

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410103928.9

[51] Int. Cl.

C12N 5/18 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1293190C

[22] 申请日 1998.2.27

[21] 申请号 200410103928.9

分案原申请号 98804574.5

[30] 优先权

[32] 1997. 2. 27 [33] JP [31] 62290/97

[32] 1998. 2. 26 [33] JP [31] 62217/98

[73] 专利权人 日本烟草产业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 玉谷卓也 手塚克成

[56] 参考文献

CN 86107666 A 1987.9.30 C12N15/00

US 5198357 A 1993.3.30 C12N5/00

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 74 页 附图 22 页

[54] 发明名称

介导细胞吸附和信号传递的细胞表面分子

[57] 摘要

分离和鉴定了一种新的由单克隆抗体识别的细胞表面分子，其特异性表达在胸腺细胞，ConA 刺激活化的淋巴细胞和外周血淋巴细胞中，由抗对自身免疫病和过敏性疾病有重要作用的淋巴细胞的细胞表面分子的单克隆抗体所发现。更进一步，还分析了该分子的功能。而且发现抗该分子的抗体显著改善了自身免疫病和过敏性疾病的状况。

---

1. 一种生成单克隆抗体的杂交瘤细胞，所述单克隆抗体是除了仓鼠单克隆抗体和小鼠单克隆抗体以外的单克隆抗体，所述抗体对氨基酸序列 SEQ ID NO:2 组成的多肽，或对由 SEQ ID NO:2 中氨基酸残基 1-140 所对应的氨基酸序列组成的多肽，或对包含所述多肽的同二聚体分子具有特异性。

## 介导细胞吸附和信号传递的细胞表面分子

本申请是一个分案申请，其母案的中国申请号是 98804574.5，国际申请号是 PCT/JP98/00837，国际申请日是 1998 年 2 月 27 日，进入中国国家阶段的日期是 1999 年 10 月 27 日。本案的发明名称与母案的一致。

### 技术领域

本发明涉及新型哺乳动物细胞表面分子；组成这些分子的多肽及其片段；包含这些多肽片段和免疫球蛋白片段的融合多肽；编码这些多肽和片段的基因；带有这些基因的载体；导入了这些载体的转化体；可与这些多肽或包含这些多肽的细胞表面分子反应的抗体；产生这些抗体的杂交瘤；包含这些多肽片段或融合多肽的药用组合物；包含这些抗体的药用组合物；转基因小鼠；及基因敲出(knockout)小鼠。

### 背景技术

活体哺乳动物具有免疫应答系统可排除侵入该活体的致病微生物(病毒、细菌、寄生虫等)或外源生物体(二者在下文中均称“抗原”)。这样的免疫应答系统之一称之为天然免疫应答系统，另一为获得性免疫应答系统。前者是排除机制，包括吞噬细胞(多形核白细胞、单核细胞、巨噬细胞等)的吞噬，自然杀伤(NK)细胞的攻击，及非特异性识别如补体对抗原的调理。后者，获得性免疫应答系统的排除机制由获得抗原特异性的淋巴细胞(主要是 T 细胞和 B 细胞)(即活化的淋巴细胞)完成。已获抗原特异性的 B 细胞产生针对抗原的特异性抗体攻击存在于细胞外的抗原。获得抗原特异性的 T 细胞(称为活化的 T 细胞)被分为辅助 T 细胞和细胞毒 T 细胞(细胞毒淋巴细胞，CTL)。辅助 T 细胞调节 B 细胞的分化和抗体的产生，并与吞噬细胞合作破坏抗原。后者，CTL 自己攻击被病毒感染的细胞及其他(实验医学：增刊，“生物科学术语文库，免疫”，Yodosha，第 14-17 页(1995))。

T 细胞之获得抗原特异性(即 T 细胞的活化)始于 T 细胞识别由抗原呈递细胞(APC)如巨噬细胞、B 细胞、或树突细胞呈递的抗原。抗原呈递细胞将加工的抗原纳为己有，并使之与主要组织相容性复合物(MHC)结合从而呈递之。T 细胞识别通过其细胞膜表面存在的 T 细胞受体(TCR)和 CD3 抗原的复合物(TCR/CD3 复合物)而由抗原呈递细胞所呈递的加工后抗原从而接受细胞活化(或获得特异性)的初级信号。

然而，TCR/CD3 复合物介导的初级信号单独不足以活化 T 细胞，而将

导致非应答性或克隆无反应性，从而使细胞不能对随后收到的任何刺激产生反应。白细胞介素 2 (IL-2) 的自分泌是 T 细胞活化，分化为抗原特异性 T 细胞克隆，并增殖所必需的。在克隆无反应性中，T 细胞由于不产生 IL-2 和无细胞分裂而被灭活。即，伴随产生如 IL-2 这样的细胞因子的 T 细胞活化作用在 TCR/CD3 复合物传递的第一信号之后需要第二信号。该第二信号称为协同刺激信号 (costimulatory signal)。

T 细胞接受该第二信号并将之传入细胞，方式是抗原呈递细胞上除 MHC 以外的分子与 T 细胞表面除 TCR/CD3 复合物的分子相互作用 (细胞粘附)。该第二信号避免细胞无反应性 (克隆无反应性) 并活化这些细胞。

尽管抗原呈递细胞和 T 细胞这样的淋巴细胞之间第二信号传递的机制中有些部分尚未详细阐明，但是到目前为止的研究已揭示第二信号传递中一个重要的因素是 CD28 (亦名 Tp44, T44 或 9.3 抗原)，主要表达在 T 细胞和胸腺细胞上的一种细胞表面分子，与 CD80 (亦名 B7-1, B7, BB1, 或 B7/BB1)，一种表达在抗原呈递细胞 (巨噬细胞单核细胞，树突细胞，等) 上的细胞表面分子，及与 CD86 (亦名 B7-2 或 B70)，也是一种抗原呈递细胞表面分子，的相互作用 (即通过这些分子相互结合而产生的细胞粘附)。而且，实验亦说明细胞裂解性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4)、(其表达被认为是依赖第二信号而增强) 与 CD80 (B7-1) 及 CD86 (B7-2) 之间的相互作用 (即经分子间结合而产生的细胞粘附) 也是第二信号调节 T 细胞活化时的重要因素。换言之，第二信号传递所调节的 T 细胞活化过程涉及至少 CD28 与 CD80/CD86 之间的相互作用，CTLA-4 的表达增强，(这种增强被认为取决于上述相互作用)，及 CTLA-4 与 CD80/CD86 之间的相互作用。

CD28 已知是 T 细胞活化和避免无反应性所必需的传递第二信号 (协同刺激信号) 的协同刺激分子。通过该分子与抗原呈递细胞上的协同刺激分子，CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2) 的结合 (分子间结合而致细胞粘附) 所传递的第二信号稳定了 Th1 型细胞因子的 mRNA 并随后促进 T 细胞产生大量 Th1 型细胞因子如 IL-2, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ 。CTLA-4 表达由 TCR/CD3 传递的初级信号诱导，并由 CD28 与 CD80 之间的结合所传递的第二信号增强表达。已有人揭示 CTLA-4 接受这些信号后抑制 T 细胞功能这种作用正相反于 CD28 传递的第二信号引起的 T 细胞活化作用。

人 CD28 和 CTLA-4 均为 I 型糖蛋白，分子量分别为 44KD 和 41-43KD。

均有免疫球蛋白样区，属于免疫球蛋白超家族，既有细胞粘附分子的功能又有信号传递分子的功能。

人 CD28 以二硫键形成同型二聚体，而 CTLA-4 为单体。CD28 和 CTLA-4 的基因均位于人类染色体的“2q33”和小鼠染色体的“1C”，均由 4 个外显子组成。人 CD28 和 CTLA-4 分别由 220 和 230 个氨基酸组成，内含前导序列，它们之间的氨基酸同源性的为 20-30 %。

CD28 和 CTLA-4 的配体在人和小鼠中为 CD80 (B7-1) 和 CD86 (B7-2)。CTLA-4 与两种配体的亲和力比 CD28 高约 20 倍。业已阐明在各动物种之间保守的氨基酸序列结构“MYPPPY (Met-Tyr-Pro-Pro-Pro-Tyr)”对于 CD28 和 CTLA-4 与 CD80 (B7-1) 的结合很重要。亦有报道，当 CD28 受刺激时，PI3 激酶(磷酸肌醇 3 激酶，PI3K)结合于 CD28 的一个部分序列“YMNM(酪氨酸-甲硫氨酸-天冬酰胺-甲硫氨酸)”的磷酸化酪氨酸残基上，这一 CD28 在细胞间经这种“YxxM”结构进行的信号传递中起重要作用。更进一步，有报道称 CTLA-4 在其胞质区也有一个 YxxM 的序列，即“YVKM(酪氨酸-缬氨酸-赖氨酸-甲硫氨酸)”，且受到刺激后，SYP 与该序列结合。

CD28 特异性表达于胸腺细胞和外周血 T 细胞，CTLA-4 特异性表达于活化的 T 细胞(细胞工程：增刊，“粘附分子手册”，Shujunsha，93-102 页(1994)；同一书中 120-136 页；实验医学：增刊，“生物科学术语文库，免疫”，Yodosha，94-98 页(1995)；实验医学：增刊，“生物科学术语文库，细胞间信号传导”，Yodosha，58-59 页(1997)；Nihon Rinsho，55 卷，6 期，215-220 页(1997))。

在 T 细胞功能的调节中(T 细胞功能的活化和抑制中)，复分子之间，如协同刺激分子(CD28，CD80 (B7-1)，CD86 (B7-2) 等和 CTLA-4 这种与上述分子互相作用的分子的相互作用，(换而言之经这些分子间结合而进行的细胞粘附)其重要性已被认识，并使人注意力转移到这些分子与疾病之间的联系，及通过调节这些分子的功能而治疗疾病的方面。

如上述，尽管某一活体活化了其获得性免疫应答系统以对抗外源生物体的抗原，它仍有免疫耐受以便对自身成分(自身抗原)不显示免疫应答。如果免疫耐受因某种原因被打破，对自身抗原产生免疫应答，自身抗原反应性 T 细胞将以上述相同的机制被诱导，而导致免疫异常，引起各种自身免疫病。

换言之，当某活体的免疫系统正常时，由于正常组织中未受刺激的抗原呈递细胞(APC)不表达协同刺激分子，即使有与自身抗原起反应的自身抗原反应性 T 细胞存在，也均处于非应答状态以维持免疫耐受。有人认为在免疫异常状态下，更多自身抗原反应性 T 细胞由于非正常过量并持续表达协同刺激分子而活化并因此导致自身免疫病。

近来从这一观点出发，提出很多治疗各种自身免疫病的尝试，采取调节协同刺激信号的传递的方法，如上述 CD28/CTLA-4 与 CD80/CD86 之间的信号传递。

有人发现 CD80 这样作为 CD28 和 CTLA-4 之配体的协同刺激分子在自身免疫病病灶部位的抗原呈递细胞中异常表达，所述自身免疫病如类风湿性关节炎，多发性硬化症，自身免疫性甲状腺炎，过敏性接触性皮炎，慢性炎症性皮肤病如扁平苔癣，和牛皮癣。很多人因这一发现而尝试通过调节 CD80 的功能来治疗各种自身免疫病。

有人提议封闭 CD80 的功能，方法是用抗 CD80 的抗体，可相配 CD80 的 CD28 可溶性蛋白，可相配 CD80 的 CTLA-4 可溶性蛋白。特别是，基于这样一个事实：CTLA-4 结合 CD80 的亲和力比 CD28 高 20 倍或更多，在动物模型和临床检验中进行了一些治疗上的尝试，所用为“可溶性 CTLA-4”，含有“CTLA-4”的胞外区和人免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 区的融合蛋白(CTLA-4-IgFc) (Nihon Rinsho, 55 卷, 6 期, 215-220 页(1997))。

如下文 1 至 5 所示，已报道 CTLA-4-IgFc 在自身免疫病的动物模型中的治疗效果。

1. 在(NZB/NZW)F1小鼠(人系统性红斑狼疮(SLE)模型)中，自身抗体的产生和狼疮肾炎的发作均由于发作前使用了 CTLA-4-IgFc 而受抑制，即使在发作后使用该药也改善了病况(科学, 125 卷, 1225-1227 页(1994))。

2. 在实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)这种多发性硬化症(MS)的模型中，由于在免疫接触种后立即短期使用 CTLA-4-IgFc 而使发作被阻止(临床调查杂志, 95 卷, 2783-2789 页(1995))。

3. 在 NOD(非肥胖型糖尿病)小鼠这种胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)模型中，由于对 2 周龄或 3 周龄的雌性小鼠持续两周施用 CTLA-4-IgFc 而使发病率显著下降(实验医学杂志, 181 卷, 1145-1155 页(1995))。

4. 在由肾小球基底膜免疫所致的大鼠肾炎这种 Goodpasture's 肾炎模

型中,因施用 CTLA-4-IgFc 而使症状大大改善(欧洲免疫学杂志, 24 卷, 6 期, 1249-1254 页(1994))。

5. 在 DBA/1 小鼠的 II 型胶原蛋白诱导型关节炎(CIA)这种人类风湿性关节炎模型中,因在免疫接种时施用受试药物而使关节炎的发作受到抑制,抗胶原蛋白的自身抗体 IgG1 和 IgG2 的产生也受抑制(欧洲免疫学杂志, 26 卷, 2320-2328 页(1996))。

上述实验结果尚未详细明确因协同刺激分子和相关分子之间的相互作用(即因这些分子间结合所致细胞粘附)而使 T 细胞活化的机制。其他未知分子有可能涉及该机制。

### 发明公开

如果弄清了上文所述淋巴细胞如 T 细胞活化所必需的第二信号传递过程中所涉及的经分子间结合导致的细胞粘附而活化淋巴细胞如 T 细胞的机制,以及弄清淋巴细胞功能的调节机制,和能介导该机制中所涉及的细胞粘附的已知或未知分子,能传递信号的已知或未知分子均能鉴别和定性。那么用于治疗或预防各种疾病如上述自身免疫病,过敏性疾病,和炎症性疾病的药物将会得到开发。

本发明的目的之一是鉴别同时具有介导该细胞粘附和信号传递这两种功能的新型细胞表面分子,并澄清其结构和生物学特点。本发明的另一目的是通过应用新型分子或这些分子的抗体而提供可用于治疗或预防各种自身免疫病和炎症疾病的药物。

为了鉴别这些有用的分子,本发明人将注意力集中于以下事实:淋巴细胞(如 T 细胞)在自身免疫病和过敏性疾病中起重要作用;细胞粘附是第二信号(协同刺激信号)从抗原呈递细胞向淋巴细胞传递时所必需的。本发明人计划分离并鉴别特异性地表达在淋巴细胞上并介导细胞粘附的细胞表面分子。

本发明人获得了针对表达在淋巴细胞表面的各种细胞表面分子的单克隆抗体,其是用上述淋巴细胞免疫动物而得;再用所获单克隆抗体分离并鉴别所需介导细胞粘附的表面分子。具体方法详见下文。

本发明人首先给小鼠施用大鼠淋巴细胞系作为抗原,制备各种单克隆抗体(简称单抗)。然后,用所获单抗与用作抗原的大鼠淋巴细胞反应,检验单抗对所给细胞的作用。结果发现一种单抗可强烈凝集大鼠淋巴细胞(此

单抗命名为“JTT-1 抗体”)。而且发现另一种单抗可强烈抑制由“JTT-1 抗体”引起的大鼠淋巴细胞凝集(此单抗命名为“JTT.2 抗体”)。

由于“JTT-1 抗体”所致大鼠淋巴细胞的凝集不受抑制于抗细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的抗体或淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)的抗体,而这两种抗原分子均是已知最具代表性的细胞表达的粘附分子,故本发明人认为这种凝集是由通过未知介导的细胞粘附的粘附分子的细胞粘附所致。

由这两种单抗每一所识别的细胞表面分子(命名为“JTT-1 抗原”和“JTT.2 抗原”)随后被鉴别。分离并定性。

首先,用“JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”以荧光抗体技术在流式细胞仪上分析“JTT-1 抗原”和“JTT.2 抗原”在不同细胞上的表达模式。尽管在用刀豆蛋白 A(ConA)这种丝裂原刺激胸腺细胞和脾细胞活化的活化的淋巴母细胞(活化的 T 淋巴母细胞、活化的 B 淋巴母细胞等)中,尤其是在活化的淋巴母细胞中,强烈表达“JTT-1 抗原”和“JTT.2 抗原”,而根本未受刺激的脾细胞几乎未见表达(这些细胞于本文中有时称为“静息淋巴细胞”)。“JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”每一所识别分子的表达模式几乎一样。

将“JTT-1 抗体”结合于吸附剂制备成亲和层析柱,由“JTT-1 抗体”捕获的分子,即“JTT-1 抗原”将从由上述大鼠淋巴细胞制备的可溶性细胞表面分子混合物中纯化出来。经“JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”免疫沉降并经 SDS-PAGE 分析纯化的“JTT-1 抗原”的分子量。结果发现“JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”每一免疫沉降所得分子相同,且每种分子均为有不同糖链的同型二聚体。特别是,当 N 连接的糖链不经消化时,该分子在非还原状态下测得为分子量约 47KD 的一种分子,在还原状态下测得分子量分别约 24KD 和约 28KD 的两种分子;当 N 连接的糖链是经消化的时,该分子在非还原状态下测得为约 36KD 的一种分子,还原状态下测得为约 20KD 的一种分子。

用包被有纯化“JTT-1 抗原”的板分析大鼠胸腺细胞的吸附。结果,只有“JTT-1 抗体”存在时,胸腺细胞显著性吸附于板上(即吸附于“JTT-1 抗原”);并在同时还有“JTT.2 抗体”存在时,吸附显著受抑,说明“JTT-1 抗原”是介导细胞粘附的细胞表面分子。

下一步,本发明人从大鼠、人和小鼠克隆了编码“JTT-1 抗原”的基

因，并分析了它们的结构。

首先，通过利用“JTT-1 抗体”的采用淘选法的表达克隆法从 ConA 刺激的大鼠脾细胞衍生的淋巴母细胞制成的 cDNA 文库中分离编码全长“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA，用双脱氧法测定其核苷酸序列而分离并鉴别出一种全新的大鼠基因。编码全长“人 JTT-1 抗原”的基因亦分离自 ConA 刺激的人外周血淋巴细胞 cDNA 文库，方法是用编码所获“大鼠 JTT-1 抗原”的基因作探针进行噬斑杂交，用双脱氧法测其核苷酸序列而分离并鉴别出一种全新的人基因。类似地，编码全长“小鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 分离自 ConA 刺激的小鼠脾细胞衍生的淋巴母细胞 cDNA 文库，用双脱氧法测定其核苷酸序列而分离并鉴别出一种全新小鼠基因。更进一步，编码全长的上述“大鼠 JTT-1 抗原”之可替换的剪切变体相似地分离自大鼠胸腺瘤细胞 cDNA 文库，而用双脱氧法测定其核苷酸序列而分离并鉴别出另一种全新大鼠基因。

对分离的“人 JTT-1 抗原” cDNA 编码的氨基酸序列进行亲水性分析发现“JTT-1 抗原”为穿膜蛋白(细胞表面分子)，由信号序列，一个有糖基化位点的胞外区，一个跨膜区和一个胞内区组成，与已知分子的同源性研究发现大鼠、人和小鼠的“JTT-1 抗原”与包括细胞粘附分子在内的任何已知分子均无明显同源性，说明它们是介导细胞粘附的新型细胞表面分子。

对“人 JTT-1 抗原”的氨基酸序列进行基序查寻结果发现，“人 JTT-1 抗原”与上文所述“CD28”和“CTLA-4”结构相似，而 CD28 为淋巴细胞如 T 细胞的表面分子，其传递的协同刺激信号对于 T 细胞经细胞粘附的活化十分重要，CTLA-4 也是淋巴细胞如 T 细胞的表面分子，与信号一同调节活化的淋巴细胞如活化 T 细胞的功能。

结构相似点如下：

1. 20 或更多个包含半脱氨酸残基在内的氨基酸残基高度保守。
2. 作为配体结合区必需的脯氨酸重复序列“Pro-Pro-Pro (PPP)”在胞外区中为保守的。
3. 作为信号传递区必需的序列“Tyr-Xaa-Xaa-Met (YxxM)”(Xaa 和 X 代表任意氨基酸)在胞浆区保守。

编码“小鼠 JTT-1 抗原”的基因座经荧光原位杂交(FISH)法发现是小

鼠染色体上的“IC3”，这相同于小鼠“CD28”和“CTLA-4”的所在位点。

下一步，考查调整“JTT-1 抗原”的功能对自身免疫病和过敏性疾病的疗效，方法是对实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)和肾小球基底膜(GBM)肾炎的模型大鼠施用上述“JTT-2 抗体”进行实验。结果发现两种疾病模型动物的病理状况显著受抑，自身免疫病或过敏性疾病可通过调节“JTT-1 抗原”的功能而进行治疗。

还发现抗“人 JTT-1 抗原”的单抗显著增殖人外周血淋巴细胞，在有抗 CD3 单抗同时存在时此增殖进一步增强(CD3 为使 T 细胞活化必需的 T 细胞上接受来自抗原呈递细胞的初级信号的 TCR/CD3 复合物的组成成分)，说明“JTT-1 抗原”是涉及向淋巴细胞传递信号的细胞表面分子。

更进一步，本发明人成功地生产了含有“人 JTT-1 抗原”的胞外区和人免疫球蛋白的 Fc 区的融合多肽。该融合多肽可作为药物通过调节“JTT-1 抗原”和/或其配体的功能而用于治疗自身免疫病，过敏性疾病，和炎症性疾病。

而且，本发明人成功地制备了一种转基因小鼠，其中转入的基因可编码其它动物种的“JTT-1 抗原”。该转基因小鼠可用于分析“JTT-1 抗原”的具体功能，也可用于开发药物以治疗自身免疫病，过敏性疾病和炎症性疾病。发明人还生成了一种基因敲出小鼠，其中编码“小鼠 JTT-1 抗原”的内源性基因被灭活。此基因敲出小鼠也适用于上述目的。

本发明涉及多肽，基因，抗体，载体，转化体，药用组合物，转基因小鼠，基因敲出小鼠等，均相关于按上述分离并鉴别所得的新型哺乳动物“JTT-1 抗原”。特别是，本发明如以下(1)至(36)所述。

(1) 一种组成具有以下特征的细胞表面分子的多肽：

(a) 该细胞表面分子至少在胸腺细胞和丝裂原刺激的淋巴母细胞上表达，

(b) 一种与该细胞表面分子反应的抗体诱导发生在丝裂原刺激的淋巴母细胞之间的粘附，

(c) 一种与该细胞表面分子反应的抗体在有抗 CD3 抗体存在时诱导外周血淋巴细胞增殖，

(d) 该细胞表面分子在其胞外区氨基酸序列中有一部分为苯丙氨酸 - 天冬氨酸 - 脯氨酸 - 脯氨酸 - 脯氨酸 - 苯丙氨酸，且

(e) 该细胞表面分子在其胞质区的氨基酸序列中有一部分是酪氨酸 - 甲硫氨酸 - 苯丙氨酸 - 甲硫氨酸。

(2) (1)多肽, 包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或包含其中一个或更多氨基酸被替代、缺失, 或加入的 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

(3) (1)多肽, 其由在严格条件下与有 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 编码。

(4) (1)多肽, 包含与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列有 60 % 或更多同源性的氨基酸序列。

(5) (1)至(4)中任何一个多肽, 其中所说细胞表面分子来自人类。

(6) 编码(1)至(5)中任何一个多肽的基因。

(7) (6)基因, 其中该基因为一段 cDNA。

(8) (7)基因, 其中该 cDNA 有 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列。

(9) (7)基因, 其中该 cDNA 含相应于 SEQ ID NO: 3 的 26 至 625 核苷酸残基, SEQ ID NO: 4 的 35 至 637 核苷酸残基, SEQ ID NO: 5 的 1 至 603 核苷酸残基, 或 SEQ ID NO: 6 的 35 至 685 核苷酸残基的一段核苷酸序列。

(10) 一种载体, 包含(6)至(9)中任何一个基因。

(11) 一种转化体, 其中导入了(10)的载体。

(12) 一种转化体, 鉴定为国际保藏号 FERM BP-5725。

(13) 一种多肽片段, 包含(1)至(5)中任一个多肽的胞外区。

(14) (13)多肽片段, 其中该多肽为有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的人源多肽。

(15) 编码(13)或(14)的多肽片段的基因。

(16) 一种包含两个多肽片段的同型二聚体分子, 其中每个片段含有(1)至(5)中任一个多肽的胞外区, 且此二个多肽片段彼此以二硫键桥联。

(17) (16)同型二聚体分子, 其中该多肽为具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的人源多肽。

(18) 一种药物组合物, 含有(14)多肽片段或含有(17)同型二聚体分子, 或二者均含, 并包含一个可药用载体。

(19) 一种融合多肽, 含(1)至(5)中任一个多肽的胞外区及人免疫球蛋白(Ig)重链恒定区或此恒定区的一部分。

(20) (19)融合多肽, 其中免疫球蛋白为 IgG。

(21) (19)融合多肽，其中恒定区的部分包含 IgG 的链区，C2 区和 C3 区。

(22) (19)至(21)中任一个融合多肽，其中该多肽为有 SEQ ID NO: 2 的一段氨基酸序列的人源多肽。

(23) 一种同型二聚体分子，包含(19)至(22)中任一两个融合多肽，其中两个多肽彼此以二硫键桥联。

(24) 一种同型二聚体分子，包含(22)的两个融合多肽，其中两个多肽间以二硫键桥联。

(25) 一种药物组合物，包含(22)融合多肽，或(24)同型二聚体分子，或二者皆有，以及一种可药用载体。

(26) (25)药物组合物，其中该药物组合物用于治疗自身免疫病或过敏性疾病，或用于预防上述疾病的症状。

(27) 可与(1)至(5)中任一个多肽，(13)或(14)多肽片段，或含有该多肽的细胞表面分子反应的一种抗体或其部分。

(28) (27)抗体或其部分，其中该抗体为单抗。

(29) 一种可与有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多肽，或(14)多肽片段，或含该多肽的人源细胞表面分子反应的单抗或其部分。

(30) 一种可与(1)至(5)中任一个多肽，或与含有该多肽的细胞表面分子反应的单抗或其部分，其中该单抗在丝裂原刺激的淋巴母细胞上的效应实质上等同于经国际保藏号 FERM BP-5707 的杂交瘤产生的单抗对丝裂原刺激的大鼠淋巴母细胞的效应。

(31) 一种可与(1)至(5)中任一个多肽，或与含有该多肽的细胞表面分子反应的单抗或其部分，其中该单抗对丝裂原刺激的淋巴母细胞的效应实质上等同于国际保藏号 FERM BP-5708 的杂交瘤所产生的单抗对丝裂原刺激的大鼠淋巴母细胞的效应。

(32) 一种药物组合物，含有(29)单抗或其部分和可药用载体。

(33) (32)药物组合物，其中该药物组合物用于治疗自身免疫病或过敏性疾病，或用于预防该疾病症状。

(34) 一种生产(28)至(31)的任一种单抗的杂交瘤。

(35) 一种转基因小鼠，其中整合入其内源基因上的编码(1)多肽的基因是包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的一种人源基因，或是包含相应于 SEQ

ID NO: 4 的 35 至 637 核苷酸残基的核苷酸序列的大鼠源基因。

(36) 一种基因敲出小鼠, 其内源编码权利要求 1 的小鼠多肽(包含 SEQ ID NO: 5 的基因编码的氨基酸序列)的基因被灭活, 从而不产生该小鼠多肽。

如上所述, 本发明的细胞表面分子(“JTT-1 抗原”)涉及细胞粘附, 向淋巴细胞(如 T 细胞)的信号传递, 对活化的淋巴细胞功能的调节。下文描述了有关淋巴细胞, 细胞粘附分子, 及它们之间关系的一般常识, 只是为了对这些生物学事件作一般性理解, 但以下常识不是为了限定性解释本发明。

淋巴细胞粗分为两类, T 细胞和 B 细胞。从骨髓的多能干细胞分化为淋巴样干细胞后, 其中一些进入血流以达胸腺。淋巴细胞在胸腺中分化成熟, 称为 T 细胞(胸腺衍生 T 细胞), 再进入血液, 循环于全身。成熟 T 细胞在其表面有一称为 CD3 的分子。CD3 分子的存在是决定该细胞是否为成熟 T 细胞的标志。CD3 是一个可信的 T 细胞标志。此外, T 细胞表达 CD4 或 CD8。T 细胞分为辅助 T 细胞(Th 细胞), 其辅助 B 淋巴细胞产生抗体; 细胞毒 T 细胞(Tc 细胞, CTL)或杀伤 T 细胞, 它们可结合靶细胞并直接破坏它们; 抑制 T 细胞, 其可抑制 B 淋巴细胞产生抗体; 效应 T 细胞, 其分泌效应物如淋巴因子引起迟发型变态反应。

B 细胞来自于骨髓中分化和成熟的淋巴样干细胞。B 细胞是产生抗体的前体细胞。因为它们受相应刺激时产生抗体。B 细胞在其细胞表面有免疫球蛋白分子, 其产生于细胞内。这些免疫球蛋白是抗原的受体。成熟 B 细胞在其表面同时具有 IgM 和 IgD。若 B 细胞受抗原刺激和 T 细胞传来的信号作用而分化, 则 IgM 的生成增加, 且其 C 端细胞膜结合区发生改变从而被分泌。只要有足够刺激, 不只是表面免疫球蛋白转换成 IgG, IgE 和 IgA, 而且每类免疫球蛋白均有分泌。B 细胞表面的免疫球蛋白有时表示为 sIg(表面 Ig 的缩写), 或 mIg(膜 Ig 的缩写)。同一 B 细胞表面所有 Ig 分子具有相同的抗原结合位点。

有些淋巴细胞称为大颗粒淋巴细胞(LGL)或无表面标志细胞, 它们即非 T 细胞, 亦非 B 细胞。这些细胞不经抗原事先刺激就能破坏肿瘤细胞和病毒感染的细胞, 这相当于细胞毒 T 细胞。故这些细胞也称自然杀伤细胞(NK 细胞)。

上述 T 细胞中, CD4 阳性 T 细胞在与抗原呈递细胞呈递的抗原反应时,

分泌多种细胞因子，重新表达这些细胞因子的受体。扩大自身体积，开始细胞分裂和增殖。在细胞水平上的这些反应发生前，抗原呈递细胞上的抗原肽与 MHC II 类分子的复合物结合于相应的 T 细胞抗原受体 (TCR)。这导致胞内发生各种生化变化，信号传入核内，启动特异性 DNA 的转录，产生相应蛋白。结果细胞水平的反应增强。例如，感染了病毒的细胞产生病毒蛋白并在胞质中由蛋白酶体降解为肽，其中部分经 TAP 进入内质网，与刚产生的 MHC I 类分子形成稳定复合物，再转移至细胞表面。转移至细胞表面的肽由 CD8 阳性 T 细胞特异性识别，但这些 T 细胞在此阶段尚不能破坏受感染的细胞。这些与抗原反应的 T 细胞表达 IL-2 受体 (IL-2R)，均在 IL-2 作用下分化为 CTL 细胞毒性然后当再次遇到相同抗原肽/MHC I 类复合物时破坏靶细胞以杀死它们。分化为 CTL 所需细胞因子不只 IL-2，还有 IFN  $\gamma$  或其它细胞因子，它们有相似的作用。故 T 细胞分泌的淋巴因子是分化为 CTL 所必需。淋巴因子的产生是 CD4 阳性 Th1 细胞 (CD4 阳性分泌 IL-2 或 IFN  $\gamma$  的 T 细胞) 识别同一病毒来源的抗原肽和 II 类分子的结果。某些例子中，没有 CD4 阳性 T 细胞的帮助，CD8 阳性 T 细胞也能与抗原反应并产生 IL-2 和其他细胞因子。当 CD8 阳性 T 细胞分化为 CTL 时，胞质中颗粒增多。这些颗粒包括各种高分子量蛋白质，表示为穿孔素。穿孔素类似于由补体的第五至第九成分组成的膜攻击复合物 (MAC)，可在靶细胞的细胞膜上产生孔。此外，颗粒还包括丝氨酸蛋白酶，LT，蛋白多糖等。而且，若分化为 CTL 的 CD8 阳性细胞受到抗原刺激，它们也可分泌淋巴因子如 IFN  $\gamma$ ，LT，TNF 或 IL-2。而且，当 T 细胞与血凝素 (植物血凝素，PHA) 或 ConA 反应时表现出母细胞 (blast) 转化表型。

完全未受刺激的成熟 T 细胞称静息 T 细胞，细胞体积较小，寿命短，只有几天。当它们接受刺激，细胞如上所述增大，易于与各种刺激发生反应。这些 T 细胞称活化的 T 细胞。一部分活化的 T 细胞变成记忆 T 细胞，若受到相同抗原刺激可产生再次免疫反应。记忆 T 细胞被认为在身体循环中保持几年或几十年。

完全未受刺激的 B 细胞称静息 B 细胞，就象 T 细胞的情况一样，受多价抗原或 CD40L 刺激而增生的 B 细胞称活化的 B 细胞。由于静息 B 细胞无协同刺激分子 (通过 TCR 传递信号刺激 T 细胞) 如 B7-1 (CD80) 或 B7-2 (CD86)，因而认为呈递抗原至静息 T 细胞只能刺激 TCR，不能表达 CD40

配体 (CD40L) 或产生淋巴因子。故认为由其他抗原呈递细胞所呈递抗原刺激活化的辅助 T 细胞可与由静息 B 细胞呈递的抗原反应。即, 若有抗原入侵, 首先, 表达 B7 分子的树突细胞 (有极多树突状突起的细胞) 或与微生物反应而活化的巨噬细胞呈递抗原, 刺激静息 T 细胞活化以表达 CD40L。活化的辅助 T 细胞随后结合于呈递了相同抗原的静息 B 细胞, 刺激其 CD40。一旦 B 细胞因多价抗原或 CD40L 的刺激而活化, 它们也表达 B7 分子, 刺激辅助 T 细胞表面的 CD28 及 TCR 而使之活化, 从而使辅助 T 细胞表达 CD40L 或产生淋巴因子。受刺激后显示有诸如细胞体积增大之类的变化但未显示抗体分泌的 B 细胞称活化的 B 细胞。若成熟至此的 B 细胞遇到抗原, 又有来自 T 细胞的刺激, IgM 的产生增加, 所产生的 IgM 从膜结合型转成分泌型分泌出细胞。而且, 它们在来自 T 细胞的体液因子作用下产生除 IgM 以外的其他同种型抗体。这称为同种型转换或类别转换。分泌抗体的 B 细胞称抗体分泌型细胞。其中一部分变为形态特征性细胞并称为浆细胞 (免疫学知识, Ohmsha, (1996))。

偶尔地, 在各种免疫系统的反应中, 白细胞亚群, 即 T 淋巴细胞, B 淋巴细胞, NK, 中性粒细胞等常显示相互不同的动力学。即使是上述同种淋巴细胞根据该细胞是活化的还是静息的也显示相互不同的动力学。这些事实暗示存在白细胞亚群特异性的识别机制, 且识别机制特异于细胞的状态, 尤其细胞粘附分子 (细胞粘附蛋白)。

细胞粘附分子, 或细胞粘附蛋白是通常在个体发育分化中或在细胞迁移至局部位点时使细胞间粘附的分子, 已知这些分子是活体的机体和功能接触所必需分子。

细胞粘附分子根据结构特征粗分为五大家族: 免疫球蛋白超家族, 整联蛋白家族, 选择素家族, 钙粘着蛋白家族, 和 CD44 家族。属免疫球蛋白超家族的粘附分子特征是有以二硫键形成的重复环状区。其例子有细胞间粘附分子-1 “ICAM-1” 和血管细胞粘附分子 “VCAM-1”。此外, 属整联蛋白家族的粘附分子特征是  $\alpha/\beta$  异二聚体结构。其实例为极迟相抗原-1 至 6 “VLA-1 至 6”, 淋巴细胞功能相关抗原-1 “LFA-1”, “Mac-1”, 和 “P150/90”。属选择素家族的分子从 N 端依次有植物血凝素样区, EGF 样区, 和补体区。其实例为 “E-选择素” 和 “P-选择素”。钙粘着蛋白家族的实例为 “E-钙粘着蛋白”, “N-钙粘着蛋白” 和 “P-钙粘着蛋白”, CD44

家族的一个实例是“CD44”。

已知这些粘附分子的特殊功能是使白细胞粘附血管内皮细胞或使淋巴细胞粘附抗原呈递细胞。最近各种研究渐渐揭示粘附分子不仅涉及这些功能，也涉及多种疾病。

尤其，已有多项关于疾病和粘附分子表达异常的报道。如类风湿性关节炎(RA)，据报道RA滑膜细胞中“Mac-1”和“P150/95”的表达均加强(Allen, C.等, 类风湿性关节炎, 32卷, 947页(1989))。另有报道RA滑膜上各种细胞表达“ICAM-1”既强又异位(Hale, L.等, 类风湿性关节炎, 32卷, 22页(1989))。另一项报道暗示“ELAM-1”亦涉及中性粒细胞对血管内皮细胞的粘附, 这些分子的过量表达涉及中性粒细胞的浸润(特别是, 进入滑液), 在RA的滑液中发现有中性粒细胞(Laffon, A.等, 类风湿性关节炎, 32卷, 386页(1989))。血管内皮细胞和RA滑膜上A型滑膜细胞中CD44的强烈表达也有报道(Heynes, B.等, 类风湿性关节炎, 34卷, 1434页(1991))。

有些报道是关于系统性红斑狼疮(SLE)与粘附分子表达异常之间的联系。如据报道系统性红斑狼疮病人的T淋巴细胞粘附血管内皮细胞的能力低于健康志愿者的。SLE病人的外周血淋巴细胞中强烈表达粘附分子“ICAM-1”, “VLA-4”, 和“IFA-1”(Haskard, D. O.等, Rheumatol. Int. 9卷, 33页(1989))。

在自身免疫病中, 据报道当甲状腺滤泡细胞受干扰素 $\gamma$ , 白细胞介素1, 和肿瘤坏死因子刺激时表达“ICAM-1”, 而滤泡细胞和单核细胞的群形成受抗“ICAM-1”抗体的抑制(Weetman, A. P.等, 欧洲免疫学杂志, 20卷, 271页(1990))。

在肝炎中, 一般认为肝细胞与炎症细胞间的粘附机率增加, 因为有“ICAM-1”和“LFA-3”, “LFA-1”和“CD2”这两条粘附通道, 因而促进了抗原的呈递和炎症细胞的活化。尤其, 乙肝中, 肝细胞强烈表达“LFA-3”, 肝细胞内病毒活跃复制, 而“ICAM-1”与肝炎的病情严重程度密切相关。故暗示“LFA-3”涉及病毒的排除, “ICAM”促进T细胞呈递抗原及调节炎症反应。在“ICAM-1”阴性而HBC抗原阳性肝细胞中, 慢性病毒感染, 一种免疫无应答, 可能由于淋巴细胞与肝细胞间无相互作用而发生, 还有报道说慢性肝病中的血清“ICAM-1”, 可能相关于肝细胞损

坏程度因为急性肝炎病人，慢性活动性肝炎病人，肝坏死病人的血清“ICAM-1”浓度高于健康志愿者的和慢性迁延性肝炎病人的，在组织学渐进性活动肝炎中该浓度是高的 (Mod. Phys., 15 卷, 1 期, 73-76 页 (1995))。

在动脉硬化的动物模型中，于发病的早早期就察到单核细胞和淋巴细胞对血管内皮的粘附和入侵。故认为这些血细胞与内皮的相互作用是动脉硬化症发病的第一步。各种报道显示急性动脉硬化病灶中有粘附分子的表达，包括人动脉硬化病灶中有“ICAM-1”表达 (Poston, R. N. 等, 美国病理学杂志, 140 卷, 665 页 (1992)) 和兔高胆固醇血症的动脉硬化病灶中有“VCAM-1”表达 (Cybulsky, M. I. 和 Gimbrone, M. A. Jr., 科学, 251 卷, 788 页 (1991))。一项近期报道揭示，于人动脉硬化灶中观察到“VCAM-1”的表达，及尤其是迁移至内膜的平滑肌细胞中和单核/巨噬细胞中有强表达。此外，兔和人动脉硬化灶中“MCP-1”的表达增强，说明“MCP-1”通过移动单核/巨噬细胞促进动脉硬化灶的形成 (Curent Therapy, 12 卷, 8 期, 1485-1488 页 (1994))。

肿瘤转移与粘附分子异常之间的关系已有报道。如 E-钙粘着蛋白减少的癌细胞显示较强侵袭力，但该癌细胞中导入 E-钙粘着蛋白的 cDNA 后侵袭力受抑，再加入 E-钙粘着蛋白抗血清侵袭力又恢复。这说明 E-钙粘着蛋白表达的减少与肿瘤细胞侵袭力之间有紧密联系 (Frixen, U. H. 等, 113 卷, 173 页 (1991))。在实际临床病例中，E-钙粘着蛋白表达减少与转移之间的联系出现在各种癌症中，如肝癌，鼻咽癌，胃癌，和乳癌。亦有报道“VLA-4”分子，作为“VCAM-1”的配体，在转移型黑色素瘤，胃癌和乳癌中高度表达，说明此分子可用于转移病例中对血管内皮细胞的植入。此外，用各种肿瘤细胞系进行实验所得报道说上皮癌，如胃癌，大肠癌，肺癌，肝癌或胰腺癌，均经 E-选择素粘附血管内皮细胞 (Takada, A. 等, 癌症研究, 53 卷, 354 页 (1993))。

另一方面，已有人采用靶向这些粘附分子的治疗方法治病。如，报道抗大鼠“ICAM-1”抗体在大鼠自身免疫性关节炎模型中强烈抑制炎症反应。亦有报道，在一个 RA 动物模型中施用抗“ICAM-1”抗体抑制了辅助性滑膜炎中关节炎的发作 (Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 14 卷, 6 期, 571-577 页 (1991))。进一步有报道说，若对胆囊癌小鼠施用大量具

有 REG 序列(为一种胞外基质蛋白中由某些整联蛋白识别并结合的一段氨基酸序列)的肽将显著抑制所接种肿部的转移形成,而在体外系统中, RGD 肽和抗 $\beta_1$ 亚单位抗体抑制了肿瘤细胞的运动和浸润(Yamada, K. M. 等, 癌症研究, 50 卷, 4485 页(1990))。

下文中, 本发明通过澄清了本文所用术语的意义, 及本发明的多肽, 融合多肽, 基因, 抗体, 转基因小鼠, 和基因敲出小鼠的一般生产方法而详述, 但不用说术语的意义不应限定在本文所给定义中。

本文所用“丝裂原”也称促分裂因子, 指能诱导细胞分裂的物质。其免疫学意义为多克隆诱导淋巴细胞母细胞生成(blastogenesis)和诱导细胞分裂的物质。其实例为外源凝集素如 PHA 和 PWM, 刀豆蛋白 A(ConA), 脂多糖, 链球菌溶血素 S, 和抗淋巴细胞抗体。已知刀豆蛋白 A 和 pHA 只作用于 T 淋巴细胞, 脂多糖只作用于 B 淋巴细胞, 而 PWM 对两种细胞均有作用。

本文所用“淋巴母细胞”也称大淋巴细胞, 淋巴母细胞, 或免疫母细胞, 意指属于出现在淋巴样组织(淋巴节, 脾, 胸腺, 骨髓, 淋巴导管, 扁桃腺等)和血液中的淋巴细胞中的大淋巴细胞的淋巴细胞。

术语“活化的淋巴细胞”指如上述淋巴细胞, 但不止于此。如该术语指受某些刺激活化的淋巴细胞。如上述, 淋巴细胞分 T 细胞, B 细胞和 NK 细胞。T 细胞分 CD4 阳性细胞和 CD8 阳性细胞。故本发明的“活化的淋巴细胞”主要包括活化 T 细胞, 活化 B 细胞, 活化的 NK 细胞, 而活化 T 细胞又包括活化的 CD4 阳性细胞和 CD8 阳性细胞。

基于与抗原呈递细胞呈递的抗原反应, CD4 阳性 T 细胞分泌各种细胞因子, 即时表达这些细胞因子的受体, 增大其自身体积, 开始细胞分裂, 增殖并被活化。活化的 CD4 阳性 T 细胞包括处于该状态的那些。

CD8 阳性 T 细胞与抗原反应时表达 IL-2R。当 IL-2 作用于 IL-2R, 这些细胞分化为 CTL, 具有细胞毒性。当 CTL 遇到相同抗原肽/MHC I 类复合物时, 将破坏其靶细胞以杀死之。当 CD8 阳性 T 细胞分化为 CTL 时, 胞质中颗粒增多。这些颗粒包括各种高分子量蛋白质, 表示为穿孔素。穿孔素类似于补体第五至第九成分组成的 MAC, 可在靶细胞的细胞膜上穿孔。这些颗粒还含有丝氨酸蛋白酶, LT, 和蛋白多糖。若 CD8 阳性细胞受到抗原刺激并分化为 CTL, 将分泌淋巴因子如 IFN  $\gamma$ , LT, TNF 或 IL-2。活化

的 CD8 阳性 T 细胞包括上述状态中的细胞。

T 细胞与血凝素(植物血凝素, PHA)或刀豆蛋白 A (ConA) 反应时显示母细胞形成现象。活化的 T 细胞包括处于此状态的细胞。

B 细胞表达 B7 分子, 刺激辅助 T 细胞表面的 CD28 及 TCR 而使之活化, 使辅助 T 细胞表达 CD40L 或产生淋巴因子。当细胞受到刺激。它们转而增大体积或增殖。活化的 B 细胞包括此状态中的细胞。本发明中, 活化的 B 细胞包括分泌抗体的细胞(抗体分泌型细胞和浆细胞)。

活化的自然杀伤细胞指上述对肿瘤细胞或病毒感染细胞有细胞毒作用的细胞。本发明中, 活化的淋巴细胞包括 ConA 刺激的胞腺细胞。

本文的“活化的淋巴母细胞”包括上述淋巴母细胞经上述“丝裂原”如 ConA 刺激生成的活化的“淋巴母细胞”。

本文的“静息淋巴细胞”在一些情况下指未活化的淋巴细胞, 未接受活化细胞的刺激, 是对比于上述活化的淋巴细胞。

本发明的“基因”包括基因组 DNA 和 cDNA。

“人源”物质在本发明包括分离自人体成分(器官, 组织, 细胞, 体液等)的天然物质, 及用重组 DNA 技术产生的重组产物。若该物质为蛋白质或多肽, 则包括人工蛋白和多肽(其中所含氨基酸序列有一处或更多氨基酸被取代, 缺失或补加)。

本发明的“细胞表面分子”来自哺乳动物, 如人, 大鼠, 小鼠, 豚鼠, 和兔, 较优选来自人, 大鼠或小鼠, 更优选来自人。

特别指出, 本发明的“细胞表面分子”具有至少以下所述特征:

(a) 该细胞表面分子至少在胸腺细胞和丝裂原刺激的淋巴母细胞中表达;

(b) 反应于该细胞表面分子的抗体诱导丝裂原刺激的淋巴母细胞间的相互粘附;

(c) 反应于该细胞表面分子的抗体在有抗 CD3 抗体存在时诱导外周血淋巴细胞增殖;

(d) 该细胞表面分子在其胞外区有表示为苯丙氨酸-天冬氨酸-脯氨酸-脯氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸的部分氨基酸序列; 且

(e) 该细胞表面分子在其胞质区有表示为酪氨酸-甲硫氨酸-苯丙氨酸-甲硫氨酸的部分氨基酸序列。

较优选地，该“细胞表面分子”包含本发明的以下“多肽”。

本发明的“多肽”是组成本发明的上述“细胞表面分子”的。其实例如下：

(1) 在严格条件下与含有 SEQ ID NO:1 核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 所编码的多肽；

(2) 其氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列有 60 % 或更多同源的多肽；

(3) 多肽，具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或与该氨基酸序列实质相同的氨基酸序列(即，组成“人 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物)；

(4) 多肽，具有由相应于 SEQ ID NO:3 的 26 至 625 核苷酸残基的一段核苷酸序列编码的氨基酸序列，或实质上相同于该氨基酸序列的一段氨基酸序列(即，组成“人 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物)；

(5) 多肽，具有由相应于 SEQ ID NO:4 的 35 至 637 核苷酸残基的核苷酸序列编码的氨基酸序列，或与该氨基酸序列实质上相同氨基酸序列(即，组成“大鼠 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物)；

(6) 多肽，具有由相应于 SEQ ID NO:5 的 1 至 603 核苷酸残基的核苷酸序列编码的氨基酸序列，或与该氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列(即，组成“小鼠 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物)；

(7) 多肽，具有由相应于 SEQ ID NO:6 的 35 至 685 核苷酸残基的核苷酸序列编码的氨基酸序列，或与此氨基酸序列实质上相同的氨基酸序列(即，组成“大鼠 JTT-1 抗原突变体”的多肽及其衍生物)；以及

(8) 多肽，具有的氨基酸序列由编码组成本发明的细胞表面分子的多肽的 DNA 所编码，其中该 DNA 导入为国际保藏号 FERM BP-5725 所定义的转化体，或该多肽具有与上述氨基酸序列实质相同的序列(即，组成“人 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物)。

“严格条件”的实例如下：当用 50 或更多个核苷酸的探针，杂交在 0.9 % NaCl 中进行时，50 % 解离温度的标准 ( $T_m$ ) 用以下公式计算，杂交温度亦根据以下公式而定：

$$T_m = 82.3 \text{ } ^\circ\text{C} + 0.41 \times (G + C) \% - 500/n - 0.61 \times \text{甲酰胺} \%$$

(n 指探针的核苷酸数)

$$\text{温度} = T_m - 25 \text{ } ^\circ\text{C}$$

此外,若用 100 或更多核苷酸(G + C 为 40 % 至 50 %)作探针,则应考虑  $T_m$  按下述(1)和(2)变化。

- (1)  $T_m$  下降为每 1 % 错配约 1 °C。
- (2)  $T_m$  下降为每 1 % 甲酰胺降 0.6 至 0.7 °C。

相应地,完全互补链的组的温度条件可按如下设定:

- (A) 65 至 75 °C (未加甲酰胺)
- (B) 35 至 45 °C (有 50 % 甲酰胺时)

不完全互补链的组的温度条件可按如下设定:

- (A) 45-55 °C (不加甲酰胺)
- (B) 35-42 °C (有 50 % 甲酰胺)。

若用 23 或更少核苷酸的探针,温度条件可为 37 °C, 或按以下公式计算:

$$\text{温度} = 2\text{ °C} \times (\text{A} + \text{T 数}) + 4\text{ °C} \times (\text{C} + \text{G 数}) - 5\text{ °C}$$

在此,“实质上相同的氨基酸序列”指包括其氨基酸序列中显示于列表中的多个氨基酸,较优选 1 至 10 个,尤其优选 1 至 5 个被替代,缺失,和/或修饰的多肽,和其氨基酸序列加入了多个氨基酸,较优选 1 至 10 个,尤其优选 1 至 5 个加入到列表中的氨基酸中的多肽,只要该多肽有着与列表中所示氨基酸序列的多肽实质上相同的生物学特点。

氨基酸的这些替代,缺失或插入可按常规方法进行(实验医学:增刊,“遗传工程手册”(1992);等等)。

其实例有,合成寡核苷酸定点诱变(缺口双链体法),经亚硝酸盐或亚硫酸盐处理而随意诱导点突变的点突变,用 *Bal* 31 酶或类似物制备缺失突变的方法。盒式诱变,连接子扫描法,错误掺入法,错配引物法。DNA 片段合成法,等等。

合成寡核苷酸定点诱变(缺口双链体法)可如下进行。将期望诱变的区段克隆进具有琥珀突变的 M13 噬菌体中以制备单链噬菌体 DNA。经限制性内切酶处理使不带琥珀突变的 M13 载体的 RF I DNA 线性化后, DNA 与上述单链噬菌体 DNA 混合,变性,退火从而形成“缺口双链体 DNA”。一段导入了突变的合成寡核苷酸与此“缺口双链 DNA”杂交,用 DNA 多聚酶和 DNA 连接酶制成闭合环状双链 DNA。大肠杆菌 *mutS* 细胞缺乏错配修补活性,用此 DNA 转染。大肠杆菌细胞中无抑制活性的用成熟噬菌体转染,筛选无琥珀

珀突变的噬菌体。

用亚硝酸盐诱导点突变的方法，其原理举例如下。DNA 若经亚硝酸盐处理，碱基脱氨使腺嘌呤变成次黄嘌呤。胞嘧啶变为尿嘧啶而鸟嘌呤变成黄嘌呤。如果脱氨的 DNA 导入细胞，“A:T”和“G:C”分别被“G:C”和“A:T”代替。因为在 DNA 复制中次黄嘌呤，尿嘧啶，和黄嘌呤分别与胞嘧啶，腺嘌呤和胸腺嘧啶形成碱基对。事实上，亚硝酸盐处理过的单链 DNA 片段均与“缺口双链 DNA”杂交，随后突变链经等同于合成寡核苷酸定点诱变的方法(缺口双链法)而分离。

三联体字母或单字母密码用来表示本说明书中的氨基酸，意义如下：  
(Gly/G)甘氨酸，(Ala/A)丙氨酸，(Val/V)缬氨酸，(Leu/L)亮氨酸，(Ile/I)异亮氨酸，(Ser/S)丝氨酸，(Thr/T)苏氨酸，(Asp/D)天冬氨酸，(Glu/E)谷氨酸，(Asn/N)天冬酰胺，(Gln/Q)谷氨酰胺，(Lys/K)赖氨酸，(Arg/R)精氨酸，(Cys/C)半胱氨酸，(Met/M)甲硫氨酸，(Phe/F)苯丙氨酸，(Tyr/Y)酪氨酸，(Trp/W)色氨酸，(His/H)组氨酸，(Pro/P)脯氨酸。

组成上述本发明的“细胞表面分子”的“多肽”为跨膜蛋白，穿透细胞膜，而此“细胞表面分子”由一或两个这样的跨膜多肽组成。

在此，“跨膜蛋白”指通过穿透膜的脂质双层一次或多次的疏水肽段与膜连接的蛋白质，其结构就整体而言，由三个主要区段组成，它们是胞外区，跨膜区，和胞质区，如在许多受体或细胞表面分子中所见一样。这样一个跨膜蛋白以单体，同型二聚体，异二聚体或与另外的具有相同或不同氨基酸序列的链形成的寡聚体形式组成每个受体或细胞表面分子。

“多肽片段”在本发明中是来自本发明上文规定的“多肽”的片段，较优选多肽的胞外区。若有需要，可在该区的 N 末端和/或 C 末端加入 1 至 5 个氨基酸。

在此，“胞外区”指上述跨膜蛋白完整结构中部分结构(部分区段)的全部或部分，其中该部分结构存在于胞外。换言之，它指跨膜蛋白中除去插入膜中的区段(跨膜区)和紧随跨膜区存在于胞内的区段(胞质区)后的区段的全部或部分。

“人免疫球蛋白(Ig)重链恒定区或其部分”在本文中指人源免疫球蛋白重链(H链)的恒定区或 Fc 区，或其一部分。该免疫球蛋白可以是任何类和亚类的任一种免疫球蛋白。特别是，免疫球蛋白的实例有 IgG(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>,

IgG<sub>3</sub>和 IgG<sub>4</sub>), IgM, IgA(IgA<sub>1</sub>和 IgA<sub>2</sub>), IgD 和 IgE。优选免疫球蛋白是 IgG(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>和 IgG<sub>4</sub>), 或 IgM。本发明之特别优选免疫球蛋白实例属于人源 IgG(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>或 IgG<sub>4</sub>)。

免疫球蛋白有 Y 形结构单位, 其中四条链由两条相同的轻链(L 链)和两条相同的重链(H 链)经二硫链(S-S 键)连接而成。轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。

重链恒定区由其氨基酸序列为每类(IgG, IgM, IgA, IgD 和 IgE)和每亚类(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>和 IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub>和 IgA<sub>2</sub>)所固有的某些区域组成。

IgG(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>和 IgG<sub>4</sub>)的重链从 N 末端依次由 VH, CH1 区, 绞链区, CH2 区, 和 CH3 区组成。

相似地, IgG<sub>1</sub>的重链从 N 末端依次由 VH, C<sub>γ1</sub>1 区, 绞链区, C<sub>γ1</sub>2 区, C<sub>γ1</sub>3 区组成。IgG<sub>2</sub>重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>γ2</sub>1 区, 绞链区, C<sub>γ2</sub>2 区, C<sub>γ2</sub>3 区。IgG<sub>3</sub>的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>γ3</sub>1 区, 绞链区, C<sub>γ3</sub>2 区, C<sub>γ3</sub>3 区。IgG<sub>4</sub>的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>4</sub>1 区, 绞链区, C<sub>4</sub>2 区, C<sub>4</sub>3 区。

IgA 的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>α1</sub>1 区, 绞链区, C<sub>α1</sub>2 区, C<sub>α1</sub>3 区。

类似地, IgA<sub>1</sub>的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>α1</sub>1 区, 绞链区, C<sub>α1</sub>2 区, C<sub>α1</sub>3 区。IgA<sub>2</sub>的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>α2</sub>1 区, 绞链区, C<sub>α2</sub>2 区, C<sub>α2</sub>3 区。

IgD 的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>δ1</sub>1 区, 绞链区, C<sub>δ1</sub>2 区, C<sub>δ1</sub>3 区。

IgM 的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>μ1</sub>1 区, C<sub>μ1</sub>2 区, C<sub>μ1</sub>3 区, C<sub>μ1</sub>4 区, 而无 IgG, IgA 和 IgD 中可见的绞链区。

IgE 的重链自 N 末端依次为 VH, C<sub>ε1</sub>1 区, C<sub>ε1</sub>2 区, C<sub>ε1</sub>3 区和 C<sub>ε1</sub>4 区, 而无 IgG, IgA 和 IgD 中可见的绞链区。

例如, 若用木瓜蛋白酶处理 IgG, 在较靠 N 末端位于绞链区中二硫键之外的地方被切断, 此时二硫链所连接的两条重链产生两个同源的 Fab 其中由 VH 和 CH1 组成的重链片段与一条轻链经二硫链连接, 和一个 Fc, 两条同源的由绞链区, CH2 区, 和 CH3 区组成的重链片段经二硫键连接(见“免疫学图谱”, 原装第 2 版, Nankodo. 65-75 页(1992)); “最新医学科学集萃 ‘免疫系统的识别机制’”, Nankodo, 4-7 页(1991); 等等)。

即, 本发明的“免疫球蛋白重链恒定区的一部分”指具有上述结构特征的免疫球蛋白重链恒定区的一部分, 且优选地是不含 C1 区的恒定区, 或

Fc 区。特别地，其实例是由 IgG, IgA 和 IgD 之每一种的绞链区, C2 区和 C3 区组成的区域, IgM 和 IgE 中每种的 C2 区, C3 区和 C4 区组成的区域。其中一个特别优选实例为人源 IgG1 的 Fc 区。

本发明的“融合多肽”指由组成本发明的上述“细胞表面分子”的“多肽”的胞外区和“人免疫球蛋白(Ig)重链恒定区或其一部分”组成的。优选地是由本发明的多肽的胞外区和人 IgG 重链恒定区的一部分组成的融合多肽, 特别优选地由本发明的多肽的胞外区与人 IgG 重链的绞链区, CH2 区, CH3 区组成的区域(Fc)组成的融合多肽。此外, 来自人, 小鼠, 或大鼠(优选人)的多肽较优选为本发明的多肽。

本发明的融合多肽的优点是纯化十分简便, 只需使用利用蛋白 A 性质的亲和柱层析, 因为蛋白 A 可特异性结合免疫球蛋白片段, 而本发明的融合多肽具有一种免疫球蛋白(如上述的 IgG)恒定区的一部分如(Fc)作为融合伙伴。而且, 由于可提供抗各种免疫球蛋白 Fc 的抗体, 可简便地用这些抗体对融合多肽进行免疫检测。

本发明的多肽, 多肽片段, 融合多肽不仅可用下文所述重组 DNA 技术生产, 亦可用本领域熟知的方法如化学合成法和细胞培养法, 或它们的改进方法生产。

本发明的“基因”含有编码上述本发明的多肽或多肽片段的 DNA, 并包括具有编码本发明的多肽或多肽片段的核苷酸序列的任何基因。

基因的实例有编码下文所提及多肽或多肽片段的那些基因。

(1) 多肽, 是由在严格条件下与包括 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列的 DNA 杂交的 DNA 所编码;

(2) 多肽, 具有与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列有 60 % 或更多同源的氨基酸序列;

(3) 多肽, 具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列或实质上相同于该氨基酸序列的氨基酸序列(即组成“人 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物);

(4) 多肽, 具有由对应于 SEQ ID NO: 3 的 26 至 625 核苷酸残基的核苷酸序列编码的氨基酸序列, 或实质上相同于这段氨基酸序列的氨基酸序列(即组成“人 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物);

(5) 多肽, 具有由 SEQ ID NO: 4 的 35 至 637 核苷酸残基相应的核苷酸序列编码的氨基酸序列或实质上相同于它的序列的氨基酸序列(即组成“大

鼠 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物);

(6) 多肽, 具有由 SEQ ID NO: 5 的 1 至 603 核苷酸残基相应的核苷酸序列编码的氨基酸序列, 或与该序列实质相同的氨基酸序列(即组成“小鼠 JTT-1 抗原”的多肽及其衍生物);

(7) 多肽, 具有由相应于 SEQ ID NO: 6 的 35 至 685 核苷酸残基的核苷酸序列编码的氨基酸序列, 或实质上相同于该序列的氨基酸序列(即组成“大鼠 JTT-1 抗原突变体”的多肽及其衍生物); 以及

(8) 多肽, 具有由编码组成本发明的细胞表面分子的多肽的 DNA 编码的氨基酸序列, 其中该 DNA 导入由国际保藏号 FERM BP-5725 所定义的转化体, 或具有实质上相同于该氨基酸序列的氨基酸序列(即组成“人 JTT-1 抗原”)的多肽及其衍生物)。

此处, “实质上相同的氨基酸序列”意义如上文所规定。

本发明的基因的具体实例是下述的 DNA 或其片段:

(1) DNA, 包含 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列, 及与该 DNA 在严格条件下杂交的 DNA;

(4) DNA, 包含相应于 SEQ ID NO: 3 的 26 至 625 核苷酸残基的核苷酸序列;

(5) DNA, 含相应于 SEQ ID NO: 4 的 35 至 637 核苷酸残基的核苷酸序列;

(6) DNA, 含相应于 SEQ ID NO: 5 的 1 至 603 核苷酸残基的核苷酸序列;

(7) DNA, 含相应于 SEQ ID NO: 6 的 35 至 685 核苷酸残基的核苷酸序列;

(8) DNA, 编码组成本发明的细胞表面分子的多肽, 其中此 DNA 导入由国际保藏号 FERM BP-5725 所定义的转化体。

编码免疫球蛋白重链恒定区的一部分(为本发明的融合多肽的一部分)的 DNA 可以是 cDNA, 或由每个外显子间内含子组成的基因组 DNA(编码如, CH1 区, 绞链区, CH2 区, CH3 区, CH4 区等的 DNA)。

本发明之 DNA 包括任意密码子组成的任意 DNA, 只要这些密码子编码的是同样的氨基酸。

本发明的 DNA 可经任何方法获得。如, 从 mRNA 制备互补 DNA(cDNA), 从基因组 DNA 制备, 化学合成, 用 RNA 或 DNA 作模板经 PCR 扩增所得, 及

将这些方法适当组合而构建。

编码本发明之多肽的 DNA 可用一般方法获得，如从编码本发明之多肽的 mRNA 克隆 cDNA，分离基因组 DNA 并切割，化学合成等等。

(1) cDNA 可从编码本发明之多肽的 mRNA 克隆而得，例如通过如下方法：

首先，编码本发明之细胞表面分子(多肽)的 mRNA 可从能表达并生产本发明之细胞表面分子(多肽)的组织或细胞(如经 ConA 刺激的胸腺细胞或脾衍生的淋巴母细胞)而制备。mRNA 可用已知方法分离总 DNA 来制备，方法如硫氰酸胍法(Chirgwin, J.M. 等, 生物化学, 18 卷, 5294 页, 1979), 热酚法, 或 AGPC 法, 再用 Oligo-dT 纤维素或 poly-U 葡聚糖进行亲和层。

然后, 用所得 mRNA 为模板通过熟知的方法用逆转录酶合成 cDNA, 如 Okayama 等的方法(分子细胞生物学, 2 卷, 161 页(1982); 同一杂志, 3 卷, 280 页(1983)), 或 Hoffman 等的方法(基因, 25 卷 263 页(1983)), 再反转成双链 cDNA。用带此 cDNA 的质粒载体, 噬菌体载体, 或 Cosmid 载体转化大肠杆菌, 或在体外包装后转染大肠杆菌制备出 cDNA 文库。

本发明所用质粒载体不受限制, 只要它们可在宿主中复制并维持。任何可在宿主中复制的噬菌体载体均可应用。常用的克隆载体如 pME 18S,  $\lambda$ ZAPII(1 ZAPII), pUC 19,  $\lambda$ gt 10,  $\lambda$ gt 11 等。用载体进行如下免疫学筛查。若载体带有可在宿主体内表达本发明之多肽的基因的启动子则较优选应用。

cDNA 可插入质粒, 方法如 Maniatis 等的(分子克隆, 实验室手册, 第二版, 冷泉港实验室, p.1.53, 1989)。cDNA 可插入噬菌体载体, 方法如 Hyunh 等(DNA 克隆, 实用方法, 1 卷, 49 页(1985))。这些方法可用商品化克隆试剂盒(如 Takara Shuzo 的产品)简便地完成。这样所得的重组质粒或噬菌体载体被导入适当的宿主细胞如原核细胞(如, 大肠杆菌: XL1Blue MRF', DH5 $\alpha$ , HB101, MC 1061/P3, 等)。

将质粒导入宿主的方法举例如氯化钙法, 氯化钙/氯化铷法, 见分子克隆实验室手册(第二版, 冷泉港实验室, p.1.74, (1989)), 以及电穿孔法。将噬菌体载体导入宿主细胞的方法如将噬菌体 DNA 体外包装后等入生长的宿主。体外包装可简单地用商品试剂盒完成(如 Stratagene 或 Amersham 的产品)。

编码本发明之多肽的 cDNA 可从用上述方法制备的 cDNA 文库中用组合总 cDNA 筛选法分离。

例如,含所需 cDNA 的克隆可用已知菌落杂交法(Crunstein 等,美国国家科学院院刊,72 卷,3961 页(1975))筛选,或用蚀斑杂交法(分子克隆实验室手册,第二版,冷泉港实验室,p.2.108(1989))以  $^{32}\text{P}$  标记的化学合成的寡核苷酸(相应于本发明之多肽的氨基的序列)为探针。另外,带有编码本发明之多肽中特殊区段的 DNA 片段的克隆可用合成的 PCR 引物经 PCR 扩增该区段而筛选得到。

应用经 cDNA 表达载体(如  $\lambda$ ZAPII 噬菌体载体)制备的 cDNA 文库时,所需克隆可用抗原-抗体反应来筛选,所用抗体针对的是本发明的多肽。当有多个克隆需筛选时,较优选用 PCR 为筛选方法。

如此所得 DNA 的核苷酸序列或用 Maxam-Gilbert 法(Maxam 等,美国国家科学院院刊,74 卷,560 页(1977))或用 M13 噬菌体比双脱氧核苷酸合成链终止法(Sanger 等,美国国家科学院院刊,74 卷,5463-5467 页(1997))测定。编码本发明的多肽的基因的全部或部分的方法是用限制性内切酶切割上述所获克隆等而获得的。

(2) 编码本发明之多肽的 DNA 可分离自衍生于表达上述本发明多肽的细胞的基因组 DNA,方法如下:

这些细胞较优选用 SDS 或蛋白激酶 K 溶解,经反复苯酚抽提使 DNA 去蛋白。RNA 较优选用核糖核酸酶消化。所得 DNA 用适当的限制酶作部分消化,所得 DNA 片段用适当的噬菌体或 cosmid 质粒扩增以产生文库。然后,检测带所需序列的克隆,如用放射性标记的 DNA 探针,编码本发明的多肽的基因的全部或部分可从克隆中经限制酶切割等方法获得。

编码人源多肽的 cDNA 获取方法如下;制备其中导入了人基因组 DNA(染色体 DNA)的 Cosmid 文库(“实验室手册:人类基因图谱”,Maruzen 出版),含所需蛋白编码区的 DNA 的阳性克隆经筛选该 Cosmid 文库可获得。然后,上述 cDNA 文库用阳性克隆经切割成的编码 DNA 密码作探针进行筛选以制备人 cDNA。

(3) 基于 SEQ ID NO: 1, 3, 4, 5, 或 6 的核苷酸序列,还可用常规方法化学合成本发明的 DNA。

本发明还涉及包含编码本发明的上述细胞表面分子(多肽)的 DNA 的重

组载体。该重组载体不受限制，只要它能在各种原核和/或真核宿主中复制和维持或能自我复制。本发明的载体包括质粒载体和噬菌体载体。

重组载体的制备可简单地将编码本发明多肽的 DNA 与本领域内可用于重组的载体(质粒 DNA 或噬菌体 DNA)按常规方法连接而成。用于重组的载体特别有大肠杆菌质粒如 pBR322, pBR325, pUC12, pUC13 和 pUC19, 酵母质粒如 pSH19 和 pSH15, 枯草杆菌质粒如 pUB110, pTP5, 和 pC194。噬菌体的实例有 $\lambda$ 噬菌体, 动物或昆虫的病毒(pVL 1393, Invitragen)如逆转录病毒, 痘苗病毒, 及核型多角体病毒。

表达载体有用于表达 DNA 所编码的本发明的多肽, 并产生该多肽。表达载体不受限, 只要它能在各种原核和/或真核宿主细胞中表达该基因所编码的本发明的多肽并生产该蛋白。其实例有 pEFneo(美国国家科学院院刊, 91 卷, 158-162 页(1994)), pEF-BOS(核酸研究, 18 卷, 5322 页(1990)), pME 18S(实验医学: 增刊, “基因工程手册”(1992)), pMAL C2, 等等。

当细菌, 尤其是大肠杆菌被用作宿主细胞时, 表达载体通常至少由包括启动子/操纵子区, 起始密码, 编码本发明多肽的 DNA, 终止密码, 终止子区, 及复制子组成。

当用酵母, 动物细胞, 或昆虫细胞作宿主时, 表达载体的优选至少由启动子, 起始密码, 编码本发明多肽的 DNA, 终止密码组成。还可能包含编码信号肽的 DNA, 增强子序列, 编码本发明多肽的基因的 5'-和 3'-非翻译区, 剪切连接, 多聚腺嘌呤化位点可选择标记区, 及复制子。如有必要, 该表达载体还可包含常用的用于基因扩增的基因(标志)。

细菌中表达本发明的多肽的启动子/操纵子区包括启动子, 操纵子和 Shine-Dalgarno(SD)序列(如 AAGG)。例如, 若宿主为大肠杆菌, 则优选包括 Trp 启动子, lac 启动子, recA 启动子,  $\lambda$ PL 启动子, Ipp 启动子, tac 启动子或其他类似启动子。酵母中表达本发明之多肽的启动子实例有 PH05 启动子、PGK 启动子, GAP 启动子, ADH 启动子等等。若宿主为芽孢杆菌, 其实例有 SL01 启动子, SP02 启动子, penP 启动子等。当宿主是诸如哺乳动物是真核细胞时, 其实例是 SV 40 衍生的启动子, 逆转录病毒启动子, 热休克启动子, EF 启动子等等, 优选 SV-40, SR $\alpha$ , 逆转录病毒衍生的启动子。当然, 启动子不限于上述实例。此外, 应用增强子将使表达更有效。

优选的起始密码如甲硫氨酸密码(ATG)。

常用的终止密码(如TAG, TGA, TAA等)均在此用作终止密码。

常用的天然或合成终止子也用于作终止子区。

复制子意指可在宿主细胞中复制全长DNA序列的DNA, 包括天然质粒, 人工修饰质粒(从天然质粒制备的DNA片段), 合成质粒等。优选质粒的实例有用于大肠杆菌的pBR322或其人工衍生物(用适当限制酶处理所得DNA片段), 用于酵母的酵母2 $\mu$ 质粒或酵母染色体DNA, 用于哺乳动物细胞的pEFneo, pME18S, pRSVneo ATCC 37198, pSV2dhfr ATCC 37145, pdBPV-MMTneo ATCC 37224, pSV2neo ATCC 37149等。

本领域常用的增强子序列, 多聚腺苷酸化位点和剪接连接, 如SV40衍生的那些, 均用于此。

可按常规方法使用可选择性标志物。其实例有抗生素耐药基因, 如四环素、新霉素、氨基青霉素、卡那霉素、及胸苷激酶基因。

用于基因扩增的基因实例有二氢叶酸还原酶、(DHFR)基因、胸苷激酶基因、新霉素耐药基因、谷氨酸合成酶基因、腺苷脱氨酶基因、鸟氨酸脱羧酶基因、潮霉素-B-磷酸转移酶基因, 天冬氨酸转氨甲酰酶基因。

本发明的表达载体可通过持续、循环地连接至少上述启动子, 起始密码, 编码本发明之多肽的DNA(基因), 终止密码, 及终止子区至合适的复制子上而制备。若有需要, 适当的DNA片段(如连接子, 其它限制酶位点)均可用诸如限制酶消化或以T4 DNA酶连接的常用方法而使用。

本发明的转化体可通过向宿主细胞导入上述表达载体而制备。

本发明所用宿主细胞不限, 只要能兼容上述表达载体并可被转化。其实例如天然细胞或人工建成的重组细胞, 均常用于本发明的技术领域(如细菌(埃希氏菌和芽孢杆菌), 酵母(酵母属, 毕赤酵母属等), 动物细胞, 或昆虫细胞)。

优选大肠杆菌或动物细胞。具体例子有大肠杆菌(DH5 $\alpha$ , XL1Blue MRF', TB1, HB101等), 小鼠衍生的细胞(COP, L.C127, Cp210, NS-1, N2H3T3, 等), 大鼠源细胞, 仓鼠源细胞(BHK, CHO-K1, CHO等), 猴源细胞(cos1, cos3, cos7, cv1, Velo, 等), 及人源细胞(HEK 293, HeLa, 二倍体成纤维细胞衍生细胞, 黑色素瘤, Namalwa等)。

表达载体可用已知方法导入(转化(转导))宿主细胞。

若宿主为细菌(大肠杆菌,枯草杆菌等)时,转化可按Cohen等的方法(美国国家科学院院刊 69 卷 2110 页(1972)),原生质体法(分子基因遗传学, 18 卷, 111 页(1979)),或感受态法(分子生物学杂志, 56 卷, 209 页(1971)),若宿主为酿酒酵母,转化可用Hinnen等人的方法(美国国家科学院院刊 75 卷, 1927 页(1978))或锂法(细菌学杂志, 153 卷, 163 页(1983)),若宿主为动物细胞用Graham法(病毒学, 52 卷, 456 页(1973)),若宿主为昆虫细胞,用Summers等人的方法(分子细胞生物学, 3 卷, 2156-2165 页(1983))。

生产本发明之多肽的方法可以是在营养培养基中培养包含上述制备的表达载体的转化体(下文中该术语包括转导子)。

营养培养基较优选包含宿主细胞(转化体)生长所必需的碳源,无机氮源,或有机氮源。碳源如葡萄糖、葡聚糖、可溶性淀粉及蔗糖、无机或有机氮源如铵盐、硝酸盐、氨基酸、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、肉浸汁、大豆糕,和马铃薯浸出汗。若有需要,还可包含其它营养(如,无机盐(如氯化钙,磷酸二氢盐,氯化镁)),维生素,抗生素(如四环素、新霉素、氯苄青霉素、卡那霉素等)。

培养方法本领域熟知。所选培养条件如温度、培养基的酸碱度、培养时间使本发明的多肽超量产生。

下文例举了根据不同宿主细胞所选用的特殊培养基和培养条件,但并非限制。

若宿主为细菌、放线菌、酵母,丝状真菌,适于用含上述营养源的液体培养基。优选pH5至8的培养基。

若宿主为大肠杆菌,优选培养基有LB培养基和M9培养基(Miller等,实验分子遗传学,冷泉港实验室,431页(1972))。用这些培养基,常于14至43℃培养约3至24小时,若有必要,通气并搅拌。

若宿主为芽孢杆菌,则根据需要于30至40℃通气并搅拌培养约16至96小时。

若宿主为酵母,培养基可选Burkholder基本培养基(Bostian,美国国家科学院院刊,77卷,4505页(1980))。培养基pH值较优选5至8。根据需要于20至35℃通气并搅拌培养14至144小时。

若宿主为动物细胞,可选MEM培养基,内含5至20%胎牛血清(科学,

122 卷, 501 页(1952)), DMEM 培养基(病毒学, 8 卷, 396 页(1959)), RPMI 1640 培养基(美国医学协会杂志, 199 卷, 519 页(1967)), 199 培养基(Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 173 卷, 1 页(1950))。培养基 pH 值约 6 至 8。根据需要于约 30 至 40 °C 通气搅拌培养约 15 至 72 小时。

若宿主为昆虫细胞, 可用例如含胎牛血清的 Grace's 培养基(美国国家科学院院刊, 82 卷, 8404 页(1985))。pH 优选约 5 至 8。根据需要于约 20 至 40 °C 通气搅拌培养 15 至 100 小时。

上述转化体的培养, 尤其动物细胞。可超量表达本发明之多肽于细胞表面。

本发明的多肽可生产成可溶性肽段如胞外区片段, 方法是用上述以编码胞外区或各区的 DNA 制备转化体, 并培养转化体使之将可溶性肽分泌于培养上清中。此外, 本发明的融合多肽可用类似的方法制备。

即, 过滤或离心所获培养物得到培养滤液(上清), 从中纯化并分离本发明的多肽或多肽片段, 方法采用常用于纯化和分离天然或合成蛋白质的常规方法。

分离及纯化法实例有利用溶解度的方法, 如盐析法和溶剂沉淀法, 利用分子量差异的方法如透析, 超滤, 凝胶过滤, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 利用电荷的方法如离子交换层析和羟基磷灰石层析, 利用特异性亲和的方法如亲和层析, 利用疏水性差异的方法如反相高效液相层析, 及利用等电点差异的方法如等电聚焦。

若本发明之多肽或多肽片段存在于所培养转化体的周质或胞质, 首先, 用常规方法如过滤或离心并悬浮于适当缓冲液的方法收获真菌菌体或细胞, 经超声破碎、溶酶体法、冻融法等方法破坏细胞壁和/或细胞膜等之后, 含本发明之多肽的膜部分用诸如离心或过滤的方法获得。用去污剂如 Triton-X100 溶解膜部分获得粗提物。最后, 用上文举例的常规方法从粗提物中分离及纯化多肽或多肽片段。

“转基因小鼠”在本发明中指这样一种转基因小鼠, 其中按上述制备的来源于除小鼠以外的动物(非自身)编码本发明多肽的 DNA 已整合在该小鼠的内源基因位点上。该转基因小鼠在其体内表达并分泌非自身多肽。

转基因小鼠可按常规方法制备(如见“动物细胞实验最新手册”, LIC 出版, 第 7 章, 361-408 页, (1990))。

具体地，如用表达载体转化得自正常小鼠胚胎的胚胎干细胞 ES 细胞均，该载体基因中可操作性插入有编码本发明之人源多肽(即“人 JTT-1 抗原”)的基因。ES 细胞的内源基因中整合了编码本发明的人源多肽的基因，用常规方法筛选。然后，所选 ES 细胞微注射入来自另一正常小鼠 Pro 受精卵胚泡(美国国家科学院院刊，77 卷，12 期，7380-7384 页(1980)；美国专利号 4,873,191)。该胚泡移植入了另一正常小鼠(养母)的子宫。然后，养母小鼠生出建立者(founder)小鼠(子代小鼠)。将建立者(founder)小鼠与正常小鼠交配，获得异源转基因小鼠。将异源转基因小鼠相互交配，根据孟德尔定律获得同源转基因小鼠。

本发明的“基因敲出小鼠”是其编码本发明之小鼠源多肽(即“小鼠源 JTT-1 抗原”)的内源基因已被基因敲出(灭活)。可用例如阳性阴性选择法制备，其中应用了同源重组(美国专利号 5,464,764；5,487,992；5,627,059，美国国家科学院院刊 86 卷，8932-8935 页(1989)；自然，342 卷，435-438 页(1989)；等等)。

“抗体”在本发明中可以是多克隆抗体(抗血清)或单克隆抗体(单抗)，优选单抗。

特别是可与上述本发明之多肽或多肽片段反应(对抗，结合)的抗体。

本发明的抗体可以用抗原免疫接种哺乳动物而得的天然抗体，其中哺乳动物如小鼠、大鼠，仓鼠，豚鼠，兔，该抗原如表达本发明之“细胞表面分子”的细胞(天然细胞，细胞系，肿瘤细胞等)，在其表面超表达在该细胞表面用重组 DNA 技术制备的本发明之多肽或细胞表面分子的转化体，或本发明的“多肽片段”或“融合多肽”。本发明之抗体还包括可用重组 DNA 技术生产的嵌合抗体和人化抗体(CDR-移植抗体)，可用产生人类抗体的转基因小鼠生产的人类抗体。

单抗包括具有 IgG, IgM, IgA, IgD, 或 IgE 中任一同种型的那些，优选 IgG 或 IgM。

本发明的多克隆抗体(抗血清)和单克隆抗体可用已知方法制备。即，用如上述某种抗原免疫接种哺乳动物，必要时可加弗氏佐剂。该哺乳动物优选小鼠，大鼠，仓鼠，豚鼠，兔，猫，狗，猪，山羊，马或牛，或更优选小鼠，大鼠，仓鼠，豚鼠，或兔。

多克隆体可从如此免疫接种的动物的抗血清中获得。此外，单抗如下

生产。用获自如此接种动物所得产抗体细胞及不产自身抗体的骨髓瘤细胞的产抗体细胞制备杂交瘤。克隆杂交瘤，筛选对用于免疫接种哺乳动物的抗原有特异亲和力的单抗生产克隆。

具体地，该单抗可如下生产。用上述抗原作免疫原，对非人类哺乳动物，特别是小鼠，大鼠，仓鼠，豚鼠或兔，较优选小鼠，大鼠或仓鼠(包括为生产其它动物抗体而产生的转基因小鼠如下文中产生人类抗体的转基因小鼠)，经皮下，肌肉，静脉，脚掌或腹膜内注射或植入一次或多次，完成免疫接种(如有必要，抗原配合弗氏佐剂)。通常，初次免疫接种后每隔 1 至 14 天再接种 1 至 4 次。末次接种的约 1 至 5 天后可得产抗体细胞。免疫接种的频率和时间间隔可根据所用免疫原的特点适当安排。制备分泌单抗的杂交瘤可用 Kohler 及 Milstein 的方法(自然, 256 卷, 495-497 页(1975))或其修改方法。即，用上述已免疫接种的非人哺乳动物的脾。淋巴结，骨髓或扁桃体(优选脾)的产抗体细胞与无产生自身抗体能力的优选地来自哺乳动物如小鼠，大鼠，豚鼠，仓鼠，兔或人，或更优选小鼠，大鼠，或人的骨髓瘤细胞融合以制备杂交瘤。

例如，小鼠源骨髓瘤 P3/X63-AG8.653(653)，P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1)，P3/X63=Ag8.U1(P3U1)，SP2/0-Ag14(Sp2/0, Sp2)，PAI, F0，或 BW 5147，大鼠源骨髓瘤 210RCY3-Ag.2.3，或人源骨髓瘤 U-266AR1，GM 1500-6TG-A1-2，UC 729-6，CEM-AGR，D1R11，或 CEM-T15 可用作该细胞融合中的骨髓瘤。

筛选产单抗的杂交瘤克隆方法可以是培养杂交瘤于如微滴板上，对发现有杂交瘤生长的各孔测培养上清对上述免疫接种所用免疫原的反应性，所用方法如酶免疫试验(如 RIA 和 ELISA)。

杂交瘤单抗可产生于通过培养杂交瘤于体外或体内如小鼠，大鼠，豚鼠，仓鼠，兔，较优选小鼠或大鼠。更优选小鼠的腹水中，从最后的培养上清或哺乳动物腹水中分离抗体。

体外培养杂交瘤可根据要培养细胞的特点，研究目的及培养法和各种条件，用已知营养培养基或衍生于已知基础培养基的任何营养型培养基培养，维持，并贮存杂交瘤以便在培养上清中产生单抗。

基础培养基的例子有低钙浓度培养基如 Ham' F12 培养基，MCDB 153 培养基，或低钙浓度 MEM 培养基，还有高钙浓度培养基如 MCDB 104 培养基，

MEM 培养基, DMEM 培养基, 1640 培养基, ASF 104 培养基或 RD 培养基。基础培养基可根据目的包含如血清、激素, 细胞因子和/或各种无机或有机物。

从上述培养上清或腹水中分离并纯化单抗可用饱和硫酸铵沉淀, 优球蛋白沉淀法, 己酸法, 辛酸法, 离子交换层析(DEAE 或 DE52), 抗免疫球蛋白柱或蛋白 A 柱的亲和层析。

本发明之单抗的优选实例如下。

(1) 单抗, 可针对有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多肽, 其衍生的多肽片段, 或由该多肽构成的人源细胞表面分子起反应;

(2) 单抗, 可针对本发明的多肽, 其衍生的多肽片段, 或由该多肽构成的细胞表面分子起反应, 其中单抗在丝裂原刺激的淋巴母细胞上的作用实质上等同于由国际保藏号 FERM BP-5707 所鉴定的杂交瘤所产生的单抗在丝裂原刺激的大鼠淋巴母细胞上的作用;

(3) 单抗, 可针对本发明的多肽, 其衍生的多肽片段, 或由该多肽组成的细胞表面分子, 其中该单抗对丝裂原刺激的淋巴母细胞的作用实质上等同于由国际保藏号 FERM BP-5708 所鉴定的杂交瘤所产单抗对丝裂原刺激的大鼠淋巴母细胞的作用。

此外, 本发明的单抗包括由国际保藏号 FERM BP-5707 或 FERM BP-5708 所鉴定的杂交瘤所产单抗。

本发明的“嵌合单抗”是用遗传工程制备的单抗, 特指嵌合的抗体诸如小鼠/人嵌合单抗, 其可变区衍生自非人哺乳动物(小鼠、大鼠、仓鼠等)的免疫球蛋白而其恒定区来自人免疫球蛋白。

人免疫球蛋白可变区具有生每种同种型如 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM、IgA, IgD 和 IgE 所固有的氨基酸序列。本发明之重组嵌合单抗的恒定区可以是任何同种型的人免疫球蛋白的。优选是人 IgG 的恒定区。

本发明的嵌合单抗可如下生产。无需说, 该生产方法并非限制与此。

小鼠/人嵌合单抗可参照实验医学; 增刊, 卷 1.6, 10 期(1988); 已审查公布的日本专利申请(JP-B)号 Hei 3-73280 制备。即将活化 VH 基因下游的 CH 基因与活化 VL 基因下游的 CL 基因可操作插入相同或不同载体表达, 其中 CH 基因(编码 H 链恒定区的 C 基因)得自编码人免疫球蛋白的 DNA;

活化 VH 基因(重排的编码 H 链可变区的 VDJ 基因)得自编码小鼠单抗的 DNA, 该单抗分离自产生该单抗的杂交瘤, CL 基因(编码 L 链恒定区的 C 基因)得自编码人免疫球蛋白的 DNA, 活化的 VL 基因(重排的编码 L 链可变区的 VJ 基因)得自小鼠编码单抗的 DNA, 该单抗分离自杂交瘤。随后用该表达载体转化宿主细胞, 再培养该转化体。

具体地, DNA 首先用常规方法抽提自小鼠单抗生成的杂交瘤。再用适当的限制酶(如 EcoRI 和 HindIII)消化, 电泳(用如 0.7% 琼脂糖凝胶), 用 Southern 印迹分析。电泳胶经染色, 如溴化乙锭染色并摄相, 胶中显示标志物位置, 用水洗两次, 在 0.25M HCl 中浸泡 15 分钟。然后, 将胶浸于 0.4N NaOH 溶液温和搅拌 10 分钟。DNA 用常规方法转移 4 小时至滤膜上。滤膜重新用  $2 \times$  SSC 覆盖并洗两次。滤膜充分干燥后, 于 75 °C 烘烤 3 小时。再用  $0.1 \times$  SSC/1% SDS 于 65 °C 将滤膜处理膜 30 分钟。然后, 浸于  $3 \times$  SSC/0.1% SDS。所得滤膜用预杂交溶液在塑料袋中于 65 °C 处理 3 至 4 小时。

下一步, 向塑料袋中加入  $^{32}\text{P}$  标记的探针 DNA 和杂交溶液 65 °C 反应 12 小时, 随后滤膜在适宜盐浓度, 反应温度和时间(如  $2 \times$  SSC-0.1% SDS, 室温 10 分钟)清洗。将滤膜放入有  $2 \times$  SSC 的塑料袋中, 封袋后进行放射自显影。

用上述 Southern 印迹法鉴别重排的编码小鼠单抗 H 链和 L 链的 VDJ 基因和 VJ 基因。用蔗糖密度梯度离心分离含有所鉴别 DNA 片段的区域, 插入噬菌体载体(如 charon 4A, charon 28,  $\lambda$ EMBL 3,  $\lambda$ EMBL 4 等)。大肠杆菌(如 LE 392, MM 539 等)用该噬菌体载体转化以产生基因组文库。用蚀斑杂交筛选该基因组文库, 方法如 Benton-Davis 方法(科学, 196 卷, 180-182 页(1977)), 用适当探针(H 链 J 基因, L 链(K)J 基因等)以获得含重排的 VDJ 基因或 VJ 基因的阳性克隆。制所得克隆的限制酶图谱并测定其核苷酸序列, 确证所得基因中含有所期望的重排 VH (VDJ) 基因或 VL (VJ) 基因。

用于嵌合的人 CH 基因和人 CL 基因单独分离。如, 当嵌合抗体用人 IgG1 产生时, C $\gamma$ 1 基因作为 CH 基因被分离, CK 基因作为 CL 基因被分离。这些基因可从人基因文库中分离, 用分别相应于人 C $\gamma$ 1 基因和人 CK 基因的小鼠 C $\gamma$ 1 基因和小鼠 CK 基因作探针, 利用小鼠免疫球蛋白基因和人免疫球蛋白基因核苷酸序列的高度同源性。

具体地, 包含人 CK 基因和一个增强子区的 DNA 片段分离自人类  $\lambda$ Charon

4A Hae III-AluI 基因组文库(细胞, 15 卷, 1157-1174 页(1978)), 探针为, 如, 克隆 Ig146 的 3kb HindIII-BamHI 片段(美国国家科学院院刊 75 卷, 4709-4713 页(1978))和克隆 MEP 10 的 6.8kb EcoRI 片段(美国国家科学院院刊, 78 卷, 474-478 页(1981)).此外, 如人胚肝细胞 DNA 用 HindIII 消化并经琼脂糖凝胶电泳分离后, 一个 5.9kb 的片段被插入  $\lambda$  788, 再用上述探针就分离到人 C $\gamma$ 1 基因。

用如此获得的小鼠 VH 基因, 小鼠 VL 基因, 人 CH 基因和人 CL 基因, 并考虑启动子区和增强子区, 就可用常规方法用合适的限制酶和 DNA 连接酶将人 CH 基因插入小鼠 VH 基因的下游, 并将人 CL 基因插入小鼠 VL 基因下游, 最终进入诸如 pSV2gpt 或 pSV2neo 之类的表达载体。在这种情况下, 小鼠 VH 基因/人 CH 基因的嵌合基因, 小鼠 VL 基因/人 CL 基基因的嵌合基因可分别插入同一个或不同的表达载体。

如此制备的插入了嵌合基因的表达载体被导入不产生抗体的骨髓瘤如 P3X63·Ag8·653 细胞或 SP 210 细胞, 方法有原生质体融合法, DEAE-葡聚糖法, 磷酸钙法或电穿孔法。将转化体培养在与插入表达载体的耐药基因相应的药物培养基中进行筛选, 而获得产生预期嵌合单抗的细胞。

从如此筛选到的抗体生成细胞的培养上清可获得预期嵌合单抗。

本发明的“人化单抗(CDR-移植抗体)”是经遗传工程所制单抗, 并特指人化的单抗, 其中超变区的互补决定区部分或全部来自非人哺乳动物(小鼠, 大鼠, 仓鼠等)单抗的超变区互补决定区, 可变区的框架区来自人免疫球蛋白的可变区框架区, 恒定区来自人免疫球蛋白的恒定区。

超变区的互补决定区在抗体可变区的超变区中, 指三个直接互补结合抗原的区域(互补决定残基, CDR 1, CDR 2 和 CDR 3)。可变区的框架区指位于三个互补决定区上游、下游或之间的 4 个相当保守区(框架区 FR1, FR2, FR3 和 FR4)。

换句话说, 人化单抗指其完整区域中除了非人哺乳动物源的单抗超变区的互补决定区部分或全部被其相应的源于人免疫球蛋白区域取代的那些。

源于人免疫球蛋白恒定区有固有于各个同种型如 IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD 和 IgE 中的氨基酸序列。本发明中人化单抗的恒定区可是来自属于任一种同种型的人免疫球蛋白。较优选为人 IgG 的

恒定区。来自人免疫球蛋白的恒定区的框架区无特别限制。

本发明的人化单抗生产方法举例如下。无需说，生产方法不限于此。

如，经遗传工程制备小鼠单抗衍生的重组人化单抗，参照未审查的日本专利发表(JP-WA)号 Hei4-506458 和未审查的日本专利发表(JP-A)号 Sho 62-296890。即，从产小鼠单抗的杂交瘤分离出至少一个小鼠 H 链 CDR 基因及其相应的至少一个小鼠 L 链 CDR 基因，从人免疫球蛋白基因中分离出编码除对应于上述小鼠 H 链 CDR 的人 H 链 CDR 以外的全部区的人 H 链基因，和编码除对应于上述小鼠 L 链 CDR 的人 L 链 CDR 以外的全部区的人 L 链基因。

如此分离到的小鼠 H 链 CDR 基因和人 H 链基因可操作插入适宜载体使它们表达。相似地，小鼠 L 链 CDR 基因和人 L 链基因可操作插入另一适宜载体使它们表达。或者，小鼠 H 链 CDR 基因/人 H 链基因和小鼠 L 链 CDR 基因/人 L 链基因可操作插入同一表达载体使它们表达。用如此制备的表达载体转化宿主细胞以获得产生人化单抗的转化体。通过培养转化体，可从培养上清中获得预期的人化单抗。

本发明的“人单抗”所指免疫球蛋白，其中含组成免疫球蛋白的 H 链可变区和恒定区，L 链可变区和恒定区的完整区域由编码人免疫球蛋白的基因产生。

人抗体的产生方法可同于上述多克隆抗体或单抗的产生方法，即用抗原免疫转基因动物，例如该动物如小鼠用常规方法在适当位点整合了至少人的免疫球蛋白基因。

例如制备可产人抗体的转基因小鼠的方法描述在自然遗传学，7 卷，13-21 页(1994)；自然遗传学，15 卷，146-156 页(1997)；JP-WA 编号 Hei 4-504365 和 Hei 7-509137；Nikkei 科学，6 期，40-50 页(1995)；国际专利发表号 WO 94/25585；自然，368 卷，856-859 页(1994)；和 JP-WA 编号 Hei 6-500233。

此外，可应用用于从转基因奶牛或猪的奶中产生人源蛋白的最新开发技术(Nikkei 科学，78-84 页(1997 年 4 月))。

用于本发明的“抗体的部分”指上述单抗的部分区域，并具体指  $F(ab')_2$ ， $Fab'$ ， $Fab$ ， $Fv$ (抗体可变片段)， $sFv$ ， $dsFv$ (二硫键所稳定的  $Fv$ )，或  $dAb$ (单区抗体)(Exp. Opin. Ther. Patents，6 卷，5 期，441-456

页(1996))。

“ $F(ab')_2$ ”和“ $Fab'$ ”可用如胃蛋白酶和木瓜蛋白酶等处理免疫球蛋白(单抗)产生,意思指消化在两条H链每一个的绞链区之间二硫键附近的免疫球蛋白所产生的抗体片段。如木瓜蛋白酶在两条H链中每一个的绞链区之间的二硫键IgG上游切割,产生两个同源的抗体片段,其中L链由VL(L链可变区)和CL(L链恒定区)组成,H链片段由VH(H链可变区)和CH<sub>1</sub>(H链恒定区的 $\gamma_1$ 区)组成,L链和H链在它们的C末端区通过二硫键连接。这样两个同源的抗体片段的每一个均称 $Fab'$ 。胃蛋白酶也在两个H链的每一个的绞链区的二硫键的IgG下游切割,产生的抗体片段略大于其中两个上述 $Fab'$ 在绞链区连接而成的片段。该抗体片段称 $F(ab')_2$ 。

本发明中“药学组合物”包括上文规定的本发明的任一个“多肽”;含该多肽的“同型二聚体分子”,“多肽片段”;“融合多肽”;包括该融合多肽的“同型二聚体分子”,“抗体”,或“抗体的部分”;以及一个可药用载体。

“可药用载体”包括赋形剂,稀释剂,膨胀剂,分解剂,稳定剂,防腐剂,缓冲液,乳化剂,芳香剂,着色剂,加甜剂,增粘剂,生泡剂,增溶剂或其它添加剂。用一种或更多这样的载体可将药学组合物配成片剂,药丸,药粉,药粒,注射液,溶液,胶囊,锭剂,酏剂,悬浮液,乳剂或糖浆。药学组合物可口服或不经胃肠道服用。非胃肠道给药的其它形式包括外用溶液,直肠用药及阴道栓剂,按常规方法开处方,其中包含一种或更多种有效成分。

剂量根据年龄,性别,体重,病症,治疗效果,给药途径,治疗阶段,或药学组合物中所含有效成分的种类(上述多肽或抗体)而有变化。一般,成人给药剂量为每次 $10\mu\text{g}$ - $1000\text{mg}$ (或 $10\mu\text{g}$ - $500\text{mg}$ )。根据不同情况,低于上述剂量在某些病例中可能足够,多于上述剂量在其它病例中可能是必需的。

尤其,注射剂的产生可将抗体溶解于或悬浮于无毒性可药用载体如生理盐水或市售注射用蒸馏水,调成 $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ml载体至 $10\text{mg}$ 抗体/ml载体的浓度。如此产生的注射液可给药于需要治疗的病人,剂量为 $1\mu\text{g}$ - $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重,较优选 $50\mu\text{g}$ - $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重,一天一次或多次给药。给药途径的实例均为医疗上适当的给药途径如静脉注射,皮下注射,皮内注射,肌肉注射,或腹膜内注射,较优选静脉注射。

注射剂也可制入非水相稀释剂(如丙二醇, 聚乙二醇, 植物油如橄榄油, 醇类如乙醇), 悬浮液, 或乳液中。

注射剂滤过除菌滤器, 或与杀菌剂混合, 或辐射可灭菌。注射剂可制成备用形式。即冻干为无菌固相组合物, 用之前溶解于注射用无菌蒸馏水或其它溶剂。

本发明的药学组合物可用于治疗或预防由淋巴细胞如 T 细胞的活化和活化淋巴细胞功能的调节所致的各种自身免疫病, 过敏性疾病, 或炎症性炎病。病例有类风湿性关节炎, 多发性硬化症, 自身免疫性甲状腺炎, 过敏性接触性皮炎, 慢性炎症性皮肤病如扁平癣, 系统性红斑狼疮, 胰岛素依赖型糖尿病和牛皮癣。

本发明之药学组合物对多种疾病的治疗效果可用常规方法将它给药于已知疾病的动物模型而检测。

模型的实例包括(1) (NZB/NZW) F1 小鼠, 人系统性红斑狼疮(SLE) 的模型(科学, 科学 125 卷, 1225-1227 页, 1994), (2) 实验性过敏性脑脊髓炎(EAE), 多发性硬化症(MS) 模型(临床调研杂志, 95 卷, 2783-2789 页(1995))。 (3) NOD(非肥胖糖尿病) 小鼠, 胰岛素依赖型糖尿病(IDDM) 模型(实验医学杂志, 181 卷, 1145-1155 页(1995)), (4) 肾小球基底膜免疫所致大鼠肾炎模型, Goodpasture's 肾炎模型(欧洲免疫学杂志, 24 卷, 6 期, 1249-1254 页(1994)), (5) DBA/1 小鼠, 人类风湿性关节炎模型(欧洲免疫学杂志, 26 卷, 2320-2328 页(1996))。

### 图的描述

图 1 为显微摄影, 显示 FTL 435 细胞经“JTT-1 抗体”诱导的凝集状态和该细胞凝集受“JTT-2 抗体”抑制的状态。

其中(a)示无任何杂交瘤上清时细胞状态, (b)示“JTT-1 抗体”诱导的细胞凝集状态, (c)示有“抗-ICAM-1 抗体”及“JTT-1 抗体”时细胞状态, (d)示有“JTT-2 抗体”与“JTT-1 抗体”共同作用的细胞凝集状态。

图 2 是显微摄影, 显示 FTL 435 细胞和大鼠活化的淋巴母细胞经“JTT-1 抗体”诱导的细胞凝集状态和“JTT-2 抗体”对细胞凝集的抑制状态。

其中(a)示无任何抗体时 FTL 435 细胞的状态, (b)示有 PMA 时 FTL 435 细胞的状态, (c)示有“JTT-1 抗体”时 FTL 435 细胞的状态, (d)示有抗

LFA-1 抗体与“JTT-1 抗体”时 FTL 435 细胞的状态, (e) 示有抗 CD18 抗体与“JTT-1 抗体”时 FTL 435 细胞的状态, (f) 示有抗 ICAM-1 抗体与“JTT-1 抗体”时 FTL 435 细胞的状态, (g) 示无任何抗体时活化的淋巴母细胞的状态, (h) 示有 PMA 时活化淋巴母细胞的状态, (i) 示有“JTT-1 抗体”时活化淋巴母细胞的状态, (j) 示有抗 LFA-1 抗体与“JTT-1 抗体”时活化淋巴母细胞的状态, (k) 示有抗 CD18 抗体与“JTT-1 抗体”时活化淋巴母细胞的状态, (l) 示有抗 ICAM-1 抗体与“JTT-1 抗体”时活化淋巴母细胞的状态。

图 3 显示用流式细胞仪测量的“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”在不同细胞中的表达状态。

图 4 显示用流式细胞仪测量的“JTT-1 抗原”在不同淋巴细胞中的表达状态。

图 5 为照片, 显示经 SDS-PAGE 分析“JTT-1 抗原”的电泳图谱。

图 6 为显微摄影, 显示大鼠胸腺细胞对包被有纯化的“JTT-1 抗原”的微滴板的粘附状态, 其粘附在“JTT-1 抗体”存在时受诱导, 和“JTT-2 抗体”抑制细胞粘附的状态。

其中 (a) 示细胞对未包被“JTT-1 抗原”的板的粘附状态, (b) 示无任何抗体时细胞对包被“JTT-1 抗原”的板的粘附状态, (c) 示在有“JTT-1 抗体”的 Fab 片段时细胞对包被“JTT-1 抗原”的板的粘附状态, (d) 示有“JTT-2 抗体”与“JTT-1 抗体” Fab 片段时细胞对包被“JTT-1 抗原”的板的粘附状态。

图 7 显示荧光强度测量所得胸腺细胞粘附于包被有纯化“JTT-1 抗原”的板的相对细胞数。

“Ag(-)”示未包被“JTT-1 抗原”的板中相对细胞数, “Ag(+)”示无任何抗体时包被“JTT-1 抗原”的板中相对细胞数, “Ag(+)+JTT-1 Fab”示有“JTT-1 抗体” Fab 片段时包被“JTT-1 抗原”的板中的相对细胞数, “Ag(+)+JTT-1 Fab+JTT-2”示有“JTT-2 抗体”与“JTT-1 抗体” Fab 片段时包被了“JTT-1 抗原”的板中的相对细胞数。

图 8 示流式细胞仪测得“大鼠 JTT-1 抗原”和“大鼠 JTT-1 抗原”在 COS 细胞中的表达状态, 该细胞转化有编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA。

图 9 显示亲水性图分析所揭示的“JTT-1 抗原”氨基酸序列的结构特征。

图 10 显示人, 大鼠和小鼠“JTT-1 抗原”及“大鼠 JTT-1 抗原”突变体的氨基酸序列间的同源性。

图 11 显示“人 JTT-1 抗原”, “人 CD28 分子”和“人 CTLA-4 分子”中的基序的氨基酸序列同源性和保守状态。

图 12 图示了“人 JTT-1 抗原”, “人 CD28 分子”和“人 CTLA-4 分子”的蛋白质二级结构和它们之间的相似性。

图 13 图示了编码“小鼠 JTT-1 抗原”的基因组 DNA 的结构。

图 14 显示“大鼠 JTT-1 抗原”及其另一种剪接实变体之间氨基酸序列的差别。

图 15 显示用 [<sup>3</sup>H] 胸苷掺入法测得的人外周血淋巴细胞受抗“人 JTT-1 抗原”的单抗诱导后的生长程度。

纵坐标示 [<sup>3</sup>H] 胸苷掺入细胞的量 (dpm)。

图 16 显示疾病模型大鼠中, 抗“JTT-1 抗原”的单抗对实验性过敏性脑脊髓炎 (EAE) 的疗效。

纵坐标显示病症的得分程度, 横坐标示免疫诱导 EAE 后的天数。

图 17 显示在疾病模型大鼠中, 抗“JTT-1 抗原”的单抗对大鼠肾小球肾炎的疗效。

纵坐标示蛋白尿排泄量, 横坐标示免疫诱导肾小球肾炎后的时间 (周数)。

图 18 显示用蛋白 A Sephaobse 柱纯化融合多肽 (“大鼠 JTT-1 抗原”胞外区与人 IgFc (rJTT-1-IgFc)) 的直方图。

图 19 为照片, 显示 rJTT-1-IgFc 经 SDS-PAGE 分析所得电泳图谱。

图 20 显示用蛋白 A Sepharose 柱纯化融合多肽 (“人 JTT-1 抗原胞外区”和人 IgFc (hJTT-1-IgFc)) 的直方图。

图 21 为照片, 显示 hJTT-1-IgFc 经 SDS-PAGE 分析所得电泳图谱。

图 22 图示了用于制备其中导入了编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 的转基因小鼠的基因转移 (靶向) 载体的结构。

### 实施本发明的最佳方式

本发明参照以下实施例作更详细描述, 但不能理解成本发明限定于此。

#### 实施例 1 单抗制备

按 Kohler 等的方法制备产抗体的杂交瘤(Omori 等, 血液, 81 卷, 101-111 页(1993)), 按 Kannagi 等的方法制备单抗(实验免疫学手册, 4 卷, 117.21-117.21(1986))。

首先, 以大鼠胸腺瘤细胞系 FTL 435 的细胞作为免疫抗原对 BALB/C 小鼠足掌给药,  $10^7$  细胞/小鼠, 给药时间为 0, 7, 14 和 28 天。只在首次免疫时将抗原与弗氏完全佐剂混合给药。末次接种 2 天后, 取出小鼠的淋巴结, 用常规方法与小鼠骨髓瘤细胞 PAI 融合(JCR NO. B0113; Stocker, J.W. 等, Res. Disclosure, 217 卷, 155 页(1982)), 以获得很多产单抗的杂交瘤。

### 实施例 2 杂交瘤的筛选和单抗的鉴定

筛选实施例 1 制备的杂交瘤的方法是, 分析杂交瘤培养上清中产生的抗体对 FTL 435 细胞(免疫原)的作用。接种 FTL 435 细胞( $5 \times 10^6$  细胞/ml, 0.1ml)至 96 孔板的每一孔中, 在每个杂交瘤的培养上清存在下(每份  $10\mu\text{g/ml}$ )于  $37^\circ\text{C}$  培养 4 小时。所得杂交瘤克隆“JTT-1”和“JTT-2”的结果示于图 1 和图 2。

显示杂交瘤克隆“JTT-1”产生的单抗(“JTT-1 抗体”)强烈凝集 FTL 435 细胞(图 1(b)和图 2(c)), 而加入“JTT-2 抗体”强烈抑制 FTL 435 细胞受“JTT-1 抗体”刺激所致的凝集(图 1(d))。不加任何杂交瘤上清的实验孔为对照(图 1(a)和图 2(a))。

为测定 FTL 435 细胞受“JTT-1 抗体”刺激引起的凝集是否由于细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)之间的粘附作用所致(因为该细胞粘附是具有代表性的已知通道), 在有抗大鼠 ICAM-1 抗体 1A29( $10\mu\text{g/ml}$ , IgG1)或抗大鼠 LFA-1 抗体( $10\mu\text{g/ml}$ , IgG2a)与“JTT-1 抗体”同时存在时  $37^\circ\text{C}$  培养 FTL 435 细胞, 1 小时。

“JTT-1 抗体”刺激引起的 FTL 435 细胞凝集既不被抗 ICAM-1 抗体抑制, 也不被抗 LFA-1 抗体(抗 ICAM-1 抗体图 1(c)和图 2(f); 抗-LFA-1 抗体, 图 2(d))抑制。

为进一步分析“JTT-1 抗体”凝集细胞的能力。用上述相同方法分析该抗体凝集刀豆蛋白 A 活化的大鼠淋巴母细胞的能力。结果示于图 2。

与对 FTL 435 细胞的作用相似, 活化的淋巴母细胞的凝集是受到“JTT-1 抗体”的刺激诱导的(图 2(i))。“JTT-1 抗体”刺激所致的活化淋

巴母细胞凝集大部分被抗-LFA-1 抗体(图 2(j))和被抗 ICAM-1 抗体抑制(图 2(1))。(但仍有部分凝集)。

根据对未加任何抗体的对照实验(图 2(g))的理解,活化的淋巴细胞如活化的淋巴母细胞显示没有经细胞粘附的凝集,除非它们接受大戟二萜醇肉豆蔻乙酸酯(PMA,活化 LFA-1)的刺激(图 2(h))或接受“JTT-1 抗体”的刺激(图 2(i))。因此抗 LFA-1 抗体部分抑制“JTT-1 抗体”刺激的细胞凝集这一事实说明,活化的淋巴母细胞中的 LFA-1 受“JTT-1 抗体”刺激而活化,它还说明“JTT-1 抗体”识别的分子涉及某些信号传递。

杂交瘤克隆“JTT-1”和“JTT-2”已被保藏在布达佩斯条约下的国际保藏机构,国家生命科学及人类技术研究所,工业科学和技术机构(国际工贸部,日本(1-1-3, Higashi, Tsukuba-Shi, Ibaraki, 日本)),保藏日 1996 年 10 月 11 日,国际保藏号为分别为 FERM BP-5707 和 FERM BP-5708。

用单抗同种型鉴定试剂盒(Amersham)分析测得每种杂交瘤产生的单抗(JTT-1 抗体和 JTT-2 抗体)均为 IgG1。

实施例 3 “JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”对各种细胞的反应性

为分析不同细胞中“JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”识别的分子的表达模式,检测了这两种抗体对不同细胞的反应性。“JTT-1 抗体”或“JTT-2 抗体”所识别的分子分别命名为“JTT-1 抗原”或“JTT-2 抗原”。

一只 5 周龄至 10 周龄 Wistar 大鼠(150-250g)用二乙醚麻醉处死。用剖腹术从其胸腔和腹部分别取出胸腺和脾,匀浆以制备细胞悬液。所得脾细胞在含 2 $\mu$ g/ml 刀豆蛋白 A 和 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液中 37 $^{\circ}$ C 培养 3 天以制备活化的淋巴母细胞。

FTL 435 细胞,胸腺细胞,脾细胞,活化淋巴母细胞(每种  $5 \times 10^5$  个细胞)与“JTT-1 抗体”或“JTT-2 抗体”反应,再与 FITC 标记的抗小鼠 IgG(Cappel)反应。被染色细胞的荧光强度用 EPICS-Elite 流式细胞仪测量。

结果示于图 3。FTL 435 细胞中,观察到“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”均强表达。这些抗原在胸腺细胞中有表达,而在脾细胞中只有很少的表达。然而用刀豆蛋白 A 刺激脾细胞所得活化淋巴母细胞中,“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”均强表达。此外,每种细胞中,“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”的表达模式一致。这些结果说明“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”

是相同的分子。

#### 实施例4 “JTT-1 抗体”对各种淋巴细胞的反应性

为分析各种淋巴细胞中“JTT-1 抗体”所识别分子(“JTT-1 抗原”)的表达模式,分析了“JTT-1 抗体”对两种大鼠(Wrstar 大鼠和 F344 大鼠)的淋巴结,脾 T 淋母细胞,脾 B 淋母细胞的反应性。

二乙醚麻醉处死 5 周龄至 10 周龄的 Wistar 大鼠和 F344 大鼠(150 ~ 250g)。剖腹术取出每只大鼠的淋巴结和脾,匀浆制成细胞悬液。脾细胞悬液在含 2 $\mu$ g/ml 刀豆蛋白 A(ConA)和 10 % FCS 的 RPMI 1640 培养液中 37 °C 培养 3 天。1 天和 3 天后获得每只大鼠的活化 T 淋母细胞和活化 B 淋母细胞。此外未加淋巴结细胞和 ConA 之前的脾 T 淋母细胞和脾 B 淋母细胞用作对照。

每种细胞(各  $5 \times 10^5$  个细胞)与生物素标记的抗大鼠 T 细胞抗体或生物素标记的抗大鼠 B 细胞抗体(10 $\mu$ g/ml, Seikagaku 公司)反应,再与藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白反应。再将细胞与 10 $\mu$ g/ml FITC 标记的“JTT-1 抗体”反应。染色细胞的荧光强度用 EPICS-Elite 流式细胞仪测量。

结果示于图 4。Wistar 大鼠和 F344 大鼠的活化 T 淋母细胞和活化 B 淋母细胞从 ConA 刺激活化作用的 1 天后开始均强表达“JTT-1 抗原”。此外,每种细胞中“JTT-1 抗原”的表达模式几乎完全一致。

#### 实施例5 用免疫沉淀法鉴定“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”

通过用 FTL 435 细胞的免疫沉淀法鉴定“JTT-1 抗原”和“JTT-2 抗原”。

##### (1) 制备生物素化可溶性细胞表面分子

FTL 435 细胞用 PBS 洗,再悬浮于含 100 $\mu$ g/ml NHS-生物素和 0.1M HEPES 的生理盐水(pH8.0),调至  $1 \times 10^7$  个细胞/ml,室温 40 分钟。用 PBS 洗细胞三次,加裂解液(1 % NP-40, 10mM Tris-HCl(pH7.4), 0.15M NaCl)调至  $5 \times 10^7$  细胞/ml, 4 °C 反应 30 分钟以裂解细胞。离心所得的裂解产物,含生物素化可溶性细胞表面分子的上清贮存于-80 °C。

##### (2) 免疫沉淀和 SDS-PAGE 分析

“JTT-1 抗体”用常规方法纯化自实施例 1 制备的杂交瘤克隆“JTT-1”的培养上清,将该抗体的纯化样品与蛋白 G-Sepharose 珠混合,调节成 2mg/ml, 4 °C 反应 1 小时使抗体结合于珠上。洗珠后,加 500 $\mu$ l 生物素化

FTL 435 细胞裂解物至 10 $\mu$ l 珠中，混合物 4 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。用裂解液洗珠三次后，将 50 $\mu$ l 葡聚糖酶缓冲液(含 0.15 % SDS 的磷酸钠缓冲液(pH7.0))加至珠上，煮沸混合液以洗脱被抗体结合珠捕获的结合分子。洗脱样品级分中加入 1.25 % NP-40 和 20U/ml N-葡聚糖酶，混合液反应过夜以降解 N 连接的糖链。

将 SDS-PAGE 的等体积样品缓冲液(Enprotech)加入 5 $\mu$ l 的有或无巯基乙醇的洗脱样品中，将该混合物煮沸。电泳后将电泳胶转移至 PVDF 膜。膜用 3 % BSA-PBS 封闭并与过氧化酶标记的链霉菌抗生物素蛋白反应以检测由“JTT-1 抗体”捕获的生物素化的可溶性细胞表面分子，检测用 ECL 系统(Amersham)，方法按手册所述。

结果示于图 5。FTL 435 细胞上被“JTT-1 抗体”识别的分子(“JTT-1 抗原”)显示在非还原条件下分子量约 47KD(图 5 中“(−)”)，还原条件下为 24KD 和 28KD(图 5 中“(+)”)。作为 N 连接的糖链消化结果(图 5 中“+ N-gly”)，“JTT-1 抗原”在非还原条件下集中在约 36KD 的一条带上，还原条件下约 20KD。这些结果暗示“JTT-1 抗原”形成了二聚体，其中相同的核心蛋白有不同糖链。用“JTT-2 抗体”按上述进行实验获得完全相同的结果。将这些结果与实施例 3 及下文实施例 7 的结果综合考虑，“JTT-1 抗原”(“JTT-1 抗体”所识别的分子)和“JTT-2 抗原”(“JTT-2 抗体”所识别的分子)被认为完全一样。

#### 实施例 6 大鼠胸腺细胞对纯化的“JTT-1 抗原”的粘附实验及 N 末端氨基酸分析

进行以下实验是为了分析“JTT-1 抗体”识别的分子(“JTT-1 抗原”)是否起粘附分子的功能。还进行了 N 末端氨基酸分析。

##### (1) “JTT-1 抗体”亲和柱的制备

用常规方法从实施例 1 的“JTT-1”杂交瘤上清纯化“JTT-1 抗体”，取纯化样品(2mg 于 2ml)与 1ml 蛋白 G-Sepharose 树脂混合，4 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用 200mM 三乙醇胺(pH8.2)洗树脂三次。再将树脂室温下于含 10mM 庚二酰亚氨酸二甲基酯(dimethyl pimelimidate)(DMD)的三乙醇胺(pH8.2)中温育 1 小时使“JTT-1 抗体”与树脂共价结合。

##### (2) “JTT-1 抗原”的纯化

在含 10 % FCS 的 RPMI 1640 中培养 FTL 435 细胞。离心得到沉淀团以

收获细胞，沉淀团用 PBS 洗三次。加入裂解液(1 % NP-40 , 10mM Tris-HCl (pH7.4) , 0.15M NaCl)调至  $5 \times 10^7$  细胞/ml , 4 °C 反应 30 分钟使细胞裂解。裂解产物离心，含可溶性细胞分子的上清贮存于-80 °C。

将裂解物(400ml)装载“JTT-1 抗体”亲和柱。柱经 50ml 裂解液和 20ml PBS 洗涤后，用 0.2M 甘氨酸缓冲液(pH2.8)洗脱“JTT-1 抗原”。向洗脱的抗原中加 1M Tris 中和。所得“JTT-1 抗原”存于-80 °C。

### (3) N 末端氨基酸序列的测定

纯化的“JTT-1 抗原”进行 SDS-PAGE 后，用常规方法测其 N 端氨基酸序列。结果显示“JTT-1 抗原”含有氨基酸序列 Glu-Leu-Asn-Asp-Leu-Ala-Asn-His-Arg.

### (4) 粘附实验

二乙醚麻醉杀死 5 周龄至 10 周龄 Wistar 大鼠(150-250g)，剖腹术取出胸腺匀浆刷成胸腺细胞悬液。向其中加入  $10 \mu\text{M}$  2', 7'-二(羧乙基)羧基荧光素四乙酰氧甲酯(BCECF-AM, 分子探针), 37 °C 温育 30 分钟以荧光标记胸腺细胞。细胞用 PBS 洗之后悬浮于含 10 % FCS 的 RPMI 1640 中，调至  $2 \times 10^7$  细胞/ml。

在(2)中所获得的纯化“JTT-1 抗原”以浓度  $10 \mu\text{l}$ /孔包被 96 孔板过夜。PBS 洗板后，板上加  $200 \mu\text{l}$ /孔 3 % BSA-PBS 封闭 2 小时。PBS 洗板，(1)只有荧光标记的胸腺细胞( $2 \times 10^7$  细胞/ml, 0.1ml)，(2)荧光标记的胸腺细胞(浓度同上)及常规方法制得的“JTT-1 抗体” Fab 段( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )，或(3)荧光标记的胸腺细胞(浓度同上)，“JTT-1 抗体” Fab 段(浓度同上)，“JTT-2 抗体”(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，被加入每孔，37 °C 培养 1 小时。为去除未结合细胞，每孔用含 10 % FCS 的 RPMI 1640 洗一次。每孔均在光学显微镜下观察。然后，每孔加  $100 \mu\text{l}$  0.1 % NP-40，吸附于板上的细胞被裂解。用 Fluoroscan II Microplate 荧光计(Flow Laboratories)在 538nm(485nm 被激发)测荧光强度计数每孔所吸附荧光标记胸腺细胞的相对细胞数。未包被纯化“JTT-1 抗原”的板为对照。

光镜观察结果示于图 6。

只有有“JTT-1 抗体” Fab 片段时，胸腺细胞才显著吸附于纯化“JTT-1 抗原”(图 6(c))。该吸附显著受“JTT-2 抗体”的抑制(图 6(d))。

图 7 显示荧光强度表示的吸附于包被于每一孔的“JTT-1 抗原”胸腺

细胞的相对细胞数。

这些结果揭示“JTT-1 抗原”有粘附分子功能。

### 实施例 7 编码大鼠“JTT-1 抗原”的 cDNA 的克隆

#### 1. 制备 cDNA 文库

##### 1-(1) 从 ConA 刺激的大鼠淋母细胞抽提 poly(A)<sup>+</sup> RNA

大鼠脾脏源的 ConA 刺激的淋巴母细胞(ConA 母细胞)(约  $1 \times 10^6$ /ml) 4 °C 离心(2000xg) 5 分钟。沉淀的细胞重新悬浮于 ISOGEN(Nippon Gene), 用氯仿振荡抽提以收集上清。加异丙醇以获上清, 混合液室温静置 10 分钟, 12,000xg 离心 4 °C 10 分钟以沉淀 RNA。用乙醇洗过的 RNA 溶于 TE 缓冲液。用“mRNA 纯化试剂盒”(Pharmacia)从所获总 RNA 中纯化 poly(A)<sup>+</sup> RNA。

##### 1-(2) cDNA 的制备

以如上制备的 poly(A)<sup>+</sup> RNA 5μg 为模板, 用“省时 cDNA 合成盒”(Pharmacia)合成 cDNA。用带 NotI 位点的“Oligo dT 引物”(Pharmacia)以增加筛选效率。加入 EcoRI 连接子, 用 NotI 酶解以获得单向性的 cDNA。随后用 Spun 柱(Pharmacia)进行大小分级分离。

##### 1-(3) 插入载体

所获有 EcoRI 末端和 Not I 末端的 cDNA 与经 EcoRI 和 NotI 消化的 pME18S 连接(Hara, T. 和 Miyajima, A. EMBO 杂志, 11 卷, 1875-1884 页(1992))。用“DNA 连接试剂盒”(Takara Shuzo)连接。用该反应产物转化大肠杆菌 DH5 细胞(Toyobo)。转化体培养至 O.D. 值(在 600nm)达 0.6, 收获以回收质粒 DNA, 用 QUIAGEN-Tip(QUIAGEN)纯化质粒 DNA。

#### 2. 筛选 cDNA 文库

用淘选法筛选(Seed B. 等, 美国国家科学院院刊, 84 卷, 3365-3369 页(1987))。

##### 2-(1) 基因转移进 COS 细胞

所得文库经电穿孔导入 COST 细胞(Potter H. 等, 美国国家科学院院刊, 85 卷, 2288-2292 页)。导入后转化体培养 60 小时, 去除上清, 沉淀用 PBS 洗三次。用 PBS(含 0.5mM EDTA) 37 °C 处理沉淀 30 分钟后, 用移液管移去细胞。只有活细胞再用“Lymphprep”(NYCOMED)收集。

##### 2-(2) 经淘选浓缩可表达基因的细胞

所得活细胞悬于 PBS(含 5 % FCS 和 0.5mM EDTA)。将该细胞悬液转至

包被有“JTT-1 抗体”的培养皿，室温温育 3 小时。去除未结合细胞后，用 PBS 洗培养皿三次，用 Hirt 的方法从结合于皿上的细胞中收集质粒 DNA(Hirt, B. 分子生物学杂志, 26 卷, 365-369 页)。用所获质粒转化大肠杆菌 DH10B(GIBCO BRL)。按上述 1-(3)用转化体扩增并纯化质粒。重复(1)和(2)的程序两次。

### 2-(3) 分离阳性克隆

三次淘汰后，将转化的大肠杆菌 DH10B 细胞培养于含青霉素的 LB 平板上过夜以获得菌落。培养出 20 个耐药菌落，用碱性 miniprep 法收集质粒 DNA(Maniatis, 下等, 分子克隆实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约), 分析插入的 DNA。琼脂糖凝胶电泳揭示浓缩到有约 0.9kb cDNA 的克隆(命名为“T132A7”)。

再次用(1)中的方法在 COS 7 细胞中瞬时表达“T132A7”。“T132A7”诱导的细胞先与“JTT-1 抗体”或“JTT-2 抗体”反应，再与 FITC 标记的抗小鼠 IgG(Cappel)反应，染色细胞的荧光强度用 EPICS-Elite 流式细胞仪(Coulter)测量。“JTT-1 抗体”和“JTT-2 抗体”强识别“T132A7”的基因产物。结果示于图 8。

### 3. 测定核苷酸序列和氨基酸序列

克隆“T132A7”的核苷酸序列用“自读测序试剂盒”(Pharmacia)和“A. L. F. DNA 测序仪”(Pharmacia)经双脱氧法测得。此外，该核苷酸序列编码的“大鼠 JTT-1 抗原”的推测氨基酸序列用基因分析软件“GENEWORKS”(IntelliGenetics)分析。核苷酸序列和推测的氨基酸序列示于图 SEQ ID NO: 4。

从克隆的基因推出的氨基酸序列(由 200 个氨基酸残基组成)包含实施例 6-(3)所测 N 末端氨基酸序列。考虑到克隆“T132A7”导入的细胞与“JTT-1 抗体”强烈反应,可得出结论克隆“T132A7”包含编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA。

### 4. 计算机分析

对“JTT-1 抗原”的推测氨基酸序列的初级结构的亲水性分析按 Kite 和 Doolittle 的方法(Kite, J. 和 Doolittle, R. F., 分子生物学杂志, 157 卷, 105-132 页(1982))(图 9)。结果揭示“JTT-1 抗原”为跨膜蛋白,在 N 端有信号序列。此外,基序分析结果揭示“JTT-1 抗原”在胞外区有

两个 Asn 连接的糖链结合位点, 在胞浆区有两个酪蛋白激酶磷酸化位点和一个蛋白激酶 C 磷酸化位点。图 9 中“CHO”指 N 连接的糖链结合位点; “P”, 磷酸化位点; “CKII”, 酪蛋白激酶 II; “PKC”, 蛋白激酶 C。

### 实施例 8 克隆编码“人 JTT-1 抗原”的 cDNA

#### 1. 制备探针

编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA (约 0.9kb) 的产生是通过用限制性酶 EcoRI 和 NotI 消化实施例 7 所得的“T132A7”, 再经琼脂糖凝胶电泳分离。用“QUIAEX 凝胶抽提试剂盒”(QUIAGEN) 纯化所分离的 DNA 片段, 所得 DNA 片段用“Ready-To-Go DNA 标记盒”(Pharmacia) 标记  $^{32}\text{P}$ 。这些标记的 DNA 作为探针用于蚀斑杂交。

#### 2. 制备 cDNA 文库

##### 2-(1) 抽提 poly(A)<sup>+</sup> RNA

从 ConA 刺激的人外周血源的淋巴母细胞 (ConA 母细胞) 抽提 poly(A)<sup>+</sup> RNA, 方法同实施例 7-1-(1)。

##### 2-(2) 制备 cDNA:

如此制得的 poly(A)<sup>+</sup> RNA 取 5 $\mu\text{l}$  作模板, 用“Oligo dT 引物”(Pharmacia) 和“省时 cDNA 合成试剂盒”(Pharmacia) 合成 cDNA。再加入 EcoRI 连接器, 在 Spun 柱 (Pharmacia) 上进行大小分级分离。

##### 2-(3) 插入载体并包装

所获带有 EcoRI 末端的 cDNA 与经 EcoRI 酶切的载体“ $\lambda$ ZAPII”(Stratagene) 连接。用“DNA 连接试剂盒”(Takara Shuzo) 连接。体外用“GIGA PACK II GOLD”(Stratagene) 进行连接的 DNA 的包装后, 用所得噬菌体颗粒转染大肠杆菌 XL1Blue MRF' 细胞 (Stratagene) 以产生由含重组噬菌体的蚀斑组成的 cDNA 文库。

#### 3. 筛选 cDNA 文库

用“快速杂交缓冲液”(Amersham), 经蚀斑杂交法 (Maniatis, T. 等, 分子克隆实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约) 筛选 cDNA 文库。首先, 所得 cDNA 文库 ( $1 \times 10^4$ ) 置于琼脂平板上, 用“Hybond-N 尼龙膜”(Amersham) 产生复制子。蚀斑杂交在“快速杂交缓冲液”(Amersham) 中用复制子和  $^{32}\text{P}$  标记的探针 (实施例 8-1 所制) 完成。首次和第二次筛选获得 8 个阳性克隆。分离每个克隆的单蚀斑, 用相应手册方法 (stratagene) 体内

切割, 收得 7 个阳性克隆的质粒 DNA。

#### 4. 测定核苷酸序列

7 个克隆的核苷酸序列用“自读测序试剂盒”(Pharmacia)和“A. L. F. DNA 测序仪(Pharmacia)经双脱氧法测得。7 个克隆含有相同核苷酸序列。发现克隆“pBSH 41”编码全长“人 JTT-1 抗原”。对应于“人 JTT-1 抗原”的开放读码框(DRF)的 DNA 序列示于 SEQ ID NO: 1, 推测的全长“人 JTT-1 抗原”氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 2, 含 5' 和 3' 序列的核苷酸序列示于 SEQ ID NO: 3(ORF 相应于核苷酸 26-625)。理解到克隆中包含的核苷酸序列编码全长“人 JTT-1 抗原”, 因为根据该核苷酸序列推测的氨基酸序列(由 199 个氨基酸残基组成)显示显著同源于“大鼠 JTT-1 抗原”的氨基酸序列(图 10)。如图 10 示, 二者同源性的 60% 或更多。

转化有克隆“pBSH 41”的大肠杆菌 DH10B(GIBCO BRL)已保藏于布达佩斯条约下的国际保藏权威机构, 国家生命科学和人类技术研究所, 工业科技机构, 国际贸工部, 日本(1-1-3, Higashi, Tsukuba-Shi, Ibaraki, 日本), 自 1996 年 10 月 25 日起(国际保藏号 FERM BP-5725)。

#### 5. “JTT-1 抗原”的结构特征和生物学功能

在已知人类蛋白中检索推测的“人 JTT-1 抗原”氨基酸序列的基序的结果揭示“人 JTT-1 抗原”结构上类似于“CD28”和“CTLA-4”, 属于免疫球蛋白超家族的人源细胞膜蛋白, 详见上文所述(图 11 和 12)。如上述, “CD28”和“CTLA-4”均为十分重要的调节免疫系统中 T 细胞活化和抑制的分子。

结构相似性如下;

1. 20 或更多个包括半胱氨酸残基在内的氨基酸序列高度保守。
2. 在 CD28 和 CTLA-4 中是作为配基连接区必需的脯氨酸重复序列(Pro-Pro-Pro, PPP)保守。
3. 作为 CD28 和 CTLA-4 中信号传递区必需的“Tyr-Xaa-Xaa-Met”(YxxM)(Xaa 和 x 表示任意氨基酸)序列在胞质区是保守的。

根据这样的事实, 即结构相同于在 T 细胞活化(免疫机制中的主要因素)调节中起重要作用的“CD28”和“CTLA-4”的特异性结构, 推断本发明的“JTT-1 抗原”为像那些分子一样在调节淋巴细胞如 T 细胞(免疫应答的主要因素)活化的调节中起重要作用。

## 实施例 9 克隆编码“小鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA

### 1. 制备探针

通过用限制性酶 EcoRI 和 NotI 消化实施例 7 的克隆“T132A7”，再经琼脂糖凝胶电泳分离，获得编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA(约 0.9kb)。用“QUIAEX 凝胶抽提试剂盒”(QUIAGEN)纯化所分离得的 DNA 片段，并用“Recdy-To-Go DNA 标记试剂盒”(Pharmacia)给 DNA 片段标记  $^{32}\text{P}$ 。这些标记 DNA 作为探针用于蚀斑杂交。

### 2. 制备 DNA 文库

#### 2-(1) 抽提 poly(A)<sup>+</sup> RNA

如实施例 7-1-(1)，从 ConA 刺激的小鼠脾脏源的淋巴母细胞(约  $1 \times 10^6$  细胞/ml)抽提 poly(A)<sup>+</sup> RNA。

#### 2-(2) 制备 cDNA 文库

取上述 poly(A)<sup>+</sup> RNA 5mg 作模板，用 obgodT 引物(Pharmacia)和“省时 cDNA 合成试剂盒”(Pharmacia)合成 cDNA。加入 EcoRI 接头到该 cDNA 后，用 Spun 柱(Pharmacia)进行分级分离。

#### 2-(3) 插入 cDNA 到载体并包装。

所得的带 EcoRI 末端的 cDNA 连接至 EcoRI 消化的载体 1ZAPII(Stratagene)，用“DNA 连接试剂盒”(Takara Shuzo)连接。用 GIGA PACK II GOLD(Stratagene)体外包装连接的 DNA 后，以所得的噬菌体颗粒转染大肠杆菌 XL1Blue MRF' 细胞(Stratagene)产生由含重组噬菌体的蚀斑组成的 cDNA 文库。

### 3. 筛选 cDNA 文库

筛选通过用快速杂交缓冲液(Amersham)蚀斑杂交法(Maniatis 等, 分子克隆实验室手册, 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约)进行。

将所得 cDNA 文库( $1 \times 10^4$ )置于琼脂平板上，用 Hybond-N 尼龙膜(Amersham)复制。蚀斑杂交在“快速杂交缓冲液”(Amerham)中用复制膜和实施例 9-1 的  $^{32}\text{P}$  标记探针完成。进行首次和第二次筛选得到 5 个阳性克隆。分离每一克隆的单蚀斑后，根据指导手册(Stratagene)进行体内切割并收集到 5 个阳性克隆体的质粒 DNA。

### 4. 测定核苷酸序列

5 个克隆的每一的核苷酸序列用“自读测序盒”(Pharmacia)和

“A. L. F. DNA 测序仪” (Pharmacia) 以双脱氧法测得。其中 4 个克隆含相同核苷酸序列, 编码全长“小鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 序列和推测的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 5。

从图 10 知, “小鼠 JTT-1 抗原”由 200 个类似“大鼠 JTT-1 抗原”的氨基酸残基组成。小鼠, 大鼠和人“JTT-1 抗原”的氨基酸序列同源性显著(60%或更多)。

#### 5. 分析“小鼠 JTT-1 抗原”基因的基因座

“小鼠 JTT-1 抗原”的编码基因的基因座用荧光原位杂交法分析

所得编码“小鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 用常规方法标记  $^{32}\text{P}$  以制备杂交探针。用这些探针筛选 129 个 SVJ 小鼠基因组文库(Stratagene)以获得编码含“小鼠 JTT-1 抗原”的外显子的小鼠基因组 DNA 克隆。该基因组 DNA 的结构图示于图 13。

上述所得基因组 DNA 克隆经缺口翻译标记上洋地黄毒苷 duTp 以制备探针。该标记的探针结合于切割的小鼠 DNA, 与小鼠胚成纤维细胞源的正常细胞分裂中期染色体杂交, 杂交在含 50% 甲醛, 10% 硫酸葡聚糖和  $2 \times \text{SSC}$  的溶液中进行。杂交玻片在荧光标记的抗洋地黄毒苷抗体中温育后, 用 DAPI 染色测得特异性的杂交信号。在第一次检验中, 根据 DNA 大小和出现的带判断, 靠近被认为是染色体 1 的最大的染色体的部分被特异性标记。根据该信息, 上述基因组 DNA 克隆共杂交于特别针对染色体 1 的着丝粒区域的探针。结果, 该染色体的着丝粒区及附近区被特异性标记。分析 10 份显示特异性杂交的染色体 1 样本, 揭示上述基因组 DNA 克隆的位置在异染色质和常染色质之间的边界至染色体 1 的端粒的这段距离中的 33% 处, 即在小鼠“CD28”和“CTLA-4”基因的基因座的同一带“IC3”上。分析了 80 个中期细胞, 结果鉴别于 79 个细胞的该位置上有特异性标记。

这些结果以及实施例 8 所得的说明“JTT-1 抗原”与“CD28”和“CTLA-4”结构相似的结果提示“JTT-1 抗原”象“CD28”和“CTLA-4”一样, 是涉及调节协同刺激信号的传递和/或淋巴细胞的活化的重要分子。

#### 实施例 10 克隆编码“大鼠 JTT-1 抗原”突变体的 cDNA

被认为是编码实施例 7 中“大鼠 JTT-1 抗原”的另一种剪接变异体的 cDNA 如下克隆。

##### 1. 制备探针

用限制性酶 EcoRI 和 NotI 消化实施例 7 所得的克隆“T132A7”，并经琼脂糖凝胶电泳分离得编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA (约 0.9kb)。用“QUIAEX 凝胶抽提试剂盒”(QUIAGEN)纯化该分离的 cDNA，所得 DNA 片段用“Ready-To-Go DNA 标记盒”(Pharmacia)标记  $^{32}\text{P}$ 。这些标记 DNA 片段作为探针用于蚀斑杂交。

## 2. 制备 cDNA 文库

### 2-(1) 抽提 poly(A)<sup>+</sup>RNA

如实施例 7-1-(1)，从大鼠胸腺瘤细胞系 FTL 435 (约  $1 \times 10^6$  细胞/ml) 抽提 poly(A)<sup>+</sup>RNA。

### 2-(2) 制备 cDNA 文库

取上述制备的 5mg poly(A)<sup>+</sup>RNA 作模板，用 Oligo dT 引物 (Pharmacia) 和“省时 cDNA 合成盒”(Pharmacia)合成 cDNA。加上 EcoRI 接头该到 cDNA 后，经 Spun 柱 (Pharmacia) 进行大小的分级分离。

### 2-(3) cDNA 插入到载体并包装

上述所得带 EcoRI 末端的 cDNA 连接于 EcoRI 消化的载体 1ZAPII (Stratagene)，用“DNA 连接盒”(Takara Shuzo)连接。用 GIGA PACK II GOLD (Stratagene) 体外包装连接的 DNA 后，以所得的噬菌体颗粒转染大肠杆菌 XL1Blue MRF' 细胞 (Stratagene)，产生由含重组噬菌体的蚀斑组成的 cDNA 文库。

## 3. 筛选 cDNA 文库

筛选通过用快速杂交缓冲液 (Amersham) 的蚀斑杂交法进行 (Maniatis 等，分子克隆，实验手册，冷泉港实验室，冷泉港，纽约)。

将所得 cDNA 文库 ( $1 \times 10^4$ ) 置于琼脂平板上，用 Hybond-N 尼龙膜 (Amersham) 复制。蚀斑杂交在快速杂交缓冲液 (Amersham) 中用复制膜和实施例 10-1 的  $^{32}\text{P}$  标记探针完成。第一次和第二次筛选得 2 个阳性克隆，分离每一克隆的单蚀斑后，根据指导手册 (Stratagene) 体内切割，并收集到两个阳性克隆的质粒载体。

## 4. 测定核苷酸序列

两个克隆的核苷酸序列用“自读测序试剂盒”(Pharmacia)和“A. L. F DNA 测序仪”(Pharmacia)以双脱氧法测得。两个克隆含相同核苷酸序列，该编码全长的所得的“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 的核苷酸序列和推测的氨

基酸序列示于 SEQ ID NO: 6。将该推测于所得的 cDNA 序列的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6) 与实施例 7 中克隆的编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 序列的推测的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 4) 比较 (图 14)。如图 14 示, 此试验克隆的 cDNA 编码的氨基酸序列与实施例 7 所得的编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 编码的完全相同, 除了 (1) (末端三个连续的氨基酸残基 (Met-Thr-Ser) 变成 Thr-Ala-Pro, (2) 紧随 Thr-Ala-Pro 之后, 加入了 16 个连续的氨基酸残基 (Leu-Arg-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Glu-His-Ser-Ser-Cys-Gln-Asp-Arg-Asn)。这说明此试验克隆的 cDNA 克隆编码实施例 7 中所得的“大鼠 JTT-1 抗原”的另一种剪接变异体。

#### 实施例 11 制备重组“人 JTT-1 抗原”表达细胞

实施例 8 所得的质粒克隆 pBsh 41 用限制性酶 EcoRI 消化并切得含编码全长“人 JTT-1 抗原”的 cDNA 的 DNA 片段。将该 DNA 片段用 DNA 连接试剂盒 (Takarashuzo) 插入用同一限制酶 EcoRI 处理的质粒 pEFneo (美国国家科学院院刊 91 卷, 158-162 页 (1994)) 以制备表达载体。用该载体经电穿孔转化 CHO-K1 细胞 (ATCC: CCL-61)。在含 0.8mg/ml 遗传霉素 (GIBCO BRL) 和 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养细胞约 2 周, 选得抗遗传霉素转化体。用常规方法经 Northern 印迹确证重组“人 JTT-1 抗原”的表达。

#### 实施例 12 制备抗“人 JTT-1 抗原”的单抗

将实施例 11 制备的重组“人 JTT-1 抗原”的表达载体匀浆并超速离心 (100,000xg)。收集含细胞膜级分的沉淀并悬浮于 PBS。将该悬浮液配合完全福氏佐剂注射入 BALB/C 小鼠的脚掌进行第一次免疫 (0 天)。在间隔至 7, 14 和 28 天时再次给脚掌注射该细胞膜级分抗原。末次免疫 2 天后, 取出淋巴结细胞, 与小鼠骨髓瘤细胞 PA1 (JCR 号 B0113; 研究揭示, 217 卷, 155 页 (1982)) 以 5:1 的比率混合, 用聚乙二醇 4000 (GIBCO) 作融合剂融合以制备产单抗杂交瘤。杂交瘤的筛选过程是将之培养于补加了 10% 胎牛血清和氨基蝶呤的含 HAT 的 ASF 104 培养基 (Ajinomoto)。用实施例 11 的重组“人 JTT-1 抗原”表达转化体与每份杂交瘤上清反应, 用 FITC 标记的抗小鼠 IgG (Cappel) 染色细胞, 荧光强度用 EPICS-ELITE 流式细胞仪测量, 以确证每份培养上清产生的单抗对“人 JTT-1 抗原”的反应性。证实得到了 10 种或更多种产可与“人 JTT-1 抗原”反应的单抗的杂交瘤。

这些杂交瘤中的两种 (命名为克隆 SA12 和 SG 430) 中的每个均腹膜内注

射入 ICR nu/nu 小鼠(雌性, 7-8 周龄) ( $10^6$ - $10^7$  细胞/0.5ml/小鼠)。10-20 天后, 对小鼠麻醉后行剖腹术, 用常规方法从腹水大量制备与“人 JTT-1 抗原”反应的两种单抗(SA 12 和 SG 430)。

### 实施例 13 抗“人 JTT-1 抗原”的单抗对人外周血淋巴细胞的效应

如实施例 8 所述, 认为“JTT-1 抗原”可涉及免疫反应中类似“CD28”和“CTLA-4”对淋巴细胞活化的调节作用。为证实之, 以细胞的生长为证据分析抗“人 JTT-1 抗原”的单抗对人淋巴细胞的效应。

96 孔板每孔加入(1)实施例 12 制备的 SA 12 或 SG 430 抗“人 JTT-1 抗原”单抗, 或(2)单抗 SA 12 或 SG 430 ( $1\mu\text{g/ml}$ ) 与抗 CD3 单抗 OKT-3 ( $1\mu\text{g/ml}$ , Orthodiagnostic Systems) 混合, 其中用 OKT-3 是为了加入淋巴细胞活化中的初级信号。板于  $37^\circ\text{C}$  培养 1 小时使每孔均被抗体包被。用 RPMI 1640 洗板后, 每孔加正常人外周血淋巴细胞 ( $1 \times 10^5$  细胞/孔)。在含 10% FCS 的 RPMI1640 中温育 3 天。若有必要, 加  $1\text{ng/ml}$  大戟二萜醇肉豆蔻乙酸酯(PMA)。然后, 每孔加 [ $^3\text{H}$ ] 胸嘧啶 ( $3.7\mu\text{Ci}$ /孔), 板于  $37^\circ\text{C}$  培养 6 小时。收集细胞, 掺入 DNA 的 [ $^3\text{H}$ ] 胸嘧啶量用液相闪烁仪(Beckman) 测量。结果示于图 15。

在包被有 SA 12 或 SG 430 的板的实验中, 淋巴细胞增加数约 10 倍于对照板。在同时有 OKT 3 时, 不管用 SA 12 还是 SG 430, 增加的淋巴细胞数约 100 倍。

这些结果说明“JTT-1 抗原”作用于淋巴细胞活化的调节。同时用 OKT 3 增加了细胞生长速率的这一事实说明“JTT-1 抗原”象“CD28”和“CTLA-4”一样, 涉及协同刺激信号的传递。

### 实施例 14 “JTT-2 抗体”对实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)的效应

如上文详述, 最近许多尝试通过调节 CD28/CTLA-4 和 CD80/CD86 之间的传递来治疗各种自身免疫病(类风湿性关节炎, 多发性硬化症, 自身免疫性甲状腺, 过敏性接触性皮炎, 慢性炎症性皮肤病如扁平癣, 系统性红斑狼疮, 胰岛素依赖型糖尿病, 牛皮癣等)。该效应已在各种自身免疫病的动物模型中得到证实((1)人系统性红斑狼疮(SLE)模型, (2)实验性过敏性脑脊髓炎(EAE), 多发性硬化症(MS)模型, (3)胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)模型, (4)Goodpasture's 肾炎模型, (5)人类风湿性关节炎)。

为证实本发明的“JTT-1 抗原”是否是涉及活化或抑制淋巴细胞的分

子, 如“CD28”和“CTLA-4”, 制成实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)模型大鼠, 多发性硬化症(MS)模型, 并分析标题的单元对模型中“JTT-1 抗体”的效应。

混合 Hartley 豚鼠脑脊髓匀浆(800mg/ml 生理盐水)与等量完全弗氏佐剂制成免疫原乳剂。对 15 只 Lewis 大鼠(雌, 6 周龄)左右脚掌皮内注射该乳剂进行免疫, 每只脚掌 0.25ml。调整给药(免疫)使所制备的匀浆剂量为每只大鼠 200mg。如此免疫可诱导实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)。

如此免疫的大鼠分为三组, 每组 5 只, 以下(1)至(3)中任一个在免疫后 0, 3, 6, 9, 12 天立即静脉注射给每组小鼠。

(1) 实施例 2 制备的抗“大鼠 JTT-1 抗原”的单抗“JTT-2 抗体”(剂量: 2mg/ml PBS, 5mg/kg)

(2) 氢化泼尼松, 类固醇剂(剂量: 4mg/ml PBS, 10mg/kg)

(3) 不与“大鼠 JTT-1 抗原”反应的对照抗体(剂量: 2mg/ml PBS, 5mg/kg)。

免疫后随时间推移观察症状。发现 EAE 发病后, 病症程度根据以下标准打分进行评估。

(1 分)尾紧张消失。

(2 分)后腿拖长, 轻型麻痹

(3 分)后腿拖长, 严重麻痹

(4 分)全身麻痹或死亡。

结果示于图 16。对照抗体给药组中, EAE 的症状在免疫后 11 至 15 天达到高峰(最高分), 然后逐渐恢复。相反, “JTT-2 抗体”给药组在免疫后 11 天 EAE 的症状被显著抑制。此抑制效应明显高于氢化泼尼松给药组的。

这些结果说明“JTT-1 抗原”是在诱导免疫应答, 如淋巴细胞受外来抗原免疫引导而活化, 中起作用的分子, “JTT-1 抗原”或其配体功能的调节可抑制各种自身免疫病的症状。

#### 实施例 15 “JTT-2 抗体”对肾小球肾炎的效应

为了与实施例 14 相同的目的, 制成肾小球基底膜(GBM)肾炎模型大鼠, 分析标题单抗对模型中“JTT-1 抗原”的效应。

经胶原酶消化的牛的肾小球基底膜(Shigei 医研所)用生理盐水稀释至 200 $\mu$ g/ml, 再与完全弗氏佐剂混合制成乳剂免疫原, 48 只 Wister Kyoto

大鼠(约 200g)麻醉后双脚后足底皮内注射该乳剂进行免疫, 剂量为每脚掌约 0.2mg(约 15 $\mu$ g)。这样免疫诱导了肾小球基底膜(GBM)肾炎。

免疫大鼠分为 8 组, 每组 6 只, 以下(1)至(3)中任一个在免疫(0 天)后立即及随后 5 周中每周三次给每只大鼠注射。

(1) 实施例 2 制备的“抗大鼠 JTT-1 抗原”的单抗“JTT-2 抗体”(剂量: 3mg/kg(2ml PBS/kg), 静脉注射)

(2) 氢化泼尼松, 类固醇剂, 作阳性对照(悬浮于 0.5% 羧甲基纤维素(CMC))(剂量: 3mg/kg(5ml/kg), 口服)。

(3) 0.5% CMC 作阴性对照(剂量, 5ml/kg, 口服)。

给试验物质后, 每只大鼠强迫性口服无菌水(25ml/kg), 并收集尿样 5 小时(大鼠关在代谢笼里不吃不喝)。测收集尿样的体积后, 并用 Tonein TP-II(Otuka)测尿蛋白浓度, 计算每 5 小时蛋白的尿排泄量(单位: mg 蛋白/5 小时)。上述尿收集和尿蛋白测定在免疫(0 天)后的 1, 2, 3, 4 周以相同方式重复进行。

结果示于图 17。与对照组相比, 免疫后第 3 周“JTT-2 抗体”给药组的蛋白尿排泄量明显减少。

这些结果显示, “JTT-1 抗原”是诱导免疫应答(如淋巴细胞受外来抗原免疫诱导而活化)的分子, 调节“JTT-1 抗原”或其配体的功能可抑制各种自身免疫病的症状。

#### 实施例 16 制备“JTT-1 抗原”和 IgFc 的融合蛋白

如实施例 8, 13-15 所述, 本发明的“JTT-1 抗原”被认为是涉及有关淋巴细胞活化的调节的协同刺激信号的传递的分子如“CD28”和“CTLA-4”。此外, 如实施例 14 所述, “CTLA-4”胞外区和人免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 区融合蛋白对各种自身免疫病有疗效。本实施例中, 如下制备“JTT-1 抗原”胞外区和人 IgGFc 的融合蛋白, 以检测可溶性 JTT-1 抗原象 CTLA-4-IgFc, 是否可用于治疗各种自身免疫病。

(1) 制备“大鼠 JTT-1 抗原”和人 IgG1-Fc 的融合蛋白(rJTT-1-IgFc)。为了用 PCR 扩增编码“大鼠 JTT-1 抗原”胞外区的 cDNA, 设计并合成了在其末端有 XhoI 限制性位点的 5' 引物(5'-CTGCTCGAGATGAAGCCCTACTTCTCG-3', SEQ ID NO: 7), 和其末端有 BamHI 限制性位点的 3' 引物(5'-ACCCTACGGGTAACGGATCCTTCAGCTGGCAA-3', SEQ ID NO: 8)。用实施例 7 所得

的编码全长“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 克隆“T132A7”作模板，用上述引物进行 PCR 制得包含在其两个末端带有 XhoI 和 BamHI 限制性位点的编码“大鼠 JTT-1 抗原”胞外区的 cDNA 的 cDNA。PCR 产物用 XhoI 和 BamHI 消化，并用琼脂糖凝胶电泳分离得到一条约 450bp 的带，预测是编码所需胞外区的 cDNA 片段。将该分离的 cDNA 片段亚克隆进入用 XhoI 和 BamHI 切割的 pBluescript IISK(+) (Stratagene)。自动荧光 DNA 测序仪 (Applied Biosystems) 分析序列揭示该 cDNA 片段包括编码相应于“大鼠 JTT-1 抗原”的 1-141 氨基酸残基 (SEQ ID NO: 4) 的氨基酸序列的区域。

另一方面，编码人 IgG1 Fc 的 DNA 作为融合伙伴经 BamHI 和 XbaI 消化 B. Seed 等 (Massachusetts General Ctospital) 制备的质粒 (见细胞, 61 卷, 1303-1313 页 (1990)) 而切得为约 1.3kb 的 BamHI-XbaI 片段。该片段包含编码人 IgG<sub>1</sub> 绞链区, C<sub>γ</sub>12 和 C<sub>γ</sub>13 的外显子。

将上述制备的编码“大鼠 JTT-1 抗原”胞外区的 XhoI-BamHI 片段和含编码人 IgG1 的 Fc (“IgFc”) 的外显子的 BamHI-XbaI 片段亚克隆进入用 XhoI 和 XbaI 切割的 pBluescript IISK(+) (Stratagene)。

然后用 XhoI 和 XbaI 消化该质粒，切得一段约 1.8kb 含该融合 DNA (包括“大鼠 JTT-1 抗原”的胞外区和人 IgFc) 的 DNA 片段。用 T4 DNA 连接酶将该融合 DNA 片段插入表达载体 pME 18S 的 XhoI 和 XbaI 位点 (a 医学免疫学, 20 卷, 1 期, 27-32 页 (1990); 实验医学: 增刊, “遗传工程手册”, Yodosha, 101-107 页 (1992)), 构建质粒 prJTT-1-IgFc。

在含 10% FCS 和氨苄青霉素的 DMEM 培养基中亚铺满培养为单层的 HEK 293 细胞 (ATCC CRL 1573) 用 prJTT-1-IgFc 经电穿孔转化获得转化体。

该转化体在无血清 ASF 104 培养基上培养 72 小时以表达 rJTT-1-IgFc。

用蛋白 G Sepharose 亲和层析柱 (Pharmacia), 如下纯化 rJTT-1-IgFc。

将离心上述培养基获得的上清装载到蛋白 G Sepharose 亲和柱 (事先用结合缓冲液平衡好)。柱经结合缓冲液洗涤后, 用洗脱缓冲液开始洗脱。收集洗脱液, 在磷酸缓冲液中透析, 更换透析外液两次或更多次, 获得纯 rJTT-1-IgFc。

亲和层析结果示于图 18, 所得的纯 rJTT-1-IgFc 的 SDS-PAGE 结果示于图 19。

(2) 制备“人 JTT-1 抗原”和人 IgG1-Fc 的融合蛋白(hJTT-1-IgFc)

如(1)制备 hJTT-1-IgFc，除了用于 PCR 的模板 cDNA 和引物不同。本试验中，模板用实施例 8 制得的含编码全长“人 JTT-1 抗原”的 cDNA 的克隆“pBSh 41”，引物为 5'-TAACTGTTTCTCGAGAACATGAAGTCAGGC-3' (SEQ ID NO: 9) 和 5'-ATCCTATGGGTAACGGATCCTTCAGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 10)。

亲和层析结果示于图 20，所得的纯 hJTT-1-IgFc 的 SDS-PAGE 结果示于图 21。

实施例 17 制备整合了编码“大鼠 JTT-1 抗原”的 cDNA 的转基因小鼠

将实施例 7 所得的编码“大鼠 JTT-1 抗原”全长的 cDNA 用 DNA Blunting 试剂盒(Takara)插入带鸡 β 肌动蛋白启动子的表达载体 pCAGGS(基因, 108 卷 193-200 页(1991))获得质粒 prJTTT-1。为制备转基因小鼠, prJTTT-1 经限制酶处理而线性化。

将一只白色 ICR 小鼠(Nihon LSC)与一只雄性输精管结扎的白色 ICR 小鼠(Nihon SLC)交配, 得到一只雌性带阴道栓的 ICR 小鼠作养母小鼠。将雌性 BDF-1 小鼠(Nihon SLC)(因施用 PEAMEX(5 单位, Sankyo Zoki)和人绒毛膜促性腺激素(Pregnil)(5 单位, organon)而过度排卵)与雄性 BDF-1 小鼠(Nihon SLC)交配, 产生可用于获得受精卵以导入“大鼠 JTT-1 抗原”基因的小鼠。支配后, 切出雌性 BDF-1 小鼠的输卵管, 经透明质酸酶处理专门收获受精卵并贮于培养基中。

“大鼠 JTT-1 抗原”基因按常规方法显微操作导入受精卵。该受精卵用维持针固定。含上述线性化的编码“大鼠 JTT-1 抗原”的基因的溶液用 Tris-EDTA 缓冲液稀释后, 于 37 °C 用 DNA 导入针显微注射至受精卵的雄性前核中。

基因导入后, 只选择保持正常状态的受精卵且将如此选择其中导入有“大鼠 JTT-1 抗原”基因的受精卵插入养母小鼠(白 ICR 小鼠)卵巢的卵巢伞。

剪去养母小鼠所生子代小鼠的尾巴, 从中收集基因组基因。经 PCR 证实“大鼠 JTT-1 抗原”基因确已整合入小鼠基因组。然后, 将该建立者小鼠与正常小鼠支配产生高表达“大鼠 JTT-1 抗原”的杂种转基因小鼠。使杂合小鼠互相间交配可得到纯合转基因小鼠。

含“大鼠 JTT-1 抗原”基因的显微注射构建体图示于图 22。

## 实施例 18 制备其内源“小鼠 JTT-1 抗原”的编码基因已被灭活的基因敲出小鼠

### (1) 构建靶向载体

经同源重组灭活(敲出)内源“小鼠 JTT-1 抗原”的编码基因的靶向载体(Nikkei 科学, 52-62 页, 1994 年 5 月)按如下制备。

将用 PstI 和 HindIII 消化实施例 9-5 克隆的含编码“小鼠 JTT-1 抗原”的基因的小鼠基因组 DNA 克隆得到的 PstI-HindIII 片段“同源 DNA(1)”亚克隆进 pGEM-3(Promega)。然后, pGEM-3 用 XhoI 线性化, 经 XhoI 和 SmaI 处理从 pMCI-neo-polyA(Stratagene)中切出的新霉素抗性基因(“neo”)插入“同源 DNA”(1)的上游并连接它们。上述小鼠基因组 DNA 克隆经 XhoI 和 NotI 消化切出位于上述“同源 DNA(1)”上游的一段约 5.5kb 的基因(“同源 DNA(2)”)。上述 pGEM-3(插入了“neo-同源 DNA(1)”)分别经 XhoI 和 HindIII 消化切出“neo-同源 DNA(1)”。将如此获得的“同源 DNA(2)”和“neo-同源 DNA(1)”亚克隆进入经 NotI 和 122 HindIII 线性化的 pSEAP2-CONT(Clontech)。

这一插入了“同源(2)-neo-同源(1)”的质粒经 NruI 消化并在“同源 DNA(1)”的下游区线性化后, 用 PvuII 消化 pMCI-TK(Stratagen)所得胸腺嘧啶激酶基因(TK)被插入“同源 DNA(1)”的下游以获得靶向载体, 该载体中插有“同源 DNA(2)-neo-同源(1)”。

### (2) 将靶向载体导入 ES 细胞

培养于含 15 % FCS 的 DMEM 培养基中的小鼠胚胎干细胞(自然, 362 卷, 255-258 页(1993); 自然, 326 卷, 292-295(页(1987)))用胰酶处理成单细胞, 洗细胞三次, 再加磷酸缓冲液以调至  $1 \times 10^7$  细胞/ml。将上述靶向载体(25 $\mu$ g/ml 细胞悬液)加入该细胞悬液, 传送一次 350v/cm(25 $\mu$ F)的电脉冲。然后将  $1 \times 10^7$  ES 细胞置于 10cm 盘并在在维持培养基中培养 1 天, 并将培养基换成选择培养基(含 250 $\mu$ g/ml G418 和 2 $\mu$ m 丙氧鸟苷)。用每两天换一次的培养该细胞培养基, 导入靶向载体后第 10 天, 在显微镜下用微吸管获得 573 个抗新霉素 ES 细胞克隆。将如此获得的每个 ES 细胞克隆单独培养于包被了饲养细胞 24 孔板上以获得 768 个抗新霉素 ES 细胞复制子。

### (3) 筛选 ES 敲除细胞

用 PCR 确证每个新霉素抗药 ES 细胞中的内源的编码“小鼠 JTT-1 抗原”的基因已通过同源重组被破坏(敲出)。

对于 PCR 而言,所用引物(1)的设计和合成根据上述新霉素抗药基因(“neo”)的序列 5'-CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGC-3', SEQ ID NO: 11) 和引物(2)根据上述“同源 DNA(1)” (5'-CATTCAAGTTTCAGGGAAGTCCATGCGTTTC-3', SEQ ID NO: 12)。

从每个抗新霉素 ES 细胞中抽提每个基因组 DNA,并用该基因组 DNA 为模板,用上述引物进行 PCR。PCR 进行一个反应循环在 94 °C, 3 分钟, 30 个反应循环在 94 °C 1 分钟, 60 °C 1 分钟, 72 °C 3.5 分钟, 1 个反应循环在 72 °C 10 分钟,所得产物存于 4 °C。当经此 PCR 扩增到一段小于约 4kb 的片段,就可判断为内源的编码“小鼠 JTT-1 抗原”的基因已通过同源重组在 ES 细胞克隆中被破坏(敲出)。

从 768 个受检 ES 细胞克隆的三个中获得预期 PCR 产物。对此三个克隆进行基因组 Southern 印迹分析以进一步筛选和确证。抽提这三个克隆的基因组 DNA,用 BamHI 酶切,产物进行琼脂糖凝胶电泳。所得 DNA 再转移至尼龙膜,用含“小鼠 JTT-1”的基因组 DNA 序列制备的探针进行杂交。探针根据同源重组发生位点外围序列而设计,可从正常型基因组中区分突变型基因组的大小。

结果,在三个克隆中有一个发现相应于突变型和正常型的两条带。该 ES 细胞克隆被用于如下制备基因敲出小鼠。

#### (4) 制备基因敲出小鼠

上述内源的“小鼠 JTT-1 抗原”编码基因已经同源重组而被灭活(敲出)的 ES 细胞(15 个 ES 细胞/个胚泡)显微注射入 C57BL6 小鼠雌雄(Nihon Charles River)交配产生的胚泡中。微注射后立即将该胚泡移植进假受孕处理 2.5 天的养母 ICR 小鼠(CLEA 日本)子宫中(每侧子宫约 10 个胚泡)。结果共获得 38 只子代小鼠其中 18 只是所预期嵌合小鼠。嵌合小鼠的 11 只是毛色贡献为 80 % 或更多的嵌合小鼠。

如此所得的嵌合小鼠再与正常 C57BL6 小鼠交配,产生的野灰色小鼠,其颜色来自 ES 细胞的毛色基因。

#### 实施例 19 制备包含抗体的药用组合物

实施例 1 制备的抗“大鼠 JTT-1 抗原”的单抗(50-150 $\mu$ g/ml),“JTT-

1 抗体”和“JTT-1 抗体”，实施例 12 制备的抗“人 JTT-1 抗原”的单抗，“SA 12”和“SG 430”的每种被加入注射用蒸馏水(10ml)中制备注射液。

### 工业应用

本发明中哺乳动物如人，小鼠和大鼠源的新型细胞表面分子(称“JTT-1 抗原”)特征如下：

(1) “JTT-1 抗原”与“CD28”(淋巴细胞如 T 细胞的细胞表面分子，通过细胞粘附传递对 T 细胞活化十分重要的协同刺激信号)，和“CTLA-4”(淋巴细胞如 T 细胞的细胞表面分子，协同该信号调节活化的淋巴细胞如活化 T 细胞的功能)有以下相似：

(i) 20 个或多个氨基酸残基(包括半胱氨酸残基)高度保守；

(ii) 配体结合区必需的脯氨酸重复序列“Pro-Pro-Pro(PPP)”在胞外区中保守；

(iii) 信号传递区必需的“Tyr-Xaa-Xaa-Met(YxxM)”(Xaa 和 x 代表任意氨基酸)在胞质区内保守；还有

(iv) 编码“小鼠 JTT-1 抗原”的基因在小鼠染色体上基因座是“IC3”，象“CD28”和“CTLA-4”一样。

(2) “JTT-1 抗原”可介导胸腺细胞，淋巴母细胞(丝裂原如 ConA 刺激的)，淋巴瘤的细胞粘附，就象介导细胞粘附的“CD28”和“CTLA-4”一样。

(3) “JTT-1 抗原”至少在胸腺细胞，丝裂原如 ConA 刺激的淋巴母细胞(如活化的 T 淋巴母细胞和活化的 B 淋巴母细胞，等等)，外周血淋巴细胞，及胸腺瘤中强烈表达。

(4) 抗“JTT-1 抗原”的抗体显著增殖人外周血淋巴细胞，并且在有抗 CD3 单抗存在时更促进这种增殖(该 CD3 组成 T 细胞表面 TCR/CD3 复合物，从抗原呈递细胞接受 T 细胞活化必需的初级信号)。

(5) 给予抗“JTT-1 抗原”的抗体显著抑制实验性过敏性脑脊髓炎(EAE)的症状。

(6) 给予抗“JTT-1 抗原”的抗体至肾小球基底膜(GBM)肾炎的模型大鼠显著抑制该病的症状。

本发明的“JTT-1 抗原”被认为象“CD28”和“CTLA-4”一样。是传递淋巴细胞如 T 细胞活化必需的第二信号(协同刺激信号)，并与该信号

一起调节活化淋巴细胞如活化的 T 细胞的功能的分子。

因此，本发明的组成此细胞表面分子的多肽，其多肽片段，其融合多肽，其对应抗体可提供特别有用的药物，用于治疗或预防各种自身免疫病，过敏性疾病，或炎症性疾病，特别是，类风湿性关节炎，多发性硬化症，自身免疫性甲状腺炎，过敏接触性皮炎，慢性炎症性皮肤病如扁平苔癣，系统性红斑狼疮，胰岛素依赖型糖尿病，和牛皮癣，这些由淋巴细胞如 T 细胞活化及活化淋巴细胞功能调节的异常所引起的疾病。

相似地，本发明的多肽或多肽片段的编码基因不仅可用于基因治疗上述各种疾病，还可用于制备反义药物。

本发明的多种抗体中，人类单克隆抗体及其药物组合物作为抗体药物具有显著增加的药用价值，因为它们对人无抗原性，而抗原性已成为含非人源抗体如小鼠源抗体的抗体药物的严重问题(副作用)。

本发明的基因(DNA)，多肽，多肽片段和抗体不仅用作药物，还用作寻找与本发明的细胞表面分子相互作用的分子(配体)，澄清该配体的功能，并开发靶向这些配体的药物的试剂。

而且，本发明的转基因小鼠不仅作为研究本发明的细胞表面分子“JTT-1 抗原”的生理功能的模型动物十分有用，而且作为筛选工具筛选具有调节(抑制，压抑，活化，刺激等)“JTT-1 抗原”的功能的各种药物(低分子量化合物，抗体，反义物质，多肽等)十分有用。特别是，这些试验物质可给药于转基因小鼠以测量和分析该小鼠产生的各种生理学，生物学，或药理学参数，从而评估所给试验物质的活性。

此外，本发明的基因敲除小鼠可通过从各种不同角度(生理学，生物学，药理学，病理学和遗传角度)分析该小鼠的特点而弄清本发明的细胞表面分子的功能。

## 序列表

<110> 日本烟草产业株式会社 (JAPAN TABACCO INC.)

<120> 介导细胞吸附和信号传递的细胞表面分子

<130> J1-802PCT

<150> JP 62290/97

<151> 1997-02-27

<150> JP 62217/98

<151> 1998-02-26

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 600

<212> RNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (600)

<400> 1

ATG AAG TCA GGC CTC TGG TAT TTC TTT CTC	30
Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu	
1 5 10	
TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT TTA ACA GGA	60
Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly	
15 20	
GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT TAT GAG ATG	90
Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met	
25 30	

TTT ATA TTT CAC AAC GGA GGT GTA CAA ATT	120
Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TTA TGC AAA TAT CCT GAC ATT GTC CAG CAA	150
Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln	
45 50	
TTT AAA ATG CAG TTG CTG AAA GGG GGG CAA	180
Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln	
55 60	
ATA CTC TGC GAT CTC ACT AAG ACA AAA GGA	210
Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGT GGA AAC ACA GTG TCC ATT AAG AGT CTG	240
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
75 80	
AAA TTC TGC CAT TCT CAG TTA TCC AAC AAC	270
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn	
85 90	
AGT GTC TCT TTT TTT CTA TAC AAC TTG GAC	300
Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp	
95 100	
CAT TCT CAT GCC AAC TAT TAC TTC TGC AAC	330
His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn	
105 110	
CTA TCA ATT TTT GAT CCT CCT CCT TTT AAA	360
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys	
115 120	
GTA ACT CTT ACA GGA GGA TAT TTG CAT ATT	390
Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile	
125 130	
TAT GAA TCA CAA CTT TGT TGC CAG CTG AAG	420
Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys	
135 140	
TTC TGG TTA CCC ATA GGA TGT GCA GCC TTT	450
Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe	
145 150	
GTT GTA GTC TGC ATT TTG GGA TGC ATA CTT	480
Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu	
155 160	
ATT TGT TGG CTT ACA AAA AAG AAG TAT TCA	510
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser	
165 170	
TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAC GGT GAA TAC	540
Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr	

```

                175                180
ATG TTC ATG AGA GCA GTG AAC ACA GCC AAA           570
Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys
                185                190
AAA TCT AGA CTC ACA GAT GTG ACC CTA TAA           600
Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
                195

```

<210> 2

<211> 199

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

```

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

Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly
                65                70
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
                75                80
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn
                85                90
Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp
                95                100
His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn
                105                110
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys
                115                120
Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile
                125                130
Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys

```

135 140  
 Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe  
 145 150  
 Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu  
 155 160  
 Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser  
 165 170  
 Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr  
 175 180  
 Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys  
 185 190  
 Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu  
 195

<210> 3

<211> 2610

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (26)..(625)

<400> 3

GGACTGTAA CTGTTTCTGG CAAAC 25  
  
 ATG AAG TCA GGC CTC TGG TAT TTC TTT CTC 55  
 Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu  
 5 10  
 TTC TGC TTG CGC ATT AAA GTT TTA ACA GGA 85  
 Phe Cys Leu Arg Ile Lys Val Leu Thr Gly  
 15 20  
 GAA ATC AAT GGT TCT GCC AAT TAT GAG ATG 115  
 Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met  
 25 30  
 TTT ATA TTT CAC AAC GGA GGT GTA CAA ATT 145  
 Phe Ile Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile  
 35 40  
 TTA TGC AAA TAT CCT GAC ATT GTC CAG CAA 175  
 Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val Gln Gln  
 45 50  
 TTT AAA ATG CAG TTG CTG AAA GGG GGG CAA 205  
 Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln

55	60	
ATA CTC TGC GAT CTC ACT AAG ACA AAA GGA		235
Ile Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly		
65	70	
AGT GGA AAC ACA GTG TCC ATT AAG AGT CTG		265
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu		
75	80	
AAA TTC TGC CAT TCT CAG TTA TCC AAC AAC		295
Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn		
85	90	
AGT GTC TCT TTT TTT CTA TAC AAC TTG GAC		325
Ser Val Ser Phe Phe Leu Tyr Asn Leu Asp		
95	100	
CAT TCT CAT GCC AAC TAT TAC TTC TGC AAC		355
His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn		
105	110	
CTA TCA ATT TTT GAT CCT CCT CCT TTT AAA		385
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys		
115	120	
GTA ACT CTT ACA GGA GGA TAT TTG CAT ATT		415
Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu His Ile		
125	130	
TAT GAA TCA CAA CTT TGT TGC CAG CTG AAG		445
Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys		
135	140	
TTC TGG TTA CCC ATA GGA TGT GCA GCC TTT		475
Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe		
145	150	
GTT GTA GTC TGC ATT TTG GGA TGC ATA CTT		505
Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu		
155	160	
ATT TGT TGG CTT ACA AAA AAG AAG TAT TCA		535
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser		
165	170	
TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAC GGT GAA TAC		565
Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr		
175	180	
ATG TTC ATG AGA GCA GTG AAC ACA GCC AAA		595
Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys		
185	190	
AAA TCT AGA CTC ACA GAT GTG ACC CTA TAA		625
Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu		
195		
TATGGAAGCTC TGGCACCCAG GCATGAAGCA CGTTGGCCAG TTTTCCTCAA		675

```

CTTGAAGTGC AAGATTCTCT TATTTCCGGG ACCACGGAGA GTCTGACTTA 725
ACTACATACA TCTTCTGCTG GTGTTTTGTT CAATCTGGAA GAATGACTGT 775
ATCAGTCAAT GGGGATTTTA ACAGACTGCC TTGGTACTGC CGAGTCTCT 825
CAAAACAAAC ACCCTCTTGC AACCAGCTTT GGAGAAAGCC CAGCTCCTGT 875
GTGCTCACTG GGAGTGGAAT CCCTGTCTCC ACATCTGCTC CTAGCAGTGC 925
ATCAGCCAGT AAAACAAACA CATTTACAAG AAAAATGTTT TAAAGATGCC 975
AGGGGTACTG AATCTGCAAA GCAAATGAGC AGCCAAGGAC CAGCATCTGT 1025
CCGCATTTCA CTATCATACT ACCTCTTCTT TCTGTAGGGR TGAGAATTCC 1075
TCTTTTAATC AGTCAAGGGA GATGCTTCAA AGCTGGRGCT ATTTTATTTC 1125
TGAGATGTTG ATGTGAACTG TACATTAGTA CATACTCAGT ACTCTCCTTC 1175
AATTGCTGAA CCCCAGTTGA CCATTTTACC AAGACTTTAG ATGCTTTCTT 1225
GTGCCCTCAA TTTTCTTTTT AAAAATACTT CTACATGACT GCTTGACAGC 1275
CCAACAGCCA CTCTCAATAG AGAGCTATGT CTTACATTCT TTCCTCTGCT 1325
GCTCAATAGT TTTATATATC TATGCATACA TATATACACA CATATGTATA 1375
TAAAATTCAT AATGAATATA TTTGCCTATA TTCTCCCTAC AAGAATATTT 1425
TTGCTCCAGA AAGACATGTT CTTTTCTCAA ATTCAGTTAA AATGGTTTAC 1475
TTTGTTC AAG TTAGTGGTAG GAAACATTGC CCGGAATTGA AAGCAAATTT 1525
AWWTTATTAT CCTATTTTCT ACCATTATCT ATGTTTTTCAT GGTGCTATTA 1575
ATTACAAGTT TAGTCTTTT TGTAGATCAT ATTA AAAATTG CAAAACAAAAT 1625
CATCTTTAAT GGGCCAGCAT TCTCATGGGG TAGAGCAGAA TATTCATTTA 1675
GCCTGAAAGC TGCAGTACT ATAGGTTGCT GTCAGACTAT ACCCATGGTG 1725
CCTCTGGGCT TGACAGGTCA AAATGGTCCC CATCAGCCTG GAGCAGCCCT 1775
CCAGACCTGG GTGGAATTCC AGGGTTGAGA GACTCCCCTG AGCCAGAGGC 1825
CACTAGGTAT TCTTGCTCCC AGAGGCTGAA GTCACCCTGG GAATCACAGT 1875
GGTCTACCTG CATTATAAT TCCAGGATCT GTGAAGAGCA CATATGTGTC 1925
AGGGCACAAAT TCCCTCTCAT AAAAACCACA CAGCCTGGAA ATTGGCCCTG 1975
GCCCTTCAAG ATAGCCTTCT TTAGAATATG ATTTGGCTAG AAAGATTCTT 2025
AAATATGTGG AATATGATTA TTCTTAGCTG GAATATTTTC TCTACTTCCT 2075
GTCTGCATGC CCAAGGCTTC TGAAGCAGCC AATGTGATG CAACAACATT 2125
TGTAACTTTA GGTA AACTGG GATTATGTTG TAGTTTAAACA TTTTGTA ACT 2175
GTGTGCTTAT AGTTTACAAG TGAGACCCGA TATGTCATTA TGCATACTTA 2225
TATTATCTTA AGCATGTGTA ATGCTGGATG TGTACAGTAC AGTACWTAAC 2275
TTGTAATTTG AATCTAGTAT GGTGTTCTGT TTTCAGCTGA CTTGGACAAC 2325
CTGACTGGCT TTGCACAGGT GTTCCCTGAG TTGTTTGCAG GTTTCTGTGT 2375
GTGGGGTGGG GTATGGGGAG GAGAACCTTC ATGGTGGCCC ACCTGGCCTG 2425
GTTGTCCAAG CTGTGCCTCG ACACATCCTC ATCCCAAGCA TGGGACACCT 2475
CAAGATGAAT AATAATTCAC AAAATTTCTG TGAAATCAA TCCAGTTTTA 2525
AGAGGAGCCA CTTATCAAAG AGATTTTAAAC AGTAGTAAGA AGGCAAAGAA 2575
TAAACATTTG ATATTCAGCA ACTGAAAAAA AAAAA 2610

```

<210> 4

<211> 2072

<212> DNA

<213> 大鼠 (Rattus)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (35)..(637)

&lt;400&gt; 4

CTGGAGGGGA AGAGTGCAGC TGTTCCTGGC AGAC	34
ATG AAG CCC TAC TTC TCG TGC GTC TTT GTC	64
Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val	
1 5 10	
TTC TGC TTC CTA ATC AAA CTT TTA ACA GGA	94
Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu Thr Gly	
15 20	
GAA CTC AAT GAC TTG GCC AAT CAC AGG ATG	124
Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met	
25 30	
TTT TCG TTT CAC GAT GGA GGT GTA CAG ATT	154
Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TCT TGT AAC TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	184
Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
45 50	
TTA AAA ATG CAG TTG TTC AAA GAC AGA GAA	214
Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu	
55 60	
GTC CTC TGC GAC CTC ACC AAG ACC AAG GGA	244
Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGC GGA AAC ACC GTG TCC ATC AAG AAT CCG	274
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro	
75 80	
ATG TCC TGT CCA TAT CAG CTG TCC AAC AAC	304
Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn	
85 90	
AGT GTC TCT TTT TTC CTA GAC AAC GCA GAC	334
Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp	
95 100	
AGC TCC CAG GGC AGC TAC TTT TTA TGC AGC	364
Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser	
105 110	
CTG TCG ATT TTC GAC CCA CCC CCT TTT CAA	394
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln	
115 120	

GAA AAG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CTT	424
Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu	
125 130	
ATT TAT GAA TCC CAG CTT TGT TGC CAG CTG	454
Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu	
135 140	
AAG CTT TGG TTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT	484
Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala	
145 150	
TTT GTG GCA GCG CTC CTT TTT GGA TGC ATA	514
Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile	
155 160	
TTT ATC GTC TGG TTT GCA AAA AAG AAG TAC	544
Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr	
165 170	
AGA TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAT AGC GAG	574
Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu	
175 180	
TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC	604
Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn	
185 190	
AAA AAG TCC AGA CTT GCA GGT ATG ACC TCA	634
Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Met Thr Ser	
195 200	
TAA	637
TCTGGAACAC GGAACCCAT GGAGGAACTA CACTGTCTAG TTCCCCTGAA	687
ACTTGAATGG AGAAAGTCTT CTATTTTCTG GACCACAGGG CATCTGACTT	737
GATTAACACTAC TGATACCTCC TTTTGGKGT TGTGTTGTCT GGATCAGTGA	787
CTATCAGTCA CTCGGAATTT CAGCAGACTG CCCTGGGTTT GCTGAGTCCT	837
TTTAAGGCAA ACCCCTTCTT ATAGAAGACC CGGCTCATAT GTATTCAACA	887
AACAGACCTC ACTGGGATAC AATCCCCTCT TTCTGCGCCT GCTTCTAGCT	937
ATGCACCGGC CAGCAAGACA AACATATCTC CAGCATTTTT ACAAAAATGC	987
CAGGGTATGA ATCTGTAAG TACACAGGCA GCCATTGACC ACCGTCTGTC	1037
CTCGTTTTTT CAGATTCTAT TTTTTCAT AGAGATCAGC ATTCCTTCTA	1087
GAATCAGACA GTAGAGGGAG ATGCTTCACA ACAGAAGCTC TTATGTTTCT	1137
GAGATGTTGA TGAATTCATG CTTTAGTACC ACCATGTTCT CTAACAACTT	1187
CTATATTCCA GCTGATCACT GCTTCAGGGC TTAGATGCCT GCTTTTGCCT	1237
TCAAGTCTCC CCTTAAAGAT ACTCCCACAG GTCTACTTGG TGGCCTGCAG	1287
CCACTCTGAA TAGGAAGTTT GGTCTACAAT TTCCCCCTC TGCTGCTCAA	1337
AAAAAAAAAT TAGTAGATAT GATTTTCCCA TATTCTCCCT GCCAAAGTAA	1387
TTTTTTCAG CAAAGACATC TAAATTCAGT TAATATGGTT TACTGTGTTG	1437
ATATTAGTGG CAGTAAACAT TTCTCAGAAT CAAAAGCAA TTAATTTTGC	1487
GGTGGTGTGTT TTCTACCATT ATCTTGGGTT TCCATGGTGC TATTACTCAC	1537
AAGTTTAGCT ATTTTTTAT GCATCATATT AAAGTTGCAA GCAAGCAGAG	1587

CAACCTCGG TTAATGGGCA AACATTCTCC TGGGGTAGAA TGAATTGTCT 1637  
 ATTTAGCCCG AAAACTGCAG TTTCTGTGGG TGGCTGCCAG ACTACAGCCG 1687  
 TGCTTTGCTC TGGCTTTGAC AGGTTGAAAT AGYCCCATG ASCSTGGAAC 1737  
 AGWACTCCAG ACTGTGCTGG AGTCCCAAAG TTAGGAGGGC CATGGAGCCT 1787  
 GGGACAGGCT GCTGCTTTGG TCTTTAGGAT CTAGGAARAA TTACAGAGGG 1837  
 GCCAAGACAG AGTTCCTCC CCTAGAAACT GTGCAGCCTG GAAGTCAGCC 1887  
 CTGGCACTTT AAGATAGCCT TCTTTAGAAC ATGAGTTAGT TGGTAGTATT 1937  
 CTGACGTGTA AACAGCCTAT KGTGCTCGG AGCTGGACCA TTTTCTCCAC 1987  
 TTCCCTGTCT GCATGCCTAA GACTTCTAGA GCAGCCAACG TATATGCAAC 2037  
 ATTAAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA 2072

<210> 5

<211> 603

<212> RNA

<213> 小鼠 (Mus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (603)

<400> 5

ATG AAG CCG TAC TTC TGC CAT GTC TTT GTC 30  
 Met Lys Pro Tyr Phe Cys His Val Phe Val  
 1 5 10  
 TTC TGC TTC CTA ATC AGA CTT TTA ACA GGA 60  
 Phe Cys Phe Leu Ile Arg Leu Leu Thr Gly  
 15 20  
 GAA ATC AAT GGC TCG GCC GAT CAT AGG ATG 90  
 Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asp His Arg Met  
 25 30  
 TTT TCA TTT CAC AAT GGA GGT GTA CAG ATT 120  
 Phe Ser Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile  
 35 40  
 TCT TGT AAA TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG 150  
 Ser Cys Lys Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln  
 45 50  
 TTA AAA ATG CGA TTG TTC AGA GAG AGA GAA 180  
 Leu Lys Met Arg Leu Phe Arg Glu Arg Glu  
 55 60  
 GTC CTC TGC GAA CTC ACC AAG ACC AAG GGA 210  
 Val Leu Cys Glu Leu Thr Lys Thr Lys Gly  
 65 70  
 AGC GGA AAT GCG GTG TCC ATC AAG AAT CCA 240

Ser Gly Asn Ala Val Ser Ile Lys Asn Pro	
75	80
ATG CTC TGT CTA TAT CAT CTG TCA AAC AAC	270
Met Leu Cys Leu Tyr His Leu Ser Asn Asn	
85	90
AGC GTC TCT TTT TTC CTA AAC AAC CCA GAC	300
Ser Val Ser Phe Phe Leu Asn Asn Pro Asp	
95	100
AGC TCC CAG GGA AGC TAT TAC TTC TGC AGC	330
Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Tyr Phe Cys Ser	
105	110
CTG TCC ATT TTT GAC CCA CCT CCT TTT CAA	360
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln	
115	120
GAA AGG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CAT	390
Glu Arg Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu His	
125	130
ATT TAT GAA TCC CAG CTC TGC TGC CAG CTG	420
Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu	
135	140
AAG CTC TGG CTA CCC GTA GGG TTG CCA GCT	450
Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Leu Pro Ala	
145	150
TTC GTT GTG GTA CTC CTT TTT GGA TGC ATA	480
Phe Val Val Val Leu Leu Phe Gly Cys Ile	
155	160
CTT ATC ATC TGG TTT TCA AAA AAG AAA TAC	510
Leu Ile Ile Trp Phe Ser Lys Lys Lys Tyr	
165	170
GGA TCC AGT GTG CAT GAC CCT AAT AGT GAA	540
Gly Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu	
175	180
TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC	570
Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn	
185	190
AAA AAG TCT AGA CTT GCA GGT GTG ACC TCA	600
Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Val Thr Ser	
195	200
TAA	603

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 836

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 大鼠(Rattus)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (35)..(685)

&lt;400&gt; 6

CTGGAGGGGA AGACTGCAGC TGTTCCCTGGC AGAC	34
ATG AAG CCC TAC TTC TCG TGC GTC TTT GTC	64
Met Lys Pro Tyr Phe Ser Cys Val Phe Val	
1 5 10	
TTC TGC TTC CTA ATC AAA CTT TTA ACA GGA	94
Phe Cys Phe Leu Ile Lys Leu Leu The Gly	
15 20	
GAA CTC AAT GAC TTG GCC AAT CAC AGG ATG	124
Glu Leu Asn Asp Leu Ala Asn His Arg Met	
25 30	
TTT TCG TTT CAC GAT GGA GGT GTA CAG ATT	154
Phe Ser Phe His Asp Gly Gly Val Gln Ile	
35 40	
TCT TGT AAC TAC CCT GAG ACT GTC CAG CAG	184
Ser Cys Asn Tyr Pro Glu Thr Val Gln Gln	
45 50	
TTA AAA ATG CAG TTG TTC AAA GAC AGA GAA	214
Leu Lys Met Gln Leu Phe Lys Asp Arg Glu	
55 60	
GTC CTC TGC GAC CTC ACC AAG ACC AAG GGA	244
Val Leu Cys Asp Leu Thr Lys Thr Lys Gly	
65 70	
AGC GGA AAC ACC GTG TCC ATC AAG AAT CCG	274
Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Asn Pro	
75 80	
ATG TCC TGT CCA TAT CAG CTG TCC AAC AAC	304
Met Ser Cys Pro Tyr Gln Leu Ser Asn Asn	
85 90	
AGT GTC TCT TTT TTC CTA GAC AAC GCA GAC	334
Ser Val Ser Phe Phe Leu Asp Asn Ala Asp	
95 100	
AGC TCC CAG GGC AGC TAC TTT TTA TGC AGC	364
Ser Ser Gln Gly Ser Tyr Phe Leu Cys Ser	
105 110	
CTG TCG ATT TTC GAC CCA CCC CCT TTT CAA	394
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Gln	
115 120	
GAA AAG AAC CTT AGT GGA GGA TAT TTG CTT	424

Glu Lys Asn Leu Ser Gly Gly Tyr Leu Leu	
125	130
ATT TAT GAA TCC CAG CTT TGT TGC CAG CTG	454
Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu	
135	140
AAG CTT TGG TTA CCC GTA GGG TGT GCA GCT	484
Lys Leu Trp Leu Pro Val Gly Cys Ala Ala	
145	150
TTT GTG GCA GCG CTC CTT TTT GGA TGC ATA	514
Phe Val Ala Ala Leu Leu Phe Gly Cys Ile	
155	160
TTT ATC GTC TGG TTT GCA AAA AAG AAG TAC	544
Phe Ile Val Trp Phe Ala Lys Lys Lys Tyr	
165	170
AGA TCC AGT GTG CAC GAC CCT AAT AGC GAG	574
Arg Ser Ser Val His Asp Pro Asn Ser Glu	
175	180
TAC ATG TTC ATG GCG GCA GTC AAC ACA AAC	604
Tyr Met Phe Met Ala Ala Val Asn Thr Asn	
185	190
AAA AAG TCC AGA CTT GCA GGT ACA GCA CCC	634
Lys Lys Ser Arg Leu Ala Gly Thr Ala Pro	
195	200
CTT AGG GCT TTG GGG AGA GGA GAA CAC TCT	664
Leu Arg Ala Leu Gly Arg Gly Glu His Ser	
205	210
TCA TGT CAA GAC CGG AAT TAA	685
Ser Cys Gln Asp Arg Asn	
215	
TTTGTTTATT TCTATTTTAA AAGAAAGACA TTTTTTCCCC TAAAGATAAT	735
TTTTGTATTT TTATGTGAAA GTCTGAATCT TCATTTTAAAC TCGACTTATA	785
TACTCTGTGG TATATTA AAA ATAATGTTTG TGAAAAAAAA AAAAAAAAAA	835
A	836

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工合成的引物序列

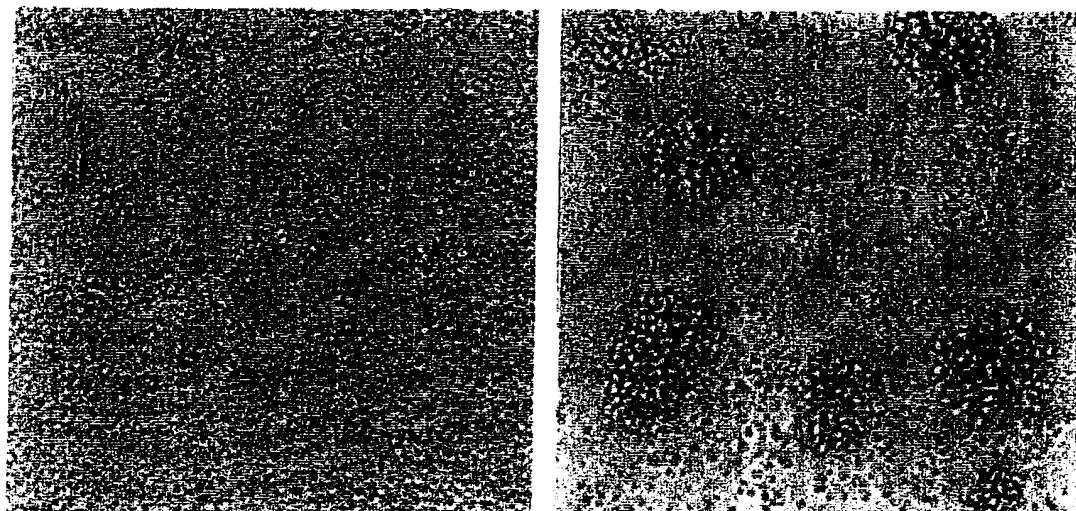
&lt;400&gt; 7

CTGCTCGAGA TGAAGCCCTA CTTCTCG

27

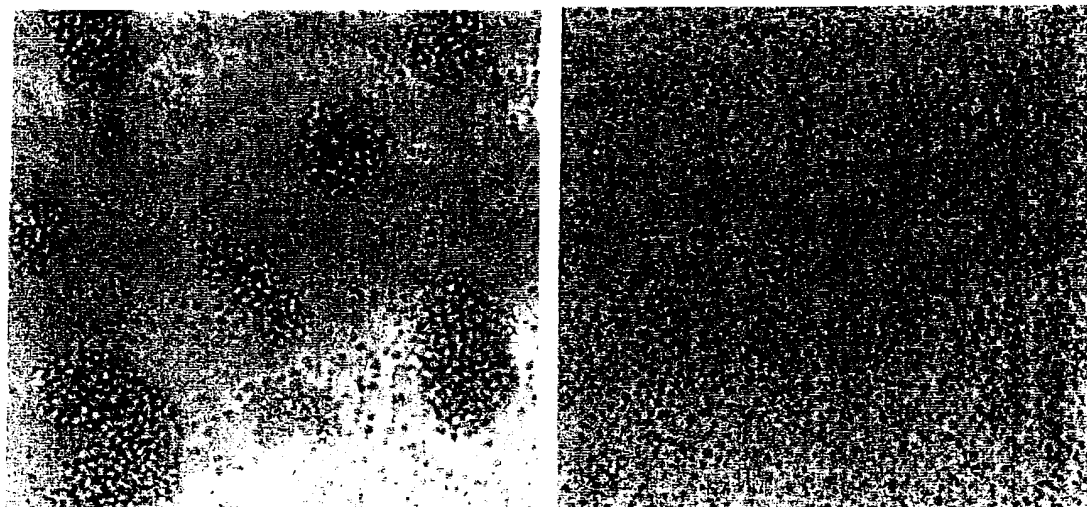
&lt;210&gt; 8

<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工合成的引物序列	
<400> 8	
ACCCTACGGG TAACGGATCC TTCAGCTGGC AA	32
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工合成的引物序列	
<400> 9	
TAACTGTTTC TCGAGAACAT GAAGTCAGGC	30
<210> 10	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工合成的引物序列	
<400> 10	
ATCCTATGGG TAACGGATCC TTCAGCTGGC	30
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工合成的引物序列	
<400> 11	
CGTGATATTG CTGAAGAGCT TGGCGCGAA TGGGC	35
<210> 12	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工合成的引物序列	
<400> 12	
CATTCAAGTT TCAGGGA ACT AGTCCATGCG TTTC	34



(a)

(b)



(c)

(d)

图 1

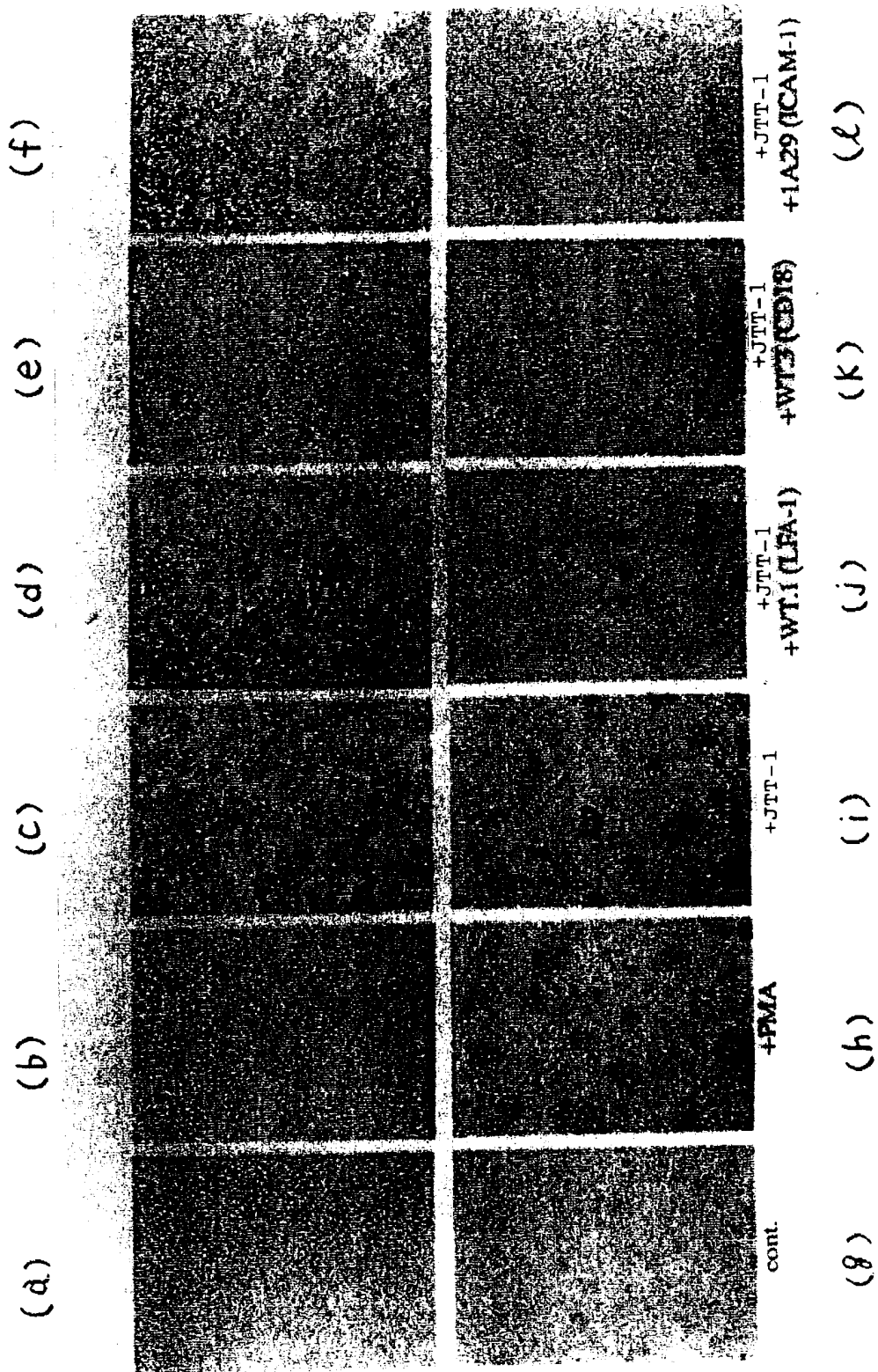


图 2

FTL435

ConA刺激的  
淋巴母细胞

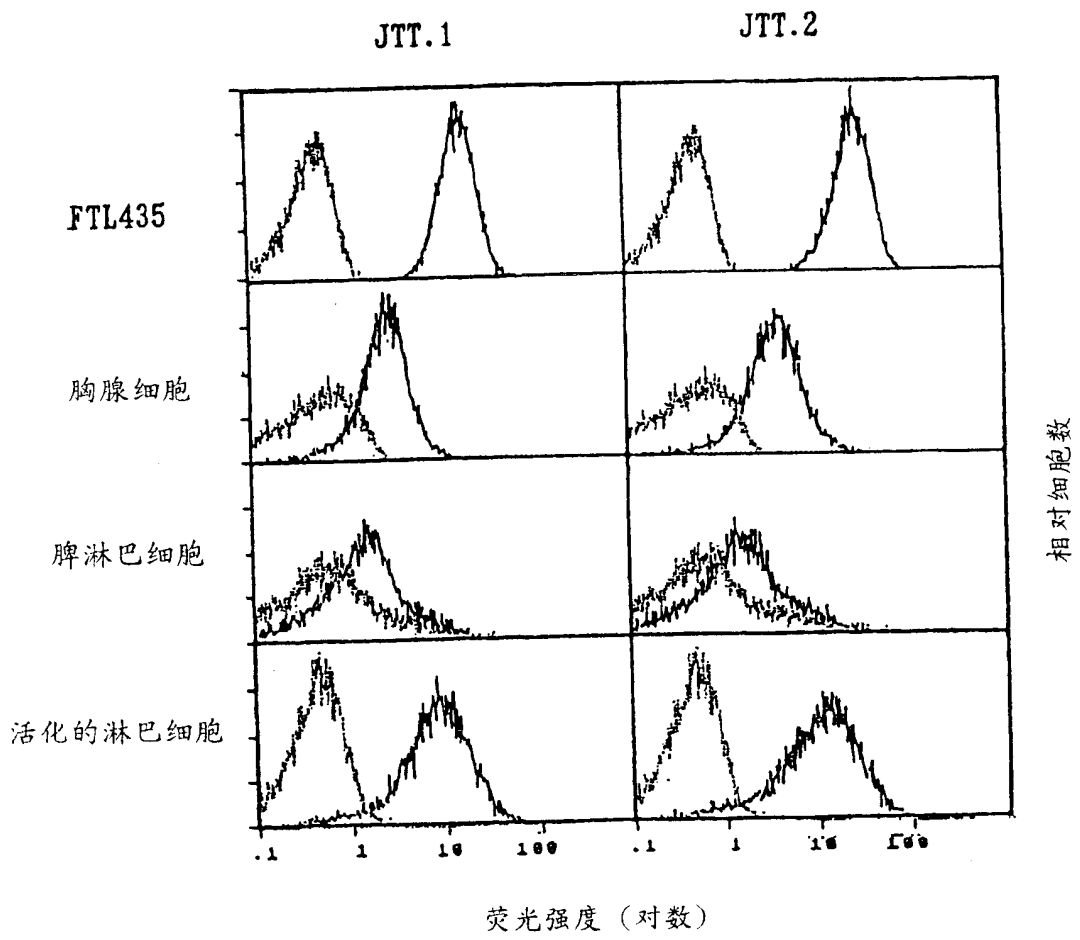


图 3

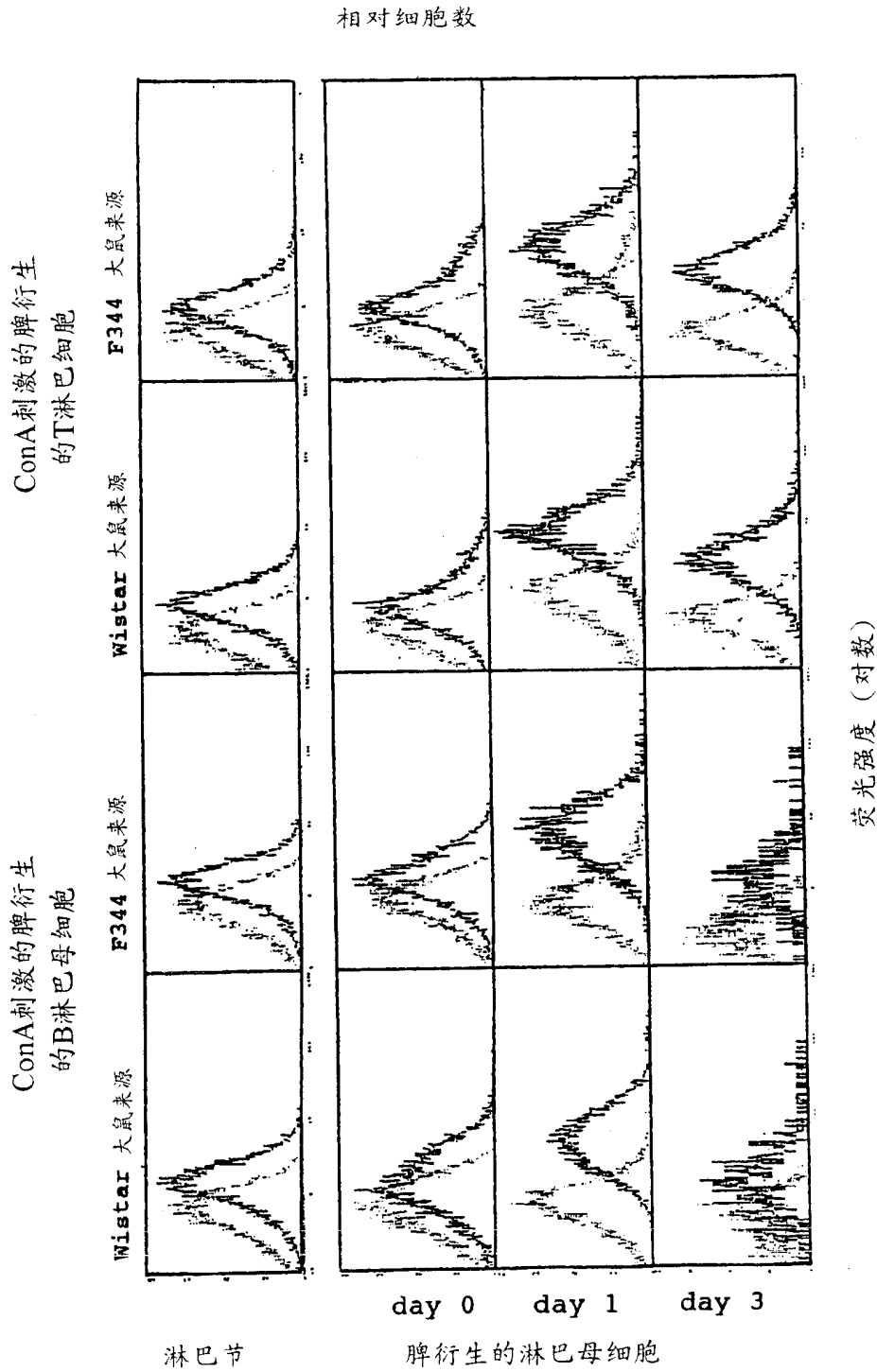


图 4

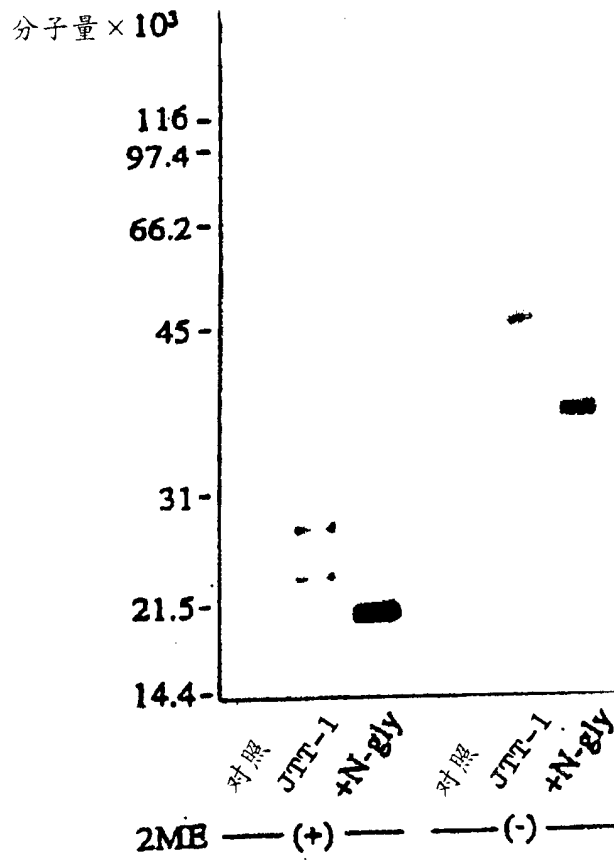


图 5

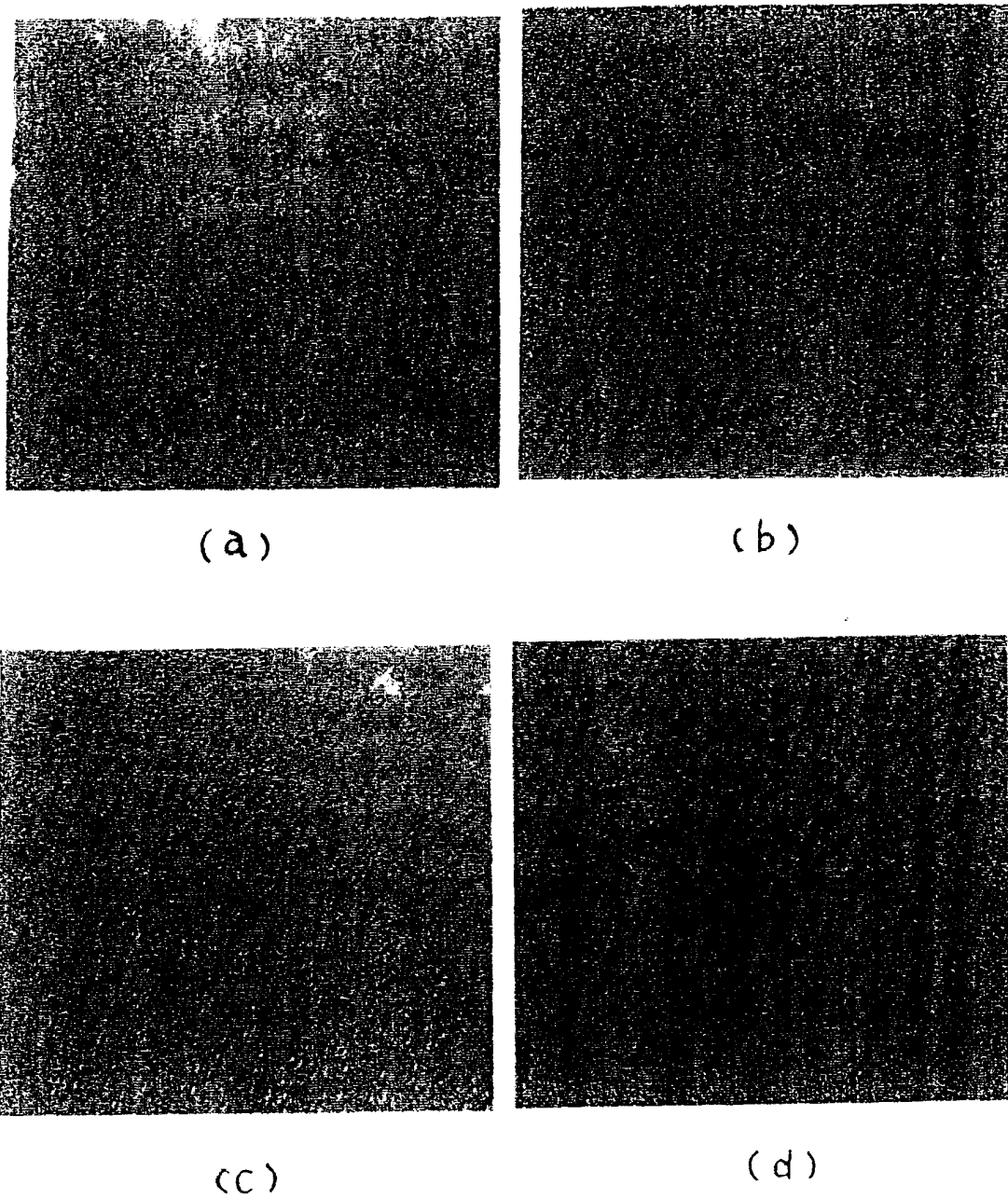


图 6

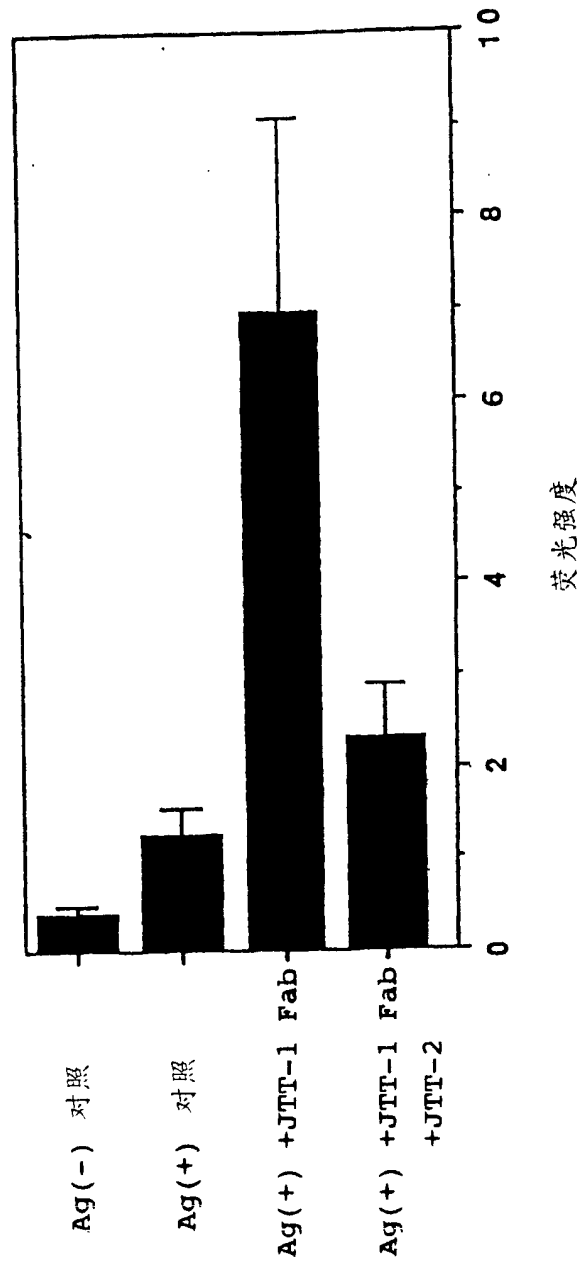


图 7

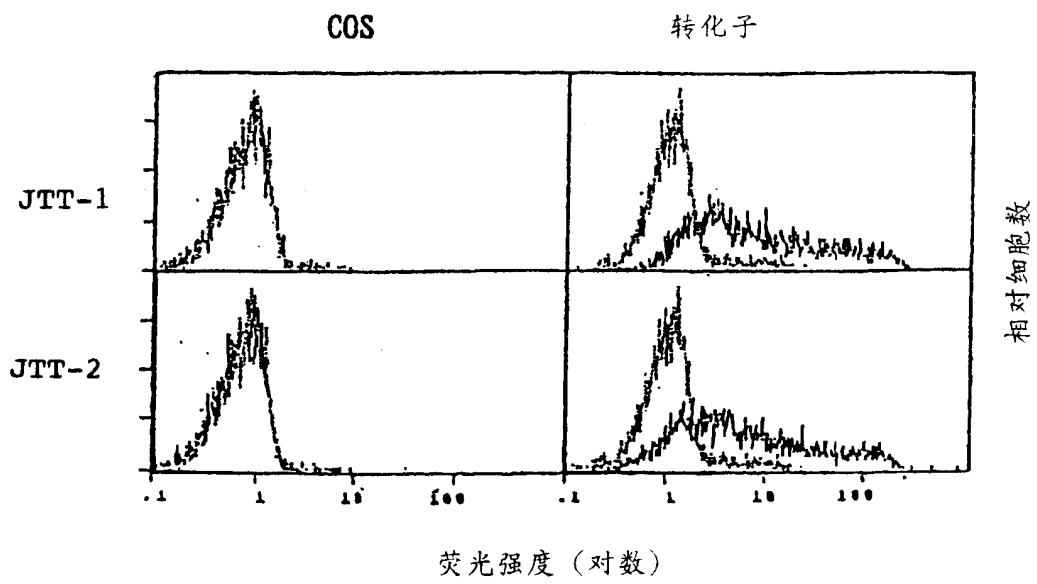


图 8

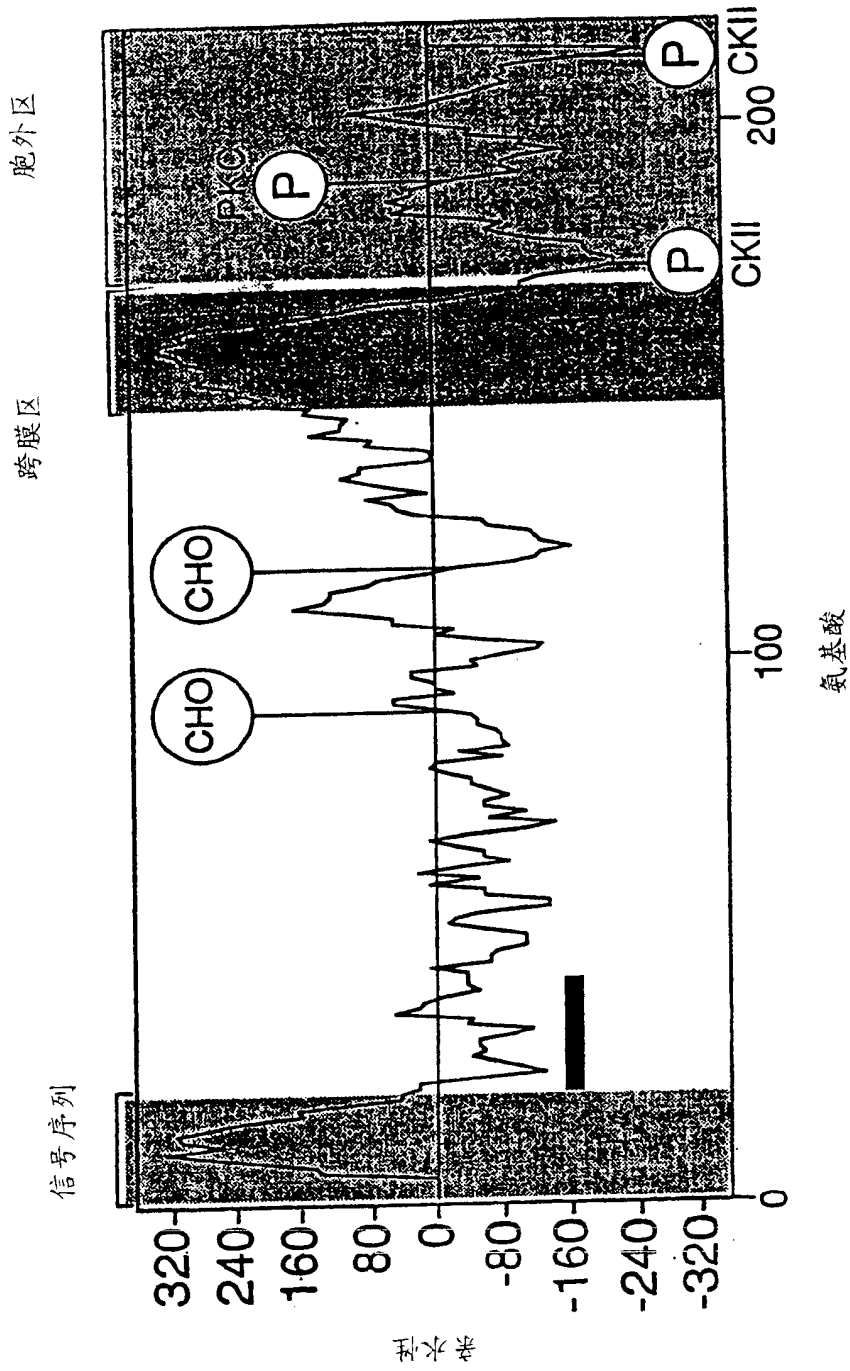


图 9



JTT1	34	M	Y	L	T	G	E	I	N	G	S	A	N	Y	E	M	F	I	F	H	
CD28	33	M	L	L	L	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CTLA4	50	M	A	C	L	G	F	Q	R	H	K	A	Q	L	N	L	A	A	R	T	W
共有序列	50	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JTT1	78	NG	G	V	Q	I	L	C	K	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CD28	81	NA	V	-	N	L	S	C	K	Y	S	N	L	F	S	R	E	F	R	A	S
CTLA4	98	RG	I	A	S	F	V	C	E	Y	A	S	P	G	K	A	T	E	V	R	V
共有序列	100	NG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JTT1	126	S	L	K	F	C	H	S	Q	L	S	N	N	S	V	S	P	F	L	Y	N
CD28	131	T	G	F	N	C	D	G	K	L	G	N	E	S	V	T	F	Y	L	Q	N
CTLA4	147	D	D	S	I	C	T	G	T	S	G	N	Q	V	N	L	T	I	Q	G	L
共有序列	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JTT1	167	Y	L	H	V	K	G	K	H	L	C	C	Q	L	K	F	-	-	-	-	-
CD28	181	I	I	H	V	K	G	K	H	L	C	C	P	S	P	L	F	P	G	P	S
CTLA4	191	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C	P	D	S	D	F	-	-	-	-	-
共有序列	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JTT1	199	K	Y	S	S	S	V	H	D	P	N	G	E	Y	M	F	M	R	A	V	N
CD28	220	K	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTLA4	223	K	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
共有序列	242	K	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图 11

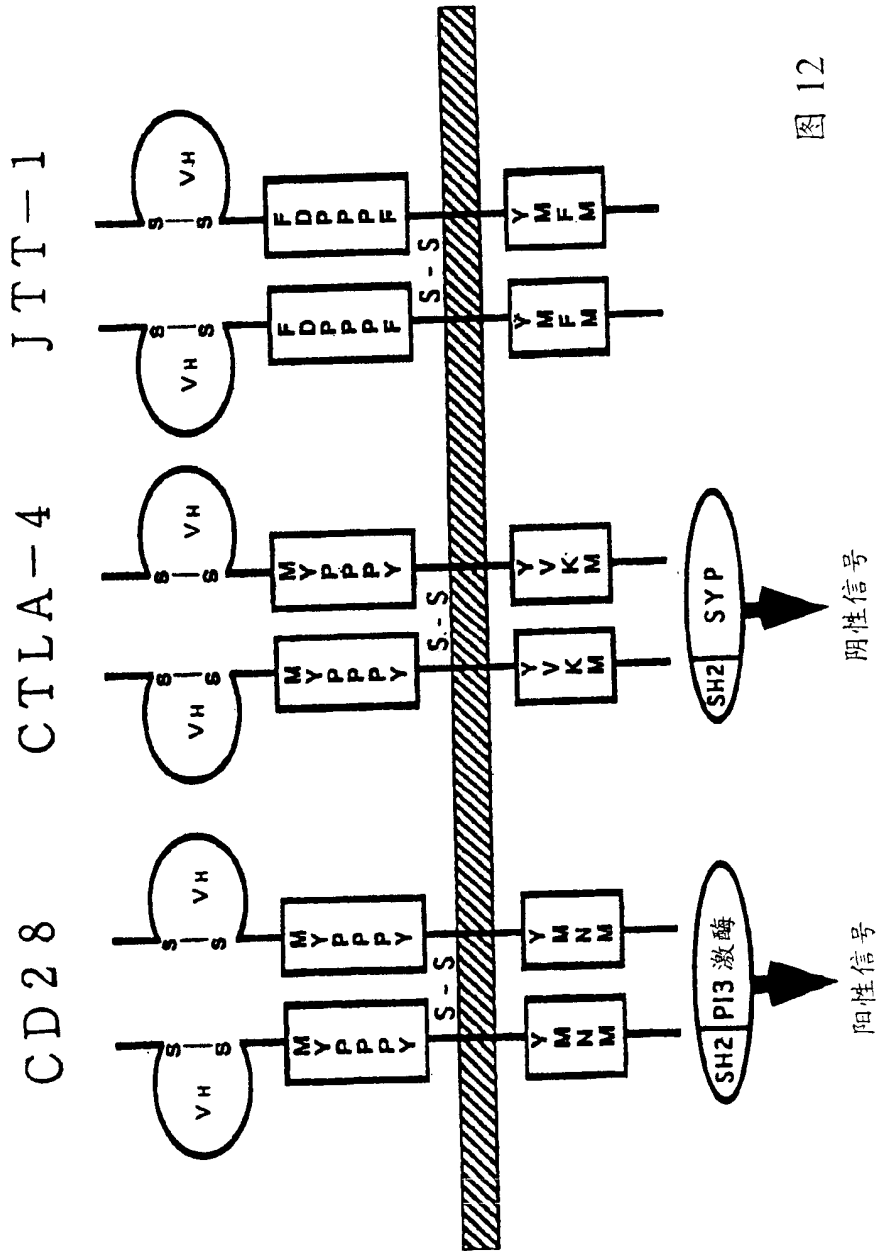


图 12

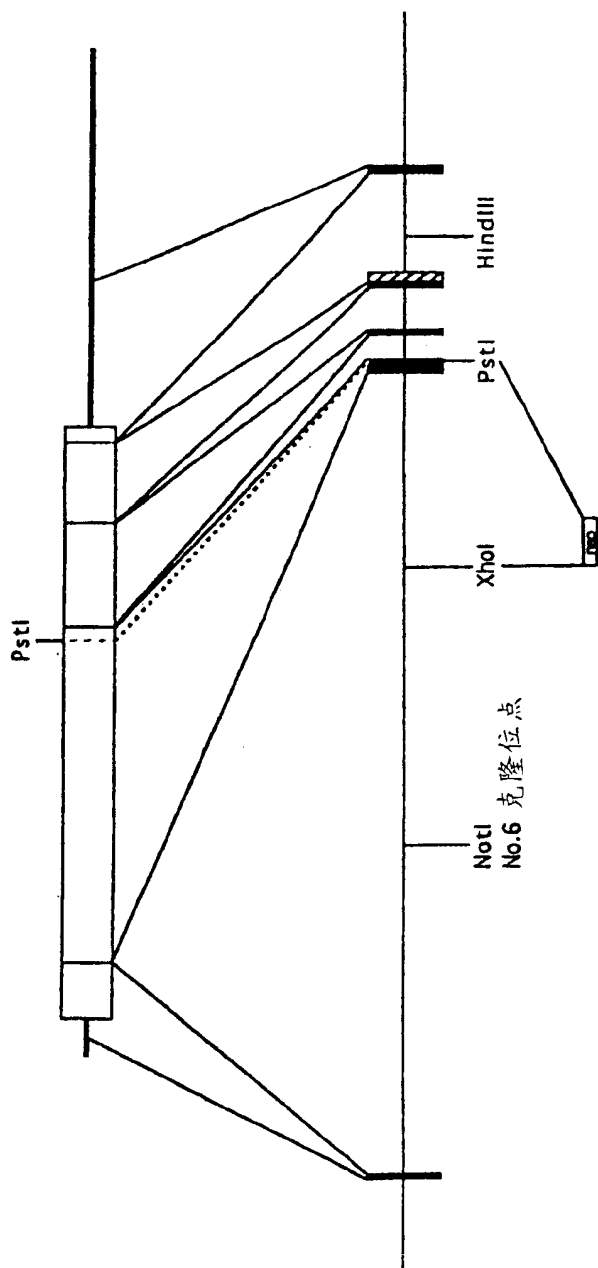


图 13

大鼠 大鼠突变体 共有序列	<pre> MKPYFSCV FV FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSHDGGVQI SCNYPETVQQ MKPYFSCV FV FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSHDGGVQI SCNYPETVQQ MKPYFSCV FV FCFLIKLLTG ELNDLANHRM FSHDGGVQI SCNYPETVQQ                     </pre>	50 50 50
大鼠 大鼠突变体 共有序列	<pre> LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNIVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNIVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD LKMQLFKDRE VLCDLTKTKG SGNIVSIKNP MSCPYQLSNN SVSFFLDNAD                     </pre>	100 100 100
大鼠 大鼠突变体 共有序列	<pre> SSQGSYFLCS LSIFDPPPFQ EKNLSCGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGC AA SSQGSYFLCS LSIFDPPPFQ EKNLSCGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGC AA SSQGSYFLCS LSIFDPPPFQ EKNLSCGYLL IYESQLCCQL KLWLPVGC AA                     </pre>	150 150 150
大鼠 大鼠突变体 共有序列	<pre> FVAALLFGCI FIVWFAKKY RSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAG MTS FVAALLFGCI FIVWFAKKY RSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAG TAP FVAALLFGCI FIVWFAKKY RSVHDPNSE YMFMAAVNTN KKSRLAG ...                     </pre>	200 200 200
大鼠 大鼠突变体 共有序列	<pre> ----- LRALGRGEHS SCQDRN .....                     </pre>	200 216 216

图 14

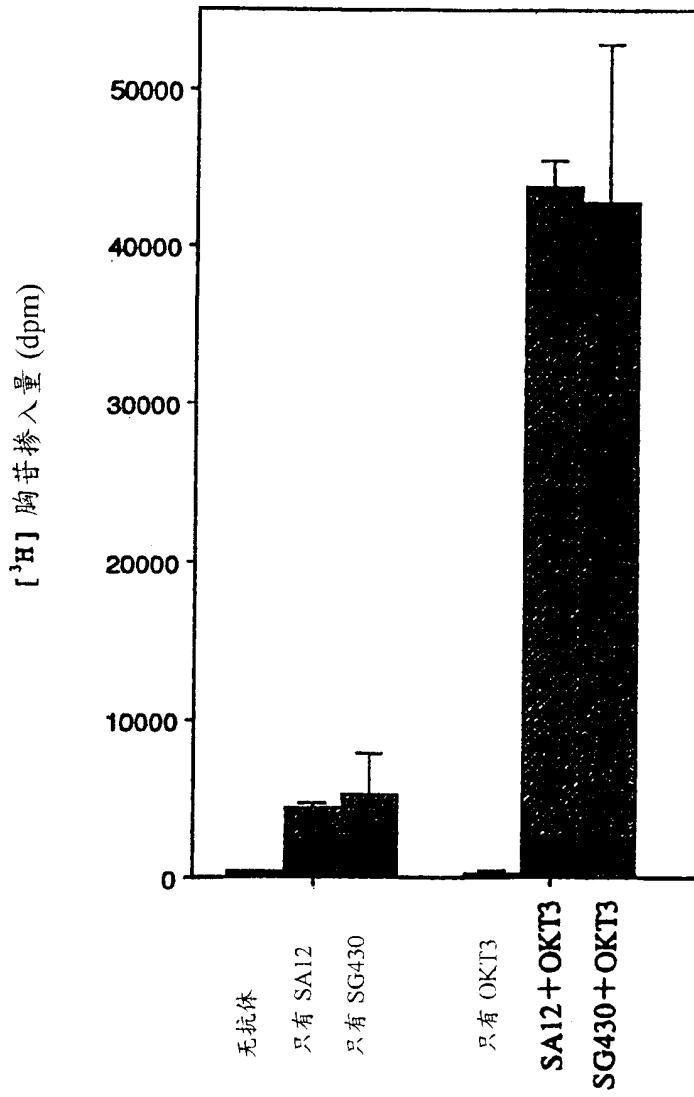


图 15

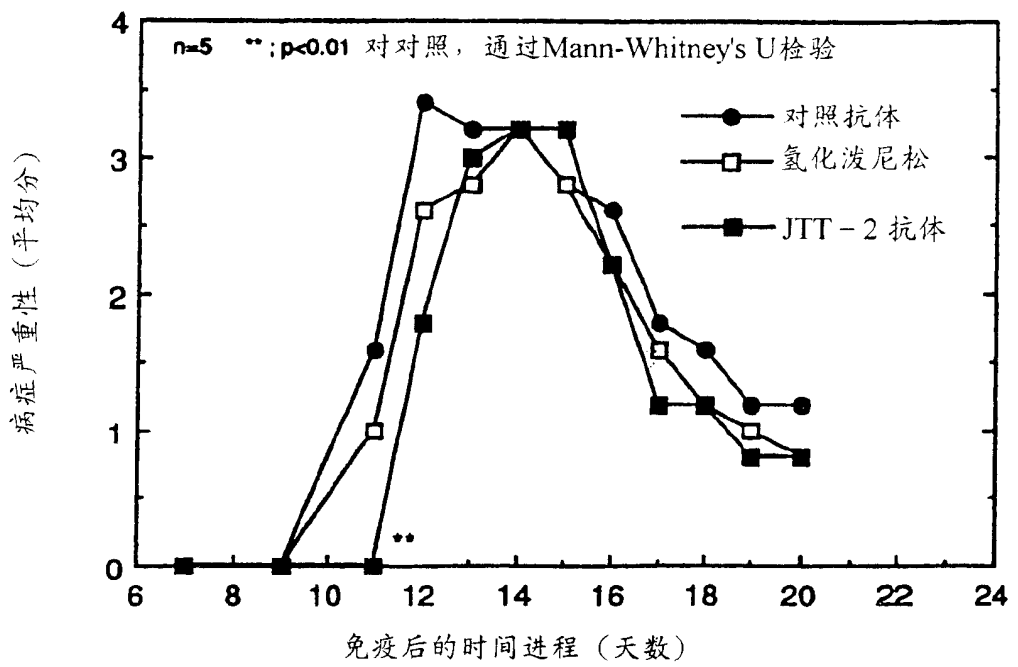


图 16

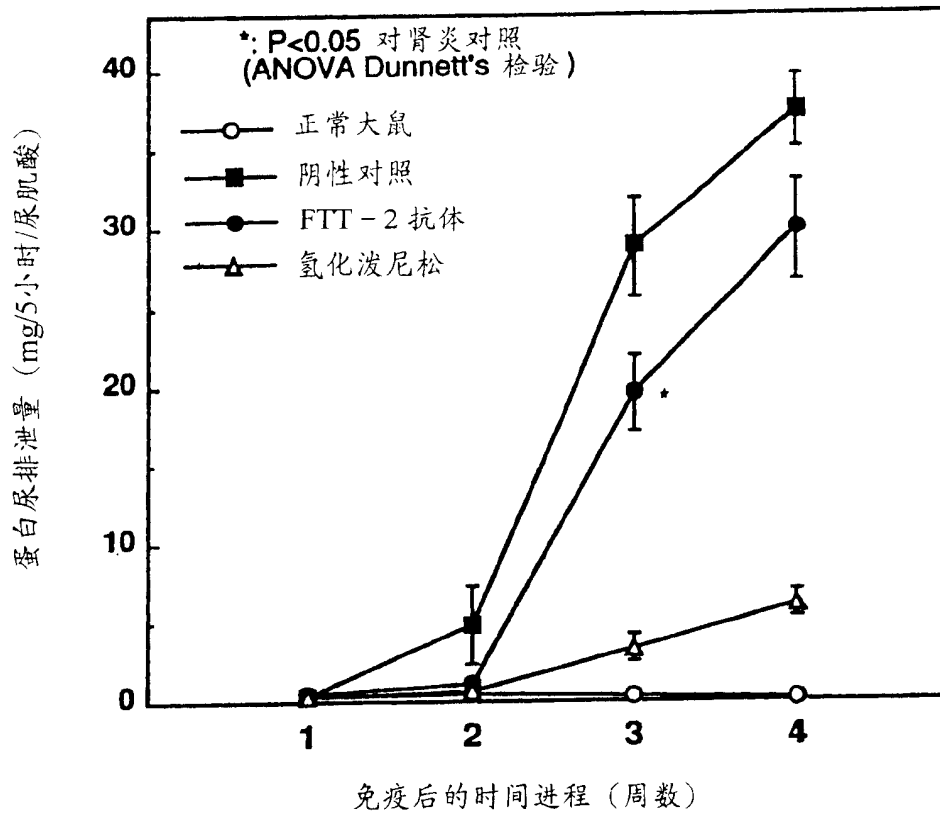


图 17

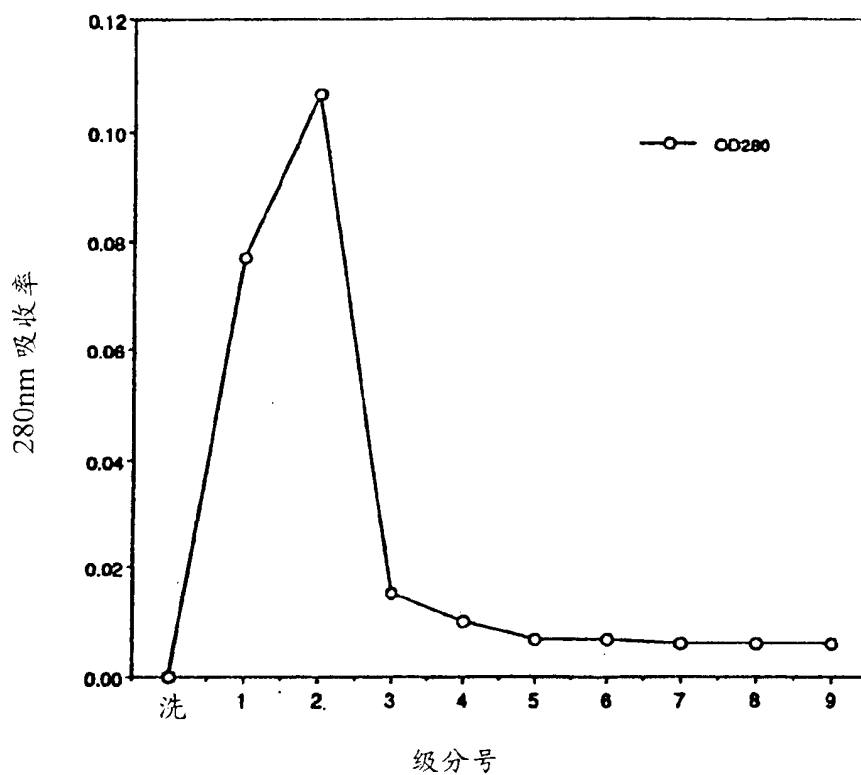


图 18

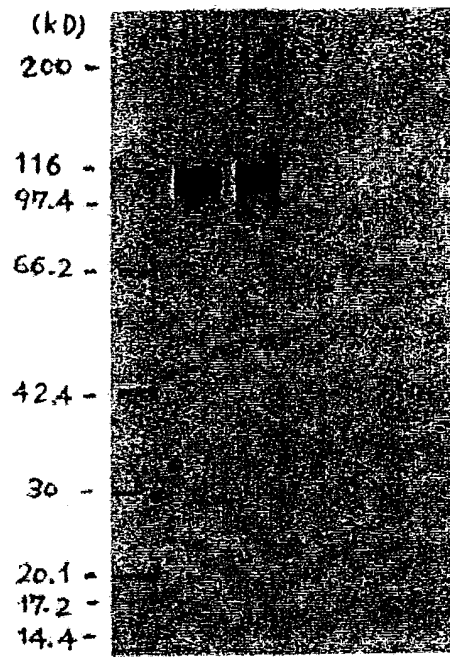


图 19

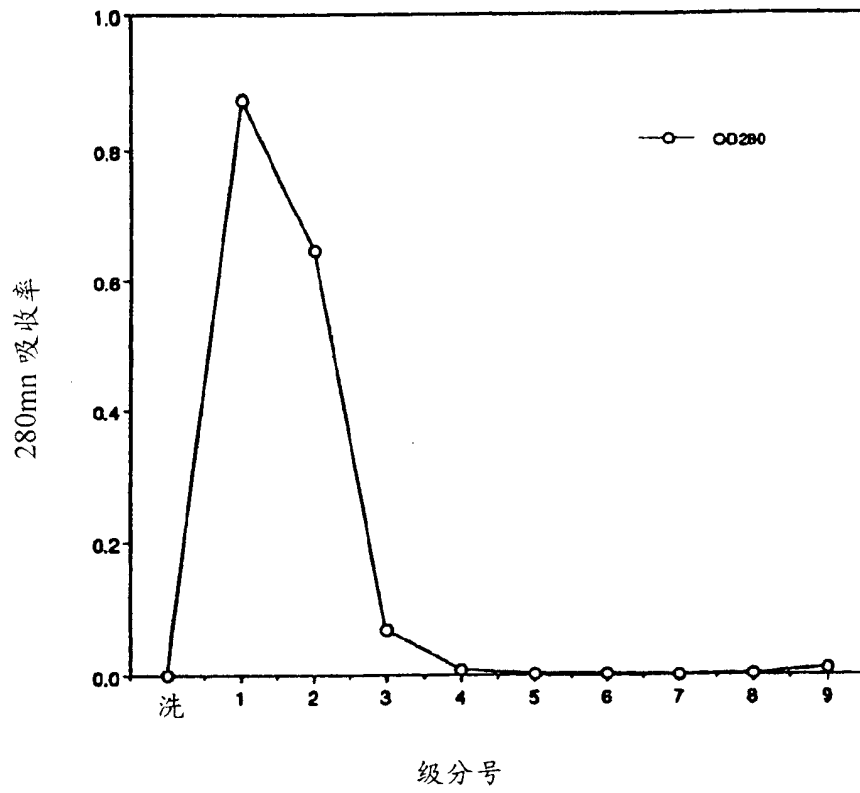


图 20

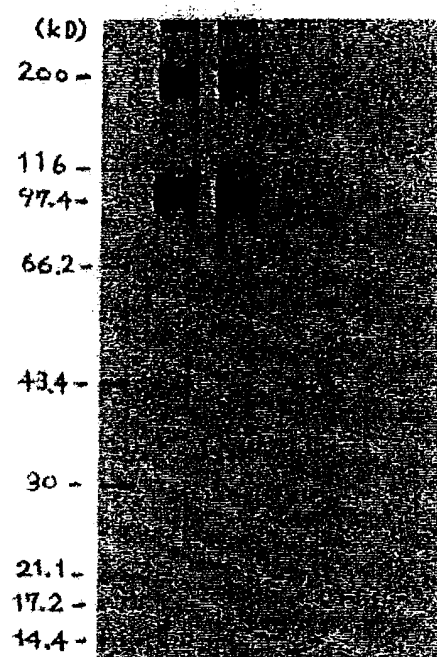


图 21

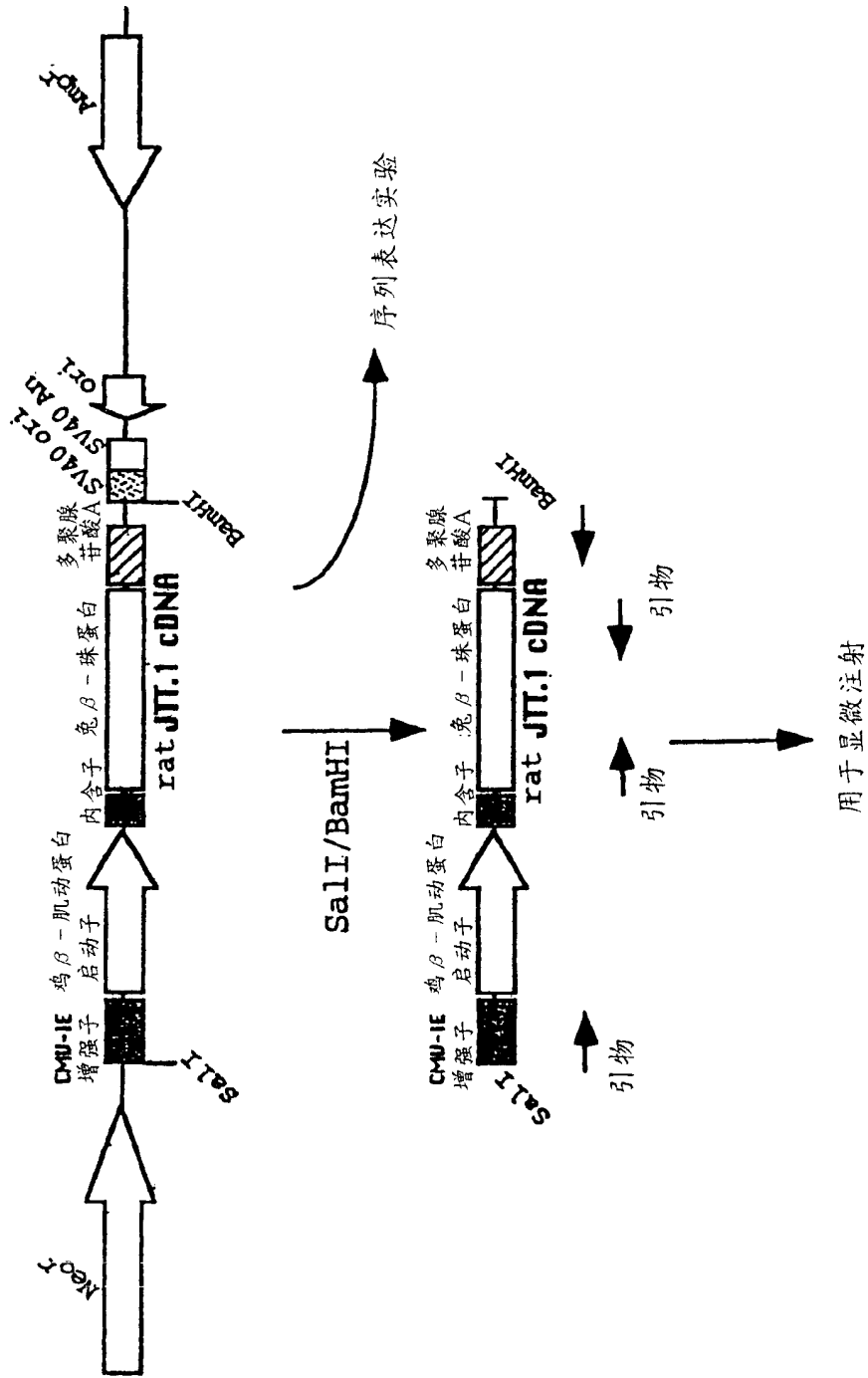


图 22