

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680051249.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 2 月 4 日

[11] 公开号 CN 101360826A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 37/02 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[22] 申请日 2006.11.17

[21] 申请号 200680051249.9

[30] 优先权

[32] 2005.11.18 [33] US [31] 60/738,303

[86] 国际申请 PCT/CA2006/001876 2006.11.17

[87] 国际公布 WO2007/056858 英 2007.5.24

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.17

[71] 申请人 格兰马克药品股份有限公司

地址 瑞士拉绍德封

[72] 发明人 E·拉扎里德斯 C·伍兹

M·贝尔南

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

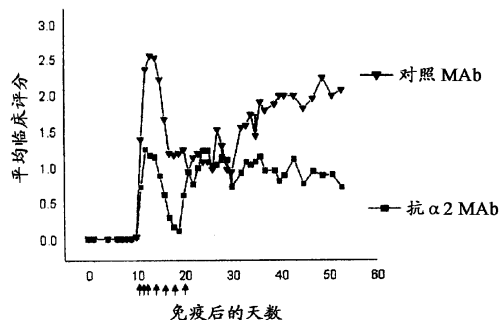
权利要求书 14 页 说明书 136 页 序列表 124 页
附图 2 页

[54] 发明名称

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体及它们的用途

[57] 摘要

本发明涉及抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和它们的用途。公开了与 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 结合和抑制 $\alpha 2 \beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白相互作用的人源化抗体。还公开了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 包括与 $\alpha 2$ 整联蛋白结合而不激活血小板的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 在治疗 $\alpha 2 \beta 1$ 介导的疾病中的治疗用途。



1、人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包含重链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列 (a)HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2), (b)HCDR1(GFSLTNYGIH, SEQ ID NO:1)、HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2) 和 HCDR3(ANDGVYYAMDY, SEQ ID NO:3), 或(c)SEQ ID NO:40。

2、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中重链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:185。

3、如权利要求 2 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中重链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:185，其中 (a) 位置 71 是赖氨酸，(b) 位置 73 是天冬酰胺，(c) 位置 78 是缬氨酸，或 (d) (a) - (c) 的任一种组合。

4、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中重链可变区包含选自 SEQ ID NO:70-79 和 SEQ ID NO:109-111 的氨基酸序列。

5、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其还包含含有氨基酸序列 WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:13)的 FW4 区。

6、如权利要求 5 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其包含氨基酸序列 HCDR1(SEQ ID NO:1)、HCDR2(SEQ ID NO:2)和 HCDR3(SEQ ID NO:3)。

7、如权利要求 1-6 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其还包含轻链。

8、人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包含轻链可变区，所述轻链可变区包含氨基酸序列 (a)LCDR1，选自 SANSSVNYIH(SEQ ID NO:4)或 SAQSSWNYIH(SEQ ID NO:112)，(b)LCDR2(DTSKLAS; SEQ ID NO:5)和(c)LCDR3(QQWTTNPLT, SEQ ID NO:6)。

9、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:186。

10、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:186，其中 (a) 位置 2 是苯丙氨酸，(b) 位置 45 是赖氨酸，(c) 位置 48 是酪氨酸，或 (d) (a) - (c) 的任何一种组合。

11、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:80-92 和 SEQ ID NO:108 的氨基酸序列。

12、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其还包含含有 SEQ ID NO:38 的氨基酸序列 FGQGTKVEIK 的 FW4 区。

13、如权利要求 12 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其包含氨基酸序列 LCDR1(SEQ ID NO:4)、LCDR2(SEQ ID NO:5)和 LCDR3(SEQ ID NO:6)。

14、如权利要求 8-13 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其还包含重链。

15、人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包含：

(i) 重链可变区，其包含氨基酸序列 (a)HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS，SEQ ID NO:2)，(b)HCDR1(GFSLTNYGIH，SEQ ID NO:1)、HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS，SEQ ID NO:2) 和 HCDR3(ANDGVYYAMDY，SEQ ID NO:3)，或(c)SEQ ID NO:40；和

(ii) 轻链可变区，其包含氨基酸序列 (a)LCDR1，选自 SANSSVNYIH(SEQ ID NO:4)或 SAQSSWNYIH(SEQ ID NO:112)，(b)LCDR2(DTSKLAS；SEQ ID NO:5)和(c)LCDR3(QQWTTNPLT，SEQ ID NO:6)。

16、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中 (a) 重链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:185，(b) 轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:186，或 (c) (a) 和 (b) 二者。

17、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中 (i) 重链

可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:185, 其中 (a) 位置 71 是赖氨酸, (b) 位置 73 是天冬酰胺, (c) 位置 78 是缬氨酸, 或 (d) (a) - (c) 的任何一种组合; (ii) 轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:186, 其中 (a) 位置 2 是苯丙氨酸, (b) 位置 45 是赖氨酸, (c) 位置 48 是酪氨酸, 或 (d) (a) - (c) 的任何一种组合; 或 (iii) (i) 和 (ii) 二者。

18、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中 (a) 重链可变区包含选自 SEQ ID NO:70-79 和 SEQ ID NO:109-111 的氨基酸序列; (b) 轻链可变区包含选自 SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:80-92 和 SEQ ID NO:108 的氨基酸序列; 或 (c) (a) 和 (b) 二者。

19、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体识别人 $\alpha 2$ 整联蛋白的结构域 I。

20、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体识别人 $\alpha 2$ 整联蛋白的结构域 I。

21、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体识别人 $\alpha 2$ 整联蛋白的结构域 I。

22、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。

23、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。

24、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。

25、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体结合 $\alpha 2$ 整联蛋白的表位, 所述表位包含:

(a) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 192 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 40 的赖氨酸残基;

(b) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 225 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 73 的天冬酰胺

残基;

(c) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 241 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 89 的谷氨酰胺残基;

(d) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 245 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 93 的酪氨酸残基;

(e) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 317 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 165 的精氨酸残基;

(f) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 318 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 166 的天冬酰胺残基; 或

(g) (a) 至 (f) 的任何一种组合。

26、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体结合 $\alpha 2$ 整联蛋白的表位, 所述表位包含:

(a) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 192 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 40 的赖氨酸残基;

(b) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 225 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 73 的天冬酰胺残基;

(c) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 241 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 89 的谷氨酰胺残基;

(d) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 245 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 93 的酪氨酸残基;

(e) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 317 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 165 的精氨酸残基;

(f) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 318 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 166 的天冬酰胺残基; 或

(g) (a) 至 (f) 的任何一种组合。

27、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中抗体结合 $\alpha 2$ 整联蛋白的表位, 所述表位包含:

(a) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 192 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 40 的赖氨酸残基;

(b) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 225 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 73 的天冬酰胺残基;

(c) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 241 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 89 的谷氨酰胺残基;

(d) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 245 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 93 的酪氨酸残基;

(e) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 317 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 165 的精氨酸残基;

(f) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 318 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 166 的天冬酰胺残基; 或

(g) (a) 至 (f) 的任何一种组合。

28、人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中抗体结合 $\alpha 2$ 整联蛋白的表位，所述表位包含：

(a) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 192 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 40 的赖氨酸残基；

(b) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 225 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 73 的天冬酰胺残基；

(c) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 241 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 89 的谷氨酰胺残基；

(d) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 245 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 93 的酪氨酸残基；

(e) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 317 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 165 的精氨酸残基；

(f) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 318 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 166 的天冬酰胺残基；或

(g) (a) 至 (f) 的任何一种组合。

29、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是全长抗体。

30、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是全长抗体。

31、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是全长抗体。

32、如权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是全

长抗体。

33、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是抗体片段。

34、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是抗体片段。

35、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是抗体片段。

36、如权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体是抗体片段。

37、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体结合至可检测标记物。

38、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体结合至可检测标记物。

39、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体结合至可检测标记物。

40、如权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体结合至可检测标记物。

41、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体固定在固相上。

42、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体固定在固相上。

43、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体固定在固相上。

44、如权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，所述抗体固定在固相上。

45、如权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中所述抗体抑制 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合至 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体。

46、如权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中所述抗体抑

制 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合至 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体。

47、如权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中所述抗体抑制 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合至 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体。

48、如权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中所述抗体抑制 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合至 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体。

49、如权利要求 45 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体选自：胶原蛋白、层粘连蛋白、艾柯病毒-1、饰胶蛋白聚糖、E-钙粘蛋白、基质金属蛋白酶 I (MMP-I)、endorepellin、胶原凝素和 C1q 补体蛋白。

50、如权利要求 46 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体选自：胶原蛋白、层粘连蛋白、艾柯病毒-1、饰胶蛋白聚糖、E-钙粘蛋白、基质金属蛋白酶 I (MMP-I)、endorepellin、胶原凝素和 C1q 补体蛋白。

51、如权利要求 47 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体选自：胶原蛋白、层粘连蛋白、艾柯病毒-1、饰胶蛋白聚糖、E-钙粘蛋白、基质金属蛋白酶 I (MMP-I)、endorepellin、胶原凝素和 C1q 补体蛋白。

52、如权利要求 48 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，其中 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体选自：胶原蛋白、层粘连蛋白、艾柯病毒-1、饰胶蛋白聚糖、E-钙粘蛋白、基质金属蛋白酶 I (MMP-I)、endorepellin、胶原凝素和 C1q 补体蛋白。

53、确定样品是否含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或二者的方法，所述方法包括将样品与权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体接触和确定抗体是否与样品结合，所述结合表明该样品含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白、或含有二者。

54、确定样品是否含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或二者的方法，所述方法包括将样品与权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体接触和确定抗体是否与样品结合，所述结合表明该样品含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$

整联蛋白、或含有二者。

55、确定样品是否含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或二者的方法，所述方法包括将样品与权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体接触和确定抗体是否与样品结合，所述结合表明该样品含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白、或含有二者。

56、确定样品是否含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或二者的方法，所述方法包括将样品与权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体接触和确定抗体是否与样品结合，所述结合表明该样品含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白、或含有二者。

57、一种试剂盒，包含权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和用此抗体检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的使用说明书。

58、一种试剂盒，包含权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和用此抗体检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的使用说明书。

59、一种试剂盒，包含权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和用此抗体检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的使用说明书。

60、一种试剂盒，包含权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和用此抗体检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的使用说明书。

61、编码权利要求 1 所述人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体的分离的核酸。

62、编码权利要求 8 所述人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体的分离的核酸。

63、包含权利要求 61 所述核酸的载体。

64、包含权利要求 62 所述核酸的载体。

65、宿主细胞，其包含：

- (a) 权利要求 61 所述的核酸；
- (b) 权利要求 62 所述的核酸；
- (c) 权利要求 63 所述的载体；
- (d) 权利要求 64 所述的载体；或
- (e) (a)到(d)的任何组合。

66、产生人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的方法，所述方法包括在允许所述

抗体表达的条件下培养权利要求 65 所述的宿主细胞。

67、如权利要求 66 所述的方法，其还包括从宿主细胞回收人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。

68、如权利要求 67 所述的方法，其中所述人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体是从宿主细胞培养基中回收的。

69、一种筛选方法，包括：

(a) 在存在与不存在受试抗体时，检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与包含 SEQ ID NO:19 所示 VL 区和 SEQ ID NO:21 所示 VH 区的抗体的结合；和

(b) 如果受试抗体的存在与 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白和包含 SEQ ID NO:19 所示 VL 区及 SEQ ID NO:21 所示 VH 区的抗体的结合降低相关，则选择所述受试抗体。

70、如权利要求 69 所述的方法，其中所述 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白被固定在固相支持物上。

71、一种筛选方法，包括：

(a) 在受试抗体存在下检测 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白的结合，其中受试抗体指结合 $\alpha 2$ 结构域 I 的抗体；

(b) 在 Mg^{++} 离子存在下检测受试抗体与 $\alpha 2$ 结构域 I 的结合；

(c) 在 Ca^{++} 离子存在下检测受试抗体与 $\alpha 2$ 结构域 I 的结合；

(d) 在无阳离子的培养基存在下检测受试抗体与 $\alpha 2$ 结构域 I 的结合；

和

(e) 如果受试抗体抑制 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白结合并在 Mg^{++} 离子和 Ca^{++} 离子及无阳离子的培养基存在下结合至 $\alpha 2$ 结构域 I，则选择所述受试抗体。

72、一种组合物，包含权利要求 1 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和可药用载体。

73、一种组合物，包含权利要求 8 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和可药用载体。

74、一种组合物，包含权利要求 15 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体

和可药用载体。

75、一种组合物，包含权利要求 28 所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和可药用载体。

76、治疗受试者 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的方法，所述方法包括施与受试者治疗有效量的权利要求 1-52 中任意一项所述的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或权利要求 72-75 中任意一项所述的组合物。

77、抑制白细胞与胶原蛋白结合的方法，包括施与受试者抑制白细胞与胶原蛋白结合有效量的权利要求 28 所述的抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体。

78、如权利要求 76 所述的方法，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自：炎症性疾病、自身免疫性疾病和以异常或增加的血管发生为特征的疾病。

79、如权利要求 76 所述的方法，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自：炎症肠病、节段性回肠炎、溃疡性结肠炎、移植反应、视神经炎、脊髓损伤、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、糖尿病、多发性硬化症、雷纳德综合征、实验性自身免疫脑脊髓炎、斯耶格伦综合征、硬皮病、幼年型糖尿病、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、心血管疾病、牛皮癣、癌症以及诱发炎症反应的感染。

80、如权利要求 76 所述的方法，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自：多发性硬化症、类风湿关节炎、视神经炎 和脊髓损伤。

81、如权利要求 76 所述的方法，其中所述方法不伴有（a）血小板活化，（b）血小板凝聚，（c）循环血小板数量减少，（d）出血并发症，或（e）（a）至（d）的任何一种组合。

82、如权利要求 76 所述的方法，其中所述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体包含含有 SEQ ID NO:174 或 SEQ ID NO:176 所示的重链和含有 SEQ ID NO:178 所示的轻链。

83、如权利要求 76 所述的方法，其中所述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体竞争性抑制包含 SEQ ID NO: 19 的 VL 区和 SEQ ID NO: 21 的 VH 区的抗体与人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或其结构域 I 结合。

84、如权利要求 80 所述的方法，其中多发性硬化症以复发为特征。

85、如权利要求 80 所述的方法，其中所述方法伴有与多发性硬化症相关的潮红或神经病学后遗症的缓解。

86、如权利要求 76 所述的方法，其中所述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体抑制 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白的结合，而且不是配体模拟物。

87、将分子、组合物或复合体靶向以存在 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体为特征的部位的方法，所述方法包括将所述分子、组合物或复合体附着或结合至权利要求 1 所述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。

88、将分子、组合物或复合体靶向以存在 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体为特征的部位的方法，所述方法包括将所述分子、组合物或复合体附着或结合至权利要求 8 所述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。

89、将分子、组合物或复合体靶向以存在 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体为特征的部位的方法，所述方法包括将所述分子、组合物或复合体附着或结合至权利要求 15 所述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。

90、将分子、组合物或复合体靶向以存在 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体为特征的部位的方法，所述方法包括将所述分子、组合物或复合体附着或结合至权利要求 28 所述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。

91、权利要求 1-52 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体作为药物的用途。

92、权利要求 1-52 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或权利要求 44 所述的组合物用于治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的用途。

93、权利要求 1-52 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在制备治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的药物中的用途。

94、如权利要求 91-93 中任意一项所述的用途，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自炎性疾病、自身免疫疾病和以不适当的血管发生为特征的疾病。

95、如权利要求 91-93 中任意一项所述的用途，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自炎性肠病、节段性回肠炎、溃疡性结肠炎、移植反应、视神经炎、脊髓损伤、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、糖尿病、

多发性硬化症、雷纳德综合征、实验性自身免疫脑脊髓炎、斯耶格伦综合征、硬皮病、幼年型糖尿病、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、心血管疾病、牛皮癣、癌症以及诱发炎症反应的感染。

96、如权利要求 91-93 中任意一项所述的用途，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自多发性硬化症、类风湿关节炎、视神经炎和脊髓损伤。

97、治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的组合物，所述组合物包含权利要求 1-52 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和可药用载体或稀释剂。

98、如权利要求 97 所述的组合物，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自炎症性疾病、自身免疫疾病和以不适当的血管发生为特征的疾病。

99、如权利要求 97 所述的组合物，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自炎症性肠病、节段性回肠炎、溃疡性结肠炎、移植反应、视神经炎、脊髓损伤、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、糖尿病、多发性硬化症、雷纳德综合征、实验性自身免疫脑脊髓炎、斯耶格伦综合征、硬皮病、幼年型糖尿病、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、心血管疾病、牛皮癣、癌症以及诱发炎症反应的感染。

100、如权利要求 97 所述的组合物，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自多发性硬化症、类风湿关节炎、视神经炎和脊髓损伤。

101、包装体，包含权利要求 1-52 中任意一项所述的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或权利要求 72-75 中任意一项所述的组合物，以及治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的使用说明书。

102、如权利要求 101 所述的包装体，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自炎症性疾病、自身免疫疾病和以不适当的血管发生为特征的疾病。

103、如权利要求 101 所述的包装体，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自炎症性肠病、节段性回肠炎、溃疡性结肠炎、移植反应、视神经炎、脊髓损伤、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮（SLE）、糖尿病、多发性硬化症、雷纳德综合征、实验性自身免疫脑脊髓炎、斯耶格伦综合征、硬皮病、幼年型糖尿病、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、心血管疾病、牛皮癣、癌症以及诱发炎症反应的感染。

104、如权利要求 101 所述的包装体，其中所述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自多发性硬化症、类风湿关节炎、视神经炎和脊髓损伤。

105、结合抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 $\alpha 2$ 整联蛋白表位，其中所述表位不包含 $\alpha 2$ 整联蛋白的配体结合位点。

106、如权利要求 105 所述的表位，其中与所述表位的结合不伴有 (a) 血小板活化，(b) 血小板凝聚，(c) 循环血小板数量减少，(d) 出血并发病，(e) $\alpha 2$ 整联蛋白活化，或 (f) (a) 至 (e) 的任何一种组合。

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体及它们的用途

相关专利申请的交互参考

本申请按照 35 U.S.C. §119(e)，要求 2005 年 11 月 18 日提交的美国临时申请序号 No.60/738,303 的权益，此专利申请的内容全部并入本文作为参考。

技术领域

本发明总体上涉及抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体及它们的用途，包括人源化的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和用抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体进行治疗的方法。

发明背景

$\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白（极晚期抗原 2；VLA-2）在多种类型细胞上表达，这些细胞包括血小板、血管内皮细胞、上皮细胞、活化的单核细胞/巨噬细胞、成纤维细胞、白细胞、淋巴细胞、活化的嗜中性白细胞和肥大细胞（Hemler, *Annu Rev Immunol* 8:365-400 (1999); Wu 和 Santore, *Dev. Dyn.* 206:169-171, 1994; Edelson 等, *Blood* 103(6):2214-20 (2004); Dikeson 等, *Cell Adhesion and Communication* 5:273-281 (1998)）。 $\alpha 2\beta 1$ 的最典型配体包括胶原蛋白和层粘连蛋白，二者见于胞外基质中。通常 $\alpha 2$ 整联蛋白的 I-结构域以二价阳离子依赖方式结合胶原蛋白，而同一结构域以二价阳离子依赖和不依赖方式结合层粘连蛋白（Dikeson 等, *Cell Adhesion and Communication* 5:273-281 (1998)）。 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的特异性随细胞类型而不同，起着特定类型细胞的胶原蛋白受体和 / 或层粘连蛋白受体的作用，例如， $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白称为血小板的胶原蛋白受体和内皮细胞的层粘连蛋白受体（Dikeson 等, *J Biol. Chem.* 272:7661-7668 (1997)）。艾柯病毒-1、

饰胶蛋白聚糖、E-钙粘着蛋白、基质金属蛋白酶 I (MMP-I)、endorepellin 和多种胶原凝素及 C1q 补体蛋白也是 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的配体 (Edelson 等, Blood 107(1): 143-50(2006))。已知 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白参与几种生物学和病理学过程, 包括胶原诱导的血小板凝聚、细胞向胶原移行、胶原纤维的细胞依赖性重组构以及导致细胞因子表达和增殖的胶原依赖性细胞应答反应 (Gendron, J. Biol. Chem. 278:48633-486431 (2003); Andreassen 等, J Immunol 171:2804-2811 (2003); Rao 等, J Immunol 165(9):4935-40 (2000)), T 细胞、肥大细胞和嗜中性白细胞的功能方面 (Chan 等, J. Immunol. 147:398-404 (1991); Dustin 和 de Fougères, Curr Opin immunol 13:286-290 (2001); Edelson 等, Blood 103(6):2214-20 (2004); Werr 等, Blood 95:1804-09 (2000))、迟发型过敏、接触性过敏和胶原诱导的关节炎方面 (de Fougères 等, J. Clin. Invest. 105:721-20 (2000); Kriegelstein 等, J. Clin. Invest. 110(12):1773-82 (2002))、乳腺导管形态发生 (Keely 等, J. Cell Sci. 108:595-607 (1995); Zutter 等, Am. J. Pathol. 155(3):927-940 (1995))、皮肤伤口愈合 (Pilcher 等, J. Biol. Chem. 272:181457-54 (1997)) 和与 VEGF-诱导的血管生成相关的过程 (Senger 等, Am. J. Pathol. 160(1):195-204 (2002))。

整联蛋白是由一个 α 亚基和一个 β 亚基组成的异源二聚体, 包括一个介导细胞粘附至胞外基质 (ECM) 及血浆蛋白的细胞表面蛋白大家族, 对于某些类型的细胞间相互作用具有关键作用。整联蛋白通过其胞外域与 ECM 组分相互作用 (Pozzi 和 Zent, Exp Nephrol 94: 77 - 84 (2003))。通过结合配体, 整联蛋白转导胞内信号给细胞骨架, 调节对细胞粘附作用起反应的细胞活性, 这称为外向内信号传递 (见例如 Hemler, Ann J. Rev Immunol 8: 365 - 400 (1999); Hynes, Cell 110 (6) : 673 - 87 (2002))。这种信号传递也可激活同一细胞上表达的其它整联蛋白亚型, 称为内向信号传递。内向信号传递也发生在通过胞浆中起源的调节信号, 如 α 与 β 亚基之间交合的破坏, 接下来传递给此受体的胞外配体结合域。整联蛋白在控制发育、器官形态发生、生理和病理以及正常组织的自身稳定和免

疫力及凝血反应的细胞粘附活动中可能起着重要作用,此外,它们也对细胞起着环境传感器的作用。这些蛋白的特征是在正常状态下为闭合构象,激活时则经历迅速的构象变化暴露出配体结合位点。X-射线晶体结构是近年来用于研究整联蛋白结构和作用机制的一种工具,了解整联蛋白的结构特征有助于更好了解其结合位点、分化状态及其活化和失活形式。通常所有整联蛋白的配体/反受体结合位点位于 α 结构域内,包括一个金属离子依赖的结合位点,称为MIDAS结构域(Dembo等, *J Biol Chem* 274:32108-111 (1998); Feuston等, *J Med Chem* 46:5316-5325 (2003); Gadek等, *Science* 295(5557):1086-9 (2002); Gurrath等, *Eur J Biochem* 210:911-21 (1992))。在结合胶原蛋白的整联蛋白(包括 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 10$ 和 $\alpha 11$ 整联蛋白)的 α 亚基中,MIDAS位点位于N-末端外插结构域内,称为I、A或I/A结构域,特点是它们分享有整联蛋白的白细胞 $\beta 2$ 家族的 α 亚基(Randi和Hogg, *J Biol Chem* 269:12395-8, 1994; Larson等, *J Cell Biol* 108(2):703-12, 1989; Lee等, *J Boil Chem* 269:12395-8 (1994); Emsley等, *J Biol Chem* 272:28512-28517 (1997))和Cell 100:47-56 (2000)。此结构域I在结构上与冯维勒布兰德(von Willebrandt)因子同源,具有被7个 α 螺旋围绕的6个 β 折叠链罗斯曼折叠拓扑构象(Colombatti和Bonaldo, *Blood* 77(11):2305-15 (1991); Larson等, *J Cell Biol* 108(2):703-712 (1989); Emsley等, *J Biol Chem* 272:28512-28517 (1997); Nolte等, *FEBS Letters* 452(3):379-385 (1999))。结合胶原蛋白的整联蛋白还有另一个 α 螺旋,称为 αC 螺旋(Emsley等, *J Biol Chem* 272:28512-28517 (1997)和Cell 100:47-56 (2000); Nolte等, *FEBS Letters* 452(3):379-385 (1999))。

在对炎性刺激的反应中,整联蛋白与配体的相互作用可促进白细胞外渗入炎症组织(Jackson等, *J Med Chem* 40:3359-3368 (1997); Gadek等, *Science* 295(5557):1086-9 (2002); Sircar等, *Bioorg Med Chem* 10:2051-2066 (2002)),以及在引起白细胞从血循环外渗入组织后的下游活动(包括促炎细胞在炎症部位的迁移、募集和活化)中起作用(Eble J.A., *Curr. Phar. Des.* 11(7):867-880 (2005))。据报导,某些能阻断 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋

白的抗体显示对迟发性过敏反应有影响,在鼠类风湿关节炎模型和炎症肠病模型中有效(Kriegelstein等, *J. Clin. Invest.* 110(12):1773-82 (2002); de Fougerolles等, *J. Clin. Invest.* 105:721-720 (2000)); 还据报导,这些抗体体外能减弱内皮细胞的增殖和迁移(Senger等, *Am. J. Pathol.* 160(1):195-204 (2002)),提示阻断 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白可预防/抑制各种癌症中所见的异常或高于正常的血管发生。

血小板通常以无活性的静息状态在血液中循环,然而在损伤部位它们可迅速对多种激动剂反应。受刺激后血小板经历了形态变化,变得与血浆蛋白如血纤蛋白原和冯维勒布兰德因子(vWf)、其它血小板和血管壁内皮层有高度反应性。这些相互作用协同促进了止血性血纤蛋白血小板塞的形成(Cramer, 2002, *Hemostasis and Thrombosis* 一书第4版)。结合配体时,血小板受体转导外向内信号通路,进而触发内向外信号传递,导致次级受体如血小板血纤蛋白原受体、 $\alpha IIb\beta 3$ 整联蛋白活化,引起血小板凝聚。与血小板受体结合或相互作用的抗体或肽配体模拟物预期诱导类似的信号传递级联反应导致血小板激活。血小板即使微量激活即可导致血小板凝聚反应、血小板减少症和出血并发症。

$\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白是在血小板上表达的唯一结合胶原蛋白的整联蛋白,在参与血小板粘附胶原蛋白和自身稳定中起着某些作用(Gruner等, *Blood* 102:4021-4027 (2003); Nieswandt和Watson, *Blood* 102(2):449-461 (2003); Santoro等, *Thromb. Haemost.* 74:813-821 (1995); Siljander等, *Blood* 15:1333-1341 (2004); Vanhoorelbeke等, *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 3(2):125-40 (2003))。此外,血小板 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白在调节血小板凝块的大小中也可能起作用(Siljander等, *Blood* 103(4):1333-1341 (2004))。

$\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白也被证明可作为结合层粘连蛋白的整联蛋白在内皮细胞上表达(Languino等, *J Cell Bio.* 109:2455-2462 (1989))。有人认为内皮细胞通过整联蛋白介导的机制附着于层粘连蛋白,然而有人提出 $\alpha 2$ 结构域I的功能可能是参与介导内皮细胞相互作用的配体特异性序列(Bahou等,

Blood 84(11):3734-3741 (1994))。

推测结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白（包括血小板上的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白）的治疗性抗体可能导致出血并发症。例如，靶向其它血小板受体如 GPIb 的抗体（Vanhoorelbeke 等, *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 3(2):125-40 (2003))或 GPIIb/IIIa(Schell 等, *Ann. Hematol.* 81:76-79 (2002); Nieswandt 和 Watson, *Blood* 102(2):449-461 (2003); Merlini 等, *Circulation* 109:2203-2206 (2004))已被证明与血小板减少症相关，虽然其机制不大了解。有人假定抗体与血小板受体的结合可改变其三维结构，暴露出通常不暴露的表位，导致血小板清除（Merlini 等, *Circulation* 109:2203-2206 (2004)）。的确，与口服 GP IIa/IIIb 拮抗剂有关的出血并发症被描述为此类化合物的“阴暗面(dark side)”（Bhatt 和 Topol, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2(1):15-28 (2003)）。如果 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白在白细胞迁移进入炎症组织中起着重要作用，则需要开发能针对包括癌症、炎症疾病和自身免疫性疾病在内的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病和 / 或与此类疾病相关的细胞过程的治疗剂，如果这类治疗剂不会激活血小板的话。因此本领域需要开发能靶向 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白（如白细胞上的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白）但不会引起不利的出血并发症的化合物。

抗人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的封闭抗体 BHA2.1 由 Hangan 等人, (*Cancer Res.* 56:3142-3149(1996))最先报导。已知还有其它抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体且已在体外应用，如市售抗体 AK7 (Mazurov 等, *Thromb. Haemost.* 66(4):494-9 (1991))、P1E6(Wayner 等, *J. Cell Biol.* 107(5):1881-91 (1988))、10G11(Giltay 等, *Blood* 73(5):1235-41 (1989)、和 A2-IIIE10(Bergelson 等, *Cell Adhes. Commun.* 2(5):455-64 (1994)。Hangan 等人 (*Cancer Res.* 56:3142-3149(1996))用 BHA2.1 抗体研究了体内阻断 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白对肿瘤细胞渗入肝脏的影响，以及在抗体治疗下这些肿瘤细胞发展成转移病灶的能力。已采用大鼠和小鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白特异性的 Ha1/29 抗体（Mendrick 和 Kelly, *Lab Invest.* 69(6):690-702 (1993)）体内研究 T 细胞被 LCMV 病毒活化后 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的上调(Andreasen 等, *J. Immunol.*

171:2804-2811 (2003)), 研究 SRBC-诱导的迟发型过敏反应和 FITC-诱导的接触性过敏反应及胶原蛋白诱导的关节炎 (de Fougerolles 等, J. Clin. Invest. 105:721-720 (2000)), 研究 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白在 VEGF 调节的血管发生中的作用 (Senger 等, Am. J. Pathol. 160(1):195-204 (2002)); Senger 等, PNAS 94(25):13612-7 (1997)) 和研究在对血小板活化因子 (PAF) 的反应中 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白对 PMN 运动的作用 (Werr 等, Blood 95:1804-1809 (2000)) 。

采用鼠单克隆抗体 (如以上所述的抗体) 作为非免疫力低下患者的治疗药物, 因可产生对所施与鼠抗体的强免疫应答反应 (特别是重复施与时) 而受到限制。此种反应不仅能缩短循环血中鼠抗体的半寿期也可导致注射部位的严重和/或过敏反应 (Shawler 等, J. Immunol. 135(2):1530 (1985))。此外, 当施与人类时, 啮齿动物抗体的与恒定区 (Fc) 相关的效应子功能比人抗体的效力低得多, 从而导致可能需要的补体激活和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 丧失。

因此, 需要开发针对 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的抗体, 包括治疗包括炎症疾病和自身免疫疾病的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病、其机制和细胞过程的抗体。而且, 需要开发不会在患者中产生相关的抗鼠抗体应答反应的抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体。

附图简述

图 1: 在小鼠 EAE 模型上, 抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在疾病最初出现症状时施用对瘫痪疾病的作用研究结果示意图 (见实施例 7)。

图 2: 抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在疾病诱导期施用对瘫痪疾病的作用研究结果示意图 (见实施例 7)。

发明概述

本发明提供抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和它们的使用方法, 特别是人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和它们的使用方法。

在某些实施方案中,所述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体包括一个或多个抗体的恒定区(如 C_L 和/或 C_H 区)和含有 SEQ ID NO: 19 氨基酸序列的轻链可变区,和/或含有 SEQ ID NO: 21 氨基酸序列的重链可变区,或它们的氨基酸序列变体。本发明考虑了多种形式的抗体。例如,抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体可以是全长抗体(如含有人免疫球蛋白的恒定区)或抗体片段(如 Fab 或 $F(ab')_2$ 或 Fab' 或 Fv 或 scFv 片段)。而且,此抗体可用可检测标记物标记、固定在固相上、和/或与异源化合物(如细胞毒性剂)缀合。

考虑了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的诊断和治疗用途以及预防用途。对于诊断用途,提供了检测 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白存在的方法,包括使怀疑含有 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的样品接触抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和测定抗体与样品的结合。对于此种用途,提供了包含抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和使用该抗体检测 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的说明书的试剂盒。治疗用途包括但不限于治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病、其机制和细胞过程,所述疾病包括炎症疾病和自身免疫疾病,特别是多发性硬化症。

考虑了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的基因治疗应用。可将编码抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体重链和轻链基因序列的各种载体转移给细胞(如成纤维细胞、干细胞)以产生分泌抗 $\alpha 2\beta 1$ Mab 的细胞群。这些细胞可具有向不同类型细胞、组织和/或器官的特异性“归巢”性能。进而可将这些抗体产生细胞引入患者体内以定位递送此抗 $\alpha 2\beta 1$ MAb。例如,可将用抗 $\alpha 2\beta 1$ MAb 的载体修饰的间充质干细胞注射入多发性硬化症患者的脑中。此干细胞可分化成为神经细胞和分泌抗 $\alpha 2\beta 1$ MAb 以治疗多发性硬化症相关的炎症。此外,可将抗 $\alpha 2\beta 1$ MAb 基因与病毒编码的治疗基因(如蓖麻毒蛋白)缀合。这种修饰的病毒能特异性结合细胞表面表达的 $\alpha 2\beta 1$, 而提高转基因转移效率。而且,由抗 $\alpha 2\beta 1$ 抗体-脂质体复合物组成的免疫缀合物包裹有编码治疗基因的核酸,可将其经静脉内引入患者体内。此种抗 $\alpha 2\beta 1$ -免疫缀合物将结合表达 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的细胞并促进该治疗基因的有效摄入。

也提供编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的分离的核酸; 含有此核酸的载体(Vector), 所述核酸任选地有效连接至用此载体转化的宿主可识别的调

控序列；含有该载体的宿主细胞；产生抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的方法，包括培养所述宿主细胞以表达所述核酸，及任选地从宿主细胞培养物（如宿主细胞培养基）中回收该抗体。

也提供包含人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和药学上可接受的载体（Carrier）或稀释剂的组合物。治疗用的组合物可以是灭菌的和可以是冻干的。还提供治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的方法，包括施与哺乳动物对象药学有效量的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，如人源化的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。对于这种治疗用途，可在抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体之前、之后或同时共同施与哺乳动物其它药剂（如另一种 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白拮抗剂）。

还提供一种人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包含重链可变区，其包含氨基酸序列(a) HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2), (b) HCDR1(GFSLTNYGIH, SEQ ID NO:1)、HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2) 和 HCDR3(ANDGVYYAMDY, SEQ ID NO:3), 或(c) SEQ ID NO:40。

在一实施方案中，上述重链可变区含氨基酸序列 SEQ ID NO: 185。

在另一实施方案中，上述重链可变区含氨基酸序列 SEQ ID NO: 185，其中（a）位置 71 是赖氨酸，（b）位置 73 是天冬酰胺，（c）位置 78 是缬氨酸，或（d）是（a）-（c）的任何一种组合。

在另一实施方案中，上述重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 70 - 79 和 SEQ ID NO: 109 - 111 的氨基酸序列。

在一实施方案中，上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体还包含含有氨基酸序列 WGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 13）的 FW4 区。

在一实施方案中，上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体包含氨基酸序列 HCDR1（SEQ ID NO: 1）、HCDR2（SEQ ID NO: 2）和 HCDR3（SEQ ID NO: 3）。

在一实施方案中，上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体还包含轻链。

本发明还提供一种人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包含轻链可变区，其包含氨基酸序列(a) LCDR1，选自 SANSSVNYIH(SEQ ID NO:4)或

SAQSSWNYIH(SEQ ID NO:112), (b) LCDR2(DTSKLAS; SEQ ID NO:5) 和(c) LCDR3(QQWTTNPLT, SEQ ID NO:6)。

在一实施方案中,上述轻链可变区含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 186。

在一实施方案中,上述轻链可变区含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 186, 其中(a)位置2是苯丙氨酸,(b)位置45是赖氨酸,(c)位置48是酪氨酸,或(d)是(a)-(c)的任何一种组合。

在一实施方案中,上述轻链可变区含有选自 SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 80-92 和 SEQ ID NO: 108 的氨基酸序列。

在一实施方案中,上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体还包含含有氨基酸序列 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38) 的 FW4 区。

在一实施方案中,上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体含有氨基酸序列 LCDR1 (SEQ ID NO: 4)、LCDR2 (SEQ ID NO: 5) 和 LCDR3 (SEQ ID NO: 6)。

在一实施方案中,上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体还含有重链。

本发明还提供人源化的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体,其包含

(i) 重链可变区,其包含氨基酸序列 (a) HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2), (b) HCDR1 (GFSLTNYGIH, SEQ ID NO:1)、HCDR2(VIWARGFTNYNSALMS, SEQ ID NO:2) 和 HCDR3(ANDGVYYAMDY, SEQ ID NO:3), 或(c) SEQ ID NO:40; 和

(ii) 轻链可变区,其包含氨基酸序列 (a) LCDR1, 选自 SANSSVNYIH(SEQ ID NO:4) 或 SAQSSWNYIH(SEQ ID NO:112), (b) LCDR2(DTSKLAS; SEQ ID NO:5) 和(c) LCDR3(QQWTTNPLT, SEQ ID NO:6)。

还提供上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体,其中(a)重链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:185, (b)轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:186, 或(c) (a) 和 (b) 二者。

还提供上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体,其中(i)重链可变区包含氨

基酸序列 SEQ ID NO:185, 其中 (a) 位置 71 是赖氨酸, (b) 位置 73 是天冬酰胺, (c) 位置 78 是缬氨酸, 或 (d) 是 (a) - (c) 的任何一种组合; (ii) 轻链可变区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:186, 其中 (a) 位置 2 是苯丙氨酸, (b) 位置 45 是赖氨酸, (c) 位置 48 是酪氨酸, 或 (d) 是 (a) - (c) 的任何一种组合; 或 (iii) (i) 和 (ii) 二者。

还提供上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中 (a) 重链可变区包含选自 SEQ ID NO: 70-79 和 SEQ ID NO: 109-111 的氨基酸序列; (b) 轻链可变区包含选自 SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 80 - 92 和 SEQ ID NO: 108 的氨基酸序列; 或 (c) (a) 和 (b) 二者。

在一实施方案中, 上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体识别人 $\alpha 2$ 整联蛋白的结构域 I。

在一实施方案中, 上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。

在一实施方案中, 上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体结合 $\alpha 2$ 整联蛋白的表位, 该表位包含:

(a) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 192 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 40 的赖氨酸残基;

(b) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 225 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 73 的天冬酰胺残基;

(c) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 241 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 89 的谷氨酰胺残基;

(d) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 245 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 93 的酪氨酸残基;

(e) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 317 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 165 的精氨酸

残基;

(f) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 318 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 166 的天冬酰胺残基; 或

(g) (a) 至 (f) 的任何一种组合。

还提供一种抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 其中该抗体结合 $\alpha 2$ 整联蛋白的表位, 该表位包含:

(a) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 192 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 40 的赖氨酸残基;

(b) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 225 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 73 的天冬酰胺残基;

(c) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 241 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 89 的谷氨酰胺残基;

(d) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 245 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 93 的酪氨酸残基;

(e) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 317 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 165 的精氨酸残基;

(f) 对应于 SEQ ID NO: 8 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白氨基酸序列位置 318 或 SEQ ID NO: 11 所示 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 氨基酸序列位置 166 的天冬酰胺残基; 或

(g) (a) 至 (f) 的任何一种组合。

在一实施方案中, 上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体是全长抗体。

在一实施方案中, 上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体是抗体片段。

在一实施方案中，上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体连接有可检测标记物。

在一实施方案中，上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体被固定在固相上。

在一实施方案中，上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体抑制 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合至 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体。

在一实施方案中，上述 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体选自：胶原蛋白、层粘连蛋白、艾柯病毒-1、饰胶蛋白聚糖、E-钙粘蛋白、基质金属蛋白酶 1(MMP-1)、endorepellin、胶原凝素和 C1q 补体蛋白。

本发明也提供测定样品是否含有 $\alpha 2$ 整联蛋白、 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或二者的方法，该方法包括使样品与上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体接触和确定抗体是否与样品结合，存在所述结合表明该样品含有 $\alpha 2$ 整联蛋白或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白，或含有二者。

本发明还提供包含上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的试剂盒，盒中任选地包含如何用此抗体检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的说明书。

本发明还提供编码上述人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体的分离的核酸。

本发明还提供包含上述核酸的载体。

本发明还提供包含上述核酸或载体的宿主细胞。

本发明还提供生产人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的方法，包括在允许此抗体表达的条件下培养上述宿主细胞。在一实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞回收人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。在一实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞培养基中回收人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。

本发明还提供筛选方法，包括：在存在与不存在受试抗体时，检测 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与包含 SEQ ID NO: 19 所示 VL 区和 SEQ ID NO: 21 所示 VH 区的抗体的结合；如果其存在与 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白和包含 SEQ ID NO: 19 所示 VL 区和 SEQ ID NO: 21 所示 VH 区的抗体的结合降低相关，则选择该受试抗体。在一实施方案中，所述 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白被固定在固相支持物上。

本发明还提供筛选方法，包括：在存在受试抗体时检测 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白

与胶原蛋白的结合,其中受试抗体指结合 $\alpha 2$ 结构域 I 的抗体;在存在 Mg^{++} 离子时检测受试抗体与 $\alpha 2$ 结构域 I 的结合;在存在 Ca^{++} 离子时检测受试抗体与 $\alpha 2$ 结构域 I 的结合;在存在无阳离子的培养基时检测受试抗体与 $\alpha 2$ 结构域 I 的结合;选择抑制 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白结合和在存在 Mg^{++} 离子和 Ca^{++} 离子及无阳离子的培养基时结合至 $\alpha 2$ 结构域 I 的受试抗体。

本发明还提供包含上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和可药用载体的组合物。

本发明还提供治疗受试者 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的方法,该方法包括施与受试者治疗有效量的上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或组合物。

本发明还提供抑制白细胞与胶原蛋白结合的方法,包括施与受试者抑制白细胞与胶原蛋白结合的有效量的上述抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体。

本发明还提供上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体作为药物的用途。

本发明还提供上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或组合物治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的用途。

本发明还提供上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或组合物在制备治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的药物上的用途。

本发明还提供治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的组合物,该组合物包含上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和可药用载体或稀释剂。

本发明还提供了包装体 (package), 包含上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或组合物以及治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的说明书。

在一些实施方案中, $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自: 炎性疾病、自身免疫疾病和以异常或增加的血管发生为特征的疾病。

在一些实施方案中, $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自: 炎性肠病、节段性回肠炎、溃疡性结肠炎、移植反应、视神经炎 (optical neuritis)、脊髓损伤、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE)、糖尿病、多发性硬化症、雷纳德综合征 (Reynaud's syndrome)、实验性自身免疫脑脊髓炎、斯耶格伦综合征、硬皮病、幼年型糖尿病、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、心血管疾病、牛皮癣、癌症以及诱发炎性反应的感染。

在一些实施方案中， $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病选自：多发性硬化症（如其特征为复发、急性期治疗、缓期治疗）、类风湿关节炎、视神经炎 和脊髓损伤。

在一些实施方案中，上述方法不伴有（a）血小板活化，（b）血小板凝聚，（c）循环血小板数量减少，（d）出血并发症，或（e）以上（a）至（d）的任何一种组合。

在一实施方案中，上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体包含含有 SEQ ID NO: 174 或 SEQ ID NO: 176 的重链和含有 SEQ ID NO: 178 的轻链。

在一实施方案中，上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体竞争性抑制含有 SEQ ID NO: 19 的 VL 区和 SEQ ID NO: 21 的 VH 区的抗体与人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或其结构域 I 结合。

在一实施方案中，上述方法伴有多发性硬化症相关的潮红或神经病学后遗症的缓解。

在一实施方案中，上述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体抑制 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白结合，而且不是配体模拟物。

也提供将分子的一部分（如分子、蛋白质、核酸、载体、组合物、复合体等）靶向以存在 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体为特征的部位的方法，该方法包括使该部分与上述人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体附着或结合。

也提供结合抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 $\alpha 2$ 整联蛋白表位，所述表位不含有 $\alpha 2$ 整联蛋白的配体结合位点。在一些实施方案中，与此表位结合不会伴有（a）血小板活化，（b）血小板凝聚，（c）循环血小板数量减少，（d）出血并发症，（e） $\alpha 2$ 整联蛋白活化，或（f）以上（a）至（e）的任何一种组合。

优选结合人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结构域 I 的抗体。具体说，优选的抗体能阻断细胞与胞外基质（ECM）（特别是与胶原蛋白和层粘连蛋白至少之一或二者）的 $\alpha 2$ 整联蛋白依赖性粘附。提供的人源化抗体包括以本发明称为 TMC-2206 的抗体为基础的抗体。提供的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体对人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白有高度特异性，它们的施用不伴有不良作用，如出血并发症或由于

细胞活化所致的并发症。这些抗体的结合特异性（如表位特异性）与它们的出乎意料的非出血性能有关。

人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体可具有重链可变区，包含氨基酸序列 HCDR1（GFSLTNYGIIH，SEQ ID NO：1），和/或 HCDR2（VIWARGFTNYNSALMS，SEQ ID NO：2）和/或 HCDR3（ANDGVYYAM D Y，SEQ ID NO：3）。人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体可具有轻链可变区，包含氨基酸序列 LCDR1（SANSSVNYIHH，SEQ ID NO：4 或 SAQSSWNYIHH，SEQ ID NO：112）和/或 LCDR2（DTSKLAS，SEQ ID NO：5）和/或 LCDR3（QQWTTNPLT，SEQ ID NO：6）。在某些实施方案中，人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体具有重链可变区，包含氨基酸序列 HCDR1（GFSLTNYGIIH，SEQ ID NO：1），和/或 HCDR2（VIWARGFTNYNSALMS，SEQ ID NO：2）和/或 HCDR3（ANDGVYYAM D Y，SEQ ID NO：3），和轻链可变区，包含氨基酸序列 LCDR1（SANSSVNYIHH，SEQ ID NO：4）和/或 LCDR2（DTSKLAS，SEQ ID NO：5）和/或 LCDR3（QQWTTNPLT，SEQ ID NO：6）。在其它实施方案中，该抗体包含一个或多个此类 CDR 的氨基酸序列变体，所述变体在 CDR 残基内或毗连处含有一个或多个氨基酸插入、和/或在 CDR 残基内或毗连处含有一个或多个氨基酸缺失、和/或 CDR 残基替代，替代是产生此类变体的氨基酸改变的优选类型。

发明详述

本发明提供能与人 $\alpha 2$ 整联蛋白特异性反应的抗体，包括人源化抗体，以及它们的使用方法。人源化抗体可具有人的构架区（FW）和非人（通常是小鼠）抗体的互补决定区（CDR），能与人 $\alpha 2$ 整联蛋白特异性反应。提供包含重链和轻链抗体的编码核苷酸序列和氨基酸序列。在优选的实施方案中，一个或多个 CDR 区衍生自或基于杂交瘤克隆 BHA2.1 分泌的鼠抗体[本发明称作 TMC-2206 抗体]。也提供具有类似结合性能的抗体和具有与本发明所述抗体类似功能的抗体（或其它拮抗剂）。优选的抗 $\alpha 2$ 整联蛋

白抗体包括：(a) 结合 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I、(b) 抑制 $\alpha 2$ 整联蛋白功能（如胶原蛋白或层粘连蛋白结合）、(c) 结合静息血小板上的 $\alpha 2$ 整联蛋白而不诱导血小板活化和(d) 识别 TMC-2206 结合表位（如与 TMC-2206 竞争结合 $\alpha 2$ 整联蛋白）的那些抗体。这类抗体可优先结合失活的或封闭构象的靶 $\alpha 2$ 整联蛋白分子而不竞争配体结合位点。本发明所述的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的出乎意料的优点是在所治疗的受试者中能优先结合封闭构象的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白和 / 或结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白而不竞争配体结合位点（例如，不是配体模拟物），包括防止可能的血小板活化、血小板凝聚、循环血小板数减少和 / 或出血并发症。

“出血并发症”在本发明用来指对血液水平和生理状况的任何不良作用，包括血小板血栓形成反应、血小板减少、血凝时间增加、出血时间延长和血液丢失，它们限制了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的治疗用途。

$\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白是由 α 整联蛋白家族的 $\alpha 2$ 整联蛋白亚基（参见例如人 $\alpha 2$ 的 DNA 序列见 SEQ ID NO: 7，蛋白质序列见 SEQ ID NO: 8）和 β 整联蛋白家族的 $\beta 1$ 整联蛋白亚基（参见例如人 $\beta 1$ 的 DNA 序列见 SEQ ID NO: 9，蛋白质序列见 SEQ ID NO: 10）组成的分子，可以源自任何对象，包括哺乳动物，但优选源自人类。 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白可从任何天然来源纯化，或可合成制备（如采用重组 DNA 技术）。 $\alpha 2$ 整联蛋白和 $\beta 1$ 整联蛋白的编码核酸序列可分别参见 Takada 和 Hemler, J Cell Biol 109 (1): 397 - 407 (1989; GenBank 提交号 X17033, 后来更新为登录号 NM 002203) 和 Argraves WS, J Cell Biol 105 (3): 1183 - 90 (1987; GenBank 提交号 X07979.1, 和代表备选剪接变体的有关序列)。

$\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白分子的结构域 I 指 $\alpha 2$ 亚基内该 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白分子的一个区域，其描述例如可参见 Kamata 等, J Biol Chem 269: 9659 - 9663 (1994); Emsley 等, J Biol Chem 272:28512 (1997) 和 Cell 101: 47 (2000)。人 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 的氨基酸序列见 SEQ ID NO: 11 (也见例如 SEQ ID NO: 107)。 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 的氨基酸序列见 SEQ ID NO: 11 (也见例如 SEQ ID NO: 107)。 $\alpha 2$ 整联蛋白的结构域 I 含有 MIDAS 类型的配体结

合位点（金属离子依赖的粘附位点），该位点对支持配体结合的给定二价阳离子具有需求和特异性。大鼠 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 的氨基酸序列见表 28 中的 SEQ ID NO: 93（也见如 SEQ ID NO: 113），小鼠的见 SEQ ID NO: 94（也见如 SEQ ID NO: 114）。已从食蟹猴和猕猴的全血分离的白细胞克隆了其结构域 I 的序列，食蟹猴和猕猴的结构域 I 序列分别是 SEQ ID NO: 103（DNA）、SEQ ID NO: 171（氨基酸）；和 SEQ ID NO: 104（DNA）、SEQ ID NO: 172（氨基酸）。

TMC-2206（BHA2.1）表位指人 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 中 TMC-2206 抗体结合的区域。此表位跨越包括 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 的氨基酸残基 K40、N73、Q89、Y93、R165 和 N166 以及任选的 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 其它氨基酸残基的区域。

$\alpha 2$ 整联蛋白相关疾病指涉及导致靶组织中异常细胞反应的 $\alpha 2$ 整联蛋白依赖性过程 / 功能（如结合、活化）的疾病、紊乱或病症。与疾病相关的 $\alpha 2$ 整联蛋白依赖性过程的例子包括：胶原蛋白依赖性细胞反应，如细胞因子表达增加和细胞增殖所涉及的反应，T 细胞、肥大细胞和嗜中性粒细胞功能方面，炎症性疾病，乳腺导管形态发生，表皮伤口愈合和血管发生。 $\alpha 2$ 整联蛋白相关疾病的例子包括但不限于：包括但不限于炎症肠病（如节段性回肠炎和溃疡性结肠炎）的炎症性疾病和病症、移植反应（包括移植排斥）、视神经炎、脊髓损伤、类风湿关节炎、多发性硬化症（包括治疗与其相关的神经后遗症和以复发为特征的多发性硬化症）、自身免疫疾病或紊乱（包括系统性红斑狼疮（SLE）、糖尿病、雷纳德综合征、实验性自身免疫脑脊髓炎、斯耶格伦综合征、硬皮病）、幼年型糖尿病、和血管生成异常或高于正常相关的疾病（如糖尿病性视网膜病变、衰老相关黄斑退变、心血管疾病、牛皮癣、类风湿关节炎和癌症），以及诱发炎症反应的感染。

治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病指本发明所述抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的治疗性和预防性用途。需要治疗的那些患者包括已患有疾病或需要预防或延缓疾病发作的患者。

哺乳动物，包括用于治疗目的的哺乳动物，指分类为哺乳动物的任何

动物，包括人、家养动物和农牧动物、动物园动物、运动动物或宠物动物，如狗、马、猫、牛等等。优选的哺乳动物是人。

间歇或定期施用是持续某一定时间和以有规律的时间间隔施用，宜分开剂量施用一天以上。

术语抗体或免疫球蛋白采用其最广义，包括单克隆抗体（包括全长单克隆抗体）、多克隆抗体、多特异性抗体和抗体片段，只要它们显示具有所需的生物学活性。抗体片段包含全长抗体的一部分，通常是抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段、双抗体、线形抗体、单链抗体分子、单结构域抗体（如骆驼的（Camelids））、鲨鱼 NAR 单结构域抗体和由抗体片段组成的多特异性抗体。抗体片段也可指包含 CDR 或抗原结合域的结合部分，包括但不限于：V_H 区（V_H，V_H-V_H）、Anticalin、PepBodiesTM、抗体-T 细胞表位融合物（Troybodies）或 Peptibodies。

单克隆抗体指获自基本上均一的抗体群的抗体，如该群所含的各个抗体都相同，除了可能存在的微量天然产生的突变外。单克隆抗体具有高度特异性，是针对一个抗原位点的。此外，与常规的（如多克隆）包含针对抗原上不同决定簇（即表位）的不同抗体的抗体制品相反，各单克隆抗体只针对抗原上的至少一个决定簇。修饰的“单克隆抗体”表示该抗体的特征是获自基本上均一的抗体群，并不解释为要用任何特定方法产生该抗体。例如，单克隆抗体可用 Kohler 等，Nature 256: 495（1975）最先报导的杂交瘤方法制备，或用重组 DNA 方法制备（参见例如美国专利 No.4, 816, 567）。也可从噬菌体抗体库，例如用 Clackson 等人，Nature 352: 624 - 628（1991）和 Marks 等人，J Mol Biol 222: 581 - 597（1991）所述的技术分离得到单克隆抗体。也可用美国专利 No.6, 025, 155 和 6, 077, 677 以及美国专利申请公开号 2002/0160970 和 2003/0083293 中描述的技术分离获得单克隆抗体（也参见如 Lindenbaum 等，Nucleic Acids Research 32（21）：0177（2004））。

单克隆抗体可包括嵌合抗体，此抗体中的重链和/或轻链的一部分与一

特定种类动物的抗体相同，或与其相应序列同源，或属于特定类型或亚类抗体，而重轻链的其余部分与源自另一种动物的抗体的相应序列相同，或与其相应序列同源，或属于另一类型或亚类抗体，以及单克隆抗体的片段，只要它们显示具有所需的生物学活性（小鼠-人嵌合抗体，见美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855（1984））。

超变区指抗体中负责结合抗原的氨基酸残基部分。超变区包含来自互补决定区或 CDR 的氨基酸残基（如轻链可变区的残基 24-34(L1), 50-56(L2) 和 89-97(L3) 和重链可变区的残基 31-35(H1), 50-65(H2) 和 95-102(H3)；见 Kabat 等，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)），和/或轻链可变区中的超变环（如残基 26-32(L1), 50-52(L2) 和 91-96(L3) 和重链可变区中的超变环 26-32(H1), 53-55(H2) 和 96-101(H3)；见 Chothia 和 Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)）。构架或 FR 残基是可变区残基中除超变区残基以外的那些残基。对于本发明所述的抗体，基于 Kabat 编号体系鉴定 CDR 和构架区，除重链的 CDR1 按 Oxford Molecular's AbM 定义限定为跨越残基 26-35 外。Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件 (<http://people.cryst.ckk.ac.uk/~ubc07s/>) (Martin 等，*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272(1989)；Martin 等，*Methods Enzymol.*, 203, 121-153(1991)；Pedersen 等，*Immunomethods*, 1, 126(1992)；和 Rees^等，刊登在 Sternberg M.J.E. 编，蛋白结构预测 (*Protein Structure Prediction*)，牛津大学出版社，牛津，141-172.(1996)) 联合采用 Kabat 的 CDR 和 Chothia 超变区编号体系来定义 CDR。

人源化的非人（如鼠）抗体可以是含有最少衍生自非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。人源化抗体的大部分是人免疫球蛋白（接受者或受者抗体），其中受者的超变区残基被具有所需特异性、亲和性和容量的非人动物（供者抗体）如小鼠、大鼠、兔或非人灵长动物的超变区残基置换。此外，可用相应的非人残基置换人免疫球蛋白的各个或各组 Fv 构架区（FR）残基。

而且,人源化抗体可含有受者或供者抗体中没有的残基。制造这些修饰可进一步净化抗体的性能。通常,人源化抗体基本上都含有至少一个、一般两个超变区或结构域,其中所有或基本上所有的超变环都对应于非人免疫球蛋白的超变环,所有或基本上所有的FR区都是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体任选地也含有免疫球蛋白通常是人免疫球蛋白的恒定区(如Fc)的至少一部分(参见Queen等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029(1989);以及Foote和Winter, J. Mol. Biol. 224: 487 (1992))。

单链Fv或scFv抗体片段可含有抗体的V_H和V_L区或结构域,这些结构域存在于一条多肽链中。通常Fv多肽在V_H与V_L结构域之间还含有一多肽接头使scFv能形成所需的抗原结合结构(综述参见例如Pluckthun刊登在“单克隆抗体药理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)”,第113卷,Rosenburg和Moore主编,Springer-Verlag,纽约,269-315页,1994)。

双抗体指含有两个抗原结合位点的小抗体片段,这种片段含有的重链可变区(V_H)和相连的轻链可变区(L_H)在同一条多肽链(V_H-V_L)中。所用的接头太短使得同一链中的此二区之间不能配对,而迫使此二区与另一条链的互补区配对产生抗原结合位点。双抗体的较全面描述可参见例如EP 404,097; WO 93/11161;和Hollinger等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993)。

线形抗体指Zapata等人,Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995))所描述的抗体。简言之,这些抗体含有一对串连的Fd区段(V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}),形成一对抗原结合区。线形抗体可以是双特异性或单特异性的。

分离的抗体指经鉴定的与其天然环境成分相分离和/或从天然环境回收的抗体。抗体天然环境中的污染成分可能是可能干扰抗体诊断或治疗用途的物质,包括酶、激素和其它蛋白或非蛋白质性溶质。在优选的实施方案中,所述抗体纯化至(1)以Lowry法测定高于95%重量的抗体,最优选高于99%重量的抗体,(2)用旋转杯测序仪足以获得N-末端或内部氨基酸序列至少15个残基的程度,或(3)用考马斯蓝或优选银染色的还原或非还

原条件下 SDS-PAGE 显示均质性。分离的抗体包括重组细胞原位产生的抗体，因为其至少不存在一种该抗体天然环境中的成分。然而通常要至少一个纯化步骤来制备分离的抗体。

加表位标签的抗体(epitope tagged antibody)指本发明抗体融合了一表位标签。此表位标签多肽具有足够的残基可提供所制备抗体识别的表位，而且此表位还足够短从而不会干扰抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联抗体的活性。此表位标签优选足够独特，使针对它的抗体基本上不会与其它表位发生交叉反应。合适的标签多肽一般具有至少 6 个氨基酸残基，通常长约 8-50 个氨基酸残基(优选约 9-30 个残基)。例子包括流感血凝素 (flu HA) 标签多肽及其抗体 12CA5(Field 等, Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165, 1988); c-myc 标签和 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和其 9E10 抗体(Evan 等, Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616, 1985);以及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD)标签及其抗体(Paborsky 等, Protein Engineering 3(6): 547-553, 1990)。在某些实施方案中，此表位标签是一个补救受体结合表位，是负责延长 IgG 分子体内血清半寿期的 IgG 分子(如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄) Fc 区中的一个表位。

细胞毒性剂指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质，可包括放射性同位素(如 ¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y 和 ¹⁸⁶Re)、化疗剂和毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段。非细胞毒性剂指不抑制或阻止细胞功能和/或不引起细胞破坏的物质。非细胞毒性剂可包括能被激活变成细胞毒的药剂。非细胞毒性剂可包括小珠、脂质体、基质或颗粒(参见例如美国专利公开 2003/0028071 和 2003/0032995，其内容并入本文作参考)。可将此类药剂与本发明所述的抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体缀合、偶联或连接。

化疗药物指用于治疗癌症的化学化合物。化疗药物的例子包括但不限于：阿霉素、羟基红比霉素 (Doxorubicin)、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷 ("Ara-C")、环磷酰胺、噻替哌、多西紫杉 (多西他赛)、白消安、细胞毒素 (Cytosine)、紫杉醇、氨甲蝶呤、顺铂、苯丙氨酸氮芥、长春花碱、博来霉素、依托泊苷、异环磷酰胺、丝裂霉素 C、盐酸米托蒽醌、长春新碱、长春烯碱、卡铂、替尼泊苷、柔红霉素、去甲柔红霉素、氨基喋呤、放线

菌素 D、丝裂霉素、埃斯波霉素(参见美国专利号 4,675,187)、苯丙氨酸氮芥和其它有关的氮芥化合物。

前药指药理学活性物质的前体或衍生物，与母体药物相比它们对肿瘤细胞的细胞毒性弱但能被酶活化或转变成更具活性的母体药物形式(参见例如 Wilman, "癌症化疗中的前药(Prodrugs in Cancer Chemotherapy)", Biochemical Society Transactions, 14, 375-382 页, 615 届大会 Belfast(1986) 和 Stella 等, "前药: 一种靶向药物递送的化学方法(Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery)", Directed Drug Delivery, Borchardt 等主编, 247-267 页, Humana 出版社(1985)。前药包括但不限于: 可转变成更具细胞毒性游离药物的含磷酸根的前药、含硫代磷酸根的前药、含硫酸根的前药、含肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含 β -内酰胺的前药、含任选取代的苯氧基乙酰胺的前药或含任选取代的苯乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿嘧啶前药。可衍生为前药形式的细胞毒性剂的例子可以是上面所述的化疗药物。

标记物指与所述抗体直接或间接缀合或偶联结合的可检测化合物或组分。标记物本身可自我检测(例如放射性同位素或荧光标记), 或在酶标记物情形时, 它可催化底物化合物或组分发生化学变化而被检测到。

固相指本发明抗体所附着的非水性基质。固相的例子本发明包括部分或全部由玻璃(例如可控孔径玻璃)、多糖(例如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅酮构成的那些基质。在某些实施方案中, 根据上下文, 固相可包括试验板的孔, 在其它方面, 固相是纯化柱(例如亲和层析柱)。此术语也包括由分离颗粒组成的不连续固相, 如美国专利号 4,275,149 中描述的那些。

脂质体指用于向哺乳动物递送药物(如本发明的抗体和任选的化疗药物)的由不同类型脂质、磷脂和/或表面活性剂形成的小囊泡。脂质体的各组分通常以双层形式排列, 类似于生物膜的脂质排列。

分离的核酸分子指经鉴定的与该抗体核酸天然来源通常相伴随的至少一种污染核酸分子相分离的核酸分子。分离的核酸分子是其天然形式以外

的核酸分子。因此分离的核酸分子可与天然细胞中存在的核酸分子相区别。然而,分离的核酸分子包括细胞中含有的通常可表达所述抗体的核酸分子,例如,该核酸分子在染色体中的位置不同于天然细胞中的分子。

病毒载体指通过病毒感染或转导将核酸(如 DNA 或 RNA)转移给细胞的运载体(Vehicle)。病毒载体的例子包括逆转录病毒、腺病毒、痘病毒和杆状病毒。

非病毒载体指通过非病毒方法,如电穿孔、注射和阳离子试剂介导的转染向细胞递送核酸的运载体,如 CAN、质粒或染色体。

表达调控序列指使有效连接的编码序列在特定宿主生物中表达所需的那些 DNA 序列。适合原核细胞的调控序列例如包括启动子、任选的操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用的有启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

当将某核酸置于与另一核酸序列功能相关处时称它们为有效连接。例如,将一 DNA 前体序列或分泌前导序列有效连接至某多肽的编码 DNA,它们可表达为前体蛋白而参与此多肽的分泌;启动子或增强子有效连接至某编码序列可影响此序列的转录;或将核糖体结合位点有效连接至某编码序列可在此位置促进其翻译。通常有效连接的 DNA 序列是毗连的,如分泌前导序列是毗连的和都在阅读相内,然而,增强子可不毗连。在常规的限制性位点处相连而实现这种连接。如果不存在此种位点,在常规实践中可利用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

本发明另一方面内容是施与受试者本发明的编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的核酸分子来治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病。合适的施用方法包括基因治疗法(见下面)。

可采用例如 DNA 直接注射、受体介导的 DNA 摄取、病毒介导的转染或非病毒介导的转染和基于脂类的转染,将本发明的核酸递送给体内细胞。这些方法都涉及使用基因治疗载体。可用直接注射法将裸 DNA 引入体内细胞(见例如 Acsadi 等, Nature 332:815-818, 1991; Wolff 等, Science 247:1465-1468, 1990)。可采用注射 DNA 入体内细胞中的递送装置(如基

因枪)。这类装置可在市场上购得(例如从 BioRad 购得)。也可使裸 DNA 与阳离子如聚赖氨酸形成复合物,和细胞表面受体的配体偶联而将其引入细胞中(参见例如 Wu, G. 和 Wu, C. H.(1988) J. Biol. Chem. 263:14621; Wilson 等, J. Biol. Chem. 267:963-967, 1992 和美国专利号 5,166,320)。DNA-配体复合物与受体结合可通过受体介导的胞吞作用促进 DNA 摄取。可利用 DNA-配体复合物连接腺病毒的壳体破坏内体,从而释放物质到胞浆中以避免被胞内容酶体降解(参见例如 Curiel 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8850, 1991; Cristiano 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2122-2126, 1993)。

经充分鉴定的缺陷型逆转录病毒可用作基因治疗的载体(综述见 Miller, A. D. Blood 76:271, 1990)。制备重组逆转录病毒及其感染体内外细胞的方法可见“分子生物学当前方法 (Current Protocols in Molecular Biology)”, Ausubel, F. M.等主编, Greene 出版协会(1989), 第 9.10-9.14 章,以及其它标准实验室手册。合适的逆转录病毒例子包括本领域技术人员熟知的 pLJ、pZIP、pWE 和 pEM。合适的包装病毒系包括.psi.Crip, .psi.Cre, .psi.2 和.psi.Am。逆序转病毒已被用来将各种基因引入体外和/或体内的许多不同类型细胞中,包括上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞、成肌细胞、肝细胞、骨髓细胞(参见例如 Eglitis 等, Science 230:1395-1398, 1985; Danos 和 Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464, 1988; Wilson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018, 1988; Armentano 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145, 1990; Huber 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043, 1991; Ferry 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381, 1991; Chowdhury 等, Science 254:1802-1805, 1991; van Beusechem 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-7644, 1992; Kay 等, Human Gene Therapy 3:641-647, 1992; Dai 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895, 1992; Hwu 等, J. Immunol. 150:4104-4115, 1993; 美国专利号 4,868,116;美国专利号 4,980,286; PCT 申请 WO 89/07136; PCT 申请 WO 89/02468; PCT 申请 WO 89/05345 和

PCT 申请 WO 92/07573) 。

为用作基因治疗载体，可操作腺病毒的基因组使之编码和表达本发明的核酸化合物，但不激活腺病毒在正常病毒裂解生命周期中的复制能力。参见例如 Berkner 等，*BioTechniques* 6:616, 1988; Rosenfeld 等，*Science* 252:431-434, 1991, 和 Rosenfeld 等，*Cell* 68:143-155, 1992。本领域技术人员熟知合适的腺病毒载体是衍生自腺病毒 Ad5 型 dl324 毒株或腺病毒其它病毒株，如 Ad2、Ad3、Ad7 等。重组腺病毒的优点是它们不需要分裂细胞即能进行有效的基因递送，因而可用于感染各种各样类型的细胞，包括气道上皮细胞(Rosenfeld 等，1992，见上)、内皮细胞(Lemarchand 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6482-6486, 1992)、肝细胞(Herz 和 Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993)和肌细胞(Quantin 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2581-2584, 1992)。

可采用腺伴随病毒(AAV)作为递送 DNA 的基因治疗载体用于基因治疗目的。AAV 是一种天然存在的有缺陷病毒，需要另一种病毒如腺病毒或疱疹病毒作为辅助病毒才能有效复制和进入生产性生命周期(Muzyczka 等，刊登于 *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129, 1992)。可利用 AAV 将 DNA 整合入非分裂细胞中(参见例如 Flotte 等，*Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356, 1992; Samulski 等，*J. Virol.* 63:3822-3828, 1989 和 McLaughlin 等，*J. Virol.* 62:1963-1973, 1989)。可使用如 Tratschin 等，*Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260, 1985 所述的 AAV 载体将 DNA 引入细胞中(参见例如 Hermonat 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470, 1984; Tratschin 等，*Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081, 1985; Wondisford 等，*Mol. Endocrinol.* 2:32-39, 1988; Tratschin 等，*J. Virol.* 51:611-619, 1984, 和 Flotte 等，*J. Biol. Chem.* 268:3781-3790, 1983)。慢病毒基因治疗载体也适合用于本发明。

基因治疗的通用方法是本领域已知的。参见例如 Anderson 等人的美国专利号 5,399,346。递送遗传物质的生物相容性胶囊的描述见 Baetge 等人的 PCT 公开文本 WO 95/05452 中先前曾报导的将基因转移入造血细胞

的方法（参见 Clapp, D. W 等, *Blood* 78: 1132-1139, 1991; Anderson, *Science* 288:627-9, 2000, 和 Cavazzana-Calvo 等, *Science* 288:669-72, 2000）。

细胞、细胞系、细胞培养物通常可互换使用, 所有这类称呼都包括后代。转化子和转化细胞(例如获自核酸、载体、病毒等的转染、转化或转导)包括衍生自它们的原代细胞和培养物而不论转移的数目多少。也可理解所有的后代细胞 DNA 成分不会精确相同, 这是由于精心考虑的或不经心的突变所致。原始转化细胞中经筛选具有相同功能或生物学活性的突变体后代细胞也包括在本发明中。当试图用不同的名称时, 从上下文中即可知其含义。

本发明所述的人源化抗体包括具有源自受者人抗体分子的可变区构架、源自供者鼠抗体的超变区或 CDR 序列及(如果存在)源自人序列的恒定区的抗体。

所构建的本发明抗体含有鼠单克隆抗体克隆 BHA2.1 重链可变区和轻链可变区的 CDR(Hangan 等, *Cancer Res.* 56:3142-3149, 1996)。构建抗体的优选起始物质是抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 如 BHA2.1 杂交瘤分泌的抗体(如 TMC-2206), 它们是针对人 $\alpha 2$ 整联蛋白的功能阻断性抗体, 其结合活性依赖于靶向的 $\alpha 2$ 整联蛋白中是否存在完整的结构域 I。含有 TMC-2206(或 BHA2.1) 识别的特异性表位的抗体优选包括能结合 $\alpha 2$ 整联蛋白分子的失活构象和/或没有配体模拟物活性的抗体, 优选地为具有 TMC-2206(或 BHA2.1)表位特异性的抗体, 虽然它们能与白细胞和血小板上的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相互作用, 但在施用浓度(包括体内治疗剂量)时, 不会导致血小板激活和导致活化血小板在胶原蛋白上凝聚、对出血只有极小作用或没有作用和/或不伴有出血并发症。

可构建抗体, 其中受者人抗体分子轻链可变区的选择应根据可能的受者人抗体分子可变区与鼠抗体轻链可变区的同源性加以考虑。优选候选的胚系受者人抗体分子来降低潜在的抗原性。胚系数据库由通读重链 FW3 区末端和部分读入 CDR3 序列的抗体序列构成。对于 FW4 区的选择, 宜

检索所选择的胚系分子产生的成熟抗体序列的数据库，在重组抗体分子中也宜选择采用合适的同源性 FW4 区。受者人抗体分子宜选自与供者鼠抗体分子相同类型的轻链，并且是与供者鼠抗体分子相同标准结构类型的可变区。受者人抗体分子轻链可变区选择的第二种考虑包括供者鼠分子与受者人分子之间的 CDR 在长度上的同源性。受者人抗体分子宜通过同源性检索 V-BASE 数据库来选择，也可采用其它数据库，如 Kabat 数据库和公开的 NCBI 数据库。对于具有与 TMC-2206 相同或相似表位特异性和/或功能特性的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，优选的受者人抗体分子轻链是 SEQ ID NO:37，其具有 FW 1-3 区的胚系抗体序列 A14，和 FW4 区的序列 FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:38)，代表成熟 $\kappa 1$ 轻链的共同 FW-4 区(如轻链序列 AAB24132(NCBI 登录 gi/259596/gb/AAB24132))。

受者人抗体分子的重链可变区的选择可基于可能的受者分子的可变区与鼠抗体重链可变区之间的同源性加以考虑，从而构建抗体。优选候选的胚系受者人抗体分子来降低潜在的抗原性。胚系数据库由通读重链 FW3 区末端和部分读入 CDR3 序列的抗体序列构成。对于 FW4 区的选择，宜检索所选择的胚系分子产生的成熟抗体序列的数据库，在重组抗体分子中也宜选择采用合适的同源性 FW4 区。受者人抗体分子宜选自与供者鼠抗体分子相同类型的重链，并且是与供者鼠抗体分子相同标准结构类型的可变区。受者人抗体分子重链可变区选择的第二种考虑包括供者鼠分子与受者人分子之间的 CDR 在长度上的同源性。受者人抗体分子宜通过同源性检索 V-BASE 数据库来选择，虽然也可采用其它数据库，如 Kabat 数据库和公开的 NCBI 数据库。对于具有与 TMC-2206 相同或相似表位特异性和/或功能特性的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，优选的受者人抗体分子重链是 SEQ ID NO:39，其具有 FW 1-3 区的胚系抗体序列 4-59(SEQ ID NO:12)，以及由 FW 4 区(SEQ ID NO:13) 的 4-59 胚系序列产生的成熟抗体 CAA48104.1 (NCBI 登录 gi/33583/emb/CAA48104.1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

本发明所述的非人 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的人源化方法包含在以下实施例中。为了人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，先获得非人抗体起始材料，包括免

疫（动物）制备抗体或购买商品化抗体。本发明中描述了产生抗体的示范性技术。

用于产生抗体的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗原,例如可以是可溶形式的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的其它片段(如含有人 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白片段(SEQ ID NO:11);也参见 SEQ ID NO: 107)。本领域技术人员根据 $\alpha 2$ 整联蛋白的序列(如 SEQ ID NO:8 所示的人 $\alpha 2$ 整联蛋白)可知道用于产生抗体的其它形式 $\alpha 2$ 整联蛋白。

宜通过给动物多次皮下(sc)、静脉内(iv)或腹膜内(ip)注射相关抗原(加或不加佐剂)来产生多克隆抗体。可采用双功能或衍生试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基连接)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 与 R^1 是不同的烷基),将相关抗原与在所免疫动物中具有免疫原性的蛋白质(如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)相缀合。

可将抗原、免疫原性缀合物或衍生物(例如家兔 100 μg , 小鼠 5 μg)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混合,多点皮内注射此溶液来免疫动物。一个月后用该抗原或缀合物(如原先免疫所用量的 1/5 - 1/10)和弗氏完全佐剂皮下多点注射进行加强免疫。7 - 14 天后动物采血,取血清检测抗体滴度。给动物加强免疫直到抗体滴度达到平台。对于用缀合物免疫,优选同样的抗原但与不同蛋白质缀合和/或通过不同的交联试剂缀合,给动物作加强免疫。也可在重组细胞培养物中将缀合物制成融合蛋白。还有,凝聚剂如明矾适合用于增强免疫应答反应。

可用 Kohler 等, Nature, 256: 495(1975)首先报导的杂交瘤方法,或用重组 DNA 方法(例如美国专利号 6,204,023)制备单克隆抗体。也可用美国专利号 6,025,155 和 6,077,677 以及美国专利申请公开号 2002/0160970 和 2003/0083293 中所述的技术(也参见例如 Lindenbaum, 等, Nucleic Acids Research 32(21):0177, 2004)制备单克隆抗体。

在杂交瘤技术中,免疫小鼠或其它合适的宿主动物如大鼠、仓鼠或猴

(如以上所述), 以诱导淋巴细胞产生抗体或产生能特异性结合免疫用抗原的抗体。或者体外免疫淋巴细胞, 然后用合适的融合试剂如聚乙二醇使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 形成杂交瘤细胞(参见例如 Goding, 单克隆抗体: 原理和实施 (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), 59-103 页(Academic Press, 1986))。

将如此制备的杂交瘤细胞接种和在适合的优选含有抑制未融合亲代骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质的培养基中培养。例如, 如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT), 那么杂交瘤培养基一般包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT 培养基), 这些物质防止 HGPRT-缺陷细胞的生长。

优选的骨髓瘤细胞是能有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定地高水平产生抗体和对培养基如 HAT 培养基敏感的那些细胞。其中优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系, 如从获自 Salk 研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, 美国加利福尼亚圣地亚哥)的 MOP-21 和 M.C.-11 小鼠肿瘤和从获自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rockville, Md. USA)的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞衍生的那些骨髓瘤系。也已报导了用人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系来生产人单克隆抗体(例如 Kozbor, J. Immunol., 133: 3001, 1984; Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页(Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

检测杂交瘤细胞生长的培养基中产生的抗所述抗原的单克隆抗体。优选免疫沉淀法或体外结合试验(如放射免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA))来检测杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

用例如 Munson 等, Anal. Biochem., 107: 220, 1980 的斯卡查德分析法测定单克隆抗体的结合亲和性。

鉴定到能产生所需特异性、亲和性和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 将其克隆用有限稀释法亚克隆并用标准方法培养(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页(Academic Press, 1986))。用于此目的合适培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,

杂交瘤细胞可在体内如动物中生长为腹水瘤。

可用常规的免疫球蛋白纯化方法,例如蛋白 A 层析、疏水相互作用层析、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和/或亲和层析,将亚克隆杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清分离。

易于用常规方法(例如用能特异性结合单克隆抗体重链和轻链编码基因的寡核苷酸探针)分离编码单克隆抗体的 DNA 并进行测序。杂交瘤细胞可作为这类 DNA 的优选来源。一旦分离得到此 DNA,可将其置入表达载体中,然后转染宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,包括不能产生免疫球蛋白的细胞,以在重组的宿主细胞中合成单克隆抗体。以下进一步详细描述抗体的重组产生。

本发明描述了示范性抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体人源化方法的实施例。在某些实施方案中,希望产生人源化抗体的氨基酸序列变体,特别是当这样可改进人源化抗体的结合亲和性或其它生物学性能时。

通过在人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体 DNA 中引入适当的核苷酸变化,或通过肽合成方法,来制备人源化抗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗体的氨基酸序列变体。此类变体包括例如在抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体 TMC-2206(例如衍生自或根据 SEQ ID NO: 19 和 21 所示的可变区序列)的氨基酸序列中删除和/或插入和/或替代残基。可制备氨基酸删除、插入和替代的任何组合以实现最终的构建体,只要该最终构建体具有所需的特性。这种氨基酸的变化也可能改变人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的翻译后加工,如糖基化位点数目或位置的改变。

有许多方法可用于制备人抗体或人样抗体(例如“人源化”)。抗体人源化的方法已经过多年的变化。一种方法是产生鼠可变区与人恒定区融合的所谓鼠-人 FC 嵌合体(参见例如 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984; 美国专利 No, 5, 807, 715)。另一种方法揭示了根据超变性(Kabat 等, J. Biol. Chem. 252:6609-6616, 1977; Kabat, Adv. Protein Chem. 32:1-75, 1978)和标准结构(Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196(4):901-17, 1987; Lazakani 等, J. Mol. Biol. 272:929, 1997) 不难鉴定

CDR 的事实, 以及通过将非人动物抗体的 CDR 区 (称为供者 CDR) 移植到人抗体构架 (称为受者构架) 上可将其人源化, 参见例如 Jones 等, *Nature* 321(6069):522-5, 1986; (也参见例如美国专利号 5,225,539; 美国专利号 6,548,640)。根据结晶学分析这 6 个 CDR 环呈现簇状, 不难鉴定关键的构架残基位于所谓的“游标 (Vernier)”区中侧接这些 CDR, 或位于重-轻链介面 (参见例如 Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196(4):901-17, 1987; Chothia 等, *J. Mol. Biol.* 186(3):651-63, 1985; Chothia 等, *Nature* 342(6252):877-83, 1989)。这些残基可能突变返回为鼠的残基而恢复这 6 个 CDR 的正确的相对方位 (参见例如 Verhoyen 等, *Science* 239(4847):1534-6, 1988; Reichman 等, *Nature* 332(6162):323-7, 1988; Tempest 等, *Biotechnology(NY)* 9(3):266-71, 1991)。由于可变区在家族分类中小鼠与人之间具有相对较高的同源性 (综述见例如 Pascual 和 Capra, *Adv. Immunol.* 49:1-74, 1991), 这些早期研究也表明, 通过选择与目的鼠抗体具有最高同源性的用作受者人抗体分子的人胚系序列, 可最大程度减少亲和性丧失的可能性 (参见例如美国专利号 5,225,539; Verhoyen 等, *Science* 239(4847):1534-6, 1988)。

已报导了构架之间的家族同源性和结构相关性可能影响到给定类型 CDR 标准结构的正确提呈 (参见例如 Al-Lazakani 等, *J. Mol. Biol.* 273(4):927-48, 1997, 及其中的参考文献)。宜选择最佳拟合的人或胚系序列。可利用已有的抗体胚系序列数据库来确定给定的鼠重链和轻链家族亚型, 及鉴定人亚家族中用作受者人抗体构架的最佳拟合序列。优选地考虑供者和受者构架的线性氨基酸同源性以及 CDR 标准结构这两者。

人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体中可被替代的示范性重链残基包括以下构架残基成员 H37、H48、H67、H71、H73、H78 和 H91 (Kabat 编号系统) 中的任何一个或多个。优选替代这些构架残基中的至少 4 个。人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体中特别优选替代的一组重链残基的示范例此处为 H37、H71、H73 和 H78。同样也可替代轻链中的残基。要替代的示范性轻链残基包括以下残基成员 L1、L2、L4、L6、L46、L47、L49 和 L71 中的任何一个或

多个。优选这些构架残基中至少三个被替代。人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体中特别优选的一组替代轻链残基的示范例此处为 L2、L46 和 L49。

用于鉴定人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体中优选诱变位点的某些残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变法”(参见例如 Cunningham 和 Wells, *Science*, 244: 1081-1085, (1989))。鉴定了靶残基或残基组(例如带电荷残基, 如 arg、asp、his、lys 和 glu)并用中性或负电荷氨基酸(优选丙氨酸或聚丙氨酸)替代以影响该氨基酸与 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白抗原的相互作用。然后通过替代位点引入其它变化, 精细构建功能上显示对替代敏感的那些氨基酸位点。因此, 虽然可预设引入氨基酸变化的位点, 但突变本身的性质不需要预先确定。例如为分析给定位点突变的性能, 对靶密码子或区域进行丙氨酸扫描诱变或随机诱变, 然后筛选所表达的具有所需活性的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体变体。

氨基酸序列插入包括长度从一个残基至含百个或更多残基的多肽的氨基末端和/或羧基末端融合, 以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括含有 N-末端甲硫氨酸残基的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或与表位标签融合的抗体。人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体分子的其它插入变体包括人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 N-或 C-末端融合了能提高该抗体血清半寿期的酶或多肽(见下文)。

另一类型的变体是氨基酸替代变体。这些变体是人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体分子中至少去除了一个氨基酸残基而其位点插入了不同的氨基酸。替代性诱变最感兴趣的位点包括超变环, 但也可考虑构架区的改变。参与抗原结合的超变区残基或构架残基的替代通常为相对保守形式。这类保守性替代见以下冠以"优选的替代"的内容。如果此类替代导致生物学活性改变, 那么可引入更实质性的变化, 名为"示范性替代"或参见氨基酸分类的如下进一步描述, 并筛选其产物。

原先的残基	示范性替代	优选的替代
Ala(A)	val; leu; ile	Val
Arg(R)	lys; gln; asn	Lys
Asn(N)	gln; his; lys; arg	Gln
Asp(D)	glu	Glu
Cys(C)	ser	Ser
Gln(Q)	asn	Asn
Glu(E)	asp	Asp
Gly(G)	pro; ala	Ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys(K)	arg; gln; asn	Arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	Leu
Pro(P)	ala	Ala
Ser(S)	thr	Thr
Thr(T)	ser	Ser
Trp(W)	tyr; phe	Tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	Leu

通过选择对维持 (a) 替代区多肽骨架结构例如折叠或螺旋构象、(b)

分子靶位点电荷或疏水性或(c)侧链体积上有显著不同作用的替代来完成该抗体生物学性能的实质性修饰。天然存在的残基根据侧链的共同性质可分成几组:(1)疏水性:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;(2)中性亲水性: cys、ser、thr;(3)酸性: asp、glu;(4)碱性: asn、gln、his、lys、arg;(5)影响链取向的残基: gly、pro; 和(6)芳族残基: trp、tyr、phe。

非保守性替代是使这些类型之一的氨基酸残基换成另一类型残基。不参与维持人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体正确构象的半胱氨酸残基通常也可用丝氨酸替代以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可在该抗体中加入半胱氨酸连接键以改进其稳定性(特别是当该抗体是抗体片段如 Fv 片段时)。

抗体的另一类氨基酸变体是改变该抗体原先的糖基化模式。这种改变是指该抗体中缺失一个或多个糖部分和/或加入了一个或多个原先不存在于该抗体的糖基化位点。

抗体的糖基化通常是 N-连接或 O-连接。N-连接指糖部分附着在天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(X是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是糖部分酶促结合至天冬酰胺侧链的识别序列。因此多肽中存在此三肽序列就产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一结合至羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,虽然也可利用 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸。

常规通过改变抗体的氨基酸序列使其含有或缺失一个或多个上述三肽序列来加入或删除糖基化位点(对于 N-连接的糖基化位点)。也可在原始抗体的序列中添加、替代、或删除一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来产生这种改变(对于 O-连接的糖基化位点)。用本领域已知的各种方法可制备编码人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源中分离(当氨基酸序列变体是天然存在时),或用寡核苷酸-介导(或定点)的诱变、PCR 诱变或基因盒诱变早先制备的变体或非变体的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体来进行制备。

人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的氨基酸序列变体的氨基酸序列通常与最

初的人源化抗体重链或轻链氨基酸序列(例如 SEQ ID NO:21 或 SEQ ID NO:19 分别所示的可变区序列)至少具有 75%氨基酸序列同一性, 优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%和最优选至少 95%氨基酸序列同一性, 包括例如 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和 100%氨基酸序列同一性。关于此序列的同一性或同源性, 本发明定义为: 在排列序列和引入空位(如需要)以达到最大百分序列同一性, 将候选序列中的氨基酸残基与人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体残基相同的百分率, 而不考虑任何保守性替代(如上所述)作为序列同一性的一部分。该抗体序列中的 N-末端、C-末端或中间延伸、删除或插入都不构成对序列同一性或同源性的影响。可用常用于比较两条多肽氨基酸位置相似性的标准方法来测定这种序列同一性。利用计算机程序如 BLAST 或 FASTA, 将两条多肽排列它们的各个氨基酸(沿一条或两条序列的全长, 或沿一条或两条序列的预定部分)至最佳匹配。这些程序提供缺省的开放罚分和缺省的空位罚分, 以及评分矩阵如 PAM250(一种标准的评分矩阵; 参见 Dayhoff 等, 刊登于 *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 第 5 卷, 补充本 3, 1978) 可与该计算机程序联用。例如, 同一性百分率可计算如下: 相同匹配的总数乘以 100 再除以匹配区中较长序列的长度与引入该较长序列中为对齐两条序列而加入的空位数之和。

用本发明所描述的方法筛选具有本发明所鉴定的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体所需特征的抗体。例如, 提供筛选具有优选特征和功能的候选抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的方法, 包括筛选能结合感兴趣抗体(例如能与 TMC-2206 抗体竞争、抑制或阻断与 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合的那些抗体)所结合的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白表位的抗体。示范性方法和材料的描述见实施例 13。可进行交叉阻断试验, 其描述例如可见 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 和 David Lane 主编(1988)。此外, 或者备选地, 可进行表位作图(其描述可见例如 Champe 等, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995))来确定该抗体是否能结合感兴趣的表位(参见例如

实施例 12 的 TMC-2206 表位作图研究)。

类似地,可利用固定的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白在竞争试验中测定 K_i 值(参见例如实施例 2) 来确定其相对的结合能力。例如,采用与上述相类似的试验系统,在存在不同浓度未标记的候选抗体时,用荧光标记的 Eu-TMC-2206 培育特定时间后,检测结合的 Eu-TMC-2206 量。用 Prism 软件(GraphPad 公司, CA) 将抑制曲线与“单点竞争模式”相拟合获得 IC_{50} 值和用 Cheng 与 Prusoff 公式(Biochem, Pharmacol. 22(23):3099-108, 1973)计算出 K_i 值。

例如,希望在实施例 2 所述的条件下制备、鉴定和/或选择具有有益结合性能的人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体,在所述条件下检测候选抗体能否阻断 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白介导的细胞粘附,如实施例 2 所述与 TMC-2206 和 TMC-2206 衍生的小鼠-人嵌合抗体作比较。例如,制备表达人 $\alpha 2$ 整联蛋白和内源性仓鼠 $\beta 1$ 的 CHO 细胞(Symington 等, J. Cell Biol. 120(2):523-35, 1993), 并用 CFSE(Molecule Probes, OR) 标记。制备标记的细胞并调整细胞浓度,将细胞保存在暗处直到使用。制备胶原蛋白包被的平板(大鼠尾巴胶原蛋白 1 型; BD Biosciences),将各种系列稀释的抗体溶液加入该胶原蛋白平板中。将标记细胞加入板孔中,培育平板。洗涤后裂解细胞,读取荧光强度(激发光 485 nm;发射光 535 nm)。计算各抗体的抑制活性。

此外,可按实施例 2 所述计算出候选抗体对固定的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白配体的结合常数。用血小板 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白包被 96 孔微量滴定板(GTI 公司, WI 定制的人血小板 $\alpha 2\beta 1$ 包被板)的各孔,然后封闭。例如,为测定 TMC-2206 对其 $\alpha 2$ 整联蛋白抗原的亲合性,可采用荧光标记的 TMC-2206 或同种型对照 IgG 抗体(参见以下实施例)。加入荧光标记的抗体,包括 Eu-TMC-2206 或 Eu-同种型对照 IgG 以封闭 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白微量滴定板。培育此封闭板使抗体-抗原相互作用达到平衡后,将各孔中的样品转移到含有增强溶液的新孔中测定游离(未结合)标记。也将增强溶液加入到空孔中测定结合的标记。用斯卡查德分析计算抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 K_d 值。通过在竞争试验中测定 K_i 值可测定 TMC-2206 衍生抗体(包括衍生自或基于

TMC-2206 的人源化抗体) 的相对亲和性。例如, 对于竞争试验, 在不同浓度未标记抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体 (包括 TMC-2206 或 TMC-2206 衍生的或以其为基础的嵌合抗体 (包括人源化的)) 或同种型对照 IgG 的存在下, 将 Eu-标记的 TMC-2206 加到 $\alpha 2\beta 1$ -包被孔中。培育一段时间达到平衡后, 洗涤各孔, 并将结合的标记抗体的水平测定为各孔中保留的 Eu 标记物。用上述直接结合试验获得的对 Eu-TMC-2206 抗体的 K_d 值从 EC_{50} 值得到其 K_i 值。

在某些实施方案中, 人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体是一种抗体片段。已开发了各种技术来产生抗体片段。常规地, 通过蛋白酶消化完整抗体来产生这些片段 (参见例如 Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117, 1992 和 Brennan 等, *Science* 229: 81, 1985)。然而可直接用重组的宿主细胞如细菌生产这些片段 (参见例如 Better 等, *Science* 240(4855):1041-1043, 1988; 美国专利号 6,204,023)。例如, Fab'-SH 片段可直接从大肠杆菌中回收, 用化学方法偶联形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter 等, *Bio/Technology* 10: 163-167, 1992)。按照另一方法, 可直接从重组宿主细胞培养物分离得到 $F(ab')_2$ 片段。技术人员明白生产抗体片段的其它技术。

在某些实施方案中, 可能需要产生对至少两个不同表位具有结合特异性的多特异性 (例如双特异性) 人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。示范性的双特异抗体 (例如具有两个不同的结合臂) 能结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的两个不同表位, 或者, 可将一个抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体臂与能结合白细胞上的触发分子如 T 细胞受体分子 (例如 CD2 或 CD3) 或 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R), 如 Fc γ R1 (CD64)、Fc γ R2 (CD32) 和 Fc γ R3 (CD16) 的臂相组合, 以使细胞防御机制聚集到其表面具有结合的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的细胞上。可利用双特异性抗体将细胞毒性剂定位于其表面具有结合的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的细胞上。这些抗体拥有 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合臂和细胞毒性剂结合臂 (例如多花白树毒蛋白 (gelonin)、肥皂草毒蛋白、抗干扰素 α 、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链或放射性同位素半抗原)。制备的双特异性抗体可以是全长抗体或

抗体片段(例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。

按照制备双特异性抗体的另一方法,可对一对抗体之间的介面进行工程改造使从重组的细胞培养物回收得到的异源二聚体百分比最大。这种优选的介面包含抗体恒定区 CH3 区的至少一部分。此法中,将一个或多个小侧链氨基酸用大侧链氨基酸(例如酪氨酸或色氨酸)替代。在第二种抗体的介面上用小氨基酸(例如丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链产生与大侧链相同或较小的补偿性空穴。这提供了使异源二聚体产量增加超过其它不良终末产物如同源二聚体的机制(参见例如 WO96/27011)。

双特异性抗体包括交联抗体或异质缀合抗体。例如,所述异质缀合抗体中的一个可与亲和素缀合,另一个可与生物素缀合。可用常规交联方法制备异质缀合抗体。合适的交联剂是本领域熟知的,其描述可参见例如美国专利号 4,676,980 和其中的一些交联技术。

从抗体片段产生双特异性抗体的技术文献中已有描述。可用化学连接法制备双特异性抗体。例如 Brennan 等(*Science* 229:81(1985)) 描述了一种方法,其中将完整的抗体经蛋白酶水解切割产生 $F(ab')_2$ 片段。在二巯基化合物络合剂亚砷酸钠存在下将这些片段还原而稳定邻近的二巯基,防止了分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变成硫代硝基苯甲酸盐(TNB) 衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一用巯乙胺还原转变成 Fab'-巯基,与等摩尔量的另一 Fab'-TNB 衍生物混合,形成双特异性抗体。产生的这种双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

可将从大肠杆菌回收的 Fab'-SH 片段化学偶联形成双特异性抗体。例如,Shalaby 等(*J. Exp. Med.* 175:217-225(1992)) 描述了产生完全人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的方法。将各 Fab' 片段分别分泌自大肠杆菌并在体外直接化学偶联形成双特异性抗体,形成的这种双特异性抗体能结合过量表达 HER2 受体的细胞和正常的人 T 细胞,以及触发人细胞毒淋巴细胞对人乳腺肿瘤靶标的裂解活性。

已报导了从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的技术。例如采用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体(参见例如 Kostgelny 等, J.

Immunol. 148(5):1547-1553(1992))。通过基因融合使 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链连接于两种不同抗体的 Fab' 部分。将此种同源二聚体抗体在绞链区还原形成单体, 然后重新氧化形成异源二聚体抗体。也可用此法产生异源二聚体抗体。双抗体技术(参见例如 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)) 提供了制备双特异性抗体片段的另一种机制。这些抗体片段含有通过一接头与轻链可变区(VL)相连的重链可变区(VH), 由于此接头太短不能使同一链上的两个结构域配对, 因此一个片段的 VH 和 VL 结构域被迫与另一片段的互补 VL 和 VH 结构域配对而形成两个抗原结合位点。另一种利用单链 Fv(sFv 或 scFv) 二聚体制备双特异性抗体的方法也已被报导(参见例如 Gruber 等, J. Immunol. 152:5368(1994))。或者, 如 Zapata 等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995) 所述产生的双特异性抗体可以是线性抗体。

考虑了具有二价以上的抗体。例如可制备三特异性抗体(参见例如 Tutt 等, J. Immunol. 147:60(1991))。

考虑了人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的其它修饰。例如, 可能需要修饰抗体使之具有效应子功能, 以提高或降低此抗体例如治疗癌症时的效力。可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基以在此区中形成链间二硫键。如此产生的同源二聚体抗体可改进内化能力和/或提高补体介导的细胞杀伤(CMC)能力和/或抗体依赖性细胞毒(ADCC)能力(参见例如 Caron 等, J. Exp. Med. 176:1191-1195(1992) 和 Shopes, B., J. Immunol. 148:2918-2922(1992))。也可利用异质双功能交联剂制备抗肿瘤活性增强的同源二聚体抗体(参见例如 Wolff 等, Cancer Research 53:2560-2565(1993) 的描述)。或者, 可工程改造抗体使之具有双 Fc 区从而增强 CMC 和/或 ADCC 能力(参见例如 Stevenson 等, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989))。

可将包含人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的免疫缀合物与某种物质相缀合, 这种物质可以是例如分子、组合物、复合物, 或药剂, 例如细胞毒性剂如化疗药物、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的具有酶活性的毒素或其片段), 或放射性同位素(例如放射性缀合物), 使药物靶向表达 $\alpha 2$ 整联

蛋白的细胞、组织或器官。这种免疫缀合物可用于将药物靶向递送到以存在 $\alpha 2$ 或 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白为特征的特定作用部位。

以上描述了产生这种免疫缀合物所用的化疗药物。可采用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的无结合活性片段、外毒素 A 链(绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -帚曲霉素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白 (*Phytolacca americana* proteins) (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻风树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制物、多花白树毒蛋白、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素或单端孢菌毒素 (tricothecenes)。可利用各种放射性核素来产生放射性缀合的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 或 ^{186}Re 。

可采用各种双功能蛋白偶联试剂,如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二酰亚胺二甲酯 HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺)、醛(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯(如 2,6-二异硫氰酸甲代亚苯酯)、或双-活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯),来制备抗体与细胞毒性剂的缀合药物。例如可按 Vitetta 等, *Science* 238:1098(1987) 所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14-标记的 1-异硫氰酸根合苯甲基-3-甲基二乙三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是放射性核素与抗体缀合的一种示例性螯合剂(参见例如 WO94/11026)。

在另一实施方案中,将抗体与受体(如链亲和素)缀合,施与患者这种抗体-受体缀合药物,先靶向表达 $\alpha 2$ 整联蛋白的细胞、组织或器官,再用清除剂去除未结合的缀合物,然后施与缀合了药剂如细胞毒性剂(如放射性核素)的配体(如生物素)。

也可将本发明所述的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体制剂成免疫脂质体。用本领域已知的方法,如 Epstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688(1985);

Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030(1980) 和美国专利号 4,485,045 和 4,544,545 描述的方法制备含此抗体的脂质体。循环时间延长的脂质体可参见美国专利号 5,013,556 中所述。

可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组分以逆相蒸发方法产生特别有用的脂质体。挤压脂质体通过精细孔径的滤器产生具有所需直径的脂质体。可如 Martin 等, J. Biol. Chem. 257: 286-288(1982) 所述通过二硫交换反应使抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 Fab' 片段与脂质体缀合。可任选地将化疗药物(如阿霉素)包含在脂质体中(参见例如 Gabizon 等, J. National Cancer Inst. 81(19): 1484(1989))。

在抗体引导的酶前药治疗(ADEPT)方法中,也可采用人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体,将该抗体与能使前药(例如肽基化疗药物,参见例如 WO81/01145)转变为活性药物的前药活化酶缀合(参见例如 WO88/07378 和美国专利号 4,975,278)。可用于 ADEPT 的免疫缀合物中的酶组分包括能作用于前药将其转变为更具活性形式的任何酶。可用的酶包括但不限于:用于将含磷酸的前药转变为游离药物的碱性磷酸酶;用于将含硫酸酯的前药转变为游离药物的芳基硫酸酯酶;用于将无毒性 5-氟胞苷转变为抗癌药物 5-氟尿嘧啶的胞苷脱氨酶;用于将含肽前药转变为游离药物的蛋白酶,如沙雷氏菌(serratia)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L);用于转变含 D-氨基酸成分的前药的 D-丙氨酰羧基肽酶;用于转变糖基化前药为游离药物的糖切割酶如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;用于将 β -内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β -内酰胺酶;以及用于分别将氨基氮上以苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变为游离药物的青霉素酰胺酶,如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者,可采用也称为抗体酶(abzyme)的具有酶活性的抗体将本发明的前药转变为游离的活性药物(参见例如 Massey, Nature 328: 457-458(1987))。可如本发明所述制备抗体-抗体酶缀合物,包括向表达 $\alpha 2$ 整联蛋白的细胞、组织或器官递送此种抗体酶。

可用本领域熟知技术,包括采用上述异质双功能交联试剂,使酶共价

结合于抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。或者,可用本领域熟知的重组 DNA 技术构建含有抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体至少一个抗原结合区与酶的至少一个功能活性部分相连的融合蛋白(参见例如 Neuberger 等, Nature 312: 604-608(1984))。

在本发明的某些实施方案中,可能需要用抗体片段而不是完整抗体,例如来提高对组织或肿瘤的渗透。也可能需要修饰此种抗体片段以提高其血清半寿期,为此可在此种抗体片段中,例如通过突变其适当区域加入补救受体结合表位,或通过 DNA 或肽合成,在与此抗体片段一末端或中央相融合的标签肽中加入此种表位而实现(参见例如 WO96/32478)。

例如,可通过化学合成、或酶或化学切割抗体来共价修饰人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。用能与所选侧链或 N-或 C-末端残基反应的有机衍生试剂与该抗体的靶氨基酸残基反应,将对此抗体的其它类型共价修饰引入分子中。例如,最常利用半胱氨酰残基与 α -卤乙酸盐(和相应的酰胺)如氯乙酸或氯乙酰胺反应产生羧甲基或羧基酰胺甲基衍生物。也可利用半胱氨酰残基与溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰磷酸盐、N-烷基马来亚胺、二硫化 3-氮-2-吡啶、二硫 2-吡啶甲酯、对-氯汞苯甲酸酯、2-氯汞-4-硝基苯酚、或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应而衍生。组氨酰残基可利用例如与焦碳酸二乙酯在 pH 5.5-7.0 反应而衍生,因为此试剂对组氨酰侧链具有相对特异性。也可用对溴苯甲基甲基溴,此反应宜在 0.1 M 二甲砷酸钠 (pH 6.0) 中进行。可利用赖氨酰残基和氨基末端残基,例如与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。与这些试剂的衍生反应能有效逆转赖氨酰残基的电荷。衍生含 α -氨基残基的其它适合试剂包括亚氨酸酯如甲基吡啶亚氨酸甲酯、吡哆醛磷酸、吡哆醛、氯氢硼化物、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮,及与乙醛酸的转氨基酶催化反应。精氨酰残基,例如可通过与一种或几种常规试剂反应而加以修饰,所述试剂有苯乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮。精氨酰残基的衍生反应需在碱性条件下进行因为其胍功能基团的 pK_a 高。此外,这些试剂可与赖氨酸和精氨酸的 ϵ -氨基反应。酪氨酸残基的修饰特别使人感兴趣的是例如通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷的反应将光谱标记引入酪氨酸残基。最常见的是分别用 N-乙酰基

咪唑 (N-acetylimidazole) 和四硝基甲烷形成 O-乙酰基酪氨酰类和 3-硝基衍生物。将酪氨酰残基用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化制成标记蛋白质用于放射免疫试验。羧基侧链基团例如天冬氨酰基或谷氨酰基选择性地通过与碳二亚胺 ($\text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$, 其中 R 和 R' 是不同的烷基) 如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基) 碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮杂, 4-二甲基戊基) 碳二亚胺进行反应而加以修饰。此外, 天冬氨酰基或谷氨酰基残基可通过与铵离子反应而转变为天冬酰胺酰基或谷氨酰胺酰基。天冬酰胺酰基或谷氨酰胺酰基经常脱去酰胺基分别形成天冬氨酰基和谷氨酰基残基。这些残基在中性或碱性条件下脱去酰胺基。这些残基的脱酰胺基形式落在本发明的范围内。其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸或苏氨酰基残基的羟基磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链 α -氨基的甲基化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86(1983))、N-末端胺的乙酰化和 C-末端羧基的酰胺化。

另一类共价修饰包括化学或酶法将糖苷与抗体偶联。这些方法的优点是它们不需要在具有 N-或 O-糖基化连接糖能力的宿主细胞中产生该抗体。取决于所用的偶联方式, 糖可结合于(a) 精氨酸和组氨酸, (b) 游离羧基, (c) 游离巯基如半胱氨酸的巯基, (d) 游离羟基如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的羟基, (e) 芳族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸残基, 或(f) 谷氨酰胺的酰胺基(参见例如 WO87/05330; Aplin 和 Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 页(1981))。

去除该抗体上的任何糖部分, 例如可用化学或酶法实现。化学方法去糖基需要使该抗体接触化合物三氟甲磺酸或等同化合物。这种处理导致除了连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺) 外大部分或所有的糖被切除, 而留下完整抗体(参见例如 Hakimuddin 等, *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 52(1987); Edge 等, *Anal. Biochem.*, 118: 131(1981))。酶法切除抗体上的糖部分可利用各种内切-和外切-糖苷酶来实现(参见例如 Thotakura 等, *Meth. Enzymol.* 138: 350(1987))。

该抗体的另一类型共价修饰包括连接该抗体与各种非蛋白聚合物之

一, 如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧乙烯(参见例如美国专利号 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 或 4,179,337)。

编码人源化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的分离的核酸、以及含有该核酸的载体和宿主细胞和产生该抗体的重组技术本发明已有所描述。为了重组产生该抗体, 分离编码该抗体的核酸并将其插入到复制载体中进一步克隆(扩增此 DNA) 或表达。不难用常规方法(例如用能特异性结合编码该抗体重链和轻链的寡核苷酸探针) 分离编码该抗体的 DNA 和进行测序。许多载体可购得。此种载体的组分通常包含但不限于以下一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

可重组产生抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 包括含有异源多肽的融合多肽, 所述异源多肽优选信号序列或在其成熟蛋白或多肽的 N-末端含有特异性切割位点的其它多肽。此种优选的异源信号序列是宿主细胞可识别和加工的序列(例如被信号肽酶切割)。对于不能识别和加工真核细胞信号序列(例如免疫球蛋白信号序列) 的原核宿主细胞, 可用原核细胞信号序列替代该信号序列, 包括采用例如果胶酸盐裂解酶(如 pelB)、碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定的内毒素 II 的前导序列。对于酵母分泌, 可利用的酵母信号序列包括例如: 酵母转化酶前导序列、因子前导序列(包括酵母 (*Saccharomyces*) 和克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 的 α -因子前导序列)、或酸性磷酸酶前导序列、白假丝酵母 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导序列、或 WO90/13646 中描述的序列。对于在哺乳动物细胞中的表达, 可购得和利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列, 例如单纯疱疹病毒 gD 信号序列。将这种前体区域(例如信号序列) 读框内连接于编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 DNA。

表达和克隆载体均含有能使该载体在一种或多种所选宿主细胞中复制的核酸序列。通常在克隆载体中, 此种序列能使该载体不依赖于宿主染色体 DNA 而独立复制, 其含有复制起点或自身复制序列。各种细菌、酵母和病毒的这类序列是人们熟知的。例如质粒 pBR322 的这种复制起点适合于大多数革兰氏阴性菌, 其 2 μ 质粒起点适合酵母和各种病毒(SV40、多瘤

病毒、腺病毒、VSV 或 BPV), 可用于哺乳动物细胞克隆载体。通常哺乳动物表达载体不需要这种复制起点组分(例如通常只采用 SV40 起点, 因为它含有早期启动子)。

表达和克隆载体可含选择基因, 也称为可选择性标记。典型的选择基因所编码的蛋白(a)能赋予对抗生素或其它毒素(如氨基青霉素、新霉素、氨基蝶呤或四环素)的抗性, (b)能补充营养缺陷型缺陷, 或(c)能提供不能从复合培养基得到的重要营养物质(如编码杆菌 D-丙氨酸消旋酶的基因)。

选择方案的一个例子采用能停止宿主细胞生长的药物。用异源基因成功转化的那些细胞可产生能赋予药物抗性的蛋白质而存活于此选择方案。这类优势选择的例子采用药物氨基蝶呤、新霉素、组氨醇、嘌呤霉素、霉酚酸和潮霉素。

哺乳动物合适的可选择标记的另一个例子是能鉴定摄入抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体核酸的细胞的那些成分, 如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I 和-II, 优选灵长动物的金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如, 先通过在含 DHFR 竞争性拮抗剂的氨基蝶呤(Mtx)培养基中培养所有的转化细胞来鉴定用 DHFR 选择基因转化的细胞。当使用野生型 DHFR 时, 适合的宿主细胞是 DHFR 活性有缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

或者, 宿主细胞(特别是含有内源 DHFR 的野生型宿主)用编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体、野生型 DHFR 蛋白、和另一种可选择标记如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶(APH) 的 DNA 序列转化或共同转化, 可在含有该可选择标记的选择试剂(包括氨基糖苷类抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418)的培养基中培养细胞进行选择(参见例如美国专利号 4,965,199)。

酵母所用的一种合适的选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp1 基因(Stinchcomb 等, Nature, 282: 39(1979))。此 trp1 基因可提供缺乏在色氨酸中生长能力的突变酵母菌株, 如 ATCC 编号 44076 或 PEP4-1 菌株的选择标记(参见例如 Jones, Genetics, 85: 12(1977))。酵母宿主细胞基因组中存在 trp1 缺损时, 通过在缺乏色氨酸培养基中培养提供了检测转化情

况的有效环境。类似地,可用已知含有 Leu2 基因的质粒弥补 Leu2-缺陷的酵母菌株(ATCC 20,622 或 38,626)。

此外,可采用衍生自 1.6 μ 环形质粒 pKD1 载体转化克鲁维酵母。或者,采用 Van den Berg, Bio/Technology, 8:135(1990) 报导的乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) 大规模生产重组牛凝乳酶的表达系统。也已公开了用工业化克鲁维酵母菌株可稳定多拷贝表达分泌成熟的重组人血清白蛋白的载体(参见例如 Fleer 等, Bio/Technology, 9: 968-975(1991))。

表达和克隆载体通常含有宿主生物可识别的与抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体核酸有效连接的启动子。适合原核宿主的启动子包括阿拉伯糖启动子(如 araB)、phoA 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统和杂交启动子如 tac 启动子。然而其它已知的细菌启动子也适用。细菌系统用的启动子还含有有效连接至编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体 DNA 的 SD 序列。

已知用于核细胞的启动子序列。大多数真核基因含有位于转录起始位点上游约 25-30 个碱基处的 AT-丰富区。许多基因转录起始位点上游 70-80 个碱基处的另一序列是 CNCAAT(SEQ ID NO:115) 区,其中的 N 可以是任何核苷酸。大多数真核基因的 3'末端是 AATAAA(SEQ ID NO:116) 序列,此序列可以是聚腺苷酸尾加到编码序列 3'末端的信号。这类序列适合插入到真核表达载体中。

适合用于酵母宿主的启动子序列例子包括但不限于 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶,如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡糖异构酶和葡糖激酶。可诱导的具有可用生长条件控制转录额外优点的其它酵母启动子是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适合用于酵母表达中的载体和启动子可参见 EP 73,657 中的描述。也优选酵母增强子与酵母启动子一起使用。

调控载体在哺乳动物宿主细胞中抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的转录, 例如可采用获自病毒(如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒或猿猴病毒 40(SV40)) 基因组的启动子, 或异源哺乳动物启动子, 如肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热激蛋白启动子, 只要这类启动子与宿主相容。常规获得的 SV40 病毒早期和晚期启动子是也含有 SV40 病毒复制起点的 SV40 限制性片段。常规获得的人巨细胞病毒立即早期启动子是 *HindIII* E 限制性片段。在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统采用牛乳头瘤病毒作为载体, 这已在美国专利号 4,419,446 中公开, 并且该系统的修饰在美国专利号 4,601,978 中公开(也参见 Reyes 等, *Nature* 297: 598-601(1982), 是关于在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子调控下在小鼠细胞中表达人 β -干扰素 cDNA)。或者, 可采用罗斯肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

在载体中插入增强子序列常能提高高等真核细胞对抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体编码 DNA 的转录。已经知道哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而常常采用真核细胞病毒的增强子。其例子包括: 位于复制起点后侧的 SV40 增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点后侧的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子(也参见例如 Yaniv, *Nature* 297: 17-18(1982)关于增强真核启动子活性的元件)。可在抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体编码序列的 5' 或 3' 位置, 但优选在启动子的 5' 位点处将增强子剪接到载体中。可采用本领域熟知的其它基因调节系统(例如, 可诱导系统如四环素可诱导系统和 GeneSwitch™) 来调控编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的 DNA 的转录。

真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或其它多核细胞生物的有核细胞)中所用的表达载体也含有终止转录和稳定 mRNA 所需的序列。这类序列通常获自真核细胞或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' 非翻译区, 偶尔获自 3' 非翻译区。这些区域所含核苷酸区段转录为编码抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体 mRNA 的非翻译区中的聚腺苷酸片段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素的聚腺苷酸区(参见例如 WO94/11026 和其中公开的表达载体)。

克隆或表达此处所述载体中的 DNA 的合适宿主细胞是上述的原核细胞、酵母或高等真核细胞。用于此目的的合适原核细胞包括真细菌，包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物，例如肠杆菌科如大肠杆菌属，如大肠杆菌，肠道细菌属，欧文氏菌属，克雷伯氏杆菌属，变形菌属，沙门氏菌属如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)，沙雷氏菌属如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)，和志贺氏菌，以及芽胞杆菌属如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)，假单胞杆菌属如绿脓假单胞菌 (*P. aeruginosa*)，和链霉菌属。合适的大肠杆菌克隆宿主包括大肠杆菌 294(ATCC 31,446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537) 和大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325)。

除原核细胞外，真核微生物如丝状真菌或酵母也是抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体编码载体的合适克隆和表达宿主。在低等真核宿主微生物中最常用酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或普通的面包酵母。然而，许多其它的菌属、菌种、菌株常常可获得和使用，如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母属宿主，包括乳酸克鲁维酵母，脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)，保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)，威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)，瓦尔提克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)，果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)，耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)，或马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*)；耶罗威亚酵母 (*yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070)；念珠菌属；里氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)；许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)；和丝状真菌，包括链孢菌属、青霉菌属、弯颈霉属 (*Tolypocladium*)，或曲霉属宿主如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 或黑曲霉 (*A. niger*)。

表达糖基化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的合适宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已有许多杆状病毒株和变体以及相应的允许的昆虫宿主细胞，来自例如已鉴定的诸如草地夜蛾

(*Spodoptera frugiperda*)(毛虫), 埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子), 白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)(果蝇)和家蚕(*Bombyx mori*)宿主。公众可利用各种用于转染的病毒株, 例如可用苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株, 并且可以使用特别是转染草地夜蛾细胞的病毒。

也可采用棉花、玉米、马铃薯、大豆、牵牛花、番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

然而, 最感兴趣的是脊椎动物细胞, 增殖脊椎动物细胞包括各种哺乳动物细胞已成为常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞的例子包括: SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系(例如 COS-7, ATCC CRL 1651)、人胚肾 293 细胞系或悬浮培养生长的亚克隆 293 细胞(参见例如 Graham 等, J. Gen Virol. 36: 59(1977))、幼仓鼠肾细胞(例如 BHK, ATCC CCL 10)、中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞包括缺乏 DHFR 的 CHO 细胞(参见例如 DHFR Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980))、小鼠足细胞(例如 TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251(1980))、猴肾细胞(例如 CV1 ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾细胞(例如 VERO-76, ATCC CRL-1587)、人子宫颈癌细胞(例如 HELA, ATCC CCL 2)、猫肾细胞(例如 MDCK, ATCC CCL 34)、水牛大鼠肝细胞(例如 BRL 3A, ATCC CRL 1442)、人肺细胞(例如 W138, ATCC CCL 75)、人肝细胞(例如 Hep G2, HB 8065)、小鼠乳腺肿瘤细胞(例如 MMT 060562, ATCC CCL51)、TRI 细胞(参见例如 Mather 等, Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68(1982))、MRC 5 细胞、FS4 细胞或人肝细胞瘤细胞系(例如 Hep G2)。

用上述用于生产抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的表达或克隆载体转化宿主细胞, 在改进的适合诱导启动子的常规营养培养基中进行培养, 选择转化株和/或扩增编码目的序列的基因。

在各种培养基中培养用于产生抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的宿主细胞。市售培养基例如 Ham's F10(Sigma)、基本必需培养基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma) 和 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基(DMEM, Sigma)

适合用于培养这种宿主细胞。此外,可采用 Ham 等, Meth. Enz. 58: 44(1979), Barnes 等, Anal. Biochem. 102: 255(1980), 美国专利号 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655;或 5,122,469; WO90103430; WO 87/00195; 或美国专利再公开号 30,985 中所述的任何一种培养基作为此种宿主细胞的培养基。在这些培养基的任何一种中,如需要可添加激素和/或其它生长因子(如胰岛素、转铁蛋白、或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(如 HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如 GENTAMYCINTM 药物)、微量元素(定义为通常最终浓度为微摩尔量的无机化合物)和葡萄糖或等同的能源物质。也可包含适当浓度的本领域技术人员知道的其它任何必需的添加剂。本领域技术人员知道选择培养条件,如温度、pH 等,包括以上选择的用于表达的宿主细胞所使用的那些培养条件。

可利用例如蛋白 A 层析、离子交换层析、疏水反应层析、凝胶电泳、透析和/或亲和层析,从细胞(包括微生物或哺乳动物细胞)纯化抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。蛋白 A 作为亲和配体是否适合取决于动物种类和此抗体中存在的免疫球蛋白 Fc 区的同种型。可用蛋白 A 纯化的抗体是基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链(参见例如 Lindmark 等, J. Immunol. Meth. 62:1-13(1983))。蛋白 G 可用于小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (参见例如 Guss 等, EMBO J. 5:1516-1517(1986))。亲和配体结合的基质最常用琼脂糖,但也可用其它基质。机械性能稳定的基质如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯,可达到的流速比用琼脂糖更快、加工时间更短。当此抗体含有 CH3 结构域时,可用 Bakerbond ABXTM(J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) 来纯化。蛋白质纯化可包括以下一种或多种技术,如离子交换柱层析、乙醇沉淀、反相 HPLC,二氧化硅层析、肝素 SEPHAROSETM 层析、阴离子或阳离子交换树脂层析(例如聚天冬氨酸柱)、聚焦层析、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀和/或疏水作用层析。例如,可采用以下纯化步骤,对含有感兴趣抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水作用层析,洗脱缓冲液 pH 约为 2.5-4.5,优选地在低盐浓度(例如 0-0.25M 的盐)下进行。

将具有所需纯度的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体与任选的生理学可接受的运载体、稀释剂、赋形剂或稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 主编(1980)), 制成冻干或水溶液形式的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体制剂(包括用于治疗性施用的制剂)用于贮藏。可接受的运载体、稀释剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下应对接受者无毒, 包含: 缓冲剂如磷酸、柠檬酸和其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(如氯化十八烷基二甲基苄基铵、氯己双铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苄醇、对羟基苯甲酸烷酯如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间-甲苯酚); 低分子量(少于 10 个残基)多肽、蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖或其它糖类包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂如 EDTA; 糖如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐反荷离子如钠; 金属复合物(例如锌-蛋白复合物); 和/或非离子型表面活性剂如 TWEENTM、PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG))。

抗体制剂还可含有一种以上特别标明用于治疗的活性化合物, 优选具有互补活性彼此之间无不良影响的那些化合物。可能需要将抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体与目前用于预防或治疗所述疾病的一种或多种药物联用。此外, 也可能需要提供免疫抑制剂。这类分子以对所述目的有效的量联合使用为宜。

活性成分也可用例如凝聚技术或界面聚合技术制备的微胶囊包裹, 例如在微胶囊胶体药物递送系统(如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒或纳米胶囊)或大乳剂中分别采用羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)。这类描述例如可参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 主编(1980)。

用于体内施用的制剂优选地为无菌的。这不难通过除菌过滤膜过滤而实现。

可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含该抗体的固体疏水聚合物组成的半渗透性基质, 基质可以是成型制品, 例如膜或微胶囊。缓释基

质的例子包括：聚脂、水凝胶（如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙酯、可降解的乳酸-羟乙酸共聚物如 Lupron DepotTM(由乳酸-羟乙酸共聚物和柳培林(leuprolide acetate)组成的可注射微球，和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然有些聚合物如乙烯乙酸乙酯和乳酸-羟乙酸能释放分子 100 天以上，但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当包裹的抗体长时间留在体内时它们可能由于 37°C 暴露于水分而变性或凝聚，导致丧失生物学活性和免疫原性可能变化。根据所涉及的机制可为稳定化设计合理的策略。例如，如果发现凝聚是由于分子间通过巯基形成二硫键，那么可通过修饰含巯基残基、冻干酸性溶液、控制水分量、利用合适的添加剂和开发特定的聚合基质组合物而达到稳定化。

可用抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体作为亲和纯化试剂。此过程中，用本领域熟知的方法将该抗体固定在固相如交联葡聚糖树脂或滤膜上。使固定的抗体与待纯化的含有 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白(或其片段)的样品接触，然后用合适的溶剂洗涤支持物基本上去除样品中除结合于固定抗体的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白以外的基本上所有物质。最后用另一种合适的溶剂如 pH 5.0 的甘氨酸缓冲液洗涤支持物，释放抗体结合的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体也可用于 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的诊断试验，如检测其在特定细胞、组织或血清中的表达。对于诊断应用，该抗体通常用可检测分子标记。已有许多标记物可购得，它们通常可分为以下类型：放射性同位素标记、荧光标记和酶-底物标记。放射性同位素如 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I 是有用的标记。例如用“当代免疫学方法 (Current Protocols in Immunology)”第 1 和第 2 卷，Coligen 等主编，Wiley-Interscience，纽约，N.Y.，出版(1991)中所述的技术，用放射性同位素可标记该抗体，放射活性例如可用液闪计数检测。也可用荧光标记，例如稀土螯合剂(铈螯合剂)或荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺、藻红素和德克萨斯红。例如，可用“当代免疫学方法 (Current Protocols in Immunology)”(同上)中所述的技术将荧光标记与该抗体缀合。可用荧

光计测定荧光。也可采用各种酶-底物标记(综述参见例如美国专利号 4,275,149)。所述酶一般催化产色底物发生化学变化,此化学变化可用各种技术测定。例如,酶可催化底物的颜色变化,该变化可用分光光度法检测。或者,酶可改变底物发出的荧光或化学发光。上面已描述了定量检测荧光变化的技术。化学发光底物通过化学反应激发电子,而发射可被检测(如用化学发光检测仪)的光或转移能量给荧光受体。酶标记物的例子包括萤光素酶(如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶,美国专利号 4,737,456)、萤光素、2,3-二氢氮杂萘二酮、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶酶体酶、糖氧化酶(如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。酶与抗体缀合技术的描述可参见例如 O'Sullivan 等“制备用于酶免疫试验的酶-抗体缀合物的方法 (Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay)”,刊登于“Methods in Enzym”中(主编 J. Langone & H. Van Vunakis), Academic 出版社, N.Y., 73: 147-166(1981)。酶-底物组合的例子包括例如 (i) 辣过氧化物酶(HRPO) 与底物过氧化氢酶,此过氧化氢酶能氧化色素前体化合物(如邻苯二胺(OPD) 或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));(ii)碱性磷酸酶(AP) 与生色底物对-硝基苯磷酸盐,和(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal) 与生色底物(如邻-硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶) 或荧光底物 4-甲基伞形酮基- β -D-半乳糖苷。本领域技术人员可购得许多其它酶-底物组合物(综述参见例如美国专利号 4,275,149 和 4,318,980)。

有时通过间接方法将标记与抗体缀合。本领域技术人员知道实现此目的的各种技术。例如,可将抗体与生物素缀合,可将上述三种类型标记物的任何一种与亲和素缀合,或反之也然。将生物素选择性地与亲和素结合,从而以间接方式使标记与抗体缀合。或者,为实现标记与抗体的间接缀合,可将该抗体与小的半抗原(如地高辛)缀合,将一种不同类型的上述标记物与抗该半抗原的抗体(如抗地高辛抗体)缀合,从而实现该标记物与该

抗体的间接缀合。

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体不需要标记, 用与抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体结合的标记抗体可检测其存在。抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体可用于任何已知的试验方法中, 如竞争结合试验、直接或间接夹心试验和沉淀试验(参见例如 Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp.147-158(CRC Press, Inc. 1987))。竞争结合试验依据标记的标准品与试样中的分析物竞争结合有限量的抗体。例如, 试样中的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白含量与标准品结合抗体的量成反比。为了有利于结合的标准品量的检测, 竞争前或后抗体通常为固相, 这样可以方便地将与抗体结合的标准品和分析物与保持未结合的标准品和分析物分离。夹心试验采用二种抗体, 各自能结合不同的待检测蛋白质的免疫原性部分或表位。在夹心试验中, 试样中的分析物与固定在固相上的一级抗体结合, 然后二级抗体与该分析物结合, 从而形成不溶性三重复合物(参见例如美国专利号 4,376,110)。所述二级抗体本身标记有可检测部分(例如直接夹心试验)或可用标记有可检测分子的抗免疫球蛋白抗体进行检测(例如间接夹心试验)。例如, 一种类型的夹心试验是 ELISA 试验, 其所用的可检测部分是酶。

对于免疫组化, 其组织样品(包括肿瘤样品)可以是新鲜的或冻存的, 或石蜡包埋和用防腐剂如甲醛固定的。

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体也可用于体内诊断试验。通常用放射性核素(^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S) 标记该抗体, 这样可利用免疫闪烁图定位组织, 例如肿瘤组织。

为了方便, 可在试剂盒中提供抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 与预定量的各试剂和如何进行诊断试验的说明书包装在一起。在抗体用酶标记的情况下, 试剂盒包括底物和酶需要的辅因子(例如提供可检测色素或荧光的底物前体)。试剂盒中可包括其它添加物, 如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等等。试剂盒中提供的各种试剂的相对量可能有很大不同, 例如提供的试剂溶液浓度能相当大地优化试验的灵敏度。提供的试剂也可以是干粉, 通常是冻干粉, 包括赋形剂, 例如在溶解时将提供具有适当浓度

的试剂溶液。

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体可用于治疗本发明所述的各种 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病。可通过适当途径施与此抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内或鼻内。如需要局部免疫抑制治疗，可病灶内施与此抗体(包括移植前用此抗体灌注或接触移植物。肠胃外施用包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。此外，抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体适合用脉冲输注，例如递减剂量抗体施与。优选注射，最优选静脉内或皮下注射施用。这可能部分取决于施用是短期还是长期。

对于预防或治疗疾病，抗体的合适剂量取决于上述待治疗疾病的类型，疾病的严重程度和进程，抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体施用是治疗还是预防目的，先前的治疗，患者的临床病史和对该抗体的反应，和主治医师的处理决定。该抗体适合患者一次施用或系列治疗。

根据疾病的类型和严重程度，施与受试者此抗体的最初候选剂量约为 $1 \mu\text{g/kg}$ - 约 15 mg/kg 或约 $0.05 \mu\text{g/kg}$ - 约 20 mg/kg ，例如，分一次或多次施用或连续输注。一般日剂量范围是约 $1 \mu\text{g/kg}$ - 约 100 mg/kg 或以上，取决于上述因素。根据病情可重复施用几天或更长，治疗持续直到疾病症状受到所需抑制。然而也可采用其它剂量方案。本领域技术人员不难监测这种治疗的进展。

配制抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，确定剂量后以符合良好医学规范方式施用。这样做要考虑的因素包括待治疗的具体疾病、待治疗的具体哺乳动物、患者个体的临床状况、病因、施用的时间安排、药理和毒性的结果研究、以及内科医生所知的其它因素。待施与该抗体的治疗有效量由这些考虑而定，是防止、缓解或治疗 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的最小必须用量。此用量优选地低于对宿主有毒的或使宿主显著更易感染的用量。

抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体不需要，但也可任选地将其配制在共同施与的药物中或用作目前用于预防或治疗所述疾病的一种辅助治疗。例如，对类风湿关节炎，此抗体可与糖皮质激素 Remicaid®或已批准治疗类风湿关节炎的药物联用。对于多发性硬化症，此抗体可与干扰素 β 、Avonex、Copaxon

或其它已批准的治疗多发性硬化症体征和症状的疗法联用。对于移植，此抗体可与上面所述的免疫抑制剂如环孢菌素 A 同时或分别使用来调节免疫抑制的效果。或者，还施与罹患 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白相关疾病的哺乳动物 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白拮抗剂。这类其它药物的有效量取决于制剂中抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的量、疾病的类型或治疗、以及上述其它因素。这些药物通常采用与以前相同的剂量和施用途径，或以前所用剂量的约 1 - 99%。

本发明提供用于治疗上述疾病的含有包括抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在内的物质的制品 (article)。这些制品包括容器和标签。合适的容器包括例如药瓶、小瓶、注射器和试管。容器可用各种材料如玻璃或塑料制成。容器中有能有效治疗疾病的组合物和具有灭菌的塞子 (如容器可以是静脉输液袋或具有可用皮下注射针头穿刺的塞子)。该组合物中的活性药物是抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体。容器上 (或所附) 的标签标明该组合物用于治疗所选择的疾病。此制品也可包括第二容器，其包含可药用缓冲液如磷酸盐缓冲液、林格氏液或葡萄糖液。还可包含其它按商品化和用户观点所需的物质，包括其它缓冲液、稀释液、过滤器、针头、注射器和有使用说明的包装说明书。

上述原理可应用于例如 BHA2.1 杂交瘤分泌的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体 (Hangan 等, *Cancer Res.*, 56(13): 3142-9(1996))。此种抗体能结合人和大鼠的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白，但不结合鼠的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。BHA2.1 杂交瘤产生的此种抗体本发明称为 TMC-2206, 可从 Chemicon (现为 Millipore 公司的一部分, 目录号 AB1998) 购得。现已制得嵌合性 (包括人源化的) TMC-2206 变体并进行了体外分析。用 TMC-2206 抗体或类似抗体 (包括能识别鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的抗体) 也进行了体内研究。提供以下实施例为了说明而非限制本发明。本说明书引用的所有文献的内容均并入本文作为参考。

实施例 1

设计和制备了 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的特异性抗体。如本发明所述测定了先前未知的 BHA2.1 杂交瘤分泌的名为 TMC-2206 的鼠抗体的可变区序列。用

RT-PCR 从 BHA2.1 杂交瘤的 mRNA 克隆了 VH 和 VL 的 cDNAs,所用的一组引物对应于鼠重链 (VH) 或轻链 (VL) 可变区 N-末端的氨基酸,第二组引物分别对应于重链 $\gamma 1$ 和 κ 轻链的恒定区。按本发明所述标准方法分离 mRNA,测定了从其合成的 cDNA 的序列。

用本领域技术人员所知的标准分子技术,从约 1 百万个(1×10^6 个)表达 TMC-2206 的 BHA2.1 杂交瘤细胞分离获得胞浆 mRNA。为分离 poly A mRNA,将用 5M 硫氰酸胍裂解的细胞与 oligo(dT)纤维素(Ambion, TX) 混合,室温轻轻振荡培育 60 分钟。沉降 oligo(dT) 纤维素结合的 poly(A) RNA,洗涤,然后加入洗涤旋转柱(Ambion, TX)。将此柱于 $3000 \times g$ 离心 1 分钟,然后用 200 μL 的 10 mM Tris、1mM EDTA(TE)缓冲液 (pH 8.0) 洗脱 RNA,用 0.1 体积 5 M 乙酸铵(NH_4Ac) 和 2.5 体积 100%乙醇 -20°C 沉淀。离心沉淀此 RNA,干燥,溶于 DEPC-处理过的水。

用基于鼠重链 (VH) 或轻链 (VL) 可变区 N-末端的引物,和对应于鼠 $\gamma 1$ 重链和 κ 轻链恒定区的第二组引物,通过逆转录合成了分离的 BHA2.1 mRNA 的 cDNAs。BHA2.1 抗体的序列未知,因此采用了鼠抗体轻重链可变区 N-末端的商品化简并引物(轻链引物混合物#27-1583-01 和重链引物混合物#27-1586-01,购自 Amersham Biosciences),见表 Table 1。据报告这些引物分别包含鼠轻重链 N-末端的异源氨基酸组成。如下进行 RT-PCR 反应(Qiagen RT 试剂盒): 0.5 μg mRNA、10 μL $5\times$ RT 缓冲液、2 μL 的 10 mM dNTP 混合液、5 μL 各种 10 mM 引物溶液和 2 μL 酶混合液,总体积 50 μL 。50 $^\circ\text{C}$ 进行逆转录反应 30 分钟,接着进行 95 $^\circ\text{C}$ 15 分钟 PCR 激活步骤,并以适合于扩增重轻链可变区的简并混合引物的 PCR 程序结束: 94 $^\circ\text{C}$ 30 秒, 56 $^\circ\text{C}$ 30 秒和 72 $^\circ\text{C}$ 1 分钟, 28 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 分钟。后续 PCR 反应所用的引物对列于表 2 中,由 Retrogen(圣地亚哥, CA)合成。所列的所有引物为 5' - 3'。

表 1

引物名	核苷酸序列(5' - 3')
VHL-正向 (SEQ ID NO:14)	CCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT
HC-反向 (SEQ ID NO:15)	GGGGCCAGTGGATAGAC
VLL-正向 (SEQ ID NO:16)	CCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG
LC κ -反向 (SEQ ID NO:17)	GTTGGTGCAGCATCAGC

表 2

引物名	核苷酸序列(5' - 3')
Ig κ -S (SEQ ID NO:27)	TCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGG GTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGAGACGC G
Ig κ -AS (SEQ ID NO:28)	AATTCGCGTCTCCAGTGGAACTGGAACCCAGAGCAG CAGTACCCATAGCAGGAGTGTGTCTGTCTCCATGGTGG C
TMC-2206-r5' (SEQ ID NO:22)	CCCGAATTCACAGGTGCAGTTGAAGGAGTCA
TMC-2206-r3' (SEQ ID NO:23)	CGGGATCCTTAGGATCATTACCAGGAGAGTGGGA
TMC-2206-k5' (SEQ ID NO:24)	CCCGAATTCACAATTGTCTCACCCAGTCT
TMC-2206-k3' (SEQ ID NO:25)	CGGGATCCTTATCTCTAACACTCATTCCTGTTGAA
TMC-2206VH- hIgG1/4Fc-Sall (SEQ ID NO:29)	CTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT

引物名	核苷酸序列(5' – 3')
TMC2206VL-hKc-SalI (SEQ ID NO:32)	TCGTTTGATGTCGACCTTGGTCCCAGCACCGAACGTGA G
hIgG1/4Fc-SalI-F (SEQ ID NO:30)	TCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCSGTCTTC
hIgG1/4Fc-NotI-R SEQ ID NO:31)	AAGGGAAGCGGCCGCTTATCATTACCCYGAGACAGG GAGAGGCTCTT
hKc-SalI-F (SEQ ID NO:33)	ACCAAGGTCTGACATCAAACGAACTGTGGCTGCACC
κ-F (SEQ ID NO:95)	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT
κ-BamHI-R (SEQ ID NO:96)	AATTCGGATCCTTACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCT CTT
hKc-NotI-R SEQ ID NO:34)	AAGGGAAGCGGCCGCTTATCARCACTCTCCCCTGTTGA AGCTCTT
TMC-2206VLwt-h Kc-F (SEQ ID NO:35)	AGGGTGGAGCTGAAACGAACTGTGGCTGC
TMC-2206VLwt-h Kc-R (SEQ ID NO:36)	TCGTTTCAGCTCCACCCTGGTCCC

从 VH 和 VL 获得长约 350 bp 的 PCR 产物。用 1%琼脂糖凝胶回收这些 PCR 产物,克隆到 pCR2.1-TOPO 克隆载体(Invitrogen, CA) 中并测序。

在 CEQ DNA 测序仪上用 M13 正向和反向引物(Invitrogen, CA) 进行测序。用 Qiagen 试剂盒按厂商说明书制备 1.5 mL 细菌培养物的质粒 DNA。每次 PCR 测序反应均采用约 300 ng 的 DNA, 体积通常为 10 μL。将此 DNA 96°C 变性 2 分钟, 然后与终浓度 0.3 μM 的测序引物混合。在混合物中加入 4μL DTCS Quick Start Master Mix(Beckman Coulter, Fullerton, CA), 混合并进行 30 个循环的测序反应: 96°C 20 秒, 50°C 20

秒和 60°C 2 分钟。在存在乙酸钠(NaAc)、EDTA 和糖原下用乙醇沉淀测序反应物。用 70%乙醇洗涤沉淀二次, 风干, 重悬浮于 20 μ L 样品加载溶液(试剂盒中提供)。用标准方法测定了 8 个分别的 VH 和 VL 克隆的序列, 表 3 和 4 分别显示推导的氨基酸序列为 VH(SEQ ID NO:21)和 VL(SEQ ID NO:19)。从所有 8 个克隆获得的序列除了第一个或头二个氨基酸外均相同。在 VL 克隆中, Glu-Asn 或 Gln-Phe 的存在频率相等。在 VH 克隆中, Gln 或 Glu 的存在频率相等。将这些序列与 NCBI 蛋白 BLAST 数据库进行核查(<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>, Ye 等, *Nucleic acids Res.*, Jul 1: 34(Web Server Issue): W6-9)。所有序列(如 TMC-2206 的 VH 或 VL) 经 CLUSTALW(多个序列比对 (Multiple Sequence Alignment)), <http://clustalw.genome.jp/>(Aiyar, *Methods Mol Biol.*, 132:221-41(2000)) 排列对比进行查询。这些克隆的插入物显示了与预期同种型的鼠重链(IgG1)和轻链(κ) 的最佳匹配。此克隆的 VH 和 VL 区序列提示, 可利用前导序列和侧翼的恒定区序列设计出更精确的引物来克隆从杂交瘤 mRNA 得到的 TMC-2206 的整个重轻链可变区。所有引物均由 Retrogen(圣地亚哥, CA) 合成。采用与上述相同的 PCR 条件, 用引物对 VHL-正向 CCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT(SEQ ID NO:14) 和 HC-反向 GGGGCCAGTGGATAGAC(SEQ ID NO:15; 来自小鼠 Fc γ CH1) 重新克隆重链可变区, 用引物对 VLL-正向 CCATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAG(SEQ ID NO:16)和 LC κ -反向 GTTGGTGCAGCATCAGC(SEQ ID NO:17) 重新克隆此杂交瘤 mRNA 的轻链可变区。产物测序证实 TMC-2206 VL 的前两个残基是 L1-Q 和 L2-F, 重链的前两个残基是 H1-Q 和 H2-V。其余的核苷酸序列与用简并混合引物克隆的相同。

表 3

名称	FW1	HCDR1	FW2	HCDR2
	-----1-----2----	----3----	----4-----	5-----6----
Kabat 编号:	1234567890123456789012345	6789012345	67890123456789	0123456789012345
TMC-2206 VH (SEQ ID NO:21)	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVS	GFSLTNYGIH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWARGFTNYSALMS

名称	FW3	HCDR3	FW4	
	----7-----8-----9----	----10-----	-----11--	
Kabat 编号:	67890123456789012ABC345678901234	567890ABC12	34567890123	
TMC-2206 VH (SEQ ID NO:21)	RLIITKDNSQSQVFLKMNSLQPD SATYFCAR	ANDGVYYAMDY	WGQGTSVTVSS	

表 4

名称	FW1	LCDR1	FW2	LCDR2
	-----1-----2---	-----3----	----4-----	5-----
Kabat 编号:	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
TMC-2206 VL (SEQ ID NO:19)	QFVLTQSPAFLSASPGKVTMTCTC	SANS-SVNYIH	WYQQKSGTSPKKWIY	DTSKLAS

名称	FW3	LCDR3	FW4	
	---6-----7-----8-----	-9-----	-10-----	
Kabat 编号:	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	
TMC-2206 VL (SEQ ID NO:19)	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISMETEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGAGTRVELK	

克隆的 VL 区长 106 个氨基酸, VH 区长 119 个氨基酸。如表 3 和 4 所示, 在克隆的重链(VH)和轻链(VL)可变区各有三个 CDR(CDR1-3)和 4 个构架(FW1-4)序列。根据 Kabat 编号系统(Kabat 等, 1983)鉴定构架和 CDR, 除了重链的 CDR1 用 Oxford Molecular's AbM 定义为跨越残基 26 - 35 外。Oxford Molecular's AbM 抗体建模软件 (<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Martin 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272(1989); Martin 等, *Methods Enzymol.*, 203,

121–153(1991); Pedersen 等, *Immunomethods*, 1, 126(1992)和 Rees 等, 刊登在 Sternberg M.J.E.(主编), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141–172.(1996))将 Kabat CDR 和 Chothia 超变区编号系统结合来确定 CDR。为了编号的一致性, 将构架区与 CDR 区两者相对于标准编号的插入序列命名为残基位置后按字母顺序排列(如残基 82A、82B、82C 插入在重链残基 82 与 83 之间, 如表 3 所示)。此 VH 和 VL 二序列具有较短的 CDR3。克隆的轻链 CDR1 中可能有潜在的糖基化位点(Asp-Ser-Ser, NSS)。这与用 SDS-PAGE 观察到 TMC-2206 轻链分子量为 29 kD 相符, 用内切糖苷酶处理可将其转变为 25 kD(抗体轻链的典型分子量)。

为验证这些克隆序列代表了 TMC-2206 抗体的生物学活性 VH 和 VL, 对从杂交瘤培养基纯化的该抗体作 Edman 降解后肽 N-末端测序。推断的 VH 和 VL 克隆氨基酸序列表明可能各自存在 N-末端谷氨酰胺, 因此提高了 N-末端封闭由该 N-末端谷氨酰胺环化产生焦谷氨酸(pGlu)所致的可能性。因此为了去除潜在的环化末端谷氨酰胺, 用来自嗜热的激烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 的耐热酶对此蛋白进行焦谷氨酸氨肽酶消化, 然后进行重链和轻链的 N-末端肽测序。在 50 μ L 消化缓冲液(50 mM 磷酸钠, pH 7.0, 1 mM EDTA 和 10 mM 二硫苏糖醇(DTT))中重建纯化的激烈热球菌的焦谷氨酸氨肽酶(0.01 U)(Sigma, St. Louis, MO)。用 1:100 摩尔比的焦谷氨酸氨肽酶: 蛋白于 95°C 消化 TMC-2206 制品 1 小时。用标准 10% SDS-PAGE 凝胶(Tris-甘氨酸, BioRad Laboratories, Hercules, CA), 上槽中含巯基乙酸钠(0.1 g/150 mL 电泳缓冲液), 电泳分辨消化的蛋白。在 250 mAmp 下, 将凝胶印迹转移到固定素 (Immobilon) P PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA)上 1 小时, 转移缓冲液为 10 mM CAPS, pH 10.5, 0.5 g/L DTT 和 15% 甲醇。用 1% 乙酸配的新鲜 0.1% 丽春红 S 溶液将印迹染色 1 分钟, 然后用 1% 乙酸脱色。对印迹肽测序时发现成功测定了头 21 个 N-末端氨基酸的 20 个, 显示与克隆获得的推导的肽序列精确相同。这证实克隆的 VL 的第一个氨基酸是谷氨酸。焦谷氨酸氨肽酶消化的 VH 没

能产生任何肽序列数据。

实施例 2

设计和制备了 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的特异性嵌合抗体, 包括小鼠-人嵌合抗体。采用标准分子克隆技术, 利用实施例 1 中所述克隆的 TMC-2206 的 VH 和 VL 区分别设计和制备嵌合性重链和轻链(参见例如 Sambrook 和 Russell 的“分子生物学手册 (Molecular Biology Manual)”, 2001)。

克隆的重链和轻链含有引入的限制性位点如下。利用引物 TMC-2206-r5' CCCGAATTCACAGGTGCAGTTGAAGGAGTCA (SEQ ID NO:22) 和 TMC-2206-r3' CGGGATCCTTAGGATCATTTACCAGGAGAGTGGA (SEQ ID NO:23) 进行 RT-PCR, 从 BHA2.1 杂交瘤 mRNA 克隆出 TMC-2206 重链, 利用引物 TMC-2206-k5' CCCGAATTCACAATTTGTTCTCACCCAGTCT (SEQ ID NO:24) 和 TMC-2206-k3' CGGGATCCTTATCTCTAACACTCATTCCTGTTGAA (SEQ ID NO:25) 克隆出 TMC-2206 轻链。这些引物分别在 5' 和 3' 末端引入了 *EcoRI* 和 *BamHI* 位点, 可将克隆的重轻链分别克隆到 pIRES2-GFP 和 pIRES2-Ds Red 哺乳动物表达载体中 (Clontech, 目录号 632306 和 632420)。工程改造此二载体使之携带 Igk 前导序列 METDTLLLWVLLLWVPGGSTGD (SEQ ID NO:26)。

为分离 mRNA, 低速 (800 转/分钟, 10 分钟) 离心沉淀约 1 百万个表达 TMC-2206 的杂交瘤细胞, 用 PBS 洗涤后用 1 mL Trizol (Invitrogen, CA) 液裂解。强烈旋涡振荡后用 0.2 mL 氯仿抽提细胞悬液, 离心 (14,000 转/分钟 4°C 5 分钟) 后, 将上清液转移到新试管中, 与 0.5 mL 异丙醇混合然后离心 (14,000 转/分钟 4°C 10 分钟) 沉淀 RNA。用 1 mL 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 然后溶于 50 μ L DEPC-处理过的水中。

如上所述进行 RT-PCR 反应 (Qiagen RT 试剂盒), 采用 0.5 μ g RNA、10 μ L 5x RT 缓冲液、2 μ L 10 mM dNTP 混合物、各 5 μ L 10 mM 引物溶

液和 2 μ L 混合酶液,总体积 50 μ L。用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 限制性酶消化 PCR 产物,将经 1%琼脂糖凝胶纯化的片段连接到 pIRES2-GFP(重链)载体和 pIRES2-Ds Red(轻链)载体的 *Eco*RI/*Bam*HI 位点中。随后对可变区序列进行测定证实 RT-PCR 没有引入突变。

选择 pCI-neo(Promega, 目录号 E1841)作为克隆基于或衍生于上述 TMC-2206 的嵌合抗体分子包括人源化抗体分子的表达载体。为减少通过 PCR 在恒定区导入突变的可能性,制备了 VH 和 VL 二者的克隆盒。首先,将编码 Ig κ 前导序列的 DNA(SEQ ID NO:26)克隆到 pCI-neo 的 *Xho*I 和 *Eco*RI 克隆位点中,采用了表 2 所列寡核苷酸 Ig κ -S(SEQ ID NO:27)和 Ig κ -AS(SEQ ID NO:28),使二者互相退火,然后用 T4 连接酶直接连接到 *Xho*I-*Eco*RI 消化的 pCI-neo 质粒中。这为所有后续克隆步骤提供了亲代载体。从此制备了两个表达盒:一个用于克隆毗连人 IgG1 Fc(hFc)的 VH 区,第二个用于克隆人 κ 链(hK κ)恒定区上游的 VL 区。

在人 IgG1 Fc(hFc)或 κ 链(hK κ)恒定区序列中没有发现 *Eco*RI、*Xba*I、*Hind*III 或 *Sal*I 位点,因此将这些限制性位点中任何一个引入恒定区的 5' 末端有利于克隆。选择 *Sal*I 作为克隆位点是因为可最大程度减少可变-恒定区连接处的氨基酸改变数目。对于重链嵌合体,在小鼠 VH-人 Fc 连接处引入 *Sal*I 位点不会导致氨基酸序列的任何改变。首先,用表 2 所示引物对 TMC-2206-r5'(SEQ ID NO:22)和 TMC2206VH-hIgG1/4Fc-*Sal*I(SEQ ID NO:29)通过 PCR 制备 *Eco*RI-*Sal*I VH 片段,将其引入小鼠 VH 序列 3' 末端 *Sal*I 的限制性位点,采用 pIRES-GFP 载体中的克隆重链作为模板。扩增 IMAGE 克隆 20688(Invitrogen, 目录号 4764519)DNA 获得人 IgG1 Fc,表 2 列出了所用的引物: hIgG1/4Fc-*Sal*I-F(SEQ ID NO:30)和 hIgG1/4Fc-*Not*I-R(SEQ ID NO:31)。分别用 *Eco*RI/*Sal*I 和 *Sal*I/*Not*I 消化两种 PCR 产物,纯化和连接于用 *Eco*RI/*Not*I 消化的 pCI-neo-Ig κ 载体。所得载体命名为 pCI-neo-Ig κ -TMCVH-hFc。

对于轻链嵌合体,设计 *Sal*I 位点不可能不导致 VL- κ C 连接处的两个氨基酸 E105D 和 L106I 改变。用表 2 所示引物 TMC-2206-k5'(SEQ ID

NO:24) 和 TMC2206VL-hKc-*Sal*I(SEQ ID NO:32) 扩增质粒 pIRES-DsRed2-TMC-2206LC 的 2206VL 区产生的 PCR 产物可实现这点。用 *Eco*RI/*Sal*I 消化此 PCR 产物, 在 1%琼脂糖凝胶上分离, 用凝胶提取试剂盒(Qiagen)纯化后与从 IMAGE 克隆#4704496(ATCC)扩增的人 Igκ轻链恒定区连接, 采用的引物为 hKc-*Sal*I-F(SEQ ID NO:33) 和 hKc-*Not*I-R(SEQ ID NO:34)及上述载体 pCL-neo-Igκ。得到的质粒命名为 pCI-neo-Igκ-TMC2206VL-hKc。

为评价 VL-κC 连接处的两个氨基酸改变是否会影响抗体活性, 构建了编码亲代氨基酸序列轻链嵌合质粒的第二种轻链嵌合体。首先, 用引物对 TMC-2206VLwt-hKc-R 与 TMC-2206-k5'(SEQ ID NO: 36 与 24)和引物对 TMC-2206VLwt-hKc-F 与 hKc-*Not*I-R(SEQ ID NO: 35 与 34)分别扩增此 VL 和人 κ 轻链恒定区, 采用上述 pIRES2-DsRed2-Igκ-TMC2206LC 载体作为模板。其次, 用 TMC-2206-k5'(SEQ ID NO:24)和 hKc-*Not*I-R(SEQ ID NO:34)引物进行重叠延伸 PCR(Horton 等, Gene 77(1):61-8(1989))剪接连接这两种产物, 消化最终 PCR 产物并克隆到 pCI-neo-Igκ中。

为了验证所克隆的小鼠-人嵌合抗体的特异性是否与 BHA2.1 杂交瘤分泌的原始单克隆 TMC-2206 抗体相同, 用瞬时转染方法在 293F 细胞中表达此小鼠-人嵌合抗体, 所用转染混合液包含等量的 DNA/OptiMEM 和 293fectin/OptiMEM(Invitrogen)。用预温至室温的 OptiMEM 配制各溶液。DNA/OptiMEM 混合液包含 20 μg 重链(HC)表达质粒、20 μg 轻链(LC)表达质粒和 OptiMEM, 总体积 1.3 mL。293fectin OptiMEM 混合液含 53 μL 293fectin 和 OptiMEM, 总体积 1.3 mL。将 293fectin 混合液加入 DNA 混合液中, 混合, 室温培育 20 分钟。将 2.6 mL 转染混合液加入含 40 mL 293F 培养细胞 (10⁶ 个细胞/mL) 的培养瓶中。37°C, 8% CO₂ 120 转/分钟振荡培养此瓶。3 天后离心细胞悬液并立即加入蛋白 A 亲和层析柱纯化该抗体。浓缩最终产物, 用 SDS-PAGE 分析, 用 Lowry 分析法测定蛋白浓度。

为了验证此纯化的小鼠-人嵌合抗体的结合活性是否与亲代

TMC-2206 抗体相同,检测了纯化的小鼠-人嵌合抗体阻断 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白介导细胞粘附的能力。用含 5mM EDTA 的无 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS 培育,使培养瓶中表达人 $\alpha 2$ 整联蛋白(SEQ ID NO:8)和内源性仓鼠 $\beta 1$ (Symington 等, J Cell Biol. 120(2):523-35.(1993))的 CHO 细胞脱落。然后将细胞离心(1200 转/分钟, 8 分钟, 用 Beckman GH 38 转头),将沉淀重悬浮于 10 mL RPMI-1640。将 30 μL 17 mM CFSE(Molecular Probes, OR)加到此细胞悬液中, 37°C 培育混合物 15 分钟。低速沉淀标记的细胞,重悬浮于 10 mL 含 0.1% BSA 的 RPMI-1640 中进行计数。将细胞浓度调节至 8×10^5 个细胞/mL,暗处保存直到应用。胶原蛋白包被的平板(大鼠尾胶原蛋白 I 型; BD Biosciences)的孔用 100 μL /孔的含 0.1% BSA 的 PBS 封闭,室温培育 30 分钟。将蛋白样品用无血清培养液作系列稀释,取每种抗体系列稀释液各 50 μL 加入胶原蛋白包被板孔中。在孔中加入 50 μL /孔标记的细胞, 37°C 培育此板 1.5 小时。洗涤后,用 0.1% Triton X-100 裂解细胞,用 Victor2 1420 多标记计数仪(Perkin-Elmer)读取荧光强度(激发光 485 nm; 发射光 535 nm)。克隆的 TMC-2206 嵌合抗体是 $\alpha 2\beta 1$ -介导细胞粘附 I 型胶原的强效抑制剂,显示其效力等于 TMC-2206, EC50 值分别为 1.8 nM 比 1.2 nM。在这些实验中,所用的对照 Ig 不能抑制结合,而所用的鼠 TMC-2206 或嵌合抗体在 10^{-11} - 10^{-6} 摩尔浓度范围内检测时显示能抑制结合。

通过例如测定 K_i 值,比较了小鼠-人嵌合抗体与亲代抗体 TMC-2206 对固定的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的亲合性,以了解其与 Eu-标记的 TMC-2206 竞争与 $\alpha 2\beta 1$ -包被板孔结合的能力。首先通过平衡结合测定亲代抗体 TMC-2206 对固定的 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白的亲合性。96 孔微量滴定板的各孔用血小板 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白(用人血小板 $\alpha 2\beta 1$ 定制包被, GTI Inc., WI)包被,然后用脱脂奶粉液封闭。对于结合和竞争试验,采用了荧光标记的 TMC-2206 或同种型对照 IgG 抗体。为用 Eu-N1-ITC 试剂标记抗体,将 TMC-2206 或同种型对照 MOPC-21(Invitrogen)各约 2mg 悬浮在磷酸缓冲盐水(PBS; 1.47 mM KH_2PO_4 、8.1 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4)、138 mM NaCl 和 2.67 mM KCl)中进行透析。在预洗的 MicroSep 浓缩器(30-kDa 截断值,

Pall Life Sciences, 9500 转 / 分钟(7000 x g), JA-20 转头(Beckman Instruments, Inc.)20 分钟 4°C)中浓缩后,用含最终浓度 100 mM NaHCO₃ (pH 9.3)的 PBS 将抗体配成 4.0 mg/mL。将此 mAb/碳酸氢盐混合液(0.250 mL)轻轻混合后加入含 0.2 mg 螯合有 Eu³⁺的 N¹-(对-异硫氰酸基苄基)-二亚乙基三胺-N¹, N², N³, N³-四乙酸(Eu-N1-ITC; Perkin Elmer Life Sciences)的小瓶中, 4°C 不搅拌过夜。将各标记的抗体混合液加入不同的用运行缓冲液(50 mM Tris, pH 7.4 和 138 mM NaCl)预先平衡的 PD-10 柱(GE Biosciences, Piscataway, NJ)中。收集各级分(0.5 mL),采用 SpectraMax 384 吸光平板读数仪检测总蛋白(Bradford 试剂; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),对于镧检测,用 DELFIA 增强溶液(Perkin-Elmer)作 1:10.000 稀释后进行时间分辨荧光检测(TRF),采用 Victor2 多种标记平板读数仪(Perkin Elmer)。合并蛋白和镧标记双阳性级分加入新的 PD-10 柱,收集样品并检测总蛋白和镧含量,用针对标准镧溶液(Perkin-Elmer)的 TRF 校验计算出荧光: 蛋白比例。然后用荧光标记抗体, Eu-TMC-2206 或 Eu-同种型对照 IgG, 10 μL/孔,封闭 α2β1-整联蛋白微量滴定板孔。37°C 培育密封板 1 小时使结合达到平衡后,将各孔 2 μL 样品转移到含 DELFIA 增强溶液(100 μL/孔, Perkin-Elmer)的新孔中检测游离(未结合)的标记物。将增强溶液(100 μL/孔)加到空孔中检测结合的标记物。振摇平板(滴定板振摇速度设置为 5, 室温 5 分钟),用 Victor2 多种标记平板读数仪(Perkin-Elmer Wallac, Boston, MA)读取时间分辨荧光(TRF)强度。用斯卡查德分析计算出的 TMC-2206 的 K_d 值是 0.374 nM。

用与上述相似的试验系统,在存在不同浓度非标记 TMC-2206 抗体或嵌合抗体作为竞争物时,采用 100 pM 的荧光标记 Eu-TMC-2206 测定竞争试验的 K_i 值,分析它们与固定的 α2β1 整联蛋白的相对结合效价。将测试的抗体组合加入 α2β1 整联蛋白包被孔中,测定的浓度范围是 10^{-11} - 10^{-7} M,经特定时间后测定结合的 Eu-TMC-2206 量。用 Prism 软件(GraphPad, Inc.)将抑制曲线与“单位点竞争”模型相拟合获得 IC₅₀ 值,用 Cheng 和 Prusoff(1973)公式和以上的 $K_d = 0.374$ nM 计算出 K_i 值。亲代 TMC-2206

抗体的 K_i 值为 0.22 ± 0.04 nM($n=10$)，相比较野生型(wt)嵌合抗体此值为 0.27 ± 0.07 nM($n=5$)。野生型嵌合抗体的此值与携带了经工程改造 *SalI* 位点引入两个 LC 突变的嵌合抗体相当(K_i 也为 0.27 nM)，证实这些突变不影响活性。在这些实验中，用对照 IgG 或 TMC-2206 检测 BSA 包被的对照孔都没显示任何抗体结合。

实施例 3

设计和制备了 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的特异性人源化抗体。确定克隆的 TMC-2206 抗体重轻链 CDR 区所含残基，如下制备其人源化变体。找出重轻链可变区中在较不可变构架区中的三个超变区。大多数情况下，这些超变区在大小上对应于 CDR，但也可能超出 CDR。表 3 和表 4 分别专门列出了 TMC-2206 重轻链可变区的氨基酸序列。利用通用的同源性检索算法和 NCBI 蛋白质 BLAST 数据库(<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>，Ye 等，Nucleic acids Res., Jul 1: 34(Web Server Issue): W6-9))将通常按照 Kabat (编号系统)说明的 CDR 区和构架区(除 HCDR1 外)与其它 VH 和 VL 区排列对比。按 AbM 定义，HCDR1 为残基 26-35。牛津分子单克隆抗体模型软件(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)(<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>，Martin 等，Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272(1989); Martin 等，Methods Enzymol., 203, 121-153(1991); Pedersen 等，Immunomethods, 1, 126(1992); 和 Rees 等，刊登于 Sternberg M.J.E.(主编)，Protein Structure Prediction, 牛津大学出版社，Oxford, 141-172(1996))将 Kabat 和 Chothia 编号系统联用来定义 CDR。因此重链 CDR 区的定义如下：

HCDR1 氨基酸 26-35

HCDR2 氨基酸 50-65

HCDR3 氨基酸 95-102

类似地，轻链 CDR 区定义如下：

LCDR1 氨基酸 24-34
LCDR2 氨基酸 50-56
LCDR3 氨基酸 89-97

人源化抗体需要保留鼠抗体的结合亲和性。需要选择与鼠抗体具有同源性的受者人分子。优选的受者人部分是人的胚系构架，因为其缺乏体细胞突变可降低其免疫原性程度。然而个体的成熟抗体构架也可用作受者分子。V-BASE 数据库(<http://base.mrc-cpe.cam.ac.uk>)提供了综合的人重轻链胚系序列列表，可用作人胚系序列的来源与 TMC-2206 的 VH 和 VL 区作比较；也可利用 Kabat 数据库(<http://kabatdatabase.com/>，Johnson, G 和 Wu, T.T. (2001), *Nucleic Acids Res.*, 29, 205–206)。

TMC-2206 的 VH 与 V-BASE 数据库中 51 个人胚系序列中的三个人胚系序列 4-59、4-61 和 4-30.4 比对良好，构架 3 中没有序列显示良好拟合。在 4-59 中 CDR H1 和 H2 与 TMC-2206 VH 的 CDR H1 和 H2 长度相同，选择此 4-59(SEQ ID NO:39)作为受者构架。它携带的 CDR H1 和 CDR H2 的标准 1 型结构与 TMC-2206 CDR H1 和 CDR H2 相同。在 VBASE 胚系序列中不包括 VH 的 CDR3 和 FW4 区，因为 CDR3 和构架 4 区部分衍生自各抗体成熟期间发生改变的不同的非毗连基因。可利用抗体 CAA48104 的序列 (NCBI 登录号：gi/33583/emb/CAA48104; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)来提供 CDR3 和 FW 4 序列进行比对，以及提供 FW4 受者分子序列。表 5 中提供了 TMC-2206 VH 与 4-59 和 CAA48104 抗体的 CDR3 和 FW4 区抗体序列的比较。

表 5

名称	FW1	HCDR1	FW2	HCDR2
	-----1-----2-----	----3----	----4-----	5-----6-----
Kabat 编号:	1234567890123456789012345	6789012345	67890123456789	0123456789012345
TMC-2206 (SEQ ID NO: 21)	QVQLKESGPGLVAPSQSLTCTVS	GFSLTNYGIH	WVRQPPGKGLEWL	VIWARGFTNYSALMS
4-59 (SEQ ID NO: 39)	QVQLQESGPGLVKPSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYPNLSLKS

名称	FW3	HCDR3	FW4
	-----7-----8-----9-----	----10-----	-----11--
Kabat 编号:	67890123456789012ABC345678901234	567890ABCDE12	34567890123
TMC-2206 (SEQ ID NO: 21)	RLIITKDNSQSQVFLKMNSLPDSDATYFCAR	ANDGVYYAM--DY	WGQGTSLTVSS
4-59 (SEQ ID NO: 39)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	HNSSSWYGRYFDY	WGQGTSLTVSS
CAA48104 (SEQ ID. 183)		HNSSSWYGRYFDY	WGQGTSLTVSS

胚系序列 A14(SEQ ID NO:37)是 V-BASE 数据库中 38 个人 VL 抗体序列之一，选其作为受者 VL 构架。A14 属于 VK VI 家族，它的 LCDR1 和 LCDR2 分别属于标准的 2 类和 1 类。TMC-2206 LCDR2 也属于 1 类，虽然 TMC-2206 LCDR1 与标准的 1 类结构相似但不相同。胚系 VL 序列延伸入 CDR-L3，因此选择了人 VL FW4 区的额外序列。选出的序列为成熟人抗体的 κ 轻链提供了常用的构架 4 基因(例如 AAB24132, NCBI 登录号 gi/259596/gb/AAB24132; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST)。虽然引入了 *SalI* 位点，在嵌合轻链构建期间发生了两个氨基酸改变(E105D 和 L106I，不影响抗体结合，见以上)，受者人轻链 FW-4 的 106 位已成为异亮氨酸，从而在该人源化变体中引入了一个保守性氨基酸突变(E105D)。表 6 提供了 TMC-2206 VL 与 A14 和 AAB24132 抗体序列 FW4 区的比较。

表 6

名称	FW1	LCDR1	FW2	LCDR2
	-----1-----2---	-----3----	-----4-----	5-----
Kabat 编号:	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
TMC-2206 (SEQ ID NO:19)	QFVLTSQSPAFLSASPGKVTMTC	SANS-SVNYIH	WYQQKSGTSPKKWIY	DTSKLAS
A14 (SEQ ID NO:37)	DVVMTSQSPAFLSVTPGEKVTITC	QASEGIGNYLY	WYQQKPDQAPKLLIK	YASQSIG

名称	FW3	LCDR3	FW4
	---6-----7-----8-----	-9-----	-10-----
Kabat 编号:	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567
TMC-2206 (SEQ ID NO:19)	GVFVRFSGSGSGTSYSLTISMETEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGAGTRVELK
A14 (SEQ ID NO:37)	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGQGTKVEIK
AAB24132 (SEQ ID NO:184)		QQGNTLPWT	FGQGTKVEIK

利用 TMC-2206 VH 和 VL 序列中的 CDR 序列和上述选择的人构架序列制备了 TMC-2206 的人源化变体。为保持 CDR 的正确提呈, 可将受者构架的一些标准残基(参见例如 Chothia 等, 1985, 1992; Queen 等, 1989; Foote 和 Winter, 1992; <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s>)变换成供者鼠标准残基, 此过程称为回复突变 (back-mutation)。表 7 和 8 分别列出了可能影响 CDR 构象和链间堆积 (interchain packing) 的残基, 显示了 TMC-2206 供者 VH 和 VL 残基与对应的受者人构架残基 (粗体斜线表示) 之间的差异。表 8 中以星号标示的 L46 残基在两个 CDR 标准结构提呈和链间堆积中可能起作用。

如表 7 和 8 所示, 有 11 个构架残基影响 CDR 标准提呈, 两个残基影响到链间堆积, 这在 TMC-2206 供者与 A14 和 4-59 受者人胚系序列之间有所不同, 残基 L46 属于这两种范畴。具体说, 这些差异存在于重链的 H37、H48、H67、H71、H73、H78 和 H91 位, 轻链构架可变区的 L2、

L4、L46、L47、L49 和 L71 位。鉴定和选择这些残基作为回复突变的候选残基。

表 7

VL			VH		
Kabat 残基编号#	TMC- 2206	A14 受者抗体	Kabat 残基编号#	TMC- 2206	4-59 受者抗体
2	F	<i>V</i>	2	V	V
4	L	<i>M</i>	47-49	W, L, G	W, <i>I</i> , G
35-36	W, Y	W, Y	67	L	<i>V</i>
46-49	K, W, I, Y	<i>L</i> , <i>L</i> , I, <i>K</i>	69	I	I
64	G	G	71	K	<i>V</i>
66	G	G	73	N	<i>T</i>
68-69	G, T	G, T	78	V	<i>F</i>
71	Y	<i>F</i>	93-94	A, R	A, R
98	F	F	103	W	W

表 8

VL			VH		
Kabat 残基编号#	TMC- 2206	A14 受者抗体	Kabat 残基编号#	TMC- 2206	4-59 受者抗体
34	H	Y	35	H	S
36	Y	Y	37	V	<i>I</i>
38	Q	Q	39	Q	Q
44	P	P	45	L	L
46*	K	<i>L</i> *	47	W	W
87	Y	Y	91	F	<i>Y</i>
89	Q	Q	93	A	A
91	W	G	95	A	H
96	L	L	100c	M	R
98	F	F	103	W	W

*也影响 CDR 构象的突变

在第一个 TMC-2206 的人源化变体中包含了所鉴定的 13 个候选回复突变残基中有 11 个参与正确的标准结构提呈, 2 个参与链间堆积。此外, 人源化 VL 中保留了氨基末端 Q。鼠抗体鉴定中此位置被保留, 因为它在 L2 中毗邻苯丙氨酸, 这是此位罕见的氨基酸。将这些人源化的轻链和重链变体称为 TMC-2206VH1.0 和 TMC-2206VL1.0。通过改变鼠残基回复到

人构架残基来制备其它人源化变体，它们含有较少的回复突变。如此鉴定的构架残基对回复到人残基敏感(就维持抗体效力而言)。在平行研究中，进行了计算机模建以帮助选择能变回人抗体对应残基的候选残基。

利用实施例 1 所述的轻重链嵌合 pCI-neo 表达载体来表达所有的人源化抗体变体。在 1.0 版的人源化 TMC-2206 VH(hVH1.0, SEQ ID NO:40) 和 1.0 版的人源化 VL(hVL1.0, SEQ ID NO:41) 中利用 Vector NT1 软件，掺入了 14 个上述回复突变，翻译产生的核苷酸序列在哺乳动物细胞中表达最优。Retrogen(圣地亚哥，CA)将定制合成的这些序列串联在一个质粒构建体中，克隆到替代小鼠 VH 和 VL 区的亲代 TMC-2206 LC 和 HC 表达载体的 *EcoRI* 和 *SalI* 位点中。具体说，质粒 DNA 经 *EcoRI-SalI* 消化产生了两个大小不同的片段，较大的片段为 hVH1.0，小片段为 hVL1.0。然后将这两个片段克隆到亲代 pCI-TMC-2206 嵌合 LC 和 HC 表达载体的 *EcoRI* 和 *SalI* 位点，分别替代小鼠 VH 和 VL 区，然后分别用 *EcoRI* 和 *SalI* 消化及凝胶纯化从 pCI-neoIgk-TMC2206VG-hFc 和 pCI-neoIgK-TMC-2206VLhkc 产生的大片段。用此策略制备了后续变体。所得质粒包含 Igk 前导序列、优化的 Kozak 翻译启动序列、可变区和人恒定区。

与嵌合抗体和实施例 2 所述的原始 TMC-2206 抗体一起，如上所述检测了具有 1.0 版人源化 TMC-2206 VH(SEQ ID NO:40)和 1.0 版人源化 VL(SEQ ID NO:41)的变体在 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白介导的细胞粘附试验中的活性，和在竞争试验中结合固定的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的活性。人源化原型的 K_i 值是 0.32 nM，与亲代抗体 TMC-2206(0.21 nM)以及嵌合抗体(0.27 nM)测定的 K_i 值相当，表明此第一种人源化抗体保留了结合亲和性。类似地，第一种人源化原型抗体在阻断 $\alpha 2\beta 1$ 介导的细胞粘附胶原蛋白中显示了与 TMC-2206 亲代抗体相当的抑制活性(例如两者的 EC_{50} 均为 1.5 nM)。

利用 1.0 版变体产生的数据，用 PCR 方法制备了一系列回复人 VH 或 VL 构架残基的突变，确定了避免损害原始 TMC-2206 mAb 特异性和亲和性的回复突变(鼠残基)的最小数目。理想的人源化突变体包括保留了亲代

鼠抗体生物学活性并且也含有较少的鼠残基以降低潜在的免疫原性的那些变体。

Sigma-Genosys 合成了各个引物序列，它们的序列列于表 9 中。产生变体所用的引物对和模板见表 10 和 11。用以下条件进行 PCR 反应：引物 1 和 2(0.6 μ M 终浓度)、dNTP(1 mM 终浓度)、DNA 模板(1-10 ng)和 1 单位的 Pfx DNA 聚合酶(Invitrogen, CA)，最终体积一般为 50 μ L。PCR 程序由初始 95°C 变性 2 分钟，然后 30 个循环，每个循环 95°C 30 秒、56°C 45 秒和 68°C 1 分 30 秒组成。最终步骤是 68°C 10 分钟。

表 9

引物名	核苷酸序列 (5' - 3')
hVH3.0-F (SEQ ID NO:42)	AGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTG
hVH3.0-R (SEQ ID NO:43)	GTTCTTGCTGGTGTCCACGCTGATGGTCACGCGGGACATGAGAGCGCTGTT
hVH4.0-F (SEQ ID NO:44)	CCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGTGATATGGGCTCGCGGC
hVH4.0-R (SEQ ID NO:45)	CTCCAGGCCCTTGCTGGAGGCTGGCGTATCCAGTGGATGCCATAGTTGGT
hVL3.0-F (SEQ ID NO:46)	CCCAAGCTCCTGATCTATGACACTTCCAAGCTG
hVL3.0-R (SEQ ID NO:47)	AGTGTCATAGATCAGGAGCTTGGGGCCTGGTCGGGCTTCTG
hVL4.0-F (SEQ ID NO:48)	GACGCGAATTCAGACGTGGTGATGACCCAGTCTCCAGCATTCCTG
hVH2.0-F (SEQ ID NO:49)	GTGACCATCAGCAAGGACAACAGC
hVH2.0-R (SEQ ID NO:50)	GCTGTTGTCCTTGCTGATGGTCACGCGGGACATGAGAGCGCTGTT
hVH5.0-F (SEQ ID NO:51)	ATCGGCGTGATATGGGCTCGCGGCTTC
hVH5.0-R (SEQ ID NO:52)	GCCGCGAGCCCATATCACGCCGATCCACTCCAGGCCCTTGCTGG

引物名	核苷酸序列 (5' - 3')
hVH6.0-F (SEQ ID NO:53)	ATATGGGCTCGCGGCTTCACAAAC
hVH6.0-R (SEQ ID NO:54)	GTTTGTGAAGCCGCGAGCCCATAT
hVH7.0-F (SEQ ID NO:55)	GCCGCGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGCCAACGACGGG
hVH7.0-R (SEQ ID NO:56)	GTAGTACACGGCGGTGTCCGCGGCGGT
hVH8.0-F (SEQ ID NO:57)	ATATCCAATATGGCATCCACTGGGTT
hVH8.0-R (SEQ ID NO:58)	CCAGTGGATGCCATAGTTGGATATGCTAAATCCAGAGACGGTACAGGT
VH12.0-(K71V)-F (SEQ ID NO:97)	GCCTGACCATCAGCGTGGACAACAGCAAGAACCAGGTGAG
VH12.0-(K71V)-R (SEQ ID NO:98)	CTCACCTGGTTCTTGCTGTTGTCCACGCTGATGGTCAGGC
VH13.0-(N73T)-F (SEQ ID NO:99)	CTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAAGAACCAGGTGAGCC
VH13.0-(N73T)-R (SEQ ID NO:100)	GGCTCACCTGGTTCTTGCTGGTGTCTTGCTGATGGTCAG
VH14.0-(V78F)-F (SEQ ID NO:101)	GCAAGGACAACAGCAAGAACCAGTTTAGCCTGAAGCTGAGC
VH14.0-(V78F)-R (SEQ ID NO:102)	GCTCAGCTTCAGGCTAAACTGGTTCTTGCTGTTGTCCTTGC
hVL2.0-R (SEQ ID NO:59)	CAGCTTGGAAGTGTATAGATCAATTTCTTGGGGGCCTGGTCGGG
hVL5.0-F (SEQ ID NO:60)	GACGCGAATTCAGAC TTCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCATTCCTG
hVL6.0-F (SEQ ID NO:61)	GACGCGAATTCACAG TTCGTGATGACCCAGTCTCCAGCATTCCTG
hVL7.0-F (SEQ ID NO:62)	GACGCGAATTCAGACTTCGTGATGACCCAGTCTCCAGCATTCCTG
hVL8.0-F (SEQ ID NO:63)	TTCACCTTCACCATCAGCAGCCTGGAG
hVL8.0-R (SEQ ID NO:64)	CTCCAGGCTGCTGATGGTGAAGGTGAAGTCGGTGCCGCTGCCGCTGCC

引物名	核苷酸序列 (5' – 3')
VH12.0-(K71V)-F (SEQ ID NO:97)	GCCTGACCATCAGCGTGGACAACAGCAAGAACCAGGTGAG
VH12.0-(K71V)-R (SEQ ID NO:98)	CTCACCTGGTTCTTGCTGTTGTCCACGCTGATGGTCAGGC
hLCQ3-F (SEQ ID NO:65)	CCAATCAAGCGTGAACCTACATTCCTGG
hLCQ3-R (SEQ ID NO:66)	CCAGTGAATGTAGTTCACGCTTGATTGGGCGCTGCAGGTGATGGTCAC
Igκ-For (SEQ ID NO:67)	ACTCCTGCTATGGGTACTGCTGC
hIgG1Fc-CH1-R (SEQ ID NO:68)	GAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG
CI-neo-msc3' (SEQ ID NO:69)	TTTCACTGCATTCTAGTTGTGG

表 10

VH 变体	用于片段 1 的 PCR 引物	用于片段 2 的 PCR 引物	用于完整 VH 的 PCR 引物
2.0	Igk-For & hVH2.0-R	hVH2.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
3.0	Igk-For & hVH3.0-R	hVH3.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
4.0	Igk-For & hVH4.0-R	hVH4.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
5.0	Igk-For & hVH5.0-R	hVH5.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
6.0	Igk-For & hVH6.0-R	hVH6.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
7.0	Igk-For & hVH7.0-R	hVH7.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
8.0	Igk-For & hVH8.0-R	hVH8.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
9.0	Igk-For & hVH7.0-R	hVH7.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
10.0	Igk-For & hVH7.0-R	hVH7.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
11.0	Igk-For & hVH2.0-R	hVH2.0-F & hIgG1 Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
12.0	Igk-For & VH12.0-R	VH12.0-F & hIgG1Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
13.0	Igk-For & VH13.0-R	VH13.0-F & hIgG1Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R
14.0	Igk-For & VH14.0-R	VH14.0-F & hIgG1Fc-CH1-R	Igk-For & hIgG1 Fc-CH1-R

表 11

VL 变体	用于片段 1 的 PCR 引物	用于片段 2 的 PCR 引物	用于完整 VL 的 PCR 引物
2.0	Igk-For & hVL2.0-R	hVL2.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'
3.0	Igk-For & hVL3.0-R	hVL3.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'
4.0	N/A	N/A	hVL4.0-F & CI-neo-msc3'
5.0	N/A	N/A	hVL5.0-F & CI-neo-msc3'
6.0	N/A	N/A	hVL6.0-F & CI-neo-msc3'
7.0	N/A	N/A	hVL7.0-F & CI-neo-msc3'
8.0	Igk-For & hVL8.0-R	hVL8.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'
9.0	Igk-For & hVL2.0-R	hVL2.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'
10.0	Igk-For & hVL8.0-R	hVL8.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'
11.0	Igk-For & hVL8.0-R	hVL8.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'
12.0	Igk-For & VL12.0-R	VL12.0-F & CI-neo-msc3'	Igk-For & CI-neo-msc3'

表 12 列出了 VH 变体, 表 13 列出了 VL 变体, 将所选的受者人构架与初始的(1.0)VH 和 VL 变体作比较。表 12 列出的 VH 变体包括: VH1.0(SEQ ID NO:21); hVH2.0(SEQ ID NO:70); hVH3.0(SEQ ID NO:71); hVH4.0(SEQ ID NO:72); hVH5.0(SEQ ID NO:73); hVH6.0(SEQ ID NO:74); hVH7.0(SEQ ID NO:75); hVH8.0(SEQ ID NO:76); hVH9.0(SEQ ID NO:77); hVH10.0(SEQ ID NO:78); hVH11.0(SEQ ID NO:79); hVH12.0(SEQ ID NO:109); hVH13.0(SEQ ID NO:110); hVH14.0(SEQ ID NO:111)。表 13 列出的 VL 变体包括: hVL1.0(SEQ ID NO:41); hVL2.0(SEQ ID NO:80); hVL3.0(SEQ ID NO:81); hVL4.0(SEQ

ID NO:82); hVL5.0(SEQ ID NO:83); hVL6.0(SEQ ID NO:84); hVL7.0(SEQ ID NO:85); hVL8.0(SEQ ID NO:86); hVL9.0(SEQ ID NO:87); hVL10.0(SEQ ID NO:88); hVL11.0(SEQ ID NO:89); hVL12.0(SEQ ID NO:108)。保留的鼠残基用粗体表示。也显示了构建的其它各变体(见以下)。表 12 VH1.0 下方显示的各变体具有与 VH1.0 相同的序列(用划线[-]表示), 除非有特殊的氨基酸替代, 显示了将保留的鼠残基改变为人构架残基。类似地, 表 13 显示的各 VL 变体具有与 VL1.0 变体相同的序列, 除了标出的特定氨基酸替代外。

表 12

名称	FW1	CDR1	FW2	CDR2
Kabat	-----1-----2-----	---3---	---4---	5-----6---
TMC-2206 VH	QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVS	GFSLTNYGIH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWARGFTNYSALMS
4-59 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GGSISSYYWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYYSGSTNYPNPSLKS
hVH1.0	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS	GFSLTNYGIH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWARGFTNYSALMS
hVH2.0	-----	-----	-----	-----
hVH3.0	-----	-----	-----	-----
hVH4.0	-----	-----	-I-----I-	-----
hVH5.0	-----	-----	-----I-	-----
hVH6.0	-----	-----	-----I-	-----
hVH7.0	-----	-----	-----	-----
hVH8.0	-----	---IS---	-----	-----
hVH9.0	-----	-----	-----	-----
hVH10.0	-----	-----	-----	-----
hVH11.0	-----	-----	-----	-----
hVH12.0	-----	-----	-I-----	-----
hVH13.0	-----	-----	-----I-	-----
hVH14.0	-----	-----	-I-----	-----

名称	FW3	CDR3	FW4
Kabat	---7-----8--ABC-----9---	-----10-----	-----11---
TMC-2206 VH	RLIITKDNSQSQVFLKMNSLQPDSSATYFCAR	ANDGVYYAM DY	WGQGTSVTVSS
4-59 VH	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	HNSSSWYGRYFDY	WGQGTSLTVTVSS

名称	FW3	CDR3	FW4
hVH1.0	RLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCAR	ANDGVYYAM DY	WGQGTLLVTVSS
hVH2.0	-V-----	-----	-----
hVH3.0	-V---V-T---F-----	-----	-----
hVH4.0	-----	-----	-----
hVH5.0	-----	-----	-----
hVH6.0	-V-----	-----	-----
hVH7.0	-----Y--	-----	-----
hVH8.0	-----	-----	-----
hVH9.0	---V-----	-----	-----
hVH10.0	-----T-----	-----	-----
hVH11.0	-----F-----	-----	-----
hVH12.0	-----Y--	-----	-----
hVH13.0	-V-----Y--	-----	-----
hVH14.0	-V-----Y--	-----	-----

表 13

名称	FW1	CDR1	FW2	CDR2
Kabat	-----1-----2---	-----3----	-----4-----	5-----
TMC-2206 VL	QFVLTQSPAFLSASPGEKVTMTC	SANSS VNYIH	WYQQKSGTSPKKWIY	DTSKLAS
A14 VL	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC	QASEGIGNYLY	WYQQKPDQAPKLLIK	YASQSIG
hVL1.0	QFVLTQSPAFLSVTPGEKVTITC	SANSS VNYIH	WYQQKPDQAPKWIY	DTSKLAS
hVL2.0	-----	-----	-----L--	-----
hVL3.0	-----	-----	-----LL--	-----
hVL4.0	DV-M-----	-----	-----	-----
hVL5.0	D-----	-----	-----	-----
hVL6.0	---M-----	-----	-----	-----
hVL7.0	D--M-----	-----	-----	-----
hVL8.0	-----	-----	-----	-----
hVL9.0	-----	-----	-----K	-----
hVL10.0	D--M-----	-----	-----L--	-----
hVL11.0	D--M-----	-----	-----	-----
hVL12.0	D--M-----	-----	-----L--	-----

名称	FW3	CDR3	FW4
Kabat	---6-----7-----8-----	-9-----	--10-----
TMC-2206 VL	GVPSRFSGSGSGTSYSLTISMETEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGAGTRVELK
A14 VL	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC	QQGNKHPLT	FGQGTKVEIK
Hv11.0	GVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLEAEDAATYYC	QQWTTNPLT	FGQGTKVEIK
hVL2.0	-----	-----	-----
hVL3.0	-----	-----	-----
hVL4.0	-----	-----	-----
hVL5.0	-----	-----	-----
hVL6.0	-----	-----	-----
hVL7.0	-----	-----	-----
hVL8.0	-----F-----	-----	-----
hVL9.0	-----	-----	-----
hVL10.0	-----	-----	-----
hVL11.0	-----F-----	-----	-----
hVL12.0	-----F-----	-----	-----

TMC-2206 与胚系序列的氨基酸序列排列比对, 显示在初始的人源化 TMC-2206 变体(TMC-2356)中已回复突变为鼠抗体的构架残基聚集成簇。如排列比对所示, 有两个簇位于重链中的 FW2 和 FW3 内, 类似地, 轻链中也有两个簇, 一个位于 FW1, 一个位于 FW2。在感兴趣位点含有回复为人残基突变的两个 hVH 和 hVL 变体是 3.0 和 4.0 变体, 它们被设计用来携带突变簇以利于确定这些感兴趣残基位于的区域(表 12 和 13)。除了表 7 和表 8 中重点标出的 VL 区残基的差异外, VL4.0 的 L1 位改变成人的天冬氨酸, 因为这是人κ轻链的常见残基。以不同 VH/VL 组合将 hVH3.0 和 hVH4.0 重链与 hVL3.0 和 hVL4.0 轻链共同转染, 将得到的抗体与上述 hVH1.0/hVL1.0 抗体通过与未标记的 TMC-2206 单克隆抗体的头对头比较来比较它们对配体的亲和性。表 14 中, 回复为人残基的 1.0 版人源化 VH 或 VL 残基用粗体斜字表示。表 14 括弧中的数字代表与 hVH1.0、hVL1.0 变体相比, 效力变化的倍数。

表 14

VH \ VL	hVH1.0 K_i 值 [nM]	hVH3.0 (H67, H71, H73, H78) K_i 值 [nM]	hVH4.0 (H37, H48) K_i 值[nM]
hVL1.0	0.33	12.0 (36x)	0.44 (1.3x)
hVL3.0 (L46, L47)	0.64 (1.9x)	202 (631x)	1.34 (4.2x)
hVL4.0 (L1, L2, L4)	1.40 (4.2x)	118 (358x)	2.60 (7.9x)

从 K_i 值可证明 VH 3.0 变体中的变化(在 H67、H71、H73 和 H78 处插入了人残基, 命名为 FW-3 簇)导致了含 hVH3.0 的抗体效力大降; 类似地, 降低也见于 hVL4.0 变体(在 L1、L2 和 L4 处插入了人残基, 命名为 FW-1 簇)。例外的是 hVH1.0/hVL3.0 和 hVH4.0/hVL1.0 组合抗体, 当将它们与 hVH1.0/hVL1.0 抗体相比时, 显示效力变化分别为 1.9 和 1.3-倍, 所有其余的组合抗体显示效力降低大于 4 倍(表 14)。这些数据表明 H37(V 变为 I)和 H48(L 变为 I)回复突变两者都是保守性氨基酸变化而良好耐受。与 hVH1.0 变体联合, 鼠残基 L46(K 变为 L)和 L47(W 变为 L)变回人残基的变化可被合理地良好耐受, 但与 hVH3.0 变体联合时对抗体的亲和性有显著的协同性不良影响。

检测人与鼠 VH 和 VL 构架之间存在的残基差异, 表明某些变化是保守性变化。此外, 进行了对鼠 TMC-2206 VH 和 VL、受者人抗体分子和 hVH 1.0 及 hVL 1.0 的三维结构计算机建模。为指导计算机建模, 进行了 BLAST 检索来鉴定与 TMC-2206 VL 和 VH 密切拟合的数据库结构。对 TMC-2206 VL 选择到结构 ISY6.pdb(2.0 Å 分辨), 对 TMC-2206 VH 选择到结构 IGIG.pdb(2.3Å 分辨)。对受者人轻链分子 A14 选择到结构 ICE1.pdb(1.9Å 分辨), 而对受者人 VH 重链分子选择到 4-59, IDN0(2.3Å 分辨)。

模建预测到人源化 VL 1.0 中保留的鼠残基可能接触抗原, 除了两个

(L1 和 L4)位点外。此模建也表明保留的人胚系构架残基不接触 CDR，而保留的鼠构架残基通常在 CDR 周围聚集成簇。

重链可变区中鉴定到模拟的鼠与人 VH 区之间有三个区域不相同。第一个区域是残基 H27-H33，预测其可能接触抗原和 CDR H1。这些残基也可能影响到 VL/VH 界面的角度，对抗原结合有额外的间接作用。第二个区域是 CDR H2 的第一个环，此环可能需要 FW 残基 H71。第三个区域是 CDR H3。

对于轻链区域，也观察到模拟的鼠与人 VL 结构之间有三个区域不相同。第一个结构是 CDR1，在鼠 TMC-2206 VL 中此结构长度多一个残基。鼠 L71 位的 Y(A14 中为 F)可用于容纳此差异。第二个区域是 L40 - L43，与人相比在小鼠是凸出于溶剂中的环，表明人 L40-43 可能有问题，虽然第一种人源化原型抗体的活性证明 hVL1.0 中这些回复突变可被耐受。第三个区域是与鼠结构相比已替代的人构架残基 L55 - L59。预测构架残基 L73(鼠为 L，人为 F)与这种差异有关，虽然在 hVL1.0 中回复突变被耐受。

利用硅片上(in silico)的分析，预测了感兴趣的特定重链残基的结果，总结于下表 15。感兴趣的轻链残基的类似结果列于表 16 中。

表 15

残基	鼠	人	位置	变化类型
H37	V	I	可能在 VH/VL 界面	保守性
H48	L	I	内部，远离结合位点，靠近 H67	保守性
H67	L	V	内部，远离结合位点，靠近 H48	保守性
H71	K	V	CDR H2 残基 H53-55 之后	大
H73	N	T	CDR H2 之后，溶剂化的 (solvated)，靠近 H71	中等
H78	V	F	接触 CDR H1 残基 H34，被包埋	大
H91	F	Y	位于 VH/VL 界面	保守性

表 16

残基	鼠	人	位置	变化类型
L1	Q	D	CDR L3 之后, 溶剂化的	保守性
L2	F	V	与 CDR L3 广泛接触, 部分溶剂化的	大
L4	L	M	CDR L3 之后, 部分溶剂化的	保守性
L46	K	L	位于 VH/VL 界面	大
L47	W	L	VL 内部 CDR L2 之后	大
L49	Y	K	可能直接接触抗原	大
L71	Y	F	CDR L1 之后	保守性

利用硅片上分析, 评估能反映人残基替代导致对抗体性能影响可能性的氨基酸位置, 导致这种影响的位置排序如下: H48, H67 < H37, H91 < H73 < H78, H71。此排序中, 预测 H48 位回复人残基的突变最可能被最好耐受, 而 H78 或 H71 位回复突变预测耐受最差。类似地, 对轻链区内感兴趣位置预测的顺序如下: L1 < L4 < L71 < L2 < L47 < L46 < L49。这些排序通常与用 hVH3.0、hVH4.0 和 hVL4.0 变体获得的 K_i 值相一致。然而, 在对 hVL3.0 变体活性的观察中, 计算机模拟预测的替代效果与用构建的变体观察到的效果之间存在差异。例如, 包含 VH1.0/VL3.0 之间组合的抗体变体产生应有的活性, 虽然以上的计算机数据预测 hVL3.0 变体活性可能大大降低。通过构建其它人源化变体, 包括 8 个 VH 和 6 个 VL 变体(各携带有一个从保留的鼠残基到其相应的人残基的突变), 进一步评估了保留的鼠构架残基的影响。检测了变化对活性的相对贡献。表 12 列出了 VH 变体, 表 13 列出了 VL 变体。

从这些变体获得的 K_i 值表明, 优选保留 H71、H78、L2 和 L46 位的小鼠残基可最大程度保留活性, 而 H37、H48、H67、H91、L1、L4 和 L71

位残基可改变为它们相应的人残基但不导致活性显著丧失。利用计算机模拟, 改变鼠残基 L47(色氨酸, 人抗体此位置罕见的残基)和 H73 预期会影响抗原结合。然而, 如 K_i 测定, 将其改变为人 Val-L47 对抗原结合无明显影响, 改变为 Thr-H73 只导致微小变化(降低 1.6 倍)。通过硅片上模拟预测 L49(酪氨酸)结合抗原, 预测其改变成人赖氨酸可能导致效力的大变化。然而, 该位置改变成人赖氨酸只导致以 K_i 测定的效力降低 3.3 倍。

通过 K_i 测定, 观察到 VH 的 H78 位从鼠的缬氨酸变为人苯丙氨酸的这种改变导致 hVH11.0、hVL1.0 变体的效力与 hVH1.0、hVL1.0 变体相比降低 70 倍。模拟表明此残基对 HCDR1 的标准结构具有作用。这些结果提示, HCDR1 在抗原结合中起作用。为了最大程度保留活性也要保留 H71。用 hVH9.0、hVL1.0 抗体变体, 将此残基从赖氨酸变为缬氨酸导致降低 6.4 倍。此外, 轻链的标准残基中 L2 苯丙氨酸对变化敏感, 证据是用 hVL4.0 变体与 hVL5.0、hVL6.0 和 hVL7.0 变体比较, 观察到结合亲和性显著丧失。计算机模拟表明, 此 Phe-L2 可能广泛接触 LCDR3。对人和鼠抗体数据库的检索表明 L2 位为苯丙氨酸是罕见的, 提示它可能代表体细胞突变而影响到抗原结合。

将上述分析后所选择的耐受回复突变的那些残基组合在 hVH 变体 12.0 至 14.0 和 VL 变体 VL10.0 至 12 中, 将这些变体的活性与原始 TMC-2206 单克隆抗体和鼠-人嵌合 TMC-2206 抗体进行比较。结果表明, hVL 中鼠残基的数目可减少到三个(例如 L2 [Phe]、L46[Lys]和 L49[Tyr])而不会导致这些变体活性的任何丧失。类似地, hVH 中鼠残基的数目可从 7 个减少到 3 个(例如 H71 [Lys]、H73 [Asn] 和 H78 [Val])而不会导致亲和性和效能在统计学意义上的显著改变。这些结果小结于表 17 中。

表 17

VH	VL	回复至人残基的变化	#鼠残基	K_i (nM) 平均值±SD	EC_{50} (nM) 平均值±SD
TMC-2206mAb		N/A		0.22±0.04	1.18±0.35
嵌合抗体		N/A		0.26±0.07	1.66±0.64
1.0	1.0	N/A	14	0.27±0.06	2.70±1.66
1.0	1.0Q	N/A	14	0.35±0.03	3.00±1.20
12.0	10.0	H37, H48, H91, L1, L4, L47	8	0.29±0.05	2.20±0.58
12.0	10.0Q	H37, H48, H91, L1, L4, L47	8	0.31±0.05	2.36±1.06
14.0	10.0	H37, H48, H91, H91, L1, L4, L47	7	0.32±0.07	2.90±2.71
14.0	10.0Q	H37, H48, H91, H91, L1, L4, L47	7	0.29±0.05	2.98±1.98
14.0	12.0	H37, H48, H67, H91, L1, L4, L47, L71	6	0.38±0.10	2.93±1.37
14.0	12.0Q	H37, H48, H67, H91, L1, L4, L47, L71	6	0.33±0.11	2.95±0.32

[用 Dunnett 多重比较检验作 ANOVA 分析, 显示用 TMC-2206 或嵌合抗体无统计学显著差异]

在平行研究中, 构建了这些变体的 LCDR1 中共有糖基化序列改变的同源抗体。去除糖基化位点(NSS 变为 QSS)对开发下游制造和加工工艺可能有用。用表 18 所列的表 9 中提供的引物对, 将 hVL1.0、hVL10.0 和

hVL12.0 变体(hVL1.0Q [SEQ ID NO:90]、hVL10.0Q [SEQ ID NO:91]和 hVL12.0Q [SEQ ID NO:92])中的 N26Q 改变引入相关的变体 VL 中。此 N26Q 改变对任一得到的抗体(如表 17 所示)的活性没有统计学显著影响。虽然野生型 TMC-2206 抗体轻链 CDR 1 上有此糖基化位点,但这些数据表明,此位点对阻断 TMC-2206 抗体功能活性的亲和性看来没有作用。

表 18

VL 变体	用于片段 1 的 PCR 引物	用于片段 2 的 PCR 引物	用于完整 VL 的 PCR 引物
1.0Q	Igk-正向 & hLCQ3-R	hLCQ3-F & CI-neo-msc3'	Igk-正向 & CI-neo-msc3'
10.0Q	Igk-正向 & Hlcq3-R	Hlcq3-F & CI-neo-msc3'	Igk-正向 & CI-neo-msc3'
12.0Q	Igk-正向 & Hlcq3-R	Hlcq3-F & CI-neo-msc3'	Igk-正向 & CI-neo-msc3'

实施例 4

$\gamma 1$ 类人抗体具有结合补体的效应子功能和 Fc 受体介导的功能。本领域技术人员理解此类抗体可避免抗体依赖的细胞毒(ADCC)和补体反应,因为可优选缺乏此种功能的 γ 链,如人 $\gamma 4$ 恒定区。为产生 VH12.0、VL10.0Q 和 VH14.0、VL10.0Q 抗体的 $\gamma 4$ 形式,如下用 VH12.0 和 VH14.0 重链的 $\gamma 4$ 恒定区序列替代它们的 $\gamma 1$ 恒定区序列。 $\gamma 4$ 恒定区序列获自 Genbank 序列 KO1316。如本发明所述用衍生自 IMAGE 克隆 20688 的 $\gamma 1$ Fc 序列产生 IgG1 抗体的完整重链,具有 hVH 和 hVL 区,衍生自 KO1316 序列的 $\gamma 4$ Fc 含有天然存在的 Apa1 限制性位点,靠近可变区与恒定区连接处。利用此位点来克隆 $\gamma 4$ 恒定区以替代 $\gamma 1$ 恒定区。将 BamH1 和 Not1 限制性位点安置在该序列的 3'末端以利于将其亚克隆到 pCI-neo 表达载体中。然后由 Blue

Heron Biotechnology(Bothell, WA)合成 $\gamma 4$ 序列(SEQ ID NO: 105 和 106)作为从头合成基因。Blue Heron Biotechnology 产生的质粒含有从头合成的 IgG4 恒定区, 用 *ApaI* 和 *NotI* 消化后, 凝胶纯化 1kb 的 $\gamma 4$ 恒定区片段, 将其连接入 *ApaI/NotI* 消化的 pCI-VH12.0 和 pCI-VH14.0 质粒中, 以产生编码 VH12.0- $\gamma 4$ 和 VH14.0- $\gamma 4$ 的质粒。将这些质粒各自与 pCI-VL10.0Q 质粒组合转染到 CHO 细胞中。转染后 4 天, 收集培养上清液, 用蛋白 A 亲和层析纯化 VH12.0、VL10.0Q 和 VH14.0、VL10.0Q 抗体的 IgG4 同种型。平行进行这些变体 $\gamma 1$ 构建体的重新瞬时转染。

用酸洗脱和中和后, 用 HPLC 进行分析型分子排阻层析, 表明在蛋白 A 纯化的 IgG4 制品中存在高等寡聚形式抗体。因此通过 Sephacryl S-300 26/60 分子排阻层析进行了二次纯化步骤获得单体组分。为此, 用 660 ml 的 SEC 运行缓冲液(40 mM HEPES、pH 6.5、20 mM L-组氨酸、100 mM NaCl 和 0.02% 吐温 80)预先平衡 Sephacryl S-300 26/60 柱。通过 Superloop(Amersham Biosciences)上样从蛋白 A 柱洗脱的含有蛋白质的合并级分(12.5 ml 注入样品)。收集 SEC 级分(每管 5 ml), 流速 2.0 ml/分钟。合并与单体形式相对应的级分(洗脱峰 168.4 ml), 用 Lowry 试验测定蛋白含量。

示范性 IgG1 抗体具有 hVH 14.0 γ 重链(SEQ ID NO:181)或 hVH12.0 $\gamma 1$ 重链(SEQ ID NO:182)和 hVL10.0Q 轻链(SEQ ID NO:178)。示范性 IgG4 抗体具有 hVH14.0 $\gamma 4$ 重链(SEQ ID NO:174)或 hVH12.0 $\gamma 4$ 重链(SEQ ID NO:176)和 hVL 10.0Q 轻链(SEQ ID NO:178)。检测了纯化的抗体, 在竞争试验中通过 K_i 值比较其效力, 以及在细胞粘附胶原蛋白试验中效力测定表示为 EC_{50} 值。不同变体同种型之间没有观察到显著差异, 在两种试验中, 它们与原始 TMC-2206 mAb 的效力也没有显著差异, 如表 19 所示。

表 19

	同种型	VH	VL	$K_d(\text{nM})$	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$
TMC-2206	IgG1/ κ	鼠	鼠	0.22	1.03±0.29
	hIgG1/ κ	14.0	10.0Q	0.24	1.30±0.10
	hIgG1/ κ	12.0	10.0Q	0.27	2.20±0.12
	hIgG4/ κ	14.0	10.0Q	0.36	2.82±1.04
	hIgG4/ κ	12.0	10.0Q	0.27	1.83±0.27

实施例 5

在小鼠和大鼠炎症腹膜炎模型中研究了抗 $\alpha 2$ 抗体对中性白细胞外渗的影响，腹膜内施用某些抗原，如酪蛋白、角叉菜聚糖或巯基醋酸盐诱导快速肥大细胞应答引起急性腹膜炎反应（Edelson 等，Blood 103(6):2214-2220(2004)）。此种腹膜炎的特征是中性白细胞快速渗入（几小时内）然后巨噬细胞慢性渗入和增殖（3-5 天）。因此，第一次利用此模型评价使用抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在功能上能否阻止或减弱中性白细胞应答反应。

在大鼠和小鼠上建立急性腹膜炎模型。TMC-2206 抗体能识别大鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白，但不能识别小鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白。然而，进行了许多小鼠体内炎症模型，在小鼠急性腹膜炎模型中采用了替代的抗 $\alpha 2$ 抗体 Ha 1/29(Pharminogen, Becton Dickenson, CA, 目录号 559987)。

攻击前 15 分钟经 IV 或 IP 给动物注射抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或同种型对照抗体，剂量范围 0.1 至 10 mg/kg。IP 注射 1 mL 9%酪蛋白(小鼠)或角叉菜聚糖(大鼠)后，将动物放回鼠笼一定时间：3 小时(小鼠)或 5 小时(大鼠)(每组 n=4)。然后用氟烷麻醉动物，用含有 5mM EDTA 的 5ml(小鼠)或 10ml(大鼠)PBS 灌洗腹膜腔。低速离心收集细胞，重悬浮于 5 mL PBS/EDTA，取 100 μ L 等份用显微镜观察，观察到大部分细胞具有与中性

白细胞相符的多形核形态。低速离心剩余悬液中的细胞获得洗涤后的沉淀细胞。

通过测定髓过氧化物酶(MPO)的活性水平定量测定中性白细胞含量(例如 Speyer 等, Am J Pathol. 163(6):2319-28(2003))。将从灌洗液回收的细胞沉淀重悬浮于 500 μ L 含 0.5% 溴化十六烷基三甲基铵(HTAB; Sigma-Aldrich, MI)的 50 mM KH_2PO_4 缓冲液(pH 6.0)中。超声破碎样品 60-90 秒, 4°C 14,000 转/分钟离心 5 分钟。将 50 μ L 样品液转移到微量滴定板孔的 50 μ L HTAB 缓冲液中, 然后将孔中的此液 50 μ L 转移到另 50 μ L 缓冲液中, 如此进行系列稀释, 制备澄清上清液的 2:1 系列稀释液。各样品液中加入 200 μ L 含 0.168 mg/mL 邻联二茴香胺和 0.0005% 双氧水的底物缓冲液(50 mM KH_2PO_4 缓冲液(pH 6.0))启动显色反应, 用设置波长为 460 nm 的 Molecular Devices 平板读数仪监测此反应。然后计算出最初细胞悬液(每只动物 500 μ L 洗涤过的细胞悬液)的酶活性单位数。建立校准曲线来滴定每 ml (血) 中对 MPO 具有活性的中性白细胞数量(直接计数中性白细胞进行评估), 表明在检测范围内 U/ml 与中性白细胞数度/ml 之间为强线性关系。

如表 20 所示, 通过测定腹腔灌洗液中回收的 MPO 总活性显示, 抗小鼠 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白抗体 Ha1/29 和 TMC-2206 对用 9% 酪蛋白攻击小鼠或用 1% 角叉菜聚糖攻击大鼠后中性白细胞渗入腹腔有显著作用。小鼠用 Ha1/29 获得的 ED_{50} 值为 ~ 0.07 mg/kg, 而大鼠用 TMC-2206 获得的 ED_{50} 值为 ~ 5 mg/kg。这种差异部分与抗人 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白抗体对大鼠 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白的亲合性与 Ha1/29 抗体对小鼠 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白的亲合性不同有关, 部分与大鼠和小鼠模型中使用的抗原(分别为角叉菜聚糖与酪蛋白)不同有关。

表 20

	剂量(mg/kg)	MPO 含量(U) 平均值±SEM (n)	
Ha 1/29 小鼠 (9%酪蛋白)	0.0	44.6 ± 10.1 (4)	
	0.05	28.1 ± 3.4 (3)	
	0.1	13.6 ± 0.8 (4)	P<0.01
	0.5	7.3 ± 2.7 (3)	P<0.01
	1.0	7.5 ± 1.6 (4)	P<0.01
TMC-2206 大鼠 (1%角叉菜聚糖)	0.0	362 ± 49 (5)	
	5.0	172 ± 41 (6)	P<0.01
	10.0	136 ± 24 (5)	P<0.01
	15.0	82 ± 18 (6)	P<0.01

实施例 6

研究了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在小鼠炎性肠病模型（硫酸葡聚糖诱导的结肠炎）中的作用。此模型中，通过饮用水施与 5%硫酸葡聚糖钠溶液(DSS)诱导小鼠结肠炎(Elson 等, *Gastroenterology* 109(4):1344-67(1995); Egger B 等, *Digestion* 62(4):240-8(2000))。评估了用抗小鼠 $\alpha 2\beta 1$ -整联蛋白抗体治疗对结肠炎临床体征和症状发展的作用，以及对促炎白细胞渗入结肠的作用。

配对关养体重 16-21 克的 Balb/C 小鼠(Harlan, IN)。施与动物蒸馏水或含 5 %硫酸葡聚糖钠(DSS)(ICN, Irvine, CA)的水；自由饮水 7 天。在此期间小鼠出现腹泻和值得注意的体重减轻。研究设计为 4 组，每组 6 只小鼠；一组为无药对照，一组为 DSS 对照，第 0、2、4 和 6 天二组接受 2 或 5mg/kg 剂量的抗 $\alpha 2$ -整联蛋白抗体 PS/2 腹膜内注射。第 7 天(喂食 DSS 开始后 168 小时)麻醉处死小鼠。称体重观察从开始研究开始以来的变化，测量结肠长度，然后按如下 0 至 2 的等级对腹泻、结肠出血和直肠出血评

分, 2 分为最严重:

直肠出血: 0 分 = 未见出血; 2 分 = 可见出血

粪便稠度: 0 分 = 正常; 1 分 = 松散; 2 分 = 水泻

结肠出血: 0 分 = 未见出血; 2 分 = 可见出血。

然后对结肠作免疫组化检查。从盲肠到直肠小心切下结肠, 用 4% 多聚甲醛(PFA)液 4°C 固定 2 小时, 在 20% 蔗糖液中放置过夜然后用 OCT 冻存化合物液(Tissue Tek)快速冰冻。用 Leica 冰冻切片机切成一系列薄片 (10 μ M 厚), 空气干燥, 用含 3% 山羊血清的 PBS 液封闭 2 小时, 加入一级抗体室温培育过夜。所用的一级抗体包括大鼠抗小鼠 CD11b/mac-1(巨噬细胞和活化的中性白细胞的一种标志, 克隆 M1/70, BD-Pharmingen)、仓鼠抗小鼠 CD3(T 细胞标志, BD-Pharmingen)和克隆 F4/80(巨噬细胞标志, Research Diagnostics, Inc)。洗涤切片, 用相应的 Alexa 488-或 TRITC-标记的二级抗体(Molecular Probes, OR)培育 2 小时, 用 PBS 洗 3 次每次 5 分钟, 用含 DAPI 的 Vectashield 培养基(Vector Labs, CA)包埋。用连接 Spot RT 照相机的 Leica 上视荧光显微镜(Research Diagnostics)观察切片。用 ImagePro 软件(Media Cybernetics, MD), 对每只动物 5 张不同切片共 5 个视野上所选择的感兴趣区域(ROI)中的荧光强度和荧光细胞数进行定量, 观察肠内膜层与肠绒毛尖端之间的区域, 但不观察浆膜表面(自发荧光高)和肠腔。

如表 21 所示, 用抗鼠 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗对逆转喂食 DSS 伴随的体重减轻和粪便稠度具有统计学显著性的剂量效应。两个治疗组(2 mg/kg 和 5 mg/kg)对直肠出血和结肠出血都有显著抑制作用, 但对与结肠炎发展相关的结肠缩短无明显影响。治疗也与白细胞渗出数显著减少相关(数据未显示)。

表 21

	水	DSS		
		盐水	2 mg/kg 抗 $\alpha 2$	5 mg/kg 抗 $\alpha 2$
体重增减(gm)	3.02 ± 1.19	-9.16 ± 0.63	$-0.44 \pm 0.81^{***}$	$-2.30 \pm 0.64^{**}$
结肠长度(cm)	7.43 ± 0.26	5.22 ± 0.17	5.35 ± 0.17	5.32 ± 0.43
直肠出血	0	1.67 ± 0.21	0.83 ± 0.31	0.83 ± 0.31
结肠出血	0	1.0 ± 0.45	0*	0*
粪便稠度	0	1.0 ± 0.0	$0.50 \pm 0.22^*$	$0.17 \pm 0.17^{**}$

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

在另一项研究中, 检测了抗 $\alpha 4$ -整联蛋白抗体(克隆 PS/2; Southern Biotech, AL)、抗 $\alpha 2$ -整联蛋白抗体(克隆 Ha1/29, BD Pharmingen, CA)和抗 $\alpha 1$ -整联蛋白抗体(克隆 Ha8/31; Invitrogen, CA)的效果, 与只用 DSS-处理的小鼠作比较(每组 $n=8$)。抗体的治疗剂量为 5 mg/kg。据报导这些抗整联蛋白功能阻断抗体能缓解实验性结肠炎(Kriegelstein 等, J Clin Invest. 110(12):1773-82(2002); Watanabe 等, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 283(6):G1379-87(2002))。如表 22 所示, 三种抗整联蛋白抗体与结肠缩短的逆转相关, 但只有用抗 $\alpha 2$ 抗体治疗与粪便稠度(腹泻)明显改善相关。抗 $\alpha 2$ 和抗 $\alpha 4$ 抗体治疗均显著改善了结肠出血。此研究中, 抗体治疗对体重减轻均无明显作用。用抗 CD3、F4/80 和抗 Mac1 抗体作间接免疫荧光测定评估固有的 T 细胞、巨噬细胞和中性白细胞数(如上文所述), 如表 23 所示, 三种抗整联蛋白抗体治疗组与盐水对照相比均显示显著降低。这些数据支持以下结论: 在对 DSS 的反应中, 拮抗 $\alpha 2$ -的功能对集聚到炎症结肠中的这些免疫效应细胞的稳态水平具有深刻的作用, 这些变化同时与结肠炎相伴的临床检测结果的改善相关。

表 22

	水	DSS			
临床病征		盐水	抗 $\alpha 2$	抗 $\alpha 1$	抗 $\alpha 4$
体重增减(mg)	7.10±0.70	-1.67± 0.76	-1.10 ± 1.69	-0.43± 1.17	1.62 ± 0.69
结肠长度(cm)	7.43±0.26	4.73 ± 0.16	6.08± 0.25**	5.85±0.22**	5.92± 0.09**
直肠出血	0.0	2.00 ± 0.21	0.50 ± 0.33*	0.50 ± 0.33*	0.83 ± 0.31
结肠出血	0.0	1.5 ± 0.33	0.25± 0.25**	0.75 ± 0.37	0.00**
粪便稠度	0.0	1.0 ± 0.0	0.38± 0.182*	0.63 ± 0.18	0.67 ± 0.21

*p<0.05

**p<0.01

表 23

	水	DSS			
细胞计数		盐水	抗 $\alpha 2$	抗 $\alpha 1$	抗 $\alpha 4$
T 细胞(CD3 阳性细胞)	6.1± 1.5	618±160	211 ± 78*	174± 48**	112 ± 36**
巨噬细胞(F4/80 阳性细胞)	21 ± 3	778 ± 94	298 ± 45**	510 ± 132	328 ± 53**
中性白细胞+巨噬细胞 (CD11b/Mac-1 阳性细胞)	19 ± 5	1937 ± 239	499± 144**	524± 141**	574 ± 192**

*p<0.05

**p<0.01

实施例 7

研究了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体对多发性硬化症的实验性变应性脑脊髓炎

模型(EAE)临床病征和症状的作用。SJL 小鼠注射合成脑源性肽 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 与弗氏佐剂诱导多发性硬化症的 EAE 模型被认为是一种复发-缓解多发性硬化症的预言性的模型 (Encinas 等, J Neurosci Res.45(6):655-69(1996))。

在 4 组小鼠(每组 8 只, 参见图 1)研究中, 两组小鼠在被认为是第一急性期的从疾病症状发作后至第 20 天内, 在第 10、11、12、14、15、18 和 20 天施与 5mg/kg 剂量抗体 (同种型对照抗体, 或抗鼠 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体 Ha1/29)。这是急性期的剂量方案。第 0 天定义为用合成肽 PLP₁₃₉₋₁₅₁ 加弗氏佐剂开始免疫的那天。疾病发作定义为连续体重减轻的第二天。其它两组小鼠以延迟剂量方案施用, 它们接受 5 mg/kg 抗鼠 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体或盐水, 每周 3 次, 从第 18 天至第 36 天, 与第二急性期/第一次复发时间重叠。对小鼠的临床病征和症状评分标准如下:

0.5 分 = 连续两天体重减轻

1 分 = 尾巴软而无力

2 分 = 共济失调

3 分 = 后肢瘫痪

4 分 = 濒死

5 分 = 死亡

如表 24 所示, 用 5 mg/kg 抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体从第一次急性期开始治疗(例如急性治疗)减轻了第一次急性发作的程度也限制了第二次急性发作的程度。第一次急性发作结束后在第 18 天首次施用(例如延迟治疗, 参见图 1), 用 5 mg/kg 抗鼠 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗的小鼠在第一次复发至第 32 天中的临床评分也降低, 此时间点, 两组的疾病评分相似, 见表 24。当小鼠只在如图 2 所示的疾病诱导期内施用, 抗 $\alpha 2$ 整联蛋白 mAb 对 EAE 模型的第一次发作或疾病后续期只有很小疗效或无疗效, 小鼠必然发生疾病与用同种型对照抗体治疗的基本相同。这些结果与前人(Yednock 等, Nature 356(6364):63-6(1992) ; Theien 等, J. Clin. Invest. 107(8):995-1006(2001))在 EAE 模型上用抗 $\alpha 4$ 抗体 PS/2 所得结果相反, 他们用抗 $\alpha 4$ 抗体 PS/2 来支持抗 $\alpha 4$ 抗体那他珠单抗 (natalizumab) 对复发

性多发性硬化症的治疗(Miller 等, N. Engl. J. Med. 348(1):15-23(2003))。这些结果表明, 与 $\alpha 4$ 整联蛋白在神经-炎症疾病中的作用相反, 拮抗该受体可能延迟多发性硬化症相关的急性复发, 而拮抗 $\alpha 2$ 整联蛋白是降低和治疗急性发作(当它们出现时)的有用治疗方法。

表 24

	临床评分	
	研究 1 平均值 $\pm$ SEM(n=6-8)	研究 2 平均值 $\pm$ SEM(n=17-20)
第 15 天		
对照 IgG	1.56 $\pm$ 0.42	2.22 $\pm$ 0.29
抗 $\alpha 2$	1.00 $\pm$ 0.37	0.88 $\pm$ 0.21 (p<0.01)
抗 $\alpha 4$	--	1.64 $\pm$ 0.25
第 20 天		
对照 IgG	1.13 $\pm$ 0.48	1.25 $\pm$ 0.28
抗 $\alpha 2$	0.58 $\pm$ 0.41	0.61 $\pm$ 0.20
抗 $\alpha 4$	--	1.11 $\pm$ 0.22
第 35 天		
对照 IgG	1.13 $\pm$ 0.48	1.49 $\pm$ 0.29
抗 $\alpha 2$	0.33 $\pm$ 0.33	1.08 $\pm$ 0.29
抗 $\alpha 4$	--	1.47 $\pm$ 0.27
第 55 天		
对照 IgG	1.63 $\pm$ 0.63	2.00 $\pm$ 0.28
抗 $\alpha 2$	1.00 $\pm$ 0.59	0.75 $\pm$ 0.31(p<0.001)
抗 $\alpha 4$	--	1.33 $\pm$ 0.35

对获自濒死(第4期)或研究结束时的小鼠脑和脊髓进行组织学分析。用氟烷麻醉濒死期(临床评分4分)小鼠或观察55-60天后的小鼠。给动物输注PBS然后输注4%多聚甲醛液。将脑分成5份纵切厚片,脊髓分成10-12份横切厚片,用石蜡包埋组织,切成4 μ 薄片,用Luxol蓝染色观察髓鞘形成。采用盲法对组织的髓鞘形成、渗入(脑脊膜炎)和血管周围白细胞渗出形成的套(perivascular cuffing)打分。对于脊髓切片评分,将每张脊髓切片分成四个象限:前脊索、后脊索、两个侧索。给含脑脊膜炎、血管周围白细胞渗出形成的套,或脱髓鞘的各象限按病理分类各打1分。确定各病理类型阳性象限的总数,除以切片上的象限总数,再乘以100,得到各病理类型的百分比。如果象限中存在病损也给以阳性评分,计算出病理总评分。

脊髓中观察到显著的脱髓鞘炎症病损,最常见于后脊索和前侧索腹侧神经根区的细小束支。只观察到轻度血管周围白细胞渗出形成的套。脑膜炎和脱髓鞘表明与临床病征强烈相关(r 分别为0.84和0.79),抗 $\alpha 2$ -抗体治疗组的评分明显低(抗 $\alpha 2$ 与对照IgG-治疗组相比,此二参数 $P<0.01$)。这些数据表明,用抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗抑制了与急性发作相关的脑膜炎和脱髓鞘,和/或促进了髓鞘再生和修复。总体效果是改善了临床结局。

进行了另一项研究(每组 $n=17-20$)来比较抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体与抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体PS/2(购自Southern Biotech)的效果,治疗开始于第一次急性发作至出现缓解(第10-20天)。另二组用对照IgG或抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗,从开始缓解(第18天)至第一次复发(第36天)和此病的慢性期开始。抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗再次显示,对神经后遗症(瘫痪)的发生率有显著疗效,在第一次EAE发作及以后的复发期(EAE的慢性期;表24)临床最高平均评分有统计学显著性降低。在疾病的慢性期,延迟的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗对临床评分有轻度缓解效应。第一次施用期间的疾病发生率(抗 $\alpha 2$ 为61%;对照IgG为85%)和慢性期治疗的发病率(抗 $\alpha 2$ 为77%;对照IgG为100%)都是抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体治疗小鼠组低于对照组。在用抗 $\alpha 4$ 治疗的情况下,第一次施用期间疾病发生率(抗 $\alpha 4$ 治疗94%;对照

为 82%)和复发率(抗 $\alpha 4$ 治疗为 89%; 对照为 92%), 抗 $\alpha 4$ 抗体治疗组与对照组结果相似, 然而, 以后复发的程度显著降低。抗 $\alpha 4$ 抗体的这些数据与前人报告的抗 $\alpha 4$ 抗体对 EAE 临床治疗(Theien 等, J. Clin. Invest. 107(8):995-1006(2001))的效果相当。

实施例 8

研究了结合血小板 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白($\alpha 2\beta 1$ 在血小板表面表达)的作用, 包括对血小板功能的影响。进行了不同组试验来研究这些效应。

第一项研究通过检测 P-选择素的上调或血小板 $\alpha IIb\beta 3$ 整联蛋白的激活来评估 TMC-2206 结合是否会导致血小板活化, $\alpha IIb\beta 3$ 整联蛋白的激活采用 $\alpha IIb\beta 3$ 活化特异性抗体如 PAC-1 进行检测。用 21 号针头收集停药至少 10 天的健康供血者前臂静脉血, 注入 1/10 体积的酸化柠檬酸葡萄糖缓冲液(ACD: 85 mM 柠檬酸钠、111 mM 葡萄糖和 71 mM 柠檬酸, 不必调 pH), 如用于制备经洗涤的血小板, 该缓冲液含有 500 ng/mL 前列腺素 I_2 (PGI_2 , Sigma-Aldrich)。室温 $160\times g$ 离心全血 20 分钟, 不扰乱中间的黄色白细胞层而取出富含血小板的血浆(PRP)。用柠檬酸葡萄糖缓冲盐水(CGS; 13 mM 柠檬酸三钠、120 mM 氯化钠和 30 mM 葡萄糖, pH 7.0)和 PGI_2 (500 ng/ml)稀释 PRP 2.5 倍, 室温 $160\times g$ 离心 20 分钟去除污染的白细胞, 从而制备洗过的血小板。收集上清液, $1100\times g$ 离心 10 分钟制备, 将所得的血小板沉淀轻轻重悬浮于 CGS 缓冲液中, 洗涤后用常规蒂罗德 s-Hepes 缓冲液(12 mM $NaHCO_3$ 、138 mM $NaCl$ 、5.5 mM 葡萄糖、2.9 mM KCl 、10 mM HEPES、1 mM $CaCl_2$ 、1 mM $MgCl_2$, pH 7.4)重悬浮。37°C 使血小板恢复 30 分钟。计数洗过的血小板, 然后加入 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 至 1 mM。用类似方法制备洗过的大鼠血小板, 但从腔静脉抽血以最大程度减少抽血过程中血小板被激活。

取 50 μL 新配制的 PRP 与 5 $\mu g/mL$ TMC-2206 或小鼠 IgG 对照抗体一起培育 30 分钟, 洗涤后再与 Alexa-594 标记的山羊抗小鼠抗体在存在或缺乏 Alexa 488-标记的 P-选择素抗体(BD Pharmingen, 目录号 555523)、

Alexa-488 标记的-PAC-1 抗体(BD Pharmingen, 目录号 340507)或 150 ng Alexa-488 标记的血纤蛋白原(Molecular Probes)的情况下室温培育 40 分钟。P-选择素和 PAC-1 是血小板活化的标志物,活化的血小板能结合血纤蛋白原。培育结束时,用 1/10 体积的 4%多聚甲醛固定血小板,用 FACScalibur™ 流式细胞计数仪进行分析。这些实验的结果出乎意料地显示血小板显然能结合 TMC-2206,如在用 TMC-2206 处理的血小板中观察到荧光强度以对数值增加所表明的那样,但这在用对照 IgG 处理的血小板中没有观察到;P-选择素或 PAC1 染色不同时增强,表明 TMC-2206 结合不激活血小板。

下一项研究通过检测胶原蛋白诱导的血小板凝聚,评估了 TMC-2206 结合是否会导致血小板激活。可溶性胶原蛋白是血小板凝聚的强效激动剂,常规用来测量血小板反应性(参见例如 Hemostasis and Thrombosis;(2001), Colman 等编)。用 $\alpha 2$ -敲除小鼠的研究结果提示,这些小鼠的血小板对胶原蛋白有轻度减小的反应(Holtkotter 等, J. Biol. Chem. 277(13):10789-94(2002), E.pub: 2002 年 1 月 11 日; Chen 等, Am. J. Pathol. 161(1):337-344(2002))。为检测 TMC-2206 对血小板的胶原蛋白反应是否有不良作用,用 Bio-data PAR4 集合度计,以经典的光传输激发血凝进行了人和大鼠血小板的凝聚试验。如上所述制备 PRP,将血小板计数调整为 3×10^8 个/mL。在 37°C、5 μ g/mL TMC-2206 存在下,用磁珠将 450 μ L PRP 或洗过的血小板搅拌 1 分钟,然后加入牛皮肤 I 型胶原蛋白(Biodata Corp)启动凝聚。加入蒂罗德缓冲液至终体积 500 μ L 进行洗过的血小板凝聚试验,加入贫血小板血浆(PPP)进行富含血小板血浆 (PRP) 试验。用 500 μ L 蒂罗德缓冲液或 PPP 作为这些试验的空白对照。在微量离心机中 3000 转/分钟离心 5 分钟沉淀 PRP 中的血小板来制备 PPP。在存在或缺乏 TMC-2206 时加入可溶性胶原蛋白后血小板凝聚的速度和程度是可比较的。这些实验的结果显示,在体外用所测试浓度检测时 TMC-2206 与血小板的结合出乎意料地对胶原蛋白诱导的血小板凝聚没有影响。

下一项研究评估了 TMC-2206 结合是否导致血小板减少,这是体内抗

体结合血小板的可能结果(Hansen 和 Balthasar, J Pharmacol Exp Ther. 298(1):165-71(2001))。为检测施与 TMC-2206 后是否发生血小板减少, 通过腹腔注射施与大鼠 10 mg/kg TMC-2206 或施与鼠 IgG 对照。用注射前的尾血测定基线血细胞数。在腹腔注射药物后特定时间点(例如 10、30、60 分钟和 4、24 及 72 小时)采血样, 大鼠不麻醉, 用毛细管眼眶取血。将约 40 μ L 血移入装有 5 μ L ACD 的试管中, 立即取样, 在 Hemavet 血细胞计数器(Drew Scientific)中计数。本研究的结果出乎意料地显示, 施与 5mg/kg 或 10 mg/kg TMC-2206 后, 血小板计数距基线无显著变化。相反, 注射 0.1 mg/kg 的抗另一种血小板受体的抗体(α IIB, 抗 CD41 抗体(BD Pharmingen, CA)), 诱导了血小板减少, 在施与此抗体后 15 分钟血小板计数下降了约 80%。

实施例 9

研究了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体对血小板粘附胶原蛋白包括粘附不同亚型胶原蛋白的作用。 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白是唯一的能结合胶原蛋白的整联蛋白, 虽然它不是唯一的血小板表达的胶原蛋白受体。但是, 如上所述, 尤其血小板激活存在其它机制, 促进其牢固粘附于胶原基质。在本实施例中, 评价了 TMC-2206 抗体阻断血小板(无论是静息的血小板或是以中等血小板激动剂 ADP 激活的血小板)粘附 I、II、III、IV 和 VI 型胶原蛋白的能力。

Immulon II 血小板试验, 采用溶解于 5mM 醋酸至终浓度 1mg/mL 的无泡沫的 I、II、III、VI (Rockland Immunochemical) 和 IV (Sigma, St. Louis, MO) 型胶原蛋白包被孔。用不含 Ca^{++} 或 BSA 而含 2mM/ Mg^{++} 的改良蒂罗德-HEPES 缓冲液洗涤板孔两次, 每孔用 100 μ L 不含 Ca^{++} 而含 2mM/ Mg^{++} 和 0.35 % BSA 的蒂罗德-HEPES 缓冲液封闭。

用人静脉血制备血小板, 包括实施例 8 中所述的 PRP。室温 1100 $\times$ g 离心 10 分钟获得贫血小板的血浆 (PPP)。将获得的血小板沉淀温和重悬浮于 1.0mL 的 CGS (13mM 柠檬酸三钠、120mM 氯化钠和 30mM 葡萄糖、pH = 7.0) 液中, 然后转移到 5ml 圆底管中加入 3 μ L CFSE 贮存液 (53.7

μM 终浓度)轻轻摇晃精确 20 分钟进行标记。标记好的血小板用 CGS 缓冲液稀释和洗涤。将沉淀的血小板重悬浮于 1mL CMFTH 缓冲液 (5mM HEPES、 $\text{pH} = 7.3$ 、12mM 碳酸氢钠、137 mM NaCl、3mM KCl、0.3 mM NaH_2PO_4 、5 mM 葡萄糖和 0.35% BSA) 保存在尽可能的黑暗处。以类似方法制备洗涤的大鼠血小板, 将血液从腔静脉中抽入注射器时, 注射器中含有 500ng/mL PGE1 (ACD 中) 以最大程度减轻抽血时的血小板激活。

将 CFSE 标记的血小板用含 0.35% BSA 的蒂罗德-HEPES 缓冲液稀释成 2.0×10^5 个/ μL 。将标记的血小板 (1.0×10^7 每孔) 加入到含 20 μM ADP 和 0.35% BSA 的蒂罗德-HEPES 缓冲液和不同浓度受试抑制剂的孔中。将含血小板混合物的微量滴定板室温 $550 \times g$ 离心 10 分钟后再于暗室中培育 10 分钟。用蒂罗德-HEPES 缓冲液洗涤各孔。用 Victor2 荧光平板阅读器读取荧光强度。为了确定荧光强度与血小板数之间的关系, 用含 0.35% BSA (不含 Ca^{++} 或 ADP) 的蒂罗德-HEPES 缓冲液将标记的血小板稀释成不同水平后, 加入到包被有 I 型或 IV 型胶原蛋白的孔中, 离心, 检测 CFSE 荧光。如表 25 所示, 在这些静态条件下 TMC-2206 阻断了与胶原蛋白的结合, EC_{50} 为 1.7 nM。用 TMC-2206 与大鼠血小板进行了类似研究。抑制大鼠血小板与大鼠 I 型胶原蛋白结合的 EC_{50} 值为 6.3 nM, 表明与人血小板上的 $\alpha 2\beta 1$ 相比, 大鼠的亲合性改变了约 5 倍。

表 25

胶原蛋白类型	人胶原蛋白来源	ADP 刺激(μ M)	EC50(nM)
I 型	胎盘	0	1.7
		20	9.5
II 型	膝软骨	0	1.9
		20	27
III 型	胎盘	0	1.6
		20	11
IV 型	胎盘	0	10
		20	>1000
VI 型	胎盘	0	2.3
		20	23

如表 25 所示, TMC-2206 是血小板粘附至纤维性胶原蛋白的强效抑制剂, 但对非纤维性 IV 型胶原蛋白效力较弱 (10 nm 比 1-2 nm)。出乎意料的是当存在 ADP 时, 此抗体抑制 (血小板) 结合至纤维性胶原蛋白的效力降低了约 10-20 倍而且不再有效防止 (血小板) 粘附 IV 型胶原蛋白。这些意外发现提示 TMC-2206 和具有 TMC-2206 特异性结合表位的抗体对抑制激活的血小板与纤维型胶质蛋白相互作用的活性较弱, 对抑制 (血小板) 结合内皮管壁的主要胶质蛋白亚型 IV 型胶质蛋白只有很少的作用或没有作用 (在治疗剂量范围内)。

实施例 10

研究了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体对出血时间的作用。本领域技术人员预计到急性损伤后施与抗血小板整联蛋白抗体, 能引起接受此类抗体的对象产生出血疾病和导致其血凝时间延长。为了评价抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体是否提高了

体内出血倾向，检测了 TMC-2206 对大鼠出血时间的影响。

大鼠通过 IP 或 IV 注射 TMC-2206 后 15 分钟后检测出血时间。将没有麻醉的大鼠固定于制动装置中，切断尾端 0.8cm 处以快速引起出血。将鼠尾迅速插入到 37°C 装有 30ml PBS 的烧杯中。记录鼠尾停止出血所需的时间为出血时间。表 26 所示数据表明施与 10 mg/kg 剂量的 TMC-2206 对出血时间无明显影响。

表 26

TMC-2206 剂量 mg/kg	出血时间(n) 分钟
0.0	3.86 ± 0.32 (5)
5.0	4.51 ± 0.32 (4)
10.0	4.62 ± 0.67 (7)

实施例 11

研究了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体在动脉血栓形成模型中的作用。施与能与血小板上的 $\alpha 2\beta 1$ 反应的抗体后另一种可能出现的血液疾病可能是由于不希望有的血小板功能影响出现急性动脉损伤后血栓形成的时间延长。因此，用氯化铁诱导的大鼠动脉血栓形成模型检测抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体例如 TMC-2206。这是已应用的开发抗血栓形成药物的一种标准模型，活性显示为血管壁内皮层接触氯化铁溶液后延迟阻塞(Kurz 等, Thromb Res. 60(4):269-80.(1990); Hoekstra 等, J Med Chem. 42(25):5254-65(1999))。

大鼠尾静脉注射 1-15mg/kg 剂量的 TMC-2206 抗体后约 30 分钟诱导动脉损伤。对于静脉内注射，大多数抗体浓度为 4-5mg/mL 以减少高剂量所需的注射体积。治疗分组为 1.0、2.5、5.0、10.0 和 15 mg/kg TMC-2206，5.0 mg/kg 的对照鼠 IgG1(κ)(克隆 MOPC21)，5.0 mg/kg 的兔多克隆抗 vWF(DAKO)或盐水；每个治疗组 3-4 只动物。

用 60mg/kg 戊巴比妥钠麻醉 220 - 270g 重 Sprague-Dawley 大鼠 (Harlan)。一旦它们达到有效麻醉状态, 暴露颈动脉将其置于一滤纸片 (4mm×5mm) 上, 该滤纸沿 4mm 边缘折叠安置颈动脉为氯化铁 (35%) 浸浴颈动脉提供表面。加入 12 μ L 的 35% FeCl₃ 处理 5 分钟, 随后移去滤纸将 Transonic Systems 公司流动系统(Ithaca, NY)流量探测器放置在颈动脉周围。测定流量 45 分钟。

纪录每组几只动物在施与氯化铁后特定时间点的血液流量平均值和 SEM。与盐水对照组相比, 用所测试的任何剂量的 TMC-2206 没有观察到时间 - 阻塞关系有明显差别, 表明 TMC-2206 施用看来对血栓形成无不良作用。虽然动物之间开始的血液流量值变化非常大, 但 TMC-2206 治疗组施与氯化铁后 10-16 分钟之间的时间 - 阻塞 (各动物之间) 相一致, 与盐水和对照 IgG 处理组非常相似, 它们的平均阻塞时间分别为 12 和 14 分钟。唯一与防止阻塞相关的所测试的处理是阳性对照多克隆抗 vWf 抗体, 在加入氯化铁后长达 45 分钟时间内血流参数没有减少。

实施例 12

研究了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体的结合特性, 包括表位图谱研究, 以表征 $\alpha 2$ 整联蛋白亚基上 TMC-2206 结合位点的性质。能直接结合靶结合位点并起着配体结合直接竞争者作用的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体预计可导致在结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白后, 血小板激活。或者, 与非激活状态 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结合且不导致整联蛋白激活的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体, 可能具类似的血小板非激活状态, 这出乎意料地见于 TMC-2206 抗体。具有与 TMC-2206 相同或相似表位的抗体能抑制白细胞与胶原蛋白的细胞粘附, 因此具有明显的治疗效果, 但不会导致结合并激活 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白可能产生的相关出血并发症。

有人进行了研究以确定 TMC-2206 识别表位是否位于 $\alpha 2$ 整联蛋白亚基的配体结合结构域 I 中, 或是否其仅依赖于完整结构域 I 的存在(Hangan 等, Cancer Res. 56:3142-3149(1996))。在这些研究中, 用 Tuckwell 等, J. Cell Sci. 108(Pt 4):1629-37(1995)所述的改进方法制备了 GST- $\alpha 2$ 结构域 I

融合蛋白。从大约 10^6 个表达人 $\alpha 2$ 整联蛋白的 CHO 细胞分离的 mRNA 克隆得到人 $\alpha 2$ 结构域 I (Symington 等, J Cell Biol. 120(2):523-35.(1993)。细胞先用 Trizol 试剂 (Gibco) 裂解, 然后加入氯仿提取水相, 再加入 0.2 体积的异丙醇离心沉淀收集 RNA, 用无 RNA 酶的水重悬浮。

由 Sigma-Genosys 合成侧接人 $\alpha 2$ 结构域 I 的引物。引物的 5' 和 3' 端通过工程改造分别加入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点使其能将其克隆入 pGEX-2TK 载体 (GE Biosciences) 中。采用标准的 Qiagen 试剂盒, 在一步法 RT-PCR 反应中用引物 *halphaI* F (5'GGGGATCCAGTCCTGATTTTCAGCTCTCAG; SEQ ID NO:117) 和 *halphaI* R (5'GGGAATTCAACAGTACCTTCAATGCTG; SEQ ID NO:118) (参见表 27) 扩增成熟 $\alpha 2$ 整联蛋白亚基的 123 - 346 位氨基酸, 并在氨基末端掺入 *Bam*HI 位点 (在结构域 I 的 124 位残基上游加入 GS) 和加入 EFIVTD 六肽作为 *Eco*RI 克隆位点的一部分直至终止密码子。用琼脂糖凝胶电泳检测为一条条带。用 Qiagen PCR Quick 试剂盒完成 PCR 反应, PCR 产物经限制性酶消化后用标准分子生物学技术克隆到 pGEX-2TK 载体 (Amersham, GE) 中。筛选含有插入物的转化细菌, 用 Beckman-Coulter 的 CEQ 系统对几个克隆进行测序。推导克隆的氨基酸序列与人 $\alpha 2$ 结构域 I 的可获得序列相同 (SEQ ID NO:11, 见表 28 所示)。在 DH5 α 细菌 (Invitrogen) 中扩增含有正确 DNA 插入物的单克隆后, 重新转化入 BL21 电穿孔感受态细菌 (Invitrogen) 中。

表 27

引物名称	核苷酸序列 (5' - 3')
<i>halphaI</i> F (SEQ ID NO:117)	GGGGATCCAGTCCTGATTTTCAGCTCTCAG
<i>halphaI</i> R (SEQ ID NO:118)	GGGAATTCAACAGTACCTTCAATGCTG
<i>malphaI</i> F (SEQ ID NO:121)	GGGGATCCAGTCCAGACTTTCAGTTCTTG
<i>malphaI</i> R (SEQ ID NO:122)	TGGGAATTCAACAGTGCCTTCAATGCTG

引物名称	核苷酸序列 (5' - 3')
ralphal F (SEQ ID NO:123)	GGGGATCCAGTCCAGACTTTTCAGTCGTTGAC
ralphal R (SEQ ID NO:124)	TGGGAATTCTGCCATTTCCATCTGGAAGTTG
halphal I21V F (SEQ ID NO:125)	CAGCCCTGCCCTTCCCTCGTAGATGTTGTGGTTG
halphal I21V R (SEQ ID NO:126)	CAACCACAACATCTACGAGGGAAGGGCAGGGCTG
halphal E44V (SEQ ID NO:127)	CAGTAAAGAATTTTTTGGTAAAATTTGTCAAGG
halphal E44V R (SEQ ID NO:128)	CCTTGACAAATTTTACCAAAAAATTTCTTTACTG
halphal Q48T F (SEQ ID NO:129)	TTTTGGAAAAATTTGTAACAGGCCTGGATATAGGC
halphal Q48T R (SEQ ID NO:130)	GCCTATATCCAGGCCTGTTACAAATTTTTCCGGGG
halphal N67E F (SEQ ID NO:131)	CAGTATGCCAATGAGCCAAGAGTTGTGTTTAAC
halphal N67E R (SEQ ID NO:132)	GTAAACACAACCTCTTGGCTCATTGGCATACTG
halphal V70I F (SEQ ID NO:133)	TGCCAATAATCCAAGAATTGTGTTTAACTTGAAC
halphal V70I R (SEQ ID NO:134)	GTTCAAGTTAACACAATTCTTGGATTATTGGCA
halphal V71I F (SEQ ID NO:135)	CCAATAATCCAAGAGTTATCTTTAACTTGAACAC
halphal V71I R (SEQ ID NO:136)	GTGTTCAAGTTAAAGATAACTCTTGGATTATTGG
halphal T76D F (SEQ ID NO:137)	GTGTTTAACTTGAACGACTATAAAACCAAAGAA
halphal T76D R (SEQ ID NO:138)	TTCTTTGGTTTTATAGTCGTTCAAGTTAAACAC
halphal Y77F F (SEQ ID NO:139)	TTTAACTTGAACACATTTAAAACCAAAGAAGAA
halphal Y77F R (SEQ ID NO:140)	TTCTTCTTTGGTTTTAAATGTGTTCAAGTTAAA
halphal K78E F (SEQ ID NO:141)	AACTTGAACACATATGAAACCAAAGAAGAAATG
halphal K78E R (SEQ ID NO:142)	CATTTCTTCTTTGGTTTCATATGTGTTCAAGTT
halphal Y93H F (SEQ ID NO:143)	TCCCAGACATCCCAACATGGTGGGGACCTCACA

引物名称	核苷酸序列 (5' - 3')
halphal Y93H R (SEQ ID NO:144)	TGTGAGGTCCCCACCATGTTGGGATGTCTGGGA
halphal Y93F F (SEQ ID NO:145)	ACATGGGAGACATCCCAATTTGGTGGGGACCTCACAAAC
halphal Y93F R (SEQ ID NO:146)	GTTTGTGAGGTCCCCACCAAATTGGGATGTCTCCCATGT
halphal Q105E F (SEQ ID NO:147)	TTCGGAGCAATTGAATATGCAAGAAAATATGCC
halphal Q105E R (SEQ ID NO:148)	GGCATATTTTCTTGCATATTCAATTGCTCCGAA
halphal A114Q F (SEQ ID NO:149)	AAATATGCCTATTCACAAGCTTCTGGTGGGCGACGAAGT
halphal A114Q R (SEQ ID NO:150)	ACTTCGTCGCCCACCAGAAGCTTGTGAATAGGCATATTT
halphal A115T F (SEQ ID NO:151)	AAATATGCCTATTCAGCAACTTCTGGTGGGCGACGAAGT
halphal A115T R (SEQ ID NO:152)	ACTTCGTCGCCCACCAGA AGTTGCTGAATAGGCATATTT
halphal A115Q F (SEQ ID NO:153)	AAATATGCCTATTCAGCACAGTCTGGTGGGCGACGAAGT
halphal A115Q R (SEQ ID NO:154)	ACTTCGTCGCCCACCAGACTGTGCTGAATAGGCATATTT
halphal R165D F (SEQ ID NO:155)	GTTCTTGGGTACTTAAACGACAACGCCCTTGATACTAAA
halphal R165D R (SEQ ID NO:156)	TTTAGTATCAAGGGCGTTGTCGTTTAAGTACCCAAGAAC
halphal N166D F (SEQ ID NO:157)	CTTGGGTACTTAAACAGGGACGCCCTTGATACTAAAAAT
halphal N166D R (SEQ ID NO:158)	ATTTTtagTATCAAGGGCGTCCCTGTTTAAGTACCCAAG
halphal E195W F (SEQ ID NO:159)	TTCAATGTGTCTGATTGGGCAGCTCTACTAGAAAAGGCTG
halphal E195W R (SEQ ID NO:160)	CAGCCTTTTCTAGTAGAGCTGCCCAATCAGACACATTGAA
halphal K40D F (SEQ ID NO:161)	ATCCTTGGGATGCAGTAGACAATTTTTTGGAAAAATTT
halphal K40D R (SEQ ID NO:162)	AAATTTTTTCCAAAAAATTGTCTACTGCATCCCAAGGAT
halphal R69D F (SEQ ID NO:163)	CAGTATGCCAATAATCCAGACGTTGTGTTAACTTGAAC
halphal R69D R (SEQ ID NO:164)	GTTCAAGTTAAACACAACGTCTGGATTATTGGCATACTG

引物名称	核苷酸序列 (5' - 3')
halphal N73D F (SEQ ID NO:165)	AATCCAAGAGTTGTGTTTGACTTGAACACATATAAA
halphal N73D R (SEQ ID NO:166)	TTTATATGTGTTCAAGTCAAACACAACCTCTTGGATT
halphal Q89H F (SEQ ID NO:167)	ATGATTGTAGCAACATCCCACACATCCCAATATGGTGGG
halphal Q89H R (SEQ ID NO:168)	ATGATTGTAGCAACATCCCACACATCCCAATATGGTGGG
malphalH93Y F (SEQ ID NO:169)	CACATCTGAGACGCGCCAATATGGTGGGGACCTCACAAAC
malphalH93Y R (SEQ ID NO:170)	GTTTGTGAGGTCCCCACCATATTGGCGCGTCTCAGATGTG

用 IPTG 作为诱导剂，在对数生长期的 BL21 细菌中表达具有人 $\alpha 2$ 结构域 I 的 GST 融合蛋白。诱导约 4 小时后，收集细菌于 50mL 锥底试管中，3000 转 / 分钟离心沉淀。沉淀物用含蛋白酶抑制剂和 1% Triton X-100 的 PBS 重悬浮。超声裂解匀浆 1 分钟后，3000 转 / 分钟离心去除裂解的细胞碎片。按照生产商说明书用谷胱甘肽-琼脂糖珠 (GE-Amersham) 纯化细菌裂解液中的 GST 融合蛋白，纯化蛋白用含 20mM 游离谷胱甘肽的 TBS (pH = 8.0) 洗脱。纯化的 GST- $\alpha 2$ 结构域 I 结合胶原蛋白的特异性与之前报道(Tuckwell 等, J Cell Sci. 108(Pt 4):1629-37(1995))的相同，即对 I 型胶原蛋白的亲合性比 IV 型胶原蛋白高。它结合固定的 TMC-2206 的表观 K_d 值为 0.31nM (ELISA 测定)，与实施例 2 中所述的直接结合研究中观察到的 TMC-2206 结合完整 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的亲合性 0.37nM 相当。然后如实施例 2 所述评价了可溶性 GST- $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白与 Eu-标记的 TMC-2206 竞争结合 $\alpha 2\beta 1$ 包被板孔的能力。发现可溶性 GST $\alpha 2$ 结构域 I 的 K_i 值与非标记 TMC-2206 获得的值相似 (0.18 nM 比 0.28 nM)，表明 TMC-2206 的结合位点位于 $\alpha 2$ 结构域 I 中并且不需要 $\beta 1$ 亚基的存在。

进行实验研究了 TMC-2206 结合的阳离子依赖性。阳离子依赖表明结合部分靶向整联蛋白的二价阳离子结合位点 (MIDAS)，因此起着配体模拟物作用。在正常生理条件下，胶原蛋白结合 $\alpha 2$ 依赖 Mg^{++} ，而将 Mg^{++}

替换为 Ca^{++} 时则不发生结合(Staatz 等, Cell Biol. 108(5):1917-24(1989); Emsley 等, Cell 101(1):47-56(2000))。在这些研究中, 将 GST- $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白固定于 Reacti-Bind 谷胱甘肽包被的微量滴定板(Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL)上, 检测了 Eu-标记的 TMC-2206 在不同阳离子存在条件(无 Ca 和 Mg, Ca^{++} 或 Mg^{++} 的浓度范围在 0.1 μM 至 3 mM)下的结合能力。滴定板每孔用 100 μL GST- $\alpha 2$ I 融合蛋白(2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用无二价阳离子的结合缓冲液(50 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl 和 0.5% 吐温 20)配制)室温培育 1 小时进行包被, 再用无二价阳离子洗涤缓冲液洗涤各孔四次。每孔用 100 μL 封闭缓冲液(含 3.0mg/mL 无 IgG 的 BSA [Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA] 的洗涤缓冲液)室温封闭 1 小时, 用无二价阳离子的洗涤缓冲液洗涤四次, 再用无二价阳离子洗涤缓冲液(每孔 300 μL)室温浸泡 45 分钟。各孔用含目的水平的二价阳离子的洗涤缓冲液(每孔 300 μL)平衡 30 分钟, 再用 41 pM、199pM、345 pM 或 1 nM Eu-标记的 TMC-2206 或对照抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 培育 1 小时。鼠 TMC-2206 抗体以浓度依赖方式结合, 在所有条件下结合效力相似, 表明其结合 $\alpha 2$ 结构域 I 为非阳离子依赖性的, 因此不涉及 MIDAS 位点。Eu-标记的对照 IgG 不结合包被 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的孔, 证实了此种结合的特异性。

进行其它实验研究了 TMC-2206 的结合位点。整联蛋白配体通常具有关键氨基酸能与二价金属离子最终形成螯合键(Haas 和 Plow, Curr. Opin. Cell. Bio. 1994; Lee 等, Structure 1955), 许多整联蛋白拮抗剂具有该特征, 包括抗 $\alpha 1$ 整联蛋白 mAb、AQC2(Karpusas 等, J. Mol. Biol. 2003), 其关键氨基酸是 CDR-H3 中的 D101 残基。类似地, TMC-2206 CDR-H3 的 D100 可能提供了与 $\alpha 2$ MIDAS 的这种相互作用。因此, 制备了两种包含 VH 的鼠变体抗体, 一种携带 D100A 突变, 另一种携带 D100R 突变。在 K_i 测试中评价了它们与 Eu-TMC-2206 竞争结合的能力, 与 TMC-2206 小鼠-人嵌合抗体进行比较。D100A 突变抗体在直至浓度 0.9 μM 时完全无活性, 与小鼠-人嵌合 TMC-2206 抗体相比高出 1600 倍。相反, 如相似的 K_i 值(0.41

nM 比 0.52nM) 所证明的那样, 带相反电荷的突变抗体 D100R 的效力几乎与小鼠-人 TMC-2206 嵌合抗体相当。这提供证据针对 TMC-2206 的 D100 残基在与形成 MIDAS 配体位点的金属离子螯合复合物的对接中起作用。

进行其它实验研究了 TMC-2206 的结合特异性, 包括研究这种鼠单克隆抗体所针对的人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白结构域 I 的表位图谱。TMC-2206 与大鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白有交叉反应, 但与小鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白无交叉反应。因为 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白在物种间有高度同源性, 采用能鉴定那些动物之间交叉反应差异的此抗体, 与不能交叉反应的抗体作比较, 这种方法能鉴定出 $\alpha 2\beta 1$ 中对抗体结合起重要作用的残基 (例如 Champe 等, J. Biol. Chem. 270(3):1388-94(1995); Karpusas 等, J.Mol. Biol. 327(5):1031-41(2003); Bonnefoy 等, Blood 101(4):1375-83)。已分析了 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域 I 单独的晶体结构和与其靶配体胶原蛋白形成的复合物的晶体结构(Emsley 等, J. Biol. Chem. 272(45):28512-7(1997); Emsley 等, Cell 101(1):47-56(2000))。从 Genbank 中获取到人 $\alpha 2$ I (SEQ ID NO:11)、大鼠 $\alpha 2$ I (SEQ ID NO:93) 和小鼠 $\alpha 2$ I (SEQ ID NO:94) 结构域的序列比较见 28 中所示。这种分析显示小鼠结构域 I 包含 14 个与大鼠和人 $\alpha 2$ 结构域 I 均不同的残基 (在表 28 中以粗体和下划线表示)。这些残基可以用于进一步研究 TMC-2206 的结合表位。

表 28

人 $\alpha 2$ I	1 SPDFQLSASF SPATQPCPSL IDVVVVCD ^{ES} NSIYPWDAVK NFLEKFVQGL DIGPTKTQVG
大鼠 $\alpha 2$ I	1 SPDFQSLTSF SPAV----- QDVVVVCD ^{ES} NSIYPWEAVK NFLEKFVQGL DIGPKKTQVA
小鼠 $\alpha 2$ I	1 SPDFQ <u>FL</u> TSF SPAVQACPSL <u>VD</u> VVVVCD ^{ES} NSIYPWEAVK N <u>FLY</u> KFVTGL DIGPKKTQVA
人 $\alpha 2$ I	61 LIQYANNPRV VFNLNTYKTK EEMIVATSQT SQYGGDLTNT FGAIQYARKY AYSAA ^{SG} GRR
大鼠 $\alpha 2$ I	61 LIQYANDPRV VFNLTTYKKNK EDMVQATSET RQYGGDLTNT FKAIQFARDI AYL <u>PES</u> GGRP
小鼠 $\alpha 2$ I	61 LIQYANEPR <u>I</u> <u>IF</u> NLN <u>D</u> <u>FE</u> TK EDMVQATSET RQ <u>H</u> GGDLTNT FRAI <u>E</u> FARDY AYS <u>QT</u> SGGRP
人 $\alpha 2$ I	121 SATKVMVVVT DGESH ^{DG} SML KAVIDQCNHD NILRFGIAVL GYLNRNALDT KNLIKEIKAI
大鼠 $\alpha 2$ I	121 GATKVMVVVT DGESH ^{DG} SKL QTVIQQCNDD EILRFGIAVL GYLNRNALDT KNLIKEIKAI
小鼠 $\alpha 2$ I	121 GATKVMVVVT DGESH ^{DG} SKL KTVIQQCNDD EILRFGIAVL GYLNRNALDT KNLIKEIKAI

人 $\alpha 2I$	181 ASIPTERYFF NVSDEAALLE KAGTLGEQIF SIEGTVQGGD NFQMEM
大鼠 $\alpha 2I$	181 ASTPTERYFF NVADEAALLE KAGTLGEHIF SIEGTVQGGD NFQMEMAQ
小鼠 $\alpha 2I$	181 ASTPTERYFF NVSDEAALLE KAGTLGEQIF SIEGTVQGGD NFQMEMSQ

用实施例 3 所述 PCR 方法将小鼠和大鼠的 GST- $\alpha 2$ 结构域 I 克隆为 GST 融合蛋白以验证各自的结构域 I 是否保留了合适的交叉反应性。以 RT-PCR 法, 用引物 malphaI F(SEQ ID NO:121)和 malphaI R(SEQ ID NO:122)从分离自 Balb/C 小鼠肾的 mRNA 克隆小鼠 $\alpha 2$ 结构域 I, 用引物 ralphaI F(SEQ ID NO:123)和 ralphaI R(SEQ ID NO:124)从分离自 Sprague Dawley 大鼠肾的 mRNA 克隆大鼠 $\alpha 2$ 结构域 I。此外, 从恒河猴和食蟹猴抽取的新鲜血液经低速离心后获得白细胞沉淀, 分别克隆这两种非人灵长类动物的 $\alpha 2$ 结构域 I。然后将白细胞快速冻存于液氮中。分别用 1mL Ttrizol(Invitrogen, Cat#15596-026)裂解总数为 5×10^6 (恒河猴)和 2×10^6 (食蟹猴)个细胞, 如上文所述制备总 RNA。将最终得到的 RNA 重悬浮于 50 μ l DEPC 处理的水中。将此 RNA 作为第一步逆转录 (RT) 的模板。逆转录反应包括 8 μ l 细胞 RNA (恒河猴 mRNA 2.24 μ g, 食蟹猴 mRNA 1.44 μ g)、1 μ l (10mM) DNTP 和 1 μ l (2 μ M) 人结构域 I 正向引物 (GGGGATCCAGTCCTGATTT; SEQ ID NO:119)。将此混合物 65°C 培育 5 分钟后用冰冷却。然后取 5 μ L 此 cDNA 作为 PCR 扩增反应的模板, 扩增反应用人的正向和反向引物(正向: GGGGATCCAGTCCTGATTT, SEQ ID NO:119; 反向: GGAATTCAACAGTACCTT, SEQ ID NO:120)。循环时间为: 94°C 30 秒一个循环; 94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 68°C 1 分钟 40 个循环; 和 68°C 5 分钟一个循环。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 直接从琼脂糖凝胶中纯化预期大小的条带后, 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 消化, 克隆入 PGEX-2TK 载体中的相同位点并转化 BL21 细菌。

分离单菌落并对插入序列测序, 用 Beckman CEQ 8000 DNA 分析仪确认小鼠和大鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 的身份, 以及检测两种猴与人序列的同源性。克隆的小鼠序列显示与保藏的序列 NM_008396.1 的结构域 I 精确相同。类

似地,克隆的大鼠序列与 Genbank 中的大鼠整联蛋白序列 XM_34156.1 相同,除了此克隆序列比保藏序列多含了 6 个残基外,这 6 个残基使大鼠该结构域的 16-21 位残基(完整 $\alpha 2$ 整联蛋白的 139-144 位残基)之间的区域得以准确翻译。此段氨基酸序列 ACPSLV 与小鼠这些位点的残基相同。

在核苷酸水平上,这两种灵长类动物的序列显示与人 $\alpha 2$ 结构域 I 序列高度同源。恒河猴 $\alpha 2$ 结构域 I 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 104) 与人核苷酸序列只有一个核苷酸差异,第 50 个密码子中 CTT 变为 CTG,但是因为两者皆编码亮氨酸,推导的蛋白序列与人相同。食蟹猴 $\alpha 2$ 结构域 I 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 103) 与人相同,除第 40 个密码子从人的 AAG 变为 GAC,导致此位从赖氨酸变为天冬氨酸残基外。但是,进一步的研究表明此核苷酸改变是由于动物种间的非保守多态性所致,因为其它食蟹猴显示与人 $\alpha 2$ 结构域 I 为 100 % 相同(参见实施例 18)。

表达融合蛋白,并用上文所述纯化人 GST- $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白的方法进行纯化。对谷胱甘肽-琼脂糖凝胶柱洗脱物的分析表明此种啮齿类融合蛋白包含聚集形式。因此,通过 FPLC,在 Akta-Basic FPLC 系统 (GE-Amersham) 的交联葡聚糖 75 10/30(GE-Amersham)柱(灵长动物蛋白)上进行分子排阻层析进一步纯化这些蛋白和灵长类融合蛋白以产生单体组分。然后检测 GST 融合蛋白结合固定的 TMC-2206 的能力以及与 Eu-标记的 TMC-2206 竞争结合固定的人 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的能力。如上文实施例 2 所述进行 K_i 测试。为了评价与 TMC-2206 的直接结合,用 50 μ L 含 5 μ g/ml TMC-2206 的碳酸氢盐溶液 (pH = 9.0) 包被 4 个 Immulon 滴定板的孔,4 $^{\circ}$ C 密封滴定板包被过夜。次日早上,用 TBS 溶液洗涤滴定板两次,然后用 200 μ l 上文所述的封闭液室温轻摇封闭 1 小时。封闭后,去除封闭液但不洗涤。而是制备 GST 融合蛋白的系列稀释液,将其加入孔中室温摇动培育 2 小时。吸弃孔中液体后加入 TBS 洗涤缓冲液室温保持 5 分钟。重复洗涤步骤两次然后加入二级抗体。二级抗体步骤包括将 Amersham 的 HRP 缀合的兔抗 GST 抗体用封闭液作 1: 2000 稀释。将 100 μ L 二级抗体液加入各孔室温轻摇培育 1.5 小时。再次吸弃孔中液体,用洗涤缓冲液洗

涤三次后加入底物反应混合液。每孔加入 100 μ L 底物反应混合液 (TMB 试剂盒 1: 1 稀释) 维持 6 分钟。加入 100 μ L 0.1M H₂SO₄ 终止反应。用 Molecular Dynamics 平板读数仪和伴随的 Softmax 软件分别读取板孔中反应液的分光光度吸光值进行定量。用 Prism 软件 (Graphpad, CA) 从 EC₅₀ 值估测 K_d 值。

与人 $\alpha 2$ 相比, 大鼠 $\alpha 2$ I 结合 TMC-2206 的 K_d 相差三倍, 而小鼠 $\alpha 2$ I-GST 融合蛋白在最高浓度时只有少许特异性结合, 表明亲和性差异超过 1500 倍 (参见表 29)。恒河猴 GST- $\alpha 2$ I 显示的亲和性与人 $\alpha 2$ 相当, 而出乎意料的是食蟹猴 GST- $\alpha 2$ I 在浓度高至 1 μ M 时未显示可测及的对 TMC-2206 的亲和性。这些相关浓度范围也在 K_i 测试中见到。食蟹猴结构域 I-GST 融合蛋白对 TMC-2206 缺乏交叉反应性, 表明 K40 残基可能是表位决定簇。克隆的大鼠 GST- $\alpha 2$ I (K_d 为 0.54 nM 和 K_i 值为 3.8 nM) 与人 GST- $\alpha 2$ I 融合蛋白 (K_d 为 0.18 和 K_i 值为 0.33 nM) 相比亲和性的差异, 与 TMC-2206 试验中所见的 EC₅₀ 值差异相符, 如上文实施例 9 所述该试验是比较 TMC-2206 拮抗新鲜的大鼠血小板与人血小板相比较粘附 I 型胶原蛋白的能力。类似地, GST 小鼠 $\alpha 2$ I 融合蛋白对 TMC-2206 缺乏交叉反应性与完整小鼠 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白对该抗体缺乏交叉反应性相符。

表 29

融合蛋白	K _d (nM)	K _i (nM)
人 $\alpha 2$ I	0.18	0.33
大鼠- $\alpha 2$	0.54	3.8
小鼠- $\alpha 2$	ND*	ND*
食蟹猴 $\alpha 2$	<u>ND@40nM</u>	ND*

融合蛋白	$K_d(\text{nM})$	$K_i(\text{nM})$
恒河猴 $\alpha 2$	0.04	4.4
GST	ND*	ND*

*ND 表示高至浓度~1 μM 时不可检测

在其它研究中,用标准的分子生物学方法作 PCR (引物序列见表 30) 分别使克隆的人 $\alpha 2$ 结构域 I-融合蛋白中 14 个残基突变,这 14 个残基对应的小鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 与人和大鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 相比是具有唯一差异的的残基。对单个细菌克隆进行测序以确认在结构域 I 中已掺入了正确的突变。一个需要的变体 G101R 突变体没有产生正确的克隆,因此不作进一步研究。设计的产生 Y93H 突变的引物导致一组克隆携带有 Y93D 替代突变。评价了这两种 Y93 变体。其余克隆的序列都正确。表达获得的蛋白变体并按上文所述野生型人 $\alpha 2$ 结构域 I-GST 融合蛋白的纯化方法进行纯化。然后用三种方法检测它们的活性: 第一,它们结合不同胶原蛋白的相对能力以确定这些突变没有产生大的构象干扰作用而干扰配体结合; 第二,对 TMC-2206 的表观亲和性(用 ELISA 检测与固定 TMC-2206 的直接结合); 第三,在 K_i 测试中作为竞争配体的能力。 K_i 和表观 K_d 数据小结于表 30。

表 30

融合蛋白中的突变	K_d 表观(nM)	$K_i(\text{nM})$
h $\alpha 2$ 结构域 I	0.31	0.18
h $\alpha 2$ 结构域 I I21V	0.28	0.24
h $\alpha 2$ 结构域 I E44V	0.23	0.35
h $\alpha 2$ 结构域 I Q48T	0.19	0.73
h $\alpha 2$ 结构域 I N67E	0.28	0.40

融合蛋白中的突变	K_d 表观(nM)	K_i (nM)
h α 2 结构域 I V70I	0.44	0.86
h α 2 结构域 I V71I	0.19	0.83
h α 2 结构域 I T76D	0.17	0.15
h α 2 结构域 I Y77F	0.22	0.39
h α 2 结构域 I K78E	0.16	0.51
h α 2 结构域 I Y93D	ND@440nM	ND*
h α 2 结构域 I Y93H	6.1	ND*
h α 2 结构域 I Q105E	0.15	0.38
h α 2 结构域 I A114Q	0.19	0.64
h α 2 结构域 I A115T	0.19	0.76

*ND 表示高至浓度 $\sim 1 \mu\text{M}$ 时仍不可检测。

在评价的 13 个残基中，12 个残基变化为鼠对应物对亲和性的影响轻微，但如表 31 所示，Y93 的变化导致亲和性显著丧失。Y93D 突变破坏了其结合抗原的能力，即使在浓度比野生型结构域 I-GST 融合蛋白的 K_d 值高 3-logs 时也如此。突变为鼠组氨酸 (Y93H) 导致对 TMC-2206 抗体的表观亲和性下降 23 倍。两种突变都破坏了 GST-结构域 I 拮抗 Eu-标记抗体结合此抗原的能力。鼠 H93 突变为 Y 赋予了鼠 α 2 结构域 I 结合 TMC-2206 的能力，虽然与野生型人 α 2 结构域 I 相比效力低 200 倍，如表 31 所示。

表 31

融合蛋白中的突变	使用的引物	K_i (nM)
hα2 结构域 I		0.28
hα2 结构域 I E195W	halphaIE195W F(SEQ ID NO:159) halphaIE195W R(SEQ ID NO:160)	12.8
hα2 结构域 I R165D	halphaIR165D F(SEQ ID NO:155) halphaIR165D R(SEQ ID NO:156)	1987
hα2 结构域 I N166D	halphaIN166G F(SEQ ID NO:157) halphaIN166G R(SEQ ID NO:158)	ND
hα2 结构域 I Y93F	HalphaIY93F F(SEQ ID NO:145) halphaIY93F R(SEQ ID NO:146)	ND
hα2 结构域 I K40D	halphaIK40D F(SEQ ID NO:161) halphaIK40D R(SEQ ID NO:162)	ND
hα2 结构域 I N73D	halphaIN73D F(SEQ ID NO:165) halphaIN73D R(SEQ ID NO:166)	2.17
hα2 结构域 I Q89H	halphaIQ89H F(SEQ ID NO:167) halphaIQ89H R(SEQ ID NO:168)	4.46
鼠 α 2I 中的突变		
mα2 结构域 I H93Y	malphaIH93Y F(SEQ ID NO:169) malphaIH93Y R(SEQ ID NO:170)	20.2

比较人 α 2 结构域 I 闭合 (NCBI PDB 入口 1AOX) 和开放时的晶体结构, 配体结合 (PDB 入口 1DZI) 构象显示 Y93 位于结构域 I 的表面 α 7 螺旋之后, 表明在配体结合时经历较大的向下运动(Emsley 等, J. Biol. Chem. 272:28512(1997)和 Cell 100:47(2000)。尽管之前没有鉴定到配体结合的相关构象变化, 但晶体结构的观察表明在闭合构象时 Y93 的芳香环凸出于蛋白表面, 而在开放的配体结合构象时, Y93 向边缘和向下翻转沿结构域 I 表面排列。为了研究 TMC-2206 与 α 2 β 1 整联蛋白结合是否依赖于

给定的构象状态，在结构域 I 中引入突变使结构域 I 倾向开放构象。已报道 E195W 突变（完整 $\alpha 2$ 整联蛋白中的 E318）将 $\alpha 2$ 结构域 I 锁定于开放构象(Aquilina 等, Eur. J. Biochem. 269(4):1136-44(2002))，因此可利用这一点来区分抗体识别是否依赖于激活的构象。此外，晶体图研究显示 E195 与 αC 环中的 R165 残基形成埋藏的盐桥，起着保持 αC 环处于屏蔽配体结合位点的构象的作用(Emsley 等, Cell 100:47(2000))。假定 αC 环在开放位置中为延伸构象，并假定 R165 与毗邻的 R166 残基对结合胶原蛋白都有贡献(Emsley 等, J Biol Chem 272:28512(1997)和 Cell 100:47(2000); Käpylä 等, J Biol Chem 275:3348(2000))。因此，构建了四个突变，E195W 突变；R165D 突变，使所带电荷逆转因而破坏了闭合构象中与 E195W 形成的盐桥；N166D 突变，也逆转 αC 螺旋内所带的电荷。E195W 改变导致如表 31 所示 K_i 值降低了 45 倍，表明 TMC-2206 抗体对闭合构象显示较高亲和性。R165D 和 N166D 改变使结构域 I 丧失结合 TMC-2206 表位的能力，即使在浓度高达 1 μM 时也如此，再次提示 MC-2206 抗体识别闭合构象。

从诱变和构象研究可明白，在闭合构象中 Y93 对 TMC-2206 结合具有重要作用，可能提供了一个种属特异性结合决定簇。用食蟹猴结构域 I 多态性获得的此意外结果表明 K40 残基在抗原-TMC-2206 相互作用中也可能起着重要作用。TMC-2206 的电脑模拟表明诸 CDR 形成了一个相对扁平的结合位点，提示此抗体可产生多点抗原接触。由于 CDR 内的几个残基带有电荷，闭合位置时 Y93 周围的带电残基在开放构象中也显示有显著位置变化，从开放和闭合两种构象的 PDB 结构鉴定到这些残基为 K40、R69、N73 和 Q89。这些残基中的三个所带电荷通因产生以下突变 K40D、R69D 和 N73D 而逆转，第四个残基经修饰产生表 31 所示的 Q89H 变体。此外，使第三个残基 93 变体从酪氨酸变为苯丙氨酸，以判断酪氨酸的芳香族特征是否是重要的结构特征，或活性是否依赖于酪氨酸的芳香族羟基特征。就这组突变为例，用 HPLC 纯化所有突变蛋白以富集从谷胱甘肽-琼脂糖亲和柱获得的单体组分蛋白制品。对每种突变蛋白先评价其结合胶原蛋白的功能。除 R69D 外，所有突变蛋白结合胶原蛋白的 EC_{50} 值都与野生型人 $\alpha 2$

结构域 I 相似。在其它突变蛋白中，导入 K40D 突变破坏了竞争结合 TMC-2206 表位的能力。此结果与显示该残基为多态性（赖氨酸变为天冬氨酸）的克隆的食蟹猴结构域 I 获得的结果相符。同样地，Y93F 突变也破坏了竞争结合 Eu-TMC-2206 的能力。N73D 和 Q89H 突变显示 K_i 值分别降低了 7.8 和 15.9 倍（表 30）。综合这些突变数据，表明 K40、Y93、R165 和 N166 残基可能是 TMC-2206 结合其表位的决定簇，N73 和 Q89 对结合能也有所贡献。

这些数据表明 TMC-2206 抗体及其衍生物和能识别与 TMC-2206 相同或相似表位的 TMC-2206 样（例如 AK47）抗体是 $\alpha_2\beta_1$ 胶原蛋白相互作用的非典型、非配体模拟拮抗剂。该结论得到以下支持：1) 它们以二价阳离子非依赖方式阻断 $\alpha_2\beta_1$ 整联蛋白介导的胶原蛋白粘附的能力，2) 这种抑制不涉及关键的酸性基团如 H-CDR3 中的 D100 与 MIDAS 的相互作用，3) 此抗体所结合的结构域 I 表面远离直接配体结合位点，4) TMC-2206 结合位点喜爱受体的闭合构象，并包含 K40、N73、Q89、Y93、R165 和 N166 氨基酸残基。因此，TMC-2206 和 TMC-2206 样抗体（例如能识别与 TMC-2206 相同或相似表位的抗体）的结合不支持同类胶原蛋白配体被占据时通常发生的整联蛋白介导的外向内信号传递，并且这种结合方式可能对此抗体和 TMC-2206 样抗体不会导致出血有所贡献。

实施例 13

进行试验研究比较其它功能性阻断抗 α_2 整联蛋白抗体与 TMC-2206 的结合。如实施例 12 所述的谱图研究结果表明，TMC-2206 抗体看来是结合 α_2 整联蛋白结构域 I 的闭合构象，和/或不具有配体模拟物的作用。这些出乎意料的结果以及实施例 8、9、10 和 11 与血小板相关的研究中得到的出乎意料的结果证明了 TMC-2206（识别的）表位极其有益，且功能特性与 TMC-2206 类似的抗体极其有用。本发明描述了开发鉴定这种相似抗体的筛选方法，并用这些方法鉴定抗体。

为了确定何者功能性阻断抗 α_2 整联蛋白抗体以相似方式结合

TMC-2206, 进行了一系列交叉竞争试验研究。该研究中, 将市售抗人 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体、人 GST- $\alpha 2$ I 融合蛋白按上文所述固定于微量滴定板孔上。检测抗体分别为 AK7(Mazurov 等, Thromb. Haemost. 66(4):494-9(1991)); P1E6(Wayner 等, J. Cell Biol. 107(5):1881-91(1988)); 10G11(Giltay 等, Blood 73(5):1235-41(1989)) 和 A2-IIIE10(Bergelson 等, Cell Adhes. Commun. 2(5):455-64(1994)), 购自 Chemicon, (Temecula, CA; 目录号 CBL477(AK7); MAB1950(P1E6); MAB1988(10G11)和 Upstate(Waltham, MA; A2-IIIE10, 目录号 05-227)。将待测抗体与表位谱图研究中所用的包被血小板 $\alpha 2\beta 1$ 的同一批微量滴定板一起, 检测它们拮抗 Eu-标记 TMC-2206 结合的能力。在另一组研究中, 检测了此抗体拮抗新鲜分离的静息血小板结合 I 型胶原蛋白的能力。因此, 检测了不同的抗人 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体拮抗 Eu-标记 TMC-2206 抗体结合包被有血小板 $\alpha 2\beta 1$ 的微量滴定板孔的能力, 表示为 K_i 值, 以及在静态条件下拮抗静息血小板粘附 I 型胶原蛋白的能力, 表示为 EC_{50} 值。表 32 所示结果表明, AK7 抗体是 TMC-2206 的有效竞争者。克隆 10G11 清晰显示能与 TMC-2206 双相竞争, 提示它的作用不仅仅是简单的竞争性拮抗剂。A2-IIIE10 阻断血小板粘附与 TMC-2206 相比有 10 倍差异, 但与 Eu-标记的 TMC-2206 竞争能力相差约 350 倍, 再次表明了两种抗体之间没有直接协同作用。P1E6 在二试验中没有显示任何作用, 表明它识别的是激活构象。

表 32

竞争性抗体	K_i (nM)	EC_{50}
TMC-2206	0.11	6
AK7	0.07	
10G11	高亲和性: 0.05 低亲和性: 7.7	>200
A2-IIIE10	29.6	68

竞争性抗体	K_i (nM)	EC ₅₀
P1E6	*[没有竞争]	*[无作用]
对照 IgG	*[没有竞争]	*[无作用]

*在所述试验条件下没有检测到。

这些数据第一次证明不是所有的功能性阻断抗体以同样的方式结合 α_2 整联蛋白, 还显示了具有类似阻断活性的对 TMC-2206 有类似表位特异性的抗体新亚组的鉴定方法。这些数据还证明了这种抗 α_2 抗体新亚组(包括 TMC-2206 和对 TMC-2206 有类似表位特异性的抗体)的特征是意想不到的不会诱发体内出血并发症和/或不激活血小板 $\alpha_2\beta_1$ 整联蛋白。表位特异性、功能性阻断活性和诸如不激活血小板的优点并非是所有抗人 $\alpha_2\beta_1$ 功能性阻断抗体的特征, 而是包括 TMC-2206 及其类似抗体在内的抗体新亚组的新特征, 所述类似抗体包括按本发明所述鉴定和/或选择的 TMC-2206 抗体的衍生物和/或变体。

已证明并非所有能结合 α_2 结构域 I 的功能性阻断抗体都能结合与 TMC-2206 相同或似(例如重叠)的表位。进行了研究以确定鼠效应研究中所用的替代抗体是否具有类似于 TMC-2206 的特性。因为 Ha1/29 抗体与大鼠和小鼠 α_2 整联蛋白有交叉反应, 而 TMC-2206 抗体能结合人和大鼠 α_2 整联蛋白二者, 所以用大鼠 GST 融合蛋白来测定这两种抗体是否能结合重叠的位点(如分享表位特异性)。为此, 将大鼠 GST α_2 结构域 I 融合蛋白固定于 Reacti-Bind 谷胱甘肽包被的微量滴定板孔(Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL)上。先按照实施例 2 所述测定 37°C 时 Eu-TMC-2206 结合固定的人和大鼠 GST- α_2 结构域 I 的 K_d 值。结合与游离 Eu-TMC-2206 的斯卡查德分析表明人 α_2 结构域 I 的 K_d 值为 0.2nM, 大鼠 α_2 结构域 I 的 K_d 值为 1.3nM(低 6 倍)。然后, 按实施例 2 所述, 利用此 K_d 值 1.3 nM, 从所观察的 EC50 值推论 K_i 值, 评价在不同浓度竞争抗体存在下 Eu-标记的 TMC-2206 结合大鼠 α_2 结构域 I 的能力。Eu-TMC-2206

结合的有效拮抗剂是 Ha1/29(Mendrick 和 Kelly, Lab Invest. 69(6):690-702(1993))而不是 HM α 2 抗体(Miyake 等, Eur. J. Immunol. 24:2000-2005(1994)), 表明 Ha1/29 抗体结合位点类似(如重叠)于 TMC-2206 结合位点。

实施例 14

进行另一项试验研究了具有 hVH14.0 γ 4 重链 (SEQ ID NO: 174) 或 hVH12.0 γ 4 重链 (SEQ ID NO: 176) 和 hVL 10.0Q 轻链 (SEQ ID NO: 178) 的示范性 IgG4 抗体。通过检测对胶原蛋白诱导的血小板凝聚的影响, 该试验评价了这些 IgG4 抗体的结合能否导致血小板激活。静脉穿刺肘前血管收集血样品, 弃去最先自然流出的 3ml 血液后将血样收集到含 3.8% 柠檬酸钠的真空管中。所有抗体都用盐水稀释到终浓度 140 μ g/ml。每个一次性使用试管 (含一次性使用电极装置) 可分装 0.5mL 含柠檬酸盐的全血和 0.5mL 盐水或抗体溶液。将每个试管在集合度计 (591A 型, Chrono-Log, Havertown, PA) 的温热孔中 37°C 预热 5 分钟, 然后放入反应孔中, 设定基线, 然后每孔中加入 20 μ l 盐水或胶原蛋白液 (1mg/ml; 马 I 型胶原, Chrono-Log) 诱发凝聚反应。在凝聚期间, 产生血小板累积于电极暴露表面导致电阻升高。通过图表记录器 (707 型, Chrono-Log) 记录 6 分钟内的电阻变化($\Delta\Omega$, 欧姆)数据。

用 Kruskal-Wallis 检验分析所得数据 (表 33), 检测对四组中每组 (盐水或胶原蛋白) 的群体中位数相等的假设, 如果 P 值小于或等于 0.05 时拒绝这种假设 (95% 置信度)。对于盐水组 (P 值 = 0.148), 与盐水阴性对照相比, 同种型对照或两种人源化抗体都不诱导人血小板凝聚。对于胶原蛋白组 (P 值 = 0.201), 与盐水阴性对照相比, 同种型对照和两种人源化抗体都不抑制胶原蛋白诱导的凝聚。该研究和实施例 8 的结果表明, 在所有的体外检测浓度下 TMC-2206 和两种人源化 IgG4 变体抗体的结合对胶原蛋白诱导的血小板凝聚都没有作用。

表 33

激动剂	检测物				P-值
	盐水	hIgG4/ κ	hIgG4/ κ VH14.0/VL10.0Q	hIgG4/ κ VH12.0/VL10.0Q	
盐水	1.0, 2.4, 2.8, 2.8, 2.8, 3.8	2.4, 5.2, 5.6, 5.6	2.2, 3.0, 3.4, 4.2	2.8, 3.6, 3.8, 5.2	0.148
胶原蛋白	17.8, 18.2, 19.4, 20.4, 21.1, 21.6	15.3, 17.2, 18.4	15.0, 15.2, 16.0, 21.8	13.2, 14.8, 18.1, 20.0	0.201

实施例 15

按照实施例 2 所述程序, 用 CHO- $\alpha 2$ 细胞、HT1080(人纤维肉瘤)细胞和人血小板检测人源化 TMC-2206(hIgG4/ κ VH12.0/VL10.0Q)阻断 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白介导细胞粘附 I 型胶原蛋白的能力。人源化 TMC-2206 是细胞结合胶原蛋白的强效抑制剂, 其 EC_{50} 值与 TMC-2206 相当(表 34)。

表 34

I 型胶原蛋白来源	细胞	TMC-2206 $EC_{50}(nm)$ (平均值 $\pm$ SEM)	人源化 TMC-2206 $EC_{50}(nm)$ (平均值 $\pm$ SEM)
大鼠尾	人血小板	3.1 ± 0.3	4.7 ± 0.3
	HT1080	0.90 ± 0.02	0.90 ± 0.27
	CHO- $\alpha 2$	0.58 ± 0.51	1.9 ± 1.5
人胎盘	人血小板(n = 1)	8.44	13.1

实施例 16

评价了人源化 TMC-2206 结合固定于 ELISA 板上的人 $\alpha 1\beta 1$ 整联蛋白的能力。人 $\alpha 1\beta 1$ 整联蛋白(Chemicon International)用包被缓冲液(25 mM Tris、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM $MgCl_2$)稀释成终浓度 $0.5\mu g/ml$ 。96 孔板每孔用 50ng 的 $\alpha 1\beta 1$ 整联蛋白包被, $4^\circ C$ 培育过夜。用洗涤缓冲液(50

mM Tris、pH 7.5、150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、0.5% 吐温 20)洗涤三次，用含 5% (W/V) 脱脂乳的洗涤缓冲液室温封闭 1 小时。人源化 TMC-2206、人 IgG4/κ(同种型对照)、小鼠抗人 α1β1(FB-12, Chemicon International)抗体用结合缓冲液(含 0.1 mg/ml BSA 的无 IgG 洗涤缓冲液)连续稀释。将每孔 50 微升的抗体稀释液加入到 α1β1 整联蛋白包被孔中，室温培育 1 小时后洗涤三次。将缀合碱性磷酸酶的山羊抗人 IgG (二级抗体; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 加入到含同种型对照和人源化 TMC-2206 的孔中; 将缀合碱性磷酸酶的羊抗小鼠 IgG (Sigma) 加入到含 FB-12 的孔中。室温培育 1 小时后洗涤三次，用底物溶液(1 mg/ml 磷酸 4-硝基苯、0.1 M 二乙醇胺、5 mM MgCl₂、pH 9.8)培育 20 分钟后用 NaOH 终止反应。用带 Softmax Pro 软件的 Spectramax Plus 平板读数器读取吸光度。与 TMC-2206 相似，人源化 TMC2206 和 IgG4/κ 抗体不结合 α1β1 整联蛋白。对照抗 α1β1 抗体(FB-12)结合 α1β1 的 EC₅₀ 为 0.79 ± 0.15 nM。

实施例 17

用竞争结合试验测定了 TMC-2206 和人源化 TMC-2206 单克隆抗体结合固定的 α2β1 整联蛋白的 K_D 和 K_i 值。96 孔微量滴定板孔用血小板 α1β1 整联蛋白包被(用人血小板 α2β1 整联蛋白定制包被, GTI Inc., WI 制)后用脱脂乳封闭。用 Eu-N1-ITC 试剂标记人源化抗体，用磷酸盐缓冲液(PBS; 1.47 mM KH₂PO₄、8.1 mM Na₂HPO₄、pH 7.4、138 mM NaCl 和 2.67 mM KCl)重悬浮约 2mg 抗体并进行透析。用预洗过的 MicroSep 离心浓缩器浓缩后(30-kDa 截断值; Pall Life Sciences 9500 转/分钟(7000 x g)和 JA-20 转头(Beckman Instruments, Inc.)) 4°C 离心 20 分钟，用含 100mM NaHCO₃ (pH 9.3) 的 PBS 将抗体浓度调整至 4.0mg/ml。在含 0.2mg 螯合有 Eu³⁺ 的 N¹-(对-异硫氰酸基苄基)-二亚乙基三胺-N¹, N², N³, N³-四乙酸(Eu-N1-ITC; Perkin Elmer Life Sciences)的试管中轻轻加入 MAb/碳酸氢盐混合液(0.250ml)并混合，4°C 静置培育过夜。将此标记的抗体混合物

加到用运行缓冲液(50 mM Tris、pH 7.4 和 138 mM NaCl)预平衡的 PD-10 柱(GE Biosciences, Piscataway, NJ)上。收集各级分(0.5ml),用 SpectraMax 384 吸光度平板阅读器检测总蛋白(Bradford 试剂; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),以 DELFIA 增强液(Perkin-Elmer)1:10.000 稀释后用 Victor2 多种标记平板阅读器(Perkin Elmer)进行时间分辨荧光 (TRF) 检测铕荧光。合并蛋白和铕标记物皆为阳性的级分,上样到新的 PD-10 柱上,收集样品检测总蛋白,用铕标准液(Perkin-Elmer)校正的 TRF 检测铕含量,计算出荧光:蛋白比。然后将 Eu-人源化-TMC-2206 按每孔 10 μ L 体积加入到封闭后的 α 2 β 1 胶原蛋白微量滴定板孔中。密封平板 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时使结合达到平衡后,将 2 μ L 的样品从各孔转移到含 DELFIA 增强液(每孔 100 μ L)的新孔中检测游离(未结合)的标记物。将增强液(每孔 100 μ L)加入到空孔中以测定结合的标记。振荡平板(滴定板振荡器,设定速度为 5,室温 5 分钟),用 Victor2 多种标记平板阅读器读出 TRF 强度。用斯卡查德分析计算出 K_D 值。

通过竞争试验测定的 K_i 值分析对固定 α 2 β 1 整联蛋白的相对结合效应,该试验使用 100pM Eu-人源化-TMC-2206,存在不同浓度的未标记 TMC-2206 抗体或人源化 TMC-2206 作为竞争抗体,所用的试验系统类似于本实施例上文所述。将受试抗体混合液加入到 α 2 β 1 整联蛋白包被孔中,检测浓度范围为 10^{-11} - 10^{-7} M,经特定时间后检测结合的 Eu-人源化-TMC-2206 量。用 Prism 软件(GraphPad, Inc.)将抑制曲线与“单一位点竞争”模式拟合得到 IC_{50} 值,用 Cheng 和 Prusoff 方程式(1973)计算出 K_i 值和从上文中得到各自的 K_D 值。

TMC-2206 和人源化 TMC-2206 的 K_D 和 K_i 值两者之差都在两倍以内(表 35)。因此, TMC-2206 和人源化 TMC-2206 对固定的 α 2 β 1 整联蛋白结合亲和性相似。

表 35

亲和性参数	TMC-2206	人源化 TMC-2206
K_D	$0.72 \pm 0.18 \text{ nm}$	$1.29 \pm 0.17 \text{ nm}$
K_i	$0.21 \pm 0.08 \text{ nm}$	$0.41 \pm 0.06 \text{ nm}$

对 TMC-2206 和人源化 TMC-2206 进行表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 分析, 分别测定对 $\alpha 2$ 结构域 I 的动力学解离常数和结合常数 k_d 和 k_a (也称为 k_{off} 和 k_{on})。SPR 是一种特征分析大分子相互作用的方法, 是一种利用瞬时波现象精确检测极其靠近传感器表面折射率微小变化的光学技术。溶液中的抗原 (例如融合蛋白) 与其 MAb 受体 (固定于芯片传感器表面) 之间的结合导致折射率变化。实时监测这种相互作用, 可高精确度检测结合抗原量以及结合和解离速率常数。用公式: $K_D = k_d/k_a = k_{off}/k_{on}$ 不难计算出平衡解离常数。克隆人 $\alpha 2$ 结构域 I 以及纯化表达的 GST-人 $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白在实施例 12 中已有描述。在 20°C 用带有研究级别 CM5 传感器芯片的 Biacore 2000 光学传感器 (Biacore Life Sciences, Uppsala, Sweden) 进行分析, 用运行缓冲液 (50 mM HEPES、150 mM NaCl、0.25 mM $MgCl_2$ 、0.25 mM $CaCl_2$ 、0.5% 吐温 20、0.1 mg/ml BSA、pH 7.4) 进行平衡。为了将 TMC-2206 捕捉在传感器芯片上, 将两个芯片流动小室表面包被抗小鼠 IgGs; 另外两个流动小室包被蛋白 A 以捕捉人源化 TMC-2206。每轮抗原 (GST-人- $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白) 结合于包被抗小鼠 IgGs 的表面包括三个步骤。在第一步中, TMC-2206 被捕捉于一个抗小鼠 IgG 表面, 然后人源化 TMC-2206 被捕捉于一个蛋白 A 表面 (其它两个表面 (一个为抗小鼠, 另一个为蛋白 A) 作为分析参照)。在第二步中, GST-人- $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白经过注射穿过四个表面。将从反应表面获得的反应 (强度) 减去从参照表面获得的反应强度 (由于抗原和流动缓冲液之间的折射率错配)。在第三步中, 使抗原/抗体复合物从表面脱离使该表面能进行另一轮结合。最高的 GST-人- $\alpha 2$ 结构域 I 融合蛋白浓度为

41nM。抗原溶液以 50 μ l/分钟流经表面 2 分钟，监测从表面解离的抗原 6 分钟。发现检测到的 GST-人- α 2 结构域 I 融合蛋白与 TMC-2206 的结合速率常数和与人源化 TMC-2206 的结合速度常数相似（表 37）。

竞争结合试验和 SPR 分析都证实了人源化过程不影响人源化 TMC-2206 与人 α 2 结构域 I 的结合亲和性。

实施例 18

用生化分析技术评价人源化 TMC-2206 的种间交叉反应。在第一项研究中，通过与铕标记的人源化 TMC-2206 竞争结合 α 2 β 1 包被板（实施例 17）检测了 TMC-2206、人源化 TMC-2206 和不同动物种属的 GST- α 2-结构域 I 融合蛋白的结合亲和性（ K_i 值）。克隆人、恒河猴、大鼠和小鼠的 α 2 结构域 I 在实施例 12 中已有描述。从皮肤组织提取的总 RNA 获得的 cDNA 中克隆了食蟹猴和其它恒河猴的 α 2 结构域 I (MediCorp, Inc., Montreal, QC)。与人 α 2 结构域 I 相比，大鼠 α 2 I 结合人源化 TMC-2206 的 K_i 值低 9 倍，而小鼠 α 2 I-GST 融合蛋白在最高浓度(4 μ M; 表 36)时只表现出轻微特异性结合。[GST-融合蛋白阴性对照和 IgG4/k 同种型阴性对照在 0.4 μ M 浓度时没有显示任何竞争结合效力]。恒河猴、食蟹猴和人 α 2 I-GST 融合蛋白显示可比较的结合。因此，所有四种动物的 α 2 I 都证明与人源化 TMC-2206 有交叉反应。

表 36

竞争抗体	K_i (nM)
TMC-2206	0.14 $\pm$ 0.01
人源化 TMC-2206	0.34 $\pm$ 0.00
GST-人- α 2 结构域 I 融合蛋白	0.57 $\pm$ 0.06
GST-食蟹猴- α 2 结构域 I 融合蛋白	0.47 $\pm$ 0.00
GST-恒河猴- α 2 结构域 I 融合蛋白	0.40 $\pm$ 0.02
GST-大鼠- α 2 结构域 I 融合蛋白	5.23 $\pm$ 0.14
GST-小鼠- α 2 结构域 I 融合蛋白	4.0 μ M 时未检测到

GST 融合蛋白(阴性对照)	0.4 μM 时未检测到
人 IgG4/ κ (阴性同种型对照)	0.4 μM 时未检测到

在第二项研究中,用 SPR 分析评价了 TMC-2206 和人源化 TMC-2206 与选择的 $\alpha 2$ I-GST 融合蛋白的速率和平衡结合常数(表 37)。亲代和人源化 TMC-2206 对人和大鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 的所有的动力学和平衡常数相似。此外,人源化 TMC-2206 对人和食蟹猴 $\alpha 2$ 结构域 I 的速率常数相似。人源化 TMC-2206 在小鼠 $\alpha 2$ I-GST 融合蛋白浓度为 $4.0\mu\text{M}$ 时不与小鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 结合。GST-食蟹猴- $\alpha 2$ -结构域 I 融合蛋白与人源化 TMC-2206 的可比较的结合与实施例 12 结果不一致,在浓度高达 $1\mu\text{M}$ 时未见竞争性结合(表 29)。但对衍生自从猴提取的 mRNA 的 cDNA 种群(Medicorp Inc.)进行的 DNA 序列分析,显示与人 $\alpha 2$ 结构域 I 相比有一个氨基酸(40 位)具有多态性。这种多态性在动物间不保守,因为一只食蟹猴和一只恒河猴显示(此位点为)异态性而其它动物显示与人 $\alpha 2$ 结构域 I 100%同源。本实施例中通过竞争性结合和 SPR 分析研究的 GST-食蟹猴- $\alpha 2$ -结构域 I 编码的序列与人 $\alpha 2$ 结构域 I 相同。这些生化研究证明了人源化 TMC-2206 与人、恒河猴、食蟹猴和大鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 有交叉反应,而与小鼠 $\alpha 2$ 结构域 I 没有交叉反应。进行体外细胞交叉反应研究(实施例 20)证实了人源化 TMC-2206 与不同种动物的血细胞有交叉反应。

表 37

MAb	GST- $\alpha 2$ I 结构域	$k_d(\text{s}^{-1})$	$k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_D(=k_d/k_a;\text{nM})$
TMC-2206	人	$(11.0 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	$(3.8 \pm 0.1) \times 10^5$	2.9 ± 0.1
	大鼠	$(8.2 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(4.2 \pm 0.1) \times 10^5$	2.0 ± 0.1
人源化 TMC-2206	人	$(8.2 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	$(3.5 \pm 0.0) \times 10^5$	2.3 ± 0.1
	大鼠	$(5.7 \pm 0.4) \times 10^{-4}$	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^5$	1.7 ± 0.1

	人	$(2.4 \pm 0.9) \times 10^{-4}$	$(5.8 \pm 0.6) \times 10^5$	4.0 ± 0.1
	食蟹猴	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^5$	5.0 ± 0.1
	小鼠	4.0 μ M 时未检出	4.0 μ M 时未检出	4.0 μ M 时未检出

实施例 19

用流式细胞计数对人源化 TMC-2206 与不同动物血细胞的结合进行研究, 进一步评价了种间交叉反应性。在第一项研究中, 评价了人源化 TMC-2206 与不同种动物血小板的交叉反应性。经静脉刺穿获得人供者、大鼠和恒河猴/食蟹猴的血样品。人血收集于 3.8% 柠檬酸钠中; 恒河猴和食蟹猴血收集于 10mM EDTA 中; 大鼠血收集于肝素中。将灵长类全血(人、恒河猴、食蟹猴)与终浓度 140 μ g/ml 的人源化 TMC-2206 室温共同培育 10 分钟, 然后与小鼠抗人 IgG4 - FITC 缀合的 MAbs (克隆 HP6023, Southern Biotech) 共同培育 10 分钟, 再与缀合荧光分子的物种特异性血小板标记抗体一起培育。人血小板用 PE-缀合的小鼠抗人 CD42b (BD Biosciences) 鉴定, 恒河猴/食蟹猴血小板用 PE-缀合的小鼠抗人 CD41a (BD Biosciences) 鉴定。将大鼠全血与缀合至 Alexa-488 的 500 μ g/ml 人源化 TMC-2206 (Alexa Fluor 488 蛋白标记试剂盒, A10235, Molecular Probes) 室温培育 10 分钟, 然后与 PE 缀合的仓鼠抗小鼠 CD61 (大鼠血小板标记物; BD Biosciences) 共同培育。所有样品洗涤一次后悬浮于磷酸盐缓冲液, 然后进行流式细胞计数分析。(前散射光和侧散射光的门控设置成对数比例以进一步区分血小板与较大的血红细胞和白细胞)。人源化 TMC-2206 能结合所有四种动物的血小板 (表 38)。

在第二项研究中, 评价了人源化 TMC-2206 与不同种动物白细胞的交叉反应。获得同样四种动物的血样品, 但是人血收集于 10mM EDTA 中。将缀合 Alexa488 的人源化 TMC-2206 加入全血中 (终浓度为 225 - 400 μ g/mL), 10 分钟后与标记抗体室温培育 30 分钟。用抗 CD45 抗体染色所有白细胞: 人白细胞用 PE-Cy5 缀合的小鼠抗人抗体 (克隆 H130, BD Biosciences); 恒河猴和食蟹猴白细胞用 PE-Cy5 缀合的小鼠抗人抗体 (克

隆 Tü116, BD Biosciences); 大鼠白细胞用 PE-Cy5 缀合的小鼠抗大鼠抗体(BD Biosciences)。用标记抗体染色血小板: 人血小板用 PE-Cy5-缀合的小鼠抗人-CD42b(BD Biosciences); 恒河猴和食蟹猴血小板用 R-PE-缀合的小鼠抗人-CD41a(BD Biosciences); 大鼠血小板用 R-PE-缀合的仓鼠抗小鼠-CD61(BD Biosciences)。将 1ml 水加入到反应混合物中(约 250 μ l), 室温培育 5 分钟以裂解红细胞, 然后加入 2ml PBS (提高渗透压水平防止白细胞裂解) 并离心。细胞沉淀重悬浮于 0.5ml PBS 进行流式细胞计数分析。[侧散射通道设置为线性比例, CD45 通道设置为对数比例以区分粒细胞、单核细胞和淋巴细胞]。不同水平的内源性血小板激活将导致血小板-白细胞微聚集体形成, 这是鉴定未与血小板(组成型表达 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白)结合的白细胞的关键。因此只评价了 $CD45^+/CD41a^-$ 、 $CD45^+/CD42b^-$ 或 $CD45^+/CD61^-$ 细胞与人源化 TMC-2206 的结合。人源化 TMC-2206 能结合所有四种动物的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞(表 38)。

这些结果与实施例 19 中的人源化 TMC-2206 能与人、恒河猴、食蟹猴和大鼠 GST- $\alpha 2$ -结构域 I 融合蛋白交叉反应(通过 K_i 和 SPR 分析)的结果相符。大鼠血细胞与人源化 TMC-2206 结合的百分率相对灵长类血细胞较低。在上文的三项研究中(实施例 9、19 和 12), 亲代和人源化 TMC-2206 抗体对大鼠 $\alpha 2$ 整联蛋白亚基的结合亲和性比对人 $\alpha 2$ 亚基的结合亲和性低一个数量级。在实施例 9 的第一项研究中, TMC-2206 抑制大鼠血小板和人血小板结合大鼠胶原蛋白 I 型的 EC_{50} 值分别为 6.3 nM 和 1.7 nM。在实施例 19 的第二项研究中(表 38), 竞争者 GST-人- $\alpha 2$ -结构域 I 和 GST-大鼠- $\alpha 2$ -结构域 I 融合蛋白抑制人源化 TMC-2206 结合固定的 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的 K_i 值分别为 0.57 nM 和 5.23 nM。类似地, 在实施例 12 的第三项研究中(表 29), GST-人- $\alpha 2$ -结构域 I 和 GST-大鼠- $\alpha 2$ -结构域 I 融合蛋白抑制 TMC-2206 结合 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白的 K_i 值分别为 0.33 nM 和 3.8 nM。此外, 在血小板和白细胞的研究中, 所有细胞样品在作流式细胞计数分析前进行了洗涤, 从低亲和性的大鼠 $\alpha 2$ 亚基上洗脱下来的人源化 TMC-2206 多于从灵长类 $\alpha 2$ 亚基上洗脱下来的。结合前面的结果, 导致与

灵长类血细胞相比，大鼠血细胞的较低百分率被评为“阳性”（假设 $\alpha 2\beta 1$ 受体的密度相似）。综上所述，四种测试动物（人、恒河猴、食蟹猴和大鼠）的血小板、淋巴细胞、单核细胞和粒细胞都能结合人源化 TMC-2206 抗体。

表 38

物种	N	细胞结合百分率(平均值 $\pm$ SEM)			
		血小板	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞
人	3	94.5 $\pm$ 0.9	63.7 $\pm$ 8.9	78.6 $\pm$ 9.1	75.5 $\pm$ 9.3
恒河猴	4	97.2 $\pm$ 0.0	72.3 $\pm$ 9.7	90.4 $\pm$ 4.9	95.3 $\pm$ 2.2
食蟹猴	4	96.5 $\pm$ 0.3	73.5 $\pm$ 12.1	87.4 $\pm$ 7.0	95.2 $\pm$ 3.0
大鼠	3	21.5 $\pm$ 2.3	38.2 $\pm$ 1.7	37.4 $\pm$ 1.6	43.2 $\pm$ 2.1

实施例 20

在另一项研究中用流式细胞计数检测评价了人源化 TMC-2206 与 $\alpha 2\beta 1$ 结合能否导致血小板激活。衡量血小板激活是 P-选择素上调或 GPIIb/IIIa(α IIb β 3)整联蛋白激活。静脉穿刺从肘前静脉收集血样品，弃去最先自然流出的 3ml 血液后，将血样品收集入含 3.8% 柠檬酸钠的真空试管中。全血用 TBS(pH 7.4)作 1:10 稀释，然后在室温下分别与盐水、IgG4/ κ 同种型对照（终浓度 132 μ g/ml）、或人源化 TMC-2206（终浓度 144 μ g/ml）培育 10 分钟。对血小板激活，将凝血酶受体激活肽-6(TRAP-6，终浓度 10 μ M；AnaSpec Inc., San Jose, CA)或腺苷二磷酸(ADP，终浓度 20 μ M；Sigma)加入样品室温培育 5 分钟。细胞与标记抗体培育后进行流式细胞计数：用 PE-Cy5-缀合的小鼠抗人-CD42b(BD Biosciences)染色血小板；用 PE 缀合的小鼠抗人-CD62b(BD Biosciences)染色 P-选择素；用 FITC-缀合的 PAC-1(BD Biosciences)染色激活的 GPIIb/IIIa(PAC-1 结合 GPIIb/IIIa 整联蛋白的活化构象)。每份样品的取样误差率低于 5%（95% 置信水平）。

第一个实验通过检测 P-选择素上调评价了人源化 TMC-2206 的结合是

否导致血小板激活。评分激活采用 P-选择素标记抗体(CD62P)染色血小板(CD42b+)的百分率(表 39)。通过 ANOVA 分析(单向 ANOVA, 95%置信区间), 与盐水、IgG4/κ 同种型对照和人源化 TMC-2206 共培育的血小板的 P-选择素表达没有统计学差异 ($P=0.96$)。因此, 人源化 TMC-2206 与血小板结合不会导致血小板激活。在平行试验中, TRAP-6 诱导 P-选择素表达明显升高。与盐水或同种型对照相比, 加入人源化 TMC-2206 在统计学上不影响 TRAP-6 诱导的 P-选择素表达($P = 0.96$; 单 ANOVA, 95%置信区间)。因此, 人源化 TMC-2206 的结合并不抑制 TRAP-6 诱导的血小板激活。

表 39

实验	全血培育的检测物					
	盐水	IgG4/κ	huTMC-2206	TRAP-6	TRAP-6 + IgG4/κ	TRAP-6 + huTMC-2206
1	2.44	1.21	0.85	76.60	80.35	79.50
2	8.40	9.10	5.29	97.01	86.73	83.32
3	29.54	30.08	25.70	92.71	95.63	96.88
平均 值 ± SEM	13.5 ± 8.2	13.5 ± 8.6	10.6 ± 7.7	88.8 ± 6.2	87.6 ± 4.4	86.6 ± 5.3

下一项研究评价了与或不与激动剂 ADP 共培育后 P-选择素的上调(血小板表达 P-选择素的百分比, 表 40)。如前文所述, 与人源化 TMC-2206、IgG4/κ 和盐水共培育的血小板有可比较的 P-选择素表达, 因此人源化 TMC-2206 抗体不诱导血小板激活。ADP 诱导的 P-选择素表达与 TRAP-6 诱导的相当。血小板与 ADP 共培育、然后与 IgG4/κ 或人源化 TMC-2206 共培育时, P-选择素表达呈现额外增加。但是, 这种 P-选择素表达上调的增加对同种型对照和人源化 TMC-2206 这两者是相似的; 再次表明了人源化 TMC-2206 与血小板结合不导致血小板激活。同样, 与 IgG4/κ 或人源

化 TMC-2206 共培育时,ADP 诱导的血小板的 P 选择素表达不减少。因此,人源化 TMC-2206 的结合不抑制 ADP 诱导的血小板激活。

表 40

激动剂	全血培育的检测物		
	盐水	IgG4/κ	huTMC-2206
盐水	29.54	30.08	25.70
ADP	79.90	96.24	96.87

下一项研究通过记录血小板结合 PAC-1 标记抗体（其结合于 GPIIbIIIa 的激活构象；表 41）的百分比来评价与或不与激动剂 TRAP-6 或 ADP 共培育后 GPIIbIIIa 的激活。与人源化 TMC-2206、IgG4/k 和盐水共培育的血小板上表达激活的 GPIIbIIIa 的水平相当,人源化 TMC-2206 不诱导血小板激活。IgG4/k 和人源化 TMC-2206 均不抑制 TRAP-6 也不抑制 ADP 诱导的激活。

表 41

激动剂	全血培育的检测物		
	盐水	IgG4/κ	huTMC-2206
盐水	26.5	24.3	18.6
TRAP-6	79.9	93.8	88.9
ADP	69.1	93.1	86.0

综上所述,人源化 TMC-2206 既不诱导血小板激活（不提高 P-选择素上调或 GPIIbIIIa 激活）也不抑制激动剂（TRAP-6、ADP）诱导的血小板激活。这些数据补充了血小板的凝聚研究结果（实施例 15, 表 34），该研究表明人源化 TMC-2206 既不诱导血小板凝聚也不抑制胶原蛋白诱导的凝

聚。

实施例 21

通过检测凝血酶原时间 (PT) 和激活的部分促凝血酶原激酶时间 (aPTT) 评价了人源化 TMC-2206 对外在和内在血凝途径的影响。用合格的人血浆冻干制品(Citrex I, Bio/Data Corporation, Horsham, PA)检测 PT 和 aPTT。将人源化 TMC-2206 加入血浆中至终浓度为 179、214 和 286 $\mu\text{g/mL}$ (分别对应于抗体单剂量 C_{max} 为 12.5、15.0 和 20.0 mg/kg 时的 C_{max})，然后进行样品血凝试验。按标准程序用 BBL 纤维计量仪 (fibrometer) (BD, Franklin Lakes, NJ)检测 PT 和 aPPT。表 42 总结了一组六个试验的数据 (3 个 PT 和 3 个 aPTT)。每个试验都有盐水对照。各配对 (人源化 TMC-2206 和盐) 的 Student-t 统计学分析表明各试验的人源化 TMC-2206 与盐水相比, 平均血凝时间无统计学显著差异。(假设如果分别计算的 P 值小于 0.05, 血凝时间有差别的拒绝置信度为 95%) 因此人源化 TMC-2206 不影响用 PT 和 aPTT 检测的血凝作用。

表 42

血凝参数	人源化 TMC-2206		盐水	P-值
	浓度	凝结时间(秒, 平均值 $\pm$ SEM)	凝结时间(秒, 平均值 $\pm$ SEM)	
凝血酶原时间	179 $\mu\text{g/mL}$	10.8 $\pm$ 0.1	10.8 $\pm$ 0.1	1.00
	214 $\mu\text{g/mL}$	11.3 $\pm$ 0.1	11.1 $\pm$ 0.1	0.67
	286 $\mu\text{g/mL}$	11.5 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 0.1	0.62
激活的部分促凝血酶原激酶时间	179 $\mu\text{g/mL}$	25.6 $\pm$ 0.7	24.8 $\pm$ 0.6	0.43
	214 $\mu\text{g/mL}$	24.1 $\pm$ 0.3	23.5 $\pm$ 0.5	0.30
	286 $\mu\text{g/mL}$	27.9 $\pm$ 0.2	27.9 $\pm$ 0.4	1.00

实施例 22

评价了人源化 TMC-2206 对大鼠出血时间的影响。给 Sprague-Dawley

大鼠（190 - 200g）静脉内（尾静脉）注射盐水、肝素（0.6mg/kg，阳性对照）或 5 和 15mg/kg 剂量的人源化 TMC-2206 抗体，1 小时后标准化切断每只大鼠尾尖（0.5mm）。大鼠不麻醉，观察出血期间其意识状态。将每只大鼠切断的尾尖立即浸入装有盐水的 37°C 试管的液面下 2cm 深处。记录开始出现出血停止 15 秒所需要的时间为出血时间。所用的最大截断时间为 20 分钟。试管中收集的血溶血后释放的血红蛋白量（分光光度测定）计为出血量。所检测的两种剂量人源化 TMC-2206 与原初动物（Naïve）和盐水对照相比，对出血时间的影响均无统计学差异（表 43：P=0.08，单向 ANOVA 分析）。所检测的两种剂量人源化 TMC-2206 与原初动物和盐水对照相比，对出血量的影响均无统计学差异（P=0.22，单向 ANOVA 分析）。因此，人源化 TMC-2206 不影响体内出血时间和出血量。

表 43

	大鼠静脉内注射的检测物				
	原初动物	盐水	人源化 TMC-2206 抗体		肝素
			5 mg/kg	15 mg/kg	
n	10	10	10	10	10
出血时间(分钟, 平均值±SEM)	3.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4	5.2 ± 0.6	4.3 ± 0.3	17.8 ± 1.1
出血量 (mg 血红蛋白, 平均值 ±SEM)	10.3 ± 3.0	17.6 ± 2.0	20.5 ± 4.1	21.2 ± 5.9	115 ± 31

实施例 23

研究检测单剂量人源化 TMC-2206 对大鼠循环的细胞因子水平的影响

响,作为确定人源化 TMC-2206 导致体内白细胞可检测的激活的方法。将盐水(阴性对照)、人 IgG4/κ 同种型对照(15mg/kg)、人源化 TMC-2206(15mg/kg)或脂多糖(LPS,阳性炎症对照,0.75mg/kg)静脉内施与大鼠。没有注射的大鼠作为原初对照。注射后 2、4、6 和 8 小时,经隐静脉收集血样,加工得到血浆。将血浆样品用于基于微珠的多重免疫试验(MIA; Linco Diagnostics, St. Charles, MO)以检测 IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、GM-CSF、IFN-γ 和 TNF-α(表 44; pg/mL, 平均值±SEM)水平。MIA 包括在不同光谱的各组微球体上联合进行数种抗原/抗体的结合反应,从而在同一样品体积(25 μl)中同时检测多种分析物(可高达 100 种)。MIA 的灵敏度取决于抗原,在 1.5-50pg/ml 之间。对每种细胞因子数据组用双向 ANOVA 分析其 95% 置信区间,以检验所有四个时间点和四种物质(原初、载体、IgG4/κ 和人源化 TMC-2206)各自导致的细胞因子水平相等的假设。当 P-值小于 0.05 时拒绝该假设。注射载体、IgG4/κ、人源化 TMC-2206 的大鼠或不注射(原初)大鼠上观察到十种细胞因子水平每种都没有统计学上的明显差异(所有 P-值范围在 0.18-1.0 之间,表 44)。因此,单剂量(15mg/kg)静脉内注射人源化 TMC-2206 不诱导参与炎症的细胞因子表达的增加。

表 44

Cyt.	时间	原初动物 (n = 3)	载体 (n = 3)	IgG4 (15mg/kg) (n = 6)	huTMC-220 6 (15mg/kg) (n = 6)	LPS (.75mg/kg) (n = 4)	P-值, 双向 ANOV A
IL-1α	2 小时	61 ± 30	84 ± 37	75 ± 29	133 ± 66	788 ± 550	1.00
	4 小时	69 ± 38	75 ± 22	101 ± 46	150 ± 63	806 ± 641	
	6 小时	58 ± 16	90 ± 54	57 ± 26	80 ± 53	640 ± 524	
	8 小时	36 ± 5	85 ± 11	57 ± 17	101 ± 48	591 ± 372	
IL-1β	2 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	733 ± 277	0.17
	4 小时	45 ± 15	107 ± 70	44 ± 17	30 ± 4	527 ± 109	
	6 小时	153 ± 78	76 ± 27	61 ± 27	44 ± 14	282 ± 70	
	8 小时	24 ± 0	24 ± 0	53 ± 29	24 ± 0	525 ± 324	
IL-6	2 小时	118 ± 35	291 ± 136	300 ± 174	309 ± 155	31386±7981	1.00
	4 小时	137 ± 58	271 ± 123	329 ± 207	362 ± 163	15971±4334	
	6 小时	265±125	359 ± 130	416 ± 209	364 ± 174	8966 ± 4379	

	8 小时	117 ± 40	341 ± 67	219 ± 133	335 ± 163	3682 ± 2431	
IL-12	2 小时	54 ± 30	237 ± 62	159 ± 67	199 ± 106	950 ± 823	1.00
	4 小时	43 ± 19	201 ± 44	173 ± 79	219 ± 119	991 ± 876	
	6 小时	43 ± 17	205 ± 93	184 ± 108	169 ± 124	941 ± 812	
	8 小时	43 ± 19	212 ± 31	132 ± 55	214 ± 102	794 ± 685	
IFN-γ	2 小时	31 ± 7	82 ± 58	121 ± 72	156 ± 94	959 ± 453	1.00
	4 小时	24 ± 0	67 ± 43	127 ± 77	153 ± 94	7740 ± 629	
	6 小时	24 ± 0	57 ± 33	127 ± 103	115 ± 91	3288 ± 756	
	8 小时	24 ± 0	76 ± 52	99 ± 59	156 ± 102	1773 ± 757	
TNF-α	2 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	1571 ± 633	1.00
	4 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	85 ± 38	
	6 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	48 ± 15	
	8 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	27 ± 3	
IL-2	2 小时	49 ± 25	31 ± 7	47 ± 17	73 ± 49	93 ± 24	0.96
	4 小时	24 ± 0	33 ± 9	52 ± 23	90 ± 62	79 ± 14	
	6 小时	24 ± 0	47 ± 23	69 ± 36	33 ± 9	52 ± 16	
	8 小时	24 ± 0	92 ± 31	47 ± 23	86 ± 39	39 ± 15	
IL-4	2 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	46 ± 22	0.85
	4 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	25 ± 1	49 ± 25	
	6 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	46 ± 22	
	8 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	41 ± 17	
IL-5	2 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	1.00
	4 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	
	6 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	
	8 小时	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	
GM-CSF	2 小时	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	1.00
	4 小时	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	
	6 小时	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	
	8 小时	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	66 ± 0	

虽然参照具体实施例对本发明进行了说明，但是应该理解这些实施方案只是为了阐述本发明的各个方面。因此，应当理解对这些阐述性实施方案可进行各种修改和设计，而不脱离本发明的构思和范围。

<110> 格兰马克药品股份有限公司

<120> 抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体及它们的用途

<130> 14575.2

<150> US 60/738,303

<151> 2005-11-18

<160> 186

<170> PatentIn 版本 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 (Homo Sapiens)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hCDR1 [重链可变区的 CDR1]

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His
1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hCDR2 [重链可变区的 CDR2]

<400> 2

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

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hCDR3 [重链可变区的 CDR3]

<400> 3

Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> lCDR1 [轻链可变区的 CDR1]

<400> 4

Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> lCDR2 [轻链可变区的 CDR2]

<400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 1CDR3 [轻链可变区的 CDR3]

<400> 6

Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 5361
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 人 α 2 整联蛋白 DNA

<400> 7
 ctgcaaacc agcgaacta cggcccccg gtcagacca ggatggggcc agaacggaca 60
 ggggccgcgc cgctgccgct gctgctggtg ttagcgctca gtcaaggcat tttaaattgt 120
 tgtttggcct acaatgttgg tctcccagaa gcaaaaatat tttccgtcc ttcaagttaa 180
 cagtttgggt atgcagtga gcagtttata aatccaaaag gcaactggtt actggttgg 240
 tcaccctgga gtggctttcc tgagaaccga atgggagatg tgtataaatg tcctgttgac 300
 ctatccactg ccacatgtga aaaactaaat ttgcaaactt caacaagcat tccaaatgtt 360
 actgagatga aaaccaacat gagcctcggc ttgatcctca ccaggaacat gggaactgga 420
 ggtttttctca catgtgtgcc tctgtgggca cagcaatgtg ggaatcagta ttacacaacg 480
 ggtgtgtgtt ctgacatcag tcctgatttt cagctctcag ccagcttctc acctgcaact 540
 cagccctgcc ctccctcat agatgttgtg gttgtgtgtg atgaatcaa tagtatttat 600
 ccttgggatg cagtaaagaa ttttttgaa aaatttgtac aaggccttga tataggcccc 660
 acaaagacac aggtgggggt aattcagtat gccataatc caagagtgtg gtttaacttg 720
 aacacatata aaaccaaaga agaatgatt gtagcaacat ccagacatc ccaatatggt 780
 ggggacctca caaacacatt cggagcaatt caatatgcaa gaaaatatgc ctattcagca 840

gcttcctggtg ggcgacgaag tgctacgaaa gtaatggtag ttgtaactga cggatgaatca	900
catgatgggtt caatgttgaa agctgtgatt gatcaatgca accatgacaa tatactgagg	960
tttggcatag cagttcttgg gtactttaaag agaaacgccc ttgatactaa aaattttaata	1020
aaagaaataa aagcgatcgc tagtattcca acagaaagat actttttcaa tgtgtctgat	1080
gaagcagctc tactagaaaa ggctgggaca ttaggagaac aaattttcag cattgaaggt	1140
actgttcaag gaggagacaa ctttcagatg gaaatgtcac aagtgggatt cagtgcagat	1200
tactcttctc aaaatgatat tctgatgctg ggtgcagtgg gagcttttgg ctggagtggg	1260
accattgtcc agaagacatc tcatggccat ttgatctttc ctaaacaagc ctttgaccaa	1320
attctgcagg acagaaatca cagttcatat ttaggttact ctgtggctgc aatttctact	1380
ggagaaaagca ctactttgt tgctgggtgct cctcgggcaa attataccgg ccagatagtg	1440
ctatatagtg tgaatgagaa tggcaatatc acggttattc aggctcacgc aggtgaccag	1500
attggctcct attttggtag tgtgtgtgtg tcagttgatg tggataaaga caccattaca	1560
gacgtgctct tggtaggtgc accaatgtac atgagtgacc taaagaaaga ggaaggaaga	1620
gtctacctgt ttactatcaa aaagggcatt ttgggtcagc accaatttct tgaaggcccc	1680
gagggcattg aaaacactcg atttggttca gcaattgcag ctctttcaga catcaacatg	1740
gatggcttta atgatgtgat tgttggttca ccactagaaa atcagaattc tggagctgta	1800
tacatttaca atggtcatca gggcactatc cgcacaaagt attcccagaa aatcttgga	1860
tccgatggag cctttaggag ccattctccag tactttggga ggtccttgga tggctatgga	1920
gatttaaatg gggattccat caccgatgtg tctattgggtg cctttggaca agtggttcaa	1980
ctctggtcac aaagtattgc tgatgtagct atagaagctt cattcacacc agaaaaaatc	2040
actttgggtca acaagaatgc tcagataatt ctcaaaactct gcttcagtgc aaagttcaga	2100
cctactaagc aaaacaatca agtggccatt gtatataaca tcacacttga tgcagatgga	2160
ttttcatcca gagtaacctc caggggggta tttaaagaaa acaatgaaag gtgcctgcag	2220
aagaatatgg tagtaaatca agcacagagt tgccccgagc acatcattta tatacaggag	2280
ccctctgatg ttgtcaactc tttggatttg cgtgtggaca tcagtctgga aaaccctggc	2340

actagccctg cccttgaagc ctattctgag actgccaagg tcttcagtat tcctttccac	2400
aaagactgtg gtgaggatgg actttgcatt tctgatctag tcctagatgt ccgacaaata	2460
ccagctgctc aagaacaacc ctttattgtc agcaaccaa acaaaagggtt aacattttca	2520
gtaacactga aaaataaaag ggaaagtgc tacaacactg gaattgttgt tgatttttca	2580
gaaaacttgt tttttgcatc attctcccta cgggttgatg ggacagaagt aacatgccag	2640
gtggctgcat ctgagaagtc tgttgccctg gatgtaggct accctgcttt aaagagagaa	2700
caacaggatga cttttactat taactttgac ttcaatcttc aaaaccttca gaatcaggcg	2760
tctctcagtt tccaagcctt aagtgaagc caagaagaa acaaggctga taatttggtc	2820
aacctcaaaa ttctctcct gtatgatgct gaaattcact taacaagatc taccaacata	2880
aatttttatg aaatctctc ggatgggaat gttccttcaa tcgtgcacag ttttgaagat	2940
gttggccaa aattcatctt ctccctgaag gtaacaacag gaagtgttcc agtaagcatg	3000
gcaactgtaa tcatccacat ccctcagtat accaaagaaa agaaccctact gatgtaccta	3060
actggggctg aaacagacaa ggctgggtgac atcagttgta atgcagatat caatccactg	3120
aaaataggac aaacatcttc ttctgtatct ttcaaaagtg aaaatttcag gcacaccaa	3180
gaattgaact gcagaactgc ttctgtagt aatgttacct gctggttgaa agacgttcac	3240
atgaaaggag aatactttgt taatgtgact accagaattt ggaacgggac tttcgcata	3300
tcaacgttcc agacagtaca gctaacggca gctgcagaaa tcaacaccta taaccctgag	3360
atatatgtga ttgaagataa cactgttacg attccctga tgataatgaa acctgatgag	3420
aaagccgaag taccaacagg agttataata ggaagtataa ttgctggaat ctttttgctg	3480
ttagctctgg ttgcaatttt atggaagctc ggcttcttca aaagaaaata tgaaaagatg	3540
acaaaaatc cagatgagat tgatgagacc acagagctca gtagctgaac cagcagacct	3600
acctgcagtg ggaaccggca gcatcccagc cagggtttgc tgtttgctg catggatttc	3660
tttttaaatc ccataatttt ttatcatgt cgtaggtaaa ctaacctggt attttaagag	3720
aaaactgcag gtcagtttgg atgaagaaat tgtgggggtt gggggagggt cggggggcag	3780
gtagggaaat aatagggaaa atacctattt tatatgatgg gggaaaaaa gtaatcttta	3840

aactggctgg cccagagttt acattctaata ttgcattgtg tcagaaacat gaaatgcttc	3900
caagcatgac aacttttaaa gaaaaaatatg atactctcag attttaaggg ggaaaactgt	3960
tctctttaaa atatttgtct ttaaacagca actacagaag tggaagtgtg tgatatgtaa	4020
gtacttccac ttgtgtatat ttaatatgaat attgatgtta acaagagggg aaaacaaaac	4080
acaggttttt tcaatttatg ctgctcatcc aaagttgcc aagatgatac ttccaagtga	4140
taattttatt tataaaactag gtaaaatttg ttgttggttc cttttatacc acggtgccc	4200
cttccacacc ccatcttgct ctaatgatca aaacatgctt gaataactga gcttagagta	4260
tacctctat atgtccattt aagttaggag agggggcgat atagagacta aggcacaaaa	4320
ttttgtttaa aactcagaat ataacattta tgtaaaatcc catctgctag aagcccatcc	4380
tgtgccagag gaaggaaaag gaggaattt ctttctctt ttaggaggca caacagttct	4440
cttctaggat ttgtttggct gactggcagt aacctagtga atttttgaaa gatgagtaat	4500
ttctttggca accttctcc tcccttactg aaccactctc ccacctctg gtggtacct	4560
tattatagaa gccctctaca gctgacttt ctctccagcg gtccaaagtt atccccctc	4620
ttaccctca tccaaagtc ccactcctc aggacagctg ctgtgcatta gatattagg	4680
gggaaagtca tctgtttaat ttacacactt gcatgaatta ctgtatataa actcctaac	4740
ttcaggagc tattttcatt tagtgctaaa caagtaagaa aaataagcta gaggtaattt	4800
ctaaatgttg gaatgttatg ggatgtaaac aatgtaaagt aaaacactct caggatttca	4860
ccagaagtta cagatgaggc actggaaacc accaccaaata tagcagggtg accttctgtg	4920
gctgtcttgt ttctgaagta cttttcttc cacaagagt aatttgacct aggcaagttt	4980
gttcaaaagg tagatctga gatgatttgg tcagattggg ataaggcca gcaatctgca	5040
tttaacaag caccctcagtc actaggatgc agatggacca cactttgaga aacaccaccc	5100
atttctactt ttgacactt attttctctg ttcttgagcc cccacattct ctaggagaaa	5160
cttagattaa aattcacaga cactacatat ctaaagcttt gacaagtcct tgacctctat	5220
aaacttcaga gtccctatta taaaatggga agactgagct ggagttcagc agtgatgctt	5280
tttagtttta aaagtctatg atctgatctg gacttctat aatacaaata cacaatcctc	5340

caagaatttg acttgaaaa g

5361

<210> 8

<211> 1181

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 人 α 2 整联蛋白

<400> 8

Met Gly Pro Glu Arg Thr Gly Ala Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Gln Gly Ile Leu Asn Cys Cys Leu Ala Tyr Asn Val
 20 25 30

Gly Leu Pro Glu Ala Lys Ile Phe Ser Gly Pro Ser Ser Glu Gln Phe
 35 40 45

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

Val Gly Ser Pro Trp Ser Gly Phe Pro Glu Asn Arg Met Gly Asp Val
 65 70 75 80

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

Leu Gln Thr Ser Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Met Lys Thr Asn
 100 105 110

Met Ser Leu Gly Leu Ile Leu Thr Arg Asn Met Gly Thr Gly Gly Phe
 115 120 125

Leu Thr Cys Gly Pro Leu Trp Ala Gln Gln Cys Gly Asn Gln Tyr Tyr
 130 135 140

Thr Thr Gly Val Cys Ser Asp Ile Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val
165 170 175

Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys
180 185 190

Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys
195 200 205

Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe
210 215 220

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

Gln Thr Ser Gln Tyr Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile
245 250 255

Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg
260 265 270

Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp
275 280 285

Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile
290 295 300

Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu
305 310 315 320

Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro
325 330 335

Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu

340	345	350
Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val		
355	360	365
Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met Glu Met Ser Gln Val Gly Phe Ser		
370	375	380
Ala Asp Tyr Ser Ser Gln Asn Asp Ile Leu Met Leu Gly Ala Val Gly		
385	390	395
Ala Phe Gly Trp Ser Gly Thr Ile Val Gln Lys Thr Ser His Gly His		
405	410	415
Leu Ile Phe Pro Lys Gln Ala Phe Asp Gln Ile Leu Gln Asp Arg Asn		
420	425	430
His Ser Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Ala Ala Ile Ser Thr Gly Glu		
435	440	445
Ser Thr His Phe Val Ala Gly Ala Pro Arg Ala Asn Tyr Thr Gly Gln		
450	455	460
Ile Val Leu Tyr Ser Val Asn Glu Asn Gly Asn Ile Thr Val Ile Gln		
465	470	475
Ala His Arg Gly Asp Gln Ile Gly Ser Tyr Phe Gly Ser Val Leu Cys		
485	490	495
Ser Val Asp Val Asp Lys Asp Thr Ile Thr Asp Val Leu Leu Val Gly		
500	505	510
Ala Pro Met Tyr Met Ser Asp Leu Lys Lys Glu Glu Gly Arg Val Tyr		
515	520	525
Leu Phe Thr Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gly Gln His Gln Phe Leu Glu		
530	535	540

Gly Pro Glu Gly Ile Glu Asn Thr Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Ala
545 550 555 560

Leu Ser Asp Ile Asn Met Asp Gly Phe Asn Asp Val Ile Val Gly Ser
565 570 575

Pro Leu Glu Asn Gln Asn Ser Gly Ala Val Tyr Ile Tyr Asn Gly His
580 585 590

Gln Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Ile Leu Gly Ser Asp
595 600 605

Gly Ala Phe Arg Ser His Leu Gln Tyr Phe Gly Arg Ser Leu Asp Gly
610 615 620

Tyr Gly Asp Leu Asn Gly Asp Ser Ile Thr Asp Val Ser Ile Gly Ala
625 630 635 640

Phe Gly Gln Val Val Gln Leu Trp Ser Gln Ser Ile Ala Asp Val Ala
645 650 655

Ile Glu Ala Ser Phe Thr Pro Glu Lys Ile Thr Leu Val Asn Lys Asn
660 665 670

Ala Gln Ile Ile Leu Lys Leu Cys Phe Ser Ala Lys Phe Arg Pro Thr
675 680 685

Lys Gln Asn Asn Gln Val Ala Ile Val Tyr Asn Ile Thr Leu Asp Ala
690 695 700

Asp Gly Phe Ser Ser Arg Val Thr Ser Arg Gly Leu Phe Lys Glu Asn
705 710 715 720

Asn Glu Arg Cys Leu Gln Lys Asn Met Val Val Asn Gln Ala Gln Ser
725 730 735

Cys Pro Glu His Ile Ile Tyr Ile Gln Glu Pro Ser Asp Val Val Asn

740	745	750
Ser Leu Asp Leu Arg Val Asp Ile Ser Leu Glu Asn Pro Gly Thr Ser		
755	760	765
Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Ser Glu Thr Ala Lys Val Phe Ser Ile Pro		
770	775	780
Phe His Lys Asp Cys Gly Glu Asp Gly Leu Cys Ile Ser Asp Leu Val		
785	790	795 800
Leu Asp Val Arg Gln Ile Pro Ala Ala Gln Glu Gln Pro Phe Ile Val		
805	810	815
Ser Asn Gln Asn Lys Arg Leu Thr Phe Ser Val Thr Leu Lys Asn Lys		
820	825	830
Arg Glu Ser Ala Tyr Asn Thr Gly Ile Val Val Asp Phe Ser Glu Asn		
835	840	845
Leu Phe Phe Ala Ser Phe Ser Leu Pro Val Asp Gly Thr Glu Val Thr		
850	855	860
Cys Gln Val Ala Ala Ser Gln Lys Ser Val Ala Cys Asp Val Gly Tyr		
865	870	875 880
Pro Ala Leu Lys Arg Glu Gln Gln Val Thr Phe Thr Ile Asn Phe Asp		
885	890	895
Phe Asn Leu Gln Asn Leu Gln Asn Gln Ala Ser Leu Ser Phe Gln Ala		
900	905	910
Leu Ser Glu Ser Gln Glu Glu Asn Lys Ala Asp Asn Leu Val Asn Leu		
915	920	925
Lys Ile Pro Leu Leu Tyr Asp Ala Glu Ile His Leu Thr Arg Ser Thr		
930	935	940

Asn Ile Asn Phe Tyr Glu Ile Ser Ser Asp Gly Asn Val Pro Ser Ile
945 950 955 960

Val His Ser Phe Glu Asp Val Gly Pro Lys Phe Ile Phe Ser Leu Lys
965 970 975

Val Thr Thr Gly Ser Val Pro Val Ser Met Ala Thr Val Ile Ile His
980 985 990

Ile Pro Gln Tyr Thr Lys Glu Lys Asn Pro Leu Met Tyr Leu Thr Gly
995 1000 1005

Val Gln Thr Asp Lys Ala Gly Asp Ile Ser Cys Asn Ala Asp Ile
1010 1015 1020

Asn Pro Leu Lys Ile Gly Gln Thr Ser Ser Ser Val Ser Phe Lys
1025 1030 1035

Ser Glu Asn Phe Arg His Thr Lys Glu Leu Asn Cys Arg Thr Ala
1040 1045 1050

Ser Cys Ser Asn Val Thr Cys Trp Leu Lys Asp Val His Met Lys
1055 1060 1065

Gly Glu Tyr Phe Val Asn Val Thr Thr Arg Ile Trp Asn Gly Thr
1070 1075 1080

Phe Ala Ser Ser Thr Phe Gln Thr Val Gln Leu Thr Ala Ala Ala
1085 1090 1095

Glu Ile Asn Thr Tyr Asn Pro Glu Ile Tyr Val Ile Glu Asp Asn
1100 1105 1110

Thr Val Thr Ile Pro Leu Met Ile Met Lys Pro Asp Glu Lys Ala
1115 1120 1125

Glu Val Pro Thr Gly Val Ile Ile Gly Ser Ile Ile Ala Gly Ile

1130	1135	1140
Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Ile Leu Trp Lys Leu Gly Phe		
1145	1150	1155
Phe Lys Arg Lys Tyr Glu Lys Met Thr Lys Asn Pro Asp Glu Ile		
1160	1165	1170
Asp Glu Thr Thr Glu Leu Ser Ser		
1175	1180	

<210> 9
 <211> 3700
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 人 β 1 整联蛋白 DNA

<400> 9
 agccgccgcc acccgccgcg cccgacaccc gggaggcccc gccagcccgcc gggagaggcc 60
 cagcgggaggt cgcgggaacag caggccccgag cccaccgcgc cgggccccgg acgccgcgcg 120
 gaaaagatga atttacaacc aattttctgg attggactga tcagttcagt ttgctgtgtg 180
 tttgctcaaa cagatgaaaa tagatgttta aaagcaaag ccaaatcatg tggagaatgt 240
 atacaagcag ggccaaattg tgggtggtgc acaaattcaa catttttaca ggaaggaatg 300
 cctacttctg cacgatgtga tgatttagaa gccttaaaaa agaagggttg ccctccagat 360
 gacatagaaa atcccagagg ctccaaagat ataaagaaaa ataaaaatgt aaccaaccgt 420
 agcaaaggaa cagcagagaa gctcaagcca gaggatatta ctcagatcca accacagcag 480
 ttggttttgc gattaagatc aggggagcca cagacattta cattaaaatt caagagagct 540
 gaagactatc ccattgacct ctactacctt atggacctgt cttactcaat gaaagacgat 600
 ttggagaatg taaaaagtct tggaacagat ctgatgaatg aatgaggag gattacttcg 660
 gacttcagaa ttggatttgg ctcatatttg gaaaagactg tgatgcctta cattagcaca 720

acaccagcta agctcaggaa cccttgacaca agtgaacaga actgcaccag cccatttagc	780
tacaaaaatg tgctcagtct tactaataaa ggagaagtat ttaatgaact tgttgaaaa	840
cagcgcatat ctggaaattt ggattctcca gaaggtggtt tcgatgccat catgcaagtt	900
gcagtttgtg gatcactgat tggctggagg aatgttacac ggctgctggt gttttccaca	960
gatgccgggt ttcactttgc tggagatggg aaacttggtg gcattgtttt accaaatgat	1020
ggacaatgtc acctggaaaa taatatgtac acaatgagcc attattatga ttatccttct	1080
attgtcacc ttgtccagaa actgagtga aataatattc agacaatttt tgcagttact	1140
gaagaatttc agcctgttta caaggagctg aaaaacttga tccctaagtc agcagtagga	1200
acattatctg caaattctag caatgtaatt cagttgatca ttgatgcata caattccctt	1260
tcctcagaag tcattttgga aaacggcaaa ttgtcagaag gagtaacaat aagttacaaa	1320
tcttactgca agaacggggt gaatggaaca ggggaaaatg gaagaaaatg ttccaatatt	1380
tccattggag atgaggttca atttgaaatt agcataactt caaataagtg tccaaaaaag	1440
gattctgaca gctttaaaat taggcctctg ggctttacgg aggaagtaga ggttattctt	1500
cagtacatct gtgaatgtga atgccaaagc gaaggcatcc ctgaaagtcc caagtgtcat	1560
gaaggaaatg ggacatttga gtgtggcgcg tgcaggtgca atgaaggcg tgttggtaga	1620
cattgtgaat gcagcacaga tgaagttaac agtgaagaca tggatgctta ctgcaggaaa	1680
gaaaacagtt cagaaatctg cagtaacaat ggagagtgcg tctgcggaca gtgtgtttgt	1740
aggaagaggg ataatacaaa tgaaatttat tctggcaaat tctgcgagtg tgataatttc	1800
aactgtgata gatccaatgg cttaatattgt ggaggaaatg gtgtttgcaa gtgtcgtgtg	1860
tgtgagtgca accccaacta cactggcagt gcatgtgact gttctttgga tactagtact	1920
tgtgaagcca gcaacggaca gatctgcaat ggccggggca tctgcgagtg tgggtgtctgt	1980
aagtgtacag atccgaagtt tcaagggcaa acgtgtgaga tgtgtcagac ctgccttggt	2040
gtctgtgctg agcataaaga atgtgttcag tgcagagcct tcaataaagg agaaaagaaa	2100
gacacatgca cacaggaatg ttcctatttt aacattacca aggtagaaag tcgggacaaa	2160
ttaccccagc cgggtccaacc tgatcctgtg tccattgta aggagaagga tgttgacgac	2220

tgttggttct attttacgta ttcagtgaat gggaacaacg aggtcatggt tcatgttggt	2280
gagaatccag agtgtccac tggtccagac atcattccaa ttgtagctgg tgtggttgct	2340
ggaattgttc ttattggcct tgcattactg ctgatatgga agcttttaat gataattcat	2400
gacagaaggg agtttgctaa atttgaaaag gagaaaatga atgccaaatg ggacacgggt	2460
gaaaatccta tttataagag tgccgtaaca actgtggtca atccgaagta tgagggaaaa	2520
tgagtactgc ccgtgcaaat cccacaacac tgaatgcaaa gtagcaattt ccatagtcac	2580
agttaggtag ctttagggca atattgccat ggttttactc atgtgcaggt tttgaaaatg	2640
tacaatatgt ataattttta aaatgtttta ttattttgaa aataatgttg taattcatgc	2700
cagggactga caaaagactt gagacaggat ggttattctt gtcagctaag gtcacattgt	2760
gcctttttga ccttttcttc ctggactatt gaaatcaagc ttattggatt aagtgatatt	2820
tctatagcga ttgaaagggc aatagttaaa gtaatgagca tgatgagagt ttctgttaat	2880
catgtattaa aactgatttt tagctttaca aatatgtcag tttgcagtta tgcagaatcc	2940
aaagtaaagtg tcttgctagc tagttaagga ttgttttaaa tctgttattt tgctatttgc	3000
ctgttagaca tgactgatga catacttgaa agacaagtat gttgagagtt gctgggtgta	3060
aatacgtttg aaatagttag tctacaaagg ccatgggaaa aattcagaga gttaggaagg	3120
aaaaaccaat agctttaaaa cctgtgtgcc attttaagag ttacttaatg tttgtaact	3180
tttatgcctt cactttacaa attcaagcct tagataaaag aaccgagcaa ttttctgcta	3240
aaaagtcctt gatttagcac tatttacata caggccatac ttacaaaagt atttgctgaa	3300
tggggacctt ttgagttgaa tttattttat tatttttatt ttgtttaatg tctggtgctt	3360
tctatcacct cttctaactt tttaatgtat ttgtttgcaa ttttggggtg agactttttt	3420
atgagtactt tttctttgaa gttttagcgg tcaatttgcc tttttaatga acatgtgaag	3480
ttatactgtg gctatgcaac agctctcacc tacgcgagtc ttactttgag ttagtgccat	3540
aacagaccac tgtatgttta cttctcacca tttagattgc ccatcttggt tcacactagt	3600
cacattcttg ttttaagtgc ctttagtttt aacagttcac tttttacagt gctatttact	3660
gaagttattt attaaatatg cctaaaatac ttaaatcgga	3700

<210> 10
 <211> 798
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 人 β 1 整联蛋白

<400> 10

Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys
 1 5 10 15

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

Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys
 35 40 45

Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys
 50 55 60

Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile
 65 70 75 80

Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr
 85 90 95

Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr
 100 105 110

Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro
 115 120 125

Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp
 130 135 140

Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu

145	150	155	160
Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile			
	165	170	175
Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val			
	180	185	190
Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr			
	195	200	205
Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser			
	210	215	220
Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg			
	225	230	235
Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met			
	245	250	255
Gln Val Ala Val Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg			
	260	265	270
Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly			
	275	280	285
Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu			
	290	295	300
Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala			
	305	310	315
His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala			
	325	330	335
Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile			
	340	345	350

Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile
355 360 365

Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu
370 375 380

Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr
385 390 395 400

Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser
405 410 415

Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser
420 425 430

Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu
435 440 445

Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys
450 455 460

Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val
485 490 495

Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met
500 505 510

Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn
515 520 525

Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr
530 535 540

Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys

545	550	555	560
Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys	565	570	575
Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys	580	585	590
Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn	595	600	605
Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys	610	615	620
Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys	625	630	635
Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu	645	650	655
Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys	660	665	670
Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val	675	680	685
Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr	690	695	700
Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn	705	710	715
Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val	725	730	735
Val Ala Gly Ile Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys	740	745	750

Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys
 755 760 765

Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys
 770 775 780

Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
 785 790 795

<210> 11
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> 人 α 2 结构域 I

<400> 11

Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro
 1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser
 20 25 30

Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln
 35 40 45

Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr
 50 55 60

Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys
 65 70 75 80

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

Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr

100	105	110
Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val		
115	120	125
Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile		
130	135	140
Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu		
145	150	155
Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu		
165	170	175
Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val		
180	185	190
Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln		
195	200	205
Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met		
210	215	220
Glu Met		
225		
<210> 12		
<211> 71		
<212> PRT		
<213> 人		
<220>		
<221> MISC_FEATURE		
<223> FW1-3 4-59 [FW=1-25; FW2=26-39; FW3=40-71]		
<400> 12		
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 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser
35 40 45

Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
50 55 60

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
65 70

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> FW4 4-59 [NCBI 登录 gi/33583]

<400> 13

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

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> VHL-for [正向引物]

<400> 14
ccatggctgt cttgggctg ctcttct

27

<210> 15
<211> 17
<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> HC-rev [反向引物]

<400> 15

ggggccagtg gatagac

17

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> VLL-for [正向引物]

<400> 16

ccatggattt tcaagtcag attttcag

28

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> LCκ-rev [反向引物]

<400> 17

gttggtgcag catcagc

17

<210> 18

<211> 318

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> TMC-2206 VL

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (318)

<400> 18

caa ttt gtt ctc acc cag tct cca gca ttc ttg tct gct tct cca ggg 48
Gln Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc aac tca agt gtg aat tac att 96
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile
20 25 30

cac tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc ccc aaa aaa tgg att tat 144
His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

gac act tcc aaa ctg gct tct gga gtc cct gtt cgc ttc agt ggc agt 192
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

gga tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag act gag 240
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Thr Glu
65 70 75 80

gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg act act aac cca ctc acg 288
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr
85 90 95

ttc ggt gct ggg acc agg gtg gag ctg aaa 318
Phe Gly Ala Gly Thr Arg Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Asn Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Ala Gly Thr Arg Val Glu Leu Lys
100 105

<210> 20
<211> 357
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (357)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (357)
<223> TMC-2206 VH

<400> 20
cag gtg cag ttg aag gag tca gga cct ggc ctg gtg gcg ccc tca cag 48
Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

agc ctg tcc atc act tgt act gtc tct gga ttt tca tta acc aac tat 96
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

ggt att cac tgg gtt cgc cag cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg 144
Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

gga gtg ata tgg gct cgt gga ttc aca aat tat aat tcg gct ctc atg 192
Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

tcc aga ctg atc atc aca aaa gac aat tcc cag agt caa gtc ttc tta 240
 Ser Arg Leu Ile Ile Thr Lys Asp Asn Ser Gln Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

aaa atg aac agt cta caa cct gat gac tca gcc act tac ttc tgt gcc 288
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

aga gcg aac gac ggg gtc tat tat gct atg gac tac tgg ggt cag gga 336
 Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

acc tca gtc acc gtc tcc tca 357
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 21

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

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

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

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

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 31
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC-2206-r5' [正向引物]

<400> 22
cccgaattca caggtgcagt tgaaggagtc a 31

<210> 23
<211> 35
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC-2206-r3' [反向引物]

<400> 23
cgggatcctt aggatcattt accaggagag tggga 35

<210> 24
<211> 31
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC-2206-k5' [正向引物]

<400> 24
cccgaattca caatttggtc tcacccagtc t 31

<210> 25
<211> 35

<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC-2206-k3' [反向引物]

<400> 25
cgggatcctt atctctaaca ctcattcctg ttgaa 35

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Igκ (Igk) 前导序列

<400> 26
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Gly Ser Thr Gly Asp
20

<210> 27
<211> 76
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> Igκ-S 寡核苷酸 [引物]

<400> 27
tcgagccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg 60

ttccactgga gacgcg 76

<210> 28
<211> 76

<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> Igκ-AS 寡核苷酸 [引物]

<400> 28
aatcgcgtc tccagtggaa cctggaaccc agagcagcag tacccatagc aggagtgtgt 60

ctgtctccat ggtggc 76

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC2206VH-hIgG1/4Fc-SalI

<400> 29
cttggtcgac gctgaggaga cggtgactga ggt 33

<210> 30
<211> 30
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hIgG1/4Fc-SalI-F [正向引物]

<400> 30
tcagcgtcga ccaagggccc atcsgtcttc 30

<210> 31
<211> 48
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature

<223> hIgG1/4Fc-NotI-R [反向引物]

<400> 31

aagggaagcg gccgcttattc atttacccyg agacaggag aggctctt

48

<210> 32

<211> 39

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> TMC2206VL-hKc-SalI [反向引物]

<400> 32

tcgtttgatg tcgaccttgg tcccagcacc gaacgtgag

39

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hKc-SalI-F [正向引物]

<400> 33

accaaggtcg acatcaaacg aactgtggct gcacc

35

<210> 34

<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hKc-NotI-R [反向引物]

<400> 34

aagggaagcg gccgcttattc arcactctcc cctgttgaag ctctt

45

<210> 35

<211> 29

<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC-2206VLwt-hKc-F [正向引物]

<400> 35
agggtggagc tgaaacgaac tgtggctgc 29

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> TMC-2206VLwt-hKc-R [反向引物]

<400> 36
tcgtttcagc tccaccctgg tccc 24

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> A14 VL 胚系蛋白

<400> 37
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
20 25 30
Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 成熟κ轻链的FW4

<400> 38

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

<210> 39
<211> 121
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 4-59 VH 胚系蛋白

<400> 39

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 His Asn Ser Ser Ser Trp Tyr Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> hVH1.0

<400> 40

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVL1.0

<400> 41

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 42
<211> 48
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH3.0-F [正向引物]

<400> 42
agcgttgaca ccagcaagaa ccagttcagc ctgaagctga gcagcgtg 48

<210> 43
<211> 51
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH3.0-R [反向引物]

<400> 43
gttcttgctg gtgtccacgc tgatggtcac gcgggacatg agagcgtgt t 51

<210> 44
<211> 48
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH4.0-F [正向引物]

<400> 44
cctccaggca agggcctgga gtggatcggc gtgatatggg ctcgcggc 48

<210> 45
<211> 51
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH4.0-R [反向引物]

<400> 45
ctccaggccc ttgcctggag gctggcgat ccagtggatg ccatagttgg t 51

<210> 46
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVL3.0-F [正向引物]

<400> 46
cccaagctcc tgatctatga cacttccaag ctg 33

<210> 47
<211> 42
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVL3.0-R [反向引物]

<400> 47
agtgtcatag atcaggagct tgggggcctg gtcgggcttc tg 42

<210> 48
<211> 45
<212> DNA
<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVL4.0-F [正向引物]

<400> 48

gacgcgaatt cagacgtggt gatgaccag tctccagcat tcctg

45

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVH2.0-F [正向引物]

<400> 49

gtgaccatca gcaaggacaa cagc

24

<210> 50

<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVH2.0-R [反向引物]

<400> 50

gctgttgcc ttgctgatgg tcacgcggga catgagagcg ctggt

45

<210> 51

<211> 27

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVH5.0-F [正向引物]

<400> 51

atcggcgtga tatgggctcg cggcttc

27

<210>	52	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	hVH5.0-R [反向引物]	
<400>	52	
	gccgcgagcc catatcacgc cgatccactc caggcccttg cctgg	45
<210>	53	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	hVH6.0-F [正向引物]	
<400>	53	
	atatgggctc gcggcttcac aaac	24
<210>	54	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	hVH6.0-R [反向引物]	
<400>	54	
	gtttgtgaag ccgcgagccc atat	24
<210>	55	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	

<223> hVH7.0-F [正向引物]

<400> 55
gccgcggaca ccgccgtgta ctactgcgcc agagccaacg acggg 45

<210> 56
<211> 27
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH7.0-R [反向引物]

<400> 56
gtagtacacg gcggtgtccg cggcgggt 27

<210> 57
<211> 27
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH8.0-F [正向引物]

<400> 57
atatccaact atggcatcca ctgggtt 27

<210> 58
<211> 48
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVH8.0-R [反向引物]

<400> 58
ccagtggatg ccatagttgg atatgctaaa tccagagacg gtacaggt 48

<210> 59
<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVL2.0-R [反向引物]

<400> 59

cagcttggaa gtgtcataga tcaatttctt gggggcctgg tcggg

45

<210> 60

<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVL5.0-F [正向引物]

<400> 60

gacgcgaatt cagacttcgt gctgaccag tctccagcat tcctg

45

<210> 61

<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVL6.0-F [正向引物]

<400> 61

gacgcgaatt cacagttcgt gatgaccag tctccagcat tcctg

45

<210> 62

<211> 45

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hVL7.0-F [正向引物]

<400> 62
gacgcgaatt cagacttcgt gatgaccag tctccagcat tcttg 45

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVL8.0-F [正向引物]

<400> 63
ttcaccttca ccatcagcag cctggag 27

<210> 64
<211> 48
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hVL8.0-R [反向引物]

<400> 64
ctccaggctg ctgatggtga aggtgaagtc ggtgccgctg ccgctgcc 48

<210> 65
<211> 28
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hLCQ3-F [正向引物]

<400> 65
ccaatcaagc gtgaactaca ttacttgg 28

<210> 66
<211> 48
<212> DNA
<213> 人

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	hLCQ3-R [反向引物]	
<400>	66	
	ccagtgaatg tagttcacgc ttgattgggc gctgcaggtg atggtcac	48
<210>	67	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	Igk-For [正向引物]	
<400>	67	
	actcctgcta tgggtactgc tgc	23
<210>	68	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	hIgG1Fc-CH1-R [反向引物]	
<400>	68	
	gaagtagtcc ttgaccaggc ag	22
<210>	69	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	CI-neo-msc3' [引物]	
<400>	69	
	tttcactgca ttctagttgt gg	22

<210> 70
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> hVH2.0

<400> 70

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH3.0

<400> 71

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 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 Phe Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH4.0

<400> 72

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH5.0

<400> 73

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 74
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVH6.0

<400> 74

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVH7.0

<400> 75

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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 Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVH8.0

<400> 76

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 Phe Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> hVH9.0 位置 48 可以是亮氨酸或异亮氨酸

<400> 77

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVH10.0

<400> 78

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH1.0 位置 48 可以是亮氨酸或异亮氨酸

<400> 79

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL2.0

<400> 80

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 81

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL3.0

<400> 81

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 82
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVL4.0

<400> 82

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 83
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVL5.0

<400> 83

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 84
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> hVL6.0

<400> 84

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 85
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<223> hVL7.0

<400> 85

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL8.0

<400> 86

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 87
<211> 106
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVL9.0

<400> 87

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Lys
35 40 45

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

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

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

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

<210> 88

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL10.0

<400> 88

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 89
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> hVL11.0

<400> 89

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 90
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<223> hVL1.0Q

<400> 90

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 91

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL10.0Q

<400> 91

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 92

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL12.0Q

<400> 92

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 93
<211> 222
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 大鼠 α 2 整联蛋白结构域 I 蛋白质

<400> 93

Ser Pro Asp Phe Gln Ser Leu Thr Ser Phe Ser Pro Ala Val Gln Asp
1 5 10 15

Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Glu Ala
20 25 30

Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln Gly Leu Asp Ile Gly Pro
35 40 45

Lys Lys Thr Gln Val Ala Leu Ile Gln Tyr Ala Asn Asp Pro Arg Val
50 55 60

Val Phe Asn Leu Thr Thr Tyr Lys Asn Lys Glu Asp Met Val Gln Ala
65 70 75 80

Thr Ser Glu Thr Arg Gln Tyr Gly Gly Asp Leu Thr Asn Thr Phe Lys
85 90 95

Ala Ile Gln Phe Ala Arg Asp Ile Ala Tyr Leu Pro Glu Ser Gly Gly
100 105 110

Arg Pro Gly Ala Thr Lys Val Met Val Val Val Thr Asp Gly Glu Ser
115 120 125

His Asp Gly Ser Lys Leu Gln Thr Val Ile Gln Gln Cys Asn Asp Asp
130 135 140

Glu Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu Gly Tyr Leu Asn Arg Asn
145 150 155 160

Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu Ile Lys Ala Ile Ala Ser
165 170 175

Thr Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val Ala Asp Glu Ala Ala Leu
180 185 190

Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu His Ile Phe Ser Ile Glu Gly
195 200 205

Thr Val Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met Glu Met Ala Gln
210 215 220

<210> 94
<211> 228
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 小鼠 α 2 整联蛋白结构域 I 蛋白质

<400> 94

Ser Pro Asp Phe Gln Phe Leu Thr Ser Phe Ser Pro Ala Val Gln Ala
1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Val Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser
20 25 30

Ile Tyr Pro Trp Glu Ala Val Lys Asn Phe Leu Val Lys Phe Val Thr
35 40 45

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

Ala Asn Glu Pro Arg Ile Ile Phe Asn Leu Asn Asp Phe Glu Thr Lys
65 70 75 80

Glu Asp Met Val Gln Ala Thr Ser Glu Thr Arg Gln His Gly Gly Asp
85 90 95

Leu Thr Asn Thr Phe Arg Ala Ile Glu Phe Ala Arg Asp Tyr Ala Tyr
100 105 110

Ser Gln Thr Ser Gly Gly Arg Pro Gly Ala Thr Lys Val Met Val Val
115 120 125

Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Lys Leu Lys Thr Val Ile
130 135 140

Gln Gln Cys Asn Asp Asp Glu Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu
165 170 175

Ile Lys Ala Ile Ala Ser Thr Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val
180 185 190

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln
195 200 205

Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val Gln Gly Gly Asp Asn Phe Gln Met
210 215 220

Glu Met Ser Gln
225

<210> 95
<211> 26
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> K-F

<400> 95
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtctt 26

<210> 96
<211> 41
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> K-BamHI-R

<400> 96
aatcggatc cttactaaca ctctccctg ttgaagctct t 41

<210> 97
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> VH12.0-(K71V)-F

<400> 97
gcctgaccat cagcgtggac aacagcaaga accaggtgag 40

<210> 98
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> VH12.0(K71V)-R

<400> 98
ctcacctggt tcttgctggt gtccacgtg atggtcaggc 40

<210> 99
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> VH13.0-(N73T)-F

<400> 99
ctgacatca gcaaggacac cagcaagaac caggtgagcc 40

<210> 100
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> VH13.0-(N73T)R

<400> 100
ggctcacctg gttcttgctg gtgtccttgc tgatggtcag 40

<210> 101
<211> 41
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> VH14.0-(V78F)-F

<400> 101
gcaaggacaa cagcaagaac cagtttagcc tgaagctgag c 41

<210> 102
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VH14.0 (V78F)-R

<400> 102
 gctcagcttc aggcataact ggttccttgct gttgtccttg c 41

<210> 103
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 食蟹猴 (Macaca fascicularis)

<220>
 <221> misc_feature
 <223> 食蟹猴 α 2 结构域 I

<400> 103
 agtcctgatt ttcagctctc agccagcttc tcacctgcaa ctacagccctg cccttccttc 60
 atagatgttg tggttgtgtg tgatgaatca aatagtattt atccttggga tgcagtagac 120
 aatttttttg aaaaatttgt acaaggcctg gatataggcc ccacaaagac acaggtgggg 180
 ttaattcagt atgccaataa tccaagagtt gtgtttaact tgaacacata taaaaccaa 240
 gaagaaatga ttgtagcaac atcccagaca tccaatatg gtggggacct cacaacaca 300
 ttcggagcaa ttcaatatgc aagaaaatat gcctattcag cagcttcttg tgggcgacga 360
 agtgctacga aagtaatggt agttgtaact gacggtgaat cacatgatgg ttcaatgttg 420
 aaagctgtga ttgatcaatg caacatgac aatatactga gggttgcat agcagttctt 480
 gggactttaa acagaaacgc ccttgatact aaaaatttaa taaaagaaat aaaagcgatc 540
 gctagtattc caacagaaag atactttttc aatgtgtctg atgaagcagc tctactagaa 600
 aaggctggga cattaggaga acaaattttc agcattgaag gtactgtt 648

<210> 104
 <211> 648

<212> DNA

<213> 恒河猴 (*Macaca mulatta*)

<220>

<221> misc_feature

<223> 恒河猴 α 2 结构域 I

<400> 104

```

agtccctgatt ttcagctctc agccagcttc tcacctgcaa ctcagccctg cccttcctc      60
atagatgttg  tggttgtgtg tgatgaatca aatagtatTT atccttgga  tgcagtaaag    120
aatttttttg  aaaaatttgt acaaggcctg gatataggcc ccacaaagac acaggtgggg    180
ttaattcagt  atgccaataa tccaagagtt gtgtttaact tgaacacata taaaaccaa      240
gaagaaatga  tttagcaac  atcccagaca tccaatatg  gtggggacct cacaacaca      300
ttcggagcaa  ttcaatatgc aagaaaatat gcctattcag cagcttctgg tgggcgacga      360
agtgctacga  aagtaatggt agttgtaact gacggtgaat cacatgatgg ttcaatgttg      420
aaagctgtga  ttgatcaatg caaccatgac aatatactga ggtttgcat  agcagttctt      480
gggtacttaa  acagaaacgc ccttgatact aaaaatttaa taaaagaaat aaaagcgatc      540
gctagtattc  caacagaaag atactttttc aatgtgtctg atgaagcagc tctactagaa      600
aaggctggga  cattaggaga acaaattttc agcattgaag gtactgtt      648

```

<210> 105

<211> 997

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> IgG4 恒定区

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(978)

<400> 105

```

tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc      48
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
1           5           10           15

```

acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe 20 25 30	96
ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly 35 40 45	144
gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu 50 55 60	192
agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc tac Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr 65 70 75 80	240
acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg 85 90 95	288
gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct gag Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu 100 105 110	336
ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 115 120 125	384
act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 130 135 140	432
gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 145 150 155 160	480
gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn 165 170 175	528
agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 180 185 190	576
ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro 195 200 205	624
tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag	672

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag aac 720
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc 768
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc 816
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc agg 864
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285
 cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc 912
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc ctc 960
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 tcc ctg tct ctg ggt aaa tgataggatc cgcggccgc 997
 Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 106
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 106

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
 1 5 10 15

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 35 40 45

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
50 55 60

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
85 90 95

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu
100 105 110

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
260	265	270
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg		
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315 320
Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
325		
<210> 107		
<211> 648		
<212> DNA		
<213> 人		
<220>		
<221> misc_feature		
<223> 人 α 2 结构域 I		
<400> 107		
agtcttgatt ttcagctctc agccagcttc tcacctgcaa ctccagccctg cccttcctc	60	
atagatgttg tgggtggtgtg tgatgaatca aatagtatTT atccttggga tgcagtaaag	120	
aatttttttg aaaaatttgt acaaggcctg gatataggcc ccacaaagac acaggtgggg	180	
ttaattcagt atgccaataa tccaagagtt gtgtttaact tgaacacata taaaaccaaa	240	
gaagaaatga ttgtagcaac atcccagaca tcccaatatg gtggggacct cacaacaca	300	
ttcggagcaa ttcaatatgc aagaaaatat gcctattcag cagcttctgg tgggcgacga	360	
agtgtctacga aagtaatggt agttgtaact gacggtgaat cacatgatgg ttcaatgttg	420	
aaagctgtga ttgatcaatg caaccatgac aatatactga ggtttggcat agcagttctt	480	

gggtacttaa acagaaacgc ccttgatact aaaaatttaa taaaagaaat aaaagcgatc 540

gctagtattc caacagaaag atactttttc aatgtgtctg atgaagcagc tctactagaa 600

aaggctggga cattaggaga acaaattttc agcattgaag gtactgtt 648

<210> 108

<211> 106

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVL12.0

<400> 108

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

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

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

<210> 109

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH12.0 位置 48 可以是亮氨酸或异亮氨酸

<400> 109

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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 Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 110

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH13.0

<400> 110

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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 Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> hVH14.0 位置 48 可以是亮氨酸或异亮氨酸

<400> 111

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 Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val 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 Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 112
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> LCDR1 [N26Q]

<400> 112

Ser Ala Gln Ser Ser Trp Asn Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 113
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Rattus rattus

<220>

<221> misc_feature

<223> 大鼠 α 2 结构域 I

<400> 113

agtccagact ttcagtcgtt gacaagcttc tcacctgcag ttcaagcttg cccttcctc 60

gtagatgtcg tagttgtctg tgatgaatca aacagtattt atccctggga agcagtaaag 120

aatttttttg aaaagtttgt gcaaggcctg gatataggac ctaaaaagac acaggtggcg 180

ttaattcaat atgccaacga cccaagagtt gtctttaact tgaccactta caaaaacaaa 240

gaagatatgg ttcaggccac atccgagacg cgccagtatg gtggggacct cacaacacc 300

ttcaaggcta tccaatttgc aagagacatt gcttatttac cggagtctgg cgggcgcca 360

ggtgctacaa aagtcattgt agttgtgact gatggggaat ccatgatgg gtcgaagctg 420

caaactgtga tccagcaatg caatgatgac gagatactga ggtttggcat agcggttctt 480

ggatatTTaa acagaaatgc tcttgatact aaaaatctaa tcaaagaaat taaagcaatc 540

gctagcactc caacggagag gtactttttc aatgtggccg atgaggcggc tcttctggag 600

aaagctggca ctctagggga gcacatattc agcattgaag gcactgttca aggaggagac 660

aacttccaga tggaaatggc a 681

<210> 114

<211> 648

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<221> misc_feature

<223> 小鼠 α 2 结构域 I 克隆

<400> 114

agtccagact ttcagttctt gaccagcttt tcacctgcag ttcaggcttg cccttcctc 60

gtggatgttg tagttgtatg tgatgaatca aacagtattt atccttggga agcagtaaag 120

aacttttttg taaagtttgt gacaggcctg gatataggac ctaaaaagac acaggtggcg 180

ttaattcaat atgccaatga gccgagaatt atattttaact tgaacgattt cgaaacaaa 240

gaggatatgg tccaggccac atctgagacg cgccaacatg gtggggacct cacaaacacc 300
ttcagagcta tcgaattcgc aagagactac gcttattcac agacttctgg cgggcgccccg 360
gggtgctacaa aagtcatggt agttgtgacc gatggcgagt cccatgatgg gtcgaagctg 420
aaaactgtga tccagcaatg caatgatgac gagatactga ggttcggcat agcagttctt 480
gggtattttaa acagaaatgc tcttgatact aaaaatttaa tcaaagaaat aaaagcaatt 540
gctagtactc caaccgagag atactttttc aatgtggccg acgaagcggc tcttctggag 600
aaggctggaa cictagggga gcaaataatc agcattgaag gcactgtt 648

<210> 115
<211> 6
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> 基因转录起始的示例性上游序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 115
cncaat 6

<210> 116
<211> 6
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> 基因 3' 端的示例性序列

<400> 116
aataaa 6

<210> 117
<211> 31

<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h α I F

<400> 117
ggggatccag tcctgaattt tcagctctca g 31

<210> 118
<211> 27
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h α I R

<400> 118
gggaattcaa cagtaccttc aatgctg 27

<210> 119
<211> 19
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> 人结构域 I 正向引物

<400> 119
ggggatccag tcctgattt 19

<210> 120
<211> 18
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> 人结构域 I 反向引物

<400> 120
ggaattcaac agtacctt 18

<210> 121
<211> 29
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> m α I F

<400> 121
ggggatccag tccagacttt cagttcttg 29

<210> 122
<211> 28
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> m α I R

<400> 122
tggggaattca acagtcctt caatgctg 28

<210> 123
<211> 31
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> r α I F

<400> 123
ggggatccag tccagacttt cagtcgttga c 31

<210> 124
<211> 31
<212> DNA
<213> 人

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	r α I R	
<400>	124	
	tgggaattct gccatttcca tctggaagtt g	31
<210>	125	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I I21V F	
<400>	125	
	cagccctgcc cttccctcgt agatgttgtg gttg	34
<210>	126	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I I21V R	
<400>	126	
	caaccacaac atctacgagg gaagggcagg gctg	34
<210>	127	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I E44V F	
<400>	127	
	cagtaaagaa ttttttggtg aaatttgtca agg	33

<210> 128
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I E44V R

<400> 128
ccttgacaaa ttttaccaaa aaattcttta ctg 33

<210> 129
<211> 35
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Q48T F

<400> 129
ttttggaaaa atttgtaaca ggccctggata taggc 35

<210> 130
<211> 35
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Q48T R

<400> 130
gcctatatcc aggcctgtta caaatTTTTc cgggg 35

<210> 131
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h a I N67E F	
<400>	131	
	cagtatgccca atgagccaag agttgtgttt aac	33
<210>	132	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h a I N67E R	
<400>	132	
	gttaaacaca actcttggct cattggcata ctg	33
<210>	133	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h a I V70I F	
<400>	133	
	tgccaataat ccaagaattg tgtttaactt gaac	34
<210>	134	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h a I V70I R	
<400>	134	
	gttcaagtta acacaattct tggattattg gca	33

<210> 135
<211> 34
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I V71I F

<400> 135
ccaataatcc aagagttatc tttaacttga acac 34

<210> 136
<211> 34
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I V71I R

<400> 136
gtgttcaagt taaagataac tcttggatta ttgg 34

<210> 137
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I T76D F

<400> 137
gtgtttaact tgaacgacta taaaaccaa gaa 33

<210> 138
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature

<223> hapIhaI T76D R

<400> 138

ttcttttggtt ttatagtcgt tcaagttaaa cac 33

<210> 139

<211> 33

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> ha I Y77F F

<400> 139

tttaacttga acacatttaa aaccaaagaa gaa 33

<210> 140

<211> 33

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> ha I Y77F R

<400> 140

ttcttctttg gttttaaatg tgttcaagtt aaa 33

<210> 141

<211> 33

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> ha I K78E F

<400> 141

aacttgaaca catatgaaac caaagaagaa atg 33

<210> 142

<211> 33

<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I K78E R

<400> 142
catttcttct ttggtttcat atgtgttcaa gtt 33

<210> 143
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Y93H F

<400> 143
tcccagacat cccaacatgg tggggacctc aca 33

<210> 144
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Y93H R

<400> 144
tgtgaggtcc ccacatggtt gggatgtctg gga 33

<210> 145
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Y93F F

<400> 145
acatgggaga catcccaatt tgggtggggac ctcacaaac 39

<210> 146
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Y93F R

<400> 146
gtttgtgagg tccccaccaa attgggatgt ctcccatgt 39

<210> 147
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Q105E F

<400> 147
ttcggagcaa ttgaatatgc aagaaaatat gcc 33

<210> 148
<211> 33
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I Q105E R

<400> 148
ggcatatttt cttgcatatt caattgctcc gaa 33

<210> 149
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I A114Q F	
<400>	149	
	aaatatgcct attcacaagc ttctggtggg cgacgaagt	39
<210>	150	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I A114Q R	
<400>	150	
	acttcgtcgc ccaccagaag cttgtgaata ggcatattt	39
<210>	151	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I A115T F	
<400>	151	
	aaatatgcct attcagcaac ttctggtggg cgacgaagt	39
<210>	152	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I A115T R	
<400>	152	
	acttcgtcgc ccaccagaag ttgctgaata ggcatattt	39

<210> 153
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I A115Q F

<400> 153
aaatatgcct attcagcaca gtctggtggg cgacgaagt 39

<210> 154
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I A115Q R

<400> 154
acttcgtcgc ccaccagact gtgctgaata ggcataattt 39

<210> 155
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I R165D F

<400> 155
gttcttgggt acttaaacga caacgccctt gatactaaa 39

<210> 156
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I R165D R	
<400>	156	
	tttagtatca agggcgttgt cgtttaagta cccaagaac	39
<210>	157	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I N166D F	
<400>	157	
	cttgggtact taaacaggga cgcccttgat actaaaaat	39
<210>	158	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I N166D R	
<400>	158	
	atTTTTtagta tcaagggcgt ccctgtttaa gtacccaag	39
<210>	159	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I E195W F	
<400>	159	
	ttcaatgtgt ctgattgggc agctctacta gaaaaggctg	40

<210> 160
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I E195W R

<400> 160
cagccttttc tagtagagct gcccaatcag acacattgaa 40

<210> 161
<211> 38
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I K40D F

<400> 161
atccttgga tgtagtagac aatTTTTTgg aaaaattt 38

<210> 162
<211> 38
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h a I K40D R

<400> 162
aaatttttcc aaaaaattgt ctactgcatc ccaaggat 38

<210> 163
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature

<223>	h α I R69D F	
<400>	163	
	cagtatgccca ataatccaga cgttggtgttt aacttgaac	39
<210>	164	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I R69D R	
<400>	164	
	gttcaagtta aacacaacgt ctggattatt ggcatactg	39
<210>	165	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I N73D F	
<400>	165	
	aatccaagag ttgtgtttga cttgaacaca tataaa	36
<210>	166	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	h α I N73D R	
<400>	166	
	tttatatgtg ttcaagtcaa acacaactct tggatt	36
<210>	167	
<211>	39	

<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h α I Q89H F

<400> 167
atgattgtag caacatccca cacatcccaa tatggtggg 39

<210> 168
<211> 39
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> h α I Q89H R

<400> 168
atgattgtag caacatccca cacatcccaa tatggtggg 39

<210> 169
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> m α I H93Y F

<400> 169
cacatctgag acgcgccaat atggtgggga cctcacaac 40

<210> 170
<211> 40
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> m α I H93Y R

<400> 170

gtttgtgagg tccccacat attggcgct ctcagatgtg

40

<210> 171

<211> 216

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 食蟹猴

<400> 171

Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro
1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser
20 25 30

Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Asp Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln
35 40 45

Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr
50 55 60

Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys
65 70 75 80

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

Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr
100 105 110

Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val
115 120 125

Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile
130 135 140

Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu
165 170 175

Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val
180 185 190

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln
195 200 205

Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val
210 215

<210> 172
<211> 216
<212> PRT
<213> 恒河猴

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 恒河猴

<400> 172

Ser Pro Asp Phe Gln Leu Ser Ala Ser Phe Ser Pro Ala Thr Gln Pro
1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Ile Asp Val Val Val Cys Asp Glu Ser Asn Ser
20 25 30

Ile Tyr Pro Trp Asp Ala Val Lys Asn Phe Leu Glu Lys Phe Val Gln
35 40 45

Gly Leu Asp Ile Gly Pro Thr Lys Thr Gln Val Gly Leu Ile Gln Tyr
50 55 60

Ala Asn Asn Pro Arg Val Val Phe Asn Leu Asn Thr Tyr Lys Thr Lys
65 70 75 80

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

Leu Thr Asn Thr Phe Gly Ala Ile Gln Tyr Ala Arg Lys Tyr Ala Tyr
100 105 110

Ser Ala Ala Ser Gly Gly Arg Arg Ser Ala Thr Lys Val Met Val Val
115 120 125

Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Gly Ser Met Leu Lys Ala Val Ile
130 135 140

Asp Gln Cys Asn His Asp Asn Ile Leu Arg Phe Gly Ile Ala Val Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Leu Asn Arg Asn Ala Leu Asp Thr Lys Asn Leu Ile Lys Glu
165 170 175

Ile Lys Ala Ile Ala Ser Ile Pro Thr Glu Arg Tyr Phe Phe Asn Val
180 185 190

Ser Asp Glu Ala Ala Leu Leu Glu Lys Ala Gly Thr Leu Gly Glu Gln
195 200 205

Ile Phe Ser Ile Glu Gly Thr Val
210 215

<210> 173
<211> 1435
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> misc_feature
<223> hvH14.0 IgG4 重链

$\langle 222 \rangle \quad (22) \dots (1416)$

tctcgagaag cttccacat g gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg 51
Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu
1 5 10

ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act gga cag gtg cag ttg cag gag tca 99
Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
15 20 25

ggc cct ggc ctg gtg aag ccc agc gag acc ctg agc ctg acc tgt acc 147
Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
30 35 40

gtc tct gga ttt agc tta acc aac tat ggc atc cac tgg ata cgc cag 195
Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln
45 50 55

cct cca ggc aag ggc ctg gag tgg ctg ggc gtg ata tgg gct cgc ggc 243
Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly
60 65 70

ttc aca aac tat aac agc gct ctc atg tcc cgc gtg acc atc agc aag 291
Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys
75 80 85 90

gac aac agc aag aac cag gtg agc ctg aag ctg agc agc gtg acc gcc 339
Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
95 100 105

gcg gac acc gcc gtg tac tac tgc gcc aga gcc aac gac ggg gtc tac 387
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr
110 115 120

tat gcc atg gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc agc tca 435
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
125 130 135

gcg tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg 483
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
140 145 150

agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 531
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
155 160 165 170

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 579

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
175 180 185	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc	627
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
190 195 200	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc	675
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr	
205 210 215	
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	723
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
220 225 230	
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct	771
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro	
235 240 245 250	
gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag	819
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
255 260 265	
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg	867
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
270 275 280	
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat	915
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
285 290 295	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc	963
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	
300 305 310	
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	1011
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
315 320 325 330	
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc	1059
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
335 340 345	
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga	1107
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
350 355 360	
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag	1155
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
365 370 375	

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac 1203
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 380 385 390

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag 1251
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 395 400 405 410

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc 1299
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 415 420 425

agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca 1347
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 430 435 440

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc 1395
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 445 450 455

ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tgataggatc cgcggccgc 1435
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 460 465

<210> 174

<211> 465

<212> PRT

<213> 人

<400> 174

Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser

65	70	75	80
Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln			
	85	90	95
Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr			
	100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp			
	115	120	125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
	130	135	140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr			
	145	150	155
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
	165	170	175
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
	180	185	190
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
	195	200	205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp			
	210	215	220
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr			
	225	230	235
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro			
	245	250	255
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	260	265	270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
450 455 460

Lys

465

<210> 175

<211> 1435

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> misc_feature

<223> hvH12.0 IgG4 重链

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(1416)

<400> 175

tctcgagaag cttccaccat g	gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg	51
	Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu	
	1 5 10	

ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act gga cag gtg cag ttg cag gag tca	99
Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser	
15 20 25	

ggc cct ggc ctg gtg aag ccc agc gag acc ctg agc ctg acc tgt acc	147
Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr	
30 35 40	

gtc tct gga ttt agc tta acc aac tat ggc atc cac tgg ata cgc cag	195
Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln	
45 50 55	

cct cca ggc aag ggc ctg gag tgg ctg ggc gtg ata tgg gct cgc ggc	243
Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly	
60 65 70	

ttc aca aac tat aac agc gct ctc atg tcc cgc ctg acc atc agc aag	291
Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys	
75 80 85 90	

gac aac agc aag aac cag gtg agc ctg aag ctg agc agc gtg acc gcc	339
Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala	
95 100 105	

gcg gac acc gcc gtg tac tac tgc gcc aga gcc aac gac ggg gtc tac	387
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr	
110 115 120	

tat gcc atg gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc agc tca Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 125 130 135	435
gcg tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg 140 145 150	483
agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 155 160 165 170	531
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tgc tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 175 180 185	579
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 190 195 200	627
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr 205 210 215	675
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 220 225 230	723
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro 235 240 245 250	771
gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 255 260 265	819
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acg tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 270 275 280	867
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 285 290 295	915
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 300 305 310	963
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	1011

315	320	325	330	
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc				1059
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu				
335		340	345	
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga				1107
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg				
350		355	360	
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag				1155
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys				
365		370	375	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac				1203
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp				
380		385	390	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag				1251
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys				
395	400	405	410	
acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc				1299
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser				
415		420	425	
agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca				1347
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser				
430		435	440	
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc				1395
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser				
445		450	455	
ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tgataggatc cgcggccgc				1435
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys				
460		465		
<210> 176				
<211> 465				
<212> PRT				
<213> 人				
<400> 176				
Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly				
1	5	10	15	

Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

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

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

Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
115 120 125

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

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160

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

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
210 215 220

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

Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
245 250 255

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 177
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> misc_feature
 <223> VL10.0Q 轻链

<220>
 <221> CDS
 <222> (22)..(720)

<400> 177
 ctatctcgag aagcttccac c atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta 51
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val
 1 5 10

 ctg ctg ctc tgg gtt cca ggt tcc act gga gac ttc gtg atg acc cag 99
 Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Asp Phe Val Met Thr Gln
 15 20 25

 tct cca gca ttc ctg agc gtg acc ccc ggc gag aag gtg acc atc acc 147
 Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr
 30 35 40

 tgc agc gcc caa tca agc gtg aac tac att cac tgg tac cag cag aag 195
 Cys Ser Ala Gln Ser Ser Val Asn Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys
 45 50 55

 ccc gac cag gcc ccc aag aaa ttg atc tat gac act tcc aag ctg gcc 243
 Pro Asp Gln Ala Pro Lys Lys Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala
 60 65 70

agc ggc gtg ccc agc cgc ttc agc ggc agc ggc agc ggc acc gac tac Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr 75 80 85 90	291
acc ttc acc atc agc agc ctg gag gcc gag gac gct gcc acc tat tac Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr 95 100 105	339
tgc cag cag tgg acc act aac cca ctg acc ttc ggc cag ggc acc aag Cys Gln Gln Trp Thr Thr Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys 110 115 120	387
gtc gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 125 130 135	435
cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu 140 145 150	483
ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp 155 160 165 170	531
aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp 175 180 185	579
agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys 190 195 200	627
gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln 205 210 215	675
ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 220 225 230	720
tgataggatc cgcggccgca tagg	744

<210> 178

<211> 233

<212> PRT

<213> 人

<400> 178

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Gln Ser Ser
35 40 45

Val Asn Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Thr
100 105 110

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

261

ata tgg gct cgc ggc ttc aca aac tat aac agc gct ctc atg tcc cgc Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg 55 60 65	291
gtg acc atc agc aag gac aac agc aag aac cag gtg agc ctg aag ctg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu 70 75 80	339
agc agc gtg acc gcc gcg gac acc gcc gtg tac tac tgc gcc aga gcc Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala 85 90 95	387
aac gac ggg gtc tac tat gcc atg gac tac tgg ggc cag gga acc ctg Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100 105 110	435
gtc acc gtc agc tca gcg tcg acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu 115 120 125 130	483
gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys 135 140 145	531
ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tca tgg aac tca Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser 150 155 160	579
ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser 165 170 175	627
tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser 180 185 190	675
ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn 195 200 205 210	723
acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His 215 220 225	771
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val 230 235 240	819
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc	867

Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr				
245								250											
cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	915			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu				
260								265								270			
gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	963			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys				
275								280								290			
aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	1011			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser				
				295								300				305			
gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	1059			
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys				
				310								315				320			
tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	1107			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile				
				325								330				335			
tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	1155			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro				
				340								345				350			
cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	1203			
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu				
355								360								365			
gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	1251			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn				
				375								380				385			
ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	1299			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser				
				390								395				400			
gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	1347			
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg				
				405								410				415			
tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	1395			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu				
420								425								430			
cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggt	aaa		1440			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
435								440								445			

tgataagcgg ccgcttcct

1460

<210> 180

<211> 473

<212> PRT

<213> 人

<400> 180

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20 -15 -10

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asn Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
-5 -1 1 5

Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
10 15 20

Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro
25 30 35 40

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe
45 50 55

Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp
60 65 70

Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala
75 80 85

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr
90 95 100

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
105 110 115 120

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
125 130 135

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
155 160 165

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
185 190 195 200

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
205 210 215

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
220 225 230

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
235 240 245

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
250 255 260

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
265 270 275 280

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
285 290 295

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
300 305 310

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
315 320 325

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

```

330              335              340

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
345              350              355              360

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
              365              370              375

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
              380              385              390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
              395              400              405

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
              410              415              420

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
425              430              435              440

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
              445

```

```

<210> 181
<211> 469
<212> PRT
<213> 人

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVH14.0 IgG1 重链 [DANS-缺失的]

```

```

<400> 181

```

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1              5              10              15

```

```

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
              20              25              30

```

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

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

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

225	230	235	240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	245	250	255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	260	265	270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	275	280	285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	290	295	300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	305	310	315
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	325	330	335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala	340	345	350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	355	360	365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	370	375	380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	385	390	395
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	405	410	415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu	420	425	430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 182
<211> 469
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> hVH12.0 IgG1 重链 [DANS-缺失的]

<400> 182

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30

Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
35 40 45

Leu Thr Asn Tyr Gly Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Arg Gly Phe Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Ala Leu Met Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val

100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr		
115	120	125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
130	135	140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
145	150	155
160		
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
165	170	175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
180	185	190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
210	215	220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
225	230	235
240		
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
245	250	255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
260	265	270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
275	280	285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
290	295	300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 183
<211> 24
<212> PRT
<213> 人

<400> 183

His Asn Ser Ser Ser Trp Tyr Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
1 5 10 15

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
20

<210> 184

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<400> 184

Glu Glu Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
1 5 10 15

Glu Ile Lys

<210> 185

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化 VH 区

<220>

<221> 变体

<222> (30).. (30)

<223> Xaa 在位置 30 可以是 Thr 或 Ile

<220>

<221> 变体

<222> (31).. (31)

<223> Xaa 在位置 31 可以是 Asn 或 Ser

<220>

<221> 变体

<222> (37).. (37)

<223> Xaa 在位置 37 可以是 Val 或 Ile

<220>

<221> 变体

<222> (48).. (48)

<223> Xaa 在位置 48 可以是 Leu 或 Ile

<220>

<221> 变体

<222> (67)..(67)

<223> Xaa 在位置 67 可以是 Val 或 Leu

<220>

<221> 变体

<222> (71)..(71)

<223> Xaa 在位置 71 可以是 Lys 或 Val

<220>

<221> 变体

<222> (73)..(73)

<223> Xaa 在位置 73 可以是 Asn 或 Thr

<220>

<221> 变体

<222> (78)..(78)

<223> Xaa 在位置 78 可以是 Val 或 Phe

<220>

<221> 变体

<222> (94)..(94)

<223> Xaa 在位置 94 可以是 Phe 或 Tyr

<400> 185

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 Phe Ser Leu Xaa Xaa Tyr
20 25 30

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys Ala

859095

Arg Ala Asn Asp Gly Val Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100105110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

- <210> 186

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列
- <220>

<223> 人源化 VL 区
- <220>

<221> 变体

<222> (1).. (1)

<223> Xaa 在位置 1 可以是 Gln 或 Asp
- <220>

<221> 变体

<222> (2).. (2)

<223> Xaa 在位置 2 可以是 Phe 或 Val
- <220>

<221> 变体

<222> (4).. (4)

<223> Xaa 在位置 4 可以是 Leu 或 Met
- <220>

<221> 变体

<222> (45).. (45)

<223> Xaa 在位置 48 可以是 Lys 或 Leu
- <220>

<221> 变体

<222> (46).. (46)

<223> Xaa 在位置 46 可以是 Trp 或 Leu
- <220>

<221> 变体

<222> (48).. (48)

<223> Xaa 在位置 48 可以是 Tyr 或 Lys
- <220>

<221> 变体

<222> (70)..(70)

<223> Xaa 在位置 70 可以是 Tyr 或 Phe

<400> 186

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

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

His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ala	Pro	Lys	Xaa	Xaa	Ile	Xaa
		35					40					45			

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

Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Xaa	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu
65					70					75					80

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

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

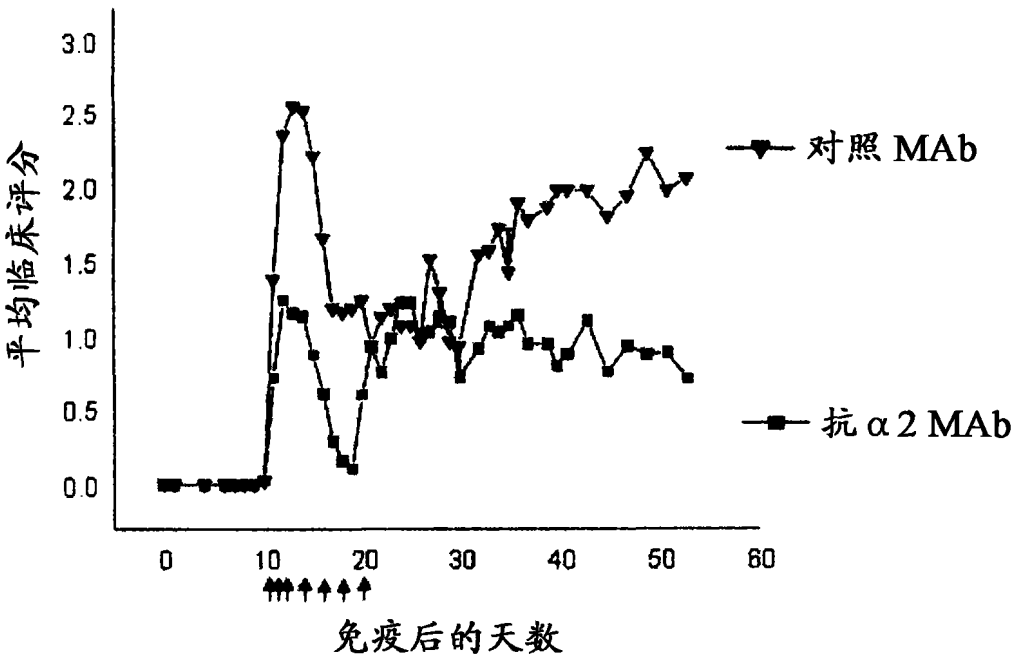


图 1

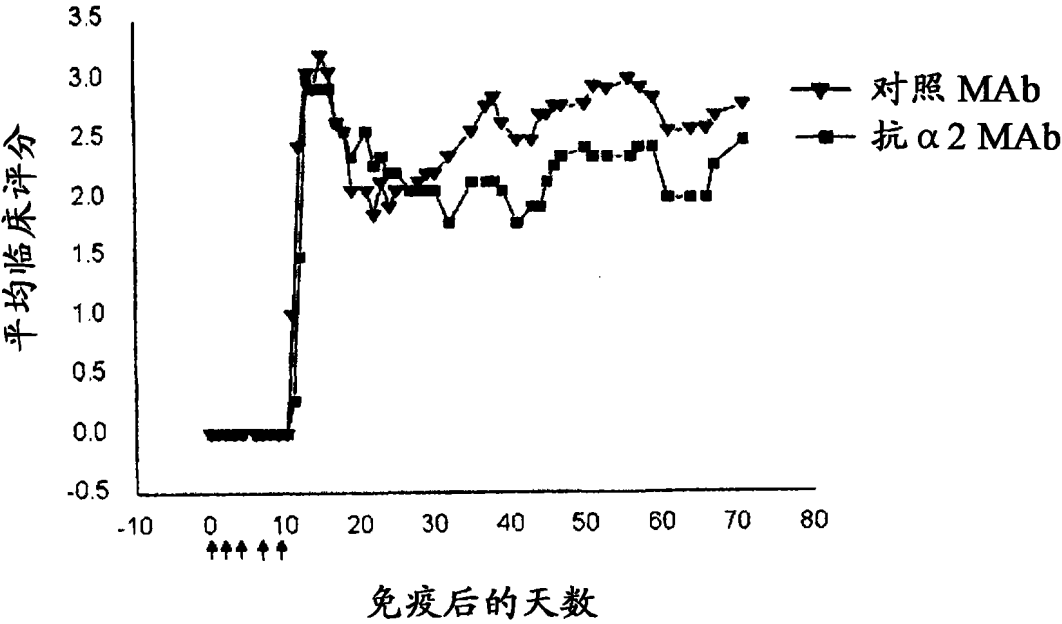


图 2

专利名称(译)	抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体及它们的用途		
公开(公告)号	CN101360826A	公开(公告)日	2009-02-04
申请号	CN200680051249.9	申请日	2006-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	格兰马克药品股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	格兰马克药品股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	格兰马克药品股份有限公司		
[标]发明人	E拉扎里德斯 C伍兹 M贝尔南		
发明人	E·拉扎里德斯 C·伍兹 M·贝尔南		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C12N5/10 A61K39/395 A61P19/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/705 C07K14/78 C07K16/28 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566		
CPC分类号	C07K2316/52 C07K2317/34 C07K2317/567 C07K2319/00 C07K2317/52 G01N33/6893 C07K2317/92 A61K2039/505 C07K16/2842 C07K2317/56 C07K2316/96 C07K2317/24 A61P1/04 A61P3/10 A61P17 /00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/02 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 A61K47/6849 C07K2317/76 A61K39/3955 C07K14/7055 G01N33/6872 G01N2333/7055		
优先权	60/738303 2005-11-18 US		
其他公开文献	CN101360826B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体和它们的用途。公开了与 $\alpha 2$ 整联蛋白结构域I结合和抑制 $\alpha 2\beta 1$ 整联蛋白与胶原蛋白相互作用的人源化抗体。还公开了抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，包括与 $\alpha 2$ 整联蛋白结合而不激活血小板的抗 $\alpha 2$ 整联蛋白抗体，在治疗 $\alpha 2\beta 1$ 介导的疾病中的治疗用途。

