



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102333791 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201080009550. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 10

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

61/251, 072 2009. 10. 13 US

C12N 1/15 (2006. 01)

61/158, 885 2009. 03. 10 US

C12N 1/19 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 1/21 (2006. 01)

2011. 08. 29

C12N 5/10 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12N 15/09 (2006. 01)

PCT/JP2010/054483 2010. 03. 10

C12P 21/08 (2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

G01N 33/563 (2006. 01)

W02010/104208 EN 2010. 09. 16

G01N 33/577 (2006. 01)

审查员 段珊

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10830 2007. 05. 29

(73) 专利权人 株式会社遗传科技

地址 日本北海道

专利权人 科研制药株式会社

(72) 发明人 S. 库马 曹仲欣 鹤下直也

原田达弘

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

权利要求书1页 说明书29页

序列表24页 附图12页

(54) 发明名称

人源化 K33N 单克隆抗体的生成、表达和表征

(57) 摘要

本发明提供了免疫特异性识别人 9 整联蛋白的人源化抗体。这些抗体中的一些抑制 9 整联蛋白的生物学功能, 由此对与 9 整联蛋白有关的各种病症或疾病 (包括癌症, 例如癌细胞的生长和转移, 和炎症性疾病, 例如类风湿性关节炎、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维化、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化、肉芽肿、炎性肠病 (溃疡性结肠炎和克罗恩氏病)、自身免疫性疾病、等等) 展现出治疗效果。

1. 一种免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含 H 链和 L 链,该 H 链包含氨基酸序列 SEQ ID NO:60 所示 VH 区,且该 L 链包含氨基酸序列 SEQ ID NO:61 所示 VL 区,其中所述抗体的抗原结合片段含有 VL 和 VH。

2. 权利要求 1 的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段选自下组:单链抗体, Fab 片段, $F(ab')_2$ 片段和二硫化物连接的 Fv。

3. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1 或 2 的人源化抗体或抗原结合片段。

4. 权利要求 3 的核酸分子,其中 VH 区由核苷酸序列 SEQ ID NO:62 编码且 VL 区由核苷酸序列 SEQ ID NO:63 编码。

5. 权利要求 3 的核酸分子,其在编码 VH 区的核苷酸序列前面进一步包含编码信号肽的核苷酸序列。

6. 权利要求 5 的核酸分子,其中所述信号肽由氨基酸序列 SEQ ID NO:58 组成。

7. 权利要求 3 的核酸分子,其在编码 VL 区的核苷酸序列前面进一步包含编码信号肽的核苷酸序列。

8. 权利要求 7 的核酸分子,其中所述信号肽由氨基酸序列 SEQ ID NO:59 组成。

9. 一种载体,其包含权利要求 3-8 任一项的核酸分子,其中所述核酸分子与一种或多种调节元件可操作连接。

10. 一种分离的宿主细胞,其包含权利要求 9 的载体。

11. 一种用于制备人源化抗体或其抗原结合片段的方法,包括在使得该人源化抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养权利要求 10 的宿主细胞,并收集所表达的人源化抗体或其抗原结合片段。

12. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段和药学可接受载体。

13. 权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途,该药物用于一种用于治疗与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的病症或疾病的方法,所述方法包括对有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段。

14. 权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段在制备诊断剂中的用途,该诊断剂用于一种用于体内诊断与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的病症或疾病的方法,所述方法包括对要检查的受试者施用有效量的权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段。

15. 权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途,该药物用于一种用于预防与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的病症或疾病的方法,所述方法包括对有此需要的受试者施用有效量的权利要求 1 或 2 的人源化抗体或其抗原结合片段。

人源化 K33N 单克隆抗体的生成、表达和表征

1. 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体及其对与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白的各种疾病或病症（包括癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病、由 $\alpha 9$ 整联蛋白诱发的疾病状况、等等）的治疗和诊断用途。

2. 背景技术

[0002] 由一组称作整联蛋白的细胞表面受体介导，细胞粘附于胞外基质（下文缩写为 ECM）。整联蛋白通过形成 α 和 β 链的 1 : 1 异二聚体来执行其功能。迄今为止，已经鉴定并确认至少 18 类 α 链、8 类 β 链和 24 类 $\alpha \beta$ 异二聚体。已知每种整联蛋白识别一种特定的配体。整联蛋白根据其配体特异性或功能而分类入亚家族中，并分成胶原受体、层粘连蛋白受体、识别存在于纤连蛋白、玻连蛋白、等中的 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列的 RGD 受体、和仅存在于白细胞中的白细胞特异性受体 (Hynes, R. O., 2002, Integrins :Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell 110 :673-87 ;Miyasaka, M., 2000, New edition of Adhesion Molecule Handbook, Shujunsha)。 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白是不属于任何这些类型并称作 $\alpha 4$ 整联蛋白亚家族的亚家族的成员 (Elise L. Palmer, Curzio Rfiegg, Ronald Ferrando, Robert Pytela, Sheppard D., 1993, Sequence and Tissue Distribution of the Integrin $\alpha 9$ Subunit, a Novel Partner of $\beta 1$ That Is Widely Distributed in Epithelia and Muscle. The Journal of Cell Biology, 123 :1289-97)。同时，迄今为止，过去认为 ECM 仅充当细胞间的粘合物质。现在已经变得清楚的是，整联蛋白介导的 ECM- 细胞相互作用显著牵涉调节细胞的生长、粘附、运动、等，而且与疾病的发作（包括癌症的进展、炎症的恶化、等）有关。

[0003] 例如，作为 ECM 之一的骨桥蛋白（下文缩写为 OPN）是一种具有约 41kDa 分子量的分泌性、酸性磷酸化糖蛋白，而且是一种在母乳、尿液、肾小管、破骨细胞、成骨细胞、巨噬细胞、激活的 T 细胞、肿瘤组织、等等中广泛观察到其表达的分子。OPN 具有粘附序列，即在其分子中央的 GRGDS (SEQ ID NO :1)、在人 OPN 中的 SVVYGLR (SEQ ID NO :2) 序列或小鼠 OPN 中的 SLAYGLR (SEQ ID NO :3) 序列，和与其极其接近的凝血酶切割位点，并经由 GRGDS (SEQ ID NO :1) 序列结合 RGD 整联蛋白或经由 SVVYGLR (SEQ ID NO :2) 序列或 SLAYGLR (SEQ ID NO :3) 序列结合 $\alpha 4(\alpha 4 \beta 1)$ 和 $\alpha 9(\alpha 9 \beta 1)$ 整联蛋白。

[0004] WO 02/081522 披露了使用 OPN 敲除小鼠或针对 OPN 的中和性抗体通过抑制 OPN 功能实现的类风湿性关节炎或肝炎的治疗效果。此外，此公开文本披露了 SVVYGLR (SEQ ID NO :2) 序列由于识别 $\alpha 9$ 和 $\alpha 4$ 整联蛋白而对于炎症疾病的发病机制是至关重要的，并且 OPN 的受体在免疫活性细胞等等中表达且与炎症疾病有关。

[0005] 已经找到了结合谱的差异，其在于 $\alpha 4 \beta 1$ 既结合未经凝血酶切割的 OPN（未切割的 OPN）又结合经凝血酶切割的 OPN（经切割的 OPN）的 N 端片段，而 $\alpha 9 \beta 1$ 仅结合经切割的 OPN (Y. Yokosaki 等, (1999) The Journal of Biological Chemistry, 274 :36328-36334 ; P. M. Green 等, (2001) FEBS Letters, 503 :75-79 ; S. T. Barry 等, (2000) Experimental Cell

Research, 258 :342-351)。

[0006] 除了 OPN 以外, $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白共享许多共同配体。已知的配体有纤连蛋白的 EDA 域、前肽 -von Willebrand 因子 (pp-vWF)、组织转谷氨酰胺酶 (tTG)、血液凝固因子 XIII、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1) 等。另外, 已知纤连蛋白的 CS-1 域、MadCAM-1 ($\alpha 4 \beta 7$)、等为受到 $\alpha 4$ 整联蛋白特异性识别的配体。已知生腱蛋白 -C、纤溶酶、等为受到 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性识别的配体。

[0007] 整联蛋白亚基 $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ 和 $\beta 1$ 的氨基酸序列是众所周知的。例如, 在 GenBank, 人 $\alpha 9$ 登记为 NM_002207, 小鼠 $\alpha 9$ 为 NM_133721, 人 $\alpha 4$ 为 NM_000885, 小鼠 $\alpha 4$ 为 NM_010576, 人 $\beta 1$ 为 X07979, 而小鼠 $\beta 1$ 为 NM_010578。还已知这些整联蛋白在氨基酸序列方面在物种间具有高度相似性。

[0008] 3. 发明概述

[0009] 虽然目前已知许多用于治疗癌症、炎性疾病和自身免疫性疾病的药物, 但是期望开发出对癌症、炎性疾病和自身免疫性疾病具有更为改善的治疗效果的预防和 / 或治疗剂等。本发明部分基于本发明人的发现, 即针对 $\alpha 9$ 整联蛋白的特异性抑制性抗体具有抑癌和消炎效果。

[0010] 先前, 本发明人分离出免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白并由杂交瘤克隆 K33N (保藏登录号 FERM BP-10830) 生成的小鼠单克隆抗体。在本文中, 该杂交瘤克隆名称与由该克隆生成的单克隆抗体的名称可互换使用。小鼠抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体是 IgG1 同种型的。该单克隆抗体抑制人和 / 或小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白与 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体, 诸如骨桥蛋白之间的结合。如此, 该抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白的功能, 而且对癌症, 例如癌细胞的生长或转移, 和对炎性疾病, 例如类风湿性关节炎、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维化、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化、肉芽肿、炎性肠病 (溃疡性结肠炎和克罗恩 (Crohn) 氏病)、自身免疫性疾病、由 $\alpha 9$ 整联蛋白诱发的疾病状况、等等展现出治疗效果。

[0011] 此外, 本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可以作为体内诊断剂用于检测受试者中的 $\alpha 9$ 整联蛋白表达的存在和水平, 由此诊断牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白的病症或疾病。

[0012] 然而, 因为该单克隆抗体是小鼠起源的, 其在人中的免疫原性所致的可能的不利影响已经阻碍了其直接应用于人的诊断或治疗用途。为了降低免疫原性, 本发明人已经制备了人源化抗体, 其具有与衍生所述人源化抗体的初始小鼠抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体展现的生物学活性对应的生物学活性。

[0013] 因而, 本发明提供了免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段, 所述抗体包含部分自非人起源衍生和部分自人起源衍生的抗原结合区。在一个具体的实施方案中, 本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含自非人来源 (供体), 诸如 K33N 单克隆抗体衍生的互补决定区 (CDR) 和自人来源 (接受体) 衍生的框架区 (FR)。在一个实施方案中, 所述人源化抗体或其抗原结合片段抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白与人 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体之间的结合。

[0014] 在一个具体的实施方案中, 所述免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗体结合片段包含: (i) 重链 (H 链), 其包含至少一种自人 H 链的可变区 (V 区) 衍生的 H 链 FR (FRH) 和至少一种自免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的非人抗体 K33N 的至少一种 CDRH 衍生的 H 链互补决定区 (CDRH); 或 (ii) 轻链 (L 链), 其包含至少一种自人 L 链的 V

区衍生的 L 链 FR(FRL) 和至少一种自免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的非人抗体 K33N 的至少一种 CDRL 衍生的 L 链互补决定区 (CDRL);或上文的 (i) 和 (ii) 两者。例如,所述非人抗体 (其衍生本发明的人源化抗体的至少一种 CDRH 和 / 或至少一种 CDRL) 是由登录号 FERMBP-10830 的杂交瘤生成的单克隆抗体。

[0015] 在一个优选的具体实施方案中,本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含:(i) 至少一种自人 FRH 衍生的 FRH 和至少一种包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:4、5 和 6 的氨基酸序列的 CDRH;或(ii) 至少一种自人 FRL 衍生的 FRL 和至少一种包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:11、12 和 13 的氨基酸序列的 CDRL;或(iii) 上文的 (i) 和 (ii) 两者。本发明的所述人源化抗体或其抗原结合片段可以包含 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3,它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4、5 和 6。在备选,本发明的所述人源化抗体或其抗原结合片段包含 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11、12 和 13。在一个优选的实施方案中,本发明的所述人源化抗体或其抗原结合片段包含 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3,它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4、5、6、11、12 和 13。在另一个备选,本发明的所述人源化抗体或其抗原结合片段包含自由 GenBank 登录号 DA980102 (SEQ ID NO:18) 编码的人 H 链的可变区衍生的 FRH,或自由 GenBank 登录号 X72441 (SEQ ID NO:23) 编码的人 κ -L 链的可变区衍生的 FRL。在一个优选的实施方案中,本发明的人源化抗体的 FRH 包含至少一种选自氨基酸序列 SEQ ID NO:19、20、21 和 22 (分别由 DA980102 的相应部分编码的 FRH1、FRH2、FRH3 和 FRH4) 的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中,本发明的人源化抗体的 FRL 包含至少一种选自氨基酸序列 SEQ ID NO:24、25、26 和 27 (分别由 X72441 的相应部分编码的 FRL1、FRL2、FRL3 和 FRL4) 的氨基酸序列。在一个更优选的实施方案中,本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含:(i) H 链可变区 (VH 区),其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29;或(ii) L 链可变区 (VL 区),其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:31;或(iii) 上文的 (i) 和 (ii) 两者。在一个最优选的实施方案中,本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包含:(i) γ -1H 链,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37;或(ii) κ L 链,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39;或(iii) 上文的 (i) 和 (ii) 两者。

[0016] 本发明进一步提供了一种分离的核酸分子,其包含编码免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的本发明人源化抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。具体地,本发明提供了一种分离的核酸分子,其包含编码包含至少一种选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的氨基酸序列的人源化 H 链,或包含至少一种选自 SEQ ID NO:11、12 和 13 的氨基酸序列的人源化 L 链,或所述人源化 H 链和所述人源化 L 链两者的核苷酸序列。在一个优选的具体实施方案中,此类分离的核酸分子包含核苷酸序列 SEQ ID NO:28 (其编码 VH 区) 或编码氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的核苷酸序列。在另一个优选的具体实施方案中,此类分离的核酸分子包含核苷酸 SEQ ID NO:30 (其编码 VL 区) 或编码氨基酸序列 SEQ ID NO:31 的核苷酸序列。在又一个优选的具体实施方案中,本发明的分离的核酸分子包含核苷酸序列 SEQ ID NO:28 和 30 两者。在一个优选的具体实施方案中,此类分离的核酸分子包含核苷酸序列 SEQ ID NO:36 (其编码 γ -1H 链) 或编码氨基酸序列 SEQ ID NO:37 的核苷酸序列。在另一个优选的具体实施方案中,此类分离的核酸分子包含核苷酸序列 SEQ ID NO:38 (其编码 κ L 链) 或编码氨基酸序列 SEQ ID NO:39 的核苷酸序列。在又一个优选的具体实施方案中,本发明的分离的核酸分子包含核苷酸序列 SEQ ID NO:36 和 38 两者。在又一个优选的具体实施方案中,本发明的

分离的核酸分子进一步包含编码供体起源（诸如分别为氨基酸序列 SEQ ID NO:10 和 17）或异源起源的信号肽的核苷酸序列。

[0017] 本发明进一步提供了一种载体，例如表达载体，其包含编码免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的本发明人源化抗体或其抗原结合片段的 H 链或 L 链或二者的核苷酸序列。在此类载体中，本发明的核苷酸序列可以与一种或多种调节元件可操作连接。本发明的核苷酸序列可以包括编码对于衍生 CDR 的非人供体抗体而言天然的信号肽或异源起源的信号肽的核苷酸序列。

[0018] 此外，本发明提供了一种宿主细胞，其包含本发明的核酸分子，包括包含本发明的核酸分子的载体。在一个实施方案中，本发明提供一种分离的宿主细胞，其包含编码本发明的人源化 H 链的第一核酸分子和编码本发明的人源化 L 链的第二核酸分子，所述第一和第二核酸分子各自以使得本发明的生物学功能性人源化抗体或其抗原结合片段表达的方式与调节元件可操作连接。

[0019] 因而，本发明进一步提供了一种用于制备本发明的人源化抗体的方法，包括在使得该人源化抗体表达的条件下培养本发明的宿主细胞；并收集所生成的人源化抗体。

[0020] 本发明进一步提供了包含至少一种本发明的人源化抗体的组合物。另外，本发明提供了一种用于预防或治疗与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的病症或疾病的药物组合物，其包含至少一种本发明的人源化抗体和药学可接受载体。任一种所述组合物可以进一步包含另一种活性化合物，其能附加地或协同地改善该病症或疾病。此类活性化合物包括（但不作为限制）消炎化合物、化学治疗化合物、等等，以及抗体或其抗原结合片段，诸如能免疫特异性结合人 $\alpha 4$ 整联蛋白的抗体。

[0021] 在另一方面，本发明提供了一种用于预防或治疗与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白的病症或疾病的方法，所述方法包括对此需要的受试者施用预防或治疗有效量的至少一种本发明的人源化抗体。对于此类用途，本发明的人源化抗体可以与增强该人源化抗体的生物学效果的治疗模块缀合。此类治疗模块的例子包括另一种抗体，诸如抗 $\alpha 4$ 抗体（例如以形成双特异性抗体）、抑制细胞性或杀细胞性细胞毒素、放射性元素、和/或其它治疗剂，包括消炎剂、抗生素、等等。

[0022] 在又一发面，本发明提供了一种用于在受试者中诊断与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白的病症或疾病的方法，所述方法包括对要检查的受试者施用诊断有效量的本发明的人源化抗体。对于此类诊断用途，可以用可检测标志物，诸如放射性元素标记本发明的人源化抗体。

[0023] 3.1 定义

[0024] 如本文中所使用的，术语“抗体”指能够免疫特异性结合期望的抗原，诸如 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体分子，而且涵盖完整的抗体分子或其片段，包括抗原结合片段。

[0025] 本文中所使用的术语“免疫特异性识别”指抗体或其抗原结合片段特异性结合靶多肽或蛋白质，特别是人 $\alpha 9$ 整联蛋白的能力。此类抗体并不非特异性结合其它多肽或蛋白质。然而，免疫特异性结合靶多肽或蛋白质（例如人 $\alpha 9$ 整联蛋白）的抗体或其抗原结合片段可以与其它抗原起交叉反应。例如，免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的本发明的人源化抗体或抗原结合片段可以与例如其它物种的 $\alpha 9$ 整联蛋白起交叉反应。优选地，免疫特异性结合人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体或其抗原结合片段不与其它抗原起交叉反应。

[0026] 本文中所使用的术语“抗原结合片段”指保留免疫特异性结合靶多肽或蛋白质,特别是人 $\alpha 9$ 整联蛋白和 / 或非人 $\alpha 9$ 整联蛋白的能力的任何抗体片段,而且包括单链抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、二硫化物连接的 Fv、和含有特异性结合靶多肽或蛋白质的轻链可变区 (VL) 和 / 或重链可变区 (VH) 或甚至互补决定区 (CDR) 的片段。如此,人源化抗体的此类抗原结合片段可以包含或不包含部分或全长人恒定区。用于获得上文所描述的抗体片段的各种方法是本领域中公知的。

[0027] 本文中所使用的术语“自人来源衍生的”或“自非人来源衍生的”指自人抗体或非人抗体的相应部分衍生其氨基酸序列的抗体部分。

[0028] 本文中所使用的术语“接受体序列”指充当来自供体抗体 (其通常是非人抗体) 的 CDR 的接受体的,来自人抗体 VH 或 VL 区的框架区的核苷酸序列或氨基酸序列。

[0029] 4. 附图简述

[0030] 图 1 显示了实验结果,其中用人 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞 (人黑素瘤细胞 G361) 和 OPN $\alpha 9$ 整联蛋白结合位点肽 (SVVYGLR) 测量抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (即本发明的两种克隆 (即 K33N 和 M35A)、五种其它克隆 (1K11、21C5、24I11、25B6、和 28S1)、和 Y9A2) 的细胞粘附抑制活性。使用针对人骨桥蛋白的单克隆抗体 (5A1) 作为阴性对照。

[0031] 图 2 显示了实验结果,其中用人 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞 (人黑素瘤细胞 G361) 和生腱蛋白 C 片段的 $\alpha 9$ 整联蛋白结合位点肽测量抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (即本发明的两种克隆 (即 K33N 和 M35A)、五种其它克隆 (1K11、21C5、24I11、25B6、和 28S1)、和 Y9A2) 的细胞粘附抑制活性。使用针对人骨桥蛋白的单克隆抗体 (5A1) 作为阴性对照。

[0032] 图 3 显示了小鼠 K33N VH cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :7) 及推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :8)。氨基酸残基以单字母代码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO :10) 为斜体。成熟 VH 的 N 端氨基酸残基 (Q) 加双下划线。依照 Kabat 等 (Sequences of Proteins of Immunological Interests, 第五版, NIH 出版 No. 91-3242, U. S. Department of Health and Human Services, 1991) 定义的 CDR 序列加下划线。

[0033] 图 4 显示了小鼠 K33N VL cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :14) 及推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :15)。氨基酸残基以单字母代码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO :17) 为斜体。成熟 VL 的 N 端氨基酸残基 (D) 加双下划线。依照 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列加下划线。

[0034] 图 5 显示了侧翼有 SpeI 和 HindIII 位点 (加下划线) 的设计 K33N VH (ChK33N VH) 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :32) 及推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :8)。氨基酸残基以单字母代码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO :10) 为斜体。成熟 VH 的 N 端氨基酸残基 (Q) 加双下划线。依照 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列加下划线。内含子序列为斜体。

[0035] 图 6 显示了侧翼有 NheI 和 EcoRI 位点 (加下划线) 的设计 K33N VL (ChK33N VL) 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :33) 及推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :15)。氨基酸残基以单字母代码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO :17) 为斜体。成熟 VL 的 N 端氨基酸残基 (D) 加双下划线。依照 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列加下划线。内含子序列为斜体。

[0036] 图 7 显示了 pChK33N 和 pHuK33N (集体为表达载体) 的示意结构。从顶部的 SalI 位点顺时针方向前进,该质粒含有重链转录单元,其始自人巨细胞病毒 (CMV) 主要立即早期启动子和增强子 (CMV 启动子) 以启动抗体重链基因的转录。CMV 启动子后面有 VH 外显

子、含有人 γ -1 重链恒定区（包括 CH1、铰链、CH2 和 CH3 外显子及居间内含子）的基因组序列、和 CH3 后面供 mRNA 加工用的 γ -1 基因多聚腺苷酸化位点。重链基因序列后面，轻链转录单元始自 CMV 启动子，后面有 VL 外显子和含有人 κ 链恒定区外显子 (CL) 及其前面的内含子一部分的基因组序列、和 κ 基因的 polyA 信号。然后，轻链基因后面有 SV40 早期启动子 (SV40 启动子)、大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因 (gpt)、和含有 SV40 多聚腺苷酸化位点的区段 (SV40 poly(A) 位点)。最后，该质粒含有质粒 pUC19 一部分，其包含细菌复制起点 (pUC ori) 和 β -内酰胺酶基因 (β -内酰胺酶)。

[0037] 图 8 显示了 K33N VH (SEQ ID NO :9)、人源化 K33N (HuK33N) VH (SEQ ID NO :29) 和自由 GenBank 登录号 DA980102 的核苷酸序列编码的氨基酸序列衍生的人接受体序列的 FRH1 (SEQ ID NO :19)、FRH2 (SEQ ID NO :20)、FRH3 (SEQ ID NO :21) 和 FRH4 (SEQ ID NO :22) 的氨基酸序列的比对。氨基酸残基以单字母代码显示。序列上方的数字标示依照 Kabat 等 (1991) 的位置。由 Kabat 等 (1991) 限定的 CDR 序列加下划线。加双下划线的残基预测为与 CDR 接触，而且小鼠残基在人源化形式中的这些位置处得到保留。将 DA980102 中的第 82 位处的 Met (加下划线) (其在人 VH 序列中的此位置处是非典型的) 用典型的残基 Leu 替换以降低潜在的免疫原性。图中省略 DA980102 中的 CDR 残基。

[0038] 图 9 显示了 K33N VL (SEQ ID NO :16)、人源化 K33N (HuK33N) VL (SEQ ID NO :31) 和自由 GenBank 登录号 X72441 的核苷酸序列编码的氨基酸序列衍生的人接受体序列的 FRL1 (SEQ ID NO :24)、FRL2 (SEQ ID NO :25)、FRL3 (SEQ ID NO :26) 和 FRL4 (SEQ ID NO :27) 的氨基酸序列的比对。氨基酸残基以单字母代码显示。序列上方的数字标示依照 Kabat 等 (1991) 的位置。由 Kabat 等 (1991) 限定的 CDR 序列加下划线。加双下划线的残基预测为与 CDR 接触，而且小鼠残基在人源化形式中的这些位置处得到保留。图中省略 X72441 中的 CDR 残基。

[0039] 图 10 显示了用于构建 HuK33N VH 基因的寡核苷酸。

[0040] 图 11 显示了用于构建 HuK33N VL 基因的寡核苷酸。

[0041] 图 12 显示了用于构建 HuK33N VH 基因的寡核苷酸。箭表示每种寡核苷酸的位置和取向 (5' 至 3')。VH 区 (SEQ ID NO :29) 的氨基酸残基以单字母代码显示。

[0042] 图 13 显示了用于构建 HuK33N VL 基因的寡核苷酸。箭表示每种寡核苷酸的位置和取向 (5' 至 3')。VL 区 (SEQ ID NO :31) 的氨基酸残基以单字母代码显示。

[0043] 图 14 显示了侧翼有 SpeI 和 HindIII 位点 (加下划线) 的 HuK33N VH 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :34) 及信号肽 (SEQ ID NO :58 ;以斜体显示) 和 VH 区 (SEQ ID NO :29) 的推导的氨基酸序列。氨基酸残基以单字母代码显示。信号肽序列为斜体。成熟 VH 的 N 端氨基酸残基 (Q) 加双下划线。依照 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列加下划线。内含子序列为斜体。

[0044] 图 15 显示了侧翼有 NheI 和 EcoRI 位点 (加下划线) 的 HuK33N VL 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO :35) 及信号肽 (SEQ ID NO :59 ;以斜体显示) 和 VL 区 (SEQ ID NO :31) 的推导的氨基酸序列。氨基酸残基以单字母代码显示。信号肽序列为斜体。成熟 VL 的 N 端氨基酸残基 (D) 加双下划线。依照 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列加下划线。内含子序列为斜体。

[0045] 图 16 显示了嵌合的与人源化的 K33N 抗体对人 α 9 整联蛋白的亲合力的比较。通

过细胞 ELISA 检查 1 和 0.5 μ g/ml 嵌合的和人源化的 K33N 对 CHO/ α 9 细胞的结合。一式三份实施实验。图中显示了均值吸光度值及 SEM。

[0046] 图 17 显示了用于 HuK33N 重链和轻链 cDNA 的 PCR 扩增和测序的寡核苷酸的序列 (SEQ ID NO:44-50)。

[0047] 图 18 显示了 pHuK33N 中的 HuK33N γ -1 重链编码区的核苷酸序列 (SEQ ID NO:36) 及推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:37)。氨基酸残基以单字母代码显示。终止密码子以“•”表示。

[0048] 图 19 显示了 pHuK33N 中的 HuK33N κ 轻链编码区的核苷酸序列 (SEQ ID NO:38) 及推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:39)。氨基酸残基以单字母代码显示。终止密码子以“•”表示。

[0049] 图 20 显示了对纯化的抗体的 SDS-PAGE 分析的结果。依照 Sambrook 等 (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第 2 版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) 在还原条件下在存在 SDS 的情况中在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上运行 6 μ g 嵌合的和人源化的 IgG1/ κ 抗体 (分别为 ChK33N 和 HuK33N)。使用宽范围蛋白质标志物 (MW; New England Biolabs, Ipswich, MA) 作为大小标志物。右侧显示的数字表示按千道尔顿 (kDa) 计的标志物大小。

[0050] 图 21 显示了对小鼠 K33N 抗体对人 α 9 整联蛋白的结合的 FACS 分析的结果。在多个浓度 (以 1.67 μ g/ml 开始且连续 3 倍稀释) 对小鼠 K33N 抗体测试对 CHO/hu α 9 细胞的结合。在图中在测试的每个抗体浓度 (X 轴) 为几何平均通道荧光数值 (MCF; Y 轴) 绘图。使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) 来计算 EC_{50} 值。

[0051] 图 22 显示了对嵌合的和人源化的 K33N 抗体对人 α 9 整联蛋白的结合的 FACS 分析的结果。在多个浓度 (以 5 μ g/ml 开始且连续 3 倍稀释) 对每种抗体测试对 CHO/hu α 9 细胞的结合。在图中在测试的每个抗体浓度 (X 轴) 为几何平均通道荧光数值 (MCF; Y 轴) 绘图。使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) 来计算 EC_{50} 值。

[0052] 图 23 显示了针对人 α 9 整联蛋白的小鼠的、嵌合的和人源化的 K33N 抗体和小鼠抗人 α 9 整联蛋白抗体 Y9A2 的剂量响应细胞粘附抑制率。在 5、1、0.2、0.04、0.008 和 0.0016 μ g/mL 的浓度对每种抗体测试对人 α 9 整联蛋白表达细胞系 G-361 的细胞粘附。一式四份实施实验。图中显示了均值抑制率值。

[0053] 5. 发明详述

[0054] 5.1. 针对人 α 9 整联蛋白的抗体的制备

[0055] 可通过本领域中已知的任何合适的方法来生成免疫特异性识别人 α 9 整联蛋白或其任何表位的抗体。

[0056] 在本发明中作为抗原使用的 α 9 整联蛋白可以是 (1) 自表达 α 9 整联蛋白的所有来自人的细胞, 或其中存在这些细胞的所有组织衍生的蛋白质, (2) 重组蛋白, 其中将编码 α 9 整联蛋白的基因 DNA, 优选地 cDNA 转染入细菌、酵母、细胞系 (包括动物细胞)、等中, 并表达, 或 (3) 合成的蛋白质。

[0057] α 9 整联蛋白包括包含与人 α 9 整联蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO:55, 其中残基 1-29 是信号肽) 基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0058] 在本文中, 术语“包含基本上相同的氨基酸序列的多肽”指包含如下氨基酸序列的

变体多肽,其中多个氨基酸,优选地 1 至 10 个氨基酸且更优选地 1 至几个(例如 1 至 5 个)氨基酸被替代、删除和/或修饰,只要这些变体多肽与天然存在的人 $\alpha 9$ 整联蛋白具有基本上等同的生物学特性;和包含如下氨基酸序列的变体多肽,其中多个氨基酸,优选地 1 至 10 个氨基酸且更优选地 1 至几个(例如 1 至 5 个)氨基酸被添加至天然存在的人 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列。此外,变体多肽可以是那些具有这些氨基酸替代、删除、修饰和添加中多处的。

[0059] 在基因重组技术外,可以通过本领域中公知的方法,诸如化学合成法、细胞培养法、等,或其修改方案来生成在本发明中作为抗原的人 $\alpha 9$ 整联蛋白。

[0060] 用于生成变体多肽的方法的例子包括合成寡核苷酸定点诱变(缺口双链体法)、牵涉通过用亚硝酸盐或亚硫酸盐处理来随机引入点突变的点诱变法、牵涉用 Bal31 酶或其它酶制备缺失突变体的方法、盒式诱变、接头扫描法、误掺入法(miss incorporation method)、错配引物法、DNA 区段合成法、等等。

[0061] 要在本发明中作为抗原使用的人 $\alpha 9$ 整联蛋白还包括所述 $\alpha 9$ 整联蛋白一“部分”。如本文中所使用的,“部分”指包含结合 $\alpha 9$ 整联蛋白配体,例如 OPN、VCAM-1、生腱蛋白 C、等所需要的区域的部分;具体地,成熟人 $\alpha 9$ 整联蛋白(SEQ ID NO:55 的第 30-第 1035 氨基酸残基)中包含第 14-第 980 氨基酸残基的部分,和包含第 11-第 981 氨基酸残基的部分。所述 $\alpha 9$ 整联蛋白一“部分”可以依照下文所描述的本领域中已知的方法或其修改方案通过基因重组或化学合成来生成,或者可以通过用蛋白水解酶等等适当消化通过细胞培养法分离的人 $\alpha 9$ 整联蛋白来生成。

[0062] 在细胞膜上过表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞本身或其膜级分也可以作为抗原使用。可以通过本领域中公知的重组 DNA 技术来制备过表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞。

[0063] 使用如上文所描述的那样制备的合适的抗原,可以通过本领域中公知的多种方法来制备对人 $\alpha 9$ 整联蛋白或其任何表位特异性的抗体。针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的多克隆抗体可以通过本领域中公知的多种规程来生成。例如,可以对多种宿主动物(包括但不限于家兔、小鼠、大鼠、等)施用感兴趣的抗原,以诱导含有对抗原特异性的多克隆抗体的抗血清生成。根据宿主物种,可以使用各种佐剂来提高免疫学应答,并且包括但不限于弗(Freund)氏(完全和不完全)佐剂、矿物凝胶诸如氢氧化铝、表面活性物质诸如溶血卵磷脂、Pluronic 多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔螯血蓝蛋白、二硝基苯酚、和对人潜在有用的佐剂诸如 BCG(卡介苗)和小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)。此类佐剂也是本领域中公知的。

[0064] 可以使用本领域中已知的极其多种技术(包括使用杂交瘤、重组体、和噬菌体展示技术,或其组合)来制备单克隆抗体。例如,可以使用杂交瘤技术来生成单克隆抗体,所述杂交瘤技术包括那些在本领域中已知的和在例如 Harlow 等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988); Hammerling 等, 于: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 第 563 页-第 681 页 (Elsevier, N.Y., 1981)(通过提及而完整收录这两者)中教导的。如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”不限于经由杂交瘤技术生成的抗体。术语“单克隆抗体”指自单克隆,包括任何真核、原核、或噬菌体克隆衍生的抗体,而非生成其的方法。

[0065] 使用杂交瘤技术来生成和筛选特异性抗体的方法是本领域中公知的且常规的。

在一个非限制性例子中,可以用感兴趣的抗原或表达此类抗原的细胞来免疫小鼠。一旦检测出免疫应答,例如在小鼠血清中检测出对抗原特异性的抗体,收获小鼠脾,并分离脾细胞。然后,通过公知的技术将脾细胞与任何合适的骨髓瘤细胞(例如 P3U1、P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653 等)融合。选择杂交瘤,并通过有限稀释将其克隆。然后,通过本领域中已知的方法对杂交瘤克隆测定分泌能够结合抗原的抗体的细胞。可以通过给小鼠腹膜内接种阳性杂交瘤克隆来生成腹水,其一般含有高水平的抗体。

[0066] 可以通过已知的技术来生成识别特定表位的抗体片段。例如,可以通过使用诸如木瓜蛋白酶(以生成 Fab 片段)或胃蛋白酶(以生成 $F(ab')_2$ 片段)等酶来蛋白水解切割免疫球蛋白分子,从而生成 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。 $F(ab')_2$ 片段含有完整的轻链和重链的可变区、CH1 区和铰链区。

[0067] 本发明的抗体或其抗原结合片段也可以通过本领域中已知的用于合成抗体的任何方法,特别是通过化学合成或者优选地,通过重组表达技术来生成。

[0068] 编码抗体的核苷酸序列可以自本领域技术人员可得的任何信息(即自 Genbank、文献、或者通过常规的克隆和序列分析)获得。若不可获得含有编码特定抗体或其表位结合片段的核酸的克隆,但是抗体分子或其表位结合片段的序列是已知的,则编码免疫球蛋白的核酸可以化学合成或者使用与序列的 3' 和 5' 端可杂交的合成引物通过 PCR 扩增或者使用对特定基因序列特异性的寡核苷酸探针以鉴定例如来自 cDNA 文库的编码抗体的 cDNA 克隆通过克隆自合适的来源(例如抗体 cDNA 文库、或自表达抗体的任何组织或细胞诸如选择为表达抗体的杂交瘤细胞生成的 cDNA 文库、或自表达抗体的任何组织或细胞分离的核酸,优选地 polyA+RNA)获得。然后,可以使用本领域中公知的任何方法来将通过 PCR 生成的扩增核酸克隆入可复制克隆载体中。

[0069] 5.2. 重组抗体的制备

[0070] 一旦确定抗体的核苷酸序列,便可以使用本领域中公知的用于操作核苷酸序列的方法,例如重组 DNA 技术、定点诱变、PCR、等(参见例如 Sambrook 等,见上文;及 Ausubel 等编,1998,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley & Sons,NY 中所记载的技术,通过提及而将这两篇文献完整收入本文)来操作抗体的核苷酸序列,以通过例如将氨基酸替代、删除、和/或插入引入抗体的表位结合域区或抗体中可以提高或降低抗体的生物学活性的任何部分中来生成具有不同氨基酸序列的抗体。

[0071] 抗体的重组表达需要构建含有编码抗体的核苷酸序列的表达载体。一旦获得了编码抗体分子或抗体的重链或轻链或其部分的核苷酸序列,便可以使用本领域中公知的技术通过重组 DNA 技术来生成供生成抗体分子用的载体,如先前的小节中所讨论的。可以使用本领域技术人员公知的方法来构建含有抗体编码序列和合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组 DNA 技术、合成技术、和体内遗传重组。可以将编码抗体的重链可变区、轻链可变区、重链和轻链可变区两者、重链和/或轻链可变区的表位结合片段、或一个或多个互补决定区(CDR)的核苷酸序列克隆入此类载体中进行表达。可以将此类序列与编码对于初始抗体而言天然的信号肽或异源信号肽的多核苷酸融合。然后,可以将如此制备的表达载体导入合适的宿主细胞中以表达抗体。因而,本发明包括含有编码免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的宿主细胞。

[0072] 可以用本发明的两种表达载体（第一种载体编码重链衍生的多肽，而第二种载体编码轻链衍生的多肽）共转染宿主细胞。两种载体可以含有相同的选择标志（其使重链和轻链多肽能够相等表达）或不同的选择标志以确保维持这两种质粒。或者，可以使用单一载体，其编码并能够表达重链和轻链多肽两者。重链和轻链的编码序列可以包含 cDNA 或基因组 DNA。

[0073] 在另一个实施方案中，也可以使用本领域中已知的多种噬菌体展示法来生成抗体。在噬菌体展示法中，功能性抗体域在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒表面上展示。在一个特别的实施方案中，可以利用此类噬菌体来展示自全集或组合抗体文库（例如人的或鼠的）表达的抗原结合域，诸如 Fab 和 Fv 或二硫键稳定化的 Fv。可以用抗原，例如使用经标记的抗原或被固体表面或珠结合或捕获的抗原来选择或鉴定表达结合感兴趣抗原的抗原结合域的噬菌体。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体，包括 fd 和 M13。抗原结合域作为与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白的重组融合蛋白表达。可以用于生成本发明的免疫球蛋白或其片段的噬菌体展示法的例子包括那些披露于 Brinkman 等, J. Immunol. Methods, 182 :41-50, 1995 ;Ames 等, J. Immunol. Methods, 184 : 177-186, 1995 ;Kettleborough 等, Eur. J. Immunol. , 24 :952-958, 1994 ;Persic 等, Gene, 187 :9-18, 1997 ;Burton 等, Advances in Immunology, 57 :191-280, 1994 ;PCT 申请 No. PCT/GB91/01134 ;PCT 公开文本 WO 90/02809 ;WO 91/10737 ;WO 92/01047 ;WO 92/18619 ;WO 93/11236 ;WO95/15982 ;WO 95/20401 ;及美国专利 No. 5, 698, 426 ;5, 223, 409 ;5, 403, 484 ;5, 580, 717 ;5, 427, 908 ;5, 750, 753 ;5, 821, 047 ;5, 571, 698 ;5, 427, 908 ;5, 516, 637 ;5, 780, 225 ;5, 658, 727 ;5, 733, 743 和 5, 969, 108 的 ;通过提及而将每篇完整收入本文。

[0074] 如上述参考文献中所记载的，噬菌体选择后，可以分离来自噬菌体的抗体编码区，并使用其来生成完整抗体，包括人抗体，或任何其它期望的片段，并在任何期望的宿主（包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、和细菌）中表达，例如如下文更为详细地描述的。例如，也可以采用用于重组生成 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术，其使用本领域中已知的方法，诸如那些披露于 PCT 公开文本 WO 92/22324 ;Mullinax 等, BioTechniques, 12(6) :864-869, 1992 ;及 Sawai 等, AJRI, 34 :26-34, 1995 ;及 Better 等, Science, 240 : 1041-1043, 1988（通过提及而完整收录每篇）的方法进行。可以用于生成单链 Fv 和抗体的技术的例子包括那些记载于美国专利 No. 4, 946, 778 和 5, 258, 498 ;Huston 等, Methods in Enzymology, 203 :46-88, 1991 ;Shu 等, PNAS, 90 :7995-7999, 1993 ;及 Skerra 等, Science, 240 :1038-1040, 1988 的。

[0075] 一旦通过上文所描述的任何方法生成了本发明的抗体分子，然后便可以通过本领域中已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法，例如通过层析（例如离子交换、亲和、特别是在蛋白 A 或蛋白 G 纯化后通过对特定抗原的亲和、和筛分柱层析）、离心、差别溶解度、或者通过任何其它用于纯化蛋白质的标准技术来将其纯化。此外，可以将本发明的抗体或其片段与本文中所描述的或者在其它情况中在本领域中已知的异源多肽序列融合以便于纯化。

[0076] 对于一些用途（包括抗体在人中的体内用途和体外检测测定法），可以优选使用嵌合的、人源化的、或人的抗体。在下文 5.3 一节中详细讨论了嵌合抗体和人源化抗体。

[0077] 与其它化合物或异源多肽融合或缀合的抗体可以在体外免疫测定法中、在纯

化法（例如亲和层析）中、及在体内治疗或诊断用途中使用。参见例如 PCT 公开文本 No. WO 93/21232 ;EP 439,095 ;Naramura 等, Immunol. Lett., 39 :91-99, 1994 ; 美国专利 5,474,981 ;Gillies 等, PNAS, 89 :1428-1432, 1992 ; 及 Fell 等, J. Immunol., 146 :2446-2452, 1991, 通过提及而将它们完整收入本文。例如, 可以使用已知的方法或商品化试剂盒（例如生物素标记、FITC 标记、APC 标记）以多种方式来标记抗体。作为另一个例子, 可以将抗体与提高抗体的体内生物学效果的治疗模块缀合。此类治疗模块的例子包括另一种抗体、抑制细胞性或杀细胞性细胞毒素、放射性元素、和 / 或其它治疗剂, 包括消炎剂、抗生素、等等。在本发明中, 可以将人源化抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白与另一种抗体, 诸如抗 $\alpha 4$ 抗体缀合（例如以形成双特异性抗体）。作为另一个例子, 对于体内诊断用途, 可以用可检测标志物, 诸如放射性元素标记本发明的人源化抗体。

[0078] 5.3. 嵌合的和人源化的抗体

[0079] 嵌合抗体是一种自不同动物物种衍生抗体的不同部分的分子, 诸如具有自鼠单克隆抗体衍生的可变区和自人免疫球蛋白衍生的恒定区的抗体。用于生成嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见例如 Morrison, Science, 229 :1202, 1985 ;Oi 等, BioTechniques, 4 :214, 1986 ;Gillies 等, J. Immunol. Methods, 125 :191-202, 1989 ;美国专利 No. 5,807,715 ;4,816,567 ;及 4,816,397, 通过提及而将它们完整收入本文。

[0080] 人源化抗体是一种结合期望的抗原且包含含有一种或多种自非人物种衍生的互补决定区 (CDR) 和一种或多种自人免疫球蛋白分子衍生的框架区的可变区的分子。用于使非人抗体人源化的典型方法已经记载于多份参考文献, 诸如如下那些 :Queen 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :10029-10033 和 美国专利 No. 5,585,089 和 5,693,762 ;Riechmann 等, Nature, 332 :323, 1988 ;及 Tsurushita 等, Methods 36 :69-83, 2005, 通过提及而将它们都完整收入本文。例如, Tsurushita 等 (2005, 见上文 ;下文称为“Tsurushita”) 的参考文献提供了一种用于使小鼠单克隆抗体人源化的实用且指导性的方案, 其基于最初由 Queen 等 (1989, 见上文) 开发的抗体人源化方法。下文简要汇总了 Tsurushita 中所披露的通用方案。

[0081] 5.3.1. 用于制备人源化抗体的通用方案

[0082] 小鼠 V 基因的克隆和测序

[0083] 有多种方法可用于克隆编码目标小鼠单克隆抗体的 VH 和 VL 区的 cDNA。例如, 通常使用 5' RACE (cDNA 末端快速扩增) 法, 其使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (BD Biosciences, CA) 或 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen, CA) 进行。可以基于目标单克隆抗体的 H 链和 L 链的同种型来制备用于 5' RACE 的基因特异性引物, 从而它可以刚好在 H 链和 L 链之每种的可变区下游结合。如此, 5' RACE 引物可以设计为对小鼠中的每种亚型, 诸如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 或 $\gamma 3$ 特异的。或者, 可以基于亚型间共有的或高度同源的区域来设计所有亚型的共同引物。在 Tsurushita 中, 下列 5' RACE 引物作为例子被披露 :

[0084] (i) 5' -GCCAGTGGATAGACTGATGG-(SEQ ID NO :56) (用于克隆小鼠 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 和 $\gamma 3H$ 链)

[0085] (ii) 5' -GATGGATACAGTTGGTGCAGC-(SEQ ID NO :57) (用于克隆小鼠 κ 轻链)。

[0086] 可以例如使用 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒 (Invitrogen) 来将 PCR 扩增的 V 基因片段直接克隆入质粒载体中, 并测定其 DNA 序列。获得的序列应当通过例如比较其编

码氨基酸序列与使用例如 241 型蛋白质测序仪 (Hewlett-Packard, CA) 通过 N 端氨基酸测序测定的目标单克隆抗体的氨基酸序列来确认。通常,通过例如埃德曼 (Edman) 降解测定在目标抗体 N 端的至少 15-20 个氨基酸残基足以确认克隆 DNA 序列的真实性。Tsurushita 告诫,在谷氨酰胺 (其是小鼠中两种最常见的 N 端氨基酸之一) 是 N 端氨基酸时,其可能已经转变成焦谷氨酰胺并封闭 N 端的测序。在该情况中,有必要使 N 端去封闭以获得序列。

[0087] V 区的三维建模

[0088] 基于 VH 和 VL 区的序列,首先通过例如由 R. Levy 等,1989, *Biochemistry* 28 : 7168-7175 ;及 B. Zilber 等,1990, *Biochemistry* 29 :10032-10041 记载的方法来鉴定靶抗体中对于维持 CDR 的构象结构潜在重要的框架残基。通常,将 VH 和 VL 区之每种分成 14 个结构上有意义的区段,其是构成免疫球蛋白超家族域结构的 β 链和环样结构。将来自目标抗体的每个区段的氨基酸序列与 PDB 数据库 (参见 H. M. Berman 等,2000, *Nucleic Acids Res.* 28 :235-342) 中的已知结构的抗体的相应区段比对。通过多序列比对,选择与每个靶区段具有最高序列同源性的相应区段,并构建 V 区的三维模型。为了优化结构,将模型进行多轮共轭梯度能量最小化 (例如使用 ENCAD,或者如由 Press 等,1990,于 “Numerical Recipes”,Cambridge University Press,Cambridge 中所记载的;Weiner 等,1981, *J. Comp. Chem.* 2 :287-303 的 AMBER;由英国癌症研究中心 (Cancer Research UK) 运行的 BioMolecularModelling 或 “BMM” 网站上可获得的 3D-JIG-SAW;或在由瑞士生物信息学研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics,Geneva) 运行的 ExPASy 蛋白质组学服务器网站上可获得的 SWISS-MODEL 进行)。

[0089] 人框架的选择

[0090] 与对 V 区结构建模并行,将自小鼠 VH 和 VL 区的 cDNA 克隆推导的氨基酸序列分别与数据库,例如 Kabat 数据库 (参见 Johnson 等,2000, *Nucleic Acids Res.* 28 :214-218.)、GenBank、等等中的人 V 区序列比较。可以使用例如 Smith-Waterman 算法 (Gusfield,1997,于 “Algorithms on Strings, Trees, and Sequences”,Cambridge University Press,Cambridge)、或 BLAST (Karlin 等,1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :2264-2268)、等等来搜索与小鼠序列具有至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、或至少 95% 同一性的总体序列同一性的人框架区。这些人序列可以根据基于 cDNA 的和蛋白质衍生的序列;然而,种系的使用常常是优选的,因为它可以用于消除与基于 cDNA 的、蛋白质衍生的序列中的体细胞高度突变有关的潜在免疫原性。在备选,如 Queen 等 (1989,见上文) 中所记载的,共有框架序列的使用也可以在自基于 cDNA 的或蛋白质衍生的序列获得的框架中鉴定并清除此类高度突变残基。在使用种系 VH 区段作为接受体框架的情况中,应当使用染色体 14,而非 15 和 16 上编码的 VH 区段,因为只有染色体 14 上的那些生成功能性 VH 区。

[0091] 人源化 V 区的设计

[0092] 依照 Queen 等 (1989,见上文),有必要鉴定距 CDR 约 4-6 埃内的框架氨基酸,因为认为这些残基是支持正确 CDR 结构的潜在的关键框架残基。此类方法可以使用计算机程序,诸如由国家科学基金会 (National Science Foundation, NSF) 支持的分子可视化免费软件 (Molecular Visualization Freeware) 网站上可获得的 RASMOL (其通过原子坐标或者经由计算机模型的手工检查来计算原子间距离) 来实现。若关键框架位置处的氨基酸在

小鼠供体和人接受体序列之间不同,则通常用小鼠供体的那些替换人残基。然后,若此类残基对支持 CDR 结构具有最小的贡献,则通常使用相应的人残基。还有,若选定的人接受体含有“非典型的”氨基酸(其在小于约 10-20%的 V 区序列中发生),则它们可以是亲和力成熟过程中体细胞高度突变的结果,而且应当用供体残基替换以避免在人的潜在免疫原性。

[0093] 另外,在设计人源化 V 区时需要仔细考虑其它因素,诸如潜在的 N 连接的糖基化信号的残基(关于详情,参见 Tsurushita)。

[0094] 根据治疗用途需要的或要消除的效应器功能,人源化抗体可以含有来自人抗体的人 κ 或 λ 轻链、和 / 或 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 μ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 δ 、或 ϵ 重链、或其变体的人恒定区或其部分。例如,可以将含有突变的恒定区的 Fc 部分与本发明的嵌合的或人源化的抗体的可变区融合,从而降低抗体对 Fc 受体的结合和 / 或降低其固定补体的能力(参见例如 Winter 等,GB 2,209,757B;Morrison 等,WO 89/07142;Morgan 等,WO 94/29351)。可以通过重组 DNA 技术来实施对抗体分子的此类操作,如 5.2 一节中所描述的。

[0095] 优选地,所得的嵌合或人源化抗体具有与非人供体抗体相同的特异性和与非人供体抗体的亲和力相似或非人供体抗体的亲和力的至少约 1/3、至少约 1/2、或至少约 2/3 的亲和力。在另一方面,所得的嵌合或人源化抗体具有至少约 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、优选地至少约 $1 \times 10^8 M^{-1}$ 、且最优选地至少约 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 的亲和常数。

[0096] 在上文所描述的通用方案外,可以使用本领域中已知的多种技术来使抗体人源化,所述技术包括例如 CDR 嫁接(EP 239,400;PCT 公开文本 W091/09967;美国专利 No. 5,225,539;5,530,101 和 5,585,089)、镶饰(veneering)或重修表面(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498,1991;Studnicka 等,Protein Engineering, 7(6):805-814,1994;Roguska 等,Proc Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973,1994)、和链改组(美国专利 No. 5,565,332),在此通过提及而将它们都完整收录。

[0097] 5.3.2. 将人源化抗体制备为药物的其它考虑因素

[0098] 为了作为药物来供应人源化抗体,需要制备有效且一致的其生产系统。例如,通过插入 H 和 L 链序列来制备适合于人源化抗体的表达载体,并可以获得经表达载体转染的高生产率细胞系作为主细胞库(MCB)的种子细胞,其充当工作细胞库(WCB)的稳定且半永久来源。然后,可以通过培养来自 WCB 的工作细胞,并收集培养液来制备人源化抗体。

[0099] 可以使用具有合适调节基因的多种表达载体来制备此类生产细胞系。作为宿主细胞,可以使用通常用于表达哺乳动物蛋白质的宿主细胞来表达人源化抗体。此类宿主细胞的例子包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、SP2/0-Ag14.19 细胞、NSO 细胞、等等。可以通过选择表达载体和宿主细胞的最好组合来使人源化抗体的生产率最大化。此外,应当探索培养基的组成以从多种无血清培养基和补充物选择合适的培养基,从而可以优化宿主细胞的人源化抗体表达。

[0100] 基于效率和最终的产率,可以使用本领域中公知的多种方法来自培养物上清液纯化由宿主细胞生成的人源化抗体,所述方法包括亲和层析、离子交换层析、疏水相互作用层析、等等。

[0101] 5.4. 药物组合物和治疗用途

[0102] 本发明提供了一种包含免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整合蛋白的上述人源化抗体或其

抗原结合片段的药物组合物。包含本发明的人源化抗体作为活性成分的药物组合物可以作为药剂用于预防和/或治疗与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的病症或疾病,包括但不限于癌症,例如癌细胞的生长或转移,和炎性疾病,例如类风湿性关节炎、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维化、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化、肉芽肿、炎性肠病(溃疡性结肠炎和克罗恩氏病)、自身免疫性疾病、等等。

[0103] 也可以使用包含本发明的人源化抗体的药物组合物来治疗器官移植后慢性排斥反应、和自身免疫性疾病诸如系统性自身免疫性疾病、全身性红斑狼疮(erythematosus)、葡萄膜炎、贝切特(Behcet)氏病、多肌炎、肾小球增殖性肾炎(glomerular proliferative nephritis)、结节病、由 $\alpha 9$ 整联蛋白诱发的疾病状况、等等。

[0104] 用于预防或治疗上文所描述的病症或疾病的预防和/或治疗剂(其包含本发明的人源化抗体)具有低毒性,而且可以作为通过在合适的溶剂中混合得到的液体制剂,或者作为合适剂量形式的药物组合物直接给人口服或胃肠外施用。

[0105] 用于上文所描述的施用的药物组合物含有上述抗体或其盐和药学可接受载体、稀释剂或赋形剂。此类组合物以适合于口服或胃肠外施用的剂量形式提供。

[0106] 剂量可以随要施用的受试者的年龄和体型、目标疾病、状况、施用路径、等等而所有变化。在使用抗体来预防和/或治疗例如成年患者中的类风湿性关节炎时,有利的是,通常以约 0.01 至约 20mg/kg 体重、优选地约 0.1 至约 10mg/kg 体重、且更优选地约 0.1 至约 5mg/kg 体重的单剂每天约 1 至 5 次、优选地每天约 1 至 3 次静脉内施用本发明的抗体。在其它胃肠外施用和口服施用中,可以以与上文给定的剂量对应的剂量施用抗体。在状况特别严重时,可以根据状况增加剂量。

[0107] 多种投递系统是已知的,并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如脂质体中的包囊、微粒、微囊剂、能够表达突变体病毒的重组细胞、受体介导的胞吞(参见例如 Wu 和 Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262 :4429-4432)。导入的方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、和口服路径。化合物可以通过任何方便的路径,例如通过输注或推注,通过经由上皮或粘膜皮肤衬里(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜、等)的吸收来施用,而且可以与其它生物学活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。还可采用肺部施用,例如通过使用吸入器或喷雾器和含雾化剂的配制剂来实现。

[0108] 在一个具体的实施方案中,可期望对需要治疗的区域局部施用本发明的药物组合物;这可以通过例如(而不作为限制)手术过程中的局部输注、表面应用(例如与手术后的伤口敷料一起)、通过注射、依靠导管、依靠栓剂、依靠鼻喷雾、或者依靠植入物来进行,所述植入物是多孔的、非多孔的、或凝胶状的材料,包括膜,诸如硅橡胶膜、或纤维。在一个实施方案中,可以通过在受感染组织部位(或以前的部位)直接注射进行施用。

[0109] 在另一个实施方案中,药物组合物可以在囊泡,特别是脂质体中投递(参见 Langer, 1990, Science 249 :1527-1533; Treat 等, 于 Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein 和 Fidler(编), Liss, New York, 第 353 页 - 第 365 页 (1989); Lopez-Berestein, 同上, 第 317 页 - 第 327 页; 通常参见如上)。

[0110] 在又一个实施方案中,药物组合物可以在受控释放系统中投递。在一个实施方案中,可使用泵(参见 Langer, 见上文; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 : 201; Buchwald 等, 1980, Surgery 88 :507; 及 Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321 :574)。

在另一个实施方案中,可使用聚合材料(参见 Medical Applications of Controlled Release, Langer 和 Wise(编), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen 和 Ball(编), Wiley, New York(1984); Ranger 和 Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61(1983); 还可参见 Levy 等, 1985, Science 228 :190; During 等, 1989, Ann. Neurol. 25 :351; Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71 :105)。在又一个实施方案中,受控释放系统可以放置在组合物的靶物附近,如此仅需要系统剂量的一部分(参见例如 Goodson, 于 Medical Applications of Controlled Release, 见上文, 第 2 卷, 第 115 页 - 第 138 页 (1984))。Langer (Science 249 :1527-1533(1990)) 的综述中讨论了其它受控释放系统。

[0111] 供口服施用的组合物的例子包括固体或液体剂量形式,具体有片剂(包括糖衣片和薄膜衣片剂)、丸剂、颗粒剂、粉状制剂、胶囊(包括软胶囊)、糖浆剂、乳剂、悬浮液、等。此类组合物通过众所周知的方法来制备,而且含有药用制剂领域中常规使用的媒介、稀释剂或赋形剂。供片剂用的媒介或赋形剂的例子有乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁、等等。

[0112] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、点滴输注、等的剂量形式。这些可注射制剂可以通过众所周知的方法来制备。可以例如通过在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中溶解、悬浮或乳化上文所描述的抗体或其盐来制备可注射制剂。作为供注射用的水性介质,有例如生理盐水、含有葡萄糖和其它辅助剂的等张溶液、等,其可以与合适的增溶剂诸如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子型表面活性剂[例如聚山梨酯 80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]、等组合使用。作为油性介质,有采用例如芝麻油、大豆油、等,其可以与增溶剂诸如苯甲酸苄酯、苯甲醇、等组合使用。优选地,在合适的安瓿中装满如此制备的注射剂。可以通过将上述抗体或其盐与供栓剂用的常规基质混合来制备用于直肠施用的栓剂。

[0113] 有利地,将上文所描述的供口服或胃肠外使用的药物组合物制备成单位剂量的剂量形式,其适合于配合活性组分的剂量。此类单位剂量的剂量形式包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂、等。所含有的上述抗体量一般是每单位剂量的剂量形式约 5 至 500mg;尤其在注射剂形式中,优选的是以约 5 至 100mg 包含上述抗体,而对于其它剂量形式以约 10 至 250mg 包含上述抗体。

[0114] 上文所描述的每种组合物可以进一步含有其它活性成分,除非配制剂引起与上文所描述的抗体的任何不利的相互作用。

[0115] 本发明还涉及用于细胞和/或组织重塑的抑制剂和/或促进剂,其包含 $\alpha 9$ 整联蛋白结合性功能分子(例如 OPN、VCAM-1、生腱蛋白-C、纤连蛋白、pp-vWF、tTG、等)作为活性组分;和用于抑制和/或促进细胞和/或组织重塑的方法,其包括使表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞和/或组织(例如肿瘤细胞、嗜中性粒细胞、平滑肌、等)与 $\alpha 9$ 整联蛋白结合性功能分子接触。可以通过参照包含本发明人源化抗体的药物的前述描述适当地确定此类治疗剂中的活性组分的剂量、施用方法、药用制剂、等。

[0116] 如上文所描述的,本发明进一步提供了一种用于预防或治疗与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白的病症或疾病的方法,所述方法包括对有此需要的受试者施用有效量的至少一种本发明的人源化抗体。

[0117] 5.5. 诊断用途

[0118] 包含本发明的人源化抗体的药物组合物可以作为癌症（例如癌细胞的生长或转移），和炎症疾病（例如类风湿性关节炎、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维化、糖尿病、癌症转移、动脉硬化、多发性硬化、肉芽肿、等）的诊断剂，或者作为器官移植后慢性排斥反应、自身免疫性疾病诸如系统性自身免疫性疾病、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、贝切特氏病、多肌炎、肾小球增殖性肾炎、结节病、由 $\alpha 9$ 整联蛋白诱发的疾病状况、等等的诊断剂使用。本发明的人源化抗体能够特异性识别 $\alpha 9$ 整联蛋白，因此可以用于量化测试流体中的 $\alpha 9$ 整联蛋白，尤其是用于通过三明治式免疫测定法、竞争性测定法、免疫测量法、肾测量法（nephrometry）、等、免疫染色、等等进行的量化。在将这些免疫学方法应用于本发明的测定方法时，不需要列出任何特定的条件、规程、等。通过向常规的条件和规程添加本领域中普通的技术考虑因素足以构建测定系统。关于这些通用技术手段的详情，可以参照综述、教科书、等等。

[0119] 如上文所描述的，可以通过使用本发明的抗体以高灵敏度量化 $\alpha 9$ 整联蛋白。本发明的人源化抗体特别可用于诊断与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的各种疾病，其通过应用于在体内量化 $\alpha 9$ 整联蛋白的方法来实现。例如，在检测出 $\alpha 9$ 整联蛋白表达水平升高或降低的情况中，可以诊断很有可能现在患有与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的疾病，例如癌症或炎症疾病，或者很有可能将来会患有这些疾病。如此，本发明还提供了一种用于在受试者中诊断与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白的病症或疾病的方法，所述方法包括对有此需要的受试者施用有效量的至少一种本发明的人源化抗体或两者。此类体内诊断需要的剂量可以小于治疗用途所需要的，而且可以由本领域技术人员依照常规规程确定。

[0120] 还可以使用本发明的人源化抗体来特异性检测测试流体诸如体液、组织、等中存在的 $\alpha 9$ 整联蛋白。还可以使用人源化抗体来制备用于纯化 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体柱，检测纯化时每个级分中含有的 $\alpha 9$ 整联蛋白或分析 $\alpha 9$ 整联蛋白在要测试的细胞中的行为。

6. 实施例

[0121] 以下实施例例示了免疫特异性识别人和 / 或小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体的制备、单克隆抗体的可变区的测序和抗体的其它表征及此类抗体的嵌合化和人源化，以及所得的嵌合和人源化抗体的表征。这些实施例不应解释为限制性的。

[0122] 6.1. 针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的小鼠抗体的制备

[0123] 依照扣除免疫法 (Williams C. V. 等, 1992, Biotechniques 12:842-847) 来制备针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的小鼠单克隆抗体。简言之，以每只小鼠 3×10^6 个给 3 只 Balb/c 小鼠腹膜内注射表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 NIH-3T3 细胞（人 $\alpha 9$ /NIH-3T3 细胞）。在注射后 1 和 2 周时，给小鼠腹膜内注射 3×10^6 个细胞 / 小鼠的人 $\alpha 9$ /NIH-3T3 细胞，接着是一周后，以 2×10^6 个细胞 / 小鼠再次静脉内注射相同细胞。通过本领域中公知的方法制备杂交瘤（参见例如 Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 1988); Hammerling 等, 于: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, 第 563 页 - 第 681 页 (Elsevier, N. Y., 1981)）。建立生成与表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞和内源表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人黑素瘤细胞而非表达人 $\alpha 4$ 整联蛋白的 CHO K1 细胞有免疫特异性反应的单克隆抗体的杂交瘤克隆，并分离生成免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体的杂交瘤克隆（即 K33N）。

[0124] 6.2. 对抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的 CDR 分析

[0125] 通过逆转录自相应的杂交瘤提取的 mRNA 以制备 cDNA 来测定单克隆抗体 (即 K33N) 的 CDR 的氨基酸序列。使用 cDNA 作为模板,使用 ScFv 克隆引物 (轻链引物混合物和重链引物混合物;Amersham Biosciences Corp., IL) 通过 PCR 来延伸并扩增 H 链和 L 链的可变区。将 PCR 产物克隆入 pCRII TOPO 载体中,测序,并确定氨基酸序列。将此过程重复三次。表 1 中显示了结果。

[0126] 表 1

[0127]

CDR	氨基酸序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SYVMN	4
CDRH2	WIFPGSGNTKYNEKFKG	5
CDRH3	SWVSYERGYFYDY	6
CDRL1	RASENIYYSLA	11
CDRL2	NANSLED	12
CDRL3	KQAYDVPLYT	13

[0128] 6.3. 细胞粘附抑制活性

[0129] (1) 因为已知细胞粘附牵涉 $\alpha 9$ 整联蛋白与其配体,即各种 ECM (包括 OPN、纤连蛋白、生腱蛋白 -C、VCAM-1、等等) 的结合,通过使用表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞 (人黑素瘤 G361 细胞) 与配体的结合来对分离的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体检查其细胞粘附抑制活性。

[0130] 简言之,以牛血清清蛋白 (BSA)- 融合 SVVYGLR (SEQ ID NO:2) 肽来制备 OPN 肽。通过在大肠杆菌宿主细胞中表达,以人生腱蛋白 C 中的纤连蛋白 III 型重复的第三区制备 TN-C fn3 (RAA), 其中已经用 RAA 序列替换该肽的 GRD 序列。

[0131] 以 $5 \mu\text{g/mL}$ 将 OPN 肽和生腱蛋白 C 片段 (TN-C fn3 (RAA)) 添加至 96 孔板,并于 37°C 温育 1 小时以包被平板,然后用封闭溶液 (0.5% BSA/PBS) 封闭平板。将人黑素瘤 G361 细胞在 0.25% BSA/DMEM 中悬浮 (1×10^5 个细胞 /mL), 并将每个浓度的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体添加至细胞悬浮液。将 0.25% BSA/DMEM 中的人黑素瘤 G361 细胞 (1×10^5 个细胞 /mL) 和抗体的混合物以 $200 \mu\text{L}$ / 孔添加至 96 孔板,并于 37°C 在 5% CO_2 下温育 1 小时。用 PBS 洗去非粘附细胞,将粘附细胞固定,并用 0.5% 结晶紫 (WAKO, Osaka, Japan) /20% 甲醇染色。用蒸馏水将经染色的细胞清洗三次,然后向其添加 20% 乙酸溶液以实现溶解。通过测量 590nm 波长的 OD 来量化粘附活性。使用抗人 OPN 单克隆抗体 (5A1) 作为阴性对照和先前制备的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (1K11、21C5、24I11、25B6 和 28S1) 作为阳性对照。

[0132] 图 1 中显示了抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对 G361 细胞结合 OPN 肽的影响,而图 2 中显示了抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对 G361 细胞结合生腱蛋白 C 片段的影响。如图 1 中所显示的,牵涉 OPN 的细胞粘附受与阳性对照 21C5 和 24I11 相比低浓度的和与 Y9A2 相同浓度的 K33N 抑制。牵涉生腱蛋白 C 的细胞粘附受低浓度的和与 Y9A2 相同浓度的 K33N 抑制,抑制效果

显著强于阳性对照 21C5 和 24I11。

[0133] 6.4. 非人抗体的人源化

[0134] 6.4.1. 小鼠 K33N V 基因的克隆和测序

[0135] 将小鼠 K33N 杂交瘤细胞在含有 10% 胎牛血清 (FBS ;HyClone, Logan, UT) 的 TIL 培养基 I (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan) 中于 37℃ 在 7.5% CO₂ 培养箱中培养。使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 依照供应商的方案自约 10⁷ 个杂交瘤细胞提取总 RNA。使用 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen) 遵循供应商的方案来合成寡聚 dT 引发的 cDNA。使用分别与小鼠 γ -1 和 κ 链恒定区退火的 3' 引物和 GeneRacer 试剂盒中提供的 GeneRacer 5' 引物 (5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3') (SEQ ID NO :51) 用 Phusion DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) 通过聚合酶链式反应 (PCR) 来扩增 K33N 重链和轻链的可变区 cDNA。为了重链可变区 (VH) 的 PCR 扩增, 3' 引物具有序列 5'-GCCAGTGGATAGACAGATGG-3' (SEQ ID NO :52)。为了轻链可变区 (VL) 的 PCR 扩增, 3' 引物具有序列 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-3' (SEQ ID NO :53)。将扩增的 VH 和 VL cDNA 亚克隆入 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen) 中以进行序列测定。可变区的 DNA 测序在 Tocore (Menlo Park, CA) 实施。对数个重链和轻链克隆测序, 并鉴定与典型的小鼠重链和轻链可变区同源的独特序列。图 3 和图 4 中分别显示了 K33N VH 和 VL 的共有 cDNA 序列及推导的氨基酸序列。

[0136] 6.4.2. 嵌合 K33N IgG1/ κ 抗体的构建

[0137] 使用 K33N VH cDNA 作为模板、5'-GGGACTAGTACCACCATGGGATG GAGCTGGATCTTTCTC-3' (SpeI 位点加下划线) (SEQ ID NO :40) 作为 5' 引物、和 5'-GGGAAG CTTGTTTTAAGGACTCACCTGAGGAGACTCTGAGACTG GTGCC-3' (SEQ ID NO :41) (HindIII 位点加下划线) 作为 3' 引物通过 PCR 以包含剪接供体信号和合适的侧翼限制酶位点的外显子生成编码 K33N VH 的基因 (图 5)。类似地, 使用 K33N VL cDNA 作为模板、5'-GGGGCTAGCACCA CCATGAGTGTGCCCCACTCAACTCCTG-3' (SEQ ID NO :42) (NheI 位点加下划线) 作为 5' 引物、和 5'-GGGGAATTCTGAGAAGAC TACTTACGTTTTATTTCAGCTTGGTCCCCC-3' (SEQ ID NO :43) (EcoRI 位点加下划线) 作为 3' 引物通过 PCR 以包含剪接供体信号和合适的侧翼限制酶位点的外显子生成编码 K33N VL 的基因 (图 6)。K33N VH 和 VL 外显子的剪接供体信号分别衍生自小鼠种系 JH4 和 J κ 2 序列。使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 将 PCR 扩增的片段进行凝胶纯化, 用 SpeI 和 HindIII (对于 VH) 或 NheI 和 EcoRI (对于 VL) 将其消化, 并克隆入携带人 γ -1 和 κ 恒定区的哺乳动物表达载体中以生成嵌合 K33N IgG1/ κ 抗体。图 7 中显示了所得的表达载体 pChK33N 的示意结构。

[0138] 6.4.3. 人源化 K33N V 基因的生成

[0139] 如由 Queen 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :10029-10033, 1989) 所概述的那样实施 K33N 可变区的人源化。首先, 借助于计算机程序来构建 K33N 可变区的分子模型。接着, 基于针对人可变区序列的同源性搜索, 选择自 DA980102 (GenBank 登录号) 衍生的人氨基酸序列 (其与 K33N VH 具有高度同源性) 作为接受体以为人源化 K33N VH 提供框架。小鼠 K33N 与 DA980102 VH 区之间的框架氨基酸同一性是 74.7% (65/87)。类似地, 选择 X72441 (GenBank 登录号) 的人氨基酸序列作为接受体以使 K33N VL 人源化。小鼠 K33N 和 X72441VL 区之间的框架氨基酸同一性是 76.3% (61/80)。

[0140] 在计算机模型提示了与互补决定区 (CDR) 的显著接触的框架位置处,用来自 K33N 可变区的氨基酸替换人框架氨基酸。这在第 28 位、第 48 位、第 66 位、第 67 位和第 71 位进行以生成人源化 K33N(HuK33N) VH(图 8)。另外,发现人 DA980102 接受体的第 82 位处的 Met 在人 VH 序列的相同亚组中是非典型的,因此用最常见的氨基酸残基 (Leu) 替换以降低潜在的免疫原性。对于轻链,在残基 70 和 71 处进行替换以生成 HuK33N VL(图 9)。图 8 中对 VH 和图 9 中对 VL 显示了 K33N(称作 HuK33N) 与人接受体氨基酸序列的比对。

[0141] 将编码 HuK33N VH 和 VL 之每种的基因设计为包含信号肽、剪接供体信号、和合适的限制酶位点(用于随后将其克隆入哺乳动物表达载体中)的外显子。HuK33N VH 和 VL 外显子的剪接供体信号分别衍生自人种系 JH4 和 J κ 1 序列。通过 SIG-Pred 信号肽预测软件 (http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html) 指明小鼠 K33N VH 基因的信号肽序列对于精确切割是最佳的。因此,在 HuK33N VH 基因中使用小鼠抗人 α 9 整联蛋白单克隆抗体 24I11(Gene Techno Science) 的 VH 基因的信号肽序列,其通过 SIG-Pred 软件预测为被有效且精确切割。人源化 K33N VL 外显子中的信号肽序列衍生自相应的小鼠 K33N VL 序列。SIG-Pred 软件指明 HuK33N VL 基因的信号肽被有效且精确切割。

[0142] 使用 ThermalAce DNA 聚合酶 (Invitrogen) 通过数种交叠的合成寡核苷酸引物的延伸和 PCR 扩增来构建 HuK33N VH 和 VL 基因,如由 He 等 (J. Immunol. 160 :1029-1035, 1998) 所概述的。图 10 和图 11 中分别列出了用于构建 HuK33NVH 和 VL 基因的寡核苷酸。图 12 和图 13 中分别显示了寡核苷酸在 HuK33N VH 和 VL 基因中的位置。使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 来将 PCR 扩增的片段进行凝胶纯化,并将其克隆入 pCR4Blunt-TOPO 载体中以进行序列测定。用 SpeI 和 HindIII(对于 VH) 或 NheI 和 EcoRI(对于 VL) 消化后,将 HuK33NVH 和 VL 基因亚克隆入哺乳动物表达载体中的相应位点中以便以人 IgG1/ κ 形式生成。图 7 中显示了所得的表达载体 pHuK33N 的示意结构。图 14 和图 15 中分别显示了所获得的 HuK33N VH 和 VL 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列。

[0143] 6.4.4. 嵌合的和人源化的 K33N IgG1/ κ 的瞬时表达

[0144] 依照 Durocher 等 (Nucl. Acids Res. 30 :e9, 2002) 使用聚乙烯亚胺来分别将 pChK33N 和 pHuK33N 质粒 DNA 转染至 HEK293 细胞,从而瞬时表达嵌合的和人源化的 K33N IgG1/ κ 抗体。将经瞬时转染的 HEK293 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 中于 37°C 在 7.5% CO₂ 培养箱中维持 4 天。通过三明治式 ELISA 来测量培养物上清液中 ChK33N 和 HuK33N IgG1/ κ 抗体之每种的表达水平。用 100 μ l/孔 PBS 中 1/2,000 稀释的山羊抗人 IgG Fc γ 链特异性多克隆抗体 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) 于 4°C 包被 ELISA 板过夜,用清洗缓冲液(含有 0.05% Tween 20 的 PBS)清洗,并用 300 μ l/孔的封闭缓冲液(含有 2% 脱脂奶和 0.05% Tween 20 的 PBS)于室温封闭 1 小时。用清洗缓冲液清洗后,将 100 μ l/孔在 ELISA 缓冲液(含有 1% 脱脂奶和 0.025% Tween 20 的 PBS)中适当稀释的样品应用于 ELISA 板。使用自人骨髓瘤血清纯化的人 IgG1/ κ 抗体 (SouthernBiotech) 作为标准品。于室温将 ELISA 板温育 2 小时并用清洗缓冲液清洗后,使用 100 μ l/孔的 1/2,000 稀释的偶联有 HRP 的山羊抗人 κ 链多克隆抗体 (SouthernBiotech) 来检测所结合的抗体。于室温温育 1 小时并用清洗缓冲液清洗后,通过添加 100 μ l/孔的 ABTS 底物 (bio WORLD, Dublin, OH) 来进行显色。通过添加 100 μ l/孔的 2% 草酸来停止显色。以 405nm 读取吸光度。

[0145] 通过细胞 ELISA 来检查瞬时表达的 ChK33N 和 HuK33N 抗体对人 α 9 整联蛋白的结

合。将在表面上表达重组人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 CHO-K1 稳定转染子 (CHO/hu $\alpha 9$; 由 Gene Techno Science 提供) 以 2×10^5 个细胞/孔在 $50 \mu\text{l}$ 含有 10% FBS 的 F12/DMEM (HyClone) 中在 96 孔组织培养板中接种, 并于 37°C 在 7.5% CO_2 培养箱中培养过夜。为了测试对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的结合, 将 $50 \mu\text{l}$ 含有 10% FBS 的 F12/DMEM 中的 ChK33N、HuK33N 或无关的人 IgG1/ κ 骨髓瘤抗体 (SouthernBiotech) 添加至每孔。于 4°C 温育 1 小时并用冰冷的 PBS 将细胞清洗两次后, 将 $100 \mu\text{l}$ 1/1,000 稀释的偶联有 HRP 的山羊抗人 IgG 多克隆抗体 (SouthernBiotech) 添加至每孔。于 4°C 温育 1 小时后, 用冰冷的 PBS 将细胞清洗三次。为了显色, 添加 $100 \mu\text{l}$ ABTS 底物。通过添加 $100 \mu\text{l}$ 2% 草酸来停止显色。以 405nm 读取吸光度。结果显示了在 0.5 和 $1 \mu\text{l/ml}$ 两者, ChK33N 抗体对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的结合几乎与 HuK33N 抗体对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的结合相同 (图 16)。

[0146] 6.4.5. 生成 ChK33N 和 HuK33N IgG1/ κ 抗体之每种的 NS0 稳定转染子的生成

[0147] 为了获得稳定生成 ChK33N 和 HuK33N IgG1/ κ 抗体的细胞系, 分别将表达载体 pChK33N 和 pHuK33N 导入小鼠骨髓瘤细胞系 NS0 (欧洲动物细胞培养物保藏中心 (European Collection of Animal Cell Cultures), Salisbury, Wiltshire, UK) 的染色体中。将 NS0 细胞在含有 10% FBS 的 DME 培养基中于 37°C 在 7.5% CO_2 培养箱中培养。通过电穿孔来实施进入 NS0 中的稳定转染, 如 Bebbington 等 (Bio/Technology 10:169-175, 1992) 中所记载的。转染前, 使用 FspI 来使表达载体线性化。用 $10 \mu\text{g}$ 线性化质粒转染约 10^7 个细胞, 将其在含有 10% FBS 的 DME 培养基中悬浮, 并分配入数块 96 孔板中。24 小时后, 应用选择培养基 (含有 10% FBS、HT 培养基补充物 (Sigma, St. Louis, MO)、0.25mg/ml 黄嘌呤和 $1 \mu\text{g/ml}$ 霉酚酸的 DME 培养基)。启动选择后约 10 天, 对培养物上清液测定抗体生成。

[0148] 通过三明治式 ELISA 本质上依照 6.4.3 一节中所描述的规程来测量 ChK33N 和 HuK33N IgG1/ κ 抗体的表达。使用杂交瘤 SFM (Invitrogen) 来使生成高水平 ChK33N 抗体的 NS0 稳定转染子 (NS0-ChK33N 3D11) 适应于在无血清培养基中的生长。通过有限稀释将生成高水平 HuK33N 抗体的 NS0 稳定转染子在 96 孔板中进一步亚克隆。使亚克隆之一 (NS0-HuK33N 8G8-11) 适应于在杂交瘤 SFM 中生长。用 PCR 枝原体检测组 (Takara Bio USA, Madison, WI) 进行的测试指明, NS0-ChK33N 3D11 和 NS0-HuK33N 8G8-11 两者在枝原体存在方面呈阴性。

[0149] 通过 cDNA 测序来确认 NS0-HuK33N 6D5-11 中生成的 HuK33N 重链和轻链的真实性。使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 自 NS0-HuK33N 6D5-11 细胞提取总 RNA, 并使用 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen) 遵循制造商的方案来合成寡聚 dT 引发的 cDNA。使用 CMV2 和 JNT098 作为引物 (图 17) 和 Phusion 聚合酶 (New England Biolabs) 通过 PCR 扩增 $\gamma-1$ 重链的编码区。将 PCR 片段进行凝胶纯化, 并用 CMV2、JNT082、JNT097 和 JNT098 作为引物 (图 17) 进行测序。类似地, 使用 CMV2 和 JNT026 (图 17) 来扩增 κ 轻链的编码区。用 CMV2、JNT026、JNT080 和 JNT084 作为引物 (图 17) 对凝胶纯化的 DNA 片段进行测序。HuK33N 重链和轻链之每种的编码区获得的核苷酸序列与 pHuK33N 载体中的相应序列完全匹配 (分别为图 18 和图 19)。

[0150] 6.4.6. ChK33N 和 HuK33N 抗体的纯化

[0151] 将 NS0-ChK33N 3D11 和 NS0-HuK33N 8G8-11 细胞在滚瓶中在杂交瘤 SFM 中培养至耗尽。离心并过滤后, 将培养物上清液加载至蛋白 A Sepharose 柱 (GE Healthcare,

Piscataway, NJ) 上。用 PBS 清洗柱,之后用 0.1M 甘氨酸-HCl (pH 3.0) 洗脱抗体。用 1M Tris-HCl (pH 8) 中和后,通过透析将洗脱抗体的缓冲液更换成 PBS。通过测量 280nm 的吸光度来测定抗体浓度 ($1\text{mg/ml} = 1.4$ 个 OD)。NS0-ChK33N 3D11 细胞的抗体表达水平是 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$, 而 NS0-HuK33N8G8-11 细胞的抗体表达水平是 $12\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

[0152] 通过 SDS-PAGE 依照标准的规程来表征纯化的 ChK33N 和 HuK33N 抗体。还原条件下的分析指明 ChK33N 和 HuK33N 抗体之每种由具有约 50kDa 分子量的重链和具有约 25kDa 分子量的轻链构成 (图 20)。每种抗体的纯度表现为超过 95%。

[0153] 6.4.7. ChK33N 和 HuK33N 抗体的表征

[0154] 在用 CHO/hu α 9 细胞进行的 FACS 结合测定法中检查小鼠的、嵌合的和人源化的 K33N 抗体对人 α 9 整合蛋白的结合。用 FACS 结合缓冲液 (含有 0.5% BSA 和 0.05% NaN_3 的 PBS) 清洗约 5×10^5 个 CHO/hu α 9 细胞 / 测试,并在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 含有多个量的测试抗体的 FACS 结合缓冲液中悬浮。在冰上 30 分钟后,用 FACS 结合缓冲液清洗细胞。然后,将用小鼠 K33N 染色的细胞在 $100\text{ }\mu\text{L}$ FACS 结合缓冲液中 1/200 稀释的经 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体 (SouthernBiotech) 中悬浮。将用嵌合或人源化 K33N 染色的细胞在 $100\text{ }\mu\text{L}$ FACS 结合缓冲液中 1/200 稀释的经 FITC 标记的山羊抗人 IgG 多克隆抗体 (SouthernBiotech) 中悬浮。在冰上 30 分钟后,将细胞用 FACS 结合缓冲液清洗,在 $200\text{ }\mu\text{L}$ FACS 结合缓冲液中悬浮,并使用 FACScan 流式细胞仪 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 来分析。小鼠 K33N 抗体结合 CHO/hu α 9 细胞的 EC_{50} 值是 104ng/ml (图 21)。在 ChK33N 和 HuK33N 抗体之间,结合样式彼此非常相似 (图 22)。另外,ChK33N 和 HuK33N 抗体的 EC_{50} 值彼此几乎相同 (ChK33N 抗体为 143ng/ml , 而 HuK33N 抗体为 151ng/ml)。此结果指明小鼠 K33N 抗体在不损失抗原结合亲和力的情况中成功人源化。

[0155] 6.4.8. 细胞粘附测定法

[0156] 用 $50\text{ }\mu\text{L}$ $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ hTNC(AEIDGIEL)-BSA 溶液于 37°C 在 CO_2 培养箱中将 96 孔平底微量滴定板 (Nunc) 包被 1 小时。用 $50\text{ }\mu\text{L}$ $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ BSA 溶液包被对照孔。包被反应后,用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 0.5w/v% BSA (封闭) 溶液更换孔中的溶液,并于室温温育 1 小时。封闭反应后,用 PBS 清洗孔。将 $150\text{ }\mu\text{L}$ 含有 0.25w/v% BSA 的 TIL 培养基中悬浮的 2.5×10^5 个细胞/mL G-361 细胞和 $50\text{ }\mu\text{L}$ 测试抗体溶液 (0.25w/v% BSA/TIL) 在孔中分配,并于 37°C 在 CO_2 培养箱中温育 1 小时。温育后,用 PBS 溶液将每孔小心清洗三次以除去非粘附细胞。添加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 0.5w/v% 结晶紫溶液以将粘附细胞固定并染色。30 分钟后,通过用一盆水清洗三次来除去过量的染料,并用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 20v/v% 乙酸溶解孔中的染料。使用吸收分光光度计来测量每孔在 595nm 的吸光度。通过下式计算细胞粘附抑制率; $(1 - (A - B) / (C - B)) \times 100(\%)$ 。A: 在存在抗体的情况中用 hTNC-BSA 包被的孔的吸光度, B: 在没有任何测试抗体的情况中用 BSA 包被的孔的吸光度, C: 在存在正常人 IgG (阴性对照) 的情况中用 hTNC-BSA 包被的孔的吸光度 (图 23)。

[0157] 结果

[0158] Y9A2 的 IC_{50} 是 $0.053\text{ }\mu\text{g/ml}$ (95 % CI : 0.032-0.089)。K33N、ChK33N 和 HuK33N 的 IC_{50} 分别是 $0.075\text{ }\mu\text{M}$ (0.053-0.106)、 $0.090\text{ }\mu\text{g/ml}$ (0.063-0.128)、 $0.084\text{ }\mu\text{g/ml}$ (0.055-0.129), 指明测试抗体的 IC_{50} 值与 Y9A2 的 IC_{50} 值在相同水平上。

[0159] 7. 保藏

[0160] 本文中称为 K33N 的生成小鼠抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白单克隆抗体的杂交瘤依照微生物保藏布达佩斯条约于 2007 年 5 月 29 日保藏于位于中心 6,1-1-1Higashi, Tsukuba, Ibaraki (邮政编码 :305-8566) 的国际专利生物体保藏中心 (International Patent Organisms Depository), 国家先进工业科学技术研究所 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 并记录为登录号 FERM BP-10830, 通过提及而将其完整收入本文。

[0161] 8. 工业实用性

[0162] 本发明的人源化单克隆抗体抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白的功能以对癌症, 例如癌细胞的生长或转移, 和炎性疾病, 例如类风湿性关节炎、骨关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维化、糖尿病、癌症转移、动脉硬化、多发性硬化、肉芽肿、炎性肠病 (溃疡性结肠炎和克罗恩氏病)、自身免疫性疾病、等等展现出治疗效果。

[0163] 9. 序列表

[0164] 下文汇总了贯穿整个说明书所提及的序列。

[0165]

SEQ ID NO.	类型	描述	序列
------------	----	----	----

[0166]

1	AA	OPN粘附序列	GRGDS
2	AA	HuOPN 的 $\alpha 4\beta 1/\alpha 9\beta 1$ 结合位点	SVVYGLR
3	AA	MuOPN 的 $\alpha 4\beta 1/\alpha 9\beta 1$ 结合位点	SLAYGLR
4	AA	K33N (FERM BP-10830) 的 CDRH1	SYVMN
5	AA	K33N (FERM BP-10830) 的 CDRH2	WIFPGSGNTKYNEKFKG
6	AA	K33N (FERM BP-10830) 的 CDRH3	SWVSYERGYDFY
7	DNA	包含编码信号肽的序列 (1-57) 的 K33N (FERM BP-10830) 的 VH 图3	ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGA ACTGCAGGTGTCCATTGCCAGGTCCAAGTGCAGCAGTCT GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGAT ATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACTA TATGAATTGGGTGAAGAAGAGGCCTGGACAGGGACTTG AGTGGATTGGTTGGATCTTTCTGGAAGTGGTAATACTA AGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACG GCAGACACATCCTCCAGTACAGCCTACATGCAGGTGAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGC AAGATCGTGGGTTAGCTACGAGAGGGGGTATTATTTTG ACTACTGGGGTCAAGGCACCAGTCTCACAGTCTCCTCA
8	AA	包含信号肽(1-19) 的 K33N (FERM BP-10830) 的 VH 图3	MGWSWIFLFLSGTAGVHCQVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGYSFTSYVMNWVKKRPGQGLEWIGWIFPGSGNTKYN EKFKGKATLTADTSSSTAYMQVSSLTSEDSAVYFCARSWV SYERGYDFYWGQGTSLTVSS
9	AA	K33N (FERM BP-10830) 的成熟 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTSYVMNWVKK RPGQGLEWIGWIFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSSSTAY MQVSSLTSEDSAVYFCARSWVSYERGYDFYWGQGTSLT VSS
10	AA	K33N H链的信号肽	MGWSWIFLFLSGTAGVHC
11	AA	K33N (FERM BP-10830) 的 CDRL1	RASENIYSLA
12	AA	K33N (FERM BP-10830) 的 CDRL2	NANSLED
13	AA	K33N (FERM BP-10830) 的 CDRL3	KQAYDVPYT
14	DNA	包含编码信号肽的序列 (1-60) 的 K33N (FERM BP-10830) 的 VL 图4	ATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTG TGGCTTACAGACGCAGGATGTGACATCCAGATGACTCA GTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGTGGGAGAACTGT CACCTCACATGTCGAGCAAGTGAGAACATTTACTACA GTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCAAGGGAAATCTCCT CAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGGAAGATGG TGTCCCATCGAGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAC AGTATTCTATGAAGATCAACAGCATGCAGCCTGAAGAT ACCGCAACTTATTTCTGTAAACAGGCTTATGACGTTCCG

[0167]

			TACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
15	AA	包含信号肽(1-20)的 K33N (FERM BP-10830)的 VL 图4	MSVPTQLLGLLLLWLTDAGCDIQMTQSPASLAASVGETVTLTCRASENIYYSLAWYQQKQKGKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDVPYTFGGGTKLEIK
16	AA	K33N (FERM BP-10830)的成熟 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTLTCRASENIYYSLAWYQQKQKGKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYDVPYTFGGGTKLEIK
17	AA	K33N L链的信号肽	MSVPTQLLGLLLLWLTDAGC
18	DNA	DA980102	AACCACATCCCTCCTCAGAAAGCCCCAGAGCACAACTCCTTACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTTTTGGTG GCAGCAGCCACAGGTGCCCACTCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTA ACTATGCTCTGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAA GGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACACTGGCAATGGTA ACACAAAATATTACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCCTTACCAGTGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAG ATGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTAC TGTGCGAGGAGCAGTGGCTGGTACGTTTGGTTCGACCCCC TGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTTCC ACCAAGGGCCCATCGGTTTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCC AGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
19	AA	DA980102 的 FRH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
20	AA	DA980102 的 FRH2	WVRQAPGQRLEWMG
21	AA	DA980102 的 FRH3	RVTLTSDTSASTAYMEMSSLRSED TAVYYCAR
22	AA	DA980102 的 FRH4	WGQGLTV TVSS
23	DNA	X72441	CGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCGAGG TGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCATTG CCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTAT CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTAT GCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGT CAACAGAGTTACAGTACCCCTCGGACGTTTCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAATCAAA
24	AA	X72441的FRL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
25	AA	X72441的FRL2	WYQQKPGKAPKLLIY
26	AA	X72441的FRL3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
27	AA	X72441的FRL4	FGQGTKVEIK
28	DNA	包含信号肽 (16-72)的HuK33N 的 VH 图12	GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTC TTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTCACAGGTC CAACTGGTGACAGTCTGGAGCTGAGGTAAGAAGCCTGG GGCTTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAG CTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTGCGCCAGGCCCCCT GGACAGAGGCTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTCTCTGGA

[0168]

			AGTGGTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAG GCCACACTGACGGCAGACACATCCGCGAGCACAGCCTA CATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCG TCTATTACTGTGCAAGATCGTGGGTAGCTACGAGAGGG GGTATTATTTTGA C T A C T G G G G T C A A G G A A C C C T G G T C A CCGTCTCCTCAGGTGAGTCCTCACAAAAGCTTCCC
29	AA	包含信号肽(1-19) 的HuK33N的VH 图12	<u>MKCSWVIFFLMAVVTGVNSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS</u> <u>CKASGYSTSYMYNWVRQAPGQRLEWIGWIFPGSGNTKY</u> <u>NEKFKGKATLTADTSASTAYMELSSLRSEDYAVYYCARSW</u> <u>VSYERGYFYFDYWGGQGLTVTVSS</u>
30	DNA	包含信号肽 (16-75)的HuK33N 的VL 图13	GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTG GGGTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGCACGATGTGAC ATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTG TGGGAGACAGAGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAG AACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCA GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGC TTGGAAGATGGTGTCCCATCGAGGTTCA GTGGCAGTGGA TCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAG CCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAGGCTTATG ACGTTCCGTACACGTTTCGGACAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAACGTGAGTAGAATTTAAAGAATTCCCC
31	AA	包含信号肽(1-20) 的HuK33N的VL 图13	<u>MSVPTQLLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTIT</u> <u>CRASENIYYSLAWYQQKPGKAPKLLIYNANSLEDGVPSRF</u> <u>SGSGSGTQYTLTISLQPEDFATYYCKQAYDVPYTFGQGTK</u> <u>VEIK</u>
32	DNA	包含编码信号肽 的序列(1-57)的 ChK33N VH基 因,其侧翼有SpeI 和HindIII位点 图5	<u>ACTAGTACCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTC</u> <u>CTCCTGTGAGGAACTGCAGGTGTCCATTGCCAGGTCCAA</u> <u>CTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGC</u> <u>TTCACTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTT</u> <u>TACAAGTTACTATATGAATTGGGTGAAGAAGAGGCCTG</u> <u>GACAGGGACTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTTCTGGA</u> <u>AGTGGTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA</u> <u>GGCCACACTGACGGCAGACACATCCTCCAGTACAGCCT</u> <u>ACATGCAGGTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCA</u> <u>GTCTATTTCTGTGCAAGATCGTGGGTTAGCTACGAGAGG</u> <u>GGGTATTATTTTGA C T A C T G G G G T C A A G G C A C C A G T C T C</u> <u>ACAGTCTCCTCAGGTGAGTCTTAAACAGCTT</u>
33	DNA	包含编码信号肽 的序列(1-60)的 ChK33N VL基因, 其侧翼有NheI和 EcoRI位点 图6	<u>GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGG</u> <u>GTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGCAGGATGTGACAT</u> <u>CCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGT</u> <u>GGGAGAACTGTCACCCTCACATGTCGAGCAAGTGAGA</u> <u>ACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCAA</u> <u>GGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAG</u> <u>CTTGGAAGATGGTGTCCCATCGAGGTTCA GTGGCAGTG</u> <u>GATCTGGGACACAGTATTCTATGAAGATCAACAGCATG</u> <u>CAGCCTGAAGATACCGCAACTTATTTCTGTAAACAGGCT</u> <u>TATGACGTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCT</u> <u>GGAAATAAAACGTAAGTAGTCTTCTCAGAATTC</u>
34	DNA	侧翼有 SpeI 和 HindIII 位点的 HuK33N VH基因 图14	<u>ACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTC</u> <u>CTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTCACAGGTCCA</u> <u>ACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGG</u> <u>CTTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCT</u> <u>TTACAAGTTACTATATGAATTGGGTGCGCCAGGCCCTG</u> <u>GACAGAGGCTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTTCTGGA</u> <u>AGTGGTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA</u> <u>GGCCACACTGACGGCAGACACATCCGCCAGTACAGCCT</u> <u>ACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCC</u>

[0169]

			GTCTATTACTGTGCAAGATCGTGGGTTAGCTACGAGAG GGGGTATTATTTTGA CT ACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCAGGTGAGTCTCACA AAA <u>AAGCTT</u>
35	DNA	侧翼有 NheI 和 EcoRI 位点的 HuK33N VL基因 图15	GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGG GTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGCACGATGTGACAT CCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGT GGGAGACAGAGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGA ACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCA GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAG CTTGGAAGATGGTGTCCCATCGAGGTTCACTGGCAGTG GATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCAGCCTG CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAGGCT TATGACGTTCCGTACACGTTCCGACAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAACGTGAGTAGAAITTAAGAATTC
36	DNA	pHuK33N 中的 HuK33N γ -1重链 图18	ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTG GTTACAGGGGTCAATTACAGGTCCAACCTGGTGACGTC TGGAGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGG TTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACT ATATGAATTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGAGGCTT GAGTGGATTGGTTGGATCTTTCCTGGAAGTGGTAATACT AAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC GGCAGACACATCCGCCAGTACAGCCTACATGGAGCTCA GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTG CAAGATCGTGGGTTAGCTACGAGAGGGGGTATTATTTT GACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACC CTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACC TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT GA
37	AA	HuK33N γ -1重链 图18	MKCSWVIFFLMAVVTGVNSQVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYSFTSYMNWVRQAPGQRLEWIGWIFPGSGNT KYNEKFKGKATLTADTSASTAYMELSLRSED TA VYYCA RSWVSYERGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS

[0170]

			RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38	DNA	pHuK33N 中的 HuK33N κ轻链 图19	ATGAGTGTGCCCCTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTG TGGCTTACAGACGCACGATGTGACATCCAGATGACTCA GTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGT CACCATCACATGTGAGCAAGTGAGAACATTTACTACA GTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCT AAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGGAAGATGG TGTCCTCATCGAGGTTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAC AGTATACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTATTACTGTAAACAGGCTTATGACGTTCCGT ACACGTTTCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACG AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA ACAGGGGAGAGTGTTAG
39	AA	HuK33N κ轻链 图19	MSVPTQLLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASENIYYSLAWYQQKPGKAPKLLIYNANSLEDGVP RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCKQAYDVPYTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLT SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
40	DNA	K33N VH的5'引 物, 其具有SpeI位 点	GGG <u>ACTAGT</u> ACCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCT C
41	DNA	K33N VH的3'引 物, 其具有HindIII 位点	GGGAAGCTTGTTTTAAGGACTCACCTGAGGAGACTCTG AGACTGGTGCC
42	DNA	K33N VL的5'引 物, 其具有NheI 位点	GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCCTCAACTCCT G
43	DNA	K33N VL的3'引 物, 其具有EcoRI 位点	GGGGAATTCTGAGAAGACTACTTACGTTTTATTTCAGC TTGGTCCCCC
44	DNA	CMV2	GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACG
45	DNA	JNT026	TGAAAGATGAGCTGGAGGAC
46	DNA	JNT080	GAAGTGTGGCTGCACCATC
47	DNA	JNT082	CTTTCTTGTCCACCTTGGTG
48	DNA	JNT084	GTTGAAGCTCTTTGTGACGG
49	DNA	JNT097	GCTGTCCTACAGTCCTCAG
50	DNA	JNT098	ACGTGCCAAGCATCCTCG
51	DNA	GeneRacer 5'引物	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
52	DNA	用于重链可变区 (VH)的PCR扩增	GCCAGTGGATAGACAGATGG

[0171]

		的3'引物	
53	DNA	用于轻链可变区(VL)的PCR扩增的3'引物	GATGGATACAGTTGGTGCAGC
54	AA	生腱蛋白C 33-35	AEIDGIEL
55	AA	人 α 9整联蛋白(信号肽; 残基1-29; 为斜体)	<i>MGGPAAPRGAGRLRALLLALVVAGIPAGAYNLDPQRPVHFQ</i> <i>GPADSFFGYAVLEHFDNTRWVLVGAPKADSKYSPSVKS</i> <i>PGAVFKCRVHTNPDRRCTELDMARGKNRGTSCGKTCRED</i> <i>RDDEWMGVSLARQPKADGRVLACAHRWKNIYYEADHIL</i> <i>PHGFCYIIPSNLQAKGRTLIPCYEEYKKKYGEEHGSCQAGI</i> <i>AGFFTEELVVMGAPGSFYWAGTIKVLNLTDNTYLKLNDE</i> <i>VIMNRRYTYLGYAVTAGHFSHPSTIDVVGGAPODKGIGKV</i> <i>YIFRADRRSGTLIKIFQASGKKMGSYFGSSLCAVDLNGDGL</i> <i>SDLLVGAPMFSEIRDEGQVTYINRGNNGALEEQLALTGDG</i> <i>AYNAHFGESIASLDDLNDGFPDVAIGAPKEDDFAGAVYI</i> <i>YHGDAGGIVPQYSMKLSGQKINPVLRMFGQSIGGIDMDG</i> <i>NGYPDVTVGAFMSDSVLLRLARPVITVDVSIFLPGSINITAP</i> <i>QCHDGQQPVNCLNVTTCFSFHGKHVPGEIGLNYVLMADV</i> <i>AKKEKGQMPRVYFVLLGETMGQVTEKLQLTMEETCRH</i> <i>YVAHVKRRVQDVISPIVFEAAYSLEHVTGEEERELPPLTP</i> <i>VLRWKKGQKIAQKNQTVFERNCRSEDCAADLQLQGKLLL</i> <i>SSMDEKTLYLALGAVKNISLNISISNLGDDAYDANVSFNVS</i> <i>RELFFINMWQKEEMGISCELLESDFLKCSVGFPMRSKSKY</i> <i>EFSVIFDTSHLSGEEVLSFIVTAQSGNTERSESLHDNTLV</i> <i>MVPLMHEVDTSITGIMSPTSIFYGESVDAANFIQLDDLEC</i> <i>HFQPINITLQVYNTGPSTLPGSSVSISFPNRLSSGGAEMFHV</i> <i>QEMVVGQEKGNCSFQKNPTPCIPQEENIFHTIFAFFTKSG</i> <i>RKVLDCCKPGISCLTAHCNFSALAKEESRTIDIYMLLNTAIL</i> <i>KKDSSSVIQFMSRAKVKVDPALRVVEIAHGNPEEVTVVFE</i> <i>ALHNLEPRGYVVGWIIAISLLVGILIFLLAVLLWKMGGFR</i> <i>RRYKEIIEAEKNRKENEDSWDWWQKNQ</i>
56	DNA	5'RACE引物	GCCAGTGGATAGACTGATGG
57	DNA	5'RACE引物	GATGGATACAGTTGGTGCAGC
58	AA	HuK33N H链的信号肽	<i>MKCSWVIFFLMAVVTGVNS</i>
59	AA	HuK33N L链的信号肽	<i>MSVPTQLLGLLLLWLTDAAC</i>
60	AA	HuK33N 的成熟VH	<u>Q</u>VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYYYMNWVR QAPGQRLEWIGWIFPGSGNTKYNEKFKGKATLTADTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARSWVSYERGYYFDYWGQGT LTVSS
61	AA	HuK33N 的成熟VL	<u>D</u>IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYYSLAWYQQKPG KAPKLLIYNANSLEDGVPSRFSGSGGTQYTLTISSLQPEDF ATYYCKQAYDVPYTFGQGTKVEIK
62	DNA	HuK33N VH基因	CAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTTAAGAA GCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGG CTACAGCTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGACAGAGGCTTGAGTGGATTGGTTGGATCT TTCCTGGAAGTGGTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACACATCCGCCAG TACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGG AACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATCGTGGGTAGCT ACGAGAGGGGGTATTATTTGACTACTGGGGTCAAGGA ACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
63	DNA	HuK33N VL基因	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA TCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACATGTCGAGCAAG

[0172]

			TGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGA AGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCA AACAGCTTGGAAGATGGTGTCCCATCGAGGTCAGTGG CAGTGGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCA GCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAAC AGGCTTATGACGTTCCGTACACGTTTCGGACAAGGGACC AAGGTGGAAATCAAA
--	--	--	--

[0001]

序列表

<110> 株式会社遗传科技(Gene Techno Science Co., Ltd.)
科研制药株式会社(Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.)

<120> 人源化 K33N 单克隆抗体的生成、表达和表征

<130> PCT10-0006

<150> US 61/158,885

<151> 2009-03-10

<150> US 61/251,072

<151> 2009-10-13

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> OPN 粘附序列

<400> 1

Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 3

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 4

Ser Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 5

[0002]

Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 6

Ser Trp Val Ser Tyr Glu Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 423
<212> DNA
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 7
atgggatgga gctggatctt tctcttcttc ctgtcaggaa ctgcagggtt ccatgcccag 60
gtccaaactgc agcagtcctgg acctgagctg gtgaagcctg gggtctcagt gaagataatcc 120
tgcaaggctt ctggctacag ctttacaagt tactatatga attgggtgaa gaagaggcct 180
ggacagggac ttgagtggat tggttggatc ttctctggaa gttgtaatac taagtacaat 240
gagaagtcca agggcaagge cacactgacg gcagacacat cctccagtac agcctacatg 300
caggtcagca gccctgacatc tgaggactct gcagctctatt tctgtgcaag atcgtgggtt 360
agctacgaga ggggttatta ttttgactac tgggtgcaag gcaccagtct cacagtctcc 420
tca 423

<210> 8
<211> 141
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 8

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

Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

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

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

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

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

[0003]

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Trp Val Ser Tyr Glu Arg Gly Tyr Tyr Phe
115 120 125

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

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Trp Val Ser Tyr Glu Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 10

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

Val His Cys

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

[0004]

<400> 11

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 12

Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 13

Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14

<211> 381

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 14

atgagtgtgc ccactcaact ccctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga cgcaggatgt 60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctggctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
ctcacatgtc gagcaagiga gaacatttac tacagtttag catggtatca gcagaagcaa 180
gggaaatctc ctacagtcct gatctataat gcaaacagct tggaagatgg tgtcccatcg 240
aggttcagtg gcagtggtac tgggacacag tattctatga agatcaacag catgcagcct 300
gaagataccg caacttattt ctglaaacag gcttatgacg ttccglacac gttcggaggg 360
gggaccaagc tggaataaaa a 381

<210> 15

<211> 127

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 15

Met Ser Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15Asp Ala Gly Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
50 55 60

[0005]

Gln Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Met Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Met Gln Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Ala Tyr
100 105 110

Asp Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 16
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 16

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

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

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

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Met Lys Ile Asn Ser Met Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 17

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

Asp Ala Gly Cys
20

<210> 18
<211> 563
<212> DNA
<213> 人

[0006]

```

<400> 18
aaccacatcc ctctcagaa gccccagag cacaactcct taccatggac tggacctgga      60
ggatccctctt ttggiggca gcagccacag gtgcccactc ccagggtccag ctgtgtcagt      120
ctggggctga ggtaagaag cctggggcct cagtgaaggt ttcttgcaag gcttctggat      180
acaccttcac taactatgct ctgcattggg tgcgccaggc ccccgacaa aggetttagt      240
ggatgggatg gatcaacact ggcaatggta acacaaaata ttacagaag ttccaggga      300
gagtcacctt taccagtga acatcccgca gcacagccta catggagatg agcagcctga      360
gatctgaaga caggctgtg tattactgtg cgaggagcag tggctggtac gtttggttcg      420
acccctgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctctcagc ttccaccaag ggcccatcgg      480
ttttccctct ggccctctg tccaggagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc      540
tggtaagga ctacttccc gaa      563

```

```

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15

```

```

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

```

```

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 20
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
1           5           10

```

```

<210> 21
<211> 32
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 21
Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1           5           10           15

```

```

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

```

```

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 22
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1           5           10

```

[0007]

<210> 23
<211> 370
<212> DNA
<213> 人

<400> 23
cgctcagctc ctggggctcc tgctactctg gctccgaggt gccagatgig acatccagat 60
gacccagttc ccatcctccc tgtctgcatc tgiaggagac agagtcacca tcacttgccg 120
ggcaagtcag agcattagca gctattttaa ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc 180
taagctcctg atctatgctg catccagitt gcaaagtggg gtcccatcaa ggttcagtgg 240
cagtggatct gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc 300
aacttactac tgtcaacaga gttacagtac ccctcggacg ttcggccaag ggaccaaggt 360
ggaaatcaaa 370

<210> 24
<211> 23
<212> PRT
<213> 人

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<400> 25
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26
<211> 32
<212> PRT
<213> 人

<400> 26
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 27
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0008]

1	5	10	
<210>	28		
<211>	462		
<212>	DNA		
<213>	未知		
<220>			
<223>	包括信号肽的 HuK33N 的 VH		
<400>	28		
gggactagta ccacatgaa atgcagctgg gtatcttct tctgatggc agtggttaca		60	
ggggtaatt cacaggtcca actgggicag tctggagctg aggttaagaa gcctggggct		120	
tcagtgaagg ttctctgcaa ggcttcctggc tacagcttta caagtacta taigaattgg		180	
gtgcgccagg cccctggaca gaggtctgag tggattgggt ggatctttcc tggaaagggt		240	
aatactaagt acaatgagaa gttcaagggc aaggccacac tgacggcaga cacatccgcg		300	
agcacagcct acatggagct cagcagcctg agatctgagg acactgccgt ctattactgt		360	
gcaagatcgt gggtttagcta cgagaggggg tattattttg actactgggg tcaaggaacc		420	
ctggtcaccg tctctcagg tgagtctca caaagcttc cc		462	
<210>	29		
<211>	141		
<212>	PRT		
<213>	未知		
<220>			
<223>	包括信号肽的 HuK33N 的 VH		
<400>	29		
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly			
1 5 10 15			
Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys			
20 25 30			
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe			
35 40 45			
Thr Ser Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu			
50 55 60			
Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn			
65 70 75 80			
Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser			
85 90 95			
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val			
100 105 110			
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Val Ser Tyr Glu Arg Gly Tyr Tyr Phe			
115 120 125			
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			

[0009]

130	135	140
<210> 30 <211> 422 <212> DNA <213> 未知 <220> <223> 包括信号肽的 HuK33N 的 VL <400> 30 ggggctagca ccacatgag tgtgccact caactcctgg ggttgctgct gctgtggctt 60 acagacgcac gatgtgacat ccagatgact cagtctccat cctccctgtc tgcattgtg 120 ggagacagag tcacatcac atgtcgagca agtgagaaca ttactacag ttiagcatgg 180 tatcagcaga agccagggaa agcccctaag ctccctgatct ataatgcaa cagcttggaa 240 gatgggtgicc catcgaggtt cagtggcagt ggatctggga cacagtatac tctcaccatc 300 agcagcctgc agcctgaaga ttttgaact tattactgia aacaggctta tgacgttccg 360 tacacgttcg gacaagggac caaggtggaa atcaaacgig agtagaattt aaagaattcc 420 cc 422		
<210> 31 <211> 127 <212> PRT <213> 未知 <220> <223> 包括信号肽的 HuK33N 的 VL <400> 31 Met Ser Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr 1 5 10 15 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser 20 25 30 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn 35 40 45 Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro 50 55 60 Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser 65 70 75 80 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser 85 90 95 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Ala Tyr 100 105 110 Asp Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 115 120 125		
<210> 32		

[0010]

<211> 457
 <212> DNA
 <213> 未知

 <220>
 <223> 侧翼为 SpeI 和 HindIII 位点的 ChK33N VH 基因，
 包括侧翼为 SpeI 和 HindIII 位点的编码信号肽(1-57)的序列

 <400> 32
 actagtacca ccatgggatg gagctggatc ttctcttcc tctgtcagg aactgcaggt 60

 gtccattgcc aggtccaact gcagcagtct ggacctgagc tggagaagcc tggggcttca 120

 gtgaagatat cctgcaagc ttctggctac agctttacaa gtactatat gaattgggtg 180

 aagaagaggc ctggacaggg acttgagtgg atgggttga tcttccctgg aagtggtaat 240

 actaagtaca atgagaagtt caagggaag gccacactga cggcagacac atccaccagt 300

 acagcctaca tgcaggctag cagcctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttctgtgca 360

 agatcgtggg ttagctacga gagggggtat tttttgact actgggggtca aggcaccagt 420

 ctcacagtct cctcaggta gtccttaaaa caagctt 457

 <210> 33
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> 未知

 <220>
 <223> 侧翼为 NheI 和 EcoRI 位点的 ChK33N VL 基因，
 包括侧翼为 NheI 和 EcoRI 位点的编码信号肽(1-60)的序列

 <400> 33
 gctagcacca ccatgagtgt gccacacaa ctccctgggt tgctgctgct gtggcttaca 60

 gacgcaggat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctggctgc atctgtggga 120

 gaaactgtca ccctcacatg tcgagcaagt gagaacattt actacagttt agcatggtat 180

 cagcagaagc aagggaatc tctcagctc ctgatctata atgcaaacag ctiggaagat 240

 gggtgccat cgaggttcag tggcagtga tctgggacac agtattctat gaagatcaac 300

 agcatgcagc ctgaagatac cgcaacttat ttctgtaaac aggcattatga cgttccgtac 360

 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaacgtaagt agtcttctca gaattc 416

 <210> 34
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 未知

 <220>
 <223> 侧翼为 SpeI 和 HindIII 位点的 HuK33N VH 基因

 <400> 34
 actagtacca ccatgaaatg cagctgggtt atcttcttcc tgatggcagt ggttacaggg 60

 gtcaattcac aggtccaact ggtgcagtct ggagctgagg ttaagaagcc tggggcttca 120

 gtgaagggtt cctgcaagc ttctggctac agctttacaa gtactatat gaattgggtg 180

 cgccaggccc ctggacagag gcttgagtagg atgggttga tcttccctgg aagtggtaat 240

 actaagtaca atgagaagtt caagggaag gccacactga cggcagacac atccgccagt 300

 acagcctaca tggagctcag cagcctgaga tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgca 360

[0011]

agalcgiggg ltagctacga gagggggial lalillgaci acigggglica aggaacccig	420
gtcacccgtct cctcaggiga gtcttcacaa aagctt	456
<210> 35	
<211> 416	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> 侧翼为 NheI 和 EcoRI 位点的 HuK33N VL 基因	
<400> 35	
gctagcacca ccatgagigt gccactcaa ctccctgggt tgctgtctgt gtggcttaca	60
gacgcacgat gigacatcca gatgactcag tctccatcct ccctgtctgc atctgtggga	120
gacagagtca ccatcacatg tegagcaagt gagaacattt actacagttt agcatggat	180
cagcagaagc cagggaagc ccclaaagtc cigaiclaa algcaaacag ctiggaagal	240
ggtgtcccat cgaggttcag tggcagtgga tctgggacac agtatactct caccatcagc	300
agcctgcagc cigaagattt tgcaacitat tactgtaaac aggcctatga cgttccgtac	360
acgttcggac aagggaacca ggtggaaatc aaacgtgagt agaatttaaa gaattc	416
<210> 36	
<211> 1416	
<212> DNA	
<213> 未知	
<220>	
<223> pHuK33N 中的 HuK33N γ -1 重链	
<400> 36	
atgaaatgca gctgggttat cttcttcttg atggcagttg ttacaggggt caattcacag	60
gtccaacttg tgcagtcagg agctgaggtt aagaagccig gggcttcagt gaaggtttcc	120
tgcaaggctt ctggctacag ctttacaagt tactatatga attgggtgct ccaggcccct	180
ggacagagggc ttgagtggtt tggttggatc ttctctggaa gttgtaatac taagtacaat	240
gagaagttca agggcaaggc cactctgacg gcagacacat ccgccagtac agcctacatg	300
gagctcagca gccctgagtc tgaggacact gccgtctatt actgtgcaag atcgtgggtt	360
agctacgaga ggggttatta ttctgactac tgggtcaag gaaccttggt caccgtctcc	420
tcagcctcca ccaagggecc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcactct	480
gggggcacag cggccctggg ctgcttggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggt	540
tcgtggaacl caggcgcctt gaccagcggc gtcacaccl tcccggctgt cctacagtc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag	660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	720
cccaaattctt gtagcaaaac tcacacatgc ccaccgtgc cagcactga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	840
ccagaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagllcaac	900
tggtagcttg accggttgga ggtgcataat gccaaagcaa agccgcggga ggagcagtac	960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctct accgtctgc accaggactg gctgaatggc	1020

[0012]

```

aaggagtaca agtgcagggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc      1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgiaca ccctgcccc atcccgggat      1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac      1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagccctccc      1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg      1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttga caaccactac      1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga                                1416

```

<210> 37
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> HuK33N γ -1 重链

<400> 37

```

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

```

```

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30

```

```

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

```

```

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

```

```

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn
65           70           75           80

```

```

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

```

```

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

```

```

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Trp Val Ser Tyr Glu Arg Gly Tyr Tyr Phe
115          120          125

```

```

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

```

```

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145          150          155          160

```

```

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165          170          175

```

```

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180          185          190

```

[0013]

Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	195	200	205	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	210	215	220	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	225	230	235	240
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	245	250	255	
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	260	265	270	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	275	280	285	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	290	295	300	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	305	310	315	320
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	325	330	335	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	340	345	350	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	355	360	365	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	370	375	380	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	385	390	395	400
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	405	410	415	
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	420	425	430	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	435	440	445	
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	450	455	460	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										465	470		

[0014]

<210> 38
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 未知

 <220>
 <223> pHuK33N 中的 HuK33N κ 轻链

 <400> 38
 atgagtgtgc ccactcaact cciggggttg ctgctgtgtg ggcttacaga cgcacgatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 120
 atcacatgtc gagcaagiga gaacatttac tacagttag catggatca gcagaagcca 180
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaacagct tggaagatgg tgtcccatcg 240
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacacag tatactctca ccatcagcag cctgcagcct 300
 gaagattttg caacttatta ctgtaaagag gcttatgacg ttccgtacac gtccggacaa 360
 gggaccaagg tggaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgtgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gctacgcci gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagi gttag 705

<210> 39
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <223> HuK33N κ 轻链

<400> 39

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

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Ala Tyr
100 105 110

[0015]

Asp Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 40
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 带 SpeI 位点的用于 K33N VH 的 5' 引物

<400> 40
 gggactagta ccaccatggg atggagctgg atctttctc 39

<210> 41
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 带 HindIII 位点的用于 K33N VH 的 3' 引物

<400> 41
 ggggaagcttg tttaaggac tcacctgagg agactctgag actggtgcc 49

<210> 42
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 带 NheI 位点的用于 K33N VL 的 5' 引物

<400> 42
 ggggctagca ccaccatgag tgigcccaact caactcctg 39

<210> 43
 <211> 50
 <212> DNA

[0016]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	带 EcoRI 位点的用于 K33N VL 的 3' 引物	
<400>	43	
	ggggaaattct gagaagacta cttacgtttt atttccagct tggteccccc	50
<210>	44	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (CMV2)	
<400>	44	
	gaaccgtcag atcgcttggg gacg	24
<210>	45	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (JNT026)	
<400>	45	
	tgaagaatga gctggaggac	20
<210>	46	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (JNT080)	
<400>	46	
	gaactgttggc tgcaccatc	19
<210>	47	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (JNT082)	
<400>	47	
	ctttcttgtc cacccttggcg	20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 (JNT084)	
<400>	48	
	gttgaagctc tttgtgacgg	20
<210>	49	
<211>	19	
<212>	DNA	

[0017]

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物(JNT097)	
<400> 49	
gctgtcctac agtcctcag	19
<210> 50	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物(JNT098)	
<400> 50	
acgtgccaaag catcctcg	18
<210> 51	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GeneRacer 5' 引物	
<400> 51	
cgactggagc acgaggacac tga	23
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于 PCR 扩增重链可变区(VH)的 3' 引物	
<400> 52	
gccagtggat agacagatgg	20
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用于 PCR 扩增轻链可变区(VL)的 3' 引物	
<400> 53	
gatggataca gtgggtgcag c	21
<210> 54	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 未知	
<220>	
<223> Tenascin-C 33-35	
<400> 54	
Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu	
1 5	
<210> 55	

[0018]


```

<211> 1035
<212> PRT
<213> 人

<400> 55

Met Gly Gly Pro Ala Ala Pro Arg Gly Ala Gly Arg Leu Arg Ala Leu
1          5          10          15

Leu Leu Ala Leu Val Val Ala Gly Ile Pro Ala Gly Ala Tyr Asn Leu
          20          25          30

Asp Pro Gln Arg Pro Val His Phe Gln Gly Pro Ala Asp Ser Phe Phe
          35          40          45

Gly Tyr Ala Val Leu Glu His Phe His Asp Asn Thr Arg Trp Val Leu
          50          55          60

Val Gly Ala Pro Lys Ala Asp Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Val Lys Ser
65          70          75          80

Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Asp Arg Arg
          85          90          95

Cys Thr Glu Leu Asp Met Ala Arg Gly Lys Asn Arg Gly Thr Ser Cys
          100          105          110

Gly Lys Thr Cys Arg Glu Asp Arg Asp Asp Glu Trp Met Gly Val Ser
          115          120          125

Leu Ala Arg Gln Pro Lys Ala Asp Gly Arg Val Leu Ala Cys Ala His
          130          135          140

Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile Leu Pro His Gly
145          150          155          160

Phe Cys Tyr Ile Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Arg Thr Leu
          165          170          175

Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu Glu His Gly
          180          185          190

Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu Leu Val Val
          195          200          205

Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Ile Lys Val Leu
          210          215          220

Asn Leu Thr Asp Asn Thr Tyr Leu Lys Leu Asn Asp Glu Val Ile Met
225          230          235          240

Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala Gly His Phe
          245          250          255

Ser His Pro Ser Thr Ile Asp Val Val Gly Gly Ala Pro Gln Asp Lys
          260          265          270

```

[0019]

Gly	Ile	Gly	Lys	Val	Tyr	Ile	Phe	Arg	Ala	Asp	Arg	Arg	Ser	Gly	Thr	275	280	285	
Leu	Ile	Lys	Ile	Phe	Gln	Ala	Ser	Gly	Lys	Lys	Met	Gly	Ser	Tyr	Phe	290	295	300	
Gly	Ser	Ser	Leu	Cys	Ala	Val	Asp	Leu	Asn	Gly	Asp	Gly	Leu	Ser	Asp	305	310	315	320
Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Glu	Ile	Arg	Asp	Glu	Gly	Gln	325	330	335	
Val	Thr	Val	Tyr	Ile	Asn	Arg	Gly	Asn	Gly	Ala	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	340	345	350	
Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Gly	Ala	Tyr	Asn	Ala	His	Phe	Gly	Glu	Ser	Ile	355	360	365	
Ala	Ser	Leu	Asp	Asp	Leu	Asp	Asn	Asp	Gly	Phe	Pro	Asp	Val	Ala	Ile	370	375	380	
Gly	Ala	Pro	Lys	Glu	Asp	Asp	Phe	Ala	Gly	Ala	Val	Tyr	Ile	Tyr	His	385	390	395	400
Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Ile	Val	Pro	Gln	Tyr	Ser	Met	Lys	Leu	Ser	Gly	405	410	415	
Gln	Lys	Ile	Asn	Pro	Val	Leu	Arg	Met	Phe	Gly	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	420	425	430	
Gly	Ile	Asp	Met	Asp	Gly	Asn	Gly	Tyr	Pro	Asp	Val	Thr	Val	Gly	Ala	435	440	445	
Phe	Met	Ser	Asp	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Arg	Pro	Val	Ile	Thr	450	455	460	
Val	Asp	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Pro	Gly	Ser	Ile	Asn	Ile	Thr	Ala	Pro	465	470	475	480
Gln	Cys	His	Asp	Gly	Gln	Gln	Pro	Val	Asn	Cys	Leu	Asn	Val	Thr	Thr	485	490	495	
Cys	Phe	Ser	Phe	His	Gly	Lys	His	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Gly	Leu	Asn	500	505	510	
Tyr	Val	Leu	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Glu	Lys	Gly	Gln	Met	Pro	515	520	525	
Arg	Val	Tyr	Phe	Val	Leu	Leu	Gly	Glu	Thr	Met	Gly	Gln	Val	Thr	Glu	530	535	540	
Lys	Leu	Gln	Leu	Thr	Tyr	Met	Glu	Glu	Thr	Cys	Arg	His	Tyr	Val	Ala	545	550	555	560

[0020]

His Val Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Ile Ser Pro Ile Val Phe Glu		
565	570	575
Ala Ala Tyr Ser Leu Ser Glu His Val Thr Gly Glu Glu Glu Arg Glu		
580	585	590
Leu Pro Pro Leu Thr Pro Val Leu Arg Trp Lys Lys Gly Gln Lys Ile		
595	600	605
Ala Gln Lys Asn Gln Thr Val Phe Glu Arg Asn Cys Arg Ser Glu Asp		
610	615	620
Cys Ala Ala Asp Leu Gln Leu Gln Gly Lys Leu Leu Leu Ser Ser Met		
625	630	635
640		
Asp Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Ala Leu Gly Ala Val Lys Asn Ile Ser		
645	650	655
Leu Asn Ile Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Asp Ala Tyr Asp Ala Asn		
660	665	670
Val Ser Phe Asn Val Ser Arg Glu Leu Phe Phe Ile Asn Met Trp Gln		
675	680	685
Lys Glu Glu Met Gly Ile Ser Cys Glu Leu Leu Glu Ser Asp Phe Leu		
690	695	700
Lys Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr Glu		
705	710	715
720		
Phe Ser Val Ile Phe Asp Thr Ser His Leu Ser Gly Glu Glu Glu Val		
725	730	735
Leu Ser Phe Ile Val Thr Ala Gln Ser Gly Asn Thr Glu Arg Ser Glu		
740	745	750
Ser Leu His Asp Asn Thr Leu Val Leu Met Val Pro Leu Met His Glu		
755	760	765
Val Asp Thr Ser Ile Thr Gly Ile Met Ser Pro Thr Ser Phe Val Tyr		
770	775	780
Gly Glu Ser Val Asp Ala Ala Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Leu Glu		
785	790	795
800		
Cys His Phe Gln Pro Ile Asn Ile Thr Leu Gln Val Tyr Asn Thr Gly		
805	810	815
Pro Ser Thr Leu Pro Gly Ser Ser Val Ser Ile Ser Phe Pro Asn Arg		
820	825	830
Leu Ser Ser Gly Gly Ala Glu Met Phe His Val Gln Glu Met Val Val		
835	840	845

[0021]

Gly Gln Glu Lys Gly Asn Cys Ser Phe Gln Lys Asn Pro Thr Pro Cys
850 855 860

Ile Ile Pro Gln Glu Gln Glu Asn Ile Phe His Thr Ile Phe Ala Phe
865 870 875 880

Phe Thr Lys Ser Gly Arg Lys Val Leu Asp Cys Glu Lys Pro Gly Ile
885 890 895

Ser Cys Leu Thr Ala His Cys Asn Phe Ser Ala Leu Ala Lys Glu Glu
900 905 910

Ser Arg Thr Ile Asp Ile Tyr Met Leu Leu Asn Thr Glu Ile Leu Lys
915 920 925

Lys Asp Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ser Arg Ala Lys Val Lys
930 935 940

Val Asp Pro Ala Leu Arg Val Val Glu Ile Ala His Gly Asn Pro Glu
945 950 955 960

Glu Val Thr Val Val Phe Glu Ala Leu His Asn Leu Glu Pro Arg Gly
965 970 975

Tyr Val Val Gly Trp Ile Ile Ala Ile Ser Leu Leu Val Gly Ile Leu
980 985 990

Ile Phe Leu Leu Leu Ala Val Leu Leu Trp Lys Met Gly Phe Phe Arg
995 1000 1005

Arg Arg Tyr Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys Glu
1010 1015 1020

Asn Glu Asp Ser Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln
1025 1030 1035

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5' RACE 引物

<400> 56
gccagtggat agactgatgg 20

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 5' RACE 引物

<400> 57
gatggataca gttggtgcag c 21

[0022]

<210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> HuK33N H 链的信号肽

<400> 58

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

Val Asn Ser

<210> 59
<211> 20
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> HuK33N L 链的信号肽

<400> 59

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

Asp Ala Arg Cys
20

<210> 60
<211> 122
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> HuK33N 的成熟 VH

<400> 60

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

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

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

[0023]

Ala Arg Ser Trp Val Ser Tyr Glu Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 61
<211> 107
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> HuK33N 的成熟 VL

<400> 61

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

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

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

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 62
<211> 366
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HuK33N VH 基因

<400> 62
caggtccaac tgggtgcagtc tggagctgag gttagaagc ctggggcttc agtgaaggtt 60
tcttgcaagg cttctggcta cagctttaca agttactata tgaattgggt gcgccaggcc 120
cctggacaga ggcttgagtg gattgggttg atctttcctg gaagtggtaa tactaagtac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg acggcagaca catccgccag tacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag atctgaggac actgccgtct attactgtgc aagatcgtgg 300
gttagctacg agagggggta ttattttgac tactggggtc aaggaaccct ggtcacgctc 360
tcttca 366

<210> 63
<211> 321

[0024]

<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HuK33N VL 基因

<400> 63
gacatccaga tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaacatttac tacagttag catggatca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaacagct tggaagatgg tgtcccatcg 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacacag tatactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtaaacag gcitatgacg ttccgtacac gttcggacaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

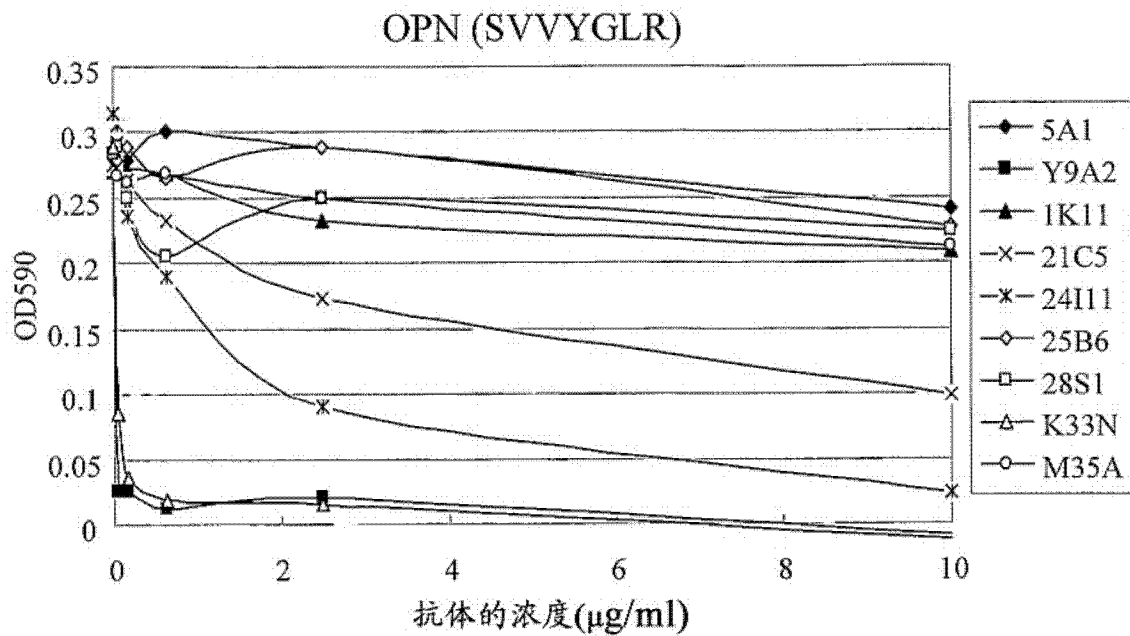


图 1

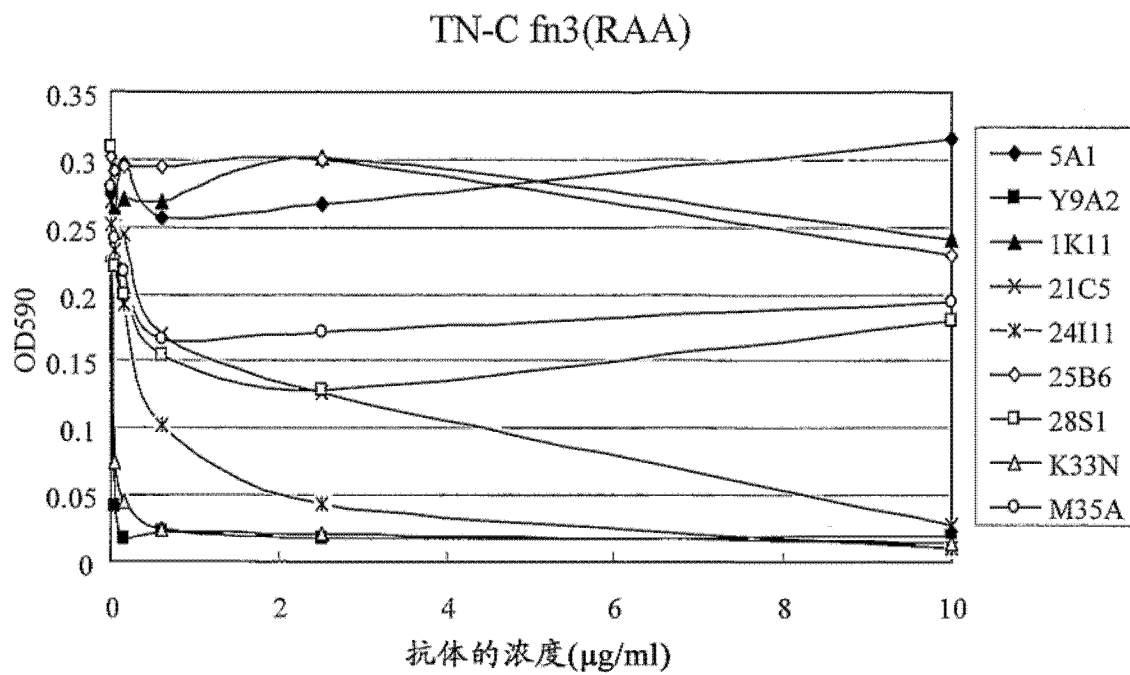


图 2

ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCATTGCCAG
 M G W S W I F L F L L S G T A G V H C Q
 GTCCAACTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC
 V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S
 TGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTGAAGAAGAGGCCT
 C K A S G Y S F T S Y Y M N W V K K R P
 GGACAGGGACTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTTCTGGAAGTGGTAATACTAAGTACAAT
 G Q G L E W I G W I F P G S G N T K Y N
 GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACACATCCTCCAGTACAGCCTACATG
E K F K G K A T L T A D T S S S T A Y M
 CAGGTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGATCGTGGGTT
 Q V S S L T S E D S A V Y F C A R S W V
 AGCTACGAGAGGGGGTATTATTTTGACTACTGGGGTCAAGGCACCAGTCTCACAGTCTCC
S Y E R G Y Y F D Y W G Q G T S L T V S
 TCA
 S

图 3

ATGAGTGTGCCCCTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGCAGGATGT
 M S V P T Q L L G L L L L W L T D A G C
 GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACC
D I Q M T Q S P A S L A A S V G E T V T
 CTCACATGTGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCAA
 L T C R A S E N I Y Y S L A W Y Q Q K Q
 GGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGGAAGATGGTGTCCCATCG
 G K S P Q L L I Y N A N S L E D G V P S
 AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATTCTATGAAGATCAACAGCATGCAGCCT
 R F S G S G S G T Q Y S M K I N S M Q P
 GAAGATACCGCAACTTATTTCTGTAAACAGGCTTATGACGTTCCGTACACGTTCCGAGGG
 E D T A T Y F C K Q A Y D V P Y T F G G
 GGGACCAAGCTGGAAATAAAA
 G T K L E I K

图 4

SpeI
ACTAGTACCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGT
 M G W S W I F L F L L S G T A G

GTCCATTGCCAGGTCCAACCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCA
 V H C Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S

GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTG
 V K I S C K A S G Y S F T S Y Y M N W V

AAGAAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTTCCTGGAAGTGGTAAT
 K K R P G Q G L E W I G W I F P G S G N

ACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACACATCCTCCAGT
T K Y N E K F K G K A T L T A D T S S S

ACAGCCTACATGCAGGTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCA
 T A Y M Q V S S L T S E D S A V Y F C A

AGATCGTGGGTTAGCTACgAGAGGGGGTATTATTTTGGACTACTGGGGTCaAGGCACCAGT
 R S W V S Y E R G Y Y F D Y W G Q G T S

HindIII
 CTCACAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTTAAAACAAGCTT
 L T V S S

图 5

NheI
GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACA
 M S V P T Q L L G L L L L W L T

GACGCAGGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGTGGGA
 D A G C D I Q M T Q S P A S L A A S V G

GAAACTGTCACCCTCACATGTCGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTAT
 E T V T L T C R A S E N I Y Y S L A W Y

CAGCAGAAGCAAGGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGGAAGAT
 Q Q K Q G K S P Q L L I Y N A N S L E D

GGTGTCCCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATTCTATGAAGATCAAC
 G V P S R F S G S G S G T Q Y S M K I N

AGCATGCAGCCTGAAGATACCGCAACTTATTTCTGTAAACAGGCTTATGACGTTCCGTAC
 S M Q P E D T A T Y F C K Q A Y D V P Y

EcoRI
 ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTAAGTAGTCTTCTCAGAATTC
T F G G G T K L E I K

图 6

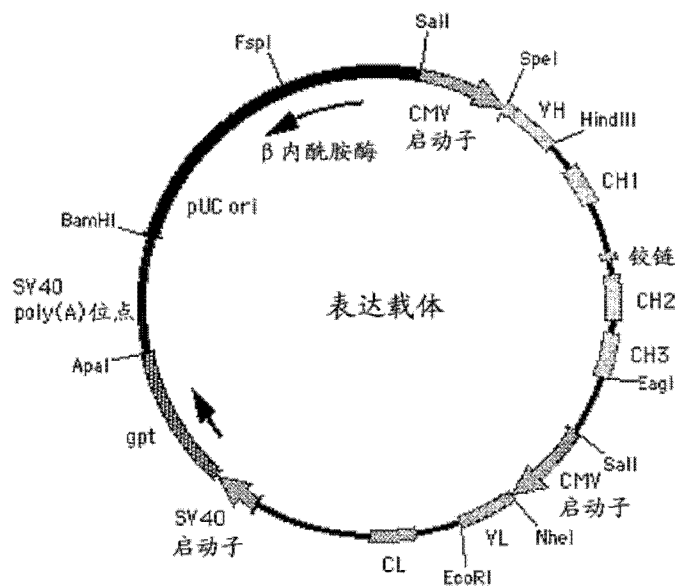


图 7

	1	2	3	4
K33N	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
HuK33N	QVQLQQSGP	ELVKPGASVK	ISCKASGYSF	TSYYMNWVKK
DA980102	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	TSYYMNWVRQ
				APGQRLEWIG
	5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
	a			abc
K33N	WIFPGSGNTKY	NEKFKGKATL	TADTSSSTAY	MQVSSLTSEDSAV
HuK33N	WIFPGSGNTKY	NEKFKGKATL	TADTSASTAY	MELSSLRSED ^u TAV
DA980102	-----	-----RVTL	TSDTSASTAY	MEMSSLRSED ^u TAV
	1	1		
	9	0	1	
	0123456789	000000123456789	0123	
	abcde			
K33N	YFCARSWVSY	ERGYFFDYWGQGTSL	TVSS	
HuK33N	YYCARSWVSY	ERGYFFDYWGQGTSLV	TVSS	
DA980102	YYCAR-----	-----WGQGTSLV	TVSS	

图 8

	1	2	3	
	123456789	0123456789	0123456789 0123456789	
K33N VL	DIQMTQSPA	SLAASVGETV	TLTCRASENI <u>YYSLAWYQQK</u>	
HuK33N VL	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASENI <u>YYSLAWYQQK</u>	
X72441	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITC----- -----WYQQK	
	4	5	6	7
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
K33N VL	QGKSPQLLIY	<u>NANSLEDGVP</u>	SRFSGSGSGT	QYSMKINSMQ
HuK33N VL	PGKAPKLLIY	<u>NANSLEDGVP</u>	SRFSGSGSGT	<u>QYTLTISSLQ</u>
X72441	PGKAPKLLIY	-----GVP	SRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ
		1		
	8	9	0	
	0123456789	0123456789	01234567	
K33N VL	PEDTATYFCK	<u>QAYDVPYTFG</u>	GGTKLEIK	
HuK33N VL	PEDFATYYCK	<u>QAYDVPYTFG</u>	QGTKVEIK	
X72441	PEDFATYYC-	-----FG	QGTKVEIK	

图 9

JNJ120 GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGC
 JNJ137 GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTT
 JNJ145 TCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTC
 JNJ148 GGGAAAGCTTTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCTTGACC
 JNJ149 GGGAAAGCTTTTGTGAGGACTC
 JNJ151 AGACTGCACCAGTTGGACCTGTGAATTGACCCCTGTAACCACTGCCATCAGGAAGAA
 JNJ152 CAGGTCCAACCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 JNJ153 ACTTGTAAGCTGTAGCCAGAAGCCTTGCAGGAAACCTTCACTGAAGCCCCAGGCTT
 JNJ154 TCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGACAGAGG
 JNJ155 ACCACTTCCAGGAAAGATCCAACCAATCCACTCAAGCCTCTGTCCAGGGGCTGGCG
 JNJ156 TGGATCTTTCTTGGAGTGGTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACA
 JNJ157 CATGTAGGCTGTACTGGCGGATGTGTCTGCCGTCAAGTGTGGCCTTGCCCTTGAACCT
 JNJ158 CCTCTCGTAGCTAACCACGATCTTGCACAGTAATAGACTGCAGTGTCTCAGATCT
 JNJ159 TCGTGGGTTAGCTACGAGAGGGGTATTATTTTACTACTGGGTCAGGAACCCCTGGTC

图 10

JNJ150 GGGGCTAGCACCACCATGAGT
 JNJ126 GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGG
 JNJ127 AGACTGAGTCATCTGGATGTCACATCGTGCGTCTGTAAAGCCACAGCAGCAGCAACCCAG
 JNJ128 GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGA
 JNJ129 GTAAATGTTCTCACTTGCTCGACATGTGATGGTGAAGTCTGTCTCCACAGATGCAGA
 JNJ130 CGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAA
 JNJ131 CAAGCTGTTTGCATTATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGCTTCTGCTGATA
 JNJ132 ATCTATAATGCAAACAGCTTGAAGATGGTGTCCCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGA
 JNJ133 CAGGCTGCTGATGGTGAGAGTATACTGTGTCCAGATCCACTGCCACTGAACCTCGA
 JNJ134 ACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAG
 JNJ135 GGTCCCTTGTCCGAACGTGTACGGAACGTGATAAGCCTGTTTACAGTAATAAGTTGC
 JNJ136 TACACGTTTCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAGTAG
 JNJ101 GGGGAATTCTTTAAATTTACTACGTTTGATTTCCTA
 JNJ117 GGGGAATTCTTTAAATTTCTA

图 11

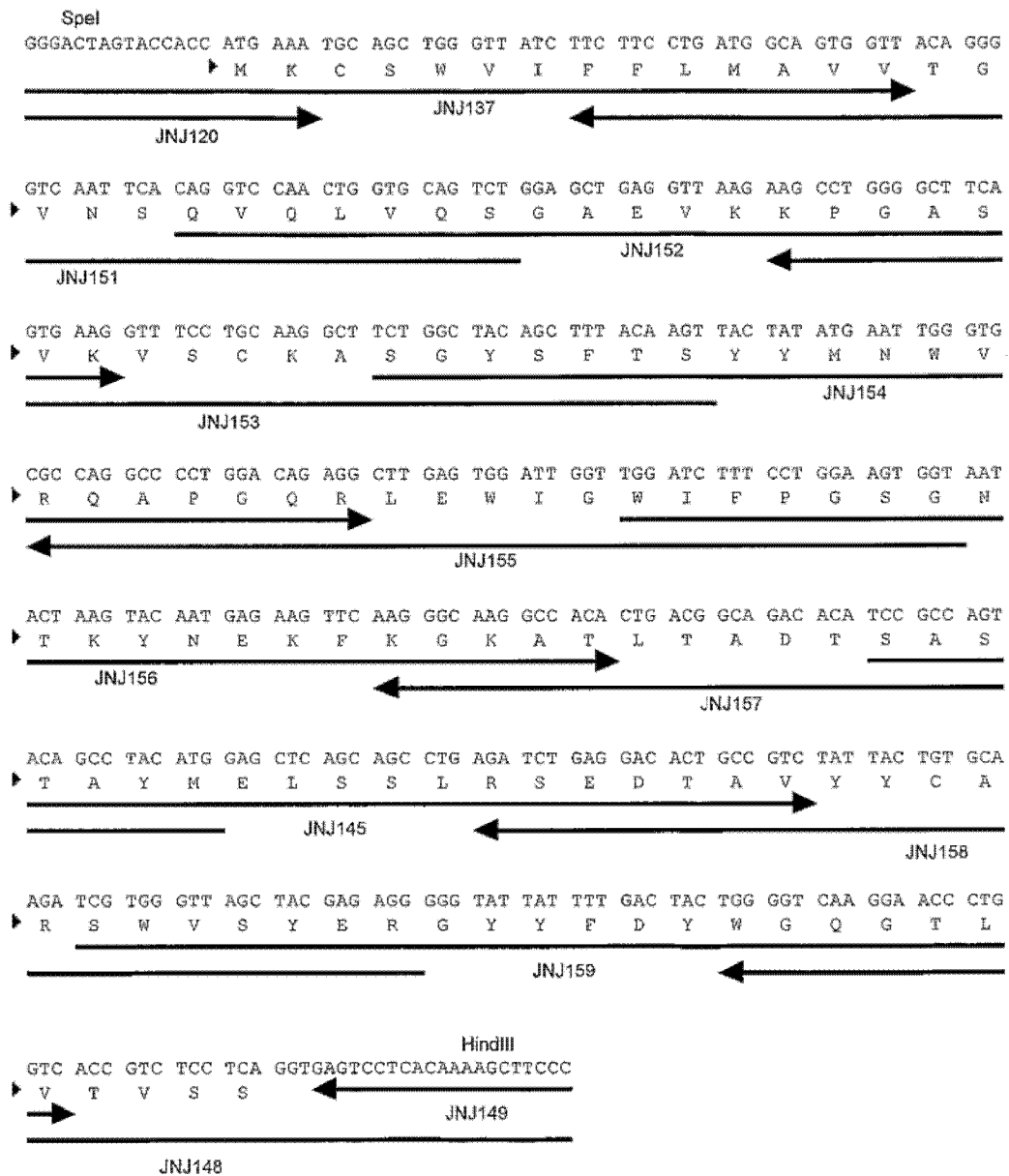


图 12

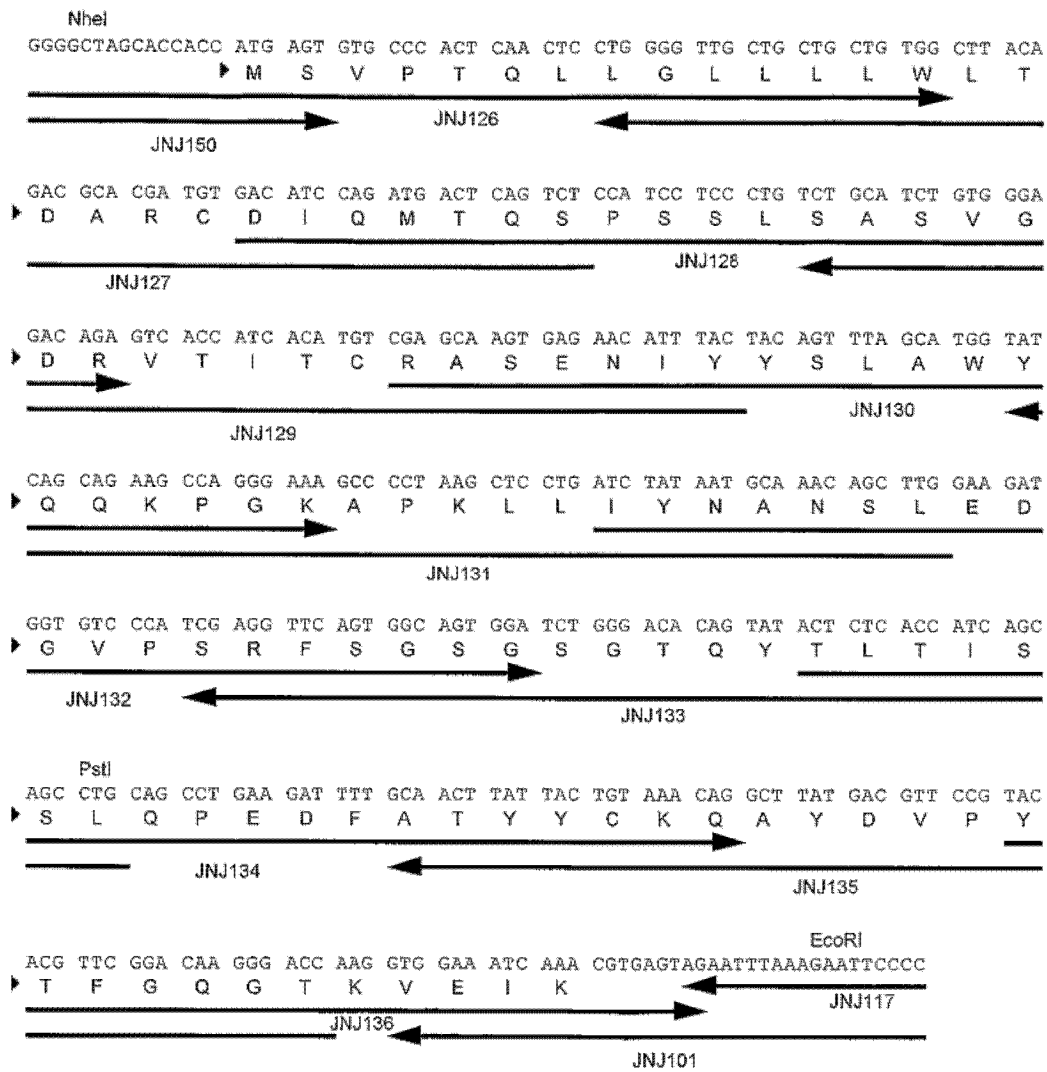


图 13

SpeI
ACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGG
 M K C S W V I F F L M A V V T G

GTCAATTCACAGGTCCAAGTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCA
 V N S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

GTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTG
 V K V S C K A S G Y S F T S Y Y M N W V

CGCCAGGCCCTGGACAGAGGCTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTTCCTGGAAGTGGTAAT
 R Q A P G Q R L E W I G W I F P G S G N

ACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACACATCCGCCAGT
T K Y N E K F K G K A T L T A D T S A S

ACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCA
 T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A

AGATCGTGGGTTAGCTACGAGAGGGGGTATTATTTGACTACTGGGGTCAAGGAACCTG
 R S W V S Y E R G Y Y F D Y W G Q G T L

HindIII
 GTCACCGTCTCCTCAGGTGAGTCCTCACAAAAGCTT
 V T V S S

图 14

NheI
GCTAGCACCAACCATGAGTGTGCCCCTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACA
 M S V P T Q L L G L L L L W L T

GACGCACGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGA
 D A R C D I Q M T Q S P S S L S A S V G

GACAGAGTCACCATCACATGTGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTAT
 D R V T I T C R A S E N I Y Y S L A W Y

CAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGAAGAT
 Q Q K P G K A P K L L I Y N A N S L E D

GGTGTCCCATCGAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGC
 G V P S R F S G S G S G T Q Y T L T I S

AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAGGCTTATGACGTTCCGTAC
 S L Q P E D F A T Y Y C K Q A Y D V P Y

EcoRI
 ACGTTCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAGTAGAATTTAAAGAATTC
T F G Q G T K V E I K

图 15

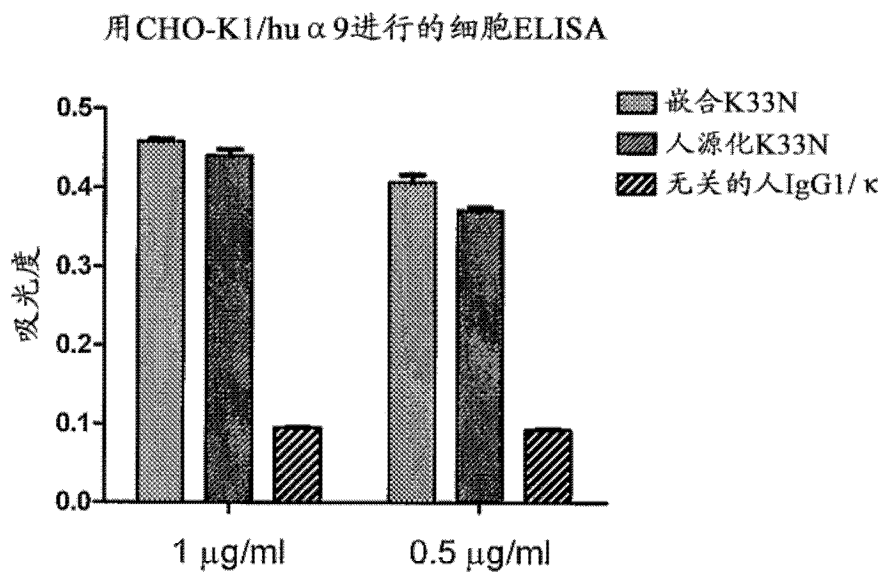


图 16

CMV2	GAACCGTCAGATCGCCTGGAGACG
JNT026	TGAAAGATGAGCTGGAGGAC
JNT080	GAAGTGTGGCTGCACCATC
JNT082	CTTTCTTGTCCACCTTGGTG
JNT084	GTTGAAGCTCTTTGTGACGG
JNT097	GCTGTCCTACAGTCCTCAG
JNT098	ACGTGCCAAGCATCCTCG

图 17

ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTCACAG
M K C S W V I F F L M A V V T G V N S Q
GTCCAACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTTTC
V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
TGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACAAGTTACTATATGAATTGGGTGCGCCAGGCCCT
C K A S G Y S F T S Y Y M N W V R Q A P
GGACAGAGGCTTGAGTGGATTGGTTGGATCTTTCCTGGAAGTGGTAATACTAAGTACAAT
G Q R L E W I G W I F P G S G N T K Y N
GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACACATCCGCCAGTACAGCCTACATG
E K F K G K A T L T A D T S A S T A Y M
GAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGATCGTGGGT
E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S W V
AGCTACGAGAGGGGGTATTATTTTACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACCGTCTCC
S Y E R G Y Y F D Y W G Q G T L V T V S
TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S
GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAG
S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGG
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G
GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
G P S V F L F P P K P K D T L M I S T
CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC
K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT
S K A C A G A Q P R E P Q V Y T L P P S R D
GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGG
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R
TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
T Q K S L S L S P G K •

图 18

```

ATGAGTGTGCCCCTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGCACGATGT
M S V P T Q L L G L L L L W L T D A R C
GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACC
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
ATCACATGTGCGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCA
I T C R A S E N I Y Y S L A W Y Q Q K P
GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGGAAGATGGTGTCCCATCG
G K A P K L L I Y N A N S L E D G V P S
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
R F S G S G S G T Q Y T L T I S S L Q P
GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAGGCTTATGACGTTCCGTACACGTTCCGGACAA
E D F A T Y Y C K Q A Y D V P Y T F G Q
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAG
P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
L S S P V T K S F N R G E C •

```

图 19

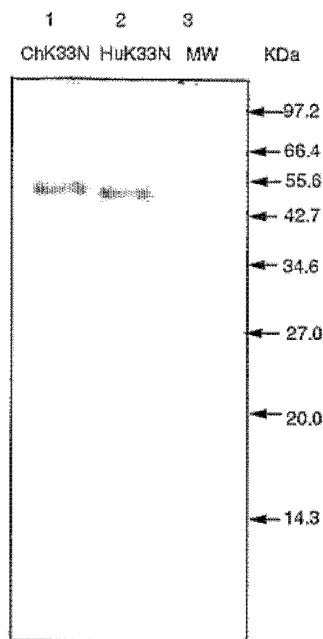


图 20

小鼠K33N对CHO/hua9的结合

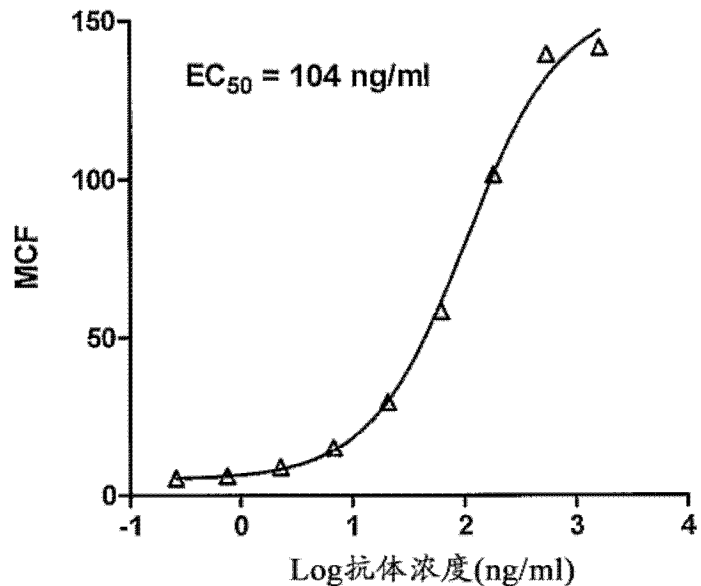


图 21

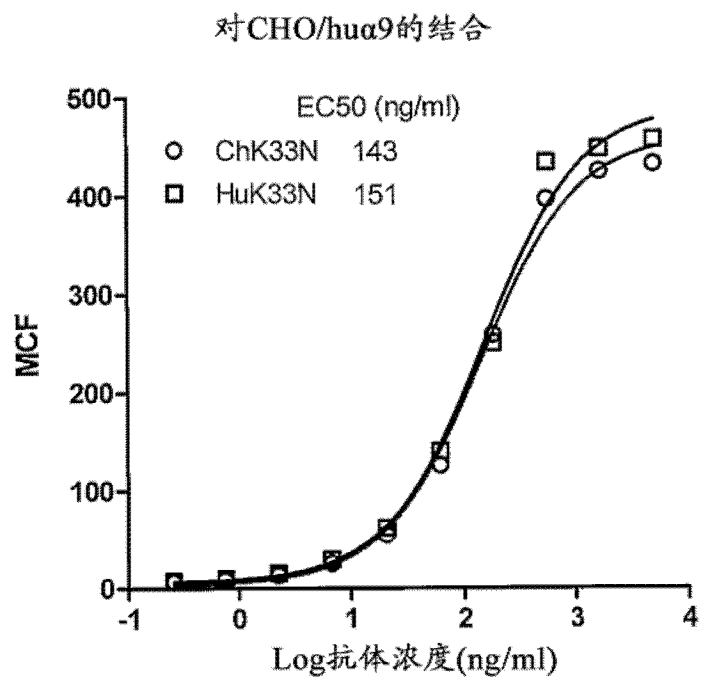


图 22

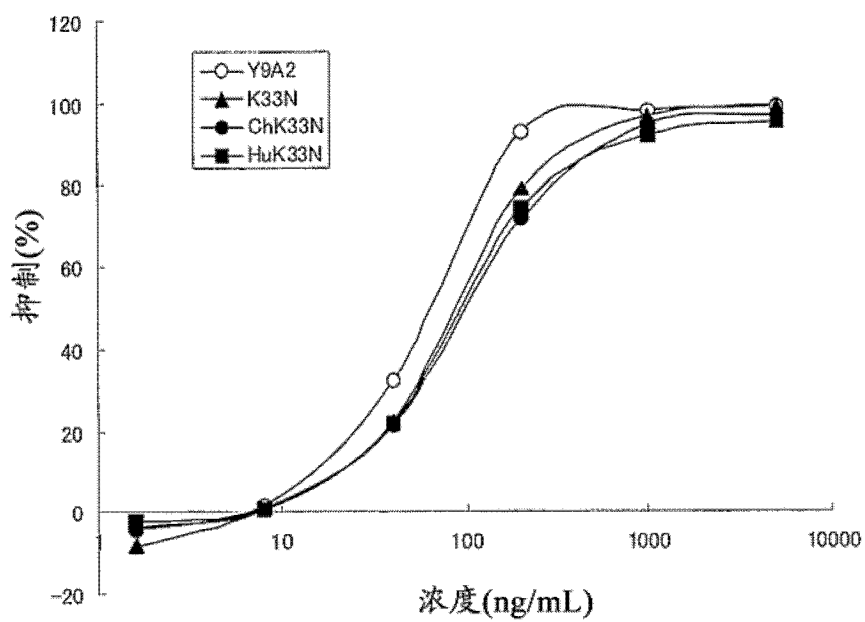


图 23