

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680014282.4

[43] 公开日 2008年5月21日

[11] 公开号 CN 101184778A

[22] 申请日 2006.4.13

[21] 申请号 200680014282.4

[30] 优先权

[32] 2005.4.26 [33] US [31] 60/675,311

[86] 国际申请 PCT/IB2006/001053 2006.4.13

[87] 国际公布 WO2006/114704 英 2006.11.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.26

[71] 申请人 辉瑞有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 克里斯托弗·托德·保尔

莫琳·杰瑞·鲍内 孟拉尼·波耶勒

杰拉尔德·菲尔斯·加斯波森

大卫·威廉·格里格斯

理查德·大卫·汉德

威廉·迪恩·卓恩

理查德·艾伦·玛扎艾勒

拉尔夫·雷蒙德·米特尔

马克·艾伦·莫法特

巴雷特·理查德·思伊拉

托德·李·瓦纳斯达勒

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限  
责任公司

代理人 李 剑

权利要求书 4 页 说明书 88 页 序列表 92 页  
附图 26 页

[54] 发明名称

P-钙黏着蛋白抗体

[57] 摘要

本发明涉及抗体，其包括人抗体及其抗原结合部分，其结合 P-钙黏着蛋白，并且发挥抑制 P-钙黏着蛋白的作用。本发明还涉及来自人 P-钙黏着蛋白抗体的重链和轻链免疫球蛋白，以及编码这类免疫球蛋白的核酸分子。本发明还涉及制造人 P-钙黏着蛋白抗体的方法、包含这些抗体的组合物和使用所述抗体和组合物的方法。本发明还涉及包含本发明核酸分子的转基因动物或植物。

1. 具有至少一个选自以下组的特征的抗体或其抗原结合部分，所述组由：
- a) 具有大于或等于 1.5 的  $K_D(E)/K_D(P)$ ；
  - b) 通过表面等离子共振测量以 50 nM 或更小的  $K_D$  与 P-钙黏着蛋白结合；
  - c) 对 P-钙黏着蛋白而言，通过表面等离子共振测量的  $k_{off}$  小于或等于  $0.01\text{ s}^{-1}$ ；
  - d) 通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞黏着测定法测量的  $IC_{50}$  为 50 nM 或更小；
  - e) 通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞聚集测定法测量的  $IC_{50}$  为 50 nM 或更小；
  - f) 在 P-钙黏着蛋白依赖性球状体破坏测定法中，与无 IgG 的对照样品相比球状体破坏增加因数为 2 或更多；
  - g) 与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体竞争结合 P-钙黏着蛋白；
  - h) 与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体交叉竞争结合 P-钙黏着蛋白；
  - i) 与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体结合在 P-钙黏着蛋白上相同的表位；
  - j) 与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09;

g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体以基本上相同的  $K_D$  结合 P-钙黏着蛋白; 和

k) 与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体以基本上相同的  $k_{off}$  结合 P-钙黏着蛋白

构成。

2. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分, 其包含氨基酸序列与 SEQ ID NOs: 13、320、321 和 322 中任一至少 90% 同一的  $V_H$  结构域。

3. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分, 其包含氨基酸序列与 SEQ ID NOs: 22、326、327 和 328 中任一至少 90% 同一的  $V_L$  结构域。

4. 选自以下组的如权利要求 1 所述的抗体或抗原结合部分, 所述组由:

a) 抗体或其抗原结合部分, 其包含如 SEQ ID NO: 13 中公开的  $V_H$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 13 不同的  $V_H$  结构域, 和如 SEQ ID NO: 22 中公开的  $V_L$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 22 不同的  $V_L$  结构域;

b) 抗体或其抗原结合部分, 其包含如 SEQ ID NO: 320 中公开的  $V_H$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 320 不同的  $V_H$  结构域, 和如 SEQ ID NO: 326 中公开的  $V_L$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 326 不同的  $V_L$  结构域;

c) 抗体或其抗原结合部分, 其包含如 SEQ ID NO: 321 中公开的  $V_H$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 321 不同的  $V_H$  结构域, 和如 SEQ ID NO: 327 中公开的  $V_L$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 327 不同的  $V_L$  结构域; 和

d) 抗体或其抗原结合部分, 其包含如 SEQ ID NO: 322 中公开的  $V_H$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 322 不同的  $V_H$  结构域, 和如 SEQ ID NO: 328 中公开的  $V_L$  结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 328 不同的  $V_L$  结构域

构成。

5. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分，其包含独立地选自 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一的 V<sub>H</sub> 结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一不同的序列；并且还包含独立地选自 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一的 V<sub>L</sub> 结构域或因 1 到 10 个保守氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一不同的序列。

6. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含选自 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一的 V<sub>H</sub> CDR3，或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一不同的序列。

7. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含选自 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一的 V<sub>L</sub> CDR3，或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一不同的序列。

8. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：

a) 如 SEQ ID NO: 24 所公开的 V<sub>H</sub> CDR1，或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 24 不同的序列；

b) 如 SEQ ID NO: 25 所公开的 V<sub>H</sub> CDR2，或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 25 不同的序列；和

c) 选自 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一的 V<sub>H</sub> CDR3，或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一不同的序列。

9. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：

a) 如 SEQ ID NO: 38 所公开的 V<sub>L</sub> CDR1，或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 38 不同的序列；

b) 如 SEQ ID NO: 39 所公开的  $V_L$  CDR2, 或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NO: 39 不同的序列; 和

c) 选自 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一的  $V_L$  CDR3, 或因 1 个或 2 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一不同的序列。

10. 抗体或其抗原结合部分, 其中  $V_H$  结构域包含 SEQ ID NOs: 13、320、321 和 322 之任一, 或因 1 到 10 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 13、320、321 和 322 之任一不同的序列; 和  $V_L$  结构域包含 SEQ ID NOs: 22、326、327 和 328 之任一, 或因 1 到 10 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 22、326、327 和 328 之任一不同的序列。

11. 如权利要求 1 到 10 任一项所述的抗体, 其为 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子, 或由这些获得。

12. 如权利要求 11 所述的抗体, 其中 IgG 为 IgG<sub>1</sub>, 其中重链恒定区包含 SEQ ID NO: 344, 其中轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 345, 并且 SEQ ID NO: 344 的 C-端赖氨酸残基任选地被切割。

13. 药物组合物, 其包含如权利要求 1 到 12 任一项所述的抗体或抗原结合部分和药物可接受载体。

14. 经分离的核酸分子, 其包含如 SEQ ID NOs: 80、89、332、333、334、338、339 和 340 中任一所公开的核苷酸序列。

15. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合部分, 其包含利用人  $V_H$ -3 家族基因的重链可变区氨基酸序列。

## P-钙黏着蛋白抗体

本申请要求在 2005 年 4 月 26 日提交的美国临时申请 No. 60/675,311 的优先权，其整体通过引用并入本文。

### 技术领域

本发明涉及结合 P-钙黏着蛋白的抗体及其抗原结合部分。本发明还涉及编码这类抗体和抗原结合部分的核酸分子、制造 P-钙黏着蛋白抗体和抗原结合部分的方法、包含这些抗体和抗原结合部分的组合物以及使用这些抗体、抗原结合部分和组合物的方法。

### 背景技术

钙黏着蛋白是在发育和组织稳态中调节细胞-细胞黏附的跨膜糖蛋白超家族 (Gumbiner *J. Cell. Biol.*, 148:399-404 (2000); Yagi, et al., *Genes Dev.*, 14:1169-1180 (2000))。钙黏着蛋白的细胞内结构域与细胞质蛋白质 (如链蛋白和 p120) 相互作用，这形成了钙黏着蛋白附着在肌动蛋白细胞骨架上的基础。钙黏着蛋白具有五个细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  结合结构域和一个在经典钙黏着蛋白中高度保守的小细胞质结构域。经典的钙黏着蛋白家族成员包括 P-钙黏着蛋白、E-钙黏着蛋白和 N-钙黏着蛋白。细胞黏附分子 (如钙黏着蛋白) 被认为在癌细胞和转移细胞的细胞联络中起重要作用 (Furukawa, et al., *Microscopy Res. Technique* 38 (4):343-352 (1997))。正常成人组织中 P-钙黏着蛋白低表达，并基本上限于肌上皮细胞和复层上皮的基底层 (Shimoyama, et al. *Cancer Res.* 49:2128-33 (1989))。在炎性肠疾病如 Crohn's 疾病和结肠炎中 P-钙黏着蛋白被上调 (Hardy, et al., *Gut* 50:513-519 (2002))。目前大量证据表明：异常的 P-钙黏着蛋白表达与细胞增殖和结肠、胸、肺、甲状腺和子宫颈肿瘤相关 (Gamallo, *Modern Pathology*, 14:650-654, (2001); 和 Stefansson, et al., *J. Clin. Oncol.* 22(7):1242-1252

(2004))。人 P-钙黏着蛋白被报导为是能被 NCC-CAD-299 单克隆抗体识别的抗原，所述抗体是针对外阴表皮样癌产生的 (Shimoyama, et al., *Cancer Res.*, 49:2128-2133 (1989))。对 P-钙黏着蛋白介导的粘附和细胞内信号转导的调节预期能导致体内肿瘤细胞的增殖和存活降低。因此，考虑到 P-钙黏着蛋白看起来具有控制细胞增殖和实体瘤发展的关键作用，产生针对 P-钙黏着蛋白的、能够给多种癌症患者提供治疗益处的抗体是人们需要的。

### 发明内容

在一个方面，本发明是 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分具有下文 A)到 K)中所述的若干功能特征的至少一种。A) 例如在一个实施方案中，抗体或其抗原结合部分具有与 E-钙黏着蛋白( $K_D(E)$ )相比对 P-钙黏着蛋白( $K_D(P)$ )更大的结合亲和力。在一个实施方案中，本发明的抗体或抗原结合部分具有大于或等于 1.5 的  $K_D(E)/K_D(P)$ 。在另一实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合部分具有大于或等于 2、大于或等于 3、大于或等于 5、大于或等于 10、大于或等于 20、大于或等于 50、大于或等于 100、大于或等于 200、大于或等于 500 或大于或等于 1000 的  $K_D(E)/K_D(P)$ 。典型地， $K_D(E)/K_D(P)$ 值不存在上限，因为  $K_D(E)$ 值可以非常小，例如是 0。然而对于实践目的而言， $K_D(E)/K_D(P)$ 的上限可以是  $1 \times 10^6$ 。对 P-钙黏着蛋白和 E-钙黏着蛋白而言，这类  $K_D$  值可通过本领域技术人员已知的任何技术测量，例如通过 ELISA、RIA、流式细胞仪或表面等离子共振，例如 BIACORE™。

B) 在另一实施方案中，通过表面等离子共振测量，抗体或其部分以 1000 nM 或更小的  $K_D$  与 P-钙黏着蛋白结合。在另一实施方案中，通过表面等离子共振测量，抗体或其部分以小于 500 nM、小于 100 nM、小于 50 nM、小于 20 nM、小于 10 nM、小于 1 nM、小于 500 pM 或小于 100 pM 的  $K_D$  与 P-钙黏着蛋白结合。典型地，不存在  $K_D$  值的下限。然而对于实践目的而言，下限可假定为约 1 pM。

C) 在另一实施方案中, 如通过表面等离子共振所测量的, 抗体或其部分对 P-钙黏着蛋白具有小于或等于  $0.01 \text{ s}^{-1}$  的清除率( $k_{\text{off}}$ )。例如, 在某些实施方案中抗体或其部分对 P-钙黏着蛋白具有小于  $0.005 \text{ s}^{-1}$ 、小于  $0.004 \text{ s}^{-1}$ 、小于  $0.003 \text{ s}^{-1}$ 、小于  $0.002 \text{ s}^{-1}$  或小于  $0.001 \text{ s}^{-1}$  的  $k_{\text{off}}$ 。典型地, 不存在  $k_{\text{off}}$  值的下限。然而对于实践的目的而言, 下限可假定为约  $1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 。

D) 在另一实施方案中, 如通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞粘附测定法所测量的, P-钙黏着蛋白抗体或其部分具有 100 nM 或更小的  $\text{IC}_{50}$ 。在另一实施方案中, 如通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞粘附测定法所测定的, 所述  $\text{IC}_{50}$  小于 50 nM、小于 40 nM、小于 20 nM、小于 10 nM、小于 1 nM、小于 500 pM、小于 200 pM、小于 100 pM 或小于 10 pM。典型地, 如通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞粘附测定法所测定的, 不存在  $\text{IC}_{50}$  值的下限。然而对于实践的目的而言, 下限可假定为约 1 pM。

E) 在另一实施方案中, 如通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞聚集测定法所测量的, P-钙黏着蛋白抗体或其部分具有 100 nM 或更小的  $\text{IC}_{50}$ 。在另一实施方案中, 如通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞聚集测定法所测定的, 所述  $\text{IC}_{50}$  小于 50 nM、小于 40 nM、小于 20 nM、小于 10 nM、小于 1 nM、小于 500 pM、小于 200 pM、小于 100 pM 或小于 1 pM。典型地, 如通过 P-钙黏着蛋白依赖性细胞聚集测定法所测定的, 不存在  $\text{IC}_{50}$  值的下限。然而对于实践的目的而言, 下限可假定为约 1 pM。

F) 在另一实施方案中, 在 P-钙黏着蛋白依赖性球状体破坏测定法中, 与不存在 IgG 的对照样品相比, P-钙黏着蛋白抗体或其部分以至少 2 的因数提高球状体破坏。在另一实施方案中, 在 P-钙黏着蛋白依赖性球状体破坏测定法中, 与不存在 IgG 的对照样品相比, P-钙黏着蛋白抗体或其部分以至少 3、至少 4、至少 6、至少 10 或至少 15 的因数提高球状体破坏。

G) 在另一实施方案中, P-钙黏着蛋白抗体或其部分与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-



h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体竞争结合 P-钙黏着蛋白。

H) 在另一实施方案中, P-钙黏着蛋白抗体或其部分与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体交叉竞争结合 P-钙黏着蛋白。

I) 在另一实施方案中, P-钙黏着蛋白抗体或其部分与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体结合 P-钙黏着蛋白的相同表位。

J) 在另一实施方案中, P-钙黏着蛋白抗体或其部分与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 的抗体以基本上相同的  $K_D$  结合 P-钙黏着蛋白。

K) 在另一实施方案中, P-钙黏着蛋白抗体或其部分与选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4; and g-129-1c4 的抗体以基本上相同的  $k_{off}$  结合 P-钙黏着蛋白。

本发明的另一方面是至少具有先前在 A)到 K)中描述的功能特征之一的抗体或其抗原结合部分, 其包含氨基酸序列与 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一至少 90%同一的  $V_H$  结构域。在一个实施方案中, 所述  $V_H$  结构域氨基酸序列与 SEQ ID NOs: 1 到 12 和 320 到 325 之任一至少 91%、至少 93%、至少 95%、至少 97%、至少 99%或 100%同一。

在另一实施方案中, 抗体或其部分至少具有先前在 A)到 K)中描述的功能特征之一, 其包含一个  $V_H$  结构域, 所述  $V_H$  结构域是 SEQ ID NOs: 1

到 13 和 320 到 325 之任一，或因具有至少一个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一不同。例如，V<sub>H</sub> 结构域因 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一不同。在另一实施方案中，任何这些保守的氨基酸取代可发生在 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区。

本发明的另一方面是至少具有先前在 A)到 K)中描述的功能特征之一的抗体或其抗原结合部分，其包含一个氨基酸序列与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一至少 90%同一的 V<sub>L</sub> 结构域。在一个实施方案中，所述 V<sub>L</sub> 结构域氨基酸序列与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一至少 91%、至少 93%、至少 95%、至少 97%、至少 99%或 100%同一。

在另一实施方案中，抗体或其部分至少具有先前 A)到 K)中所述的功能特征之一，并包含一个 V<sub>L</sub> 结构域，所述 V<sub>L</sub> 结构域是 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一，或因具有至少一个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一不同。例如 V<sub>L</sub> 结构域因 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守的氨基酸取代而与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一不同。在另一实施方案中，任何这些保守的氨基酸取代可发生在 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区。

本发明的另一方面是至少具有先前 A)到 K)中所述功能特征之一的抗体或其抗原结合部分，其中 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域分别与下述抗体的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域氨基酸序列至少 90%同一，所述抗体选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 任一。例如，V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域分别与下述抗体的 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 结构域氨基酸序列至少 91%、93%、95%、97%、99%或 100%同一，所述抗体选自 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 任一。

本发明的另一方面是选自以下的抗体或其抗原结合部分：a)包含如 SEQ ID NO: 1 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 14 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；b)包含如 SEQ ID NO: 2 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 14 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；c) 包含如 SEQ ID NO: 2 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 15 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；d) 包含如 SEQ ID NO: 3 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 16 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；e) 包含如 SEQ ID NO: 4 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 17 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；f) 包含如 SEQ ID NO: 4 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 23 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；g) 包含如 SEQ ID NO: 5 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 18 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；h) 包含如 SEQ ID NO: 6 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 23 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；i) 包含如 SEQ ID NO: 7 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 23 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；j) 包含如 SEQ ID NO: 8 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 23 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；k) 包含如 SEQ ID NO: 9 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 23 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；l) 包含如 SEQ ID NO: 10 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 19 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；m) 包含如 SEQ ID NO: 11 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 20 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；n) 包含如 SEQ ID NO: 12 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 21 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；o) 包含如 SEQ ID NO: 13 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 22 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；p) 包含如 SEQ ID NO: 320 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 326 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；q) 包含如 SEQ ID NO: 321 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 327 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；r) 包含如 SEQ ID NO: 322 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 328 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；s) 包含如 SEQ ID NO: 323 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 329 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；t) 包含如 SEQ ID NO: 324 所公开的  $V_H$  结构域和如 SEQ ID NO: 330 所公开的  $V_L$  结构域的抗体或其部分；和 u) 包

含如 SEQ ID NO: 325 所公开的 V<sub>H</sub> 结构域和如 SEQ ID NO: 331 所公开的 V<sub>L</sub> 结构域的抗体或其部分。

在另一实施方案中，对如上文在组 a)到 u)中所述的任何抗体或其部分而言，V<sub>H</sub>和/或 V<sub>L</sub>结构域可与本文所述的特定 SEQ ID NOs 因至少一个保守的氨基酸取代而不同。例如 V<sub>H</sub>和/或 V<sub>L</sub>结构域可与所述的 SEQ ID NO 因 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守的氨基酸取代而不同。在另一实施方案中，这些保守的氨基酸取代中任一可发生在 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区。

在另一实施方案中，本发明提供具有至少一种先前在 A)到 K)中所述功能特征的抗体或其抗原结合部分，其包含一个 V<sub>H</sub>结构域和一个 V<sub>L</sub>结构域，所述 V<sub>H</sub>结构域独立地选自 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一，或是与 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列；所述 V<sub>L</sub>结构域独立地选自 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一，或是与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列。例如，V<sub>H</sub>和 V<sub>L</sub>结构域可各自独立地与 SEQ ID NOs: 1 到 13、320 到 325、14 到 23 和 326 到 331 之任一因 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守的氨基酸取代而不同。

在另一实施方案中，本发明提供具有至少一种先前在 A)到 K)中所述功能特征的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或部分包含选自 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一的 V<sub>H</sub> CDR3，或与 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列。例如，V<sub>H</sub> CDR3 可与 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一因 1、2、3 或 4 个保守的氨基酸取代而不同。

在另一实施方案中，本发明提供具有至少一种先前在 A)到 K)中所述功能特征的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或部分包含选自 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一的 V<sub>L</sub> CDR3，或与 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列。例如，V<sub>L</sub> CDR3 可与 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一因 1、2、3 或 4 个保守的氨基酸取代而不同。

在另一实施方案中，本发明提供抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：如 SEQ ID NO: 24 中公开的 V<sub>H</sub> CDR1，或与 SEQ ID NO: 24 因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列；如 SEQ ID NO: 25 中所公开的 V<sub>H</sub> CDR2，或与 SEQ ID NO: 25 因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列；和独立地选自 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一的 V<sub>H</sub> CDR3，或与 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列。例如上文提到的每个 V<sub>H</sub> CDR1、CDR2 和 CDR3 序列可独立地与各自所述的 SEQ ID NOs 因 1、2、3、4 或 5 个保守的氨基酸取代而不同。

在另一实施方案中，本发明提供抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：如 SEQ ID NO: 38 中公开的 V<sub>L</sub> CDR1，或与 SEQ ID NO: 38 因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列；如 SEQ ID NO: 39 中所公开的 V<sub>L</sub> CDR2，或与 SEQ ID NO: 39 因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列；和独立地选自 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一的 V<sub>L</sub> CDR3，或与 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一因至少一个保守的氨基酸取代而不同的序列。例如上文提到的每个 V<sub>L</sub> CDR1、CDR2 和 CDR3 序列可独立地与各自所述的 SEQ ID NOs 因 1、2、3、4 或 5 个保守的氨基酸取代而不同。

本发明还提供了抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分包含：如 SEQ ID NO: 24 中公开的 V<sub>H</sub> CDR1；如 SEQ ID NO: 25 中所公开的 V<sub>H</sub> CDR2；选自 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一的 V<sub>H</sub> CDR3；如 SEQ ID NO: 38 中公开的 V<sub>L</sub> CDR1；如 SEQ ID NO: 39 中公开的 V<sub>L</sub> CDR2；和选自 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一的 V<sub>L</sub> CDR3。在另一实施方案中，所述每个 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> CDR1、CDR2 和 CDR3 序列也可独立地与上文所述特定的 SEQ ID NOs 因至少一个保守的氨基酸取代而不同。例如每个 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列可独立地与上文所述的特定 SEQ ID NOs 因 1、2、3、4 或 5 个保守的氨基酸取代而不同。

本发明还提供抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含如存在于 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-

e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g129-1c4 的任何抗体中的 V<sub>H</sub>和 V<sub>L</sub> CDR1、V<sub>H</sub>和 V<sub>L</sub> CDR2 和 V<sub>H</sub>和 V<sub>L</sub> CDR3。

本发明还提供抗体或其抗原结合部分，其包含选自 SEQ ID NOs: 1 到 3 和 20 到 325 之任一或与 SEQ ID NOs: 1 到 3 和 20 到 325 之任一因 1 到 10 个保守的氨基酸取代而不同的 V<sub>H</sub>结构域。

本发明还提供抗体或其抗原结合部分，其包含选自 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一或与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一因 1 到 10 个保守的氨基酸取代而不同的 V<sub>L</sub>结构域。

本发明还提供抗体或其抗原结合部分，其包含一个 V<sub>H</sub>结构域和一个 V<sub>L</sub>结构域，所述 V<sub>H</sub>结构域独立地选自 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一，或是与 SEQ ID NOs: 1 到 13 和 320 到 325 之任一因 1 到 10 个保守的氨基酸取代而不同的序列；所述 V<sub>L</sub>结构域独立地选自 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一，或是与 SEQ ID NOs: 14 到 23 和 326 到 331 之任一因至 1 到 10 个保守的氨基酸取代而不同的序列。

本发明还提供抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：如 SEQ ID NO: 24 中公开的 V<sub>H</sub> CDR1，或与 SEQ ID NO: 24 因 1 到 4 个保守的氨基酸取代而不同的序列；如 SEQ ID NO: 25 中所公开的 V<sub>H</sub> CDR2，或与 SEQ ID NO: 25 因 1 到 4 个保守的氨基酸取代而不同的序列；和选自 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一的 V<sub>H</sub> CDR3，或与 SEQ ID NOs: 26 到 37 和 91 到 256 之任一因 1 到 4 个保守的氨基酸取代而不同的序列。

本发明还提供抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：如 SEQ ID NO: 38 中公开的 V<sub>L</sub> CDR1，或与 SEQ ID NO: 38 因 1 到 4 个保守的氨基酸取代而不同的序列；如 SEQ ID NO: 39 中所公开的 V<sub>L</sub> CDR2，或与 SEQ ID NO: 39 因 1 到 4 个保守的氨基酸取代而不同的序列；和选自 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一的 V<sub>L</sub> CDR3，或与 SEQ ID NOs: 40 到 47 和 257 到 319 之任一因 1 到 4 个保守的氨基酸取代而不同的序列。

本发明还提供至少具有先前在 A)到 K)中描述的功能特征之一的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分包含：如 SEQ ID NO: 48 中公开的 V<sub>H</sub> FR1；如 SEQ ID NO: 49 中公开的 V<sub>H</sub> FR2；选自 SEQ ID NOs: 50 到 55 之任一的 V<sub>H</sub> FR3；选自 SEQ ID NOs: 56 和 57 之任一的 V<sub>H</sub> FR4；选自 SEQ ID NOs: 58 和 59 之任一的 V<sub>L</sub> FR1；选自 SEQ ID NOs: 60 到 62 之任一的 V<sub>L</sub> FR2；选自 SEQ ID NOs: 63 到 66 之任一的 V<sub>L</sub> FR3；和如 SEQ ID NO: 67 中公开的 V<sub>L</sub> FR4。在另一实施方案中，每个所述 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> FR1、FR2、FR3 和 FR4 序列也可独立地与上述特定的 SEQ ID NOs 因至少一个保守的氨基酸取代而不同。例如，每个所述 FR1、FR2、FR3 和 FR4 序列可独立地与上述各自特定的 SEQ ID NOs 因 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个保守的氨基酸取代而不同。还在另一实施方案中，每个 FR1、FR2、FR3 和 FR4 序列之任一可独立地被突变以匹配各自的种系框架序列 (germline framework sequence)。

本发明的另一实施方案是本文所述的任何抗体，其中所述抗体为 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子，或来自其中。例如，抗体可以是 IgG<sub>1</sub> 或 IgG<sub>2</sub>。例如在一个实施方案中，IgG 是 IgG<sub>1</sub>，其中重链恒定区包含 SEQ ID NO: 344，其中轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 345，并且 SEQ ID NO: 344 的 C-端任选地被切割。

另一实施方案提供上述任何抗体或抗原结合部分，其为 Fab 片段、F(ab')<sub>2</sub> 片段、F<sub>V</sub> 片段、单链 F<sub>V</sub> 片段、单链 V<sub>H</sub> 片段、单链 V<sub>L</sub> 片段、人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

另一实施方案是衍生的抗体或抗原结合部分，其包含本文所述任何抗体或其部分和至少一个额外的分子实体。例如，所述至少一个额外的分子实体可以是另一抗体（例如双特异性抗体或双抗体）、检测剂、标签、细胞毒素剂、药剂和/或能够介导抗体或抗体部分与另一分子（例如链霉亲和素核心区或多组氨酸标签）联合的蛋白质或肽。例如，有用的检测剂（使用它可衍生本发明的抗体或抗原结合部分）包括荧光化合物，包括萤光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酸、藻红蛋白、镧系磷光体等。抗体还可以用适用于检测的酶标记，所述酶例如辣根过氧化物酶、

$\beta$ -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶等。在另一实施方案中，本发明的抗体或其部分也可用生物素标记，或用被次级报告子识别的预先确定的多态表位（例如亮氨酸拉链对序列、次级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签）来标记。还在本发明的另一实施方案中，任何抗体或其部分也可用化学基团来衍生，所述基团例如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基，或碳水化合物基团。

在一些实施方案中，本文公开的 P-钙黏着蛋白抗体或抗原结合部分附着在固体载体上。

在一些实施方案中，任何本发明 P-钙黏着蛋白抗体的重链 C-端赖氨酸被切割。在本发明的多个实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体的重链和轻链可任选地包括 N-端信号序列。例如重链信号序列可以是 SEQ ID NO: 346，轻链信号序列可以是 SEQ ID NO: 347。

在另一实施方案中，本发明涉及本文所述任何抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分是人来源的。

本发明还提供药物组合物，其包含上述任何抗体或其抗原结合部分和药物可接受载体。

在另一实施方案中，本发明涉及分离的核酸分子，其包含编码本文所述任何抗体或其抗原结合部分的核苷酸序列。一个具体的实施方案是分离的核酸分子，其包含如 SEQ ID NOs: 68 到 90 和 332 到 343 之任一所公开的核苷酸序列。本发明还涉及包含本文所述的任何核酸分子的载体，其中所述载体任选地包含与所述核酸分子可操作连接的表达调控序列。

另一实施方案提供宿主细胞，其包含本文所述任一载体，或包含本文所述任一核酸分子。本发明还提供分离的细胞系，其生产本文所述的任何抗体或抗原结合部分，或生产任何所述抗体或所述抗原结合部分的重链或轻链。

在另一实施方案中，本发明涉及用于生产 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分的方法，所述方法包含在合适条件下培养本文所述的任何宿主细胞或细胞系，并回收所述抗体或抗原结合部分。



本发明还涉及包含本文所述任何核酸的非人转基因动物或转基因植物，其中所述非人转基因动物或转基因植物表达所述核酸。

本发明还提供用于分离结合 P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合部分的方法，所述方法包含从本文所述的非人转基因动物或转基因植物中分离所述抗体的步骤。

本发明还提供用于在有需要的哺乳动物中治疗异常细胞生长的方法，所述方法包含向所述哺乳动物施用本文所述的任何抗体或其抗原结合部分，或任何药物组合物的步骤。本发明还提供使用结合 P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合部分用于在有需要的哺乳动物中治疗异常细胞生长的方法，所述方法包含在合适的条件下向所述哺乳动物施用有效数量的本文所述任何核酸分子的步骤，所述合适的条件允许所述核酸分子表达。在另一实施方案中，治疗异常细胞生长的方法还包含施用一定用量的一种或多种选自抗肿瘤剂、抗血管生成剂、信号转导抑制剂和抗增殖剂中的物质，所述用量一起能有效地治疗所述异常细胞生长。在具体的实施方案中，所述异常细胞生长是癌性的。

本发明还提供用于降低 P-钙黏着蛋白依赖性细胞聚集的方法，所述方法包含将细胞与本文所述任何抗体或其抗原结合部分或本文所述任何药物组合物接触。

本发明的另一方面是抗体或其抗原结合部分，其包含利用人 V<sub>H</sub>-3 家族基因的重链可变区氨基酸序列。例如在一个实施方案中，人 V<sub>H</sub>-3 家族基因是 V<sub>H</sub>-3-23。

本发明的另一方面提供本文所述的任何抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或抗原结合部分为人抗体。在另一方面，所述抗体或抗原结合部分是人重组抗体。

本发明还提供用于生产 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分的方法，所述方法包含步骤：在噬菌体上合成人抗体文库、用 P-钙黏着蛋白或其抗原部分筛选所述文库、分离与 P-钙黏着蛋白结合的噬菌体和从噬菌体获得所述抗体。

### 定义和一般技术

除非本文另有定义，涉及本发明使用的科学和技术术语应当具有本领域常规技术人员所普遍理解的含义。另外，除非上下文另有要求，单数术语应当包括复数，复数术语应当包括单数。一般地，涉及本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质与核酸化学和杂交而使用的术语或其技术是本领域所公知和普遍使用的。

除非另有说明，本发明的方法和技术一般根据本领域公知的传统方法进行，和如贯穿本说明书所列和所述的多种一般的和更特定的参考文献所述来进行。参阅例如 Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); 和 Coligan, et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003),其公开内容通过引用并入本文。如本领域所普遍完成的或如本文所述，酶反应和纯化技术根据制造商的说明书进行。涉及本文所述分析化学、合成有机化学和医学及制药化学所使用的术语，或其实验步骤和技术是本领域所公知并普遍使用的。标准技术被用于化学合成，化学分析，药物制备、配制、递送和治疗患者。

已知基本的抗体结构单元包含四聚物。每个四聚物由两个同样的多态链对组成，每对具有一个“轻”链（约 25 kDa）和一个“重”链（约 50-70 kDa）。每个链的氨基端部分包括约 100 到 120 或更多个氨基酸的可变区，其主要负责抗原识别。每个链的羧基端定义恒定区，所述恒定区主要负责效应子作用。人轻链被分类为  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链。重链被分类为  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$  或  $\epsilon$ ，并将抗体同种型分别定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链中，可变区和恒定区通过约 12 或更多个氨基酸的“J”区而结合，重链还包括约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。一般地参阅 Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))（就所有

目的而言，以其整体通过引用并入本文)。每个重链/轻链对 ( $V_H$  和  $V_L$ ) 形成抗体结合位点。因此，例如完整的 IgG 抗体具有两个结合位点。除在双功能或双特异性抗体中之外，两个结合位点是相同的。

重链和轻链的可变区显示相同的一般结构，所述结构为通过三个高度可变区结合的相对保守的框架区(FR)，也称为互补性决定区或 CDR。术语“可变的”是指下述情况：抗体之中可变区的某些部分在序列上大为不同，并被用于每个具体的抗体与其具体的抗原的结合和特异性。然而，所述可变性并非均等地分布于抗体的整个可变结构域，而是集中在 CDR 中，所述 CDR 被更高度保守的 FR 隔开。来自每对两条链的 CDR 通过 FR 排列，使得能够与特定表位结合。从 N-端到 C-端，轻链和重链均包含 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 结构域。每个结构域的氨基酸分配是根据 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))或 Chothia & Lesk J., *Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia, et al., *Nature* 342:878-883 (1989)的定义，其公开内容通过引用并入本文。

除非另有说明，以下的术语应当理解为具有以下含义：

除非另有特别说明，术语“P-钙黏着蛋白”是指人 P-钙黏着蛋白，其是一种膜内在蛋白和调节细胞-细胞粘附的跨膜糖蛋白的经典钙黏着蛋白家族成员。人 P-钙黏着蛋白的克隆和序列已被报导，例如 Shimoyama, et al., *J. Cell Biol.* 109 (4 Pt 1), 1787-1794 (1989)，其公开内容通过引用并入本文。术语 P-钙黏着蛋白旨在包括重组的人 P-钙黏着蛋白和 P-钙黏着蛋白的重组嵌合体形式，其可通过标准的重组表达方法制备或商业购得 (R&D Systems 861-PC-100)。

除非另有特别说明，本文使用术语“E-钙黏着蛋白”是指人 E-钙黏着蛋白，其是一种膜内在蛋白和调节细胞-细胞粘附的跨膜糖蛋白的经典钙黏着蛋白家族成员。E-钙黏着蛋白描述于例如 Takeichi, *Science*, 251: 1451-1455 (1991)，其公开内容通过引用并入本文。术语 E-钙黏着蛋白旨在包括重组的人 E-钙黏着蛋白和 E-钙黏着蛋白的重组嵌合体形式，其可通过标准的重组表达方法制备或商业购得 (R&D Systems 861-EC-100)。

术语“多肽”包括天然或人造的蛋白质、蛋白质片段和蛋白质序列的多肽类似物。多肽可以是单体的或多聚体的。

术语“经分离的蛋白质”、“经分离的多肽”或“经分离的抗体”是下述蛋白质、多肽或抗体，所述蛋白质、多肽或抗体由于其起源或衍生来源而（1）不带有在其天然状态下与之相随的天然结合的成分，（2）不含来自相同种类的其他蛋白质，（3）由来自不同种类的细胞表达，或（4）天然不存在。因此，经化学合成的或在与下述多肽天然来源的细胞不同的细胞体系中合成的多肽应是从其天然结合的成分中“经分离的”。也可以使用本领域公知的蛋白质纯化技术通过分离使得蛋白质基本上不含天然结合的成分。

经分离的抗体实例包括已经使用 P-钙黏着蛋白亲和纯化的 P-钙黏着蛋白抗体，和通过细胞系体外合成的 P-钙黏着蛋白抗体。

当样品的至少约 60%到 75%显示为单一种类的多肽时，蛋白质或多肽是“基本上纯净的”、“基本上均相的”或“基本上经纯化的”。多肽或蛋白质可以是单体的或多聚体的。基本上纯净的多肽或蛋白质可典型地包含约 50%、60%、70%、80%或 90% w/w 的蛋白质样品，更经常为约 95%，优选地可以大于 99%的纯净。蛋白质纯净度可以通过大量本领域公知手段表明，如蛋白质样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳之后用本领域公知的染料将凝胶染色来显影单一的多肽条带。就某些目的而言，可通过使用 HPLC 或纯化领域公知的其他手段提供更高的分辨率。

术语本文使用术语“多肽片段”是指具有氨基端和/或羧基端删除、但是剩余的氨基酸序列与天然存在序列中相应的位置相同的多肽。在一些实施方案中，片段为至少 5、6、8 或 10 个氨基酸长。在其他实施方案中，所述片段为至少 14 个、至少 20 个、至少 50 个或至少 70、80、90、100、150 或 200 个氨基酸长。

本文使用术语“类似物”或“多肽类似物”是指包含下述片段的多肽，所述片段与一些参考氨基酸序列具有基本的同一性，并与参考氨基酸序列具有基本上相同的功能或活性。典型地，多肽类似物相对于参考序列包含保守的氨基酸取代（或插入或缺失）。类似物可以是至少 20 或 25 个

氨基酸长，或可以是至少 50、60、70、80、90、100、150 或 200 个氨基酸长或更长，或经常可以与全长多肽一样长。本发明的一些实施方案包括与种系氨基酸序列相比带有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16 或 17 个取代的多肽片段或多肽类似物抗体。抗体的片段或类似物或免疫球蛋白分子可以由本领域常规技术人员依照本说明书的教导容易地制备。

在某些实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分的氨基酸取代为：（1）降低对蛋白酶解的敏感性，（2）降低对氧化的敏感性，（3）改变形成蛋白质络合物的亲合力，和（4）赋予或修饰这类类似物的其他物理化学特征或功能特征，但仍保留对 P-钙黏着蛋白的特异结合。类似物可包括对天然存在的肽序列的多种取代。例如，可以在天然存在的序列中（例如在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中）制造单个或多个氨基酸取代（优选地保守氨基酸取代）。氨基酸取代还可以在形成分子间接触的结构域中制造，所述分子间接触可以促进多肽活性。保守的氨基酸取代不应当显著改变母体序列的结构性质；例如替换氨基酸不应改变母体序列中存在的组成免疫球蛋白结合结构域的反向平行的 $\beta$ -折叠，或破坏表征母体序列的其他类型二级结构。通常，甘氨酸或脯氨酸不应用于反向平行的 $\beta$ -折叠。本领域识别的多肽二级结构和三级结构的实例描述于 Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 和 Thornton, et al., *Nature*, 354:105 (1991), 其通过引用并入本文。

本文使用术语“抗体”与免疫球蛋白同义，应如本领域普遍已知地理解。具体地，术语抗体不受生产抗体的任何具体方法限制。例如术语抗体包括但不限于重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。

本文使用术语抗体的“抗原结合部分”（或简单地“抗体部分”）是指具有与抗原（例如 P-钙黏着蛋白）特异结合能力的一个或多个抗体片段。已显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段完成。包括在术语抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段，由  $V_L$ 、

$V_H$ 、 $C_L$  和  $C_{H1}$  结构域组成的单价片段；(ii)  $F(ab')_2$  片段，包含两个 Fab 片段的二价片段，所述 Fab 片段在铰链区通过二硫键连接；(iii) 由  $V_H$  和  $C_{H1}$  结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由单臂抗体的  $V_L$  and  $V_H$  结构域组成的 Fv 片段，(v) dAb 片段 (Ward, et al., *Nature*, (1989) 341:544-546)，其由  $V_H$  结构域组成；和 (vi) 经分离的互补性决定区(CDR)。另外，尽管 Fv 片段的两个结构域  $V_L$  和  $V_H$  由独立的基因编码，但是它们可以使用重组方法通过合成的接头连接，所述接头允许它们作为单个蛋白质链产生，所述单链中  $V_L$  和  $V_H$  区对形成单价分子（已知为单链 Fv (scFv)）；参阅例如 Bird, et al., *Science* (1988) 242:423-426 和 Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988)。这类单链抗体也旨在被包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。其他形式的单链抗体如双抗体也包括在内。双抗体是二价的、双特异性的抗体，其中  $V_H$  和  $V_L$  结构域在单个多肽链上表达，但是使用太短而不允许相同链上两个结构域之间配对的接头，从而强迫所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点（参阅例如 Holliger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Poljak, et al. *Structure*, 2:1121-1123 (1994)）。

另外，抗体或其抗原结合部分可以是更大的免疫粘附分子的部分，其通过抗体或抗体部分与一个或多个其他蛋白质或肽的共价或非共价结合而形成。这类免疫粘附分子包括链霉亲和素核心区制造四聚体 scFv 分子的用途 (Kipriyanov, et al., *Human Antibodies and Hybridomas*, 6:93-101 (1995)) 和半胱氨酸残基、标记物肽和 C-端多组氨酸标签制造二价的和生物素化的 scFv 分子的用途 (Kipriyanov, et al., *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058 (1994))。其他实例包括来自抗体的一个或多个 CDR 被共价地或非共价地整合进分子中使其成为特异性结合目的抗原（如 P-钙黏着蛋白）的免疫粘附素。在这类实施方案中，CDR 可以作为更大的多肽链的一部分被整合，可以与另一多肽链共价连接或可以非共价地整合。抗体部分如 Fab 和  $F(ab')_2$  片段可以使用传统技术（分别为例如整个抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化）从整个抗体中制备。另外，抗体、抗体部分和免疫粘附分子可使用如本文所述的标准重组 DNA 技术获得。

当关于本发明涉及“抗体”时，应当理解也可使用其抗原结合部分。抗原结合部分与完整抗体竞争特异结合。一般地参阅 Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (以其整体通过引用并入，用于所有目的)。抗原结合部分可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶切割或化学切割产生。在一些实施方案中，抗原结合部分包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb 和互补性决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、双抗体和含有至少一个抗体部分的多肽，所述至少一个抗体部分足够赋予所述多肽特异的抗原结合。在具有一个或多个结合位点的实施方案中，结合位点可以彼此相同或不同。

本文使用术语“人抗体”是指其中可变结构域和恒定结构域的序列是人序列的任何抗体。该术语包括下述抗体，所述抗体带有来自人基因的序列，但是已被改变以降低可能的免疫原性、提高亲合力、消除可能引起不期望的折叠的半胱氨酸等。该术语还包括在非人细胞中重组产生的这类抗体，其可能赋予对人细胞非典型的糖基化。这些抗体可以以多种方式制备，如下所述。

本文使用术语“嵌合抗体”是指下述抗体，所述抗体包含来自两种或更多不同抗体（包括来自不同物种的抗体）的区域。例如，嵌合抗体的一个或多个 CDR 可以来自人 P-钙黏着蛋白抗体。在一个实例中，来自人抗体的 CDR 可以与来自非人抗体（如小鼠或大鼠）的 CDR 结合。在另一实例中，所有的 CDR 可来自人 P-钙黏着蛋白抗体。在另一实例中，来自多个人 P-钙黏着蛋白抗体的 CDR 可以组合在一个嵌合抗体中。例如，嵌合抗体可包含来自第一个人 P-钙黏着蛋白抗体轻链的 CDR1、来自第二个人 P-钙黏着蛋白抗体轻链的 CDR2 和来自第三个人 P-钙黏着蛋白抗体轻链的 CDR3，且重链的 CDR 可以来自一个或多个其他 P-钙黏着蛋白抗体。另外，框架区可来自一个 P-钙黏着蛋白抗体（一个或多个 CDR 来自其中）或来自一个或多个不同的人抗体。另外，术语“嵌合抗体”旨在包括任何上述组合，其中所述组合涉及人和非人抗体。

本文使用术语“人源化抗体”是指非人来源的抗体，其中属于非人物种抗体序列特征性的氨基酸残基被替换为存在于人抗体相应位置的残基。

该“人源化”过程被认为降低所产生抗体在人中的免疫原性。应当知道非人来源的抗体可以使用本领域公知的技术被人源化。参阅例如 Winter, et al., *Immunol. Today*, 14:43-46 (1993)。目的抗体可以通过重组 DNA 技术被加工为用相应的人序列取代 CH1、CH2、CH3、铰链结构域和/或框架结构域。参阅例如 WO 92/02190 和 U.S.专利 Nos. 5,530,101、5,585,089、5,693,761、5,693,792、5,714,350 和 5,777,085。本文使用术语“人源化抗体”在其含义中包括嵌合的人抗体和 CDR-嫁接的抗体。本发明的嵌合人抗体包括非人物种抗体的  $V_H$  和  $V_L$  以及人抗体的  $C_H$  和  $C_L$  结构域。本发明的 CDR 移植的抗体通过将人抗体  $V_H$  和  $V_L$  的 CDR 分别用非人动物抗体的  $V_H$  和  $V_L$  代替而得到。

本文使用术语“ELISA”是指酶联免疫吸附测定法。该测定法为本领域技术人员公知。该测定法的实例可见于 Vaughan, T.J., et al., *Nat. Biotech.*, 14:309-314 (1996)以及本申请的实施例 7。

本文使用的术语“表面等离子共振”是指例如使用 BIACORE™ 体系(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.), 通过检测生物传感器基质中蛋白质浓度改变允许分析实时生物特异性相互作用的光学现象。进一步的描述参阅 Jonsson et al., *Ann. Biol. Clin.*, 51:19-26 (1993); Jonsson, et al., *Biotechniques*, 11:620-627 (1991); Jonsson, et al., *J. Mol. Recognit.*, 8:125-131 (1995);和 Johnson, et al., *Anal. Biochem.*, 198:268-277 (1991)。

术语“ $K_D$ ”是指具体的抗体-抗原相互作用的亲合力平衡常数。当  $K_D \leq 1$  mM, 优选地  $\leq 100$  nM 和最优选地  $\leq 10$  nM 时称抗体与抗原特异结合。 $K_D$  亲合力常数可通过表面等离子共振测量, 例如使用实施例 6 中所述的 BIACORE™ 体系。

术语“ $k_{off}$ ”是指具体的抗体-抗原相互作用的解离速率常数。 $k_{off}$  解离速率常数可通过表面等离子共振测量, 例如使用实施例 6 中所述的 BIACORE™ 体系。

本文使用术语“P-钙黏着蛋白依赖性细胞粘附测定法”是指下述测定法, 其用于测量 P-钙黏着蛋白抗体阻断细胞与已固定在固体载体上的受体



P-钙黏着蛋白粘附的能力。该类型的测定法可通过例如将 P-钙黏着蛋白固定在固体载体（例如塑料）上来进行。然后允许过表达 P-钙黏着蛋白的细胞通过 P-钙黏着蛋白-P-钙黏着蛋白相互作用粘附在固体载体上。可使用或不使用 P-钙黏着蛋白抗体来定量粘附水平。作为抗体浓度函数的粘附可随后被用于测定 IC<sub>50</sub> 值。实施例 3 提供了用于测量 P-钙黏着蛋白抗体 IC<sub>50</sub> 值的 P-钙黏着蛋白依赖性的细胞粘附测定法的其他细节。

本文使用术语“P-钙黏着蛋白依赖性细胞聚集测定法”是指下述测定法，其用于测量 P-钙黏着蛋白抗体阻断其表面上表达 P-钙黏着蛋白的细胞聚集的能力。例如，这种类型的测定法可使用过表达 P-钙黏着蛋白的细胞系，其中所述细胞被置于悬浮液中，并允许其形成 P-钙黏着蛋白依赖性的聚集体。然后使用聚集测定法，通过测量使用和不使用抗体得到的细胞聚集体的尺寸来定量 P-钙黏着蛋白抗体阻止该聚集的能力。作为 P-钙黏着蛋白抗体浓度函数的细胞聚集体的尺寸可随后被用于测定 IC<sub>50</sub> 值。实施例 4 提供了用于测量若干 P-钙黏着蛋白抗体 IC<sub>50</sub> 值的 P-钙黏着蛋白依赖性聚集测定法的其他细节。

本文使用术语“P-钙黏着蛋白依赖性球状体破坏测定法”是指下述测定法，其用于测量 P-钙黏着蛋白抗体破坏预先形成的 P-钙黏着蛋白依赖性的细胞聚集体的能力。通过测量作为抗体浓度函数的聚集体尺寸减小，可测定 IC<sub>50</sub> 值。实施例 5 提供了用于测量 P-钙黏着蛋白抗体 IC<sub>50</sub> 值的 P-钙黏着蛋白依赖性球状体破坏测定法的其他细节。

本文使用术语“分子选择性”是指抗体对特定抗原的亲合力大于对相关抗原的亲合力。例如，相对于 E-钙黏着蛋白，本发明的抗体是选择 P-钙黏着蛋白的，即所述抗体对 P-钙黏着蛋白的亲合力比对 E-钙黏着蛋白的亲合力至少大 2 倍，例如 4 倍、或 10 倍、或 50 倍、或 100 倍或更多。这类亲合力可使用本领域技术人员已知的标准技术来测量。

术语“表位”包括能够特异结合免疫球蛋白或 T-细胞受体或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面簇（例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链）组成，并通常具有特异的三维结构特性以及特异的电荷特性。表位可以是“线性的”或“构象

的”。在线性表位中，蛋白质和相互作用的分子（例如抗体）之间所有的相互作用点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性地存在。在构象型表位中，相互作用点横穿蛋白质上彼此分离的氨基酸残基而存在。一旦抗原上的目的表位被确定，可能使用例如本发明所述的技术产生针对该表位的抗体。或者，在发现过程中，抗体的产生和表征可阐述关于目的表位的信息。根据该信息可能随后竞争性地筛选抗体对相同表位的结合。达到该目的的一个途径是构建交叉竞争研究以找出彼此竞争性结合的抗体，即所述抗体竞争结合抗原。以其交叉竞争为基础的用于“binning”抗体的高通量方法描述于国际专利公开 No. WO 03/48731。

本文关于抗体使用术语“竞争”是指第一种抗体或其抗原结合部分与第二种抗体或其抗原结合部分竞争结合，其中与不存在第二种抗体时第一种抗体的结合相比，当存在第二种抗体时第一种抗体与其相关表位的结合可检测地降低。或者，情况可以是（但不必须是）第二种抗体与其表位的结合在存在第一种抗体时也可检测地降低。即，第一种抗体能够抑制第二种抗体与其表位的结合，而第二种抗体不能抑制第一种抗体与其各自表位的结合。然而，当每个抗体可检测地抑制另一抗体与其表位或配体的结合时，无论程度相同、更大或更小，称为抗体彼此“交叉竞争”地结合它们各自的表位。竞争和交叉竞争抗体均包括在本发明中。不考虑这类竞争或交叉竞争发生的机制（例如位阻、构象变化或与共同表位或其部分结合等），熟练的技术人员应当知道，根据本文提供的教导，这类竞争和/或交叉竞争抗体包括在并适用于本文公开的方法中。

本文关于具体的基因使用术语“利用”是指抗体中具体区域的氨基酸序列在 B-细胞成熟时根本地来源于该基因。例如，短语“利用人 V<sub>H</sub>-3 家族基因的重链可变区氨基酸序列”是指下述取代：B-细胞成熟时抗体的 V<sub>H</sub> 区域来自 VH-3 家族的基因片段。在人 B 细胞中存在多于 30 种不同的功能性重链可变基因，这些基因被用于产生抗体。因此，就结合抗原和功能活性的组合特征而言，具体的重链可变基因的使用指示优选的抗体-抗原相互作用的结合基序。应当知道，基因利用分析仅提供了有限的抗体结构概况。因为人 B-细胞随机地产生 V-D-J 重链或 V-J<sub>κ</sub> 轻链转录物，所以存

在大量次级过程，所述次级过程包括但不限于体细胞高度突变、n-添加和 CDR3 扩展。参阅例如 Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997)。

本文依照常规用法使用二十个常规氨基酸及其缩写。参阅 Immunology - A Synthesis (2<sup>nd</sup> Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用并入本文。

本文所涉及的术语“多核苷酸”是指至少 10 个碱基长度的多聚体形式核苷酸，其为核糖核苷酸或脱氧核苷酸或两种类型核苷酸的经修饰的形式。该术语包括单链和双链形式。

本文使用术语“经分离的多核苷酸”是指基因组、cDNA 或合成来源的多核苷酸或其一些组合，因为所述“经分离的多核苷酸”的来源，其 (1) 不伴随有所述“经分离的多核苷酸”天然被发现时的所有或部分多核苷酸，(2) 与多核苷酸可操作地连接，所述多核苷酸天然不与其连接，或 (3) 天然不作为更大序列的部分而存在。

本文使用的术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。本文使用的术语“经修饰的核苷酸”包括带有经修饰的或经取代的糖基等的核苷酸。本文涉及的术语“寡核苷酸连接”包括例如硫代磷酸、二硫代磷酸、硒代磷酸、二硒代磷酸、苯胺硫代磷酸酯 (phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯 (phosphoraniladate)、磷酰胺酸 (phosphoramidate) 等的寡核苷酸键。参阅例如 LaPlanche, et al., *Nucl. Acids Res.*, 14:9081 (1986); Stec, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 106:6077 (1984); Stein, et al., *Nucl. Acids Res.*, 16:3209 (1988); Zon, et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 6:539 (1991); Zon, et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); U.S. 专利 No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543 (1990), 其公开内容通过引用并入本文。需要时寡核苷酸可包括用于检测的标签。

“可操作地连接的”序列包括与目的基因相邻的表达调控序列和反向作用或在远处作用以调控目的基因的表达调控序列。

本文使用术语“表达调控序列”是指影响它们所连接的编码序列表达和加工所必须的多核苷酸序列。表达调控序列包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列；有效的 RNA 加工信号，例如剪接和多腺苷酸化信号；稳定细胞质 mRNA 的序列；增强翻译效率的序列（例如 Kozak 共有序列）；增强蛋白质稳定性的序列；和需要时增强蛋白质分泌的序列。这类调控序列的本质取决于宿主生物而不同；在原核生物中，这类调控序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列；在真核生物中这类调控序列通常包括启动子和转录终止序列。术语“调控序列”旨在至少包括其存在对于表达和加工是必需的所有成分，并也可包括其存在是有利的额外成分，例如前导序列和融合配偶体序列。

本文使用术语“载体”是指能够将转移其所连接的另一核酸的核酸分子。在一些实施方案中，载体是质粒，即额外的 DNA 片段可连接在其中的环状双链 DNA 部分。在一些实施方案中，载体是病毒载体，其中额外的 DNA 片段可被连接进病毒基因组中。在一些实施方案中，载体能够在其被引入的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体）。在其他实施方案中，载体（例如非附加体哺乳动物载体）可以通过引入宿主细胞被整合进宿主细胞基因组中，从而与宿主基因组一起被复制。此外，某些载体能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。这类载体在本文中称为“重组表达载体”（或简单地“表达载体”）。

本文使用的术语“重组宿主细胞”（或简单地“宿主细胞”）是指重组表达载体已被引入其中的细胞。应当理解“重组宿主细胞”和“宿主细胞”不但指具体的受试者细胞（subject cell），也指该细胞的后代。因为某些修饰可由于突变或环境影响而在后继的世代中发生，因此这类后代事实上可与母细胞不相同，但是其仍然包括在本文所使用的术语“宿主细胞”的范围内。

本文使用术语“种系”是指抗体基因和基因片段的核苷酸序列，因为它们通过生殖细胞从亲代传递给后代。该种系序列与编码成熟 B 细胞中抗

体的核苷酸不同，所述抗体在 B 细胞成熟的过程中已被重组和高突变事件改变。

在核酸序列语境中的术语“序列同一性百分比”是指针对最大对应进行比对时，两个序列中相同的残基。序列同一性比较的长度可以在至少约九个核苷酸，通常至少约 18 个核苷酸，更通常至少约 24 个核苷酸，典型地至少约 28 个核苷酸，更典型地至少约 32 个核苷酸和优选地至少约 36、48 或更多核苷酸的一段上。本领域存在可用于测量核苷酸序列同一性的大量不同的算法。例如，可使用 FASTA、Gap 或 Bestfit（其为 Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin 中的程序）比较多核苷酸序列。包括例如程序 FASTA2 和 FASTA3 的 FASTA 提供查询序列和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比（Pearson, *Methods Enzymol.*, 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.*, 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998);通过引用并入本文）。除非另有说明，使用针对具体程序或算法的默认参数。例如，核酸序列间的序列同一性百分比可使用 FASTA 用其默认参数（字码尺寸为 6，NOPAM 因子用于积分矩阵）测定，或使用 Gap 用 GCG Version 6.1 中提供的默认参数测定，通过引用并入本文。

除非另有说明，提到核苷酸序列时包括其补体。因此，具有具体序列的核酸的含义应当被理解为包括其互补链及其互补序列。

当涉及核酸或其片段时，术语“显著相似性”或“显著序列相似性”是指与另一核酸（或其互补链）就适当的核苷酸插入或删除进行最佳比对时，通过任何公知的序列同一性算法（例如如上所述的 FASTA、BLAST 或 Gap）测量得到：至少约 85%，优选地至少约 90%，和更优选地至少约 95%、96%、97%、98%或 99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性。

在氨基酸语境中的术语“序列同一性百分比”是指针对最大对应进行比对时，两个序列中相同的残基。序列同一性比较的长度可以在至少约五个氨基酸，通常至少约 20 个氨基酸，更通常至少约 30 个氨基酸，典型地

至少约 50 个氨基酸，更典型地至少约 100 个氨基酸和进一步更典型地约 150、200 或更多个氨基酸的一段上。存在大量不同的可用于测量氨基酸序列同一性的本领域已知算法。例如，可使用 FASTA、Gap 或 Bestfit（其为 Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin 中的程序）比较氨基酸序列。

应用于多肽时，术语“显著同一性”或“显著相似性”是指例如通过程序 GAP 或 BESTFIT 使用程序提供的默认缺口权重进行最佳比对时，两个氨基酸序列共享至少 70%、75%或 80%的序列同一性，优选地至少 90%或 95%的序列同一性，更优选地至少 97%、98%或 99%的序列同一性。在某些实施方案中，不同的残基位置区别在于保守的氨基酸取代。

本文使用“保守的氨基酸取代”是指下述氨基酸取代：其中一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基所取代，所述另一个氨基酸残基带有有相似化学特征（例如电荷或疏水性）的侧链 R 基团的。一般地，保守的氨基酸残基不会显著改变蛋白质的功能特征。当两个或更多的氨基酸序列彼此因保守取代而不同时，可上调序列同一性百分比以纠正取代的保守本质。进行该调节的手段为本领域技术人员所公知。参阅例如 Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 243:307-31 (1994)。具有有相似化学特征侧链的氨基酸基团的实例包括 1) 脂肪族侧链：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；2) 脂肪族-羟基侧链：丝氨酸和苏氨酸；3) 含酰胺的侧链：天冬酰胺和谷氨酰胺；4) 芳香族侧链：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；5) 碱性侧链：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；6) 酸性侧链：天冬氨酸和谷氨酸；和 7) 含硫的侧链：半胱氨酸和甲硫氨酸。例如，保守的氨基酸取代基团可以是：缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

或者，保守的替换是在 Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992)（通过引用并入本文）中公开的 PAM250 log-相似性矩阵中具有正值的任何改变。“适度保守的”替换是在 PAM250 log-相似性矩阵中具有非负值的任何改变。

多肽的序列同一性典型地使用序列分析软件来测量。蛋白质分析软件使用对多种取代、缺失和其他修饰（包括保守的氨基酸取代）赋值的相似性手段来匹配序列。例如，GCG 含有例如“Gap”和“Bestfit”的软件，其可使用程序指明的默认参数来测定密切相关的多肽（例如来自不同种类生物的同源多肽）之间或野生型蛋白质和其类似物之间的序列同源性或序列同一性。参阅例如 GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, WI)。多肽序列还可使用 FASTA 用默认的或推荐的参数进行比较，参阅 GCG Version 6.1. FASTA（例如 FASTA2 和 FASTA3）提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比（Pearson, *Methods Enzymol.*, 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132:185-219 (2000)）。将本发明的序列与包含来自不同生物的大量序列的数据库进行比较时，另一优选地算法是计算机程序 BLAST，特别是 blastp 或 tblastn，使用随程序提供的默认参数。参阅例如 Altschul, et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul, et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997)。

一般地，进行同源性的多肽序列的长度应为至少约 16 个氨基酸残基，通常至少约 20 个残基，更通常至少约 24 个残基，典型地至少约 28 个残基和优选地多于约 35 个残基。当在包含来自不同生物的大量序列的数据库中搜索时，优选比较氨基酸序列。

本文使用术语“标签”或“经标记的”是指抗体中整合了另一分子。在一个实施方案中，标签是可检测的标记，例如整合经放射性标记的氨基酸，或生物素基部分附着在多肽上，所述生物素基部分可由经标记的抗生物素蛋白（例如含有荧光标记物的链霉亲和素，或可通过光学或比色法检测的酶活性）检测。在另一实施方案中，标签或标记物可以是治疗性的，例如药物缀合物或毒素。标记多肽和糖蛋白的多种方法是本领域已知的并可被使用。用于多肽的标签包括但不限于以下的：放射性同位素或放射性核素（例如  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、荧光标签（例如 FITC、罗丹明、镧系磷光体）、酶标签（例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶）、化学发光标记物、生物素基、被次级报告子识别的、预先确定的多肽表位（例如亮氨酸拉链对序列、次

级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)、磁性剂如钆螯合物、毒素如百日咳毒素、紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁 (emetine)、丝裂霉素、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷 (etoposide)、鬼臼噻吩甙 (teniposide)、长春新碱 (vincristine)、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟炭疽菌素二酮 (dihydroxy anthracin dione)、盐酸米托蒽醌 (mitoxantrone)、光辉霉素、放线菌素 D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。在一些实施方案中, 标签通过多种长度的间隔臂连接以降低可能的位阻。

“治疗有效量”是指所施用的治疗剂的用量会在一定程度上减轻被治疗的疾病的一种或多种症状。就癌症治疗而言, 治疗有效量是指具有至少一种以下效果的量: 减小肿瘤的尺寸; 抑制 (即在一定程度上减缓, 优选地停止) 肿瘤转移; 在一定程度上抑制 (即在一定程度上减缓, 优选地停止) 肿瘤生长和在一定程度上减轻 (或优选地消除) 癌症相关的一种或多种症状。

“治疗”是指减轻或消除生物学疾病和/或附带的症状。就癌症而言, 这些术语简单地表示受癌症影响的个体的预期寿命会被延长, 或疾病的一种或多种症状会被减轻。

“接触”是指以抗体能够影响 P-钙黏着蛋白生物活性的方式, 将本发明的抗体或其抗原结合部分和靶 P-钙黏着蛋白或其表位集合在一起。这类“接触”可“体外”完成, 即在试管、培养皿等中完成。在试管中, 接触可仅涉及抗体或其抗原结合部分和 P-钙黏着蛋白或其表位, 或其可涉及整个细胞。细胞可维持或培养在细胞培养皿中, 并在该环境中与抗体或其抗原结合部分接触。在该语境中, 可在用更复杂的活体体内尝试抗体的用途之前测定具体抗体或其抗原结合部分影响 P-钙黏着蛋白相关疾病的能力 (即抗体的  $IC_{50}$ )。对生物外的细胞而言, 将 P-钙黏着蛋白与抗体或其抗原结合部分接触的多种方法存在并是本领域技术人员公知的。

除非另有说明, 本文使用“异常细胞生长”是指不依赖于正常调节机制的细胞生长 (例如缺失接触抑制), 包括正常细胞的异常生长和异常细



胞的生长。这包括但不限于以下的异常生长：通过表达经突变的酪氨酸激酶或过表达受体酪氨酸激酶而增殖的肿瘤细胞（肿瘤）；其他增殖性疾病的良性或恶性细胞，其中发生异常的酪氨酸激酶激活；通过受体酪氨酸激酶增殖的任何肿瘤；通过异常的丝氨酸/苏氨酸激酶激活而增殖的任何肿瘤；其他增殖性疾病的良性和恶性细胞，其中发生异常的丝氨酸/苏氨酸激酶激活；表达经激活的 Ras 癌基因的良性和恶性肿瘤；良性或恶性的肿瘤细胞，其中 Ras 蛋白质作为另一基因中致癌突变的结果而被激活；其他增殖性疾病的良性或恶性细胞，其中发生异常的 Ras 激活。这类良性增殖疾病的实例是银屑病、良性前列腺肥大、人乳头状瘤病毒(HPV)和 restinosis。“异常细胞生长”还涉及并包括由法呢基蛋白转移酶的酶活性导致的良性和恶性细胞的异常生长。

术语“异常细胞生长”和“高增殖性疾病”在本申请中可交换使用。

“体外”是指在人造环境中（例如但不限于试管或培养基中）进行的步骤。

“体内”是指在活体中（例如但不限于小鼠、大鼠或兔）中进行的步骤。

### 附图概述

图 1 显示 SEQ ID NOs: 1-347 的氨基酸和核酸序列。

### 发明详述

#### 人 P-钙黏着蛋白抗体

本发明涉及与人 P-钙黏着蛋白结合的、经分离的人抗体或其抗原结合部分。优选地，人抗体是重组的人 P-钙黏着蛋白抗体，其对 P-钙黏着蛋白具有比对 E-钙黏着蛋白更大的亲和力。本发明的多个方面涉及这类抗体和抗原结合部分及其药物组合物，以及用于制造这类抗体和抗原结合部分的核酸、重组表达载体和宿主细胞。使用本发明抗体和抗原结合部分以体内或体外地检测人 P-钙黏着蛋白或抑制人 P-钙黏着蛋白活性的方法也包括在本发明中。

已知来自若干物种（包括人）的 P-钙黏着蛋白氨基酸和核苷酸序列（参阅例如登录号 No. NM\_001793.3）。人 P-钙黏着蛋白或其抗原部分可根据本领域技术人员公知的方法来制备，或可从商业卖主处购得（例如 R&D Systems 861-PC-100）。

在某些实施方案中，本发明的抗体是如 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09; 200-h06; g-194-b09; g-194-g09; g-196-g03; g-196-h02; g-194-e01; g-194-e06; 129-1c4;和 g-129-1c4 所指的 IgG。如实施例 1 中更详细讨论的，使用 scFv 噬菌体展示文库的高通量筛选来鉴定 129-1c4 scFv，其随后被转化为 IgG。129-1c4 代表了初期噬菌体展示筛选中鉴定的前导抗体，并且是一个谱系的亲本抗体，从其中派生出本发明的若干个其他抗体。若干个这类经派生的抗体被指定为 194-e06; 194-a02; 194-b09; 195-e11; 194-g09; 196-h02; 194-e01; 196-d10; 196-g03; 196-e06; 195-a09; 198-a09;和 200-h06，并代表了 129-1c4 亲本谱系中经最优化的抗体。所述 g-129-1c4 抗体是 129-1c4 亲本抗体的种系版，其中  $V_H$  和  $V_L$  结构域的骨架区中某些氨基酸被突变以匹配种系骨架区中的氨基酸。上述任何抗体也可被种系化，使得骨架区序列与 g-129-1c4 中的种系骨架序列相同。例如在本发明的一个实施方案中，抗体 g-194-b09、g-194-g09、g-196-g03、g-196-h02、g-194-e01、g-195-e11、g-200-h06 和 g-194-e06 分别是 194-b09、194-g09、196-g03、196-h02、194-e01、195-e11、200-h06 和 194-e06 经种系化的版本。被突变以达到经种系化版本的特定氨基酸对本领域技术人员是显而易见的，可通过将经种系化的抗体与未种系化的抗体比较得到。如下所讨论的，本发明抗体的特定氨基酸序列描述于表 1-3 和图 1 中。

强烈倾向于利用重链可变区的  $V_H3$  基因家族生产本发明的抗体。具体地，129-1c4 亲本抗体衍生自  $V_H3-23$  可变基因片段。在人 B 细胞中，存在多于 30 种不同的功能性重链可变基因，其被用于生产抗体。然而就结合抗原和功能活性的组合特征而言，倾向预示着抗体-抗原相互作用的优选的结合基序。

应当知道，基因利用分析仅提供有限的抗体结构概况。因为人 B-细胞随机地产生 V-D-J 重链或 V-J $\kappa$  轻链转录物，所以存在大量次级过程，所述次级过程包括但不限于体细胞高度突变、n-添加和 CDR3 扩展。参阅例如 Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997)和在 2002 年二月 19 日提交的 U.S.公开专利申请 2003-0070185。因此，为了进一步检查本发明的抗体结构，从得自克隆的 cDNA 产生预知氨基酸序列的抗体。另外，N-端氨基酸序列通过蛋白质测序获得。图 1 提供若干个本发明抗体的重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列。

如表 1 和 2 中所示，上述每个特定的抗体可通过它们重链 ( $V_H$ ) 和轻链 ( $V_L$ ) 的可变结构域序列来描述。这些 SEQ ID NOs.所涉及的特定序列显示在图 1 中。如表 1 和表 2 所示，上述抗体相应的  $V_H$  和  $V_L$  的氨基酸和 DNA 序列由 SEQ ID NOs: 1-23、68-90 和 320-343 描述。

表 1

人 P-钙黏着蛋白抗体				
抗体	序列标识符 (SEQ ID NO:)			
	$V_H$		$V_L$	
	氨基酸	DNA	氨基酸	DNA
194-e06	1	68	14	81
194-a02	2	69	14	81
194-b09	2	69	15	82
195-e11	3	70	16	83
194-g09	4	71	17	84
196-h02	4	71	23	90
194-e01	5	72	18	85
196-d10	6	73	23	90
196-g03	7	74	23	90
196-e06	8	75	23	90
195-a09	9	76	23	90

人 P-钙黏着蛋白抗体				
抗体	序列标识符 (SEQ ID NO:)			
	$V_H$		$V_L$	
	氨基酸	DNA	氨基酸	DNA
198-a09	10	77	19	86
200-h06	11	78	20	87
129-1c4	12	79	21	88

表 2

种系化的人 P-钙黏着蛋白抗体				
抗体	序列标识符 (SEQ ID NO:)			
	$V_H$		$V_L$	
	氨基酸	DNA	氨基酸	DNA
g-194-b09	320	332	326	338
g-194-g09	321	333	327	339
g-196-g03	322	334	328	340
g-196-h02	323	335	329	341
g-194-e01	324	336	330	342
g-194-e06	325	337	331	343
g-129-1c4	13	80	22	89

本发明的额外抗体和抗原结合部分也可被描述为包含 CDR 和 FR 序列, 所述 CDR 和 FR 序列构成表 1 和 2 中所示抗体的重链和轻链可变区。因此, 对应于本发明抗体多种 CDR 和 FR 序列的 SEQ ID NOs. 在表 3 中显示。另外, 也在 129-1c4 亲本抗体的重链和轻链 CDR3 区中进行了大量随机的突变, 其产生经改进的 P-钙黏着蛋白亲和力, 所述亲和力通过表位竞争测定法测量改进 10-到 417-倍范围内 (见实施例 8)。这些经突变的  $V_H$  和  $V_L$  CDR3 序列的 SEQ ID NOs. (SEQ ID NOs: 91-256 和 257-319) 也包括在以下表 3 中。

表 3

SEQ ID NOs:	描述
24	V <sub>H</sub> CDR1
25	V <sub>H</sub> CDR2
26-37, 91-256	V <sub>H</sub> CDR3
38	V <sub>L</sub> CDR1
39	V <sub>L</sub> CDR2
40-47, 257-319	V <sub>L</sub> CDR3
48	V <sub>H</sub> FR1
49	V <sub>H</sub> FR2
50-55	V <sub>H</sub> FR3
56, 57	V <sub>H</sub> FR4
58, 59	V <sub>L</sub> FR1
60-62	V <sub>L</sub> FR2
63-66	V <sub>L</sub> FR3
67	V <sub>L</sub> FR4

### 生产抗体的方法

#### 噬菌体展示文库

本发明的抗体或抗原结合部分可根据本领域已知的若干方法来制备。例如，可使用噬菌体展示技术提供含有一系列抗体的文库，所述抗体具有不同的对 P-钙黏着蛋白的亲和力。然后可筛选这些文库以鉴定并分离对 P-钙黏着蛋白具有所需亲和力的分离抗体。

例如，本发明的重组人 P-钙黏着蛋白抗体可通过筛选重组的组合抗体文库来分离。优选地，所述文库为使用人 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> cDNA 生产的 scFv 噬菌体展示文库，所述 cDNA 从分离自人 B 细胞的 mRNA 制备。用于制备和筛选这类文库的方法为本领域已知。用于生产噬菌体展示文库的试剂盒可商业购得（例如 Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, 产品目录号 no. 27-9400-01; 和 the Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒，产品目录

号 no. 240612)。还存在其他方法和试剂可用于产生和筛选抗体展示文库（参阅例如 U.S.专利 No. 5,223,409; PCT 公开 Nos. WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047 和 WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay, et al., *Hum. Antibod. Hybridomas*, 3:81-85 (1992); Huse, et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Griffiths, et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993); Hawkins, et al., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992); Clackson, et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3576-3580 (1992); Garrad, et al., *Bio/Technology*, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom, et al., *Nuc. Acid Res.*, 19:4133-4137 (1991); Barbas, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991);和 Griffiths, et al., *EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994); 其均通过引用并入本文)。

用于制备用于噬菌体展示技术的抗体文库的另一方法包含步骤：用 P-钙黏着蛋白或其抗原部分免疫包含人免疫球蛋白基因座的非人动物，以产生免疫应答，从被免疫的动物中抽提产生抗体的细胞；从经抽提的细胞中分离编码本发明抗体重链和轻链的 RNA；反转录该 RNA 产生 cDNA，使用引物扩增该 cDNA 并将该 cDNA 插入噬菌体展示载体中，使得抗体在噬菌体上被表达。为了生产这类系列，不必须将来自被免疫动物的 B 细胞无限增殖化。另外，原始 B 细胞可直接用作 DNA 的来源。得自 B 细胞（例如来自脾）的 cDNA 混合物被用于制备表达文库，例如转染进 *E.coli* 的噬菌体展示文库。根本地，鉴定对抗原产生所需强度亲和力的来自文库的克隆，并将编码负责这类结合的产物的 DNA 回收并处理用于标准重组表达。噬菌体展示文库还可使用先前经处理的核苷酸序列构建并以相似方式筛选。一般地，编码重链和轻链的 cDNA 被独立地提供或被连接以形成 Fv 类似物，用于在噬菌体文库中生产。然后从噬菌体文库中筛选对 P-钙黏着蛋白具有最高亲和力的抗体，并从适当的克隆中回收遗传材料。更多轮的筛选可提高所分离的原始抗体的亲和力。

在一个实施方案中，为了分离和生产具有所需特性的人 P-钙黏着蛋白抗体，本文所述的人 P-钙黏着蛋白抗体首先被用于使用 PCT 公开 No. WO

93/06213 中所述的表位印记方法选择对 P-钙黏着蛋白具有相似结合活性的人重链和轻链序列，所述资料通过引用并入本文。优选地，该方法中使用的抗体文库是如 PCT 公开 No. WO 92/01047, McCafferty, et al., *Nature*, 348:552-554 (1990);和 Griffiths, et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993),所述制备并筛选的 scFv 文库，所述资料均通过引用并入本文。所述 scFv 抗体文库可使用人 P-钙黏着蛋白作为抗原来筛选。从噬菌体文库中筛选对 P-钙黏着蛋白具有最高亲和力的抗体，并从适当的克隆中回收遗传材料。更多轮的筛选可提高所分离的原始抗体的亲和力。

一旦选择了初始的人  $V_L$  和  $V_H$  结构域，可然后进行“混合并匹配”实验，其中筛选初始选择的不同对  $V_L$  和  $V_H$  片段对 P-钙黏着蛋白的结合，以选择优选的  $V_L/V_H$  对组合。这些混合并匹配实验也可在随机突变  $V_L$  和  $V_H$  片段后进行，用于下文所述的最佳化结合。另外，为了进一步提高抗体品质，优选的  $V_L/V_H$  对的  $V_L$  和  $V_H$  片段可以在下述方法中被随机突变（优选地在  $V_H$  和/或  $V_L$  的 CDR3 区中），所述方法与天然免疫应答中负责抗体亲和力成熟的体内体细胞突变方法类似。该体外亲和力成熟可以例如通过使用分别与  $V_H$  CDR3 或  $V_L$  CDR3 互补的 PCR 引物扩增  $V_H$  或  $V_L$  结构域而完成，所述引物已用四种核苷酸碱基的随机混合物在某些位置上被“穿刺（spiked）”，使得产生的 PCR 产物编码下述  $V_H$  和  $V_L$  片段，所述  $V_H$  和  $V_L$  片段中随机突变被引入  $V_H$  和/或  $V_L$  CDR3 区中。可在这些随机突变的  $V_H$  和  $V_L$  片段中再筛选对 P-钙黏着蛋白的结合，对 P-钙黏着蛋白显示高亲和力和低解离率（off rate）的序列可被选择。如先前所述，SEQ ID NOs: 91-256 和 257-319 指出被随机突变并显示经改进的亲和力的、本发明的若干  $V_H$  和  $V_L$  CDR3 序列。

从重组的免疫球蛋白展示文库中筛选并分离本发明的 P-钙黏着蛋白抗体之后，可从展示包（例如从噬菌体基因组中）中回收编码所选择抗体的核酸，并通过标准重组 DNA 技术亚克隆进其他表达载体中。需要时，核酸可被进一步加工以产生本发明的其他抗体形式，如下文所述。为了表达通过筛选组合文库而分离的重组人抗体，将编码所述抗体的 DNA 克隆进重组表达载体中并引入宿主细胞中，如下文所述。

## 免疫

在另一实施方案中，人 P-钙黏着蛋白抗体可以通过免疫非人的、转基因的动物来产生，所述动物的基因组中包含带有 P-钙黏着蛋白抗原的一些或所有的人免疫球蛋白重链和轻链基因座。例如，非人动物可以是 XENOMOUSE™动物。(Abgenix, Inc., Fremont, CA)。

XENOMOUSE™小鼠被操作为包含大片段人免疫球蛋白重链和轻链基因座的、小鼠抗体生产不足的小鼠株系。参阅例如 Green, et al., *Nature Genetics*, 7:13-21 (1994) 和 U.S. 专利 Nos. 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598、6,130,364、6,162,963 和 6,150,584。还参阅 WO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560 和 WO 00/037504。

这些文件中公开的方法可如 U.S.专利 No. 5,994,619 中所述被修饰，其通过引用并入本文。U.S.专利 No. 5,994,619 描述用于制造新培养的内细胞团 (CICM) 细胞和细胞系 (来自猪和牛)，以及其中被插入异源 DNA 的转基因 CICM 细胞。CICM 转基因细胞可以用于制造克隆的转基因胚、胎和后代。所述‘619 专利还描述了制造转基因动物的方法，所述转基因动物能够将异源 DNA 传递给其后代。可用于这些方法的非人动物实例包括大鼠、绵羊、猪、山羊、牛、鸡和马。

XENOMOUSE™小鼠生产成人样人系列的全人抗体并产生抗原特异性的人抗体。在一些实施方案中，XENOMOUSE™小鼠通过引入经测量的巨碱基 (megabase sized)、人重链基因座的种系构型片段和酵母人工染色体 (YAC) 中  $\kappa$  轻链基因座而含有约 80% 的人抗体 V 基因系列。在另一实施方案中，XENOMOUSE™小鼠还含有约所有人  $\lambda$  轻链基因座。参阅 Mendez, et al., *Nature Genetics*, 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.*, 188:483-495 (1998) 和 WO 98/24893，其公开内容通过引用并入本文。

在一些实施方案中，包含人免疫球蛋白基因的非人动物是具有人免疫球蛋白“小基因座 (minilocus)”的动物。在小基因座途径中，外源 Ig 基因座通过包括来自 Ig 基因座的个体基因而被模拟。因此，一个或多个  $V_H$



基因、一个或多个 D<sub>H</sub> 基因、一个或多个 J<sub>H</sub> 基因、 $\mu$  恒定结构域和另一恒定结构域（优选地， $\gamma$  恒定结构域）形成一个构建体用于插入动物中。该途径描述于 U.S. 专利 Nos. 5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,591,669、5,612,205、5,721,367、5,789,215 和 5,643,763 中，通过引用并入本文。

上述非人动物可随后用如下所述的 P-钙黏着蛋白抗原在允许抗体产生的条件下被免疫。从动物中分离产生抗体的细胞，从经分离的产生抗体的细胞中或从这类细胞所产生的无限增殖细胞系中分离编码目的 P-钙黏着蛋白抗体的重链和轻链的核酸。这些核酸随后使用本领域技术人员已知的和如下文进一步描述的技术被加工，以降低非人序列的量，即人源化所述抗体以降低在人中的免疫应答。

在一些实施方案中，P-钙黏着蛋白抗原可被分离和/或是经纯化的 P-钙黏着蛋白。在一些实施方案中，P-钙黏着蛋白是人 P-钙黏着蛋白。在其他实施方案中，P-钙黏着蛋白抗原可以是表达或过表达 P-钙黏着蛋白的细胞。在其他实施方案中，P-钙黏着蛋白抗原是由酵母、昆虫细胞、细菌如 *E.coli* 或其他来源通过重组技术所表达的重组蛋白质。动物免疫可以通过本领域已知的任何方法进行。参阅例如 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press (1990)。用于免疫非人动物如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛和马的方法为本领域公知。参阅例如 Harlow and Lane, 上文, 和 U.S. 专利 No. 5,994,619。例如，P-钙黏着蛋白抗原可以与佐剂一起被施用以刺激免疫应答。示范性的佐剂包括完全或不完全 Freund's 佐剂、RIBI（胞壁酰二肽）或 ISCOM（免疫刺激复合物）。这类佐剂可通过将多肽隔离在局部沉积物中而保护其免于快速分散，或它们可包含刺激宿主分泌下述因子的物质，所述因子对巨噬细胞和免疫系统中的其他成分是趋化性的（chemotactic）。优选地，如果多肽被施用，则免疫程序表会涉及多肽的两次或更多施用（遍布若干周中）。

例如，如上所述用 P-钙黏着蛋白免疫转基因动物后，可从经免疫的转基因动物中分离原始细胞（例如脾或外周血 B 细胞），并可鉴定产生下述抗体的个体细胞，所述抗体对目的抗原特异。然后分离来自每个个体细胞

的经多腺苷酸化的 mRNA，使用与可变区序列退火的有义引物（例如识别大部分或所有人重链和轻链可变区基因 FR1 区的简并引物，和与恒定区或连接区序列退火的反义引物）进行反转录多聚酶链式反应(RT-PCR)。然后克隆重链和轻链可变区的 cDNA 并在任何合适的宿主细胞（例如骨髓瘤细胞）中表达为嵌合抗体，所述嵌合抗体带有各自的免疫球蛋白恒定区，例如重链和  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定结构域。参阅 Babcook, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7843-48, (1996)，通过引用并入本文。然后可如本文所述鉴定并分离 P-钙黏着蛋白。

### 生产抗体的重组方法

本发明的抗体或抗体部分可以通过免疫球蛋白轻链和重链基因在宿主细胞中的重组表达来制备。例如，为了重组地表达抗体，用带有编码抗体免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的一个或多个重组表达载体来转染宿主细胞，使得所述轻链和重链在宿主细胞中被表达，优选地被分泌进入培养宿主细胞的培养基中，从该培养基中可回收抗体。使用标准的重组 DNA 方法获得抗体重链和轻链基因，将这些基因整合进重组表达载体并将所述载体引入宿主细胞，所述方法例如 Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M., et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989)和 U.S.专利 No. 4,816,397 中所述的方法，这些资料的公开内容通过引用并入本文。

### 突变和修饰

为了表达本发明的 P-钙黏着蛋白抗体，可使用如上所述的任何方法首先获得编码  $V_H$  和  $V_L$  区的 DNA 片段。也可使用本领域技术人员已知的标准方法向 DNA 序列中引入多种突变、缺失和/或添加。例如，可使用标准方法（例如 PCR-介导的诱变）进行诱变，其中经突变的核苷酸被整合进 PCR 引物中，使得 PCR 产物含有所需的突变或定点诱变。例如，可以制造的一种类型的取代是改变抗体中一个或多个半胱氨酸，所述半胱氨酸对另一残基（例如但不限于丙氨酸或丝氨酸）可以是化学反应性的。例如，可以存在不规范半胱氨酸的取代。该取代可以在抗体的 CDR 中或可变结

构域框架区中或恒定结构域中产生。在一些实施方案中，半胱氨酸是规范的。

抗体也可以在重链和/或轻链可变结构域中发生突变，例如以改变抗体的结合特征。例如，突变可以在一个或多个 CDR 区中发生以提高或降低抗体对 P-钙黏着蛋白的  $K_D$ 、提高或降低  $k_{off}$  或改变抗体的结合特异性。定点诱变技术为本领域公知。参阅例如 Sambrook, et al. and Ausubel, et al., 上文，其通过引用并入本文。例如，如在实施例 8 中更详细描述，根据上文所述步骤制造 129-1c4 亲本的大量可变的  $V_H$  和  $V_L$  CDR3 序列，并在图 1 中被显示为 SEQ ID NOs: 91 到 256 ( $V_H$  CDR3 变体)和 SEQ ID NOs: 257 到 319 ( $V_L$  CDR3 变体)。

也可在框架区或恒定结构域中制造突变以提高 P-钙黏着蛋白抗体的半衰期。参阅例如 PCT 公开 No. WO 00/09560，通过引用并入本文。框架区或恒定结构域中的突变也可被制造以改变抗体的免疫原性、提供与另一分子共价或非共价结合的位点或改变如补体结合、FcR 结合和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性之类的特征。根据本发明，单个抗体可在任何一个或多个 CDR 或可变结构域框架区或恒定区中具有突变。

在称作“种系化”的方法中， $V_H$  和  $V_L$  序列中某些氨基酸可以被突变以匹配在种系  $V_H$  和  $V_L$  序列中天然存在的氨基酸。具体地， $V_H$  和  $V_L$  序列中框架区的氨基酸序列可以被突变来匹配种系序列，以降低抗体被施用时的免疫原性风险。人  $V_H$  和  $V_L$  基因的种系 DNA 序列为本领域已知（参阅例如 the "Vbase" human germline sequence database;还参阅 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798;和 Cox, et al. *Eur. J. Immunol.* 24:827-836 (1994);每个资料的内容通过引用明确并入本文）。

可以制造的另一类型的氨基酸取代是去除抗体中可能的蛋白水解位点。这类位点可存在于 CDR 中或可变结构域的框架区中或抗体的恒定结构域中。半胱氨酸残基的取代和蛋白水解位点的去除可降低抗体产物中的异质性风险从而提高其同质性。另一类型的氨基酸取代是通过改变天冬酰

胺-甘氨酸对的一个或两个残基将其消除，所述天冬酰胺-甘氨酸对形成可能的脱酰胺位点。在另一实例中，本发明的 P-钙黏着蛋白抗体重链的 C-端赖氨酸可以被切割。在本发明的多种实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体的重链和轻链可任选地包括 N-端信号序列，如 SEQ ID NOs: 346 和 347 所指的序列。

一旦获得编码本发明  $V_H$  和  $V_L$  片段的 DNA 片段，这些 DNA 片段可通过标准重组 DNA 技术被进一步地处理，以例如将可变区基因转化为全长抗体链基因、转化为 Fab 片段基因或转化为 scFv 基因。在这些处理中， $V_L$ -或  $V_H$ -编码 DNA 片段被可操作地与编码另一蛋白质的另一 DNA 片段连接，所述另一蛋白质为例如抗体恒定区或柔性接头（flexible linker）。该语境中使用术语“可操作地连接”旨在表示两个 DNA 片段被连接，使得由两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持在读码框内（in-frame）。

经分离的编码  $V_H$  区的 DNA 可通过将  $V_H$ -编码 DNA 与编码重链恒定区（CH1、CH2 和 CH3）的另一 DNA 分子可操作地连接而被转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列为本领域已知（参阅例如 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242），包含这些区的 DNA 片段可通过标准的 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区，但是最优选地是 IgG1 或 IgG2 恒定区。IgG1 恒定区序列可以是任何已知在不同个体间存在的等位基因或同种异型，例如 Gm(1)、Gm(2)、Gm(3)和 Gm(17)。这些同种异型代表了 IgG1 恒定区中天然存在的氨基酸取代。例如，重链 IgG1 恒定区可以是 SEQ ID NO: 344。就 Fab 片段重链基因而言， $V_H$ -编码 DNA 可以与仅编码重链 CH1 恒定区的另一 DNA 分子可操作地连接。CH1 重链恒定区可以来自任何重链基因。

经分离的编码  $V_L$  区的 DNA 可以通过将  $V_L$ -编码 DNA 与编码轻链恒定区  $C_L$  的另一 DNA 分子可操作地连接而被转化为全长轻链基因（例如 Fab 轻链基因）。人轻链恒定区基因的序列为本领域已知（参阅例如 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed.,

U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), 包含这些区的 DNA 片段可通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区。 $\kappa$  恒定区可以是任何已知发生在不同个体间的多种等位基因, 例如 Inv(1)、Inv(2)和 Inv(3)。 $\lambda$  恒定区可以来自三个  $\lambda$  基因之任一。例如, 轻链 IgG1 恒定区可以是 SEQ ID NO: 347。

为了产生 scFv 基因, 将  $V_H$ -和  $V_L$ -编码 DNA 片段与编码柔性接头(例如编码氨基酸序列(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>)的另一片段可操作地连接, 使得  $V_H$ 和  $V_L$ 序列可以被表达为紧邻的单链蛋白质, 其中  $V_H$ 和  $V_L$ 区通过柔性接头相连(参阅例如 Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty, et al., *Nature*, 348:552-554 (1990))。单链抗体可以是单价的(如果仅使用单个  $V_H$ 和  $V_L$ )、双价的(如果使用两个  $V_H$ 和  $V_L$ )或多价的(如果使用多于两个  $V_H$ 和  $V_L$ )。可产生与 P-钙黏着蛋白和另一分子特异结合的双特异性抗体或多价抗体。

在另一实施方案中, 可以制造融合抗体或免疫粘附素, 其包含与另一多肽连接的本发明 P-钙黏着蛋白抗体的全部或部分。在另一实施方案中, 仅 P-钙黏着蛋白抗体的可变区与多肽连接。在另一实施方案中, P-钙黏着蛋白抗体的  $V_H$ 结构域与第一个多肽连接, 而 P-钙黏着蛋白抗体的  $V_L$ 结构域与第二个多肽连接, 所述第二个多肽以下述方式与第一个多肽相连:  $V_H$ 和  $V_L$ 结构域能够彼此相互作用, 形成抗原结合位点。在另一优选的实施方案中,  $V_H$ 结构域与  $V_L$ 结构域通过接头分离, 使得  $V_H$ 和  $V_L$ 结构域可以彼此相互作用。然后将  $V_H$ -接头- $V_L$ 抗体与目的多肽连接。另外可产生融合蛋白质, 其中两个(或更多)单链抗体被彼此连接。这适用于想要在单一多肽链上产生二价或多价抗体, 或想要产生双特异性抗体时。

在其他实施方案中, 可使用编码 P-钙黏着蛋白抗体的核酸分子制备其他的经修饰的抗体。例如可使用标准分子生物学技术依照本说明书的教导制备“ $\kappa$  抗体 (Kappa bodies)” (Ill, et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), “小抗体 (Minibodies)” (Martin, et al., *EMBO J.*, 13: 5303-9 (1994)), “双抗体” (Holliger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993))或

“Janusins” (Traunecker, et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991)和 Traunecker, et al., *Int. J. Cancer*, (Suppl.) 7:51-52 (1992))。

可通过大量方法（包括融合杂交瘤或连接 Fab'片段）生产双特异性抗体或抗原结合片段。参阅例如 Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990), Kostelny, et al., *J. Immunol.*, 148:1547-1553 (1992)。另外，双特异性抗体可以形成为“双抗体”或“Janusins”。在一些实施方案中，双特异性抗体与 P-钙黏着蛋白两个不同的表位结合。在一些实施方案中，使用来自本文提供的人 P-钙黏着蛋白抗体的一个或多个可变结构域或 CDR 区制备如上所述的经修饰的抗体。

### 载体和宿主细胞

为了表达本发明的抗体和抗原结合部分，将如上所述获得的、编码部分或全长的轻链和重链的 DNA 插入表达载体中，使得基因与转录和翻译调控序列可操作地连接。在该语境中，术语“可操作地连接”旨在表示抗体基因被连接进载体，使得载体内的转录和翻译调控序列提供它们预期的调节抗体基因转录和翻译的功能。选择与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达调控序列。表达载体包括质粒，反转录病毒，腺病毒，腺伴随病毒(AAV)，植物病毒如花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒，粘粒，YAC，EBV 衍生的附加体等。抗体基因被连接进载体，使得载体内的转录和翻译调控序列提供它们预期的调节抗体基因转录和翻译的功能。选择与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达调控序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可以被插入分离的载体中。在优选的实施方案中，两个基因被插入同一表达载体中。抗体基因通过标准方法（例如连接抗体基因片段和载体上互补的限制性位点，或不存在限制性位点时连接平末端）被插入表达载体中。

便利的载体是下述载体，其编码功能完整的人 C<sub>H</sub> 或 C<sub>L</sub> 免疫球蛋白序列，带有被设计的适当的限制性位点，使得任何 V<sub>H</sub> 或 V<sub>L</sub> 序列可以被容易地插入和表达，如上所述。在这类载体中，剪接通常发生在被插入的 J 区中剪接供体位点和人 C 结构域之前的剪接受体位点之间，还发生在存在于

人 C<sub>H</sub> 外显子中的剪接区中。多腺苷酸化和转录终止存在于编码区下游的天然染色体位点中。重组表达载体还可编码信号肽，所述信号肽有助于抗体链从宿主细胞中分泌。抗体链基因可以被克隆进载体中，使得信号肽与免疫球蛋白链氨基端按照读码框连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽（即来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽）。

除抗体链基因外，本发明的重组表达载体带有调控抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。本领域技术人员应当知道表达载体的设计，包括调节序列的选择可取决于下述因子：用于被转化的宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等等。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选的调节序列包括指导哺乳动物细胞中蛋白质高水平表达的病毒元件，例如来自逆转录病毒 LTR 的启动子和/或增强子、来自巨细胞病毒(CMV)的启动子和/或增强子（例如 CMV 启动子/增强子）、来自猿猴病毒 40(SV40)的启动子和/或增强子（例如 SV40 启动子/增强子）、来自腺病毒的启动子和/或增强子（例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)）、多瘤启动子和强哺乳动物启动子如天然免疫球蛋白启动子和肌动蛋白启动子。病毒调节元件的进一步描述及其序列参阅例如 U.S.专利 No. 5,168,062、U.S.专利 No. 4,510,245 和 U.S.专利 No. 4,968,615。用于在植物中表达抗体的方法（包括启动子和载体的描述）以及植物转化的方法为本领域已知。参阅例如 U. S.专利 No. 6,517,529，通过引用并入本文。在细菌细胞或真菌细胞（例如酵母细胞）中表达多肽的方法也是本领域公知的。

除抗体链基因和调节序列外，本发明的重组表达载体可带有额外的序列，例如调节载体在宿主细胞中复制的序列（如复制起点）和可选择的标记基因。可选择的标记基因有助于选择其中已被引入载体的宿主细胞（参阅例如 U.S.专利 Nos. 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017，通过引用并入本文）。例如典型地，可选择的标记基因给其中已被引入载体的宿主细胞赋予了对药物（如 G418、潮霉素或甲氨喋呤）的抗性。优选的可选择的标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因（用于用甲氨喋呤选择/扩增的 dhfr-宿主细胞）、新霉素磷酸转移酶基因（用于 G418 选择）和谷氨酸合成酶基因。

编码 P-钙黏着蛋白抗体的核酸分子和包含这些核酸分子的载体可以用于转染合适的哺乳动物、植物、细菌或酵母宿主细胞。转化可以通过用于将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知方法进行。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法为本领域公知，其包括葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、polybrene（1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物）介导的转染、原生质体融合、电穿孔、脂质体包裹多核苷酸和将 DNA 直接显微注射进细胞核中。另外，可通过病毒载体将核酸分子引入哺乳动物细胞中。转化细胞的方法为本领域公知。参阅例如 U.S. 专利 Nos. 4,399,216、4,912,040、4,740,461 和 4,959,455，通过引用并入本文。转化植物细胞的方法为本领域公知，包括例如土壤杆菌（*Agrobacterium*）介导的转化、生物射弹转化（*biolistic transformation*）、直接注射、电穿孔和病毒转化。转化细菌和酵母细胞的方法也是本领域公知的。

可获得的作为宿主用于表达的哺乳动物细胞系是本领域公知的，其包括可得自 American Type Culture Collection (ATCC) 的许多无限增殖细胞系。这些包括例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO 细胞、SP2 细胞、HEK-293T 细胞、NIH-3T3 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、非洲绿猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞（例如 Hep G2）、A549 细胞和大量其他细胞系。具体优选的细胞系通过确定具有高表达水平的细胞系来选择。可使用的其他细胞系是昆虫细胞系，如 Sf9 或 Sf21 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被引入哺乳动物宿主细胞中时，通过将宿主细胞培养下述时间段来生产抗体，所述时间段足够允许抗体在宿主细胞中表达，或更优选地，允许抗体被分泌进培养宿主细胞的培养基中。可使用标准的蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。植物宿主细胞包括例如烟草、拟南芥、浮萍、玉米、小麦、马铃薯等等。细菌宿主细胞包括 *E. coli* 和 *Streptomyces* 种。酵母宿主细胞包括 *Schizosaccharomyces pombe*、*Saccharomyces cerevisiae* 和 *Pichia pastoris*。

另外，生产细胞系对本发明抗体的表达可使用大量已知技术来增强。例如，谷氨酰胺合成酶（GS 体系）和 DHFR 基因表达体系是用于在某些条件下增强表达的普遍途径。高表达细胞克隆可以使用常规技术（例如有



限稀释克隆法和微滴技术)来鉴定。GS 体系描述于欧洲专利 Nos. 0 216 846、0 256 055、0 323 997 和 0 338 841。

很可能由不同细胞系或转基因动物表达的抗体会具有彼此不同的糖基化作用。然而,由本文提供的核酸分子编码的所有抗体,或包含本文提供的氨基酸序列的所有抗体都属于本发明,无论抗体是否糖基化。

#### 转基因动物和植物

本发明的 P-钙黏着蛋白抗体也可通过产生下述哺乳动物或植物而转基因地生产,所述哺乳动物或植物被转入目的免疫球蛋白重链和轻链序列的基因并生产可回收形式的抗体。就哺乳动物中的转基因生产而言,P-钙黏着蛋白抗体可以在山羊、牛或其他哺乳动物的乳中产生,并从其中回收。参阅例如 U.S.专利 Nos. 5,827,690、5,756,687、5,750,172 和 5,741,957,通过引用并入本文。

在一些实施方案中,包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物使用 P-钙黏着蛋白或其免疫原性部分被免疫,如上所述。用于在植物中制造抗体的方法描述于例如 U.S.专利 6,046,037 和 5,959,177 中,通过引用并入本文。

在一些实施方案中,非人转基因动物或植物通过将个或多个本发明的核酸分子(其编码 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分)通过标准的转基因技术引入动物或植物中来生产。参阅 Hogan 和 United States 专利 6,417,429,如上文。用于制造转基因动物的转基因细胞可以是胚胎干细胞或体细胞或受精卵。转基因非人生物可以是嵌合体的、非嵌合体的杂合子和非嵌合体的纯合子。参阅例如 Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson, et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); 和 Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999), 其均通过引用并入本文。在一些实施方案中,转基因非人动物具有靶向构建体的定向破坏和替换,所述靶向构建体编码目的重链和/或轻链。P-钙黏着蛋白可在任何转基因动物中产生。在优选的实施方案中,非人动物是小鼠、大鼠、绵羊、猪、山

羊、牛或马。非人转基因动物在血、乳、尿、唾液、泪水、粘液和其他体液中表达所述被编码的多肽。

#### 种类转换

P-钙黏着蛋白的种类（例如 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD）和亚类（IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）可以通过本领域已知的任何方法确定。一般地，抗体的种类和亚类可以使用对具体的抗体种类和亚类特异的抗体来确定。这类抗体是可商业购得的。可通过 ELISA 或 Western 印迹以及其他技术确定种类和亚类。或者，可如下确定种类和亚类：通过测序抗体重链和/或轻链的全部或部分恒定区，将它们的氨基酸序列与多种免疫球蛋白种类和亚类的已知氨基酸序列比较，并确定抗体的种类和亚类。本发明的 P-钙黏着蛋白抗体可以是 IgG、IgM、IgE、IgA 或 IgD 分子。例如，P-钙黏着蛋白抗体可以是 IgG，所述 IgG 是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 亚类。在一个实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体可具有 SEQ ID NO: 344 所示的重链恒定区和 SEQ ID NO: 345 所示的轻链恒定区。

本发明的一方面提供用于将 P-钙黏着蛋白抗体的种类或亚类转化为另一种类或亚类的方法。在一些实施方案中，使用本领域公知的方法分离编码  $V_L$  或  $V_H$  的核酸分子，其不包括编码  $C_L$  或  $C_H$  的序列。然后将所述核酸分子与来自目的免疫球蛋白种类或亚类的、编码  $C_L$  或  $C_H$  的核酸序列可操作地连接。这可使用载体或包含  $C_L$  或  $C_H$  链的核酸分子完成，如上所述。例如，最初是 IgM 的 P-钙黏着蛋白抗体可以被种类转换为 IgG。另外，可使用种类转换将一个 IgG 亚类转换为另一个，例如从 IgG1 转换为 IgG2。生产包含目的同种型的本发明抗体的另一种方法包括以下步骤：分离编码 P-钙黏着蛋白抗体重链的核酸和编码 P-钙黏着蛋白抗体轻链的核酸，分离编码  $V_H$  区的序列，将  $V_H$  序列与编码目的同种型重链恒定结构域的序列连接，在细胞中表达轻链基因和重链构建体，和收集带有目的同种型的 P-钙黏着蛋白抗体。

#### 脱免疫化的抗体

在本发明的另一方面，可使用例如 PCT 公开 Nos. WO98/52976 和 WO00/34317（通过引用并入本文）中描述的技术脱免疫化抗体或其抗原结合部分以降低其免疫原性。

#### 经衍生的和经标记的抗体

本发明的 P-钙黏着蛋白或其抗原结合部分可以被衍生或连接至另一分子（例如另一肽或蛋白质）。一般地，抗体或其部分被衍生使得 P-钙黏着蛋白结合不受衍生或标记的不利影响。因此，本发明的抗体和抗体部分旨在包括本文所述的完整的和经修饰形式的人 P-钙黏着蛋白。例如，本发明的抗体或抗体部分可以被功能性地连接（通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或以其他方式）至一个或多个其他分子部分，例如另一抗体（例如双特异性抗体或双抗体）、检测剂、标签、细胞毒素剂、药剂和/或蛋白质或肽，所述一个或多个其他分子部分能够介导抗体或抗体部分与另一分子（例如链霉亲和素核区或多组氨酸标签）的结合。

一种类型的衍生抗体是通过将两个或更多个抗体（相同或不同类型的，例如产生双特异性抗体）交联而生产的。合适的交联剂包括异双功能剂（例如 *m*-maleimidobenzoyl-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯）或同双功能剂（例如 disuccinimidyl suberate），所述异双功能剂具有被适当隔离区分隔开的两个不同的反应基团。这类接头可得自 Pierce Chemical Company, Rockford, IL。

另一种类型的衍生抗体是经标记的抗体。可以用来衍生本发明抗体或抗原结合部分的检测剂包括荧光化合物（包括荧光黄、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白、镧系磷光体等）。抗体还可适用于检测的酶标记，例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等。抗体使用可检测的酶标记时，其可通过添加额外的试剂检测，酶使用所述额外的试剂产生可以辨别的反应产物。例如当存在辣根过氧化物酶时，添加过氧化氢酶和二氨基联苯导致有色的反应产物，其是可检测的。抗体还可用生物素标记，并通过间接测量抗生物素蛋白或链霉亲和素结合来检测。抗体还可用预先确定的、被二级报告基因（例如亮氨酸拉链对序列、用于二级抗体的结合位点、金属结合结构

域、表位标签)识别的多肽表位来标记。在一些实施方案中,标签通过多种长度的间隔臂结合以降低可能的位阻。P-钙黏着蛋白还可以用化学基团衍生,所述化学基团例如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基或碳水化合物基团。这些基团适用于促进抗体的生物学特性,例如提高血清的半衰期。

#### P-钙黏着蛋白抗体对 P-钙黏着蛋白的亲合力

P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分对 P-钙黏着蛋白的亲合力( $K_D$ )和离解速率( $k_{off}$ )可通过本领域已知方法测量。可通过 ELISA、RIA、流式细胞仪或表面等离子共振,例如 BIACORE™ 来测量亲合力。离解速率可以通过表面等离子共振来测量。优选地,通过表面等离子共振测量亲合力和离解速率。更优选地,使用 BIACORE™ 测量亲合力和离解速率。可使用本领域已知方法测定抗体是否与 P-钙黏着蛋白抗体具有基本相同的  $K_D$ 。这类测定  $K_D$  和  $k_{off}$  的方法可用于初始的筛选阶段,以及随后的优化阶段。

#### 鉴定被 P-钙黏着蛋白识别的 P-钙黏着蛋白表位

本发明提供下述人 P-钙黏着蛋白抗体,所述人 P-钙黏着蛋白抗体与 P-钙黏着蛋白结合,并与表 1 或 2 中所述的任何抗体竞争或交叉竞争和/或结合相同表位。可使用本领域已知方法测定抗体是否与本发明的 P-钙黏着蛋白抗体结合相同的表位,或针对结合而交叉竞争。在一个实施方案中,允许本发明的 P-钙黏着蛋白抗体在饱和条件下与 P-钙黏着蛋白结合,然后测量测试抗体与 P-钙黏着蛋白结合的能力。如果测试抗体能够和 P-钙黏着蛋白抗体同时与 P-钙黏着蛋白结合,则测试抗体和 P-钙黏着蛋白抗体结合不同的表位。然而,如果测试抗体不能同时结合 P-钙黏着蛋白,则测试抗体结合相同的表位或重叠表位,或与人 P-钙黏着蛋白抗体所结合的表位密切近似的表位结合。该实验可使用 ELISA、RIA、BIACORE™ 或流式细胞仪进行。在优选的实施方案中,实验使用 ELISA 进行。

#### 通过 P-钙黏着蛋白抗体抑制 P-钙黏着蛋白活性

可使用大量测定法鉴定抑制 P-钙黏着蛋白活性的 P-钙黏着蛋白抗体。例如,细胞聚集测定法提供了测量 P-钙黏着蛋白-依赖性的细胞聚集的方法。该类型的测定法使用过表达 P-钙黏着蛋白的细胞系,其中细胞被置于

悬浮液中并被允许形成 P-钙黏着蛋白-依赖性聚集体。然后使用聚集测试，通过测量使用和不使用抗体导致的细胞聚集体的尺寸来定量 P-钙黏着蛋白抗体阻止该聚集的能力。作为 P-钙黏着蛋白抗体浓度的函数，细胞聚集体的尺寸可随后被用于测定  $IC_{50}$  值。实施例 3 提供了用于测量若干 P-钙黏着蛋白抗体  $IC_{50}$  值的 P-钙黏着蛋白-依赖性聚集体测定法的其他细节。

细胞粘附测定法还可用于测量 P-钙黏着蛋白阻断细胞与受体 P-钙黏着蛋白粘附的能力，所述受体 P-钙黏着蛋白已被固定在固体载体上。该类型的测定法可通过例如将 P-钙黏着蛋白固定在固体载体如塑料上来进行。然后允许过表达 P-钙黏着蛋白的细胞通过 P-钙黏着蛋白-P-钙黏着蛋白相互作用附着在固体载体上。然后可以使用或不使用 P-钙黏着蛋白抗体定量附着的水平。作为抗体浓度的函数，附着可随后用于测定  $IC_{50}$  值。实施例 3 提供用于测量 P-钙黏着蛋白抗体  $IC_{50}$  值的 P-钙黏着蛋白-依赖性细胞附着测定法的其他细节。

P-钙黏着蛋白活性的抑制也可使用 P-钙黏着蛋白依赖性球状体破坏测定法来测量。该类型的测定法测量 P-钙黏着蛋白抗体破坏预先形成的 P-钙黏着蛋白-依赖性细胞聚集的能力。通过测量聚集体的尺寸减小（作为抗体浓度的函数），可测定  $IC_{50}$  值。实施例 5 提供用于测量 P-钙黏着蛋白抗体  $IC_{50}$  值的 P-钙黏着蛋白-依赖性球状体破坏测定法的其他细节。上述通过多种抗体或其抗原结合部分用于测定 P-钙黏着蛋白活性抑制的方法和测定法，可在初始的筛选阶段以及随后的优化阶段使用。

### 分子选择性

本发明 P-钙黏着蛋白抗体对其他钙黏着蛋白（例如 E-钙黏着蛋白）的选择性可使用本领域公知方法测定。例如，可使用 Western 印迹、流式细胞仪、ELISA、免疫沉淀或 RIA 测定选择性。实施例 7 提供 ELISA 测定法的其他细节，所述 ELISA 测定法用于测量特定抗体对 P-钙黏着蛋白超出 E-钙黏着蛋白的选择性。上述用于测定多种抗体或其抗原结合部分对 P-钙黏着蛋白选择性的方法和测定法，可在初始的筛选阶段以及随后的优化阶段使用。

### 药物组合物和施用

本发明还涉及用于在哺乳动物（包括人）中治疗异常细胞生长的药物组合物，所述药物组合物包含一定量的本文所述 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分以及药物可接受载体，所述量有效治疗异常细胞生长。

本发明的抗体和抗原结合部分可被整合进适用于施用给受试者的药物组合物中。典型地，药物组合物包含本发明的抗体或抗原结合部分和药物可接受载体。本文使用“药物可接受载体”是指生理学适用的任何和所有的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药物可接受载体的一些实例是水、盐水、磷酸盐缓冲的盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。在许多情况下，组合物中优选包括等渗剂例如糖，多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。药物可接受物质的其他实例是湿润剂或少量辅助物质，例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液，其延长抗体的储藏寿命或提高其效力。

本发明的组合物可以是多种形式，例如液体、半固体和固体剂型，例如液体溶液（例如可注射的和可输注的溶液）、分散液或悬浮液、药片、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选的形式取决于将采用的施用和治疗应用模式。典型的优选的组合物是可注射或可输注的溶液，例如与用于被动免疫人的组合物类似的组合物。优选的施用模式是肠胃外的（例如静脉、皮下、腹膜内、肌肉）。在优选的实施方案中，通过静脉输注或注射施用抗体。在另一优选的实施方案中，通过肌肉或皮下注射施用抗体。用于注射的配方可以以单位剂型存在于例如安瓿或多剂容器中，添加或不添加防腐剂。组合物可在油性或水性运载体中带有如悬浮液、溶液或乳剂之类的形

式，并可含有配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，活性成分可以是用于在使用前与合适运载体（例如灭菌的无热原水）组合的粉末形式。

典型地，治疗组合物在制造和储存的条件下必须是无菌和稳定的。组合物可被配制为溶液、微乳剂、分散剂、脂质体或适用于高药物浓度的其他有序结构。可通过将所需用量的 P-钙黏着蛋白抗体整合进带有所需的上文所列成分之一或其组合的适当溶剂中，然后过滤灭菌来制备无菌的可注射溶液。一般地，通过将活性化合物整合进无菌运载体中制备分散剂，所述无菌运载体含有基础分散介质和来自上文所列的需要的其他成分。在用于配制无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的配制方法是真空干燥和冷冻干燥，其从先前经无菌过滤的溶液中得到活性成分加上任何额外所需成分的粉末。可例如通过使用涂层如卵磷脂，通过维持所需的颗粒尺寸（在分散剂的情况下）和通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动性。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包括延迟吸收的剂（例如单硬脂酸盐和明胶）来实现。

本发明的抗体或抗体部分可通过本领域已知的多种方法施用，尽管对于许多治疗应用而言，优选的施用途径/方式是皮下、肌内或静脉输注。本领域技术人员应当知道，施用途径和/或方式会取决于所需结果而变化。

在某些实施方案中，本发明的抗体组合物可以用下述载体制备，所述载体会保护抗体免于快速释放，例如受控释放成分，包括埋植剂、透皮贴剂和微囊包埋递送体系。可使用生物可降解的、生物相容的多聚体，例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚正酯和聚乳酸。用于制备这类配方的许多方法是本领域技术人员普遍已知的。参阅例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, 其通过引用并入本文。

额外的活性化合物也可被整合进组合物中。在某些实施方案中，本发明的异质性 P-钙黏着蛋白抗体与一种或多种额外的治疗剂共同配制和/或共同施用。这些剂包括但不限于结合其他靶标的抗体、抗肿瘤剂、抗血管生成剂、信号转导抑制剂、抗增殖剂、化学治疗剂或抑制 P-钙黏着蛋白的

肽类似物。这类组合治疗可需要低剂量的抑制性 P-钙黏着蛋白以及共同施用的剂，从而避免伴随着多种单一治疗的可能的毒性或并发症。

本发明的组合物可包括“治疗上有效量”或“预防上有效量”的本发明抗体或抗原结合部分。“治疗上有效量”是指按剂量或对必需的时间段而言，有效达到所需治疗结果的量。抗体或抗原结合部分的治疗上有效量可根据例如疾病阶段、年龄、性别和个体体重的因子以及抗体或抗体部分在个体中因其所需应答的能力而变化。治疗上有效量也是下述量，其中治疗上有益的效应胜过抗体或抗原结合部分的任何有毒效应或有害效应。

“预防上有效量”是指按剂量或对必需的时间段而言，有效达到所需预防结果的量。典型地，因为预防剂量被用于患疾病之前的或处于疾病早期阶段的受试者中，所以预防上有效量可少于治疗上有效量。

可调节给药方案以提供最佳的期望应答（例如治疗的或预防的应答）。例如，可以施用单次大丸剂(bolus)，可以随时间进展施用若干被分开的剂量或所述剂量可根据治疗情况所要求的按比例降低或提高。特别有利的是以单位剂型配制肠胃外组合物，以简化施用和剂量均一性。本文使用单位剂型是指物理上分离的单位，其适合作为单一剂量用于被治疗的哺乳动物受试者；每个单位含有与所需药物载体结合的、经计算以产生所需治疗效果的预定数量的活性成分。本发明单位剂型的规格由以下规定并直接取决于（a）P-钙黏着蛋白抗体或其部分的独特特性和所要达到的具体治疗或预防效应；和（b）调剂领域中这类抗体用于治疗个体中敏感性的固有限制。

本发明抗体或抗体部分的治疗上或预防上有效量的示范性的、非限制的范围是0.025到50 mg/kg，更优选地0.1到50 mg/kg，更优选地0.1-25、0.1到10或0.1到3 mg/kg。在一些实施方案中，配方在20mM柠檬酸钠（pH 5.5）、140mM NaCl和0.2mg/mL聚山梨酯80的缓冲液中含有5 mg/mL的抗体。应当注意剂量值可随着待减轻的病症类型和严重性而变化。还应当理解对任何具体的受试者，应当根据个体需要和施用组合物或管理组合物施用的人的专业判断，随着时间调整特定的给药方案，本文公开的剂量范围仅是示范性的，并不旨在限制所要求的组合物的范围或实践。



本发明的另一方面提供包含本发明P-钙黏着蛋白抗体或抗原结合部分的试剂盒，或包含这类抗体或部分的组合物。除抗体或组合物外，试剂盒可包括诊断剂或治疗剂。试剂盒可包括针对诊断方法或治疗方法使用的说明书。在优选的实施方案中，试剂盒包括抗体或包含抗体的组合物，以及可用于下述方法中的诊断剂。在另一优选的实施方案中，试剂盒包括抗体或包含抗体的组合物，以及可用于下述方法中的一种或多种治疗剂。

### 使用的诊断方法

P-钙黏着蛋白或其抗体结合部分可用于诊断方法以检测体外或体内生物样品中的 P-钙黏着蛋白。例如，P-钙黏着蛋白可用于常规免疫测定法，包括但不限于 ELISA、RIA、流式细胞仪、组织免疫组织化学、Western 印迹或免疫沉淀。本发明的 P-钙黏着蛋白可用于检测来自人的 P-钙黏着蛋白。P-钙黏着蛋白也可用于检测来自小鼠、大鼠和短尾猴的 P-钙黏着蛋白。

本发明提供用于检测生物样品中 P-钙黏着蛋白的方法，包含将生物样品与本发明的 P-钙黏着蛋白接触并检测结合的抗体。在一个实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体用可检测的标签直接标记。在另一实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体（第一抗体）未被标记，能够结合 P-钙黏着蛋白抗体的第二抗体或其他分子被标记。如本领域技术人员所公知的，选择能够与具体种类和类别的第一抗体特异结合的第二抗体。例如，如果 P-钙黏着蛋白抗体是人 IgG，则第二抗体可以是抗-人-IgG。能够结合抗体的其他分子包括但不限于 A 蛋白和 G 蛋白，其均可从例如 Pierce Chemical Co. 商业获得。

用于抗体或二级抗体的合适标签先前已讨论，其包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；合适的辅基络合物实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；合适的荧光材料实例包括伞形酮、荧光黄、异硫氰酸荧光素、罗丹明、dichlorotriazinylamine 荧光黄、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的实例包括鲁米诺；合适的放射性材料的实例包括  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$  或  $^3\text{H}$ 。

在其他实施方案中，可使用经可检测物质标记的 P-钙黏着蛋白标准和未标记的 P-钙黏着蛋白抗体，通过竞争免疫测定法在生物样品中测定 P-钙黏着蛋白。在该测定法中，将生物样品、经标记的 P-钙黏着蛋白标准和 P-钙黏着蛋白抗体组合，并测定与未标记抗体结合的经标记的 P-钙黏着蛋白标准的量。生物样品中 P-钙黏着蛋白的量和结合了 P-钙黏着蛋白抗体的经标记的 P-钙黏着蛋白标准的量成反比。

上述免疫测定法可被用于大量目的。例如，P-钙黏着蛋白抗体可被用于在经培养的细胞中检测 P-钙黏着蛋白。在优选的实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体被用于检测细胞产生的 P-钙黏着蛋白的量，所述细胞已用多种化合物处理。该方法可用于鉴定调节 P-钙黏着蛋白水平的化合物。根据该方法，用一种测试化合物处理一种细胞一段时间，同时另一样品不被处理。如果要测量总 P-钙黏着蛋白水平，则将细胞裂解并使用上述免疫测定法之一测量总 P-钙黏着蛋白水平。比较处理细胞与未处理细胞相对的总 P-钙黏着蛋白水平以测定测试化合物的效应。

用于测量总 P-钙黏着蛋白水平的优选免疫测定法是流式细胞仪或免疫组织化学。例如 ELISA、RIA、流式细胞仪、Western 印迹、免疫组织化学、细胞表面标记膜内在蛋白质和免疫沉淀为本领域公知。参阅例如 Harlow and Lane, 上文。另外，免疫测定法可以提高为高通量筛选，从而检测大量化合物的活性或对 P-钙黏着蛋白的抑制。

本发明的P-钙黏着蛋白抗体也可用于检测组织中或来自该组织的细胞中P-钙黏着蛋白水平。在一些实施方案中，该组织是患病组织。在该方法的一些实施方案中，组织或其组织活检从患者切离。然后将组织或组织活检用于免疫测定法，以通过上文所述方法测定例如总P-钙黏着蛋白水平或定位P-钙黏着蛋白。

本发明的抗体还可体内用于鉴定表达P-钙黏着蛋白的组织 and 器官。使用本发明的人P-钙黏着蛋白抗体的一个优点在于：与非人来源的抗体或人源化抗体或嵌合抗体不同，它们可被安全地体内使用而不因为施用引起对抗体的显著免疫应答。

该方法包含步骤：向需要这类诊断测试的患者施用经可检测地标记的 P-钙黏着蛋白抗体或包含它们的组合物，对患者进行图像分析以确定表达 P-钙黏着蛋白的组织定位。图像分析为医学领域所公知，包括但不限于 x 射线分析、磁共振成像(MRI)或计算机断层摄影术(CT)。抗体可用适用于体内成像的任何剂标记，例如造影剂如钡（其可被用于 x 射线分析），或磁造影剂如钆螯合物（其可用于 MRI 或 CT）。其他标记剂包括但不限于放射性同位素，例如  $^{99}\text{Tc}$ 。在另一实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体可以是未标记的，并可通过施用可检测并能结合 P-钙黏着蛋白抗体的第二抗体或其它分子而被成像。在一个实施方案中，从患者获得组织活检以确定目的组织是否表达 P-钙黏着蛋白。

#### 使用的治疗方法

在另一实施方案中，本发明提供通过向需要的患者施用 P-钙黏着蛋白抗体而用于抑制 P-钙黏着蛋白活性的方法。本文所述任何抗体或其抗原结合部分可治疗性地使用。在优选的实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体是人抗体、嵌合抗体或人源化的抗体。在另一优选的实施方案中，P-钙黏着蛋白是人的，患者是人患者。或者，患者可以是表达与所述 P-钙黏着蛋白抗体交叉反应的 P-钙黏着蛋白的哺乳动物。可以向表达（与所述抗体交叉反应的）P-钙黏着蛋白的非人哺乳动物（例如大鼠、小鼠或短尾猴）施用抗体，用于兽医的目的或用作人疾病的动物模型。这类动物模型可适用于评价本发明抗体的治疗效力。

在另一实施方案中，P-钙黏着蛋白抗体或其抗体部分可被施用给表达异常高水平 P-钙黏着蛋白的患者。该抗体可被施用一次，但更优选被施用多次。抗体可被施用为一天三次到每六个月或更久一次。施用可以按照如下的日程表：一天三次、一天两次、一天一次、两天一次、三天一次、一周一次、两周一次、一个月一次、两个月一次、三个月一次和六个月一次。抗体还可通过微泵被连续地施用。抗体可以通过粘膜、颊、鼻内、吸入、静脉、皮下、肌内、肠胃外或瘤内途径被施用。抗体可被施用一次、至少两次或至少施用一段之间直到病症被治疗、减轻或治愈。一般地，只要病症存在，抗体就被施用。一般地，抗体会作为上文所述药物组合物的

一部分被施用。一般地，抗体剂量会在 0.1 到 100 mg/kg，更优选地 0.5 到 50 mg/kg，更优选地 1 到 20 mg/kg 和进一步更优选地 1 到 10 mg/kg 的范围内。血清抗体浓度可通过本领域已知的任何方法测量。

本发明还涉及用于治疗哺乳动物（包括人）中异常细胞生长的方法，包含向所述哺乳动物施用治疗上有效量的 P-钙黏着蛋白或其抗原结合部分，如上所述，其有效治疗异常细胞生长。

在该方法的一个实施方案中，异常细胞生长是癌症，包括但不限于间皮瘤、肝胆管（肝和胆管）的癌症、原发性或继发性的 CNS 肿瘤、原发性或继发性的脑肿瘤、肺癌（NSCLC 和 SCLC）、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头与颈癌、表皮或眼内黑色素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、肠胃（胃的、结肠直肠的和十二指肠的）的癌症、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、阴门癌、Hodgkin's 疾病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、慢性或急性白血病、慢性髓细胞样白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)新生物、原发性 CNS 淋巴瘤、非 hodgkins's 淋巴瘤、脊髓性枢椎肿瘤（spinal axis tumors）、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、单囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤，或一种或多种上述癌症的组合。

在本发明优选的实施方案中，癌症选自肺癌（NSCLC 和 SCLC）、头与颈癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、乳腺癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)新生物、原发性 CNS 淋巴瘤、非 hodgkins's 淋巴瘤、脊髓枢椎肿瘤或一种或多种上述癌症的组合。

在本发明优选的实施方案中，癌症选自肺癌（NSCLC 和 SCLC）、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌或一种或多种上述癌症的组合。

在所述方法的另一实施方案中，所述异常细胞生长是良性的增生疾病，包括但不限于银屑病、良性前列腺肥大或组织增生（restinosis）。

本发明还涉及用于治疗哺乳动物中异常细胞生长的方法，其包含向所述哺乳动物施用一定量的 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分（如本文所

述，所述量有效治疗异常细胞生长）以及选自以下的抗肿瘤剂：核分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答修饰剂、抗体、细胞毒素、抗激素和抗雄激素。

本发明还涉及用于治疗哺乳动物（包括人）中异常细胞生长的药物组合物，其包含一定量（如本文所述，所述量有效治疗异常细胞生长）的 P-钙黏着蛋白或其抗原结合部分与药物可接受载体和选自以下的抗肿瘤剂：核分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答修饰剂、抗激素和抗雄激素。

本发明还涉及用于治疗哺乳动物中高增生性疾病的方法，其包含向所述哺乳动物施用治疗上有效量的 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分（如本文所述）以及选自以下的抗肿瘤剂：抗增殖剂、激酶抑制剂、血管生成抑制剂、生长因子抑制剂、cox-I 抑制剂、cox-II 抑制剂、核分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、辐射、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答修饰剂、抗体、细胞毒素、抗激素、statins 和抗雄激素。

在本发明的一个实施方案中，与本文所述 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分和药物组合物组合使用的抗肿瘤剂是抗血管生成剂、激酶抑制剂、pan 激酶抑制剂或生长因子抑制剂。优选的 pan 激酶抑制剂包括 U.S. 专利 No. 6,573,293 (Pfizer, Inc, NY, USA) 中描述的 SU-11248。

抗血管生成剂，包括但不限于以下剂，例如 EGF 抑制剂、EGFR 抑制剂、VEGF 抑制剂、VEGFR 抑制剂、TIE2 抑制剂、IGFIR 抑制剂、COX-II（环氧合酶 II）抑制剂、MMP-2（基质-金属蛋白酶 2）抑制剂和 MMP-9（基质-金属蛋白酶 9）抑制剂。优选的 VEGF 抑制剂包括例如 Avastin（贝伐单抗 bevacizumab）和 Genentech, Inc. of South San Francisco, California 的抗 VEGF 单克隆抗体。

其它的 VEGF 抑制剂包括 CP-547,632 (Pfizer Inc., NY, USA)、AG13736 (Pfizer Inc.)、ZD-6474 (AstraZeneca)、AEE788 (Novartis)、AZD-

2171)、 VEGF Trap (Regeneron,/Aventis)、 Vatalanib (也称为 PTK-787、 ZK-222584: Novartis & Schering AG)、 Macugen (pegaptanib octasodium, NX-1838, EYE-001, Pfizer Inc./Gilead/Eyetech)、 IM862 (Cytran Inc. of Kirkland, Washington, USA);和 angiozyme——来自 Ribozyme (Boulder, Colorado)和 Chiron (Emeryville, California)的合成性合酶, 及其组合。在本发明实践中有用的 VEGF 抑制剂公开于 US 专利 No. 6,534,524 和 6,235,764 中, 所述资料的整体内容均并入本文用于所有目的。具体优选的 VEGF 抑制剂包括 CP-547,632、 AG13736、 Vatalanib、 Macugen 及其组合。

其它的 VEGF 抑制剂描述于例如 WO 99/24440 (1999 年五月 20 日公开)、 PCT 国际申请 PCT/IB99/00797 (1999 年五月 3 日提交)、 WO 95/21613 (1995 年八月 17 日公开)、 WO 99/61422 (1999 年十二月 2 日公开)、 美国专利 6, 534,524 (公开 AG13736)、 美国专利 5,834,504 (1998 年十一月 10 日出版)、 WO 98/50356 (1998 年十一月 12 日公开)、 美国专利 5,883,113 (1999 年三月 16 日出版)、 美国专利 5,886,020 (1999 年三月 23 日出版)、 美国专利 5,792,783 (1998 年八月 11 日出版)、 U.S.专利 No. US 6,653,308 (2003 年十一月 25 日出版)、 WO 99/10349 (1999 年三月 4 日公开)、 WO 97/32856 (1997 年十二月 12 日公开)、 WO 97/22596 (1997 年六月 26 日公开)、 WO 98/54093 (1998 年十二月 3 日公开)、 WO 98/02438 (1998 年一月 22 日公开)、 WO 99/16755 (1999 年四月 8 日公开) 和 WO 98/02437 (1998 年一月 22 日公开), 其整体内容均通过引用并入本文。

可以与本发明抗体或其抗原结合部分使用的其它抗增殖剂包括法呢基蛋白质转移酶的酶抑制剂和受体酪氨酸激酶 PDGFr 的抑制剂, 包括以下美国专利申请中所公开并要求的化合物: 09/221946 (1998 年十二月 28 日提交); 09/454058 (1999 年十二月 2 日提交); 09/501163 (2000 年二月 9 日提交); 09/539930 (2000 年三月 31 日提交); 09/202796 (1997 年五月 22 日提交); 09/384339 (1999 年八月 26 日提交) 和 09/383755 (1999 年八月 26 日提交); 和以下的美国临时专利申请中公开并要求的化合物: 60/168207 (1999 年十一月 30 日提交); 60/170119 (1999 年十二月

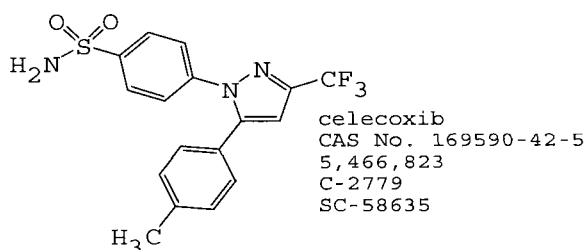
10 日提交)；60/177718 (2000 年一月 21 日提交)；60/168217 (1999 年十一月 30 日提交)和 60/200834 (2000 年五月 1 日提交)。每个上述专利申请和临时专利申请的整体内容被引入本文。

PDGFR $\alpha$  抑制剂包括但不限于公开于以下的那些：2001 年七月 7 日公开的 WO01/40217 和 2004 年三月 11 日公开的 WO2004/020431，就一切目的而言其内容整体并入本文。优选的 PDGFR $\alpha$  抑制剂包括 Pfizer's CP-673,451 和 CP-868,596 及其可药用盐。

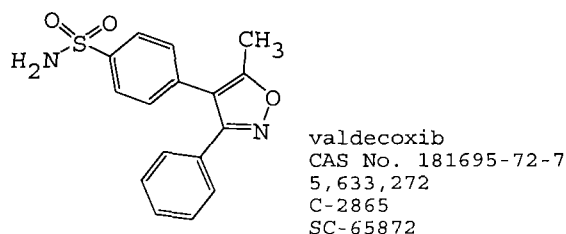
优选的 GARF 抑制剂包括 Pfizer's AG-2037 (pelitrexol 及其可药用盐)。适用于本发明实践的 GARF 抑制剂公开于 U.S.专利 No. 5,608,082，就一切目的而言其被整体引入。

可与本文所述 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分和本文所述药物组合物组合使用的、有用的 COX-II 抑制剂的实例包括：CELEBREX<sup>TM</sup> (塞来考昔)、帕瑞考昔、地拉考昔、ABT-963、MK-663 (艾托考昔)、COX-189 (Lumiracoxib)、BMS 347070、RS 57067、NS-398、Bextra (伐地考昔)、paracoxib、Vioxx (罗非考昔)、SD-8381、4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-氨磺酰基-苯基)-1H-吡咯、2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰基苯基)-1H-吡咯、T-614、JTE-522、S-2474、SVT-2016、CT-3、SC-58125 和 Arcoxia (艾托考昔)。另外，COX-II 抑制剂公开于 U.S.专利申请 Nos. 10/801,446 和 10/801,429，就一切目的而言其内容被整体并入。

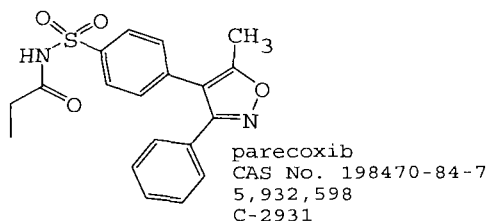
在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如 U.S.专利 No. 5,466,823 中公开的塞来考昔，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。塞来考昔的结构如下所示：



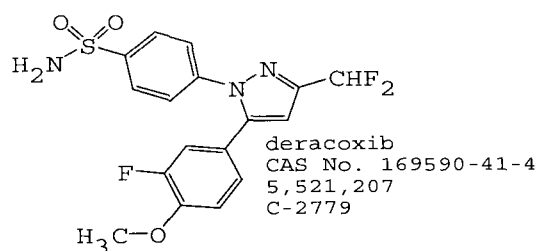
在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如 U.S.专利 No. 5,633,272 中所公开的法利考昔 (valdecoxib)，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。法利考昔的结构如下所示：



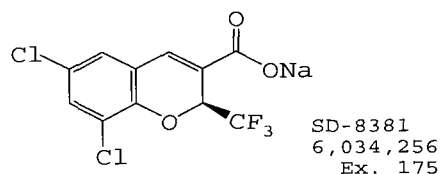
在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如 U.S.专利 No. 5,932,598 中所公开的帕瑞考昔，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。帕瑞考昔的结构如下所示：



在一个实施方案中，抗肿瘤剂是如 U.S.专利 No. 5,521,207 所述的地拉考昔，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。地拉考昔的结构如下所示：

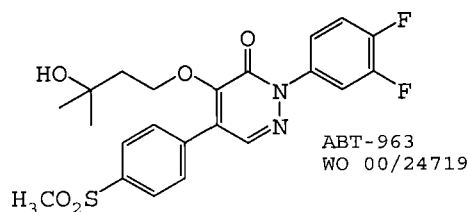


在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如 U.S.专利 No. 6,034,256 中公开的 SD-8381，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。SD-8381 的结构如下所示：

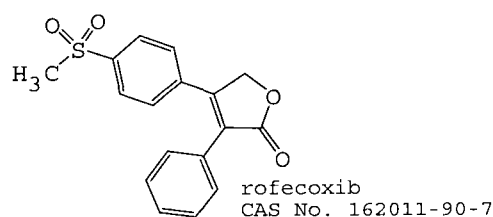




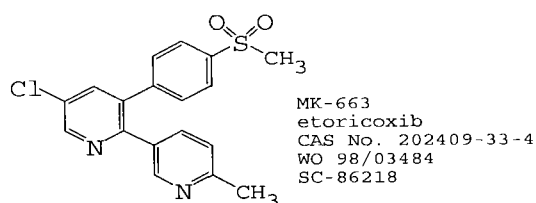
在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如国际公开号 WO 2002/24719 中公开的 ABT-963，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。ABT-963 的结构如下所示：



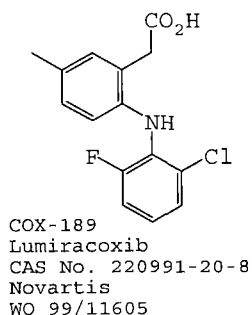
在优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如下所示的罗非考昔：



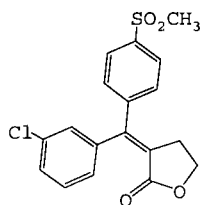
在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如国际公开号 WO 1998/03484 中所公开的 MK-663（艾托考昔），就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。艾托考昔的结构如下所示：



在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如国际公开号 WO 1999/11605 中所述的 COX-189 (Lumiracoxib)，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。Lumiracoxib 的结构如下所示：

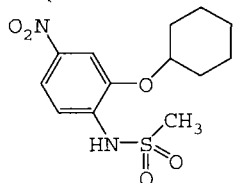


在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是如美国专利 No. 6,180,651 中所公开的 BMS-347070，就一切目的而言其内容通过引用被整体并入。BMS-347070 的结构如下所示：



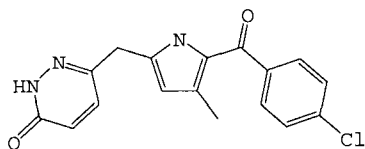
BMS 347070  
CAS No. 197438-48-5  
6,180,651

在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是 NS-398 (CAS 123653-11-2)。NS-398 (CAS 123653-11-2) 的结构如下所示：



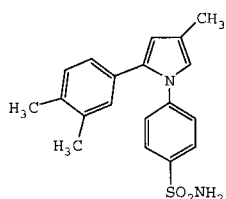
NS-398  
CAS No. 123653-11-2

在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是 RS 57067 (CAS 17932-91-3)。RS 57067 (CAS 17932-91-3) 的结构如下所示：

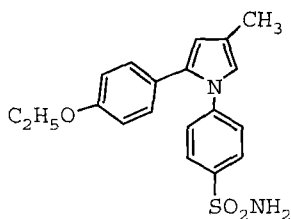


RS 57067  
CAS No. 17932-91-3

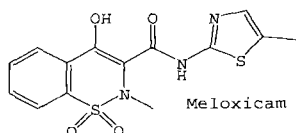
在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是 4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-氨磺酰基-苯基)-1H-吡咯。4-甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-氨磺酰基-苯基)-1H-吡咯的结构如下所示：



在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是 2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰基苯基)-1H-吡咯。2-(4-乙氧苯基)-4-甲基-1-(4-氨磺酰基苯基)-1H-吡咯的结构如下所示：



在一个优选的实施方案中，抗肿瘤剂是美洛昔康(meloxicam)。美洛昔康的结构如下所示：



与本发明抗体和本文所述的药物组合物一起用作抗肿瘤剂的其它有用抑制剂包括阿司匹林和非载体抗炎药(NSAID)，它们抑制制造前列腺素的酶（环氧合酶 I 和 II），导致更低的前列腺素水平，其包括但不限于以下的：双水杨酸酯（Salsalate）（Amigesic）、氟苯水杨酸（Diflunisal）（Dolobid）、布洛芬（Ibuprofen）（Motrin）、酮洛芬（Ketoprofen）（Orudis）、萘丁美酮（Nabumetone）（Relafen）、皮洛西康（Piroxicam）（Feldene）、萘普生（Naproxen）（Aleve, Naprosyn）、双氯芬酸（Diclofenac）（Voltaren）、吲哚美辛（Indomethacin）（Indocin）、舒林酸（Sulindac）（Clinoril）、痛灭定（Tolmetin）（Tolectin）、依托度酸（Etodolac）（Lodine）、酮咯酸（Ketorolac）（Toradol）、恶丙嗪（Oxaprozin）（Daypro）及其组合。优选的 COX-I 抑制剂包括布洛芬（Motrin）、磺胺二甲噻唑、萘普生（Aleve）、吲哚美辛（Indocin）、萘丁美酮（Relafen）及其组合。

与本文所述 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分以及本文所述药物组合物组合使用的定向剂包括 EGFR 抑制剂，例如易瑞沙（Iressa）（吉非替尼（gefitinib）、阿斯利康（AstraZeneca））、得舒缓（Tarceva）（埃罗替尼（erlotinib）或 OSI-774, OSI Pharmaceuticals Inc.）、而必得舒（Erbix）

(西妥昔单抗, Imclone Pharmaceuticals, Inc.)、EMD-7200 (Merck AG)、ABX-EGF (Amgen Inc.和 Abgenix Inc.)、HR3 (Cuban Government)、IgA 抗体(University of Erlangen-Nuremberg)、TP-38 (IVAX)、EGFR 融合蛋白、EGF-疫苗、抗-EGFr 免疫脂质体(Hermes Biosciences Inc.) 及其组合。

优选的 EGFr 抑制剂包括易瑞沙、而必得舒、得舒缓及其组合。

本发明还涉及选自 pan erb 受体抑制剂或 ErbB2 受体抑制剂的抗肿瘤剂, 例如 CP-724,714 (Pfizer, Inc.)、CI-1033 (坎呢替尼 (canertinib), Pfizer, Inc.)、贺癌平 (Herceptin) (曲妥单抗, Genentech Inc.)、奥米他 (Omitarg) (2C4, 派特资哌 (pertuzumab), Genentech Inc.)、TAK-165 (Takeda)、GW-572016 (龙呢法尼 (lonafarnib), GlaxoSmithKline)、GW-282974 (GlaxoSmithKline)、EKB-569 (Wyeth)、PKI-166 (Novartis)、dHER2 (HER2 Vaccine, Corixa and GlaxoSmithKline)、APC8024 (HER2 Vaccine, Dendreon)、抗 HER2/神经鞘双特异性抗体 (Decof Cancer Center)、B7.her2.IgG3 (Agensys)、AS HER2 (Research Institute for Rad Biology & Medicine)、三功能双特异性抗体 (University of Munich)和 mAB AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc)和 mAB 2B-1 (Chiron)及其组合。优选的 erb 选择性抗肿瘤剂包括 Herceptin、TAK-165、CP-724,714、ABX-EGF、HER3 及其组合。优选的 pan erbb 受体抑制剂包括 GW572016、CI-1033、EKB-569 和奥米他及其组合。

其它的 erbB2 抑制剂包括描述于以下的那些: WO 98/02434 (1998 年一月 22 日公开)、WO 99/35146 (1999 年七月 15 日公开)、WO 99/35132 (1999 年七月 15 日公开)、WO 98/02437 (1998 年一月 22 日公开)、WO 97/13760 (1997 年四月 17 日公开)、WO 95/19970 (1995 年七月 27 日公开)、美国专利 5,587,458 (1996 年十二月 24 日出版)和美国专利 5,877,305 (1999 年三月 2 日出版), 每个资料通过引用被整体并入本文。适用于本发明的 ErbB2 受体抑制剂也描述于美国专利 Nos. 6,465,449 和 6,284,764 和国际申请 No. WO 2001/98277 中, 每个资料通过引用被整体并入本文。

另外，其它的抗肿瘤剂可选自以下剂：BAY-43-9006 (Onyx Pharmaceuticals Inc.)、根纳三思 (Genasense) (奥格莫森 (augmerosen), Genta)、盘尼图姆 (Panitumumab) (Abgenix/Amgen)、泽娃灵 (Zevalin) (Schering)、托西莫 (Bexxar) (Corixa/GlaxoSmithKline)、阿巴瑞克 (Abarelix)、力比泰 (Alimta)、EPO 906 (Novartis)、迪斯德莫来 (discodermolide) (XAA-296)、ABT-510 (Abbott)、癌立消 (Neovastat) (Aeterna)、恩泽特林 (enzastaurin) (Eli Lilly)、风车子阻生素 (Combrestatin) A4P (Oxigene)、ZD-6126 (AstraZeneca)、氟拉皮雷多 (flavopiridol) (Aventis)、CYC-202 (Cyclacel)、AVE-8062 (Aventis)、DMXAA (Roche/Antisoma)、诺拉曲特 (Thymitaq) (Eximias)、硝卡芥 (Temodar) (替莫唑胺, Schering Plough) 和雷维里德 (Revilimd) (Celegene)及其组合。

其它抗肿瘤剂可选自以下剂：西皮特 (CyPat) (醋酸环丙孕酮)、组胺瑞林 (Histerelin, 醋酸组氨瑞林)、皮雷恩思 (Plenaixis) (abarelix depot)、阿曲生坦 (Atrasentan) (ABT-627)、萨特铂 (Satraplatin) (JM-216)、沙利度胺 (thalomid)、塞拉特 (Theratope)、替米利芬 (Temilifene) (DPPE)、ABI-007 (紫杉醇)、易维特 (Evista) (雷洛昔芬)、阿他美坦 (Atamestane) (Biomed-777)、聚壳氨酸紫杉醇 (Xyotax, polyglutamate paclitaxel)、他格停 (Targetin) (bexarotene)及其组合。

另外，其它抗肿瘤剂可选自以下剂：特塞酮 (Trizaone) (替拉扎明)、依昔舒林 (Aposyn, exisulind)、萘瓦特 (Nevastat) (AE-941)、色谱林 (Ceplene) (二盐酸组胺)、卢比替康 (Orathecin, rubitecan)、维如利金 (Virulizin)、胰腺癌疫苗 (Gastrimmune) (G17DT)、DX-8951f (依喜替康甲磺酸盐 (exatecan mesylate))、Onconase (豹蛙酶)、BEC2 (米妥莫单抗)、莫特沙芬钆 (Xcytrin, motexafin gadolinium) 及其组合。

其它的抗肿瘤剂可选自以下剂：昔瓦 (CeaVac) (CEA)、新特瑞辛 (NeuTrexin) (三切葡糖醛酸酯 (trimetresate glucuronate))及其组合。额

外的抗肿瘤剂可选自以下剂：奥雷瑞（OvaRex）（oregovomab）、奥昔地（Osidem）（IDM-1）及其组合。额外的抗肿瘤剂可选自以下剂：阿德维辛（Advexin）（ING 201）、替拉兹明（Tirazone）（tirapazamine）及其组合。额外的抗肿瘤剂可以选自以下剂：RSR13（乙丙昔罗（efaproxiral））、克他拉（Cotara）（131I chTNT 1/b）、NBI-3001（IL-4）及其组合。额外的抗肿瘤剂可选自以下剂：Canvaxin、GMK 疫苗、PEG Interon A、泰克派新（Taxoprexin）（DHA/派昔泰克（pacitaxel））及其组合。其它优选的抗肿瘤剂包括 Pfizer 的 MEK1/2 抑制剂 PD325901、Array Biopharm 的 MEK 抑制剂 ARRY-142886、Bristol Myers 的 CDK2 抑制剂 BMS-387,032、Pfizer 的 CDK 抑制剂 PD0332991 和 AstraZeneca 的 AXD-5438 及其组合。额外地，mTOR 抑制剂也可利用，例如 CCI-779（Wyeth）和雷怕霉素衍生物 RAD001（Novartis）和 AP-23573（Ariad）、HDAC 抑制剂 SAHA（Merck Inc./Aton Pharmaceuticals）及其组合。额外的抗肿瘤剂包括 aurora 2 抑制剂 VX-680（Vertex）、Chk1/2 抑制剂 XL844（Exilixis）。

以下的细胞毒素剂，例如选自表柔比星（Ellence）、多西紫杉醇（Taxotere）、紫杉醇、右雷佐生（Zinecard，dexrazoxane）、美罗华（Rituxan）、甲磺酸伊马替尼（imatinib mesylate）（Gleevec）的一种或多种及其组合可与本文所述的 P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合部分和本文所述的药物组合物组合使用。

本发明还关注本发明抗体及其抗原结合部分与激素疗法一起的用途，所述激素疗法包括但不限于依西美坦（Aromasin, Pfizer Inc.）、亮丙瑞林（Lupron 或 Leuplin, TAP/Abbott/Takeda）、阿那曲唑（Arimidex, AstraZeneca）、gosrelin（Zoladex, AstraZeneca）、度骨化醇、法倔唑、福美坦、柠檬酸他莫昔芬（他莫昔芬，Nolvadex, AstraZeneca）、康士得（Casodex）（AstraZeneca）、阿巴瑞克（Abarelix）（Praecis）、普托雷林（Trelstar）及其组合。

本发明还涉及激素治疗剂例如抗雌激素，包括但不限于氟维司群、托瑞米芬、雷洛昔芬、拉索昔芬、来曲唑（Femara, Novartis）；抗雄激素，

例如比卡鲁胺、氟他胺、米非司酮、尼鲁米特、Casodex® (4'-氰基-3-(4-氟苯基磺酰)-2-羟基-2-甲基-3'-(三氟甲基)丙酰苯胺, 比卡鲁胺) 及其组合。

另外, 本发明提供单独的或与一种或多种支持性医护产品组合的本发明的抗体, 所述支持性医护产品例如选自沙格莫丁 (Filgrastim) (Neupogen)、昂丹司琼 (Zofran)、法玛西亚 (Fragmin)、促红细胞生长素 (Procrit)、阿乐喜 (Aloxi)、止敏吐 (Emend) 的产品或其组合。

具体地优选的细胞毒素剂包括伊立替康 (Camptosar)、而必得舒、易瑞沙、格列卫 (Gleevec)、泰素帝 (Taxotere) 及其组合。

以下的拓扑异构酶 I 抑制剂可以作为抗肿瘤剂使用: 喜树碱、盐酸伊立替康 (irinotecan HCl, 伊立替康 (Camptosar))、艾替卡辛 (edotecarin)、卢比替康 (orathecin) (Supergen)、依沙替康 (exatecan, Daiichi)、BN-80915 (Roche) 及其组合。具体地优选的拓扑异构酶 II 包括柔比星 (Elevance)。

本发明的抗体可以与抗肿瘤剂、烷化剂、抗代谢物、抗生素、来自植物的抗肿瘤剂、喜树碱衍生物、酪氨酸激酶抑制剂、其它抗体、干扰素和/或生物应答修饰剂一起使用。

烷化剂包括但不限于氮芥 N-氧化物、环磷酰胺、异磷酰胺、美法仑、白消安、二溴甘露醇、卡波醌、塞替派、雷莫司汀、尼莫司汀、替莫唑胺、AMD-473、六甲蜜胺、AP-5280、阿帕兹酮 (apaziquone)、布罗他辛 (brostallicin)、苯达莫司汀、卡莫司汀、雌莫司汀、福莫司汀、葡磷酰胺、异磷酰胺、KW-2170、马磷酰胺和二溴卫矛醇; 铂配合的烷化化合物包括但不限于顺铂、必治妥 (Paraplatin) (卡铂)、依它铂、洛铂、奈达铂、奥沙利铂 (Eloxatin, oxaliplatin, Sanofi) 或塞特铂 (satraplatin) 及其组合。具体地优选的烷化剂包括奥沙利铂 (Eloxatin)。

抗代谢物包括但不限于甲氨喋呤、6-巯嘌呤、巯嘌呤、5-氟尿嘧啶 (5-FU) 单独或与亚叶酸 (leucovorin)、替加氟、UFT、去氧氟尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷 (cytarabine)、阿糖胞苷 (cytarabine ocfosphate)、依诺他滨、S-1, 力比泰 (Alimta, pemetrexed 二钠, LY231514, MTA)、健泽 (Gemzar) (吉西他滨, Eli Lilly)、氟达拉滨、5-阿扎胞苷、卡培他滨、

克拉屈滨、氯法拉滨 (clofarabine)、地西他滨、依氟鸟氨酸、乙炔基胞核 (ethynylcytidine)、阿糖胞苷 (cytosine arabinoside)、羟基脲、TS-1、美法仑、奈拉滨、诺拉曲塞、奥佛思特 (ocfosfate)、力比泰 (disodium premetrexed)、喷司他丁、派利特克 (pelitrexol)、雷替曲塞、特阿平 (triapine)、曲美沙特、阿糖腺苷、长春新碱、长春瑞滨组合；或例如优选的抗代谢物之一公开于欧洲专利申请 No. 239362，例如 N-(5-[N-(3,4-二氢-2-甲基-4-氧喹啉-6-基甲基)-N-甲氨基]-2-噻吩甲酰)-L-谷氨酸及其组合。

抗生素包括嵌入抗生素但不限于：阿柔比星 (aclarubicin)、放线菌素 D (actinomycin D)、安柔比星 (amrubicin)、脂质体蒽环霉素 (annamycin)、阿霉素 (adriamycin)、博来霉素 (bleomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、多柔比星 (doxorubicin)、依沙芦星 (elsamitrucin)、表柔比星 (epirubicin)、加柔比星 (galarubicin)、伊达比星 (idarubicin)、丝裂霉素 C、奈莫柔比星 (nemorubicin)、新制癌菌素 (neocarzinostatin)、培洛霉素 (peplomycin)、吡柔比星 (pirarubicin)、蝴蝶霉素 (rebeccamycin)、司丁拉米 (stimalamer)、链佐星 (streptozocin)、戊柔比星 (valrubicin)、净司他丁 (zinostatin) 及其组合。

来自植物的抗肿瘤物质包括例如选自核分裂抑制剂的物质，例如长春碱 (vinblastine)、多西紫杉醇 (Taxotere)、紫杉醇 (paclitaxel) 及其组合。

细胞毒拓扑异构酶抑制剂包括一种或多种选自以下的剂：阿拉柔比星 (aclarubicin)、氨萘非特 (amonafide)、白龙替康 (belotecan)、喜树碱 (camptothecin)、10-羟基喜树碱 (10-hydroxycamptothecin)、9-氨基喜树碱 (9-aminocamptothecin)、达佛莫替康 (diflomotecan)、盐酸伊立替康 (Camptosar)、edotecarin、表柔比星 (Ellence)、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷 (etoposide)、依沙替康 (exatecan)、基哌替康 (gimatecan)、勒托替康 (lurtotecan)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、吡柔比星 (pirarubicin)、皮可特酮 (pixantrone)、卢比替康 (rubitecan)、索布佐生



(sobuzoxane)、SN-38、泰鲁泼昔(tafluposide)、托泊替康(topotecan)及其组合。

优选的细胞毒拓扑异构酶抑制剂包括选自以下的一种或多种剂：喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、盐酸伊立替康(Camptosar)、艾替卡辛(edotecarin)、表柔比星(Ellence)、表鬼白毒吡喃葡萄糖苷、SN-38、托泊替康及其组合。

免疫剂包括干扰素和大量其它免疫增强剂。干扰素包括干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $\alpha$ -2a、干扰素 $\alpha$ -2b、干扰素 $\beta$ 、干扰素 $\gamma$ -1a、干扰素 $\gamma$ -1b(Actimmune)或干扰素 $\gamma$ -n1及其组合。其它剂包括非格司亭(filgrastim)、香菇多糖(lentinan)、裂裨多糖(sizofilan)、TheraCys、乌苯美司(ubenimex)、WF-10、阿地白介素(aldesleukin)、阿仑单抗(alemtuzumab)、BAM-002、达卡巴嗪(dacarbazine)、达珠单抗(daclizumab)、地尼白介素(denileukin)、吉姆单抗(gemtuzumab)、奥佐米星(ozogamicin)、伊莫单抗(ibritumomab)、咪喹莫特(imiquimod)、来格司亭(lenograstim)、香菇多糖(lentinan)、黑瘤疫苗(melanoma vaccine)(Corixa)、莫拉司亭(molgramostim)、OncoVAX-CL、沙格司亭(sargramostim)、他索纳明(tasonermin)、泰克白介素(tecleukin)、司哌拉辛(thymalasin)、托西莫单抗(tositumomab)、维如利金(Virulizin)、Z-100、依帕珠单抗(epratuzumab)、米妥莫单抗(mitumomab)、奥雷瑞(oregovomab)、派图莫(pemtumomab)(Y-muHMFG1)、普拉维格(Provence)(Dendreon)及其组合。

生物应答修饰剂是修饰活体防御机制或生物应答(例如存活、生长或组织细胞分化)使得它们具有抗肿瘤活性的剂。这类剂包括云芝多糖(krestin)、香菇多糖(lentinan)、西佐喃(sizofiran)、溶链菌(picibanil)、乌苯美司(ubenimex)及其组合。

其它抗癌剂包括阿利维A酸(alitretinoin)、聚肌胞(ampligen)、阿曲生坦(atrasentan)贝沙罗汀(bexarotene)、硼替佐米(bortezomib)、伯森坦(Bosentan)、骨化三醇(calcitriol)、依昔舒林(exisulind)、非那雄胺(finasteride)、福莫司汀(fotemustine)、伊班膦酸(ibandronic

acid)、米替福新(miltefosine)、米托蒽醌(mitoxantrone)、L-门冬酰胺酶、丙卡巴阱(procarbazine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、羟基脲(hydroxycarbamide)、培门冬酶(pegaspargase)、喷司他丁(pentostatin)、泰紫罗尼(tazarotne)、泰司特(Telcyta)(TLK-286, Telik Inc.)、万珂(Velcade)(bortemazib, Millenium)、维甲酸(tretinoin)及其组合。

其它抗血管生成化合物包括阿西曲丁(acitretin)、芬维A胺(fenretinide)、沙利度胺(thalidomide)、唑来膦酸(zoledronic acid)、制管张素(angiostatin)、脱氢膜海鞘素B(aplidine)、昔冷特(cilengtide)、考布他汀A-4(combretastatin A-4)、内皮抑制素(endostatin)、卤夫酮(halofuginone)、雷必玛特(rebimastat)、雷莫氟(removab)、来那度胺(Revlimid)、角鲨胺(squalamine)、乌克兰(ukrain)、单抗LM609(Vitaxin)及其组合。

与铂配合的化合物包括但不限于顺铂、卡铂、奈达铂、奥沙利铂及其组合。

喜树碱衍生物包括但不限于喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、伊立替康、SN-38、艾替卡辛(edotecarin)、托泊替康及其组合。

其它抗肿瘤剂包括米托蒽醌、L-门冬酰胺酶、丙卡巴阱、达卡巴嗪、羟基脲、喷司他丁、维甲酸及其组合。

能够增强抗肿瘤免疫应答的抗肿瘤剂如CTLA4(细胞毒性淋巴细胞抗原4)和能够阻断CTLA4的其它剂也可被利用,例如MDX-010(Medarex)和美国专利No. 6,682,736中公开的CTLA4化合物;和抗增殖剂如其它法呢基蛋白转移酶抑制剂,例如法呢基蛋白转移酶抑制剂。另外,可用于本发明的特定CTLA4抗体包括描述于美国临时申请60/113,647(1998年十二月23日提交)、美国专利No. 6,682,736中的那些,所述两个资料均通过引用整体并入本文。

可用于本发明的特定IGF1R抗体包括描述于国际专利申请No. WO 2002/053596中的那些,其通过引用整体并入本文。

可用于本发明的特定 CD40 抗体包括描述于国际专利申请 No. WO 2003/040170 中的那些，其通过引用整体并入本文。

基因治疗剂也可用作抗肿瘤剂，例如 TNFerade (GeneVec)，其响应放射性治疗而表达 TNF  $\alpha$ 。

在本发明的一个实施方案中，他汀类 (statins) 可与本文所述的 P-钙黏着蛋白抗体或其抗体结合部分及其药物组合物组合使用。他汀类 (HMG-CoA 还原酶抑制剂) 可以选自阿托伐他汀 (Atorvastatin, Lipitor, Pfizer Inc.)、普法他汀 (Provastatin, Pravachol, Bristol-Myers Squibb)、洛伐他汀 (Lovastatin, Mevacor, Merck Inc.)、辛伐他汀 (Simvastatin, Zocor, Merck Inc.)、氟伐他汀 (Fluvastatin, Lescol, Novartis)、薛利伐史达汀 (Cerivastatin, Baycol, Bayer)、瑞舒伐他汀 (Rosuvastatin, Crestor, AstraZeneca)、洛伐他汀 (Lovostatin) 和烟碱酸 (Niacin, Advicor, Kos Pharmaceuticals) 其衍生物或其组合。

在优选的实施方案中，他汀类选自阿托伐他汀和洛伐他汀、其衍生物或其组合。

适用于抗肿瘤剂的其它剂包括苯磺酸氨氯地平/阿伐他汀钙 (Caduet)。

就治疗本文所述的高增生性疾病或异常细胞生长的任何方法而言 (所述方法使用 P-钙黏着蛋白抗体或抗原结合部分与至少一种额外的治疗剂的组合)，P-钙黏着蛋白抗体可以与额外的治疗剂缀合，或衍生化。所述至少一种额外的治疗剂也可以单独地施用，或以非衍生化的或非缀合的方式施用。当所述至少一种额外的治疗剂不是经衍生化的或与抗体缀合，其可以在与抗体相同的药物配方中施用，或其可以在单独的配方中施用。

### 基因疗法

编码本发明抗体和抗体部分的核酸分子可以通过基因疗法施用给需要的患者。该疗法可以是体内的或离体的。在优选的实施方案中，编码重链和轻链二者的核酸分子被施用给患者。在更优选的实施方案中，核酸分子被施用，使得它们被稳定的整合进 B 细胞的染色体中，因为这些细胞是专门用于生产抗体的。在优选的实施方案中，转染或离体感染前体 B 细胞，

并再移植进需要的患者中。在另一实施方案中，使用已知感染目的细胞类型的病毒体内感染前体 B 细胞或其它细胞。用于基因疗法的典型载体包括脂质体、质粒和病毒载体。示范性的病毒载体是逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒。体内或离体感染后，通过从被治疗的患者中采样并使用本领域已知的或本文所述的任何免疫测定法监控抗体表达水平。

在优选的实施方案中，基因治疗方法包含步骤：施用编码 P-钙黏着蛋白抗体重链或其抗原结合部分的、经分离的核酸分子，和表达所述核酸分子。在另一实施方案中，基因治疗方法包含步骤：施用编码 P-钙黏着蛋白抗体轻链或其抗原结合部分的、经分离的核酸分子，和表达所述核酸分子。在更优选的实施方案中，基因治疗方法包含步骤：施用编码 P-钙黏着蛋白抗体重链或其抗原结合部分的、经分离的核酸分子和编码 P-钙黏着蛋白抗体轻链或其抗原结合部分的、经分离的核酸分子，和表达所述核酸分子。基因治疗方法还可包含施用另一治疗剂（例如先前所述的与组合疗法相关的任何剂）的步骤。

为了使本发明更好地被理解，公开以下实施例。这些实施例仅用于阐述的目的而不应当理解为以任何方式限制本发明的范围。

### 实施例

在以下的实施例和制剂中，“BSA”是指牛血清白蛋白；“EDTA”是指乙二胺四乙酸；“DMSO”是指二甲基亚砷；“MOPS”是指 3-(N-吗啉代) 丙磺酸；“MES”是指 2-(N-吗啉代)甲磺酸；“PBS”是指磷酸盐缓冲的盐水；“dPBS”是指 Dulbecco’s 磷酸盐缓冲的盐水；“HEMA”是指 2-羟基-乙基异丁烯酸；“DMEM”是指 Dulbecco’s 改良的小鹰培养基（eagle’s medium）；“FBS”是指胎牛血清；“NEAA”是指非必需的氨基酸；“HEPES”是指 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸；“DMF”是指二甲基甲酰胺。

#### 实施例 1：筛选 scFv 噬菌体展示文库

重组的人 P-钙黏着蛋白（R&D Systems 861-PC-100）被用作抗原以筛选 scFv 噬菌体展示文库。克隆进噬菌粒载体中的大 scFv 人抗体文库被用

于选择 (Vaughan, T.J. et al., Nat. Biotech. 14:309-314 (1996))。识别 P-钙黏着蛋白的 scFv 在对重组人 P-钙黏着蛋白和表达 P-钙黏着蛋白的 HCT116 细胞融合单细胞层所采取的一系列重复选择循环中从噬菌体展示文库中被分离。简言之,与文库孵育之后,从 P-钙黏着蛋白回收结合的噬菌体,未结合的噬菌体被洗掉。然后如 Vaughan, T.J. et al., Nat. Biotech. 14:309-314 (1996)中所述复苏结合的噬菌体,并重复选择过程。来自选择周期输出的代表性比例的克隆进行噬菌体酶联免疫吸附测定法(ELISA)以检测对 P-钙黏着蛋白的结合,基本上如 Vaughan, T.J. et al., Nat. Biotech. 14:309-314 (1996)中所述。ELISA 中使用两个不同的抗原:重组的人 P-钙黏着蛋白(R&D Systems)和表达 P-钙黏着蛋白的 A431 细胞的融合单细胞层。对 ELISA-阳性克隆进行如 Vaughan, T.J. et al., Nat. Biotech. 14:309-314 (1996)和 Osbourn, J.K. et al., Immunotechnology 3:293-302 (1998)中所述的 DNA 测序。独特的 ELISA-阳性克隆被转化为完整 IgG 分子并检测它们在实施例 4 中描述的 P-钙黏着蛋白依赖性粘附测定法中中和 P-钙黏着蛋白的能力。根据该筛选的结果,抗体 129-1c4 (在 A431 粘附测定法中 IC50 为 1-3  $\mu\text{M}$ ) 被选择为先导亲本谱系用于进一步的优化。

### 实施例 2: 先导物优化

通过寡核苷酸指导诱变抗体可变重链 ( $V_H$ ) 和可变轻链 ( $V_L$ ) CD3 区构建来自 129-1c4 的噬菌体展示文库。使用如 Clackson and Lowman, Phage Display – A Practical Approach (Oxford University Press 2004)中所述的标准分子生物学技术构建该文库。由此进行基于亲和力的选择;与文库孵育后,重组人 P-钙黏着蛋白 (R&D Systems) 被 G 蛋白包被的顺磁珠 (Dynal 100.03) 捕获,结合的噬菌体通过磁分离被回收,同时未结合的复合物被洗掉。重复选择过程,选择时存在的重组人 P-钙黏着蛋白浓度递减 (4 轮中 25 nM 到 10 pM)。另外,来自  $V_H$  CDR3 和  $V_L$  CDR3 文库的选择输出被重组进另一噬菌体展示文库,并在另外两轮基于亲和力的选择中被选择。来自选择周期输出的代表性比例的克隆进行筛选,如实施例 8 中所述 129-1c4 表位竞争测定法中的 scFv。

### 实施例 3: P-钙黏着蛋白依赖性的粘附测定法

使用以下的方案在 P-钙黏着蛋白依赖性的粘附测定法中使用若干个经最佳化的 scFv 测定 IC<sub>50</sub> 值, 所述经最佳化的 scFv 在如实施例 2 中上述的抗体回收最佳化阶段中被转化为 IgG。这些抗体的平均测量 IC<sub>50</sub> 值显示在下表 4 中。

使用前 24 小时, 用 2 mM CaCl<sub>2</sub> 的 MilliQ 水溶液将重组人 P-钙黏着蛋白 Fc(R&D Cat. 861-PC)重建为 1 mg/mL 的浓度并储存于 4°C。如下培养并制备 A431 细胞。常规地, 将 A431 细胞(ECACC No. 85090402)在最小必需培养基(MEM) (Invitrogen Cat 31095)中培养于 Nunc 三元烧瓶 (3 x 175cm<sup>2</sup> 面积) 中, 所述最小必需培养基含有 10%胎牛血清(Invitrogen Cat. 10100-147)和 1%的非必需氨基酸(Invitrogen Cat. 11140-035)。在收集用于测定时, 经培养的细胞约 80%融合。为了防止可能的传代相关小鹰, 常规地使用第 4 代和第 8 代之间、在培养 48 或 72 小时后收集的细胞。用 0.25%胰蛋白酶/ 1 mM EDTA (Gibco Cat 25200-056)经恰好足够细胞分离的时间 (7-10 分钟) 收集 A431 细胞, 然后立刻在组织培养培养基中稀释为约 2 x 10<sup>6</sup> 细胞/mL 的密度。然后将 A431 细胞离心 (1200 rpm)、重悬进测定缓冲液中 (Hanks 平衡盐溶液 (不含 Mg<sup>2+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup>, 不含酚磺酞) (Invitrogen Cat. 14175-053), 补充为 1 mM 的终 CaCl<sub>2</sub> 终浓度)、再离心并再次以 2 x 10<sup>6</sup> 细胞/mL 的终浓度再重悬进测定缓冲液中。

如下进行 IgG 系列稀释液的制备和与 A431 细胞的预孵育。180 μL 的每种检测 IgG 或其部分被补充以 20 μL 含 10% BSA (Sigma Cat. A-9576)的测定缓冲液, 将 BSA 浓度标准化为 1%。最初将抗鼠/人 P-钙黏着蛋白参考多克隆抗体(R&D Cat. AF-761)重悬进 MilliQ 水中得到 1 mg/mL 的储液。然后将 40 μL 该储存液进一步稀释进 140 μL 测定缓冲液中。然后加入 20 μL 含 10% BSA 的测定缓冲液, 得到 200 μL 溶液 (0.2 mg/mL 抗体和 0.1% BSA)。通过首先向 Greiner 96 孔聚丙烯稀释板(Greiner Cat. 780271)的第一列添加 2 x 90 μL 的 AF-761 多克隆抗体或检测 IgG 来制备双份系列稀释。然后向第 2-11 列加入 60 μL 测定缓冲液。然后在平板上从左到右从

第 1-11 列制备 30  $\mu\text{L}$  到 60  $\mu\text{L}$  (1:3)的稀释。然后向孔 12 A-D 中单独加入 60  $\mu\text{L}$  测定缓冲液以定义最大粘附。通过向孔 12 E-H 中添加 60  $\mu\text{L}$  的 25 mM EDTA (测定缓冲液中) 来定义最小粘附。然后向所有孔中加入 60  $\mu\text{L}$  的 A431 细胞悬浮液 (测定缓冲液中  $2 \times 10^6$  细胞/mL——如上文下划线的制备), 搅动后将平板在 37°C 预孵育 1 小时。

制备测试 IgG 系列稀释和与 A431 细胞预孵育的同时, 如下制备 P-钙黏着蛋白包被的测定平板。将重组人 P-钙黏着蛋白 Fc 在包被缓冲液 (不含  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  的 PBS-Invitrogen Cat. 14190-094) 中稀释至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度并分散在 Fluoronunc 96 (Nunc Cat. 437958) 孔测定平板 (100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ) 上。然后将平板在室温下孵育 1 到 30 分钟。然后使用 Tecan 96 平板洗涤器用 PBS 洗涤平板 3 次。然后加入 200  $\mu\text{L}/\text{孔}$  的测定缓冲液用于封闭, 并将平板在室温下孵育额外的 1 小时。然后如前所述将平板用 PBS 洗涤 3 次。

然后将 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  经预孵育的 IgG / A431 材料从 Greiner 96 孔稀释平板转移至 P-钙黏着蛋白包被的测定平板中。转移时通过吸打混合 IgG / A431 材料, 以保证细胞是均相的。然后通过将测定板在 37°C 孵育 30-45 分钟允许粘附过程发生。孵育结束时, 通过将培养基从平板中轻柔抽吸去除未粘附的细胞, 并用细胞洗涤缓冲液 (补充至 1 mM  $\text{CaCl}_2$  终浓度的 Hanks 平衡盐溶液 (不含  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  并且不含酚磺酞- Invitrogen Cat. 14175-053) 再充填孔。然后将平板倒置于细胞洗涤缓冲液浴中 15 分钟以去除残留的未粘附细胞。该孵育结束时, 轻柔抽吸孔的内含物。

如下进行粘附细胞的定量。通过添加 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  的组合溶解/碱性磷酸酶检测试剂 (用水 1:5 稀释的二乙醇胺底物缓冲液 5X 浓缩物 (Pierce Cat. 34064), 之后每 25 mL 的 1X 溶液中溶解一个 15 mg 的 PNPP 药片 (Sigma Cat. N-2640)) 然后再 37°C 孵育 30-60 分钟来检测粘附细胞。然后通过添加 1 M NaOH (50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ) 终止反应, 以得到不存在抑制时约 0.8 的最大 OD 值。然后使用标准平板读数器测量 405 nm 处的吸光度。

然后如下分析结果。第 12 列、孔 A-D 作为 100% 粘附, 第 12 列、孔 E-H 作为 0% 粘附, 如下将原始数据首先转化为 % 粘附值:

$$\%粘附 = \{(\text{粘附值} - \text{最小粘附值}) / (\text{最大粘附} - \text{最小粘附})\} * 100$$

然后使用 Prism 软件计算%粘附比 IgG 抑制剂浓度，测定 IC<sub>50</sub> 值。当观察到部分抑制时，IC<sub>50</sub> 引用为与曲线中点相比产生真实的 50%抑制的 IgG 浓度。IC<sub>50</sub> 值报告于表 4 中。

表 4

IgG	A431 粘附测定平均 IC <sub>50</sub> (nM) (n=3)
194-e06	0.162
194-a02	0.217
194-b09	0.229
195-e11	0.114
194-g09	0.158
196-h02	0.148
194-e01	0.147
196-d10	0.080
196-g03	0.149
196-e06	0.117
195-a09	0.114
198-a09	0.097
200-h06	0.168

进行两个独立的 A431 粘附测定，与其未种系化的等价物相比，研究若干个来自 129-1c4 谱系的经种系化、最优化的 IgG。就这些实验而言，必须改变为一批新的 P-钙黏着蛋白(CFR-134041)，其显示和比其它数据轻微提高的 IC<sub>50</sub> 值相关。来自这两个实验的针对若干个经种系化的 IgG 的平均数据显示于表 5 中。如前所述，g-194-b09 是指 194-b09 的经种系化版本，等等。

表 5

IgG	A431 粘附测定平均 IC <sub>50</sub> (nM) (n=2)
g-194-b09	0.77



194-b09	2.10
g-194-g09	1.00
194-g09	0.73
g-196-g03	1.05
196-g03	0.39
g-194-e06	0.77
194-e06	0.46
g-195-e11	0.87
195-e11	0.97
g-200-h06	1.31
200-h06	0.63

#### 实施例 4: P-钙黏着蛋白依赖性的细胞聚集测定法

使用以下方案用于在 P-钙黏着蛋白依赖性的聚集测定法中测定 IC<sub>50</sub> 值, 所述方法使用若干在如上文实施例 2 所述的抗体回收最佳化阶段中被转化为 IgG 的经最佳化的 scFv。因为置于悬液生长中时, 过表达 P-钙黏着蛋白的细胞系形成紧密的多细胞聚集体, 因此细胞聚集可以在影响细胞聚集的 P-钙黏着蛋白抗体存在时被测量。若干抗体的平均测量 IC<sub>50</sub> 显示于下表 6 中。

如下制备平板。每个 96 孔测定板用 50  $\mu$ L 多聚 HEMA (12 mg/mL 溶于 90%乙醇、10%甲醇中) 包被, 然后蒸发 6 小时过夜, 之后在使用前用 3 x 100  $\mu$ L 无菌 H<sub>2</sub>O 洗涤。然后如下培养细胞。来自人细胞系 SW480 (稳定表达 P-钙黏着蛋白 G418<sup>r</sup>) 的细胞在完全生长培养基 (qs DMEM (inVitrogen 11995-065)、10% FBS (Omega Scientific FB-02)、1:100 NEAA (InVitrogen 11140-050)、1:100 丙酮酸钠(InVitrogen 11360-070)、1:100 谷氨酰胺(InVitrogen 25030-051)、1:100 青霉素/链球菌溶血素(InVitrogen 15070-063)、1:100、遗传霉素 50 mg/mL (Invitrogen 10131-035)) + G418 (500  $\mu$ g/mL) 中传代, 然后 1:3-4 每周分传两次。然后将培养物冷冻于生长培养基 + 10% DMSO 中。

第 1 天以  $5 \times 10^6$  细胞/100 mm 平皿、不大于 1:3 的稀释度接种 SW480:pCAD 细胞和对照 SW480:pCLNX（稳定的对照载体）。细胞然后在培养基中生长 48 小时。每个 100 mm 平皿提供约  $10 \times 10^6$  的或足够  $2 \times 96$  孔板的细胞。

第 3 天，去除培养基后用 dPBS(Dulbecco's PBS (Invitrogen 14040-133)) 洗涤，之后在 3 mL / 100 mm 平皿中使细胞受胰蛋白酶作用。用两体积（6 mL）完全生长培养基释放后进行中和。然后使用 10 mL 的吸量管将平板洗涤三次以破坏聚簇。然后计数细胞并使用 Beckman 离心机在 1000 rpm 5 分钟获得沉淀。吸去培养基，通过手指涡旋随后 p1000 吸量管吸打将沉淀首先重悬于 < 1 mL 的完全生长培养基中，然后将细胞浓度标准化至 1.3 M/mL。通过显微镜确保单个细胞分散。

然后通过用 dPBS 和 5%PBS 封闭 96 孔板 30 分钟来制备试剂平板。然后用  $1 \times 100 \mu\text{L}$  dPBS 洗涤平板，随后抽吸并轻弹至干燥。使用 4x [IgG] 浓度，用 dPBS 制备测试 IgG 的稀释系列，其足够 96 孔中一个孔中处理板的 3 个孔。 $30 \mu\text{L}$  /孔中的 40 000 个细胞被等分至 96 孔的、经洗涤的、多聚 HEMA 包被的 Costar3590 非组织培养平板（Corning 3590）中。然后向 96 孔板的每个孔转移  $10 \mu\text{L}$  试剂。使用 8 通道吸量管进行每处理三份样品。然后在 250 rpm 摇动下在潮湿的  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜（16-18 小时）。

第 4 天，将  $40 \mu\text{L}$  经摇动的细胞转移至聚赖氨酸包被的 96 孔板（BioCoat 聚赖氨酸包被的 96 孔板: BD 356516）。然后用  $60 \mu\text{L}$  完全生长培养基冲洗孔，通过敲打摇动平板，并转移至涂布有聚赖氨酸的平板。必要时进行额外的  $50 \mu\text{L}$  洗涤。随后在潮湿的  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 60 分钟。在该步骤小心地在数量上转移所有的细胞，尽可能轻柔，不要过度吸打。然后通过通风橱中添加  $100 \mu\text{L}$  固定液（7.4% 甲醛 (37% wt/vol. – Sigma F15587)），之后在室温下孵育 > 30 分钟来固定细胞。

为了洗涤细胞，随后将液体倾析进收集杯中或碟中并轻弹以去除残余液体，轻柔地倒在纸巾上。然后添加  $100 \mu\text{L}$  每孔的 dPBS 以洗涤，随后孵育 15 分钟。然后通过如上倾析并使用  $100 \mu\text{L}$  Hoescht（dPBS 中 1 g/mL

Hoescht– Hoescht 10 mg/mL Molecular Probes 33342)，随后孵育 30 分钟将细胞染色。然后洗涤细胞两次，孔中剩余 100  $\mu$  L dPBS 用于显微镜检查。

然后测量每孔中聚集的物体数量(Cellomics)，将平均物体计数（测试 IgG）与 IgG（例如 Gt-抗-P-钙黏着蛋白 R&D Systems AF761）的或只有培养基的对照相比。然后计算物体计数比 IgG 抑制剂的浓度，并测定 IC<sub>50</sub> 值。本发明若干抗体的 IC<sub>50</sub> 值报告于表 6 中。

表 6

IgG	SW480 聚集测定平均 IC <sub>50</sub> (nM)
194-e06	0.7
194-a02	1.1
g-194-b09	0.9
g-195-e11	2.2
g-194-g09	2.6
196-h02	3.2
194-e01	1.3
196-d10	1.5
g-196-g03	0.9
196-e06	1.9
195-a09	1.7
198-a09	2.9
g-200-h06	4.7
129-1c4	35

#### 实施例 5: P-钙黏着蛋白依赖性的球形体破坏测定法

以下的球形体破坏测定法是聚集测定法（描述于实施例 4）的变体，其中在添加 P-钙黏着蛋白和对照抗体之前过夜形成细胞聚集体。然后在分析前额外的 24 小时加入测试试剂。

如下制备平板。每个 96 孔测定板用 50  $\mu$  L 多聚 HEMA（90%乙醇、10%甲醇中 12 mg/mL）包被，然后蒸发 6 小时过夜，之后在使用前用 3 x

100  $\mu$  L 无菌 H<sub>2</sub>O 洗涤。然后如下培养细胞。来自人细胞系 SW480（稳定表达 P-钙黏着蛋白 G418<sup>r</sup>）的细胞在完全生长培养基（qs DMEM (inVitrogen 11995-065)、10% FBS (Omega Scientific FB-02)、1:100 NEAA (InVitrogen 11140-050)、1:100 丙酮酸钠(InVitrogen 11360-070)、1:100 谷氨酰胺(InVitrogen 25030-051)、1:100 青霉素/链球菌溶血素(InVitrogen 15070-063)、1:100、遗传霉素 50 mg/mL (Invitrogen 10131-035)) + G418 (500  $\mu$  g/mL)中传代，然后 1:3-4 每周分传两次。然后将培养物冷冻于生长培养基 + 10% DMSO 中。

第 1 天以  $5 \times 10^6$  细胞/100 mm 平皿、不大于 1:3 的稀释度接种 SW480:pCAD 细胞和对照 SW480:pCLNX（稳定的对照载体）。细胞然后在培养基中生长 48 小时。每个 100 mm 平皿提供约  $10 \times 10^6$  的或足够  $2 \times 96$  孔板的细胞。

第 3 天，去除培养基后用 dPBS(Dulbecco's PBS (InVitrogen 14040-133)) 洗涤，之后在 3 mL / 100 mm 平皿中使细胞受胰蛋白酶作用。用两体积（6 mL）完全生长培养基释放后进行中和。然后使用 10 mL 的吸量管将平板洗涤三次以破坏聚簇。然后计数细胞并使用 Beckman 离心机在 1000 rpm 5 分钟获得沉淀。吸去培养基，通过手指涡旋随后 p1000 吸量管吸打将沉淀首先重悬于 < 1 mL 的完全生长培养基中，然后将细胞浓度标准化至  $1.0 \times 10^6$ /mL。通过显微镜确保单个细胞分散。

40  $\mu$  L /孔中的 40 000 个细胞被等分至 96 孔的、经洗涤的、多聚 HEMA 包被的 Costar3590 非组织培养平板（Corning 3590）中。然后在 250 rpm 摇动下在潮湿的 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜（16-18 小时）。

第 4 天，通过用 dPBS 和 5%PBS 封闭 96 孔板 30 分钟来制备试剂平板。然后用  $1 \times 100 \mu$  L dPBS 洗涤平板，随后抽吸并轻弹至干燥。使用 5x [IgG]浓度，用 dPBS 制备测试 IgG 的稀释系列，其足够 96 孔中一个孔中处理板的 3 个孔。使用 8 通道吸量管进行每处理三份样品。然后在 250 rpm 摇动下在潮湿的 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养（20-24 小时）。

第 5 天，将 50  $\mu$  L 经摇动的细胞转移至聚赖氨酸包被的 96 孔板（BioCoat 聚赖氨酸包被的 96 孔板: BD 356516）。然后用 50  $\mu$  L 完全生长培养基冲洗孔，通过敲打摇动平板，并转移至涂布有聚赖氨酸的平板。需要时进行额外的 50  $\mu$  L 洗涤。随后在潮湿的 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 60 分钟。在该步骤小心地在数量上转移所有的细胞，尽可能轻柔，不要过度吸打。然后通过通风橱中添加 100  $\mu$  L 固定液（7.4% 甲醛 (37% wt/vol. – Sigma F15587)），之后在室温下孵育 > 30 分钟来固定细胞。

为了洗涤细胞，随后将液体倾析进收集杯中或碟中并轻弹以去除残余液体，轻柔地倒在纸巾上。然后添加 100  $\mu$  L 每孔的 dPBS 以洗涤，随后孵育 15 分钟。然后通过如上倾析并使用 100  $\mu$  L Hoescht（dPBS 中 1 g/mL Hoescht– Hoescht 10 mg/mL Molecular Probes 33342），随后孵育 30 分钟将细胞染色。然后洗涤细胞两次，孔中剩余 100  $\mu$  L dPBS 用于显微镜检查。然后测量每孔中聚集的物体数量(Cellomics)，将平均物体计数（测试 IgG）与 IgG（例如 Gt-抗-P-钙黏着蛋白 R&D Systems AF761）的或只有培养基的对照相比。然后计算物体计数比 IgG 抑制剂的浓度以测定 IC<sub>50</sub> 值。或者，物体计数被表达为在表 7 所示的一个确定的浓度下与对照相比的破坏倍数。

## 表 7

IgG	SW480 球形体破坏测定法 5 nM 处与对照相比提高的破坏倍数
194-e06	10
194-a02	10
g-194-b09	10
g-195-e11	7
g-194-g09	14
196-h02	10
194-e01	16
196-d10	10
g-196-g03	13
196-e06	10
195-a09	10
198-a09	13
g-200-h06	7
129-1c4	4

#### 实施例 6: 测量 P-钙黏着蛋白抗体的 $K_D$ 和 $k_{off}$

如下使用制造商的方案, 使用 BIACORE™ 3000 设备通过表面等离子共振进行 P-钙黏着蛋白 scFv 单链抗体的亲和力测量 ( $K_D$  和  $k_{off}$ )。

为了进行动力学分析, 使用常规的胺偶合将重组的人 P-钙黏着蛋白/Fc 融合蛋白(hCad/Fc)和小鼠 P-钙黏着蛋白/Fc 融合蛋白(mCad/Fc)固定在 CM5 BIACORE™ 传感器芯片的分离流动单元上。使用含有 2.0 mM  $CaCl_2$  的 10 mM 乙酸盐缓冲液 pH 4.5 作为固定缓冲液制备表面, 并达到 hCad/Fc 和 mCad/Fc 融合蛋白分别为 5800 和 1600 RU 的蛋白质密度。使用 1 M 盐酸乙醇胺, pH 8.5 进行未反应 N-羟基琥珀酰亚胺酯的失活。使用激活的/灭活的空白表面作为对照表面。在电泳缓冲液中制备浓度从 200 nM 到 0.78 nM (包括作为零参考的、只包含电泳缓冲液的 0 nM 溶液) 的 scFv 抗体样品。将样品随机化, 并使用 HBS-P (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM

NaCl, 0.005% Surfactant P20) 一式三份穿过流动单元注射 1 分钟, 使用 2.0 mM CaCl<sub>2</sub> 作为电泳缓冲液。使用 25 μL/分钟的流速测定亲和常数。抗体离解被检测 5 分钟, 表面通过 12 秒注射 10 mM 甘氨酸-HCl pH 1.5 (25 μL/min) 来再生。原始数据使用 Scrubber (©BioLogic Software) 软件包加工, 使用 CLAMP (©BioLogic Software) 软件包分析。数据整体上符合 1:1 的 Langmuir 结合模型。

表 8 列出本发明单链抗 P-钙黏着蛋白抗体的亲和常数:

表 8

scFv	hCad/Fc	hCad/Fc	mCad/Fc	mCad/Fc
	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>off</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)	k <sub>off</sub> (1/s)
194-b09	4.0	1.9 x 10 <sup>-03</sup>	11	3.6 x 10 <sup>-3</sup>
194-g09	2.6	1.6 x 10 <sup>-03</sup>	1.8	8.1 x 10 <sup>-4</sup>
196-g03	1.1	7.0 x 10 <sup>-04</sup>	0.76	4.7 x 10 <sup>-4</sup>

#### 实施例 7: 测定 P-钙黏着蛋白抗体的选择性

使用以下方案测定多种抗体对 P-钙黏着蛋白超出 E-钙黏着蛋白的选择性。

将重组人 P-钙黏着蛋白(R&D Systems 861-PC-100)和重组人 E-钙黏着蛋白(R&D Systems 648-EC-100)以 1 μg/mL 在 PBS+ 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 中涂布于 Exiqon 蛋白质固定平板 (VWR International) 的孔上。在从 50 nM (7.5 μg/mL) 滴定至 0.64 nM (0.096 μg/mL) 前将样品 IgG 在 3% Marvel / PBS + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 中封闭 1 小时, 双份加入用两种不同抗原包被的孔中。在 4 °C 过夜平衡后, 将平板用 1x PBS / 0.1% Tween + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 洗涤三次, 随后用 1 x PBS + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 洗涤三次。然后向每个孔中加入 50 μL 1:5000 稀释于 3% Marvel / PBS + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 中的抗人 Fab 过氧化物酶缀合物, 使其在室温下平衡 1 小时。将平板用 1 x PBS / 0.1% Tween + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 洗涤三次, 用 1 x PBS + 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> 洗涤三次。向每个孔中加入 50 μl 3,3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB; Sigma), 允许反应进行 20 分钟, 之后通过加入 25 μL/well 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。在 450 nm 处读吸光度数值

后，使用 Graphpad Prism 软件分析数据以计算每个抗体结合 P-钙黏着蛋白和 E-钙黏着蛋白的相对  $K_D$  值。得到的数据概括在表 9 中。

**表 9**

<b>IgG</b>	<b>P-钙黏着蛋白 <math>K_D</math> (pM)</b>	<b>E-钙黏着蛋白 <math>K_D</math> (pM)</b>	<b><math>K_D(E)/K_D(P)</math></b>
194-a02	116	682	6
g-194-b09	788	2156	3
g-194-g09	2602	不结合	> 100
194-e01	112	20511	183
g-194-e06	191	794	4
195-a09	120	11516	96
194-e06	56	264	5
196-d10	45	63	1.4
196-e06	62	187	3
g-196-g03	449	7513	17
196-h02	102	33212	326
198-a09	78	19396	249

#### 实施例 8：表位竞争测定法

使用以下的方案在表位竞争测定法中测量  $IC_{50}$  值以测量亲本谱系中变体 scFv 用亲本 IgG 代替 A431 细胞表面上天然 P-钙黏着蛋白的能力。用钕链霉亲和素 (europium streptavidin) 和 DELFIA 定量来检测存在抑制性 scFv 时结合的、经生物素化的亲本 IgG 的数量。若干 scFv 的经测量的  $IC_{50}$  值显示在表 10 中。

使用前一天，将根据标准方法培养的、随后在约 80% 融合时收集的 A431 细胞 (ECACC No. 85090402) 以  $2.5 \times 10^4$  细胞每孔接种在 96 孔 Beckton Dickenson (BD Cat. 6407) 胶原包被的平板上。然后通过浸入 PBS 缓冲液 (Gibco Cat. 14190-094, 不含钙、镁和碳酸氢钠) 容器中，之后添加 200  $\mu$ L 每孔的封闭缓冲液 (PBS Gibco Cat. 14190-094, 加 3% Marvel (Premier



International Foods Ltd.) 并在室温下孵育 2 小时。然后将平板用如上的 PBS 洗涤 3 次。

对高通量筛选和  $IC_{50}$  绘图而言, 首先在 Greiner 稀释平板 (Greiner 96 孔聚丙烯平板 (Greiner Cat. 780271)) 中 60  $\mu$ L 总体积的测定缓冲液中制备 scFv / IgG 材料。然后将 50  $\mu$ L 从被控的 Greiner 平板直接转移至测定平板, 允许结合反应在室温下进行 2 小时 30 分钟。结合反应结束时, 将平板在 PBS 中洗涤三次, 之后添加钨标记的链霉亲和素 (Perkin Elmer Cat. 1244-360, 1:1000 稀释于 DELFIA 测定缓冲液 (Perkin Elmer Cat. 4002-0010) 中), 在室温下再孵育 1 小时。

然后通过重复地将平板浸入缓冲液容器中, 用 DELFIA 洗涤缓冲液 (Perkin Elmer Cat. 4010-0010) 洗涤平板 7 次。最后, 添加 DELFIA 增强因子 (Perkin Elmer Cat. 4001-0010 – 100  $\mu$ L/孔) 后, 使用标准 DELFIA 方案在适合的读数器 (例如 Wallac 或 Envision) 上读数平板。

#### Greiner 稀释平板装配-HTS

高通量筛选 (HTS) 条件根据最佳化的阶段而不同地设置。对来自个体  $V_H$  和  $V_L$  链最佳化的输出 HTS 而言, 最终 [peri-prep] 被设定为 12.5%, 使得亲本 scFv 给出部分抑制。对来自  $V_H:V_L$  重组文库输出的后期 HTS 而言, 最终 peri-prep 浓度降至 1.7%, 在这些条件下经  $V_H$  优化的基准 scFv (TOP-108-C01) 给出部分抑制。最优化 peri-prep 浓度使得相关的基准 scFv 产生部分抑制, 这建立了一个鉴定经改良克隆的窗口。

为了达到这些最终 scFv peri-prep 浓度, 采取以下步骤:

i) 使用 Cybiwell 设备, 将所需体积 (见下文) 的 peri-prep 样品材料从深孔样品平板中转移至 Greiner 稀释平板的第 1-11 列。

[最终 peri-prep]		转移体积
[12.5%]	=	7.5 $\mu$ L
[1.7%]	=	10.0 $\mu$ L (的 1:10 稀释的 peri-prep)

(通过将 10  $\mu$ L 纯 peri-prep 从样品平板转移进含 90  $\mu$ L 测定缓冲液的 Greiner 稀释平板 (使用 Cybiwell) 来制备 1:10 预稀释的 peri-prep)

ii) 然后通过添加合适体积的测定缓冲液将第 1-11 列的体积补足 30  $\mu$  L。

iii) 然后向第 12 列 (A-D) (完全结合孔) 中添加 30  $\mu$ L 测定缓冲液。

iv) 向第 12 列 (E-H) 添加 30  $\mu$ L 测定缓冲液中过量的未标记的亲本 IgG (129-1c4) 以定义非特异性的结合。以 1000 nM 的浓度添加以得到 500 nM 的终浓度。

v) 使用水溶性试剂 EZ-link-NHS-LC-Biotin (Perbio/Pierce product no. 21336) 生物素化 129-1c4 IgG。通过添加 1/10 体积的 1 M NaHCO<sub>3</sub> 和 1/10 体积的二甲基酰胺补充 IgG 溶液。将 EZ-link-NHS-LC-Biotin 试剂溶解在 DMF 中, 然后以超出 IgG 五倍的摩尔数添加, 允许反应在室温下进行 20 分钟。然后通过添加 BSA (0.1%) 来稳定经生物素化的 IgG。然后向所有孔中添加 30  $\mu$ L 的、测定缓冲液中的、经生物素化的亲本 129-1c4 IgG, 得到最终 60  $\mu$ L 体积中 1.5 nM 的终浓度 (即以 2x 终浓度添加标记的 IgG)。

vi) 通过搅动混合 Greiner 平板内含物后, 将 50  $\mu$ L 直接转移至测定平板, 允许结合反应在室温下进行 2 小时 30 分钟 (如前文所述)。

#### Greiner 稀释平板装配—IC<sub>50</sub> 绘图

i) 将 30  $\mu$ L/孔测定缓冲液添加至标准 Greiner 稀释平板的第 2-11 列和孔 12A 到 12D。

ii) 将 30  $\mu$ L 的、测定缓冲液中的、过量的未标记的 129-1c4 亲本 IgG 添加至第 12 列 (E-H) 中以定义非特异性结合。这应当以 1000 nM 浓度添加以得到 500 nM 的终浓度。

iii) 向第 1 列中加入 2x45 $\mu$ L 每种未稀释的 scFv His-prep, 使得每个 96 孔测定平板能够进行 4 个双份 11 点 IC<sub>50</sub> 滴定。然后通过从第 1 列取出 15  $\mu$ L 与第 2 列混合、之后从第 2 列取出 15  $\mu$ L 混合进第 3 列等等, 进行 1:3 的双份系列稀释。混合进第 11 列后, 去除 15  $\mu$ L (即剩余 30  $\mu$ L 的终体积)。

iv) 然后向所有孔中加入 30  $\mu\text{L}$  的、测定缓冲液中的、经生物素化的 129-1c4 亲本 IgG，得到最终 60  $\mu\text{L}$  体积中 1.5nM 的终浓度（即以 2x 终浓度添加铈标记的 IgG）。

v) 通过搅动混合 Greiner 平板内含物后，将 50  $\mu\text{L}$  直接转移至测定平板，如前文所述允许结合反应在室温下进行 2 小时 30 分钟。

对 HTS 而言，scFv 在 96 孔板中被表达为来自含 MOPS / EDTA / Sorbitol pH 7.4 (MES pH 7.4) 的基础缓冲液中的细菌周质膜（scFv periprep）的粗提物。就  $\text{IC}_{50}$  绘图而言，使用基础缓冲液中用于亲和纯化的 scFv His-tag（scFv His-prep）PBS 将 scFv 表达较低通量的经纯化的形式。

对 HTS 和  $\text{IC}_{50}$  分析二者而言，原始数据首先根据以下等式转化为%结合数据：

$$\% \text{结合} = \{ (\text{结合值} - \text{非特异结合}) / (\text{总结合} - \text{非特异结合}) \} * 100$$

然后使用标准 Excel 模板进一步分析 HTS 数据，以鉴定与相关基准 scFv 相比给出更大抑制（更低%结合）的提示。对  $\text{IC}_{50}$  分析而言，使用 Prism 4.0 版曲线拟合软件分析%结合数据。ScFv 是 129-1c4 亲本 IgG 的变体，其中  $V_H$  和  $V_L$  CDR3 区被随机突变，如实施例 2 中所述。 $V_H$  CDR3 变体序列在图 1 中显示为 SEQ ID NOs: 91 到 256。 $V_L$  CDR3 变体序列在图 1 中显示为 SEQ ID NOs: 257 到 319。显示超出亲本 129-1c4 IgG 的经改进的结合的若干 scFv 的  $\text{IC}_{50}$  值显示在表 10 中。129-1c4 亲本的每种 scFv 变体通过两个序列 SEQ ID NOs:  $V_H$  CDR3 和  $V_L$  CDR3 鉴定。作为参考，亲本 129-1c4 IgG 的  $\text{IC}_{50}$  是 108.3 nM。

表 10

SEQ ID NO: $V_H$ CDR3	SEQ ID NO: $V_L$ CDR3	$\text{IC}_{50}$ (nM)
37	40	2.49
37	261	1.78
37	43	5.67
37	274	8.73
37	277	2.20
37	287	10.50

37	288	6.67
37	295	0.80
37	297	2.49
37	299	1.97
37	303	1.47
37	304	1.10
37	305	2.19
95	47	2.36
97	47	1.33
113	47	2.06
125	47	0.26
131	47	0.35
31	47	2.05
147	47	1.16
165	47	5.11
167	47	0.60
180	47	0.43
181	47	2.46
27	47	0.54
195	47	1.29
187	43	1.58
27	296	1.16
163	43	2.45
26	40	0.76
26	43	0.93
27	309	1.36
199	310	2.54
201	310	2.26
207	291	2.73

---

240	313	2.98
-----	-----	------

本说明书所列的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入本文，好像每个单独的出版物或专利申请被明确地、单独地指出是通过引用并入本文一样。尽管已经就明确理解的目的通过阐述和举例比较详细地描述了前述发明，但是根据本发明的教导，本领域常规技术人员应当容易地明白：可以对其进行某些改变和变更，而不偏离所附带的权利要求书的思想或范围。

<110> 辉瑞有限公司

<120> P-钙黏着蛋白抗体

<130> PC32778A

<160> 347

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ser Trp Gly Thr Gly Thr Leu Trp Pro Trp Gly Gln Gly Lys Met  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Trp Gly Asp Gly Thr Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly Lys Met  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 3  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 3  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr





<213> 人

<400> 5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Gly Thr Ala Lys Pro Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 7  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Gly Asn Glu Arg Pro Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Gly Ser Arg Thr Val Gln Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 9  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Thr Ile Ala Pro Gly Arg Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 11

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

<210> 12  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 12

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Ser Trp Gly Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 13  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Trp Gly Gly Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 14  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 14

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

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

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

Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Leu Pro Trp Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 15  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 15

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

```

          35              40              45

Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50              55              60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
65              70              75              80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Gly
          85              90              95

Leu Pro Trp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100              105              110

<210> 16
<211> 111
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

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

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

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

Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50              55              60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
65              70              75              80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Gly
          85              90              95

Ile Val Phe Asn Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100              105              110

<210> 17
<211> 111
<212> PRT

```



<213> 人  
 <400> 17  
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr  
 20 25 30  
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Arg His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Met Gly  
 85 90 95  
 Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110  
  
 <210> 18  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 18  
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr  
 20 25 30  
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 19  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 19

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

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

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

Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 20  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 20

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Asn Asp Val Gly Ala Tyr



<210> 22  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 22

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

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

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

Met Ile Tyr Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95

Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 23  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 23

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

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

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

Ile Leu Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

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

Gly

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Trp Gly Thr Gly Thr Leu Trp Pro  
1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 27

Trp Gly Asp Gly Thr Leu Asn Pro  
1 5

<210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 28

Trp Gly Leu Gly Ser Asn Glu Asn  
1 5

<210> 29  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 29

Thr Asn Ser Ala Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 30  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 30

Thr Gly Tyr Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 31  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 31

Thr Ala Lys Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 32  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 32

Asn Glu Arg Pro Ser Phe Asp Pro

1	5
<210>	33
<211>	8
<212>	PRT
<213>	人
<400>	33
Ser Arg Thr Val Gln Phe Asp Pro	
1	5
<210>	34
<211>	8
<212>	PRT
<213>	人
<400>	34
Asn Ser Pro Gly Thr Phe Asp Pro	
1	5
<210>	35
<211>	8
<212>	PRT
<213>	人
<400>	35
Ile Ala Pro Gly Arg Phe Asp Pro	
1	5
<210>	36
<211>	8
<212>	PRT
<213>	人
<400>	36
Leu Asp Arg Val Trp Phe Asp Pro	
1	5
<210>	37
<211>	8
<212>	PRT
<213>	人
<400>	37
Trp Gly Gly Gly Trp Phe Asp Pro	
1	5







<213> 人

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
20 25 30

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

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

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<400> 50

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

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

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

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

<210> 52

<211> 32

<212> PRT

<213> 人

&lt;400&gt; 52

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

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

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 53

Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

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

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 54

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

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

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 55

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 1                   5                   10                   15

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

&lt;210&gt; 56

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 56

Trp Gly Gln Gly Lys Met Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 57  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 57

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

<210> 58  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 58

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys  
 20

<210> 59  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 59

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys  
 20

<210> 60  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 60

Trp Tyr Gln Arg His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Leu Ser  
1 5 10 15

<210> 61  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 61

Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 62  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 62

Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Leu Ser  
1 5 10 15

<210> 63  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 63

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
1 5 10 15

Leu Ser Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 64  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 64

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
1 5 10 15

Leu Ser Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Gly Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 65  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 65

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
 1                   5                   10                   15

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

<210> 66  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 66

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser  
 1                   5                   10                   15

Leu Ser Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys  
           20                   25                   30

<210> 67  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 67

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 1                   5                   10

<210> 68  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 68

gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc       60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgcc tggagctgggt ccgccaggct       120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac       180  
 gcagactcgc tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat       240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagttgggga       300

acggggacct tgtggccctg gggccaaggg aaaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 69  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (330)..(330)  
 <223> n是a、c、g或t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (348)..(348)  
 <223> n是a、c、g或t

<400> 69  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagttgggga 300  
 gacgggacct tgaaccctg gggccaaggn aaaatggtca ccgtctcnag t 351

<210> 70  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 70  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagttgggga 300  
 ctggggagca acgaaaactg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 71  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 71  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggacacgaac 300  
 tccgccaaagt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 72  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 72  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gggcacgggg 300  
 taccctctct tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 73  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 73  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caoctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gggcacggcc 300  
 aagccgagct tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 74  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人



<400> 74  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggttag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggggaacgag 300  
 aggcctcgt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 75  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 75  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggttag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcgccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gggcagccgc 300  
 acggtgcagt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 76  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 76  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggttag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gacgaactcg 300  
 ccggggacgt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 77  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 77  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtaoagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaccatcgcg 300  
 cccggccggt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 78  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 78  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggggctcgac 300  
 cgggtgtggt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcgag t 351

<210> 79  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 79  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagttgggga 300  
 ggaggctggt tcgaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcctc a 351

<210> 80  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 80  
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt cgcacaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggcgc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaatgggga 300  
 ggaggctggt tcgacccctg gggccaaggg acaatggtea ccgtctcctc a 351

<210> 81  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 81  
 cagtctgccc tgactcagcc tgccctcctg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccaggca aagcccccaa actcattctt tctgaggta ataaacggcc ctcagggggt 180  
 tctaatecgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcggcct cccctgggctc 300  
 ctcttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 82  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 82  
 cagtctgccc tgactcagcc tgccctcctg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccaggca aagcccccaa actcattctt tctgaggta ataaacggcc ctcagggggt 180  
 tctaatecgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcgggct cccctgggctc 300  
 gtcttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 83  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 83  
 cagtctgccc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccagggca aagcccccaa actcattctt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt 180  
 tctaatecgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcggcat cgtgttcaac 300  
 ctgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 84  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 84  
 cagtctgccc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacga 120  
 caccagggca aagcccccaa actcattctt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt 180  
 tctaatecgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga gtattactgc agcagctaca cgatggggag cacttttatg 300  
 ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 85  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 85  
 cagtctgccc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccagggca aagcccccaa actcattctt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt 180  
 tctaatecgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctgg ttattactgc acgagctacc gggccgggag cacttttatg 300  
 ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 86  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

```

<400> 86
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggcttc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcttgcactg gaaccagtaa tgaegttagt gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccaggca aagcccccaa actcattctt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt      180
tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc acctcgtaca ccatgggcag cacttttatg      300
ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333

<210> 87
<211> 333
<212> DNA
<213> 人

<400> 87
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcttgcactg gaaccagtaa tgacgttagt gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccaggca aagcccccaa actcattctt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt      180
tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc acctcgtacc gcatggacag cacttttatg      300
ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333

<210> 88
<211> 333
<212> DNA
<213> 人

<400> 88
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcttgcactg gaaccagtaa tgacgttagt gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccaggca aagcccccaa actcattctt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt      180
tctaatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcggcag cacttttatg      300
ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333

<210> 89
<211> 333
<212> DNA
<213> 人

```

```

<400> 89
cagtctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccagggca aagcccccaa actcatgatt tatgagggtca ataaacggcc ctcagggggtt      180
tctaatacgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgacat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcggcag cacttttatg      300
ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333

<210> 90
<211> 333
<212> DNA
<213> 人

<400> 90
cagtctgcc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccagggca aagcccccaa actcattctt tctgagggtca ataaacggcc ctcagggggtt      180
tctaatacgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgagcat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc acctcgtaca ccatgggcag cacttttatg      300
ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333

<210> 91
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 91
Asn Pro Lys Gly Gln Phe Asp Pro
1          5

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 92
Asn Ser Ala Gly Ser Phe Asp Pro
1          5

<210> 93
<211> 8

```

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Ser Asn Gly Gly Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 94

Ser Asn Gly Gly Phe Phe Asp Pro  
1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 95

Ser Asp Leu Gly Glu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 96

Thr Asn Thr Gly Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 97

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 97

Thr Pro Arg Gly Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 98

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 98  
Ser Asn Thr Gly Asn Phe Asp Pro  
1 5

<210> 99  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 99  
Ser Arg Thr Val Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 100  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 100  
Leu Gly Val Pro Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 101  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 101  
Ser Asp Asn Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 102  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 102  
Ile Ala Pro Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 103  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 103



Asn Thr Thr Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 104  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 104

Ser Asp Ala Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 105  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 105

Ile Asn Glu Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 106  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 106

Asn Ser Asn Gly Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 107  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 107

Ser His Ser Gly Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 108  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 108

Asn Lys Lys Pro Pro Phe Asp Pro



<210> 114  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 114

Ile Arg Ser Gly Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 115  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 115

Thr Glu Gly Ala Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 116  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 116

Ser Asp Phe Gly Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 117  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 117

Asn Glu Leu Gly Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 118  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 118

Gln Glu Leu Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 119

<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 119  
Phe Arg Asp Thr Ala Phe Asp Pro  
1 5

<210> 120  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 120  
Ala Asp Met Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 121  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 121  
Leu Gly Val Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 122  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 122  
Thr His Ala Gly Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 123  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 123  
Val Tyr Ala Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 124  
<211> 8  
<212> PRT

<213> 人

<400> 124

Asn Thr Gln Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 125

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 125

Thr Asn Gly Gly Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 126

Ile Thr Thr Val Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 127

Arg Leu Val His Gly Phe Asp Pro  
1 5

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 128

Ile Arg Leu Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 129

Ser Glu Arg Pro Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 130

Thr Ser Arg Pro Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 131

Val Glu Ser Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 132

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 132

Ser Glu Met Pro Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 133

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 133

Val Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 134

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 134

Asn Asp Ile Ala Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 135  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 135

Val Gly Val Gly Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 136  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 136

Thr Arg Tyr Pro Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 137  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 137

Asn Ser Ala Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 138  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 138

Val Asn Glu Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 139  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 139

Asn Arg Thr Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 140  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 140

Asn Ala Ser Ala Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 141  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 141

Ile Asn Thr Gly Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 142  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 142

Asn Asp Asn Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 143  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 143

Val Asp Gln Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 144  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 144

Val Asp Arg Gly Gln Phe Asp Pro  
1 5



<210> 145  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 145

Asn His Thr Gly Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 146  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 146

Thr Asn Thr Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 147  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 147

Ser Asp Ser Gly Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 148  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 148

Asn Val Leu Ala Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 149  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 149

Asn Tyr Glu Ala Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 150  
<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 150

Pro Asp Asn Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 151

Asn Arg Asn Gly Asn Phe Asp Pro  
1 5

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 152

Thr Thr Gly Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 153

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 153

Thr Gly Tyr Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 154

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 154

Asn Asn Glu Gly Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 155

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 155

Asn Ser Lys Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 156

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 156

Thr Glu Asn Pro Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 157

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 157

Thr Asn Gly Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 158

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 158

Asn Ser Tyr Gly Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 159

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 159

Leu Glu Asn Val Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 160

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 160

Ala Asn His Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 161  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 161

Ala Asn Gly Gly Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 162  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 162

Trp Gly Asn Asp Ala Ser Leu Gly  
1 5

<210> 163  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 163

Trp Gly Pro Thr Ala Ser Leu Asp  
1 5

<210> 164  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 164

Trp Gly Arg Gly Thr Asn Glu Tyr  
1 5

<210> 165  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 165

Trp Gly Gly Gly Gly His Tyr Asp



<210> 171  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 171

Ser Leu Arg Val Glu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 172  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 172

Asn Asp Arg Gly Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 173  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 173

Asn Ser Pro Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 174  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 174

Asn Thr Ala Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 175  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> , 175

Val Asn Arg Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 176

<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 176  
  
Thr Glu Lys Pro Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 177  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 177  
  
Trp Ser Val Ser Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 178  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 178  
  
Met Glu Val Val Glu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 179  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 179  
  
Val Asn His Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 180  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 180  
  
Thr Glu Val Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 181  
<211> 8  
<212> PRT

<213> 人

<400> 181

Thr Asp Lys Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 182

Leu Glu Leu Pro Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 183

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 183

Thr Asn His Ala Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 184

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 184

Thr His Ser Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 185

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 185

Asn Asp Arg Gly Gly Phe Asp Pro  
1 5

<210> 186

<211> 8

<212> PRT

<213> 人



<400> 186

Pro His Arg Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 187

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 187

Thr Glu Leu Gly Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 188

Trp Gly Leu Gly Ser Asn Glu Asn  
1 5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 189

Trp Gly Asn Asp Ala Thr Trp Asn  
1 5

<210> 190

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 190

Trp Gly Ser Thr Ala Ser Leu Asp  
1 5

<210> 191

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 191

Trp Gly Gly Gly Gly His Gln Asp  
1 5

<210> 192  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 192

Trp Gly Arg Gly Asp Trp Arg Ser  
1 5

<210> 193  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 193

Trp Gly Ser Thr Ala Ser Leu Ser  
1 5

<210> 194  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 194

Trp Gly His Gly Gly His Asp Thr  
1 5

<210> 195  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 195

Trp Gly Pro Arg Ala Thr Leu Asp  
1 5

<210> 196  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 196

Trp Gly Asn Gly Ala Phe Val Pro  
1 5

<210> 197  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 197

Trp Gly Asn Asp Ala Thr Leu Ala  
1 5

<210> 198  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 198

Trp Gly Ser Gly Asn Leu Asp Pro  
1 5

<210> 199  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 199

Asn Glu Leu Pro Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 200  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 200

Ser Asp Gly Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 201  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 201

Leu Asp Met Val Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 202  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 202

Trp Gly Ser Gly Thr Met Asp Pro  
1 5

<210> 203  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 203

Pro Asp Arg Gly Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 204  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 204

Thr His Asn Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 205  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 205

Asn Ser Ala Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 206  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 206

Leu Asp Ser Val Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 207  
<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 207

Trp Gly Thr Gly Gln His Glu Asn  
1 5

<210> 208

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 208

Trp Gly Thr Gly His His Asp Pro  
1 5

<210> 209

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 209

Asn Phe Lys Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 210

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 210

Ala Asn Gly Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 211

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 211

Trp Gly Thr Gly His Leu Glu Pro  
1 5

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 212

Thr Gly Leu Pro Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 213

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 213

Ser Asn Val Gly Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 214

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 214

Asn Ala Val Ala Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 215

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 215

Thr Asp Arg Pro Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 216

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 216

Ser Leu Thr Val Asp Phe Asp Pro  
1 5

<210> 217

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 217

Thr Glu Met Ala Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 218  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 218

Trp Gly Glu Gly His Leu Glu Tyr  
1 5

<210> 219  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 219

Gln Lys Lys Val Glu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 220  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 220

Thr Gly Tyr Pro Val Phe Asn Pro  
1 5

<210> 221  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 221

Ala Asn Ser Ala Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 222  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 222

Val Gly Arg Pro Gln Phe Asp Pro





<210> 228  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 228

Asn Thr Leu Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 229  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 229

Ile Lys Pro Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 230  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 230

Thr Gly Tyr Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 231  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 231

Ile Lys Pro Gly Met Phe Asp Pro  
1 5

<210> 232  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 232

Asn Met Thr Pro Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 233

<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 233

Thr Glu Arg Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 234  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 234

Thr Asn Tyr Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 235  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 235

Thr Ser Arg Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 236  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 236

Thr Tyr Trp Pro Ala Phe Asp Pro  
1 5

<210> 237  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 237

Ile Asp Met Pro Trp Phe Asp Pro  
1 5

<210> 238  
<211> 8  
<212> PRT

<213> 人  
<400> 238  
Trp Gly Thr Gly His His Asp Pro  
1 5

<210> 239  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 239  
Asn Ala Arg Pro Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 240  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 240  
Asn Gln Ile Val His Phe Asp Pro  
1 5

<210> 241  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 241  
Asn Val Met Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 242  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
<400> 242  
Thr Asp Thr Pro Val Phe Asp Pro  
1 5

<210> 243  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 243

Asn Arg Thr Val Trp Phe Asp Pro  
1 5

<210> 244

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 244

Asn Arg Met Gly Ser Phe Asp Pro  
1 5

<210> 245

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 245

Val Lys Pro Gly Phe Phe Asp Pro  
1 5

<210> 246

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 246

Ile Asp Gln Gly Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 247

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 247

Gln Ser Leu Pro Gln Phe Asp Pro  
1 5

<210> 248

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 248

Asn Glu Leu Gly Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 249  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 249

Gln Lys Lys Val Glu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 250  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 250

Ile Asp Thr Pro Thr Phe Asp Pro  
1 5

<210> 251  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 251

Trp Gly Tyr Asp Ala Thr Leu Glu  
1 5

<210> 252  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 252

Ser Asp Gly Gly Lys Phe Asp Pro  
1 5

<210> 253  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 253

Leu Asp Leu Val Arg Phe Asp Pro  
1 5

<210> 254  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 254

Ala Asn Ala Gly Leu Phe Asp Pro  
1 5

<210> 255  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 255

Trp Gly Thr Gly Ser Asn Arg Asp  
1 5

<210> 256  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 256

Ser Glu Thr Ile Asn Phe Asp Pro  
1 5

<210> 257  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 257

Gly Ser Tyr Thr His Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 258  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人  
  
<400> 258

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ile Pro Trp Ala Val  
1 5 10







<400> 269

Ala Ser Phe Gln Ser Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 .5 10

<210> 270

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 270

Ala Ser Tyr Gln Ser Ala Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 271

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 271

Thr Ser Tyr Thr Ala Ser Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 272

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 272

Ser Ala Phe Gln Gln Ser Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 273

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 273

Gly Ser Tyr Ser Gln Gln Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 274

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 274

Gly Ala Tyr Ser Ala Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 275

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 275

Thr Ser Tyr Thr Gln Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 276

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 276

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Ala Phe Thr Cys  
1 5 10

<210> 277

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 277

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Asp His Trp Val Leu  
1 5 10

<210> 278

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 278

Ser Ser Phe Thr Ser Arg Ile Pro Trp Ala Val  
1 5 10

<210> 279

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 279

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Lys Ala Trp Val Ile

1	5	10
---	---	----

<210> 280  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 280

Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Ala	Pro
1				5						10

<210> 281  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 281

Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Gly	Asp	Arg	Phe	Asn	Leu
1				5						10

<210> 282  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 282

Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Lys	Pro	His	Met	Val
1				5						10

<210> 283  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 283

Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Gly	Ile	Gln	Phe	Asn	Leu
1				5						10

<210> 284  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 284

Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Ala	Ala	Arg	Phe	Ala	Leu
1				5						10



<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 290

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Pro Arg Trp Asn Leu  
 1                   5                   10

<210> 291  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 291

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ser Thr Phe Asn Leu  
 1                   5                   10

<210> 292  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 292

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Arg Phe Val Leu  
 1                   5                   10

<210> 293  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 293

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Asn Val Trp Val Leu  
 1                   5                   10

<210> 294  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 294

Ser Ser Phe Thr Ser Ala Pro Ala Phe Val Val  
 1                   5                   10

<210> 295  
 <211> 11  
 <212> PRT

<213> 人  
 <400> 295  
 Ser Ser Phe Thr Ser Gly Lys Thr Phe Val Leu  
 1 5 10

<210> 296  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 296

Ser Ser Phe Thr Ser Asn Ile Pro Trp Ala Ile  
 1 5 10

<210> 297  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 297

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

<210> 298  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 298

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Pro Val Phe Asn Ile  
 1 5 10

<210> 299  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 299

Ser Ser Phe Thr Ser Asp Arg Ala Phe Asn Leu  
 1 5 10

<210> 300  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 300  
Ser Ser Phe Thr Ser Glu Trp Leu Trp Val Leu  
1 5 10

<210> 301  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 301  
Ser Ser Phe Thr Ser Gln Pro Arg Trp Ala Pro  
1 5 10

<210> 302  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 302  
Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ile Arg Phe Asn Leu  
1 5 10

<210> 303  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 303  
Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Ala Phe Asn Leu  
1 5 10

<210> 304  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 304  
Ser Ser Phe Thr Ser Gly Pro Val Phe Asn Leu  
1 5 10

<210> 305  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 305

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

<210> 306

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 306

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ile Arg Phe Asn Val  
1 5 10

<210> 307

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 307

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

<210> 308

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 308

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Ile Phe Asn Leu  
1 5 10

<210> 309

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 309

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ile Pro Trp Ile Val  
1 5 10

<210> 310

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 310

Thr Ser Tyr Thr Leu Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10



<210> 311  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 311

Thr Ser Tyr Thr His Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 312  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 312

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Ala Trp Leu Leu  
1 5 10

<210> 313  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 313

Thr Ser Tyr Val Met Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 314  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 314

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ser Thr Phe Thr Leu  
1 5 10

<210> 315  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 315

Thr Ser Phe Thr Ser Gly Ser Thr Phe Met Leu  
1 5 10

<210> 316  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 316

Thr Ser Ser Thr Leu Gly Ser Thr Phe Met Leu  
 1 5 10

<210> 317  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 317

Thr Arg Tyr Val Met Gly Ser Thr Phe Met Leu  
 1 5 10

<210> 318  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 318

Thr Ser Tyr Arg Glu Gly Ser Thr Phe Met Leu  
 1 5 10

<210> 319  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 319

Ala Ser Tyr Gln Ala Ser Ser Thr Phe Met Leu  
 1 5 10

<210> 320  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 320

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Trp Gly Asp Gly Thr Leu Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 321  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 321

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Thr Asn Ser Ala Lys Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 322  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 322

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asn Glu Arg Pro Ser Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 323  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> 人  
 <400> 323

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Thr Asn Ser Ala Lys Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Met  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 324

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 324

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



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

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

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

Met Ile Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Gly  
85 90 95

Leu Pro Trp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
100 105 110

<210> 327

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 327

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

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

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

Met Ile Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 328

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 328

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

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

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

Met Ile Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

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

Ser Thr Phe Met Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 329

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 329

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu





&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 331

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

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

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

Met Ile Ser Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Gly  
 85 90 95

Leu Pro Trp Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

&lt;210&gt; 332

&lt;211&gt; 351

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 332

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaatgggga 300

gacgggacct tgaacccgtg gggccaaggg acaatggtca ccgtctctc a 351

&lt;210&gt; 333

&lt;211&gt; 351

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 333

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaaacgaac 300  
 tccgccaaagt tgcaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcctc a 351

<210> 334  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 334  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaaaacgag 300  
 aggcctcgt tgcaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcctc a 351

<210> 335  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 335  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaatgggga 300  
 gacgggacct tgaaccctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcctc a 351

<210> 336  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 336

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaaacgggg 300  
 taccctcctc tgcaccctg gggccaaggg acaatggcca ccgtctctc a 351

<210> 337  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 337  
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaatgggga 300  
 acggggacct tgtggccctg gggccaaggg acaatggcca ccgtctctc a 351

<210> 338  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 338  
 cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tctgaggtca ataacggcc ctcaggggtt 180  
 tctaactcgt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgaccat ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcgggct cccctgggtc 300  
 gtcttcggcg gagggaccaa gctgaccgct cta 333

<210> 339  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 339

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tctgaggca ataaacggcc ctgaggggtt 180  
 tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgacct ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc agcagctaca cgatggggag cacttttatg 300  
 ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 340  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 340  
 cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tctgaggca ataaacggcc ctgaggggtt 180  
 tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgacct ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc acctcgta caatggggag cacttttatg 300  
 ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 341  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 341  
 cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa 120  
 caccaggca aagccccaa actcatgatt tctgaggca ataaacggcc ctgaggggtt 180  
 tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgacct ctctgggctc 240  
 caggctgagg acgaggctga ttattactgc acctcgta caatggggag cacttttatg 300  
 ctattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 342  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 342

```

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcttgcaactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccaggca aagcccccaa actcatgatt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt      180
tctaatoget tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgaccat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc acctcgtaca ccatgggcag cacttttatg      300
ctatteggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333
    
```

```

<210> 343
<211> 333
<212> DNA
<213> 人
    
```

```

<400> 343
cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc      60
tcttgcaactg gaaccagtaa tgacgttggg gcttataatt atgtctcctg gtaccaacaa      120
caccaggca aagcccccaa actcatgatt tctgaggcca ataaacggcc ctcagggggt      180
tctaatoget tctctggctc caagtctggc aacacggcct ctctgaccat ctctgggctc      240
caggctgagg acgaggctga ttattactgc agctcattta caagcggggt gccgtgggtg      300
ctcttggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta                                     333
    
```

```

<210> 344
<211> 330
<212> PRT
<213> 人
    
```

<400> 344

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
    
```

```

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

```

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35           40           45
    
```

```

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50           55           60
    
```

```

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
    
```

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 345

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<400> 345

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

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

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

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
 50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
 65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 100 105

<210> 346

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<400> 346

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

Val His Ser



<210> 347

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 347

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

Asp Ala Arg Cys  
20

SEQ ID NO.	序列	描述	抗体
1	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCASWG TGTLPWGQG KMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	194_e06, 196_a07, 198_f06
2	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCASWG DGTLPWGQG KMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	194_a02, 194_b09
3	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCASWG LGSNENWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	195_e11
4	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCADTN SAKEDPWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	194_g09, 196_h02
5	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAGTG YPSFDPWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	194_e01
6	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAGTA KPSFDPWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	196_d10
7	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAGNE RPSFDPWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	196_g03
8	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFPI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAGSR TVQEDPWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	196_e06
9	EVQLLESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVROA PGKGLEWVSA ISGSGGTTY ADSVKGRFTI SRDMSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCATNS PGTFDPWGQG TMTVSS	全长 V <sub>H</sub>	195_a09

图1A

10	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWWSA ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDINSKNTLY LQANSLRAED TAVYYCATIA PGREDFWGQG TMTVYSS	全长 $V_H$	198_a09
11	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWWSA ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDINSKNTLY LQANSLRAED TAVYYCAGLD RWDFDFWGQG TMTVYSS	全长 $V_H$	200_h08
12	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWWSA ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDINSKNTLY LQANSLRAED TAVYYCASWG GGWFDFWGQG TMTVYSS	全长 $V_H$	129_1c4
13	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWWSA ISGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDINSKNTLY LQANSLRAED TAVYYCAKWG GGWFDFWGQG TMTVYSS	全长 $V_H$ - 种系化的	Q_129_1c4
14	QSALIQPASV SGPFGQSITI SCTGTSNDVG AINYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPSTV SNRFGSKSG NTASLSISGL QAEDRDYIC SFTSGLPWW LFGGTTKLTIV L	全长 $V_L$	194_a02, 194_e08, 196_a07, 198_f06
15	QSALIQPASV SGPFGQSITI SCTGTSNDVG AINYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPSTV SNRFGSKSG NTASLSISGL QAEDRDYIC SFTSGLPWW VFGGTTKLTIV L	全长 $V_L$	194_b09
16	QSALIQPASV SGPFGQSITI SCTGTSNDVG AINYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPSTV SNRFGSKSG NTASLSISGL QAEDRDYIC SFTSGLPWW LFGGTTKLTIV L	全长 $V_L$	195_e11
17	QSALIQPASV SGPFGQSITI SCTGTSNDVG AINYVSWYQR HPGKAPKLIIL SEVNRKRPSTV SNRFGSKSG NTASLSISGL QAEDRDYIC SFTSGLPWW LFGGTTKLTIV L	全长 $V_L$	194_g09
18	QSALIQPASV SGPFGQSITI SCTGTSNDVG AINYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPSTV SNRFGSKSG NTASLSISGL QAEDRDYIC TSYRAGSTEM LFGGTTKLTIV L	全长 $V_L$	194_e01
19	QSALIQPASV SGPFGQSITI SCTGTSNDVG AINYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPSTV SNRFGSKSG NTASLSISGL QAEDRDYIC TSYRAGSTEM LFGGTTKLTIV L	全长 $V_L$	198_a09

图1B

20	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSDVVG AVNYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPBGV SNRFSGSKSG NTASLSISGL QAEDEADYIC TSYTRNDSTFM LFGGGTKLTV L	全长 VL	200_h06
21	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSDVVG AVNYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPBGV SNRFSGSKSG NTASLSISGL QAEDEADYIC SFTSGSTFM LFGGGTKLTV L	全长 VL	129_1c4
22	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSDVVG AVNYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPBGV SNRFSGSKSG NTASLSISGL QAEDEADYIC SFTSGSTFM LFGGGTKLTV L	全长 VL	0_129_1c4
23	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSDVVG AVNYVSWYQQ HPGKAPKLIIL SEVNRKRPBGV SNRFSGSKSG NTASLSISGL QAEDEADYIC TSYTRNDSTFM LFGGGTKLTV L	全长 VL	198_h02, 198_d10, 198_g03, 198_e06, 195_a09
24	SYAMS	V <sub>H</sub> CDR1	All
25	ALSGGGSTYYADSVKNG	V <sub>H</sub> CDR2	All
26	WGTGTLMP	V <sub>H</sub> CDR3	194_e06, 196_a07, 198_f06
27	WGDGTLNP	V <sub>H</sub> CDR3	194_a02, 194_b09
28	WGLGSNEN	V <sub>H</sub> CDR3	195_e11
29	TNSAKEDP	V <sub>H</sub> CDR3	194_g09, 198_h02
30	TGYPSFDP	V <sub>H</sub> CDR3	194_e01
31	TAKESFDP	V <sub>H</sub> CDR3	196_d10
32	NERPSFDP	V <sub>H</sub> CDR3	198_g03
33	SRTVQEDP	V <sub>H</sub> CDR3	198_e06
34	NSPQTEDP	V <sub>H</sub> CDR3	195_a09

图1C

35	IAPGRFDP		V <sub>H</sub> CDR3	198_a09
36	LDRVWFDP		V <sub>H</sub> CDR3	200_h06
37	WGGGWEDP		V <sub>H</sub> CDR3	129_1c4, Q_129_1c4
38	TGTSDVGYNYVS		V <sub>L</sub> CDR1	All
39	EYVKRFS		V <sub>L</sub> CDR2	All
40	SSFTSGLEFWVL		V <sub>L</sub> CDR3	194_a02, 194_e06, 196_a07, 198_f06
41	SSFTSGLEFWV		V <sub>L</sub> CDR3	194_b09
42	SSFTSGIVENL		V <sub>L</sub> CDR3	195_e11
43	TSYTWGSTEML		V <sub>L</sub> CDR3	195_a09, 196_d10, 196_e06, 196_g03, 196_h02, 196_a09
44	SSYTWGSTEML		V <sub>L</sub> CDR3	194_g09
45	TSYRMDSTEML		V <sub>L</sub> CDR3	200_h06
46	TSYRAGSTEML		V <sub>L</sub> CDR3	194_e01
47	SSFTSGSTEML		V <sub>L</sub> CDR3	129_1c4, Q_129_1c4
48	EYVLLSGLVQGGSLRLSCARSGFTFS		V <sub>H</sub> FR1	All
49	WYRQAFKGLWVS		V <sub>H</sub> FR2	All
50	RETIERDNRKNTLYLQNNLSLRAEDTAVYYCAS		V <sub>H</sub> FR3	194_e06, 196_a07, 198_f06, 194_a02, 194_b09, 195_e11, 129_1c4

图1D

51	RETISRNSKNTLYIQNNSLRAEDTAVYYCAD	V <sub>H</sub> FR3	194_g09, 196_h02
52	RETISRNSKNTLYIQNNSLRAEDTAVYYCAG	V <sub>H</sub> FR3	194_e01, 196_d10, 196_g03, 200_h06
53	RFALSRNSKNTLYIQNNSLRAEDTAVYYCAG	V <sub>H</sub> FR3	196_e06
54	RETISRNSKNTLYIQNNSLRAEDTAVYYCAT	V <sub>H</sub> FR3	195_a09, 198_a09
55	RETISRNSKNTLYIQNNSLRAEDTAVYYCAK	V <sub>H</sub> FR3	g_129_1c4
56	WGQGHVTVSS	V <sub>H</sub> FR4	194_e06, 196_a07, 198_f06, 194_a02, 194_b09
57	WGQGHVTVSS	V <sub>H</sub> FR4	195_e11, 194_g09, 196_h02, 194_e01, 196_d10, 196_g03, 196_e06, 195_a09, 198_a09, 200_h06, 129_1c4, g_129_1c4
58	QSALTPASVSGPQGITISC	V <sub>L</sub> FR1	198_a09
59	QSALTPASVSGPQGITISC	V <sub>L</sub> FR1	All - except 198_a09
60	WYQRHEGKAPKLIILS	V <sub>L</sub> FR2	194_g09
61	WYQRHEGKAPKLIIMY	V <sub>L</sub> FR2	g_129_1c4

图 1 E

62	WTQQHFGKAPKLIILS	V <sub>L</sub> FR2	194_a02, 194_e06, 196_a07, 198_f06, 194_b09, 195_e11, 195_a09, 196_d10, 196_e06, 196_g03, 196_h02, 198_a09, 200_h06, 194_e01, 129_1c4, 194_g09
63	GVSNRFSGKSGNTASLISGLQAEDEAYYC	V <sub>L</sub> FR3	
64	GVSNRFSGKSGNTASLISGLQAEDEAYYC	V <sub>L</sub> FR3	194_e01
65	GVSNRFSGKSGNTASLISGLQAEDEAYYC	V <sub>L</sub> FR3	Q_129_1c4
66	GVSNRFSGKSGNTASLISGLQAEDEAYYC	V <sub>L</sub> FR3	194_a02, 194_e06, 196_a07, 198_f06, 194_b09, 195_e11, 195_a09, 196_d10, 196_e06, 196_g03, 196_h02, 198_a09, 200_h06, 129_1c4
67	FgggTKLIVL	V <sub>L</sub> FR4	所有
68	<p>GAGGTGAGCTFTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACRGCCTGGGGGTC                  COTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTAEBCCA                  TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT                  ATTACTGGTAGTGGTGGTAGCATACTACGCAGACTCCCGTGAAGGGCCG                  GTTCACCAFTCCGAGACAAATCCAGAACACAGCTGTATCTGCAAATGA                  ACAGCCTGAGGCCGAGGACAGCCCGTATTAATTAATGCGAGTTGGGA                  ACGGGACCTTGTGGCCCTGGGCCRAGGGAAATGGTCAACCGTCTCGAG                  T</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	194_e06, 196_a07, 198_f06

图1F

69	<p>GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CTTGAGACTCTCTGTGCAAGCTCTGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACAATACCCAGACTCCGTGGAAGGCGG                  GTTCAACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAGACAGCTGTATCTGCAAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACAGCCCTGTATTACTGTGCGAGTTGGGA                  GACGGGACCTTGAACCCGTGGGCCAAGGNAATGGTCAACCTCTCNAG                  T</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	194_a02, 194_b09
70	<p>GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CTTGAGACTCTCTGTGCAAGCTCTGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACAATACCCAGACTCCGTGGAAGGCGG                  GTTCAACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAGACAGCTGTATCTGCAAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACAGCCCTGTATTACTGTGCGAGTTGGGA                  CTGGGAGCAACGAAAATCTGGGCCAAGGNAATGGTCAACCTCTCNAG                  T</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	195_e11
71	<p>GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CTTGAGACTCTCTGTGCAAGCTCTGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACAATACCCAGACTCCGTGGAAGGCGG                  GTTCAACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAGACAGCTGTATCTGCAAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACAGCCCTGTATTACTGTGCGAGTTGGGA                  TCCGCCAAGTTGACCCCTGGGCCAAGGNAATGGTCAACCTCTCNAG                  T</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	194_g09, 196_h02

图1G



72	<p>GAGGTGCGAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACCCTTACCGCTATGCCCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTGGTGGTAGCAGATACTAGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGAGACAGGCCGTGTATTTACTGTGCGGGCACGGGGTACCCCTCTCCBACCCCTGGGGCCAAAGGACAAATGGTCAACCGTCTCGAGT</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	194_e01
73	<p>GAGGTGCGAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACCCTTACCGCTATGCCCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTGGTGGTAGCAGATACTAGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGAGACAGGCCGTGTATTTACTGTGCGGGCACGGGCAAGCCGAGCTTCGACCCCTGGGGCCAAAGGACAAATGGTCAACCGTCTCGAGT</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	196_d10
74	<p>GAGGTGCGAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACCCTTACCGCTATGCCCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTGGTGGTAGCAGATACTAGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGAGACAGGCCGTGTATTTACTGTGCGGGCACGGGCAAGCCGCTCGTTCGACCCCTGGGGCCAAAGGACAAATGGTCAACCGTCTCGAGT</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	196_g03
75	<p>GAGGTGCGAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCACCCTTACCGCTATGCCCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTGGTGGTAGCAGATACTAGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGAGACAGGCCGTGTATTTACTGTGCGGGCACGGGCAACGCTGCAATTCGACCCCTGGGGCCAAAGGACAAATGGTCAACCGTCTCGAGT</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	196_e06

图 1H



80	<p>GAGGTGACGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC                  CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGGCA                  TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCT                  ATTATGTTAGTGGTGGTGGTACACATACGAGACTCCGTGAAGGGGCG                  GTTCACCATCTCCAGAGACHATTCCAGGACAGGCTGTATCTGCAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACAGCCGCTGTATTACTGTGGAAATGGGGA                  GGAGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGACCAATGGTCAACCGTCTCCTC                  A</p>	全长 V <sub>H</sub> DNA	9_129_1c4
81	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCGCTCCSTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC                  GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCGATTAATGAGTGGTGTATTAATTT                  ATGTCCTCGTGTACCAACACACCCAGGCAAGCCGCCAAACTCATTTCTT                  TCTGAGGTCATTAACGGCCCTCAGGGGTTCTAATGCTTCTCTGGCTC                  CAAGTCTGGCAACCGCCTCTCTGAGCATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                  ACGAGGCTGATTAATTACTGCAAGCTCATTTACAAGCGGCTCCCCCTGGGTC                  CTCTCGCGGAGGAGCCAAAGCTGACCCCTCCTA</p>	全长 V <sub>L</sub> DNA	194_a02, 194_e06, 196_a07, 198_f06
82	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCGCTCCSTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC                  GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCGATTAATGAGTGGTGTATTAATTT                  ATGTCCTCGTGTACCAACACACCCAGGCAAGCCGCCAAACTCATTTCTT                  TCTGAGGTCATTAACGGCCCTCAGGGGTTCTAATGCTTCTCTGGCTC                  CAAGTCTGGCAACCGCCTCTCTGAGCATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                  ACGAGGCTGATTAATTACTGCAAGCTCATTTACAAGCGGCTCCCCCTGGGTC                  GTCTTCGCGGAGGAGCCAAAGCTGACCCCTCCTA</p>	全长 V <sub>L</sub> DNA	194_b09
83	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCGCTCCSTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC                  GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCGATTAATGAGTGGTGTATTAATTT                  ATGTCCTCGTGTACCAACACACCCAGGCAAGCCGCCAAACTCATTTCTT                  TCTGAGGTCATTAACGGCCCTCAGGGGTTCTAATGCTTCTCTGGCTC                  CAAGTCTGGCAACCGCCTCTCTGAGCATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                  ACGAGGCTGATTAATTACTGCAAGCTCATTTACAAGCGGCTCCCCCTGGGTC                  CTGTTTCGCGGAGGAGCCAAAGCTGACCCCTCCTA</p>	全长 V <sub>L</sub> DNA	195_e11
84	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCGCTCCSTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC                  GATCACCATCTCCTGCACTGGAACCGATTAATGAGTGGTGTATTAATTT                  ATGTCCTCGTGTACCAACACACCCAGGCAAGCCGCCAAACTCATTTCTT                  TCTGAGGTCATTAACGGCCCTCAGGGGTTCTAATGCTTCTCTGGCTC                  CAAGTCTGGCAACCGCCTCTCTGAGCATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                  ACGAGGCTGATTAATTACTGCAAGCTCATTTACAAGCGGCTCCCCCTGGGTC                  CTATTTTCGCGGAGGAGCCAAAGCTGACCCCTCCTA</p>	全长 V <sub>L</sub> DNA	194_g09

图1J

85	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGGCTGCTCGTGTCTGGTCTCTGGACAGTC                      GATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCACTAATGACGTTGGTCTTAAATT                      ATGTCTCCTCTGTACCAACACCCAGCAAGCCCAAACTCATTTCTT                      TCTGAGTCAATAAAGGCCCTCAGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC                      CAAGTCTGGCAACACGGCTCTCTGACATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                      ACGAGGCTGATTAATTACTGCACAGCTACCGGGCCGGGAGCACTTTATG                      CTATTGGGGGGGAGCCAAAGCTGACCGTCTCTA</p>	全长 VL DNA	194_e01
86	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGGCTGCTCGTGTCTGGTCTCTGGACAGTC                      GATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCACTAATGACGTTGGTCTTAAATT                      ATGTCTCCTCTGTACCAACACCCAGCAAGCCCAAACTCATTTCTT                      TCTGAGTCAATAAAGGCCCTCAGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC                      CAAGTCTGGCAACACGGCTCTCTGACATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                      ACGAGGCTGATTAATTACTGCACAGCTACCGGGCCGGGAGCACTTTATG                      CTATTGGGGGGGAGCCAAAGCTGACCGTCTCTA</p>	全长 VL DNA	198_h08
87	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGGCTGCTCGTGTCTGGTCTCTGGACAGTC                      GATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCACTAATGACGTTGGTCTTAAATT                      ATGTCTCCTCTGTACCAACACCCAGCAAGCCCAAACTCATTTCTT                      TCTGAGTCAATAAAGGCCCTCAGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC                      CAAGTCTGGCAACACGGCTCTCTGACATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                      ACGAGGCTGATTAATTACTGCACAGCTACCGGGCCGGGAGCACTTTATG                      CTATTGGGGGGGAGCCAAAGCTGACCGTCTCTA</p>	全长 VL DNA	200_h08
88	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGGCTGCTCGTGTCTGGTCTCTGGACAGTC                      GATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCACTAATGACGTTGGTCTTAAATT                      ATGTCTCCTCTGTACCAACACCCAGCAAGCCCAAACTCATTTCTT                      TCTGAGTCAATAAAGGCCCTCAGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC                      CAAGTCTGGCAACACGGCTCTCTGACATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                      ACGAGGCTGATTAATTACTGCACAGCTACCGGGCCGGGAGCACTTTATG                      CTATTGGGGGGGAGCCAAAGCTGACCGTCTCTA</p>	全长 VL DNA	129_1c4
89	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGGCTGCTCGTGTCTGGTCTCTGGACAGTC                      GATCACCATCTCCTGCACCTGGAACCACTAATGACGTTGGTCTTAAATT                      ATGTCTCCTCTGTACCAACACCCAGCAAGCCCAAACTCATTTCTT                      TATGAGTCAATAAAGGCCCTCAGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTC                      CAAGTCTGGCAACACGGCTCTCTGACATCTCTGGCTCCAGGCTGAGG                      ACGAGGCTGATTAATTACTGCACAGCTACCGGGCCGGGAGCACTTTATG                      CTATTGGGGGGGAGCCAAAGCTGACCGTCTCTA</p>	全长 VL DNA	9_129_1c4

图1K

90	<p>                     CAGTGTGCCCTGACTCAGCTCAGCCTCCGCTGCTGGGTCTCCTGGACAGTC                      GATCACCATCTCTGCACTGGAACCCAGTAATGACGTTGGTCTTATAAAT                      ATGTCTCCTGTTACCAACACACCCAGCCAGGCAAGCCCCCAACTCATTTCTT                      TCTGAGTCAATAAACGGCCCTCAGGGTTTCTAATCAGCTTCTCTGGCTC                      CAGTCTGGCAACACGGCCCTCTGAGCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGG                      ACGAGCTGATTTACTGCACTGATACACCAATGGGACAGCACTTTATG                      CTATTCGGCGAGGAGCCAAAGCTGACCCGCTTA                 </p>	全长 VL DNA	196_h02, 196_d10, 196_g03, 196_e06, 195_a09
91	NPKGQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
92	NSAGSFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
93	SNGGLFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
94	SNGGFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
95	SDLGEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
96	TNTGQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
97	TPRGLFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
98	SNTGNFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
99	SRTVQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
100	LGVPQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
101	SDNGTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
102	IAPGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
103	NTTGFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
104	SDAGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
105	INEGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
106	NSNGVFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
107	SHSGKFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体

图 1L

108	NKKPFEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
109	SDNGLFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
110	WGAGELDH	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
111	WGTAHEN	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
112	NNVGRFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
113	TDRPVFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
114	IRSGMFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
115	TEGALFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
116	SDFGKFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
117	NELGSFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
118	QELPVFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
119	FRDTAFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
120	ADMGREFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
121	LGVPVFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
122	THAGMFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
123	VYVGRFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
124	NTQGRFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
125	TNGGLEFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
126	LTTKGFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
127	RLVHGDFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
128	IRLGTDFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
129	SERPFDFDR	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体

图 1 M

130	TSRPLEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
131	VEBGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
132	SEMMEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
133	VNPGYFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
134	NDIARFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
135	VGVGFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
136	TRYPTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
137	NSAGTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
138	VNEGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
139	NRTGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
140	NASARFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
141	INTGMEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
142	NDNGREFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
143	VDQPSFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
144	VDRGFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
145	NHTGAFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
146	TNTGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
147	SDSGLFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
148	NVLALFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
149	NYEARFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
150	PDNGTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
151	NRNGNFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体

图1N

152	TTGGREDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
153	TGYPSFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
154	NNEGQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
155	NSKGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
156	TENPTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
157	TNGGREDE	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
158	NSYGSFDE	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
159	LENVVEDE	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
160	ANIGREDF	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
161	ANGGQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
162	WENDASLG	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
163	WGPTASLD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
164	WGRGTNEY	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
165	WGGGGHYD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
166	WGADATLD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
167	TERSTEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
168	NATGTEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
169	TNSAKEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
170	VNSGKEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
171	SLRVEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
172	NDRGMEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
173	NSPGETDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体

图10



174	NTPAGREDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
175	VNARGREDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
176	TEKPMEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
177	MEVSLFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
178	MEVVEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
179	VNHGREDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
180	TEVGTEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
181	TKKPFEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
182	LELPRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
183	TNHMEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
184	THSGREFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
185	NDRGGFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
186	PHRGTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
187	TELGQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
188	WGLGSNEK	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
189	WGNDAITW	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
190	WGSTASLD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
191	WGGGGHQD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
192	WGRGDWRS	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
193	WGSTASLS	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
194	WGHGGHDT	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
195	WGPRAFLD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体

图1P

196	WGNGAEVP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
197	WGNDAFLA	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
198	WGSGRILDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
199	NELPKAFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
200	SDGGTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
201	LDMVMEDE	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
202	WGSSTHDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
203	FDRGKFDLP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
204	THNPFVDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
205	NSAGAEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
206	LDSVVEFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
207	WGTGQHEN	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
208	WGTGHHDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
209	NFKP9FDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
210	ANGGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
211	WGTGHLEP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
212	TGLPRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
213	SNVGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
214	NAVAREFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
215	TDRPQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
216	SLTVDFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
217	TEMAQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体

图10

216	WGEQHLEY	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
219	QKKVDFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
220	TGYEVENP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
221	ANSAKEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
222	VGRFQDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
223	TYNEMEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
224	TERPVDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
225	LDLPRDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
226	WSSGSIH	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
227	LDRVCSRW	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
228	NTLPEVDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
229	IKPRDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
230	TGYPVDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
231	IKPGMEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
232	NWTPRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
233	TERPSDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
234	TNYGTDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
235	TSRPSDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
236	TYNPAEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
237	IDMPMEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
238	WGTGHHDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体
239	NARPSDFP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	129-104 变体

图1R

240	NQIVHEDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
241	NVMGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
242	TDIEVFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
243	NRTVWFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
244	NRVGSFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
245	VKRFDFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
246	IDQGRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
247	QSLRFQFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
248	NEIGTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
249	QKRVDFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
250	IDPFTFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
251	HGYDRTLE	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
252	SDGKDFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
253	LDLVRFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
254	ANAGLFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
255	WGTGSNRD	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
256	SETINFDP	V <sub>H</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
257	GBYTHGSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
258	SSFTSGIPNAV	V <sub>L</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
259	SSFTSGVFNAM	V <sub>L</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
260	SSFTSGLQWVV	V <sub>L</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体
261	SSFTSQIPNAL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	128-1c4 变体

图1S

262	SSFTSAEQWVM	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
263	SSFTSQPQNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
264	SSFTSGSTWVL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
265	SSFTSAVPMAL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
266	SSFTSGAVFVL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
267	SSFTSGIVFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
268	ASRYDGSSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
269	ASFOGSGSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
270	ASVQASSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
271	TSYTAGSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
272	SAPQSSSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
273	GSYSQSSSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
274	GAYSAGSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
275	TSYTOGSTFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
276	SSFTSGRAFTC	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
277	SSFTSGDHWVL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
278	SSFTSRLPMNV	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
279	SSFTSGICAWVI	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
280	SSFTSRAWAP	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
281	SSFTSGDRENL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
282	SSFTSYKPHMV	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
283	SSFTSGIQFNL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体

图11

284	SSFTSAAAFAL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
285	SSFTSGRREVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
286	SSFTSGLPWAL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
287	SSFTSGIKFTL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
288	SSFTSALPMSL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
289	SSFTSGEQELL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
290	SSFTSGPRWNL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
291	SSFTSGSTENL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
292	SSFTSGRREVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
293	SSFTSGNVWVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
294	SSFTSAPAFVW	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
295	SSFTSGKTVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
296	SSFTSNI PWAL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
297	SSFTSSAHEVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
298	SSFTSGPVFNI	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
299	SSFTSDRAENL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
300	SSFTSEM L WVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
301	SSFTSQPRWAP	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
302	SSFTSGIRENL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
303	SSFTSGRAFNL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
304	SSFTSGPVFNL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体
305	SSFTSGQQWVL	V <sub>L</sub> CDR3	变体	129-1c4	变体

图1U

306	SSFTSGIRENV	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
307	SSFTSGVTWLL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
308	SSFTSGRIENL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
309	SSFTSGIPWIV	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
310	TSYTLGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
311	TSYTHGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
312	SSFTSGYAWLL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
313	TSYVMGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
314	SSFTSGSTFTL	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
315	TSETSGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
316	TSSTLGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
317	TRYVMGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
318	TSYREGSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
319	ASYQASSTEML	V <sub>L</sub> CDR3 变体	129-1c4 变体
320	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCVAAGFTES SYAMSWVROA PGKGLEWYSA ISGGGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAKMG DGTLPNGQG TMVTYSS	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-194-b09
321	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCVAAGFTES SYAMSWVROA PGKGLEWYSA ISGGGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAKTN SAKEDPMGQG TMVTYSS	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-194-g09
322	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCVAAGFTES SYAMSWVROA PGKGLEWYSA ISGGGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAKNE RPFEDPMGQG TMVTYSS	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-198-g03
323	EVQLLESGGG LVQPFGSLRL SCVAAGFTES SYAMSWVROA PGKGLEWYSA ISGGGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCAKTN SAKEDPMGQG TMVTYSS	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-198-h02

图1V





333	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTGTAGTGGTGTAGCACAFACTACGCAACTCCGTTAAGGGCCG                  GTTCCACCATCTCCGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAACGAAC                  TCCGCCAAGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGACAATGGTCAACCCTCTCCTC                  A</p>	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-194-g09
334	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTGTAGTGGTGTAGCACAFACTACGCAACTCCGTTAAGGGCCG                  GTTCCACCATCTCCGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAACGAAC                  TCCGCCAAGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGACAATGGTCAACCCTCTCCTC                  A</p>	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-196-g03
335	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTGTAGTGGTGTAGCACAFACTACGCAACTCCGTTAAGGGCCG                  GTTCCACCATCTCCGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAACGAAC                  TCCGCCAAGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGACAATGGTCAACCCTCTCCTC                  A</p>	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-198-h02
336	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTC                  CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCA                  TGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGTCTCAGCT                  ATTAGTGGTGTAGTGGTGTAGCACAFACTACGCAACTCCGTTAAGGGCCG                  GTTCCACCATCTCCGAGACAAATCCAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA                  ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAACGAAC                  TCCGCCAAGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGACAATGGTCAACCCTCTCCTC                  A</p>	种系化的全长V <sub>H</sub>	g-194-e01

图1X



342	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCTGCCTCCGGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC                  GATCACCATCTCTGCACTGGAACCAAGTAATGNCETTTGGTCTTATATT                  ATGTCCTCTGGTACCAACACACCCAGGCAAGCCCCCAAACTCATGATT                  TCTGAGGTCAATAAACGGCCCTCAGGGTTCTAATGCTTCTCTGGGTC                  CAGTCTGGCAACACGGCCCTCTGACCAATCTGGGCTCCAGGCTGAGG                  ACGAGGCTGATTATTACTGACCTCGTACACCATGGGACACACTTTATG                  CTATTGGGGGAGGACCAAGCTGACCCCTCTA</p>	种系化的全长V <sub>L</sub>	g-194-e01
343	<p>CAGTCTGCCCTGACTCAGCTGCCTCCGGTCTGGGTCTCCTGGACAGTC                  GATCACCATCTCTGCACTGGAACCAAGTAATGNCETTTGGTCTTATATT                  ATGTCCTCTGGTACCAACACACCCAGGCAAGCCCCCAAACTCATGATT                  TCTGAGGTCAATAAACGGCCCTCAGGGTTCTAATGCTTCTCTGGGTC                  CAGTCTGGCAACACGGCCCTCTGACCAATCTGGGCTCCAGGCTGAGG                  ACGAGGCTGATTATTACTGACCTCGTACACCATGGGACACACTTTATG                  CTATTGGGGGAGGACCAAGCTGACCCCTCTA</p>	种系化的全长V <sub>L</sub>	g-194-e06
344	<p>ASTKGPSVFP LAPBBSKTSB GTAALGLVVK DYFPEPVTVS MNSGALTSGV                  HTEPAVLQSS GLYLSLSVVT VFSSSLGTQT YICNVNHHKPS MTRVDRKVEP                  KSCDKHTCP PCPAPELLGG PSEVLEPPKP KDTLMLSRTP EYTCVVDVDS                  HEDEPKENW YVDGVEVHNA KTKPREEOZN STYRVSVLT VLHQDWLNGK                  EYCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTRKQVSLTC                  LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSEFELY SKLTVDKSRW                  QQGNVFCSV MHEALRNHYT QKBLSLSPGK</p>	IgG <sub>1</sub> 重链恒定区	所有
345	<p>GQRKAAPSVT LFPSSSEELQ ANKATLVCLI SDFYFGAVTV AWKADSSPVK                  AGVETTFPSK QSNKCYRASS YLSLTFEQMK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV                  APTECS</p>	IgG <sub>1</sub> 轻链恒定区	所有
346	MEMSWVLEFF LSVTTGVHS	重链信号序列	所有
347	MSVPTQVLGL LLLMLTDARC	轻链信号序列	所有

图1Z