



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01822884.4

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100347194C

[22] 申请日 2001.12.31 [21] 申请号 01822884.4

[30] 优先权

[32] 2000.12.29 [33] US [31] 09/751,181

[32] 2000.12.29 [33] US [31] 60/258,948

[86] 国际申请 PCT/US2001/049442 2001.12.31

[87] 国际公布 WO2002/053700 英 2002.7.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.27

[73] 专利权人 萨文特医药公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 J·拉扎罗维茨 Y·哈盖

D·普拉克辛 T·沃格尔

A·尼姆罗德 H·马-海姆

E·桑通 T·里希特 B·阿米特

L·库佩尔曼 T·佩雷茨

A·莱瓦农

[56] 参考文献

US5985833A 1999.11.16

A Novel P - Selectin GlycoproteinLigand - 1  
MonoclonalAntibody Recognizes an Epitope Within  
Tyrosine SulfateMotif of Human PSGL - 1 and  
Blocks Recognition of Both P - and L - Selectin.  
Karen R. Snapp. 等. Blood, Vol. 91 No. 1. 1998

审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 温宏艳 张广育

权利要求书 1 页 说明书 186 页 附图 53 页

[54] 发明名称

分离的包括含硫酸根部分的表位的分子,抗这  
样的表位的抗体,和它们的应用

[57] 摘要

本发明涉及癌细胞上存在的并且在细胞滚动,  
转移,和炎症等生理现象中重要的表位。提供了使  
用能与所述表位结合的抗体的治疗和诊断方法和组  
合物。在癌症等疾病,包括肿瘤生长和转移,白血  
病,自身免疫疾病,和炎症疾病的诊断和治疗中能  
使用本发明的方法和组合物。

1. 一种 scFv 或衍生自 scFv 的多肽, 其中所述 scFv 分子或多肽包含重链可变区和轻链可变区, 并且其中的重链可变区包含 CDR3、CDR2 和 CDR1 区, 所述 CDR3、CDR2 和 CDR1 区分别由氨基酸序列 SEQ ID NOs : 20、115 和 114 组成; 并且其中轻链可变区由 SEQ ID NOs : 7 组成,

其中所述 scFv 分子或多肽还包含 CDR3、CDR2 和 CDR1 区侧翼的上游或下游区, 其中 CDR3 区侧翼的上游区由 SEQ ID NO:117 的氨基酸序列组成, CDR3 区侧翼的下游区由 SEQ ID NO:116 的氨基酸序列组成; 其中 CDR2 区侧翼的上游区由 SEQ ID NO:119 的氨基酸序列组成, CDR2 区侧翼的下游区由 SEQ ID NO:118 的氨基酸序列组成; 并且其中 CDR1 区侧翼的上游区由 SEQ ID NO:121 的氨基酸序列组成, CDR1 区侧翼的下游区由 SEQ ID NO:120 的氨基酸序列组成; 并且

其中所述 scFv 分子或衍生自 scFv 的多肽能够结合血小板。

2. 由 SEQ ID NO: 203 组成的 scFv.

分离的包括含硫酸根部分的表位的分子，  
抗这样的表位的抗体，和它们的应用

### 发明领域

本发明涉及例如癌细胞，转移细胞，白血病细胞和血小板细胞上存在的表位，所述表位在这样的不同的生理现象中是重要的，所述生理现象如细胞滚动，转移，炎症，自身免疫疾病，例如自发性血小板减少性紫癜 (ITP)，粘连，血栓形成和/或再狭窄，和凝集作用。本发明涉及使用抗这样的表位的抗体的治疗和诊断方法和组合物。本发明还涉及组织定向和鉴定领域，借助于与靶细胞特异性结合的肽和多肽的噬菌体展示技术。这样的肽和多肽是抗体及其抗原结合片段，其构建体，其抗原结合片段或其构建体的片段，或者片段的构建体。更特别地，肽和多肽可以具有抗癌活性，抗转移活性，抗白血病活性，抗病毒活性，抗感染活性，和/或抗其它疾病的活性，例如炎症疾病，涉及异常或病原性粘连的疾病，血栓形成和/或再狭窄，涉及异常或病原性凝集作用的疾病，和自身免疫疾病，心血管疾病例如心肌梗塞，视网膜病变性疾病，硫酸化酪氨酸依赖性蛋白质-蛋白质相互作用引起的疾病，一般性病变细胞。

### 发明背景

#### 抗体，噬菌体展示，和组织定向

治疗药物组织选择性定向是制药工业正在形成的领域。设计以定向为基础的新的癌症治疗来提高治疗的特异性和效力，同时减小毒性，从而提高总体功效。有人使用针对肿瘤相关抗原的小鼠单克隆抗体 (MAb's)-试图使毒素，放射性核苷酸，和化学治疗偶联物定向于肿瘤。另外，分化抗原，例如 CD19，CD20，CD22 和 CD25，已经被开发为治疗血生成恶性肿瘤中癌症特异性靶物。虽然进行了大量研究，该方法还是有几方面的局限性。一个局限是分离显示选择性结合的合适的单克隆抗体困难。第二个局限是抗体成功分离的先决条件是需要高抗体免疫原性。第三个局限是终产物包含非人序列，它引起对非人材料的免疫应答(例如，人抗-小鼠抗体-HAMA 应答)。HAMA 应答经常导致更短的血清半衰期并且防止重复治疗，因此降低了抗体的治疗价值。这

后一种局限刺激了人们对鼠源工程嵌合或人源化单克隆抗体以及在发现人抗体中的兴趣。该方法的另一个局限在于它能分离仅一种针对仅是已知和纯化抗原的抗体物质。此外，该方法不是选择范围内的因为其使正常的和恶性的细胞上存在的抗细胞表面标记物抗体分离。

有很多影响用于治疗癌症的 Mab 的治疗功效的因素。这些因素包括肿瘤细胞上抗原表达的特异性，表达水平，抗原异质性和肿瘤质的可进性。

与实体肿瘤例如癌相比，白血病和淋巴瘤一般对用抗体治疗更易感。Mab 与血液中的白血病和淋巴瘤细胞快速结合，并且容易穿透淋巴组织中的恶性细胞，因此使得淋巴样肿瘤是以 Mab 为基础的治疗的极好的候选者。一个理想体系详述了鉴定识别产生恶性子代细胞的干细胞细胞表面上的标记物的 Mab。

利用噬菌体文库随机淘选与分离的预先测定的靶蛋白质例如抗体，激素和受体结合的单链 Fv' s (scFv' s)。另外，使用一般抗体展示文库，特别是噬菌体 scFv 文库，有利于发现靶特异性的但是还没有识别没有测定的细胞表面部分的独特分子的替代方法。

白血病，淋巴瘤和骨髓瘤是源自骨髓和淋巴组织的癌并且在细胞不受控制生长中涉及。急性成淋巴细胞白血病 (ALL) 是一种异质疾病，由特定临床和免疫学特征确定。和 ALL 其它形式一样，尽管还不知道大多数情况下 B-细胞 ALL (B-ALL) 的决定性原因，但是单细胞中 DNA 的获得性基因改变导致疾病，引起它变得异常并且连续繁殖。对于儿童和成年人来说，与其它白血病患者相比，受 B ALL 折磨的患者的预后要坏得多。

急性髓细胞性白血病 (AML) 是一组异质肿瘤，在正常情况下始祖细胞引起骨髓系列 (红细胞，粒细胞，单核细胞，和血小板) 最后分化细胞。作为瘤形成的其它形式，AML 与获得性基因改变有关，获得性基因改变导致相对未分化胚细胞代替正常分化的骨髓细胞，表现出早期骨髓分化的一种或多种类型。骨髓中一般包括 AML，但程度较小，并且在二级造血器官中。AML 主要影响成年人，发生高峰是在 15-40 岁年龄之间，但是已知也影响儿童和老年人。几乎所有的 AML 患者在诊断之后需要立即治疗实现临床症状减轻，其中没有循环的没有分化的胚细胞异常水平的证据。

迄今为止,开发出了诱导抗肿瘤细胞的细胞溶解活性的各种各样的单克隆抗体。FDA 批准了针对 P 185-生长因子受体 (HER2) 的人源化单克隆抗体 MuMAb4D5, 并且被用来治疗乳腺癌 (美国专利 Nos. 5, 821, 337 和 5, 720, 954)。结合之后,抗体能抑制依赖于 HER2 生长因子受体的肿瘤细胞生长。另外,一种抗 CD20 的嵌合抗体,其引起外周 B 细胞快速消耗,包括与淋巴瘤相关的那些,最近被 FDA 批准了 (美国专利 No. 5, 843, 439)。这种抗体与靶细胞的结合导致补体依赖性溶胞作用。该产品最近被批准并且目前临床上被用来治疗低等级 B-细胞非何杰金氏淋巴瘤。

几种其它人源化和嵌合抗体正在开发或者在进行临床试验。另外,在正常骨髓细胞上和在大多数类型的骨髓白血病细胞上都表达的与 CD33 抗原特异性反应的人源化 Ig, 与抗癌剂加利车霉素, CMA-676 (Sievers 等, 血液增刊 (Blood Supplement), 308, 504a (1997)) 偶联。这种已知是 MYLOTARG<sup>®</sup> 的偶联物,最近受到 FDA 批准 (Caron 等, 癌症增刊 (Cancer Supplement), 73, 1049-1056 (1994))。着眼于它的细胞溶解活性,一种另外的抗-CD33 抗体 (HumM195), 最近处于临床试验中,与几种细胞毒性物质偶联,包括 gelonin 毒素 (McGraw 等, Cancer Immunol. Immunother, 39, 367-374 (1994)) 和放射性同位素 <sup>131</sup>I (Caron 等, 血液 (Blood) 83, 1760-1768 (1994)), <sup>90</sup>Y (Jurcic 等, 血液增刊 (Blood Supplement), 92, 613a (1998)) 和 <sup>213</sup>Bi (Humm 等, 血液增刊 (Blood Supplement), 38: 231P (1997))。

抗白细胞抗原 CD45 的嵌合抗体 (cHuLym3) 处于用于治疗人白血病和淋巴瘤的临床研究中 (Sun 等, Cancer Immunol. Immunother., 48, 595-602 (2000))。在体外分析中,在 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒性) 测试中发现特异性细胞溶胞作用 (Henkart, 免疫学 (Immunity), 1, 343-346 (1994); Squier 和 Cohen, Current Opin. Immunol., 6, 447-452 (1994))。

与小鼠单克隆人源化作用和嵌合抗体构建体相反,利用噬菌体展示技术能分离包括全人序列的 scFv's。最近开发了以来自噬菌体展示技术的 scFv 克隆为基础的抗人 TGFb2 受体全人抗体。这种 scFv, 转换成能与 TGFb2 的结合竞争的全长人 IgG4 (Thompson 等, 免疫学方法杂志 (J. Immunol Methods), 227, 17-29 (1999)), 具有强抗增

殖活性。本领域技术人员公知的这项技术更具体地描述于下面的公开文献中：Smith, 科学 (Science), 228,1315 (1985) ; Scott 等, Science 249,386-390 (1990); Cwirla 等, PNAS, 87,6378-6382 (1990); Devlin 等, Science, 249,404-406 (1990); Griffiths 等, EMBO J., 13 (14), 3245-3260 (1994); Bass 等, 蛋白质 (Proteins), 8,309-314 (1990); McCafferty 等, 自然 (Nature), 348,552-554 (1990); Nissim 等, EMBO J., 13,692-698 (1994); 美国专利 Nos 5,427,908,5,432,018,5,223,409 和 5,403,484。

#### 用于分离 scFv 抗体分子的抗体

血小板,纤维蛋白原, GPIb, 选择蛋白, 和 PSGL-1 分别在几种致病环境或疾病状态中起着重要的作用, 所述致病环境或疾病状态是例如异常或致病炎症, 异常或致病免疫反应, 自身免疫反应, 转移, 异常或致病粘着, 血栓形成和/或再狭窄, 和异常或致病聚集作用。因此, 在涉及这些及其它致病情况的疾病和病症的诊断和治疗中, 与血小板和与这些分子交叉反应的抗体会是有用的。

#### 血小板

血小板是被充分表征的血液体系的成分, 并且在止血法, 血栓形成和/或再狭窄, 和再狭窄中起着几项重要的作用。在已知为止血法的方法的滚动中产生对血管的损伤, 其特征在于一系列连续的作用。损伤血管的初始反应是血小板与血管内表面上受影响的区域粘着。下一步是很多层血小板聚集到前面粘着的血小板上的聚集作用, 形成止血栓塞。血小板的这种凝块封闭了血管壁。纤维蛋白聚合物的沉积增强了止血栓塞。只有当补救损伤时凝块才降解。

#### 血小板在转移中的重要性

肿瘤转移可能是限制癌症患者存活的最重要的因素。累积数据表明肿瘤细胞与宿主血小板相互作用的能力代表转移所必需的决定因素之一。Leslie Oleksowicz, Z. M., “肿瘤诱导的血小板凝集作用的特征: MCF-7 乳腺癌细胞的免疫相关的 GPIb 和 GPIIb/IIIa 表达的作用”, 血栓形成研究 (Thrombosis Research) 79: 261-274 (1995)。

已经证明肿瘤细胞聚集血小板的能力与肿瘤细胞转移可能性相关, 并且已经证明在啮齿动物模型中肿瘤诱导的血小板凝集作用的抑制与转移的抑制有关。已经证明肿瘤细胞与血小板的相互作用涉及膜粘着

分子和激动剂分泌。已经在肿瘤细胞系上鉴定了免疫相关血小板糖蛋白的表达。证明血小板免疫相关糖蛋白, GPIb, GPIIb/IIIa。在乳腺肿瘤细胞系表面上表达 GPIb/IX 和整联蛋白  $\alpha_v$  亚基。Leslie Oleksowicz, Z. M., “肿瘤诱导的血小板凝集作用的特征: MCF-7 乳腺癌细胞的免疫相关的 GPIb 和 GPIIb/IIIa 表达的作用”, 血栓形成研究 (Thrombosis Research) 79: 261-274 (1995); Kamiyama, M., 等, “血清因子对血小板 GPIIb/IIIa 结合纤维蛋白原的抑制: 血友病, 免疫血小板减少性紫癜, 人免疫缺陷病毒-相关免疫血小板减少性紫癜, 和全身性红斑狼疮患者循环免疫复合体和血小板抗体之研究”, J Lab Clin Med 117 (3): 209-17 (1991)。

Gasic (J. T. B. Gasic 等, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 61: 46-52 (1968)) 和同事证明抗体诱导的血小板减少显著减少 CT26 结肠腺癌, Lewis 肺癌, 和 B16 黑素瘤产生的转移的数目和体积。Karpatkin, S., 等, “粘着蛋白在体外血小板肿瘤相互作用中和体内转移形成中的作用”, 临床研究杂志 (J. Clin. Invest.), 81 (4): 1012-9 (1988); Clezardin, P., 等, “在人骨肉瘤细胞诱导的血小板凝集作用中血小板膜糖蛋白 Ib/IX 和 IIb/IIIa 的作用, 和血小板  $\alpha$ -颗粒蛋白质的作用”, 癌症研究 (Cancer Res.) 53 (19): 4695-700 (1993)。此外, 发现单多肽链 (60kd) 在与 GPIb 紧密相关的 HEL 细胞的表面膜上表达并且相当于不完全或异常 O-糖基化 GPIb  $\alpha$  亚基。Kieffer, N., 等, “HEL 细胞中血小板糖蛋白 Ib  $\alpha$  的表达” (“Expression of platelet glycoprotein Ib alpha in HEL cells”), 生物化学杂志 (J. Biol. Chem.) 261 (34): 15854-62 (1986)。

### GPIb 复合体

止血法中的每一个步骤要求血小板表面上存在受体。止血法中重要的一个受体是糖蛋白 Ib-IX 复合体 (也已知为 CD42)。该受体通过内皮下膜中结合 vonWillebrand 因子 (vWF) 而介导血小板与受伤部位血管壁的粘着 (最初的粘附)。它在止血法中重要的其它两个血小板功能中具有重要的作用: (a) 动脉狭窄区中高剪切诱导的血小板的凝集作用和 (b) 低浓度凝血酶诱导的血小板激活作用。

GPIb-IX 复合体是血小板血浆膜外表面主要成分之一。GPIb-IX 复

合体包括三种跨膜多肽- GPIb 的二硫键连接的 130 kDa $\alpha$ -链和 25 kDa $\beta$ -链和非共价缔合的 GPIX (22 kDa)。所有四种遗传单位都以等摩尔量存在于血小板膜上,用于CD42复合体的有效细胞表面表达和功能,表明三种亚基适当组装成一个复合体对于血浆膜上的全表达是必需的。GPIb 的  $\alpha$ -链由三个不同的结构域组成: (1) 包含富亮氨酸重复序列和 Cys- 键合的支链序列的球形 N-末端肽; (2) 高度糖基化粘蛋白样大糖肽结构域; 和 (3) 包含与 GPIb $\beta$  和跨膜和细胞质序列的膜缔合 C-末端区。

几套证据表明 GPIb-IX 复合体的 vWF 和凝血酶结合结构域位于包括 GPIb $\alpha$  的氨基末端大约 300 个氨基酸的球形区中。人血小板 GPIb-IX 复合体一种介导血小板功能和反应性的关键膜受体。GPIb 对内皮下结合的 vWF 的识别使得血小板与受伤的血管粘着。此外, vWF 与 GPIb $\alpha$  的结合也诱导血小板激活, 其可能包括 GPIb-IX 的胞质结构域与细胞支架或磷脂酶 A2 的相互作用。此外, GPIb $\alpha$  包含对于  $\alpha$ -凝血酶的高亲和性结合位点, 其有助于血小板激活, 但是迄今没有完全确定其机理。

GPIb $\alpha$  的 N-末端球形结构域包含带负电荷的氨基酸簇。几组证据表明, 在表达 GPIb-IX 复合体的转染 CHO 细胞中和在血小板 GPIb $\alpha$  中, 该结构域 (Tyr-276, Tyr-278, 和 Tyr-279) 经硫酸化而包含三个酪氨酸残基。

### 蛋白质硫酸化

蛋白质硫酸化是一种普遍的翻译后修饰, 它涉及硫酸根与糖侧链或者与多肽主链酶促共价连接。这种修饰发生在高尔基体外侧区室中, 因此只影响横越该区室的蛋白质。这样的蛋白质包括分泌蛋白, 以颗粒体为目标的蛋白质, 和血浆膜蛋白的胞外区。酪氨酸是现在已知经硫酸化的氨基酸残基。J. W. Kehoe 等, 化学和生物学 (Chemistry and Biol) 7: R57-R61 (2000)。其它氨基酸, 例如苏氨酸, 也可能经硫酸化, 特别是在病变细胞中。

发现很多种蛋白质是酪氨酸-硫酸化的, 但是在一个多肽中存在三个或多个硫酸化酪氨酸, 如在 GPIb 上发现的, 不是常见的。GPIb $\alpha$  (CD42), 它由血小板表达, 并且巨核细胞介导血小板粘附和通过与 vWF 结合在内皮下膜上的滚动, 还在其 N-末端结构域带有多价负电荷。

认为这样一种高度酸性和亲水性环境是硫酸化的一个先决条件,

因为酪氨酸基蛋白质磺基转移酶特异性识别与酸性氨基酸残基邻接的酪氨酸并且将其硫酸化。J. R. Bundgaard 等, JBC 272: 21700-21705 (1997)。GPIb $\alpha$  的酸性区的完全硫酸化得到具有显著负电荷密度的一个区—19 个氨基酸的片段中有 13 个负电荷, 使得它成为与其它蛋白质静电相互作用的候选位点。

### 选择蛋白和 PSGL-1

P-, E-, 和 L-选择蛋白是粘连分子的一个家族, 其功能当中, 介导血管内皮上白细胞的滚动。P-选择蛋白贮存在血小板中的颗粒体中, 并且在被凝血酶, 组胺, 佛波醇酯, 或者其它刺激分子激活之后运输到表面。P-选择蛋白在激活的内皮细胞上表达。E-选择蛋白在内皮细胞上表达, 而 L-选择蛋白在嗜中性白细胞, 单核细胞, T 细胞, 和 B 细胞上表达。

P-选择蛋白糖蛋白配体-1 (PSGL-1, 也称作 CD162) 是 P-选择蛋白, E-选择蛋白, L-选择蛋白的一种粘蛋白糖蛋白配体。PSGL-1 是一种二硫键连接的同型二聚体, 其具有一个 PACE (配对碱基氨基酸转化酶) 酶切位点。PSGL-1 还具有三个可能的酪氨酸硫酸化位点, 后面接着脯氨酸, 丝氨酸和苏氨酸比例高的大约 15 个十二聚体重复单元。PSGL-1 的胞外部分包含三个 N-连接的糖基化位点并且具有多个唾液酸化, 岩藻糖基化 O-连接低聚糖支链。K. L. Moore 等, JBC 118: 445-456 (1992)。大多数 N-聚糖位点和很多 O-聚糖位点被占据。确定了来自人 HL-60 细胞的 PSGL-1 的 O-聚糖的结构。这些 O-聚糖中的一组是核心-2, 唾液酸化, 岩藻糖基化结构, 那是与选择蛋白结合所要求的。与 P-选择蛋白和 L-选择蛋白结合还要求 PSGL-1 的氨基末端区的酪氨酸硫酸化作用。此外, 还有可能在翻译后被酶切的 N-末端前肽。

HL-60 细胞中 PSGL-1 具有 361 个残基, 带有 267 个残基的胞外区, 25 个残基的跨膜区, 和 69 个残基的胞内区。编码 PSGL-1 的序列是单一的外显子, 这样两者择一的剪接应该是不可能的。但是, HL-60 细胞中的, 和大多数细胞系中的 PSGL-1 胞外区中存在 10 个残基共有序列的 15 个连续重复单元, 但是在多形核白细胞, 单核细胞, 和几种其它细胞系, 包括大多数天然白细胞中存在该序列的 14 和 16 个重复单元。PSGL-1 在细胞表面形成二硫键键合的同型二聚体。V. Afshar-

Kharghan 等, Blood 97: 3306-3312 (2001)。

PSGL-1 作为二聚体在嗜中性白细胞上表达, 表观分子量是 250 kDa 和 160 kDa, 而在 HL60 上二聚体形式是大约 220 kDa。当在还原条件下分析时, 每个亚基都被还原一半。分子量不同可能归因于存在不同数目十聚体重单元引起的分子中的多态性。白细胞型分析 VI (Leukocyte Typing VI), T. Kishimoto 等编著(1997)。

PSGL-1 在大多数血液白细胞上表达, 例如嗜中性白细胞, 单核细胞, 白细胞, B 细胞亚型, 和所有的 T 细胞, 并且介导 P-选择蛋白上嗜中性白细胞的滚动。白细胞型分析 VI (Leukocyte Typing VI), T. Kishimoto 等编著(1997)。PSGL-1 还可以介导通过与 L-选择蛋白结合的嗜中性白细胞-嗜中性白细胞相互作用, 从而介导炎症。Snapp, 等, Blood 91 (1) : 154-64 (1998)。

PSGL-1 介导激活的内皮上, 激活的血小板上, 及其它白细胞上和炎症部位上白细胞的滚动。

产生了商业上可获得的抗人 PGSL-1 的单克隆抗体, KPL1, 并且证明抑制 PGSL-1 和 P-选择蛋白之间和 PGSL-1 和 L-选择蛋白之间的相互作用。对 PGSL-1 的酪氨酸硫酸化作用共有基序 (YEYLDYD) 作出 KPL1 表位图谱 (Snapp 等, Blood 91(1):154-164 (1998))。KPL1 只识别这个特定的表位, 并且不与其它细胞例如 B-CLL 细胞, AML 细胞, 转移细胞, 多数骨髓瘤细胞, 等之上存在的硫酸化表位交叉反应。

白细胞滚动在炎症中是重要的, P-选择蛋白(在激活的内皮和血小板上表达, 其可以在受伤位点被固定)和 PSGL-1 之间的相互作用是管壁上白细胞束缚和滚动的作用手段。Ramachandran 等, PNAS 98 (18) : 10166-71 (2001); Afshar-Kharghan, 等, Blood 97 (10): 3306-7 (2001)。

细胞滚动在转移中也是重要的, 相信内皮细胞上 P-和 E-选择蛋白结合转移细胞, 从而有利于从血流中外渗到周围的组织中。

转移过程中也涉及血小板; 当转移癌细胞进入血液时, 形成包被肿瘤细胞的血小板和白细胞组成的多细胞复合体。这些复合体可以称作微栓, 有助于肿瘤细胞逃避免疫系统。血小板包被肿瘤细胞要求血小板表达 P-选择蛋白。

用肝素处理, P-和 L-选择蛋白的抑制剂抑制肿瘤细胞-血小板相

互作用。用 0-唾液酸糖蛋白酶预处理肿瘤细胞，其去除唾液酸化，岩藻糖基化粘蛋白配体，还抑制肿瘤细胞-血小板复合物形成。体内实验表明这些处理的任一项产生与循环的肿瘤细胞相结合的更大的单核细胞，提示减少血小板结合增加了免疫细胞发病成循环肿瘤细胞的机会。Varki 和 Varki, *Braz. J. Biol. Res.* 34 (6): 711-7 (2001)。

PSGL-1 和 GPIIb 有着结构相似性，具有粘蛋白样高度糖基化配体结合区。Afshar-Kharghan, 等, *Blood* 97 (10): 3306-7 (2001)。

所有的白细胞：嗜中性白细胞，单核细胞，淋巴细胞，激活的外周 T-细胞，粒细胞，嗜酸性细胞，血小板上以及在一些 CD34 阳性干细胞上和 B-细胞一些亚型上都发现了 PSGL-1。P-选择蛋白在激活的血小板和内皮细胞上选择性表达选择蛋白。P-选择蛋白和 PSGL-1 之间的相互作用促进白细胞在管壁上滚动，而白细胞在血管位点的异常蓄积导致各种病理学炎症。各酪氨酸硫酸酯在 PSGL-1 上的立体特异性分布对于 P-选择蛋白和 PSGL-1 的结合是重要的。电荷对于结合也是重要的：减少 NaCl (从 150 减少至 50 mM) 增强结合 ( $K_d$  约 75nM)。PSGL-1 上酪氨酸硫酸化增强 P-选择蛋白 PSGL-1 粘附，但不是最终必需的。PSGL-1 酪氨酸硫酸化支持所有的剪切速度下更慢的滚动粘附，并且支持高得多的剪切速率的滚动粘附。(Rodgers SD, 等, *Biophys J.* 81: 2001-9 (2001))。

### 纤维蛋白原

有两种形式的正常人纤维蛋白原：较多的纤维蛋白原  $\gamma$  和较少的纤维蛋白原  $\gamma$  原型变体，各自都在正常个体中被发现。正常纤维蛋白原，它是最大量形式(包括体内发现的纤维蛋白原的大约 90%)，由两个相同的 55 kDa  $\alpha$  链，两个相同的 95 kDa  $\beta$  链，和两个相同的 49.5 kDa  $\gamma$  链组成。正常变体纤维蛋白原，它是较小丰度形式(包括体内发现的纤维蛋白原的大约 10%)，由两个相同的 55 kDa  $\alpha$  链，两个相同的 95 kDa  $\beta$  链，一个 49.5 kDa  $\gamma$  链和一个 50.5 kDa 原型 ( $\gamma'$ ) 链组成。 $\gamma$  和  $\gamma$  原型链都由相同基因编码，在 3' 端发生交替剪接。正常  $\gamma$  链由氨基酸 1-411 构成。正常变体  $\gamma$  原型链由 427 个氨基酸组成：氨基酸 1-407 与正常  $\gamma$  链中的那些相同，氨基酸 408-427 是 VRPEHPAETEDSLYPEDDL。正常地，这个区一般被凝血酶分子占据。

通过在离子化钙的存在下凝血酶的作用纤维蛋白原被转化为纤维蛋白，产生血液的凝固作用。纤维蛋白也是血栓和急性炎症渗出物的一个成分。

血小板和在细胞-细胞相互作用，细胞基质相互作用，血小板-血小板相互作用，血小板-细胞相互作用，血小板-基质相互作用，细胞滚动和粘附，和止血法中起着重要作用的分子(例如纤维蛋白原，GPIb，选择蛋白，和PSGL-1)在致病症状或疾病变中也起着重要的作用，例如在异常或致病炎症，异常或致病免疫反应，自身免疫反应，转移，异常或致病粘附，血栓形成和/或再狭窄，和异常或致病聚集作用中。因此，与血小板和与这些分子交叉反应的抗体在涉及这些及其它致病症状的疾病和失调的诊断和治疗中会是有益的。因此需要鉴定这些分子中或者中间共同表位，和鉴定能起交叉反应的抗体。

可以提供很多形式的抗体，例如片段，复合体，和聚合体。抗体片段的例子包括单链Fv(scFv)片段和Fab片段。

已经确定scFv渗透组织并且比全长抗体更快地从血液中清除，因为它们的大小较小。Adams, G. P., 等, 英国癌症杂志(Br. J. Cancer) 77, 1405-1412 (1988); Hudson, P. J., Curr. Opin. Immunol. 11 (5), 548-557 (1999); Wu, A. M., 等, 肿瘤靶(Tumor Targeting) 4, 47 (1999)。因此，经常在涉及放射性标记例如肿瘤成像的诊断中使用scFv，使得从体内更快地清除放射性标记。多种定向癌症的scFv多聚体最近接受了临床前体内稳定性和效力的评估。Adams, G. P., 等, Br. J. Cancer 77, 1405-1412 (1988); Wu, A. M., 等, Tumor Targeting 4, 47 (1999)。

单链Fv(scFv)片段由多肽接头连接在一起的重链( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )可变区组成。接头足够长，使得( $V_H$ )和( $V_L$ )结构域折叠成功能Fv结构域，使得scFv识别并结合它的靶物，亲和性与母体抗体相似或提高。

典型地，设计scFv单体，带有通过多肽接头与 $V_L$ 的N-末端残基连接在一起的 $V_H$ 结构域的C-末端。任选地，利用反向取向： $V_L$ 结构域的C-末端通过多肽接头与 $V_H$ 的N-末端残基连接在一起。Power, B., 等, J. Immun. Meth. 242, 193-204 (2000)。典型地，多肽接头长度15个氨基酸左右。当接头减少至大约3-7个氨基酸时，scFvs不能折叠成功能Fv结构域，反而与第二个scFv缔合生成二聚体。进一

步将接头长度减小至少于三个氨基酸使得 scFv 缔合成三聚体或四聚体，取决于接头长度，组成和 Fv 结构域趋向。B. E. Powers, P. J. Hudson, *J. Immun. Meth.* 242 (2000) 193-194。

最近，发现多价抗体片段例如 scFv 二聚体，三聚体，和四聚体经常提供比母体抗体结合靶物高的亲和性。这种更高的亲和性提供了潜在的利益，包括提高的对于肿瘤定向应用的药代动力学。另外，在 P-选择蛋白及其配体 PSGL-1 的研究中，它们涉及白细胞的聚集和滚动，科学家推断表达 PSGL-1 二聚体形式的细胞建立更稳定的滚动粘附，因为这种更高的结合亲和性。这些粘附力有更大偏转抗性并且表现出滚动速度较小波动。Ramachandran, 等, *PNAS*, vol. 98 (18): 10166-71 (2001)。

这些多价形式的更高结合亲和性在诊断和治疗法中可能是有益的。例如，scFv 可以被用作阻断剂来结合靶受体，因此阻断“天然”配体的结合。在这样的情况下，期望在 scFv 和受体之间有更高的亲和和缔合作用来减少解缔合机会，这可能允许天然配体与靶物的不期望的结合。另外，当粘附和滚动中涉及靶物受体时或者当高偏转流动区中存在的细胞例如血小板上有靶受体时，这种更高的亲和性可能是有用的。

本发明的一个目的是提供在例如细胞滚动，炎症，免疫反应，感染，自身免疫反应，转移，粘附，血栓形成和/或再狭窄，和聚集作用这样的过程中作为手段的各种分子上存在的，和病变细胞例如 AML 细胞，B-CLL 细胞，多骨髓瘤细胞，和转移细胞上存在的分离的表位。

本发明的另一个目的是提供使用这样的分离表位开发识别例如细胞滚动，炎症，免疫反应，感染，自身免疫反应，转移，粘附，血栓形成和/或再狭窄，和聚集作用这样的过程中作为手段的各种分子上存在的，和病变细胞例如 AML 细胞，B-CLL 细胞，多骨髓瘤细胞，和转移细胞上存在的表位并且与其交叉反应的抗体。

本发明的其它目的包括这样的抗体在开发和提供用于抑制细胞滚动，炎症，免疫反应，感染，自身免疫反应，转移，粘附，血栓形成和/或再狭窄，和聚集作用，和用于治疗例如 AML，B-CLL，多发性骨髓瘤，转移，心血管病例如心肌梗塞，视网膜病，硫酸化酪氨酸依赖性蛋白质-蛋白质相互作用引起的疾病，或者其中这样的细胞功能或作用

起着重要作用的其它疾病这样的疾病的药物的用途。

本发明的一个目的是在用于诊断各种个体疾病状态的方法中应用所述表位和抗体,所述疾病例如 AML, B-CLL, 多发性骨髓瘤, 和转移或者其中这样的细胞功能或作用如细胞滚动, 炎症, 免疫反应, 感染, 自身免疫反应, 转移, 粘附, 血栓形成和/或再狭窄, 和聚集作用起着重要作用的其它疾病。

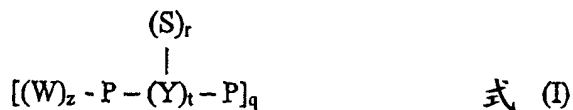
本发明的再一个目的是提供抗体的多价形式, 片段和复合体。更具体地, 本发明的一个目的是提供二聚体, 三聚体和四聚体, 有时这里分别指二聚体(双抗体), 三聚体(三抗体), 和四聚体(四抗体)。

这里提供本发明的这些及其它目的。

### 发明概述

本发明提供在如炎症, 免疫反应, 转移, 粘附, 血栓形成, 再狭窄, 和聚集作用这样的不同过程中起着重要作用的配体和受体上发现的表位。在白血病和肿瘤细胞上, 特别是在骨髓来源的白血病上也发现了根据本发明的表位。因此, 这些表位对于这些过程的治疗介导是有用的靶物。抗这样的表位的抗体用作抗下面疾病的治疗药物: 癌症(即作为抗肿瘤剂又作为抗转移剂), 白血病, 自身免疫疾病, 炎症, 心血管病例如心肌梗塞, 视网膜病和血小板功能异常引起的其它疾病, 和硫酸化酪氨酸依赖性蛋白质-蛋白质相互作用引起的疾病。本发明提供了这样的抗体, 含有所述抗体的组合物, 和使用所述抗体的治疗和诊断方法。

本发明提供一种分离的表位, 包括下面的结构式



其中:

W 是除了天冬氨酸和谷氨酸之外的任何氨基酸,

Y 是能被硫酸化的任何天然存在的部分,

P 是  $(A)_m (A)_n (X)_u$  或  $(X)_u (A)_n (A)_m$  或  $(A)_n (X)_u (A)_m$  或  $(A)_n (A)_m (X)_u$  或  $(X)_u (A)_m (A)_n$  或  $(A)_m (X)_u (A)_n$

S 是硫酸酯或硫酸化分子

X 是除了天冬氨酸，谷氨酸或酪氨酸之外的任何氨基酸，

A 是任何带负电荷的氨基酸或亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，丝氨酸，或甘氨酸

q 是 1 至 6

z 是 0, 1, 或 2

r 是 0 或 1

t 是 1, 2 或 3

u 是 0 至 2

n 是 0 至 3

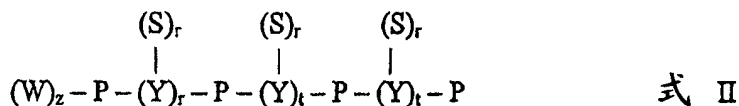
m 是 0 至 3

其中如果  $n = 0$ ，则  $m > 0$ ；其中如果  $m = 0$ ，则  $n > 0$ ；其中如果 q 是 1，r 是 1，并且如果 q 是  $> 1$ ，则 Y 中至少一个被硫酸化；并且进一步地，其中分离的表位能被抗体，其抗原结合片段，或者其包括抗体或者其包括含有 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 20 第一高变区的结合片段的复合体结合。

本发明提供了包括式 I 的分离的表位，其中硫酸化部分是肽或糖或脂偶联物，或者它们的组合。

本发明还提供了包括式 I 的分离的表位，其中 W 是甘氨酸，Y 是酪氨酸的肽偶联物或天冬酰胺，丝氨酸或苏氨酸的糖偶联物；A 是谷氨酸， $\gamma$  羧基谷氨酸或天冬氨酸；和 q 是 1, 2, 或 3。在这些实施方案的一些中，Y 是酪氨酸的肽偶联物；q 是 3；并且 r 是 1。

本发明还提供一种分离的表位，包括下面的结构式



其中：

W 是除了天冬氨酸和谷氨酸之外的任何氨基酸，

Y 是能被硫酸化的任何天然存在的部分，

P 是  $(A)_m (A)_n (X)_u$  或  $(X)_u (A)_n (A)_m$  或  $(A)_n (X)_u (A)_m$  或  $(A)_n (A)_m (X)_u$  或  $(X)_u (A)_m (A)_n$  或  $(A)_m (X)_u (A)_n$

S 是硫酸酯或硫酸化分子

X 是除了天冬氨酸, 谷氨酸或酪氨酸之外的任何氨基酸,

A 是任何带负电荷的氨基酸或亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 丝氨酸, 或甘氨酸

z 是 0, 1, 或 2

r 是 0 或 1

t 是 1, 2 或 3

u 是 0 至 2

n 是 0 至 3

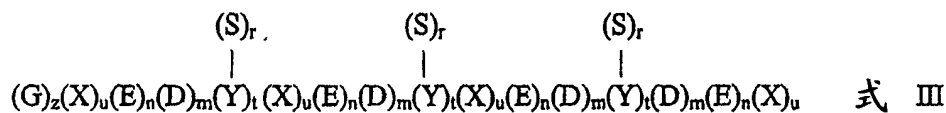
m 是 0 至 3

其中如果  $n = 0$ , 则  $m > 0$ ; 其中如果  $m = 0$ , 则  $n > 0$ ; 其中至少一个 Y 被硫酸化; 并且进一步地, 其中分离的表位能被抗体, 其抗原结合片段, 或者其包括抗体或者其包括含有 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 20 第一高变区的结合片段的复合体结合。

本发明提供了包括式 II 的分离的表位, 其中硫酸化部分是肽或糖或脂偶联物, 或者它们的组合。

本发明还提供了包括式 II 的分离的表位, 其中 W 是甘氨酸, Y 是酪氨酸的肽偶联物或天冬酰胺, 丝氨酸或苏氨酸的糖偶联物; A 是谷氨酸,  $\gamma$  羧基谷氨酸或天冬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 脯氨酸, 苯丙氨酸, 丝氨酸或甘氨酸。在这些实施方案的一些中, Y 是酪氨酸的肽偶联物; q 是 3; 并且 r 是 1。

本发明提供了包括下式的分离的表位:



其中:

G 是甘氨酸

E 是谷氨酸

D 是天冬氨酸

Y 是酪氨酸

S 是硫酸酯或硫酸化分子

X 是除上述之外的任何氨基酸

Z 是 0, 1, 或 2

t 是 1, 2 或 3

r 是 0 至 1

u 是 0 至 2

n 是 0 至 3

m 是 0 至 3

其中至少一个 Y 被硫酸化; 其中如果  $n = 0$ , 则  $m > 0$ ; 其中如果  $m = 0$ , 则  $n > 0$ ; 并且进一步地, 其中分离的表位能被抗体, 其抗原结合片段, 或者其包括抗体或者其包括含有 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 20 第一高变区的结合片段的复合体结合。

本发明提供包括式 III 的分离的表位, 其中 r 是 1。

在上述实施方案中, Y 可以包括脂质, 碳水化合物, 肽, 糖脂, 糖蛋白, 脂蛋白, 和/或脂多糖分子。

本发明还提供了上述表位的衍生物, 同系物, 模拟物, 和变体, 并且除了硫酸化作用之外具有至少一个翻译后修饰作用。

本发明提供了含有上述分离的表位的一种或多种的组合物。还提供了编码上述表位的至少一部分的分离的多核苷酸。

本发明还提供了能与至少一种上述表位结合或交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的其复合体。

同样, 提供了用于制备能与至少一种上述表位结合或交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的其复合体的方法。该方法包括步骤: (a) 提供噬菌体展示文库; (b) 提供上述表位之一; (c) 对噬菌体展示文库淘选显示能与所述分离的表位结合的寡肽或多肽的噬菌体颗粒; 和 (d) 制备能与分离的表位结合的抗体, 其结合片段, 或者包括抗体或其结合片段的复合体, 包括肽或多肽。

本发明还提供了具有 SEQ ID NO: 25 [Y1 scFv] 和/或 SEQ ID NO: 203 [Y17 scFv] 的 scFv 抗体片段结合能力的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或者其结合片段的其复合体。

提供了具有肽或多肽结合能力的抗体, 抗体片段, 和抗体复合体, 其中所述肽或多肽具有包括 SEQ ID NO: 8 [Y1 CDR3] 或 SEQ ID NO: 20 [Y17 CDR3] 第一高变区。在这些实施方案中的一些中, 肽或多肽

具有包括 SEQ ID NO: 115 的第二高变区和/或包括 SEQ ID NO: 114 的第三高变区。

提供了能与长度大约 3 - 126 个氨基酸残基并且包括至少一个硫酸化酪氨酸残基和至少两个酸性氨基酸的肽或多肽表位结合的抗体，抗体片段，和抗体复合体。在一些实施方案中，所述表位进一步包括至少一个亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，丝氨酸或甘氨酸残基。在一些实施方案中，亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，丝氨酸或甘氨酸残基置换至少两个酸性氨基酸残基中的一个或多个。在一些实施方案中，所述表位包括 DYD 或 EYE。在一些实施方案中，所述表位是 DYD 或 EYE。在其它实施方案中，所述表位包括 DYE 或 EYD。

在一些实施方案中，根据本发明提供的抗体，抗体片段，和抗体复合体能与脂质，碳水化合物，肽，糖脂，糖蛋白，脂蛋白，和/或脂多糖分子上的表位结合。优选地，根据本发明的抗体，抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的其复合体能结合脂质，碳水化合物，肽表位，糖脂表位，糖蛋白表位，脂蛋白表位，和/或脂多糖表位。在很多实施方案中，脂质，碳水化合物，肽，糖脂，糖蛋白，脂蛋白，和/或脂多糖分子包括至少一个硫酸化部分。

本发明提供了能与选自下面的至少两种不同的分子结合的抗体，抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的其复合体：PSGL-1，纤维蛋白原  $\gamma$  原型 (prime)，GP1b $\alpha$ ，肝素，lumican，补体化合物 4 (CC4)，间  $\alpha$  抑制剂 (interalpha inhibitor)，和凝血酶原，但是不是必须同时发生。还有，本发明的抗体，抗体片段，或者复合体将结合这些蛋白质的任何类似物，只要受体表位是完整的。

在一些优选的实施方案中，提供了能与选自 PSGL-1，纤维蛋白原  $\gamma$  原型，GP1b $\alpha$ ，lumican，补体化合物 4 (CC4)，间  $\alpha$  抑制剂，和凝血酶原和肝素的至少两种蛋白质结合并且能与病变细胞例如 B-CLL 细胞，AML 细胞，多发性骨髓瘤细胞，和转移细胞结合的抗体，其抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。在一些实施方案中，提供了能与 PSGL-1，纤维蛋白原  $\gamma$  原型，GP1b $\alpha$ ，肝素，lumican，补体化合物 4 (CC4)，间  $\alpha$  抑制剂，和凝血酶原之一结合的抗体，其抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。在一些实施方案中，提供了能与 PSGL-1，纤维蛋白原  $\gamma$  原型，

GP1b $\alpha$ , 和肝素之一结合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体; 在一些实施方案中, 这些抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体能结合病变细胞例如 B-CLL 细胞, AML 细胞, 多发性骨髓瘤细胞, 和转移细胞。

本发明提供了能与选自 PSGL-1, 纤维蛋白原  $\gamma$  原型, GP1b $\alpha$ , 肝素, lumican, 补体化合物 4 (CC4), 间  $\alpha$  抑制剂, 和凝血酶原的至少两种不同的分子结合并且进一步能与碳水化合物和/或脂质分子上的表位结合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。在一些实施方案中, 碳水化合物和/或脂质分子上的表位包括至少一个硫酸化部分。

本发明提供了能与两个或多个表位交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体, 每个表位在酸性氨基酸序列中包括一个或多个硫酸化酪氨酸残基。在一些实施方案中, 提供了能与选自 B-CLL 细胞, AML 细胞, 多发性骨髓瘤细胞, 和转移细胞的至少一种细胞类型交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。在其它一些实施方案中, 抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体能与 PSGL-1 交叉反应。优选地, 能与 PSGL-1 交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体与其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 QATEYEYLDYDFLPETE 结合。

在另外一些实施方案中, 抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体能与 GP1b- $\alpha$  交叉反应。优选地, 能与 GP1b- $\alpha$  交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体与其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 DEGDTLDYDYYPEEDTEGD, 其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 TDLYDYYPEEDTE, 其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 GDEGDTLDYDYYP, 其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 YDYYPEE, 和/或其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 TDLYDYYP 结合。

在另外一些实施方案中, 抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体能与纤维蛋白原  $\gamma$  原型交叉反应。优选地, 能与纤维蛋白原  $\gamma$  原型交叉反应的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体与其中至少一个酪氨酸残

基被硫酸化的表位 EPHAETEYDSLYPED 结合。

在另外一些实施方案中，提供了能与肝素交叉反应抗体，其抗原结合片段，或者包括一种抗体或其结合片段的复合物。

在另外一些实施方案中，提供了能与补体化合物 4 (CC4) 交叉反应抗体，其抗原结合片段，或者包括一种抗体或其结合片段的复合物。优选地，能与 CC4 交叉反应的抗体，其抗原结合片段，或者包括一种抗体或其结合片段的复合物与其中至少一个酪氨酸残基被硫酸化的表位 MEANEDYEDYEDLPAK 结合。

本发明还提供了能与上述蛋白质的片段，类似物，变体和模拟物结合的抗体，其抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合物，只要表位是基本上完整的。

本发明提供了能与选自 B-CLL 细胞，AML 细胞，多发性骨髓瘤细胞，和转移细胞的至少一种细胞类型交叉反应的抗体，其抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合物。

本发明还提供了能抑制细胞滚动；抑制炎症；抑制自身免疫疾病；抑制血栓形成；抑制再狭窄；抑制转移；抑制肿瘤细胞的生长和/或复制；提高肿瘤细胞死亡率；抑制白血病细胞的生长和/或复制；提高白血病细胞死亡率；提高病变细胞对于抗疾病剂损伤的易感性；提高肿瘤细胞对于抗癌剂损伤的易感性；提高白血病细胞对于抗白血病剂损伤的易感性；抑制肿瘤患者中肿瘤细胞数的增加；降低癌症患者中肿瘤细胞数；抑制白血病患者中白血病细胞数的增加；降低白血病患者中白血病细胞数；抑制细胞-细胞，细胞-基质，血小板-基质，血小板-血小板，和/或细胞-血小板复合物形成；抑制细胞-细胞，细胞-基质，血小板-基质，血小板-血小板，和/或细胞-血小板粘附；聚集作用的抗体，其抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合物。

提供了含有有效抑制，治疗，改善，或者预防感兴趣的疾病和/或症状的量的根据本发明的抗体，其抗原结合片段，或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合物的药物组合物。

本发明提供了根据本发明的抗体，其抗原结合片段，或者其复合物在制备抑制，治疗，改善，或者预防感兴趣的疾病和/或症状的药物中的用途。

本发明提供了根据本发明的抗体，其抗原结合片段，或者其复合

体作为抑制, 治疗, 改善, 或者预防感兴趣的疾病和/或症状的药物的用途。

本发明提供了抑制, 治疗, 改善, 或者预防感兴趣的疾病和/或症状的方法, 包括对需要的患者施用含有有效量的根据本发明的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体的药物组合物。

根据本发明的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体可以与药物复合或偶联。

本发明提供了与选自下面的一种试剂偶联或复合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体: 抗癌剂, 抗转移剂, 抗白血病剂, 抗疾病剂, 抗粘附剂, 抗血栓形成剂, 抗再狭窄剂, 抗自身免疫剂, 抗聚集作用剂, 抗细菌剂, 抗病毒剂, 和抗炎剂。

本发明还提供了与一种或多种毒素, 放射性同位素和药物试剂偶联或复合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。

本发明提供了与能与一种以上试剂偶联或复合的赋形剂或载体偶联或复合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。这样的赋形剂和载体的例子包括葡聚糖, 亲脂性聚合物, 亲水性聚合物, HPMA, 和脂质体。

本发明还提供了与放射性同位素及其它成像剂偶联或复合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体。还提供了包括根据本发明的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体的诊断试剂盒。

本发明提供了包括 GPIIb $\alpha$  氨基酸序列 Tyr 276 至 Glu 282 的分离的表位, 其中氨基酸 276, 278 和 279 中至少一个被硫酸化。在优选的实施方案中, 所述表位进一步包括 GPIIb $\alpha$  氨基酸 283-285。

本发明还提供了能与包括 GPIIb $\alpha$  氨基酸序列 Tyr 276 至 Glu 282 的表位结合的抗体, 其抗原结合片段, 或者包括至少一种抗体或其结合片段的复合体, 其中氨基酸 276, 278 和 279 中至少一个被硫酸化, 并且当表位进一步包括 GPIIb $\alpha$  氨基酸 283-285 时结合被增强。

还提供了具有大约 40 Kda 表观分子量的分离的 GPIIb $\alpha$ N-末端肽,

所述肽包括具有序列 YDYYPEE 的表位, 所述表位中至少一个酪氨酸残基被硫酸化, 和由氨基酸 1 至 282 组成的其中氨基酸 276, 278 和 279 中至少一个被硫酸化的分离的 GPIb $\alpha$  肽。

本发明还提供了与人单克隆抗体 scFv Y1 的可变轻链交叉反应的多克隆抗体, 抗体片段和抗体复合体。在一些实施方案中, 多克隆抗体, 抗体片段或抗体复合体与人单克隆抗体 Y-1 的可变轻链的 NdeI-EcoRI 限制片段编码的肽交叉反应。还提供了包括这样的多克隆抗体诊断试剂盒。

#### 定义:

抗体 (Ab's), 或免疫球蛋白 (IgG's), 是与抗原结合的蛋白质分子。它们由二硫键键合在一起的四条多肽链 (2 条重链和 2 条轻链) 单元组成。各条链都具有恒定区和可变区。它们可以以它们的重链成分为基础被分为五类, IgG, IgM, IgA, IgD, 和 IgE。IgG 类包括几个亚类, 包括但不限于 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4。体内 B 淋巴细胞产生免疫球蛋白并且识别特定外来抗原决定簇并且有利于那种抗原的清除。

抗体可以以多种形式制备和使用, 包括抗体复合体。如这里使用的, 术语 "抗体复合体" 或 "抗体复合体类" 被用来指一种或多种抗体与另一种抗体或者与抗体的一个片段或几个片段的复合体, 或者两个或多个抗体片段的复合体。抗体片段的例子包括 Fv, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), Fc, 和 Fd 片段。

如这里说明书和权利要求书中使用的, Fv 被定义为由可以是相同或不同的人抗体重链可变区和人抗体轻链可变区构成的分子, 其中重链可变区与轻链可变区连接, 键合, 融合或共价连接, 或缔合。Fv 可以是单链 Fv (scFv) 或二硫键稳定的 Fv (dsFv)。ScFv 由柔顺性氨基酸多肽间隔基团或接头连接的抗体的重链和轻链的可变区组成。接头可以是支化或没有支化的。优选地, 接头是 0-15 个氨基酸残基, 最优选地, 接头是 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。

Fv 分子本身由第一链和第二链组成, 每条链包括第一, 第二和第三高变区。轻链和重链可变区中高变环称作互补决定区 (CDR)。各条重链和轻链中有 CDR1, CDR2 和 CDR3 区。相信这些区形成抗原结合位点, 并且能被具体修饰, 得到增强的结合活性。自然中这些区大多数是重

链 CDR3 区。CDR3 区被理解是 Ig 分子最暴露的区，如图所示，这里提供的是主要负责观察到的选择性和/或特异结合特征的位点。

Fv 分子的片段定义为比源 Fv 小但是仍然保留源 Fv 的选择性和/或特异结合特征的任何分子。这样的片段的例子包括但不限于(1)小型体，它只包括 Fv 重链的片段，(2)微型体，它包括抗体重链可变区小的功能单位(PCT 申请号 No. PCT/IL99/00581)，(3)包括轻链片段的类似体，和(4)包括轻链可变区功能单位的类似体。

如这里使用的，术语"Fab 片段"是免疫球蛋白的一价抗原结合片段。Fab 片段由轻链可变区和重链的部分组成。

F(ab')<sub>2</sub> 片段是通过胃蛋白酶消化获得的免疫球蛋白的二价抗原结合片段。它包含轻链和两条重链的部分。

Fc 片段是免疫球蛋白的非抗原结合部分。它包含重链的羧基末端部分和对于 Fc 受体的结合位点。

Fd 片段是免疫球蛋白的重链的可变区和第一恒定区。

多克隆抗体是免疫反应的产物，并且由多种不同的 B-淋巴细胞形成。单克隆抗体得自单一细胞。

对于多肽应用的和作为本发明中定义的，所谓盒指给定的连续氨基酸的序列，它作为构架并且被认为是单一单元并且以此被操作。在一个末端或两个末端，氨基酸可以被置换，插入，去除或连接。

术语"表位"在这里用来指抗原决定簇或抗原位点，它与抗体，抗体片段，抗体复合体或包括其结合片段或 T-细胞受体的复合体相互作用。术语表位在这里与术语配体，结构域和结合区互换使用。

选择性在这里定义为靶分子从细胞类型或细胞态的混合物中选择和结合一种类型细胞或细胞态的能力，其所有的细胞类型或细胞态对于该靶分子可以是特异性的。

这里使用的术语"亲和性"是受体(例如抗体上的一个结合位点)和配体(例如抗原决定簇)之间的结合强度的量度(缔合常数)。抗体上单一抗原结合位点和单一表位之间的非共价相互作用总和的强度是所述抗体对那个表位的亲和性。低亲和性抗体对抗原结合弱并且有容易解缔合的倾向，而高亲和性抗体对抗原结合更紧密并且保持结合时间更长。术语"抗体亲抗原性"与亲和性不同，因为前者反映抗原-抗体相互作用的效价。

抗体-抗原相互作用的特异性: 虽然抗原-抗体反应是特异性的, 在某些情况下, 一种抗原激发的抗体能与另一种不相关的抗原交叉反应。如果两种不同的抗原共享一个同源或相似表位, 或者其锚定区或者如果对一个表位特异的抗体与具有类似的化学性质的不相关的表位结合, 则发生这样的交叉反应。

血小板是巨核细胞盘状细胞质片段, 在髓窦中散布, 随后在外周血液中循环。血小板具有几种生理学功能, 包括在凝固中的主要作用。在中枢部分和外周, 澄清原生质中, 血小板含有颗粒, 但是没有确定的核。

这里使用的凝集作用指一种过程, 通过该过程引起悬浮的细菌, 细胞, 碎屑, 或者相同大小的其它颗粒粘附并且形成凝块。该过程类似于沉淀作用, 但是颗粒更大并且是在悬浮液中而不是在溶液中。

术语凝集作用指体外产生的血小板, 和凝血酶和胶原的凝集, 是导致血栓或止血栓形成的连续机理的部分。

保守的氨基酸取代作用定义为通过改变肽, 多肽, 或蛋白质, 或者其片段的一个或两个氨基酸的氨基酸成分的变化。取代作用一般是具有一般相似性质(例如, 酸性, 碱性, 芳香性, 大小, 带正电荷或负电荷, 极性, 非极性)的氨基酸的取代作用, 使得取代作用基本上不以主要方式改变肽, 多肽或蛋白质特征(例如, 电荷, 等电点, 亲和性, 抗体亲抗原性, 构象, 溶解度)或活性。可以对这样的保守的氨基酸取代进行的典型的取代作用如下各组氨基酸之间的取代作用:

- (i) 甘氨酸(G), 丙氨酸(A), 缬氨酸(V), 亮氨酸(L) 和异亮氨酸(I)
- (ii) 天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)
- (iii) 丙氨酸(A), 丝氨酸(S)和苏氨酸(T)
- (iv) 组氨酸(H), 赖氨酸(K)和精氨酸(R)
- (v) 天冬酰胺(N)和谷酰胺(Q)
- (vi) 苯丙氨酸(F), 酪氨酸(Y)和色氨酸(W)

在主要负责分子的选择性和/或特异性结合特征的高变区中或两侧, 以及分子的其它部分, 例如重链可变盒, 能进行保守氨基酸取代作用。另外, 或者, 通过将分子再构建形成完全大小的抗体, 双抗体(二聚体), 三抗体(三聚体), 和/或四抗体(四聚体)或者形成小

型体或微型体来完成修饰作用。

噬菌粒定义为携带质粒 DNA 的噬菌体颗粒。噬菌粒是经设计而包含来自有丝噬菌体的复制起点例如 M13 或 fd 的质粒载体。因为它携带质粒 DNA, 噬菌粒颗粒不具有足够的空间来包含噬菌体基因组的全部补体。从噬菌体基因组遗失的成分是包装噬菌体颗粒必需的信息。因此, 为了繁殖噬菌体, 需要将期望的噬菌体颗粒与补足遗失的包装信息的辅助噬菌体菌株一起培养。

启动子是 DNA 上的一个区, 在这个区中 RNA 聚合酶结合并引发转录。

噬菌体展示库(也称为噬菌体肽/抗体库, 噬菌体库, 或者肽/抗体库)包括大量噬菌体(一般  $10^8$  至  $10^9$ ), 各噬菌体颗粒具有不同的肽或多肽序列。这些肽或多肽片段可以被构建成可变长度。展示的肽或多肽可以从人抗体重链或轻链衍生, 但是不必局限于此。

药物组合物指含有本发明的肽或多肽和药学可接受载体, 赋形剂或其稀释剂的配方。

药物试剂指在哺乳动物的预防性治疗或诊断中有用的试剂, 所述哺乳动物包括但不限于人, 牛, 马, 猪, 鼠, 狗, 猫, 或者其它温血动物。药物试剂选自放射性同位素, 毒素, 寡核苷酸, 重组蛋白质, 抗体片段, 和抗癌剂。这样的药物试剂的例子包括但不限于抗病毒剂, 包括阿昔洛韦, 更昔洛韦和齐多夫定; 抗血栓形成/抗再狭窄药物, 包括西洛他唑, 达肝素钠, 瑞维肝素钠, 和阿司匹林; 抗炎剂, 包括扎托洛芬, 普拉洛芬, 朵昔康, 乙酰水杨酸 17, 双氯酚酸钠, 布洛芬, 右布洛芬, 舒林酸, 萘普生, 氨托美丁, 塞利克西 (celecoxib), 消炎痛, 罗非克西 (rofecoxib), 和尼美舒利; 抗自身免疫剂, 包括来氟米特, denileulcin diftitox, subreum, WinRho SDF, 去纤苷, 和环磷酰胺; 和抗粘附/抗聚集作用剂, 包括利脉前列素, 氯克罗孟, 和透明质酸。

抗白血病剂是具有抗白血病活性的物质。例如, 抗白血病剂包括抑制或停止白血病细胞或未成熟白血病前细胞的药物, 杀死白血病细胞或白血病前细胞的药物, 提高白血病细胞或白血病前细胞对其它抗白血病剂易感性的药物, 和抑制白血病细胞转移的药物。在本发明中, 抗白血病剂还可以是具有预防, 抑制, 阻止或停止肿瘤血管形成的抗

生血管活性的药物。

通过分析在不同条件下，以具体的时间，在各种组织中等产生的基因产物的量能研究基因的表达模式。当基因产物的量比正常对照物例如没有病的对照物中发现的要高时，认为基因是"超量表达"。

给定细胞可以在其表面上表达具有对于给定抗体的结合位点（或者表位）的蛋白质，但是那个结合位点可以在可以称之为第一阶段（I阶段）的状态中的细胞中以隐性形式（例如，是空间阻碍的或者被阻断，或者没有抗体结合所需要的特征）存在。I阶段可以是，例如，正常的，健康的，没有病的状态。当表位以隐藏形式存在时，给定抗体不识别它，即，抗体不与I阶段的这个表位结合或者不与I阶段的给定细胞结合。但是，例如通过接受修饰作用本身，或者去除阻断，可以暴露出表位，因为附近的或结合的分子被修饰或者因为区域经历构象变化。

修饰作用的例子包括折叠变化，翻译后修饰变化，磷酸脂质化作用变化，硫酸化作用变化，糖基化作用变化，等等。当细胞进入可以称之为第二阶段（II阶段）的不同状态时可以发生这样的修饰作用。第二状态或阶段的例子包括激活，增殖，转化，或恶性状态。被修饰后，可以暴露表位，并且抗体可以结合。

肽模拟物是具有另一个整体例如抗体的相同的功能作用或活性的小分子，肽，多肽，脂质，多肽或其偶联物。

#### 附图简述

图1 说明内切蛋白酶对 GPIb  $\alpha$ 链的酶切位点。

图2 描述证明还原和非还原条件下 Y1 和 Y17 对血小板的结合的蛋白质印迹。

图3 描述 Y1 与血小板 GC 和 KG 细胞的膜级分 4 的不同制备物的反应性。

图4 给出证明 O-唾液糖蛋白内切酶对血小板 GPIb 的酶切消除了 Y1 和 Y17 的结合的蛋白质印迹。

图5 给出证明 O-唾液糖蛋白内切酶酶切之后 Y1 和 Y17 结合类似 glyocalicin 片段的蛋白质印迹。

图6 描述证明特异性 GPIb 蛋白水解消除 Y1 结合血小板的 FACS 分析的结果。

图 7 给出证明 mocarhagin 酶切之后 Y1 与血小板 GPIb $\alpha$  的 N-末端 (His 1-Glu 282) 片段结合的蛋白质印迹。

图 8 给出证明 mocarhagin 酶切之后 Y1 和 Y17 与 glyco-calicin 结合的蛋白质印迹。

图 9 给出证明 Y1 和 Y17 与血小板结合的蛋白质印迹。

图 10 给出类似地无花果蛋白酶酶切之后 Y1 和 Y17 与 glyco-calicin 结合的蛋白质印迹。

图 11 给出证明 Y1 与 GPIb $\alpha$  经组织蛋白酶 G 酶切产生的较大片段反应的蛋白质印迹。

图 12 给出证明 Y1 和 Y17 与 GPIb $\alpha$  经组织蛋白酶 G 酶切产生的较大片段反应的蛋白质印迹。

图 13 给出证明 mocarhagin 和组织蛋白酶 G 对 glyco-calicin 的酶切消除 Y1 的结合的蛋白质印迹。

图 14 给出说明 Y1 和 Y17 与 mocarhagin 和组织蛋白酶 G 酶切的洗涤过的血小板的溶胞产物结合的蛋白质印迹。

图 15 是说明 Y1-scFv 对洗涤过的血小板的凝集作用抑制的图形。

图 16 是说明 Y1-scFv 对富集血小板血浆中的血小板的凝集作用抑制的图形。

图 17 是说明 Y1-IgG 对洗涤过的血小板的凝集作用的诱导的图形。

图 18 是说明 Y1-IgG 对富集血小板血浆中的血小板的凝集作用的诱导的图形。

图 19 提供了 ELISA 检验结果。

图 20 给出说明 Y1 和  $\alpha$ -CD42 (N1-19) 与它们的配体结合的特异性的蛋白质印迹。

图 21 给出 Y1 与应用免疫沉淀和 RP-HPLC 纯化的 KG-1 细胞膜上 Y1-配体的反应性的蛋白质印迹。

图 22 给出说明 O-唾液糖蛋白内切蛋白酶酶切对 Y1 结合的作用的蛋白质印迹。

图 23 给出说明芳基-硫酸酯酶酶切之后对 Y1 与 RP-HPLC-纯化的 KG-1 细胞溶胞产物, 和肝素-BSA 的作用的蛋白质印迹。

图 24 给出 Y1 结合特异性分析中使用的免疫沉淀图示。

图 25 给出 Y1 与来自 AML 患者和正常全血细胞的抗-CD-162 抗体结合之比较蛋白质印迹。

图 26 描述说明抗体 KPL1, PL1, 和 PL2 与 Y1 竞争结合的能力的 FACS 分析的结果。

图 27 描述证明 Y1 结合特异性的 FACS 分析的结果。

图 28 也描述证明 Y1 结合特异性的 FACS 分析的结果。

图 29 是说明在各种肽的存在下 Y1 结合的抑制作用百分比%的图形。

图 30 是描述不同处理组中小鼠肝重的图形。

图 31 是描述不同处理组中小鼠骨髓中 MOLT 细胞百分比的图形。

图 32 是描述不同处理组中小鼠血液中 MOLT 细胞百分比的图形。

图 33 描述表示芳基-硫酸酯酶和 Mocarhagin 酶切对 Y1 结合的影响的蛋白质印迹。

图 34 是描述第 35 天时小鼠肝重 (平均值+/-SEM) 的图形。

图 35 是说明处理对成活率的影响的图形。

图 36 是说明不同处理组中白血病发生率%的图形。

图 37 是说明不同处理组中血液中 KG-1 细胞百分比%的图形。

图 38 是说明实验动物骨髓中 KG-1 细胞百分比%的图形。

图 39 是说明静脉内对小鼠注射  $^{125}\text{I}$ -CONY1 之后血浆中 TCA-沉淀放射性药代动力学的图形。CONY1 的序列如 SEQ ED NO: 204 中给出的。

图 40 是说明静脉内对小鼠注射  $^{125}\text{I}$ -CONY1 之后各种器官/组织的特异性放射性的图形。

图 41 是说明对小鼠静脉内注射  $^{125}\text{I}$ -CONY1 之后各种器官/组织的放射性分布的图形。

图 42 是 Y1-cys-kak 的 Superdex 75 图形。

图 43 说明在还原和非还原条件下二聚体与单体相比较的大小。

图 44 给出证明 IgG Y1 分子的结合水平与 scFv-Y1 的结合水平相比较的 FACS 分析。

图 45 给出证明 Y1 及其它抗体与天然人血小板衍生的 glycojalicin 和与大肠杆菌产生的重组 glycojalicin 结合的蛋白质印迹。

图 46 说明 Y1 二聚体, Y1 scFv (CONY1), 和 Y1 IgG 之间的结合之比较。

图 47 说明 Y1 二硫桥二聚体与 Y1 scFv (CONY1) 之间的结合比较。

图 48 提供 Y1-IgG 的重链和轻链的氨基酸和核苷酸序列。提供了 Y1-HC 的核苷酸序列的可读框(ORF) (SEQ ID NO: 205), Y1-HC 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 206), 和 Y1-LC 的核苷酸序列的 ORF (SEQ ID NO: 207), 和 Y1-LC (SEQ ID NO : 208) 的氨基酸序列。

图 49 提供了 TM1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 209)。

图 50 提供了 Y16 scFv 的氨基酸和核苷酸序列 (SEQ ID NO : 210)。

图 51 提供了 Y1 生物标记物的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 211)。

图 52 提供了 Y1-cys-KAK scFv 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 212)。

### 本发明的详细描述

在本发明中, 使用全细胞来筛选识别白血病细胞表面抗原决定簇的特异性抗体, 其中特异性受体先前是未知的或者没有表征。另外, 应用多步骤生物筛选方法, 通过对一种以上细胞类型筛选来选择噬菌体。这比其中抗原特异性噬菌体抗体的筛选大大依赖于抗固定单一抗原的生物淘选的现有技术方法有显著改善, 使用全细胞作为靶物只有有限筛选。

通过硫酸化部分的存在表征通过该多步骤方法鉴定的某些表位, 例如在炎症, 免疫反应, 感染, 自身免疫反应, 转移, 粘附, 血栓形成和/或再狭窄, 细胞滚动, 和聚集作用这样的不同过程中起重要作用的配体和受体上发现硫酸化酪氨酸残基或者硫酸化碳水化合物或脂质部分, 优选地在两个或多个酸性氨基酸序列中。在病变细胞例如 B-CLL 细胞 AML 细胞, 多骨髓瘤细胞, 和转移细胞上也发现了这样的表位。这些表位对于这些过程的治疗性介导作用和对于诊断方法是有用的。

但是, 这些表位具有可变的一级氨基酸序列, 抗这样的硫酸化表位的抗体经常能与一种以上的分子上的一种以上这样的表位结合或者交叉反应, 但是不必须同时是这种情况。这样的抗体用作抗下面疾病的治疗药物: 癌症 (即作为抗肿瘤剂又作为抗转移剂), 白血病, 自身免疫疾病, 病毒疾病, 涉及异常聚集作用的疾病, 涉及异常粘附的疾病, 梗塞, 心血管疾病和炎症。

为了鉴定结合血小板的抗体，从用来筛选固定的人血小板的人抗体噬菌体展示文库分离人 scFv Y1 抗体。分离出几个克隆（不同的 scFv 抗体）并且表征。这些克隆中的一个，制定为 Y1，出人意料地发现与来自 AML 患者和患有某些其它白血病的患者得到的白血病细胞结合。通过对固定的血小板筛选，也分离到了另一个克隆，Y17，并且发现与人血液结合。

为了鉴定在血小板表面上抗体与之结合的表位，使用 Y1 scFv 抗体和 Y17 scFv 抗体在 SDS-PAGE 对从人血小板提取的蛋白质进行蛋白质印迹。利用这种方法，测得血小板上的 Y1 scFv 和 Y17 scFv 表位是 glycojalicin, CD42 复合体的亚基之一。

从激活的血小板纯化来自人血小板的 glycojalicin 胞外片段。为了精确定位 glycojalicin 分子上 Y1 结合表位，用各种蛋白酶消化，例如无花果蛋白酶，mocarhagin, 组织蛋白酶 G。利用 Y1 抗体作为检测工具，通过蛋白质印迹方法进行分析。另外，在与 Y1 抗体的竞争结合测试中使用商售抗-glycojalicin 抗体（已知与 glycojalicin 的不同表位结合的抗体）来测定 glycojalicin 上 Y1 结合表位。

以这些结果为基础，得出结论：glycojalicin 的氨基酸 272 至 285 在 Y1 与 glycojalicin 的结合中起着重要的作用。另外，因为 Y1 抗体检测不到大肠杆菌产生的 glycojalicin 的 N-末端多肽（氨基酸 1 至 340 和 1 至 480），得出结论：Y1 与它的表位结合以翻译后修饰为基础，例如糖基化作用或硫酸化作用，所述翻译后修饰是已知在大肠杆菌中不发生的修饰。

为了验证这一假设，用从蛋白质去除 N 和 O-连接糖基的酶（糖苷酶）和从蛋白质去除硫酸酯部分的酶（硫酸酯酶）处理纯化的 glycojalicin。糖苷酶不影响 Y1 抗体与 glycojalicin 或 glycojalicin 衍生片段的结合。这个结果表明硫酸化基团对于 Y1 与 glycojalicin 的结合是必需的。

为了进一步验证这些结果，制备以鉴定的表位（glycojalicin 的氨基酸 272 至 285）为基础的硫酸化和非硫酸化合成肽，并且用来评价在它们的存在下 Y1 抗体与 glycojalicin 的结合特异性（ELISA 分析）。与相关的非硫酸化肽相比，硫酸化肽抑制 Y1 抗体与 glycojalicin 的结合高出几倍，表明硫酸化作用对于结合是必需的。

从上述实验结果得出结论：Y1 抗体的表位位于其中有带负电荷氨基酸串的 glyocalicin 上氨基酸 272 和 285 之间。

平行地，研究了 Y1 抗体与 KG-1 细胞（来源于 AML 患者的人细胞系），与各种来自人血浆的蛋白质，和与原发性白血病患者血样的结合。

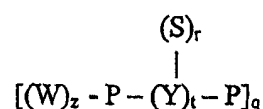
发现 Y1 抗体以相对低的亲和性与两种来自人血浆的蛋白质结合，一种大小分子量是大约 50kD，其被鉴定是纤维蛋白原  $\gamma$  原型并且分子量是大约 80kD 的蛋白质，其被纯化成为补体化合物 4 (CC4) 和人 lumican。这些蛋白质含有硫酸化酪氨酸残基并带有带负电荷氨基酸序列。

KG-1 细胞上 Y1 配体被鉴定为 PSGL-1，其是 E, L-和 P-选择蛋白的受体。根据竞争测试（其中在不同的商业上可购得的抗 PSGL-1 抗体的存在下进行 Y1 抗体与 KG-1 细胞的结合）为基础以及以使用从 PSGL-1 的 N- 末端位点衍生的硫酸化和非硫酸化合成肽的一套实验为基础，PSGL-1 被鉴定是 KG-1 细胞上 Y1 抗体配体。PSGL-1 的 N- 末端位点含有硫酸化酪氨酸残基并带有带负电荷氨基酸序列。

虽然 Y1 抗体与几种分子结合，例如血小板上的 glyocalicin 分子，纤维蛋白原  $\gamma$  原型，人血浆补体化合物 4，和 KG-1 细胞上 PSGL-1 分子，其对来自 AML 或多样骨髓瘤 (MM) 患者的原发性白血病细胞的亲和性比先前提到的表位高几倍。此外，商售抗 PSGL-1 抗体 (KPL1) 不识别所有的来自患者血样中原发性白血病细胞（识别 12 中的 7 个），而 Y1 抗体特异性和选择性地识别它们，这个事实表明与 KG-1 细胞上的不同的原发性白血病细胞上有另外的对于 Y1 抗体的表位。

根据本发明的硫酸化表位的例子包括式 I, II, 和 III 中，描述的那些，以及其衍生物，同系物，模拟物，和变体。

式 (I) :



其中：

W 是除了天冬氨酸和谷氨酸之外的任何氨基酸，

Y 是能被硫酸化的任何天然存在的部分，

P 是  $(A)_m(A)_n(X)_u$  或  $(X)_u(A)_n(A)_m$  或  $(A)_n(X)_u(A)_m$  或  $(A)_n(A)_m(X)_u$  或  $(X)_u(A)_m(A)_n$  或  $(A)_m(X)_u(A)_n$

S 是硫酸酯或硫酸化分子

X 是除了天冬氨酸，谷氨酸或酪氨酸之外的任何氨基酸，

A 是任何带负电荷的氨基酸或亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，丝氨酸，或甘氨酸

q 是 1 至 6

z 是 0, 1, 或 2

r 是 0 或 1

t 是 1, 2 或 3

u 是 0 至 2

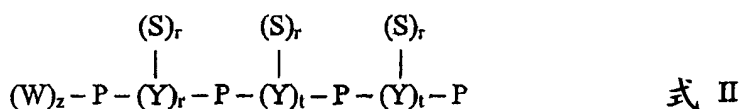
n 是 0 至 3

m 是 0 至 3

其中如果  $n = 0$ ，则  $m > 0$ ；其中如果  $m = 0$ ，则  $n > 0$ ；其中如果 q 是 1，r 是 1，并且如果  $q > 1$ ，则 Y 中至少一个被硫酸化；并且进一步地，其中分离的表位能被抗体，其抗原结合片段，或者其包括抗体或者其包括含有 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 20 的第一高变区的结合片段的复合体结合。

优选的表位是式 I 的表位，其中 W 是甘氨酸，Y 是酪氨酸的肽偶联物或天冬酰胺，丝氨酸或苏氨酸的糖偶联物；A 是谷氨酸， $\gamma$  羧基谷氨酸或天冬氨酸；和 q 是 1, 2, 或 3。在一些实施方案中，Y 是酪氨酸的肽偶联物；q 是 3；并且 r 是 1。

式 II:



其中:

W 是除了天冬氨酸和谷氨酸之外的任何氨基酸，

Y 是能被硫酸化的任何天然存在的部分，

P 是  $(A)_m(A)_n(X)_u$  或  $(X)_u(A)_n(A)_m$  或  $(A)_n(X)_u(A)_m$  或  $(A)_n(A)_m(X)_u$  或  $(X)_u(A)_m(A)_n$  或  $(A)_m(X)_u(A)_n$

S 是硫酸酯或硫酸化分子

X 是除了天冬氨酸，谷氨酸或酪氨酸之外的任何氨基酸，

A 是任何带负电荷的氨基酸或亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，丝氨酸，或甘氨酸

z 是 0, 1, 或 2

r 是 0 或 1

t 是 1, 2 或 3

u 是 0 至 2

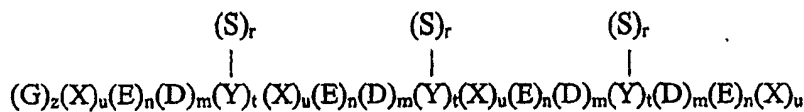
n 是 0 至 3

m 是 0 至 3

其中如果  $n = 0$ ，则  $m > 0$ ；其中如果  $m = 0$ ，则  $n > 0$ ；其中至少一个 Y 被硫酸化；并且进一步地，其中分离的表位能被抗体，其抗原结合片段，或者其包括抗体或者其包括含有 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 20 的第一高变区的结合片段的复合体结合。

优选的表位是式 II 的表位，其中 W 是甘氨酸，Y 是酪氨酸的肽偶联物或天冬酰胺，丝氨酸或苏氨酸的糖偶联物；A 是谷氨酸， $\gamma$  羧基谷氨酸或天冬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，苯丙氨酸，丝氨酸或甘氨酸。在一些实施方案的中，Y 是酪氨酸的肽偶联物；q 是 3；并且 r 是 1。

式 III:



其中:

G 是甘氨酸

E 是谷氨酸

D 是天冬氨酸

Y 是酪氨酸

S 是硫酸酯或硫酸化分子

X 是除上述之外的任何氨基酸

Z 是 0, 1, 或 2

t 是 1, 2 或 3

r 是 0 或 1

u 是 0 至 2

n 是 0 至 3

m 是 0 至 3

其中至少一个 Y 被硫酸化; 其中如果  $n = 0$ , 则  $m > 0$ ; 其中如果  $m = 0$ , 则  $n > 0$ ; 并且进一步地, 其中分离的表位能被抗体, 其抗原结合片段, 或者其包括抗体或者其包括含有 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 20 的第一高变区的结合片段的复合体结合。

优选的表位是式 III 的表位, 其中 r 是 1。

所有的结构式的硫酸化部分也可以是肽-或糖-或脂-偶联物。Y 可以包括脂质, 和/或碳水化合物分子。除了硫酸化作用之外, 表位可以具有至少一个翻译后修饰作用。

在如 GPIb 和 PSGL-1 这样的不同的分子上发现这样的表位, 并且在一些病变细胞例如 B-CLL 细胞, AML 细胞, 多骨髓瘤细胞, 和转移细胞上发现这样的表位。酪氨酸和/或其它部分的硫酸化作用对于与这些表位的结合是特别重要的。已知是被硫酸化酪氨酸的人蛋白质包括如下:

肽	序列
凝血调节蛋白 (408-426)	E C P E G Y I L D D G F I C T D I D E
人 GP1b $\alpha$ (269-287)	DEGDTDLYDYYPEEDTEGD
人肝素辅助因子 II (56-75)	GEEDDDYLDLEEDDDYIDIVD
人纤维蛋白原 $\gamma'$ (408-427)	VRPEHPAET EYDSL YPEDOL
$\alpha$ -2-抗纤维蛋白溶酶	P P M E E D Y P Q F G S P
肠促胰肽酶 (CCK)	R I S D R D Y M G W M D F
$\alpha$ -2-绒毛膜促性腺激素	C H C S T C Y Y H K S-C O O H
补体 C4	MEANEDYEDY EYDELPAK
PSGL-1	QATEYEYLDYDFLPET
因子 VIII (716-731)	GDYYEDSYEDISAYLL
Lumican	GYDYDFPL

#### Y1-制备和筛选

本发明的与式 I-III 的表位结合的抗体的一个例子是全人单克隆

抗体 Y1。Y1 的筛选, 制备, 和初步表征详细地描述于美国专利申请登记号 Nos. 09/751,181 和 60/258,948 中。简要地说, 使用展示 scFv 抗体片段的噬菌体展示文库来获得和制备定向分子, 利用流式细胞计, 特别是荧光激活的细胞分类 (FACS), 来鉴定和分离特异噬菌体克隆, 识别靶细胞的肽或多肽。从没有免疫的人供体的外周血淋巴细胞构建这里使用的噬菌体展示文库。

用已知为生物淘选的多步骤方法筛选和鉴定噬菌体克隆。通过将噬菌体展示蛋白质配体变体 (噬菌体展示文库) 与靶物温育, 通过洗涤技术去除没有结合的噬菌体, 并且特异性洗脱结合的噬菌体, 来进行生物筛选。任选地, 在进行另外的结合和任选的扩增的循环之前将洗脱的噬菌体扩增, 所述任选的扩增富集特异序列的集合, 好处是那些噬菌体克隆带有展示与靶物的最佳结合的抗体片段。几轮之后, 表征各个噬菌体克隆, 并且通过对噬菌体病毒体相应的 DNA 测序来测定克隆展示的肽的序列。

在本发明中, 在初步生物淘选步骤中对没有确定的表位进行血小板筛选, 接着用期望的靶细胞 (例如, B-CLL 细胞, AML 细胞, 多骨髓瘤细胞, 和转移细胞), 靶细胞表面标记物是未知的, 进行克隆筛选。

恶性和病变血液细胞 (例如, 白血病或淋巴瘤) 被表征为未成熟细胞, 其表达通常在部分分化的造血祖代中发现的细胞表面蛋白质。因此, 血小板是鉴定在病变或恶性血细胞上表达的成熟前细胞表面标记物的有吸引力的来源。

选择与血小板和骨髓源白血病细胞, 特别是 AML 细胞结合的 Y1, 一种 scFv 克隆。Y1 scFv 具有序列 SEQ ID NO: 25。Y1 的结合特性主要归因于它的重链 CDR3 区, 其具有序列 SEQ ID NO: 8。也制备了全 Y1-IgG 抗体。

还选择了第二个 scFv 克隆, Y17, 其与血小板和来自人 myleogenous 白血病细胞的细胞系, 特别是 AML 细胞, 结合。Y17 scFv 具有序列 SEQ ID NO: 203。Y17 的结合特性主要归因于它的重链 CDR3 区, 其具有序列 SEQ ID NO: 20。

#### 抗体制备

也可以将根据本发明的 CDRs 插入盒中制备抗体。一种盒, 对多肽使用时或者在本发明中定义时, 指作为构架的并且被认为是单一单元

并且以此操作的连续氨基酸的给定序列。氨基酸可以被置换，插入，去除，或者连接在一个或两个末端。同样，一段或几段氨基酸序列可以被置换，插入，去除，或者连接在一个或两个末端。

显然盒氨基酸序列可以是固定的，而置换的，插入的或连接的序列可以是高度可变的。盒可以由几个结构域构成，每一个具有对最终构建体重要的功能。

本发明抗体的高变区形成本发明抗体的抗原结合位点。抗原结合位点与表位结构互补，抗体与该表位结合，因此称作互补决定区(CDRs)。抗体的各条轻链和重链上有三个 CDRs，每一个位于连接 VH 和 VL 结构域的链的环上。

本发明的具体实施方案的盒包括，从 N-末端，构架区 1 (FR1)，CDR1，构架区 2 (FR2)，CDR2，和构架区 3 (FR3)。

在本发明的实施方案中，在盒中置换不同的区是可能的。例如，盒的 CDR2 和 CDR1 高变区可以被非保守的，或者，优选地，保守型氨基酸取代作用置换或修饰。更具体地，选自 SEQ ID NOs: 30-113 或者其片段的连续氨基酸盒的 CDR2 和 CDR1 区可以分别被 SEQ ID NOs: 115 和 114 置换。甚至更具体地，选自 SEQ ID NOs: 30-32, 35, 37-39, 41, 43, 45, 46, 48, 51, 54, 57, 59-68, 70, 71, 76-85, 87, 89-92, 94, 97, 99, 103, 106, 112, 和 113 或者其片段的连续氨基酸盒的 CDR2 和 CDR1 区可以分别被 SEQ ID NOs: 115 和 114 置换。

在本发明优选的实施方案中，肽或多肽包括重链和轻链，每条链包括第一，第二和第三高变区，它们分别是 CDR3，CDR2 和 CDR1 区。测定结合选择性和特异性，特别对链的 CDR3 区，可能对轻链的 CDR3 区和，优选地，对重链的 CDR3 区，及其对轻链的 CDR2 和 CDR1 区和，优选地，对重链的 CDR2 和 CDR1 区。结合选择性和特异性其次也可以受到第一，第二和/或第三高变区两侧上游区或下游区的影响。

在优选的实施方案中，肽或多肽的 CDR3 区具有选自 SEQ ID NOs: 8-24 的氨基酸序列。

在更优选的实施方案中，重链的 CDR3 区具有选自 SEQ ID NOs: 8-24 的氨基酸序列，CDR2 具有和 SEQ ID NO: 115 相同的氨基酸序列，CDR1 区具有和 SEQ ID NO: 114 相同的氨基酸序列。

在最优选的实施方案中，CDR3 区具有和 SEQ ID NO: 8 相同的

氨基酸序列。

本发明的优选的实施方案是具有和 SEQ ID NO : 8 相同的 CDR3 序列的 scFv , 并且全 scFv 序列与 SEQ ID NO : 25 相同。

在本发明最优选的实施方案中, CDR3, CDR2 和 CDR1 区分别具有氨基酸 SEQ ID NOs : 8, 115 和 114。

在本发明的实施方案中, Fv 肽包括可变重链的 CDR1 和 CDR2 区, 其本身包括具有选自 SEQ ID NOs : 30-113 的氨基酸序列的盒; CDR3 区, 优选可变重链的 CDR3 区, 其具有选自 SEQ ID NO : 8-24 的氨基酸序列; 具有 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列的 CDR3 区两侧的上游区; 具有 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列的 CDR3 区两侧的下游区; SEQ ID NO: 123 或 124 的 0-20 个氨基酸残基的间隔区; 其序列是 SEQ ID NO : 7 的可变轻链区。

类似地, 在另一个实施方案中, CDR2 区两侧的上游区 具有 SEQ ID NO: 119 的氨基酸序列, CDR2 区两侧的下游区具有 SEQ ID NO: 118 的氨基酸序列, CDR1 区两侧的上游区具有 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列, CDR1 区两侧的下游区具有 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列。

本发明优选的实施方案对肽或多肽提供了, 其中第二和第三高变区分别是 CDR2 和 CDR1 高变区, 并且其中 CDR3 氨基酸序列是 SEQ ID NO : 8, 其中 CDR2 氨基酸序列是 SEQ ID NO : 115, 其中 CDR1 氨基酸序列是 SEQ ID NO : 114, 其中 CDR3 区两侧的上游区具有 SEQ ID NO: 117 的氨基酸序列, CDR3 区两侧的下游区具有 SEQ ID NO: 116 的氨基酸序列, CDR2 区两侧的上游区具有 SEQ ID NO: 119 的氨基酸序列, CDR2 区两侧的下游区具有 SEQ ID NO: 118 的氨基酸序列, 其中 CDR1 区两侧的上游区具有 SEQ ID NO: 121 的氨基酸序列, CDR1 区两侧的下游区具有 SEQ ID NO: 120 的氨基酸序列。

本发明另一个优选的实施方案提供了 Fv 分子, 其包括具有第一, 第二和第三高变区的第一链和具有第一, 第二和第三高变区的第二链, 其中第一链的高变区的一个具有选自 SEQ ID NOs : 8-24 的序列, 并且其中第二链的高变区的一个具有选自 SEQ ID NOs : 1-6 和 125-202 的序列, 并且其中第一, 第二和第三高变区分别是 CDR3, CDR2 和 CDR1 区, 并且其中 Fv 是 scFv 或 dsFv, 并且任选地带有一个或多个标记。

本发明另一个实施方案对肽或多肽提供了 (i) 其中第一链和第二

链各自包括选自 SEQ ID NOs : 8-24 的第一高变区; 或(ii) 其中第一和第二链的第一高变区是相同的, 并且选自 SEQ ID NOs : 8-24; 或(iii) 其中第一链的第一高变区选自 SEQ ID NOs : 8-24, 并且第二链的第一高变区选自 SEQ ID NOs : 1-6 和 125-202; 或(iv) 其中第一链的第一高变区选自 SEQ ID NOs : 1-6 和 125-202, 并且第二链的第一高变区选自 SEQ ID NOs : 8-24。

另一个实施方案对本发明肽或多肽提供了其中第一链的第二和第三高变区分别是 SEQ ID NOs : 114 和 115。

对于这里描述和详细说明确定的所有的小于等于 25 个氨基酸残基的氨基酸序列(例如, CDR 区, CDR 两侧区), 理解和认为是本发明的另一个实施方案, 其中这些氨基酸序列在其范围内包括一个或两个氨基酸取代, 并且优选地取代作用是保守的氨基酸取代。对于这里描述和详细说明确定的所有的大于 25 个氨基酸残基的氨基酸序列, 理解和认为是本发明的另一个实施方案, 其中这些氨基酸序列在其范围内包括与源序列有大于等于 90% 序列相似性的氨基酸序列(Altschul 等, 核酸研究(Nucleic Acids Res.), 25, 3389-3402 (1997))。相似或同源氨基酸定义是具有相似性质例如酸性, 碱性, 芳香性, 大小, 正电荷或负电荷, 极性, 非极性的不同的氨基酸。

通过两个不同的肽或多肽的氨基酸序列比较确定氨基酸相似性或同源性或序列相似性百分比。将两个序列比对, 通常通过应用以此目的设计的各种计算机程序之一, 比较各位置的氨基酸残基。然后确定氨基酸同一性或同源性。然后应用一种算法来确定氨基酸相似性百分比。一般优选的是比较氨基酸序列, 因为大大提高了肽, 多肽或蛋白质分子之间的精密关系检测的灵敏度。蛋白质比较可以考虑保守氨基酸取代, 通过保守氨基酸取代, 如果不相同的氨基酸具有相似的物理和/或化学性质, 则错配也得到一个正分值(Altschul 等, Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402 (1997))。

在本发明的实施方案中, 各条轻链和重链的三个高变区可以在两条链之间和链中和/或链间三个高变位点之间交换。

#### 抗 V<sub>L</sub> 的多克隆抗体(从 Y1 衍生)

使用下面的合成寡核苷酸引物从 Y1 克隆 PCR-克隆出编码 V<sub>L</sub> 结构域(可变轻链)的 DNA 片段(从 Nissim I 文库中能获得相同的 DNA 片

段(Nissim 等,"来自‘单点’噬菌体展示文库的抗体片段作为免疫化学试剂", EMBO J. 13 (3): 692-698 (1994))或者甚至使用相同的方法来自人基因组): 寡 5'-NdeI (TTTCATATGGAGCTGACTCAGGACCCTGCT) 和寡 3'-EcoRI (TTTGAATTCCTATTTTGCTTTTGCGGC)。聚合酶链反应扩增之后 (PCR 条件: 94° 1', 56° 2', 72° 2' x30, 然后 65° 5'), 将得到的 DNA 片段用 NdeI 和 EcoRI 限制性内切酶消化, 并且克隆到预先消化过的质粒的 NdeI 和 EcoRI 限制性酶切位点, 这预先消化过的质粒是用于在大肠杆菌中原核表达重组蛋白质的 IPTG 可诱导表达载体。用连接混合物转化大肠杆菌细胞, 并且使用上述寡核苷酸引物通过 PCR 扩增筛选阳性克隆。培养携带这种质粒的细胞并且通过 IPTG 诱导表达。通过离心从 1 升 IPTG 诱导后培养物离心收集细菌细胞, 分离包涵体并且溶解于胍-HCl + DTT, 通过在含有 Tris-精氨酸-EDTA 的缓冲液中稀释而重折叠。5-10°C 下重折叠 48 小时之后, 将含有蛋白质的溶液透析并且浓缩至 20mM 甘氨酸 pH 9。通过使用离子交换树脂, HiTrapQ, 并且用梯度 NaCl 洗脱, 将透析过的含有蛋白质的溶液再次纯化。通过 SDS PAGE 并且通过凝胶过滤分析主峰。从原始的 1 升培养物获得至少 10 毫克纯化的 V<sub>L</sub>。

以 2-4 周间隔, 在 CFA (弗氏完全佐剂) 的存在下用 V<sub>L</sub> (400mg) 然后在 IFA (弗氏不完全佐剂) 的存在下用 V<sub>L</sub> (200mg) 免疫兔。获得的滴度低 (1: 50-1: 100), 可能是由于来自人和兔的 V<sub>L</sub> 之间的高同源性。

#### 抗 scFv 抗体的多克隆抗体

分别培养来自 Nissim I 抗体噬菌体展示文库 (Nissim 等,"来自‘单点’噬菌体展示文库的抗体片段作为免疫化学试剂", EMBO J. 13 (3): 692-698 (1994)) 的两个 scFv 抗体克隆 (Y1 和 N14)。IPTG 诱导之后培养物在 22°C 下培养 16 小时。从细菌细胞周质收获 scFv 抗体片段并且在蛋白 A-琼脂糖柱子上纯化。根据 Harrison J. L., Williams S. C., Winter G, 和 Nissim A., 酶学方法 (Methods Enzymol.) 267: 83-109 (1996) 实施所有的细菌克隆培养的程序, 诱导方案, scFv 抗体片段收获和抗体片段纯化。基本上, 为了制备兔产生的多克隆抗体, 能从 Nissim I 抗体噬菌体展示文库筛选两个或多个各 scFv 克隆, 所述多克隆抗体识别 Nissim 文库中存在的任何个体 scFv 抗体或者任何 IgG 或者其片段, 前提是它包含相同的 V<sub>L</sub> 或者其片段。

以 2-4 周间隔, 在弗氏完全佐剂的存在下, 用 400 mg 的 1:1 比例的纯化的 scFv 抗体片段的混合物, 然后在弗氏不完全佐剂的存在下, 用 200 mg 的那种混合物免疫。

为了通过流式细胞仪 (FACS) 检测 scFv 抗体与细胞或者在 SDS-PAGE (蛋白质印迹分析) 上与各种蛋白质级分的结合, 使用直接来自免疫的兔的血清的或者在蛋白 A-琼脂糖柱子上纯化过的多克隆抗 scFv 抗体。

### 血小板上 Y1 结合位点的表征

循环血小板是从巨核细胞外周释放的细胞质颗粒。在止血中血小板起着重要的作用。血管受到损伤时, 血小板粘附在受伤的组织表面并且彼此粘附 (内聚)。这种作用快速发生, 在血管受伤部位形成没有结构的块 (通常称作血小板栓或血栓)。内聚现象, 也已知为聚集作用, 可以由各种物质或激动剂体外引发, 例如: 胶原, 腺苷二磷酸 (ADP), 肾上腺素, 血清素, 和瑞斯托菌素。聚集作用是体外进行的多种测试之一, 是血小板功能的一个量度。

现有技术几组数据证明 GPIb $\alpha$  的 Asp269 和 Asp287 之间带负电荷的氨基酸串对于与血小板结合的 von Willebrand Factor (vWF) 是重要的, 其接着介导与受伤的血管的血小板粘附, 动脉狭窄区中高剪切力诱导的血小板凝集作用, 低浓度凝血酶诱导的血小板激活作用。Ward, C. M., 等, 生物化学 (Biochemistry) 35 (15): 4929-39 (1996)。vWF 与 GPIb 的相互作用依赖于激活作用或当与基质结合或者暴露给剪切力时 vWF 结构构象变化。与 vWF 例如瑞斯托菌素和 botrocetin 结合的特异调节剂体外模仿该过程。

### Y1 与血小板细胞提取物的反应性

利用免疫印迹和内切酶裂解技术来鉴定血小板表面膜上 Y1 的表位。图 1 给出了 GPIb $\alpha$  分子上内切酶裂解位点。

### 蛋白质印迹分析

通过对人血小板的生物筛选从噬菌体抗体文库筛选 Y1 scFv, 并且发现与固定的和洗涤过的人血小板结合。利用 ELISA 测定和 FACS 分析进行 Y1 的表征。

为了表征血小板膜上 Y1 结合的表位, 通过 SDS-PAGE (还原条件和非还原条件下) 分离血小板表面蛋白质, 并且使用生物素标记的 Y1

进行免疫印迹。这项实验的结果证明 Y1 与分子量 135 kDa 的蛋白质在还原条件下反应,与分子量大约 160kDa 的蛋白质在非还原条件下反应。这些分子量与血小板 GPIb $\alpha$  相一致,血小板 GPIb $\alpha$  在还原条件下分子量是 135 kDa。非还原条件下,与 GPIb $\beta$  二硫键键合的 GPIb $\alpha$  链具有 160-kDa 分子量(图 2)。

GPIb $\alpha$  链与 GPIb $\beta$  二硫键键合,形成血小板膜蛋白 GPIb。已知单克隆抗体, MCA466S (Serotec) 和 S. C. 7071 (Santa Cruz) 分别与 GPIb $\alpha$  的 C-末端片段和与 GPIb $\alpha$  的 N-末端片段结合,并且发现和还原条件下和非还原条件下与 Y1 反应的相同的片段反应(还原条件下只使用 S. C.)。这些结果进一步证明 Y1 与 GPIb $\alpha$  血小板表面蛋白质结合。

通过 Western 分析对半纯化 GPIb 片段(glycocalicin)的进一步分析证明事实上 Y1 与 GPIb 复合体的  $\alpha$  亚基结合。

大肠杆菌中表达的重组 GPIb 的 Western 分析证明,大肠杆菌中表达的 GPIb 不与 Y1 反应。因此,表明在大肠杆菌中不发生的翻译后修饰对于 Y1 结合是必需的。无论 N-还是 O-多糖酶都不影响 Y1 与 KG-1 细胞的结合。但是,用芳基硫酸酯酶或者通过蛋白水解酶处理配体能灭活(消除)Y1 结合。(图 3)。

#### glycocalicin (GC) 的 GPIb $\alpha$ 片段上 Y1 表位位点的定位

为了进一步定位 Y1 结合位点,使用具有已知的酶切位点的特异性内切酶消化 GPIb,并且对该片段测试 Y1 结合。

#### O-唾液糖蛋白内切酶对 Y1 与血小板 GPIb $\alpha$ 结合的作用

来自溶血巴斯德氏菌(*Pasteurella haemolytica*)(Cedarlan CLE 100)的 O-唾液糖蛋白内切酶选择性酶切人血小板 GPIb 并且特异性地只酶切含有唾液酸化 O-连接多糖地蛋白质。O-唾液糖蛋白内切酶不酶切 N-连接地糖蛋白或者没有糖基化的蛋白质。据报道这种酶酶切 GPIb,它是高度 O-糖基化的,但是不酶切 GPIIb-IIIa 或者血小板上的其它受体。为了进一步确定 Y1 与分子的结合,用 O-唾液糖蛋白内切酶消化 GPIb $\alpha$ 。

免疫印迹(图 4 和 5)和 FACS 分析(图 6)证明洗涤过的血小板与 O-唾液糖蛋白内切酶温育取消了 Y1 结合,和单克隆抗体 MCA466S (Serotec) 的结合,该单克隆抗体抗 GPIb $\alpha$ 。该内切酶不改变抗

GPIIb/IIIa 单克隆抗体(抗-CD61)的结合(图 4)。这些结果提供了另外的证据,即血小板膜上 Y1 的受体是 GPIb $\alpha$ 。

#### GPIb 的 Mocarhagin 酶切 -- Y1 表位的图谱

Mocarhagin 是一种眼镜蛇蛇毒金属蛋白酶,它在残基 glu-282 和 asp-283 之间的一个单一位点特异性酶切血小板 GPIb $\alpha$ ,从而产生两种稳定产物: 约 45-kDa N-末端片段(His1-Glu282),它释放到上清液中,和膜结合的约 95 kDa C-末端片段。

用 mocarhagin 处理洗涤过的血小板,并且在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上对血小板溶胞产物进行电泳。使用 Y1 的 mocarhagin 处理过洗涤过的血小板的溶胞产物的蛋白质印迹分析表明缺少了相应于 GPIb $\alpha$  的泳带(135 kDa) 并且 Y1 与 N-末端大约 45 kDa 片段结合。抗 GPIb $\alpha$  的 C-末端的单克隆抗体 (MCA466S) 与大约 95 kDa C-末端片段反应,抗 GPIb $\alpha$  的 N-末端的单克隆抗体 (S. C. 7071) 与 Y1 识别的相同的大约 45 kDa 片段反应(图 7)。

用 Mocarhagin 处理 glycojalicin (可溶的, GPIb $\alpha$  的胞外片段) 给出和用洗涤过的血小板观察到的那些结果相同的结果,表明 Y1 和单克隆抗体 S. C. 7071 与 GPIb $\alpha$  的大约 45 kDa N-末端酶切产物片段结合(图 8)。这些结果提示 Y1 的表位包含在序列 His1-Glu282 中。

#### Y17 克隆的表征 -- 与 GPIb 结合

Y17, 本发明的第二种 scFv 人抗体片段,以和 Y1 一样的方法筛选,利用用来表征 Y1 的方法来表征[参见实施例 17]。简要地说,通过对人血小板生物筛选从噬菌体抗体文库筛选 Y17。利用 ELISA 测试和 FACS 分析进行 Y17 的表征。发现 Y17 与固定的和洗涤过的人血小板都结合。为了进一步表征结合 Y17 的血小板膜上的受体,通过 SDS-PAGE 和免疫印迹,使用标记的-Y17,在还原和非还原条件下,分离血小板蛋白质。结果证明在还原条件下 Y17 与表观分子量为 135 kDa 的蛋白质反应,并且在非还原条件下与表观分子量为大约 160 kDa 的蛋白质反应。这些结果与还原条件下具有 135 kDa 的分子量,非还原条件下具有 135 kDa 的分子量的血小板 GPIb $\alpha$  相一致,并且由二硫键连接 GPIb $\alpha$  的 GPIb $\alpha$  链组成。在还原和非还原条件下,抗识别 GPIb $\alpha$  的 N-末端的 GPIb $\alpha$  单克隆抗体 S. C. 7071 (Santa Cruz) 的 C-末端片段的单克隆抗体, MCA466S (Serotec) 与和 Y17 相同的泳带反应(图 2)。

蛋白质印迹表明 Y1 和 Y17 类似地结合血小板溶胞产物。(图 9)。

0-唾液糖蛋白内切酶或无花果蛋白酶酶切 glyocalicin 之后, Y1 和 Y17 也类似地结合 glyocalicin (图 5 和 10)。

FACS 分析表明 Y1 和 Y17 具有相似的与血小板和 KG-1 的结合曲线。另外, 两者都结合 Raji 和 T2 细胞。相反, TM1 (SEQ ID NO: 209), Y16 (SEQ ID NO: 210) 和 Y45 不结合任何上述人细胞系。

这些结果证明, Y1 和 Y17, 本发明的两种单克隆抗体片段, 在不同的细胞共同由一种表位, 并且这种表位不被任何其它试验的单克隆抗体识别。

#### GPIb 的组织蛋白酶 G 酶切 - Y1 表位图谱

组织蛋白酶 G (Sigma C4428), 一种嗜中性白细胞丝氨酸蛋白酶, 在残基 Leu-275 和 Tyr-276 之间的第一酶切位点和残基 Val-296 和 Lys-297 之间的第二酶切位点酶切 glyocalicin。glyocalicin 的组织蛋白酶 G 处理产生两种 N-末端片段: 小的 N-末端 42 kDa 片段 (His1-Leu275), 大的 N-末端 45 kDa N-末端片段 (His1-Val-296), 和相应的大约 95 kDa C-末端片段(图 1)。

组织蛋白酶 G 消化产生的 Glyocalicin 和 glyocalicin 片段在 SDS-聚丙烯酰胺上进行电泳, 并且转移给硝基纤维素进行蛋白质分析。在免疫印迹中, Y1 与较大的 N-末端片段 (His 1-Val-296) 结合, 而不与较小的 N-末端片段 (His1-Leu275) 结合, 也不与 C-末端片段结合。同样, 商售单克隆抗体 SZ2 (Immunotech 0719), 已知它识别 GPIba 上残基 Tyr276 和 Glu282 之间的表位, 也只与较大的 N-末端片段反应 (图 11 和 12)。

此外, 已知识别 His1 和 Leu 275 之间的表位的单克隆抗体 S. C. 7071, 与两个 N-末端片段结合。Y1 不与 S. C. 7071 结合的 His 1-Leu 275 片段结合。这些结果表明 Y1 的表位位于 Tyr 276-Val 296 序列中第一和第二组织蛋白酶 G 酶切位点之间, 更可能在氨基酸约 276 至 282 之间。

#### 合成的部分 GPIba 肽对 Y1 结合纯化的 Glyocalicin 和结合洗涤过的血小板 (WP) 的影响

进行 ELISA 测试来评价 GPIb 衍生的合成的肽对 Y1 与纯化的 glyocalicin 结合的影响。另外, 使用洗涤过的血小板进行 FACS 分

析。为了评价 GPIb 的 Y1 结合位点中的硫酸化酪氨酸的重要性, 应用竞争结合 FACS 分析。浓度 1 微克的 Y1-scFv 与浓度 2.5 和 200  $\mu\text{M}$  的不同的肽预先温育。室温下预温育 30 分钟之后, 将混合物加给含有约  $10^7$  洗涤过的血小板的试管, 并且使用多克隆兔抗-scFv-PE 评价 Y1 与洗涤过的血小板的结合。通过测定 Y1 与洗涤过的血小板的残留结合评价与对照结合(只有 Y1)相比较的肽的抑制作用。表 1 和表 3 分别描述了肽和结果, 并且类似于在 ELISA 测试中(表 2) 使用相同的肽观察到的结果。在这两项测试中, 如下测定 Y1 结合的对照水平。用 (a) 纯化的 glycofalin 或 (b) 洗涤过的血小板包被聚苯乙烯微量滴定 maxisorp™ 平板。充分洗涤之后, 加入 0.5 微克/孔的 Y1。然后平板与兔抗-scFv 温育, 然后加入抗兔-HRP (辣根过氧化物酶) 和 HRP 底物。通过产生的颜色的强度测量抗兔 HRP 结合的水平, 并且抗兔-HRP 结合的水平与抗 Y1-scFv 的结合水平和 Y1 的结合水平有相关性。测定  $A_{405}$  的光密度。每个样品测定两次, 并且计算平均值。

通过将各种浓度的肽与恒定量的 Y1 混合来评价合成的 GPIba 肽对 Y1 与纯化的 glycofalin 结合的影响。和对于没有肽存在下评价 Y1 结合的描述一样, 室温下温育 30 分钟之后, 将混合物加给纯化的 glycofalin 包被聚苯乙烯微量滴定 maxisorb 平板。和对于没有肽存在下评价 Y1 结合的描述一样, 使用兔抗 Y1scFv 和抗兔-HRP 抗体通过测定 Y1 与 glycofalin 的残留结合来评价肽的抑制效果。使用代表序列 268 至 285 的不同亚组的四种肽和对照肽进行这项研究。在不同的浓度下测试各种肽: 200  $\mu\text{M}$ , 25 $\mu\text{M}$ , 2.5 $\mu\text{M}$ , 和 0.5 $\mu\text{M}$ 。

五种肽如下面表 1 所示:

表 1

肽名称	特征	序列
EGR	阴性对照肽	REEGRQHFFLLEGRSSYS
P-1	GPIba 的残基 268-285	GDEGDTDLYDYYPEEDTE
P-1-S	GPIba 的残基 268-285	GDEGDTDLY*DY*Y*PEEDTE
P-2-S	GPIba 的残基 273-285	TDLY*DY*Y*PEEDTE
P-3-S	GPIba 的残基 268-280	GDEGDTDLY*DY*Y*P

Y' 与 Y 相同, 它是硫酸化酪氨酸。

下面表 2 和表 3 给出了从这些测试获得的结果。

表 2

合成的 GPIb $\alpha$  肽对 Y1 结合 Glycocalicin 的作用

0.25 微克/孔 Y1

肽浓度	Y1 残基结合百分比 (占基线的百分比 %)			
	200 $\mu$ M	25 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
EGR	85	89	100	121
P-1	61	71	94	88
P-1-S	0	25	62	89
P-2-S		15	52	78
P-3-S		21	67	80

这些结果清楚地表明, 含有硫酸化酪氨酸的肽的抑制作用显著高于对于没有硫酸化的肽所观察到的。这种作用是剂量依赖性的, 包含较长 N' (上游) 侧翼序列的肽比具有延伸的 C' (下游) 侧翼序列的肽具有更高的抑制作用。这些结果清楚地支持这样的结论, 即 Y1 与 GPIb $\alpha$  结合需要硫酸化酪氨酸, 来自硫酸化区的上游和下游序列增强 Y1 与 GPIb $\alpha$  结合。

表 3

根据竞争 FACS 分析描述的合成的 GPIb $\alpha$  肽对 Y1 结合洗涤过的血小板的影响

肽浓度	Y1 的残基结合 (占基线的百分比) (Geo 平均值)	
	200 $\mu$ M	2.5 $\mu$ M
EGR	119	96
P-1	87	106
P-1-S	5	41
P-2-S	7	61
P-3-S	26	82
对照 - 没有肽	114	

这些结果进一步支持这样的假设: 特异区中硫酸化酪氨酸残基对于 GPIb 上 Y1 识别是重要的。总之, mocarhagin 和组织蛋白酶 G 的

N-末端肽蛋白水解片段的分析表明 GPIb $\alpha$  氨基酸序列 Tyr276-Glu-282 是或者包含用于 Y1 结合的重要的表位(图 3)。进一步表征表明,除了 glycocalicin 的残基 276-282 (硫酸化阴离子序列), Y1 的识别位点中也包括上游氨基酸 283-285 。

#### Y1 scFv, Y17 scFv 和 IgG Y1 对血小板功能的生物活性

定位化实验表明 Y1 结合位点在  $\alpha$ -凝血酶和 vWF 结合位点, 它对于血小板聚集作用是重要的。研究 Y1 scFv, Y17 scFv, 和 Y1 IgG 对洗涤过的血小板和对富集血小板的血浆的结合, 确定这种结合对血小板聚集作用的影响。

#### Y1-scFv 和 Y17-scFv 对洗涤过的血小板(W. P.)聚集作用的影响

在 PRP 中测定由于存在栓塞物质的聚集作用, 同时测定洗涤过的血小板的聚集作用。以各种浓度的 Y1 测试 Y1 (scFv) 对洗涤过的血小板的聚集作用的影响。在暴露给血小板凝集作用和聚集作用的诱导剂瑞斯托菌素之前, 血小板在 37 $^{\circ}$ C 下与 Y1 scFv, Y17 scFv, Y16-scFv, 或对照 TM-1 scFv 预温育 4 分钟。

表 4 和图 15 给出了该项研究的结果。血小板与 25 微克/毫升 Y1 scFv 预温育抑制瑞斯托菌素诱导的洗涤过的血小板的凝集作用。Y1 浓度 12.5 微克/毫升时, 只观察到血小板凝集作用的部分抑制作用。Y1 浓度是微克/毫升下, 没有观察到血小板凝集作用的抑制作用。这些结果表明 Y1 对洗涤过的血小板的凝集作用的抑制活性是剂量依赖性的。洗涤过的血小板与阴性对照 scFv TM1 温育对瑞斯托菌素诱导的血小板的凝集作用没有影响。不管 Y17 还是 Y16, 它是从相同的噬菌体展示文库并且使用用于筛选 Y1 的相同的多步骤程序筛选的另一个 scFv 克隆, 都不显著抑制洗涤过的血小板的凝集作用。

表 4

ScFv 浓度	抑制百分比 %	凝集作用 %
TM-1 scFv 25 微克/毫升	10	90
Y1 scFv 25 微克/毫升	77	23
Y1 scFv 12.5 微克/毫升	33	67
Y1 scFv 14 微克/毫升	8	92
Y17 scFv 25 微克/毫升	15	85
Y16 scFv 38 微克/毫升	14	86

以瑞斯托菌素处理为基础校正 100% 凝集作用。

#### Y1-scFv 和 Y17-scFv 对富集血小板血浆聚集作用的影响

以各种浓度的 Y1 测试 Y1 (scFv)对富集血小板血浆 (PRP) 的聚集作用的影响。在暴露给血小板凝集作用和聚集作用的诱导剂瑞斯托菌素之前, PRP 在 37℃ 下与 Y1 scFv, Y17 scFv, 或对照 TM-1 scFv 预温育 4 分钟。当在加入瑞斯托菌素之前将 scFv 加给 PRP 时观察到可逆转抑制作用, 它是剂量依赖性的。

表 5 和图 16 给出了该项研究的结果。根据头 4 分钟的记录, 最终浓度是 50 微克/毫升的 Y1 抑制瑞斯托菌素诱导的血小板富集血浆中血小板聚集作用的约 80 %。Y1 浓度是 25 微克/毫升时没有血小板聚集作用的显著抑制作用。Y17 不抑制血小板的聚集作用。洗涤过的血小板与 50 微克/毫升的 I 阴性对照 scFv, TM1 温育, 对瑞斯托菌素诱导的血小板聚集作用没有影响。

表 5

ScFv 浓度	抑制百分比 %	聚集作用 %
TM-1 scFv50 微克/毫升	0	100
Y1 scFv50 微克/毫升	80	20
Y1 scFv25 微克/毫升	13	87
Y17 scFv38 微克/毫升	0	100

以瑞斯托菌素处理为基础校正 100% 聚集作用。

#### Y1-IgG 对洗涤过的血小板 (W. P.) 的凝集作用的影响

由于其天然结构, 完整 IgG Y1 有两个 GPIb $\alpha$  结合位点并且一个结合位点是对 Fc 受体。可能的是, 如果完整 IgG Y1 结合两种 GPIb $\alpha$  分子, 它将激活血小板并且诱导血小板凝集作用。此外, 因为血小板具有 Fc-受体, Y1-IgG 能通过与 GPIb $\alpha$  结合和与 Fc-受体结合而诱导血小板凝集作用, 从而产生通过每一种 IgG Y1 与三种血小板结合的血小板凝集作用。因此, 在有或没有瑞斯托菌素的存在下以不同浓度的 Y1-IgG 测定 IgG Y1 对洗涤过的血小板的聚集作用的影响。37℃ 下检测 Y1-IgG 对血小板聚集作用的诱导 4 分钟, 之后加入瑞斯托菌素。

表 6 和图 17 给出了没有激动剂的结果。单独的最终浓度是 50 微克/毫升的 Y1-IgG 诱导洗涤过的血小板的正常凝集作用的约 39%的血小板凝集作用。37℃ 下检测 Y1-IgG 对血小板聚集作用的诱导 4 分钟,

之后加入瑞斯托菌素。加入瑞斯托菌素之后没有发现另外的对血小板凝集作用的影响：观察到正常的血小板凝集作用。但是，当与微克/毫升的 Y1 温育时没有血小板凝集作用的诱导。

当如上所述使用抑制血小板凝集作用的商售单克隆抗体抗 GPIIb $\alpha$  (CD42) (Pharmigen) 时，或者对照人  $\lambda$ - (Sigma) 时，血小板凝集作用没有减弱。

表 6

IgG Ab 浓度	抑制作用 %		凝集作用 %	
	没有瑞斯托菌素	有瑞斯托菌素	没有瑞斯托菌素	有瑞斯托菌素
Y1-IgG 50 $\mu$ g/ml	61	5	39	95
Y1-IgG 25 $\mu$ g/ml	65	5	35	95
Y1-IgG 12.5 $\mu$ g/ml	62	5	38	95
Y1-IgG 3.5 $\mu$ g/ml	66	14	34	86
Y1-IgG 1 $\mu$ g/ml	92	7	8	93
小鼠抗-人 CD42 IgG 20 $\mu$ g/ml	99.5	100	0.5	0
对照人 IgG 20 $\mu$ g/ml	99.5	25	0.5	75
对照瑞斯托菌素 激活作用	-	0	-	100

#### Y1-IgG 对血小板-富集-血浆 (PRP) 的聚集作用的影响

在有或没有瑞斯托菌素的存在下以不同浓度的 Y1-IgG 测定 IgG Y1 对血小板-富集-血浆 (PRP) 的聚集作用的影响。37 $^{\circ}$ C 下检测 Y1-IgG

对血小板聚集作用的诱导 4 分钟，之后加入瑞斯托菌素。

表 7 和图 18 给出了结果。加入瑞斯托菌素之后没有发现对血小板凝集作用的影响：观察到正常的血小板聚集作用。加入瑞斯托菌素之前，最终浓度是 50 微克/毫升的 Y1-IgG 诱导血小板-富集-血浆中的血小板聚集作用。加入瑞斯托菌素之前，浓度是微克/毫升的 Y1-IgG 仅部分诱导血小板聚集作用。10 微克/毫升，4 微克/毫升，或 1 微克/毫升浓度的 Y1-IgG 没有观察到血小板聚集作用的抑制。20 微克/毫升的抑制血小板凝集作用的商售单克隆抗体抗 GPIb $\alpha$  (CD42) (Pharmigen) 不诱导血小板凝集作用。和 Y1-IgG 相同浓度的对照人  $\lambda$ -IgG (Sigma) 不诱导血小板凝集作用。

表 7

IgG 浓度	抑制作用 %		聚集作用 %	
	没有瑞斯托菌素	有瑞斯托菌素	没有瑞斯托菌素	有瑞斯托菌素
Y1-IgG 50 $\mu$ g/ml	64	0	36	100
Y1-IgG 25 $\mu$ g/ml	75	8	25	92
Y1-IgG 10 $\mu$ g/ml	93	10	7	90
Y1-IgG 4 $\mu$ g/ml	98	5	2	95
Y1-IgG 1 $\mu$ g/ml	95.5	0.5	0.5	99.5
人抗 CD42 IgG 20 $\mu$ g/ml	99.5	0.5	0.5	99.5
对照瑞斯托菌素激活作用	-	0	-	100

#### Y1 血浆可溶配体和细胞系的鉴定

抗 GPIb $\alpha$  (CD42b) 抗体识别血小板溶胞产物和 glycojalicin，但是不识别 KG-1 细胞溶胞产物 (Y1 结合正骨髓细胞系) 或 RAJI 细胞

溶胞产物 (对于 KG-1 细胞对于 Y1 结合是阳性的浓度下对于 Y1 结合是阴性的 B 细胞系)。相反, Y1 识别 glyocalicin, 血小板溶胞产物, 和 KG-1 细胞, 但是不识别 RAJI 细胞提取物。阴性对照 scFv-181, 不识别任何相关的蛋白质 (图 20)。

在 Y1 和 SZ2 (抗 GPIb 的硫酸化区的 Mab) 之间的比较分析中进一步证明 Y1 交叉反应性的唯一性。和 SZ2 相反, Y1 只与 GPIb 结合, 但是还与血浆蛋白质结合, 和如下所述的来自骨髓的细胞提取物结合。

#### 人血浆中的 Y1 配体

两种蛋白质与正常的以及白血病患者血浆中的 Y1 发生免疫反应。第一种被指定为 H P-配体 1, 它在还原条件下具有约 50 kDa 的分子量, 在非还原条件下具有 > 300 kDa 的分子量, 并且从凝结之后的血清中完全消失; 和 (2) H P-配体 2, 它在还原和非还原条件下都具有约 80 kDa 的分子量并且保留在凝结之后的血清中。使用 Q-琼脂糖柱反相 (RP-HPLC) 2D 凝胶电泳纯化之后, 分析肽, 这种约 50 kDa 配体被鉴定为人纤维蛋白原的  $\gamma$  链 ( $\gamma$  原型) 的正常变体。序列 VRPEHPAETEDSLYPEDDL, 只在纤维蛋白原  $\gamma$  原型中存在, 不是纤维蛋白原  $\gamma$  的大量形式, 并且类似于含有硫酸化酪氨酸的 GPIb 阴离子区。最可能的是这是对于 Y1 的结合位点。这种约 80 kDa 被鉴定为补体化合物 4 (CC4) 和 Lumican。如上所述, 它包含硫酸化酪氨酸残基并且带有带负电荷氨基酸的一段序列。

#### Y1 与原发性白血病细胞的结合

FACS 分析表明, Y1 选择性结合白血病细胞, 但是不结合正常血样中的正常血细胞和白血病样品血样中的正常细胞。下面的表中给出了从患者分析得到的结果的总结。

表 8: 使用 Y1 的患者的结果

疾病	阳性数目	阳性百分比
多发性骨髓瘤	16/16	100%
AML	60/75	80%
B-白血病	29/43	67%

表 9: B-白血病

类型	来源	阳性数目	阳性百分比	阴性百分比
Pre-B-ALL	BM	3/3	100	0
B-ALL	BM	3/9	33	67
B-CLL	PB	17/23	74	26
B-淋巴瘤	PB	5/8	62	38

BM = 骨髓

PB = 外周血

#### 骨髓细胞(KG-1)上 Y1 表位的表征

收集大约 250 亿 KG-1 细胞，用于从 KG-1 细胞膜纯化 Y1 表位。发现 KG-1 膜制剂含有至少 2 个亚基，Y1 与这两个亚基结合：一个约 110 kDa 亚基和一个约 120 kDa 亚基。还发现 Y1 与约 220 kDa 亚基结合，其可能是约 110 kDa 亚基的二聚体。通过与 Y1 的免疫沉淀和反相 (RP-HPLC) 完成 Y1 表位的纯化。2 微升合并的级分被用于使用 scFv Y1 的蛋白质印迹，40 微升被用于银染色 (图 21)。

应用使用蛋白酶，多糖酶和硫酸酯酶的酶处理；使用 Y1，抗-CD42 抗体，抗 CD162 抗体和 181 的蛋白质印迹，使用 Y1 和抗-CD162 抗体的免疫沉淀；使用 Y1 抗-CD162 抗体的 FACS 分析；和测序，进一步表征 Y1 配体。

下表总结了用来表征和定位 KG-1 细胞上 Y1 结合位点的生物化学实验。

#### 在 SDS-PAGE 还原凝胶上进行的蛋白质印迹分析

表 10

底物	处理	条件	与 Y1 的反应性	图中的表示
RP-HPLC KG-1 膜级分	0-唾液糖蛋白 内肽酶	37℃ 30'	只与 120kDa 形式有反应性	图 22 Tab 2A 玻片 14
RP-HPLC KG-1 膜级分	0-唾液糖蛋白 内肽酶	37℃ 4 小时	没有反应性	图 22 Tab 2A 玻片 14
RP-HPLC KG-1 膜级分	芳基-硫酸酯酶	22℃ 18 小时	没有反应性	图 23 Tab 2A 玻片 14
RP-HPLC KG-1 膜级分	mocarhagin	37℃ 7'	没有反应性	图 23 Tab 2A 玻片 14
Glycocalic in	0-唾液糖蛋白 内肽酶	37℃ 30'	增强的结合	图 22 Tab 2A 玻片 14
肝素-BSA	芳基-硫酸酯酶	22℃ 18 小时	与没有处理的 Y1 结合	图 23 Tab 2A 玻片 16

总之，用内肽酶处理之后，Y1 信号被酶切掉而不能检测到（图 22）。最可能地，在 N-末端发现含有 Y1 结合位点地片段，并且它太小，在上述实验中使用的条件下不能被检测。同样，用 Mocarhagin 处理后，Y1 信号被切除，并且不能检测到（图 33），表明 Y1 的表位发现于配体的 N'端。另外，使用从蛋白质去除硫酸酯部分（KG-1 细胞提取物中）但是不形成糖部分（肝素上）的芳基-硫酸酯酶获得的结果进一步支持我们的假设：Y1 识别需要硫酸酯（图 23）。令人感兴趣的是，0-唾液糖蛋白内肽酶增强 GC 酶切产物中的 Y1 信号。我们假设这种处理之后，现在位于 C-末端的 Y1 结合位点更好地暴露给 Y1 结合。

#### Y1 和 PSGL-1 抗体-KPL1 之间的相关性：蛋白质印迹分析

评价 scFv Y1 抗体和抗来自 KG-1 细胞的 KPL1 免疫沉淀 (IP) 膜蛋白的商售抗-PSGL-1 单克隆抗体 (KPL1) 的结合。使用 Raji 细胞溶胞产物作为 Y1 和 KPL1 阴性对照。

用 KPL1 免疫沉淀 KG-1 细胞的膜级分。使用 scFv Y1 抗体或者使用 KPL1 将 IP 级分进一步免疫沉淀。使用 scFvYI 或 KPL1 抗体通过蛋白质印迹分析没有沉淀出的（洗出液）级分。

图 24 中给出了两种免疫沉淀方案和结果。KPL1 不识别

glycocalicin。但是，scFv Y1 和 KPL1 抗体两者都识别 KG-1 细胞上的膜蛋白。

使用抗-CD162 抗体免疫沉淀来自细胞系的溶胞产物和原始白细胞，并且离心，产生上清液和洗出液。使用 scFv Y1 和抗-CD162 抗体进行洗出液中和上清液中存在的蛋白质的 Western 印迹分析。KG-1 膜制剂含有两种亚基(约 110 kDa 和约 120 kDa)，抗-CD162 (PSGL-1) 抗体与它们结合。相反，正常白细胞膜制剂只有较小的亚基。来自 AML 患者的膜制剂只有较大的亚基。scFv Y1 与不同的物质结合，在免疫沉淀的上清液中发现这些物质，抗-CD 162 抗体不与这些物质结合(图 25)。

### FACS 分析

利用 FACS 分析在竞争结合试验中评价在抗-PSGL-1 (抗-CD162) (KPL1) 抗体的存在下 Y1 抗体 (scFv 和 IgG 两种形式) 与 KG-1 细胞的结合。为此，使用不同的商售抗-PSGL-1 抗体，KPL1 (鉴定 PSGL-1 的硫酸化酪氨酸 N-末端结构域的抗体)，PL1 (鉴定 PSGL-1 的没有硫酸化的 N-末端结构域的抗体)，和 PL2 (鉴定 PSGL-1 受体的没有硫酸化的内部结构域的抗体)。只有 KPL1 完全抑制 Y1 与 KG-1 细胞的结合，而 PL1 部分抑制结合。在 PL2 抗体的存在下没有结合的抑制作用(图 26)。Raji 细胞不与 KPL1 抗体结合。类似地，不同浓度的完整 IgG Y1 以剂量依赖方式抑制 KPL1 抗体与 KG-1 细胞的结合(图 27)。同样，KPL1 抗体以剂量依赖方式抑制完整 IgG Y1 抗体与 KG-1 细胞的结合(图 28)。

### Y1 和 KPL1 与原发白血病细胞结合之间的相关性

scFv Y1 抗体和抗-CD162 抗体与病变细胞的结合的分析也详细说明了 scFv Y1 具有与抗-CD162 抗体不同的结合特征。具体地说，Y1 和抗-CD162 结合 Pre-B-ALL, HCL, AML, B-ALL, B-CLL, 没有分类的白血病细胞, B-PLL, 和来自人患者的多骨髓瘤细胞的 FACS 分析表明两种抗体具有不同的结合曲线(表 11)。在 12 个样品中的 10 个样品中 Y1 与白血病细胞结合。相反，抗-CD162 只结合 12 个样品中的 5 个。在 12 个样品中，发现 5 个结合 Y1 但是不结合抗-CD162。因此，可以得出结论，在白血病细胞中，scFv Y1 与抗-CD162 识别之外的配体。

表 11: 白血病样品--抗-CD162 对 Y1 的分析

患者编号	疾病	与白血病细胞的反应	
		ScFv Y1	抗 CD162
42291	Pre-B-ALL	+	-
42299	HCL	-	-
42311	AML	+	+
42321	B-ALL	-	-
42323	B-CLL	+	-
42325	没有分类	+	-
42332	B-CLL	+	-
42352	B-PLL	+	+/-
42330	AML	+	+
42334	MM	+	-
42366	AML	+	+
42370	AML/ ALL	+	+/-

总之, GP1ba, 纤维蛋白原  $\gamma$  原型, 和 PSGL-1 中含有硫酸化酪氨酸的 Y1-结合结构域分别是, DEGDTDLYDYYPEEDTEGD (氨基酸 269-287), EHPAETEDSLYPED (氨基酸 411-427), 和 QATEYELDYDFLPETE (氨基酸 1-17)。另一个结合位点, 有更高的对于 Y1 的亲合性, 最可能在原发白血病细胞上表达。令人感兴趣地, 对 scFv Y1 和抗-CD162 都呈阳性血液样品来自 AML 患者, 而 B-细胞对抗-CD 162 呈阴性。

#### 硫酸化肽与 Y1 的结合分析

应用竞争结合 ELISA 测试来评价硫酸化酪氨酸的存在和位置对于肽与 Y1 结合的重要性。

Glycocalicin 固定在 Maxisorb 平板上。为了发现剂量响应, 以三种不同的浓度 (1, 10 和 100  $\mu$ M) 将 scFv Y1 与感兴趣的肽预温育 10 分钟 (表 12)。预温育之后, 将混合物 (Y1 + 肽) 加给平板, 使用识别 scFv Y1 的  $V_L$  链的多克隆兔抗- $V_L$ , 接着使用抗-兔-HRP 评价 scFv Y1 的结合。在其中肽与 scFv Y1 结合的混合物中, 观察到与对照结合相比较 scFv Y1 与 glycocalicin 结合的减弱。在其中肽与 scFv Y1 没有结合的混合物中, 观察到与对照结合相比较 scFv Y1 与

glycocalicin 结合没有变化。

将实验重复两次,在 ELISA 图表中描述了结果(图 29)。不管硫酸化与否,从纤维蛋白原衍生的肽不抑制 Y1 的结合。来自 PSGL-1 的没有硫酸化的肽不抑制 Y1 与 glycocalicin 结合。来自 PSGL-1 的所有硫酸化肽抑制 Y1 与 glycocalicin 结合。肽 P-YYY\*和 P-YY\* Y\* 是最好的抑制剂,效力接着是 P-Y\*Y Y\* , 然后是 P-YY\*Y , 然后是 P-Y\* Y\*Y 和 P-Y\*YY。来自 glycocalicin 的没有硫酸化的肽不抑制 Y1 与 glycocalicin 结合,但是具有相同序列的在两个硫酸酯(G-Y\*

Y\* Y\*)上被硫酸化的 glycocalicin-衍生的肽确实抑制结合,效力与 P-Y Y\*Y 的类似。

因此,清楚的是,并不是每一种硫酸化肽都以相同的程度与 scFv Y1 结合。还有,明显地,这些结果证明,只有一个硫酸化酪氨酸对于结合是必需的,这一点用肽 P-Y\*YY 和 P-YY Y\*可以看到。此外,可以看到硫酸化酪氨酸的氨基酸序列影响 Y1 结合。例如, P-Y\*YY (在序列 EY\*E 中含有一个硫酸化酪氨酸)只在 100 $\mu$ M 下有效抑制结合。相反, P-YYY\* (在序列 DY\*D 中含有一个硫酸化酪氨酸)在 1 $\mu$ M 下有效抑制结合。

表 12 : 硫酸化肽

名称	肽的来源	序列	# aa	MW	硫酸化 作用
F-YY	纤维蛋白原- $\gamma$ -原型链	VRPEHPAETEYESLYPEDDL	20	2389	-
F-Y' Y'	纤维蛋白原- $\gamma$ -原型链	VRPEHPAETEY*ESLY*PEDD L	20	2549	硫酸化
P-YYY	PSGL-1-n-末 端	QATEYEYLDYDFLPETE	17	2126	-
P-Y'YY	PSGL-1-n-末 端	QATEY*EYLDYDFLPETE	17	2206	硫酸化
P-Y' Y'Y	PSGL-1-n-末 端	QATEY*EY*LDYDFLPETE	17	2286	硫酸化
P-Y'Y Y'	PSGL-1-n-末 端	QATEY*EYLDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
P-Y Y'Y	PSGL-1-n-末 端	QATEYEY*LDYDFLPETE	17	2286	硫酸化
P-Y Y' Y'	PSGL-1-n-末 端	QATEYEY*LDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
P-YY Y'	PSGL-1-n-末 端	QATEYEYLDY*DFLPETE	17	2286	硫酸化
G-YYY	GPIb $\alpha$	GDEGDTDLYDYYPEEDTE	18	2126	-
G-Y'Y'Y'	GPIb $\alpha$	GDEGDTDLY*DY*Y*PEEDTE	18	2366	硫酸化

Y\*=硫酸化酪氨酸

#### 假设/结论

(1) Y1 类似识别硫酸化蛋白质和糖部分的 L-选择蛋白, 并且与只识别硫酸化蛋白质的 P-选择蛋白不同。因此, 它能竞争两种蛋白质的结合

(2) 分化和细胞生长期间硫酸化作用的变化可以影响 Y1 结合。因此, 对于与它们的硫酸化配体的结合, Y1 可以与 P 和 L 选择蛋白竞争。

用于评价白血病特异性抗体的效能的体内模型

用免疫缺陷小鼠和测试系统创立两个人白血病模型。

使用的人细胞系是来自 T 细胞白血病患者的 MOLT4 细胞和来自 AML 患者的 KG-1 细胞。使用每种细胞系上相关的人抗原特异性抗体鉴定和定量测定恶性细胞移入。

#### T-ALL (MOLT4) 模型

用于 T-ALL 的体内小鼠模型使用注射有来自 T 细胞白血病患者的 MOLT4 细胞的 SCID 小鼠 (Jackson Laboratories)。

在一个实施方案中,用 100mg/kg Cytoven (CTX, 注射用环磷酰胺, Mead Johnson) 预处理 SCID 小鼠,用  $2 \times 10^7$  MOLT-4 细胞/小鼠静脉注射,处理后 5 天注射环磷酰胺。MOLT-4 细胞注射后静脉注射抗癌剂或 PBS (阴性对照动物) 3 次/周并继续进行。在第 35 天,从动物取血,处死动物,切除肝并且称重。在未处理、PBS 处理的携带 MOLT-4 细胞动物中,肝脏表现出非常显著的肿瘤生长,其大小与 PBS 对照未感染动物相比增加了 2-3 倍。在此实验中,有 5 个处理组。

表 13

1. 未注射 MOLT-4 细胞, PBS 处理的
2. MOLT-4 注射的对照, PBS 处理的
3. MOLT-4 注射的, 用 Y1 scFv (CONY 1),  $75 \mu\text{g}$ /小鼠
4. MOLT-4 注射的, 用 CONY1 scFv - 阿霉素处理,  $75 \mu\text{g}$ /小鼠
5. MOLT-4 注射的, 用阿霉素处理,  $0.1\text{mg}/\text{kg}$

小鼠编号	接种	处理
5	PBS	-
9	MOLT-4	-
9	MOLT-4	CONY-Dox (2.5mg/ml)
9	MOLT-4	CONY-Dox (2.5mg/ml)
8	MOLT-4	游离 Dox (0.1mg/ml)

细胞接种之后 32 天,小鼠开始死亡,在此时杀死存活的小鼠。使用抗-人 CD44-FITC 和 Y1-生物素/SAV-PE 通过流式细胞仪分析骨髓。对来自几个动物的血样检查血小板和白细胞数目。将肝脏称重并且检查是否出现肿瘤。也对其它肿瘤检查是否出现肿瘤。

图 30, 31 和 32 给出结果。注射了 MOLT-4 细胞的所有的小鼠的肝脏都发现大块肿瘤生长(白色小瘤)。

骨髓中发现的 MOLT-4 细胞的百分比非常低(图 31)。

总之, 这些结果证明 MOLT-4 模型可以被用作白血病细胞肝转移的有用的模型。

平行地, 取出肝组织部分进行组织学检查并且收集细胞用于 FACS 分析。记录相对于对照未治疗小鼠的另一组接受治疗的动物的成活率。

图 30 给出第 35 天的肝脏重量。如图所示, 感染肿瘤的小鼠的肝脏大小几乎是相对于 PBS 对照物处理过的阴性对照 PBS 和没有注射 MOLT-4 小鼠的三倍。接受低剂量阿霉素治疗的小鼠的肝脏重量类似于 PBS 处理的感染肿瘤的小鼠。另一方面, CONY1 scFv 和 CONY1 scFv-阿霉素偶联物治疗大大抑制肝脏中的肿瘤生长(肝脏重量低得多)。

在第二个实施方案中, 使用相同的 SCID/MOLT-4 方案, 有 6 组:

1. 没有注射 MOLT-4, PBS 对照组
2. 注射 MOLT-4, 用 PBS 处理
3. 注射 MOLT-4, 用 CONY1 scFv 处理, 75 微克/小鼠
4. 注射 MOLT-4, 用来自 Nissim I 文库的非特异性 scFv 抗体处理, 75 微克/小鼠(对照)
5. 注射 MOLT-4, 用 Y1-IgG 处理, 5 微克/小鼠
6. MOLT-4 组, 用非特异性人-IgG 处理, 5 微克/小鼠(对照)

图 34 中所示结果表明用 CONY1 scFv 或 Y1 IgG 处理都抑制肿瘤生长(以肝脏重量为基础), 而在接受非特异性抗体分子处理的动物中几乎没有或没有效果。

从接受连续治疗的三个组的小鼠评价成活率, 图 35 给出结果。如图所示, 只有 CONY1 scFv-处理小鼠的存活期延长了。

#### AML KG-1 模型

用于人 AML 的体内小鼠模型使用接种了来自人 AML 细胞系的 KG-1 细胞的 SCID/NOD 小鼠 (Jackson Laboratories)。

在第一个实施方案中, 用 100mg/kg CYTOXAN<sup>®</sup>预处理 NOD/SCID 小鼠。CYTOXAN<sup>®</sup>注射后 4 天, 对六组小鼠的尾静脉内注射 KG-1 细胞(表 14, 第 2 和 5-9 组)。一组小鼠只注射 PBS (对照) (表 14, 第 1

组)。

从 KG-1 注射后 14 天开始, 用下面的物质处理小鼠: CONY1, 阿霉素, CONY1-阿霉素偶联物, 或 MYLOTATG<sup>®</sup>。 (MYLOTATG<sup>®</sup>是最近 FDA 批准的用于治疗 60 岁 AML 患者 和过了第一次复发的患者的与 calcheamicin 化学偶联的单克隆抗体(抗 CD33) 。每周处理小鼠一次或三次, 治疗三周。一组(第 2 组)接种 KG-1 的小鼠没有接受治疗(表 14)。另两组小鼠(第 3 和 4 组)注射了先前在含有 1 % BSA 的无血清 RPMI 中与 CONY1 或 181-scFv (负的, 非特异性对照抗体) 在 4℃ 下温育 1 小时的 KG-1 细胞。以 0. 25mg scFv/10<sup>8</sup> 细胞(75 微克小鼠)的浓度使用抗体。在对小鼠注射之前洗涤预温育的 KG-1 细胞并且悬浮于 RPMI。将 RPMI 中的 KG-1 细胞以每只小鼠 75 微克 scFv/0. 2 ml RPMI 的浓度对小鼠接种。用 KG-1 + CONY1 接种第 3 组小鼠, 用 KG-1 + 181-scFv 接种第 4 组小鼠 (表 14)。在第 1-2 和 5-9 组接种之后的第一天进行这项处理(第 3 和 4 组), 即, CYTOXAN<sup>®</sup>注射之后 5 天。

表 14

小鼠编号	组号	接种	处理
9	1	PBS	--
11	2	KG-1	--
9	3	KG-1+Y1	--
9	4	KG-1+181	--
8	5	KG-1	75 微克/小鼠 (2.5 毫克/千克) CONY1, 每周三次
9	6	KG-1	0.1 毫克/千克阿霉素, 每周三次
10	7	KG-1	5 毫克/千克阿霉素, 每周一次
11	8	KG-1	75 微克/小鼠 (2.5 毫克/千克) CONY1-阿霉素, 每周三次
9	9	KG-1	0.2 毫克/千克 MYLOTATG®, 每周一次

从细胞注射后 60 - 65 天杀死小鼠。使用小鼠抗人 CD34 FITC (IQP 144F) (或者抗 CD44-FITC (MCA89F, Serotec)) 和 Y1-生物素/SAV-PE 通过流式细胞仪分析骨髓和血样。小鼠 IgG1-FITC (IQP 191-F) 被用作同位型对照物, 小鼠 IgG2a-FITC (MCA929F, Serotec) 被用作阴性对照。使用 FACSCalibur 系统和 CellQwest 软件, Becton Dickinson 进行流式细胞计数。

图 36 和 37 给出了结果。在处理开始之后三周内, 用 5mg/kg 游离阿霉素处理的 10 只 KG-1 细胞注射的小鼠 (第 7 组) 中有 9 只死亡。

没有治疗的 (第 2 组) 注射有 KG-1 细胞的小鼠的骨髓在骨髓细胞集落平均水平上含有大约 30% KG-1 细胞。这组中的所有的小鼠发生了白血病。

总之, 几乎所有 KG-1 注射小鼠发生了白血病, 骨髓中 KG-1 细胞含量大约 30% (根据 FACS 分析测定)。一般情况下, KG-1 移入被限制在骨髓中。在血液中发现 KG-1 细胞少于 10%。在一例中在腹膜壁上观察到实体肿瘤。

注射了 KG-1 细胞并且用 0.1 mg/kg 游离阿霉素处理的小鼠 (第 6 组) 与第 2 组相比, 骨髓中 KG-1 细胞统计学意义 ( $p < 0.05$ ) 百分比较低。

注射了 KG-1 细胞并且用 CONY1-阿霉素处理的小鼠 (第 5 组) 与第 2 组相比, 骨髓中 KG-1 细胞百分比较低 (分别是 16.3% 对 30.4%)。但是, 发现这种差异不具有统计学意义。发现在实验中 CONY1-阿霉素被脂多糖 (LPS) 污染。因此, 没有使用 CONY1-阿霉素的最佳浓度, 在实验结束之前处理就终止了。

用体外与 CONY1 或 181-scFv 预温育过的 KG-1 细胞注射的小鼠 (分别是第 3 和 4 组) 其骨髓中 KG-1 细胞百分比显著地低。

只注射 PBS (阴性对照) 的小鼠和用 KG-1 细胞注射并且用 MYLOTATG™ 处理的小鼠 (第 9 组) 的骨髓都没有 KG-1 细胞。这些结果证明这种体内模型是用于 AML 的有用的模型。

各个组的血液中发现 KG-1 细胞总的百分比总之都非常低, 各组间差异大。应该注意 Mylotarg™ 处理的一只小鼠证明血液中有相对高百分比的 KG-1 细胞, 但是在骨髓中则没有。

使用商售抗-人 CD34 或 CD44 抗体, 平行使用 Y1 scFv 抗体, 通过 FACS 分析进行小鼠骨髓和血液中人白血病细胞 (KG-1 来源) 鉴定。

在分析的第一天, 与用 CONY1-阿霉素处理的小鼠 (第 8 组) 相比, 骨髓中具有更高百分比的 KG-1 细胞的只注射 KG-1 的小鼠 (第 2 组) 之间有显著差异。在分析的第三天, 这种状况发生逆转: 与第 2 组小鼠相比较时, 第 8 组的小鼠骨髓中有更高百分比的 KG-1 细胞。这种情况是如下得出的: A) 选择第一天生理状况恶化的小鼠, B) 处理终止后第 8 组的小鼠的 KG-1 细胞增殖, 和 C) 各个组中小鼠数目太少不能产生统计学意义结果。

这项研究包括 7 组:

1. PBS 对照组, 没有感染 MOLT-4 细胞
2. PBS-处理的 KG 1 对照组
3. KG 1 组, 用 CONY1 scFv 处理, 75 微克/小鼠
4. KG 1 组, 用 CONY I scFv-阿霉素处理, 75 微克/小鼠
5. KG 1 组, 用阿霉素处理, 0.1 mg/kg
6. KG 1 组, 用阿霉素处理, 3mg/kg, 每周一次
7. KG 1 组, 用 Mylotarg™ 处理, 7 微克/小鼠, 每周一次 (Mylotarg™ 是与化学治疗药物连接的抗体, 并且是 FDA-批准用于白血病患者)。

### 小鼠中 CONY1 的药代动力学

用  $^{125}\text{I}$ -Bolton Hunter 试剂(对赖氨酸)标记 CONY 1 scFv。在 4 °C 下在硼酸盐缓冲液(pH 9.2) 中用  $^{125}\text{I}$ -Bolton Hunter 试剂进行标记反应,然后在 PD-10 色谱柱上纯化  $^{125}\text{I}$ -CONY1。然后将放射性蛋白质与没有标记的 CONY-1 混合,得到盐水中含有  $2.5 \times 10^6$  CPM/毫升的 75 微克/毫升 CONY-1 的溶液。

通过以 0.5 ml/小鼠的剂量对雄性 Balb-C 小鼠腹膜内注射 0.9% NaI 预处理小鼠。2 小时之后,对小鼠静脉内注射 0.2 ml 标记的 CONY-1 溶液,每只小鼠  $^{125}\text{I}$ -CONY-1 剂量是 15 微克 ( $5 \times 10^5$  CPM)。

在注射之后的不同的时间,将血液收集到 EDTA 中,杀死小鼠,并且切除组织。在注射之后 5, 15, 和 30 分钟和 1, 2, 4, 8, 和 24 小时取样和器官。对于每个时间点使用 2-4 只小鼠。分离血浆并且测定  $\gamma$  放射性或者用三氯乙酸(TCA)沉淀。离心之后,对 TCA 沉淀物进行  $\gamma$  放射性测定。将肝脏,肺,肾,脾和骨髓样品称重并且计数  $\gamma$  放射性。血浆 TCA 沉淀放射性对时间作图,并且设定两个隔间动力学模型。计算器官/组织总的和特异性放射性值。图 39, 40 和 41 给出了结果。

血液和血浆放射性值之比较表明实际上所有的 CONY-1 都存在于血浆中并且不粘附红细胞。血浆放射性值类似于 TCA 沉淀物的那些,表明它们与没有降解的蛋白质缔合。图 39 表明施药之后各个时间点血浆中 CONY-1 水平。数值统计学上符合两隔间模型,并且获得的血液清除率的半衰期分别是 35 和 190 分钟。

施药之后各个时间点不同组织中放射性分布分别以特异性和总的放射性给出(图 40 和 41)。在大多数组织中,没有特异性放射性积累,这一点可以从特异性与血液的活性之比较证明。在 4 小时在肾中和在 4 和 8 小时在骨髓中看到稍高的数值;这最可能与降解产物分泌有关。

结果表明小鼠分泌 CONY-1, 半衰期是 35 分钟。第二隔室分泌速度重要性小并且可能是存在注射物质的某些聚合物形式的结果。体组织中没有 CONY-1 主要的特异性吸收,除了骨髓中稍有增加。

### 抗体和片段的制备

可以在原核或真核表达系统中制备抗体,其片段,其构建体,肽,多肽,蛋白质,及其片段和构建体。在原核和真核系统中制备抗体和片段的方法是本领域公知的。

真核细胞系统，如本发明定义和讨论的，指通过遗传工程方法制备肽或多肽的真核系统，其中宿主细胞是真核细胞。真核表达系统可以是哺乳动物系统，哺乳动物表达系统中产生的肽或多肽，在纯化之后，优选基本上没有哺乳动物污染物。有用的真核表达系统的其它例子包括酵母表达系统。

用于制备本发明的肽或多肽的优选的原核系统使用大肠杆菌作为表达载体的宿主。大肠杆菌系统中产生的肽或多肽，在纯化之后，基本上没有大肠杆菌污染蛋白质。原核表达系统的使用可能导致对本发明提供的序列的一些或全部的 N-末端加甲硫氨酸残基。肽或多肽制备之后去除 N-末端甲硫氨酸残基，使得能进行肽或多肽的完全表达，这一点是本领域公知的，一个例子是在适当的条件下使用气单胞菌属 (*Aeromonas*) 氨基肽酶 (美国专利 No. 5,763,215)。

#### 抗体片段和构建体的类型

本发明提供了包括抗体或其抗原结合片段，其构建体，或片段的构建体的肽或多肽。根据本发明的抗体包括 IgG, IgA, IgD, IgE, 或 IgM 抗体。IgG 类包括几个亚类，包括 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, 和 IgG<sub>4</sub>。

根据本发明的抗体片段包括 Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab<sub>2</sub>, 和 Fd 分子。较小的抗体片段，例如 Fv 片段，都包括在术语"片段"中，只要它们保持源抗体或较大片段的结合特性。这样的片段的例子可以是 (1) 小型体，它只包括 Fv 重链的片段，(2) 微型体，它包括抗体重链可变区小的功能单位 (PCT 申请号 No. PCT/IL99/00581)，(3) 包括轻链片段的类似体，和 (4) 包括轻链可变区功能单位的类似体。构建体包括，例如多聚体，例如二聚体，三聚体，和四聚体。术语"抗体，其结合片段，或者包括抗体或其结合片段的复合体"和"抗体或片段"意在包括所有的这样的分子，以及其衍生物和同系物，模拟物，和变体，除非另外具体说明或者另外根据说明书和/或公知常识证明。

一旦选择和/或开发具有期望的结合能力的抗体，片段，或构建体，本领域技术人员就能够应用这里提供的指导制备保持源抗体特征的构建体和片段。例如，能制备保持原来筛选或研发出的抗体，片段或构建体期望的特征的完整抗体分子，Fv 片段，Fab 片段，Fab<sub>2</sub> 片段，二聚体，三聚体，及其它构建体。

如果期望取代氨基酸但是依然保留抗体或片段的特征，本领域技

术人员能进行保守氨基酸取代作用。也可以对抗体或片段进行修饰，例如与药物或诊断试剂偶联，而不改变它们的结合特征。也可以对抗体或片段进行其它修饰，例如产生更稳定抗体或片段而不改变它们的特异性的那些修饰作用。例如，可以进行类脲修饰，半类脲修饰，环肽修饰，N末端修饰，C末端修饰，肽键修饰，主链修饰，和残基修饰。本领域技术人员还能够根据本发明说明书的指导测定修饰的抗体或片段，评价它们的结合特征是否发生了改变。

同样，本领域技术人员根据这里提供的指导能改变抗体，片段，或构建体的结合特征，获得具有更理想特征的分子。例如，一旦鉴定了具有期望的性质的抗体，可以利用随机或定向诱变产生抗体的变体，可以对那些变体筛选期望的特征。

根据本发明的抗体和片段还可以带有标记，可以连接或插入标记，有助于制备和鉴定，和诊断。可以随后从分子上去除该标记。有用的标记的例子包括：AU1，AU5，BTag，c-myc，FLAG，Glu-Glu，HA，His6，HSV，HTTPhH，IRS，KT3，Protein C，S-TAG®，T7，V5，和VSV-G (Jarvik 和 Telmer, *Ann Rev. Gen.*, 32, 601-618 (1998))。标记优选是 c-myc 或 KAK。

### 多聚体抗体

本发明提供包括 scFv 分子的 Y1 或 Y17 肽或多肽。如这里使用的，scFv 被定义为这样一种分子，其由人抗体的重链可变区和人抗体的轻链可变区组成，这两个区可以是相同或不同的，其中重链可变区与轻链可变区连接，键合，融合或共价连接，或缔合。

Y1 和 Y17 scFv 构建体可以是 scFv 分子的多聚体(例如，二聚体，三聚体，四聚体等)，它结合 Y1 或 Y17 抗体的一个或多个高变区。所有的 scFv 衍生的构建体和片段保留增强的结合特征，这样从其它细胞中选择性和/或特异性结合靶细胞。结合选择性和/或特异性主要由高变区决定。

轻链和重链可变区中高变环称作互补决定区(CDR)。各条重链和轻链中有 CDR1，CDR2 和 CDR3 区。这些区中最可变的是重链 CDR3 区。CDR3 区被理解是 Ig 分子最暴露的区，如图所示，这里提供的是主要负责观察到的选择性和/或特异结合特征的位点。

本发明的 Y1 和 Y17 肽能构建折叠成多价 Fv 形式。构建 Y1 和

Y17 多聚体形式，提高结合亲和性和特异性并且延长血液半衰期。

其他人合成出了 scFv 的多价形式。一个方案是用接头连接两个 scFvs。另一个方案包括使用两个 scFvs 之间的二硫键键合。Holliger 等, PNAS, 90, 6444-6448 (1993) 和 A. Kortt, 等, Protein Eng., 10, 423-433 (1997) 报道了制备二聚体或三聚体 Fv 的最简单的方案。设计一种制备 scFvs 二聚体的这样的方法, 加入 FOS 和 JUN 蛋白质区的序列, 在它们之间在 scFv 的 C-末端形成亮氨酸链。Kostelny SA 等, J Immunol. 1992 年 3 月 1 日; 148 (5): 1547-53; De Kruif J 等, J Biol Chem. 1996 年 3 月 29 日; 271 (13): 7630-4。设计另一种方法制备四聚体, 在 scFv 的 C-末端加链霉抗生物素蛋白编码序列。链霉抗生物素蛋白由 4 个亚基组成, 当 scFv 链霉抗生物素蛋白发生折叠时, 4 个亚基自我调整形成四聚体。Kipriyanov SM 等, 人抗体杂交瘤 (Hum Antibodies Hybridomas), 1995; 6 (3): 93-101。在另一个方法中, 为了制备二聚体, 三聚体和四聚体, 在感兴趣的蛋白质中导入自由的半胱氨酸。使用带有不同数目 (2-4) 的马来酰亚胺基团的肽交联剂使感兴趣的蛋白质与自由的半胱氨酸交联。Cochran JR 等, Immunity, 2000 年 3 月; 12 (3): 241-50。

在这个系统中, 设计噬菌体文库 (如上文所述) 展示 scFvs, 其能折叠成抗体的 Fv 区一价形式。此外, 也如上所述, 该构建体适合细菌表达。遗传工程 scFvs 包括通过连续编码的 15 个氨基酸柔顺肽间隔基团连接在一起的重链和轻链可变区。优选的间隔基团是 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。这种间隔基团的长度, 以及其氨基酸取代基提高不大的间隔基团, 它使得 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 区折叠成功能 Fv 结构域, 提供与它的靶物的有效结合。

本发明涉及通过本领域任何公知的方法制备的 Y1 和 Y17 多聚体。形成多聚体特别是二聚体的优选的方法, 应用利用半胱氨酸在两个单体之间形成二硫键。在该实施方案中, 为了有利于二聚体形成, 在 scFvs 的羧基末端加上一个半胱氨酸, 形成二聚体 (称之为 Y1-cys scFv 或 Y1 二聚体)。制备了 DNA 构建体 (参见实施例 2D 和 6D) 并用于转染之后, 在制备载体中表达 Y1 二聚体并且体外重折叠。通过 SDS-PAGE, HPLC, 和 FACS 分析蛋白质。但是, 这些初次尝试中没有一个是指出形成二聚体。因此, 重复该方法, 并且这一次, 实现抗体的 2 升发酵批量。再大肠杆菌菌株 BL21 中表达 Y1-cys 之后, 在精氨酸中进

行重折叠。重折叠之后，将蛋白质透析并且通过 Q-琼脂糖凝胶和凝胶过滤 (sephadex 75) 纯化。通过 SDS-PAGE (非还原) 并且通过凝胶过滤检测到两个峰。分别收集各个峰并且通过 FACS 分析。通过 FACS 检查与 Jurkat 细胞结合的单体和二聚体。结合二聚体只需要 1/100 量的单体抗体用于相同水平的染色，表明二聚体具有更大的抗体亲抗原性。确定二聚体重折叠的条件，接着透析，色谱，和凝胶过滤步骤之后产生含有 > 90% 二聚体 (mg 量) 的物质。通过凝胶过滤和通过氧化条件下的 SDS-PAGE 分析表征纯化的二聚体。通过放射受体测定，ELISA，和 FACS 分析证实二聚体的结合能力。

为了比较 scFv 单体 (也称作 CONY1) 与 Y1 二聚体的结合，体外对 KG-1 细胞进行结合竞争实验。另外，这些实验也比较了完整 Y1 IgG 与 scFv Y1 单体的结合。为了进行这项研究，用生物素标记 Y1 IgG。这项研究表明 Y1 IgG 与 IgG Y1-生物素竞争。不相关的人 IgG 不与标记的 Y1 IgG 竞争。Y1 scFvs (5 微克和 10 微克) 与 Y1 IgG 生物素 (50ng) 部分竞争。这项研究还表明 1ng 的 IgGY1-FITC 与 KG-1 细胞 (没有血清) 键合的程度和 1 微克的 Y1 scFv-FITC 程度一样，但是在血清存在下，这种结合大多数被阻断。这些研究还表明，根据放射受体测定，ELISA，和 FACS 分析，Y1 二聚体的结合至少比 Y1 scFv 单体高 20-倍。

在另一个实施方案中，除了在羧基末端加半胱氨酸之外还加入赖氨酸-丙氨酸-赖氨酸 (称作 Y1-cys-kak scFv)。这种 scFv 构建体的氨基酸序列下面复制并且也是 SEQ ID NO: 212。

1 MEVQLVESGG GVVVRPGGSLR LSACAASGFTF DDYGMSWVRQ  
APGKGLEWVS GINWNGGSTG 60

61 YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARM  
RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG 120

121 SGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY  
YASWYQQKPG QAPVLVIYGK 180

181 NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCNSR  
DSSGNHVVFG GGTKLTVLGG 240

241 GGCKAK

在细菌中在  $\lambda$ -pL 载体中产生 Y1-cys-KAK。通过将温度提高至 42°C 诱导  $\lambda$ -pL 载体中的表达。从诱导的培养物获得包涵体，并且通过水溶液半纯化，去除不期望的溶解性蛋白质。包涵体溶解于脲，用 DTT 还原，以精氨酸/氧化的谷胱甘肽为基础在溶液中体外重折叠。重折叠之后，将蛋白质透析并且通过正切流动过滤到含有脲/磷酸盐缓冲液的缓冲液中浓缩。再次纯化蛋白质并且通过在 SP-柱子中离子色谱浓缩。

通过 SDS-PAGE 电泳，凝胶过滤色谱，ELISA，放射受体结合，和 FACS 表征二聚体。二聚体的表观亲和性高于单体，由于抗体亲抗原性作用。通过对 glycoCalicin 的 ELISA，对 KG-1 细胞的 FACS，和放射受体测试中的竞争，证实了该作用。

进行 HPLC 分析重折叠并且从 Superdex 75 凝胶过滤柱子上纯化之后的二聚体。再图 42 中，Y1-cys-KAK (二聚体) 是左侧第一个峰 (约 10.8 分钟) 并且接下来的峰是单体 (约 12 分钟)。根据在相同的柱子上对蛋白质大小标记物电泳得知，二聚体大约是 52kDa，单体是 26kDa。通过改变重折叠条件 (重折叠缓冲液中氧化剂浓度和蛋白质浓度) 能改变二聚体和单体之间的平衡。在 superdex 75 柱子上通过层析来分离二聚体和单体。

在图 43 中，给出的凝胶有混合的二聚体和单体。在还原形式中，由于两种单体之间的还原作用而可见到单体，在非还原形式中，可见到两种物质 (和在凝胶过滤实验种一样)，大约 30kDa 的单体级分和大约 60kDa 的二聚体。

进行 ELISA 分析，确定单体 (tY1 scFv-也已知是 Y1-kak) 和二聚体 Y1-cys-kak (半胱氨酸二聚体) 对于来自血小板的抗原 GPIb (glycoCalicin) 的结合之间的差异。使用多克隆抗单一链抗体和/或新的多克隆抗-V<sub>L</sub> (来自兔) 和抗-兔 HRP，来测定与 GPIb 的结合。二聚体活性比单体活性高大约 100 倍。例如，为了达到 0.8 OD 单位，使用 12.8 微克/毫升的单体比较只有 0.1 微克/毫升的二聚体。参见兔 19。

另外，对 KG-1 细胞的 FACS 结合分析表明当进行两步或三步结合测试时，二聚体比单体更灵敏。直接用 FITC 标记的二聚体表现出比单体稍好 (使用少于 10 倍的材料)。使用二聚体作为竞争剂，对 KG-1 细

胞的放射受体测试表明二聚体比单体更有效 30x 倍。

改变间隔基团的长度也是另一个优选的形成二聚体，三聚体，和四聚体（本领域经常分别称作二聚体，三聚体和四聚体）的方法。在连接 scFv 的两个可变链的间隔基团缩短至一般 5-12 个氨基酸残基这样的条件下形成二聚体。这种缩短的间隔基团阻止两个可变链从相同的分子折叠成功能 Fv 结构域。取而代之的是，使结构域与另一个分子的互补结构域配对，产生两个结合结构域。在优选的方法中，使用只有 5 个氨基酸的间隔基团 (Gly4Ser) 构建二聚体。从两个相同的 scFvs，或者从两个不同的 scFvs 能形成这种二聚体，并且保持母体 scFv (s) 的选择性和/或特异性增强的结合活性，和/或表现出增强的结合强度或亲和性。

以相似的方式，在连接 scFv 的两个可变链的间隔基团缩短至一般少于 5 个氨基酸残基这样的条件下形成三聚体，这样的条件阻止两个可变链从相同的分子折叠成功能 Fv 结构域。取而代之的是，三个分开的 scFv 分子缔合成三聚体。在优选的方法中，通过完全去除这种柔顺间隔基团而获得三聚体。从三个相同的 scFvs，或者从两个或三个不同的 scFvs 能形成这种三聚体，并且保持母体 scFv (s) 的选择性和/或特异性增强的结合活性，和/或表现出增强的结合强度或亲和性。

类似地，在连接 scFv 的两个可变链的间隔基团缩短至一般少于 5 个氨基酸残基这样的条件下形成四聚体，这样的条件阻止两个可变链从相同的分子折叠成功能 Fv 结构域。取而代之的是，四个分开的 scFv 分子缔合成四聚体。从四个相同的 scFvs，或者从 1-4 个来自不同的 scFvs 的单元能形成这种四聚体，并且保持母体 scFv (s) 的选择性和/或特异性增强的结合活性，和/或表现出增强的结合强度或亲和性。

在间隔基团一般少于 5 个氨基酸残基长这样的条件下形成三聚体还是四聚体取决于混合物和反应条件下特定 scFv (s) 的氨基酸序列。

在优选的方法中，通过生物素/链霉抗生物素蛋白缔合形成四聚体。产生能用生物素酶学标记的新的发酵构建体（这里称作 Y1-生物标记或 Y1-B）。在 Y1 C-末端加有 BirA 酶底物的序列。BirA 酶将生物素加给序列中的赖氨酸残基。Y1-生物标记在大肠杆菌中表达。分离包涵体材料并且重折叠。折叠的蛋白质的纯度 > 95%，并且从 1-升培养物获得 > 100 mg（小规模，没有使条件最佳化）。根据 HPLC, SDS-PAGE,

和质谱,发现这种形式的分子量与 scFv 类似。发现 Y1-生物标记是用于 FACS 分析的最适当的试剂。但是,当在血清的存在下检查 Y1-生物标记与 KG-1 细胞的结合时,与不存在血清时的结合相比较需要高浓度(10 倍以上)。虽然如此,这种构建体为其中分子的结合位点保持完整的特异性生物素化作用提供了好处。此外,只用一个生物素标记各个分子--每个分子在羧基末端接受一个生物素。

在期望的位置限制性标记一个生物素/分子使得产生带有链霉抗生物素蛋白的四聚体。通过温育 Y1- B 和链霉抗生物素蛋白-PE 形成四聚体。

FACS 分析表明 Y1-生物标记和链霉抗生物素蛋白-PE 制备成的四聚体比 Y1 scFv 单体灵敏 100 至 1000 倍。带有链霉抗生物素蛋白-PE 的 Y1-生物标记四聚体表现出与 Y1-反应细胞系之一(KG-1)特异性结合。由于结合背景,该反应的差异非常大,并且提供高灵敏性来检测低量受体。使用 Y1 BSAV 四聚体对正常全血进行 FACS 评价表明不存在高反应性物质。单核细胞和粒细胞在小程度上是阳性的。在其中存在阳性结果的细胞系中,例如 KG-1 细胞,四聚体反应性高至少 100-倍。

然后,四聚体与细胞样品培养。低剂量 Y1 四聚体(5 ng)很好地结合细胞系(KG-1),比先前用其它 Y1 抗体形式所观察到的响应高 10 至 20-倍。当用不同剂量的四聚体检查阴性细胞系时观察到次要反应。

#### 用于诊断和制药用途的偶联物

本发明的抗体及其结合片段能与各种药物试剂例如药物,毒素,和放射性同位素缔合,混合,融合或连接,任选地,含有药学有效载体,形成具有抗疾病和/或抗癌活性的药物-肽组合物,融合体或偶联物。这样的偶联物和融合体也可以用于诊断目的。

本发明中有用的载体的例子包括葡聚糖,HPMA(亲脂性聚合物)或者任何其它聚合物。或者,使用修饰性脂质体,例如用 scFv Y1 分子修饰的脂质体,例如 Doxil,一种商售的含有大量阿霉素的脂质体。可以制备这样的脂质体,含有一种或多种期望的药物试剂,和与本发明的抗体混合,提供高比例药物与抗体之比。

或者,抗体或其片段和药物试剂之间的连接可以是直接连接。通过分子元件之间或元件组之间的化学键合可以产生两个或多个相邻分子

之间的直接连接。化学键可以是例如离子键，共价键，疏水键，亲水键，静电键或氢键。键可以是例如胺，羧酸，酰胺，羟基，肽和/或二硫键。直接连接优选是蛋白酶抗性键。

肽和药物试剂之间的，或者肽和载体之间的，或者载体和药物试剂之间的连接可以通过接头化合物。如这里在说明书和权利要求书中使用的，接头化合物被定义为将两个或多个部分连接的一起的化合物。接头可以是直链或支链的。支链接头化合物可以由双支链，三支链，或四支链或者更多支链的化合物组成。本发明中使用的接头化合物包括选自二元羧酸，马来酰亚胺酰肼，PDPH，羧酸酰肼，和小肽的那些。

根据本发明有用的接头化合物的更具体的例子包括：

- a. 二元羧酸，例如琥珀酸，戊二酸，和己二酸；
- b. 马来酰亚胺酰肼，例如 N-[ε-马来酰亚胺己酸]酰肼，4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧基酰肼，和 N-[κ-马来酰亚胺十一酸]酰肼；
- c. PDPH 接头，例如与 sulfurhydryl 反应蛋白质偶联的 (3-[2-吡啶基二硫基]丙酰基酰肼)；和
- d. 选自 2-5 个碳原子的羧酸酰肼。

通过使用小肽接头直接偶联的连接也是有用的。例如，使用小肽可以实现例如抗癌剂阿霉素的游离糖基和 scFv 之间的直接偶联。小肽的例子包括 AU1, AU5, BTag, c-myc, FLAG, Glu-Glu, HA, His6, HSV, HTTPHH, IRS, KT3, Protein C, S-TAG<sup>®</sup>, T7, V5, 和 VSV-G。

本发明的抗体及其片段可以与成像剂（也称作指示标记），例如放射性同位素键合，偶联，复合或者缔合，这些偶联物可以用于诊断和成像目的。提供了包括这样的放射性同位素-抗体（或片段）偶联物的试剂盒。

用于诊断的放射性同位素的例子包括 <sup>111</sup> 铟，<sup>113</sup> 铟，<sup>99m</sup> 锝，<sup>105</sup> 锝，<sup>101</sup> 锝，<sup>99m</sup> 锝，<sup>121m</sup> 碲，<sup>122m</sup> 碲，<sup>125m</sup> 碲，<sup>165</sup> 铥，<sup>167</sup> 铥，<sup>168</sup> 铥，<sup>123</sup> 碘，<sup>126</sup> 碘，<sup>131</sup> 碘，<sup>133</sup> 碘，<sup>81m</sup> 氩，<sup>33</sup> 氩，<sup>90</sup> 钇，<sup>213</sup> 铋，<sup>77</sup> 溴，<sup>18</sup> 氟，<sup>95</sup> 钷，<sup>97</sup> 钷，<sup>103</sup> 钷，<sup>105</sup> 钷，<sup>107</sup> 汞，<sup>203</sup> 汞，<sup>67</sup> 镓和 <sup>68</sup> 镓。优选的放射性同位素对是 X-射线或顺磁性离子不透明的。

指示标记分子也可以是荧光标记分子。荧光标记分子的例子包括

荧光素，藻红蛋白，或罗丹明，或者其修饰物或偶联物。

可以将与指示标记物偶联的抗体或片段用来诊断或检测疾病状态。这样的监测可以在体内，体外，离体进行。体内或离体进行监测或诊断时，成像剂优选是生理可接受的，因为不对患者损伤至不可接受的水平。医生应用象疾病的严重程度及其它选项的有效性这样的标准可以确定损伤的可接受水平。

本发明提供在治疗之前，期间和之后用于体外分析治疗效力的诊断试剂盒，包括包括与指示标记分子连接的本发明的肽的成像剂，或成像剂。本发明进一步提供使用用于对癌症，更具体地，对肿瘤诊断定位和成像的成像剂的方法，包括下面的步骤：

- a) 使细胞接触组合物，
- b) 测定与细胞结合的放射性，并且因此
- c) 目测肿瘤。

合适的成像剂的例子包括荧光染料，例如 FITC，PE，等，和荧光蛋白质，例如绿色荧光蛋白质。

其它例子包括放射性分子和与底物反应产生可识别的变化例如颜色变化的酶。

在一个实施例中，试剂盒的成像剂是荧光染料，例如 FITC，试剂盒提供对癌症治疗功效的分析，更具体的是与血液相关的癌症，例如，白血病，淋巴瘤和骨髓瘤。利用 FACS 分析来测定成像剂染色的细胞的百分比。和疾病的各个阶段染色的强度，例如，诊断时，治疗期间，减轻期间和复发期间。

本发明的抗体及其片段可以与下面的物质键合，偶联，或缔合：抗癌剂，抗白血病剂，抗病毒剂，抗转移剂，抗炎剂，抗血栓形成剂，抗再狭窄剂，抗聚集作用剂，抗自身免疫剂，抗粘附剂，抗心血管疾病药物，或者其它抗疾病剂或药物试剂。药物试剂指用于哺乳动物预防性处理或诊断的试剂，所述哺乳动物包括但不限于人，牛，马，猪，鼠，狗，猫，或者其它温血动物。

这样的药物试剂的例子包括但不限于阿昔洛韦，更昔洛韦和齐多夫定；抗血栓形成/抗再狭窄药物，包括西洛他唑，达肝素钠，瑞维肝素钠，和阿司匹林；抗炎剂，包括扎托洛芬，普拉洛芬，朵昔康，乙酰水杨酸 17，双氯酚酸钠，布洛芬，右布洛芬，舒林酸，萘普生，氨托

美丁, 塞利克西, 消炎痛, 罗非克西, 和尼美舒利; 抗自身免疫剂, 包括来氟米特, denileulcin diftitox, subreum, WinRho SDF, 去纤苷, 和环磷酰胺; 和抗粘附/抗聚集作用剂, 包括利脉前列素, 氯克罗孟, 和透明质酸。

其它例示的药物制剂包括阿霉素(阿得里亚霉素), 吗啉代阿霉素, 甲氧基吗啉基阿霉素, 顺铂, 紫杉醇, 加利车霉素, 长春新碱, 阿糖胞苷(Ara-C), 环磷酰胺, 强的松, 柔红霉素, 吗啉代柔红霉素, 甲氧基吗啉基柔红霉素, 去甲氧柔红霉素, 氟达拉滨, 瘤可宁,  $\alpha$ 干扰素, 羟基脲, 替莫唑胺, 沙利度胺和博莱霉素, 及其衍生物和组合物。

抗癌剂是具有抗癌活性的物质。例如, 抗癌剂包括抑制或停止癌细胞或未成熟癌变前细胞的药物, 杀死癌细胞或癌变前细胞的药物, 提高癌细胞或癌变前细胞对其它抗癌病药物易感性的药物, 和抑制癌细胞转移的药物。在本发明中, 抗癌剂还可以是具有预防, 抑制, 阻止或停止肿瘤血管形成的抗生血管活性的药物。

对癌细胞生长的抑制作用包括, 例如, (i) 阻止癌生长或转移生长, (ii) 延缓癌生长或转移生长, (iii) 完全阻止癌细胞生长过程或转移过程, 同时保持细胞完整和存活, 或者(iv) 杀死癌细胞。

抗白血病剂是具有抗白血病活性的物质。例如, 抗白血病剂包括抑制或停止白血病细胞或未成熟白血病前细胞的药物, 杀死白血病细胞或白血病前细胞的药物, 提高白血病细胞或白血病前细胞对其它抗白血病剂易感性的药物, 和抑制白血病细胞转移的药物。在本发明中, 抗白血病剂还可以是具有预防, 抑制, 阻止或停止肿瘤血管形成的抗生血管活性的药物。

对白血病细胞生长的抑制作用包括, 例如, (i) 阻止白血病生长或转移生长, (ii) 延缓白血病生长或转移生长, (iii) 完全阻止白血病细胞生长过程或转移过程, 同时保持细胞完整和存活, 或者(iv) 杀死白血病细胞。

本发明的抗体和片段可以有用地与之连接的抗疾病剂, 抗癌剂, 和抗白血病剂的例子包括毒素, 放射性同位素和药物。

毒素的例子包括 gelonin, 假单胞菌外毒素(PE), PE40, PE38, 白喉毒素, 蓖麻毒, 或者其修饰物或衍生物。

放射性同位素的例子包括可以用于定位和/或治疗的  $\gamma$ -发射体,

正电子-发射体, 和 x-射线发射体和可以用于治疗的 $\beta$ -发射体和 $\alpha$ -发射体。

治疗性放射性同位素的更具体的例子包括<sup>111</sup>铟, <sup>113</sup>铟, <sup>99m</sup>锝, <sup>105</sup>锝, <sup>101</sup>锝, <sup>99m</sup>锝, <sup>121m</sup>碲, <sup>122m</sup>碲, <sup>125m</sup>碲, <sup>165</sup>铥, <sup>167</sup>铥, <sup>168</sup>铥, <sup>123</sup>碘, <sup>126</sup>碘, <sup>131</sup>碘, <sup>133</sup>碘, <sup>81m</sup>氩, <sup>33</sup>氩, <sup>90</sup>钇, <sup>213</sup>铋, <sup>77</sup>溴, <sup>18</sup>氟, <sup>95</sup>钷, <sup>97</sup>钷, <sup>103</sup>钷, <sup>105</sup>钷, <sup>107</sup>汞, <sup>203</sup>汞, <sup>67</sup>镓和<sup>68</sup>镓。

抗癌或抗白血病剂试剂的非限制性例子包括阿霉素(阿得里亚霉素), 吗啉代阿霉素, 甲氧基吗啉基阿霉素, 顺铂, 紫杉醇, 加利车霉素, 长春新碱, 阿糖胞苷(Ara-C), 环磷酰胺, 强的松, 柔红霉素, 吗啉代柔红霉素, 甲氧基吗啉基柔红霉素, 去甲氧柔红霉素, 氟达拉滨, 瘤可宁,  $\alpha$ 干扰素, 羟基脲, 替莫唑胺, 沙利度胺和博莱霉素, 及其衍生物和组合物。

### 药物组合物

通过任何适合的方法可以对需它的患者施用本发明的抗体, 构建体, 偶联物, 和片段。例示的方法包括静脉内, 肌内, 皮下, 局部, 气管内, 鞘内, 腹膜内, 眼内, 鼻内, 舌下, 口部, 直肠, 阴道, 呼吸道, 口腔, 真皮内, 脑内或胸膜内给药。

对于静脉内给药, 优选这样制备制剂使得对患者的施用量是大约0.1 mg至大约1 000mg期望的组合物的有效量。更优选地, 施用的量在大约1 mg至大约500mg期望的组合物的范围内。本发明的组合物在宽的剂量范围内都有效, 并且取决于下面的因素, 例如要治疗的疾病的特殊性, 以肽或多肽为基础的药物组合物在患者体内的半衰期, 药物试剂和药物组合物的物理和化学特性, 药物组合物的给药方式, 要治疗或诊断的患者的特殊性, 以及治疗医生认为是重要的其它参数。

用于口服的药物组合物可以是任何合适的形式。例子包括片剂, 液体, 乳剂, 混悬液, 糖浆, 丸剂, 小香囊, 和胶囊剂。制备药物组合物的方法是本领域公知的。参见, 例如, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (编著) Lippincott, Williams & Wilkins (pub)。

也可以这样配制药物组合物, 使得有利于定时, 持续, 脉冲式, 或者连续释放。也可以在一个装置中施用药物组合物, 例如一种定时, 持续, 脉冲式, 或者连续释放装置。

局部给药的药物组合物可以是任何适合的形式，例如乳油，软膏，洗剂，贴，溶液，混悬液，和凝胶。

含有本发明的抗体，构建体，偶联物，和片段的组合物可以含有常规药学可接受稀释剂，赋形剂，载体，等等。片剂，丸剂，小香囊 (caplets) 和胶囊可以含有常规赋形剂，例如乳糖，淀粉和硬脂酸镁。栓剂可以含有赋形剂例如蜡和甘油。注射液含有灭菌无热原介质，例如盐水，并且可以含有缓冲剂，稳定剂或防腐剂。可以使用常规的肠衣。

### 实施例

给出下面的实施例有助于理解但不是要也不应该认为是在任何方面限制本发明的范围。虽然描述了具体试剂和反应条件，能进行本发明范围意义所包括的修饰。因此提供下面的实施例进一步详细说明本发明。

#### 实施例 1: 血小板的制备

从血库获得血小板的柠檬酸葡萄糖 (ACD) 浓液，分离血小板，在以 1:7 的比例含有 ACD 和盐水的缓冲液中洗涤一次。每次洗涤之后以 800 g 将血小板离心 10 分钟，并且重新悬浮于蒂罗德溶液 (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 % 葡萄糖, 5 mM HEPES 和 0.35 % albumin 白蛋白, pH 7.35) 并且计数细胞数。

#### 富血小板血浆的制备

将血液收集到盛有 3.8 % 柠檬酸钠的试管中。以 250 x g 离心 10 分钟制备富血小板血浆。

#### 实施例 2: 血小板凝集作用

对于血小板凝集作用的研究，在全血 Lumiaggregometer (Chronolog, Havertown, PA) 中将富集血小板的血浆 (PRP) 和洗涤过的血小板在 37°C 下以 500 rpm 搅拌。穿过血小板悬浮液和悬浮的介质的光透射差异定为 100% 凝集作用。通过在加入激动剂之前加入不同浓度的 Y1 来评价 Y1 对血小板凝集的影响，并且记录该作用 4 分钟。

#### 实施例 3: 用内切蛋白酶处理血小板

##### 3.1 Mocarhagin 对血小板的切割

对于 mocarhagin 消化，在 22°C 下，用 12 微克 / 毫升 mocarhagin

(终浓度)将含有 1 mM 氯化钙的 TS 缓冲液(0.01 M Tris, 0.15 M 氯化钠, pH 7.4)中的  $10^8$  洗涤过的血小板处理 1 小时,并且通过加入 EDTA 达到 0.01 M 来终止消化。

### 3.2 组织蛋白酶 G 对 glyco-calicin 切割

含有 1 mM 氯化钙的 TS 缓冲液中的  $10^8$  洗涤过的血小板与 1.8 微克/毫升组织蛋白酶 G (终浓度)在 22℃ 下温育 4 小时,并且通过加入 PMSF 至 1 mM 终止消化。

### 3.3 0-唾液酸糖蛋白内切酶对 glyco-calicin 的切割

在 37℃ 下,含有 0.2 % 白蛋白和蛋白酶抑制剂(10  $\mu$ M 亮抑蛋白酶肽, 0.24 mM PMSF)中  $10^6$  血小板和 0.14 mg/ml 0-唾液酸糖蛋白内切酶(终浓度)温育 45 分钟,并且通过加入样品缓冲剂并且沸腾来终止消化。使用的样品缓冲剂含有 3% SDS, 12% 甘油, 50mM TrisHCl, 2% (3-巯基乙醇, 和 0.03% 溴酚蓝。

### 实施例 4: 内切酶对 Glyco-calicin 的切割

#### Mocarhagin 对 Glyco-calicin 的切割

对于 mocarhagin 消化,含有 1 mM 氯化钙的 TS 缓冲剂中的 glyco-calicin 与 10 微克/毫升 mocarhagin (终浓度)在 22℃ 下温育 1 小时,并且通过加入 EDTA 达到 0.01 M 来终止消化。

#### 组织蛋白酶 G 对 glyco-calicin 的切割

对于组织蛋白酶 G 消化,含有 1 mM 氯化钙的 TS 缓冲剂中的 glyco-calicin 与 3.4 微克/毫升组织蛋白酶 G(终浓度)在 22℃ 下温育 4 小时,并且通过加入 PMSF 达到 1 mM 来终止消化。

#### 0-唾液酸糖蛋白内切酶对 glyco-calicin 的切割

在 37℃ 下,0.05 M Tris 缓冲剂 pH 7.4 中 Glyco-calicin 和 1.2 mg/ml 0-唾液酸糖蛋白内切酶(终浓度)温育 15 分钟,并且通过加入样品缓冲剂(如实施例 3 所述(YH))并且沸腾来终止消化。

### 实施例 5: 全长 Y1 IgG 的构建

全长 IgG 分子具有比 Fv 型好的几个优点,包括更长的体内半衰期和减小体内细胞响应的可能性,例如 ADCC 或 CDC 介导的那些(补体依赖性细胞毒性;Tomlinson, 免疫学最新趋势(Current Opinions of Immunology), 5, 83-89 (1993))。通过下面描述的分子克隆方法,我们已经将 Y1 Fv 区转化到完全大小的 IgG1 分子中。Y1-IgG1 构建通

过以下面的顺序彼此连接的 cDNA 连接片段来完成:图 48 给出了 Y1-IgG 重链和轻链的序列。给出了 Y1-HC 核苷酸序列的可读框(ORF) (SEQ ID NO: 205), Y1-HC 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 206), Y1-LC 核苷酸序列的 ORF (SEQ ID NO: 207), Y1-LC 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 208)。

与哺乳动物表达系统相容的前导序列:

设计使容易插入全 IgG 分子必需的元件的可替换系统。合成下面的编码推导的前导序列的值得称赞的双链寡核苷酸,退火,并且连接到哺乳动物表达载体的 XhoI 位点(SR $\alpha$ 5 启动子调控下)。

5'-TCGACCTCATCACCATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCCCTCCTCACTCA  
GGACACAGGGTCCTGGGCCGAT

和

5'-GATCGATTGCACCAGCTGGATATCGGCCAGGACCCTGTGTCCTGAGTGAG  
GAGGGTGAGGAGCAGCAGAGCCCAGGCCATGGTGATGAGG.

起始密码子 ATG 的上游,包括两个 Kozak 元件。另外,在前导序列推导的切割位点和 XhoI 位点之间导入内 EcoRV 位点,使亚克隆可变区。这种修饰的载体指定为 pBJ-3。

在前导序列和轻链恒定区-编码序列之间插入从 Y1 scFv cDNA 序列衍生的 VL 编码序列。类似地,在前导序列和重链恒定区-编码序列之间插入从 Y1 scFv cDNA 序列衍生的 VL 编码序列。这通过编码源 Y1 的载体 pHEN-Y1 的 PCR 扩增来实现,分别获得 VL 和 VH 区。

寡核苷酸

5'-TTTGATATCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA (有义) 和 5'-GCTGACCTAGGACGGTCAGCTTGGT (反义)被用于 VL PCR 反应。纯化预期大小大约 350 bp 的 cDNA 产物,测序并且用 EcoRV 和 AvrII 限制性内切酶消化。相同的程序用于扩增和纯化 VH cDNA 区,分别使用有义和反义寡核苷酸

5'-GGGATATCCAGCTG (C/G) (A/T) GGAGTCGGGC

和

5'-GGACTCGAGACGGTGACCAGGGTACCTTG。

恒定区：分别如下合成从 IgG1 cDNA 衍生的  $\lambda 3$  (CL- $\lambda 3$ ) 恒定区和恒定重链区 CH1-CH3:

对于 CL- $\lambda 3$  恒定区，使用有义 5'-CCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGC 和反义

5'-TTTGCGGCCGCTCATGAACATTCTGTAGGGGCCACTGT 寡核苷酸，在从正常外周 B-细胞 (CD19+细胞) 库中提取的 mRNA 上进行。纯化预期大小 (大约 400 bp) 的 PCR 产物，测序，并且用 AvrII 和 NotI 限制性内切酶消化。

对于 IgG1 恒定区 ( $\gamma$  链)，对于 PCR 扩增选择 BTG 不灭化人 B 细胞克隆 (CMV 克隆 # 40)。证明该克隆分泌抗人 CMV IgG1，并且在体外试验中还证明诱导 ADCC 相应。对于 CH1-CH3 cDNA，合成寡核苷酸

5'-ACCGCTCGAGTGC (T/C) TCCACCAAGGGCCATC (G/C) GTCTTC (有义)

和

5'-TTTGCGGCCGCTCATTTACCC (A/G) GAGACAGGGAGAGGCT (反义) 并且用于 PCR 扩增。和对于 CL cDNA 编码序列描述的一样，纯化预期大小 (大约 1500 bp) 的 PCR 产物，测序，并且用 AvrII 和 NotI 限制性内切酶消化。

对于最终表达载体，使用 EcoRV-NotI 预消化 pBJ-3 载体，EcoRV-AvrII 可变区 cDNAs 和 AvrII-NotI 恒定区进行三联连接程序。分别将 pBJ-Y1-HC 和 pBJ-Y1-LC 指定为重链和轻链表达的最终载体。

以 pBJ-Y1-LC 为基础构建另外一个载体，pBJ-Y1-LP，使得以嘌呤霉素抗性基因 (PAC) 为基础二次选择。在这个载体中，编码 PAC 基因的大约 1600bp 片段 (来自 pMCC-ZP 载体) 置换了 pBJ-Y1-LC 质粒的新霉素抗性基因。

SEQ IDNOS. 205-208 给出了 Y1-HC 和 Y1-LC 的可读框 (ORF) 和它们编码的氨基酸序列。

下划线是前导序列。粗体是氨基酸序列的 VH 和 VL 区，接着是 IgG1 (对于重链) 或  $\lambda 3$  (对于轻链) 恒定区序列。

Y1 重链和轻链在 CHO 细胞中的表达

载体 pBJ-Y1-HC 和 pBJ-Y1-LC 分别用于表达重链和轻链的稳定细胞的转染和筛选。对 G418 和细胞生长筛选之后，通过如下所述的捕获

EIA 分析和通过蛋白质印迹分析对上清液中分泌的蛋白质分析 IgG1 表达:

捕获 EIA 分析: 用小鼠抗人 IgG1 Fc (Sigma) 预先包被 96 孔板的孔。向孔中加入上面获得的上清液, 用生物素化山羊抗- $\gamma$  链特异性抗体 (Sigma), 链霉抗生物素蛋白-HRP 和底物检测重链 IgG1 的存在。ELISA 平板读数器监测  $A_{405}$  颜色的出现。

蛋白质印迹分析: 上面细胞的上清液在 12.5% SDS-PAGE 上进行电泳。用 (a) 用于重链检测的山羊抗-人血清 IgG HRP (H+L; Sigma Cat # A8667) 和 (b) 用于轻链检测的生物素化山羊抗-人血清  $\lambda$  3 链 (Southern Biotechnology Association, Cat # 2070-08) 检测各条链的表达。

上面测试证实两条链的表达, 并且进行共同转染, 获得完全大小的 Y1-IgG1。

#### IgG-Y1 的表达和纯化

细胞培养和转染: 37°C 下 5% CO<sub>2</sub> 气氛中在含有 10% 胎牛血清和 40 微克/毫升庆大霉素的 F-12 培养基中培养 CHO<sup>-</sup> 细胞。转染之前的一天在 90mm 培养皿上接种  $0.8-1 \times 10^6$  细胞。通过 FuGene (Roche) 转染试剂技术用 10 微克轻链和重链 DNA 共同转染培养物。在非选择性培养基中生长 2 天之后, 在含有 550 微克/ml 新霉素和 3 微克/ml 嘌呤霉素的 F-12 培养基中将细胞培养 10-12 天。使细胞受到胰蛋白酶作用并且通过在 Costar 96-孔板中 0.5 细胞/孔限制性稀释来克隆。取各菌落, 接种在 6 孔培养皿中并且转移到烧瓶中。

重链和轻链分泌的测定: 利用夹心 ELISA 检测来测定分泌到转染的 CHO 细胞上清液中的抗体的浓度。为了测定抗体浓度, 使用下面的试剂: 单克隆抗人 IgG1 (Fc) (Sigma) 为包被抗体, 山羊抗人 IgG ( $\gamma$ -链特异性) 生物素偶联物为检测剂 (Sigma), 和纯人 IgG1,  $\lambda$  (Sigma) 为标准物。以这项 ELISA 测试为基础, 产率在 3-4 微克/ml 之间。

从细胞制备和纯化 Mab: 细胞在摇瓶中生长至每瓶培养基中  $1-2 \times 10^8$  细胞的终浓度, 培养基是含有 10% 胎牛血清, 补充有新霉素和嘌呤霉素的 F-12 培养基。对于生产, 在含有 2% 胎牛血清的相同的培养基中又培养细胞两天。

在蛋白质 G-琼脂糖柱 (Pharmacia) 上纯化分泌的抗体。在 20mM 磷

酸钠缓冲剂, pH 7.0 中结合;用 0.1M 甘氨酸缓冲剂, pH 2.5-3.0 进行洗脱。通过 UV 吸光度测定纯化的抗体的量;用 SDS-PAGE 分析纯度。在不变性条件下,全 IgG 抗体具有其预期的 160kD 分子量。在变性凝胶中,重链和轻链分别具有 55 和 28 kD 预期的分子量。

完全大小 IgG-Y1 分子的结合:进行结合实验来测定 IgG-Y1 分子结合水平与 scFv-Y1 分子结合水平之比较。利用两步染色方法,其中 5 ng 的 IgG-Y1 与 RAJI 细胞(阴性对照,图 44-47a)和 Jurkat 细胞(Y1 阳性细胞,图 44-47b 和 44-47c)。对于检测,使用 PE-标记山羊抗人 IgG(图 44-47c)。类似地,1 微克的 scFv-Y1 与 Jurkat 细胞反应(图 44-47b),并且使用 PE-标记兔抗-scFv 用于检测。结果表明 IgG-Y1 和 scFv-Y1 与 Jurkat 细胞结合,获得与 IgG-Y1 类似检测水平需要比 scFv-Y1 分子多大约  $10^3$ -倍。

#### 实施例 6: 从完整 IgG Y1 抗体制备 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段

##### 细胞培养和瞬时转染:

37°C 下 5% CO<sub>2</sub> 气氛中在含有 10% 胎牛血清和 40 微克/毫升庆大霉素的 F-12 培养基中培养 CHO<sup>-</sup> 细胞。转染之前的一天在 90mm 培养皿上接种  $1-1.5-1 \times 10^6$  细胞。各自在分开的真核表达系统中,用 10 微克编码 Y1 抗体的可变轻链和可变重链的 DNA 共同转染培养物。利用 FuGene (Roche) 转染试剂技术进行转染。

在非选择性培养基中生长 2 天之后,在含有 550 微克/ml 新霉素和 3 微克/ml 嘌呤霉素的 F-12 培养基中将细胞培养 10-12 天。使细胞受到胰蛋白酶作用并且通过在 Costar 96-孔板中 0.5 细胞/孔限制性稀释来克隆。取各菌落,接种在 6 孔培养皿中并且转移到烧瓶中以进一步筛选(测定表达水平和分泌到生长培养基中的抗体)。

##### 细胞培养和长期转染:

37°C 下 5% CO<sub>2</sub> 气氛中在含有 10% 胎牛血清和 40 微克/毫升庆大霉素的 F-12 培养基中培养 CHO<sup>-</sup> 细胞。转染之前的一天在 90mm 培养皿上接种  $0.8-1 \times 10^6$  细胞。用 10 微克编码 Y1 抗体的可变轻链和可变重链的 DNA 共同转染培养物,抗体是在 CMV (巨细胞病毒) 启动子调控下,sv-40 启动子调控下 dhfr 基因克隆的。利用 FuGene (Roche) 转染试剂技术进行转染。在非选择性培养基中生长 2 天之后,为了筛选表达高水平的完整 Y1 抗体的克隆(有限稀释)在含有 100nM-5 $\mu$ M 甲氨喋呤

(MTX)和透析过的胎牛血清在培养基中培养细胞。

#### 重链和轻链分泌的测定:

建立夹心 ELISA 分析来测定分泌到转染的 CHO 细胞上清液中的抗体浓度。为了定量测定抗体的浓度,使用下面的试剂:单克隆抗人 IgG1 (Fc) (Sigma)为包被抗体,山羊抗人 IgG ( $\gamma$ -链特异性)生物素偶联物为检测剂(Sigma),和纯的人 IgG1,  $\lambda$ (Sigma)为标准物。

#### 从细胞制备和纯化 Mab:

在摇瓶中在补充有 10% 胎牛血清,新霉素和嘌呤霉素(如上所述)的 F-12 培养基中每瓶将细胞培养至  $1-2 \times 10^8$  细胞的最终浓度。关于抗体制备,在含有 2%胎牛血清的相同的培养基中将细胞再培养两天。

在蛋白质 G-琼脂糖柱(Pharmacia)和离子交换柱 Q 琼脂糖凝胶(Pharmacia)上纯化分泌的抗体。在 20mM 磷酸钠缓冲剂, pH 7.0 中结合;用 0.1M 甘氨酸缓冲剂, pH 2.5-3.0 进行洗脱。通过 UV 吸光度和 ELISA 测定纯化的抗体的量。在不变性条件下,全 IgG 抗体具有其预期的 160kD 分子量。在变性凝胶中,重链和轻链分别具有 55 和 28 kD 预期的分子量。

#### Y1 IgG 片段化成 Fab F (ab')<sub>2</sub> :

IgG 分子由两个相同的轻链和两个相同的重链组成。这些链通过非共价相互作用和共价键(二硫键)的联合在折叠(结构域)中保持在一起。轻链由一个可变区和一个恒定区组成。重链由一个可变区(V<sub>H</sub>)和三个分开的恒定区(CH 1, 2 和 3)组成。重链恒定区 1(CH1)和重链恒定区 2(CH2)容易被酶酶解。在这个位点酶切产生 Fab 或 F (ab')<sub>2</sub> 片段和 Fc 部分。分子的 Fab 部分保留分子的抗原结合能力,但是具有低非特异性结合。Fab 部分最适合那些期望没有效应子功能的抗原结合能力的情况。

体内 Fab 和 F (ab')<sub>2</sub> 片段被用作诊断和治疗试剂。为了制备肿瘤特异性对所有的细胞的损伤的癌症化疗药物,药物能与结合肿瘤细胞表面抗原的抗体结合。使用 Fab 或 F (ab')<sub>2</sub> 片段代替完整 IgG 提供了几点好处:

- (1) 片段能更容易地穿过毛细管并且扩散在组织表面。
- (2) 与完整的没有结合的 IgG 相比,更快地澄清没有与偶联物结合的片段;因此,将有更多的片段治疗物质达到目标区。

### 制备 Fab 片段的详细方法：

对 2 mg/ml 半胱氨酸 HCl (用于制备 F(ab')<sub>2</sub> 片段) 和 20mg/ml (用于制备 Fab 片段) 浓度消化缓冲液中 2 ml 固定化无花果蛋白酶柱子施加 1 mg 纯化的 Y1 抗体, 37 °C 下温育 5 小时(对于 Fab) 和 20 小时(F(ab')<sub>2</sub>)。通过用 4 ml 免疫纯结合缓冲液洗脱消化物来终止反应。通过使用蛋白 A 柱子使用结合缓冲液实施从没有消化的 IgG 和 Fc 片段分离 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。流出液中含有 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub>。通过在 280nm 读出吸光度, 合并含有片段的峰级分。浓缩片段并且使用截留分子量是 10,000 道尔顿的微型浓缩器对 PBS 透析。通过利用 280nm 的吸光度, 凝胶电泳和 HPLC, 测定蛋白质回收, 纯度和特征。

### 细胞提取物 (溶胞产物) 制备

收集  $2 \times 10^6$  细胞并且在微型离心机中离心 (1300 rpm, 4°C, 5 分钟)。为了洗涤, 对沉淀加 0.5-1 ml PBS+pi 并且轻轻混合。和上面一样将混合物离心。反复用 0.5-1 ml PBS+pi 洗涤, 和上面一样将混合物离心。将沉淀的细胞重复悬浮于细胞溶解缓冲液中 (200 微升 /  $20 \times 10^6$  细胞沉淀。使用的细胞溶解缓冲液是 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM PMSF 1 % NP-40, 和 1 mM EDTA, 但是也可以使用其他合适的细胞溶解缓冲液。缓冲液在冰上温育大约 60 分钟, 然后离心 (3000 rpm, 4°C, 5 分钟)。收集上清液并且分成等份。

### 粗膜级分的制备和膜蛋白的提取

将 20 体积匀化缓冲液加给一体积的细胞。使用的匀化缓冲液是 2% (w/v) Tween 20, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 和 25 mM Tris-HCl, pH 7.4。还加入下面的蛋白酶抑制剂: 1mM PMSF, 5 微克/ml 亮抑酶肽, 5 微克/ml 抑肽酶。在带有旋转聚四氟乙烯棒 (Ultra-Torex) Potter-Elvehjem 匀浆器中 3-5 次将细胞匀化。在匀化期间样品保持冷却, 然后在冰浴上搅拌 1 小时。使样品在均化器中在操作几次, 然后在 4°C 下以 3000 g 离心 30 分钟。收集上清液并且在 4°C 下以 45000 g 离心 1 小时 (19000 rpm 转子 ss-34)。从 45000g 离心物去除上清液。向沉淀加 50 mM Tris 7.4, 1mM EDTA, 1% NP-40 和蛋白酶抑制剂的溶液, 将溶解的沉淀放置在冰上 1 小时。

### HPLC 柱上膜级分纯化

对于膜级分纯化使用 RPC 柱 (Phannacia Type PLRP-S 300 A)。

使用缓冲液(A) 20mM Tris 8.0 和(B) 60% 丙醇 DDW 溶液。流速是 1 毫升/分钟, 除了洗涤步骤期间流速是 2 毫升/分钟。在室温下进行整个程序。

用缓冲液 A 以 1: 4 的比例稀释样品缓冲液(62mM Tris pH 6.8, 10% 甘油, 3% SDS, 720mM 巯基乙醇)加入 Jurkat 或 KG-1 膜级分的免疫沉淀(IP)之后的洗脱样品。

将样品加到柱子上, 收集流出的液体。用缓冲液 A 冲洗柱子直到流出物光密度降至 0。

根据下面的程序从柱子洗出蛋白质: 用 80% A 5 分钟, 然后是 40 分钟的 80-0% 的 A 和 20-100%B 的梯度。然后施加第二梯度, 使得流出物的成分达到 80% A, 使用该组合物洗涤柱子 5 分钟以上。在级分收集器中收集洗出液, 1 ml 级分规模。

在 Speed-Vac 蒸发器中将样品蒸发至小体积, 然后利用 SDS-PAGE (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 和蛋白质印迹进行分析。

#### Q- 琼脂糖柱子上正常人血浆的纯化

使用起始缓冲液将 5 ml 正常人新鲜冷冬血浆稀释 1: 10 并且通过 0.45 微米注射式过滤器(Sartorius, cat # 16555)过滤。起始缓冲液是 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 并且含有蛋白酶抑制剂 (5 微克/毫升亮抑酶肽, 5 微克/毫升抑肽酶, 和 1mM PMSF)。

5 ml HiTrap Q 琼脂糖 柱子(Amersham Pharmacia, cat #; 17-1154-01) 连接 P-1 蠕动泵(Amersham Pharmacia)。根据商业说明以大约 4 毫升/分钟的流速冲洗柱子。稀释的过滤过的血浆加到柱子上, 收集流出的液体。用 20 体积的 0.3 M NaCl 的起始缓冲液溶液冲洗柱子。用起始缓冲液中 0.6 M, 0.8 M, 和 1.0 M NaCl 溶液洗脱蛋白质。洗脱体积分别是 50, 20 和 20 ml。整个过程在 4℃ 下进行。

在双份凝胶上对洗脱级分进行 SDS-PAGE 分析, 接着使用生物素化 Y1 和抗体 181 作为阴性对照进行蛋白质印迹分析。在 0.6M NaCl 洗脱级分中发现纤维蛋白原  $\gamma$  原型。1.0 M NaCl 洗脱级分含有补体化合物 4 (CC4), lumican, 凝血酶原, 和间  $\alpha$  抑制剂。

#### 在 HPLC 柱子上正常人血浆的纯化

Q 琼脂糖纯化的正常人血浆与脲(达到至少 8M 的最终浓度), DTT (达到 30 mM 的最终浓度)和 TFA (达到 0.1%的最终浓度)。

将纯化的血浆溶液加到 3 毫升 RPC 柱子 (AmersOham Pharmacia) 上, 收集流出的液体。用缓冲液 A 冲洗柱子直到流出物光密度降至 0。根据下面的程序从柱子洗出蛋白质: 用 90% A 5 分钟, 然后是 40 分钟的 90-0% 的 A 和 10-100%B 的梯度。然后施加第二梯度, 使得流出物的成分达到 90% A, 使用该组合物连续洗涤柱子 5 分钟以上。使用的缓冲液是 (A) DDW 中的 0.1 % TFA 和 (B) DDW 中的 80% CAN 和 0.1% TFA。流速是 1 毫升/分钟, 除了洗涤步骤期间流速是 2 毫升/分钟。

在级分收集器中收集洗出液, 1 ml 级分规模。在室温下进行整个程序。

在 Speed-Vac 蒸发器中将样品蒸发至小体积, 然后利用 SDS-PAGE 和蛋白质印迹进行分析。

#### Y1 受体的蛋白质印迹分析-印迹之后过滤器的处理

室温下使用 5% 脱脂奶封闭硝基纤维素膜 1 小时。将硝基纤维素膜洗涤三次, 每次 5 分钟, 使用 PBS 中 0.05% Tween 20。室温下在 2% 脱脂奶 PBS 溶液中使用 5 微克/毫升 Y1-生物素 (或者 181-生物素) 温育膜 1 小时。然后将膜洗涤三次, 每次 5 分钟, 使用低于室温 (大约 4℃ 至大约 10℃) 的冷的 PBS 中 0.05% Tween 20。然后在 2% 脱脂奶, 0.05% Tween 以 SAV-HRP (链霉抗生物素蛋白-HRP) (1 g/ml 的终浓度) 的 1: 1000 稀释度低于室温下温育膜。稀释在室温下进行 (大约 25℃), 然后在使用之前在冰上将稀释的 SAV-HRP 冷却 10-15 分钟。轻轻摇动进行温育 1 小时。与 SAV-HRP 温育之后, 如上所述将膜洗涤。根据厂商说明将膜与 Super Signal 混合物 (Pierce) 温育 5 分钟, 然后干燥过量的溶液。使用膜, 将它暴露给 X-射线胶片 (Fuji), 将胶片显影。

#### 实施例 7: 重组 glycojalicin (GC) 的原核表达

编码 glycojalicin (GC, GPIb $\alpha$  氨基酸 1 至氨基酸 493) 的 DNA 片段被克隆到 IPTG 可诱导原核载体盒中。在 37℃ 下将携带新构建的质粒的大肠杆菌 (BL21 DE3) 细胞培养至 O. D. 0.7-0.8, 然后在 IPTG 存在下在 37℃ 下温育 3 小时用于诱导。

将半纯化人血小板产生的 glycojalicin ("GC") 或者将来自诱导的和没有诱导的细胞的大肠杆菌细胞溶胞产物 ("总") 加给 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 进行分析。使用下面的物质进行蛋白质印迹分析: 生物

素化 Y1-scFv, 多克隆兔抗-人 glycojalicin 抗体, 商售小鼠抗-人 CD42 单克隆抗体 (SZ2 Immunotech, PM640 Serotec, HIP1 Pharmigen, AN51 DAKO), 和抗 GPIIb 的 N-末端的多克隆抗体 (Sc-7071, Santa Cruz)。

两种多克隆抗体识别重组细菌产生的 glycojalicin 和天然人血小板产生的 glycojalicin。Y1-scFv 和商售抗体识别天然人产生的 glycojalicin, 但是不识别细菌产生的重组血小板 glycojalicin。图 45。

原核系统(例如大肠杆菌)没有翻译后修饰机理, 例如糖基化和硫酸化机理。因此, 不被细菌产生的 glycojalicin 的 Y1-scFv 识别支持这样的结论, 即翻译后修饰, 例如糖基化和硫酸化, 对于 Y1-scFv 结合 glycojalicin 是必需的。

#### 用于血液 / 骨髓样品的 FACS 程序

样品来自医院。患者样品 30 微升 / 试管。加入 5 微升 / 试管的 CD33-APC (用于 AML) 或 CD19-APC (用于 B-CLL) 或 CD38-APC (用于多发性骨髓瘤)。加入 5 微升 / 试管的 CD45-PerCp 5 毫升的 scFv-Y1 或对照 scFv-N31 或 CD162-PE (KPL1)。低摇动速度下在 4℃ 下将试管温育 30 分钟。加入 2ml PBS 洗涤并且以 1200rpm 离心 5 分钟。弃除上清液。

使用溶解步骤继续一步测试:

加入 500 微升用 ddH<sub>2</sub>O 以 1: 10 稀释的 BD 赖氨酸溶液 (加给患者 300 微升)。以高速涡旋并且在 4℃ 下温育 12 分钟。如上所述进行洗涤。弃除上清液。加入 500 微升 PBS。用 FACS 分析样品, 根据国际标准, 使用血样获得分析。

对于两项或多项测试: 工作缓冲液是 PBS + 1% BSA + 0.05% 叠氮化钠。如上所述温育和洗涤。

红细胞溶解是测试中的最后步骤, 接着用 500 微升 PBS 再次悬浮。

#### 实施例 8: 三聚体的构建

载体 pHEN-Y1, 编码原 Y1, 利用 PCR 分别对 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 区扩增。对于 V<sub>L</sub> PCR 反应使用有义寡核苷酸 5' AACTCGAGTGAGCTGACACAGGACCCT, 和反义寡核苷酸 5'-TTTGTCGACTCATTTCTTTTTTGCGGCCGACC。将期望大小的 cDNA 产物约 350 bp 纯化, 测序, 并且用 XhoI 和 NotI 限制性内

切酶消化。

使用相同的程序扩增  $V_H$  区 (使用有义寡核苷酸 5'-ATGAAATACCTATTGCCTACGG 和反义寡核苷酸 5'-AACTCGAGACGGTGACCAGGGTACC)。用 NcoI 和 XhoI 限制性内切酶消化  $V_H$  PCR 产物。对 pHEN 载体进行三次连接和用 NcoI-NotI 预消化程序。最后的载体指定为 pTria-Y1。

大肠杆菌转化之后,取几个克隆用于进一步分析,包括 DNA 测序,蛋白质表达,和从细菌的周质间隙提取。进行还原条件下的 SDS-PAGE 和蛋白质印迹分析来证实 Y1 三聚体的大小。

#### 实施例 9: 二聚体的构建

用 XhoI 限制性内切酶将上述载体 pTria-Y1 线性化,将合成的互补双链寡核苷酸 (5'-TCGAGAGGTGGAGGCGGT 和 5' TCGAACCGCCTCCACCTC) 预退火并且与 Y1-重链和 Y1-轻链之间的 XhoI 位点连接。这个新的载体指定为 pDia-Y1。和对于三聚体的描述一样,证实 DNA 序列和蛋白质表达。

#### 实施例 10: 二聚体和三聚体的表达和纯化

在大肠杆菌中的表达基本上与对于 scFv-Y1 的描述相同。但是,从转化的大肠杆菌细胞的周质纯化 Y1 二聚体和三聚体是不同的。scFv Y1 单体形式能在 Protein-A 琼脂糖小球的亲和柱子上纯化。但是 Y1 的多聚体形式通过这个方法却没有效。因此,从细菌提取的周质蛋白质用 60%硫酸铵沉淀过夜,再次悬浮于水中,加到用 0.1. XPBS 预平衡过的 Sephacryl-200 (Pharmacia) 大小排阻柱子上。收集级分并且通过 HPLC 分析,并且收集含有二聚体或三聚体形式的分离的级分进行 FITC 标记和 FACS 分析。

#### 实施例 11: Y1 二聚体和三聚体与细胞的结合

利用“三步染色方法”对 Jurkat 细胞进行 FACS 分析。首先,对粗提物或纯化的没有标记的 scFv 染色,然后对小鼠抗-myc 抗体,最后对 FITC-或 PE-偶联抗-小鼠抗体。FACS 分析需要  $5-8 \times 10^5$  细胞,它们再次悬浮于 PBS+1% BSA。在 4℃ 下进行结合 1 小时每一个步骤之后,洗涤细胞并且再次悬浮于 PBS+1% BSA。最后染色步骤之后,通过再次悬浮于 PBS, 1% BSA, 2% 甲醛中固定细胞,然后进行 FACS (Becton-Dickinson) 分析。

将 Y1-scFv 的结合与二聚体和三聚体的结合相比较。在该项分析中,所有三种形式的结合曲线非常相似,表明上述分子中的修饰不改变,掩盖或破坏 Y1 与它的配体的表观结合亲和性。

#### 实施例 12: 与 应用 KG-1 细胞的放射受体结合测试, S-S Y1-二聚体与 CONY1 和 Y1-IgG 的亲和性比较研究

测试系统包括使用放射性配体, 通过使用 Y1-IgG 构建体或 Bolton-Hunter (CONY1) 试剂上的氯胺 T, 通过使用  $^{125}\text{I}$  碘化制备该放射性配体。测试试管中, PBS + 0.1 % BSA, pH 7.4 中含有  $5 \times 10^6$  KG-1 细胞 / 0.2 ml 和带有不同量的没有标记的竞争剂的标记的示踪剂。4 °C 下搅拌下温育 1 小时之后, 用冷的缓冲液充分洗涤细胞并且用于放射性计数。

对于放射性受体结合测试 (RRA), 使用 2 ng/试管的  $^{125}\text{I}$ -Y1-IgG, 并且用三种分子的每一个进行竞争。图 46 给出结果。该图中的结果证明 S-S Y1 二聚体的抗体亲抗原性比大多数完整 Y1 抗体低 2 倍, 并且比 CONY 1 的高 30 倍。在该项实验中估计 Y1-IgG 的亲和性是  $2 \times 10^{-8}$  M。因此相应的二聚体的亲和性是  $4 \times 10^{-8}$  M。

在使用标记的 CONY1 的第二 RRA 中, 使用 100 ng/试管的  $^{125}\text{I}$ -Y1-IgG, 使用三种分子的每一种进行竞争。图 47 给出结果。这个图表明 S-S 二聚体的亲和性比 CONY1 的高 20 倍。该项实验中 CONY 1 亲和性总的估计是  $10^{-6}$  M。二聚体相应的亲和性因此是  $5 \times 10^{-8}$  M。

#### 实施例 13: Y1-cys-kak (半胱氨酸二聚体) 的制备

42 °C 下将 1 升  $\lambda$  pL-y1-cys-KAK 细胞培养物温育 2-3 小时。这种培养物以 5000 RPM 离心 30 分钟。沉淀再次悬浮于 180 ml 的 TE (50mM Tris-HCl pH 7.4, 20mM EDTA) 中。加入 8 ml 的溶菌酶 (取自 5 mg/ml 原种液) 并且温育 1 小时。加入 20 ml 的 5M NaCl 和 25 ml 的 25%, 并且又温育 1 小时。4 °C 下以 13000 RPM 将混合物离心 60 分钟。弃除上清液。借助组织匀浆器 (或匀化器) 将沉淀再次悬浮于 TE。重复该过程 3-4 次直到包涵体 (沉淀) 颜色呈现灰/浅棕。包涵体溶解于 6M 胍-HCl, 0.1M Tris pH 7.4, 2 mM EDTA (10 ml 溶解缓冲液中 1.5 克的包涵体提供约 10 mg/ml 可溶性蛋白质)。这被温育至少 4 小时。测定蛋白质浓度并且达到 10 mg/ml 的浓度。加入 DTT 达到最后浓度是 65 mM 并且在室温下温育过夜。将 10 ml 蛋白质 (一滴一滴地) 稀释

到含有 0.5 M 精氨酸, 0.1 M Tris pH 8, 2 mM EDTA, 0.9 mM GSSG 的溶液引发重折叠。重折叠溶液在 10℃ 下温育 48 小时。用含有 25 mM 磷酸盐缓冲液 pH 6, 100 mM 脲的缓冲液对含有蛋白质的重折叠溶液透析, 并且浓缩至 500 ml。浓缩的/透析的溶液与 SP-sepharose 柱子结合, 通过梯度 NaCl (最高达 1M) 洗脱蛋白质。

#### 实施例 14: 对 GC (glycocalicin) 的 ELISA

在 4℃ 下, 在 96 孔 Maxisorp 平板中将 100 ml 纯化的 glycocalicin 温育过夜。用 PBST (PBS+0.05% Tween) 将平板冲洗 3 次, 然后加 200 ml of PBST-奶 (PBST + 2% 脱脂奶), 室温下温育 1 小时。用 PBST 冲洗平板, 并且在 PBST-奶中加入不同浓度的单体和二聚体 (100 ml), 室温下温育 1 小时。然后冲洗平板并且加入抗-V<sub>L</sub> 多克隆 (来自用从 Y1 衍生的 V<sub>L</sub> 免疫的兔) (在 PBST-奶中以 1: 100 稀释), 温育 1 小时。冲洗平板并且加入抗-兔 HRP 再温育 1 小时。将平板冲洗 5 次并且用大约 15 分钟加入 100 微升 TMB 底物, 然后加入 100 微升的 0.5 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。在 ELISA 读数器上测定 450nm 的平板的光密度。

#### 实施例 15: Y1 四聚体的制备

设计构建体, 其中通过 PCR 在 Y1 的 C-末端加入下面的序列, LNDIFEAQKIEWHE, 并且克隆到 IPTG 可诱导表达载体盒中。该克隆命名为 Y1-生物标记。该序列是 BirA 酶的底物, 在自由生物素的存在下, 该酶能使生物素与赖氨酸残基 (K) 共价连接 (抗原特异性 T 淋巴细胞的表型分析 (Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes), Science. 1996 年 10 月 4 日; 274 (5284): 94-6, Altman JD 等)。将这种构建体制备成 BL21 细菌细胞中的包涵体。如上所述进行重折叠。包涵体溶解于脲-DTT。通过在含有精氨酸-Tris EDTA 的缓冲剂中稀释进行重折叠。HiTrapQ 离子交换纯化之后进行透析和浓缩。

根据厂商说明, 纯化的 Y1-生物标记 scFv 与 BirA 酶 (从 Avidity 购得) 和生物素温育。通过 HABA 测定分析生物素化 Y1-生物标记 (估计每个分子的生物素的量), 并且证明大约是 > 0.8 生物素残基/分子。

生物素化的 Y1-生物标记与链霉抗生物素蛋白 -PE (Phycoerythrin) 温育, 形成复合体, 并且在使用 KG-1 细胞 (对 Y1

呈阳性)的 FACS 实验中使用。由于抗体亲抗原性提高,结合的灵敏性提高至少 100 倍。链霉抗生物素蛋白能与最多 4 个生物素化 Y1-生物标记分子结合。

Y1-生物标记的序列如下,并且是 SEQ ID NO: 211:

```

1   MEVQLVESGG GVVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ
41  APKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL
81  YLQMNSLRAE DTAVYYCARM RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG
121 SGGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY
161 YASWYQKPG QAPVLVIYK NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA
201 SLTITGAQAE DEADYYCNSR DSSGNNVVFV GGTKLTVLGG
241 GGLNDIFEAQ KIEWHE

```

#### 实施例 16: Y17 活性表征

为了确定 Y17 与 GPIb $\alpha$  结合的特异性,使用选择性裂解人血小板 GPIb 的来自 *Pastoral haernolytica* 的酶 0-唾液糖蛋白内切酶。0-唾液糖蛋白内切酶特异性地只酶切含有唾液酸化 0-连接多糖,而不裂解 N-连接糖蛋白或没有糖基化的蛋白质。据报道这种酶切割 GPIb, GPIb 是 0-糖基化程度高的,但是不裂解 GPIIb-11Ia 或者血小板上的其它受体。如免疫印迹和通过 FACS 分析所证明的,用酶切 GPIb 的 0-唾液糖蛋白内切酶诱导洗涤过的血小板,消除 Y17 的以及抗 GPIb $\alpha$  的单克隆抗体 (MCA466S-serotec) 对 GPIb 的结合。这些蛋白质内切酶不改变抗 GPIIb/IIIa 的单克隆抗体 (抗 CD61) 的结合 (图 4)。

#### 实施例 17: 血小板 GPIb 上 Y17 表位的鉴定

鉴定血小板 GPIb 上 Y17 表位的令人感兴趣的方法是使用其在血小板 GPTb 上的酶切位点完全表征的蛋白质内切酶。

##### 17.1: Mocarhagin 对 Y1 表位图谱的作用

Mocarhagin 是一种眼镜蛇蛇毒金属蛋白酶,它在残基 glu-282 和 asp-283 之间的一个单一位点特异性酶切血小板 GPIb $\alpha$ ,从而产生两种稳定产物: 约 45-kDa N-末端片段 (His1-Glu282), 存在于上清液中, 和膜结合的 100kDa C-末端片段。

用 mocarhagin 处理洗涤过的血小板, 并且在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上对血小板溶胞产物进行电泳分离并且转移给硝基纤维素。使用 Y1 的 mocarhagin 处理过洗涤过的血小板的蛋白质印迹分析表明缺少了相应于 GPIb 的泳带 (135 kDa), 并且 Y17 与 N-末端 45 kDa 胰蛋白酶片段结合。抗 GPIb $\alpha$  的 C-末端片段的单克隆抗体 MCA466S 与 100kDa C-末端片段反应, 同时识别 GPIb $\alpha$  的 N-末端的单克隆抗体 S. C. 7071 与 Y17 识别的相同的 45 kDa N-末端片段反应 (图 14)。

用 Mocarhagin 处理 glycojalicin 给出和用洗涤过的血小板观察到的那些结果相似的结果, 表明 Y1 和单克隆抗体 S. C. 7071 与 GPIb $\alpha$  的 45 kDa N-末端酶切产物片段结合 (图 8)。这些结果提示 Y17 的表位包含在序列 His1-Glu282 中。

### 17.2: 组织蛋白酶 G 对 Y17 表位图谱的作用

组织蛋白酶 G, 一种嗜中性白细胞丝氨酸蛋白酶, 在残基 Leu-275 和 Tyr-276 之间的第一酶切位点和残基 Val-296 和 Lys-297 之间的第二酶切位点酶切 glycojalicin。组织蛋白酶 G 处理 glycojalicin 产生两种 N-末端片段: 小的 N-末端 42 kDa 片段 (His1-Leu275), 和大的 45 kDa N-末端片段 (His1-Val-296), 和约 95 kDa C-末端片段。组织蛋白酶 G 消化产生的 Glycojalicin 和 glycojalicin 片段在 SDS-聚丙烯酰胺上进行电泳分离, 并且转移给硝基纤维素。Y1 与较大的片段 (His 1-Val-296) 结合, 而不与较小的 N-末端段 (His1-Leu275) 结合。此外, 识别 His1-Leu 275 中的表位的单克隆抗体 S. C. 7071 与两种片段结合 (图 12)。mocarhagin 和组织蛋白酶 G 的 N-末端肽蛋白质酶解片段的分析表明, BPIb $\alpha$  氨基酸序列 Tyr-276-Glu-282 是 Y17 的结合的重要的识别基序。

### 实施例 18: Y17-scFv 对 vWF-依赖性凝集作用的影响

在 Y17 不同的浓度下, 测试 Y17-scFv 对血小板 vWF-依赖性凝集作用的影响。与 Y1 相反, 10, 25 或 50 微克/毫升最终浓度下, Y17 不抑制瑞斯托菌素诱导的洗涤过的血小板中 vWF-依赖性血小板凝集作用。mocarhagin 和组织蛋白酶 G 的 N-末端肽蛋白质酶解片段的分析表明, BPIb $\alpha$  氨基酸序列 Tyr-276-Glu-282 是 Y17 和 Y1 的结合的重要的识别基序。因为 Y17 不抑制血小板凝集作用, 似乎 Y1 和 Y17 不与相同的序列结合, 但是与重叠序列结合。

## 序列表

- <110> 生物技术通用公司  
 <120> 分离的包括含硫酸根部分的表位的分子，抗这样的表位的抗体，和它们的应用  
 <130> 10793/49  
 <140> PCT/US01/49442  
 <141> 31-12-2001  
 <150> 09/751, 181  
 <151> 29-12-2000  
 <150> 60/258, 948  
 <151> 29-12-2000
- <160> 204  
 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人 (Homo sapiens)
- <400> 1  
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Val  
 1                    5                    10
- <210> 2
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人
- <400> 2  
 Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Leu Gly  
 1                    5                    10
- <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 人
- <400> 3  
 Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Leu Arg Val  
 1                    5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Thr

1                   5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Phe Gln Leu Val

1                   5                   10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr

1                   5

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr

1                   5                   10                   15

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

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

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser  
 50 55 60

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

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val  
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala  
 100 105 110

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Met Arg Ala Pro Val Ile  
 1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Pro Trp Asp Asp Val Thr Pro Pro  
 1 5

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Gly Phe Pro Arg Ile Thr Pro Pro Ser Ala Glu Ile  
1                   5                   10

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Gly Phe Pro Met Pro  
1                   5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Gly Phe Pro His Ser Ser Ser Val Ser Arg  
1                   5                   10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Arg Phe Pro Met Arg His Glu Lys Thr Asn Tyr  
1                   5                   10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Arg Phe Pro Pro Thr Ala Thr Ile  
1                   5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Thr Gln Arg Arg Asp Leu Gly  
1                   5

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

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

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Gly Phe Pro Val Ile Val Glu Glu Arg Gln Ser Thr  
1                    5                    10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Arg Phe Pro Gln Arg Val Asp Asn Arg Val  
1                    5                    10

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Thr Gly Gln Ser Ile Lys Arg Ser  
1                    5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Leu Thr His Pro Tyr Phe  
1                    5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

Leu Arg Pro Pro Gln Ser  
1                   5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Thr Ser Lys Asn Thr Ser Ser Ser Lys Arg His  
1                   5                   10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Arg Tyr Tyr Cys Arg Ser Ser Asp Cys Thr Val Ser  
1                   5                   10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Phe Arg Arg Met Glu Thr Val Pro Ala Pro  
1                   5                   10

<210> 25

<211> 277

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1                   5                   10                   15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
                  20                   25                   30

Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
                  35                   40                   45

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

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr  
65                   70                   75                   80

Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
                  85                   90                   95

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                  100                   105                   110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Arg Ala Pro Val Ile Trp Gly  
                  115                   120                   125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
                  130                   135                   140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala  
145 150 155 160

Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp  
165 170 175

Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
180 185 190

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
210 215 220

Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser  
225 230 235 240

Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
245 250 255

Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
260 265 270

Leu Asn Gly Ala Ala  
275

<210> 26

<211> 464

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Gln Asp Thr Gly  
1 5 10 15

Ser Trp Ala Asp Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg  
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

Asp Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala  
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Arg Ala Pro Val Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
130 135 140

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val



	35		40		45														
Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu				
	50					55					60								
Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe				
	65				70					75					80				
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala				
				85					90						95				
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser				
			100					105						110					
Gly	Asn	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly				
	115						120							125					
Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu				
	130					135								140					
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe				
	145				150					155					160				
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val				
				165					170						175				
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys				
			180					185						190					
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser				
	195					200								205					
His	Lys	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu				
	210					215					220								
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser											
	225				230														

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 28

Phe Leu Thr Tyr Asn Ser Tyr Glu Val Pro Thr  
1                   5                   10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 29

Thr Asn Trp Tyr Leu Arg Pro Leu Asn  
1                   5

<210> 30

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

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

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

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                  35                   40                   45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe  
                  50                   55                   60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
Ala Thr			
<210>	31		
<211>	98		
<212>	PRT		
<213>	人		
<400>	31		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Leu Gly Trp Met			
	35	40	45
Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Thr Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys			
	85	90	95

Ala Arg

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

Ala Thr

<210> 33

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

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

Ala Arg

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 34

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80

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

Ala Arg

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 35

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

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

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

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

Gln Gly Trp Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 36

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> X

<222> (1)..(98)

<223> Xaa

<400> 36

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

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

Tyr Met His Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80



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

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

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

Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Ala

<210> 39

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 40

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

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

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

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

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80

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

Ala Arg

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 41

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 42

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 42

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

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

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

Gly Trp Ser Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Glu Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 43

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 43

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
          50                   55                   60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

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

Ala Arg

<210> 44

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 45

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 46

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

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

Ala Arg

<210> 47

<211> 92

<212> PRT

<213> 人

<400> 47

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala  
 85 90

<210> 48

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 48

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 49

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

&lt;400&gt; 49

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 50

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys



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

<210> 53

<211> 99

<212> PRT

<213> 人

<400> 53

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

Ala His Arg

<210> 54

<211> 96

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

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

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

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

Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser  
          50                   55                   60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
                  85                   90                   95

<210> 55

<211> 96

<212> PRT

<213> 人

<400> 55

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

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

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Ser Thr Ser  
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

<210> 56

<211> 100

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

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

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

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala His Arg  
100

<210> 57

<211> 100

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val 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 Asp His  
20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala  
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg  
100

<210> 58

<211> 100

<212> PRT

<213> 人

<400> 58

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 Asp His  
20 25 30

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

Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala



<213> 人

<400> 60

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
50                   55                   60

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

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

Ala Lys

<210> 61

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 61

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

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

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

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



<213> 人

<400> 63

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg

<210> 64

<211> 100

<212> PRT

<213> 人

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala



<213> 人

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val 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 Asn His  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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

Val Lys

<210> 67

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Ser  
20 25 30

Asp Met Asn Trp Val His Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val



<213> 人

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val 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 Val Ser Ser Asn  
                   20                   25                   30

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

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

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

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

Arg

<210> 70

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 70

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys



<213> 人

<400> 72

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Ser Asn 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

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

Val Arg

<210> 73

<211> 35

<212> PRT

<213> 人

<400> 73

Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
1                   5                   10                   15

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

Tyr Ala Asp  
                  35

<210> 74

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 74

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Arg

<210> 75

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Arg

<210> 76

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 76

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Arg

<210> 77

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 77

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

<210> 78

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val 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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Arg

<210> 79

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val 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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg

<210> 80

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 80

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

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

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

Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	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

<210> 81

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

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

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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 Arg

<210> 82

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val 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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 83

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 83

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 84

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val 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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala 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 Arg

<210> 85

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 85

Glu Val Gln Leu Val 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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg

<210> 86

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 86

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

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

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

Gly Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50                   55                   60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                  85                   90                   95

Arg

<210> 87

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 87

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

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

Arg

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 88

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

Arg

<210> 89

<211> 99

<212> PRT

<213> 人

<400> 89

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly  
                  20                   25                   30

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

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50                   55                   60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
                  85                   90                   95

Cys Ala Arg

<210> 90

<211> 99

<212> PRT

<213> 人

<400> 90

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly



<210> 92

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 92

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

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

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
   50                   55                   60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95

Ala Arg

<210> 93

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly  
                   20                   25                   30

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

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg

<210> 94

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 94

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg

<210> 95

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 95

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
       50                   55                   60

Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65                   70                   75                   80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95

Ala Arg

<210> 96

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 96

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Val Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser

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

Ala Arg

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 97

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

Ala Arg

<210> 98

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 98

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser  
                  20                   25                   30

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

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
                  50                   55                   60

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

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Cys Cys  
                  85                   90                   95

Ala Arg

<210> 99

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 99

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser



<210> 101

<211> 99

<212> PRT

<213> 人

<400> 101

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

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

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

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 102

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 102

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Asn Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg

<210> 103

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 103

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

Arg

<210> 104

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 104

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                  50                   55                   60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                  85                   90                   95

Arg

<210> 105

<211> 97

<212> PRT

<213> 人

<400> 105

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Arg

<210> 106

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 106

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

Ala Arg

<210> 107

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 107

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
50                   55                   60

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

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

Ala Arg

<210> 108

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 108

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

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

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 109

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 109

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

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

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

Val Arg

<210> 110

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 110

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
                  20                   25                   30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
          50                   55                   60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80

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

Ala Arg

<210> 111

<211> 98

<212> PRT

<213> 人

<400> 111

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

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 112

<211> 101

<212> PRT

<213> 人

<400> 112

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

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala  
 50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
 65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg

100

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 87

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 113

Arg Lys Leu Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Arg Lys Ala Ser Ser Tyr  
 1                   5                   10                   15

Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile His Cys Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
                   20                   25                   30

Gly Leu Lys Gly Trp Met Gly Gly Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Lys Thr  
                   35                   40                   45

Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Met Ser  
                   50                   55                   60

Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Gln Arg Ser Glu Asp Ile  
 65                   70                   75                   80

Asp Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                   85

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 114

Asp Tyr Gly Met Ser  
 1                   5

&lt;210&gt; 115

&lt;211&gt; 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 115

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

Gly

<210> 116

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 116

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

<210> 117

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 117

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
1                   5                   10

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 118

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
1                   5                   10

<210> 119

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 119

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser  
1                   5

<210> 120

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 120

Trp Val Arg Gln Ala Pro  
1                   5

<210> 121

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 121

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp  
1                   5                   10

<210> 122

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 122

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
1                   5

<210> 123

<211> 20

<212> PRT

<213> 人

<400> 123

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

Gly Gly Gly Ser  
                  20

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 124

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

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 125

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His  
1                   5

<210> 126

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 126

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Val  
1                   5

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 127

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Thr  
1                   5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 128

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Ala Thr  
1                   5

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 129

Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu Ser Leu Val  
1                   5                   10

<210> 130

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 130

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val  
1                   5                   10

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 131

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ser Val Arg Val  
1                   5                   10

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 132

Leu Leu Tyr Tyr Gly Gly Ala Tyr Val  
1                   5

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 133

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Val Ser Arg Val  
1                   5                   10

<210> 134

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 134

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Pro Tyr Val  
1                   5                   10

<210> 135

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 135

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Cys Pro Glu Phe Val  
1                   5                   10

<210> 136

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 136

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ala Trp Phe Val  
1                   5                   10

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 137



<210> 141

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 141

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Arg Leu Val  
1                   5                   10

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 142

Met Gln Gly Thr His Trp Arg Pro Thr  
1                   5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 143

Met Gln Gly Lys His Trp Pro Leu Thr  
1                   5

<210> 144

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 144

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Gly Phe  
1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 145

Met Gln Gly Thr His Arg Arg Ala Thr  
1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 146

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 147

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 147

Met Arg Gly Thr His Arg Arg Ala Thr  
1                   5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 148

Met Gln Gly Thr His Trp His Pro Thr  
1                   5

<210> 149

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 149

Met Gln Ala Leu Gln Ser Pro Thr  
1                   5

<210> 150

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 150

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ala Phe Val  
1                   5                   10

<210> 151

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 151

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Thr  
1                   5

<210> 152

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 152

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr  
1                   5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 153

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Phe Thr  
1                   5

<210> 154



<213> 人

<400> 157

Asp Ser Trp Asp Asn Ser Leu Val Ser Pro Val  
1                   5                   10

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 158

Met Gln Ala Leu Gln Ser Pro Ala Thr  
1                   5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 159

Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Val Thr  
1                   5

<210> 160

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 160

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala Tyr Val  
1                   5                   10

<210> 161

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 161

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Arg Val Asn Val  
1                   5                   10

<210> 162

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 162

Met Gln Ala Leu Arg Thr Arg Thr  
1                   5

<210> 163

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 163

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Phe Tyr Pro Val

1                    5                    10

<210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 164

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Val Thr

1                    5

<210> 165

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 165

Met Gln Gly Thr His Trp Arg Thr

1                    5

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 166

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Phe Tyr Val

1                    5                    10

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 167

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Leu Thr  
1 5

<210> 168

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 168

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Leu Gly Ser Val  
1 5 10

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 169

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Ser Tyr Val  
1 5

<210> 170

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 170

Gln Gln Asp Tyr Asn Leu Leu Thr  
1 5

<210> 171

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 171

Val Leu Tyr Met Gly Ser Gly Ser Ala Val  
1 5 10

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 172

Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Asn Thr  
1 5

<210> 173

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 173

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ala Cys Ala Val  
1                   5                   10

<210> 174

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 174

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Arg Thr  
1                   5

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 175

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Arg Pro Val  
1                   5                   10

<210> 176

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 176

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Asn Val  
1                   5                   10

<210> 177

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 177

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Arg Asn Val  
1                   5                   10

<210> 178

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 178

Met Gln Val Leu Gln Thr Arg Thr  
1                   5

<210> 179

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 179

Met Gln Ala Leu Gln Thr Arg Thr  
1 5

<210> 180

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 180

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Met  
1 5

<210> 181

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 181

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr  
1 5

<210> 182

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 182

Met Arg Ala Leu Gln Thr Pro Thr  
1 5

<210> 183

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 183

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Pro Gly Tyr Val  
1 5 10

<210> 184

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 184

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Gly Phe Val  
1 5 10

<210> 185

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 185

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Phe Leu Val

1                    5                    10

<210> 186

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 186

Met Gln Ser Ile Gln Leu Arg Thr

1                    5

<210> 187

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 187

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ile Val

1                    5                    10

<210> 188

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 188

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Thr

1                    5

<210> 189

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 189

Met Gln Ala Leu His Thr Arg Thr  
1                   5

<210> 190

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 190

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ser Val  
1                   5

<210> 191

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 191

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr  
1                   5

<210> 192

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 192

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Arg Thr  
1                   5

<210> 193

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 193

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Ala Ala Thr  
1                   5

<210> 194

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 194

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ala Thr  
1                   5

<210> 195

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 195

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

<210> 196

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 196

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Trp Ser Ala Val  
1                   5                   10

<210> 197

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 197

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Pro Arg Arg Leu Val  
1                   5                   10

<210> 198

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 198

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Pro Ser Gly Val  
1                   5                   10

<210> 199

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 199

Met Gln Ala Leu Gln Thr Leu Thr  
1                   5

<210> 200

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 200

Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu Leu Arg Val  
1                   5                   10

<210> 201

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<400> 201

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ala Leu Val  
1                   5                   10

<210> 202

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 202

Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Phe Gln Leu Val  
1                   5                   10

<210> 203

<211> 277

<212> PRT

<213> 人

<400> 203

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1                   5                   10                   15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
                  20                   25                   30

Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
                  35                   40                   45

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



<213> 人

<400> 204

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
20 25 30

Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
35 40 45

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

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr  
65 70 75 80

Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
85 90 95

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Arg Ala Pro Val Ile Trp Gly  
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala  
145 150 155 160

Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp  
165 170 175

Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
180 185 190

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr  
210 215 220

Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser

---

225					230					235					240
Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
				245					250					255	
Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys						
260					265										

内切蛋白酶对GPIb的  
a链的酶切位点

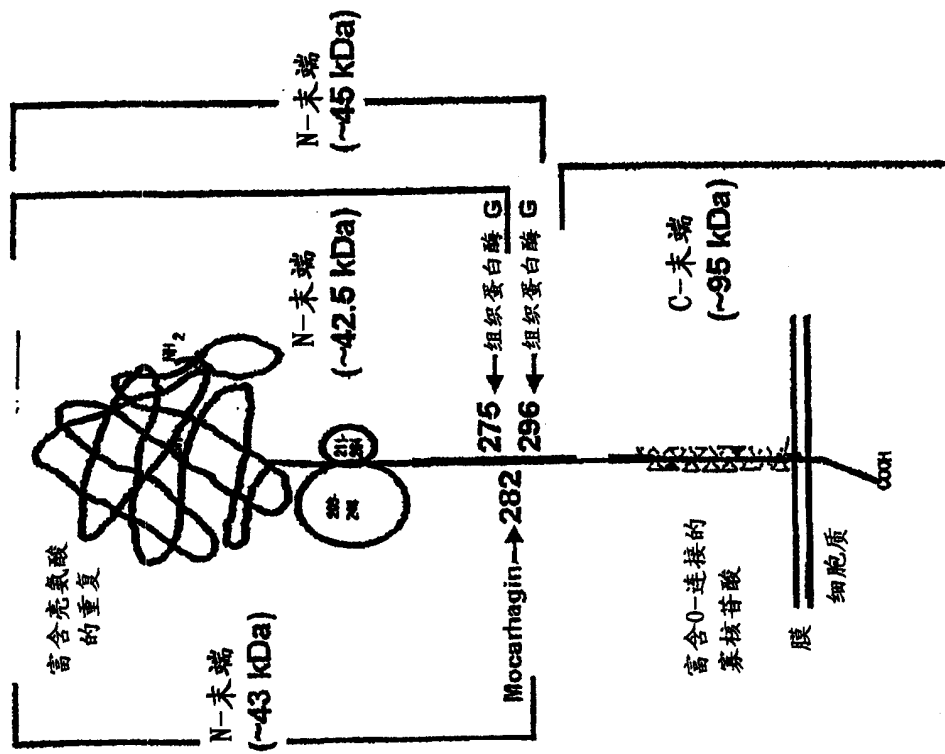


图 1

还原和非还原条件下Y1和Y17对血小板的结合

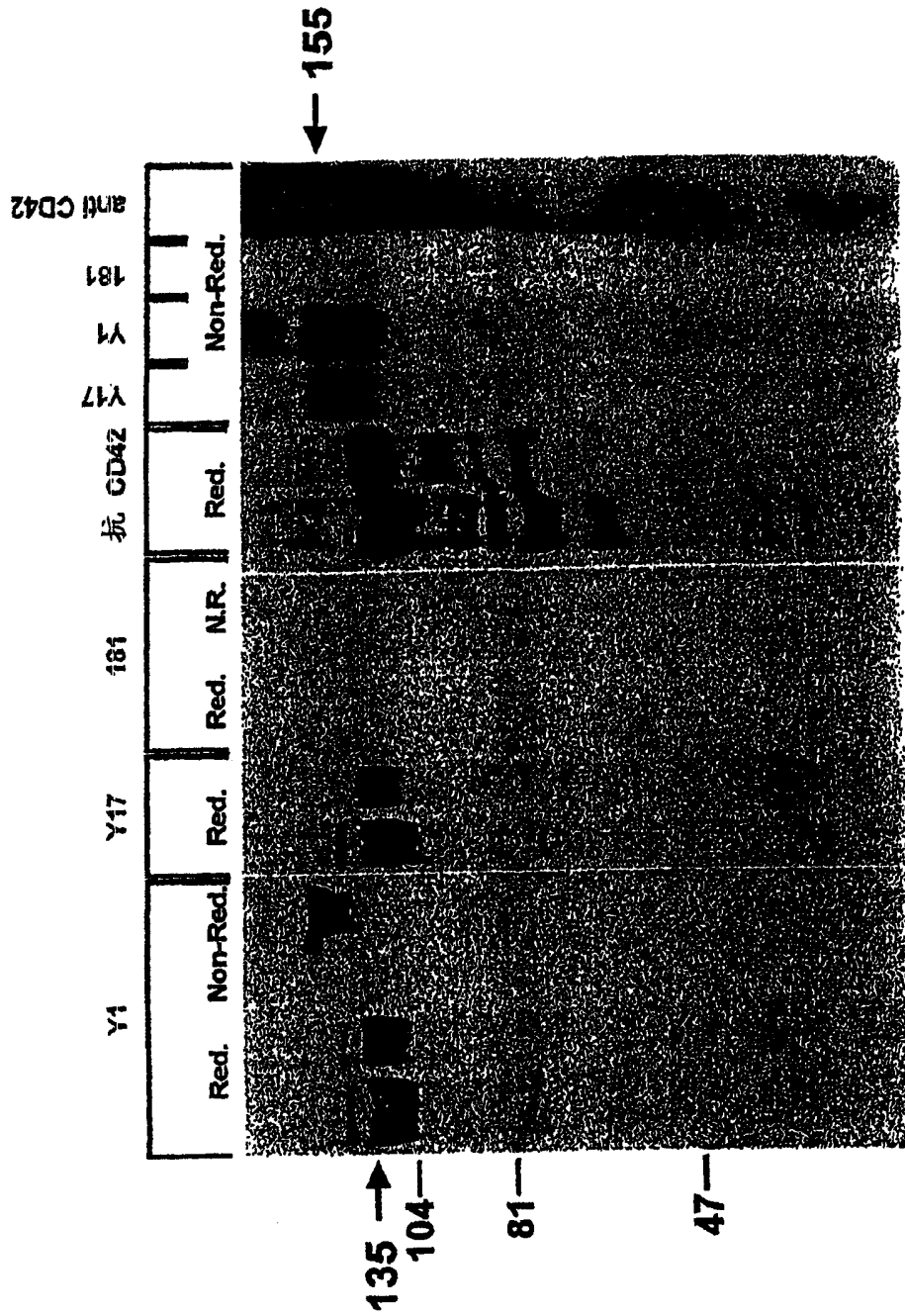


图 2

Y1与其配体结合的最佳决定簇的表征

	血小板	IGC	KG1/RP-HPLC #4
Rec: GP1b 1-340 GP1b 1-480	- -	- -	
多糖酶: N N+O	+ +		+++ +++
蛋白酶: Mocarhagin 唾液肽酶 无花果蛋白酶 胰蛋白酶 弹性蛋白酶	++ (~40kD) ++ (~40kD) - ++ (~40kD) ++ (~40kD)		- - - - ++
硫酸酯酶 (芳基)			-/+

图 3

0-唾液糖蛋白对血小板GPIIb的酶切  
消除Y1和Y17的结合

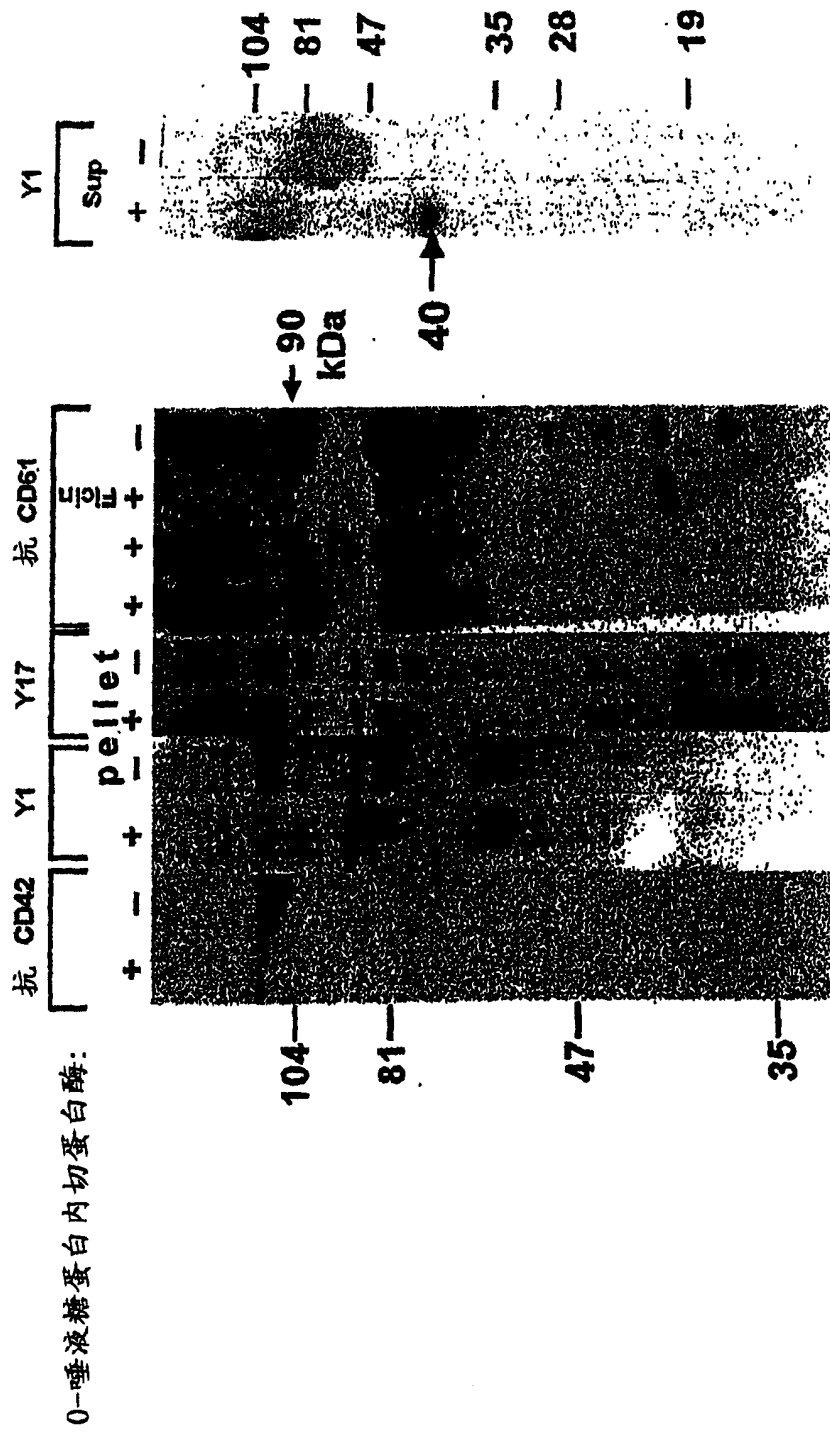


图 4

0-唾液糖蛋白内切蛋白酶酶切之后  
Y1和Y17结合类似的glycocalycin片段

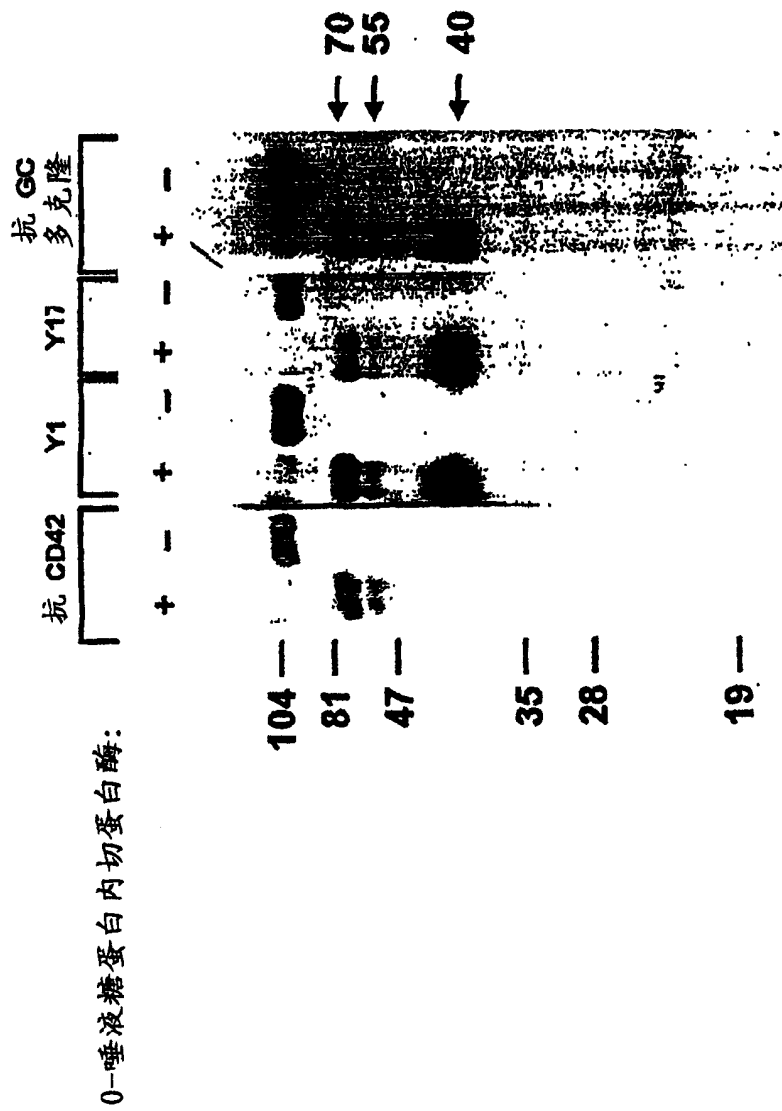
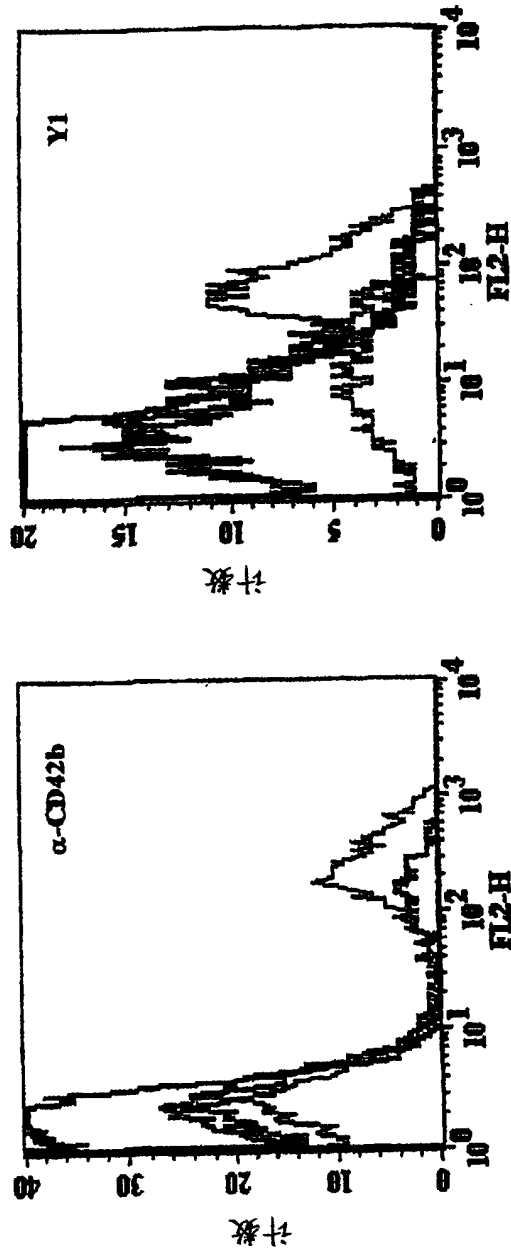


图 5

特异GPIIb蛋白酶解除Y1结合血小板



图例	名称	参数
—	未处理的血小板	G
- - -	0-唾液糖蛋白内切酶 (10 μg/ml)	
· · ·	0-唾液糖蛋白内切酶 (50 μg/ml)	
—	无花果蛋白酶 (18 μg/ml)	

未处理的血小板  
 - - - 0-唾液糖蛋白内切酶 (10 μg/ml)  
 · · · 0-唾液糖蛋白内切酶 (50 μg/ml)  
 — 无花果蛋白酶 (18 μg/ml)

图 6



mocarhagin酶切之后Y1和Y17对glycocalycin的结合

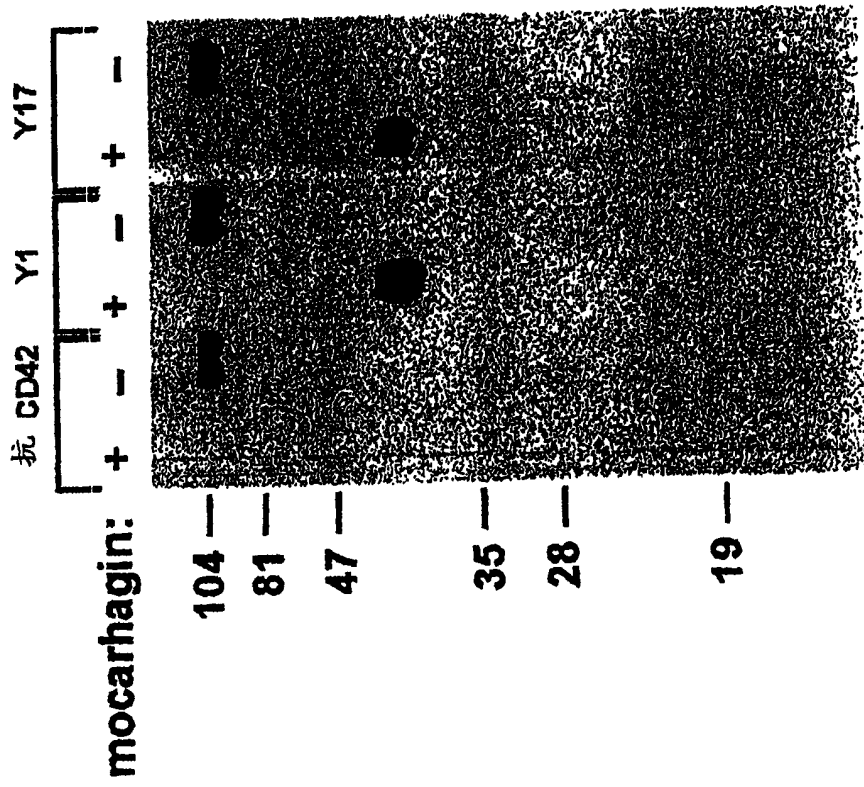


图 8

Y1和Y17与血小板的结合

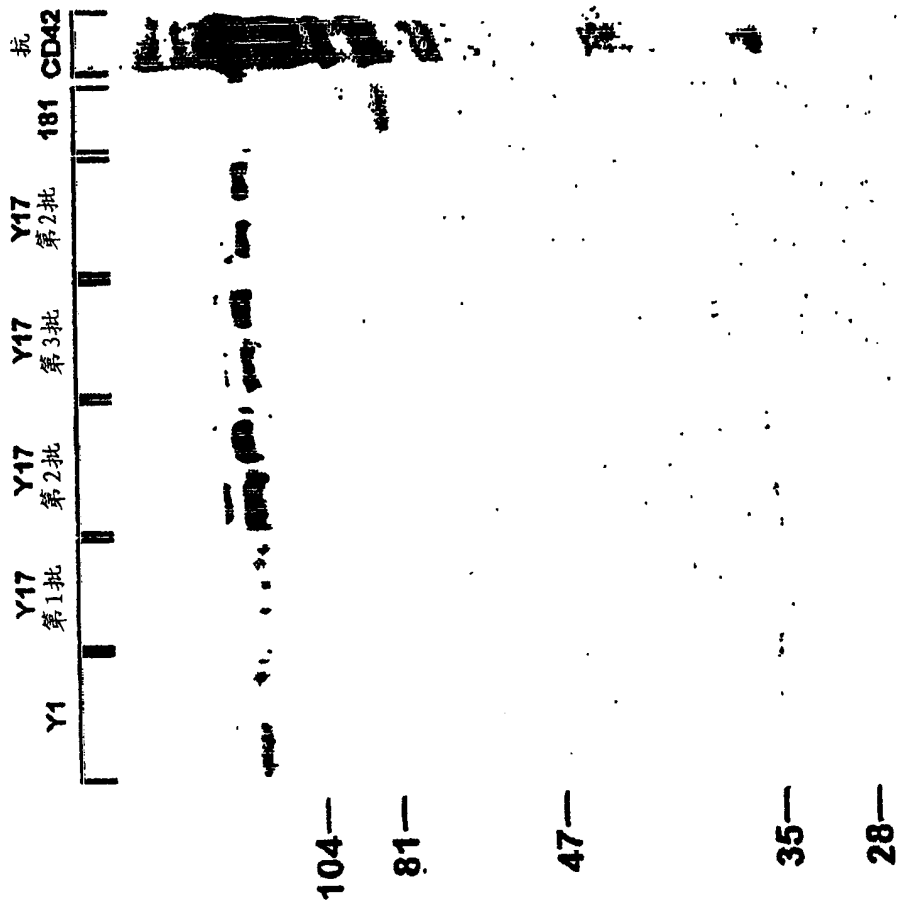


图 9

无花果蛋白酶酶切之后Y1和Y17类似地结合glycocalycin

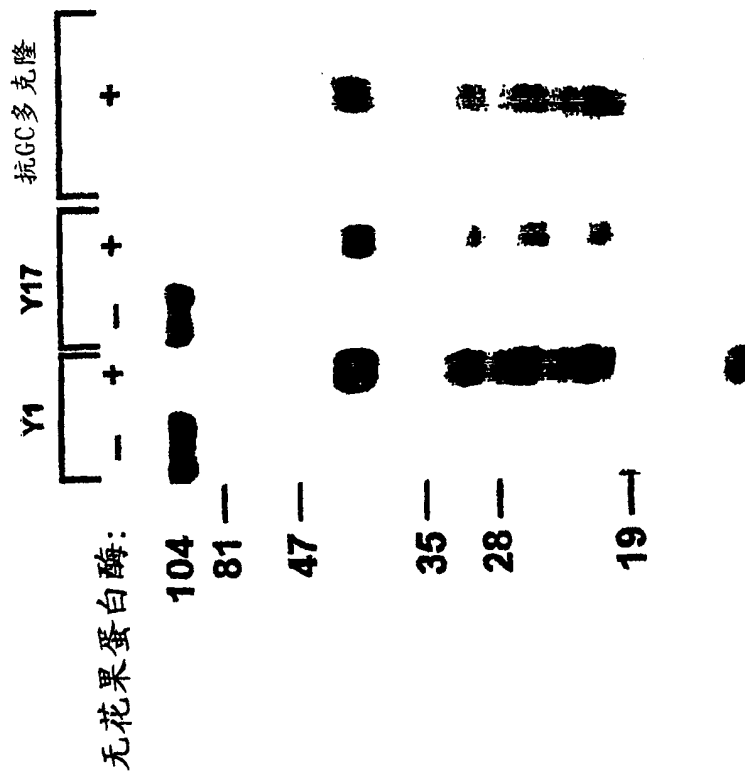


图 10

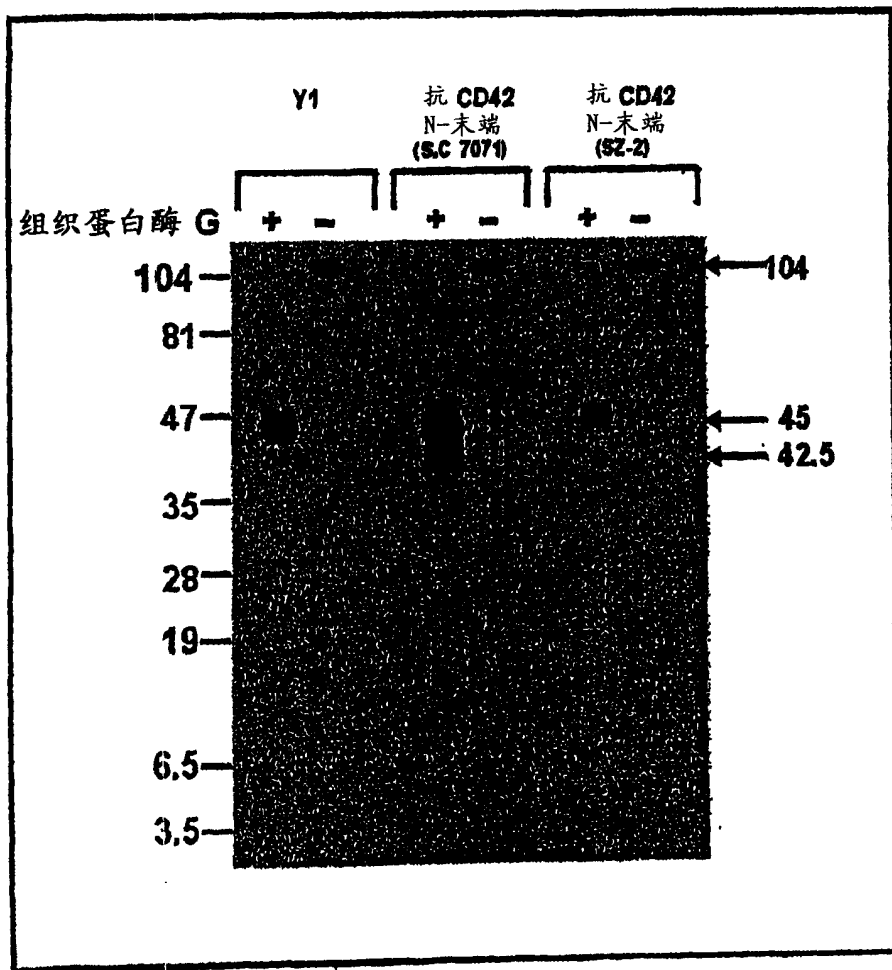


图 11

Y1和Y17与较大组织蛋白酶G酶切的血小板GPIIb片段反应

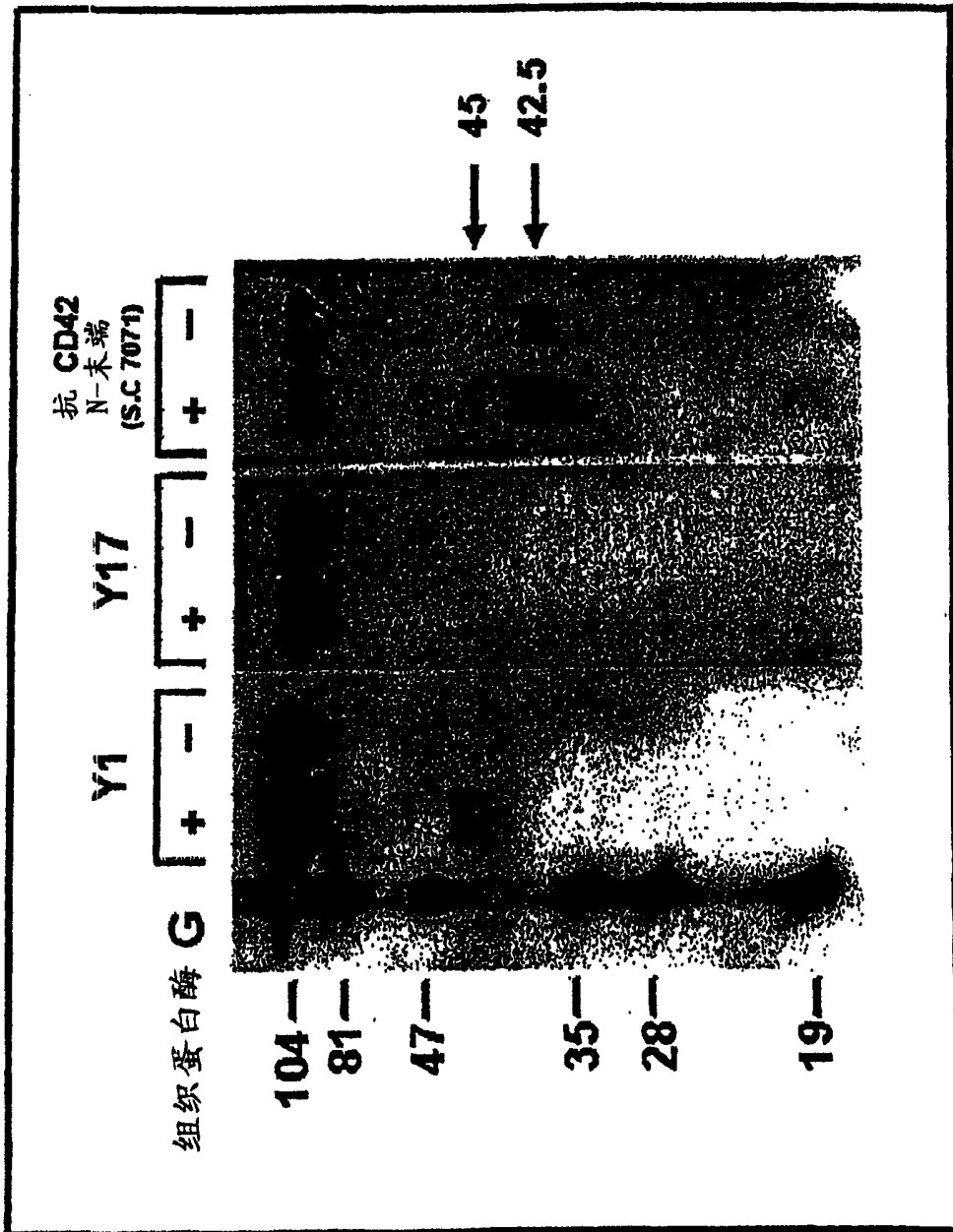


图 12

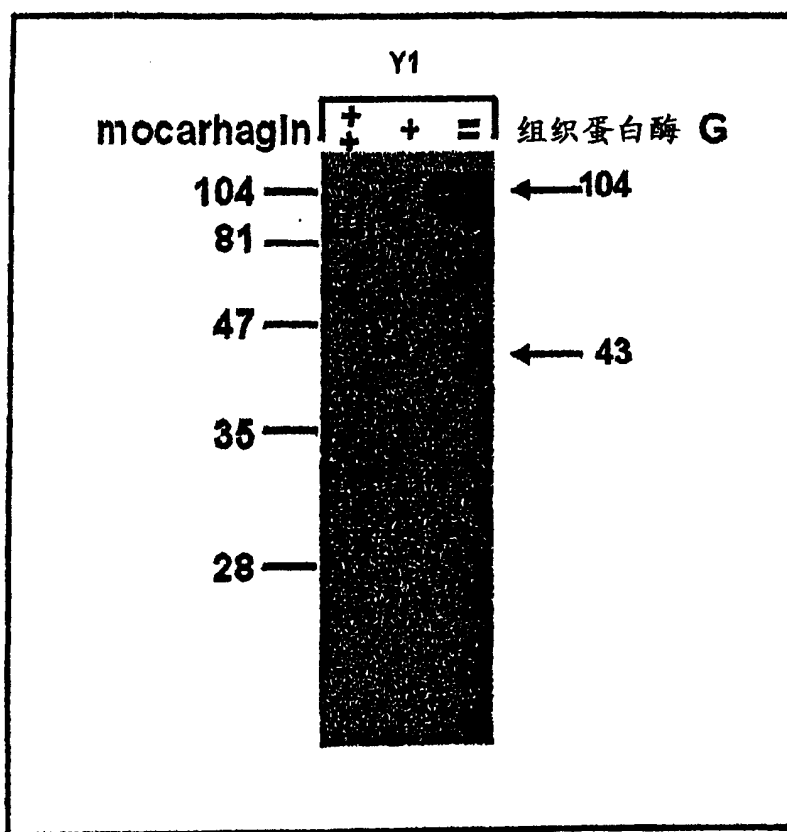


图 13

moCarhagin和组织蛋白酶G对洗涤过的血小板的酶切

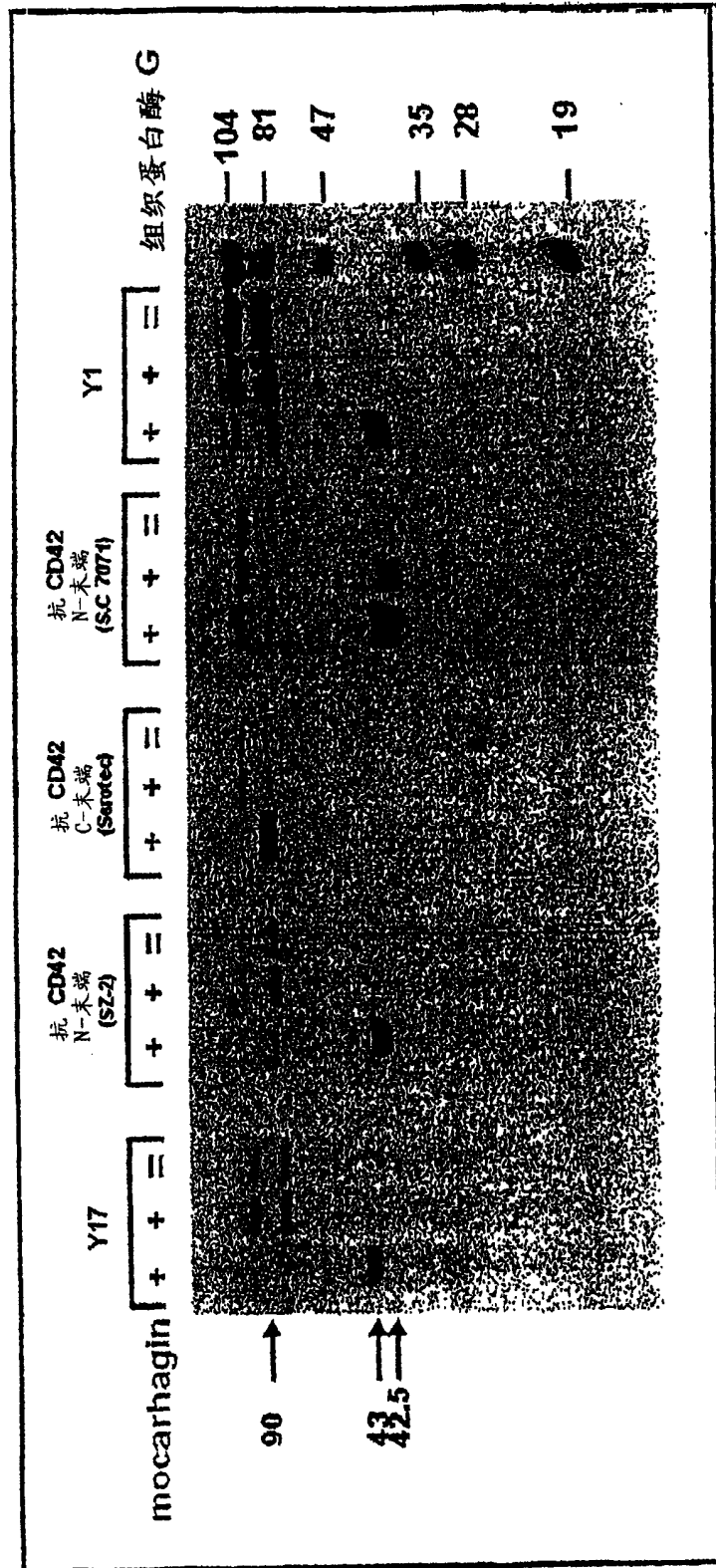


图 14

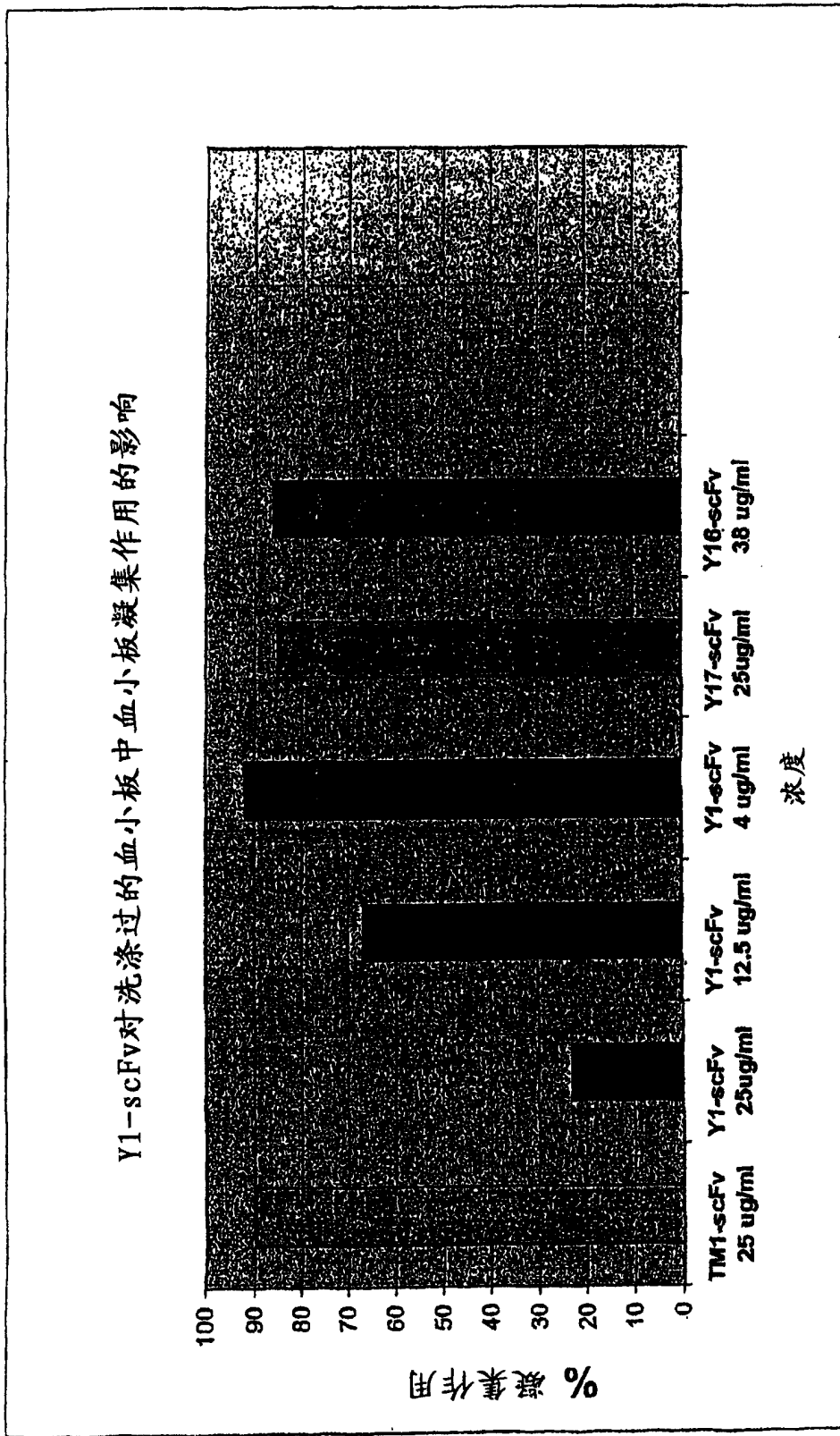


图 15

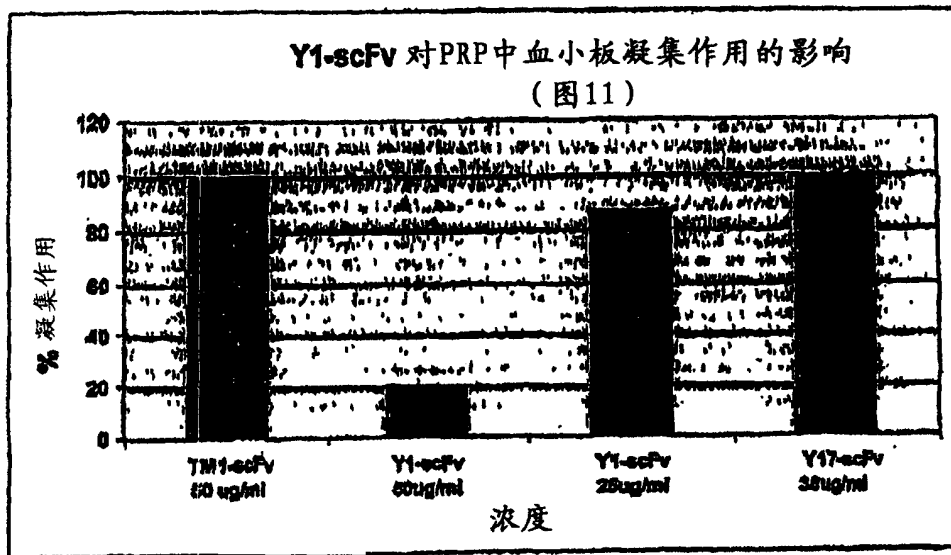


图 16

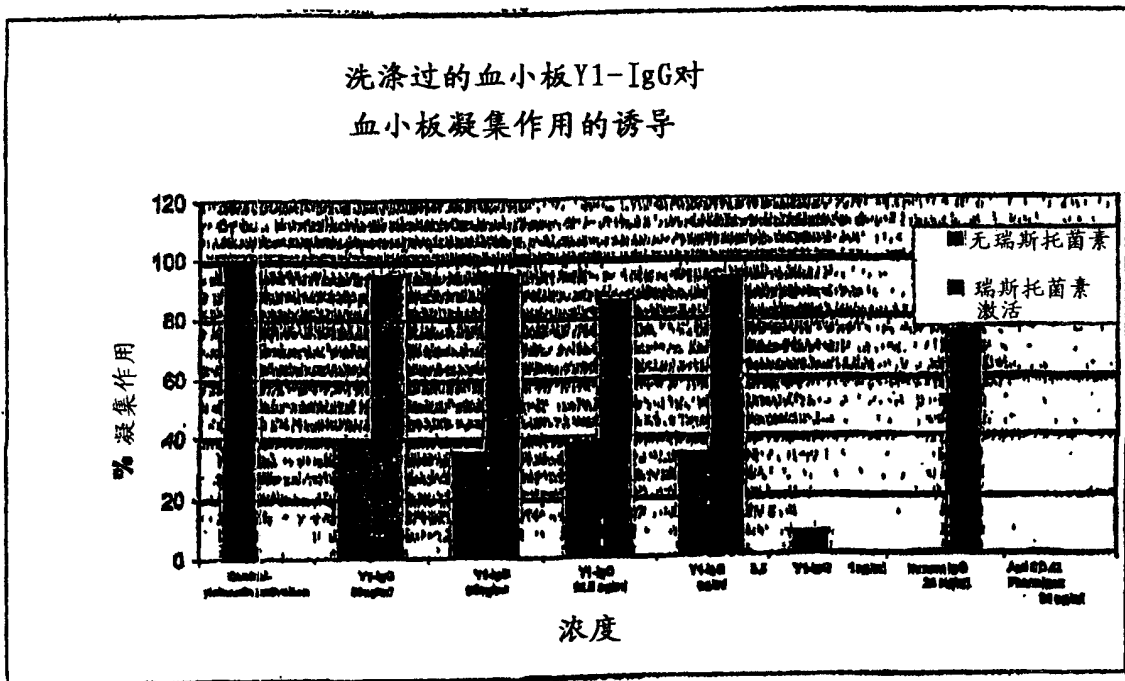


图 17

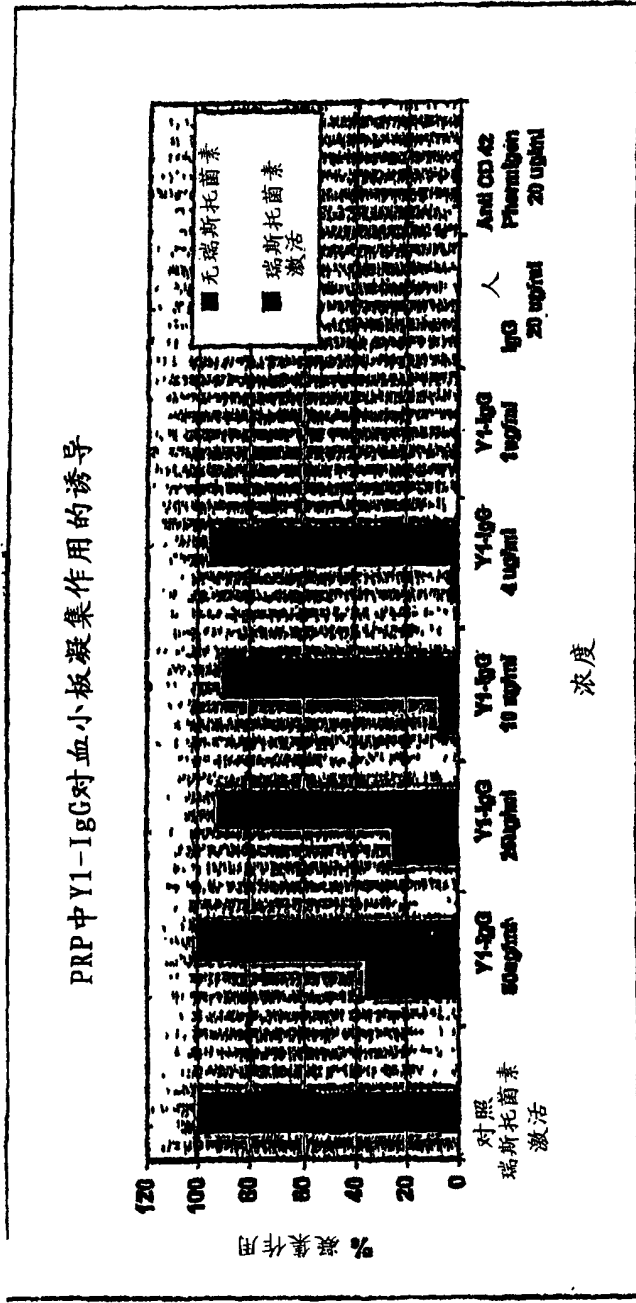


图 18

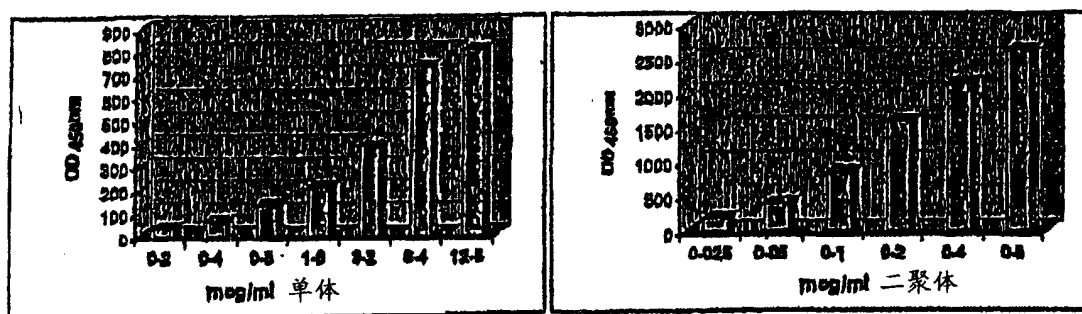


图 19

Y1和 $\alpha$ -CD42 (N1-19) 与它们的  
配体结合的特异性

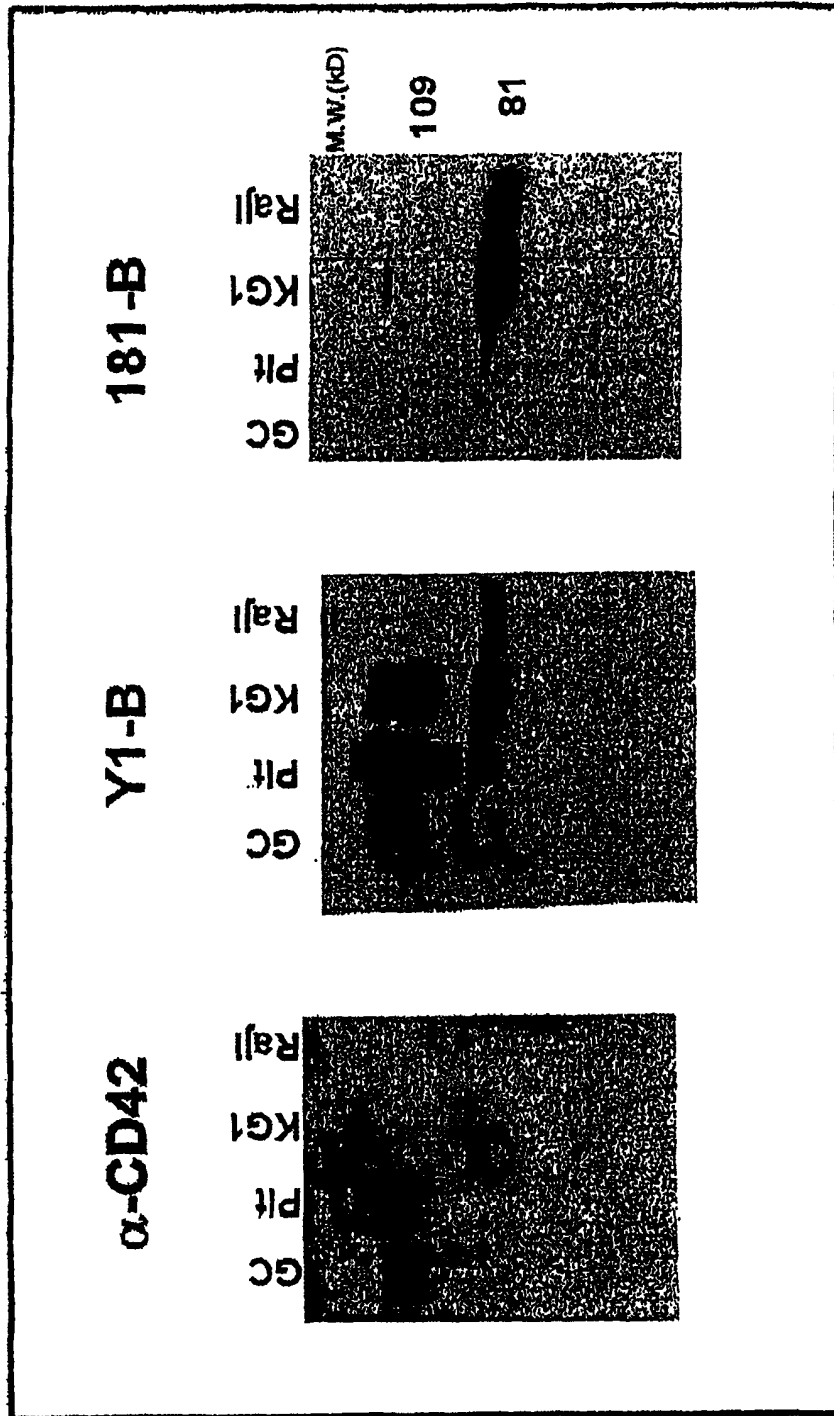


图 20

Y1免疫沉淀之后来自KG1膜的Y1-配体：在RP-HPLC上纯化

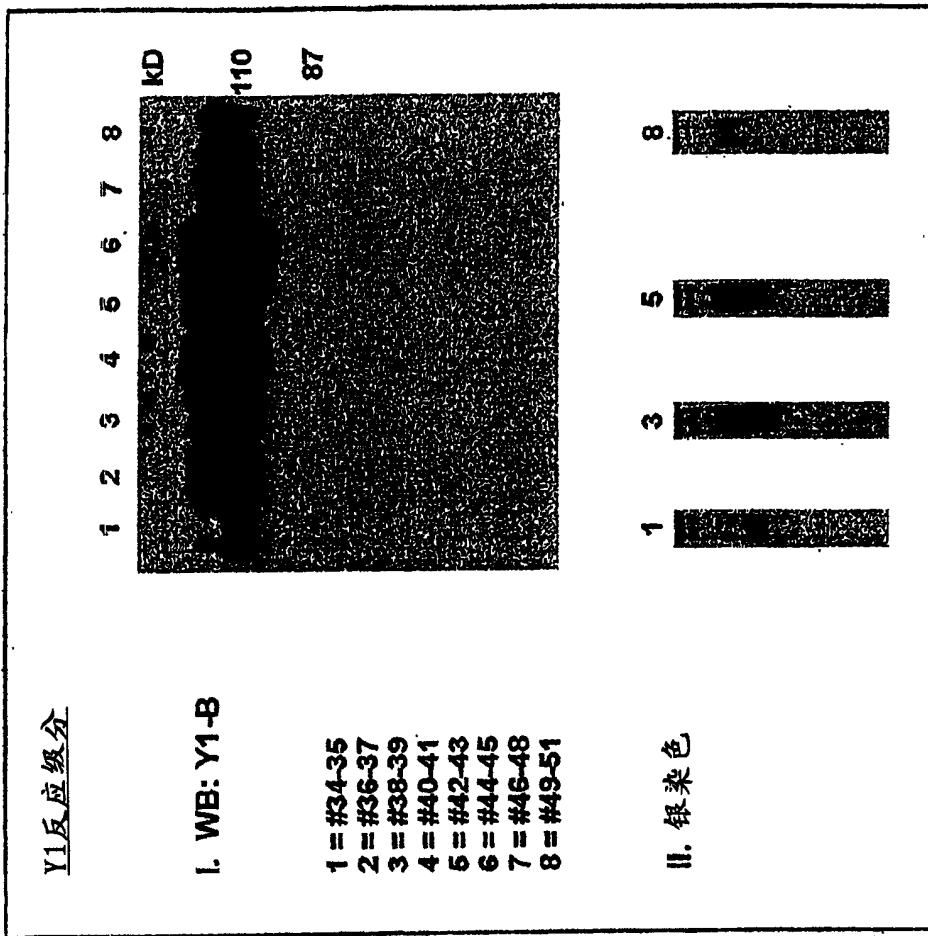


图 21

0-唾液糖蛋白内切蛋白酶对Y1结合的作用

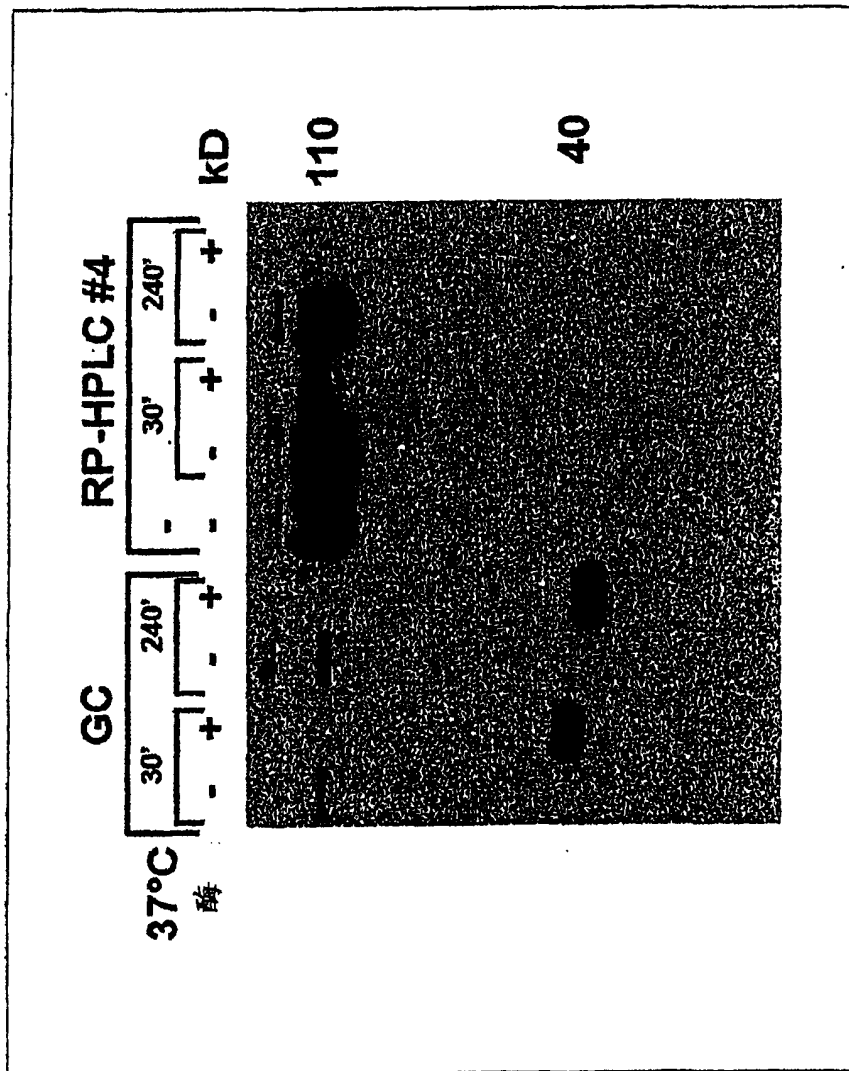


图 22

芳基-硫酸酯酶对Y1结合的作用：  
RP-HPLC (KGI) &H-B (Heparin-BSA)

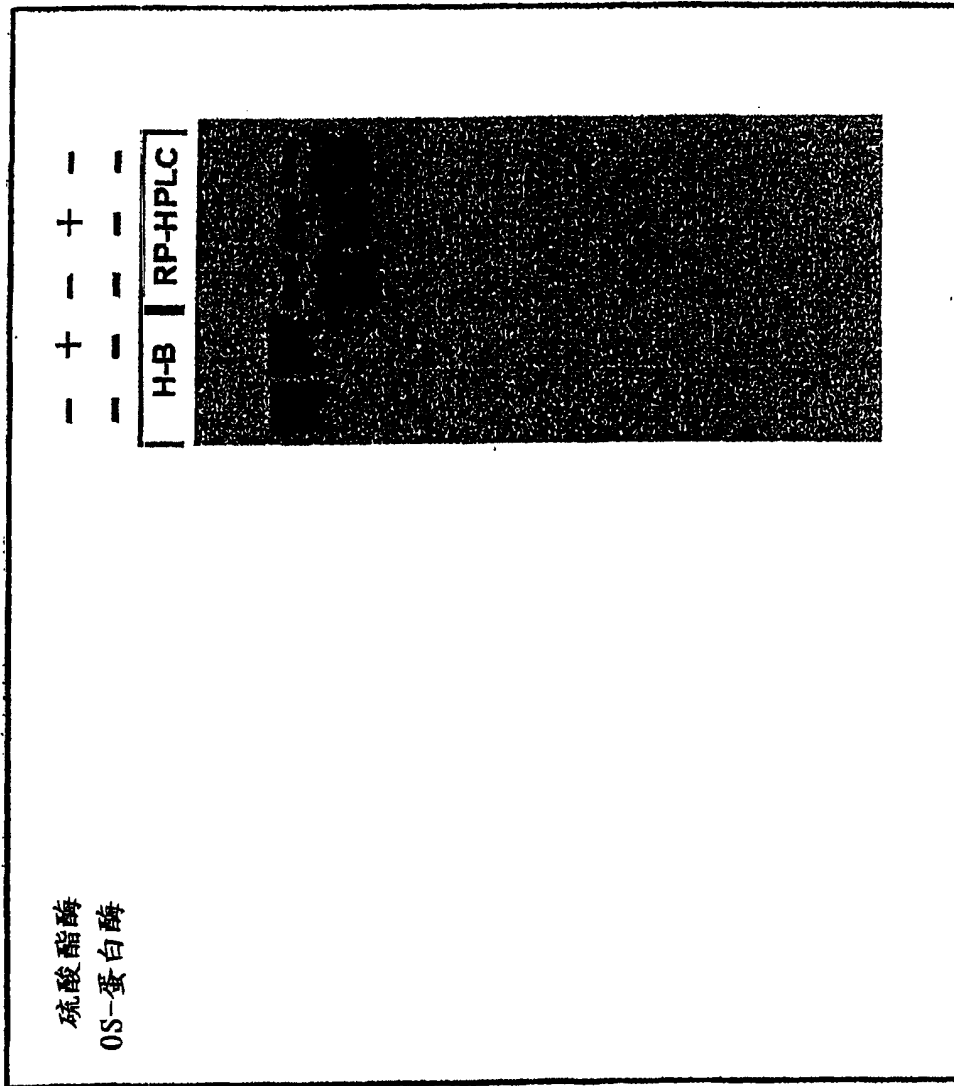


图 23

Y1结合的特异性: 用Y1和抗-PSGL-1的免疫沉淀分析

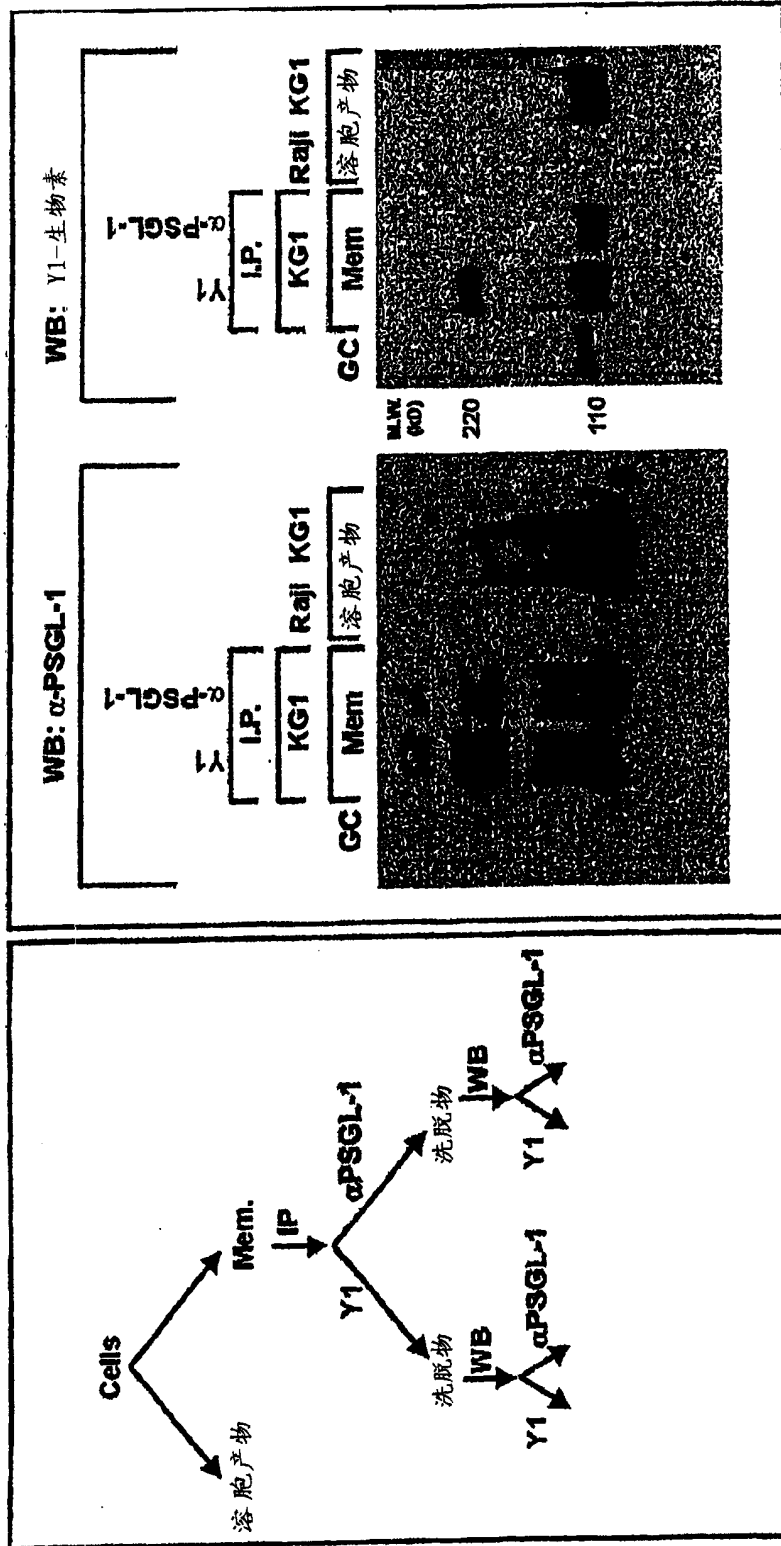


图 24



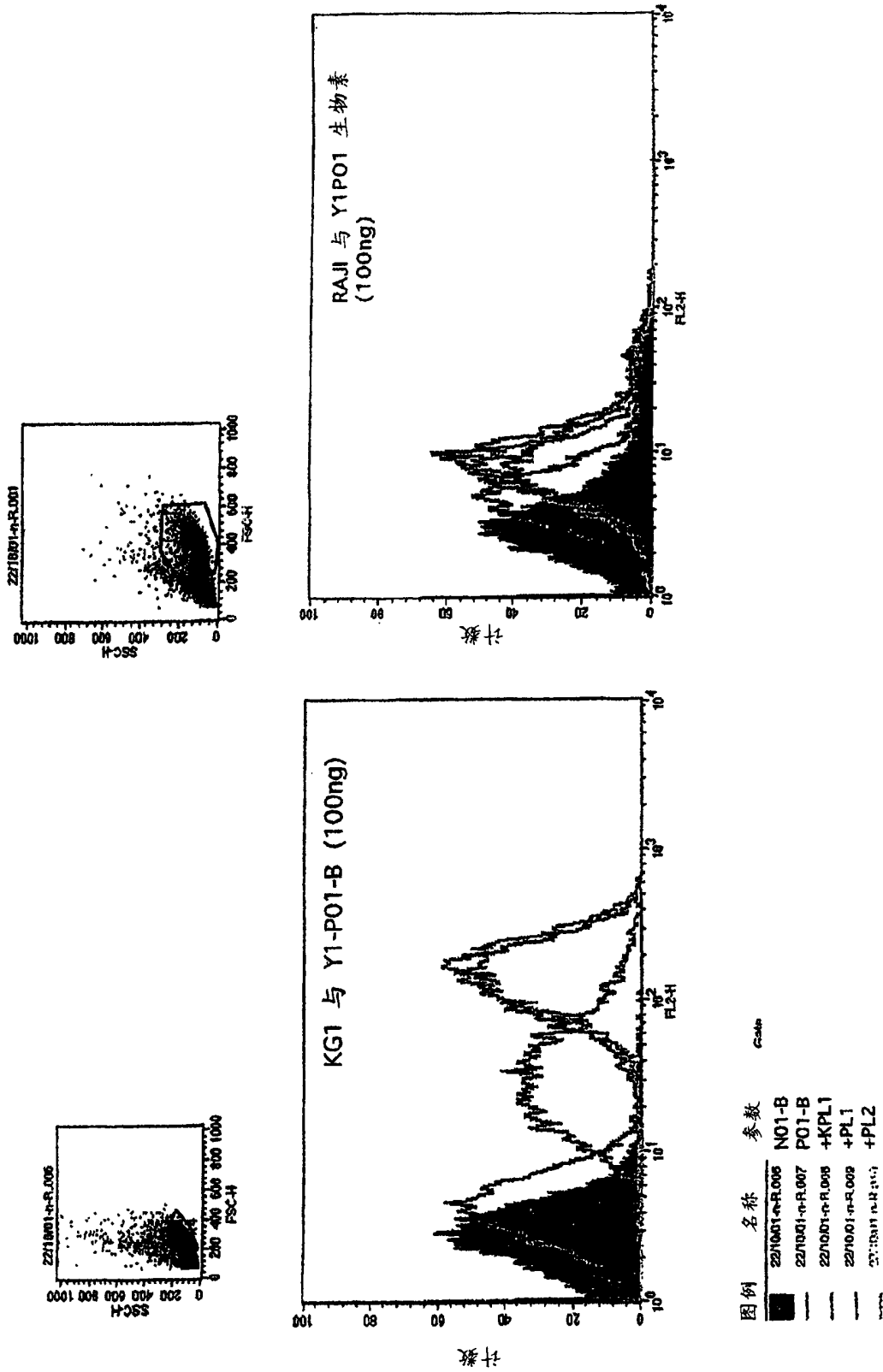
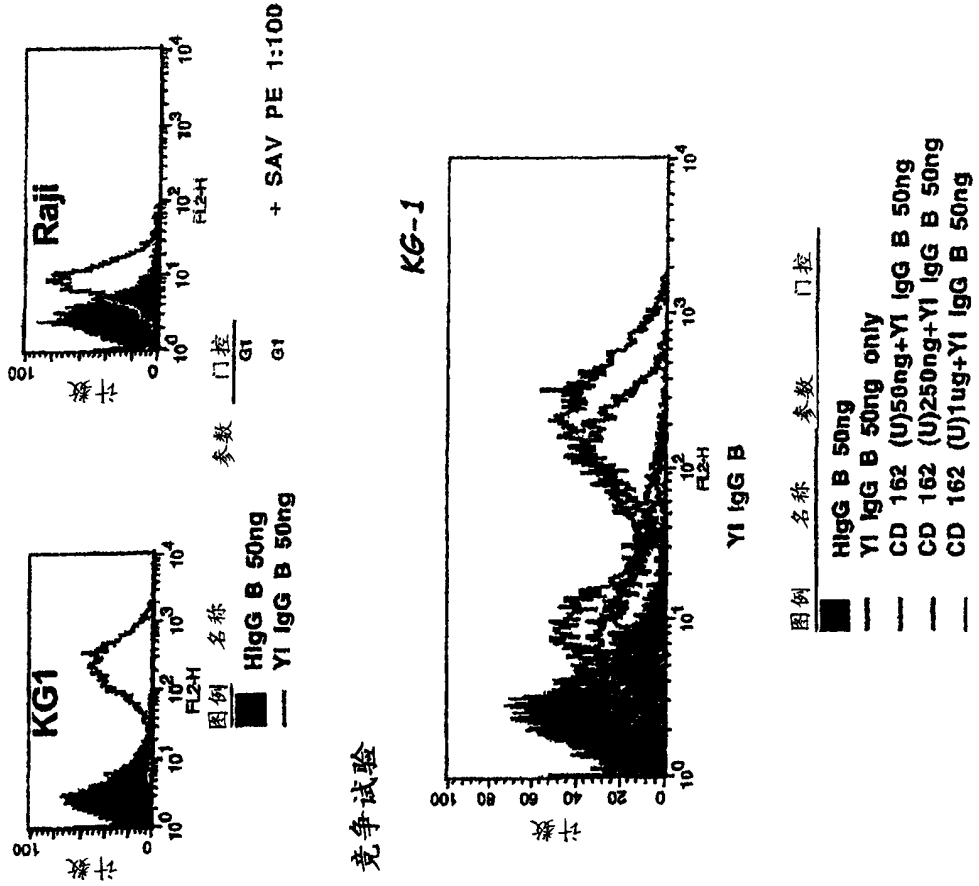


图 26



Y1结合的特异性: FACS分析



Y1-IgG的结合:  
与αPSGL-1的竞争  
(CD162/KPL1)

图 28



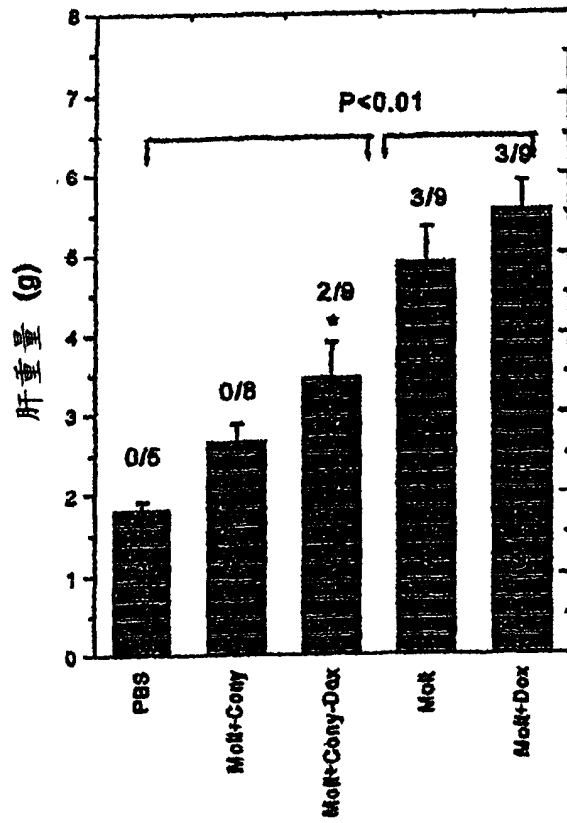


图 30

\*Ns 是：对于DOX是9，对于CONY1是8，对于Y1-DOX6是7，对于MOLT是6，对于PFB是5。

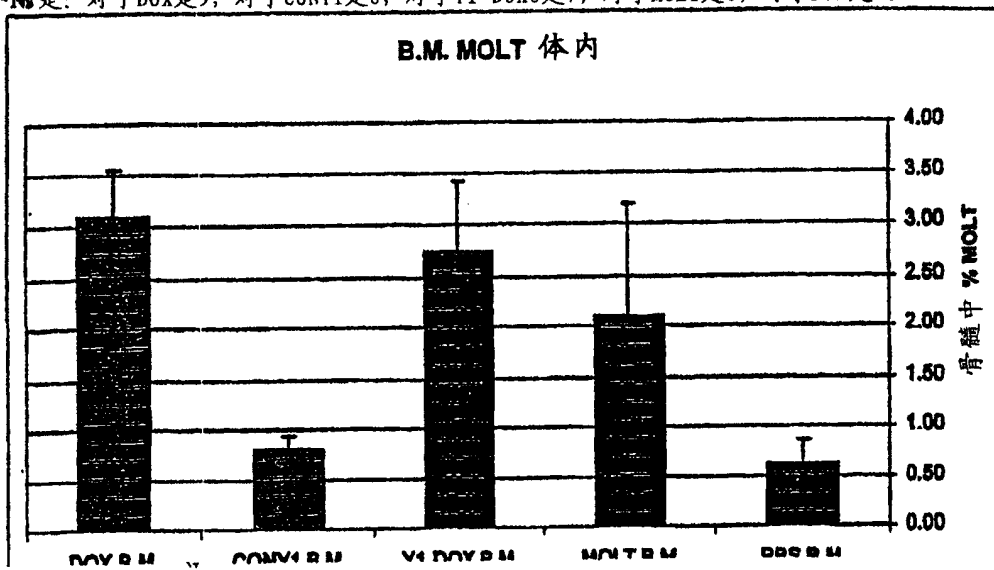
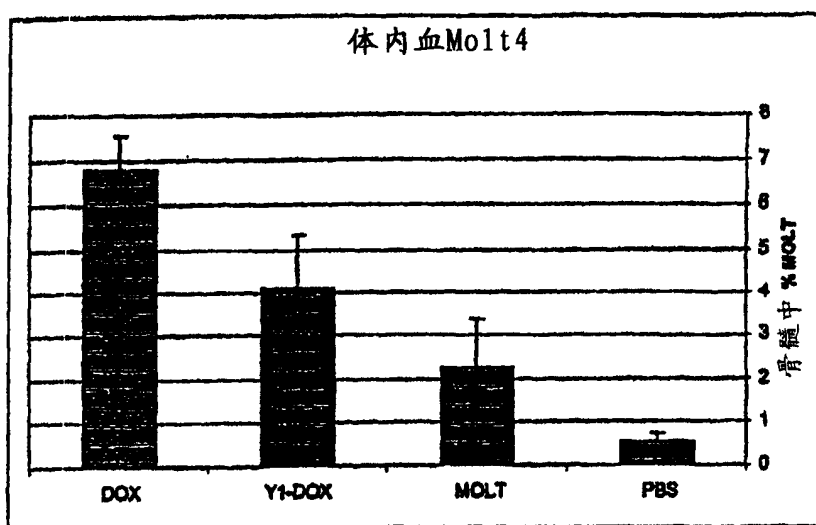


图 31



\*\*Ns 是：对于DOX是4，对于Y1-DOX是2，对于MOLT是3，对于PBS是3。

图 32

芳基-硫酸酯酶和Mocarhagin处理对  
Y1结合于RP-HPLC#4 (KG1) 的影响

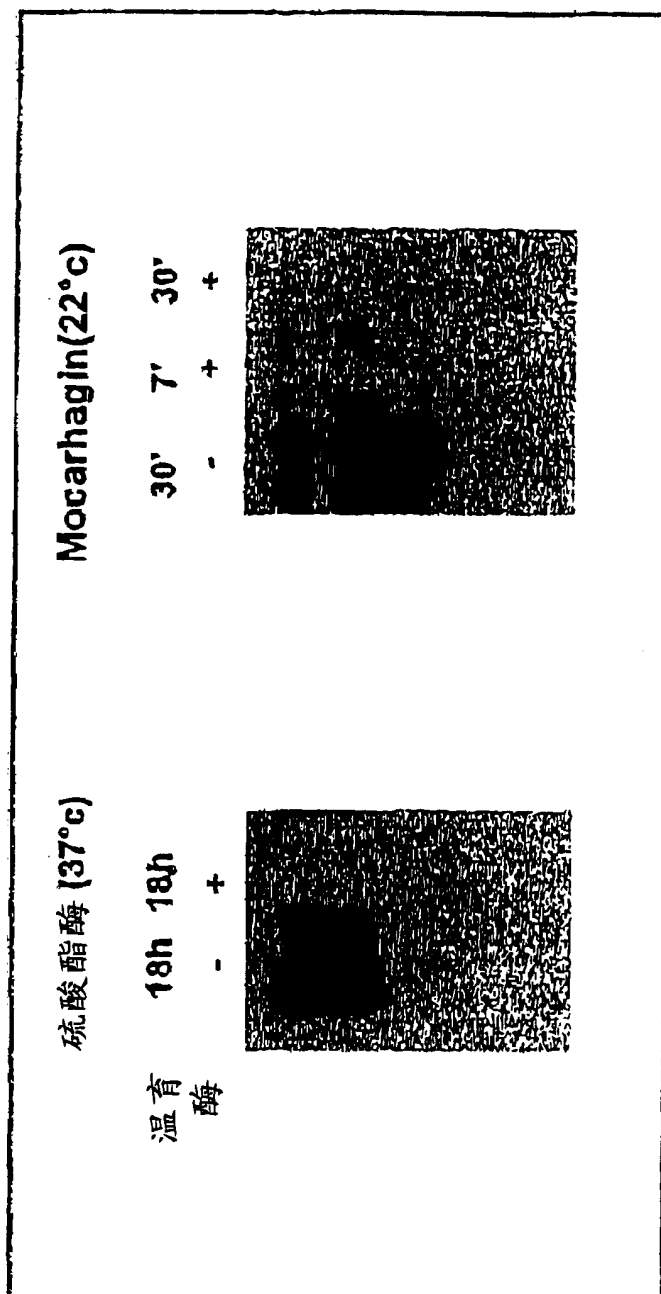


图 33

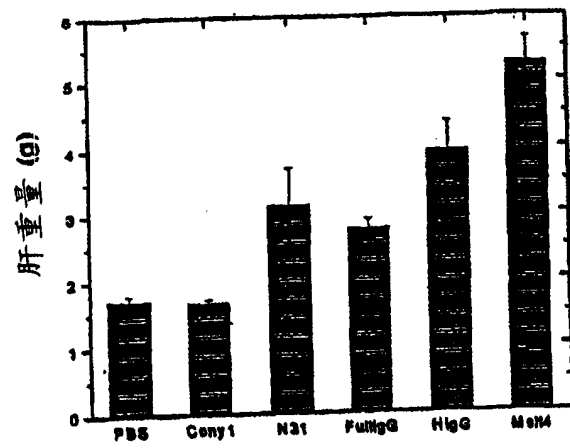


图 34

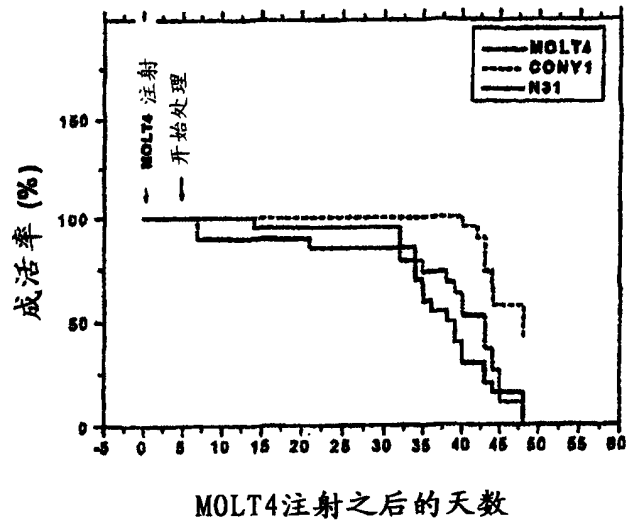


图 35

\*\*\*Ns 是：对于PBS是8，对于KG1是9，对于CONY1是8，对于CONY1-DOX是11，对于DOX是9，体外对于181是8，体外对于Y1是9，对于Mylotarg是9。

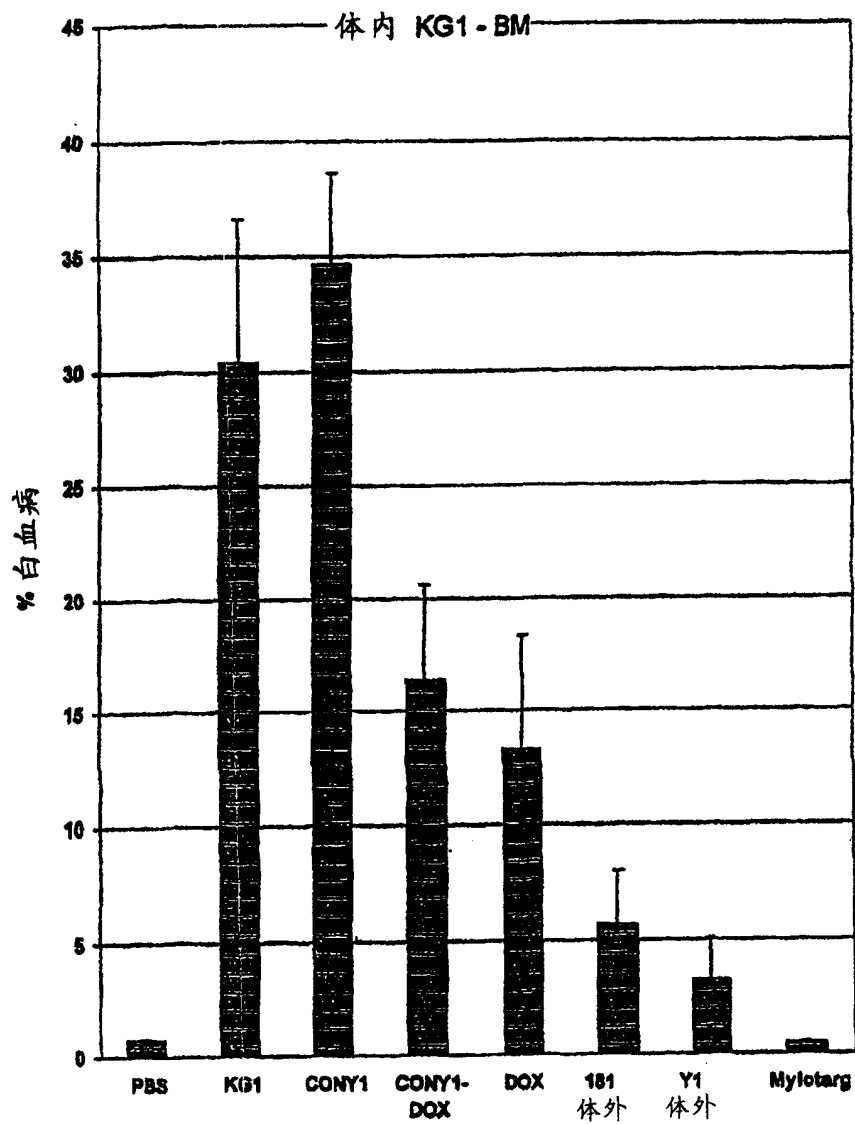
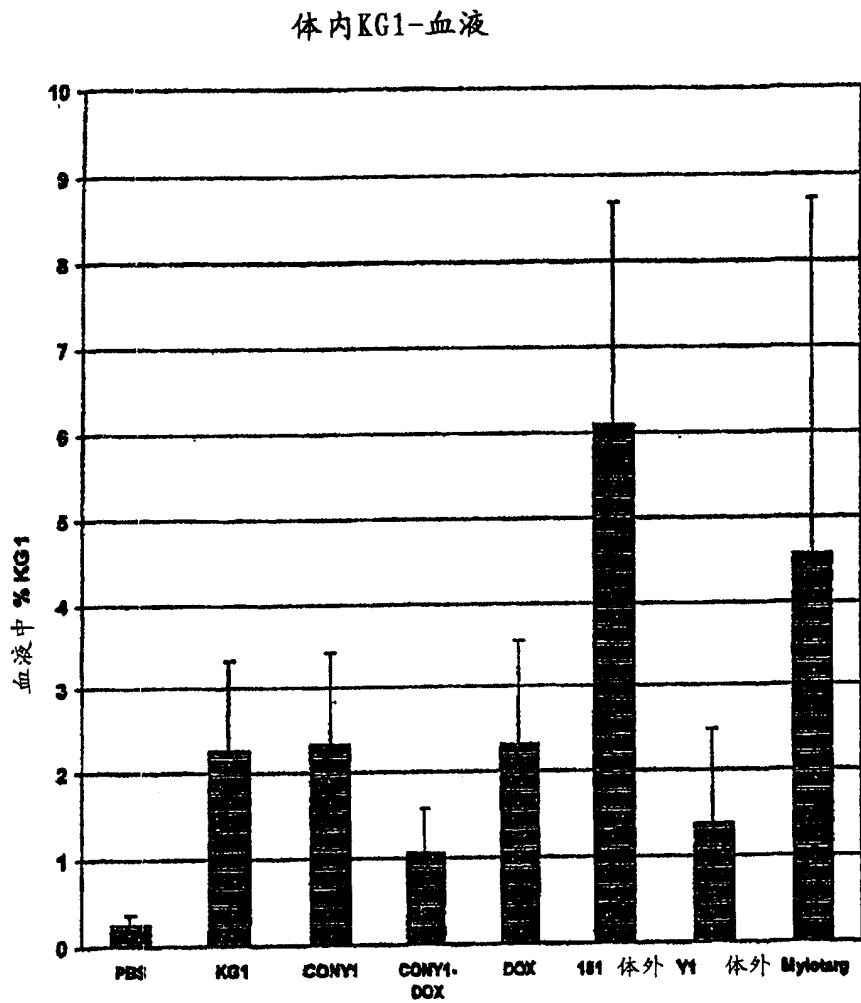


图 36



\*\*\*\*Ns 是：对于PBS是8，对于KG1是9，对于CONY1是8，对于CONY1-DOX是9，对于DOX是11（包括一只用5mg/kg DOX注射的小鼠），体外对于181是7，体外对于Y1是8，对于Mylotarg是7。

图 37

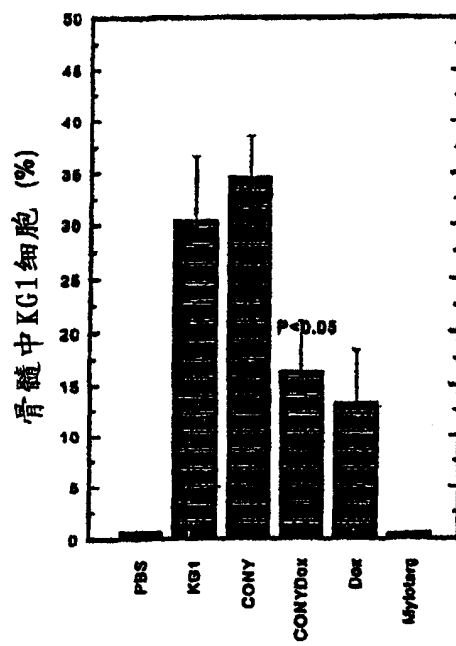


图 38

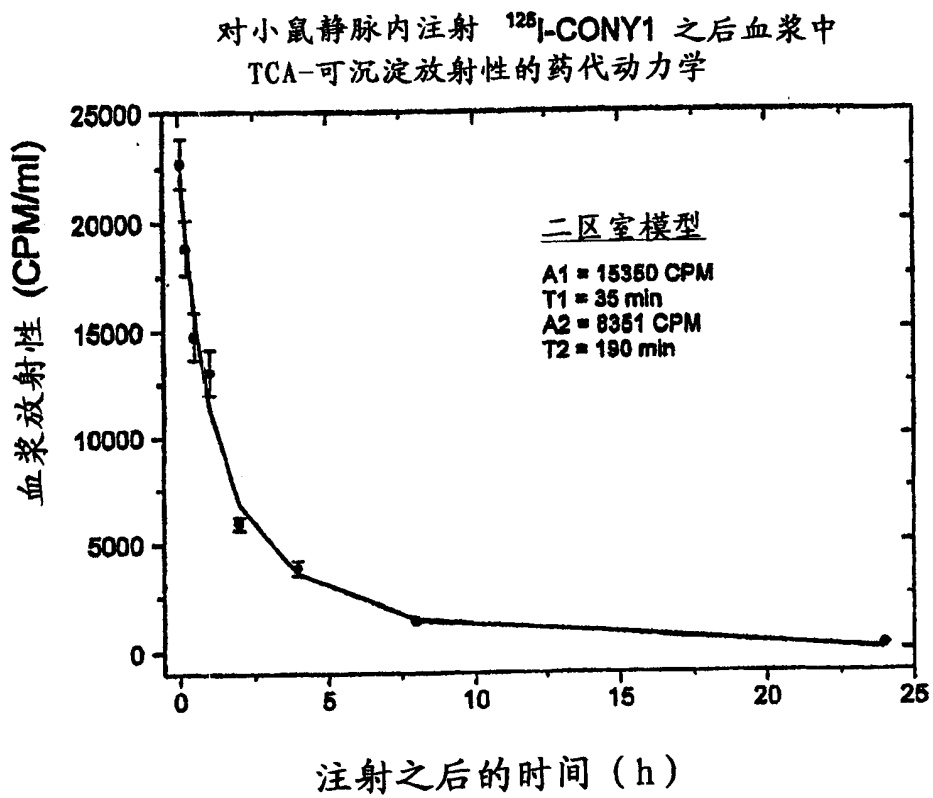


图 39

对小鼠IV注射  $^{125}\text{I}$ -CONY1 之后各种器官/组织的特异性放射性

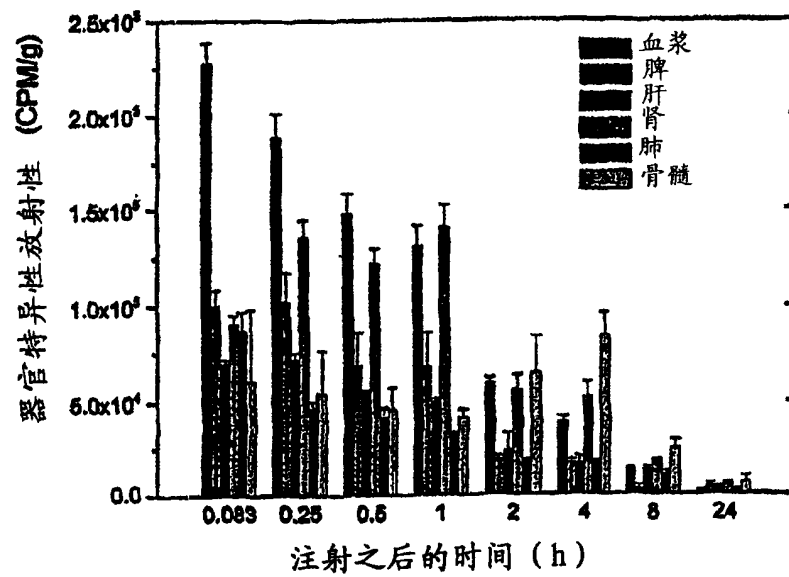


图 40

对小鼠IV注射  $^{125}\text{I}$ -CONY1 之后身体器官中  
放射性分布

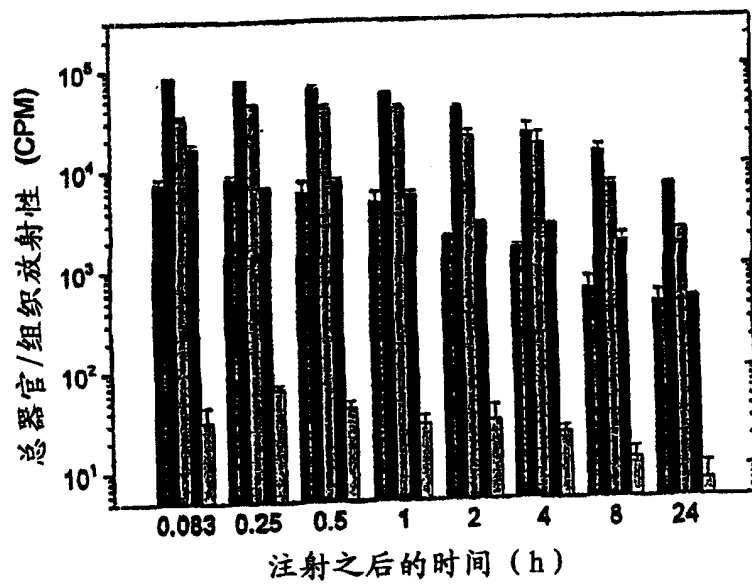


图 41

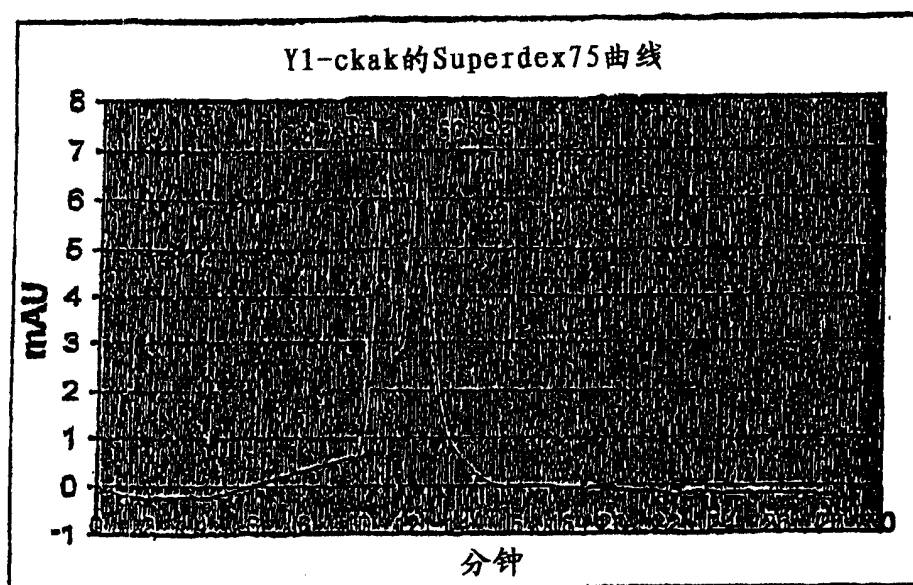


图 42

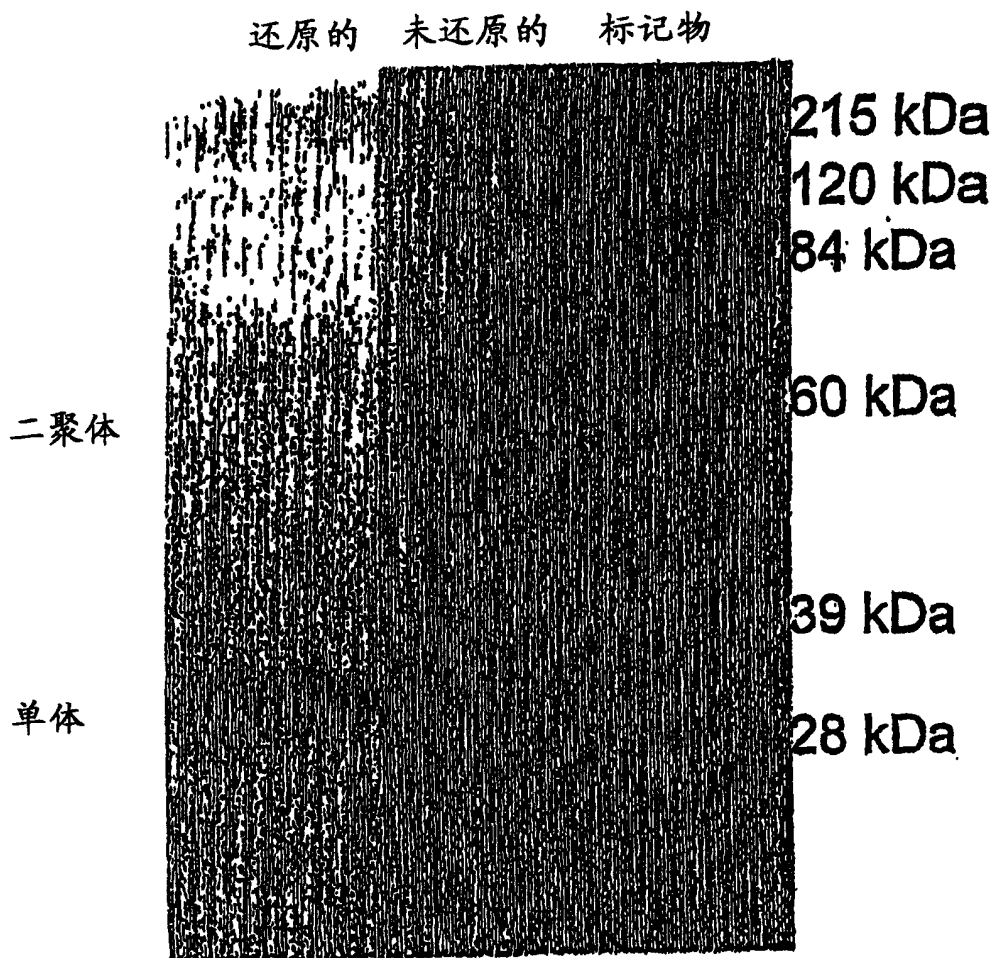


图 43

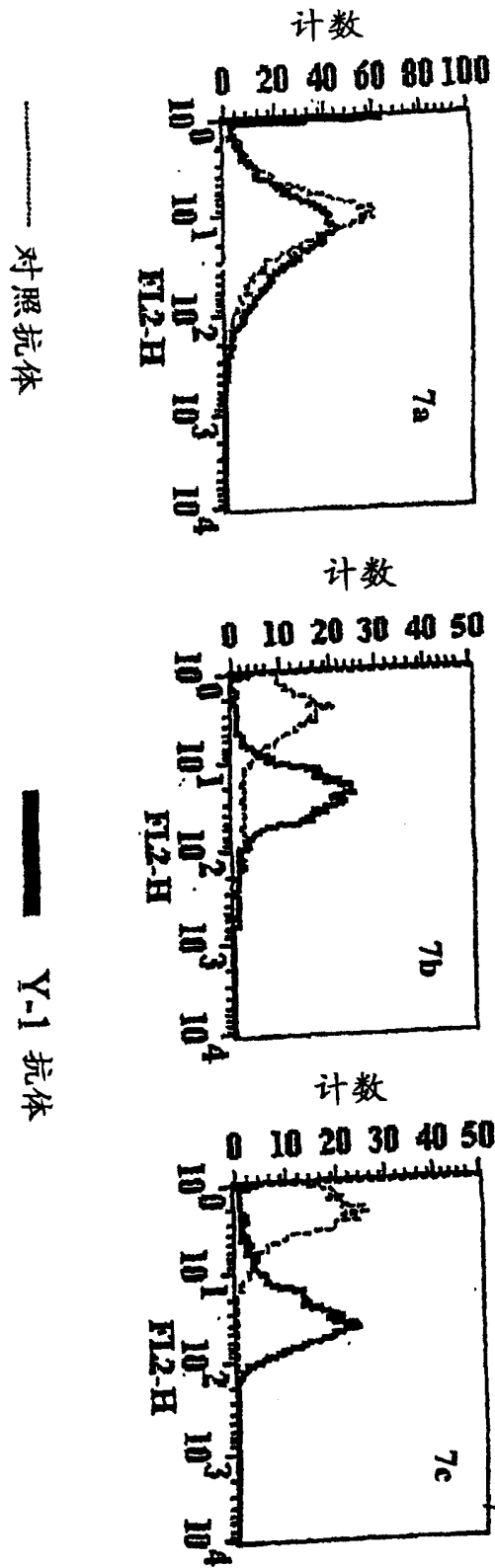


图 44

抗-GPIb $\alpha$  抗体的表位

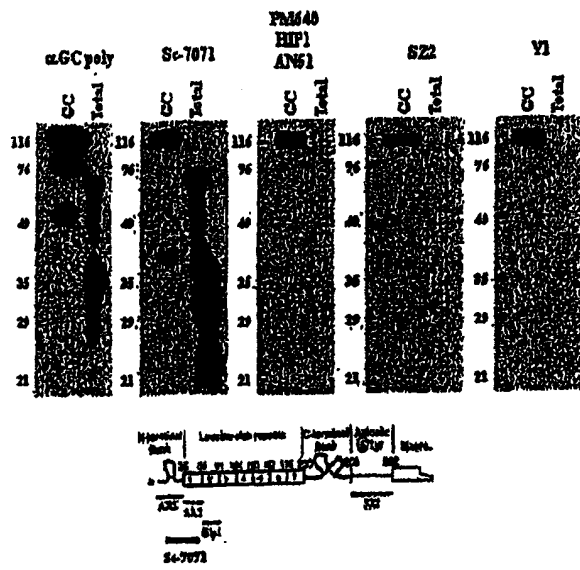


图 45

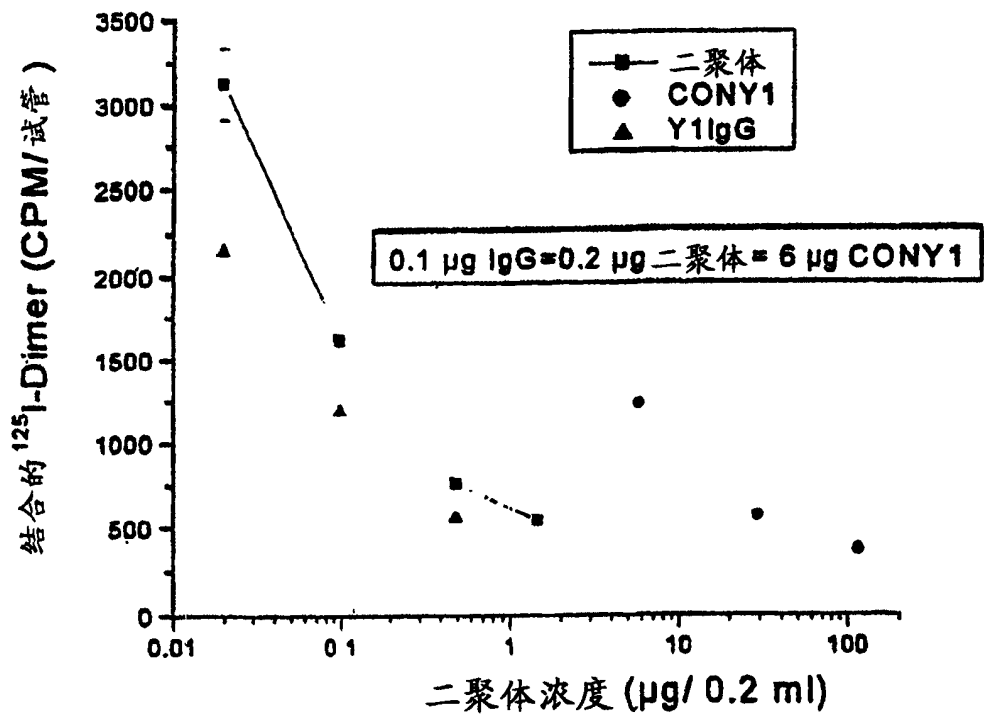


图 46

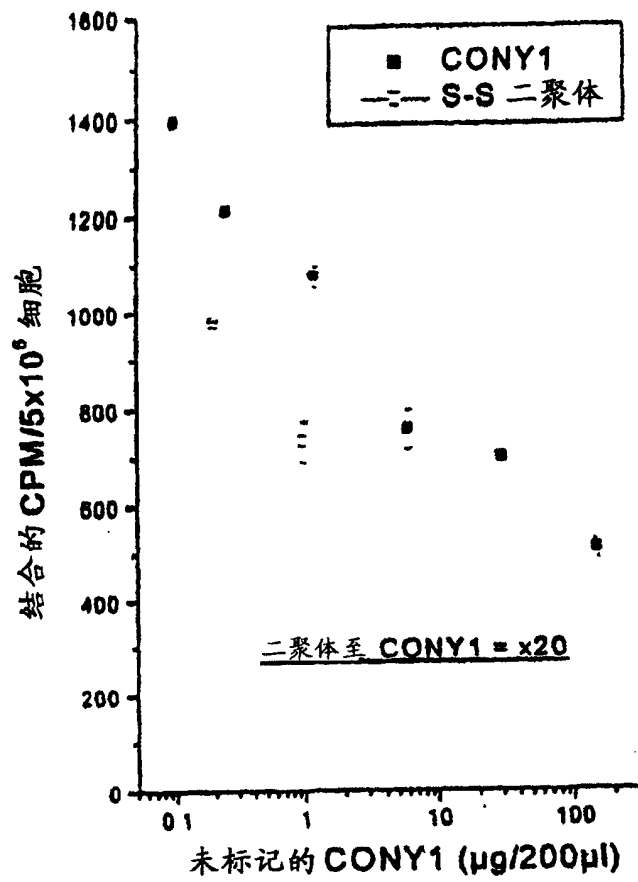


图 47

## Y1-HC的ORF和氨基酸序列

SEQ ID NO: 205 ( 核酸序列 ): SEQ ID NO: 206 ( 氨基酸序列 )

```

1      ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTOACCCTCCTCACTCAGGACACAGGGTCCCTGGGCCGAT
1      M A W A L L L L T L L T Q D T G S W A D
61     ATCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCC
21     I Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S
121    TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCA
41     C A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A P
181    GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGTATTAATGGAATGGTGGTAGCACAGGTTATGCA
61     G K G L E W V S G I N W N G G S T G Y A
241    GACTCTGTGAAGGGCCGATTCCACATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTG
81     D E V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
301    CAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAGAATGAGGGCT
101    Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R M R A
361    CCTGTGATTTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTTCCACCAAGGGCCCA
121    P V I W G Q G T L V T V S S A S T K G P
421    TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
141    S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
481    TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTG
161    C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L
541    ACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
181    T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S
601    AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
201    S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N
661    CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT
221    H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T
721    CACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACTGTCACTCTTCOTCTTC
241    H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F
781    CCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTG
261    P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V
841    GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
281    V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E
901    GTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
301    V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
961    AGCGTCCCTCACCGTCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
321    S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
1021   TCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCC
341   S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P
1081   OGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
361   R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V
1141   AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
381   S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S
1201   AATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGTCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCC
401   N G Q P E N N Y K T T S P V L D S D G S
1261   TTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGCACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
421   F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
1321   TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
441   S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
1381   TCTCTGGGTAAATGA
461   S L G K *

```

图 48A

## Y1-LC的ORF和氨基酸序列

SEQ ID NO: 207 ( 核酸序列 ); SEQ ID NO: 208 ( 氨基酸序列 )

```

1      ATGGCCTGGGCTCTGCTGCTCCTCACCCTCCTCACTCAGGACACAGGGTCTGGGCCGAT
1      M A W A L L L L T L L T Q D T G S W A D
61     GCAGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGACAGACAGTCAGGATCACA
21     A E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T
121    TGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG
41     C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q
181    GCCCCTGTACTTGTTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCAGACCGATTC
161    A P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F
241    TCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCCGAAGAT
81     S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D
301    GAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGACAGCAGTGGTAACCATGTGGTATTCCGGCGGA
101    E A D Y Y C N S R D S S G N H V V F G G
361    GGGACCAAGCTGACCGTCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCG
121    G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F P
421    CCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTC
141    P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F
481    TACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGCGGGAGTG
161    Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V
541    GAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC
181    E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S
601    CTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCAAAAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG
201    L T P E Q W K S H K S Y S C Q V T H E G
661    AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTTCATGA
221    S T V E K T V A P T E C S *

```

图 48B

	1	11	21	31	41	51	
1	EVOLVESGGG	LVQFGGSLRL	SCAASGTFPS	SYAMSWVRQA	PGKGLEWVSA	ISGSGGSTYY	60
61	ADRYKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQNSLRARD	TAVYYCARYA	KTLMRQYSLW	GQGTLVTVSR	120
121	GGGSGGGGS	GGGSSSELTQ	DEAVSVALGO	TVRITCOGDS	LRSYXASWIQ	QKPGQAPVLV	180
161	IYGKYNRPSG	IPDRFSGSS	GNTASLTITG	AQAEDEADYY	CNSRDSSGNE	VVFGGGTKLT	240
241	VLGAAAEQKL	ISEEDLNGAA					

图 49

	10	20	30	40	50	60
L	ATTATTACTC GCGGCCAGC CCGCCAGAC CGAGGTCCAG CTGGTGGAGT CTGGGGGAGG					
B	L L L A A Q P A F A E V Q L V E S G G G					
	70	80	90	100	110	120
L	CTTGGTACAG CCGGGGGGT CCTCGAGCT CTCCTGTGCA CCCTCTGGAT TCACOPTTAG					
B	L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S					
	130	140	150	160	170	180
L	CAGCTATGCC ATGAGCTGGG TCGCCAGGC TCCAGGGAAG GGGCTGGAGT GGGTCTCAGC					
B	S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A					
	190	200	210	220	230	240
L	TATTAGTGGT AGTGGTGGTA GCACATACTA CGCAGACTCC GTGAGGGCC GGTTCACCAT					
B	I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I					
	250	260	270	280	290	300
L	CTCCAGAGAC AATTCCAAGA ACACCGTGTG TCTGCAATG AACAGCCTGA GAGCCGAGGA					
B	S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D					
	310	320	330	340	350	360
L	CAGGCCGGTG TATTACIGTG CAAGACCGG SCAGSTETGAGGCTGATG GGGCCAGG					
B	T A V Y Y C A R T G Q S I K R S W G Q G					
	370	380	390	400	410	420
L	TACCCGTGTC ACCGTGTGGA GAGGTGGAGG CGGTTCAGGC GGAGGTGGCT CTGGCCGTGG					
B	T L V T V S R G G G G S G G G G S G G G					
	430	440	450	460	470	480
L	CCGATCTCT GAGCTGACTC AGGACCCCTGC TGTGTCTGTG GCCTTGGGAC AGACAGTCAG					
B	G S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R					
	490	500	510	520	530	540
L	GATCACAAGC CAGGAGACA GCCTCAGAAG CTATTATGCA AGCTGGTACC AGCAGAGCC					
B	I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P					
	550	560	570	580	590	600
L	AGGACAGGCC CCTGTACTTG TCACTATGG TAAAAACAAC CGCCCTCAG GATCCCGAGA					
B	G Q A P V L V I Y G K N N R P S G I P D					
	610	620	630	640	650	660
L	CCGATCTCT GGTCCAGCT CAGGAACAC AGCTTCCTTG ACCATCACTG GGGCTCAGGC					
B	R P S G S S S G N T A S L T I T G A Q A					
	670	680	690	700	710	720
L	GGAAGATGAG GCTGACTATT ACTGTAATC CCGGGACAGC AGTGGTAACC ATGTGGTATT					
B	S D E A D Y Y C N S R D S S G N H V V F					
	730	740	750	760	770	780
L	CGGGGAGGG ACCAAGCTGA CCGTCTAGG TCGGGCCGCA GAACAACAAC TCACTCAGA					
B	G G G T K L T V L G A A A E Q K L I S E					
	790	800	810	820	830	840
L	AGAGGATCTG AATGGGGCCG CAGGTAATG TCGATTTTT TAAGTTRACC T					
B	E D L N G A A * N C * I F * V N					

图 50

## Y1-生物标记的序列 (SEQ ID NO: 211)

1 MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ  
41 APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL  
81 YLQMNSLRAE DTAVYYCARM RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG  
121 SGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY  
161 YASWYQQKPG QAPVLLVIYGK NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA  
201 SLTITGAQAE DEADYYCNSR DSSGNNVVFG GGTKLTVLGG  
241 GGLNDIFEAQ KIEWHE

图 51

Y1-cys-kak scFv (SEQ ID NO. 212)

1 MEVQLVESGG GVVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ  
APGKGLEWVS GINWNGGSTG 60

61 YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARM  
RAPVIWGQGT LVTVSRGGGG 120

121 SGGGSGGGG SSELTQDPAV SVALGQTVRI TCQGDSLRSY  
YASWYQQKPG QAPVLVIYGK 180

181 NNRPSGIPDR FSGSSSGNTA SLTITGAQAE DEADYYCNSR  
DSSGNHVVFG GGTKLTVLGG 240

241 GGCKAK

图 52