



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102007147 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 05

(21) 申请号 200980125356. 5
 (22) 申请日 2009. 06. 30
 (30) 优先权数据
 2008-171353 2008. 06. 30 JP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2010. 12. 30
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2009/061996 2009. 06. 30
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02010/001908 JA 2010. 01. 07
 (83) 生物保藏信息
 FERM BP-10976 2008. 06. 05
 (73) 专利权人 协和发酵麒麟株式会社
 地址 日本东京都
 (72) 发明人 森胜弘 桧浦奈绪子 久保田丽夫
 古谷安希子 神田丰 佐藤光男
 (74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
 责任公司 11219
 代理人 张颖 樊卫民
 (51) Int. Cl.
 C07K 16/28(2006. 01)
 A61K 39/395(2006. 01)
 A61P 13/12(2006. 01)
 A61P 35/00(2006. 01)
 C12N 1/15(2006. 01)
 C12N 1/19(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)
 C12N 5/10(2006. 01)
 C12N 15/09(2006. 01)
 C12P 21/08(2006. 01)
 G01N 33/53(2006. 01)
 (56) 对比文件
 Arne Engelsberg, et, al. . The Golgi Protein RCAS1 Controls Cell Surface Expression of Tumor-associated O-Linked Glycan Antigens. 《The Journal of Biological Chemistry》. 2003, 第 278 卷 (第 25 期), 第 22998-23007 页.
 Wil A. M. Loenen, et, al. . The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis. 《European Journal of Immunology》. 1992, 第 22 卷 (第 2 期), 第 447-455 页.
 Dong H. Y., et, al. . CD148 and CD27 are Expressed in B Cell Lymphomas Derived from both Memory and Naïve B Cells. 《Leukemia and Lymphoma》. 2002, 第 43 卷 (第 9 期), 第 1855-1858.

审查员 王涛

权利要求书2页 说明书64页
序列表54页 附图30页

(54) 发明名称
 抗 CD27 抗体
 (57) 摘要
 本发明提供了一种单克隆抗体或其使用方法, 所述单克隆抗体能特异性识别含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 并能与 CD27 细胞外区域结合。本发明具体公开了: 单克隆抗体或抗体片段, 所述单克隆抗体能特异性识别含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 并能与 CD27 细胞外区域结合; 能产生所述抗体的杂交瘤; 编码所述

抗体的 DNA; 携带所述 DNA 的载体; 可以通过转化所述载体获得的转化体; 使用所述杂交瘤或转化体产生抗体或其片段的方法; 以及包含所述抗体或其片段作为活性成分的用于 CD27 相关疾病的诊断剂或治疗剂。

CN 102007147 B

1. 单克隆抗体,或其具有单克隆抗体的功能抗体片段,所述单克隆抗体在结合有 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域中,不识别含有结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域、但是识别并结合含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域,其中未结合半乳糖的 O- 连接糖链是选自唾液酸化 Tn 抗原和 Tn 抗原的至少一种 O- 连接糖链,并且其中单克隆抗体不结合 Tn 抗原本身,其中

单克隆抗体的 VH 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:40 到 42 显示,并且单克隆抗体的 VL 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:43 到 45 显示;

单克隆抗体的 VH 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:46 到 48 显示,并且单克隆抗体的 VL 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:49 到 51 显示;

单克隆抗体的 VH 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:52 到 54 显示,并且单克隆抗体的 VL 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:55 到 57 显示;

单克隆抗体的 VH 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:58 到 60 显示,并且单克隆抗体的 VL 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:61 到 63 显示;或者

单克隆抗体的 VH 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:64 到 66 显示,并且单克隆抗体的 VL 的 CDR1 到 3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO:67 到 69 显示;

其中抗体片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体(scFv)、二聚体化的 V 区(双链抗体)、二硫键稳定化的 V 区(dsFv)的抗体片段。

2. 权利要求 1 的单克隆抗体或其抗体片段,其中未结合半乳糖的 O- 连接糖链是 Tn 抗原。

3. 权利要求 1 或 2 的单克隆抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是与单克隆抗体 KM4030 竞争与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体。

4. 权利要求 1 的单克隆抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域中的表位结合的单克隆抗体,所述表位是单克隆抗体 KM4030 结合的表位。

5. 权利要求 1 到 4 任一项的抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是以保藏号 FERM BP-10976 保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体。

6. 权利要求 1 到 4 任一项的抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是重组抗体。

7. 权利要求 6 的抗体或其抗体片段,其中重组抗体是选自人类嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体的抗体。

8. 杂交瘤,其产生权利要求 1 到 5 任一项的单克隆抗体。

9. 权利要求 8 的杂交瘤,其中杂交瘤是以保藏号 FERM BP-10976 保藏的杂交瘤。

10. DNA,其编码权利要求 1 到 7 任一项的抗体或其抗体片段。

11. 重组载体,其包含权利要求 10 的 DNA。

12. 转化体,能通过将权利要求 11 的重组载体导入宿主细胞获得。

13. 用于生产权利要求 1 到 7 任一项的抗体或其抗体片段的方法,其包括将权利要求 8 或 9 的杂交瘤或权利要求 12 的转化体培养在培养基中,以在培养物中形成并积累权利要求 1 到 7 任一项的抗体或其抗体片段,然后从培养物收集抗体或其抗体片段。

14. 用于非诊断目的的免疫检测或测量含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的方

法,其包括使用权利要求 1 到 7 任一项的抗体或其抗体片段。

15. 用于检测含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的试剂,其包含权利要求 1 到 7 任一项的抗体或其抗体片段。

抗 CD27 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体或其抗体片段,其特异性识别由 CD27 基因编码的含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的多肽,并与其细胞外区域结合;产生所述抗体的杂交瘤;编码所述抗体的 DNA;包含所述 DNA 的载体;可以通过转化所述载体获得的转化体;使用所述杂交瘤或转化体生产抗体或其抗体片段的方法;以及使用所述抗体或其抗体片段的诊断剂,或包含所述抗体或其抗体片段作为活性成分的治疗剂。

背景技术

[0002] 近年中已经报道了一些情况,其中各种疾病的发作或病理的发展伴有由细胞表达的参与疾病或其病理的蛋白上附加的糖链的结构变化。这些情况中的代表性实例是 Tn 抗原的表达,它是一种 O- 连接的(丝氨酸/苏氨酸类型)糖链抗原,在超过 80% 的人类癌症类型中被识别,以及其中唾液酸添加到 Tn 抗原上的唾液酸化 Tn 抗原的表达(非专利文献 2)。已知在正常细胞中几乎不能验证到这些糖链抗原的表达,并且已经进行了将它们作为癌症特异性疫苗治疗的靶分子用于医疗护理的研究(非专利文献 1)。它们的癌症特异性糖链抗原的表达,处于活生物体中构成糖链的复杂生物合成途径和糖链的复杂代谢途径的酶的活性控制之下。例如,已知在癌细胞中,作为参与糖链生物合成途径的蛋白的编码基因表达模式发生改变的结果,糖链的生物合成途径在某种程度上被阻断。已知 Tn 抗原在正常细胞中是 O- 连接糖链生物合成途径的中间体,并具有结构(GalNAc α -Ser/Thr),其中 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc) α - 连接到蛋白氨基酸序列的某个丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基侧链上的羟基上。正常类型的 O- 连接糖链(例如 TF 抗原)的生物合成,通过核心 1 β 3 半乳糖基转移酶(核心 1 β 3Gal-T, T- 合成酶)的活性将一分子半乳糖转移到 Tn 抗原的非还原末端上来进行。在许多类型的癌细胞系中,据认为作为细胞内核心 1 β 3 半乳糖基转移酶活性降低的结果,糖链的生物合成途径被阻断,从而表达 Tn 抗原或唾液酸化 Tn 抗原。癌细胞中核心 1 β 3 半乳糖基转移酶活性降低的机制非常复杂,并且还未完全阐明。但是,作为一种可能的机制,推测细胞内核心 1 β 3 半乳糖基转移酶活性的极大降低是由于某些核心 1 β 3 半乳糖基转移酶活性表达所需的伴侣蛋白(Cosmc)的编码基因的突变(非专利文献 6)。根据在众多癌症类型中共同识别到 Tn 抗原表达这一事实,据信细胞中糖链生物合成途径或糖链代谢途径的异常,是添加到细胞中表达的许多不同糖蛋白上的糖链结构发生共同变化的主因。

[0003] 癌症是已知在糖链结构变化与病理发展之间具有密切关系的代表性疾病。除了癌症之外,已知 IgA 型肾病是已知在糖链结构变化与病理发展之间具有密切关联的另一种疾病。IgA 型肾病是慢性肾小球性肾炎,其病理特征为在肾小球膜中显示出一种免疫球蛋白——免疫球蛋白 A(IgA) 的颗粒状沉积物,首先由 Berger 在 1968 年报道(非专利文献 2)。这种疾病是代表性的肾炎,在日本占慢性肾小球性肾炎患者的大约一半。据称,约 40% 已诊断患有 IgA 型肾病的患者将在 20 年内经历疾病向晚期肾衰的转变,并且他们将不可避免地接受血液透析或肾脏移植。如上所述,尽管 IgA 型肾病已被公认为预后不良的疾病,但还没

有建立起临床确认的疗法。已知在两种不同的 IgA 同种型 (IgA1 和 IgA2) 中, 沉积在患有 IgA 型肾病患者体内肾脏中的主要是 IgA1。此外, 作为 IgA1 沉积的原因, 已报道在 IgA1 分子上存在但是在 IgA2 分子上不存在的添加到铰链区的 O- 连接糖链的结构, 从正常类型变为 Tn 或唾液酸化 Tn 抗原 (非专利文献 3 和 4)。已证实, 一旦添加到 IgA1 铰链区的 O- 连接糖链上缺乏半乳糖导致糖链转变成 Tn 或唾液酸化 Tn 抗原, IgA1 分子的自身凝集能力增强, IgA1 分子在肾脏系膜区域中的沉积加速 (非专利文献 5)。此外, 在从 IgA 型肾病患者分离到的 IgA 生产细胞中, 已报道由于 Cosmc 表达水平的降低, 核心 1 β 3 半乳糖基转移酶的活性下降 (非专利文献 6)。换句话说, 在 IgA 型肾病患者体内的 IgA 生产细胞中, 糖链的生物合成途径在中途阻断, 结果产生了糖链缺陷的 IgA1 而不是具有正常类型糖链的 IgA1。作为 IgA 型肾病的发病机理之一, 主张作为这种糖链缺陷的 IgA1 在肾小球中沉积的结果, 引起了炎症。

[0004] 一般来说, IgA 由血液中的 B 细胞或从 B 细胞分化的浆细胞 (PC) 产生。浆细胞是 B- 细胞分化的最终阶段。浆细胞分布在次级淋巴组织、全身粘膜组织、骨髓等中, 并产生大量抗体。已知产生 IgA 的浆细胞主要分布在粘膜组织中。另一方面, 已知在次级淋巴组织的生发中心中, 从已获得生产高亲和性 IgA 抗体能力的 B 细胞克隆分化出记忆 B 细胞或浆细胞, 因此分化出的细胞分布在整个身体的靶器官中, 并在较长时期内持续产生抗体。但是, 还不清楚在 B 细胞分化的哪个阶段发育出产生参与 IgA 型肾病病理发生的糖链缺陷的 IgA 的细胞, 以及产生糖链缺陷的 IgA 的 B 细胞或浆细胞分布于哪些身体组织。

[0005] 在 B 细胞或浆细胞中表达的被称作细胞膜表面分子的蛋白中, CD27 是已知的结合有 O- 连接糖链的分子之一 (非专利文献 7)。CD27 分子属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的成员, 是分子量约为 55kDa 的 I 型膜蛋白, 并作为两个单体通过二硫键连接的二聚体形式存在 (非专利文献 8)。已知 CD27 表达在某些 T 淋巴细胞以及浆细胞和 B 细胞中。具体来说, 已知在 B 细胞的分化过程中, 在 B 细胞分化成记忆性 B 细胞和浆细胞后, CD27 的表达水平升高。已知在分化过程中, 结合 O- 连接糖链的 CD27 在这些细胞中表达, 但是结合糖链的氨基酸残基还没有清楚地证实 (非专利文献 9)。对于 CD27 的配体分子来说, 已知的是属于 TNF 家族的 CD70。已知 CD70 与某些 B 或 T 细胞中表达的 CD27 结合, 诱导细胞增殖信号, 并刺激 B 细胞产生抗体 (非专利文献 10)。

[0006] 此外, 已知在几种类型的癌细胞以及正常细胞中 CD27 的表达增加。对于表达 CD27 的癌症类型来说, 已报道的有多种非霍奇金氏淋巴瘤, 例如套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、MALT 淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、浆细胞瘤 (非专利文献 11)。已知许多癌细胞表达糖链缺陷的蛋白, 其含有包括如上所述的 Tn 抗原、唾液酸化 Tn 抗原等的糖链。

[0007] 对于特异性识别 CD27 的抗体来说, 已报道的有通过免疫接种从患有 Sezary 综合征的患者分离到的白血病细胞所获得的 S152 抗体 (非专利文献 8)。S152 抗体也显示出与正常 B 细胞和 T 细胞具有亲和性。到目前为止, 还不知道特异性识别含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 分子的这种抗体。

[0008] 已经知道, 一般来说, 当向人类给药非人类动物抗体例如小鼠抗体时, 它被识别作外来物质, 从而在人体中诱导了针对小鼠抗体的人类抗体 [人抗小鼠抗体 (HAMA)]。已知 HAMA 与给药的小鼠抗体反应, 由此诱导了副作用 (非专利文献 12 到 15), 增加了小鼠抗体

从体内的消除（非专利文献 16 到 18），并降低了小鼠抗体的治疗效果（非专利文献 19 和 20）。

[0009] 为了解决这些问题，已经尝试了使用基因重组技术从非人类抗体制备人类嵌合抗体或人源化抗体。

[0010] 人源化抗体与非人类抗体例如小鼠抗体相比，在给药于人类方面具有多种优点。例如，已经报道，在使用猴的试验中，与小鼠抗体相比，其免疫原性降低，在血液中的半衰期延长（非专利文献 21 和 22）。也就是说，人源化抗体与非人类抗体相比，预计在人类中引起更少的副作用，并具有更长时间的持续治疗效果。

[0011] 此外，因为人源化抗体使用基因重组技术制备，因此它可以制备成各种不同形式的分子。例如，当使用 $\gamma 1$ 亚类作为人类抗体的重链（在后文中称为“H 链”）恒定区（在后文中称为“C 区”）（H 链 C 区被称为“CH”）时，可以制备具有高的效应子功能、例如抗体依赖性细胞性细胞毒性（在后文中称为“ADCC 活性”）的人源化抗体（非专利文献 23），并可以预期其血液半衰期与小鼠抗体相比延长（非专利文献 24）。特别是，在进行治疗以抑制 CLDN 阳性细胞增殖的情况下，细胞毒性活性、例如经抗体 Fc 区域（抗体重链铰链区后的区域）的补体依赖性细胞毒性（在后文中称为“CDC 活性”）和 ADCC 活性是重要的，以便通过抗体在肿瘤组织附近积累效应子细胞来特异性损伤靶细胞。在人类治疗中，为了显示细胞毒性活性，优选使用人类嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体（非专利文献 25 和 26）。

[0012] 此外，使用蛋白质工程和遗传工程的最新进展，也可以将人源化抗体制备成具有小分子量的抗体片段例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体（在后文中称为“scFv”）（非专利文献 27）、二聚体化的 V 区片段（在后文中称为“双链抗体（diabody）”）（非专利文献 28）、二硫键稳定化的 V 区片段（在后文中称为“dsFv”）（非专利文献 29）、或含有互补性决定区（在后文中称为“CDR”）的肽（非专利文献 30），这些抗体片段与完整抗体分子相比，具有更出色的向靶组织迁移的能力（非专利文献 31）。

[0013] 引用名单

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献 1 :Crit Rev Oncog. ,6,57(1995)

[0016] 非专利文献 2 :J Urol Nephrol. ,74,694(1968)

[0017] 非专利文献 3 :Clin Exp Immunol. ,100,470(1995)

[0018] 非专利文献 4 :J Am Soc Neph. ,7,955(1996)

[0019] 非专利文献 5 :Nephrol Dial Transplant. ,17,50(2002)

[0020] 非专利文献 6 :J Intern Med. ,258,467(2005)

[0021] 非专利文献 7 :Current Opinion in Immunology 17,275(2005)

[0022] 非专利文献 8 :J Immunol. ,141,21(1988)

[0023] 非专利文献 9 :Eur J Immunol. ,22,447(1992)

[0024] 非专利文献 10 :Proc. Natl. Acad. Sci. ,94. 6346(1997)

[0025] 非专利文献 11 :Leukemia and Lymphoma. ,43,1855(2002)

[0026] 非专利文献 12 :Hum. Pathol. ,38,564(2007)

[0027] 非专利文献 13 :Hum. Pathol. ,36,886(2005)

[0028] 非专利文献 14 :FEBS Lett. ,579,6179(2005)

- [0029] 非专利文献 15 :Cancer Res. ,65,7378(2005)
[0030] 非专利文献 16 :Hum. Pathol. ,36,886(2005)
[0031] 非专利文献 17 :Oncogene,13,2328(2006)
[0032] 非专利文献 18 :Virchows Arch. ,448,52(2006)
[0033] 非专利文献 19 :J. Immunol,135,1530(1985)
[0034] 非专利文献 20 :Cancer Res. ,46,6489(1986)
[0035] 非专利文献 21 :Cancer Res. ,56,1118(1996)
[0036] 非专利文献 22 :Immunol. ,85,668(1995)
[0037] 非专利文献 23 :Cancer Res. ,56,1118(1996)
[0038] 非专利文献 24 :Immunol,85,668(1995)
[0039] 非专利文献 25 :J. Immunol,144,1382(1990)
[0040] 非专利文献 26 :Nature,322,323(1988)
[0041] 非专利文献 27 :Science,242,423(1988)
[0042] 非专利文献 28 :Nature Biotechnol,15,629(1997)
[0043] 非专利文献 29 :Molecular Immunol,32,249(1995)
[0044] 非专利文献 30 :J. Biol Chem. ,271,2966(1996)
[0045] 非专利文献 31 :Cancer Res. ,52,3402(1992)

[0046] 发明简述

[0047] 技术难题

[0048] 本发明的目的是提供特异性识别含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27、并与其细胞外区域结合的单克隆抗体,或使用所述单克隆抗体的方法。

[0049] 对于特异性识别含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27、并与其细胞外区域结合的单克隆抗体或使用所述单克隆抗体的方法,存在着需求。

[0050] 技术问题的解决方案

[0051] 本发明涉及下列 (1) 到 (32) :

[0052] (1) 一种特异性识别并结合由 CD27 基因编码的含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的多肽(在后文中称为“CD27”)的细胞外区域的单克隆抗体或其抗体片段;

[0053] (2) 一种在结合有 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域中,不识别含有结合有半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域、但是识别并结合含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域的单克隆抗体或其抗体片段;

[0054] (3) 上述 (1) 或 (2) 中描述的单克隆抗体或其抗体片段,其中未结合半乳糖的 O- 连接糖链是选自唾液酸化 Tn 抗原和 Tn 抗原的至少一种 O- 连接糖链;

[0055] (4) 上述 (3) 中描述的单克隆抗体或其抗体片段,其中未结合半乳糖的 O- 连接糖链是 Tn 抗原;

[0056] (5) 上述 (3) 或 (4) 中描述的单克隆抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是与单克隆抗体 KM4030 竞争与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体;

[0057] (6) 上述 (1) 到 (3) 任一项中描述的单克隆抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞外区域中单克隆抗体 KM4030 所结合的

表位结合的单克隆抗体；

[0058] (7) 上述 (1) 到 (6) 任一项中描述的抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是由在登记号 FERM BP-10976 下保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体；

[0059] (8) 上述 (1) 到 (6) 任一项中描述的抗体或其抗体片段,其中单克隆抗体是重组抗体；

[0060] (9) 上述 (8) 中描述的抗体或其抗体片段,其中重组抗体是选自人类嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体的抗体；

[0061] (10) 上述 (1) 到 (9) 任一项中描述的抗体片段,其中抗体片段是选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、单链抗体 (scFv)、二聚体化的 V 区 (双链抗体)、二硫键稳定化的 V 区 (dsFv) 和含有 CDR 的肽的抗体片段；

[0062] (11) 一种杂交瘤,其产生上述 (1) 到 (7) 任一项中描述的单克隆抗体；

[0063] (12) 上述 (11) 中描述的杂交瘤,其中杂交瘤是在登记号 FERM BP-10976 下保藏的杂交瘤；

[0064] (13) 一种 DNA,其编码在上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段；

[0065] (14) 一种重组载体,其包含上述 (13) 中描述的 DNA；

[0066] (15) 可以通过将上述 (14) 中描述的重组载体导入宿主细胞而获得的转化体；

[0067] (16) 一种用于生产上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段的方法,其包含将上述 (11) 或 (12) 中描述的杂交瘤或上述 (15) 中描述的转化体在培养基中进行培养,以在培养物中形成并积累上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段,然后从培养物收集抗体或其抗体片段；

[0068] (17) 一种用于免疫检测或测量含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的方法,其包含使用上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段；

[0069] (18) 一种用于检测含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的试剂,其包含上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段；

[0070] (19) 用于与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病的诊断试剂,其包含上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段；

[0071] (20) 上述 (19) 中描述的诊断试剂,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是 IgA 型肾病；

[0072] (21) 上述 (19) 中描述的诊断试剂,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是癌症；

[0073] (22) 用于与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病的治疗药剂,其包含上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段作为活性成分；

[0074] (23) 上述 (22) 中描述的治疗药剂,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是 IgA 型肾病；

[0075] (24) 上述 (22) 中描述的治疗药剂,其中与 CD27 基因编码的连接有缺乏半乳糖的 O- 连接糖链的多肽的结构相关的疾病是癌症；

[0076] (25) 用于与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病的诊断方法,其包含通过使用上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段,对表达含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞进行检测或测量；

[0077] (26) 用于与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病的诊断方法,其包含通过使用上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段,对含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 进行检测或测量;

[0078] (27) 上述 (25) 或 (26) 中描述的诊断方法,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是 IgA 型肾病;

[0079] (28) 上述 (25) 或 (26) 中描述的诊断方法,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是癌症;

[0080] (29) 上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段在制造与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病的诊断试剂中的应用;

[0081] (30) 上述 (1) 到 (10) 任一项中描述的抗体或其抗体片段在制造与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病的治疗药剂中的应用;

[0082] (31) 上述 (29) 或 (30) 中描述的抗体或其抗体片段的应用,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是 IgA 型肾病;以及

[0083] (32) 上述 (29) 或 (30) 中描述的抗体或其抗体片段的应用,其中与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的疾病是癌症。

[0084] 本发明的有利效果

[0085] 本发明可以提供特异性识别由 CD27 基因编码的含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的多肽(在后文中称为“CD27)的细胞外区域并与细胞外区域结合的单克隆抗体。此外,本发明可以提供与含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 相关的各种疾病的治疗药剂或诊断试剂。

附图说明

[0086] 图 1 显示包含编码人类 CD27 蛋白的 DNA 序列的质粒载体 pCR2.1CD27 的构建方法。

[0087] 图 2 显示包含编码人类 CD27 蛋白的细胞外区域的 DNA 序列的质粒载体 pCR CD27axb 的构建方法。

[0088] 图 3 显示带有在人类 IgG4 恒定区中具有氨基酸取代的突变型人类 IgG4 Fc 区的质粒载体 pBShC γ 4SP 的构建方法。

[0089] 图 4 显示质粒载体 pCR IgG4Fc BamHISa1I 的构建方法,在所述质粒载体包含的 DNA 序列中,限制性酶识别序列被插入到突变型人类 IgG4Fc 区的 DNA 序列中。

[0090] 图 5 显示通过插入 CD27-Fc DNA 序列构建 pKANTEX XhoI/Sa1I 的方法。

[0091] 图 6 显示 CD27-Fc 蛋白表达载体 pKANTEX CD27-hIgG4Fc 的构建方法。

[0092] 图 7 显示在作为宿主细胞的 CHO/DG44 细胞和 Lec8 细胞中表达的 CD27-Fc 蛋白的 SDS-PAGE 分析结果。左图显示未添加 β -巯基乙醇的非还原性条件,右图显示添加有 β -巯基乙醇的还原性条件。从左侧显示了分子量标准品、Lec8 细胞级份和 CHO/DG44 细胞级份。

[0093] 图 8 显示在作为宿主细胞的 CHO/DG44 细胞和 Lec8 细胞中表达的 CD27-Fc 蛋白的 SDS-PAGE 分析(左图)或 Western 印迹(右图)的结果。从左侧的道开始,显示了分子量标准品、CHO/DG44 细胞样品和 Lec8 细胞样品。通过用抗 RCAS1 抗体(22-1-1 抗体)染色细胞来进行 Western 印迹。

[0094] 图 9 显示质粒载体 pCRCD27 axe 的构建方法,所述质粒载体包含编码 CD27 蛋白的

DNA,并打算用于在动物细胞中表达。

[0095] 图 10 显示动物细胞表达载体 pKANTEX CD27 的构建方法。

[0096] 图 11 显示抗 CD27 单克隆抗体针对表达 CD27 的 CHO/DG44 细胞和表达 CD27 的 Lec8 细胞的流式细胞术分析结果。上图显示 CD27/Lec8-4 的直方图结果,下图显示 CD27/DG44-8 的直方图结果。在两个直方图中,纵坐标表示细胞计数,横坐标表示荧光强度。

[0097] 图 12 显示通过荧光细胞染色进行测量, Lec8 细胞、CD27/Lec8-4 细胞和 CD27/DG44-8 细胞对抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 和 KM4031 的结合活性。上图显示使用 ABI 细胞检测系统 (ABI Cellular Detection System) 的测量结果。纵坐标表示荧光强度,横坐标表示反应的抗体。下图显示通过流式细胞仪 (FCM) 获得的测量结果。纵坐标表示平均荧光强度,横坐标表示反应的抗体。

[0098] 图 13 显示抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 和 KM4031 的竞争性 ELISA 的结果。上图显示抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 的反应性,下图显示抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4031 的反应性。纵坐标表示细胞生长,横坐标表示抗体浓度。

[0099] 图 14 显示抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体的基因克隆。

[0100] 图 15 显示抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体的构建方法。

[0101] 图 16 显示抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体的构建方法。

[0102] 图 17 显示抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体的构建方法。

[0103] 图 18 显示抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体的构建方法。

[0104] 图 19-1 显示使用流式细胞仪 (FCM) 进行测量的 CD27/Lec8-4 细胞对各种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026 (◇)、嵌合 KM4028 (△)、嵌合 KM4030 (○)、嵌合 KM4031 (□)、商购的抗 CD27 抗体 0323 (●) 和商购的抗 Tn 抗体 22-1-1 (■) 的结合活性的结果。纵坐标表示平均荧光强度,横坐标表示反应的抗体的终浓度。

[0105] 图 19-2 显示使用流式细胞仪 (FCM) 进行测量的 CD27/DG44-4 细胞对各种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026 (◇)、嵌合 KM4028 (△)、嵌合 KM4030 (○)、嵌合 KM4031 (□)、商购的抗 CD27 抗体 0323 (●) 和商购的抗 Tn 抗体 22-1-1 (■) 的结合活性的结果。纵坐标表示平均荧光强度,横坐标表示反应的抗体的终浓度。

[0106] 图 19-3 显示使用流式细胞仪 (FCM) 进行测量的 Lec8 细胞对各种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026 (◇)、嵌合 KM4028 (△)、嵌合 KM4030 (○)、嵌合 KM4031 (□)、商购的抗 CD27 抗体 0323 (●) 和商购的抗 Tn 抗体 22-1-1 (■) 的结合活性的结果。纵坐标表示平均荧光强度,横坐标表示反应的抗体的终浓度。

[0107] 图 20 显示各种不同的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026 (◇)、嵌合 KM4028 (△)、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 (□) 对 CD27/Lec8-4 细胞的抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC 活性)。纵坐标表示细胞性细胞毒性 (%),横坐标表示相应抗体的终浓度。

[0108] 图 21 显示各种不同的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM402、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 对 CD27/Lec8-4 细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC 活性)。纵坐标表示细胞性细胞毒性 (%),横坐标表示反应的抗体。

[0109] 图 22 显示包含编码猴 CD27 蛋白的 DNA 的质粒载体 pCR mfCD27 的构建方法。

[0110] 图 23 显示包含编码猴 CD27 蛋白的 DNA 的质粒载体 mfCD27His 的构建方法。

[0111] 图 24 显示猴 CD27 表达载体 pKATEX mfCD27His 的构建方法。

[0112] 图 25 显示使用流式细胞仪 (FCM) 进行测量的食蟹猴 CD27/Lec8 细胞或食蟹猴 CD27/DG44 细胞对各种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM402、嵌合 KM4030、嵌合 KM4031 和可商购的抗 CD27 抗体 0323 的结合活性的结果。纵坐标表示平均荧光强度,横坐标表示反应的抗体。

[0113] 图 26 显示各种不同的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026 (◆)、嵌合 KM4028 (▲)、嵌合 KM4030 (●) 和嵌合 KM4031 (■) 对食蟹猴 CD27/Lec8 细胞的抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC 活性)。纵坐标表示细胞性细胞毒性 (%),横坐标表示相应抗体的终浓度。

[0114] 图 27 显示各种不同的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4030 对食蟹猴 CD27/Lec8 细胞 (●) 或人类 CD27/Lec8 细胞 (○) 的抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC 活性)。纵坐标表示细胞性细胞毒性 (%),横坐标表示相应抗体的终浓度。

[0115] 图 28-1 显示各种不同的抗糖链缺陷型 CD27 抗体 KM4026、KM402、KM4030 和 KM4031 与糖链缺陷型 CD27-Fc (Tn 抗原类型的 CD27-Fc) 结合的 Biacore 传感图。纵坐标表示共振单位 (RU),横坐标表示反应时间 (s)。

[0116] 图 28-2 显示各种不同的抗糖链缺陷型 CD27 抗体 KM4026、KM402、KM4030 和 KM4031 与糖链缺陷型 CD27-Fc (唾液酸化 Tn 抗原类型的 CD27-Fc) 结合的 Biacore 传感图。纵坐标表示共振单位 (RU),横坐标表示反应时间 (s)。

[0117] 实施方案描述

[0118] 本发明涉及特异性识别由 CD27 基因编码的含有未结合半乳糖的 O-连接糖链的多肽 (在后文中称为“CD27”) 的细胞外区域并与该细胞外区域结合的单克隆抗体。CD27 基因可以是任何编码 CD27 的基因。例如,CD27 基因可以是含有 SEQ ID NO :1 所显示的核苷酸序列的基因。此外,本发明的 CD27 基因包括在严紧条件下与由 SEQ ID NO :1 所显示的核苷酸序列构成的 DNA 杂交,并也编码具有 CD27 功能的多肽的基因等。

[0119] 在本发明中,在严紧条件下杂交的 DNA 是指使用由 SEQ ID NO :1 所显示的核苷酸序列构成的 DNA 作为探针,通过集落杂交、噬菌斑杂交、Southern 印迹杂交等获得的 DNA。这种 DNA 的具体实例是可以通过在 0.7 到 1.0mol/l 氯化钠存在下,使用其上固定有包含核苷酸序列的集落或噬菌斑来源的 DNA 或 PCR 产物或寡 DNA 的滤膜或载玻片在 65°C 下进行杂交,然后在 65°C 下用 0.1 到 2 倍浓度的 SSC 溶液 (1 倍浓度的 SSC 溶液 :150mmol/l 氯化钠和 15mmol/l 柠檬酸钠) 清洗滤膜或载玻片而鉴定的 DNA。可以按照《分子克隆实验指南》(第二版) (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989))、《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997))、《DNA 克隆 1 :核心技术实用手段》(第二版) (DNA Cloning 1 :Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)) 等中描述的方法进行杂交。具体来说,能够在严紧条件下杂交的 DNA 包括与 SEQ ID NO :1 所显示的核苷酸序列具有至少 60% 或以上同源性、优选 80% 或以上同源性、更优选 90% 或以上同源性、最优选 95% 或以上同源性的 DNA。

[0120] 在编码真核生物蛋白的基因的核苷酸序列中,经常识别到遗传多态性。在本发明中使用的 CD27 基因也包括通过这种多态性在核苷酸序列中产生少量改变的基因。

[0121] CD27 包括包含 SEQ ID NO :2 所显示的氨基酸序列的多肽 ;包含在 SEQ ID NO :2 显示

的氨基酸序列中缺失、取代或添加至少一个氨基酸的氨基酸序列的多肽；包含与 SEQ ID NO : 2 所显示的氨基酸序列具有至少 60% 同源性、优选至少 80% 同源性、更优选至少 90% 同源性、最优选至少 95% 同源性的氨基酸序列，并具有 CD27 的功能的多肽；等等。

[0122] 包含在 SEQ ID NO : 2 显示的氨基酸序列中缺失、取代和 / 或添加一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列的多肽，可以通过例如使用定点突变方法将定点突变引入包含 SEQ ID NO : 2 所显示的氨基酸序列的多肽的编码 DNA 中来获得，所述定点突变方法描述在《分子克隆实验指南》(第二版)(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989))、《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1987-1997))、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) 等中。被缺失、取代、或添加的氨基酸残基的数量没有具体限制，并且数量优选是 1 到几十个，例如 1 到 20，更优选为 1 到几个，例如 1 到 5。

[0123] 除非另有指明，否则在本发明中描述的同源性数值可以通过使用本领域技术人员已知的同源性搜索程序计算的数值。对于核苷酸序列来说，该数值可以通过在 BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] 等中使用缺省参数来计算，对于氨基酸序列来说，该数值可以通过在 BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>] 等中使用缺省参数来计算。

[0124] 作为缺省参数，G (开放式间隙的价值，cost to open gap) 对于核苷酸序列来说是 5，对于氨基酸序列来说是 11；-E (扩展间隙的价值，cost to extend gap) 对于核苷酸序列来说是 2，对于氨基酸序列来说是 1；-q (核苷酸错配的罚分 (penalty for nucleotide mismatch)) 是 -3；-r (核苷酸匹配的奖励 (reward for nucleotide match)) 是 -e (预期值 (expect value)) 是 10；-W (字长 (wordsize)) 对于核苷酸序列来说是 11 个残基，对于氨基酸序列来说是 3 个残基；-y (blast 延伸的减少 (X) 的位数 (dropoff (X) for blast extensions in bits)) 对于 blastn 来说是 20，对于 blastn 之外的程序来说是 7；-X (有间隙比对的 X 减少值的位数 (X dropoff value for gapped alignment in bits)) 是 15；-Z (有间隙比对的最终 X 减少值的位数 (final X dropoff value for gapped alignment in bits)) 对于 blastn 来说是 50，对于 blastn 之外的程序来说是 25 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

[0125] 包含 SEQ ID NO : 2 所显示的氨基酸序列的部分序列的多肽可以按照专业技术人员公知的方法进行制备。例如，它可以通过缺失一部分编码 SEQ ID NO : 2 所显示的氨基酸序列的 DNA，并对其中导入了含有 DNA 的表达载体的转化体进行培养来制备。此外，在由此制备的多肽或 DNA 的基础上，可以与上述相同的方式制备包含在 SEQ ID NO : 2 显示的氨基酸序列的部分序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列的多肽。

[0126] CD27 的细胞外区域的实例包括对应于由参考文献 [The Journal of Immunology, 147, 3165 (1991)] 等所预测的细胞外区域的 1 到 171 位的区域。

[0127] 在本发明中，由 CD27 基因编码的、含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的多肽的细胞外区域，可以是含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的任何 CD27。具体来说，细胞外区域的

实例包括含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链、并由 SEQ ID NO :1 所显示的核苷酸序列编码的 CD27 的细胞外区域。

[0128] 术语“O- 连接糖链”是指糖链通过蛋白的丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 的氨基酸残基的每个氨基酸侧链中包含的 -OH 基团进行连接的结构。在 O- 连接糖链中,具有连接到多肽的 Ser 或 Thr 的氨基酸侧链的 -OH 基团上的 N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 的 O- 连接糖链,被称为“粘蛋白型糖链”。O- 连接糖链的具体实例包括 T 抗原、唾液酸化 T 抗原、Tn 抗原、唾液酸化 Tn 抗原等 (表 1)。

[0129] 表 1

[0130]

糖链抗原名称	糖链结构
Tn 抗原	GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr
唾液酸化 Tn 抗原	NeuNAc α 2 \rightarrow 6GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr
T 抗原	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr
唾液酸化 T 抗原	NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc1 α \rightarrow Ser/Thr

[0131] (NeuNAc :N- 乙酰神经氨酸)

[0132] 在本发明中,术语“未结合半乳糖的 O- 连接糖链”是指其中半乳糖 (Gal) 没有结合到通过蛋白中 Ser 或 Thr 的氨基酸残基的 -OH 基团结合的 N- 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 上的 O- 连接糖链。具体来说,实例包括上面提到的 Tn 抗原和唾液酸化 Tn 抗原。未结合半乳糖的 O- 连接糖链是正常 O- 连接糖链合成途径中的中间体,并且一般在正常细胞产生的糖蛋白中很少发现,其表达在特定疾病例如癌症或肾病中得到证实。

[0133] 在本发明的后文中,未结合半乳糖的 O- 连接糖链有时可以被称为异常糖链,异常糖链所结合的蛋白有时可以被称为糖链缺陷型蛋白,并且结合有异常糖链的 CD27 有时可以被称为糖链缺陷型 CD27。

[0134] O- 连接糖链所结合的多肽的氨基酸残基的实例,包括 CD27 蛋白的细胞外区域的氨基酸序列中的丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 的氨基酸残基。

[0135] 此外,O- 连接糖链所结合的多肽的氨基酸残基,可以使用测序软件例如 NetOGlyc 3.1 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>),通过 O- 连接糖链的共有序列来验证。或者,具体的糖链结合位点可以通过含有 O- 连接糖链的糖蛋白的质谱 (MS) 分析来详细说明。

[0136] 在本发明中,对于 CD27 蛋白上 O- 连接糖链所结合的多肽的氨基酸残基来说,CD27 蛋白的氨基酸序列中任何 Ser 或 Thr 残基都可以被 O- 连接糖链连接。其优选实例包括含有选自下列至少一个氨基酸残基的糖链结合位点:SEQ ID NO :2 所显示的 CD27 蛋白中的第 118 位 Thr,第 127 位 Ser,第 129 位 Thr,第 132 位 Ser,第 133 位 Ser,第 137 位 Ser,第 143 位 Thr,第 149 位 Ser,第 156 位 Thr,第 162 位 Thr,第 173 位 Thr,第 175 位 Ser 和第 176 位 Thr。

[0137] 结合到每个 CD27 蛋白分子细胞外区域上的 O- 连接糖链的数量可以是任何数量,

只要 O- 连接糖链结合到至少一个 Ser 或 Thr 残基上即可。对于 O- 连接糖链的数量没有限制。

[0138] 作为用于获得表达本发明的含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 (在后文中称为“糖链缺陷型 CD27”) 的细胞的方法,方法包含构建糖链缺陷型 CD27 表达细胞,所述方法通过将 CD27 编码 DNA 导入其中在 O- 连接糖链合成过程中,能够向连接到多肽的 Ser/Thr 上的 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白、或参与尿苷 5' - 二磷酸 - 半乳糖 (UDP- 半乳糖) 运输的蛋白的活性降低或缺失的细胞系中,从而获得糖链缺陷型 CD27 表达细胞。或者,表达具有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的细胞,也可以通过用糖链切割酶例如唾液酸酶和半乳糖苷酶处理表达具有正常 O- 连接糖链的 CD27 的细胞来构建。

[0139] 能够向结合到多肽的 Ser 或 Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶的具体实例可以包括 β 1,3- 半乳糖基转移酶 [The Journal of Biological Chemistry, 277, 178-186 (2002)] 等。参与向结合到多肽的 Ser 或 Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶的活性的蛋白实例包括 Cosmc [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 16613-16618 (2002)] 等, Cosmc 是参与酶的蛋白质折叠的伴侣蛋白。

[0140] 基于由于在能够向结合到多肽的 Ser/Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白、参与 UDP- 半乳糖运输的蛋白等的编码 DNA 中发生添加、缺失、取代等而引起酶活性降低或缺失这一事实,源自于 IgA 型肾病患者的 CD27 表达细胞可以用作 CD27 表达细胞。

[0141] 参与 UDP- 半乳糖运输的蛋白的实例包括 UDP- 半乳糖转运蛋白等。其中 UDP- 半乳糖转运蛋白的活性降低或缺失的细胞系的实例包括 Lec8 细胞 [Glycobiology, 1, 307-14 (1991)] 等。

[0142] 在本发明中,表达糖链缺陷型 CD27 的细胞的实例包括在人体中天然存在的细胞、从人体中天然存在的细胞建立的细胞系、通过基因重组技术获得的细胞等。优选的是其中在 O- 连接糖链合成过程中,能够向连接到多肽的 Ser/Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白或参与 UDP- 半乳糖运输的蛋白的活性如上所述降低或缺失的细胞系,具有类似性质并在人体中天然存在的细胞等。

[0143] 人体中天然存在的细胞的实例优选为其中在 O- 连接糖链合成过程中,能够向结合到多肽的 Ser/Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白或参与 UDP- 半乳糖运输的蛋白的活性降低或缺失的细胞系。这样的细胞的具体实例包括在患有 IgA 型肾病或癌症的患者体内表达 CD27 蛋白的细胞,例如在通过活组织检查等获得的免疫相关细胞或肿瘤细胞中表达 CD27 蛋白的细胞。

[0144] 通过基因重组技术获得的细胞的实例包括通过构建其中在 O- 连接糖链合成过程中,向结合到多肽的 Ser/Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白或参与 UDP- 半乳糖运输的蛋白的活性降低或缺失的宿主细胞,然后将包含所需多肽的编码 cDNA 的表达载体导入宿主细胞而获得的糖链缺陷型 CD27 表达细胞。

[0145] 宿主细胞的具体实例包括其中 UDP- 半乳糖转运蛋白的活性降低的 Lec8 细胞,或源自于其中由于 β 1,3- 半乳糖基转移酶或参与酶活性的 Cosmc 伴侣蛋白的异常而导致酶活性降低或缺失的 IgA 型肾病患者的 IgA 抗体表达细胞。

[0146] 此外,可以通过使用上述 CD27 表达细胞表达并纯化糖链缺陷型 CD27 蛋白,来构建

糖链缺陷型 CD27 蛋白。

[0147] 可以通过将 CD27 蛋白作为与另一种材料的融合蛋白进行表达, 然后进行纯化, 来获得糖链缺陷型 CD27 蛋白。与 CD27 蛋白融合的材料实例包括多肽例如抗体恒定区、抗体 Fc 区、GST 标签、组氨酸标签 (也称为“His 标签”) 和 Myc 标签。融合蛋白可以使用亲和柱例如蛋白 A、镍柱和特异性抗体柱进行分离和纯化。

[0148] 本发明的单克隆抗体或抗体片段对如此获得的糖链缺陷型 CD27 细胞或糖链缺陷型 CD27 具有结合活性。

[0149] 本发明的抗体或抗体片段与糖链缺陷型 CD27 多肽的细胞外区域的结合, 可以通过下述方法验证, 在所述方法中, 表达特定抗原的细胞与针对特异性抗原的抗体的结合能力, 通过例如常规的已知免疫检测方法、优选为荧光细胞染色方法来证实。此外, 它也可以通过常规的已知免疫检测方法的组合等来证实 [《单克隆抗体——原理与实践》(第三版)(Monoclonal Antibodies—Principles and Practice, Third edition, Academic Press(1996)), 《抗体实验手册》(Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)), 《单克隆抗体实验手册》(Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific(1987))]。

[0150] 本发明的单克隆抗体包括由杂交瘤产生的抗体和由转化有含编码抗体的基因的表达载体的转化体产生的重组抗体。

[0151] 可以通过例如制备上述表达糖链缺陷型 CD27 的细胞作为抗原, 从使用抗原免疫的动物诱导具有抗原特异性的抗体产生细胞, 并将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合, 来制备杂交瘤。可以通过培养杂交瘤或将杂交瘤细胞施用给动物以在动物中引起腹水肿瘤, 并分离和纯化培养物或腹水, 来获得抗糖链缺陷型 CD27 的抗体。

[0152] 用抗原免疫的动物可以是任何动物, 只要可以制备杂交瘤即可, 并且适于使用的是小鼠、大鼠、仓鼠、兔等。此外, 可以从这样的动物获得具有抗体产生活性的细胞, 并且本发明的抗体包括由通过体外免疫后的细胞与骨髓瘤细胞的融合获得的杂交瘤所产生的抗体。

[0153] 单克隆抗体是由单一克隆的抗体产生细胞所分泌的抗体, 只识别一个表位 (也称为抗原决定簇), 并具有独特的氨基酸序列 (一级结构)。

[0154] 表位的实例包括被单克隆抗体识别并结合的单一氨基酸序列、由氨基酸序列构成的三维结构、结合糖链的氨基酸序列、由结合糖链的氨基酸序列构成的三维结构等。本发明的单克隆抗体的表位的实例包括糖链缺陷型 CD27 蛋白的三维结构。

[0155] 本发明的单克隆抗体的实例包括任何单克隆抗体, 只要它识别并也结合糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域即可。单克隆抗体的具体实例包括单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030、KM4031 等。

[0156] 更具体来说, 本发明的单克隆抗体的实例包括由杂交瘤 KM4026 产生的单克隆抗体 KM4026、与单克隆抗体 KM4026 竞争与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体、以及与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的与单克隆抗体 KM4026 结合的表位结合的单克隆抗体。

[0157] 此外, 本发明的单克隆抗体的实例包括由杂交瘤 KM4027 产生的单克隆抗体 KM4027、与单克隆抗体 KM4027 竞争与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体、

以及与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的与单克隆抗体 KM4027 结合的表位结合的单克隆抗体。

[0158] 此外,本发明的单克隆抗体的实例包括由杂交瘤 KM4028 产生的单克隆抗体 KM4028、与单克隆抗体 KM4028 竞争与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体、以及与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的与单克隆抗体 KM4028 结合的表位结合的单克隆抗体。

[0159] 此外,本发明的单克隆抗体的实例可以包括由杂交瘤 KM4030 产生的单克隆抗体 KM4030、与单克隆抗体 KM4030 竞争与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体、以及与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的与单克隆抗体 KM4030 结合的表位结合的单克隆抗体。

[0160] 此外,本发明的单克隆抗体的实例包括由杂交瘤 KM4031 产生的单克隆抗体 KM4031、与单克隆抗体 KM4031 竞争与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域的结合的单克隆抗体、以及与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的与单克隆抗体 KM4031 结合的表位结合的单克隆抗体。

[0161] 与本发明的单克隆抗体竞争的单克隆抗体的实例,具体来说包括对如上所述的多种单克隆抗体和糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的表位具有竞争性反应的单克隆抗体。

[0162] 此外,与本发明的单克隆抗体所结合的表位结合的单克隆抗体的实例,具体来说包括与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域中存在的被如上所述的多种单克隆抗体识别的表位结合的单克隆抗体。

[0163] 根据《布达佩斯公约》,杂交瘤 KM4030 已经于 2008 年 6 月 5 日以 FERM BP-10976 保藏于独立行政法人产业技术综合研究所特许生物保藏中心 [International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6,1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566)]。

[0164] 重组抗体包括通过基因重组生产的抗体,例如人类嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体及其抗体片段。在重组抗体中,作为治疗剂,优选的是具有抗原结合活性、低免疫原性和延长的血液半衰期的重组抗体。

[0165] 人类嵌合抗体是含有非人类动物的抗体的重链可变区(在后文中称为“VH”)和轻链可变区(在后文中称为“VL”)以及人类抗体的重链恒定区(在后文中称为“CH”)和轻链恒定区(在后文中称为“CL”)的抗体。

[0166] 本发明的人类嵌合抗体可以如下产生。具体来说,可以通过从产生特异性识别糖链缺陷型 CD27 并与细胞外区域结合的单克隆抗体、或特异性识别糖链缺陷型 CD27 并与细胞外区域结合的单克隆抗体的杂交瘤获得编码 VH 和 VL 的 cDNA,将它们的每个插入到用于动物细胞的、含有人类抗体的 CH 和 CL 的编码 DNA 的表达载体中,从而构建用于表达人类嵌合抗体的载体,然后将载体导入到动物细胞中以表达抗体,来生产人类嵌合抗体。

[0167] 对于人类嵌合抗体的 CH 来说,可以使用任何 CH,只要它属于人类免疫球蛋白(在后文中称为“hIg”)即可,优选属于 hIgG 类别的,可以使用属于 hIgG 类别的任何一个亚类,例如 hIgG1、hIgG2、hIgG3 和 hIgG4。对于人类嵌合抗体的 CL 来说,可以使用任何 CL,只要

它属于 hIg 类别即可,并可以使用属于 κ 类别或 λ 类别的。

[0168] 本发明的人类嵌合抗体的实例,包括其中抗体的 VH 是 SEQ ID NO :25 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 是 SEQ ID NO :35 显示的氨基酸序列的人类嵌合抗体,其中抗体的 VH 是 SEQ ID NO :26 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 是 SEQ ID NO :36 显示的氨基酸序列的人类嵌合抗体,其中抗体的 VH 是 SEQ ID NO :27 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 是 SEQ ID NO :37 显示的氨基酸序列的人类嵌合抗体,其中抗体的 VH 是 SEQ ID NO :28 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 是 SEQ ID NO :38 显示的氨基酸序列的人类嵌合抗体,以及其中抗体的 VH 是 SEQ ID NO :29 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 是 SEQ ID NO :39 显示的氨基酸序列的人类嵌合抗体。

[0169] 此外,本发明的人类嵌合抗体的实例,包括其中抗体的 VH 包含由 SEQ ID NO :40 到 42 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列、并且抗体的 VL 包含由 SEQ ID NO :43 到 45 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列的人类嵌合抗体;其中抗体的 VH 包含由 SEQ ID NO :46 到 48 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列、并且抗体的 VL 包含由 SEQ ID NO :49 到 51 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列的人类嵌合抗体;其中抗体的 VH 包含由 SEQ ID NO :52 到 54 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列、并且抗体的 VL 包含由 SEQ ID NO :55 到 57 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列的人类嵌合抗体;其中抗体的 VH 包含由 SEQ ID NO :58 到 60 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列、并且抗体的 VL 包含由 SEQ ID NO :61 到 63 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列的人类嵌合抗体;以及其中抗体的 VH 包含由 SEQ ID NO :64 到 66 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列、并且抗体的 VL 包含由 SEQ ID NO :67 到 69 分别显示的 CDR1 到 3 的氨基酸序列的人类嵌合抗体。

[0170] 人源化抗体是其中源自非人类动物的抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的氨基酸序列被移植到人类抗体的 VH 和 VL 的适当位置中的抗体,也被称为人类 CDR 移植抗体或重构抗体等。

[0171] 本发明的人源化抗体可以通过如下方法生产:构建编码抗体可变区(在后文中称为“V 区”)的 cDNA,其中源自于非人类动物的、由产生本发明的特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体的杂交瘤生产的抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的氨基酸序列,被移植到任何人类抗体的 VH 和 VL 的构架中(在后文中称为“FR”)。将它们每个插入到用于动物细胞表达的、含有人类抗体的 CH 和 CL 的编码基因的载体中,从而构建用于人源化抗体表达的载体,并将其导入到动物细胞中以表达和生产人源化抗体。

[0172] 对于人类抗体的 VH 和 VL 的 FR 的氨基酸序列来说,可以使用任何氨基酸序列,只要它们分别是源自于人类抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列即可。实例包括在数据库例如蛋白数据库 (Protein Data Bank) 中登记的人类抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列、在例如美国健康与人类服务部 (Dept. Health and Human Services) (1991) 的《免疫学重要的蛋白序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest) 中描述的人类抗体的 VH 和 VL 的每个亚组 FR 的共有氨基酸序列,等等。

[0173] 对于人源化抗体的 CH 来说,可以使用任何 CH,只要它属于 hIg 类别即可,优选的是 hIgG 类别,并且可以使用属于 hIgG 类别的任何一个亚类,例如 hIgG1、hIgG2、hIgG3 和 hIgG4。对于人源化抗体的 CL 来说,可以使用任何 CL,只要它属于 hIg 类别即可,并且可以使用属于 κ 类别或 λ 类别的。

[0174] 本发明的人源化抗体的实例,包括其中抗体的 VH 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :

40 到 42 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :43 到 45 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中抗体的 VH 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :52 到 54 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :55 到 57 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中抗体的 VH 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :58 到 60 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :61 到 63 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中抗体的 VH 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :64 到 66 显示的氨基酸序列并且抗体的 VL 的 CDR1 到 3 分别包含 SEQ ID NO :67 到 69 显示的氨基酸序列的人源化抗体,等等。

[0175] 此外,本发明的人源化抗体的具体实例包括下列人源化抗体:

[0176] 对于抗体的 VH 的氨基酸序列来说,示例的是其中抗体的 VH 包含 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列,以及在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中第 30 位 Ser、第 48 位 Val、第 49 位 Ser、第 77 位 Asn、第 93 位 Val、第 97 位 Ala 和第 117 位 Thr 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列的人源化抗体,和 / 或对于抗体的 VL 的氨基酸序列来说,示例的是其中抗体的 VL 包含 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列,以及在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中第 21 位 Ile、第 40 位 Pro、第 58 位 Val、第 85 位 Thr 和第 87 位 Tyr 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列的人源化抗体。就此而言,被导入的修饰的数量没有限制。

[0177] 例如,包含了下列人源化抗体:

[0178] 其中抗体的 VH 包含在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中第 30 位 Ser、第 48 位 Val、第 49 位 Ser、第 77 位 Asn 和第 97 位 Ala 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列的人源化抗体,

[0179] 优选为其中抗体的 VH 包含在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中第 48 位 Val、第 49 位 Ser 和第 97 位 Ala 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列的人源化抗体,

[0180] 优选为其中抗体的 VH 包含在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中第 30 位 Ser 和第 97 位 Ala 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列的人源化抗体,等等。

[0181] 通过上述氨基酸修饰获得的抗体的 VH 的氨基酸序列,包括其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入至少一个修饰的氨基酸序列,所述至少修饰选自 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr。

[0182] 其中导入了 7 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例,包括在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入下列取代的氨基酸序列:Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr。

[0183] 其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入了 6 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0184] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0185] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0186] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0187] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0188] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0189] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0190] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，等等。

[0191] 其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入了 5 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例，包括下列氨基酸序列：

[0192] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0193] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0194] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0195] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0196] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0197] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0198] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0199] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0200] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0201] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0202] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0203] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0204] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0205] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0206] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr

取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0207] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0208] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0209] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0210] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0211] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0212] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，等等。

[0213] 其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入了 4 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例，包括下列氨基酸序列：

[0214] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0215] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0216] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0217] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0218] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0219] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0220] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0221] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0222] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0223] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0224] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0225] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0226] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0227] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0228] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0229] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0230] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0231] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0232] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0233] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0234] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0235] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0236] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0237] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0238] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0239] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0240] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0241] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0242] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0243] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0244] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0245] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和

Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0246] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0247] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0248] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列，等等。

[0249] 其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入了 3 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例，包括下列氨基酸序列：

[0250] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val 和 Ala 取代第 49 位 Ser 的氨基酸序列，

[0251] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列，

[0252] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0253] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0254] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0255] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列，

[0256] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0257] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0258] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0259] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0260] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0261] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0262] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0263] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0264] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0265] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列，

[0266] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0267] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0268] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0269] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0270] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0271] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0272] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0273] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0274] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0275] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列，

[0276] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0277] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0278] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0279] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0280] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0281] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列，

[0282] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0283] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列，

[0284] 其中导入了 Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr

的氨基酸序列,等等。

[0285] 其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入了 2 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0286] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 和 Ile 取代第 48 位 Val 的氨基酸序列,

[0287] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 和 Ala 取代第 49 位 Ser 的氨基酸序列,

[0288] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列,

[0289] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列,

[0290] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0291] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0292] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val 和 Ala 取代第 49 位 Ser 的氨基酸序列,

[0293] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列,

[0294] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列,

[0295] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0296] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0297] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser 和 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列,

[0298] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列,

[0299] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0300] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0301] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列,

[0302] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0303] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0304] 其中导入了 Thr 取代第 93 位 Val 和 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0305] 其中导入了 Thr 取代第 93 位 Val 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,

[0306] 其中导入了 Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列,等等。

[0307] 其中在 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列中导入了 1 个修饰的 VH 的氨基酸序列的具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0308] 其中导入了 Asn 取代第 30 位 Ser 的氨基酸序列,

[0309] 其中导入了 Ile 取代第 48 位 Val 的氨基酸序列,

[0310] 其中导入了 Ala 取代第 49 位 Ser 的氨基酸序列,

[0311] 其中导入了 Gly 取代第 77 位 Asn 的氨基酸序列,

[0312] 其中导入了 Thr 取代第 93 位 Val 的氨基酸序列,

[0313] 其中导入了 Thr 取代第 97 位 Ala 的氨基酸序列,

[0314] 其中导入了 Val 取代第 117 位 Thr 的氨基酸序列。

[0315] 对于抗体的 VL 来说,可以提到的是在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中第 21 位 Ile、第 40 位 Pro、第 58 位 Val、第 85 位 Thr 和第 87 位 Tyr 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列。

[0316] 优选的是其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中第 40 位 Pro、第 58 位 Val 和第 87 位 Tyr 被其他氨基酸残基取代的氨基酸序列。

[0317] 通过上述氨基酸修饰获得的 VL 的氨基酸序列,包括其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨

氨基酸序列中导入至少一个修饰的氨基酸序列,所述修饰选自 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸修饰。

[0318] 其中导入了 5 个修饰的 VL 的氨基酸序列,包括其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中导入下列取代的氨基酸序列等:Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr。

[0319] 其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中导入了 4 个修饰的 VL 的氨基酸序列的具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0320] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0321] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Ile 取代第 58 位 Val、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0322] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0323] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0324] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,等等。

[0325] 其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中导入了 3 个修饰的 VL 的氨基酸序列的具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0326] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro 和 Ile 取代第 58 位 Val 的氨基酸序列,

[0327] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0328] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0329] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Ile 取代第 58 位 Val 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0330] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Ile 取代第 58 位 Val 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0331] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0332] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0333] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位 Val 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0334] 其中导入了 Ile 取代第 58 位 Val、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,等等。

[0335] 其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中导入了 2 个修饰的 VL 的氨基酸序列的

具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0336] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile 和 Leu 取代第 40 位 Pro 的氨基酸序列,

[0337] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile 和 Ile 取代第 58 位 Val 的氨基酸序列,

[0338] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0339] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0340] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro 和 Ile 取代第 58 位 Val 的氨基酸序列,

[0341] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0342] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0343] 其中导入了 Ile 取代第 58 位 Val 和 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0344] 其中导入了 Ile 取代第 58 位 Val 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,

[0345] 其中导入了 Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,等等。

[0346] 其中在 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列中导入了 1 个修饰的 VL 的氨基酸序列的具体实例,包括下列氨基酸序列:

[0347] 其中导入了 Leu 取代第 21 位 Ile 的氨基酸序列,

[0348] 其中导入了 Leu 取代第 40 位 Pro 的氨基酸序列,

[0349] 其中导入了 Ile 取代第 58 位 Val 的氨基酸序列,

[0350] 其中导入了 Ala 取代第 85 位 Thr 的氨基酸序列,

[0351] 其中导入了 Phe 取代第 87 位 Tyr 的氨基酸序列,等等。

[0352] 此外,本发明的人源化抗体的具体实例,包括其中可变区的 H 链包含 SEQ ID NO :96 显示的氨基酸序列和 / 或可变区的 L 链包含 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中可变区的 H 链包含 SEQ ID NO :101 显示的氨基酸序列和 / 或可变区的 L 链包含 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中可变区的 H 链包含 SEQ ID NO :103 显示的氨基酸序列和 / 或可变区的 L 链包含 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中可变区的 H 链包含 SEQ ID NO :105 显示的氨基酸序列和 / 或可变区的 L 链包含 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列的人源化抗体,其中可变区的 H 链包含 SEQ ID NO :107 显示的氨基酸序列和 / 或可变区的 L 链包含 SEQ ID NO :97 显示的氨基酸序列的人源化抗体,等等。

[0353] 人类抗体最初是人体中天然存在的抗体,但是它也包括从基于遗传工程、细胞工程和发育工程技术的最新进展制备的人类抗体噬菌体文库或产生人类抗体的转基因动物获得的抗体。

[0354] 人体中存在的抗体可以如下制备:例如分离人类外周血淋巴细胞,通过用 EB 病毒等感染使其永生化,然后对它进行克隆,从而获得能够生产抗体的淋巴细胞,对这样获得的淋巴细胞进行培养,并从培养上清液中纯化抗体。

[0355] 人类抗体噬菌体文库,是其中通过将人类 B 细胞制备的编码抗体的基因插入到噬菌体基因中,而在噬菌体表面上表达抗体片段例如 Fab 和 scFv 的文库。表达具有所需抗原结合活性的抗体片段的噬菌体,可以利用它与固定有抗原的基体的结合活性作为指标,从文库中回收。抗体片段可以通过遗传工程技术进一步转变为含有两条完整的 H 链和两条完整的 L 链的人类抗体分子。

[0356] 产生人类抗体的转基因动物是其中人类抗体基因被整合到细胞中的动物。具体来说,产生人类抗体的转基因动物可以如下制备:将编码人类抗体的基因导入到小鼠 ES 细胞

中,将 ES 细胞移植到另一只小鼠的早期胚胎中,然后使其发育。人类抗体可以从产生人类抗体的转基因非人类动物如下制备:通过通常在非人类哺乳动物中进行的杂交瘤制备方法获得产生人类抗体的杂交瘤,将获得的杂交瘤进行培养,并在培养上清液中形成和积累人类抗体。

[0357] 在构成上述的抗体或抗体片段的氨基酸序列中,其中一个或多个氨基酸被缺失、取代、插入或添加、但仍与上述抗体或其片段具有相似活性的抗体或其抗体片段,也包括在本发明的抗体或其抗体片段中。

[0358] 被缺失、取代、插入和 / 或添加的氨基酸数量是一个或多个,没有具体的限制,但是它在通过已知方法例如定点突变方法有可能缺失、取代、或添加的范围内,定点突变方法描述在《分子克隆》(第二版)(Molecular Cloning, Second Edition)、《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology)、Nucleic Acids Research, 10, 6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315(1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488(1985) 等中。例如,数量为 1 到几十个,优选为 1 到 20,更优选为 1 到 10,最优选为 1 到 5。

[0359] 上述抗体的氨基酸序列中“一个或多个氨基酸被缺失、取代、插入或添加”的表述意义如下。即,它意味着在该序列和一个或多个氨基酸序列中的任选位置上,存在着一个或多个氨基酸的缺失、取代、插入或添加。此外,缺失、取代、插入或添加可以同时发生,被取代、插入或添加的氨基酸可以是天然类型或非天然类型的。天然类型的氨基酸包括 L- 丙氨酸、L- 天冬酰胺、L- 天冬氨酸、L- 谷氨酰胺、L- 谷氨酸、甘氨酸、L- 组氨酸、L- 异亮氨酸、L- 亮氨酸、L- 赖氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 苯丙氨酸、L- 脯氨酸、L- 丝氨酸、L- 苏氨酸、L- 色氨酸、L- 酪氨酸、L- 缬氨酸、L- 半胱氨酸等。

[0360] 可互相取代的氨基酸的优选实例显示在下面。同样组中的氨基酸可以互相取代。

[0361] A 组:亮氨酸,异亮氨酸,正亮氨酸,缬氨酸,正缬氨酸,丙氨酸,2- 氨基丁酸,甲硫氨酸,0- 甲基丝氨酸,叔丁基甘氨酸,叔丁基丙氨酸,环己基丙氨酸

[0362] B 组:天冬氨酸,谷氨酸,异天冬氨酸,异谷氨酸,2- 氨基己二酸,2- 氨基辛二酸

[0363] C 组:天冬酰胺,谷氨酰胺

[0364] D 组:赖氨酸,精氨酸,鸟氨酸,2,4- 二氨基丁酸,2,3- 二氨基丙酸

[0365] E 组:脯氨酸,3- 羟基脯氨酸,4- 羟基脯氨酸

[0366] F 组:丝氨酸,苏氨酸,高丝氨酸

[0367] G 组:苯丙氨酸,酪氨酸

[0368] 抗体的效应子活性包括 ADCC 活性、CDC 活性、抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP) 活性、调理作用效应等。它可以通过各种方法控制。

[0369] 用于控制效应子活性的方法的实例包括控制结合到抗体 Fc 区的糖链的方法、对抗体 Fc 区中的氨基酸残基进行氨基酸修饰的方法等。

[0370] 控制结合到抗体 Fc 区的糖链的方法的实例包括通过消除 IgG 抗体第 297 位的糖链降低 ADCC 或 CDC 活性的方法 [Molecular Immunology, 32, 1311, (1995), W02008/030564], 通过减少半乳糖与抗体 Fc 区的结合降低 CDC 活性的方法等。

[0371] 此外,控制结合到抗体 Fc 区的糖链的方法的实例,包括生产含有在连接到 IgG 抗体 Fc 区第 297 位的天冬酰胺上的 N- 连接糖链中、在结合到糖链结合的基部的 N- 乙酰葡

葡萄糖胺 (GlcNAc) 上的不含岩藻糖的糖链的抗体的方法 (US7, 214, 775 和 US6, 946, 292), 生产含有结合有对分 GlcNAc 的糖链的抗体的方法 [Nature Biotechnology, 17, 176, (1999)], 生产含有在非还原末端结合有半乳糖 (Gal) 的糖链的抗体的方法 [Hum. Antibod. Hybridomas, 5, 143-151. (1994)], 等等。

[0372] 对抗体 Fc 区中的氨基酸残基进行氨基酸修饰的方法的实例, 包括通过抗体 Fc 区的氨基酸修饰控制效应子活性的方法 (J. B. C., 277, 26733-26740, 2002, US6, 737, 056, US7, 297, 775, US2007/0020260 和 W02005/070963), 通过抗体 Fc 区域的相应亚类之间的结构域交换控制效应子活性的方法 (W02007/011041) 等。

[0373] 本发明的抗体片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、双链抗体、dsFv 等。

[0374] 本发明的抗体片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、双链抗体、dsFv、包含 CDR 的肽等。

[0375] Fab 是具有大约 50,000 的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段, 其中在通过用蛋白酶木瓜蛋白酶 (在 H 链的第 224 位切开氨基酸残基) 处理 IgG 抗体分子所获得的片段中, H 链的大约一半 N-端侧和整个 L 链通过二硫键结合在一起。

[0376] 本发明的 Fab 可以通过用蛋白酶木瓜蛋白酶处理特异性识别本发明的糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体来生产。此外, Fab 也可以通过将编码抗体的 Fab 的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中, 并将载体导入到原核生物或真核细胞中以表达 Fab 来生产。

[0377] F(ab')₂ 是分子量约为 100,000 并具有抗原结合活性的抗体片段, 其包含通过用酶木瓜蛋白酶消化 IgG 铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的在铰链位置结合的两个 Fab 区。

[0378] 本发明的 F(ab')₂ 可以通过用蛋白酶木瓜蛋白酶处理特异性识别本发明的糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体来生产。此外, 所述 F(ab')₂ 也可以通过用硫醚键或二硫键连接下面描述的 Fab' 来生产。

[0379] Fab' 是分子量约为 50,000 并具有抗原结合活性的抗体片段, 其通过在上述 F(ab')₂ 的铰链区处切开二硫键而获得。

[0380] 本发明的 Fab' 可以使用还原剂二硫苏糖醇, 由特异性识别本发明的糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的 F(ab')₂ 生产。此外, Fab' 也可以通过将编码抗体的 Fab' 片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中, 并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab' 来生产。

[0381] scFv 是 VH-P-VL 或 VL-P-VH 多肽, 其中使用了适当的肽接头 (在后文中称为“P”) 将一条链 VH 和一条链 VL 连接在一起, 并且是具有抗原结合活性的抗体片段。

[0382] 本发明的 scFv 可以通过获得特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的编码 cDNA, 构建编码 scFv 的 DNA, 将 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中, 然后将表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达 scFv 来生产。

[0383] 双链抗体是其中 scFv 被二聚体化并具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中, 两个抗原可以是相同或不同的。

[0384] 本发明的双链抗体可以通过获得特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区

域结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的编码 cDNA, 构建编码 scFv 的 DNA 使得 P 的氨基酸序列长度是 8 个或以下的残基, 将 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中, 然后将表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双链抗体, 来生产。

[0385] dsFv 是通过将其中每个 VH 和 VL 中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽, 通过半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。用半胱氨酸残基取代的氨基酸残基, 可以按照 Reiter 等 (Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)) 显示的方法, 根据抗体的三维结构评估进行选择。

[0386] 本发明的 dsFv 可以通过获得获得特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的编码 cDNA, 构建编码 dsFv 的 DNA, 将 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中, 然后将表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达 dsFv 来生产。

[0387] 含 CDR 的肽通过包含 VH 或 VL 的 CDR 的一个或多个区域来构成。含多个 CDR 的肽可以直接或通过适合的肽连接物相连。

[0388] 本发明的含 CDR 的肽, 可以通过构建特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体的 VH 和 VL 的 CDR 的编码 DNA, 将 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中, 然后将表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达肽, 来生产。

[0389] 含有 CDR 的肽也可以通过化学合成方法来生产, 例如 Fmoc 方法 (苄基甲氧基羰基方法)、tBoc 方法 (叔丁氧基羰基方法)。

[0390] 本发明的抗体包括抗体结合物, 其中特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体或其抗体片段通过化学或遗传方法与药剂、蛋白、放射性同位素等连接。

[0391] 本发明的结合物可以通过将药剂、蛋白、放射性同位素等化学连接到本发明的特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体或其抗体片段的 H 链或 L 链的 N- 端侧或 C- 端侧、抗体或抗体片段的适合的取代基或侧链上、抗体或抗体片段中的糖链上等, 来生产 [《抗体工程手册》, Antibody Engineering Handbook, Osamu Kanemitsu 主编, Chijin Shokan 出版 (1994)]。

[0392] 此外, 结合物也可以如下遗传方法生产: 将特异性识别糖链缺陷型 CD27 蛋白并与细胞外区域结合的单克隆抗体或其抗体片段的编码 DNA 与编码待结合蛋白的其他 DNA 连接在一起, 将 DNA 插入到表达载体中, 并将表达载体导入到原核生物或真核生物宿主细胞中。

[0393] 药剂包括化疗剂、治疗性抗体、免疫刺激剂、具有高分子量的药剂等。

[0394] 蛋白包括细胞因子、生长因子、毒性蛋白等。

[0395] 此外, 待结合到抗体或其抗体片段上的药剂可以是药物前体的形式。本发明中的药物前体是受到肿瘤环境中存在的酶的化学修饰、并被转化成具有损害肿瘤细胞的活性的物质的药剂。

[0396] 化疗剂包括任何化疗剂, 例如烷基化剂、亚硝基脲剂、代谢拮抗剂、抗癌性抗生物质、来源于植物的生物碱、拓扑异构酶抑制剂、激素疗法药剂、激素拮抗剂、芳香化酶抑制剂、P 糖蛋白抑制剂、铂复合物衍生物、M 期抑制剂和激酶抑制剂。化疗剂的实例包括氨磷汀 (Ethyol)、顺铂, 达卡巴嗪 (DTIC)、更生霉素、mecloretamin (氮芥子气)、链脲佐菌素、环磷酰胺、异环磷酰胺、卡莫司汀 (BCNU)、洛莫司汀 (CCNU)、阿霉素 (亚德里亚霉素)、阿霉素脂

质体 (Doxyl)、表柔比星、吉西他滨 (Gemsal)、柔红霉素、柔红霉素脂质体 (Daunozome)、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶、长春花碱、长春新碱、博来霉素、道诺霉素、培洛霉素、雌氮芥、紫杉醇 (泰克索 (Taxol))、多烯紫杉醇 (泰素帝)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、克拉曲滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基喜树碱 (SN38)、5-氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司那、伊立替康、nogitecan、米托蒽醌、拓扑替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、羟基脲、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、戊制菌素、哌泊溴烷、链脲霉素、他莫昔芬、戈舍瑞林、亮丙瑞林、氟他胺、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、硫替哌、尿嘧啶氮芥、长春瑞宾、苯丁酸氮芥、氢化可的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、长春地辛、尼莫司汀、司莫司汀、卡培他滨、雷替曲塞、氮胞苷、UFT、奥沙利铂、吉非替尼 (易瑞沙)、伊马替尼 (STI 571)、埃罗替尼、Flt3 抑制剂、VEGFR 抑制剂、FGFR 抑制剂、根赤壳菌素、17-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素、雷帕霉素、安丫啶、全反式视黄酸、沙利度胺、阿那曲唑、法曲唑、来曲唑、依西美坦、硫代苹果酸金、D-青霉胺、布西拉明、硫唑嘌呤、咪唑立宾、环孢霉素、雷帕霉素、氢化可的松、蓓萨罗丁 (Targretin)、他莫昔芬、地塞米松、孕激素物质、雌激素物质、阿那曲唑 (瑞宁得)、来普隆、阿司匹林、吡啶美辛、塞来考昔、硫唑嘌呤、青霉胺、硫代苹果酸金、马来酸氯苯吡胺、氯苯那敏、氯马斯汀、维 A 酸、蓓萨罗丁、砷、voltezomib、别嘌呤醇、吉妥单抗、伊莫单抗、131 托西莫单抗、塔革雷汀、ONTAK、奥唑米星、克拉霉素、甲酰四氢叶酸、异环磷酰胺、酮康唑、氨基苯乙哌啶酮、苏拉明、氨甲蝶呤、美登醇及其衍生物。

[0397] 将化疗剂与抗体结合的方法包括其中化疗剂与抗体的氨基通过戊二醛连接的方法,其中化疗剂的氨基与抗体的羧基通过水溶性碳二亚胺连接的方法,等等。

[0398] 治疗性抗体包括针对其中与抗体的结合诱导了凋亡的抗原的抗体、针对参与肿瘤的病态形成的抗原的抗体、调节免疫功能的抗体、以及与病态部位中血管形成相关的抗体。

[0399] 其中与抗体的结合诱导了凋亡的抗原包括分化簇 (在后文中称为“CD”) 19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7. 1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7. 2)、II 类人类白细胞抗原 (HLA)、EGFR, 等等。

[0400] 调节免疫功能的抗体的抗原包括 CD4、CD40、CD40 配体、B7 家族分子 (CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、B7-H4)、B7 家族分子的配体 (CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、BTLA)、OX-40、OX-40 配体、CD137、肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族分子 (DR4、DR5、TNFR1、TNFR2)、诱导 TNF 相关的凋亡的配体受体 (TRAIL) 家族分子、TRAIL 家族分子的受体家族 (TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4)、核因子 κ B 配体 (RANK) 的受体激活剂、RANK 配体、CD25、叶酸受体 4、细胞因子 [白介素-1 α (后文中自介素称为“IL”)、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、转化生长因子 (TGF) β 、TNF α , 等等]、这些细胞因子的受体、趋化因子 (SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、CTACK 等) 以及这些趋化因子的受体。

[0401] 在病态部位抑制血管形成的抗体的抗原包括内皮生长因子 (VEGF)、血管生成素、成纤维细胞生长因子 (FGF)、EGF、血小板衍生的生长因子 (PDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、促红细胞生成素 (EPO)、TGF β 、IL-8、ephrin、SDF-1 等。

[0402] 免疫刺激剂可以是任何被称为免疫佐剂的天然产物。增强免疫原的药剂的实例包括 β -1,3-葡聚糖 (香菇多糖, 裂殖菌素)、 α -半乳糖苷神经酰胺 (KRN7000)、真菌粉末

(picibanil, BCG) 和真菌提取物 (云芝多糖 (krestin))。

[0403] 具有高分子量的药剂包括聚乙二醇 (在后文中称为“PEG”)、白蛋白、葡聚糖、聚氧乙烯、苯乙烯-马来酸共聚物、聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、羟丙基甲基丙烯酰胺等。通过将具有高分子量的化合物与抗体或抗体片段结合,预期发生下列效应:(1)改进对抗各种不同化学、物理或生物因子的稳定性,(2)显著延长在血液中的半衰期,(3)免疫原性、抗体生产的抑制等的消失 [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]。例如,用于将 PEG 结合到抗体上的方法,包括使抗体与 PEG 修饰反应物进行反应的方法 [Bioconjugate Drug, Hirokawa Shoten (1993)]。PEG 修饰反应物包括赖氨酸的 ϵ -氨基的修饰剂 (日本公开的未经审查的专利申请 No. 178926/86)、天冬氨酸和谷氨酸的羧基的修饰剂 (日本公开的未经审查的专利申请 No. 23587/81)、精氨酸的胍基的修饰剂 (日本公开的未经审查的专利申请 No. 117920/90) 等。

[0404] 细胞因子或生长因子可以是任何细胞因子或生长因子,只要它增强了细胞例如 NK 细胞、巨噬细胞和嗜中性细胞即可。例子包括干扰素 (在后文中称为“INF”)- α 、INF- β 、INF- γ 、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 等。

[0405] 毒性蛋白包括蓖麻毒素、白喉毒素、ONTAK 等,还包括在蛋白中导入突变以便控制毒性的毒性蛋白。

[0406] 放射性同位素包括 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{199}Tc 、 ^{77}Lu 、 ^{211}At 等。放射性同位素可以通过氯胺-T 方法直接与抗体相连。此外,也可以将螯合放射性同位素的物质与抗体相连。螯合剂包括甲基苯甲基二亚乙基-三胺五乙酸 (MX-DTPA) 等。

[0407] 在本发明中,用于本发明的抗体可以与一种或多种其他药剂组合施用,并也可以组合使用放射性辐照。其它的药剂包括上面描述的化疗剂、治疗性抗体、免疫刺激剂例如细胞因子等。

[0408] 放射性辐照包括光子 (电磁) 辐照例如 X-射线或 γ -射线、粒子辐照例如电子束、质子束或重粒子束,等等。

[0409] 在组合给药的方法中,药剂可以与本发明中使用的抗体同时给药,或者药剂可以在本发明中使用的抗体给药之前或之后给药。

[0410] 本发明中的检测方法、测定方法、检测试剂、测定试剂或诊断试剂,包括其中通过标记本发明的抗体而使用了特定标记物的方法。标记物包括在通用免疫检测或测量方法中使用的标记物,实例包括酶例如碱性磷酸酶、过氧化物酶和萤光素酶,发光材料例如吖啶酯和洛粉碱,荧光材料例如荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 和三甲基罗丹明 (RITC) 等。

[0411] 下面,将对本发明的抗体的制备方法进行更详细描述。

[0412] 1. 单克隆抗体的生产方法

[0413] (1) 抗原的制备

[0414] 按照下列步骤,通过将包含编码全长或部分长度 CD27 的 cDNA 的表达载体导入其中在 O-连接糖链合成过程中能够向连接到多肽的 Ser/Thr 上的 GalNAc 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白或参与 UDP-半乳糖运输的蛋白的活性降低或缺失的酵母、昆虫细胞、动物细胞等中,可以获得作为抗原的糖链缺陷型 CD27 或表达糖链缺陷型 CD27 的细胞。此外,可以从各种在细胞膜上或在培养基中表达大量糖链缺陷型 CD27 的人类来源的培养细胞、人

类组织等纯化糖链缺陷型 CD27, 从而制备抗原。或者, 可以制备具有糖链缺陷型 CD27 的部分序列的合成肽并用作抗原。此外, 也可以通过向从不具有糖链添加能力的原核生物例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达和纯化的 CD27 体外添加糖链来获得糖链缺陷型 CD27。

[0415] 同样地, 可以通过将包含全长或部分长度 CD27 的编码 cDNA 的表达载体导入具有正常的 O- 连接糖链合成过程的宿主细胞 (例如酵母、昆虫细胞或动物细胞) 中, 并从如此获得的细胞纯化含有正常 O- 连接糖链的 CD27 蛋白, 来获得表达含有正常 O- 连接糖链的 CD27 的细胞。

[0416] 如上获得的糖链缺陷型 CD27、含有正常 O- 连接糖链的 CD27 蛋白或表达细胞, 可用于筛选所需抗体和验证获得的抗体对抗原的反应性。

[0417] 本发明中使用的多肽可以通过使用在《分子克隆实验指南》(第二版) (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989))、《分子生物学现代方法》(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons(1987-1997)) 等中描述的方法根据下述方法, 例如在宿主细胞中表达编码多肽的 DNA 来生产。

[0418] 首先, 通过将全长 cDNA 导入到适合的表达载体的启动子下游而制备重组载体。这时, 如果需要, 可以制备具有适当长度、含有基于全长 cDNA 的多肽的编码区的 DNA 片段, 该 DNA 片段可以代替上述的全长 cDNA 使用。接下来, 通过将重组载体导入适合表达载体的宿主细胞, 可以获得产生多肽的转化体。

[0419] 宿主细胞可以是任何细胞, 只要它具有添加 O- 连接糖链的能力并能够表达目的基因即可, 并包括大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等。

[0420] 表达载体包括能够在供使用的宿主细胞中自主复制的载体, 或者能够整合到染色体中、在适当位置含有适当启动子以使得编码多肽的 DNA 能够被转录的载体。

[0421] 当使用原核生物例如大肠杆菌作为宿主细胞时, 优选情况下, 重组载体可以在原核生物中自主复制, 并含有启动子、核糖体结合序列、在本发明中使用的 DNA 以及转录终止序列。重组载体还可以含有调控启动子的基因。

[0422] 表达载体包括例如 pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (都由 Roche Diagnostics 制造)、pKK233-2 (Pharmacia 制造)、pSE280 (Invitrogen 制造)、pGEMEX-1 (Promega 制造)、pQE-8 (QIAGEN 制造)、pKYP10 (日本公开的未经审查的专利申请 No. 110600/83)、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene 制造)、pTrs30 [从大肠杆菌 JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) 制备]、pTrs32 [从大肠杆菌 JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) 制备]、pGHA2 [从大肠杆菌 IGHA2 (FERM BP-400) 制备, 日本公开的未经审查的专利申请 No. 221091/85]、pGKA2 [从大肠杆菌 IGKA2 (FERM BP-6798) 制备, 日本公开的未经审查的专利申请 No. 221091/85]、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia 制造)、pET 系统 (Novagen 制造)、pME18SFL3, 等等。

[0423] 可以使用任何启动子, 只要它能够在供使用的宿主细胞中起作用即可。实例包括源自于大肠杆菌、噬菌体等的启动子, 例如 trp 启动子 (Ptrp)、lac 启动子、PL 启动子、PR 启

动子和 T7 启动子。此外,也可以使用人工设计和修饰的启动子,例如其中两个 P_{trp} 串联连接的启动子、tac 启动子、lacT7 启动子和 letI 启动子。

[0424] 此外,上述的重组载体优选为质粒,其中作为核糖体结合序列的 Shine-Dalgarno 序列与起始密码子之间的间距被调整到适当的距离(例如 6 到 18 个核苷酸)。在本发明所用的多肽的编码 DNA 的核苷酸序列中,核苷酸能够适当地安排,以获得适合在宿主中表达的密码子,使得目的多肽的生产率可以提高。此外,尽管上述重组载体中的转录终止序列对于表达基因来说不是必需的,但在优选情况下,将转录终止序列布置在紧邻结构基因的下游

[0425] 宿主细胞包括属于大肠杆菌属 (*Escherichia*) 的微生物,其实例包括大肠杆菌 XL1-Blue、大肠杆菌 XL2-Blue、大肠杆菌 DH1、大肠杆菌 MC1000、大肠杆菌 KY3276、大肠杆菌 W1485、大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 HB101、大肠杆菌 No. 49、大肠杆菌 W3110、大肠杆菌 NY49、大肠杆菌 DH5 α , 等等。

[0426] 任何导入重组载体的方法都可以使用,只要它是用于将 DNA 导入到上述宿主细胞中的方法即可,实例包括在 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110 (1972) 中描述的使用钙离子的方法、*Gene*, 17, 107 (1982) 和 *Molecular & General Genetics*, 168, 111 (1979) 等中描述的方法。

[0427] 当动物细胞被用作宿主细胞时,表达载体包括例如 pcDNA1、pcDM8(从 Funakoshi 获得)、pAGE107[日本公开的未经审查的专利申请 No. 22979/91; *Cytotechnology*, 3, 133 (1990)]、pAS3-3(日本公开的未经审查的专利申请 No. 227075/90)、pcDM8[*Nature*, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp(Invitrogen 制造)、pREP4(Invitrogen 制造)、pAGE103[*J. Biochemistry*, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、pKANTEX93(WO 97/10354) 等等。

[0428] 可以使用任何启动子,只要它能够在动物细胞中起作用即可。实例包括细胞肥大病毒 (CMV) 的 IE(立即早期)基因的启动子、SV40 早期启动子、逆转录病毒的启动子、金属硫蛋白启动子、热休克启动子、SR α 启动子等。此外,人类 CMV 的 IE 基因的增强子可以与启动子一起使用。

[0429] 宿主细胞可以是任何宿主细胞,只要它是其中在糖链合成过程中能够向结合到多肽的 Ser/Thr 上的 N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 添加 Gal 的酶、参与酶活性的蛋白或参与尿苷 5' -二磷酸 -半乳糖 (UDP-半乳糖) 运输的蛋白的活性降低或缺失的细胞系即可。具体来说,宿主细胞可以是 Lec8 突变体 [*ACS Symp. Ser.* 128, 214 (1980)], 其是不含 UDP-半乳糖转运蛋白的中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0430] 此外,即使细胞没有参与糖链合成过程的酶活性或转运蛋白活性的缺陷,也可以使用其中酶例如 UDP-半乳糖转运蛋白(也称为 UDP-半乳糖转运体,UGALT)或核心 1 合酶、糖蛋白-n-乙酰半乳糖胺 3- β -半乳糖基转移酶 (C1GALT1,也称为核心 1 β -3-gal-t, t 合酶)或 C1GALT1 特异性伴侣蛋白 1(c1gal t1c1,也称为核心 1 β -3-半乳糖基转移酶特异性分子伴侣 (COSMC), C1GALT2) 的功能,或转运蛋白的功能降低或缺失的细胞株。

[0431] 其中参与糖链合成过程的酶的活性或转运蛋白的活性没有缺失的细胞的实例,包括 Namalwa 细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HBT5637(日本公开的未经审查的专利申请 No. 299/88) 等。

[0432] 用于抑制基因功能的方法的实例包括反义方法、核酶方法 [*Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A., 96, 1886 (1999)]、同源重组方法 [《小鼠胚胎操作实验指南》(第二版) (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994), 《基因定向实用方法》 (Gene Targeting, A Practical Approach), IRL Press at Oxford University Press (1993)]、RNA-DNA 寡核苷酸 (RDO) 方法、RNA 干扰 (RNAi) 方法 [Nature, 391, 806, (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502, (1998), Nature, 395, 854, (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5049, (1999), Cell, 95, 1017, (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1451, (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13959, (1998), Nature Cell Biol, 2, 70, (2000)]、使用反转录病毒的方法、使用转座子的方法 [Nature Genetics, 25, 35, (2000)], 等等。

[0433] 任何导入重组载体的方法都可以使用, 只要它是用于将 DNA 导入到动物细胞中的方法即可, 实例包括电穿孔 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、磷酸钙方法 (日本公开的未经审查的专利申请 No. 227075/90)、脂转染方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)], 等等。

[0434] 作为基因的表达方法, 除了直接表达之外, 还可以按照《分子克隆实验指南》(第二版) (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 中描述的方法进行分泌生产、融合蛋白表达等。当在真核生物来源的细胞中进行表达时, 可以获得添加有糖或糖链的多肽。

[0435] 在本发明中使用的多肽可以通过将如此获得的转化体在培养基中进行培养, 以在培养基中形成和积累多肽并从培养物中回收它来生产。在培养基中培养转化体的方法按照在宿主培养中常用的方法来进行。

[0436] 当用含有可诱导的启动子作为启动子的重组载体转化的微生物被培养时, 如果需要, 可以向培养基加入诱导剂。例如, 当对使用 lac 启动子的重组载体转化的微生物进行培养时, 可以向培养基加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷等, 或者当对使用 trp 启动子的重组载体转化的微生物进行培养时, 可以向其中加入吲哚丙烯酸等。

[0437] 当使用动物细胞作为宿主细胞获得的转化体被培养时, 培养基包括常用的 RPMI 1640 培养基 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle's MEM 培养基 [Science, 122, 501 (1952)]、Dulbecco's 修改的 MEM 培养基 [Virology, 8, 396 (1959)] 以及 199 培养基 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)]、其中添加了胎牛血清等的培养基, 等等。培养一般在存在 5% CO₂ 的情况下, 在 pH 6 到 8 和 30 到 40°C 下进行 1 到 7 天。如果必要, 在培养过程中可以向培养基添加例如卡那霉素或青霉素的抗生素。

[0438] 因此, 在本发明中使用的多肽, 可以通过按照通用的培养方法, 对源自于微生物、动物细胞等的转化体进行培养, 所述转化体包含其中插入了本发明使用的多肽的编码 DNA 的重组载体, 从而形成和积累多肽, 然后从培养物中回收多肽, 来进行生产。

[0439] 对于基因的表达方法来说, 除了直接表达之外, 还可以按照《分子克隆实验指南》(第二版) (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 中描述的方法进行分泌生产、融合蛋白表达等。

[0440] 生产多肽的方法包括在宿主细胞中进行细胞内表达的方法、从宿主细胞进行细胞外分泌的方法、在宿主细胞膜外膜上生产的方法, 等等。适合的方法可以通过改变使用的宿

主细胞和产生的多肽的结构来选择。

[0441] 当在宿主细胞中或宿主细胞膜外膜上生产多肽时,使用 Paulson 等的方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、Lowe 等的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本公开的未经审查的专利申请 No. 336963/93 和 W094/23021 中描述的方法等,可以将基因产物主动分泌到细胞外。

[0442] 此外,按照日本公开的未经审查的专利申请 No. 227075/90 中描述的方法,利用使用二氢叶酸还原酶基因的基因扩增系统,能够增加产量。

[0443] 多肽可以例如如下所述从上述培养物中分离和纯化。

[0444] 当多肽以溶解状态在细胞内表达时,细胞在培养后通过离心回收,悬浮在水性缓冲液中,然后使用超声发生器、French 压力器、Manton Gaulin 匀浆器、珠磨机 (dynomill) 等进行破碎,以获得无细胞提取物。将无细胞提取物进行离心以获得上清液,并可以通过对上清液使用通用的酶分离和纯化技术来获得纯化的制备物,这些技术例如为溶剂抽提,使用硫酸铵等进行盐析,脱盐,用有机溶剂沉淀,使用树脂例如二乙氨基乙基 (DEAE)-琼脂糖凝胶、DIAION HPA-75 (Mitsubishi Chemical 制造) 进行阴离子交换层析,使用树脂例如 S-琼脂糖凝胶 FF (Pharmacia 制造) 进行阳离子交换层析,使用树脂例如丁基-琼脂糖凝胶或苯基-琼脂糖凝胶进行疏水层析,使用分子筛进行凝胶过滤,亲和层析,层析聚焦,电泳例如等点聚焦,等等,它们可以单独或组合使用。

[0445] 当多肽通过形成包涵体在细胞内表达时,细胞以同样的方式回收、破碎和离心,多肽的包涵体作为沉淀级份被收集。将收集的蛋白的包涵体用蛋白变性剂进行溶解。通过对溶解的溶液进行稀释或透析,使蛋白成为正常的三维结构,然后通过上述相同的分离纯化方法获得多肽的纯化产品。

[0446] 此外,本发明中使用的多肽可以通过化学合成方法来生产,例如 Fmoc (苄基甲氧基羰基) 方法或 tBoc (叔丁氧基羰基) 方法。此外,可以使用由 Advanced ChemTech、Perkin-Elmer、Pharmacia、Protein Technology Instrument、Synthecell-Vega、PerSeptive、Shimadzu Corporation 等公司制造的肽合成仪来化学合成。

[0447] (2) 动物的免疫接种和抗体产生细胞的制备

[0448] 使用上面制备的抗原免疫接种 3 到 20 周龄的小鼠、大鼠或仓鼠,并从动物的脾脏、淋巴结或外周血收集抗体产生细胞。此外,当在上述动物中识别由于低的免疫原性而导致的足够的滴度增加时,可以使用 CD27 敲除的小鼠作为供免疫接种的动物。

[0449] 免疫接种通过给动物皮下、静脉内或腹膜内注射抗原连同适合的佐剂 (例如完全 Freund' s 佐剂,氢氧化铝凝胶与百日咳疫苗的组合等) 来进行。当抗原是部分肽时,用载体蛋白例如 BSA (牛血清白蛋白)、KLH (匙孔血蓝蛋白) 等产生偶联物,将其用作抗原。

[0450] 在第一次给药后,抗原的给药每一周或每两周内进行 5 到 10 次。在每次给药后的第三到第七天,从眼底收集血液样品,通过例如酶法免疫分析 [《抗体实验指南》, Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory (1988))] 等测试血清与抗原的反应性。在其血清中显示出针对于免疫接种抗原的足够的抗体滴度的小鼠、大鼠或仓鼠,被用作抗体产生细胞的供应源。

[0451] 在抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的融合中,在最后一次给药抗原后的第三到第七天,切除含有抗体产生细胞的组织例如来自被免疫接种的小鼠、大鼠或仓鼠的脾脏,

以收集抗体产生细胞。当使用脾脏细胞时,将切除的脾脏置于 MEM 培养基中 (Nissui Pharmaceutical),用镊子打散,并离心 (1200rpm,5 分钟)。然后,丢弃上清液,加入 Tris-氯化铵缓冲液 (pH 7.65)1 到 2 分钟以除去红细胞。在用 MEM 培养基洗 3 次后,提供了用于融合的抗体产生细胞。

[0452] (3) 骨髓瘤细胞的制备

[0453] 从小鼠获得的已建立的细胞系被用作骨髓瘤细胞。例子包括 8- 氮杂鸟嘌呤抗性小鼠 (源自于 BALB/c 小鼠) 的骨髓瘤细胞系 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1-7 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41 (NS-1) [European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)]、SP2/0-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269-270 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)]、P3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495-497 (1975)], 等等。将这些细胞系在 8- 氮杂鸟嘌呤培养基中传代培养 [该培养基是将谷氨酰胺 (1.5mM)、2- 巯基乙醇 (5×10^{-5} M)、庆大霉素 (10 μ g/ml) 和胎牛血清 (FCS) 加入到 RPMI-1640 培养基 (在后文中称为“正常培养基”) 中,并再加入 8- 氮杂鸟嘌呤 (15 μ g/ml)], 并且在细胞融合之前将它们正常培养基中传代培养 3 或 4 天,以确保在进行融合的当天细胞数量达到 2×10^7 个或以上。

[0454] (4) 细胞融合

[0455] 将上述的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞用 MEM 培养基或 PBS (1.83g 磷酸氢二钠, 0.21g 磷酸二氢钾, 7.65g 氯化钠, 1 升蒸馏水, pH 7.2) 进行充分清洗和混合,使抗体产生细胞:骨髓瘤细胞的比率 = 5-10 : 1, 然后离心 (1200rpm, 5 分钟)。然后丢弃上清液,将沉淀的细胞群充分打散。向 10^8 个抗体产生细胞中,在 37°C 下在搅拌下加入 0.2 到 1mL 2g 聚乙二醇-1000 (PEG-1000)、2mL MEM 和 0.7mL 二甲亚砷的混合物溶液,每 1 或 2 分钟加入 1 到 2mL MEM 培养基数次,并加入 MEM 培养基使得总量为 50mL。离心 (900rpm, 5 分钟) 后,将上清液丢弃,轻轻地将细胞打散,通过使用移液管吹吸,将细胞轻柔地悬浮在 100mL HAT 培养基中 [该培养基是添加了次黄嘌呤 (10^{-4} M)、胸腺嘧啶 (1.5×10^{-5} M) 和氨基蝶呤 (4×10^{-7} M) 的正常培养基]。将悬浮液以 100 μ L/孔分配到 96 孔培养板上,在 5% CO₂ 的培养箱中在 37°C 培养 7 到 14 天。

[0456] 培养后,将部分培养上清液作为样品,通过下面描述的结合分析方法选择对含有本发明中使用的多肽的抗原具有反应性而对不包含多肽的抗原没有反应性的杂交瘤。

[0457] 然后,通过有限稀释方法进行两次克隆 [第一次使用 HT 培养基 (其中除去了氨基蝶呤的 HAT 培养基),第二次使用正常培养基],选择显示出稳定的高抗体滴度的杂交瘤作为生产单克隆抗体的杂交瘤。

[0458] (5) 单克隆抗体的制备

[0459] 将在 (4) 中获得的产生抗 CD27 单克隆抗体的杂交瘤细胞,以 2×10^6 到 5×10^7 个细胞/动物的剂量通过腹膜内注射给药于 8 到 10 周龄的鲨肝油烷处理过的小鼠或裸鼠中 (0.5ml 2, 6, 10, 14- 四甲基十五烷 (鲨肝油烷) 腹膜内注射,然后饲养 2 周)。杂交瘤在 10 到 21 天内发展成腹水肿瘤。从小鼠收集腹水液,离心 (3,000rpm, 5 分钟) 以除去固形物,用 40 到 50% 饱和的硫酸铵进行盐析,然后用辛酸沉淀,通过 DEAE- 琼脂糖凝胶柱、蛋白 A 柱或凝胶过滤柱,收集 IgG 或 IgM 级份作为纯化的单克隆抗体。

[0460] 抗体的亚类可以使用亚类分型试剂盒通过酶法免疫分析来确定。蛋白的量可以通

过 Lowry 方法或 280nm 处的吸光度来测定。

[0461] (6) 结合分析

[0462] 通过将含有本发明使用的 CD27 多肽的编码 cDNA 的表达载体导入到大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等中而获得的导入了基因的细胞或重组蛋白、或从人类组织获得的纯化的多肽或部分肽,被用作抗原。当抗原是部分肽时,使用 BSA(牛血清白蛋白)或 KLH(匙孔血蓝蛋白)等制备结合物并使用。

[0463] 在通过分配到 96 孔板中使这些抗原进入固相层后,在其中分配作为第一抗体的免疫动物的血清、产生单克隆抗体的杂交瘤的培养上清液或纯化的抗体,并进行反应。在用 PBS 或 PBS-0.05% Tween 充分清洗后,在其中分配作为第二抗体的用生物素、酶、化学发光物质、放射性化合物等标记的抗免疫球蛋白抗体,并进行反应。在用 PBS-Tween 充分清洗后,对第二抗体的标记物质作出响应进行反应。

[0464] 与如此获得的单克隆抗体竞争与 CD27 的细胞外区域结合的抗体,可以通过向上面提到的结合检测系统加入待测试抗体并进行反应,来制备。也就是说,与如此获得的单克隆抗体竞争与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域结合的单克隆抗体,可以通过进行当加入待测试抗体时单克隆抗体的结合被抑制的抗体的筛选来制备。

[0465] 此外,与识别糖链缺陷型 CD27 并结合其细胞外区域的单克隆抗体所识别的表位结合的抗体,可以通过使用上面提到的结合检测系统鉴定获得的抗体的表位,并构建所鉴定到的表位的部分糖链结合肽或模拟表位三维结构的糖链结合肽,然后进行免疫接种来获得。

[0466] 2. 重组抗体的制备

[0467] 作为重组抗体的生产实例,下面显示了用于生产人类嵌合抗体和人源化抗体的方法。

[0468] (1) 表达重组抗体的载体的构建

[0469] 表达重组抗体的载体是用于动物细胞的、其中插入了编码人类抗体的 CH 和 CL 的 DNA,并通过将每个编码人类抗体的 CH 和 CL 的 DNA 克隆到动物细胞表达载体中来构建的表达载体。

[0470] 人类抗体的 C 区可以是任何人类抗体的 CH 和 CL。实例包括属于 $\gamma 1$ 亚类的 CH、属于 κ 亚类的 CL 等。对于编码人类抗体的 CH 和 CL 的 DNA 来说,可以使用含有外显子和内含子的染色体 DNA 或 cDNA。对于动物细胞的表达载体来说,可以使用任何表达载体,只要其中能够插入并表达编码人类抗体 C 区的基因即可。实例包括 pAGE107[Cytotechnol., 3, 133-140(1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307(1987)]、pHSG274[Gene, 27, 223(1984)]、pKCR[Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 1527(1981)]、pSG1 β d2-4[Cytotechnol., 4, 173(1990)]、pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol., 13, 79(1993)], 等等。用于动物细胞的表达载体的启动子和增强子的实例包括 SV40 早期启动子 [J. Biochem., 101, 1307(1987)]、莫洛尼小鼠白血病病毒 LTR[Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960-968(1987)]、免疫球蛋白 H 链启动子 [Cell, 41, 479(1985)] 和增强子 [Cell, 33, 717(1983)], 等等。

[0471] 用于重组抗体表达的载体可以是其中抗体的 H 链编码基因和 L 链编码基因存在于分开的载体上的类型,也可以是其中两个基因存在于同一个载体上的类型(串联类型)。对于构建用于重组抗体表达的载体的容易性、导入动物细胞的容易性、以及动物细

胞中抗体 H 链和 L 链的表达量之间的平衡来说,串联类型的表达重组抗体的载体更为优选 [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]。串联类型的用于表达重组抗体的载体的实例包括 pKANTEX93 (WO 97/10354)、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)], 等等。

[0472] (2) 源自非人类动物的抗体 V 区的编码 cDNA 的获得及氨基酸序列分析

[0473] 编码源自非人类动物的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 可以按照下面的方式获得。

[0474] 从产生源自非人类动物的抗体的杂交瘤细胞提取 mRNA 用于合成 cDNA。将合成的 cDNA 克隆到载体例如噬菌体或质粒中以制备 cDNA 文库。通过使用编码非人类动物抗体的 C 区或 V 区的一部分的 DNA 作为探针,从文库中分离每个含有编码 VH 或 VL 的 cDNA 的重组噬菌体或重组质粒。测定重组噬菌体或重组质粒上目的源于非人类动物抗体的 VH 和 VL 的全长核苷酸序列,并从核苷酸序列推导出 VH 和 VL 的全长氨基酸序列。

[0475] 非人类动物可以是任何动物,例如小鼠、大鼠、仓鼠或兔,只要可以从其生产杂交瘤细胞即可。

[0476] 从杂交瘤细胞制备总 RNA 的方法的实例,包括硫氰酸胍-三氟乙酸铯方法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)] 等。从总 RNA 制备 mRNA 的方法的实例,包括固定化有寡聚 (dT) 的纤维素柱的方法 [《分子克隆实验指南》(第二版), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], 等等。此外,用于从杂交瘤细胞制备 mRNA 的试剂盒的实例包括 Fast Track mRNA 分离试剂盒 (Invitrogen 制造)、Quick Prep mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 制造), 等等。

[0477] 用于合成 cDNA 和制备 cDNA 文库的方法的实例,包括已知方法 [《分子克隆实验指南》Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989), 《分子生物学现代方法》Current Protocols in Molecular Biology, 附录 1-34], 使用可商购试剂盒的方法,例如用于 cDNA 合成和质粒克隆的 SuperScript™ 质粒系统 (GIBCO BRL 制造)、ZAP-cDNA 合成试剂盒 (Stratagene 制造), 等等。

[0478] 其中插入使用从杂交瘤细胞提取的 mRNA 作为模板合成的 cDNA、用于制备 cDNA 文库的载体,可以是任何载体,只要可以插入 cDNA 即可。实例包括 ZAP Express [Strategies, 5, 58-61 (1992)], pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)], λ zap II (Stratagene 制造)、λ gt10 和 λ gt11 [《DNA 克隆实用方法》DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49 (1985)], Lambda BlueMid (Clontech 制造)、λ ExCell 和 pT7T318U (Pharmacia 制造)、pcD2 [Molecular & Cellular Biology, 3, 280 (1983)], pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)], 等等。

[0479] 可以使用任何用于导入通过噬菌体或质粒载体所构建的 cDNA 文库的大肠杆菌,只要 cDNA 文库可以被导入、表达并维持即可。实例包括 XL 1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)], C600 [Genetics, 39, 440 (1954)], Y1088 和 Y1090 [Science, 222:778 (1983)], NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)], K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)], JM105 [Gene, 38, 275 (1985)], 等等。

[0480] 使用同位素或荧光标记的探针进行菌落杂交或噬斑杂交的方法,可用于从 cDNA 文库中筛选编码非人类动物来源的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 克隆 [《分子克隆实验指南》(第二版), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]。此外,编码 VH 和 VL 的 cDNA,可以通过制备引物并使用从 mRNA

制备的 cDNA 或 cDNA 文库作为模板进行聚合酶链反应（在后文中称为“PCR”），来制备 [《分子克隆实验指南》（第二版），Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 《分子生物学现代方法》，Current Protocols in Molecular Biology, 附录 1-34]。

[0481] cDNA 的核苷酸序列可以如下确定：用适合的限制性酶等消化通过上述方法筛选的 cDNA，将片段克隆到质粒例如 pBluescript SK(-) (Stratagene 制造) 中，通过常用的核苷酸分析方法例如 Sanger, F. 等的双脱氧方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] 进行反应，然后使用自动化核苷酸序列分析仪例如 A. L. F. DNA 测序仪 (Pharmacia 制造) 来分析序列。

[0482] 获得的 cDNA 是否编码含有分泌信号序列的抗体的 VH 和 VL 的完整氨基酸序列，可以通过从测定的核苷酸序列估计出 VH 和 VL 的全长氨基酸序列，并将它们与已知抗体的 VH 和 VL 的全长氨基酸序列进行比较 [《免疫重要的蛋白序列》，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 美国健康与人类服务部, (1991)], 来验证。将含有分泌信号序列的抗体的 VH 和 VL 的全长氨基酸序列与已知抗体的 VH 和 VL 的全长氨基酸序列 [《免疫重要的蛋白的序列》，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 美国健康与人类服务部, (1991)] 进行比较，可以推导出分泌信号序列的长度和 N- 末端氨基酸序列，并且也可以知道它们所属的亚类。此外，VH 和 VL 的每个 CDR 的氨基酸序列，可以通过将获得的氨基酸序列与已知抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列 [《免疫重要的蛋白的序列》，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 美国健康与人类服务部, (1991)] 进行比较来发现。

[0483] 此外，通过使用 VH 和 VL 的全长氨基酸序列在任何数据库例如 SWISS-PROT 或 PIR-Protein 等中进行序列同源性搜索，例如按照 BLAST 方法 [J. Mol. Biol, 215, 403 (1990)] 等，可以检查序列的新颖性。

[0484] (3) 人类嵌合抗体表达载体的构建

[0485] 将编码非人类动物的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA，克隆到上面 2(1) 中提到的重组抗体表达载体中人类抗体的 CH 或 CL 编码基因的上游，从而构建了人类嵌合抗体表达载体。例如，将每个编码非人类动物的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 与合成的 DNA 进行连接，所述合成的 DNA 含有非人类动物的抗体的 VH 或 VL 的 3' - 端核苷酸序列和人类抗体的 CH 或 CL 的 5' - 端核苷酸序列，并在两端具有适当的限制性酶的识别序列，并进行克隆，以便它们每个都以适当的形式表达在上面 2(1) 中提到的人源化抗体表达载体中编码人类抗体的 CH 或 CL 的基因的上游，从而构建了人类嵌合抗体表达载体。此外，使用在两端具有适当的限制性酶识别序列的合成的 DNA，通过 PCR 扩增了编码非人类动物的 VH 或 VL 的 cDNA，并将它们每个克隆到上面 2(1) 中提到的重组抗体表达载体中。

[0486] (4) 人源化抗体 V 区的编码 cDNA 的构建

[0487] 编码人源化抗体的 VH 或 VL 的 cDNAs 可以如下获得。首先，选择人类抗体的 VH 或 VL 中的架构区（在后文中称为“FR”）的氨基酸序列，在该序列中移植源自非人类动物的抗体的 VH 或 VL 中 CDR 的氨基酸序列。可以使用人类抗体的 VH 或 VL 中 FR 的任何氨基酸序列，只要它们来自人类即可。实例包括在数据库例如蛋白数据库 (Protein Data Bank) 等中登记的人类抗体的 VH 或 VL 中 FR 的氨基酸序列、在人类抗体的 VH 或 VL 中 FR 的亚类共有的氨基酸序列 [《免疫重要的蛋白的序列》，Sequences of Proteins of Immunological

Interest,美国健康与人类服务部,(1991)],等等。为了抑制抗体的结合活性,选择与原始抗体的 VH 或 VL 中 FR 的氨基酸序列具有高度同源性(至少 60%或以上)的氨基酸序列。然后,将原始抗体的 VH 或 VL 的 CDR 的氨基酸序列分别移植到人类抗体的 VH 或 VL 中 FR 的选定氨基酸序列中,以设计人源化抗体的每个 VH 或 VL 的氨基酸序列。通过考虑在抗体基因的核苷酸序列[《免疫重要的蛋白的序列》,Sequences of Proteins of Immunological Interest,美国健康与人类服务部,(1991)]中发现的密码子使用频率,将设计的氨基酸序列转化成 DNA 序列,设计了编码人源化抗体的 VH 或 VL 的氨基酸序列的 DNA 序列。根据设计的核苷酸序列,合成几个长度约为 100 个核苷酸的合成 DNA,并使用它们进行 PCR。在这种情况下,鉴于 PCR 反应的效率和可以合成的 DNA 的长度,优选在每个 H 链和 L 链中设计 6 个合成的 DNA。

[0488] 此外,通过在存在于两端上的合成的 DNA 的 5' - 末端引入适当的限制性酶的识别序列,可以将编码人源化抗体的 VH 或 VL 的 cDNA 容易地克隆到在本部分 2 的 (1) 中构建的用于人源化抗体的表达载体中。在 PCR 后,将扩增产物克隆到质粒例如 pBluescript SK(-) (Stratagene 制造) 等中,按照在本部分 2 (2) 中描述的方法测定核苷酸序列,从而获得了具有所需人源化抗体的 VH 或 VL 的氨基酸序列的编码 DNA 序列的质粒。

[0489] (5) 人源化抗体 V 区的氨基酸序列的修饰

[0490] 已经知道,当通过仅仅将非人类动物的抗体的 VH 和 VL 中的 CDR 简单地移植到人类抗体的 VH 和 VL 的 FR 中来生产人源化抗体时,它的抗原结合活性比来自非人类动物的原始抗体的抗原结合活性低 [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。因此,据认为,不仅在 CDR 而且在 FR 中的几个氨基酸残基,与非人类动物来源的原始抗体的 VH 和 VL 中的抗原结合活性直接或间接相关,并且作为 CDR 移植的结果,这些氨基酸残基被改变成了人类抗体的 VH 和 VL 中 FR 的不同的氨基酸残基。为了在人 -CDR 移植的抗体中解决这个问题,在人类抗体的 VH 和 VL 中 FR 的氨基酸序列中,鉴定了直接与结合抗原相关的氨基酸残基、或通过与 CDR 中的氨基酸残基相互作用或通过维持抗体的三维结构间接地与结合抗原相关的氨基酸残基,并将其修饰成在非人类动物的原始抗体中发现的氨基酸残基,从而使已经降低的抗原结合活性增加 [BIO/TECHNOLOGY, 9, 266 (1991)]。在人源化抗体的生产中,最重要的是如何有效地鉴定 FR 中与抗原结合活性有关的氨基酸残基,以便构建抗体的三维结构,并通过 X-射线晶体学 [J. Mol. Biol, 112, 535 (1977)]、计算机模拟 [Protein Engineering, 7, 1501 (1994)] 等进行分析。尽管抗体三维结构的信息在人源化抗体的生产中是有用的,但还没有建立起能够适用于任何抗体的生产人源化抗体的方法。因此,现在必须进行各种不同的尝试,例如,生产每个抗体的几种修饰抗体,并检验每种修饰抗体与其抗体结合活性之间的相关性。

[0491] 人类抗体的 VH 和 VL 中 FR 的氨基酸序列的修饰可以使用各种不同的用于修饰的合成 DNA,按照本部分 2 (4) 中描述的 PCR 来进行。对于通过 PCR 获得的扩增产物来说,核苷酸序列按照本部分 2 (2) 中描述的方法来测定,以便验证目的修饰是否已经发生。

[0492] (6) 人源化抗体表达载体的构建

[0493] 人源化抗体表达载体可以通过将构建的重组抗体的 VH 或 VL 的每个编码 cDNA,克隆到在本部分 2 (1) 中描述的用于表达人源化抗体的载体中人类抗体的 CH 或 CL 的每个编码基因的上游中来构建。

[0494] 例如,当适合的限制性酶的识别序列被引入到在本部分 2 (4) 和 2 (5) 中构建人源

化抗体的 VH 或 VL 中使用的合成 DNA 中位于两端的合成 DNA 的 5' - 末端中时,克隆能够进行,以便它们在本部分 2(1) 中描述的用于表达人源化抗体的载体中,在每个编码人类抗体的 CH 或 CL 的基因的上游中以适当的形式表达。

[0495] (7) 重组抗体的瞬时表达

[0496] 为了有效评估产生的各种不同的人源化抗体的抗原结合活性,可以使用在本部分 2(3) 和 2(6) 中描述的人源化抗体表达载体或其修改的表达载体来瞬时表达重组抗体。任何细胞都可以用作宿主细胞,只要宿主细胞能够表达重组抗体即可。一般来说使用 COS-7 细胞(ATCC CRL1651),因为它的表达量高 [Methods in Nucleic Acids Research, CRC Press, 283(1991)]。将表达载体导入 COS-7 细胞的方法的实例,包括 DEAE- 葡聚糖方法 [Methods in Nucleic Acids Research, CRC Press, 283(1991)]、脂转染方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)], 等等。

[0497] 导入表达载体之后,在培养上清液中重组抗体的表达量和抗原结合活性,可以通过酶法免疫分析 [在后文中称为“ELISA”;《单克隆抗体:原理和实践》(第三版), Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996);《抗体实验指南》, Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988);《单克隆抗体实验手册》, Monoclonal Antibody Experiment Manual, Kodansha Scientific(1987)] 等来测定。

[0498] (8) 重组抗体的稳定表达

[0499] 稳定表达重组抗体的转化体,可以通过将本部分 2(3) 和 (6) 中描述的重组抗体表达载体导入到适合的宿主细胞中来获得。

[0500] 将表达载体导入宿主细胞的方法的实例包括电穿孔 [日本出版的未经审查的专利申请 No. 257891/90, Cytotechnology, 3, 133(1990)] 等。

[0501] 对于在其中导入重组表达载体的动物细胞来说,可以使用任何细胞,只要它是能够产生重组抗体的动物细胞即可。实例包括小鼠 SP2/0-Ag14 细胞(ATCC CRL1581)、小鼠 P3X63-Ag8.653 细胞(ATCC CRL1580)、两种中华仓鼠卵巢细胞 CHO/dhFr- 细胞(ATCC CRL9096) 和 CHO/DG44 细胞 [Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555(1986)]、获得外源凝集素抗性的 Lec13 [Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55(1986)]、其中 1,6- 岩藻糖基转移酶基因缺陷的 CHO 细胞 (WO 05/35586)、大鼠 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞(ATCC CRL1662) 等。除了上述宿主细胞之外,也可以使用其中导入的蛋白例如与细胞内糖核苷酸 GDP- 岩藻糖的合成相关的酶、蛋白例如与其中岩藻糖的 1- 位通过 α 键连接到复合类型的 N- 糖苷连接的糖链中还原末端中 N- 乙酰葡萄糖胺的 6- 位上的糖链的修饰相关的酶、或与细胞内糖核苷酸 GDP- 岩藻糖向高尔基体的运输相关的蛋白的活性降低或缺失的宿主细胞,优选为 WO 05/35586、WO 02/31140 等中描述的其中缺陷了 α 1,6- 岩藻糖基转移酶基因的 CHO 细胞。

[0502] 在导入表达载体之后,按照在日本公开的未经审查的专利申请 No. 257891/90 中公开的方法,通过在含有药剂例如硫酸 G418 (在后文中称为“G418”,由 Sigma 制造) 等的用于动物细胞培养的培养基中进行培养,来筛选稳定地表达重组抗体的转化体。用于动物细胞培养的培养基的实例包括 RPMI1640 培养基 (Invitrogen 制造)、GIT 培养基 (Nissui Pharmaceutical 制造)、EX-CELL301 培养基 (JRH 制造)、IMDM 培养基 (Invitrogen) 制造、

杂交瘤-SFM培养基(Invitrogen制造)、通过在培养基中加入各种不同的添加物例如胎牛血清(在后文中称为“FCS”)而获得的培养基,等等。通过将选出的转化体在培养基中进行培养,重组抗体可以生产并积累在培养上清液中。培养上清液中重组抗体的表达量和抗原结合活性可以通过ELISA等测定。此外,在转化体中,可以按照日本公开的未经审查的专利申请No. 257891/90中公开的方法,通过使用dhfr扩增系统等来增加重组抗体的表达量。

[0503] 可以通过使用蛋白A柱,从转化体的培养上清液中纯化重组抗体[《单克隆抗体:原理和实践》,Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Academic Press Limited(1996);《抗体实验室指南》,Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]。可以使用任何用于蛋白纯化的其他常规方法。例如,重组抗体可以通过凝胶过滤、离子交换层析、超滤等的组合来纯化。纯化的重组抗体的H链或L链或完整抗体分子的分子量可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(在后文中称为“SDS-PAGE”)[Nature, 227, 680(1970)]、Western印迹[《单克隆抗体:原理和实践》(第三版), Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press(1996);《抗体实验室指南》, Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)]等来测定。

[0504] 3. 本发明的抗体或抗体片段的活性评估

[0505] 本发明的纯化的抗体或抗体片段的反应特异性可以按照下列步骤进行评估。

[0506] 使用表达正常糖链的细胞以及其中在O-连接糖链合成过程中,向结合到多肽的Ser/Thr上的GalNAc添加Gal的酶、参与酶活性的蛋白、或参与尿苷5'-二磷酸-半乳糖(UDP-半乳糖)运输的蛋白的活性降低或缺失的细胞系作为宿主,可以分别构建表达CD27编码核苷酸序列(SEQ ID NO:1)的CD27表达细胞。通过这种方式,可以构建表达具有正常的O-连接糖链的CD27的细胞以及表达糖链缺陷型CD27的细胞,并通过ELISA、荧光抗体技术[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]等评估表达每种CD27的细胞系与纯化抗体的反应性。

[0507] 或者,将CD27的细胞外区域以可溶形式例如融合蛋白表达在每种上面提到的宿主细胞中,并在适合条件下纯化,以制备保留了三维结构的相应CD27可溶性蛋白。融合蛋白的实例可以包括CD27蛋白与另一种多肽例如抗体恒定区(也称为Fc)、GST标签、组氨酸标签(也称为His标签)或Myc标签的融合物。融合蛋白可以使用亲和柱例如蛋白A、镍柱、特异性抗体柱等进行分离和纯化。纯化的CD27可溶性蛋白与纯化的抗体的反应性,可以通过表面等离子体共振(SPR)辅助的BIAcore™、ELISA、免疫沉淀等方法来测量[《单克隆抗体原理与应用》(第三版), Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Third edition, Academic Press(1996),《抗体实验室指南》, Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]。

[0508] 对表达糖链缺陷型CD27的培养的细胞系的细胞毒性活性,可以通过按照已知方法测量CDC活性、ADCC活性等,来进行评估[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]。

[0509] 4. 使用本发明的特异性识别糖链缺陷型CD27并也与其细胞外区域结合的单克隆抗体或抗体片段诊断疾病的方法

[0510] 可以通过使用本发明的抗体或抗体片段检测或定量糖链缺陷型 CD27 或表达多肽的细胞,来诊断与糖链缺陷型 CD27 相关的疾病。

[0511] 与糖链缺陷型 CD27 相关的疾病可以是任何疾病,只要它是其中在体内发现了糖链缺陷型 CD27 多肽表达细胞的疾病即可。具体来说,它可以是 IgA 型肾病或癌症。癌症的实例可以包括源自 B 或 T 细胞分化过程的癌症,具体来说是各种非霍奇金氏淋巴瘤,其包括套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、MALT 淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、浆细胞瘤等。

[0512] 对于用于本发明的糖链缺陷型 CD27 多肽的检测或测量的活体样品没有具体限制,只要它可能含有多肽即可,例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便物、组织液或培养基。

[0513] 在与糖链缺陷型 CD27 相关的疾病中,例如 IgA 型肾病的诊断可以下述方式进行。

[0514] 在从两个或多个健康人的活体收集活体样品后,通过采用免疫学手段使用本发明的抗体或抗体片段或其衍生物进行糖链缺陷型 CD27 多肽的检测或测量,来验证健康人活体样品中多肽的表达量。通过以同样方式也检测被测试人的活体样品中多肽的表达量,将表达量与健康人中的表达量进行比较。当被测试人中多肽的表达量与健康人相比增加时,可以诊断癌症阳性。

[0515] 在与糖链缺陷型 CD27 相关的疾病中,例如癌症的诊断可以下述方式进行。

[0516] 在从两个或多个健康人的活体收集活体样品后,通过采用免疫学手段使用本发明的抗体或抗体片段或其衍生物进行糖链缺陷型 CD27 多肽的检测或测量,来验证健康人活体样品中多肽的表达量。通过以同样方式也检测被测试人的活体样品中多肽的表达量,将表达量与健康人中的表达量进行比较。当被测试人中多肽的表达量与健康人相比增加时,可以诊断癌症阳性。

[0517] 包含本发明的抗体或抗体片段或其衍生物的诊断试剂,还可以包含用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测依赖于所需诊断方法的反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲液、盐等。用于检测的试剂包括用于常规免疫检测或免疫测定法的试剂,例如抗体或其抗体片段、其衍生物、用于识别抗体、抗体片段或其衍生物的标记的第二抗体,以及对应标记的底物。

[0518] 作为检测或测定本发明的糖链缺陷型 CD27 的量的方法,可以包括任何已知方法。例如,可以例举的是免疫检测方法或免疫测定法。

[0519] 免疫检测或免疫测定法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体的量或抗原的量的方法。免疫检测或免疫测定法的实例是放射活性物质标记的免疫抗体方法 (RIA)、酶免疫测定法 (EIA 或 ELISA)、荧光免疫测定法 (FIA)、发光免疫测定法、Western 印迹法、物理化学手段 (TIA、LAPIA 和 PCIA) 等。

[0520] 放射活性物质标记的免疫抗体方法 (RIA) 的实例包括这样的方法,其中使本发明的抗体或抗体片段与抗原或表达抗原的细胞进行反应,然后将进行了放射活性标记的抗免疫球蛋白抗体或其结合片段与其进行反应,然后使用闪烁计数器等进行检测。

[0521] 酶免疫测定法 (EIA 或 ELISA) 的实例包括这样的方法,其中使本发明的抗体或抗体片段与抗原或表达抗原的细胞进行反应,然后将进行了抗体标记的抗免疫球蛋白抗体或其结合片段与其进行反应,然后通过分光光度计测量有色颜料,并且可以使用例如夹心

ELISA。作为在酶免疫测定法中使用的标记物,可以使用已经描述的任何酶标记物 (Eiji Ishikawa 等主编的《酶免疫测定法》, Enzyme Immunoassay, 由 Igaku Shoin 出版)。实例包括碱性磷酸酶标记、过氧化物酶标记、萤光素酶标记、生物素标记等。

[0522] 夹心 ELISA 是其中将抗体结合到固相上,捕获待检测或测量的抗原,并使另一种抗体与被捕获的抗原反应的方法。在 ELISA 中,制备了两种识别待检测或测量的抗原的抗体或其抗体片段,其中抗原识别位点是不同的,并将一种抗体或抗体片段预先吸附在板(例如 96 孔板)上,将另一种抗体或抗体片段用荧光物质例如 FITC、酶例如过氧化物酶或生物素进行标记。使吸附有上述抗体的板与从活体分离的细胞或其破碎的细胞悬液、组织或其分解溶液、培养的细胞、血清、胸膜腔积液、腹水、眼溶液等进行反应,然后使其与标记的单克隆抗体或抗体片段反应,并进行与标记物质相对应的检测反应。当通过方法测量待测试样品中的抗原浓度时,可以从已知浓度的抗原的逐步稀释液制备的校正曲线计算出待测试样品中的抗原浓度。作为用于夹心 ELISA 的抗体来说,可以使用任何多克隆抗体和单克隆抗体,或者可以使用抗体片段例如 Fab、Fab' 和 F(ab)₂。对于在夹心 ELISA 中使用的两种抗体的组合来说,可以使用识别不同表位的单克隆抗体或抗体片段的组合,或者可以使用多克隆抗体与单克隆抗体或抗体片段的组合。

[0523] 荧光免疫测定法 (FIA) 包括文献中描述的方法 [《单克隆抗体原理与应用》(第三版), Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third Edition, Academic Press(1996);《单克隆抗体实验手册》, Manual for Monoclonal Antibody Experiments, Kodansha Scientific(1987)] 等。对于荧光免疫测定法的标记物来说,可以使用已经描述的任何已知荧光标记物(《荧光免疫测定法》, Fluorescent Immunoassay, Akira Kawao, Soft Science)。实例包括 FITC 标记、RITC 标记等。

[0524] 发光免疫测定法可以使用《单克隆抗体原理与应用》(第三版)(Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third Edition, Academic Press(1996))、《单克隆抗体实验手册》(Manual for Monoclonal Antibody Experiments, Kodansha Scientific(1987)) 等中描述的方法来进行。对于用于发光免疫测定法的标记物来说,可以包含上面描述的任何已知发光标记物 [《生物发光和化学发光》, Bioluminescence and Chemical Luminescence, Hirokawa Shoten ;Rinsho Kensa, 42(1998)]。实例包括吖啶酯标记,洛粉碱标记等也可以使用。

[0525] Western 印迹是这样的方法,其中将抗原或表达抗原的细胞通过 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分级 [《抗体实验指南》, Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)], 将凝胶转印到 PVDF 膜或硝酸纤维素膜上,使膜与识别抗原的抗体或抗体片段进行反应,进一步使其与用荧光物质例如 FITC、酶标记物例如过氧化物酶、生物素标记等标记的抗小鼠 IgG 抗体或抗体片段进行反应,并使标记物可视化以验证反应。Western 印迹的实例如下所述。

[0526] 在还原条件下,将其中表达具有 SEQ ID NO :2 显示的氨基酸序列的多肽的细胞或组织溶解在溶液中,通过 SDS-PAGE 方法对每道 0.1 到 30 μ g 的蛋白量进行电泳。将电泳后的蛋白转移到 PVDF 膜上,并使其与含有 1% BSA 的 PBS(在后文中称为“BSA-PBS”) 在室温下反应 30 分钟进行阻断。此时,将本发明的单克隆抗体与其进行反应,用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS(在后文中称为“吐温-PBS”) 清洗,并使其与过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG

抗体在室温下反应 2 小时。将其用吐温 -PBS 清洗,使用 ECL™ Western 印迹检测试剂(由 Amersham 制造)等检测结合有单克隆抗体的条带,从而检测具有 SEQ ID NO:2 显示的氨基酸序列的多肽。对于在 Western 印迹中用于检测的抗体来说,使用能够与不具有天然类型的三维结构的多肽结合的抗体。

[0527] 具体来说,物理化学方法使用本发明的抗体或抗体片段来进行,通过将作为抗原的 CD27 与本发明的抗体或抗体片段进行反应以形成聚集体,并检测该聚集体。物理化学方法的其他实例包括毛细管方法、一维免疫扩散方法、免疫比浊法和乳胶免疫比浊法[《临床测试方法手册》, Handbook of Clinical Test Methods, Kanehara Shuppan, 499(1988)]。

[0528] 例如,在乳胶免疫扩散法中,可以使用载体、例如用抗体或抗原致敏的粒径约为 0.1 到 1 μm 的聚苯乙烯乳胶,当使用相应的抗原或抗体进行抗原-抗体反应时,反应溶液中的散射光增加而透射光降低。当这样的变化作为吸光值或整体球体浊度被检测到时,就可以测量待测试样品中的抗原浓度等。

[0529] 因为本发明的抗体或抗体片段能够结合糖链缺陷型 CD27 多肽的细胞外区域,因此它优选用于检测表达多肽的细胞。

[0530] 为了检测表达多肽的细胞,可以使用已知的免疫检测方法,并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外,也可以使用利用 FMAT 8100 HTS 系统(Applied Biosystem)等的免疫荧光染色法。

[0531] 免疫沉淀法是这样的方法,其中使表达多肽的细胞与本发明的单克隆抗体或抗体片段进行反应,然后加入对免疫球蛋白具有特异性结合能力的载体例如蛋白 G-琼脂糖凝胶,使得抗原-抗体复合物沉淀。此外,可以执行下述方法。

[0532] 将上述本发明的抗体或抗体片段固相化在用于 ELISA 的 96 孔板上,然后用 BSA-PBS 阻断。当抗体处于未纯化状态例如是杂交瘤细胞的培养上清液时,将抗小鼠免疫球蛋白或大鼠免疫球蛋白或蛋白 A 或 G 等的抗体预先吸附在用于 ELISA 的 96 孔板上,并用 BSA-PBS 阻断,然后向其分发杂交瘤细胞的培养上清液进行结合。在丢弃 BSA-PBS 并将残留物用 PBS 充分清洗后,与表达具有 SEQ ID NO:2 显示的氨基酸序列的多肽的细胞或组织的溶解溶液进行反应。使用用于 SDS-PAGE 的样品缓冲液将免疫沉淀物从充分清洗的板中提取出来,并通过上述的 Western 印迹进行检测。

[0533] 免疫细胞染色方法和免疫组织染色方法是免疫荧光染色方法(流式细胞术),其中如果需要,将表达抗原的细胞或组织用表面活性剂或甲醇处理,以使抗体容易渗透到细胞或组织中,然后将本发明的抗体与其进行反应,然后将其进一步与进行过荧光标记例如 FITC、酶标记物例如过氧化物酶或生物素标记的抗免疫球蛋白抗体或其结合片段进行反应,并使标记物可视化并在显微镜下观察,或使细胞与荧光标记的抗体进行反应并通过流式细胞仪进行分析。这可以通过例如在文献中描述的方法来进行[《单克隆抗体原理与应用》(第三版), Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third Edition, Academic Press(1996),《单克隆抗体实验手册》(Manual for Experiments of Monoclonal Antibodies, Kodansha Scientific(1987))。具体来说,因为本发明的抗体或抗体片段与糖链缺陷型 CD27 的细胞外区域的三维结构结合,因此它可以优选用于通过流式细胞术检测表达维持天然类型的三维结构的多肽的细胞。

[0534] 此外,通过使用利用荧光抗体染色原理的 FMAT8100HTS 系统(由 Applied

Biosystems 制造), 可以不用分离形成的抗体-抗原复合物与没有参与抗体-抗原复合物形成的游离抗体或抗原, 来测量抗原的量或抗体的量。

[0535] 5. 使用本发明的与糖链缺陷型 CD27 多肽反应的单克隆抗体或抗体片段治疗疾病的方法

[0536] 本发明的特异性识别糖链缺陷型 CD27 多肽并与其细胞外区域结合的单克隆抗体或抗体片段, 可用于治疗与糖链缺陷型 CD27 多肽相关的疾病。

[0537] 与糖链缺陷型 CD27 多肽相关的疾病可以是任何疾病, 只要它是在体内检测到表达所述多肽的细胞的疾病即可。例如, 它可以是 IgA 型肾病、癌症等。

[0538] 此外, 疾病也可以包含表现出由 IgA 型肾病的发展所引起的肾病综合征或肾衰的疾病。

[0539] 癌症的实例可以包括源自造血器官的肿瘤(也称为血癌)或源自上皮细胞的实体癌症。

[0540] 具体来说, 血癌的实例包括白血病、淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤)、多发性骨髓瘤等。非霍奇金氏淋巴瘤的具体实例包括套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、MALT 淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、浆细胞瘤等。

[0541] 实体癌症的具体实例包括乳腺癌、子宫癌、结肠直肠癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌、宫颈癌、小肠癌、前列腺癌、胰腺癌等。

[0542] 本发明的治疗性药剂包括包含本发明的抗体或抗体片段作为活性成分的癌症治疗药剂。本发明的治疗药剂也包括具有效应子活性例如 ADCC 活性和 CDC 活性的癌症治疗药剂、通过凋亡诱导活性用于癌症的治疗药剂等。

[0543] 因为本发明的抗体或抗体片段能够识别表达在细胞膜上的糖链缺陷型 CD27 多肽, 因此它能够在体内识别表达糖链缺陷型 CD27 多肽的细胞。因此, 在本发明的抗体或抗体片段中, 其具有效应子活性的抗体或抗体片段能够在体内和体外损伤表达糖链缺陷型 CD27 多肽的细胞。此外, 因为本发明的抗体或抗体片段能够在体内损伤并由此减少表达糖链缺陷型 CD27 多肽的细胞, 因此它作为治疗性药剂特别有效。

[0544] 包含本发明的抗体或抗体片段或其衍生物的治疗药剂可以仅仅是作为活性成分的抗体或抗体片段或其衍生物, 并优选作为通过制药学技术领域众所周知的适合方法、通过将其与一种或多种可药用载体混合而生产的药物制剂提供。

[0545] 优选情况下, 选择在治疗中最有效的给药途径。实例包括口服给药和肠胃外给药, 例如颊、气管、直肠、皮下、肌肉内或静脉内给药。在抗体或肽制剂的情况下, 静脉内给药是优选的。剂型包括喷剂、胶囊、片剂、颗粒、糖浆、乳剂、栓剂、注射剂、软膏、胶带等。

[0546] 适合于口服给药的药物制剂包括乳剂、糖浆、胶囊、片剂、粉末、颗粒等。液体制剂例如乳剂和糖浆可以使用水, 糖类如蔗糖、山梨糖醇和果糖, 二醇例如聚乙二醇和丙二醇, 油例如芝麻油、橄榄油和大豆油, 防腐剂例如对羟基苯甲酸酯, 香料例如草莓香料和胡椒薄荷等作为添加剂来生产。胶囊、片剂、粉末、颗粒等可以使用赋形剂例如乳糖、葡萄糖、蔗糖和甘露糖醇, 崩解剂例如淀粉和藻酸钠, 润滑剂例如硬脂酸镁和滑石粉, 粘合剂例如聚乙烯醇、羟丙基纤维素和明胶, 表面活性剂例如脂肪酸酯, 增塑剂例如甘油等作为添加剂来生产。

[0547] 适合肠胃外给药的药物制剂包括注射剂、栓剂、喷剂等。注射剂可以使用载体例如盐溶液、葡萄糖溶液或其二者的混合物来制备。栓剂可以使用载体例如可可脂、氢化脂肪或羧酸来制备。喷剂可以使用抗体或抗体片段本身、或将其与不刺激患者的颊或气管粘膜并能通过将化合物分散成细小颗粒促进其吸收的载体一起使用来制备。载体包括乳糖、甘油等。根据抗体和载体的性质,生产药物制剂例如气溶胶和干粉是可能的。此外,成分例如用于口服制剂的添加剂也可以添加到肠胃外制剂中。

[0548] 尽管给药的剂量或频率根据目标疗效、给药方法、治疗时间、年龄、体重等而变化,但它通常为每个成年人每天 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 到 $8\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0549] 下面将通过实施例对本发明进行描述;但是,本发明不限于下述实施例。

[0550] 实施例 1

[0551] 含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的可溶性 CD27 细胞外结构域(在后文中称为“糖链缺陷型 CD27”)的构建

[0552] (1) 人类 CD27 基因的克隆

[0553] 按照下列步骤,从购自 Clontech 的源自人类外周血的 cDNA 文库分离编码 CD27 的基因。通过制备 $50 \mu\text{L}$ 反应溶液进行 PCR,所述反应溶液包含 1 倍浓度的 BD Advantage PCR 缓冲液(由 Clontech 制造)和 1 倍浓度的附带的 dNTP、 25ng 源自人类外周血单核细胞的单链 cDNA、 $0.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ CD27fw (SEQ ID NO :3)、 $0.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ CD27809B (SEQ ID NO :4) 和 1 倍浓度的 Advantage 2 PCR 聚合酶混合物(由 Clontech 制造)。PCR 在下列反应条件下进行:30 个循环,每个循环由 98°C 下反应 15 秒和 68°C 下反应 30 秒构成。将反应溶液通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,并使用 TOPO TA 克隆试剂盒(由 Invitrogen 制造)按照随附的说明书将约 1-kbp 的 PCR 产物插入 pCR-2.1 载体中。用其中插入有 PCR 扩增片段的质粒转化大肠杆菌,并从相应的克隆制备质粒,然后进行 DNA 测序。获得了具有 SEQ ID NO :1 显示的 DNA 序列的 pCR 2.1 CD27(图 1)。

[0554] (2) 其中克隆有具有人类 CD27 细胞外区域的基因的质粒的构建

[0555] 按照下述 PCR 步骤分离了在 C- 端一侧移除了跨膜区的 CD27 的编码 cDNA。向含有 $0.2\text{mmol}/\text{L}$ dNTP 和 $1\text{mmol}/\text{L}$ 氯化镁的反应溶液中加入 1ng pCR 2.1 CD27、 $1 \mu\text{mol}/\text{L}$ CD27-A (SEQ ID NO :5)、 $1 \mu\text{mol}/\text{L}$ CD27-B (SEQ ID NO :6) 和 2.5 单位 KOD 聚合酶(由 Toyobo 制造),并将终体积调整到 $50 \mu\text{L}$,然后在下述反应条件下进行 PCR :25 个循环,每个循环由 98°C 下反应 15 秒和 68°C 下反应 30 秒构成。将反应溶液通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,并使用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒(由 Invitrogen 制造)按照随附的说明书将约 600-bp 的 PCR 产物导入 pCR-Blunt 载体中。得到的其中克隆了具有人类 CD27 的细胞外区域的基因的质粒,被命名为 pCRCD27axb(图 2)。

[0556] (3) 具有突变的人类 IgG4Fc 区的载体 pBShC γ 4SP 的构建

[0557] 使用如 W097/10354 中所述的具有野生型 IgG4 亚类的 C 区编码 cDNA 的质粒 pBShC γ 4, 构建了质粒 pBShC γ 4SP,其具有突变型人类 IgG4 亚类的 C 区,其在野生型人类 IgG4 亚类的 C 区(铰链区)中第 108 位 Ser 被 Pro 取代。已知该修饰导致通过 IgG 铰链区的二聚体化的稳定化(Molecular Immunology, 30, 105, 1993)。制备了含有 1ng 质粒 pBShC γ 4 作为模板的 $50 \mu\text{L}$ 反应溶液 [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM 氯化钾, 1.5mM 氯化镁, 0.001% 明胶, $200 \mu\text{M}$ dNTP, $0.5 \mu\text{M}$ 引物 1 (SEQ ID NO :7), $0.5 \mu\text{M}$ 引物 2 (SEQ ID NO :8) 和

2 单位 TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶], 然后使用 GeneAmp PCR 系统 9700 (由 Perkin-Elmer 制造) 进行 PCR:30 个循环, 每个循环由 94°C 下反应 2 分钟、55°C 下反应 2 分钟和 72°C 下反应 2 分钟构成。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (由 Qiagen 制造) 按照随附的说明书纯化反应溶液, 用限制性酶 EcoT14I (由 Takara Bio 制造) 处理, 并通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 然后使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (由 Qiagen 制造) 按照随附的说明书回收扩增的片段。将质粒 pBShC γ 4 用限制性酶 EcoT14I 切开, 然后用碱性磷酸酶 (由 Takara Bio 制造) 进行处理以除去 5' - 端磷酸。类似, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 并使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒按照随附的说明书回收得到的质粒片段。将回收的扩增片段与源自质粒 pBShC γ 4 的质粒连接, 构建了包含所需 cDNA 的质粒 pBShC γ 4SP (图 3)。

[0558] (4) 包含人类 IgG4Fc 部分序列的 cDNA 的克隆

[0559] 按照下面的 PCR 步骤扩增了在 5' - 端具有限制性酶 BamHI 位点并在 3' - 端具有限制性酶 SalI 位点的人类 IgG4Fc 的编码 DNA 片段。向含有 0.2mmol/L dNTP 和 1mmol/L 氯化镁的反应溶液中, 加入 25ng 在部分 (3) 中构建的 pBShC γ 4SP、1 μ mol/L g4A (SEQ ID NO:9)、1 μ mol/L g4B (SEQ ID NO:10) 和 2.5 单位 KOD 聚合酶 (由 Toyobo 制造), 并将终体积调整到 50 μ L, 然后在下列反应条件下进行 PCR:25 个循环, 每个循环由 98°C 下反应 15 秒和 68°C 下反应 30 秒构成。将反应溶液通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 并使用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒 (由 Invitrogen 制造) 按照随附的说明书将约 700-bp 的 PCR 产物导入 pCR-Blunt 载体中。得到的质粒被命名为 pCRIgG4FcBamHISalI (图 4)。

[0560] (5) 动物细胞表达载体 pKANTEX XhoI/SalI 的构建

[0561] 将 W097/10354 中描述的人源化抗体表达载体 pKANTEX93 用限制性酶 XhoI (由 Takara Bio 制造) 和 SalI (由 Takara Bio 制造) 消化, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行分离, 并使用凝胶提取试剂盒 (由 Qiagen 制造) 回收约 9.8-kbp 的质粒片段。使用 DNA 连接试剂盒 (由 Takara Bio 制造) 将回收到的 DNA 片段的 5' 和 3' - 端连接, 然后使用得到的重组质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH5 α (由 Toyobo 制造)。使用 QIAprep Spin 小量制备试剂盒 (由 Qiagen 制造) 从多个获得的氨苄青霉素抗性克隆分离重组质粒 DNA, 然后通过用限制性酶 NotI (由 Takara Bio 制造) 和 KpnI (由 Takara Bio 制造) 消化, 验证抗体 L 链表达单元的排除。得到的质粒被命名为 pKANTEX XhoI/SalI (图 5)。

[0562] (6) 表达可溶性 CD27 细胞外结构域的质粒 pKANTEXCD27IgG4Fc 的构建

[0563] 将用 NotI 和 BamHI 消化部分 (2) 中构建的 pCR2.1CD27axb 所获得的约 600-bp 片段和用 BamHI 和 SalI 消化部分 (5) 中构建的 pCRIgG4FcBamHISalI 所获得的约 700-bp 的 DNA 片段, 连接到用 NotI 和 SalI 消化部分 (4) 中构建的 pKANTEX XhoI/SalI 所获得的约 8.8-kbp 的 DNA 片段中, 从而获得用于表达 CD27-Fc 的质粒 pKANTEX CD27IgG4Fc (图 6)。由上述质粒编码的可溶性 CD27-Fc 融合蛋白 (在后文中通常称为“CD27-Fc”) 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:11 所述, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所述。将该表达载体转化的大肠杆菌接种到 100mL LB 培养基中, 培养过夜并收集, 使用 QIAfilter 质粒中提试剂盒 (由 Qiagen 制造) 按照随附的方案纯化质粒。在纯化完成后, 通过用限制性酶 AatII 消化将 30 μ g 质粒载体线性化。线性化后进行苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀, 溶解在 0.1 倍浓度的 TE 缓冲液 (1mM Tris HCl, 0.1mM EDTA) 中并测量 DNA 浓度。它被提供用于基因导入。

[0564] (7) CD27-Fc 的表达

[0565] 根据电穿孔方法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)], 按照下述方式将 CD27-Fc 表达质粒 pKANTEX CD27IgG4Fc 导入 CHO/DG44 细胞 (Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555(1986)), 在后文中称为“DG44”或 Lec8 细胞。首先, 将在基本培养基 [Iscove 修改的 Dulbecco 培养基 (由 Invitrogen 制造), 其中添加有 10% 透析过的胎牛血清 (由 Invitrogen 制造)、50 μ g/mL 庆大霉素 (由 Nacalai Tesque 制造) 和 1xHT 增补剂 (由 Invitrogen 制造)] 中传代培养的 DG44 细胞, 以 8×10^6 个细胞/mL 的密度悬浮在 K-PBS 缓冲液中 [137mmol/L KCl、2.7mmol/L NaCl、8.1mmol/L Na₂HPO₄、1.5mmol/L KH₂PO₄、4.0mmol/L MgCl₂ 的悬浮液] 以制备细胞悬液。将 10 μ g 线性化的在部分 (6) 中构建的质粒 pKANTEX CD27IgG4Fc 与 200 μ L (1.8×10^6 个细胞) 细胞悬液混合。Lec8 细胞的传代培养在不添加 1xHT 增补剂的基本培养基 (在后文中称为“HT-培养基”) 中进行。将细胞/DNA 混合物转移到基因脉冲仪杯 (Gene Pulser Cuvette) 中 (电极间距离: 2mm, 由 Bio-Rad 制造), 使用 GenePulser (Bio-Rad) 装置以 0.35KV 的脉冲电压和 250 μ F 的电容进行基因转移。将细胞悬液与 HT-培养基 [10mL Iscove 修改的 Dulbecco 培养基 (由 Invitrogen 制造), 其中添加有 10% 胎牛血清 (由 Invitrogen 制造) 和 50 μ g/mL 庆大霉素 (由 Nacalai Tesque 制造)] 混合, 接种在 75-cm² 组织培养瓶 (由 Greiner 制造) 中, 并在 5% CO₂ 培养箱中在 37°C 下培养。培养三天后, 向其添加 G418 (由 Sigma 制造), 使终浓度为 0.5mg/mL, 然后继续培养 10 天。10 天后, 将细胞在 182-cm² 组织培养瓶 (由 Greiner 制造) 中传代培养, 然后继续培养至铺满。在铺满时用无血清的培养基 EXCELL 301 (由 JRH Bioscience 制造) 更换培养基后, 将细胞培养一周, 收集培养上清液并按照下面的方法进行纯化。

[0566] (8) CD27-Fc 的纯化

[0567] 将从部分 (7) 获得的培养物的培养上清液以 3000rpm 在 4°C 下离心 10 分钟。回收得到的上清液并通过 0.22- μ m 孔径的 PES 膜 (由 Asahi Techno Glass 制造) 过滤。在直径为 0.8cm 的柱中装入 0.5mL Mab select (由 Amersham Pharmacia Biotech 制造), 然后将 3.0mL 纯水和 3.0mL 0.2M 硼酸-0.15M NaCl 缓冲液 (pH 7.5, 在后文中称为“硼酸盐缓冲液”) 顺序通过。此外, 通过用 2.0mL 0.1M 柠檬盐酸缓冲液 (pH 3.5) 和 1.5mL 硼酸盐缓冲液相继清洗使介质平衡。接下来, 将培养上清液通过柱子, 然后用 3.0mL 硼酸盐缓冲液清洗。在清洗后, 使用 1.25mL 0.1M 柠檬酸盐缓冲液 (pH 3.5) 将吸附到载体上的抗体洗脱。进行洗脱获得 5 个独立级份, 各由 250 μ L 组成。接下来, 将获得的纯化级份进行 SDS-PAGE 分析, 并将所需蛋白的洗脱得到证实的级份合并, 在 4°C 下对 PBS 透析过夜。在透析完成后, 回收 CD27-Fc 溶液, 并使用 0.22- μ m Millex GV (Millipore) 进行除菌过滤。然后, 使用 Shimadzu UV-1700 分光光度计测量吸光度 (OD_{280nm}) 并计算 CD27-Fc 的浓度 (取 OD_{280nm} = 1.0 为 0.68mg/mL; 从 $\epsilon M = 134655$ 和 MW = 92840 计算)。从源自相应宿主细胞的表达 CD27-Fc 的细胞的约 300mL 无血清培养上清液获得 3.6mg 源自 Lec8 的 CD27-Fc 和 2.2mg 源自 CHO/DG44 的 CD27-Fc。对于相应的蛋白, 洗脱级份的 SDS-PAGE 分析结果在图 7 中给出。

[0568] 结果, 在还原条件下, 以 DG44 为宿主时观察到的 CD27-Fc 的分子量约为 65kDa, 以 Lec8 为宿主时分子量约为 48kDa。另一方面, 在非还原条件下, 在分子量约为还原条件下获得的两倍高的位置处观察到各自的条带, 从而证实 CD27-Fc 作为二聚体存在。

[0569] (9) 糖链结构的验证

[0570] 向 16 μ L 在 PBS 中稀释 10 倍的部分 (8) 的纯化 CD27-Fc 中, 加入 4 μ L 5 倍浓度的

SDS 样品缓冲液,然后在 90°C 下处理 5 分钟,然后进行 SDS-PAGE。使用 5 到 20% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 e-PAGEL (由 ATTO 制造,目录号 E-T520L),在 RAPID AS Mini-Slab 电泳池 (ATTO) 中以 20mA/凝胶的电流进行 90 分钟电泳。在 PVDF 膜 (由 Millipore Immobilon 制造,目录号 IPVH304F0) 上的转移使用 ATTO Holize 转印仪以 180mA 进行 90 分钟。将转移后的膜浸泡在含有 10% BSA 的 PBS 中 (在后文中称为“10% BSA-PBS”),并使其在 4°C 保持静置以进行阻断。然后向其加入使用 1% BSA-PBS 制备的 5 μ g/mL 的抗 RCAS1 抗体克隆 22-1-1 (由 MBL 制造,目录号 D060-3),然后在室温下反应 2 小时。将膜用 0.05% 吐温-20-PBS (由 Wako Pure Chemical 制造,目录号 167-11515) 在室温下清洗 30 分钟,使其与在 1% BSA-PBS 中稀释 2000 倍的第二抗体过氧化物酶标记的兔抗小鼠免疫球蛋白抗体 (由 DAKO 制造,目录号 P0161) 在室温下反应 1 小时。将膜用 0.05% 吐温-20-PBS 在室温下清洗 30 分钟,然后使用 ECL Western 印迹检测试剂 (由 Amersham Pharmacia Biotech 制造,目录号 RPN2106) 进行检测。结果在图 8 中给出。

[0571] 从 SDS-PAGE 分析结果,显示出 DG44 来源的 CD27-Fc 的分子量大于 Lec8 来源的 CD27-Fc 的分子量,并且取决于宿主细胞 DG44 和 Lec8,存在着与 CD27-Fc 结合的糖链结构的差异。

[0572] 此外,抗 RCAS1 抗体 22-1-1 明显识别 O-连接糖链的 Tn 抗原,并已知是抗 Tn 抗体 [J. B. C., 278. 22998-23007, (2003)]。作为抗 Tn 抗体的抗-RCAS-1 抗体克隆 22-1-1 不与 DG44 来源的 CD27-Fc 结合,但是特异性结合 Lec8 来源的 CD27-Fc。这证实了作为未结合半乳糖的 O-连接糖链的 Tn 抗原,结合在由 Lec8 产生的 CD27-Fc 上。

[0573] 实施例 2

[0574] 在细胞膜上表达 CD27 的 CHO 细胞的制备

[0575] (1) CD27 表达质粒 pKANTEX CD27 的构建

[0576] 从实施例 1 中构建的 pCR2.1CD27,按照下面的 PCR 步骤构建了移除基因表达非必需的 cDNA 部分的 cDNA 片段。

[0577] 通过制备 50 μ L 反应溶液进行 PCR,所述反应溶液含有 0.2mmol/LdNTP、1mmol/L 氯化镁、1ng pCR2.1CD27、1 μ mol/L CD27-A (SEQ ID NO :5)、1 μ mol/L CD27-C (SEQ ID NO :13) 和 2.5 单位 KOD 聚合酶 (由 Toyobo 制造)。PCR 在下列反应条件下进行:25 个循环,每个循环由 98°C 反应 15 秒和 68°C 反应 30 秒构成。将反应溶液通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,并使用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒 (由 Invitrogen 制造) 按照随附的说明书将约 800-bp 的 PCR 产物导入 pCR-Blunt 载体,从而获得具有 SEQ ID NO :1 中显示的 DNA 序列的 pCR27axc (图 9)。接下来,将用限制性酶 NotI 和 SalI 消化 pCR27axc 而获得的约 780-bp 的 DNA 片段连接到用限制性酶 NotI 和 SalI 消化实施例 1 中构建的 pKANTEX XhoI/SalI 而获得约 8.9-kbp 的 DNA 片段中,从而构建了用于表达 CD27 的质粒 pKANTEX CD27 (图 10)。由该质粒编码的 CD27 核苷酸序列显示在 SEQ ID NO :1 中,从其翻译的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO :2 中。将用如此构建的表达载体转化的大肠杆菌接种到 100mL LB 培养基中,然后培养过夜。在培养完成后,回收细菌并使用 QIAfilter 质粒中提试剂盒 (由 Qiagen 制造) 按照随附的说明书纯化质粒。然后通过用限制性酶 AatII 消化将 30 μ g 质粒载体线性化。线性化后进行苯酚/氯仿抽提、乙醇沉淀,溶解在 0.1 倍浓度的 TE 缓冲液 (1mM Tris HCl, 0.1mM EDTA) 中,测量 DNA 浓度并进行基因导入。

[0578] (2) CD27 表达质粒 pKANTEX CD27 的导入

[0579] 通过将部分 (1) 中构建的 CD27 表达质粒 pKANTEX CD27 基因导入到 Lec8 细胞和 CHO/DG44 细胞中,建立了表达 CD27 的 Lec8 和 DG44 细胞。基因导入以与实施例 1 相同的方式进行,只是使用 pKANTEXCD27 作为被导入的质粒。将基因导入后的细胞悬浮在 30mL HT 培养基中,并将 100 μ L/孔的细胞悬液接种到 96 孔板上,进行三份平行样。在接种后两天,将培养基用包含 500 μ g/mL G418 的传代培养基替换,然后培养 10 天。10 天后,将培养基用含有 50nM MTX(由 Sigma Aldrich 制造)的 HT 培养基代替,并获得 MTX 抗性细胞。源自 Lec8 的 CD27 表达细胞系被命名为 CD27/Lec8-4,源自 DG44 的 CD27 表达细胞被命名为 CD27/DG44-8。

[0580] (3) CD27 表达细胞的验证

[0581] 为了验证在部分 (2) 中构建的 CD27 表达细胞的 CD27 表达,使用流式细胞仪 [FCM] 进行了如下分析。

[0582] 将 1 到 5×10^6 个 CD27 表达细胞分配到 15mL 管(由 Becton, Dickinson and Company 制造)中,并以 1500rpm 离心 5 分钟。在丢弃上清液后,将残留物悬浮在含有 50 μ L 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 缓冲液 [在后文中称为“1% BSA-PBS”,由 Kohjin Bio 制造]中。向其加入作为第一抗体的 10 μ L PC5 标记的抗 CD27 小鼠单克隆抗体(由 Beckman Coulter 制造,目录号 No. 6607107)或 10 μ L PC5 标记的小鼠 IgG1 同种型对照(Beckman Coulter, 目录号 No. 6607012),然后在冰上的温度下反应 60 分钟。在反应完成后,将细胞用 1mL 1% BSA-PBS 清洗两次,悬浮在 500 μ L 1% BSA-PBS 中,并使用流式细胞仪 (FCM, 由 Becton, Dickinson and Company 制造)测量荧光强度。

[0583] 结果显示在图 11 中。如图 11 中所示,证实了 CD27/Lec8-4 和 CD27/DG44-8 在细胞膜上表达基本上同样表达水平的 CD27。

[0584] 实施例 3

[0585] 用于含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的 CD27 的单克隆抗体(在后文中称为“抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体”)的构建

[0586] (1) 免疫原制备

[0587] 将 50 μ g 在实施例 1 中获得的 Lec8 产生的 CD27-Fc 与 2mg 氢氧化铝佐剂(《抗体实验指南》,Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99, 1988)和 1×10^9 个细胞的百日咳疫苗(由 Chiba Serum Institute 制造)一起,给药于 4 周龄雌性 SD 大鼠 ($n = 3$)。在给药后两周,每周一次将 50 μ g Lec8 产生的 CD27-Fc 给药动物,一共三次。从动物的尾部静脉部分收集血液,并使用 ABI8200 细胞检测系统(由 Applied Biosystems 制造)或流式细胞仪 (Cytomics FC500 MPL, 由 Beckman Coulter 制造)通过荧光细胞染色测量获得的抗血清的结合活性。在最后一次免疫接种后三天,从显示出足够抗体滴度的小鼠取出脾脏。将脾脏在最低基本培养基 (MEM, 由 Nissui Pharmaceutical 制造)中切成小片,使用一副钳子将其打散并离心 (1200rpm, 5 分钟)。加入 Tris- 氯化铵缓冲液 (pH 7.6) 对得到的沉淀级份处理 1 到 2 分钟,由此除去红细胞。将得到的沉淀级份(细胞级份)用 MEM 清洗三次,并用于随后的细胞融合。

[0588] (2) 结合 ELISA

[0589] 将在实施例 1 中获得的 Lec8 产生的 CD27-Fc 和 DG44 产生的 CD27-Fc 在结合 ELISA

中分别用作抗原。然后,将 5 μ g/mL 每种 CD27-Fc 蛋白分配在 96 孔 ELISA 板 (Greiner) 中,以给出 50 μ L/孔的浓度,并将其在 4 $^{\circ}$ C 下放置过夜进行吸附。在将板清洗后,向板中加入 100 μ L/孔的 1% BSA-PBS,然后将其在室温下放置 1 小时,以便阻断剩余的活性基团。然后丢弃 1% BSA-PBS,向板中分配 50 μ L/孔的作为第一抗体的免疫动物抗血清或杂交瘤培养上清液,然后放置 2 小时。将板用 0.05% 聚氧乙烯 (20) 失水山梨糖醇单月桂酸酯 [相当于 ICI 的商品名吐温 20,由 Wako Pure Chemical 制造]-PBS (在后文中称为“吐温-PBS”)清洗,并向板中加入 50 μ L/孔的作为第二抗体的过氧化物酶标记的兔抗大鼠免疫球蛋白抗体 (由 Zymed 制造),然后将其在室温下放置 1 小时。将板用吐温-PBS 清洗,并通过加入 2,2-联氮双 (3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) 铵 (ABTS) 底物溶液 [1mmol/L ABTS-0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH4.2),0.1% H₂O₂] 进行显色。使用读板器 (Emax ;Molecular Devices) 测量吸光度 (OD415nm)。

[0590] (3) 荧光细胞染色 (ABI8200 细胞检测系统分析)

[0591] 使用实施例 2 中构建的 CD27/Lec8-4 和 CD27/DG44-8 作为测定细胞。将在添加有 50nM MTX 和 500ng/mL G418 的传代培养基中传代培养的 CD27/Lec8-4 和 CD27/DG44-8 使用 0.05% 胰蛋白酶溶液 (由 Invitrogen 制造) 进行剥离,并以 1×10^4 个细胞 /100 μ L 培养基 /孔的密度接种在 ABI8200 黑色 96 孔板上,然后培养过夜。然后,将 10 μ L/孔的作为第一抗体的免疫大鼠抗血清或杂交瘤培养上清液分配到板中,向其加入 100 μ L/孔的作为第二抗体的 ALEXA647 标记的抗大鼠免疫球蛋白 G(H+L) 抗体 (由 Invitrogen 制造),然后将其在暗处放置 4 小时。通过 ABI8200 细胞检测系统 (由 Applied Biosystems 制造) 测量由 633He/Ne 激光器激发的 650 到 685nm 的荧光。

[0592] (4) 荧光细胞染色 (流式细胞仪分析)

[0593] 使用实施例 2 中构建的 CD27/Lec8-4 和 CD27/DG44-8 作为测定细胞。将在添加有 50nM MTX 和 500 μ g/mL G418 的 HT- 培养基中传代培养的 CD27/Lec8-4 和 CD27/DG44-8 使用 0.02% EDTA 溶液 (由 Nacalai Tesque 制造) 进行剥离,并用 PBS 清洗相应的细胞。在清洗后,将 1 到 5×10^5 个细胞悬浮在 50 μ L 1% BSA-PBS 中,并向其分配 50 μ L/孔的作为第一抗体的免疫大鼠抗血清或杂交瘤培养上清液,然后在冰上的温度下反应 30 分钟。此外,同时将细胞与作为阴性对照的牛血清白蛋白 (BSA)、小鼠 IgG1 同种型对照 (由 Cosmo Bio 制造) 和大鼠 IgG2a 同种型对照 (由 Cosmo Bio 制造),以及作为阳性对照的抗 RCAS1 抗体 22-1-1 (由 MBL 制造) 和抗 CD27 小鼠单克隆抗体 (由 Beckman Coulter 制造) 进行反应。在反应完成后,将细胞通过离心用 PBS 清洗两次,并向其加入 50 μ L/孔的作为第二抗体的 ALEXA488 标记的抗大鼠免疫球蛋白 G(H+L) 抗体 (Invitrogen),然后在冰上的温度下在暗处反应 30 分钟。在再次通过离心用 PBS 清洗细胞两次后,将细胞悬浮在 500 μ L 1% BSA-PBS 中,并使用流式细胞仪 (由 Beckman Coulter, Cytomics FC500 MPL 制造) 测量由 488nm 氩激光器激发的 510 到 530nm 的荧光。

[0594] (5) 小鼠骨髓瘤细胞的制备

[0595] 使用正常培养基 (10% FCS RPMI 培养基) 对 8-氮杂鸟嘌呤抗性的小鼠骨髓瘤细胞系 P3X63Ag8U.1 (P3-U1 ;从 ATCC 购买) 进行培养,并将 2×10^7 个或以上的细胞保存到细胞融合时,作为亲本细胞系进行细胞融合。

[0596] (6) 杂交瘤的制备

[0597] 将在实施例 (1) 中获得的小鼠脾细胞和在实施例 (5) 中获得的骨髓瘤细胞以 10 : 1 的比例进行混合并离心 (250xg, 5 分钟)。在充分打散由此获得的沉淀级份的细胞团后, 在 37°C 和搅拌下以每 10^8 个小鼠脾细胞 0.5ml 的量加入 1g 聚乙二醇-1000 (PEG-1000)、1ml MEM 培养基和 0.35ml 二甲基亚砷的混合溶液, 以 1 到 2 分钟的时间间隔向悬液中数次加入 1ml MEM 培养基, 然后通过加入 MEM 培养基将总体积调整到 50ml。

[0598] 将悬液离心 (900rpm, 5 分钟), 将由此获得的沉淀级份的细胞轻柔打散, 然后通过重复吸入和打出移液管, 将细胞轻轻悬浮在 100ml HAT 培养基中 [通过向补充有 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基添加 HAT 培养基补充物 (由 Invitrogen 制造) 而制备的培养基]。将悬液以 200 μ l / 孔的量分配到 96 孔培养板中, 并在 5% CO₂ 培养箱中在 37°C 下培养 8 到 10 天。

[0599] 在培养后, 对培养上清液取样, 使用在部分 (3) 和 (4) 中描述的荧光细胞染色选择与 CD27/Lec8-4 反应并且不与 CD27/DG44-8 和 Lec8 细胞反应的孔。然后, 从如此筛选到的孔中含有的细胞, 通过有限稀释法进行两次克隆, 并获得单个细胞克隆。

[0600] 结果, 建立了分别生产与糖链缺陷型 CD27 特异性结合的单克隆抗体 KM4030 和 KM4031 的杂交瘤 KM4030 和 KM4031 (图 12)。以同样方式建立了分别生产与糖链缺陷型 CD27 特异性反应的单克隆抗体 KM4026、KM4027 和 KM4028 的杂交瘤 KM4026、KM4027 和 KM4028。

[0601] 这些生产与糖链缺陷型 CD27 特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤, 是通过下述过程获得的: 使用在参与糖链合成过程的酶、转运蛋白的活性没有缺陷的 DG44 细胞以及其中 UDP-半乳糖转运蛋白的活性降低或缺失的 Lec8 细胞系, 构建表达每种含有正常糖链的 CD27 和糖链缺陷型 CD27 的重组细胞; 设计允许筛选不与含有正常糖链的 CD27 表达细胞或 Lec8 细胞系结合、但是只特异性与糖链缺陷型 CD27 表达细胞结合的单克隆抗体的系统; 以及然后执行约 6000 个孔规模的筛选分析。

[0602] (7) 单克隆抗体的纯化

[0603] 将在部分 (6) 中获得的杂交瘤细胞, 以 5 到 20×10^6 个细胞 / 动物的剂量通过腹膜内注射给药到用鲨肝油烷处理过的 7 周龄雌性裸鼠 (ICR) 中。当在 10 到 21 天内杂交瘤发展成腹水肿瘤时, 从小鼠收集腹水液 (1 到 8ml / 动物), 然后通过注射过滤器 (孔径: 5 μ m) 过滤以除去固形物。通过使用辛酸沉淀方法 [《抗体实验室指南》, Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 进行纯化, 获得了纯化的 IgG 单克隆抗体。通过结合 ELISA, 使用亚类分型试剂盒 (大鼠单克隆抗体同种型分型试剂盒, 由 DS Pharma Biomedical 制造) 进行了单克隆抗体亚类的确定。结果显示, 每种抗体的亚类确定如下: 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4026 为大鼠 IgG2a 类型, 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4027 为大鼠 IgG2b 类型, 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4028 为大鼠 IgG1 类型, 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 为大鼠 IgG2a 类型, 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4031 为大鼠 IgG1 类型。

[0604] 实施例 4

[0605] 抗糖链缺陷型 CD27 特异性单克隆抗体的反应性的检测

[0606] 使用下述竞争性 ELISA 系统, 检测抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 和 KM4031 的反应特异性。首先, 将实施例 1 中获得的 Lec8 产生的 CD27-Fc 以 5 μ g/ml / 50 μ l / 孔的量分配在 96 孔 ELISA 板中 (Greiner 制造), 然后在 4°C 放置过夜进行吸附。在洗板后,

以 200 μ l/ 孔的量向板中加入 1% BSA-PBS, 然后在室温放置 1 小时以阻断剩余的活性基团。然后弃去 1% BSA-PBS, 将作为第一抗体的稀释的抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 纯化抗体或 KM4031 纯化抗体以 50 μ l/ 孔分配到板中。同时, 以 20、2、0.2 和 0.02 μ g/mL 的浓度加入作为结合竞争物质的 Lec8 产生的 CD27-Fc 蛋白、DG44 产生的 CD27-Fc 蛋白或人类免疫球蛋白, 以便抗体与结合竞争性物质共存。将板在室温放置 2 小时。将板用 0.05% 聚氧乙烯 (20) 失水山梨糖醇单月桂酸酯 [相当于 ICI 的商品名吐温 20, 由 Wako Pure Chemical 制造]-PBS (在后文中称为“吐温 -PBS”) 清洗, 并向板中加入 50 μ L/ 孔的作为第二抗体的过氧化物酶标记的兔抗大鼠免疫球蛋白 (由 Zymed 制造), 然后将其在室温下放置 1 小时。将板用吐温 -PBS 清洗, 并通过加入 2,2'- 联氮双 (3- 乙基苯并噻唑 -6- 磺酸) 铵 (ABTS) 底物溶液 [1mmol/L ABTS-0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.2), 0.1% H₂O₂] 进行显色。使用读板器 (Emax ;Molecular Devices) 测量吸光度 (OD415nm)。

[0607] 图 13 显示了抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 和 KM4031 的竞争性 ELISA 的结果。结果证明, DG44 产生的 CD27-Fc 和人类免疫球蛋白不抑制抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 和 KM4031 与 Tn 抗原结合的 CD27-Fc 之间的结合, 但是它们抑制 Tn 抗原结合的 CD27-Fc。此外, 对于抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027 和 KM4028 来说, 获得了同样的结果。从上述结果证明了本发明的抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 和 KM4031 特异性识别糖链缺陷型 CD27。

[0608] 图 28(A) 和 28(B) 显示了抗糖链缺陷型 CD27 单克隆嵌合抗体 KM4026、KM4027、KM4028、M4030 和 KM4031 对糖链缺陷型 CD27-Fc 的结合活性的基于 Biacore 的评估结果。结合活性使用 Biacore T100 (由 GE Healthcare Bio-Sciences 制造) 通过表面等离子体共振 (SPR) 测定。

[0609] 使用胺偶联试剂盒 (由 Biacore 制造) 按照随附的说明书通过胺偶联将抗人类 IgG4 抗体 (由 Pharmingen 制造) 固定化在 CM5 传感器芯片 (由 GE Healthcare Bio-Sciences 制造) 上。对于在实施例 1(7) 中获得的 DG44 生产的 CD27-Fc 来说, 加入使用 Prozyme Glyco 酶法脱糖基化试剂盒 (由 Prozyme 制造) 和 Pro0-Link Extender Deglycosylation Plus (由 Prozyme 制造) 中的唾液酸酶 A 或 β (1-4) 半乳糖苷酶、按照随附的说明书进行糖链消化酶处理的 Tn 抗原类型的 CD27-Fc 或唾液酸化 Tn 抗原类型的 CD27-Fc, 使其捕获在固定化有抗人类 IgG4 抗体的芯片上以获得 200 到 250RU (共振单位)。然后, 将从 20000ng/mL 分五步稀释的测定样品 (抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 和 KM4031) 以 30 μ L/min 的流速在芯片上通过, 获得每种浓度的传感器谱, 并使用安装在装置上的分析软件 Biacore T100 评估软件 (由 Biacore 制造) 进行分析。

[0610] 结果证明, 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体表现出对 Tn 抗原类型的 CD27-Fc 和唾液酸化 Tn 抗原类型的 CD27-Fc 的结合活性。从上述结果证明, 所有本发明的抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体都结合 Tn 和唾液酸化 Tn 抗原。

[0611] 实施例 5

[0612] 编码抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体的 cDNA 的分离和分析

[0613] (1) 从产生抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体的杂交瘤细胞制备 mRNA

[0614] 从实施例 3 中获得的相应杂交瘤 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 和 KM4031

的 5×10^7 到 1×10^8 个杂交瘤细胞中,使用 RNAeasy Mini 试剂盒 (Qiagen 制造) 和 OligotexTM-dt30<Super>mRNA 纯化试剂盒 (Takara 制造) 按照其随附的说明书制备了相应的抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体的 mRNA。

[0615] (2) 抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体的 H 链和 L 链可变区的基因克隆

[0616] 使用 BD SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (BD Biosciences 制造),按照其随附的说明书,从实施例 5(1) 中获得的单克隆抗体的 mRNA 获得了 cDNA。使用如此获得的 cDNA 作为模板,并使用大鼠 IgG1 特异性引物 (SEQ ID NO :14)、大鼠 IgG2a 特异性引物 (SEQ ID NO :15) 大鼠 IgG2b 特异性引物 (SEQ ID NO :16) 或大鼠 CH1 特异性引物 (SEQ ID NO :17) 通过进行 PCR,扩增了相应抗体的重链可变区 (在后文中称为“VH”) 的 cDNA 片段。此外,通过使用大鼠 Ig(κ) 特异性引物 (SEQ ID NO :18) 和 (SEQ ID NO :19) 代替抗体的相应亚类特异性引物,通过进行 PCR 扩增了相应抗体的轻链可变区 (在后文中称为“VL”) 的 cDNA 片段。用于扩增 KM4026、KM4030 和 KM4031 的 VL 和 VH 的 PCR 使用 Advantage 2 PCR 试剂盒 (由 Clontech 制造) 按照其随附的说明书进行,而用于扩增 KM4027 和 KM4028 的 VL 和 VH 的 PCR 使用 KOD Plus 聚合酶 (由 Toyobo 制造) 按照其随附的说明书进行。

[0617] 接下来,为了确定克隆到的核苷酸序列,将获得的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离,并将源自 KM4026、KM4030 和 KM4031 的每个 PCR 产物使用 TOPO TA 克隆试剂盒 (由 Invitrogen 制造) 按照其随附的说明书插入到 pCR 载体中,而源自 KM4027 和 KM4028 的每个 PCR 产物使用用于测序的 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒 (由 Invitrogen 制造) 按照其随附的说明书插入到 pCR 载体中。使用其中插入有 PCR 扩增片段的质粒转化大肠杆菌,制备从相应克隆获得的质粒,然后进行 DNA 测序。结果,获得了包含全长 VH cDNA 的质粒和包含全长 VL cDNA 的质粒,其中被认为是起始密码子的 ATG 序列存在于 cDNA 的 5' - 末端中。克隆的流程图显示在图 14 中。

[0618] (3) 抗 CD27 单克隆抗体可变区的基因序列的分析

[0619] 在实施例 5(2) 中获得的质粒中包含的抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 和 KM4031 的 VH 的完整核苷酸序列由 SEQ ID NO :20 到 24 显示,由这些核苷酸序列推导出的包含信号序列的 VH 的完整氨基酸序列由 SEQ ID NO :25 到 29 显示,质粒中包含的 VL 的完整核苷酸序列由 SEQ ID NO :30 到 34 显示,由这些核苷酸序列推导出的包含信号序列的 VL 的完整氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :35 到 39 显示。

[0620] 此外,基于与常规抗体的氨基酸序列的比较,鉴定了相应的单克隆抗体的 VH 和 VL 的 CDR。抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4026 的 VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41 和 SEQ ID NO :42 显示,而 VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44 和 SEQ ID NO :45 显示。抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4027 的 VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47 和 SEQ ID NO :48 显示,而 VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50 和 SEQ ID NO :51 显示。抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4028 的 VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53 和 SEQ ID NO :54 显示,而 VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56 和 SEQ ID NO :57 显示。抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4030 的 VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59 和 SEQ ID NO :60 显示,而 VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的

氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62 和 SEQ ID NO :63 显示。抗糖链缺陷型 CD27 单克隆抗体 KM4031 的 VH 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65 和 SEQ ID NO :66 显示,而 VL 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68 和 SEQ ID NO :69 显示。

[0621] 实施例 6

[0622] 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的制备

[0623] (1) 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体的构建

[0624] 在本发明中制备的嵌合抗体,是其中在 US97/10354 中公开的人类 IgG1 的 H 链恒定区和人类 κ 的 L 链恒定区分别连接到在实施例 5(3) 中获得的抗 CD27 大鼠单克隆抗体的 H 和 L 链的可变区中的嵌合抗体。为此,使用在实施例 5(3) 中获得的包含每个单克隆抗体的 VL 和 VH 的 pCR 载体以及在 US97/10354 中公开的包含人类 IgG1 的 H 链恒定区和人类 κ 的 L 链恒定区的抗体表达载体 pKANTEX93,按照下列步骤构建了抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体(图 15、16、17 和 18)。

[0625] 使用 10ng 包含 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 或 KM4031 的 VL 或 VH 的 pCR 载体作为模板,制备了总共 20 μ L 的溶液,其中含有 2 μ L 10x KOD Plus 缓冲液、2 μ L 2mmol/L dNTP、1 μ L 25mmol/L 硫酸镁、1 μ L KOD Plus 聚合酶(由 Toyobo 制造)、对每种抗 CD27 单克隆抗体的 VL 和 VH 特异的 10 μ mol/L 引物各 1 μ L。使用如此制备的溶液进行如下的 PCR:在 94 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环由 94 $^{\circ}$ C 反应 1 分钟和 68 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟构成。KM4026 的 VL 的引物由 SEQ ID NO :70 和 71 显示,KM4026 的 VH 的引物由 SEQ ID NO :72 和 73 显示;KM4027 的 VL 的引物由 SEQ ID NO :74 和 75 显示,KM4027 的 VH 的引物由 SEQ ID NO :76 和 77 显示;KM4028 的 VL 的引物由 SEQ ID NO :78 和 79 显示,KM4028 的 VH 的引物由 SEQ ID NO :80 和 81 显示;KM4030 的 VL 的引物由 SEQ ID NO :82 和 83 显示,KM4030 的 VH 的引物由 SEQ ID NO :84 和 85 显示;KM4031 的 VL 的引物由 SEQ ID NO :86 和 87 显示,KM4031 的 VH 的引物分别由 SEQ ID NO :88 和 89 显示。

[0626] 将每种 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离。收集特异的 PCR 扩增条带,并使用用于测序的 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒(由 Invitrogen 制造)按照其随附的说明书插入到 pCR Blunt-TOPO 载体中。将获得的每个抗体的 VL 用限制性酶 EcoRI(由 New England Biolabs 制造)和 BsiWI(由 New England Biolabs 制造)消化,由此获得 VL 的 EcoRI-BsiWI 片段。此外,将每个抗体的 VH 用限制性酶 NotI(由 New England Biolabs 制造)和 ApaI(由 New England Biolabs 制造)消化,由此获得 NotI-ApaI 片段。

[0627] 使用 Ligation High(由 Toyobo 制造)按照其随附的说明书,将抗 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 和 KM4031 的 VL 的每个 EcoRI-BsiWI 片段连接到用限制性酶 EcoRI 和 BsiWI 消化 pKANTEX93 所获得的 DNA 片段中。使用连接的 DNA 片段转化大肠杆菌 DH5 α (由 Toyobo 制造),制备从相应克隆获得的质粒,使用 BigDye 终止物循环测序 FS 简便反应试剂盒(由 PE Biosystems 制造)按照其随附的说明书进行反应,然后使用同一公司的测序仪 ABI PRISM 3700 分析它们的核苷酸序列。结果,获得了其中插入有抗 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 或 KM4031 的 VL 的编码 cDNA 的 pKANTEX93。随后,使用 Ligation High(由 Toyobo 制造)按照其随附的说明书,将抗 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 和 KM4031 的 VH 的每个 NotI-ApaI 片段连接到用限制性酶

NotI 和 ApaI 消化具有抗 CD27 单克隆抗体的每个 VL 插入序列的 pKANTE93 所获得的 DNA 片段中。使用连接的 DNA 片段转化大肠杆菌 DH5 α (由 Toyobo 制造), 制备从相应克隆获得的质粒, 使用 BigDye 终止物循环测序 FS 简便反应试剂盒 (由 PE Biosystems 制造) 按照其随附的说明书进行反应, 然后使用同一公司的测序仪 ABI PRISM 3700 分析它们的核苷酸序列。结果获得了具有抗 CD27 单克隆抗体 KM4026、KM4027、KM4028、KM4030 或 KM4031 的 VL 和 VH 的每个编码 cDNA 的插入片段的抗 CD27 嵌合抗体表达载体。

[0628] (2) 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体在动物细胞中的表达

[0629] 使用在部分 (1) 中获得的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体表达载体, 通过常用的方法 [《抗体工程实用指南》, Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company (1992)] 进行抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体在动物细胞中的表达, 获得产生抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的转化体 (嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031)。作为用于所需抗体表达的动物细胞, 使用了其中 α 1,6-岩藻糖基转移酶基因 (FUT8) 被双敲除的 CHO/DG44 细胞系 (在后文中称为“FUT8 敲除的 CHO 细胞”)。已知岩藻糖不能添加到在该宿主细胞中表达的抗体的复杂的 N-连接糖链的核心上 [W02002/31140]。

[0630] (3) 纯化的嵌合抗体的制备

[0631] 在通过普通的培养方法对部分 (2) 中获得的每种转化体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 进行培养后, 回收细胞悬浮液并在 3000rpm 和 4°C 下离心 20 分钟以回收培养上清液, 然后使用 0.22 μ m 孔径的 Millex GV 滤器对培养上清液进行过滤除菌。使用 Mab Select, 以与实施例 1(7) 中相同的方式, 从如此获得的培养上清液中纯化抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031。

[0632] (4) 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的岩藻糖含量的测定

[0633] 按照 W02002/31140 中描述的方法, 测量了其中岩藻糖的 1-位通过 α -键连接到每个抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的 Fc 区的复杂的 N-连接糖链中的还原末端中 N-乙酰葡萄糖胺的 6-位上的糖链的比例。结果在下面的表 2 中给出。

[0634] 从这些结果证明了岩藻糖没有添加到实施例 6(3) 中构建的嵌合抗体上。

[0635] 表 2

抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体中岩藻糖的含量	
嵌合 KM4026	0%
嵌合 KM4028	0%
嵌合 KM4030	0%
嵌合 KM4031	0%

[0637] 实施例 7

[0638] 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体活性的评估

[0639] 在下面的部分 (1) 到 (3) 中, 评估了实施例 6 中获得的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 的活性。

[0640] (1) 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体对人类糖链缺陷型 CD27-Fc 的结合活性的基于 Biacore 的评估

[0641] 为了对抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028 和嵌合 KM4030 对人类糖链缺陷型 CD27-Fc 的结合活性进行动力学分析,通过表面等离子体共振方法 (SPR 方法) 测量了结合活性。所有下面的操作都使用 Biacore T100 (由 GE Healthcare Bio-Sciences 制造) 执行。通过胺偶联将实施例 1(7) 中或源自 Lec8 的 CD27-Fc 固定化在 CM5 传感器芯片上 (由 GE Healthcare Bio-Sciences 制造)。将从 $9 \mu\text{g/mL}$ 起进行三倍连续稀释以给出 5 种不同浓度的测定样品 (嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031), 根据自动化程序 (Single Kinetix), 以浓度增加的次序相继并连续添加到固定化有 CD27-Fc 的芯片上, 然后进行测量。使用安装在装置上的分析软件 Biacore T100 评估软件 (由 Biacore 制造), 使用二价被分析物模型进行分析, 由此计算每种抗体对人类糖链缺陷型 CD27-Fc 的结合速率常数 k_a 和解离速率常数 k_d 。

[0642] 由此获得的每个抗体的结合速率常数 k_{a1} 、解离速率常数 k_{d1} 和解离常数 $KD(k_{d1}/k_{a1})$, 在下面的表 3 中给出。

[0643] 如表 3 中所示, 所有嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 都对人类糖链缺陷型 CD27-Fc 表现出高亲和性, 范围为 1×10^{-8} 到 $1 \times 10^{-9} \text{mol/L}$ 。

[0644] 表 3

[0645]

抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体对人类糖链缺陷型 CD27-Fc 的结合活性			
抗体	$k_a(1/\text{Ms})$	$k_d(1/\text{s})$	$KD(\text{mol/L})$
嵌合 KM4026	1.8×10^5	83.1×10^{-4}	46.65×10^{-9}
嵌合 KM4028	11.7×10^5	9.2×10^{-4}	0.79×10^{-9}
嵌合 KM4030	2.9×10^5	3.4×10^{-4}	1.07×10^{-9}
嵌合 KM4031	4.0×10^5	2.0×10^{-4}	0.51×10^{-9}

[0646] (2) 通过荧光细胞染色 (流式细胞仪分析) 评估抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的反应特异性

[0647] 使用与实施例 2 中相同的方式构建的 CD27/DG44-4、CD27/Lec8-4 和 Lec8 细胞作为测定细胞。将在添加有 $500 \mu\text{g/mL}$ G418 的 HT- 培养基中传代培养的 CD27/DG44-4 和在添加有 50nmol/L MTX 和 $500 \mu\text{g/mL}$ G418 的 HT- 培养基中传代培养的 CD27/Lec8-4, 使用 0.02% EDTA 溶液进行剥离, 然后用 PBS 洗涤。然后, 将 5×10^5 个细胞悬浮在 $50 \mu\text{L}$ 1% BSA-PBS 中, 制备每种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体 (嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031) 的抗体溶液, 以给出 0.02、0.2、2 和 $10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度, 然后将每种抗体溶液以 $50 \mu\text{L}$ /孔的量分配到板中作为第一抗体, 然后在冰上的温度下反应 1 小时。作为阳性对照, 使用了作为抗 Tn 抗体的抗 RCAS1 小鼠抗体 22-1-1 (由 MBL 制造) 和抗 CD27 小鼠抗体 0323 (由 Santa Cruz Biotechnology 制造)。在反应完成后, 使用 PBS 进行两次离心, 并以 $50 \mu\text{L}$ /孔的浓度加入 ALEXA Fluoro 488 标记的抗人类免疫球蛋白 G(H+L)、ALEXA Fluoro 488 标记的抗小鼠免疫球蛋白 G(H+L) 或 ALEXA Fluoro 488 标记的抗人类免疫球蛋白 M(μ) 作为第二抗体, 然后在冰上的温度下在暗处反应 30 分钟。再一次使用 PBS 重复两次离心,

并将细胞清洗和悬浮在 500 μ L 1% BSA-PBS 中。通过流式细胞仪（由 Beckman Coulter 制造, Cytomics FC500MPL）测量用 488nm 氩激光激发的 510 到 530nm 的荧光。结果显示在图 19(A) 到 19(C) 中。

[0648] 结果,所有抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体不与 Lec8 细胞和 CD27/DG44-4 细胞结合,但是只表现出与表达糖链缺陷型 CD27 的 CD27/Lec8-4 细胞的结合。

[0649] 从这些结果证明,本发明的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 特异性识别在细胞表面上表达的糖链缺陷型 CD27。

[0650] (3) 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC 活性) 的评估

[0651] 以下述方式测量了抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 对实施例 2 中构建的 CD27/Lec8-4 细胞的 ADCC 活性。

[0652] (3)-1 靶细胞悬液的制备

[0653] 将在添加有 50nmol/L MTX 和 500 μ g/mL G418 的 HT- 培养基中传代培养的 CD27/Lec8-4 细胞,使用 0.02% EDTA 溶液进行剥离,用 PBS 洗涤,用含有 5% 透析过的胎牛血清 (dFBS, 由 Invitrogen 制造) 且不含酚红的 RPMI 1640 培养基 (Invitrogen 制造) (在后文中称为“ADCC 培养基”) 清洗,然后悬浮在同样的培养基中以调整到最适浓度,并用作靶细胞悬液。

[0654] (3)-2 效应细胞悬液的制备

[0655] 通过下面的方式,从健康人的外周血分离外周血单核细胞 (PBMC)。使用添加有 0.5mL 肝素钠 (由 Shimizu Pharmaceutical 制造) 的注射器,收集 50ml 健康人外周血。在 Monopoly 溶解培养基 (由 DS Pharma Biomedical 制造) 上将 3.5mL 收集到的外周血轻轻分层,取其 3mL 分配到每个 15-mL 管中。然后,通过以 400xg 离心、破裂并在室温放置 20 分钟,分离出单核细胞层。将如此获得的单核细胞级份用 ADCC 培养基清洗两次,然后悬浮在同样培养基中以给出最适细胞计数,并用作效应细胞悬液。

[0656] (3)-3ADCC 活性的测量

[0657] 以下述方式,使用 LDH- 细胞毒性测试 Wako (由 Wako 制造),按照其随附的说明书测量 ADCC 活性。

[0658] 首先,将 50 μ L/ 孔的抗体溶液分配到 96 孔 U 型底板 (由 Falcon 制造) 中,在所述抗体溶液中每种抗体从 30 μ g/mL 起进行 10 倍稀释,以给出 0.003 μ g/mL 的浓度。接下来,以 1×10^4 个细胞 /50 μ L/ 孔的量向其中分配在部分 (3)-1 中制备的靶细胞悬液。最后,以 2.5×10^5 个细胞 /50 μ L/ 孔的量向其中分配在部分 (3)-2 中制备的效应细胞悬液,以给出 150 μ L 的总体积,然后在 37°C 下反应 4 小时。因此,实验以 25 : 1 的效应细胞 (E) : 靶细胞 (T) 比例进行。ADCC 活性通过下列公式计算。结果显示在图 20 中。

[0659] (公式)

[0660] ADCC 活性 (%) = ([样品的吸光度] - [靶细胞自发释放的吸光度] - [效应细胞自发释放的吸光度]) / ([靶细胞总释放的吸光度] - [靶细胞自发释放的吸光度]) x 100

[0661] 结果,所有其中没有核心岩藻糖与抗体 Fc 区的复杂 N- 连接糖链结合的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031,都对 CD27/Lec8-4 细胞显示出高的 ADCC 活性。

[0662] 从这些结果证明,所有本发明的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031,都对表达糖链缺陷型 CD27 的细胞具有高的 ADCC 活性。

[0663] (4) 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体的补体依赖性细胞毒性 (CDC 活性) 的评估

[0664] 以下述方式测量了抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 对实施例 2 中构建的 CD27/Lec8-4 细胞的 CDC 活性。

[0665] 将 CD27/Lec8-4 细胞用 PBS 清洗,用添加有 10% dFBS 的 RPMI1640 培养基清洗,然后悬浮在同样的培养基中以给出最适浓度,并用作靶细胞悬液。将靶细胞悬液分配到 96 孔平底板 (由 Greiner 制造) 中,以给出 5×10^4 个细胞 / $50 \mu\text{L}$ / 孔的密度。此外,向其中加入所制备的具有适合浓度的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体溶液和人类补体 (由 Sigma 制造),以给出 $150 \mu\text{L}$ / 孔的总体积。此外,分别制备了作为阴性对照的无抗体反应孔 (0% 细胞毒性孔) 和作为阳性对照的无细胞反应孔 (100% 细胞毒性孔)。将反应在 5% CO_2 培养箱中在 37°C 下进行 2 小时。在反应完成后,向相应的反应孔加入 $15 \mu\text{L}$ WST-1 试剂 (由 Roche 制造),然后在 37°C 下反应约 4 小时。使用读板器 (Emax) 测量每个孔的吸光度 ($\text{OD}_{450\text{nm}}-\text{OD}_{690\text{nm}}$)。从每个孔的吸光度,通过下列公式计算 CDC 活性 (细胞毒性 [%])。结果在图 21 中给出。

[0666] (公式)

[0667] $\text{CDC 活性 (细胞毒性 [\%])} = \{1 - (\text{反应孔的吸光度} - 100\% \text{裂解孔的吸光度}) / (0\% \text{裂解孔的吸光度} - 100\% \text{裂解孔的吸光度})\} \times 100$

[0668] 结果,所有本发明获得的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 都表现出 CDC 活性。

[0669] 实施例 8

[0670] 在细胞膜上表达食蟹猴 CD27 的 CHO 细胞的构建

[0671] (1) 食蟹猴 CD27 基因的克隆

[0672] 按照下列步骤,从源自食蟹猴外周血的 RNA,分离了 CD27 编码基因。制备了总共 $5 \mu\text{L}$ 溶液,其含有 $3.3 \mu\text{g}$ 使用 Trizol (由 Invitrogen 制造) 从食蟹猴外周血分离到的 RNA 作为模板,以及随附于 Superscript III 第一链试剂盒 (由 Invitrogen 制造) 的 $1 \mu\text{L}$ 寡聚 dT 和 $1 \mu\text{L}$ dNTP 混合物。将如此制备的溶液在 65°C 下反应 5 分钟,并在冰上淬灭 1 分钟。然后向其中加入随附于 Superscript III 第一链试剂盒的 $2 \mu\text{L}$ 10x RT 缓冲液、 $2 \mu\text{L}$ DTT、 $1 \mu\text{L}$ RNase OUT 和 $1 \mu\text{L}$ RT,然后在 50°C 下进行反转录反应 50 分钟。在反应完成后,将反应溶液在 85°C 加热 5 分钟使反转录酶失活,并加入随附于 Superscript III 第一链试剂盒的 $1 \mu\text{L}$ RNase H,然后在 37°C 反应 20 分钟以完全降解 RNA。将该源自食蟹猴外周血的单链 cDNA 储存在 -20°C 直到使用。

[0673] 制备总共 $25 \mu\text{L}$ 的溶液,其含有 $1.25 \mu\text{L}$ 上述制备的源自食蟹猴外周血的单链 cDNA 作为模板、 $2.5 \mu\text{L}$ 10x KOD Plus 缓冲液、 $2.5 \mu\text{L}$ 2mmol/L dNTP、 $1 \mu\text{L}$ 25mmol/L 硫酸镁、 $0.5 \mu\text{L}$ KOD Plus 聚合酶 (由 Toyobo 制造)、 20pmol 从恒河猴 CD27 的 5' 非翻译区序列设计的 mfCD27_5UTR (SEQ ID NO :90) 和 20pmol 从恒河猴 CD27 的 3' 非翻译区序列设计的 mfCD27_3UTR (SEQ ID NO :91)。将如此制备的溶液在 94°C 加热 5 分钟,并在下列反应条件下进行 PCR :30 个循环,每个循环由 94°C 反应 30 秒和 68°C 反应 2 分钟构成。将反应溶液通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,并使用用于测序的 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒 (由

Invitrogen 制造),按照其随附的说明书将约 800-bp 的 PCR 产物插入到 pCR Blunt-TOPO 载体中。使用其中插入有 PCR 扩增片段的载体转化大肠杆菌 DH5 α (由 Toyobo 制造),并制备从相应克隆获得的质粒,然后使用 BigDye 终止物循环测序 FS 简便反应试剂盒(由 PE Biosystems 制造)按照其随附的说明书进行反应,然后使用同一公司的测序仪 ABI PRISM 3700 分析它们的核苷酸序列。结果,获得了其中克隆有食蟹猴 CD27 编码 cDNA (SEQ ID NO : 92) 的质粒 pCR mfCD27 (图 22)。

[0674] (2) 猴 CD27 表达质粒 pKANTEX mfCD27His 的构建

[0675] 按照下列步骤构建了在 C-末端附有 His 标签的食蟹猴 CD27 表达载体 pKANTEX mfCD27His。

[0676] 制备总共 50 μ L 的溶液,其含有 10ng pCR mfCD27 作为模板,以及 5 μ L 10x KOD Plus 缓冲液、5 μ L 2mmol/L dNTP、2 μ L 25mmol/L 硫酸镁、1 μ L KOD Plus 聚合酶(由 Toyobo 制造)、0.2 μ L 100 μ mol/L 的 mfCD27toKAN_5 (SEQ ID NO :93) 和 0.2 μ L 100 μ mol/L 的 mfCD27HisKAN_3 (SEQ ID NO :94)。将如此制备的溶液在 94 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,并在下列反应条件下进行 PCR :94 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟,然后进行 30 个循环,每个循环由 94 $^{\circ}$ C 反应 30 秒和 68 $^{\circ}$ C 反应 2 分钟构成。将反应溶液通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离,并使用用于测序的 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒(由 Invitrogen 制造),按照其随附的说明书将约 800-bp 的 PCR 产物插入到 pCR Blunt-TOPO 载体中。使用其中插入有 PCR 扩增片段的载体转化大肠杆菌 DH5 α (由 Toyobo 制造),并制备从相应克隆获得的质粒,使用 BigDye 终止物循环测序 FS 简便反应试剂盒(由 PE Biosystems 制造)按照其随附的说明书进行反应,然后使用同一公司的测序仪 ABI PRISM 3700 分析它们的核苷酸序列。结果,获得了其中克隆有在 C-末端附有 His 标签的编码食蟹猴 CD27 的 cDNA (SEQ ID NO :95) 的质粒 pCR mfCD27His (图 23)。

[0677] 使用 Ligation High (由 Toyobo 制造),按照其随附的说明书,将用限制性酶 NotI 和 SalI (由 Takara Bio 制造) 消化 pCR mfCD27His 而获得的约 800-bp 的 DNA 片段,连接到用限制性酶 NotI 和 SalI (由 Takara Bio 制造) 消化实施例 2 中构建的 pKANTEX CD27 而获得的约 10-kbp 的 DNA 片段中。使用连接的 DNA 片段转化大肠杆菌 DH5 α (由 Toyobo 制造),并制备从相应克隆获得的质粒,使用 BigDye 终止物循环测序 FS 简便反应试剂盒(由 PE Biosystems 制造)按照其随附的说明书进行反应,然后使用同一公司的测序仪 ABI PRISM 3700 分析它们的核苷酸序列。结果,获得了用于表达在 C-末端附有 His 标签的食蟹猴 CD27 的质粒 pKANTEX mfCD27His (图 24)。

[0678] 将用 pKANTEX mfCD27His 转化的大肠杆菌 DH5 α 接种到 200mLLB 培养基中,然后培养过夜。在培养完成后,回收细菌并使用 QIAfilter 质粒中提试剂盒(由 Qiagen 制造),按照其随附的说明书纯化质粒。然后,将 50 μ g 纯化的质粒用限制性酶 AatII (由 New England Biolabs 制造) 消化进行线性化。

[0679] (3) 猴 CD27 表达质粒 pKANTEX mfCD27His 的导入

[0680] 通过将部分 (2) 中构建的食蟹猴 CD27 表达质粒 pKANTEXmfCD27His 基因导入到 Lec8 细胞和 CHO/DG44 细胞中,建立了表达食蟹猴 CD27 的 Lec8 和 DG44 细胞。基因导入以与实施例 1(6) 中相同的方式进行,差别在于使用 pKANTEX mfCD27His 作为待导入的质粒。在基因导入后,将细胞悬浮在 30mL HT- 培养基中,以 100 μ L/ 孔的量将细胞悬液接种在 96 孔板上,进行三份平行样。接种后 1 天,将培养基更换为含有 500 μ g/mL G418 的传代培养

基,然后培养 10 天。然后获得了 G418 抗性克隆。将源自于 Lec8 的食蟹猴 CD27 表达细胞系命名为食蟹猴 CD27/Lec8 细胞,而源自于 DG44 的食蟹猴 CD27 表达细胞系命名为食蟹猴 CD27/DG44 细胞。

[0681] 实施例 9

[0682] 评估抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体与猴 CD27 蛋白的交叉反应性

[0683] 使用实施例 8 中构建的食蟹猴 CD27/DG44 和食蟹猴 CD27/Lec8 细胞作为测定细胞。

[0684] (1) 使用荧光细胞染色(流式细胞仪分析)评估抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体与猴 CD27 表达细胞的反应性

[0685] 按照下列步骤测量了每种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 与食蟹猴 CD27 表达细胞的结合活性。

[0686] 将在添加有 500 μ g/mL G418 的 HT- 培养基中传代培养的食蟹猴 CD27/DG44 和食蟹猴 CD27/Lec8 细胞,使用 0.02% EDTA 溶液进行剥离,并将相应的细胞用 PBS 洗涤。然后,将 5×10^5 个细胞悬浮在 50 μ L 1% BSA-PBS 中,并以 50 μ L/孔的量向其中分配每种制备的含有 10 μ g/mL 抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体(嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031)的抗体溶液作为第一抗体,然后在冰上的温度下反应 1 小时。作为阳性对照,使用了抗 CD27 小鼠抗体 0323。在反应完成后,使用 PBS 通过离心将细胞清洗两次,并以 50 μ L/孔的量向其加入 ALEXA Fluoro 488 标记的抗人类免疫球蛋白 G(H+L) 或 ALEXA Fluoro 488 标记的抗小鼠免疫球蛋白 G(H+L)(都由 BioLegend 制造)作为第二抗体,然后在冰上的温度下在暗处反应 30 分钟。再一次使用 PBS 通过离心将细胞清洗两次后,将细胞悬浮在 500 μ L 1% BSA-PBS 中,并通过流式细胞仪(由 Beckman Coulter 制造,Cytomics FC500MPL)测量用 488nm 氩激光激发的 510 到 530nm 的荧光。结果显示在图 25 中。

[0687] 结果证明,抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 与表达糖链缺陷型 CD27 的食蟹猴 CD27/Lec8 细胞反应。另一方面,抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026 和嵌合 KM4028 与食蟹猴 CD27/Lec8 细胞的反应性不显著。此外,证实了所有抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体都不与食蟹猴 CD27/DG44 细胞结合。

[0688] (2) 评估抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体对猴 CD27 表达细胞的 ADCC 活性

[0689] 将在添加有 500 μ g/mL G418 的 HT- 培养基中传代培养的食蟹猴 CD27/Lec8 细胞,使用 0.02% EDTA 溶液进行剥离,用 PBS 清洗,用 ADCC 培养基清洗,然后悬浮在相同培养基中以给出最适浓度,并用作靶细胞悬液。此外,以与实施例 7 中相同的方式进行效应细胞悬液的制备和 ADCC 活性的测量。结果显示在图 26 中。

[0690] 结果,所有的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031,都对含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的食蟹猴 CD27/Lec8 细胞(糖链缺陷型食蟹猴 CD27 细胞)表现出 ADCC 活性。

[0691] 从上述结果证明,所有本发明的抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4026、嵌合 KM4028、嵌合 KM4030 和嵌合 KM4031 都表现出对糖链缺陷型食蟹猴 CD27 细胞的交叉反应性。这表明,每种抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体在它们与糖链缺陷型食蟹猴 CD27 的反应性方面显示出强和弱,并表现出将被识别的表位类型的差异。

[0692] 此外,使用通过流式细胞仪分析证实了其中细胞表面上 CD27 的表达量几乎相等

的细胞,在实施例 2 中构建的人类 CD27/Lec8 细胞和实施例 8 中构建的食蟹猴 CD27/Lec8 细胞中测量了抗糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4030 的 ADCC 活性。效应细胞悬液从同样的健康人外周血制备。结果显示在图 27 中。

[0693] 结果表明,糖链缺陷型 CD27 嵌合抗体嵌合 KM4030 对食蟹猴 CD27/Lec8 细胞和人类 CD27/Lec8 细胞表现出相等的 ADCC 活性。

[0694] 实施例 10

[0695] 人源化抗体的制备

[0696] (1) 抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VH 和 VL 的氨基酸序列的设计

[0697] 以下列方式设计抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VH 的氨基酸序列。

[0698] 首先,选择分别用于移植 SEQ ID NO :58、59 和 60 所显示的抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030VH 的 CDR1 到 CDR3 的氨基酸序列的人类抗体的 VH 的 FR 的氨基酸序列。使用 GCG 软件包(由 Genetics Computer Group 制造)作为序列分析系统,根据常规蛋白的氨基酸序列数据库,通过 BLASTP 方法 [Nucleic Acids Res., 25, 3389(1997)], 搜索与抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 具有高度同源性的类抗体。当将同源性分值与实际氨基酸序列的同源性相比时, SWISSPROT 数据库登记号 BAH04525, 人类中抗 H3N2 流感病毒的中和单克隆抗体的全部组成成分(在后文中称为“BAH04525”)表现出 83.9% 的同源性,并且它是具有最高同源性的人类抗体,因此选择该抗体的 FR 的氨基酸序列。

[0699] 将由 SEQ ID NO :58 到 60 所显示的抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的 VH 的 CDR 的氨基酸序列移植到如此确定的人类抗体的 FR 的氨基酸序列的适合位置中。通过这种方式,设计了由 SEQ ID NO :96 显示的抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VH 的氨基酸序列 HV0。

[0700] 接下来,以下列方式设计抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VL 的氨基酸序列。

[0701] 选择分别用于移植 SEQ ID NO :61 到 63 所显示的抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030VL 的 CDR1 到 CDR3 的氨基酸序列的人类抗体的 VL 的 FR 的氨基酸序列。Kabat 等已经将通常所知的各种不同人类抗体的 VL,根据其氨基酸序列的同源性分类成四个亚组(HSGI 到 IV),并报道了每个亚组的共有序列[《免疫学重要的蛋白序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),美国健康与人类服务部(US Dept. Health and Human Services)(1991)]。因此,在人类抗体 VL 的亚组 I 到 IV 的共有序列的 FR 的氨基酸序列与抗糖链缺陷型 CD27 大鼠抗体 KM4030VL 的 FR 的氨基酸序列之间进行了同源性检查。

[0702] 作为同源性分析的结果,HSGI、HSGII、HSGIII 和 HSGIV 的同源性分别为 86.3%、60.0%、73.8% 和 73.8%。因此, KM4030VL 的 FR 的氨基酸序列与亚类 I 具有最高的同源性。

[0703] 根据这些结果,将抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的 VL 的 CDR 的氨基酸序列移植到人类抗体的 VL 的亚类 I 的共有序列的 FR 的氨基酸序列的适合位置中。但是,因为 SEQ ID NO :38 所显示的抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的 VL 的氨基酸序列中第 124 位的 Leu,在对应于 Kabat 所引用的人类抗体 FR 的氨基酸序列的区域中不是使用频率最高的氨基酸残基,而是以相对高频率使用的氨基酸残基,因此使用了上面提到的在抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的氨基酸序列中识别的氨基酸残基。通过这种方式,设计了由 SEQ ID NO :97 显示的抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VL 的氨基酸序列

LV0。

[0704] 在上面设计的抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VH 的氨基酸序列 HV0 和 VL 的氨基酸序列 LV0, 是其中仅仅将抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的 CDR 氨基酸序列移植到所选的人类抗体的 FR 氨基酸序列中的序列, 但是, 一般来说, 当制备人源化抗体时, 在仅仅简单地将大鼠抗体的 CDR 氨基酸序列移植到人类抗体 FR 中的情况下, 其结合活性常常降低。因此, 为了避免结合活性的降低, 在移植 CDR 氨基酸序列的同时, 在人类抗体与小鼠抗体之间不同的 FR 氨基酸残基中, 进行了被认为对结合活性有影响的氨基酸残基的修饰。因此, 在本实施例中, 以下述方式鉴定了被认为对结合活性有影响的 FR 的氨基酸残基。

[0705] 首先, 使用计算机模拟技术构建了包含上面设计的抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 VH 的氨基酸序列 HV0 和 VL 的氨基酸序列 LV0 的抗体 V 区 (HV0LV0) 的三维结构。三维结构坐标的制备和三维结构的显示使用软件 Discovery Studio (由 Accelrys 制造), 按照其随附的说明书进行。此外, 也以同样方式构建了抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的 V 区的三维结构的计算机模型。此外, 通过同样地构建包含氨基酸序列的三维结构模型, 在所述氨基酸中选出 HV0LV0 与抗糖链缺陷型 CD27 大鼠抗体 KM4030 的 VH 和 VL 的 FR 氨基酸序列不同的氨基酸残基, 并将其修饰成抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的氨基酸残基, 对抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030、HV0LV0 和修饰产物的 V 区的三维结构进行比较, 由此鉴定到预测对抗体的结合活性具有影响的氨基酸残基。

[0706] 结果, 在据认为改变了抗原结合区的三维结构、因此对抗体的结合活性具有影响的 HV0LV0 的 FR 的氨基酸残基中, 分别选择了 HV0 序列中的第 30 位 Ser、第 48 位 Val、第 49 位 Ser、第 77 位 Asn、第 93 位 Val、第 97 位 Ala 和第 117 位 Thr, 以及 LV0 序列中的第 21 位 Ile、第 40 位 Pro、第 58 位 Val、第 85 位 Thr 和第 87 位 Tyr 作为氨基酸残基。通过将选择的氨基酸残基的至少一个或多个氨基酸序列修饰成在抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的氨基酸序列的相同位置上存在的氨基酸残基, 设计了具有各种不同修饰的人源化抗体的 VH 和 VL。

[0707] 具体来说, 对于抗体 VH 来说, 在 SEQ ID NO :96 所显示的氨基酸序列中导入至少一个修饰, 所述修饰选自用 Asn 取代第 30 位 Ser、Ile 取代第 48 位 Val、Ala 取代第 49 位 Ser、Gly 取代第 77 位 Asn、Thr 取代第 93 位 Val、Thr 取代第 97 位 Ala 和 Val 取代第 117 位 Thr。此外, 对于抗体 VL 来说, 在 SEQ ID NO :97 所显示的氨基酸序列中导入至少一个修饰, 所述修饰选自用 Leu 取代第 21 位 Ile、Leu 取代第 40 位 Pro、Ile 取代第 58 位、Ala 取代第 85 位 Thr 和 Phe 取代第 87 位 Tyr。

[0708] 通过对 HV0LV0 的 FR 中存在的至少一个氨基酸残基进行修饰, 设计了 HV2LV0、HV3LV0、HV5LV0 和 HV7LV0 的可变区氨基酸序列, H 链可变区 HV2、HV3、HV5 和 HV7 的氨基酸序列分别由 SEQ ID NO :101、103、105 和 107 显示。

[0709] (2) 抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的制备和评估

[0710] 使用以高频率使用的密码子, 将编码抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体可变区的氨基酸序列的 DNA 构建在哺乳动物细胞中, 当进行氨基酸序列修饰时, 使用用于抗糖链缺陷型 CD27 大鼠单克隆抗体 KM4030 的 VH 或 VL 的氨基酸序列的编码 DNA 的密码子。抗糖链缺陷型 CD27 人源化抗体的 HV0 和 LV0 的氨基酸序列的编码 DNA 序列分别由 SEQ ID NO :98 和 99 显示, 而其上进行了氨基酸修饰的可变区 HV2、HV3、HV5 和 HV7 的氨基酸序列的编码 DNA

序列分别由 SEQ ID NO :100、102、104 和 106 显示。

[0711] 工业实用性

[0712] 本发明能够提供单克隆抗体或其抗体片段,其特异性识别 CD27 基因编码的含有未结合半乳糖的 O- 连接糖链的多肽,并与其细胞外区域结合;产生所述抗体的杂交瘤;编码所述抗体的 DNA;包含所述 DNA 的载体;可以通过转化所述载体获得的转化体;使用所述杂交瘤或转化体生产抗体或其抗体片段的方法;以及使用所述抗体或其抗体片段的诊断剂或包含所述抗体或其抗体片段作为活性成分的治疗剂。

[0713] 所保藏的生物材料的参考

[0714] IPOD FREM BP-10976

[0715] 序列表的自定义文本

[0716] SEQ ID NO :1- 人类 CD27 DNA 序列

[0717] SEQ ID NO :2- 人类 CD27 氨基酸序列

[0718] SEQ ID NO :3- 描述了人工序列 :CD27 正向引物

[0719] SEQ ID NO :4- 描述了人工序列 :CD27809B

[0720] SEQ ID NO :5- 描述了人工序列 :CD27-A 引物

[0721] SEQ ID NO :6- 描述了人工序列 :CD27-B 引物

[0722] SEQ ID NO :7- 描述了人工序列 :引物 1

[0723] SEQ ID NO :8- 描述了人工序列 :引物 2

[0724] SEQ ID NO :9- 描述了人工序列 :g4A 引物

[0725] SEQ ID NO :10- 描述了人工序列 :g4B 引物

[0726] SEQ ID NO :11- 描述了人工序列 :CD27-Fc 蛋白核苷酸序列

[0727] SEQ ID NO :12- 描述了人工序列 :CD27-Fc 蛋白氨基酸序列

[0728] SEQ ID NO :13- 描述了人工序列 :CD27-C 引物

[0729] SEQ ID NO :14- 描述了人工序列 :大鼠 IgG1 特异性引物

[0730] SEQ ID NO :15- 描述了人工序列 :大鼠 IgG2a 特异性引物

[0731] SEQ ID NO :16- 描述了人工序列 :大鼠 IgG2b 特异性引物

[0732] SEQ ID NO :17- 描述了人工序列 :大鼠 CH1 特异性引物

[0733] SEQ ID NO :18- 描述了人工序列 :大鼠 Ig(κ) 特异性引物 1

[0734] SEQ ID NO :19- 描述了人工序列 :大鼠 Ig(κ) 特异性引物 2

[0735] SEQ ID NO :20-KM4026 VH 的核苷酸序列

[0736] SEQ ID NO :21-KM4027 VH 的核苷酸序列

[0737] SEQ ID NO :22-KM4028 VH 的核苷酸序列

[0738] SEQ ID NO :23-KM4030 VH 的核苷酸序列

[0739] SEQ ID NO :24-KM4031 VH 的核苷酸序列

[0740] SEQ ID NO :25-KM4026 VH 的氨基酸序列

[0741] SEQ ID NO :26-KM4027 VH 的氨基酸序列

[0742] SEQ ID NO :27-KM4028 VH 的氨基酸序列

[0743] SEQ ID NO :28-KM4030 VH 的氨基酸序列

[0744] SEQ ID NO :29-KM4031 VH 的氨基酸序列

- [0745] SEQ ID NO :30-KM4026 VL 的核苷酸序列
- [0746] SEQ ID NO :31-KM4027 VL 的核苷酸序列
- [0747] SEQ ID NO :32-KM4028 VL 的核苷酸序列
- [0748] SEQ ID NO :33-KM4030 VL 的核苷酸序列
- [0749] SEQ ID NO :34-KM4031 VL 的核苷酸序列
- [0750] SEQ ID NO :35-KM4026 VL 的氨基酸序列
- [0751] SEQ ID NO :36-KM4027 VL 的氨基酸序列
- [0752] SEQ ID NO :37-KM4028 VL 的氨基酸序列
- [0753] SEQ ID NO :38-KM4030 VL 的氨基酸序列
- [0754] SEQ ID NO :39-KM4031 VL 的氨基酸序列
- [0755] SEQ ID NO :40-KM4026 VH CDR1
- [0756] SEQ ID NO :41-KM4026 VH CDR2
- [0757] SEQ ID NO :42-KM4026 VH CDR3
- [0758] SEQ ID NO :43-KM4026 VL CDR1
- [0759] SEQ ID NO :44-KM4026 VL CDR2
- [0760] SEQ ID NO :45-KM4026 VL CDR3
- [0761] SEQ ID NO :46-KM4027 VH CDR1
- [0762] SEQ ID NO :47-KM4027 VH CDR2
- [0763] SEQ ID NO :48-KM4027 VH CDR3
- [0764] SEQ ID NO :49-KM4027 VL CDR1
- [0765] SEQ ID NO :50-KM4027 VL CDR2
- [0766] SEQ ID NO :51-KM4027 VL CDR3
- [0767] SEQ ID NO :52-KM4028 VH CDR1
- [0768] SEQ ID NO :53-KM4028 VH CDR2
- [0769] SEQ ID NO :54-KM4028 VH CDR3
- [0770] SEQ ID NO :55-KM4028 VL CDR1
- [0771] SEQ ID NO :56-KM4028 VL CDR2
- [0772] SEQ ID NO :57-KM4028 VL CDR3
- [0773] SEQ ID NO :58-KM4030 VH CDR1
- [0774] SEQ ID NO :59-KM4030 VH CDR2
- [0775] SEQ ID NO :60-KM4030 VH CDR3
- [0776] SEQ ID NO :61-KM4030 VL CDR1
- [0777] SEQ ID NO :62-KM4030 VL CDR2
- [0778] SEQ ID NO :63-KM4030 VL CDR3
- [0779] SEQ ID NO :64-KM4031 VH CDR1
- [0780] SEQ ID NO :65-KM4031 VH CDR2
- [0781] SEQ ID NO :66-KM4031 VH CDR3
- [0782] SEQ ID NO :67-KM4031 VL CDR1
- [0783] SEQ ID NO :68-KM4031 VL CDR2

- [0784] SEQ ID NO :69- KM4031 VL CDR3
- [0785] SEQ ID NO :70- 描述了人工序列 :KM4026 VL 嵌合物的引物 1
- [0786] SEQ ID NO :71- 描述了人工序列 :KM4026 VL 嵌合物的引物 2
- [0787] SEQ ID NO :72- 描述了人工序列 :KM4026 VH 嵌合物的引物 1
- [0788] SEQ ID NO :73- 描述了人工序列 :KM4026 VH 嵌合物的引物 2
- [0789] SEQ ID NO :74- 描述了人工序列 :KM4027 VL 嵌合物的引物 1
- [0790] SEQ ID NO :75- 描述了人工序列 :KM4027 VL 嵌合物的引物 2
- [0791] SEQ ID NO :76- 描述了人工序列 :KM4027 VH 嵌合物的引物 1
- [0792] SEQ ID NO :77- 描述了人工序列 :KM4027 VH 嵌合物的引物 2
- [0793] SEQ ID NO :78- 描述了人工序列 :KM4028 VL 嵌合物的引物 1
- [0794] SEQ ID NO :79- 描述了人工序列 :KM4028 VL 嵌合物的引物 2
- [0795] SEQ ID NO :80- 描述了人工序列 :KM4028 VH 嵌合物的引物 1
- [0796] SEQ ID NO :81- 描述了人工序列 :KM4028 VH 嵌合物的引物 2
- [0797] SEQ ID NO :82- 描述了人工序列 :KM4030 VL 嵌合物的引物 1
- [0798] SEQ ID NO :83- 描述了人工序列 :KM4030 VL 嵌合物的引物 2
- [0799] SEQ ID NO :84- 描述了人工序列 :KM4030 VH 嵌合物的引物 1
- [0800] SEQ ID NO :85- 描述了人工序列 :KM4030 VH 嵌合物的引物 2
- [0801] SEQ ID NO :86- 描述了人工序列 :KM4031 VL 嵌合物的引物 1
- [0802] SEQ ID NO :87- 描述了人工序列 :KM4031 VL 嵌合物的引物 2
- [0803] SEQ ID NO :88- 描述了人工序列 :KM4031 VH 嵌合物的引物 1
- [0804] SEQ ID NO :89- 描述了人工序列 :KM4031 VH 嵌合物的引物 2
- [0805] SEQ ID NO :90- 描述了人工序列 :引物 mfCD27_5UTR
- [0806] SEQ ID NO :91- 描述了人工序列 :引物 mfCD2_73UTR
- [0807] SEQ ID NO :92- 恒河猴 CD27 cDNA 序列
- [0808] SEQ ID NO :93- 描述了人工序列 :引物 mfCD27toKAN_5
- [0809] SEQ ID NO :94- 描述了人工序列 :引物 mfCD27HisKAN_3
- [0810] SEQ ID NO :95- 描述了人工序列 :带 His 标签的恒河猴 CD27 cDNA 序列
- [0811] SEQ ID NO :96- 描述了人工序列 :KM4030 HV0 的氨基酸序列
- [0812] SEQ ID NO :97- 描述了人工序列 :KM4030 LV0 的氨基酸序列
- [0813] SEQ ID NO :98- 描述了人工序列 :KM4030 HV0 的核苷酸序列
- [0814] SEQ ID NO :99- 描述了人工序列 :KM4030 LV0 的核苷酸序列
- [0815] SEQ ID NO :100- 描述了人工序列 :KM4030 HV2 的核苷酸序列
- [0816] SEQ ID NO :101- 描述了人工序列 :KM4030 HV2 的氨基酸序列
- [0817] SEQ ID NO :102- 描述了人工序列 :KM4030 HV3 的核苷酸序列
- [0818] SEQ ID NO :103- 描述了人工序列 :KM4030 HV3 的氨基酸序列
- [0819] SEQ ID NO :104- 描述了人工序列 :KM4030 HV5 的核苷酸序列
- [0820] SEQ ID NO :105- 描述了人工序列 :KM4030 HV5 的氨基酸序列
- [0821] SEQ ID NO :106- 描述了人工序列 :KM4030 HV7 的核苷酸序列
- [0822] SEQ ID NO :107- 描述了人工序列 :KM4030 HV7 的氨基酸序列

[0001]

序列表

- <110> 协和发酵麒麟株式会社
- <120> 抗 CD27 抗体
- <130> SCT105547-00
- <150> JP 2008-171353
- <151> 2008-06-30
- <160> 107
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 783
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(783)
- <223> human CD27 DNA sequence

- <400> 1

atg gca cgg cca cat ccc tgg tgg ctg tgc gtt ctg ggg acc ctg gtg	48
Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val	
1 5 10 15	
ggg ctc tca gct act cca gcc ccc aag agc tgc cca gag agg cac tac	96
Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr	
20 25 30	
tgg gct cag gga aag ctg tgc tgc cag atg tgt gag cca gga aca ttc	144
Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe	
35 40 45	
ctc gtg aag gac tgt gac cag cat aga aag gct gct cag tgt gat cct	192
Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro	
50 55 60	
tgc ata ccg ggg gtc tcc ttc tct cct gac cac cac acc cgg ccc cac	240

[0002]

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His 65	70	75	80	
tgt gag agc tgt cgg cac tgt aac tct ggt ctt ctc gtt cgc aac tgc Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys	85	90	95	288
acc atc act gcc aat gct gag tgt gcc tgt cgc aat ggc tgg cag tgc Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys	100	105	110	336
agg gac aag gag tgc acc gag tgt gat cct ctt cca aac cct tcg ctg Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu	115	120	125	384
acc gct cgg tcg tct cag gcc ctg agc cca cac cct cag ccc acc cac Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His	130	135	140	432
tta cct tat gtc agt gag atg ctg gag gcc agg aca gct ggg cac atg Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met	145	150	155	480
cag act ctg gct gac ttc agg cag ctg cct gcc cgg act ctc tct acc Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr	165	170	175	528
cac tgg cca ccc caa aga tcc ctg tgc agc tcc gat ttt att cgc atc His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile	180	185	190	576
ctt gtg atc ttc tct gga atg ttc ctt gtt ttc acc ctg gcc ggg gcc Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala	195	200	205	624
ctg ttc ctc cat caa cga agg aaa tat aga tca aac aaa gga gaa agt Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser	210	215	220	672
cct gtg gag cct gca gag cct tgt cgt tac agc tgc ccc agg gag gag Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu	225	230	235	720
gag ggc agc acc atc ccc atc cag gag gat tac cga aaa ccg gag cct				768

[0003]

Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro
 245 250 255

gcc tgc tcc ccc tga
 Ala Cys Ser Pro
 260

783

<210> 2

<211> 260

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
 1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
 65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu

[0004]

115	120	125
Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His 130	135	140
Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met 145	150	155 160
Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr 165	170	175
His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile 180	185	190
Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala 195	200	205
Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser 210	215	220
Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu 225	230	235 240
Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro 245	250	255
Ala Cys Ser Pro 260		
<210> 3		
<211> 65		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		

[0005]

<220>
 <223> Description of artificial sequence : CD27 forward primer

 <400> 3
 gggcggccgc tcctcaggct gtctcctcag gttgcctcct caaaatggca cggccacatc 60

 cctgg 65

 <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: CD27809B

 <400> 4
 ggggatccca gggatctttg ggggtggcca 29

 <210> 5
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence : CD27-A primer

 <400> 5
 gggcggccgc tcctcaggct gtctcctcag gttgcctcct caaaatggca cggccacatc 60

 cctgg 65

 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: CD27-B primer

 <400> 6

[0006]

ggggatccca gggatcttg ggtggcca	29
<210> 7	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: Primer1	
<400> 7	
caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt ccccatgcc caccatgcc	60
ag	62
<210> 8	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: Primer2	
<400> 8	
acgcacgtga cctcaggggt cgggagatc atgagagtgt ccttggggtt tggggggaac	60
<210> 9	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: g4A primer	
<400> 9	
ggggatccga gtccaaatat ggtcccccac gccca	35
<210> 10	
<211> 32	
<212> DNA	

[0007]

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: g4B primer

<400> 10
gggtcgactc atttaccag agacagggag ag 32

<210> 11
<211> 1248
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: CD27-Fc protein

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(1248)
<223> CD27-Fc fusion protein DNA sequence

<400> 11
atg gca cgg cca cat ccc tgg tgg ctg tgc gtt ctg ggg acc ctg gtg 48
Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

ggg ctc tca gct act cca gcc ccc aag agc tgc cca gag agg cac tac 96
Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
20 25 30

tgg gct cag gga aag ctg tgc tgc cag atg tgt gag cca gga aca ttc 144
Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
35 40 45

ctc gtg aag gac tgt gac cag cat aga aag gct gct cag tgt gat cct 192
Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
50 55 60

tgc ata ccg ggg gtc tcc ttc tct cct gac cac cac acc cgg ccc cac 240
Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

[0008]

tgt gag agc tgt cgg cac tgt aac tct ggt ctt ctc gtt cgc aac tgc	288
Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys	
85 90 95	
acc atc act gcc aat gct gag tgt gcc tgt cgc aat ggc tgg cag tgc	336
Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys	
100 105 110	
agg gac aag gag tgc acc gag tgt gat cct ctt cca aac cct tcg ctg	384
Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu	
115 120 125	
acc gct cgg tcg tct cag gcc ctg agc cca cac cct cag ccc acc cac	432
Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His	
130 135 140	
tta cct tat gtc agt gag atg ctg gag gcc agg aca gct ggg cac atg	480
Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met	
145 150 155 160	
cag act ctg gct gac ttc agg cag ctg cct gcc cgg act ctc tct acc	528
Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr	
165 170 175	
cac tgg cca ccc caa aga tcc ctg gga tcc gag tcc aaa tat ggt ccc	576
His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro	
180 185 190	
cca tgc cca cca tgc cca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc	624
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val	
195 200 205	
ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg acc	672
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	
210 215 220	
cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc gag	720
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	
225 230 235 240	
gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat gcc gtg gag gtg cat aat gcc aag	768
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
245 250 255	

[0009]

aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc agc	816
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	
260 265 270	
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag	864
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	
275 280 285	
tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc	912
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile	
290 295 300	
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg ccc	960
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	
305 310 315 320	
cca tcc cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg	1008
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	
325 330 335	
gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat	1056
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	
340 345 350	
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc	1104
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	
355 360 365	
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc agg cta acc gtg gac aag agc agg	1152
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	
370 375 380	
tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg	1200
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	
385 390 395 400	
cac aac cac tac aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga	1248
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
405 410 415	

<210> 12
 <211> 415
 <212> PRT

[0010]

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 12

Met Ala Arg Pro His Pro Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val
1 5 10 15

Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr
 20 25 30

Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met Cys Glu Pro Gly Thr Phe
 35 40 45

Leu Val Lys Asp Cys Asp Gln His Arg Lys Ala Ala Gln Cys Asp Pro
 50 55 60

Cys Ile Pro Gly Val Ser Phe Ser Pro Asp His His Thr Arg Pro His
65 70 75 80

Cys Glu Ser Cys Arg His Cys Asn Ser Gly Leu Leu Val Arg Asn Cys
 85 90 95

Thr Ile Thr Ala Asn Ala Glu Cys Ala Cys Arg Asn Gly Trp Gln Cys
 100 105 110

Arg Asp Lys Glu Cys Thr Glu Cys Asp Pro Leu Pro Asn Pro Ser Leu
 115 120 125

Thr Ala Arg Ser Ser Gln Ala Leu Ser Pro His Pro Gln Pro Thr His
 130 135 140

Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met

[0011]

145	150	155	160
Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr	165	170	175
His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro	180	185	190
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val	195	200	205
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	210	215	220
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu	225	230	240
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	245	250	255
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	260	265	270
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	275	280	285
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile	290	295	300
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	305	310	320
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			

[0012]

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

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: CD27-C primer

<400> 13
 gggtcgacct caggggggagc aggcaggctc

30

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: a primer for rat IgG1

<400> 14

[0013]

gcaatcacct ccacagtttc tgggcac	27
<210> 15	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: a primer for rat IgG2a	
<400> 15	
ccacaaggat tgcattcct tggcac	26
<210> 16	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: a primer for rat IgG2b	
<400> 16	
gggcatgtag ggcatttg tg tccaatgc	28
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: a primer for rat CH1	
<400> 17	
cgctggacag ggctccagag ttcc	24
<210> 18	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

[0014]

<220>		
<223>	Description of artificial sequence: a primer for rat Ig kappa	
<400>	18	
	gactgaggca cctccagttg ctaactgttc c	31
<210>	19	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial sequence	
<220>		
<223>	Description of artificial sequence: a primer for rat Ig kappa	
<400>	19	
	cctgttgaag ctcttgacga cgggtgagg	29
<210>	20	
<211>	405	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	
<400>	20	
	atgagaacgt tgggtcttct gtacctgttg acagcccttc ctggatcct gtctgaggtg	60
	cagcttcagg agtcaggacc tggccttggtg aaaccctcac agtcactctc cctcacctgt	120
	tctgtcactg gtttctccat cactagtagt tactggggct ggatccgaa gttcccagga	180
	aataaaatgg agtggatggg atacataaac tacagtggta gcactagcta caaccatct	240
	ctcaaaagtc gaatctccat tactagagac acatcgaaga atcagttctt cctgcagttg	300
	aactctataa ctactgagga cacagccgca tatttctgtg caagatggac tgggcagtac	360
	tactttgatt actggggcca aggagtcatg gtcacagtct cctca	405
<210>	21	
<211>	411	
<212>	DNA	
<213>	Rattus norvegicus	

[0015]

<400> 21
 atggacatca ggctcagctt ggctttcctt gtccttttca taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tagagtctgg gggcggttta gtgcagcctg gaaggccat gaaaatctcc 120
 tgtgtagcct caggatccac tttcagtaac tatggcatgg cctgggtccg ccaggctcca 180
 acgaaggggc tggagtggct tgcaaccatt acttatgatg gtagtaccac ttactatcga 240
 gactccgtga agggccgatt cactatctcc agagataatg caaaaagcac cctatacctg 300
 caaatgaaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaag agatctggga 360
 ctctactact ttgattactg gggccaagga gtcatggta cagtctctc a 411

<210> 22
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 22
 atggacatca ggctcagctt ggctttcctt gtccttttca taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tagagtctgg gggcggttta gtgcagcctg gaaggccat gaaactctcc 120
 tgtgcagcct caggattcac tttcagtaac tatggcatgg cctgggtccg ccaggctcca 180
 acgaaggggc tggagtgggt tgcaaccatt agttatgatg gtagtagtat ttactatcga 240
 gactccgtga agggccgatt tattatctcc agagataatg caaaaagcac cctatacctg 300
 caaatgaaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaag agatccgggg 360
 gtctactact ttgattactg gggccaagga gtcatggta cagtctctc a 411

<210> 23
 <211> 426
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 23

[0016]

atggacatca ggctcagctt ggttttcctt gtccttttca taaaagggtg ccagtgtgag	60
gtgcagttgg tggagtctgg gggaggccta gtgcagcctg gaaggtctct gaaactatcc	120
tgtgtagcct ctggattcac attcaataac tactggatga cctggatccg ccaggctcca	180
gggaaggggc tggagtggat tgcattccatt actaatagtg gtggtagcac ttactatcca	240
gactctgtga agggccgatt cactatctcc agagataatg caaaaggcac cctatacctg	300
caaatgaaca gtctgaggtc tggagacacg gccacttatt actgtacaag agatgttaac	360
acatactatg ggtataacgc cctctttgat tactggggcc aaggagtcac ggtcacagtc	420
tctca	426

<210> 24
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 24	
atggacatca ggctcagctt ggctttcatt gtccttttca taaaagggtg cccgtgtgag	60
gtacagttgg tagagtctgg gggcggttta gtggagcctg gaaggtccat gaaactctcc	120
tgtgcagcct caggattcac cttcagtgac tatggcatgg cctgggtccg ccaggctcca	180
acgaaggggc tggagtgggt tgcaaccatt acttatgatg gtagcattta ctatcgagac	240
tccgtgaagg gccgattcac aatctccaga gataatgcaa aaagcacct ttacctgcaa	300
atgaacagtc tgaggtctga ggacacggcc acttattact gtacaagaga cccgggtctc	360
tactactttg atttctgggg ccaaggagtc atggtcacag tctcctca	408

<210> 25
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 25

[0017]

1	5	10	15	
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	20	25	30	
Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	35	40	45	
Ser Asn Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu	50	55	60	
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Arg	65	70	75	80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser	85	90	95	
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr	100	105	110	
Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Pro Gly Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly	115	120	125	
Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser	130	135		
<210> 28				
<211> 142				
<212> PRT				
<213> Rattus norvegicus				
<400> 28				
Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly	1	5	10	15

[0020]

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

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

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

Glu Trp Ile Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Val Asn Thr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Leu
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 29

<211> 136

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 29

Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Ala Phe Ile Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15

[0021]

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

Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu
 50 55 60

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg Asp Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 30

<211> 399

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 30

atggaatcac agaccaggt cctcatgtcc ctgctgctct ggatttctgg tacctgtggg 60

gacattgtga tgaccaatc tccatcctct ctggctgtgt cagcaggaga gacggtcact 120

ataaactgca agtccagtca gagtctttta tacagtggaa accaaaagaa ctatttggcc 180

[0022]

tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaattgctga tctactgggc atctactagg 240
 caatctgggtg tccctgatcg cttcataggg agtggatctg ggacagactt cactctgacc 300
 atcagcagtg tgcaggcaga agatctggca atttattact gtcagcagta ttatgatact 360
 cctccggcgt ttggagctgg gaccaagctg gaactgaaa 399

<210> 31
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 31
 atggaatcac agaccagggt cctcatgtcc ctgctgctct ggatttctgg taccctgggg 60
 gacattgtga tgaccaatc accatcctct ctggctgtgt cagcaggaga gacggctcact 120
 ataaactgca agtccagtca gagtctttta tacagtggaa accaaaagaa ctacttggcc 180
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atcttctagg 240
 caatctgggtg tccctgatcg cttcataggg agtggatctg ggacagactt cactctgacc 300
 atcagcagtg tgcaggcaga agatccggca atttattact gtcagcagta ttatgatget 360
 cctcggacgt tcggtggagg ctccaagctg gaattgaaa 399

<210> 32
 <211> 399
 <212> DNA
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 32
 atggaatcac agaccagggt cctcatgtcc ctgctgctct ggatttctgg tacctgtggg 60
 gacattgtga tgaccaatc tccatcctct ctggctgtgt cagcaggaga gacggctcact 120
 ataaactgta agtccagtca gagtcttttg tacagtggaa accaaaggaa ctatttggcc 180
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atctactagg 240

[0023]

caatctggtg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacaaactt cactctgacc	300
atcagcagtg tgcaggcaga agatctggca atttattact gtcaacagta ttatgatact	360
cctcggacgt tcggtggagg caccaagctg gaattgaaa	399
<210> 33	
<211> 381	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 33	
atgatggctg cacttcaact cttagggctg ctgctgctct ggctcccagg catgagatgt	60
gacatccaga tgaccagtc tcctcagtc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact	120
ctcaactgca aagcaagtca gaatattaat gagtacttaa actggtatca gcaaaagctt	180
ggagaagctc ccaaactcct gatataataa acaacaatt tgcaaacggg catcccatca	240
aggttcagtg gcagtgatc tggtagatc ttcacactca ccatcagcag cctgcagcct	300
gaggatttg ccgatattt ctgctttcag cataatagtt ggccgtacac gtttggagct	360
gggaccaagc tggaactgaa a	381
<210> 34	
<211> 399	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 34	
atggaatcac agaccaggt cctcatgtcc ctgctgctct ggatttctgg tacctgtggg	60
gacattgtga tgaccagtc tccatcctct ctggctgtgt cagcaggaga gacggtcact	120
ctaaactgcc agtccagtc gagtctttta tacagtggaa accagaagaa ctacttgcc	180
tgtaccagc agaaaccagg tcagtctcct aaacttctga tctactgggc atctactegg	240
caatctggtg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagactt cactctgacc	300

[0024]

atcagcagtg tgcaggcaga agatctggca atttattact gtcagcagta ttataatact 360

cctcggacgt tcggtggagg caccaagctg gaattgaaa 399

<210> 35

<211> 133

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 35

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Thr Pro Pro Ala Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

[0025]

Lys Leu Glu Leu Lys
130

<210> 37
<211> 133
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 37

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Thr Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asp Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys

[0027]

130

<210> 38
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 38

Met Met Ala Ala Leu Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Gly Met Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Val Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn
 35 40 45

Ile Asn Glu Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ala Tyr Phe Cys Phe Gln His Asn
 100 105 110

Ser Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 39
 <211> 133

[0028]

<213> Rattus norvegicus

<400> 40

Ser Ser Tyr Trp Gly
1 5

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 41

Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 42

Trp Thr Gly Gln Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 43

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

[0030]

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 44

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 45

Gln Gln Tyr Tyr Asp Thr Pro Pro Ala
1 5

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 46

Asn Tyr Gly Met Ala
1 5

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 47

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

[0031]

<210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Arg Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 56

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
 1 5

<210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 57

Gln Gln Tyr Tyr Asp Thr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 58

Asn Tyr Trp Met Thr
 1 5

[0034]

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 59

Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 60
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 60

Asp Val Asn Thr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 61

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Glu Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

[0035]

<400> 62

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 63

Phe Gln His Asn Ser Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 64

Asp Tyr Gly Met Ala
1 5

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 65

Thr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

[0036]

<400> 66

Asp Pro Gly Leu Tyr Tyr Phe Asp Phe
1 5

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 67

Gln Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 68

Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp
1 5 10

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 69

Gln Gln Tyr Tyr Asn Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 70

[0037]

- <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4026 VL primer 1

 <400> 70
 gcgaattcgc ctctcaaaa tggaatcaca gaccaggtc ctcatgtcc 49
- <210> 71
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4026 VL primer 2

 <400> 71
 gccgtacgtt tcagttccag cttggtccca gctccaaac 39
- <210> 72
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4026 VH primer 1

 <400> 72
 atggggccgc gaccctcac catgagaacg ttgggtcttc tgtacctgtt g 51
- <210> 73
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4026 VH primer 2

 <400> 73

[0038]

gcgggccctt ggtggaggct gaggagactg tgaccatgac tccttgcc	49
<210> 74	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> KM4027 VL primer 1	
<400> 74	
ggaattgcc tcctcaaat ggaatcacag acccaggtcc tcatg	45
<210> 75	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: KM4027 VL primer 2	
<400> 75	
ccgtacgttt caattccagc ttggagcctc cacc	34
<210> 76	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: KM4027 VH primer 1	
<400> 76	
ggcggccgcg acccctcacc atggacatca ggctcagctt ggctttc	47
<210> 77	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

[0039]

- <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4027 VH primer 2
- <400> 77
 ggggcccttg gtggaggctg aggagactgt gaccatgact ccttg 45
- <210> 78
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
- <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4028 VL primer 1
- <400> 78
 ggaattcgcc tcctcaaaat ggaatcacag acccaggtcc tcatg 45
- <210> 79
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
- <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4028 VL primer 2
- <400> 79
 ccgtacgttt caattccagc ttggtgcctc cacc 34
- <210> 80
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
- <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4028 VH primer 1
- <400> 80
 ggcgcccgcg acccctcacc atggacatca ggctcagctt ggctttc 47
- <210> 81

[0040]

- <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4028 VH primer 2

 <400> 81
 ggggcccttg gtggaggctg aggagactgt gaccatgact ccttg 45
- <210> 82
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4030 VL primer 1

 <400> 82
 gcgaattcgc ctctcaaaa tgatggctgc acttcaactc ttagggctg 49
- <210> 83
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4030 VL primer 2

 <400> 83
 gccgtacgtt tcagttccag cttggtccca gctccaaac 39
- <210> 84
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4030 VH primer 1

 <400> 84

[0041]

atgcggccgc gaccctcac catggacatc aggctcagct tggtttctct tg	52
<210> 85	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: KM4030 VH primer 2	
<400> 85	
gctggccctt ggtggaggct gaggagactg tgaccatgac tccttgcc	49
<210> 86	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: KM4031 VL primer 1	
<400> 86	
gcgaattcgc ctctcaaaa tggaatcaca gaccaggctc ctcatgtcc	49
<210> 87	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: KM4031 VL primer 2	
<400> 87	
gccgtacgtt tcaattccag cttggtgctt ccaccgaac	39
<210> 88	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	

[0042]

- <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4031 VH primer 1
- <400> 88
 atgcgggccgc gaccctcac catggacatc aggctcagct tggctttcat tg 52
- <210> 89
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
- <220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4031 VH primer 2
- <400> 89
 gcgggcccctt ggtggaggct gaggagactg tgacatgac tccttgcc 49
- <210> 90
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
- <220>
 <223> Description of artificial sequence: mfCD27_5UTR
- <400> 90
 gcacagaaag gcgctccctg ggcaggaacc 30
- <210> 91
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
- <220>
 <223> Description of artificial sequence: mfCD27_3UTR
- <400> 91
 ggctgtagtg cagctcccgc aggtgctggc 30
- <210> 92

[0043]

<211> 783
 <212> DNA
 <213> *Macaca fascicularis*

 <400> 92
 atggcacggc cacatccctg gtggctgtgc tttctgggga ccttgggtggg gctctcagct 60
 actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg ctccaggaaa actgtgctgc 120
 cagatgtgtg agccaggaac attccttgtg aaggactgtg accagcacag aaaggctgcc 180
 cagtgtcacc cttgcatacc aggggtctcc ttctctccag accaccacac ccggcctcac 240
 tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcattc gcaactgcac catcactgcc 300
 aacgctgtgt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg tactgagtgt 360
 gatcctcttc caaaccttc gctgaccact tggccatctc aggccctggg cccacaccct 420
 cagcccacc acttacctta tgtcaatgag atgctggagg ccagaacagc agggcacatg 480
 cagactctgg ctgacttcag gcacctgcct gcccggactc tctctacca ctggccacc 540
 caaagatccc tgtgcagctc agatcttatt cgtatccttg tgatcttctc cggaatgttt 600
 ctgttttca ccctggccgg aaccctgttc ctccatcaac aaaggaaata tagatcaaac 660
 aaaggagaaa gtcccatgga gcctgcagaa cttgtcctt acagctgccc caggaggag 720
 gaaggcagca ccaccccat ccaagaggat taccgaaaac cggagcctgc ctctccccg 780
 tga 783

<210> 93
 <211> 71
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> mfCD27toKAN_5

<400> 93
 gggcggccgc tcctcaggct gtctcctcag gttgcctcct caaaatggca cggccacatc 60

[0044]

cctggtggct g	71
<210> 94	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: mfCD27HisKAN_3	
<400> 94	
gggtcgactc aatgatgatg atgatgatgc ggggaggagg caggctccgg ttttcg	56
<210> 95	
<211> 801	
<212> DNA	
<213> Artificial sequence	
<220>	
<223> Description of artificial sequence: His tag-fused mucaca fascicularis CD27 cDNA sequence	
<400> 95	
atggcacggc cacatccctg gtggetgtgc tttctgggga cctggtggg gctctcagct	60
actccagccc ccaagagctg cccagagagg cactactggg cttagggaaa actgtgctgc	120
cagatgtgtg agccaggaac attccttgtg aaggactgtg accagcacag aaaggctgcc	180
cagtgtcatc cttgcatacc aggggtctcc ttctctccag accaccacac ccggcctcac	240
tgtgagagct gtcggcactg taactctggt cttctcatc gcaactgcac catcactgcc	300
aacgctgtgt gtgcctgtcg caatggctgg cagtgcaggg acaaggagtg tactgagtgt	360
gatcctctc caaaccttc gctgaccact tggccatctc aggcctggg cccacacct	420
cagcccacc acttacctta tgtcaatgag atgctggagg ccagaacagc agggcacatg	480
cagactctgg ctgacttcag gcacctgct gcccgactc tctctacca ctggccacc	540

[0045]

caaagatccc tgtgcagctc agatatttatt cgtatccttg tgatcttctc cggaatgttt 600
 cttgttttca ccttgccgg aaccctgttc ctccatcaac aaaggaaata tagatcaaac 660
 aaaggagaaa gtcccatgga gcctgcagaa ccttgcctt acagctgccc caggaggag 720
 gaaggcagca ccatcccat ccaagaggat taccgaaaac cggagcctgc ctctccccg 780
 catcatcatc atcatcattg a 801

<210> 96

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HVO amino acid sequence

<400> 96

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

[0046]

Ala Arg Asp Val Asn Thr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Leu Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 97

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 LVO amino acid
 sequence

<400> 97

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

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

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln His Asn Ser Trp Pro Tyr
 85 90 95

[0047]

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

<210> 98
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HVO DNA sequence

<400> 98

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggtggc ttggtaaagc ctgggcggtc cctgcgactc 60
 tcctgtgcag cctctggttt cacctttagc aactactgga tgacctggat cgcagcaggct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcatcc attactaata gtggtggtag cacttactat 180
 ccagactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccagaca atgccaagaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagccgtat attactgtgc ccgagatggt 300
 aacacatact atgggtataa cgccctcttt gattactggg gcctgggtac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 99
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 LVO DNA sequence

<400> 99

gacatccaga tgaccagtc tccttcctca ctgtctgcat ctgtaggtga ccgagtcacc 60
 atcacttgca aagcaagtca gaatattaat gactacttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataat acaacaatt tgcaaacggg ggtcccatca 180

[0048]

cggttcagcg gcagtggttc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct 240
 gaagatttcg caacttatta ctgctttcag cataatagtt ggccgtacac gttcggccaa 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 100
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4030 HV2 DNA Sequence

<400> 100
 gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggtggc ttggtaaagc ctgggcggtc cctgcgactc 60
 tcctgtgcag cctctggttt cacctttaat aactactgga tgacctggat ccgccaggct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcatcc attactaata gtggtggtag cacttactat 180
 ccagactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccagagaca atgccaagaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagccgtat attactgtac acgagatggt 300
 aacacatact atgggtataa cgccctcttt gattactggg gcctgggtac cctggtcacc 360
 gtctctctca 369

<210> 101
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: KM4030 HV2 amino acid
 sequence

<400> 101

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

[0049]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Thr Arg Asp Val Asn Thr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Leu Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HV3 DNA Sequence

<400> 102

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggtggc ttggtaaaagc ctgggcggtc cctgcgactc 60

tcctgtgcag cctctggttt cacctttagc aactactgga tgacctggat ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg gattgcatcc attactaata gtggtggtag cacttactat 180

[0050]

ccagactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccagagaca atgccaagaa cagcctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagccgtat attactgtac acgagatgtt 300
 aacacatact atgggtataa cgccctcttt gattactggg gcctgggtac cctggtcacc 360
 gtctcctca 369

<210> 103

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: HV3 amino acid sequence

<400> 103

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

[0051]

Thr Arg Asp Val Asn Thr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Leu Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 104

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HV5 DNA Sequence

<400> 104

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggtggc ttggtaaagc ctgggcggtc cctgcgactc 60

tctgtgcag cctctggttt caccitaaat aactactgga tgacctgat cggccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg gattgcatcc attactaata gtggtgtag cacttactat 180

ccagactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccagaca atgccaaggg cagcctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagccgtat attactgtac acgagatgtt 300

aacacatact atgggtataa cgccctcttt gattactggg gcttgggtac cctggtcacc 360

gtctctca 369

<210> 105

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HV5 amino acid sequence

<400> 105

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

[0052]

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

<210> 106

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HV7 DNA Sequence

<400> 106

gaggatgcagc tggatggagtc tgggggtggc ttggtaaagc ctgggcggtc cctgcgactc 60

tcctgtgcag cctctggttt cacctttaat aactactgga tgacctggat ccgccaggct 120

[0053]

ccaggggaagg ggctggagtg gattgcatcc attactaata gtggtgtag cacttactat 180
ccagactctg tgaagggccg gttcaccatc tcccgagaca atgccaaggg cagcctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagccactt attactgtac acgagatggt 300
aacacatact atgggtataa cgccctcttt gattactggg gcctgggtgt cctggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 107

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: KM4030 HV7 amino acid
sequence

<400> 107

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

[0054]

Thr Arg Asp Val Asn Thr Tyr Tyr Gly Tyr Asn Ala Leu Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Leu Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

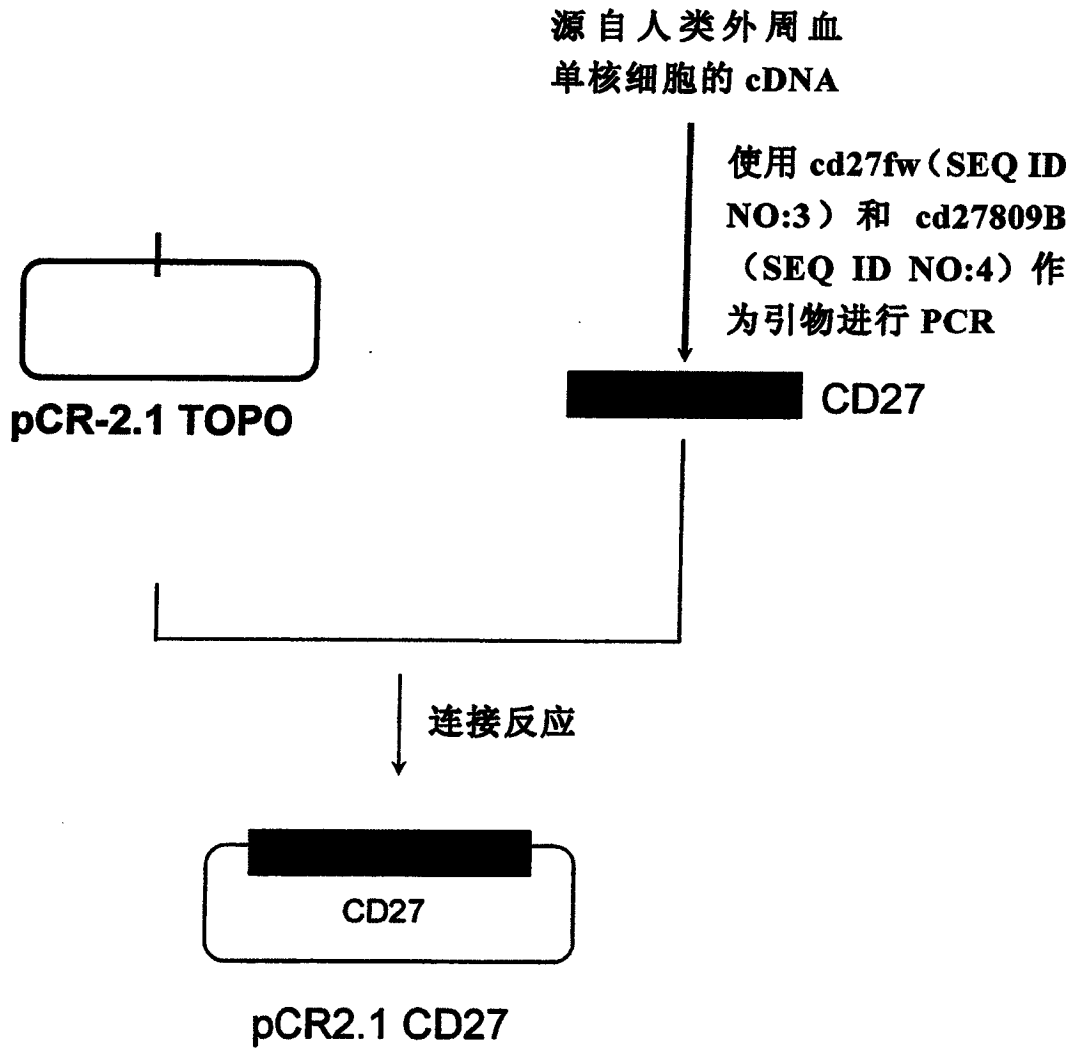


图 1

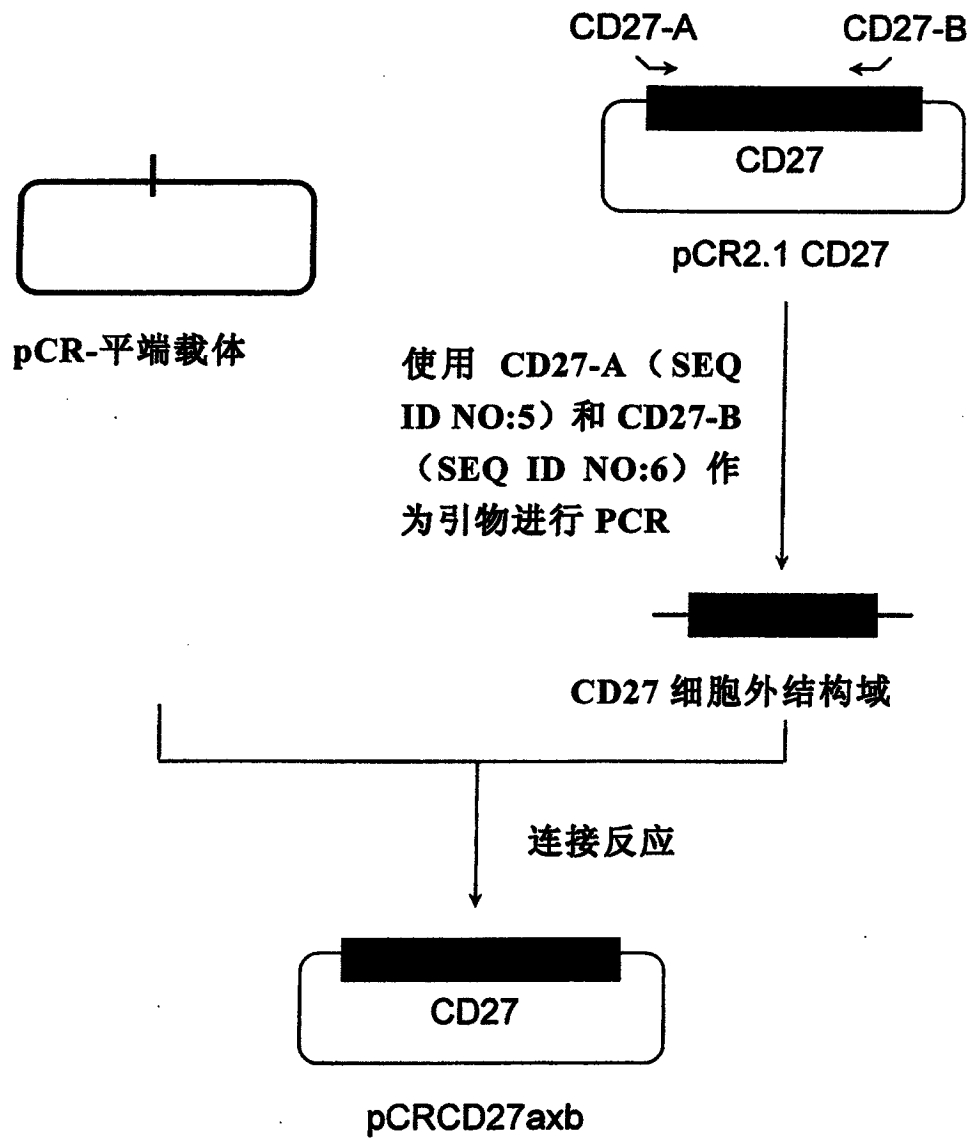


图 2

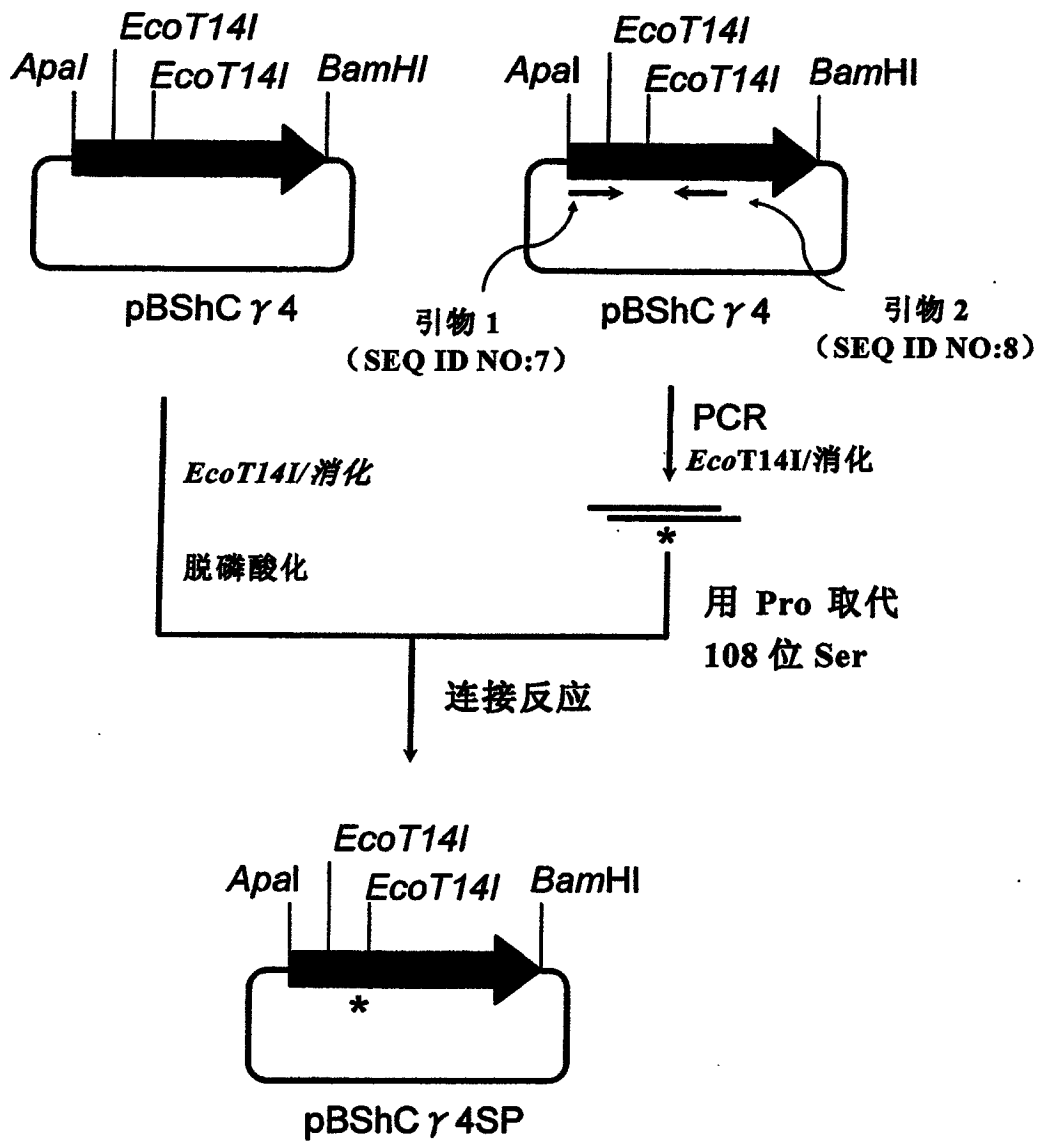


图 3

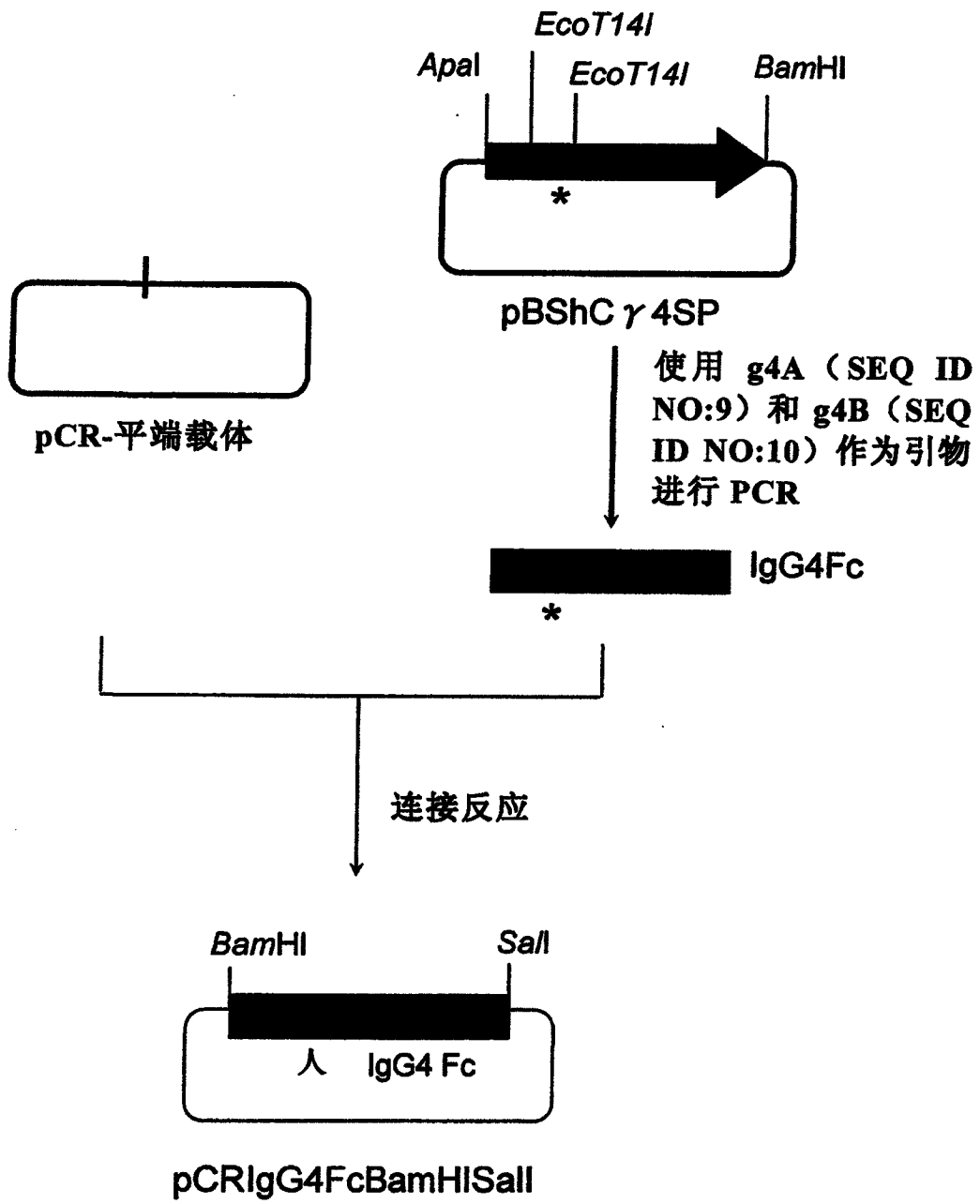


图 4

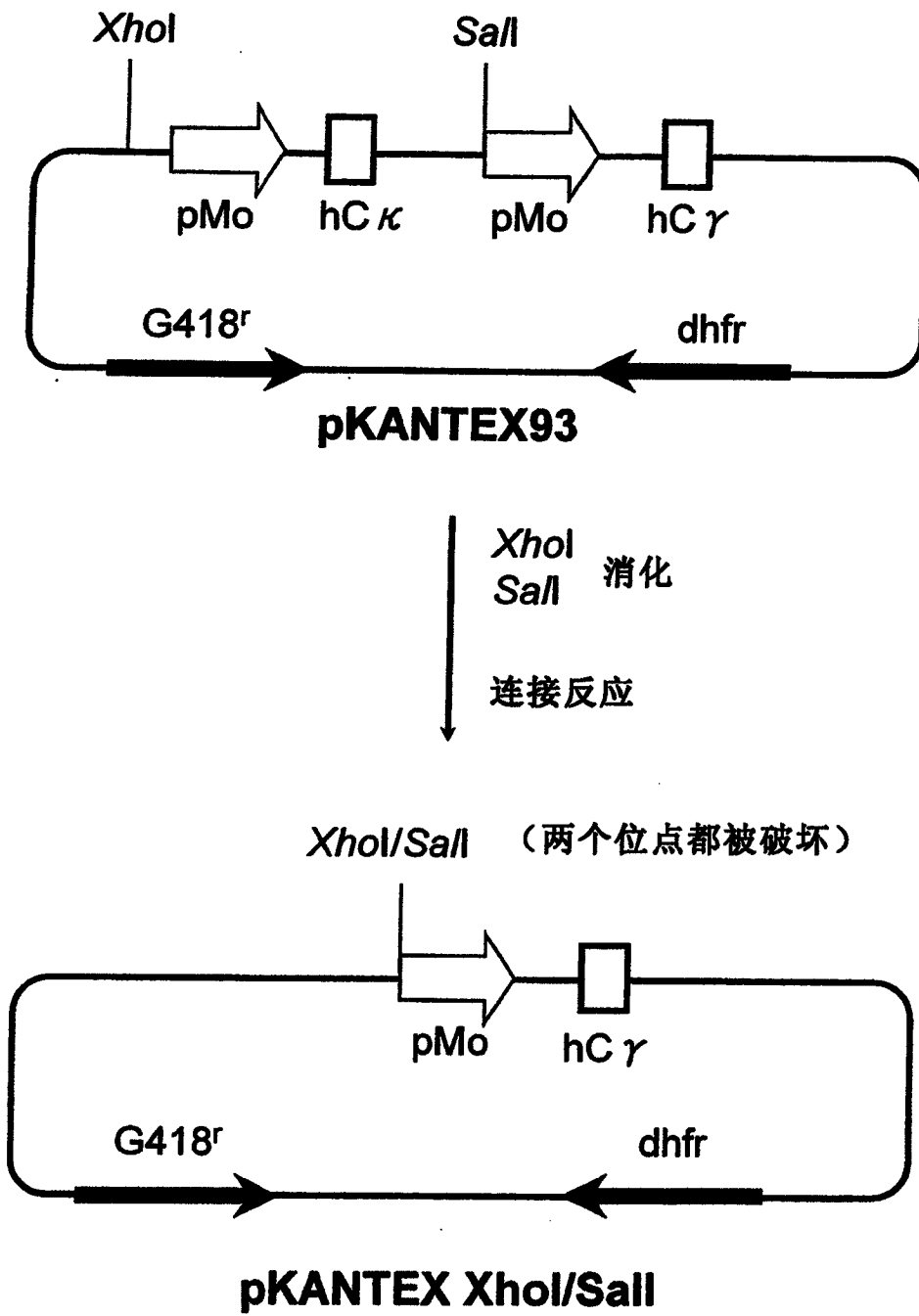


图 5

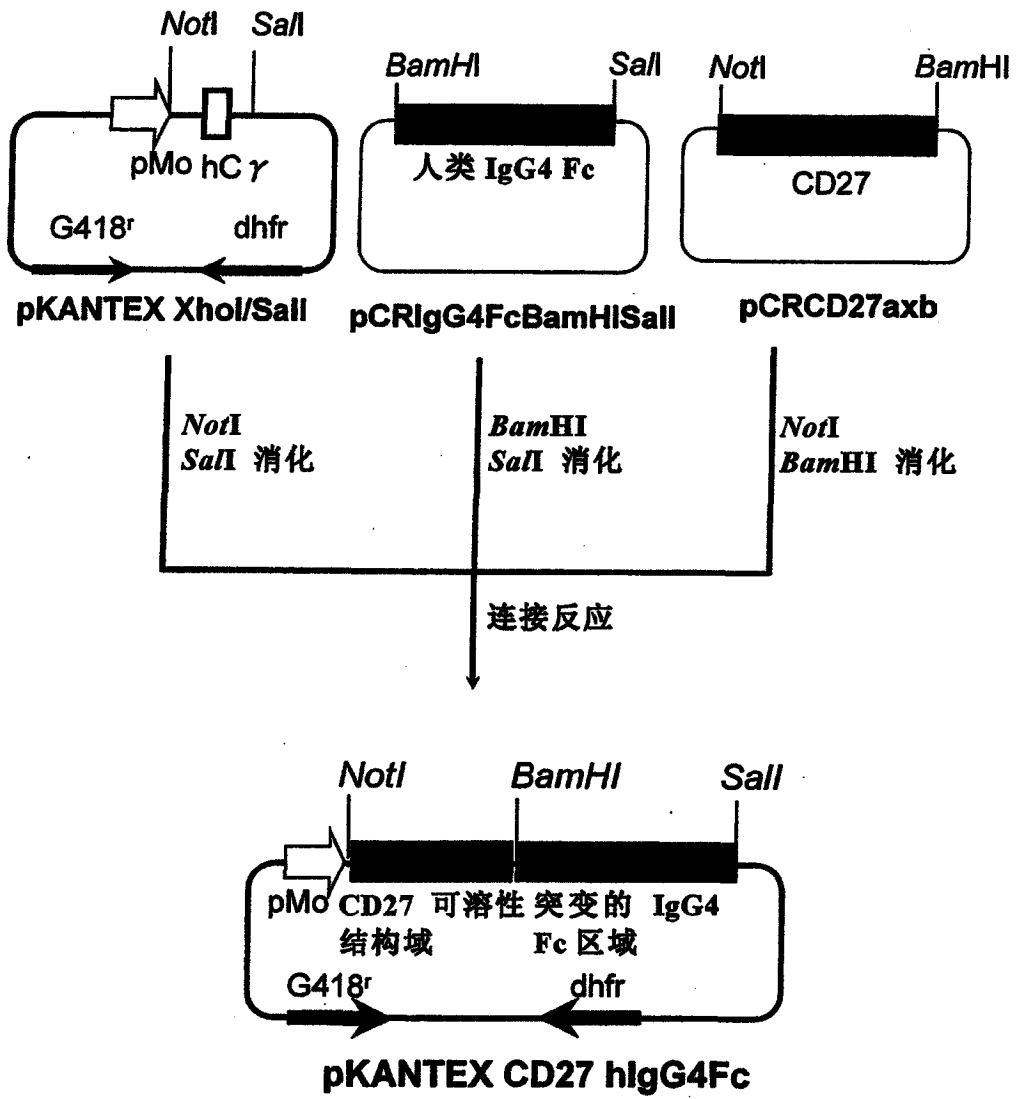


图 6

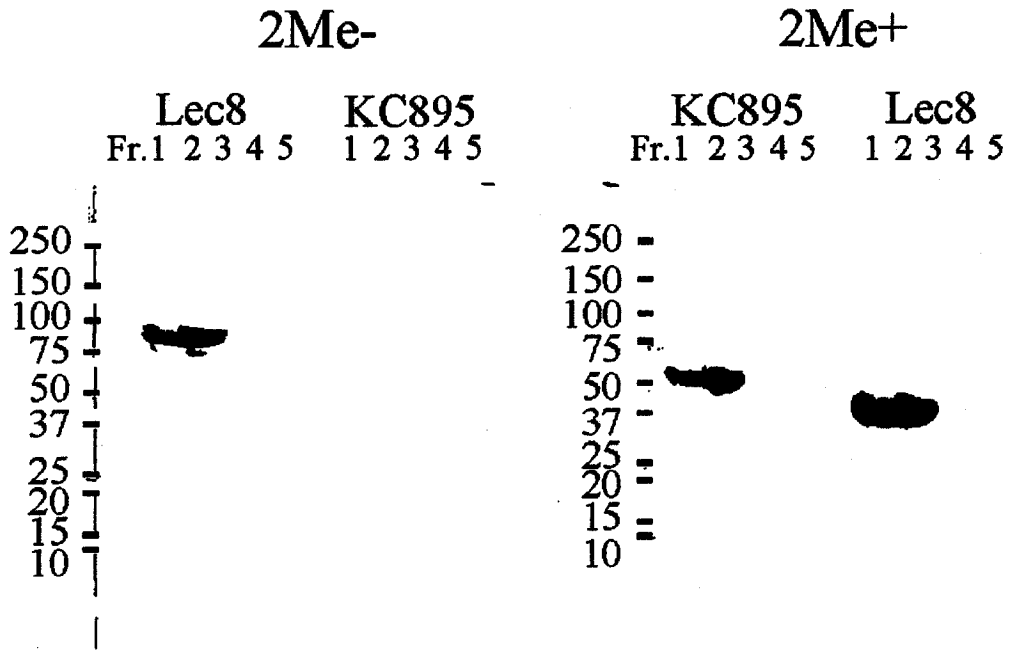


图 7

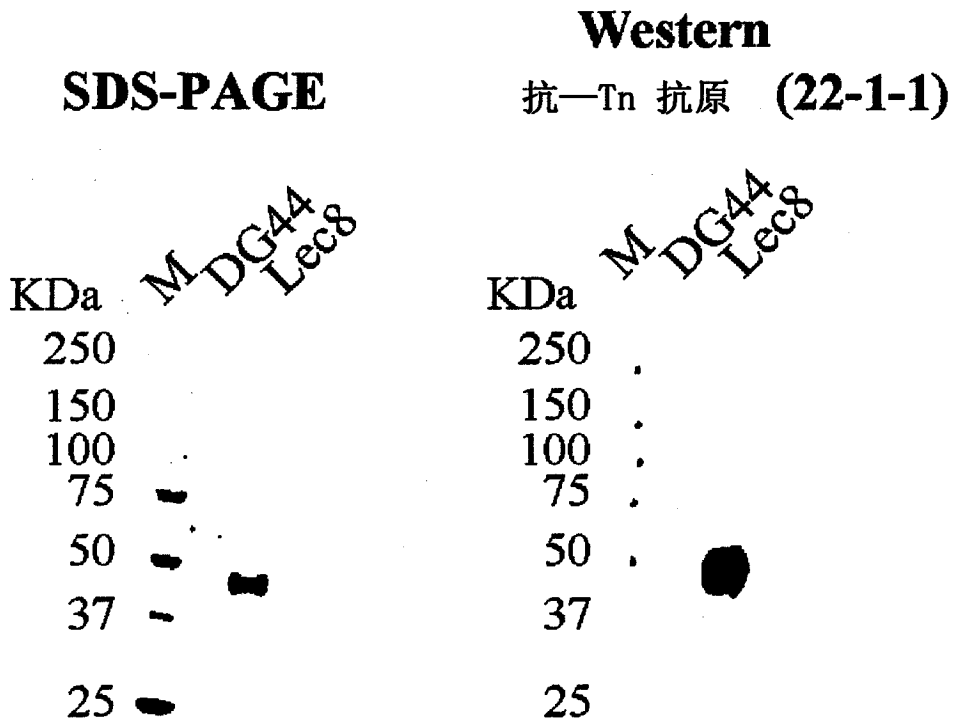


图 8

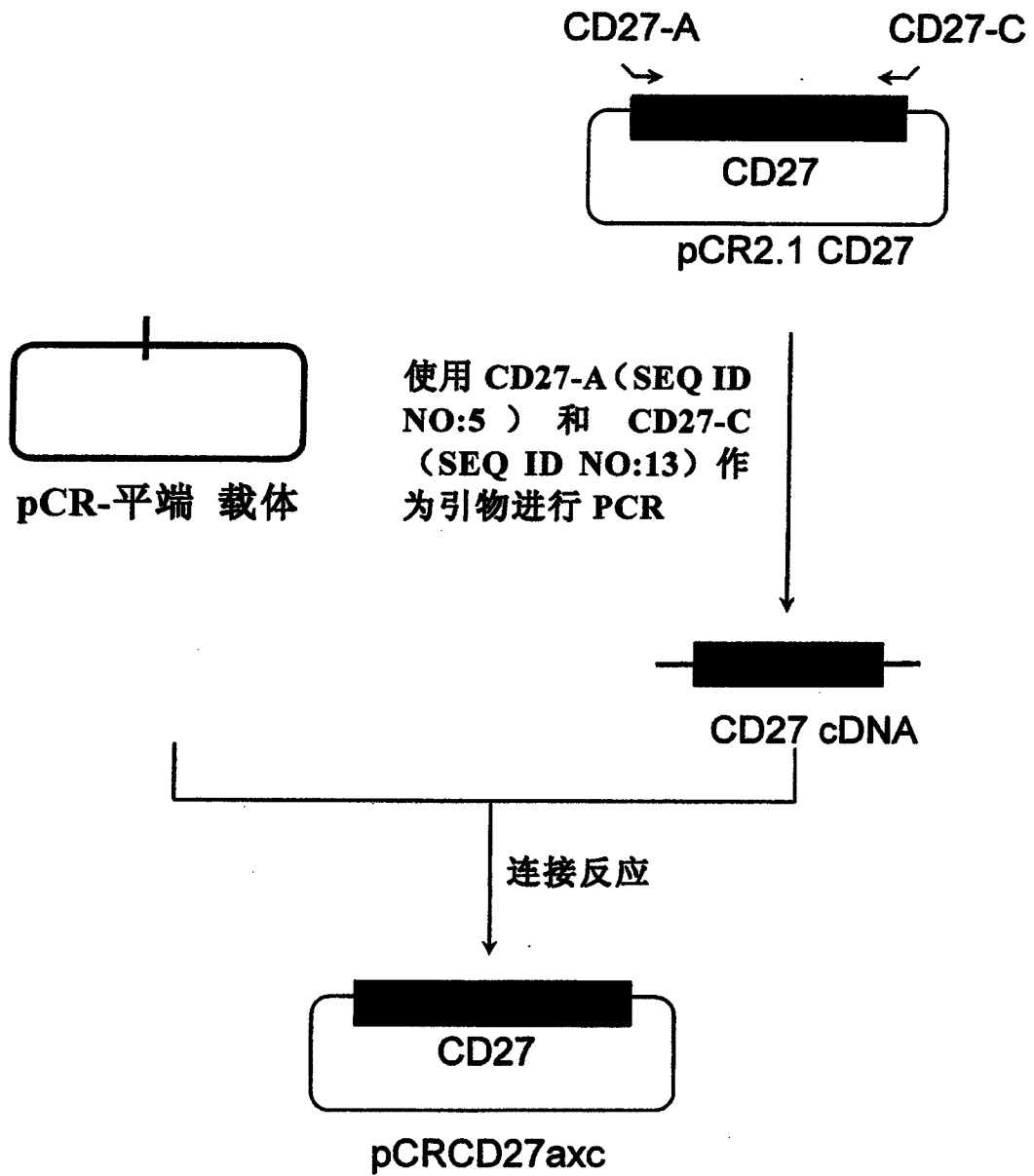


图 9

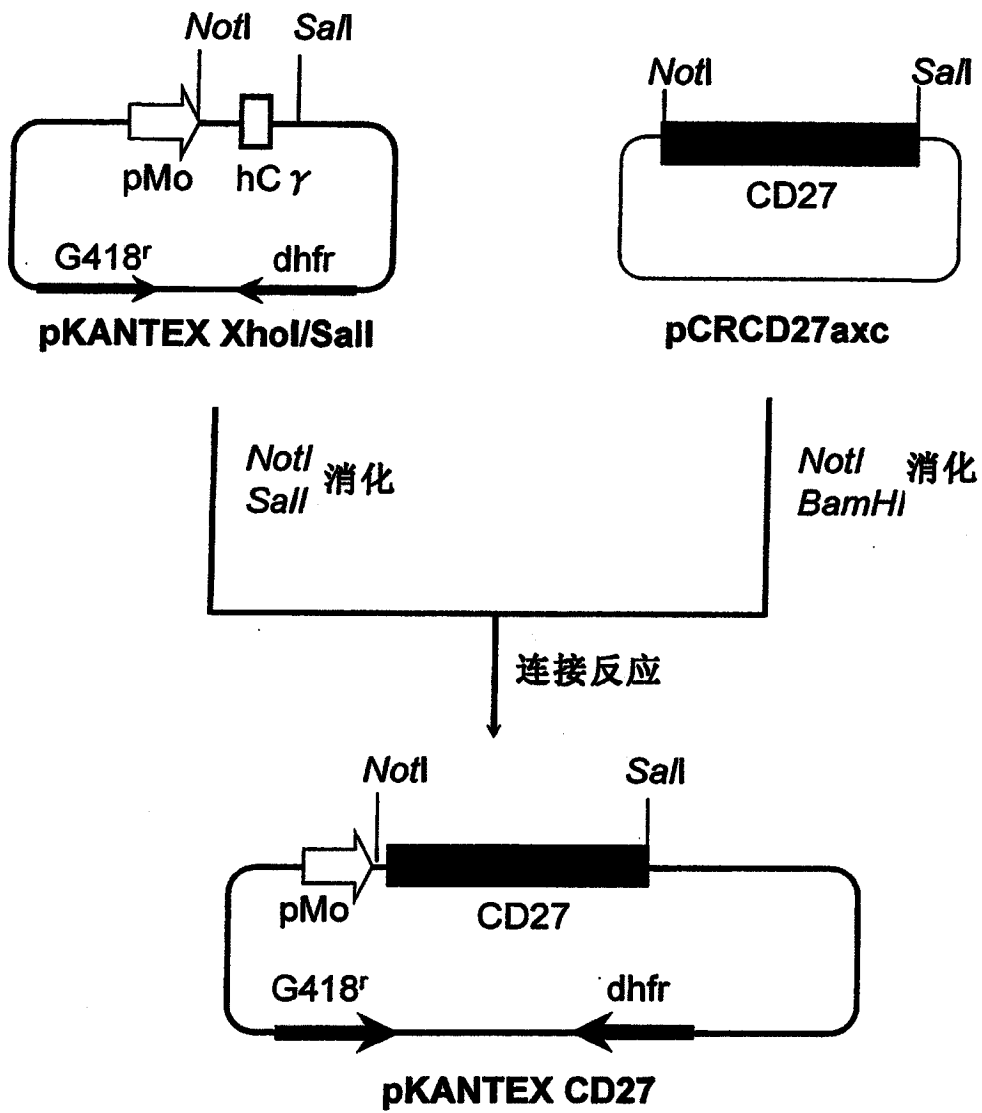
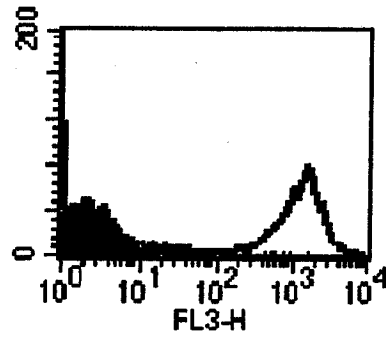


图 10

CD27/Lec8-4

CD27-PC5



CD27/DG44-8

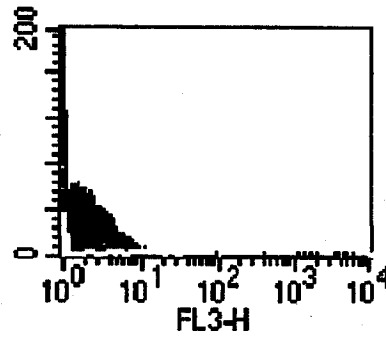
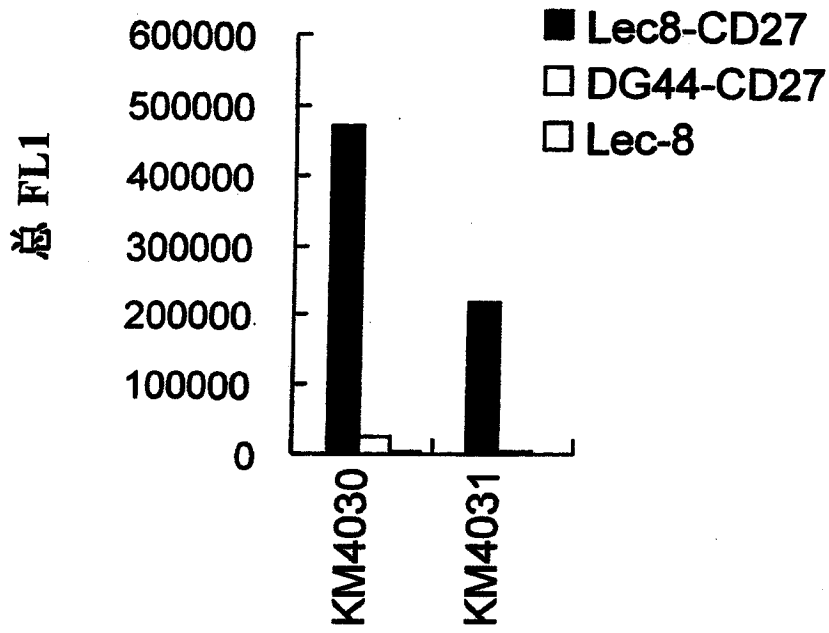


图 11

ABI8200 细胞检测系统



荧光细胞染色方法 (FCM)

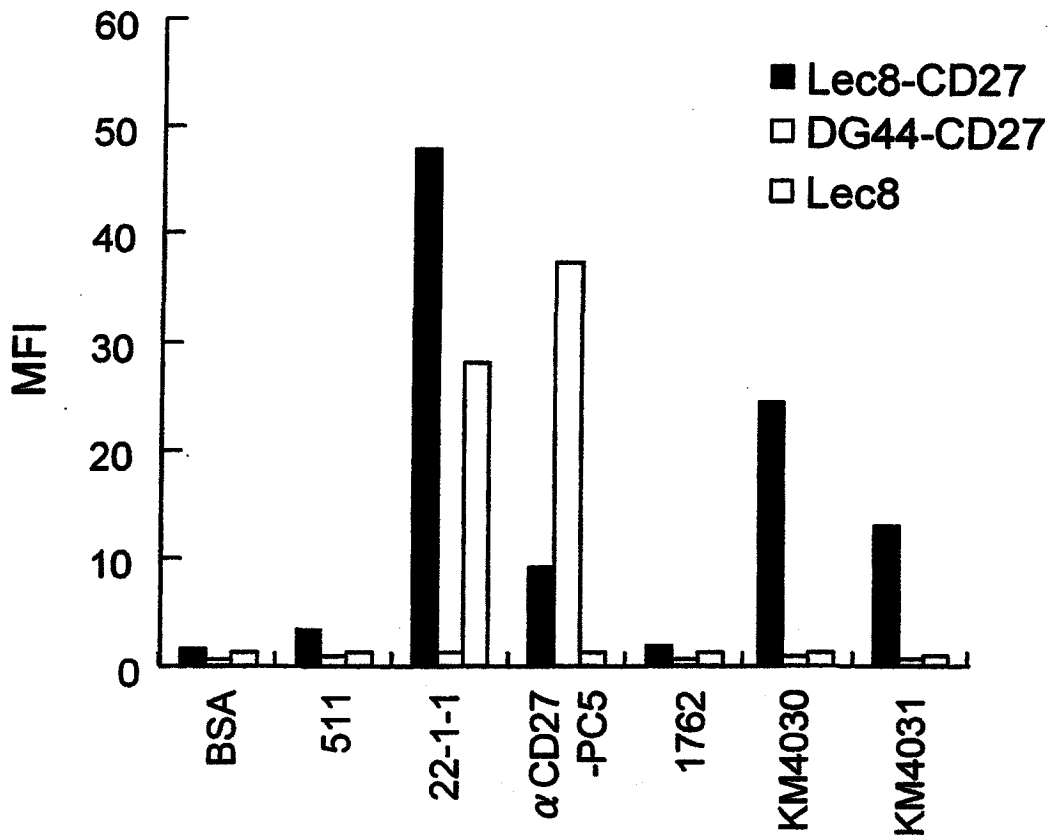


图 12

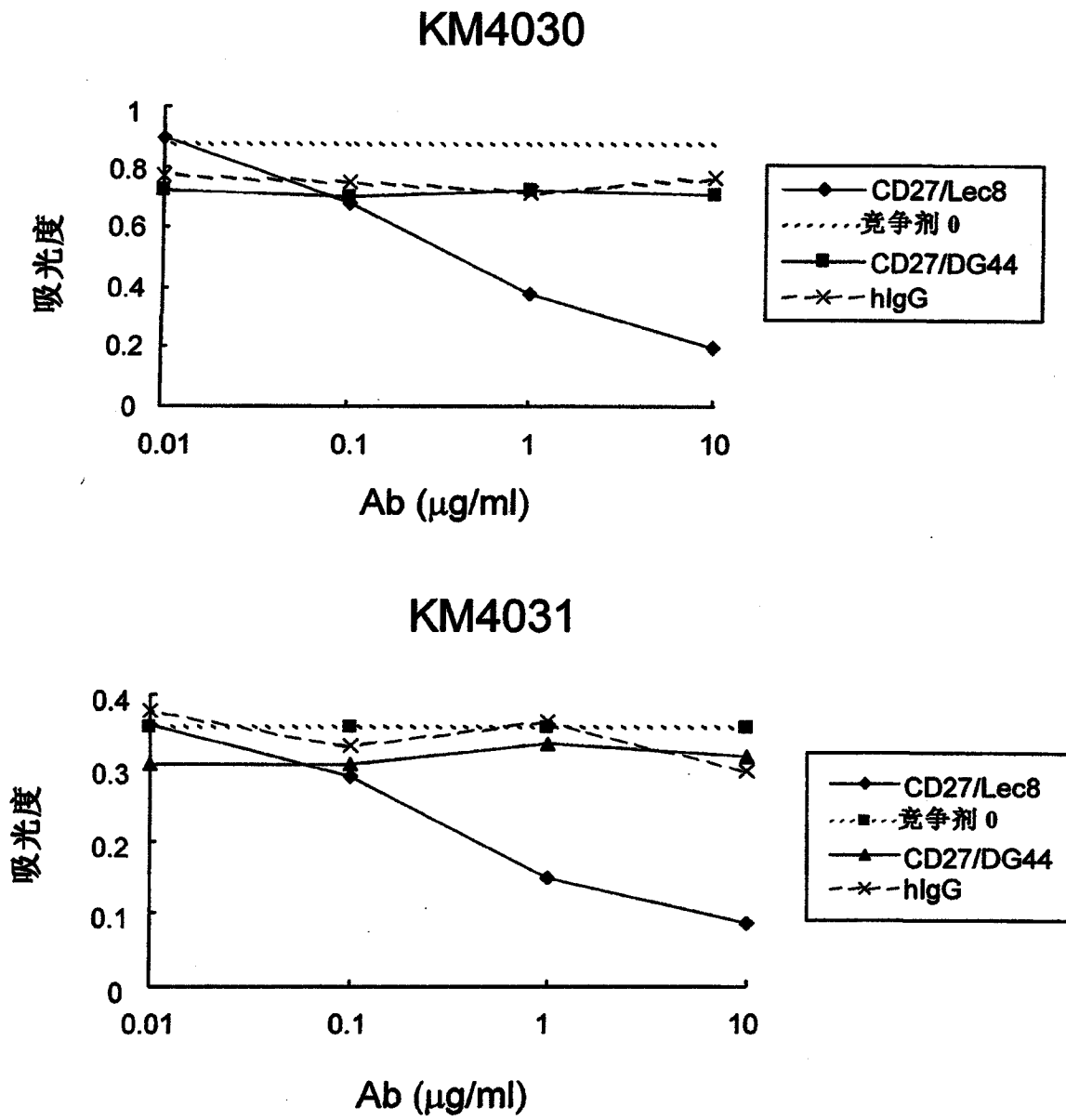


图 13

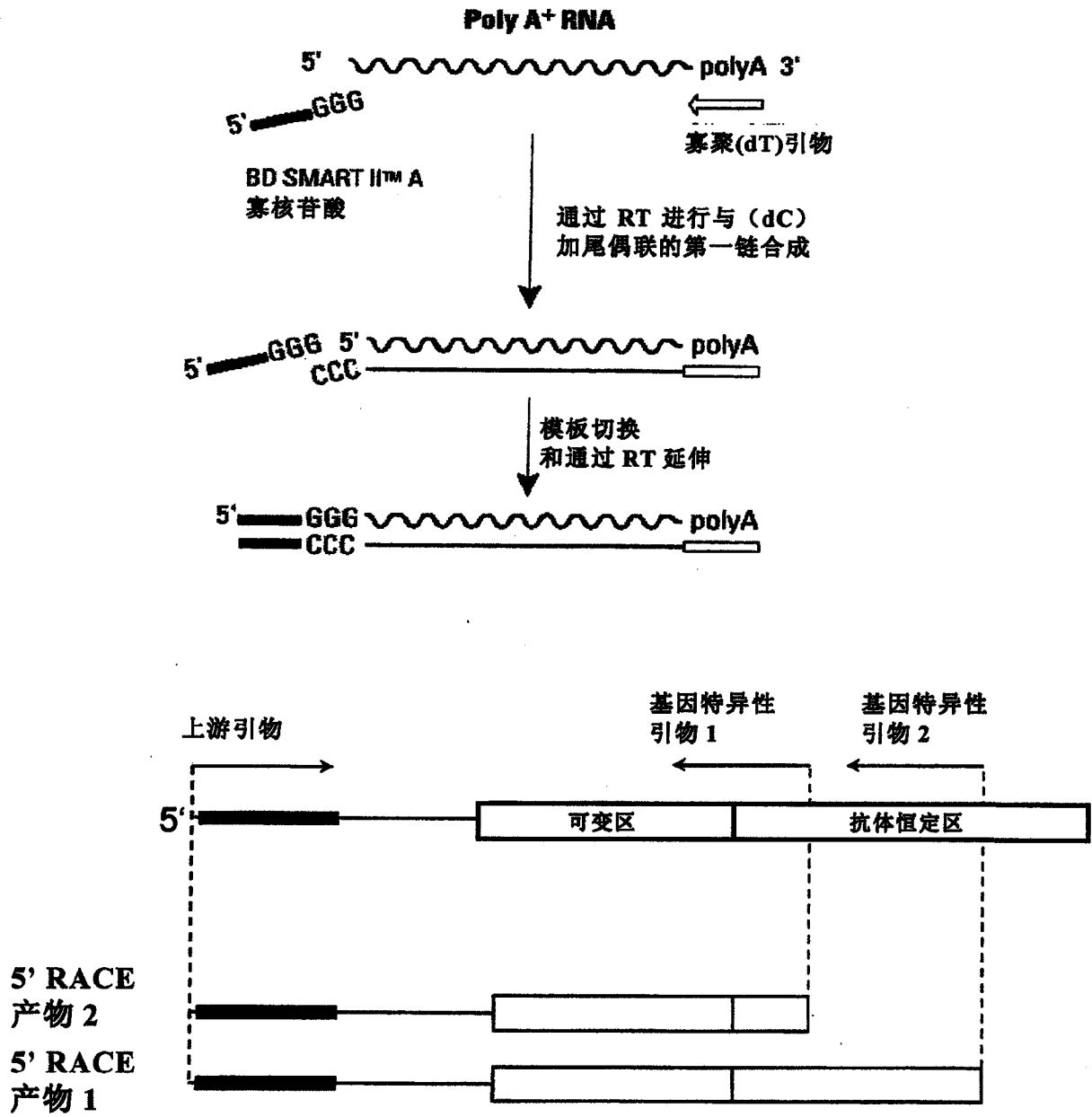


图 14

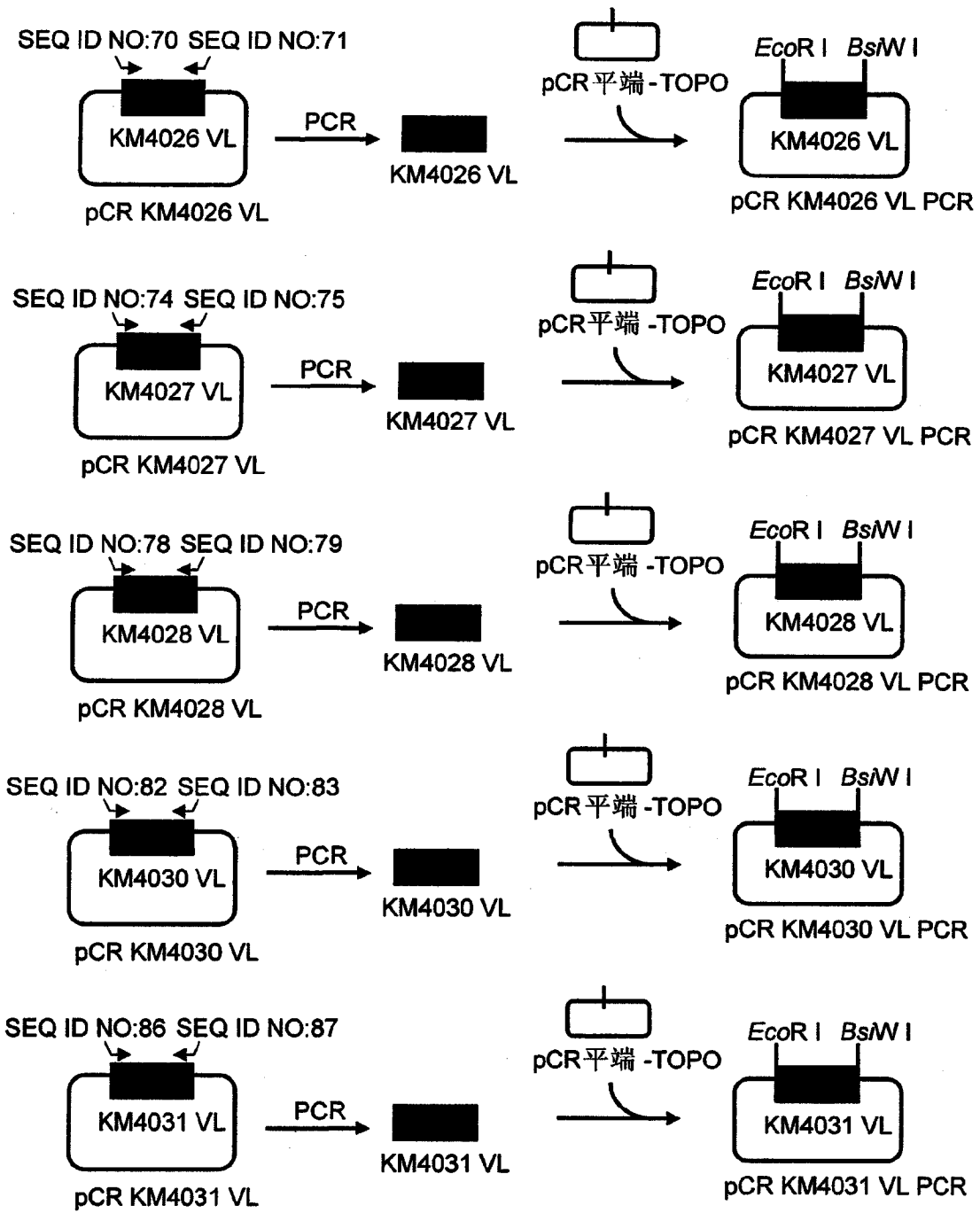


图 15

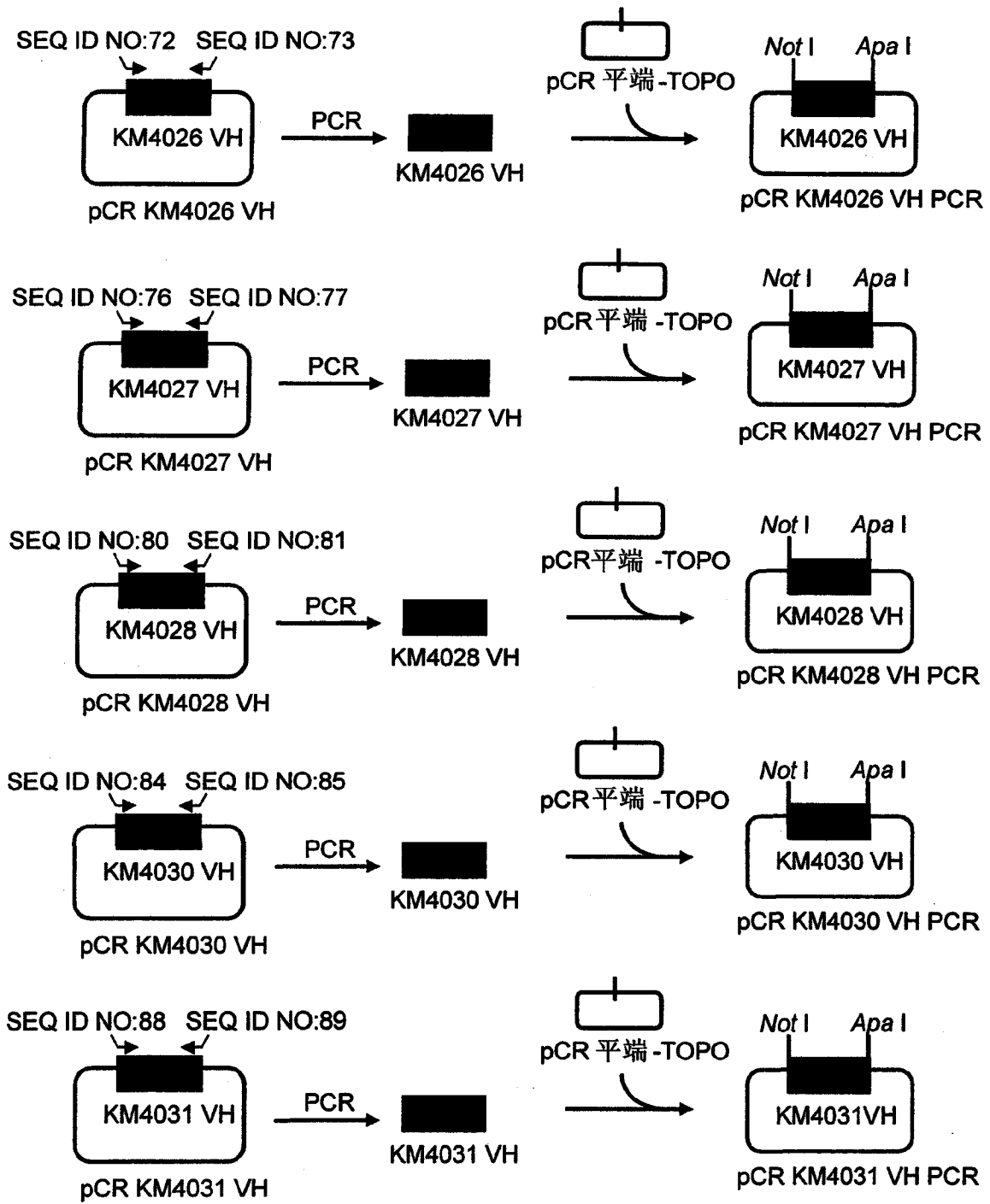


图 16

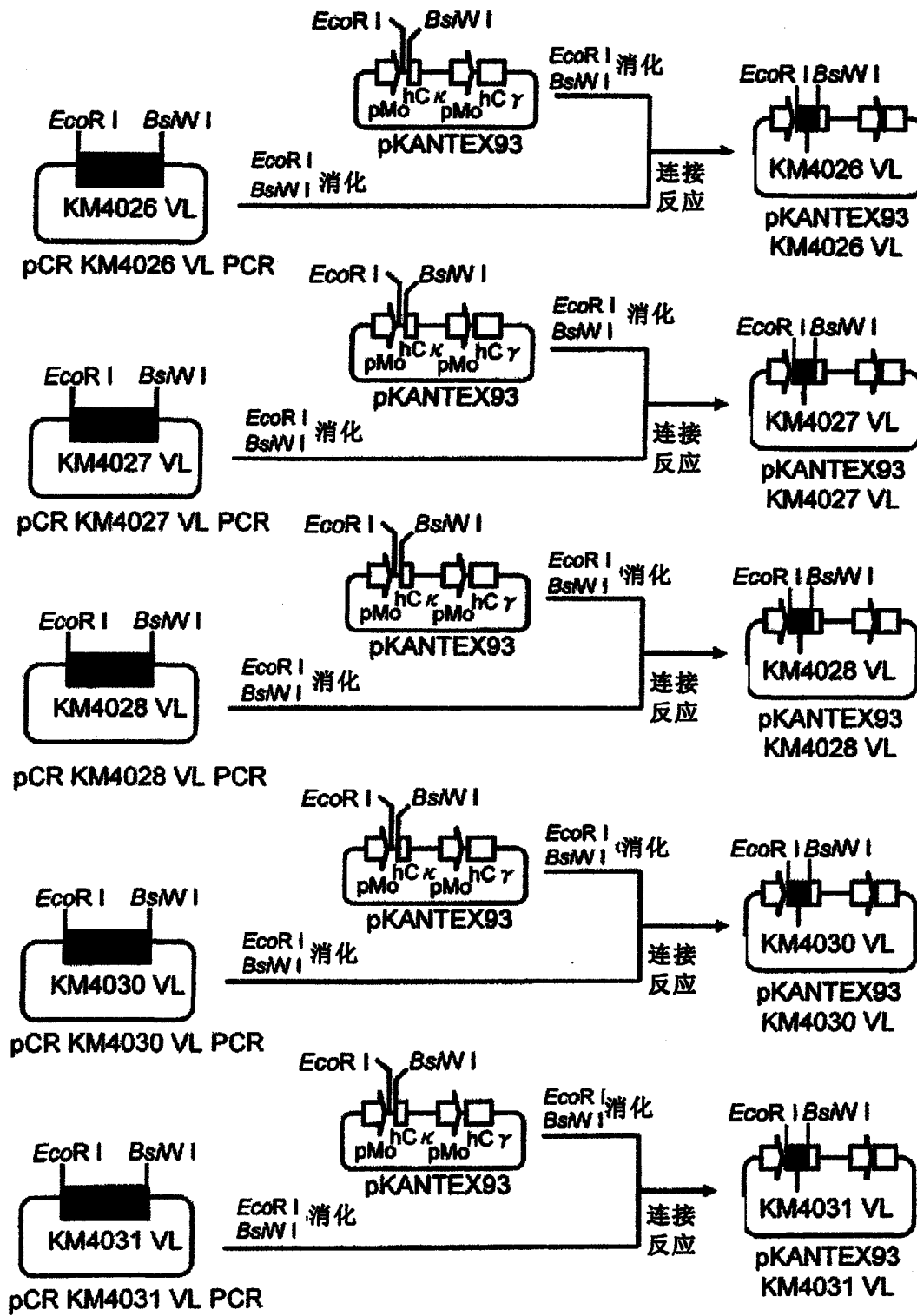


图 17

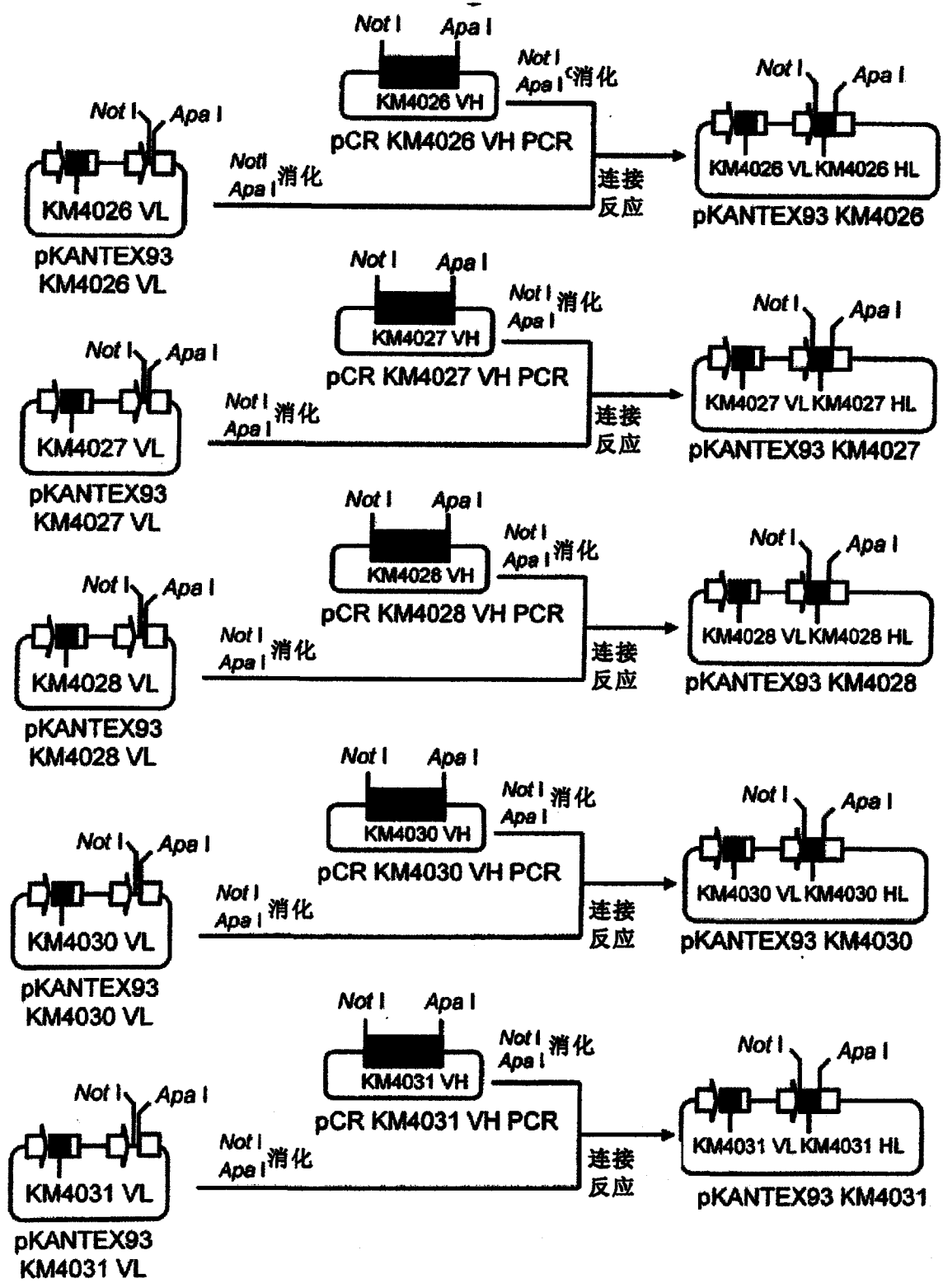


图 18

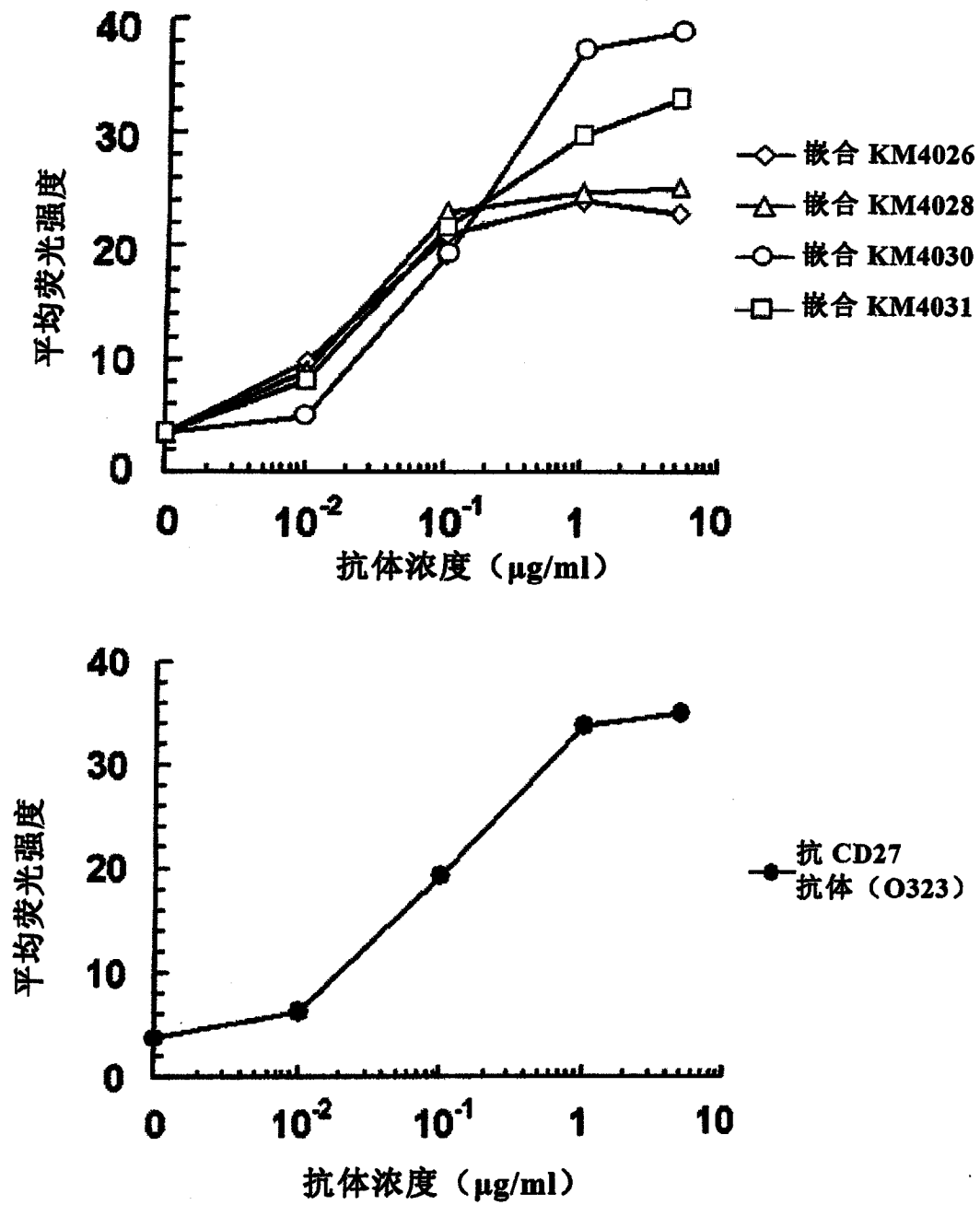


图 19-1

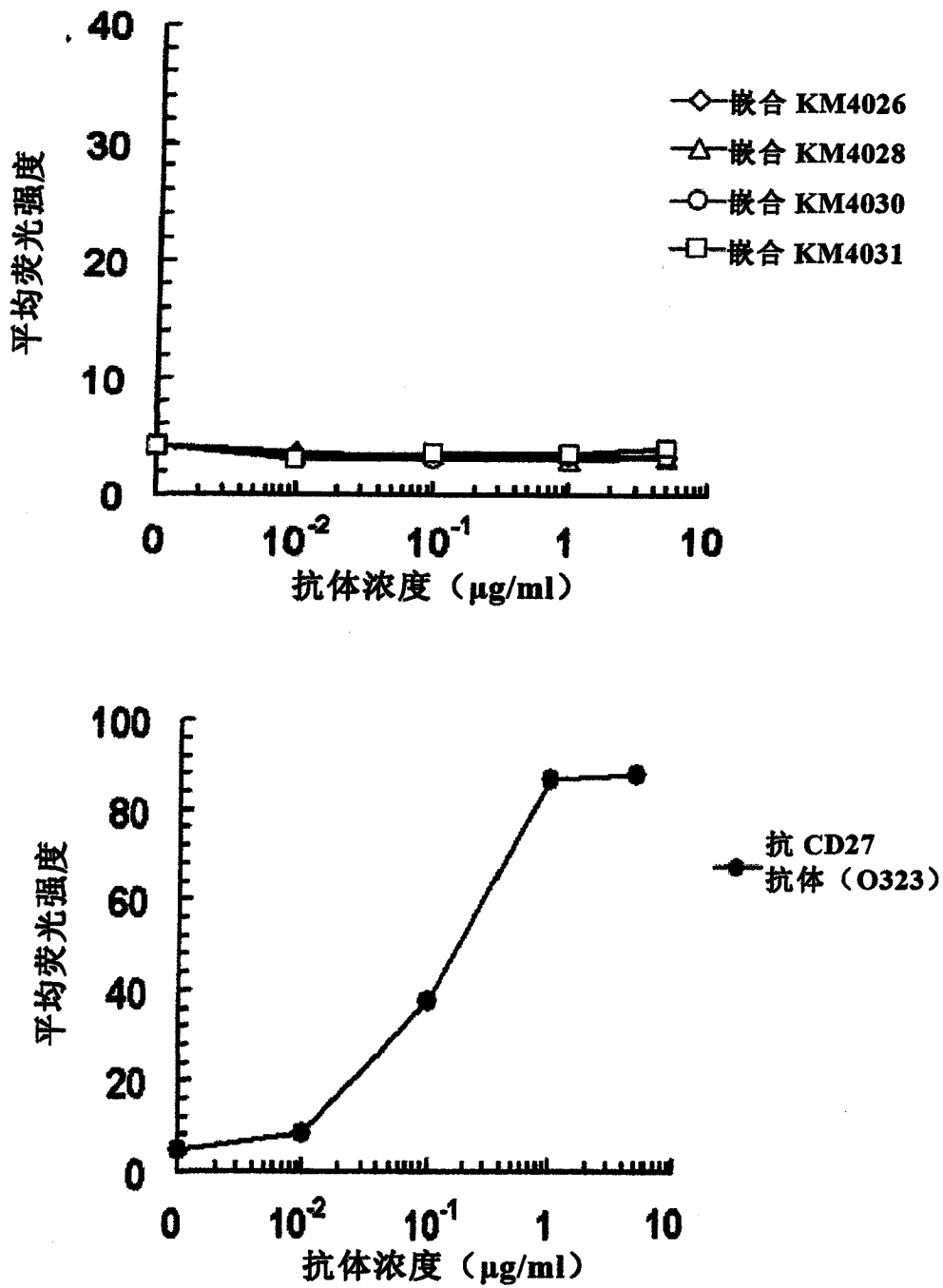


图 19-2

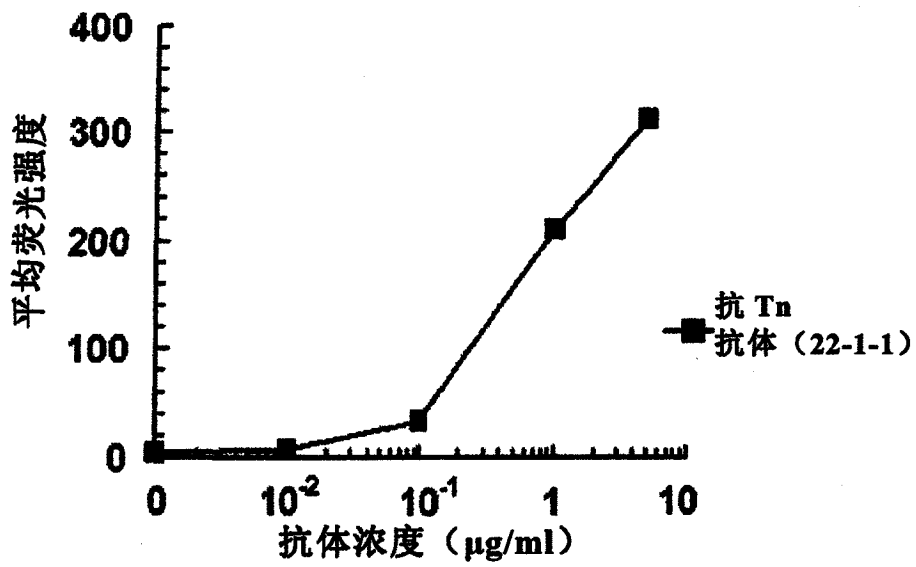
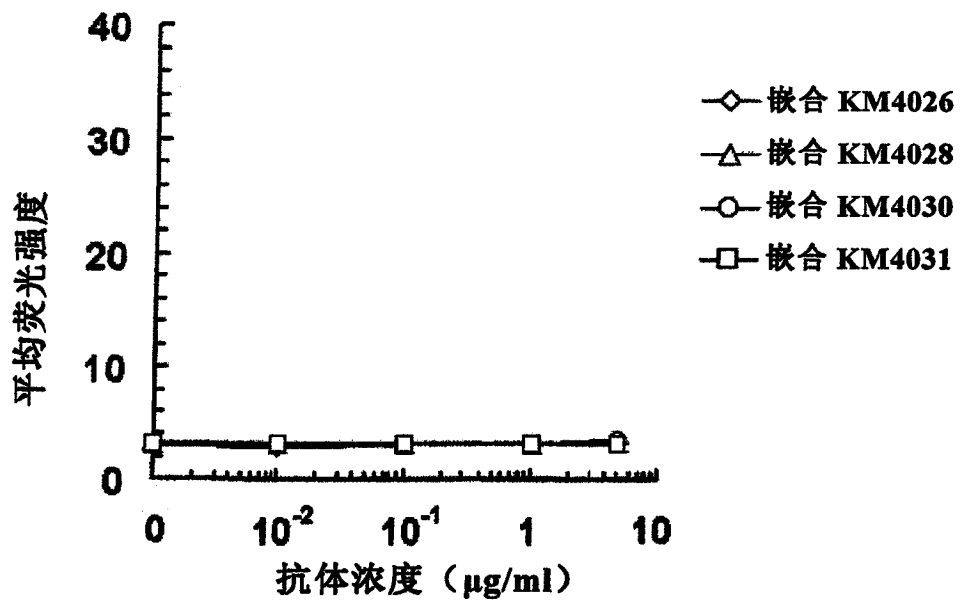


图 19-3

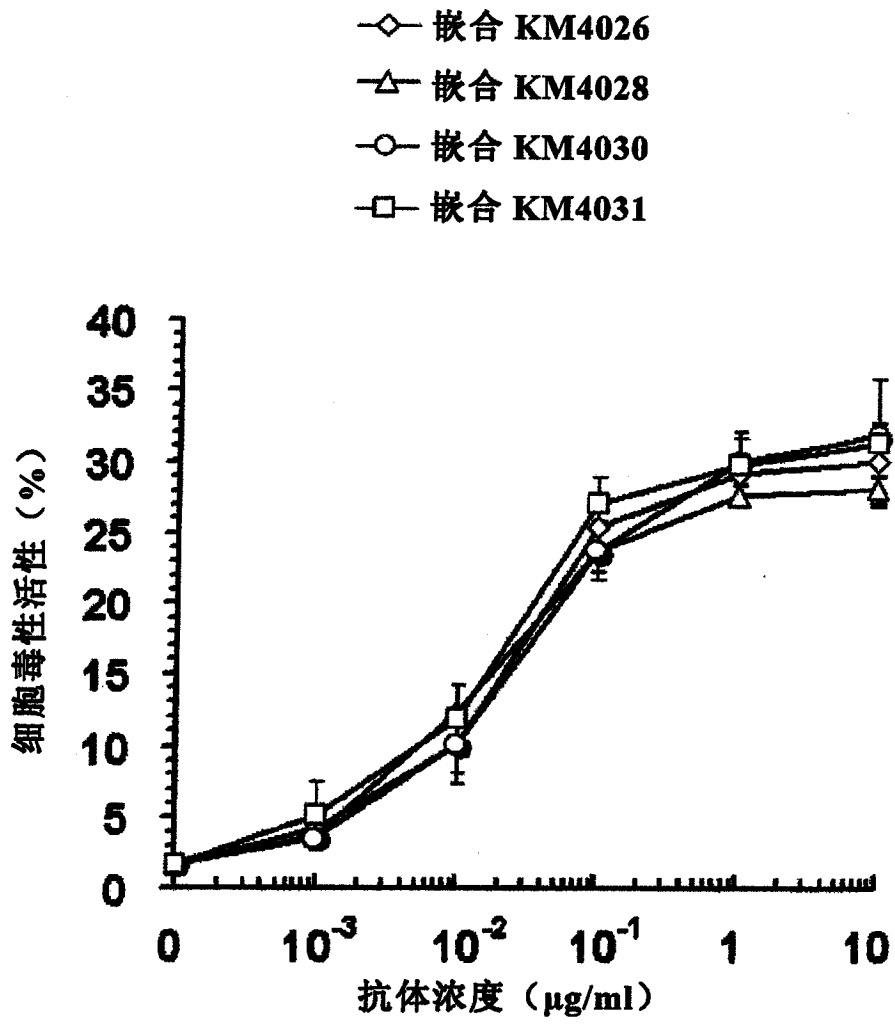


图 20

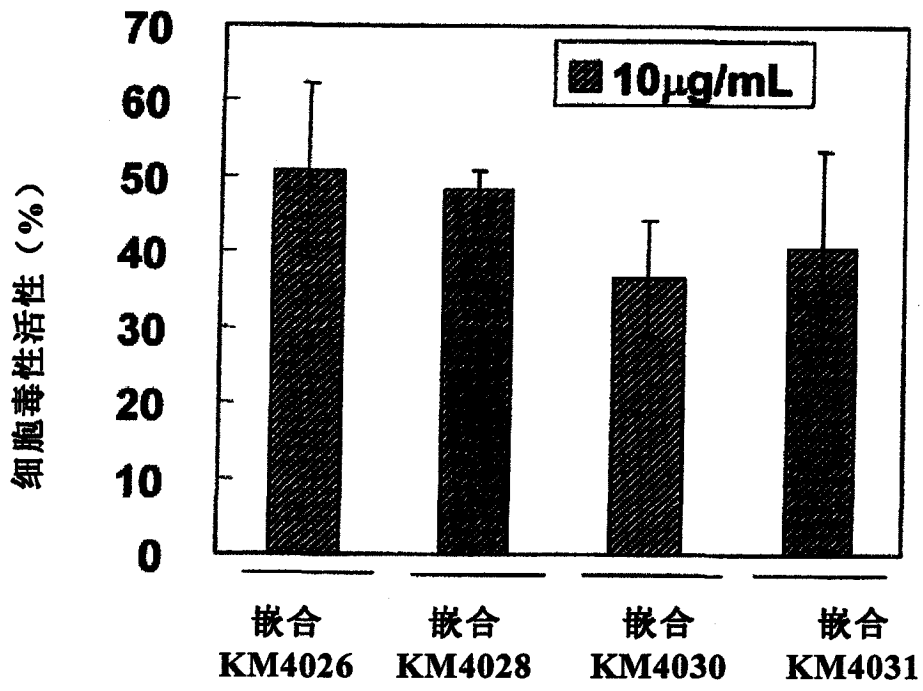


图 21

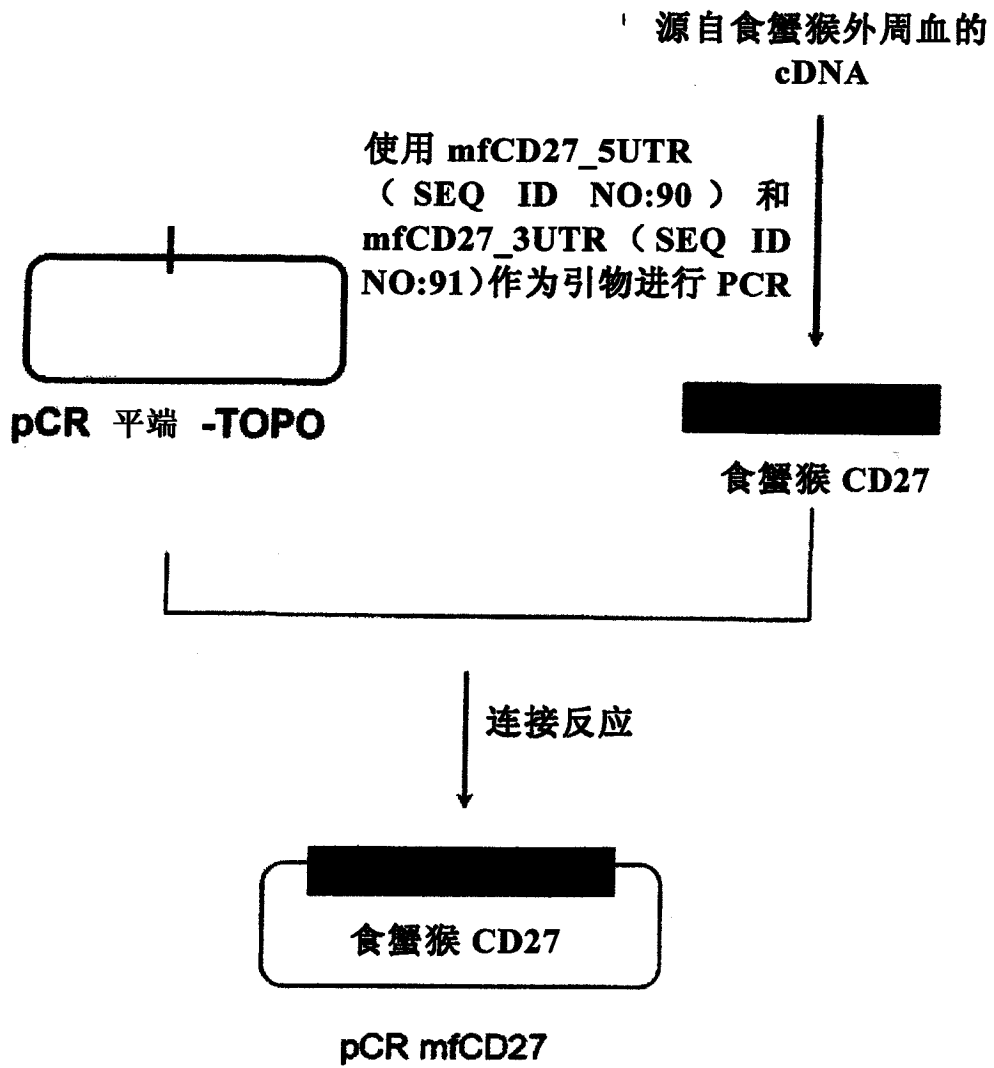


图 22

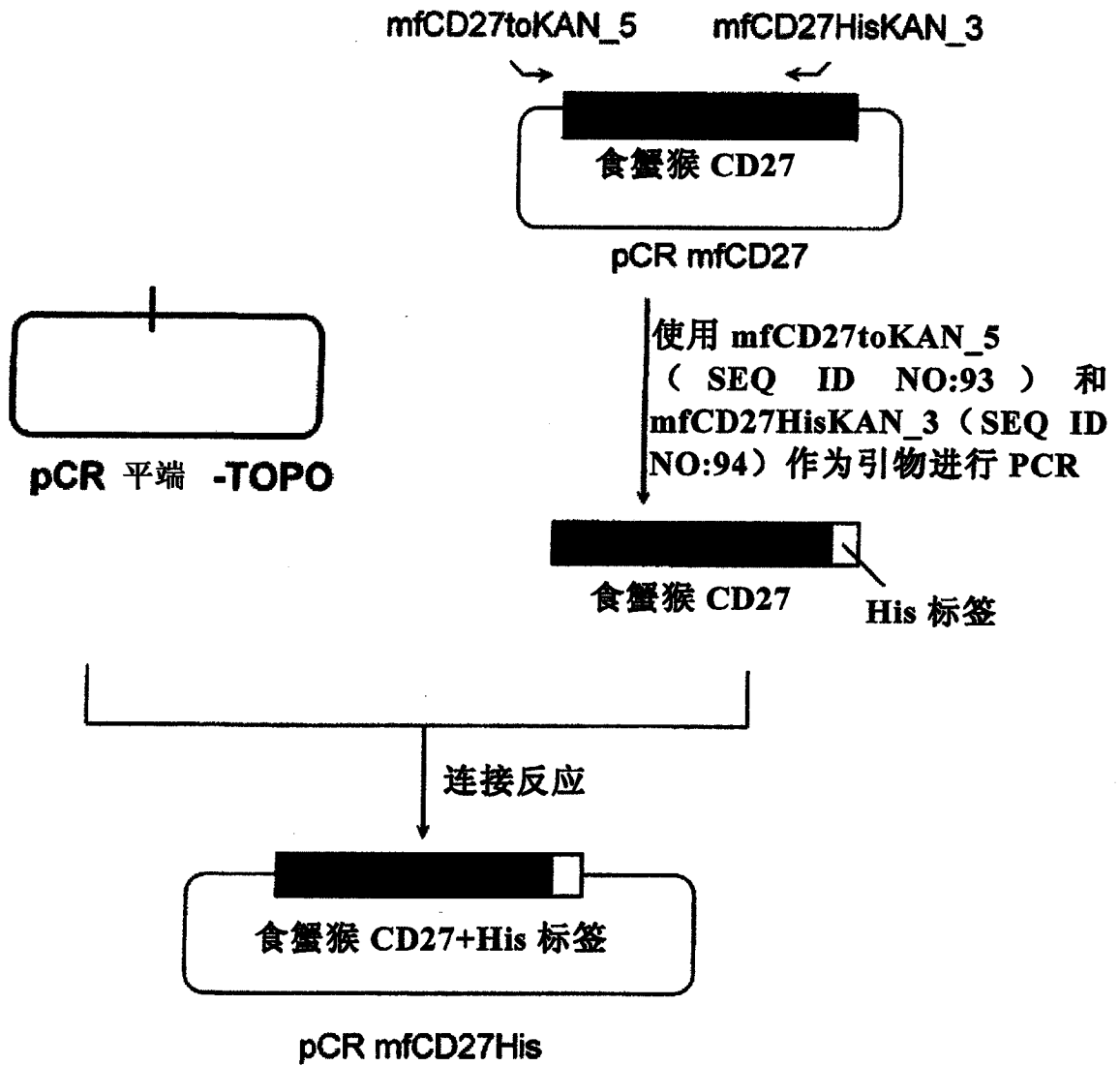


图 23

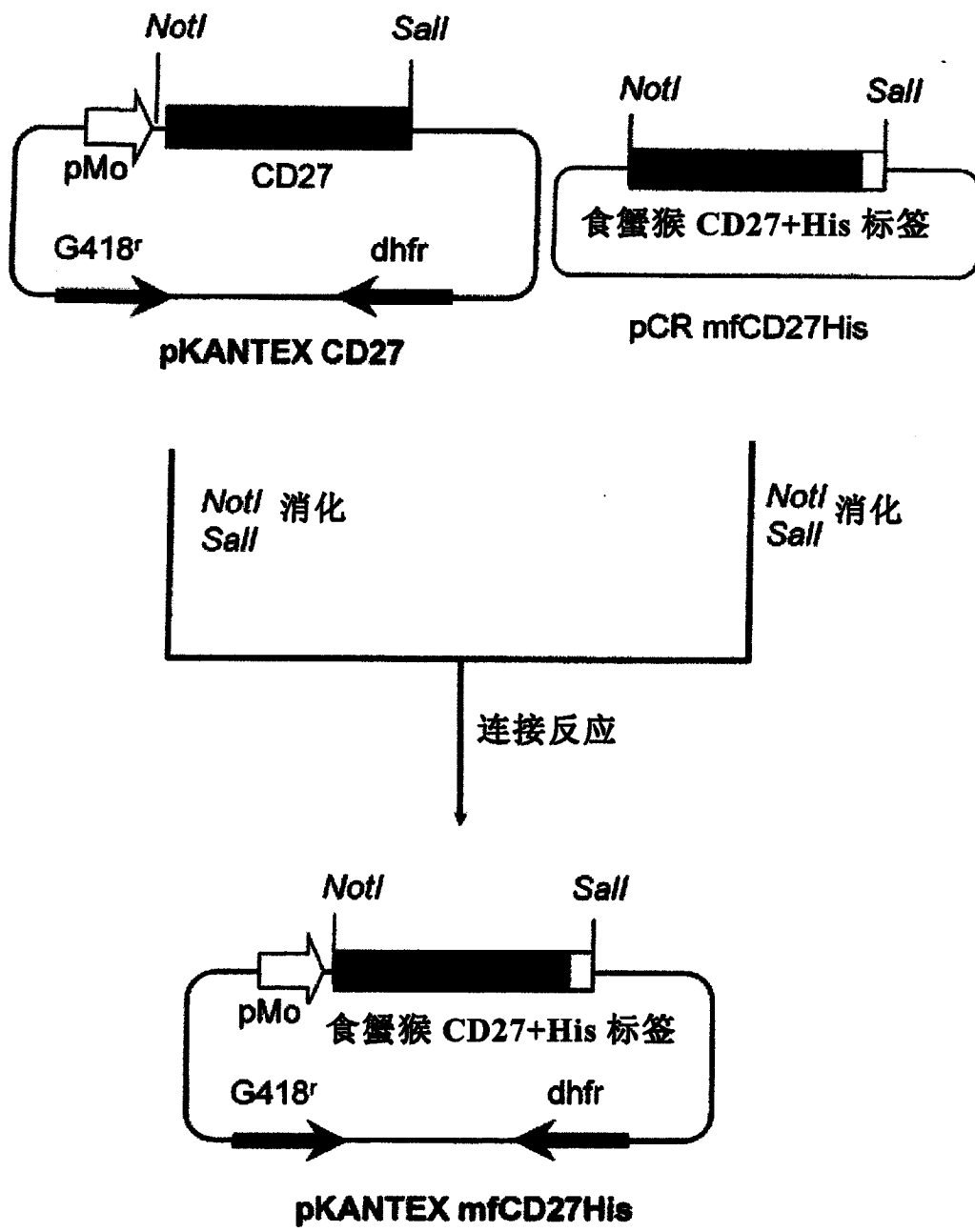


图 24

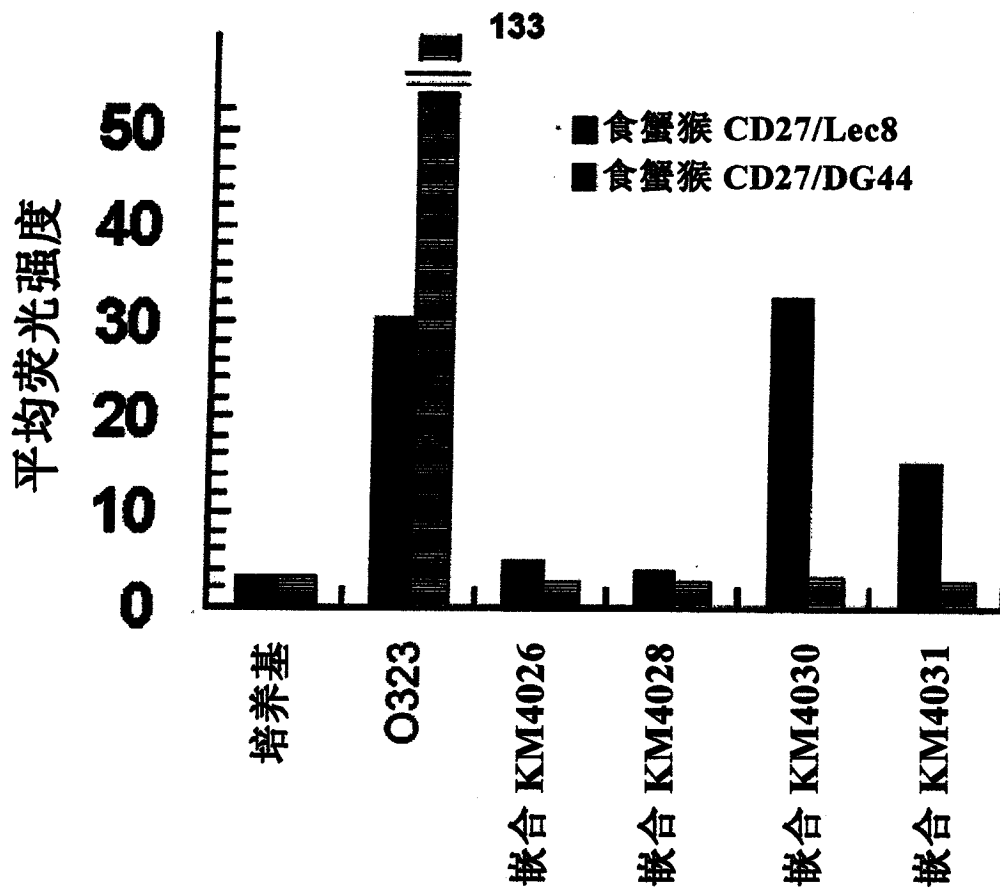


图 25

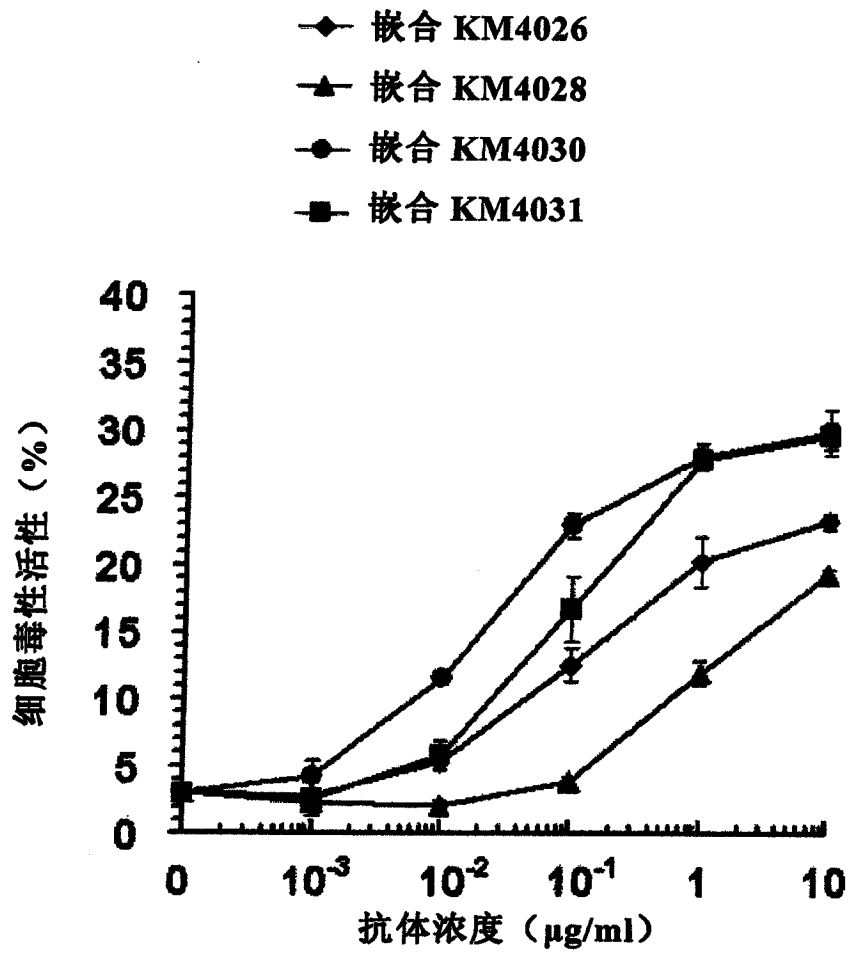


图 26

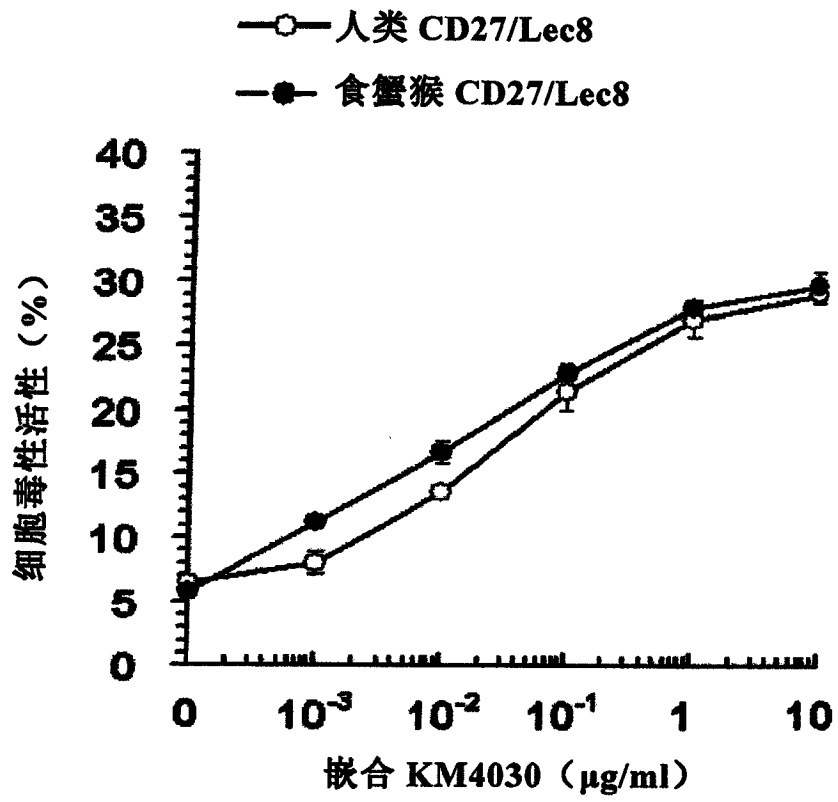


图 27

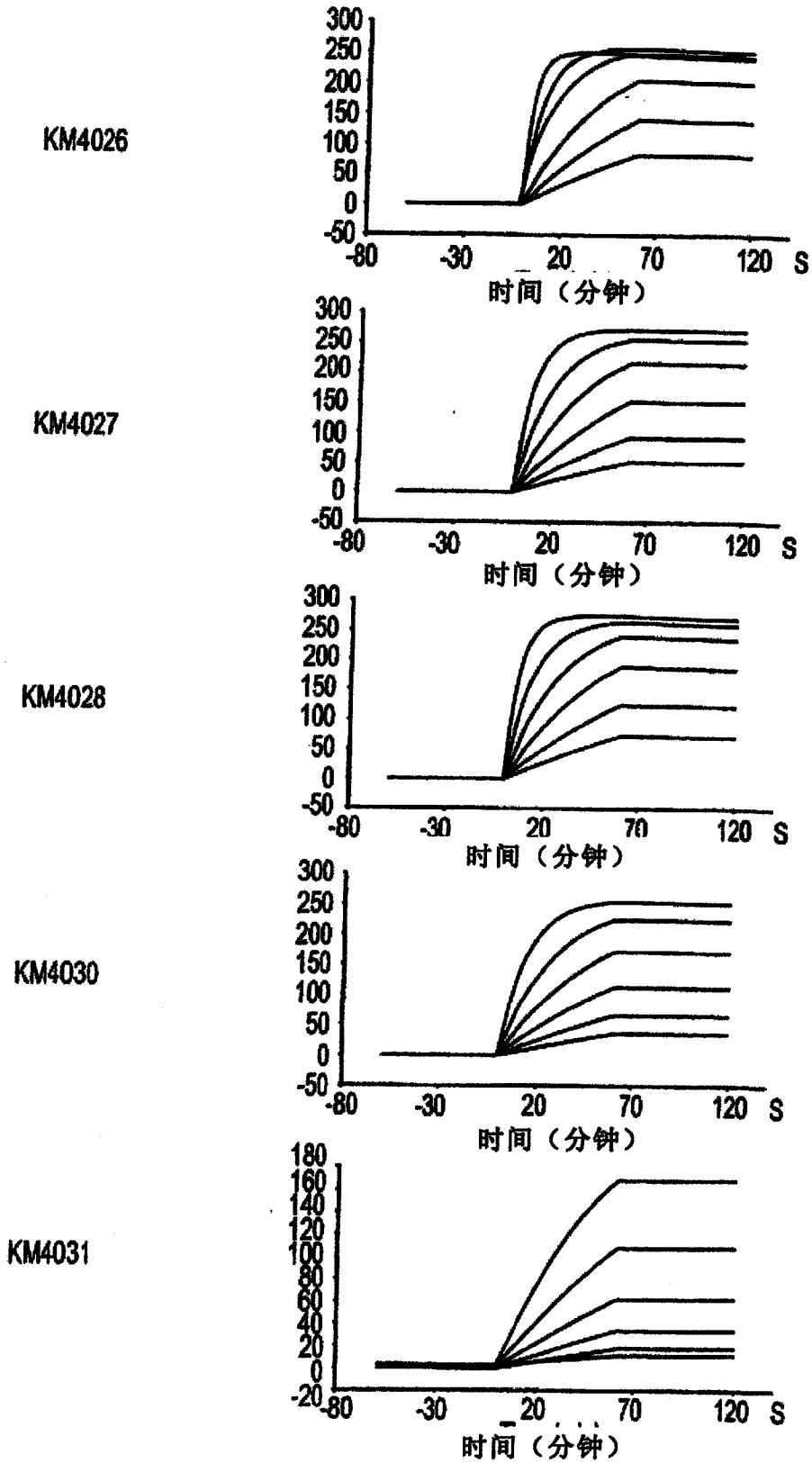


图 28-1

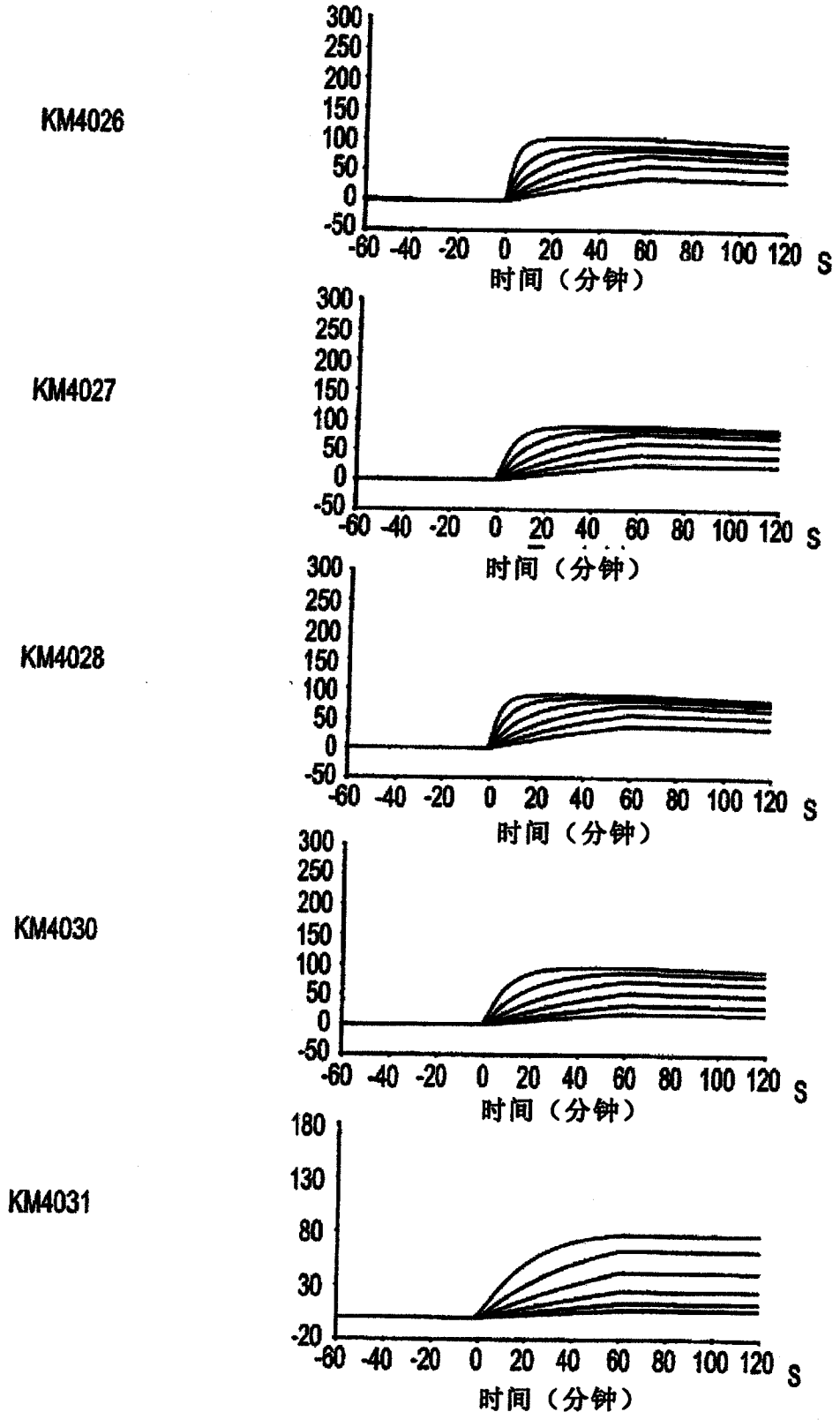


图 28-2