

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780028564.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101495632A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 16/46 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2007.5.30

[21] 申请号 200780028564.4

[30] 优先权

[32] 2006.5.31 [33] JP [31] 152892/2006

[86] 国际申请 PCT/JP2007/061026 2007.5.30

[87] 国际公布 WO2007/139164 日 2007.12.6

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.1

[71] 申请人 安斯泰来制药有限公司

地址 日本东京

共同申请人 财团法人化学及血清疗法研究所

[72] 发明人 山本宣哉 酒井文彦 樋口浩文

鸟饲正治 中岛敏博

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 李连涛

权利要求书 2 页 说明书 31 页 序列表 26 页
附图 13 页

[54] 发明名称

人源化抗人骨桥蛋白抗体

[57] 摘要

本发明提供比以往的抗人骨桥蛋白抗体活性(抗原结合活性、白细胞游走抑制活性等)和/或稳定性(对热、低酸性条件和改性剂的耐性等)优异的人源化抗人骨桥蛋白抗体。

1. 人源化抗人骨桥蛋白抗体，该抗体含有由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列组成的重链可变区、和由 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列组成的轻链可变区。
2. 权利要求 1 所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体，其中，上述抗体的重链恒定区是人 Igy1。
3. 权利要求 1 所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体，其中，上述抗体的轻链恒定区是人 Igk。
4. 权利要求 1 所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体，其中，上述抗体的重链恒定区为人 Igy1，上述抗体的轻链恒定区为人 Igk。
5. 人源化抗人骨桥蛋白抗体，该抗体含有由 SEQ ID NO.25 所示氨基酸序列组成的重链、和由 SEQ ID NO.27 所示氨基酸序列组成的轻链。
6. 多核苷酸，该多核苷酸含有编码权利要求 1 所述人源化抗人骨桥蛋白抗体的重链可变区的序列。
7. 多核苷酸，该多核苷酸含有编码权利要求 1 所述人源化抗人骨桥蛋白抗体的轻链可变区的序列。
8. 表达载体，该表达载体含有权利要求 6 和/或 7 所述多核苷酸。
9. 宿主细胞，该宿主细胞中导入了权利要求 8 所述的表达载体。
10. 生产人源化抗人骨桥蛋白抗体的方法，该方法包含培养权利要求 9 所述的宿主细胞，使该细胞表达人源化抗人骨桥蛋白抗体的步骤。
11. 自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎或变形性关节炎的治疗药，该药物含有权利要求 1~5 中任一项所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体。
12. 用于预防或治疗自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎或变形性关节炎的方法，该方法包含给予治疗有效量的权利要求 1~5

中任一项所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体的步骤。

13. 权利要求 1~5 中任一项所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体在制备用于预防或治疗自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎或变形性关节病的药物中的应用。

人源化抗人骨桥蛋白抗体

技术领域

本发明涉及具有优异的活性和稳定性的人源化抗人骨桥蛋白抗体、以及使用该抗体的疾病的治疗和诊断方法。

背景技术

骨桥蛋白(以下称为“OPN”)是在骨中较多含有的酸性钙结合性糖蛋白,已知在人体中,由于 mRNA 剪切的的不同,可以产生骨桥蛋白-a(以下称为“OPN-a”)、骨桥蛋白-b(以下称为“OPN-b”)、骨桥蛋白-c(以下称为“OPN-c”)的至少三种同工型(非专利文献 1)。其中,OPN-a 的前体具有后述序列的 SEQ ID NO.23 所示的氨基酸序列,通过分泌,信号肽被切割,形成 I17-N314 成熟体 OPN-a。另外,成熟体 OPN 是通过生物体内的凝血酶,在第 168 号(为 OPN-a 时)的精氨酸残基的 C 末端一侧被切割,形成 N 末端片段和 C 末端片段两段。

上述 OPN 在多种生理学和病理学方面担负着重要的功能,例如具有细胞粘附、细胞游走、肿瘤形成、免疫应答和抑制以补体为介质的细胞溶解等功能。该多种功能是以多种细胞表面受体为介质。OPN 在内部具有 RGD 序列(例如 OPN-a 中的第 159~161 号残基),识别该 RGD 序列的 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha V\beta 1$ 和 $\alpha V\beta 5$ 等整联蛋白是 OPN 的主要受体,其中, $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha V\beta 1$ 和 $\alpha V\beta 5$ 整联蛋白在血管的平滑肌细胞中经由细胞粘附、特别是 $\alpha V\beta 3$ 参与巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞和平滑肌细胞等的游走。

目前的研究也表明:OPN 经由 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)与 $\alpha 9\beta 1$ 、 $\alpha 4\beta 1$ 和 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白结合,但发现了其中 $\alpha 4\beta 1$ 与未被凝血酶切割的 OPN(非切割型 OPN)和被凝血酶切割的 N 末端片段(切割

型 OPN)两者结合,而 $\alpha 9\beta 1$ 只与凝血酶切割型 OPN 结合这样的差异(非专利文献 2~4)。该 $\alpha 9$ 和 $\alpha 4$ 、以及 $\beta 1$ 和 $\beta 7$ 的整联亚单元相互之间的氨基酸序列间的类似性高。 $\alpha 4\beta 1$ 和 $\alpha 4\beta 7$ 整联蛋白主要在淋巴细胞和单核细胞中发现,而在嗜中性粒细胞中只有极少表达。另一方面, $\alpha 9\beta 1$ 在嗜中性粒细胞中选择性高表达,经由 VCAM-1 或腱生蛋白-C (Tenascin-C)等在嗜中性粒细胞游走中担负着必须的功能。另外, $\alpha 9\beta 1$ 在肌细胞或上皮细胞、肝细胞等中也广泛表达。这样,整联蛋白亚单元 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 的细胞质结构域分别经由有微妙不同的细胞内信号转导途径,互相协同地促进白细胞向炎症部位的游走和凝集,增强其浸润活性,由此参与各种炎症反应。

这样,各种种类的整联蛋白均促进白细胞的游走,参与炎症反应,因此抑制这些整联蛋白活性的药物被认为潜在性地具有作为抗炎症药物的可能性。例如,整联蛋白 $\alpha V\beta 3$ 在破骨细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞等中表达,通过抑制 $\alpha V\beta 3$ 整联蛋白与其各种结合配体的结合,例如在关节中期待发挥抑制关节破坏的作用,因此可以实际进行抗 $\alpha V\beta 3$ 抗体的开发。

但是,属于整联蛋白家族的受体在广泛的组织内普遍表达,在维持生命活动中担负着必须的功能,因此,在类风湿性关节炎或变形性关节炎的治疗中使用整联蛋白的抗体,则在其它部位也有发生同样的抑制的可能性,可能产生副作用。

由上述观点考虑,目前为止,已经明确了类风湿性关节炎、变形性关节炎等的病因,尝试提供更优异的治疗方法。

例如 WO02/081522 (专利文献 1)中发现,风湿病患者和变形性关节炎患者,关节腔液的 OPN 浓度显示高值,并且在风湿病患者中,凝血酶切割型 N 末端片段占全部 OPN 的比例增加,确认了 OPN 与这些疾病的发病有很深相关性。专利文献 1 中,对于用凝血酶切割 OPN 得到的 N 末端片段和 C 末端片段,制备将各片段分别区别识别的抗体,使用它们进行试验,发现在类风湿性关节炎患者中,特别是由凝血酶

切割的 N 末端片段在关节腔内显示高浓度。该 N 末端片段中均存在人型整联蛋白可识别的 RGD 序列和 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)，确认同时阻断这两者序列的抗体可广泛抑制 OPN 与整联蛋白的结合，对于类风湿性关节炎或变形性关节炎等治疗有效。

具体来说，专利文献 1 中制备了抑制人 OPN 的 RGD 序列与整联蛋白结合、以及人 OPN 的 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)与整联蛋白结合的抗体，通过细胞粘附和细胞游走等的试验确认了其效果。并获得了小鼠 OPN 的该内部序列所对应的合成肽的抗体，使用小鼠的关节炎病态模型，确认了上述抗体作为治疗药的效果。

即，小鼠 OPN 与人 OPN 在氨基酸序列上、在相同位置上具有可被小鼠的整联蛋白识别的 RGD 序列和 SLAYGLR 序列(SEQ ID NO.12)，因此，取得了 M5 抗体作为同时阻断这些序列的抗体。确认了该 M5 抗体与小鼠 OPN 及其凝血酶消化产物的结合被含有 RGD 序列的 GRGDSP 肽抑制，该 M5 抗体抑制由 TNF- α 活化的、来自小鼠脾脏的单核细胞的游走。在小鼠的颅骨器官培养系统中研究该 M5 抗体，观察到抑制骨破坏的作用。并且，在小鼠胶原关节炎模型中尝试给予上述抗体，确认显示明显的治疗效果(专利文献 1 和非专利文献 5)。

这些结果强烈显示：同时阻断 RGD 序列与人型整联蛋白的结合、SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)与人型整联蛋白的结合的抗体可抑制 OPN 与整联蛋白的结合，对于类风湿性关节炎等的治疗有效，并且，不仅对于幼年型类风湿性关节炎或慢性风湿病等风湿病，也期待对于银屑病性关节炎或银屑病的治疗有效。器官移植后的慢性排斥的特征在于：发生血管或支气管的阻塞性病变，从其组织学的研究来看，T 细胞和巨噬细胞的活化引发细胞因子和生长因子的生成、血管内皮细胞障碍，并且血管平滑肌增殖引发纤维化等，因此使血管阻塞进展(非专利文献 6~8)。

已有报道称，这些巨噬细胞的活化或血管平滑肌的纤维化中，

OPN 作为必须的蛋白而发挥作用(非专利文献 9), OPN 抑制抗体通过抑制单核细胞或嗜中性粒细胞的游走, 可以抑制向上述纤维化发展的过程。因此, 期待抑制器官移植后的慢性排斥反应, 有助于器官的存活, 也期待对于全身性自身免疫疾病、红斑狼疮、葡萄膜炎、白塞氏病、多发性肌炎、系膜增殖性肾小球肾炎、结节病等自身免疫疾病的治疗的效果。还确认了在各种癌症中 OPN 的表达量增加, OPN 促进了癌症的进展和转移(非专利文献 10~12), 通过抗 OPN 抗体癌细胞的增殖和转移得到抑制(专利文献 3、非专利文献 13)。因此, 还期待抗 OPN 抗体对于各种癌症的治疗发挥作用。

WO03/027151 (专利文献 2)中公开了具有专利文献 1 所述的小鼠抗人骨桥蛋白抗体 2K1 可变区和人抗体恒定区的嵌合抗人骨桥蛋白抗体, 以及具有 2K1 抗体的互补决定区和人抗体构架区以及恒定区的人源化抗人骨桥蛋白抗体。

时至今日, 作为癌症治疗用抗体(例如利妥昔单抗、曲妥单抗、贝伐单抗)、风湿病治疗用抗体(例如英夫利昔单抗、阿达木单抗)、用于抑制移植片排斥的治疗用抗体(例如莫罗单抗、巴利昔单抗)等很多治疗用单克隆抗体已经上市。

今后, 单克隆抗体制剂由于其特异性和安全性高等的根本性特征, 特别是以低分子治疗药的开发较为困难的各种疾病作为目标的研究开发将会得到加速。

另一方面, 上述抗体药物的开发中, 最大的问题是抗体的生产性。目前市售的单克隆抗体的临床给药量大约为数 mg/kg 水平, 因此需要相当大的制备成本。

为此, 在显示优异的活性的抗体、显示相同活性的抗体中选择表达量高、作为蛋白质的稳定性高的抗体, 这在抗体药物应用化中是极重要的因素。

专利文献 1: 国际公开第 WO02/081522 小册子

专利文献 2: 国际公开第 WO03/027151 小册子

专利文献 3: 国际公开第 WO06/043954 小册子

非专利文献 1: Y. Saitoh 等人., (1995): Laboratory Investigation, 72, 55 ~ 63

非专利文献 2: Y. Yokosaki 等人., (1999): The Journal of Biological Chemistry 274, 36328 ~ 36334

非专利文献 3: P. M. Green 等人., (2001): FEBS Letters 503, 75 ~ 79

非专利文献 4: S. T. Barry 等人., (2000): Experimental Cell Research 258, 342 ~ 351

非专利文献 5: Yamamoto 等人., (2003): The Journal of Clinical Investigation, 112, 181 ~ 188

非专利文献 6: P. Freese 等人., (2001): Nephrology, dialysis, transplantation, 16, 2401 ~ 2406

非专利文献 7: J. R. Waller 等人., (2001): British Journal of Surgery, 88, 1429 ~ 1441

非专利文献 8: S. R. Lehtonen 等人., (2001): Transplantation, 72, 1138 ~ 1144

非专利文献 9: A. O'Regan 等人., (2000): International Journal of Experimental Pathology, 81, 373 ~ 390

非专利文献 10: G. F. Weber, (2001): Biochimica et Biophysica Acta, 1552, 61 ~ 85

非专利文献 11: H. Rangaswami 等人., (2006): TRENDS in Cell Biology 16, 79 ~ 87

非专利文献 12: S.S. Forootan 等人., (2006): Int. J. Cancer: 118, 2255 ~ 2261

非专利文献 13: Z. Hu 等人., (2005): Clin. Cancer Res. 11 4646 ~ 4652

发明内容

发明所要解决的课题

本发明针对上述状况而设, 要解决的课题在于: 提供比以往的抗

人骨桥蛋白抗体的活性(抗原结合活性、白细胞游走抑制活性等)和/或稳定性(对热、低 pH 条件和改性剂的耐性等)优异的人源化抗人骨桥蛋白抗体。本发明人等为了解决上述课题进行了深入的研究,结果,成功地制备了具有上述特性的人源化抗骨桥蛋白抗体。

解决课题的方法

即,本发明具有以下特征。

(1) 人源化抗人骨桥蛋白抗体,该抗体含有由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列组成的重链可变区、和由 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列组成的轻链可变区。

(2) 上述(1)所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体,其中,上述抗体的重链恒定区是人 Igγ1。

(3) 上述(1)所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体,其中,上述抗体的轻链恒定区是人 Igκ。

(4) 上述(1)所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体,其中,上述抗体的重链恒定区为人 Igγ1,上述抗体的轻链恒定区为人 Igκ。

(5) 人源化抗人骨桥蛋白抗体,该抗体含有由 SEQ ID NO.25 所示氨基酸序列组成的重链、和由 SEQ ID NO.27 所示氨基酸序列组成的轻链。

(6) 多核苷酸,该多核苷酸含有编码上述(1)所述人源化抗人骨桥蛋白抗体的重链可变区的序列。

(7) 多核苷酸,该多核苷酸含有编码上述(1)所述人源化抗人骨桥蛋白抗体的轻链可变区的序列。

(8) 表达载体,该表达载体含有上述(6)和/或(7)所述多核苷酸。

(9) 宿主细胞,该宿主细胞中导入了上述(8)所述的表达载体。

(10) 生产人源化抗人骨桥蛋白抗体的方法,该方法包含培养上述(9)所述的宿主细胞,使该细胞表达人源化抗人骨桥蛋白抗体的步骤。

(11) 自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎或变形性关节炎的治疗药,该药物含有上述(1)~(5)中任一项所述的人源化抗人骨桥蛋白

抗体。

(12) 预防或治疗自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎或变形性关节病的方法,该方法包含给予治疗有效量的上述(1)~(5)中任一项所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体的步骤。

(13) 上述(1)~(5)中任一项所述的人源化抗人骨桥蛋白抗体在制备用于预防或治疗自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎或变形性关节病的药物中的应用。

发明效果

本发明可提供比以往的抗人骨桥蛋白抗体的活性(抗原结合活性、白细胞游走抑制活性等)和/或稳定性(对热、低 pH 条件和改性剂的耐性等)优异的人源化抗人骨桥蛋白抗体。具有上述特征的本发明的抗体可用于以自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎、变形性关节病为代表的各种炎症性疾病的预防或治疗。

附图简述

图 1 表示含有插入到载体中的 R2K1-VH1.7 编码区的 DNA 碱基序列(上一行: SEQ ID NO.15)和氨基酸序列(下一行: SEQ ID NO.16)(下划线部分是用于分泌表达的前导序列)。

图 2 表示含有插入到载体中的 R2K1-VH1.8 编码区的 DNA 的碱基序列(上一行: SEQ ID NO.17)和氨基酸序列(下一行: SEQ ID NO.18)(下划线部分是用于分泌表达的前导序列)。

图 3 表示含有插入到载体中的 R2K1-VL1.7 编码区的 DNA 的碱基序列(上一行: SEQ ID NO.19)和氨基酸序列(下一行: SEQ ID NO.20)(下划线部分是用于分泌表达的前导序列)。

图 4 表示含有插入到载体中的 R2K1-VL1.8 编码区的 DNA 的碱基序列(上一行: SEQ ID NO.21)和氨基酸序列(下一行: SEQ ID NO.22)(下划线部分是用于分泌表达的前导序列)。

图 5 表示通过 ELISA 法研究嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体与

hOPN5 肽的结合性的结果。

图 6 表示通过 ELISA 法研究在 70°C 下加热处理的嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体与 hOPN5 肽的结合性的结果。以未加热处理时的结合性为 100%，表示其比例。

图 7 表示通过 ELISA 法研究用 pH5 缓冲液处理的嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体与 hOPN5 肽的结合性的结果。以未经 pH5 缓冲液处理时的结合性为 100，表示其比例。

图 8 表示对用含各种浓度的盐酸胍缓冲液处理的嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体的荧光光谱中峰波长制图的结果。

图 9 表示通过 CD 测定用各 pH 缓冲液处理的嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体中随机结构的含量的结果。

图 10 是表示使用超高灵敏度差示扫描量热仪研究嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体的热稳定性的结果图。虚线箭头和实线箭头分别表示嵌合 2K1 抗体和 R2K1v1.7 抗体的 T_m 。

图 11 表示 R2K1v1.7 和 R2K1v0 对人 OPN 的细胞粘附抑制效果。

图 12 表示 R2K1v1.7 对于猴胶原诱导关节炎的关节肿胀的效果。数据分为对照组、25 mg/kg 组和 50 mg/kg 组，分别表示 8 个动物、7 个动物和 5 个动物的平均 \pm SE。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ：通过 Dunnet 多重比较检验确认与对照组明显不同。

图 13 表示通过 HPLC 分析纯化 R2K1v1.7-scFv 的结果。

图 14 表示通过 ELISA 法研究纯化 R2K1v1.7-scFv 与 hOPN5 肽的结合性的结果。

图 15 表示完全分子型 R2K1v1.7 抗体、R2K1v1.7 抗体的 $F(ab')_2$ 和纯化 $F(ab')_2$ -PEG 的 SDS-PAGE 结果。

图 16 表示通过 BIAcore 研究 R2K1v1.7 的 $F(ab')_2$ -PEG 与 hOPN5 肽的结合性的结果。

实施发明的最佳方式

以下详述本发明。

本发明人等为了克服与上述以往的抗人骨桥蛋白抗体相关的课题而进行了深入的研究，结果成功的获得了与 WO03/027151 (专利文献 2)所述的嵌合 2K1 抗体和人源化 2K1 抗体相比、具有优异的活性和/或稳定性的人源化抗人骨桥蛋白抗体。

抗体分子的基本结构为所有类别(classes)所共有，由具有分子量 5 万~7 万的重链和具有 2~3 万的轻链构成。重链通常由含有约 440 个氨基酸的多肽链组成，每类重链具有特征性结构，对应于 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE，称为 γ 、 μ 、 α 、 δ 和 ϵ 链。并且，IgG 存在 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，分别称为 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 和 γ_4 。轻链通常由含有约 220 个氨基酸的多肽链组成，已知有 L 型和 K 型两种，分别称为 λ 和 κ 链。抗体分子的基本结构中的肽构成是两条相同的重链和两条相同的轻链通过二硫键(S-S 键)和非共价键结合，且分子量为 15 万~19 万。两种轻链可以与任何重链形成对。各抗体总是由相同的两条轻链和相同的两条重链形成。

链内 S-S 键是在重链中有 4 个(μ 、 ϵ 链中有 5 个)，轻链中有 2 个，每 100~110 个氨基酸残基形成一个环，该立体结构在各环之间类似，称为结构单元或结构域。对于重链和轻链两者，其位于 N 末端的结构域尽管是同种动物的相同类(亚类)的指标，但其氨基酸序列不恒定，该结构域被称为可变区(V 区，可变区) (各结构域分别表示为 V_H 和 V_L)。由此向 C 末端一侧的氨基酸序列是在每类或亚类中大致恒定的、被称为恒定区(C 区，恒定区) (各结构域分别表示为 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和 C_L)。

抗体的抗原决定部位由 V_H 和 V_L 构成，结合特异性由该部位的氨基酸序列确定。另一方面，与补体或各种细胞结合的生物学活性反映了各类 Ig 之间 C 区的结构差异。轻链和重链可变区的可变性大致限于在两种链中均存在的三个小的超可变区，将这些区称为 CDR (互补决定区)。可变区的其余部分被称为构架区，该区是比较恒定的。通常，

只有各可变区的互补决定区的5~10个氨基酸形成抗原结合部位。

本说明书中,将与抗原反应的可变区具有来自小鼠抗体(也称为供体异源抗体)的可变区、恒定区具有来自人抗体的恒定区的抗体称为嵌合抗体,将识别骨桥蛋白及其片段的嵌合抗体称为嵌合抗骨桥蛋白抗体。将除抗原特异性的非人哺乳动物(例如小鼠)抗体分子的互补决定区(抗原结合部位)以外全部置换为人抗体的氨基酸,所得重组抗体称为人源化抗体。人源化抗体也包含如本发明抗体的、在构架区附加有氨基酸修饰(置换、插入、缺失、附加)而得到的抗体。

通常认为在人源化抗体的制备中,当只是将互补决定区的氨基酸序列嫁接到作为模板的人抗体构架区时,很多情况下抗原结合活性比原始小鼠抗体降低。已经确认上述人源化2K1抗体虽然具有与OPN肽的结合性,但是与OPN的细胞粘附抑制活性极低,因此不适合作为抗体药物使用(后述实施例9)。

本发明人等为了改善上述人源化抗体的活性降低、且为了获得适合作为抗体药物使用的具有更优异的稳定性的人源化抗体,进行了深入的研究,结果发现,含有由SEQ ID NO.1所示氨基酸序列组成的重链可变区、和由SEQ ID NO.3所示氨基酸序列组成的轻链可变区的人源化抗人骨桥蛋白抗体与以往的嵌合和人源化抗人骨桥蛋白抗体比较,具有显著改善的活性和/或各种稳定性指标方面具有优异的稳定性。上述本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体是在作为模板的人抗体的重链和轻链的构架区对几种氨基酸进行修饰而制备的。与只嫁接互补决定区而制备的以往的人源化抗人骨桥蛋白抗体相比,构架区的序列不同(专利文献2)。

本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体可根据本说明书中所公开的其重链可变区和轻链可变区的序列信息,使用该领域所公知的方法,由本领域技术人员容易地制备。具体来说,可制备具有编码本发明的抗体的重链可变区氨基酸(SEQ ID NO.1)的碱基序列的重链可变区基因片段、以及具有编码本发明的抗体的轻链可变区氨基酸(SEQ ID

NO.3)的碱基序列的轻链可变区基因片段。然后,将该可变区基因与人抗体的适当类别(class)的恒定区基因连接,来制备人源化抗体基因。接着,将该人源化抗体基因与适当的表达载体连接,导入到培养细胞中。最后,培养该培养细胞,由此可从培养上清中获得人源化抗体。

编码上述本发明的抗体的重链或轻链可变区氨基酸(SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.3)的各可变区基因片段例如可按照 WO03/027151 所述方法,如下制备:制备分别编码该文献公开的人源化 2K1 抗体的重链可变区和轻链可变区的基因片段,将突变导入到编码人源化 2K1 抗体构架区的该基因片段的规定位点。为了将突变导入构架区规定位点可以采用位点定向诱变法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel 等人. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 8.1 ~ 8.5) 等本领域所公知的各种方法。或者本发明的抗体的重链和轻链可变区的基因片段也可以基于根据该重链和轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.3)而设计的碱基序列、或 SEQ ID NO.5 和 SEQ ID NO.7 所示的本发明的抗体的重链和轻链可变区的碱基序列,利用本领域所公知的基因合成方法进行合成。上述基因合成方法可以采用 WO90/07861 所述抗体基因的合成方法等本领域所公知的各种方法。

接着,将上述可变区基因片段与人抗体的恒定区基因连接,来制备人源化抗体基因。尽管所使用的人抗体的恒定区可以选择任何亚类的恒定区,但重链恒定区可优选使用人 I γ 1,轻链恒定区可优选使用人 I γ k。

制备该人源化抗体基因后,对于人源化抗体基因向表达载体的导入、表达载体向培养细胞的导入、培养细胞的培养、抗体的纯化等,可采用本领域所公知的各种方法,或者参照 WO02/081522 或 WO03/027151 所述的嵌合抗人骨桥蛋白抗体或人源化抗人骨桥蛋白抗体的制备方法进行。与上述得到的人源化抗体基因连接的表达载体可以使用国际公开公报 WO94/20632 所述的 AG- γ 1 或 AG- κ 等表达载体,但对表达载体没有特别限定,只要可表达人源化抗体基因即可。

表达载体如果利用 AG- γ 1 或 AG- κ 等已经具有人 Ig 恒定区基因的载体, 则只是将人源化抗体可变区基因插入其中, 即可形成具有人源化抗体基因的表达载体, 因此优选。

上述表达载体例如可通过磷酸钙法等导入到培养细胞中。

要导入表达载体的培养细胞例如可使用 CHO-DG44 细胞等的培养细胞, 可以按照常规方法进行培养。

上述培养后, 在培养上清中累积的抗体例如可通过使用蛋白 A 柱的各种色谱来纯化。

上述得到的人源化抗人骨桥蛋白抗体的抗原活性例如可通过后述实施例所述的使用骨桥蛋白肽等的 ELISA、或 BIACore (BIACore 公司) 等测定。人源化抗人骨桥蛋白抗体的白细胞游走抑制活性例如如后述实施例所述, 可以通过在受试抗体和 OPN 或凝血酶切割型 OPN 的存在下培养人末梢血单核细胞来测定。本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体具有抑制由细胞因子(例如 TNF- α)活化的人末梢血单核细胞向凝血酶切割型 OPN 游走的生物学活性。

接着, 针对各种稳定性指标, 对上述制备的人源化抗人骨桥蛋白抗体进行试验。本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体显示以下的稳定性指标(A)~D):

A) 热稳定性表现为: 与在 PBS 中、在 70°C 下加热处理 2 小时后的含有 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)的肽的结合活性为未加热处理时的 90%以上。

B) 与具有来自供体异源抗体的可变区和来自人抗体的恒定区的嵌合抗体相比, 中点转变温度(midpoint transition temperature, T_m)至少高 5°C。

C) 与具有来自供体异源抗体的可变区和来自人抗体的恒定区的嵌合抗体相比, 具有至少可以耐受高 0.5 M 浓度的盐酸胍的耐性。

D) 与具有来自供体异源抗体的可变区和来自人抗体的恒定区的嵌合抗体相比, 具有至少可以耐受低 0.3 的 pH 的耐性。

这里，上述指标 A)和 B)均为热稳定性的指标，这些指标越好的抗体，其在长期保存稳定性和剂型方面越具有优势。即，抗体制剂由于是蛋白质，因此在保存稳定性方面有较多问题，而冻干制剂(在使用时必须溶解，因此在医疗现场、在便利性方面存在问题，特别是蛋白制剂溶解大多需要 30 秒以上，大多成为医疗现场较大的负担)，如果是具有良好的温度稳定性的抗体，则可以在溶液状态下可冷藏保持 2 年以上的长期稳定性。实际上，作为本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体的后述实施例所述的 R2K1v1.7 在室温(25℃)下可确保一年左右的稳定性。如果可以形成溶液制剂，则可以制成预灌封注射器等便利性更高的制剂。满足上述指标的、温度稳定性高的抗体其制剂化变化形式广，为实现医疗需求更高的制剂增添了更多的选择可能性。

上述指标 C)是关于盐耐性的指标，具有所述盐耐性的抗体可以在形成药物制剂时进行更为有利的处方研究。特别是在预灌封注射器中，在设计为 100 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的高浓度的蛋白制剂方面大多使用高的盐浓度，因此是有用的。

上述指标 D)是关于 pH 耐性的指标，具有上述 pH 耐性的抗体在抗体的制备纯化过程的病毒灭活步骤中，可以以更低的 pH 进行处理，因此是有用的。为此，与通常的抗体比较，即使具有低 0.3 左右的低 pH 耐性，也会成为很大的优势。

指标 A)的试验方法如下。首先，将受试人源化抗人骨桥蛋白抗体在 PBS 中稀释(优选 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，并在 70℃ 下加热处理 2 小时。然后将该稀释液恢复至室温，例如通过 Kon 等人的 ELISA 方法(*Journal of Cellular Biology*, 88: 420 ~ 432 (2002))测定该抗体与含有 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)的肽的结合活性。该热处理的抗体的结合活性与对未热处理的相同抗体测定的结合活性进行比较。本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体，在上述加热处理时，显示与含有 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)的肽的结合活性为未进行加热处理时的 90%以上的结合活性。优选本指标试验中使用的含有 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)的

肽是具有 CVDTYDGRGDSVVYGLRS 序列(SEQ ID NO.13)的骨桥蛋白肽。

指标 B)的试验方法如下。首先,将受试人源化抗人骨桥蛋白抗体和 WO03/027151 所述的嵌合 2K1 抗体(C2K1)用适当的缓冲液(优选 20 mM 柠檬酸缓冲液+120 mM NaCl (pH6.0))进行调节,通过差示扫描量热仪(优选 MicroCal 公司的 VP capillary DSC platform)可评价对加热的稳定性。表示本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体变性温度的中点转变温度(T_m)与 C2K1 比较,至少高 5°C。

指标 C)的试验方法如下。首先,将受试人源化抗人骨桥蛋白抗体和上述嵌合 2K1 抗体(C2K1)溶解于含有 0~5 M 各浓度盐酸胍的缓冲液(优选 20 mM 磷酸钠+120 mM NaCl 溶液(pH7.0)),将溶液调整为适当的浓度(优选 50 μ g/mL)。接着,将各溶液样品在 10°C 下静置过夜,然后测定各样品的荧光光谱。具体来说,在波长 320 nm~370 m 的范围内对通过 280 nm 的激发光使色氨酸产生的荧光进行扫描。峰波长由于盐酸胍导致的抗体蛋白立体结构的松散而发生位移。对受试抗体和嵌合抗体分别测定使峰波长发生位移的盐酸胍浓度。对于本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体,上述使峰波长发生位移的盐酸胍浓度与 C2K1 比较,至少约高 0.5 M 浓度。

指标 D)的试验方法如下。首先,将受试人源化抗人骨桥蛋白抗体和上述嵌合 2K1 抗体(C2K1)用适当的缓冲液(优选 20 mM 柠檬酸钠缓冲液+120 mM NaCl (pH6.0))调节(优选 2 mg/mL),向其中加入酸性溶液(优选 0.1N HCl)和水,制备规定浓度(1 mg/mL)的各低 pH 的样品。将该样品在室温下处理 1 小时,然后测定圆二色性(CD)光谱。在波长 205 nm~260 nm 的范围内测定 CD 光谱,根据 Yang 等人的 CD 光谱分析法(Methods in Enzymology, 130, 208~269 (1986)),对各抗体的各 pH 处理样品测定随机结构的含有率。对于本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体,随机结构的含有率开始升高的 pH 比 C2K1 至少低约 0.3。

本发明人等以 WO03/027151 所述人源化抗体为基础,将位点定

向诱变等产生的构架区基因的修饰、与使用上述 A)~D)的稳定性指标的稳定性试验组合,进行了深入的研究,结果,通过使人抗体支架部分(FR1-4)为 SEQ ID NO.1 所示的氨基酸序列(氨基酸编号分别为 1~30、36~49、67~98 和 106~116)以及 SEQ ID NO.3 所示的氨基酸序列(氨基酸编号分别为 1~23、40~54、62~93 和 103~113),首次成功地获得了比以往的抗人骨桥蛋白抗体具有优异的活性(抗原结合活性、白细胞游走抑制活性等)和/或稳定性(对热、低 pH 条件、变性剂的耐性等)的人源化抗人骨桥蛋白抗体。对本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体的上述抗原结合活性、白细胞游走抑制活性和各种稳定性指标进行试验,结果发现,具有该活性,且显示该指标 A)~D)的所有的特性。

含有由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列组成的重链可变区、以及由 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列组成的轻链可变区的本发明的入源化抗人骨桥蛋白抗体可如下容易地获得:使用本领域中公知的方法,合成编码 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列的 DNA、和编码 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列的 DNA,将它们与适当类别的人抗体恒定区基因、优选重链为人 Igy1 恒定区基因、轻链为人 Igk 恒定区基因连接,构建入源化抗体基因,采用本领域中公知的各种方法或 WO02/081522 或 WO03/027151 所述方法等,将该入源化抗体基因导入到表达载体中,将该表达载体导入培养细胞中,培养该培养细胞,由所得培养物中纯化抗体。将 SEQ ID NO.1 所示重链可变区基因和人 Igy1 重链恒定区基因连接得到的本发明的优选的入源化抗体重链基因例如有:含有编码 SEQ ID NO.25 所示氨基酸序列的碱基序列的基因,更优选含有 SEQ ID NO.24 所示的碱基序列的基因。将 SEQ ID NO.3 所示的轻链可变区基因与人 Igk 轻链恒定区基因连接得到的本发明的优选的入源化抗体轻链基因例如有:含有编码 SEQ ID NO.27 所示氨基酸序列的碱基序列的基因,更优选含有 SEQ ID NO.26 所示碱基序列的基因。由含有 SEQ ID NO.24 所示碱基序列的重链基因、和含有 SEQ ID NO.26 所示

碱基序列的轻链基因所编码的本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体例如有后述实施例所示的 R2K1v1.7。

或者，含有由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列组成的重链可变区、和由 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列组成的轻链可变区的本发明的人源化抗骨桥蛋白抗体还可以以编码上述 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列的 DNA 和人抗体重链恒定区基因、以及编码 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列的 DNA 和人抗体轻链恒定区基因为模板，使用无细胞转录/翻译体系进行合成。无细胞转录/翻译体系可以使用市售商品，也可以按照本身已知的方法，具体来说，大肠杆菌提取液可按照 Pratt J.M.等人., “Transcription and Translation”, Hames B.D.和 Higgins S.J.编辑., IRL Press, Oxford 179 ~ 209 (1984)中所述的方法等制备。作为市售的细胞裂解物，来自大肠杆菌的例如有：大肠杆菌 S30 提取系统(Promega 公司制备)或 RTS 500 Rapid 翻译系统(Roche 公司制备)等，来自兔网织红细胞的例如有：兔网织红细胞裂解系统(Promega 公司制备)等，来自小麦胚芽的例如有：PROTEIOSTM (TOYOBO 公司制备)等。其中，优选使用小麦胚芽裂解物。小麦胚芽裂解物的制备方法例如可采用 Johnston F.B.等人., Nature, 179, 160 ~ 161 (1957)、或者 Erickson A.H.等人., Meth. Enzymol., 96, 38 ~ 50 (1996)等所述的方法。

本发明也包含含有由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列组成的重链可变区、由 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列组成的轻链可变区的、保有活性的单链可变区片段(scFv)、Fab、Fab'和 F(ab')₂ 等人源化抗人骨桥蛋白抗体片段。

可在 scFv 的制备中使用的用于将重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)连接的接头只要可使本发明的抗体片段具有上述特性即可，没有特别限定，例如有：含有 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO.14)所示氨基酸序列的肽。本领域技术人员可以根据本发明制备该人源化抗人骨桥蛋白抗体或抗体片段与其它肽和蛋白质的融合抗体，和制备结合有修饰剂的修饰抗体。融合中使用的其它肽或蛋白质只要不使抗体

结合活性降低即可，没有特别限定，例如有人血清白蛋白，各种 tag 肽、人工螺旋基序肽、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶、各种毒素、可促进多聚体化的其它肽或蛋白质等。修饰中使用的修饰剂只要不使抗体结合活性降低即可，没有特别限定，例如有：聚乙二醇、糖链、磷脂、脂质体、低分子化合物等。

上述得到的本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体或保有起因于该抗体的活性的抗体片段、将该抗体或该抗体片段与肽或其它蛋白质融合而成的融合抗体、或者使该抗体或抗体片段与修饰剂结合而成的修饰抗体还可以根据需要进一步纯化，然后按照常规方法制成药物制剂，可用于类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎和慢性类风湿等风湿病、银屑病关节炎、银屑病等的治疗；抑制癌症和器官移植后的慢性排斥反应；以及变形性关节炎、全身性自身免疫疾病、红斑狼疮、葡萄膜炎、白塞氏病、多发性肌炎、系膜增殖性肾小球肾炎和结节病等自身免疫疾病的治疗。

本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体优选作为风湿病治疗药、自身免疫疾病治疗药、变形性关节炎治疗药或类风湿性关节炎治疗药，更优选作为类风湿性关节炎治疗药使用。这些风湿病治疗药等的剂型的例子可以是注射剂、点滴剂等非肠道给药制剂，优选通过静脉内给药、皮下给药等进行给药(为自身免疫疾病治疗药时也可以按照该方法)。制成药物制剂时，在药学上可接受的范围内可以使用与这些剂型匹配的载体或添加剂。

在上述制剂制备中，人源化抗人骨桥蛋白抗体的添加量根据患者的症状程度、年龄或所使用的制剂的剂型或重组 OPN 抑制抗体的结合效价等不同，例如可以使用 0.1 mg/kg ~ 100 mg/kg 左右。

上述得到的本发明的治疗药是作为有效成分的人源化抗人骨桥蛋白抗体与 OPN 的 RGD 序列和 SVVYGLR 序列(SEQ ID NO.10)牢固地结合，抑制 OPN 的该部分与整联蛋白的结合，结果可以抑制风湿病和类风湿性关节炎以及除此之外的自身免疫疾病症状的恶化。

本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体不是与整联蛋白一侧、而是与 OPN 一侧特异性结合，因此，抑制整联蛋白的其它重要功能的可能性小，期待避免副作用的问题。

此外，本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体还可用作类风湿性关节炎的诊断药。如前所述，在类风湿性关节炎患者的关节中，特别发现了高浓度的凝血酶切割的 OPN 的 N 末端片段。因此，使用该人源化抗人骨桥蛋白抗体测定检体中的 OPN 或其 N 末端片段的量，可对于类风湿性关节炎的诊断发挥作用。该方法可以利用放射性同位素免疫测定法(RIA 法)、ELISA 法(E. Engvall 等人., (1980): Methods in Enzymol., 70, 419~439)、荧光抗体法、噬菌斑法、点样法、凝集法、Ouchterlony method (乌赫特朗尼氏法)等常规免疫化学测定法中使用的各种方法(“杂交瘤法和单克隆抗体”，株式会社 R&D Planning 发行，30~53 页，1982 年 3 月 5 日)。

尽管上述方法可根据各种角度适当选择，但从灵敏度、简便性等角度考虑优选 ELISA 法。更优选方法的例子是：例如将本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体固定在载体上，对与本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体识别不同的 OPN 上的部位的抗体进行标记，由此可以检测 OPN 或其 N 末端片段，可以将其用作类风湿性关节炎的诊断药。

在标记上述抗体时所使用的标记物可以是用于形成融合蛋白/肽的谷胱甘肽 S-转移酶等蛋白质/肽，辣根过氧化物酶(以下称为“HRP”)、碱性磷酸酶(以下称为“AP”)等酶，异硫氰酸荧光素、罗丹明等荧光物质，³²P、¹²⁵I 等放射性物质，和化学发光物质等修饰剂。

关于 OPN 同工型的检测方法，例如可使用夹层法等本领域中公知的方法，更具体来说，可以通过使用与 WO02/081522 (专利文献 2) 或 WO03/027151 (专利文献 3) 所述的检测方法同样的方法实施。

本发明还提供编码本发明的抗体或其片段的基因、以及含有该基因的表达载体。本发明的表达载体只要是在原核细胞和/或真核细胞的各种宿主细胞中表达编码本发明的抗体或其片段的基因、可生成这些

多肽即可，没有特别限定。例如有质粒载体、病毒载体(例如腺病毒、反转录病毒)等。

本发明的表达载体可以含有编码本发明的抗体或其片段的基因、以及可与该基因功能性连接的启动子。作为使本发明的多肽在细菌中表达的启动子，当宿主为埃希氏杆菌属细菌时，例如有 Trp 启动子、lac 启动子、rec 启动子、 λ PL 启动子、lpp 启动子、tac 启动子等。作为使本发明的抗体或其片段在酵母中表达的启动子，例如有 PH05 启动子、PGK 启动子、GAP 启动子和 ADH 启动子，宿主为芽孢杆菌属细菌时，例如有 SL01 启动子、SP02 启动子、penP 启动子等。宿主为哺乳动物细胞等的真核细胞时，例如有来自 SV40 的启动子、反转录病毒的启动子、热激启动子等。

宿主细胞使用细菌、特别是大肠杆菌时，本发明的载体可以进一步含有起始密码子、终止密码子、终止子区和可复制单元。宿主使用酵母、动物细胞或昆虫细胞时，本发明的表达载体可以含有起始密码子和终止密码子。此时，可以含有增强子序列、编码本发明的多肽的基因的 5'一侧和 3'一侧的非翻译区、剪接界、聚腺苷酸化位点、或可复制单元等。还可根据需要含有通常使用的选择标记(例如四环素、氨基青霉素、卡那霉素)。

本发明还提供导入了本发明的基因的转化体。上述转化体例如可通过用本发明的表达载体转化宿主细胞来制备。转化体的制备所使用的宿主细胞只要适合上述表达载体、并可转化即可，没有特别限定，可例举本发明技术领域通常使用的天然细胞或人工建立的细胞系等各种细胞(例如细菌(埃希氏杆菌属细菌、芽孢杆菌属细菌)、酵母(酵母属、毕赤氏酵母属等)、动物细胞或昆虫细胞(例如 Sf9)等)。转化可按照本身公知的方法进行。

本发明还提供本发明的抗体或其片段的生成方法，该方法包含使本发明的基因在宿主细胞中表达，即，使用上述转化体。

本发明的抗体或其片段的生成中，转化体可在营养培养基中培

养。营养培养基优选含有转化体生长发育所必需的碳源、无机氮源或有机氮源。碳源例如有：葡萄糖、葡聚糖、可溶性淀粉、蔗糖等，无机氮源或有机氮源例如有：铵盐类、硝酸盐类、氨基酸、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、肉膏、大豆粕、马铃薯提取液等。还可根据需要含有其它营养素(例如无机盐(例如氯化钙、磷酸二氢钠、氯化镁)、维生素类、抗生素(例如四环素、新霉素、氨基青霉素、卡那霉素等)等)。

转化体的培养可按照本身公知的方法进行。培养条件例如温度、培养基的 pH 和培养时间可适当选择。例如，宿主为动物细胞时，培养基可以使用含有约 5~20%胎牛血清的 MEM 培养基(Science, 122 卷, 501 页, 1952)、DMEM 培养基(Virology, 8 卷, 396 页, 1959)、RPMI1640 培养基(J. Am. Med. Assoc., 199 卷, 519 页, 1967)、199 培养基(Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73 卷, 1 页, 1950)等。培养基的 pH 优选约为 6~8，培养通常在约 30~40℃下进行约 15~72 小时，可以根据需要进行通气或搅拌。宿主为昆虫细胞时，例如有含胎牛血清的 Grace's 培养基(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 卷, 8404 页, 1985)等，其 pH 优选约 5~8。培养通常在约 20~40℃下进行 15~100 小时，可以根据需要进行通气或搅拌。宿主为细菌、放线菌、酵母、丝状真菌时，例如含有上述营养源的液体培养基较为适当。优选 pH 为 5~8 的培养基。宿主为大肠杆菌时，优选的培养基可例举 LB 培养基、M9 培养基(Miller 等人., Exp. Mol. Genet, Cold Spring Harbor Laboratory, 431 页, 1972)等。这种情况下，培养通常可以在 14~43℃下进行约 3~24 小时，根据需要可同时进行通气或搅拌。宿主为芽孢杆菌属细菌时，培养通常可以在 30~40℃下进行约 16~96 小时，根据需要可同时进行通气或搅拌。宿主为酵母时，培养基例如有 Burkholder's 极限培养基(Bostian, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 卷, 4505 页, 1980)，pH 优选为 5~8。培养通常在约 20~35℃下进行约 14~144 小时，并且可以根据需要进行通气或搅拌。

本发明的抗体或其片段可以是由上述培养的转化体中回收，优选分离和纯化。分离和纯化的方法例如有：盐析和溶剂沉淀法等利用溶

解度差的方法；透析、超滤、凝胶过滤和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳等利用分子量差的方法；离子交换色谱和羟基磷灰石色谱等利用电荷差的方法；亲和层析等利用特异性亲和性的方法；反相高效液相色谱等利用疏水性差异的方法；等电点聚焦电泳等利用等电点差的方法等。

以上对于本发明的整体情况进行了描述，这里给出为了深化理解而参照的特定实施例，它们的目的是例举，并不限定本发明的范围。

实施例

以下给出实施例。如无特别说明，涉及使用试剂盒等的部分是按照所附说明书进行。

(1. 人源化 2K1 抗体的制备)

本发明中，制备两种将国际公开公报 WO2003/027151 所述的来自小鼠的抗人骨桥蛋白抗体—2K1 抗体进行人源化的人源化抗人骨桥蛋白抗体(以下称为人源化 2K1 抗体或 R2K1 抗体)。

各人源化 2K1 抗体的制备大致按上述公报所述方法制备，因此以下概略描述。

首先，通过使用合成寡 DNA 的 PCR，制备具有图 1 和图 2 所示碱基序列的、两种编码人源化抗 OPN 抗体的重链可变区(VHs)的 DNA，和具有图 3 和图 4 所示碱基序列的、两种编码人源化抗 OPN 抗体的轻链可变区(VLs)的 DNA。在以下的记述中，为了将它们区别，将图 1 和图 2 所示人源化抗人 OPN 抗体 VHs 分别称为 R2K1-VH1.7 和 R2K1-VH1.8。同样，将图 3 和图 4 所示的人源化抗人 OPN 抗体 VLs 分别称为 R2K1-VL1.7 和 R2K1-VL1.8。

接着，利用限制酶 HindIII 识别位点和 BamHI 识别位点，将各编码上述人源化抗人 OPN 抗体 VHs 的 DNA 插入到含有人免疫球蛋白恒定区 $\gamma 1$ 链的基因的表达载体 AG- $\gamma 1$ 中，制备具有 R2K1-VH1.7 的重链的表达质粒、和具有 R2K1-VH1.8 的重链的表达质粒。同样，将

各编码上述人源化抗人 OPN 抗体 VLs 的 DNA 插入到含有人免疫球蛋白恒定区 κ 链的基因的表达载体 AG- κ 中, 制备具有 R2K1-VL1.8 的轻链的表达质粒、和具有 R2K1-VL1.7 的轻链的表达质粒。这些表达质粒导入到大肠杆菌中, 使其增殖, 使用市售的质粒纯化试剂盒 (QIAGEN 公司) 进行纯化。

最后, 将上述纯化表达质粒的各种组合, 通过磷酸钙法转染 CHO-DG44 细胞, 在含有 Geneticin (Invitrogen 公司) 和透析型 FCS (Invitrogen 公司) 的 MEM 培养基 (Invitrogen 公司) 中选择细胞, 由此得到表达两种人源化 2K1 抗体的细胞。即, 可使由具有 R2K1-VH1.8 的重链和具有 R2K1-VL1.8 的轻链组成的人源化 2K1 抗体—R2K1v1.8 抗体; 由具有 R2K1-VH1.7 的重链和具有 R2K1-VL1.7 的轻链组成的人源化 2K1 抗体—R2K1v1.7 抗体表达。

将按照上述顺序得到的各 R2K1 抗体生成细胞在添加有进行了 10% 透析型 FCS 的 MEM 培养基中充分增殖, 接种于细胞培养滚瓶 (BD Biosciences 公司) 中, 在 37°C、1 rpm 转速的条件下进行培养。数日后, 确认细胞贴附于器壁并增殖, 舍去培养液, 更换为 500 mL 不含有血清的 MEM 培养基, 并在上述条件下培养细胞。约 2 周后, 在由器壁剥离并悬浮的细胞增多时结束培养, 将培养上清用 0.22 μm 的滤器过滤并回收, 由此得到含有各 R2K1 抗体的培养上清。

以这些培养上清为起始材料, 使用蛋白 A 柱 (MILLIPORE 公司) 和阳离子交换柱 (Amersham 公司), 得到了各数 mg 的两种纯化人源化抗体, 即 R2K1v1.8 抗体和 R2K1v1.7 抗体。

在以下所述各种试验中, 使用上述得到的纯化抗体。嵌合 2K1 抗体 (以下也称为 C2K1 抗体) 使用按照上述国际公开公报 WO2003/027151 所述方法获得的抗体。

(2. 通过 ELISA 确认与人骨桥蛋白肽的结合性)

参考 Kon 等人的 ELISA 法 (Journal of Cellular Biology, 88: 420 ~

432 (2002)), 对各 R2K1 抗体和 C2K1 抗体与人骨桥蛋白肽 (CVDTYDGRGDSVVYGLRS: SEQ ID NO.13)的结合活性进行比较。以下概略描述。

具有上述序列的肽(以下称为 hOPN5 肽)使用 Sulfo-EMCS (同仁化学社)与导入了马来酰亚氨基的 BSA 反应, 制备 hOPN5-BSA 螯合物。将 hOPN5-BSA 螯合物以 200 ng/100 μ L/孔在 4 $^{\circ}$ C 下、在 ELISA 板(Nunc 公司)中固定一夜, 洗板, 然后用添加了 1%BSA 的 PBS 在 4 $^{\circ}$ C 下封闭过夜。将用添加 1%BSA 的 PBS 稀释的抗体样品以 100 μ L/孔添加到上述板中, 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。检测是使用过氧化物酶(HRP)标记抗人 IgG (H+L)抗体(和光纯药株式会社制备)进行。使用酶标仪(Molecular Devices 公司)测定波长 450 nm 的吸光度。

结果证实, R2K1v1.7 抗体和 R2K1v1.8 抗体与 hOPN5 肽的结合性与 C2K1 抗体同等(图 5)。

(3. R2K1 抗体对人末梢血单核细胞游走的抑制活性)

纯化抗体对细胞因子活化末梢血单核细胞游走的抑制活性如下进行研究。

首先, 将对健康人肝素采血得到的血液用 RPMI1640 培养基稀释 2 倍。将稀释的血液铺于 Ficoll-Paque (Pharmacia 公司)中, 以 400 \times g 下在室温下离心 30 分钟。回收在血浆和 Ficoll-Paque 交界所见到的白色层, 作为单核细胞使用。将这样得到的单核细胞用人 TNF- α (20 ng/mL)进行过夜培养和活化, 将活化后的细胞用于游走试验。

游走试验是使用 48 孔微型化学趋化室装置(micro chemotaxis chamber, Neuro Probe Inc 公司)进行。将人 OPN 与牛凝血酶(Sigma)一起在 37 $^{\circ}$ C 下反应 2 小时, 进行切割。将以各种浓度添加 R2K1 抗体和 C2K1 抗体而得到的混合液预先在 37 $^{\circ}$ C 下放置 15 分钟, 然后加入到下侧房室中(人 OPN 终浓度为 10 μ g/mL)。在其上放置聚碳酸酯滤器(孔径 5 μ m), 再向上侧房室中加入 50 μ L 细胞悬浮液(2×10^6 个细胞

/mL)。

在 37°C、5%CO₂ 存在下培养 2 小时，然后取下聚碳酸酯滤器，除去上侧滤器表面的细胞，然后将细胞用 Diff-Quick (Baxter 公司)染色。以 40 倍的放大倍率下计测上侧滤器表面的细胞数，结果以 6 孔的平均细胞数(细胞/mm³)±SEM 表示(表 1)。这些结果显示，R2K1v1.7 抗体和 R2K1v1.8 抗体两者与 C2K1 抗体同样，抑制了由 TNF-α 活化的人末梢血单核细胞向凝血酶切割型人骨桥蛋白的游走。

[表 1]

R2K1v1.7 和 R2K1v1.8

	平均细胞数	SEM
培养基	701.7	24.8
Thr-OPN	881.7	24.0
R2K1v1.7 50 μg/mL	723.3	43.0
R2K1v1.8 50 μg/mL	688.3	16.6

C2K1

	平均细胞数	SEM
培养基	686.7	15.9
Thr-OPN	860.0	30.7
C2K1 50 μg/mL	671.7	48.5

(4. 通过 ELISA 评价热稳定性)

将 C2K1 抗体和两种 R2K1 抗体用 PBS 稀释为 50 μg/mL，在 70°C 的水浴下进行 2 小时处理，然后恢复至室温，通过上述 ELISA，将所得的吸光度与未处理样品的吸光度的比例作为残留活性制成图表表示。残留活性使用具有直线性的 0.2~2.0 范围内的吸光度的值计算(以下相同)。结果表明，上述处理后的残留活性中，R2K1v1.7 抗体和 R2K1v1.8 抗体比 C2K1 抗体高(图 6)。特别是 R2K1v1.7 抗体显示超过 90% 的残留活性。由此可以判断，R2K1v1.7 抗体和 R2K1v1.8 抗体与

C2K1 抗体相比，热稳定性提高。

(5. 通过 ELISA 评价低 pH 耐性)

将 C2K1 抗体和两种 R2K1 抗体的纯化品用 PBS 稀释为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。使用 1 N HCl 和 pH 计(HORIBA 公司)将各稀释剂调节至 pH5, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 2 小时。然后用 1 M Tris-HCl (pH9.5)将各稀释剂调节至 pH7, 进行上述 ELISA, 将所得吸光度与未处理样品的吸光度的比例作为残留活性制成图表表示。结果发现, 上述处理后的残留活性中, R2K1v1.7 抗体比 C2K1 抗体和 R2K1v1.8 抗体显著高(图 7)。由此表明, R2K1v1.7 抗体与 R2K1v1.8 抗体和 C2K1 抗体相比, 对低 pH 的耐性提高。

(6. 通过荧光光谱测定来评价盐酸胍耐性)

将 C2K1 抗体和两种 R2K1 抗体用含有各浓度的盐酸胍的 20 mM 磷酸钠缓冲液+120 mM NaCl (pH7)调节至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (对照未添加盐酸胍), 在 10 $^{\circ}\text{C}$ 下静置过夜, 然后测定各样品的荧光光谱。荧光光谱的测定使用 FP-6500 荧光分光计(JASCO 公司)进行。使用光路长 3 mm 的比色皿(cell), 在波长 320 nm ~ 370 nm 的范围内对由 280 nm 的激发光产生色氨酸发出的荧光进行扫描。在抗体间比较盐酸胍浓度和峰波长之间的关系。结果, 对于 C2K1, 从盐酸胍浓度超过 1 M 的时间点, 对于 R2K1v1.8, 从超过 2 M 的时间点, 可观察到由于蛋白立体结构松散而产生的峰波长的位移, 而对于 R2K1v1.7, 直至 3.8 M 也未有峰波长位移(图 8)。由此表明, R2K1v1.7 抗体与 R2K1v1.8 抗体和 C2K1 抗体比较, 对盐酸胍的耐性提高。

(7. 通过 CD 评价低 pH 耐性)

将 C2K1 抗体和 R2K1v1.7 抗体用 20 mM 柠檬酸缓冲液+120 mM NaCl (pH6)调节至 2 mg/mL。向其中边加入 0.1 N HCl 和蒸馏水边制备具有抗体浓度为 1 mg/mL 的各 pH 水准的样品, 在室温下处理 1 小时后测定各样品的 CD 光谱。

CD (圆二色性)的测定使用 J-820 分光偏振计(JASCO 公司)进行。使用光路长 0.1 mm 的比色皿, 测定波长 205 nm ~ 260 nm 范围内 CD 光谱。光谱的分析使用基于 Yang 等人的 CD 光谱分析法(Methods in Enzymology, 130, 208 ~ 269 (1986))制造的 JWSSE-480 型蛋白质二次结构分析程序(JASCO 公司)。在抗体间比较本方法中计算的随机结构的含有率与处理 pH 之间的关系。结果表明, 对于 C2K1 抗体, 由 pH3 可见随机结构含有率的升高, 而对于 R2K1v1.7, 直至 pH2.7 也未见随机结构的升高(图 9)。由此确认, R2K1v1.7 抗体与 C2K1 抗体相比, 具有低 0.3 的 pH 耐性。

(8. 通过差示扫描量热仪评价热稳定性)

将 C2K1 抗体和 R2K1v1.7 抗体以 1 mg/mL 的浓度溶解于 20 mM 柠檬酸缓冲液+120 mM NaCl (pH6.0)缓冲液中, 使用 MicroCal 公司的超高灵敏度差示扫描量热仪(VP capillary DSC platform)研究热稳定性。结果如图 10 所示。表示高级结构变性温度的中点转变温度(T_m) 在 C2K1 抗体中是 76.0°C, 而在 R2K1v1.7 抗体中是 82.8°C, 确认升高约 6°C。由此表明, R2K1v1.7 抗体的热稳定性显著提高。

(9. R2K1v1.7 对 OPN 的细胞粘附抑制效果)

为了比较本申请发明的 R2K1v1.7 和公知的人源化抗 OPN 抗体(参照 WO03/027151, 以下称为 R2K1v0)的药理效果, 研究了这两种抗体对人 OPN 的细胞粘附抑制效果。

1. 细胞的培养和继代

Jurkat E6.1 细胞购自大日本制药(株), 使用 RPMI1640 (10%FCS、青霉素-链霉素)进行继代和培养。

2. 试剂的制备

粘附缓冲液(L-15 培养基、1%BSA、50 mM HEPES、pH7.4)

PMA 溶液(粘附缓冲液中含有 40 ng/mL 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯 (PMA) [SIGMA])

CV 染色液(0.5%结晶紫、1%甲酰胺、20%甲醇)

GST 溶液(PBS(-)中含有 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 谷胱甘肽 S-转移酶(GST) [SIGMA])

人 IgG₁ 溶液(PBS(-)中含有 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)[CALBIOCHEM]

3. 凝血酶切割型人 N 末端骨桥蛋白(OPN)的制备

GST 融合凝血酶切割型人 N 末端 OPN (GST-人 N-OPN, 1.6 mg/mL)如 WO02/081522 中记载的方法进行制备, 用 PBS(-)稀释为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 用于试验。

4. 受试药物的制备

将 R2K1v1.7 (18.6 mg/mL)和 R2K1v0 (4.39 mg/mL)用 PBS(-)稀释为 4、12、40、120 和 400 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), 各稀释液均添加人 IgG₁, 使总蛋白质浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5. 组构成

空白组(GST)

对照组

受试药物组 R2K1v1.7 (1、3、10、30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

R2K1v0 (1、3、10、30、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

6. 细胞粘附试验

将 25 μL GST-人 N-OPN 溶液添加到 96 孔微孔板的除外空白的所有的孔中, 空白组是添加 25 μL GST 溶液, 将该微孔板在 37°C 下温育 1 小时, 然后用 PBS(-)清洗 2 次。添加 50 μL PMA 溶液, 将该微孔板在 37°C 下温育 30 分钟, 然后添加 25 μL 受试药物溶液(受试药物组)或人 IgG₁ 溶液(空白组和对照组)。Jurkat E6.1 细胞悬浮于粘附缓冲液中, 使浓度为 2×10^6 个细胞/mL, 所有孔中均添加 25 μL 。将悬浮液以 $15 \times g$ 离心 1 分钟, 使细胞沉淀于板的底部, 然后在 37°C 下培养 1 小时。反应结束后, 将板倒转, 以 $47 \times g$ 离心 2 分钟, 除去上清(非粘附细胞)。粘附细胞数的定量是添加 25 μL CV 染色液, 将该微孔板在室温下放置 10 分钟, 对细胞染色并固定, 然后将该微孔板用纯水洗 3

次。在所有的孔中加入 25 μ L 1%Triton-X100 溶液，确认细胞溶解，然后用酶标仪(SPECTRAmax250, Molecular Devices)测定吸光度(测定波长 595 nm)。

7. 分析

试验是每组使用 5 个孔。计算各组吸光度的平均值和抑制率，计算 IC₅₀ 值(抑制率为 50%时的受试药物浓度)。抑制率是以空白组为 100%，对照组为 0%。IC₅₀ 值如下计算：绘制 X 轴以对数表示受试药物浓度，Y 轴表示抑制率的图表，通过最小二乘法代入直线回归方程式进行计算。IC₅₀ 值的计算使用在用量反应中显示直线性的受试药物浓度的数据。由图 11 所示的结果可以理解：公知的人源化抗人 OPN 抗体的细胞粘附抑制效果极低，而 R2K1v1.7 具有优异的细胞粘附抑制效果(IC₅₀ 值：6.4)。

(10. R2K1v1.7 在食蟹猴中对于胶原诱导关节炎的效果)

将用弗氏完全佐剂(Becton Dickinson and Company)乳液化的牛 II 型胶原(胶原技术研修会)在给药 36 日前免疫雌性食蟹猴的背部和尾部，在给药 15 天前加强免疫。根据与免疫前进行比较的体重和近侧指间关节椭圆面积的变化率，将动物随机分成三组给药治疗组(n=10)。将 25 mg/kg 或 50 mg/kg 用量的 R2K1v1.7 或溶剂对照组按每周 1 次、共 8 次通过静脉内注入给药。以最初给药日规定为第 0 天。给药期间的第 0、6、13、20、27、34、41、48 和 55 天，监控近侧指间关节椭圆面积作为关节肿胀的体征。用游标卡尺测定前后肢近侧指间关节的短轴和长轴，计算椭圆面积，用 16 个指的椭圆面积的平均值作为近侧指间关节椭圆面积。以给药前的值为 100，计算近侧指间关节椭圆面积的变化率。第 0 天以及第 6、13、20、27、34、41、48 和 55 天(给药 6 天后)采集血浆，测定 R2K1v1.7 和抗 R2K1v1.7 抗体。该测定的 R2K1v1.7 的血浆浓度与波谷水平对应。数据分析是在删除抗 R2K1v1.7 抗体阳性动物和试验期间死亡的动物的数据后进行。

在 25 mg/kg 用量 R2K1v1.7 组的 1 只动物、以及 50 mg/kg 用量 R2K1v1.7 组的 4 只动物中产生了抗 R2K1v1.7 抗体。溶剂对照组的 2 只动物、25 mg/kg 用量 R2K1v1.7 组的 2 只动物以及 50 mg/kg 用量 R2K1v1.7 组的 1 只动物在给药后死亡。死亡例可能是由于剧烈炎症导致的衰竭而死亡。50 mg/kg R2K1v1.7 的治疗中，与对照溶剂组比较，在第 27 天~第 55 天期间，通过近侧指间关节椭圆面积的变化率测定的足肿胀显著减少(图 12)。25 mg/kg 用量 R2K1v1.7 对于近侧指间关节椭圆面积的变化未显示显著效果。25 mg/kg 用量和 50 mg/kg 用量的血浆中 R2K1v1.7 波谷浓度分别为 38.41 ~ 76.13 $\mu\text{g/mL}$ 和 73.91 ~ 125.3 $\mu\text{g/mL}$ 。人 OPN 的 SVVYGLR 序列与猴 OPN 的相应序列(SVAYGLR) (SEQ ID NO.11)不同，R2K1v1.7 与该人 OPN 肽的结合亲和性比对应的对猴 OPN 肽的结合亲和性高 100 倍以上。考虑到这些发现，推定在关节炎治疗中，R2K1v1.7 的有效血浆浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 以下。

(11. R2K1v1.7 的 scFv 的制备)

以上述具有 R2K1-VH1.7 的重链表达质粒和具有 R2K1-VL1.7 的轻链表达质粒作为模板，通过 PCR 制备编码具有 VH1.7-接头-VL1.7 (接头是编码 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO.14)所示氨基酸序列的碱基序列)结构的单链可变区片段(scFv)的 DNA 片段。该 DNA 片段的末端附加有限制酶 SfiI 和 NotI 的识别序列。将该 DNA 片段用限制酶 SfiI 和 NotI 消化，插入到同样用 SfiI 和 NotI 消化的 pCANTAB5E 载体(Marks, J.D 等人, J. Mol. Biol., 222 卷, 581 ~ 97 页, 1991)的 SfiI 位点和 NotI 位点，由此制备 R2K1-VH1.7 的 scFv 表达质粒。该表达质粒中，scFv 的编码区的下游附加有编码 E-Tag 的碱基序列。按照常规方法，将该质粒导入大肠杆菌 HB2151 株，接种于 SOBAG 琼脂板(含 2%葡萄糖和 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 SOB 板)，得到转化克隆。由所得克隆提取质粒 DNA，通过以该质粒 DNA 为模板的 DNA 碱基序列分析确认 scFv 的编码区的序列。DNA 碱基序列分析是使用

DTCS-Quick Start 试剂盒和 CEQ2000XL DNA 分析系统(两者均为 Beckman Coulter 公司)。所得碱基序列如 SEQ ID NO.9 所示。

确认了碱基序列的大肠杆菌克隆在含有 2%葡萄糖和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 2xYT 培养基中培养后,将其一部分悬浮于加入了 1 mM IPTG 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 2xYT 培养基中,再培养过夜,进行 scFv 的表达诱导。培养结束后,通过离心回收细胞,悬浮于含有 1 mM EDTA 的 PBS 中,在冰上放置 30 分钟。接着将悬浮液以 10,000 rpm 离心 15 分钟,回收上清,用 0.45 μm 的滤器过滤,由此得到含有 scFv 的周质组分。通过使用抗 E-Tag 抗体的亲和层析,由该周质组分中纯化 R2K1v1.7 的 scFv (以下称为 R2K1v1.7-scFv)。

对于上述制备的 R2K1v1.7-scFv 进行凝胶过滤层析,结果由图 13 所示的分离图谱中确认,几乎均为单体。

(12. 确认 R2K1v1.7-scFv 与人骨桥蛋白肽的结合性)

通过 ELISA 法测定纯化的 R2K1v1.7-scFv 与 hOPN5 肽的结合活性。方法大致如前所述,在本测定中,使用 HRP 标记抗 E-Tag 抗体作为标记抗体。结果如图 14 所示。确认纯化的 R2K1v1.7-scFv 未与阴性对照的 BSA 结合,而与 hOPN5 肽特异性结合。

(13. 聚乙二醇修饰抗体片段的制备)

按照常规方法,对 R2K1v1.7 抗体进行胃蛋白酶处理,然后使用蛋白 G HP 柱(两者均为 Amersham Biosciences 公司)和 Hi prep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution 柱(Amersham Biosciences 公司),得到纯化 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 。接着,用 0.1 M DTT 对纯化 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 进行还原处理,活化硫醇基,然后进行使用 Sephadex G-25 柱 (Amersham Biosciences 公司)的凝胶过滤,除去 DTT。将这样得到的 Fab'与马来酰亚胺化聚乙二醇 SUNBRIGHT ME-120MA (日本油脂)按照摩尔比 1:10 混合,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下静置过夜,进行偶联反应。添加碘乙酰胺(Nacalai Tesque),终止偶联

反应, 然后通过使用 Hi prep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution 柱的凝胶过滤, 得到聚乙二醇修饰的 $F(ab')_2$ (以下可记为 $F(ab')_2$ -PEG)。该 SDS-PAGE 的结果如图 15 所示。通过与作为比较对照的、电泳的未修饰 $F(ab')_2$ 进行比较, 可以确认通过聚乙二醇修饰导致分子量增加。

(14. 确认 $F(ab')_2$ -PEG 与骨桥蛋白肽的结合活性)

使用表面等离子共振测定法确认纯化 R2K1v1.7 的 $F(ab')_2$ -PEG 与 hOPN5 肽的结合活性。将生物素化 hOPN5 肽固定在 Sensor Chip SA (BIAcore 公司) 上, 使用 HBS-EP 缓冲液 (BIAcore 公司) 预先稀释为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 $F(ab')_2$ -PEG 确认结合活性, 结果如图 16 所示。由信号的升高, 可确认本 $F(ab')_2$ -PGE 与 hOPN5 肽的结合活性与 R2K1v1.7 相同。

产业实用性

本发明的人源化抗人骨桥蛋白抗体的活性(抗原结合活性、白细胞游走抑制活性等)和/或稳定性(对热、低 pH 条件和改性剂的耐性等)优异, 因此在以自身免疫疾病、风湿病、类风湿性关节炎和变形性关节炎为代表的各种炎症性疾病的预防或治疗中, 比起以往的抗人骨桥蛋白抗体可作为更为有效的药物。

虽然本发明强调、说明了优选方式, 但优选的方式也可以变更, 这对于本领域技术人员来说是显而易见的。本发明可以按照本说明书详述以外的方法实施。因此, 本发明包含在所附“权利要求书”的要旨和范围内所包含的所有变更。

本申请是以在日本国申请的特愿 2006-152892 为基础, 其中所公开的内容均包含在本说明书中。这里所述的包含专利或专利申请说明书的所有发行物中所述的内容也通过在此引用而与其所有的公布同等程度地引入到本说明书中。

<110> 安斯泰来制药有限公司
财团法人化学及血清疗法研究所

<120> 人源化抗人骨桥蛋白抗体

<130> 091084

<150> JP 2006-152892

<151> 2006-05-31

<160> 27

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的结构

<400> 1

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

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

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

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的结构

<400> 2

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

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

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

Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的结构

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn 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 His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的结构

<400> 4

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn 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 His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 5

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> R2K1-VH1.7 区

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 5

cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttg ggg tat acc ttc act gac tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100	105	110	
acc gtc tcc tca			348
Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 6			
<211> 348			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> R2K1-VH1.8 区			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(348)			
<400> 6			
cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc			48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser			
1 5 10 15			
tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc act gac tat			96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
20 25 30			
gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att			144
Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile			
35 40 45			
gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc			192
Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe			
50 55 60			
aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac			240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			
atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt			288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc			336
Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val			
100 105 110			

acc gtc tcc tca Thr Val Ser Ser 115	348
<210> 7 <211> 339 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> R2K1-VL1.7 区	
<220> <221> CDS <222> (1)..(339)	
<400> 7 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly 1 5 10 15	48
cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser 20 25 30	96
aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35 40 45	144
cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro 50 55 60	192
gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80	240
agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly 85 90 95	288
tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110	336
cgt Arg	339

<210> 8
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> R2K1-VL1.8 区

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 8
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Asn 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 aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act 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 agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga 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 cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 cgt 339
 Arg

<210> 9

<211> 732
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> R2K1v1.7-scFv

 <400> 9
 cagggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc cgtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctttggggta taccttcaact gactatgaaa tgcaactgggt gaagcagacc 120
 cctgtacatg ggcttgagtg gattggagct attcatccag gaagaggtgg tactgcctac 180
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccacgctg accgcggaca aatccactag tacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagaattact 300
 gggtaacttcg atgtctgggg gcaagggacc acggtcaccg tctcctcagg tggaggcgg 360
 tcaggcggag gtggctctgg cgggtggcga tcggatgttg tgatgacca gtctccactc 420
 tccctgagcg tcacccttgg acagccggcc tccatctcct gcaggagctc tcaaagcatt 480
 gtacatagta atggaaacac ctatttggaa tggtagctgc agaagccagg gcagtctcca 540
 cagctcctga tctataaagt ttccaaccga ttttctgggg tcccagacag attcagcggc 600
 agtgggtcag gcactgattt cacactgaaa atcagcaggg ttgaagctga agacgtcgga 660
 gtttattact gctttcaagg ttcacatgtt ccgctcacgt ttggccaggg gaccaagctg 720
 gagatcaaac gt 732

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人或猪骨桥蛋白的部分肽

<400> 10
 Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
 1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 猴类骨桥蛋白的部分肽

<400> 11

Ser Val Ala Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 小鼠或大鼠骨桥蛋白的部分肽

<400> 12

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg

1 5

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 骨桥蛋白的部分肽

<400> 13

Cys Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Arg Ser

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 15

<211> 441

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 图1中描述的 R2K1-VH1.7

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(424)

<400> 15

cagcaagctt gccgccacc atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg 52
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu
1 5 10

tca gta act gca ggt gtc caa tcc cag gtg cag ctg cag cag tct ggg 100
Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
15 20 25

gct gag gtg aag aag cct ggg gcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
30 35 40

ttg ggg tat acc ttc act gac tat gaa atg cac tgg gtg aag cag acc 196
Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr
45 50 55

cct gta cat ggg ctt gag tgg att gga gct att cat cca gga aga ggt 244
Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
60 65 70 75

ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg 292
Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
80 85 90

gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aca tct 340
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
95 100 105

gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aca aga att act ggg tac ttc gat 388
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
 110 115 120

gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 125 130 135

tccgcga 441

<210> 16
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的结构

<400> 16
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 17
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 图2中描述的R2K1-VH1.8

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(424)

<400> 17
 cagcaagctt gccgccacc atg gaa tgg agc tgg atc ttt ctc ttc ctc ctg 52
 Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu
 1 5 10

tca gta act gca ggt gtc caa tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg 100
 Ser Val Thr Ala Gly Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 15 20 25

gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct 148
 Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 30 35 40

tct ggg tat acc ttc act gac tat gaa atg cac tgg gtg aag cag acc 196
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr
 45 50 55

cct gta cat ggg ctt gag tgg att gga gct att cat cca gga aga ggt 244
 Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly
 60 65 70 75

ggt act gcc tac aat cag aag ttc aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg 292
 Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 80 85 90

gac aaa tcc act agt aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aca tct 340
 Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 95 100 105

gag gac acg gcc gtg tat tac tgt aca aga att act ggg tac ttc gat 388
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp
 110 115 120

gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 434
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 125 130 135

tccgcga

441

<210> 18

<211> 135

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的结构

<400> 18

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 19

<211> 455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 图3中描述的 R2K1-VL1.7

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(415)

<400> 19

cagcaagctt gccgccacc atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg 52
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met
 1 5 10

ttc tgg att cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct cca 100
 Phe Trp Ile Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro
 15 20 25

ctc tcc ctg agc gtc acc ctt gga cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg 148
 Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 30 35 40

agc tct caa agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg 196
 Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp
 45 50 55

tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt 244
 Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 60 65 70 75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac aga ttc agc ggc agt ggg tca 292
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 80 85 90

ggc act gat ttc aca ctg aaa atc agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc 340
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 95 100 105

gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc 388
 Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly
 110 115 120

cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gagtagaatt taaactttgc 435
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 125 130

ttctcagtt ggatccgcga 455

<210> 20

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的结构

<400> 20

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 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val
20 25 30

Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg
130

<210> 21

<211> 455

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 图4中描述的 R2K1-VL1.8

<220>

<221> CDS

<222> (20)..(415)

<400> 21

cagcaagctt gccgccacc atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg 52

	Met	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Met	
	1				5						10	
ttc tgg att cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct cca												100
Phe Trp Ile Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro												
	15				20						25	
ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg												148
Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg												
	30				35						40	
agc tct caa agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg gaa tgg												196
Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp												
	45				50						55	
tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa gtt												244
Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val												
	60				65						70	75
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac aga ttc agc ggc agt ggg tca												292
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser												
			80				85					90
ggc act gat ttc aca ctg aaa atc agc agg gtt gaa gct gaa gac gtc												340
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val												
			95				100					105
gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg ctc acg ttt ggc												388
Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly												
			110				115					120
cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gagtagaatt taaactttgc												435
Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg												
			125				130					
ttcctcagtt ggatccgcga												455

<210> 22

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的结构

<400> 22

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 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 23
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
 1 5 10 15
 Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
 20 25 30
 Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
 35 40 45
 Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
 50 55 60
 Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
 65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
85 90 95

Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp
100 105 110

Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu
115 120 125

Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu
130 135 140

Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
145 150 155 160

Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg
165 170 175

Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His
180 185 190

Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala
195 200 205

Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser
210 215 220

Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
225 230 235 240

Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu
245 250 255

His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
260 265 270

Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
275 280 285

Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
290 295 300

Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
305 310

<210> 24

<211> 1338

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> R2K1v1.7 H链

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

 <400> 24
 cag gtg cag ctg cag cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct ttg ggg tat acc ttc act gac tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

 gaa atg cac tgg gtg aag cag acc cct gta cat ggg ctt gag tgg att 144
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 gga gct att cat cca gga aga ggt ggt act gcc tac aat cag aag ttc 192
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 aag ggc aag gcc acg ctg acc gcg gac aaa tcc act agt aca gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 atg gag ctg agc agc ctg aca tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 aca aga att act ggg tac ttc gat gtc tgg ggg caa ggg acc acg gtc 336
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

 acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca 384
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

 ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg 432
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

 gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc 480

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly	
145	150 155 160
gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca	528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser	
	165 170 175
gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg	576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	
	180 185 190
ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc	624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr	
	195 200 205
aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca	672
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr	
	210 215 220
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc	720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe	
225	230 235 240
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct	768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	
	245 250 255
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc	816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	
	260 265 270
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
	275 280 285
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc	912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	
	290 295 300
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc	960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
305	310 315 320
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
	325 330 335
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	1056

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 1200
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1338
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 25
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的结构
 <400> 25
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile His Pro Gly Arg Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ile Thr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 26

<211> 657

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> R2K1v1.7 L链

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(657)

<400> 26

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

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg agc tct caa agc att gta cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat ttg gaa tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144

Asn Gly Asn 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 aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act 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 agg gtt gaa gct gaa gac gtc gga 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 cat gtt ccg ctc acg ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa	336
Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	
cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	384
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
115 120 125	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	432
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
130 135 140	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	480
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
145 150 155 160	
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	528
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
165 170 175	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	576
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
180 185 190	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg	624
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
195 200 205	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt	657
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210 215	

<210> 27
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的结构

<400> 27
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn 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 His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

10 20 30 40 50 60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAAC
 HindIII M E W S W I F L F L L S V T

70 80 90 100 110 120
TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG
 A G V Q S Q V Q L Q Q S G A E V K K P G

130 140 150 160 170 180
 GGCCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTTGGGGTATACCTTCACTGACTATGAAATGCA
 A S V K V S C K A L G Y T F T D Y E M H

190 200 210 220 230 240
 CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAG
 W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R

250 260 270 280 290 300
 AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGCTGACCGCGGACAAATC
 G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S

310 320 330 340 350 360
 CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
 T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y

370 380 390 400 410 420
 CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S

430 440
 CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA
 S BamHI

图 1

```

      10      20      30      40      50      60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAAC
HindIII      M E W S W I F L F L L S V T

      70      80      90      100     110     120
TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGG
A G V Q S Q V Q L V Q S G A E L V R P G

      130     140     150     160     170     180
GTCCTCCGTGAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACTTCACTGACTATGAAATGCA
S S V K V S C K A S G Y T F T D Y E M H

      190     200     210     220     230     240
CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTCATCCAGGAAG
W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R

      250     260     270     280     290     300
AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGCTGACCGCGGACAAATC
G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S

      310     320     330     340     350     360
CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y

      370     380     390     400     410     420
CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S

      430     440     450
CTCAGGTGAGTGGATCCGCGA
S      BamHI

```

图 2

10 20 30 40 50 60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT
 HindIII M K L P V R L L V L M F W I

70 80 90 100 110 120
TCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGAGCGTCACCCCT
 P A S S S D V V M T Q S P L S L S V T L

130 140 150 160 170 180
 TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA
 G Q P A S I S C R S S Q S I V H S N G N

190 200 210 220 230 240
 CACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA
 T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K

250 260 270 280 290 300
 AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGA
 V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D

310 320 330 340 350 360
 TTTCACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA
 F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q

370 380 390 400 410 420
 AGG TTCACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA
 G S H V P L T F G Q G T K L E I K R

430 440 450
 GAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA
 BamHI

图 3

```

      10      20      30      40      50      60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGAT
HindIII      M K L P V R L L V L M F W I

      70      80      90      100     110     120
TCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCT
P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T L

      130     140     150     160     170     180
TGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGAGCTCTCAAAGCATTGTACATAGTAATGGAAA
G Q P A S I S C R S S Q S I V H S N G N

      190     200     210     220     230     240
CACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAA
T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K

      250     260     270     280     290     300
AGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGATTTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGA
V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D

      310     320     330     340     350     360
TTTCACACTGAAAATCAGCAGGGTTGAAGCTGAAGACGTCGGAGTTTATTACTGCTTTCA
F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q

      370     380     390     400     410     420
AGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTGAGTA
G S H V P L T F G Q G T K L E I K R

      430     440     450
GAATTTAAACTTTGCTTCCTCAGTTGGATCCGCGA
BamHI

```

图 4

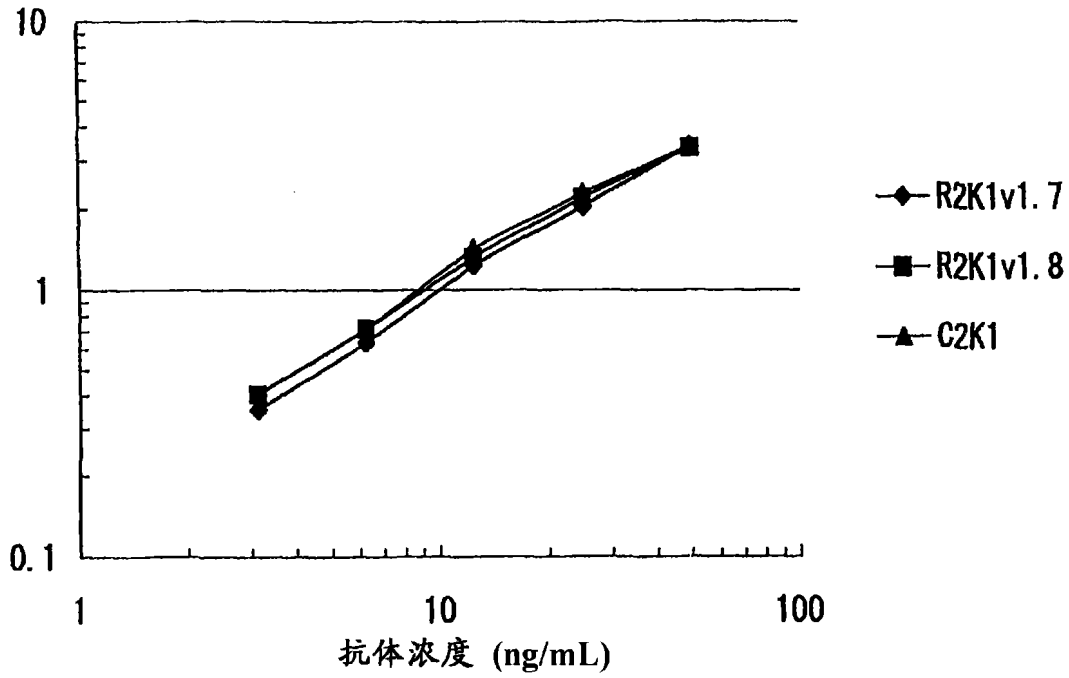


图 5

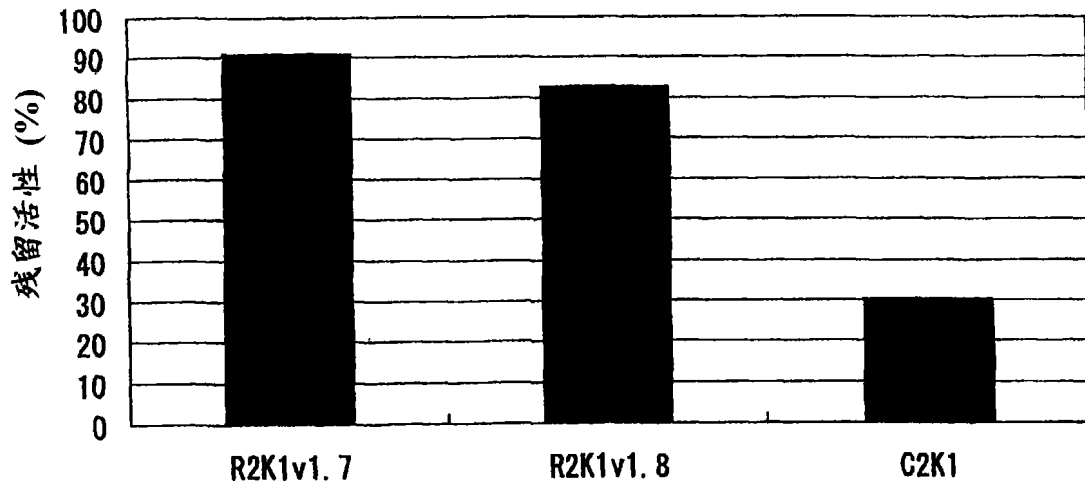


图 6

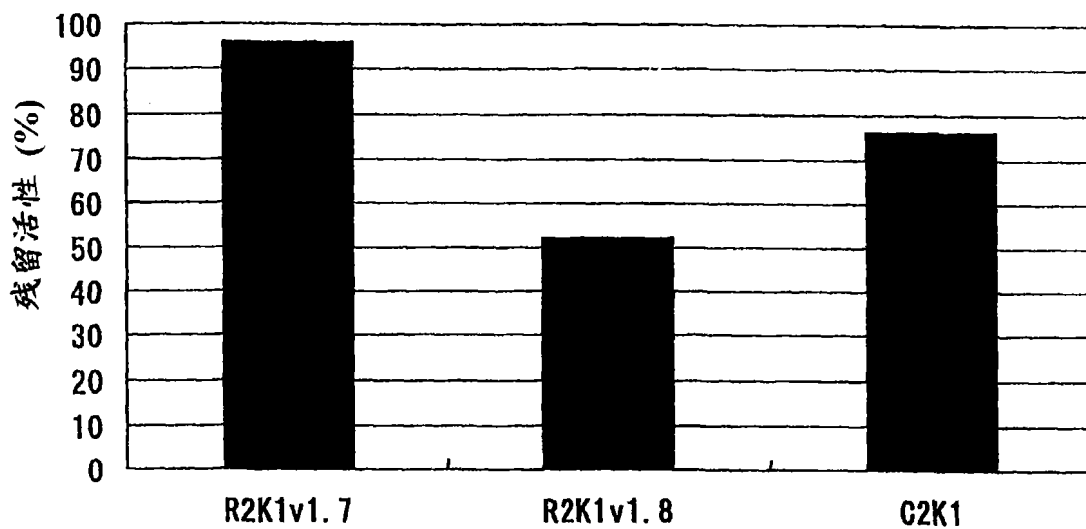


图 7

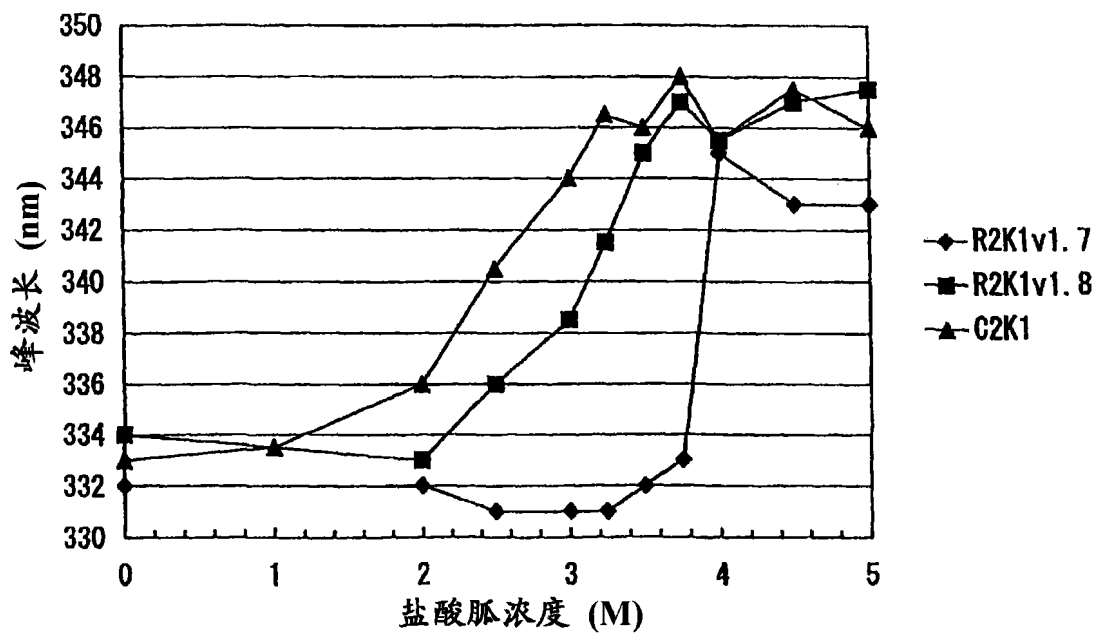


图 8

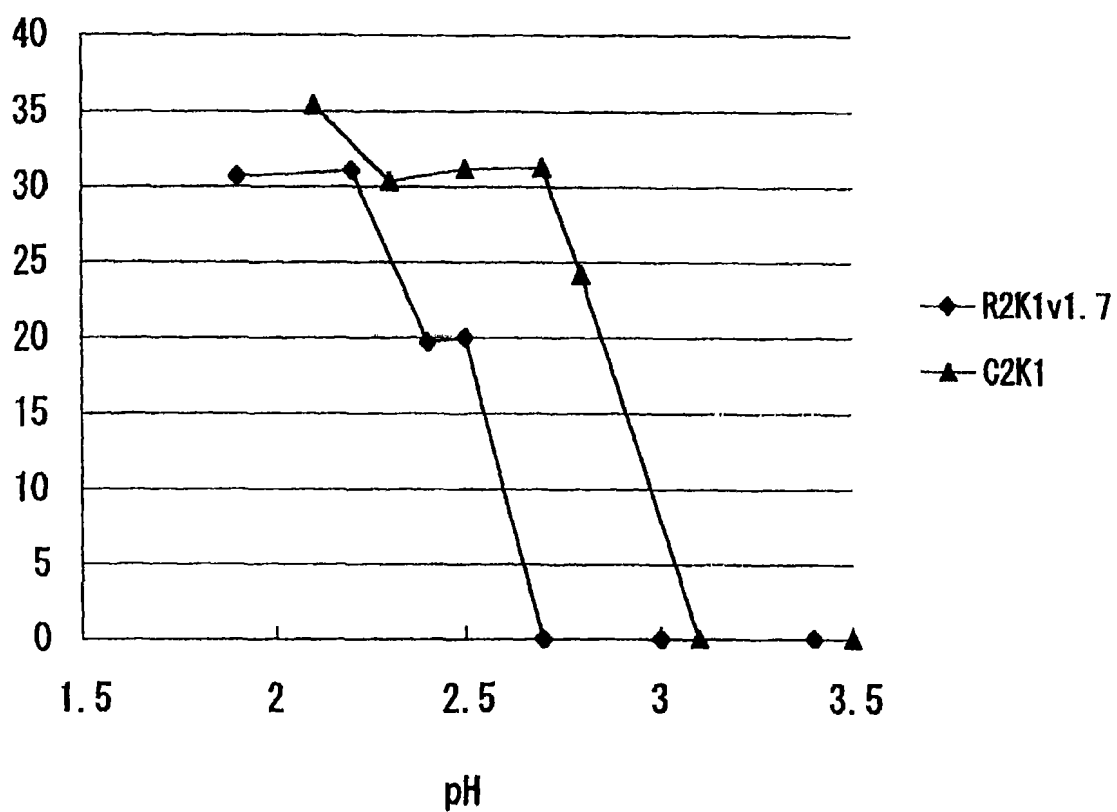


图 9

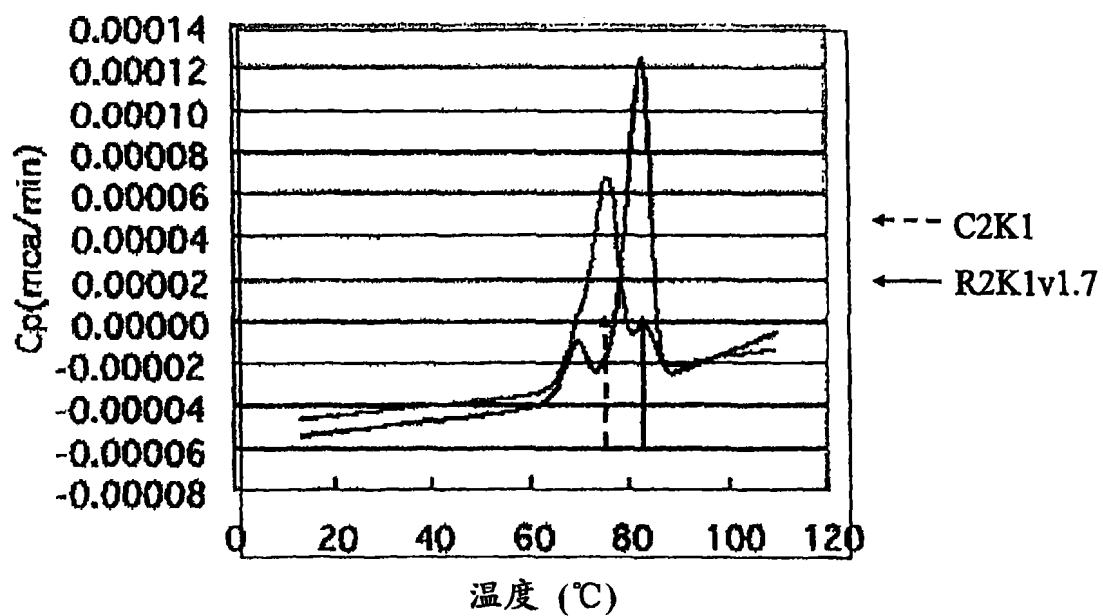


图 10

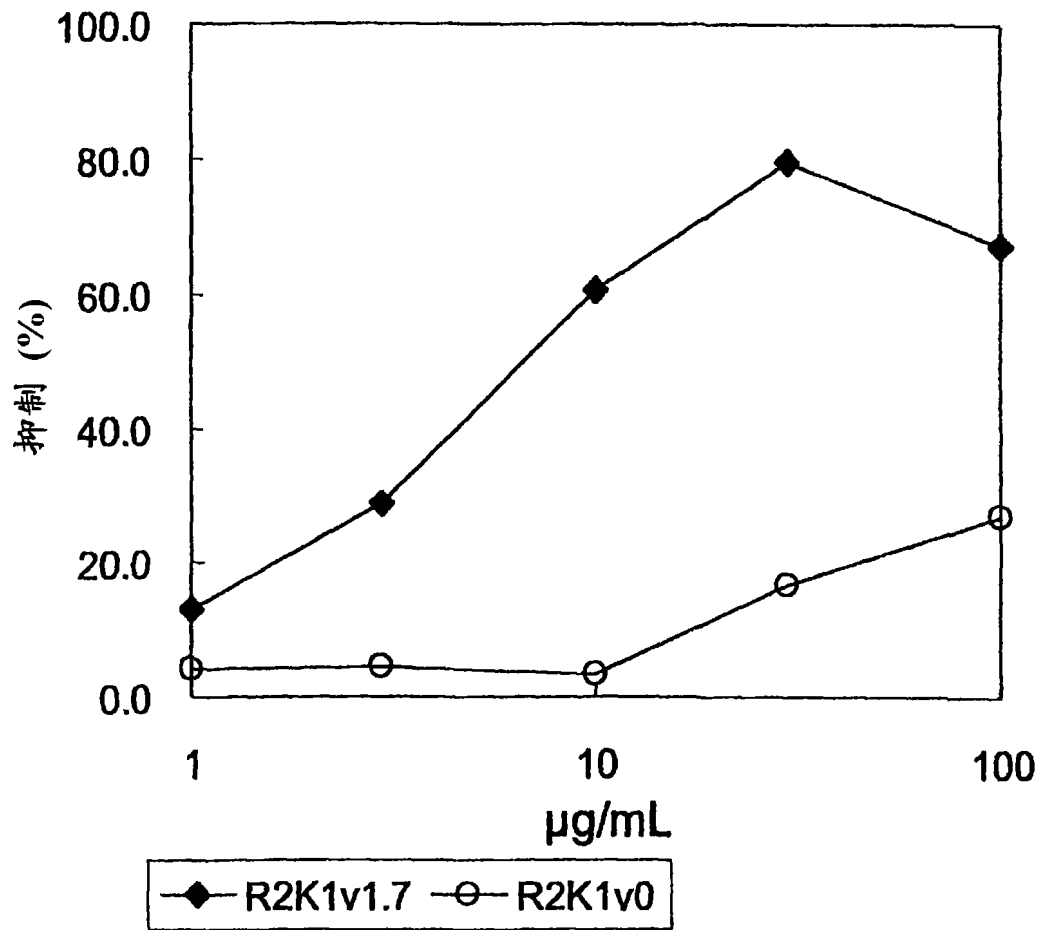


图 11

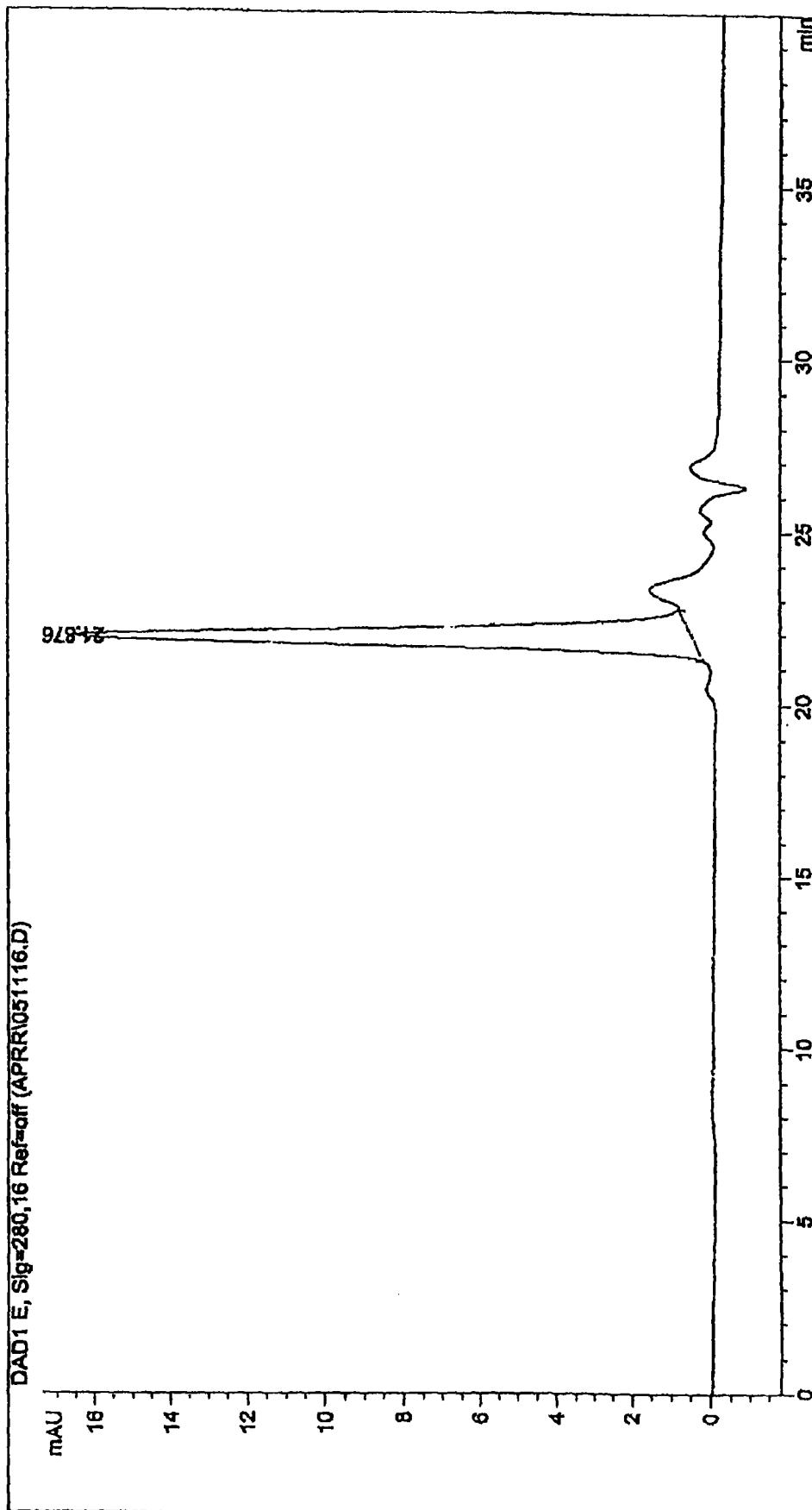


图 13

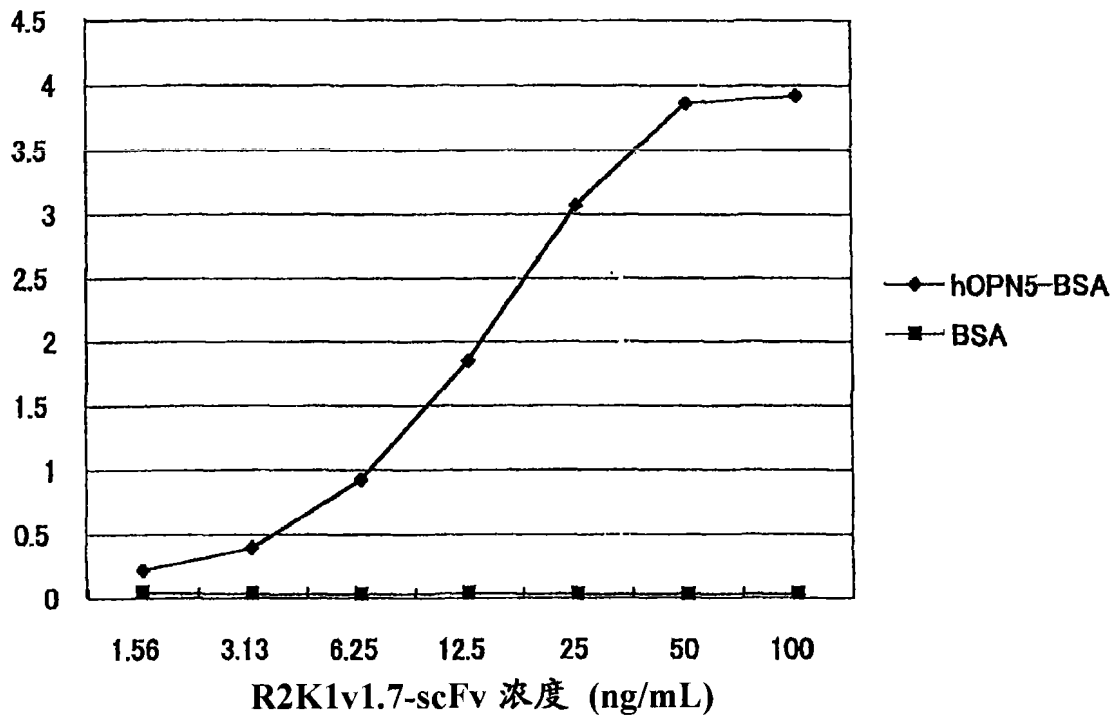


图 14

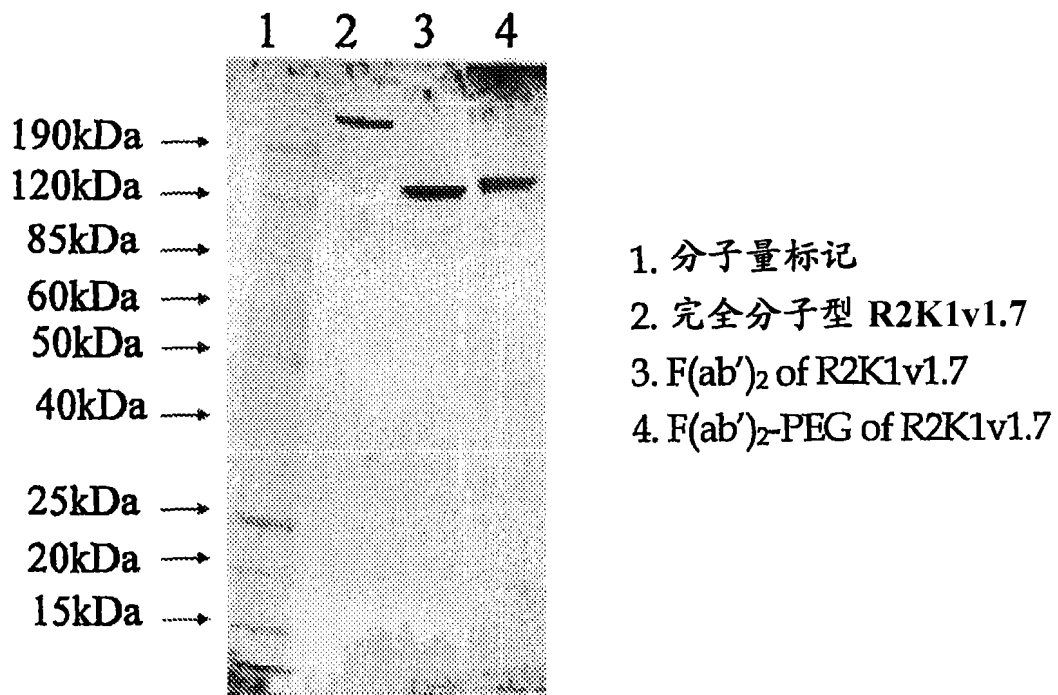


图 15

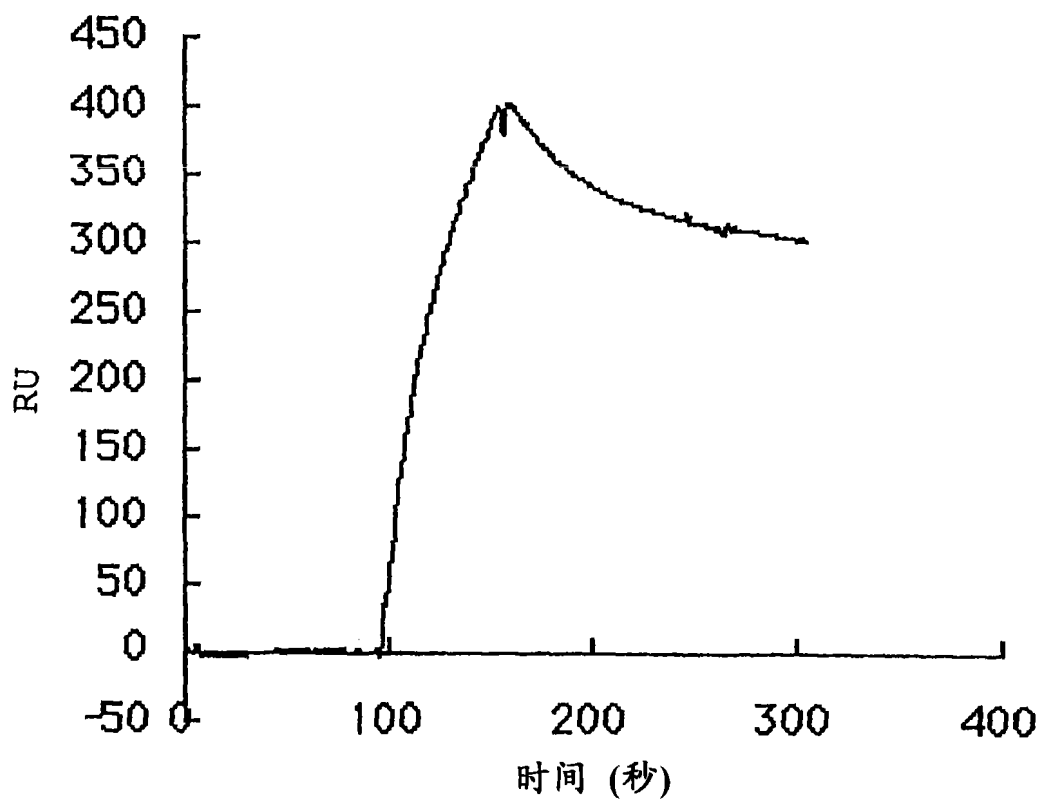


图 16

专利名称(译)	人源化抗人骨桥蛋白抗体		
公开(公告)号	CN101495632A	公开(公告)日	2009-07-29
申请号	CN200780028564.4	申请日	2007-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	安斯泰来制药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	安斯泰来制药有限公司 财团法人化学及血清疗法研究所		
当前申请(专利权)人(译)	安斯泰来制药有限公司 财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	山本宣哉 酒井文彦 樋口浩文 鸟饲正治 中岛敏博		
发明人	山本宣哉 酒井文彦 樋口浩文 鸟饲正治 中岛敏博		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P19/02 A61P29/00 A61P37/06 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/24 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K2317/56 A61P19/02 A61P29/00		
代理人(译)	刘冬 李连涛		
优先权	2006152892 2006-05-31 JP		
其他公开文献	CN101495632B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供比以往的人骨桥蛋白抗体活性(抗原结合活性、白细胞游走抑制活性等)和/或稳定性(对热、低酸性条件和改性剂的耐性等)优异的人源化抗人骨桥蛋白抗体。

```

10      20      30      40      50      60
CAGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGATCTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAAC
HindIII      M E W S W I F L F L L S V T
70      80      90      100     110     120
TGCAGGTGTCCAATCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGTGAAGAAGCCTGG
A G V Q S Q V Q L Q Q S G A E V K K P G
130     140     150     160     170     180
GGCTCCGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTGGGGTATACCTCACTGACTATGAAATGCA
A S V K V S C K A L G Y T F T D Y E M H
190     200     210     220     230     240
CTGGGTGAAGCAGACCCCTGTACATGGGCTTGAGTGGATTGGAGCTATTTCATCCAGGAAG
W V K Q T P V H G L E W I G A I H P G R
250     260     270     280     290     300
AGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACGCTGACCCGGGACAAATC
G G T A Y N Q K F K G K A T L T A D K S
310     320     330     340     350     360
CACTAGTACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
T S T A Y M E L S S L T S E D T A V Y Y
370     380     390     400     410     420
CTGTACAAGAATTACTGGGTACTTCGATGTCTGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
C T R I T G Y F D V W G Q G T T V T V S
430     440
CTCAGGTGACTGGATCCGCGA
S      BamHI

```