

[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 01822636.1

[51] Int. Cl.

*C07K 16/28 (2006.01)*

*C12N 15/13 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 37/06 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2006年8月30日

[11] 授权公告号 CN 1272345C

[22] 申请日 2001.12.14 [21] 申请号 01822636.1

[30] 优先权

[32] 2000.12.14 [33] US [31] 60/255,155

[86] 国际申请 PCT/US2001/047955 2001.12.14

[87] 国际公布 WO2002/047721 英 2002.6.20

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.13

[71] 专利权人 安斯泰来制药有限公司

地址 日本东京

[72] 发明人 J·尊曹 保罗·欣顿

马克西米利安诺·瓦斯克斯

田村康一 东康之 关信男

上田博嗣

审查员 柯珂

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘玥

权利要求书 2 页 说明书 51 页 附图 21 页

[54] 发明名称

沉默型抗 CD-28 抗体及其应用

[57] 摘要

本发明提供：缺乏促有丝分裂活性的抗 CD28 抗体(沉默型抗 CD28 抗体)、生产方法、包含所述抗体的组合物以及免疫抑制、诱发 T 细胞耐受及治疗器官和/或组织移植排斥的方法。

1. 一种沉默型抗 CD28 抗体，其具有：具有 SEQ ID NO: 4 中氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO: 2 中氨基酸序列的轻链可变区，或者具有 SEQ ID NO: 7 中氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO: 9 中氨基酸序列的轻链可变区；并且具有人 IgG2M3 重链恒定区。
2. 一种编码权利要求 1 的抗体的多核苷酸。
3. 一种包含权利要求 2 的多核苷酸的表达载体。
- 10 4. 一种包含权利要求 2 的多核苷酸的宿主细胞。
- 5 一种包含权利要求 3 的表达载体的宿主细胞。
6. 一种生产沉默型抗 CD28 抗体的方法，所述方法包括：  
在适合于所述抗体表达的条件下，培养权利要求 4 的宿主细胞；  
并从所述培养物中回收所表达的抗体。
- 15 7. 一种生产沉默型抗 CD28 抗体的方法，所述方法包括：  
在适合于所述抗体表达的条件下，培养权利要求 5 的宿主细胞；  
并从所述培养物中回收所表达的抗体。
8. 一种生产沉默型抗 CD28 抗体的方法，所述方法包括：  
将权利要求 2 的多核苷酸引入到宿主细胞中；  
20 在适合于所述抗体表达的条件下，培养所述宿主细胞；并从所述培养物中回收所表达的抗体。
9. 一种生产沉默型抗 CD28 抗体的方法，所述方法包括：  
将权利要求 3 的表达载体引入到宿主细胞中；  
在适合于所述抗体表达的条件下，培养所述宿主细胞；并从所  
25 述培养物中回收所表达的抗体。
10. 一种药用组合物，所述组合物包括权利要求 1 的沉默型抗 CD28 抗体以及药学上可接受成分。
11. 权利要求 1 的抗体在制备用于治疗患者体内器官或组织移植

排斥的药物中的应用。

12. 权利要求 11 的应用，其中所述药物与另一种免疫抑制药联用。

13. 抗体 HuTN228，其具有：具有 SEQ ID NO: 7 中氨基酸序列的重链可变区、具有 SEQ ID NO: 9 中氨基酸序列的轻链可变区、和人 IgG2M3 重链恒定区。

## 沉默型抗 CD-28 抗体及其应用

### 5 发明领域

本发明涉及缺乏促有丝分裂活性的抗 CD-28 抗体及其应用。

### 发明背景

10 免疫反应，尤其是器官的移植排斥，主要起因于 T 淋巴细胞的活化。T 细胞的这种活化由一种来自抗原呈递细胞(APC)的信号诱导。来自 APC 的该信号通过 T 细胞受体(TCR)而涉及第一信号，通过共同刺激分子而涉及第二信号(共同刺激信号)。当 APC 通过 TCR 来呈递 T 细胞抗原时，所述第一信号来自肽抗原的主要组织相容性抗原(MHC)复合体。所述第二信号由几种共同刺激分子介导；所述共同刺激分子的实例包括：在 APC 一侧称为配体的 B7 (B7-1 (CD80)和 B7-2 (CD86))  
15 以及在 T 细胞一侧作为受体的 CD28、CTLA-4 等等。配体 B7 是一种属于免疫球蛋白超家族的糖蛋白，而且在属于抗原呈递细胞类群的 B 细胞等中表达。识别作为共同配体之 B7 的 CD28 和 CTLA-4 都是属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白。因此，通过同时转导经由 TCR 的第一信号和来自例如 B7 和 CD28/CTLA-4 的第二信号，来调节 T 细胞的活化。已经知道，从 B7 到 CD28 的信号促进 T 细胞的活化，而从 B7 到 CTLA-4 的信号则抑制 T 细胞的活化[Waterhouse 等，Science, 270:985-988 (1995)]。  
20

到现在为止，为了诱导免疫抑制或耐受，已尝试通过给予  
25 CTLA-4Ig、抗 B7-1 抗体/抗 B7-2 抗体、抗 CD28 抗体等来阻断 B7-CD28 信号。例如，CTLA-4Ig 结合 B7，从而干扰 B7 与 CD28 之间的反应，且因此阻断来自 CD28 的信号，显示出免疫抑制活性。但是，由于 B7 与 CTLA-4 之间的反应同时也被抑制，因而也抑制对 T 细胞活化起负

调节作用的 CTLA-4 信号, 以致于无法诱发所需的耐受(Kirk 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:8789-8794 (1997))。此外还制备了抗 B7 抗体, 据报道抗 B7 抗体仅仅在 CTLA-4Ig 情况下抑制 T 细胞活化, 该抗体也抑制 CTLA-4 信号。在体外实验中, 发现抗 CD28 抗体对 T 细胞产生促有丝分裂效应, 而且用这种抗体和抗 CD3 抗体的联合刺激则促进 T 细胞的生长与活化, 并增加细胞因子的产量[WO 90/05541, Eur. J. Immunology, 16, 1289-1296 (1986)等等]。此外, 在体内激发出抗 CD28 抗体对 T 细胞 CD28 受体的促有丝分裂刺激, 导致类似于从 B7 到 CD28 之第二信号的 T 细胞活化信号的产生[Yin 等, J. Immunology, 163:4328-4334 (1999)]。这些 T 细胞活化功能则暗示: 可以在癌症和艾滋病(AIDS)治疗中将抗 CD28 抗体用作免疫增强剂(WO 90/05541)。

### 发明概述

用常规技术制备的抗 CD28 抗体对 T 细胞产生促有丝分裂的作用。虽然并不完全了解这种促有丝分裂活性的原因, 但据信抗 CD28 的 Fc 区与抗原呈递细胞 Fc 受体的结合是可能的原因(Cole 等, J. Immunology, 36:159 (1997))。因此, 我们通过使用基因工程技术, 将突变引入到抗 CD28 抗体的 Fc 受体的结合位点中, 从而修饰该抗体, 使得它不再会具有促有丝分裂活性。本发明人已制备出一种这样的抗体 - TN228 IgG2M3, 在该抗体中, IgG2M3 在 IgG 基因中有两个氨基酸的取代。而且, 我们证实了所产生的沉默型抗 CD28 抗体没有促有丝分裂的活性, 这对于诱导 T 细胞耐受是非常有用的。

因此, 本发明提供没有促有丝分裂活性的抗 CD28 抗体(在下文中称之为沉默型抗 CD28 抗体), 并提供通过用所述抗体来抑制免疫反应(尤其是移植排斥)且诱发免疫耐受的方法。

本发明的一个目标是沉默型抗 CD28 抗体, 其中所述抗 CD28 抗体可以是嵌合抗体和/或人源化抗体。所述抗 CD28 抗体的可变区可包括用 SEQ ID NO: 2、4、7 和 9 中所示的氨基酸序列以及编码这样氨基

酸序列的多核苷酸。例如，这样的多核苷酸包括 SEQ ID NO: 1、3、6 和 8。

本发明的另一个目标是：包含编码所述抗 CD28 抗体的多核苷酸的载体与细胞宿主。

5 本发明的又一个目标是：通过在允许所述多核苷酸表达的条件下，培养包含编码抗 CD28 抗体的多核苷酸的细胞宿主并且收集所产生的该基因产物，来生产沉默型抗 CD28 抗体的方法。

10 本发明的再一个目标是包含一种或更多种沉默型抗 CD28 抗体的药用组合物，最好是与一种或更多种药学上可接受成分混合的所述药用组合物。

所述沉默型抗 CD28 抗体可用于诱发 T 细胞耐受、免疫抑制，且可用作器官或组织移植排斥的一种预防/治疗药。因此，本发明提供：通过给予哺乳动物一种或更多种沉默型抗 CD28 抗体来诱发 T 细胞耐受、免疫抑制的方法，以及在器官或组织移植排斥期间通过给予哺乳动物一种或更多种沉默型抗 CD28 抗体来达到预防性或治疗性治疗的方法。最好是以本文描述的药用组合物形式来给予这样的沉默型抗 CD28 抗体，且可以包含合适的附加药/药物。

### 附图简述

20 图 1: 表达 ChTN228 抗体用的质粒构建体。将鼠 TN228 的 VL 和 VH 构建成邻接 XbaI 位点的小外显子。把所述 VL 序列插入到表达载体 pVk 中，而将所述 VH 序列插入到表达载体 pVg2M3 中。

图 2: 小外显子中 ChTN228 轻链的核苷酸序列以及推定的氨基酸序列。信号肽序列用斜体表示。CDR 以下划线标注。成熟的轻链以天冬氨酸残基(粗体字母)开始。非翻译序列和内含子序列用小写字母表示。(SEQ ID NO: 1 和 2)。

25 图 3: 小外显子中 ChTN228 重链可变区的核苷酸序列以及推定的氨基酸序列。信号肽序列用斜体表示。CDR 以下划线标注。成熟的重

链以谷氨酰胺残基(粗体字母)开始。非翻译序列和内含子序列用小写字母表示。(SEQ ID NO: 3 和 4)。

5 图 4: 竞争实验。将 P815/CD28<sup>+</sup>细胞与 25 ng MuTN228-FITC 和所描述的或者 ChTN228、或者 MuTN228 的 2 倍连续稀释液一起温育 P815/CD28<sup>+</sup>。同样, 将 P815/CD28<sup>+</sup>细胞与单独的 MuTN228-FITC 一起温育, 不加入任何竞争剂。将每个样品的通道荧光平均量对竞争剂的浓度作图。

图 5: TN228-IgG2m3 对人初次 MLR(1)的抑制作用。分别显示了来自四个个体的初次 MLR 的百分抑制率。

10 图 6: TN228-IgG2m3 对人初次 MLR(2)的抑制作用。分别显示了来自四个个体的初次 MLR 的百分抑制率。

图 7: TN228-IgG2m3 对二次 MLR 的作用。分别显示了来自两个志愿者的数据。以初次 MLR 中单独的 Raji 刺激作为 100, 以单独 Raji 刺激的 dpm 百分数的形式, 来表示二次 MLR 中的[3H]-胸苷的摄入。  
15 TN228-IgG2m3: 0.1 mg/ml。

图 8: 表达 HuTN228 抗体用的质粒构建体。将人源化 TN228 的 VL 和 VH 构建成邻接 XbaI 位点的小外显子。把所述 VL 序列插入到表达载体 pVk 中, 而将所述 VH 序列插入到表达载体 pVg2M3 中。

20 图 9: 小外显子中 HuTN228 重链可变区的核苷酸序列以及推定的氨基酸序列。信号肽序列用斜体表示。CDR 以下划线标注。成熟的重链以谷氨酰胺残基(粗体字母)开始。(SEQ ID NO: 6 和 7)。

图 10: 小外显子中 HuTN228 轻链可变区的核苷酸序列以及推定的氨基酸序列。信号肽序列用斜体表示。CDR 以下划线标注。成熟的轻链以天冬氨酸残基(粗体字母)开始。(SEQ ID NO: 8 和 9)。

25 图 11: FACS 竞争实验。用在实施例描述的流式细胞仪竞争实验, 分析了 FITC 标记的 MuTN228 在存在不同量竞争剂 MuTN228 抗体或 HuTN228 抗体的情况下与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞的结合。

图 12: ELISA 竞争实验。用在实施例描述的 ELISA 竞争实验,

分析了生物素化的 MuTN228 在存在不同量竞争剂 MuTN228 抗体或 HuTN228 抗体的情况下与 sCD28-Fc 的结合。

图 13: I-125 竞争实验。用在实施例中描述的 <sup>125</sup>I 标记抗体竞争实验, 分析了 <sup>125</sup>I 标记的 MuTN228 在存在不同量竞争剂 MuTN228 抗体或 HuTN228 抗体的情况下与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞的结合。

图 14: 表达 PV1-IgG3 抗体用的质粒构建体。将 PV1 的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 构建成邻接 XbaI 位点的小外显子。把所述 V<sub>L</sub> 序列插入到表达载体 pMVk.rg.dE 中, 而将所述 V<sub>H</sub> 序列插入到表达载体 pMVg3.D.Tt 中。然后, 重组所述两种质粒, 产生共表达 PV1-IgG3 重链和 PV1-IgG3 轻链的单一质粒。

图 15A: 小外显子中所述轻链和重链的 cDNA 序列以及推定的氨基酸序列。CDR 以下划线标注。成熟的轻链以位于位置 20 的天冬氨酸残基(双下划线标注的)开始。(SEQ ID NO: 10 和 11)。

图 15B: 小外显子中的 PV1 可变区的 cDNA 序列以及推定的氨基酸序列。CDR 以下划线标注。成熟的重链以位于位置 20 的谷氨酰胺(双下划线标注的)开始。(SEQ ID NO: 12 和 13)。

图 16: 按照方法中描述的, 运用 HPLC, 通过大小排阻层析而进行 PV-1-IgG3 分析。根据蛋白在 280 nM 的吸光度来监测蛋白。

图 17: 小鼠 IgG3 同种型对照(泳道 1)、PV1 (泳道 2)以及 PV1-IgG3 (泳道 3)的 SDS-PAGE 分析。A 板中的蛋白在非还原条件下电泳, 并 B 板中的蛋白在还原条件下电泳。MW 表示分子量标记。所列数字是以 kD 为单位的 MW 标准。

图 18: 用 PV1 (A)、37.51 (B)或 PV1-IgG3 (C)染色的且用流式细胞仪分析的 EL4 细胞。所用的第二抗体是: 用于 PV1 的缀合 FITC 的驴抗亚美尼亚仓鼠 IgG (H+L), 用于 37.51 的缀合 FITC 的驴抗金黄仓鼠 IgG, 以及用于 PV1-IgG3 的缀合 FITC 的山羊抗小鼠κ。实线的分布图表示仅被第二抗体染色的细胞。虚线分布图表示被方法中描述的第一抗体和第二抗体两者染色的细胞。小鼠 IgG3 同种型对照不使 EL4

细胞染色(数据未显示)。

图 19: (A) 过量的 PV1 或 PV1-IgG3 与缀合 R-PE 的 PV1 竞争与 EL4 细胞的结合。在流式细胞术频率分布图中的细实线(黑色)表示没有染任何色的细胞,粗实线(深蓝色)表示仅被 R-PE-PV1 染色的细胞,细虚线(洋红色)表示被 R-PE-PV1 和过量未缀合的 PV1 染色的细胞,而细的双虚线(淡蓝色)表示被 R-PE-PV1 和过量未缀合的 PV1-IgG3 染色的细胞。过量的小鼠 IgG3 同种型对照对 R-PE-PV1 与 EL4 细胞的结合没有影响(数据未显示)。(B) 过量的 145.2C11 或 145.2C11-IgG3 与缀合 R-PE 的 145.2C11 竞争结合到 EL4 细胞上。细实线(黑色)表示无任何染色的细胞,粗实线(深蓝色)表示仅被 R-PE-145.2C11 染色的细胞,细虚线(洋红色)表示被 R-PE-145.2C11 和过量未缀合的 145.2C11 染色的细胞,而细的双虚线(淡蓝色)表示被 R-PE-145.2C11 和过量未缀合的 145.2C11-IgG3 染色的细胞。(C) 过量的 PV1 与 PV1-IgG3 竞争结合 EL4 细胞。用 PV1-IgG3 和过量的 PV1 将 EL4 细胞染色,或在没有过量 PV1 的情况下用 PV1-IgG3 将 EL4 细胞染色。洗涤细胞,并用小鼠 IgG3 特异性的、缀合 FITC 的驴抗小鼠 IgG (H+L)将其染色。细实线(黑色)表示仅被第二抗体染色的细胞,粗实线(深蓝色)表示被 PV1-IgG3 和第二抗体染色的细胞,而细虚线(洋红色)表示被 PV1-IgG3 和过量的 PV1 以及第二抗体染色的细胞。

图 20: 用 PV1-IgG3 和 145.2C11 染色的鼠脾细胞。用小鼠 IgG3 同种型对照(A)或 PV1-IgG3 (B)将细胞染色,用缀合 R-PE 的山羊抗小鼠 IgG 和缀合 FITC 的 145.2C11 复染细胞,并用材料与方法中描述的双色流式细胞术分析细胞。仅分析淋巴细胞闸门中的细胞。PV1-IgG3 阳性细胞在上面的“象限”中,而 CD-3 阳性细胞在右边的“象限”中。每个“象限”中的数字表示在那特定“象限”中的细胞的百分数。

### 发明详述

在本发明范围内,术语“沉默型抗 CD28 抗体”意指缺乏促有丝

分裂活性的任何抗 CD28 抗体。更准确地说，它是特异性结合 T 细胞表面上的抗原 CD28 受体并且不会通过与抗 CD3 抗体联合刺激而促进 T 细胞生长或活化的抗体。

可以在抗 CD28 抗体的基础上或在产生抗 CD28 抗体的杂交瘤的基础上，通过用基因工程技术或通过化学修饰，使具有激动性的抗 CD28 抗体突变或将其修饰，来构建沉默型抗 CD28 抗体。以基因工程技术的运用为例，通过将突变引入到所述抗体 Fc 区的氨基酸序列中，可降低或消除抗 CD28 抗体对 Fc 受体的结合亲和性。例如，通过从能够产生抗 CD28 单克隆抗体的杂交瘤细胞中分离 cDNA，且将突变引入到与在结合 Fc 受体过程中起重要作用的 Fc 区域相对应的序列区中，则可获得沉默型抗 CD28 抗体(WO 88/07089)。对于突变的位点并无特别的限制，因为都可以抑制与 Fc 受体的结合。因此，在 IgG 类抗体的情况下，例如 H-链氨基酸残基 234、235、236、237、318、320 和 322 是优选的，且可通过用不同的氨基酸来取代这些氨基酸中的至少一种而构建沉默型抗 CD28 抗体。

可根据应用所述抗体的靶动物，来审慎地选择这样的沉默型抗 CD28 抗体之来源。例如，非人类的单克隆抗体含有在人类中在相当广泛的范围内显示抗原性的氨基酸序列。许多研究已显示：在注射抗体之后，患者对外来抗体的免疫应答非常强烈；且只给予该抗体，可能使患者进入危险状态之中或可使该抗体失去治疗效用。因此，值得推荐的是：取代 Fc 区以便使所述抗体与治疗靶动物相对更同源，取代可变区的构架部分，或使用从已经引入了所述抗体基因的转基因动物获得的所述抗体。例如，当要把所述抗体给予人时，则可用以下抗体：通过取代 Fc 区可获得的嵌合抗体(EP125023)、构架部分被取代的人源化抗体(EP0239400, EP045126)、或从已经引入了所述人抗体基因的转基因动物获得的人抗体(EP546073, WO 97/07671)。通过用基因工程技术例如上述那些技术在这些抗体中引入突变，或通过化学修饰而在这些抗体中引入突变，可降低或消除所述抗体的促有丝分裂活性。

作为具有沉默型 Fc 区的抗 CD28 抗体的具体实例, 不仅可提到下文实施例部分中描述的抗体, 而且可提到用所治疗靶动物的恒定区基因与基于 SEQ ID NO: 2 和 4 或 SEQ ID NO: 7 和 9 所示可变区氨基酸序列的可变区多核苷酸合成制备的抗体。这样的多核苷酸的实例是

5 SEQ ID NO: 1、3、6 和 8。

本发明的更具体的实例是 HuTN228 和 MuTN228 以及其 Fab 片段、其 F(ab)'<sub>2</sub> 片段、其衍生物等等。

正如本领域技术熟练人员所想到的, 由于第 3 个碱基的简并性, 几乎每种氨基酸在核苷酸编码序列中, 都可以由不止一个三联体密码子来表示。而且, 较小的碱基对变化可能导致所编码氨基酸序列的变异(保守取代); 但预计不会显著改变所述基因产物的生物学活性。因此, 在序列上, 可略微修饰编码本文所公开的蛋白或肽的核酸序列(例如取代三联体密码子中的一个核苷酸), 但该序列仍编码其相应的、同

15 样氨基酸序列的基因产物。

术语“表达载体”是指编码本发明之肽且提供在所选宿主细胞中表达该肽所必需之序列的多核苷酸。表达载体通常会包含转录启动子和终止子, 或者将为邻近内源启动子掺入创造条件。表达载体通常会进一步包含一个复制起点以及一个或更多个选择标记的质粒。然而另一方面, 表达载体可以是设计来感染宿主的病毒重组子, 或是设计用于在宿主基因组内的一个优选位点整合的整合型载体。在

20 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 中, 公开了表达载体的实例。

用于表达沉默型抗 CD28 抗体的合适宿主细胞包括: 原核生物、酵母、古细菌(archae)和其它真核细胞。供细菌、真菌、酵母以及哺乳动物细胞宿主使用的合适的克隆载体与表达载体是本技术领域众所周知的, 例如, Pouwels 等, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985)。所述细胞最好是哺乳动物细胞。所述载体可以是质粒载体、单链或双链噬菌体载体、或者单链或双链 RNA 或 DNA 病毒

载体。可以用众所周知的把 DNA 和 RNA 导入到细胞中的技术，以多核苷酸的形式，且最好是以 DNA 的形式，将这样的载体引入到细胞中。在噬菌体和病毒载体的情况下，用众所周知的感染和转导技术，也可以且优选以包装病毒或有包膜病毒的形式，将所述载体引入到细胞中。病毒载体可以是具有复制能力的或是复制缺陷型的。在后一种情况下，病毒繁殖通常将仅仅发生于互补的宿主细胞中。也能使用来源于本发明 DNA 构建体的 RNA，用无细胞翻译系统来生产所述蛋白。

可以按蛋白质化学领域中通常已知的蛋白分离/纯化的方法，来纯化沉默型抗 CD28 抗体/蛋白。更详细地讲，可以提到例如：提取，重结晶，用硫酸铵、硫酸钠等等的盐析，离心，透析，超滤，吸附色谱，离子交换层析，疏水层析，正相层析，反相层析，凝胶过滤法，凝胶渗透层析，亲和层析，电泳，逆流分配等等以及这些方法的组合。

按照本发明，可以用上面描述的重组表达系统来生产纯化的抗体。该方法包括：在足以促进所述蛋白表达的条件下，培养用含有编码该蛋白之 DNA 序列的表达载体转化的宿主细胞。然后，依所用的表达系统而定，从培养基或细胞抽提物中回收该蛋白。正如技术人员所知道的，纯化重组蛋白的步骤，将根据诸如所用宿主细胞的类型以及该重组蛋白是否被分泌到培养基中的因素而变化。

如果把沉默型抗 CD28 抗体配制成一种药用组合物，则可以将其用于：(a) 器官或组织移植后的移植排斥，所述器官或组织例如心、肾、肝、骨髓、皮肤、角膜、肺、胰、小肠、肌肉、神经等等；(b) 骨髓移植时的移植物抗宿主反应；(c) 例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、I 型糖尿病等等的自身免疫疾病；以及 (d) 例如哮喘、特应性皮炎等等的免疫疾病。

虽然可以预计沉默型抗 CD28 抗体本身抑制免疫反应和移植排斥并诱发免疫耐受，但也可以与其它药物联合使用。在这样的可用于与沉默型抗 CD28 抗体联合的其它药物之中，有各种各样的免疫抑制药，例如雷帕霉素、脱氧精胍菌素、抗 CD40 抗体、抗 CD40L 抗体、普乐

可复、环孢菌素 A、抗 IL-2 抗体、抗 IL-2 受体的抗体以及 MMF。特别是雷帕霉素，抑制来自 IL-2 受体的信号中的涉及 T 细胞生长信号的转导，而不抑制凋亡相关信号的转导；因此预期它与 CD28 信号的特异性抑制剂的联用将是有益的。

5 可以口服或非肠道给予本发明的沉默型抗 CD28 抗体，优选通过静脉内途径、肌肉途径或皮下途径给予。

可以以溶液或冻干粉的形式，制备本发明的沉默型抗 CD28 抗体；且必要时，可以用药学上可接受的各种添加剂例如赋形剂、稀释剂、稳定剂、等渗剂以及缓冲剂，来配制本发明的沉默型抗 CD28 抗体。优选的添加剂包括：糖例如麦芽糖、表面活性剂例如聚山梨酸酯、氨基酸例如甘氨酸、蛋白质例如人血清白蛋白、以及盐例如氯化钠。

同样，可依据给药方式而适当地选择剂型，所述剂型例如注射剂（溶液系、混悬剂、乳剂、在使用时溶解的固体等等）、片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、液体制剂、脂质体包含物、油膏、凝胶剂、外用散剂、喷雾剂、吸入粉剂、滴眼剂、眼膏剂、栓剂、阴道栓剂等等；且可以相应地配制本发明的肽。在 Comprehensive Medicinal Chemistry, 第 5 卷, Hansch 等编辑, Pergamon Press 1990 的 25.2 章节中，全面描述了制剂。

本发明药用组合物的剂量尤其取决于具体的组合物、作为治疗或预防目标的疾病的类型、给药方式、患者的年龄和健康状况以及治疗的持续时间。然而，在静脉内给予、肌肉给予或皮下给予的情况下，每天可给予每个成人 0.01-100 mg/kg，优选给予 0.1-10 mg/kg。

当使用本发明的沉默型抗 CD28 抗体抑制移植排斥或诱发免疫耐受时，在器官或组织移植后，可通过静脉注射、肌肉注射或皮下注射，以大约 1 mg/kg/天的剂量，在临移植前、刚移植之后，以及在移植后 3 天、7 天、12 天、18 天、25 天、35 天、45 天和 60 天，给予所述组合物。在监测移植后的排斥反应过程的同时，可以审慎地增加或减少给药的频率和剂量。

虽然给药的间隔尤其取决于所用给药方式与患者的病症；但不仅连续给药、而且间歇给药，都是可行的。如此，由于本发明的沉默型抗 CD28 抗体是一种抗体，因而它提供一种持续的作用，以致于间歇给药可以获得所期望的功效。至于治疗期，一旦建立了耐受状态，则即使停止使用沉默型抗 CD28 抗体，也可以保持这种耐受性。在这方  
5 面，这种沉默型抗 CD28 抗体无疑优于停用后免疫抑制作用下降的其它免疫抑制药。

### 实施例

10 已经概括地描述了本发明，通过参考本文提供的某些具体实施例，可进一步理解本发明，提供所述实施例仅为了说明，而非限制性的，除非另有说明。除非另有详细描述，用本领域技术人员众所周知的且常规的标准技术，来实施下面的实施例。

#### 15 实施例 1 小鼠抗人 CD28 抗体的氨基酸序列测定

产生抗人 CD28 抗体的杂交瘤(克隆: TN228, 小鼠 IgG1 $\kappa$ )由 Yagita 博士(Juntendo University School of Medicine, Japan))慷慨提供。让大约 0.2 mg 纯化的抗人 CD28 抗体(TN228)在 0.64 M 盐酸胍、pH 8.5 的 0.28 M Tris-HCl、0.055 M DTT 中，于 60°C (在氩中)还原达 90 分  
20 钟，在室温(于黑暗中)通过添加碘乙酸至 0.13 M 而进行羧甲基化达 45 分钟，继之以添加 DTT 至 0.32 M(终止羧甲基化反应)，并立即用一根 PD-10 柱(目录号 17-0851-01, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweeden)使其在 0.1 M 磷酸钠、pH 8.0 的 0.002 M EDTA 中进行缓冲液交换。将洗脱物调至 0.005 M DTT、0.02%的甘油；且把该溶液的三分  
25 之一(大约 0.35 ml)转移至一根单独的管中，供重链 N 末端的去封闭。用 1800  $\mu$ U 焦谷氨酸氨肽酶(目录号 7334, Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan)于 45°C 消化该样品达 24 小时。通过 20 个循环的自动 Edman 降解以及用 241 型蛋白序列测定仪(Model 241 Protein Sequencer)(Hewlett

Packard, Palo Alto, CA)的 PTH 分析, 测定来自去封闭样品的轻链和重链的 N 末端序列。用一根 Hypersil ODS C18 柱来分析 PTH 衍生物。按照制造商的说明书, 用得自 Hewlett Packard 的试剂、溶剂及柱, 操作所述序列测定仪和 HPLC。

5 用焦谷氨酸氨肽酶去封闭的 TN228 的 N 末端测序的结果如下:

残基号	氨基酸	残基号	氨基酸	残基号	氨基酸	残基号	氨基酸
1	D, Q	6	Q, E	11	L	16	G, Q
2	I, V	7	S	12	A, V	17	Q, S
3	V, Q	8	P, G	13	V, A	18	R, L
4	L	9	A, P	14	S, P	19	A, S
5	T, K	10	S, G	15	L, S	20	T, I

## 实施例 2 可变区 cDNA 的克隆

用 Co 等描述的锚式聚合酶链式反应(PCR)法(Co, M.S., N.M. Avadalovic, P.C. Caron, M.V. Avadalovic, D.A. Scheinberg 和 C. Queen. 10 1992. 对 CD33 抗原具有特异性的嵌合抗体和人源化抗体. J. Immunol. 148:1149-1154), 从所述杂交瘤细胞克隆 TN228 的轻链和重链 V 区 cDNA。运用分别退火到小鼠 $\kappa$ 链 C 区和 $\gamma$ 链 C 区上的 3'引物以及退火到添加的 cDNA 之 G 尾上的 5'引物, 在 cDNA 上进行扩增。对于 VL PCR, 所述 3'引物具有以下序列(SEQ ID NO: 14):

15 5' TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC 3'

其残基 17-46 与小鼠  $C_{\kappa}$  区杂交。对于 VH PCR, 所述 3'引物具有以下简并序列(SEQ ID NO: 15、16 和 17):

5' TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC 3'

20 其残基 17-50 与小鼠 IgG  $C_{H1}$  杂交。两个引物组中的非杂交序列包含供克隆用的限制性酶切位点。将 VL cDNA 和 VH cDNA 亚克隆到 TOPOII Blunt 载体(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)中供序列测定。

从两个独立的聚合酶链式反应, 对几个轻链与重链克隆进行序列

测定。至于所述轻链，鉴定出两种与小鼠轻链可变区同源的独特序列。一种 VL 序列由于移码突变，是无功能的，被鉴定为非生产性等位基因。另一种 VL 序列是一种功能性小鼠  $\kappa$  链可变区的典型。对于所述重链，鉴定出一种与典型的小鼠重链可变区同源的独特序列。在图 2 和图 3 中，描绘了其可变区的核苷酸序列及其推定的氨基酸序列。

### 实施例 3 嵌合 TN228-IgG2M3 的构建与表达

#### (方法)

按照 He 等(He, X.Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mallowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S. Co 和 E. L. Berg: 1998. 对 E-选择蛋白和 P-选择蛋白都有特异性的单克隆抗体的人源化及药物代谢动力学. *J. Immunol.* 160:1029-1035)所描述的，通过 PCR，将 TN228 的  $V_L$  和  $V_H$  转变成邻接 XbaI 位点的小外显子区段；并将其亚克隆到所述轻链和重链表达质粒(图 1)中。每个小外显子包含一段信号肽序列、一段成熟可变区序列和一段来源于同源性最高的小鼠 J 链基因的剪接供体序列。用这样的剪接供体序列，将所述 V 区外显子剪接到人抗体的恒定区上。在把小外显子克隆到表达载体中之后，测定每个小外显子的序列，以确保得到正确的序列且没产生 PCR 差错。同样，通过序列测定，来确认轻链和重链表达质粒的所述恒定区外显子。

在本说明书中，ChTN228 是指一种包含小鼠 TN228 VL 和 VH 可变区、人 IgG2M3 的重链恒定区以及人轻链  $\kappa$  恒定区的嵌合抗体。来自人种系 2 基因组片段的该重链恒定区是修饰过的(Cole, M.S., C. Anasetti 和 J.Y. Tso. 1997. 嵌合抗 CD33 的人 IgG2 变异体对 T 细胞无促有丝分裂性. *J. Immunol.* 159:3613-3621)，且该轻链来源于人种系 K 基因组片段。所述重链基因和轻链基因都由人巨细胞病毒的主要立即早期启动子和增强子驱动。所述重链基因后接来源于人补体基因 C2 的转录终止子(Ashfield, R., P. Enriquez-Harris 和 N.J. Proudfoot. 1991. 紧密连锁的人补体基因 C2 与 B 因子之间的转录终止：C2 和 c-myc 的

共同终止因子? EMBO J. 10:4197-4207)。轻链选择标记 *gpt* 基因 (Mulligan, R.C.和 P. Berg. 1981. 表达大肠杆菌的黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶编码基因的动物细胞的选择. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072-2076)和重链选择标记 *dhfr* 基因 (Simonsen, C.C.和 A.D. Levinson. 1983. 一种改建的小鼠二氢叶酸还原酶 cDNA 的分离与表达. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-2499)都由 SV40 早期启动子驱动。为了表达嵌合 TN228, 用脂质转染胺(目录号 10964-013, GIBCO BRL)完成转染到 COS-7 细胞(猴肾细胞系)中的瞬时转染。用山羊抗人 IgG  $\gamma$  链的特异性抗体作为捕获试剂, 且用缀合 HRP 的山羊抗人  $\kappa$  链抗体作为显色试剂, 通过 ELISA, 对瞬时转染子用过的培养基分析人 IgG2M3 抗体的产生。此外, 还通过间接免疫荧光染色, 对所述用过的培养基测试 ChTN228 结合到 P815/CD28<sup>+</sup>细胞(用 CD28 转染 P815 (小鼠肥大细胞瘤)所得的稳定转染细胞)上的能力; 并用流式细胞仪进行分析。至于稳定细胞系的产生, 则通过电穿孔, 使嵌合表达质粒转染到鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 中; 且根据 *gpt* 的表达而挑选出转染子。关于瞬时转染, 通过 ELISA, 分析稳定转染子用过的培养基。

## 结果

通过 PCR, 将克隆的  $V_L$  基因和  $V_H$  基因转变成小外显子(图 2 和图 3), 并将其亚克隆到上面描述的和图 1 所示的轻链和重链表达载体中。

COS-7 细胞的瞬时转染: 使所述嵌合表达载体瞬时转染到猴肾细胞系 COS-7 中, 以产生嵌合 TN228<sup>+</sup>抗体。而通过 ELISA 来检验所述转染细胞用过的培养基的嵌合 IgG2M3 抗体的产生情况; 且 P815/CD28<sup>+</sup>用流式细胞仪检验所述转染细胞用过的培养基与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞结合的情况。在两种分析中, 用过的培养基都是阳性的。来自瞬时转染的嵌合抗体的产量大约是 0.9  $\mu\text{g/ml}$ 。来自瞬时上清液的 ChTN228 抗体以依赖浓度的方式结合到 P815/CD28<sup>+</sup>细胞上(数据

未显示)。

Sp2/0 细胞的稳定转染: 为了产生稳定的细胞系, 而将所述嵌合表达载体转染到 Sp2/0 细胞中。检验几种转染子用过的培养基中 TN228 嵌合抗体产生的情况; 且如同所述瞬时转染子一样, 检验与 P815/CD28<sup>+</sup> 细胞结合的情况。对于两种分析, 大多数转染子是阳性的。一种转染子由于其抗体生产率较高而被挑选出, 且将其培养扩大而使其在 5 升的无血清培养基中生长。通过亲和层析, 从 5 升用过的培养基中纯化出 ChTN228。纯化的抗体产量大约是 25 mg。

#### 10 实施例 4 嵌合抗体 ChTN228 的蛋白纯化

在 5 升的 GIBCO 杂交瘤无血清培养基(目录号 12045-076, GIBCO BRL)中, 培养来自稳定转染的 ChTN228 表达高的转染子中的一种(克隆 7H)。当细胞生存力达到 10%或更低时, 收获用过的培养上清液; 并将其浓缩至 500 ml, 且用一台 Pharmacia P1 泵(2-3 ml/分钟), 将其加样到一根 5 ml 的蛋白-A Sepharose 柱上。用 PBS 洗涤该柱, 然后用 0.1 M 甘氨酸、0.1 M NaCl pH 2.7 洗脱所述抗体。对 2 升 PBS 透析所洗脱的蛋白, 且更换 PBS 达 3 次; 然后, 将其加到一根用含有额外 0.1 M NaCl 的 PBS 平衡的 PD-10 柱上, 使其脱盐。在贮存于 4°C 之前, 通过一张 0.2 mm 的滤纸, 过滤脱过盐的蛋白溶液。

20

#### 实施例 5 通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE 进行纯度测定

用由一台 PE ISS 200 Advanced LC Sample Processor (样品处理器)、一台 PE Series 410 Bio LC Pump (泵)、一台 PE 235C Diode Array Detector (二极管阵列检测器)以及 PE Nelson 600 Series LINK 组成的 Perkin Elmer HPLC 系统, 来进行大小排阻 HPLC。使用 Perkin Elmer Turbochrom Navigator Version 4.1 软件, 来控制自动进样器、泵与检测器; 且用该软件来获得、储存及处理数据。用两根串联连接的 TosoHaas TSK-GEL G3000SWXL 大小排阻 HPLC 柱, 来完成分离; 所述柱的数

据为: 7.8 mm x 300 mm, 5 mm 的粒度, 250Å 的孔隙大小(目录号 08541, TosoHaas, Montgomeryville, MD)。流动相是 pH 6.9 的 200 mM 磷酸钾/150 mM 氯化钾, 且流速为 1.00 ml/分钟。用分光光度计在 220 nm 波长和 280 nm 波长下监测该柱的洗脱液。ChTN228 样品的注射体积为 50 µl (50 µg)。

按照标准步骤, 用 4-20% 的梯度凝胶(目录号 EC6025, Novex, San Diego, CA)进行 SDS-PAGE。

通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE, 来分析所分离的 ChTN228 的纯度。根据这一分析, 该蛋白是 96.5% 的单体, 且具有相当于分子量约 160 kD 蛋白的迁移率。MuTN228、同种型对照 MuFd79 (小鼠 IgG1)、ChTN228 以及同种型对照 HuEP5C7 (人 IgG2M3) 在非还原条件下的 SDS-PAGE 分析也表明: 所有四种抗体都有大约 150-160 kD 的分子量。在还原条件下分析同样的四种蛋白则表明: 所有四种抗体都是由一条分子量约 50 kD 的重链和一条分子量约 25 kD 的轻链组成的。

## 实施例 6 竞争实验

### 方法

使用 MuTN228-FITC 抗体的从 250 ng/试验开始的二倍连续稀释液, 来完成滴定实验。在冰上将 P815/CD28<sup>+</sup>细胞( $5 \times 10^5$  个细胞/试验)与 FITC 标记的抗体一起孵育达 1 小时, 然后用 PBS 洗涤且用流式细胞仪分析。至于竞争实验, 将 25 ng MuTN228-FITC 以及竞争性 ChTN228 或 MuTN228 抗体从 800 ng/试验开始的二倍连续稀释液, 加到 P815/CD28<sup>+</sup>细胞( $5 \times 10^5$  个细胞/试验)中。作为对照, 将 25 ng 单独的 MuTN228-FITC 与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞( $5 \times 10^5$  个细胞/试验)一起孵育(即没有任何竞争剂)。同样, 测试作为竞争剂的 HuEP5C7 同种型对照抗体(800 ng/试验)和 MuFd79 同种型对照抗体(800 ng/试验)。在冰上(于黑暗中), 将细胞与抗体混合物一起以 150 ml 的终体积孵育达 1 小时, 然后洗涤, 并用流式细胞仪分析。

## 结果

如在方法中所描述的，用流式细胞计量术竞争实验，比较 MuTN228 抗体和 ChTN228 抗体的结合特异性。将不同量未标记的 MuTN228 或 ChTN228 与 25 ng FITC 标记的 MuTN228 抗体相混合，  
5 并使其与 P815/CD28' 细胞温育。MuTN228 和 ChTN228 都以依赖浓度的方式与 MuTN228-FITC 竞争，这表明这两种抗体与 CD28 抗原的结合是特异性的(图 4)。同种型对照抗体 MuFd79 和 HuEP5C7 不与 MuTN228-FITC 竞争，表明 MuTN228 抗体和 ChTN228 抗体通过 V 区的特异性相互作用而识别 CD28 抗原。

10

## **实施例 7 对人 F R 亲和性降低的嵌合抗人 CD28 抗体抑制初次混合淋巴细胞反应**

### 细胞的制备

通过用 Ficoll-Paque plus (Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan) 进行密度梯度离心，制备来自健康正常自愿者的人外周血单核细胞(PBMC)。用等体积的 RPMI1640 稀释人血，然后铺在 Ficoll-Paque plus 的上面。在室温离心 30 分钟后，收集外周血细胞单核细胞并用 RPMI1640 洗涤。此后，用培养基(含有 2.5% 的人 AB 型血清、2-巯基乙醇以及抗生素的 RPMI1640)悬浮外周血细胞单核细胞，并将其加到  
15 一根尼龙纤维柱(Wako junyaku, Osaka, Japan)上。在 5% CO<sub>2</sub> 中于 37°C 孵育 1 小时后，用温热的培养基洗脱 T 细胞。

20

在混合淋巴细胞反应中，将人 B 细胞系(Raji 和 JY)用作刺激细胞。这些细胞在使用之前经过 X 射线照射(2000R)。

### 初次混合淋巴细胞反应(初次 MLR)

把纯化的人 T 细胞( $1 \times 10^5$  个细胞/孔)和照射过的 Raji ( $1 \times 10^5$  个细胞/孔)接种到 96 孔平底小平板中。向培养基中添加抗生素，并培养细胞 7 天。在最后的 6 小时培养中，用 10 kBq/孔的 [<sup>3</sup>H] 胸苷(Amersham

25

Pharmacia biotech)标记所有的培养物。收获细胞,并用液体闪烁计数器测量掺入的放射性。

在图 5 和图 6 中显示了 TN228-IgG2m3 (ChTN228)对初次 MLR 的影响。原始的抗人 CD28 抗体 TN228 (MuTN228)不抑制初次 MLR,然而,嵌合抗体 TN228-IgG2m3 则以依赖剂量的方式抑制初次 MLR。因此,将抗人 CD28 抗体的 Fc 区转变成对人 Fc R 亲和性降低的 Fc 区,则使得该抗体成为对 T 细胞增殖有拮抗性。

对人 Fc R 亲和性降低的抗人 CD28 嵌合抗体在二次混合淋巴细胞反应中减弱了 T 细胞的低应答性。

10

#### 二次混合淋巴细胞反应(二次 MLR)

把纯化的人 T 细胞( $1 \times 10^5$  个细胞/孔)和照射过的 Raji 细胞( $1 \times 10^5$  个细胞/孔)接种到 96 孔平底小平板中。向培养基中添加抗生素并孵育细胞。5 天之后,收集细胞,用新鲜的培养基洗涤。用新鲜的培养基悬浮细胞,并培养所述细胞 8 天。用照射过的 Raji 细胞或 JY 细胞再刺激所述细胞。再培养 7 天之后,将 10 kBq/孔的 $[^3\text{H}]$ 胸苷与细胞一起孵育 6 小时。收获细胞,并用液体闪烁计数器测量放射性。

TN228-IgG2m3 抑制初次 MLR (图 5 和图 6)。接着,我们分析这种抗体对二次 MLR 的影响。把所述抗体加到初次 MLR 培养物中,然后,从培养上清液中除去该抗体。在没有抗体的培养基中培养细胞之后,用同样的刺激细胞(Raji)或第三方刺激物(JY)再刺激细胞。与没有处理过的细胞的增殖相比,用 TN228-IgG2m3 通过初次 MLR 处理过的细胞的增殖减少。但是,用第三方刺激物(JY),两种细胞增殖到几乎同样的程度(图 7)。这个结果表明了对人 Fc R 亲和性降低的抗人 CD28 抗体可通过异源(allo-)抗原刺激而诱导 T 细胞的活力(energy)。

25

#### 实施例 8 人源化 TN228 可变区的设计

通过计算机建模,来分析 MuTN228 的 V 区序列。基于对 Kabat

抗体序列数据库(8. Johnson, G.和 T.T.Wu. 2000. Kabat 数据库及其应用: 在第一幅变异性图后的 30 年. *Nucleic Acids Res.* 28:214-218)的序列同源性搜寻, 挑选出 IC4 (Manheimmer-Lory, A., J.B. Katz, M. Pillinger, C. Ghossein, A. Smith, B. Diamond. 1991. 带有抗 DNA 相关独特型的抗体的分子特征. *J. Exp. Med.* 174:1639-1652), 来为人源化 TN228 的重链可变区和轻链可变区两者提供构架。人源化的 TN228 重链可变区在 85 个构架残基中有 65 个残基与小鼠 TN228 重链构架的残基相同, 即有 76% 的序列同一性。人源化的 TN228 轻链可变区在 80 个构架残基中有 56 个残基与小鼠 TN228 轻链构架的残基相同, 即有 70% 的序列同一性。

使用计算机程序 ABMOD 和 ENCAD (Levitt, M. 1983. 天然蛋白的分子动力学. I. 轨道的计算机模拟. *J. Mol. Biol.* 168:595-620), 来构建 TN228 可变区的分子模型; 用该模型来确定小鼠 TN228 构架中足够靠近 CDR 从而可能与它们相互作用的氨基酸的位置。为了设计人源化 TN228 的重链可变区与轻链可变区, 将来自小鼠 TN228 重链的 CDR 移植到人 IC4 重链构架区中, 且把来自小鼠 TN228 轻链的 CDR 移植到人 IC4 轻链的构架区中。在计算机模型提示值得注意的与所述 CDR 接触的构架位置, 来自小鼠抗体的氨基酸取代了原始人构架的氨基酸。对于人源化的 TN228, 在重链残基 27、29、30、48、67、71 和 78 之处完成这种取代。对于轻链, 不进行取代(即将 MuTN228 CDR 直接移植到 IC4 构架区中)。此外, 至于在人抗体数据库中在相应位置上只是罕见的构架残基, 则用那些残基位置上的人共有序列氨基酸来取代。对于人源化的 TN228, 在重链残基 23、40、73、83 和 85 之处以及在轻链残基 69 和 77 之处, 进行这种取代。图 9 和图 10 显示了人源化 TN228 抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

## 实施例9 人源化 TN228-IgG2M3 的构建与表达

### 方法

一旦如上所述设计了所述人源化可变区的氨基酸序列，则构建基  
因来编码它们，包括信号肽、剪接供体信号以及合适的限制酶位点(图  
5 8)。构建重链可变区基因和轻链可变区基因，并用长度为大约 65-80  
个碱基的 8 种重叠合成寡核苷酸来扩增它们(He, X.Y., Z. Xu, J.  
Melrose, A. Mullooney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil,  
M.S. Co 和 E. L. Berg. 1998. 对 E-选择蛋白和 P-选择蛋白都有特异性的  
单克隆抗体的人源化与药物代谢动力学. *J. Immunol.* 160:1029-1035)。  
10 使所述寡核苷酸成对退火，并用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段将其延  
伸，产生四种双链片段。将所产生的片段变性，成对退火，且用 Klenow  
片段将其延伸，产生两种片段。把这些片段变性，成对退火，且再一  
次将其延伸，而产生全长的基因。所产生的产物通过聚合酶链式反应  
(PCR)用 Taq 聚合酶将扩增，用凝胶纯化，并用 XbaI 消化；再次用凝  
15 胶纯化，然后亚克隆到用于表达重链的 pVg2M3 以及用于表达轻链的  
pVk 的 XbaI 位点中。先前已描述了用于人 $\gamma 2$  重链表达的 pVg2M3 载  
体(Cole, M.S., C. Anasetti 和 J.Y. Tso. 1997. 嵌合抗 CD33 的人 IgG2 变  
异体对 T 细胞无促有丝分裂性. *J. Immunol.* 159:3613-3621)以及用于人  
 $\kappa$ 轻链表达的 pVk 载体(Co, M.S., N.M. Avadalovic, P.C. Caron, M.V.  
20 Avadalovic, D.A. Scheinberg 和 C. Queen. 1992. 对 CD33 抗原具有特异  
性的嵌合抗体和人源化抗体. *J. Immunol.* 148:1149-1154)。

通过核苷酸序列测定，来验证最终的重链质粒和轻链质粒的 V 区  
与恒定区外显子的序列。通过限制酶作图，来验证最终质粒的整个结  
构。按标准方法进行 DNA 的所有操作。

25 在本说明书中，HuTN228 是指包含人源化 TN228V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 可变  
区、人 IgG2M3 的重链恒定区以及人的轻链 $\kappa$ 恒定区的人源化抗体。来  
自人种系 2 基因组片段的该重链恒定区是修饰过的(Cole, M.S., C.  
Anasetti 和 J.Y. Tso. 1997. 嵌合抗 CD33 的人 IgG2 变异体对 T 细胞无

促有丝分裂性. *J. Immunol.* 159:3613-3621), 且该轻链来源于人种系 K 基因组片段。人巨细胞病毒的主要立即早期启动子和增强子既驱动重链基因、又驱动轻链基因。所述重链基因后面是来源于人补体基因 C2 的转录终止子(Ashfield, R., P. Enriquez-Harris 和 N.J. Proudfoot. 1991. 5 紧密连锁的人补体基因 C2 与 B 因子之间的转录终止: C2 和 c-myc 的共同终止因子? *EMBO J.* 10:4197-4207)。轻链选择标记 *gpt* 基因 (Mulligan, R.C.和 P. Berg. 1981. 表达大肠杆菌的黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶编码基因的动物细胞的选择. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072-2076)和重链选择标记 *dhfr* 基因 (Simonsen, C.C.和 A.D. Levinson. 1983. 一种改建的小鼠二氢叶酸还原酶 cDNA 的分离与表达. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2495-2499)两者都由 SV40 早期启动子驱动。 10

为了表达 HuTN228, 用脂质转染胺 2000 (目录号 11668-027, Life Technologies)来完成到 COS-7 细胞(猴肾细胞系)中的瞬时转染。用山羊抗人 IgG  $\gamma$ 链的特异性抗体作为捕获试剂, 且用缀合 HRP 的山羊抗人  $\kappa$  链抗体作为显色试剂, 通过 ELISA, 来对瞬时转染子用过的培养基进行人 IgG2M3 抗体产生方面的分析。此外还通过间接免疫荧光染色, 15 对所述用过的培养基检验 HuTN228 与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞结合的能力; 并用流式细胞仪, 对所述用过的培养基进行分析(数据未显示)。至于稳定细胞系的产生, 通过电穿孔使人源化的表达质粒转染到鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 中; 且根据 *gpt* 的表达而选择出转染子。在瞬时转染方面, 20 通过 ELISA, 分析稳定转染子用过的培养基。

## 结果

25 基于人源化 V 区氨基酸序列的设计, 如方法中所描述的, 构建重链的 V 区基因和轻链的 V 区基因(图 9 和图 10)。正如图 8 中所显示的, 将重链的 V 区基因和轻链的 V 区基因分别克隆到 pVg2M3 载体和 pVk 载体中。通过核苷酸序列测定来分析几个克隆, 且将重链表达载体和

轻链表达载体的正确克隆都用于转染。同样，通过序列测定，进一步证实重链表达载体和轻链表达载体两者的恒定区。

### 实施例 10 HuTN228 的表达

5 COS-7 细胞的瞬时转染：使所述表达载体瞬时转染到猴肾细胞系 COS-7 中，以产生 HuTN228 抗体。用所转染细胞用过的培养基，通过 ELISA 检验人源化 IgG2M3 抗体的产生来，且用流式细胞仪检验与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞的结合(数据未显示)。在两种分析中，用过的培养基是阳性的。由瞬时转染而来的人源化抗体的产量大约是 3.7 g/ml。来自  
10 瞬时上清液的 HuTN228 抗体以依赖浓度的方式结合到 P815/CD28<sup>+</sup>细胞上(数据未显示)。

Sp2/0 细胞的稳定转染：为了产生稳定的细胞系，将所述人源化表达载体转染到 Sp2/0 细胞中。如同所述瞬时转染子一样，对几种转染子用过的几份培养基检验 HuTN228 抗体的产生。一种转染子(克隆  
15 4)由于抗体生产率较高而被挑选出，且在 GIBCO 杂交瘤无血清培养基中将其扩大培养。通过亲和层析，从 570 毫升用过的培养基中纯化出 HuTN228 抗体。纯化的抗体产量大约是 7 mg。

### 实施例 11 蛋白的纯化

20 在 570 ml GIBCO 杂交瘤无血清培养基(目录号 12045076, Life Technologies)中，培养来自稳定转染(克隆 4)的、HuTN228 表达高的转染子中的一种。当细胞生存力达到 10%或更低时，收获用过的培养上清液；并将其加样到一根 2 ml 的蛋白-A Sepharose 柱上。用 PBS 洗涤该柱，然后用 0.1 M 甘氨酸、0.1 M NaCl pH 2.5 洗脱所述抗体。对 2  
25 升 PBS 透析所洗脱的蛋白，且更换 PBS 达 3 次；然后，在一根用含有额外 0.1 M NaCl 的 PBS 平衡的 PD-10 柱上，使其脱盐。在贮存于 4℃ 之前，通过一张 0.2 mm 的滤纸，过滤脱过盐的蛋白溶液。

## 实施例 11 通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE 进行纯度测定 方法

5 用由一台 PE ISS 200 Advanced LC Sample Processor (样品处理器)、一台 PE Series 410 Bio LC Pump (泵)、一台 PE 235C Diode Array  
Detector (二极管阵列检测器)以及 PE Nelson 600 Series LINK 组成的  
Perkin Elmer HPLC 系统, 来进行大小排阻 HPLC。使用 Perkin Elmer  
Turbochrom Navigator Version 4.1 软件, 来控制自动进样器、泵与检测  
器; 且用该软件来获得、储存及处理数据。用两根串联连接的 TosoHaas  
10 TSK-GEL G3000SWXL 大小排阻 HPLC 柱(7.8 mm x 300 mm, 5 mm 的  
粒度, 250Å 的孔隙大小, 目录号 08541, TosoHaas, Montgomeryville,  
MD), 来完成分离。流动相是 pH 6.9 的 200 mM 磷酸钾/150 mM 氯化  
钾, 且流速为 1.00 ml/分钟。用分光光度计在 220 nm 波长和 280 nm 波  
长下监测该柱的洗脱液。HuTN228 样品的注射体积为 60 l (60 g)。

15 按照标准步骤, 在 4-20%的梯度凝胶(目录号 EC6025, Novex, San  
Diego, CA)上进行 SDS-PAGE。

按照制造商的建议, 用 Human IgG Subclass Profile ELISA Kit (人  
IgG 亚类分布型 ELISA 试剂盒)(目录号 99-1000, Zymed Laboratories,  
South San Francisco, CA), 来证实所纯化抗体的同种型。

## 20 结果

通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE, 来分析所分离的 HuTN228  
抗体的纯度。未显示 HuTN228 的 HPLC 洗脱分布图。根据这一分析,  
该蛋白是约 98%的单体, 且具有相当于分子量约 160 kD 蛋白的迁移  
率。

25 MuTN228、同种型对照 MuFd79 (小鼠 IgG1)、HuTN228 以及同种  
型对照 HuEP5C7 (人 IgG2M3)在非还原条件下的 SDS-PAGE 分析也表  
明: 所有四种抗体都有大约 150-160 kD 的分子量。在还原条件下分析  
同样的四种蛋白则表明: 所有四种抗体都是由一条分子量约 50 kD 的

重链和一条分子量约 25 kD 的轻链组成的。

同种型试验表明: HuTN228 抗体的同种型和所预期的 IgG2 同种型一致(数据未显示)。

## 5 实施例 12 FACS 竞争实验

### 方法

使用 MuTN228-FITC 抗体的从 250 ng/试验开始的二倍连续稀释液,来完成滴定实验。在冰上在 100 l FACS 染色缓冲液(FSB = PBS, 2% FBS, 3%正常小鼠血清, 0.1% NaN<sub>3</sub>)中,将 FITC 标记的抗体与  
10 P815/CD28<sup>+</sup>细胞(3 x 10<sup>5</sup> 个细胞/试验)一起孵育达 1 小时,然后用 2 ml 的 FBS 洗涤,并用流式细胞仪分析(数据未显示)。

至于竞争实验,把 25 l FSB 中的 MuTN228-FITC (50 ng/试验)与、25 l FSB 中的竞争性 HuTN228 抗体或 MuTN228 抗体的三倍连续稀释液的(从 200 g/ml 的抗体开始)混合,并添加到 50 l FSB 里的 P815/CD28<sup>+</sup>  
15 细胞(3x10<sup>5</sup> 个细胞/试验)中。作为对照,单独用 MuTN228-FITC 孵育 P815/CD28<sup>+</sup>细胞(50 ng /试验,于 50 l 的 FSB 中)。同样,测试作为非特异性竞争剂的、在 25 l FSB 中的 HuEP5C7 (人 IgG2M3)同种型对照抗体(200 g/ml)和 MuFd79 (小鼠 IgG1)同种型对照抗体(200 g/ml)。在冰上(于黑暗中),在终体积 100 l 中将抗体混合物与细胞一起孵育达 1 小时,然后用 2 ml FSB 洗涤,并用流式细胞仪分析。重复这一实验三次。  
20

### 结果

正如在方法中所描述的,用一个流式细胞计量术竞争实验,比较了 MuTN228 抗体和 HuTN228 抗体与 P815/CD28<sup>+</sup>细胞上的 CD28 分子的结合特异性。在图 5 中显示了有代表性的结果。MuTN228 和  
25 HuTN228 两者都以依赖浓度的方式与 MuTN228-FITC 竞争,这表明这两种抗体与 CD28 抗原的结合是特异性的。HuTN228 的相对结合是 MuTN228 的相对结合的几分之一。同种型对照抗体 MuFd79 和

HuEP5C7 不与 MuTN228-FITC 竞争, 表明 MuTN228 抗体和 HuTN228 抗体通过 V 区的特异性相互作用而识别 CD28 抗原。

### 实施例 13 ELISA 竞争实验

#### 5 方法

用 100  $\mu$ l 孔的 sCD28-Fc (于 PBS 中, 0.5 g/ml)(sCD28-Fc 是其中 CD28 的胞外域与 IgG1 的 CH2 结构域及 CH3 结构域结合的指融合蛋白)在 4 $^{\circ}$ C 包被 96 孔 ELISA 板(Nunc-Immuno 板, 目录号 439454, NalgeNunc, Naperville, IL)过夜。用 300  $\mu$ l 孔的、于 TBS 中的 Superblock Blocking Buffer (封闭缓冲液)(目录号 37535, Pierce, Rockford, IL)封闭该平板达 30 分钟, 并用 300  $\mu$ l 孔的 ELISA Wash Buffer (洗涤缓冲液)(EWB = PBS, 0.1% Tween-20)洗涤所述平板。按终体积 200  $\mu$ l 孔, 每种三份地添加 100  $\mu$ l ELISA Buffer(ELISA 缓冲液)(EB = PBS, 1% BSA, 0.1% Tween-20)中的 MuTN228-生物素(0.5 g/ml)与竞争剂 HuTN228 抗体或 MuTN228 抗体在 100  $\mu$ l EB 中的三倍连续稀释液(从 100 g/ml 开始)的混合物。同样试验在 100  $\mu$ l EB 中的、作为非特异性竞争剂的同种型对照抗体 HuEP5C7 和 MuFd79 (100 g/ml)。将 100  $\mu$ l 的 EB 加到 100  $\mu$ l 的 MuTN228-生物素(0.5 g/ml)中, 作为‘无竞争剂’对照。将 200  $\mu$ l 的 EB 加到剩余的孔中(不包含 MuTN228-生物素), 作为空白(对照)。在室温振荡保温该平板达 1.5 小时。在用 300  $\mu$ l 孔的 EWB 洗涤所述孔 4 次后, 向所有的孔中添加 100  $\mu$ l 孔的链霉亲和素-HRP (1 g/ml, 目录号 21124, Pierce)。在室温振荡保温该平板达 1 小时。如上所述洗涤所述孔之后, 向所有的孔中添加 100  $\mu$ l 孔的 ABTS 底物(目录号 507602 和 506502, KPL, Gaithersburg, MD)。在室温下温育该平板达 5 至 7 分钟, 然后读出 415 nm 的光密度。重复这一实验三次。

#### 25 结果

正如在方法中所描述的, 用一种 ELISA 竞争实验, 比较了

HuTN228 抗体和 MuTN228 抗体与 sCD28-Fc 的结合特异性。在图 12 中显示了有代表性的结果。MuTN228 和 HuTN228 两者都以依赖浓度的方式与 MuTN228-生物素竞争。同种型对照抗体 MuFd79 和 HuEP5C7 不与 MuTN228-生物素竞争，表明 MuTN228 抗体和 HuTN228 抗体通过 V 区的特异性相互作用而识别 CD28 抗原。在表 2 中显示了所有三次实验的 MuTN228 和 HuTN228 的 IC<sub>50</sub> 值。HuTN228 的相对结合平均是 MuTN228 结合的 2.6 分之一。

表 2 ELISA 竞争的总结

10

IC<sub>50</sub> (g/ml)

竞争剂	实验 1	实验 2	实验 3	平均值	标准偏差
MuTN228	0.21	0.20	0.15	0.19	0.03
HuTN228	0.37	0.64	0.48	0.50	0.14

#### 实施例 14 <sup>125</sup>I 标记抗体的竞争实验

##### 方法

按照 Queen 等的方法(Queen, C., W.P. Schneider, H.E. Selick, P.W. Payne, N.F. Landolfi, J.F. Duncan, N.M. Avdalovic, M. Levitt, R.P. Junghans, T.A. Waldmann. 1989. 一种与白介素 2 受体结合的人源化抗体. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:10029-10033), 测定了 MuTN228 抗体和 HuTN228 抗体的相对结合亲和性。简短地说, 使 50 l 结合缓冲液 (Binding Buffer)(BB = PBS, 2% FBS, 1 g/ml 小鼠 IgG, 0.1% NaN<sub>3</sub>)中的约 10 ng <sup>125</sup>I 标记的 MuTN228 与竞争剂 MuTN228 抗体或 HuTN228 抗体在 50 l BB 中的三倍连续稀释液(从 400 g/ml 开始)相混合, 且每种混合做三份; 然后, 将其加到孵育管(Skatron Macrowell Tube Strips, 目录号 15773, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)里的 100 l P815/CD28<sup>+</sup>细胞 (2.5 x 10<sup>5</sup> 个细胞/试验)中; 并于 4℃温和振荡孵育达 90 分钟。同样试验在 50 l BB 中的、作为非特异性竞争剂的同种型对照抗体 HuEP5C7 和 MuFd79 (400 g/ml)。在孵育之后, 将细胞-抗体混合物转移到含有

0.1 ml 80%邻苯二甲酸二丁酯-20%橄榄油的离心管(Sarstedt Micro Tubes, 目录号 72.702, Sarstedt, Newton, NC)中, 用 50 l 的 BB 洗涤所述孵育管一次, 并通过已描述的方法离心来分离结合的计数和游离的计数(Kuziel, W.A., S.J. Morgan, T.C. Dawson, S. Griffin, O. Smithies, K. Ley, N. Maeda. 1997. 在 CC 趋化因子受体 2 缺乏的小鼠中白细胞粘附与单核细胞外渗的严重减少. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12053-12058)。重复这一实验三次。

### 结果

正如在方法中所描述的, 用  $^{125}\text{I}$  标记抗体竞争实验, 比较了 MuTN228 抗体和 HuTN228 抗体的相对结合亲和性。在图 13 中显示了有代表性的结果。MuTN228 和 HuTN228 两者都以依赖浓度的方式与  $^{125}\text{I}$  标记的 MuTN228 竞争。同种型对照抗体 MuFd79 在高浓度时显示出弱而可重复的竞争, 但同种型对照抗体 HuEP5C7 不与  $^{125}\text{I}$  标记的 MuTN228 竞争; 这表明 HuTN228 抗体通过 V 区的特异性相互作用而识别 CD28 抗原。在表 3 中显示了所有三次实验的 MuTN228 和 HuTN228 的  $\text{IC}_{50}$  值。HuTN228 的表观结合亲和性是 MuTN228 抗体的表观结合亲和性的大约 2.4 倍。

表 3  $^{125}\text{I}$  竞争的总结

竞争剂	$\text{IC}_{50}$ (nM)				
	实验 1	实验 2	实验 3	平均	标准偏差
MuTN228	0.93	1.05	1.02	1.00	0.06
HuTN228	2.65	2.43	2.13	2.40	0.26

### 实施例 15 仓鼠抗鼠 CD28 抗体的氨基酸序列测定

#### 方法

杂交瘤和抗体: 从 ATCC (ATCC HB-12352) 获得亚美尼亚仓鼠抗鼠 CD28 的杂交瘤 PV1。从 Southern Biotechnology (Birmingham, AL)

购买纯化的 PV1、缀合 R-藻红蛋白(R-PE)的 PV1。叙利亚仓鼠抗 CD28 抗体 37.51 来自 PharMingen (San Diego, CA)。第二抗体缀合荧光素 (FITC)的驴抗亚美尼亚仓鼠 IgG (H+L)、缀合 FITC 的驴抗叙利亚仓鼠 IgG (H+L)、缀合 FITC 的驴抗小鼠 IgG (H+L)、R-PE-F(ab')<sub>2</sub> 驴抗小鼠 IgG (H+L), 则来自 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA); 而缀合 FITC 的山羊抗小鼠  $\kappa$ 、缀合 R-PE 的山羊抗小鼠 IgG3、以及缀合辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗小鼠  $\kappa$  则来自 Southern Biotechnology。山羊抗小鼠 IgG3 以及小鼠 IgG3 同种型对照 FLOPC 22, 则来自 Sigma Chemicals (St. Louis, MO)。在我们实验室中, 制备出亚美尼亚仓鼠抗鼠 CD3 抗体 145.2C11 及其仓鼠/小鼠嵌合体 145.2C11-IgG3。缀合 FITC 的 145.2C11 来自 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN)。

可变区 cDNA 的克隆: 用 Co 等描述的锚式聚合酶链式反应(PCR)法(Co, M.S., N.M. Avadalovic, P.C. Caron, M.V. Avadalovic, D.A. Scheinberg 和 C. Queen. 1992. *J. Immunol.* 148:1149-1154), 从所述杂交瘤细胞克隆 PV1 之轻链和重链 V 区的 cDNA。运用分别退火到仓鼠  $\kappa$ 链 C 区和  $\gamma$ 链 C 区上的 3'引物以及退火到添加的 cDNA 之 G 尾上的 5'引物, 在 cDNA 上进行扩增。对于 V<sub>L</sub> PCR, 所述 3'引物具有序列 5'TATAGAGCTCCACTTCCAGTGCCC 3' (SEQ ID NO: 21), 其残基 11-24 与仓鼠 C <sub>$\kappa$</sub>  区杂交。对于 V<sub>H</sub> PCR, 所述 3'引物具有以下的简并序列(SEQ ID NO: 18、19 和 20):

```

          A       G   T
5' TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGACCGATGGGGCTGTCGTTTTGGC,
          T

```

其残基 19-50 与大多数啮齿类动物的 IgG C<sub>H1</sub> 杂交。两种引物组中的非杂交序列包含供克隆用的限制酶切位点。将 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 的 cDNA 亚克隆到 pUC19 载体中供序列测定。为了避免 PCR 产生的差错, 每种 cDNA 测定了 5 个独立克隆的序列; 且仅仅选择克隆之序列与共有序列一致的克隆, 来表达嵌合的 PV1。

## 结果

PV1 V 区 cDNA 的克隆: 正如在方法中所描述的, 从杂交瘤细胞中克隆了 PV1 轻链可变区的 cDNA 和重链可变区的 cDNA。对于  $V_L$  PCR, 仅仅对应于仓鼠  $C_\gamma$  区的 3' 引物能够从 PV1 产生  $V_L$  cDNA 产物。另一方面, 来自仓鼠  $C_\gamma$  区的一种 3' 引物不产生任何 PCR 的产物。这些结果表明: 杂交瘤 PV1 的轻链使用  $\kappa$ 。测定了轻链和重链的几个克隆的序列, 发现它们分别含有相同的  $V_L$  和  $V_H$ 。  $C_{H1}$  和  $C_\gamma$  的有限序列数据表明: 所克隆的重链和轻链不是起源于鼠的。

## 10 实施例 16 嵌合 PV1-IgG3 的构建与表达

### 方法

按照已描述的方法(He, X.Y., Z. Xu, J. Melrose, A. Mallowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S. Co 和 E. L. Berg. 1998. *J. Immunol.* 160:1029-1035), 通过 PCR, 将 PV1 的  $V_L$  和  $V_H$  制备成邻接 XbaI 位点的小外显子区段; 并将它们分别引入到轻链表达质粒和重链表达质粒中(图 14)。每个小外显子包含一段信号肽序列、一段成熟可变区序列和一段来源于同源性最高的小鼠 J 链基因的 5' 剪接供体序列。用这样的剪接供体, 将所述可变区外显子剪接到小鼠抗体的恒定区上。在把小外显子克隆到表达载体中之后, 再一次测定每个小外显子的序列, 从而确保引入正确的剪接信号, 且不产生 PCR 的差错。

构建一种载体, 来由一种单一质粒表达嵌合 PV1-IgG3 的重链基因和轻链基因两者。在本报告中, PV1-IgG3 表示一种包含仓鼠 PV1  $V_L$  和  $V_H$  可变区、小鼠 IgG3 的重链恒定区以及小鼠轻链的  $\kappa$  恒定区的嵌合抗体。通过类似于 Cole 等所述方法(Cole, M.S., C. Anasetti 和 J.Y. Tso. 1997. *J. Immunol.* 159:3613-3621) 的两步克隆法, 获得表达载体 pV1.g3.rg.dE (图 14)。重链恒定区来源于小鼠  $\gamma_3$  基因组片段, 轻链来自  $\kappa$  片段。所述重链基因和轻链基因都由人巨细胞病毒的主要立即早期启动子和增强子驱动, 且它们被来源于人补体基因 C2 的转录终止子

(Ashfield, R., P. Enriquez-Harris 和 N.J. Proudfoot. 1991. *EMBO J.* 10:4197-4207)隔开。选择标记的 gpt 基因(Mulligan, R.C.和 P. Berg. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072-2076)由经修饰的 SV40 早期启动子来驱动。为了表达嵌合 PV1-IgG3, 将所述单一质粒载体转染到鼠骨髓瘤细胞系 NS0 中; 且根据 gpt 的表达而选择出转染子。用山羊抗小鼠 IgG3 作为捕获试剂, 且用缀合 HRP 的山羊抗小鼠 $\kappa$ 链作为显色试剂, 通过 ELISA, 对转染子用过的培养基进行小鼠 IgG3 抗体产生方面的分析。这一分析对小鼠 IgG3 是特异性的, 在该分析中, 其它小鼠 IgG 同种型是阴性的。

10

### 结果

嵌合 PV1-IgG3 的表达: 按照材料和方法以及图 15 中所描述的, 把克隆的  $V_L$  和  $V_H$  制备成小外显子(图 15), 并使其结合到一种表达载体中。然后, 将该表达载体转染到鼠骨髓瘤细胞系 NS0 中, 以产生嵌合 PV1-IgG3。用几种转染子用过的培养基通过 ELISA 分析了小鼠 IgG3 抗体的产生, 并且用 FACScan 分析了与 EL4 细胞的结合。在两种分析中, 大多数转染子是阳性的。一种转染子由于抗体生产率高而被挑选出, 在 1 升无血清培养基中将其扩大培养。通过亲和层析, 从 1 升用过的培养基中纯化出 PV1-IgG3。产率 > 10 mg/l。

15

### **实施例 17 通过 HPLC 和 SDS-PAGE 表征纯化的嵌合 PV1-IgG3**

#### 方法

蛋白的纯化: 在 1 升 Gibco 无血清杂交瘤培养基中, 培养 IgG3 表达高的转染子中的一种(克隆 1 号)。当细胞生存力达到 30%或更低时, 收获用过的培养上清液; 并将其浓缩至 200 ml, 且用一台 Pharmacia P1 泵(2-3 ml/分钟), 将其加样到一根 5 ml 的蛋白-A Sepharose 柱上。接着, 用含有额外 0.1 M NaCl (NaCl 的终浓度为 0.25 M)的 PBS 洗涤该柱, 然后用 3.5 M 的  $MgCl_2$  洗脱所述抗体。接着, 在一根用含有额

20

外 0.1 M NaCl 的 PBS 平衡的 PD-10 柱上, 使洗脱的蛋白脱盐。在贮存于 4°C 之前, 通过一张 0.2 mm 的滤纸, 过滤脱过盐的蛋白溶液。和所有的小鼠 IgG3 一样, 高浓度 (> 1 mg/ml) 下 PV1-IgG3 在低温时沉淀, 而通过在 37°C 温热则溶解回溶液中。在室温, 该抗体则保持在溶液里。

5 冷沉淀的反复循环似乎不影响该抗体的结合抗原的活性。

通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE 进行纯度测定: 用由一台 PE ISS 200 Advanced LC Sample Processor (样品处理器)、一台 PE Series 410 Bio LC Pump (泵)、一台 PE 235C Diode Array Detector (二极管阵列检测器) 以及 PE Nelson 600 Series LINK 组成的 Perkin Elmer HPLC 系

10 统, 来进行大小排阻 HPLC。使用 Perkin Elmer Turbochrom Navigator Version 4.1 软件, 来控制自动进样器、泵与检测器; 且用该软件来获得、储存及处理数据。用两根串联连接的 TosoHaas TSK-GEL G3000SWXL 大小排阻 HPLC 柱 (TosoHaas, 目录号 08541, 7.8 mm x 300 mm, 5 mm 的粒度, 250Å 的孔隙大小), 来完成分离。流动相是 pH 6.9

15 的 200 mM 磷酸钾/150 mM 氯化钾, 且流速为 1.00 ml/分钟。用分光光度计在 220 nm 波长和 280 nm 波长下监测该柱的洗脱液。未稀释的 PV1-IgG3 样品的注射体积为 50 µl (63.5 µg)。按照标准方法, 进行 SDS-PAGE。

## 20 结果

通过大小排阻 HPLC 和 SDS-PAGE, 来分析所分离的 PV1-IgG3 的纯度。在图 16 中显示了 PV1-IgG3 的 HPLC 洗脱分布图。根据这一分析, 该蛋白是 99% 的单体, 且具有相当于分子量 150 kD 的迁移率。PV1、PV1-IgG3 以及同种型对照在非还原条件下的 SDS-PAGE 分析也

25 表明: 所有三种抗体都有大约 150 kD 的分子量 (图 17A)。在图 17A 中看到的较弱的带, 是由于所述样品在没有还原作用的 SDS 中沸腾而形成的人工产物。它们反映了所述抗体中未完成的链间二硫键的数目。但是在还原条件下 (图 17B) 分析同样的三种蛋白则表明: PV1, 而不是

PV1-IgG3 或同种型对照, 具有分子量比通常所见的 IgG 的 50 kD 分子量略高的重链。因此, 或者仓鼠抗体 PV1 在 C<sub>H</sub>3 中的 Asn<sub>297</sub> 得到重链糖基化, 或者它在重链中的其它位置有一个额外的糖基化位点。正如以后所讨论的, 这种罕见的糖基化模式可能促使 PV1 与 EL4 细胞的非特异性结合, 或许是通过凝集素/碳水化合物的相互作用来结合。

## 实施例 18

### 方法

流式细胞术: 在 4°C 用 1 μg/ml 的 PV1、37.51 或 PV1-IgG3 染色鼠 T 细胞系 EL4 细胞(2.5 x 10<sup>5</sup> 个细胞/0.2 ml)达 30 分钟, 然后用 2 ml 冷 PBS 洗涤它们, 并用 20 μl 缀合荧光染料的特异性第二抗体(10 μg/ml)将其染色。在黑暗中于 4°C 孵育 20 分钟后, 用 PBS 洗涤所述细胞, 并用 FACScan (Becton Dickenson, Milpitas, CA)分析。

在所述竞争实验中, 于 4°C 用 1 μg/ml 的 R-PE-PV1 和 25 μg/ml 的 PV1、PV1-IgG3 或 IgG3 同种型对照在黑暗中染色 EL4 细胞(2.5 x 10<sup>5</sup> 个细胞/0.2 ml)达 30 分钟; 用 PBS 洗涤所述细胞, 并用 FACScan 分析。也用不同形式的 145.2C11 进行类似的竞争实验。在可逆竞争实验中, 于 4°C 用 1 μg/ml 的 PV1-IgG3 和 25 μg/ml 的 PV1 染色 EL4 细胞(2.5 x 10<sup>5</sup> 个细胞/0.2 ml)达 30 分钟; 用 PBS 洗涤两次, 且用缀合 FITC 的驴抗小鼠 IgG (H+L)将其染色, 然后洗涤, 并用 FACScan 分析。为了控制第二抗体与 PV1 的非特异性结合, 在没有 PV1-IgG3 的情况下用过量的 PV1 对 EL4 细胞进行染色, 并分析所述细胞。

至于小鼠 T 细胞染色, 在 4°C 用 1 μg/ml 的小鼠 IgG3 同种型对照 (FLOPC 21)或 PV1-IgG3 对 BALB/c 小鼠的脾细胞(2.5 x 10<sup>5</sup> 个细胞/0.2 ml)染色达 30 分钟; 然后用 2 ml 冷的 PBS 洗涤, 并用 20 μl 缀合 FITC 的 145.2C11 (10 μg/ml)与 20 μl 缀合 R-PE 的山羊抗小鼠 IgG3 (10 μg/ml)染色。在 4°C 于黑暗中孵育 20 分钟后, 用 PBS 洗涤所述细胞, 并用 FACScan 分析。

## 结果

5 通过流式细胞术表征 PV1 和 PV1-IgG3: 用 PV1 使 CD28 阳性 T 细胞系 EL4 染色, 并用 FACScan 进行分析。着色的方式表明: PV1 在两个不同的位点结合 EL4 细胞(图 17A)。另外, PV1 以及几种亚美尼亚仓鼠抗鼠 T 细胞抗体(145.2C11, 抗-CD3; H57-597, 抗-TCR; 以及 UC10-4F10-11, 抗-CTLA4), 也与 CD28 阴性骨髓瘤细胞系 NS0 非特异性地结合(数据未显示)。相反, 叙利亚仓鼠抗-CD28 抗体 37.51 仅仅与 EL4 细胞上的一个位点特异性地结合(图 17B)。看来 PV1 除了结合 CD28 之外, 也非特异性地结合到其它位点上; 可能是通过碳水化合物/凝集素型的相互作用。正如在图 17C 中所显示的, 嵌合 PV1-IgG3 不包含这种非特异性结合的活性。这种抗体以类似于 37.51 之结合方式的方式与 EL4 细胞结合, 且它不结合 CD28 阴性的 NS0 细胞(数据未显示)。因此, PV1 的非特异性结合特性取决于这种特殊抗体的重链恒定区, 且通过嵌合作用而消除这种特性。

15 为了证实 PV1-IgG3 包含 CD28 特异性结合活性, 我们采用了 FACScan 竞争分析。在这些实验中, 使缀合 R-PE 的 PV1 与过量(25 倍)的未标记的 PV1、PV1-IgG3 或小鼠 IgG3 对照混合, 并用该混合物使 EL4 细胞染色。正如在图 18A 中所显示的, PV1 和 PV1-IgG3 两者, 而不是同种型对照, 阻止缀合 R-PE 的 PV1 结合到 EL4 细胞上。由 PV1-IgG3 造成的抑制小于由 PV1 造成的抑制, 我们把这些数据理解为: PV1-IgG3 与缀合 R-PE 的 PV1 竞争 CD28 位点, 而不是竞争非特异性位点。类似地是, 145.2C11 (亚美尼亚仓鼠抗鼠 CD3)和嵌合 145.2C11-IgG3 两者都阻止缀合 R-PE 的 145.2C11 结合到 EL4 细胞上(图 18B); 但由于该嵌合抗体不能消除 R-PE-145.2C11 与细胞的非特异性结合, 因而该抗体效率较低。

25 我们也用过量(25 倍)的 PV1 与 PV1-IgG3 竞争同 EL4 细胞的结合, 做了可逆竞争实验。虽然在这种情况下没有标记 PV-1-IgG3, 但用缀合 FITC 的驴抗小鼠抗体来特异性地识别它。图 18C 中的结果显

示：由过量 PV1 造成的对 PV1-IgG3 与 EL4 细胞结合的抑制，几乎是完全的；从而证实了 PV1 与 PV1-IgG3 结合同一表位。

最后，用 PV1-IgG3 对小鼠脾细胞进行染色。包有 PV1-IgG3 的脾细胞为第二抗体缀合 R-PE 的山羊抗小鼠 IgG3 特异性地识别。同时，也将缀合 FITC 的 145.2C11 添加到脾细胞之中，从而标记 CD3 阳性细胞。在双色流式细胞术分析中，PV1-IgG3 特异性地使 CD3 阳性细胞染色，而不使 CD3 阴性细胞染色(图 19B)。相反，小鼠 IgG3 同种型对照不使 CD3 阳性细胞着色(图 19A)。因此，嵌合 PV1-IgG3 识别在鼠 T 细胞上表达的一种抗原，这是与抗 CD28 抗体相符合的结合抗原活性。

## 实施例 19 胶原蛋白诱发性关节炎的诱导

### 方法

用以等体积的 CFA (Wako, Japan)乳化的 125  $\mu$ g 牛 CII (Collagen Gijutsu Kenkyukai, Japan)，在小鼠尾的基底真皮内免疫小鼠。在第 21 天，用 125  $\mu$ g 的、CFA 中的牛 CII，通过真皮内注射，来加强免疫小鼠。在初次免疫之后，以 1 mg/kg/天的剂量，借助于等渗泵连续输注抗 CD28 抗体(PV1-IgG3)达 7 天，来治疗小鼠。在第二次免疫后的第 11 天，通过观察四只爪，来检查关节炎的发生；并按照先前所描述的 (Tada, Y., A. Ho, D.-R. Koh, T.W. Mak. 1996. J. Immunol. 156:4520, Tada, Y., A. Ho, T. Matsuyama, T.W. Mak. 1997. J. Exp. Med. 185:231)，将四只爪的炎症按 0 至 3 级评等级。评定每只爪的等级，并将四个得分相加；因此每只小鼠的最高得分为 12。通过用小鼠总数除实验小鼠的总得分，来计算关节炎指数。

### 结果

用牛 CII 免疫了小鼠，观察小鼠关节炎发生的情况。在第二次免疫后的第 11 天，在用抗 CD28 抗体治疗的小鼠中，关节炎指数( $0.63 \pm 0.50$ )( $P < 0.01$ )与对照( $7.50 \pm 0.66$ )相比较显著降低。

## 实施例 20

### 方法

#### 小鼠: 动物

从 Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Japan), 得到雌性 BALB/c 小鼠和 C3H 小鼠。动物全部关养在无病原体设施中的具有过滤空气的小隔离笼里, 且能自由获得食物和水。当开始实验时, 所有小鼠为 6 至 8 周龄。

#### 抗体:

10 沉默型抗小鼠 CD28 (PV1-IgG3)具有与 PV-1 克隆相同的特异性, 但它在体外不具有强激动活性(Fc→IgG3)。抗小鼠 CD154 (TRAP1, IgG1)购自 BD PharMingen (San Diego, CA)。CTLA4-Ig (CTLA-4/Fc 嵌合体)购自 Genzyme (Cambridge, MA)。

#### 15 尾皮移植:

将来自供体小鼠(BALB/c:H-2d)尾部的全厚度皮肤移植物(0.5 cm<sup>2</sup>)移植到受体小鼠(C3H:H-2b)的背侧胸部, 并用急救绷带将其固定 7 天。然后, 通过每日目视观察, 来跟踪移植物的存活。排斥定义为丧失>80% 的活的表皮移植物组织。用 Dunnett 的多重比较检验进行统计学分析。  
20  $p < 0.05$  的数值被认为是显著性的。

#### 治疗方案:

用 10  $\mu$ g、50  $\mu$ g、250  $\mu$ g 的沉默型抗小鼠 CD28, 来治疗皮肤移植物的受体。在移植当天(0 天)以及在手后第 3 天和第 6 天, 腹膜内给予 250  $\mu$ g 抗小鼠 CD154 和 100  $\mu$ gCTLA4-Ig。  
25

#### 结果:

通过给予沉默型抗小鼠 CD28 和抗小鼠 CD154 而同时阻断 CD40

和 CD28 的 T 细胞共同刺激途径, 则有效地促进 C3H 小鼠中的皮肤同种移植物的存活。对照动物在第 9 天排斥其移植物。单独的抗 CD40L 单克隆抗体适中地延长同种移植物的存活(MST 为 10 天), 但当与 CD28 联合时, 则观察到显著地改善存活, 而使半数存活时间(MST) 5 延长到超过第 33 天。这种策略在给予 CTLA4-Ig 和抗小鼠 CD40L 单克隆抗体时明显是不太有效的, MST 为 12 天。

## 实施例 21 抗 CD28 抗体的 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段的制备

### 抗 CD28 抗体的 Fab 片段的制备

10 用固定化的无花果蛋白酶(Pierce, USA)消化抗人 CD28 抗体 (HuTN228)。用含有 5 mM EDTA 和 11.5 mM 半胱氨酸盐酸的 50 mM Tris-HCl pH 6.8 缓冲液, 来活化固定化的无花果蛋白酶; 并将其填充到一根柱里。将抗体溶液添加到该柱上, 并在 37°C 保温达 2 或 3 天。用 PBS 洗涤该柱, 并通过超滤, 浓缩所述消化液。将浓缩的消化液加 15 到凝胶过滤柱(TSKgel-3000SWx1, Tosoh, Japan) 上, 并收集适当的级分, 且通过超滤进行浓缩。根据在 280 nm 的吸光度(对于 1 mg/ml, Abs<sub>280</sub> = 1.4)而确定蛋白的浓度; 并通过 SDS-PAGE 来确认片段的大小。

### 20 抗 CD28 抗体的 F(ab')<sub>2</sub> 片段的制备

用与 Fab 片段制备方法一样的方法(除了半胱氨酸的浓度(1.15 mM)和保温时间(过夜一次)之外), 来制备抗人 CD28 抗体。

显然, 根据上述内容, 可能存在本发明的许多改进与变化。因此必须明白: 在所附的权利要求书的范围内, 可以以除本文具体所描述的 25 的之外的其它方式, 来实施本发明。

本文提到的所有出版物、专利申请、专利以及其它参考文献通过引用全部结合到本文中。



Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala  
 30 35 40 45  
 agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa 194  
 5 Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln  
 50 55 60  
 cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac 242  
 10 Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn  
 65 70 75  
 gta gat tct ggg gtc cct gcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca 290  
 15 Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 80 85 90  
 gac ttc agc ctc aac atc cat cct gtg gag gag gat gat att gca atg 338  
 Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met  
 95 100 105  
 20 tat ttc tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc tcg ggg 386  
 Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly  
 110 115 120 125  
 aca aag ttg gaa ata aaa cgtaagtaga cttttgctct aga 427  
 25 Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 130  
 <210> 2  
 <211> 131  
 30 <212> PRT  
 <213> 杂合  
 <400> 2  
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 35 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala  
 20 25 30  
 40 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser  
 35 40 45

	Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
	50	55 60
5	Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser	
	65	70 75 80
	Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser	
		85 90 95
10	Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys	
		100 105 110
	Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu	
15		115 120 125
	Glu Ile Lys	
	130	
	<210> 3	
20	<211> 877	
	<212> DNA	
	<213> 杂合	
	<220>	
25	<221> CDS	
	<222> (12)..(431)	
	<223>	
	<400> 3	
30	tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc	50
	Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu	
	1 5 10	
	tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att gtg ctc acc caa tct cca get	98
35	Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala	
	15 20 25	
	tct ttg gct gtg tct ctg ggg cag aga gcc acc atc tcc tgc aga gcc	146
40	Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala	
	30 35 40 45	
	agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa	194

	Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln	
	50 55 60	
5	cag aaa cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn	242
	65 70 75	
10	gta gat tot ggg gtc cct gcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca Val Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr	290
	80 85 90	
15	gac ttc agc ctc aac atc cat cct gtg gag gag gat gat att gca atg Asp Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met	338
	95 100 105	
20	tat ttc tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc tgc ggg Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly	386
	110 115 120 125	
25	aca aag ttg gaa ata aaa cgt aag tag act ttt gct cta gat cta Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Lys Thr Phe Ala Leu Asp Leu	431
	130 135 131	
30	gaccaccatg gctgtcctgg tgctgttctc ctgcctgggt gcatttccaa gctgtgtcct gtcccaggtg cagctgaagg agtcaggacc tggcctgggt ggcacctcac agagcctgtc	491 551
	catcacttgc actgtctctg gattttcatt aaccagctat ggtgtacact gggttcgcca	611
35	gocccagga aagggtctgg aatggctggg agtcatatgg cctgggtggag gcacaaattt taattcgct ctcattgcca gactgagcat cagcgaagac aactccaaga gccaaagttt	671 731
	otaaaaatg aacactctgc aaactgatga cacagccata tattattgtg ccagagatcg	791
40	ggcgtatggt aactacctct atgcatgga ctactggggt caaggaacct cagtcacctg ctcctcaggt aagaatggcc tctaga	851 877
	<210> 4 <211> 133 <212> PRT	

<213> 杂合  
  
 <400> 4  
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 5 1 5 10 15  
  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala  
 20 25 30  
  
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser  
 10 35 40 45  
  
 Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 50 55 60  
 15  
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser  
 65 70 75 80  
  
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser  
 20 85 90 95  
  
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys  
 100 105 110  
  
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu  
 25 115 120 125  
  
 Glu Ile Lys Arg Lys  
 130  
 30  
 <210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 杂合  
 35  
 <400> 5  
  
 Thr Phe Ala Leu Asp Leu  
 1 5  
 40  
 <210> 6  
 <211> 450

<212> DNA  
 <213> 杂合  
  
 <220>  
 5 <221> CDS  
 <222> (12)..(431)  
 <223>  
  
 <400> 6  
 10 tctagaccac c atg gct gtc ctg gtg ctg ttc ctc tgc ctg gtt gca ttt 50  
                   Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe  
                           1                  5                  10  
  
                   cca agc tgt gtc ctg tcc cag gtg cag ctg cag gag tca gga cct ggc 98  
 15 Pro Ser Cys Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly  
                   15                  20                  25  
  
                   ctg gtg aag occ tca gag acc ctg tcc ctc act tgc gct gtc tct gga 146  
 20 Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly  
                   30                  35                  40                  45  
  
                   ttt tca tta acc agc tat ggt gta cac tgg att cgc cag cct cca gga 194  
                   Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly  
                                   50                  55                  60  
 25  
                   aag ggt ctg gaa tgg ctg gga gtc ata tgg cct ggt gga ggc aca aat 242  
                   Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn  
                           65                  70                  75  
  
                   ttt aat tcg gct ctc atg tcc aga ctg acc atc agc gaa gac acc tcc 290  
 30 Phe Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser  
                   80                  85                  90  
  
                   aag aac caa gtt tcc tta aaa ttg agc tct gtg aca gct gct gac aca 338  
 35 Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr  
                   95                  100                  105  
  
                   gcc gta tat tat tgt gcc aga gat cgg gcg tat ggt aac tac ctc tat 386  
 40 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Leu Tyr  
                   110                  115                  120                  125  
  
                   gcg atg gac tac tgg ggt caa gga acc tta gtc acc gtc tcc tca 431

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

ggtaagaatg gcctctaga 450

5  
 <210> 7  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> 杂合

10  
 <400> 7  
 Met Ala Val Leu Val Leu Phe Leu Cys Leu Val Ala Phe Pro Ser Cys  
 1 5 10 15

15  
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 20 25 30

20  
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45

25  
 Thr Ser Tyr Gly Val His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

25  
 Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Phe Asn Ser  
 65 70 75 80

30  
 Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95

30  
 Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110

35  
 Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Ala Tyr Gly Asn Tyr Leu Tyr Ala Met Asp  
 115 120 125

35  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

40  
 <210> 8  
 <211> 427  
 <212> DNA  
 <213> 杂合

```

<220>
<221> CDS
<222> (12)..(404)
5 <223>

<400> 8
tctagaccac c atg gag tca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc      50
      Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu
10      1          5          10

tgg gtt cca ggc tcc act ggt gac att cag atg acc caa tct cca tct      98
Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
      15          20          25
15

tot ttg tct gcg tct gtg ggg gac agg gtc acc atc aca tgc aga gcc      146
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
30          35          40          45

20 agt gaa agt gtt gaa tat tat gtc aca agt tta atg cag tgg tac caa      194
Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln
      50          55          60

25 cag aaa cca gga aag gca ccc aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc aac      242
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
      65          70          75

30 gta gat tct ggg gtc cct tcc agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca      290
Val Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
      80          85          90

gac ttc acc ctc acc atc tct tct ctg cag ccg gag gat att gca acg      338
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr
35      95          100          105

tat tac tgt cag caa agt agg aag gtt cca ttc acg ttc ggc ggg ggg      386
Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
40      110          115          120          125

aca aag gtg gaa ata aaa cgtaagtaga cttttgctct aga      427
Thr Lys Val Glu Ile Lys
      130

```

<210> 9  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 5 <213> 杂合  
  
 <400> 9  
 Met Glu Ser Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1                   5                   10                   15  
 10 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
                   20                   25                   30  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser  
 15                   35                   40                   45  
 Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
           50                   55                   60  
 20 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Asp Ser  
       65                   70                   75                   80  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
                   85                   90                   95  
 25 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   100                   105                   110  
 Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val  
 30                   115                   120                   125  
 Glu Ile Lys  
       130  
 35 <210> 10  
       <211> 445  
       <212> DNA  
       <213> 杂合  
  
 40 <220>  
       <221> CDS  
       <222> (21)..(419)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 10

	tctagacagt ggggaacaat atg gat tca cag atc cag gtc ctc atg tcc ctg	53
5	Met Asp Ser Gln Ile Gln Val Leu Met Ser Leu	
	1 5 10	
	ctc ctc tgg atg tct ggt gcc tgt gga gat att gtg atg acc cag tct	101
	Leu Leu Trp Met Ser Gly Ala Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser	
10	15 20 25	
	cca tat tcc ctg gct gtg tca gca gga gag aag gtc acc atg agt tgc	149
	Pro Tyr Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys	
15	30 35 40	
	agg tcc agt cag agc ctc tat tac agt gga atc aaa aag aac ctc ttg	197
	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser Gly Ile Lys Lys Asn Leu Leu	
	45 50 55	
20	gcc tgg tac cag cag aaa cca ggc cag tct ccg aaa ctg ctg atc tac	245
	Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
	60 65 70 75	
	ttt aca tct act cgg tta cct ggg gta ccg gat cgc ttc aca ggc agt	293
25	Phe Thr Ser Thr Arg Leu Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser	
	80 85 90	
	gga tct ggg aca gat tac act ctc acc atc acc agt gtc cag gct gaa	341
	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu	
30	95 100 105	
	gac atg ggg cat tat ttc tgt cag cag ggt ata agc act ccg ctc acg	389
	Asp Met Gly His Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ile Ser Thr Pro Leu Thr	
35	110 115 120	
	ttc ggt gat ggc acc aag ctg gag ata aga cgtaagtaga atccaaagtc	439
	Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg	
	125 130	
40	tctaga	445

&lt;210&gt; 11

<211> 133  
 <212> PRT  
 <213> 杂合

5 <400> 11  
 Met Asp Ser Gln Ile Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Leu Trp Met Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Tyr Ser Leu Ala  
 10 20 25 30  
 Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Tyr Tyr Ser Gly Ile Lys Lys Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Thr Arg  
 65 70 75 80  
 20 Leu Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95  
 Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly His Tyr  
 25 100 105 110  
 Phe Cys Gln Gln Gly Ile Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr  
 115 120 125  
 30 Lys Leu Glu Ile Arg  
 130

<210> 12  
 <211> 467  
 35 <212> DNA  
 <213> 杂合

<220>  
 <221> CDS  
 40 <222> (16)..(444)  
 <223>

	<400> 12	
	tctagagtct tcacc atg gta tgg ggc ttg atc atc atc ttc ctg gtc aca	51
	Met Val Trp Gly Leu Ile Ile Ile Phe Leu Val Thr	
	1 5 10	
5	gca gct aca ggt gtc cac tcc cag gtc cag ttg aag cag tct ggg gct	99
	Ala Ala Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala	
	15 20 25	
10	gag ctt gtg aag cct gga gcc tca gtg aag ata tcc tgc aaa act tca	147
	Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser	
	30 35 40	
15	ggc tat acc ttc act gat ggc tac atg aac tgg gtt gag cag aag cct	195
	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Gly Tyr Met Asn Trp Val Glu Gln Lys Pro	
	45 50 55 60	
20	ggg cag ggc ctt gag tgg att gga aga att gat cct gat agt ggt aat	243
	Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asn	
	65 70 75	
25	act cgg tac aat cag aaa ttc cag ggc aag gcc aca ctg act aga gac	291
	Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp	
	80 85 90	
30	aaa tcc tcc agc aca gtc tac atg gac ctc agg agc ctg aca tct gag	339
	Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu	
	95 100 105	
35	gac tct gct gtc tat tac tgt gcg aga gat ggg acc ttc tac ggt acc	387
	Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Phe Tyr Gly Thr	
	110 115 120	
40	tac ggc tac tgg tac ttc gat ttc tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc	435
	Tyr Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr	
	125 130 135 140	
45	gtc tcc tca ggtgagtcc taaaacctct aga	467
	Val Ser Ser	
	<210> 13	
	<211> 143	

<212> PRT  
 <213> 杂合

<400> 13  
 5 Met Val Trp Gly Leu Ile Ile Ile Phe Leu Val Thr Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys  
 20 25 30  
 10 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Thr Asp Gly Tyr Met Asn Trp Val Glu Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu  
 15 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 20 Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Thr Val Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110  
 25 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Thr Phe Tyr Gly Thr Tyr Gly Tyr Trp  
 115 120 125  
 Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 130 135 140  
 30

<210> 14  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 35 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成 DNA

40 <400> 14  
 tatagagctc aagcttggat ggtggaaga tggatacagt tggatgc

	<210> 15	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
5	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 15	
10	tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatggggctg tcgttttggc	50
	<210> 16	
	<211> 50	
	<212> DNA	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 16	
20	tatagagctc aagcttccag tggatagaca gatgggggtg ttgttttggc	50
	<210> 17	
	<211> 50	
25	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
30	<400> 17	
	tatagagctc aagcttccag tggatagacc gttggggctg tcgttttggc	50
	<210> 18	
35	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
40	<223> 合成 DNA	
	<400> 18	

	tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatggggctg tcgttttggc	50
	<210> 19	
	<211> 50	
5	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成 DNA	
10	<400> 19	
	tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatgggggtg ttgttttggc	50
	<210> 20	
15	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
20	<223> 合成 DNA	
	<400> 20	
	tatagagctc aagcttccag tggatagacc gatggggctg tcgttttggc	50
25	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
30	<220>	
	<223> 合成 DNA	
	<400> 21	
35	tatagagctc cacttccagt gccc	24

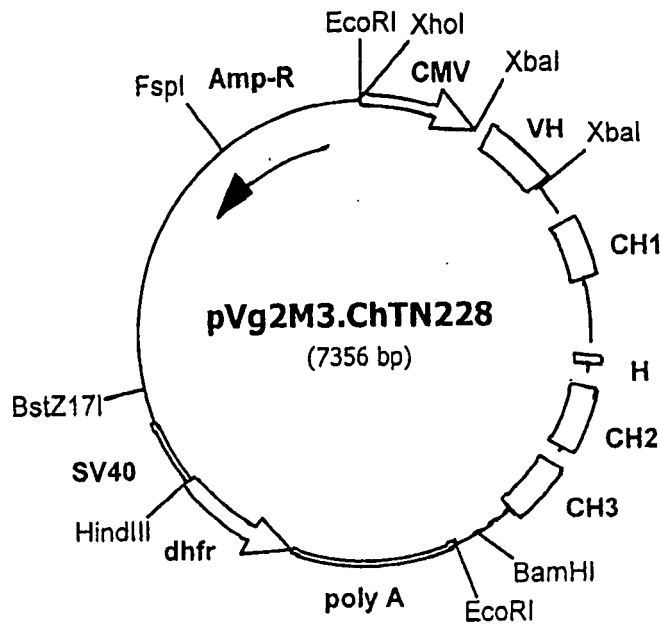
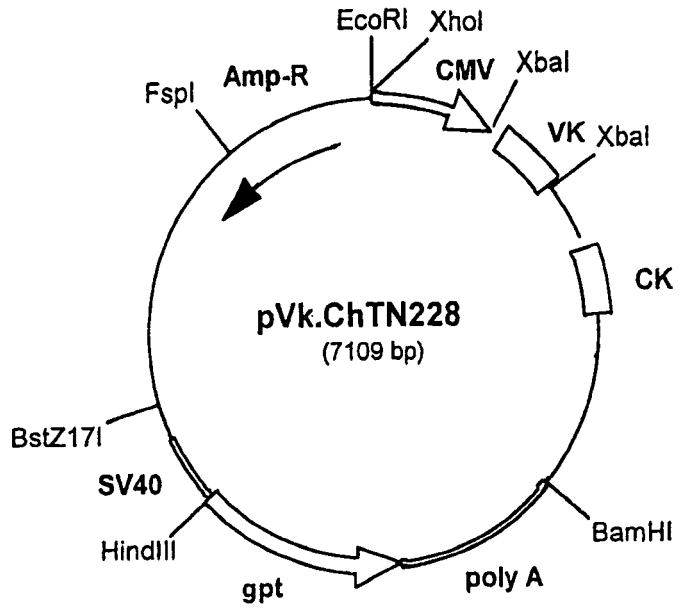


图 1

30 60  
 tctagaccaccATGGAGTCAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTCCAG  
 M E S D T L L L W V L L L W V P

90 120  
 GCTCCACTGGTGACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGC  
 G S T G D I V L T Q S P A S L A V S L G

150 180  
 AGAGAGCCACCATCTCCTGCAGAGCCAGTCAAAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTTAA  
 Q R A T I S C R A S E S V E Y Y V T S L

210 240  
 TGCAGTGGTACCAACAGAAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCA  
M Q W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S

270 300  
 ACGTAGATTCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCC  
N V D S G V P A R F S G S G S G T D F S

330 360  
 TCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGATGATATTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGA  
 L N I H P V E E D D I A M Y F C Q Q S R

390 420  
 AGGTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAATAAAACgtaagtagacttttg  
K V P F T F G S G T K L E I K

ctctaga

图 2

30 60  
 tctagaccaccATGGCTGTCCTGGTGCTGTTCCCTCTGCCTGGTTGCATTTCCAAGCTGTG  
 M A V L V L F L C L V A F P S C

90 120  
 TCCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC  
 V L S Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S

150 180  
 TGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGATTTTCATTAACCAGCTATGGTGTACACTGGGTTTC  
 L S I T C T V S G F S L T S Y G V H W V

210 240  
 GCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGGAGTCATATGGCCTGGTGGAGGCACAA  
 R Q P P G K G L E W L G V I W P G G G T

270 300  
 ATTTTAATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCGAAGACAACCTCCAAGAGCCAAG  
N F N S A L M S R L S I S E D N S K S Q

330 360  
 TTTTCTTAAAAATGAACACTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATATATTATTGTGCCAGAG  
 V F L K M N T L Q T D D T A I Y Y C A R

390 420  
 ATCGGGCGTATGGTAACTACCTCTATGCCATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCA  
D R A Y G N Y L Y A M D Y W G Q G T S V

450  
 CCGTCTCCTCAGgtaagaatggcctctaga  
 T V S S

图 3

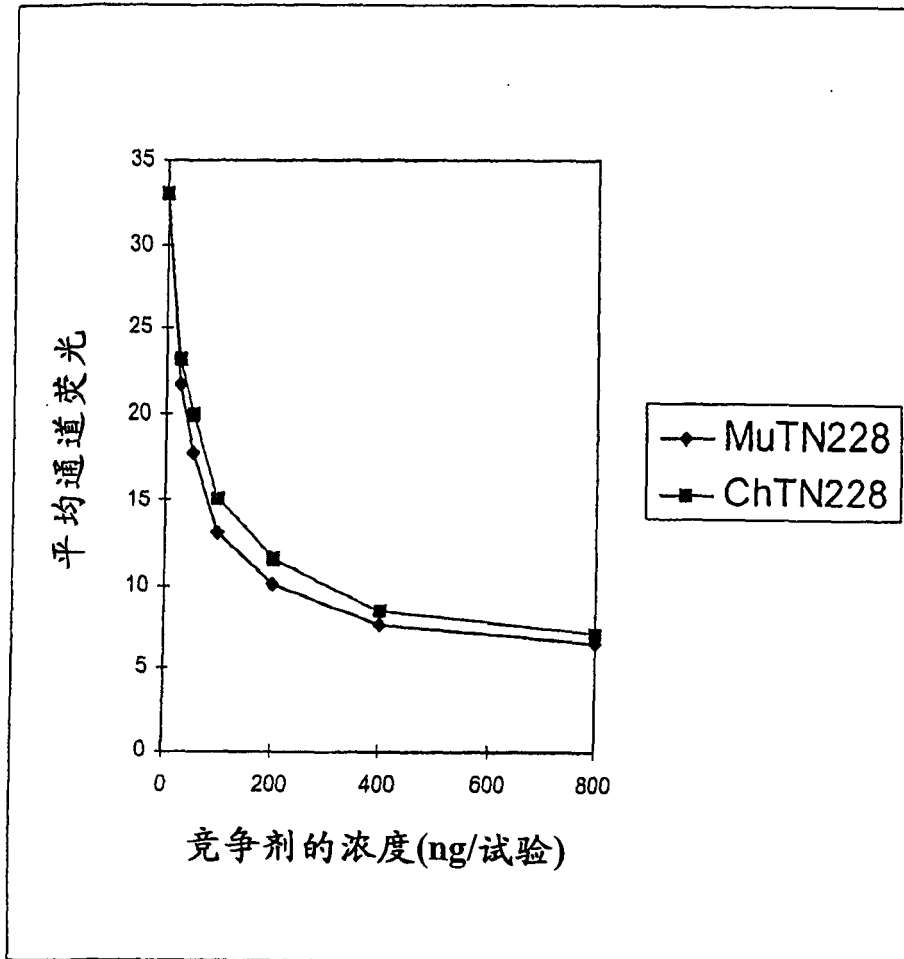


图 4

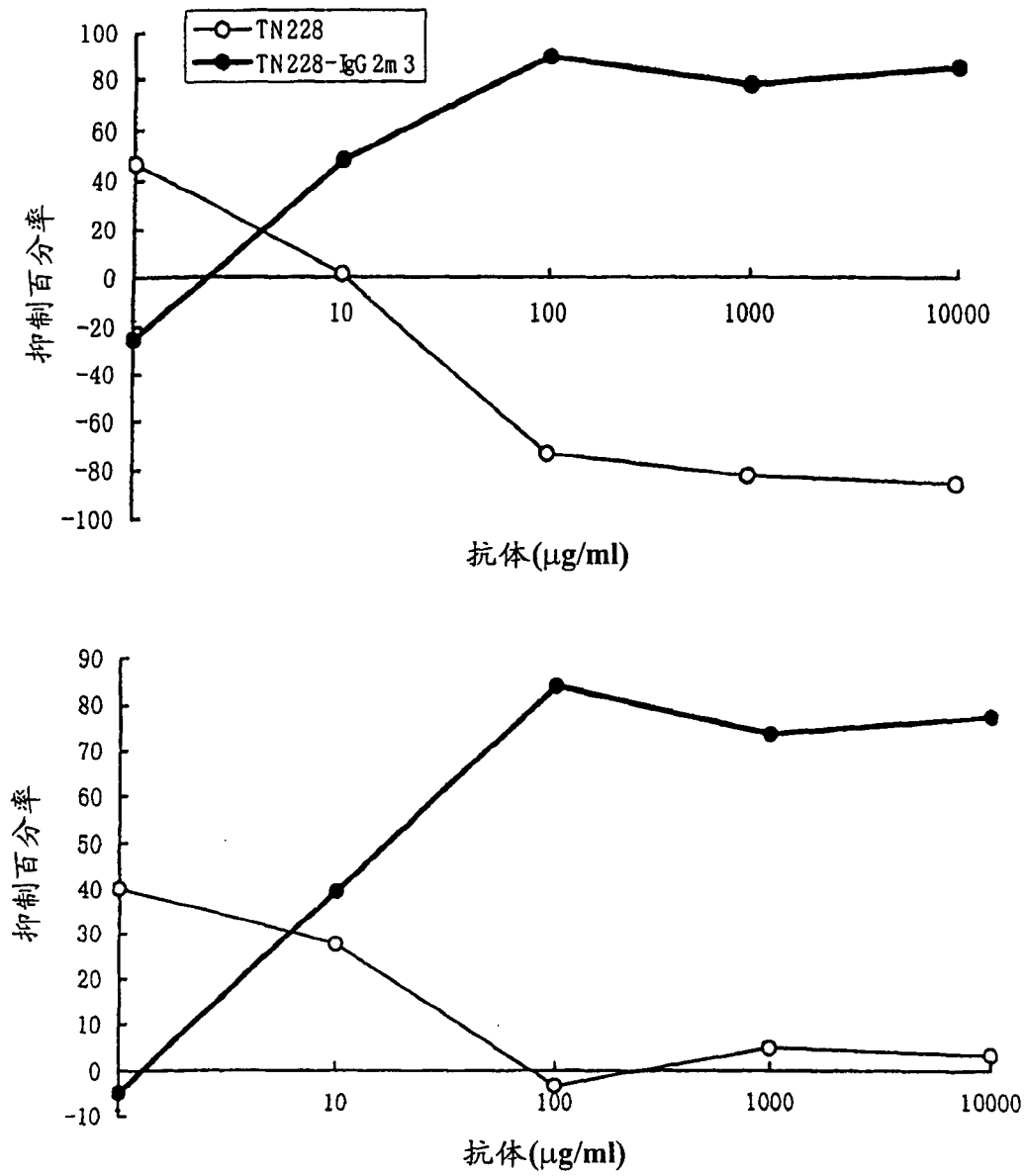


图 5

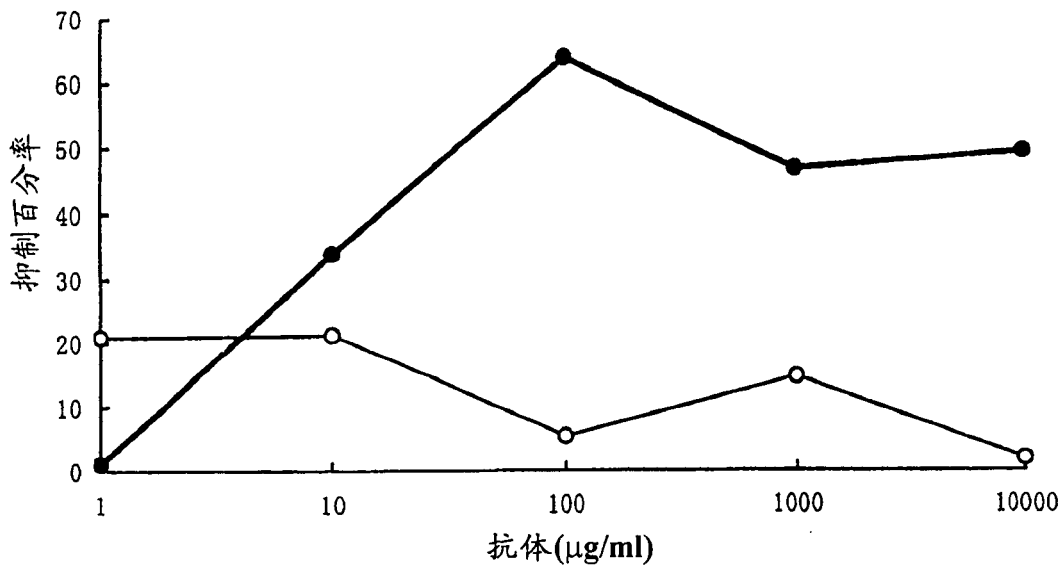
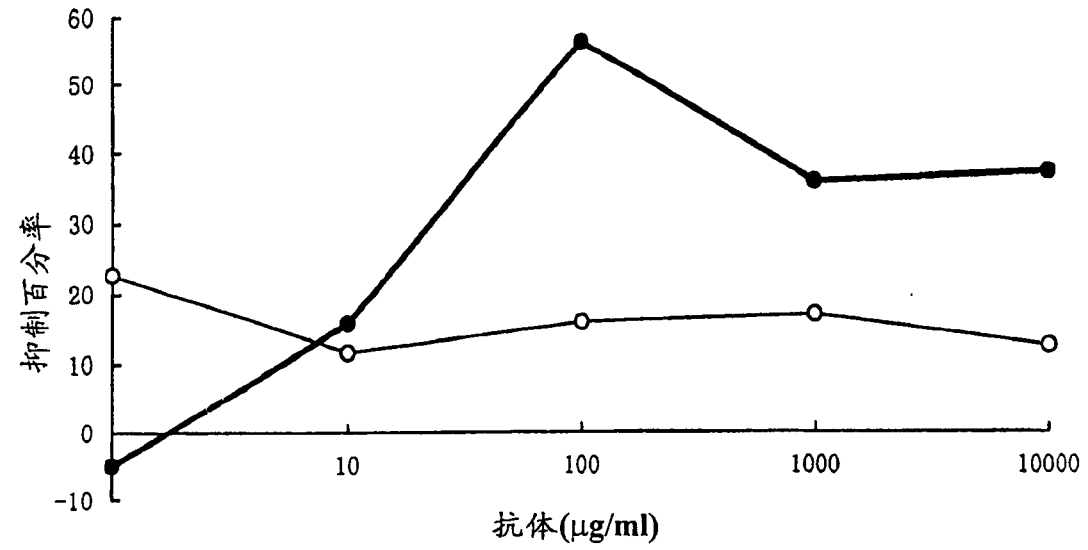
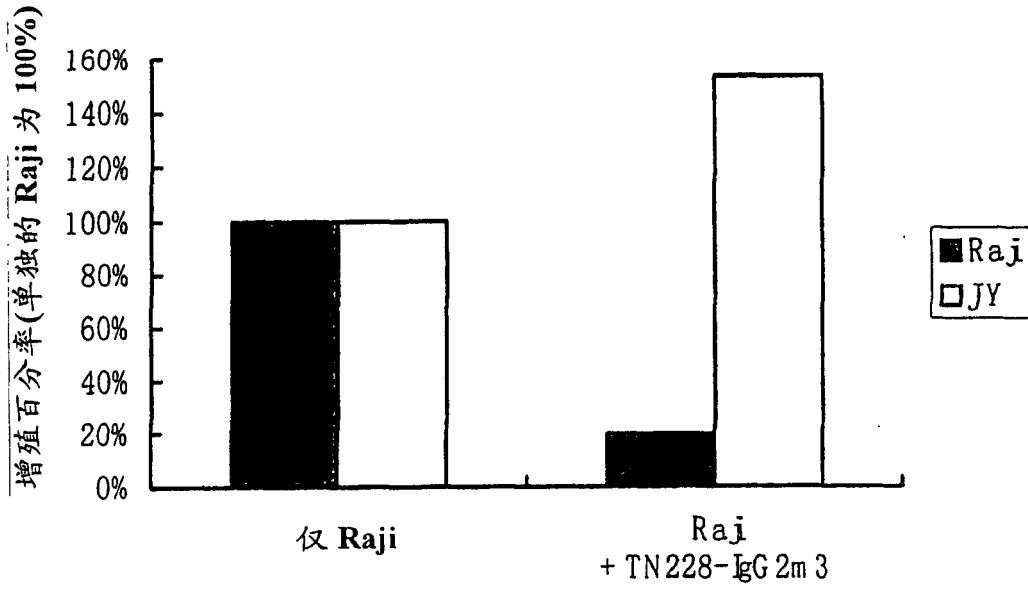


图 6

志愿者: A



志愿者: B

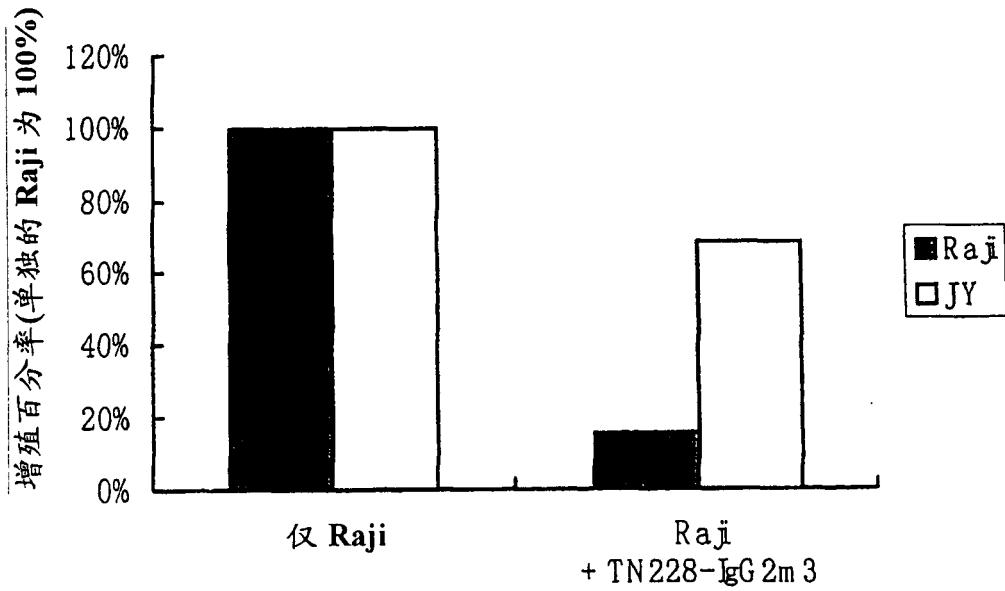


图 7

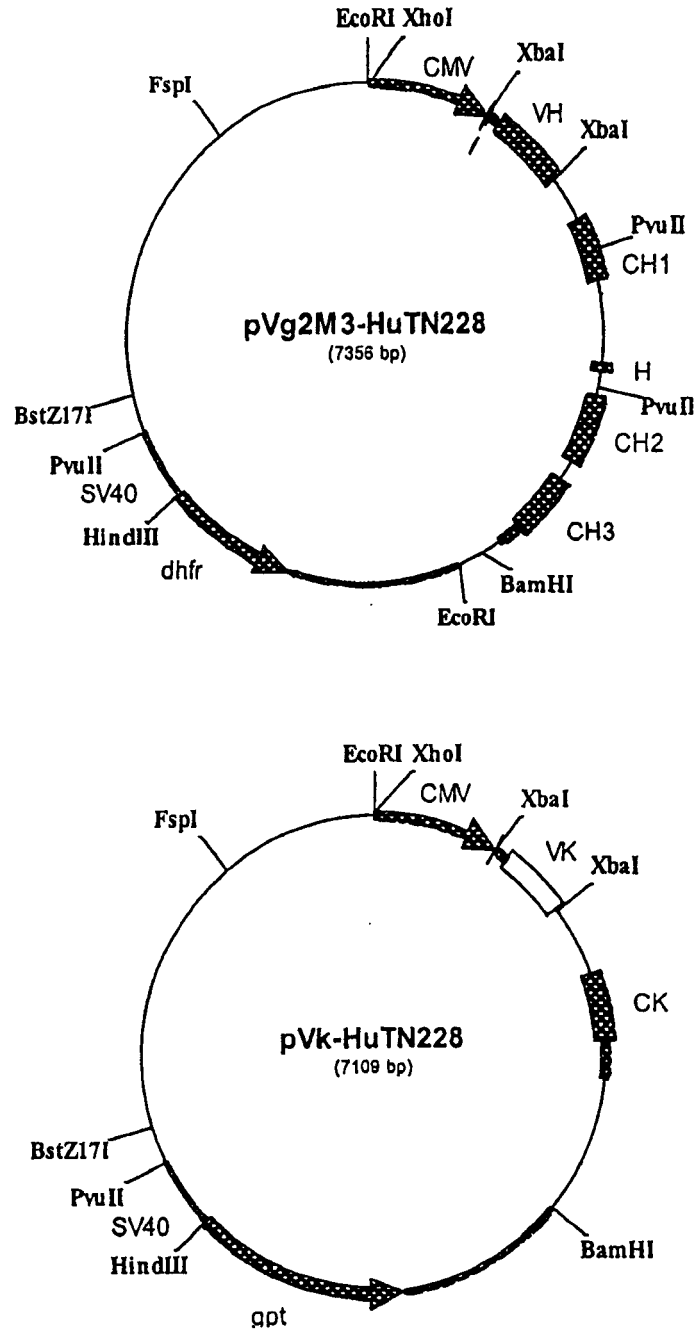


图 8

tctagaccaccATGGCTGCCTGGTGTCTTCCTCTGCCTGGTTGCATTTCCAAGCTGTG  
*M A V L V L F L C L V A F P S C*

90 120  
 TCCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCAGAGACCC  
*V L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T*

150 180  
 TGTCCCTCACTTGCCTGTCTCTGGATTTTCATTAACCAGCTATGGTGTACACTGGATTC  
*L S L T C A V S G F S L T S Y G V H W I*

210 240  
 GCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGGAGTCATATGGCCTGGTGGAGGCACAA  
*R Q P P G K G L E W L G V I W P G G G T*

270 300  
 ATTTTAATTCGGCTCTCATGTCCAGACTGACCATCAGCGAAGACACCTCCAAGAACCAAG  
*N F N S A L M S R L T I S E D T S K N Q*

330 360  
 TTTCCTTAAAATTGAGCTCTGTGACAGCTGCTGACACAGCCGTATATTATTGTGCCAGAG  
*V S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R*

390 420  
 ATCGGGCGTATGGTAACTACCTCTATGCGATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTTAGTCA  
*D R A Y G N Y L Y A M D Y W G Q G T L V*

450  
 CCGTCTCCTCAGgtaagaatggcctctaga  
*T V S S*

图 9

30 60  
 tctagaccaccATGGAGTCAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAG  
 M E S D T L L L W V L L L W V P

90 120  
 GCTCCACTGGTGACATTCAGATGACCCAATCTCCATCTTCTTTGTCTGCGTCTGTGGGGG  
 G S T G D I Q M T Q S P S S L S A S V G

150 180  
 ACAGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGTGAAAGTGTGAATATTATGTCACAAGTTTAA  
 D R V T I T C R A S E S V E Y Y V T S L

210 240  
 TGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGAAAGGCACCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCA  
M Q W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S

270 300  
 ACGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCC  
N V D S G V P S R F S G S G S G T D F T

330 360  
 TCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATATTGCAACGTATTACTGTCAGCAAAGTAGGA  
 L T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q S R

390 420  
 AGGTTCCATTCACGTTCCGGCGGGGGACAAAGGTGGAATAAACgtaagtagacttttg  
K V P F T F G G G T K V E I K

ctctaga

图 10

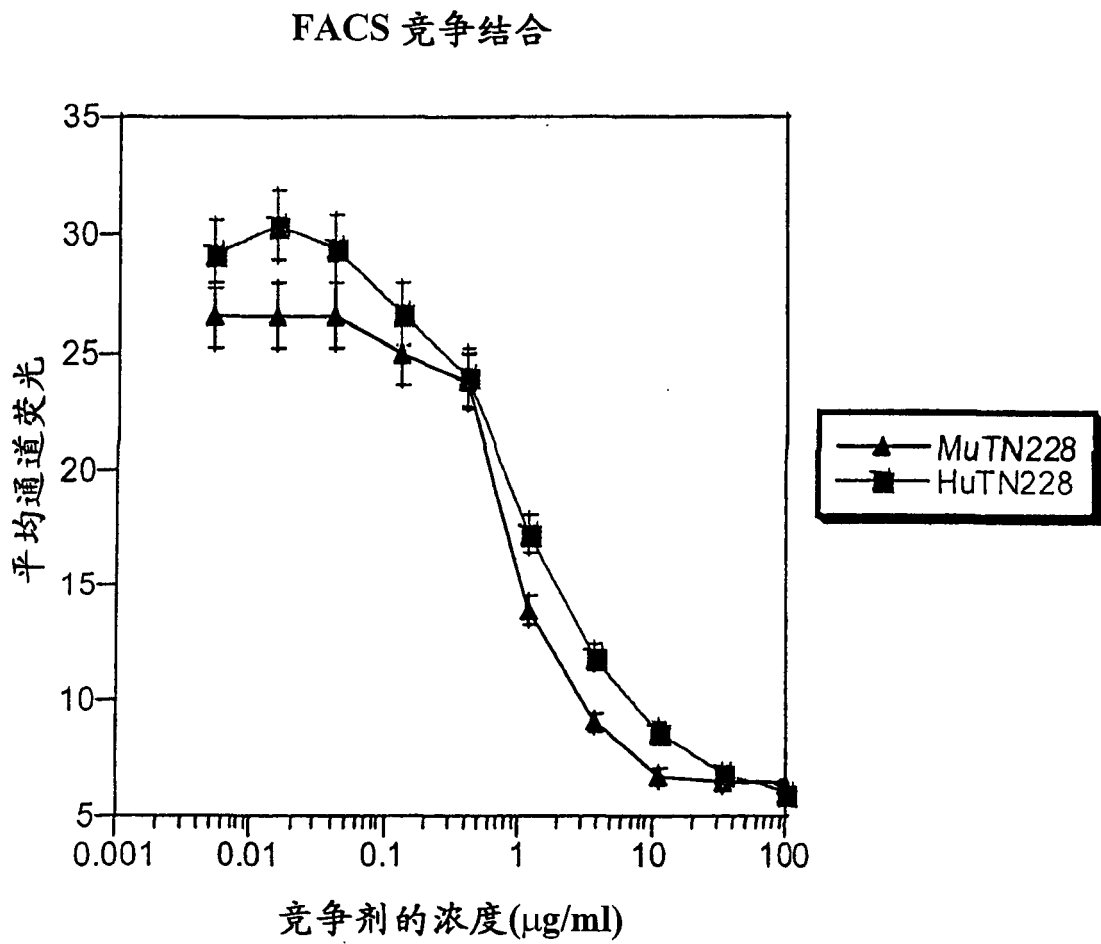


图 11

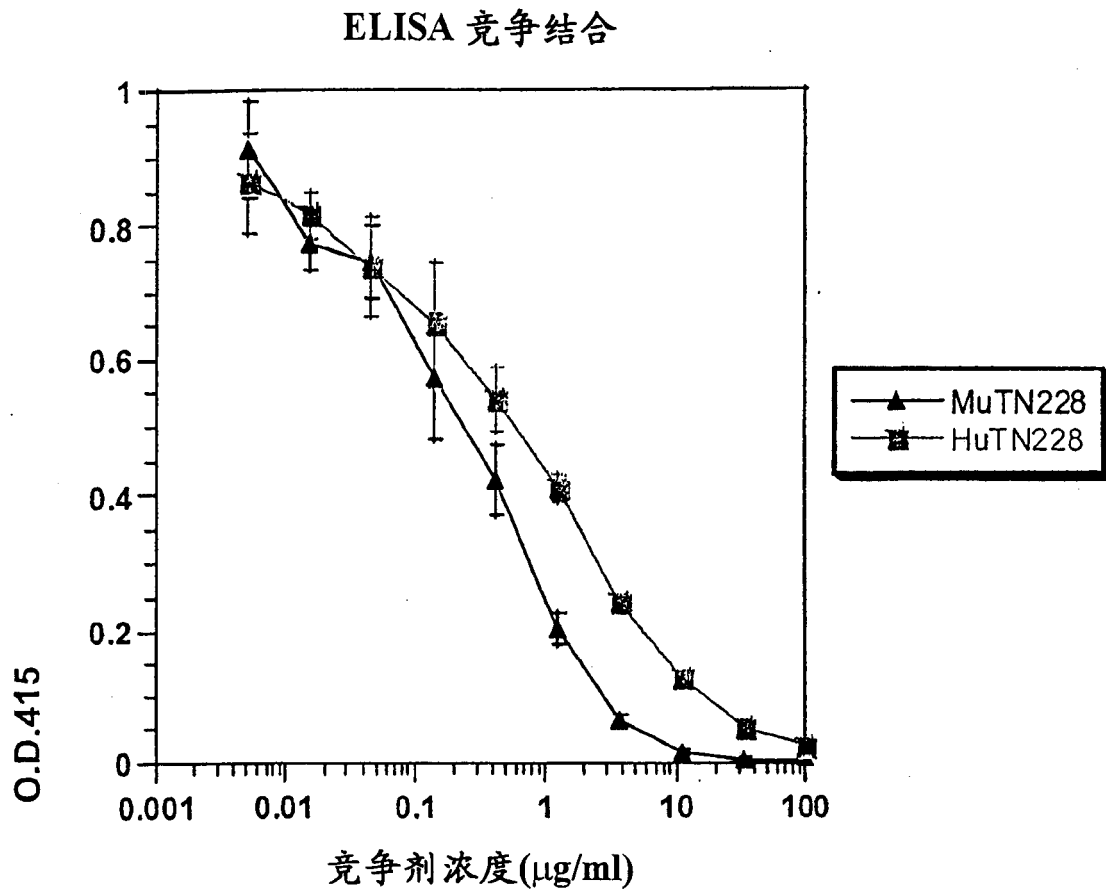


图 12

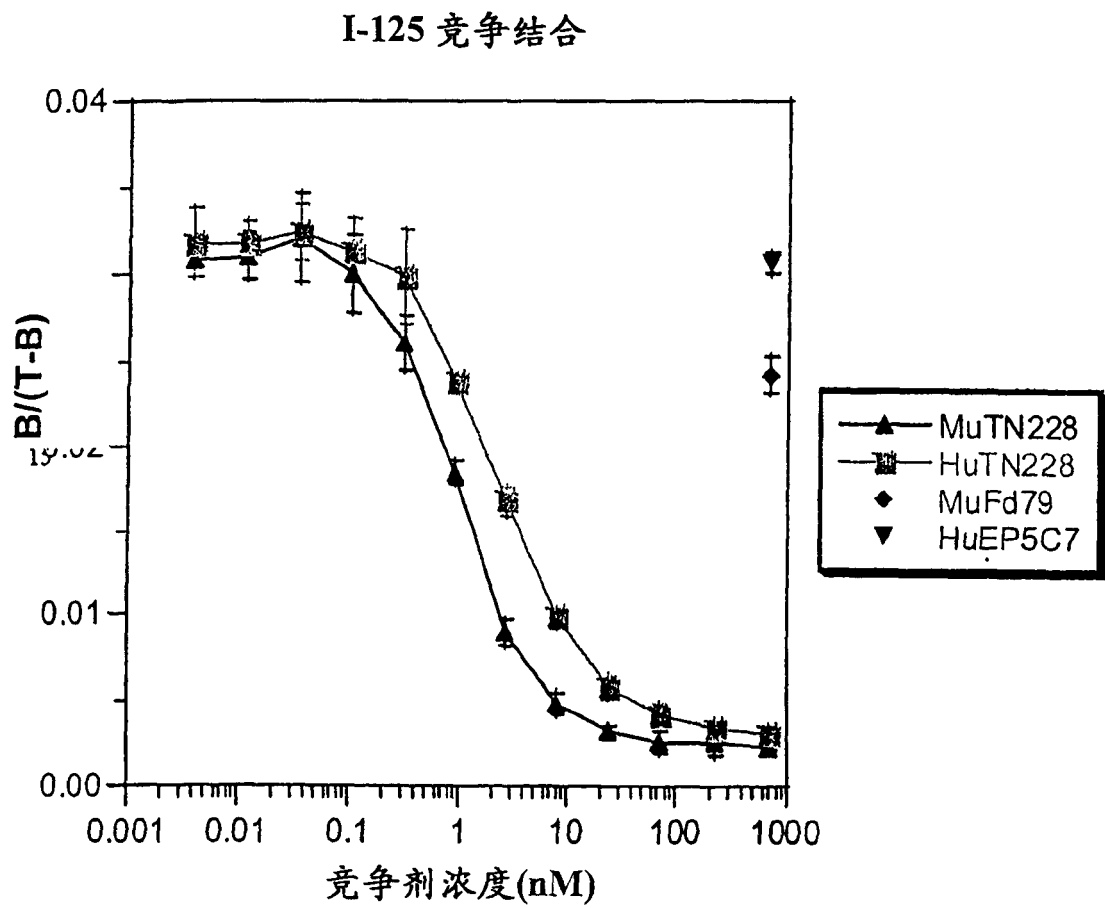


图 13

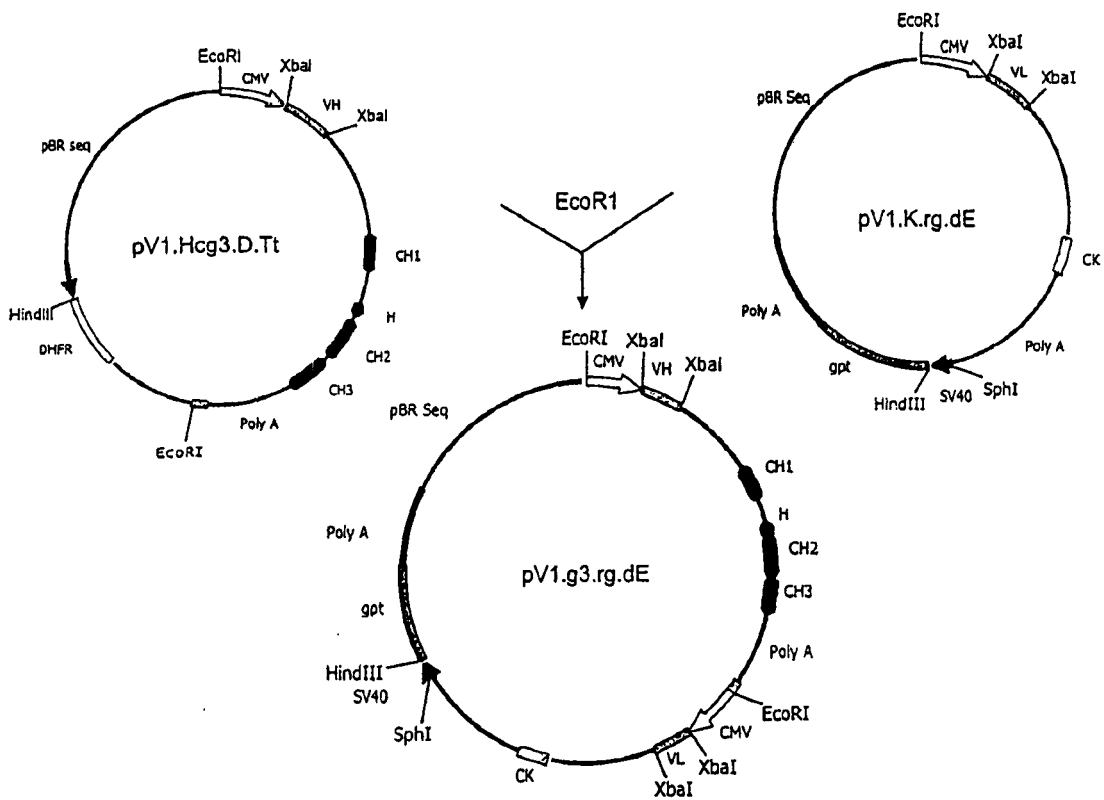


图 14

XbaI  
tctagacagtggggaacaat ATG GAT TCA CAG ATC CAG GTC CTC ATG TCC  
M D S Q I Q V L M S

CTG CTC CTC TGG ATG TCT GGT GCC TGT GGA GAT ATT GTG ATG ACC  
L L L W M S G A C G D I V M T

CAG TCT CCA TAT TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC ACC  
Q S P Y S L A V S A G E K V T

ATG AGT TGC AGG TCC AGT CAG AGC CTC TAT TAC AGT GGA ATC AAA  
M S C R S S Q S L Y Y S G I K

AAG AAC CTC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCG  
K N L L A W Y Q Q K P G Q S P

AAA CTG CTG ATC TAC TTT ACA TCT ACT CGG TTA CCT GGG GTA CCG  
K L L I Y F T S T R L P G V P

GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TAC ACT CTC ACC  
D R F T G S G S G T D Y T L T

ATC ACC AGT GTC CAG GCT GAA GAC ATG GGG CAT TAT TTC TGT CAG  
I T S V Q A E D M G H Y F C Q

CAG GGT ATA AGC ACT CCG CTC ACG TTC GGT GAT GGC ACC AAG CTG  
Q G I S T P L T F G D G T K

GAG ATA AGA Cgtaagtagaatccaaagtctctaga  
E I R XbaI

图 15A

**B**

XbaI

```

tctagagtcttcacc  ATG GTA TGG GGC TTG ATC ATC ATC TTC CTG GTC
                   M  V  W  G  L  I  I  I  F  L  V

ACA GCA GCT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GTC CAG TTG AAG CAG TCT
T  A  A  T  G  V  H  S  Q  V  Q  L  K  Q  S

GGG GCT GAG CTT GTG AAG CCT GGA GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC
G  A  E  L  V  K  P  G  A  S  V  K  I  S  C

AAA ACT TCA GGC TAT ACC TTC ACT GAT GGC TAC ATG AAC TGG GTT
K  T  S  G  Y  T  F  T  D  G  Y  M  N  W  V

GAG CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA AGA ATT GAT
E  Q  K  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  R  I  D

CCT GAT AGT GGT AAT ACT CGG TAC AAT CAG AAA TTC CAG GGC AAG
P  D  S  G  N  T  R  Y  N  Q  K  F  Q  G  K

GCC ACA CTG ACT AGA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GTC TAC ATG GAC
A  T  L  T  R  D  K  S  S  S  T  V  Y  M  D

CTC AGG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT GTC TAT TAC TGT GCG
L  R  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A

AGA GAT GGG ACC TTC TAC GGT ACC TAC GGC TAC TGG TAC TTC GAT
R  D  G  T  F  Y  G  T  Y  G  Y  W  Y  F  D

TTC TGG GGC CAG GGG ACC CAG GTC ACC GTC TCC TCA G gtagtcct
F  W  G  Q  G  T  Q  V  T  V  S  S

taaaacctctaga
XbaI

```

图 15

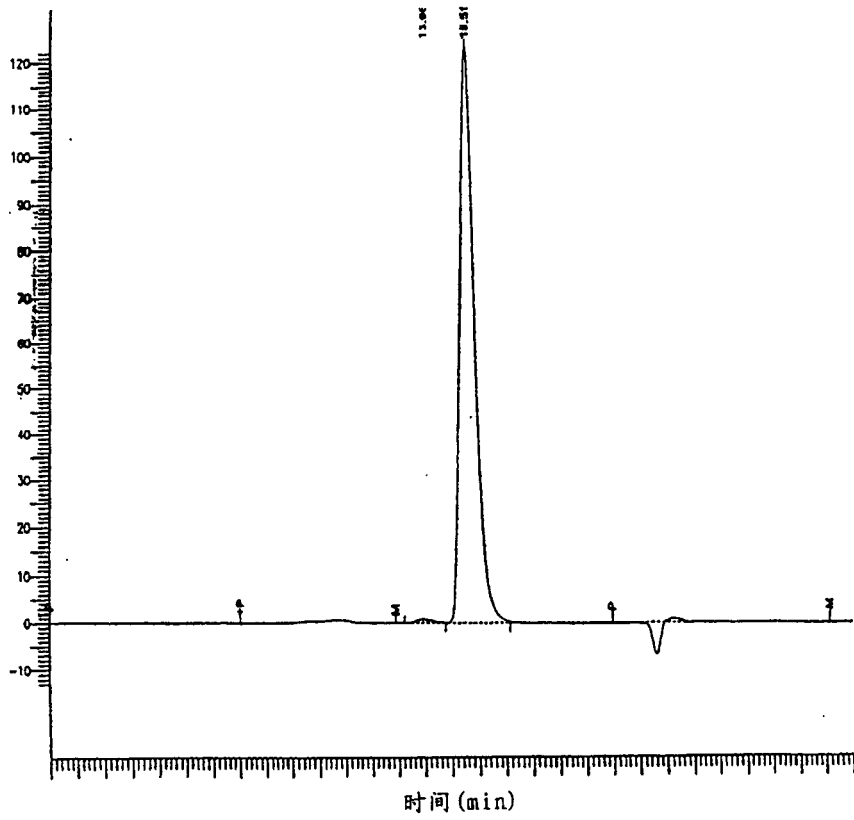


图 16

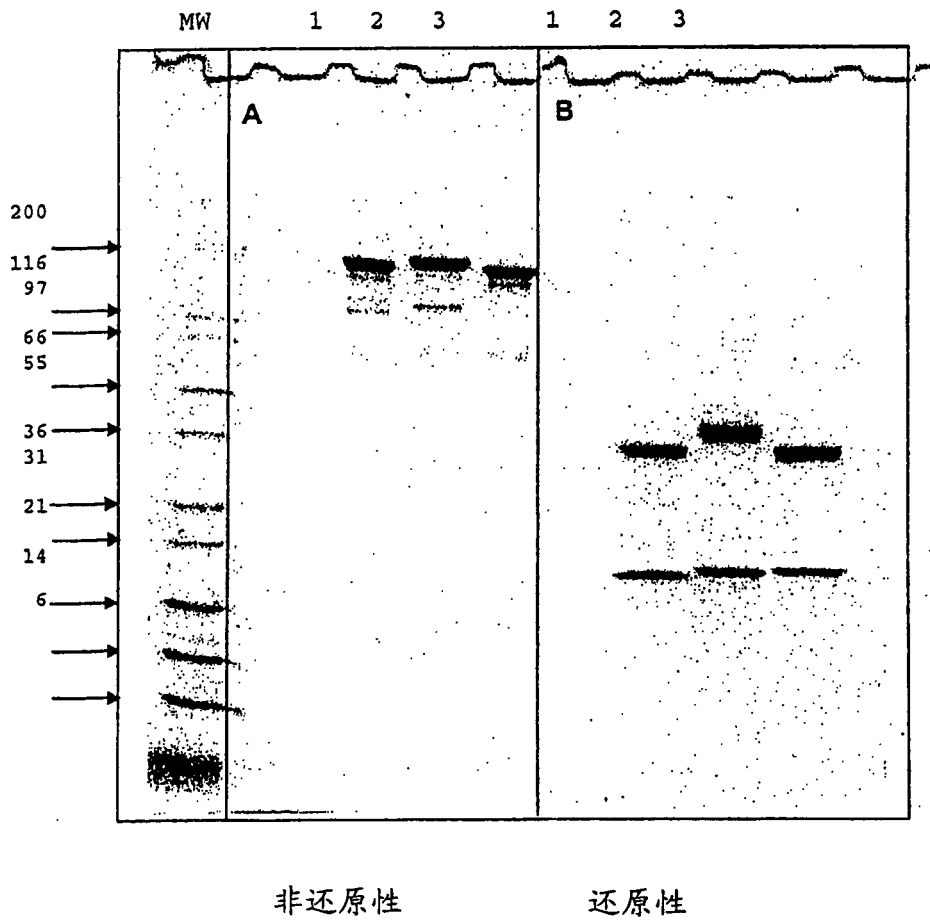


图 17

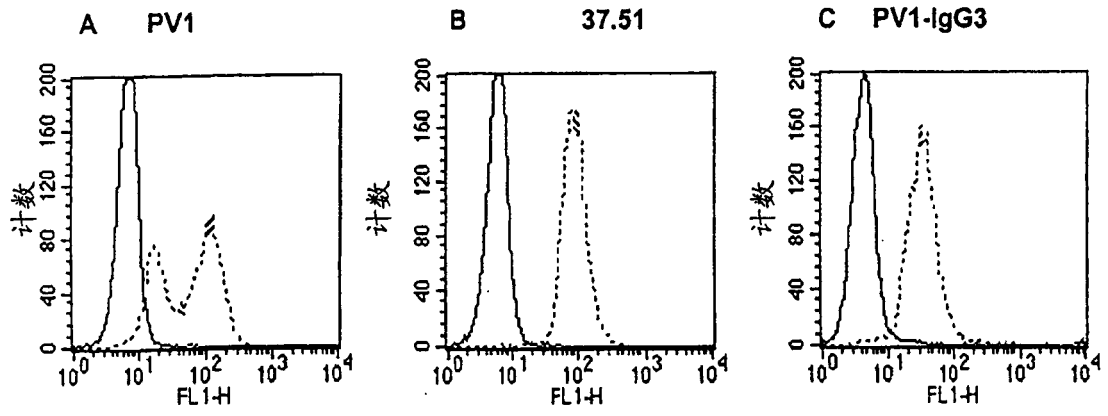


图 18

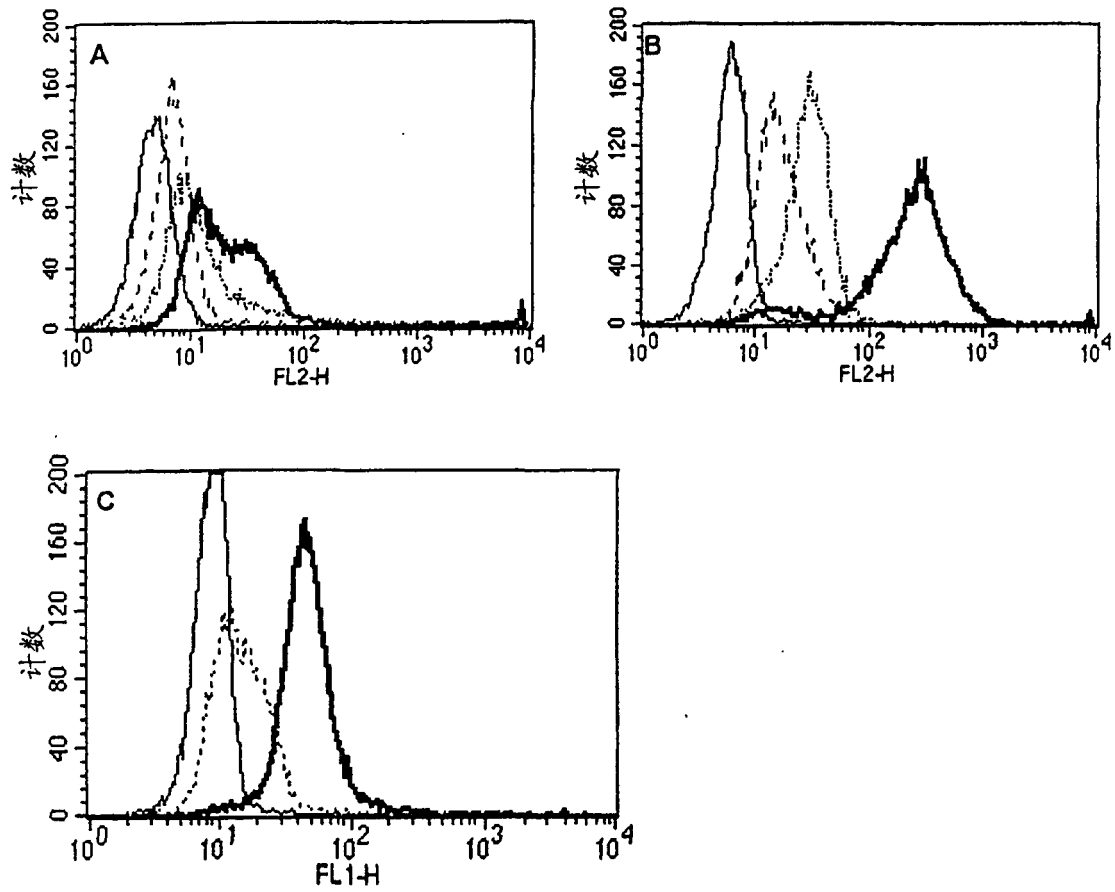


图 19

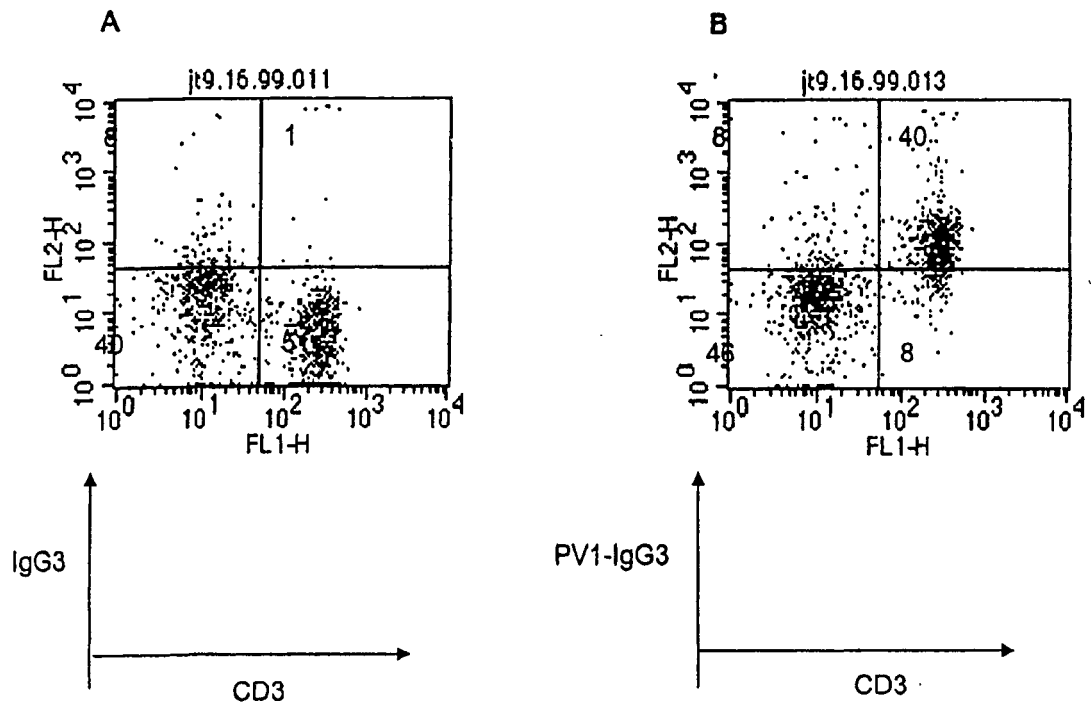


图 20

专利名称(译)	沉默型抗CD - 28抗体及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1272345C</a>	公开(公告)日	2006-08-30
申请号	CN01822636.1	申请日	2001-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	藤泽药品工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	藤泽药品工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	安斯泰来制药有限公司		
[标]发明人	马克西米利安诺·瓦斯克斯 田村康一 东康之 关信男 上田博嗣		
发明人	J·尊曹 保罗·欣顿 马克西米利安诺·瓦斯克斯 田村康一 东康之 关信男 上田博嗣		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12N15/63 C12N5/10 A61K39/395 A61P37/06 C12N15/09 A61K39/00 A61K45/00 A61P37/00 A61P41/00 A61P43/00 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K16/2818 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K2317/54 C07K2317/56 C07K2317/55 A61P37/00 A61P37/06 A61P41/00 A61P43/00		
代理人(译)	刘玥		
优先权	60/255155 2000-12-14 US		
其他公开文献	CN1489473A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供：缺乏促有丝分裂活性的抗CD28抗体(沉默型抗CD28抗体)、生产方法、包含所述抗体的组合物以及免疫抑制、诱发T细胞耐受及治疗器官和/或组织移植排斥的方法。

