

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/30

C07K 16/14 G01N 33/574

A61K 39/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814886.4

[43] 公开日 2002 年 12 月 11 日

[11] 公开号 CN 1384840A

[22] 申请日 2000.10.26 [21] 申请号 00814886.4

[30] 优先权

[32] 1999.10.28 [33] SE [31] 9903895-2

[86] 国际申请 PCT/SE00/02082 2000.10.26

[87] 国际公布 WO01/30854 英 2001.5.3

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.26

[71] 申请人 活跃生物技术股份公司

地址 瑞典隆德

[72] 发明人 T·N·布罗丁 P·J·卡尔斯特罗姆

L·G·奥尔森 M·J·特德森

P·P·奇尔尼

B·H·K·尼尔森

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 5 页 说明书 47 页 附图 10 页

[54] 发明名称 涉及 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的人胃肠上皮肿瘤抗原的抗体

[57] 摘要

描述了具有靶结构的结合结构的抗体、衍生物或其片段。抗体展示于人胃肠上皮肿瘤细胞中和细胞表面上以及正常人胃肠上皮细胞亚群中。所述结合结构含有轻链中 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 23-33 (CDR1)、49-55 (CDR2)、88-98 (CDR3) 位氨基酸的互补决定区 (CDR) 序列, 和重链中基本地包含 SEQ ID NO:2 中所示氨基酸序列第 158-162 (CDR1)、177-193 (CDR2) 和 226-238 (CDR3) 位氨基酸的 CDR 序列, 或者有相似独特结合特性的其它结合结构。本发明还描述了展示于肿瘤细胞中或表面上的靶结构、疫苗组合物、药物组合物以及与人恶性疾病相关的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 抗体、衍生物或其片段，具有展示于人胃肠上皮肿瘤细胞中和人胃肠上皮肿瘤细胞细胞表面上及正常人胃肠上皮细胞亚群中的靶结构的结合结构，所述结合结构含有轻链中基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 23-33(CDR1)、49-55(CDR2)、88-98(CDR3)位氨基酸的互补决定区(CDR)序列，和重链中基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 158-162(CDR1)、177-193(CDR2)和 226-238(CDR3)位氨基酸的 CDR 序列，或者有相似独特结合特性的其它结合结构。

2. 根据权利要求 1 的抗体，其是噬菌体选择的。

3. 根据权利要求 1 的抗体，其中该序列是 *Macaca fascicularis* 来源的。

4. 根据权利要求 1 的抗体的衍生物，其是人来源的。

5. 根据权利要求 1 的抗体，其中该序列与相应的人来源的序列有至少 84% 的同一性。

6. 根据权利要求 1 的抗体，其在人中有低免疫原性或无免疫原性。

7. 根据权利要求 1 的抗体，其已通过基因上连接到其它多肽，和/或通过化学偶联到有机或无机化学分子，和/或通过二聚化、寡聚化或多聚化被衍生化。

8. 根据权利要求 1 的抗体，其在基因上连接到或化学偶联到细胞毒性多肽或细胞毒性有机或无机化学分子上。

9. 根据权利要求 1 的抗体，其在基因上连接到或化学偶联到生物学活性分子上。

10. 根据权利要求 1 的抗体，其在基因上连接到或化学偶联到免疫活化分子上。

11. 根据权利要求 1 的抗体，其已被改变以提高或降低其抗体亲抗原性和/或亲和力。

12. 根据权利要求 1 的抗体，其已被改变以提高其产率。

13. 根据权利要求 1 的抗体，其已被改变以影响其药代动力学特性。

14. 根据权利要求 1 的抗体, 其已被改变以赋予其新的药代动力学特性。

15. 根据权利要求 1 的抗体, 其被标记, 并且其结合被非标记形式的所述抗体抑制而不被其它结合结构抑制, 并且不抑制有其它结合特异性的其它结合结构的结合。

16. 根据权利要求 1 的抗体, 其中所述结合结构识别非还原形式的 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白。

17. 展示于肿瘤细胞中或表面上的靶结构, 所述靶结构

a) 能被权利要求 1-14 之任意一项限定的抗体的结合结构和有相似结合特性的其它结合结构特异地阻断, 并能特异地阻断之,

b) 展示于人胃肠上皮细胞中和表面上,

c) 与 $\alpha 6$ 和/或 $\beta 4$ 整联蛋白链或其变异体基本同源, 代表共有的或独特的表位,

d) 在肿瘤细胞表面上高表达, 并且

e) 是细胞毒性效应机制的靶子。

18. 根据权利要求 17 的靶结构, 其中该结合结构被标记并且其结合被非标记形式的所述结合结构抑制而不被其它结合结构抑制, 并且不抑制有其它结合特异性的其它结合结构的结合。

19. 根据权利要求 17 的靶结构, 其中所述结合结构含有基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 23-33、49-55、88-98、158-162、177-193 和 226-238 位氨基酸的一个或更多个互补决定区 (CDR) 序列, 或有相似独特结合特性的其它结合结构。

20. 根据权利要求 17 的靶结构, 其中所述结合结构是抗体。

21. 根据权利要求 20 的靶结构, 其中所述抗体含有基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 1-109 位氨基酸的轻链可变区, 和基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 128-249 位氨基酸的重链可变区。

22. 根据权利要求 17-21 之任意一项的靶结构, 其在人结肠上皮细胞中均一地表达, 在胰腺管和胆管细胞中表达较低。

23. 根据权利要求 17-22 之任意一项的靶结构, 其表达与胃肠上皮

分化相关联。

24. 根据权利要求 17-23 之任意一项的靶结构，其基本地包含 SEQ ID NO:3 所示 $\alpha 6$ 整联蛋白和/或 SEQ ID NO:4 所示 $\beta 4$ 整联蛋白的氨基酸序列，和/或其一个或更多个片段，和/或变体或拼接变体，和/或亚单位。

25. 根据权利要求 24 的靶结构，其包含所述 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白和/或其所述的一个或更多个片段和/或变体和/或亚单位的同型或异型单体或同型或异型多聚体。

26. 根据权利要求 24 的靶结构，其在非还原形式下的表观分子量为 90-140 kDa，最优选为 80-160 kDa。

27. 根据权利要求 24 的靶结构，其含有基本地包含 SEQ ID Nos:5-51 所示氨基酸序列之任一个的肽或多肽，或含有与所述多肽复合的分子。

28. 根据权利要求 24-27 之任意一项的靶结构，其在还原形式被权利要求 1-16 之任意一项所定义的抗体包含的结合结构唯一或不唯一地识别。

29. 一种物质，其与权利要求 17-28 之任意一项所定义的靶结构结合，该物质是有机化学分子或肽。

30. 一种物质，其是权利要求 17-28 之任意一项所定义的所述靶结构的结合结构的抗独特型。

31. 根据权利要求 30 的物质，该抗独特型被对所述靶结构有结合特异性的结合结构特异地阻断并特异地阻断之。

32. 一种物质，其阻断权利要求 17-28 之任意一项所定义的靶结构功能，该物质是有机化学分子或肽。

33. 一种结合结构，其识别权利要求 17-28 之任意一项所定义的靶结构，并且其具有有机化学性质。

34. 一种药物组合物，其包含权利要求 1-16 之任意一项中所定义的抗体作为有效成分。

35. 一种药物组合物，其包含权利要求 17-28 之任意一项中所定义的靶结构作为有效成分。

36. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 29-32 之任意一项所定

义的物质作为有效成分。

37. 一种疫苗组合物，其包含权利要求 1-16 之任意一项中所定义的抗体或权利要求 17-28 之任意一项所定义的靶结构或权利要求 29-32 之任意一项所定义的物质作为有效成分。

38. 一种基于抗血管扩张机制治疗疾病的治疗方法，其中将权利要求 1-16 之任意一项中所定义的抗体或权利要求 17-28 之任意一项中所定义的靶结构或权利要求 29-32 之任意一项中所定义的物质施用给实施对象人。

39. 一种治疗人转移性疾病的方法，其中将权利要求 1-16 之任意一项中所定义的抗体施用给实施对象人。

40. 一种人恶性疾病体外组织病理诊断和预后的方法，其中将样品与权利要求 1-17 之任意一项中所定义的抗体和指示剂接触。

41. 根据权利要求 40 的方法，该方法包括肿瘤分型。

42. 根据权利要求 40 的方法，该方法包括肿瘤筛选。

43. 根据权利要求 40 的方法，该方法包括肿瘤诊断和预后。

44. 根据权利要求 40 的方法，该方法包括监测恶化前疾病。

45. 一种人恶性疾病体外诊断和预后的方法，其中测定体液中包含权利要求 17-28 之任意一项所定义的靶结构的抗原的浓度。

46. 一种人恶性疾病体外诊断和预后的方法，其中测定体液中权利要求 1-16 之任意一项所定义的抗体的浓度。

47. 一种人恶性疾病体外诊断和预后的方法，其中测定体液中 a) 包含权利要求 17-28 之任意一项所定义的靶结构的抗原或权利要求 29-32 之任意一项所定义的结构，和 b) 权利要求 1-16 之任意一项所定义的抗体的复合物的浓度。

48. 一种人恶性疾病体内诊断和预后的方法，其中确定权利要求 1-16 之任意一项所定义的抗体在实施对象人体内肿瘤沉积物 (tumour deposits) 中的定位。

49. 根据权利要求 48 的方法，其中所述抗体在确定前施用给该对象。

50. 根据权利要求 48 的方法，其中所述抗体在肿瘤沉积物中积累。

51. 根据权利要求 48-50 之任意一项的方法，其是定量性的。

52. 一种治疗人恶性疾病的方法，其中将权利要求 1-16 之任意一项所定义的抗体施用给实施对象人。

53. 根据权利要求 52 的方法，其中所述抗体通过在基因上连接到这样的分子上而被改变，该分子赋予联合分子改变的药代动力学性质。

54. 根据权利要求 52 的方法，其中所述抗体通过衍生而被改变。

说明书

涉及 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的人胃肠上皮肿瘤抗原的抗体

本发明涉及具有在人胃肠上皮肿瘤细胞中和细胞表面上以及正常人胃肠上皮细胞亚群中展示的靶结构的结合结构的抗体、或其衍生物或片段；并且涉及展示在肿瘤细胞中或表面上的靶结构、疫苗组合物、药物组合物以及与人恶性疾病相关的方法。

发明背景

外科手术是结肠癌的主要治疗方案，根据 Dukes Stage A 到 C 的肿瘤进程状态，导致五年存活率为 90%到 40%。包括放疗和化疗的传统的辅助治疗已经能够进一步降低死亡率大约 30% (1)。尽管有这些进步，结肠癌和直肠癌仍是人类癌症死亡的主要原因之一。已经广泛尝试了免疫治疗。然而，结肠癌通常对免疫治疗有抗性并且被认为是低免疫原性的。结肠癌病人对白细胞介素-2 治疗和过继转移体外培养的肿瘤浸润淋巴细胞没有反应，而这些对免疫原性恶性疾病如黑色素瘤患者有效。然而，最振奋的是，Riethmuller 等报道：Dukes Stage C 结肠癌经原发癌切除后用针对肿瘤和正常上皮相关抗原 (Ep-CAM) 的裸鼠单克隆抗体 (mAb) 治疗，七年死亡率下降了 32% (2)，表明其它免疫治疗模式也会有效。

辅助免疫治疗及更高阶段癌症的治疗的显著改进需要提供比裸 mAb 更有效力的效应机制。原则上，需要提高导向抗体的肿瘤选择性来提高效力。

使用从人肿瘤异种免疫得到的杂交瘤产生的鼠 mAbs 已经发现了目前所定义的有限数目的结肠癌相关抗原 (3)。

使用大的噬菌体展示文库来鉴定新的肿瘤相关抗原预期能显著加快发现对肿瘤免疫治疗和诊断有用的靶分子的进程。可以通过在培养的肿瘤细胞和组织块上选择和筛选抗体噬菌体文库来这样鉴定靶分子以产生定义体内外表达抗原的特异试剂 (4)。噬菌体展示技术已经成为产生针对各种纯化抗原的单克隆抗体试剂的有效工具，并且在几项研究中已经

描述了从免疫的、原初的和合成的抗体噬菌体文库来的构建和成功的筛选结果(5)。

考虑到其普遍应用,非免疫文库是有利的,使得针对每一个单一靶标的独特文库是不必要的。在另一方面,足够大的和高质量的非免疫文库难于构建,并且,使用这些文库发现靶子的过程在基于复合抗原时需要有效的消减筛选法。

现在已经用复合人抗原免疫的近人灵长类构建了更适度容量的噬菌体文库。这代表了利用体内预选择库的方案。对异种抗原反应背景降低时应该富集对肿瘤特异性表位有特异性的该种文库(6)。进一步,与鼠相比,与人抗体有接近的序列同源性的灵长类抗体在人中应无免疫原性(7)。

现在已经鉴定了噬菌体文库来的限定选择性表达的结肠癌相关抗原的新的灵长类抗体。治疗潜力(由T细胞介导的对包被了两种与工程化超抗原融合的该抗体的培养结肠癌细胞的杀伤所证明)和与结肠癌相关抗原例如EP-CAM特异的鼠Fab片段融合的超抗原是相当的,该超抗原先前在实验系统中确定了其治疗能力。

本发明还提供了噬菌体抗体的有效的正向和消减细胞筛选法,其能够促进将来用从大噬菌体文库来的抗体鉴定包括肿瘤相关抗原在内的新的表型特异性抗原。

发明概述

本发明第一方面涉及具有在人胃肠上皮肿瘤细胞中和人胃肠上皮肿瘤细胞表面上及正常人胃肠上皮细胞亚群中展示的靶结构的结合结构的抗体、或其衍生物或片段,所述结合结构含有轻链中基本地包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的第23-33(CDR1)、49-55(CDR2)、88-98(CDR3)位氨基酸的互补决定区(CDR)序列,和重链中基本地包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的第158-162(CDR1)、177-193(CDR2)和226-238(CDR3)位氨基酸的CDR序列,或者所述结合结构可以是有相似独特结合特性的其它结合结构。

在一个实施方案中,抗体是噬菌体选择的。在另一个实施方案中,

所述序列起源于 *Macaca fascicularis*。本发明的另一个实施方案是所述抗体的衍生物，该衍生物起源于人。优选地，该序列与人来源的相应序列有至少 84% 的同一性。优选地，抗体在人中是低免疫原性的或无免疫原性。

在另一个实施方案中，通过在基因上连接到其它多肽、和/或通过化学偶联到有机或无机化学分子和/或通过二聚化、寡聚化或多聚化来衍生该抗体。

在另一个实施方案中，所述抗体在基因上连接或化学偶联到细胞毒性多肽或细胞毒性有机或无机化学分子。

在另一个实施方案中，所述抗体在基因上连接或化学偶联到生物学活性分子。

在另一个实施方案中，所述抗体在基因上连接或化学偶联到免疫活化分子。

在另一个实施方案中，已改变所述抗体以提高或降低其抗体亲抗原性 (avidity) 和/或其亲和力 (affinity)。

在另一个实施方案中，已改变所述抗体以提高其产率。

在另一个实施方案中，已改变所述抗体以影响其药代动力学特性。

在另一个实施方案中，已改变所述抗体以赋予其新的药代动力学特性。

在另一个实施方案中，所述抗体被标记，并且其结合被未标记形式的所述抗体抑制而不被其它结合结构抑制，而且不抑制有其它特异性的其它结合结构的结合。

另一个实施方案是抗体，其结合结构识别非还原形式的 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白。

在另一方面，本发明涉及展示于肿瘤细胞中或表面上的靶结构，所述靶结构

a) 能被权利要求 1-14 之中任意一项所限定的抗体的结合结构、和有相似结合特异性的其它结合结构特异地阻断并能特异地阻断它们，

b) 展示于人胃肠上皮细胞中和表面上，

c) 与 $\alpha 6$ 和/或 $\beta 4$ 整联蛋白链或其变异体基本同源，代表共有的或独特的表位，

d) 在肿瘤细胞表面上高表达，并且

e) 是细胞毒性效应机制的靶子。

上文中“基本同源”意为与靶结构中 与抗体结合有关的那些部分的同源性。

在所述靶结构的一个实施方案中，结合结构被标记并且其结合被所述结合结构的未标记形式抑制而不被其它结合结构所抑制，并且不抑制有其它结合特异性的其它结合结构的结合。

在所述靶结构的另一个实施方案中，所述结合结构含有基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 23-33、49-55、88-98、158-162、177-193 和 226-238 位氨基酸的一个或更多个互补决定区 (CDR) 序列，或是有相似独特结合特性的其它结合结构。

在所述靶结构另一实施方案中所述结合结构是抗体，该抗体在另一实施方案中含有基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 1-109 位氨基酸的轻链可变区，和基本地包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列第 128-249 位氨基酸的重链可变区。

在另一实施方案中，所述靶结构在人结肠上皮细胞中均一地表达，在胰腺管和胆管细胞中表达较低。

在另一实施方案中，所述靶结构的表达与胃肠上皮分化相关联。

在另一实施方案中，所述靶结构包含 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的氨基酸序列，其中 $\alpha 6$ 部分如 SEQ ID NO:3 所示并且 $\beta 4$ 部分如 SEQ ID NO:4 所示。靶结构的另一个实施方案包含所述 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白和/或其所述一个或更多片段和/或变异体和/或亚单位的同型的或异型的单体或同型或异型的多聚体。优选地，所述靶结构非还原形式的表观分子量为 90-140 kDa，最优选 80-160 kDa。

在另一实施方案中，靶结构含有基本地包含 SEQ ID Nos:5-51 所示氨基酸序列之任意一个的肽或多肽，或者含有与所述多肽复合的分子。

对包含来自 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的氨基酸序列的靶结构，所述靶结构在

另一实施方案中可在其非还原形式下被上述抗体包含的结合结构唯一或不唯一地识别。

在另一方面本发明涉及结合以上定义的靶结构的物质，该物质是有机化学分子或肽。在一个实施方案中，所述物质是所述靶结构的抗独特型。所述抗独特型可被对所述靶结构有相似结合特异性的结合结构特异地阻断并特异地阻断之。

在另一方面本发明涉及阻断以上定义靶结构的功能的物质，该物质是有机分子或肽。

在另一方面，本发明涉及识别以上定义靶结构、并有有机化学特性的结合结构。

在另一方面，本发明涉及包含以上定义的抗体、以上定义的靶结构或以上定义的物质作为有效成份的药物组合物。

在另一方面，本发明涉及包含以上定义的抗体、以上定义的靶结构或以上定义的物质作为有效成份的疫苗组合物。

在另一方面，本发明涉及基于抗血管扩张机制（anti-angiotenic mechanism）治疗疾病的治疗方法，其中将以上定义抗体、或以上定义靶结构或以上定义物质施用给人实施对象。

在另一方面，本发明涉及治疗人转移性疾病的方法，其中将以上定义抗体施用给实施对象人。

在另一方面，本发明涉及人恶性疾病体外组织病理诊断和预后的方法，其中将样品与以上定义的抗体和指示剂接触。

所述方法的实施方案包含肿瘤分型、肿瘤筛选、肿瘤诊断和预后以及监测恶化前疾病。

在另一方面，本发明涉及人恶性疾病体外诊断和预后的方法，其中测定液体中包含以上定义的靶结构的抗原、或以上定义的所述靶结构的抗独特型的浓度。

在另一方面，本发明涉及人恶性疾病体外诊断和预后的方法，其中测定液体中以上定义抗体的浓度。

在另一方面，本发明涉及人恶性疾病体外诊断和预后的方法，其中

测定体液中 a) 包含以上定义的靶结构的抗原或以上定义的所述靶结构的抗独特型, 和 b) 以上定义的抗体的复合物的浓度。

在另一方面, 本发明涉及人恶性疾病体内诊断和预后的方法, 其中确定实施对象人中以上定义的抗体在肿瘤沉积物 (tumour deposits) 的定位。优选地所述抗体在确定前施用给该实施对象。在一个实施方案中, 所述抗体在肿瘤沉积物中积累。在另一实施方案中, 所述方法是定量性的。

在另一方面, 本发明涉及人恶性疾病的治疗方法, 其中将以上定义抗体施用给实施对象人。在该方法的一个实施方案中, 已通过基因上连接到赋予联合分子改变的药代动力学特性的分子改变了所述抗体。在另一实施方案中, 已通过衍生改变了所述抗体。

发明详述

鉴定新的肿瘤相关抗原 (TAAs) 对肿瘤免疫治疗和诊断领域的进步很关键。基于流式细胞术评估和使用由连接了不同抗生素抗性标记物的特异抗体克隆组成的微小文库, 在本发明中首创了利用完整细胞作为抗原来源的噬菌体抗体的正向和消减筛选 (positive and subtractive selection) 法。从用混合的人结肠癌免疫的灵长类动物 (*Macaca fascicularis*) 构建了 scFv 噬菌体文库 (2.7×10^7)。通过结合到 Colo205 结肠腺癌细胞、蛋白质水解洗脱和随后的噬菌体扩增进行三轮文库筛选。

用免疫组化鉴定了与结肠癌有反应的并且只与少数几种正常上皮组织有有限反应的几个抗体。一个克隆, A3 scFv, 识别在所研究的 11/11 结肠癌和 4/4 胰腺癌中均一表达的表位, 并且正常组织的表达局限于胃肠道上皮亚型。A3 scFv 的总表观亲和力比 A3 Fab 高约 100 倍, 表明 scFv 同型二聚体的结合。基于 Fab 结合计算的 A3 表位的细胞表面密度特别地高, 接近每个细胞 3,000,000 个。

还证明了: T 细胞介导的对包被有融合了 A3 scFv 的低 II 类 MHC 结合超抗原突变体 SEA (D227A) 的结肠癌细胞的有效杀伤。因此所鉴定的 A3 分子是一种 TAA, 其特性预示了其在结肠癌和胰腺癌免疫治疗中的用途。

讨论

在本发明中开发了用于从噬菌体文库中鉴定细胞表型特异性抗体片段的有效的噬菌体筛选方案。作为范例应用的靶特异性是针对结肠癌相关抗原的。

首先使用此处提供的用于噬菌体增殖的噬菌粒构建体分析了在噬菌体群中 pIII-scFv 融合蛋白表面展示的频率。与以前的报道相比，获得了更高水平的 C215 scFv 展示。这有利于消减筛选效率，但是也提高了从文库中亲和力筛选低亲和性抗体的可能性。

清楚地证明了 C215 scFv 噬菌体结合到 Colo205 结肠腺癌细胞的特异性。使用能特异性切割噬菌体蛋白 III 和 scFv 抗体之间的靶序列的蛋白酶 Genenase 能够有效地洗脱结合的噬菌体并使洗脱后细胞完整。无论其结合亲和力如何，这种非化学性洗脱方法应该同样有效地洗脱噬菌体抗体，和仅通过 scFv 相互作用结合的噬菌体，增加了该过程的特异性。

使用该筛选方案在 Colo205 细胞 (500 000 ×) 上三轮筛选后获得的富集与其它研究人员报道的对复合抗原的筛选相似。

证实了各种方法步骤的效果后，将此联合技术应用于使用 Colo205 细胞的文库筛选。

用人肿瘤免疫的近人物种构建文库。在对广泛分布的正常人组织抗原的有限异种反应性背景下，该方式产生的抗体库可能包括针对肿瘤特异性抗原的亲和力成熟抗体 (6)。所鉴定的抗体识别在正常组织中有限分布的肿瘤和组织分化抗原。在初级筛选中筛选出的鉴定为结肠癌组织反应性的所有抗体在流式细胞仪上也与活的 Colo205 细胞反应。这种对细胞表面特异性的限制反映了筛选过程而不是文库的组成，因为用于免疫的是肿瘤组织成分混合物悬液。

在以往相似的研究中，在相同方式产生并用组织块作为抗原来源筛选出的抗黑素瘤文库中鉴定了细胞外和细胞内的特异性 (4)。与流式细胞术筛选相比，在初级筛选中使用术后人结直肠肿瘤和正常结肠 (在相同孔中封固) 的组织切片用免疫组化法确保选出的特异性的临床相关性、提高效率 and 获得更高质量的信息。

根据其对不同器官上皮的反应性模式来区分，筛选出的抗体可分为

四个抗体特异性组（见实施例 1，表 1）。在这些特异组中，A3 scFv 识别了大多数的肿瘤选择性抗原。在原发的和转移的结肠癌和胰腺癌样品中该 A3 TAA 的表达高、均一和频繁。而且，用 A3 Fab 融合蛋白（3 百万表位/细胞）确定其细胞表面表达水平特别地高，并且允许细胞表面介导的细胞毒性效应。

所定义的频繁表达的人肿瘤抗原很少（如果有的话）是肿瘤特异性的，但是通常涉及组织分化，例如 A3 和 Ep-CAM。然而，这些抗原在肿瘤中上调的表达提供了治疗有效剂量窗口的基础。由于有限的毛细血管通透性和体内表达位点（例如暴露给循环抗体的肠上皮细胞顶面非常有限），正常组织区室表达抗原的有效循环也许更局限。

全上皮 Ep-CAM 反应性 17-1A mAb 的临床经验支持鉴定有效无毒抗体剂量的可行性。该工作中筛选出的所有 scFv 克隆在上皮中的限制性表达，表明原则上能认为这些克隆是与 17-1A（例如全长 mAbs）相似的用于免疫治疗的候选者。然而与 Ep-CAM 相比，A3 TAA 的特别优势是在大多数正常上皮例如肺和肾上皮中缺乏表达，尽管在结肠中的表达是相似的。

在源于胃肠道的肿瘤亚型中的选择性表达支持正常上皮亚型的组织分布（见实施例 2，表 2）。

与 A3 表位相比，以前熟知的几个结肠癌相关抗原（CEA, CA50, CA19-9, CA242, Tag-72）（3）在正常组织中表达相同或更局限。然而，与 A3 和 C215 Ep-CAM 相反，它们在肿瘤中的表达更不均一。

使用 Ep-CAM 抗体已经证明了好的临床结果，包括在辅助背景下结肠癌患者的存活优势（2）。为了在甚至更高阶段的患者中诱导肿瘤应答，引入与该抗体连接的有效的效应分子将有望克服在用裸 17-1A mAb 治疗时所见的“正常组织抗性”。临床使用前，这能够用毒素偶联的鼠源该抗原的特异抗体或人结肠癌相关抗原的转基因动物在模式系统中进行研究。

以往，应用抗体免疫毒素成功地治疗了带有表达异源（人）肿瘤抗原（其在鼠组织中不表达）的转移性生长的肿瘤的小鼠模型（10）。然而，所用 TAAs 是真正肿瘤特异性，并且该模型不反映对正常组织靶向毒

性的潜力。

在以前的研究中我们报道了作为免疫刺激毒素的超抗原在肿瘤免疫治疗中的潜力(8)。抗体介导的超抗原的靶向吸引大量细胞毒性的和产生细胞因子的T细胞到肿瘤部位。突变为MHC II类低结合亲和力的超抗原SEA(D227A)，被遗传连接到肿瘤靶向性抗体。该“肿瘤选择”剂用于征集肿瘤中不依赖于MHC表达的T细胞，因此解决了代表其它主动免疫治疗方法重大障碍的MHC下调和多态性的问题。

所建立的“肿瘤选择性”1F scFv噬菌体、“广泛反应的”C215噬菌体和非特异性D1.3噬菌体抗体克隆的微小文库(mini-library)是研发有效的消减细胞筛选法重要的工具。由于不展示噬菌体颗粒的频率高，该筛选原则需要在噬菌体拯救和扩增前先负选择再正选择。或者，通过选择性蛋白水解(G. Winter, pers. comm.)，可以使不展示的噬菌体成为无感染性的。该技术可允许产生“无作用文库”，例如广泛地负向预选择的文库(例如针对静息状态细胞或可转染的亲代细胞)。

总之，对每一轮筛选，能从噬菌体群中选择性地减去约100位的“不需要的”模型噬菌体特异性。将来的消减筛选法联合使用该研发方案和非免疫的大噬菌体文库以鉴定细胞表面差异表达抗原将证明该方法是否优于本研究中我们使用的策略，即使用体内预选择免疫库的正向筛选法，包括限制性和偏向性如免疫优势(4)。与A3 scFv融合蛋白相比，A3 Fab结合肿瘤细胞的低亲和力和高的表位密度，表明形成了与在细胞表面聚集的表位相互作用的scFv多聚体。应该研发更高亲和力的A3 Fab单价变体或者是稳定二价构建体例如与推断的A3的低免疫原性相容的全长的A3 Fv嫁接mAbs。该构建体将适于将适宜的效应分子靶向高度表达的该胃肠肿瘤相关抗原。

本发明在本说明书以下非限制性实验部分中进一步阐述。

实验部分

材料与amp;方法

动物

瑞典斯德哥尔摩传染病控制研究所(Swedish Institute for

Infectious Disease Control (SIIDC), Stockholm) 饲养并免疫猕猴 Macaque (*Macaca fascicularis*)。总能自由地得到食物和水。用 2ml 在含 10% 正常猕猴血清的 PBS 中的结肠癌组织粗悬液皮下接种四只猴子。第 21、35 和 49 天时给予加强免疫剂量。在两只接种了与明矾佐剂混合的抗原的猴子中证实了抗体反应。按照瑞典立法饲养动物并且当地道德委员会认可实验。

组织和细胞

从 Lund University Hospital 和 Malmö General Hospital, Sweden 得到人肿瘤和正常组织样品。人结肠细胞系 Colo205、人 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji 和鼠 B16 黑素瘤细胞系获自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Rockville, MD)。以前描述了用含有 Ep-CAM-1 基因 (C215) 的表达载体 pKGE839 转染的鼠黑素瘤 B16-C215⁺ 细胞。

人细胞培养于补充了 10% 热灭活胎牛血清 (Gibco) 和 0.1mg/ml 硫酸庆大霉素 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, 以色列) 的 RPMI 1640 (Gibco, Middlesex, UK) 培养基中。鼠细胞培养于额外补加了 1mM 谷氨酰胺 (Hyclone, Cramlington, UK)、 5×10^{-5} M β -巯基乙醇 (ICN, Costa Mesa, CA)、0.2% NaHCO₃ (Seromed Biochrome, Berlin, 德国)、 1×10^{-2} M HEPES (HyClone, UT) 和 1×10^{-3} M 丙酮酸钠 (Hyclone) 的培养基中。用 Gene-Probe Mycoplasma T.C. test (San Diego, CA) 反复测试细胞的支原体污染。

噬菌粒载体和噬菌体文库构建

从一只对应的猴子用 Promega 的 RNA 分离试剂盒 (Mannheim, Germany) 抽提脾脏总 RNA。用 PE Biosystems (Stockholm, Sweden) RNA PCR 试剂盒扩增 cDNA。以前报道了用于 λ 轻链和重链基因的 cDNA 合成和组装这些基因到 scFv 基因的引物 (4)。scFv cDNA 连接进噬菌粒载体 (4) 与 M13 基因 III 的 249-406 位残基融合。scFv gIII 基因由 *phoA* 启动子表达并且所导致的蛋白由大肠杆菌热稳定毒素 II 的信号肽引导。

用有 scFv 基因插入的 7 μ g 文库载体重复电穿孔在最小化琼脂平板上得到 2.7×10^7 个原始转化的大肠杆菌 TG-1 菌落。从平板上刮下菌落并在

2 ×YT 中在以 150rpm 37℃ 生长 1 小时。培养物用 50 倍过量 M13K07 辅助噬菌体 (promega) 超感染。加入终浓度为 100mg/l 氯苄青霉素、让培养物再生长 1 小时。加入终浓度为 70mg/l 的卡那霉素, 培养物以 250 rpm 在 30℃ 生长 15 小时。用 PEG/NaCl 重复沉淀二次以从培养上清中收获噬菌体颗粒。沉淀的噬菌体溶解于含 1% BSA 的 PBS 中。

Western 印迹分析

scFv-C215 噬菌体颗粒的两倍比稀释系列 (来自 PEG 沉淀/浓缩的噬菌体的未稀释原种) 在含 1% SDS 和 2% β 巯基乙醇的 12% 还原性聚丙烯酰胺凝胶上分离。蛋白质通过电泳转移到硝酸纤维素膜 (Bio-Rad, Hercules, CA) 上。用 5% 低脂牛奶 (Semper AB, Stockholm, Sweden) 封闭膜。再用偶联到匙孔血蓝蛋白上针对蛋白 III 衍生肽序列 (AEGDDPAKAAFNSLQASATEC) 的兔抗血清孵育。用偶联了辣根过氧化物酶 (HRP) 的二级羊抗兔抗体 (Bio-Rad) 孵育 30 分钟。所有步骤间在 PBS/0.5% Tween 20 中洗膜, 洗 3 次, 每次 5 分钟。膜在底物 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfon Buckingham-shire, UK) 中孵育 1 分钟。光敏感胶片 (ECL hyperfilm, Amersham) 曝光到膜上并显色 0.5-5 分钟。

相似地, 为分析纯化 Fab (A3, 包括猕猴 CH1 和 Clambda 区域)、scFv-和 Fab (包括鼠 CH1 和 Ckappa) -SEA (D227A) 融合蛋白 (按照以前描述 (9) 生产) 的完整性, 进行 12% SDS-PAGEs。用纯化的多克隆兔抗-SEA 抗体孵育含转移蛋白的膜, 随后是以上描述的试剂步骤。

模型和噬菌体文库在细胞上的筛选

10^{12} 个在 100 μl PBS/1%BSA 中的 λ 轻链文库 (或者是模型噬菌体) 噬菌体悬液, 用 3, 000, 000 个 Colo205 细胞在冰上孵育 1 小时。细胞用 2ml PBS/1%BSA 洗 3 遍, 每次洗时孵育 10 分钟。向细胞沉淀加入 50 μl 的 33 μg/ml 的 Genenase 洗脱噬菌体, 并且孵育 15 分钟。Genenase, 枯草芽孢杆菌素 BPN 突变体, S24C/H64A/E156S/G169A/Y217L, 由 Dr. Poul Carter (San Francisco, CA) 慷慨提供。离心后, 上清转移到新管, 加入 250 μl 含 1%BSA 的 PBS。为拯救和扩增选出的文库 (和多代实验中的模

型噬菌体颗粒)，使洗脱的噬菌体颗粒感染 1ml 大肠杆菌 DH5 α F (OD_{600nm}=1.0)。感染的细菌培养物用补充了适当抗生素的 2 ×YT 稀释 100 倍，并且培养直到 OD>1.0 (直到 2 天)。

最终，为产生可溶性 scFv，大肠杆菌的琥珀抑制株 HB2151 用从第二轮和第三轮筛选出的文库感染。在含有氨苄青霉素的琼脂平板上生长后，在 30℃ 在 96 微孔板上补充了氨苄青霉素的 2 ×YT 培养基中培养单菌落 17 小时。离心后，去掉上清，加入等体积的 PBS/1%BSA，分析单个 scFvs 对人肿瘤和正常组织切片的免疫反应性。简而言之，用兔抗血清、随后用生物素标记的羊抗兔抗体 (DAKO A/S, Copenhagen, Denmark) 和 StreptABComplex HRP (DAKO A/S) 检测 C-末端标签 ATPAKSE (见“免疫组织化学”)。

免疫组织化学

冰冻切片 (8 μ m) 在载玻片上空气干燥，-20℃ 丙酮固定 10 分钟并在含 20%胎牛血清的 PBS (FBS) 中重新水化。内源性生物素用亲和素 (1/6 稀释) 封闭 15 分钟再用生物素 (1/6 稀释) 孵育 15 分钟 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)。5 μ g/ml 亲和纯化和生物素标记的兔抗-SEA 抗体孵育 30 分钟，随后用 1/110 稀释于 50mM Tris pH 7.6 中的 StreptABComplex HRP (DAKO A/S, Copenhagen, Denmark) 孵育 30 分钟。所有步骤间，切片在 TBS 中洗 3 次。在 0.5mg/ml 3, 3' 二氨基联苯胺四盐酸盐 (Sigma) (溶解于含 0.01% H₂O₂ 的 Tris pH7.6) 中进行染色反应 8 分钟。在 0.5%甲基绿中复染 10 分钟，载玻片在自来水下冲洗 10 分钟，在 70-99%乙醇和二甲苯中逐渐脱水，再在 DPX 介质 (Sigma) 中封固。

流式细胞术

用 0.02% w/v EDTA 解离并用 PBS 洗 Colo205 结肠癌细胞。为跟踪猴子的抗体反应进程，用稀释血清、生物素标记的兔抗人 IgG 抗体 (Southern Biotechnology Ass. Inc., Al, USA)、最终用抗生物素蛋白-PE (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 连续 4℃ 分别孵育细胞 1 小时、30 分钟和 30 分钟。

用兔-抗-M13 抗体 (用 M13 颗粒免疫兔子产生) 和 FITC 偶联的驴抗

兔抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) 分析模型噬菌体和细胞的结合。用生物素标记的兔抗 SEA 抗体和亲和素-PE 检测融合到 SEA(D227A) 的抗体的结合。所有试剂稀释于 PBS/1% BSA。噬菌体颗粒结合后, 用试剂孵育三次, 每次 10 分钟, 再用 PBS/1% BSA 洗两次细胞。

用 FACSORT 流式细胞仪 (Becton Dickinson) 进行流式细胞分析。

在培养细胞上确定亲和性

按照 Bolton Hunter 描述用碘标记 A3 scFv-SEA(D227A)、A3 Fab-SEA(D227A) 和 1F scFv SEA(D227A) 融合蛋白, 每种蛋白 80 μ g, 比活性为 10-15 μ Ci/ μ g。Colo205 细胞和 Raji 细胞, 30,000 个/样品, 与两倍比系列稀释于 1% BSA 中的碘标记融合蛋白 (100 μ l/管) 孵育 1 小时。再在 PBS 中洗 3 次, 然后测定结合活性。加入的和结合的融合蛋白的浓度用于斯卡查得分析 (Scatchard analysis)。减去与 Raji 细胞的背景结合以计算与 Colo205 细胞的特异结合。

细胞毒性实验

用 ^{51}Cr -标记的 Colo205 细胞作为靶细胞, 人 T 细胞作为效应细胞在标准的 4 小时铬释放试验中测定超抗原融合蛋白的 T 细胞依赖的细胞毒性 (超抗原抗体依赖的细胞的细胞毒性, SADCC) (9)。特异性裂解的百分比计算为:

$100 \times \frac{\text{实验所释放的 cpm} - \text{背景所释放的 cpm}}{\text{总释放 cpm} - \text{背景所释放的 cpm}}$

总释放 cpm-背景所释放的 cpm

实施例 1

结合肿瘤的猕猴单克隆抗体的产生

每隔一周用人结肠癌悬液免疫猕猴, *Macaca fascicularis* (4 只), 重复四次。猴子中抗体反应的逐渐形成通过使用系列稀释的免疫前和免疫血清, 流式细胞染色培养的结肠细胞 Colo205 来跟踪。仅仅当使用明矾沉淀的肿瘤组织悬液时引发 IgG 抗体反应 (2 个个体)。

用免疫前血清抗体有最高免疫结合水平的猴子用于构建大的大约 2.7×10^7 (由原始转化体数目估计) 的联合 scFv 噬菌体文库。用 Colo205 细胞筛选灵长类噬菌体文库。经三轮连续筛选, 总噬菌体产量 (洗脱的/

加入的噬菌体数目, 计算为集落形成单位, CFU) 由 1.9×10^{-7} 、 1.4×10^{-5} 到 1.2×10^{-3} 逐渐增加。流式细胞术证明: 三轮筛选后从噬菌体文库产生的 5% (12/246) 单克隆可溶性 scFv: s 结合人结肠癌组织块和完整的 Colo205 细胞。根据用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析的 Hinf I 限制性图谱, 证明所有选择的抗体分别有独特核酸序列。

用 $5 \mu\text{l}$ 细菌培养物和互补于噬菌粒载体中 scFv 基因的 5' 和 3' 区域的引物 (在 *phoA* 启动子和 M13 基因 III 中的区域) 用聚合酶链式反应扩增抗体基因。

选出的 scFv 逐个证明了与正常组织上皮的独特反应性

根据其于正常组织的免疫组化反应模式, 将结肠癌反应性 scFv' s 分为特异性组 (表 1)。详尽研究的抗体是 A3 scFv (和 A3 scFv-SEA (D227A))、A10 scFv、3D scFv 和 1D scFv。通过其对不同器官上皮的精细特异性和其与白细胞的结合能相互区分代表性抗体。1D scFv 与肠上皮强烈反应, 并且是与有多形核粒细胞形态细胞反应的唯一抗体。通过对肾小管和收集管的管腔表面染色, 1D scFv 能够与其它抗体区分, 然而 A10 scFv 与这些上皮细胞均一地 (非极性) 反应, 并且 3D scFv 和 A3 scFv 为阴性反应。1D、A10 和 3D, 而非 A3 scFv, 也与肺中巨嗜细胞样细胞反应。

第五组抗体未广泛评估, 因而不包括在表 1 中, 其与结肠上皮和白细胞及肝中枯否细胞反应。A3 scFv 突出地显示与所用的正常组织组最大限制性地反应。A3 最显著的正常组织反应性是正常结肠上皮的染色。在胰腺小管和肝胆管及小肠上皮的亚结构中也检测到弱染色。两个胃样品的其中一个的表面上皮被 A3 抗体强烈染色。

用融合蛋白 A3 scFv-SEA (D227A) 证实了 A3 scFv 的反应模式。该模式允许使用多克隆兔抗-SEA 抗体以便免疫组化检测, 其与使用针对 scFvs C-末端肽标签 ATPAKSE 的二级抗体比较, 是更为敏感的检测系统, 显示低的反应背景和组织交叉反应性。

表 1 对来自选出的结直肠癌噬菌体文库的可溶性 scFv 片段对正常人组织的免疫组织化学反应性

组织 / 亚结构	n*	ScFv 克隆名称				
		A3 **	A10	3D	1D	
食管	1	0	ND	ND	ND	
/上皮组织						
/非上皮组织		0	ND	ND	ND	
结肠	5	++	+	+	++	
/上皮						
/非上皮组织		0	0	0	粒细胞	++
小肠	2	(+)	不均一地	+	+	不均一地 (+)
/绒毛上皮						
/基底腺		+	+	+	++	
/非上皮组织		0	0	0	0	
Ventricle	2	0, ++	0	0, +	++	
/表面上皮						
/腺上皮		0	+, ++	0	++	
/非上皮组织		0	0	0	0	
胰腺	1	0	(+)	+	++	
/腺泡						
/小管		(+)	(+)	+	++	
/大管		0	(+)	+	++	
/非上皮组织		0	0	0	0	
/内分泌		0	0	0	0	
肝	2	0	ND	ND	ND	
/肝细胞						
/枯否氏细胞		0	ND	ND	ND	
/胆管		(+)	ND	ND	ND	
肾	1	0	+	0	腔表面	++
/近端小管						
/远端小管		0	+	0	腔表面	++
/收集管		0	+	0	腔表面	++
/肾小球		0	0	0	0	
/非上皮组织		0	0	0	0	
膀胱	1	0	ND	ND	ND	
/上皮组织						
/非上皮组织		0	ND	ND	ND	
前列腺	1	0	++	+	和分泌物质	++
/上皮组织						
/非上皮组织		0	0	0	0	
肺	1	0	(+)	(+)	0	
/支气管上皮						
/肺泡上皮		0	(+)	(+)	0	
/非上皮组织		0	巨嗜细胞	+	巨嗜细胞	++ + 巨嗜细胞
CNS	1	0	ND	ND	ND	
/灰质						
/白质		0	ND	ND	ND	
骨骼肌	1	0	ND	ND	ND	

表 1 注解:

0=阴性, (+)=弱, +=中等, ++=强, ND=未测

*检查的组织样品数目

**已用 A3 scFv (D227A) 融合蛋白确证 A3 scFv 的反应性。

实施例 2

A3 肿瘤相关抗原在结直肠癌和胰腺癌中均一地和频繁地表达

A3 scFv-SEA (D227A) 融合蛋白用于上皮来源的各种肿瘤的免疫组织化学染色 (表 2 和图 1)。该融合蛋白均一地和强烈地染色原发结肠癌组织的 11/11 样品和取自卵巢、淋巴结和肝中的 4/4 转移结肠癌样品。胰腺癌的 4/4 样品均呈强烈阳性。与之相反, 胃的、前列腺的、乳腺的和非小细胞性肺癌的组织样品呈阴性。

表 2 . A3 scFv SEA (D227A) 的肿瘤组织反应性

肿瘤组织	n	反应性
结肠癌, 原发肿瘤	11	所有肿瘤细胞被强烈 和均一地染色
结肠癌在淋巴结、肝和卵巢中的转 移癌	4	同上
胰腺癌	4	同上
心室癌	2	阴性
前列腺癌	2	阴性
乳腺癌	2	阴性
肺癌 (非小细胞)	2	阴性
恶性黑素瘤	2	阴性

实施例 3

A3 TAA 在结肠癌细胞表面上表达很高。

来自几个确定亲和性的斯卡查德图 (Scatchard plot) 的结果, 根据融合蛋白 A3 scFv-SEA (D227A), A3 Fab 和 1F scFv-SEA (D227A) (1F 分类为 A3 特异群) 对 Colo250 细胞的结合, 总结于表 3。从对 Colo250 细胞的结合减去对不表达 A3 和 A3 TAAs 的细胞系 B 细胞杂交瘤 Raji 细

胞的非特异性结合，计算出特异性结合。用线性回归计算 Scatchard 图 中外推直线的斜率和截距。与 A3 Fab（每个细胞约 300 万个结合位点） 融合蛋白相比，A3 scFv-SEA（D227A）融合蛋白在每个细胞的饱和结合 位点约少 10 倍，显示对 scFv 涉及二价（多价）结合。与 A3 Fab（580-780nM） 相比 A3 scFv 融合蛋白的总亲和力（3.6-5.5 nM）高 100 倍支持这个观 点。

用 1F scFv-SEA（D227A）融合蛋白进行的单一实验，证明了与 A3 scFv-SEA（D227A）融合蛋白相似的结合亲和力和结合位点的饱和。

表 3 结合到 Colo205 细胞的碘标记的融合蛋白的斯卡查德分析

融合蛋白	n*	Kd (nM)	百万位点/细胞
A3 Fab-SEA (D227A)	2	580-780	3.0-3.9
A3 ScFv-SEA (D227A)	3	3.6-5.5	0.11-0.39
1F ScFv-SEA (D227A)	1	4.2	0.18

*进行的实验次数

实施例 4

A3 和 1F scFv-SEA（D227A）介导对 Colo250 细胞的 T 细胞裂解 检查和比较了两种融合蛋白 A3 和 1F scFv-SEA（D227A）与阳性对 照 C215 Fab-SEA（D227A）和阴性对照 D1.3 scFv-SEA（D227A）融合蛋 白介导对 Colo250 细胞的超抗原抗体依赖性细胞毒（SADCC）的能力。A3 scFv-SEA（D227A）融合蛋白滴度在这个 4 小时实验中达到与 C215 Fab-SEA （D227A）融合蛋白相似的最大裂解平台，约 50%，虽然以高 10 倍的浓度 （图 2）。与 A3 scFv-SEA（D227A）相比，1F scFv-SEA（D227A）以稍高 的浓度介导相似水平的细胞毒性。

阴性对照 D1.3 scFv-SEA（D227A）融合蛋白不介导任何细胞毒性。

实施例 5

纯化结肠癌反应性抗体 A3 所识别的肿瘤相关抗原

从异种移植肿瘤细胞系 Colo250 中制备肿瘤抽提物。将抽提物加样 到用 C215 Fab-SEAm9 偶联的前置柱和用 A3scFv-SEA m9 偶联的柱上。在 加样时将柱子串联，但在碱性条件洗脱前将柱子分离。

洗脱时通过紫外分光光度计检测到一个单峰(图3)。收集、中和并浓缩后一个A3柱来的该洗脱组分,然后在非还原条件下SDS-PAGE分析(图4)。通过银染可看到两条表观分子量大约为90-140kDa的条带(图4中标记的I和II),将其切下并用标准的肽作图法检查。这两条带对应于Western印迹中被A3检测的条带,见实施例8。从条带I得到47条分离的胰化肽质量(序列和对应的质量见SEQ ID NO: 3、表4、和图5),其完全匹配人 $\alpha 6$ 整联蛋白或 $\beta 4$ 整联蛋白的MALDI-TOF(分别见SEQ ID NOs: 5-51和3-4,和分别见图3A和B,在图3A中下划线部分对应于图3B/SEQ ID Nos: 5-51所示的肽)确定的不同胰化肽质量。从条带II得到22条分离的胰化肽质量,其完全匹配 $\beta 4$ 整联蛋白不同的胰化肽质量(数据未出示)。数据显示可用A3-亲和柱特异性分离 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白异型二聚体。

表4 源于人 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白的肽/多肽和其质量

序列号	序列	测量的质量	计算的质量
5	LLLVGAPR	838.568	838.551
6	ANRTGGLYSCDITARGPCTR	2226.131	2226.050
7	VVTCAHRYEK	1262.637	1262.631
8	RQHVNTK	882.524	882.490
9	CYVLSQNL	1152.618	1152.583
10	FGSCQQGVAATFTK	1501.706	1501.710
11	DFHYIVFGAPGTYNWK	1914.881	1914.917
12	DEITFVSGAPR	1191.625	1191.600
13	ANHSGAVVLLK	1108.600	1108.647
14	DGWQDIVIGAPQYFDR	1879.865	1879.897
15	DGEVGGAVYVYMNQGR	1842.811	1842.844
16	WNNVKPIR	1026.608	1026.584
17	NIGDINQDGYPDIAVGAPYDDLK	2520.213	2520.189
18	GISPYFGYSIAGNMDLDR	1975.913	1975.922
19	NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	2026.992	2027.008
20	SRPVINIQK	1054.644	1054.637
21	LRPIITASVEIQEPSSR	1993.066	1993.108
22	VNSLPEVLPILNSDEPK	1863.920	1864.006
23	TAHIDVHFLK	1180.665	1180.647
24	FSYLPQK	995.601	995.556
25	DIALEITVTNSPSNPR	1726.866	1726.897
26	SEDEVGSLIEYFR	1672.764	1672.770
27	VESKGLEKVTCEPQK	1731.866	1731.895

28	REITEKQIDDNRK	1644.792	1644.866
29	FSLFAER	869.476	869.452
30	YQTLNCSVNVNVCVNR	1954.003	1953.927
31	LNyLDILMR	1150.644	1150.629
32	AFIDVTA AAENIR	1390.739	1390.733
33	LPNAGTQVR	955.523	955.532
34	VSVPTQDMRPEK	1386.727	1386.705
35	EPWPNSDPPFSFK	1547.730	1547.717
36	NVISLTEDVDFR	1536.744	1536.754
37	TQDYPSVPTLVR	1375.718	1375.722
38	RGEVGIYQVQLR	1417.801	1417.791
39	ALEHVDGTHVCQLPEDQK	2075.965	2075.981
40	GNIHLKPSFSDGLK	1512.749	1512.817
41	MDAGIICDVCTCELQK	1928.901	1928.822
42	YEGQFCEYDNFQCPR	2012.795	2012.790
43	SCVQCQAWGTGEKKGR	1879.865	1879.890
44	DEDDDCTYSYTMEGDGAPGPNSTVL VHK	3103.229	3103.278
45	QEVEENLNEVYR	1521.779	1521.718
46	VAPGYTTLTADQDAR	1640.779	1640.791
47	VPLFIRPEDDDEK	1572.778	1572.790
48	DVVSFEQPEFSVSR	1625.758	1625.781
49	LLELQEVDSLRL	1427.760	1427.810
50	VCAAYGAQEGPYSSLVSCR	2060.883	2060.916
51	VLVDNPKNR	1054.644	1054.600

材料与amp;方法

肿瘤组织的溶解

由瑞典医院提供表达 A3 抗原的人结肠癌组织，并且在 ABR 组织银行将其冻存于 -70°C 。冰冻的结肠癌组织用解剖刀切并转移到含有冷的等渗的蔗糖缓冲液（ 0.25M 蔗糖， 10mM KCl， 1.5M MgCl_2 ， 50mM Tris-HCl pH7.4 在 25°C ）并补充了 1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40) 和蛋白酶抑制剂 (CompleatTM 蛋白酶抑制剂鸡尾酒片, Boehringer Mannheim) 的管子中。用 Ultra-Turrax 匀浆器匀浆组织并置于 0°C 溶解。溶解的制备物在 $11,000\text{rpm}$ (Hettich centrifuge Universal 30RF 转子) 离心，去除细胞碎片。上清进一步在 $108,000\text{g}$ 4°C 离心 (Beckman Ultracentrifuge Ti-60 转子)，并且最终通过 $0.2\ \mu\text{m}$ Minisart plus 滤膜 (Sartorius AG Gottingen Germany) 过滤。

组织抗原的亲纯化

按照生产者建议偶联 A3scFv-SEAm9 到 NHS 活化的 HiTrap[®] 柱 (Pharmacia Biotech Uppsala Sweden)。用 C215Fab-SEAm9 偶联对照和前置柱, 并且对照、前置柱和柱子串联安装。用预洗缓冲液 (20mM Tris HCl pH7.5, 4°C, 0.2%NP40) 洗所有柱子。抽提物以 0.1ml/min 加载到柱子上, 流穿物再循环。柱子再用起始缓冲液洗涤。结合的抗原在二乙胺的 pH 从 7.5 到 11.0 的 pH 梯度中洗脱。收集 2.5ml 的洗脱物并浓缩为 75 μ l。用 AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech Uppsala Sweden) 系统在 4°C 进行纯化。洗脱的蛋白用 SDS PAGE 和银染分析。切下各个带, 用胰蛋白酶消化并且采用 Protana A/S (Odense, Denmark) 的 MALDI-TOF 仪器确定肽质量。在 SWISSPROT 数据库为每一个蛋白通过计算机搜索比较所有胰酶化肽质量, Protana A/S (Odense Denmark) 提供这种服务。

实施例 6

A3scFv-SEAm9 检测新的 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白表位

人 $\alpha 6$ 整联蛋白和 $\beta 4$ 整联蛋白商业化抗体与 A3 在正常和恶性结肠切片上比较。反应性, 如图 6 所示, 证明了 A3 限制于结肠上皮 (图 6 [i]), 和肿瘤中恶性细胞 (图 6 [ii])。对 $\alpha 6$ 整联蛋白的商业化抗体 NKI-GoH3 也对正常结肠 (图 6 [iii]) 和结肠癌 (图 6 [iv]) 反应。反应见于结肠的上皮细胞和恶性细胞 (箭头), 也见于血管 (BV), 某些基底成分和粘膜肌层 (mm)。用商业化 ASC-3 抗- $\beta 4$ 整联蛋白抗体观察到的反应在正常结肠 (v) 和结肠癌 (vi) 中与用抗- $\alpha 6$ 抗体观察到的相似但是较弱。

材料与方法

抗体

A3 scFv 选自 M fascicularis 文库。来源于此的 VH 和 VL 基因用限制性内切酶消化释放并融合到葡萄球菌内毒素 AE 嵌合突变体 (D227A) 以产生 A3scFv-SEAm9。这证明了非常低水平的非特异性结合并使得可用二级抗体敏感地检测。ASC-3 抗人 $\beta 4$ 整联蛋白抗体和 NKI-GoH3 抗人 $\alpha 6$ 整联蛋白抗体来自 Becton Dickinson (Copenhagen, Denmark)。

免疫组化

肿瘤和正常组织样品获自 Lund Hospital 外科。这些样品在异戊烷中冻存，其已在液氮中预冷。样品在切片前储存于 -70°C 。冰冻切片后，切片空气干燥过夜，在冷丙酮中固定并用亲和素/生物素（Vector Burlingame CA）封闭。加入一级抗体到切片 1 小时。

二级抗体孵育 30 分钟，随后用链霉亲和素-生物素/HRP (Dakopatts Copenhagen Denmark) 再孵育 30 分钟。在所有步骤间用 50mM Tris pH 7.6, 0.15M NaCl 充分洗涤。二氨基联苯胺 (DAB) 用作色原，并且切片在 0.5% 甲基绿中复染。对照包括非组织反应性 Fab 和 SEA-D227A 或无一级抗体。所有抗体使用的终浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 。结果表述为阴性、弱的、中等的或强的染色。

实施例 7

A3 肿瘤相关抗原与 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 整联蛋白抗体在捕获 ELISA 中反应

粗肿瘤抽提物或用 A3 亲和层析（见实施例 5）纯化的 A3 抗原用捕获 ELISA 分析。对 $\beta 4$ 整联蛋白特异性的商业化抗体 ASC-3 用作捕获抗体，施加不同稀释度的粗肿瘤抽提物。这再用 A3scFv-SEAm9 示踪。结合的 A3scFv-SEAm9 再用抗 SEA-HRP 检测（图 7A）。在图 7B 中商业化的抗 $\alpha 6$ 整联蛋白抗体 NKI-GoH3 用于捕获不同稀释度的浓缩 A3 亲和纯化洗脱物。以图 7A 相似的方式捕获的抗体用 A3scFv-SEAm9 示踪，并用抗-SEA-HRP 检测。在两个实验中，检测到浓度依赖的信号。结果证实了 A3 对 $\alpha 6 \beta 4$ 整联蛋白异二聚体的特异性，其也显示在实施例 5 中从 A3 亲和柱特异性分离。

材料与方法

商业化的抗体 NKI-GoH3 或 ASC-3 (Becton Dickinson Copenhagen Denmark) $100\mu\text{l}$ 用于在 0.05M NaHCO_3 pH 9.6 中包被 E. I. A. /R. I. A. 平板 (Costar) 的孔。允许反应 4°C 过夜，随后平板在 DPBS+0.05% Tween 20 中洗 4 次。孔再用 $200\mu\text{l}$ 在 DPBS+0.05% Tween20 中的 3% 脱脂奶粉在室温 (RT) 中摇晃封闭 1-2 小时。按以上定义的再次冲洗孔并施加 $100\mu\text{l}$ 稀释于含 3% 脱脂奶的 DPBS+0.05% Tween 20 中的抗原提取物，室温摇动 2 小时。再次洗涤各孔 ($4 \times$ DPBS+0.05% Tween 20)，之后加入 $100\mu\text{l}$ 稀

释于含 3%脱脂奶粉的 DPBS+0.5% Tween 20 中的一级抗体，室温摇动孵育 2 小时。再按以上定义的洗孔，并将 100 μ l 稀释于含 3%脱脂奶的 DPBS+0.05% Tween 20 中的二级抗体加到每孔中，室温摇动 1 小时。再次按以上定义的洗孔，加入 100 μ l 过氧化物酶底物 (Sigma Fast OPD Peroxidase Substrate Tablet Set P-9187) 显色。使反应在室温黑暗中继续 30 分钟，并摇动，然后加入 50 μ l 3M H₂SO₄ 终止反应。在 490nm 读吸光度值。

实施例 8

A3 肿瘤抗原的 Western 印迹分析

A3 亲和纯化的肿瘤抗原抽提物用 SDS-PAGE 分离并转移到膜上做 Western 印迹分析。抽提物直接用或加热到 100 $^{\circ}$ C 5 分钟或在巯基乙醇 (BME) 存在下加热到 100 $^{\circ}$ C 5 分钟 (图 8)。膜再用 A3scFv-SEAm9 和抗 SEA-HRP 或抗人 α 6 整联蛋白或抗人 β 4 整联蛋白抗体探测。抗 β 4 整联蛋白抗体不与膜上的任何蛋白反应 (图 8[ii])。抗人 α 6 整联蛋白与在 A3 亲和纯化的肿瘤抗原抽提物中表观分子量在 90-140 kDa 的主要种类反应 (图 8[iii])。同样的种类也用 A3scFv-SEAm9 检测到，其也在加热后检测到，但在还原条件下弱得多 (有 BME 在) (图 8[i])。在 90-140kDa 区间检测到的主要带对应于在实施例 5 中的带，用肽作图分析并发现包含 α 6 整联蛋白和 β 4 整联蛋白。

材料与方法

ASC-3 抗人 β 4 整联蛋白抗体和 NKI-GoH3 抗人 α 6 整联蛋白抗体来自 Becton Dickinson (Copenhagen, Denmark)。样品用 SDS-PAGE 在 0.25M tris-甘氨酸 pH8.9 和 0.1%SDS 在 100V 经过上层胶，再 170V 经过分离胶进行分离。所有胶上都有分子量标准 (Biorad 宽范围, Biorad)。分离的样品在转移缓冲液 (10mM Tris 碱, 2M 甘氨酸, 40%(v/v) 甲醇) 中在 100V 1 小时转移到硝酸纤维素膜 (Biorad) 上。膜用 5%(w/v) BSA/TBS 在 4 $^{\circ}$ C 封闭至少 2 小时，再与稀释于 5% BSA/TBS/0.2%叠氮化物的适当抗体孵育。让反应在室温持续至少 2 小时，随后用 TBST-T 充分洗膜。结合的抗体通过与稀释于含有 5%奶粉的 TBS-T 中的 HRP 偶联的抗体孵育 1 小时来检测。

膜再用增强化学发光 (ECL) 检测试剂 (Renaissance® NEN Life Science Products, Boston MA) 孵育 1 分钟并曝光到胶片上至 1 小时。

参考文献

1. DeCosse JJ, Tsioulis GJ, Jacobson JS. 结肠癌: 检测、治疗和康复 (Colorectal cancer: detection, treatment, and rehabilitation). *CA Cancer J Clin* 1994; 44:27-42
2. Riethmuller G, et al. 手术后 Dukes' C 结直肠癌的单克隆抗体治疗: 多中心随机实验的七年结果 (Monoclonal antibody therapy for resected Duke' s C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial). *J clin Oncol* 1998;16:1788-1794
3. Kuhn JA, Thomas G. 单克隆抗体和结直肠癌: 诊断应用的临床综述 (Monoclonal antibodies and colorectal carcinoma: a clinical review of diagnostic applications). *Cancer Invest* 1994;12:314-323.
4. Tordsson J, 等, 通过吸附到组织块中的原位表达抗原对 scFv 抗体噬菌体的有效筛选 (Efficient selection of scFv antibody phage by adsorption to in situ expressed antigens in tissue sections). *J Immunol Methods* 1997; 210:11-23.
5. Aujame L, Geoffroy F, Sodoyer R. 通过噬菌体展示的高亲和力人抗体 (High affinity human antibodies by phage display). *Hum Antibodies* 1997; 8:155-168
6. Clark RK, Trainer DL, Bailey DS, Greig RG 人结肠癌免疫恒河猴的抗血清的免疫组化分析 (Immunohistochemical analysis of antiserum from rhesus monkeys immunized with human colon carcinoma). *Cancer Res* 1989;49:3656-3661
7. Lewis Ap, et al. 猕猴免疫球蛋白 κ 链和 γ 链的 cDNAs 的克隆和序列分析 (Cloning and sequence analysis of kappa and gamma cynomolgus monkey immunoglobulin cDNAs). *Dev Comp Immunol*

1993;17:549-560

8. Brodin TN, et al. 人造超抗原: 用于基于 T-细胞治疗的肿瘤选择剂 (Man-made superantigens: Tumor-selective reagents for T-cell-based therapy). *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31:131-142.

9. Dohlsten M, et al. 单克隆抗体超抗原融合蛋白: 用于基于 T-细胞肿瘤治疗的肿瘤特异性试剂 (Monoclonal antibody-superantigen fusion proteins: tumor-specific agents for T-cell-based tumor therapy). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8945-8949.

10. Liu C, et al. 通过定向传输美登木素生物碱根除大结肠癌异源移植 (Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8618-8623.

附图说明

图 1 A3 肿瘤-相关抗原在原发肿瘤和转移肿瘤中的均一表达

使用 70nM A3 scFv-SEA (D227A) 和 C215 Fab-SEA (D227A) 对冷冻和丙酮固定的人肿瘤组织切片的免疫组化染色。A3 scFv 融合蛋白与从肿瘤患者切除的原发结肠癌和胰腺癌都能强烈地均一地反应。原发结肠癌对 C215 Fab-SEA (D227A) 的代表性染色示于 (A) 中, 对 A3 scFv-SEA (D227A) 的代表性染色示于 (B) 中。A3 scFv-SEA (D227A) 染色的结肠癌肝转移瘤和原发胰腺癌分别示于 (C) 和 (D) 中。

图 2 T 细胞能有效地杀死 A3 scFv-SEA (D227A) 包被的 Colo250 肿瘤细胞

A3 scFv-SEA (D227A) 介导的对 Colo250 细胞的超抗原抗体依赖的细胞毒 (SADCC) 与抗-Ep-CAM 融合蛋白 C215 Fab-SEA (D227A) 一样达到相同的最大细胞毒, 但所用浓度高 10 倍。D1.3 scFv-SEA (D227A) 介导的细胞毒缺乏证明在融合蛋白中需要肿瘤导向的抗体部分。

图 3

A3scFv-SEA m9 偶联柱上肿瘤抽提物的免疫亲和层析。彻底地洗脱

A3 偶联柱上的结合蛋白，然后按实施例 5 “材料和方法” 中的描述洗脱。洗脱组分用紫外分光光度计（箭头）检测并检测到一单峰。如 X 所示，用 pH 梯度洗脱样品。

图 4

在非还原 SDS-PAGE 上分离并银染 A3 抗原制备品。以前 Western 分析确定了据信 A3 抗原所处的分子量范围。切下该区域（标记的 I 和 II）中的明显条带用于肽作图分析。

图 5A 和 5B

上皮整联蛋白 $\alpha 6 \beta 4$: $\alpha 6$ 完整的一级结构和 $\beta 4$ 的变体形式（前体）（Tamura 等, J. Cell Biol. 111: 1593-1604 (1990)）。在发表的人 $\alpha 6$ （图 5A）整联蛋白和 $\beta 4$ （前体）（图 5B）整联蛋白序列中对 SEQ ID Nos: 5-51 所示的对应肽加有下划线。

图 6

使用 A3scFv 和商业化的抗人 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 整联蛋白单克隆抗体所进行的正常和恶性化结肠的免疫组化。

图 7A 和 7B

捕获 ELISA。图 7A 中 $\beta 4$ 整联蛋白特异的单克隆抗体 ASC-3 用作捕获抗体，向其施加不同稀释度的肿瘤抽提物。图 7B 中抗- $\alpha 6$ 整联蛋白单克隆抗体 NKI-GoH3 用于捕获不同稀释度的浓缩 A3-亲和纯化洗脱液。然后用 A3scFv-SEA m9 都成功地检测到图 7A 和 7B 中的捕获的整联蛋白抗原。

图 8A 和 8B

Western 印迹分析 A3-亲和层析洗脱物。使用的一级抗体是 (i) 和 (ii) A3scFv-SEA m9, (iii) ASC-3 抗-人- $\beta 4$ 整联蛋白抗体和 (iv) NKI-GoH3 抗-人- $\alpha 6$ 整联蛋白抗体。道 A-洗脱液直接应用，道 B-洗脱液 100℃ 加热 5 分钟，和道 C-洗脱液在巯基乙醇存在下 100℃ 加热 5 分钟。显示了分子量标准的位置。

gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag cct ggg ggg tcc 432
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 130 135 140

ctg aga ctc tct tgt gta gcc tct ggg tcc atc ttc agt agc tct gtt 480
 Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Ser Val
 145 150 155 160

atg cac tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggt ctg gag tgg gtc tca 528
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175

gtt att agt gaa aat ggg cgt acc att aac tac gca gac tct gtg aag 576
 Val Ile Ser Glu Asn Gly Arg Thr Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg ttt ctg 624
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu
 195 200 205

cag atg aac agc ctg aca ggc gag gac acg gcc gtc tat tac tgt agt 672
 Gln Met Asn Ser Leu Thr Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 210 215 220

aga gag ggg gga cct gga aca acg tcc aac cgg ctc gat gcc tgg ggc 720
 Arg Glu Gly Gly Pro Gly Thr Thr Ser Asn Arg Leu Asp Ala Trp Gly
 225 230 235 240

ccg gga gtc ctg gtc acc gtt tcc tca 747
 Pro Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 2
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*
 <223> 编码序列 VL (1-109) - 修饰的 Huston
 接头 (110-127) - VH (128-249)

<400> 2
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Gly Pro Ala Leu Ser Val Ala Leu Gly His
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Met Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Lys Thr Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Asn Asn Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Trp Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Ala Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Trp Asp Ser Ser Gly Thr His
 85 90 95
 Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Val Thr Val Leu Gly Gln Ala Asn
 100 105 110

Gly Glu Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 115 120 125
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
 130 135 140
 Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ser Ser Val
 145 150 155 160
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 165 170 175
 Val Ile Ser Glu Asn Gly Arg Thr Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 180 185 190
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe Leu
 195 200 205
 Gln Met Asn Ser Leu Thr Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 210 215 220
 Arg Glu Gly Gly Pro Gly Thr Thr Ser Asn Arg Leu Asp Ala Trp Gly
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 3

<211> 1073

<212> PRT

<213> 人

<223> TA6-人整联蛋白 α -6A

<400> 3

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

Val Thr Cys Ala His Arg Tyr Glu Lys Arg Gln His Val Asn Thr Lys
 130 135 140

Gln Glu Ser Arg Asp Ile Phe Gly Arg Cys Tyr Val Leu Ser Gln Asn
 145 150 155 160

Leu Arg Ile Glu Asp Asp Met Asp Gly Gly Asp Trp Ser Phe Cys Asp
 165 170 175

Gly Arg Leu Arg Gly His Glu Lys Phe Gly Ser Cys Gln Gln Gly Val
 180 185 190

Ala Ala Thr Phe Thr Lys Asp Phe His Tyr Ile Val Phe Gly Ala Pro
 195 200 205

Gly Thr Tyr Asn Trp Lys Gly Ile Val Arg Val Glu Gln Lys Asn Asn
 210 215 220

Thr Phe Phe Asp Met Asn Ile Phe Glu Asp Gly Pro Tyr Glu Val Gly
 225 230 235 240

Gly Glu Thr Glu His Asp Glu Ser Leu Val Pro Val Pro Ala Asn Ser
 245 250 255

Tyr Leu Gly Phe Ser Leu Asp Ser Gly Lys Gly Ile Val Ser Lys Asp
 260 265 270

Glu Ile Thr Phe Val Ser Gly Ala Pro Arg Ala Asn His Ser Gly Ala
 275 280 285

Val Val Leu Leu Lys Arg Asp Met Lys Ser Ala His Leu Leu Pro Glu
 290 295 300

His Ile Phe Asp Gly Glu Gly Leu Ala Ser Ser Phe Gly Tyr Asp Val
 305 310 315 320

Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Asp Gly Trp Gln Asp Ile Val Ile Gly
 325 330 335

Ala Pro Gln Tyr Phe Asp Arg Asp Gly Glu Val Gly Gly Ala Val Tyr
 340 345 350

Val Tyr Met Asn Gln Gln Gly Arg Trp Asn Asn Val Lys Pro Ile Arg
 355 360 365

Leu Asn Gly Thr Lys Asp Ser Met Phe Gly Ile Ala Val Lys Asn Ile
 370 375 380

Gly Asp Ile Asn Gln Asp Gly Tyr Pro Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro
 385 390 395 400

Tyr Asp Asp Leu Gly Lys Val Phe Ile Tyr His Gly Ser Ala Asn Gly
 405 410 415

Ile Asn Thr Lys Pro Thr Gln Val Leu Lys Gly Ile Ser Pro Tyr Phe
 420 425 430

Gly Tyr Ser Ile Ala Gly Asn Met Asp Leu Asp Arg Asn Ser Tyr Pro
 435 440 445

Asp Val Ala Val Gly Ser Leu Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Arg Ser
 450 455 460

Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys Thr Ile Thr Val Thr Pro Asn Arg
 465 470 475 480

Ile Asp Leu Arg Gln Lys Thr Ala Cys Gly Ala Pro Ser Gly Ile Cys
 485 490 495

Leu Gln Val Lys Ser Cys Phe Glu Tyr Thr Ala Asn Pro Ala Gly Tyr
 500 505 510

Asn Pro Ser Ile Ser Ile Val Gly Thr Leu Glu Ala Glu Lys Glu Arg
 515 520 525

Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ser Arg Val Gln Phe Arg Asn Gln Gly Ser
 530 535 540

Glu Pro Lys Tyr Thr Gln Glu Leu Thr Leu Lys Arg Gln Lys Gln Lys
 545 550 555 560

Val Cys Met Glu Glu Thr Leu Trp Leu Gln Asp Asn Ile Arg Asp Lys
 565 570 575

Leu Arg Pro Ile Pro Ile Thr Ala Ser Val Glu Ile Gln Glu Pro Ser
 580 585 590

Ser Arg Arg Arg Val Asn Ser Leu Pro Glu Val Leu Pro Ile Leu Asn
 595 600 605

Ser Asp Glu Pro Lys Thr Ala His Ile Asp Val His Phe Leu Lys Glu
 610 615 620

Gly Cys Gly Asp Asp Asn Val Cys Asn Ser Asn Leu Lys Leu Glu Tyr
 625 630 635 640

Lys Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Gln Asp Lys Phe Ser Tyr Leu Pro
 645 650 655

Ile Gln Lys Gly Val Pro Glu Leu Val Leu Lys Asp Gln Lys Asp Ile
 660 665 670

Ala Leu Glu Ile Thr Val Thr Asn Ser Pro Ser Asn Pro Arg Asn Pro
 675 680 685

Thr Lys Asp Gly Asp Asp Ala His Glu Ala Lys Leu Ile Ala Thr Phe
 690 695 700

Pro Asp Thr Leu Thr Tyr Ser Ala Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Phe Pro
 705 710 715 720

Glu Lys Gln Leu Ser Cys Val Ala Asn Gln Asn Gly Ser Gln Ala Asp
 725 730 735

Cys Glu Leu Gly Asn Pro Phe Lys Arg Asn Ser Asn Val Thr Phe Tyr
 740 745 750

Leu Val Leu Ser Thr Thr Glu Val Thr Phe Asp Thr Pro Asp Leu Asp
 755 760 765

Ile Asn Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Asn Gln Asp Asn Leu Ala Pro
 770 775 780
 Ile Thr Ala Lys Ala Lys Val Val Ile Glu Leu Leu Leu Ser Val Ser
 785 790 795 800
 Gly Val Ala Lys Pro Ser Gln Val Tyr Phe Gly Gly Thr Val Val Gly
 805 810 815
 Glu Gln Ala Met Lys Ser Glu Asp Glu Val Gly Ser Leu Ile Glu Tyr
 820 825 830
 Glu Phe Arg Val Ile Asn Leu Gly Lys Pro Leu Thr Asn Leu Gly Thr
 835 840 845
 Ala Thr Leu Asn Ile Gln Trp Pro Lys Glu Ile Ser Asn Gly Lys Trp
 850 855 860
 Leu Leu Tyr Leu Val Lys Val Glu Ser Lys Gly Leu Glu Lys Val Thr
 865 870 875 880
 Cys Glu Pro Gln Lys Glu Ile Asn Ser Leu Asn Leu Thr Glu Ser His
 885 890 895
 Asn Ser Arg Lys Lys Arg Glu Ile Thr Glu Lys Gln Ile Asp Asp Asn
 900 905 910
 Arg Lys Phe Ser Leu Phe Ala Glu Arg Lys Tyr Gln Thr Leu Asn Cys
 915 920 925
 Ser Val Asn Val Asn Cys Val Asn Ile Arg Cys Pro Leu Arg Gly Leu
 930 935 940
 Asp Ser Lys Ala Ser Leu Ile Leu Arg Ser Arg Leu Trp Asn Ser Thr
 945 950 955 960
 Phe Leu Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Asn Tyr Leu Asp Ile Leu Met Arg
 965 970 975
 Ala Phe Ile Asp Val Thr Ala Ala Ala Glu Asn Ile Arg Leu Pro Asn
 980 985 990
 Ala Gly Thr Gln Val Arg Val Thr Val Phe Pro Ser Lys Thr Val Ala
 995 1000 1005
 Gln Tyr Ser Gly Val Pro Trp Trp Ile Ile Leu Val Ala Ile Leu Ala
 1010 1015 1020
 Gly Ile Leu Met Leu Ala Leu Leu Val Phe Ile Leu Trp Lys Cys Gly
 1025 1030 1035 1040
 Phe Phe Lys Arg Asn Lys Lys Asp His Tyr Asp Ala Thr Tyr His Lys
 1045 1050 1055
 Ala Glu Ile His Ala Gln Pro Ser Asp Lys Glu Arg Leu Thr Ser Asp
 1060 1065 1070

Ala

<210> 4
 <211> 1875
 <212> PRT
 <213> 人

<223> 整联蛋白β-4(前体)

<400> 4

Met Ala Gly Pro Arg Pro Ser Pro Trp Ala Arg Leu Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Ile Ser Val Ser Leu Ser Gly Thr Leu Ala Asn Arg Cys Lys Lys
 20 25 30
 Ala Pro Val Lys Ser Cys Thr Glu Cys Val Arg Val Asp Lys Asp Cys
 35 40 45
 Ala Tyr Cys Thr Asp Glu Met Phe Arg Asp Arg Arg Cys Asn Thr Gln
 50 55 60
 Ala Glu Leu Leu Ala Ala Gly Cys Gln Arg Glu Ser Ile Val Val Met
 65 70 75 80
 Glu Ser Ser Phe Gln Ile Thr Glu Glu Thr Gln Ile Asp Thr Thr Leu
 85 90 95
 Arg Arg Ser Gln Met Ser Pro Gln Gly Leu Arg Val Arg Leu Arg Pro
 100 105 110
 Gly Glu Glu Arg His Phe Glu Leu Glu Val Phe Glu Pro Leu Glu Ser
 115 120 125
 Pro Val Asp Leu Tyr Ile Leu Met Asp Phe Ser Asn Ser Met Ser Asp
 130 135 140
 Asp Leu Asp Asn Leu Lys Lys Met Gly Gln Asn Leu Ala Arg Val Leu
 145 150 155 160
 Ser Gln Leu Thr Ser Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Gly Lys Phe Val Asp
 165 170 175
 Lys Val Ser Val Pro Gln Thr Asp Met Arg Pro Glu Lys Leu Lys Glu
 180 185 190
 Pro Trp Pro Asn Ser Asp Pro Pro Phe Ser Phe Lys Asn Val Ile Ser
 195 200 205
 Leu Thr Glu Asp Val Asp Glu Phe Arg Asn Lys Leu Gln Gly Glu Arg
 210 215 220
 Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu
 225 230 235 240
 Gln Thr Ala Val Cys Thr Arg Asp Ile Gly Trp Arg Pro Asp Ser Thr
 245 250 255
 His Leu Leu Val Phe Ser Thr Glu Ser Ala Phe His Tyr Glu Ala Asp
 260 265 270
 Gly Ala Asn Val Leu Ala Gly Ile Met Ser Arg Asn Asp Glu Arg Cys
 275 280 285

His Leu Asp Thr Thr Gly Thr Tyr Thr Gln Tyr Arg Thr Gln Asp Tyr
 290 295 300

Pro Ser Val Pro Thr Leu Val Arg Leu Leu Ala Lys His Asn Ile Ile
 305 310 315 320

Pro Ile Phe Ala Val Thr Asn Tyr Ser Tyr Ser Tyr Tyr Glu Lys Leu
 325 330 335

His Thr Tyr Phe Pro Val Ser Ser Leu Gly Val Leu Gln Glu Asp Ser
 340 345 350

Ser Asn Ile Val Glu Leu Leu Glu Glu Ala Phe Asn Arg Ile Arg Ser
 355 360 365

Asn Leu Asp Ile Arg Ala Leu Asp Ser Pro Arg Gly Leu Arg Thr Glu
 370 375 380

Val Thr Ser Lys Met Phe Gln, Lys Thr Arg Thr Gly Ser Phe His Ile
 385 390 395 400

Arg Arg Gly Glu Val Gly Ile Tyr Gln Val Gln Leu Arg Ala Leu Glu
 405 410 415

His Val Asp Gly Thr His Val Cys Gln Leu Pro Glu Asp Gln Lys Gly
 420 425 430

Asn Ile His Leu Lys Pro Ser Phe Ser Asp Gly Leu Lys Met Asp Ala
 435 440 445

Gly Ile Ile Cys Asp Val Cys Thr Cys Glu Leu Gln Lys Glu Val Arg
 450 455 460

Ser Ala Arg Cys Ser Phe Asn Gly Asp Phe Val Cys Gly Gln Cys Val
 465 470 475 480

Cys Ser Glu Gly Trp Ser Gly Gln Thr Cys Asn Cys Ser Thr Gly Ser
 485 490 495

Leu Ser Asp Ile Gln Pro Cys Leu Arg Glu Gly Glu Asp Lys Pro Cys
 500 505 510

Ser Gly Arg Gly Glu Cys Gln Cys Gly His Cys Val Cys Tyr Gly Glu
 515 520 525

Gly Arg Tyr Glu Gly Gln Phe Cys Glu Tyr Asp Asn Phe Gln Cys Pro
 530 535 540

Arg Thr Ser Gly Phe Leu Cys Asn Asp Arg Gly Arg Cys Ser Met Gly
 545 550 555 560

Gln Cys Val Cys Glu Pro Gly Trp Thr Gly Pro Ser Cys Asp Cys Pro
 565 570 575

Leu Ser Asn Ala Thr Cys Ile Asp Ser Asn Gly Gly Ile Cys Asn Gly
 580 585 590

Arg Gly His Cys Glu Cys Gly Arg Cys His Cys His Gln Gln Ser Leu
 595 600 605

Tyr Thr Asp Thr Ile Cys Glu Ile Asn Tyr Ser Ala Ile His Pro Gly
 610 615 620

Leu Cys Glu Asp Leu Arg Ser Cys Val Gln Cys Gln Ala Trp Gly Thr
 625 630 635 640

Gly Glu Lys Lys Gly Arg Thr Cys Glu Glu Cys Asn Phe Lys Val Lys
 645 650 655

Met Val Asp Glu Leu Lys Arg Ala Glu Glu Val Val Val Arg Cys Ser
 660 665 670

Phe Arg Asp Glu Asp Asp Asp Cys Thr Tyr Ser Tyr Thr Met Glu Gly
 675 680 685

Asp Gly Ala Pro Gly Pro Asn Ser Thr Val Leu Val His Lys Lys Lys
 690 695 700

Asp Cys Pro Pro Gly Ser Phe Trp Trp Leu Ile Pro Leu Leu Leu Leu
 705 710 715 720

Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Cys Trp Lys Tyr Cys
 725 730 735

Ala Cys Cys Lys Ala Cys Leu Ala Leu Leu Pro Cys Cys Asn Arg Gly
 740 745 750

His Met Val Gly Phe Lys Glu Asp His Tyr Met Leu Arg Glu Asn Leu
 755 760 765

Met Ala Ser Asp His Leu Asp Thr Pro Met Leu Arg Ser Gly Asn Leu
 770 775 780

Lys Gly Arg Asp Val Val Arg Trp Lys Val Thr Asn Asn Met Gln Arg
 785 790 795 800

Pro Gly Phe Ala Thr His Ala Ala Ser Ile Asn Pro Thr Glu Leu Val
 805 810 815

Pro Tyr Gly Leu Ser Leu Arg Leu Ala Arg Leu Cys Thr Glu Asn Leu
 820 825 830

Leu Lys Pro Asp Thr Arg Glu Cys Ala Gln Leu Arg Gln Glu Val Glu
 835 840 845

Glu Asn Leu Asn Glu Val Tyr Arg Gln Ile Ser Gly Val His Lys Leu
 850 855 860

Gln Gln Thr Lys Phe Arg Gln Gln Pro Asn Ala Gly Lys Lys Gln Asp
 865 870 875 880

His Thr Ile Val Asp Thr Val Leu Met Ala Pro Arg Ser Ala Lys Pro
 885 890 895

Ala Leu Leu Lys Leu Thr Glu Lys Gln Val Glu Gln Arg Ala Phe His
 900 905 910

Asp Leu Lys Val Ala Pro Gly Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Asp Gln Asp
 915 920 925

Ala Arg Gly Met Val Glu Phe Gln Glu Gly Val Glu Leu Val Asp Val
 930 935 940

Arg Val Pro Leu Phe Ile Arg Pro Glu Asp Asp Asp Glu Lys Gln Leu
 945 950 955 960

Leu Val Glu Ala Ile Asp Val Pro Ala Gly Thr Ala Thr Leu Gly Arg
 965 970 975

Arg Leu Val Asn Ile Thr Ile Ile Lys Glu Gln Ala Arg Asp Val Val
 980 985 990

Ser Phe Glu Gln Pro Glu Phe Ser Val Ser Arg Gly Asp Gln Val Ala
 995 1000 1005

Arg Ile Pro Val Ile Arg Arg Val Leu Asp Gly Gly Lys Ser Gln Val
 1010 1015 1020

Ser Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Thr Ala Gln Gly Asn Arg Asp Tyr Ile
 1025 1030 1035 1040

Pro Val Glu Gly Glu Leu Leu Phe Gln Pro Gly Glu Ala Trp Lys Glu
 1045 1050 1055

Leu Gln Val Lys Leu Leu Glu Leu Gln Glu Val Asp Ser Leu Leu Arg
 1060 1065 1070

Gly Arg Gln Val Arg Arg Phe His Val Gln Leu Ser Asn Pro Lys Phe
 1075 1080 1085

Gly Ala His Leu Gly Gln Pro His Ser Thr Thr Ile Ile Ile Arg Asp
 1090 1095 1100

Pro Asp Glu Leu Asp Arg Ser Phe Thr Ser Gln Met Leu Ser Ser Gln
 1105 1110 1115 1120

Pro Pro Pro His Gly Asp Leu Gly Ala Pro Gln Asn Pro Asn Ala Lys
 1125 1130 1135

Ala Ala Gly Ser Arg Lys Ile His Phe Asn Trp Leu Pro Pro Ser Gly
 1140 1145 1150

Lys Pro Met Gly Tyr Arg Val Lys Tyr Trp Ile Gln Gly Asp Ser Glu
 1155 1160 1165

Ser Glu Ala His Leu Leu Asp Ser Lys Val Pro Ser Val Glu Leu Thr
 1170 1175 1180

Asn Leu Tyr Pro Tyr Cys Asp Tyr Glu Met Lys Val Cys Ala Tyr Gly
 1185 1190 1195 1200

Ala Gln Gly Glu Gly Pro Tyr Ser Ser Leu Val Ser Cys Arg Thr His
 1205 1210 1215

Gln Glu Val Pro Ser Glu Pro Gly Arg Leu Ala Phe Asn Val Val Ser
 1220 1225 1230

Ser Thr Val Thr Gln Leu Ser Trp Ala Glu Pro Ala Glu Thr Asn Gly
 1235 1240 1245

Glu Ile Thr Ala Tyr Glu Val Cys Tyr Gly Leu Val Asn Asp Asp Asn
 1250 1255 1260
 Arg Pro Ile Gly Pro Met Lys Lys Val Leu Val Asp Asn Pro Lys Asn
 1265 1270 1275 1280
 Arg Met Leu Leu Ile Glu Asn Leu Arg Glu Ser Gln Pro Tyr Arg Tyr
 1285 1290 1295
 Thr Val Lys Ala Arg Asn Gly Ala Gly Trp Gly Pro Glu Arg Glu Ala
 1300 1305 1310
 Ile Ile Asn Leu Ala Thr Gln Pro Lys Arg Pro Met Ser Ile Pro Ile
 1315 1320 1325
 Ile Pro Asp Ile Pro Ile Val Asp Ala Gln Ser Gly Glu Asp Tyr Asp
 1330 1335 1340
 Ser Phe Leu Met Tyr Ser Asp Asp Val Leu Arg Ser Pro Ser Gly Ser
 1345 1350 1355 1360
 Gln Arg Pro Ser Val Ser Asp Asp Thr Gly Cys Gly Trp Lys Phe Glu
 1365 1370 1375
 Pro Leu Leu Gly Glu Glu Leu Asp Leu Arg Arg Val Thr Trp Arg Leu
 1380 1385 1390
 Pro Pro Glu Leu Ile Pro Arg Leu Ser Ala Ser Ser Gly Arg Ser Ser
 1395 1400 1405
 Asp Ala Glu Ala Pro Thr Ala Pro Arg Thr Thr Ala Ala Arg Ala Gly
 1410 1415 1420
 Arg Ala Ala Ala Val Pro Arg Ser Ala Thr Pro Gly Pro Pro Gly Glu
 1425 1430 1435 1440
 His Leu Val Asn Gly Arg Met Asp Phe Ala Phe Pro Gly Ser Thr Asn
 1445 1450 1455
 Ser Leu His Arg Met Thr Thr Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Gly Thr His
 1460 1465 1470
 Leu Ser Pro His Val Pro His Arg Val Leu Ser Thr Ser Ser Thr Leu
 1475 1480 1485
 Thr Arg Asp Tyr Asn Ser Leu Thr Arg Ser Glu His Ser His Ser Thr
 1490 1495 1500
 Thr Leu Pro Arg Asp Tyr Ser Thr Leu Thr Ser Val Ser Ser His Gly
 1505 1510 1515 1520
 Leu Pro Pro Ile Trp Glu His Gly Arg Ser Arg Leu Pro Leu Ser Trp
 1525 1530 1535
 Ala Leu Gly Ser Arg Ser Arg Ala Gln Met Lys Gly Phe Pro Pro Ser
 1540 1545 1550
 Arg Gly Pro Arg Asp Ser Ile Ile Leu Ala Gly Arg Pro Ala Ala Pro
 1555 1560 1565

Ser Trp Gly Pro Asp Ser Arg Leu Thr Ala Gly Val Pro Asp Thr Pro
 1570 1575 1580

Thr Arg Leu Val Phe Ser Ala Leu Gly Pro Thr Ser Leu Arg Val Ser
 1585 1590 1595 1600

Trp Gln Glu Pro Arg Cys Glu Arg Pro Leu Gln Gly Tyr Ser Val Glu
 1605 1610 1615

Tyr Gln Leu Leu Asn Gly Gly Glu Leu His Arg Leu Asn Ile Pro Asn
 1620 1625 1630

Pro Ala Gln Thr Ser Val Val Val Glu Asp Leu Leu Pro Asn His Ser
 1635 1640 1645

Tyr Val Phe Arg Val Arg Ala Gln Ser Gln Glu Gly Trp Gly Arg Glu
 1650 1655 1660

Arg Glu Gly Val Ile Thr Ile Glu Ser Gln Val His Pro Gln Ser Pro
 1665 1670 1675 1680

Leu Cys Pro Leu Pro Gly Ser Ala Phe Thr Leu Ser Thr Pro Ser Ala
 1685 1690 1695

Pro Gly Pro Leu Val Phe Thr Ala Leu Ser Pro Asp Ser Leu Gln Leu
 1700 1705 1710

Ser Trp Glu Arg Pro Arg Arg Pro Asn Gly Asp Ile Val Gly Tyr Leu
 1715 1720 1725

Val Thr Cys Glu Met Ala Gln Gly Gly Gly Pro Ala Thr Ala Phe Arg
 1730 1735 1740

Val Asp Gly Asp Ser Pro Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro Gly Leu Ser
 1745 1750 1755 1760

Glu Asn Val Pro Tyr Lys Phe Lys Val Gln Ala Arg Thr Thr Glu Gly
 1765 1770 1775

Phe Gly Pro Glu Arg Glu Gly Ile Ile Thr Ile Glu Ser Gln Asp Gly
 1780 1785 1790

Gly Pro Phe Pro Gln Leu Gly Ser Arg Ala Gly Leu Phe Gln His Pro
 1795 1800 1805

Leu Gln Ser Glu Tyr Ser Ser Ile Thr Thr Thr His Thr Ser Ala Thr
 1810 1815 1820

Glu Pro Phe Leu Val Asp Gly Pro Thr Leu Gly Ala Gln His Leu Glu
 1825 1830 1835 1840

Ala Gly Gly Ser Leu Thr Arg His Val Thr Gln Glu Phe Val Ser Arg
 1845 1850 1855

Thr Leu Thr Thr Ser Gly Thr Leu Ser Thr His Met Asp Gln Gln Phe
 1860 1865 1870

Phe Gln Thr
 1875

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 61-68 位氨基酸

<400> 5
Leu Leu Leu Val Gly Ala Pro Arg
1 5

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 77-96 位氨基酸

<400> 6
Ala Asn Arg Thr Gly Gly Leu Tyr Ser Cys Asp Ile Thr Ala Arg Gly
1 5 10 15
Pro Cys Thr Arg
20

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 128-137 位氨基酸

<400> 7
Val Val Thr Cys Ala His Arg Tyr Glu Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 138-144 位氨基酸

<400> 8
Arg Gln His Val Asn Thr Lys
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 154-162 位氨基酸

<400> 9
Cys Tyr Val Leu Ser Gln Asn Leu Arg
1 5

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 185-198 位氨基酸

<400> 10
Phe Gly Ser Cys Gln Gln Gly Val Ala Ala Thr Phe Thr Lys
1 5 10

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 199-214 位氨基酸

<400> 11
Asp Phe His Tyr Ile Val Phe Gly Ala Pro Gly Thr Tyr Asn Trp Lys
1 5 10 15

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 272-282 位氨基酸

<400> 12
Asp Glu Ile Thr Phe Val Ser Gly Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 283-293 位氨基酸

<400> 13
Ala Asn His Ser Gly Ala Val Val Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 328-343 位氨基酸

<400> 14
Asp Gly Trp Gln Asp Ile Val Ile Gly Ala Pro Gln Tyr Phe Asp Arg
1 5 10 15

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 344-360 位氨基酸

<400> 15
Asp Gly Glu Val Gly Gly Ala Val Tyr Val Tyr Met Asn Gln Gln Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 361-368 位氨基酸

<400> 16
Trp Asn Asn Val Lys Pro Ile Arg
1 5

<210> 17
<211> 24
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 383-406 位氨基酸

<400> 17
Asn Ile Gly Asp Ile Asn Gln Asp Gly Tyr Pro Asp Ile Ala Val Gly
1 5 10 15

Ala Pro Tyr Asp Asp Leu Gly Lys
20

<210> 18
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 427-444 位氨基酸

<400> 18
Gly Ile Ser Pro Tyr Phe Gly Tyr Ser Ile Ala Gly Asn Met Asp Leu
1 5 10 15

Asp Arg

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 445-463 位氨基酸

<400> 19
Asn Ser Tyr Pro Asp Val Ala Val Gly Ser Leu Ser Asp Ser Val Thr
1 5 10 15

Ile Phe Arg

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 464-472 位氨基酸

<400> 20
Ser Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys
1 5

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 577-594 位氨基酸

<400> 21
Leu Arg Pro Ile Pro Ile Thr Ala Ser Val Glu Ile Gln Glu Pro Ser
1 5 10 15

Ser Arg

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 597-613 位氨基酸

<400> 22
Val Asn Ser Leu Pro Glu Val Leu Pro Ile Leu Asn Ser Asp Glu Pro
1 5 10 15

Lys

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 614-623 位氨基酸

<400> 23
Thr Ala His Ile Asp Val His Phe Leu Lys
1 5 10

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 652-659 位氨基酸

<400> 24
Phe Ser Tyr Leu Pro Ile Gln Lys
1 5

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 671-686 位氨基酸

<400> 25
Asp Ile Ala Leu Glu Ile Thr Val Thr Asn Ser Pro Ser Asn Pro Arg
1 5 10 15

<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 822-835 位氨基酸

<400> 26
Ser Glu Asp Glu Val Gly Ser Leu Ile Glu Tyr Glu Phe Arg
1 5 10

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 871-885 位氨基酸

<400> 27
Val Glu Ser Lys Gly Leu Glu Lys Val Thr Cys Glu Pro Gln Lys
1 5 10 15

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 902-914 位氨基酸

<400> 28
Arg Glu Ile Thr Glu Lys Gln Ile Asp Asp Asn Arg Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 915-921 位氨基酸

<400> 29
Phe Ser Leu Phe Ala Glu Arg
1 5

<210> 30
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 923-938 位氨基酸

<400> 30
Tyr Gln Thr Leu Asn Cys Ser Val Asn Val Asn Cys Val Asn Ile Arg
1 5 10 15

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 968-976 位氨基酸

<400> 31
Leu Asn Tyr Leu Asp Ile Leu Met Arg
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 977-989 位氨基酸

<400> 32
Ala Phe Ile Asp Val Thr Ala Ala Ala Glu Asn Ile Arg
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:3 第 990-998 位氨基酸

<400> 33
Leu Pro Asn Ala Gly Thr Gln Val Arg
1 5

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 178-189 位氨基酸

<400> 34
Val Ser Val Pro Gln Thr Asp Met Arg Pro Glu Lys
1 5 10

<210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 192-204 位氨基酸

<400> 35
Glu Pro Trp Pro Asn Ser Asp Pro Pro Phe Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 205-217 位氨基酸

<400> 36
Asn Val Ile Ser Leu Thr Glu Asp Val Asp Glu Phe Arg
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 301-312 位氨基酸

<400> 37
Thr Gln Asp Tyr Pro Ser Val Pro Thr Leu Val Arg
1 5 10

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 402-413 位氨基酸

<400> 38
Arg Gly Glu Val Gly Ile Tyr Gln Val Gln Leu Arg
1 5 10

<210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 414-431 位氨基酸

<400> 39
Ala Leu Glu His Val Asp Gly Thr His Val Cys Gln Leu Pro Glu Asp
1 5 10 15

Gln Lys

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 432-445 位氨基酸

<400> 40
Gly Asn Ile His Leu Lys Pro Ser Phe Ser Asp Gly Leu Lys
1 5 10

<210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 446-461 位氨基酸

<400> 41
Met Asp Ala Gly Ile Ile Cys Asp Val Cys Thr Cys Glu Leu Gln Lys
1 5 10 15

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 531-545 位氨基酸

<400> 42
Tyr Glu Gly Gln Phe Cys Glu Tyr Asp Asn Phe Gln Cys Pro Arg
1 5 10 15

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 631-646 位氨基酸

<400> 43
Ser Cys Val Gln Cys Gln Ala Trp Gly Thr Gly Glu Lys Lys Gly Arg
1 5 10 15

<210> 44
<211> 28
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 675-702 位氨基酸

<400> 44
Asp Glu Asp Asp Asp Cys Thr Tyr Ser Tyr Thr Met Glu Gly Asp Gly
1 5 10 15

Ala Pro Gly Pro Asn Ser Thr Val Leu Val His Lys
20 25

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 845-856 位氨基酸

<400> 45
Gln Glu Val Glu Glu Asn Leu Asn Glu Val Tyr Arg
1 5 10

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 916-930 位氨基酸

<400> 46
Val Ala Pro Gly Tyr Tyr Thr Leu Thr Ala Asp Gln Asp Ala Arg
1 5 10 15

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 946-958 位氨基酸

<400> 47
Val Pro Leu Phe Ile Arg Pro Glu Asp Asp Asp Glu Lys
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 990-1003 位氨基酸

<400> 48
Asp Val Val Ser Phe Glu Gln Pro Glu Phe Ser Val Ser Arg
1 5 10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 1061-1072 位氨基酸

<400> 49
Leu Leu Glu Leu Gln Glu Val Asp Ser Leu Leu Arg
1 5 10

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 1196-1214 位氨基酸

<400> 50
Val Cys Ala Tyr Gly Ala Gln Gly Glu Gly Pro Tyr Ser Ser Leu Val
1 5 10 15

Ser Cys Arg

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<223> SEQ ID NO:4 第 1273-1281 位氨基酸

<400> 51
Val Leu Val Asp Asn Pro Lys Asn Arg
1 5

说明书附图

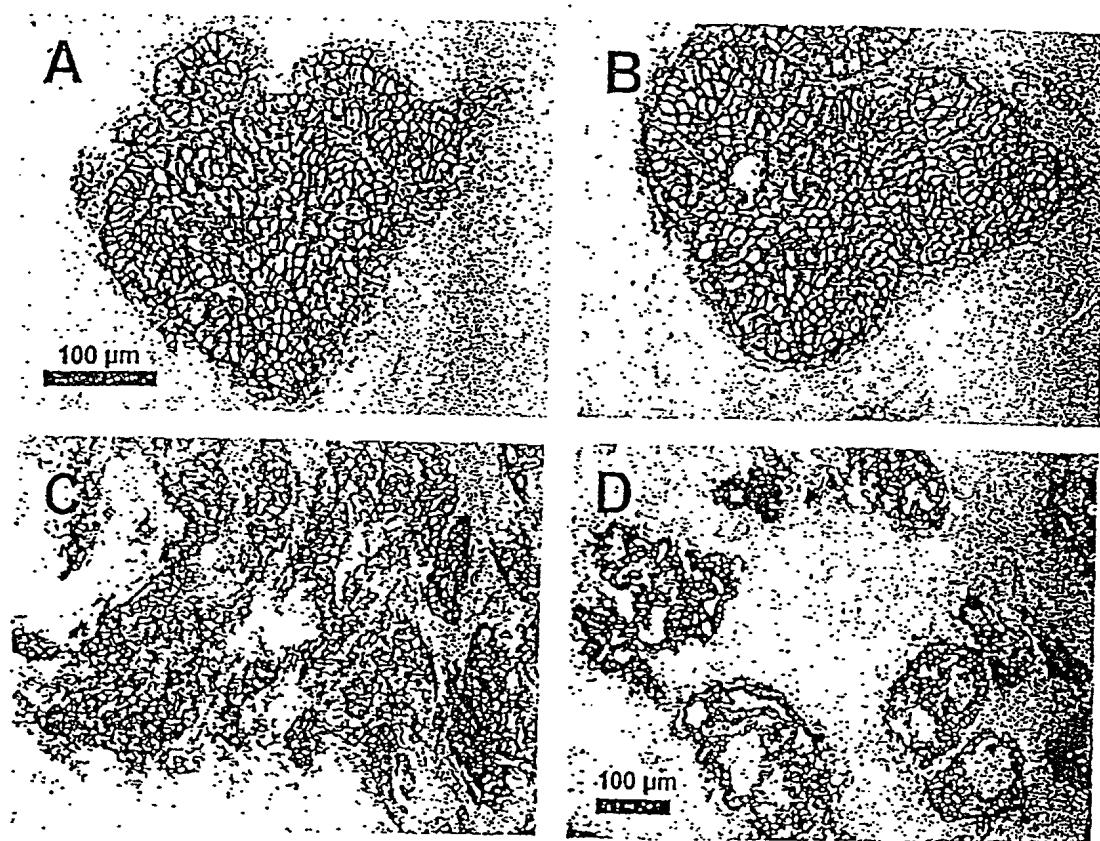


图 1

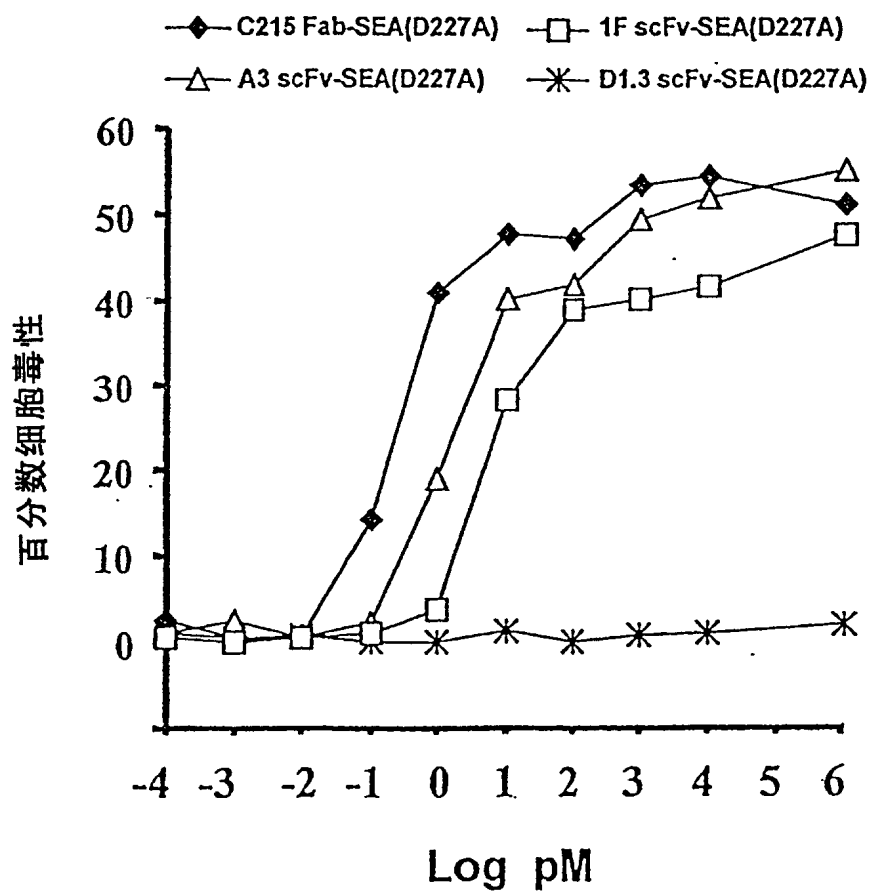


图 2

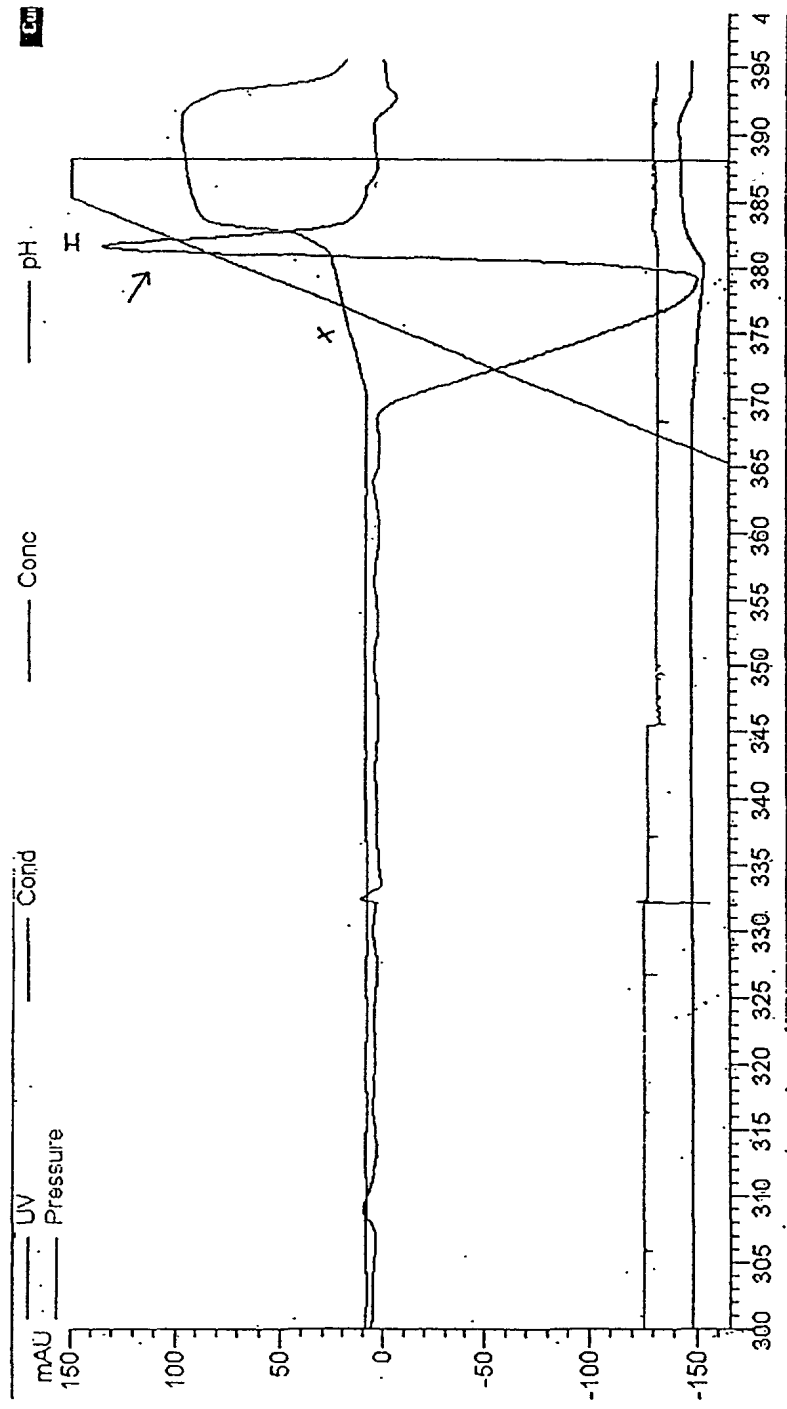


图 3

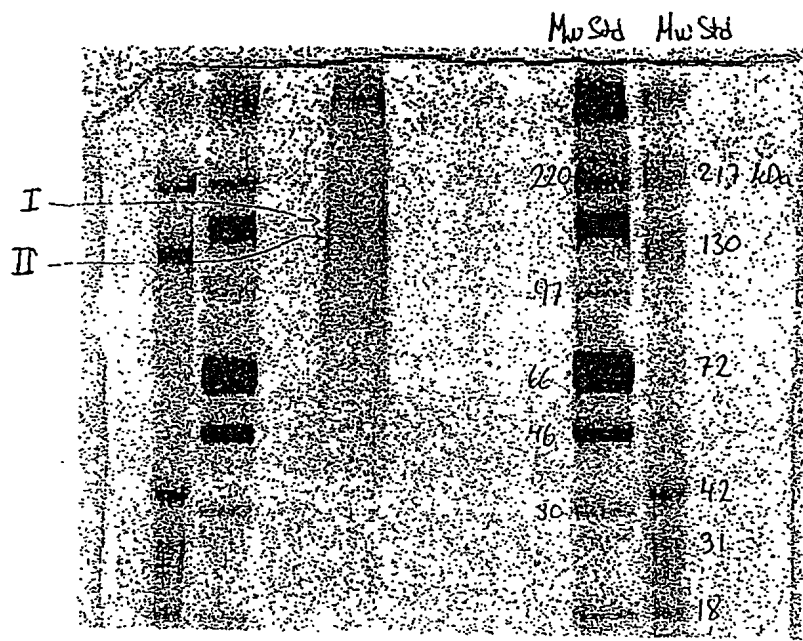


图 4

TA6-人整联蛋白 α -6A

MAAAGQLCLLYLSAGLLSRLGAAFNLDTREDNVIRKYGDPGSLFGFSLAMHWQLQP
EDKRLLLVGAPRGEALPLQRANRTGGLYSCDITARGPCTRIEFDNDADPTSESKEDQ
WMGVTVQSQGGKVVTC~~AHRYEKROHVNTKQESRDIFGR~~CYVLSO~~NLR~~IEDDMD
GGDWSFCDGRLRGHEKFGSCOOGVAATFTKDFHYIVFGAPGTYNWKGIVRVEQKN
NTFFDMNIFEDGPYEVGGETEHDESLVPVPANSYLGFSLDSGKGIVSKDEITFVSGAPR
ANHSGAVVLLKRDMKSAHLLPEHIFDGEGLASSFGYDVAVVDLNKDGWODIVIGAP
OYFDRDGEVGGAVYVYMNOQGRWNNVKPIRLNGTKDSMFGIAVKNIGDINODGYP
DIAVGAPYDDLGVFIYHGSANGINTKPTQVLKGISPYFGYSIAGNMDLDRNSYPDV
AVGSLSDSVTIFRSRPVINIOKTITVTPNRIDLRQKTACGAPSGICLQVKSCFEYTANPA
GYNPSISIVGTLEAEKERRKSGLSSRVQFRNQGSEPKYTQELTLKRQKQKVCMEETL
WLQDNIRDKLRPIPITASVEIQEPSSRRRVNSLPEVLPILNSDEPKTAHIDVHFLKEGCG
DDNVCNSNLKLEYKFCTREGNODKFSYLPIQKGVPELVKDKDIALEITVTNSPSNP
RNPTKDGDDAHEAKLIATFPDTLTYSAYRELRAFPEKQLSCVANQNGSQADCELGNP
FKRNSNVTFYLVLSTTEVTFDTPDLINLKLETTSNQDNLAPITAKAKVVIELLLSVSG
VAKPSQVYFGGTVVGEQAMKSEDEVGSLIEYEFRVINLGKPLTNLGTATLNIQWPKEI
SNGKWLLYLKVESKGLEKVTCEPOKEINSLNLTESHNSRKKREITEKOIDDNRKFSL
FAERKYOTLNCVNVNCVNIRCPLRGLDSKASLILRSRLWNSTFLEEYSKLN~~YLDILM~~
RAFIDVTAAAENIRLPNAGTQVRVTVFPSKTVAQYSGVPWWIILVAILAGILMLALLV
FILWKC~~GFF~~KRNKKDHYDATYHKAEIHAQPSDKERLTSDA

图 5A

整联蛋白 β -4（前体）

MAGPRPSPW^ARLLLAALISVLSGTLANRCKKAPVKSCTECVRVDKDCAYCTDEMF
RDRRCNTQAELLAAGCQRESIVVMESSFQITEETQIDTTLRRSQMSPQGLRVRLRPGE
ERHFELEVFEPLESPVDLYILMDFSNSMSDDLNLKKGQNLARVLSQLTSDYTIGFG
KFVDKVSVPOTDMRPEKLEPWPNSDPPFSFKNVISLTEDVDEFRNKLQGERISGNLD
APEGGFDAILQTAVCTRDIGWRPDSHLLVFSTESAFHYEADGANVLAGIMSRNDER
CHLDTTGTYTQYRTQDYPSVPTLVRLAKHNIPFAVTNYSYSYYEKLHTYFPVSSLG
VLQEDSSNIVELLEAFNRIRSNLDIRALDSPRGLRTEVTSKMFQKTRTGSFHRRGEV
GIYQVQLRALEHVDGTHVCQLPEDOKGNIHLKPSFSDGLKMDAGIICDVCTCELOKE
VRSARCSFNDFVCGQCVCSEGWGQTCNCSTGSLSDIQPCLREGEDKPCSGRGECQ
CGHCVCYGEGRYEGQFCEYDNFOCPRTSGLCNDRGRC SMGQCVCEPGWTGPSCDC
PLSNATCIDSNGGICNGRGHCECGRCHCHQQSLYTDTICEINYS AIHPGLCEDLRSCVQ
COAWGTGEKKGRTCBECNFKVKMVDELKRAEEVVRC SFRDEDDCTYSYTMEGD
GAPGPNSTVLVHKKKDCPPGSFWWLIPLLLLLPLLALLLLLCWKYCACCKACLALL
PCCNRGHMVGFKEDHYMLRENLMASDHLDTPMLRSGNLKGRDVVRWKVTNNMQR
PGFATHAASINPTELVPYGLSLRLARLCTENLLKPDTRCAQLROEVEENLNEVYRQI
SGVHKLQQTFRQQPNAGKKQDHTIVDTVLMAPRSAKPALLKLTEKQVEQRAFHDL
KVAPGYTTLTADQDARGMVEFQEGVELVDVRVPLFIRPEDDDEKQLLVEAIDVPAG
TATLGRRLVNITIIKEQARDVVSFEQPEFSVSRGDQVARIPVIRRVLDGGKSQVSYRTQ
DGTAQGNRDYIPVEGELLFQPGEAWKELQVKLELOEVD SLLRGRQVRRFHVQLSNP
KFGAHLGQPHSTTIIRDPELDRSFTSQMLSSQPPPHGDLGAPQNPNAKAAGSRKIHF
NWLPPSGKPMGYRVKYWIQGDSESEAHLLDSKVPVELTNLYPYCDYEMKVCAYG
AOGEGPYSSLVSCRTHQEVSEPGRLAFNVVSSTVTQLSWAEP AETNGEITAYEVCY
GLVNDDNRPIGPMKKVLVDNPKNRMLLIENLRESQPYRYTVKARNGAGWGPEREAI
NLATQPKRPMSIPIPIVDAQSGEDYDSFLMYSDDVLRSPSGSQRPSVSDDTGCGW
KFPELLGEELDLRRVTWRLPPELIPRLSASSGRSSDAEAPTAPRTTAARAGRAAAVPR
SATPGPPGEHLVNGRMDFAFPGSTNSLHRMTTTSAAAYGTHLSPHVPHRVLSTSSTLT
RDYNSLTRSEHSHSTTLPRDYSTLTSVSSHGLPPIWEHGRSRLPLSWALGSRSAQMK
GFPPSRGPRDSIILAGRPAAPSWGPD SRLTAGVPDTPTRLVFSALGPTSLRVSWQEPRC
ERPLQGY SVEYQLLNGGELHRLNIPNAQTSVVVEDLLPNHSYVFRVRAQSQEGWGR
EREGVITIESQVHPQSPCLPLGSAFTLSTPSAPGPLVFTALSPDSLQLSWERPRRPNGD
IVGYLVTCEMAQGGGPATAFRVDGDSPE SRLTVPGLSENVPYKFKVQARTTEGFGPE
REGIITIESQDGGFPQLGSRAGLFQHPLQSEYSSITTTHTSATEPFLVDGPTLGAQHLE
AGGSLTRHVTQEFVSRTLTTSGLSTHMDQQFFQT

图 5B

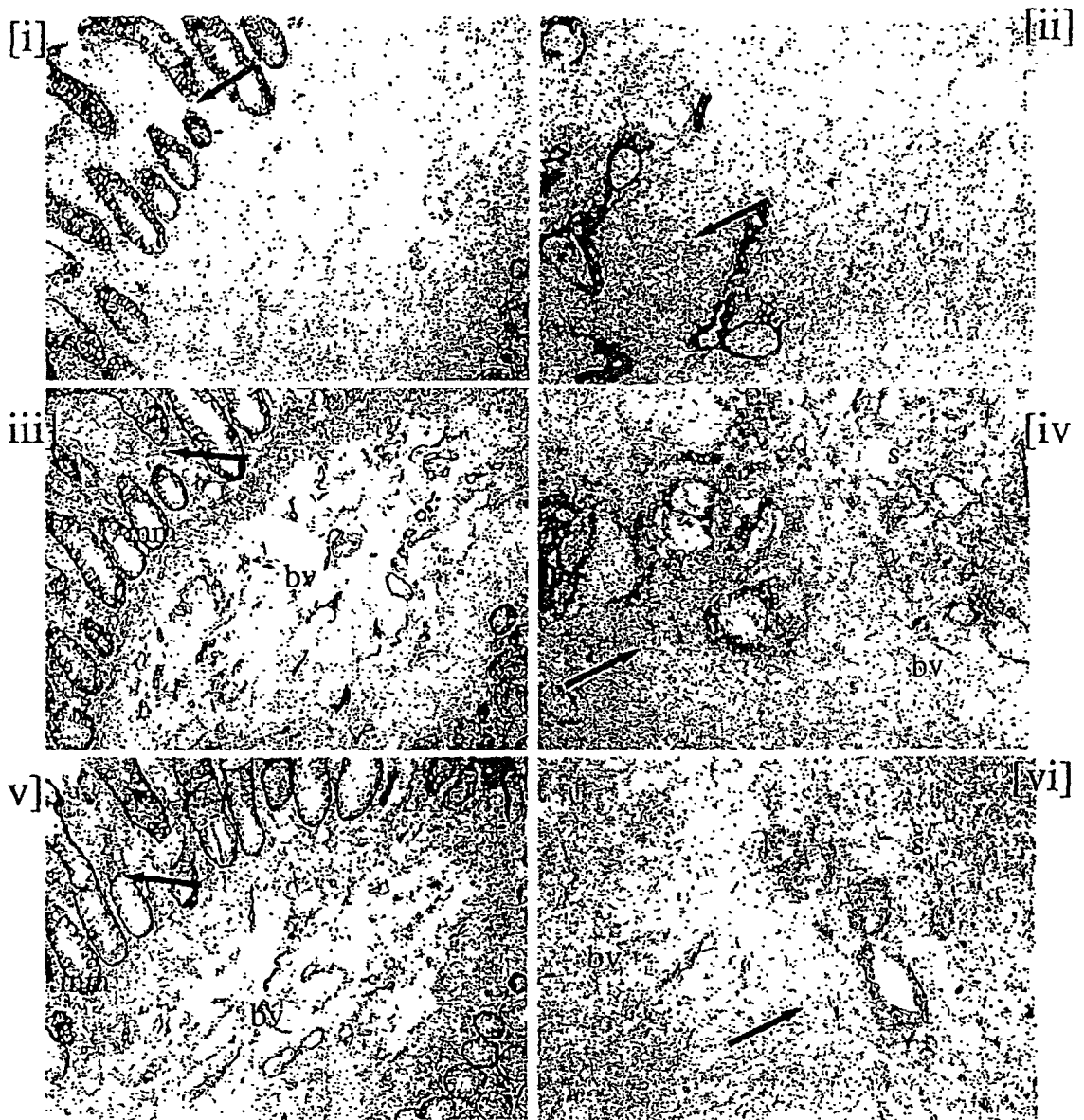


图 6

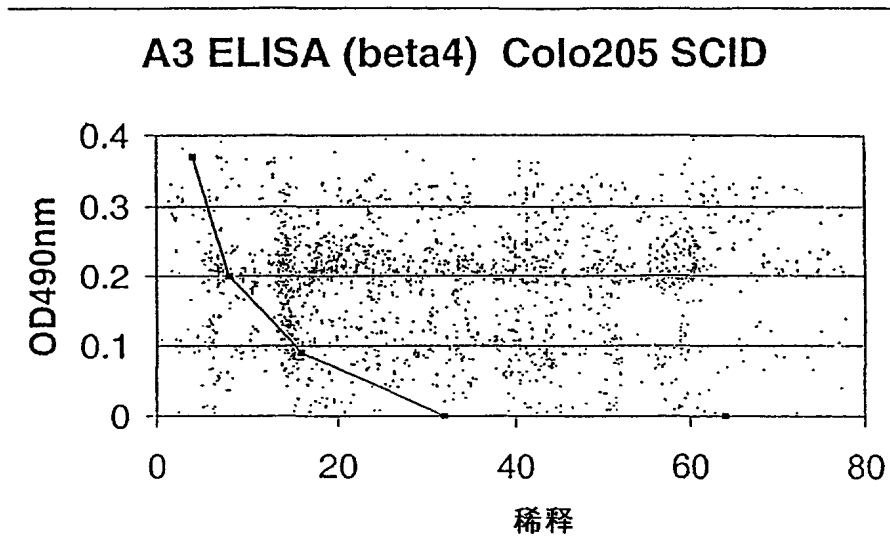


图 7A

FIG. 7B

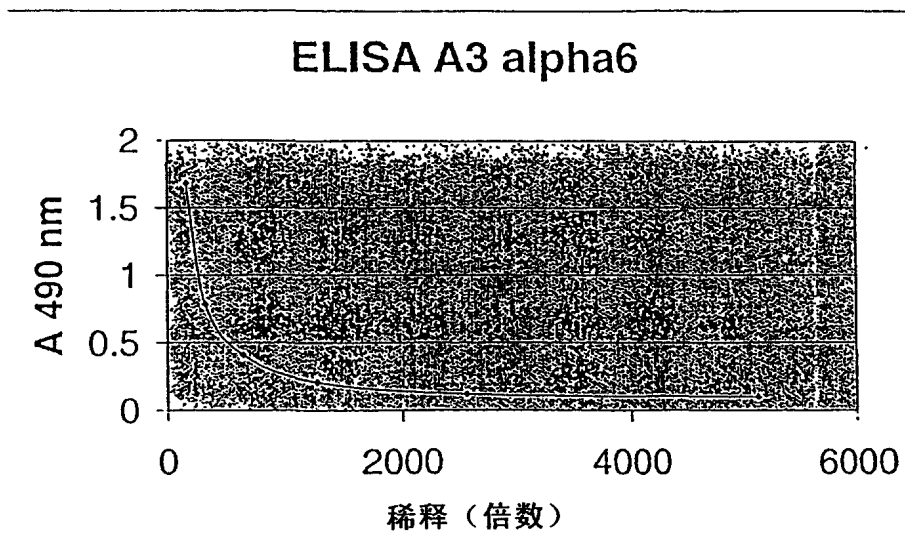


图 7B

(i)

scFvA3FabSEAm9 (4 $\mu\text{g/ml}$)

$\alpha\text{SEA-HRP}$ (1/2000)

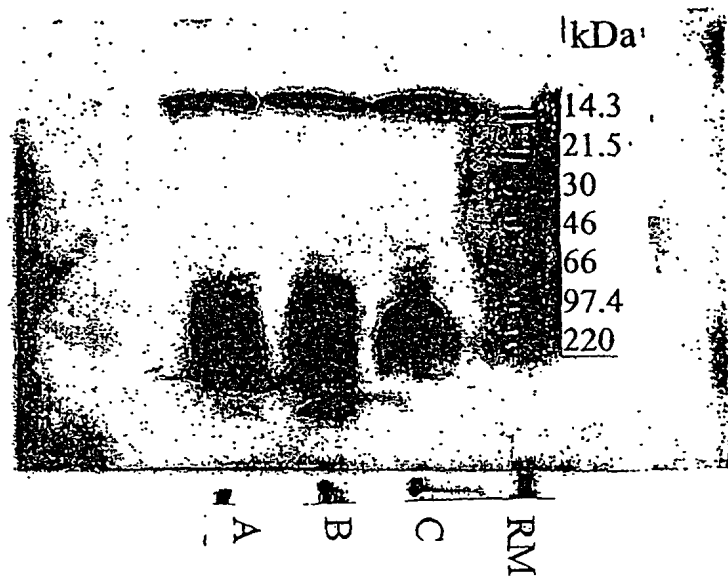


图 8A

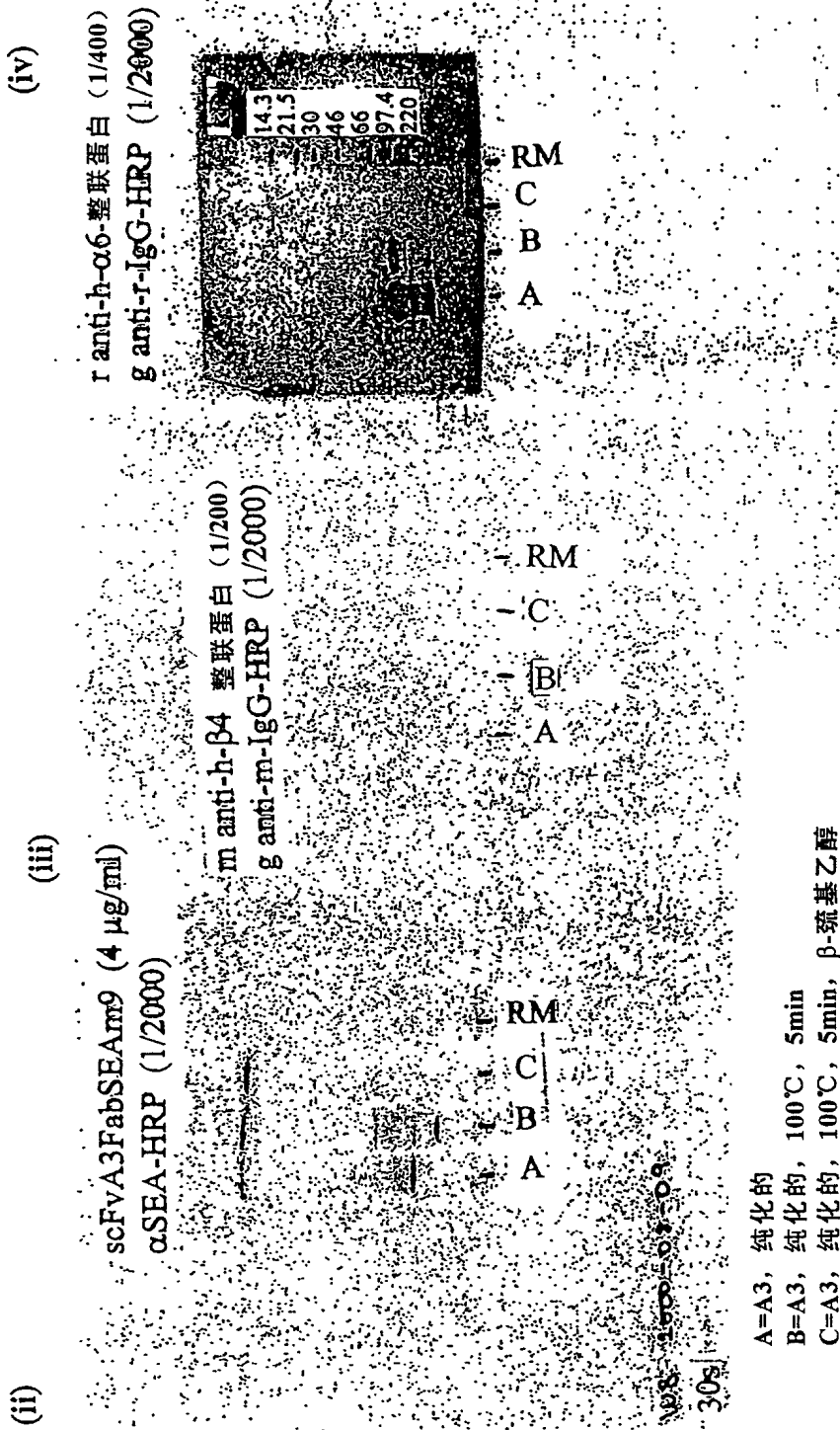


图 8B

专利名称(译)	涉及α6β4整联蛋白的人胃肠上皮肿瘤抗原的抗体		
公开(公告)号	CN1384840A	公开(公告)日	2002-12-11
申请号	CN00814886.4	申请日	2000-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	活跃生物技术股份公司		
[标]发明人	TN布罗丁 PJ卡尔斯特罗姆 LG奥尔森 MJ特德森 PP奇尔尼 BHK尼尔森		
发明人	T·N·布罗丁 P·J·卡尔斯特罗姆 L·G·奥尔森 M·J·特德森 P·P·奇尔尼 B·H·K·尼尔森		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/02 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/53 G01N33/574 C07K16/14 A61K39/00		
CPC分类号	C07K16/3046 A61K2039/505 C07K16/2839 C07K16/303 C07K2317/21 C07K2317/622 C07K2317/732 C07K2319/00 G01N33/57446 Y02P20/582		
代理人(译)	唐伟杰		
优先权	9903895 1999-10-28 SE		
其他公开文献	CN1229391C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了具有靶结构的结合结构的抗体、衍生物或其片段。抗体展示于人胃肠上皮肿瘤细胞中和细胞表面上以及正常人胃肠上皮细胞亚群中。所述结合结构含有轻链中SEQ ID NO:2所示氨基酸序列第23 - 33(CDR1)、49 - 55(CDR2)、88 - 98(CDR3)位氨基酸的互补决定区(CDR)序列,和重链中基本地包含SEQ ID NO:2中所示氨基酸序列第158 - 162(CDR1)、177 - 193(CDR2)和226 - 238(CDR3)位氨基酸的CDR序列,或者有相似独特结合特性的其它结合结构。本发明还描述了展示于肿瘤细胞中或表面上的靶结构、疫苗组合物、药物组合物以及与人恶性疾病相关的方法。

[22]申请日 2000.10.26 [21]申请号 00814886.4
[30]优先权 [32]1999.10.28 [33]SE [31]9903895-2
[86]国际申请 PCT/SE00/02082 2000.10.26
[87]国际公布 WO01/30854 英 2001.5.3
[85]进入国家阶段日期 2002.4.26
[71]申请人 活跃生物技术股份公司
地址 瑞典隆德
[72]发明人 T·N·布罗丁 P·J·卡尔斯特罗姆
L·G·奥尔森 M·J·特德森
P·P·奇尔尼
B·H·K·尼尔森

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 5 页 说明书 47 页 附图 10 页