[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12P 21/08
C12N 15/12
C12N 15/63 A61K 39/395
A61K 39/44 C12Q 1/68

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93119845.3

[45]授权公告日 2002 年 1 月 23 日

[11]授权公告号 CN 1078250C

[22]申请日 1993.9.24 [24]颁证日 2002.1.23
[21]申请号 93119845.3
[30]优先权
[32]1992.9.24 [33]GB [31]9220228.2
[32]1992.9.25 [33]US [31]07/952,802
[73]专利权人 诺瓦提斯公司
地址 瑞士巴塞尔
共同专利权人 塔诺克斯生物系统公司
[72]发明人 N·哈德曼 F·科尔宾格
J·萨尔丹
[56]参考文献
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA86 1989. 1. 1
审查员 孙广秀

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 黄革生

权利要求书 4 页 说明书 100 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 抗免疫球蛋白等模式标本的重整形单克隆抗体

[57]摘要

本发明涉及一种用以抗免疫球蛋白 E(lgE)的等模式标本定子的重整的人单 克隆抗体、所述抗体的直接等同物和衍生物。本发明的分子对于诊断、预防和 治疗过敏是有用的。

ISSN1008-4274

权　利　要　求　书

1. 一种 IgE 特异性的重整的人单克隆抗体，它包括一种抗原结合位点，所述位点包含类人构架和得自 CDR－供体抗体的高变区 CDR1，CDR2 和 CDR3；所述的 CDR1 具有氨基酸序列 Met－Tyr－Trp－Leu－Glu，所述 CDR2 具有氨基酸序列 Glu－Ile－Ser－Pro－Gly－Thr－Phe－Thr－Thr－Asn－Tyr－Asn－Glu－Lys－Phe－Lys－Ala，所述的 CDR3 具有氨基酸序列 Phe－Ser－His－Phe－Ser－Gly－Ser－Asn－Tyr－Asp－Tyr－Phe－Asp－Tyr－Phe－Asp－Tyr。

2. 根据权利要求 1 的重整的人抗体，它含一抗原结合位点，该位点含：

a)一个第一区，它依次包含高变区 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述的 CDR1 的氨基酸序列为 Met－Tyr－Trp－Leu－Glu，所述 CDR2 的氨基酸序列为 Glu－Ile－Ser－Pro－Gly－Thr－Phe－Thr－Thr－Asn－Tyr－Asn－Glu－Lys－Phe－Lys－Ala，所述的 CDR3 氨基酸的序列为 Phe－Ser－His－Phe－Ser－Gly－Ser－Asn－Tyr－Asp－Tyr－Phe－Asp－Tyr－Phe－Asp－Tyr，和

b)第二区，它依次包含高变区 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述的的 CDR1 的氨基酸序列为 Arg－Ala－Ser－Gln－Ser－Ile－Gly－Thr－Asn－Ile－His，所述的 CDR2 的氨基酸序列为 Tyr－Ala－Ser－Glu－Ser－Ile－Ser，所述的 CDR3 的氨基酸序列为 Gln－Gln－Ser－Asp－Ser－Trp－Pro－Thr－Thr。

3. 根据权利要求 2 的重整的人抗体，它包括:

a) 一种免疫球蛋白重链或其片断，它具有依次包含高变区 CDR1H、CDR2H 和 CDR3H 的可变区域，以及人重链的恒定部分或其片断，所述的 CDR1H 的氨基酸序列有 Met－Tyr－Trp－Leu－Glu，所述的 CDR2H 的氨基酸序列有 Glu－Ile－Ser－Pro－Gly－Thr－Phe－Thr－Thr－Asn－Tyr－Asn－Glu－Lys－Phe－Lys－Ala，所述的 CDR3H 的氨基酸的序列是 Phe－Ser－His－Phe－Ser－Gly－Ser－Asn－Tyr－Asp－Tyr－Phe－Asp－Tyr－Phe－Asp－Tyr; 和

b)一种免疫球蛋白轻链或其片断，它具有一个依次包含高变区 CDR1L、CDR2L 和 CDR3L 的轻链可变区和人轻链恒定部分或其片断，所述的 CDR1L 的氨基酸序列为 Arg－Ala－Ser－Gln－Ser－Ile－Gly－Thr－Asn－Ile－His, 所述的 CDR2L 的氨基酸序列为 Tyr－Ala－Ser－Glu－Ser－Ile－Ser，所述的 CDR3L 的氨基酸序列为 Gln－Gln－Ser－Asp－Ser－Trp－Pro－Thr－Thr。

4. 根据权利要求 2 的重整的人抗体，它们含:

a)一重链，它包含具有与 SEQ. ID. No. 11 所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列的可变区和人重链的恒定部分，所述的氨基酸序列始于 1 位氨基酸而终止于 123 位氨基酸; 和

b)一轻链，它包含具有与 SEQ . ID. No.5 所示的氨基酸序列相同的氨基酸序列的可变区和人轻链的恒定部分，所述的氨基酸序列始于 1 位氨基酸而终于 107 位氨基酸。

5. 根据权利要求 2 的重整的人抗体，它包括:

a) 一包含一可变区和人重链的恒定部分的重链，该可变区的氨基酸序列与 SEQ. ID. No.13 所示的序列相同，它始于 1 位氨基酸而终于 123 位氨基酸；和

b)一包含一可变区和人轻链的恒定部分的轻链，该可变区的氨基酸序列与 SEQ. ID. No. 5 所示的序列相同，它始于 1 位氨基酸而终于 107 位氨基酸。

6. 根据权利要求 5 的重整的人抗体，其中该重链包括人重链恒定区γ1。

7. 根据权利要求 5 的重整的人抗体，其中该轻链包括人轻链恒定区 k。

8. 一种结合物，它含有权利要求 1－7 中任一项所述的重整人抗体和另一种蛋白质类或非蛋白质类分子。

9. 制备根据权利要求 1－7 的重整的人抗体或根据权利要求 8 的结合物的方法，它包括培养一产生本发明蛋白的适宜寄主，若需要则分离所述蛋白并任选地将其转化成一种结合物。

10. 编码一重链或其断片的 DNA 构成物，它包含:

a) 编码可选择地含有 FR 和 CDR 的可变区的第一部分，所述 CDR 依次是 CDR1H、CDR2H 和 CDR3H，它们的氨基酸序列与权利要求 3 中的该序列相同，和任选地含

b) 编码人重链恒定区或其断片的第二部分。

11. 编码一轻链或其断片的 DNA 构成物，它包含:

a) 编码可选择地含有 FR 和 CDR 的可变区的第一部分，所述 CDR 依次是 CDR1L、CDR2L 和 CDR3L，它们的氨基酸序列与权利要求 3 中的该序列相同，和任选地含

b) 编码人轻链恒定区或其断片的第二部分。

12. 含根据权利要求 10 和/或根据权利要求 11 的 DNA 构成物的杂交载体。

13. 用根据权利要求 12 的杂交载体转化的寄主细胞。

14. 一种药物组合物，它含有权利要求 1－7 的抗体或权利要求 8 的结合物以及药学上可接受的载体。

15. 权利要求 1－7 的抗体或权利要求 8 的结合物用于 IgE 的定性或定量测定。

16. 用于 IgE 的定性或定量测定的试剂盒，它含有权利要求 1－7 的抗体或权利要求 8 的结合物。

说　明　书

抗免疫球蛋白等模式标本的重整形单克隆抗体

本发明涉及直接抗免疫球蛋白E（IgE）的等模式标本定子的重整形人的单克隆抗体及所述抗体的衍生物。该抗体及其衍生物对于在体外及体内诊断、预防和治疗过敏反应是有效的。

过敏反应是一种由于对外界动因（过敏原）的过度的免疫响应而引起的过敏状态。特征为与过敏原一接触而立即产生过敏反应的快速过敏性（Ⅰ型）是由B细胞为媒介的，而且是基于抗原－抗体反应的，而滞后过敏性是以T细胞为媒介，而且是基于细胞免疫力机理的。近年来，术语过敏（allergy）已日渐成为Ⅰ型过敏性（Hypersensitivity）的同意词了。

快速过敏性是基于E类免疫球蛋白抗体（IgE抗体）的产生，这种产生是由于B细胞对抗过敏原分化入抗体而分泌出浆细胞。IgE所引起的反应是一种发生在过敏原进入人体的位点，即粘膜表面和／或局部淋巴结处的局部症状。局部产生的IgE首先使局部肥大细胞致敏，即IgE抗体结合到其恒定区处于该肥大细胞表面上的Fce受体上，然后“溢出”IgE进行循环，并结合到循环嗜碱的和组织固定的周身的肥大细胞上的受体上。当结合了的IgE接着与反应原接触时，通过与反应原结合使Fce受体交联，而这种结合是通过细胞脱去并释放出一些过敏媒介，如组胺、前列腺素leukotrienes 等。正是释放出的这些物质是引起典型的快速过敏性

的临床症状的主要原因，这些症状如呼吸或肠中平滑肌痉挛，微血管扩张和对水的渗透性和原生蛋白质的提高，导致如鼻炎、异位、excema 和气喘的粘液分泌，刺激皮肤中的神经末稍而导致的痛和痒。

另外，与该过敏原二次接触的反应增加，这是因为在通过在细胞表面上表达的ＩｇＥ与抗原的第一次接触后，某些Ｂ细胞形成了表面ＩｇＥ正Ｂ细胞（ＳＩｇＥ⁺ Ｂ细胞）的“记忆池”。

治疗过敏的有发展前途的思路涉及到应用单克隆抗体，该抗体是ＩｇＥ等模式标本－特性的，因而能结合ＩｇＥ。这种方法基于通过减弱ＩｇＥ免疫应答来抑制过敏反应，这种应答是诱发过敏的最早状况，而且它使过敏状况得以保持。当其它抗体类的应答不受影响时，对过敏症状的即刻的和长期的效果就可达到。另外，适于作抗过敏物的抗体应与进入产生浆细胞的ＩｇＥ的表面ＩｇＥ正Ｂ细胞反应，从而使之可用来在功能上消除这些Ｂ细胞。然而，从原则上来说，抗ＩｇＥ的抗体还可通过交联Ｆｃｅ受体诱发自ＩｇＥ致敏的肥大细胞的介质的释放，从而拮抗了施加在血清ＩｇＥ和ＳＩｇ⁺ Ｂ细胞水平上的有益效果。因此，可用于治疗过敏的抗体不必能与接合在致敏的肥大细胞和嗜碱细胞上的ＩｇＥ反应，但应保持识别ＳＩｇ⁺ Ｂ细胞的能力。

这类ＩｇＥ等模式标本－特征的抗体已由 Chang 等人（Biotechnology ８．１２２－１２６（１９９０）在ＰＣＴ申请Ｎｏ．８９／０６１３８和欧洲专利申请Ｎｏ．３９６５０５中公开。然而由于这类已公开的抗体不是源于人类的，所以它们不适于用于人身，这是因为作为外源蛋白质时的免疫原性，它们相当时间地持续在循环中，以及可能形成破坏的免疫配合物。这些缺点可通过将例如啮

齿类抗－ＩｇＥ单克隆抗体转化成将可变的啮齿类抗体区域与人抗体的恒定区相结合的一种嵌合抗体而有可能地得以减少。这方法保留了啮齿类亲本抗－ＩｇＥ抗体的抗原结合位点，同时又赋予了人等模式标本和效应因子功能。然而，就对用于人身而言，这类嵌合抗体在临床上可能并不充分地优于原生的啮齿类抗体。

通过将啮齿类的超可变区，又术语为补偿性确定区（ＣＤＲｓ），嫁接到人的轻链的和重链可变区域范围中的结构中产生重整的人抗体，这样就可进一步降低嵌合抗体免疫原性。这种技术包括对这些在“种属”的人重链和轻链可变范围内现存物的抗原－特定啮齿类ＣＤＲ序列的替代或重组嫁接（欧洲专利申请Ｎｏ．２３９４００）。可以推断这种技术将能把该抗体结合位点的决定性的和主要位点传递到人的抗原中。

天然的完整的免疫球蛋白或抗体包含一个通常是Ｙ型的，有在每上臂端处的抗原结合位点的四聚分子。抗体结合位点由与轻链的可变范围相关联的重链可变范围构成。特别是，一种抗原结合位点基本上由重链可变区（V_H）中的三个ＣＤＲ和轻链可变区（V_L）中的三个ＣＤＲ构成。在 V_L 和 V_H 中ＣＤＲ可同４个骨架区域（ＦＲＳ）交替形成下面通式的多肽链，通式为：

$$FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 \qquad (1)$$

其中，该多肽是按始于Ｎ－末端，终于Ｃ－末端而被描述的。V_H 和 V_L 的ＣＤＲ还分别命名为Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３和Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３。谈到是什么构成ＦＲ或ＣＤＲ，通常是通过比较在相同种类中提高的

氨基酸序列抗体数目和本领域中用于鉴别的通用规则来确定的（“Sequences of proteins of immunological interest”，Kabat E. A. et al., US depatement of health and human Service, Public health service, National Institute of Health）。

近来发现轻链可变区对结合动力学的作用与相关的重链可变区的这一作用相比起来是小的，并发现隔开了的重链可变区对其本身有抗原结合活性。这类分子通常称为单区域抗体，Ward, E. S. et al., Nature 341，544-546（1989）。

这些CDR在该区域中形成与b-层结构相连的环。一个环的结构和氨基酸序列间的关系可用规范的结构模型来描述（Chothia et al., Nature 342，887-883（1989））。根据这种模型，对每一起可变区而言，抗体仅有少数主链构象或“典型结构”。通过该CDR中特定位点上存在的少数关键氨基酸残基，对于某些环而言是存在于框架区来确定了其构象。在这些位点上，在不同免疫蛋白中有相同构象的超可变区有相同的或非常相似的氨基酸残基。

对产生具有结合亲和力远比啮齿类CDR-供体抗体的这种亲合力低的重整人（或人化的）抗体的几种啮齿类单克隆抗体已进行了CDR缘接。近来的发现表明，除CDR传递之外，在人的序列框架内的改变对于提供CDR-嫁接产物中的令人满意的抗原结合活性可能是必要的。

Queen 等人（Proc. Natl. Acad. Sci. USA86，10029-10033（1989））已公开：来源于鼠抗-Tac单克隆抗体的CDR可被嫁接成人的框架中。选择人的框架以使与鼠

序列的同系性为最大。作者还使用鼠亲本抗体的计算机模型来确认位于FR内的氨基酸残基，所述的FR是接近得足以与该CDR或抗原料在使用的。这些残基被突变成成鼠序列中发现的残基。这种人化了的抗Tac 抗体的亲合力仅为鼠格Tac 抗体的这一亲合力的1／3左右，而保持这种抗体的人的特征还是成问题的。

令人惊奇的是，现已发现有可能生产直接抗人IgE的，有抗原，即IgE结合力的重整人抗体，所述的亲合力大约等于或甚至超过鼠的CDR－供体抗体的这一亲合力。

因而，本发明的目的之一是提供专对IgE的重整的人单克隆抗体，它包含至少一种抗原结合位点，该位点在顺序中包括该超可变区CDR1、CDR2和CDR3；所述的CDR1的氨基酸序列为Met - Tyr - Trp - Leu - Glu，所述的氨基酸序列为Glu - Ile - Ser - Pro - Gly - Thr - Phe - Thr - Thr - Asn - Tyr - Asn - Glu - Lys - Phe - Lys - Ala，所述的CDR_3的序列是 Phe - Ser - His - Phe - Ser - Gly - Ser - Asn - Tyr - Asp - Tyr - Phe - Asp - Tyr - Phe - Asp - Tyr，所述的重整的人抗体的抗原结合亲合力具有至少约等于鼠的CDR－供体抗体的亲合力，一种所述重整抗体的直接等同物的或衍生物。在SEQID No：1序列中所描绘的氨基酸序列中，CDR1从氨基酸31伸展至35、CDR2从氨基酸50伸展至66，而CDR3从氨基酸99伸展至112。该鼠的CDR－供体抗体是单克隆抗体TES－C21。

本发明优选地涉及一种具有至少一个抗原结合位点的重整的人抗体，所述位点有：

a）顺次包含超可变区域CDR1、CDR2和CDR3的第一区，

所述的CDR1的氨基酸序列为Met - Tyr - Trp - Leu - Glu，所述的氨基酸序列为Glu - Ile - Ser - Pro - Gly - Thr - Phe - Thr - Tyr - Asn - Glu - Lys - Phe - Lys - Ala，所述的CDR_3的序列是 Phe - Ser - His - Phe - Ser - Gly - Ser - Asn - Tyr - Asp - Tyr - Phe - Asp - Tyr - Phe - Asp - Tyr；以及

b）顺次包含超可变区域CDR1、CDR2和CDR3的第二区，所述的CDR1的氨基酸序列为 Arg - Ala - Ser - Gln - Ser - Ile - Gly - Thr - Asn - Ile - His，所述的CDR2的氨基酸序列为Tyr - Ala - Ser - Glu - Ser - Ile - Ser，所述的CDR3的氨基酸序列为 Gln - Gln - Ser - Asp - Ser - Trp - Pro - Thr - Thr，所述的重整的人抗体有一种至少与鼠的CDR-供体抗体相当的抗原结合亲合力，有一种所述重整形抗体的直接等同物或衍生物。第一区的CDR1、CDR2和CDR3是一种蛋白质的CDR，其序列在SEQID No.1序列中被确认出来，在SEQIDNo.3序列中所描绘的氨基酸序列中，第二区的CDR1、CDR2和CDR3分别从24、50、89伸展到34、56和87。

当该抗原结合位点包含第一区和第二区二者时，这些位点可位于相同的多肽链上，或者最好是每个区在不同的链上，第一区是一种免疫球蛋白重链，或其片断的一个部分，第二区是一种免疫球蛋白轻链，或其片断的一个部分。

按本发明，重整的人抗体指的是一种特征如下的分子：（1）它至少包含一种抗原结合位点，在其中每条存在的链都包含一个人类的结构，以及，（2）任何存在的恒定区至少与人免疫球蛋白恒定区同源，最好是与之相同。本文所用的“人一类结构”是一种依次由构架

区FR1、FR2和FR3构成的结构，它包含至少约70或更多，最好是至少约75或更多个与一种特殊的人免疫球蛋白序列中的氨基酸相同的氨基酸。因此，除可能的重整的人抗体的CDR外，全部都与一种或多种天然人免疫球蛋白序列的相应部分同系的，比如，一种重整的人抗体不具有含有鼠的可变区和人恒定区的嵌合抗体。

一种人-类型的构架可与特定的人免疫球蛋白的结构相同，或最好是与该特定的人结构不同，即，一个有限数目的氨基酸残基可插入，去除或被其它的氨基酸残基替代。这类修饰可被限制在单个的FR1、FR2、FR3或FR4，或包括两种、三种或全部四种FR。比如，人受体结构中的疏水氨基酸可被另种的氨基酸，最好也是疏水的氨基酸，如同系的氨基酸取代，被两种氨基酸取代，或被去除。同样，人结构中的亲水氨基酸也可被其它的氨基酸，两种氨基酸所替代，或被去除，因此，取代的氨基酸最好保持了原结构的氢键结构。这种修饰可根据试错法的基础完成，即通过对比所产生和重整人抗体与鼠CDR-供体抗体TES-C21的抗原-结合亲合力来评价其效果。适用于确定抗原结合亲合力的分析将于下文叙述。

特别是，所选的人受体结构中的有限数目的氨基酸残基，最好是1-12个残基被存在于鼠单克隆抗体中的相应位置上的氨基酸残基所取代（人H鼠交换）。特别是被鼠TES-C21，和/或被存在于不同人抗体中的相应部位上的氨基酸残基取代（人H人交换）。这种设想的氨基酸取代最好是基于先前被确认的特殊构架残基，它们被认为对抗原结合和/或 V_L/V_H 效集是潜在关键的。这类关键性的氨基酸包括这样的构架残基，其由于特殊的性质和/或位置：

——被认为是与该抗体的CDR中的氨基酸接触着的或位于其附近的；

——可能参与该抗原的关键性的相互作用；

——被认为是参与保持成对的 V_H/V_L 结构的完整性，直接或间接影响 V_H 和 V_L 区中，或期间的相互作用。

已知的适于鉴别所谓的关键氨基酸的方法包括分子模拟法。比如，一种抗原结合位点的分子模型可通过采用本领域普通技术人员熟知的和一般可得到的计算机程序在计算机监视器上形成和显示。

特别是，本发明的重整抗体的设计可包括以下步骤：

a）构造鼠抗体TES-C21的 V_L 和 V_H 的似乎真实分子模式，例如基于1和3号序列中所描绘的氨基酸序列和相应的被确定为高度同源的鼠抗体的已知结构，通过序列搭配来构造。该已知的结构来源于同样的鼠抗体或源于两种不同的鼠抗体。

b）从已知的人免疫球蛋白序列，即从公众可得的数据库，如KABAT数据库（“Sequence of proteins of immunological interest”Kabat E. A. et al., US departmant of health and human service public health service National Institute of Health）中可获得的序列中选择适宜的人受体构架。适宜的人受体构架即是来自特定的免疫球蛋白的构架，该球蛋白与数据库中所存的序列相比是与抗体TES-C21的 V_H 和 V_L 区高度同源，而更好是不寻常地同源的，或最好是来自与抗体TES-C21的 V_H 和 V_L 区高度同源的很多的人抗体的一致的构架。为嫁接所选的重和轻链构架序列无需自相同的人抗体中衍生，但从不同的人抗体产生则为好。

c）构造包含鼠TES-C21的CDR和选自符合式I的人受体构架FR的重整的人抗体的 V_H 和 V_L 的分子模型。

d）对比得自步骤a）和c）的分子模型。

在本发明的重整的人抗体中，经鉴别的关键氨基酸残基中的一个，一些或全部均可被另外的氨基酸残基，特别是被存在于另一个抗体TES-C21中的特定位置上的氨基酸所取代，最好是在所选的人构架中的“原来”的氨基酸是不曾被取代的，前提是，它是假设的规范结构中的一个部分，或它对确定超可变化环的结构是重要的。然而，氨基酸的取代不限于关键的氨基酸。最好是，非关键性影响残基的转变是人-人型的转变。

在本发明的重整的人抗体中的氨基酸 Cys 可处于形成-S-S-桥的氧化态。

本发明所提供的重整的人抗体的例子包括单区抗体，单链抗体以及完整的多链的，如四聚的包含全长度重链和轻链和其任何片断，如Fv、F(ab')$_2$、Fab'和Fab片断的抗体。

单区抗体包括一个含单区的单抗原结合位点。

单链抗体（术语也叫SCFv）基本上由重链和轻链的可变区构成。最好是，这些可变区通过由含约10-30，特别是15个选自甘氨酸和丝氨酸的氨基酸的短肽键共价连接的。优选的肽键是由三个重复单元 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 构成的15个氨基酸多肽.单链抗体既不包括重链的，也不包括轻链的恒定部分。

本发明的重整的人抗体是专门针对IgE的，即，它被用来直接对抗人IgE的等模式标本决定簇。因此，本发明的抗体识别IgE类的免疫球蛋白所共有的重链上的抗原决定簇，即，它与不同种类的IgE分子反应，但不与其它等模式标本的免疫球蛋白或免疫球蛋白轻链反应。

要求本发明的重整的抗体具有至少约与鼠抗体ＴＥＳ－Ｃ２１相等的ＩｇＥ－结合亲合力。如在此前或此后所用的术语“至少约相等”意指该重整的人抗体（检测抗体）的ＩｇＥ－结合亲合力，在统计的基础上是参比抗体ＴＥＳ－Ｃ２１的至少约９０％，更好是高于９０％特别是在约１００％和约２５０％的范围内。重整的抗体与ＴＥＳ－Ｃ２１的相应结构对比。如，如果该重整的抗体是一单区抗体，那么，它的亲合力应与单区ＴＥＳ－Ｃ２１相关。在ＳＥＱ　ＩＤ的1和3号序列所给的信息的基础上，可很容易地制出鼠单区抗体。在这段叙述中抗体的亲合力（“affinity”）和结合力（“avidity”）没有区别，但术语亲合力“affinity”既指亲合力“affinity”又指结合力“avidity”。

参比的和重整的实验抗体亲合力的确定将以同样的方法，即以相同的条件在相同的分析中进行。相互对比的这些抗体的纯度应相同，最好是用高纯度的抗体。

针对ＩｇＥ的抗体的结合亲合力被本领域的普通技术人员基于已知技术和原则用适当的定量分析很容易地确定。

欲测的适宜的参数是平衡常数 kaff（亲合力常数）。已研究出各种数学公式以用于抗体－抗原相互间的亲合力常数的实验性计算。测量 Kaff 的适宜的实验方法可以，如有赖于对游离抗原束缚的比例的测量，如竞争性放射免疫分析（ＲＩＡ）或竞争性酶－键合的免疫吸附剂分析（ＥＩＡ），或有赖于总的抗体浓度的测量，如由Beatty等所述的非竞争性固相ＥＩＡ（J. Immunol. Meth　１００，１７３－１７９（１９８７））。

最好是在采用ＣＭ５表面嵌片的ＢＩＡ　coreTM　体系

(Phamacia Biosensor, Uppsela, Sweden)上分析此抗体对此IgE的抗体的实际时间的生物特点的相互作用(Jonsson, V. et al., Biotechniques 11, 620-627(1991)来测定Kaff。该项分析基本上按制造者的说明书进行，并包括测定动力学常数 Kass 和 Kdiss。适宜的抗体比如是，如由 Serotec所供的市售人的IgE(如BP094，Dottikon Switzerland) 或是一种有人e恒定区的嵌合抗体，如SE44(Sun et al., J. Cell. Biol. 109，289a(1989))。特别是这种分析包括一种实验过程，它包括：

1)采用化学方法制动该嵌片表面上的所谓传染性抗体，即对包含鼠抗体TES-C21的一种抗-鼠抗体，如抗-鼠IgE的测量，或对包含本发明的重整的人抗体的一种抗-人的抗体，如抗-人IgG。

2)将参比的或实验的抗体与已制动的传染性抗体结合。

3)将已结合的参比的或实验的抗体与固定浓度的抗原接触。

最好用定量的已束缚的抗体和可变浓度(已知的)IgE进行数次，比如四次实验周期。完成每次实验后，比如用酸，如HCl恢复此表面。

设计本发明的重整的抗体旨在构成一种有高结合率(Kass)，优选为$2.5\times10^{5}\ M^{-1}S^{-1}$或更高，而离解率(Kdiss)低的，优选为$1.9\times10^{-5}\ S^{-1}$或更低的抗体。

如本文所述，本发明的重整的人抗体的直接等同物是一种顺次含有1号序列所示的CDR1、CDR2和 CDR3，以及任选的示于3号序列的CDR1、CDR2和CDR3的重整的人抗体，其中，在一个可变区内，该CDR中最多有4个氨基酸残基，即在该CDR

中的1、2、3或4个氨基可被其它的氨基酸取代。因此术语“其直接等同物既指一种单区重整的人抗体（蛋白质Y）

（1）其中，超可变区CDR1、CDR2和CDR3作为一个整体被认为是至少90%与SEQ ID的1号序列中所示的CDR同源的，以及

（2）它所具有的对IgE的亲合力至少约与本发明的参比蛋白的亲合力相等，所述的参比蛋白的FR与蛋白Y的相同，而且其有与SEQ ID1号序列中的CDR相同的CDR；又指

每个结合位点有两个区的重整的抗体（蛋白Y'）

（1）其中该超可变区$CDR1_H$、$CDR2_H$、$CDR3_H$和$CDR1_L$、$CDR2_L$和$CDR3_L$作为一整体认为至少80%，最好是90%与1和3号序列中所示的CDR同源，而且

（2）它的对IgE的亲合力至少约与本发明参比蛋白的亲合力相等，所述的参比蛋白FR和恒定部分与蛋白Y'的相同，但它具有与1和3号序列中的等同的超可变区$CDR1_H$、$CDR2_H$、CDR_H和$CDR1_L$、$CDR2_L$、和$CDR3_L$。

后一指标可通过测定 Kaff，如按上述方法测定来检测。

鼠单克隆抗体TES-C21显示（在其它抗体之中）以下特征，此特征也为本发明的重整的人抗体所共有：

——它抑制了IgE与带有Fce受体Ⅰ或Ⅱ的细胞的结合；

——专与人-IgE分泌细胞结合；

——不识别和不结合已结合在带有Fce受体Ⅰ或Ⅱ的细胞，如已致敏的肥大细胞和嗜碱细胞，表面上的IgE；

——不触发介质（如组胺）释放；

——抑制IgE在免疫应答中的形成。

这些有特征性的能力可用本技术领域中的已知方法，如公开在欧洲申请No．396505中的方法测定，该申请经参阅已引入本文。

本发明较佳的重整的抗体或其衍生物至少含有：

a）一种免疫球蛋白重链或其断片，它含有顺次包含超可变区$CDR1_H$、$CDR2_H$和$CDR3_H$的可变区域，以及人重链的恒定部分或其断片，所述的$CDR1_H$的氨基酸序列有Met - Tyr - Trp - Leu - Glu，所述的$CDR2_H$的氨基酸序列有Glu - Ile - Ser - Pro - Gly - Thr - Phe - Thr - Thr - Asn - Tyr - Asn - Glu - Lys - Phe - Lys - Ala，所述的$CDR3_H$的氨基酸的序列是Phe - Ser - His - Phe - Ser - Gly - Ser - Asn - Tyr - Asp - Tyr - Phe - Asp - Tyr - Phe - Asp - Tyr；和

b）一种免疫球蛋白轻链或其断片，它包含一个轻链可变区和一个人轻链的恒定部分或其断片，所述可变区顺次包含超可变区$CDR1_L$ $CDR2_L$和$CDR3_L$，所述的$CDR1_L$的氨基酸序列为Arg - Ala - Ser - Gln - Ser - Ile - Gly - Thr - Asn - Ile - His，所述的$CDR2_L$的氨基酸序列为Tyr - Ala - Ser - Gln - Ser - Ile - Ser，所述的$CDR3_L$的氨基酸序列为Gln - Gln - Ser - Asp - Ser - Trp - Pro - Thr - Thr。

免疫球蛋白的重链或轻链断片是一种重链或轻链，它不是全长度链，但包含一可变区和任选地包含该链恒定区的部分。

更为优选的重整的人抗体或其衍生物至少包含：

a）有一个可变区的重链，而该可变区的氨基酸序列基本上与11号序列中所示的相同，该序列起始于1位上的氨基酸而终止于123位

上的氨基酸，该可变区还具有人重链的恒定部分；以及

b）在一个可变区的轻链，该可变区的氨基酸序列基本上与5号序列中所示的相同，该序列起始于1位上的氨基酸序列而终止于107位上的氨基酸，该可变区还具有人轻链的恒定部分；

重整的人抗体或其衍生物是特别优选的，其至少包含

a）有一个可变区的重链，该可变区的氨基酸序列基本上与13号序列中所示的相同，该序列起始于1位上的氨基酸而终止于123位上的氨基酸，该可变区还具有人重链的恒定部分；以及

b）有一可变区的轻链，该可变区的氨基酸序列与5号序列中所示的基本相同，该序列始于1位氨基酸而终于107位氨基酸，该可变区还具有人轻链的恒定部分；

本申请中的残基符号与氨基酸残基的直线编码相对应。

人的重链的恒定部分可选自等模式标本（a）、（d）、(g)或（μ）中的任几种，各种次级重链，如IgG1-4次级都可用。人g1链的恒定部分是优选的。重链中的不同级和次级参与不同的效应子功能。因此，通过挑选重链恒定区的类型，就可产生出有所需效应子功能的重链抗体。轻链恒定区是（1）链，优选的是（k）链。

由细胞系EH31.8所产生，编号为H3L1的重整的人抗体是最好的。

本发明还涉及本发明的重整的人抗体的衍生物。重整的人抗体的一种衍生物具有所述抗体的抗原特性。根据本发明，衍生物指的是任意可通过修饰本发明的抗体而获得的分子，所述的修饰比如是吸附或化学改性。比如，按衍生物的目的用途，可通过与蛋白质的，或非蛋白质的分子的共价的或非共价的联接而衍生出本发明的抗体。比如用

本技术领域中已知的偶合技术就可得到共价结合而产生的抗体轭合物。在类轭合物中抗体直接与共轭配偶体结合，或以隔离物或直线基团的方式结合。衍生物的例子是本发明的放射性标记的重整的人抗体和重整的人抗体的轭合物，如带有酶的，一种荧光的或化学发光标记，一种适宜的细胞溶解或抑细胞的物质，一种金属螯合物，一种非酶的蛋白，如抗生物素蛋白，或带有非－蛋白质的分子，如生物素的重整的人抗体和其轭合物。

用于本发明抗体轭合物的酶比如是辣根过氧化酶、碱性磷酸盐酶、b－D－半乳糖苷酶、葡糖氧化酶、碱性磷酸盐酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶或葡糖－6－磷酸酯脱氢酶。

荧光标记物包括荧光素；荧光染料、若丹明等类似物。

化学发光标记物是鲁米诺的2，3－哌啉二羧酸锡(acridinium)酯。

金属螯合物的例子是：乙二胺四乙酸（EDTA）、二亚乙基三胺五乙酸（DPIA）、1，4，8，11－四吖十四烷、1，4，8，11－四吖十四烷－1，4，8，11－四乙酸、1－噁－4，7，12，15－四吖十七烷－4，7，12，15－四乙酸等。

本发明的放射性标记抗体或其断片含有如放射性碘（^{123}I、^{125}I、^{131}I），氚（^{3}H）、碳（^{14}C）、硫（^{35}S）、钇（^{90}Y）锝（^{99m}TC）等。

本发明还涉及制备本发明的抗IgE重整的人抗体，其直接等同物和衍生物的方法。

本发明的重整的人抗体，其直接等同物或衍生物用其本身是已知的方法制备，该方法的特征是：下文将进一步定义的产生本发明蛋白

的寄主细胞在体内或体外增殖，若需要，将所需的蛋白分离出来，并任选地将其转化成其衍生物。本发明的蛋白质用一种方法制备，该方法包括在可表达所述蛋白质的条件下培养任何适宜的可转化的寄主，分离所述蛋白并任选地通过蛋白水解分裂将分离出的蛋白转变成本发明的另种蛋白，或比如将另一种化合物，如上述的蛋白或一种非蛋白质的分子按上述的方法进行连接而转化成本发明的衍生物。

在本发明的一较佳实施例中提供了一种产生多链抗－ＩｇＥ重整的人抗体的方法，该方法包括：（１）用下文将定义的本发明的第一和第二ＤＮＡ构成物培养已转化的适宜的寄主细胞，及（２）从该培养物中恢复活性的抗ＩｇＥ重整的人抗体。在本文的上下文中，活性抗体是一种专与ＩｇＥ结合的抗体。多链抗体是一种至少包含具有一个重链和一轻链可变区的至少一个抗原结合位点的抗体。

可以选择的是，可将重链和轻链分别恢复并在体外折叠后重新构成一种活性抗体。适宜的重构方法是为本技术领域中普通技术人员熟知的。因此，产生本发明的多链抗体的方法还包括：

（１）以本发明的第一ＤＮＡ构成物培养已转变的第一寄主细胞，然后从培养物中恢复所述的重链或其断片，及

（２）以本发明的第二ＤＮＡ构成物培养已转变的第二寄主细胞，然后从培养基中恢复所述的轻链或其断片，以及

（３）以得于（１）的重链或其断片和得于（２）中的轻链及其断片在体内重构活性的抗－ＩｇＥ重整的抗体。

还以类似的方式提供了产生本发明单链或单区的重整的人抗体的方法。该法包括（１）以分别对本发明的单链或单区重整的人抗体编码的ＤＮＡ构成培养一种已转变的寄主细胞，及（２）从培养基中恢

复所述的多肽。

该重整的人抗体的断片，如Ｆａｂ、Ｆａｂ′或Ｆ（ａｂ′）$_2$断片可用上述的重组ＤＮＡ技术制成，或用上文已提及的实际上已知的方法，如通过用酶，如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化和／或用化学反应分裂二硫化物键从如上述的已制得的无损伤的多链重整白人抗体制成。

适宜的寄主细胞包括真核细胞，如动物细胞、植物细胞和真菌，和原核细胞，如革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌，如Ｅ．coli。较佳的真核寄主细胞是哺乳动物源的细胞和酵母细胞。

在上下文所用的体外（in vitro）意指非体内（ex vivo），因此这就包括如细胞培养和组织培养条件。

比如，在适宜的培养基中于体外增殖哺乳动物细胞，该培养基是惯例的标准培养基，如 Dulbecco's Modified Eagle Medium（ＤＭＥＭ）或ＲＰＭＩ１６４０介质，任选地补充了哺乳动物血清，如胎牛血清，或痕量元素和生长持久补充剂，如诸如通常的鼠腹膜渗出物细胞、脾细胞、骨髓巨噬细胞之类的喂养细胞、２－氨基乙醇、胰岛素、铁传递蛋白、低密度脂蛋白、油酸等。

体外产生提供了相当纯的抗体制品，并使之递增以得到大量的所期望的抗体。培养细菌细胞、酵母和哺乳动物细胞的技术在本技术领域中是已知的，而且包括均匀悬浮液培养，如在空气提升反应器或在连续搅拌反应器中培养，或制动或捕捉细胞培养物，如在中空纤维中，在微囊中，在琼脂糖微珠上或陶瓷盒中进行的培养。

也可通过体内繁殖哺乳动物细胞来获取大量的本发明的所期望的重整的人抗体。为此，将产生所需抗体的杂交细胞注入组织适宜的哺

乳动物中，以引发产生肿瘤抗体的生长。任选地，在注射前，用碳氢化物，特别是矿物油，如姥鲛烷（四甲基十五烷）使此动物作好准备。1－3周后，从这些哺乳动物的体液中分离出抗体。比如，将产自杂交细胞系Sp2／0的，产生所需抗体的被转染的细胞以腹膜注射注入最好用姥鲛烷预处理过的Balb／c鼠中，1－2周后从该动物中提取腹水流体。

为得到所需的重整的人抗体筛选该细胞培养上清液，优先采用酶免疫分析法，如多层分析或点分析，或用人IgE作抗原的放射免疫分析。如，可用多层酶分析来确定是否在细胞培养上清液中存在正确组合的免疫球蛋白，借此使用直接对着该轻链人恒定区K或I（当适合时）的抗体和直接邻对该重链人恒定区的另一抗体，如所需次级的抗体，其中之一被复盖到一固体支撑物上，而另一被共轭到可用适宜的酶基质监测的酶上。这类免疫分析比如是一种酶键合的免疫吸附分析（ELISA），其中一适宜的载体，如塑性微滴定板覆以免疫球蛋白E，然后用待测的培养上清液进行培养。通过在该上清液中用酶标记的，识别抗－IgE抗体的抗体的培养，然后接着添加适宜的酶培养基溶液来检测已结合的单克隆抗体。该酶培养基反应比如导致可用肉眼观察到的或用光学测量装置观察到的颜色变化。

为分离此重整的人抗体，则可将该培养物上清液中的，或该腹水流体中的免疫球蛋白浓缩，如通过用硫酸铵沉淀，抗吸湿材料如PEG渗析用选择性膜过滤等方法浓缩。如果需要和／或必要，用惯用的色谱法，如凝胶过滤、离子交换色谱法、疏水相互反应色谱法或亲合性色谱法，如免疫亲合性色谱法提纯该抗体。最好是，将该重整的人抗体与含它们的细胞上清液中分离，所用的方法包括一种色谱提

纯步骤，如亲合性色谱法，比如采用Protein A（如果本发明的抗体含有－Fc部分）的亲合性色谱法、离子交换色谱法和／或凝胶过滤法。

用本身为已知的方法，如通过将本发明的重整人抗体吸附于另一种化合物，或通过偶合提供化学结合的轭合物来制备本发明的重整人抗体衍生物。含蛋白，如一种酶的本发明抗体的轭合物，比如是通过使按上述方法制得的抗体与该蛋白在有偶合剂存在时进行反应，偶合剂如，戊二醛、高碘酸酯、N－N′－O－亚苯基二马来酰亚胺、N－（m－马来酰亚胺基苯甲酸基）－琥珀酰亚胺、N－（3－[2′－吡啶基二硫基]－丙酰基氧）－琥珀酰亚胺、N－乙基－N－（3－二甲基氨基丙基）－碳化二亚胺等。含生物素的轭合物，比如是通过使抗体与一种生物素的活化的酯，如生物素羟基－琥珀酰亚胺酯反应而制成。含荧光的或化学发光标记的轭合物是在有如上在所列的偶合剂存在时，或通过与一种异硫氰酸盐，优选是荧光素－异硫氰酸盐反应而制得。

用碘（^{123}I、^{125}I、^{131}I）的放射性标记的重整的抗体是通过根据本身已知的方法碘化而从本发明的抗体中获得的，该碘化比如用放射活性钠或钾的碘化物和一种化学氧化剂，如次氯酸钠、氯胺T或类似物，或一种酶氧化剂，如乳过氧化酶；或葡糖氧化酶和葡萄糖进行的。本发明的抗体或断片，比如通过二亚乙基三胺五乙酸－螯合作用而与钇^{90}Y偶合。锝－99m标记的抗体或断片通过脂交换方法，如通过用亚锡离子溶液还原锝酸盐（TcO_4^-），将还原的锝螯合到Sephadex 柱上再将该抗体施于该柱而制得，或用直接标记技术用如高锝盐，一种还原剂，如$SnCl_2$，一种缓冲溶液，如钠－钾的磷

酸盐和本发明的抗体培养制得。

也可直接用重组ＤＮＡ技术，如下面将述及的技术制成与蛋白结合的本发明抗体的轭合物。

制备本发明的一种重整的人抗体，或其一种直接等同物或衍生物的方法应产生其量足供亲合力和特性测定的所需的蛋白。

本发明还涉及对本发明的重整的人抗体及其直接等同物编码的重组体ＤＮＡ。以一种非常通用的方式提供了将本发明的单区重整的人抗体、单链重整的人抗体，本发明的重整的人抗体的重链或轻链或其断片编码的ＤＮＡ分子。经确定，这类ＤＮＡ包括编码单线ＤＮＡ，由所述编码ＤＮＡ此外和补偿ＤＮＡ，或这些补偿ＤＮＡ（单线的）本身构成的双线ＤＮＡ。特别是本发明涉及下述的第一和第二ＤＮＡ构成物。

第一ＤＮＡ构成物将一重链或其断片编码，而且包括：

ａ）对任选地包含ＦＲ和ＣＤＲ的可变区编码的第一部分，所述的ＣＤＲ按顺序是$CDR1_H$、$CDR2_H$、$CDR3_H$，它们在１号序列中的氨基酸序分别从３１、５０和９９位伸展至３５、６６和１１２位；第一部分起始于将该可变区的第一个氨基酸编码的密码子，而终止于将可变区最后一个氨基酸编码的密码子，而且还任选地含

ｂ）对一人重链恒定区部分或其断片编码的第二部分，它始于将该重链的恒定部分的第一氨基酸编码的密码子，而终于将其恒定部分或其断片的最后一个氨基酸编码的密码子，接着的是一个无意义的密码子。较好是，这第一部分编码－可变区，其氨基酸序列基本上与１３号序列中所描述的氨基酸相同，其序列始于１位氨基酸终于１２３位氨基酸。更好是此第一部分有一示于１３号序列的核苷酸序列，它始于

79位上的核苷酸而终于447位上的核苷酸。这第二部分可以是基因源的DNA断片（包括基因内区），或一种cDNA断片（不含基因内区）。如果存在，将g1链恒定部分编码的第二部分是优选的。

该第二DNA构成物将一轻链及其断片编码并含有：

a）一个对任选地含有FR和CDR的可变区编码的第一部分，所述CDR依次是CDR1L、CDR2L和CDR3L，它们在3号序列中的氨基酸序列中自24、50和89位分别伸展至34、56、97位；这第一部分始于将该可变区的第一氨基酸编码的密码子，而终于将该可变区的最后一个氨基酸编码的密码子，及，任选地含有

b）将一人轻链恒定部分或其断片编码的第二部分，它始于对此轻链的恒定部分的第一氨基酸编码的密码子，而终于对该恒定部分或其断片的最后一个氨基酸编码的密码子，接着是一个无义密码子。较佳的是，这第一部分对具有氨基酸序列基本与5号序列中所描绘的氨基酸序相同的可变区编码，该序列始于1位上的氨基酸而终于107位的氨基酸。更佳的是，这第一部分有如5号序列所示的核苷酸序列，它始于82位上的核苷酸而终于403位上的核苷酸。这第二部分可以是基因源的一个DNA断片（包含基因内区）或是－cDNA断片（无基因内区）。如果存在，将此K链的恒定部分编码的第二部分是优选的。

含有此第二和第二部分的第一和第二DNA构成物是优选的。在这种情况下，第一和第二部分通过基因内区序列分隔开。

有益的是，这第一和第二DNA构成物含有一第三部分，它位于该第一部分的上游，而且它将一引导肽（leader peptide）编码；这第三部分始于将该引导肽的第一氨基酸编码的密码子而终于将该引

导肽的最后氨基酸编码的密码子。一种适宜的引导肽是被该寄主有机体要求分泌出链的肽，其中，链被表达，而且接着被该寄主排除。较佳的是，第一和第二ＤＮＡ构成物的第三部分将一免疫球蛋白的基因的引导肽编码。最佳的是，该第一ＤＮＡ构成物的第三部分对具有氨基酸序列基本上与１３号序列中所示的序列相同的引导肽编码，１３号序列始于在－１９位的氨基酸而终于－１位的氨基酸。最佳的还有，第二ＤＮＡ构成物的第三部分对具有氨基酸序列基本上同于５号序列中所示的氨基酸序列的引导肽编码，０号其序列始于－２０位上的氨基酸而终于－１位上的氨基酸。

本发明还涉及为本发明重整的人抗体的直接等同物编码的重组体ＤＮＡ和为本发明抗体的与一蛋白偶合的轭合物编码的重组体ＤＮＡ。

本技术领域的发现状是这样的：本技术领域中的普通技术人员得到本文所提供的信息，即ＣＤＲ的氨基酸序列和对其编码的ＤＮＡ序列（１和３号序列）就能够合成本发明的ＤＮＡ分子。获得将本发明重整的人抗体可变区编码的ＤＮＡ构成物的方法包括合成一些低核苷酸，用ＰＣＲ法使其增殖以及为得到所需的ＤＮＡ序列使它们连接。为构成一可变区基因的可供选择的方法是：

——克隆一对有任意物特性的人单克隆抗编码的基因，

——确定将ＦＲ和ＣＤＲ编码的该ＤＮＡ的片段，

——去除ＣＤＲ编码的ＤＮＡ片段，以使对此ＦＲ编码的ＤＮＡ片段与适宜的限制位点在结合处融合在一起，

——根据上面鉴定的１和３号序列中的序列制备双线合成ＣＤＲ盒，所述盒有粘性末端，

——将此盒绑扎在此ＦＲ结点处(欧洲专利申请Ｎｏ２３９４００)。

如果愿意，可用各种已知的标准方法，如用诱发随机突变或位点定向的诱变法使该ＤＮＡ构成物发生突变。在为本发明的重整的人抗体编码的ＤＮＡ构成物中，诱变不会导致ＣＤＲ内的任何氨基酸的改变。在对为本发明重整的人抗体的直接等同物编码的ＤＮＡ构成物中，用另一核苷酸替代一核苷酸有可能改变一个或多个ＣＤＲ中的氨基酸序列。

为本发明的重整的人抗体的直接等同物编码的ＤＮＡ可根据本领域中已知的方法，如随机突变或位点定向诱导对本发明的重整的人抗体编码的ＤＮＡ来制备。不是不活动突变而是导致位于ＣＤＲ内的至少一个氨基酸残基取代的这种突变会产生为本发明的重整的人抗体的直接等同物编码的ＤＮＡ，前提是如果这样产生的蛋白满足上述规定。

如在本说明书以下部位所用的，本发明的重整的人抗体意味着包括其直接等同物。

此外，本发明还涉及一种重组体ＤＮＡ，它是一种杂交的载体，它包括至少一种上述的ＤＮＡ构成物，如为一轻链可变区和／或一重链可变区编码的插入物，所述载体是可在一原核的和／或真核的寄主中复制的。

本发明优选的杂交载体包含一种为本文前述的轻链编码的插入物和／或为本文前述重链编码的插入物。

本发明的杂交载体包括一复制源或一自发复制序列，一个或多个主要标志序列和，任选地，表达控制序列，信号序列和附加的限制位点。

较佳的是，本发明的杂交载体包括一上述的可行地键联于一表达控制序列上的插入物，这些在下文将专门描述。

载体一般与可相容的寄主细胞协同完成两个功能。一个是促使将该免疫球蛋白链编码的核酸的克隆，即产生可用量的核酸(克隆载体)。另一功能是在适宜的寄主中提供基因构成物的复制和表达，方法或是保持作为染色体外元素，或是合并到寄主染色体中（表达载体）。一个克隆载体包含上述的基因构成物，一个复制源或一自发复制序列，可选择的标志序列和，任选地，包括信号序列和附助的限制位点。一表达载体还另外包含表达控制序列，它主要用于基因的转录和转译的。

一种复制源或一种自发复制序列或由包括外生源，如产自Simina 病毒40（SV40）或其它病毒源的载体结构，或由该寄主细胞的染色体机构提供。

该标志可允许选择含该载体的寄主细胞。选择标志包括提供抗重金属如对铜的抗性，或提供对抗体，如四环素，氨苄青霉素geneticin（G-418）、新霉素、卡纳霉素、潮霉素抗性的基因，或补偿该寄主细胞基因损伤，如缺乏胸腺激酶，次黄嘌呤磷酰转移酶、二氯叶酸还原酶等的基因。

信号序列比如可以是对引导抗体分泌的引导肽编码的前序列或分泌引导、并合信号等。

作为表达控制序列，该载体DNA包括一启动子，为起始和终止转录和为稳定mRNA所必须的序列，以及，任选地包括强化因子和其它的调节序列。按该寄主细胞的特性可采用多种起动序列。很强的、同时也很易调节的启动子是最有用的。起始转录的序列比如是Shine - Dalgano 序列。为起始和终止转录及为稳定该mRNA所必需的序列通常可分别得自病毒的或真核的cDNA，如得自表达寄主，的不编码的5′-区和3′-区。强化因子是基因或病毒源的转录-

刺激DNA序列，如产生于 Simima 病毒、多形瘤病毒、牛乳头瘤病毒、Moloney 肉瘤病毒，或特别是产生于人淋巴病毒的病毒源。

该载体DNA的各种DNA片段可被锥合，即它们彼此接合并处于功能上的互相关系。

适于在一种E. Coli 菌株中复制和表达的载体的例子是噬菌体，如λ噬菌体的衍生物，或质粒。适宜的载体包括一完整的复制子，一种标志基因、限制核酸内切酶的识别序列，从而使外来DNA，以及，如果适合，该表达控制序列可被嵌在这些位点上，以及信号序列和强化因子上。本发明的表达载体包含一含有定义如上的含有适宜启动子和DNA结构成物的表达盒，该DNA是为所述启动子所控制。

微生物启动子比如是噬菌体λ的强向左的启动子P_L，它受温度敏感阻遏物控制。E. Coli 启动子，如被乳糖阻遏物调节的和被异丙基－β－D－硫代半乳糖苷引发的乳糖启动子，被色氨酸阻遏物调节的，和被如色氨酸缺乏而诱发的，以及被乳糖阻遏物调节的杂文色氨酸－乳糖启动子调节的乳糖启动子也是适宜的。

适于在酵母中复制和表达的载体含有对酵母的复制起始和可选择的基因标志。这类载体中的一组包括作为复制源的称之为ars 序列（自发复制序列）。这些载体在转化和自发复制后被滞留在染色体外的酶母细胞内。此外含全部或部分得自Saccharomyces cerevisise的2μ（2微克）质粒DNA也可用，这类载体将通过重组入已存在于该细胞中的2μ质粒，而得以完整，或自发复制。当要达到高转化频率和高复制数时，2μ序列是尤为适宜的。

适于在酵母表达中的表达控制序列比如是被高度表达的酵母基因序列。因而，对TRP I 基因，ADH I 基因或ADH II 基因，酸性

磷酸酶（PHO3或PHO5）基因，异细胞色素基因的启动子或与糖酵解途径有关的启动子。如烯醇酶、甘油醛－3－磷酸盐激酶（PGK）、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸苹果糖激酶、葡糖－6－磷酸盐异构酶、3－磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡糖异构酶和葡糖激酶基因的启动子是可用的。

适用于哺乳动物寄主细胞的启动子可从人的免疫蛋白基因中获得或从诸如 Simiana 病毒40（SV40），Rous sarcoma 病毒 adeno 病毒（RSV）、adeno 病毒2，bovine papilloma 病毒（BPV），papova 病毒BK突变体（BKV），或鼠或人的细胞肥大病毒（CMV）中来获得。人的CMV启动子是较佳的。任选地，该载体可含有得自哺乳动物表达产物的启动子，如肌动蛋白、胶原蛋白、肌球蛋白等的启动子，或天然启动子和通常与该免疫球蛋白基因序列有关的控制序列。

该载体可适用于原核的和真核的寄主。本发明的DNA分子一旦制成，则可将其很方便地转录到适宜的表达载体中。包括适宜的启动子和将重和轻链恒定部分编码的基因的表达载体是公众可得的。

用于该轻链和该重链的基因构成物借助两种载体顺次地或同时地转移到该寄主细胞。任选地，将重链和轻链二者克隆入同一杂交载体，并以一步工艺按单一构成物并入该寄主细胞中。一种第三选择方法利用共转染没键合的DNA断片。

所需的重整的人抗体编码的重组体DNA，比如可通过培养已转化的寄主细胞而制得。

特别是，这类DNA可用包括下述步骤的方法制备。

a）制备了专对IgE的重整的人抗体的可变重链和／或轻链可变区

编码的ＤＮＡ；

ｂ）制备为一种人抗体的重链和／或轻链恒定区编码的ＤＮＡ，如通过将ＤＮＡ从基因库分离及用ＤＮＡ探针选择所需的为抗体所述恒定区编码的ＤＮＡ；

ｃ）将步骤ａ）或ａ）和ｂ）的ＤＮＡ并入到适宜的杂交载体中；

ｄ）将所得的杂交载体转移到受体寄主细胞或恢复为此所需基因编码的ＤＮＡ，再将此未键合的ＤＮＡ转入适宜的受体寄主细胞中；

ｅ）选择和培养此已转化的寄主细胞，并任选地；

ｆ）分离所需的ＤＮＡ。

将上述方法ｂ）的基因组人的ＤＮＡ自适宜的人组织。最好是从人胎盘或人的胎肝细胞中，以本技术领域的已知方法分离出来。根据已确定的步骤通过用适当的，限制性内切酶限制消化由此构成一遗传ＤＮＡ库。复制此基因组的ＤＮＡ库，如在消化纤维膜上复制，然后用ＤＮＡ探针筛选感兴趣的此ＤＮＡ序列。该所需的ＤＮＡ可用ＰＣＲ技术放大。

下文将述及转移该重组体，如转移杂交载体，以及选择已转化的细胞。

此外，本发明还涉及一种以上述重组体ＤＮＡ转变的适宜的寄主细胞。即称之为以对该轻链编码的ＤＮＡ和／或对所希望的本发明的重整的人抗体的重链编码的ＤＮＡ转变的寄主细胞。对每个细胞含大量该载体复制的寄主细胞是优选的。

本发明的寄主细胞必须能在体外培养。适宜的寄主细胞是原核源或真核源的寄主细胞，而且包括细菌细胞，特别是E．Coli．酵母，如Saccharomyces 啤酒酵母细胞，或哺乳动物细胞。为提供适于功能

四聚抗体产生的环境，真核的，特别是哺乳动物或酵母源的寄主细胞是优选的，因为功能的四聚物抗体分子的生物合成需要正确的新生的多肽链叠合和组合。原核细胞，尤其是E．Coli．可用于产生本发明的抗体断片。如Fab及Fv断片。

适宜的寄主的例子是缺乏或没有限制性或修饰性的酶的微生物，如细菌，特别是 Escherichia coli 菌株，以及酵母，比如 Saccharomyces 啤酒酵母。

本发明优选的寄主细胞是哺乳动物细胞，如COS－7细胞、Bowes 黑素瘤细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、胎肺细胞L－132及淋巴结源的哺乳动物细胞，如淋巴瘤、骨髓瘤、杂交瘤（hybridoma）trioma 或 quadroma 细胞。鼠的骨髓瘤NSO细胞是最好的。

这些寄主细胞单独用轻（L－）链－基因构成物，单独用重（H－）链－基因构成物，或以二者，或依次地或同时地借助两个分别的载体，或以一个一步骤程序，通过采用前文确定的双－构成物（L－链／H－链）载体转染。在这种可选择方案中，未连接的基因结构可顺次地或同时地转染到该寄主细胞中。

以优选的是上文所述的两种基因构成物转染分泌重整的人抗体的寄主细胞，特别是细胞系EH31．8是优选的。本发明寄主细胞的其它例子是以类似的重组体质粒转染的细胞，其含H－和L－链基因构成物的可选的取向，将另外的DNA成份合并以利于高度表达本发明的抗体。

本发明的寄主细胞是遗传稳定的，产生和最好是分泌恒定特性的本发明的重整的人抗体，并且可通过解冻和再克隆从深冷培养物中活

化。

该已转变的寄主细胞可用本技术领域中的已知方法在一液体培养基中培养，此培养基含有可吸收的碳源，如葡萄糖或乳糖之类的碳水化合物、氮，如氨基酸、肽或它们的降解产物，如胨、铵盐等以及无机盐，如钠、钾、镁和钙的硫酸盐、磷酸盐和／或碳酸盐。该培养基比如还含促进生长的物质，如痕量元素，如铁、锌、锰等。

为了对选择压力和防止尚未转变的，或已失去杂交载体的细胞生长，最好挑选此培养基。因此，比如如果该杂交载体含作为标志的一种抗生素阻抗基因，则将一种抗生素加入该培养基中，比如使用一种寄主细胞，它在基本氨基酸中属营养缺乏型，而杂交载体含一对补偿此寄主缺陷的酶编码的基因，则所述氨基酸的最小培养基缺陷则被用来培养此转变的细胞。

培养是以本技术领域中已知的方法完成，要挑选培养条件如温度、培养基的pH值和终止时间以便获得本发明的该多肽或衍生物的最大滴定值。因此，最好在需氧条件下，通过拌随震动或搅拌的浸渍培养，在约20℃－40℃。最好是在约30℃的温度下，以4－8，最好是7的pH值一种E．Coli 或酵母菌系培养约4－30小时，最好是直到获本发明的多肽或衍生物的最大产率时为止。

当此细胞密度达到一充分值时，阻断此培养并可分离此多肽或衍生物。如果此杂交载体含适当的分泌信号序列，则将已转化的细胞直接转入此培养基的细胞就分泌此多肽或衍生物。否则，该细胞必须破坏，如用洗涤剂，如SDS、NP－40™ Triton™ 或脱氧胆酸处理，用溶菌酶或类似的活性酶溶解或用渗透震动或超声波破坏。如果信号序列直接分泌所需蛋白到此细胞周质中，则也将需要破坏此细

胞。如果用酵母作寄主微生物，则通过葡糖苷酶的酶消化去除细胞壁。任选地或附加地，可用机械力，如剪切力（如 French 压力机、Pyno 碾压机或类似机械）或玻璃珠或铝氧化物的摇动，或转化冷冻，如在液氮中冷冻，和解冻如在 30℃－40℃解冻，以及超声波来打破此细胞。

将分裂细胞后所得的混合物离心分离后所获的细胞上清液或溶液－它含有蛋白、核酸和其它的细胞成分－以本领域已知的方式，在包括本发明的多肽在内的蛋白中富集。因此，比如用聚乙烯亚胺处理去除大部分非蛋白质组分。而包括本发明多肽和衍生物的蛋白则，如用上述方法分离。

本发明涉及转化寄主细胞的制备方法，其特征是，用符合本发明的一种或两种载体将前文所述的适宜的受体寄主细胞转化。然后选择此已转化的细胞。

衍生物转化按文献，比如针对 S. cerevisiae （A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 75：1929, 1978）及对 E. coli （M. Mandel et al., J. Mol. Biol. 53：159, 1970）
的文献进行。

因此，E. Coli细胞的转化步骤包括如对 Ca^{2+} 细胞的预处理以使DNA被摄取，以及用杂交载体培养。已转化细胞的后续选择可以进行，比如可通过将该细胞转移到可使已转化细胞按该载体DNA的标志序列特性与亲本细胞分离的选择性生长培养基而完成。较佳的是，使用不使不含该载体的细胞生长的生长培养基。酵母的转化，比如包括借助葡糖苷的酶去除酵母细胞壁，用该载体在有聚乙二醇和

Ca^{2+} 离子存在时处理所得的原生质球以及通过将该原生质球埋入琼脂来再生此细胞的步骤。较佳的是，用一种上述的可同时再生和选择已转化的细胞的方法制备此再生琼脂。

较高的真核源的细胞转化，如哺乳动物细胞系的细胞转化最好通过转染完成。用常规技术完成转染，如磷酸钙沉淀、微注射入细胞核、原生质体融合、电穿孔(electroporation)，即用短电脉冲引入DNA（它瞬间提高细胞膜穿透性）等进行转染。转染可在辅助化合物，如二乙氨基葡聚糖、二甲亚砜、甘油、聚乙二醇等存在时进行，或以载体DNA和磷酸钙的共沉淀进行。

转染程序之后，借助与用于转染的DNA的选择标志匹配的选择程序鉴定和选择已转染的细胞。选择标志包括提供对重金属，如铜、或对抗生素。如G-418（遗传霉素，一种新霉素的衍生物）或潮霉素抗性的基因，或补偿寄主细胞基因缺乏的基因，如缺乏胸腺苷激酶、次黄嘌呤磷酰转移酶、二氨叶酸还原酶等的基因。比如，如果用于转染的DNA包括一种遗传霉素抗性标志，则通过有抗生素遗传霉素存在时的培养物来确认已转化的细胞，并将之与未转化的细胞分离。

本发明的重整的人抗体或其衍生物用于定性和定量的测定IgE，特别是在体液中，如在血清中的体内和体外。

比如，该重整的人抗体或其衍生物可用于任何取决于IgE的抗原定子和所述抗体的抗体结合部之间的联接间的相互作用的已知免疫分析中，这类分析的例子是放射性免疫分析（RIA）、酶、免疫荧光、化学发光、免疫沉淀、乳液凝集或血细胞凝集免疫分析。

本发明的重整的人抗体可以就这样地或以放射性示踪衍生物的形式用于放射免疫分析中（RIA）。RIA的任何已知的修饰都是可

用的。如可溶相（均质的）ＲＩＡ、固相、（非均质的）ＲＩＡ、单ＲＩＡ或双（分层的）ＲＩＡ以直接的或间接的（竞争性的）ＩｇＥ定子的方式使用。

这类放射免疫分析的例子是分层ＲＩＡ，在其中适宜的载体，如微空板或试管的塑性表面，如聚苯乙烯、聚丙烯或聚氯乙烯的塑性表面、玻璃或塑性珠、滤纸、葡聚糖等，乙酸纤维素或硝基纤维素片、磁性颗粒等，最好是在激活此载体后以简单的吸附方法覆盖这些表面以本发明的抗体。然后添加测试溶液，它含ＩｇＥ及最后还含也与该抗原反应并作放射性示踪，如用^{125}I示踪的重整的人抗体。测试溶液中的ＩｇＥ的量与结合的重整的人抗体的量成正比，并且通过对结合到该载体上的放射性来确定。

本发明的重整的人抗体可以就这样或以一种结合酶衍生物的形式用于酶免疫分析中，如上对放射性免疫分析所述，酶免疫分析的任何已知的改变形式都可使用。

以类似上述放射免疫分析的方式，用一种酶标记替代放射性标准进行此测试。与存在于该测试溶液中的ＩｇＥ量相对应的已形成的免疫复合体的量通过添酶物溶液来测定。此酶作用物反应，比如产生可被肉眼或用光学测量装置观察到的颜色的变化。

本发明的重整的人抗体可以就这样使用或以与同化学发光标记结合的衍生物的形式用于化学发光分析。如上对于放射免疫分析所述化学发光分析的任何已知变化形式都可用。

以类似于上述放射免疫分析的方式，用化学发光标记代替放射性标记来进行此测试。与存在于该测试溶液中的ＩｇＥ的量相对应的已形成的免疫复合体的量是通过添加引起发光的化合物，如H_2O_2和

NaOH，再用光学测量仪器测量光的发射来测定的。

上述的本发明的重整的人抗体或其衍生物对测定IgE的应用还包括其它的本质上是已知的免疫分析，如免疫荧光分析，用抗体覆盖或抗原覆盖的胶乳颗粒进行的胶乳凝集，用抗体涂覆或抗原涂复的红血细胞进行的血球凝集作用，用涂以抗体光纤和其它的将结合情况转化为电的或光信号等的直接作用的免疫传感器进行的瞬时光分析。

本发明的重整的人抗体或其衍生物对测定产生IgE的细胞是有用的，它被优选地用于噬菌斑形成细胞分析（PFC）。

本发明的噬菌斑形成分析基于固相免疫分析的原理。任何固相免疫分析的已知变形都可采用，如，放射免疫分析，一种酶、免疫荧光或化学发光免疫分析等。

这类噬菌斑形成细胞分析的例子是基于酶键合免疫吸着剂分析（ELISA）。为测定产生IgE细胞的总量，将一种上述用于多层RIA的适宜的载体涂以本发明的抗体。添加产生IgE的细胞的悬浮液，该细胞得含这种细胞的体液，这是通过离心分离，过滤等得到的。所述体液还含专对IgE的第二种多克隆或单克隆抗体，如本发明的抗体识别IgE的不同抗原决定基不同于第一抗体，它与一种酶，如碱性磷酸酶轭合。在此测试悬浮液中的产生IgE细胞的量与已结合的第二抗体的量成正比，且通过添加合适的酶作用物溶液而确定的，这产生了有色反应产物，然后计算着色点（噬菌斑）。为测定产生用来抗特定过敏原而产生IgE细胞的量，在添加上述的细胞悬浮液之前首先将载体涂以该过敏原或其可吸收的轭合物。直接抗该过敏原的测试悬浮液中的IgE的份额与表面结合的过敏相结合，IgE测定是通过加入本发明的抗体，所述抗体是与一种酶和导致着

色反应产物发生的适合的酶作用物溶液相结合的，然后计算着色点（噬菌斑）。

此外，本发明还涉及一种用于IgE和产生IgE细胞的定性和定量测定的测试仪器，该细胞包括本发明的单克隆抗体和/或其衍生物，任选地还包括其它单克隆或多克隆抗体和/或附属物。

本发明的用于放射免疫分析的测试仪比如含有一适宜的载体，一种或多种单克隆抗体的任选地经冷冻干燥或浓缩的溶液，放射性示踪的单克隆抗体的溶液或放射性示踪的IgE溶液。IgE的标准溶液缓冲液及，任选地，防止非特性吸附和凝聚形成的清洁剂、吸管、反应容器、校准曲线等。该测试仪中的一种或多种单克隆抗体是本发明的单克抗体，测定产生用以直接抗特定过敏原的IgE的产生出IgE细胞的测试仪另外还包含该抗原的溶液或该过敏原的一种可吸附的轭合物。

用于酶免疫分析的本发明的测试仪比如含有一适宜的载体，一种或多种单克隆抗体的任选地经冷冻干燥或浓缩溶液，任选地经冷冻干燥或浓缩的酶标记单克隆抗体的溶液、酶标记的IgE溶液，多克隆抗-IgE血清和/或酶标记的识别和结合该抗-IgE抗体的单克隆或多克隆抗体的溶液，固态或溶解态的酶作用物、IgE的标准溶液、缓冲液、清洁剂、吸管、反应容器、校准曲线、色标表等。该测试仪中的一种或多种单克隆抗体是本发明的单克隆抗体，用于测定产生用以抗特定过敏原的IgE的产生IgE细胞的测试仪还另外包括该过敏原的溶液及其可吸附的轭合物。

此外，通过任何已知的常规着色法技术，如通过流动血细胞计数分析可将本发明的重整形人抗体及其衍生物用于定量和定性测定表面

IgE阳性（sIgE$^+$）B细胞。

此外，本发明的单克隆抗体和／或其衍生物对于治疗和／或预防过敏是有用的。

通过使IgE免疫应答的调节下降而达到此疗效，这是由于本发明的重整人抗体和其衍生物的专门特征：

* 它们通过结合游离IgE和抑制IgE与生成Fce受体I或II的细胞，特别是肥大细胞和嗜碱细胞的结合而能中和已形成的IgE。

* 它们的识别和结合表达在表面IgE阳性B细胞（sIgE$^+$ B细胞，表面上的IgE，因此它们对减少这样一类细胞的种群是有用的：它们形一种“记忆池”在第二次暴露于该过敏原之后则导致IgE的产生。产生经选择的免疫球蛋白类（次级）的重整的人抗体可能性使得寄主免疫体系的细胞机制得以激活，导致专门扼杀sIgE$^+$ B细胞。这也可通过将本发明的单克隆抗体与细胞毒素药物的轭合物而达到，所述轭合物将把这类药物输至靶细胞。

* 由于本发明的重整的人抗体及其衍生物不识别在产生Fce受体I或II的细胞，如肥大细胞和嗜碱细胞上的嗜细胞IgE，它们不因为这些细胞而诱发媒介物释放。

* 本发明单克隆抗体及其衍生物还具有长的疗效，因为它们对免疫应答中IgE形成有明显的抑制作用。

结果，本发明的重整的人抗体及其衍生物就提供了一种治疗，它不治疗症状，确切地说是影响潜在的致敏原因，比如，通过去除IgE抗体和表面IgE阳性B细胞，从而消除了过敏应答的可能因素并抑制了IgE的形成。特别有益的是，这种治疗无需进行重复用药，及本发明的重整的人抗体及其衍生物可通过在确定任何过敏症之

前给药而用于预防性治疗。

由于它们是弱致免疫性或非致免疫性的，那么当施药于人时，本发明的重整的人抗体及其衍生物对体内的诊断治疗应用及预防是尤为有效的。较佳的是，当以治疗目的而施用时，该重整的人抗体作为自身蛋白为人有机体所耐受的。

对于哺乳动物的治疗日剂量为0.1mg和10mg公斤体重，这取决于病人的状态及施用的方式。

本发明还涉及药物制品，它们包括本发明的重整的人抗体及其衍生物。该药物制品含，比如，治疗上有效量的该重整的人抗体和/或其衍生物，它们本身合在一起，或与有机或无机的，固态或液态的药用载体混合。

肠胃外施用或吸入的制剂是等渗水溶液或悬浮液，任选地就在刚使用前从冷冻干燥的或浓缩的制剂中制备。此药用制剂可经消毒并含比如用来保存、稳定增湿、乳化或增溶这些成分，调节渗透压的盐，缓冲剂和/或调节粘度的化合物，如羧基纤维素钠、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮或明胶的助剂。用本技术领域中已知的方法，如用常规的混合、溶解或冷冻干燥来制备它们，它们含有约0.01%-约50%的活性成分。用于注射的此制剂经处理，装入安瓿、小瓶或不回收的注射器，然后在本领域所知的无菌条件下密封。

本发明的药用制剂可用于预防和治疗人身中的过敏反应，特别是那些一般与快速型过敏性有关的反应，如过敏性气喘、过敏性鼻炎、特异反应性气喘。

对下图的简要说明：

图1：HCWV-用于产生与人k轻链恒定区融合的C21-L

1和与人γ1重链恒定区融合的C21-H1的哺乳动物表达载体。

如在实施例中所述，本发明特别是涉及重整的人抗体、重组体DNA、经转化的寄主细胞以及制备它们的方法。以下实施例解释本发明但不将其限于任何程度。

缩略符号：V_L=轻链可变区；V_H=重链可变区；CDR=补充性确定区；FR=构架区；HCWV=人细胞肥大病毒。

原料

从人质粒中提纯的带有k轻链的人IgG均购自 Sigma, Buchs. Switkzerland(IgG1：1-3889，IgG2：1-4139，IgG3：1-4389及IgG：1-4639)。来自人骨髓瘤血清的人IgM(Cat, No. PHP003)及人IgD(Cat. No. PHP005)得自Serotec.来自人质粒的IgA(IgA1：400105；IgA2：400108)得自 Calbiochem, Läufelfingen, Switzerland。

实施例1：mAbC21 V_L 和 V_H 的分子模型建立

识别人Ig的鼠单克隆抗体C21的V_L（1号序列）和V_H（3号序列）区的分子模型被建立，对V_L按高度同源鼠抗-溶菌酶抗体HyHEL-10(Padlan, E.A. Silverton, E. W. Sheriff, S., Cohen, G. H., Smith-Gill and Davies, D. R., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86：5938；在 Brookhavin 数据库称之为序列3号HFM，Bernstein et al., J. Mol. Biol 112，535-542(1977)的溶解结构建立；对VH按鼠抗溶菌酶抗体 HyHEL-5(Sherff, S., Silverton, E. W. Padlan, E. A., Cohen, G. H., Smith-Gill,

S. J., Binzel, B. C. and Pivies, D. R., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8075; 在 Brookhaven 数据库中称之为2号序列HFL, Supra 结构而建立。mAbC21和HyHEKL-10或HyHEL-5的重链和轻链的可变区分别有91%和90%的氨基酸同一性。该模型建立在按UNIX操作系统下运行的 Silicon Graphics IRLS4D工作站，并采用分子模型化 组件QUANTA (Polygen Corp USA)。在该构架中相同的残基被保留；不相同的残基用最大重叠程序 (Snow, M. E. and Amzel, L. M., 1986, Proteins 1: 267)取代，所述程序已纳入QUANTA的蛋白模型建立的设备。

确定得自鼠C21抗体的V_L区的CDR1 (L1)、CDR2 (L2)和CDR3 (L3)及V_H的CDR1 (H1)、CDR2 (H2)与预先设定的典型规范的互补性 (Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Leviett, M., Smith - Gill, S. T. Air. G., Sherrif, S., Padlan E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M., and Poljak, R. J., 1989, Nature 342: 877)。这些环的主链扭角象原抗体结构一样保持 (HyKEL-10对于L1-L3，和HyHEL-5对于H1和H2)。对于VH区的CDR3 (H3)而言没有规范的结构，因此难以为其建立模型。用已公开的方法 (Jones, T. A., and Thurup, S., 1986, EMBO J., 5: 819-822)(该法已在QUANTA中用过)从91个高溶解性的蛋白结构中抽取30个选择的环，而最好的模型用肉眼挑选。这种环固定在H3CDR值一侧的三个构架的残基上。V_H区的H3的模型就建在

残基87-106的区中的 Bence-Jones 蛋白RHE上(Furey, W., Wang, B, C., Yoo C. S., and San, M., 1983, J. Mol, Biol., 167:661-692)。其大致对应着CDR3(L3)。

为了解脱不希望的原子接触，优化范德华力和静电力的相互反应，用在QUANTA中用过的CHATM的势能(Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. S., Swaminathan, S. and Karplus, M., 1983, J. Comp, Chem., 4:187)使该模型经一急剧下降和使轭合梯度能够减至最小。

实施例2：重整形人C21V_L和V_H区设计

重整的C21V_L和V_H区的设计主要基于V_L和V_H区的一致序列(模型C21-L1，C21-L2，C21-L3，C21-H1，和C21-H3，其在KABST数据库中发现的(Kabat., E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. and Gottsman, K. S., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, U. S. Department of Heafth and Human Services, V. S. Government Printing Office)。此外两个更重整的人C21VH区(C21-Hay1及C21-Hay3)基于一个单独的人抗体的构架区(FR)。

为设计在一致基础上的重整的人C21可变区，将来自鼠C21抗体的V_L和V_H区的氨基酸序列与得自KABAT数据库的人抗体V_L和V_H区的一致序列对比。这些分析说明：鼠C21V_L区和鼠C21V_H区分别与人kV_L次组Ⅲ一致序列，和人的V_H次组Ⅰ一致序列极为相似，其中分别有77%氨基酸和71%氨基酸相同。这些人的一致序列被用于设计含鼠C21CDR和人的相应的一致序列

的FR的重整的人C21轻和重链可变区C21-LO和C21-HO。鼠C21可变区的分子模型（实施例1）被用于鉴别构架残基，所述残基对于得到好的抗原结合是很可能重要的，而且对V_L/V_H的致集可能是关键性的，作为这图解分析的结果，该FR中的被标出的某些人的一致氨基酸与它们的相应的鼠C21残基互相交换。如果它们不落入以下范畴，这类变化只在人构架区中考虑：

[1]人的一致序列（人亚组1；HSG1）显示出在此位置没有任何的主要的氨基酸选择，但如在原鼠C21序列中发现的该氨基酸存在于相关的人免疫球蛋白可变区亚组的至少一个单独的序列中。比如，HSG1被认为是在氨基酸残基19上（Kaba+等，见上文）没有任何一致序列，虽然在此位置上一些人抗体有赖氨酸残基。由于赖氨酸还出现在C21序列中，所以被保留在此重整的单克隆抗体中。

[2]在构架位置上的氨基酸是假设的规范结构的一部分，这对确定CDR或超可变环的结构是重要的，因而被期望对保持该抗原结合位点的形状和完整性是不可缺少的（Chothia, C and Lesk, A. M., 1987, J. Mol. Biol., 196：901；Chothia, C. et al., 1989, supra）。

按照这些规定，当与人的一致序列比较时，在该重整的人轻和重链可变区C21-LO和C21-HO中的4个和6个氨基酸被交换，结果形成了类型C21-L1′和C21-H1。被更换的氨基酸位置是C21-L1′和其后鉴定的修饰后的类型C21-L1（5号序列）中的1、3、49位。在C21-H1（11号序列）这些被交换的氨基酸的位置是38、40、67、68、70和87。重整的人C21HV区的76位是上述规定的例外，在此我们为此位置挑

选了如在人V_H一致序列中发现的最常出现的人氨基酸（苏氨酸）。

进而，V_L和V_H的新类型含有如下变形（与C21-L1和C21-H1分别相比）：

C21-L1（7号序列）：天冬氨酸（替代丝氨酸）在60位；

C21-L3（9号序列）：谷氨酸（替代天冬氨酸）在1位；

缬氨酸（替代亮氨酸）在3位；

C21-H3（13号序列）：精氨酸（替代赖氨酸）在38位；

丙氨酸（替代精氨酸）在40位；精氨酸（替代赖氨酸）在67位；

精氨酸（替代苏氨酸）在87位。

用C21-L1′和C21-H1的数据库检索重整的人C21 V_L模型C21-L1′与人k轻链可变区HVMIG KAF（DMBL 数据库，Heidelberg, Germany, Newkirk, M. M., Gram, H., Heinrich, G. F., Oeseberg, L., Capra, J. D., and Isserman, R. L., 1988, J. Clin. Invest., 81：1511-1518）最相似（91%序列相同），而重整的人抗体C21 V_H模型C21-H1与人重链可变区HVMIG HAY（EMBL 数据库，Supra, Dersimonian, H., Schwartz, R. S., Barrett, K. J. and Stollar, B. D., 1987, J. Immunol., 139：2496-2501）最相似（78%序列相同）。这些序列以下分别被称为KAF和HAY。KAF的FR与人k V_L亚组Ⅲ一致序列仅在49和85位不同。在49号位置上相应的鼠C21氨基酸（赖氨酸）被保持，这是因为其推断的抗原结合，而在85位，人V_LⅣ一致氨基酸缬氨酸如在KAF所发现的那样被转变成甲硫氨酸。因此，改型的C21-L1′，符号为C21-L1（5号序列）

是基于单独的人轻链可变区KAF（Newkirk, m. m., et al., 1988，Supra 的。它与第一型C21-L1′的不同处在于：在85位甲硫氨酸代替了缬氨酸。重整类型C21-L2（7号序列）和C21-L3（9号序列）在89位也有甲硫氨酸。

相反，人重链可变区的FR和人V_H亚组I的一致序列在数个位置上不同。为构成与这独特的人抗体高度相似的重整人C21V_H区，基于得自人重链可变区HAY的该重链可变区的FR用来设计重整的人C21V_H区的两种以上的类型。基于HAY的重整的人C21V_H类型的构成必需要在重整的人C21模型C21-H1及C21-H3的FR2和FR3中分别于43、44、48、76及77位作5种变化。这些以HAY为基础的模型被分别称为C21-Hay1（15号序列）和C21-Hay3（17号序列）。HAY的FR和人V_H亚组I一致序列之间在30和72位的两种另外的区别仍象在鼠C21V_H中一样被保存下来，而且不被认为是变化了，因为它们是确定CDR结构的规定的残基（Chothia, C. et al., 1989, Supra）。

实施例3：设计的和构成人化的抗体基因

为设计人化的抗体基因盒，将有效表达和克隆所必需的辅助序列加在所得的编码区的5′-和3′-端。为有效表达重整的人C21抗体的真核引导序列加于构架中到已指定为人化可变区。对该重整的人C21V_L区的引导序列自发现于人抗体KAF的K轻链中的引导序列产生（Newkirk, M. M., et al., 1988, Supra）由此该可变区被用于C21V_L区的重整。用于重整的人C21V_H区的引导序列自发现于人抗体HG3（Rechavi, G., Ram, D., Glazer, L.,

Zakut, R. and Givol, D., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80：855-859）的重链中的引导序列和人V_H亚组I的成员（Kabat, E.A., Wu, T. T., Reid - Miller, M. Perry, H. M. and Gottesman, K. S., 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Edition, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Governmen^t Printing Office）产生。所得的重整的人C21 V_L／V_H区的蛋白序列然后被所转译成DNA序列，所用的是鼠序列的密码子使用表（Codon Usage Table），该表可在 the Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wiseonsin, USA，找到。对于此已设计成的DNA构架，还在5′端位上加入真核转译信号（Kozak, M., 1987, J, Mol. Biol., 196：947-950），在3′端加入供体并合位点（Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F, and Chambon, P., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 75：4853-4857）及将 HindⅢ（5′端）和 Bam H1及 Xba（3′端）DNA限制位点，以便于亚克进入到指定的哺乳动物表达载体中。

对该重整的人C21 V_L 和V_H区C21-L1和C21-H1编码的已设计成的人化抗体基因盒用合成DNA聚核苷酸通过基因合成法而构成。整个DNA构被再分成六个用20个核苷酸相互交错的区。对于每个重整的人C21可变区基因盒而言，被标为C21-LA（19号序列）、C21-LB（20号序列）、C21-LC（21号序列）、C21-LD（22号序列）、C21-LE

（２３号序列）、Ｃ２１－ＬＦ（２４号序列）、Ｃ２１－ＨＡ（２５号序列）、Ｃ２１－ＨＢ（２６号序列）、Ｃ２１－ＨＣ（２７号序列）、Ｃ２１－ＨＤ（２８号序列）、Ｃ２１－ＨＥ（２９号序列）、至ＨＦ（３０号序列）的六种５′磷酸化的和ＰＡＧＥ－提纯的聚核苷酸均购自 Genosys Biotechnologies, Houston, Texas, ＵＳＡ。它们在一基于聚合酶链反应（ＰＣＲ）的基因合成中进行重组。５ｐｍｏｌ的每种聚核苷酸（即ＬＡ至ＬＦ）首先被逐渐冷却，然后在一含ＷｍＭ Tris－HCl ｐＨ８．３、１．５ｍＭ $MgCl_2$、５０ｍＭ ＫＣｌ，１０ｍＭ β－巯基乙醇，０．０５％（重量／体积）Tween－２０，０．０５％ＮＰ－４０（Merck Zürich ２０μｍ ｄＮＴＰｓ（Ｎ＝Ｇ．Ａ．Ｔ或Ｃ）及５Ｖ VentTM ＤＮＡ聚合酶（New England Biolabs）的１００μｌ反应物中伸展。温度步骤是９５℃／分，５０℃／２分及７２℃／４分，用的是 Techne ＰＨＣ－２温度循环控制器。第一循环后，添加在所需的全长度ＤＮＡ断片的５′端和３′杂交的５０ｐｍｏｌ的低核苷酸引物Ｃ２１－５′（３１号序列）和Ｃ２１－Ｌ３′（３３号序列）或Ｃ２１－Ｈ３′（３２号序列），然后在一约２０个循环的ＰＣＲ反应中入大此全长度ＤＮＡ断片，所用的是以下的循环参数：９５℃／１分、６０℃／２分、７２℃／２分。然后用１份体积的氯仿将此ＰＣＲ混合物萃取一次，并通过添加１／１０体积８Ｍ ＬｉＣｌ条３体积乙醇使此ＤＮＡ沉淀。沉淀的ＤＮＡ被重溶于H_2O，再用 HindⅢ和 Bam Ｈｌ限制核内切酶在供应商（Boehringer, Mannhein , Germany ）建议的条件下消化。尺寸大小合适的ＤＮＡ断片（Ｃ２１－Ｌ１＝４１６ｂｐ和Ｃ２１ Ｈ１＝

459bp）在1%琼脂糖／TBE中经电泳提纯然后从此凝胶上切断，将此胶状片切成较小的段，在液氮中冷冻5分钟，再经玻璃纤维在一微型离心机中经离心分离而洗脱（30分钟，136000×g）室温下的酚－氯仿萃取及 LiCl／乙醇沉淀后，将提纯的Hind Ⅲ－Bam H1限制断片亚克隆入 pBluescript KSⅡMB＋（层基因（Stratagene））再转染入胜任的E．Coli 细胞中（得自 GIBCO-BRL的HB101菌株）。含尺寸正确的DNA插入物的KS＋C21／L1或KS＋C21／H1的多质粒克隆用 Sequenase（VSB）序化。在该DNA序列中的点突变和／或缺失按已公开的程序通过交换不同的克隆和／或导致PCR诱变的低核苷酸之间的DNA限制酶断片来校正（Kammann, M., Lauts, J., Schell J. and Groneneborn B., 1989, Nucl. Acid. Res., 17：5404）。显示出能校正DNA序列的 Hind Ⅲ －Bam H1断片则被亚克隆入轻或重链表达载体中以产生质粒HCMV C21／L1和HCMV－r1－C21／H1（描绘于图1），其中这 Hind Ⅲ－Bam H1断片（它将该重整的人轻或重链可变区编码）分别与为人k和r1恒定区编码的DNA进行结合。两种质粒含 Simith Virus 40（SV40）源，HCMV加强因子区，HCMV启动子，氨苄青霉素可选择的基因（ Keffleborough et al., 1991, Supra）。

重整的人C21VL 区模型C21－L2和C21－L3通过低核苷酸引发的诱变，利用发生在PCR反应期间重组情况而产生（Mullis, K., Faloona, F., Sharf, S., Saiki, R., Horn, G and Ehrlich, H., 1986, Cold Spring Harbour Symp.,

51：263 and Yolov, A. A. and Shabarovam, Z. A., 1990, Nucl. Acids. Res., 18：3983）。为了通过PCR放大而产生两个DNA断片则对应两个轻链V－区型中的每一个部分合成低核苷酸引物C21－5′（31号序列）、L／D60SL（35号序列）、L／D60S－SL（36号序列）（对于C21－L2）、RSP（34号序列）、L／EID－V_3L（37号序列）、L／EID－V_3L－SL（38号序列）（对C21－L3）及C21－L3′（33号序列）（对C21－L2和－L3）。除末端低核苷酸引物C21－5′，RSP及C21－L3′）外，低核苷酸都纳入所期望的密码子变化的所需的序列。除引物 对RSP和L／EID－V_3L外，约50pmol的适宜引物对的每一种都与Ca·10ng得自KS＋C1／L1的 Xho I－Not I 断片，3单位的 VEntTM DNA聚合酶结合及25PCR放大循环被采用（60℃／25秒，72℃／40秒及93℃／25秒）。对于引物对RSP和L／EID V_3L而言，Ca.150ng的KS＋C21／L1质粒DNA被用作样板，而所需的DNA断片用35个循环（40℃／30秒、72℃／1分，及93℃／30秒）进行PCR放大。这些用琼脂糖凝胶电泳提纯的反应产物首先结合，而Ca5－30ng的每个DNA断片用5个单位的 VentTM DNA聚合酶扩展（95℃／1分、50℃／2分及72℃／4分）。然后加入末端低核苷酸引物C21－5′和C21－L3′和已结合的，用25个循环（95℃／1分、50℃／2分及72℃／2分 ）PCR放大的全长度DNA断片。对C21－L2和C21－L3的PCR放大的DNA在用DNA限制核酸内切酶 Hind Ⅲ和 Bam H1

消化后被亚克隆入pBluescript KSⅡM13+（层基因），然后序化。正确的序列再转移到上述的HCMV-r1-表达载体中。

重整人21Vh区模型C21-H3、C21-Hay1及C21-Hay^{3}以类似于产生C21-L1和C21-L2的方式产生。为得到这些C21Hv区模型，低核苷酸引物C21-5^1、H/R3.8K-A40R-L（39号序列）、H/R38K-40R-SL（40号序列）、H/R67K-L（41号序列）、H/R67K-SL（42号序列）、H/R87T-L（43号序列）、H/R87T-S（44号序列）、HayFR2（45号序列）、HayFR2-S（47号序列）、HayFR3（48号序列）、HayFR3S（49号序列）及C21-H3^{1}被用于PCR放大，所用DAN模板是C21-H1（用于C21-H3和C21-Hay1）或C221-H3（用于C21-Hay3），含所需密码子的双线DNA断片改变了不同的重整形人C21Vh型。相应地，琼脂糖凝胶提纯的断片则通过PCR重组而产生上述的全长度DNA断片，如上述在经DNA限制性核酸内切酶 Hind Ⅲ和 Bam H1消化，接着克隆入pBluescript KSⅡM13+（层基因）后，检查质粒克隆以便在被克隆入 HCMV-r1-表达载体之前校正序列。

实施例4：重组质粒在COS细胞中的瞬时表达

用带有对该重整人C21重和轻链编码的基因的HCMV表达载体10μg使COS细胞电穿孔（electroporated）。将10μgH-和L-链表达质粒加至0.8ml的COS细胞在PBS/O（PBS缺乏由GIBCO-BRL. Basel, Switzerland 提供的 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，cat. no. 041-0419m）中的1×10^{7}细胞/

ml的悬浮液中。然后将－ Bio－Rad Gene 脉冲器用来在２５μＦ电容下将１９００Ｖ脉冲送入此悬浮的细胞中，在深入到１０ｍｌ含５％（体积／体积）游离γ球蛋白和热失活胎牛血清的（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬ，Basel，Switzerland；cat，no．０６３－０６５１０Ｈ）的 DMEM 之前，让此细胞恢复１０分钟。经７小时培育后，收集此培养基，离心分离以去除细胞和细胞碎片。用０．４５μｍ的膜过滤ＣＯＳ细胞上清液，然后以ＥＬＩＳＨ分析人ｒ１／ｋ等模式标本的组合抗体的存在。再用蛋白Ａ亲合色谱法进一步提纯此人化的抗体。

实施例５：人ＩｇＧ／ｋ产生的ＥＬＩＳＡ分析

在９６－＃微滴定板上（Nunc Maxisorb，Cat．No．439454）涂以５０μｌ的山羊抗人ＩｇＧ（Fcspecific；Dianova，＃１０９－００５－０９８）在ＰＢＳ／Ｏ，ｐＨ７．２中的１：１０００稀释液过一整夜。这一及后续的全部步骤之后，用２００μｌ ＰＢＳＴ（ＰＢＳ／ＯｐＨ７．２含０．０５％Tween－２０）将样板洗三次。来结合位点用１００μｌ ＲＩＡ－缓冲液（１％的在ＰＢＳＴ中的牛血清白蛋白）在３７℃时阻断１小时。添加５０μｌ的试样及其在ＲＩＡ－缓冲液中的稀释液。再将此混合物于３７°培养１小时。以高纯重组人抗体Ｆ５－４４４（人ｒ１／ｋ等模式标本，欧洲申请Ｎｏ．４９７６７）作为标准。然后施用５０μｌ与在ＲＩＡ－缓冲液辣根过氧化酶轭合的亲合纯化的山羊抗人ｋ－轻链抗血清的１：１０００的稀释液（Sigma，Buchs，Switzerland；Cat．no．Ａ－７１６４），接着于３７℃培养１小时。１００μｌ ＡＢＴＳ（２，２′－连氮基－双（３－乙基苯－噻唑啉－６－磺酸））培养溶液

（BioRad, Glattbrugg, Switzeland;# 172-1064）被用于发育。经一般适宜的培养时间之后，用等体积（100μl）的2%（重量／体积）草酸阻止此酶反应。以415nm的吸收用于定量分析结合的和已完整组合的人抗体。

实施例6：自COS细胞和人化抗体的蛋白A提纯

通过亲合色谱法，在被填入到HR5／5FPLC柱（Pharmacia, Uppsala, Sweden）中的1ml Prosep A柱（Bioprocessing Ltd, Durham, England）中提纯暂时被表达的人化抗体。该柱以2ml／分的恒定流速在FPLC系统（Pharmacia, Uppsala, Sweden）上运行，从柱上洗下的蛋白洗脱物在流动池中用U.V-以280nm吸收测定。该柱的制备是这样的，用10个柱体积的PBS／O pH8.0（20mM·磷酸钠，150mM NaCl）洗涤，用10个柱体积的100mM柠檬酸钠缓冲液pH3.0预洗脱及用10个体积的PBS／O pH8.0再平衡。经0.5μm膜过滤而澄清的COS细胞上清液（20-50ml）用压缩泵直接装入到该柱上。然后该柱用PBS／O pH8.0洗涤直到此u.v-吸收率回到基准线为止。洗脱的牛IgG用100mM柠檬酸钠缓冲液pH5.0洗涤直到基线回到0。最后用100mM柠檬酸钠缓冲液pH3.0洗脱此人化的抗体，然后立即将洗脱物用1M Trizma - Base（Sigma, Buchs, Switzerland）调节至pH7.0。用Coomassie兰着斑法（Laemmli U.K.1970。Nature 227：680-685）通过SDS - Poly - arylamide凝胶电泳分析此人化抗体的纯度。对于生物传感器分析，则将此中和的蛋白A洗脱液在一Centricon -10型微浓缩器（Amicon）中浓缩，

而缓冲液改成PBS/OZpH7.2。按抗体制品的纯度，用匹配的等模式标本的已知的提纯重组体嵌合抗体F5-444作标准，通过u.v-280nm吸收率或通过ELISA对此蛋白浓缩物定量分析。

实施例7：用生物特性相互作用分析（BIA）分析鼠和重整形人C21抗体的亲合力及特异性

重整人C21可变轻和重链的不同组合体的亲合力以及特异性是用实时生物相互作用分析法（Jönsson, V., Fägerstam, L., Lvarsson, B., Johnsson , B., Karsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Stahlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H., and Malmqvist., 1991, Bio Techniques, 11:620-627）进行分析的。全部实验是用CM5传感片在 BIAcore™ 系统（Pharmacia, Biosenser AB, Uppsala, Sweden）上完成的。作为俘获抗体，将Ca，11000RU（11ng/mm²）的多克隆兔抗-鼠IgG1（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden, Cat, no BR-1000-55）或兔抗-人IgG（得自Pharmacia Biosensor AB）制动于此传感片表面上，基本上用的是前述的它们的氨基及EDC/NHS化学（Jönsson, U, et al., 1991, Supra）。对每种抗体进行4个实验周期以测定与人IgG结合的结合率。每个周期由恒量待测试抗体与相关的传染性抗体的结合，接着是这种测试抗体与固定浓度的抗原（人IgE；单克隆抗体SE44；3.125、6.25、12.5及25nM）的相互作用，再接着是用40mM HCl恢复此表面所组成。实验细节如下：

[1]流量：5μl/分；

[2]HBS（10mM Hepes，3.4mM EDTA，150mM NaCl，0.05%BIA表面活性剂，pH7.4）为用作运行缓冲液；

[3]测试抗体（在PBS/O pH7.2）在HBS中稀释至最终浓度为5-10μg/ml，然后与此俘获抗体结合以获得1300-2200RV（1.3-2.2ng/mm²）的已结合的测试抗体；

[4]将人单克隆IgE（SE44）在此结合抗体上通过9分钟；

[5]4μl的40mM HCl用于去除抗体-抗原配合物并为下一周期准备表面；

[6]分析温度：25℃。

用在 Biocore™ 系统中所用的计算机程序计算抗体-抗原相互作用的结合常数。

为测定离解率常数，除包括离解相外，采用类似的方法。分析条件如上述。首先通过制动传染性抗体而将测试抗体来得到传感器表面。在高浓度的（25nM）IgE（SE44）与该抗体结合。接着结合HBS缓冲液以 5μl/分的恒流速在该传感10表面上经过，然后以15-2.5分的期间监测共振信号的减少。通过用4μl的40mM HCl洗涤使该传感器片最终恢复。由于抗体：IgE配合物的离解是一级的反应，所以取传感器程序的线性部份及使用BIACORETM 系统中所用的计算机程序来计算此离解率常数。

重整的人C21抗体的动力学常数 Kass（抗体-抗原结合的速度常数）及 Kdiss（抗体-抗原配合物离解的速度常数）以及亲合力（由平衡常数 Kaff 表示）被归纳于表1。

表1：重整的人C21抗体的动力学常数和亲合力。对 Kass 所作的独立实验次数列在括弧中；每个 Kdiss 是用两次独立实验测定的

抗　体	$k_{ass} \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$	$k_{diss} \times 10^{-5} s^{-1}$	$K_{aff} \times 10^{10} M^{-1}$
TES-C21	2.4±0.3 (6)	2.6±0.0	0.92±0.12
C21-H1/L1	2.6±0.1 (3)	3.0±1.1	0.87±0.32
C21-H1/L2	2.8±0.1 (3)	5.7±0.2	0.49±0.02
C21-H1/L3	2.9±0.4 (3)	6.2±1.0	0.47±0.10
C21-H3/L1	2.5±0.3 (3)	1.9±0.6	1.32±0.44
C21-H3/L2	2.5±0.3 (4)	4.4±0.7	0.57±0.11
C21-H3/L3	2.6±0.5 (3)	3.5±0.2	0.74±0.15
C21-Hay3/L1	2.5±0.3 (3)	4.1±0.6	0.61±0.12
C21-Hay3/L2	2.5±0.3 (3)	3.1±0.6	0.81±0.18
C21-Hay3/L3	2.6±0.3 (3)	15.9±1.8	0.16±0.03

所有这些重整的人C21抗体都有相当相似的结合率。结合亲合力的下降主要是由较高的离解率所引起的。由于氨基末端1和3位的重要性，分析重整的人C21轻链的不同的类型。当这些位置上的氨基酸与存在于C21轻链上的氨基酸相同时就得到了与抗原的良好结合。使用完整的人 KAF FR1就降低了与配偶体无关结合。

通过生物性相互作用分析来检测该重整人C21抗体对人免疫球蛋白的所有等模式标本的结合。首先，使测试抗体分别结合到在前述传感器片上的被制动的俘获抗体上。在5μg/ml的所有等模式标本的人免疫球蛋白IgM、IgD、IgA1、IgA2、IgG4、

IgG3、IgG2、IgG1及IgE（SE44）依次在此预处理过的表面上通过5分钟之前，用嵌合抗CEA抗体10μg/ml Rek41阻断这些被制动的兔抗-人IgG和兔抗-鼠IgG1抗体的高反应性5分钟（人r1/k，欧洲专利申请No.323806）。最后该表面用4mM HCl恢复。流量，温度和其它条件与前述的相同。用BIAcore™ 体系记录传感器程序。该重整形人C21抗体是专对人IgE等模式标本的。

实施例8：制造永久细胞系

通过按氯化铯梯度离心分离到平衡将用于转染的重整TESC-21人CMVH-和-L-链表达载体的质粒DNA，提纯两次。通过用基因脉冲仪（Gene Pulser）仪（BioRad, Richmond CA）用电穿孔将该重组体免疫球蛋白基因引入到鼠骨髓瘤NSO细胞。NOS细胞（2-3×10^7）用磷酸盐缓冲的盐水（PBS）洗涤，然后再悬浮于0.8ml PBS中，它含有BspC1-线性化的H-和L-链质粒DNA，每种10μg。电穿孔是在210V的电场和960μFD的电容下进行的。回收的细胞在含2%FBS（胎牛血清）的 Protein - Free Hybridoma Medium（PFHM，Gibco）中稀释，然后以每#104个细胞的量涂在96#的微滴定板中。经48小时培养后，在含0.7mg/ml G418（Gibco）和2%FCS（胎牛犊血清）的PFHM中选择转集物，2周后，含抗药集群的#用ELISA筛选以便产生人IgG。为定量表面在该培养物上清液中的重组人IgG Kappa 抗体使ELISA发育。Immulon 2（Dynatech Labs）96#板用100μl的在PBS中的0.5μg/ml山羊抗-人Kappa 抗体（Souther Biotech）于室

温下涂复过夜。用 Blotto（5%在PBS中的干奶粉）将#阻断1小时，然后用含0.05% Tween-20的PBS（PBST）洗涤。将培养物上清液（50μl）加于该被涂过的#上，然后培养1小时在用PBST洗涤之后，将在 Blotto 中以1/50000稀释的100μl与辣根过氧化酶轭合的山羊抗-人IgG（FC）抗体（Jackson Immuno Reseach Lad）加到每一#中，然后将该板培养1小时。含0.1%的3′、3″、5′、5″-四甲基联苯胺（Sigma）和0.003%的过氧化氢（Sigma）的过氧化酶培养基溶液以每#100μl的量加入，再于室温下培养0.5小时。通过添加50μl的2M硫酸阻止此反应，然后用 Dynatech MR5000平板阅读器在450nm读出每#中的反应混合物的O.D.。重整的TESC-21人CMV表达质粒H1、H3、L1和L3以四种组合方式，H3L1、H3L3、H1L1和H1L3被用于转染NSO细胞。H3L1、H3L3、H1L1和H1L3的142、122、68和64全部#以低于0.01的背景读数分别都得到大于0.05的O.D读数。对每种组合而言，基于IgG分泌水平选择一种细胞系：EH31.8分泌H3L1抗体；EH33.16分泌H3L3抗体；EH11.13，分泌H1L1抗体；而EH13.5，分泌H1L3抗体。

寄存数据：

下列细胞系已按 American Type Culture Collection（ATCC），12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA于1992年9月23日寄存。登记号列于括弧中。

产生重整人抗体H3L1的细胞系EH31.8(HB11130)

产生重整人抗体H1L1的细胞系EH11.13(HB11132)

产生重整鼠单克隆抗体TES-C21的细胞系TES-C21(HB11133)

产生重整人抗体H3L3的细胞系EH33.6(HB11131)

产生重整人抗体H1L3的细胞系EH13.5(HB11134)。

序 列 表

（1）总的情况

（i）申请人

（A）姓名：CIBA-GEIGY AG

（B）街道：Klybeckstr. 141

（C）城市：Basle

（E）国家：Switzerland

（F）邮编：4002

（G）电话：+41 61 69 11 11

（H）电传：+41 61 696 79 76

（I）传真：962 991

（A）姓名：TANOX BIOSYSTEMS，INC

（B）街道：10301 Stella Link

（C）城市：Houston

（D）州名：Texas

（E）国家：United States of America

（F）邮政编码：：77025

（ii）发明名称：抗免疫球蛋白等模式标本的重整的单克隆抗体

（iii）序列数：49

（iv）计算机可阅读的形式：

（A）存贮媒体类型：Floppy 盘

（B）计算机：IBM PC 可兼容的

（C）操作系统：PC-POS／MS-DOS

（D）软件：PatentIn Release #1.0, Verston #1.25（EPO）

（2）序列标号1的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：370碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：双

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（ix）特征：

（A）名称／关键词：CDS

（B）位置：1..369

（D）其它信息：产物="抗体TES-21重链可变区"

（xi）序列描述：1号序列

```
CAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GGA GCG GAG CTG ATG AAG CCT GGG GCC      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15

TCA GTG AAG ATC TCC TGC AAG ACT ACT GGC TAC ACA TTC AGT ATG TAC      96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
            20                  25                  30

TGG TTA GAG TGG GTA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT GAG TGG GTT     144
Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

GGA GAG ATT TCA CCT GGA ACT TTT ACT ACT AAC TAC AAT GAG AAA TTC     192
Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

AAG GCC AAG GCC ACA TTC ACT GCG GAT ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC     240
Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

CTG CAA CTC AGC GGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC GTC TAC TTC TGT     288
Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

GCA AGA TTC TCC CAT TTT TCC GGT AGT AAC TAC GAC TAC TTT GAC TAC     336
Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

TGG GGC CAG GGC ACC TCT CTC ACA GTC TCC TCC G                      370
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

（2）2号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：123氨基酸

（B）类型：氨基酸

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：2号序列

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
            20                  25                  30

Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

（2）3号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：322碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：双

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（ix）特征：

（A）名称／关键词：CDS

（B）位置：1..321

（D）其它信息：产物="鼠抗体TES-C21轻链可变区"

（xi）序列描述：3号序列

```
GAC ATC TTG CTG ACT CAG TCT CCA GCC ATC CTG TCT GTG AGT CCA GGA      48
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15

GAA AGA GTC AGT TTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGC ATT GGC ACA AAC      96
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

ATA CAC TGG TAT CAG CAA AGA ACA GAT GGT TCT CCA AGG CTT CTC ATA     144
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

AAG TAT GCT TCT GAG TCT ATC TCT GGG ATC CCT TCC AGG TTT AGT GGC     192
Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

AGT GGA TCA GGG ACA GAG TTT ACT CTA AAC ATC AAC AGT GTG GAG TCT     240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
65                  70                  75                  80

GAA GAT ATT GCA GAT TAT TAC TGT CAA CAA AGT GAT AGC TGG CCA ACC     288
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
                85                  90                  95
```

```
ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAG ATA AAA C                    322
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100                 105
```

（2）4号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：107氨基酸

（B）类型：氨基酸

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：4号序列

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
65                  70                  75                  80
```

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

（2）5号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：424碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：双

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（ix）特征：

（A）名称／关键词：CDS

（B）位置：22..402

（ix）特征：

（A）名称／关键词：mat - peptide

（B）位置：82..402

（D）其它信息：／产物＝“轻链可变区C21-L1”

（xi）序列描述：5号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAG ACC CCC GCC CAG CTG CTG TTC CTG        51
                        Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu
                        -20                 -15

CTG CTG CTG TGG CTG CCC GAC ACC ACC GGC GAC ATC CTG CTG ACC CAG        99
Leu Leu Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln
-10                  -5                   1                   5

AGC CCC GGC ACC CTG AGC CTG AGC CCC GGC GAG AGG GCC ACC CTG AGC       147
Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
              10                  15                  20

TGC AGG GCC AGC CAG AGC ATC GGC ACC AAC ATC CAC TGG TAC CAG CAG       195
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln
          25                  30                  35

AAG CCC GGC CAG GCC CCC AGG CTG CTG ATC AAG TAC GCC AGC GAG AGC       243
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser
      40                  45                  50

ATC AGC GGC ATC CCC AGC AGG TTC AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC GAC       291
Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 55                  60                  65                  70

TTC ACC CTG ACC ATC AGC AGG CTG GAG CCC GAG GAC TTC GCC ATG TAC       339
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr
                 75                  80                  85

TAC TGC CAG CAG AGC GAC AGC TGG CCC ACC ACC TTC GGC CAG GGC ACC       387
Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
              90                  95                  100

AAG GTG GAG ATC AAA CGTGAGTATT CTAGAAGGAT CC                          424
Lys Val Glu Ile Lys
        105
```

（2）6号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１２７氨基酸

（Ｂ）类型：氨基酸

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：６号序列

```
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
-20                 -15                 -10                 -5

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                  1                   5                  10

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
         15                  20                  25

Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
     30                  35                  40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
 45                  50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                 65                  70                  75

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp
             80                  85                  90

Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
         95                 100                 105
```

（２）７号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：４２４碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：双

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（ix）特征：

（Ａ）名称／关键词：ＣＤＳ

（Ｂ）位置：２２．．４０２

（ix）特征：

（Ａ）名称／关键词：mat - peptide

（Ｂ）位置：８２．．４０２

（Ｄ）其它信息：／产物＝“轻链可变区Ｃ２１－Ｌ２”

（xi）序列描述：７号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAG ACC CCC GCC CAG CTG CTG TTC CTG        51
                        Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu
                        -20                 -15

CTG CTG CTG TGG CTG CCC GAC ACC ACC GGC GAC ATC CTG CTG ACC CAG        99
Leu Leu Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln
-10                 -5                  1               5

AGC CCC GGC ACC CTG AGC CTG AGC CCC GGC GAG AGG GCC ACC CTG AGC       147
Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
            10                  15                  20

TGC AGG GCC AGC CAG AGC ATC GGC ACC AAC ATC CAC TGG TAC CAG CAG       195
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln
        25                  30                  35

AAG CCC GGC CAG GCC CCC AGG CTG CTG ATC AAG TAC GCC AGC GAG AGC       243
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser
    40                  45                  50

ATC AGC GGC ATC CCC GAC AGG TTC AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC GAC       291
Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
55                  60                  65                  70

TTC ACC CTG ACC ATC AGC AGG CTG GAG CCC GAG GAC TTC GCC ATG TAC       339
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr
                75                  80                  85

TAC TGC CAG CAG AGC GAC AGC TGG CCC ACC ACC TTC GGC CAG GGC ACC       387
Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
            90                  95                  100

AAG GTG GAG ATC AAA CGTGAGTATT CTAGAAGGAT CC                          424
Lys Val Glu Ile Lys
        105
```

（2）8号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：127氨基酸

（B）类型：氨基酸

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：8号序列

```
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
-20                 -15                 -10                 -5

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                    1                   5                   10

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          15                  20                  25

Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
      30                  35                  40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp
 45                  50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                    65                  70                  75

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp
               80                  85                  90

Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          95                  100                 105
```

（2）9号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：424碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：双

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（ix）特征：

（A）名称／关键词：CDS

（B）位置：22..402

（ix）特征：

（A）名称／关键词：mat - peptide

（B）位置：82..402

（D）其它信息：／产物＝“轻链可变区C21-L3”

（xi）序列描述：9号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAG ACC CCC GCC CAG CTG CTG TTC CTG     51
                        Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu
                        -20             -15
```

```
CTG CTG CTG TGG CTG CCC GAC ACC ACC GGC GAG ATC GTG CTG ACC CAG
Leu Leu Leu Trp Leu Pro Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln          99
-10                 -5                  1                   5

AGC CCC GGC ACC CTG AGC CTG AGC CCC GGC GAG AGG GCC ACC CTG AGC
Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser         147
            10                  15                  20

TGC AGG GCC AGC CAG AGC ATC GGC ACC AAC ATC CAC TGG TAC CAG CAG         195
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln
        25                  30                  35

AAG CCC GGC CAG GCC CCC AGG CTG CTG ATC AAG TAC GCC AGC GAG AGC         243
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser
    40                  45                  50

ATC AGC GGC ATC CCC AGC AGG TTC AGC GGC AGC GGC AGC GGC ACC GAC         291
Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
55                  60                  65                  70

TTC ACC CTG ACC ATC AGC AGG CTG GAG CCC GAG GAC TTC GCC ATG TAC         339
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr
                75                  80                  85

TAC TGC CAG CAG AGC GAC AGC TGG CCC ACC ACC TTC GGC CAG GGC ACC         387
Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
            90                  95                  100

AAG GTG GAG ATC AAA CGTGAGTATT CTAGAAGGAT CC                            424
Lys Val Glu Ile Lys
        105
```

（２）１０号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１２７氨基酸

（Ｂ）类型：氨基酸

（Ｄ）拓扑学：线性

(ii)分子类型：蛋白质

(xi)序列描述：10号序列

```
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
-20                 -15                 -10                 -5

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
                1               5                   10

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        15                  20                  25

Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
    30                  35                  40

Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser
45                  50                  55                  60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                65                  70                  75

Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp
            80                  85                  90

Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        95                  100                 105
```

(2)11号序列的信息：

(i)序列特征：

(A)长度：468碱基对

(B)类型：核酸

(C)束型：双

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（ix）特征：

（A）名称／关键词：CDS

（B）位置：22..447

（ix）特征：

（A）名称／关键词：mat - peptide

（B）位置：79..447

（D）其它信息：／产物＝“重链可变区C21-H1”

（xi）序列描述：11号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTG TTC TGC CTG        51
                        Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu
                       -19             -15                 -10
CTG GCC GTG GCC CCC GGC GCC CAC AGC CAG GTG CAG CTG GTG CAG AGC        99
Leu Ala Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                   -5                  1               5
GGC GCC GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC GTG AAG GTG AGC TGC AAG       147
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
          10                  15                  20
GCC AGC GGC TAC ACC TTC AGC ATG TAC TGG CTG GAG TGG GTG AAG CAG       195
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln
      25                  30                  35
AGG CCC GGC CAC GGC CTG GAG TGG GTG GGC GAG ATC AGC CCC GGC ACC       243
Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr
  40                  45                  50                  55

TTC ACC ACC AAC TAC AAC GAG AAG TTC AAG GCC AAG GCC ACC TTC ACC       291
Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr
                  60                  65                  70
```

```
GCC GAC ACC AGC ACC AAC ACC GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG ACC        339
Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr
            75                  80                  85
AGC GAG GAC ACC GCC GTG TAC TAC TGC GCC AGG TTC AGC CAC TTC AGC        387
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser
        90.                  95                 100
GGC AGC AAC TAC GAC TAC TTC GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTG        435
Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    105                 110                 115
ACC GTG AGC TCA GGTGAGTTCT AGAAGGGATC C                                468
Thr Val Ser Ser
120
```

（2）12号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：142氨基酸

（B）类型：氨基酸

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：12号序列

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
-19                 -15                 -10                  -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                1                   5                  10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
    15                  20                  25
```

```
Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 30                  35                  40                  45

Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn
                 50                  55                  60

Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
             65                  70                  75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
         80                  85                  90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr
     95                 100                 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110                 115                 120
```

（２）１３号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：４６８碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：双

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（ix）特征：

（Ａ）名称／关键词：ＣＤＳ

（Ｂ）位置：２２．．４４７

(ix)特征：

(A)名称/关键词：mat - peptide

(B)位置：79..447

(D)其它信息：/产物="重链可变区C21-H3"

(xi)序列描述：13号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTG TTC TGC CTG        51
                        Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu
                        -19             -15                 -10

CTG GCC GTG GCC CCC GGC GCC CAC AGC CAG GTG CAG CTG GTG CAG AGC        99
Leu Ala Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                -5                  1               5

GGC GCC GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC GTG AAG GTG AGC TGC AAG       147
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
        10                  15                  20

GCC AGC GGC TAC ACC TTC AGC ATG TAC TGG CTG GAG TGG GTG AGG CAG       195
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln
    25                  30                  35

GCC CCC GGC CAC GGC CTG GAG TGG GTG GGC GAG ATC AGC CCC GGC ACC       243
Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr
40                  45                  50                  55

TTC ACC ACC AAC TAC AAC GAG AAG TTC AAG GCC AGG GCC ACC TTC ACC       291
Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala Arg Ala Thr Phe Thr
                60                  65                  70

GCC GAC ACC AGC ACC AAC ACC GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGG       339
Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
            75                  80                  85
```

```
AGC GAG GAC ACC GCC GTG TAC TAC TGC GCC AGG TTC AGC CAC TTC AGC      387
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser
         90                  95                 100

GGC AGC AAC TAC GAC TAC TTC GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTG      435
Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    105                 110                 115

ACC GTG AGC TCA GGTGAGTTCT AGAAGGGATC C                              468
Thr Val Ser Ser
120
```

（２）１４号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１４２氨基酸

（Ｂ）类型：氨基酸

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：１４号序列

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
-19                 -15                 -10                  -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                1                   5                  10
```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
15 20 25

Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu
30 35 40 45

Glu Trp Val Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn
50 55 60

Glu Lys Phe Lys Ala Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn
65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr
95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

（２）１５号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：４６７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：双

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（ix）特征：

（A）名称／关键词：CDS

（B）位置：22..447

（ix）特征：

（A）名称／关键词：mat - peptide

（B）位置：79..447

（D）其它信息：／产物＝“重链可变区C21-Hay 1”

（xi）序列描述：15号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTG TTC TGC CTG      51
                        Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu
                        -19             -15                 -10

CTG GCC GTG GCC CCC GGC GCC CAC AGC CAG GTG CAG CTG GTG CAG AGC      99
Leu Ala Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                -5                  1               5

GGC GCC GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC GTG AAG GTG AGC TGC AAG     147
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
        10                  15              20

GCC AGC GGC TAC ACC TTC AGC ATG TAC TGG CTG GAG TGG GTG AAG CAG     195
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln
    25                  30                  35

AGG CCC GGC CAG AGG CTG GAG TGG ATG GGC GAG ATC AGC CCC GGC ACC     243
Arg Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr
 40                  45                  50                  55

TTC ACC ACC AAC TAC AAC GAG AAG TTC AAG GCC AAG GCC ACC TTC ACC     291
Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr
                60                  65                  70
```

```
GCC GAC ACC AGC GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG ACC      339
Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr
            75                  80                  85

AGC GAG GAC ACC GCC GTG TAC TAC TGC GCC AGG TTC AGC CAC TTC AGC      387
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser
        90                  95                 100

GGC AGC AAC TAC GAC TAC TTC GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTG      435
Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    105                 110                 115

ACC GTG AGC TCA GGTGAGTTCT AGAAGGATCC                               467
Thr Val Ser Ser
120
```

（２）１６号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１４２氨基酸

（Ｂ）类型：氨基酸

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：１６号序列

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
-19             -15                 -10                 -5

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
            1               5               10
```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
15 20 25

Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Arg Leu
30 35 40 45

Glu Trp Met Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn
50 55 60

Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser
65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr
95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

（２）１７号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：４６７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：双

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

(ix)特征：

(A)名称/关键词：CDS

(B)位置：22..447

(ix)特征：

(A)名称/关键词：mat - peptide

(B)位置：79..447

(D)其它信息：/产物="重链可变区C21-Hay 3"

(xi)序列描述：17号序列

```
CTCCGCAAGC TTGCCGCCAC C ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTG TTC TGC CTG        51
                        Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu
                        -19             -15                 -10

CTG GCC GTG GCC CCC GGC GCC CAC AGC CAG GTG CAG CTG GTG CAG AGC        99
Leu Ala Val Ala Pro Gly Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser
                -5                  1               5

GGC GCC GAG GTG AAG AAG CCC GGC GCC AGC GTG AAG GTG AGC TGC AAG       147
Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys
        10                  15                  20

GCC AGC GGC TAC ACC TTC AGC ATG TAC TGG CTG GAG TGG GTG AGG CAG       195
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln
    25                  30                  35

GCC CCC GGC CAG AGG CTG GAG TGG ATG GGC GAG ATC AGC CCC GGC ACC       243
Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr
40                  45                  50                  55
```

```
TTC ACC ACC AAC TAC AAC GAG AAG TTC AAG GCC AGG GCC ACC TTC ACC      291
Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ala Arg Ala Thr Phe Thr
                60                  65                  70

GCC GAC ACC AGC GCC AGC ACC GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGG      339
Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg
            75                  80                  85

AGC GAG GAC ACC GCC GTG TAC TAC TGC GCC AGG TTC AGC CAC TTC AGC      387
Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser
        90                  95                  100

GGC AGC AAC TAC GAC TAC TTC GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTG      435
Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    105                 110                 115

ACC GTG AGC TCA GGTGAGTTCT AGAAGGATCC                               467
Thr Val Ser Ser
120
```

（２）１８号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１４２氨基酸

（Ｂ）类型：氨基酸

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：蛋白质

（xi）序列描述：１８号序列

```
Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
-19             -15                 -10                 -5
```

Ala His Ser Gln Val Gln Len Val Gln Ser Gly
1 5

Ala Glu Val Lys Lys
10

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
15 20 25

Ser Met Tyr Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
30 35 40 45

Glu Trp Met Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn
50 55 60

Glu Lys Phe Lys Ala Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser
65 70 75

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr
95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

（２）１９号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１０５碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

(xi)序列描述：19号序列

TGAAGAAAGC TTGCCGCCAC CATGGAGACC CCCGCCCAGC TGCTGTTCCT GCTGCTGCTG 60

TGGCTGCCCG ACACCACCGG CGACATCCTG CTGACCCAGA GCCCC 105

(2)20号序列的信息：

(i)序列特征：

(A)长度：95碱基对

(B)类型：核酸

(C)束型：单

(D)拓扑学：线性

(ii)分子类型：DNA(基因组)

(xi)序列描述：20号序列

GATGTTGGTG CCGATGCTCT GGCTGGCCCT GCAGCTCAGG GTGGCCCTCT CGCCGGGGCT 60

CAGGCTCAGG GTGCCGGGGC TCTGGGTCAG CAGGA 95

(2)21号序列的信息：

(i)序列特征：

(A)长度：75碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：21号序列

CAGAGCATCG GCACCAACAT CCACTGGTAC CAGCAGAAGC CCGGCCAGGC CCCCAGGCTG 60

CTGATCAAGT ACGCC 75

（2）22号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：87碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：22号序列

AGGGTGAAGT CGGTGCCGCT GCCGCTGCCG CTGAACCTGC TGGGGATGCC GCTGATGCTC 60

TCGCTGGCGT ACTTGATCAG CAGCCTG 87

（２）２３号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：８４碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：２３号序列

GCGGCACCGA CTTCACCCTG ACCATCAGCA GGCTGGAGCC CGAGGACTTC GCCATGTACT 60

ACTGCCAGCA GAGCGACAGC TGGC 84

（２）２４号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：８２碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：２４号序列

TTTGGATCCT TCTAGAATAC TCACGTTTGA TCTCCACCTT GGTGCCCTGG CCGAAGGTGG 60

TGGGCCAGCT GTCGCTCTGC TG 82

（２）2.5号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：９７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：２５号序列

TGAAGAAAGC TTGCCGCCAC CATGGACTGG ACCTGGAGGG TGTTCTGCCT GCTGGCCGTG 60

GCCCCCGGCG CCCACAGCCA GGTGCAGCTG GTGCAGA 97

（２）２６号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１０３碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：26号序列

CAGCCAGTAC ATGCTGAAGG TGTAGCCGCT GGCCTTGCAG CTCACCTTCA CGCTGGCGCC 60

GGGCTTCTTC ACCTCGGCGC CGCTCTGCAC CAGCTGCACC TGG 103

（2）27号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：105碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：27号序列

CACCTTCAGC ATGTACTGGC TGGAGTGGGT GAAGCAGAGG CCCGGCCACG GCCTGGAGTG 60

GGTGGGCGAG ATCAGCCCCG GCACCTTCAC CACCAACTAC AACGA 105

（２）２８号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１０７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：２８号序列

GTCCTCGCTG GTCAGGCTGC TCAGCTCCAT GTAGGCGGTG TTGGTGCTGG TGTCGGCGGT 60

GAAGGTGGCC TTGGCCTTGA ACTTCTCGTT GTAGTTGGTG GTGAAGG 107

（２）２９号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：８３碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：２９号序列

AGCAGCCTGA CCAGCGAGGA CACCGCCGTG TACTACTGCG CCAGGTTCAG CCACTTCAGC 60

GGCAGCAACT ACGACTACTT CGA 83

（２）３０号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：８３碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：３０号序列

TTTGGATCCT TCTAGAACTC ACCTGAGCTC ACGGTCACCA GGGTGCCCTG GCCCCAGTAG 60

TCGAAGTAGT CGTAGTTGCT GCC 83

（２）３１号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２１碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：31号序列

TGAAGAAAGC TTGCCGCCAC C 21

（2）32号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：23碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：32号序列

TTTGGATCCT TCTAGAACTC ACC 23

（２）３３号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２４碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：３３号序列

TTTGGATCCT TCTAGAATAC TCAC 24

（２）３４号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：１６碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：３４号序列

AACAGCTATG ACCATG 16

（２）３５号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：３０碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：３５号序列

CTGAACCTGT CGGGGATGCC GCTGATGCTC 30

（２）３６号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２５碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：36号序列

CCCGACAGGT TCAGCGGCAG CGGCA 25

（2）37号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：22碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：37号序列

GGTCAGCACG ATCTCGCCGG TG 22

（2）38号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：３８号序列

GAGATCGTGC TGACCCAGAG CCCCGGC 27

（２）３９号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２８碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：３９号序列

CCGGGGGCCT GCCTCACCCA CTCCAGCC 28

（２）４０号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２９碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：４０号序列

GAGGCAGGCC CCCGGCCACG GCCTGGAGT 29

（２）４１号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：３４碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：41号序列

GAAGGTGGCC CTGGCCTTGA ACTTCTCGTT GTAG 34

（2）42号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：28碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：42号序列

CAAGGCCAGG GCCACCTTCA CCGCCGAC 28

（2）43号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：31碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：43号序列

GTCCTCGCTC CTCAGGCTGC TCAGCTCCAT G 31

（2）44号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：21碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：44号序列

CAGCCTGAGG AGCGAGGACA C 21

（2）45号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：４５号序列

CCATCCACTC CAGCCTCTGG CCGGGCC 27

（２）４６号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：３３碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：４６号序列

CCATCCACTC CAGCCTCTGG CCGGGGGCCT GCC 33

（２）４７号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２７碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：４７号序列

CAGAGGCTGG AGTGGATGGG CGAGATC 27

（２）４８号序列的信息：

（ｉ）序列特征：

（Ａ）长度：２０碱基对

（Ｂ）类型：核酸

（Ｃ）束型：单

（Ｄ）拓扑学：线性

（ii）分子类型：ＤＮＡ（基因组）

（xi）序列描述：48号序列

GTGCTGGCGC TGGTGTCGGC 20

（2）49号序列的信息：

（i）序列特征：

（A）长度：21碱基对

（B）类型：核酸

（C）束型：单

（D）拓扑学：线性

（ii）分子类型：DNA（基因组）

（xi）序列描述：49号序列

ACCAGCGCCA GCACCGCCTA C 21

说 明 书 附 图

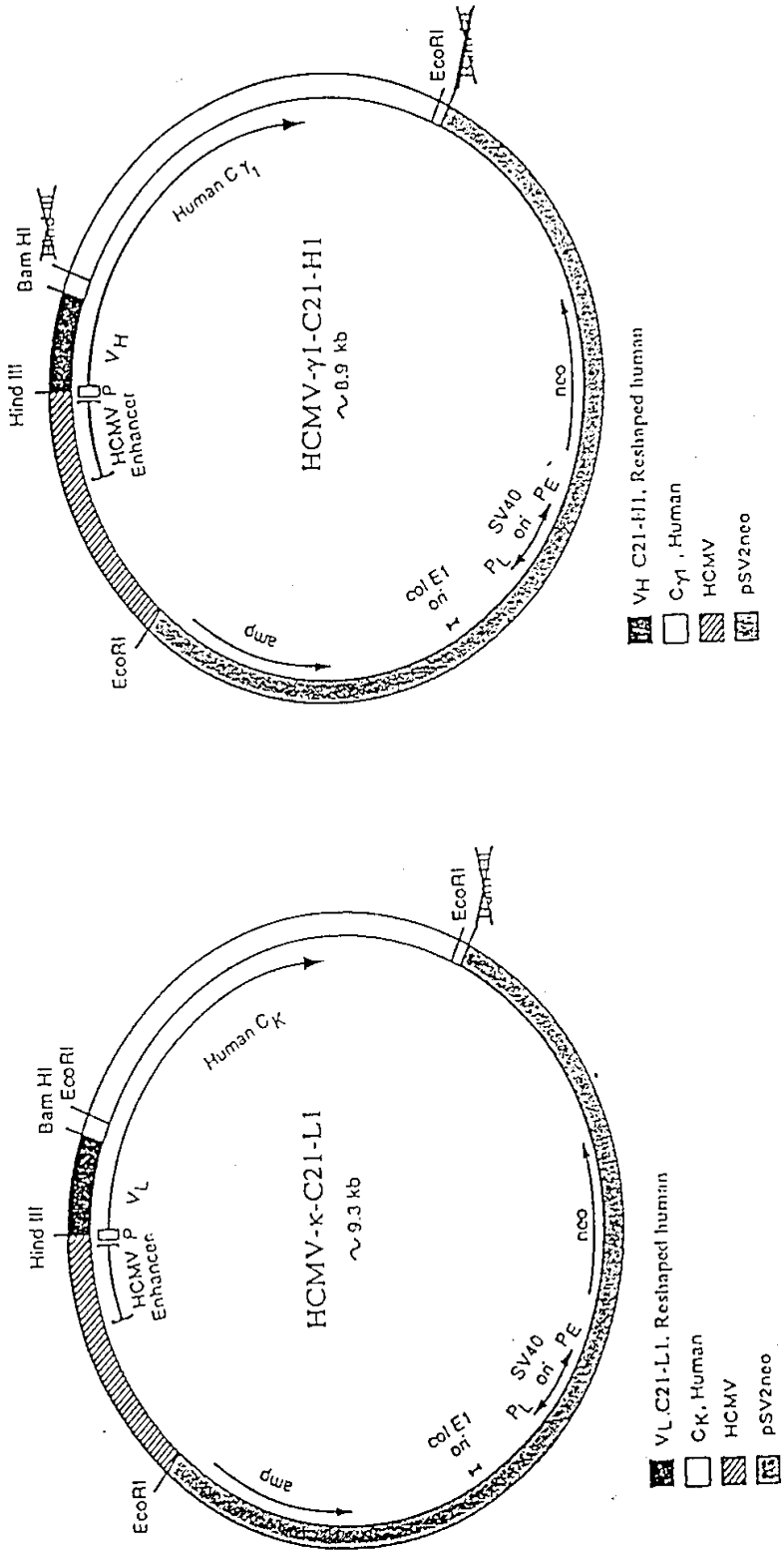

HCMV-γ1-C21-H1
~8.9 kb
Human Cγ1
EcoRI
Bam HI
Hind III
HCMV P Enhancer
VH
amp
ori
Col E1
PL
SV40 ori
PE
neo
EcoRI
VH C21-H1, Reshaped human
Cγ1, Human
HCMV
pSV2neo
HCMV-κ-C21-L1
~9.3 kb
Human Cκ
EcoRI
Bam HI
EcoRI
Hind III
HCMV P Enhancer
VL
amp
ori
Col E1
PL
SV40 ori
PE
neo
EcoRI
VL C21-L1, Reshaped human
Cκ, Human
HCMV
pSV2neo

图 1