



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1701117 B

(45) 授权公告日 2011.04.20

(21) 申请号 03825393.3

(22) 申请日 2003.09.25

(30) 优先权数据

279924/2002 2002.09.25 JP

377569/2002 2002.12.26 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.05.25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2003/012280 2003.09.25

(87) PCT申请的公布数据

W02004/029242 JA 2004.04.08

(73) 专利权人 财团法人化学及血清疗法研究所
地址 日本熊本县

(72) 发明人 副岛见事 三村法子 前田浩明
野崎周英 滨本高义 中垣智弘

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 郭文洁 王景朝

(51) Int. Cl.

C12N 15/02 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件

PLAIMAUER 等. Cloning, expression, and functional characterization of the vonWillebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). BLOOD 100, 10, 2002, 100(10), 第 3626-3631 页.

审查员 罗霄

权利要求书 1 页 说明书 20 页 序列表 9 页
附图 11 页

(54) 发明名称

针对 VON WILLEBRAND 因子切割酶的抗体及利用所述抗体的分析系统

(57) 摘要

提供对 ADAMTS-13 显示有选择的免疫反应性的抗体, 以及该抗体在表位分析或 ADAMTS-13 自身抗体-阳性患者诊断中的应用。备选地, 为了应用于药物产品, 提供用于生产和使用部分缺失的修饰的 ADAMTS-13 分子的方法。特异于 ADAMTS-13 的抗体可从用包含部分或完整的 ADAMTS-13 氨基酸序列的多肽免疫和致敏的温血动物获得; 用于生产抗体的方法包括用包含部分或完整的 ADAMTS-13 氨基酸序列的多肽免疫和致敏温血动物的步骤; 上述抗体的用途包括检测和纯化 ADAMTS-13 的方法; 以及提供部分缺失的修饰的 ADAMTS-13 分子。

1. 单克隆抗体，其是由保藏号为 FERM BP-8483 的杂交瘤系 WH2-22-1A 或保藏号为 FERM BP-8474 的杂交瘤系 Pep6-6A 的杂交瘤所产生的抗体。
2. 产生权利要求 1 的抗体的杂交瘤，其为保藏号为 FERM BP-8483 的杂交瘤系 WH2-22-1A 或保藏号为 FERM BP-8474 的杂交瘤系 Pep6-6A。
3. 用于检测 ADAMTS-13 的免疫测定试剂盒，其包含权利要求 1 所述的抗体。
4. 检测 ADAMTS-13 的方法，其特征在于将权利要求 1 的抗体与分析靶物接触并通过免疫反应检测 ADAMTS-13。

针对 VON WILLEBRAND 因子切割酶的抗体及利用所述抗体的分析系统

技术领域

[0001] 本发明涉及伦理药物领域中的蛋白质。具体地，本发明涉及特异于参与血液凝固的 von Willebrand 因子 (von Willebrand 因子：在下文中也称为 vWF) 的切割酶 (在下文中也称为 ADAMTS-13) 的全长或部分片段及其抗体。通过本发明提供的针对 ADAMTS-13 的抗体开发了有效制备高纯度酶的可能性，该酶可用于诊断酶的缺失和降低，例如血栓性血小板减少性紫癜 (在下文中也称为 TTP)、或用于诊断该酶蛋白质的自身抗体 - 阳性患者、以及用于酶替代疗法患有与此相关的疾病的患者。在另一个方面，它能够鉴别由于弥漫性血管内凝血 (在下文中也缩写为 DIC) 等造成的血小板降低和由于先天性或获得性的 TTP 造成的血小板降低，并且在血小板注射时提供指标。此外，可以展望其用作新的抗 -ADAMTS-13 的药物。

背景技术

[0002] vWF 是由血管内皮细胞或骨髓巨核细胞产生的血液凝固因子，并且以通过 S-S 键结合的由具有 2,050 个氨基酸残基的单一类型亚基 (单体为大约 250kDa) 以及组成的多聚体结构 (分子量为 500 至 20,000kDa) 存在。血液浓度是大约 10 μ g/ml，并且一般地分子量越高的分子特异活性越高。

[0003] vWF 作为血液凝固因子有 2 个主要功能；一个功能是作为结合和稳定血液凝固因子 VIII 的载体蛋白质，而另一个功能是容许血小板粘附和聚集至损伤的血管壁处血管内皮细胞下的组织并且形成血小板栓。

[0004] 血栓性血小板减少性紫癜 (TTP) 是在机体组织小动脉和遍及机体的毛细血管中形成血小板栓的疾病，尽管近代医学技术不断发展，与该疾病相关的致死率在 1971 至 1991 间增加了大约 3 倍。病理学上 TTP 被认为是由血管内皮细胞紊乱和血管中血小板凝集所引起的，并且在形成的血小板栓中观察到免疫组织学显著数量的 vWF，推测 vWF 在其起源中扮演重要角色。在患有 TTP 的患者中，vWF 的多聚体结构优势于正常的或高分子的 vWF，特别地，推测在高剪切应力下很少观察到的异常大的 vWF 多聚体 (ULvWFM) 和大的 vWF 多聚体 (LvWFM) 在促进血小板凝集和微血栓形成中扮演重要角色。同时，已知在高剪切应力下，健康人的循环血液中，在 vWF 切割酶 (vWF-切割蛋白酶) 的作用下，vWF 在 842Tyr-843Met 的位置分解。因此，就 TTP 而言，在假定的情况下，通过一些原因降低血浆中上述酶的活性，ULvWFM 至 LvWFM 的增加增强了血小板凝集，由此导致在血管中形成血小板栓。

[0005] 编码具有这种酶活性的活性主要部分的 vWF 切割酶的基因亦称为 ADAMTS-13，是由本申请的申请人在 2001 年克隆的 (WO 02/088366)。关于 ADAMTS-13 分子结构的知识概括如下。

[0006] 就 ADAMTS-13 的结构域组成而言，信号肽后是前肽，随后是弗林蛋白酶裂解基序的 RQRR 序列，其后是包含由 HEXXHXXGXXHD 共有序列组成的 reprotin 型锌螯

合区域的金属蛋白酶结构域（至 P285 终止）。通过在蛇毒金属蛋白酶中发现的解聚素 - 样结构域（至 W387 终止），它与由大约 50 至 60 个残基组成的第一个 Tsp1 基序（Tsp1-1）连接，一般认为该基序对于分子识别是很重要的（至 Q449 终止），并且进一步地延伸至包括了 RGDS 序列，一种细胞粘附基序的富含 Cys 的区域（至 T581 终止）。随后，经过大约 130 个氨基酸残基组成的、不包含半胱氨酸残基的间隔结构域（至 W688 终止），再接附加的 7 个 Tsp1 基序（Tsp1-2 至 8），以及延伸为 CUB 结构域 -1 和 -2，已知该结构域首先是在补体成分 C1r 或 C1s 中发现的。

[0007] 但尚未建立对于这个酶的有效的高纯度的纯化方法，也未建立用于定性和/或定量诊断这个酶的存在数量的方法。此外，还未建立用于诊断该酶的自身抗体 - 阳性患者的方法，并且也没有鉴定对该酶活性表达必不可少的结构域。

[0008] 发明公开

[0009] 既然如此，本发明的第一个目的是提供对 ADAMTS-13 具有高选择性的免疫活性抗体。

[0010] 本发明的第二个目的是提供用于制备该抗体的方法。

[0011] 本发明的第三个目的是提供该抗体的应用。

[0012] 本发明的第四个目的是提供能够鉴定上述抗体或来源于自身抗体 - 阳性患者抗体的存在或其识别区域的全长或部分缺失的 ADAMTS-13 分子。

[0013] 本发明的第五个目的是提供用于制备这种全长或修饰分子的方法。

[0014] 本发明的第六个目的是提供这种全长或修饰分子的应用。

[0015] 作为治疗患有先天性缺乏特异的 vWF 切割酶的患者以及该酶的后天性抗体阳性患者的方法，迄今只是进行血浆替代治疗并且需要用纯的酶，例如该酶的纯化产物或重组体建立替代治疗。据报道患有家族性 TTP 的患者先天性缺乏特异的 vWF 切割酶，而非家族性的 TTP 是由于产生对该酶的自身抗体而后天引起的。因此，用该酶进行替代治疗对于家族性的 TTP 患者（实际上进行血浆施用）是合乎需要的，而通过血浆交换除去自身抗体并且补充这种酶对于非家族性的病例是符合需要的。

[0016] 因此，需要有效的制备方法或对这种酶的诊断等，但是不能通过根据由本申请人的在前申请（WO 02/088366）所描述的方法或其他方法（参见，例如，Kokame, K. 等，" Proc.N.A.S.U.S.A "，2002，vol.99，pp.11902-11907；Fujikawa, K. 等，" Blood "，2001，vol.98，pp.1662-1666），从血浆或表达重组体的上清液纯化酶的方法预期得到足够纯度和产率的 vWF 切割酶。此外，迄今为止还未存在用于测定这种酶的数量，特别是测定该酶作为适量抗原的数量的技术。此外，在血小板减少症的情况下，当此状况不是由 DIC 而是由 TTP 作为原发性疾病所引起时，存在例如由血小板注射引起的恶化病症的风险。

[0017] 因此，本发明旨在提供针对 vWF 切割酶的抗体来解决这些问题。这些抗体能够定量和纯化 vWF。

[0018] 在上述情况下，本发明人已经进行了深入的研究来实现 vWF 切割酶的分离和鉴定，结果是我们已经成功地纯化和分离尚未有报道的所需要的 vWF 切割酶，并且已经鉴定了成熟蛋白质的氨基酸序列和编码该氨基酸序列的基因（WO 02/088366）。

[0019] 为了鉴定被认为对表达活性必不可少的区域，我们制备从 C-末端侧面的 CUB 结

构域产生连续缺失的修饰分子，并且测定 vWF 切割活性。从该研究中证实在由 SEQ ID No.1 中从第 688 位的附近到 N-末端的氨基酸组成的分子中仍可定性地保持酶活性，该区域被称为间隔结构域。另一方面，证实在由达到第 581 位附近的氨基酸组成的分子中，妨碍了正常的分泌，并且观察到其分泌到培养上清液中但是酶活性是微弱的，或者在由达到第 449 位附近的氨基酸组成的分子中没有观察到分泌，这些发现表明了对本发明的酶分子活化所必要的结构域。因此能够制备为获得可以中和这种酶活性的抗体或可以检测具有活性的该酶分子的抗体所必需的表位区域。

[0020] 可使用根据获得的 ADAMTS-13 的氨基酸序列等制备的肽作为常规的免疫方法制备单克隆和多克隆抗体的抗原等 (Current Protocols in Molecular Biology, Edited by F.M.Ausbel 等 (1987), Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J.McCAFFERTY 等 (1996), Antibodies: A Laboratory Manual, Edited by Harlow David Lane (1988) or ANTIBODY ENGINEERING, second edition, Edited by Carl A.K.BORREBAECK (1995))。备选地，可以利用噬菌体展示技术通过抗原制备方法来生产结合上述蛋白质的抗体 (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Edited by Brian K.Kay 等 (1996), Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Edited by J.McCAFFERTY 等 (1996), or ANTIBODY ENGINEERING second edition edited by Carl A.K.BORREBAECK (1995))。备选地，也可根据这些技术从针对该酶活性的自身抗体-阳性的 TTP 患者的样品中分离针对该酶活性的中和抗体或简单的结合抗体。利用这些抗体能够用于诊断和治疗伴随该酶数量变化的疾病，例如 TTP 等。备选地，如此制备的抗体可用于制备针对例如小鼠 ADAMTS-13 的抗体，并且可通过将抗体导入到小鼠中或通过将其整合入该抗体基因的表达载体导入到小鼠中来产生自身抗体-阳性模型的小鼠。

[0021] 简而言之，本发明如下进行说明。

[0022] [1] 针对蛋白质或肽的抗体，其中该蛋白质或肽由构成 von Willebrand 因子切割酶 (在下文中也称为 ADAMTS-13) 的全长氨基酸序列、在所述氨基酸序列中通过缺失、取代或添加一个或几个氨基酸所得的经修饰的氨基酸序列，或任何一个上述氨基酸序列的部分序列、或包括所述的全长氨基酸序列的多肽链组成。

[0023] [2] 根据 [1] 的抗体，其中 ADAMTS-13 来源于灵长类或啮齿类。

[0024] [3] 针对蛋白质的抗体，其中该蛋白质由在构成 SEQ ID No.1 所示的 ADAMTS-13 的氨基酸序列中通过缺失、取代或添加一个或几个氨基酸所得的经修饰的氨基酸序列，或任何一个所述氨基酸序列的部分序列、或包含所述的 ADAMTS-13 氨基酸序列的多肽链组成。

[0025] [4] 识别构成如 SEQ ID No.1 所示的 ADAMTS-13 的氨基酸序列的多肽的一部分的抗体，其中所述的部分是从间隔结构域到 N-末端的区域、或从金属蛋白酶结构域、解聚素-样结构域、Tsp1-1 结构域或富含 Cys 的区域到间隔结构域的区域。

[0026] [5] 根据 [1] 至 [4] 中任何一项所述的适用于亲合纯化蛋白质的抗体，其中该蛋白质由在构成 ADAMTS-13 的氨基酸序列中通过缺失、取代或添加一个或几个氨基酸所得的经修饰的氨基酸序列，或任何一个上述氨基酸序列的部分序列、或包含所述的 ADAMTS-13 的氨基酸序列的多肽链组成。

[0027] [6] 根据 [1] 至 [4] 中任何一项所述的能够抑制或中和蛋白质酶活性的抗体，其中该蛋白质由在构成 ADAMTS-13 的氨基酸序列中通过缺失、取代或添加一个或几个氨基酸所得的经修饰的氨基酸序列，或任何一个所述氨基酸序列的部分序列、或包含所述的 ADAMTS-13 的氨基酸序列的多肽链组成。

[0028] [7] 根据 [6] 所述的抗体，其中该抗体识别从 ADAMTS-13 的间隔结构域到 N- 末端、金属蛋白酶结构域或解聚素 - 样结构域的区域。

[0029] [8] 由包括如 SEQ ID Nos.2 和 3 所示的 ADAMTS-13 的部分肽的免疫原制备的抗体。

[0030] [9] 通过用表示为全长或部分长度的如 SEQ ID No.1 所示的多肽链进行免疫，或通过能够将表达所述多肽链的表达载体直接转染到动物中而制备的抗体。

[0031] [10] 根据 [1] 至 [9] 中任何一项所述的抗体，其是多克隆抗体。

[0032] [11] 根据 [1] 至 [9] 中任何一项所述的抗体，其是单克隆抗体，以及编码所述抗体的基因。

[0033] [12] 根据 [9] 的单克隆抗体，其是由选自杂交瘤系 WH10、WH63.1、WHS40.3、Pep4-34.1、WH2-22-1A、WH2-1-1、WH2-11-1、Pep6-6A 和 Pep4-5B-1 的杂交瘤所产生的抗体，以及编码该单克隆抗体的基因，其中 WH10、WH63.1、WHS40.3 和 Pep4-34.1 分别于 2002 年 9 月 4 日保藏在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心 (AIST) (Tsukuba Central 6, 1-1-1Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本)，保藏号为 FERM BP-8174、FERM BP-8175、FERM BP-8176 和 FERM BP-8177，而 WH2-22-1A、WH2-1-1、WH2-11-1、Pep6-6A 和 Pep4-5B-1 分别于 2003 年 4 月 22 日和 2003 年 9 月 10 日保藏在独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心 (AIST) (Tsukuba Central 6, 1-1-1Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 日本)，其保藏号为 FERM BP-8483、FERM BP-8484、FERMBP-8485、FERM BP-8474 和 FERM BP-8475。

[0034] [13] 可结合或竞争性地结合由 [1] 至 [12] 中任何一项所述的抗体识别的 ADAMTS-13 的表位的抗体。

[0035] [14] 药物组合物或诊断性的药物，包括 [1] 至 [13] 中任何一项所述的抗体。

[0036] [15] 经标记的蛋白质，其包含 [1] 至 [13] 中任何一项所述的抗体作为组分。

[0037] [16] 经分离的细胞，其可产生 [1] 至 [13] 中任何一项所述的抗体的。

[0038] [17] 根据 [16] 所述的细胞，其是杂交瘤。

[0039] [18] 根据 [17] 所述的细胞，其选自杂交瘤系 WH10 (保藏号 FERM BP-8174)、杂交瘤系 WH63.1 (保藏号 FERM BP-8175)、杂交瘤系 WHS40.3 (保藏号 FERM BP-8176)、杂交瘤系 Pep4-34.1 (保藏号 FERM BP-8177)、杂交瘤系 WH2-22-1A (保藏号 FERM BP-8483)、杂交瘤系 WH2-1-1 (保藏号 FERM BP-8484)、杂交瘤系 WH2-11-1 (保藏号 FERMBP-8485)、杂交瘤系 Pep6-6A (保藏号 FERM BP-8474) 和杂交瘤系 Pep4-5B-1 (保藏号 FERM BP-8475)。

[0040] [19] 免疫测定试剂盒，其包含 [1] 至 [13] 中任何一项所述的抗体。

[0041] [20] 用于制备抗体的方法，其包括下列步骤：用包括部分或全部 ADAMTS-13 的氨基酸序列的多肽免疫和致敏温血动物，以及从所述的经免疫和致敏的温血动物的体液提取如 [1] 至 [13] 中任何一项所述的抗体。

[0042] [21]用于制备如[20]所述的抗体的方法，其中用于免疫和致敏温血动物的多肽包括作为 ADAMTS-13 的一部分的、部分或完整的序列表中 SEQ ID No.1 所示的氨基酸序列。

[0043] [22]用于制备抗体的方法，包括下列步骤：体内或体外培养可以产生 [1] 至 [13] 中任何一项所述抗体的经分离的细胞，以及从体液或培养物中提取所述的抗体。

[0044] [23]权利要求[22]所述的制备抗体的方法，其中可以产生抗体的分离细胞是杂交瘤。

[0045] [24][20]至[23]中任何一项所述的制备抗体的方法，其中通过一种或多种选自盐析、透析、过滤、浓缩、离心、分级沉淀、凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、高效液相色谱法、亲和色谱法、凝胶电泳和等电聚焦的纯化方法来提取抗体。

[0046] [25]检测 ADAMTS-13 的方法，其特征在于将 [1] 至 [13] 中任何一项所述的抗体与分析靶物接触并通过免疫反应检测 ADAMTS-13。

[0047] [26]根据 [25]所述的检测方法，其是利用权利要求 1 至 13 中任何一项所述的抗体，通过放射免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫分析进行的。

[0048] [27]根据 [25]或 [26]所述的检测方法，其中的分析靶物是从活体提取的生物样品。

[0049] [28]用于纯化 ADAMTS-13 的方法，其包括下列步骤：将权利要求 1 至 13 中任何一项所述的抗体与包含 ADAMTS-13 和杂质的混合物接触使所述蛋白质吸附在抗体上，以及使所述的被吸附的蛋白质从抗体释放出来。

[0050] [29]根据 [28]所述的纯化方法，其中该抗体结合不溶于水的载体。

[0051] [30]诊断性的药品或药物产品，包括作为主要成分的 ADAMTS-13 的全长序列或其部分缺失的变体。

[0052] [31]根据 [30]所述的诊断性的药品或药物产品，包括作为主要成分的、从 ADAMTS-13 的间隔结构域到 N-末端、从金属蛋白酶结构域、解聚素-样结构域、Tsp1-1 结构域的区域、或富含 Cys 的区域到间隔结构域的区域。

[0053] [32]一种试剂、诊断性的药品或药物产品，其用于检测针对包括作为主要成分的 ADAMTS-13 的全长序列或其部分缺失的变体的多肽链的抗体。

[0054] [33]用于检测抗体或分析表位的抗原的用途和制备方法，该抗原包括作为主要成分的 ADAMTS-13 的全长序列或其部分缺失的变体。

[0055] 在此公开了可结合 ADAMTS-13 的抗体。可利用本领域的常规技术修饰这些抗体。也可通过组合在此公开的方法和已知的方法制备与在此首次说明的抗体相似的抗体。产生抗体的这些方法包括用 ADAMTS-13 或其片段免疫哺乳动物（例如小鼠、大鼠、兔、马、山羊、绵羊或猴子），或使可重组表达 ADAMTS-13 的表达载体进行皮下地、皮内地或肌肉注射转染。可利用本领域已知的多种技术从免疫的动物获得抗体，并且优选地可利用结合目标抗原进行抗体筛选。可通过屠宰动物的步骤实现从该动物分离抗体和/或产生抗体的细胞。

[0056] 备选地，除用 ADAMTS-13 免疫哺乳动物外，可利用例如 λ 噬菌体或在表面上显示功能性的免疫球蛋白结合结构域的噬菌体纤丝，从表达免疫球蛋白的可变域的重组体产生文库获得针对 ADAMTS-13 的特异抗体。该文库可以从获得自没有用任何

ADAMTS-13(或片段)免疫的生物体的序列天然构建,或可以从获得自己已经暴露于目标抗原的生物体的序列构建。

[0057] 可通过由 Kohler 和 Milstein 首次描述的方法, Nature, 256: 495, 1975, 或重组的方法(参见 Mage 和 Lamoyi, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97, Marcel Dekker, New York, 1987) 制备在此使用的单克隆抗体。

[0058] 在杂交瘤方法中,为了衍生出产生或可以产生可以与用于免疫的 ADAMTS-13 特异结合的抗体的淋巴细胞,用抗原以皮下的、腹膜内的或肌内的途径免疫合适的宿主温血动物,例如小鼠、大鼠、兔、马、山羊、绵羊或猴子。备选地,可以体外免疫淋巴细胞。随后,利用合适的助融剂,例如聚乙二醇等,使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞[参见 Goding, Monoclonal antibodies: Principles and Practice, pp.59-103(Academic Press, 1986)]。

[0059] 用于免疫的抗原包括从人或非人的哺乳动物的血液分离的天然 ADAMTS-13, 和利用遗传工程技术制备的重组 ADAMTS-13, 也可能来源于人或其他哺乳动物。不仅可使用全长的 ADAMTS-13, 而且可使用酶促切割片段或从编码 ADAMTS-13 的 DNA 片段遗传工程化的重组 ADAMTS-13 的部分肽。ADAMTS-13 片段的实例包括包含从间隔结构域到 N-末端、或从金属蛋白酶结构域、解聚素样结构域、Tsp1-1 结构域或富含 Cys 的区域到间隔结构域的片段。

[0060] 可以在优选包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞复制或存活的物质的合适培养基中接种和培养如此制备的杂交瘤细胞。例如,当亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT 或 HPRT)时,用于培养杂交瘤的培养基一般包含次黄嘌呤、氨基蝶呤、和胸腺嘧啶脱氧核苷(HAT 培养基),并且这些物质抑制 HGPRT 缺陷细胞的复制。

[0061] 优选的骨髓瘤细胞是有效融合并支持由所选择的产生抗体的细胞稳定和高水平表达抗体的骨髓瘤细胞,其对培养基例如 HAT 培养基具有敏感性。

[0062] 可根据针对 ADAMTS-13 产生单克隆抗体来分析用于培养杂交瘤细胞的培养基。优选地,通过固相酶联免疫吸附测定(ELISA)测定特异的结合。本发明的单克隆抗体特异地结合 ADAMTS-13 或其部分的片段。

[0063] 可通过表达如下所述的缺失 C-末端的变体 ADAMTS-13 分子来描绘结合抗体的表位的图谱。因此,本发明包括可以结合 ADAMTS-13 表位的抗体,该 ADAMTS-13 表位结合所阐述的抗体。

[0064] 在本发明优选的实施方案中,单克隆抗体可能具有微摩尔以上的更大亲合力,或当通过例如 Scatchard 分析(参见 Munson, Pollard, Anal.Biochem.107: 220, 1980)测定时为更大的亲合力(即,大于 10^{-6} mol 的亲合力)。

[0065] 在鉴定产生具有所需要的特异性和亲合力的抗体的杂交瘤细胞后,通过有限稀释克隆来进行亚克隆,并且通过标准方法进行培养。适于该目的的培养基包括 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养基或 RPMI-1640 培养基。此外,可在动物中以腹水肿瘤体内增殖杂交瘤细胞。

[0066] 通过体外培养该杂交瘤细胞,可以获得包含所需要的抗体的培养上清液。此外,可以通过将这个杂交瘤移植到哺乳动物,例如小鼠的腹腔而获得包含所需要抗体的

腹水。

[0067] 优选地通过常规的免疫球蛋白纯化方法，例如用蛋白质 A 琼脂糖凝胶、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法从培养基、腹水或血清分离由杂交瘤分泌的单克隆抗体。

[0068] 可以通过本领域已知的方法，例如利用可以特异结合编码啮齿类抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针容易地分离和测序编码本发明的单克隆抗体的核酸。本发明的杂交瘤细胞是编码抗体或其片段的核酸的优选供应源。分离后，可以将核酸连接至表达载体或克隆载体，然后转化入宿主细胞，以及培养重组的宿主细胞以便生长的细胞可以产生单克隆抗体。

[0069] 可生产具有所需要的结合特性的抗体的杂交瘤包含编码抗体（包括抗体片段）的核酸，并且可表达这些抗体的宿主细胞都落入本发明的范围。此外，本发明提供用于生产抗体的方法，包括在其产生并且优选分泌该抗体的条件下培养可以产生抗体的细胞。

[0070] 可以通过多种方法改进本发明的抗体。此外，术语“抗体”应被解释为涵盖具有显示所需特异性的结合结构域的所有结合物质。因此，本发明涵盖抗原或表位、包含合成分子和与可以结合这里的 ADAMTS-13 具有相似形式的分子的抗体片段、该抗体的衍生物和功能等同物和同系物。

[0071] 可以结合抗原或其他结合对的抗体片段的实例是由 VL、VH、C1 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段；由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；由 VH 结构域组成的 dAb 片段；和包含分离的 CDR 结构域和 F(ab')₂ 片段以及在铰链结构域中通过二硫键连接的 2 个 Fab 片段的二价片段。也包含单链的 Fv 片段。

[0072] 产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤可以受到遗传变异或其他的变化的影响。此外，本领域的技术人员将理解该单克隆抗体可以经过重组 DNA 技术而用于产生保持原始抗体特异性的另一个抗体、人源化的抗体或嵌合分子。这种技术可以包括将编码抗体免疫球蛋白的可变域或互补决定域 (CDR) 的 DNA 导入到连接另一个免疫球蛋白的骨架区域的恒定结构域或不变结构域中。

[0073] 由本发明提供的产生单克隆抗体的杂交瘤包括 WH10、WH63.1、WHS40.3、Pep4-34.1、WH2-22-1A、WH2-1-1、WH2-11-1、Pep6-6A 和 Pep4-5B-1。

[0074] 免疫测定

[0075] 本发明的抗体可以多种分析形式用于本发明的检测或诊断方法。可使用该抗体作为特异结合 ADAMTS-13 的结合剂，并且例如能够体外检测样品中的 ADAMTS-13。在另一个方面，可在与分析靶物接触后使用其作为显影剂来确定被 vWF 切割酶占据的结合剂结合位点的部份，其是待分析靶物中的被分析物（分析的靶物）。也就是说，本发明的抗体在结合位点结合分析靶物并且通过测定结合待分析靶的数量，可确定待分析靶的本发明抗体的数量，因此本发明的抗体可用作验证被分析物存在的显影剂。

[0076] 该抗体的用途，特别是在分析中该抗体作为显影剂的用途包括用可以直接或间接地产生可检测的、以及优选为可测定的信号的标记物质或报告分子标记它们。此外，本发明的抗体也包括标记的抗体。可以通过将标记物质或报告分子与抗体偶联来进行标记，可以例如通过经肽键的共价键或非共价键直接或间接地形成这种偶联。可以通过重

组表达编码抗体和报告分子的融合基因获得借助于肽键的偶联。可使用本领域已知的分别将抗体与可检测部分结合的任何方法，包括 Hunter 等人，Nature, 144 : 945, 1962 ; David 等人，Biochemistry 13 : 1014, 1974 ; Pain 等人，J.Immunol.Meth.40 : 219, 1981 ; 和 Nygren, J.Histochem.and Cytochem.30 : 407, 1982 描述的方法。

[0077] 标记物质或报告分子包括荧光染料、荧光基团或激光染料等，其具有利用光谱方法加以分离的吸收或荧光，并且这些物质可通过共价键与抗体偶联。合适的荧光染料包括荧光素、罗丹明、虫荧光素、藻红蛋白和德克萨斯红。合适的显色染料包括二氨基联苯胺。其他可检测的标记包括放射性同位素标记，例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 或 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ，以及催化产生可检测反应产物的反应并且可以扩增信号的酶标记，例如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。可以利用本领域已知的技术进行这些酶的标记，包括利用生物素 / 抗生物素蛋白或生物素 / 链霉抗生物素的结合。

[0078] 另一个报告分子包括颗粒物质，例如显色的聚合物胶体颗粒或，例如乳液珠，其可以直接或间接地产生可目测观察、电学检测或用其它方式记录的可检测信号。此外，也可使用磁性的或顺磁的颗粒。此外，报告分子可以是催化例如显色反应、脱色反应或改变电特性的反应的酶。这些分子可能具有通过在能级之间带电跃迁而产生特征性光谱吸收或荧光的分子活性。此外，这些分子可以包括用于与生物传感器组合的化学实体。

[0079] 此外，既然该抗体比存在于样品中的其他物质可以更优先地特异结合 ADAMTS-13，可使用该抗体作为结合剂。优选地，将结合剂固定以便在分析中可以在固相支持物上，例如容易地在特异性位点进行操作。可以利用本领域已知的技术进行固定，例如物理吸附或化学吸附，并且可使用生物素 / 抗生物素蛋白或生物素 / 链霉抗生物素，例如用于使抗体化学结合到固态的支持材料（固相支持物）上。一般地，在适宜条件下将结合试剂和样品接触，以便存在于样品中的 ADAMTS-13 可以结合至结合剂。随后，可以利用显影剂测定结合剂结合位点部份的占据比。也就是说，通过测定结合至样品中的待分析靶物的抗体的数量来测定待分析靶物的数量。

[0080] 当利用本发明的抗体作为上述的显影剂时，对显影剂进行标记（使用例如，放射性标记、荧光标记或酶标记），以使得可以利用本领域已知的技术进行检测。因此，可以利用闪烁计数器或其他放射性计数装置检测放射性标记，利用激光或共聚焦显微镜检测荧光标记，以及利用底物上的酶标记作用检测酶标记，一般地这种作用导致颜色变化。显影剂可被用于竞争性的方法，其中该显影剂与被分析物竞争占据结合剂的结合位点，或可被用于非竞争性的方法，其中标记的显影剂与已经结合至结合剂或占据结合位点的被分析物结合。通过任何一个方法，显示由被分析物占据的结合位点部份，并且由此与例如利用包含已知浓度的被分析物的样品获得的标准相比显示样品中被分析物的浓度。

[0081] 利用来自患者的生物样品进行诊断分析。这些样品也可直接使用而不经预处理，也可能受到处理，例如除去样品中可能例如由进行分析前的离心或过滤而产生干扰的物质。合适的生物样品的实例包括血液、尿、汗、组织或其提取液体、或血清。

[0082] 在一个实施方案中，本发明涉及诊断具有 TTP 或 TTP- 样疾病或依赖于 vWF 血栓（由 vWF 所引起的血栓）的危险的患者是否患有这些疾病的方法，或评估风险或

评估是否存在患有这些疾病的任何风险，该方法包括下列步骤：(a) 将从患者获得的生物样品与其上已经固定有可特异结合 ADAMTS-13 的抗体的固态支持材料接触；(b) 将其上已经固定有抗体，并且已经与样品接触的固态支持材料与可与抗体上未被占据的结合位点、已经结合到抗体上的结合 ADAMTS-13 或该抗体上已占据的结合位点结合的标记显影剂接触；以及 (c) 检测步骤 (b) 中特异结合的显影剂标记，以获得相应于样品中 ADAMTS-13 浓度的值。

[0083] 在进一步的实施方案中，本发明提供用于诊断患者依赖于 vWF 血栓的方法，该方法包括下列步骤：(a) 将从患者获得的生物样品与任何一项权利要求所述的抗-ADAMTS-13 的抗体接触；以及 (b) 测定样品中 ADAMTS-13 与抗-ADAMTS-13 抗体的结合。

[0084] 该方法进一步包括下列步骤：使相应于样品中 ADAMTS-13 浓度的值与从已知的标准物获得的值联系起来，例如测定具有已知浓度的标准物，产生标准曲线，将通过测定未知浓度的物质所获得的观测值与标准曲线比较，由此计算浓度。

[0085] 本发明的抗体可用于所有已知的免疫学-测定方法，例如竞争性结合分析、直接和间接的夹层分析和免疫沉淀分析 [参见 Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, PP.147-158 (CRC Press, 1987)]。

[0086] 夹层分析使用 2 种抗体，其可分别结合 ADAMTS-13 待检测的不同免疫位点或表位。使待分析靶物的被分析物与固定在固态支持材料上的第一抗体结合，在夹层分析中容许第二抗体与被分析物结合以形成不溶的 3 部分的复合物（抗原、第一抗体和第二抗体）。在可检测的部分（标记物质或报告分子）标记第二抗体或利用已经在可检测的部分标记的抗-免疫球蛋白的抗体进行测定（间接的夹层分析）。例如，夹层分析的一种模型是 ELISA 分析，其可检测的部分是酶。

[0087] 本发明也包括包含本发明抗体的免疫测定试剂盒。当该试剂盒是以酶免疫分析为基础时，该试剂盒可包括其上已经有固相抗体的载体或该抗体可能预先结合该载体。当这个试剂盒是以利用例如乳液的载体的浓缩方法为基础时，该试剂盒可能包括其上吸附有抗体的载体。该试剂盒也可适当地包括标准样品、封闭溶液、反应溶液、反应终止液、用于处理样品的试剂等。

[0088] 本发明的抗体可用于体内成像，其中用可检测的部分，例如放射性同位素标记该抗体，将其施用于宿主，优选地施用到血流中，并且测定标记抗体在宿主中的存在和定位。该抗体可以结合其中存在或定位有 ADAMTS-13 的组织或器官等。可以在所有的部分标记抗体，其可通过核磁共振、X 射线荧光检查、或其他本领域已知的检测方式加以检测，并且利用根据检测部分的特异检测方式测定标记抗体的存在和定位，即可以检测 ADAMTS-13 的存在和定位。

[0089] 此外，本发明的抗体作为用于亲和色谱法中亲和纯化的试剂也是有用的。在这个方法中，利用本领域众所周知的方法将抗体固定在支持物，例如合成树脂，如 Cellulofine 和滤纸上。随后，在将待纯化的包含 ADAMTS-13 的样品与固定的抗体接触后，用可以完全除去样品中除了结合于固定的抗体的 ADAMTS-13 外的所有物质的溶剂洗涤支持物。最后，用可以从抗体释放 ADAMTS-13 的溶剂，例如甘氨酸缓冲溶液，pH3 至 5 洗涤支持物，分离和纯化 ADAMTS-13。

[0090] 可以将本发明的抗体或 ADAMTS-13 分子或其变体混合到药理学组合物中。简而言之，本发明包括包含本发明抗体或 ADAMTS-13 分子或其变体的药理学组合物。在此，变体是在氨基酸序列片段中缺失、取代或加入了一个或多个氨基酸的分子，该片段包含在 ADAMTS-13 分子的完整分子或氨基酸序列中显示药理学效果的部分（它不是必然的保持活性的修饰）。

[0091] 本发明的抗体包含可以抑制或中和 ADAMTS-13 酶活性的抗体。优选地，这种抗体识别并结合存在于 ADAMTS-13 的域结构中从间隔结构域到 N-末端的表位。该抗体也识别并结合存在于金属蛋白酶结构域、解聚素-样结构域、Tsp1-1 结构域，或 Cys-间隔区域的表位。

[0092] 药理学组合物可以包含药理学上可接受的赋形剂、载体、缓冲溶液、稳定剂、或除上述抗体、ADAMTS-13 分子或其变体之外的本领域众所周知的另外物质。这种物质是无毒的并且不干扰活性成分的效果。载体或另外物质的严格特性依赖于给药途径、例如口服的、静脉内的、皮内或皮下的、经鼻的、肌内的或皮下地、腹腔内途径，并且可以根据给药途径选择合适的载体或物质。

[0093] 用于口服的药理学组合物可以是片剂、胶囊剂、粉剂或液体形式。片剂可以包含固体类型的载体，例如白明胶或佐剂。液体类型的药理学组合物通常可以是载体，例如水、石油、动物油、植物油、矿物油或合成油。也包括盐水、葡萄糖或其他糖溶液、或甘醇，例如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0094] 就静脉内的、皮内或皮下的注射、或注射至疼痛部分来说，活性成分可能不包含任何发热因子并且可能是含水溶剂的形式，其中该含水溶剂可以是非肠胃道可接受的并且具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域的技术人员可以利用等渗性培养基制备合适的溶液，例如氯化钠液体、Ringer' s 溶液、乳酸化的 Ringer' s 溶液等。如果需要也可包含防腐剂、稳定剂、缓冲溶液、抗氧化剂、和 / 或其他添加剂。

[0095] 针对本发明的 ADAMTS-13 的抗体，ADAMTS-13 分子或其变体可以用盐水、缓冲溶液等稀释和配制以制备药物组合物。制剂的 pH 优选是接近体液的 pH 的弱酸至中性区域的 pH，并且优选最低为 5.0 至 6.4 和优选最高为 pH6.4 至 8.0。也可提供可以长时间储存的形式，例如是冻干的形式等，并且在这种情况下，可以在使用的时候用水、盐水、缓冲溶液等溶解和使用，以成为所需要的浓度。本发明的制剂可能包含通常用于药品的药理学上可接受的添加剂（例如，载体、赋形剂、稀释剂等）、稳定剂、或药理学上必需的成分。作为稳定剂，可以是例如葡萄糖的单糖、例如蔗糖和麦芽糖的二糖、例如甘露糖醇和山梨糖醇的糖醇、例如氯化钠的中性盐、例如甘氨酸的氨基酸、非离子型表面活性剂，例如聚乙二醇、聚氧乙烯-聚氧化丙烯共聚物 (Pluronic)、聚氧乙烯山梨糖醇酐酸酯 (Tween)、人白蛋白等，并且优选加入大约 1 至 10w/v%。

[0096] 可以通过静脉注射、肌肉注射、皮下注射等以有效量施用本发明的药物组合物，并且为一次性或若干次给药。给药的数量随状况、年龄、重量等而变化，但是每次 0.001mg 至 100mg 是优选的。

[0097] 本说明书引入由日本专利申请 Nos.2002-279924 和 2002-377569 的说明书和 / 或附图所公开的内容，上述申请是本申请要求优先权的基础。

[0098] 附图简述

- [0099] 图 1 显示用于制备确定抗体表位的 C- 末端缺失变体的方法；
- [0100] 图 2 通过非还原条件下利用抗-FLAG 抗体的 Western 印迹证明制备的 C- 末端缺失变体的瞬时表达；
- [0101] 图 3 通过还原条件下的 SDS-PAGE 证明制备的 C- 末端缺失变体瞬时表达的 vWF 切割活性；
- [0102] 图 4 显示给出结果证明 PoAb1 表位的非还原条件下的 Western 印迹；
- [0103] 图 5 显示给出结果证明 PoAb2 表位的非还原条件下的 Western 印迹；
- [0104] 图 6 显示给出结果证明 MoAb Pep4-34-1 表位的非还原条件下的 Western 印迹；
- [0105] 图 7 显示给出结果证明 MoAb WH10 表位的非还原条件下的 Western 印迹；
- [0106] 图 8 显示给出结果证明 MoAb WH63-1 表位的非还原条件下的 Western 印迹；
- [0107] 图 9 显示给出结果证明 MoAb WHS40-3 表位的非还原条件下的 Western 印迹；
- [0108] 图 10 概括了对多种抗体活性表达重要的结构域和识别区域；
- [0109] 图 11 通过用 ADAMTS-13 的部分肽免疫获得的兔抗血清的方式，显示表明健康人和 TTP 患者血浆中的 ADAMTS-13 的还原条件下的 Western 印迹结果；
- [0110] 图 12 是通过联合多克隆抗体和单克隆抗体构建的 ELISA 系统的图解以及该分析的流程图；
- [0111] 图 13 是通过针对各个结构域所制备的抗体构建 ELISA 方法的概念图；
- [0112] 图 14 是通过联合单克隆抗体和单克隆抗体构建的 ELISA 系统的图解以及该分析的流程图；
- [0113] 图 15 是通过用来自利用人胚肾细胞系 293 作为宿主的培养基的抗体柱的亲合纯化而纯化的重组 ADAMTS-13 的 SDS-PAGE 的电泳图谱；
- [0114] 图 16 是通过用来自收集的人血浆的 FI 糊状物的抗体柱的亲合纯化而纯化的重组 ADAMTS-13 的 SDS-PAGE 的电泳图谱；
- [0115] 图 17 显示利用抗体评估中和能力（非还原条件下 vWF 切割活性的 SDS-PAGE）；
- [0116] 图 18 显示患有获得性 TTP 的患者血浆中抗-ADAMTS-13 抗体的检测（ELISA 方法）；以及
- [0117] 图 19 显示小鼠血浆中 ADAMTS-13 的检测（Western 印迹方法）。
- [0118] 实施本发明的最佳方式
- [0119] 本发明将通过下列的实施例进行详细地描述，但是本发明不以任何方式只限于这些实施例。

[0120] 实施例 1

[0121] （多克隆抗体（PoAb）的制备）

[0122] 根据常规方法将从人血浆部分纯化的抗原蛋白质、或具有结合合适的载体物质（KLH 等）的氨基酸序列部分（由 SEQ ID No.2 或 SEQ ID No.3 的肽例证性说明）的合成肽（在 N- 或 C- 末端附加 Cys 以便于加入 KLH 的肽）、或被导入重组蛋白质或编码重组蛋白质的基因的表达载体按常规方法皮下、皮内或肌内地转染小鼠或兔子（Current Protocols in Molecular Biology : Chapter 11 immunology, Antibody Engineering : A PRACTICAL APPROACH Edited by J.McCAFFERTY 等，或 ANTIBODY ENGINEERING

second edition Edited by Carl A.K.BORREBAECKetc.) 以建立表达单克隆抗体的杂交瘤以及产生多克隆抗体 (PoAb)。对于 PoAb, 通过转染下列描述的表达全长、Q449 终止或 P285 终止的载体来制备三种抗体, 即 PoAb1、PoAb2 和 PoAb3。

[0123] 实施例 2

[0124] (单克隆抗体 (MoAb) 的制备)

[0125] 用重组衍生的 ADAMTS-13 和利用 KLH 作为载体的 SEQ ID No.2 或 SEQ ID No.3 的肽, 在存在弗氏完全佐剂时, 第一次免疫 Balb/c 小鼠的后腿。可通过 WO 02/088366 中所描述的方法制备 ADAMTS-13。

[0126] 一次性免疫接种 $1\ \mu\text{g}$ 至 $10\ \mu\text{g}$ 等量的所制备抗原一周后, 根据常规方法从小鼠后腿的股骨淋巴结或脾脏取样细胞。将从两只小鼠获得的细胞分别以 1 比 1-2 个细胞的比率与骨髓瘤细胞 P3X63Ag8U.1 (P3U1) (ATCC 保藏号 CRL-1597; Curr.Top.Microbiol. Immunol., vol.81, p.1(1978)) 混合, 离心 (1,500rpm, 5 分钟) 除去上清液, 使沉淀的细胞块充分松散, 边搅动边加入预先在 37°C 温热的 1ml 聚乙二醇溶液 (45% 聚乙二醇 4000, 55% RPMI 培养基)。在 37°C 温育 5 分钟后, 缓慢加入 RPMI 培养基, 以使得液体的总量为 50ml。离心后 (1,300rpm, 7 分钟), 除去上清液, 并轻轻地松散细胞。向其加入 50ml 的 S-Clone CM-B 培养基 (Sanko Junyaku Co., Ltd. 的产品), 利用移液管轻轻地使细胞悬浮。将 $100\ \mu\text{l}$ 的这种细胞悬浮液置入 96-孔细胞培养平板的 4 或 5 个每个孔, 并在含有 5% 二氧化碳的 CO_2 恒温箱中于 37°C 进行培养。次日, 向每个孔加入 $100\ \mu\text{l}$ HAT 培养基 (补充有 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 的次黄嘌呤、 $1.5 \times 10^{-3}\text{M}$ 的胸苷和 $4 \times 10^{-7}\text{M}$ 的氨嘌呤的 S-Clone CM-B 培养基), 并在含有 5% 二氧化碳的 CO_2 恒温箱中于 37°C 进行培养。对于其中杂交瘤生长充分的克隆, 将该培养基置换为 HT 培养基 (除了除去氨嘌呤的上述的 HAT 培养基), 取样部分的培养上清液, 通过下列描述的筛选分离靶杂交瘤。

[0127] 组合下列 ELISA 方法和 Western 印迹方法来分离靶杂交瘤。

[0128] (1) ELISA 方法

[0129] 将与以上述相似的方式制备的合成肽抗原或纯化的抗原 (蛋白质浓度: 0.5 至 $2\ \mu\text{g/ml}$) 以 $50\ \mu\text{l}$ /孔加入 96-孔微测定平板, 并且通过在 4°C 孵育过夜而进行固定。此外, 加入 $300\ \mu\text{l}$ 的 1% BSA (牛血清白蛋白) 溶液, 并且以相似的方式孵育以进行有效封闭。向如此制备的固定抗原的平板, 加入通过细胞融合方法获得的杂交瘤的培养上清液和克隆后的杂交瘤, 并且在 4°C 培养 1 小时, 然后用 TBS 洗涤平板 3 次, 并且加入 $100\ \mu\text{l}$ /孔的过氧化物酶-标记的抗-小鼠免疫球蛋白抗体溶液 (Cappel 的产品, 稀释 5,000-倍)。在 4°C 孵育 1 小时后, 用 TBS 洗涤 3 次, 然后加入 TMBZ 底物溶液, 以通过常规方法进行显色, 并在 450nm 的波长处测定吸光率。由此选择出与纯化的抗原反应的杂交瘤克隆。这个方法也可用于检测人血浆中 ADAMTS-13 的自身抗体。

[0130] (2) Western 印迹方法

[0131] 通过 Western 印迹方法筛选由 ELISA 获得的阳性克隆。利用 8% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶对纯化的抗原进行电泳, 转移到 PVDF 膜上, 并且将膜切成 0.4 至 0.5cm 宽。将每个小条浸入杂交瘤培养上清液, 并且在 37°C 孵育 1 小时。然后用 TBST (含有 0.05% Tween) 洗涤 3 次后, 在以 1 : 2000 稀释的碱性磷酸酶标记的抗-小鼠 IgG (TAGO Inc. 的产品) 溶液中于 37°C 孵育 1 小时。用 TBST 洗涤 3 次后, 利用 BCIP/NBT 的显色剂

(Bio-Rad 的产品)使其显色,选择显示纯化抗原的色带的杂交瘤,并进行克隆。以相同的技术分拣克隆后的杂交瘤克隆。通过上述的分拣方法获得了产生所需要的单克隆抗体的大约 30 个克隆的杂交瘤。这个方法也可用于检测人血浆中 ADAMTS-13 的自身抗体。

[0132] 实施例 3

[0133] (ADAMTS-13 的 C-末端缺失变体的制备)

[0134] 通过图 1 所示的策略,利用全长 vWF 切割酶基因克隆载体 (pCR2.1vWFCP),利用全长的和序列表中的 SEQ ID Nos.4 至 18 的引物制备表达变体的基因,该变体中从 C-末端逐一缺失结构域(完全的 1427 终止、T1135 终止、W1016 终止、W897 终止、W808 终止、W746 终止、W688 终止、T581 终止、Q449 终止、W387 终止、P285 终止;其中每个数字表示从由起始密码子 ATG 编码的 Met 至终止密码子的氨基酸残基的数目,表明了添加 FLAG 表位的位点(DNA 序列:gactacaaggacgatgacgataagtga(序列表中的 SEQ ID No.19)、氨基酸序列:Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys(序列表中的 SEQ ID No.20)),并整合到 pCAG 表达载体中(Niwa, H., 等 Gene vol.108, 193-199),并利用 Hela 细胞以下列步骤进行转染。

[0135] 可通过 WO 02/088366 中所描述的方法获得载有全长 ADAMTS-13 基因的载体 (pCR2.1cWFCP) 的全长。

[0136] 首先,将细胞以 $1-3 \times 10^5$ 个细胞/35mm 碟进行接种,次日,将 2 μ g 的上述表达载体加入 10 μ l 的聚胺转染试剂 TransIT (TAKARA 的产品),并加入 200 μ l 的无血清培养基,例如 Opti-MEM,根据试剂所附的用法说明制备 DNA 复合物,滴加到上述制备的多种细胞上,培养 6 小时,然后在将培养基变为 ASF104 无血清培养基 (Ajinomoto Co., Inc. 的产品)后,在 37°C 培养 72 小时,并收集上清液。利用抗-FLAG-M2 抗体 (KODAK 的产品),在抗-小鼠的 Ig-碱性磷酸酶标记的抗体系统中染色,通过 Western 印迹方法进行检测(如图 2 所示的结果证明了所观察到的表达)。这组修饰的分子具有附加的 FLAG 标记,并且能够以常规方法,利用固定抗-FLAG 标记的抗体的琼脂糖轻易地进行纯化。

[0137] 实施例 4

[0138] (确证 ADAMTS-13C-末端缺失变体的 vWF 切割活性)

[0139] vWF 的制备

[0140] 通过将溶解在 20mL 缓冲液中 (0.01% Tween-80/50mM Tris-HCl/100mM NaCl pH7.4) 的 2g 血浆冷冻部分在 Sephacryl S-500HR (Amersham-Pharmacia) 的 2.6 \times 90cm 柱上凝胶过滤来制备 vWF (参见 WO02/088366)。

[0141] vWF 切割反应

[0142] 通过 WO 02/088366 的方法进行 vWF 切割活性的分析。也就是说,将加入终浓度为 10mM 氯化钡的样品在 37°C 预孵育 5 分钟以激活蛋白酶。将缓冲液 (15 至 20mL 的 1.5M 尿素 /5mM Tris-HCl pH 8.0) 置入 50mL 的 falcon 管。然后,使由 Millipore Corp. 制造的膜滤器 (0.025 μ m) 浮起,并加入 100 μ L 的激活样品,其中已经加入并混合了 50 μ L 的 vWF 底物溶液。在恒温箱中于 37°C 静置过夜,次日从滤器收集样品。根据下列 SDS-PAGE 小节所示的 vWF 切割模式评估收集的样品。

[0143] SDS-PAGE

[0144] 室内制备并使用 SDS-5% 聚丙烯酰胺凝胶。用于电泳的样品是煮沸 3 分钟的、

vWF 切割活性分析小节中所描述的 10 μ L 样品和 2 μ L 的 SDS 电泳缓冲液（存在或缺乏还原剂 2-巯基乙醇时）。在 30mA 电泳 1 小时后，用 Gel Code Blue Stain 试剂（PIERCE）染色凝胶。

[0145] 因此，如图 3 所示，全长分子至 W688 终止分子可清楚地识别 vWF 切割活性。此外，当考虑到如上所述的抗 -FLAG 抗体到上清液中的表达模式，其中在上清液中未识别到 T581 终止的表达，证实接近这个区域（从富含 Cys 的区域到间隔结构域）的切割可能导致分泌的紊乱，因此可以理解为了保持该酶的活性而包括这个结构域是很重要的。

[0146] 实施例 5

[0147] （利用 Western 印迹分析抗体的表位）

[0148] 为了鉴定按照常规方法进行 Western 印迹的已建立的多克隆抗体（PoAb1 and PoAb2）和认为其识别位点相互之间是非竞争性的几个单克隆抗体（先前由本发明人制备的克隆号 WH10（FERM BP-8174）以及 WH63.1（FERM BP-8175）、WHS40.3（FERM BP-8176）和 Pep4-34.1（FERMBP-8177））的识别区域，利用实施例 4 的部分缺失的修饰分子的瞬时表达培养上清液进行 Western 印迹（图 4 至 9）。

[0149] 除此之外，对于新建立的克隆 WH2-22-1A（FERM BP-8483）、WH2-1-1（FERM BP-8484）、WH2-11-1（FERM BP-8485）、Pep6-6A（FERM BP-8474）和 Pep4-5B-1（FERM BP-8475）进行相似的分析。在图 10 中概括了抗体的识别区域和被认为对活性表达重要的区域。从图 4 推测出 PoAb1 的识别区域从 Q449 终止延伸至 W688 终止或跨越全长，并且如图 5 中所示，同时认为 PoAb2 识别从 P285 终止至 W387 终止和至 Tsp1- 以后，认为本多克隆抗体 PoAb1 具有中和的活性（如下所述），PoAb2 以及 PoAb3 也中和 ADAMTS-13 的酶活性。证实从间隔结构域至 N- 末端、金属蛋白酶结构域、解聚素 - 样结构域、Tsp1-1 结构域或 Cys- 间隔域的区域在体外分析中是功能性重要的，它们可能成为中和的区域。

[0150] 实施例 6

[0151] （利用 ELISA 鉴定抗 -ADAMTS-13 抗体的表位区域）

[0152] 将 100 μ L 的抗 -FLAG 抗体以 10 μ g/mL 固定到免疫模块（immunodule）的 96 孔平板上后，再固定多肽链添加了 FLAG 的 ADAMTS-13 野生型或各种上述的缺失变体，或备选地将 ADAMTS-13 的变体直接固定到平板上，在 100 μ L 适当稀释的 MoAb 与通过已知的方法进行封闭操作的平板发生反应后，用含有例如 Tween 的表面活性剂的缓冲液洗涤平板，在与抗 - 小鼠的共轭 IgHRP 于 37°C 反应 1 小时后，进行洗涤并通过 TMBZ 显色，由此以与实施例 5 中相似的方法搜索表位区域。因此支持实施例 5 中所示的结果。此外，证实这个方法对于存在于人血浆中的抗 -ADAMTS-13 抗体的检测和表位分析是有效的。

[0153] 实施例 7

[0154] （利用已建立的抗体通过 Western 印迹检测人血浆中的 ADAMTS-13）

[0155] 然后，利用通过上述各种方法制备的抗体，按照常规方法通过 Western 印迹方法检测本发明的酶（例如 Current Protocols in Molecular Biology : Chapter 10 analysis of proteins and Chapter 11 immunology）。利用连接至 KLH 的 ADAMTS-13C- 末端的肽序列（SEQ ID No.2）Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-A

sn-Ser-Val-Gln-Ser-Ser 作为免疫原所获得的肽抗体在还原条件下，对来自健康人和 TTP 患者的血浆进行检测，尽管对于一些来自 TTP 患者的血浆不很清楚，还是证实了推测为来源于 ADAMTS-13 的信号条带一般是大约 250kDa (图 11)。

[0156] 实施例 8

[0157] (利用已建立的抗体通过酶联免疫吸附测定对人血浆中 ADAMTS-13 的检测和确定 1)

[0158] 利用由所获得的多克隆抗体和单克隆抗体的组合 (MoAb-PoAb 系统) 构建的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 对各种样品中的本发明的酶进行定量 (图 12) (对于识别表位, 参见图 10)。测定过程的步骤如下所示:

[0159] 1. 使每种试剂温热至室温。

[0160] 2. 向固定有 WH10 MoAb 的平板加入 100 μ L/ 孔的样品, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时。

[0161] 3. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。

[0162] 4. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 稀释 PoAb1 或 PoAb2, 使其成为 1 μ g/ml, 并以 100 μ L/ 孔加入平板, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时。

[0163] 5. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。

[0164] 6. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 将抗-兔的 IgG-HRP 标记的共轭物稀释到 10000- 倍, 并以 100 μ L/ 孔加入平板, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时。

[0165] 7. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。

[0166] 8. 向平板加入 100 μ L/ 孔的 TMB 底物溶液 (在使用前于室温立即混合 2 种液体而制备) (阳性孔变为蓝色); 于室温下, 在大约 10 分钟内向平板加入 100 μ L/ 孔的反应终止液体 (0.5M 硫酸) (以便于当反应终止后, 所附作为标准的 100ng/ml 重组产物的颜色在 OD450nm 处可能最终大约为 1) (阳性孔变为黄色)。

[0167] 9. 用平板读出器在 450nm 和 650nm 处测定平板

[0168] 用于定量的标准物是通过用下述的抗体亲合纯化重组的 ADAMTS-13 而获得的。因此, 显示健康个体的血浆中 ADAMTS-13 的浓度随所使用的抗体而变化, 这表明该酶以多种分子形式存在于血浆中 (表 1)。由此认为, 作为理想的 ELISA 系统, 根据表 2 中所示的 PoAb-PoAb (生物素酰化的 PoAb- 链霉抗生物素 HRP 直接固定在 ELISA 平板上, 其中 PoAb 用蛋白质 G 等纯化) 构建利用一组识别各个结构域的抗体并使分解模式能够进行确切分析的系统或几乎不受这些影响的系统是优选的 (图 13)。在图 13 所示的系统中, 固定具有针对 N- 末端 (例如金属蛋白酶结构域) 的识别表位的多克隆抗体 (PoAb) 或单克隆抗体 (MoAb), 具有针对各个结构域的不同表位的 MoAbs 作为检测方面的第二抗体, 由此捕获 ADAMTS-13 的所有变体。备选地, 可固定具有这些多种表位的 MoAbs 或观察使用 PoAb 和 PoAb 等的夹层 ELISA。在这些系统中可能观察到病理状况和血浆中存在的分子形式之间的相关性。

[0169] 表 1

[0170]

	MoAb (WH10)-PoAb1	MoAb (WH10)-PoAb2
血浆 1	0.39 μ g/ml	1.2 μ g/ml

血浆 2	0.27 μ g/ml	1.1 μ g/ml
血浆 3	0.25 μ g/ml	0.9 μ g/ml
TTP 血浆	0 μ g/ml	0 μ g/ml

[0171] 表 2

[0172]

	PoAb1-PoAb1
血浆 4	1.0 μ g/ml
血浆 5	1.0 μ g/ml
血浆 6	0.9 μ g/ml
血浆 7	1.1 μ g/ml
血浆 8	0.9 μ g/ml
血浆 9	0.8 μ g/ml

[0173] 实施例 9

[0174] (利用已建立的抗体通过酶联免疫吸附测定对人血浆中 ADAMTS-13 的检测和确定 2)

[0175] 利用由所获得的单克隆抗体的组合 (MoAb-MoAb 系统) 构建的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 定量几个样品的人血浆中的该酶 (图 14)。测定过程的步骤如下所示:

[0176] 1. 使每种试剂温热至室温。

[0177] 2. 向固定有 WH10 MoAb 的平板加入 100 μ L/ 孔的样品, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时

[0178] 3. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。

[0179] 4. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 稀释生物素化的抗体, 使其成为 1 μ g/ml, 并以 100 μ L/ 孔加入平板, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时。

[0180] 5. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。

[0181] 6. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 将链霉抗生物素 -HRP 标记的共轭物稀释至 10000- 倍, 并以 100 μ L/ 孔加入平板, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时

[0182] 7. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。

[0183] 8. 向平板加入 100 μ L/ 孔的 TMB 底物溶液 (在使用前于室温立即混合 2 种液体而制备) (阳性孔变为蓝色); 于室温下, 在大约 10 分钟内向平板加入 100 μ L/ 孔的反应终止液体 (0.5M 硫酸) (以便于当反应终止后, 所附作为标准的 100ng/ml 重组产物的颜色在 OD450nm 处可能最终大约为 1) (阳性孔变为黄色)。

[0184] 9. 用平板读出器在 450nm 和 650nm 处测定平板

[0185] 与上述实施例 5 的结果比较, 这个组合的系统显示最低的定量值(表 3)。此外, 在这个组合中没有检测到从下述的收集的人血浆的 FI 糊状物纯化的该酶。由此可见构建多种系统的重要性, 其中考虑到定量值依赖于抗体组合而变化的事实, 改变抗体的组合(图 13)。

[0186] 表 3

[0187]

	MoAb(WH10)- PoAb1	MoAb(WH10)- PoAb2	MoAb(WH10)- MoAb(WH63-1)
血浆 1	0.39 μ g/ml	1.2 μ g/ml	0.13 μ g/ml
血浆 2	0.27 μ g/ml	1.1 μ g/ml	0.09 μ g/ml
血浆 3	0.25 μ g/ml	0.9 μ g/ml	0.09 μ g/ml
TTP 血浆	0 μ g/ml	0 μ g/ml	0 μ g/ml

[0188] 实施例 10

[0189] (重组 ADAMTS-13 的表达)

[0190] 利用人胚肾细胞系 293- 细胞, 通过下列方法(WO 02/088366)产生稳定表达 ADAMTS-13 的细胞系。正如所列出的, 按照下列步骤进行转染。首先, 以 $1-3 \times 10^5$ 个细胞/35mm 碟接种细胞, 次日, 将 2 μ g 的上述表达载体加入 10 μ l 的聚胺转染试剂 TransIT(TAKARA 的产品), 并加入 200 μ l 的无血清培养基, 例如 Opti-MEM, 根据试剂所附的用法说明制备 DNA 复合物, 滴加到上述制备的多种细胞上, 培养 6 小时, 然后更换培养基, 进一步培养 3 天后将培养基变换为加入 G418 的选择培养基, 再变换培养基进一步培养 3 天, 通过有限稀释方法和上述 MoAb(WH10)-PoAb1 的 ELISA 系统从所选择的克隆群建立表达克隆(克隆号 VWFCP-293-35 和 293-2-4)。

[0191] 实施例 11

[0192] (利用抗体从重组体的培养上清液纯化重组的 ADAMTS-13)

[0193] 利用 WH10 作为所获得抗体的实例来说明一个实施例。通过使该抗体结合至合适的固定载体来制备亲和柱, 并用于纯化酶。在亲和柱的制备中, 利用由 Chisso Corp. 制造的 NHS 活化的 Cellulofine, 根据所附的用法说明固定抗体。使用大约 1ml 的如此制备的溶胀载体, 在施加了利用实施例 9 中所示作为宿主的 293- 细胞而获得的重组酶的表达培养上清液后, 用 50mM Tris-HCl 0.1M NaCl pH7.5(下文中为 TBS)洗涤柱子, 并用 0.1M 甘氨酸 pH3 缓冲液洗脱。用 1M Tris-HCl pH8.5 中和洗脱的级分, 并用 TBS 透析。所得到的纯化酶的 SDS-PAGE 显示在图 15 中。也证实在所获得的纯化级分中存在 vWF 切割活性。并且从片段的 N- 末端氨基酸序列分析证实伴随该重组酶片段 vWF 的切割点是 842Tyr-843Met 的位置。

[0194] 然后测定衍生自纯化重组体的 ADAMTS-13 的部分氨基酸序列。SDS-PAGE 后, 通过常规方法有效地转移至 PVDF 膜, 通过由 PE Applied Biosystems Co. 制造的自动蛋白质测序仪 492 分析空气干燥的膜。从而显示含有作为部分 N- 末端序列的

Ala-Ala-Gly-Gly-Ile-。这个序列与从基因结构推测的成熟酶的 N- 末端序列一致。

[0195] 实施例 12

[0196] (利用抗体从来自收集的人血浆 FI 糊状物纯化 ADAMTS-13)

[0197] FI 糊状物的溶解

[0198] 将 FI 糊状物分为 12g 的小份, 并且储存为冷冻状态。在使用前一天将其置于 4°C 并溶解, 次日, 加入 120mL 的溶解缓冲液 (0.05% 叠氮化物、50mM Tris-HCl pH7.4、100mM NaCl), 使其为 10mg/mL, 并于 37°C 搅拌 2 小时。在 10000rpm 离心 10 分钟后, 收集上清液并按顺序经过预滤器、5.0- μ m 滤器和 0.8- μ m 滤器过滤以获得溶解的样品。

[0199] ADAMTS-13 的凝胶过滤色谱法

[0200] 使溶解的 FI 糊状物在 Sephacryl S-300HR 5 \times 90cm 柱 (Amersham-Pharmacia) 上进行第一次凝胶过滤。使用与溶解缓冲液相同的 0.05% 叠氮化物、50mM Tris-HCl pH7.4、100mM NaCl (以下为洗脱缓冲液), 流速为 5mL/min, 收集相应于推测分子量为 100k 至 300kDa 的级分, 滴加小部分的饱和硫酸铵溶液至终浓度相当于 33% 的饱和度。进一步使其在 4°C 静置过夜。次日, 在 10000rpm 离心 10 分钟, 收集沉淀的目标活性级分。进行 5 批的溶解、凝胶过滤和用硫酸铵沉淀的步骤, 在 -20°C 使产品贮藏为冷冻状态。

[0201] 将通过硫酸铵沉淀第一次凝胶过滤物而获得的 2 至 3 批沉淀物溶解在 50mL 的洗脱缓冲液中, 并以与第一次相同的方式通过 Sephacryl S-300HR 柱 (5 \times 90cm) 进行第二次凝胶过滤。洗脱溶液、条件和操作都与第一次的相同。这个操作进行两次。

[0202] 将通过硫酸铵沉淀第二次凝胶过滤物而获得的两批沉淀物溶解在 50mL 的洗脱缓冲液中, 并以与第一次和第二次相同的方式通过 Sephacryl S-300HR 柱 (5 \times 90cm) 进行第三次凝胶过滤。洗脱溶液、条件和操作都与第一次和第二次的相同。收集相应于推测分子量为 100k 至 300kDa 的级分。通过与上述重组 ADAMTS-13 纯化相同的步骤, 利用固定克隆号 WH10 单克隆抗体的柱子纯化这个收集的样品。从而纯化了图 16 所示的 SDS-PAGE 中具有 105kDa 至 160kDa 大小的几乎单一的 ADAMTS-13。分析其的 N- 末端氨基酸序列, 并且获得与重组体相同的结果。

[0203] 实施例 13

[0204] (通过抗体中和酶的活性)

[0205] 评估上述兔多克隆抗体对 vWF 切割酶活性的中和活性。将正常的兔血清、由利用连接至 KLH 的 C- 末端区域肽序列 (SEQ ID No.2) Phe-Ser-Pro-Ala-Pro-Gln-Pro-Arg-Arg-Leu-Leu-Pro-Gly-Pro-Gln-Glu-Asn-Ser-Val-Gln-Ser-Ser 作为抗原而获得的兔抗血清和通过由全长 ADAMTS-13 表达载体表达的蛋白质免疫来源的抗血清 (PoAb1) 各自按照体积稀释至 1 : 1 或 1 : 10 倍, 而与 1 至 10 μ g/ml (通过 Bradford 方法估计) 的重组 ADAMTS-13 以 1 比 1 的比率在 37°C 预先反应 1 小时, 对抗血清进行上述的 vWF 切割活性分析以评估其活性的抑制。

[0206] 结果是, 如图 17 所示制备对该酶具有抑制活性的抗体 (使用金属蛋白酶的抑制剂 EDTA 作为抑制的阳性对照)。此外, 从具有中和活性的多克隆抗体 (PoAb1) 表位分析的结果猜测 (图 4), 中和表位可能由 ADAMTS-13 域结构中的间隔结构域指向 N- 末端而存在。此外, 证实 PoAb2 和 PoAb3 也具有中和能力。由此推测金属蛋白酶结构域、

解聚素-样结构域等是具有中和能力的结构域。可如此产生中和抗体表明也可以构建具有针对 ADAMTS-13 的自身抗体的获得性 TTP 患者类似的模型。

[0207] 实施例 14

[0208] (检测人血浆中抗-ADAMTS-13 的抗体)

[0209] 使用实施例 6 中所显示的方法, 并且检测获得性 TTP 患者的血浆中抗-ADAMTS-13 的抗体。将 100 μ L 的抗-FLAG 抗体以 2 μ g/mL 固定到免疫模块的 96 孔平板上后, FLAG 标记的 ADAMTS-13 野生型开始发生反应。此后, 稀释 5、10、50 倍的 100 μ L 样品血浆在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 用含有 0.05% 的 Tween20 的 Tris- 缓冲液洗涤平板, 在与抗-人的 IgHRP 共轭物于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时后, 进行洗涤, 并通过 TMBZ 等进行显色。如图 18 中显示的结果所证实的, 与正常的血浆(正常)和先天性的 TTP 血浆(先天的)相比, 只有获得性的 TTP 患者(后天的)的血浆在 450nm 处显示显著的值, 并且具有抗-ADAMTS-13 的抗体。

[0210] 实施例 15

[0211] (产生抗-小鼠的 ADAMTS-13 多克隆抗体 (PoAb)) 以与人中相似的方式, 通过常规方法将导入编码小鼠所述酶的基因 (WO 02/088366) 的表达载体皮下地、皮内地或肌内地转染到兔中以产生多克隆抗体 (PoAb)。利用所得到的抗体, 从小鼠血浆免疫沉淀并检测所述的酶(图 19)。可认识到所述酶的分子大小根据小鼠的品系而变化。此外, 该多克隆抗体在平板上是固相的, 并且进一步的被生物素酰化以构建具有 PoAb 和 PoAb 的夹层 ELISA(表 4)。由此甚至可以在小鼠中分析测定所述酶的血液水平。

[0212] 表 4

[0213]

450nm-650nm 处的值	$\times 5$	$\times 10$	$\times 20$	$\times 40$	缓冲液(空白)
表达重组体的浓缩的上清液	0.809	0.554	0.341		0.087
Balb/c 血浆			0.257	0.180	
ICR 血浆			0.375	0.279	

[0214] 对于在本说明书中引用的所有出版物, 在本说明书中引入其全部内容。此外, 本领域的技术人员可以容易的理解对于本发明的各种改进和变化都可能是有效的, 而不背离所附的权利要求书中描述的本发明的技术理念和范围。旨在本发明也包括这种改进和变化。

[0215] 工业实用性

[0216] 本发明的抗体显示对 ADAMTS-13 的特异的免疫反应性。因此, 能够快速检测 ADAMTS-13 酶的数量、诊断与该酶的变化相关的疾病、有效的纯化 ADAMTS-13、或中和 ADAMTS-13 的酶活性。因此, 本发明的抗体也具有多种应用, 包括检测和纯化 ADAMTS-13。可以通过制备本发明抗体的方法容易地获得所需要量的如此有用的本发明的抗体。

[0217] 本发明显示出如此显著的作用和效果，并且可以被认为是对本领域产生巨大贡献的发明。此外，本发明的 ADAMTS-13 的部分缺失变体也可用于确定功能性重要的结构域等。此外，能够利用这些酶分子判断针对样品中存在的酶的抗体的存在或缺乏，并且提供对血小板减少症原因进行进一步详细研究的方法，由此可以避免无意中错误注射血小板的危险。

[0001]

序列表

<110>JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120>针对 von Willebrand 因子切割酶的抗体及利用所述抗体的分析方法

<130>PH-1893-PCT

<150> JP 2002/279924

<151> 2002-09-25

<150> JP 2002/377569

<151> 2002-12-26

<160>19

<210>1

<211>1427

<212>PRT

<213>人源

<400>1

```

Met His Gln Arg His Pro Arg Ala Arg Cys Pro Pro Leu Cys Val
1           5           10           15
Ala Gly Ile Leu Ala Cys Gly Phe Leu Leu Gly Cys Trp Gly Pro
           20           25           30
Ser His Phe Gln Gln Ser Cys Leu Gln Ala Leu Glu Pro Gln Ala
           35           40           45
Val Ser Ser Tyr Leu Ser Pro Gly Ala Pro Leu Lys Gly Arg Pro
           50           55           60
Pro Ser Pro Gly Phe Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gln Arg Arg Ala
           65           70           75
Ala Gly Gly Ile Leu His Leu Glu Leu Leu Val Ala Val Gly Pro
           80           85           90
Asp Val Phe Gln Ala His Gln Glu Asp Thr Glu Arg Tyr Val Leu
           95           100          105
Thr Asn Leu Asn Ile Gly Ala Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ser Leu
           110          115          120
Gly Ala Gln Phe Arg Val His Leu Val Lys Met Val Ile Leu Thr
           125          130          135
Glu Pro Glu Gly Ala Pro Asn Ile Thr Ala Asn Leu Thr Ser Ser
           140          145          150
Leu Leu Ser Val Cys Gly Trp Ser Gln Thr Ile Asn Pro Glu Asp
           155          160          165
Asp Thr Asp Pro Gly His Ala Asp Leu Val Leu Tyr Ile Thr Arg
           170          175          180
Phe Asp Leu Glu Leu Pro Asp Gly Asn Arg Gln Val Arg Gly Val

```

[0002]

	185	190	195
Thr Gln Leu Gly Gly Ala Cys Ser Pro Thr Trp Ser Cys Leu Ile			
	200	205	210
Thr Glu Asp Thr Gly Phe Asp Leu Gly Val Thr Ile Ala His Glu			
	215	220	225
Ile Gly His Ser Phe Gly Leu Glu His Asp Gly Ala Pro Gly Ser			
	230	235	240
Gly Cys Gly Pro Ser Gly His Val Met Ala Ser Asp Gly Ala Ala			
	245	250	255
Pro Arg Ala Gly Leu Ala Trp Ser Pro Cys Ser Arg Arg Gln Leu			
	260	265	270
Leu Ser Leu Leu Ser Ala Gly Arg Ala Arg Cys Val Trp Asp Pro			
	275	280	285
Pro Arg Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly His Pro Pro Asp Ala Gln			
	290	295	300
Pro Gly Leu Tyr Tyr Ser Ala Asn Glu Gln Cys Arg Val Ala Phe			
	305	310	315
Gly Pro Lys Ala Val Ala Cys Thr Phe Ala Arg Glu His Leu Asp			
	320	325	330
Met Cys Gln Ala Leu Ser Cys His Thr Asp Pro Leu Asp Gln Ser			
	335	340	345
Ser Cys Ser Arg Leu Leu Val Pro Leu Leu Asp Gly Thr Glu Cys			
	350	355	360
Gly Val Glu Lys Trp Cys Ser Lys Gly Arg Cys Arg Ser Leu Val			
	365	370	375
Glu Leu Thr Pro Ile Ala Ala Val His Gly Arg Trp Ser Ser Trp			
	380	385	390
Gly Pro Arg Ser Pro Cys Ser Arg Ser Cys Gly Gly Gly Val Val			
	395	400	405
Thr Arg Arg Arg Gln Cys Asn Asn Pro Arg Pro Ala Phe Gly Gly			
	410	415	420
Arg Ala Cys Val Gly Ala Asp Leu Gln Ala Glu Met Cys Asn Thr			
	425	430	435
Gln Ala Cys Glu Lys Thr Gln Leu Glu Phe Met Ser Gln Gln Cys			
	440	445	450
Ala Arg Thr Asp Gly Gln Pro Leu Arg Ser Ser Pro Gly Gly Ala			
	455	460	465
Ser Phe Tyr His Trp Gly Ala Ala Val Pro His Ser Gln Gly Asp			
	470	475	480
Ala Leu Cys Arg His Met Cys Arg Ala Ile Gly Glu Ser Phe Ile			
	485	490	495
Met Lys Arg Gly Asp Ser Phe Leu Asp Gly Thr Arg Cys Met Pro			
	500	505	510
Ser Gly Pro Arg Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Cys Val Ser Gly			

[0003]

	515	520	525
Ser Cys Arg Thr Phe Gly Cys Asp Gly Arg Met Asp Ser Gln Gln			
	530	535	540
Val Trp Asp Arg Cys Gln Val Cys Gly Gly Asp Asn Ser Thr Cys			
	545	550	555
Ser Pro Arg Lys Gly Ser Phe Thr Ala Gly Arg Ala Arg Glu Tyr			
	560	565	570
Val Thr Phe Leu Thr Val Thr Pro Asn Leu Thr Ser Val Tyr Ile			
	575	580	585
Ala Asn His Arg Pro Leu Phe Thr His Leu Ala Val Arg Ile Gly			
	590	595	600
Gly Arg Tyr Val Val Ala Gly Lys Met Ser Ile Ser Pro Asn Thr			
	605	610	615
Thr Tyr Pro Ser Leu Leu Glu Asp Gly Arg Val Glu Tyr Arg Val			
	620	625	630
Ala Leu Thr Glu Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile Arg Ile			
	635	640	645
Trp Gly Pro Leu Gln Glu Asp Ala Asp Ile Gln Val Tyr Arg Arg			
	650	655	660
Tyr Gly Glu Glu Tyr Gly Asn Leu Thr Arg Pro Asp Ile Thr Phe			
	665	670	675
Thr Tyr Phe Gln Pro Lys Pro Arg Gln Ala Trp Val Trp Ala Ala			
	680	685	690
Val Arg Gly Pro Cys Ser Val Ser Cys Gly Ala Gly Leu Arg Trp			
	695	700	705
Val Asn Tyr Ser Cys Leu Asp Gln Ala Arg Lys Glu Leu Val Glu			
	710	715	720
Thr Val Gln Cys Gln Gly Ser Gln Gln Pro Pro Ala Trp Pro Glu			
	725	730	735
Ala Cys Val Leu Glu Pro Cys Pro Pro Tyr Trp Ala Val Gly Asp			
	740	745	750
Phe Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly Gly Leu Arg Glu Arg			
	755	760	765
Pro Val Arg Cys Val Glu Ala Gln Gly Ser Leu Leu Lys Thr Leu			
	770	775	780
Pro Pro Ala Arg Cys Arg Ala Gly Ala Gln Gln Pro Ala Val Ala			
	785	790	795
Leu Glu Thr Cys Asn Pro Gln Pro Cys Pro Ala Arg Trp Glu Val			
	800	805	810
Ser Glu Pro Ser Ser Cys Thr Ser Ala Gly Gly Ala Gly Leu Ala			
	815	820	825
Leu Glu Asn Glu Thr Cys Val Pro Gly Ala Asp Gly Leu Glu Ala			
	830	835	840
Pro Val Thr Glu Gly Pro Gly Ser Val Asp Glu Lys Leu Pro Ala			

[0004]

	845	850	855
Pro Glu Pro Cys Val Gly Met Ser Cys Pro		Pro Gly Trp Gly His	
	860	865	870
Leu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu Lys Ala		Pro Ser Pro Trp Gly	
	875	880	885
Ser Ile Arg Thr Gly Ala Gln Ala Ala His		Val Trp Thr Pro Ala	
	890	895	900
Ala Gly Ser Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg		Gly Leu Met Glu Leu	
	905	910	915
Arg Phe Leu Cys Met Asp Ser Ala Leu Arg		Val Pro Val Gln Glu	
	920	925	930
Glu Leu Cys Gly Leu Ala Ser Lys Pro Gly		Ser Arg Arg Glu Val	
	935	940	945
Cys Gln Ala Val Pro Cys Pro Ala Arg Trp		Gln Tyr Lys Leu Ala	
	950	955	960
Ala Cys Ser Val Ser Cys Gly Arg Gly Val		Val Arg Arg Ile Leu	
	965	970	975
Tyr Cys Ala Arg Ala His Gly Glu Asp Asp		Gly Glu Glu Ile Leu	
	980	985	990
Leu Asp Thr Gln Cys Gln Gly Leu Pro Arg		Pro Glu Pro Gln Glu	
	995	1000	1005
Ala Cys Ser Leu Glu Pro Cys Pro Pro Arg		Trp Lys Val Met Ser	
	1010	1015	1020
Leu Gly Pro Cys Ser Ala Ser Cys Gly Leu		Gly Thr Ala Arg Arg	
	1025	1030	1035
Ser Val Ala Cys Val Gln Leu Asp Gln Gly		Gln Asp Val Glu Val	
	1040	1045	1050
Asp Glu Ala Ala Cys Ala Ala Leu Val Arg		Pro Glu Ala Ser Val	
	1055	1060	1065
Pro Cys Leu Ile Ala Asp Cys Thr Tyr Arg		Trp His Val Gly Thr	
	1070	1075	1080
Trp Met Glu Cys Ser Val Ser Cys Gly Asp		Gly Ile Gln Arg Arg	
	1085	1090	1095
Arg Asp Thr Cys Leu Gly Pro Gln Ala Gln		Ala Pro Val Pro Ala	
	1100	1105	1110
Asp Phe Cys Gln His Leu Pro Lys Pro Val		Thr Val Arg Gly Cys	
	1115	1120	1125
Trp Ala Gly Pro Cys Val Gly Gln Gly Thr		Pro Ser Leu Val Pro	
	1130	1135	1140
His Glu Glu Ala Ala Ala Pro Gly Arg Thr		Thr Ala Thr Pro Ala	
	1145	1150	1155
Gly Ala Ser Leu Glu Trp Ser Gln Ala Arg		Gly Leu Leu Phe Ser	
	1160	1165	1170
Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro		Gly Pro Gln Glu Asn	

[0005]

	1175	1180	1185
Ser Val Gln Ser Ser Ala Cys Gly Arg Gln His Leu Glu Pro Thr			
	1190	1195	1200
Gly Thr Ile Asp Met Arg Gly Pro Gly Gln Ala Asp Cys Ala Val			
	1205	1210	1215
Ala Ile Gly Arg Pro Leu Gly Glu Val Val Thr Leu Arg Val Leu			
	1220	1225	1230
Glu Ser Ser Leu Asn Cys Ser Ala Gly Asp Met Leu Leu Leu Trp			
	1235	1240	1245
Gly Arg Leu Thr Trp Arg Lys Met Cys Arg Lys Leu Leu Asp Met			
	1250	1255	1260
Thr Phe Ser Ser Lys Thr Asn Thr Leu Val Val Arg Gln Arg Cys			
	1265	1270	1275
Gly Arg Pro Gly Gly Gly Val Leu Leu Arg Tyr Gly Ser Gln Leu			
	1280	1285	1290
Ala Pro Glu Thr Phe Tyr Arg Glu Cys Asp Met Gln Leu Phe Gly			
	1295	1300	1305
Pro Trp Gly Glu Ile Val Ser Pro Ser Leu Ser Pro Ala Thr Ser			
	1310	1315	1320
Asn Ala Gly Gly Cys Arg Leu Phe Ile Asn Val Ala Pro His Ala			
	1325	1330	1335
Arg Ile Ala Ile His Ala Leu Ala Thr Asn Met Gly Ala Gly Thr			
	1340	1345	1350
Glu Gly Ala Asn Ala Ser Tyr Ile Leu Ile Arg Asp Thr His Ser			
	1355	1360	1365
Leu Arg Thr Thr Ala Phe His Gly Gln Gln Val Leu Tyr Trp Glu			
	1370	1375	1380
Ser Glu Ser Ser Gln Ala Glu Met Glu Phe Ser Glu Gly Phe Leu			
	1385	1390	1395
Lys Ala Gln Ala Ser Leu Arg Gly Gln Tyr Trp Thr Leu Gln Ser			
	1400	1405	1410
Trp Val Pro Glu Met Gln Asp Pro Gln Ser Trp Lys Gly Lys Glu			
	1415	1420	1425
Gly Thr			
1427			
<210>2			
<211>22			
<212>PRT			
<213>人源			
<400>2			
Phe Ser Pro Ala Pro Gln Pro Arg Arg Leu Leu Pro Gly Pro Gln			
1 5 10 15			
Glu Asn Ser Val Gln Ser Ser			

[0006]

20

<210>3
 <211>18
 <212>PRT
 <213>人源
 <400>3
 Asp Arg Leu Pro Arg Leu Glu Glu Ile Arg Ile Trp Gly Pro Leu
 1 5 10 15
 Gln Glu Asp

<210>4
 <211>30
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>4
 ctggagcaag acggcgcgcc eggcagcggc 30

<210>5
 <211>30
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>5
 atgtgcaaca ctcaggcctg cgagaagacc 30

<210>6
 <211>30
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>6
 ccaacctgac cagtgtctac attgccaacc 30

<210>7
 <211>21
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>7
 ctggagccct gccacactag g 21

<210>8
 <211>62
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>8

[0007]

tccgtcgact cttatacactt atcgtcateg tccctttagt cgtcccacac gcagecgcgc	60
cg	62
<210>9	
<211>62	
<212>DNA	
<213>人源	
<400>9	
tccgtcgact cttatacactt atcgtcateg tccctttagt cgcgcccacg cactgctgt	60
at	62
<210>10	
<211>62	
<212>DNA	
<213>人源	
<400>10	
gccgtcgact cttatacactt atcgtcateg tccctttagt cttgcgacat gaactccagc	60
tg	62
<210>11	
<211>62	
<212>DNA	
<213>人源	
<400>11	
gccgtcgact cttatacactt atcgtcateg tccctttagt ccagggtggg ggtaactgic	60
ag	62
<210>12	
<211>62	
<212>DNA	
<213>人源	
<400>12	
tccgtcgact cttatacactt atcgtcateg tccctttagt ccaccacaggc ctgccgtggc	60
tt	62
<210>13	
<211>62	
<212>DNA	
<213>人源	
<400>13	
tccgtcgact cttatacactt atcgtcateg tccctttagt cgtagggagg gcagggttcg	60
ag	62
<210>14	

[0008]

<211>62
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>14
 tccgtcgact cttatcactt atcgcatcg tcctttagt ccctggcagg gcagggetgg 60
 gg 62

<210>15
 <211>62
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>15
 gccgtcgact cttatcactt atcgcatcg tcctttagt ccacgtgtgc agcttgagcc 60
 cc 62

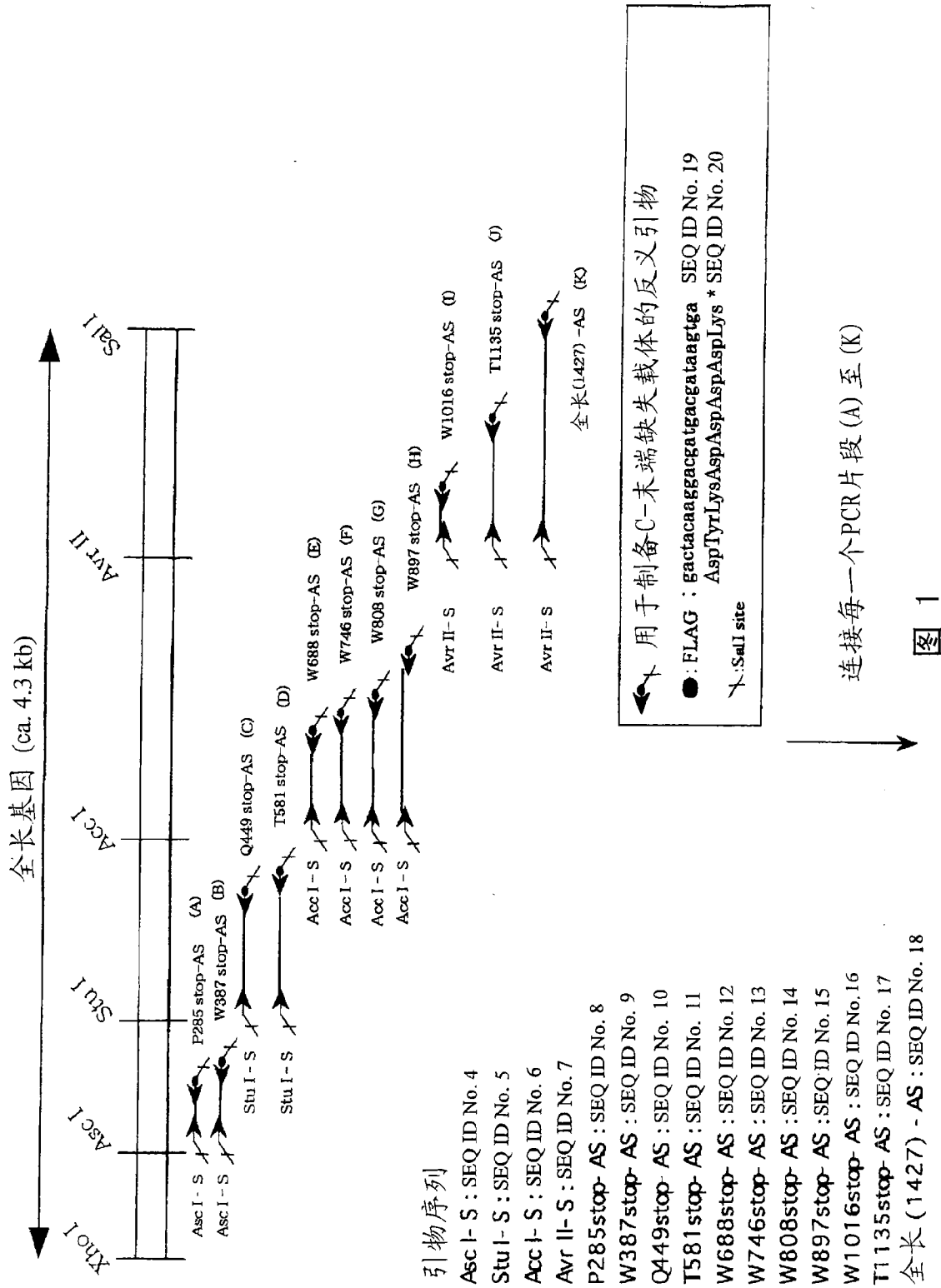
<210>16
 <211>62
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>16
 gccgtcgact cttatcactt atcgcatcg tcctttagt ccttaggtgg gcagggetcc 60
 ag 62

<210>17
 <211>62
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>17
 gccgtcgact cttatcactt atcgcatcg tcctttagt caccctgtcc cacacaggge 60
 cc 62

<210>18
 <211>60
 <212>DNA
 <213>人源
 <400>18
 tccaagcttg togactetta teacttateg teategtct tntagtegg tcttctttt 60

<210>19
 <211>27
 <212>DNA
 <213>人工序列
 <220>
 <223>人工序列的描述: 合成的 DNA

[0009]



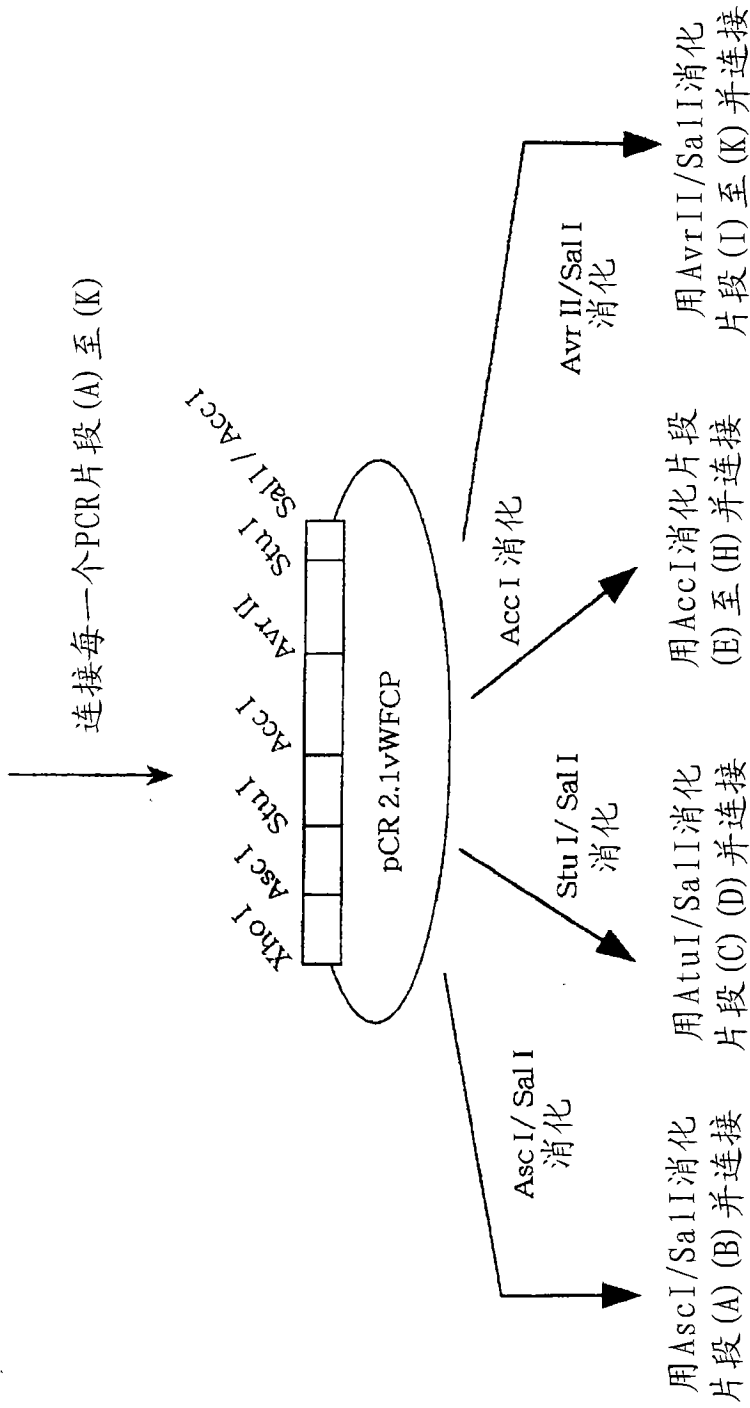


图 1 (续)

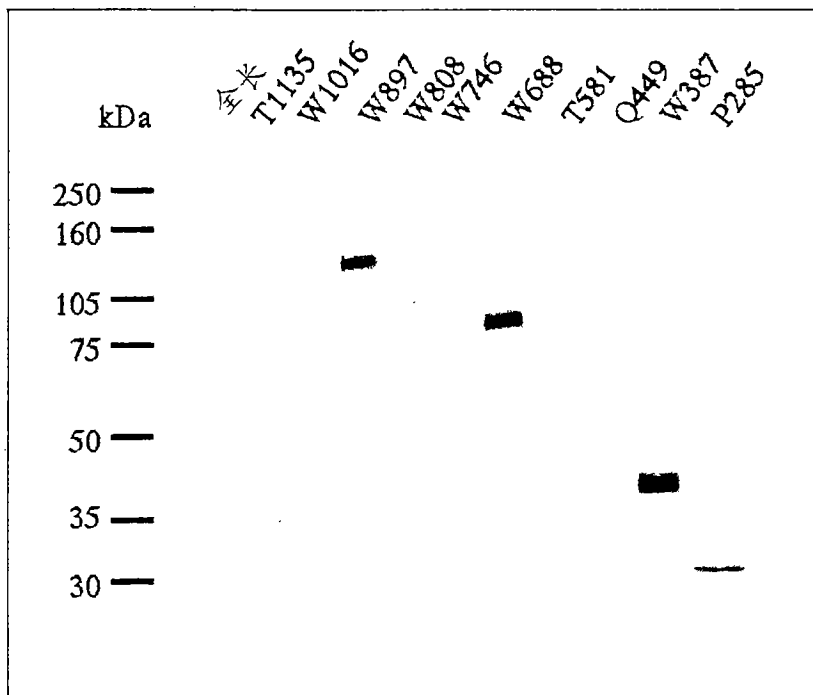


图 2

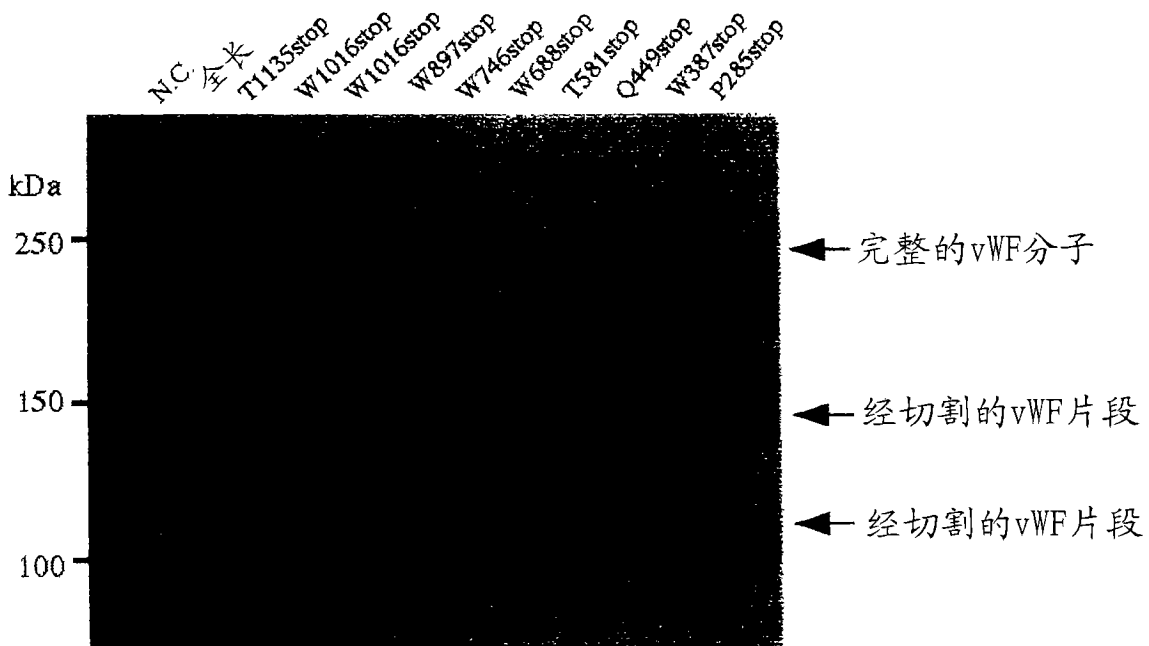


图 3

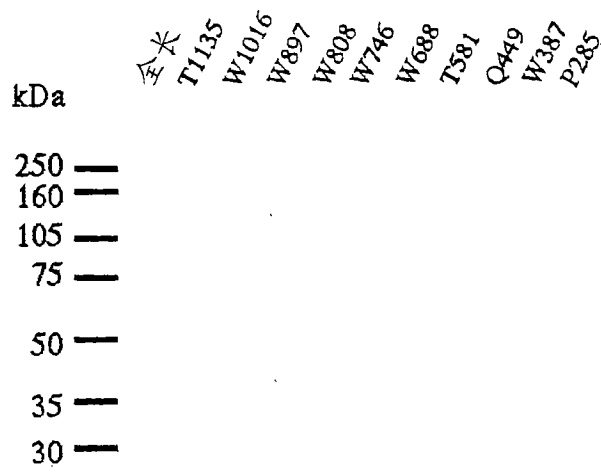


图 4

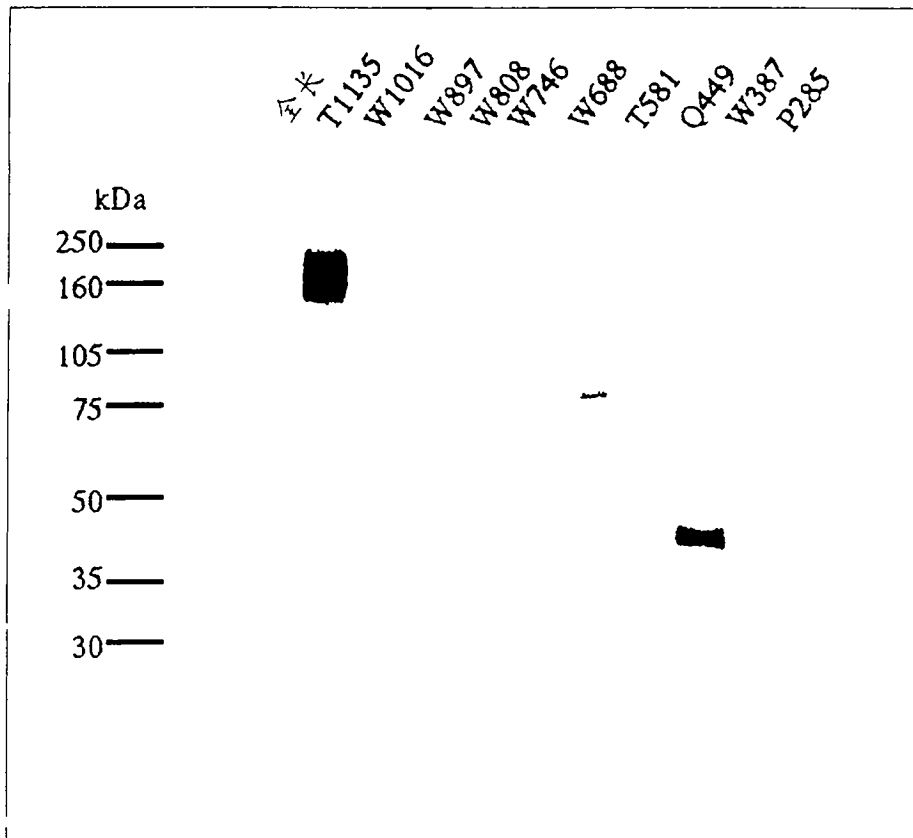


图 5

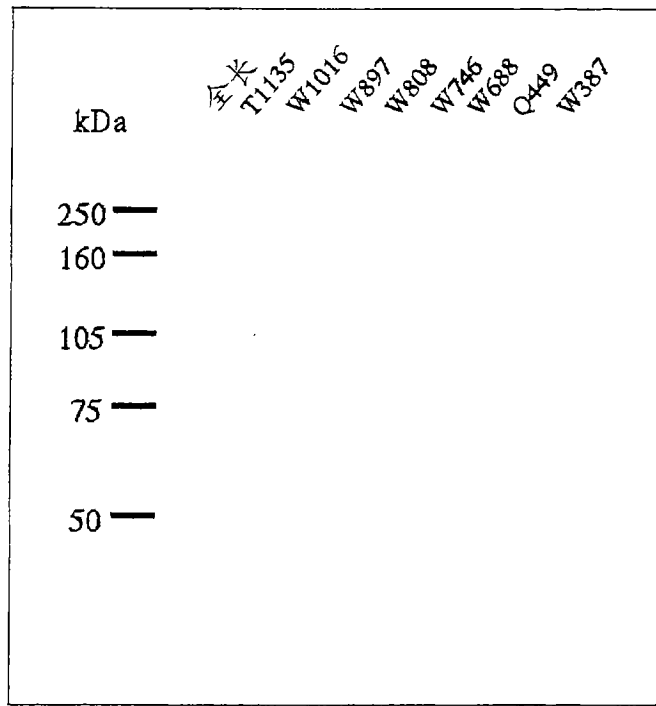


图 6

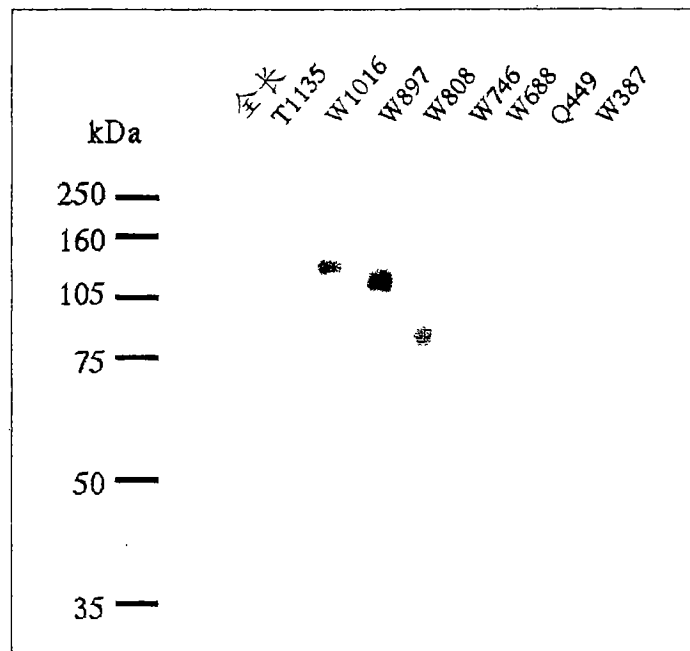


图 7

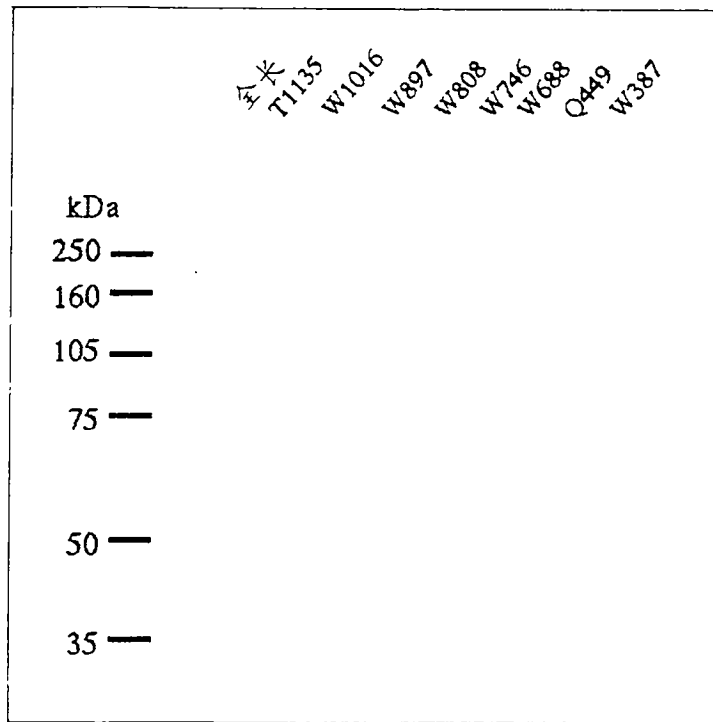


图 8

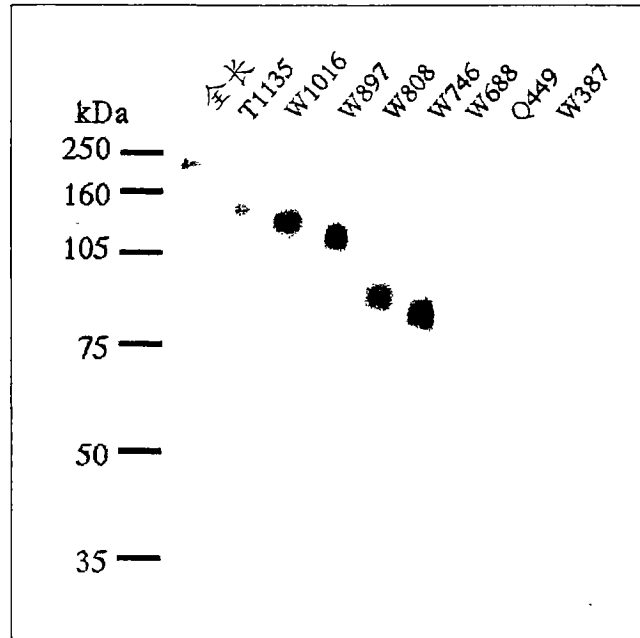


图 9

5. 来自 TTP 患者的血浆 1
6. 来自 TTP 患者的血浆 2
(MoAb-PoAb 系统)

 1. 使每种试剂温热至室温。
 2. 向固定有 WH10 MoAb 的平板加入 100 μ L/ 孔的样品，37℃，1 小时。
 3. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。
 4. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 稀释 PoAb1 或 PoAb2，使其成为 1 μ g/ml，并以 100 μ L/ 孔加入平板，37℃，1 小时。
 5. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。
 6. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 稀释抗 - 兔的 IgG-HRP 标记的共轭物 10000- 倍，并以 100 μ L/ 孔加入平板，37℃，1 小时。
 7. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。
 8. 向平板加入 100 μ L/ 孔的 TMB 底物溶液 (在使用前于室温立即混合 2 种液体而制备) (阳性孔变为蓝色) ; 于室温下，在大约 10 分钟内向平板加入 100 μ L/ 孔的反应终止液体 (0.5M 硫酸) (以便于当反应终止后，所附作为标准的 100ng/ml 重组产物的颜色在 OD450nm 处可能最终大约为 1) (阳性孔变为黄色) 。
 9. 向平板加入 100 μ L/ 孔的反应终止液 (0.5M 硫酸)
 10. 用平板读出器在 450nm 和 650nm 下进行测定。

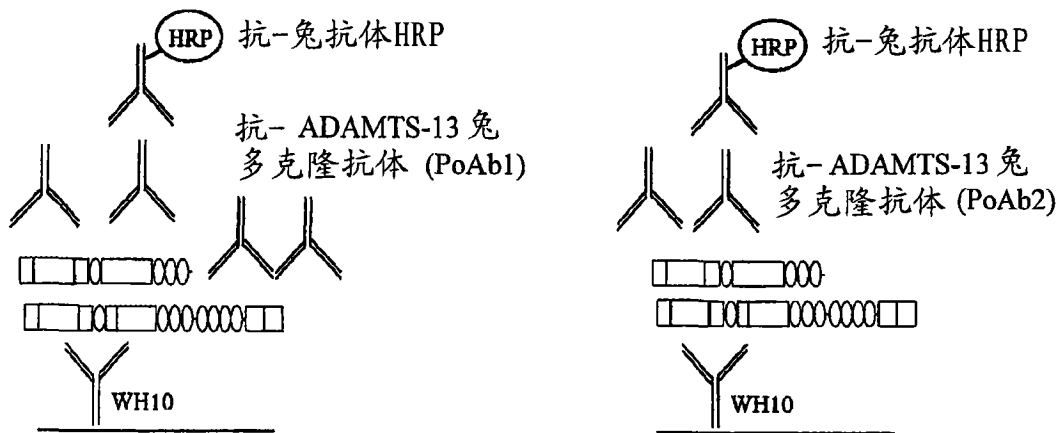


图 12

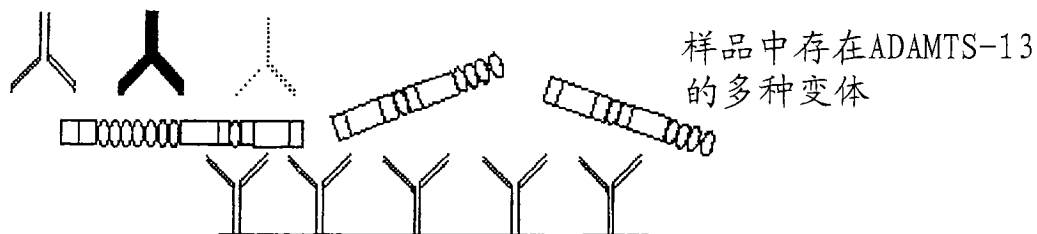


图 13

(MoAb-MoAb 系统)

1. 使每种试剂温热至室温。
2. 向固定有 WH10 MoAb 的平板加入 100 μ L/ 孔的样品，37 $^{\circ}$ C，1 小时。
3. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。
4. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 稀释生物素化的抗体，使其成为 1 μ g/ml，并以 100 μ L/ 孔加入平板，37 $^{\circ}$ C，1 小时。
5. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。
6. 用稀释溶液 (1% 的 BSA-TBS) 稀释链霉抗生物素 -HRP 标记的共轭物至 10000- 倍，并以 100 μ L/ 孔加入平板，37 $^{\circ}$ C，1 小时。
7. 用 0.05% 的 Tween-20-TBS 洗涤平板 3 次。
8. 向平板加入 100 μ L/ 孔的 TMB 底物溶液 (在使用前于室温立即混合 2 种液体而制备) (阳性孔变为蓝色) ; 于室温下，在大约 10 分钟内向平板加入 100 μ L/ 孔的反应终止液体 (0.5M 硫酸) (以便于当反应终止后，所附作为标准的 100ng/ml 重组产物的颜色在 OD450nm 处可能最终大约为 1) (阳性孔变为黄色) 。
9. 向平板加入 100 μ L/ 孔的反应终止液 (0.5M 硫酸)
10. 用平板读出器在 450nm 和 650nm 下进行测定。

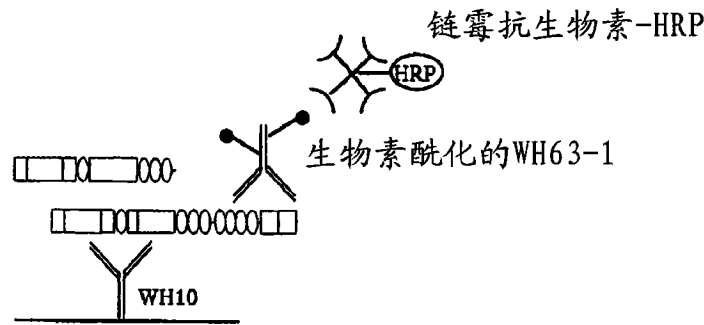


图 14

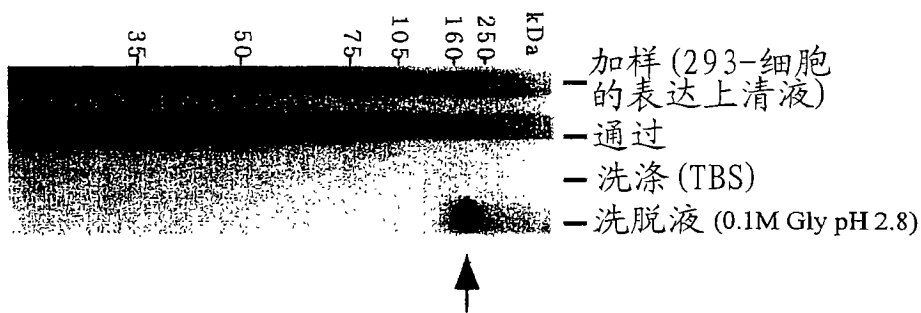


图 15

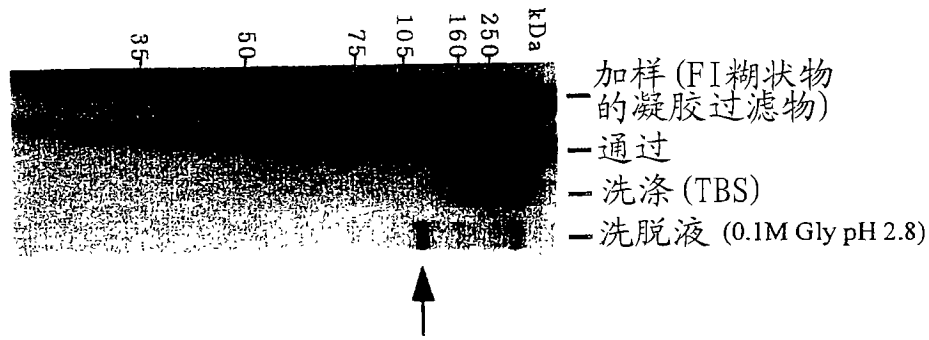


图 16

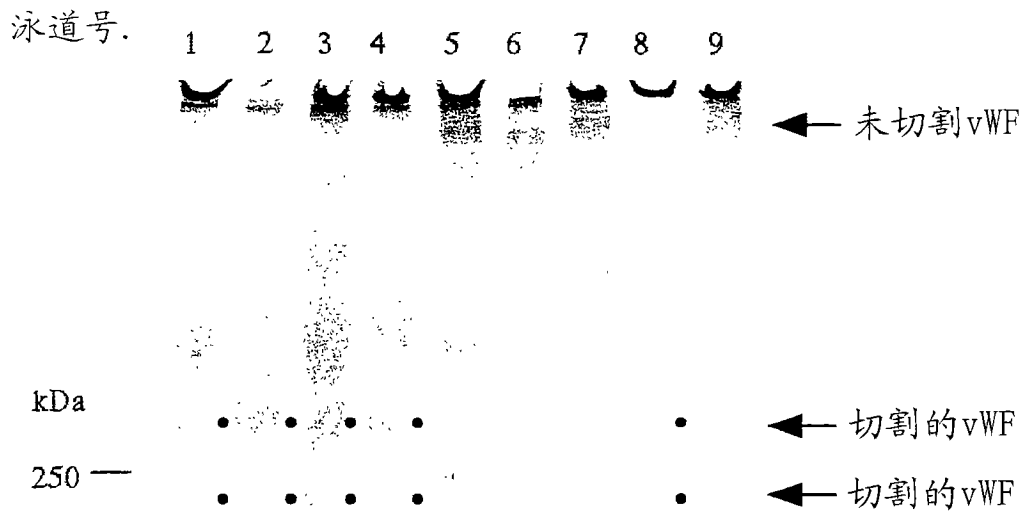


图 17

1. ADAMTS-13 溶液：正常兔血清 = 1 : 1
2. ADAMTS-13 溶液：正常兔血清（稀释 5 倍） = 1 : 1
3. ADAMTS-13 溶液：肽免疫的兔血清 = 1 : 1
4. ADAMTS-13 溶液：肽免疫的兔血清（稀释 5 倍） = 1 : 1
5. ADAMTS-13 溶液：重组蛋白免疫的兔血清 = 1 : 1
6. ADAMTS-13 溶液：重组蛋白免疫的兔血清（稀释 5 倍） = 1 : 1
7. ADAMTS-13 溶液：10mM EDTA = 1 : 1
8. ADAMTS-13 溶液：只有缓冲液 = 1 : 1
9. 缓冲液（无 ADAMTS-13）：缓冲液 = 1 : 1

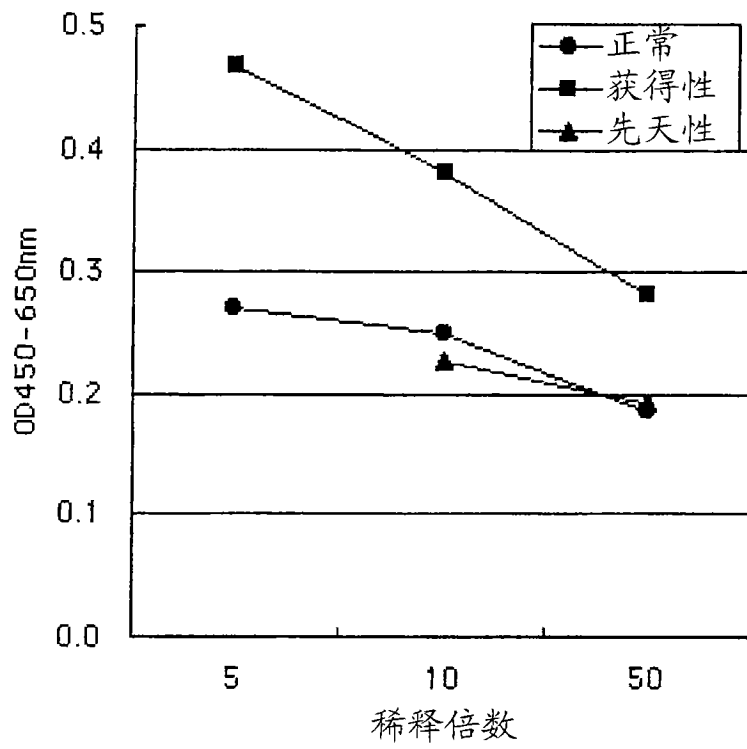


图 18

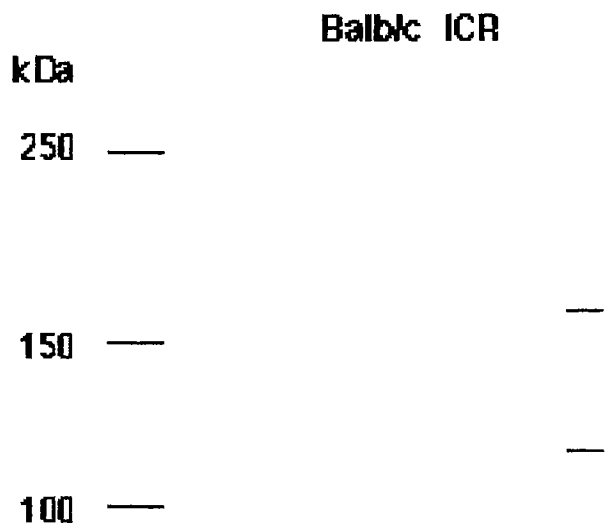


图 19

专利名称(译)	针对VON WILLEBRAND 因子切割酶的抗体及利用所述抗体的分析系统		
公开(公告)号	CN1701117B	公开(公告)日	2011-04-20
申请号	CN03825393.3	申请日	2003-09-25
申请(专利权)人(译)	财团法人化学及血清疗法研究所		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人化学及血清疗法研究所		
[标]发明人	副岛见事 三村法子 前田浩明 野崎周英 滨本高义 中垣智弘		
发明人	副岛见事 三村法子 前田浩明 野崎周英 滨本高义 中垣智弘		
IPC分类号	C12N15/02 C12N9/64 C12N5/10 C07K16/40 C12P21/08 A61K38/43 A61K39/395 A61P7/02 G01N33/532 G01N33/573 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/40 C12N9/6489		
代理人(译)	郭文洁 王景朝		
审查员(译)	罗霄		
优先权	2002377569 2002-12-26 JP 2002279924 2002-09-25 JP		
其他公开文献	CN1701117A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供对ADAMTS-13显示有选择的免疫反应性的抗体，以及该抗体在表位分析或ADAMTS-13自身抗体-阳性患者诊断中的应用。备选地，为了应用于药物产品，提供用于生产和使用部分缺失的修饰的ADAMTS-13分子的方法。特异于ADAMTS-13的抗体可从用包含部分或完整的ADAMTS-13氨基酸序列的多肽免疫和致敏的温血动物获得；用于生产抗体的方法包括用包含部分或完整的ADAMTS-13氨基酸序列的多肽免疫和致敏温血动物的步骤；上述抗体的用途包括检测和纯化ADAMTS-13的方法；以及提供部分缺失的修饰的ADAMTS-13分子。

序列表

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE
<120> 针对 von Willebrand 因子切割酶的抗体及利用所述抗体的分析方法
<130> PH-1893-PCT

<150> JP 2002/279924
<151> 2002-09-25

<150> JP 2002/377569
<151> 2002-12-26

<160> 19

<210> 1
<211> 1427
<212> PRT
<213> 人源
<400> 1

Met His Gln Arg His Pro Arg Ala Arg Cys Pro Pro Leu Cys Val
1 5 10 15
Ala Gly Ile Leu Ala Cys Gly Phe Leu Leu Gly Cys Trp Gly Pro
20 25 30
Ser His Phe Gln Gln Ser Cys Leu Gln Ala Leu Glu Pro Gln Ala
35 40 45
Val Ser Ser Tyr Leu Ser Pro Gly Ala Pro Leu Lys Gly Arg Pro
50 55 60
Pro Ser Pro Gly Phe Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gln Arg Arg Ala
65 70 75
Ala Gly Gly Ile Leu His Leu Glu Leu Leu Val Ala Val Gly Pro
80 85 90
Asp Val Phe Gln Ala His Gln Glu Asp Thr Glu Arg Tyr Val Leu
95 100 105
Thr Asn Leu Asn Ile Gly Ala Glu Leu Leu Arg Asp Pro Ser
110 115 120
Gly Ala Gln Phe Arg Val His Leu Val Lys Met Val Ile Leu Thr
125 130 135
Glu Pro Glu Gly Ala Pro Asn Ile Thr Ala Asn Leu Thr Ser
140 145 150
Leu Leu Ser Val Cys Gly Trp Ser Gln Thr Ile Asn Pro Glu Asp
155 160 165
Asp Thr Asp Pro Gly His Ala Asp Leu Val Leu Tyr Ile Thr Arg
170 175 180
Phe Asp Leu Glu Leu Pro Asp Gly Asn Arg Gln Val Arg Gly Val