

[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 200810090840.6

[51] Int. Cl.

*C07K 16/28 (2006.01)*

*G12N 15/13 (2006.01)*

*G12N 15/85 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*G12N 5/08 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101481417A

[22] 申请日 2008.4.2

[21] 申请号 200810090840.6

[30] 优先权

[32] 2008.1.8 [33] CN [31] 200810043016.5

[71] 申请人 上海国健生物技术研究院

地址 201203 上海浦东新区郭守敬路 351 号 1  
号楼 431 室

[72] 发明人 郭亚军 钱卫珠 李博华 王 皓  
马 菁

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 4 页

[54] 发明名称

抗人 CD34 人源化抗体、其制备方法及应用

[57] 摘要

本发明属于生物技术领域。具体地，本发明公开了抗人 CD34 人源化抗体 h4C8、其制备方法及其在分选骨髓干/祖细胞中的用途。h4C8 抗体能很好地与高表达 CD34 的人髓性白血病细胞特异性结合，可以将它与磁性纳米材料偶联，制备免疫磁珠，来分选骨髓造血干细胞，能有效地减少 HAMA 的发生率，提高临床造血干细胞移植的安全性，用于某些恶性血液病及实体瘤的治疗。

1. 一种人源化抗 CD34 抗体,其重链可变区 CDR 氨基酸序列分别选自 GYTFTNYGMN、WINTNTGEPKYAEEFKG 或 GYGNRYARGAWLAY, 轻链可变区 CDR 氨基酸序列分别选自 KSSQTIIVHSNGNTYLE、QVSNRFS 或 FQGSHPRT。
2. 权利要求 1 所述的人源化抗 CD34 抗体, 其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示, 轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示, 恒定区为人抗体恒定区。
3. 一种核苷酸序列, 编码权利要求 1 所述的人源化抗 CD34 抗体。
4. 权利要求 3 所述的核苷酸序列, 其中编码重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示, 轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。
5. 一种含有权利要求 4 所述的核苷酸序列的表达载体, 为 pcDNA3.1/ZEO(+) 或 pcDNA3.1 (+)。
6. 权利要求 5 所述的表达载体转化的宿主细胞为 CHO 细胞。
7. 一种制备权利要求 1-2 任一所述的抗 CD34 的人源化抗体的方法, 包括通过计算机辅助设计出人源化抗体 h4C8 的氨基酸序列, 全基因合成 h4C8 的重链和轻链可变区基因并经基因重组分别与人抗体重、轻链恒定区基因拼接, 克隆到真核表达载体中, 分别构建人源化抗体的轻、重链表达载体, 然后将轻、重链表达载体用脂质体法共转染 CHO 细胞, 然后进行筛选、培养纯化即得。
8. 权利要求 1-2 任一所述的抗体在分选骨髓造血干/祖细胞中的用途。

## 抗人 CD34 人源化抗体、其制备方法及用途

### 技术领域

本发明属于生物技术领域，更具体地，本发明公开了一种抗体、其制备方法及用途。

### 背景技术

在某些恶性血液病及实体瘤的临床治疗上，造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSC)移植已经成为目前公认的唯一有效的治疗方法。但因移植物中含有大量T淋巴细胞致使移植后发生急性、重度移植物抗宿主病(graft-versus-host disease GVHD)是影响异基因造血干细胞移植能否获长期生存的主要原因之一。造血干/祖细胞移植面临的首要问题是如何获得大量纯化的造血干细胞，以去除杂质细胞对移植的干扰，因此，清除或富集移植物中特定的细胞是当前移植领域所关注的问题。由于HSC没有明确的形态学特征，主要表现为淋巴细胞样的单个核母细胞，所以只能以细胞表面的一些蛋白来鉴定。CD34是一个分子量约110Kd的穿膜糖蛋白，是目前所能认识的表达在人类HSC上最早期也是最广泛的抗原，是衡量HSC质与量的较好的标志，随着基于CD34抗体的阳性选择技术的发展，CD34<sup>+</sup>造血干细胞无论是在实验性动物还是在人身上都显示出重建造血的功能 [Andrews RG, Bryant EM, Bartelmez SH, Muirhead

DT, Knitter GH, Bensinger W, Strong DM, Bernstein TD (1992) CD34<sup>+</sup> marrow cells, devoid of T and B Lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated baboons. *Blood* 80:1693] [Shpall EJ, Jones RB, Franklin W, Bearman S, Stemmer S, Hami L, Petsche D, Taffs S, Myers S, Purdy M, Heimfeld S, Halligan J, Berenson RJ (1994) Transplantation of autologous CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells into breast cancer patient following high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 12:28], 因此它们以其独特的生物学特性与功能正成为造血干细胞移植最理想的靶细胞。

目前, 应用于细胞分离纯化主要采用贴壁法、差速离心、非连续性密度梯度法等手段。虽然这些技术解决了不少实际问题, 但由于操作周期长、细胞回收率低、分离纯化成本高, 阻碍了细胞生物学的发展以及细胞生物治疗技术产品的开发和应用。免疫磁珠分选细胞技术是近年来发展起来的一项新的细胞分离技术, 具有简便易行、分离纯度高、保留细胞活性等优点, 可用于分离和检测各种骨髓及血细胞、肿瘤细胞、细菌及其他微生物等, 日益受到生物医学领域科研工作者的青睐。近几年, 免疫磁珠逐步朝着亚微米尺寸方向发展, 以使得磁珠能够在低梯度磁场下简便快速分离细胞, 又在实施分离后无需将磁珠从细胞表面解离而直接进行后续分析与应用, 且磁珠对分离后的细胞活性没有影响。其分离原理为: 运用抗体特异性亲和作用原理, 以磁性纳米颗粒作为载体将抗体偶联在其表面, 磁性纳米颗粒上抗体与

待分选细胞特异性表面抗原结合，形成细胞-抗体-磁性纳米颗粒复合物，在外加磁场的定向控制下，通过亲和吸附、清洗和解吸等操作，可以一步从原始细胞混合液中直接分离出靶细胞。纳米磁性细胞亲和分离具有磁性分离的简单方便和亲和分离的高选择性双重优势。

随着免疫磁珠的问世，通过 CD34 单克隆抗体偶联磁性纳米微球制备相应的免疫磁珠来分选骨髓造血干细胞已经应用于临床造血干细胞移植，由于用其分选细胞具有操作简便、分离迅速完全、细胞纯度高等优点，已成为某些恶性血液病、重症免疫缺陷和肿瘤放化疗所致的造血功能低下等疾病的首选疗法。在造血干细胞分选的过程中，这些抗体将不可避免地伴随着造血干细胞进入人体。杂交瘤技术生产的鼠源单克隆抗体进入人体后可能引起人抗鼠抗体免疫应答 human antimouse antibody response (HAMA) [Winter G, Harris WJ. Humanized antibodies. Immunol Today. 1993 Jun;14(6):243-6]。因此，如何通过基因工程技术来构建抗降低鼠源抗体的免疫原性的抗体，有效地减少 HAMA 反应的发生率是本领域的技术人员急于解决的问题。

人源化抗体是为了克服鼠源单抗在临床应用中的缺陷而发展起来的新型基因工程抗体。第一代人源化抗体是将鼠单抗的可变区和人抗体的恒定区组成嵌合抗体，由于抗体的抗原亲和力是由其可变区决定的，因此嵌合抗体的亲和力保持得很好，同时免疫原性也得到了一定程度的降低。抗体的可变区是由超变区 (CDR) 区和框架区 (FR) 区组成的，CDR 是高度可变的区域，直接介导抗体与抗原的结合。FR

区相对保守，作为支架维持着 CDR 区的空间位置，它是可变区中产生免疫原性的主要区域。由于嵌合抗体上还保留着鼠可变区，临床应用时仍常常会有强烈的 HAMA 反应。因此，为了尽可能降低嵌合抗体的免疫原性，人们考虑将鼠 CDR 区直接移植到人源抗体可变区中的 FR 区上，得到 CDR 移植抗体，也就是人源化抗体。但是，单纯的 CDR 移植往往降低甚至丧失原抗体的亲和力，这是因为 FR 区不仅提供了 CDR 的空间构象环境，有时还直接参与抗原抗体的相互结合，只有将 FR 中某些重要残基回复突变成鼠源残基才能恢复抗体的活性。因此，如何确定 FR 中影响抗体活性的重要残基成为了抗体人源化的关键。

## 发明内容

本发明的发明人进行了大量的实验，在申请人于2007年12月13日申请的发明专利申请号为200710094456.9，发明名称为《抗人CD34抗体、其制备方法及其用途》的基础上对抗体CD34的小鼠单抗4C8进行了人源化改型设计，成功构建了抗CD34人源化抗体h4C8。

具体地，本发明公开了一种人源化抗 CD34 抗体，其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示，恒定区为人抗体恒定区。

本发明还公开了一种编码上述人源化抗 CD34 抗体的核苷酸序列，更具体地，编码重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO:5 所示，轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

本发明还公开了含有上述核苷酸序列表达载体，为 pcDNA3.1/ZEO(1)和 pcDNA3.1 (+)。

本发明还公开了被上述表达载体转化的宿主细胞为 CHO 细胞。

本发明进一步公开了上述抗 CD34 的人源化抗体的制备方法，包括通过计算机辅助设计出人源化抗体 h4C8 的氨基酸序列，全基因合成 h4C8 的重链和轻链可变区基因并经基因重组分别与人抗体重、轻链恒定区基因拼接，克隆到真核表达载体中，分别构建人源化抗体的轻、重链表达载体，然后将轻、重链表达载体用脂质体法共转染 CHO 细胞，然后进行筛选、培养纯化即得。

本发명의发明人还利用得到的抗体进行了一系列实验，体外抗原结合活性测定结果表明 h4C8 都能很好地与高表达 CD34 的人髓性白血病细胞 KG-1a 特异性结合。竞争抑制实验结果表明 h4C8 保留了原鼠源抗体的亲和力和特异性，可以将它与磁性纳米材料偶联，制备免疫磁珠，来分选骨髓造血干细胞，能有效地减少 HAMA 的发生率，提高临床造血干细胞移植的安全性，用于某些恶性血液病及实体瘤的治疗。

发明人采用碳化二亚胺/N-羟基琥珀酰亚胺 (EDC/NHS) 方法活化磁珠表面羧基，活化的羧基再与抗体上氨基进行反应，偶联 CD34 抗体，制备可高效分离细胞的 CD34<sup>+</sup>免疫磁珠。利用 CD34<sup>+</sup>的 KG-1a 细胞与 CD34<sup>-</sup>的 Raji 细胞制备分选模型，CD34 单抗免疫磁珠分选 CD34<sup>+</sup>的细胞。还利用 CD34<sup>+</sup>的免疫磁性纳米颗粒分选分离骨髓造血干细胞，并对分选获得细胞的纯度、得率进行检测分析。

将抗 CD34 单克隆抗体结合在磁性纳米颗粒上，这种作为抗体载体的磁性纳米颗粒与 CD34<sup>+</sup>造血干/祖细胞结合后，形成免疫复合物。在外加磁场的作用下，复合物发生力学移动，将与磁性纳米颗粒上抗体特异性结合的造血干/祖细胞与其它细胞（不表达 CD34 抗原的肿瘤细胞）分离，将净化后的造血干细胞回输患者，重建造血及免疫系统，并有效减少肿瘤复发。

### 附图说明

图 1. 4C8单克隆抗体的分子模拟结构示意图：FR区残基用浅灰色条带表示，CDR区残基用深灰色条带表示，9个位于CDR区周围5 Å距离内的FR区残基用浅灰色球棒状表示。

图 2. 人源化抗体h4C8的重链（图2-1）和轻链（图2-2）氨基酸序列与相关序列的比对图，其中4C8VH 和4C8VL分别表示鼠源单克隆抗体4C8的重链和轻链的可变区；选择人抗体AAC18206的重链可变区和人抗体BAC01734的轻链可变区分别作为人源化抗体hu4C8重链和轻链的框架区；hu4C8VHa和hu4C8VHb表示不同的人源化抗体重链可变区，h4C8VLa和h4C8VLb分别表示不同的人源化抗体轻链可变区；破折号表示与人抗体AAC18206或BAC01734对应残基相同的氨基酸，括弧里表示的是CDR区；氨基酸的按照Kabat的编号方式进行编号 [E. A. Kabat, T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, C. Foeller, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth ed., United States Department of Health and Human Services, Bethesda,

MD, 1991.]。

图 3. 4C8 的人源化抗体的抗原结合活性实验结果。

图 4. 竞争抑制实验结果。

图 5: CD34 免疫磁珠分选 CD34+细胞系实验结果: 前方的图为分选前混合细胞, 左侧的峰为 CD34 的 Raji 细胞, 右侧的峰为 CD34+ 的 KG-1a 细胞; 后方的图为分选后的阳性细胞群, CD34-的 Raji 细胞已被去除, CD34+的细胞得到有效的富集。

图 6: CD34 免疫磁珠分选人脐带血造血干细胞实验结果: 前方的图为分选前脐带血单个核细胞, 左侧的峰为 CD34-的细胞群, 右侧的峰为 CD34+的细胞群; 后方的图为分选后的阳性细胞群, CD34-的细胞已被去除, CD34+的干细胞得到有效的富集。

## 具体实施方式

以下实施例仅仅对本发明进行进一步说明, 不应理解为对本发明的限制。

KG-1a (人白血病细胞, ATCC, CCL-246.1)

Raji (人 B 淋巴瘤细胞, ATCC, CCL-86)

在本发明中, 如果没有特别说明, 4C8 均指按本发明的申请人于 2007 年 12 月 13 日申请的发明专利申请号为 200710094456.9, 发明名称为《抗人 CD34 抗体、其制备方法及用途》中公开的方法中得到的 4C8。

### 实施例 1. 人抗体轻、重链恒定区基因的克隆

用淋巴细胞分离液（鼎国生物技术发展公司产品）分离健康人淋巴细胞，用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司产品)提取总 RNA，根据文献（Cell, 1980, 22: 197-207）和文献（Nucleic Acids Research, 1982, 10: 4071-4079）报道的序列分别设计引物采用 RT-PCR 反应扩增抗体重链和轻链恒定区基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收并克隆到 pGEM-T 载体中，测序验证后确认获得了正确的克隆。SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 分别显示了重链恒定区（CH）的核苷酸序列和氨基酸序列。SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 分别显示了轻链恒定区（CL）的核苷酸序列和氨基酸序列。本例中的正确克隆记作 pGEM-T/CH 和 pGEM T/CL。

### 实施例 2. 鼠源 4C8 单抗可变区（Fv）三维结构的同源模建

利用 Accelrys 公司的 Insight II 程序包来模拟 4C8 鼠源单抗可变区的三维结构。首先，用 BLAST 程序在蛋白质结构数据库（Protein Data Bank, PDB）中分别搜索 4C8 重链和轻链可变区蛋白的模板蛋白。我们选取同源性最高的抗体 1A4J 作为 4C8 的模建模板，利用 Insight II 程序模建出 4C8 的三维结构，如图 1 所示。

### 实施例 3. 4C8 人源化抗体的设计与构建

用 BLAST 程序在 Genbank 数据库中分别搜索与 4C8 轻链和重链可变区的最相似人源模板。与 4C8 重链可变区同源性最高的人源抗体是 human antibody AAC18206 抗体(GenBank No. AAC18206)，相似度为 68%，与 4C8 轻链可变区同源性最高的人源抗体是 BAC01734 (GenBank No. BAC01734)，相似度为 80%。因此，我们分别采用 AAC18206 和

BAC01734 作为 4C8 重链和轻链人源化的模板。首先将 4C8 的重链和轻链 CDR 区分别直接移植到人源模板 AAC18206 和 BAC01734 上, 构成 CDR 移植抗体, 重链为 h4C8IIa, 轻链为 h4C8La。h4C8Ha 和 h4C8La 的可变区氨基酸序列如图 2 所示。全基因合成人源化抗体重、轻链可变区基因 (h4C8VHa 和 h4C8VL a), 然后以 h4C8VHa 基因和 pGEM-T/CH 载体为模板通过重叠 PCR 合成人源化抗体重链基因, 反应条件为: 95 °C 15 分钟; 94 °C 50 秒, 58 °C 50 秒, 72 °C 50 秒, 30 个循环; 72 °C 10 分钟。并使此人源化重链基因的 5'端含有限制酶位点 HindIII 和信号肽基因序列, 3'端含有翻译终止密码 TAA 和限制酶位点 EcoR I。信号肽基因序列见 SEQ ID NO: ( ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTG CCTCAGTCATAATATCCAGAGGA)。最后琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 回收目的条带并克隆到 pGEMT 载体中, 筛选阳性克隆测序。挑选测序正确的克隆用 HindIII 和 EcoR I 酶切, 经琼脂糖凝胶电泳纯化回收人源化抗体重链片段 h4C8VHaCH, 与用 HindIII 和 EcoR I 酶切的质粒 pcDNA3.1(+)(美国 Invitrogen 公司产品)进行连接, 构建成人源化重链真核表达载体 pcDNA3.1 (+)(h4C8VHaCH)。

以 h4C8VL a 基因和 pGEM-T/CL 载体为模板通过重叠 PCR 合成人源化抗体轻链基因, 反应条件为: 95 °C 15 分钟; 94 °C 50 秒, 58 °C 50 秒, 72 °C 50 秒, 30 个循环; 72 °C 10 分钟, 得到 PCR 产物 h4C8VL aCL, 其 5'端含有限制酶位点 HindIII 和信号肽基因序列, 3'端含有翻译终止密码 TAA 和限制酶位点 EcoR I。信号肽基因序列见

SEQ ID NO:

( ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTG  
CC1CAGTCATAATATCCAGAGGA)。挑选测序正确的克隆用 Hind  
III和 EcoR I 酶切，经琼脂糖凝胶电泳纯化回收人源化抗体轻链片段  
h4C8VLaCL，与用 HindIII和 EcoR I 酶切的质粒 pcDNA3.1/ZEO(+)  
载体(美国 Invitrogen 公司产品)进行连接，构建成人源化轻链真核表  
达载体 pcDNA3.1/ZEO(+)(h4C8VLaCL)。

于 24 孔组织培养板中接种  $0.8 \times 10^5$ /孔的 COS-1 细胞 (ATCC CRL  
1650)，用 10%FCS 的 RPMI1640/DMEM 混合培养基(16/DM 培养基)培  
养至 90-95%融合度时进行转染：取质粒 1  $\mu$ g (轻链表达载体 0.6 $\mu$ g；  
重链表达载体 0.4 $\mu$ g) 和 2 $\mu$ l Lipofectamine2000 Reagent 分别溶于  
50 $\mu$ l 无血清 16/DM 培养基，室温静置 5 分钟，将以上 2 种液体混合，  
室温孵育 20 分钟以使 DNA-脂质体复合物形成，其间用 0.5ml 无血清  
的 16/DM 培养基替换 24 孔板中的含血清培养基，然后将形成的 DNA-  
脂质体复合物加入到孔中，CO<sub>2</sub>孵箱培养 4 小时后补加 0.5ml 含 20%  
FCS 的 16/DM 培养基，置于 CO<sub>2</sub>孵箱中继续培养，72 小时后取培养上  
清进行分析，采用 ELISA 确定培养上清中抗体的含量：Goat  
anti-human IgG(Fc)包被于 ELISA 板，4 $^{\circ}$ C 过夜，用 2%BSA-PBS 于  
37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时，加入待测的培养上清和标准品 (Human myeloma  
IgG1,  $\kappa$ )，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时，加入 HRP-goat anti human kappa 进行  
结合反应，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，加入 TMB 于 37 $^{\circ}$ C 作用 5 分钟，最后用  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应，测 OD<sub>450</sub> 值。

将人 KG-1a 细胞用 2%FCS-PBS 重悬成  $1 \times 10^6$  cells/ml, 分别加入不同稀释度的转染人源化抗体的 COS 细胞培养上清, 表达后置于 4℃ 孵育 60min, 用 2% FCS PBS 洗细胞 2 遍, 再加入 FITC-goat anti human IgG (H+L) 于 4℃ 孵育 60min, 洗细胞后用 FCM 分析并计算细胞的荧光强度。结果发现与 c4C8 嵌合抗体相比, h4C8Ha 和 h4C8La 组成的人源化抗体 (h4C8Ha/h4C8La) 的活性几乎完全丧失 (图 3)。因此, 为了获得高亲和力的人源化抗体, 我们还需对可能影响 4C8 抗体结合活性的 FR 区鼠源残基进行分析和回复突变。

通过分析模建的 4C8 单抗可变区的三维结构 (图 1), 我们发现在 CDR 区周围 5 Å 的空间范围内可能影响原抗体 CDR 构象而又与人源模板中相应位置不同的 FR 区残基有 9 个, 分别为 L3Leu, L4Leu, L46Leu, H21Ile, H46Lys, H68Ala, H69Leu, H82aAsn, 和 H91Phe。将这些鼠源氨基酸残基保留在构建的 CDR 移植抗体中可得到人源化抗体 (h4C8Hb/h4C8Lb)。h4C8Hb 和 h4C8Lb 的可变区氨基酸序列如图 2 所示。SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 分别显示了 h4C8Hb 的核苷酸序列和氨基酸序列。SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 分别显示了 h4C8Lb 的核苷酸序列和氨基酸序列。H4C8Hb 的三个 CDR 区氨基酸序列分别为 (可参见图 2-1 的 H4C8VHb) :  
HCDR1(GYTFTNYGMN), HCDR2(WINTNTGEPKYAEFFKG),  
HCDR3(GYGNYARGAWLAY); h4C8Lb 的三个 CDR 区氨基酸序列分别为 (可参见图 2-2 的 H4C8VLb) :  
LCDR1(RSSQTIVHSNGNTYLE), LCDR2(QVSNRFS),

LCDR3(FQGSHVPRT)。采用重叠 PCR 的方法分别合成人源化抗体重、轻链可变区基因 (h4C8VIIb/h4C8VLb)，并按与人源化抗体 (h4C8Ha/h4C8La) 相同的方法构建轻链表达载体 pcDNA3.1/ZEO(+) (h4C8VLbCL) 和重链表达载体 pcDNA3.1 (-) (h4C8VHbCH)。然后将轻、重表达载体共转染 COS-1 细胞，用流式细胞术测定抗体的抗原结合活性，发现其与 KG-1a 的结合活性与 4C8 嵌合抗体相似，将这个人源化抗体 (h4C8IIa/h4C8La) 命名为 h4C8。

#### 实施例 4. 人源化抗体的稳定表达与纯化

于 3.5cm 组织培养皿中接种  $3 \times 10^5$  CHO-K1 细胞 (ATCC CRL-9618)，细胞培养至 90%-95% 融合时进行转染：取质粒 10  $\mu$ g (质粒 pcDNA3.1 (-) (Vh4C8HbCH) 4  $\mu$ g，质粒 pcDNA3.1/ZEO(+) (Vh4C8LbCL) 6  $\mu$ g) 和 20  $\mu$ l lipofectamine2000 Reagent (Invitrogen 公司产品) 分别溶于 500  $\mu$ l 无血清 DMEM 培养基，室温静置 5 分钟，将以上 2 种液体混合，室温孵育 20 分钟以使 DNA-脂质体复合物形成，其间用 3ml 无血清的 DMEM 培养基替换培养皿中的含血清培养基，然后将形成的 DNA-脂质体复合物加入到板中，CO<sub>2</sub> 孵箱培养 4 小时后补加 2ml 含 10% 血清的 DMEM 完全培养基，置于 CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养。转染进行 24h 后细胞换含 600  $\mu$ g/ml G418 和 250  $\mu$ g/ml Zeocin 的选择培养基筛选抗性克隆。取细胞培养上清用 ELISA 检测筛选高表达克隆：羊抗人 IgG (Fc) 包被于 ELISA 板，4°C 过夜，用 2% BSA PBS 于 37°C 封闭 2h，加入待测的抗性克隆培养上清或标准品 (Human myeloma IgG1,  $\kappa$ )，37°C 温育 2h，加

入 HRP-羊抗人 IgG( $\kappa$ ) 进行结合反应, 37°C 温育 1h, 加入 TMB 于 37°C 作用 5min, 最后用 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 测 A450 值。将筛选得到的高表达克隆用无血清培养基扩大培养, 用 Protein A 亲和柱 (GE 公司产品) 分离纯化人源化抗体 h4C8。将纯化抗体用 PBS 进行透析, 最后以紫外吸收法定量。

### 实施例 5. 竞争抑制实验

将固定的亚饱和浓度的荧光标记抗体 FITC-4C8 和系列稀释的未标记纯化抗体分别混合后加入到靶细胞 KG-1a ( $1 \times 10^6$  /ml) 中, 4°C 孵育 60min, 1%FCS-PBS 洗细胞 2 遍, 流式细胞仪检测并用 Cellquest 软件分析。人源化抗 CD3 的单克隆抗体 hu12F6 (制备参见 Li BH, Wang H, Dai JX, Ji JJ, Qian WZ, Zhang DP, Hou S, Guo YJ. Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology. 2005, 116(4):487-98) 作为对照。竞争抗体的每个浓度设 3 个复管, 计算半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值, 最大荧光强度表示在没有竞争抗体时获得的平均荧光强度。

实验结果见图 4, 抗体 h4C8 能完全阻断荧光标记抗体 FITC-4C8 与 KG-1a 细胞的结合, 它们的 IC<sub>50</sub> 值接近, 表明人源化抗体具有与原鼠源抗体相似的特异性和亲和力 (表 1)。

表 1. 竞争抑制分析结果

抗体类型	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup>	SD	n
4C8	1.723	0.145	3

c4C8	1.692	0.137	3
h4C8	1.764	0.158	3

### 实施例6 免疫磁珠的制备

活化：以pH6.0，0.01mol/L的NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>吐温（0.05%Tween-20）溶液作为活化缓冲溶液，取2mg羧基磁珠（美国Bangs laboratories, BioMag Carboxyl（BM570））于2ml离心管中，加入500μl活化缓冲液，在漩涡振荡器上混合均匀，再将离心管放置于磁分离架上，待磁珠完全被吸附，用微型台式真空泵把上清液抽提掉；加入500μl活化缓冲液重新洗涤磁珠2遍后，向磁珠中加入485μl活化缓冲液，再分别加入2.5mg碳化二亚胺（EDC，原浓度0.5g/ml）与N-羟基琥珀酰亚胺（NHS，原浓度0.25g/ml），在漩涡振荡器上混合均匀，室温活化2mg磁珠表面的羧基30min。

偶联：以500μl，pH7.4，0.01mol/L的磷酸盐吐温（PBST，0.05% Tween-20）溶液作偶联缓冲液，加500μl的活化缓冲液重新洗涤已经活化的磁珠3遍后，再用500μl的偶联缓冲液洗涤磁珠两遍；加475μl偶联缓冲液重悬洗涤后的磁珠，再加入25μl 6mg/ml的抗CD34抗体，使得磁珠表面活化的羧基跟抗CD34抗体的氨基室温反应3 h，将抗体偶联于磁珠表面，得到免疫磁珠。

封闭：用500μl的偶联缓冲液洗涤偶联后的磁珠2遍，加入500μl含有1%牛血清白蛋白（BSA）的偶联缓冲液封闭磁珠30min。

保存：用500μl的偶联缓冲液洗涤偶联后的磁珠2遍，用500μl含0.02%NaN<sub>3</sub>，0.1%BSA，pH7.4，0.01mol/L磷酸盐吐温（0.05%Tween-20）溶液重悬磁珠，保存于4℃冰箱，待用。

### 实验例 1 CD34 免疫磁珠分选 CD34+细胞系

利用 CD34+的 KG-1a (人白血病细胞) 及 CD34-的 Raji (人 B 淋巴瘤细胞) 体外混合, 混合比例为 1:10, 模拟人脐带血单个核细胞 (或动员后外周血单个核细胞)。

配制 0.1M PBS 溶液: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O 3.488g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, 加 Milli-Q 水至 1000ml, 调节 pH 至 7.4, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

配制免疫磁珠分选 buffer: 0.1M PBS 溶液内含有 2mM EDTA 和 0.5%的 BSA。

按 90 $\mu$ l /10<sup>7</sup> 细胞的比例加分选 buffer 重悬上述混合细胞;

按 10 $\mu$ l /10<sup>7</sup> 细胞的比例加 CD34 免疫磁珠于上述细胞悬液中, 混匀, 4-8 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟;

按 1000 $\mu$ l/10<sup>7</sup> 细胞的比例加入分选 buffer 重悬细胞(细胞少于 10<sup>7</sup> 也用 1000 $\mu$ l); 将分离管放置于磁场中, 吸去上清;

重复上步两次;

用 500 $\mu$ l 分选 buffer 重悬细胞沉淀, 所得即为 CD34+的 KG-1a 细胞。

细胞利用 CD34-FITC (8G12, BD Bioscience, 340668, 与分选抗体没有竞争作用) 染色, 鉴定分选获得细胞的纯度大于 95%; 分选细胞计数, 分选 CD34+细胞的得率大于 90%; 结果见图 5。

### 实验例 2 CD34 免疫磁珠分选人脐带血造血干细胞

分选人脐带血中 CD34+造血干细胞。

配制 0.1M PBS 溶液: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.488g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, 加 Milli-Q 水至 1000ml, 调节 pH 至 7.4, 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

配制免疫磁珠分选 buffer: 0.1M PBS 溶液内含有 2mM EDTA 和 0.5%的 BSA。

利用 Ficoll 分离健康产妇脐带血中单个核细胞。

按 90 $\mu$ l /10<sup>7</sup> 细胞的比例加分选 buffer 重悬单个核细胞:

按 10 $\mu$ l /10<sup>7</sup> 细胞的比例加 CD34 免疫磁珠于上述细胞悬液中, 混匀, 4-8 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟;

按 1000 $\mu$ l/10<sup>7</sup> 细胞的比例加入分选 buffer 重悬细胞(细胞少于 10<sup>7</sup> 也用 1000 $\mu$ l); 将分离管放置于磁场中, 吸去上清;

重复上步两次;

用 500 $\mu$ l 分选 buffer 重悬细胞沉淀, 所得即为 CD34<sup>+</sup>的造血干细胞。

细胞利用 CD34-FITC (8G12, BD Bioscience, 340668, 与分选抗体没有竞争作用) 染色, 鉴定分选获得细胞的纯度大于 95%; 分选细胞计数, 分选 CD34<sup>+</sup>细胞的得率大于 90%; 结果见图 6。

利用我们制备的 CD34 免疫磁珠分选脐带血造血干细胞所得的纯度和得率已经达到临床应用的要求, 可望用于临床骨髓造血干细胞移植。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海中信国健药业有限公司

<120> 抗人 CD34 人源化抗体、其制备方法及其用途

<130> Andrews RG, Bryant EM, Bartelmez SH, Muirhead DT, Kritter GH, Bensinger W, Strong DM, Bernstein ID(1992) CD34+ marrow cells, devoid of T and B Lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated baboons. Blood 80:1693

<150> 200810043016.5

<151> 2008-01-08

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 990

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

gelagcacca agggcccac ggctctccccc ctggccacct cctccaagag caccctctggg      60
ggcaccgggg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc cegaaccggg gacgggtgctg      120
tggaaactcag ggcacctgac cagcggcgctg cacaccttcc cgctctgctc acagtcctca      180
ggactctact cctctcagcag cgtgggtgacc glgcccctca gcagcttggg caccacagacc      240
tacatctgca aagtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaaactgttg acaaaaactc cacatgccc ccgtgcccag cacctgaact cctggggggga      360
cctgtagctt tctctctccc cccaaaaacc agggacccc tcatgatctc cgggacccc      420
gaggteacat gctgggtggg ggacgtgagc cagcaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gctgtggagg gcataatgcc aagacaagc cgggggaaga gcagtcaaac      540
agcaccgacc gctgtggctcag cgtctctcacc gctctgcaac aggaactggt gaatggcaag      600
gaglacaaat gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtglacaccc tgcctccate cggggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggctcaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gctgtggagt gggagagcaa lgggcagccc gagaacaact acaagaccac gctctccgtg      840
ctggactcag aagctctctt ctctctctac agcaagctca cctgtgacaa gacagsgtgg      900
cagcagggga aagctctctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      960
cagaagagcc tctccctgct tccggtaaa
    
```

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                20                25                30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                35                40                45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    
```

50		55		60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr				
65		70		75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys				80
		85		90
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys				95
		100		105
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro				110
		115		120
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys				125
		130		135
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp				140
		145		150
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu				155
		165		170
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu				175
		180		185
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Gln Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn				190
		195		200
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly				205
		210		215
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu				220
		225		230
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr				235
		245		250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn				255
		260		265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe				270
		275		280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn				285
		295		300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr				305
		310		315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				320
		325		330

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 3

actgtggctg caaccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga	60
actgectctg ttgigtgect gotgaataac tctatccca gagaggccaa agtaeagtgg	120
aaggtagata aegeccleca ategggtaac tcccaggaga ggttcacaga gcaggacagc	180
aaggacagca cctacagect cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa	240
cacaaagctc acgectgoga agtcacccat cagggeciga gctcgcctgt cacaaagagc	300
ttcaacaggg gagagtgt	318

<210> 4  
 <211> 106  
 <212> PRI  
 <213> 人工序列  
 <400> 4  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 5  
 <211> 1356  
 <212> DNA  
 <213> 人源化抗体 h4C8 重链核苷酸序列  
 <400> 5  
 eagatccaac tegtccagtc eggetcagag ctaaagaaac cgggagccag tgtaaagglt 60  
 agctgcaaaag caletgggia cacctttaca aactatggta tgaaltgggt tgcceaagcg 120  
 ccaggccagg gactgaagt gatgggggtg ataaacacga aiactgggtga accgaaatac 180  
 gctgaggagt lcaagggecg attogcetta tccittggaca cctcagtctc gacagcalat 240  
 ctccaataa acagictcaa agcggaggat acggctglal acttttgtgc cgggggalat 300  
 gggaaattac caagaggtgc gtggeteget tattggggcc agggaaactct ggtgaccglt 360  
 tcttctgela gcaccaaggg cccatcggtc tccccclgg caccctctc caagagcacc 420  
 tetgggggca cagcggccc gggclgctc gtcaggact acttcccga accggltgac 480  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cclgaccagc ggegtgcaca ccttcccggc tgtctacag 540  
 tctcaggac tctactcct cagcagcgtg glgaccgtgc cctccagcag cltgggcacc 600  
 cagacelaca tetgeaacgt gaateacaag cccagcaaca ccaaggltga caagaaagtt 660  
 gagcccaaal ctgtlgacaa aactcacaca tgcaccctgt gccagcacc tgaactctg 720  
 gggggaccgt caglettcct ctcccccca aaacccaagg acacctcat gatctccgg 780  
 accctgagg leacatgcti ggtgggtggc gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 840  
 aactgglacg tggacggcgt ggaggtgcat aalgcacaaga caaagecgcg ggaagagcag 900  
 tacaacagca cgtaccgigt ggtcagcgtc clcaccgicc tgcaccaggc clggctgaat 960  
 ggcaaggagl acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccal cgagaaaacc 1020  
 atctccaag ccaagggca gccccagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatccgg 1080  
 galgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acclccctgg tcaaaagctt ciateccagc 1140  
 gacatgcgc tggagltgga gagcaatggg cagccggaga acaactaca gaccacgct 1200  
 cccgtgctgg actccgacgg ctctcttelle clctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260  
 aggtggcagc aggggaacct ctctctalgc lccgtgatgc atgagctct gcacaaccac 1320

tacaagcaga agagccctc cctgtctccc ggtaaa

1356

<210> 6

<211> 452

<212> PRT

<213> 人源化抗体 h4C8 重链氨基酸序列

<400> 6

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
                   35                   40                   45  
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Lys Tyr Ala Glu Glu Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Leu Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gln Ile Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Ala Arg Gly Ala Trp Leu Ala Tyr Trp  
                  100                   105                   110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
                  115                   120                   125  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
                  130                   135                   140  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 145                   150                   155                   160  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
                  165                   170                   175  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
                  180                   185                   190  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
                  195                   200                   205  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
                  210                   215                   220  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 225                   230                   235                   240  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
                  245                   250                   255  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
                  260                   265                   270  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
                  275                   280                   285  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
                  290                   295                   300  
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 305                   310                   315                   320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 340 345 350  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 355 360 365  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 370 375 380  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 405 410 415  
  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 420 425 430  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
 Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 7

<211> 657

<212> DNA

<213> 人源化抗体 hu4C8 轻链核苷酸序列

<400> 7

```

gacgtcttgc ttaccacagtc cccccctctca ctaccagtaa cactgggcca accggcctcg      60
atcagtlgcc gcagctctca gacgctagtg cactccaacg gaaataetta cttagagtlgg      120
ttccaacagc gacctgggca atcaccgcgg ttgcttattt atcaggcttc gaacagattt      180
agtggtgtcc ctgataggtt cagcggctct ggcctcggga cggactttac acccaagatc      240
tcacgtgtag aagcagagga tgtgggtgtt taclattgtt tccaaggctc gcattgtccc      300
cgcacgtttg gaggggglac taaagtagaa ataaagegaa ctgtggctgc accatctgtc      360
ttcatcttcc cgcctctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctctctg tgtgtgcoctg      420
ctgaataaai tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgcctctccaa      480
tcgggtaaac cccaggagag tctcaccagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540
agcagcacc ctagcctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctcgcaa      600
gtaccctatc agggcctgag ctgcctcctc acaaagagct tcaacagggg agagtgt      657
    
```

<210> 8

<211> 219

<212> PRT

<213> 人源化抗体 hu4C8 轻链氨基酸序列

<400> 8

Asp Val Leu Leu 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 Thr Ile Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Glu Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gln 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 Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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

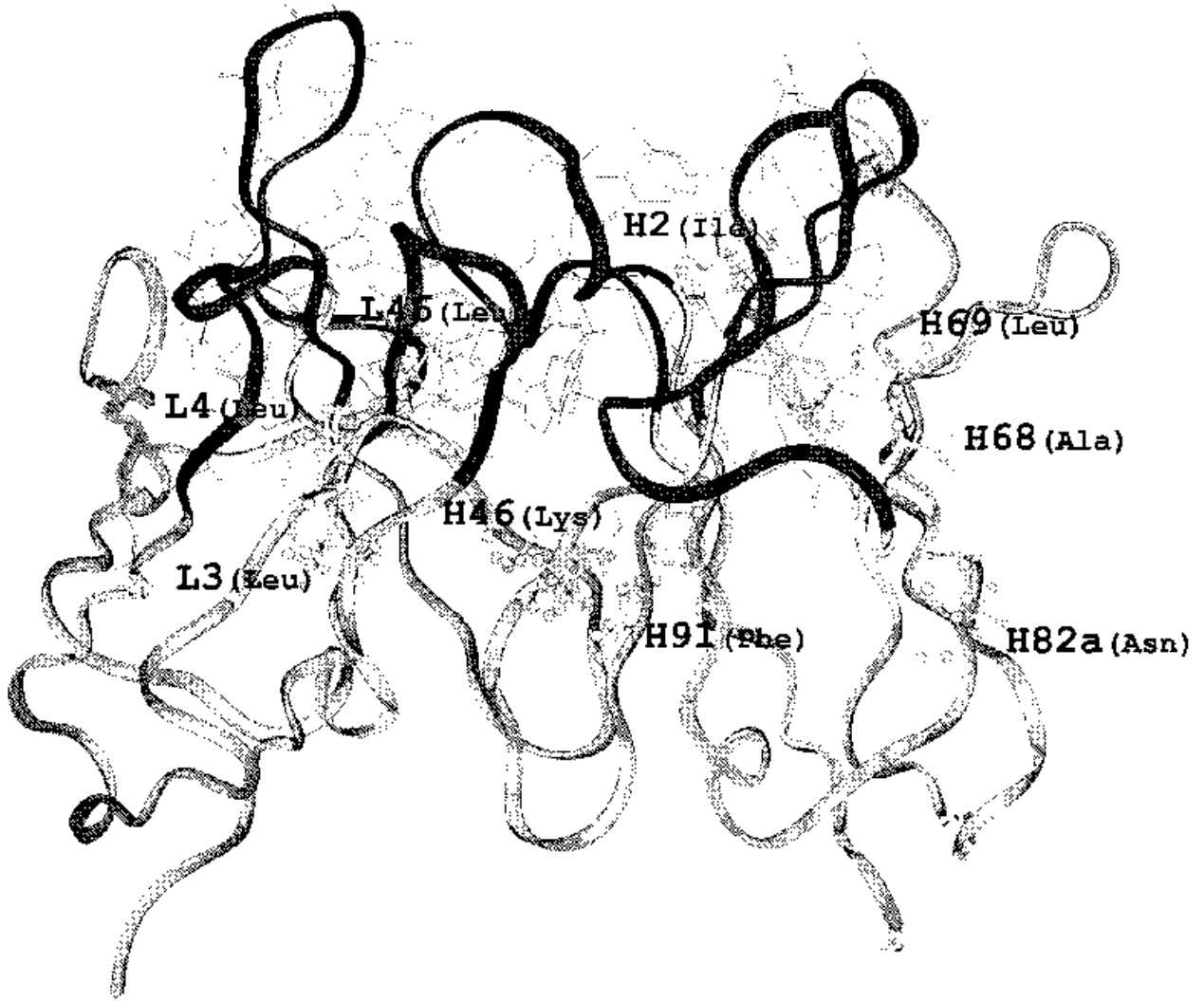


图 1

```

4C8VH      1 10 20 30 40 50
QIQLVQSGPELKKPGETVN[10SCKAS[20GYTFTNYGMN]30WVKQAPGKGLKWMG40[50W
AAC18206   QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS[GYTFTSYAMN]WVRQAUGQGGLWWMG[W
h4C8VHa    -----[-----N-G-----]-----[
h4C8VHb    -T-----[-----N-G-----]-----K-----]

4C8VH      60 70 80 90
ENTNTCEPKYAEEFKG]RFA60LSLETSAS70DAY80QLN85NLEK90NEDTATYFCAR[GY
AAC18206   TNTNTGNPTYAQQFTG]RPFV60LSLETSVSTAYLQISS70LKAEDTAVYYCAR[DV
h4C8VHa    -----E-K--EE-K-]-----[GY
h4C8VHb    ---E-K--EE-K-]---AL-----N-----F---[GY

4C8VH      100 110
GNYARGAWLAY]WGQGTIVTVSA
AAC18206   ATIDEN-WFDP]WGQGTIVTVSS
h4C8VHa    GNYARGA-LAY]-----
h4C8VHb    GNYARGA-LAY]-----

```

图2-1

```

4C8VL      1 10 20 30 40 50
DVLLTQTFLLSI10PVSLCDQAS20ISC[30RSSQ35TLVHSDGNTYLE]40WFLQKPGQSP
BAC01734   DVVMFQSFLLSLPVTLGQPASISC[RSSQSLVHSDGNTYLN]WFQQRPQSP
h4C8VLa    -----[-----T-----N-----E]-----
h4C8VLb    --DL-----[-----T-----N-----E]-----

4C8VL      50 60 70 80
KLI50Y[55QVSNRES]60GVPDRFSGSGSG70FD75FTLKISRVEAED80DGVVYFC[FQGS85HV
BAC01734   RRLIY[55KVSNRDS]60GVPDRFSGSGSGID70FTLKISRVEAED80DGVVYFC[MQGT85RW
h4C8VLa    -----[Q-----F-----]-----[F--S-V
h4C8VLb    -L---[Q-----F-----]-----;F--S-V

4C8VL      100
PRT]FGGGTKLEIKR
BAC01734   ELT]FGGGTKVEIKR
h4C8VLa    -R]-----
h4C8VLb    -R]-----

```

图2-2

图 2

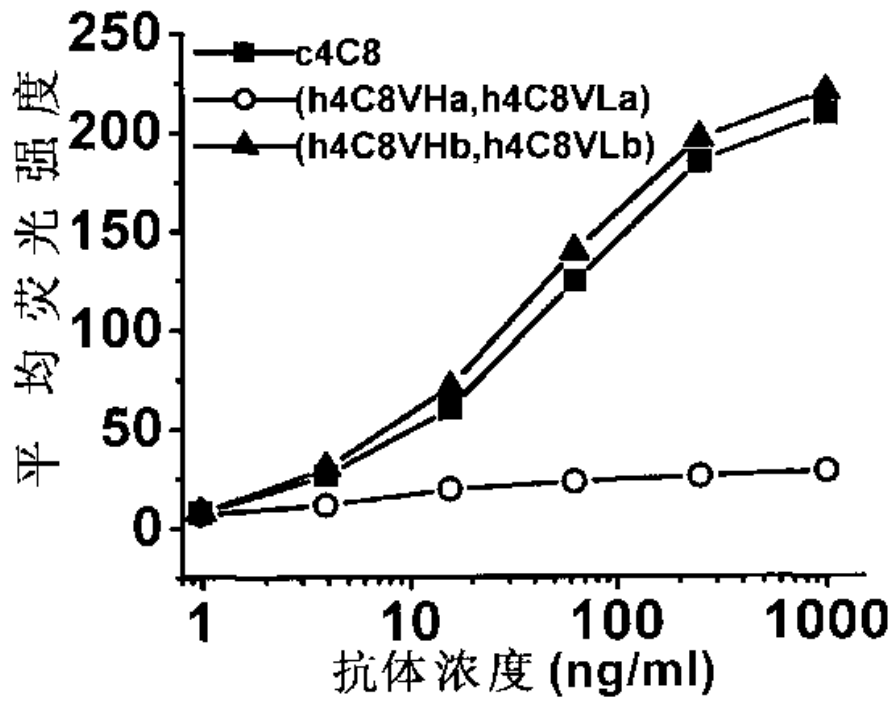


图 3

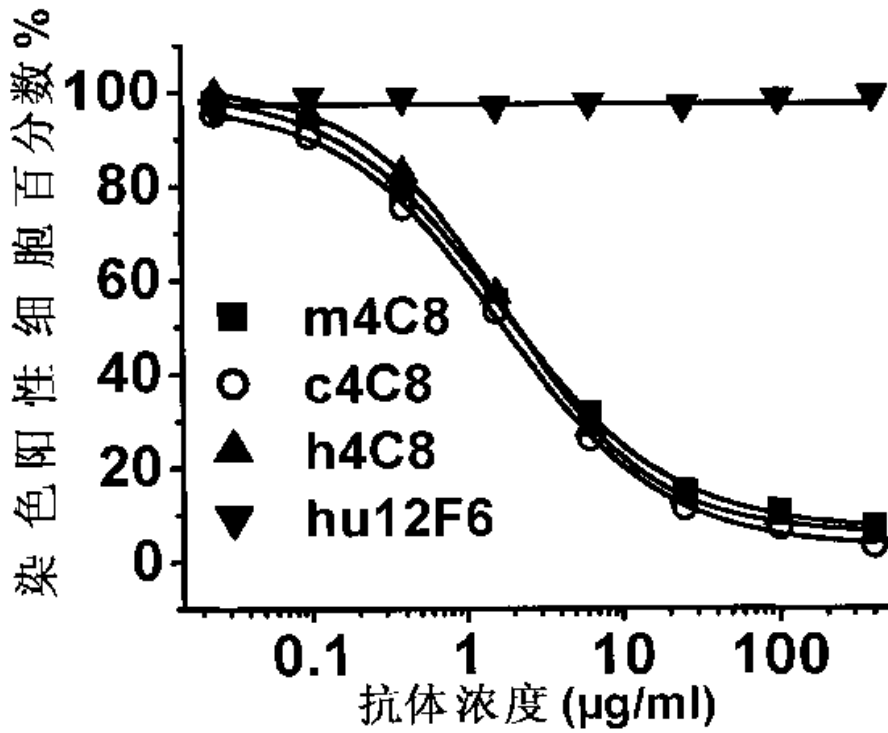


图 4

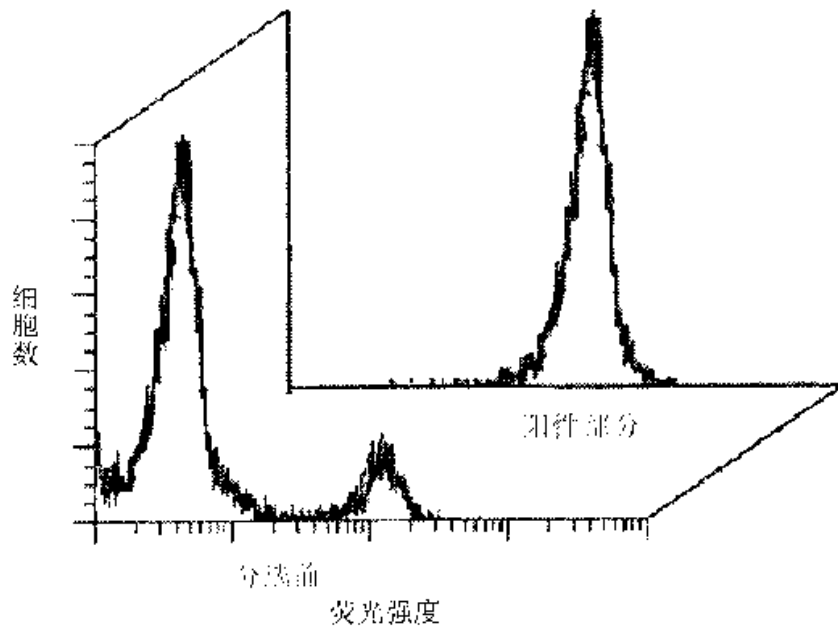


图 5

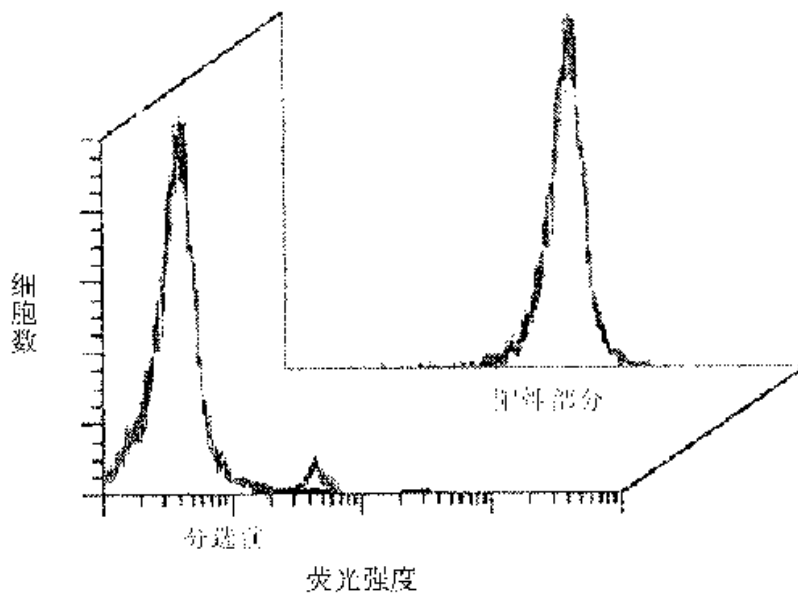


图 6

专利名称(译)	抗人CD34人源化抗体、其制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101481417A</a>	公开(公告)日	2009-07-15
申请号	CN200810090840.6	申请日	2008-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	上海国健生物技术研究院		
申请(专利权)人(译)	上海国健生物技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	上海国健生物技术研究院		
[标]发明人	郭亚军 钱卫珠 李博华 王皓 马菁		
发明人	郭亚军 钱卫珠 李博华 王皓 马菁		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C12N15/85 C12N5/10 C12N5/08 G01N33/53		
优先权	200810043016.5 2008-01-08 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域。具体地，本发明公开了抗人CD34人源化抗体h4C8、其制备方法及其在分选骨髓干/祖细胞中的用途。h4C8抗体能很好地与高表达CD34的人髓性白血病细胞特异性结合，可以将它与磁性纳米材料偶联，制备免疫磁珠，来分选骨髓造血干细胞，能有效地减少HAMA的发生率，提高临床造血干细胞移植的安全性，用于某些恶性血液病及实体瘤的治疗。

抗体类型	IC <sub>50</sub> (μg/ml) <sup>a</sup>	SD	n
4C8	1.723	0.145	3