



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101918555 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200980102026. 4

代理人 罗天乐

(22) 申请日 2009. 01. 13

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/020, 527 2008. 01. 11 US

C12N 15/09 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 12

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/050606 2009. 01. 13

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02009/088105 EN 2009. 07. 16

C12P 21/08 (2006. 01)

G01N 33/563 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

FERM BP-10510 2006. 02. 15

FERM BP-10511 2006. 02. 15

FERM BP-10512 2006. 02. 15

FERM BP-10513 2006. 02. 15

FERM BP-10832 2007. 05. 29

(56) 对比文件

CN 101103044 A, 2008. 01. 09,

CN 101506239 A, 2009. 08. 12,

EP 1840135 A1, 2007. 10. 03,

审查员 徐俊

(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 尚卡·库马 曹仲欣 鹤下直也

今重之

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

权利要求书2页 说明书42页

序列表30页 附图18页

(54) 发明名称

人源化抗整联蛋白 $\alpha 9$ 抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体。这些抗体中的一些可以抑制整联蛋白 $\alpha 9$ 的生物学功能,从而显示对多种与整联蛋白 $\alpha 9$ 有关的病症或疾病具有治疗作用,这些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(溃疡性大肠炎和克罗恩氏病)、自身免疫性疾病等。

1. 一种可免疫特异性地识别人 α 9 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,其包括:

(i)H 链,其包含人抗体 VH 区的四个 FRH,以及可免疫特异性地识别人 α 9 整联蛋白的非人类抗体的三个 CDRH;和

(ii)L 链,其包含人抗体 VL 区的四个 FRL,以及可免疫特异性地识别人 α 9 整联蛋白的非人类抗体的三个 CDRL;

其中所述人源化抗体的 CDRH 由氨基酸序列 SEQ ID NO:4、5 和 6 组成,并且所述人源化抗体的 CDRL 由氨基酸序列 SEQ ID NO:11、12 和 13 组成,

其中抗原结合片段是单链抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段或二硫键连接的 Fvs,

其中所述人抗体 VH 区的 FRH 由氨基酸序列 SEQ ID NO:19、20、21 和 22 组成,并且所述人抗体 VL 区的 FRL 由氨基酸序列 SEQ ID NO:24、25、26 和 27 组成。

2. 一种可免疫特异性地识别人 α 9 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述 H 链的可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO:29 组成,并且所述 L 链的可变区由氨基酸序列 SEQ ID NO:31 组成。

3. 一种分离的核酸分子,由编码人源化抗体的 H 链的核苷酸序列及编码人源化抗体的 L 链的核苷酸序列组成,其中所述人源化抗体是根据权利要求 1 或 2 的抗体。

4. 一种分离的核酸分子,其由编码氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的核苷酸序列和编码氨基酸序列 SEQ ID NO:31 核苷酸序列组成。

5. 权利要求 4 的核酸分子,其中所述核苷酸序列由核苷酸序列 SEQ ID NO:28 和核苷酸序列 SEQ ID NO:30 组成。

6. 一种核酸分子,其由

(i) 编码氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的核苷酸序列和编码氨基酸序列 SEQ ID NO:31 的核苷酸序列;或

(ii) 核苷酸序列 SEQ ID NO:28 和核苷酸序列 SEQ ID NO:30;

以及编码信号肽的核苷酸序列组成。

7. 权利要求 6 的核酸分子,其中所述编码氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的核苷酸序列或者核苷酸序列 SEQ ID NO:28 的信号肽由氨基酸序列 SEQ ID NO:10 组成。

8. 权利要求 6 的核酸分子,其中所述编码氨基酸序列 SEQ ID NO:31 的核苷酸序列或者核苷酸序列 SEQ ID NO:30 的信号肽由氨基酸序列 SEQ ID NO:17 组成。

9. 一种载体,其包含权利要求 3~8 中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子与一个或多个调节元件可操作地连接。

10. 一种分离的宿主细胞,其包含权利要求 9 的载体。

11. 一种制备人源化抗体或其抗原结合片段的方法,包括在所述人源化抗体或其抗原结合片段得以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。

12. 一种药物组合物,其包含权利要求 1~2 中任一项的人源化抗体或其抗原结合片段以及可药用的载体。

13. 权利要求 1~2 中任一项的人源化抗体或其抗原结合片段在制备用于预防或治疗与 α 9 整联蛋白有关的病症或疾病的药物中的用途。

14. 权利要求 1~2 中任一项的人源化抗体或其抗原结合片段在制备用于体内诊断与

α 9 整联蛋白有关的病症或疾病的诊断试剂中的用途。

人源化抗整联蛋白 $\alpha 9$ 抗体及其应用

[0001] 1. 发明领域

[0002] 本发明涉及可免疫特异性地识别人整联蛋白 $\alpha 9$ 的人源化抗体,并涉及它们在治疗和诊断各种与整联蛋白 $\alpha 9$ 有关或涉及整联蛋白 $\alpha 9$ 的疾病或病症中的应用,这些病症或疾病包括癌症、炎症性疾病、自身免疫性疾病等。

[0003] 2. 发明背景

[0004] 细胞在一群称作整联蛋白 (integrins) 的细胞表面受体的介导下粘附于细胞外基质 (下文简称作 ECM)。整联蛋白通过形成 α 和 β 链的 1 : 1 异源二聚体而发挥其功能。迄今为止,已经鉴定和确认了至少 18 种 α 链、8 种 β 链和 24 种 $\alpha \beta$ 异源二聚体。已知每种整联蛋白识别一种特异的配体。根据整联蛋白的配体特异性或功能将整联蛋白归为多个亚家族,并将它们分为存在于纤连蛋白、玻连蛋白等内的胶原蛋白受体、层粘连蛋白受体、识别 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列的 RGD 受体,和仅存在于白细胞内的白细胞特异受体 (Hynes, R. O., 2002, Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell 110 : 673-87 ; Miyasaka, M., 2000, New edition of Adhesion Molecule Handbook, Shuinsya)。 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白是一个不属于上述任何类型的亚家族的成员,该亚家族称作 $\alpha 4$ 整联蛋白亚家族 (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)。迄今为止 ECM 被认为仅发挥细胞间的粘合物质 (cementing substance) 的作用。现在已经清楚,整联蛋白介导的 ECM-细胞相互作用显著地参与了细胞生长、粘附、移动等的调节,并与多种疾病的发生有关,包括癌症的进展、炎症加重等。

[0005] 例如,骨桥蛋白 (osteopontin) (下文简称作 OPN),一种 ECM,是一种分泌型酸性磷酸化糖蛋白,分子量为大约 41kDa,该分子的表达被广泛发现于乳汁、尿液、肾小管、破骨细胞、成骨细胞、巨噬细胞、活化的 T 细胞、肿瘤组织等。OPN 具有 : 粘附序列 GRGDS (SEQ ID NO : 1),位于其分子中心 ; 人 OPN 中的 SVVYGLR (SEQ ID NO : 2) 序列或小鼠 OPN 中的 SLAYGLR (SEQ ID NO : 3) 序列 ; 及与其非常邻近的一个凝血酶切割位点。OPN 通过所述 GRGDS (SEQ ID NO : 1) 序列与 RGD 整联蛋白结合,或者通过 SVVYGLR (SEQ ID NO : 2) 序列或 SLAYGLR (SEQ ID NO : 3) 序列与 $\alpha 4$ ($\alpha 4 \beta 1$) 和 $\alpha 9$ ($\alpha 9 \beta 1$) 整联蛋白结合。

[0006] WO 02/081522 公开了通过使用 OPN 敲除小鼠或针对 OPN 的中和抗体抑制 OPN 的功能对风湿性关节炎或肝炎的治疗效果。而且,该公开文献表明,SVVYGLR (SEQ ID NO : 2) 序列通过识别 $\alpha 9$ 和 $\alpha 4$ 整联蛋白对于炎症性疾病的发病是至关重要的,并且 OPN 受体在免疫活性细胞等内表达并与炎症性疾病有关。

[0007] 已经发现, $\alpha 9$ 和 $\alpha 4$ 的结合谱的差异在于, $\alpha 4 \beta 1$ 既结合未被凝血酶切割的 OPN (未切割的 OPN),也结合被凝血酶切割后 OPN 的 N 端片段 (已切割的 OPN),而 $\alpha 9 \beta 1$ 仅结合已切割的 OPN (Y. Yokosaki, et al., (1999) The Journal of Biological Chemistry, 274 : 36328-36334 ; P. M. Green, et al., (2001) FEBS Letters, 503 : 75-79 ; S. T. Barry, et al., (2000) Experimental Cell Research, 258 : 342-351)。

[0008] 除了 OPN 之外, $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白有许多共同的配体。已知的配体有纤连蛋白的 EDA 域、前肽-血管性血友病因子 (propeptide-von Willebrand factor, pp-vWF)、组织转谷氨酰胺酶 (tTG)、凝血因子 XIII、血管细胞粘附分子-1 (VCAM-1) 等。此外, 纤连蛋白的 CS-1 域、MadCAM-1 ($\alpha 4 \beta 7$) 等已知是被 $\alpha 4$ 整联蛋白特异识别的配体。生腱蛋白-C、纤溶酶等已知是被 $\alpha 9$ 整联蛋白特异识别的配体。

[0009] 整联蛋白亚单位 $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ 和 $\beta 1$ 的氨基酸序列是公知的。例如, 在 GenBank 中, 人 $\alpha 9$ 被登记为 NM_002207, 小鼠 $\alpha 9$ 被登记为 NM_133721, 人 $\alpha 4$ 被登记为 NM_000885, 小鼠 $\alpha 4$ 被登记为 NM_010576, 人 $\beta 1$ 被登记为 X07979, 小鼠 $\beta 1$ 被登记为 NM_010578。还已知这些整联蛋白的氨基酸序列在物种间高度相似。

[0010] 3. 发明概要

[0011] 尽管目前已知有多种治疗癌症、炎症性疾病和自身免疫性疾病的药物, 但是人们仍然希望开发对癌症、炎症性疾病和自身免疫性疾病具有更好的治疗效果的预防和 / 或抑制剂等。本发明是部分地基于本发明人的如下发现, 即针对整联蛋白 $\alpha 9$ 的特异性抑制抗体具有抑癌和抗炎作用。

[0012] 先前, 本发明人分离了可免疫特异性地识别人整联蛋白 $\alpha 9$ 的小鼠单克隆抗体, 它们是由杂交瘤克隆 1K11、21C5、24I11、25B6 和 28S1 (保藏号分别是 FERM BP-10510、FERM BP-10511、FERM BP-10512、FERMBP-10513 和 FERM BP-10832) 产生的, 并分离了可免疫特异性地识别小鼠整联蛋白 $\alpha 9$ 的小鼠单克隆抗体, 它们是由杂交瘤克隆 18R18D、12C4' 58、11L2B 和 55A2C (保藏号分别是 FERM ABP-10195、FERM ABP-10196、FERM ABP-10197 和 FERM ABP-10198) 产生的。这里, 杂交瘤克隆的名称可以和由该克隆产生的单克隆抗体的名称互换使用。所有这些小鼠抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均是 IgG1 同种型。这些单克隆抗体中的一些可抑制人和 / 或小鼠整联蛋白 $\alpha 9$ 与整联蛋白 $\alpha 9$ 的配体 (例如骨桥蛋白) 之间的结合。因此, 这些抗整联蛋白 $\alpha 9$ 抗体可抑制整联蛋白 $\alpha 9$ 的功能, 并对癌症, 例如癌细胞的生长或转移, 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, 具有治疗作用。

[0013] 而且, 本发明的抗整联蛋白 $\alpha 9$ 抗体可以用作体内诊断剂, 用于检测受试者体内整联蛋白 $\alpha 9$ 表达的存在和水平, 藉此诊断涉及整联蛋白 $\alpha 9$ 的疾病或病症。

[0014] 然而, 因为这些单克隆抗体是小鼠来源的, 由于它们在人体内的免疫原性可能导致不良作用, 这妨碍了它们直接应用于人体的诊断或治疗。为了降低免疫原性, 本发明人制备了一种人源化抗体, 它们具备作为所述人源化抗体来源的原始小鼠抗整联蛋白 $\alpha 9$ 抗体所展示的生物学活性。

[0015] 因此, 本发明提供了一种可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段, 所述抗体包括部分地衍生自非人类来源且部分地衍生自人类来源的抗原结合区。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括: 衍生自非人类来源 (供体), 例如 1K11、21C5、24I11、25B6 和 28S1 单克隆抗体, 的互补决定区 (CDR), 和衍生自人类来源 (受体) 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可抑制人 $\alpha 9$ 整联蛋白与人 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体之间的结合。

[0016] 在一个具体的实施方案中, 所述可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗

体或其抗原结合片段包括：(i) 重链 (H 链)，其包括至少一个衍生自人 H 链可变区 (V 区) 的 H 链 FR (FRH)，和至少一个 H 链互补决定区 (CDRH)，所述 CDRH 衍生自可免疫特异性地识别人 α 9 整联蛋白的非人类抗体的 CDRH 中的至少一个；或 (ii) 轻链 (L 链)，其包括至少一个衍生自人 L 链 V 区的 L 链 FR (FRL)，和至少一个 L 链互补决定区 (CDRL)，该 CDRL 衍生自可免疫特异性地识别人 α 9 整联蛋白的非人类抗体的 CDRL 中的至少一个；或 (iii) 上面的 (i) 和 (ii)。例如，所述非人类抗体，作为本发明人源化抗体中的至少一个 CDRH 和 / 或至少一个 CDRL 的来源，是由从下组选出的杂交瘤产生的单克隆抗体：保藏号 FERM BP-10510、FERM BP-10511、FERMBP-10512、FERM BP-10513 和 FERM BP-10832。

[0017] 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) 至少一个衍生自人 FRH 的 FRH，以及至少一个 CDRH，所述 CDRH 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO：4、5 和 6 中的氨基酸序列；或 (ii) 至少一个衍生自人 FRL 的 FRL，以及至少一个 CDRL，所述 CDRL 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO：11、12 和 13 中的氨基酸序列；或 (iii) 同时包含上面的 (i) 和 (ii)。所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包含 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO：4、5 和 6。或者，所述的本发明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。在一个优选实施方案中，所述的本发明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。又或者，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包含：从由 GenBank 登录号 No. X65891 (SEQ ID NO：18) 编码的人 H 链可变区衍生的 FRH，或从由 GenBank 登录号 No. X72441 (SEQ ID NO：23) 编码的人 κ -L 链可变区衍生的 FRL。在一个优选实施方案中，本发明人源化抗体的 FRH 包含至少一个选自氨基酸序列 SEQ ID NO：19、20、21 和 22 (FRH1、FRH2、FRH3 和 FRH4，分别由 X65891 的相应部分编码) 中的氨基酸序列。在另一个优选实施方案中，本发明人源化抗体的 FRL 包含至少一个选自氨基酸序列 SEQ ID NO：24、25、26 和 27 (FRL1、FRL2、FRL3 和 FRL4，分别由 X72441 的相应部分编码) 中的氨基酸序列。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括：(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) 上面的 (i) 和 (ii)。

[0018] 在另一个优选具体实施方案中，本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包括：(i) 至少一个衍生自人 FRH 的 FRH，以及至少一个 CDRH，所述 CDRH 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO：32、33 和 34 中的氨基酸序列；或 (ii) 至少一个衍生自人 FRL 的 FRL，以及至少一个 CDRL，所述 CDRL 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO：37、38 和 39 中的氨基酸序列；或 (iii) 上面的 (i) 和 (ii)。所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段可以包括 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO：32、33 和 34。或者，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO：37、38 和 39。在一个优选实施方案中，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO：32、33、34、37、38 和 39。

[0019] 在另一个优选具体实施方案中，本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包括：(i) 至少一个衍生自人 FRH 的 FRH，以及至少一个 CDRH，所述 CDRH 包含选自氨基酸序列 SEQ

ID NO:42、43 和 44 中的氨基酸序列；或 (ii) 至少一个衍生自人 FRL 的 FRL，以及至少一个 CDRL，所述 CDRL 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:47、48 和 49 中的氨基酸序列；或 (iii) 上面的 (i) 和 (ii)。所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段可以包括 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42、43 和 44。或者，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47、48 和 49。在一个优选实施方案中，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42、43、44、47、48 和 49。

[0020] 在另一个优选具体实施方案中，本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包括：(i) 至少一个衍生自人 FRH 的 FRH，以及至少一个 CDRH，所述 CDRH 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:52、53 和 54 中的氨基酸序列；或 (ii) 至少一个衍生自人 FRL 的 FRL，以及至少一个 CDRL，所述 CDRL 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:57、58 和 59 中的氨基酸序列；或 (iii) 上面的 (i) 和 (ii)。所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段可以包括 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52、53 和 54。或者，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段可以包括 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57、58 和 59。在一个优选实施方案中，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52、53、54、57、58 和 59。

[0021] 在另一个优选具体实施方案中，本发明的人源化抗体或其抗原结合片段包括：(i) 至少一个衍生自人 FRH 的 FRH，以及至少一个 CDRH，所述 CDRH 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:62、63 和 64 中的氨基酸序列；或 (ii) 至少一个衍生自人 FRL 的 FRL，以及至少一个 CDRL，所述 CDRL 包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:67、68 和 69 中的氨基酸序列；或 (iii) 上面的 (i) 和 (ii)。所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段可以包括 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62、63 和 64 的。或者，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:67、68 和 69。在一个优选实施方案中，所述的本发明人源化抗体或其抗原结合片段包括 CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2 和 CDRL3，它们分别包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62、63、64、67、68 和 69。

[0022] 本发明进一步提供了一种分离的核酸分子，其包含编码可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 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，其包含这样的核苷酸序列，该序列编码：包含从 SEQ ID NO:4、5、6、32、33、34、42、43、44、52、53、54、62、63 和 64 中选出的至少一种氨基酸序列的人源化 H 链，或包含从 SEQ ID NO:11、12、13、37、38、39、47、48、49、57、58、59、67、68 和 69 中选出的至少一种氨基酸序列的人源化 L 链，或者所述人源化 H 链和所述人源化 L 链二者。在一个优选的具体实施方案中，这样的分离的核酸分子包括编码 VH 区的核苷酸序列 SEQ ID NO:28，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，这样的分离的核酸分子包括编码 VL 区的核苷酸序列 SEQ ID NO:30，或编码氨基酸序列 SEQ ID NO:31 的核苷酸序列。在另外一个优选的具体实施方案中，这种分离的核酸分子同时包括核苷酸序列 SEQ ID NO:28 和 30。在另外一个优选的具体实施方案中，本发明的分离核酸分子进

一步包括编码供体来源的信号肽（例如氨基酸序列 SEQ ID NO:10 和 17, 分别地）或异种来源的信号肽的核苷酸序列。

[0023] 本发明进一步提供了一种载体, 例如表达载体, 其包括编码本发明的可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段的 H 链和 / 或 L 链的核苷酸序列。在这样的载体中, 本发明的核苷酸序列可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信号肽的核苷酸序列, 其中所述信号肽是作为 CDR 来源的非人类供体抗体的天然信号肽, 或者是异种来源的信号肽。

[0024] 而且, 本发明提供了一种宿主细胞, 其包含本发明的核酸分子, 包括含有本发明核酸分子的载体。在一个实施方案中, 本发明提供了一种分离的宿主细胞, 其包括编码本发明人源化 H 链的第一核酸分子和编码本发明人源化 L 链的第二核酸分子, 所述第一和第二核酸分子各自与调节元件可操作连接, 使得有生物功能的本发明人源化抗体或其抗原结合片段得以被表达。

[0025] 因此, 本发明进一步提供了一种用于制备本发明人源化抗体的方法, 其包括: 在使得所述人源化抗体表达的条件下培养本发明的宿主细胞; 并收集所产生的人源化抗体。

[0026] 本发明进一步提供了一种组合物, 其包含至少一种本发明的人源化抗体。此外, 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可药用的载体。所述任何一种组合物均可进一步包含其它可以加和性或协同性地改善疾病或病症的活性化合物。这样的活性化合物包括, 但不限于, 抗炎化合物、化疗化合物, 等等, 以及抗体或其抗原结合片段, 例如能够免疫特异性地结合人 $\alpha 4$ 整联蛋白的抗体。

[0027] 在另一个方面中, 本发明提供了一种用于预防或治疗与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或涉及 $\alpha 9$ 整联蛋白的疾病或病症的方法, 所述方法包括向需要的受试者施用预防或治疗有效量的至少一种本发明人源化抗体。对于这类应用, 本发明的人源化抗体可以和可增强该人源化抗体生物学效应的治疗性模块偶联。这样的治疗性模块的实例包括另一种抗体, 例如抗 $\alpha 4$ 抗体（例如形成双特异性抗体）, 细胞生长抑制性或细胞杀伤性的细胞毒素, 放射性元素, 和 / 或其它治疗剂, 包括抗炎剂、抗生素等。

[0028] 在另外一个方面中, 本发明提供了一种用于诊断受试者体内与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关或涉及 $\alpha 9$ 整联蛋白的病症或疾病的方法, 所述方法包括向待检查的受试者施用诊断有效量的本发明人源化抗体。对于这类诊断应用, 本发明的人源化抗体可以用可检测的标志物, 例如放射性元素, 标记。

[0029] 3.1 定义

[0030] 如这里所使用的, 术语“抗体”是指能够免疫特异性地结合期望抗原, 例如 $\alpha 9$ 整联蛋白, 的抗体分子, 并且涵盖完整抗体或其片段, 包括抗原结合片段。

[0031] 这里使用的术语“免疫特异性地识别”是指抗体或其抗原结合片段特异性地结合靶多肽或蛋白（尤其是人 $\alpha 9$ 整联蛋白）的能力。这样的抗体不与其它多肽或蛋白非特异性结合。然而, 免疫特异性结合靶多肽或蛋白（例如人 $\alpha 9$ 整联蛋白）的抗体或其抗原结合片段可能和其它抗原交叉反应。例如, 本发明可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的人源化抗体或其抗原结合片段可能与例如鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白交叉反应。优选地, 可免疫特异性地结合人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体或其抗原结合片段不与其它抗原交叉反应。

[0032] 这里使用的术语“抗原结合片段”是指抗体的保留有免疫特异性结合靶多肽或蛋白（特别是人 $\alpha 9$ 整联蛋白和 / 或小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白）的能力的任意片段，包括单链抗体、Fab 片段、 $F(ab')_2$ 片段、二硫键连接的 Fvs，以及含有轻链 (VL) 可变区和 / 或重链 (VH) 可变区或者甚至互补决定区 (CDR) 的可以特异性结合靶多肽或蛋白的片段。因此，人源化抗体的这种抗原结合片段可以包含或者可以不包含部分或全长人类恒定区。各种用于获得上述抗体片段的方法在本领域是众所周知的。

[0033] 这里使用的术语“衍生自人类来源”或“衍生自非人类来源”是指这样的抗体部分，其氨基酸序列衍生自人类抗体或非人类抗体的相应部分。

[0034] 这里使用的术语“受体序列”是指来自人类抗体的 VH 或 VL 区的框架区的核苷酸或氨基酸序列，所述框架区充当来自供体抗体（通常是非人类抗体）的 CDR 的受体。

[0035] 4. 附图简述

[0036] 图 1 显示了小鼠 24I11 VH cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:7) 和推导氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)。氨基酸残基用单字母编码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO:10) 用斜体标记。成熟 VH 的 N 端氨基酸残基 (E) 用双下划线标记。根据 Kabat 等 (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U. S. Department of Health and Human Services, 1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。

[0037] 图 2 显示了小鼠 24I11 VL cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:14) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)。氨基酸残基用单字母编码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO:17) 用斜体标记。成熟 VL 的 N 端氨基酸残基 (D) 用双下划线标记。根据 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。

[0038] 图 3 显示了两侧有 SpeI 和 HindIII 位点（下划线）的设计的 24I11 VH 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO:72) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)。氨基酸残基用单字母编码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO:10) 用斜体标记。成熟 VH 的 N 端氨基酸残基 (E) 用双下划线标记。根据 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。内含子序列用斜体标记。

[0039] 图 4 显示了两侧有 NheI 和 EcoRI 位点（下划线）的设计的 24I11 VL 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO:73) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)。氨基酸残基用单字母编码显示。信号肽序列 (SEQ ID NO:17) 用斜体标记。成熟 VL 的 N 端氨基酸残基 (D) 用双下划线标记。根据 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。内含子序列用斜体标记。

[0040] 图 5 显示了 pCh24I11 和 pHu24I11（统称“表达载体”）的结构示意图。从顶部的 SalI 位点出发顺时针方向，质粒包含以人类巨细胞病毒 (CMV) 主立即早期启动子 (major immediate early promoter) 和增强子 (CMV 启动子) 的重链转录单位，用于起始抗体重链基因的转录。CMV 启动子后面是 VH 外显子，一段含有人类 $\gamma 1$ 重链恒定区的基因组序列，其包括 CH1、铰链、CH2 和 CH3 外显子以及间插的内含子，和一个位于 CH3 后面的、用于 mRNA 加工的 $\gamma -1$ 基因多聚腺苷酸位点。在重链基因序列之后，轻链转录单位从 CMV 启动子开始，随后是 VL 外显子和一段含有人 κ 链恒定区外显子 (CL) 及其前面的部分内含子的基因组序列，和 κ 基因的多聚 A 信号。轻链基因的后面是 SV40 早期启动子 (SV40 启动子)、大肠杆菌黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因 (gpt) 和一个含有 SV40 多聚腺苷酸位点 (SV40 poly(A) 位点) 的区段。最后，质粒含有质粒 pUC19 的一部分，包括细菌复制起点 (pUC ori) 和 β 内酰胺酶基因 (β 内酰胺酶)。

[0041] 图 6 显示了 24I11 VH(SEQ ID NO:9)、人源化 24I11(Hu24I11)VH(SEQID NO:29) 和人类受体序列 FRH1(SEQ ID NO:19)、FRH2(SEQ ID NO:20)、FRH3(SEQ ID NO:21) 和 FRH4(SEQ ID NO:22) 的氨基酸序列比对,这些序列衍生自由 GenBank 登录号 No. X65891 的核苷酸序列编码的氨基酸序列。氨基酸残基用单字母编码显示。序列上方的数字表示根据 Kabat 等 (1991) 的位置。由 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。双下划线标记的残基被预测与 CDR 接触,并且在人源化形式中在这些位置上保留小鼠残基。图中省略了 X65891 中的 CDR 残基。

[0042] 图 7 显示了 24I11 VL(SEQ ID NO:16)、人源化 24I11 VL(SEQ ID NO:16) 和人类受体序列 FRL1(SEQ ID NO:24), FRL2(SEQ ID NO:25), FRL3(SEQID NO:26) 和 FRL4(SEQ ID NO:27) 的氨基酸序列比对,这些序列衍生自由 GenBank 登录号 No. X72441 的核苷酸序列编码的氨基酸序列。氨基酸残基用单字母编码显示。序列上方的数字表示根据 Kabat 等 (1991) 的位置。由 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。双下划线标记的残基被预测与 CDR 接触,并且在人源化形式中在这些位置上保留小鼠残基。图中省略了 X72441 中的 CDR 残基。

[0043] 图 8 显示了用于构建 Hu24I11 VH 基因的寡核苷酸。

[0044] 图 9 显示了用于构建 Hu24I11 VL 基因的寡核苷酸。

[0045] 图 10 显示了用于构建两侧有 SpeI 和 HindIII 位点的 Hu24I11 VH 基因 (SEQ ID NO:74 在 5' 端有 5'-GGG 尾巴,在 3' 端有 CCC-3' 尾巴) 的寡核苷酸。箭头指示每条寡核苷酸的位置和方向 (5' 到 3')。信号肽 (SEQ ID NO:10) 和 VH 区 (SEQ ID NO:29) 的氨基酸残基用单字母编码显示。

[0046] 图 11 显示了用于构建两侧有 NheI 和 EcoRI 位点 (SEQ ID NO:75 在 5' 端有 5'-GGG 尾巴,在 3' 端有 CCC-3' 尾巴) 的 Hu24I11 VL 基因的寡核苷酸。箭头指示每条寡核苷酸的位置和方向 (5' 到 3')。信号肽 (SEQ ID NO:17) 和 VL 区 (SEQ ID NO:31) 的氨基酸残基用单字母编码显示。

[0047] 图 12 显示了两侧有 SpeI 和 HindIII 位点 (下划线) 的 Hu24I11 VH 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO:74),以及信号肽 (SEQ ID NO:10;斜体显示) 和 VH 区 (SEQ ID NO:29) 的推导氨基酸序列。氨基酸残基用单字母编码显示。成熟 VH 的 N 端氨基酸残基 (Q) 用双下划线标记。根据 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。内含子序列用斜体标记。

[0048] 图 13 显示了两侧有 NheI 和 EcoRI 位点 (下划线) 的 Hu24I11 VL 基因的核苷酸序列 (SEQ ID NO:75),以及信号肽 (SEQ ID NO:17;斜体显示) 和 VL 区 (SEQ ID NO:31) 的推导氨基酸序列。氨基酸残基用单字母编码显示。成熟 VL 的 N 端氨基酸残基 (D) 用双下划线标记。根据 Kabat 等 (1991) 定义的 CDR 序列用下划线标记。内含子序列用斜体标记。

[0049] 图 14 显示了嵌合 24I11 抗体和人源化 24I11 抗体与人 $\alpha 9$ 整联蛋白亲和性之间的比较。通过细胞 ELISA 考察了 1 和 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的嵌合和人源化 24I11 与 CHO/ $\alpha 9$ 细胞的结合。实验重复进行三次。图中显示了平均吸光度值和 SEM。

[0050] 图 15 显示了小鼠、嵌合和人源化 24I11 抗体与人 $\alpha 9$ 整联蛋白结合的 FACS 分析结果。测试每种抗体在 1, 0.33, 0.11, 0.037 和 0.012 $\mu\text{g/ml}$ 下与 CHO/hu $\alpha 9$ 细胞的结合。

该图中,以几何平均通道荧光值(MCF;Y轴)在被测的每种抗体浓度(X轴)作图。

[0051] 图16显示了抗人 α 9整联蛋白抗体对人 α 9/CHO-K1细胞与hOPN(RAA)N-half、生腱蛋白-C、VCAM-1或人纤连蛋白之间细胞粘附抑制活性的结果。

[0052] 图17显示了在抗人整联蛋白 α 4抗体的存在下,抗人 α 9整联蛋白抗体对人黑素瘤细胞的细胞粘附抑制作用的结果。

[0053] 图18显示了抗整联蛋白 α 4抗体和抗 α 9整联蛋白抗体对肝炎的治疗效果。在图中,NHG指示正常仓鼠抗体,NRG指示正常大鼠抗体。

[0054] 图19显示B16-BL6细胞的生长被抗 α 9整联蛋白抗体抑制。

[0055] 图20显示了使用抗人 α 9整联蛋白抗体对人 α 9/CHO-K1细胞(图20a)、人 α 4/CHO-K1(图20b)和人嗜中性粒细胞(图20c)的FACS分析结果。

[0056] 图21显示了在使用固定的VCAM-1作为ECM时,抗 α 9整联蛋白抗体对B16-BL6细胞生长的抑制。

[0057] 图22显示了抗 α 9整联蛋白抗体在小鼠类风湿性关节炎模型中的治疗作用。

[0058] 5. 发明详细说明

[0059] 5.1 针对人 α 9整联蛋白的抗体的制备

[0060] 可以免疫特异性地识别人 α 9整联蛋白或其任何表位的抗体可以通过任何合适的本领域已知方法来产生。

[0061] 在本发明中用作抗原的 α 9整联蛋白可以是(1)衍生自所有表达 α 9整联蛋白的人类细胞或所有存在这些细胞的组织的蛋白质;(2) α 9整联蛋白编码基因DNA(优选地cDNA)被转染进入细菌、酵母、细胞系包括动物细胞系等并表达而得的重组蛋白质;或(3)合成蛋白质。

[0062] α 9整联蛋白包括包含与人 α 9整联蛋白(SEQ ID NO:76,其中残基1-29是信号肽)的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0063] 这里,术语“包含基本上相同氨基酸序列的多肽”是指这样的变体多肽,其包含这样的氨基酸序列,其中有多氨基酸,优选地1-10个氨基酸,更优选地,1个至数个(例如1-5)氨基酸被替换、删除和/或修饰,只要这些变体多肽仍具有与天然存在的人 α 9整联蛋白基本上等价的生物学性质;以及这样的变体多肽,其包含这样的氨基酸序列,其中有多氨基酸,优选地1-10个氨基酸,更优选地,1个至数个(例如1-5个)氨基酸被添加到天然存在的人 α 9整联蛋白的氨基酸序列。而且,变体多肽可以是具有多个这样的氨基酸替换、删除、修饰和添加的多肽。

[0064] 作为本发明抗原的人 α 9整联蛋白可以通过本领域众所周知的方法加以产生,除了基因重组技术之外,还可以使用例如化学合成方法、细胞培养方法等,或者它们的修改形式。

[0065] 用于产生变体多肽的方法实例包括合成寡核苷酸定点突变(缺口双链体法(gapped duplex method))、涉及通过用亚硝酸盐或亚硫酸盐处理随机引入点突变的点突变方法、涉及用Bal31酶或其它酶制备删除突变体的方法、盒式诱变、接头扫描法、错误掺入法(miss incorporation method)、错配引物法、DNA区段合成法等。

[0066] 在本发明中用作抗原的人 α 9整联蛋白还包括所述 α 9整联蛋白的“部分”。如这里所使用的,“部分”是指包含与 α 9整联蛋白配体(例如OPN、VCAM-1、生腱蛋白-C等)结

合所需区域的部分；具体地说，包含成熟人 $\alpha 9$ 整联蛋白 (SEQ ID NO:76 的第 30- 第 1035 个氨基酸残基) 第 14- 第 980 个氨基酸残基的部分，和包含第 11- 第 981 个氨基酸残基的部分。所述 $\alpha 9$ 整联蛋白的“部分”可以根据下文所述的本领域已知方法通过基因重组或化学合成或其修改形式来产生，或者可以通过用蛋白水解酶等适当地消化通过细胞培养方法分离的人 $\alpha 9$ 整联蛋白来产生。

[0067] 作为抗原，也可以使用在细胞膜或其膜级分上过表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞本身。过表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞可以通过本领域众所周知的重组 DNA 技术加以制备。

[0068] 使用如上所述制备的合适抗原，可以通过本领域众所周知的各种方法制备特异针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白或其任意表位的抗体。可以通过本领域众所周知的各种程序产生针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的多克隆抗体。例如，可以将目的抗原施用于多种宿主动物，包括但不限于，家兔、小鼠、大鼠等，诱导含有抗原特异多克隆抗体的抗血清的产生。可以使用各种佐剂以提高免疫响应，这取决于宿主物种，包括但不限于，弗氏佐剂（完全或不完全）、矿物凝胶例如氢氧化铝、表面活性物质例如溶血卵磷脂、普卢兰尼克多元醇类 (pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油乳液、钥孔血蓝蛋白、二硝基苯酚，和潜在可用于人类的佐剂，例如 BCG (卡介苗) 和短棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。这些佐剂也是本领域众所周知的。

[0069] 单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术加以制备，包括使用杂交瘤、重组、噬菌体展示技术或其组合。例如，单克隆抗体可以用杂交瘤技术产生，所述杂交瘤技术包括本领域已知的和例如下列文献中教导的：Harlow 等，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)；Hammerling 等，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, pp. 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981) (本文通过提述并入两篇文献的全部内容)。这里使用的术语“单克隆抗体”不仅限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆，包括任何真核、原核或噬菌体克隆，的抗体，并不指产生它们的方法。

[0070] 用杂交瘤技术产生和筛选特异抗体的方法是常规的并且是本领域众所周知的。在一个非限制性实例中，可以用感兴趣的抗原或表达这种抗原的细胞对小鼠进行免疫。一旦检测到免疫响应，例如在小鼠血清中检测到特异针对该抗原的抗体，即收集小鼠的脾脏并分离脾细胞。然后通过众所周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。通过有限稀释对杂交瘤进行筛选和克隆。然后通过本领域已知的方法对杂交瘤克隆进行测定，检测分泌能够结合该抗原的抗体的细胞。可以通过用阳性杂交瘤克隆对小鼠进行腹腔接种以产生腹水，其一般含有高水平的抗体。

[0071] 识别特异表位的抗体片段可以通过已知技术加以产生。例如，Fab 和 $F(ab')_2$ 片段可以通过用酶，例如木瓜蛋白酶（用于产生 Fab 片段）或胃蛋白酶（用于产生 $F(ab')_2$ 片段），对免疫球蛋白分子进行蛋白酶切割加以产生。 $F(ab')_2$ 片段含有完整的轻链和重链的可变区、CH1 区和铰链区。

[0072] 本发明的抗体或其抗原结合片段还可以通过任何本领域已知的用于合成抗体的方法来产生，特别是通过化学合成，或者优选地，通过重组表达技术产生。

[0073] 编码抗体的核苷酸序列可以从本领域技术人员能够获得的任何信息来获得（即，从 Genbank、文献或者通过常规克隆和序列分析）。如果含有编码特定抗体或其表位结合片

段的核酸的克隆无法获得,但是该抗体分子或其表位结合片段的序列已知,则可以化学合成编码该免疫球蛋白的核酸,或者通过使用可与序列的 5' 端杂交的合成引物进行 PCR 扩增,从合适的来源[例如抗体 cDNA 文库,或者从任何表达该抗体的组织或细胞(例如被选择用于表达抗体的杂交瘤细胞)产生的 cDNA 文库或从其分离的核酸,优选为 poly A+RNA]获得编码该免疫球蛋白的核酸,或者通过用特定针对特殊基因序列的寡核苷酸探针进行克隆,从编码该抗体的 cDNA 文库中鉴定出例如 cDNA 克隆。PCR 产生的扩增核酸随后可通过任何本领域众所周知的方法克隆到可复制的克隆载体内。

[0074] 5.2 重组抗体的制备

[0075] 一旦确定了抗体的核苷酸序列,就可以用本领域众所周知的核苷酸序列操作方法对抗体的核苷酸序列进行操作,例如重组 DNA 技术、定点诱变、PCR 等(见例如前文 Sambrook 等中描述的技术;和 Ausubel 等编,1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY, 本文通过提述并入其全部内容),通过向抗体的表位结合区域或任何可能提高或降低抗体生物学活性的抗体部分内引入例如氨基酸替换、删除、和 / 或插入,而产生具有不同氨基酸序列的抗体。

[0076] 抗体的重组表达需要构建含有编码该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一部分的核苷酸序列,就可以通过使用如前面部分讨论的本领域众所周知的技术通过重组 DNA 技术产生用于产生抗体分子的载体。本领域技术人员众所周知的方法可以用于构建含有抗体编码序列和合适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。可以将编码重链可变区、轻链可变区、重链和轻链可变区、重链和 / 或轻链可变区表位结合片段、或抗体的一个或多个互补决定区(CDR)的核苷酸序列克隆到这样的载体内,用于表达。可以使这样的序列和编码原始抗体的天然信号肽或异源信号肽的多核苷酸融合。然后可以将这样制备的表达载体引入到合适的宿主细胞内,用于表达该抗体。因此,本发明包括含有编码可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整合蛋白的人源化抗体或其抗体结合片段的多核苷酸的宿主细胞。

[0077] 可以用本发明的两种表达载体共转染宿主细胞,第一个载体编码衍生自重链的多肽,第二个载体编码衍生自轻链的多肽。两个载体可以含有相同的选择标记,以便同等(equal)表达重链和轻链多肽,或含有不同的选择标签,以确保维持这两种质粒。或者,可以使用编码并且能够表达重链和轻链多肽二者的单个载体。重链和轻链的编码序列可以包含 cDNA 或基因组 DNA。

[0078] 在另一个实施方案中,抗体还可以用本领域已知的各种噬菌体展示方法来产生。在噬菌体展示方法中,功能性抗体域被展示在携带有它们的编码多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。在一个特定的实施方案中,这样的噬菌体可用于展示从全套或组合抗体文库(例如人或鼠)表达的抗原结合域,例如 Fab 和 Fv 或二硫键稳定化 Fv。对于展示与感兴趣的抗原结合的抗原结合域的噬菌体,可以用抗原来选择或鉴定它们,例如使用标记抗原或结合或捕获于固体表面或珠子上的抗原。在这些方法中使用的噬菌体典型地为丝状噬菌体,包括 fd 和 M13。抗原结合域被表达作为与噬菌体基因 III 或基因 VIII 蛋白融合的重组融合蛋白。可用于制造本发明的免疫球蛋白或其片段的噬菌体展示方法的实例包括在如下文献中公开的方法:Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol.,

24:952-958,1994;Persic et al., Gene,187:9-18,1997;Burton et al., Advances in Immunology,57:191-280,1994;PCT 申请 No.PCT/GB91/01134;PCT 公开 WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;和美国专利 Nos. 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,本文通过提述并入上述所有文献的全部内容。

[0079] 如在上述参考文献中介绍的,在噬菌体选择之后,可以从噬菌体分离出抗体编码区,并用它们产生完整抗体,包括人抗体,或者产生任何其它期望的片段,并在任何期望的宿主内表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、细菌,例如将在下文详细介绍的。例如,也可以采用重组产生 Fab, Fab' 和 F(ab')₂ 片段的技术,其中可以使用本领域已知的方法,例如在下列文献中公开的方法:PCT 公布 WO 92/22324;Mullinax et al., BioTechniques,12(6):864-869,1992;和 Sawai et al., AJRI,34:26-34,1995;和 Better et al., Science,240:1041-1043,1988(本文通过提述并入上述所有文献的全部内容)。可以用于产生单链 Fvs 和抗体的技术的实例包括在下列文献中介绍的技术:美国专利 Nos. 4,946,778 和 5,258,498;Huston et al., Methods in Enzymology,203:46-88,1991;Shu et al., PNAS,90:7995-7999,1993;和 Skerra et al., Science,240:1038-1040,1988。

[0080] 一旦通过上述任何方法产生了本发明的抗体分子,就可以用任何本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的方法加以纯化,例如通过色谱(例如离子交换色谱、亲和色谱,特别是经蛋白 A 或蛋白 G 纯化后借助针对特定抗原的亲和性,和大小排阻柱色谱)、离心、差异溶解性、或任何其它用于纯化蛋白的常规技术。进一步,本发明的抗体或其片段可以和本文所述的或者本领域已知的异源多肽序列相融合以帮助纯化。

[0081] 对于一些应用,包括抗体在人体内的体内使用和体外检测试验,可以优选地使用嵌合、人源化或人抗体。嵌合抗体和人源化抗体在下文 5.3 部分中有详细讨论。

[0082] 在体外免疫测定、纯化方法(例如亲和色谱)以及体内治疗或诊断应用中,可以使用与其它化合物或异源多肽融合或偶联的抗体。见例如 PCT 公布 WO 93/21232;EP 439,095;Naramura et al., Immunol.Lett.,39:91-99,1994;美国专利 5,474,981;Gillies et al., PNAS,89:1428-1432,1992;和 Fell et al., J. Immunol.,146:2446-2452,1991,本文通过提述并入它们的全部内容。例如,抗体可以用已知方法或商业可得的试剂盒以多种方式加以标记(例如生物素标记、FITC 标记、APC 标记)。作为另一个实例,可以将抗体和可在体内提高抗体生物学效应的治疗性模块偶联。这些治疗性模块的实例包括另一种抗体,细胞生长抑制性或细胞杀伤性的细胞毒素,放射性元素,和/或其它治疗剂,包括抗炎剂、抗生素等。在本发明中,人源化抗人 $\alpha 9$ 整合蛋白抗体可以和另一种抗体(例如抗 α 抗体)偶联(以便例如形成双特异性抗体)。作为另一个实例,本发明的人源化抗体可以用可检测的标志物(例如放射性元素)加以标记,用于体内诊断用途。

[0083] 5.3 嵌合和人源化抗体

[0084] 嵌合抗体是这样的分子,其中抗体的不同部分来源于不同的动物物种,例如抗体具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和衍生自人免疫球蛋白的恒定区。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。见例如 Morrison, Science,229:1202,1985;Oi et al., BioTechniques,4:214 1986;Gillies et al., J. Immunol.Methods,125:191-202,1989;

美国专利 Nos. 5, 807, 715 ;4, 816, 567 ;和 4, 816, 397, 本文通过提述并入其全部内容。

[0085] 人源化抗体是这样的分子,其结合期望的抗原,并包含如下所述的可变区:该可变区含有一个或多个衍生自非人物种的互补决定区(CDR)和一个或多个衍生自人免疫球蛋白分子的框架区。典型的非人类抗体人源化方法已经在多种参考文献中有描述,例如 Queen et al.,1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 和美国专利 Nos. 5, 585, 089 和 5, 693, 762 ;Riechmann et al., Nature, 332:323, 1988 ;和 Tsurushita et al., Methods 36:69-83, 2005, 本文通过提述并入上述所有文献的全部内容。例如, Tsurushita 等(2005, 前文;下文称作“Tsurushita”)的参考文献提供了一种根据 Queen 等(1989, 前文)最初开发的抗体-人源化方法改进的用于小鼠单克隆抗体人源化的实际且有指导性的方案。Tsurushita 中公开的通用方案简述如下。

[0086] 5.3.1. 用于制备人源化抗体的通用方案

[0087] 小鼠 V 基因克隆和测序

[0088] 有多种方法可用于克隆编码目标小鼠单克隆抗体 VH 和 VL 区的 cDNA。例如,使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(BD Biosciences, CA)或 GeneRacer 试剂盒(Invitrogen, CA)的 5'RACE(cDNA 末端快速扩增)方法已经被普遍使用。根据靶单克隆抗体 H 链和 L 链的同种型可以制备用于 5'RACE 的基因特异引物,从而能够结合每条 H 链和 L 链可变区的直接下游。因此,5'RACE 引物可以被设计成对小鼠的每个亚型(例如 γ 1, γ 2a, γ 2b 或 γ 3) 特异。或者,可以根据亚型间的共有或高度同源区设计用于所有亚型的通用引物。在 Tsurushita 中,公开了如下的 5'RACE 引物作为举例:

[0089] (i) 5'-GCCAGTGGATAGACTGATGG-(SEQ ID NO:129) (用于克隆小鼠 γ 1, γ 2a, γ 2b 和 γ 3H 链)

[0090] (ii) 5'-GATGGATACAGTTGGTGCAGC-(SEQ ID NO:130) (用于克隆小鼠 κ 轻链)

[0091] PCR 扩增的 V 基因片段可以被直接克隆到质粒载体内,例如使用 ZeroBlunt TOPO PCR 克隆试剂盒(Invitrogen),并确定它们的 DNA 序列。对所得的序列应当加以确认,例如通过将其编码的氨基酸序列与目标单克隆抗体的氨基酸序列进行比较,该靶单克隆抗体的序列通过 N 端氨基酸测序来确定,例如通过使用 Model 241 蛋白测序仪(Hewlett-Packard, CA)。典型地,确定目标抗体 N 端的至少 15-20 个氨基酸残基,例如通过例如 Edman 降解,即足以确认所克隆的 DNA 序列的真实性。Tsurushita 提醒,当 N 端氨基酸是谷氨酰胺-小鼠 N 端氨基酸最常见的两种氨基酸之一-时,它可能已被转换成焦谷氨酸(pyroglutamine)并可阻断 N 端测序。在这种情况下,必须将 N 端去阻断以获得序列。

[0092] V 区的三维建模

[0093] 首先,基于 VH 和 VL 区的序列,依照例如 R. Levy et al., 1989, Biochemistry 28:7168-7175 和 B. Zilber et al., 1990, Biochemistry 29:10032-10041 介绍的方法,鉴定对于保持 CDR 构象结构具有潜在重要性的目标抗体框架残基。典型地,将每一个 VH 和 VL 区分成 14 个结构上有意义的区段,它们是包含免疫球蛋白超家族域结构的 β 折叠片和类环结构。在 PDB 数据库中,将每个来自目标抗体的区段的氨基酸序列与结构已知的抗体的相应区段进行比对(见 H. M. Berman et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28:235-342)。通过多重序列比对,选择与每个目标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。为了使结构最优化,将模型进行多个循环的共轭梯度能量最小化(例如使用 ENCAD,

或如 Press et al., 1990, "Numerical Recipes, Cambridge University Press, Cambridge 所述; AMBER, 如 Weiner et al., 1981, J. Comp. Chem. 2 :287-303 所述; 3D-JIG-SAW, 可在由 Cancer Research UK 运营的 BioMolecularModelling 或“BMM”网站访问; 或 SWISS-MODEL, 可在由 Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva 运营的 ExpASy Proteomics Server 网站访问)。

[0094] 人框架的选择

[0095] 与 V 区结构建模并行地, 将分别依据小鼠 VH 和 VL 区 cDNA 克隆推导出的氨基酸序列与数据库中, 例如 Kabat 数据库 (见 Johnson et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28 : 214-218.)、GenBank 等, 的人 V 区序列进行比较。与小鼠序列具有至少大约 65%、至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 85%、至少大约 90%、或者至少大约 95% 整体同一性的人框架序列可以使用, 例如, Smith-Waterman 算法 (Gusfield, 1997, "Algorithms on Strings, Trees, and Sequences", Cambridge University Press, Cambridge) 或 BLAST (Karlin et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :2264-2268) 等来检索。这些人序列可以以基于 cDNA 的序列或者是蛋白质衍生序列为基础; 然而, 常常优选地使用胚系 (germline), 因为胚系可有助于消除与基于 cDNA 的或蛋白质衍生的序列中的体细胞高度突变 (somatic hypermutations) 相关的潜在免疫原性。或者, 如 Queen 等 (1989, 前文) 中介绍的, 使用共有框架序列也能够鉴定和除去从基于 cDNA 的或蛋白质衍生的序列获得的框架内的这些超突变残基。在使用胚系 VH 区段作为受体框架的情况下, 应当使用 14 号染色体, 而非 15 和 16 号染色体上编码的 VH 片段, 因为只有 14 号染色体上的 VH 片段可产生有功能的 VH 区。

[0096] 人源化 V 区的设计

[0097] 根据 Queen 等 (1989, 前文), 必须鉴定 CDR 的大约 4-6 Å 内的框架氨基酸, 因为这些残基被认为是支持正确 CDR 结构的潜在的关键框架残基。这个过程可以用根据原子坐标计算原子间距离的计算机程序来实现, 或者通过计算机模型进行人工检查来实现, 所述计算机程序例如 RASMOL, 其可以在由 National Science Foundation (NSF) 支持的 Molecular Visualization Freeware 网站访问。如果关键框架位置处的氨基酸在小鼠供体与人受体序列之间不同, 则通常用小鼠供体的氨基酸代替人类残基。然而, 如果这些残基对支持 CDR 结构的贡献极小, 则通常使用相应的人类残基。另外, 如果所选的人类受体含有“非典型”氨基酸, 此类氨基酸在少于大约 10-20% 的 V 区序列中出现, 则它们可能是在亲和成熟期间发生了体细胞高度突变的结果, 应当用供体残基代替它们, 以避免人体内的潜在免疫原性。

[0098] 此外, 为了设计人源化的 V 区, 还需要仔细考虑其它的因素, 例如潜在 N 连接糖基化信号的残基 (详见 Tsurushita)。

[0099] 取决于治疗用途所需要获得的或需要消除的效应物功能, 人源化抗体可以含有衍生自人抗体的人 κ 或 λ 轻链和 / 或 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 μ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 δ , 或 ϵ 重链的人类恒定区或其一部分, 或其变异体。例如, 含有突变的恒定区 Fc 部分可以和本发明嵌合或人源化抗体的可变区融合, 从而减少抗体与 Fc 受体的结合, 和 / 或减少其修复 (fix) 补体的能力 (见例如 Winter et al., GB2, 209, 757 B; Morrison et al., WO 89/07142, Morgan et al., WO 94/29351)。这些抗体分子操作可以借助在 5.2 部分介绍的重组 DNA 技术来实施。

[0100] 优选地, 所得的嵌合或人源化抗体具有与非人类供体抗体相同的特异性, 并具有

与非人类供体抗体相似的或者至少为其大约 1/3、至少大约 1/2、或至少大约 2/3 的亲合力。在另一方面中,所得的嵌合或人源化抗体的亲合力常数为至少大约 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$,优选地至少大约 $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$,并且最优选地至少大约 $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ 。

[0101] 除了上述的通用方案之外,抗体可以用本领域已知的多种技术进行人源化,包括例如 CDR 移植 (EP 239,400 ;PCT 公布 WO 91/09967 ;美国专利 Nos. 5,225,539 ;5,530,101 和 5,585,089),饰面或表面重修 (EP 592,106 ;EP519,596 ;Padlan, Molecular Immunology,28(4/5) :489-498,1991 ;Studnicka et al., Protein Engineering,7(6) :805-814,1994 ;Roguska et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA,91 :969-973,1994),和链改组 (chain shuffling) (美国专利 No. 5,565,332),本文通过提述并入这些文献的全部内容。

[0102] 5.3.2 用于制备人源化抗体作为药物的其它考虑

[0103] 为了提供用作药物的人源化抗体,需要为其准备一个高效、持续的产生系统。例如,通过插入 H 和 L 链序列来制备用于人源化抗体的合适表达载体,并且可以获得用该表达载体转染的高产率细胞系作为主细胞库 (master cell bank MCB) 的种子细胞,其充当工作细胞库 (working cell bank, WCB) 的稳定和半永久性来源。然后,可通过培养来自 WCB 的工作细胞并收集培养基来制备人源化抗体。

[0104] 多种具有合适调节基因的表达载体均可用于制备这种生产细胞系。作为宿主细胞,可以使用常用于表达哺乳动物蛋白质的细胞来表达人源化抗体。这些宿主细胞的实例包括,但不限于,中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、SP2/0-Ag14.19 细胞、NSO 细胞等。可以通过选择表达载体与宿主细胞的最佳组合使人源化抗体的生产率最大化。而且,应当探索培养基的组成,以便从各种无血清培养基和补充物中选择合适的介质,使宿主细胞的人源化抗体表达得以最优化。

[0105] 根据效率和最终的产率,可以用本领域众所周知的各种方法从培养上清纯化由宿主细胞产生的人源化抗体,包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水互作色谱等。

[0106] 5.4 药物组合物和治疗用途

[0107] 本发明提供了一种药物组合物,其包含如上所述的可免疫特异性地识别人 $\alpha 9$ 整合蛋白的人源化抗体或其抗体结合片段。包含本发明人源化抗体作为活性成分的药物组合物可用作预防和 / 或治疗与 $\alpha 9$ 整合蛋白有关的疾病或病症的药剂,所述疾病或病症包括但不限于,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、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。

[0108] 包含本发明人源化抗体的药物组合物还可用于治疗器官移植后的慢性排斥,和自身免疫性疾病,例如全身性自身免疫性疾病、红斑狼疮、葡萄膜炎、白塞氏病 (Behcet's disease)、多肌炎、增生性肾小球肾炎、结节病等。

[0109] 包含本发明人源化抗体的用于预防或治疗上述疾病或病症的预防和 / 或治疗剂,具有低毒性,通过与合适的溶剂混合直接作为液体制备物,或者作为呈合适剂型的药物组合物,能够经口或肠胃外施用给人类。

[0110] 用于上述施用的药物组合物含有前述抗体或其盐,以及可药用的载体、稀释剂或赋形剂。这种组合物以适于口服或胃肠外施用的剂型提供。

[0111] 剂量可以根据待施用的受试者的年龄、体格、目标疾病、状况、施用途径等而改变。

当抗体用于预防和 / 或治疗例如成年患者的类风湿性关节炎时,有利的是通过静脉内施用本发明抗体,通常为单个剂量大约 0.01- 大约 20mg/kg 体重,优选地大约 0.1- 大约 10mg/kg 体重,更优选地大约 0.1- 大约 5mg/kg 体重,每天大约 1-5 次,优选地大约每天 1-3 次。在其它胃肠外施用和口服施用中,抗体可以按照相应于上面给定剂量的剂量施用。当状况特别严重时,剂量可以根据状况而增加。

[0112] 各种输送系统是已知的,并可用于施用本发明的药物组合物,例如包裹在脂质体、微颗粒、微胶囊内,能够表达突变病毒的重组细胞,受体介导的内吞(见例如 Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262 :44294432)。导入的方法包括,但不仅限于,皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和经口途径。化合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮细胞或黏膜衬里(例如口腔黏膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并可以和其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身性的或局部的。也可以采用肺部施用,例如通过使用吸入器或喷雾器并与气溶胶化剂配方。

[0113] 在一个具体实施方案中,可能希望将本发明的药物组合物局部施用于需要治疗的区域;这可以通过包括但不限于下述的方法实现:手术期间的局部灌注、局部施加(topical application),例如与手术后的创口包扎一起进行,通过注射、通过导管、通过栓剂、通过鼻喷雾、或通过植入体,所述植入体是有孔、无孔或胶状材料,包括膜,例如 sialastic 膜,或纤维。在一个实施方案中,施用可以是通过在被感染组织部位(或之前部位)直接注射。

[0114] 在另一个实施方案中,药物组合物可以用在囊泡,特别是脂质体中投递(见 Langer, 1990, Science 249 :1527-1533 ;Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez Berestein and Fidler(eds.), Liss, New York, pp. 353-365(1989) ;Lopez-Berestein, 上文, pp. 317-327 ;通见上文)。

[0115] 在另外一个实施方案中,药物组合物可以用控释系统投递。在一个实施方案中,可以使用泵(见 Langer, 前文 ;Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :201 ;Buchwald et al., 1980, Surgery 88 :507 ;和 Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321 :574)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(见 Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974) ;Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984) ;Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61(1983) ;see also Levy et al., 1985, Science 228 :190 ;During et al., 1989, Ann. Neurol. 25 :351 ;Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71 :105)。在另外一个实施方案中,可以将控释系统置于组合物的目标的附近,这样就仅需要全身剂量的一部分(见例如 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 前文, vol. 2, pp. 115-138(1984))。其它的控释系统在 Langer(Science 249 :1527-1533(1990)) 的综述中有讨论。

[0116] 用于口服给药的组合物实例包括固体或液体剂型,具体地,药片(包括糖衣和薄膜包衣的药片)、药丸、颗粒、粉末制备物、胶囊(包括软胶囊)、糖浆、乳剂、悬浮液等。这种组合物通过公知的方法制造,并包含在药物制备领域中通常使用的载体、稀释剂或赋形剂中。用于药片的载体或赋形剂实例有乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁等。

[0117] 可注射的制备物可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌肉内注射、点滴注射等的剂型。这些可注射制备物可以通过公知的方法制备。可注射制备物可以通过例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在常规用于注射的无菌水介质或油介质内加以制备。用于注射的水介质有例如生理盐水、含有葡萄糖和其它助剂的等渗溶液等，其可以与合适的增溶剂联合使用，例如醇（例如乙醇）、多元醇（polyalcohol）（例如丙二醇、聚乙二醇）、非离子表面活性剂 [例如聚山梨醇 80 (polysorbate 80)，HCO-50（氢化蓖麻油的聚氧乙烯（50mol）加合物）] 等。作为油介质，可以采用例如芝麻油、大豆油等，它们可以与增溶剂联合使用，例如苯甲酸苄酯、苯甲醇等。这样制备的注射剂优选地填充在合适的安瓿小瓶内。用于直肠给药的栓剂可以通过将前述抗体或其盐与常规的栓剂基质混合加以制备。

[0118] 有利地，上述用于经口或胃肠外使用的药物组合物被制备成与活性成分的某个剂量相符合的单位剂量剂型（dosage forms in a unit dose）。这类单位剂量剂型包括例如片剂、药丸、胶囊、注射剂（安瓿小瓶）、栓剂等。所含的前述抗体的量一般为每个单位剂量剂型大约 5-500mg；特别地，在注射剂型中，优选地含有大约 5-100mg 前述抗体，对于其它剂型，为大约 10-250mg。

[0119] 上述的每种组合物可以进一步包含其它的活性化合物，除非配方会导致与上述抗体发生任何不良相互作用。

[0120] 本发明还涉及细胞和 / 或组织重塑的抑制剂和 / 或促进剂，其包括 $\alpha 9$ 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）作为活性成分；并涉及用于抑制和 / 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。在这种治疗剂中活性成分的剂量、给药方法、药物制备等可以参考前述包含本发明的人源化抗体的药物的说明适当地加以确定。

[0121] 如上所述，本发明进一步提供了用于预防或治疗涉及 $\alpha 9$ 整联蛋白或与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的疾病或病症的方法，所述方法包括向需要的受试者施用有效量的至少一种本发明人源化抗体。

[0122] 5.5 诊断用途

[0123] 包含本发明人源化抗体的药物组合物可以用作如下疾病的诊断剂：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、癌症转移、动脉硬化、多发性硬化、肉芽肿等，或作为下述疾病的诊断剂：器官移植后慢性排斥，自身免疫性疾病，例如全身性自身免疫性疾病、红斑狼疮、葡萄膜炎、白塞氏病、多肌炎、增生性肾小球肾炎、结节病等。本发明的人源化抗体能够特异识别 $\alpha 9$ 整联蛋白，因此能够用于定量试液中的 $\alpha 9$ 整联蛋白，特别是用于通过夹心式免疫测定、竞争性测定、免疫测量、浊度滴定法等、免疫染色等等的定量。在本发明的测试方法中应用这些免疫学方法时，不需要陈述任何特定的条件、程序等。通过在常规条件和程序的基础上加以本领域的普通技术上的考虑就足以构建测定系统。关于这些一般技术手段的细节，可以参考综述、教科书等。

[0124] 如上所述，使用本发明的抗体可以高敏感度地定量 $\alpha 9$ 整联蛋白。本发明的人源化抗体特别有助于通过应用体内定量 $\alpha 9$ 整联蛋白的方法诊断各种与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的疾病。例如，当检测到 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达水平增加或降低时，即可诊断某人很可能正患有

与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的疾病,例如癌症或炎症性疾病,或者某人很可能将来会患上这些疾病。因此,本发明还提供了用于诊断受试者涉及 $\alpha 9$ 整联蛋白或与 $\alpha 9$ 整联蛋白有关的疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的至少一种本发明人源化抗体或两种均施用。用于这种体内诊断的所需剂量可能少于治疗用途所需的剂量,并可以由本领域的技术人员根据常规程序加以确定。

[0125] 本发明的人源化抗体还可用于特异性检测试液(例如体液、组织等)中存在的 $\alpha 9$ 整联蛋白。所述人源化抗体还可用于制备纯化 $\alpha 9$ 整联蛋白用的抗体柱、用于在纯化时检测每一组分中含有的 $\alpha 9$ 整联蛋白、或用于分析整联蛋白 α 在测试细胞内的行为。

[0126] 6. 实施例

[0127] 下面的实施例举例说明了可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,单克隆抗体可变区的测序,抗体的表位作图和其它表征,这些抗体的嵌合和人源化,以及所得的嵌合和人源化抗体的表征。这些实施例不应理解为限制性。

[0128] 6.1 针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的小鼠抗体的制备

[0129] 针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的小鼠单克隆抗体根据消减免疫法(Williams C.V., et al., 1992, Biotechniques 12:842-847)加以制备。简而言之,三只 Balb/c 小鼠以 4×10^6 细胞/小鼠腹腔注射 CHO-K1 细胞。随后 2 天内,对小鼠环磷酰胺腹腔给药,剂量为 4mg/小鼠。环磷酰胺注射后 2 周时,对小鼠进行腹腔注射表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 CHO-K1 细胞(人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞),剂量为 2×10^6 细胞/小鼠。在 2 周后再用相同的细胞以 3×10^6 细胞/小鼠再进行一次腹腔注射。通过本领域众所周知的方法制备杂交瘤(见例如 Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)。建立了产生与人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞免疫特异性反应,但不与表达人整联蛋白 $\alpha 4$ 的 CHO K1 细胞反应的单克隆抗体的杂交瘤克隆,并分离了 5 个产生可免疫特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体的杂交瘤克隆(即 1K11, 21C5, 24I11, 25B6 和 28S1)。

[0130] 6.2 抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白单克隆抗体的表位分析

[0131] 制备了多个 12 残基多肽,它们从人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 N 端及随后每隔 3 个残基开始(即氨基酸残基 1-12, 4-15, 7-18, 以此类推),并以 5nmol/点将它们藉由 C6 间隔臂和 2 β A1a 残基偶联到纤维素膜上。用封闭缓冲液(牛奶/0.05% Tween20 溶于 PBS)封闭膜,并使之与 10ml 如下所述的溶液在室温下反应 3 小时,该溶液含有 1.0 μ g/ml 用过氧化物酶标记的每种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白单克隆抗体(即分别是 1K11, 21C5, 24I11 和 25B6)。用 T-TBS 清洗后,使膜与增强化学发光(ECL)检测试剂在室温下反应 1 分钟。测量由于酶反应而发射的冷光,并根据发光强度确定抗体的表位。作为对照,使用 Y9A2(见 Wang et al., 1996, Am J Respir Cell Mol Biol 15, 664-672),一种商业可得的针对人 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体。

[0132] 下面的表 1 显示了表位作图的结果,表明本发明人分离的单克隆抗体具有与 Y9A2 迥异的表位。

[0133] 表 1

[0134]

人整联蛋白 $\alpha 9$ 序列	1K11	21C5	24I11	25B6	Y9A2
FQGPADSFFGYA (SEQ ID NO :77)	-	-	-	++	-
KSPGAVFKRVHTNPDRR (SEQ ID NO :78)	++	+++	++++	-	+
WMGVSLARQPKADGRVLA (SEQ ID NO :79)	+	+++	+	-	+
CAHRWKNIYYEADHI (SEQ ID NO :80)	+	+	+++	+	+
GFCYIIPSNLQAKGRTL (SEQ ID NO :81)	+++	+++++	+++++	+++++	+++++
VMGAPGSFYWAGTIKVLN (SEQ ID NO :82)	+	+	+	+++	+
VIMNRRYTYLGYAVT (SEQ ID NO :83)	+++++	++	+++++	+++++	+++
VYIFRADRRSGTLIKIFQ (SEQ ID NO :84)	++++	+++++	+++	-	+
QYSMKLSGQKINPVLRMFGQSISG (SEQ ID NO :85)	+	++++	-	-	+
VLLRARPVITVDVSIFL (SEQ ID NO :86)	++	++	-	-	+++++
RHYVAHVKRRVQDVISPI (SEQ ID NO :87)	+++	+++	+++++	+	++
ELPPLTPVLRWKKGQKIAQKNQTVFERNCR (SEQ ID NO :88)	+	+++++	+	-	++
YLALGAVKNISL (SEQ ID NO :89)	+	+	-	++	+++++
CSVGFPFMRSSKYEFSV (SEQ ID NO :90)	+	++	++	-	+++
SSSVIQFMSRAVKVDPALRV (SEQ ID NO : 91)	+	++	+++	-	+

[0135] 6.3 抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的 CDR 分析

[0136] 单克隆抗体 (即 1K11, 21 C5, 24I11, 25B6 和 28S1) 的 CDR 氨基酸序列通过将相应杂交瘤提取的 mRNA 逆转录制备 cDNA 来加以确定。使用这些 cDNA 作为模板, 使用 ScFv 克隆引物 (Light Primer Mix 和 Heavy PrimerMix ;Amersham Biosciences Corp., IL 生产) 通过 PCR 对 H 链和 L 链的可变区进行延伸和扩增。将 PCR 产物克隆到 pCRII TOPO 载体内, 测序并确定氨基酸序列。每种抗体该过程重复 3 次。结果如表 2 所示。

[0137]

表 2

CDRs	1K11	21C5	24H11	25B6	28S1
CDRH1	DYNMD (SEQ ID NO:32)	DYYMY (SEQ ID NO:42)	DTYVH (SEQ ID NO:4)	SYGVH (SEQ ID NO:52)	GYGVN (SEQ ID NO:62)
CDRH2	DINPNGGTYNQKFG (SEQ ID NO:33)	TISDGGNYTYTPDSVKG (SEQ ID NO:43)	NIDPANGNTKYDPKFG (SEQ ID NO:5)	VIVSGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO:53)	MTWGDGITEYNSALKS (SEQ ID NO:63)
CDRH3	SGVISTDY (SEQ ID NO:34)	DRDGSSELAY (SEQ ID NO:44)	WLRHFFYAMDY (SEQ ID NO:6)	DYGNYPWFAY (SEQ ID NO:54)	RDASSGYGFA (SEQ ID NO:64)
CDRL1	RASQEISGYLI (SEQ ID NO:37)	KASQDVNLAVA (SEQ ID NO:47)	RASENIYSLA (SEQ ID NO:11)	KASQDVNTAVA (SEQ ID NO:57)	TASSSVSSSYLH (SEQ ID NO:67)
CDRL2	AASILDs (SEQ ID NO:38)	WASTRHT (SEQ ID NO:48)	NANSLED (SEQ ID NO:12)	SASYRYT (SEQ ID NO:58)	STSNLAS (SEQ ID NO:68)
CDRL3	LQYANYPPT (SEQ ID NO:39)	QQHYNTPW (SEQ ID NO:49)	KQAYDVVPT (SEQ ID NO:13)	QQHYSTPCA (SEQ ID NO:59)	HQYHRSPYT (SEQ ID NO:69)

[0138] 6.4 细胞粘附抑制活性

[0139] (1) 因为已知细胞粘附涉及 $\alpha 9$ 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,的结合,所以对分离的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的细胞粘附抑制活性进行了检查。

[0140] 简而言之,通过从大肠杆菌宿主细胞分离 N 端以下至 OPN 凝血酶切割位点为止的部分,制备了与谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 形成融合蛋白的 hOPN(RAA)N-half,其中 GRD 序

列已被 RAA 序列替换;并用 Precision 蛋白酶 (Amersham Biosciences) 切去 GST 部分。VCAM-1 从 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) 购买。生腱蛋白 -C 和人纤连蛋白通过分别合成含有 AEIDGIEL (SEQ ID NO:92) 的多肽;生腱蛋白 -C 的 $\alpha 9$ 整联蛋白结合区和 CPEDGIHELFP (SEQ ID NO:93);人纤连蛋白的 $\alpha 9$ 整联蛋白结合区),随后将它们附接于牛血清白蛋白 (BSA) 上来加以制备。对于人 $\alpha 9$ 整联蛋白,使用大量表达人 $\alpha 9$ 整联蛋白的 CHO-KO 细胞 (人 $\alpha 9$ /CHO-K1)。

[0141] 将 50 微升生腱蛋白 -C、纤连蛋白、VCAM-1 或 hOPN(RAA)N-half 以 1.25–5.0 $\mu\text{g/ml}$ 添加到 96 孔板中,并在 37°C 温育 1 小时以包被平板。用封闭液 (0.5% BSA/PBS) 封闭平板后,用 PBS 清洗一次,然后向平板添加人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞 (1.0×10^5 细胞 /ml) 并以 200 μl /孔添加溶解于 0.25% BSA- 最小基本培养基 (MEM) 中的分离单克隆抗体 (10g/ml),并在 5% CO_2 下 37°C 温育 1 小时。用 PBS 洗去未粘附细胞,固定粘附的细胞并用 0.5% 结晶紫 (WAKO, Osaka, Japan)/20% 甲醇进行染色。将经染色的细胞在室温下保持 30 分钟,并向其添加 20% 乙酸以使之分散 (dissolution)。通过测量 590nm 波长下的 OD 对粘附活性进行定量。

[0142] 如图 16 所示,涉及生腱蛋白 -C 的细胞粘附被 21C5, 24I11, 25B6 和 28S1 抑制,但不被 1K11 抑制。涉及纤连蛋白的细胞粘附被 21C5, 25B6 和 28S1 抑制,并被 24I11 抑制 (程度低一些),但不被 1K11 抑制。涉及 VICAM-1 的细胞粘附被 21C5, 24I11, 25B6 和 28S1 抑制,但不被 1K11 抑制。相似地,涉及 hOPN(RAA)N-half 的细胞粘附被 21C5, 24I11, 25B6 和 28S1 抑制,但不被 1K11 抑制。

[0143] (2) 因为整联蛋白 $\alpha 4$ 与 $\alpha 9$ 整联蛋白具有许多共同的 ECM 配体,故而预期抗整联蛋白 $\alpha 4$ 和抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的共存可提高细胞粘附抑制活性。因此,对两种类型抗体的组合效果进行体外检验,基于表达整联蛋白 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白的人黑素瘤细胞 (G361) 的细胞粘附考察抗体组合对转移癌的可能抑制效果,以 VCAM-1 (1.25 $\mu\text{g/ml}$) 为 ECM,使用大鼠单克隆抗体 P1H4 (Cat. No. MAB 16983Z, Chemicon International Inc., CA) 作为抗人整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体。

[0144] 如图 17 所示,涉及 VCAM-1 的粘附不被单独任何一种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制,但在抗人整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体的共同存在下,可以被阳性对照 (Y9A2)、21C5 和 24I11 抑制。由于表达多种 $\alpha 9$ 整联蛋白分子的细胞通常也表达整联蛋白 $\alpha 4$ 分子,所以这个结果提示,通过组合使用抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗人整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体,可有效实现对细胞粘附的抑制,藉此增强对各种病症和疾病,包括涉及这些整联蛋白分子的转移癌,的抑制。

[0145] 6.5 抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体在 FACS 分析中的应用

[0146] 使用内源表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞、CHO-K1 细胞和人嗜中性粒细胞检查抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体是否可用于 FACS。在人嗜中性粒细胞中,FACS 分析在细胞计数为 1.0×10^5 的条件进行,且抗体在冰上反应。用 50% 山羊血清封闭与 Fc 受体的非特异性反应。使用 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体作为第二抗体。结果 (见图 20a, 20b 和 20c),所有抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均可检测到人 $\alpha 9$ /CHO-K1 和人嗜中性粒细胞上的 $\alpha 9$ 整联蛋白。所有抗体均不与人 $\alpha 4$ /CHO-K1 细胞反应 (见图 20a, 20b 和 20c)。这些结果显示,所有的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均可用 FACS 检测在细胞上表达的人 $\alpha 9$ 整联蛋白。

[0147] 6.6 抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的治疗效果

[0148] 在小鼠系统中考察抗 $\alpha 9$ 整联蛋白的治疗效果。

[0149] 制备了抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (11L2B, 12C4'58, 18R18D 和 55A2C), 方法与制备小鼠抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的方法 (见前文 6.1 部分) 基本上相同, 只是仓鼠用表达小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的 CHO-K1 细胞 (小鼠 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞) 进行免疫, 并且选择所得的与小鼠 $\alpha 9$ /NIH3T3 细胞反应但不与小鼠 $\alpha 4$ /NIH3T3 细胞反应的单克隆抗体。

[0150] 6.6.1 对肝炎的治疗效果

[0151] WO 02/081522 公开, 抑制 OPN 功能可以治疗肝炎。因此, 在小鼠肝炎模型中使用仓鼠抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 11L2B 和大鼠抗小鼠整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体 R1-2 (Pharmingen) 对抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的治疗效果进行了研究。静脉内注射 200 μ g 伴刀豆球蛋白 A (Con A) (Vector) 12 小时后, 用 GPT/ALT-PIII 和 GOT/AST-PIII (Fuji Film) 对小鼠血液的 AST 和 ALT 水平进行测量。Con A 注射前 3 个小时, 施用 200 μ g 抗体。如图 18 所示, 发现 AST 和 ALT 水平被抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体降低, 可以见到治疗效果。此外, 同时使用抗整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体可以提高治疗效果。这些结果表明, 抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可以治疗肝炎。

[0152] 6.6.2 抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对小鼠癌细胞系生长的影响

[0153] 鼠黑素瘤细胞系 B16-BL6 大量表达 $\alpha 9$ 整联蛋白。因此, 对于已建立的抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 考察了它们抑制癌细胞生长的活性。

[0154] 在细胞培养用 96 孔板 (Becton Dickinson) 上准备 B16-BL6 细胞, 10% FCS/DMEM 中 5×10^4 细胞/mL。添加 10 μ g/ml 抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗小鼠整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体之后, 向每个孔添加 100 μ L 细胞-抗体悬浮液。在 5% CO₂ 下 37°C 温育 24 小时, 并添加每孔 10 μ L Cell Counting Kit 8 (Dojin Kagaku Kenkyu-sho), 随后在 5% CO₂ 下 37°C 温育 1 小时。测量 O.D. 450 吸光值, 并对细胞计数进行定量分析。如图 19 所示, 12C4'58 给出最高的抑制活性, 对 B16-BL6 细胞生长的抑制为大约 35%。55A2C 和 R1-2 均可抑制生长达大约 20%。

[0155] 接下来, 为了在接近体内条件下分析对细胞生长的抑制效果, 将 VCAM-1 固定在固相上, 并类似地进行测定。VCAM-1 是 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体; 使用了一种重组可溶形式的 VCAM-1 蛋白: rhVCAM-1-Fc 嵌合体 (Roche)。使用 10 μ g/mL 的固定在固相上的 rhVCAM-1-Fc 嵌合体, 用 0.5% BSA/PBS 封闭非特异性反应。在抗体单独使用时, 嵌合体的添加浓度为 10 μ g/ml, 在共同使用抗体时, 添加浓度为各 5 μ g/ml。之后, 遵循与图 19 相同的程序。结果, 单独施用 12C4'58 和单独使用 $\alpha 4$ 抑制抗体克隆 R1-2 根本未获得效果或者仅获得微弱的效果, 而在同时施用 12C4'58 和 R1-2 时, 细胞生长抑制效果显示了大约 20% 的显著增加, 如图 21 所示。

[0156] 6.6.3 抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体在小鼠类风湿性关节炎模型中的治疗效果

[0157] 用仓鼠抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (55A2C) 或正常仓鼠 IgG (NHG) 以 400 μ g/小鼠腹腔内注射 7 周龄雌性小鼠 (Balb/c) (每组 3 只)。24 小时后, 以 2mg/小鼠静脉内注射 II 型胶原特异性单克隆抗体关节炎诱导鸡尾酒 (Chondrex Inc.)。72 小时后, 腹腔内注射 400 μ g/小鼠的 55A2C 或 NHG 以及 50 μ g/小鼠的 LPS。从 LPS 注射前 3 天到 LPS 注射后 6 天对小鼠进行观察, 根据 Wood 等人 (1969, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 35:456) 的方法对关节炎水平进行打分。结果如图 22 所示。注射对照 NHG 的小鼠具有高分值, 并发生了类风湿性关节炎, 而在注射了抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的小鼠体内, 类风湿性关节炎的发生被完全阻断。因此, 表明抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对类风湿性关节炎具有预防和治疗效果。

[0158] 6.7 非人抗体的人源化

[0159] 6.7.1 小鼠 24I11 V 基因的克隆和测序

[0160] 小鼠 24I11 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) 中在 7.5 % CO₂ 培养箱内 37 °C 生长。使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 按照供应商的方案从大约 3x10⁶ 个杂交瘤细胞提取总 RNA。使用 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen) 按照供应商的规程合成以寡 dT 为引物的 cDNA。通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 24I11 重链和轻链的可变区 cDNA, 其中使用 PhusionDNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, MA)、分别对小鼠 γ 1- 和 κ 链恒定区退火的引物、以及 GeneRacer 试剂盒提供的 GeneRacer 5' 引物 (5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-) (SEQ ID NO :94)。对于重链可变区 (VH) 的 PCR 扩增, 引物序列为 5' -GCCAGTGGATAGACAGATGG-(SEQ IDNO :95)。对于轻链可变区 (VL) 的 PCR 扩增, 引物序列为 5' -GATGGATACAGTTGGTGCAGC-(SEQ ID NO :96)。将扩增的 VH 和 VLcDNA 亚克隆到 pCR4Blunt-TOPO 载体 (Invitrogen) 内, 用于确定序列。在 ToCore (Menlo Park, CA) 进行可变区 DNA 测序。对多条重链和轻链克隆测序, 鉴定了与典型小鼠重链和轻链可变区同源的独特序列。图 1 和 2 分别显示了共有 cDNA 序列以及推导的氨基酸序列。

[0161] 6.7.2 嵌合 24I11IgG1/ κ 抗体的构建

[0162] 通过 PCR 生成了呈包括剪接供体信号和合适的侧翼限制酶位点的外显子形式的编码 24I11 VH 的基因, 所述 PCR 用 24I11 VH cDNA 作为模板, 5'-GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTATCTTC-(SEQ IDNO :97) (SpeI 位点用下划线标记) 作为 5' 引物, 5'-GGGAAGCTTAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGTTC-(SEQ ID NO :98) (HindIII 位点用下划线标记) 作为 3' 引物 (图 3)。相似地, 通过 PCR 生成了呈包括剪接供体信号和合适侧翼限制酶位点的外显子形式的编码 24I11 VL 的基因, PCR 以 24I11 VL cDNA 为模板, 5'-GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTG-(SEQ IDNO :99) (NheI 位点用下划线标记) 为 5' 引物, 5'-GGGGAATTCTGAAGAAGACTACTTACGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCCCC-(SEQ ID NO :100) (EcoRI 位点用下划线标记) 为 3' 引物 (图 4)。24I11 VH 和 VL 外显子的剪接供体信号分别衍生自小鼠胚系 JH4 和 J κ 2 序列。PCR 扩增片段用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 进行凝胶纯化, 用 SpeI 和 HindIII (用于 VH) 或 NheI 和 EcoRI (用于 VL) 消化, 并克隆到带有人 γ -1 和 κ 恒定区的哺乳动物表达载体内, 用于产生嵌合 24I11 IgG1/ κ 抗体。图 5 显示了所得的表达载体 pCh24I11 的结构示意图。

[0163] 6.7.3 人源化 24I11 基因的产生

[0164] 24I11 可变区的人源化按照 Queen 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 10029-10033, 1989) 概述的方法进行。首先, 在计算机程序的帮助下构建 24I11 可变区的分子模型。接着, 基于面向人可变区序列的同源性搜索, 选择了由 GenBank 登录号 No. X65891 核苷酸序列编码的人氨基酸序列作为受体来提供人源化 24I11 VH 的框架, 其中 X65891 与 24I11 VH 具有高度同源性 [FRH 中的氨基酸同一性为 74.2 % (63/87)]。相似地, 选择由 GenBank 登录号 No. X72441 [FRH 中的氨基酸同一性为 77.5 % (62/80)] 的核苷酸序列编码的人氨基酸序列作为受体, 用于人源化 24I11 VL。

[0165] 在计算机模型提示与互补决定区 (CDR) 有显著接触的框架位置上, 用来自 24I11 可变区的氨基酸代替人框架氨基酸。这在位置 27、28、29、30、48、66、67 和 71 上进行 (根据

Kabat 编码系统;见 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U. S. Department of Health and Human Services, 1991), 从而产生人源化 24I11 (Hu24I11) VH (图 6)。对于轻链, 在残基 70 和 71 进行替换, 以产生人源化 24I11 (Hu24I11) VL (图 7)。图 6 和图 7 分别显示了 VH 和 VL 的 24I11、设计的 Hu24I11 和人受体氨基酸序列的比对结果。

[0166] 将编码每一个 Hu24I11 VH 和 VL 的基因设计为这样的外显子, 其包含信号肽、剪接供体信号、和用于后续克隆到哺乳动物表达载体内的合适的限制酶位点。Hu24I11 VH 和 VL 外显子的剪接供体信号分别来自人胚系 JH4 和 J κ 1 序列。Hu24I11 VH 和 VL 外显子内的信号肽序列分别衍生自相应的小鼠 Hu24I11 VH 和 VL 序列。使用 ThermalAce DNA 聚合酶 (Invitrogen), 通过多个重叠合成寡核苷酸引物的延伸和 PCR 扩增, 构建了 Hu24I11 VH 和 VL 基因, 如 He 等 (J. Immunol. 160 :1029-1035, 1998) 所概述的那样。图 8 和 9 分别列举了用于构建 Hu24I11 VH 和 VL 基因的寡核苷酸。图 10 和 11 分别显示了所述寡核苷酸在 Hu24I11 VH 和 VL 基因内的位置。用 QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 对 PCR 扩增片段进行凝胶提纯, 并克隆到 pCR4Blunt-TOPO 载体内, 用于确定序列。用 SpeI 和 HindIII (用于 VH) 或 NheI 和 EcoRI (用于 VL) 消化后, 将 Hu24I11 VH 和 VL 基因亚克隆到哺乳动物表达载体内的相应位点, 用于产生人 IgG1/ κ 形式。图 5 显示了所得的表达载体 pHu24I11 的示意结构。图 12 和 13 分别显示了所得的 Hu24I11 VH 和 VL 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。

[0167] 6.7.4 嵌合和人源化 24I11 IgG1/ κ 的瞬时表达

[0168] 根据 Durocher 等 (Nucl. Acids Res. 30 :e9, 2002) 的方法利用聚乙烯亚胺分别将 pCh24I11 和 pHu24I11 质粒 DNA 转染到 HEK293 细胞内, 对嵌合和人源化的 24I11 IgG1/ κ 抗体进行瞬时表达。将经瞬时转染的 HEK293 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 内在 7.5% CO₂ 培养箱内 37°C 保持 4 天。通过夹心式 ELISA 测量培养上清中每种 Ch24I11 和 Hu24I11 IgG1/ κ 抗体的表达水平。取块 ELISA 板, 加入 100 μ l/孔在 PBS 中以 1/2,000 稀释过的山羊抗人 IgG Fc γ 链特异多克隆抗体 (Southern Biotech, Birmingham, AL) 在 4°C 过夜进行包被, 用清洗缓冲液 (含有 0.05% Tween 20 的 PBS) 清洗, 并用 300 μ l/孔封闭缓冲液 (含有 2% 脱脂牛奶和 0.05% Tween 20 的 PBS) 在室温下封闭 1 小时。用清洗缓冲液清洗后, 向 ELISA 板添加 100 μ l/孔的适当溶解于 ELISA 缓冲液 (含有 1% 脱脂牛奶和 0.025% Tween 20 的 PBS) 中的样品。使用从人骨髓瘤血清纯化的人 IgG1/ κ 抗体 (Southern Biotech) 作为标准。在室温下温育 ELISA 板 2 小时并用清洗缓冲液清洗之后, 用 100 μ l/孔的 1/2,000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的山羊抗人 κ 链多克隆抗体 (Southern Biotech) 检测结合的抗体。在室温下温育 1 小时并用清洗缓冲液清洗之后, 通过添加 100 μ l/孔 ABTS 底物 (bioWORLD, Dublin, OH) 进行显色。通过添加 100 μ l/孔的 2% 草酸终止显色。读取 405nm 吸光度。

[0169] 6.7.5 人源化 24I11 的表征

[0170] 通过细胞 ELISA 考察嵌合和人源化 24I11 抗体与人 α 9 整联蛋白的结合。将在表面上表达重组人 α 9 整联蛋白的 CHO-K1 稳定转染体 (CHO/hu α 9; 由 Gene Technology Science 提供) 以 2×10^5 个细胞/孔接种在 96 孔组织培养板的 50 μ l 含有 10% FBS 的 F12/DMEM (HyClone) 内, 并使其在 7.5% CO₂ 培养箱内 37°C 过夜生长。为了检测与人 α 9 整联

蛋白的结合,向每个孔添加 50 μ l 溶于含有 10% FBS 的 F12/DMEM 中的嵌合 24I11、人源化 24I11 或无关人 IgG1/ κ 骨髓瘤抗体 (SouthernBiotech)。在 4℃温育 1 小时并用冰冷 PBS 清洗细胞两次后,向每个孔添加 100 μ l/孔 1/1,000 稀释的 HRP 偶联山羊抗人 IgG 多克隆抗体 (SouthernBiotech)。在 4℃温育 1 小时后,用冰冷 PBS 清洗细胞三次。为了显色,添加 100 μ l ABTS 底物。通过添加 100 μ l 2%草酸终止显色。读取 405nm 吸光度。结果显示,在 0.5 和 1 μ g/ml 下,嵌合 24I11 抗体与人 α 9 整联蛋白的结合与人源化 24I11 抗体几乎相同 (图 14)。

[0171] 还利用 CHO/hu α 9 细胞进行 FACS 结合测定检查了小鼠、嵌合和人源化 24I11 单克隆抗体的抗原结合。纯化的小鼠 24I11 单克隆抗体由 Gene TechnoSciences 提供。每次试验大约 8×10^5 个 CHO/hu α 9 细胞,用 FACS 结合缓冲液 (含有 0.5% BSA 和 0.05% NaN_3 的 PBS) 清洗,并悬浮在 200 μ l 含有各种量的测试抗体的 FACS 结合缓冲液中。冰上 30 分钟后,用 FACS 结合缓冲液清洗细胞两次。然后将被小鼠 24I11 染色的细胞悬浮在 200 μ l 以 1/200 稀释在 FACS 结合缓冲液内的 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体 (SouthernBiotech) 内。将被嵌合或人源化 24I11 染色的细胞悬浮在 200 μ l 以 1/200 稀释在 FACS 结合缓冲液内的 FITC 标记羊抗人 IgG 多克隆抗体 (SouthernBiotech) 内。冰上 30 分钟后,将细胞用 FACS 结合缓冲液清洗,并悬浮在 200 μ l FACS 结合缓冲液中,用 FACSCan 流式细胞仪 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 进行分析。在本分析中,嵌合和人源化 24I11 抗体与 CHO/hu α 9 细胞的结合彼此非常相似 (图 15)。

[0172] 使用瞬时表达抗体的细胞 ELISA 和 FACS 的实验结果表明,小鼠 24I11 抗体的人源化是成功的。

[0173] 这里公开的其它小鼠抗人 α 9 抗体 (即 1K11, 21C5, 25B6 和 28S1) 的人源化也同样可以通过采用本文说明的程序来进行。这些小鼠单克隆抗体各自的 VH 和 VL 区 DNA 序列和氨基酸序列汇总如下。

[0174]

小鼠单克隆抗体	VH 区 DNA 序列 (SEQ ID NO :) ¹	成熟 VH 推导氨基酸序列 (SEQ ID NO :) ²	VL 区 DNA 序列 (SEQ ID NO :) ¹	成熟 VL 推导氨基酸序列 (SEQ ID NO :)
1K11	35	36	40	41
21C5	45	46	50	51
25B6	55	56	60	61
28S1	65	66	70	71

[0175] ¹ 每一个抗体的 V 基因通过使用 Amersham 简并引物的方法克隆。

[0176] ² 每个克隆的推导氨基酸序列从 VH 区的第 2 个残基开始 (根据 Kabat 编码体系)

[0177] 7. 保藏

[0178] 根据微生物保藏布达佩斯条约,可产生抗人 α 9 整联蛋白单克隆抗体的在这里称作 1K11, 21C5, 24I11, 25B6 和 28S 1 的杂交瘤于 2006 年 2 月 15 日储存于日本产业技术综

合研究所国际专利生物保管 (International PatentOrganism Depositary),地址为 AIST Tsukuba Central 6,1-1, Higashi 1-chomeTsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan, 授予的登录号分别为 Nos. FERMBP-10510, FERM BP-10511, FERM BP-10512, FERM BP-10513 和 FERMBP-10832, 本文引用所有这些的全部内容作为参考。

[0179] 8. 工业实用性

[0180] 本发明的人源化单克隆抗体可抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白的功能, 从而对癌症, 例如癌细胞的生长或转移, 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、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, 显示治疗作用。本发明的包含抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗整联蛋白 $\alpha 4$ 抗体二者的药物组合物显示出对癌症和炎症性疾病具有更高的治疗作用。

[0181] 9. 序列表

[0182] 整个说明书中引用的序列总结如下。

[0183]

SEQ ID NO.	类型	描述	序列
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	24I11(FERM BP-10512) 的 CDRH1	DTYVH
5	AA	24I11(FERM BP-10512) 的 CDRH2	NIDPANGNTKYDPKFQG
6	AA	24I11(FERM BP-10512) 的 CDRH3	WLRHFYYAMDY

7	DNA	24I11(FERM BP-10512) 的 VH, 包括编码信号肽 (1-57) 的序列	ATGAAATGCAGCTGGGTATCTTCTTC CTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAA TTCAGAGGTTTACAGTGCAGCAGTCTG GGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCC TCAGTCAAGTTGTCTGCACAGCTTCT GGCTTCAACATTAAAGACACCTATGT GCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAAC AGGGCCTGGAGTGGATTGGAAATATT GATCCTGCCAATGGTAATACTAAATA TGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCA CTATAACAGCAGACACATCTCCAAC ACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCT GACATCTGAGGACACTGCCGTCTATT ACTGTGCTAGATGGTTACGACATTTT ACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAA GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
8	AA	24I11(FERM BP-10512) 的 VH, 包括信号肽 (1-19)	MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGA ELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYVHW VKQRPEQGLEWIGNIDPANGNTKYDPK FQGKATITADTSSNTAYLHLSSLTSED AVYYCARWLRHFYAMDYWGQTSV TVSS
9	AA	24I11(FERM BP-10512) 的成熟 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGF NIKDTYVHWVKQRPEQGLEWIGNIDPA NGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYL HLSSLTSEDVAVYYCARWLRHFYAM DYWGQTSVTVSS
10	AA	24I11 H 链的信号肽	MKCSWVIFFLMAVVTGVNS
11	AA	24I11(FERM BP-10512) 的 CDRL1	RASENIYSLA
12	AA	24I11(FERM BP-10512) 的 CDRL2	NANSLED
13	AA	24I11(FERM BP-10512) 的	KQAYDVPYT
		CDRL3	

[0184]

14	DNA	24I11 (FERM BP-10512) 的 VL, 包括编码信号肽 (1-60) 的序列	ATGAGTGTGCCCCTCAACTCCTGGG GTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGC AGGATGTGACATCCAGATGACTCAGT CTCCAGCCTCCCTGGCTGCATCTGTGG GAGAACTGTCACCGACATCCAGATG ACTCAGTCTCCAGCCTCCCTGGCTGCA TCTGTGGGAGAACTGTCACCGGGAA ATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGC AAACAGCTTGGAAGATGGTGTCCCAT CGAGGTTCA GTGGCAGTGGATCTGGG ACACAGTATTCTATGAAGATCAACAG CATGCAGCCTGAAGATACCGCAACTT ATTTCTGTAAACAGGCTTATGACGTTC CGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAG CTGGAAATAAAA
15	AA	24I11 (FERM BP-10512) 的 VL, 包括信号肽 (1-20)	MSVPTQLLGLLLLWLT DAGCDIQMTQSP ASLAASVGETVTITCRASENIYYS LAWY QQKQGKSPQLLIYNANSLEDGVPSRFSG SGSGTQYSMKINSMPEDTATYFCKQA YDVPYTFGGGTKLEIK
16	AA	24I11 (FERM BP-10512) 的成熟 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENI YYS LAWYQQKQGKSPQLLIYNANSLED GVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMPEDT ATYFCKQAYDVPYTFGGGTKLEIK
17	AA	24I11 L 链的信号肽	MSVPTQLLGLLLLWLT DAGC

18	DNA	X65891	ATGGA CTGGACCTGGAGGGTCTCTT TTTGGTGGCAGCAGCCACAGGTGCCC ACTCCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCT GGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGC CTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTC TGGATACACCTTCACTAGCTATGCTAT GCATTGGGTGCGCCAGGCCCGGGAC AAAGGCTTGAGTGGATGGGATGGATC AACGCTGGCAATGGTAACACAAAATA TTCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA CCATTACCAGGGACACATCCGCGAGC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCT GAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATT ACTGTGCGAGAATACCCCGTATTAGC AGTGGCTGGTTGGGGGACTACTTTGA CTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCA CCGTCTCCTCA
19	AA	X65891 的 FRH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASG YTFT
20	AA	X65891 的 FRH2	WVRQAPGQRLEWMG
21	AA	X65891 的 FRH3	RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVY YCAR
22	AA	X65891 的 FRH4	WGQGTLLTVSS
23	DNA	X72441	CGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACT CTGGCTCCGAGGTGCCAGATGTGACA TCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC ACCATCACTTGCCGGCAAGTCAGAG CATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCA GCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCACT GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTG AAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAC AGAGTTACAGTACCCCTCGGACGTTT GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA AA

24	AA	X72441 的 FRL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
25	AA	X72441 的 FRL2	WYQQKPGKAPKLLIY
26	AA	X72441 的 FRL3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYC
27	AA	X72441 的 FRL4	FGQGTKVEIK
28	DNA	Hu24I11 的 VH	CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGG GCAGAGGTGAAGAAGCCAGGGGCC TCAGTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTT CTGGCTTCAACATTAAAGACACCTAT GTGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTG GACAGAGGCTGGAGTGGATTGGAA ATATTGATCCTGCGAATGGTAATACT AAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAA GGCCACTATAACAGCAGACACATCC GCGAGCACAGCCTACATGGAGCTCA GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGC CGTCTATTACTGTGCTAGATGGTTAC GACATTTTACTATGCTATGGACTACT GGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCA
29	AA	Hu24I11 的 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGF NIKDTYVHWVRQAPGQRLEWIGNIDPA NGNTKYDPKFQGKATITADTSASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARWLRHFYYAM DYWGQGTLLTVSS
30	DNA	Hu24I11 的 VL	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATC CTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACA GAGTCACCATCACATGTCGAGCAAGT GAGAACATTTACTACAGTTTAGCATG GTATCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCC CTAAGCTCCTGATCTATAATGCAAAC AGCTTGGGAAGATGGTGTCCCATCGAG GTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAC AGTATACTCTCACCATCAGCAGCCTG

[0185]

			CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTAC TGTAACAGGCTTATGACGTTCCGTA CACGTTCCGACAAGGGACCAAGGTGG AAATCAAA
31	AA	Hu24I11 的 VL	DIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCRASENI YYSLAWYQQKPGKAPKLLIYNANSLED GVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFAT YYCKQAYDVPYTFGQGTKVEIK
32	AA	1K11(FERM BP-10510) 的 CDRH1	DYNMD
33	AA	1K11(FERM BP-10510) 的 CDRH2	DINPNNGGTIYNQKFQG
34	AA	1K11(FERM BP-10510) 的 CDRH3	SGVISTDY
35	DNA	1K11(FERM BP-10510) 的 VH	GTGCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGA GCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA AGATACCCTGCAAGGCTTCTGGATAC ACATTCAGTACTACAACATGGACTG GGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGC CTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCT AACAACGGTGGTACAATCTACAACCA GAAGTTCAGGGCAAGGCCACATTGA CTGTAGACAAGTCTCCAGCACAGCC TACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATC TGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTG CAAGATCGGGGTTATTAGTACGGAC TACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCA
36	AA	1K11(FERM BP-10510) 的成熟 VH, 从根据 Kabat 编号的第 2 个残基开始	? VQLQESGPELVKPGASVKIPCKASGYT FTDYNMDWVKQSHGKSLEWIGDINPN NGGTIYNQKFQGGKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDYAVYYCARSGVISTDYWG QGTTVTVSS
37	AA	1K11(FERM BP-10510) 的 CDRL1	RASQEISGYLI
38	AA	1K11(FERM BP-10510) 的 CDRL2	AASTLDS

39	AA	1K11 (FERM BP-10510) 的 CDRL3	LQYANYPPT
40	DNA	1K11 (FERM BP-10510) 的 VL	GACATCCAGATGACACAGTCTCCACC CTCCCTATCTGCCTCTCTGGGAGAAA GAGTCAGTCTCACTTGTCTGGGCAAGT CAGGAAATTAGTGGTTACTTAATCTG GCTTCAACAGAAACCAGATGGAACATA TTCAACGCCTGATCTACGCCGCATCC ACTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAG GTTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTGAG ATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTG AGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACT
			GTCTACAATATGCTAATTATCCTCCGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA ATCAAACGG
41	AA	1K11 (FERM BP-10510) 的成熟 VL	DIQMTQSPPSLASLGERVSLTCRASQEI SGYLIWLQQKPDGTIQRLIYAASLDLSDG VPKRFGSGRSGSDYSLTISSELEDFADY YCLQYANYPPTFGGGTKLEIKR
42	AA	21C5 (FERM BP-10511) 的 CDRH1	DYYMY
43	AA	21C5 (FERM BP-10511) 的 CDRH2	TISDGGNYTYYPDSVKG
44	AA	21C5 (FERM BP-10511) 的 CDRH3	DRDGSSLFAY

45	DNA	21C5(FERM BP-10511) 的 VH	GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGG CTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCCTGA AACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCA CTTTCAGTGACTATTACATGTATTGGG TTCGCCAGACTCCGGAAAAGAGGCTG GAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGG TGGTAATTACACCTACTATCCAGACA GTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCC AGAGACAATGCCAAGAATAACCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTG AGGACACAGCCATGTATTACTGTGCA AGAGATCGGGACGGTAGTAGCCTGTT TGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
46	AA	21C5(FERM BP-10511) 的成熟 VH, 从根据 Kabat 编号的第 2 个残基开始	? VQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFT FSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISDG GNYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNNLYL QMSSLKSEDTAMYCARDRDGSSLFAY WGQGTITVTVSS
47	AA	21C5(FERM BP-10511) 的 CDRL1	KASQDVNIAVA
48	AA	21C5(FERM BP-10511) 的 CDRL2	WASTRHT
49	AA	21C5(FERM BP-10511) 的 CDRL3	QQHYNTPW
50	DNA	21C5(FERM BP-10511) 的 VL	CATCCAGATGACACAGTCTCCAAATT CATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG TCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAG GATGTGAATATTGCTGTAGCCTGGTAT CAACAAAGACCAGGGCAATCTCCTAA ACTACTGATTTACTGGGCATCCACCC GGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTC ACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTA TACTCTACCATCAGCAGTGTGCAGG CTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTC AGCAACATCATAAACTCCGTGGACG

[0186]

			TTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT CAAACGG
51	AA	21C5 (FERM BP-10511) 的成熟 VL	HPDDTVSKFMSTSVGDRVSITCKASQD VNIAVAWYQQRPQGSPKLLIWASTRH TGVDPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDL ALYYCQQHYNTPWTFGGGKLEIKR
52	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的 CDRH1	SYGVH
53	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的 CDRH2	VIWSGGSTNYNSALMS
54	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的 CDRH3	DYGNYPWFAY
55	DNA	25B6 (FERM BP-10513) 的 VH	GTCAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGG CCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGT CCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTT CATTAAACCAGTTATGGTGTACACTGG GTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCT GGAGTGGCTGGGAGTAATATGGTCTG GTGGAAGCACAAATTATAATTCGGCT CTCATGTCCAGACTGAGCATCAGTAA AGACAATTTTAAGAGCCAAGTTTCTT AAAAATGAACAGTCTGCAAAGTATG ACACAGCCATATACTACTGTGCCAGA GACTATGGTAACTACCCCTGGTTTGCT TACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAC CGTCTCCTCA
56	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的成熟 VH, 从根据 Kabat 编号的第 2 个残基开始	? VKLQQSGPGLVAPSQLSITCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGKLEWLGIWSSG STNYNSALMSRLSISKDNFKSQVFLKM NSLQTDDTAIYYCARDYGNYPWFAYW GQGTTVTVS
57	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的 CDRL1	KASQDVNTAVA
58	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的 CDRL2	SASYRYT

59	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的 CDRL3	QQHYSTPCA
60	DNA	25B6 (FERM BP-10513) 的 VL	CATCCAGATGACACAGTCTCCAAATT CATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG TCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAG GATGTGAATACTGCTGTGGCCTGGTA TCAACAGAAACCAGGACAATCCCCTA AACTACTGATTTACTCGGCATCCTACC GGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTC ACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTT CACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGG CTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTC AGCAACATTATAGTACTCCGTGCGCG
			TTCGGAGGGGGACAAAGTTGGAAAT AAAACGG
61	AA	25B6 (FERM BP-10513) 的成熟 VL	HPDDTVSKFMSTSVGDRVSITCKASQD VNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRY TGVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDL AVYYCQQHYSTPCAFGGGTKLEIKR
62	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的 CDRH1	GYGVN
63	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的 CDRH2	MIWGDGITEYNSALKS
64	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的 CDRH3	RDASSGYGFA

65	DNA	28S1 (FERM BP-10832) 的 VH	AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCT GGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCT GTCCATCACATGCACCGTCTCAGGGT TCTCATTAACCGGCTATGGTGTAACT GGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGT CTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG TGATGGAATCACAGAGTATAATTTCAG CTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGC AAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTT CTTAAAAATGAACAGTCTGCAAATG ATGACACAGCCAGGTACTACTGTGCC AGAGATGCCAGCTCGGGCTACGGGTT TGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
66	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的成熟 VH, 从根据 Kabat 编号的第 2 个残基开始	? VKLQESGPLVAPSQSLITCTVSGFSL TGYGVNWVRQPPGKLEWLGMWGD GITEYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTARYYCARDASSGYGFAYW GQGTTTVVSS
67	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的 CDRL1	TASSSVSSSYLH
68	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的 CDRL2	STSNLAS
69	AA	28S1 (FERM BP-10832) 的 CDRL3	HQYHRSPYT
70	DNA	28S1 (FERM BP-10832) 的 VL	TACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGC AATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAAC GGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGC TCAAGTGTAAAGTTCCAGTTACTTGCAC TGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTC CCCCAACTCTGGATTATAGCACAT CCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCT CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC CTCTTACTCTCTACAATCAGCAGCAT GGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATT ACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCGT

[0187]

			ACACGTTCCGAGGGGGACAAAGTTG GAAATAAAACGG
71	AA	28S1(FERM BP-10832) 的成熟 VL	YIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSS VSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNL ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCHQYHRSPYTFGGGTKLEIKR
72	DNA	24I11(FERM BP-10512) 的 VH, 包括编码信号肽 (1-57) 的序列, 两侧为 SpeI 和 HindIII 位点	ACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTG GGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGT TACAGGGGTCAATTCAGAGGTTCAGC TGCAGCAGTCTGGGCAGAGCTTGTG AAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTC CTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAA AGACACCTATGTGCACTGGGTGAAGC AGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGG ATTGGAAATATTGATCCTGCGAATGG TAATACTAAATATGACCCGAAGTTCC AGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGAC ACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCA CCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACA CTGCCGTCTATTACTGTGCTAGATGGT TACGACATTTTACTATGCTATGGACT ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC GTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTA AGCTT
73	DNA	24I11(FERM BP-10512) 的 VL, 包括编码信号肽 (1-60) 的序列, 两侧为 NheI 和 EcoRI 位点	GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCAC TCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTG GCTTACAGACGCAGGATGTGACATCC AGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTG GCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCAC CGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAG CCTCCCTGGCTGCATCTGTGGGAGAA ACTGTCACCGGAAATCTCCTCAGCT CCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGG AAGATGGTGTCCCATCGAGGTTCACT GGCAGTGGATCTGGGACACAGTATTC TATGAAGATCAACAGCATGCAGCCTG AAGATACCGCAACTTATTTCTGTAAA CAGGCTTATGACGTTCCGTACACGTTT GGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAA AACGTAAGTAGTCTTCTCAGAATTC

74	DNA	图 10(有 5' -GGG 和 CCC-) 和图 12 Hu24I11 VH 基因, 两侧为 SpeI 和 HindIII 位点	ACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTG GGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGT TACAGGGGTCAATTCACAGGTCAGC TGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAG AAGCCAGGGGCTCAGTCAAGGTTTC CTGCAAGGCTTCTGGCTTCAACATTAA AGACACCTATGTGCACTGGGTGCGCC AGGCCCCTGGACAGAGGCTGGAGTGG ATTGGAAATATTGATCCTGCGAATGG TAATACTAAATATGACCCGAAGTTCC
----	-----	---	--

[0188]

			AGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGAC ACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGA GCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACA CTGCCGTCTATTACTGTGCTAGATGGT TACGACATTTTTACTATGCTATGGACT ACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACC GTCTCCTCAGGTGAGTCCTCACAAAA GCTT
75	DNA	图 11 (有 5'-GGG 和 CCC-)和图 13 Hu24H11 VL 基因, 两侧为 NheI 和 EcoRI 位点	GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCAC TCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTG GCTTACAGACGCACGATGTGACATCC AGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACC ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAACAT TTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCA GAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAATGCAAACAGCTTGGA GATGGTGTCCCATCGAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCTGGGACACAGTATACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAG GCTTATGACGTTCCGTACACGTTCCGA CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC GTGAGTAGAATTTAAAGAATTC
76	AA	人 $\alpha 9$ 整联蛋白(信号肽; 1-29 残 基; 斜体)	<i>MGGPAAPRGAGRLRALLLALVVAGIPAGA</i> <i>YNLDPQRPVHFQGPADSFFGYAVLEHF</i> <i>HDNTRWVLVGAPKADSKYSPSVKSPG</i> <i>AVFKCRVHTNPDRRCTELDMARGKNR</i> <i>GTSCGKTCREDRDDEWMGVSLARQPK</i> <i>ADGRVLACAHRWKNIYYEADHILPHGF</i> <i>CYIIPSNLQAKGRTLIPCYYEYKKKYGEE</i> <i>HGSCQAGIAGFFTEELVVMGAPGSFYW</i> <i>AGTIKVLNLTDNTYLKLNDEVIMNRRY</i> <i>TYLGAVTAGHFHSPSTIDVVGAPQD</i> <i>KGIGKVYIFRADRRSGTLIKIFQASGKK</i> <i>MGSYFGSSSLCAVDLNGDGLSDLLVGAP</i> <i>MFSEIRDEGQVTVYINRGNGALEEQLAL</i> <i>TGDGAYNAHFGESIASLDDLNDGFPD</i> <i>VAIGAPKEDDFAGAVYIYHGDAGGIVP</i> <i>QYSMKLSGQKINPVLRMFGQSISGGIDM</i> <i>DGNGYPDVTVGAFMSDSVLLRARPVI</i> <i>TVDVSIPLPGSINITAPQCHDGQQPVNCL</i> <i>NVTTCFSFHGKHVPGEIGLNYVLMADV</i> <i>AKKEKGQMPRVYFVLLGETMGQVTEK</i> <i>LQLTYMEETCRHYVAHVKRRVQDVISP</i> <i>IVFEAAYSLEHVTGEEERELPPLTPVLR</i> <i>WKKGQKIAQKNQTVFERNCRSEDCAA</i> <i>DLQLQGKLLLSSMDEKTLYLALGAVKN</i> <i>ISLNISISNLGDDAYDANVSFNVSREFFI</i>

[0189]

			NMWQKEEMGISCELLESDFLKCSVGFP FMRSKSKYEFSVIFDTSHLSGEEVLSFI VTAQSGNTERSESLHDNTLVLMVPLMH EVDTSITGIMSPTS FVYGESVDAANFIQL DDLECHFQPINITLQVYNTGPSTLPGSSV SISFPNRLSSGGAEMFHVQEMVVGQEK GNCSFQKNPTPCIIPQEENIFHTIFAFFT KSGRKVLDCEKPGISCLTAHCNFSALAK EESRTIDIYMLLNTEILKKDSSSVIQFMS RAKVKVPALRVVEIAHGNPEEVTVVF EALHNLEPRGYVVGWIIAISLLVGILIFLL LAVLLWKMGFFRRRYKEITIEAEKNRKE NEDSWDWWQKNQ
77	AA	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	FQGPADSFFGYA
78	AA	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	KSPGAVFKCRVHTNPDRR
79	AA	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	WMGVSLARQPKADGRVLA
80	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	CAHRWKNIYYEADHI
81	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	GFCYTIIPSNLQAKGRTL I
82	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	VMGAPGSFYWAGTIKVLN
83	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	VIMNRRYTYLGYAVT
84	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	VYIFRADRRSGTLIKIFQ
85	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	QYSMKLSGQKINPVLRMFGQSISG
86	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	VVLLRARPVITVDVSIFL
87	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	RHYVAHVKRRVQDVISPI
88	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	ELPPLTPVLRWKKGQKIAQKNQTVFER NCR
89	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	YLALGAVKNISL
90	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	CSVGPFPMRSKSKYEFSV
91	aa	hu α 9 整联蛋白部分氨基酸序列	SSSVIQFMSSRAKVKVPALRV
92	aa	生腱蛋白 -C hu α 9 结合位点	AEIDGIEL

93	aa	人纤连蛋白 hu α 9 结合位点	CPEDGIHELFP
94	DNA	GeneRacer 5' 引物	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
95	DNA	VH 引物	GCCAGTGGATAGACAGATGG
96	DNA	VL 引物	GATGGATACAGTTGGTGCAGC
97	DNA	VH 5' 引物, 带有 SpeI 位点	GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAG CTGGGTATCTTC
98	DNA	VH 引物, 带有 HindIII 位点	GGGAAGCTTAGAGGCCATTCTTACCT GAGGAGACGGTGACTGAGGTTCC3
99		VL 5' 引物, 带有 NheI 位点	GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCC
			CACTCAACTCCTG
100		VL 5' 引物, 带有 EcpRI 位点	GGGGAATTCTGAGAAGACTACTTACG TTTTATTTCAGCTTGGTCCCCC
101	DNA	JNJ120	GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAG C
102	DNA	JNJ137	GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAG CTGGGTATCTTCTTCCTGATGGCAGT GGTT
103	DNA	JNJ138	AGACTGCACCAGCTGAACCTGTGAAT TGACCCCTGTAACCACTGCCATCAGG AAGAA
104	DNA	JNJ139	CAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGC AGAGGTGAAGAAGCCAGGGCCCTCA GTCAAG
105	DNA	JNJ140	GTCTTTAATGTTGAAGCCAGAAGCCTT GCAGGAAACCTTGACTGAGGCCCTG GCTT

106	DNA	JNJ141	TCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTAT GTGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGG ACAGAGG
107	DNA	JNJ142	ACCATTTCGAGGATCAATATTTCCAAT CCACTCCAGCCTCTGTCCAGGGGCCT GGCG
108	DNA	JNJ143	AATATTGATCCTGCGAATGGTAATAC TAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCA AGGCCACT
109	DNA	JNJ144	CATGTAGGCTGTGCTCGCGGATGTGT CTGCTGTTATAGTGGCCTTGCCCTGGA ACTT
110	DNA	JNJ145	TCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCT CAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTG CCGTC
111	DNA	JNJ146	ATAGTAAAAATGTCGTAACCATCTAG CACAGTAATAGACGGCAGTGTCTCA GA
112	DNA	JNJ147	TGGTTACGACATTTTACTATGCTATG GACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGT CACC
113	DNA	JNJ148	GGGAAGCTTTTGTGAGGACTCACCTG AGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGA CC
114	DNA	JNJ149	GGGAAGCTTTTGTGAGGACTC
115	DNA	JNJ150	GGGGCTAGCACCACCATGAGT
116	DNA	JNJ126	GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCC CACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCT GTGG
117	DNA	JNJ127	AGACTGAGTCATCTGGATGTCACATC GTGCGTCTGTAAGCCACAGCAGCAGC AACCCAG

118	DNA	JNJ128	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATC CTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACA GA
119	DNA	JNJ129	GTAAATGTTCTCACTTGCTCGACATGT GATGGTGACTCTGTCTCCACAGATG CAGA
120	DNA	JNJ130	CGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAG TTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCAG GGAAA
121	DNA	JNJ131	CAAGCTGTTTGCATTATAGATCAGGA GCTTAGGGGCTTCCCTGGCTTCTGCT GATA
122	DNA	JNJ132	ATCTATAATGCAAACAGCTTGAAGA TGGTGTCCCATCGAGGTTCA GTGGA GTGGA
123	DNA	JNJ133	CAGGCTGCTGATGGTGAGGTATACT GTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAAC CTCGA
124	DNA	JNJ134	ACTCTACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAA ACAG
125	DNA	JNJ135	GGTCCCTTGTCCGAACGTGTACGGAA CGTCATAAGCCTGTTTACAGTAATAA GTTGC
126	DNA	JNJ136	TACACGTTCCGACAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAACGTGAGTAG
127	DNA	JNJ101	GGGGAATTCTTTAAATTCTACTCACGT TTGATTTC CA
128	DNA	JNJ117	GGGGAATTCTTTAAATTCTA
129	DNA	用于小鼠 γ 1, γ 2a, γ 2b 和 γ 3H 链 的引物	GCCAGTGGATAGACTGATGG
130	DNA	用于小鼠 κ L 链引物的引物	GATGGATACAGTTGGTGCAGC

[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> 人源化抗整合蛋白 $\alpha 9$ 抗体及其应用

<130> PCT08-0060

<150> US61/020,527
<151> 2008-01-11

<160> 130

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> OPN 粘附序列

<400> 1

Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> HuOPN 的 $\alpha 4 \beta 1 / \alpha 9 \beta 1$ 结合位点

<400> 2

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> MuOPN 的 $\alpha 4 \beta 1 / \alpha 9 \beta 1$ 结合位点

<400> 3

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 24111 的 CDRH1 (FERM BP-10512)

<400> 4

Asp Thr Tyr Val His
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 24111 的 CDRH2 (FERM BP-10512)

<400> 5

Asn Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6

[0002]

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 24111 的 CDRH3 (FERM BP-10512)
 <400> 6
 Trp Leu Arg His Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> 24111 的 VH (FERM BP-10512) 包括编码信号肽的序列 (1-57)
 <400> 7
 atgaaatgca gctgggttat ctcttcctg atggcagtggt ttacaggggt caattcagag 60
 gttcagctgc agcagctctgg ggcagagctt gtgaagccag gggcctcagt caagttgtcc 120
 tgcacagctt ctggcttcaa cattaaagac acctatgtgc actgggtgaa gcagaggcct 180
 gaacagggcc tggagtggat tggaaatatt gatcctgcga atggttaatac taaatatgac 240
 ccgaagtcc agggcaaggc cactataaca gcagacacat cctccaacac agcctacctg 300
 caccctcagca gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctag atggttacga 360
 catttttact atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctccctca 417
 <210> 8
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> 24111 的 VH (FERM BP-10512) 包括信号肽 (1-19)
 <400> 8
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Thr Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Leu Arg His Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 <210> 9
 <211> 120

[0003]

<212> PRT
 <213> 24I11 的成熟 VH (FERM BP-10512)
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Leu Arg His Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 24I11 重链的信号肽
 <400> 10
 Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 24I11 的 CDRL1 (FERM BP-10512)
 <400> 11
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Tyr Ser Leu Ala
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 24I11 的 CDRL2 (FERM BP-10512)
 <400> 12
 Asn Ala Asn Ser Leu Glu Asp
 1 5
 <210> 13
 <211> 9

[0004]

```

<212> PRT
<213> 24I11 的 CDRL3 (FERM BP-10512)

<400> 13

Lys Gln Ala Tyr Asp Val Pro Tyr Thr
1          5

<210> 14
<211> 381
<212> DNA
<213> 24I11 的 VL (FERM BP-10512) 包括编码信号肽的序列 (1-60)

<400> 14
atgagtgtgc ccactcaact cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga cgcaggatgt    60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctggctgcat ctgtgggaga aactgtcacc    120
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctggctgcat ctgtgggaga aactgtcacc    180
gggaaatctc ctacgctcct gatctataat gcaaacagct tggaagatgg tgcctcatcg    240
aggttcagtg gcagtggatc tgggacacag tattctaiga agatcaacag catgcagcct    300
gaagataccg caacttattt ctgtaaacag gcttatgacg ttccgtacac gttcggaggg    360
gggaccaagc tggaaataaa a                                           381

<210> 15
<211> 127
<212> PRT
<213> 24I11 的 VL (FERM BP-10512) 包括信号肽 (1-20)

<400> 15

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

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

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

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

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> 24I11 的成熟 VL (FERM BP-10512)

<400> 16

```

[0005]

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

Glu Thr Val Thr Ile 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> 24111 轻链的信号肽

<400> 17

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

Asp Ala Gly Cys
20

<210> 18
<211> 429
<212> DNA
<213> X65891

<400> 18
atggactgga cctggagggt cctctttttg gtggcagcag ccacagggtc ccactcccag 60
gtccagcttg tgcagtcctg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120
tgcaaggcct ctggatacac cttcactagc tatgctatgc attgggtgcg ccaggccccc 180
ggacaaaggc ttgagtggtt ggatggatc aacgctggca atggtaacac aaaatattca 240
cagaagttcc agggcagagt caccattacc agggacacat ccgcgagcac agcctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaagacacg gctgtgtatt actgtgcgag aataccctgt 360
attagcagtg gctgggtggg ggactacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 420
gtctcctca 429

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> X65891 的 FRH1

<400> 19

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

[0006]

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

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> X65891 的 FRH2

<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> X65891 的 FRH3

<400> 21

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu 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> X65891 的 FRH4

<400> 22

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 23
<211> 370
<212> DNA
<213> X72441

<400> 23
cgctcagctc ctggggctcc tgctactctg gctccgaggt gccagatgtg acatccagat 60
gaccacgtct ccatcctccc tgtctgcac ttaggagac agagtcacca tcacttgccg 120
ggcaagtcag agcattagca gctatttaaa ttggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc 180
taagctcctg atctatgctg catccagttt gcaaagtggg gtcccatcaa ggttcagtgg 240
cagtggatct gggacagatt tcactctcac catcagcagt ctgcaacctg aagattttgc 300
aacttactac tgicaacaga gttacagtac ccctcggacg ttcggccaag ggaccaaggt 360
ggaaatcaaa 370

<210> 24
<211> 23
<212> PRT
<213> X72441 的 FRL1

<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

[0007]

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> X72441 的 FRL2

<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> X72441 的 FRL3

<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> X72441 的 FRL4

<400> 27

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 28
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Hu24111 的 VII

<400> 28
 caggttcagc tggcgcagtc tggggcagag gtgaagaagc caggggcctc agtcaaggtt 60
 tcttgcaagg cttctggctt caacattaaa gacacctatg tgcactgggt gcgccaggcc 120
 cctggacaga ggctggagtg gattggaaat attgatcctg cgaatggtaa tactaaatat 180
 gaccggaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catccgcgag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgag atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagatggtta 300
 cgacattttt actatgctat ggactactgg ggtcaaggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 29
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Hu24111 的 VII

<400> 29

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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

[0008]

Gly Asn Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile 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

Ala Arg Trp Leu Arg His Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 321
<212> DNA
<213> Hu24111 的 VL

<400> 30
gacatccaga tgactcagtc tccatcctcc ctgtcigcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaacatttac tacagtttag catggtatca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaacagct tggaagatgg tgtcccatcg 180
aggttcagtg gcagtggtac tgggacacag tatactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtaaacag gcttatgacg ttccgtacac gttcggacaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> Hu24111 的 VL

<400> 31

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> 32

[0009]

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 1K11 的 CDRH1 (FERM BP-10510)

 <400> 32

 Asp Tyr Asn Met Asp
 1 5

 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 1K11 的 CDRH2 (FERM BP-10510)

 <400> 33

 Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 34
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 1K11 的 CDRH3 (FERM BP-10510)

 <400> 34

 Ser Gly Val Ile Ser Thr Asp Tyr
 1 5

 <210> 35
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 1K11 的 VH (FERM BP-10510)

 <400> 35
 gtgcagctgc aggagtcagg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagataccc 60
 tgcaaggctt ctggatacac attcactgac tacaacatgg actgggtgaa gcagagccat 120
 ggaaagagcc ttgagtggat tggagatatt aatcctaaca acggiggtac aatctacaac 180
 cagaagttcc agggcaaggc cacattgact gtagacaagt cctccagcac agcctacatg 240
 gagctccgca gcctgacatc taggacact gcagtcctatt actgtgcaag atcggggggt 300
 attagtacgg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctca 348

 <210> 36
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 1K11 的成熟 VH (FERM BP-10510), 从依照 Kabat 编号的第 2 个残基开始

 <400> 36

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

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

 Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

 Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 50 55 60

[0010]

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> 1K11 的 CDRL1 (FERM BP-10510)

<400> 37

Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ile
1 5 10

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 1K11 的 CDRL2 (FERM BP-10510)

<400> 38

Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 1K11 的 CDRL3 (FERM BP-10510)

<400> 39

Leu Gln Tyr Ala Asn Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 40
<211> 324
<212> DNA
<213> 1K11 的 VL (FERM BP-10510)

<400> 40
gacatccaga tgacacagtc tccacccctcc ctatctgcct ctctggggaga aagagtcagt 60
ctcacttgtc gggcaagtca ggaaattagt ggttacttaa tctggcttca acagaaacca 120
gatggaacta ttcaacgcct gatctacgcc gcatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat taitctctca ccatcagcag ccttgagtc 240
gaagattttg cagactatia ctgtctacaa tatgctaatt atcctccgac gticggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> 1K11 的成熟 VL (FERM BP-10510)

<400> 41

[0011]

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

<210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 21C5 的 CDRH1 (FERM BP-10511)

<400> 42

Asp Tyr Tyr Met Tyr
 1 5

<210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 21C5 的 CDRH2 (FERM BP-10511)

<400> 43

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 21C5 的 CDRH3 (FERM BP-10511)

<400> 44

Asp Arg Asp Gly Ser Ser Leu Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 21C5 的 VH (FERM BP-10511)

<400> 45
 gtgcagctgc aggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggctcct gaaactctcc 60
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtac tattacatgt attgggttcg ccagactccg 120

[0012]

```

gaaaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtgatgggt gtaattacac ctactatcca 180
gacagtgtga aggggcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaataa cctgtacctg 240
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag agatcgggac 300
ggtagtagcc tgtttgctta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

```

<210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 21C5 的成熟 VH (FERM BP-10511), 从依照 Kabat 编号的第 2 个残基开始

<400> 46

```

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

```

```

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

```

```

Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
35           40           45

```

```

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50           55           60

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 21C5 的 CDRL1 (FERM BP-10511)

<400> 47

```

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Ile Ala Val Ala
1           5           10

```

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 21C5 的 CDRL2 (FERM BP-10511)

<400> 48

```

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1           5

```

<210> 49
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 21C5 的 CDRL3 (FERM BP-10511)

<400> 49

[0013]

Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Trp
1 5

<210> 50
<211> 321
<212> DNA
<213> 21C5 的 VL (FERM BP-10511)

<400> 50
catccagatg acacagtctc caaattcatg tccacatcag taggagacag ggtcagcatc 60
acctgcaagg ccagtcagga tgtgaatatt gctgtagcct ggtatcaaca aagaccaggg 120
caatctccta aactactgat ttactgggca tccacccggc acactggagt ccctgatcgc 180
ttcacaggca gtggatctgg gacagattat actctacca tcagcagtgt gcaggctgaa 240
gacctggcac ttattactg tcagcaacat cataacactc cgtggacgtt cgggtggaggc 300
accaagctgg aaatcaaacg g 321

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> 21C5 的成熟 VL (FERM BP-10511)

<400> 51

His Pro Asp Asp Thr Val Ser Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp
1 5 10 15

Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Ile Ala Val
20 25 30

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

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser
50 55 60

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

Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> 25B6 的 CDRH1 (FERM BP-10513)

<400> 52

Ser Tyr Gly Val His
1 5

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> 25B6 的 CDRH2 (FERM BP-10513)

<400> 53

[0014]

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 25B6 的 CDRH3 (FERM BP-10513)

<400> 54

Asp Tyr Gly Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 351
<212> DNA
<213> 25B6 的 VH (FERM BP-10513)

<400> 55
gtcaagctgc agcagtcctg acctggcctg gtggcgccct cacagagcct gtccatcact 60
tgactgtct ctgggttttc attaacctgt tatgggtgtac actgggttcg ccagcctcca 120
ggaaagggtc tggagtggct gggagtaata tggctctggg gaagcacaaa ttataattcg 180
gctctcatgt ccagactgag catcagtaaa gacaatttta agagccaagt tttcttaaaa 240
atgaacagtc tgcnaactga tgacacagcc atatactact gtgccagaga ctatggtaac 300
taccctctgt ttgcttactg gggccaaggg accacgggca cgtctctctc a 351

<210> 56
<211> 116
<212> PRT
<213> 25B6 的成熟 VH (FERM BP-10513), 从依照 Kabat 编号的第 2 个残基开始

<400> 56

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

Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
20 25 30

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

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
50 55 60

Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Phe Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
65 70 75 80

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

Asp Tyr Gly Asn Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser
115

<210> 57
<211> 11

[0015]

```

<212> PRT
<213> 25B6 的 CDRL1 (FERM BP-10513)

<400> 57

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1          5          10

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 25B6 的 CDRL2 (FERM BP-10513)

<400> 58

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1          5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 25B6 的 CDRL3 (FERM BP-10513)

<400> 59

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Cys Ala
1          5

<210> 60
<211> 321
<212> DNA
<213> 25B6 的 VL (FERM BP-10513)

<400> 60
caiccagatg acacagtcctc caaatccatg tccacatcag taggagacag ggtcagcatc 60
acctgcaagg ccagtcagga tgtgaatact gctgtggcct ggtatcaaca gaaaccagga 120
caatccccta aactactgat ttactcggca tcctaccggt acactggagt ccctgatcgc 180
ttcactggca gtggatctgg gacggatttc actttcacca tcagcagtgt gcaggctgaa 240
gaccctggcag titattactg tcagcaacat tatagtactc cgtgcgcgtt cggagggggg 300
acaaagtlgg aaataaaacg g 321

<210> 61
<211> 107
<212> PRT
<213> 25B6 的成熟 VL (FERM BP-10513)

<400> 61

His Pro Asp Asp Thr Val Ser Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp
1          5          10          15

Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val
20          25          30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

```

[0016]

Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Cys Ala
85 90 95

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

<210> 62
<211> 5
<212> PRT
<213> 28S1 的 CDRH1 (FERM BP- 10832)

<400> 62

Gly Tyr Gly Val Asn
1 5

<210> 63
<211> 16
<212> PRT
<213> 28S1 的 CDRH2 (FERM BP- 10832)

<400> 63

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ile Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 28S1 的 CDRH3 (FERM BP- 10832)

<400> 64

Arg Asp Ala Ser Ser Gly Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 353
<212> DNA
<213> 28S1 的 VH (FERM BP- 10832)

<400> 65
agggtgaagct gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgcc ctcacagagc ctgtccatca 60
catgcaccgt ctcagggttc tcattaaccg gctatgggtg aaactgggtt cgccagcctc 120
caggaaaggg tctgggagtgg ctgggaatga tatgggggtg tggaatcaca gagtataatt 180
cagctctcaa atccagactg agcatcagca aggacaactc caagagccaa gttttcttaa 240
aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccaggtacta ctgtgccaga gatgccagct 300
cgggctacgg gtttgcttac tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tca 353

<210> 66
<211> 117
<212> PRT
<213> 28S1 的成熟 VH (FERM BP- 10832), 从依照 Kabat 编号的第 2 个残基开始

<400> 66

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

Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Gly
20 25 30

[0017]

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

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ile Thr Glu Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 50 55 60

Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 28S1 的 CDRL1 (FERM BP- 10832)

<400> 67

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
 1 5 10

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 28S1 的 CDRL2 (FERM BP- 10832)

<400> 68

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 28S1 的 CDRL3 (FERM BP- 10832)

<400> 69

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 70
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 28S1 的 VL (FERM BP- 10832)

<400> 70
 tacattgtgc tgacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctaggga acgggtcacc 60
 atgacctgca ctgccagctc aagtgttaagt tccagttact tgcactgcta ccagcagaag 120
 ccaggatcct cccccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtccca 180
 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagcatggag 240
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccac cagtatcacc gttccccgta cacgttcgga 300
 ggggggacaa agttggaaat aaaacgg 327

[0018]

<210> 71
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 28S1 的成熟 VL (FERM BP- 10832)

<400> 71

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
 85 90 95

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

<210> 72
 <211> 451
 <212> DNA
 <213> 24I11 的 VH (FERM BP-10512), 包括编码信号肽的序列 (1-57), 侧翼有 SpeI 和 HindIII 位点

<400> 72
 actagtacca ccatgaaatg cagctgggtt atcttcttcc tgatggcagt ggttacaggg 60
 gtcaattcag aggttcagct gcagcagctc ggggcagagc ttgtgaagcc aggggcctca 120
 gtcaagtgt cctgcacagc ttctggcttc aacattaaag acacctatgt gcactgggtg 180
 aagcagaggc ctgaacaggc cctggagtgg attggaaata ttgatcctgc gaatggtaat 240
 actaaatattg acccgaagtt ccagggcgaag gccactataa cagcagacac atccccaac 300
 acagcctacc tgcacctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct 360
 agatggttac gacattttta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcatgcacc 420
 gtctcctcag gtaagaatgg cctctaagct t 451

<210> 73
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> 24I11 的 VL (FERM BP-10512), 包括编码信号肽的序列 (1-60), 侧翼有 NheI 和 EcoRI 位点

<400> 73
 gctagcacca ccatgagigt gccacacaa ctccctgggt tgctgctgct gtggcttaca 60
 gacgcaggat gtgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctggctgc atctgtggga 120
 gaaactgtca ccgacatcca gatgactcag tctccagcct ccctggctgc atctgtggga 180
 gaaactgtca ccgggaaatc tctcagctc ctgatctata atgcaaacag ctgggaagat 240
 gggtgccat cgaggttcag tggcagtggg tctgggacac agtattctat gaagatcaac 300
 agcatgcagc ctgaagatac cgcaacttat ttctgtaaac aggcattatga cgttccgtac 360

[0019]

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtaagt agtcttctca gaattc	416
<210> 74	
<211> 450	
<212> DNA	
<213> 图 10 (w/ 5' -GGG 和 CCC-)和图 12 Hu24111 VH 基因, 侧翼有 SpeI 和 HindIII 位点	
<400> 74	
actagtiacca ccatgaaatg cagctggggtt atcttcttcc tgatggcagt ggttacaggg	60
gtcaattcac aggttcagct ggtgcagtct ggggcagagg tgaagaagcc aggggcctca	120
gtcaagggtt cctgcaaggc ttctggcttc aacattaaag acacctatgt gcactgggtg	180
cgccaggccc ctggacagag gctggagtgg attggaaata ttgatcctgc gaatggtaat	240
actaaataig acccgaaatt ccagggaag gccactataa cagcagacac atccgcgagc	300
acagcctaca tggagctcag cagccigaga tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct	360
agatgggtac gacattttta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac cctggtcacc	420
gtctcctcag gtgagtcctc acaaaagctt	450
<210> 75	
<211> 416	
<212> DNA	
<213> 图 11 (w/ 5' -GGG 和 CCC-)和图 13	
<Hu24111 VL 基因, 侧翼有 NheI 和 EcoRI 位点	
<400> 75	
gctagcacca ccatgaggtg gcccaactcaa ctccctggggt tgctgtctgct gggccttaca	60
gacgcacgat gtgacatcca gatgactcag tctccatcct cctgtctctg atctgtggga	120
gacagagtca ccatcacatg tcgagcaagt gagaacattt actacagttt agcatgggat	180
cagcagaagc cagggaagc ccctaagctc ctgatctata atgcaaacag ctggaagat	240
gggtgcccat cgagggttcag tggcagtggg tctgggacac agtatactct caccatcagc	300
agcctgcagc ctgaagattt tgcaacttat tactgtaaac aggcttatga cgttccgtac	360
acgttcggac aagggaacaa ggtggaaatc aaacgtgagt agaatttaaa gaattc	416
<210> 76	
<211> 1035	
<212> PRT	
<213> 人 α 9 整联蛋白 (信号肽; 1-29 残基; 斜体)	
<400> 76	
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	

[0020]

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
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

[0021]

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	
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				

[0022]

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
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
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
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
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
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

[0023]

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> 77
<211> 12
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 77

Phe Gln Gly Pro Ala Asp Ser Phe Phe Gly Tyr Ala
1 5 10

<210> 78
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 78

Lys Ser Pro Gly Ala Val Phe Lys Cys Arg Val His Thr Asn Pro Asp
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 79

Trp Met Gly Val Ser Leu Ala Arg Gln Pro Lys Ala Asp Gly Arg Val
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 80

Cys Ala His Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile
1 5 10 15

<210> 81
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 81

Gly Phe Cys Tyr Ile Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Arg Thr
1 5 10 15

Leu Ile

[0024]

<210> 82
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 82

Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Ile Lys Val
1 5 10 15

Leu Asn

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 83

Val Ile Met Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr
1 5 10 15

<210> 84
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 84

Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg Ser Gly Thr Leu Ile Lys Ile
1 5 10 15

Phe Gln

<210> 85
<211> 24
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 85

Gln Tyr Ser Met Lys Leu Ser Gly Gln Lys Ile Asn Pro Val Leu Arg
1 5 10 15

Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly
20

<210> 86
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 86

Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asp Val Ser Ile
1 5 10 15

Phe Leu

<210> 87
<211> 18

[0025]

<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 87
Arg His Tyr Val Ala His Val Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Ile Ser
1 5 10 15

Pro Ile

<210> 88
<211> 30
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 88
Glu Leu Pro Pro Leu Thr Pro Val Leu Arg Trp Lys Lys Gly Gln Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Asn Gln Thr Val Phe Glu Arg Asn Cys Arg
20 25 30

<210> 89
<211> 12
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 89
Tyr Leu Ala Leu Gly Ala Val Lys Asn Ile Ser Leu
1 5 10

<210> 90
<211> 18
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 90
Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr Glu Phe
1 5 10 15

Ser Val

<210> 91
<211> 21
<212> PRT
<213> hu α 9 整联蛋白的部分氨基酸序列

<400> 91
Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ser Arg Ala Lys Val Lys Val Asp
1 5 10 15

Pro Ala Leu Arg Val
20

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> 生腱蛋白-C hu α 9 结合位点

<400> 92

[0026]

Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu
1 5

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> 人纤连蛋白 hu α 9 结合位点

<400> 93

Cys Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro
1 5 10

<210> 94
<211> 23
<212> DNA
<213> GeneRacer 5' 引物

<400> 94
cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> VH 引物

<400> 95
gccagtggat agacagatgg 20

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> VL 引物

<400> 96
gatggatata gttggtgcag c 21

<210> 97
<211> 39
<212> DNA
<213> VH 5' 引物 w/SpeI 位点

<400> 97
gggactagta ccaccatgaa atgcagctgg gttatcttc 39

<210> 98
<211> 49
<212> DNA
<213> VH 引物 w/ HindIII site

<400> 98
gggaagctta gaggccattc ttacctgagg agacggtgac tgaggttcc 49

<210> 99
<211> 39
<212> DNA
<213> VL 5' 引物 w/ NheI 位点

<400> 99
ggggctagca ccaccatgag tgtgcccact caactcctg 39

<210> 100
<211> 50
<212> DNA
<213> VL 5' 引物 w/ EcpRI 位点

<400> 100
ggggaattct gagaagacta cttacgtttt atttccagct tgggtccccc 50

[0027]

<210>	101	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	JNJ120	
<400>	101	
	gggactagta ccaccatgaa atgcagc	27
<210>	102	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	JNJ137	
<400>	102	
	gggactagta ccaccatgaa atgcagctgg gttatcttct tcctgatggc agtggtt	57
<210>	103	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	JNJ138	
<400>	103	
	agactgcacc agctgaacct gtgaattgac ccctgtaacc actgccatca ggaagaa	57
<210>	104	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	JNJ139	
<400>	104	
	caggttcagc tgggtgcagtc tggggcagag gtgaagaagc caggggcctc agtcaag	57
<210>	105	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	JNJ140	
<400>	105	
	gtctttaatg tgaagccag aagccttgca ggaaaccttg actgaggccc ctggctt	57
<210>	106	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	JNJ141	
<400>	106	
	tctggcttca acattaaaga cacctatgtg cactgggtgc gccaggcccc tggacagagg	60
<210>	107	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	JNJ142	
<400>	107	
	accatttcga ggatcaatat ttccaatcca ctccagcctc tgtccagggg cctggcg	57
<210>	108	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	JNJ143	
<400>	108	
	aatattgatc ctgcgaatgg taatactaaa tatgaccga agttccaggg caaggccact	60
<210>	109	
<211>	57	

[0028]

<212> DNA
<213> JNJ144

<400> 109
catgtaggct gtgctcgcgg atgtgtctgc tgttatagtg gccttgccct ggaactt 57

<210> 110
<211> 57
<212> DNA
<213> JNJ145

<400> 110
tccgcgagca cagcctacat ggagctcagc agcctgagat ctgaggacac tgccgic 57

<210> 111
<211> 54
<212> DNA
<213> JNJ146

<400> 111
atagtaaaaa tgtcgttaacc atctagcaca gtaatagacg gcagtgicct caga 54

<210> 112
<211> 57
<212> DNA
<213> JNJ147

<400> 112
tggttacgac atttttacta tgctatggac tactggggtc aaggaaccct ggtcacc 57

<210> 113
<211> 54
<212> DNA
<213> JNJ148

<400> 113
gggaagcttt tgtgaggact cacctgagga gacggtgacc agggttcctt gacc 54

<210> 114
<211> 21
<212> DNA
<213> JNJ149

<400> 114
gggaagcttt tgtgaggact c 21

<210> 115
<211> 21
<212> DNA
<213> JNJ150

<400> 115
ggggctagca ccaccatgag t 21

<210> 116
<211> 57
<212> DNA
<213> JNJ126

<400> 116
ggggctagca ccaccatgag tgtgccact caactcctgg ggttgctgct gctgtgg 57

<210> 117
<211> 60
<212> DNA
<213> JNJ127

<400> 117

[0029]

agactgagtc atctggatgt cacatcgtgc gtcgtgaagc cacagcagca gcaaccccag	60
<210> 118	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> JNJ128	
<400> 118	
gacatccaga tgactcagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga caga	54
<210> 119	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ129	
<400> 119	
gtaaattgtc tcacttgctc gacatgtgat ggtgactctg tctccacag atgcaga	57
<210> 120	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ130	
<400> 120	
cgagcaagtg agaacattta ctacagtta gcatgggtatc agcagaagcc agggaaa	57
<210> 121	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ131	
<400> 121	
caagctgttt gcattataga tcaggagctt aggggcttcc cctggcttct gctgata	57
<210> 122	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ132	
<400> 122	
atctataatg caaacagctt ggaagatggt gtcccatcga ggttcagtgg cagtgga	57
<210> 123	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ133	
<400> 123	
caggctgctg atggtgagag tatactgtgt ccagatcca ctgccactga acctcga	57
<210> 124	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ134	
<400> 124	
actctacca tcagcagcct gcagcctgaa gattttgcaa ctattactg taaacag	57
<210> 125	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> JNJ135	
<400> 125	
ggtccttgt ccgaacgtgt acggaacgtc ataagcctgt ttacagtaat aagtgtc	57
<210> 126	

[0030]

<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	JNJ136	
<400>	126	
	tacacgttcg gacaaggac caaggtggaa atcaaactg agtag	45
<210>	127	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	JNJ101	
<400>	127	
	ggggaattct ttaaattcta ctcacgttg attcca	37
<210>	128	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	JNJ117	
<400>	128	
	ggggaattct ttaaattcta	20
<210>	129	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	用于小鼠 γ 1, γ 2a, γ 2b 和 γ 3 重链的引物	
<400>	129	
	gccagtggat agactgatgg	20
<210>	130	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	用于小鼠 κ 轻链引物的引物	
<400>	130	
	gatggataca gttggtgcag c	21

ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTCAGAG
 M K C S W V I F F L M A V V T G V N S E
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCCTCAGTCAAGTTGTCC
 V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S
 TGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATGTGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
 C T A S G F N I K D T Y V H W V K Q R P
 GAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAATATTGATCCTGCCAATGGTAATACTAAATATGAC
 E Q G L E W I G N I D P A N G N T K Y D
 CCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTG
P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y L
 CACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGATGGTTACGA
 H L S S L T S E D T A V Y Y C A R W L R
 CATTTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
H F Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S

图 1

ATGAGTGTGCCCCACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGACGCAGGATGT
 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
 ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCAA
 I T C R A S E N I Y Y S L A W Y Q Q K Q
 GGGAAATCTCCTCAGCTCCTGATCTATAATGCAAACAGCTTGGGAAGATGGTGTCCCATCG
 G K S P Q L L I Y N A N S L E D G V P S
 AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATTCTATGAAGATCAACAGCATGCAGCCT
 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 2

SpeI

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

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

GTCAAGTTGTCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATGTGCACCTGGGTG
 V K L S C T A S G F N I K D T Y V H W V

AAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAATATTGATCCTGCGAATGGTAAT
 K Q R P E Q G L E W I G N I D P A N G N

ACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAAC
T K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N

ACAGCCTACCTGCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCT
 T A Y L H L S S L T S E D T A V Y Y C A

AGATGGTTACGACATTTTTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
 R W L R H F Y Y A M D Y W G Q G T S V T

HindIII

GTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTTAAGCTT
 V S S

图 3

NheI

GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCCTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTTGGCTTACA
 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

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

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

GGTGTCCCATCGAGGTTTCTGCTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATTCTATGAAGATCAAC
 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

ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTAAGTAGTCTTCTCAGAAATTC
T F G G G T K L E I K

图 4

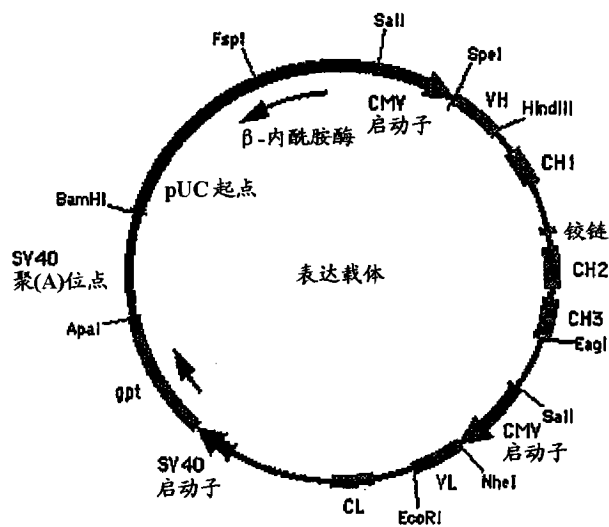


图 5

	1	2	3
24I11 VH	123456789	0123456789	0123456789
Hu24I11 VH	EVQLQQSGA	ELVKPGASVK	LSCTASGFNI
X65891	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGFNI
	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYTF
	4	5	6
	0123456789	01223456789	0123456789
		a	7
24I11 VH	RPEQGLEWIG	NIDPANGNTKY	DPKFQGKATI
Hu24I11 VH	APGQRLEWIG	NIDPANGNTKY	DPKFQGKATI
X65891	APGQRLEWMG	-----	RVTI
			1
	8	9	0
	0122223456789	0123456789	0000123456789
	abc		1
24I11 VH	LHLSSLTSED	YTCARWLRHF	YYAMDYWGQGT
Hu24I11 VH	MELSSLRSED	YTCARWLRHF	YYAMDYWGQGT
X65891	MELSSLRSED	YTCAR-----	WGQGT

图 6

	1	2	3
	123456789	0123456789	0123456789 0123456789
24I11 VL	DIQMTQSPA	SLAASVGETV	TITCRASENI YYSLAWYQQK
Hu24I11 VL	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASENI YYSLAWYQQK
X72441	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITC----- -WYQQK
	4	5	6
	0123456789	0123456789	0123456789 0123456789
24I11 VL	QGKSPQLLIY	NANSLEDGVP	SRFSGSGSGT QYSMKINSMQ
Hu24I11 VL	PGKAPKLLIY	NANSLEDGVP	SRFSGSGSGT QYTLTISSLQ
X72441	PGKAPKLLIY	-----GVP	SRFSGSGSGT DFTLTISSLQ
		1	
	8	9	0
	0123456789	0123456789	01234567
24I11 VL	PEDTATYFCK	QAYDVPYTFG	GGTKLEIK
Hu24I11 VL	PEDFATYYCK	QAYDVPYTFG	QGTKVEIK
X72441	PEDFATYYC-	-----FG	QGTKVEIK

图 7

寡核苷酸	序列	SEQ ID NO.
JNJ120	GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGC	101
JNJ137	GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTCTGATGGCAGTGGTT	102
JNJ138	AGACTGCACCAGCTGAACCTGTGAATTGACCCCTGTAACCACTGCCATCAGGAAGAA	103
JNJ139	CAGGTTGAGCTGGTGCACTCTGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGGCCCTCAGTCAAG	104
JNJ140	GTCCTTAATGTTGAAGCCAGAAGCCTTGCCAGGAAACCTTGACTGAGGCCCTGGCTT	105
JNJ141	TCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATGTGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAGAGG	106
JNJ142	ACCATTGCGAGGATCAATATTTCCAATCCACTCCAGCCTCTGTCCAGGGGCTGGCG	107
JNJ143	AATATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACT	108
JNJ144	CATGTAGGCTGTGCTCGCGGATGTGTCTGCTGTTATAGTGGCCTTGCCCTGGAAGTT	109
JNJ145	TCCGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTC	110
JNJ146	ATAGTAAAAATGTCGTAACCATCTAGCACAGTAATAGACGGCAGTGTCTCAGAA	111
JNJ147	TGGTTACGACATTTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGTCACC	112
JNJ148	GGGAAGCTTTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCTTGACC	113
JNJ149	GGGAAGCTTTTGTGAGGACTC	114

图 8

寡核苷酸	序列	SEQ ID NO.
JNJ150	GGGGCTAGCACCACCATGAGT	115
JNJ126	GGGGCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGG	116
JNJ127	AGACTGAGTCATCTGGATGTCACATCGTGCGTCTGTAAGCCACAGCAGCAGCAACCCAG	117
JNJ128	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTCATCTGTGGGAGACAGA	118
JNJ129	GTAAATGTTCTCACTTGCTCGACATGTGATGGTGACTCTGTCTCCACAGATGCAGA	119
JNJ130	CGAGCAAGTGAGACATTTACTACAGTTTAGCATGGTATCAGCAGAAGCCAGGGAAA	120
JNJ131	CAAGCTGTTTGCAATTATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGCTTCTGCTGATA	121
JNJ132	ATCTATAATGCAAACAGCTTGGGAAGATGGTGTCCTCATCGAGGTTCACTGGCAGTGGGA	122
JNJ133	CAGGCTGCTGATGGTGAGAGTATACTGTGTCCAGATCCACTGCCACTGAACCTCGA	123
JNJ134	ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTAAACAG	124
JNJ135	GGTCCCTTGTCGGAACGTGTACGGAACGTGATAAGCCTGTTACAGTAATAAGTTGC	125
JNJ136	TACACGTTCCGACAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTGAGTAG	126
JNJ101	GGGGAATTCTTTAAATTCTACTACGTTTGATTTCCA	127
JNJ117	GGGGAATTCTTTAAATTCTA	128

图 9

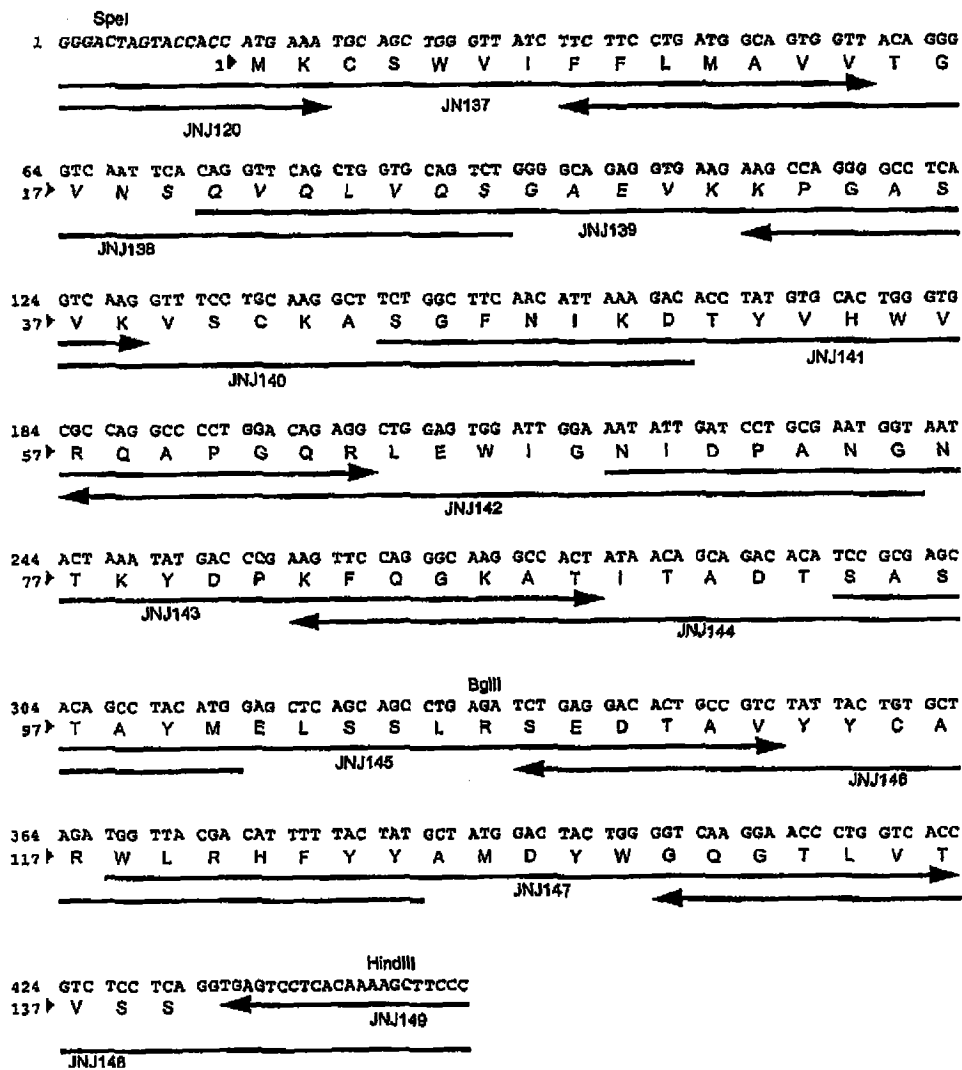


图 10

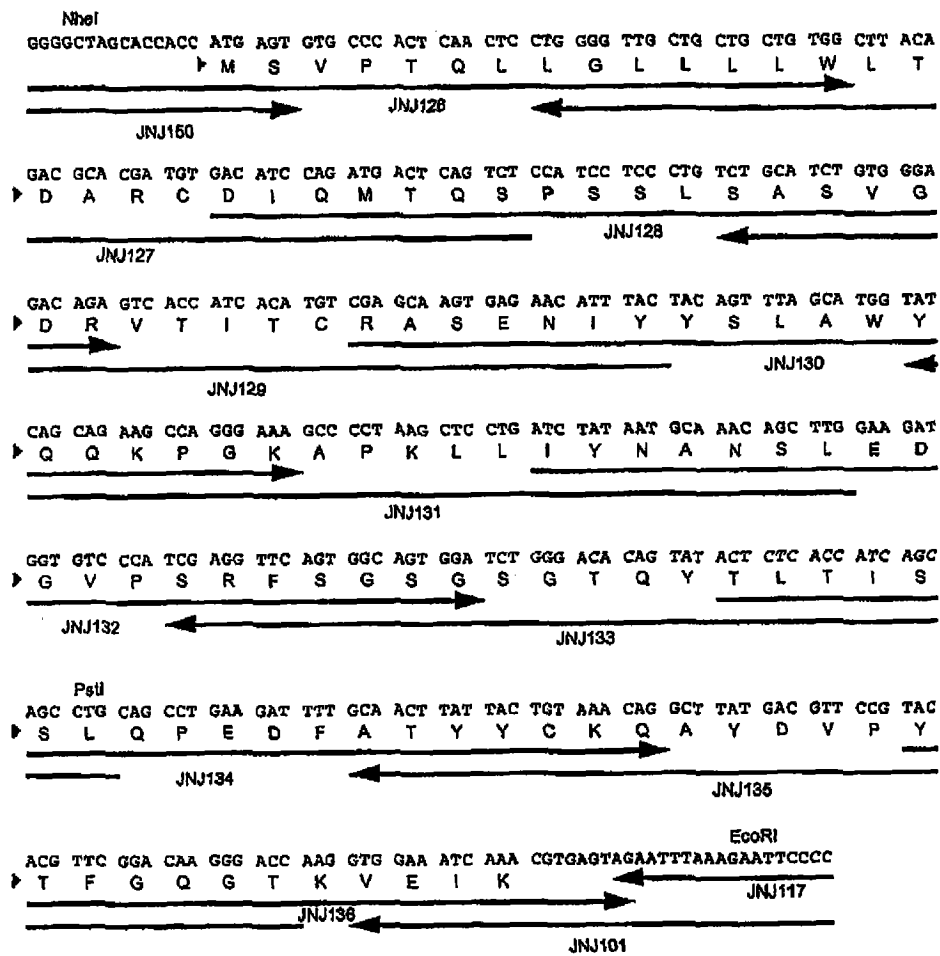


图 11

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

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

GTCAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATGTGCACTGGGTG
 V K V S C K A S G F N I K D T Y V H W V

CGCCAGGCCCCTGGACAGAGGCTGGAGTGGATTGGAAATATTGATCCTGCGAATGGTAAT
 R Q A P G Q R L E W I G N I D P A N G N

ACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCGCGAGC
T K Y D P K F Q G K A T I T A D T S A S

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

AGATGGTTACGACATTTTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACC
 R W L R H F Y Y A M D Y W G Q G T L V T

HindIII
 GTCTCCTCAGGTGAGTCCTCACAAAAGCTT
 V S S

图 12

NheI
GCTAGCACCACCATGAGTGTGCCCACTCAACTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACA
 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

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

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

GGTGTCCCATCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGC
 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
 ACGTTTCGGACAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAGTAGAATTTAAAGAATTC
T F G Q G T K V E I K

图 13

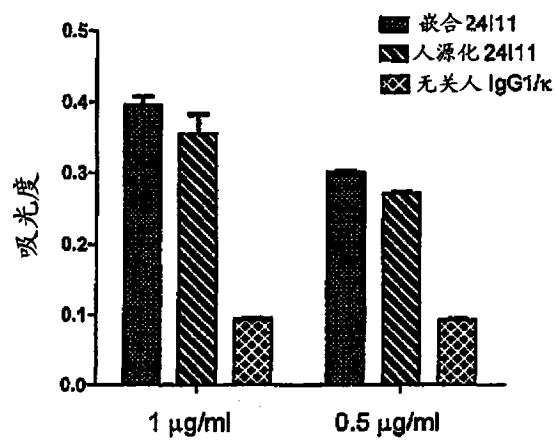
用 CHO/hu α 9 进行细胞 ELISA

图 14

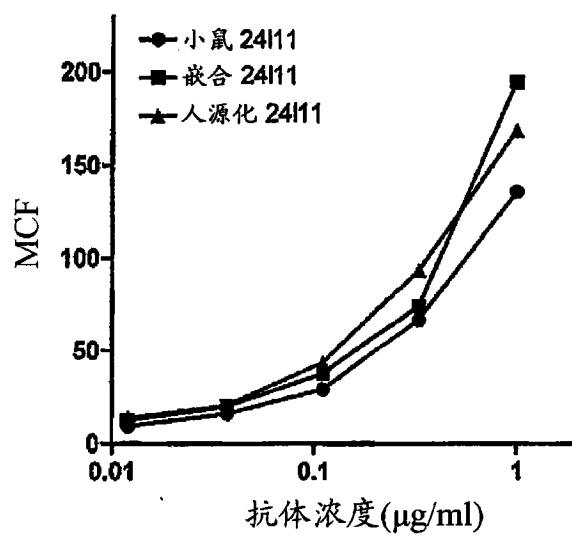
对 CHO/hu α 9 的结合

图 15

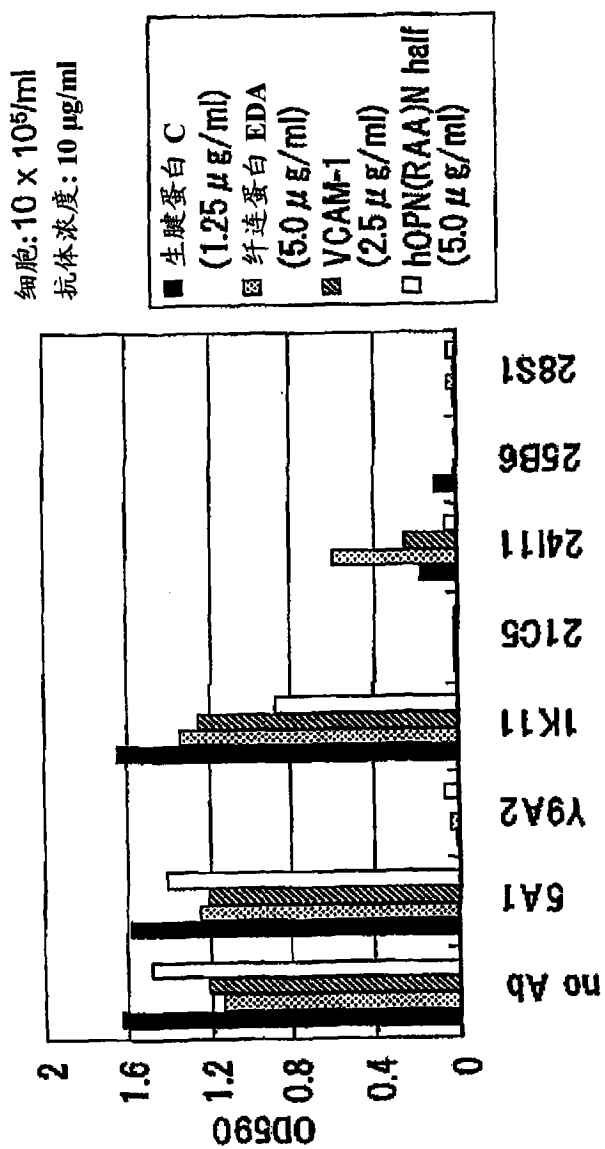


图 16

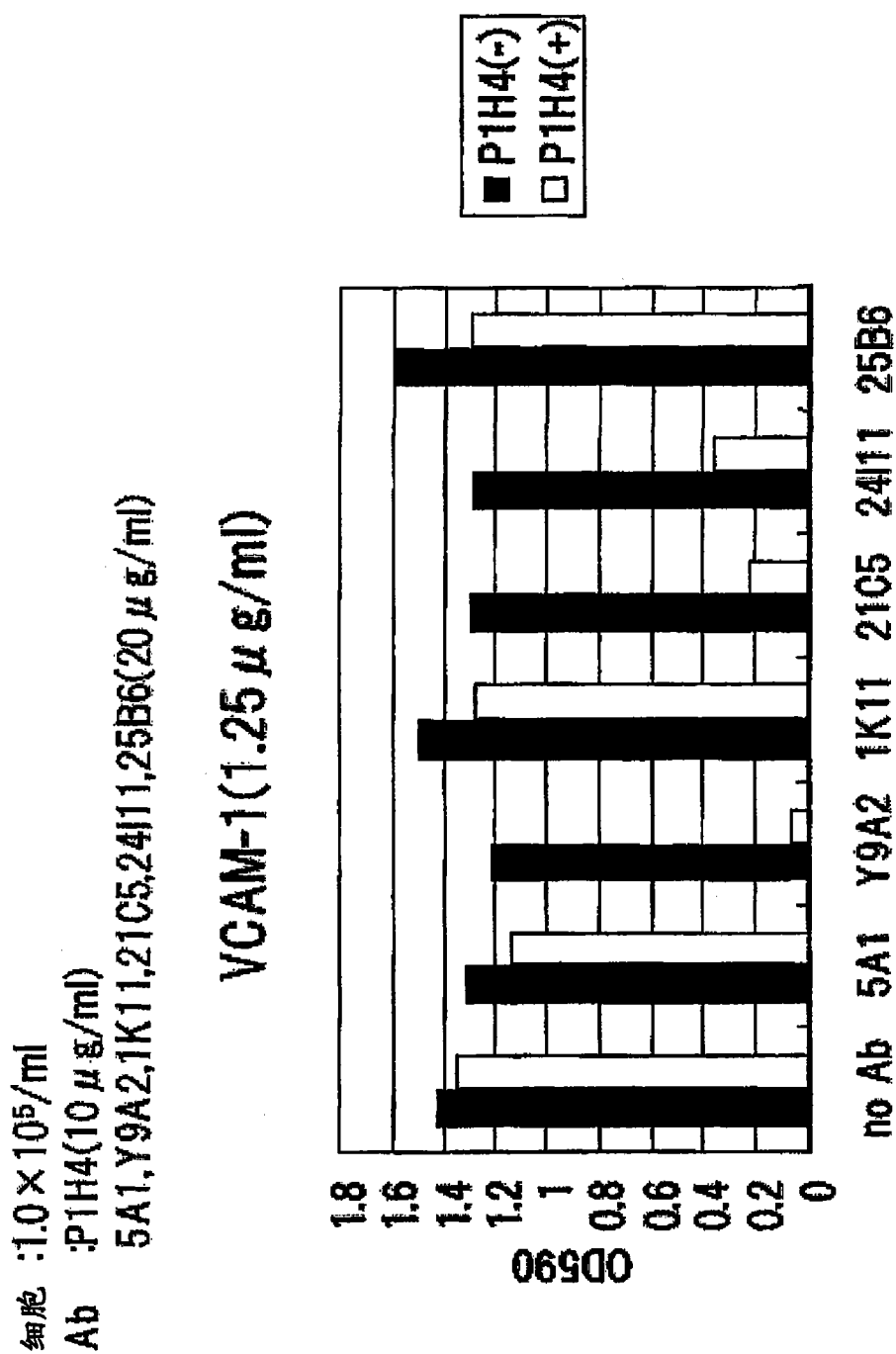


图 17

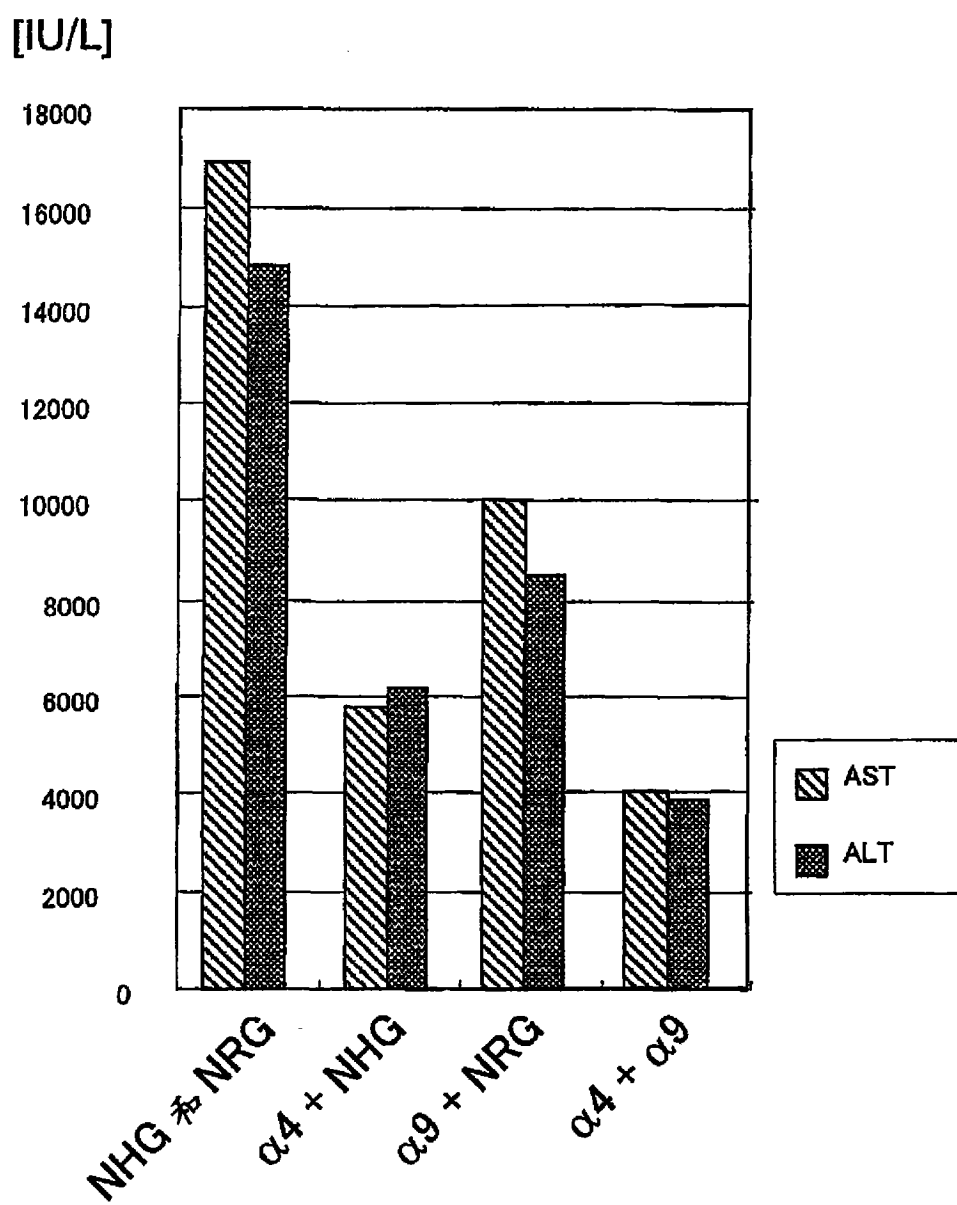


图 18

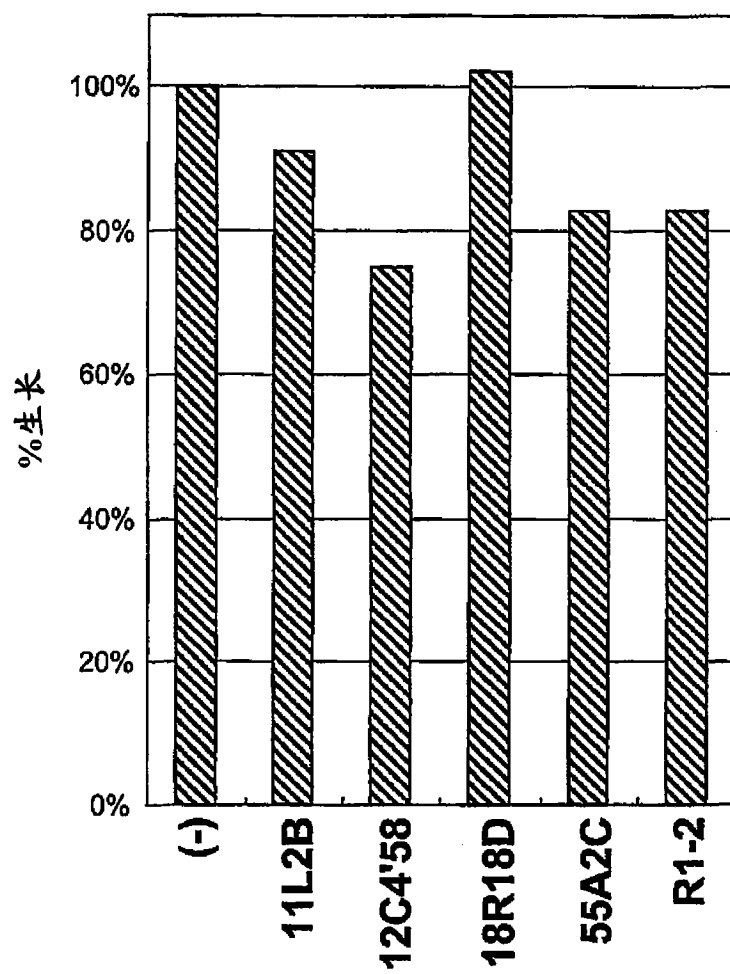


图 19

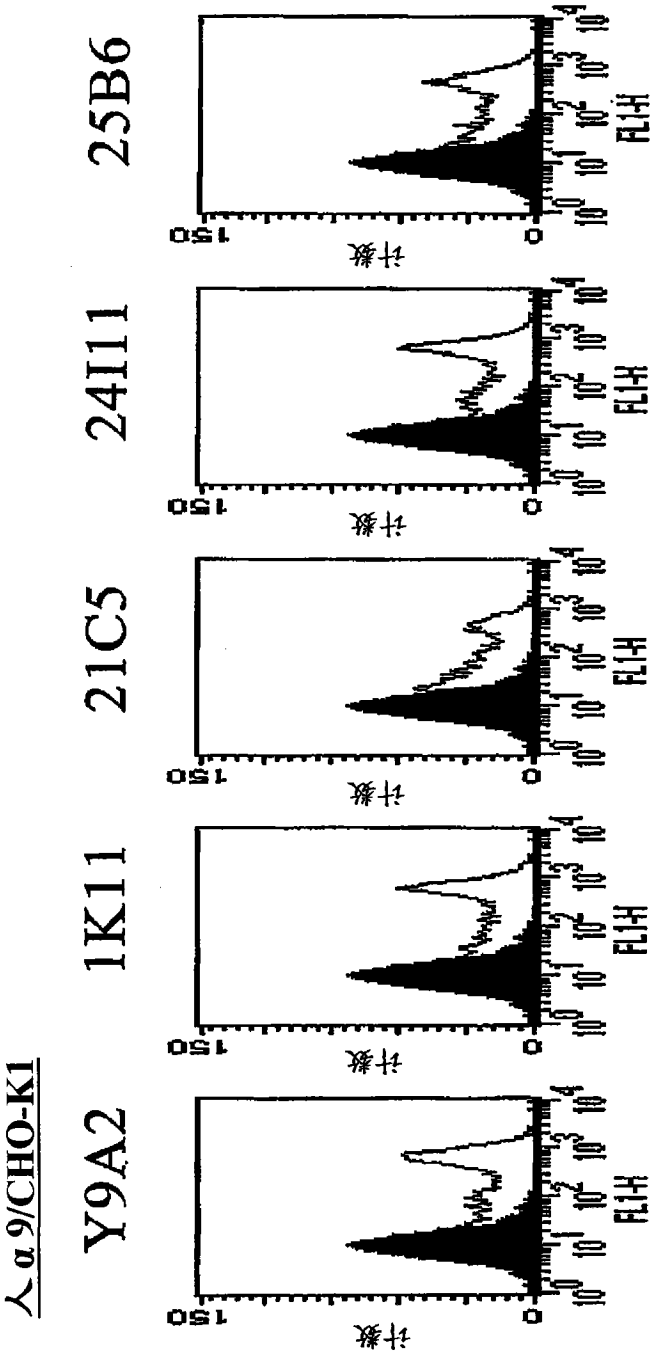


图 20a

$\lambda_{\alpha 4}/\text{CHO-K1}$

Y9A2

1K11

21C5

24I11

25B6

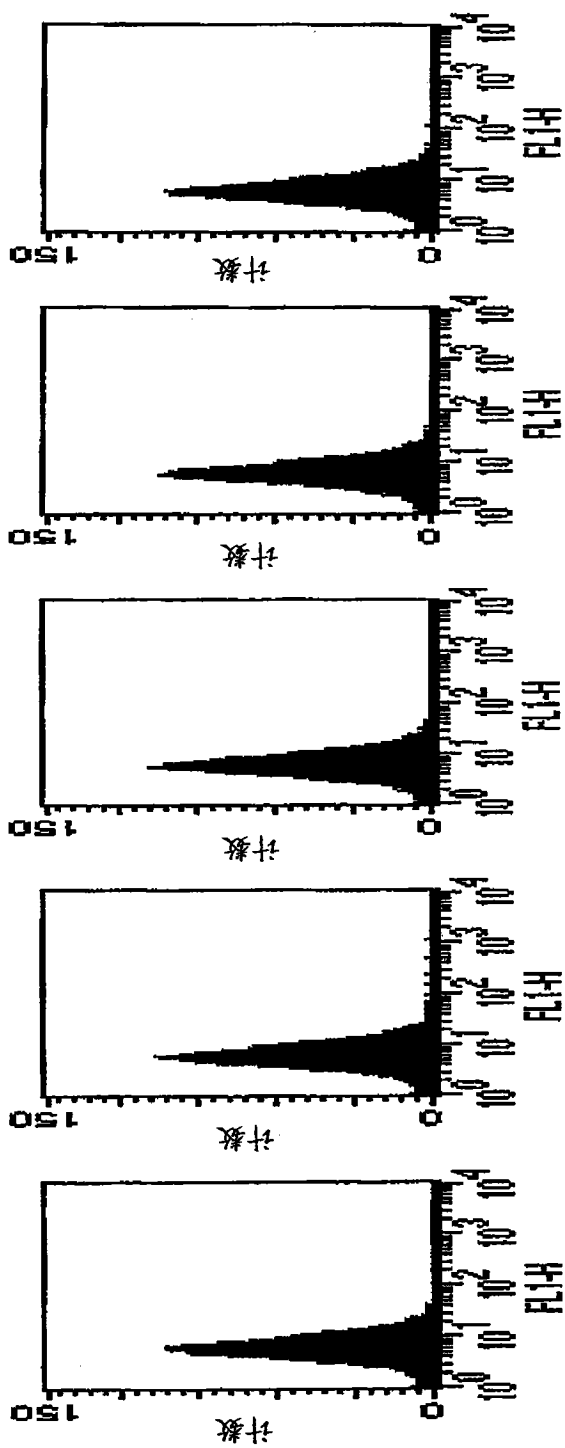


图 20b

嗜中性粒细胞

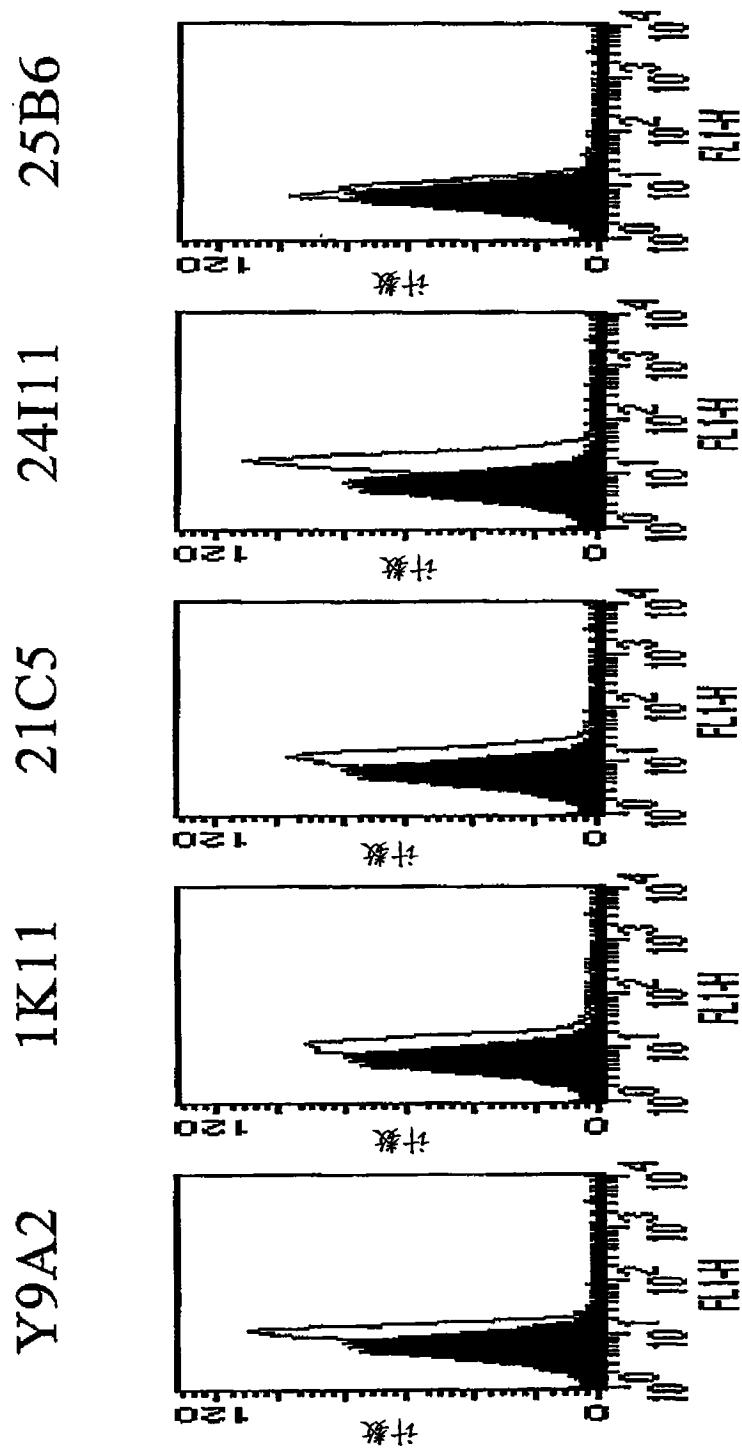


图 20c

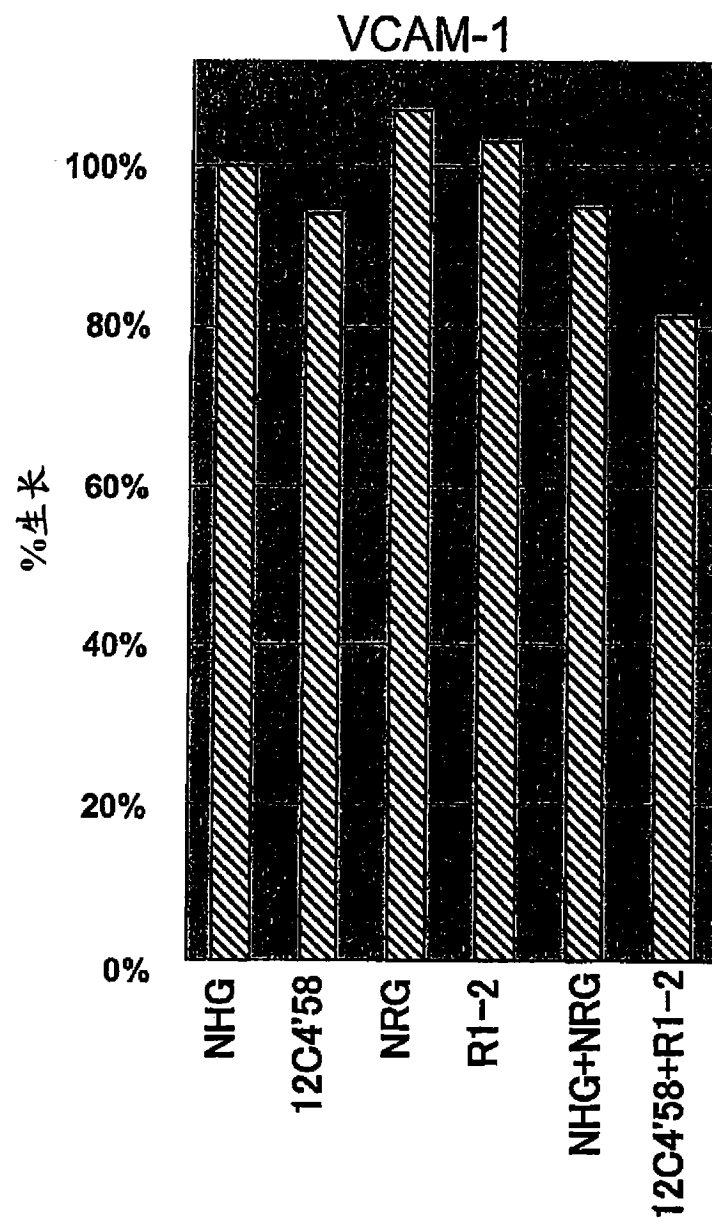


图 21

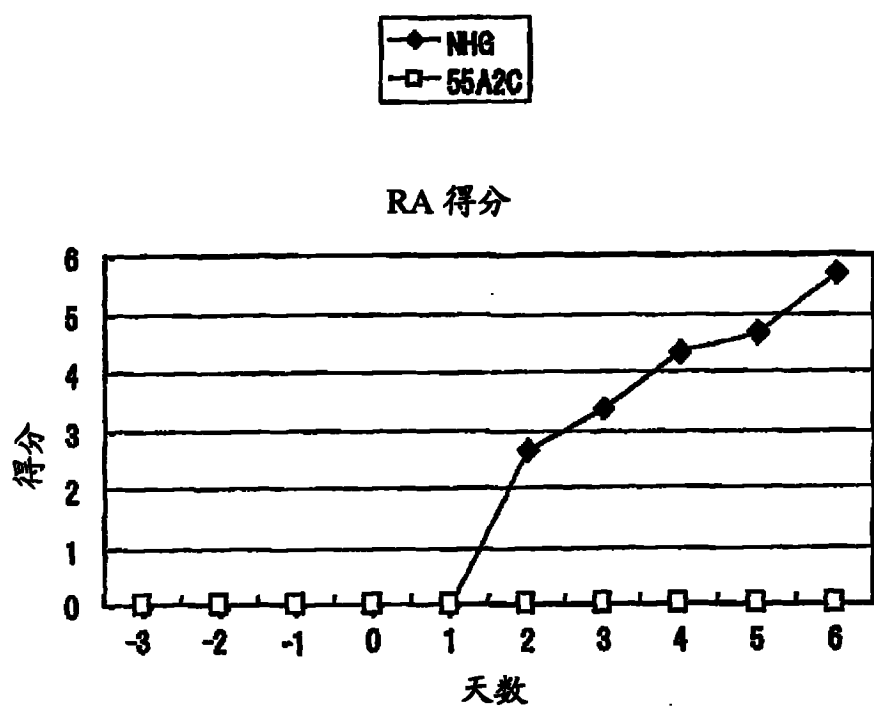


图 22