

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/28

A61K 39/395 C12N 15/12



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99813393.0

[45] 授权公告日 2005 年 2 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1187374C

[22] 申请日 1999.11.17 [21] 申请号 99813393.0

[30] 优先权

[32] 1998.11.17 [33] KR [31] 1998/49177

[32] 1999.5.11 [33] KR [31] 1999/16750

[86] 国际申请 PCT/KR1999/000689 1999.11.17

[87] 国际公布 WO2000/029445 英 2000.5.25

[85] 进入国家阶段日期 2001.5.17

[71] 专利权人 株式会社 LG 化学

地址 韩国汉城市

[72] 发明人 洪孝贞 朴圣燮 姜荣峻 姜昌律

尹圣宽

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 胡交宇

权利要求书 2 页 说明书 43 页 附图 18 页

[54] 发明名称 人源化的特异于人 4-1BB 的抗体
和含有它的药物组合物

[57] 摘要

本发明涉及特异地结合蛋白质 4-1BB 的人源化抗体。这种抗体可通过将针对人 4-1BB 的小鼠单克隆抗体的互补性决定区移植到人抗体的剩余部分上，并通过进一步的氨基酸替换来制备。此外，可制备含有这种人源化抗体的药物组合物并用于治疗自身免疫疾病来抑制免疫反应。本发明的人源化抗体对人 4-1BB 具有很高的亲和性，并与人抗体具有序列相似性。本发明的药物组合物可用于治疗自身免疫疾病并充当人体内的免疫抑制剂而不产生任何副作用。

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

1. 一种针对人 4-1BB 分子的人源化抗体，含有：

5 a) 一种轻链可变区，其互补决定区具有如下的氨基酸序列；

RASQXISDY LH YASQ SIS QDGHSFPPT

其中的 X 是任何的氨基酸残基；

b) 一种重链可变区，其互补决定区具有如下的氨基酸序列；

10

SYWMH EINPGNGHTNYXXKFXX SFTTARAFAY

其中的 X 是任何的氨基酸残基；

c) 一种轻链恒定区，它与人抗体的轻链恒定区相同；和

d) 一种重链恒定区，它与人抗体的重链恒定区相同。

15

2. 权利要求 1 的人源化抗体，其中所述人源化抗体的 K_d 是 $8.7 \times 10^{-11} M$ 或更低。

3. 权利要求 1 的人源化抗体，它含有：

a) 一种轻链可变区，它含有具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的多肽；

20

b) 一种重量可变区，它含有具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的多肽；

c) 一种轻链恒定区，它与人抗体的轻链恒定区相同；和

d) 一种重链恒定区，它与人抗体的重链恒定区相同。

25

4. 权利要求 3 的人源化抗体，其中，所述的人源化抗体是由保藏号为 KCTC 0540BP 的细胞系表达的。

5. 权利要求 1 的一种人源化抗体，它含有：

a) 一种轻链可变区，它含有具有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的多肽；

30

b) 一种重量可变区，它含有具有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的多肽；

- c) 一种轻链恒定区，它与人抗体的轻链恒定区相同；和
- d) 一种重链恒定区，它与人抗体的重链恒定区相同。
6. 权利要求 3 或 5 的人源化抗体，其中，该重链是 $\gamma 1$ ， $\gamma 2$ ， $\gamma 3$ ，或 $\gamma 4$ 链。
- 5 7. 权利要求 3 或 5 的人源化抗体，其中，该轻链是 κ 或 λ 轻链。
8. 权利要求 5 的人源化抗体，其中，所述的人源化抗体是由保藏号为 KCTC 0541 BP 的细胞系表达的。
9. 一种质粒，它含有一种多核苷酸，该多核苷酸编码一种人源化抗体的轻链可变区，其中，所述的质粒是 pRc-Hz4B4-k-gs 或存在于保藏号为 KCTC 0537BP 的细胞中的 pRc-Hz4B4-Mok-gs。
- 10 10. 一种质粒，它含有一种多核苷酸，该多核苷酸编码一种人源化抗体的重链可变区，其中，该质粒是 pCI-Hz4B4-H 或存在于保藏号为 KCTC 0536 BP 的细胞中的 pCI-Hz4B4-MoH。
11. 一种用权利要求 9 和 10 的质粒转化的宿主细胞。
- 15 12. 一种保藏号为 KCTC 0540 BP 或 KCTC 0541 BP 的细胞系的细胞。
13. 一种用于免疫抑制的组合物，含有权利要求 1-8 中任何一项所述的人源化抗体作为活性成分。
14. 权利要求 13 的组合物，其中所述的免疫抑制是抑制自身免疫疾
- 20 病。
15. 权利要求 14 的组合物，其中，所述的自身免疫疾病是类风湿性关节炎。
16. 权利要求 1-8 中任何一项的人源化抗体在用于制备抑制或压制病人免疫反应的药物中的用途。
- 25 17. 权利要求 31 的用途，其中，所述的免疫反应是移植排异。

人源化的特异于人 4-1BB 的抗体和含有它的药物组合物

5

发明领域

本发明涉及特异地结合 4-1BB 受体蛋白，优选人的 4-1BB 受体蛋白的人源化抗体。这种人源化的抗体可被用作诊断试剂或被用于配制给病人施用的药物组合物。

10

发明的背景

免疫系统变化的多样性，并且由于 B 细胞和 T 细胞随机地特异表达各种成份，该成份特异的与许多包括自身在内的组分结合。因此，体内必须建立自身-免疫耐受机制以区别自体和非自体的决定簇以避免自身反应。但所有的机制都有被破坏的危险。自我-识别机制也不例外，已经证明许多疾病是由于自身免疫产生大量的自身抗体和自身反应 T 细胞而引起的。

15

至少有 30 多种疾病是自身免疫引起的或与自身免疫有关。此类疾病有类风湿性关节炎，寻常天疱疮，肾小球肾炎，恶性贫血，甲状腺炎和系统性红斑狼疮。在韩国，每一百人中就有一人患类风湿性关节炎。

20

目前主要的治疗手段是组织移植以替换患病的器官。在大多数病例中，移植成功的最大障碍是对移植组织的免疫反应适应。当移植的组织含有有核细胞时，T 细胞立即与经常引起移植器官排斥的高度多态性主要组织相容性基因复合体分子 (MHC) 反应。供体和受体 MHC 类型的配型会增加移植的成功率。只有当供体和受体有亲缘关系，才可能有相当好的配型。但在这种情况下，其它遗传位点的差异也会引起排异反应。

25

对于自身免疫病和移植排异，人们可以利用或控制免疫系统，抑制不希望的免疫反应。目前临床上常用几种不同的免疫抑制剂，如氨甲喋呤、硫唑嘌呤、环磷酰胺、强的松、环孢 A、FK506 (tacrolimus)，抗淋巴细胞球蛋白 (ALG) 和抗胸腺球蛋白 (ATG)。最近，已经利用抗体高度的特异性用于治疗，以抑制特异免疫反应。该类抗体的靶分子可以分成

30

两组，第一组包括在淋巴细胞表面表达的分子，如 CD3，CD4，IL-2R，CDw52 和 ICAM-1。另一组主要是细胞因子，如 TNF- α ，和 IL-6。其中一些抗体是有效的，已作为药物出售。

然而，目前使用的免疫抑制剂都有一个共同的问题，即与免疫反应无关的细胞或正常细胞都会受到这些药物的影响。会引起不可避免的严重的副作用。因此，需要一种对活化的免疫细胞是特异的，具有最好的免疫抑制活性而没有有害副作用的免疫抑制剂。

虽然鼠类的单克隆抗体已被广泛用作诊断试剂，但已经证实只有极少数情况下可以用它们进行治疗。以下三种原因可能限制其应用：第一，多次证明鼠类的单克隆抗体对于人类一般会引起人抗这些分子的免疫反应。人抗小鼠抗体（HAMA）反应针对两个不同的区域。抗可变区反应称作抗-个体基因型反应，该反应能阻断抗原与鼠类抗体结合的活性。抗恒定区的反应为抗-同型反应，该反应阻断抗体的效应子功能。HAMA 反应不仅阻断了作为新药物的抗体功能，而且也与鼠类抗体形成免疫复合物，结果引起一些副作用，并降低了抗体的半衰期。第二，在体内，即使没有形成免疫复合物，鼠类抗体的半衰期也比人的抗体半衰期短。第三，鼠类抗体 Fc 区产生的效应子功能比人的抗体弱或没有。上述所有因素都会降低鼠类单克隆抗体的疗效，而且在人类免疫治疗中普遍存在的问题也是由于异源性的单克隆抗体引起的。

为了避免鼠类单克隆抗体固有的不需要的特性，我们利用基因工程的手段将鼠类抗体与人抗体区域重组，开发了“人源化的抗体”。采用这种替换策略是由于免疫系统对自身抗原会产生免疫耐受性，很难对人的抗原如细胞表面分子产生人的抗体。这种人源化的抗体含有互补性决定区（CDR）区域，只有极少数几个氨基酸是鼠类的，而其余的全部是人的抗体的结构。

发明概述

4-1BB 是活化的 T 细胞表面表达的一类附带分子(Kwon 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1963(1989); Pollok 等, J. Immunol. 151:771(1993)), 是与肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 相关的一种膜蛋白 (Malett 等, Immunol. Today 12:220(1991))。4-1BB 分子量为 55KD，是一个均一的二聚体。此

外, 4-1BB 与细胞内蛋白激酶 p56^{lck} 结合。已显示 4-1BB 蛋白介导细胞外向细胞内的信号传导途径。(Kim 等, *J. Immunol.* 151:1255(1993))。

人的 4-1BB 基因已经从人外周血活化的 T-细胞 mRNA 制备的 cDNA 文库中分离出来(Goodwin 等, *Eur. J. Immunol.* 23:2631(1993))。人的 4-1BB 氨基酸序列与小鼠 4-1BB 60%同源 (Kwon 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1963(1989)), 表明这些序列是高度保守的。氨基酸序列分析表明, 4-1BB 与 CD40, CD27, TNFR- I, TNFR- II, Fas 和 CD30 一起属于神经生长因子超家族 (Alderson 等, *Eur. J. Immunol.* 24:2219(1994))。当单克隆抗体与小鼠 T-细胞表面表达的 4-1BB 结合时, 抗-CD3 T-细胞活性增加许多倍 (Pollok 等, *J. Immunol.* 150:771(1993))。

4-1BB 与几种抗原递呈细胞所表达的高亲和性配体结合, 例如巨噬细胞和活化的 B 细胞 (Pollok 等, *J. Immunol.* 150:771(1993)); Schwarz 等, *Blood* 85:1043(1995))。4-1BB 与其配体的相互作用产生共刺激信号而引起 T 细胞的活化和生长 (Goodwin 等, *Eur. J. Immunol.* 23:2631(1993); Alderson 等, *Eur. J. Immunol.* 24:2219(1994); Hurtado 等, *J. Immunol.* 155:3360(1995); Pollok 等, *Eur. J. Immunol.* 25:488(1995); DeBenedette 等, *J. Exp. Med.* 181:985(1995)。这些观察提示 4-1BB 在调节由 T 细胞介导的免疫反应中起着很重要的作用 (Ignacio 等, *Nature Med.* 3:682(1997))。

发明者已经用杂交瘤的方法产生了小鼠单克隆抗体, 该抗体是特异地与活化的 T 细胞表面表达的人的 4-1BB (h4-1BB) 结合 (韩国公开专利号 no.96-37064)。为了寻找只对活化的 T 淋巴细胞特异而没有任何副作用的免疫抑制剂, 本发明者利用只抗活化的 T 细胞表达的 4-1BB 的小鼠单克隆抗体构建了人源化的单克隆抗体 (韩国公开专利号 no.96-37064)。这种人源化的单克隆抗体与 4-1BB 有很高的亲和性。将这种人源化的抗 4-1BB 单克隆抗体用于非-人类的灵长类治疗没有产生抗-抗体反应, 相反却产生了很强的免疫抑制活性。

本发明的一个目的是提供一种人源化的单克隆抗体, 该抗体特异与 4-1BB 结合, 特别是与人的 4-1BB (h4-1BB) 有很高的亲和性。本发明的人源化抗体与人的 4-1BB 具有很高的亲和性, 而且其序列与人的抗体十分相似。由于与本发明抗体特异结合的 4-1BB 受体蛋白好像参与免疫

系统的激活，因此该产品可以有效地用于治疗自身免疫病或作为一种免疫抑制剂抑制移植排异反应。由于本发明的抗体十分类似于人的抗体，因此可以作为药物用于治疗而没有相反的副作用，如人抗小鼠抗体反应。

5 本发明的另一个目的是提供一种药物组合物，它含有人源化的抗 h4-1BB 单克隆抗体。该药物组合物用于治疗自身免疫病或作为一种免疫抑制剂、防止移植排异是十分有效的。如类风湿性关节炎可能是由于 4-1BB 受体的异常活性造成的，这种组合物治疗类风湿性关节炎就特别有效。

本发明的另一目的是提供一种诊断试剂，用于诊断由于 4-1BB 受体蛋白过高或过低活性而引起的免疫机能障碍。

10 附图简要说明

图 1，人源化抗人 4-1BB 抗体，Hz4B4-1，Hz4B4-2 重链 (VH) 和轻链 (VL) 可变区的氨基酸序列比较。这些序列与小鼠单克隆抗体 4B4-1-1，人的抗体 VHM17750 和人的抗体 VL X82934 的氨基酸序列进行了比较。

15 图 2，PCR 方法合成编码人源化抗体 Hz4B4-1 的 VH 和 VL 基因时所用的引物定位以及人源化的定位。

图 3，表达质粒 pRc-Hz4B4-k-gs 的构建及其限制性酶切图谱。

图 4，表达质粒 pCI-Hz4B4-H 的构建及其限制性酶切图谱。

20 图 5，PCR 方法合成编码人源化抗体 Hz4B4-2 的 VH 和 VL 基因时所用的引物定位以及人源化的定位。

图 6a-6i 经卵白蛋白免疫和用人源化抗体 Hz4B4-1 治疗时，狒狒体内 OVA-特异 IgG 含量的变化。

25 图 7a-7d，图 7a 和 7b 表明正常人和类风湿关节炎病人外周血中与 4B4 单克隆抗体反应的细胞与 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的比例，图 7c 和 7d 表示正常人和类风湿关节炎病人外周血和滑膜液中与 4B4 单克隆抗体反应的细胞与 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞的比例。

发明的详细说明

30 本发明体现在两种从小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 制得的人源化单克隆抗体，这种小鼠单克隆抗体与人的 4-1BB 特异结合 (韩国公开专利号 no. 96-37064)。这些人源化单克隆抗体被用于人体实验。

第一种人源化的抗体 Hz4B4-1 的制备是将小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 可变区的抗原结合区，互补性决定区（CDR）移植。为了增加人源化抗体与抗原结合的亲和性，将类似于小鼠抗体框架结构区(FR)的几个氨基酸残基进行置换，使该抗体与原小鼠单克隆抗体有几乎完全相同的抗原结合亲和性。人源化的抗体 Hz4B4-1 是由轻链可变区，氨基酸序列是 SEQ ID NO: 1 和重链可变区，氨基酸序列是 SEQ ID NO: 2 所组成。

为了使 Hz4B4-1 与人的抗体更相似，将小鼠框架结构区（FR）和互补性决定区（CDR）（参见, pp.24-28 of Hood 等, “Immunology”, second ed. c. 1984, by Benjamin/Cumming Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA, esp. 图. 2-6和2-10 和 PP.288-296 of Paul, “Fundamental Immunology”, third ed.c. 1993 by Raven Press, Ltd., New York, NY., esp. 表 2）的另外几个氨基酸也用人抗体的相应几个位点进行了替换，从而构建了人源化的抗体 Hz4B4-2。Hz4B4-2 与抗原结合的亲和性比 Hz4B4-1 高 5 倍，比原小鼠单克隆抗体高 7 倍。人源化抗体 Hz4B4-2 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，重链可变区氨基酸序列是 SEQ ID NO: 4。

含有编码本发明的人源化抗体 Hz4B4-1 轻链的基因的表达质粒 pRc-Hz4B4-Mok-gs 和编码重链基因的表达质粒 pCI-Hz4B4-MoH 的细菌已经于 1998 年 10 月 27 保存在韩国科学和技术研究所,生命科学研究所基因库，编号分别为 KCTC 0537BP 和 KCTC 0536BP。

生产 Hz4B4-1 抗体的细胞系 MH200-3 和生产 Hz4B4-2 抗体的 SB500-23 细胞系，也于 1998 年 10 月 27 保存在韩国科学和技术研究所，生命科学研究所基因库，编号分别为 KCTC 0540BP 和 KCTC 0541BP。

本发明的人源化抗体对人的 4-1BB 具有很高的亲和性，而且其序列与人的抗体十分相似。因此该人源化的抗体可以用于治疗自身免疫病，和作为有效的免疫抑制剂而不会产生任何副作用。

为了这一目的，本发明的人源化抗体可被用作治疗自身免疫性疾病的药物组合物中的活性成分，也可被用作免疫抑制剂。这种药物组合物可被配制成口服或非口服剂型，以便药物立即或缓慢释放。该组合物可含有通常用于制药的非活性成分，如稀释剂，填充剂，崩解剂，甜化剂，

润滑剂，调味剂。给药的最好方式是静脉注射，或者是大丸剂注射（bolus injection）或点滴，或者胶囊释放。典型的用于静脉内注射的剂型使用生理盐水作为稀释剂。

5 本发明的抗体的 Fab 或 Fab' 部分也可以用作治疗的活性组分。这些抗体片段的制备方法是本领域公知的技术。

病人服用的剂量与所用的特定的抗体，体重，年龄，性别，健康程度，饮食，给药时间，药物的剂型，给药的途径和所治疗的疾病有关。常规的剂量是 0.1mg/kg/天-100mg/kg/天，最常用的剂量是 1mg/kg/天-50mg/kg/天。

10 本发明的组合物也可包括使用说明书，用以描述可使用这种抗体作为治疗剂的临床指症，所用的剂量，服用方式和/或治疗病人时的禁忌。

本发明的抗体也可以用于诊断检验。本发明的诊断检测的一个优选的形式是定量样品中在其表面表达 h4-1BB 的细胞。计数携带特定的表面标记的细胞的方法是本领域公知的技术。例如可使用荧光标记活化细胞分类。另一种诊断检验的形式是对标本中 h4-1BB 蛋白进行定量分析。
15 还有许多这类检验，例如，固定抗原或“三明治”式的酶联免疫吸附试验。

本发明通过下面的实施例加以说明，这些实施例是为了说明本发明而不是为了限定本发明的。

20 实施例 1：人源化抗体 Hz4B4-1 的设计

为了构建人源化的抗体，将小鼠单克隆抗体 4B4-1-1（韩国公开申请号 no. 96-37064）的轻链和重链可变区的氨基酸序列与基因数据库中人的序列进行比较。选择出与小鼠 4B4-1-1 抗体重链序列十分相似的人重链可变区序列 M17750（Dersimonian, H.等, J. Immunol., 139, 2496(1987)）
25 以及与小鼠 4B4-1-1 抗体轻链非常相似的人的轻链可变区序列 X82934（Esposito, G.等, Arch. Vitrol., 142, 601(1997)）。为了将小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 人源化，将小鼠抗体的 CDR 区转移到人的抗体上。同时将人源化的轻链 FR 区的 10 个关键氨基酸残基和人源化的重链 FR 区的 11 个关键氨基酸残基用小鼠 4B4-1-1 抗体相应的氨基酸所替换。

30 如上所述设计的人源化抗体 Hz4B4k-1 轻链可变区和人源化重链可变

区 Hz4B4h-1 分别具有被称作 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 的序列。这些序列与小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 轻链可变区序列 (SEQ ID NO: 38) 和重链可变区序列 (SEQ ID NO: 39) 进行比较, 然后再与人的抗体轻链可变区序列 X82934 (SEQ ID NO: 40) 和重链可变区序列 M17750 (SEQ ID NO: 41) 进行比较。排列如图 1 所示。

实施例 2: 编码人源化抗体 Hz4B4-1 基因和表达质粒的构建

制备的引物包括了期望替换的区域中的碱基序列。这些引物是: KXA (SEQ ID NO:5), KXB (SEQ ID NO:6), KXC(SEQ ID NO:7), KXD (SEQ ID NO:8), KXE(SEQ ID NO:9), KXF (SEQ ID NO:10), KXG (SEQ ID NO:11), KXH (SEQ ID NO:12), AMH (SEQ ID NO:13), BMH (SEQ ID NO:14), CMH (SEQ ID NO:15), DMH(SEQ ID NO:16), EMH (SEQ ID NO:17), FMH (SEQ ID NO:18), GMH (SEQ ID NO19), HMM(SEQ ID NO:20) 。

上述引物中, 引物 KXA (SEQ ID NO: 5) 至 KXH (SEQ ID NO: 12) 被用于构建编码人源化 κ -轻链可变区的基因。引物 AMH (SEQ ID NO: 13) 至 HMM (SEQ ID NO: 20) 被用于构建编码人源化重链可变区的基因。图 2 由引物的定位表明在人源化抗体 Hz4B4-1 中的人源化区域, 包括编码 VL (SEQ ID NO: 42) 和 VH (SEQ ID NO: 43) 的基因。为了便于比较, 图 2 列出了小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 轻链可变区 (SEQ ID NO: 44) 和重链可变区 (SEQ ID NO: 45) 的基因序列。

上述引物被用于以编码小鼠单克隆抗体 4-1BB (韩国公开专利号 no.96-37064) 轻链和重链可变区的 DNA 为模板进行聚合酶链反应 (PCR)。产物通过常规 PCR 重组方法连接, 形成完整的 VL 和 VH cDNA。

人源化的 VL 的 PCR 产物用 HindIII 酶切, Klenow 酶平端化, 然后再用 Bgl II 酶切。将编码 VL 的 PCR 产物插入到 pBluescript™ 质粒中, 该 PCR 产物合成时, 引物为 HKD (SEQ ID NO: 22) 和 Ryu-93 (SEQ ID NO: 48), 模板为含有质粒 pAcS2-CK (Jin 等, Virus Research, 38:269-277(1995)) 的人 VL (Hck)。如此构建的质粒 pBS-Ck 用 SpeI 酶切, Klenow 酶平端化, 然后再用 Bgl II 酶切, 从而构建了含有人源化 VL 的 pBS-Vk-Ck 质粒。

为将人源化的 VL 插入到表达载体, 将含有 EPO 基因的 HindIII-Sal

I 片段从质粒 pcDNA-EPO-dE1-gs (韩国专利申请 no. 97-76923) 中切出, 然后用从质粒 pBS-Vk-Ck 中得到的含有 NotI-SalI 片段的人源化 VL cDNA 替换。由此得到的质粒被称为 pRc-Hz4B4-k-gs。表达质粒 pRc-Hz4B4-k-gs 的构建及其酶切图谱的详细说明如图 3 所示。

5 为了构建重链, 将用类似的方法制得的 VH 的 PCR 产物用 NotI 和 NheI 酶切。然后将编码 VH 的 PCR 产物 cDNA 插入到 pBluescript™ 质粒中, 该 PCR 的模板 DNA 为含有人抗体 VH 基因的质粒 pAcS2-CH (Jin 等, Virus Research, 38:269-277(1995), 引物为 HHCD (SEQ ID NO: 21) 和 Ryu-101 (SEQ ID NO:49), 从而构建了 pBS-Cr1 质粒。将 pBS-Cr1 质粒用
10 NotI 和 NheI 酶切后, 又构建了 pBS-Vh-Cr1 质粒。为了将编码人源化重链基因插入到表达载体中, pBS-Vh-Cr1 质粒用 NotI 酶切, 用 Klenow 酶平端化, 再用 SalI 酶切, 然后插入到质粒 pCI-neo 的 XhoI-SalI 位点, 得到 pCI-Hz4B4-H 质粒。图 4 详细说明了 pCI-Hz4B4-H 质粒的构建及其限制性酶切图谱。

15 从每种质粒得到的编码人源化轻链和重链基因的碱基序列通过 DNA 序列分析进行了证实。在表达质粒中人源化轻链和重链基因是与人巨细胞病毒 (HCMV) 启动子连接的。

实施例 3: 人源化抗体 Hz4B4-1 的表达及细胞的筛选

在含 10% 透析的牛血清 (FBS) 的 GDMEM 培养基中 5%CO₂ 37°C
20 条件下培养的 CHO-K1 细胞 (ATCC CCL61), 接种到直径为 6cm 的培养皿中, 得到 5×10⁵ 细胞。GDMEM 培养基含 DMEM (Gibco), 4.5g/L 葡萄糖, 15mg/L 酚红, 1mM 丙酮酸钠, 1.75g/L 碳酸氢钠, 500 μm 天门冬酰胺, 30 μm 腺苷, 30 μm 鸟苷, 30 μm 胞苷, 30 μm 尿苷, 10 μm 胸腺嘧啶核苷和非必需氨基酸 (GIBCO)。从实施例 2 制备的 2.5 μg 的
25 pRc-Hz4B4-k-gs 质粒和 2.5 μg 的 pCI-Hz4B4-H 质粒合并, 用 0.3ml OPTI-MEM I™ (GIBCO) 稀释, 同时用 0.3ml 的 OPTI-MEM I™ 稀释 15 μl 的 Lipofectamine™ (GIBCO), 然后混合, 放置 15 分钟。

预先培养好的细胞用 OPTI-MEM I™ 洗 3 次。然后将上步制备的质粒-Lipofectamine™ 混合物均匀地加到细胞中。细胞在 5%CO₂, 37°C 下
30 培养 6 小时。然后将培养基换成 3ml 含 10% 透析的牛血清的 GDMEM 培

培养基，继续培养 48 小时。在培养基中，在 37℃加入 3ml 0.25%胰酶 (GIBCO)，反应 3 分钟，离心 (1,000×g, 5 分钟)。将得到的细胞接种到 96 孔板，每孔 2×10^3 细胞。48 小时后，将 5 μM 甲硫氨酸硫代酰胺 (methionine sulfoxamine, MSX) 加到含 10%透析的牛血清的 GDMEM 中，将细胞在 5%CO₂, 37℃进行培养。每隔 4 天换一次培养基，连续培养 2 周。

检测每个存活细胞克隆产生抗体的能力。进行使用偶联到辣根过氧化物酶上 (HRP) 的羊抗人 IgG (Sigma) (Park 等, Hybridoma, 15, 435-441,1996) 的 ELISA 三明治检测，得到产生抗体的克隆。在这些克隆中，有 5 个克隆 (A6B, A9A, B1F, 212A, A7B) 产生很高的抗体。将这 5 个克隆在含 10%透析的牛血清的 GDMEM 中培养。向每个培养物种加入 100、200、350、500 和 1000 μM 的 MSX，然后检测细胞生长最好而且产生抗体量最高的克隆并将其分离出来。产生抗体的量最高的 3 个克隆示于表 1。

15

表 1

克隆	MSX (μM) 的浓度	产生抗体的量 (μg/10 ⁶ 细胞/天)
A6B-200-2	200	11.3
MH200-2	200	12.2
MH200-3	200	16.2

20

实施例 4: 人源化抗体 Hz4B4-1 的分离和纯化

从实施例 3 中得到的 MH200-3 克隆的细胞在 T175 培养瓶中，于无血清培养基 (CHO-S-SFM II, GIBCO) 5% CO₂, 37℃下培养。收集这种条件培养的培养液，经过蛋白 G-Sepharose 亲和柱 (Pharmacia)，用 0.1M 的甘氨酸 (pH2.7) 将结合到柱上的抗体洗脱下来，用 1M Tris(pH9.0)中和，然后用 PBS 缓冲液 (pH7.0) 透析。纯化的抗体经 10% SDS-PAGE 电泳分析，可以观察到 55KD (重链)和约 25KD (轻链)的二条带，表明人源化的抗体已被纯化。

30

实施例 5, 人源化抗体 Hz4B4-1 与抗原结合的亲和性

测定了小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 和人源化抗体与抗原结合亲和性并用 BIAcore™ 检测 (Pharmacia) 进行了比较。用 10mM 醋酸缓冲液稀释兔抗小鼠 IgG(Sigma)和羊抗人 IgG(Fc-特异的),然后偶联到 Dextran CM-5 sensor chip(Pharmacia)。加 1M 乙醇胺终止反应。用 HEPES 缓冲液(HBS)将小鼠单克隆抗体, 4B4-1-1 和人源化的抗体, Hz4B4-1 稀释至浓度为 50 μ g/ml。偶联的抗体以 100 频率单位结合 (R-U), 25 μ g/ml 的 4-1BB 抗原以 10 μ l/分的流速加入, 使其结合 5 分钟。然后以同样的流速用 HBS 缓冲液洗脱 5 分钟, 使其解离。用 BIA 计算软件测定结合速率, 解离速率和相应的速率常数。K_{on}、K_{off} 和 k_d 值测定结果如表 2 所示。

10

表 2

人源化抗体 Hz4B4-1 与抗原结合的亲和性

抗体	K _{on} (M ⁻¹ S ⁻¹)	K _{off} (S ⁻¹)	K _d (M)
小鼠单克隆抗体 4B4-1-1	1.16×10 ⁴	1.54×10 ⁻⁶	1.33×10 ⁻¹⁰
人源化抗体 Hz4B4-1	5.00×10 ⁴	4.36×10 ⁻⁶	8.72×10 ⁻¹¹

上述结果表明, 人源化抗体 Hz4B4-1 与抗原结合和解离的速度比小鼠的抗体高, 抗原结合亲和性 (k_d) 比小鼠抗体高约 1.5 倍。

实施例 6, 人源化抗体 Hz4B4-2 的设计

为了获得比 Hz4B4-1 更人源化的抗体, 将轻链 CDR1 的 1 个氨基酸残基和小鼠 FR 的 8 个氨基酸残基用相应的人的氨基酸残基进行替换。同时, 将人源化的重链 CDR2 的 4 个氨基酸, 小鼠 FR 的 8 个氨基酸残基用相应的人抗体的氨基酸残基进行替换。如上所述, 新构建的人源化轻链 Hz4B4k-2 和重链 Hz4B4h-2 的氨基酸序列分别是 SEQ ID NOS: 3 和 4。图 1 排列出所有这些序列: 小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 VL (SEQ ID NO: 38) 和 VH (SEQ ID NO: 39), 人抗体 VL X82934 (SEQ ID NO: 40) 和 VH M17750 (SEQ ID NO: 41), 和人源化抗体序列 Hz4B4-1 (SEQ ID NOS: 1 和 2)。

25

实施例 7 编码人源体抗体 Hz4B4-2 基因及其表达质粒的构建

合成的引物包括了设计需要替换的碱基序列, 这些引物是:

MOKA(SEQ ID NO:23), MOKB(SEQ ID NO:24), MOKC(SEQ ID NO:25),
MOKD(SEQ ID NO:26), MOKE(SEQ ID NO:27), MOKF(SEQ ID NO:28),
MOKG(SEQ ID NO:29), MOKH(SEQ ID NO:30), MOHA(SEQ ID NO:31),
MOHB(SEQ ID NO:32), MOHC(SEQ ID NO:33), MOHD(SEQ ID NO:34),
5 MOHE(SEQ ID NO:35), MOHF(SEQ ID NO:36), MOHG(SEQ ID NO:37)。

上述引物中, 从 MOKA (SEQ ID NO: 23) 至 MOKH (SEQ ID NO:
30) 是用于构建编码人源化 κ -轻链可变区基因的引物。从 MOHA (SEQ ID
NO : 31) 至 MOHG (SEQ ID NO : 37) 是用于构建编码人源化重链可
可变区基因的引物。此外, HMH (SEQ ID NO: 20) 也是用于构建编码
10 人源化重链可变区基因的引物。图 5 表明 Hz4B4-1 的人源化区域和
Hz4B4-1 的 VL 基因 (SEQ ID NO: 42) 和 VH 基因 (SEQ ID NO: 43)。

上述引物中的 MOK*系列是以 Hz4B4-1 抗体的轻链基因为模板, 合
成编码人源化抗体 Hz4B4k-2 轻链基因。上述引物中的 MOH*系列是以
Hz4B4-1 抗体的重链基因为模板, 合成 VH 基因, 然后用常规重组 PCR
15 方法使抗体进一步人源化。合成了编码 VL (Hz4B4k-2, SEQ ID NO: 46)
和 VH (Hz4B4h-2, SEQ ID NO: 47) 基因。将上述得到的 Hz4B4k-2 DNA
用 XbaI 和 Bgl II 酶切后, 插入到 Hz4B4-1 轻链表达载体 pRC-Hz4B4-k-gs
的 XbaI/ Bgl II 位点。构建了表达 Hz4B4-2 轻链的质粒 pRc-Hz4B4MoK-
gs。

20 对于重链来说, 将 Hz4B4h-2 DNA 用 XhoI 和 NheI 酶切, 然后插入
到重链表达载体 pCI-Hz4B4-H 的 XhoI/ NheI 位点。从而构建了表达人源
化抗体 Hz4B4-2 重链的质粒 pCI-Hz4B4-MoH。

通过 DNA 序列分析证实了来自每种质粒的编码人源化轻链和重链的
基因的碱基序列。

25 实施例 8: 人源化抗体 Hz4B4-2 的表达及细胞筛选

如实施例 3 所述, CHO-K1 细胞用 pRc-Hz4B4-Mok-gs 和 pCI-
Hz4B4-MoH 质粒转染。将转化的细胞在含 25 μ M 甲硫氨酸硫代酰胺
(methionine sulphoximine) 的 GDMEM 培养基中于 37°C 5% CO₂ 培养 2
周。分离有抗性的克隆, 然后用三明治 ELISA 法检测产生的抗体。在这
30 些克隆中, 大量产生 SB 的克隆在含 10%透析牛血清的 GDMEM 培养基

中培养，加入 100、200、350、500 和 1000 μM 的 MSX。将生长最好和在 500 μM MSX 时产生最大量抗体的克隆分离出来。这些克隆产生的抗体大约是 $3\mu\text{g}/10^6$ 细胞/天。

实施例 9：人源化抗体 Hz4B4-2 的分离和纯化

- 5 如实施例 4 所述，将上述 SB500 的细胞培养在无血清的培养基中。然后收集这种条件培养的培养液经过蛋白 G-Sepharose 亲和柱 (Pharmacia)。纯化后的抗体经 10%SDS-PAGE 电泳鉴定，可以看到约 55KD (重链) 和约 25KD (轻链) 的二条蛋白带，表明这些人源化的抗体已被纯化。

10 实施例 10：人源化抗体 Hz4B4-2 的抗原结合亲和性

测定纯化的人源化抗体 Hz4B4-2 的抗原结合亲和性是按实施例 5 所用的 BIAcore™ 方法 (Pharmacia) 进行的。结果如表 3 所示。

表 3

15 人源化抗体 Hz4B4-2 与抗原结合的亲和性

抗体	$k_{on} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{off} (\text{s}^{-1})$	$K_d (\text{M})$
小鼠单克隆抗体 4B4-1-1	1.16×10^4	1.54×10^{16}	1.33×10^{-10}
人源化抗体 Hz4B4-1	5.00×10^4	4.36×10^{-6}	8.72×10^{-11}
人源化抗体 Hz4B4-2	1.17×10^4	2.14×10^{-6}	1.83×10^{-11}

- 如表 3 所示，Hz4B4-1 抗原结合亲和性 (K_d) 比小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 高 1.5 倍。人源化抗体 Hz4B4-2 比小鼠单克隆抗体的抗原结合亲和性高 7.3 倍。本发明的人源化的抗体 Hz4B4-1 和 Hz4B4-2 具有我们所希望的与人的抗体相同的亲和性。

20 实施例 11：实验结果——人源化抗体的免疫反应和免疫抑制效应

A. 狒狒的免疫反应和人源化抗体 Hz4B4-1 的施用

使用了 Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio,

Texas) 的 7-8 岁雄性和雌性狒狒 (Panubis), 体重 12-15kg。将狒狒分成 3 组, 每组 2 只雄性, 1 只雌性, 在标准的饲养动物条件下饲养。每只动物肌肉注射氢氧化铝佐剂 (Sigma) 配制的 1mg OVA 进行免疫。设开始 OVA-免疫时为 0 周, 6 周后, 用 OVA (1mg, PBS 配制) 进行第二次免疫。人源化抗体 (或 PBS, 对照组) 的第一次注射与第一次 OVA 免疫同时进行 (0 周), 随后分别在 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 周给予注射人源化抗体或 PBS。第 1 组的 3 只狒狒 (对照组) 静脉注射 10ml PBS。而第 2 和第 3 组用人源化的抗体 Hz4B4-1 进行治疗, 该抗体是从实施例 4 中获得, 分别以 1 或 4mg/kg 体重给予治疗。在-1.5 周, 0 周和每隔一周收集血清标本直至第 10 周。

B. 宿主体液免疫反应的评价

通过 ELISA 测定抗-OVA 和 IgM 水平。用浓度为 500ng/孔的 OVA 包被 Immunomaxisorp™ 板 (Nunc InterMed, Rockilde, Denmark)。板用 1%牛血清白蛋白封闭后, 将从步骤 1 收集的血清标本进行一系列的 2 倍稀释, 从 1/32 稀释开始, 向每孔中加入 0.1ml。室温孵育 4 小时后, 用碱性磷酸酶 (AP) 偶联的兔抗猴 IgG (Sigma)或 AP 偶联的羊抗人 IgM (Sigma) 检测结合的 IgG 和 IgM。每孔加 0.1ml 偶联剂, 在上述温度下孵育, 然后用自动微量板测定仪在 A_{405} 波长下测定光吸收 (Molecular Devices Corp., Menlo Park, California)。IgG 和 IgM 滴度测定是以最高稀释度时在 A_{405} 的光吸收, 应分别是本底的 3 倍或 5 倍。

用 ELISA 法定量测定血清中总的 IgG 或 Hz4B4-1 的含量。稀释的血清样品如上所述加到包被了羊抗人 IgG (150ng/孔)或 GST-4-1BB (100ng/孔) 的板上, 在上述所用的温度下孵育 4 小时。温浴后, 每孔加入 AP-偶联的羊抗人 IgG (Sigma), 用 P-硝基苯磷酸盐显色, 在自动微量测定仪在 A_{405} 波长下测定光吸收。结果如表 4 和图 6a-6i 所示。每个样品的总 IgG 或 Hz4B4-1 的含量是分别参考人的 IgG 或纯化的 Hz4B4-1 制备的标准曲线计算的。

表 4

实验动物 No	Hz4B4-1 剂量 (mg/kg)	7周和0周 时 OVA-特 异的 IgG 的滴度比率	7周和0周 时 OVA-特 异的 IgM 的滴度比率	7周和1周 时血清总 IgG 浓度的 比率	1周时血清 中 Hz4B4-1 的浓度 (μ g/ml)
A1	0	64	2	1.13	-
A2	0	16	1	1.02	-
A3	0	32	1	1.05	-
B1	1	2	1	0.96	6.66
B2	1	128	1	1.06	0.42
B3	1	2	1	1.01	3.85
C1	4	4	2	1.09	25.74
C2	4	1	0.5	1.16	10.14
C3	4	2	1	1.09	14.49

对照组中血清的抗 OVA IgG 水平显著地增加。在第 7 周时滴度最
 5 高，第 2 次 OVA 免疫一周后，A1、A2 和 A3 狒狒抗体滴度比 0 周时滴
 度分别高 64-、16-和 32 倍（表 4 和图 6a、6b、6c）。相比之下，在 Hz4B4-1
 治疗的狒狒中，OVA-特异抗体反应被明显抑制。在第 2 组中，Hz4B4-1
 治疗的剂量为 1mg/kg，3 只狒狒中有 2 只（B1 和 B3）也表现出抑制作
 用。在第 7 周时，滴度是 0 周时的 2 倍（表 1，图 6d、6e 和 6f）。但在
 10 B2 狒狒中没有检测到这种抑制，而在第 7 周时，其滴度比 0 周时高 128
 倍。在第 3 组中，Hz4B4-1 治疗浓度为 4mg/kg，在所有的 3 只狒狒中
 都有这种抑制作用。C1、C2 和 C3 狒狒中滴度分别增加 4，1 和 2 倍（表
 1 和图 6g，6h 和 6i）。

在所有的动物中，抗 OVA IgM 滴度都没有明显增加，无论它们是否
 15 经 Hz4B4-1 处理，表明用 Hz4B4-1 处理都没有影响可检测水平的 IgM 的
 产生。综上所述，这些数据表示，一种对 OVA（一种 T-细胞依赖的抗原）
 的体液无反应状态，由于 Hz4B4-1 的治疗而被诱导出来。这一点也可以

通过测定血清中 Hz4B4-1 的浓度来进一步证实。在所有的狒狒中，第一周时，血清中 Hz4B4-1 的浓度是最高的。但在 B2 狒狒（其没有表现出 OVA——特异的 IgG 抑制反应）中，其血清中 Hz4B4-1 的浓度比用相同剂量治疗的 B1 和 B3 明显降低（表 1）。

- 5 比较了每只狒狒在 0 周和 7 周时总 IgG 含量。如表 1 所示，总的 IgG 变化很小，而不论是否用 Hz4B4-1 治疗。此外，用 Hz4B4-1 治疗过程中，流式细胞仪分析每份血清标本中 B 和 T 细胞的数量和比例也没有明显的改变。综上所述，这些数据表明经 Hz4B4-1 治疗所引起的这种免疫系统无反应是抗原-特异性的，而不是由于全部的免疫抑制。

10 C. 4-1BB 阳性 T 细胞分析

为了评价 4-1BB 分子在临床上的重要性，用 4B4 单克隆抗体通过 FACS 分析法分析了类风湿性关节炎病人(RA)的 T 淋巴细胞上这些分子的表达。PBMC 是从正常志愿者或类风湿病人肝素抗凝的静脉血中制备的，而滑膜液细胞是从类风湿病人滑膜液中得到的。5x10⁵ PBMC 或关节滑膜液细胞与 5 μl 藻红蛋白 (PE) 标记的抗人 CD4 或者 PE 标记的抗人 CD8 的小鼠单克隆抗体 (Immune Source, Los Altos, California) 在一种含有 DMEM(1%BSA 和 0.005% NaNH₃)的染色缓冲液中，于 4°C 在避光条件下孵育 30 分钟。温浴之后，用染液缓冲液洗细胞，然后与 5 μl FITC-标记的 4B4 单克隆抗体在染色缓冲液中于 4°C 孵育 30 分钟。通过流式细胞仪分析表达 4-1BB 的 T 淋巴细胞的百分率。通过 FACStar Plus™ 细胞计数仪(Becton Dicknson & Co. Mountain View, California)分析 T 淋巴细胞上 4-1BB 分子的表达。

比较了 41 例类风湿性关节炎病人与 13 例正常志愿者的外周血 (PBMC)T 淋巴细胞中这些分子的表达。结果如图 7a 和 7b 所示。正常志愿者的 CD4 或 CD8 T 淋巴细胞与 4B4 单克隆抗体的反应很低或不能观察到：CD4⁺, <0.5%; CD8⁺, <1.2%。而相比之下，一些类风湿性关节炎病人 T 淋巴细胞 CD4⁺, 或 CD8⁺表现对 4B4 单克隆抗体的反应明显增强。在 CD4⁺ T 细胞的情况下，41 例病人有 18 例反应速率超过 1%，峰值达 7.5%。在 CD8⁺ T 细胞中，38 例病人中有 17 例的反应速率超过了 2%，最大值是 15%。

类风湿性关节炎特征为滑膜炎。受影响的滑膜组织的是淋巴细胞和血浆的浸润。这种疾病是由对一些诱发关节炎的因子响应的 T 淋巴细胞诱发的，T 淋巴细胞在类风湿性关节炎病人的发病机制中起了重要的作用，表明 T 淋巴细胞在类风湿性关节炎病人滑膜液中是处于活化状态(G.S. Firestein, p.851 in "Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis", 5thed., W.N. Kelley 等 eds., c. 1997 by W.B. Saunders, Philadelphia, PA)。因此，将 13 例类风湿性关节炎病人滑膜液的 T 淋巴细胞中 4-1BB 分子的表达与相同的病人的外周血 T 淋巴细胞中 4-1BB 分子的表达进行比较，结果如图 7c 和 7d 所示。滑膜液中的 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞与 4B4 单克隆抗体比外周血中的反应性更强；13 例类风湿性关节炎病人中 8~9 例的 CD4⁺或 CD8⁺的亚类超过了正常的 2 倍。图 7c 和 7d 中，在两个圆点之间的每一条线代表从相同的病人得到了相应的 PBMC 和 SFC。这些发现提示 4-1BB 的表达可能与类风湿性关节炎的发病过程有关。

本发明人没有局限于任何一种理论，推测 Hz4B4-1 的这种免疫抑制效应可能有两种互不排斥的机制。首先，该抗体可能干扰了在 T 细胞活化中起重要作用的 4-1BB/4-1BBL 的相互作用。第二，抗体可能通过补体-依赖的细胞毒性和抗体-依赖的细胞毒性消除表达 4-1BB 的 T 细胞。在许多由 T 细胞介导的自身免疫病的病例中，自身抗原的确定较难，或是由于变化太大而无法控制这些抗自身抗原的免疫反应。由此看来，在患自身免疫病的病人中，功能的阻断和/或活化的 T 细胞的消除（在患有自体免疫疾病的患者中，其中的大部分可能是自体抗原特异性的），将有可能成为减轻疾病的一种途径。本发明者已经发现，类风湿性关节炎病人 PBMC 和滑膜液的大部分 T 细胞表达 4-1BB，提示 4-1BB 可能是对类风湿性关节炎的抗体介导的治疗中理想的靶标，因为，仅仅活化的 T 细胞，可能大部分的病理性 T 细胞，才表达 4-1BB。在这方面，与其它共刺激分子如 CD40L 相比，4-1BB 较长的表达时间（超过 72 小时），可能是另一个用抗体靶击 4-1BB 的有利因素。除了类风湿性关节炎，也可以用 Hz4B4-1 治疗其它 T 细胞介导的自身免疫病和移植排斥。

本发明说明书包括后附的序列列表，其中有 49 个核酸或氨基酸序列。本文中引用的专利文献和科学文献全部引入本文作为参考。

微生物国际保藏证明

5

保藏人	洪孝贞
地址	韩国, 大田广域市
保藏日	1998年10月27日
保藏号	KCTC 0536BP
微生物分类命名	大肠杆菌 DH5 α /pCI-HZ4B4-MOH
国际保藏单位名称	韩国典型培养物保藏中心

微生物国际保藏证明

5

保藏人	洪孝贞
地址	韩国，大田广域市
保藏日	1998年10月27日
保藏号	KCTC 0537BP
微生物分类命名	大肠杆菌 DH5 α /pRC-HZ4B4-MOK-gs
国际保藏单位名称	韩国典型培养物保藏中心

微生物国际保藏证明

5

保藏人	洪孝贞
地址	韩国，大田广域市
保藏日	1998年10月27日
保藏号	KCTC 0540BP
保藏人命名名称	MH200-3
国际保藏单位名称	韩国典型培养物保藏中心

微生物国际保藏证明

5

保藏人	洪孝贞
地址	韩国，大田广域市
保藏日	1998年10月27日
保藏号	KCTC 0541BP
保藏人命名名称	SB500-23
国际保藏单位名称	韩国典型培养物保藏中心

序列表

- <110> 株式会社 LG 化学
- 5
- <120> 人源化的特异于人 4-1BB 的抗体和含有它的药物组合物
- <130> PC91146/LKY
- 10 <150> KR 1998-49177
- <151> 1999-05-11
- <160> 49
- 15 <170> KOPATIN 1.5
- <210> 1
- <211> 107
- <212> 蛋白质
- 20 <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人源化抗体 Hz4B4-1 的轻链的可变区
- 25
- <400> 1
- Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
- Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30
- Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

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

<210> 2

<211> 119

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

15

<220>

<223> 人源化抗体 Hz4B4-1 的重链的可变区

20 <400> 2

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 3

<211> 107

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

15 <220>

<223> 人源化抗体 Hz4B4-2 的轻链的可变区

<400> 3

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

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

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

5 <210> 4

<211> 119

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

10 <220>

<223> 人源化抗体 Hz4B4-2 的重链的可变区

<400> 4

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

	<210> 5	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
5	<220>	
	<223> 引物 KXA	
	<400> 5	
	actaagcttc atcagacagg cagggga	27
	<210> 6	
	<211> 48	
	<212> DNA	
15	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 KXB	
20	<400> 6	
	tggagacaca gactgggtgg ctggagactg ggtcatcaca atgteccc	48
	<210> 7	
	<211> 48	
25	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 KXC	
30	<400> 7	
	accagtctg tgtctccagg agaaagagtc acccttctct gcagggcc	48
	<210> 8	
35		

- <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- 5 <220>
 <223> 引物 KXD
- <400> 8
- agactggcca ggtttttggt gataccagtg 30
- <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- 15 <220>
 <223> 引物 KXE
- <400> 9
- caaaaacctg gccagtcctc aagcttctc atc 33
- <210> 10
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- 25 <220>
 <223> 引物 KXF
- <400> 10
- ttcaggttcc acactgctga tggtagaggt gaaatctgac cc 42
- <210> 11
 <211> 39

- <212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
5 <223> 引物 KXG
- <400> 11
agcagtgtgg aacctgaaga tttggagtg tattactgt 39
- 10 <210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
- 15 <220>
<223> 引物 KXH
- <400> 12
aggcagatct tttgatttct agcttggt 28
- <210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列
- 25 <220>
<223> 引物 AMH
- <400> 13
attagcggcc gccacatgg gatggagcta tatic 34
- <210> 14
<211> 33
<212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 BMH	
5	<400> 14	
	ttcagcccca gactgcacca gttggacctg gga	33
	<210> 15	
10	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
15	<223> 引物 CMH	
	<400> 15	
	cagtctgggg ctgaagtgt gaagcctggg gct	33
20	<210> 16	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
25	<220>	
	<223> 引物 DMH	
	<400> 16	
	tccaggggcc tgcttcaccc agtgcac	27
	<210> 17	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<223> 引物 EMH	
	<400> 17	
	aagcaggccc ctggacaagt ccttgag	27
	<210> 18	
	<211> 48	
	<212> DNA	
10	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 FMH	
15	<400> 18	
	caggctgctg agctccatgt aggetgtgct cgcggatttg tctacagt	48
	<210> 19	
	<211> 48	
20	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 GMH	
25	<400> 19	
	atggagctca gcagcctgag atctgaggac acggcggctct attactgt	48
	<210> 20	
30	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
35		

	<223> 引物 HMH	
	<400> 20	
5	tatagctagc tgaagagaca gtgaccagag t	31
	<210> 21	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
10	<220>	
	<223> 引物 HHCD	
	<400> 21	
15	atatgctagc accaagggcc catcggtc	28
	<210> 22	
	<211> 28	
	<212> DNA	
20	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 HDK	
25	<400> 22	
	atatagatct gtggctgcac catctgtc	28
	<210> 23	
	<211> 21	
30	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 MOKA	

	<400> 23	
	ccgctctaga actagagctt c	21
	<210> 24	
5	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
10	<223> 引物 MOKB	
	<400> 24	
	cagagaaagg gttggtggag actgggtcat c	31
15	<210> 25	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
20	<220>	
	<223> 引物 MOKC	
	<400> 25	
	accaaccctt tctctgtctc caggagaaag a	31
	<210> 26	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
30	<220>	
	<223> 引物 MOKD	
	<400> 26	
35		

	cgctaatagga ctggctggcc ctgca	25
	<210> 27	
	<211> 25	
5	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物 MOKE	
10	<400> 27	
	agccagtcca ttagcgacta cttac	25
	<210> 28	
15	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
20	<223> 引物 MOKF	
	<400> 28	
	tggtgagagt gaaatcggtc cctgatccac tgccactgaa cctagcgggg atccc	55
25	<210> 29	
	<211> 54	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
30	<220>	
	<223> 引物 MOKG	
	<400> 29	
35	gatttcactc tcaccatcag cagtctggaa cctgaagatt ttgctgtgta ttac	54

- <210> 30
 <211> 38
 <212> DNA
 5 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物 MOKH

 10 <400> 30
 aggcagatct ttgatttcc accttgggtgc ctccaccg 38

 <210> 31
 <211> 25
 15 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物 MOHA
 20
 <400> 31
 gccgactagt ctcgaggccg ccacc 25

 <210> 32
 25 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 30 <223> 引物 MOHB

 <400> 32
 actgaagccc caggttctt cacttcagc 29

 35 <210> 33

- <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- 5 <220>
 <223> 引物 MOHC
- <400> 33
 agcctggggc ttcagtgaag ggtcctgca 30
- 10 <210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- 15 <220>
 <223> 引物 MOHD
- <400> 34
 aaggcgttgt ccagggcct ggcgcaccca gtg 33
- <210> 35
 <211> 34
 <212> DNA
 25 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 引物 MOHE
- 30 <400> 35
 ccctggacaa cgccttgagt ggatgggaga gatt 34
- <210> 36
 <211> 41

35

- <212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
5 <223> 引物 MOHF
- <400> 36
acgcgtccct ggaacttcig ggagtagtta gtatgaccgt t 41
- 10 <210> 37
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
- 15 <220>
<223> 引物 MOHG
- <400> 37
agttccaggg acgcgtgaca atcactgtag acaaatccgc g 41
- 20 <210> 38
<211> 107
<212> 蛋白质
<213> 人工序列
- 25 <220>
<223> 小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 的轻链可变区
- <400> 38
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
 85 90 95

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

15

<210> 39

<211> 119

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

20

<220>

<223> 小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 的重链可变区

<400> 39

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 40

<211> 107

15 <212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 人抗体(X82934)的轻链可变区

20

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 41

<211> 119

<212> 蛋白质

10 <213> 人工序列

<220>

<223> 人抗体(M17750)的重链可变区

15 <400> 41

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

5 <211> 415

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

10 <223> 编码人源化抗体 Hz4B4-1 的轻链可变区的基因

<400> 42

```

actagagctt catcagacag gcaggggaag caagatggat tcacaggccc aggttcttat      60
gttactgctg ctatgggtat ctggtacctg tggggacatt gtgatgacc agtctccagc      120
caccagtct gtgtctccag gagaaagagt caccctttcc tgcagggcca gccagactat      180
tagcgactac ttacactggt atcaacaaaa acctggccag tctccaaggc ttctcatcaa      240
atatgcttcc caatccatct ctgggatccc ctccaggttc agtggcagtg gatcagggtc      300
agatttact ctcacatca gcagtgtgga acctgaagat tttggagtgt attactgtca      360
agatggtcac agctttctc cgacgttcgg tggaggcacc aagctagaaa tcaaa          415

```

<210> 43

<211> 423

<212> DNA

30 <213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化抗体 Hz4B4-1 的重链可变区的基因

35

<400> 43

```

gccgccacca tgggatggag ctatatcadc ctctttttgg tagcaacagc tacagatgtc      60
cactcccagg tccaactggt gcagtctggg gctgaagtgg tgaagcctgg ggcttcagtg      120
aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcagcagct actggatgca ctgggtgaag      180
caggcccctg gacaagtccct tgagtggatt ggagagatta atcctggcaa cggtcatact      240
aactacaatg agaagttcaa gagcaaggcc aactgactg tagacaaatc cgcgagcaca      300
gcctacatgg agctcagcag cctgagatct gaggacacgg cggctctatta ctgtgaaga      360
tcttttacta cggcacgggc gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct      420
tca                                                                              423

```

<210> 44

<211> 415

<212> DNA

20 <213> 人工序列

<220>

<223> 编码小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 的轻链可变区的基因

25 <400> 44

```

actagagctt catcagacag gcaggggaag caagatggat tcacaggccc aggttcttat      60
gttactgctg ctatgggtat ctggtacctg tggggacatt gtgatgacct agtctcaagc      120
caccagctct gtgactccag gagatagagt ctctcttcc tgcagggcca gccagactat      180
tagcgactac ttacactggt atcaacaaaa atcacatgag tctccaaggc ttctcatcaa      240
atatgcttcc caatccatct ctgggatccc ctccaggctc agtggcagtg gatcagggtc      300

```

agatttcact ctcagtatca acagtgtgga acctgaagat gttggagtgt attactgtca 360

agatggtcac agctttccic cgacgttcgg tggaggcacc aagctagaaa tcaaa 415

<210> 45

<211> 423

<212> DNA

<213> 人工序列

10

<220>

<223> 编码小鼠单克隆抗体 4B4-1-1 的重链可变区的基因

<400> 45

gccgccacca tgggatggag ctatatcatic ctcttttttgg tagcaacagc tacagatgtc 60

cactcccagg tccaactgca gcagcctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 120

aagctgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttcagcagct actggatgca ctgggtgaag 180

cagaggcctg gacaagtctt tgagtggatt ggagagatta atcctggcaa cggtcatact 240

aactacaatg agaagttcaa gagcaaggcc aactgactg tagacaaatc ctccagcaca 300

gcctacatgc aactcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ctgtgcaaga 360

tcttttacta cggcacgggc gtttgcttac tggggccaag ggactctggg cactgtctct 420

gca 423

30

<210> 46

<211> 415

<212> DNA

<213> 人工序列

35

<220>

<223> 编码人源化抗体 Hz4B4-2 的轻链可变区的基因

<400> 46

```

actagagcct catcagacag gcaggggaag caagatggat tcacaggccc aggttcttat      60
gttactgctg ctatgggtat ctggtacctg tggggacatt gtgatgacct agtctccacc      120
aaccctttct ctgtctccag gagaaagagt caccctttcc tgcagggcca gccagtccat      180
tagcgactac ttacactggt atcaacaaaa acctggccag tctccaaggc ttctcatcaa      240
atatgcttcc caatccatct ctgggatccc cgctaggttc agtggcagtg gatcagggac      300
cgatttact ctcacatca gcagtctgga acctgaagat ttgtctgtgt attactgtca      360
agatggtcac agctttctc cgacgttcgg tggaggcacc aaggtggaaa tcaaa          415

```

<210> 47

<211> 423

20 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码人源化抗体 Hz4B4-2 的重链可变区的基因

25

<400> 47

```

gccgccacca tgggatggag ctatatcatc ctctttttgg tagcaacagc tacagatgtc      60
cactcccagg tccaactggt gcagtctggg gctgaagtga agaagcctgg ggcttcagtg      120
aaggigtctt gcaaggcttc tggctacacc ttcagcagct actggatgca ctgggtgcgc      180
caggcccctg gacaacgcct tgagtggatg ggagagatta atcctggcaa cggtcatact      240

```

	aactactccc agaagttcca gggacgctg acaatcactg tagacaaatc cgcgagcaca	300
	gcctacatgg agctcagcag cctgagatct gaggacacgg cggcttatta ctgtgcaaga	360
	tcttttacta cggcacgggc gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct	420
	tca	423
	<210> 48	
10	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
15	<223> 引物 Ryu-93	
	<400> 48	
	gaagtcgacc taacactctc ccctgtt	27
20	<210> 49	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
25	<220>	
	<223> 引物 Ryu-101	
	<400> 49	
	cggtcgactc atttaccgg agacag	26

K 轻链

4B4-1-1 DIVMTQSQATQSVTPGDRVSLSC RASQTISDY LH WYQOKSHESPRLLIK

X82934 DVVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSVSSYLA WYQOKPGQAPRLLIY

Hz4B4-1 DIVMTQSPATQSVSPGERVTLSC RASQTISDY LH WYQOKPGQSPRLLIK

Hz4B4-2 -----P-L-L-----S-----

4B4-1-1 YASQIS GIPSRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYYC QDGHSPPT FGGTKLEIK

X82934 DASRRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QRSNWPLT FGGTKVEIK

Hz4B4-1 YASQIS GIPSRFSGSGSGSDFTLTISSVEPEDFGVYYC QDGHSPPT FGGTKLEIK

Hz4B4-2 -----A-----T-----L-----A-----V---

重链

4B4-1-1 QVQLQQGAELVKPGASVKLSCKASGYTFS SYMH WVKQRPQVLEWIG EINPGNGHTNYNEKFKS

M17750 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT SYAMH WVRQAPGQRLEWVG WINAGNGNTKYSQKFGG

Hz4B4-1 QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFS SYMH WVKQAPQVLEWIG EINPGNGHTNYNEKFKS

Hz4B4-2 -----K-----V-----R-----R---M-----SQ---QG

4B4-1-1 KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR SFTTARAFAY WGQGLTVTSA

M17750 RVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR GGYGSGSNY WGEGLTVTVSS

Hz4B4-1 KATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR SFTTARAFAY WGQGLTVTVSS

Hz4B4-2 RV-I-----

图 1

人源化抗体 Hz4B4-1的 VL

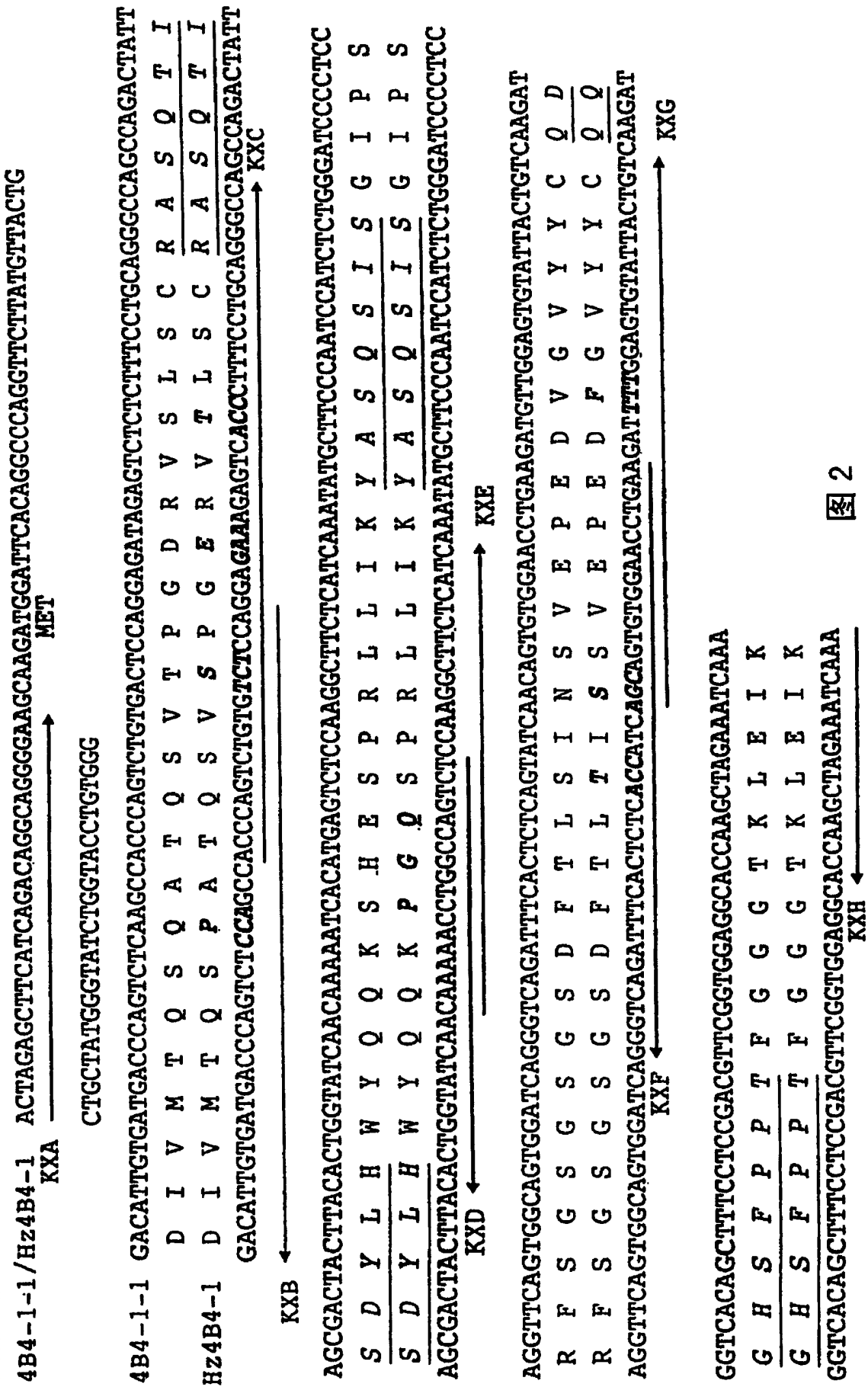


图 2

人源化抗体 Hz4B4-1 的 VH
 4B4-1-1
 GCCGCCACCATGGGATGGAGCTATATCAATCCCTCTTTTGGTAGCAACAGCTACAGATGTCCACTCC
 MET
 Hz4B4-1
 GCCGCCACCATGGGATGGAGCTATATCAATCCCTCTTTTGGTAGCAACAGCTACAGATGTCCACTCC ← BMH
 CAGGTCCAACTGCAGCAGCCCTGGGCTGAACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAGC
 Q V Q L Q Q P G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F S
 Q V Q L V Q S G A E V V K P G A S V K L S C K A S G Y T F S
 CAGGTCCAACTGGTGCAGTCTGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAGC
 AGCTACTGGATGCCTGGTGAAGCAGAGCCCTGGACAAGCTCTTGAAGTGGATGGAGAGATTAATCTGGCAACGGTCACTAATACTAC
 S Y W M H W V K Q R P G Q V L E W I G E I N P G N G H T N Y
 S Y W M H W V K Q A P G Q V L E W I G E I N P G N G H T N Y
 AGCTACTGGATGCCTGGTGAAGCAGAGCCCTGGACAAGCTCTTGAAGTGGATGGAGAGATTAATCTGGCAACGGTCACTAATACTAC
 DMH ←
 AATGAGAAGTTC AAGCAAGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCCTACATGCAACTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGAC
 N E K F K S K A T L T V D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D
 N E K F K S K A T L T V D K S S A S T A Y M E L S S L R S E D
 AATGAGAAGTTC AAGCAAGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCCTACATGCAACTCAGCAGCCCTGAGATCTGAGGAC
 FMH ←
 TCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCTTTTACTACGGCAGCGGGCTTGTACTGGGGCC AAGGACTCTGGTCACTGTCCTCGCA
 S A V Y Y C A R S F T T A R A F A Y W G Q G T L V T V S A
 T A V Y Y C A R S F T T A R A F A Y W G Q G T L V T V S S
 ACGGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCTTTTACTACGGCAGCGGGCTTGTACTGGGGCC AAGGACTCTGGTCACTGTCCTCGCA
 GMH ←
 HMH ←

图 2

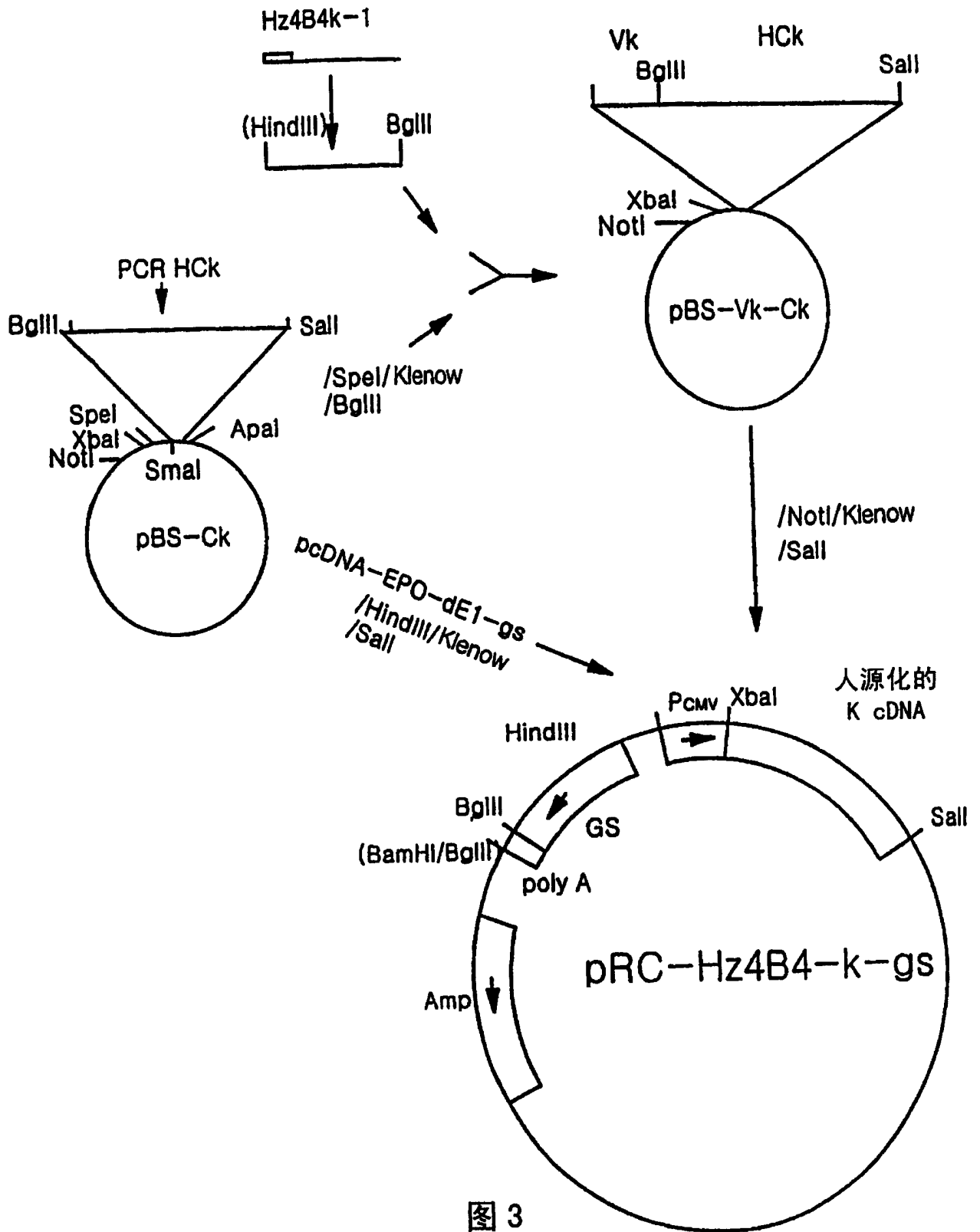


图 3

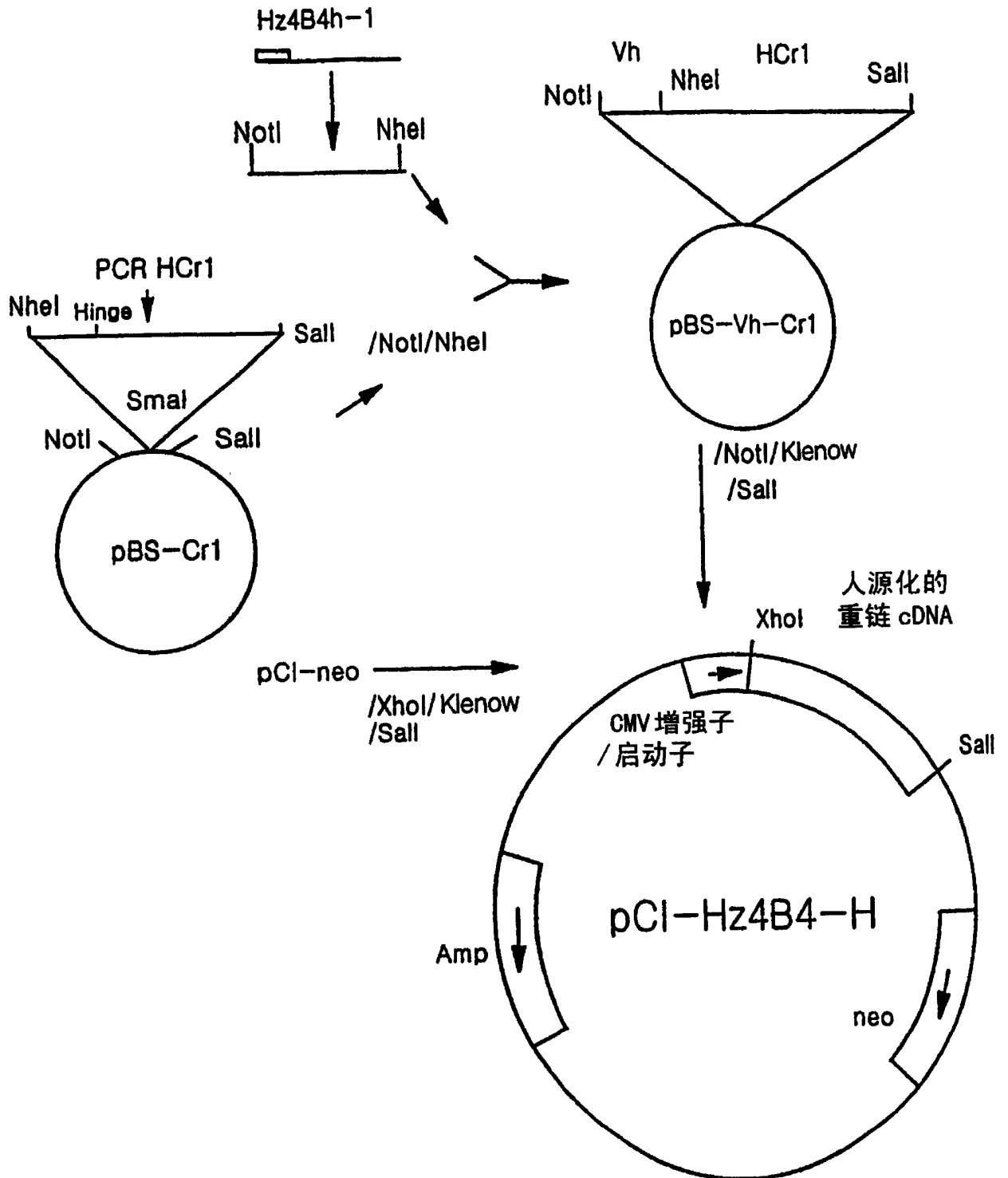


图 4

人源化抗体 Hz4B4-2 的 VL

Hz4B4-1/Hz4B4-2 ACTAGAGCTTCATCAGACAGGAGGGAAGCAAGATGGATTACAGGGCCAGGGTTCTTATGTACTGCTG
MOKA → MET

TATGGGTATCTGGTACCTGTGGG

Hz4B4-1 GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCAGTCTGTCTCCAGGAGAAAGAGTCACCCCTTCCTGCAGGGCCAGCCAGACTATTAGC
D I V M T Q S P A T Q S V S P G E R V T L S C R A S Q T I S
D I V M T Q S P P T L S L S P G E R V T L S C R A S Q S I S
Hz4B4-2 GACATTGTGATGACCCAGTCTCCAACAACCTTCTGTCTCCAGGAGAAAGAGTCACCCCTTCCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATTAGC
MOKC → MOKD

MOKB ←

GACTACTTACACTGGTATCAACAAAACCTGGCCAGTCTCCAAGCTTCTCATCAAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTCC
D Y L H W Y Q Q K P G Q S P R L L I K Y A S Q S I S G I P S
D Y L H W Y Q Q K P G Q S P R L L I K Y A S Q S I S G I P A
GACTACTTACACTGGTATCAACAAAACCTGGCCAGTCTCCAAGCTTCTCATCAAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCCTCC
MOKE → MOKF

AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACCTCACCATCAGCAGTGGAACTGAAGATTTGGAGTGTATTACTGTCAAGAT
R F S G S G S D F T L T I S S V E P E D F G V Y Y C Q D
R F S G S G S T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q D
AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACCGATTTCACCTCACCATCAGCAGTGGAACTGAAGATTTGGAGTGTATTACTGTCAAGAT
MOKG →

GGTCACAGCTTTCCTCCGACGTTGGTGGAGCCCAAGCTAGAATCAAA
G H S F P P T F G G G T K L E I K
G H S F P P T F G G G T K V E I K
GGTCACAGCTTTCCTCCGACGTTGGTGGAGCCCAAGCTAGAATCAAA
MOKH ←

图 5

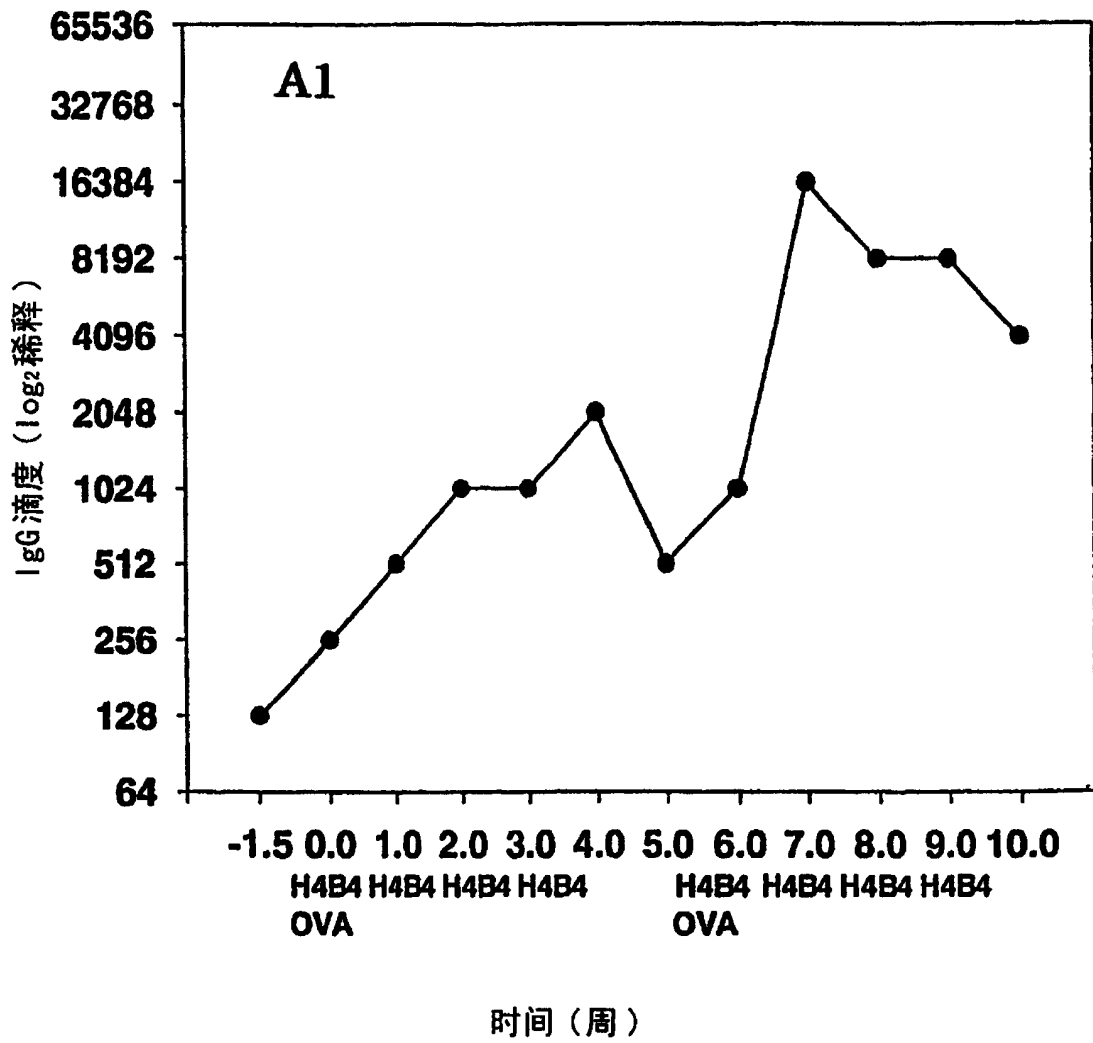


图 6a

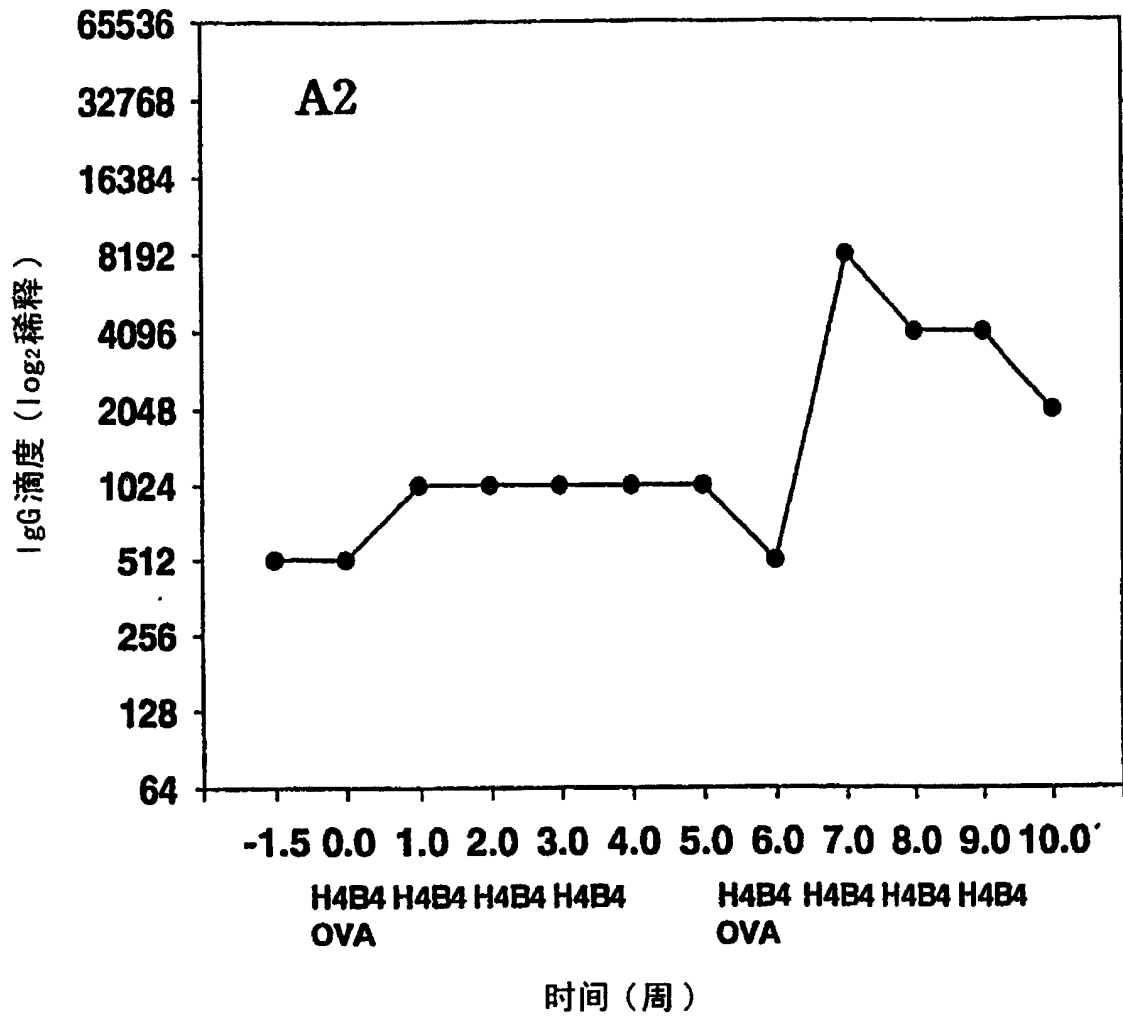


图 6b

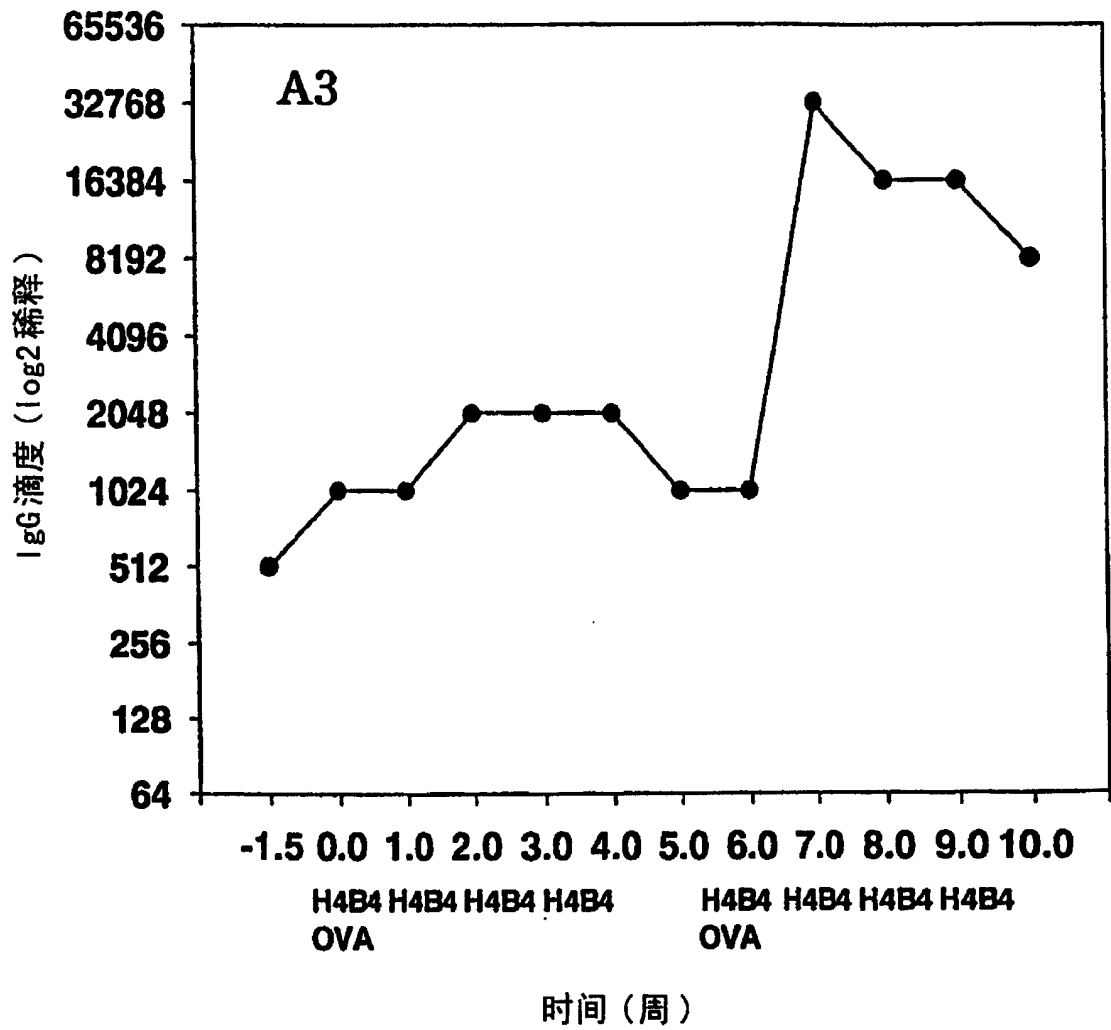


图 6c

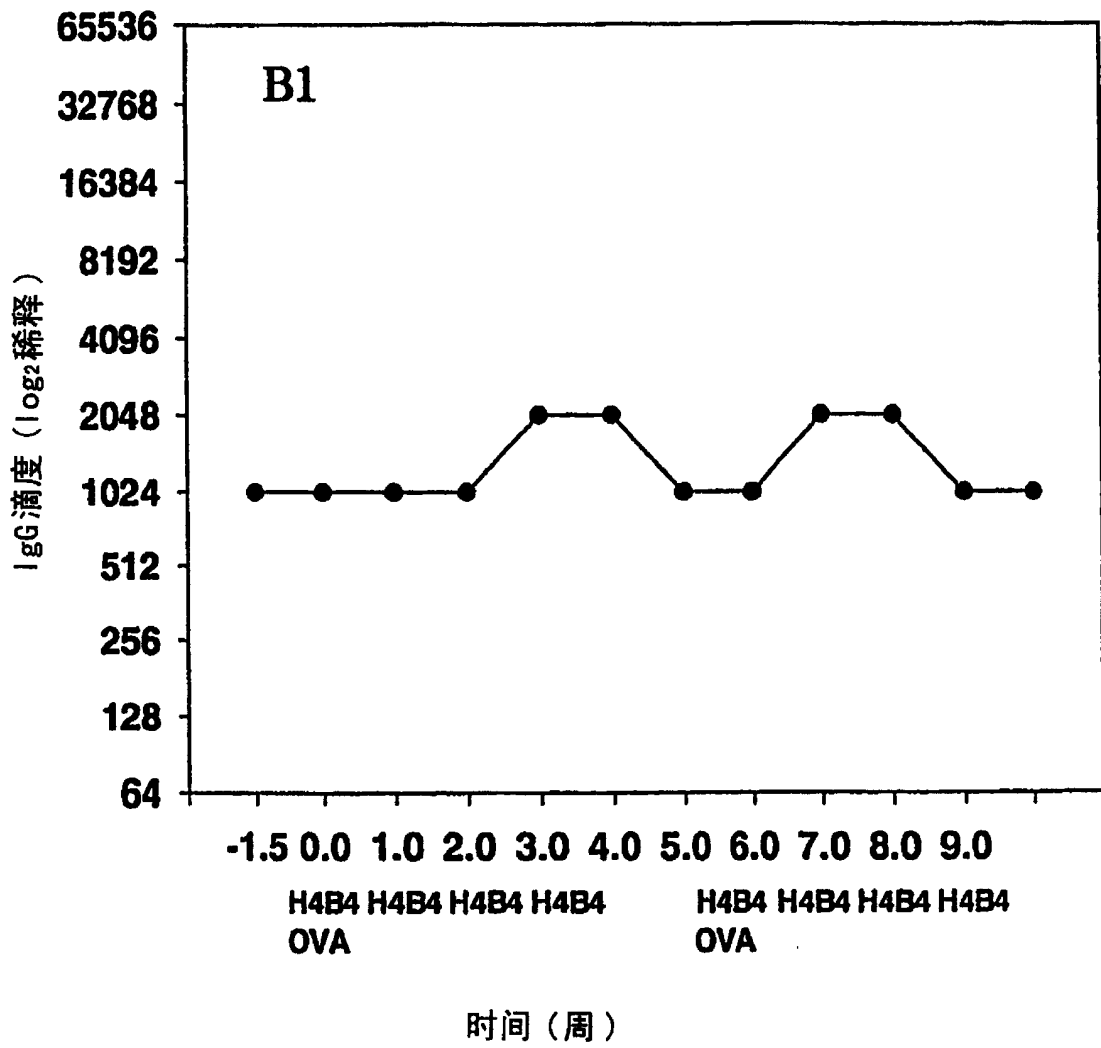


图 6d

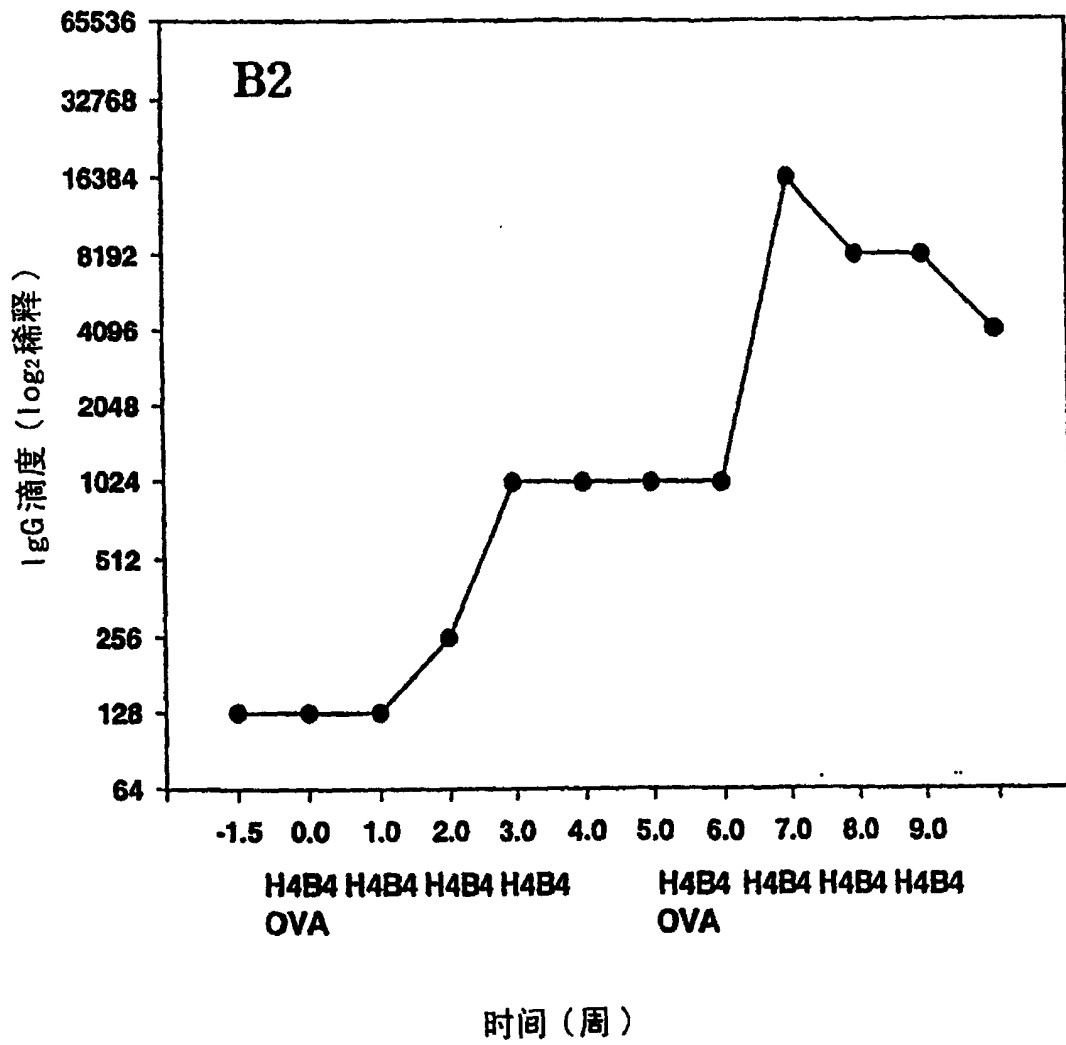


图 6e

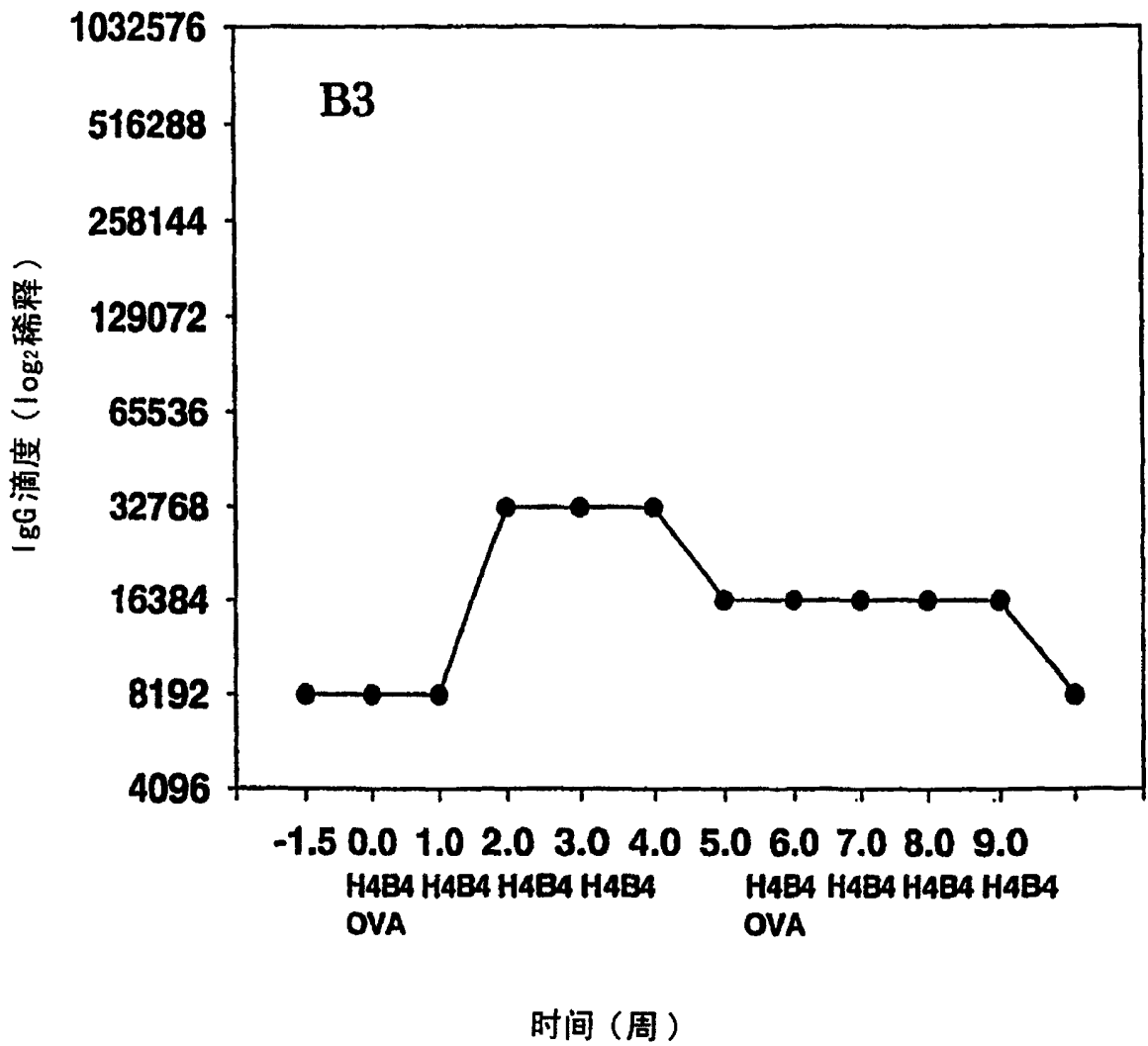


图 6f

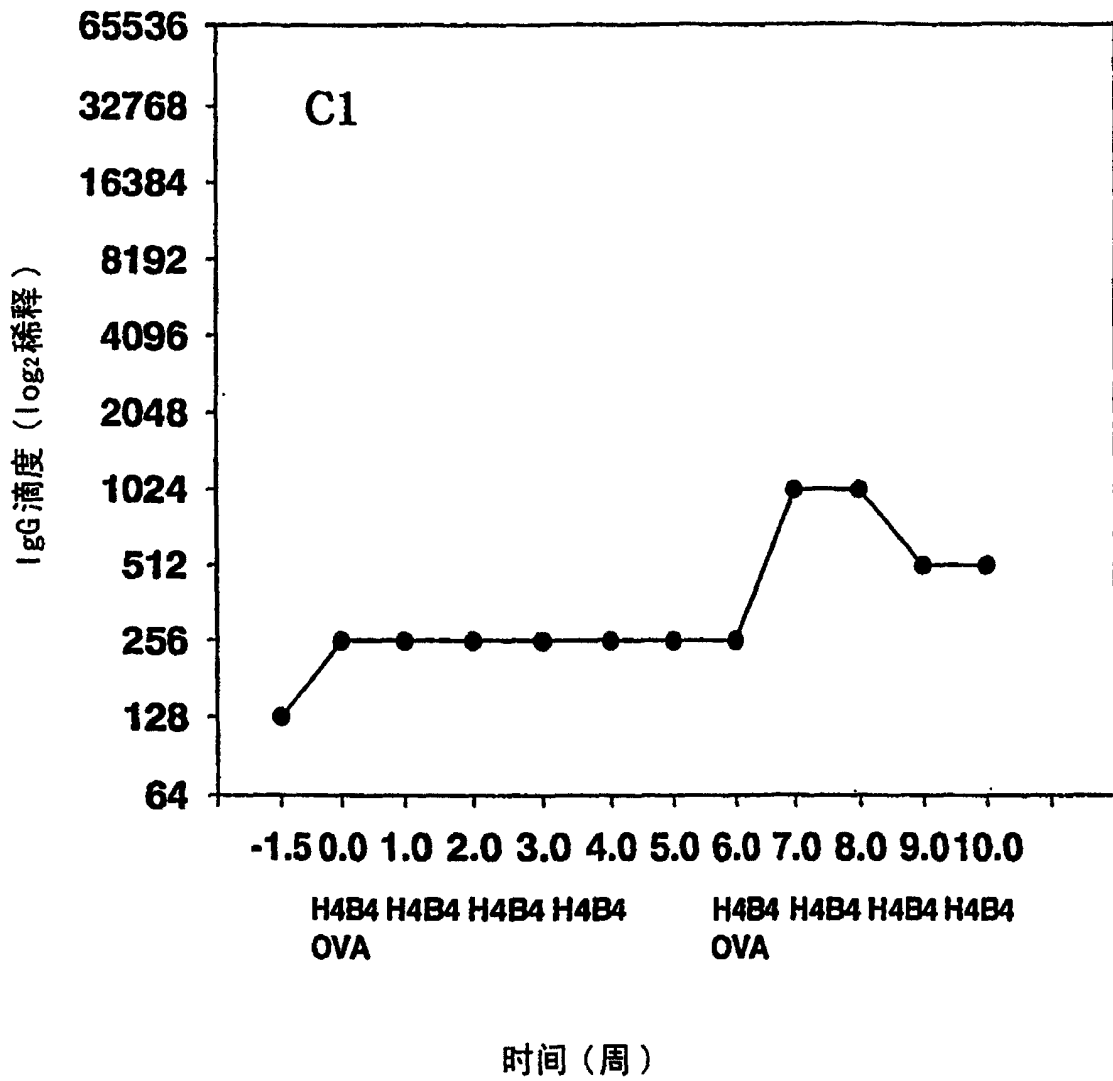


图 6g

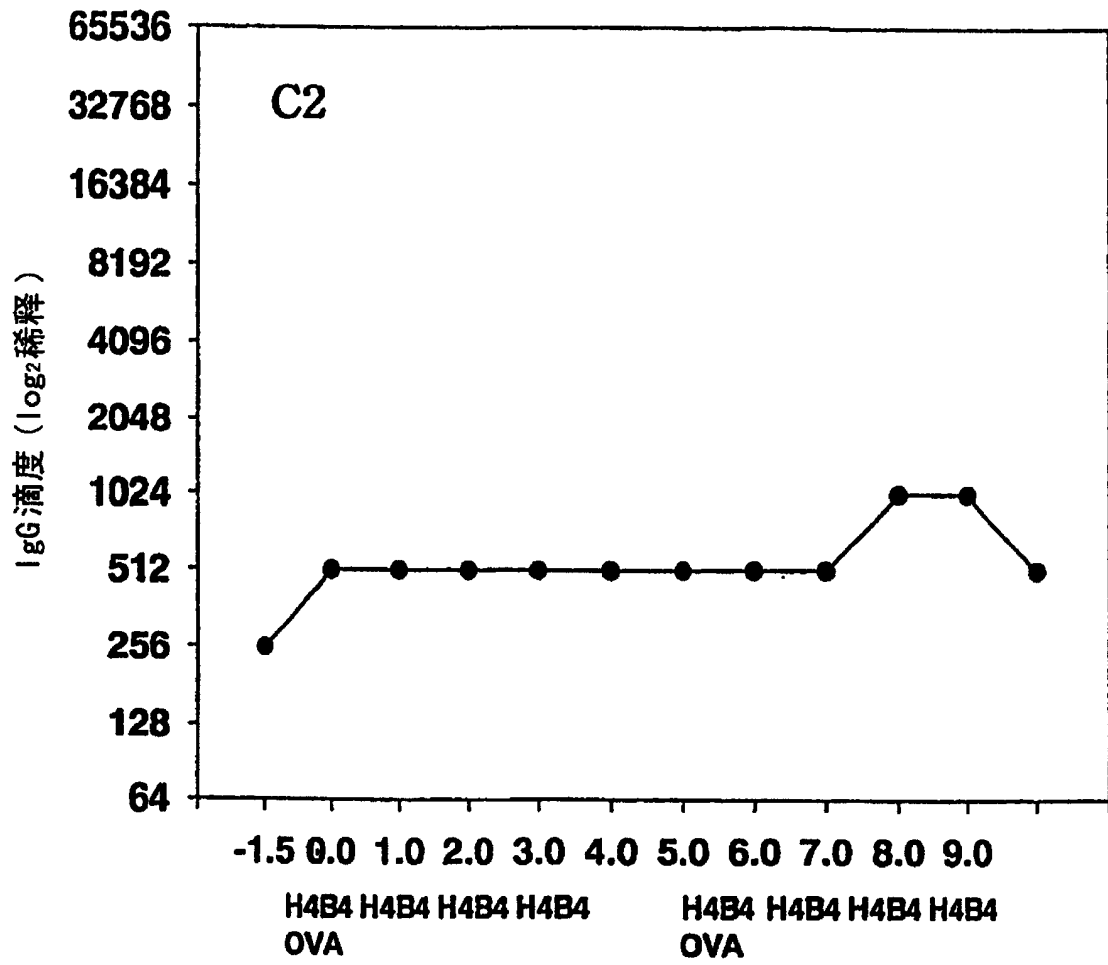


图 6h

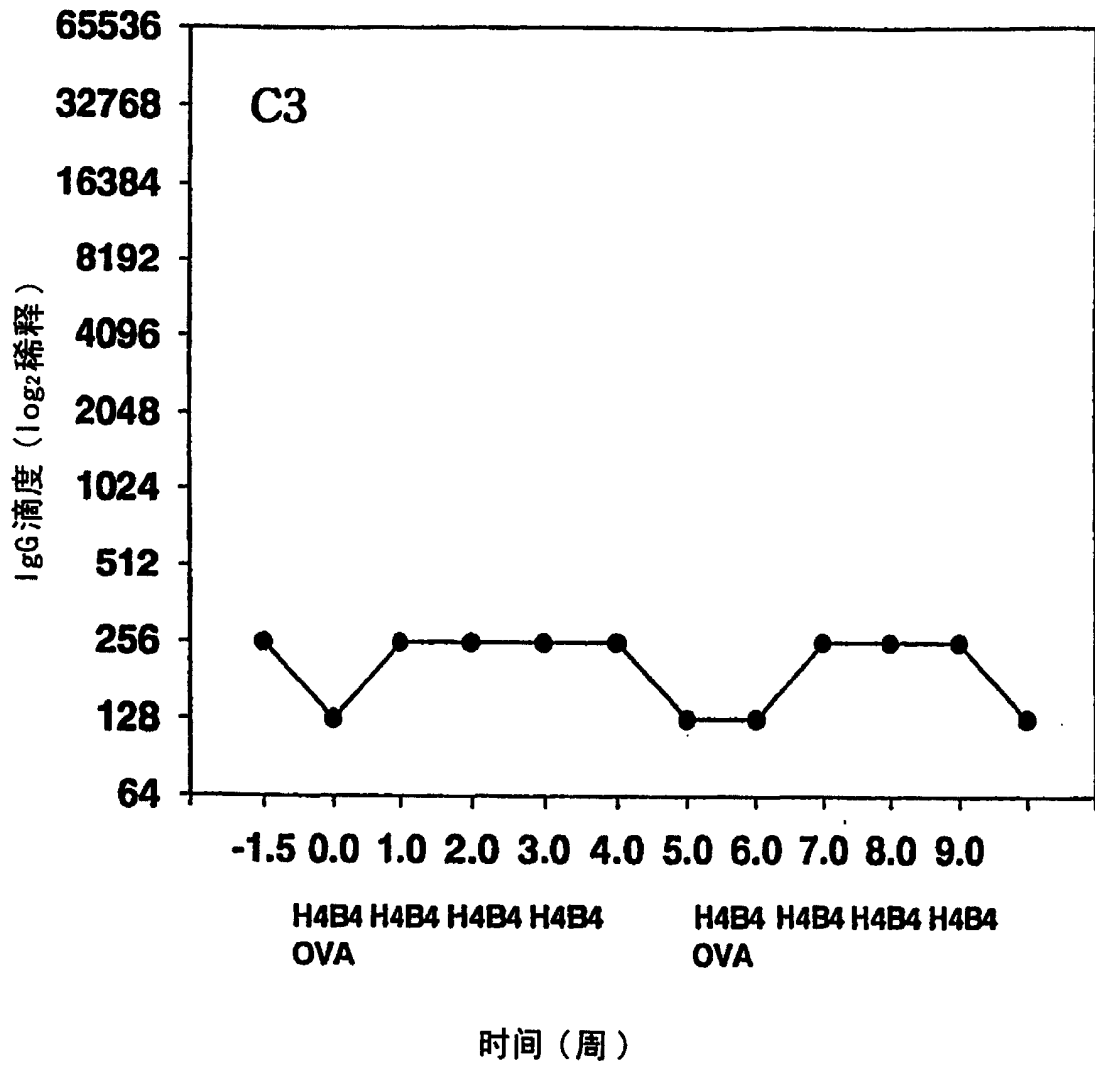


图 6i

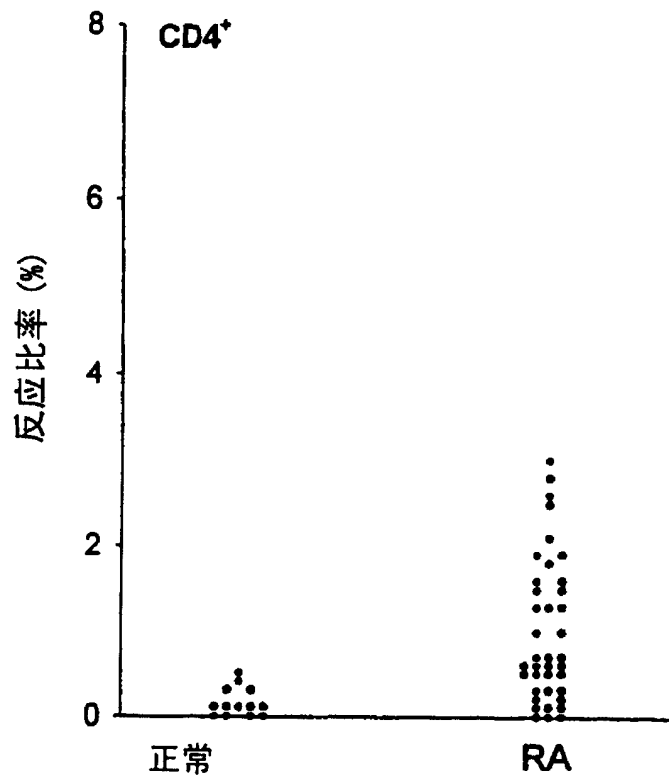


图 7a

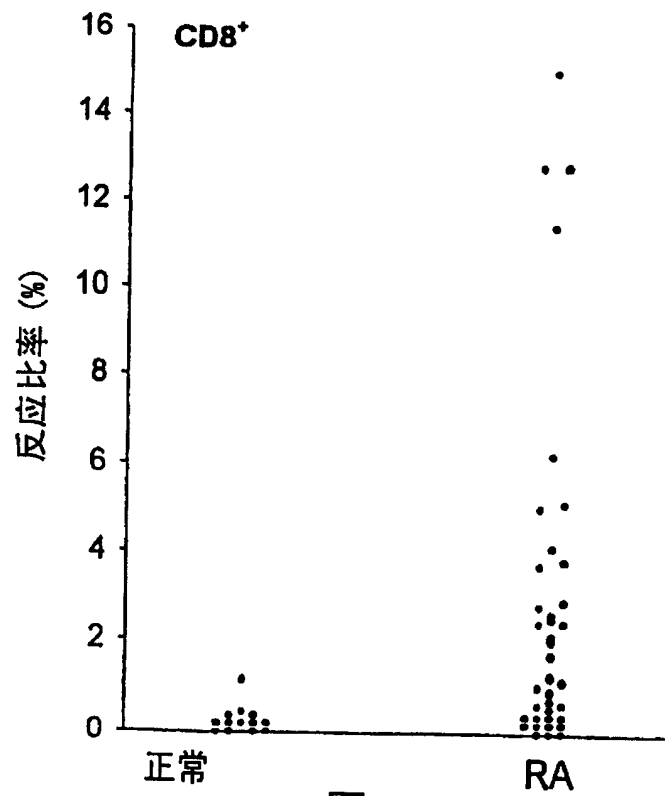


图 7b

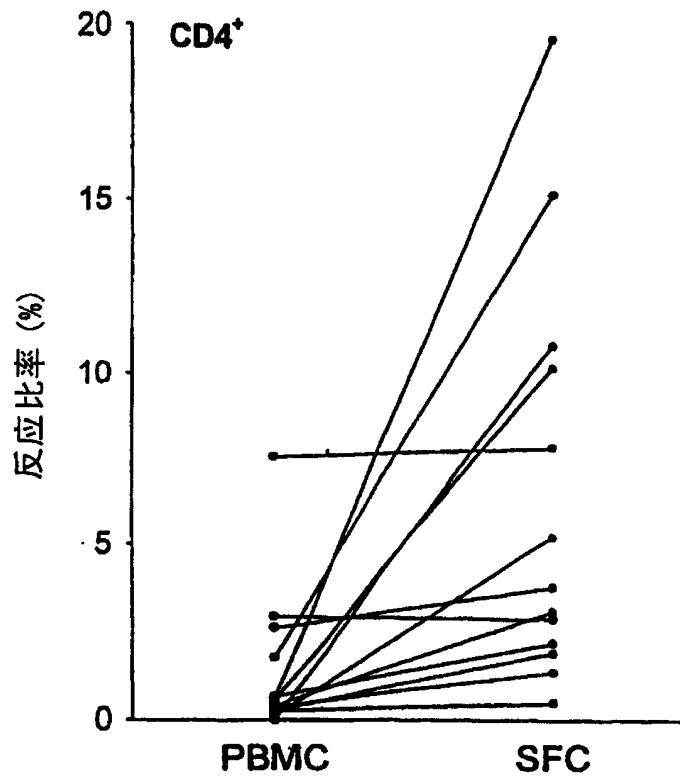


图 7c

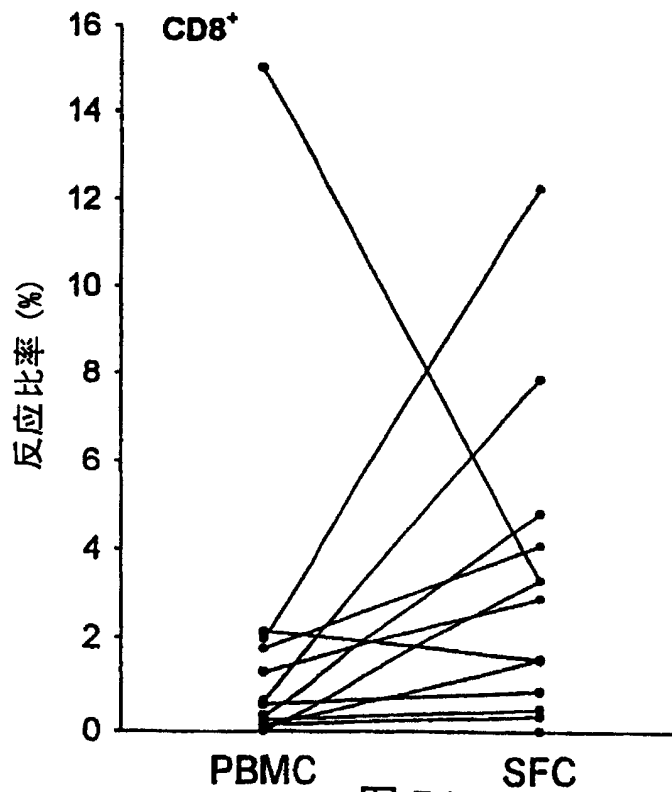


图 7d