

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/28



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 5/10 C12N 15/13
C12P 21/08 A61K 39/395
A61P 35/00 G01N 33/53

[21] 申请号 02820882.X

[43] 公开日 2005 年 2 月 2 日

[11] 公开号 CN 1575303A

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02820882.X

[30] 优先权

[32] 2001.8.31 [33] JP [31] 265114/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/008828 2002.8.30

[87] 国际公布 WO2003/018635 日 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.21

[71] 申请人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 设乐研也 中村和靖 保坂绘美

田中晶子 小池正道

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 龙 淳 彭益群

权利要求书 7 页 说明书 63 页 序列表 34 页
附图 17 页

[54] 发明名称 人 CDR - 移植抗体及其抗体片段

[57] 摘要

一种与人 CC 趋化因子受体 4 (CCR4) 的细胞外区特异反应,但不与人血小板反应的人 CDR 移植抗体或其抗体片段;一种与 CCR4 的细胞外区特异反应,并对 CCR4 表达细胞有细胞毒活性的人 CDR 移植抗体或其抗体片段;和一种含有这些抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分的药物,治疗剂或诊断试剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种人CDR移植抗体或其抗体片段，其与人CC趋化因子受体4(CCR4)的细胞外区特异反应，但不与人血小板反应。

2. 一种人CDR移植抗体或其抗体片段，其与人CC趋化因子受体
5 4(CCR4)的细胞外区特异反应，并且对CCR4表达细胞有细胞毒活性。

3. 根据权利要求1的人CDR移植抗体或其抗体片段，其对CCR4表达细胞有细胞毒活性。

4. 根据权利要求1至3任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述细胞外区选自SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的1位至39位，
10 98位至112位，176位至206位和271位至284位。

5. 根据权利要求1至4任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述细胞外区是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的2位至29位表示的抗原决定簇。

6. 根据权利要求1至5任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述细胞外区是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的13位至29位表示的抗原决定簇。
15

7. 根据权利要求1至6任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述细胞外区是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的13位至25位表示的抗原决定簇。

8. 根据权利要求1至7任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其
20 与CCR4表达细胞特异反应。

9. 根据权利要求1至8任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其较非人动物杂交瘤产生的单克隆抗体具有更高的对CCR4表达细胞的细胞毒活性。

10. 根据权利要求2至9任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其中所述细胞因子活性是抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 活性。

11. 根据权利要求10的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其中所述
5 ADCC活性是诱导CCR4表达细胞凋亡的活性。

12. 根据权利要求1至11任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 具有消除CCR4表达细胞的活性。

13. 根据权利要求8至12任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其中所述CCR4表达细胞是Th2细胞。

10 14. 根据权利要求1至13任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其具有抑制Th2细胞产生细胞因子的活性。

15. 根据权利要求14的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其中所述细胞因子是IL-4, IL-5或 IL-13。

16. 根据权利要求1至15任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段,
15 其属于人IgG抗体。

17. 根据权利要求1至16任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗CCR4单克隆抗体重链(H链)可变区(V区)和轻链(L链)V区的互补决定簇(CDRs)。

18. 根据权利要求1至17任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段,
20 其含有抗CCR4的单克隆抗体的重链(H链)可变区(V区)和轻链(L链)V区的互补决定簇(CDR), 以及人抗体的H链V区和L链V区的框架区(FRs)。

19. 根据权利要求1至18任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗CCR4的单克隆抗体的重链(H链)可变区(V区)和轻链(L链)V区的互补决定簇(CDR), 人抗体的H链V区和L链V区的框架区(FRs), 和人
25 抗体的H链恒定区(C区)和L链C区。

20. 根据权利要求1至19任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其含有分别具有SEQ ID NO:1, 2和3所示氨基酸序列的抗体重链(H链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3。

21. 根据权利要求1至20任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，
5 含有分别具有SEQ ID NO:5, 6和7所示氨基酸序列的抗体轻链(L链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3。

22. 根据权利要求1至21任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，含有分别具有SEQ ID NO:1, 2和3所示氨基酸序列的抗体重链(H链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3和分别具有SEQ ID
10 NO:5, 6和7所示氨基酸序列的抗体轻链(L链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3。

23. 根据权利要求1至22任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其含有抗体重链(H链)可变区(V区)，该区含有的氨基酸序列中，至少一个选自SEQ ID NO:4所示氨基酸序列中40位的Ala, 42位的Gly, 43位的
15 Lys, 44位的Gly, 76位的Lys和97位的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸取代。

24. 根据权利要求1至22任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其含有抗体重链(H链)可变区(V区)，该区含有的氨基酸序列中，至少一个选自SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中28位的Thr, 和97位的Ala的氨
20 基酸残基被另一个氨基酸取代。

25. 根据权利要求1至24任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其含有抗体轻链(L链)可变区(V区)，该区含有的氨基酸序列中，至少一个选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile, 3位的Val, 50位的Gln, 和88位的Val的氨基酸残基被另一个氨基酸取代。

26. 根据权利要求1至23和25任一项的人CDR移植抗体或其抗体片
25 段，其含有抗体重链(H链)可变区(V区)，该区含有的氨基酸序列中，至少一个选自SEQ ID NO:4所示氨基酸序列中40位的Ala, 42位的Gly, 43

位的Lys, 44位的Gly, 76位的Lys和97位的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸取代; 和抗体轻链(L链)V区, 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile, 3位的Val, 50位的Gln, 和88位的Val的氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代。

- 5 27. 根据权利要求1至22, 24和25任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中28位的Thr, 和97位的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代; 和抗体轻链(L链)V区, 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中
10 2位的Ile, 3位的Val, 50位的Gln, 和88位的Val的氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代。

28. 根据权利要求1至22和25任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO:4, 9, 10, 11, 38, 39, 40或41所示的氨基酸序列。

- 15 29. 根据权利要求1至24和28任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体轻链(L链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO:8, 12, 13或14所示的氨基酸序列。

30. 根据权利要求1至22任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO:4, 9, 10, 11,
20 38, 39, 40或41所示的氨基酸序列, 和抗体轻链(L链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO:8, 12, 13或14所示的氨基酸序列。

31. 根据权利要求1至22任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO: 9或10所示的氨基酸序列; 和抗体轻链(L链)V区, 该区含有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。
25

32. 根据权利要求1至31任一项的抗体片段, 其中所述抗体片段选自Fab, Fab', F(ab')₂, 单链抗体(scFv), 二聚化可变区(V区)片段(微型双

功能抗体), 二硫键稳定的V区片段(dsFv)和含有互补决定簇(CDR)的肽。

33. 一种人CDR移植抗体或其抗体片段, 可由转化体KM8759 (PERM BP-8129)或KM8760 (FERM BP-8130)产生。

5 34. 产生根据权利要求1至33任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段的转化体。

35. 根据权利要求34的转化体, 其中所述转化体是KM8759 (FERM BP-8129)或KM8760 (FERM BP-8130)。

10 36. 一种用于产生能够产生根据权利要求1至33任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段的转化体方法, 该方法包括在培养基中培养根据权利要求34或35的转化体, 以在培养物中形成和累积人CDR移植抗体或其抗体片段; 从培养物中回收抗体或抗体片段。

15 37. 一种人CDR移植抗体或其抗体片段, 其中根据权利要求1至33任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段与放射性同位素, 蛋白质或试剂化学性或遗传性的连接在一起。

38. 一种编码根据权利要求1至33任一项所述的人CDR移植抗体或其抗体片段的DNA。

39. 一种含有根据权利要求38所述的DNA的重组载体。

20 40. 一种将根据权利要求39的重组载体导入进宿主细胞获得的转化体。

41. 一种药物, 其含有选自根据权利要求1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

25 42. 一种治疗CCR4相关疾病的治疗剂, 其含有选自根据权利要求1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的任一种作为活性成分。

43. 根据权利要求42的治疗剂, 其中所述CCR4相关疾病是癌症或炎性疾病。

44. 根据权利要求43的治疗剂, 其中所述癌症是血癌。

45. 根据权利要求44的治疗剂, 其中所述血癌是白血病或淋巴瘤
5 病。

46. 根据权利要求43的治疗剂, 其中所述的炎性疾病是急性或慢性呼吸道敏感性过度或支气管哮喘、异位异位性疾病、过敏性鼻炎或花粉病。

47. 一种CCR4相关疾病的诊断试剂, 其含有选自权利要求1至33
10 和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

48. 根据权利要求47的诊断试剂, 其中所述CCR4相关疾病是癌症或炎性疾病。

49. 根据权利要求48的诊断试剂, 其中所述癌症是血癌。

50. 根据权利要求48的诊断试剂, 其中所述血癌是白血病或淋巴瘤
15 病。

51. 根据权利要求48的诊断试剂, 其中所述炎性疾病是慢性呼吸道敏感性过度、支气管哮喘、异位性皮肤疾病、过敏性鼻炎或花粉病。

52. 一种治疗Th2介导免疫疾病的治疗制剂, 其含有选自权利要求
20 1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

53. 根据权利要求52的治疗制剂, 其中所述Th2介导免疫疾病是慢性呼吸道敏感性过度、支气管哮喘、异位性皮肤疾病、过敏性鼻炎或花粉病。

54. 一种Th2介导的免疫疾病的诊断试剂, 其含有选自权利要求1
25

至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

55. 根据权利要求54的诊断试剂，其中所述Th2介导的免疫疾病是慢性呼吸道敏感性过度、支气管哮喘、异位性皮肤疾病、过敏性鼻炎
5 或花粉病。

56. 一种免疫学检测CCR4的方法，该方法使用了根据权利要求1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

57. 一种免疫学检测细胞表面上表达CCR4的细胞的方法，其含有使用根据权利要求1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

10 58. 一种减少或消除细胞表面上表达CCR4的细胞的方法，该方法包括使用根据权利要求1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

59. 一种抑制Th2细胞产生细胞因子的方法，该方法包括使用根据权利要求1至33和37任一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

人CDR-移植抗体及其抗体片段

技术领域

5 本发明涉及一种人CDR-移植抗体及其抗体片段,这种抗体与人CC趋化因子受体4(以下称为“CCR4”)的胞外区特异反应,但不与血小板反应。而且,本发明涉及一种人CDR-移植抗体及其抗体片段,这种抗体与人CCR4的细胞外区特异反应,但不具有CCR4配体,如与CCR4结合的TARC或MDC的抑制活性。此外,本发明涉及一种人CDR-移植抗体及其抗体片段,这种抗体与CCR4的胞外区特异反应,具有细胞毒活性和抑制Th2细胞产生细胞因子的活性,并含有特异的互补决定簇(以下称为“CDR”)。本发明也涉及编码抗体或其抗体片段的DNA。而且,本发明涉及含有此DNA的载体,和用该载体转化的转化体。此外,本发明涉及了采用转化体产生抗体或其抗体片段的方法,和一种药物, 10 例如治疗制剂、诊断制剂及其类似物,其中包括使用此抗体或其抗体片段,用于Th2介导的免疫疾病如异位性疾病和类似疾病。另外,本发明涉及一种药物如治疗制剂,诊断试剂及其类似物,其中包括使用此抗体或其抗体片段,用于癌症如血癌,如白血病,和淋巴瘤形成。

20 背景技术

多种因素如嗜酸性粒细胞,肥大细胞,IgE在异位性疾病如支气管哮喘中起作用。嗜酸性粒细胞浸润至炎症部位,通过脱粒释放细胞毒碱性蛋白质如MBP(主要碱性蛋白质)或其类似物,周围组织被这些细胞毒碱性蛋白质损害。肥大细胞与B细胞产生的IgE结合成抗原免疫复合体,并释放组织胺,因此诱导速发性变态反应。变态反应由生物功能分子如细胞因子,趋化因子及其类似物控制,它们参与细胞间的信号转导。IL-5诱导嗜酸性粒细胞的分化,存活和脱粒。IL-4诱导B细胞的活化和IgE的产生。产生的IgE与抗原形成免疫复合体,导致肥大细胞的脱粒。已经发现IL-4, IL-13及其类似物也可由肥大细胞产生,并 25

促进B细胞产生IgE(*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152, 2059 (1995), *Immunol. Toddy*, 15, 19 (1994))。因此, 在炎症细胞中存在一种错综复杂的细胞因子-趋化因子网络, 并保持很复杂的平衡关系。

细胞因子和趋化因子是由在细胞表面上表达CD4的辅助性T细胞
5 (以下称为“CD4+Th细胞”)产生的。实际上, 已经发现辅助性T细胞的浸润可见于支气管哮喘病人的呼吸道炎症部位, 在外周血中活化的T细胞也是增加的, 呼吸道炎症部位中相当大量的T细胞是活化的, 哮喘病人的严重性和呼吸道高敏感性与活化的T细胞数目是相关的 (*Am. Rev. Respir. Dis.*, 145, S22 (1992))。

10 因此根据产生的细胞因子的类型, 辅助性T细胞被分为Th1细胞和Th2细胞(*Annu. Rev. Immunol.*, 7, 145 (1989))。Th2细胞产生IL-4, IL-5, IL-13等。Th2细胞产生的细胞因子是Th2细胞因子。

已经发现从异位性疾病病人中分离的抗原特异性T细胞克隆在体外被刺激时, 可释放Th2细胞因子(*Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88, 4538
15 (1991)), Th2细胞存在于哮喘病人的支气管肺泡灌洗液(以下称为“BAL”)和呼吸道粘膜中(*N. Engl. J. Med.*, 326, 298 (1992), *Eur. J. Immunol.*, 23, 1445 (1993))。当采用异位性炎症动物模型检测到在BAL中的细胞有多种细胞因子的mRNA表达时, Th2的细胞因子IL-4和IL-5的mRNA的表达水平增加(*Clin. Immunol. Immunopathol.*, 75, 75 (1995))。
20 当Th2细胞经静脉或鼻内给予小鼠时, 也可以抗原特异的方式在肺中诱导哮喘性炎症(*J. Exp. Med.*, 186, 1737 (1997), *J. Immunol.*, 160, 1378 (1998))并观察到嗜酸性粒细胞增多(*J. Immunol.*, 161, 3128 (1998))。在哮喘病人的呼吸道粘膜和异位性皮炎病人的皮肤病变中观察到IL-5的表达(*J. Clin. Invest.*, 87, 1541 (1991), *J. Exp. Med.*, 173, 775 (1991)), 在慢
25 性过敏性鼻炎的粘膜中IL-5的表达水平与IL-13的表达水平, 血清总IgE的量和抗原特异性IgE的量相关(*Therapeutics*, 32, 19 (1998))。

趋化因子是碱性肝素结合蛋白的总称, 它可诱导白细胞的化学趋化性和活化, 根据在一级结构中半胱氨酸残基的位置可分为CXC, CC, C 和CX₃C亚类。至今已经确定了趋化因子受体中的16个 (*Curr. Opl.*
30 *Immunol.*, 11, 626 (1999)), 已经显示在白细胞如Th1细胞, Th2细胞及

类似细胞中每种趋化因子受体的表达都是不同的(*Cell Engineering*, 17, 1022 (1998))。

人CCR4是7次跨膜的G蛋白偶联受体, 从人未成熟嗜碱性细胞系 KU-812中克隆命名为K5-5。CCR4的跨膜区在氨基酸序列中的是40至67
5 位, 78至97位, 113至133位, 151至175位, 207至226位, 243至270位
和285至308位, 细胞外区认为在氨基酸序列中的是1至39位, 98至112
位, 176至206位, 和271至284位, 细胞内区在氨基酸序列中的是68至
77位, 134至150位, 227至242位和309至360位(*J. Biol. Chem.*, 270, 19495
(1995))。最初, 报道CCR4的配体是MIP-1 α (巨噬细胞炎性蛋白-1 α),
10 RANTES(激活时可调节的正常T细胞表达和分泌因子)或MCP-1(单核
细胞趋化蛋白)(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218, 337 (1996), WO
96/23068)。但已经发现从被刺激的人外周血单核细胞(以下称为
“PBMC”)和胸腺细胞(*J. Biol. Chem.*, 271, 21514 (1996))中产生的
TARC (胸腺和活化-调节的趋化因子)与CCR4特异性结合(*J. Biol.*
15 *Chem.*, 272, 15036 (1997))。也有报道, 从巨噬细胞中分离的MDC(巨噬
细胞衍生的趋化因子)(*J. Exp. Med.*, 185, 1595 (1997)), 也称为
STCP-1(被刺激的T细胞趋化蛋白-1)(*J. Biol. Chem.*, 272, 25229 (1997)),
与CCR4的结合比TARC更强(*J. Biol. Chem.*, 273, 1764 (1998))。

已经显示CCR4在产生细胞因子和/或趋化因子的CD4+Th细胞中表
20 达(*J. Biol. Chem.*, 272, 15036 (1997)), 有报道CCR4可在CD4+Th细胞中的
Th2细胞中选择性地表达(*J. Exp. Med.*, 187, 129 (1998), *J. Immunol.*,
161,5111 (1998))。另外, CCR4+ 细胞已经在效应器/记忆T细胞
(CD4+/CD45RO+)中被发现, 当CCR4+细胞被刺激时, 可产生IL-4和
IL-5, 但不产生IFN- γ (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999))。也有报道, CCR4+
25 细胞属于记忆T细胞中的CLA (皮肤淋巴细胞抗原)阳性和 $\alpha 4\beta 8$ 整合素
阴性群, CCR4在记忆T细胞上表达, 不仅涉及肠道免疫, 还涉及皮肤
及类似部位的系统免疫 (*Nature*, 400, 776 (1999))。这些结果强烈的表
明当炎症被诱导时, 记忆T细胞被活化, 表达CCR4, 通过CCR4的配体
MDC和TARC迁移至炎症部位中, 并加速其他炎症细胞的活化。

30 最近已经发现 CCR4 也可在人的自然杀伤细胞(*Journal of*

Immunology, 164, 4048-4054 (200), *Blood*, 97, 367-375 (2001)) 和血小板 (*Thrombosis Research*, 101, 279-289 (2001), *Blood*, 96, 4046-4054 (2000), *Blood*, 97, 937-945 (2001))中表达。

已知作为CCR4的配体TARC或MDC的拮抗剂, 称为CCR4拮抗剂,
5 可抑制血小板的凝集(WO 99/15666)。也知道这种调节CCR4功能的剂
也可影响血小板的功能。

在血小板中发现了CCR4的表达。例如, Adrian等人(*Blood*, 97,
937-945 (2001))和Abi-Younes等人 (*Thrombosis Research*, 101, 279-289
(2001), WO 00/42074, WO 00/41724)采用抗CCR4抗体已经在人血小板
10 中检测到CCR4的表达。至今仍不知道有与CCR4具有反应性, 但不能
结合人血小板的抗体。

也已经知道当产生能够与血小板结合的自身抗体时, 可诱导产生
自体免疫性血小板减少(*Blood*, 70, 428-431 (1987), *Transfusion Science*,
19, 245-251 (1998))。能够影响血小板减少症和血小板功能的制剂一般
15 不适于用作药物, 因为它们经常导致严重的副作用如出血和血栓形成。
特别因为抗体具有很长的血液半衰期, 影响血小板功能的抗体很难被
开发为药物。例如, 已经被开发作为治疗自体免疫性疾病的制剂的抗
CD40配体抗体的开发已经被暂停, 因为产生了被认为是由于识别活化
的血小板上表达的抗原所致的副作用(*Nature Medicine*, 6, 114 (2000),
20 *BioCentury*, A8 of 18 (2002.06.20))。

已知翻译后蛋白质要经受多种修饰反应。已知的修饰反应之一是
酪氨酸残基的硫酸化反应。据报道, 许多蛋白质在酪氨酸残基上是硫
酸化的(*Chemistry and Biology*, 7, R57-R61 (2000))。硫酸化的酪氨酸残
基的特征是在其附近存在许多酸性氨基酸残基, 有硫酸化可能性的蛋
25 白质及其区域已经被提出(*Cell*, 96, 667-676 (1999))。就CCR4而言, 紧
靠N末端存在4个酪氨酸残基, 但没有报道显示这些酪氨酸残基是硫酸
化的。

就目前治疗Th2介导的免疫疾病而言, 已经发展了下列方法: (1)
细胞因子和趋化因子的拮抗剂如人源化抗IL-5抗体(SB-240563: Smith
30 Kline Beecham, Sch-55700 (CDP-835): Shehling Plough/Celltech), 人源化

IL-4抗体(美国专利5,914,110),可溶性趋化因子受体(*J. Immunol.*, 160, 624 (1998)),等;(2)细胞因子/趋化因子生成抑制剂如IL-5生成抑制剂(日本已公开的未审查专利申请53355/96号),视黄醛类似物拮抗剂(WO 99/24024), splatast对甲苯磺酸盐(splatast tosilate)(IPD-1151T, 5 由Taiho Pharmaceutical生产)等;(3)作用于作为最终炎症细胞的嗜酸性粒细胞,肥大细胞和类似细胞的制剂,如人源化IL-5受体抗体(WO 97/10354),CC趋化因子受体3(CCR3)拮抗剂(日本已公开的未审查专利申请第147872/99)等;(4)炎性分子抑制剂如人源化抗IgE抗体(*Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 157, 1429 (1998))等;和类似物质。但它们仅抑制10 制细胞因子,趋化因子和炎性细胞之间复杂网络的一部分。Th2介导的免疫疾病不会被这些制剂治愈。抗CD4抗体具有调控T细胞的活性,对类固醇依赖的严重哮喘有作用。但因为CD4分子在多种免疫细胞中广泛地表达,它们缺乏特异性,伴随强烈的免疫抑制效应是其不利之处(*Int. Arch. Allerg. Immunol.*, 118, 133 (1999))。

15 因此,为了避免所有这些问题,需要特异性的控制产生问题的过敏反应的上游,主要是Th2细胞。

现行普遍使用的治疗严重的Th2介导的免疫疾病患者的方法是给予类固醇,但类固醇产生的副作用不能避免。而且,其缺点是当暂停类固醇的给药时,每个患者的病情会返回原来的状态,当长时间使用20 类固醇会产生耐药性。

至今,没有构建出能够检测CCR4表达细胞和对CCR4表达细胞也有细胞毒性的人CDR-移植抗体或其抗体片段。另外,至今也不知道有能够抑制Th2细胞因子产生的治疗性制剂。

虽然已经有报道,在白血病患者的癌细胞上也有CCR4的表达25 (*Blood*, 96, 685 (2000)),消灭白血病细胞的治疗性制剂仍不知道。

一般认为,当来自一种非人动物的抗体,如鼠抗体用于人体时,它被识别为一种外源性物质,在人体中诱导对抗鼠抗体的人抗体(人抗鼠抗体;以下称为“HAMA”)。已知HAMA与给予的鼠抗体发生反应产生副作用(*J. Clin. Oncol.*, 2, 881 (1984), *Blood*, 65, 1349 (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 932 (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 124230

(1985)), 加速给予的鼠抗体从机体的消失(*J. Nucl. Med.*, 26, 1011 (1985), *Blood*, 65, 1349 (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 937 (1988)), 降低鼠抗体的治疗效果(*J. Immunol.*, 135, 1530 (1985), *Cancer Res.*, 46, 6489 (1986))。

- 5 为了解决这些问题, 人们已经尝试使用遗传工程技术将来自非人动物的抗体转变为人CDR移植抗体。

人CDR移植抗体是一种抗体, 其中来自非人动物的抗体可变区(以下称为“V区”)的CDR氨基酸序列被移植到人抗体的合适位置(*Nature*, 321, 522 (1986))。与来自非人动物的抗体如鼠抗体等比较, 这些人CDR移植抗体在对人的临床应用中具有很多优势。例如, 据报道, 使用猴, 与鼠抗体相比, 其免疫原性降低, 血液半衰期延长(*Cancer Res.*, 56, 1118 (1996), *Immunol.*, 85, 668 (1995))。因此, 可以预测与来自非人动物的抗体相比, 人CDR移植抗体在人体中的副作用较小, 治疗效应可延续更长的时间。

- 15 而且, 因为人CDR移植抗体使用遗传工程技术制备, 可制备许多形式的分子。例如, 当 γ 1亚类被用作人抗体的重链(以下称为“H链”)恒定区(以下称为“C区”)(H链C区被称为“CH”), 可制备具有高效应器功能, 如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用活性(以下称为“ADCC”)的人源化抗体(*Cancer Res.*, 56, 1118 (1996)), 可预测与鼠抗体相比, 具有延长的血液半衰期(*Immunol.*, 85, 668 (1995))。同样, 特别是在减少CCR4表达细胞的数目的治疗中, 通过抗体的Fc区(在抗体重链内, 铰链区之后的区域)发挥更高的细胞毒作用, 如补体依赖性细胞毒作用(以下称为“CDC活性”)和ADCC活性对于治疗效果是很重要的。因此, 这些结果清楚的显示了人CDR移植抗体优选来自非人动物如鼠的抗体。

- 25 而且, 根据最近在蛋白质工程和遗传工程方面的进展, 具有较小分子量的抗体片段如Fab, Fab', F(ab')₂, 单链抗体(以下称为“scFv”)(*Science*, 242, 423 (1988)), 二聚化V区片段(以下称为“微型双功能抗体(Diabody)”)(*Nature Biotechnol.*, 15, 629 (1997)), 二硫键稳定的V区片段(以下称为“dsFv”)(*Molecular Immunol.*, 32, 249 (1995)), 含有CDR的肽(*J. Biol. Chem.*, 271, 2966 (1996))及其类似物, 可作为人CDR移植抗体
- 30

被制备。与完整抗体分子相比,抗体片段向靶组织的转移性很好(*Cancer Res.*, 52, 3402 (1992))。

认为当用于人体临床应用时,这些来自人CDR移植抗体或其抗体片段的片段较那些来自非人动物的抗体如鼠抗体是更期待的。

- 5 如上所述,单独使用人CDR移植抗体或其抗体片段时,可预测的诊断和治疗效应,但已经尝试通过联合其他分子,以进一步提高效果。例如,细胞因子可用作这种分子之一。细胞因子是在免疫反应中可调控细胞间相互作用的多种可溶性因子的总称。例如,CDC活性和ADCC活性已知是抗体的细胞毒活性,ADCC活性是由细胞表面上具有Fc受体的效应细胞如单核细胞,巨噬细胞,NK细胞等控制的(*J. Immunol.*, 138, 1992 (1987))。由于许多细胞因子可活化这些效应细胞,它们可与抗体联合使用以提高抗体的ADCC活性。
- 10

发明内容

- 15 本发明涉及下面(1)至(59)的内容。

(1) 一种人CDR移植抗体或其抗体片段,其与人CC趋化因子受体4(CCR4)的胞外区特异反应,但不与人血小板反应。

(2) 一种人CDR移植抗体或其抗体片段,其与人CC趋化因子受体4(CCR4)的胞外区特异反应,并对CCR4表达细胞具有细胞毒活性。

- 20 (3) 根据(1)的人CDR移植抗体或其抗体片段,其对CCR4表达细胞具有细胞毒活性。

(4) 根据(1)至(3)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段,其中所述胞外区选自SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的1至39, 98至112, 176至206和271至284位。

- 25 (5) 根据(1)至(4)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段,其中所述胞外区是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的2至39位中存在的抗原决定簇。

- (6) 根据(1)至(5)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段,其中所述的细胞外区是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的13至29位点中存在的抗原决定簇。
- 30

(7) 根据(1)至(6)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述胞外区是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中的13至25位中存在的抗原决定簇。

5 (8) 根据(1)至(7)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其可与CCR4表达细胞特异反应。

(9) 根据(1)至(8)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其与非人动物杂交瘤产生的单克隆抗体相比，对CCR4表达细胞具有更高的细胞毒活性。

10 (10) 根据(2)至(9)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述细胞毒活性是抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC) 活性。

(11) 根据(10)的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述ADCC活性是诱导CCR4表达细胞凋亡的活性。

15 (12) 根据(1)至(11)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，具有消灭CCR4表达细胞的活性。

(13) 根据(8)至(12)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述CCR4表达细胞是Th2细胞。

(14) 根据(1)至(13)的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其具有抑制Th2细胞产生细胞因子的活性。

20 (15) 根据(14)的人CDR移植抗体或其抗体片段，其中所述细胞因子是IL-4, IL-5或IL-13。

(16) 根据(1)至(15)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其属于人IgG抗体。

25 (17) 根据(1)至(16)的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其含有抗CCR4的单克隆抗体的重链(H链)可变区(V区)和轻链(L链)V区的互补决定簇(CDR)。

30 (18) 根据(1)至(17)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段，其含有抗CCR4的单克隆抗体的重链(H链)可变区(V区)和轻链(L链)V区的互补决定簇(CDR)，以及人抗体的H链V区和L链V区的框架区(FR)。

(19) 根据(1)至(18)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗CCR4的单克隆抗体的重链(H链)可变区(V区)和轻链(L链)V区的互补决定簇(CDRs), 以及人抗体的H链V区和L链V区的框架区(FRs), 和人抗体的H链恒定区(C区)和L链C区。

5 (20) 根据(1)至(19)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其包含具有SEQ ID NOs:1, 2和3分别所示的氨基酸序列的抗体重链(H链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3。

(21) 根据(1)至(20)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 包含具有SEQ ID NOs:5, 6和7分别所示的氨基酸序列的抗体轻链(L链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3。

(22) 根据(1)至(21)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 包含具有SEQ ID NOs:1, 2和3分别所示的氨基酸序列的抗体重链(H链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3和分别具有SEQ ID NO:5, 6和7所示的氨基酸序列的抗体轻链(L链)可变区(V区)的互补决定簇(CDR)1, CDR2和CDR3。

(23) 根据(1)至(22)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其包含抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有的氨基酸序列中至少有一个选自SEQ ID NO:4所示氨基酸序列中的40位上的Ala, 42位上的Gly, 43位上的Lys, 44位上的Gly, 76位上的Lys和97位上的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸取代。

(24) 根据(1)至(22)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其包含抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中28位的Thr, 和97位的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸取代。。

25 (25) 根据(1)至(24)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体轻链(L链)可变区(V区), 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile, 3位的Val, 50位的Gln, 和88位的Val的氨基酸残基被另一个氨基酸取代。

(26) 根据(1)至(23)和(25)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有的氨基酸序列中,

至少一个选自SEQ ID NO:4所示氨基酸序列中40位的Ala, 42位的Gly, 43位的Lys, 44位的Gly, 76位的Lys和97位的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸取代; 和抗体轻链(L链)V区, 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile, 3位的Val, 50位的Gln, 和88位的Val的氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代。

(27) 根据(1)至(22), (24)和(25)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其含有抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中28位的Thr, 和97位的Ala的氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代; 和抗体轻链(L链)V区, 该区含有的氨基酸序列中, 至少一个选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile, 3位的Val, 50位的Gln, 和88位的Val的氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代。

(28) 根据(1)至(22)和(25)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 包含抗体重链(H链)可变区(V区), 含有SEQ ID NO: 4, 9, 10, 11, 38, 39, 40或41所示的氨基酸序列。

(29) 根据(1)至(24)和(28)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其包含抗体轻链(L链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO: 8, 12, 13或14所示的氨基酸序列。

(30) 根据(1)至(22)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其包含抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO: 4, 9, 10, 11, 38, 39, 40或41所示的氨基酸序列; 和抗体轻链(L链)可变区(V区), 含有SEQ ID NO: 8, 12, 13或14所示的氨基酸序列。

(31) 根据(1)至(22)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段, 其包含抗体重链(H链)可变区(V区), 该区含有SEQ ID NO: 9或10所示的氨基酸序列; 和抗体轻链(L链)可变区(V区), 含有SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列。

(32) 根据(1)至(31)中任何一项的抗体片段, 其中所述抗体片段是选自Fab, Fab', F(ab')₂, 单链抗体 (scFv), 二聚化可变区(V区)片段(微型双功能抗体), 二硫键稳定的V区片段(dsFv)和含有互补决定簇(CDR)的肽的抗体片断。

(33) 一种由转化体KM8759(FERM BP-8129)或KM8760 (FERM BP-8130)产生的人CDR移植抗体或其抗体片段。

(34) 产生根据(1)至(33)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段的转化体。

5 (35) 根据(34)中的转化体, 其中转所述化体是KM8759(FERM BP-8129)或KM8760 (FERM BP-8130)。

(36) 一种用于产生能够产生根据(1)至(33)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段的转化体的转化体方法, 该方法包括在培养基中培养根据(34)或(35)的转化体, 以在培养物中形成和累积人CDR移植抗体或其抗体片段; 从培养物中回收抗体或抗体片段。

(37) 一种人CDR移植抗体或其抗体片段, 其中根据(1)至(33)中的任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段与放射性同位素, 蛋白质或制剂化学的或遗传性的连接在一起。

15 (38) 一种编码(1)至(33)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段的DNA。

(39) 一种含有(38)中DNA的重组载体。

(40) 一种将(39)的重组载体导入进宿主细胞而获得的转化体。

(41) 一种药物, 含有选自(1)至(33)和(37)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

20 (42) 治疗CCR4相关疾病的治疗剂, 其含有选自(1)至(33)和(37)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

(43) 根据(42)的治疗剂, 其中所述CCR4相关的疾病是癌症或炎症疾病。

25 (44) 根据(43)的治疗剂, 其中所述的癌症是血癌。

(45) 根据(44)的治疗剂, 其中所述的血癌是白血病或淋巴瘤病。

(46) 根据(43)的治疗剂, 其中所述的炎症疾病是急性或慢性呼吸道超敏性或支气管哮喘, 异位性皮肤病, 过敏性鼻炎或花粉病。

30 (47) 一种 CCR4相关疾病的诊断试剂, 含有选自(1)至(33)和(37)中任何一项的人CDR移植抗体及其抗体片段中的至少一种作为活性成

分。

(48) 根据(47)中的诊断试剂，其中所述的CCR4相关疾病是癌症或炎性疾病。

(49) 根据(48)中的诊断试剂，其中所述的癌症是血癌。

5 (50) 根据(48)中的诊断试剂，其中所述的血癌是白血病或淋巴瘤病。

(51) 根据(48)中的诊断试剂，其中所述的炎性疾病是慢性呼吸道超敏性哮喘、支气管哮喘、异位性皮肤病、过敏性鼻炎或花粉病。

10 (52) 一种治疗Th2介导的免疫疾病的治疗性制剂，含有选自(1)至(33)和(37)中任何一项的人CDR移植抗体及其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

(53) 根据(52)中的治疗性制剂，其中所述的Th2介导的免疫疾病是慢性呼吸道超敏性哮喘，异位性皮肤病，过敏性鼻炎或花粉病。

15 (54) 一种Th2介导的免疫疾病的诊断试剂，含有选自(1)至(33)和(37)中任何一项的人CDR移植抗体及其抗体片段中的至少一种作为活性成分。

(55) 根据(54)中的诊断试剂，其中所述Th2介导的免疫疾病是慢性呼吸道超敏性哮喘、异位性皮肤病、过敏性鼻炎或花粉病。

20 (56) 一种免疫学检测CCR4的方法，该方法使用(1)至(33)和(37)任何一项的人CDR移植抗体及其抗体片段。

(57) 一种免疫学检测细胞表面CCR4表达细胞的方法，其包括使用(1)至(33)和(37)任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

(58) 一种减少或除去细胞表面CCR4表达细胞的方法，其包括使用使用(1)至(33)和(37)任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

25 (59) 一种抑制Th2细胞产生细胞因子的方法，该方法包括使用(1)至(33)和(37)中任何一项的人CDR移植抗体或其抗体片段。

在本发明中，CCR4相关疾病包括癌症，炎性疾病和类似疾病。

在本发明中，癌症包括血癌，特别是白血病，淋巴瘤病和类似疾病。

30 在本发明中，炎性疾病包括急性或慢性呼吸道超敏性或支气管哮

喘，异位性皮肤病如异位性皮炎；过敏性鼻炎；花粉病；和类似疾病。

在本发明中，Th2介导的免疫疾病可以是与Th2细胞相关的免疫疾病，包括急性或慢性呼吸道超敏性或支气管哮喘；异位性皮肤病如异位性皮炎；过敏性鼻炎；花粉病；间质性肺炎；肺纤维化；自体免疫性疾病如系统性红斑狼疮；和类似疾病。

本发明的与CCR4特异反应的人CDR移植抗体(抗CCR4 CDR移植抗体)及其抗体片段(以下，在某些情况中两者一般都是指本发明的抗体)是有限制的，只要它是能与人CCR4的胞外区特异反应，但不与人血小板反应的人CDR移植抗体或其抗体片段。术语“不能与人血小板反应”的含义是抗体显示与人血小板基本上没有结合作用。具体的是，它意味着当通过流式细胞仪检测时，不显示结合活性。

同样，本发明的抗体能特异的与人CCR4的胞外区反应，并对CCR4表达细胞具有细胞毒活性。

细胞毒活性包括CDC活性和ADCC活性。

本发明的抗体也包括优选与下述区域特异反应的抗体，该区域包括SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中1至39位，98至112位，176至206位或271至284位，更优选的区域是SEQ ID NO:48(SEQ ID NO:36)所示的氨基酸序列中2至29位的区域，更优选的是SEQ ID NO:48(SEQ ID NO:37)所示的氨基酸序列中的12至29位的区域，最优选的是SEQ ID NO:48所示的氨基酸序列中12至25位的区域。

人CDR移植抗体代表的抗体中，来源于非人动物的抗体中VH和VL的CDR氨基酸序列被移植至人抗体的VH和VL的合适位置。

本发明的人CDR移植抗体的产生可通过构建编码V区的cDNA，其中与CCR4特异反应，来源于非人动物的抗体中的VH和VL的CDR氨基酸序列被移植至人抗体的VH和VL的FR上，将它们分别插入到动物细胞的表达载体中以构建人CDR移植抗体的表达载体，然后将其导入至动物细胞中以表达人CDR移植抗体，所述动物的表达载体含有编码人抗体的CH和H链C区(以下称为“CL”)的DNA。

作为选择人抗体的VH和VL的FR氨基酸序列的方法，可以使用任何方法，只要它们来自人抗体。实例包括在数据库如蛋白质数据库和

类似数据库中登记的人抗体中VH和VL的FR氨基酸序列，或人抗体中VH和VL的每个亚组FR中通用的氨基酸序列(*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991)。

在本发明的抗体中的任何CH可用，只要它属于人免疫球蛋白(以下称为"hIg")。优选地，可以使用hIgG类，和属于hIgG类的 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ 和 $\gamma 4$ 亚类中的任何一种。也可使用人CDR移植抗体中的任何CL，只要它属于hIg，可使用 κ 类或 λ 类。

本发明的抗体包括的人CDR移植抗体或其抗体片段，包含分别含有SEQ ID NOs:1, 2和3表示的氨基酸序列的人抗体的HV CDR1, CDR2和CDR3，和/或分别含有SEQ ID NOs:5, 6和7表示的氨基酸序列的VL的CDR1, CDR2和CDR3。

优选的实例包括人CDR移植抗体，其中所述抗体中的VH包括SEQ ID NO:4或38所示的氨基酸序列，和/或VL包括SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

更优选的实例包括：

一种人CDR移植抗体，包含抗体的VH，所述抗体包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:4所示氨基酸序列中40位的Ala，42位的Gly，43位的Lys，44位的Gly，76位的Lys和97位的Ala，

一种人CDR移植抗体，包含抗体的VH，所述抗体包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中28位的Thr和位点97位中的Ala，

一种人CDR移植抗体，包含抗体的VL，所述抗体包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中位2的Ile，3位的Val，50位的Gln和88位的Val，

一种人CDR移植抗体，包含抗体的VH和抗体的VL，所述抗体的VH包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:4所示氨基酸序列中40位的Ala，42位的Gly，43位的Lys，44位的Gly，76位的Lys和97位的Ala；所述抗体的VL

包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile，3位的Val，50位的Gln和88位的Val，

一种人CDR移植抗体，包含抗体的VH和抗体的VL，所述抗体的VH包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:38所示氨基酸序列中28位的Thr和97位的Ala；所述抗体的VL包含氨基酸序列，其中至少有一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代，该残基选自SEQ ID NO:8所示氨基酸序列中2位的Ile，3位的Val，50位的Gln和88位的Val及其类似物。

10 本发明包括抗体及其抗体片段，该抗体所包含的氨基酸序列中，一个或多个氨基酸被删除，取代，插入或添加，并如上所述特异的与CCR4反应。

在本发明中，氨基酸序列中的缺失，取代，插入或添加一个或多个氨基酸的含义是在氨基酸序列中的一个或多个位点上，一个或多个氨基酸被缺失，取代，插入和/或添加。在同一个氨基酸序列中可同时发生缺失，取代，插入和/或添加。同样，氨基酸残基的取代，插入或添加可以是天然的或非天然的。天然的氨基酸残基包括L-丙氨酸，L-天冬酰胺，L-天冬氨酸，L-谷氨酰胺，L-谷氨酸，甘氨酸，L-组氨酸，L-异亮氨酸，L-亮氨酸，L-赖氨酸，L-蛋氨酸，L-苯丙氨酸，L-脯氨酸，L-丝氨酸，L-苏氨酸，L-色氨酸，L-酪氨酸，L-缬氨酸，L-半胱氨酸及其类似物。

以下显示了相互取代的氨基酸残基的优选实例。同组内的氨基酸残基可相互取代。

A组:

25 亮氨酸，异亮氨酸，正亮氨酸，缬氨酸，正缬氨酸，丙氨酸，2-氨基丁酸，蛋氨酸，O-甲基丝氨酸，叔-丁基甘氨酸，叔-丁基丙氨酸，环己基丙氨酸；

B组:

天冬氨酸，谷氨酸，异天冬氨酸，异谷氨酸，2-氨基己二酸，2-氨基辛二酸；

C组:

天冬酰胺, 谷氨酰胺;

D组:

赖氨酸, 精氨酸, 鸟氨酸, 2,4-二氨基丁酸, 2,3-二氨基丙酸;

5 E组:

脯氨酸, 3-羟脯氨酸, 4-羟脯氨酸;

F组:

丝氨酸, 苏氨酸, 高丝氨酸;

G组: 苯丙氨酸, 酪氨酸。

10 本发明的抗体片段包括Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, 微型双功能抗体, dsFv, 含有CDR的肽及其类似物。

Fab是具有大约50,000分子量和抗原结合活性的抗体片段, 其中用蛋白酶, 即木瓜蛋白酶(在H链的224位上的氨基酸残基切开)处理IgG获得的片段中的H链N-端侧链的大约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。
15

本发明的Fab可通过用蛋白酶, 即木瓜蛋白酶处理能与CCR4特异反应的本发明的人CDR移植抗体获得。Fab的产生也可通过将编码抗体Fab的DNA插入进一个原核细胞表达载体或真核细胞表达载体中, 并将该载体导入原核细胞或真核细胞中表达Fab。

20 F(ab')₂ 是具有大约100,000分子量和抗原结合活性的抗体片段, 其稍大于在用蛋白酶, 即木瓜蛋白酶处理IgG获得的片段通过铰链区的二硫键结合的Fab。

本发明的F(ab')₂ 可通过用蛋白酶, 即木瓜蛋白酶处理能与CCR4特异反应的本发明的人CDR移植抗体获得。F(ab')₂也可通过一个硫醚键或二硫键通过结合如下所述的Fab' 而产生。
25

Fab'是具有大约50,000分子量和抗原结合活性的抗体片段, 其可通过切开F(ab')₂ 铰链区的二硫键而获得。

本发明的Fab' 可通过用一种还原剂, 二硫苏糖醇处理能与本发明的CCR4特异反应的F(ab')₂而获得。Fab'的产生也可通过将编码与CCR4特异反应的本发明的人CDR移植抗体的Fab'的DNA插入原核细胞表达
30

载体或真核细胞表达载体中，并将该载体导入原核细胞或真核细胞中以表达Fab'。

scFv是一种VH-P-VL或VL-P-VH多肽，其中一个链VH和一个链VL采用12个或更多个残基的合适肽连接子(P)来连接，并具有抗原结合活性。

本发明的scFv的产生可通过获取编码本发明的能与CCR4特异反应的人CDR移植抗体的VH和VL的cDNA，构建编码scFv的DNA，将此DNA插入进原核细胞表达载体或真核细胞表达载体中，然后将表达载体导入原核细胞或真核细胞中表达scFv。

微型双功能抗体是一种抗体片段，其中具有相同或不同抗原结合特异性的scFv形成二聚体，对相同的抗原具有二价的抗原结合活性或对不同的抗原具有两种特异的抗原结合活性。

本发明的微型双功能抗体，例如可与CCR4特异反应的二价微型双功能抗体的产生可通过获取编码与CCR4特异反应的抗体的VH和VL的cDNA，构建编码具有3至10个残基的肽连接子的scFv的DNA，将DNA插入进一个原核细胞表达载体或真核细胞表达载体中，然后将表达载体导入进一种原核细胞或真核细胞中以表达微型双功能抗体。

dsFv通过半胱氨酸残基之间的二硫键结合多肽获得，其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被一个半胱氨酸取代。被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基可按照Reiter 等人所提出的方法，根据抗体的三维结构预测来选择(*Protein Engineering*, 7, 697 (1994))。

本发明的dsFv的产生可通过获取编码本发明的与CCR4特异反应的人CDR移植抗体的VH和VL的cDNA，构建编码dsFv的DNA，将DNA插入进原核细胞表达载体或真核细胞表达载体中，然后将表达载体导入原核细胞或真核细胞中以表达dsFv。

含有CDR的肽由包含H链的至少一个区和L链CDR构建。多个CDR可直接结合或通过合适的肽连接子结合。

本发明的含有CDR的肽可通过下述方法产生：获取编码与CCR4特异反应的人CDR移植抗体的VH和VL的CDR的cDNA，构建编码CDR的DNA，将DNA插入原核细胞表达载体或真核细胞表达载体中，然后将

表达载体导入原核细胞或真核细胞中以表达肽。含有CDR的肽也可通过化学合成的方法如Fmoc法(苄醇甲氧羰基法), tBoc法(叔-丁氧基羰基法)或类似方法产生。

本发明的抗体包括抗体衍生物, 其中放射性同位素、蛋白质、制剂及其类似物与本发明的抗体化学性连接或遗传性连接在一起。

本发明的抗体衍生物的产生可通过将放射性同位素、蛋白质或试剂化学性连接至能与CCR4特异反应的抗体或抗体片段的H链或L链的N末端侧链或C末端侧链, 抗体或抗体片段的一个适合的取代基团或侧链, 或抗体或抗体片段中的糖链上(抗体工程手册(*Antibody Engineering Handbook*), Osamu Kanemitsu主编, Chijin Shokan出版(1994))。

也可通过遗传工程产生, 通过将编码本发明的能与CCR4特异反应的抗体或抗体片段的DNA与编码待结合的蛋白质的其他DNA连接起来, 将DNA插入至表达载体中, 并将表达载体导入进宿主细胞中。

放射性同位素包括 ^{131}I , ^{125}I 及其类似物, 它可通过如氯胺T法与抗体连接。

制剂优选是低分子量的化合物。实例包括抗癌制剂如烷化剂(如, 氮芥, 环磷酰胺), 代谢拮抗剂(如, 5-氟尿嘧啶, 氨甲喋呤), 抗生素(如, 道诺霉素, 博来霉素, 丝裂霉素C, 道诺红霉素, 阿霉素), 植物生物碱(如, 长春花新碱, 长春花碱, 长春地辛), 激素药物(如, 三苯氧胺, 地塞米松)等(临床肿瘤学(*Clinical Oncology*), 日本临床肿瘤学会主编, *Cancer and Chemotherapy*出版(1996)); 抗炎剂如类固醇制剂(如, 氢化可的松, 强的松), 非类固醇药物(如, 阿司匹林, 吲哚美辛), 免疫调节剂(如, 硫代苹果酸亚金, 青霉胺), 免疫抑制剂(如, 环磷酰胺, 硫唑嘌呤)和抗组胺剂(如, 氯苯吡胺马来酸盐, 氯马斯丁)(炎症和抗炎治疗(*Inflammation and Antiinflammatory*), Ishiyaku Shuppan(1982)); 和类似药物。将道诺霉素与抗体结合的方法包括道诺霉素和抗体的氨基通过戊二醛连接(conjugate)的方法, 道诺霉素的氨基与抗体的羧基通过水溶性碳化二亚胺连接的方法等。

蛋白质优选是可活化免疫细胞的细胞因子。实例包括人白介素2(以后称为"IL-2"), 人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(以后称为

"hGM-CSF"), 人巨噬细胞集落刺激因子(此后称为"hM-CSF"), 人白介素12 (此后称为"hIL-12")等。为了直接抑制癌细胞, 也可使用如蓖麻蛋白, 白喉毒素等毒素。例如, 产生与蛋白质融合的抗体, 可通过将编码抗体或抗体片段的cDNA与编码蛋白质的其他cDNA连接在一起, 构建编码融合抗体的DNA, 将DNA插入原核细胞的表达载体或真核细胞的表达载体, 然后将其导入原核细胞或真核细胞中以表达此融合抗体。

产生人CDR移植抗体及其与CCR4特异反应的抗体片段的方法, 评价其活性的方法和应用它们的方法解释如下。

1. 制备人CDR移植抗体

10 (1)构建人源化抗体表达载体

人源化抗体表达载体是动物细胞的表达载体, 其中编码人抗体的CH和CL的基因已经被插入, 通过将人抗体的每一个CH和CL克隆进动物细胞的表达载体中而构建。

人抗体的C区是任何人抗体的CH和CL。实例包括人抗体 γ 亚类的CH 和 κ 类的CL及其类似物。也可使用cDNA。作为动物细胞的表达载体, 可使用任何表达载体, 只要能插入和表达人抗体的C区。实例包括pAGE107 (*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)), pAGE103 (*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), pHSG274 (*Gene*, 27, 223 (1984)), pKCR (*Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 78, 1527 (1981)), pSGI β d2-4 (*Cytofechnology*, 4, 173 (1990)), pSElUKlSedl-3 (*Cytotechnology*, 13, 79 1993))等。用于动物细胞表达载体的启动子和增强子包括SV40早期启动子和增强子(*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)), 莫洛尼鼠白血病病毒LTR启动子和增强子(*Biochem. Biophys. Res. Comun.*, 149, 960 (1987)), 免疫球蛋白H链启动子(*Cell*, 41, 479 (1985))和增强子(*Cell*, 33, 717 (1983))等。

人源化抗体表达载体可以是编码抗体的H链的基因和编码抗体的L链的基因存在于不同的载体上, 或是两个基因存在于同一个载体(串联式)的类型。考虑到构建人源化抗体表达载体的易行性, 导入动物细胞的易行性, 和抗体的H和L链在动物细胞中表达量之间的平衡, 更优选串联式的人源化抗体表达载体(*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994))。

串联式的人源化抗体表达载体包括pKANTEX93 (WO 97/10354),

pEE18 (HYBRIDOMA. 17, 559 (1998))等。

构建的人源化抗体表达载体可用于在动物细胞中表达人CDR移植抗体。

(2) 构建编码人CDR移植抗体V区的cDNA

5 编码人CDR移植抗体的VH和VL的cDNA可如下获得。首先，选择将来自非人动物的抗体的VH和VL中CDR的氨基酸序列移植到人抗体的VH和VL中FR的氨基酸序列。可使用人抗体的VH和VL中FR的任何氨基酸序列，只要它们来自人体。实例包括在数据库如蛋白质数据库及其类似数据库中登记的人抗体的VH和VL中FR的氨基酸序列，以及
10 人抗体的VH和VL中FR的亚类通用的氨基酸序列(, US Dept. Health and Human Services (1991))等。为了产生具有有效活性的人CDR移植抗体，优选选择与来自非人动物的靶抗体的VH和VL中FR的氨基酸序列具有高度同源性(至少60%或更高)的氨基酸序列。

然后，来自非人动物的抗体的VH和VL中CDR的氨基酸序列被移植
15 至选择的人抗体的VH和VL中FR的氨基酸序列上，来设计人CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列。考虑到在抗体基因的核苷酸序列中发现的密码子使用的频率，将设计的氨基酸序列转换为DNA序列(*Sequence of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991))，设计编码人CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列的
20 DNA序列。合成几个具有大约100至200个核苷酸长度的合成DNA，使用它们来进行PCR。在这种情况下，根据PCR的反应效率和可以被合成的DNA的长度，优选每个VH和VL中设计4或6个合成DNA。而且，它们很容易通过在合成DNA的两个末端上的5'末端引入适当的限制性酶的识别序列，克隆到第1(1)中构建的人源化抗体表达载体中。PCR后，
25 扩增产物被克隆进质粒中，如pBluescript SK (-) (Stratagene制造)等，确定核苷酸序列，获得具有编码设计的人CDR移植抗体的VH和VL的DNA序列的质粒。

(3) 修饰人CDR移植抗体V区氨基酸序列

已知当简单的仅仅将来自非人动物的抗体的VH和VL的CDR移植
30 至人抗体的VH和VL中的FR中，产生人CDR移植抗体时，其抗原结合

活性低于来自非人动物的原始抗体(*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991))。正是这个原因,要考虑不但在CDR,而且在FR中的几个氨基酸残基直接或间接涉及来自非人动物原始抗体的VH和VL的抗原结合活性,且它们变成在人抗体的VH和VL中不同的FR中的不同的氨基酸残基。为了解决这个问题,在人CDR移植抗体中,在人抗体的VH和VL中FR的氨基酸序列中,通过与CDR中的氨基酸残基相互作用,或通过维持抗体的三维结构直接涉及与抗原结合的氨基酸残基,或间接涉及与抗原结合的氨基酸残基被鉴定和修饰为在原始的非人动物抗体中发现的氨基酸残基,以便增加被降低的抗原结合活性(*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991))。在人CDR移植抗体的产生过程中,如何有效的鉴定与FR中抗原结合活性有关的氨基酸残基是最重要的,所以通过X-线结晶学(*J. Mol. Biol.*, 112, 535 (1977)),计算机建模(*Protein Engineering*, 7, 1501 (1994))或类似方法构建和分析抗体的三维结构。尽管抗体的三维结构在产生人CDR移植抗体时是有用的,但仍然没有建立产生可应用于任何抗体的人CDR移植抗体的方法。因此,现在必须进行多种尝试,例如产生每种抗体的几个修饰抗体,检测每个修饰抗体之间的关系和其抗体结合活性。

根据PCR,采用多种用于修饰的合成DNA可完成对人抗体的VH和VL中FR的选定的氨基酸序列的修饰。关于通过PCR获得的扩增产物,依照在第1(2)项中描述的方法确定核苷酸序列,以便证实是否已经进行了目的性修饰。

(4) 构建人CDR移植抗体的表达载体

人CDR移植抗体的表达载体的构建可通过将编码第1(2)项和1(3)项中构建的人CDR移植抗体的VH和VL的cDNA克隆到编码第1(1)项中所述的人源化抗体表达载体中人抗体的VH和VL的基因上游。例如,当适当的限制性酶的识别位点被导入合成DNA两端的5'末端时(此合成DNA用于第1(2)项和(3)项中构建的人CDR移植抗体的VH和VL),可进行克隆,因此它们在人抗体的CH和CL的基因上游,在如第1(1)项中所述的人源化抗体表达载体中以合适的形式表达。

(5) 人CDR移植抗体的瞬时表达

为了有效的评价产生的多种人CDR移植抗体的抗原结合活性，用第1(4)中所述的人CDR移植抗体的表达载体或其修饰的表达载体瞬时表达人CDR移植抗体。任何细胞可用作宿主细胞，只要宿主细胞可表达人CDR移植抗体。通常，考虑到其高表达量可使用COS-7细胞(ATCC
5 CRL1651) (*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC Press, p.283 (1991))。将表达载体导入进COS-7细胞中的方法包括DEAE-葡聚糖法(*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC印刷, p.283 (1991)), 脂质转染法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987))及其类似方法。

导入表达载体后，在培养上清液中人CDR移植抗体的表达量和抗原结合活性可通过酶免疫试验(ELISA)来确定；抗体 (*Antibody*)：实验室手册(*A Laboratory Manual*), Cold Spring Harbor Laboratory, 第14章(1988)，单克隆抗体(*Monoclonal Antibodies*): 理论和实践(*Principles and Practice*), Academic Press Limited (1996))等。

(6) 稳定的表达人CDR移植抗体

15 稳定地产生人CDR移植抗体的转化体可通过将在第1(4)项中所述的人CDR移植抗体的表达载体导入合适的宿主细胞中而获得。

将表达载体导入宿主细胞中的方法包括电穿孔(*Cytotechnology*, 3, 133 (1990))等。

任何细胞可用作宿主细胞，导入人CDR移植抗体的表达载体，只要它表达人CDR移植抗体。实例包括鼠SP2/0-Ag14细胞(ATCC
20 CRL1581)，鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC CRL1580)，可检测到二氢叶酸还原酶(defr)基因的CHO细胞(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 4216 (1980))，大鼠 YB2/3HL.P2.G11.16 Ag.20细胞(YB2/0细胞；ATCC CRL1662)等。

25 导入表达载体后，通过在含有制剂如G418硫酸盐(G418;Sigma生产)或类似物(*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994))的动物细胞培养基中培养，选择稳定表达人CDR移植抗体的转化体。动物细胞培养基包括PRMI1640培养基(Nissui Pharmaceutical生产)，GIT培养基(Nissui Pharmaceutical生产)，EX-CELL302培养基(JRH生产)，IMDM培养基
30 (GIBCO BRL生产)，杂交瘤-SFM培养基(GIBCO BRL生产)，通过添加

多种添加物如FBS至这些培养基中获得的培养基及其类似培养基。通过将选择出的转化体培养在培养基中可在培养基中，产生或累积人CDR移植抗体。在培养上清液中人源化抗体的表达量和抗原结合活性可通过ELISA或类似方法测定。同样，在转化体中，人CDR移植抗体的表达量可通过使用dhfr扩增系统等来增加(*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994))。

人CDR移植抗体可通过蛋白A柱从转化体的培养上清液中纯化(抗体(*Antibody*):实验室手册(*A Laboratory Manual*), Cold Spring Harbor Laboratory, 第8章(1988), 单克隆抗体(*Monoclonal Antibodies*): 原理和实践(*Principles and Practice*), Academic Press Limited (1996))。可使用任何常规的蛋白质纯化方法。例如，可通过凝胶过滤，离子交换层析，超滤等的组合纯化人源化抗体。纯化的人源化抗体或抗体分子的H链或L链的或整个抗体分子分子量可通过聚丙烯凝胶电泳等来确定(SDS-PAGE; *Nature*, 227, 680 (1970)), Western印迹(抗体(*Antibody*):实验室手册(*A Laboratory Manual*), Cold Spring Harbor Laboratory, 第12章(1988), 单克隆抗体(*Monoclonal Antibodies*): 原理和实践(*Principles and Practice*), Academic Press Limited (1996))。

2.制备抗体片段

根据在第1项中所述的人源化抗体，采用遗传工程或蛋白质工程制备抗体片段。抗体片段包括Fab, F(ab')₂, Fab', sdFv, 微型双功能抗体, dsFv, 含有CDR的肽及其类似物。

(1) 制备Fab

Fab可通过用蛋白水解酶木瓜蛋白酶处理IgG而制备。在木瓜蛋白酶处理后，当原始抗体是具有蛋白A结合活性的IgG亚型时，通过经过蛋白A柱，从IgG分子和Fc片段中分离Fab，回收均一的Fab(单克隆抗体(*Monoclonal Antibodies*): 原理和实践(*Principles and Practice*), 第三版(1995))。当原始抗体是没有蛋白A活性的IgG亚型时，Fab可通过在离子交换层析，低盐浓度下分布洗脱回收(单克隆抗体(*Monoclonal Antibodies*): 原理和实践(*Principles and Practice*)第三版(1995))。另外，Fab也可通过遗传工程技术使用大肠杆菌来制备。例如，Fab表达载体

可通过将在第1(2)和1(3)项中所述的编码抗体V区的DNA克隆进Fab表达载体中而制备。作为Fab表达载体,可使用任何载体,只要Fab的DNA能被插入和表达。实例包括pIT106 (*Science*, 240, 1041 (1988))及其类似物。通过将Fab表达载体导入合适的大肠杆菌中, Fab可在包涵体或胞质间隙中形成和积累。通过常用于蛋白质的重折叠方法从包涵体中获得有活性的Fab, 当它在胞质间隙中表达时, 活性的Fab漏入培养上清液中。均一的Fab可在重折叠后纯化或从培养上清液中采用抗体接合柱纯化(抗体工程(Antibody Engineering), 实践指南(A Practical Guide), W.H. Freeman和Company (1992))。

10 (2) 制备F(ab')₂

F(ab')₂ 可通过用蛋白水解酶木瓜蛋白酶处理IgG而制备。在木瓜蛋白酶处理后,通过类似于Fab情形的纯化方法回收均一的F(ab')₂ (单克隆抗体(Monoclonal Antibodies): 原理和实践(Principles and Practice), 第三版, Academic Press (1995))。另外,也可通过第2(3)中所述的方法来制备,其中用马来酰亚胺如o-PDM, 双马来酰亚胺己烷或其类似物处理Fab', 形成硫醚键, 或用DTNB处理, 形成S-S键的方法(抗体工程(Antibody Engineering), 实践指南(A Practical Guide), IRL PRESS (1996))。

(3) 制备Fab'

20 Fab'可通过遗传工程技术采用大肠杆菌来制备。例如, Fab'表达载体可通过克隆第1(2)和(3)中所述的编码抗体V区的DNA进Fab'表达载体中而制备。对于Fab'表达的载体,可使用任何载体,只要Fab'的DNA可被插入和表达。实例包括pAK19 (*Bio/Technology*, 10, 163 (1992))及其类似物。通过将Fab'表达载体导入进合适的大肠杆菌中, Fab'可在包涵体或胞质间隙中形成和积累。通过通常用于蛋白质重折叠的方法从包涵体中获得有活性的Fab', 当它在胞质间隙中表达时, 通过用如溶菌酶部分消化, 渗透压冲击, 超声处理或及其类似处理破裂细胞, 它可在细胞外部分被回收。均一的Fab'可重折叠后纯化或从破裂的细胞悬液中采用蛋白G柱或类似物纯化(抗体工程(Antibody Engineering), 实践指南(A Practical Guide), IRL PRESS (1996))。

25

30

(4)制备scFv

scFv 可采用噬菌体或大肠杆菌通过遗传工程技术来制备。例如，通过编码含有12个或更多残基的氨基酸序列的多肽连接子的DNA连接第1(2)和(3)项中所述的编码抗体的VH和VL的DNA，产生编码scFv的DNA。通过将得到的DNA克隆到scFv表达载体中可构建scFv表达载体。作为scFv表达载体，可以使用任何载体，只要scFv的DNA能被插入和表达。实例包括pCANTAB5E (由Pharmacia生产)，Phfa (*Hum. Antibody Hybridoma*, 5, 48 (1994))及其类似物。scFv表达载体被导入合适的大肠杆菌中，被一个辅助噬菌体感染，为获得噬菌体可在噬菌体表面表达与噬菌体表面蛋白质融合的形式scFv。scFv也可在包涵体或大肠杆菌的胞质间隙中形成和积累，此大肠杆菌已经被导入scFv表达载体。通过通常用于蛋白质重折叠的方法，从包涵体中获得有活性的scFv，当它在胞质间隙中表达时，通过用如溶菌酶部分消化，渗透压冲击，超声处理及其类似方法处理破裂细胞，它可在细胞外被回收。均一的scFv可在重折叠后纯化或从破裂的细胞悬液中采用阳离子交换层析或类似物纯化(抗体工程(Antibody Engineering)，实践指南(A Practical Guide)，IRL PRESS (1996))。

(5) 制备微型双功能抗体

通过改变制备scFv的多肽连接子的大小至大约3至10个残基，制备微型双功能抗体。当使用一种抗体类型的VH和VL时，可制备二价的微型双功能抗体，当使用两种抗体类型的VH和VL时，制备具有两种不同特异性的微型双功能抗体 (*FEBS Letters*, 453, 164 (1999), *Int. J. Cancer*, 77, 763 (1998))。

(6) 制备dsFv

dsFv可采用大肠杆菌通过遗传工程技术制备。首先，通过将突变导入编码第1(2)和1(3)项中所述的抗体的VH和VL的DNA的合适位置上，产生其中编码的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的DNA。VH和VL表达载体可通过将每一个得到的DNA导入进dsFv表达载体中而产生。作为dsFv表达载体，可使用任何载体，只要dsFv的DNA能被插入和表达。实例包括pULI9 (蛋白质工程 (*Protein Engineering*), 7, 697

(1994))及其类似物。VH和VL表达载体被导入合适的大肠杆菌中,从而在包涵体或胞质间隙中形成和积累VH和VL。VH和VL从包涵体或胞质间隙中获得,并混合,通过通常用于蛋白质的重折叠法可获得活性dsFv。重折叠后,可进一步通过离子交换层析和凝胶过滤或其类似方法
5 来纯化(蛋白质工程(*Protein Engineering*), 7, 697 (1994))。

(7) 制备含有CDR的肽

含有CDR的肽可通过化学合成法,如Fmoc, tBoc或类似方法来制备。同样,制备编码含有CDR的肽的DNA,得到的DNA被克隆到合适的表达载体中,以制备含有CDR的肽。作为表达载体,可以使用任何
10 载体,只要编码含有CDR的肽的DNA被插入和表达。实例包括pLEX (Invitrogen生产), pAX4a+(Invitrogen生产)及其类似物。表达载体被导入合适的大肠杆菌,因此在包涵体或胞质间隙中形成和积累含有CDR的肽。含有CDR的肽可从包涵体或胞质间隙中获得,可通过离子交换层析和凝胶过滤或类似方法纯化(蛋白质工程(*Protein Engineering*), 7,
15 697 (1994))。

3. 评价本发明的抗体的活性和特性

(1) 评价抗原结合活性

本发明的抗体对抗原的结合活性可通过酶联免疫吸附试验(ELISA), 荧光抗体技术(*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993),
20 使用如BIAcore™的表面胞质共振等方法来测定。特别是,产生含有CCR4部分序列的合成肽,通过将其化学性连接于一个载体蛋白质如牛血清白蛋白或类似物来制备结合物。本发明的抗体的CCR4结合活性的测定可通过将结合物固定在ELISA板上,使其与本发明的抗体反应,进一步使其与标记的抗体或结合片段如过氧化物酶或生物素标记的抗体
25 或结合片段反应,然后使用吸收光度计测定有色染料。

(2) 表达CCR4细胞的反应性

为了测定CCR4表达细胞的反应性,优选使用可有效检测细胞表面上表达的CCR4的方法。方法包括使用荧光抗体技术的流式细胞仪和类似方法。另外,当检测与活体细胞如血小板和类似细胞的反应性时,
30 优选在与活细胞尽可能相近的条件下进行检测。由于这些原因,当检

测本发明的抗CCR4抗体的反应性时,最希望的是采用荧光抗体技术的流式细胞仪来进行检测。

5 荧光抗体技术中的抗体可以用荧光材料如FITC,生物素或类似物标记的抗体,或是未标记的抗体。根据所使用的抗体是否有标记和其类型,可使用荧光素标记的抗生物素蛋白,荧光标记的抗人免疫球蛋白抗体。可通过向被测样品中加入足够量的抗CCR4抗体(终浓度一般从0.1至10 $\mu\text{g/ml}$)进行反应,将其反应性与阴性对照抗体和阳性对照抗体进行比较来评价反应性。

(3) 细胞毒活性

10 CCR4表达细胞的细胞毒活性可通过测定CDC活性,ADCC活性及其类似方法来评价(*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993))。所产生的细胞因子量的变化可通过ELISA法,荧光抗体技术和采用细胞因子抗体的类似方法来测定。

(4) 抑制配体结合的活性

15 抑制本发明抗CCR4抗体结合配体的活性可通过TARC或MDC的标记来测定,它们可作为与CCR4,CCR4表达细胞或其细胞膜片段具有结合活性的配体。TARC或MDC可被任何可被探测的技术所标记,实例包括荧光标记,酶标记,放射标记和类似方法。具体的实例包括通过采用WO 00/42074中所述的放射标记来测定结合抑制活性的方法。

20 抑制本发明的抗CCR4抗体的配体结合活性也可通过使用配体与CCR4结合诱导的细胞反应作为指标来检测。细胞反应可以是任何类型,只要可以通过配体与CCR4表达细胞的接触而被诱导,实例包括细胞内钙离子浓度的变化,细胞迁移和类似反应。具体的实例包括通过在WO 00/42074中所述的监测CCR4配体诱导的CCR4表达细胞的迁移抑制的方法。

(5) 检测识别序列

有本发明抗体识别的氨基酸序列可通过使用合成肽来检测,该肽是根据其相应抗原蛋白质的一级序列来设计的。

30 合成肽的一级序列是根据抗原蛋白质的一级序列来设计的。为了制备一种蛋白质,其中合成肽与载体蛋白质是结合的,半胱氨酸残基

被加入至合成肽的羧基末端或氨基末端。得到的蛋白质可被用于ELISA中，ELISA将在后面描述。如果需要，合成肽的N末端或C末端也可分别被乙酰化和酰胺化。

可通过普通的液相或固相肽合成方法，其任何组合法或其修饰的方法来合成肽(*International Journal of Peptide Protein Research*, 35, 161-214 (1990), “固相肽合成”，酶学方法 (Methods in Enzymology), 289卷, Gregg B. Fields主编, Academic Press (1997), “肽合成方法”，分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology), 35卷, Michael W. Pennington和Ben M. Dunn主编, Humana Press (1994))。

另外，也可使用自动肽合成仪。通过肽合成仪合成的肽可采用市售的肽合成仪如由Shimadzu Corp.生产的肽合成仪，Advanced ChemTech Inc, USA (此后称为"ACT")生产的肽合成仪或类似仪器来进行，使用N^α-Fmoc-氨基酸，N^α-Boc-氨基酸或类似物，它们的侧链被适当的保护，并根据各自的合成程序。被保护的氨基酸被用作原料，载体树脂可从ABI Inc., Shimadzu Corp., Kokusan Kagaku K.K., NovaBiochem, Watanabe Kagaku K.K., ACT, AnaSpec Inc., Peptide Research Institute和类似公司购买。

作为检测氨基酸序列的方法，可使用任何技术，只要它是可检测合成肽与抗体结合的方法，所述的氨基酸序列可采用合成肽被本发明的抗体识别。例如，可由抗体识别的氨基酸序列，通过用荧光材料，放射形材料或类似物标记合成肽检测，并检测得到的标记肽与抗体的结合活性。也可通过将合成肽与蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)或类似物结合，并通过ELISA或类似方法评价得到的蛋白质与抗体的反应性。另外，可被本发明抗体识别的氨基酸序列也可通过使用一种物质来测定，该物质已经被证实有抗体结合在其上，如抗体蛋白质，并检测能抑制抗体与该物质结合的合成肽。

4. 用抗CCR4抗体检测和定量CCR4的方法

本发明涉及一种使用本发明的抗体的免疫学检测和测定CCR4或其表面表达CCR4的细胞的方法。

采用本发明的抗体的免疫学检测和测定CCR4或其表面表达CCR4

的细胞的方法包括免疫荧光法, 酶联免疫吸附试验(ELISA), 放射性材料标记的免疫试验(RIA), 免疫组织化学染色方法例如免疫细胞染色法, 免疫组织染色法等(ABC法, CSA法, 等), 上述的酶免疫测定, 夹心ELISA (单克隆抗体试验手册 (*Monoclonal Antibody Experiment*
5 *Manual*) (Kodansha Scientific出版, 1987), 生物化学试验教程第二系列丛书(*Second Series Biochemical Experiment Course*), 第5卷, 免疫生物化学研究方法(*Immunobiochemistry Research Method*), Tokyo Kagaku Dojin出版 (1986))。

免疫荧光法包括将分离的细胞, 组织或类似物与本发明的抗体反
10 应, 将反应物与标记有荧光物质的抗免疫球蛋白抗体或结合片段反应, 荧光物质如异硫氰酸荧光素(FITC)或类似物, 然后用流式细胞仪测定荧光物质。

酶联免疫吸附试验(ELISA)包括用分离的细胞或其细胞裂解物, 组织或其组织裂解物, 细胞培养上清液, 血清, preural液, 腹水, 眼液等
15 与本发明的抗体反应, 将反应物与标记有酶如过氧化物酶、生物素等的抗免疫球蛋白抗体或结合片段反应, 然后用吸收光度计测定产生的颜色(resultant developed dye)。

放射性材料标记的免疫试验(RIA)包括将分离的细胞或细胞裂解物, 组织或组织裂解物, 细胞培养上清液, 血清, preural液, 腹水, 眼
20 液或类似物与本发明的抗体反应, 进一步将反应物与标记有放射性同位素的抗免疫球蛋白抗体或结合片段反应, 然后用闪烁扫描计数器或类似仪器测定放射性。

免疫细胞染色和免疫组织染色法包括将分离的细胞, 组织等与本发明的抗体反应, 将反应物与标记有荧光物质的抗免疫球蛋白抗体或
25 结合片段反应, 荧光物质如异硫氰酸荧光素(FITC)或类似物, 或酶如过氧化物酶, 生物素等, 然后用显微镜观察细胞, 组织等。

夹心ELISA是一种方法, 包括在板上吸附具有本发明抗体中不同的抗原决定簇的两种抗体中的一种, 用荧光物质如FITC或类似物, 或酶如过氧化物酶, 生物素等标记另一个抗体, 将分离的细胞或细胞裂解
30 物, 组织或组织裂解物, 细胞培养上清液, 血清, preural液, 腹水, 眼

液或类似物与抗体吸附板反应；然后根据标记物质，将其与标记的抗体进行反应。

5. 使用人CDR移植抗体或其抗体片段的方法

由于本发明的抗体能与在培养细胞系上表达的CCR4特异结合，，
5 显示如CDC活性，ADCC活性等细胞毒活性，可用于诊断和治疗CCR4相关的疾病，如Th2介导的疾病等。同样，因为来自人抗体的氨基酸序列部分的比例高于非人动物的抗体，可以预测它在人体内可显示强的细胞毒活性，不显示免疫原性，效应可持续很长的时间。

另外，可由细胞产生的Th2细胞因子如IL-4, IL-5, IL-13和类似物，
10 通过将本发明的抗体给于实验受试者的细胞或组织中而被抑制。

作为与本发明相关的CCR4表达细胞，Th2细胞和类似细胞可作为例证。用于本发明的Th2细胞优选是活化的Th2细胞或记忆Th2细胞。实例包括具有CD45RA-或CD45RO+和CD4+特性的细胞。

本发明的抗体的细胞毒活性是例如当本发明的抗体与CCR4表达
15 细胞，如Th2细胞结合，然后诱导细胞发生凋亡时产生的。细胞也可通过诱导凋亡被减少和除去。

诊断Th2介导的免疫疾病或癌症的方法也包括如上所述免疫检测实验受试者细胞或组织中存在的人CCR4阳性细胞。

而且，本发明的抗体可用作CCR4相关疾病的诊断试剂，所述疾病
20 如Th2介导免疫疾病或癌症，或由于Th2细胞的异常增加或减少引起病情进展的疾病。

而且，因为本发明的抗体可通过其细胞毒活性减少或除去CCR4表达细胞，它对CCR4相关疾病如Th2介导的免疫疾病或癌症可提供一种诊断或治疗的方法，该法使用本发明的抗体，和CCR4相关疾病如Th2
25 介导的免疫疾病或癌症的治疗和预防制剂，其中含有本发明的抗体作为活性成分的。

Th2介导的免疫疾病包括，无论轻微或严重的炎性疾病如急性或慢性呼吸道高敏性或支气管哮喘，异位性皮肤疾病包括异位性皮炎，过敏性鼻炎，花粉病和类似疾病，由炎症敏感细胞如嗜酸性粒细胞，肥大细胞和类似细胞引起的疾病，这些细胞可被Th2细胞释放的细胞因子
30

和趋化因子，由Th2细胞释放的细胞因子和趋化因子等产生的生物学功能性分子如IgE等增殖或活化；以及由于Th2细胞异常改变引起病情进展的免疫疾病。

本发明的抗体可单独使用，但通常优选以一种药制剂的形式提供，根据制药学技术领域已知的方法，该制剂是将抗体与至少一种
5 制药学可接受的载体混合而产生的。

优选的给药途径，在进行所需要的治疗中是最有效的，如口服给药或胃肠外给药，如口内给药，气管给药，直肠给药，皮下注射，肌肉注射，静脉注射和类似途径。抗体或肽制剂优选以静脉给药。

10 药物剂型包括喷雾剂，胶囊，片剂，颗粒，糖浆，乳剂，栓剂，注射剂，膏剂，带剂等。

适合口服的剂型包括乳剂，喷雾剂，糖浆，胶囊，片剂，粉剂，颗粒和类似剂型。

液体制剂如乳剂和糖浆的产生，可使用添加剂如水；糖类，如蔗糖，山梨醇，果糖；二元醇，如聚乙二醇，丙二醇；油类，如芝麻油，
15 橄榄油，豆油；防腐剂，如p-对羟基苯甲酸盐；和香料，如草莓香料，薄荷油。

胶囊，片剂，粉剂，颗粒和类似剂型的产生可使用添加剂如填料，如乳糖，葡萄糖，蔗糖，甘露醇；分解剂，如淀粉，藻酸钠；润滑剂，
20 如硬脂酸镁；滑石；粘合剂，如聚乙烯醇，羟丙纤维素，明胶；表面活性剂，如脂肪酸酯类；和增塑剂，如甘油。

适合胃肠外给药的制剂包括注射剂，栓剂，喷雾剂和类似制剂。

注射剂的制备可使用载体如盐溶液，葡萄糖溶液或其混合物，或类似物质。

25 栓剂的制备可使用载体，如可可脂，氢化脂，羧酸或类似物质。

喷雾剂也可从抗体本身来制备，或使用载体，或使用不刺激患者的口腔和呼吸道粘膜的类似物质，可通过将其分散为微小颗粒来促进抗体或其抗体片段的吸收。

载体包括如乳糖，甘油和类似物。根据抗体或肽的特性和使用的
30 载体，可产生气溶胶、干粉等。口服制剂中例举的添加剂也可加入至

胃肠外制剂中。

给药的剂量和频率可根据所需的治疗效应，给药方法，治疗周期，年龄，体重和类似因素而变化，但剂量的通常范围是从每个成人每天0.01 mg/kg 至20 mg/kg。

5 本发明根据下面的实例进行描述，但本发明并不受此限制。

附图简述

图1显示了质粒pKM2160Ga10的构建步骤。

图2显示了质粒pKM2160Ga11的构建步骤。符号*表示修饰氨基酸残基的突变遗传代码的位点。
10

图3显示了质粒pKM2160Ga13的构建步骤。符号*显示了修饰氨基酸残基的突变遗传代码的位点。

图4显示了质粒pKM2160LV0的构建步骤。

图5显示了质粒pKM2160LV1的构建步骤。符号*显示了修饰氨基酸残基的突变遗传代码的位点。
15

图6显示了质粒pKANTEK2160LV0和质粒pKANTEK2160Ga10LV0的构建步骤。

图7显示了根据ELISA，在COS-7细胞中瞬时表达每种抗CCR4 CDR移植抗体的表达载体获得的培养上清液，与CCR4部分肽的反应性。
20

图8显示了根据ELISA，在COS-7细胞中瞬时表达每种抗CCR4 CDR移植抗体的表达载体获得的培养上清液，与CCR4部分肽的反应性，其中的抗CCR4 CDR移植抗体是使用其他FR来制备的。

图9显示了纯化的抗CCR4 CDR移植抗体与CCR4部分肽的反应性。

图10显示了纯化的抗CCR4 CDR移植抗体与CCR4高表达细胞(CCR4/EL-4)的反应性。
25

图11显示了纯化的抗CCR4 CDR移植抗体与CCR4部分肽的亲合性，使用表面胞质共振传感器来测定。

图12显示了根据ADCC活性对CCR4/EL-4细胞的细胞毒性。

图13显示了来自人PBMC的IL-4, IL-13和IFN- γ 产生的抑制效应。
30

图14显示了每种抗体与人血小板的结合作用。

图15显示了质粒pKM2160的VH41和pKM2160的VL61的构建步骤。

图16显示了质粒pKANTEX2160H的构建步骤。

5 图17显示了质粒pKANTEX2160的构建步骤。

实施本发明的最佳方式

实施例 1

产生CCR4的人CDR移植抗体

10 1. 设计编码CCR4的人CDR移植抗体的VH和VL的cDNA

(1) 设计编码CCR4的人CDR移植抗体的VH和VL的氨基酸序列

首先,CCR4的人CDR移植抗体(抗CCR4 CDR-移植抗体)的VH的氨基酸序列设计如下。使用在参考例1中建立的抗CCR4鼠抗体KM2160 (*Int. Immunol.*, 11, 81 (1999))选择人抗体的VH的FR的氨基酸序列来移植VH的CDR1, 2和3的氨基酸序列,该氨基酸序列表示为SEQ ID NO:1, 2和3。与KM2160具有高度同源性的人抗体可通过BLASTP法使用GCG程序包(Genetics Computer Group生产)作为序列分析系统,从已存在蛋白质的氨基酸序列数据库中搜索到(*Nucleic Acid Res.*, 25, 3389 (1997))。当实际的氨基酸同源性同源性记分相比较时,SWISSPROT数据库登记编号P01781, Ig 重链V-III区Gal(*Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.*, 354, 1505-1509 (1973);以后称为"Gal")是一种显示最高同源性为82.5%的人抗体,这样就选择了抗体的FR氨基酸序列。但在数据库中Gal的FR氨基酸序列中可发现一些位点和氨基酸残基,其中在这些位点的氨基酸残基不能被唯一的确定(分泌性抗体N末端的28和30位),所述的氨基酸残基在人抗体的序列中具有较低的产生频率(Thr作为最终的V区残基)。因此,作为鼠KM2160中发现的Ile和Ser残基可选择作为28位和30位,Thr作为V区的最终残基被Ser取代。因为发现这些氨基酸残基在任何人抗体的序列中都有很高的频率(*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991),它们
25
30 不背离人体抗体序列的。

表示为SEQ ID NO:4的抗CCR4 CDR移植抗体的VH氨基酸序列Ga10, 可通过分别将表示为SEQ ID NO:1, 2和3的抗CCR4鼠抗体的VH CDR1, 2和3的氨基酸序列移植至已确定的人抗体FR氨基酸序列中的合适位点上而设计。编码SEQ ID NO:4的氨基酸序列的核苷酸序列表示为

5 SEQ ID NO:49。

抗CCR4 CDR移植抗体的VH的氨基酸序列也可根据Kabat等人所分类的共有序列来设计。

Kabat等人已经将多种已知的人抗体的VH根据其氨基酸序列的同源性和在每个亚型中已报道的共有序列, 归为三种亚型(HSG I至III)

10 (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991)。共有序列的免疫原性在人体中减小是可能的。因此, 为了制备具有高活性的抗CCR4 CDR移植抗体, 在人抗体的VH的三个亚型中共有序列的FR氨基酸序列中, 设计选择与KM2160的VH的FR氨基酸序列具有最高同源性的FR氨基酸序列。表1显示了人抗体的

15 的VH每个亚型的共有序列的FR氨基酸序列和KM2160的VH的FR氨基酸序列之间同源性搜索结果。如表1所示, KM2160的VH区的FR氨基酸序列与亚型III显示具有最高的同源性。

表 1		
HSGI	HSGII	HSGIII
57.47%	50.58%	77.01%

根据上述的结果, SEQ ID NO:38所示的抗CCR4 CDR移植抗体的

20 VH氨基酸序列HV0, 可通过将抗CCR4鼠抗体KM2160的VH的 CDR的氨基酸序列移植至人抗体的VH亚型III的共有序列的FR氨基酸序列的合适上而设计。编码SEQ ID NO:38氨基酸序列的核苷酸序列表示为SEQ ID NO:57。

(2) 设计CCR4的人CDR移植抗体的VL的氨基酸序列

25 下一步, 抗CCR4 CDR-移植抗体的VL的氨基酸序列设计如下。人抗体的VL的FR的氨基酸序列选自移植抗CCR4鼠抗体KM2160的VL的CDR1, 2和3的氨基酸序列, 该氨基酸序列分别表示为SEQ ID NO:5, 6和7。Kabat等人已经将多种已知的人抗体的VL根据其氨基酸序列的同

源性和在每个亚型中已报道的共有序列， 归为四种亚型(HSG I至IV) (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991)。因此， 在人抗体的VL的四个亚型中共有序列的FR氨基酸序列中， 选择与KM2160的VL的FR氨基酸序列具有最高同源性的FR氨基酸序列。表2显示了人抗体的VL每个亚型的共有序列的FR氨基酸序列和KM2160的VL的FR氨基酸序列之间同源性搜索结果。如表2所示， KM2160的VL的FR氨基酸序列与亚型II显示具有最高的同源性。

表 2

	HSGI	HSGII	HSGIII	HSG IV
	65.00%	82.50%	65.00%	72.50%

根据上述的结果， SEQ ID NO: 8所示的抗CCR4 CDR移植抗体的VL氨基酸序列LV0， 可通过将分别表示为SEQ ID NO:5, 6, 7的抗CCR4鼠抗体KM2160的VL的CDR1， 2和3的氨基酸序列移植至人抗体的VL亚型II的共有序列的FR氨基酸序列的合适位点上而设计。编码SEQ ID NO:8氨基酸序列的核苷酸序列表示为SEQ ID NO:53。

(3) 修饰CCR4的人CDR移植抗体的VH和VL

上面设计的抗CCR4 CDR移植抗体的VH氨基酸序列Ga10和HV0， 和VL氨基酸序列LV0是其中抗CCR4鼠抗体KM2160的CDR氨基酸序列单独被移植至选择的人抗体FR氨基酸序列上的抗体。但， 当仅用鼠抗体的CDR氨基酸序列移植时， 人CDR移植抗体的活性经常会降低， 为了避免这种降低， 被认为对活性有影响的人抗体和鼠抗体之间不同的FR氨基酸残基中的某些氨基酸残基通常会与CDR氨基酸序列一起移植。因此， 在本实施例中， 进行一种检测以鉴定被认为对活性有影响的FR氨基酸残基。

首先， 采用计算机模型技术构建上面设计的抗CCR4 CDR移植抗体V区的三维结构(Ga10LV0和HV0LV0)， 其中V区含有VH的氨基酸序列Ga10和HV0和VL的氨基酸序列LV0的抗体。使用软件AbM(Oxford Molecular制作)来制备三维结构坐标， 使用软件Pro-Explore(Oxford Molecular制作)或RasMol(Glaxo制作)根据各自附带的说明书来显示三

维结构。抗CCR4鼠抗体KM2160的V区三维结构的计算机模型也可以相同的方式构建。另外，含有修饰氨基酸序列的三维结构模型可以相同的方式构建，其中不同于抗CCR4鼠抗体KM2160的VH和VL的FR氨基酸序列Gal0LV0或HV0LV0的某些残基，可被在抗CCR4鼠抗体KM2160
5 中相应位点上发现的其他残基取代，并比较抗CCR4鼠抗体KM2160的V区，Gal0LV0或HV0LV0和修饰产物的三维结构。

结果是，改变了抗原结合区的三维结构，以便选择Gal0中40位的Ala，42位的Gly，43位的Lys，44位的Gly和76位的Lys，97位中的Ala，HV0中28位的Thr和97中的Ala和LV0中2位的Ile，3位的Val，50位的Gln
10 和88位的Val作为被认为是Gal0LV0或HV0LV0的FR氨基酸残基中对抗体的活性有影响的残基。在这些选择的氨基酸残基中，至少有一个氨基酸被修饰为鼠抗体KM2160中发现的氨基酸残基，以便设计含有多种修饰作用的人CDR移植抗体的VH和VL。

首先，就VH而言，例如设计Gal1表示为SEQ ID NO:9，其中Gal0
15 的97位的Ala被修饰，Gal2表示为SEQ ID NO:10，其中Gal0的42位的Gly和44位的Gly被修饰，Gal3表示为SEQ ID NO:11，其中Gal0的97位的Ala，42位的Gly和44位上的Gly被修饰，HV1表示为SEQ ID NO:39，其中HV0的28位的Thr被修饰，HV2表示为SEQ ID NO:40，其中HV0的97位的Ala被修饰，HV3表示为SEQ ID NO:41，其中HV0的28位的Thr，
20 97位的Ala被修饰。而且，就VL而言，例如设计LV1表示为SEQ ID NO:12，其中2位的Ile被修饰，LV2表示为SEQ ID NO:13，其中3位上的Val被修饰，LV3表示为SEQ ID NO:14，其中2位的Ile和3位的Val被修饰。编码SEQ ID NO:9至11，39至41和12至14所示氨基酸序列的核苷酸序列分别表示为SEQ ID NO:50至52，58至60和54至56。

25 2. 构建编码抗CCR4 CDR移植抗体的cDNA

(1) 构建编码抗CCR4 CDR移植抗体的VH的cDNA

如下，使用PCR构建在实施例1(1)中设计的编码抗CCR4 CDR移植抗体的VH的Gal0的氨基酸序列的cDNA。

首先，通过将设计的氨基酸序列与表示为SEQ ID NO:15的抗CCR4
30 鼠抗体KM2160的H链分泌信号序列连接，形成完整的抗体氨基酸序列。

下一步, 氨基酸序列被转变为遗传密码子。当对于一个氨基酸残基存在两种或更多的遗传密码子, 通过考虑在抗体基因核苷酸序列中发现的密码子确定相应的遗传密码子 (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991)。通过连接已确定的遗传密码子, 并结合PCR扩增引物的核苷酸序列(包括为了克隆进载体, 表达人源化抗体的限制性酶识别序列)设计编码完整抗体V区氨基酸序列的cDNA的核苷酸序列, 并将其加入至其5'末端和3'末端。设计的核苷酸序列被分成总共6个核苷酸序列, 每个都含有从5'末端计大约100个核苷酸(设计其邻接的核苷酸序列, 这样在其末端具有大约20个核苷酸的互补序列), 并且6个合成的寡核苷酸SEQ ID NO:16, 17, 18, 19, 20和21以正义链和反义链(GENSET制造)的互补顺序被合成。

PCR的进行是向含有0.2 mM dNTPs和1 mM氯化镁的反应溶液中添加每种寡核苷酸至终浓度0.1 μ M, 使用0.4 μ M M13 引物RV (Takara Shuzo制造), 0.4 μ M M13引物M3 (GENSET制造)和2.5单位KOD聚合酶 (TOYOBO制造), 调整总体积至50 μ l。反应进行30个循环, 每个循环包括94°C 30秒, 55°C 30秒和74°C 60秒, 然后74°C 10分钟进行1个循环。反应溶液用QIA快速PCR纯化试剂盒(QIAGEN制造)进行纯化, 最后溶解在无菌水中。反应溶液使用10单位限制性酶*ApaI* (Takara Shuzo制造)和10单位限制性酶*NotI* (Takara Shuzo制造) 在37°C反应1小时。反应溶液通过琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约0.47kb的*ApaI*-*NotI* 片段。

下一步, 使用10单位限制性酶*ApaI* (Takara Shuzo制造)和10单位限制性酶*NotI* (Takara Shuzo制造), 使3 μ g 质粒pBluescript II SK(-) (Stratagene制造)与片段, 在37°C反应1小时。所述的反应溶液通过琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约2.95kb的*ApaI*-*NotI*片段。

下一步, 得到的抗CCR4 CDR移植抗体的VH的PCR产物的*ApaI*-*NotI* 片段和质粒pBluescript II SK(-)的*ApaI*-*NotI* 片段使用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I根据产品的说明书进行连接。使用以这种方式获得的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造), 每种质粒DNA从转化体克隆中制备, Big Dye

Terminator Kit ver. 2 (Applied Biosystems制造)分析其核苷酸序列。核苷酸序列分析的结果是, 获得了在图1中所示的具有目的核苷酸序列的质粒pKM2160Gal0。用质粒pKM2160Gal0转化的大肠杆菌, 即大肠杆菌DH5 α /pKM2160Gal0已经在2001年8月22日作为FERM BP-7709存放在
5 专利生物保藏中心(International Patent Organism Depositary), 独立行政法人产业技术综合研究所((National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本))。

下一步, 如下修饰在实施例1的1(3)中设计的FR氨基酸残基。修饰
10 后氨基酸残基的遗传密码子被修饰为鼠抗体KM2160中发现的遗传密码子。

在97位的Ala修饰为Gly的过程中, 使用PCR, 使用在此项中制备的25ng质粒pKM2160Gal0作为模板, 在50 μ l的反应系统中首次94 $^{\circ}$ C加热2分钟, 然后反应35循环, 每次循环包括94 $^{\circ}$ C 15秒, 55 $^{\circ}$ C 30秒和68 $^{\circ}$ C
15 40秒, 该系统的制备是通过加入用于基因转变的每种合成的DNA作为引物至终浓度为0.4 μ M, 其含有表示为SEQ ID:22 和23(GENSET制造)的核苷酸序列, 根据产品说明书使用2.5单位KOD加聚合酶(TOYOBO制造)。反应溶液使用QIA快速PCR纯化试剂盒(QIAGEN制造)进行纯化, 最终溶解在无菌水中。总体积可允许使用10单位限制性酶*Pst*I
20 (Takara Shuzo制造)在37 $^{\circ}$ C反应1小时, 然后和10单位限制性酶*Dra*III (New England Biolabs制造)在37 $^{\circ}$ C反应1小时。反应溶液用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约0.58kb的*Pst*I-*Dra*III 片段。

下一步, 3 μ g 质粒pKM2160Gal0使用10单位限制性酶*Pst*I (Takara Shuzo制造)在37 $^{\circ}$ C反应1小时, 然后和10单位限制性酶*Dra*III (New
25 England Biolabs制造)在37 $^{\circ}$ C反应1小时。反应溶液用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约2.7kb的*Pst*I-*Dra*III 片段。

下一步, 这样从PCR产物中获得的*Pst*I-*Dra*III片段和从质粒pKM2160Gal0中获得的*Pst*I-*Dra*III 片段使用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I根据产品说明书进行连接。使用以此种
30 方式获得的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造), 从

转化体克隆中制备的每种质粒DNA，使用Big Dye Terminator Kit ver. 2(Applied Biosystems制造)分析其核苷酸序列。核苷酸序列分析的结果是，获得了图2所示的具有目标核苷酸序列的质粒pKM2160Gal1。用质粒pKM2160Gal1转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160Gal1已经
5 已经在2001年8月22日作为FERM BP-7710存放在专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

在42位的Gly修饰为Asp，44位的Gly修饰为Arg的过程中，通过基本上与上述相似的方法获得质粒pKM2160Gal2，不同之处在于使用用于基因转变的合成DNA和M13引物RV(Takara Shuzo制造)用作PCR引物，所述合成DNA含有SEQ ID NO:24(GENSET制造)所示的核苷酸序列。用质粒pKM2160Gal2转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160Gal2已经在2001年8月22日作为FERM BP-7711存放在
10 专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

同样，所有上述三种残基的修饰如下进行构建。上面获得的每种pKM2160Gal1和pKM2160Gal2大约0.5 μ g，使用10单位限制性酶*Nhe*I (Takara Shuzo制造)在37°C反应1小时，然后和10单位限制性酶*Sca*I (Takara Shuzo制造)在37°C反应1小时。反应溶液用琼脂糖凝胶电泳分离，回收来自pKM2160Gal1的大约1.3kb的*Nhe*I-*Sca*I 片段和来自pKM2160Gal2的大约2.0kb的片段。得到的两个片段采用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I，根据产品的说明书进行连接。使用
20 这种方式获得的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造)，每一质粒DNA从转化体克隆中制备，使用Big Dye Terminator Kit ver. 2(Applied Biosystems制造)分析核苷酸序列。核苷酸序列分析的结果是获得了图3所示的具有目的核苷酸序列的质粒pKM2160Gal3。用质粒pKM2160Gal3转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160Gal3已经在2001年8月22日作为FERM BP-7712存放在专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi
25 30

1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

下一步,使用PCR,如下进行构建编码实施例1(1)中设计的抗CCR4 CDR移植抗体的VH的HV0的氨基酸序列的cDNA。

首先,通过将设计的氨基酸序列与抗CCR4鼠抗体KM2160的H链分泌信号序列连接在一起形成的完整抗体氨基酸序列,表示为SEQ ID NO:15。下一步,氨基酸序列被转变为遗传密码子。当一个氨基酸残基存在两种或更多的遗传密码子时,通过考虑在抗体基因核苷酸序列中发现的密码子确定相应的遗传密码子(*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services, 1991)。连接已确定的遗传密码子,因此设计编码完整抗体V区氨基酸序列的cDNA的核苷酸序列,在其5'末端和3'末端加入增加的PCR扩增的引物核苷酸序列(包括使用为克隆进载体以表达人源化抗体的限制性酶识别序列)。设计的核苷酸序列被分成总共6个核苷酸序列,每个都含有从5'末端计大约100个核苷酸(设计其邻接的核苷酸序列,这样在其末端具有大约20个核苷酸的复制序列),6个合成的寡核苷酸SEQ ID NO:16, 42, 43, 44, 45和21以正义链和反义链(GENSET制造)的互补顺序合成,然后pKM2160HV0可通过在此项中所述的类似于pKM2160Gal0的方法获得。用质粒pKM2160HV0转化的大肠杆菌,即大肠杆菌DH5 α /pKM2160HV0已经在2001年8月22日作为FERM BP-7718存放在专利生物保藏中心,独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

在28位的Thr修饰为Ile的过程中,使用具有SEQ ID NO:69所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:42所示的核苷酸序列的寡核苷酸,使用具有SEQ ID NO:46所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:43所示的核苷酸序列的寡核苷酸,进行与构建上述质粒pKM2160HV0相似的反应,获得具有目的核苷酸序列的pKM2160HV1。用质粒pKM2160HV1转化的大肠杆菌,即大肠杆菌DH5 α /pKM2160HV1已经在2001年8月27日作为FERM BP-7719存放在专利生物保藏中心,独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba

Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

在28位的Thr修饰为Ile, 97位的Ala修饰为Gly的过程中, 使用具有SEQ ID NO:69所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:42所示的核苷酸序列的寡核苷酸, 使用具有SEQ ID NO:46所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:43所示的核苷酸序列的寡核苷酸, 使用具有SEQ ID NO:47所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:45所示的核苷酸序列的寡核苷酸, 进行与构建上述质粒pKM2160HV0相似的反应获得具有目的核苷酸序列的pKM2160HV3。

10 用质粒 pKM2160HV3 转化的大肠杆菌, 即大肠杆菌 DH5 α /pKM2160HV3 已经在2001年8月27日作为FERM BP-7721存放在专利生物保藏中心, 独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

15 在97位的Ala修饰为Gly的过程中, 质粒如下构建。每一获得的 pKM2160HV0和pKM2160HV3大约0.5 μ g, 使用10单位限制性酶*Nhe*I (Takara Shuzo制造), 在37°C反应1小时, 然后和10单位限制性酶*Sca*I (Takara Shuzo制造)在37°C反应1小时, 。反应溶液用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收来自 pKM2160HV3 大约 1.3kb 的 *Nhe*I-*Sca*I 片段和来自 pKM2160HV0的大约2.0kb的*Nhe*I-*Sca*I片段。得到的两个片段采用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I根据产品的说明书进行连接。使用这种方式获得的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造), 每一质粒DNA从转化体克隆中制备, 使用Big Dye Terminator Kit ver. 2(Applied Biosystems制造)分析核苷酸序列。核苷酸
25 序列分析的结果是, 获得了具有目的核苷酸序列的质粒pKM2160HV2。用质粒 pKM2160HV2 转化的大肠杆菌, 即大肠杆菌 DH5 α /pKM2160HV2已经在2001年8月27日作为FERM BP-7720存放在专利生物保藏中心, 独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。
30

(2) 构建编码抗CCR4 CDR移植抗体的VL的cDNA

类似VH的情况，编码实施例1的1(2)中设计的抗CCR4 CDR移植抗体的VL的LV0氨基酸序列的cDNA的构建，采用PCR如下进行。在此情况下，具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的抗CCR4鼠抗体KM2160的L链序列用作分泌信号序列。

首先，合成具有SEQ ID NO:26, 27, 28, 29, 30和31中所述的核苷酸序列的6个合成寡核苷酸(GENSET制造)。通过向50 μ l反应溶液中加入每种寡核苷酸至终浓度为0.1 μ M，使用0.4 μ M M13 引物RV (Takara Shuzo制造)，0.4 μ M M13引物M4 (GENSET制造)或SEQ ID NO:32所示的M13引物M3(GENSET制造)，和2.5单位KOD聚合酶(TOYOBO制造)进行PCR。反应进行30个循环，每个循环包括94°C 30秒，55°C 30秒和74°C 60秒，然后72°C 10分钟进行1个循环。反应溶液用QIA快速PCR纯化试剂盒(QIAGEN制造)进行纯化，最后溶解在无菌水中。反应溶液使用10单位限制性酶EcoRI (Takara Shuzo制造)和10单位限制性酶XhoI (Takara Shuzo制造)，在37°C反应1小时。反应溶液通过琼脂糖凝胶电泳分离，回收大约0.44kb的EcoRI-XhoI 片段。

下一步，使用15单位限制性酶EcoRI(Takara Shuzo制造)和15单位限制性酶XhoI(Takara Shuzo制造)，使得3 μ g 质粒pBluescript II SK(-) (Stratagene制造)，在37°C反应1小时。此反应溶液通过琼脂糖凝胶电泳分离，回收大约2.95kb的EcoRI-XhoI片段。

下一步，得到的抗CCR4 CDR移植抗体的VL的PCR产物的EcoRI-XhoI片段和质粒pBluescript II SK(-)的EcoRI-XhoI片段，采用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I，根据产品的说明书进行连接。使用以这种方式获得的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造)，每种质粒DNA从转化体克隆中制备，使用Big Dye Terminator Kit ver. 2 (Applied Biosystems制造)分析核苷酸序列。核苷酸序列分析的结果是，获得了图4所示的具有目的核苷酸序列的质粒pKM2160LV4。用pKM2160LV0转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160LV0已经在2001年8月22日作为FERM BP-7713存放在专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba

Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

下一步，如下修饰在实施例1的1(3)中设计的FR的氨基酸残基。修饰后的氨基酸残基的遗传密码子被修饰为具有鼠抗体KM2160中发现的遗传密码子。

在2位的Ile修饰为Val的过程中，使用具有SEQ ID NO:33所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:27所示的核苷酸序列的寡核苷酸，进行与构建上述质粒pKM2160LV0相似的反应，获得图5显示的具有目的核苷酸序列的pKM2160LV1，。用质粒pKM2160LV1转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160LV1已经在2001年8月22日作为FERM BP-7714存放在专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

当3位的Val修饰为Leu时，以同样的方式，通过使用具有SEQ ID NO:34所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:27所示的核苷酸序列的寡核苷酸，获得每种目的质粒pKM2160LV2和pKM2160LV3，当上述两种残基都被修饰时，使用具有SEQ ID NO:35所示的核苷酸序列的寡核苷酸代替具有SEQ ID NO:27所示的核苷酸序列的寡核苷酸。用质粒pKM2160LV2转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160LV2，用质粒pKM2160LV3转化的大肠杆菌，即大肠杆菌DH5 α /pKM2160LV3已经在2001年8月22日作为FERM BP-7715和FERM BP-7716分别存放在专利生物保藏中心，独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

(3) 构建抗CCR4 CDR移植抗体的表达载体

如下，使用人源化抗体表达载体pKANTEX93(*Mol. Immunol.*, 37, 1035 (2000))和实例1的2(1)和(2)中获得的质粒pKM2160Gal0和pKM2160LV0构建抗CCR4 CDR移植抗体的表达载体pKANTEX2160Gal0LV0。

实施例1的2(2)中获得的质粒pKM2160LV0(3 μ g)与10单位限制性

酶*Bsi*WI(New England Biolabs制造) 55°C反应1小时,然后和10单位限制性酶*Eco*RI (Takara Shuzo制造)37°C反应1小时。通过琼脂糖凝胶电泳分离反应溶液,回收大约0.44kb的*Bsi*WI-*Eco*RI片段。

下一步, 3 μ g 人源化抗体的表达载体pKANTEX93与10单位限制性酶*Bsi*WI(New England Biolabs制造)55°C反应1小时,然后和10单位限制性酶*Eco*RI(Takara Shuzo制造)37°C反应1小时。通过琼脂糖凝胶电泳分离反应溶液,回收大约12.75kb的*Bsi*WI-*Eco*RI片段。

下一步,来源于pKM2160LV0的目的*Bsi*WI-*Eco*RI片段和来源于pKANTEX93的目的*Bsi*WI-*Eco*RI片段使用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I,根据产品的说明书进行连接。使用以这种方式获得的重组质粒DNA转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造),从而获得图6中显示的质粒pKANTEX2160LV0。

下一步,实施例1的2(1)中获得的质粒pKM2160Gal0 3 μ g与10单位限制性酶*Apa*I(Takara Shuzo制造)37°C反应1小时,然后和10单位限制性酶*Not*I(Takara Shuzo制造)37°C反应1小时。通过琼脂糖凝胶电泳分离反应溶液,回收大约0.47kb的*Apa*I-*Not*I片段。

下一步, 3 μ g上面获得的质粒pKANTEX2160LV0与10单位限制性酶*Apa*I(Takara Shuzo制造)37°C反应1小时,然后和10单位限制性酶*Not*I(Takara Shuzo制造)37°C反应1小时。通过琼脂糖凝胶电泳分离反应溶液,回收大约0.45kb的*Apa*I-*Not*I片段。

下一步,来源于pKM2160Gal0的目的*Apa*I-*Not*I片段和来源于质粒pKANTEX2160LV0的目的*Apa*I-*Not*I片段使用DNA连接试剂盒Ver.2(Takara Shuzo制造)的溶液I,根据产品的说明书进行连接。使用以此种方式获得的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造),每一质粒DNA从转化体克隆中制备。

这样获得的质粒的核苷酸序列作为结果,使用Big Dye Terminator Kit ver. 2 (Applied Biosystems制造)分析,证实得到图6显示的表达载体pKANTEX2160Gal0LV0,目的DNA已被克隆到该表达载体中。

另外,使用VH和VL上的相同的方法制备表达载体,其中包括HV0的其他FR的氨基酸残基被修饰。

具体的是, 22个表达载体pKM2160Gal0LV0, pKM2160Gal0LV1, pKM2160Gal0LV2, pKM2160Gal0LV3, pKM2160Gal1LV1, pKM2160Gal1LV3, pKM2160Gal2LV1, pKM2160Gal2LV3, pKM2160Gal3LV1, pKM2160Gal3LV3, pKM2160HV0LV0, pKM2160HV0LV1, pKM2160HV0LV2, pKM2160HV0LV3, pKM2160HV1LV0, pKM2160HV1LV1, pKM2160HV1LV2, pKM2160HV1LV3, pKM2160HV2LV0, pKM2160HV2LV3, pKM2160HV3LV0和pKM2160HV3LV3通过将实施例1的2(1)中构建的pKM2160Gal0, pKM2160Gal1, pKM2160Gal2, pKM2160Gal3, pKM2160HV0, pKM2160HV1, pKM2160HV2和pKM2160HV3与实施例1的2(2)中构建的pKM2160LV0, pKM2160LV1, pKM2160LV2和pKM2160LV3分别结合而构建。

实施例2

在动物细胞中表达抗CCR4 CDR移植抗体:

1. 使用COS-7细胞(ATCC CRL 1651)瞬时表达抗CCR4 CDR移植抗体
- (1) 在COS-7细胞中的瞬时表达

使用含有10%FCS的DMEM培养基(Bibco制造), 1×10^5 细胞/ml 的COS-7细胞以2 ml/孔分装在6孔板(Iwaki Glass制造)中, 37°C培养过夜。每100 μ l OPTI-MEM培养基(Bibco制造)中加入3 μ l Fu-GENETM 6 转

移试剂(Roche制造), 其中进一步加入1 μ g实施例1的2(3)项中获得的22种抗CCR4 CDR移植抗体的表达载体中的每一种, 混合物在室温下放置15分钟, 形成DNA-脂质体复合体。每种反应溶液逐滴加入至上述的COS-7细胞中, 完全混合, 然后37°C培养。培养72小时后, 回收培养上清液, 评价培养上清液中抗CCR4 CDR移植抗体作用的活性。

- (2) 人CCR4的抗CCR4 CDR移植抗体的反应性评价

得到的22种抗体的培养上清液的活性如下进行评价。

化合物1 (SEQ ID NO:37)被选作人CCR4细胞外区肽, 它可与抗CCR4嵌合抗体KM2760反应, 该抗体是在参考例2中制备的转化体KM2760 (FERM BP-7054)产生的。为了在通过ELISA的活性测定中使用化合物1, 制备其与BSA(牛血清白蛋白) (Nakalai Tesque制造)的结合物, 并用作抗原。即, 在旋涡条件下, 25 mg/ml SMCC (4-(N-马来酰

亚胺甲基)环己烷-1-羧酸N-羟基琥珀酰亚胺酯)(Sigma制造)-DMSO溶液100 ml逐滴加入至含有10mg BSA的900 ml PBS溶液中，并温和搅拌30分钟。1 ml反应溶液应用于已用25ml PBS平衡的一个凝胶过滤柱上，如NAP-10柱等，用1.5 ml PBS洗脱的洗脱液用作BSA-SMCC溶液(用A₂₈₀ 测定计算BSA浓度)。下一步，0.5 mg 化合物1中加入250 ml PBS，然后通过加入250ml DMF使化合物1完全溶解，然后在旋涡条件下加入上述的BSA-SMCC溶液(BSA含量: 1.25 mg)，温和搅拌3小时。反应溶液在PBS中4℃透析过夜，向其中加入叠氮化钠至终浓度为0.05%，然后得到的混合物使用0.22mm滤器过滤，得到BSA-化合物1溶液。

0.05 µg/ml制备的结合物以50 µl/孔分装至96孔ELISA板(Greiner制造)中，为了吸附，4℃静置过夜。用PBS漂洗后，以100 µl/孔加入含有1%BSA的PBS(此后称为"1% BSA-PBS")，在室温下反应1小时以阻断残留的活性基团。用含有0.05% Tween 20的PBS(此后称为"Tween-PBS")漂洗每个孔后，转化体的培养上清液以50 µl/孔加入，在室温下反应1小时。反应和随后用Tween-PBS漂洗每个孔之后，用1%BSA-PBS稀释6000倍的过氧化物酶标记的羊抗人IgG(γ)抗体溶液(American Qualex制造)作为二抗溶液，以50 µl/孔加入，在室温下反应1小时。反应和用Tween-PBS漂洗之后，50µl/孔加入ABTS 底物溶液(通过在1升0.1M柠檬酸盐缓冲液(pH 4.2)中溶解0.55g 2,2'-叠氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)胺制备的溶液，并正好在使用前加入1µl/ml过氧化氢)以显色，此后20分钟通过以50µl/孔加入5%SDS溶液终止反应。之后，在415nm测定吸光度。

同样，为了比较在培养上清液中产生的人IgG抗体的浓度，用PBS稀释2000倍的羊抗人IgG(γ)抗体 (American Qualex制造)用作抗原。

结果在图7和图8中显示。每种人CCR4 CDR移植抗体显示与人嵌合抗体KM2760几乎相同的活性。

2. 使用动物细胞稳定表达抗CCR4 CDR-移植抗体

使用实施例1的2(3)中获得的抗CCR4 CDR移植抗体的表达载体，在动物细胞中如下表达抗CCR4 CDR移植抗体。

(1) 在大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0细胞 (ATCC CRL 1581)中的稳定表达

通过将每种人 CDR 移植抗体的表达质粒用限制性酶 *AatII*(TOYOBO制造)消化, 该表达质粒被制成线性化状态, 10 μg 消化产物通过电穿孔(*Cytotechnology*, 3, 133 (1990))导入 4×10^6 个大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0 细胞(ATCC CRL 1581)的细胞中, 然后细胞在 40 ml
5 H-SFM (GIBCO-BRL 制造)培养基(添加 5% 胎牛血清(FBS))中, 以 200 μl /孔分配到 96 孔微量滴定板(Sumitomo Bakelite 制造)中。在 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养 1 至 3 天后, 往里加入 G418(Nakalai Tesque 制造)至浓度 1 mg/ml, 并继续培养 1 至 2 周获得 G418 抗性转化体。

从显示 G418 抗性的转化体克隆变融合的孔中回收培养上清液, 通过
10 过实施例 2 的 1(2)中显示的 ELISA 测定培养上清液中抗 CCR4 人 CDR 移植抗体的抗原结合活性。

为了增加抗体表达量, 采用 dhfr 基因扩增系统, 在培养上清液中发现表达抗 CCR4 嵌合抗体的孔中的转化体, 被悬浮在含有 1 mg/ml G418 和 50 nM 氨甲喋呤(此后称为“MTX”)的 H-SFM 培养基中, 达到 1 到 2×10^5
15 细胞/ml 的密度, 以 1 ml 一份分配至 24 孔板中(Greiner 制造), 所述氨甲喋呤是 dhfr 基因产物二氢叶酸还原酶的抑制剂。在 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养 1 至 2 周, 诱导显示 50 nM MTX 抗性的转化体。当转化体在孔中融合时, 通过实例 2 的 1(2)中所示的 ELISA 测定培养上清液中抗 CCR4 人 CDR 移植抗体的抗原结合活性。关于在培养上清液中发现表达抗 CCR4
20 人 CCR4 移植抗体的孔中的转化体, 通过上述方法增加 MTX 的浓度至 100 nM, 然后增加至 200 nM, 最终获得能够在含有 1 mg/ml G418 和 200 nM MTX 的 H-SFM 培养基中生长, 并也能够高表达抗 CCR4 人 CDR 移植抗体的转化体。对于这样获得的转化体, 通过限度稀释分析进行单细胞分离(克隆), 获得显示出抗 CCR4 人 CDR 移植抗体最高表达的转
25 化体细胞克隆。通过表达载体 pKANTEX2160Gal1LV3 基因转变获得的抗体生产细胞 KM8760 和通过表达载体 pKANTEX2160Gal2LV3 基因转变获得抗体生产细胞 KM8759 已经在 2002 年 7 月 30 日分别作为 FERM BP-8130 和 FERM BP-8129 存放在专利生物保藏中心, 独立行政法人产业技术综合研究所(AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome
30 Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 日本)。

(2)从培养上清液中纯化抗CCR4 CDR移植抗体

当显示G418抗性的转化体出现并融合时，培养基改变为300至1,100 ml 含有浓度为5%的Daigo's GF21 (Wako Pure Chemical Industries 制造)的H-SFM培养基，然后培养3至5天。当融合时，回收培养上清液。

- 5 通过使用Prosep-A柱(Millipore制造)，根据附带的说明书，从大约300至1,100ml 培养上清液中纯化抗CCR4 CDR移植抗体，获得纯化的蛋白质。

3. 纯化的抗CCR4 CDR移植抗体的活性评价

- 使用来自抗体生产细胞的抗CCR4 CDR移植抗体来评价活性，所述的细胞是通过将表达载体Gal0LV0, Gal0LV1, Gal0LV3, Gal1LV1, Gal1LV3, Gal2LV1, Gal2LV3, Gal3LV1和Gal3LV3导入YB2/0(此后分别简称为"Gal0LV0", "Gal0LV1", "Gal0LV3", "Gal1LV1", "Gal1LV3", "Gal2LV1", "Gal2LV3", "Gal3LV1"和"Gal3LV3 ")中获得的。

(1) 测定人CCR4的抗CCR4 CDR移植抗体的结合活性(ELISA 法)

- 15 以实施例2的1(2)项中所述方法相同的方式进行测定。结果在图9中显示。每种抗CCR4 CDR移植抗体显示与人嵌合抗体KM2760几乎相同的活性。

(2) 抗CCR4 CDR移植抗体与高度表达CCR4的人体细胞的反应性(荧光抗体技术)

- 20 2×10^5 或更多的CCR4/EL-4细胞，从参考例3中获得的高度CCR4表达细胞被分配到96孔板中。通过用FACS缓冲液稀释每种纯化的抗体和防止非特异性染色的人免疫球蛋白(Welfide制造)至浓度分别为10 $\mu\text{g/ml}$ 和3.75 mg/ml，制备抗体溶液，以100 μl /孔加入此抗体溶液，在冰中反应30分钟。作为阴性对照，使用10 $\mu\text{g/ml}$ 抗人IL-5受体 α 链抗体
- 25 (WO 97/10354)。用FACS缓冲液200 μl /孔漂洗两次后，以50 μl /孔加入稀释100倍的PE标记的抗人IgG抗体(Coulter制造)。在冰中避光反应，用FACS缓冲液200 μl /孔漂洗三次后，反应产物悬浮在500 μl FACS缓冲液中，使用流式细胞仪测定荧光强度。结果在图10中显示。所有抗CCR4 CDR移植抗体显示与人嵌合抗体KM2760几乎相同的活性。

- 30 (3) 测定抗CCR4 CDR移植抗体与人CCR4结合的活性(BIAcore法)

为了更详细的测定结合活性，如下采用BIAcore2000(BIACORE制造)测定多种纯化抗体的结合活性。在这种情况下，HBS-EP(BIACORE制造)用作稀释样品和测定的缓冲液。首先，0.05 µg/ml化合物1溶液5 µl作为生物素化的CCR4部分肽，以5 µl/分的流速加入至传感器头SA (BIACORE制造)上，并固定在传感器头上。

4 µg/ml每种纯化抗体溶液20 µl，以5 µl/分的流速加入到制备的生物素化的化合物1-固定的传感器头上，添加完毕后，监测解离反应4分钟，然后通过两次添加5 µl 10 mM HCl再生传感器头的表面。使用这种方法，就获得了化合物1的结合反应曲线(sensorgram)。

10 结果在图11中显示。纵坐标代表共振单位(RU)，表示传感器头上的质量变化。例如，1,000 RU对应大约1 ng/mm² 蛋白质的质量变化。显示KM 2760具有显著稳定的和高的结合活性，因为化合物1显示了时间依赖性的结合活性，很难在解离反应中发现其结合的解离。另一方面，每种抗CCR4 CDR移植抗体显示了与人嵌合抗体KM2760几乎相同的解离反应，但在化合物1与CCR4部分肽的结合反应中发现活性有轻微的降低。单独移植CDR的抗CCR4 CDR移植抗体GalOLV0显示最低的结合活性，FR氨基酸残基的修饰可增加结合活性。结果显示制备保持抗原结合活性和鼠抗体结合特异性的抗CCR4 CDR移植抗体，可通过将鼠抗体KM2160的CDR移植至合适的人抗体FR上，制备具有较高结合活性的抗CCR4 CDR移植抗体，可根据抗体V区的三维结构等鉴定对结合活性很重要的FR氨基酸残基，并将它们与CDR移植在一起。预计在本实施例中制备的抗CCR4 CDR移植抗体与CCR4具有很高的结合活性，与鼠抗体和人嵌合抗体相比在人体中的免疫原性下降，并具有很高的安全性和很高的治疗效应。

25 2.抗CCR4 CDR移植抗体的体外细胞毒活性(ADCC活性)

为了评价实施例2的2(2)中获得的纯化的抗CCR4 CDR移植抗体的体外细胞毒活性，如下测定其ADCC活性。

(1) 制备靶细胞悬液

在参考例3中获得的人CCR4高表达细胞CCR4/EL-4培养在含有30 10% FCS，和0.5 mg/ml G418的RPMI1640培养基(GIBCO制造)中，达到

1×10⁶ 细胞/0.5 ml的密度。往里加入1.85 MBq 当量的放射性铬酸钠 (Na₂⁵¹CrO₄) (Daiichi Pure Chemicals制造), 混合物在37°C反应1.5小时, 使同位素标记细胞。反应后, 将其在RPMI1640培养基中的悬浮并离心洗涤三次, 重新悬浮在培养基中, 然后在冰中4°C孵育30分钟, 自然释放放射性物质。离心后, 往里加入5ml含有10% FCS的RPMI 1640培养基, 达到2×10⁵ 细胞/ml的密度, 作为靶细胞悬液。

(2) 制备效应细胞悬液

使用含有200单位(200 μl)肝素钠注射液(Takeda Pharmaceutical制造)的注射器收集健康人的外周血(60 ml)。用相同体积的生理盐水 (Otsuka Pharmaceutical 制造) 将其稀释两倍, 总量达到120ml。Lymphoprep (NYCOMED制造)以5 ml分配至12管15ml容量的离心管 (Sumitomo Bakelite制造)中, 在其上面铺10ml稀释的外周血, 混合物在室温下800×g离心20分钟。从所有离心管中收集血浆层和Lymphoprep层之间的PBMC部分, 悬浮在含有1% FCS的RPMI 1640培养基(此后称为 "1% FCS-RPMI")中, 4°C, 400 × g, 5分钟离心两次洗涤, 然后重悬达到5×10⁶ 细胞/ml的密度, 用作效应细胞。

(3) 测定ADCC活性

在(1)中制备的靶细胞悬液以50 μl (1×10⁴ 细胞/孔)分配进U型底96孔板(Falcon制造)的孔中。下一步, 在(2)中制备的效应细胞以100 μl进行分配(5×10⁵ 细胞/孔, 效应细胞与靶细胞的比率为50 : 1)。下一步, 加入每种抗CCR4嵌合抗体达到终浓度为0.1 ng/ml至10 ug/ml, 混合物在37°C反应4小时。反应后, 平板离心, 每孔100 μl上清液中⁵¹Cr的量通过γ-计数器来测定。以上述相同的方式, 只是使用培养基代替效应细胞悬液和抗体溶液, 并测定上清液中的⁵¹Cr的量, 计算自然解离的⁵¹Cr的量。以上述相同的方式, 只是加入培养基代替抗体溶液, 和1 N 盐酸代替效应细胞悬液, 测定上清液中⁵¹Cr的量, 计算总解离⁵¹Cr的量。ADCC活性通过下列的等式计算:

$$\text{ADCC活性(\%)} = \frac{(\text{样品上清液中}^{51}\text{Cr的量}) - (\text{自发释放的}^{51}\text{Cr的量})}{(\text{}^{51}\text{Cr的总量}) - (\text{自发释放的}^{51}\text{Cr的量})} \times 100$$

结果在图12中显示。如在图12中所示，抗CCR4 CDR移植抗体具有很强的抗体浓度依赖性的细胞毒活性。

5. 抑制人PBMC产生细胞因子的效果

- 5 使用抗CCR4 CDR移植抗体Gal1LV3和嵌合抗体KM2760检测抑制细胞因子产生的效果。抗IL-5R抗体用作阴性对照。

以实施例2的4(2)中的相同方式分离PBMC，并以 1×10^6 细胞/孔分配进U型底96孔板中，加入评价的抗体至终浓度为 $1 \mu\text{g/ml}$ ，总量调整至 $200 \mu\text{l/孔}$ 。在 37°C 共培养24小时，气流为5% CO_2 ，诱导ADCC活性。培养后，去除 $100 \mu\text{l}$ 上清液，加入 $100 \mu\text{l}$ 含有 100 ng/ml PMA (佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯)和 $2 \mu\text{g/ml}$ 离子霉素(SIGMA制造)的培养基，至终浓度为 50 ng/ml PMA和 $1 \mu\text{g/ml}$ 离子霉素，刺激细胞诱导细胞因子产生。引入每次刺激后，培养24小时，回收培养上清液，使用细胞因子检测试剂盒(Biosource制造)测定IL-4, IL-13和干扰素(IFN)- γ 。产生的抑制比例的计算是通过在缺少抗体时每种细胞因子产生的定义为0%抑制率，结果在图13中显示。如在图13中所示，类似于嵌合抗体KM2760，加了抗CCR4 CDR移植抗体Gal1LV3的组明显抑制Th2细胞因子IL-4和IL-13的产生，但对Th1细胞因子IFN- γ 的影响很小。

20 此结果显示通过有效活化人效应细胞，每种抗CCR4 CDR移植抗体可减少或除去表达CCR4的Th2细胞，并作为结果，具有抑制Th2细胞产生Th2细胞因子的效应，因此可用于治疗或诊断人Th2介导的免疫疾病如支气管哮喘，异位性皮炎和类似疾病。

6. 分析人血小板的反应性

(1) 分离人血小板

25 向从健康人中收集的血液样品中加入1/10体积的3.2%柠檬酸钠，并完全混合。以5ml的量将血分配进15 ml容量管(Greiner制造)中，室温下 $90 \times g$ 离心10分钟。收集上清液，进一步在室温下 $1,950 \times g$ 离心10分钟。弃去上清液后，在FACS缓冲液中悬浮沉淀物，室温下 $1,190 \times g$ 离心5分钟洗涤沉淀物。再次在FACS缓冲液中悬浮沉淀物，以相同的方式离心，然后沉淀形式的血小板使用FACS缓冲液调整至大约 1×10^7 沉淀/ml的

30

密度。

(2) 血小板染色

实施例2的3项中获得的每种纯化的抗CCR4人CDR移植抗体加入100 μ l的6(1)项中获得的血小板悬液中至浓度10 μ g/100 μ l,在室温下避光反应30分钟。作为对比的对照,每种抗CCR4人嵌合抗体KM2760和抗鼠抗体1G1抗体(Pharmingen制造)与100ml相同浓度的血小板悬液反应。反应后,向每个15ml容量管中加入2 ml FACS缓冲液,搅拌混合物,然后840 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C离心5分钟洗涤。弃去上清液后,再次执行相同的操作。加入20 μ l用FACS缓冲液稀释50倍的PE-标记的抗鼠IgG抗体 (Coulter制造)至含有与每种人CDR移植抗体和KM2760反应的样品的管中,在室温下避光反应30分钟。关于含有与1G1抗体反应的样品的管,进一步加入50倍稀释的PE标记的抗鼠IgG抗体(DAKO制造) 20 μ l,在室温下避光反应30分钟。

反应后,向每管中加入2 ml FACS缓冲液,然后搅拌,4 $^{\circ}$ C下混合物840 $\times$ g离心5分钟洗涤。弃去上清液后,再次执行相同的操作。将残留物悬浮在500 μ l FACS缓冲液后,使用流式细胞仪EPICS XL-MCL(Beckman Coulter制造)测定荧光强度。

结果在图14中显示。作为对比性对照的1G1抗体显示与血小板的反应性,但所有抗CCR4人CDR移植抗体类似于抗CCR4人嵌合抗体KM2760并不显示与人血小板的特异反应性。

参考例1

制备产生鼠抗CCR4单克隆抗体的杂交瘤细胞:

产生鼠抗CCR4单克隆抗体KM2160 (., 11, 81 (1999))的杂交瘤细胞根据下面的步骤产生。

(1) 制备抗原

人CCR4(此后称为“hCCR4”)蛋白质的氨基酸序列(SEQ ID NO:48)使用Genetyx Mac来分析,在有高亲水性,N末端和C末端的部分中选择认为适合作为抗原的化合物2 (SEQ ID NO:36)作为部分序列。

(2) 制备免疫原

为了增加参考例1(1)中获得的hCCR4部分肽的免疫原性,通过下列

方法制备它与KLH (Calbiochem)的结合物后,它被用作免疫原。具体是, KLH溶解在PBS中达到浓度10 mg/ml, 往里逐滴加入1/10体积的25 mg/ml MBS(Nakalai Tesque制造), 通过搅拌混合物反应30分钟。通过凝胶过滤柱如Sephadex G-25柱去掉游离的MBS, 该柱预先用PBS或类似物平衡, 得到的2.5 mg KLH-MB与溶解在0.1 M磷酸钠缓冲液(pH 7.0)中的1 mg 肽混合, 然后室温下搅拌3小时。反应后, 在PBS中透析混合物。

(3) 免疫动物, 生产抗体产生细胞

参考例1(2)中制备的肽-KLH结合物100 μ g与2mg铝凝胶和 1×10^9 个百日咳疫苗细胞(Chiba Serum Institute制备)一起给予5-周龄雌性小鼠(Balb/c), 2周后, 每周给予一次100 μ g结合物, 总共4次。从每只动物的眼底静脉丛中抽取血样, 通过下面所述的酶免疫测定检测血清效价, 最后一次免疫后3天从小鼠身上切下脾脏, 其显示充分的抗体效价。最后给药后第三天从小鼠中切下脾脏, 并在MEM(Nissui Pharmaceutical制造)中切碎, 使用一镊子将细胞弄散, 离心(1,200 rpm, 5分钟), 去掉上清液, 然后用3 ml Tris-氯化铵缓冲液(pH 7.65)处理1至2分钟去除红细胞。剩余的细胞进一步用MEM漂洗3次, 作于细胞融合。

(4) 制备鼠骨髓瘤细胞

培养8-氮鸟嘌呤抗性的鼠骨髓瘤细胞系, P3X63Ag8U.1 (ATCC CRL-1597,此后称为"P3-U1"), 并在细胞融合中用作亲代细胞系。

(5)制备杂交瘤细胞

在参考例1(3)和(4)中获得的脾细胞和骨髓瘤细胞以10:1的比例混合, 然后离心(1,200 rpm, 5分钟)去掉上清液, 在37°C下, 这种沉淀的细胞每 10^8 脾细胞中加入0.5 ml聚乙二醇溶液(含有2g聚乙二醇-1000, 2ml MEM和0.7 ml DMSO的溶液), 然后完全悬浮。此后, 间隔1至2分钟, 几次加入1至2 ml MEM, 终体积用MEM调整至50 ml。离心(900 rpm, 5分钟)去上清液后, 沉淀悬浮在100 ml HAT培养基中, 以100 μ l/孔分配在96孔微量滴定板(Sumitomo Bakelite制造)中, 然后在5% CO₂的培养箱中37°C 培养10至14天。使用可观察到融合细胞增殖的孔, 通过ELISA(抗体 (Antibodies): 实验室手册(*A Laboratory Manual*), Cold

Spring Harbor Laboratory, 第14章(1988), 单克隆抗体(*Monoclonal Antibodies*): 原理和实践(*Principles and Practice*), Academic Press Limited (1966)等)测定在培养上清液中与hCCR4部分肽(化合物2)的结合活性。活性被确定的孔通过总共两次限度稀释克隆, 一次改变培养基为HT培养基, 然后改变培养基为正常培养基。以此方式, 获得了产生鼠抗体KM2160的杂交瘤细胞KM2160。KM2160与hCCR4部分肽(化合物2) 特异反应。

参考例2

制备抗CCR4嵌合抗体:

1. 分离和分析编码抗CCR4鼠抗体V区的cDNA:

(1) 从产生抗CCR4鼠抗体的杂交瘤细胞中制备mRNA

从参考例1中所述的杂交瘤细胞KM2160中制备mRNA。根据产品说明书, 使用mRNA制备试剂盒Fast Track mRNA分离试剂盒(Invitrogen制造), 从 8×10^7 个杂交瘤细胞KM2160中制备大约48 μg mRNA。

(2) 制备抗CCR4鼠抗体的H链和L链cDNA文库

根据产品说明书, 使用cDNA合成试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech制造)从参考例2的1(1)中获得的5 μg KM2160 mRNA中合成在两个末端都具有*EcoRI-NotI*适配子(adapter)的cDNA。由此制备的cDNA溶解在20 μl 无菌水中, 通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 使用QIA快速凝胶提取试剂盒(QIAGEN制备)分别回收对应IgG型抗体的H链的大约1.5kb的cDNA片段, 和对应 κ 型L链的大约1.0 kb的cDNA片段。下一步, 使用*EcoRI*/CIAP预消化处理的 λ ZAPII载体试剂盒(Stratagene制造), 每0.1 μg 大约1.5 kb的cDNA片段和0.1 μg 大约1.0 kb的cDNA片段连接于1 μg λ ZAPII 载体, 该载体根据产品的说明书已经用限制性酶*EcoRI*消化, 末端用小牛肠碱性磷酸酶脱磷酸化。连接后, 根据产品的说明书, 使用GigapackIII Gold Packing Extract(Stratagene制造), 2.5 μl 每种反应溶液被包装进 λ 噬菌体中, 然后用合适量的此噬菌体感染大肠杆菌XL1-Blue (*Biotechniques*, 5, 376 (1987)), 获得 9.3×10^4 噬菌体克隆作为KM2160的H链cDNA文库, 7.4×10^4 噬菌体克隆作为L链cDNA文库。然后根据产品的说明书每个噬菌体被固定在尼龙滤膜 (nylon membrane

filter) Hybond-N+(Amersham Pharmacia Biotech制造)上。

(3) 克隆抗CCR4鼠抗体的H链和L链cDNA

使用ECL直接核酸标记和检测系统(Amersham Pharmacia Biotech制造), 根据产品的说明书, 在参考例2的1(2)中制备的尼龙滤膜上的
5 KM2160 H链cDNA文库和L链cDNA文库的克隆, 用鼠抗体(H链是鼠Cyl cDNA的BamHI-EcoRI片段(*EMBO J.*, 3, 2047 (1984)), L链是Ck cDNA的HpaI-EcoRI片段(*Cell*, 22, 197 (1980))C区的cDNA作为探针进行探测, 每一H链和L链中获得与探针强结合的噬菌体的10个克隆。下一步, 根据产品的说明书, 使用λZAPII克隆试剂盒(Stratagene制造),
10 每个噬菌体克隆通过体内切割法转变为质粒。使用BigDye终止子循环测序FS备用反应试剂盒(PE Biosystems制造), 以这种方式获得的每种质粒中含有的cDNA的核苷酸序列用相同生产厂家的DNA测序仪ABI PRISM 377, 根据产品的说明书来分析。结果, 获得了含有H链全长功能性cDNA的质粒pKM2160H4, 和含有L链全长cDNA的质粒
15 pKM2160L6, 其中ATG序列被认为是存在于cDNA 5'末端的起始密码子。

(4) 分析抗CCR4鼠抗体V区的氨基酸序列

包含在质粒pKM2160H4中的H链V区的全长核苷酸序列, 由其推测的H链V区的全长氨基酸序列, 包含在质粒pKM2160L6中的L链V区的全长核苷酸序列, 由此推测的L链V区的全长氨基酸序列分别表示为
20 SEQ ID NO:61, 62, 63和64。根据与已知鼠抗体的序列数据的比较(*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)), 与使用蛋白质测序仪(PPSQ-10, Shimadzu制造)进行的纯化抗CCR4鼠抗体KM2160的H链和L链N末端氨基酸序列
25 分析的结果比较, 发现由此分离的每种cDNA是编码含有分泌信号序列的抗CCR4鼠抗体KM2160的全长cDNA, 该信号序列是在H链的氨基酸序列中1-19位的氨基酸, 由SEQ ID NO:15表示, 在L链的氨基酸序列中1-19位的氨基酸, 由SEQ ID NO:25表示。

下一步, 检测抗CCR4鼠抗体KM2160的H链和L链的V区氨基酸序列
30 的新颖性。使用GCG程序包(版本9.1, Genetics Computer Group制造)

作为序列分析系统，用BLAST法搜索已知蛋白质的氨基酸序列数据库 (*Nucleic Acids Res.*, 25, 3389 (1997))。结果，H链和L链都没有发现完全相同的序列，这样证实了抗CCR4鼠抗体KM2160的H链V区和L链V区是新的氨基酸序列。

- 5 通过比较已知抗体的氨基酸序列也确定了抗CCR4鼠抗体KM2160的H链V区和L链V区的CDR。抗CCR4鼠抗体KM2160H链V区中的CDR1，CDR2和CDR3的氨基酸序列分别表示为SEQ ID NO:1, 2和3，L链V区中的CDR1，CDR2和CDR3氨基酸序列分别表示为SEQ ID NO:5, 6和7。

10 2. 使用动物细胞稳定表达抗CCR4嵌合抗体

(1) 构建抗CCR4嵌合抗体表达载体pKANTEX2160

抗CCR4嵌合抗体表达载体pKANTEX2160构建如下，使用表达人IgG1和κ型抗体的人源化抗体表达载体pKANTEX2160H4和参考例2的1(3)中获得的质粒pKM2160H4和pKM2160L6。

- 15 通过PCR设计具有SEQ ID NO:65和66所示的核苷酸序列的合成DNA，以获得KM2160的H链V区cDNA，另一个合成DNA具有SEQ ID NO: 67和68所示核苷酸序列，以获得L链V区cDNA。每个合成DNA为了克隆进pKANTEX93，在其5'末端含有一个限制性酶识别序列，DNA的合成委托给Genset Inc.。参考例2的1(3)中获得的质粒pKM2160H4 (20
20 ng)加入至含有50 μl PCR 缓冲液#1，该缓冲液是KOD DNA聚合酶(TOYOBO制造)附带的，0.2 mM dNTPs, 1 mM氯化镁和0.5 μM 具有SEQ ID NO:11和12所示核苷酸序列的合成DNA的缓冲液中，混合物在94°C加热3分钟。加入2.5单位KOD DNA聚合酶(TOYOBO制造)后，混合物反应25个循环，每个循环包括94°C加热30秒，58°C 30秒，74°C 1
25 分钟，使用DNA热循环仪GeneAmp PCR系统9600 (PERKIN ELMER制造)。以相同的方式，20 ng参考例2的1(3)中获得的质粒pKM2160L6加入至含有50 μl PCR 缓冲液#1，该缓冲液是KOD DNA聚合酶(TOYOBO制造)附带的，0.2 mM dNTPs, 1 mM氯化镁和0.5 μM 具有SEQ ID NO:67和68所示核苷酸序列的合成DNA的缓冲液中，PCR以上
30 述相同的方式进行。反应溶液(10 ul)进行琼脂糖凝胶电泳，然后用QIA

快速凝胶提取试剂盒(QIAGEN制造)回收每一个大约0.46kb的H链V区的PCR产物和大约0.43kb的L链V区的PCR产物。

下一步, 通过用限制性酶 *Sma*I (Takara Shuzo 制造) 消化质粒 pBluescript SK(-) (Stratagene制造), 获得的0.1 μ g DNA, 和上面获得的大约0.1 μ g 每种PCR产物加入至无菌水中, 至终体积7.5 μ l, 往里加入7.5 μ l TAKARA DNA 连接试剂盒Ver. 2 (Takara Shuzo制造)的溶液I和0.3 μ l限制性酶 *Sma*I, 混合物22 $^{\circ}$ C反应过夜。使用得到的重组质粒DNA溶液, 转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造)。每一质粒DNA从转化体克隆中制备, 使用BigDye终止子循环测序仪FS备用反应试剂盒(PE Biosystems制造), 根据产品的说明书进行反应, 核苷酸序列使用相同厂家的DNA测序仪ABI PRISM 377来分析。因此获得了图15中显示的具有所需核苷酸序列的质粒pKM2160的VH41 和pKM2160的VL61。

下一步, 3 μ g人源化抗体表达载体pKANTEX93和3 μ g 上面获得的pKM2160的VH41加入至含有30 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM氯化镁和1 mM DTT的缓冲液中, 向其中加入10 单位限制性酶 *Apa*I (Takara Shuzo制造), 混合物在37 $^{\circ}$ C反应1小时。反应溶液用乙醇沉淀, 得到的沉淀加入至含有10 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM氯化钠, 10 mM氯化镁, 1 mM DTT, 100 μ g/ml BSA和0.01% Triton X-100的缓冲液中, 向其中加入10单位限制性酶 *Not*I (Takara Shuzo制造), 混合物在37 $^{\circ}$ C反应1小时。反应混合物通过琼脂糖凝胶电泳分离, 分别回收pKANTEX93 和pKM2160的VH41的大约12.75 kb和大约0.44 kb的 *Apa*I-*Not*I片段。由此获得的两个片段使用TAKARA DNA连接试剂盒Ver. 2, 根据产品的说明书进行连接, 使用得到的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造)。每一质粒DNA从转化体克隆中制备, 通过限制性酶处理证实, 获得图16中的质粒pKANTEX2160H, 其中已经插入了所需的大约0.44 kb的 *Apa*I-*Not*I 片段。

下一步, 3 μ g pKANTEX2160H和3 μ g从上面获得的pKM2160的VL61加入至含有50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM氯化钠, 10 mM氯化镁, 1 mM DTT 和100 μ g/ml BSA的缓冲液中, 调整溶液的总体积至30 μ l, 向其中加入10单位限制性酶 *Bsi*WI (New England Biolabs制造), 混

合物在55°C反应1小时。然后向其中加入限制性酶*EcoRI* (Takara Shuzo 制造), 混合物在37°C反应1小时。反应混合物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 分别回收pKANTEX2160H和pKM2160的VL61的大约13.20 kb 和大约0.41 kb的*EcdRI-BsiWI* 片段。由此获得的两个片段使用
5 TAKARA DNA连接试剂盒Ver. 2, 根据产品的说明书进行连接, 用得到的重组质粒DNA溶液转化大肠杆菌DH5 α (TOYOBO制造)。每一质粒DNA从转化体克隆中制备, 通过限制性酶处理证实, 获得图17中的质粒pKANTEX2160, 其中已经插入了所需的大约0.41 kb的*EcoRI-BsiWI* 片段。当质粒使用BigDye终止子循环测序仪FS备用反应试剂盒(PE
10 Biosystems制造), 根据产品的说明书进行反应时, 其核苷酸序列使用相同厂家的DNA测序仪ABI PRISM 377来分析, 证实已经获得了所需的质粒, 编码KM2160 H链和L链V区的cDNA已经被克隆进质粒中。

(2) 使用动物细胞稳定表达抗CCR4 嵌合抗体

如下所述, 使用参考例2的2(1)中获得的抗CCR4嵌合抗体表达载体
15 pKANTEX2160, 在动物细胞中表达抗CCR4嵌合抗体。

通过用限制性酶*AatII* (TOYOBO制造)消化, 质粒pKANTEX2160 转变为线性形式, 其10 μ g 通过电穿孔被导入进 4×10^6 个鼠骨髓瘤细胞系YB2/0 (ATCC CRL1662)中(Cytotechnology, 3, 133 (1990)), 细胞悬浮在40 ml H-SFM (GIBCO-BRL制造)培养基(添加5% FCS)中, 并以200 μ l/
20 孔分配于96孔微量滴定板(Sumitomo Bakelite制造)中。在5% CO₂的培养箱中37°C 培养 (incubation) 24小时后, 加入G418至浓度1 mg/ml, 然后培养1至2周。从出现G418抗性转化体克隆, 并融合的孔中回收培养上清液, 上清液中抗CCR4嵌合抗体的抗原结合活性用参考例2的2(3) 中所示的ELISA来检测(过氧化物酶标记的羊抗人IgG(γ)抗体用作二
25 抗)。

为了增加抗体的表达量, 使用dhfr基因扩增系统, 发现在培养上清液中有抗CCR4嵌合抗体表达的孔中的转化体悬浮在含有1 mg/ml G418 和50 nM氨甲喋呤(此后称为"MTX": Sigma制造) 的H-SFM培养基中, 至1到 2×10^5 细胞/ml的密度, 氨甲喋呤是dhfr基因产物二氢叶酸还原酶的抑制剂, 悬液以1ml分配进24孔板的孔中(Greiner制造)。混合物在
30

37°C , 5% CO₂的培养箱中培养1至2周, 因此诱导出对50 nM MTX显示抗性的转化体。当转化体在孔中融合时, 培养上清液中抗CCR4嵌合抗体的抗原结合活性用参考例2的2(3)中所示的ELISA来测定。对于在培养上清液中发现有抗CCR4嵌合抗体的表达的孔中的转化体, MTX
5 浓度增加至100 nM, 然后以相同的方式增加至200 nM, 最终获得的转化体可在含有1 mg/ml G418和200 nM MTX的H-SFM培养基生长, 并能高表达抗CCR4嵌合抗体由此得到的转化体通过两次限度稀释测定进行单细胞分离(克隆), 具有最高的抗CCR4嵌合抗体表达的转化体克隆命名为KM2760。KM2760的抗CCR4嵌合抗体表达量大约为5 µg/10⁶ 细胞/24小时。另外, KM2760抗体的H链C区属于人IgG1亚型。KM2760已经在国际上作为FERM BP-7054, 于2000年2月24日, 存放在国际生物科学和人类技术学会 (National Institute of Bioscience and Human and Human Technology,), 工业科学和技术机构(Agency of Industrial Science and Technology), 世界贸易和工业部(Ministry of International Trade and Industry)(现名: 专利生物保藏中心, 独立行政法人产业技术综合研究所)(Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki Prefecture, 日本(现地址: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan))。

参考例3

20 建立高表达hCCR4的细胞:

(1) 构建动物细胞表达载体CAG-pcDNA3

如下所述, 通过产生表达载体(CAG-pcDNA3)而构建表达载体, 其中动物细胞表达载体pcDNA3 (INVITROGEN制造)的启动子区从巨细胞病毒(CMV)启动子改变为CAG(AG (修饰的鸡β肌动蛋白)启动子, 含有CMV-IE增强子), 并将CCR4基因插入至载体中。

25 pcDNA3 (5 µg)与限制性酶*NruI*(Takara Shuzo制造) 在37°C反应1小时, 然后通过乙醇沉淀回收DNA片段。下一步, 它们与限制性酶*HindIII* (Takara Shuzo制造)37°C反应1小时, 然后通过琼脂糖凝胶电泳分离, 回收含有无CMV启动子区的大约5.8 kb的DNA片段。具有CAG启动子区的质粒CAG-pBluescript IKS(+)(Nuc. Acid Res., 23, 3816
30

(1995)) (3 μ g)与限制性酶*Sa*I (Takara Shuzo制造)在37°C反应1小时, 然后通过乙醇沉淀回收DNA片段。它们用DNA平末端试剂盒(Takara Shuzo制造)平末端化, 进一步与*Hind*III 37°C反应1小时, 然后通过琼脂糖凝胶电泳分离, 回收含有CAG启动子区的大约1.8kb的DNA片段。

- 5 分别回收的DNA片段用DNA连接试剂盒(Takara Shuzo制造)进行连接, 采用得到的重组质粒DNA转化大肠杆菌DH5 α , 获得质粒CAG-pcDNA3。

(2) 构建hCCR4表达载体

- 如下所述, 用参考例2的3(1)中获得的CAG-pcDNA3和hCCR4
10 DNA-插入的pcDNA3 (CCR4/pcDNA3)构建hCCR4表达载体。CAG-pcDNA3和CCR4/pcDNA3都在37°C与*Hind*III 反应1小时, 通过乙醇沉淀回收DNA片段。下一步, 它们与*Bg*III (Takara Shuzo制造)37°C 反应1小时, 然后通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 回收含有CAG启动子区的大约2.0kb的DNA片段, 和含有hCCR4基因区的大约5.5kb的DNA片
15 段。此后, 以参考例2的3(1)中的相同方式, 使用那两种DNA片段, 获得质粒CAG-CCR4/pcDNA3。

(3) 动物细胞中hCCR4的表达

- 如参考例2的2(2)中所述的相同方式, 通过电穿孔将质粒导入进动物细胞中。EL-4细胞(ATCC TIB-39)悬浮在PBS(-)(GIBCO-BRL制造)中
20 至 1×10^7 细胞/500 μ l的密度, 向其中加入在参考例2的3(2)中获得的10 μ g CAG-CCR4/pcDNA3, 混合物在冰中孵育10分钟, 然后置入专用的杯中 (Bio-Rad制造), 在260 V 和500 μ FD下进行基因导入。混合物进一步在冰中孵育10分钟后, 细胞悬浮在200 ml 10% FCS-RPMI培养基中, 并以200 μ l/孔分配进96孔板中进行细胞培养。培养24小时后, 从每
25 孔中移去100 μ l 培养上清液, 以100 μ l/孔加入含有1 mg/ml G418的10% FCS-RPMI培养基, 得到终浓度为0.5 mg/ml。两周后, 选择10和100之间的单个克隆, 并再次培养。

(4)选择hCCR4高表达的细胞

- 使用参考例1的(5)中制备的KM2160通过免疫荧光法选择它们。选择出
30 的数十个基因已导入的克隆中的每一种取 2×10^5 细胞分配进U形96孔

板中。通过已知方法用生物素标记的KM2160(酶抗体方法 (*Enzyme Antibody Method*), Gakusai Kikaku出版)用FACS缓冲液(1% BSA-PBS, 0.02% EDTA, 0.05% NaN₃, pH 7.4)稀释为5 µg/ml, 人IgG (Welfide制造)稀释为3.75 mg/ml以防止非特异性染色, 由此稀释的每种抗体溶液以
5 200 µl/孔进行分配, 混合物在冰中反应30分钟。作为阴性对照, 使用相同浓度的生物素化的抗IL-5R抗体(WO 97/10354)。用缓冲液200 µl/孔漂洗两次后, 链亲和素 (streptoavidin) -PE (Becton Dickinson Japan制造)以20 µl/孔进行分配。避光在冰上反应30分钟后, 细胞以200 µl/孔漂洗3次, 最终悬浮至500 µl, 通过流式细胞仪测定荧光密度, 选择具有最高
10 荧光强度的细胞系。使用的具有最高荧光强度的细胞系作为CCR4/EL-4。

当发明已被详细描述时, 根据其具体的实施例, 对本领域的技术人员来说它将是显而易见的, 即在那里可作各种不偏离本发明的精神和范围的改变和修饰。所有引用的参考文献在此完整合并。

15 本申请是根据在2001年8月31日提交的日本申请2001-265144号, 其全部内容在此合并为参考文献。

工业应用性

如上所述, 根据本发明, 其中可与人CCR4特异结合的重组抗体或其抗体片段, 含有CCR4的新CDR。本发明的抗体可用诊断或治疗CCR4
20 相关疾病。具体是, 通过免疫细胞染色, 可用于免疫学检测人Th2细胞, 并可诊断或治疗所有Th2介导的免疫疾病, 包括支气管哮喘和异位性皮肤病疾病, 由于Th2细胞的异常平衡和包括血癌如白血病在内的癌症引起病情进展的疾病。

25 序列列表正文

SEQ ID NO:4--人工序列的说明: 合成肽

SEQ ID NO:8--人工序列的说明: 合成肽

SEQ ID NO:9--人工序列的说明: 合成肽

SEQ ID NO:10-人工序列的说明: 合成肽

30 SEQ ID NO:11-人工序列的说明: 合成肽

SEQ ID NO:12-人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:13-人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:14-人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:16-人工序列的说明: 合成DNA
5 SEQ ID NO:17-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:18-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:19-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:20-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:21-人工序列的说明: 合成DNA
10 SEQ ID NO:22-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:23-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:24-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:26-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:27-人工序列的说明: 合成DNA
15 SEQ ID NO:28-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:29-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:30-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:31-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:32-人工序列的说明: 合成DNA
20 SEQ ID NO:33-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:34-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:35-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:38-人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:39-人工序列的说明: 合成肽
25 SEQ ID NO:40-人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:41-人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:42-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:43-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:44-人工序列的说明: 合成DNA
30 SEQ ID NO:45-人工序列的说明: 合成DNA

SEQ ID NO:46-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:47-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:49-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:50-人工序列的说明: 合成DNA
5 SEQ ID NO:51-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:52-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:53-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:54-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:55-人工序列的说明: 合成DNA
10 SEQ ID NO:56-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:57-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:58-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:59-人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:60-人工序列的说明: 合成DNA
15 SEQ ID NO:65 -人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:66--人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:67--人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:68--人工序列的说明: 合成DNA
SEQ ID NO:69--人工序列的说明: 合成DNA
20 SEQ ID NO:70--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:71--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:72--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:73--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:74--人工序列的说明: 合成肽
25 SEQ ID NO:75--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:76--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:77--人工序列的说明: 合成肽
SEQ ID NO:78--人工序列的说明: 合成肽

<110>协和发酵工业株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD.)

<120>人CDR-移植抗体及其抗体片段

<130> P-41263

<140> 日本 2001-265144

<141> 2001-08-31

<160> 83

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213>小鼠 (Mus Musculus)

<400> 1

Asn Tyr Gly Met Ser

1

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 2

Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 3

His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 5

Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 6

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 7

Phe Gln Gly Ser Leu Leu Phe Trp Thr
1 5

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

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

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213>人工序列

<220>
 <223> 合成肽

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

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213>人工序列 合成肽

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 12

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 13
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213>人工序列

<220>
<223>合成肽

<400> 14
Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 15
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 16
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 16
 aacagctatg accatggcgg ccgcgacccc tcaccatgaa cctcgggctc agtttgattt 60
 tccttgccct cattttaaaa ggtgtccagt gtgaggtg 98

<210> 17
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 17
 atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggacctcc caggctgtac caagtctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt 97

<210> 18
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 18
tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60
gggaaggggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtgc 98

<210> 19
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 19
acagggagtt cttggcattg tctctggaga tggatgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60
aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgcgacc 98

<210> 20
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 20
acaatgccaa gaactccctg tatctgcaga tgaacagcct gagagtcgag gacacggccc 60
tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 21
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 21
 gtaaaacgac ggccagtggg cccttgggtgg aggctgagga gacggtgacc agggttccct 60
 ggccccaata accaaacgcg aagtttccat cgctat 96

<210> 22
 <211> 17
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 22
 gatggttcac gtagtgg 17

<210> 23
 <211> 61
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 23
 ctgtatctgc agatgaacag cctgagagtc gaggacacgg ccctgtatta ctgtggaaga 60
 c 61

<210> 24
 <211> 56
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 24
 gaataagtgc tagcactact aatggttgcg acccactcca gcctcttgtc tggagc 56

<210> 25
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400>25
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser

<210> 26
<211> 92
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 26
aacagctatg accatggaat tcgcctcttc aaaatgaagt tgcctgtag gctgttggtg 60
ctgatgttct ggattcctgc ttccagcagt ga 92

<210> 27
<211> 94
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 27
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcaggag agtggagact 60
gagtcacac gatatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 28
<211> 92
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 28
ctccatctcc tgcagatcta gtcggaacat tgttcataatt aatggtgaca catatttaga 60
atggtacctg cagaagccag gccagtctcc ac 92

<210> 29
<211> 93
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 29
tgtgcctgac ccactgccac tgaacctgtc tgggacccca gaaaatcggt tggaaacttt 60
atagatcagg agctgtggag actggcctgg ctt 93

<210> 30
<211> 92
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 30
tggcagtggg tcaggcacag atttcacact gaaaatcagc agagtggagg ctgaggatgt 60
tggggtttat tactgctttc aaggttcact tc 92

<210> 31
<211> 91
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 31
gtaaaacgac ggccagtctc gagcgtagct ttgatttcca ccttggtccc ttggccgaac 60
gtccacggaa gaagtgaacc ttgaaagcag t 91

<210> 32
<211> 17
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 32
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 33
<211> 94
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 33
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
gagtcacac aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 34
<211> 94
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 34
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
gagtcacaa gatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 35
<211> 94
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 35
tagatctgca ggagatggag gccggctctc caggggtgac gggcagggag agtggagact 60
gagtcacaa aacatcactg ctggaagcag gaat 94

<210> 36
<211> 28
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 36
Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr Ser
1 5 10 15
Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
20 25

<210> 37
<211> 18
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 37

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
 1 5 10 15

Pro Cys

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

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

115

<210> 41
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 42
 gtgaatccag aggtgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60
 ccagactcca ccagctgcac ctcaactgg acacctt 97

<210> 43
 <211> 98

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 43
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 44
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 44
acagcgtggt cttggaattg tctctggaga tggatgaatcg tcccttcaca ctgtctggat 60
aataggaata agtgctagca ctactaatgg ttgagacc 98

<210> 45
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 45
acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60
tgtattactg tgcgagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 46
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成DNA

<400> 46
tgtgcagcct ctggattcat tttcagtaat tatggcatgt cttgggtccg ccaggctcca 60
gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtgc 98

<210> 47
 <211> 98
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 47
 acaattccaa gaacacgctg tatctgcaga tgaacagcct gagagccgag gacacggccg 60
 tgtattactg tggaagacat agcgatggaa acttcgcg 98

<210> 48
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 48
 Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr
 1 5 10 15
 Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu
 20 25 30
 Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu
 35 40 45
 Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu
 50 55 60
 Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn
 65 70 75 80
 Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly
 85 90 95
 Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met
 100 105 110
 Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val
 115 120 125
 Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe
 130 135 140
 Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala
 145 150 155 160
 Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser
 165 170 175

Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205
 Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
 210 215 220
 Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
 225 230 235 240
 Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255
 Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270
 Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285
 Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300
 Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320
 Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335
 Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350
 Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355

<210> 49
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)
 <223> 合成DNA

<400> 49

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 50
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (357)
 <223> 合成DNA

<400> 50
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> 合成DNA

<400> 51

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                90                95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
                100                105                110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115

<210> 52
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> 合成DNA

<400> 52
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac ttg gta cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg
    1                5                10                15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
                20                25                30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca gac aag agg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
                35                40                45

gca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
                50                55                60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tcc ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
                65                70                75                80

ctg cag atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gcc ctg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                90                95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
                100                105                110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                357

```

115

<210> 53
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (336)
 <223> 合成DNA

<400> 53
 gat atc gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30
 aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 54
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (336)
 <223> 合成DNA

<400> 54

gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 55

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (336)

<223> 合成DNA

<400> 55

gat atc ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
 20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 56
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)
<223> 合成DNA

<400> 56
gat gtt ttg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tct agt cgg aac att gtt cat att 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile Val His Ile
20 25 30

aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt ggg tca ggc aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336

Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (357)
 <223> 合成DNA

<400> 57
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ser Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 58
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<223> 合成DNA

<400> 58

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Ala Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 59

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (357)

<223> 合成DNA

<400> 59

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

```

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
                20                25                30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
                50                55                60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
                65                70                75                80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
                100                105                110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115

```

357

<210> 60
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)
 <223> 合成DNA

```

<400> 60
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
    1                5                10                15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt aat tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asn Tyr
                20                25                30

ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45

```

tca acc att agt agt gct agc act tat tcc tat tat cca gac agt gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag gga cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg ggc cag gga 336
 Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 61

<211> 414

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (414)

<400> 61

atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48
 Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
 20 25 30

cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45

agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg 192
 Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu
 50 55 60

gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct agt act tat tcc tat tat cca 240
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn

85										90					95					
tcc	cta	tat	ctg	caa	atg	aat	agt	ctg	agg	tct	gag	gac	aca	ggc	ata	336				
Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Gly	Ile					
			100					105					110							
tat	tac	tgt	gga	aga	cat	agc	gat	gga	aac	ttc	gcg	ttt	ggt	tat	tgg	384				
Tyr	Tyr	Cys	Gly	Arg	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Phe	Ala	Phe	Gly	Tyr	Trp					
		115					120					125								
ggc	cga	ggg	act	ctg	gtc	act	gtc	tct	gca							414				
Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala											
		130				135														

<210> 62

<211> 138

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 62

Met	Asn	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Phe	Leu	Ala	Leu	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10					15	

Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Met	Lys
			20					25					30		

Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe
			35				40					45			

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

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

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

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

Tyr	Tyr	Cys	Gly	Arg	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Phe	Ala	Phe	Gly	Tyr	Trp
		115					120					125			

Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala						
		130				135									

<210> 63

<211> 396

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (396)

<400> 63

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
 35 40 45

gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg 192
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60

ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125

gaa atc aga cgg 396
 Glu Ile Arg Arg
 130

<210> 64

<211> 132

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus Musculus)

<400> 64

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

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

<210> 65
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 65
 aaggaaaaaa gcggccgcga cccctcacca tgaacctcg 39

<210> 66
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成DNA

<400> 66
 cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccag 39

<210> 67
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 67

ccggaattcg cctcctcaaa atgaagttgc c

31

<210> 68

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 68

agccaccgta cgtctgattt ccagcctggt g

31

<210> 69

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成DNA

<400> 69

atgaatccag aggctgcaca ggagagtctc agggaccccc caggctgtac caagcctccc 60

ccagactcca ccagctgcac ctcacactgg acacctt

97

<210> 70

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 70

Asn	Pro	Thr	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser
1				5					10					15	

Asn	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Lys	Pro	Cys
			20					25			

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 71

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys
1 5 10 15

Pro Cys

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 72

Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro
1 5 10 15

Cys

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 73

Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 74

Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys
1 5 10 15

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 75
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Cys
1 5 10

<210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 76
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Cys
1 5 10

<210> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 77
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Cys
1 5 10

<210> 78
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 78
Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Cys
1 5 10

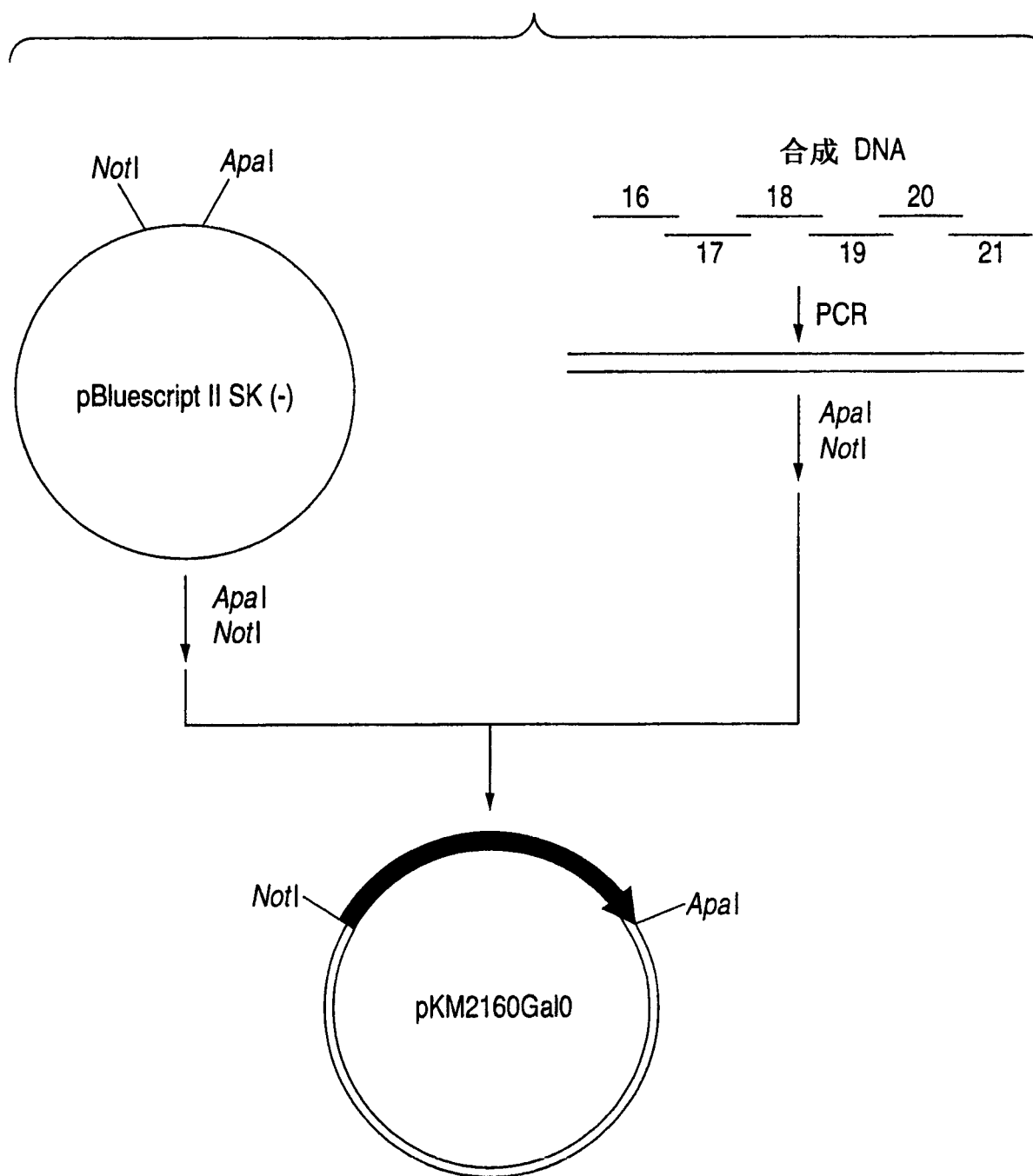


图1

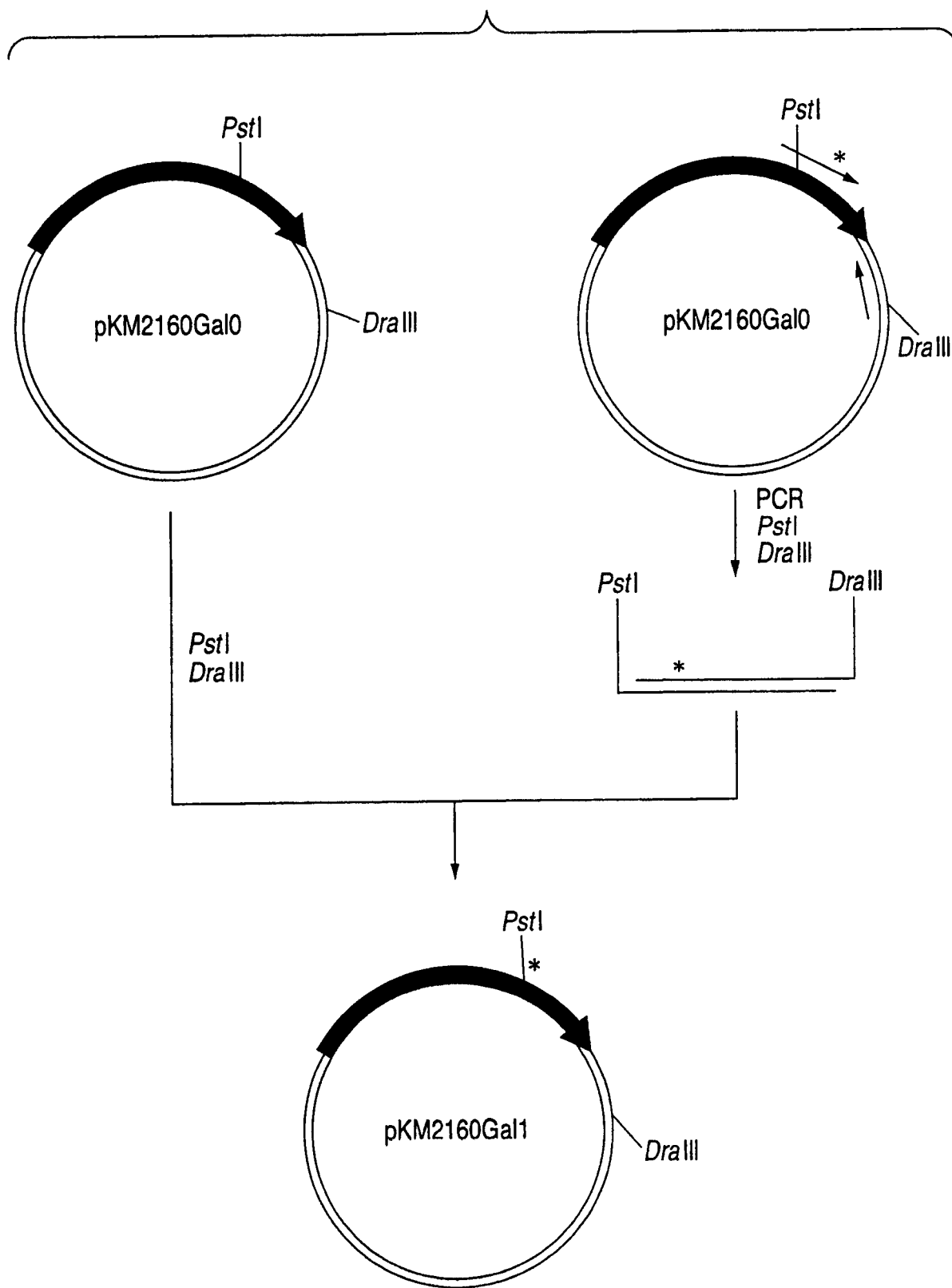


图2

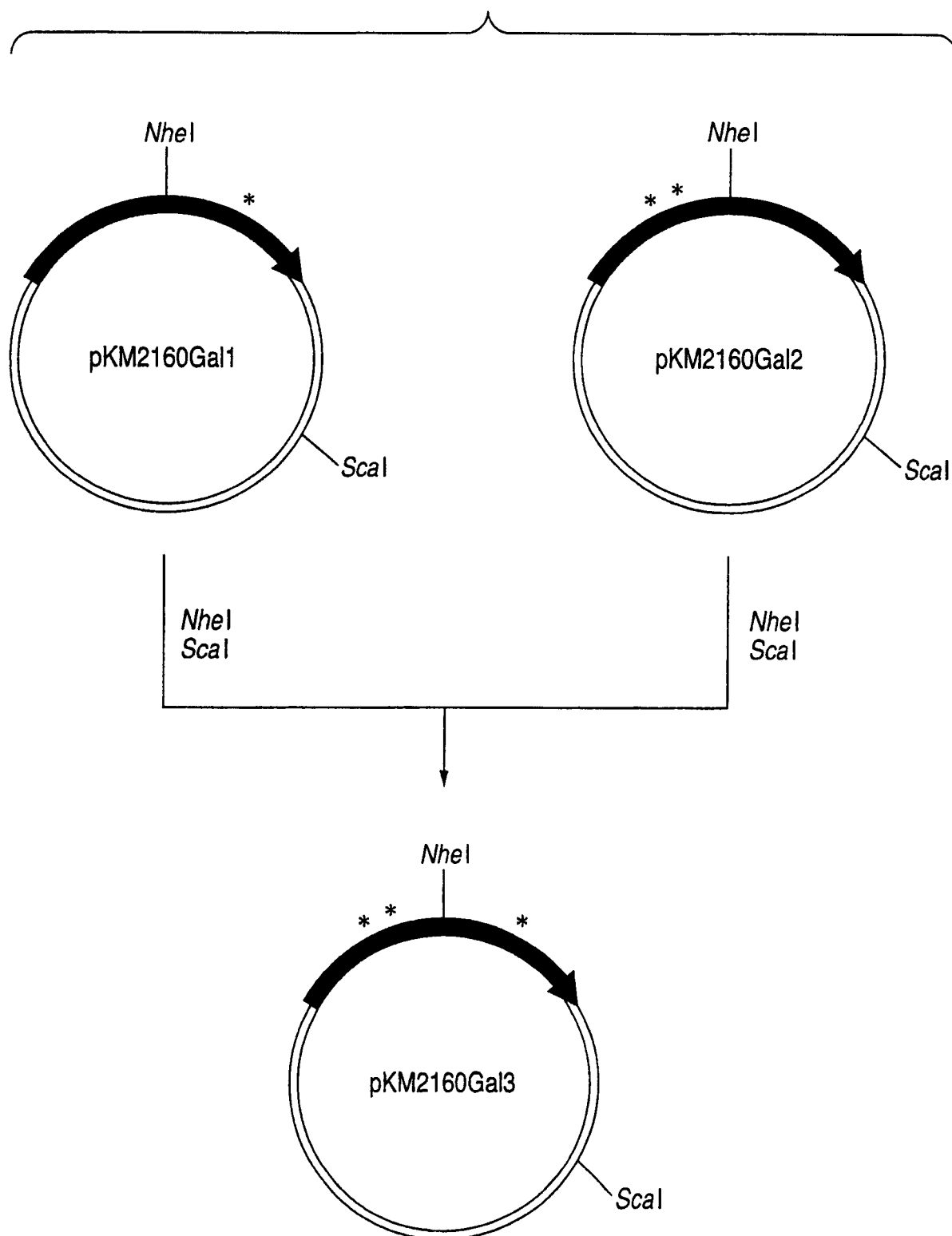


图3

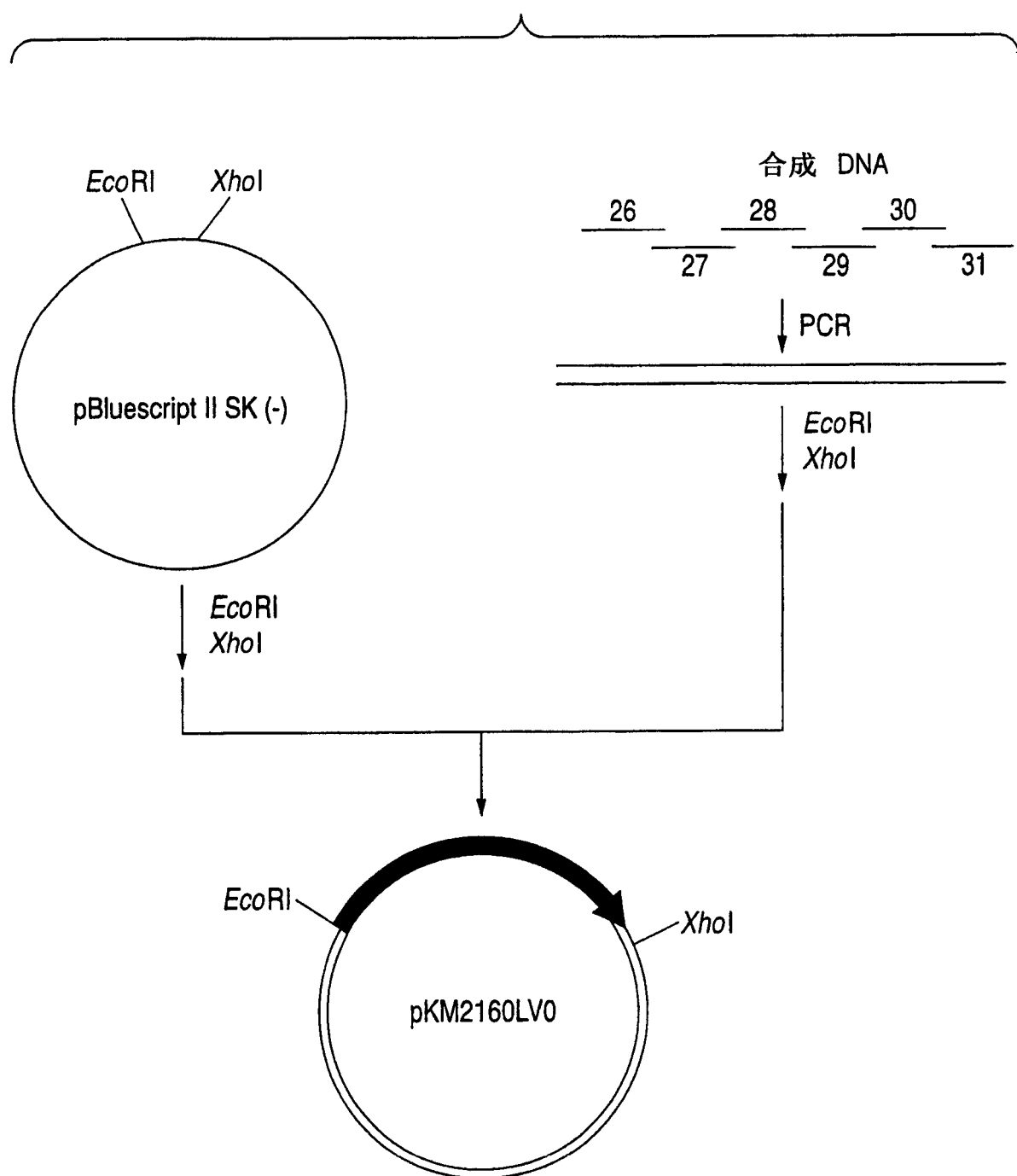


图4

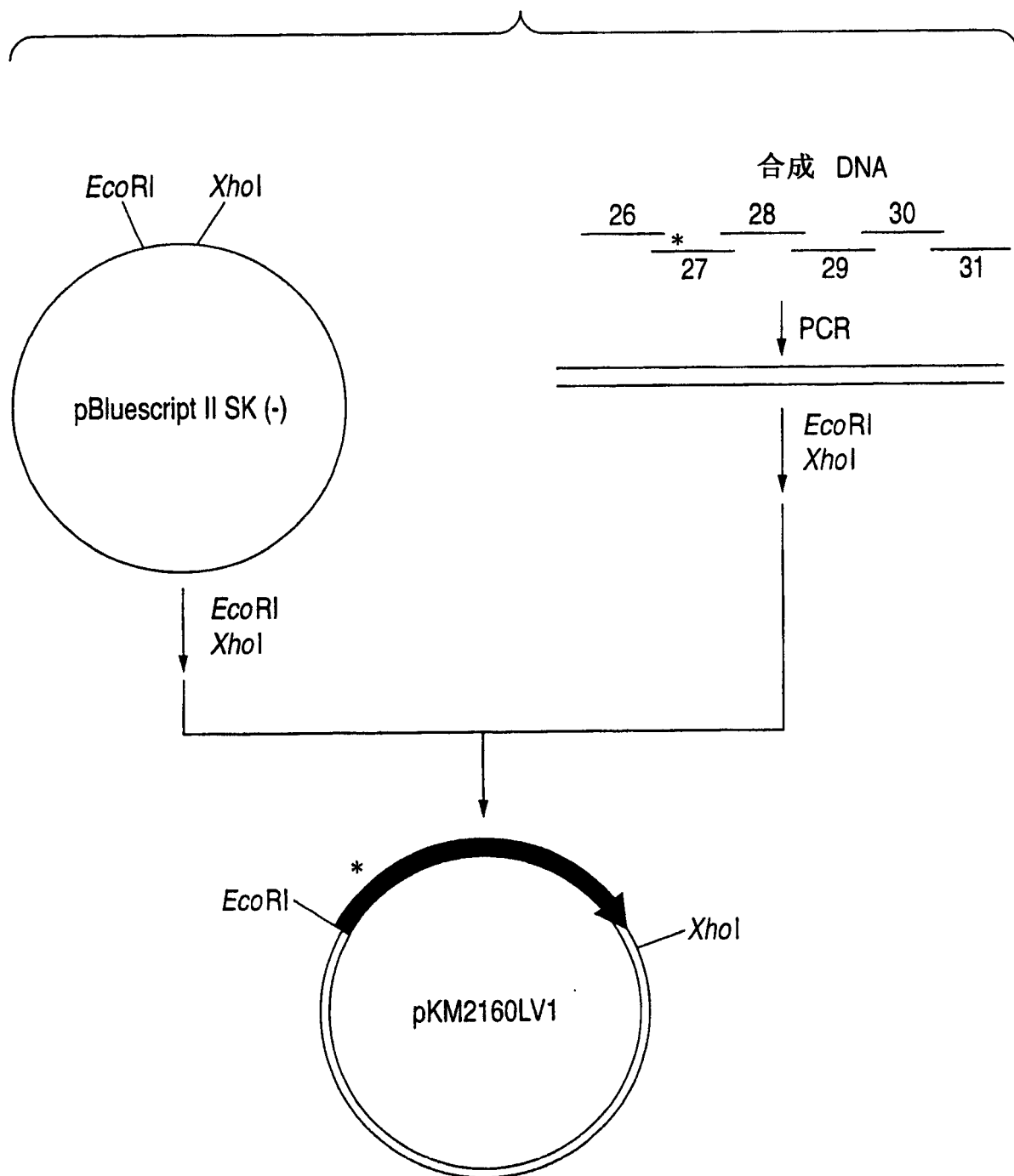


图5

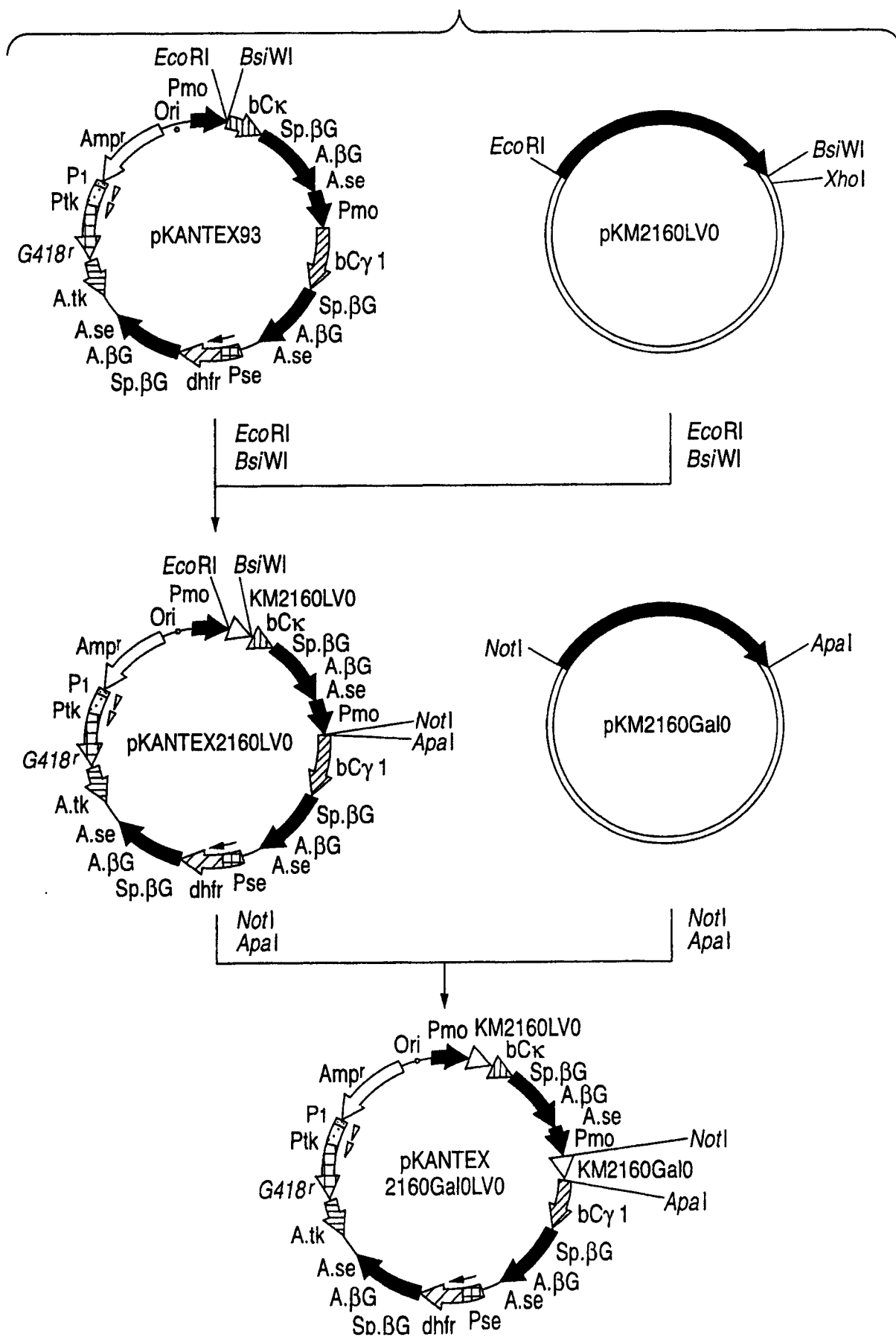


图6

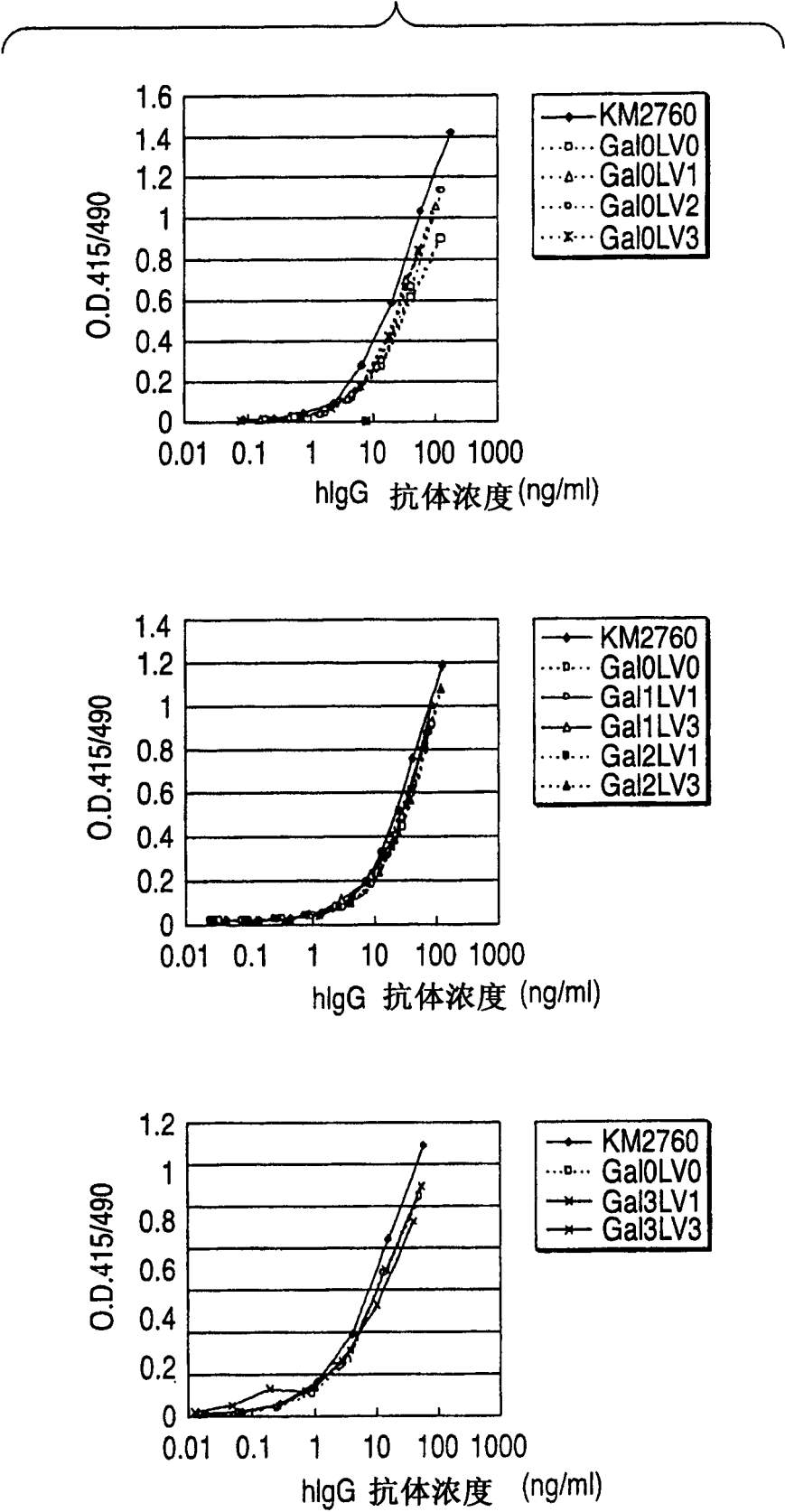


图7

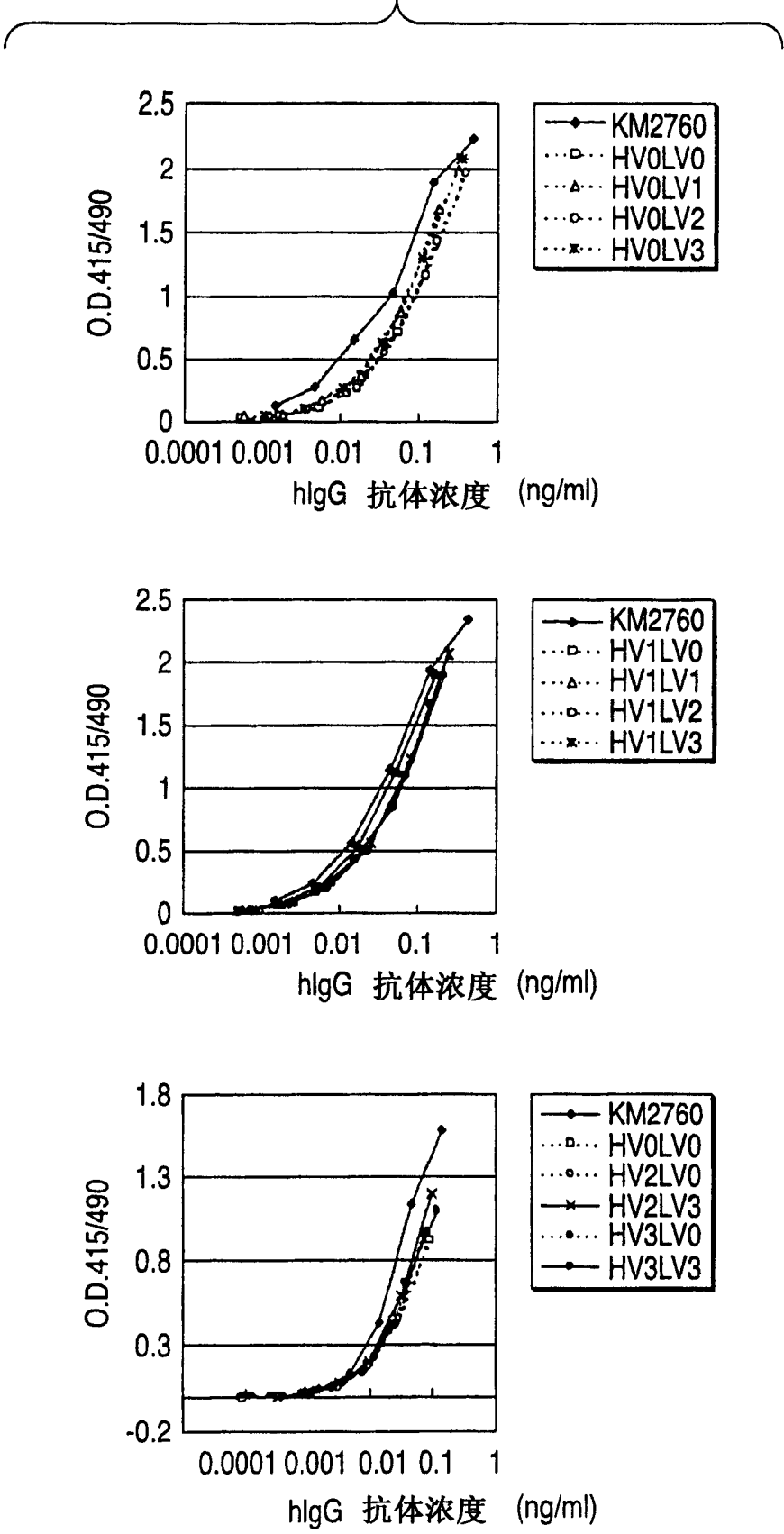


图8

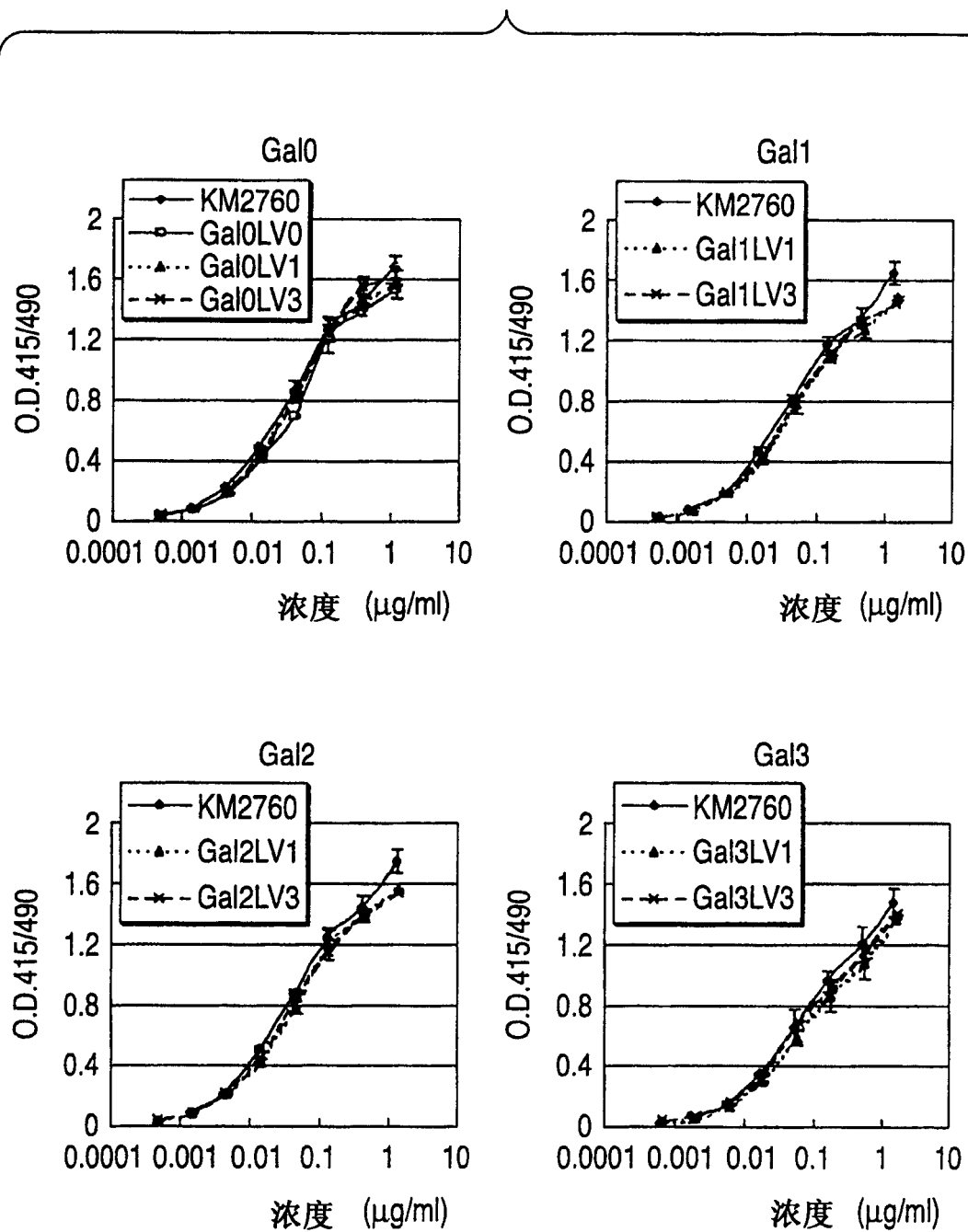


图9

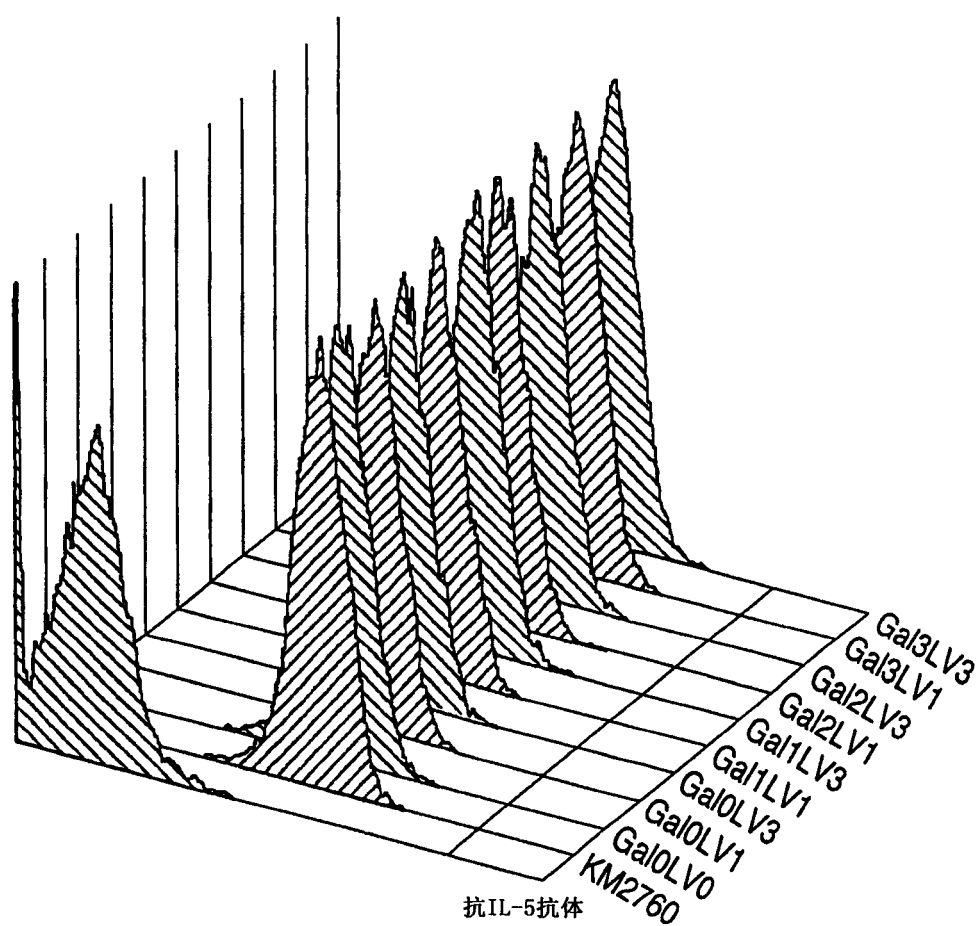


图10

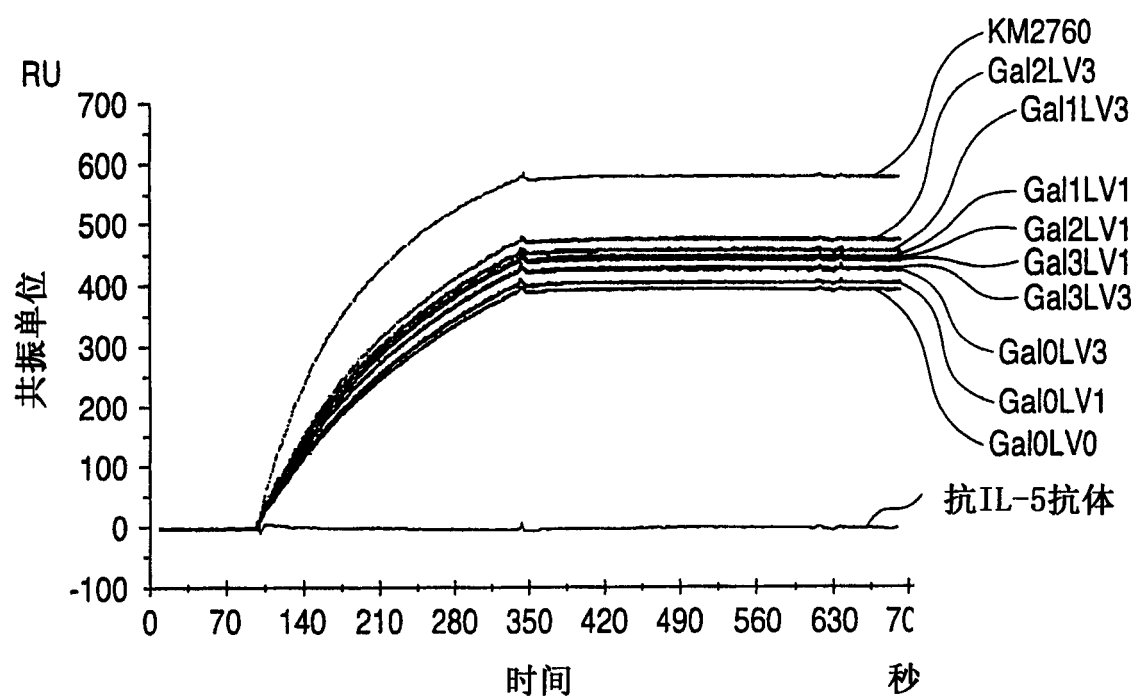


图11

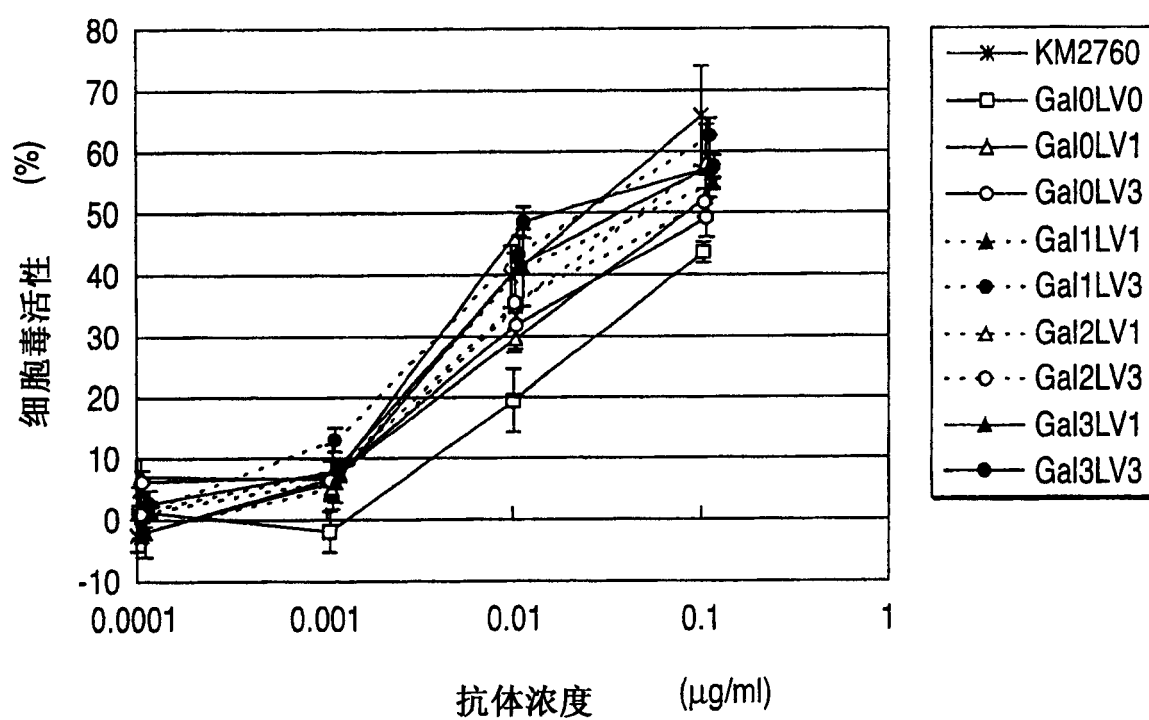


图12

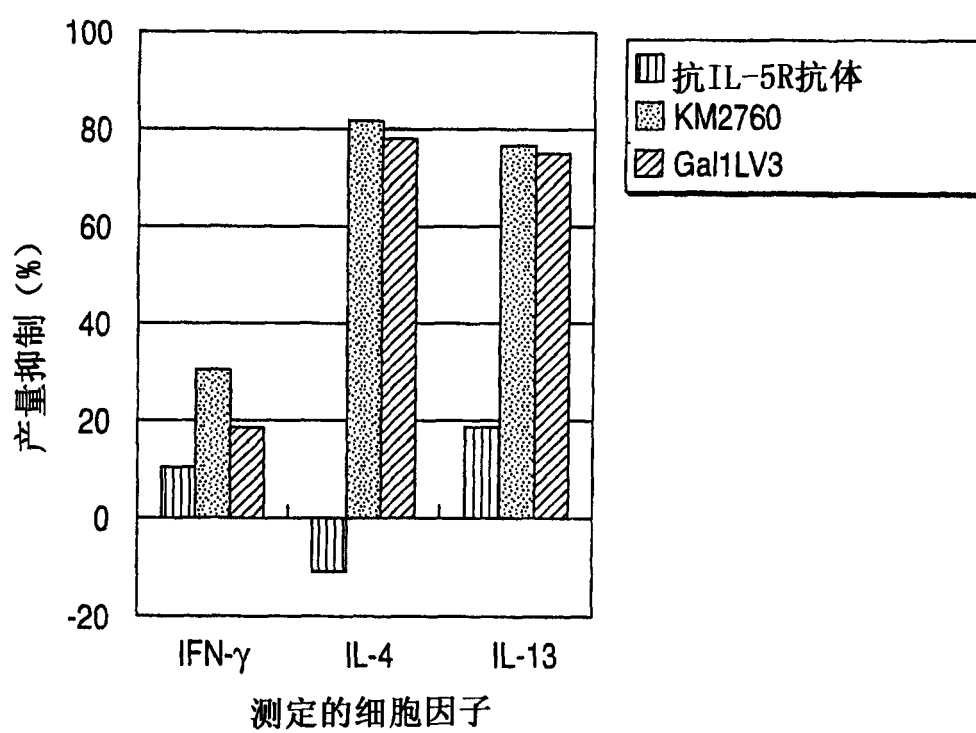


图13

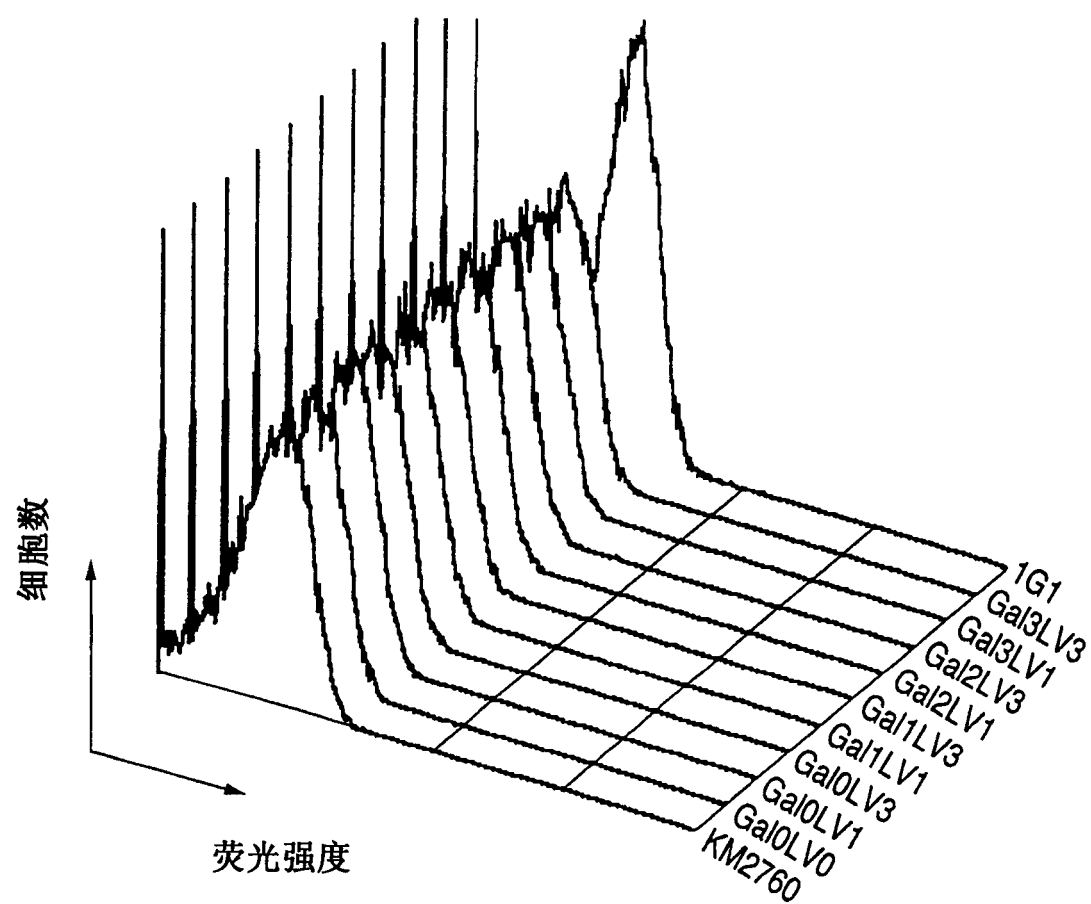


图14

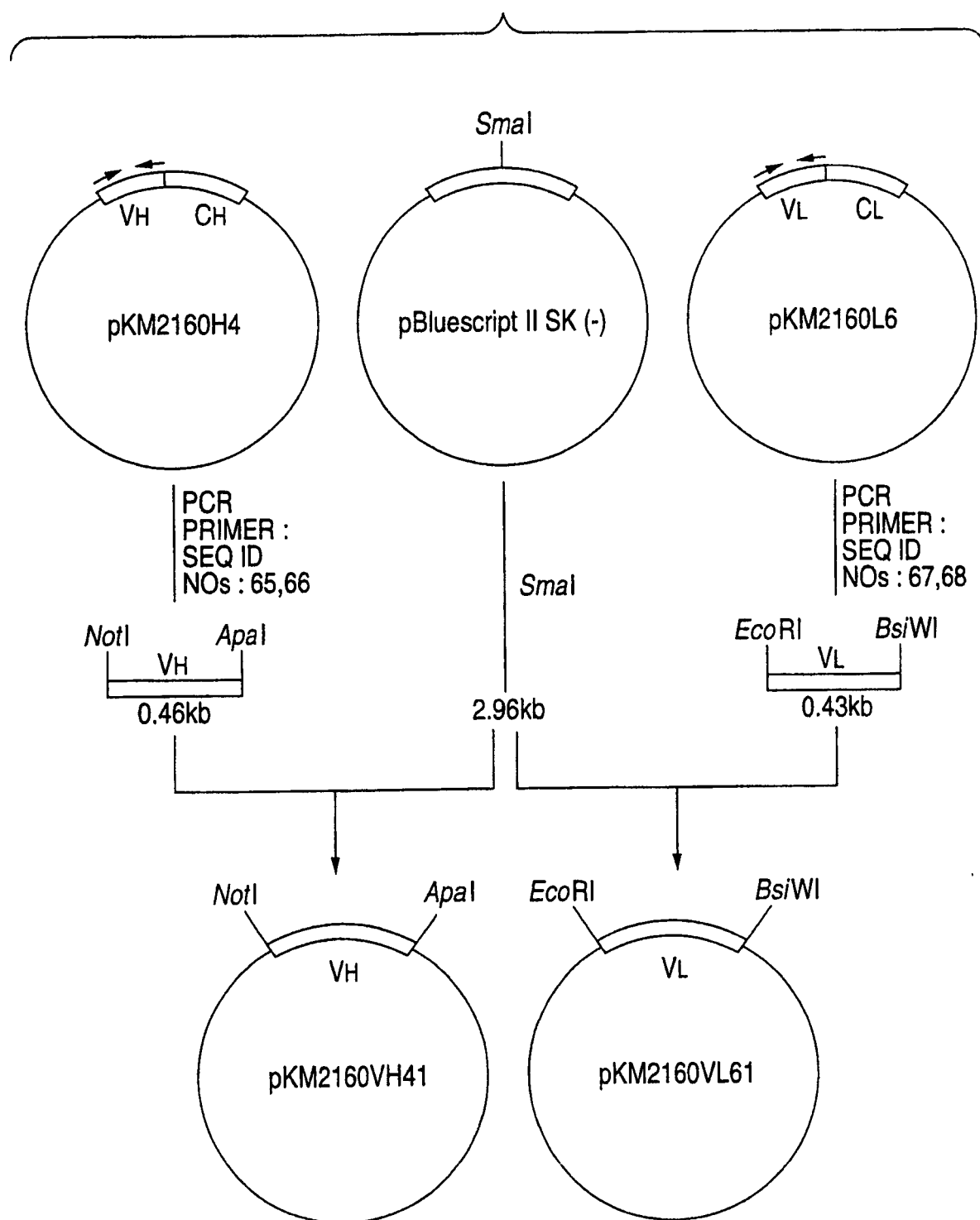


图15

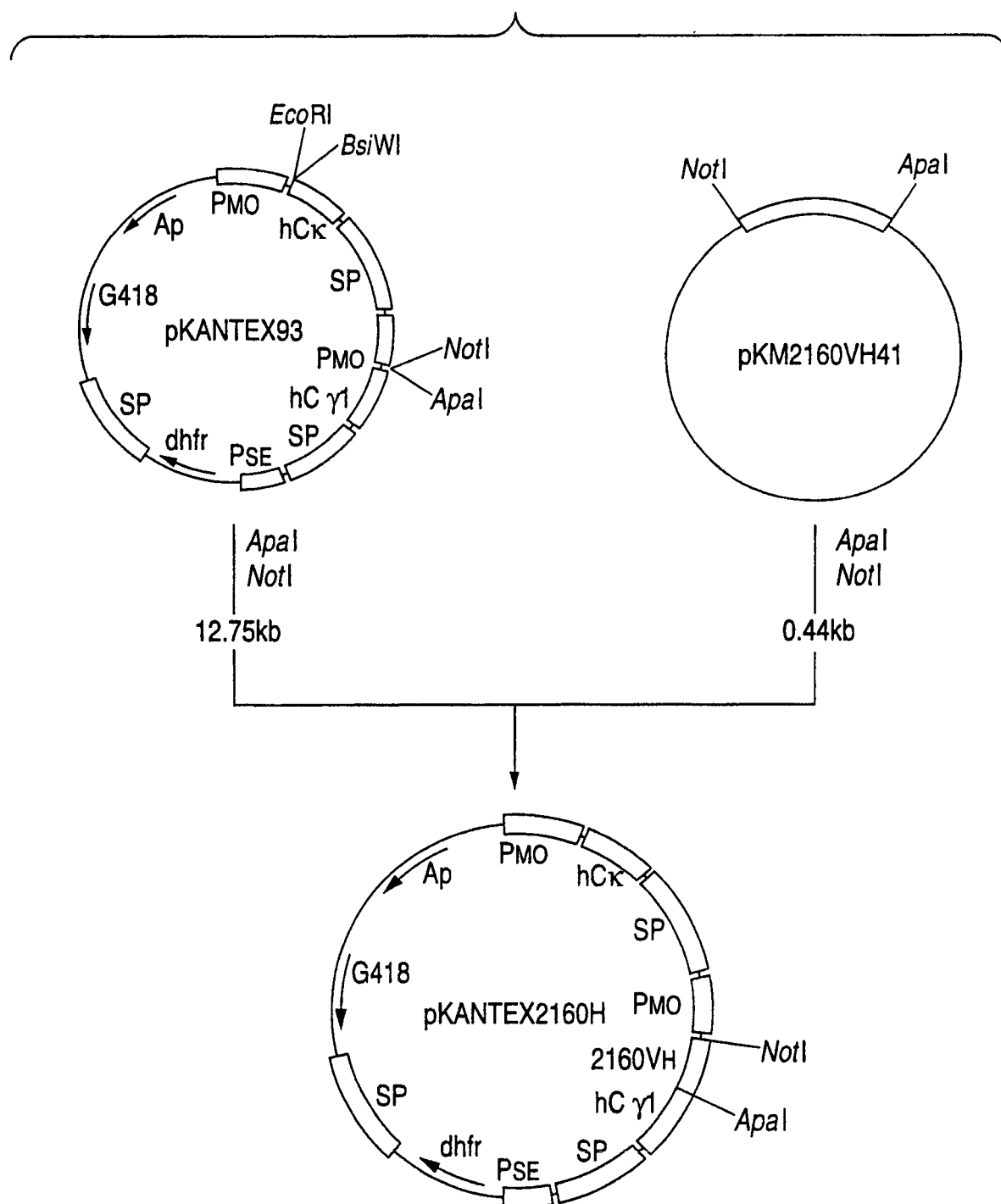


图16

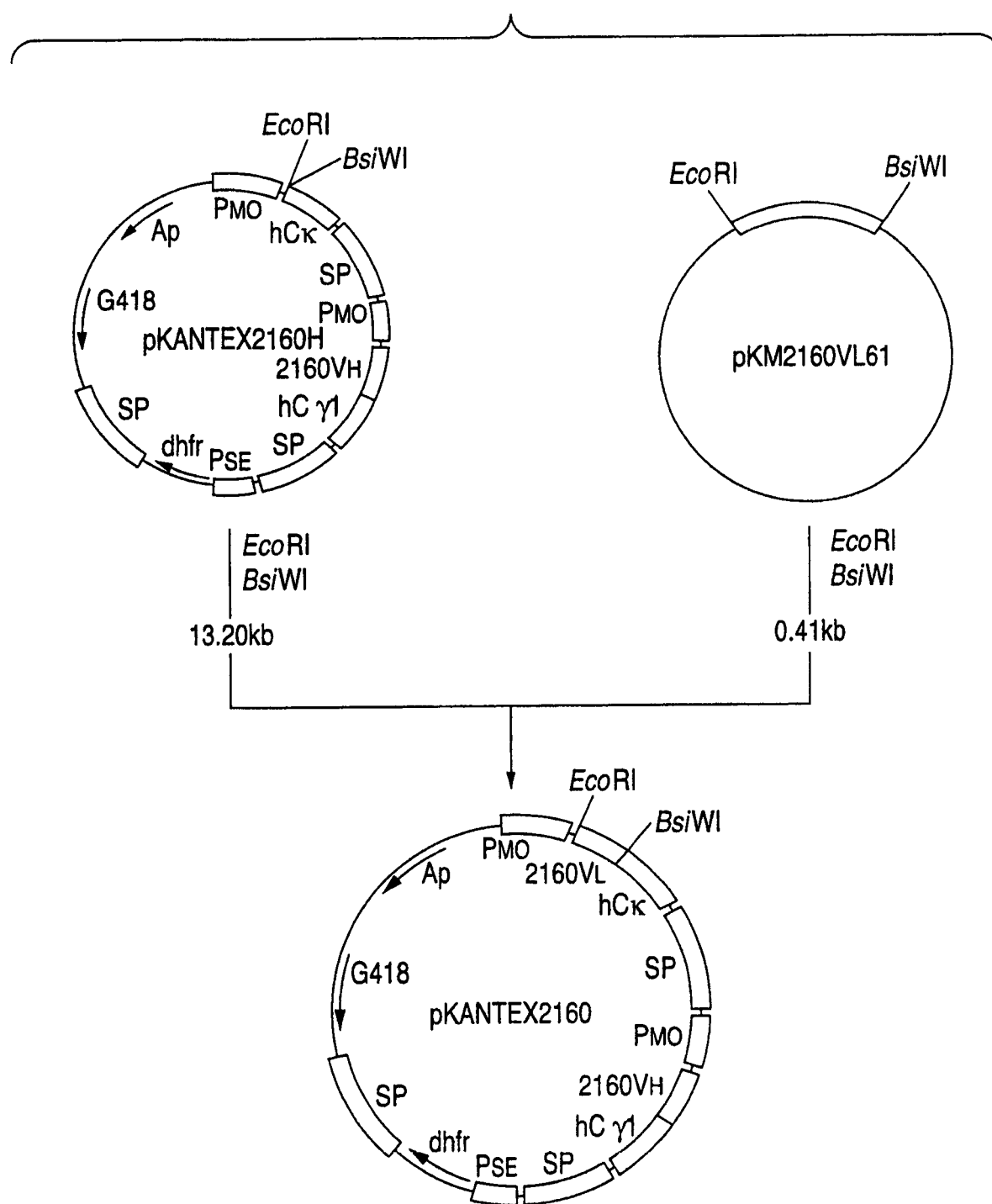


图17

专利名称(译)	人CDR - 移植抗体及其抗体片段		
公开(公告)号	CN1575303A	公开(公告)日	2005-02-02
申请号	CN02820882.X	申请日	2002-08-30
申请(专利权)人(译)	协和发酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和发酵工业株式会社		
[标]发明人	设乐研也 中村和靖 保坂绘美 田中晶子 小池正道		
发明人	设乐研也 中村和靖 保坂绘美 田中晶子 小池正道		
IPC分类号	B65H31/30 A61K39/395 A61P35/00 B65H31/24 B65H31/26 B65H31/36 B65H37/04 C07K14/715 C07K16/28 C12N5/10 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/2866 G01N2333/4719 C07K2317/565 C07K14/7158 C07K2317/732 A61K2039/505 C07K2317/24 G01N33/6863 A61P11/02 A61P11/06 A61P17/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/2896 G01N33/57492 G01N2333/7158		
优先权	2001265144 2001-08-31 JP		
其他公开文献	CN100430420C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种与人CC趋化因子受体4(CCR4)的细胞外区特异反应，但不与人血小板反应的人CDR移植抗体或其抗体片段；一种与CCR4的细胞外区特异反应，并对CCR4表达细胞有细胞毒活性的人CDR移植抗体或其抗体片段；和一种含有这些抗体或其抗体片段中的至少一种作为活性成分的药物，治疗剂或诊断试剂。

$$ADCC活性(\%) = \frac{(\text{样品上清液中}^51\text{Cr的量}) - (\text{自发释放的}^51\text{Cr的量})}{(\text{}^51\text{Cr的总量}) - (\text{自发释放的}^51\text{Cr的量})} \times 100$$