以及很少一部分FR。CDR由高度可变氨基酸序列和不表现任何种属特异性的序列组成。因此，包含鼠CDR的人源化抗体将不再显示比含人CDR

的天然存在的人抗体更强的免疫原性。

关于人源化抗体，还有如下参考文献： Riechmann, L.等，自然，  
332, 323-327, 1988； Verhoeye, M.等，科学， 239, 1534-1536, 1988；  
5 Kettleborough, C. A.等，蛋白工程， 4, 773-783, 1991； Maeda, H.等，  
人抗体和杂交瘤， 2, 124-134, 1991； Gorman, S. D.等，美国国家科学  
院年报， 88, 4181-4185, 1991； Tempest, P. R.等，生物/技术， 9, 266-  
271, 1991； Co, M. S.等，美国国家科学院年报， 88, 2869-2873, 1991；  
10 Carter, P.等，美国国家科学院年报， 89, 4285-4289, 1992； Co, M. S.  
等，免疫学杂志， 148, 1149-1154, 1992； Sato, K.等，癌症研究， 53,  
851-856, 1993。

虽然期望人源化抗体对以前提及的治疗目的有益，但是上述的参考  
文献中未公开抗 PTHrP 的人源化抗体，也没有任何建议。另外，在人源  
15 化抗体的制备过程中通常没有适用于任何抗体的标准方法；有必要研究  
特异抗原显示充分结合力和中和活性的人源化抗体的多种手段和方  
法：参见，例如， Sato, K.等，癌症研究， 53, 851-856, 1993。

## 发明公开

20 本发明的一个目的是提供包含抗 PTHrP 鼠单克隆抗体可变区（V  
区）和人抗体恒定区（C区）的人/鼠嵌合抗体，在人源化抗体中抗 PTHrP  
鼠单克隆抗体轻链（L链）和重链（H链）构成的V区的互补决定区  
移植到人抗体的人源化抗体，所述抗体的L链和H链，以及含所述抗体  
L链或H链构成的V区的多肽。

25 本发明的另一个目的是提供含编码上述抗体尤其是其V区的碱基  
序列的DNA，编码含V区多肽的L或H链的DNA。本发明的再一个  
目的是提供含所述DNA的重组载体和用所述载体转化的宿主。另外，  
本发明的目的还在于提供制备抗 PTHrP 嵌合人源化抗体的方法。本发明  
30 的目的还在于提供具有高度中和活性的抗 PTHrP 抗体。本发明的目的还

在于提供一种抗 PTHrP 的抗体或人源化抗体作为有效成分的药物组合  
物和高钙血症抑制剂、低磷酸盐血症改善剂、或碱毒症改善剂。

5 作为综合上述目的后充分研究的结果，本发明人已经成功地获得一  
种抗 PTHrP 鼠单克隆抗体，其免疫原性在人体中降低；从而实现了本发  
明。

10 本发明涉及含人抗体 L 链 C 区和抗 PTHrP 的鼠单克隆抗体 L 链 V  
区的嵌合 L 链。上述 L 链 V 区包括如 SEQ ID NO:45 所示的氨基酸序列，  
L 链 C 区包括 C $\lambda$  区。

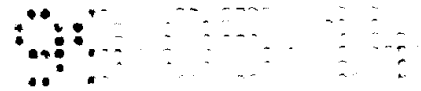
15 本发明还涉及含人抗体 H 链 C 区和抗 PTHrP 的鼠单克隆抗体 H 链  
V 区的嵌合 H 链。上述 H 链 V 区包括如 SEQ ID NO:46 所示的氨基酸序  
列，H 链 C 区包括 C $\lambda$  1 区。

另外，本发明还涉及含所述嵌合 L 链和所述嵌合 H 链的抗 PTHrP  
的嵌合单克隆抗体。

20 并且，本发明还包括含人抗体 L 链 V 区的 1 到 4 框架区和抗 PTHrP  
的鼠单克隆抗体 L 链 V 区的 1 到 3 互补决定区的人源化抗体的 L 链 V  
区的多肽。互补决定区 1 到 3 分别为如 SEQ ID NO:59-61 所示的氨基酸  
序列；框架区 1 到 3 分别来源于人抗体 HSU03868 的 1 到 3 框架区，框  
架区 4 包括来源于人抗体 S25755 框架区 4；或者框架区 1 到 3 包括基  
25 基本上分别与人抗体 HSU03868 的框架区 1 到 3 相同的序列，框架区 4 包  
括基本上与人抗体 S25755 的框架区 4 相同的序列。

本文使用的术语“基本上相同”是指人源化抗体中使用的人抗体的  
框架区具有形成鼠单克隆抗体互补决定区需要的氨基酸缺失、替换和/  
或添加以使人源化抗体具有与鼠单克隆抗体等同的活性。

30



因此，本发明涉及含人源化抗体 L 链 V 区的多肽，其中框架区的第 36 和 49 位氨基酸按照 Kabat 的规定（Kabat, E. A. 等，美国健康和人类服务部，美国政府印刷局，1991）分别为酪氨酸和天冬氨酸。

5            本发明还涉及含人源化抗体 L 链 V 区的多肽，该人源化抗体含如 SEQ ID NO：48-51 所示的任意一种氨基酸序列。

本发明进一步涉及含人源化抗体 L 链 V 区的多肽，其中框架区的第 45 位和 87 位氨基酸按照 Kabat 的规定分别为赖氨酸和异亮氨酸。

10

本发明还进一步涉及含人源化抗体 L 链 V 区的多肽，该人源化抗体含如 SEQ ID NO：52-55 所示的任意一种氨基酸序列。

15

本发明进一步涉及含人源化抗体 H 链 V 区的多肽，该人源化抗体包括人抗体 H 链 V 区的框架区 1 到 4 以及抗人 PTHrP 的鼠单克隆抗体 H 链 V 区的互补决定区 1 到 3。该互补决定区 1 到 3 分别包括含 SEQ ID NO：62-64 所示的氨基酸序列，该框架区 1 到 4 包括来源于人亚群 III（人亚群 III（HSG III），Kabat, E. A. 等，美国健康和人类服务部，美国政府印刷局，1991）的人抗体的框架区 1 到 4，尤其是那些分别来源于人抗体 S31679 的框架区 1 到 4 的序列，或者分别与人抗体 S31679 的框架区 1 到 4 基本上等同的序列。

20

本发明还涉及包含 SEQ ID NO：56 所示氨基酸序列的人源化抗体的 H 链 V 区的多肽。

25

本发明还涉及含所述人源化抗体 L 链 V 区多肽以及含人抗体 L 链 C 区多肽的抗人 PTHrP 的人源化抗体的 L 链。C 区包括 C $\lambda$  区，框架区 1 到 3 包括基本上分别与人抗体 HSU03868 的框架区 1 到 3 等同的序列，框架区 4 包括基本上与人抗体 S25755 的框架区 4 等同的序列，互补决定区 1 到 3 的氨基酸序列分别包括 SEQ ID NO：59-61 表示的序列。

30

本发明还涉及抗人 PTHrP 人源化抗体的 H 链，该人源化抗体包含所述人抗体 H 链 C 区和 H 链 V 区的多肽。C 区包括 C<sub>γ</sub> 1 区，框架区 1 到 4 包括来源于 HSG III 的人抗体的框架区 1 到 4，互补决定区 1 到 3 分别为 SEQ ID NO：62-64 所示的氨基酸序列。

仍进一步，本发明还涉及具有弱抗原性和高度中和活性的抗 PTHrP 抗体。PTHrP 抗体包括可以在人类疾病治疗中使用的人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和灵长类源化抗体。该抗体具有低解离常数。本发明的该抗体由于其具有低解离常数而具有高度中和活性，因此可以治疗人类疾病。

本发明抗体的解离常数为  $1.86 \times 10^{-7}$  [M] 或更低，解离率常数为  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec] 或更低，结合率常数为  $6.55 \times 10^4$  [l/M.Sec] 或更高。这些常数使用 RI 标记配基或表面质粒基因组共振传感器通过 Scatchard 分析测定。

本发明进一步涉及含编码抗人 PTHrP 的鼠单克隆抗体 L 链 V 区或 H 链 V 区碱基序列的 DNA。上述 L 链 V 区和 H 链 V 区分别包括 SEQ ID NO：45-46 所示的氨基酸序列，包括编码 L 链 V 区的碱基序列的 DNA 包括例如，SEQ ID NO：65 所示序列的，包括编码 H 链 V 区的碱基序列的 DNA 包括 SEQ ID NO：57 所示序列。

另外，本发明也涉及编码所述嵌合 L 或 H 链的 DNA。编码所述 L 链的 DNA 包括，例如，SEQ ID NO：65 所示的碱基序列，编码所述 H 链的 DNA 包括 SEQ ID NO：57 所示的碱基序列。

仍然进一步，本发明还涉及包括编码所述人源化抗体 L 链 V 区或 H 链 V 区的碱基序列的 DNA。含编码 L 链 V 区碱基序列的 DNA 包括 SEQ ID NO：66-74 所示的碱基序列，含编码 H 链 V 区碱基序列的 DNA 包

括 SEQ ID NO： 58 所示的序列。

本发明还涉及含编码 SEQ ID NO： 47-55 所示氨基酸序列之一的  
碱基序列的人源化抗体的 L 链 V 区的 DNA。所述 DNA 包括 SEQ ID  
5 NO： 66-74 所示的碱基序列。

仍然进一步，本发明涉及编码 SEQ ID NO： 56 所示氨基酸序列的  
人源化抗体的 H 链 V 区的 DNA。所述 DNA 包括 SEQ ID NO： 58 所  
示的碱基序列。

本发明进一步涉及含任意一种所述 DNA 的重组载体。

本发明仍然进一步涉及用所述重组载体转化的转化体。

另外，本发明也涉及制备抗人副甲状腺激素相关蛋白的嵌合或人源  
15 化抗体的方法，包括培养所述转化体，从得到的培养物中收集抗人副甲  
状腺激素相关蛋白的嵌合或人源化抗体。

仍然进一步，本发明还涉及包括所述抗体作为有效成分的药物组合  
20 物，或高钙血症抑制剂或低磷酸盐血症促进剂。恶性肿瘤导致钙血，恶  
性肿瘤相关高钙血症病人通常观察到低磷酸盐血症症状。因此，本发明  
的抗体可用于治疗恶性肿瘤或用于改善高钙血或低磷酸盐血症症状。恶  
性肿瘤包括，但不限于，至少选自于下述之一：胰腺、肺、咽、喉、舌、  
25 齿龈、食道、胃、胆管、乳腺、肾、膀胱、子宫和前列腺癌，以及恶性  
淋巴瘤。本发明的高钙血症抑制剂可以用于治疗产生高钙血症的任何恶  
性肿瘤。

下面将详细描述本发明。

# 1. 制备抗人 PTHrP 的鼠单克隆抗体

可以通过骨髓瘤细胞与来源于用抗原免疫接种的动物的抗体产生细胞之间的细胞融合制备杂交瘤，并且从得到的杂交瘤中选择产生特异性抑制 PTHrP 活性的抗体的克隆，以获得抗 PTHrP 的鼠单克隆抗体。

## 5 (1) 抗原的制备

用于免疫接种动物的 PTHrP 包括具有采用重组 DNA 技术或化学合成制备的 PTHrP，和来源于产生高钙血症的癌细胞上清液的 PTHrP 的全部或部分氨基酸序列的多肽。例如，含已知 PTHrP (Kemp, B. E.等, 科学 (1987) 238, 1568-1570) 第 1 到第 34 位氨基酸的多肽[PTHrP (1-34)]可以用作上述抗原。人 PTHrP (1-34) 具有 SEQ ID NO: 75 所示的氨基酸序列。

得到的 PTHrP 附着于载体蛋白例如甲状腺球蛋白，随后添加佐剂。可以与任何佐剂，包括弗氏的完全和不完全佐剂混和。

15

## (2) 免疫接种并收集抗体产生细胞

对哺乳动物例如小鼠、大鼠、马、猴、兔、山羊或绵羊使用上述得到的抗原给药。可以用已知方法进行免疫接种，包括静脉注射、皮下注射和腹膜内注射。免疫接种的注射间歇没有特别限制，可以为几天到几星期，最好为 4 到 21 天。

20

最后一次免疫接种后两或三天，收集抗体产生细胞。抗体产生细胞包括脾、淋巴结、和外周血细胞；通常使用脾细胞。用于免疫接种的抗原的单剂量为每只鼠 100  $\mu$ g。

25

## (3) 抗体滴度的确定

为了确定免疫接种动物的免疫反应水平以及从经过细胞融合处理的细胞中选择感兴趣的杂交瘤，测量了免疫接种动物血液中的抗体滴度或抗体产生细胞上清液中的抗体滴度。

30

抗体测定方法是已知的，包括 EIA（酶免疫分析）、RIA（放射性免疫分析）、和 ELISA（酶联免疫吸附分析）。

#### (4) 细胞融合

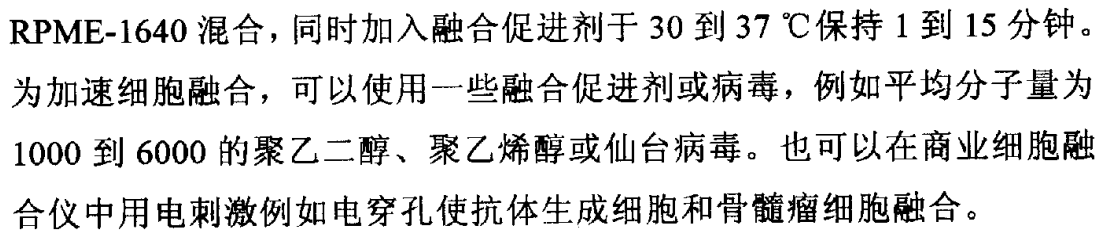
5           用于与抗体生成细胞融合的骨髓瘤细胞包括来源于各种动物例如小鼠、大鼠和人的细胞系，本领域通常提供了这些技术。使用的合适细胞系是具有药物抗性，在选择性培养基例如 HAT 培养基中非融合状态不能存活，而融合状态能够存活的细胞系。通常使用 8-氮鸟嘌呤抗性细胞系，其缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶，不能在次黄嘌呤-氨基  
10           嘌呤-胸腺嘧啶（HAT）培养基中生长。

可以使用的合适骨髓瘤细胞包括各种已知细胞系，例如 P3  
（ P3x63Ag8.653 ）（免疫学杂志，（ 1979 ） 123 ： 1548-1550）；  
P3x63Ag8U.1(微生物学和免疫学当前主题（ 1978 ） 81 ： 1-7)； NS-1  
（ Kohler, G 和 Milstein, C.欧洲免疫学杂志（ 1976 ） 6： 511-519 ）；  
MPC-11 （ Margulies, D. H.等，细胞（ 1976 ） 8： 405-415 ）； SP2/0  
（ Shulman, M.等，自然（ 1978 ） 8： 276： 269-270 ）； FO （ de St.  
Groth, S. F.等，免疫学方法杂志（ 1980 ） 35 ： 1-21 ）； S194  
（ Trowbridge, I.S., 实验医学杂志（ 1978 ） 148： 313-323 ）；和 R210  
（ Galfre, G 等，自然（ 1979 ） 277： 131-133 ）。

可以从脾细胞、淋巴结细胞等获得抗体产生细胞。即，从上述任一种动物提取或分离脾、淋巴结等，压碎组织。得到的压碎的材料在培养基或缓冲液中悬浮，例如 PBS、DMEM 或 RPMI1640，用不锈钢筛等过滤并离心以制备所需的抗体生成细胞。

然后，所述骨髓瘤细胞和抗体生成细胞进行细胞融合。

细胞融合可以按照下述方式进行：将骨髓瘤细胞和抗体生成细胞以 1:1 到 1:10 的比率在培养动物细胞的培养基中例如 MEM、DMEM 或



### (5) 杂交瘤的选择和克隆

10

因此，选择生长的细胞作为杂交瘤。

然后用限制性稀释、荧光活化的细胞分类仪或其它方法筛选这些杂交瘤。最后，获得生成单克隆抗体的杂交瘤。

20

从获得的杂交瘤中收集单克隆抗体的方法包括常规细胞培养法和腹水形成法。

细胞培养法中，杂交瘤培养在培养动物细胞的培养基中，例如含 10%到 20%胎牛血清的 PRMI-1640 培养基、MEM 培养基或无血清培养基中，常规条件（例如，37 °C，5%CO<sub>2</sub>）培养 2 到 14 天，从上清液中收集抗体。

30

如果需要纯化这些方法中的抗体,可以任意选择或组合已知的方法例如硫酸铵沉淀、离子交换色谱和亲和色谱。

## 2. 嵌合抗体的构建

5 (1) 含编码抗人 PTHrP 的鼠单克隆抗体 V 区的碱基序列的 DNA 的克隆

### (i) mRNA 的制备

为克隆含编码抗人 PTHrP 的鼠单克隆抗体 V 区的碱基序列的 DNA, 用常规方法处理收集的杂交瘤, 例如, 胍-超离心 (Chirgwin, J. M.等, 生物化学 (1979) 18, 5294-5299), 或 AGPC 法 (Chomczynski, P 等, 分析生化 (1987) 162, 156-159), 以制备总 RNA, 其中 mRNA 通过, 例如, 附加在 mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia) 上的低聚 (dT) -纤维素填充柱制备。也可以使用快速预备 mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia AB) 制备 mRNA 而不必提取总 RNA。

15

### (ii) cDNA 的制备和扩增

用上述 (i) 中获得的 mRNA, 用逆转录酶合成 L 和 H 链的 V 区的每一 cDNA。在 cDNA 的合成中, 低聚-dT 引物或其它与 L 或 H 链 C 区杂交的合适引物, 例如, 可以使用具有 SEQ ID NO: 1 所示碱基序列的 MHC2 引物。

20

在 cDNA 的合成中, 所述 mRNA 和引物混合, 在逆转录酶存在下能够实现反应, 反应条件为: 例如, 52 °C, 30 分钟。

25

可以通过 5'-RACE 法基础上的 PCR (聚合酶链反应) 使用 5'-Ampli FINDER RACE 试剂盒 (CLONTECH Inc.) 扩增 L 链和 H 链的 cDNA (Frohman, M. A.等, 美国国家科学院年报, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A.等, 核酸研究, 17, 2919-2932, 1989)。因此, 将 Ampli FINDER 锚 (SEQ ID NO: 42) 连接于上述合成的 cDNA 的 5' 末端, PCR 合成含编码 L 和 H 链 V 区碱基序列的 DNA。(此后, 含编码 L 链

30

V 区碱基序列的 DNA 有时简单地表示为“L 链 V 区的 DNA”或“编码 L 链 V 区的 DNA”。这也同样适用于 H 链 V 区、C 区等。)

可以使用的扩增 L 链 V 区 DNA 的引物包括, 例如, 锚引物 (SEQ ID NO: 2) 和从鼠抗体 L  $\lambda$  链恒定区 (C  $\lambda$  区) 保守序列设计出的引物, 例如具有 SEQ ID NO: 4 所示碱基序列的 ML C 引物。可以使用的扩增 H 链 V 区 DNA 的引物包括, 例如, 锚引物 (SEQ ID NO: 2) 和 MHC-G1 引物 (SEQ ID NO: 3) (S. T. Jones, 等, 生物技术, 9, 88, 1991)。

### (iii) DNA 的纯化和碱基序列的确定

PCR 产物按照常规方法进行琼脂糖凝胶电泳以切下感兴趣的 DNA 片段, 然后回收, 纯化并且连接到载体 DNA 上。

DNA 的纯化可以用商业试剂盒例如 GENECLEAN II、BIO 101 进行。本文适用的运载 DNA 片段的载体 DNA 是已知的, 例如, pUC19 或 Bluescript。

用已知连接试剂盒 (Takara Shuzo) 连接所述 DNA 和载体 DNA 以制备重组载体。得到的重组载体导入例如大肠埃希氏杆菌 JM109, 选择氨苄青霉素抗性菌落; 载体 DNA 用已知方法制备: J. Sambrook, 等, “分子克隆”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。限制性酶消化载体 DNA 后, 再用已知方法例如双脱氧法 (J. Sambrook, 等, “分子克隆”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 确定需要 DNA 的碱基序列。本发明可以使用自动碱基序列决定装置 (DNA 测序仪 373A; ABI Inc.)。

### (iv) 互补决定区

H 和 L 链 V 区形成抗原结合位点, 它们的整体结构互相具有某些相似。即, 四个框架区 (FR) 部分通过三个高变区或互补决定区

( CDR ) 连接。FR 中的氨基酸序列具有相对较高的保守性，而 CDR 区氨基酸序列的变异性较高：Kabat, E. A. 等，“免疫相关蛋白序列”美国健康和人类服务部，1983。

5           四个框架区的许多部分具有 $\beta$ 片层结构，因此，三个 CDR 形成一个环。CDR 有时也形成 $\beta$ 片层结构的一部分。因此，通过在成对区与三个 CDR 结合形成抗原结合位点的 FR，三个 CDR 在空间上彼此非常靠近。

10           鉴于这一事实，可以比较抗人 PTHrP 的鼠单克隆抗体可变区的氨基酸序列和 Kabat 等制备的抗体氨基酸序列数据库（“免疫相关蛋白序列”美国健康和人类服务部，1983）寻找 CDR 区以便研究二者之间的同源性。

15           ( 2 ) 嵌合抗体表达载体的构件。

编码鼠单克隆抗体 L 和 H 链 V 区（此后有时也将鼠抗体的 L 或 H 链表示为“鼠 L 链”等，人抗体的 L 或 H 链表示为“人 H 链”等）的 DNA 片段被克隆后，将编码鼠 V 区的 DNA 和编码人抗体恒定区的 DNA 连接，并表达产生嵌合抗人 PTHrP 抗体。

20           制备嵌合抗体的标准方法涉及将存在于克隆 cDNA 中的鼠引导序列和 V 区序列连接到已经存在于哺乳动物细胞表达载体中编码人抗体 C 区的序列上。或者，存在于克隆 cDNA 中的鼠引导序列和 V 区序列连接到编码人抗体 C 区的序列上，随后连接到哺乳动物细胞表达载体上。

25           包含人抗体 C 区的多肽可以是人抗体的任意 H 或 L 链 C 区，包括，例如，人 H 链的  $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 2$ 、 $C\gamma 3$  或  $C\gamma 4$ ，或者 L 链的  $C\lambda$  或  $C\kappa$ 。

30           为制备嵌合抗体，首先构建两个表达载体；即，构建了处于表达控制区例如增强子/启动子系统调控下，包含编码鼠 L 链 V 区和人 L 链 C

区的 DNA 的表达载体，和处于表达控制区例如增强子/启动子系统调控下，包含编码鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区 DNA 的表达载体。然后用这些表达载体共转化宿主细胞例如哺乳动物细胞，转化细胞体外或体内培养以制备嵌合抗体：参见，例如， WO91/16928。

5

或者，存在于克隆 cDNA 中的鼠引导序列和编码鼠 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 以及鼠引导序列和编码鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 导入单一表达载体（参见，例如， WO94/11523），所述载体用于转化宿主细胞；然后体内或体外培养转化的宿主以制备所需的嵌合抗体。

10

#### (i) 嵌合抗体 H 链的制备

可以将包含编码鼠 H 链 V 区碱基序列的 cDNA（此后也表示为“H 链 V 区的 cDNA”）导入含有包含编码人抗体 H 链 C 区碱基序列的基因组 DNA（此后也表示为“H 链 C 区的基因组 DNA”）或编码所述区的 cDNA（此后也表示为“H 链 C 区的 cDNA”）的合适表达载体中。H 链 C 区包括，例如， C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3 或 C $\gamma$ 4 区。

15

(i-a) 含有编码 H 链 C 区的基因组 DNA 的嵌合 H 链表达载体的构建

20

具有编码 H 链 C 区，尤其是编码 C $\gamma$ 1 区的基因组 DNA 的表达载体包括，例如， HEF-PMh-g  $\gamma$  1(WO92/19759)和 DHFR- $\Delta$  E-RVh-PM1-f (WO92/19759)。

25

当编码鼠 H 链 V 区的 cDNA 插入这些表达载体时，可以用 PCR 法将合适的碱基序列导入所述 cDNA。可以用特别设计的 PCR 引物进行 PCR，例如，使得所述 cDNA 具有识别合适限制性酶的 5'端识别序列和紧接在起始密码子之前具有促进转录效能的 kozak 共有序列，以及使得所述 cDNA 具有识别合适限制性酶的 3'端识别序列和拼接供体位点以将基因组 DNA 的初级转录产物正确地拼接获得 mRNA 由此将合适的碱基序列导入表达载体的 PCR 引物。

30

编码鼠 H 链 V 区的构建的 cDNA 用合适的限制性酶处理后，即插入所述表达载体以构建包含编码 H 链 C 区（C $\gamma$ 1 区）基因组 DNA 的嵌合 H 链表达载体。

5

(i-b) 含有包括编码 H 链碱基序列的 cDNA 的嵌合 H 链表达载体的构建

具有编码 H 链 C 区（例如 C $\gamma$ 1 区）cDNA 的表达载体可以按照下列方式构建：包括编码人源化 PM1 抗体 H 链 V 区的 DNA 和人抗体 H 链 C 区 C $\gamma$ 1（N. Takahashi 等，细胞，29，671-679（1982））的基因组 DNA 的表达载体 DHFR- $\Delta$ E-RVh-PM1-f（参见 WO92/19759）以及包括编码人源化 PM1 抗体 L 链 V 区的基因组 DNA 和人抗体 L $\kappa$  链 C 区的基因组 DNA 的表达载体 RV1-PM1a（参见，WO92/19759）导入 CHO 细胞，从上述 CHO 细胞制备 mRNA，编码人源化 PM1 抗体 H 链 V 区的 cDNA 和编码人抗体 H 链 C 区（C $\gamma$ 1）的 cDNA 通过 RT-PCR 方法克隆，并且连接到用合适限制性酶处理的动物细胞表达载体上，以构建需要的表达载体。

当编码鼠 H 链 V 区的 cDNA 直接连接到编码人抗体 H 链 C 区 C $\gamma$ 1 的 cDNA 上时，可以用 PCR 法将合适的碱基序列导入包含编码 H 链 V 区的 cDNA 的片段。例如，可以用特别设计的 PCR 引物进行 PCR，例如，使得所述 cDNA 具有 5'端识别序列以识别合适的限制性酶并且紧接在密码子之前具有 kozak 共有序列由此促进转录效能的 PCR 引物，以及使得所述 cDNA 具有 3'端识别序列以识别合适的限制性酶由此将这些合适的碱基序列导入所述 cDNA 的 PCR 引物。

25

编码鼠 H 链 V 区的构建 cDNA 用合适的限制性酶处理，连接到编码所述 H 链 C 区 C $\gamma$ 1 的 cDNA 上，然后插入表达载体例如 pCOS1 或 pCHO1，以构建包含编码嵌合抗体 H 链 cDNA 的表达载体。

30

(ii) 嵌合抗体 L 链的制备

可以将编码鼠 L 链 V 区的 cDNA 与编码人抗体 L 链 C 区的基因组 DNA 或 cDNA 连接起来，并导入合适的表达载体，获得表达嵌合抗体的 L 链的载体。L 链 C 区包括，例如， $\kappa$  链和  $\lambda$  链。

5

(ii-a) 包含编码嵌合 L $\lambda$  链 cDNA 的表达载体的构建

当构建包含编码鼠 L 链 V 区 cDNA 的表达载体时，可以用 PCR 法将合适的碱基序列导入所述表达载体中。例如，可以用特别设计的 PCR 引物，例如，使得所述 cDNA 具有 5' 端的识别合适限制性酶的识别序列和紧接在密码子之前促进转录效能的 Kozak 共有序列，以及使得所述 cDNA 具有 3' 端识别合适限制性酶的识别序列，由此将合适的碱基序列导入所述 cDNA 的 PCR 引物实现 PCR。

10

编码人 L  $\lambda$  链 C 区的 cDNA 的全部碱基序列可以用 DNA 合成仪合成，并用 PCR 法构建。已知人 L  $\lambda$  链 C 区具有至少四种不同的同种型，每一型都可以用于构建表达载体。例如，在寻找与克隆的鼠单克隆抗体 L  $\lambda$  链 C 区的同源性时，可以选择人 L  $\lambda$  链 C 区片段（登记号 X57819）的同种型 Mcg+Ke+Oz-（P. Dariavach 等美国国家科学院年报，84，9074-9078，1987）用来构建表达载体。为构建已知的人 L  $\lambda$  链 C 区例如 Mcg+Ke+Oz- 的 cDNA，例如，设计了下面四种如 SEQ ID NO：11-14 所示的引物：引物 MBC1HGP1（SEQ ID NO：11）和 MBC1HGP3（SEQ ID NO：13）具有有义 DNA 序列，引物 MBC1HGP2（SEQ ID NO：12）和 MBC1HGP4（SEQ ID NO：14）具有反义 DNA 序列，其中每种引物的每一末端都具有 20 到 23 个碱基对的互补序列。

20

25

MBC1HGPS（SEQ ID NO：15）和 MBC1HGPR（SEQ ID NO：16）称为外部引物，它们具有分别和 MBC1HGP1 和 MBC1HGP4 同源的序列，并且具有合适限制性酶的识别序列。通过 PCR 法，四种引物被组装起来合成全长 cDNA，并且加入外部引物以扩增 cDNA。

30

通过 PCR 法组装是指 MBC1HGP1 和 MBC1HGP2 或 MBC1HGP3 和 MBC1HGP4 通过它们的互补序列退火以合成 MBC1HGP1-MBC1HGP2 片段和 MBC1HGP3-MBC1HGP4 片段，每一片段再次通过互补序列退火合成编码全长人 L  $\lambda$  链 C 区的 cDNA。

5

编码人 L  $\lambda$  链 C 区的构建的 cDNA 和上述编码鼠 L 链 V 区的构建的 cDNA 可以在合适的限制性酶位点之间连接起来并插入表达载体例如 pCOS1 或 pCHO1，以构建包括编码嵌合抗体 L  $\lambda$  链 cDNA 的表达载体。

10

(ii-b) 包括编码嵌合 L  $\kappa$  链 cDNA 的表达载体的构建

15

当包含编码鼠 L 链 V 区的 cDNA 的表达载体构建时，可以用 PCR 法将合适的碱基序列导入所述 cDNA。例如，可以用特别设计的 PCR 引物进行 PCR，例如，使得所述 cDNA 在其 5' 末端具有识别合适限制性酶的识别序列和促进转录效能的 Kozak 共有序列的 PCR 引物，以及使得所述 cDNA 具有识别合适限制性酶的 3' 端识别序列，由此将合适的碱基序列导入所述 cDNA 的 PCR 引物。

20

连接于编码鼠 L 链 V 区 DNA 的编码人 L  $\kappa$  链 C 区的 DNA 可以从，例如，含基因组 DNA 的 HEF-PM1k-gk 构建（参见 WO92/19759）。

25

可以用 PCR 法将合适限制性酶的识别序列导入编码 L  $\kappa$  链 C 区的 DNA 的 5' 和 3' 末端，上述构建的编码鼠 L 链 V 区的 DNA 可以与编码 L  $\kappa$  链 C 区的 DNA 彼此连接并插入表达载体例如 pCOS1 或 pCHO1，以构建包括编码嵌合抗体 L  $\kappa$  链 cDNA 的表达载体。

### 3. 人源化抗体的制备

#### (1) 人抗体同源物的筛选

30

为制备鼠单克隆抗体的 CDR 接支到人抗体上的人源化抗体，期望鼠单克隆抗体的 FR 和人抗体的 FR 之间存在高度同源性。因此，对鼠

抗人 PTHrP 单克隆抗体 H 和 L 链的 V 区和应用蛋白数据库描述过结构的所有已知的抗体的 V 区进行了比较。同时也比较了它们和 Kabat 等分类的人抗体亚群 ( HSG : 人亚群 ) 的抗体 FR 的长度、氨基酸同等性等: Kabat, E. A. 等美国健康和人类服务部, 美国政府印刷局, 1991。

5

按照 Kabat 等对 HSG 的分类人 H 链 V 区可以分为 HSG I 到 III, 鼠抗人 PTHrP 单克隆抗体 H 链 V 区与 HSG III 的共有序列具有 82.7% 的同源性。另一方面, 按照 Kabat 等对 HSG 的分类人 L  $\lambda$  链 C 区可以分为 HSG I 到 VI, 鼠抗人 PTHrP 单克隆抗体 L  $\lambda$  链 V 区与属于任何亚群的人 L  $\lambda$  链 V 区的共有序列不具有高度同源性。

10

当鼠抗人 PTHrP 单克隆抗体人源化时, 期望使用的人 H 链 V 区属于 HSG III 并具有最高度同源性, 或者具有相应规范 FR 结构的人 H 链 V 区 ( Chothia C 等, 分子生物学杂志, 196, 901-917, 1987 ) 作为人 H 链 V 区, 用来构建人源化抗体。另外, 因为人 L  $\lambda$  链 V 区亚群不具有最高度同源性的共有序列, 构建人源化抗体时期望使用蛋白数据库中已注册的具有高度同源性的人抗体 L  $\lambda$  链 V 区。

15

## (2) 编码人源化抗体 V 区的 DNA 的设计

20

设计编码人源化抗体 V 区的 DNA 的第一步是选择人抗体 V 区作为设计的基础。

25

本发明中, 与鼠抗体 V 区 FR 的同源性高于 80% 的人抗体 V 区的 FR 可以用于人源化抗体。作为基本上相同 FR 的框架, H 链 V 区 FR 可以包括来源于亚群 III 的 FR, 例如 S31679: NBRF-PDB, Cuisinier A. M. 等, 欧洲免疫杂志, 23, 110-118, 1993。另外, 作为基本上相同 FR 的框架, L 链 V 区的 FR 可以包括例如, 来源于人抗体 HSU03868 ( GEN-BANK, Deftos M. 等, Scand. 免疫杂志, 39, 95-103, 1994 ) 的 FR1、FR2、和 FR3 以及来源于人抗体 S25755 ( NBRF-PDB ) 的 FR4。

30

人抗体 S31679 从人胎肝的 cDNA 文库克隆，而人抗体 HSU03868 作为编码人 L  $\lambda$  链 V 区的新的基因克隆。

### (3) 包含人源化抗体 V 区多肽的制备

5 本发明的人源化抗体中，所述抗体的 C 区和 V 区的框架区来源于人，V 区的互补决定区（CDR）来源于鼠（图 1）。按照本发明可以用 PCR 法通过称为 CDR 接支的方式得到包含人源化抗体 V 区的多肽，只要人抗体的 DNA 片段可以用作模版。“CDR 移植”指一种方法，其中制备编码来源于鼠的 CDR 的 DNA 片段，并用其替换作为模版的人抗体的 CDR。

10 如果没有提供用作模版的人抗体的 DNA 片段，可以用 DNA 合成仪合成数据库中登记的碱基序列，并可以用 PCR 法制备编码人源化抗体 V 区的 DNA。另外，当数据库中仅登记了一种氨基酸序列，可以根据 Kabat, E. A. 等（美国健康和人类服务部，美国政府印刷局，1991）报道的抗体惯用密码子的知识从氨基酸序列推断全部碱基序列。这种碱基序列在 DNA 合成仪上合成，然后用 PCR 法制备人源化抗体 V 区的 DNA，并导入合适宿主，随后在其中表达以制备需要的多肽。

20 当存在作为模版的人抗体 DNA 片段时，通过 PCR 法的 CDR 移植的一般程序描述如下。

#### (i) CDR 移植

25 假设编码 V 区的 DNA 包括编码如图 2 所示按顺序互相连接的 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 的 DNA。

首先，合成来源于鼠的对应于相应 CDR 的 DNA 片段。CDR1 到 3 在以前克隆的鼠 H 和 L 链 V 区的碱基序列基础上合成。合成的移植引物 B 和 E，其中应该具有沿有义链方向与鼠 CDR1 和人抗体 FR2 杂交的序列，移植引物 E 应该具有沿反义链方向与 CDR1 和人抗体 FR1 杂交

的引物（如图 2（1））。同样，合成移植引物 C 和 F 以及引物 D 和 G。另外，也分别合成了可以与 FR1 的上游区和 FR4 下游区杂交的称为“外部引物”并相应地表示为图 2（1）的 A 和 H 的合适引物。可以按照已知程序分离和提取所述移植引物：Sambrook,等, 分子克隆：实验手册，Cold Spring Harbor 实验出版社，1989。

然后，用移植引物 E 和外部引物 A，移植引物 B 和 F，移植引物 C 和 G 以及移植引物 D 和外部引物 H 进行第一次 PCR，分别形成 A-E、B-F、C-G 和 D-H 片段（如图 2（2））。

因为设计的移植引物 B 的上游区和部分移植引物 E 的下游区相互重叠（移植引物 C 和 F 以及 D 和 G 也同样），这些片段可以在合适温度条件下反应分别与互补序列退火，然后通过 PCR 组合从 A 到 H 长度的 DNA。获得编码 V 区的 DNA 片段后，可以加入外部引物 A 和 H，并且进行第二次 PCR 以生产编码人源化抗体 V 区的 DNA，该人源化抗体 FR1 到 4 来源于人，CDR1 到 3 来源于鼠。然后，所述 DNA 可以导入合适的宿主以表达生产需要的多肽（图 2（3））。

## （ii）DNA 和编码人源化 H 链 V 区的表达载体的构建

本发明中，作为人源化抗体模版的编码人抗体 H 链 V 区 DNA 的全碱基序列可以通过 DNA 合成仪合成，并通过 PCR 法构建，即使所述 DNA 不能从天然来源获得。

鼠抗人 PTHrP 单克隆抗体的 H 链 V 区与属于人亚群 III 的 S31679 高度同源。为了使用这一人抗体作为模版构建编码人源化 H 链 V 区的 DNA，使用了例如 SEQ ID NO：23-26 所示的四种引物。引物 MBC1HGP1（SEQ ID NO：23）和 MBC1HGP3（SEQ ID NO：24）具有有义 DNA 序列，引物 MBC1HGP2（SEQ ID NO：25）和 MBC1HGP4（SEQ ID NO：26）具有反义 DNA 序列。其中将每种引物设计为每一末端都具有 15 到 21 碱基对的互补序列。

外部引物 MBC1HVS1 (SEQ ID NO: 27) 和 MBC1HVR1 (SEQ ID NO: 28) 具有分别和 MBC1HGP1 和 MBC1HGP4 同源的序列, 并且分别具有合适限制性酶的识别序列。通过 PCR 法, 四种引物被组装起来合成全长 cDNA, 并且加入外部引物以扩增 DNA。 “通过 PCR 法组装” 涉及 MBC1HGP1 和 MBC1HGP2 或 MBC1HGP3 和 MBC1HGP4 通过它们的互补序列退火以合成 MBC1HGP1-MBC1HGP3 片段和 MBC1HGP2-MBC1HGP4 片段, 每一片段再次通过互补序列退火合成编码人源化 H 链 V 区的全长 DNA。

人抗体 H 链 C 区可以是任何人 H 链 C 区, 例如, 人 H 链的 C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3 或 C $\gamma$ 4。

编码上述构建的人源化抗体 H 链 V 区的 DNA 可以连接到任何人抗体 H 链 C 区的 DNA 上, 例如, 人 H 链 C $\gamma$ 1 区。如同 “嵌合抗体 H 链的制备” 一节所提到的, H 链 V 区的 DNA 可以用合适的限制性酶处理然后连接到编码人 H 链 V 区的 DNA 上使之处于表达调控区的控制下例如增强子/启动子系统, 以制备包含编码人源化 H 链 V 区和人 H 链 V 区的 DNA 的表达载体。

### (iii) DNA 和编码人源化 L 链 V 区表达载体的构建

本发明中, 用作模板的编码人抗体 L 链 V 区 DNA 的全部碱基序列可以用 DNA 合成仪合成, 用 PCR 法构建, 即使不象编码 H 链 V 区的 DNA 那样 L 链 V 区的 DNA 可获得。

为了构建用作与鼠抗人 PTHrP 单克隆抗体 L 链 V 区有最高同源性的人抗体 SU03868 的模板的人源化 L 链 V 区的 DNA, 使用了如 SEQ ID NO: 29-32 所示的四种引物。引物 MBC1LGP1 (SEQ ID NO: 29) 和 MBC1LGP3 (SEQ ID NO: 30) 具有有义 DNA 序列, 引物 MBC1LGP2 (SEQ ID NO: 31) 和 MBC1LGP4 (SEQ ID NO: 32)

具有反义 DNA 序列。其中每种引物的每一末端都设计具有 15 到 21 碱基对的互补序列。

外部引物 MBC1LVS1 ( SEQ ID NO : 33 ) 和 MBC1LVR1 ( SEQ ID NO : 34 ) 分别具有和 MBC1LGP1 和 MBC1LGP4 同源的序列, 并且分别具有相应的合适限制性酶的识别序列。通过 PCR 法, 四种引物被组装起来合成全长 DNA , 并且加入外部引物以扩增 DNA 。 “通过 PCR 法组装” 涉及 MBC1LGP1 和 MBC1LGP3 或 MBC1LGP2 和 MBC1LGP4 通过它们的互补序列退火以合成 MBC1LGP1-MBC1LGP3 片段和 MBC1LGP2-MBC1LGP4 片段, 每一片段再次通过互补序列退火合成编码人源化 H 链 V 区的全长 DNA 。

人抗体 L 链 C 区可以是任何人 L 链 C 区, 例如, 人 L 链的 C  $\lambda$  或 C  $\kappa$  。

将编码上述构建的人源化抗体 L 链 V 区的 DNA 可以连接到任何人抗体 L 链 C 区的 DNA 上, 例如, 人 L 链 C  $\lambda$  区。L 链 V 区的 DNA 可以用合适的限制性酶处理然后连接到编码人 L  $\lambda$  链 C 区的 DNA 上处于表达调控区例如增强子/启动子系统的控制下, 以制备包含人源化 L 链 V 区和人 L  $\lambda$  链 C 区 DNA 的表达载体。

如果包含人源化抗体 V 区的多肽可以如上述制备, 就不必清楚是否所述多肽具有抗体活性, 例如对其抗原的结合或中和活性。尤其对于 L 链, 因为鼠抗人 PTHrP 单克隆抗体 L 链 V 区来源于非常罕见的 V  $\lambda$  x 基因, 就有必要将它和人源化 H 链结合并在动物细胞例如 COS7 中表达来研究其是否存在活性。

杂交 V 区的构建 ( Ohtomo,T.等, 分子免疫学, 32 , 407-416 , 1995 ) 和证实可以作为说明人源化抗体 V 区 FR 有助于人源化抗体的结合和中和活性的有效方法。为了阐明应该突变本发明人源化抗体 L 链 V

区中的氨基酸以赋予其活性，构建了人源化抗体 FR 区片段与来源于鼠的 FR 区片段重组的 DNA，并评价每一区的人源化作用。

5 如图 3 所示，制备了具有包含来源于人抗体 FR1 和 FR2 和来源于鼠抗体 FR3 和 FR4 的重组 V 区多肽的抗体（例如，具有称作为“杂合抗体”重组片段的抗体），仅 FR1 来源于人的杂合抗体，以及仅 FR2 来源于人的杂合抗体。编码这些杂合抗体的每种 DNA 分别被导入表达载体，短暂表达人源化抗体以研究是否存在抗体活性。

10 通过这种方法，本发明人研究了包含 L 链 V 区的多肽的抗原结合和中和活性，最后发现存在于 FR2 和 FR3 中的某些氨基酸被替换。

发现存在于 FR2 和 FR3 区对活性有贡献的氨基酸后，本发明人进一步阐述了 FR2 区的第 36、45、49 位的氨基酸和 FR3 区第 87 位氨基酸（抗体氨基酸的编号由 Kabat, E. A. 等确定（美国健康和人类服务部，美国政府印刷局，1991））对活性有贡献。

因此，本发明制备了 V 区的某个或某些氨基酸被突变（例如替换）的多肽。

20 首先，通过前述 CDR 移植法制备包括具有导入了氨基酸序列的某个或某些氨基酸突变 V 区的多肽作为基础。这种基础多肽包含 SEQ ID NO: 47 所示的氨基酸序列，并称之为“a 型”（表 1 中的 a）。

25 然后，以 a 型为基础，制备 FR 的一个或一些氨基酸突变的多种变异片段。

可以通过设计编码导致产生需要突变的氨基酸的寡聚核苷酸引物（诱变引物）并用所述引物进行 PCR 来导入突变。

30

因此，可以制备 V 区（b 到 t 型）FR2 和 FR3 的特定氨基酸被突变的肽（表 1 中的 b 到 t）。

5

表 1

|              | FR1                              | 1  | 2 | 3  | CDR1              |
|--------------|----------------------------------|----|---|----|-------------------|
| MBC II. PEP  | 123456789012345678901234567890   |    |   |    | 12345             |
|              | EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS   |    |   |    | SYGMS             |
|              | *                                | ** | * | *  |                   |
| S31679       | QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFS   |    |   |    | SYAMH             |
| hMBC1-H. pep | -----                            |    |   |    | SYGMS             |
|              | FR2                              | 4  | 5 | 6  |                   |
| MBC H. PEP   | 67890123456789                   |    |   |    |                   |
|              | WIRQTPDKRLEWVA                   |    |   |    | 012A3456789012345 |
|              | *                                | *  | * | *  | TISSGGSYTYPPDSVKG |
| S31679       | WVRQAPGKGLEWVA                   |    |   |    | VISYDGSNKYYADSVKG |
| hMBC1-H. pep | -----                            |    |   |    | TISSGGSYTYPPDSVKG |
|              | FR3                              | 7  | 8 | 9  | CDR3              |
| MBC H. PEP   | 67890123456789012ABC345678901234 |    |   |    | 10                |
|              | RFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMFYCAR  |    |   |    | 567890A12         |
|              | *                                | *  | * | *  | QTTMTYFAY         |
| S31679       | RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  |    |   |    | ESRGDY            |
| hMBC1-H. pep | -----                            |    |   |    | QTTMTYFAY         |
|              | FR4                              |    |   | 11 |                   |
|              |                                  |    |   |    | 34567890123       |
|              |                                  |    |   |    | WGQGTLLVTVSA      |
|              |                                  |    |   |    | *                 |
|              |                                  |    |   |    | WGQGTLLVTVSS      |
|              |                                  |    |   |    | -----             |

|              | FR1                     | 1                       | 2            | CDR1         | 3               | FR2             | 4            | CDR2         | 5 |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|---|
| MBC L. PEP   | 12345678901234567890123 | 12345678901234567890123 | 45678901234  | 45678901234  | 567890123456789 | 567890123456789 | 01234ABCD56  | 01234ABCD56  |   |
|              | QLVLTQSSS-ASFSLGASAKLTC | QLVLTQSSS-ASFSLGASAKLTC | TLSSQHSTYTIE | TLSSQHSTYTIE | WYQQQLKPPKYVMD  | WYQQQLKPPKYVMD  | LKQDGSHTGSD  | LKQDGSHTGSD  |   |
|              | QLVLTQSPS-ASASLGASVKLTC | QLVLTQSPS-ASASLGASVKLTC | TLSSGHSSYAIA | TLSSGHSSYAIA | WHQQQPEKGPRLMK  | WHQQQPEKGPRLMK  | LNSDGSHTSKGD | LNSDGSHTSKGD |   |
| HSU03868     |                         |                         |              |              |                 |                 |              | LKQDGSHTGSD  |   |
| hMBC1-L. pep |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| a            |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| b            |                         |                         |              |              |                 |                 | P---         |              |   |
| c            |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| d            |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| e            |                         |                         |              |              |                 |                 | P---         |              |   |
| f            |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| g            |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| h            |                         |                         |              |              |                 |                 |              |              |   |
| i            |                         |                         |              |              |                 |                 | K---         |              |   |
| j            |                         |                         |              |              |                 |                 | K---         |              |   |
| k            |                         |                         |              |              |                 |                 | K-V---       |              |   |
| l            |                         |                         |              |              |                 |                 | K-V-D        |              |   |
| m            |                         |                         |              |              |                 |                 | D            |              |   |
| n            |                         |                         |              |              |                 |                 | V---         |              |   |
| o            |                         |                         |              |              |                 |                 | V-D          |              |   |
| p            |                         |                         |              |              |                 |                 | K---         |              |   |
| q            |                         |                         |              |              |                 |                 | K-D          |              |   |
| r            |                         |                         |              |              |                 |                 | D            |              |   |
| s            |                         |                         |              |              |                 |                 | K-V-D        |              |   |
| t            |                         |                         |              |              |                 |                 | V-D          |              |   |

|              | FR3                              | CDR3          | FR4            |
|--------------|----------------------------------|---------------|----------------|
|              | 6                                | 9             | 10             |
|              | 7                                |               | 11             |
| MBC L. PEP   | 8                                |               |                |
|              | 78901234567890123456789012345678 | 9012345ABCD67 | 890123456A7890 |
|              | GIPDRFSGSSGADRYLSISNIQPEDEAMYIC  | GVGDTIKEQFVYV | FGGCTKVTVLGQP  |
|              | * * * * *                        |               |                |
| HSU03868     | GIPDRFSGSSGAERYLTISLQSEDEADYYC   | QTWGTGI       |                |
| hMBC1-L. pep |                                  | GVGDTIKEQFVYV |                |
| a            |                                  |               | L---           |
| b            |                                  |               | L---           |
| c            | p---                             |               | L---           |
| d            |                                  |               | L---           |
| e            | I---                             |               | L---           |
| f            | I---                             |               | L---           |
| g            | p---                             |               | L---           |
| h            |                                  |               | L---           |
| i            | I---                             |               | L---           |
| j            |                                  |               | L---           |
| k            |                                  |               | L---           |
| l            |                                  |               | L---           |
| m            |                                  |               | L---           |
| n            |                                  |               | L---           |
| o            |                                  |               | L---           |
| p            | I---                             |               | L---           |
| q            | I---                             |               | L---           |
| r            | I---                             |               | L---           |
| s            | I---                             |               | L---           |
| t            | I---                             |               | L---           |

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

编码上述构建的人源化抗体 L 链 V 区每种类型的 DNA 可以连接到任何人抗体 L 链 C 区的 DNA 上, 例如人 L 链 C  $\lambda$  区。因此用合适的限制性酶处理它, 并连接到编码人 L  $\lambda$  链 C 区的 DNA 上以在表达调控序列例如增强子/启动子系统的控制下, 以构建包含编码人源化 L 链 V 区

5 每种类型的 DNA 和编码人源化 L  $\lambda$  链 C 区 DNA 的表达载体。

以前构建的编码人源化抗体 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 以及编码人源化 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 也可以导入单一表达载体例如 WO94/11523 公开的载体, 所述载体可以用于转化宿主细胞, 转化的

10 宿主可以在体内或体外培养以制备需要的人源化抗体。

#### 4. 嵌合抗体和人源化抗体的制备

为制备嵌合或人源化抗体, 应该制备上述的两种表达载体。因此, 对于嵌合抗体, 构建了包含在表达调控区例如增强子/启动子系统控制下

15 编码鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA 的表达载体, 以及包含在表达调控区例如增强子/启动子系统控制下编码鼠 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 的表达载体。对于人源化抗体, 构建了包含在表达调控区例如增强子/启动子系统控制下编码人源化 H 链 V 区和人 H 链 C 区 DNA 的表达载体, 以及包含在表达调控区例如增强子/启动子系统控制下编码人源

20 化 L 链 V 区和人 L 链 C 区 DNA 的表达载体。

然后用这些表达载体共转化宿主细胞例如哺乳动物细胞, 得到的转化细胞体内或体外培养以制备嵌合或人源化抗体 (参见, 例如, WO91/16928)。

25

或者, 编码 H 链 V 区和 C 区的 DNA 和编码 L 链 V 区和 C 区的 DNA 可以连接到单一载体上并转化合适的宿主细胞以制备抗体。因此, 在嵌合抗体的表达中, 编码存在于克隆 cDNA 中的鼠引导序列、鼠 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA, 以及编码鼠引导序列、鼠 L 链 V 区和人 L 链

30 C 区的 DNA 被导入单一表达载体例如 WO94/11523 所公开的载体。在

人源化抗体的表达中，编码人源化 H 链 V 区和人 H 链 C 区的 DNA，以及编码人源化 L 链 V 区和人 L 链 C 区的 DNA 被导入单一表达载体例如 WO94/11523 所公开的载体。这样的一种载体用于转化宿主细胞，转化宿主在体内或体外培养以制备感兴趣的嵌合或人源化抗体。

5

这样通过培养用编码所述嵌合或人源化抗体的 DNA 转化的转化体制备的感兴趣的嵌合或人源化抗体可以从细胞内部或外部分离出来并纯化为单体。

10

本发明的感兴趣的嵌合或人源化抗体可以使用蛋白 A 琼脂糖柱分离和纯化，但也可以使用常规蛋白的分离纯化方法，因此该步骤没有限制。例如，可以非强制性选择或组合各种色谱法、超滤、盐析和透析方法以分离和纯化嵌合或人源化抗体。

15

可以使用任何表达系统制备本发明的抗人 PTHrP 嵌合或人源化抗体。例如，真核细胞包括动物细胞例如已建立的哺乳动物细胞系、霉菌和真菌细胞、以及酵母细胞；原核细胞包括细菌细胞例如大肠埃希氏杆菌细胞。本发明的嵌合或人源化抗体优选在哺乳动物细胞例如 COS 或 CHO 细胞中表达。

20

可以使用用于哺乳动物细胞表达的任何常规启动子。例如，人细胞巨大病毒（HCMV）即早期启动子是优选使用的。含 HCMV 启动子的表达载体的例子包括来源于 pSV2neo 的 HCMV-VH-HC  $\gamma$  1 和 HCMV-VL-HCK（WO92/19759）。

25

另外，本发明可以使用的用于哺乳动物细胞中基因表达的启动子包括病毒启动子，例如逆转录病毒、多瘤病毒、腺病毒和猿病毒（SV）40，以及来源于哺乳动物细胞的启动子，例如人多肽链延长因子-1  $\alpha$ （HEF-1  $\alpha$ ）。例如，按照 Mulligan 等的方法（自然，277，108，

30

1979）可以方便地使用 SV40 启动子；按照 Mizushima 等的方法（核酸

研究, 18, 5322, 1990) 可以方便地使用启动子 HEF-1  $\alpha$ 。

本发明可用的复制起点包括来源于 SV40、多瘤病毒、腺病毒或牛乳突淋巴瘤病毒 (BPV) 的复制起点。另外表达载体可以包含磷酸转移酶 APH (3') II 或 I (neo) 基因、胸腺嘧啶核苷激酶 (TK) 基因、大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Ecogpt) 基因或二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因作为增加宿主细胞系统中基因拷贝数的选择性标识物。

## 5. 嵌合抗体和人源化抗体的抗原结合和中和活性的评价

### (1) 抗体浓度的确定

得到的纯化抗体的浓度可以用 ELISA 法确定。

按照以下方式制备测定抗体浓度的 ELISA 平板: 制备的浓度为例如 1 $\mu$ g/毫升的山羊抗人 IgG 抗体 100 $\mu$ l 固定在用于 ELISA 的 96 孔平板的每个孔中 (例如, Maxisorp, NUNC)。用 200 $\mu$ l 稀释缓冲液隔断后 (例如, 50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.05% 吐温 20, 0.02%NaN<sub>3</sub>, 1%牛血清白蛋白(BSA), pH7.2), 每孔加入逐步稀释的有嵌合、杂合或人源化抗体表达的 COS-7 或 CHO 细胞上清液, 或者纯化的嵌合、杂合或人源化抗体, 加入 100 $\mu$ l 碱式磷酸酶结合山羊抗人 IgG 抗体, 然后加入 1 毫克/毫升基础溶液 (Sigma 104, 对-硝基苯磷酸, SIGMA), 随后用微平板读数仪(Bio Rad)测定 405 nm 处的吸收值。纯化的 Hu IgG1  $\lambda$  (结合位点) 可以用作浓度测定中的标准品。

### (2) 抗原结合能力的确定

确定抗原结合能力的 ELISA 平板按照下述方式制备: 制备的浓度为 1 $\mu$ g/毫升的人 PTHrP (1-34) 100 $\mu$ l 固定在用于 ELISA 的 96 孔平板的每个孔中。用 200 $\mu$ l 稀释缓冲液隔断后, 每孔加入逐步稀释的有嵌合、杂合或人源化抗体表达的 COS-7 或 CHO 细胞上清液中, 或者纯化的嵌合、杂合或人源化抗体中, 加入 100 $\mu$ l 碱式磷酸酶结合山羊抗人 IgG 抗

体，然后加入 1 毫克/毫升基础溶液（Sigma 104，对-硝基苯磷酸，SIGMA），随后用微平板读数仪(Bio Rad)测定 405 nm 处的吸收值。

### （3）中和活性的确定

5           可以通过例如大鼠骨肉瘤细胞系 ROS17/2.8-5 细胞确定鼠、嵌合和人源化抗体的中和活性（Sato, K 等, 内分泌学公报, 116, 113-120, 1987）。因此，用 4 mM 氢化可的松刺激 ROS17/2.8-5 细胞以诱导 PTH/PTHrP 受体。cAMP 降解酶与 1 mM 异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX, SIGMA）抑制。待测定中和活性的鼠、嵌合或人源化抗体与等量 PTHrP（1-34）混合，得到的每种抗体和 PTHrP（1-34）的混合物分别加入平板的各个孔中。可以通过测量大鼠骨肉瘤细胞系 ROS17/2.8-5 细胞由于用 PTHrP 刺激导致 cAMP 产生的数量评估鼠、嵌合或人源化抗体的中和活性。

### 15           （4）PTHrP 和抗 PTHrP 抗体之间相互作用的动力学分析

          本发明可以用多种方法和程序分析 PTHrP 和抗 PTHrP 之间相互作用的动力学。特别是，可以通过 Scatchard 分析法和称为 BIACORE 的表面胞质团共振传感器（Pharmacia Biotech 研究开发）测定解离常数、解离率常数和结合率常数。称为 BIACORE 的表面胞质团共振传感器分析将在后文作为一个实施例描述。

          BIACORE 的基本结构包括光源、棱镜、检测器和微通道。操作中，配基固定在盒式传感器顶部，被分析物注射入传感器。当它们之间存在亲和力时，即可光学测定结合量。

25           检测原理是称为表面胞质团共振现象。即，入射光照射到玻璃盒金属膜之间的表面，以至发生全反射，某一角度的入射光用于刺激表面胞质团，随后衰减。角度随着与金属膜（传感器）接触溶剂浓度的变化而改变。BIACORE 即检测这种改变。

30

BIACORE 中, 这种变化称为共振信号(SPR 信号), 0.1 度的改变为 1000 RU (共振单位)。1000 RU 对应约 1 纳克蛋白结合到表面积为 1 mm<sup>2</sup> 的金薄层传感器上的变化。对于蛋白, 50 RU(50 pg)的变化就完全可以检测得到。

5

检测信号由附在 BIACORE 上的计算机转化成结合曲线, 其被称为传感图, 该图由计算机即时显示: Natsume, T.等(1995), 实验医学, 13, 563-569; Karlsson, R.等(1991) 免疫方法学杂志 145, 229-240。

10

本发明抗 PTHrP 抗体的动力学参数, 即解离常数(KD)、解离率常数(Kdiss)和结合率常数(Kass)可以通过上述 BIACORE 方法测定。

15

考虑到中和活性, 本发明的抗 PTHrP 抗体最好具有尽可能小的解离常数 (KD 值)。本发明的抗 PTHrP 抗体优选 KD 值为  $1.86 \times 10^{-7}$  或更低, 更优选的是  $1.8 \times 10^{-8}$  或更低, 最优选的是  $3.58 \times 10^{-10}$  或更低。

20

KD 值通过两个参数确定, 解离率常数(Kdiss)和结合率常数(Kass) ( $KD=Kdiss/Kass$ )。因此可以看到, 当 Kdiss 值较小而 Kass 值较大时 KD 值较小。

25

尤其, 本发明的抗 PTHrP 抗体 Kdiss 值可以为  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec] 或更低。Kdiss 值优选  $1.22 \times 10^{-2}$  [l/Sec]或更低, 更优选  $3.16 \times 10^{-4}$  [l/Sec]或更低, 最优选  $2.32 \times 10^{-4}$  [l/Sec]或更低。

30

另一方面, Kass 值可以为  $6.55 \times 10^4$  [l/M.Sec]或更高。Kass 值优选  $6.55 \times 10^5$  [l/M.Sec]或更高, 更优选  $0.883 \times 10^6$  [l/M.Sec]或更高, 最优选  $1.03 \times 10^6$  [l/M.Sec]或更高。

并且还优选的 Kdiss 值为  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec]和 Kass 值可以为 6.55

$\times 10^4$  [l/M.Sec]或更高的抗 PTHrP 抗体。

更具体地说，本发明的抗 PTHrP 抗体的 KD 值范围为  $1.02 \times 10^{-11}$  到  $1.86 \times 10^{-7}$  [M]，优选  $1.02 \times 10^{-10}$  到  $1.86 \times 10^{-8}$  [M]，更优选  $1.34 \times 10^{-10}$  到  $3.58 \times 10^{-10}$  [M]，最优选  $2.25 \times 10^{-10}$  到  $3.58 \times 10^{-10}$  [M]。

Kdiss 值在  $7.38 \times 10^{-6}$  到  $1.22 \times 10^{-1}$  [l/Sec]之间，优选  $7.38 \times 10^{-5}$  到  $1.22 \times 10^{-2}$  [l/Sec]，更优选  $1.66 \times 10^{-4}$  到  $3.16 \times 10^{-4}$  [l/Sec]，最优选  $1.66 \times 10^{-4}$  到  $2.32 \times 10^{-4}$  [l/Sec]之间。

Kass 值在  $6.55 \times 10^4$  到  $1.24 \times 10^7$  [l/M.Sec]之间，优选  $6.55 \times 10^5$  到  $1.24 \times 10^6$  [l/M.Sec]，更优选  $7.23 \times 10^5$  到  $1.03 \times 10^6$  [l/M.Sec]，最优选  $0.883 \times 10^6$  到  $1.03 \times 10^6$  [l/M.Sec]之间。

这些 KD、Kdiss 和 Kass 值可以通过 Scatchard 分析或表面胞质团共振传感器例如 BIACORE，并且最好是 BIACORE 测定。

6. 含抗 PTHrP 抗体或人源化抗体作为有效成分的药剂组合物和高钙血症抑制剂。

可以通过给表现高钙血症的动物使用抗 PTHrP 抗体或人源化抗体给药并测定高钙血症指标来确定人源化抗体抗 PTHrP 的治疗作用。表现高钙血症的动物或高钙血症病人中，通常观察到低磷酸盐血症；本发明的抗体也可以用于改善低磷酸盐血症。

本发明使用的抗体是抗 PTHrP 抗体，包括具有解离常数、解离率常数和结合率常数的抗 PTHrP 人抗体、嵌合抗体和灵长类化或人源化抗体。该抗体通过与 PTHrP 结合而中和了 PTHrP 活性，该抗体特别优选，人源化#23-57-137-1 抗体。人源化#23-57-137-1 抗体的制备方法将在实施例 1 到 3 中描述。

本发明使用的抗体可以通过常规纯化方法例如盐析、应用 HPLC 等的凝胶过滤、和使用蛋白 A 柱等的亲和色谱的组合得到高度纯化的纯品。因此可以通过常规免疫方法例如放射免疫法（RIA）、酶免疫法（EIA，ELISA）或免疫荧光分析确定纯化抗体对 PTHrP 识别的高精确性。

可以使用的表现高钙血症的动物包括将产生 PTHrP 的肿瘤细胞移植到免疫功能降低或缺乏的实验动物中而制备的模型动物。移植的肿瘤细胞最好来源于人类，包括，例如，人胰腺癌 PAN-7。植入肿瘤细胞的免疫功能低下或缺乏的动物包括裸鼠和 SCID 鼠。

可以通过观察血液中的钙浓度，体重的降低，或者随流逝时间运动程度的减少以及测定改善程度评价对高钙血症的抑制作用。

含本发明抗 PTHrP 抗体或抗 PTHrP 人源化抗体作为有效成分的药剂组合物和高钙血症抑制剂可以非肠道系统给药或局部给药。例如，可以选择静脉注射包括滴注、肌肉注射、腹膜内注射、或皮下注射。可以根据病人的年龄和疾病状况选择合适的给药方式。有效的单剂量可以从每公斤体重 0.01 到 1000 毫克范围内选择。或者，给药剂量为 5 到 10000 毫克/体重，优选 50 到 1000 毫克/体积。

含本发明抗 PTHrP 抗体或抗 PTHrP 人源化抗体作为有效成分的药剂组合物和高钙血症抑制剂可以根据给药途径进一步包括药物学可接收载体和/或添加剂。这种载体和添加剂的例子可以包括水、药物学可接收的有机溶剂、胶原、聚丙烯醇、聚丙烯吡咯烷酮、羧丙烯聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、二甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白（HSA）、甘露醇、山梨醇、乳糖和可以作为药

物添加剂的表面活性剂。使用的添加剂可以选择上述之一或组合，单不限于此。

本发明抗体可以广泛用于高钙血症相关的各种癌症（恶性肿瘤）。这些癌症没有特别限制，不仅包括单一癌症而且包括许多癌症的并发。癌症还包括例如胰腺、肺、咽、喉、齿龈、食道、胃、胆管、乳腺、肾、膀胱、子宫和前列腺癌，以及恶性淋巴瘤。

#### 附图简介

- 10           图 1 为本发明抗体的图示说明；
- 图 2 为 CDR-移植的图示说明；
- 图 3 为确定 FR 和 V 区 CDR 的说明；
- 图 4 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 图 5 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 15           图 6 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 图 7 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 图 8 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 图 9 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 图 10 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 20           图 11 为抗体的抗原结合活性的测量结果显示图；
- 图 12 为人源化抗体的中和活性显示图；
- 图 13 为人源化抗体的中和活性显示图；
- 图 14 为人源化抗体的中和活性显示图；
- 图 15 为本发明抗体对高钙血症模型动物治疗效果的说明图；
- 25           图 16 为本发明抗体对高钙血症模型动物治疗效果的说明图；
- 图 17 为本发明抗体对高钙血症模型动物治疗效果的说明图；
- 图 18 为本发明抗体对高钙血症模型动物治疗效果的说明图；
- 图 19 为说明 PTHrP 固定到传感器顶部的传感图；
- 图 20 为本发明抗体动力学分析的结果图；
- 30           图 21 为本发明抗体动力学分析的结果图；

图 22 为本发明抗体动力学分析的结果图；

图 23 为本发明抗体动力学分析的结果图；

图 24 为本发明抗体动力学分析的结果图；

图 25 为本发明人源化抗体对局部磷酸盐分泌影响的测定结果图；

5 图 26 为本发明人源化抗体对血浆磷浓度影响的测定结果图；

图 27 为使用本发明抗 PTHrP 抗体给药后高钙血症模型鼠临床表观症状的照片（活动物的形态）；

图 28 为使用本发明抗 PTHrP 抗体给药后高钙血症模型鼠临床表观症状的照片（活动物的形态）；

10 图 29 为与使用生理盐水给药的对照模型动物相比高钙血症模型动物使用本发明抗 PTHrP 抗体给药后一段时间的活性变化图。

图 30 为与使用生理盐水给药的对照模型动物相比高钙血症模型动物使用本发明抗 PTHrP 抗体给药后一段时间的体温变化图。

15 图 31 为与使用生理盐水给药的对照模型动物相比高钙血症模型动物使用本发明抗 PTHrP 抗体给药后一段时间的血液 pH 变化图。

## 实施例

下文将参考下列实施例详细描述本发明，这些实施例不应该构成本发明范围的限制。

20

## 参考实施例 1

产生抗- PTHrP （ 1-34 ） 鼠单克隆抗体的杂交瘤的制备

能够产生抗人 PTHrP （ 1-34 ）、 #23-57-154 和 #23-57-137-1 单克隆抗体的杂交瘤按照 Kanji Sato 等报道的方法制备（ Sato, K.等， Bone Miner.研究杂志， 8， 849-860， 1993 ）。

25

使用的免疫原是 PTHrP （ 1-34 ） （ Peninsula ）， 用碳二亚胺（ Dojinn ） 将所述 PTHrP 键合到载体蛋白， 甲状腺球蛋白上。透析甲状腺球蛋白键合 PTHrP （ 1-34 ） 获得蛋白浓度为 2μg/毫升的溶液。得到的溶液与弗氏佐剂（ Difco ） 以 1:1 的比例混合得到乳剂。该乳剂以

30

100 $\mu$ g/只鼠的剂量分别对 16 只雌鼠 BALB/C 背部皮下注射或腹膜内注射以免疫接种鼠。注射 11 次。关于佐剂，第一次免疫注射时使用弗氏完全佐剂，随后的免疫注射中使用弗氏不完全佐剂。

5                    以下列方式测定每只免疫接种鼠血清中的抗体滴度。

10                   从每只鼠尾静脉取血，然后离心该血样获得血清。血清用 RIA 缓冲液稀释，与  $^{125}$ I-标记的 PTHrP ( 1-34 ) 混合，然后测定其结合活性。已经确定具有令人满意的高抗体滴度的鼠以 50 $\mu$ g/只鼠的剂量腹膜内注射无载体蛋白的 PTHrP ( 1-34 ) 作为最后免疫接种。

15                   最后免疫接种后三天，处死鼠，切除它们的脾。然后，按照已知的常规方法用 50% 聚乙二醇 4000 使脾细胞与鼠骨髓瘤细胞系 P3x63Ag8U.1 进行细胞融合。如此制备的融合细胞在 96 孔的平板中以  $2 \times 10^4$ /孔的量在 85 个孔中培养。感兴趣的杂交瘤通过 HAT 培养如下述进行筛选。

20                   用固相 RIA 法确定 HAT 培养基中观察到细胞生长的孔的培养物上清液中 PTHrP-识别抗体的存在来筛选杂交瘤。从明确具有识别 PTHrP-抗体结合能力的孔中收集杂交瘤。获得的杂交瘤悬浮于含 15% FCS 并添加 OPI-补充物 ( Sigma ) 的 RPMI-1640 培养基中，随后采用限制稀释法匀化杂交瘤，因此获得两种杂交瘤克隆类型，#23-57-154 和 #23-57-137-1，均对 PTHrP ( 1-34 ) 表现强结合能力。

25                   指定为“鼠-鼠杂交瘤#23-57-137-1”的杂交瘤克隆#23-57-137-1 已经按照布达佩斯条约的条款于 1996 年 8 月 15 日保藏在国家生物科学和人类技术所，科学和技术所代理，日本 ( 1-3 , Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, 日本 )，登记号为 FERM BP-5631。

30                   实施例 1

编码鼠抗人 PTHrP ( 1-34 ) 单克隆抗体 V 区 DNA 的克隆

编码上述从#23-57-137-1 获得的鼠抗人 PTHrP ( 1-34 ) 单克隆抗体 V 区的 DNA , 按照下列方式进行克隆。

## 5 ( 1 ) mRNA 的制备

从杂交瘤 #23-57-137-1 用 Quick Prep mRNA 纯化试剂盒 ( Pharmacia Biotech ) 如下述制备 mRNA 。

10 上述获得的杂交瘤#23-57-137-1 细胞用提取缓冲液完全匀化, 用低聚 ( dT ) -纤维素旋转柱按照试剂盒生产商规定的程序从其中提取 mRNA 。提取溶液用乙醇沉淀获得作为沉淀的 mRNA 。 mRNA 沉淀溶解于洗脱缓冲液。

## 15 ( 2 ) 编码鼠 H 链 V 区基因的 cDNA 的制备和扩增

### (i) #23-57-137-1 抗体 H 链 V 区的 cDNA 的克隆

15 编码抗人 PTHrP 鼠单克隆抗体 H 链 V 区的 DNA 通过 5'-RACE 法克隆 ( Frohman, M. A.等,美国国家科学院年报, 85, 8998-9002, 1988 ; Belyavsky, A.等,核酸研究 17, 2919-2932, 1989 )。该方法用 5'-Ampli FINDER RACE 试剂盒 ( CLONETECH ) 按照生产商的程序进行。该方法中, 用于合成 cDNA 的引物是 MHC2 引物 ( SEQ ID NO : 1 ), 其  
20 可与鼠 H 链 C 区杂交。作为 cDNA 合成模板的 2 $\mu$ g 上述获得的 mRNA 与 10 pmoles MHC2 引物混合。得到的混合物与逆转录酶在 52  $^{\circ}$ C 反应 30 分钟以制备与 mRNA 互补的 cDNA 。

25 产物与 6N NaOH 混合以水解其中的 mRNA ( 65  $^{\circ}$ C 反应 30 分钟), 然后乙醇沉淀分离作为沉淀的 cDNA 。如此分离到的 cDNA 与 T4 RNA 连接酶在 37  $^{\circ}$ C 反应 6 小时另外室温反应 16 小时, 以使 cDNA 连接到 Ampli FINDER Anchor(SEQ ID NO : 42)的 5'末端上。使用了锚引物 ( SEQ ID NO : 2 ) 和 MHC-G1 引物 ( SEQ ID NO : 3 ) 作为 PCR 法  
30 扩增 cDNA 的引物 ( S. T. Jones 等, 生物技术, 9, 88, 1991 ) 。

该方法中使用的 PCR 溶液 (50 $\mu$ l) 包括 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 0.25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 单位 TaKaRa Taq (Takara Shuzo), 10 pmoles 锚引物, 和 1 $\mu$ l MHC-G1 引物  
 5 物和 Ampli FINDER Anchor 引物连接其上的 cDNA 反应混合物, 并且该混合物用 50 $\mu$ l 矿物油液封。用热循环仪 480J 型 (Perkin Elmer) 进行 PCR 反应 30 个循环, 循环温度为 94  $^{\circ}$ C 45 秒; 60  $^{\circ}$ C 45 秒; 72  $^{\circ}$ C 2 分钟。

(ii) #23-57-137-1 抗体 L 链 V 区的 cDNA 的克隆

10 编码抗人 PTHrP 鼠单克隆抗体 L 链 V 区的 DNA 通过 5'-RACE 法克隆 (Frohman, M. A. 等, 美国国家科学院年报, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. 等, 核酸研究 17, 2919-2932, 1989)。该方法用 5'-Ampli FINDER RACE 试剂盒 (Clontech) 按照生产商的程序进行。该方法中, 低聚-dT 引物用作合成 cDNA 的引物。2 $\mu$ g 上述 mRNA  
 15 (作为 cDNA 合成模板) 与低聚-dT 引物混合。得到的混合物与逆转录酶在 52  $^{\circ}$ C 反应 30 分钟以制备 cDNA。产物与 6N NaOH 混合以水解其中的 RNA (65  $^{\circ}$ C 反应 30 分钟), 得到的混合物用乙醇沉淀分离作为沉淀的 cDNA。如此合成的 cDNA 与 T4 RNA 连接酶在 37  $^{\circ}$ C 反应 6 小时另外室温反应 16 小时, 以使 cDNA 连接到 Ampli FINDER Anchor 的  
 20 5'末端上。

在鼠 L 链 $\lambda$ 链 C 区保守序列的基础上设计 PCR 引物 ML C (SEQ ID NO: 4), 然后用 394 DNA/RNA 合成仪 (ABI) 合成。用于合成引物的 PCR 溶液 (100 $\mu$ l) 包括 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 0.25  
 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 单位 AmpliTaq (Perkin Elmer), 50 pmoles 锚引物 (SEQ ID NO: 2), 和 1 $\mu$ l ML C (SEQ ID NO: 4) 引物和 Ampli FINDER 锚引物连接其上的 cDNA 反应混合物, 上面覆盖 50 $\mu$ l 矿物油。用热循环仪 480J 型 (Perkin Elmer) 进行 PCR 反应 35 循环, 温度循环为 94  $^{\circ}$ C 45 秒; 60  $^{\circ}$ C 45 秒; 72  $^{\circ}$ C 2 分钟。

### (3) PCR 产物的纯化和裂解成片段

上述 PCR 法扩增的每种 DNA 片段用 3% Nu Sieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. 产品) 通过琼脂糖凝胶电泳分离。分别从凝胶上切下长度约为 550 碱基对 DNA 片段的每种 H 链 V 区和 L 链 V 区的琼脂糖凝胶片段。获得的每种凝胶组份用 GENE CLEAN II 试剂盒 (BIO 101) 按照生产商提供的程序纯化其中的 DNA。纯化的 DNA 用乙醇从溶液中沉淀出来, 然后溶解于含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的 20  $\mu$ l 溶液中。这样制备的 DNA 溶液 1  $\mu$ l 用限制性酶 XmaI (New England Biolabs) 于 37  $^{\circ}$ C 消化 1 小时, 另外用限制性酶 EcoRI (Takara Shuzo) 于 37  $^{\circ}$ C 消化 1 小时。消化混合物用苯酚和氯仿提取, 然后用乙醇沉淀, 收集 DNA。

按照这种方式使得获得的编码鼠 H 链 V 区的 DNA 和编码鼠 L 链 V 区的 DNA 都具有 5' 末端 EcoRI 识别序列和 3' 末端 XmaI 识别序列。

每一种包含编码鼠 H 链 V 区 DNA 和编码鼠 L 链 V 区 DNA 的 EcoRI-XmaI DNA 片段分别与事先用 EcoRI 和 XmaI 消化的 pUC19 载体使用 DNA 连接试剂盒 ver.2 (Takara Shuzo) 按照生产商推荐的程序于 16  $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 以彼此连接。获得的连接混合物 (10  $\mu$ l) 加入 100  $\mu$ l 含大肠杆菌 JM109 (Nippon Gene) 感受态细胞的溶液。冰上静置细胞混合物 15 分钟, 42  $^{\circ}$ C 静置 1 分钟, 然后再于冰上静止 1 分钟。产物与 300  $\mu$ l SOC 培养基混合 (分子克隆: 实验室手册, Sambrook, 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 于 37  $^{\circ}$ C 保温 30 分钟。得到的细胞溶液接种到添加 100 或 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素, 0.1 mM IPTG 和 20  $\mu$ g/毫升 X-gal 的 LB 或 2xYT 琼脂培养基上 (分子克隆: 实验室手册, Sambrook, 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 然后于 37  $^{\circ}$ C 保温过夜。按照这种方式, 即可制备大肠杆菌转化体。

该转化体在含 100 或 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2 毫升 LB 或 2xYT 培养基上于 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 然后用质粒提取仪 PI-100  $\Sigma$  (Kurabou) 或 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 从细胞碎片制备质粒 DNA。确

定获得的质粒 DNA 的序列。

#### (4) 编码鼠抗体 V 区的 cDNA 序列

承载于质粒上的编码区 cDNA 序列用染料终止循环测序试剂盒 (Perkin-Elmer) 由 DNA 测序仪 373A (ABI; Perkin-Elmer) 确定。这是通过使用 M13 引物 M4(Takara Shuzo) (SEQ ID NO: 5) 和 M13 引物 RV(Takara Shuzo) (SEQ ID NO: 6) 确定两个方向上碱基序列的 DNA 测序方法。

获得的包含编码来源于杂交瘤#23-57-137-1 的鼠 H 链 V 区的 cDNA 和编码鼠 L 链 V 区 cDNA 的质粒分别被指定为 “MBC1H04” 和 “MBC1L24”。编码鼠#23-57-137-1 抗体 H 链 V 区的 DNA 序列和 L 链 V 区的 DNA 序列 (包括相应的氨基酸序列) (分别承载于质粒 MBC1H04 和质粒 MBC1L24) 分别如 SEQ ID NO: 57 和 65 所示。H 链 V 区片段和 L 链 V 区片段的多肽都从 SEQ ID NO: 57 和 65 所示 DNA 序列的第 58 个碱基 (编码谷氨酰胺) 开始翻译。H 链 V 区和 L 链 V 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 46 和 45 所示。

具有质粒 MBC1H04 的大肠杆菌和具有质粒 MBC1L24 的大肠杆菌分别被指定为 “大肠杆菌 JM109 (MBC1H04)” 和 “大肠杆菌 JM109 (MBC1L24)”。这些大肠杆菌株系已经按照布达佩斯条约的条款于 1996 年 8 月 15 日保藏在国家生物科学和人类技术所, 科学和技术所代理, 日本 (1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, 日本), 大肠杆菌 JM109 (MBC1H04) 的登记号为 FERM BP-5628, 大肠杆菌 JM109 (MBC1L24) 的登记号为 FERM BP-5627。

#### (5) 抗人 PTHrP 鼠单克隆抗体#23-57-137-1 CDR 的确定

H 链 V 区和 L 链 V 区的一般结构彼此相似。即, 两者都有通过三个高可变区 (即, 互补决定区 (CDR)) 连接四个框架区的结构。框架区的氨基酸序列相对保守, 而 CDR 区的氨基酸序列表现相当高的诱

变性（Kabat, E. A.等, “具有免疫活性的蛋白序列”, 美国健康和人服  
务部门, 1983）。

5 基于上述事实, 可以参考 Kabat, E. A.等建立的抗体氨基酸序列数  
据库通过检索鼠单克隆抗体 V 区氨基酸序列的同源性确定 CDR。

L 链 V 区中 CDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 59-61 所  
示, H 链 V 区中 CDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 62-64 所  
示。

10

| 表 2     |           |       |       |        |
|---------|-----------|-------|-------|--------|
| V 区     | SEQ ID NO | CDR1  | CDR2  | CDR3   |
| H 链 V 区 | 57        | 31-35 | 50-66 | 99-107 |
| L 链 V 区 | 65        | 23-34 | 50-60 | 93-105 |

## 实施例 2

### 嵌合抗体的构建

15 (1) 嵌合抗体 H 链的构建

#### (i) H 链 V 区的构建

编码鼠 H 链 V 区的克隆 cDNA 用 PCR 法修饰, 以将其连接到携带  
人 H 链 V 区 C<sub>γ</sub>1 基因组 DNA 的表达载体上。使用的下游侧端引物  
MBC1-S1 (SEQ ID NO: 7) 设计为可以与编码 V 区引导序列 5'-末端  
区的 DNA 杂交, 并具有 Kozak 共有序列 (Kozak, M 等, 分子生物学  
杂志, 196, 947-950, 1987) 和 HindIII-识别序列。使用的上游引物  
MBC1-a (SEQ ID NO: 8) 设计为可以与编码 J 区 3'-末端区的 DNA  
杂交, 并具有接合供体序列和 BamHI-识别序列。使用 TaKaRa Ex Taq  
(Takara Shuzo) 并添加缓冲液进行 PCR 反应。使用的 PCR 溶液 (50μl)  
20 包括 0.07μg 的质粒 MBC1H04 作为模版 DNA 的, 50 pmole 的 MBC1-a  
和 50 pmole 的 MBC1-S1 作为引物, 添加到缓冲液中 2.5U 的 TaKaRa Ex  
Taq 和 0.25 mM 的 dNTP, 液面用 50μl 矿物油覆盖。PCR 反应进行 30

25

次循环，温度循环为 94 °C 1 分钟； 55 °C 1 分钟； 72 °C 2 分钟。PCR 反应扩增的 DNA 片段使用 3% Nu Sieve GTG 琼脂糖（FMC Bio. 产品）通过琼脂糖电泳分离。

5           然后，除下含长度为 437 碱基对 DNA 片段的琼脂糖凝胶片段，  
用 GENECLAN II 试剂盒（BIO101）按照试剂盒商介绍的方法纯化  
DNA 片段。纯化的 DNA 通过乙醇沉淀收集，然后溶解于 20μl 含 10 mM  
Tris-HCl (pH 7.4) 和 1mM EDTA 的溶液中。得到的 DNA 溶液一微升用  
10       限制性酶 BamHI 和 HindIII (Takara Shuzo) 于 37 °C 消化 1 小时。消化混合  
物用苯酚和氯仿提取，然后乙醇沉淀收集 DNA。

获得的包含编码鼠 H 链 V 区 DNA 的 HindIII-BamHI DNA 片段亚克  
隆到用 HindIII 和 BamHI 消化过的 pUC19 载体。得到的质粒使用 M13 引  
物 M4 和 M13 引物 RV 作为引物，和染料终止循环测序试剂盒（Perkin  
15       -Elmer）通过 DNA 测序仪 373A（Perkin -Elmer）测序。包含编码来  
源于杂交瘤 #23-57-137-1 的鼠 H 链 V 区的正确碱基序列的 DNA 并具有  
5' 末端区的 HindIII 识别序列和 Kozak 序列以及 3' 末端区的 BamHI 识别序  
列的质粒被指定为 “MBC1H/pUC19”。

20           (ii) 用于制备鼠-人嵌合 H 链 cDNA 型的 H 链 V 区的构建

上述步骤构建的编码鼠 H 链 V 区的 DNA 用 PCR 法修饰，以使其连  
接到人 H 链 C 区 C<sub>γ1</sub> 的 cDNA 上。设计了用于修饰 H 链 V 区的反向  
引物 MBC1HVS2（SEQ ID NO：9）以使用甘氨酸替代编码 V 区引导  
序列前面部分序列的第二个氨基酸（即，天冬氨酸），并具有 Kozak 共  
25       有序列（Kozak，M 等，分子生物学杂志，196，947-950，1987）  
及 HindIII-和 EcoRI-识别序列。同时设计了用于修饰 H 链 V 区的正向引  
物 MBC1HVR2（SEQ ID NO：10）以便可与编码 J 区 3' 末端区的 DNA  
序列和编码 C 区 5' 末端区的 DNA 杂交，并具有 ApaI-和 SmaI-识别序列。

30           使用 TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 及所附的缓冲液进行 PCR 反

应。使用的 PCR 溶液 ( 50 $\mu$ l ) 包括 0.6 $\mu$ g 的质粒 MBC1H/pUC19 作为模版 DNA , 50 pmole 的 MBC1HVS2 和 50 pmole 的 MBC1HVR2 作为引物, 缓冲液中的 2.5U 的 TaKaRa Ex Taq 和 0.25 mM 的 dNTP , 液面用 50 $\mu$ l 矿物油覆盖。PCR 反应进行 30 次循环, 温度循环为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 55  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟。PCR 反应扩增的 DNA 片段使用 1% Sea Kem GTG 琼脂糖 ( FMC Bio. 产品 ) 通过琼脂糖电泳分离。然后, 切下含长度为 456 碱基对 DNA 片段的琼脂糖凝胶片段, 用 GENECLAN II 试剂盒 ( BIO101 ) 按照试剂盒商介绍的方法纯化其中的 DNA 片段。纯化的 DNA 乙醇沉淀收集, 然后溶解于 20 $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1mM EDTA 的溶液中。

得到的 DNA 溶液一微升用限制性酶 EcoRI 和 SmaI (Takara Shuzo) 于 37  $^{\circ}$ C 消化 1 小时。消化混合溶液用苯酚和氯仿提取, 然后乙醇沉淀收集 DNA 。获得的包含编码鼠 H 链 V 区 DNA 的 EcoRI-SmaI DNA 片段亚克隆到用 EcoRI 和 SmaI 消化过的质粒 pUC19 载体上。得到的质粒使用 M13 引物 M4 和 M13 引物 RV 作为引物, 和染料终止循环测序试剂盒 ( Perkin -Elmer ) 通过 DNA 测序仪 373A ( Perkin -Elmer ) 测序。包含编码来源于杂交瘤#23-57-137-1 的鼠 H 链 V 区的正确碱基序列的 DNA 并具有 5'末端区 HindIII 识别序列和 Kozak 序列以及 3'末端区 ApaI 和 SmaI 识别序列的质粒被指定为 “ MBC1Hv/pUC19 ” 。

### (iii) 嵌合抗体 H 链表达载体的构建

包含人抗体 H 链 C 区 C  $\gamma$  1 的 cDNA 按照如下方法制备。

从将编码人源化 PM1 抗体 H 链 V 区和人抗体 H 链 C 区 IgG1 的基因组 DNA 的表达载体 DHFR- $\Delta$  E-RVh-PM-1-f (见 WO92/19759) 和编码人源化 PM1 抗体 L 链 V 区和人抗体 L 链  $\kappa$  链 C 区的基因组 DNA 的表达载体 RV1-PM1a (见 WO92/19759) 导入的 CHO 细胞中制备 mRNA 。通过获得的 mRNA , 用 RT-PCR 法克隆包含人源化 PM1 抗体 H 链 V 区和人抗体 C 区 C  $\gamma$  1 的 cDNA , 然后亚克隆到质粒 pUC19 的 HindIII-BamHI

位点。确定亚克隆质粒的 DNA 序列，具有正确碱基序列的质粒被指定为“pRVh-PM1f-cDNA”。

5 制备了具有 SV40 启动子和 DHFR 基因之间 HindIII 位点缺失和 EF-1  $\alpha$  启动子和人源化 PM1 抗体 H 链 V 区之间 EcoRI 位点缺失的表达载体，用于构建包含人源化 PM1 抗体 H 链 V 区和人抗体 C 区 C $\gamma$  1 的 cDNA 的表达载体。

10 获得的质粒 pRVh-PM1f-cDNA 用 BamHI 消化，用 Klenow 片段使末端平齐化，进一步用 HindIII 消化，从而获得平端 HindIII- BamHI 片段。这种平端 HindIII- BamHI 片段分别连接到上述已经用 HindIII 和 BamHI 消化的 HindIII 位点和 BamHI 位点缺失的表达载体 DHFR- $\Delta$  E-RVh-PM1-f 上以构建包含编码人源化 PM1 抗体 H 链 V 区和人抗体 C 区 C $\gamma$  1 的 cDNA 的表达载体 RVh-PM1f-cDNA。

15 包含编码人源化 PM1 抗体 H 链 V 区和人抗体 C 区 C $\gamma$  1 的 cDNA 的表达载体 RVh-PM1f-cDNA 用 ApaI 和 BamHI 消化，从其中收集包含 H 链 V 区的 DNA 片段。得到的 DNA 片段导入上述用 ApaI 和 BamHI 消化过的质粒 MBC1Hv/pUC19 中。如此制备的质粒被指定为  
20 “MBC1HcDNA /pUC19”。这种质粒是分别包含编码鼠抗体 H 链 V 区和人抗体 C 区 C $\gamma$  1 的 cDNA 的质粒，并具有 5'端 EcoRI -和 HindIII-识别序列以及 3'端 BamHI-识别序列。

25 质粒 MBC1HcDNA /pUC19 用 EcoRI 和 BamHI 消化以获得编码嵌合抗体 H 链的 DNA。得到的 DNA 片段导入预先用 EcoRI 和 BamHI 消化的表达载体 pCOS1 中。这样获得的编码嵌合抗体的表达载体指定为“MBC1HcDNA /pCOS1”。其中，用 EcoRI 和 SmaI 消化使 HEF-PMh-g $\gamma$  1(见 W092/19759) 抗体基因缺失，然后将它连接到 EcoRI-NotI-BamHI 接合物 (Takara Shuzo) 上，以构建表达载体 pCOS1。

30

为制备在 CHO 细胞中表达的质粒，质粒 MBC1HcDNA /pUC19 用 EcoRI 和 BamHI 消化以获得编码嵌合抗体 H 链的 DNA，然后其被导入预先用 EcoRI 和 BamHI 消化的表达质粒 pCHO1 中。这样获得的编码嵌合抗体的表达质粒指定为“MBC1HcDNA / pCHO1”。其中，用 EcoRI 和 SamI 消化使 DHFR-Δ E-RVh-PM1-f (见 WO92/19759) 抗体基因缺失，然后将它连接到 EcoRI-NotI-BamHI 接合物 (Takara Shuzo) 上，以构建表达载体 pCHO1。

## (2) 人 L 链 C 区的构建

### (i) 克隆载体的制备

为构建包含人 L 链 C 区的 pUC19 载体，制备了 HindIII 位点缺失的 pUC19 载体。2μg 的 pUC19 载体用 20μl 包含 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8 U HindIII (Takara Shuzo) 反应液于 37 °C 消化 1 小时。得到的消化混合液用苯酚和氯仿提取，然后用乙醇沉淀，收集感兴趣的 DNA。

收集到的 DNA 在 50μl 包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 0.5 mM dNTP 和 6U Klenow 片段 (GIBCO BRL) 的反应液中室温反应 20 分钟以钝化 DNA 末端。这种反应混合物用苯酚和氯仿提取，然后用乙醇沉淀收集载体 DNA。

这样收集到的载体 DNA 在 10 μl 包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% (v/v) 聚乙二醇-8000, 和 0.5 U T4 DNA 连接酶 (GIBCO BRL) 的反应液中 16 °C 反应 2 小时以使载体 DNA 自主连接。5 μl 反应液加入 100 μl 包含感受态大肠杆菌 JM109 (Nippon Gene) 细胞的溶液中，得到的溶液冰上静置 30 分钟，42 °C 反应 1 分钟，进一步置于冰上 1 分钟。反应溶液中加入 500 毫升 SOC 培养基，37 °C 培养 1 小时。得到的溶液在表面添加 X-gal 和 IPTG 的 2xYT 琼脂培养基 (包含 50 μg/毫升的氨苄青霉素) 上铺板 (分子克隆：实验室手册, Sambrook, 等, Cold Spri 纳克 Harbor Laboratory Press,

1989), 然后 37 °C 培养过夜, 由此获得转化体。

转化体在包含 50 µg/毫升的氨苄青霉素的 2xYT 琼脂培养基中 37 °C 培养过夜。从培养基的细胞碎片用质粒 Mini 试剂盒 (QIAGEN) 按照试剂盒上的介绍纯化质粒 DNA。纯化的质粒用 HindIII 消化。明确具有 HindIII 位点缺失的质粒指定为 “pUC19 ΔHindIII”。

#### (ii) 编码人 L 链 λ 链 C 区 DNA 的构建

已经知道人抗体 L 链 λ 链 C 区具有至少四种同种型包括 Mcg<sup>+</sup>Ke<sup>+</sup>Oz<sup>-</sup>, Mcg<sup>-</sup>Ke<sup>-</sup>Oz<sup>-</sup>, Mcg<sup>-</sup>Ke<sup>-</sup>Oz<sup>+</sup> 和 Mcg<sup>-</sup>Ke<sup>+</sup>Oz<sup>-</sup> (P. Dariavach, 等, 美国国家科学院年报, 84, 9074-9078, 1987)。基于 EMBL 数据库检索与 #23-57-137-1 鼠 L 链 λ 链 C 区同源的人抗体 L 链 λ 链 C 区。结果发现人抗体 L 链 λ 链的同种型 Mcg<sup>+</sup>Ke<sup>+</sup>Oz<sup>-</sup> (登记号为 X57819) (P. Dariavach, 等, 美国国家科学院年报, 84, 9074-9078, 1987) 表现与 #23-57-137-1 鼠 L 链 λ 链 C 区最高的同源性, 氨基酸序列为 64.4% 的同源性, DNA 序列为 73.4% 的同源性。

然后, 用 PCR 法构建编码人抗体 L 链 λ 链 C 区的 DNA。下列使用的每种引物均通过 394DNA/RNA 合成仪 (ABI) 合成。合成的引物 HLAMB1 (SEQ ID NO: 11) 和 HLAMB3 (SEQ ID NO: 13) 均具有有义 DNA 序列, 引物 HLAMB2 (SEQ ID NO: 12) 和 HLAMB4 (SEQ ID NO: 14) 均具有反义 DNA 序列, 每种引物的两个末端均包含长度为 20-23 碱基对的互补序列。

外部引物 HLAMBS (SEQ ID NO: 15) 和 HLAMBR (SEQ ID NO: 16) 分别具有与引物 HLAMB1 和 HLAMB4 互补的序列, 并分别包含 EcoRI-, HindIII-和 BlnI-识别序列和 EcoRI-识别序列。第一次 PCR 反应中进行了 HLAMB1-HLAMB2 和 HLAMB3-HLAMB4 反应。反应完成后, 这两种生成物等量混合, 然后进入第二次 PCR 反应。反应物中加入外部引物 HLAMBS 和 HLAMBR。反应混合物进行第三 PCR 反应

用于扩增全长 DNA。

PCR 反应用 TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo)按照生产商的程序进行。第一次PCR反应中,使用了 100  $\mu$ l 包含 5 pmole HLAMB1, 0.5 pmole HLAMB2 和 5U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo)的反应液或者包含 0.5 pmole HLAMB3, 5 pmole HLAMB4 和 5U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo)的反应液,液面用 50  $\mu$ l 矿物油覆盖, PCR 反应进行 5 次,温度循环程序为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 60  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟。第二次 PCR 反应中,使用每种反应液 50  $\mu$ l 混合,液面用 50  $\mu$ l 矿物油覆盖, PCR 反应的 3 个循环利用,温度循环程序为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 60  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟进行。第三次 PCR 反应中,反应液加入外部引物 HLAMBS 和 HLAMBR 各 50 pmole, PCR 反应进行 30 个循环,利用温度循环程序为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 60  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟。

第三次 PCR 反应获得的 DNA 片段用 3%低熔点琼脂糖凝胶 (NuSieve GTG Agarose, FMC)进行电泳,用 GENECLAN II试剂盒 (BIO101) 按照试剂盒上介绍的程序从凝胶收集和纯化。

这样获得的 DNA 片段在 20  $\mu$ l 包含 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 和 8U EcoRI (Takara Shuzo) 的反应液中 37  $^{\circ}$ C 反应 1 小时。消化液用苯酚和氯仿提取,然后用乙醇沉淀由此获得 DNA。收集 DNA 并溶解于 8  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

0.8  $\mu$ g 的质粒 pUC19  $\Delta$ HindIII 用EcoRI按照上述同样方式消化。消化液用苯酚和氯仿提取,随后用乙醇沉淀,获得消化的质粒 pUC19  $\Delta$ HindIII。这样消化获得的质粒在 50  $\mu$ l 包含 50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1 mM  $MgCl_2$ , 和碱性磷酸酶 (大肠杆菌 C75; Takara Shuzo)的反应液中 37  $^{\circ}$ C 反应 30 分钟以使质粒脱磷酸化 (即, BAP-处理)。反应液用苯酚和氯仿提取,乙醇沉淀获得 DNA。这样获得的 DNA 溶解于 10  $\mu$ l 含 10 mM

Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

5 这样制备的 BAP-处理的质粒 pUC19  $\Delta$ HindIII 1  $\mu$ l 与 4  $\mu$ l 上述 PCR 反应获得的 DNA 混合, 利用 DNA 连接试剂盒 Ver.2 (Takara Shuzo)将二者连接起来。得到的质粒导入感受态大肠杆菌, JM109 细胞形成转化体。转化体在 2 毫升含 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养过夜。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 纯化细胞中的质粒。

10 对于上述质粒, 确定了克隆 DNA 的序列。确定 DNA 序列时, 使用了 373A DNA 测序仪 (ABI) 和引物 “M13 引物 M4” 和 “M13 引物 RV” (Takara Shuzo)。结果发现克隆 DNA 中具有长度为 12 碱基对的缺失部分。包含该 DNA 的质粒指定为 “c $\lambda$  $\Delta$ /pUC19”。然后, 为了弥补这一部分, 重新合成了引物、HCLMS (SEQ ID NO: 17) 和 HCLMR (SEQ ID NO: 18), 并且通过 PCR 法重新构建了正确的  
15 DNA。

用包含缺失 DNA 的质粒 c $\lambda$  $\Delta$ /pUC19 作为模版以及引物 HLAMBS 和 HCLMS 或引物 HCLMS 和 HLAMB4 进行了第一次 PCR 反应。分别纯化每一个 PCR 反应产物。在第二次 PCR 反应中, PCR 产物彼此混  
20 合。产物中加入外部引物 HLAMBS 和 HLAMB4, 随后进行第三次 PCR 反应, 以扩增全长 DNA。

第一次 PCR 反应中, 使用了 100  $\mu$ l 包含 0.1  $\mu$ g c $\lambda$  $\Delta$ /pUC19 作为模版, 各 50 pmole 引物 HLAMBS 和 HCLMR 或者各 50 pmole 引物 HCLMS 和 HLAMB4, 以及 5U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo)的反应液, 液面用  
25 50  $\mu$ l 矿物油覆盖, PCR 反应进行 30 个循环, 其中利用温度循环程序为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 60  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟。

30 PCR 产物, HLAMBS-HCLMR (236 碱基对) 和 HCLMS-HLAMB4 (147 碱基对) 用 3%低熔点琼脂糖凝胶进行电泳分离 DNA

片段。然后用 GENECLAN II 试剂盒 ( BIO101 ) 从凝胶中收集和纯化 DNA 片段。第二次 PCR 反应中, 使用了 20  $\mu$ l 包含 40 纳克纯化的 DNA 片段和 1U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 的反应液, 液面用 25  $\mu$ l 矿物油覆盖, 以温度循环程序为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 60  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟进行 5 个循环。

第三次 PCR 反应中, 使用了 100  $\mu$ l 包含 2  $\mu$ l 第二次 PCR 反应得到的反应液, 外部引物 HLAMBS 和 HLAMB4 各 50 pmole, 以及 5U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 的反应液, 液面用 50  $\mu$ l 矿物油覆盖, PCR 反应进行 30 个循环, 其中利用温度循环程序为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 60  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟, 由此得到长度为 357 碱基对的 DNA 片段 (第三次 PCR 产物)。用 3% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段。用 GENECLAN II 试剂盒 ( BIO101 ) 收集和纯化产生的 DNA 片段。

0.1  $\mu$ g 这样获得的 DNA 片段用 EcoRI 消化, 然后亚克隆到预先用 BAP 处理过的质粒 pUC19  $\Delta$ HindIII 中。得到的质粒导入感受态大肠杆菌 JM109 细胞形成转化体。这样制备的转化体在 2 毫升含 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养过夜。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 ( QIAGEN ) 从细胞碎片中纯化质粒。

用 M13 引物 M4 和 M13 引物 RV (Takara Shuzo) 在 373A DNA 测序仪 ( ABI ) 确定了如此获得的质粒的 DNA 序列。明确具有无任何缺失的正确 DNA 序列的质粒指定为 “ C $\lambda$ /pUC19”。

### (iii) 编码人 L 链 $\kappa$ 链 C 区 DNA 的构建

用 PCR 法从质粒 HEF-PM1k-gk (WO92/19759) 克隆了编码 L 链  $\kappa$  链 C 区的 DNA 片段。正向引物 HKAPS ( SEQ ID NO : 19 ) EcoRI-和 HindIII-以及 BlnI-识别序列, 反向引物 HKAPA ( SEQ ID NO : 20 ) 设计为包含设计为包含 EcoRI-识别序列, 二者均使用 394 DNA/RNA 合成仪 ( ABI ) 合成。

5 用 100  $\mu$ l 包含 0.1  $\mu$ g 质粒 HEF-PM1k-gk 作为模版，各 50 pmole 引物 HKAPS 和 HKAPA，以及 5U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 的反应液进行 PCR 反应，液面覆盖 50  $\mu$ l 矿物油。PCR 反应进行 30 个循环，其中利用了温度循环为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟；60  $^{\circ}$ C 1 分钟；72  $^{\circ}$ C 1 分钟，由此得到长度为 360 碱基对的 DNA 片段。DNA 片段用 3% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离，然后用 GENECLAN II 试剂盒 (BIO101) 收集和纯化。

10 这样获得的 DNA 片段用 EcoRI 消化，然后克隆到已经用 BAP 处理过的质粒 pUC19  $\Delta$ HindIII 中。得到的质粒导入感受态大肠杆菌，JM109 细胞形成转化体。这样制备的转化体在 2 毫升含 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养过夜。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 从细胞碎片中纯化质粒。

15 纯化的质粒 DNA 用 M13 引物 M4 和 M13 引物 RV (Takara Shuzo) 在 373A DNA 测序仪 (ABI) 测序。明确具有正确碱基序列的质粒指定为 “C  $\kappa$  /pUC19”。

### (3) 嵌合抗体 L 链表达载体的构建

20 构建了嵌合 #23-57-137-1 抗体 L 链表达载体。编码 #23-57-137-1 抗体 L 链 V 区的 DNA 连接到各个质粒 C  $\lambda$  /pUC19 和 C  $\kappa$  /pUC19 人抗体 C 区之前的 HindIII 和 BlnI 位点，由此得到包含编码嵌合 #23-57-137-1 抗体 L 链 V 区和 L 链  $\lambda$  或  $\kappa$  链 C 区 DNA 的 pUC19 载体。然后用 EcoRI 消化每种得到的载体以便切出编码嵌合抗体 L 链的 DNA，该 DNA 亚克  
25 隆到 HEF 表达载体中。

用 PCR 法从质粒 MBC1L24 克隆编码 #23-57-137-1 抗体 L 链 V 区的 DNA。用 394 DNA/RNA 合成仪 (ABI) 单独合成引物。使用的反向引物 MBCCHL1 (SEQ ID NO: 21) 设计为包含 Hind III-识别序列和  
30 Kozak 序列 (Kozak, M 等, 分子生物学杂志, 196, 947-950,

1987)，正向引物 MBCCHL3 (SEQ ID NO: 22) 设计为包含 BglII-和 RcoRI-识别序列。

用 100  $\mu$ l 包含 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.1  $\mu$ g MBC1L24, 引物 MBCCHL1 和 MBCCHL3 各 50 pmole, 以及 1  $\mu$ l AmpliTaq (PERKIN ELMER) 的反应液进行 PCR 反应, 液面覆盖 50  $\mu$ l 矿物油。PCR 反应进行 30 个循环, 其中利用温度循环为 94  $^{\circ}$ C 45 秒; 60  $^{\circ}$ C 45 秒; 72  $^{\circ}$ C 2 分钟。

用 3% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离出长度为 444 碱基对的 DNA 片段, 然后用 GENE CLEAN II 试剂盒 (BIO101) 收集和纯化。纯化的 DNA 片段溶解于 20  $\mu$ l 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。1  $\mu$ l PCR 产物在 20  $\mu$ l 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 8U HindIII (Takara Shuzo) 和 8U EcoRI (Takara Shuzo) 的反应液中 37  $^{\circ}$ C 消化 1 小时。消化液用苯酚氯仿提取, 随后用乙醇沉淀收集沉淀 DNA。如此获得的 DNA 溶解于 8  $\mu$ l 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。

1  $\mu$ g 的质粒 pUC19 用 HindIII 和 EcoRI 按照上述同样方式消化。然后用苯酚和氯仿提取, 随后用乙醇沉淀收集消化的质粒。产物用 BAP (即, 碱性磷酸盐 (大肠杆菌 C75; Takara Shuzo)) 处理, 然后用苯酚和氯仿提取, 乙醇沉淀获得 DNA。这样获得的 DNA 溶解于 10  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。

BAP-处理的质粒 pUC19 1  $\mu$ l 与 4  $\mu$ l 上述 PCR 产物混合, 用 DNA 连接试剂盒 Ver.2 (Takara Shuzo) 将二者连接起来。得到的质粒导入感受态大肠杆菌 JM109 细胞 (Nippon Gene), 以上述同样的方式形成转化体。转化体在含 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2xYT 琼脂培养基上 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 纯化细胞碎片中的质粒。DNA 测序后, 明确具有正确 DNA 序列的质粒指定为 “CHL/pUC19”。

各 1  $\mu\text{g}$  质粒 C  $\lambda$  /pUC19 和 C  $\kappa$  /pUC19 分别在 20  $\mu\text{l}$  包含 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8U HindIII (Takara Shuzo)和 2U BlnI (Takara Shuzo)的反应液中 37  $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 小时。  
5 消化液用苯酚和氯仿提取, 随后用乙醇沉淀, 由此获得 DNA。DNA 用 BAP 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 分钟, 然后用苯酚和氯仿提取, 随后用乙醇沉淀。产物溶解于 10  $\mu\text{l}$  包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

10 8  $\mu\text{g}$  包含编码#23-57-137-1 L 链 V 区 DNA 的质粒 CHL/pUC19 用 HindIII 和BlnI以上述同样方式消化。利用 3%低熔点琼脂糖凝胶电泳获得长度为 409 碱基对的 DNA 片段, 然后用 GENECLAN II试剂盒 ( BIO101 )从凝胶中收集和纯化该 DNA 片段。DNA 片段溶解于 10  $\mu\text{l}$  含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

15 4  $\mu\text{l}$  L 链 V 区的 DNA 分别亚克隆到 1  $\mu\text{l}$  BAP-处理的质粒 C  $\lambda$  /pUC19 或 C  $\kappa$  /pUC19 上, 然后导入感受态大肠杆菌, JM109 细胞形成转化体。转化体在 3 毫升含 50  $\mu\text{g}$ /毫升氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养过夜。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 ( QIAGEN )分离和纯化细胞碎片  
20 中的质粒。由此制备的质粒分别指定为 “ MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 ” 和 “ MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 ”。

25 质粒 MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 和 MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 分别用 EcoRI 消化, 然后用 3%低熔点琼脂糖凝胶电泳。用 GENECLAN II试剂盒 ( BIO101 )从凝胶中分离和纯化长度 743 碱基对的 DNA 片段, 并将该 DNA 片段溶解于 10  $\mu\text{l}$  含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

30 2.7  $\mu\text{g}$  的表达载体, 质粒 HEF-PM1k-gk 用 EcoRI 消化, 然后用苯酚和氯仿提取, 随后用乙醇沉淀, 由此获得 DNA 片段。DNA 片段用

BAP 处理，然后用 1%低熔点琼脂糖凝胶电泳。用 GENECLAN II试剂盒（ BIO101 ）从凝胶中分离和纯化到长度为 6561 碱基对的 DNA 片段。该 DNA 片段溶解于 10  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

5

这样制备的 HEF 载体用 BAP 处理， 2  $\mu$ l BAP-处理的 HEF 载体与 3  $\mu$ l 质粒 MBC1L( $\lambda$ )/pUC19 和 MBC1L( $\kappa$ )/pUC19 的 EcoRI 片段混合，以使彼此连接。连接产物导入感受态大肠杆菌， JM109 细胞形成转化体。转化体在 2 毫升含 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒（ QIAGEN ）纯化细胞碎片中的质粒。

10

这样纯化的质粒 DNA 在 20  $\mu$ l 包含 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8U HindIII (Takara Shuzo)和 2U PvuI (Takara Shuzo)的反应液中 37  $^{\circ}$ C 消化 1 小时。在这一消化反应中，推测如果上述 DNA 片段正向插入载体，则得到 5104/2195 碱基对的消化片段，如果上述 DNA 片段反向插入载体，则得到 4387/2926 碱基对的消化片段。基于这种推测，正向插入片段的质粒分别指定为 “ MBC1L( $\lambda$ )/neo ” 和 “ MBC1L( $\kappa$ )/ neo ”。

15

20

#### （ 4 ） COS-7 细胞的转染

上述制备的表达质粒分别用 COS-7 细胞短暂表达以便评价嵌合抗体对抗原的结合和中和活性。

25

通过 Gene Pulser (Bio Rad)电穿孔将质粒 MBC1HcDNA/pCOS1 和 MBC1L( $\lambda$ )/neo 或者质粒 MBC1HcDNA/pCOS1 和 MBC1L( $\kappa$ )/ neo 结合进行嵌合抗体的短暂表达以便将这些质粒 DNA 的组合物共转染到 COS-7 细胞中。即，共转染到 0.8 毫升细胞悬浮液中，其中 COS-7 细胞悬浮于 PBS（-），浓度为  $1 \times 10^7$  个细胞/毫升，并加入每种质粒 DNA 各 10  $\mu$ l。得到的溶液应用 1500 V 和 2 $\mu$ F 静电容量的脉冲进行电穿孔。室温恢复 10 分钟后，细胞悬浮于包含 2% Ultra Low IgG 胎牛血清

30

( GIBCO ) 的 DMEM 培养基中, 然后用 10 cm 的培养皿在 CO<sub>2</sub> 培养箱种培养。培养 72 小时后, 收集培养上清液, 离心除去细胞碎片, 以此作为 ELISA 分析的样品。

- 5                    该程序中, 嵌合抗体从 COS-7 细胞上清液中的纯化通过 AffiGel Protein A MAPSII 试剂盒 ( Bio Rad ) 按照试剂盒上介绍的方法进行。

### ( 5 ) ELISA 分析

#### (i) 抗体浓度的确定

- 10                    确定抗体浓度的 ELISA 平板如下制备。用于 ELISA ( Maxisorp, NUNC ) 的 96 孔平板的每个孔都用 100 $\mu$ l 包含包被缓冲液 ( 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub> ) 中制备的浓度为 1  $\mu$ g/毫升的山羊抗人 IgG 抗体 ( TAGO ) 的溶液包被, 然后用 200  $\mu$ l 稀释缓冲液[50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1%牛血清白蛋白 ( BSA ) ; pH 7.2]隔断。每孔加入其中嵌合抗体得以表达的 COS-7 细胞培养上清液或者逐步稀释的纯化嵌合抗体。室温培养 1 小时并用 PBS-Tween20 冲洗后, 每孔加入 100  $\mu$ l 碱性磷酸酶偶合山羊抗人 IgG 抗体 ( TAGO ) 。室温培养 1 小时并用 PBS-Tween20 冲洗后, 每孔加入 1 毫克/毫升的基质溶液 ( “ Sigma104”, 对-硝基苯磷酸, SIGMA ) 。用
- 15
- 20                    微平板读数仪 ( Bio Rad ) 于 405 nm 测量溶液的吸收值。纯化的 Hu IgG1  $\lambda$  (结合位点)用作该测定的标准品。

#### (ii) 抗原结合能力的确定

- 25                    确定抗原结合能力的 ELISA 平板如下制备。用于 ELISA 分析的 96 孔平板的每个孔都用 100 $\mu$ l 包含包被缓冲液中制备的浓度为 1  $\mu$ g/毫升的人 PTHrP ( 1-34 ) ( 肽研究所 ) 的溶液包被, 然后用 200  $\mu$ l 稀释缓冲液隔断。每孔加入其中嵌合抗体得以表达的 COS-7 细胞培养上清液或者逐步稀释的纯化嵌合抗体。室温培养并用 PBS- Tween20 冲洗后, 每孔加入 100  $\mu$ l 碱性磷酸酶偶合山羊抗人 IgG 抗体 ( TAGO ) 溶液。室温培养
- 30                    养并用 PBS-Tween20 冲洗后, 每孔加入 1 毫克/毫升的基质溶液

( “ Sigma104”, 对-硝基苯磷酸, SIGMA )。用微平板读数仪 ( Bio Rad ) 于 405 nm 测量溶液的吸收值。

5 结果发现嵌合抗体具有对人 PTHrP ( 1-34 ) 的结合能力, 也具有克隆的鼠抗体 V 区 ( 图 4 ) 的正确结构。还发现 L 链 C 区有  $\lambda$  链的嵌合抗体和 L 链 C 区有  $\kappa$  链的嵌合抗体对 PTHrP ( 1-34 ) 的结合能力没有差异。因此, 通过人源化抗体 L 链  $\lambda$  链构建了人源化抗体 L 链 C 区。

#### ( 6 ) CHO 稳定转化细胞系的建立

10 为了建立产生嵌合抗体的稳定转化体, 上述表达质粒导入 CHO 细胞 ( DXB11 )。

嵌合抗体稳定转化体的建立通过 CHO 细胞的表达质粒、质粒 MBC1HcDNA/pCHO1 和 MBC1L(  $\lambda$  )/neo 结合或者 CHO 细胞的表达质粒、MBC1HcDNA/pCHO1 和 MBC1L(  $\kappa$  )/ neo 结合实现。这些质粒组合体通过 Gene Pulser ( Bio Rad ) 电穿孔分别共转染到 CHO 细胞中。每种表达载体用限制性酶 PvuI 切开成为线型 DNA。得到的 DNA 用苯酚和氯仿提取并用乙醇沉淀收集。这样制备的质粒 DNA 分别电穿孔。质粒 DNA 各 10  $\mu$ g 加入 0.8 毫升包含 CHO 细胞 ( 浓度为  $1 \times 10^7$  个细胞/毫升 ) 的 PBS ( - ) 细胞悬浮液中。得到的混合液应用静电容量为 1500 V 和 2  $\mu$ F 的脉冲进行电穿孔。室温恢复 10 分钟后, 电穿孔的细胞悬浮于添加 10% 胎牛血清 ( GIBCO ) 的 MEM-  $\alpha$  培养基中。得到的悬浮液用三个 96 孔平板 ( Falcon ) 在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。培养当天, 培养基用选择性培养基 [ 添加 10% 胎牛血清 ( GIBCO ) 和 500 毫克/毫升 GENETICIN ( G418 Sulfate; GIBCO ) 无核糖核苷或脱氧核糖核苷的 MEM-  $\alpha$  培养基 ] 替换。从培养基中选择导入抗体基因的细胞。新鲜培养基替换选择性培养基后, 显微镜下观察开始培养之前的细胞和培养 2 周后的细胞。当观察到细胞生长时, 用上述 ELISA 分析法确定产生的抗体量。选择性收集产生大量抗体的细胞。

已建立抗体稳定转化体在摇瓶中用添加 2%Ultra Low IgG 胎牛血清，无核糖核苷或脱氧核糖核苷的 MEM 培养基大规模培养。培养第 3 到 4 天，收集培养基上清液，然后用孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore)的滤器过滤以除去其中的细胞碎片。

5

随后，用 POROS Protein A 柱(PerSeptive Biosystems)在 ConSep LC100 (Millipore)上按照其上介绍的方法纯化 CHO 细胞培养上清液中的嵌合抗体。纯化的嵌合抗体作为确定中和活性和检验对高钙血症模型动物的效能的样品。纯化嵌合抗体抗原的浓度和结合活性用同样的 ELISA 系统确定。

10

### 实施例 3

#### 人源化抗体的构建

#### 15 (1) 人源化抗体 H 链的构建

##### (i) 人源化 H 链 V 区的构建

通过 PCR 法用 CDR-移植技术制备人源化#23-57-137-1 抗体 H 链。为制备具有来源于人抗体 S31679 (NMRF-PDB; Cuisinier, A. M.等, 欧洲免疫杂志, 23, 110-118, 1993) FR 的人源化#23-57-137-1 抗体 H 链 (“a”型)使用了下列六种类型 PCR 引物: CDR-移植引物: MBC1HGP1 (SEQ ID NO: 23)和 MBC1HGP3 (SEQ ID NO: 24) (均包含有义 DNA 序列)以及 MBCHGP2 (SEQ ID NO: 25)和 MBC1HGP4 (SEQ ID NO: 26) (均包含反义 DNA 序列), 它们的每个末端均包含长度为 15-21 碱基对的互补序列; 以及外部引物: MBC1HVS1 (SEQ ID NO: 27)和 MBC1HVR1 (SEQ ID NO: 28), 它们分别具有与 CDR-移植引物 MBC1HGP1 和 MBC1HGP4 的同源性。

20

25

CDR-移植引物 MBC1HGP1、MBCHGP2、MBC1HGP3 和 MBC1HGP4 按照下列方式用尿素变性的聚丙烯酰胺凝胶 (分子克隆: 实验室手册, Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

30

1989) 分离, 并用压碎浸泡法 (分子克隆: 实验室手册, Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 从凝胶片段中提取。

5 每种 CDR-移植引物各 1 nmole 用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶分离得到 DNA 片段。用 UV 照射硅胶薄层平板从产物 DNA 片段中鉴定需要长度的 DNA 片段, 然后用压碎浸泡法收集。产物溶解于 20  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。用 TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 进行 PCR 反应。用于 PCR 反应的反应液 (100  $\mu$ l) 包含上述 CDR-移植引物 MBC1HGP1、MBCHGP2、MBC1HGP3 和 MBC1HGP4 各 1  
10  $\mu$ l, 0.25 mM dNTP 和 2.5U TaKaRa Ex Taq 的缓冲液。PCR 反应进行 5 个循环, 其中利用温度循环为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟; 55  $^{\circ}$ C 1 分钟; 72  $^{\circ}$ C 1 分钟。外部引物 MBC1HVS1 和 MBC1HVR1 各 50 pmole 加入反应混合物。利用这种反应混合物再用同样的温度循环进行 PCR 反应另外 30 个循环。这样扩增得到的 DNA 片段用 4% Nu Sieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio.  
15 Products) 凝胶电泳分离。

切下包含长度为 421 碱基对 DNA 片段的琼脂糖片段, 用 GENE CLEAN II 试剂盒 (BIO101) 按照试剂盒上指示的方法纯化 DNA 片段。纯化的 DNA 片段用乙醇沉淀, 然后溶于 20  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl  
20 (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。获得的 PCR 反应混合物用于将 DNA 片段亚克隆到预先用 BamHI 和 HindIII 消化的质粒 pUC19 上; 随后确定得到质粒的碱基序列。具有正确序列的质粒指定为 “hMBCHv/pUC19”。

## 25 (ii) 用于人源化 H 链 cDNA 的 H 链 V 区的构建

为了连接到人源化 H 链 C 区 C $\gamma$ 1 的 cDNA 上, 上述步骤构建的人源化 H 链 V 区的 DNA 用 PCR 法修饰。该方法中, 使用的反向引物 MBC1HVS2 设计为可以与编码 V 区引导序列 5'-末端区的序列杂交并携带 Kozak 共有序列 (Kozak 等, 分子生物学杂志, 196, 947-950,  
30 1987) 以及 HindIII-和 EcoRI-识别序列。用于修饰 H 链 V 区 DNA 的正

向引物 MBC1HVR2 设计为可以与编码 J 区 3'-末端区的 DNA 序列和编码 C 区 5'-末端区的 DNA 序列杂交并携带 *Apal*-和 *SamI*-识别序列。

用 TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 进行 PCR 反应，随其应用了缓冲液。用于 PCR 反应的反应液为包含 0.4  $\mu$ g hMBCHv/ pUC19 作为 DNA 模版，MBC1HVS2 和 MBC1HVR2 各 50 pmole 作为引物，2.5U TaKaRa Ex Taq 和缓冲液中的 0.25 mM dNTP。PCR 反应进行 30 个循环，其中利用温度循环为 94  $^{\circ}$ C 1 分钟；55  $^{\circ}$ C 1 分钟；72  $^{\circ}$ C 1 分钟。这样由 PCR 法扩增得到的 DNA 片段用 3%Nu Sieve GTG 琼脂糖 (FMC Bio. Products) 凝胶电泳分离。

切下长度为 456 碱基对的 DNA 片段，用 GENECLAN II 试剂盒 (BIO101) 按照试剂盒上指示的方法从中纯化 DNA 片段。纯化的 DNA 片段用乙醇沉淀，然后溶于 20  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。获得的 PCR 反应混合物用于 DNA 片段亚克隆到预先用 *EcoRI* 和 *SamI* 消化的质粒 pUC19 上；随后确定得到质粒的碱基序列。由此制备的包含编码来源于杂交瘤 #23-57-137-1 的鼠 H 链 V 区的 DNA 和也包含 5'-末端区 *HindIII*-和 *EcoRI*-识别序列和 Kozak 序列以及 3'-末端区 *Apal*-和 *SamI*-识别序列的质粒 DNA 指定为 “hMBC1Hv/ pUC19”。

## (2) 人源化抗体 H 链表达载体的构建

包含 hPM1 抗体 H 链的 cDNA 序列的质粒 RVh-PM1f-cDNA 用 *Apal* 和 *BamHI* 消化以获得包含 H 链 C 区碱基序列的 DNA 片段。该 DNA 片段导入预先用 *Apal* 和 *BamHI* 消化过的质粒 hMBC1Hv/ pUC19 上。由此制备的质粒指定为 “hMBC1HcDNA/ pUC19”。该质粒包含编码人源化 #23-57-137-1 抗体 H 链 V 区的 DNA 和编码人 H 链 C 区 C  $\gamma$  1 的 DNA 并具有 5'-末端区 *HindIII*-和 *EcoRI*-识别序列以及 3'-末端区 *BamHI*-识别序列。质粒 hMBC1HcDNA/ pUC19 中包含的人源化 H 链 “a” 型的碱基序列和对应的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 58 和 SEQ ID NO: 56 所示。

质粒 hMBC1HcDNA/ pUC19 用 EcoRI 和 BamHI 消化以获得包含编码 H 链碱基序列的 DNA 片段。将该 DNA 片段导入预先用 EcoRI 和 BamHI 消化过的表达质粒 pCOS1 上。获得的人源化抗体的表达质粒指定为 “ hMBC1HcDNA/ pCOS1 ”。

为制备在 CHO 细胞中表达的质粒，质粒 hMBC1HcDNA/ pUC19 用 EcoRI 和 BamHI 消化以获得包含编码 H 链 DNA 的 DNA 片段。该 DNA 片段导入预先用 EcoRI 和 BamHI 消化过的表达载体 pCHO1 上。由此获得的人源化抗体的表达质粒指定为 “ hMBC1HcDNA/ pCHO1 ”。

### (3) L 链杂合可变区的构建

#### (i) FR1、2/FR3、4 杂合抗体的制备

构建了编码其中 FR 区与人源化抗体和鼠（嵌合）抗体 FR 区重组的 L 链的 DNA，并评价了该区人源化作用的适宜性。该步骤中，包含来源于人抗体的 FR1 和 FR2 以及来源于鼠抗体的 FR3 和 FR4 的抗体利用存在于 CDR2 中的 Afl II 限制性位点制备。

质粒 MBC1L(λ)/neo 和 hMBC1L(λ)/ neo 各 10 μg 在 100 μl 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA 和 10U Afl II(Takara Shuzo)的反应液中 37℃消化 1 小时。反应液用 2%低熔点琼脂糖凝胶电泳，用 GENECLANII 试剂盒（BIO101）从凝胶中收集和纯化长度为 6282 碱基对的 DNA 片段（称为 “cl”）和长度为 1022 碱基对的 DNA 片段（称为 “hl”）。

获得的 cl 和 hl 片段各 1 μg 用 BAP 处理。用苯酚和氯仿提取，乙醇沉淀收集 DNA 片段，然后溶于 10 μl 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

BAP-处理的 cl 和 hl DNA 片段各 1 μl 分别与 4 μl h2 和 c2 DNA 片

段混合，以使彼此连接（4℃过夜）。连接产物导入感受态大肠杆菌 JM109 细胞以形成转化体。转化体在 2 毫升包含 50 μg/毫升胺苄青霉素的 2xYT 培养基中培养。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒（QIAGEN）从细胞碎片中纯化质粒。

5

纯化的质粒 DNA 在 20 μl 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 2U ApaLI(Takara Shuzo), 和 8U BamHI(Takara Shuzo) 或 HindIII(Takara Shuzo)的反应液中 37℃消化 1 小时。该步骤中，基于这样的设想鉴定了质粒，即如果 c1-h2 片段正确连接到质粒上，该连接获得 5560/124/ 498 碱基对的 ApaLI 消化片段或者 7134/269 碱基对的 BamHI/ HindIII 消化片段。

10

编码人 FR1、2/鼠 FR3、4 杂合抗体 L 链的表达载体指定为“h/m MBC1L(λ)/neo”。另一方面，没有获得 h1-c1 的克隆。因此，在 pUC 载体上进行了重组，随后克隆到 HEF 载体上。其中，用做模版的是包含编码无氨基酸替换的人源化抗体 L 链 V 区 DNA 的质粒 hMBC1La λ/pUC19，和包含编码 FR3 中第 91 位（即，按照 Kabat 定义的 87 号氨基酸）酪氨酸由异亮氨酸取代的人源化抗体 L 链 V 区 DNA 的质粒 hMBC1Ld λ/pUC19。

15

20

质粒 MBC1L(λ)/ pUC19、hMBC1La λ/pUC19 和 hMBC1Ld λ/pUC19 各 10 微升在 30 μl 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA，16U HindIII 和 4U Afl II 的反应液中 37℃消化 1 小时。反应液用 2%低熔点琼脂糖凝胶电泳，然后用 GENECLANII 试剂盒（BIO101）从质粒 MBC1L(λ)/pUC19 中收集和纯化下面 DNA 片段：长度为 215 碱基对的 DNA 片段（称为“c2”）或者分别从质粒 hMBC1La λ/pUC19 和 hMBC1Ld λ/pUC19 中收集和纯化长度为 3218 碱基对的 DNA 片段（分别称为“hal”和“hdl”）。

25

30

每种 hal'和 hdl'片段分别连接到 c2'片段上，然后导入感受态大肠

杆菌 JM109 细胞以形成转化体。转化体在 2 毫升包含 50  $\mu\text{g}$ /毫升胺苄青霉素的 2xYT 培养基中培养。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 从细胞碎片中纯化质粒。得到的包含 hal' 片段和 hdl' 片段的质粒 DNA 分别指定为 “m/hMBC1La  $\lambda$  /pUC19” 和 “m/ hMBC1Ld  $\lambda$  /pUC 19”。

5

质粒 m/hMBC1La  $\lambda$  /pUC19 和 m/ hMBC1Ld  $\lambda$  /pUC19 分别用 EcoRI 消化。2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳, 然后用 GENECLANII 试剂盒 (BIO101) 从凝胶中收集和纯化长度为 743 碱基对的 DNA 片段。产物溶于 20  $\mu\text{l}$  含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM EDTA 的溶液中。

10

获得的 DNA 片段 4  $\mu\text{l}$  与上述 BAP-处理的 HEF 载体 1  $\mu\text{l}$  混合以彼此连接。连接产物导入感受态大肠杆菌 JM109 细胞以形成转化体。转化体在 2 毫升包含 50  $\mu\text{g}$ /毫升胺苄青霉素的 2xYT 培养基中培养。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 (QIAGEN) 从细胞碎片中纯化质粒 DNA。

15

纯化的质粒 DNA 在 20  $\mu\text{l}$  包含 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 100 mM KCl, 8U HindIII(Takara Shuzo) 和 2U PvuI(Takara Shuzo) 的反应液中 37  $^\circ\text{C}$  消化 1 小时。该步骤中, 基于这样的设想鉴定了质粒 DNA, 即如果 DNA 片段正向插入质粒, 该连接反应得到 5104/2195 碱基对的消化片段, 而如果 DNA 片段反向插入质粒, 该连接反应得到 4378/2926 碱基对的消化片段。由此获得的质粒是编码鼠 FR1、2/人 FR3、4 杂合抗体 L 链的表达载体分别指定为表达载体 “m/hMBC1La  $\lambda$  /neo” 和 “m/ hMBC1Ld  $\lambda$  /neo”。

20

25

#### (ii) FR1/FR2 杂合抗体的制备

按照上述同样的方式利用存在于 CDR1 中 SnaBI 限制性位点制备 FR1/FR2 杂合抗体。

30

质粒 MBC1L( $\lambda$ )/neo 和 mMBC1L( $\lambda$ )/neo 各 10  $\mu\text{g}$  在 20  $\mu\text{l}$  包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 50 mM NaCl,

0.01%(w/v)BSA，和 6U *Sna*BI(Takara Shuzo)的反应液中 37 °C 消化 1 小时。得到反应液进一步在 50  $\mu$ l 包含 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 100 mM KCl, 0.01%(w/v)BSA，和 6U *Pvu*I 的反应液中 37 °C 消化 1 小时。

5

得到的反应液用 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶电泳，然后用 GENECLEANII 试剂盒 ( BIO101 ) 从凝胶中收集和纯化长度为 4955 碱基对和 2349 碱基对的 DNA 片段。从质粒 MBC1L( $\lambda$ )/neo 中获得的 DNA 片段指定为 “ m1”(4955 碱基对)和 “ m2”(2349 碱基对)，从质粒 h/mMBC1L( $\lambda$ )/neo 中获得的 DNA 片段指定为 “ hm1”(4955 碱基对)和 “ hm2 ” (2349 碱基对)。获得的每种 DNA 片段均溶于 20  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)和 1 mM EDTA 的溶液中。

10

m1 和 hm1 片段各 1  $\mu$ l 分别连接到 hm2 和 m2 片段各 4  $\mu$ l 上，然后导入感受态大肠杆菌 JM109 细胞以形成转化体。获得的转化体在 2 毫升包含 50  $\mu$ g/毫升氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养。用 QIAprep Spin 质粒试剂盒 ( QIAGEN ) 从细胞碎片中纯化质粒 DNA。

15

纯化的质粒 DNA 在 20  $\mu$ l 包含 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 和 8U *Apa*I(Takara Shuzo)或者 2U *Apa*II(Takara Shuzo)的反应液中 37 °C 消化 1 小时。

20

基于下述设想鉴定了由此制备的质粒 ( m1-hm2 和 hm1-m2 )，即如果每种 DNA 片段以正确方向连接到质粒上，用 *Apa*I 和 *Apa*LI 消化的质粒 ( m1-hm2 ) 将分别得到 7304 碱基对的消化片段和 5560/1246/498 碱基对的消化片段，用 *Apa*I 和 *Apa*LI 消化的质粒 ( hm1-m2 ) 将分别得到 6538/766 碱基对的片段和 3535/2025/1246/498 碱基对的片段。

25

编码人 FR1/鼠 FR2 、 3 、 4 杂合抗体 L 链的表达载体指定为 “ hmmmBC1L( $\lambda$ )/neo”，编码鼠 FR1/人 FR2/鼠 FR3 、 4 杂合抗体 L 链

30

的表达载体指定为“mhmMBC1L( $\lambda$ )/neo”。

#### (4)人源化抗体 L 链的构建

5 通过 PCR 法用 CDR-移植技术制备了人源化#23-57-137-1 抗体 L 链。即，包含来源于人抗体 HSU03868 ( GEN-BANK, Deftos M.等, Scand.免疫学杂志, 39, 95-103, 1994 ) FR1、FR2、FR3 以及来源于人抗体 S25755 ( NBRF-PDB ) FR4 的人源化#23-57-137-1 抗体 L 链 ( “ a”型) 用下述六种类型的 PCR 引物制备:

10 具有有义 DNA 序列的 CDR-移植引物: MBC1LGP1 ( SEQ ID NO: 29 ) 和 MBC1LGP3 ( SEQ ID NO: 30 ), 具有反义 DNA 序列的 CDR-移植引物: MBC1LGP2 ( SEQ ID NO: 31 ) 和 MBC1LGP4 ( SEQ ID NO: 32 ), 所有这些 CDR-移植引物的每个末端都具有 15-21 碱基对的互补序列; 以及分别与 CDR-移植引物 MBC1LGP1 和 MBC1LGP4 同源的外部引物 MBC1LVS1 ( SEQ ID NO: 33 ) 和  
15 MBC1LVR1 ( SEQ ID NO: 34 ) 。

CDR-移植引物 MBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3 和 MBC1LGP4 用尿素变性的聚丙烯酰胺凝胶分离 (分子克隆: 实验室手册, Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 并用  
20 压碎浸泡法从凝胶片段中提取 (分子克隆: 实验室手册, Sambrook 等, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 。

每种 CDR-移植引物各 1 nmole 用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶分离。UV 射线照射的硅胶薄层平板鉴定需要长度的 DNA 片段, 然后用压碎浸泡法从中收集。产物溶解于 20  $\mu$ l 含 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 和 1 mM  
25 EDTA 的溶液中。

用 TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo) 缓冲液进行 PCR 反应。用于 PCR 反应的反应液 ( 100  $\mu$ l ) 包含 CDR-移植引物 MBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3 和 MBC1LGP4 各 1  $\mu$ l, 0.25 mM dNTP, 缓  
30

5 冲液中的 2.5U TaKaRa Ex Taq。PCR 反应进行 5 个循环，其中利用了温度循环为 94 °C 1 分钟； 55 °C 1 分钟； 72 °C 1 分钟。反应混合物中加入外部引物 MBC1LVS1 和 MBC1LVR1 各 50 pmole。利用这种反应混合物再用同样的温度循环进行 PCR 反应另外 30 个循环。这样扩增得到的 DNA 片段用 3%Nu Sieve GTG 琼脂糖（FMC Bio. Products）凝胶电泳分离。

10 切下包含长度为 421 碱基对 DNA 片段的琼脂糖片段，用 GENECLAN II 试剂盒（BIO101）按照试剂盒上指示的方法纯化 DNA 片段。由此制备的 PCR 反应混合物用于 DNA 片段亚克隆到预先用 BamHI 和 HindIII 消化的质粒 pUC19 上。确定得到质粒的 DNA 序列。由此制备的质粒指定为“hMBCL/ pUC19”。然而发现该质粒 CDR4 的第 104 位氨基酸（按照 Kabat 确定的 96 号氨基酸）由精氨酸取代。为了将这个氨基酸校正为酪氨酸，设计和合成了引物 MBC1LGP10R（SEQ ID NO： 35）。然后用 TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo)和缓冲液进行 PCR 反应。用于 PCR 反应的反应液（100 μl）包含 0.6 μg 的质粒 hMBCL/ pUC19 为模版 DNA，引物 MBC1LVS1 和 MBC1LVR1 各 50 pmole， 2.5U TaKaRa Ex Taq (Takara Shuzo)，和缓冲液中的 0.25 mM dNTP，液面覆盖矿物油。PCR 反应进行 30 个循环，其中利用温度循环为 94 °C 1 分钟； 55 °C 1 分钟； 72 °C 1 分钟。这样扩增得到的 DNA 片段用 3%Nu Sieve GTG 琼脂糖（FMC Bio. Products）凝胶电泳分离。

25 切下长度为 421 碱基对的 DNA 片段，用 GENECLAN II 试剂盒（BIO101）按照试剂盒上指示的方法纯化 DNA 片段。由此制备的 PCR 反应混合物用于该 DNA 片段亚克隆到预先用 BamHI 和 HindIII 消化的质粒 pUC19 上。

30 用 M13 引物 M4 和 M13 引物 RV 确定该质粒的 DNA 序列。结果确定该质粒具有正确的序列。然后该质粒用 HindIII 和 BlnI 消化，用 1%的琼脂糖凝胶电泳从中分离到 416 碱基对的 DNA 片段。DNA 片段用

GENECLEAN II 试剂盒（BIO101）按照试剂盒上指示的方法纯化。然后导入预先用 HindIII 和 BlnI 消化的质粒 C $\lambda$ /pUC 上。得到的质粒指定为“hMBC1La $\lambda$ /pUC19”。该质粒用 EcoRI 消化，得到编码人源化 L 链的 DNA 片段。该 DNA 片段导入质粒 pCOS1 以至人源化 L 链的起始密码子定位于 EF1  $\alpha$  启动子的下游。这样获得的质粒指定为“hMBC1La $\lambda$ /pCOS1”。人源化 L 链“a”型的 DNA 序列（包括对应氨基酸序列）如 SEQ ID NO：66 所示。“a”型的氨基酸序列如 SEQ ID NO：47 所示。

“b”型通过 PCR 法用诱变导入技术制备。设计“b”型是为了用脯氨酸替换 43 位的甘氨酸（Kabat 定义的 43 号氨基酸）并用天冬氨酸替换 49 位的赖氨酸（Kabat 定义的 49 号氨基酸）。用质粒 hMBC1La $\lambda$ /pUC19 作模版，用突变引物 MBC1LGP5R（SEQ ID NO：36）和引物 MBC1LVS1 进行 PCR 反应。获得的 DNA 片段用 BamHI 和 HindIII 消化，消化片段亚克隆到 pUC19 的 BamHI-HindIII 位点。测序后，获得的质粒 DNA 用 HindIII 和 AflII 消化，产生的消化片段连接到预先用 HindIII 和 AflII 消化过的质粒 hMBC1La $\lambda$ /pUC19 上。

由此获得的质粒指定为“hMBC1Lb $\lambda$ /pUC19”。该质粒 DNA 用 EcoRI 消化，获得包含编码人源化 L 链 DNA 的 DNA 片段。该 DNA 片段导入质粒 pCOS1 以至于人源化 L 链的起始密码子定位于 EF1  $\alpha$  启动子的下游。由此获得的质粒指定为“hMBC1Lb $\lambda$ /pCOS1”。

“c”型通过 PCR 法用诱变导入技术制备。设计“c”型是为了用脯氨酸替换 84 位的丝氨酸（Kabat 定义的 80 号氨基酸）。用质粒 hMBC1La $\lambda$ /pUC19 作模版，用突变引物 MBC1LGP6S（SEQ ID NO：37）和引物 M13 引物 RV 进行 PCR 反应。获得的 DNA 片段用 BamHI 和 HindIII 消化，然后亚克隆到预先用 BamHI 和 HindIII 消化过的 pUC19 上。测序后，获得的质粒 DNA 用 BstPI 和 Aor51HI 消化，产生的 DNA 片段连接到预先用 BstPI 和 Aor51HI 消化过的质粒 hMBC1La $\lambda$ /pUC19 上。由此

获得的质粒指定为“hMBC1Lc λ/pUC19”。该质粒 DNA 用 EcoRI 消化, 获得包含编码人源化 L 链序列的 DNA 片段。该序列导入质粒 pCOS1 的 EcoRI 位点以至于人源化 L 链的起始密码子定位于 EF1 α 启动子的下游。由此获得的质粒指定为“hMBC1Lc λ/pCOS1”

5

“d”、“e”、“f”型也通过 PCR 法用诱变导入技术制备。设计“d”、“e”、“f”型是为了在 91 位分别用“a”、“b”、“c”型的异亮氨酸替换酪氨酸 (Kabat 定义的 87 号氨基酸)。分别用质粒 hMBC1La λ/pCOS1 作为“d”型的模版, 质粒 hMBC1Lb λ/pUC19 作为“e”型的模版, 质粒 hMBC1Lc λ/pUC19 作为“f”型的模版, 用突变引物 MBC1LGP11R (SEQ ID NO: 38) 和引物 M-S1 (SEQ ID NO: 44) 分别进行“d”、“e”、“f”各型的 PCR 反应。获得的 DNA 片段用 BamHI 和 HindIII 消化, 然后亚克隆到预先用 BamHI 和 HindIII 消化过的 pUC19 上。测序后, 质粒用 HindIII 和 BlnI 消化, 产生的消化片段连接到预先用 HindIII 和 BlnI 消化过的质粒 C λ/pUC19 上。

15

由此获得的质粒分别指定为“hMBC1Ld λ/pUC19”、“hMBC1Le λ/pUC19”和“hMBC1Lf λ/pUC19”。每种质粒用 EcoRI 消化, 获得包含编码人源化 L 链 DNA 的 DNA 片段。该 DNA 片段导入质粒 pCOS1 的 EcoRI 位点以至于人源化 L 链的起始密码子定位于该质粒 EF1 α 启动子的下游。由此获得的质粒分别指定为“hMBC1Ld λ/pCOS1”, “hMBC1Le λ/pCOS1”和“hMBC1Lf λ/pCOS1”。

20

“g”、“h”型也通过 PCR 法用诱变导入技术制备。设计“g”、“h”型是为了在 36 位分别用“a”和“d”型的酪氨酸替换组氨酸 (Kabat 定义的 36 号氨基酸)。用突变引物 MBC1LGP9R (SEQ ID NO: 39) 和引物 M13 引物 RV, 并用质粒 hMBC1La λ/pUC19 作为模版进行 PCR 反应。PCR 产物用 M13 引物 M4 作为引物以及质粒 hMBC1La λ/pUC19 作为模版再次进行另一个 PCR 反应。获得的 DNA 片段用 HindIII 和 BlnI 消化, 然后继代克隆到预先用 HindIII 和 BlnI 消

30

化过的质粒 C  $\lambda$ /pUC19 上。用该质粒作为模版，用引物 MBC1LGP13R (SEQ ID NO: 40) 和 MBC1LVS1 再次进行 PCR 反应。获得的 PCR 片段用 *Apa*I 和 *Hind*III 消化，然后分别导入预先用 *Apa*I 和 *Hind*III 消化过的质粒 hMBC1La  $\lambda$ /pUC19 和 hMBC1Ld  $\lambda$ /pUC19 上。确定获得的质粒的 DNA 序列。明确含有正确序列的质粒分别指定为 “hMBC1Lg  $\lambda$ /pUC19” 和 “hMBC1Lh  $\lambda$ /pUC19”。每种质粒用 *Eco*RI 消化，获得包含编码人源化 L 链序列的序列。该序列导入质粒 pCOS1 的 *Eco*RI 位点以至于人源化 L 链的起始密码子定位于 EF1  $\alpha$  启动子的下游。由此获得的质粒分别指定为 “hMBC1Lg  $\lambda$ /pCOS1” 和 “hMBC1Lh  $\lambda$ /pCOS1”。

“i”、“j”、“k”、“l”、“m”、“n”、“o”型也通过 PCR 法用诱变导入技术制备。用突变引物 MBC1LGP14S (SEQ ID NO: 41) 和引物 V1RV( $\lambda$ ) (SEQ ID NO: 43), 并用质粒 hMBC1La  $\lambda$ /pUC19 作为模版进行 PCR 反应。产生的 DNA 片段用 *Apa*I 和 *Bln*I 消化, 然后亚克隆到预先用 *Apa*I 和 *Bln*I 消化过的质粒 hMBC1Lg  $\lambda$ /pUC19 上。确定获得的质粒的碱基序列, 对应每种类型导入突变的克隆。由此获得的质粒指定为 “hMBC1Lx  $\lambda$ /pUC19 (x=i, j, k, l, m, n 或 o)”。该质粒用 *Eco*RI 消化, 获得包含编码人源化 L 链序列的序列。该序列导入质粒 pCOS1 的 *Eco*RI 位点以至于人源化 L 链的起始密码子定位于 EF1  $\alpha$  启动子的下游。由此获得的质粒指定为 “hMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 (x=i, j, k, l, m, n 或 o)”。 “j”、“l”、“m”、和 “o” 型的 DNA 序列 (包括对应的氨基酸序列) 分别如 SEQ ID NO: 67、68、69 和 70 所示。这些类型的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 48、49、50 和 51 所示。

“p”、“q”、“r”、“s”和 “t”型分别是 “i”、“j”、“m”、“l”和 “o”型的 87 位酪氨酸被异亮氨酸替代的修饰型。这些类型按照下列方式利用 FR3 中的 Aor51MI 限制性位点用 “i”、“j”、“m”、“l”或 “o”型替换 “h”型制备。从表达质粒 hMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 (x=i, j, m, l, 或 o) 中缺失包含 CDR3 的 Aor51HI 限制性片段

( 514 碱基对)、部分 FR3 和全部 FR4。包含 CDR3 的 Aor51HI 限制性片段 ( 514 碱基对)、部分 FR3 和全部 FR4 连接到表达质粒的缺失部分上, 从而用异亮氨酸替换了 91 位的酪氨酸 ( Kabat 定义的 87 号氨基酸)。确定产生的质粒的 DNA 序列, 选择 91 位酪氨酸 ( Kabat 定义的 87 号氨基酸) 被异亮氨酸替换的各种 “ i ”、 “ j ”、 “ m ”、 “ l ” 或 “ o ” 型克隆。对应于 “ i ”、 “ j ”、 “ m ”、 “ l ” 或 “ o ” 型的类型分别指定为 “ p ”、 “ q ”、 “ r ”、 “ s ” 和 “ t ” 型, 这些类型的质粒指定为 “ hMBC1Lx  $\lambda$  / pCOS1 (x=p, q, s, r 或 t) ”。 “ q ”、 “ r ”、 “ s ” 和 “ t ” 型的 DNA 序列 (包括对应的氨基酸序列) 分别如 SEQ ID NO: 71、72、73、74 所示。这些类型的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 52、53、54、55 所示。

质粒 hMBC1Lq  $\lambda$  / pCOS1 用 HindIII 和 EcoRI 消化, 然后亚克隆到预先用 HindIII 和 EcoRI 消化的质粒 pUC19 上。获得的质粒指定为 “ hMBC1Lq  $\lambda$  /pUC19 ”。

每种人源化 L 链类型中取代氨基酸的位置如表 3 所示。

表 3

序列表中取代氨基酸的位置（按照 Kabat 定义的氨基酸编号）

| 型 | 3 6 | 4 3 | 4 5 | 4 7 | 4 9 | 8 0 | 8 7 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| a |     |     |     |     |     |     |     |
| b |     | P   |     |     | D   |     |     |
| c |     |     |     |     |     | P   |     |
| d |     |     |     |     |     |     | I   |
| e |     | P   |     |     | D   |     | I   |
| f |     |     |     |     |     | P   | I   |
| g | Y   |     |     |     |     |     |     |
| h | Y   |     |     |     |     | I   |     |
| i | Y   |     | K   |     |     |     |     |
| j | Y   |     | K   |     | D   |     |     |
| k | Y   |     | K   | V   |     |     |     |
| l | Y   |     | K   | V   | D   |     |     |
| m | Y   |     |     |     | D   |     |     |
| n | Y   |     | V   |     |     |     |     |
| o | Y   |     | V   | D   |     |     |     |
| p | Y   |     | K   |     |     |     | I   |
| q | Y   |     | K   |     | D   |     | I   |
| r | Y   |     |     |     | D   |     | I   |
| s | Y   |     | K   | V   | D   |     | I   |
| t | Y   |     |     | V   | D   |     | I   |

上表 3 中, 大写字母代表下列氨基酸: Y: 酪氨酸; P: 脯氨酸;  
K: 赖氨酸; V: 缬氨酸; D: 天冬氨酸; I: 异亮氨酸。

5            包含质粒 hMBC1HcDNA/pUC19 的大肠杆菌株系和包含质粒  
hMBC1Lq  $\lambda$ /pUC19 的大肠杆菌株系分别指定为“大肠杆菌 JM109  
(hMBC1HcDNA/pUC19)”和“大肠杆菌 JM109 (hMBC1Lq  $\lambda$ /pUC19)”,  
它们已经按照布达佩斯条约的条款于 1996 年 8 月 15 日保藏在国家生物  
科学和人类技术所, 科学和技术所代理, 日本 ( 1-3, Higashi 1-chome,  
10        Tsukuba-shi, Ibaragi-ken, 日本 ), 大肠杆菌 JM109  
(hMBC1HcDNA/pUC19)的登记号为 FERM BP-5629, 大肠杆菌 JM109  
(hMBC1Lq  $\lambda$ /pUC19)的登记号为 FERM BP-5630。

#### ( 5 ) 转染到 COS-7 细胞

15            为确定杂合抗体和人源化#23-57-137-1 抗体的抗原结合活性和中  
和活性, 上述表达质粒在 COS-7 细胞中短暂表达。为短暂表达杂合抗体  
L 链, 下列各质粒的组合用 Gene Pulser (Bio Rad)通过电穿孔共转染  
COS-7 细胞: hMBC1HcDNA/pCOS1 和 h/mMBC1L(  $\lambda$  )/neo;  
hMBC1HcDNA/pCOS1 和 m/hMBC1La  $\lambda$ /neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 和  
20        m/hMBC1Ld  $\lambda$ /neo; hMBC1HcDNA/pCOS1 和 hmmmMBC1L(  $\lambda$  )/neo;  
hMBC1HcDNA/pCOS1 和 mhmMBC1L(  $\lambda$  )/neo。即, 各质粒 DNA 10 微  
克加入 0.8 毫升 COS-7 细胞悬浮于 PBS (-) 浓度为  $1 \times 10^7$  个细胞/  
毫升的细胞悬浮液。得到的溶液应用静电容量为 1500V 和 25  $\mu$ F 的脉  
冲。室温恢复 10 分钟, 电穿孔处理的细胞悬浮于添加 2% Ultra Low IgG  
25        胎牛血清 ( GIBCO ) 的 DMEM 培养基中, 然后用 10 cm 的培养皿在  
CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。培养 72 小时后, 收集培养上清液, 并离心除去细  
胞碎片。产物作为 ELISA 分析的样品。

为实现人源化#23-57-137-1 抗体的短暂表达, 各质粒组合  
30        hMBC1HcDNA/pCOS1 或 hMBC1Lx  $\lambda$ /pCOS1 (x = a - t) 以上述杂合抗

体同样的方式用 Gene Pulser (Bio Rad)转染到 COS-7 细胞中。获得的培养上清液作为 ELISA 分析的样品。

其中， COS-7 细胞培养上清液中的杂合抗体或人源化抗体用 AffiGel Protein A MAPSII 试剂盒 ( Bio Rad ) 按照试剂盒上指示的方法进行纯化。

## ( 6 ) ELISA 分析

### (i) 抗体浓度的确定

确定抗体浓度的 ELISA 平板如下制备。用于 ELISA ( Maxisorp, NUNC )的 96 孔平板的每个孔都用 100 $\mu$ l 添加 1  $\mu$ g/毫升的山羊抗人 IgG 抗体 ( TAGO ) 的包被缓冲液 ( 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub> ) 包被, 然后用 200  $\mu$ l 稀释缓冲液[50 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl, 0.05% Tween20, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1%牛血清白蛋白 ( BSA ) ; pH 7.2]隔断。每孔加入表达杂合抗体或人源化抗体的 COS-7 细胞培养上清液或者逐步稀释的纯化杂合抗体或人源化抗体溶液。室温培养 1 小时并用 PBS-Tween20 冲洗后, 每孔加入 100  $\mu$ l 碱性磷酸酶偶合山羊抗人 IgG 抗体 ( TAGO )。室温培养 1 小时并用 PBS-Tween20 冲洗后, 每孔加入 1 毫克/毫升的基质溶液 ( “ Sigma104”, 对-硝基苯磷酸, SIGMA )。用微平板读数仪 ( Bio Rad ) 于 405 nm 测量溶液的吸收值。纯化的 Hu IgG1  $\lambda$  (结合位点)用作抗体浓度测定的标准品。

### (ii) 抗原结合能力的确定

确定抗原结合能力的 ELISA 平板如下制备。用于 ELISA ( Maxisorp, NUNC ) 的 96 孔平板的每个孔均用 100 $\mu$ l 添加 1  $\mu$ g/毫升 人 PTHrP ( 1-34 ) 的包被缓冲液包被, 然后用 200  $\mu$ l 稀释缓冲液隔断。每孔加入杂合抗体或人源化抗体得以表达的 COS-7 细胞培养上清液或者逐步稀释的纯化杂合抗体或人源化抗体溶液。室温培养并用 PBS- Tween20 冲洗后, 每孔加入 100  $\mu$ l 碱性磷酸酶偶合山羊抗人 IgG 抗体 ( TAGO )。室温培养并用 PBS-Tween20 冲洗后, 每孔加入 1 毫克/毫升的基质溶液

( “ Sigma104”, 对-硝基苯磷酸, SIGMA )。用微平板读数仪 ( Bio Rad ) 于 405 nm 测量溶液的吸收值。

## ( 7 ) 活性的确定

### 5 (i) 人源化 H 链的评价

发现包含人源化 H 链 “ a ” 型和嵌合 L 链的抗体表现与嵌合抗体 ( 见图 5 ) 同样水平的 PTHrP 结合活性。该结果表明 “ a ” 型成功地实现了 H 链 V 区的人源化。因此, 人源化 H 链 “ a ” 型用做下列实验中的人源化抗体 H 链。

10

### (ii) 杂合抗体的活性

#### (ii-a) FR1、2/FR3、4 杂合抗体

当 L 链为 h/mMBC1Ld( $\lambda$ ) 时, 抗体不表现抗原结合活性。然而, 当杂合抗体的 L 链为 m/hMBC1La $\lambda$  或 m/hMBC1Ld $\lambda$  时, 抗体表现与嵌合 #23-57-137-1 抗体同样水平的抗原结合活性 ( 图 6 )。这些结果表明 FR3 和 FR4 适于人源化抗体, 但 FR1 和 FR2 存在需要的一些氨基酸残基被替换。

15

#### (ii-b) FR1/FR2 杂合抗体

当杂合抗体的 L 链为 mhmMBC1L( $\lambda$ ) 时, 抗体不表现抗原结合活性。然而, 当杂合抗体的 L 链为 hmmmMBC1L( $\lambda$ ) 时, 抗体表现与嵌合 #23-57-137-1 抗体同样水平的抗原结合活性 ( 图 7 )。这些结果表明 FR1 适于人源化抗体, 但 FR2 存在需要的一些氨基酸残基被替换。

20

### (iii) 人源化抗体的活性

确定了每种 “ a ” 型到 “ t ” 型用做 L 链的人源化抗体的抗原结合活性。结果发现, 具有 “ j ”, “ l ”, “ m ”, “ o ”, “ q ”, “ r ”, “ s ” 和 “ t ” 型 L 链的人源化抗体表现与嵌合抗体同样水平的 PTHrP-结合活性 ( 图 8-11 )。

25

30

## (8) CHO 稳定生产细胞系的建立

为建立人源化抗体的稳定转化体，上述表达质粒导入 CHO 细胞 (DXB11)。

5        采用下列质粒的组合作为 CHO 细胞的表达载体建立了人源化抗体的稳定转化体：hMBC1HcDNA/pCHO1 和 hMBC1Lm  $\lambda$  /pCOS1; hMBC1HcDNA/pCHO1 和 hMBC1Lq  $\lambda$  /pCOS1; hMBC1HcDNA/pCHO1 和 hMBC1Lr  $\lambda$  /pCOS1。质粒用 Gene Pulser (Bio Rad)通过电穿孔共转染到 CHO 细胞中。随后，每种表达载体用限制性酶 PvuI 裂解获得线型 DNA。得到的 DNA 用苯酚和氯仿提取，然后用乙醇沉淀。制备的 DNA 分别如下述进行电穿孔。即，每种质粒 DNA 各 10 微克加入 0.8 毫升包括 COS-7 细胞悬浮于 PBS (-) 浓度为  $1 \times 10^7$  个细胞/毫升的细胞悬浮液。得到的混合物应用静电容量为 1500V 和 25  $\mu$ F 的脉冲。恢复室温 10 分钟，电穿孔处理的细胞悬浮于添加 10%胎牛血清 (GIBCO) 的 MEM- $\alpha$  培养基 (GIBCO) 中，然后用 96 孔平板 (Falcon) 在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。培养当天，用添加 10%胎牛血清 (GIBCO) 和 500 毫克/毫升 GENETICIN (硫酸 G418; GIBCO) 但无核糖核苷和脱氧核糖核苷的 MEM- $\alpha$  选择培养基替换原培养基。从培养基中筛选导入抗体基因的细胞。用新鲜培养基替换原培养基后，培养之前和之后两周，显微镜观察细胞。当观察到满意的细胞生长后，用如上述确定抗体浓度的常规 ELISA 分析法确定细胞产生的抗体量。选择性收集大量产生抗体的那些细胞。

25        用添加 2%Ultra Low IgG 胎牛血清，无核糖核苷或脱氧核糖核苷的 MEM- $\alpha$  培养基在摇瓶中大规模培养这样建立的抗体的稳定转化体。培养后第 3 天和第 4 天收集培养基上清液，并用 0.2  $\mu$ m 的滤器 (Millipore) 过滤以除去其中的细胞碎片。CHO 细胞培养上清液中的人源化抗体用 POROS Protein A 柱(PerSeptive Biosystems)在 ConSep LC100 (Millipore) 上按照包括于其中的指导进行纯化。该人源化抗体用做确定中和活性和检查对高钙血症模型动物药理效能的样品。用上

述 ELISA 系统确定纯化的人源化抗体的浓度和抗原结合活性。

#### 实施例 4

##### 中和活性的确定

5           鼠抗体、嵌合抗体和人源化抗体的中和活性的测定通过大鼠骨髓瘤细胞系 ROS17/2.8-5 细胞进行。在 CO<sub>2</sub> 培养箱中，将 ROS17/2.8-5 细胞培养在添加 10%胎牛血清（GIBCO）的 Ham's F-12 培养基中，细胞浓度为 10<sup>4</sup> 个细胞/100 μl/孔，将 ROS17/2.8-5 细胞接种到用 96 孔平板的每孔中培养 1 天。培养基用添加 4 mM 氢化可的松和 10%胎牛血清的 Ham's F-12 培养基（GIBCO）更换。培养三到四天后，培养细胞用 260 μl Ham's F-12 培养基（GIBCO）冲洗，然后其中加入 80 μl 添加 1 mM 异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX，SIGMA）、10%胎牛血清和 10 mM HEPES 的 Ham's F-12 培养基。得到的混合物于 37 °C 保温 30 分钟。

15           用于检测中和活性的鼠抗体、嵌合抗体和人源化抗体预先按照下列各组逐步稀释：[10 μg/毫升, 3.3 μg/毫升, 1.1 μg/毫升和 0.37 μg/毫升], [10 μg/毫升, 2 μg/毫升, 0.5 μg/毫升和 0.01 μg/毫升]和[10 μg/毫升, 5 μg/毫升, 1.25 μg/毫升, 0.63 μg/毫升和 0.31 μg/毫升]。每种稀释的抗体样品溶液与等量 4 纳克/毫升 PTHrP(1-34)混合。80 μl 得到的混合溶液加入各孔。

20           每种抗体的终浓度为上述抗体浓度的四分之一，因此 PTHrP(1-34)的浓度成为 1 纳克/毫升。室温处理十分钟后，除去培养上清液，残留物用 PBS 冲洗三次。从产物中用 10μl 0.3%HCl-95%乙醇提取细胞中的 cAMP，然后水蒸汽吸收器蒸发除去 HCl-乙醇。残留物溶解于 120μl 吸附到 cAMP EIA 试剂盒 (CAYMAN CHEMICAL'S)的 EIA 缓冲液中以提取其中的 cAMP。用 cAMP EIA 试剂盒(CAYMAN CHEMICAL'S)按照其中指示的方法确定 cAMP 的水平。结果发现，在具有与嵌合抗体表现同样水平抗原结合活性的 L 链型的人源化抗体中，具有在 91 位酪氨酸被异亮氨酸取代的“q”，“r”，“s”和“t”型 L 链人源化抗体表现与嵌合抗体最接近的中和活性，尤其 L 链为“q”型的人源化抗体表现最强的中和活性

25           

30           (图 12-14)。

## 实施例 5

### 对高钙血症模型动物药理效能的检测（1）

5 用高钙血症模型动物（人肿瘤移植的裸鼠），分别检测了具有“m”，  
“r”和“q”型 L 链的抗 PTHrP 嵌合抗体和人源化抗体对高钙血症的  
治疗效能。

10 移植人胰腺癌 PAN-7 的裸鼠[从实验动物中心购买]用做高钙血症  
模型动物。已知移植人胰腺癌 PAN-7 的裸鼠随肿瘤体积的增加表现血钙  
浓度的增加，并形成与体重和自发活性（例如）降低有关的高钙血症。  
该实施例中，本发明的嵌合抗体和人源化抗体对人胰腺癌 PAN-7 诱导的  
高钙血症治疗效能通过受测动物的体重和血钙浓度测定而检测。

15 利用 BALB/c-nu/nu 裸鼠（Nippon Charles River）体内移植人胰腺癌  
PAN-7。为评价药理效能，购买了 5 周大的雄性 BALB/c-nu/nu 裸鼠  
（Nippon Charles River），然后使它们适应一周，这样，六周大的鼠用  
于上述评价实验。制备高钙血症模型鼠并将它们按照下列方式分组。切  
下人胰腺癌 PAN-7，并精切成 3 mm 的立方体。得到的肿瘤块移植到鼠  
皮瓣下，每只鼠移植一块。移植后两或三周，当确定每只鼠的肿瘤体积  
20 都足够大时，将鼠按照肿瘤体积、血钙浓度、和体重平均分组，这样鼠  
被用做高钙血症模型动物。

25 对高钙血症治疗效能的检测如下进行。具有“m”或“r”型 L  
链的抗 PTHrP 嵌合抗体或人源化抗体给上述每只高钙血症模型鼠的尾  
静脉分别以单剂量 10 或 30  $\mu\text{g}$ /鼠给药。具有“q”型 L 链的人源化抗  
体单剂量给上述每只高钙血症模型鼠的尾静脉以剂量 20 或 60  $\mu\text{g}$ /鼠给  
药。给药后第 1 天、第 4 天、第 7 天和第 11 天分别测量每只鼠的血钙  
浓度和体重以评价抗体的治疗效能。肿瘤体积通过测量肿瘤的最大直径  
（a mm）和最小直径（b mm）并且按照 Galant's 计算式 $[ab^2/2]$ 计算两次测  
30 量值确定。血钙浓度用血细胞比容管从每只鼠眼眶取血，并加到 643 自

动  $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}$  分析仪（CIBA-CORNING）测定全血钙离子浓度作为血钙浓度。

5 结果发现具有“m”，“r”和“q”型L链的嵌合抗体和人源化抗体对受试体给药导致体重和血钙浓度的变化迅速改善以及延长期滞留的增加。该结果表明本发明的嵌合抗体和人源化抗体可用于治疗高钙血症相关恶性肿瘤（见图15和16）。

#### 实施例6

10 对高钙血症模型动物药理效能的检测（2）

利用高钙血症模型动物（人肿瘤移植的裸鼠）如下述检测了具有“q”型L链的抗PTHrP嵌合抗体和人源化抗体对高钙血症的治疗效能。

15 对高钙血症的治疗效能如下检测。具有“q”型L链的抗PTHrP嵌合抗体或人源化抗体的单剂量给上述每只高钙血症模型鼠的尾静脉以剂量10或30  $\mu\text{g}/\text{鼠}$  给药。给药后第1天、第3天、第7天和第11天分别测量每只鼠的血钙浓度和体重以评价抗体的治疗效能。用血细胞比容管从每只鼠眼眶取血，并用643自动  $\text{Ca}^{2+}/\text{pH}$  分析仪（CIBA-  
20 CORNING）测定全血钙离子浓度作为血钙浓度。

25 结果发现具有“q”型L链的嵌合抗体和人源化抗体对携带人胰腺癌PAN-7的高钙血症模型动物给药导致受体体重和血钙浓度的迅速改善以及延长期保留的增加。该结果表明本发明的嵌合抗体和人源化抗体是治疗高钙血症相关恶性肿瘤的有效药物（见图17）。

#### 实施例7

对高钙血症模型动物药理效能的检测（3）

30 通过高钙血症模型动物（人肺癌LC-6移植的裸鼠），检测了具有“q”型L链的抗PTHrP嵌合抗体和人源化抗体对高钙血症的治疗效

能。

5 该实验中，移植了人肺癌 LC-6 移植的裸鼠（购买自实验动物中心）用作高钙血症模型动物。移植了已知人肺癌 LC-6 移植的裸鼠倾向于随肿瘤体积的增加表现血钙浓度随之增加，并形成与体重和自发活性有关的高钙血症。

该实施例中，通过测量受试动物体重和血钙浓度来检测本发明嵌合抗体和人源化抗体对人肺癌 LC-6 诱导的高钙血症的治疗效能。

10

用 BALB/c-nu/nu 裸鼠（Nippon Charles River）体内移植人肺癌株系 LC-6。购买了 5 周大的雄性 BALB/c-nu/nu 裸鼠（Nippon Charles River）用于评价药理效能，然后使它们适应一周，因此该实验使用了六周大的鼠。

15

制备高钙血症模型鼠并将它们按照下列方式分组。切下移植的人肺癌 LC-6，并精切成 3 mm 的立方体。得到的肿瘤块皮下移植到鼠皮瓣下，每只鼠移植一块。移植后两或三周，当确定每只鼠的肿瘤体积都足够大时，将鼠按照肿瘤体积、血钙浓度、和体重平均分组，这样处理的鼠被用做高钙血症模型动物。

20

25 对高钙血症治疗效能进行如下检测。单剂量的具有“q”型 L 链抗 PTHrP 的嵌合抗体或人源化抗体给上述每只高钙血症模型鼠的尾静脉分别以 10 或 30  $\mu\text{g}$ /鼠剂量给药。给药后第 1 天、第 3 天、第 6 天和第 10 天分别测量每只鼠的血钙浓度和体重以评价抗体的治疗效能。血钙浓度用血细胞比容管从每只鼠眼眶取血，并用 643 自动  $\text{Ca}^{2+}$ /pH 分析仪（CIBA-CORNING）测定全血钙离子浓度作为血钙浓度。

25

30 结果发现具有“q”型 L 链的嵌合抗体和人源化抗体对携带人肺癌 LC-6 的高钙血症模型动物给药导致受体体重和血钙浓度的迅速改善以

及延长期保留的增加。该结果表明本发明的嵌合抗体和人源化抗体是治疗高钙血症相关恶性肿瘤的有效药物（见图 18）。

## 实施例 8

### 5 利用 BIACORE 分析 PTHrP 和抗-PTHrP 抗体之间相互作用的动力学

该实验中，利用 BIACORE 分析抗原-抗体相互作用的动力学。 PTHrP（1-34+Cys）用做抗原，其 C-末端特异地吸附到传感器顶端。各种浓度的纯化抗体用做被分析物。从获得的传感图计算动力学指标（结合率常数“*k<sub>ass</sub>*”和解离率常数“*k<sub>diss</sub>*”）。动力学分析中参考了文献“基于新型生物传感器的分析体系的单克隆抗体-抗原相互作用的动力学分析”，Karlsson, R.等，（1991），免疫学方法杂志，145，p.229-240。

#### 15 （1）PTHrP（1-34+C）固定到传感器顶端

PTHrP（1-34+C）吸附到传感器顶端 CM5（Pharmacia）。

使用 HBS（10 mM HEPES, pH 7.4; 0.15 M NaCl; 3.4 mM EDTA; 0.005%表面活性剂 P20）作为流动缓冲液，流速 5μl/分钟。注射 100 μl 0.05M N-羟基丁二酰亚胺（NHS）/0.2M N-乙基-N’-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 100μl 80 mM 2-(2-吡啶二硫)乙酰胺（PDEA）/0.1M 硼酸盐缓冲液（pH 8.5），激活传感器顶端 CM5 上羧甲基葡聚糖的羧基，另外注射 10μl 5μg/毫升的 PTHrP（1-34+C）/10 mM 乙酸钠缓冲液（pH 5.0），使得所述羧基特异吸附到 PTHrP（1-34+C）C-末端的半胱氨酸残基上。随后，注射 100μl 50 mM（L）-半胱氨酸/1M NaCl/0.1M 甲酸钠缓冲液（pH 4.3）以封闭过量的活化基团。随后，注射 10μl 0.1M 甘氨酸-HCl 缓冲液（pH 2.5）和 10μl 10mM HCl 以冲洗具有非共价结合的基质。固定的 PTHrP（1-34+C）的量为 226.4 RU（共振单位）（图 19）。

(2) 免疫接种的 PTHrP (1-34+C) 和纯化的鼠抗 PTHrP 抗体之间的相互作用

5 使用 HBS 作为流动缓冲液，流速为 20 $\mu$ l/分钟。将抗体生成杂交瘤注射到 Balb/c 鼠的腹腔，两周后收集腹水，加样到用于纯化抗体的蛋白 A 柱。纯化的#23-57-137-1 抗体指定为“MBC”，纯化的 3F5 抗体指定为“3F5”。这些抗体用 HBS 稀释到 1.25, 2.5, 5, 10 和 20 $\mu$ g/毫升一系列浓度。

10 分析中，注射 40 $\mu$ l 抗体溶液两分钟以得到结合相，然后注射 HBS 两分钟以得到解离相。完全解离后，注射 10 $\mu$ l 10mM HCl 恢复传感器顶端。结合-解离-恢复作为一个循环，注射各种抗体溶液获得传感图进行分析。

15 (3) 固定化 PTHrP (1-34+C) 和纯化的人源化抗 PTHrP 抗体之间的相互作用

使用 HBS 作为流动缓冲液，流速为 20 $\mu$ l/分钟。抗体由 CHO 细胞制备，用蛋白 A 柱纯化。纯化的嵌合抗体指定为“chMBC”，纯化的 m 和 q 型人源化抗体分别指定为“hMBCm”和“hMBCq”，这些抗体用 HBS 稀释到 1.25, 2.5, 5, 10 和 20 $\mu$ g/毫升一系列浓度。

20 分析中，注射 40 $\mu$ l 抗体溶液两分钟以得到结合相，然后注射 HBS 两分钟以得到解离相。完全解离后，注射 10 $\mu$ l 10mM HCl 恢复传感器顶端。结合-解离-恢复作为一个循环，注射各种抗体溶液获得传感图进行分析。

25 (4) 相互作用的动力学分析

记录感兴趣的数据，通过覆盖感兴趣的反应区比较反应模式（图 20-24）。在附图 20-24 各图中，从上到下的连续线表示抗体浓度为 1.25, 2.5, 5, 10 和 20 $\mu$ g/毫升的数据。另外，通过特别为 BIAcore 设计的分析软件“BIAevaluation 2.1”（Pharmacia）进行相互作用的动力学分析，

30

其能够通过曲线切割计算动力学指标（结合率常数“**kass**”和解离率常数“**kdis**”）(表 4 和 5)。

表 4：MBC 和 3F5 的动力学指标

|             | MBC                    | 3F5                   |
|-------------|------------------------|-----------------------|
| Kdis [l/s]  | $7.38 \times 10^{-5}$  | $1.22 \times 10^{-2}$ |
| Kass [l/Ms] | $7.23 \times 10^5$     | $6.55 \times 10^5$    |
| KD [M]      | $1.02 \times 10^{-10}$ | $1.86 \times 10^{-8}$ |

5

表 5：嵌合抗体和人源化抗体的动力学指标

|                                 | chH-chλ | hMBCm | hMBCq |
|---------------------------------|---------|-------|-------|
| Kdis [l/s] ( $\times 10^{-4}$ ) | 1.66    | 3.16  | 2.32  |
| Kass [l/Ms] ( $\times 10^6$ )   | 1.24    | 0.883 | 1.03  |
| KD [M] ( $\times 10^{-10}$ )    | 1.34    | 3.58  | 2.25  |

该实验中，为确定结合率常数，使用了分析模型 4（BIAevaluation 2.1 软件手册，A1-A5）。

10

### 实施例 9

#### 恶性肿瘤相关高钙血症模型中磷分泌的抑制

恶性肿瘤相关高钙血症（HHM）是 PTHrP 出现而导致的疾病，已知 PTHrP 加速骨重吸收和肾脏及输尿管对钙的重吸收，导致形成高钙血症。另一方面，就磷而言，PTHrP 抑制肾脏和输尿管对磷的重吸收，导致形成排泄作用，因此临床 HHM 病人经常形成低磷血症。其中，利用恶性肿瘤相关高钙血症模型鼠检测了人源化抗-PTHrP 抗体对肾脏磷排泄的影响。

15

20

移植人肺癌 LC-6 的裸大鼠（实验动物中心购买）用做模型动物。已知皮下移植人肺癌 LC-6 的裸大鼠倾向于血钙浓度增加及肿瘤体积的增大，结果，大鼠形成与，例如体重和自发活性降低，有关的高钙血症。

利用这种动物模型，基于下述磷酸盐部分排泄的肾清除率法检测了本发明的人源化抗 PTHrP 抗体对肾脏磷排泄的影响。

5 利用 BALB/c-nu/nu 裸大鼠 ( Nippon Kurea)进行体内人肺癌 LC-6 的移植。购买五周大的雄性 F344N/Jcl-rnu 裸大鼠 ( Nippon Kurea)，使它们适应一周，这些六周大的大鼠用于评价药理效能。

10 恶性肿瘤相关高钙血症模型动物如下制备。切下移植的人肺癌 LC-6，精切成 3 mm 的立方块。得到的肿瘤块皮下移植到鼠皮瓣下，每鼠一块。移植后约三十天，确定每只鼠的肿瘤体积已经足够大 ( 3000 mm<sup>3</sup>)，基于血钙浓度和体重选择可以用作恶性肿瘤相关高钙血症模型动物的大鼠。

肾清除率法检查磷排泄如下进行。

15 ( 1 ) 肾清除法

用戊巴比妥 ( Nembutal, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd)麻醉恶性肿瘤相关高钙血症模型动物，仰卧固定在 37 ℃ 的保温垫上，膀胱插入套管以收集尿 (聚乙烯管， PE50， Nippon Beckton Dickinson)。随后，在模型动物的股静脉插入灌注管 (聚乙烯管， PE50， Nippon Beckton Dickinson)，然后用灌注泵 ( Terufusion 注射泵 STC-525; TERUMO ) 通过灌注管向模型动物导入灌注液 ( 0.7%菊粉， 5%甘露醇， 0.2%戊巴比妥， 0.9%氯化钠)，流速为 2 毫升/小时。平衡 50 分钟后，通过套管 20 分钟收集尿液 5 次 (即， 1 期-5 期)，得到尿样。每次收集尿的中间时间点，用肝素处理的注射器从模型动物的右颈静脉收集约 0.25 毫升的血样。

25

( 2 ) 抗体的给药

上述清除率检测中，在收集尿液 2 期刚开始的时间点，对动物静脉注射人源化抗-PTHrP 抗体，剂量为 1 毫克/毫升/千克。

30



图 25 说明磷相对组分排泄率（=磷清除率/菊粉清除率）随清除时间（1 期=20 分钟）的变化关系。人源化抗-PTHrP 抗体（1 毫克/千克）在 2 期的开始给药（静注）。

5

图 26 说明血浆磷浓度随清除时间（1 期=20 分钟）的变化关系。人源化抗-PTHrP 抗体（1 毫克/千克）在 2 期的开始给药（静注）。

10

结果发现，使用抗体给药后（即，2 期和 5 期）得到的磷组分排泄率与使用抗体前（即，1 期）得到的磷相对排泄率相比明显被抑制。换句话说，发现对形成低磷血症（导致磷加速排泄， $FE_p > 0.2$ ）的个体使用中和抗体给药，使受体磷的重吸收大致恢复到正常水平（磷重吸收分数=1- $FE_p > 0.8\%$ ），结果观察到个体血磷浓度趋向正常。该结果表明本发明抗体可以作为治疗磷加速排泄和 PTHrP 导致的低磷血症的有效治疗药物。

15

20

因为 PTHrP 是导致恶性肿瘤相关高钙血症的物质，预示 PTHrP 可能促进磷排泄和降低组织中的高能有机磷。因此，各种与低磷血症相关的疾病，例如低磷性佝偻病和低磷性抗维生素 D 佝偻病，认为主要由磷经由尿排泄的增加导致，因此本发明的抗体也会用于治疗这类疾病有效。

### 实施例 10

#### 各种恶性肿瘤相关高钙血症的临床症状的改善

25

已知恶性肿瘤相关高钙血症是由于肿瘤产生了 PTHrP，并且 PTHrP 加速骨重吸收以及肾脏和输尿管对钙的重吸收（导致高钙血症）而导致。另外，观察到高钙血症病人临床症状恶化，例如不良性能状态，意识低下，系统系不适，饮水习性，恶心和呕吐（厌食）。用人肿瘤裸家鼠移植系统和人肿瘤裸鼠移植系统的高钙血症模型动物检测了抗-PTHrP 抗体对这些临床症状的影响。

30

人肺癌 LC-6 移植的裸家鼠和裸大鼠（购自实验动物中心）作为高该血症模型动物。移植人肺癌 LC-6 的裸家鼠和裸大鼠倾向于表现血钙浓度的增加和肿瘤体积的增加，其导致高钙血症相关的体温和体重降低。

5

用人肺癌 LC-6 裸家鼠移植系统检测了鼠抗-PTHrP 抗体对恶性肿瘤相关高钙血症一般临床症状的改善作用，结果用照片显示。用人肺癌 LC-6 裸家鼠移植系统检测了抗体对自发活性和体温和降低以及厌食的改善作用。

10

### 1. 高钙血症的表观临床症状的改善

利用 BALB/c-nu/nu 裸鼠（Nippon Kurea）体内移植人肺癌株系 LC-6。购买五周大的雄性 BALB/c-nu/nu 裸鼠（Nippon Kurea），使它们适应一周，这些六周大的鼠用于评价药理效能。

15

制备高钙血症模型鼠，并将它们按下列方式分组。切下移植的人肺癌 LC-6，精切成 3 mm 的立方块。得到的肿瘤块皮下方式移植到鼠皮瓣下，每鼠一块。移植后约二十七天，确定每只鼠的肿瘤体积已经足够大时，按照鼠的肿瘤体积、血钙浓度和体重将鼠平均分组，然后鼠用做高钙血症模型动物。

20

通过测量肿瘤的最大直径（a mm）和最小直径（b mm）并且用这两个测量值按照 Galant's 计算式 $[ab^2/2]$ 计算确定肿瘤体积。

25

用血细胞比容管从每只鼠眼眶取血，并用 643 自动  $\text{Ca}^{2+}$ /pH 分析仪（CIBA-CORNING）测定全血钙离子浓度作为血钙浓度。

30

抗体对高钙血症治疗效能的检测按照下列方式进行。给上述每只高钙血症模型动物在移植肿瘤后第 27，30，34，37 天经尾静脉注射鼠抗 PTHrP 抗体，剂量为每只鼠 100  $\mu\text{g}$ 。磷酸盐缓冲的生理盐水代替该

抗体按照同样方式给药，用于制备对照。移植肿瘤后第 41 天，从使用抗体给药组和对照组分别选择一只典型的鼠，连同一只正常鼠拍照。

结果是，对于一只移植了人肺癌 LC-6 的高钙血症模型动物，虽然使用抗体给药鼠（如图 27 和 28 的中图所示）与对照鼠（如图 27 和 28 的右图所示）相比具有同样水平的肿瘤块，但它们表现与正常鼠（如图 27 和 28 的左图所示）同样水平的表现。该结果表明抗 PTHrP 抗体的给药改善了表观临床症状（图 27 和 28）。

## 2. 高钙血症相关自发活性降低的改善

利用 BALB/c-nu/nu 裸鼠（Nippon Kurea）体内移植人肺癌 LC-6。购买五周大的雄性 F344/NJcl-run 裸大鼠（Nippon Kurea），使它们适应一周，这些六周大的大鼠用于评价药理效能。

按照下列方式制备高钙血症模型动物。切下移植的人肺癌 LC-6，精切成 3 mm 的立方块。得到的肿瘤块皮下方式移植到鼠皮瓣下，每鼠一块。移植后约三十天，确定每只鼠的肿瘤体积已经足够大时，按照鼠的肿瘤体积、血钙浓度和体重将鼠平均分组，然后鼠用做高钙血症模型动物。

用血细胞比容管从每只鼠眼眶取血，并用 643 自动  $\text{Ca}^{2+}$ /pH 分析仪（CIBA-CORNING）测定全血钙离子浓度作为血钙浓度。

### （1）确定自发活性的方法

用 SE 型 ANIMEX 活性计量器（FARAD，Electronics, Sweden）确定自发活性，该装置放置在各单独饲养（水和食物）的模型动物的聚乙烯笼中的预测定位置。该装置设计为测量每只大鼠的运动量。通过这种装置，运动量记录为一定时间段的次数。该测量进行 13 小时（从某一天晚 7 点到第二天早 8 点），结果记作次/小时。

## (2) 抗体的给药

对上述制备的形成高钙血症的每只大鼠经尾静脉注射人源化抗-PTHrP 抗体 (剂量为 5 毫克/0.5 毫升/千克)作为对照。对另一组大鼠以同样方式注射盐水。给药的抗体鼠和对照鼠轮流进行测量。

5

第 0 (即, 给药抗体的前一天), 2, 4, 7 和 14 天对给药的抗体鼠进行测量, 第 1, 3, 5, 8 和 15 天对对照鼠进行测量。

10

结果, 检测期间对照大鼠没有表现自发活性的变化或降低, 而使用抗体鼠给药第 4 天后表现自发活性的增加 (图 29)。

## 3. 高钙血症相关体温降低的改善

人肺癌 LC-6 的移植和恶性肿瘤相关高钙血症模型动物的制备如上述步骤 2 同样的方式进行。

15

### (1) 体温测量方法

用戊巴比妥 (Nembutal, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.)麻醉动物, 直肠插入温度传感器, 通过数字温度计测量体温。

20

### (2) 抗体的给药

对上述每只高钙血症模型大鼠经尾静脉注射人源化抗-PTHrP 抗体, 剂量为 1 毫克/毫升/千克。对另一些模型大鼠经尾静脉注射生理盐水作为对照。另外, 也测量了没有使用抗体给药的正常大鼠的体温。分别对所有使用抗体大鼠、对照鼠和正常鼠在给药的第 0 天 (即, 给药当天), 1, 2 天和 3 天之后测量体温。

25

结果是, 测量期间正常鼠没有表现体温变化 (34.2-34.4 °C), 而恶性肿瘤相关高钙血症模型大鼠比正常大鼠体温降低约 2 °C。当对模型大鼠使用人源化抗-PTHrP 抗体给药后, 恶性肿瘤相关高钙血症模型大鼠降低的体温明显恢复到给药后三天的正常鼠体温的同样水平。这些结果

30

表明本发明的人源化抗 PTHrP 抗体对恶性肿瘤相关高钙血症模型动物体温降低有明显的改善作用（图 30）。

#### 4. 对诱导的食物摄取减少的改善

5 人肺癌 LC-6 的移植和高钙血症模型动物的制备如上述第 2 节描述的同样方式进行。制备的模型动物按照血钙浓度和体重平均分组，这样的鼠用于下述实验。

##### （1）食物摄取的量的测量

10 检测期间，大鼠单独放置于新陈代谢笼，饲喂水和食物。对每只大鼠，摄取量确定为 24 小时的食物量（g）（从某一天早 9 时到第二天早 9 时）。测量第一天早 9 时和第二天早 9 时的饲料罐总重，计算二者的重量差以确定食物摄取量。

##### （2）抗体的给药

15 对上述每只高钙血症模型大鼠（HHM 鼠）经尾静脉注射人源化抗-PTHrP 抗体，剂量为 5 毫克/0.5 毫升/千克。对对照组每只动物以同样方式经尾静脉注射生理盐水。对每只正常大鼠也以同样方式经尾静脉注射生理盐水。在第 0 天（即，给药前一天到给药当天的时间段），第 1 天（即，给药当天到第二天的时间段），第 3 天（即，给药后第三天到第四天的时间段）和第 5 天（即，给药后第 5 天到第 6 天的时间段）对  
20 所有使用抗体鼠、对照鼠和正常大鼠测量食物摄取量。

25 结果是，使用抗体给药前，高钙血症模型大鼠（5-9 只大鼠）的摄取量平均为 8.11 g，而正常大鼠平均为 12.06 g，这表明高钙血症模型大鼠摄取量明显减少。当对模型大鼠使用人源化抗 PTHrP 抗体后，给药抗体后当天及其后，虽然对照大鼠的摄取量没有观察到变化，但是给药抗体鼠的摄取量恢复到正常鼠的水平。这些结果表明本发明的人源化抗 PTHrP 抗体对恶性肿瘤相关高钙血症模型动物摄取量降低有明显改善  
30 作用（表 6）。

表 6：对摄食的影响

| 动物     | 个体<br>编号 | 给药*        | 个体摄食量 (g) |       |       |       |
|--------|----------|------------|-----------|-------|-------|-------|
|        |          |            | 第 0 天     | 第 1 天 | 第 3 天 | 第 5 天 |
| 正常大鼠   | 1        | 盐水         | 13.7      | 16.7  | 18.63 | 18.71 |
|        | 2        | 盐水         | 14.27     | 15.3  | 19.55 | 19.39 |
|        | 3        | 盐水         | 9.83      | 15.5  | 20.72 | 19.88 |
|        | 4        | 盐水         | 10.42     | 15.04 | 20.28 | 22.03 |
| HHM 大鼠 | 5        | 盐水         | 10.77     | 14.24 | 12.66 | 11.82 |
|        | 6        | 盐水         | 6.99      | 8.92  | 2.59  | 14.8  |
| HHM 大鼠 | 7        | 抗 PTHrP 抗体 | 7.46      | 17.65 | 22.52 | 17.99 |
|        | 8        | 抗 PTHrP 抗体 | 12        | 12.38 | 20.94 | 23.1  |
|        | 9        | 抗 PTHrP 抗体 | 3.35      | 16.65 | 20.36 | 21.89 |

\*使用盐水给药: 0.5 毫升/千克, 经尾静脉;

使用抗体给药：5 毫克/0.5 毫升/千克，经尾静脉。

5

上述结果论证了本发明的嵌合抗体和人源化抗体可以作为改善恶性肿瘤相关高钙血症的各种临床症状的有效药物。

### 5. 高钙血症导致的血液 pH 值降低的改善

10

人肺癌 LC-6 的移植和恶性肿瘤相关高钙血症模型动物的制备如上述第 2 步同样的方式进行。模型动物按照血钙浓度和体重平均分组。

### (1) 血液 pH 的测定

15

通过心脏采血技术用肝素处理的注射器对每只待检动物采血,然后将取到的血样应用于  $643\text{Ca}^{2+}/\text{pH}$  自动分析仪 (CIBA-CORNING) 以测定血样的 pH 值。

### (2) 抗体的给药

对上述每只高钙血症模型大鼠（HHM 大鼠）经尾静脉注射人源化



## 序列表

### (2) SEQ ID NO : 1 的资料:

5

#### (i) 序列特征:

(A) 长度: 20 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10

(D) 拓扑结构: 线性

#### (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

15

### (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 1 :

AAATAGCCCT TGACCAGGCA

20

20

### (2) SEQ ID NO : 2 的资料:

#### (i) 序列特征:

(A) 长度: 38 个碱基对

(B) 类型: 核酸

25

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

#### (ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 2 :

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG 38

5

(2) SEQ ID NO : 3 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 28 个碱基对

10

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

15

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 3 :

CGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG 28

20

(2) SEQ ID NO : 4 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 29 个碱基对

25

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

30

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 4 :  
GGATCCCGGG TCAGRGAAG GTGGRAACA

29

5

(2) SEQ ID NO : 5 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

10

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

15

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 5 :

GTTTTCCCAG TCACGAC

17

20

(2) SEQ ID NO : 6 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 个碱基对

25

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

30

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 6 :  
CAGGAAACAG CTATGAC

17

5 (2) SEQ ID NO : 7 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 31 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 7 :  
GTCTAAGCTT CCACCATGAA ACTTCGGGCT C

31

20 (2) SEQ ID NO : 8 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

25 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 8 :  
TGTTGGATCC CTGCAGAGAC AGTGACCAGA

30

5 (2) SEQ ID NO : 9 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 9 :  
GTCCTGAATTC AAGCTTCCAC CATGGGGTTT GGGCTG

36

20 (2) SEQ ID NO : 10 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 41 个碱基对

(B) 类型: 核酸

25 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 10 :

TTTCCCGGGC CCTTGGTGA GGCTGAGGAG ACGGTGACCA G 41

5 (2) SEQ ID NO : 11 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 109 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "合成 DNA "

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 11 :

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCCCACGGTC ACCCTGTTCC 60  
CGCCCTCCTC TGAGGAGCTC CAAGCCAACA AGGCCACACT AGTGTGTCT 109

20

(2) SEQ ID NO : 12 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 110 个碱基对

25 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

30 (A) 说明: /desc= "合成 DNA "

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 12 :

GGTTTGGTGGTCTCCACTCC CGCCTTGACG GGGCTGCCAT CTGCCTTCCA GGCCACTGTC 60  
ACAGCTCCCG GGTAGAAGTC ACTGATCAGA CACACTAGTG TGGCCTTGTT 110

5

(2) SEQ ID NO : 13 的资料:

(i) 序列特征:

10

- (A) 长度: 98 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 13 :

GGAGTGGAGA CCACCAAACC CTCCAAACAG AGCAACAACA AGTACGGGGC CAGCAGCTAC 60  
CTGAGCCTGA CGCCCGAGCA GTGGAAGTCC CACAGAAG 98

20

(2) SEQ ID NO : 14 的资料:

(i) 序列特征:

25

- (A) 长度: 106 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

30

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO： 14：

5 TGTGAATTC TTACTATGAA CATCTGTAG GGGCCACTGT CTTCTCCACG GTGCTCCCTT 60  
CATGCGTGAC CTGGCAGCTG TAGCTTCTGT GGGACTTCCA CTGCTC 106

(2) SEQ ID NO： 15 的资料：

10

(i) 序列特征：

(A) 长度： 43 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

15

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

20

(xi) 序列描述： SEQ ID NO： 15：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCC 43

(2) SEQ ID NO： 16 的资料：

25

(i) 序列特征：

(A) 长度： 20 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

30

(D) 拓扑结构：线性



(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5

(xi) 序列描述：SEQ ID NO： 16：

TGTTGAATTC TTACTATGAA

20

(2) SEQ ID NO： 17 的资料：

10

(i) 序列特征：

(A) 长度： 39 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

15

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

20

(xi) 序列描述：SEQ ID NO： 17：

CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTACCTGAG CCTGACGCC

39

(2) SEQ ID NO： 18 的资料：

25

(i) 序列特征：

(A) 长度： 39 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5

(xi) 序列描述： SEQ ID NO： 18：

GTAGCTGCTG GCCGCGTACT TGITGTTGCT CTGTTTGGA

39

(2) SEQ ID NO： 19 的资料：

10

(i) 序列特征：

(A) 长度： 46 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

15

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

20

(xi) 序列描述： SEQ ID NO： 19：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTC CTAGGTCGAA CTGTGGCTGC ACCATC

46

(2) SEQ ID NO： 20 的资料：

25

(i) 序列特征：

(A) 长度： 34 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5

(xi) 序列描述： SEQ ID NO： 20：

TGTTGAATTC TTACTAACAC TCTCCCCTGT TGAA

34

(2) SEQ ID NO： 21 的资料：

10

(i) 序列特征：

(A) 长度： 35 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

15

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

20

(xi) 序列描述： SEQ ID NO： 21：

GTCTAAGCTT CCACCATGGC CTGGACTCCT CTCTT

35

(2) SEQ ID NO： 22 的资料：

25

(i) 序列特征：

(A) 长度： 48 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5 (xi) 序列描述： SEQ ID NO : 22 :

TGTTGAATTC AGATCTAACT ACTTACCTAG GACAGTGACC TTGGTCCC 48

(2) SEQ ID NO : 23 的资料:

10 (i) 序列特征:

(A) 长度: 128 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 23 :

20 GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG AGCTGGGTTT TCCTCGTTGC TCTTTTAAGA 60  
GGTGTCCAGT GTCAGGTGCA GCTGCTGGAG TCTGGGGGAG GCGTGGTCCA GCCTGGGAGG 120  
TCCCTGAG 128

25 (2) SEQ ID NO : 24 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 125 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

30 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 24 :

ACCATTAGTA GTGGTGGTAG TTACACCTAC TATCCAGACA GTGTGAAGGG GCGATTCACC 60  
ATCTCCAGAG ACAATTCCAA GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCTGAG 120  
GACAC 125

10

(2) SEQ ID NO : 25 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度： 132 个碱基对

15

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

20

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 25 :

CTACCACCAC TACTAATGGT TGCCACCCAC TCCAGCCCCT TGCCTGGAGC CTGGCGGACC 60  
CAAGACATGC CATAGCTACT GAAGGTGAAT CCAGAGGCTG CACAGGAGAG TCTCAGGGAC 120  
CTCCCAGGCT GG 132

25

(2) SEQ ID NO : 26 的资料:

30

(i) 序列特征:

(A) 长度：110 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑结构：线性

5

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：26：

10

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG GTTCCCTGGC CCCAGTAAGC AAAGTAAGTC 60  
ATAGTAGTCT GTCTCGCACA GTAATACACA GCCGTGTCCT CAGCTCTCAG 110

15

(2) SEQ ID NO：27 的资料：

(i) 序列特征：

(A) 长度：30 个碱基对

(B) 类型：核酸

20

(C) 链型：单链

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

25

(xi) 序列描述：SEQ ID NO：27：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG 30

30

(2) SEQ ID NO：28 的资料：

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 30 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

- (A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 28 :  
 TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG

30

(2) SEQ ID NO : 29 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 133 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

- (A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 29 :

ACAAAGCTTC CACCATGGCC TGGACTCCTC TCTTCTTCTT CTTTGTTCCTT CATTGCTCAG 60  
 GTTCTTTCTC CCAGCTTGTG CTGACTCAAT CGCCCTCTGC CTCTGCCTCC CTGGGAGCCT 120  
 CGGTCAAGCT CAC 133

(2) SEQ ID NO : 30 的资料:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 118 个碱基对  
 (B) 类型: 核酸  
 (C) 链型: 单链  
 (D) 拓扑结构: 线性

10 (ii) 分子类型: 其它核酸

- (A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 30 :

15 AGCAAGATGG AAGCCACAGC ACAGGTGATG GGATTCTCTGA TCGCTTCTCA GGCTCCAGCT 60  
 CTGGGGCTGA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGTC TGAGGATGAG GCTGACTA 118

(2) SEQ ID NO : 31 的资料:

(i) 序列特征:

- 20 (A) 长度: 128 个碱基对  
 (B) 类型: 核酸  
 (C) 链型: 单链  
 25 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

- (A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 31 :

CTGTGGCTTC CATCTTGCTT AAGTTTCATC AAGTACCGAG GGCCCTTCTC TGGCTGCTGC 60  
TGATGCCATT CAATGGTGTA CGTACTGTGC TGACTACTCA AGGTGCAGGT GAGCTTGACC 120  
GAGGCTCC 128

5 (2) SEQ ID NO : 32 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 114 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 32 :

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CCCTCACAAA 60  
TTGTTCCCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GTAATAGTCA GCCTCATCCT CAGA 114

(2) SEQ ID NO : 33 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 17 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 33 :

5

ACAAAGCTTC CACCATG

17

(2) SEQ ID NO : 34 的资料:

10

(i) 序列特征:

(A) 长度: 19 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 34 :

20

CTTGGATCCG GGCTGACCT

19

(2) SEQ ID NO : 35 的资料:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 75 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑结构: 线性

30

- (ii) 分子类型：其它核酸
  - (A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 35 :

5      CTTGGATCCGGGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA 60  
CGTACACAAA TTGTTCTTA ATTGT 75

(2) SEQ ID NO : 36 的资料:

10

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度： 43 个碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (C) 链型：单链
  - (D) 拓扑结构：线性

15

- (ii) 分子类型：其它核酸
  - (A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 36 :

20

AAAGGATCCT TAAGATCCAT CAAGTACCGA GGGGGCTTCT CTG 43

(2) SEQ ID NO : 37 的资料:

25

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度： 46 个碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (C) 链型：单链
  - (D) 拓扑结构：线性

30

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5 (xi) 序列描述： SEQ ID NO： 37：

ACAAAGCTTA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGCC TGAGGA 46

(2) SEQ ID NO： 38 的资料：

10

(i) 序列特征：

(A) 长度： 111 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

15

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

20 (xi) 序列描述： SEQ ID NO： 38：

CTTGGATCCG GCCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60  
 TTGTTCCCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GATATAGTCA GCCTCATCCT C 111

(2) SEQ ID NO： 39 的资料：

25

(i) 序列特征：

(A) 长度： 42 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5

(xi) 序列描述：SEQ ID NO： 39：

CTTCTCTGGC TGCTGCTGAT ACCATTCAAT GGTGTACGTA CT

42

(2) SEQ ID NO： 40 的资料：

10

(i) 序列特征：

(A) 长度： 26 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

15

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

20

(xi) 序列描述：SEQ ID NO： 40：

CGAGGGCCCT TCTCTGGCTG CTGCTG

26

(2) SEQ ID NO： 41 的资料：

25

(i) 序列特征：

(A) 长度： 35 个碱基对

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

5

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 41 :

GAGAAGGGCC CTARGTACST GATGRAWCTT AAGCA

35

(2) SEQ ID NO : 42 的资料:

10

(i) 序列特征:

(A) 长度: 35 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

15

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 42 :

CACGAATTCA CTATCGATTC TGGAACCTTC AGAGG

35

(2) SEQ ID NO : 43 的资料:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 18 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

30

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型：其它核酸

(A) 说明：/desc= “合成 DNA ”

5 (xi) 序列描述： SEQ ID NO : 43 :

GGCTTGGAGC TCCTCAGA

18

(2) SEQ ID NO : 44 的资料:

10

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

15

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= “合成 DNA ”

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 44 :

GACAGTGGTT CAAAGTTTTT

20

(2) SEQ ID NO : 45 的资料:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 118 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

30

(ii) 分子类型：蛋白质

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 45 :

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

(2) SEQ ID NO : 46 的资料:

(i) 序列特征:

|    |                  |
|----|------------------|
| 25 | (A) 长度: 118 个氨基酸 |
|    | (B) 类型: 氨基酸      |
|    | (D) 拓扑结构: 线性     |

(ii) 分子类型：蛋白质

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 46 :

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

(2) SEQ ID NO : 47 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 116 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 47 :

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

(2) SEQ ID NO : 48 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 118 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 48 :

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

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

(2) SEQ ID NO : 49 的资料:

(i) 序列特征:  
(A) 长度: 118 个氨基酸  
20 (B) 类型: 氨基酸  
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

25 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 49 :

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr  
20 25 30  
30 Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys  
35 40 45  
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp  
118

50 55 60  
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg  
 65 70 75  
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 5 80 85 90  
 Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
 95 100 105  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 10 110 115

(2) SEQ ID NO : 50 的资料:

(i) 序列特征:

15 (A) 长度: 118 个氨基酸  
 (B) 类型: 氨基酸  
 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

20

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 50 :

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

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

(2) SEQ ID NO : 51 的资料:

(i) 序列特征:

15  
(A) 长度: 118 个氨基酸  
(B) 类型: 氨基酸  
(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 51 :

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

5  
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
80 85 90  
Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
95 100 105  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
110 115

(2) SEQ ID NO : 52 的资料:

10

- (i) 序列特征:  
(A) 长度: 118 个氨基酸  
(B) 类型: 氨基酸  
(D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 52 :

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

30

5  
65 70 75  
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
80 85 90  
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
95 100 105  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
110 115

10 (2) SEQ ID NO : 53 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 118 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

15 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 53 :

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

30

5  
 Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
 80 85 90  
 Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
 95 100 105  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
 110 115

(2) SEQ ID NO : 54 的资料:

10

- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 118 个氨基酸
  - (B) 类型: 氨基酸
  - (D) 拓扑结构: 线性

15

- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 54 :

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

30

65 70 75  
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
80 85 90  
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
95 100 105  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
110 115

(2) SEQ ID NO : 55 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 118 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 55 :

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



65 70 75  
Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr  
80 85 90  
Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val  
5 95 100 105  
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro  
110 115

(2) SEQ ID NO : 56 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 118 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 56 :

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

5  
65 70 75  
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
80 85 90  
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe  
95 100 105  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115

(2) SEQ ID NO : 57 的资料:

10

(i) 序列特征:

15

- (A) 长度: 411 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 双链
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 57 :

20

ATG AAC TTC GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA 45

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys

-15 -10 -5

GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA 90

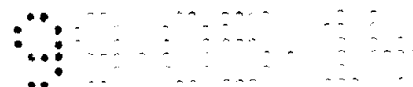
Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu

25

1 5 10

GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA 135

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



15 20 25  
TTC ACT TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG ATT CGC CAG ACT CCA 180  
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro  
30 35 40  
5 GAC AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT ACT GGT GGT AGT 225  
Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser  
45 50 55  
TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC 270  
Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
10 60 65 70  
AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTA TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG 315  
Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu  
75 80 85  
AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TTT TAC TGT GCA AGA CAG ACT ACT 360  
Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr  
90 95 100  
ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC 405  
Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
105 110 115  
20 TCT GCA 411  
Ser Ala

25 (2) SEQ ID NO : 58 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型：cDNA 到 mRNA

5

(xi) 序列描述：SEQ ID NO : 58 :

```

ATG GGG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTC GTT GCT CTT TTA AGA 45
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg
      -15          -10          -5
GGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG 90
Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
      1           5           10
GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA 135
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
      15          20          25
TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA 180
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
      30          35          40
GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT 225
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser
      45          50          55
TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC 270
Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
      60          65          70
AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG 315
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
      75          80          85
AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAG ACT ACT 360
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr

```



5  
90 95 100  
ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC 405  
Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
105 110 115  
TCC TCA 411  
Ser Ser

10 (2) SEQ ID NO : 59 的资料:

- (i) 序列特征:  
(A) 长度: 11 个氨基酸  
(B) 类型: 氨基酸  
15 (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 59 :

20  
Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala  
1 5 10

(2) SEQ ID NO : 60 的资料:

- 25  
(i) 序列特征:  
(A) 长度: 7 个氨基酸  
(B) 类型: 氨基酸  
(D) 拓扑结构: 线性

30



(ii) 分子类型：多肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO： 60：

5           Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
            1                      5

(2) SEQ ID NO： 61 的资料：

10           (i) 序列特征：  
              (A) 长度： 9 个氨基酸  
              (B) 类型：氨基酸  
              (D) 拓扑结构：线性

15           (ii) 分子类型：多肽

(xi) 序列描述：SEQ ID NO： 61：

20           Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr  
            1                      5

(2) SEQ ID NO： 62 的资料：

25           (i) 序列特征：  
              (A) 长度： 5 个氨基酸  
              (B) 类型：氨基酸  
              (D) 拓扑结构：线性

30           (ii) 分子类型：多肽

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 62 :

Pro Tyr Trp Met Gln

5                      1                      5

(2) SEQ ID NO : 63 的资料:

(i) 序列特征:

- 10                      (A) 长度: 16 个氨基酸  
                         (B) 类型: 氨基酸  
                         (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

15

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 63 :

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1                      5                      10                      15

20

(2) SEQ ID NO : 64 的资料:

(i) 序列特征:

- 25                      (A) 长度: 11 个氨基酸  
                         (B) 类型: 氨基酸  
                         (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 多肽

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 64 :

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

5

(2) SEQ ID NO : 65 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

10

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

15

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAA CTT GTG CTC ACT CAG TCA TCT TCA GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser

20

1 5 10

TTC TCC CTG GGA GCC TCA GCA AAA CTC ACG TGC ACC TTG AGT AGT 135

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

25

30

5 CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAA CAG CCA CTC 180  
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu  
30 35 40

10 AAG CCT CCT AAG TAT GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225  
Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His  
45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCT GGA TCC AGC TCT 270  
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
60 65 70

GGT GCT GAT CGC TAC CTT AGC ATT TCC AAC ATC CAG CCA GAA GAT 315  
Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp  
75 80 85

15 GAA GCA ATG TAC ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360  
Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln  
90 95 100

TTT GTG TAT GTT TTC GGC GGT GGG ACC AAG GTC ACT GTC CTA GGT 405  
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
105 110 115

CAG CCC 411  
Gln Pro

25

(2) SEQ ID NO : 66 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 405 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

30

(D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型： cDNA 到 mRNA

5

(xi) 序列描述： SEQ ID NO : 66 :

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
          -15          -10          -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
          1          5          10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
          15          20          25

CAG CAC AGT ACC TAC ACC ATT GAA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu
          30          35          40

AAG GGC CCT CGG TAC TTG ATG AAA CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
          45          50          55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
          60          65          70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
          75          80          85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

```



5  
90 95 100  
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGT 405  
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
105 110 115

(2) SEQ ID NO : 67 的资料:

- 10 (i) 序列特征:  
(A) 长度: 411 个碱基对  
(B) 类型: 核酸  
(C) 链型: 双链  
(D) 拓扑结构: 线性

15 (ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 67 :

20 ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
-15 -10 -5  
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
1 5 10  
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135  
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser  
15 20 25  
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180  
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

5  
 30 35 40  
 AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225  
 Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His  
 45 50 55  
 AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270  
 Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
 10 60 65 70  
 GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315  
 Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp  
 75 80 85  
 GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360  
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln  
 15 90 95 100  
 TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405  
 Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 105 110 115  
 20 CAG CCC 411  
 Gln Pro

(2) SEQ ID NO : 68 的资料:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

30

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 68:

5

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
          -15          -10          -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
          1           5           10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
          15           20           25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
          30           35           40

AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
          45           50           55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
          60           65           70

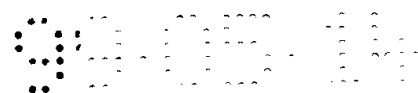
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
          75           80           85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
          90           95          100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

```





|    |                                                             |     |     |  |
|----|-------------------------------------------------------------|-----|-----|--|
|    | 30                                                          | 35  | 40  |  |
| 5  | AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC | 225 |     |  |
|    | Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His |     |     |  |
|    | 45                                                          | 50  | 55  |  |
|    | AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT | 270 |     |  |
|    | Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser |     |     |  |
| 10 | 60                                                          | 65  | 70  |  |
|    | GGG.GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT | 315 |     |  |
|    | Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp |     |     |  |
|    | 75                                                          | 80  | 85  |  |
|    | GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA | 360 |     |  |
| 15 | Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln |     |     |  |
|    | 90                                                          | 95  | 100 |  |
|    | TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC | 405 |     |  |
|    | Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly |     |     |  |
|    | 105                                                         | 110 | 115 |  |
| 20 | CAG CCC                                                     | 411 |     |  |
|    | Gln Pro                                                     |     |     |  |

25 (2) SEQ ID NO: 70 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型：双链

30 (D) 拓扑结构：线性

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 70 :

5

```

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
      -15          -10          -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
      1           5           10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
      15          20          25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
      30          35          40

AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
      45          50          55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
      60          65          70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
      75          80          85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
      90          95         100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

```

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105

110

115

5

CAG CCC 411

Gln Pro

(2) SEQ ID NO : 71 的资料:

10

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑结构: 线性

15

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 71 :

20

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser

-15

-10

-5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

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

1

5

10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15

20

25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu



|    |  |                                                             |     |     |  |     |  |
|----|--|-------------------------------------------------------------|-----|-----|--|-----|--|
|    |  | 30                                                          |     | 35  |  | 40  |  |
|    |  | AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC | 225 |     |  |     |  |
| 5  |  | Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His |     |     |  |     |  |
|    |  | 45                                                          |     | 50  |  | 55  |  |
|    |  | AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT | 270 |     |  |     |  |
|    |  | Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser |     |     |  |     |  |
|    |  | 60                                                          |     | 65  |  | 70  |  |
| 10 |  | GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT | 315 |     |  |     |  |
|    |  | Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp |     |     |  |     |  |
|    |  | 75                                                          |     | 80  |  | 85  |  |
|    |  | GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA | 360 |     |  |     |  |
| 15 |  | Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln |     |     |  |     |  |
|    |  | 90                                                          |     | 95  |  | 100 |  |
|    |  | TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC | 405 |     |  |     |  |
|    |  | Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly |     |     |  |     |  |
|    |  | 105                                                         |     | 110 |  | 115 |  |
| 20 |  | CAG CCC 411                                                 |     |     |  |     |  |
|    |  | Gln Pro                                                     |     |     |  |     |  |

(2) SEQ ID NO : 72 的资料:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型：双链

(D) 拓扑结构：线性

30

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 72 :

5 ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135  
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser  
15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180  
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu  
30 35 40

AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225  
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His  
45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270  
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315  
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp  
75 80 85

GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360  
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln  
90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405



Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105

110

115

CAG CCC 411

Gln Pro

5

(2) SEQ ID NO : 73 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

10

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

15

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 73 :

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser

-15

-10

-5

20

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

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

1

5

10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15

20

25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

|    |                                                             |     |     |     |
|----|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|    | 30                                                          | 35  | 40  |     |
| 5  | AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC |     |     | 225 |
|    | Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His |     |     |     |
|    | 45                                                          | 50  | 55  |     |
|    | AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT |     |     | 270 |
|    | Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser |     |     |     |
| 10 | 60                                                          | 65  | 70  |     |
|    | GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT |     |     | 315 |
|    | Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp |     |     |     |
|    | 75                                                          | 80  | 85  |     |
| 15 | GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA |     |     | 360 |
|    | Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln |     |     |     |
|    | 90                                                          | 95  | 100 |     |
|    | TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC |     |     | 405 |
|    | Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly |     |     |     |
| 20 | 105                                                         | 110 | 115 |     |
|    | CAG CCC                                                     |     |     | 411 |
|    | Gln Pro                                                     |     |     |     |

(2) SEQ ID NO : 74 的资料:

25

(i) 序列特征:

(A) 长度: 411 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

30

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: cDNA 到 mRNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 74:

5 ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45  
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser  
-15 -10 -5  
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90  
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser  
1 5 10  
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135  
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser  
15 20 25  
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180  
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu  
30 35 40  
AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225  
Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His  
45 50 55  
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270  
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser  
60 65 70  
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315  
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp  
75 80 85  
GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360  
Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln  
90 95 100  
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105

110

115

CAG CCC 411

Gln Pro

5

(2) SEQ ID NO : 75 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 34 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

10

(ii) 分子类型: 多肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 75 :

15

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

1

5

10

15

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu

20

25

30

20

Ile His Thr Ala

说明书附图

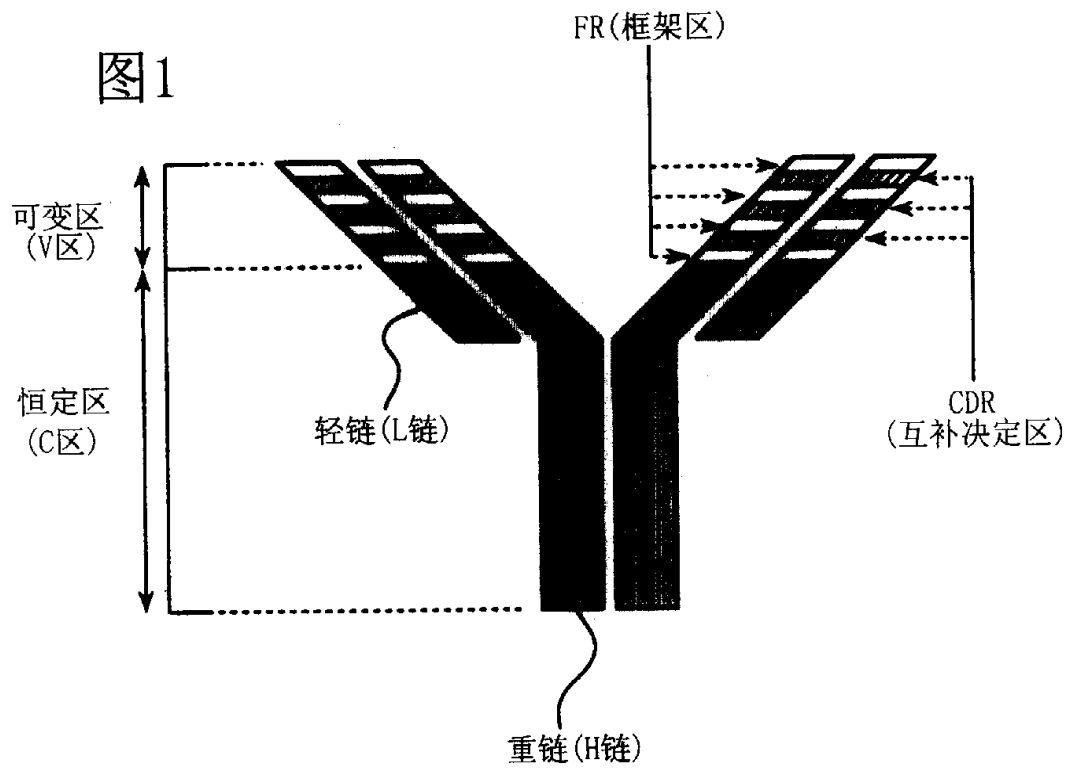


图2

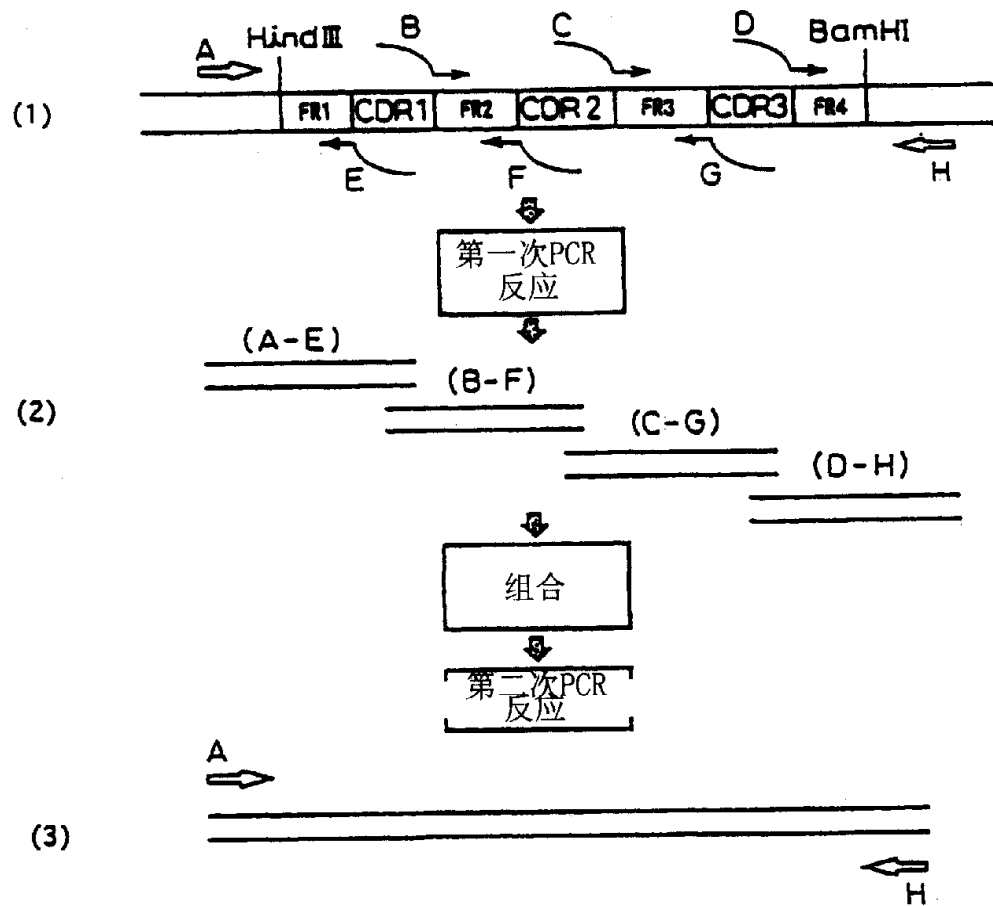


图3

| V区  |      |      |      |      |                       |   |
|-----|------|------|------|------|-----------------------|---|
| FR1 | FR2  | FR3  | FR4  |      |                       |   |
|     | CDR1 | CDR2 | CDR3 |      |                       |   |
| H   | H    | m    | m    | 质粒活性 | h/mMBC1L( $\lambda$ ) | - |
| m   | m    | H    | H    |      | m/hMBC1L( $\lambda$ ) | + |
| H   | m    | m    | m    |      | hmmMBC1L( $\lambda$ ) | + |
| m   | H    | m    | m    |      | mhmMBC1L( $\lambda$ ) | - |

H: 人抗性FR

m: 鼠抗性FR

图4

抗原结合活性的确定

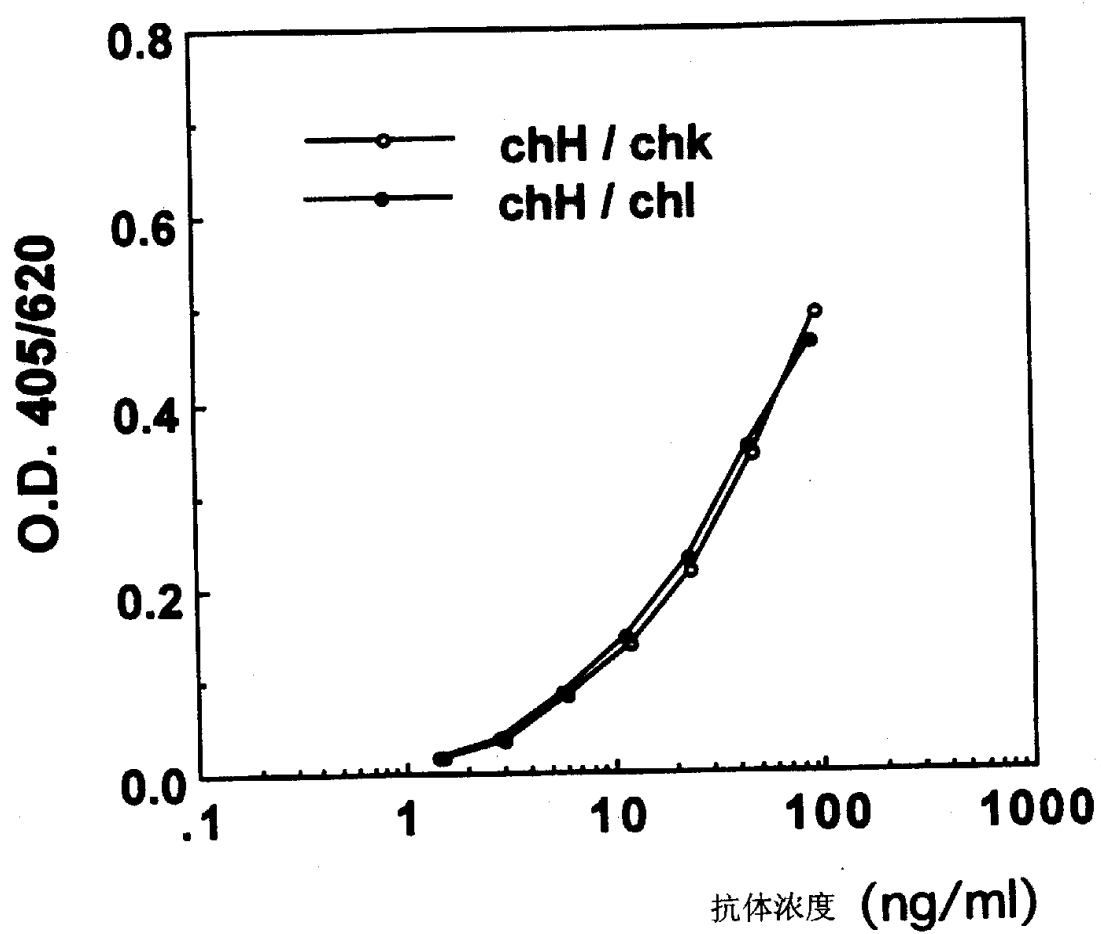


图5

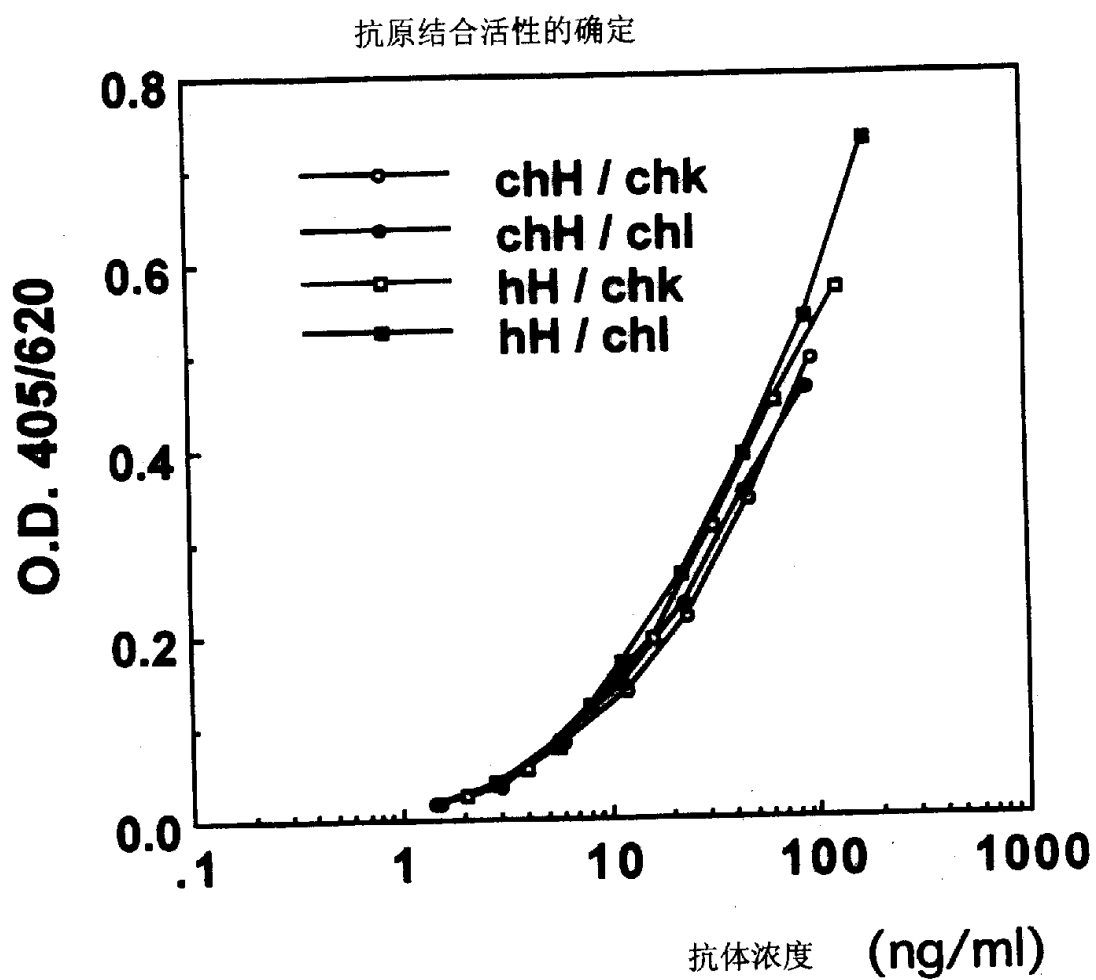


图6

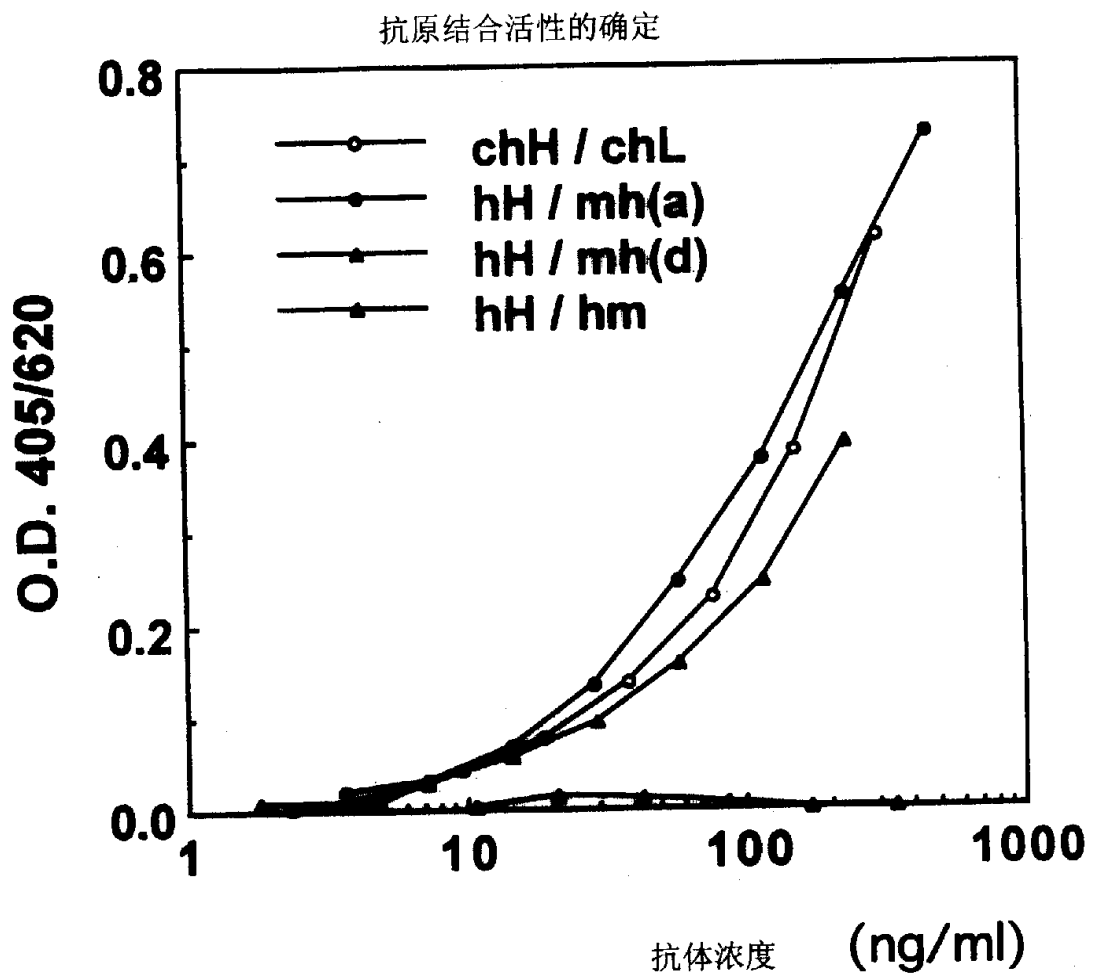


图7

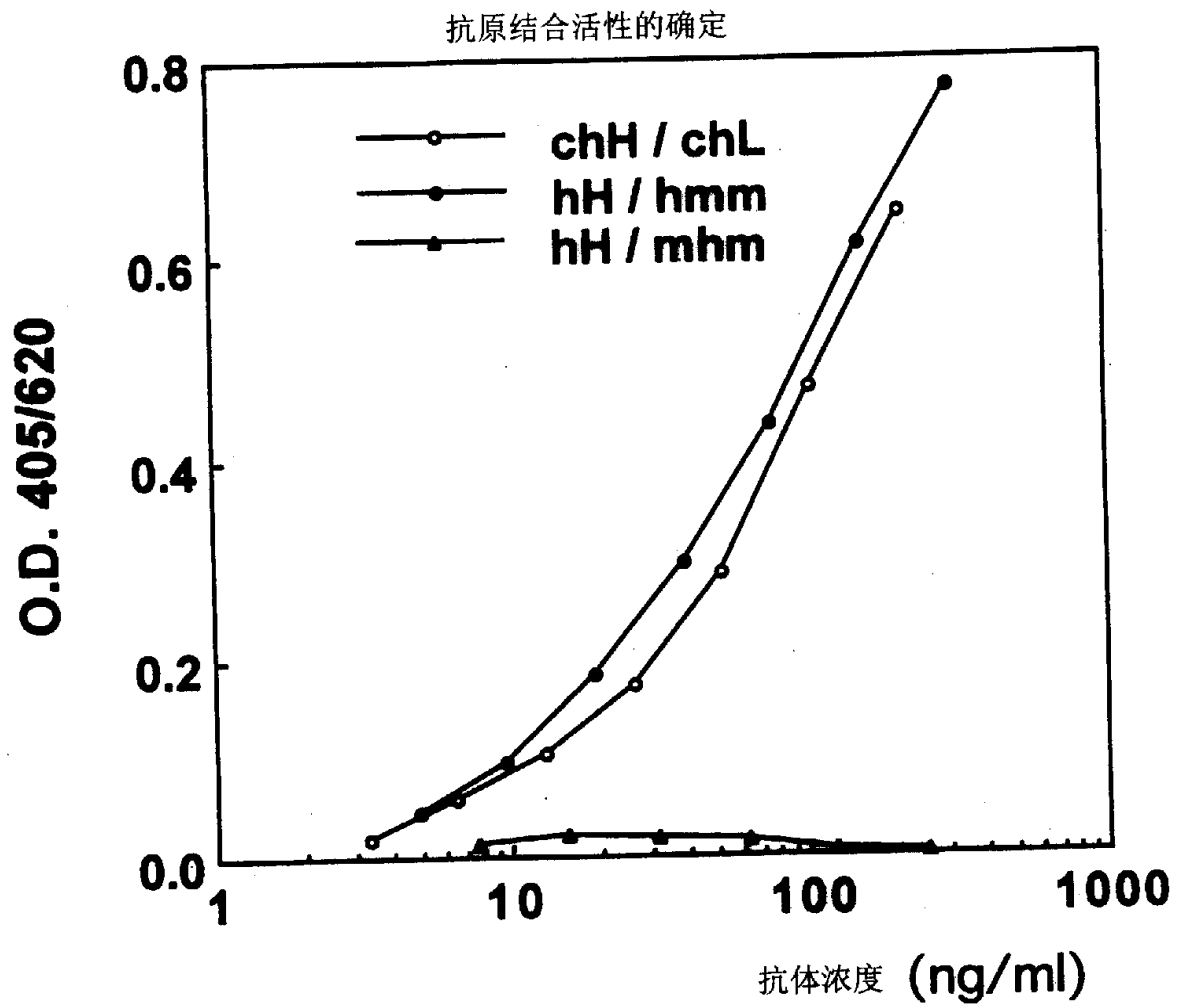


图8

抗原结合活性的确定

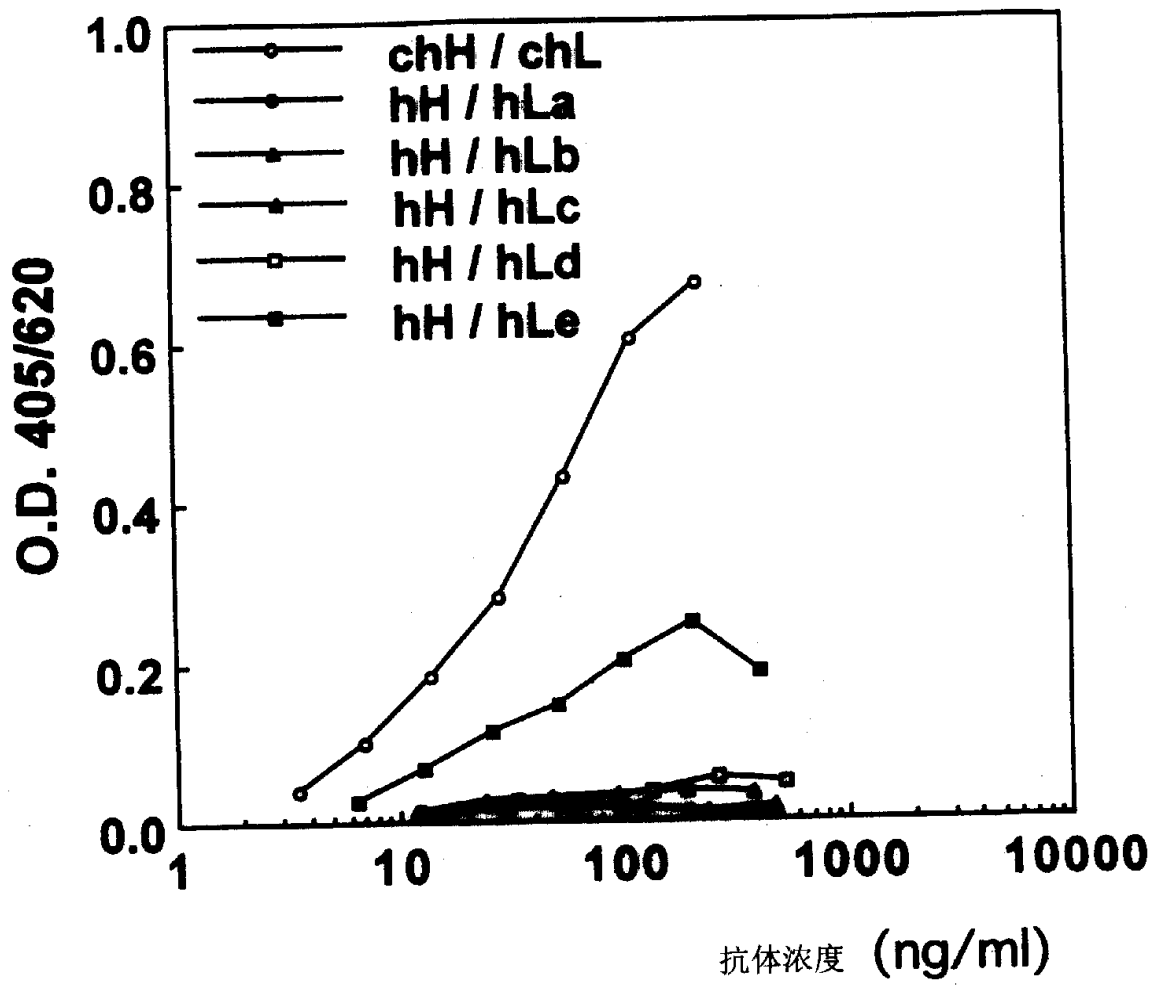


图9

抗原结合活性的确定

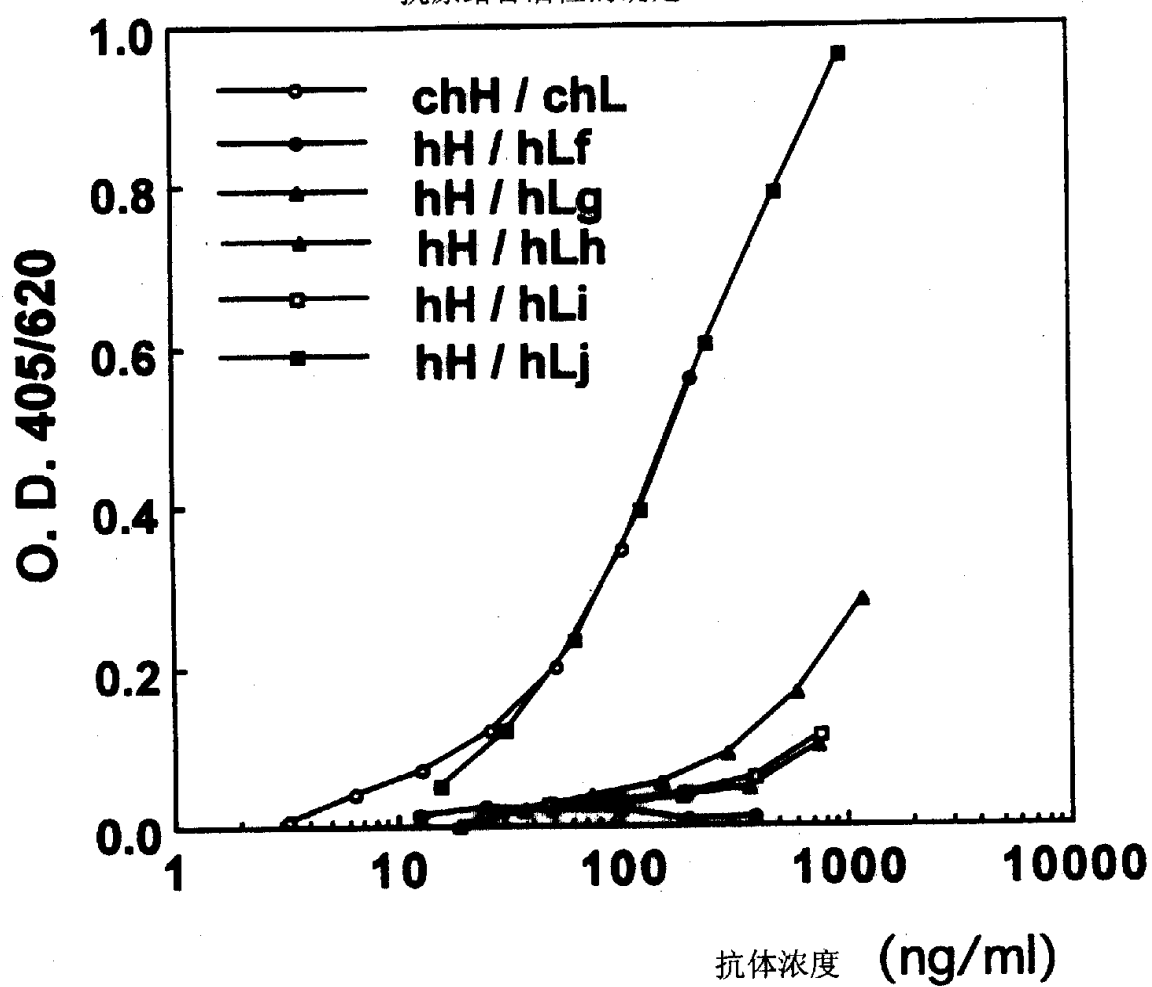


图10

抗原结合活性的确定

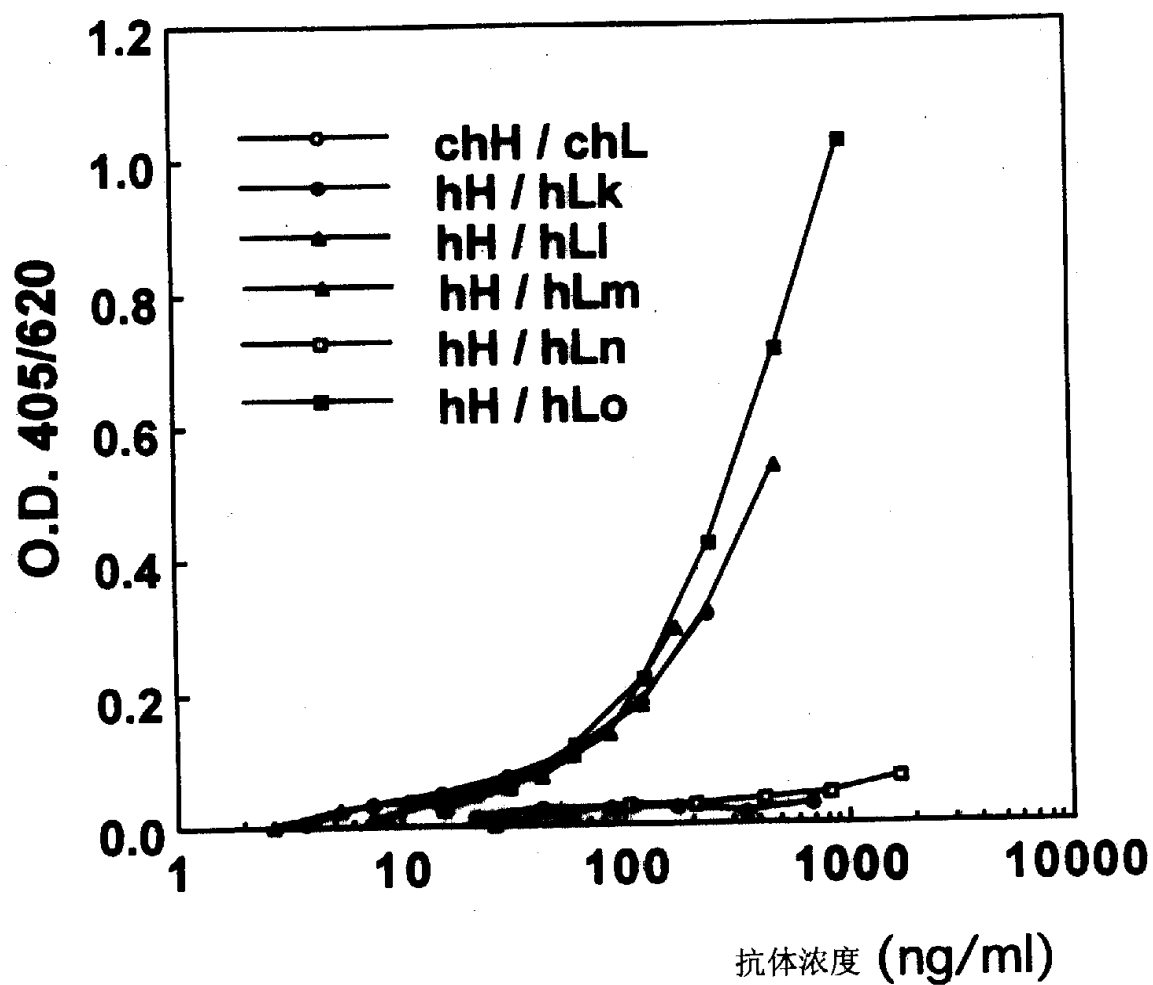


图11

抗原结合活性的确定

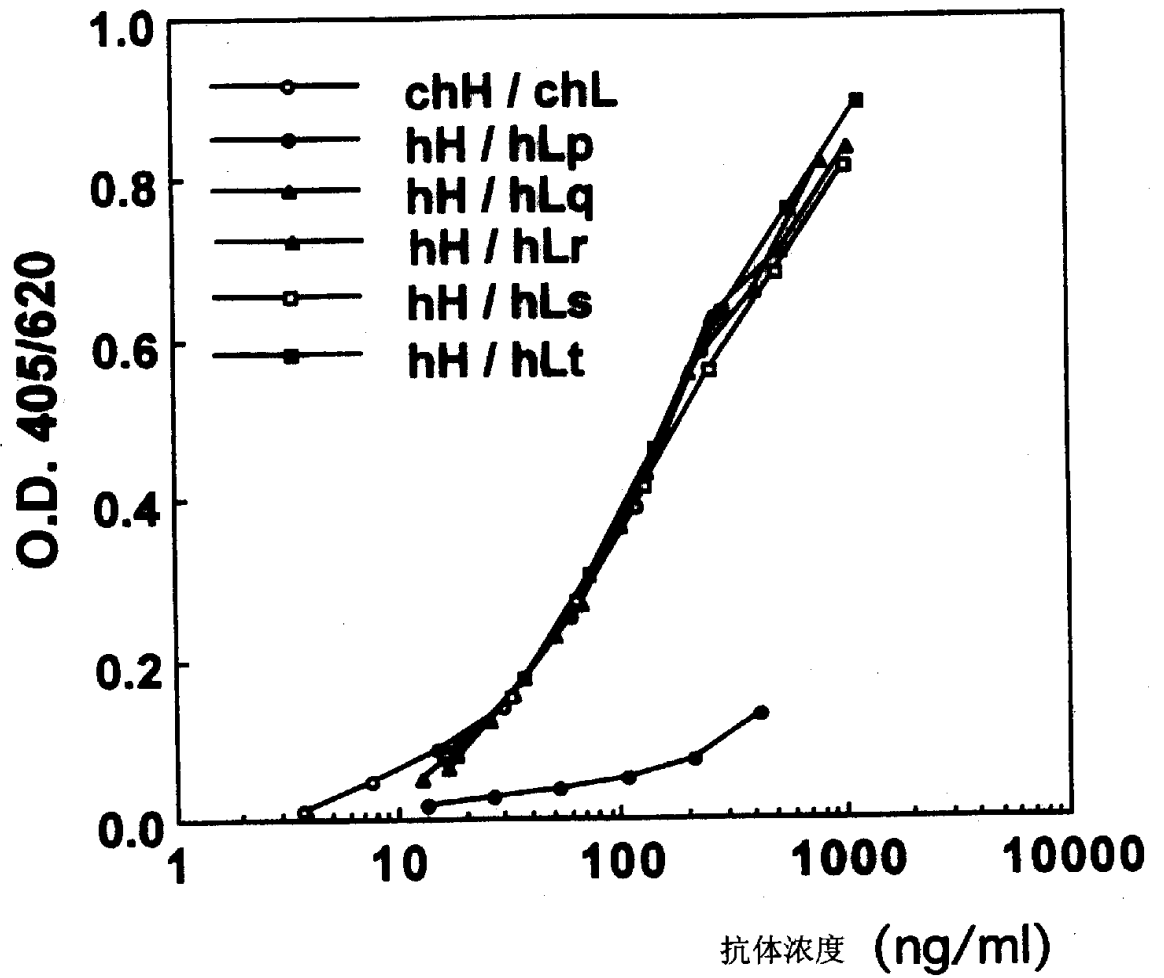


图12

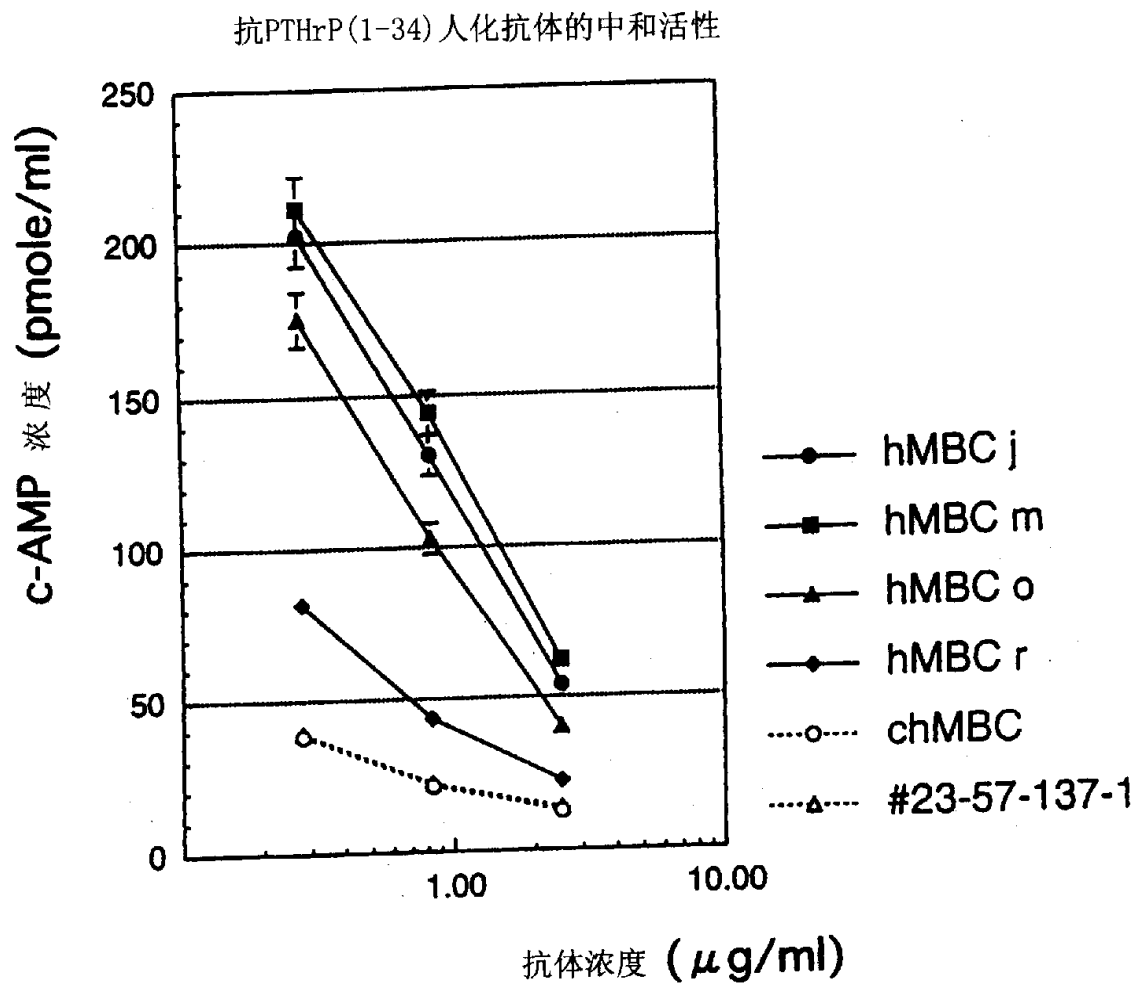


图13

抗PTHrP(1-34)人化抗体的中和活性

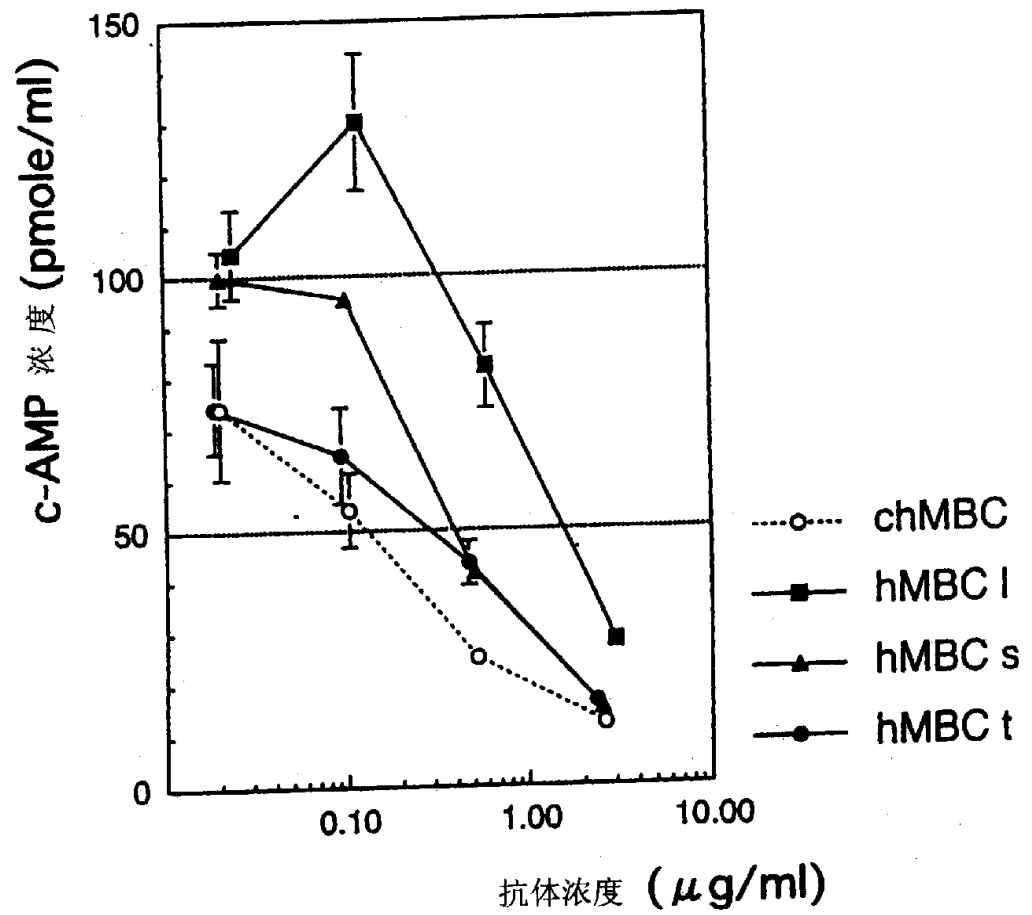


图14

抗PTHrP(1-34)人化抗体的中和活性

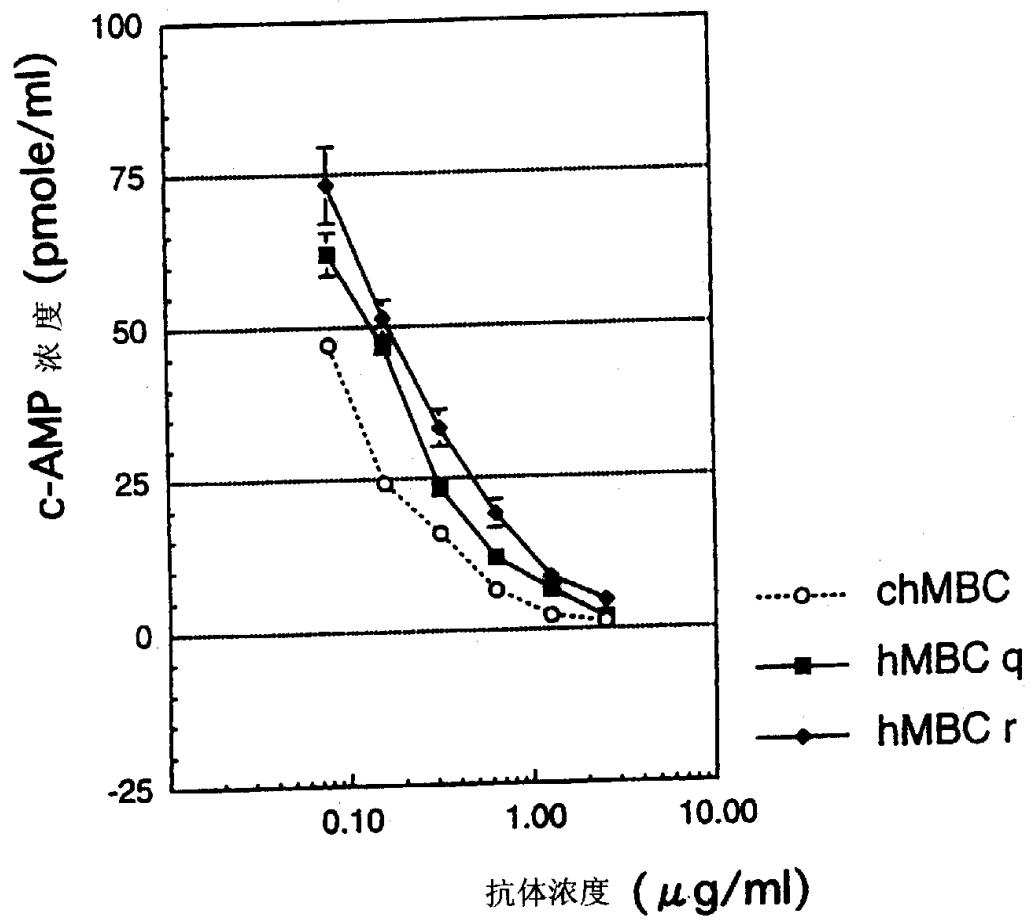


图15

嵌合抗体和人化抗体对高钙血症模型动物（承载人胰腺癌 PAN-7 的裸鼠）的影响

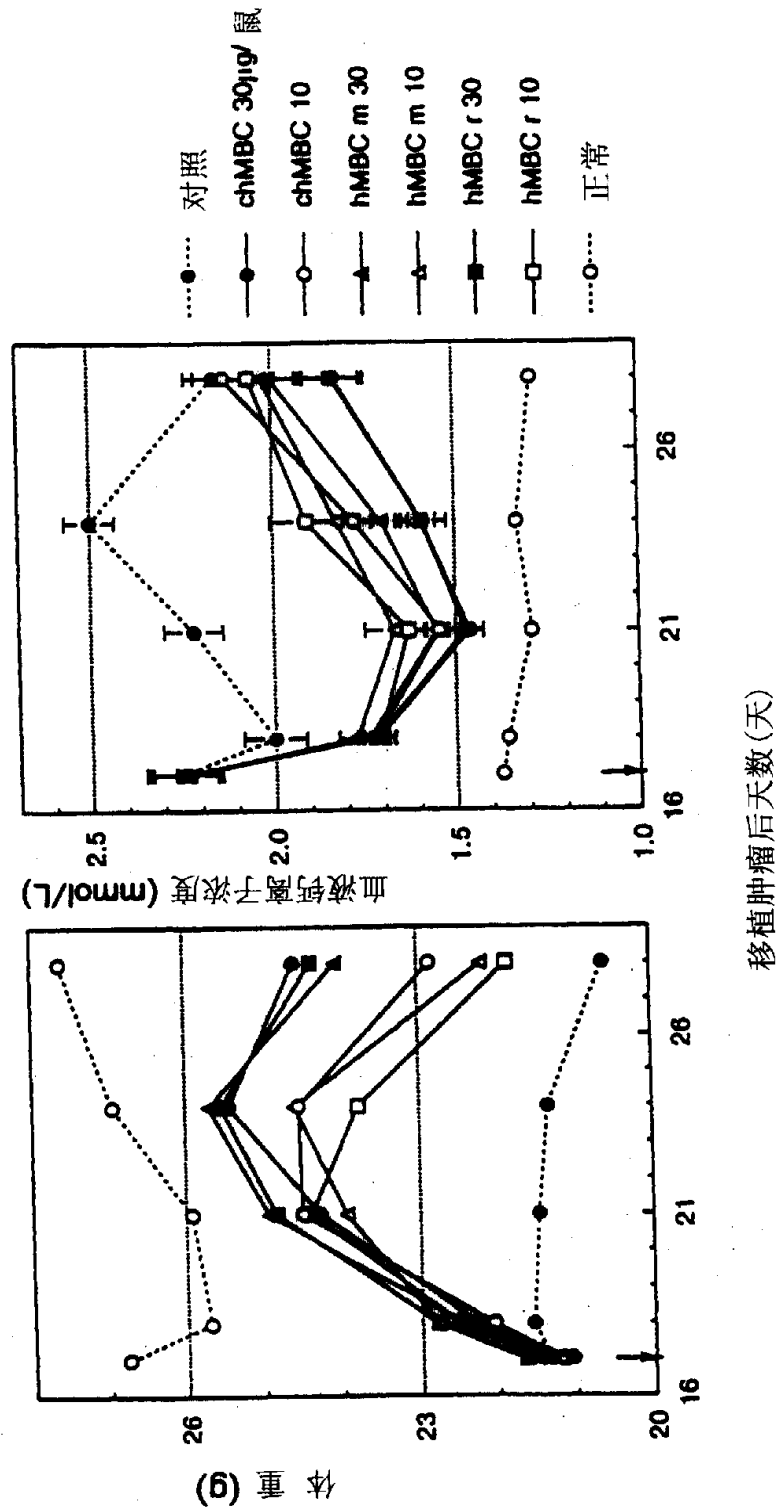


图16

嵌合抗体和人化抗体对高钙血症模型动物（承载人胰腺癌 PAN-7 的裸鼠）的影响

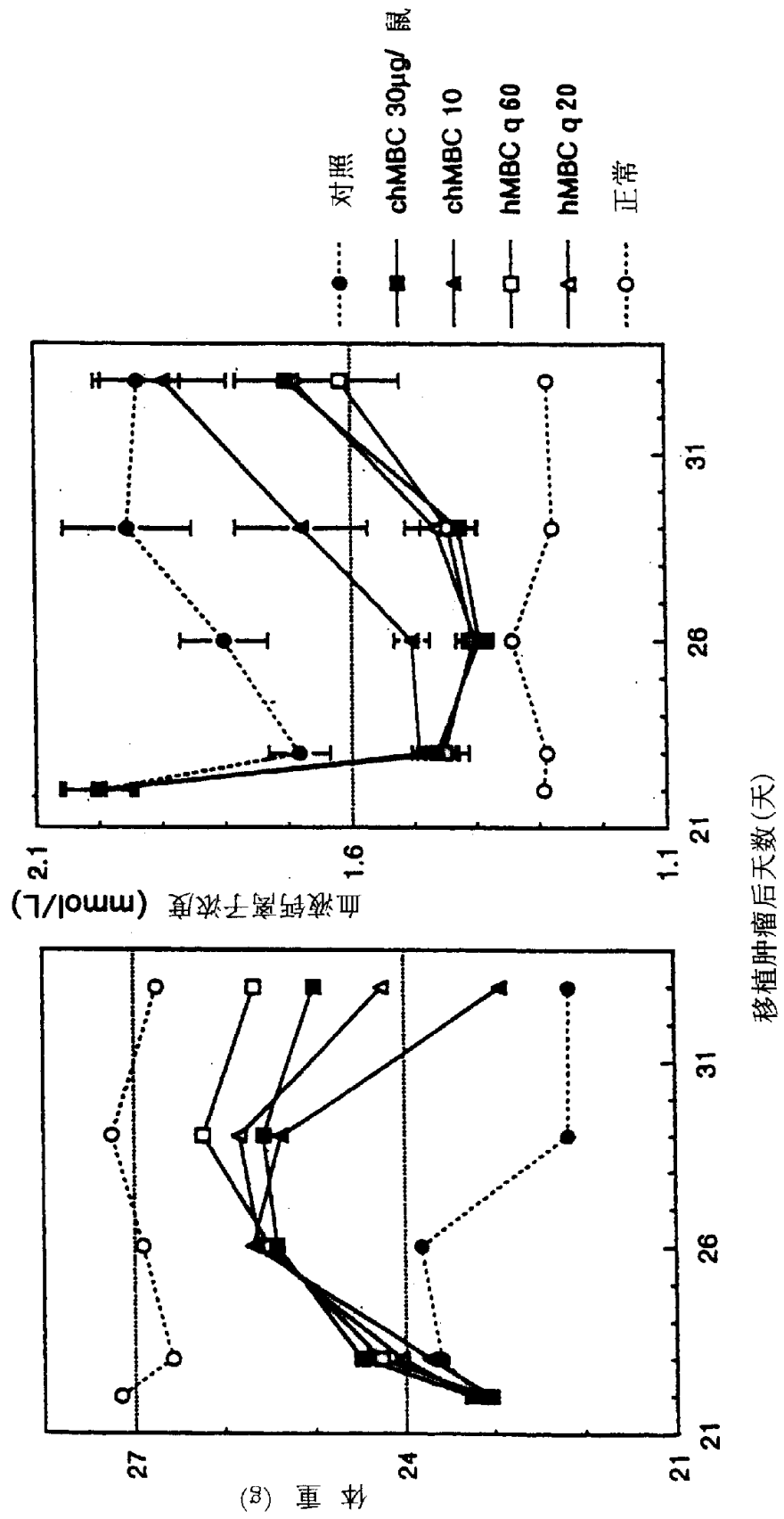


图17

嵌合抗体和人化抗体对高钙血症模型动物（承载人胰腺癌 PAN-7 的裸鼠）的影响

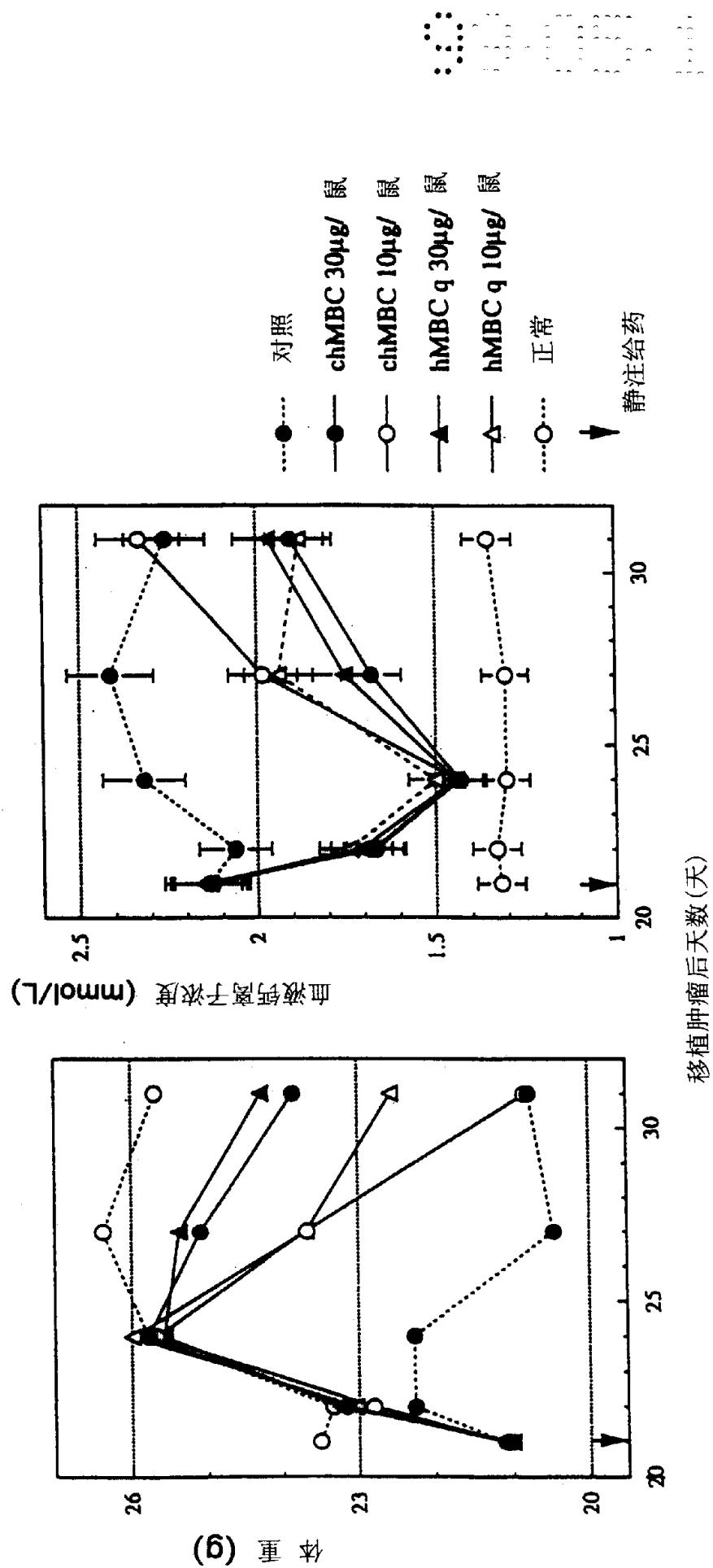
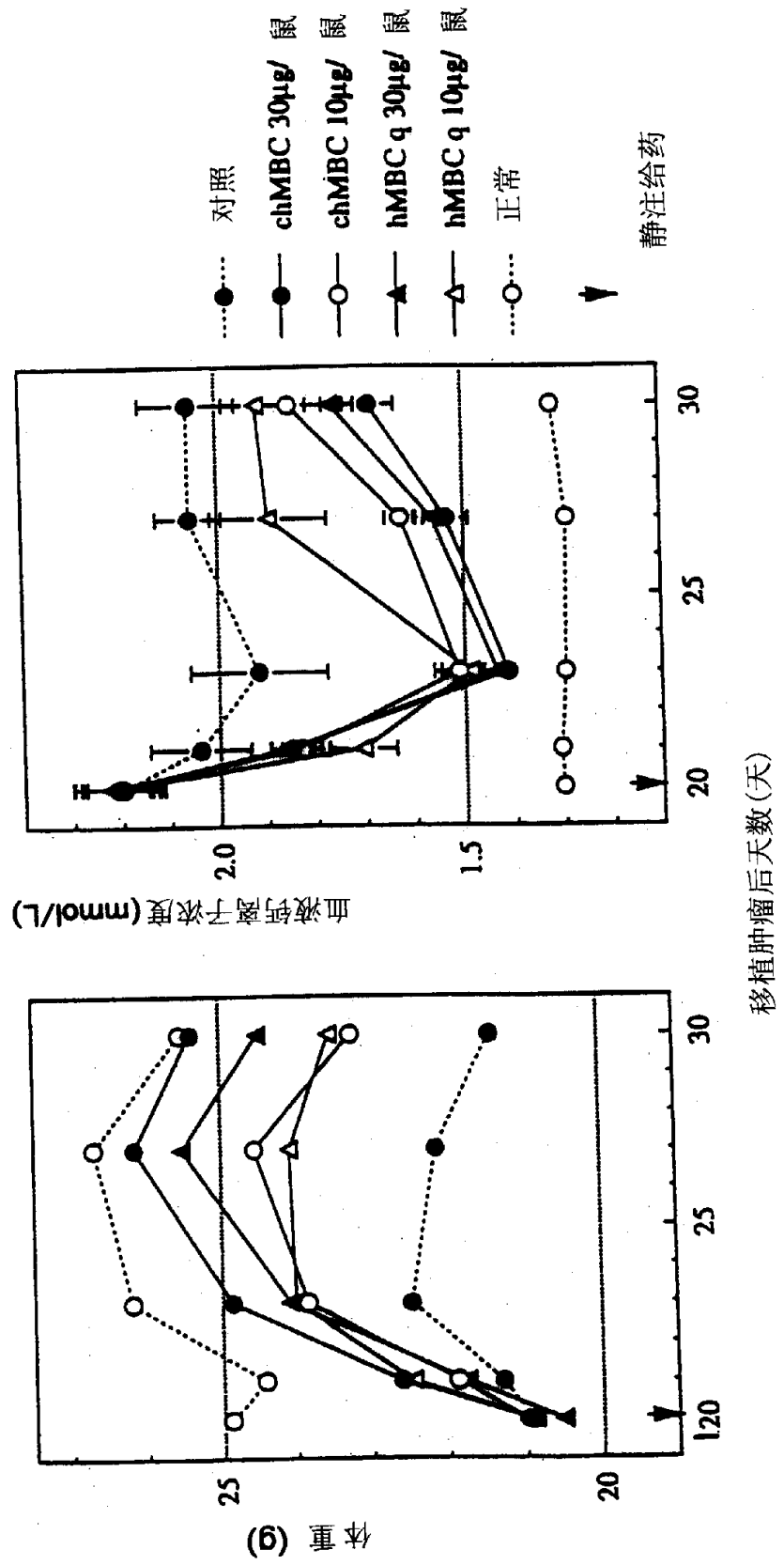
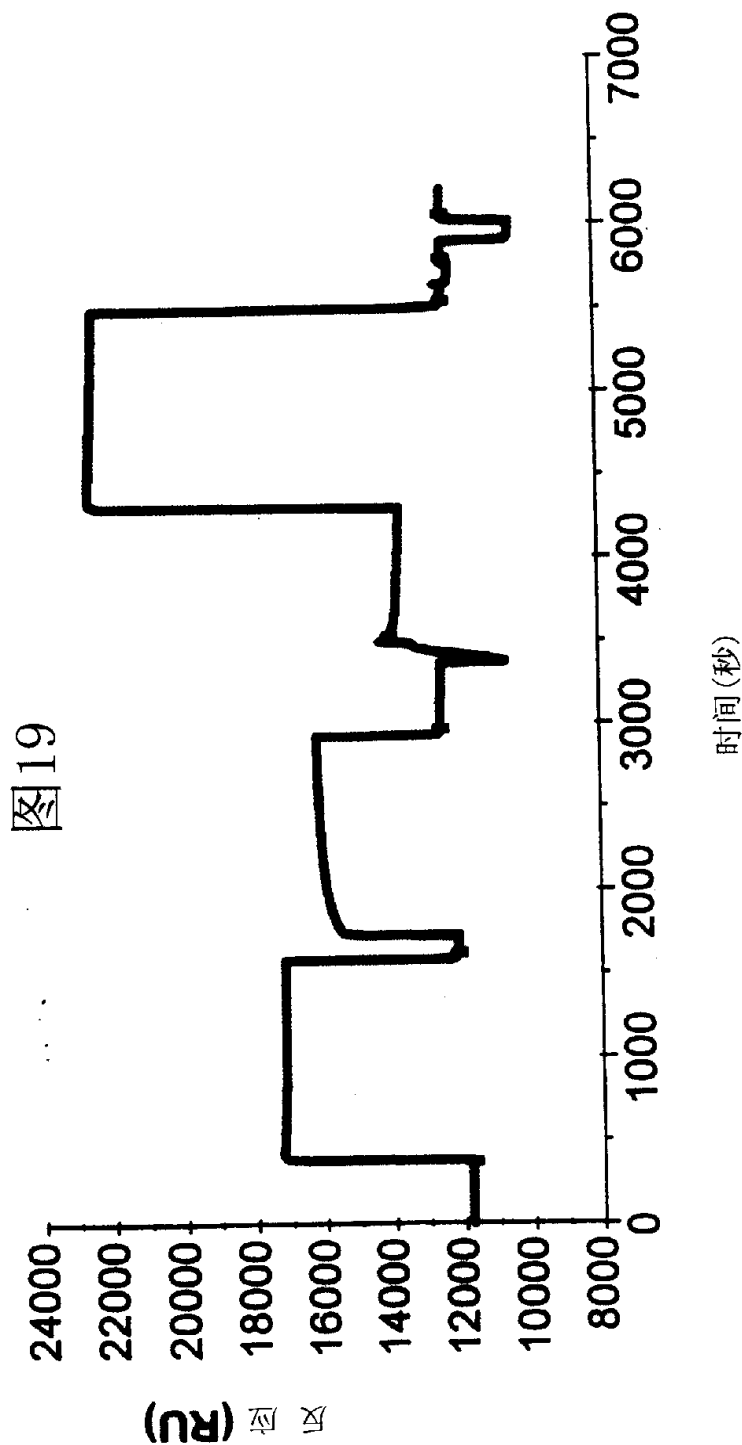


图18

嵌合抗体和人化抗体对高钙血症模型动物(承载人胰腺癌PAN-6的裸鼠)的影响

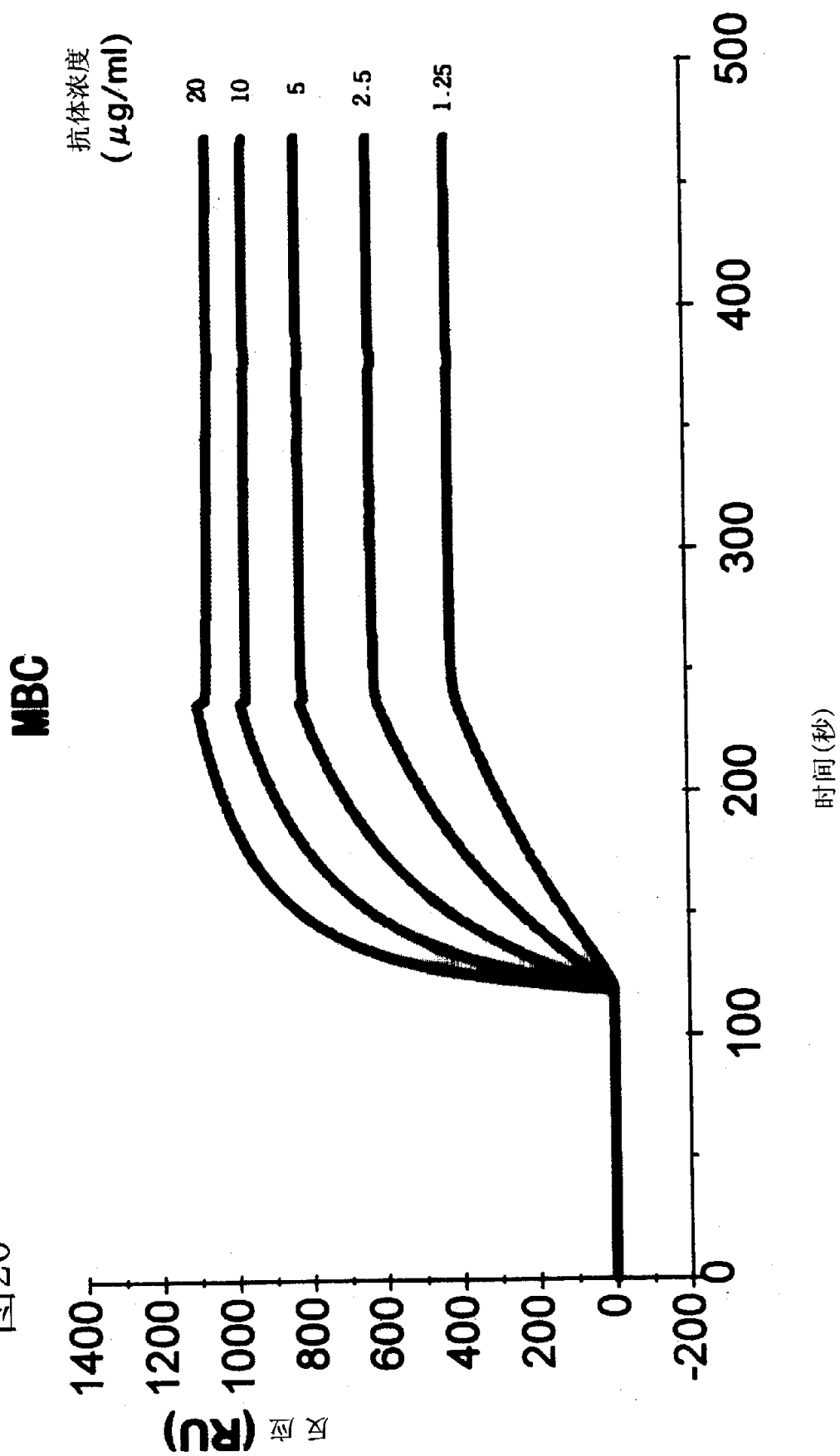




| Fc | 时间    | 窗孔  | AbsResp | SD   | 斜率    | 基线  | RelResp | Id                        |
|----|-------|-----|---------|------|-------|-----|---------|---------------------------|
| 2  | 368.5 | 5.0 | 11784.0 | 0.17 | 0.07  | Yes | 0       | pre-NHS+EDC               |
| 2  | 1622  | 5.0 | 12157.3 | 2.29 | -1.22 | Yes | 373.2   | NHS+EDC-100ul             |
| 2  | 2966  | 5.0 | 12604.9 | 1.36 | -0.71 | No  | 447.6   | PDEA-100ul                |
| 2  | 3530  | 5.0 | 14058.6 | 8.34 | -4.45 | No  | 1901.3  | (1-34+C)5ug/ml-10ul-pH5.0 |
| 2  | 5546  | 5.0 | 12423.6 | 2.08 | -1.10 | No  | 266.3   | Cys/NaCl-100ul            |
| 2  | 5804  | 5.0 | 12396.6 | 0.28 | -0.13 | No  | 239.3   | Gly/HCl-10ul              |
| 2  | 6063  | 5.0 | 12383.6 | 0.13 | 0.00  | No  | 226.4   | 10mM-HCl-10ul             |

PTHrP (1-34+C) 固定到传感器顶部的传感图

图20

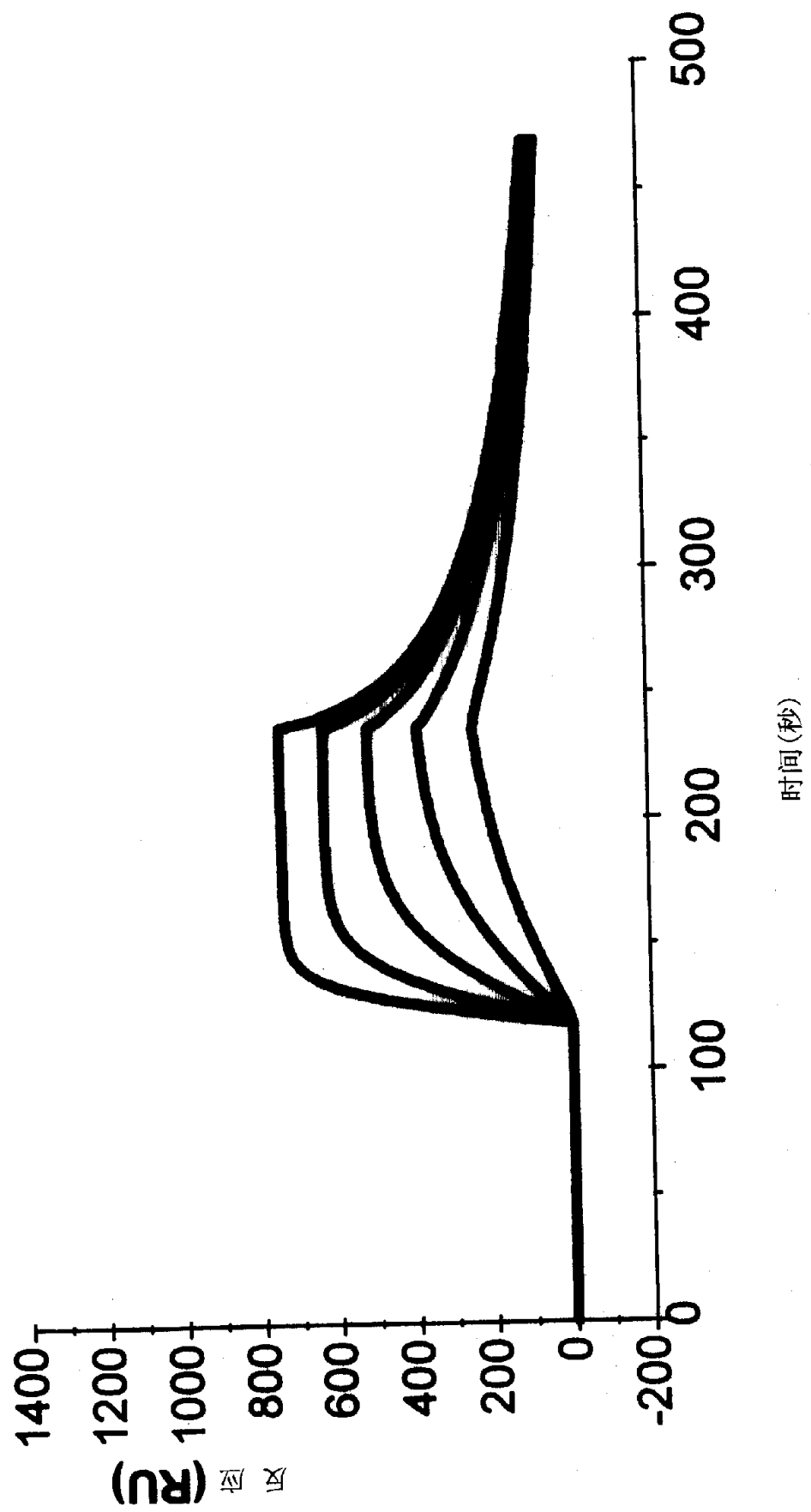


MBC传感图的重叠图

3F5 3F5 3F5 3F5

图21

3F5

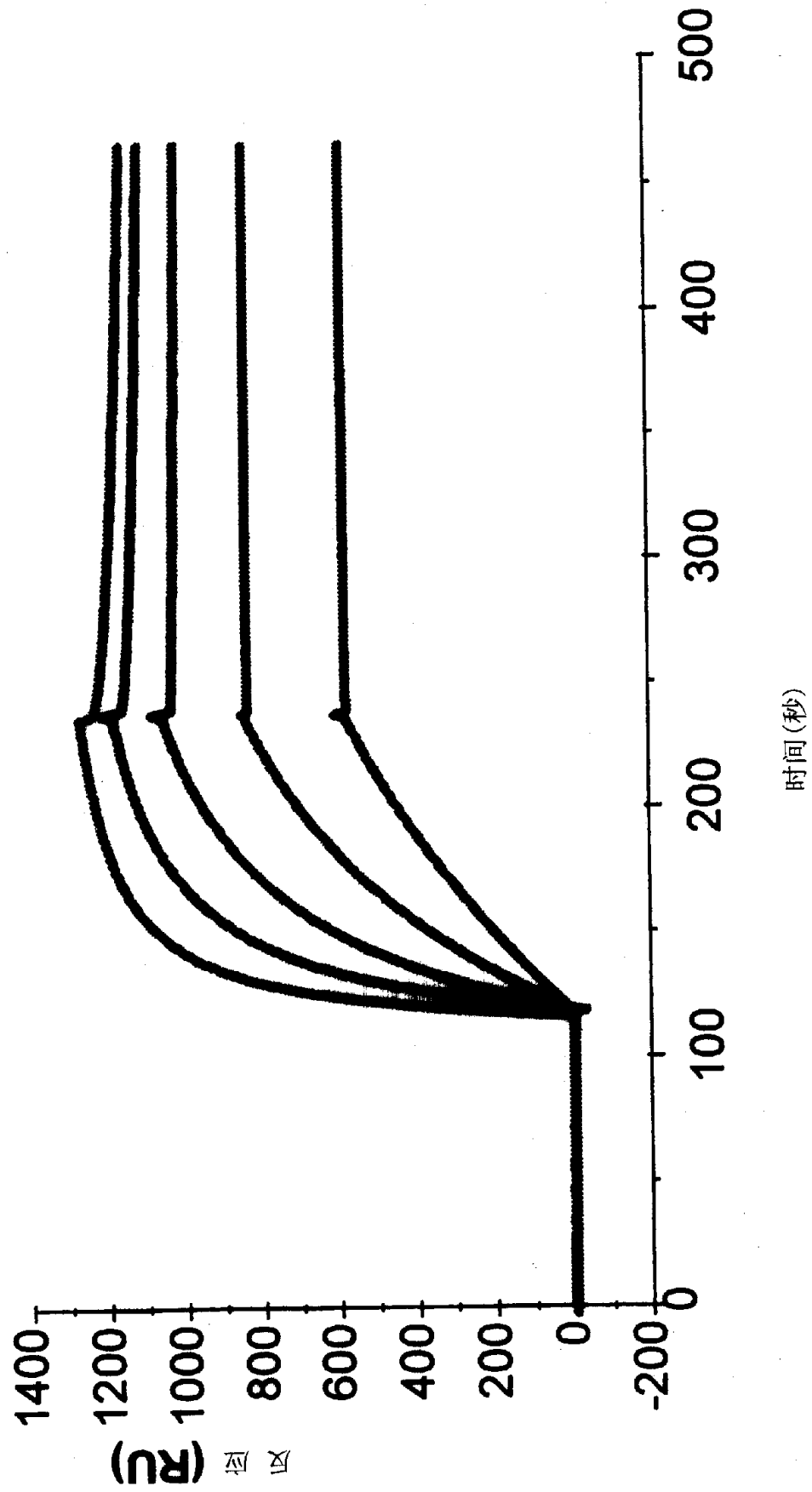


3F5传感器的重叠图



hMBCm

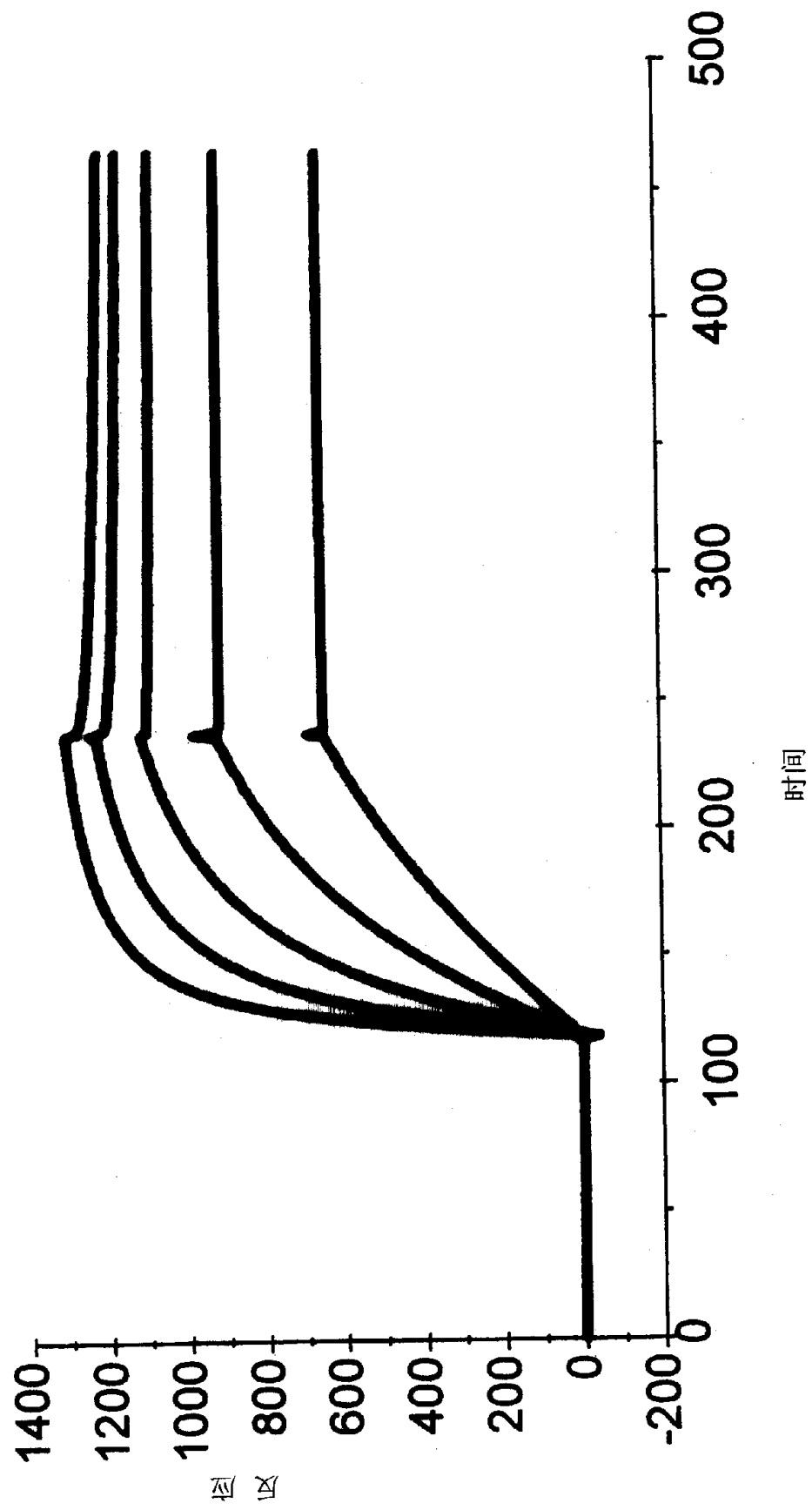
图 23



hMBCm 传感图的重叠图

图24

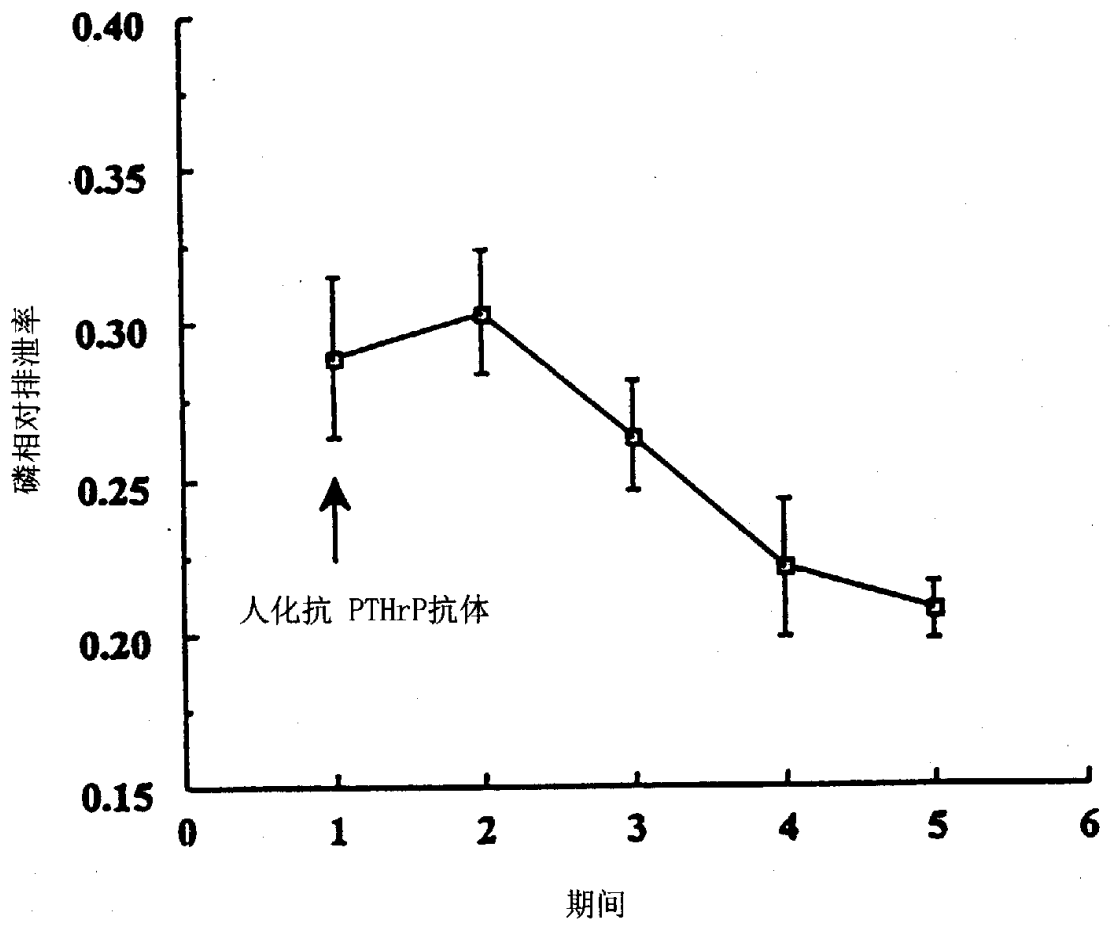
hMBCq



hMBCq 传感图的重叠图

图25

磷相对排泄率的影响



(1期间:20分钟, 平均值±标准差)

图26

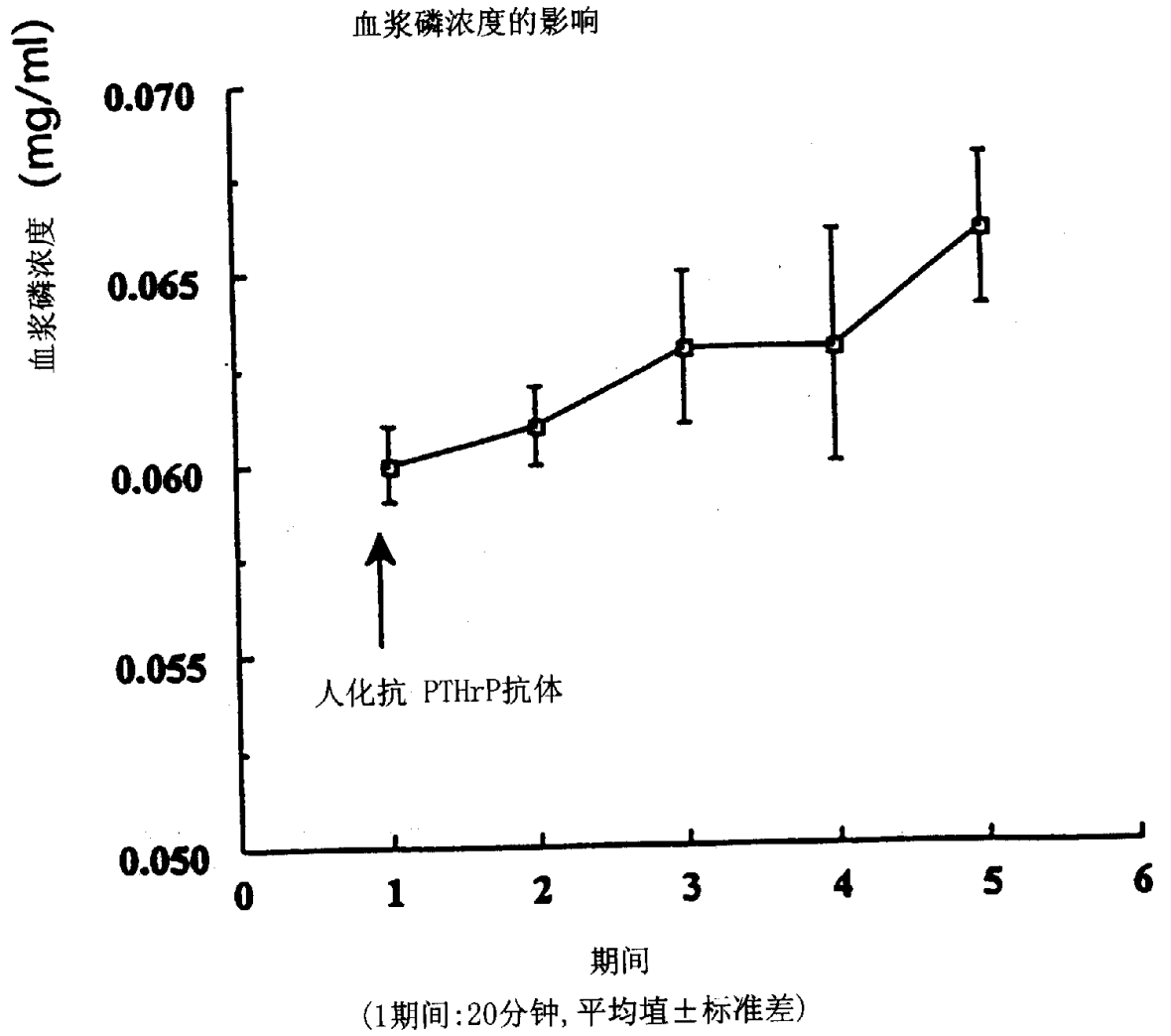


图 27



图 28



图29

自发运动的影响

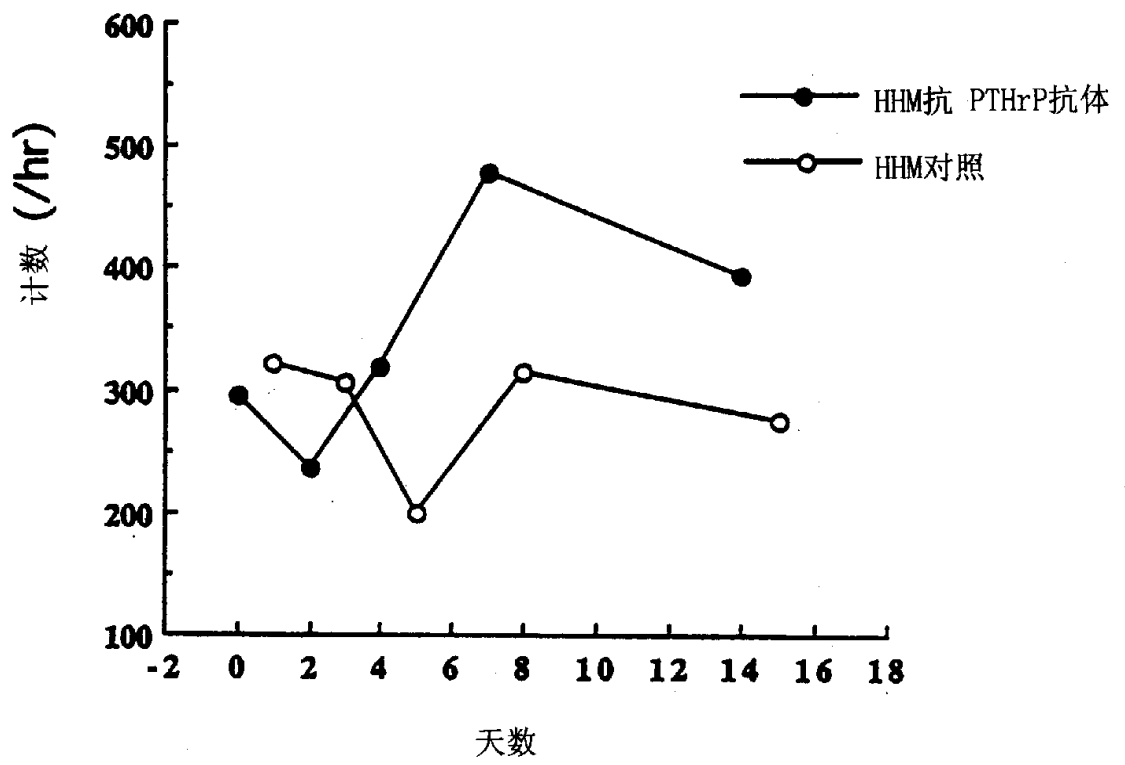




图31

