



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101103044 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 02

(21) 申请号 200680002252. 1

A61P 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 01. 12

A61P 37/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/10 (2006. 01)

006348/2005 2005. 01. 13 JP

C12P 21/08 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/53 (2006. 01)

2007. 07. 12

G01N 33/577 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/JP2006/300676 2006. 01. 12

Protopopov, A. 等. 序列号 Q91YD5.

(87) PCT申请的公布数据

W02006/075784 JA 2006. 07. 20

UniProtKB/TrEMBL. 2001,

(73) 专利权人 株式会社遗传科技

地址 日本北海道札幌市

PALMER EL. SEQUENCE AND TISSUE

DISTRIBUTION OF THE INTEGRIN-ALPHA-9 SUBUNIT, A NOVEL PARTNER OF BETA-1 THAT IS WIDELY DISTRIBUTED IN EPITHELIA AND MUSCLE. The Journal of Cell Biology 123 5. 1993, 123 (5), 1289-1297.

(72) 发明人 黑泷大翼 金山刚士 今重之上出利光

审查员 汪波莉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 庞立志 李平英

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页

序列表 20 页 附图 22 页

(54) 发明名称

抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体、抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体、产生上述抗体的杂交瘤细胞、上述抗体和杂交瘤细胞的制备方法、含有上述抗体的药物组合物等。本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体通过抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白功能, 对于癌例如癌细胞的增殖、转移、炎症性疾病例如类风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维变性、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿、炎症性肠疾病(溃疡性结肠炎、克罗恩病)、以及自身免疫性疾病等发挥治疗效果。

CN 101103044 B

1. 单克隆抗体, 该单克隆抗体由保藏编号 FERM BP-10195、FERM BP-10196、FERM BP-10197 或 FERM BP-10198 标示的杂交瘤细胞产生。
2. 杂交瘤细胞, 该杂交瘤细胞由保藏编号 FERM BP-10195、FERM BP-10196、FERM BP-10197 或 FERM BP-10198 标示。
3. 用于治疗肝炎的药物组合物, 该药物组合物含有由保藏编号 FERM BP-10197 的杂交瘤细胞产生的单克隆抗体。
4. 用于权利要求 3 的药物组合物, 该药物组合物还含有抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体。
5. 由保藏编号 FERM BP-10197 的杂交瘤细胞产生的单克隆抗体在制备用于治疗肝炎的药物中的用途。
6. 由保藏编号 FERM BP-10197 的杂交瘤细胞产生的单克隆抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体在制备用于治疗肝炎的药物中的用途。

抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性识别 $\alpha 9$ 整联蛋白 (integrin) 和小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体;产生上述单克隆抗体的杂交瘤细胞;含有上述单克隆抗体的药物组合物;含有上述单克隆抗体的诊断剂;上述单克隆抗体的制备方法;上述杂交瘤细胞的制备方法等。

背景技术

[0002] 细胞通过被称为整联蛋白的一组细胞表面受体与胞外基质 (extracellular matrix, 以下简称为 ECM) 结合。整联蛋白通过形成 α 链和 β 链 1:1 的异二聚体来发挥功能。目前至少鉴定了 18 种 α 链、8 种 β 链和 24 种 $\alpha \beta$ 异二聚体。已知各整联蛋白分别识别特异性的配体。按照与配体的特异性以及功能,整联蛋白被分类为亚家族 (subfamily), 分成胶原受体、层粘连蛋白受体、识别纤连蛋白或玻连蛋白等中含有的 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列的 RGD 受体、只存在于白细胞中的白细胞特异性受体 (非专利文献 1:Hynes RO. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell 110:673-87;非专利文献 2:Miyasaka M. 2000. New edition of Adhesion Molecule handbook. Shujunsha)。 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白是不属于上述任何一种的亚家族,被称为 $\alpha 4$ 整联蛋白亚家族 (非专利文献 3:Elise L. Palmer, Curzio Rfieg, Ronald Ferrando, Robert Pytela, Sheppard D. 1993. Sequence and Tissue Distribution of the Integrin $\alpha 9$ Subunit, a Novel Partner of 131 That Is Widely Distributed in Epithelia and Muscle. The Journal of Cell Biology 123:1289-97)。而目前 ECM 只被认为是细胞间的填充物,不过,已经搞清楚整联蛋白介导的 ECM 与细胞的相互作用与细胞的增殖、粘附、运动等的调节有很大关系,与癌的进展或炎症的恶化等疾病的发病相关。

[0003] 作为 ECM 一种的骨桥蛋白 (osteopontin, 以下简称为 OPN) 是分子量约为 41kDa 的分泌型酸性磷酸化糖蛋白,是在乳汁、尿、肾小管、破骨细胞、成骨细胞、巨噬细胞、活化 T 细胞、肿瘤组织等中可见广泛表达的分子。分子中央部具有细胞粘附序列 GRGDS,在人类的 OPN 中具有 SVVYGLR 序列,在小鼠 OPN 中具有 SLAYGLR 序列,其后紧接着具有凝血酶切断位点,通过 GRGDS 序列与 RGD 整联蛋白粘附,通过 SVVYGLR 序列或 SLAYGLR 序列与 $\alpha 4 (\alpha 4 \beta 1)$ 和 $\alpha 9 (\alpha 9 \beta 1)$ 整联蛋白粘附。

[0004] 还发现 $\alpha 4 \beta 1$ 和 $\alpha 9 \beta 1$ 有以下的方式差异: $\alpha 4 \beta 1$ 与未被凝血酶切断的 OPN (非切断型 OPN) 和被凝血酶切断的 N 末端片段 (切断型 OPN) 两者结合, $\alpha 9 \beta 1$ 只与切断型 OPN 结合 (非专利文献 4:Y. Yokosaki 等人, (1999) The Journal of Biological Chemistry 274, 36328-36334;非专利文献 5:P. M. Green 等人, (2001) FEBS Letters 503, 75-79;非专利文献 6:S. T. Barry 等人, (2000) Experimental Cell Research 258, 342-351)。

[0005] $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白除 OPN 之外还有很多共通的配体。已知有纤连蛋白的 EDA 位点、前肽-血管性血友病因子 (pp-vWF)、组织型转谷氨酰胺酶 (tTG)、第 XIII 凝血因子以及血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 等。已知 $\alpha 4$ 整联蛋白特异性识别的配体有纤连蛋白的 CS-1 结构域、MadCAM-1 ($\alpha 4 \beta 7$) 等。已知 $\alpha 9$ 整联蛋

白特异性识别的配体有腱生蛋白 C、血纤蛋白溶酶等。

[0006] $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ 和 $\beta 1$ 的整联蛋白亚单位的氨基酸序列是公知的。例如，在 GenBank 中，人 $\alpha 9$ 登记为 NM_002207、小鼠 $\alpha 9$ 登记为 NM_133721、人 $\alpha 4$ 登记为 NM_000885、小鼠 $\alpha 4$ 登记为 NM_010576、人 $\beta 1$ 登记为 X07979、小鼠 $\beta 1$ 登记为 NM_010578。还已知这些整联蛋白种间的氨基酸序列间类似性高。

[0007] W002/081522(专利文献 1) 中公开了使用 OPN 缺损小鼠或 OPN 中和抗体的 OPN 功能性抑制对于类风湿性关节炎或肝炎的治愈效果。该公报中公开了：在炎症性疾病发病中， $\alpha 9$ 整联蛋白、 $\alpha 4$ 整联蛋白识别序列 SVVYGLR 序列是重要的，OPN 的受体在免疫活性细胞等中表达，与炎症性疾病相关。

发明内容

[0008] 目前，已知关于癌、炎症性疾病、自身免疫性疾病的治疗药有多种多样，但是人们仍希望开发出具有更好的治疗效果的癌、炎症性疾病、自身免疫性疾病的预防药和 / 或治疗药等。

[0009] 本发明人着眼于整联蛋白，进行了各种研究，结果发现： $\alpha 9$ 整联蛋白的特异性抑制抗体具有癌抑制效果、抗炎症效果，从而完成了本发明。即，具体来说，本发明提供以下单克隆抗体，杂交瘤细胞、药物组合物等。

[0010] (1) 单克隆抗体，该单克隆抗体特异性识别人 $\alpha 9$ 整联蛋白和小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白。

[0011] (2) 上述 (1) 的单克隆抗体，该单克隆抗体抑制人和 / 或小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白与 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体的结合。

[0012] (3) 上述 (2) 的单克隆抗体，其中， $\alpha 9$ 整联蛋白的配体是骨桥蛋白。

[0013] (4) 上述 (1) ~ (3) 中任一项的单克隆抗体，所述单克隆抗体由保藏编号 FERM BP-10195、FERM BP-10196、FERM BP-10197 或 FERM BP-10198 标示的杂交瘤细胞产生。

[0014] (5) 杂交瘤细胞，该杂交瘤细胞产生上述 (1) ~ (4) 中任一项的单克隆抗体。

[0015] (6) 药物组合物，该药物组合物含有上述 (1) ~ (4) 中任一项的单克隆抗体。

[0016] (7) 药物组合物，该药物组合物含有权利要求 (1) ~ (4) 中任一项的单克隆抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体两者。

[0017] (8) 上述 (6) 或 (7) 的药物组合物，该药物组合物是炎症性疾病的预防和 / 或治疗剂。

[0018] (9) 炎症性疾病的诊断剂，该诊断剂含有上述 (1) ~ (4) 中任一项的单克隆抗体。

[0019] (10) 上述 (1) ~ (4) 中任一项的单克隆抗体的制备方法，其特征在于：使用过量表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞作为抗原。

[0020] (11) 上述 (5) 的杂交瘤细胞的制备方法，其特征在于，使用与作为过量表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗原使用的细胞不同种类的细胞。

[0021] (12) 细胞和 / 或组织的重塑 (リモデリング) 的抑制和 / 或促进剂，该抑制和 / 或促进剂含有 $\alpha 9$ 整联蛋白结合性功能分子 (例如 OPN、VCAM-1、腱生蛋白 C、纤连蛋白、pp-vWF、tTG 等) 作为有效成分。

[0022] [0022] (13) 细胞和 / 或组织重塑的抑制和 / 或促进方法，其特征在于，使 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞和 / 或组织 (例如肿瘤细胞、嗜中性粒细胞、平滑肌等) 与 $\alpha 9$ 整联蛋白结

合性功能分子（例如 OPN、VCAM-1、腱生蛋白 C、纤连蛋白、pp-vWF、tTG 等）接触。

[0023] 本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体通过抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白功能,可对癌例如癌细胞的增殖、转移;炎症性疾病例如类风湿性关节炎(リウマチ関節炎)、变形性关节炎(变形性関節症)、肝炎、支气管哮喘、纤维变性(纖維症)、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿、炎症性肠病(溃疡性结肠炎、克罗恩病(クローン病))以及自身免疫性疾病等发挥治疗效果。

[0024] 含有本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体两者的药物组合物发挥更好的炎症性疾病治疗效果。本发明制备了小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白、人 $\alpha 9$ 整联蛋白各自的单克隆抗体。抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可在动物实验中使用,抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可作为治疗药使用。

附图说明

[0025] 图 1 是表示整联蛋白基因导入细胞中 mRNA 表达量的分析结果图。

[0026] 图 2 是表示抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的 FACS 分析结果图。

[0027] 图 3 是通过抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对正常组织进行染色的图像。

[0028] 图 4 是免疫染色结果一览图。

[0029] 图 5 是表示四个克隆的抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的细胞粘附抑制效果图。

[0030] 图 6 是抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体克隆的细胞粘附抑制效果的比较图。

[0031] 图 7 是表示通过竞争抑制实验对抗体的表位分析结果图。

[0032] 图 8 是 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白在小鼠黑素瘤细胞株中的表达分析结果图。

[0033] 图 9 是 $\alpha 9$ 整联蛋白在单核细胞系细胞株中的表达的分析结果图。

[0034] 图 10 是表示小鼠嗜中性粒细胞的 FACS 分析结果图。

[0035] 图 11 是表示小鼠肝脏浸润白细胞的 FACS 分析结果图。

[0036] 图 12 是表示抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体和 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的 B16-BL6 细胞粘附抑制效果图。

[0037] 图 13 是表示抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对肝炎的治疗效果图。

[0038] 图 14 是表示腱成纤维细胞的 $\alpha 9$ 整联蛋白表达的图。

[0039] 图 15 是表示通过凝血酶切断型 OPN 增加腱成纤维细胞的 MMP-13mRNA 转录的图。

[0040] 图 16 是表示通过抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制来自腱成纤维细胞的 MMP-13mRNA 的转录的图。

[0041] 图 17 是表示通过抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制 B16-BL6 细胞的增殖的图。

[0042] 图 18 是表示通过并用抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体抑制 VCAM-1 的刺激导致的 B16-BL6 细胞的增殖的图。

[0043] 图 19 是表示抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的 FACS 分析结果图。

[0044] 图 20 是抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体四个克隆和 Y9A2 的细胞粘附抑制效果图。

具体实施方式

[0045] 作为抗整联蛋白抗体, $\alpha 4$ 整联蛋白的中和抗体已经进入临床实验阶段。例如 2004 年 7 月,美国食品药品监督管理局(FDA)受理了 BiogenIdec Inc(美国麻萨诸塞州)和

Elan Corporation (爱尔兰) 的多发性硬化症治疗药 Tysabri (注册商标) (那他珠单抗 (natalizumab)) 的认证申请, Tysabri (注册商标) 被指定为优先审查对象。Tysabri (注册商标) 还以克罗恩病、类风湿性关节炎等疾病为对象。另外, 被称作 P4C2 的抗人 $\alpha 4 \beta 1$ 整联蛋白单克隆抗体已在实验室水平使用。

[0046] 但是, 作为 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体, 以人 $\alpha 9$ 整联蛋白为抗原、对人和豚鼠的 $\alpha 9$ 整联蛋白显示特异性的被称为 Y9A2 的中和抗体 (A. Wang 等人, (1996) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 15, 664-672) 虽然在实验室水平使用, 但并未在临床中应用。

[0047] 另一方面, 在将抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体作为对人使用的药物时, 在开发阶段不能直接施与人, 不能确认其结果。即, 为了确认效果, 必须进行动物实验, 如果该效果得到确认, 才可以制作成人源化抗体 (ヒト化抗体) 等。小鼠有很多是遗传背景明确的系统, 还具有世代间隔短的特征。并且已知小鼠可以观察到与人的疾病大致相同的疾病, 因此适合作为实验动物。但是与小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白显示交叉反应的中和抗体目前尚未有报告。

[0048] 本发明中, 通过小心地进行以下四个步骤, 可以获得分别与人、小鼠的 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性反应的抑制抗体。

[0049] (1) $\alpha 9$ 整联蛋白过量表达株的制备

[0050] 基因表达细胞的筛选通常是在蛋白质水平或基因水平进行, 但这里是通过利用作为 $\alpha 9$ 整联蛋白的功能的细胞粘附功能进行筛选, 由此建立分别在细胞膜上过量表达人或小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞株。

[0051] 人或小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞可应用于分别对小鼠或仓鼠进行的免疫。

[0052] (2) 细胞的选择

[0053] 为了制备小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体, 考虑对金黄仓鼠进行免疫。为此, 向来自仓鼠卵巢的细胞 CHO-K1 细胞导入小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白基因, 在仓鼠内构建只使主要抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体的抗体效价 (抗体価) 增加的实验体系。

[0054] 人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体是向 CHO-K1 细胞中导入人 $\alpha 9$ 整联蛋白的基因, 在小鼠内构建使人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体增加的实验体系。

[0055] (3) 产生抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的杂交瘤的筛选

[0056] 为了有效地从各种杂交瘤中获得只与小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白反应的克隆, 筛选中使用在与免疫的细胞的母细胞 (CHO-K1) 不同的细胞 (NIH3T3) 中表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞。进一步使用在 NIH3T3 细胞中表达与 $\alpha 9$ 整联蛋白同样属于整联蛋白家族的小鼠 $\alpha 4$ 整联蛋白的细胞, 通过选择与 $\alpha 9$ 整联蛋白以外的整联蛋白不显示交叉反应性的克隆, 有效地得到了与小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性反应的抗体。

[0057] (4) 产生抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的杂交瘤的筛选

[0058] 为了从各种杂交瘤中有效地获得只与人 $\alpha 9$ 整联蛋白反应的克隆, 选择与基因导入 CHO-K1 反应、不与 CHO-K1 细胞反应的克隆。另外, 通过确认不与导入人 $\alpha 4$ 整联蛋白基因的 CHO-K1 细胞反应, 得到了与人 $\alpha 9$ 整联蛋白特异性反应的抑制抗体。

[0059] [$\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体]

[0060] 本发明提供 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体。本发明中, “抗体”是指可与作为抗原的 $\alpha 9$ 整联蛋白或其部分肽结合的抗体分子整体或其片段 (例如 Fab 或 (Fab')₂ 片段), 可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体。本发明中, 优选指单克隆抗体。本发明中, “抗体”包含

人抗体、人源化抗体（ H_2L_2 型化抗体）、嵌合抗体。

[0061] 上述“人源化抗体（ H_2L_2 型化抗体）”是指将来自小鼠等人以外的种的抗体进行改变，将 H 链和 L 链的互补决定区以外的一级结构用人的抗体所对应的一级结构替代所得的抗体。另外，“嵌合抗体”是指具有来自不同种抗体的 Fab 区和 Fc 区的抗体。

[0062] 本发明中，“抗体片段”是指抗体总长的一部分，通常为抗原结合区或可变区。例如，抗体片段包含 Fab、Fab'、 $\text{F(ab}')_2$ 和 Fv 片段。抗体通过木瓜蛋白酶消化，可以生成被称为 Fab 片段的各具有一个抗原结合部位的两个相同的抗原结合片段、以及其余的因容易结晶而被称为“Fc”的片段。还可以通过胃蛋白酶消化而得到具有两个抗原结合部位、可与抗原交叉结合的 $\text{F(ab}')_2$ 片段、以及余下的另一片段（被称为 pFc'）。

[0063] 这里，“Fv”片段是最小的抗体片段，包含完全的抗原识别部位和结合部位。该区域是一条重链和轻链的可变结构域通过非共价键紧密连接的二聚体（ V_H-V_L 二聚体）。各可变结构域的三个 CDR 相互作用，在 V_H-V_L 二聚体的表面形成抗原结合部位。六个 CDR 使抗体具有抗原结合部位。但是，即使是一个可变结构域（或者只含有抗原特异性的三个 CDR 的半个 Fv），虽然比全部结合部位的亲和性低，但仍具有识别抗原并结合的能力。

[0064] Fab 片段（也称为 F(ab) ）还包含轻链的恒定结构域、和重链的细胞的恒定结构域（CH1）。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于：Fab' 片段附加有多个残基，所述多个残基来自包含抗体铰链区的 1 个或者 1 个以上半胱氨酸的重链 CH1 结构域的羧基末端。

[0065] 本发明的“单克隆抗体”是指实质上均质的抗体集团，即，构成集团的各个抗体是从除了天然发生的、少量存在的突变体以外为均一的抗体集团得到的抗体。单克隆抗体具有高度特异性，对单一的抗原部位发生作用。并且，与包含相对于不同表位的不同抗体的多克隆抗体相比，各单克隆抗体只面向抗原上的单一表位。除其特异性之外，单克隆抗体可通过不混杂其它免疫球蛋白的杂交瘤培养进行合成，这是有利的。“单克隆”的修饰语显示了由实质上均一的抗体集团得到的抗体的特性，但抗体并不限于通过特定的方法制备。

[0066] 以下对抗 $\alpha 9$ 整联蛋白单克隆抗体的制备进行详细描述，但该抗体的制备并不限于此。

[0067] [$\alpha 9$ 整联蛋白（抗原）]

[0068] 本发明中作为抗原使用的 $\alpha 9$ 整联蛋白可以是（1）来自表达人或其它哺乳动物的 $\alpha 9$ 整联蛋白的所有细胞、或者是存在这些细胞的所有组织的蛋白质、（2）将编码 $\alpha 9$ 整联蛋白的基因 DNA、优选 cDNA 导入细菌、酵母、动物细胞等细胞株并使其表达的重组蛋白，还可以是（3）合成蛋白质。

[0069] 本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白也包括具有与各种哺乳动物的 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列、特别优选人 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列（SEQ ID NO:1）基本上相同的氨基酸序列的多肽。

[0070] 这里，“具有基本上相同的氨基酸序列的多肽”只要是与天然型的 $\alpha 9$ 整联蛋白、特别优选来自人的 $\alpha 9$ 整联蛋白基本上具有同等的生物学性质，是指具有该氨基酸序列中的多个氨基酸、优选 1-10 个氨基酸、特别优选 1~数个（例如 1~5 个）氨基酸发生取代、缺失和/或修饰的氨基酸序列的突变多肽；以及具有在该天然型的 $\alpha 9$ 整联蛋白、特别优选来自人的 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列中附加了多个氨基酸、优选 1~10 个氨基酸，特别优选 1~数个（例如 1~5 个）氨基酸的氨基酸序列的突变多肽。还可以是具有多个上述取

代、缺失、修饰和附加的突变多肽。

[0071] 本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白、特别是来自人的 $\alpha 9$ 整联蛋白除基因重组技术之外,还可以通过采用化学合成法、细胞培养方法等本技术领域公知的方法或其改造方法制备。

[0072] 突变多肽的制备方法例如有:合成寡核苷酸定点诱变法(缺口双链体法, gapped duplex 法)、通过亚硝酸或亚硫酸处理而随机导入点突变的方法、通过 Ba131 酶等制备缺失突变体的方法、盒式诱变法、接头分区法(リンカースキヤニング法)、miss incorporation 法、错配引物(mismatch primer)法、DNA 片段合成法等。

[0073] 本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白也包括该 $\alpha 9$ 整联蛋白的“一部分”。这里,“一部分”是包含与 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体、例如 OPN 或 VCAM-1、腱生蛋白 -C 等结合所必需的区的部分。具体来说,是指包含 SEQ ID NO:1 表示的氨基酸序列的 14-980 号、SEQ ID NO:2 表示的氨基酸序列的 11-981 号的部分。该 $\alpha 9$ 整联蛋白的“一部分”可按照后述的本技术领域公知的方法或其改造的方法,通过基因重组技术或化学合成法制备,还可通过蛋白质分解酶等将由细胞培养法分离的 $\alpha 9$ 整联蛋白、特别优选来自人的 $\alpha 9$ 整联蛋白适当切断来制备。

[0074] 作为抗原,还可以使用通过重组技术使 $\alpha 9$ 整联蛋白在细胞膜上过量表达的细胞本身、或者其膜级分(膜画分)等。

[0075] 本发明的 $\alpha 9$ 整联蛋白也包括具有与人 $\alpha 9$ 整联蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)基本上相同的氨基酸序列的多肽。作为具有与 SEQ ID NO:1 表示的氨基酸序列基本上相同的氨基酸序列的多肽具体可列举:具有 SEQ ID NO:2 表示的氨基酸序列的小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白。本发明中,考虑将小鼠作为疾病模型动物,因此优选使用来自小鼠的 $\alpha 9$ 整联蛋白作为本发明的抗原。在本发明中,特别是,优选使用通过重组技术使 $\alpha 9$ 整联蛋白在细胞膜上过量表达的细胞本身。因此,如后所述,可以使用公知的基因工程技术克隆编码 $\alpha 9$ 整联蛋白的基因(例如 cDNA),将 $\alpha 9$ 整联蛋白在细胞膜上过量表达的细胞本身、或者其细胞膜级分作为抗原。

[0076] [抗体产生细胞的制备]

[0077] 抗原是施与要被免疫的动物,将抗原本身或与载体、稀释剂一起施与通过施与可产生抗体的部位。施与时,为了提高抗体产生能力,可以施与完全氟氏佐剂或不完全氟氏佐剂。施与通常是每隔 1~6 周一次,共进行 2~10 次左右。所使用的温血动物例如有小鼠、猴、兔、狗、豚鼠、大鼠、仓鼠、绵羊、山羊、鸡等,本发明中优选使用仓鼠。

[0078] 治疗对象为人,OPN 抑制抗体产生动物为小鼠时,优选使用人小鼠嵌合抗体或人源化抗体(ヒト化抗体),进一步优选使用导入了与抗体产生相关的人基因的小鼠等转基因动物制备人型单克隆抗体(ヒト型モノクローナル抗体),并使用。

[0079] [抗体产生细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合]

[0080] 骨髓瘤细胞使用来自小鼠、大鼠、人等的细胞。例如可列举小鼠骨髓瘤 P3U1、P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653 等,优选抗体产生细胞与骨髓瘤细胞来自同种动物、特别是来自同系(同系统)的动物。骨髓瘤细胞可以冷冻保存,或者在添加了马、兔或胎牛血清的常规培养基中継代维持。细胞融合优选使用对数增殖期的细胞。本发明中适合使用 P3X63-Ag8-653。

[0081] 使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合、形成杂交瘤的方法可列举:使用聚乙二醇(PEG)的方法、使用仙台病毒的方法、使用电融合装置的方法等。例如为 PEG 法时,在含有约

30-60% PEG (平均分子量 1000-6000) 的适当的培养基或缓冲液中,以 1 ~ 10:1、优选 5 ~ 10:1 的混合比悬浮脾细胞和骨髓瘤细胞,在温度约为 25 ~ 37°C、pH 为 6 ~ 8 的条件下反应约 30 秒 ~ 3 分钟左右即可。反应终止后,除去 PEG 溶液,再悬浮于培养基中,接种于细胞孔板 (cell-well plate) 中继续培养。

[0082] [杂交瘤细胞的筛选]

[0083] 产生单克隆抗体的杂交瘤细胞的筛选可按照公知或与其近似的方法进行。通常可用添加了 HAT (次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷) 的动物细胞用培养基进行。筛选和育种用培养基只要是杂交瘤细胞可生长的培养基,可以使用任何培养基。例如可以使用含有 1 ~ 20%、优选 10 ~ 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基;含有 1 ~ 10% 胎牛血清的 GIT 培养基 (和光纯药工业 (株)) 或杂交瘤培养用无血清培养基 (SFM-101, 日水制药 (株)) 等。培养温度通常为 20 ~ 40°C, 优选为约 37°C。培养时间通常为 5 天 ~ 3 周, 优选 1 周 ~ 2 周。培养通常可在 5% CO₂ 下进行。

[0084] 本发明的单克隆抗体的产生可使用新临床免疫实验操作法 (Part3)、科学评论社、1997 中记载的细胞 ELISA 法进行确认和筛选。预想到将用于免疫的细胞用于筛选,背景增高或假阳性变多的情况,可以将与在和用于免疫的细胞不同的另外的细胞中过量表达的 $\alpha 9$ 整联蛋白反应,且与过量表达 $\alpha 4$ 整联蛋白的细胞不反应的克隆作为抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。重复 1 ~ 5 次、优选 2 ~ 4 次有限稀释法 (限界希积法),可由这样的克隆制备单克隆抗体。

[0085] [抗体的分离纯化]

[0086] 所得抗体可以纯化至均一。抗体的分离、纯化可以使用通常的蛋白质所使用的分离、纯化方法。例如可以适当选择、组合亲和色谱等的色谱柱、过滤、超滤、盐析、透析、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电位电泳等分离、纯化抗体 (Antibodies :A Laboratory Manual. EdHarlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), 但并不限于此。亲和色谱中使用的柱子可列举蛋白 A 柱、蛋白 G 柱。例如作为蛋白 A 柱使用的柱有 Hyper D、POROS、Sepharose F.F. (Amersham Biosciences) 等。

[0087] [抗体的标记]

[0088] 使用公知的方法或市售的试剂盒,可以对所得抗体进行各种标记 (例如生物素标记、FITC 标记、APC 标记)。本发明中,优选采用使用生物素标记试剂盒 (Biotin Labeling Kit, 同仁化学) 的生物素标记。

[0089] [含有本发明的单克隆抗体的药物组合物]

[0090] 本发明提供含有上述单克隆抗体的药物组合物。含有本发明的单克隆抗体作为有效成分的药物组合物可用作癌例如癌细胞的增殖、转移,炎症性疾病例如类风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维变性、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿、炎症性肠病 (溃疡性结肠炎、克罗恩病) 以及自身免疫性疾病等的预防和 / 或治疗剂。

[0091] 含有本发明的单克隆抗体而成的药物组合物还可用于器官移植后的慢性排斥反应的抑制、全身性自身免疫性疾病・红斑狼疮・葡萄膜炎・贝切特病 (ベ—チエト病)、多发性肌炎 (多発性筋炎)、肾小球增殖性肾炎 (糸状体增殖性肾炎)、结节病等自身免疫性疾病的治疗。

[0092] 含有本发明的抗体的上述疾病的预防和 / 或治疗剂毒性低,配合在适当的溶剂中

制成液体制剂,或者制成适当剂型的药物组合物,可以口服或非口服地施与人或哺乳动物(例如大鼠、兔、羊、猪、牛、猫、狗、猴等)。施与量根据施与对象、对象疾病、症状、给药途径等而不同,例如用于成人的类风湿性关节炎患者的预防和/或治疗时,可以是通常按照一次剂量为0.01-20mg/kg体重左右、优选0.1-10mg/kg体重左右、进一步优选0.1-5mg/kg体重左右,每天1-5次、优选每天1-3次左右,通过静脉注射施与本发明的抗体。其它的非口服施与和口服施与的情形也可以根据该量给药。症状特别严重时,可以根据其症状进行增量。

[0093] 本发明的抗体可以以其本身或适当的药物组合物的形式给药。上述给药中所使用的药物组合物包含上述抗体或其盐和药理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。所述组合物可以以适合口服或非口服的剂型提供。

[0094] 即,例如作为适合口服的组合物,可以是固体或液体的剂型,具体可列举片剂(包括糖衣片、薄膜包衣片)、丸剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂(包括软胶囊剂)、糖浆剂、乳剂、混悬剂等。上述组合物可通过公知的方法制备,含有制剂领域中通常使用的载体、稀释剂或赋形剂。例如,作为片剂用的载体、赋形剂,可以使用乳糖、淀粉、蔗糖、硬脂酸镁等。

[0095] 作为用于非口服的组合物,例如可使用注射剂、栓剂等。注射剂包括静脉注射剂、皮下注射剂、皮内注射剂、肌肉注射剂、输液注射剂等剂型。所述注射剂可按照公知的方法,例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化于通常注射剂所使用的无菌水性或油性液中来制备。注射用的水性液例如使用生理食盐水、含有葡萄糖或其它辅助剂的等渗液等,还可以并用适当的溶解助剂例如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物(adduct))]等。油性液例如可使用芝麻油、大豆油等,可以并用苯甲酸苄酯、苄醇等作为溶解助剂。所制备的注射液通常填充在适当的安瓿瓶中。在直肠给药的栓剂中,可通过将上述抗体或其盐与通常的栓剂用基质混合而制备。

[0096] 上述口服或非口服药物组合物优选制备成适合活性成分给药量的给药单位的剂型。作为这种给药单位的剂型,可列举片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿瓶)、栓剂等,每个给药单位剂型通常分别含有5-500mg、注射剂为5-100mg、其它剂型中优选10-250mg的上述抗体。

[0097] 上述各组合物只要不因与上述抗体配合而发生不希望的相互作用即可含有其它活性成分。

[0098] 本发明涉及含有 $\alpha 9$ 整联蛋白结合性功能分子(例如OPN、VCAM-1、腱生蛋白C、纤连蛋白、pp-vWF、tTG等)作为有效成分的细胞和/或组织重塑的抑制和/或促进剂;以及以使 $\alpha 9$ 整联蛋白表达细胞和/或组织(例如肿瘤细胞、嗜中性粒细胞、平滑肌等)与 $\alpha 9$ 整联蛋白结合性功能分子接触为特征的细胞和/或组织重塑的抑制和/或促进方法。上述治疗剂有效成分的施与量、施与方法、制剂等可参照上述含有抗体的药物中的记载适当确定。

[0099] [含有本发明的单克隆抗体的诊断剂]

[0100] 含有本发明的单克隆抗体的药物组合物可作为癌例如癌细胞的增殖、转移;炎症性疾病例如类风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维变性、糖尿病、癌转移、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿等的诊断剂,还可以作为器官移植后慢性排斥反应抑制、

全身性自身免疫性疾病・红斑狼疮・葡萄膜炎・贝切特病、多发性肌炎、肾小球增殖性肾炎・结节病等自身免疫性疾病的诊断剂使用。本发明的单克隆抗体可特异性识别 $\alpha 9$ 整联蛋白,因此可用于被检液中的 $\alpha 9$ 整联蛋白的定量、特别是利用夹层免疫测定法(サンドイッチ免疫测定法)、竞争法(競合法)、免疫法(イムノメトリック法)或ネフロメトリー法等进行的定量、免疫染色等中。将上述各种免疫学测定方法应用于本发明的测定方法时,无需设定特别的条件、操作等。可以在各方法的常规条件、操作方法基础上加入技术人员的通常的技术性考虑,构建测定系统。这些常规技术方法的详细内容可以参照综述、现有书籍(成書)等。

[0101] 如上所述,通过使用本发明的抗体,可以灵敏度良好地对 $\alpha 9$ 整联蛋白进行定量。并且,通过利用使用本发明的抗体在生物体内进行的 $\alpha 9$ 整联蛋白的定量方法,可以诊断与 $\alpha 9$ 整联蛋白相关的各种疾病。例如,检测出 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达量的增减时,可以诊断为与 $\alpha 9$ 整联蛋白相关的疾病、例如癌或炎症性疾病的可能性高或将来罹患该疾病的可能性高。本发明的单克隆抗体可用于特异性检测存在于体液或组织等被检物中的 $\alpha 9$ 整联蛋白。还可用于制备纯化 $\alpha 9$ 整联蛋白时使用的抗体柱、以及纯化时各组分中所含的 $\alpha 9$ 整联蛋白的检测、被检细胞内 $\alpha 9$ 整联蛋白的行为(挙動)的分析等。

[0102] 实施例

[0103] 以下给出实施例,进一步详细说明本发明,但这并不限定本发明的范围。

[0104] 实施例 1

[0105] [小鼠 $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ 整联蛋白 cDNA 的克隆]

[0106] $\alpha 4$ 整联蛋白基因是由小鼠 12.5 天的胚胎、 $\alpha 9$ 整联蛋白是由 B16-BL6 细胞(小鼠黑素瘤细胞)的总 RNA 中使用随机引物进行反转录,以所得 cDNA 为模板,通过 PCR 法进行克隆。克隆所使用的引物如下所示。

[0107] ma4Integin-5' :5' -CGTGGATCCGAGCGCATGGCTGCGGAAGCGAGGTGC-3' (SEQ IDNO : 3)

[0108] m $\alpha 4$ Integin-3' :5' -CAGCTCGAGTCAGTCATCATTGCTTTTGTGTTGAC-3' (SEQ IDNO :4)

[0109] m $\alpha 9$ Integin-5' :5' -GTCAAGCTTCTGGGGATGGGCGGCCCGCTGGGCTG-3' (SEQ IDNO :5)

[0110] m $\alpha 9$ Integin-3' :5' -CGGTCTAGACACGGTGGGTCACTGGTTTTTCTGGAC-3' (SEQ IDNO :6)

[0111] PCR 是制备组成:模板 cDNA $5 \mu\text{L}$ 、GC 缓冲液 $125 \mu\text{L}$ 、dNTPmix $5 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 引物 $11 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 引物 $21 \mu\text{L}$ 、DW $10.5 \mu\text{L}$ 、LA Taq(TaKaRa LA Taq(注册商标)) $0.5 \mu\text{L}$ 的反应体系,在 94°C 2 分钟 \rightarrow (94°C 30 秒 \rightarrow 68°C 3 分钟、30 个循环) \rightarrow 4°C 的反应条件下,通过热循环仪(GeneAmp(注册商标)PCR System2700(アプライドバイオシステムズ)进行反应。反应后,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳,为 $\alpha 4$ 整联蛋白时分离 3kb 附近的条带,为 $\alpha 9$ 整联蛋白时分离 3kb 附近的条带,然后从凝胶中切出,使用 QIA quick(注册商标)凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)(QIAGEN)纯化 PCR 扩增产物。

[0112] [人 $\alpha 9$ 、 $\alpha 4$ 整联蛋白 cDNA 的克隆]

[0113] $\alpha 4$ 整联蛋白基因是从人嗜中性粒细胞, $\alpha 9$ 整联蛋白是从人末梢单核细胞提取

总 RNA, 使用随机引物进行反转录, 将所得 cDNA 作为模板, 通过 PCR 法克隆的。克隆所使用的引物如下所示。

[0114] ha4Integin-5' :5' -ACGCTCGAGTGTACCATGTTCCCCACCGAGAGCGCA-3' (SEQ ID NO : 11)

[0115] h α 4Integin-3' :5' -TCATCTAGATTAATCATCATTGCTTTTACT-3' (SEQ ID NO :12)

[0116] h α 9Integin-5' :5' -TCGAAGCTTCTGGGGATGGGCGGCCCGGCT-3' (SEQ ID NO :13)

[0117] h α 9Integin-3' :5' -ACCTCTAGATCACTGGTTTTTCTGGACCCA-3' (SEQ ID NO :14)

[0118] 如上所述, 将通过 PCR 法扩增的 α 4 整联蛋白和 α 9 整联蛋白的 cDNA 分别整合到 pCRII-TOPO(注册商标) 载体 (Invitrogen) 中, 通过 ABI PRISM(注册商标) 310(アプライドバイオシステムズ) 确认各碱基序列。所得 cDNA 的碱基序列分别与 SEQ ID NO :7(小鼠 α 9) 和 SEQ ID NO :8(小鼠 α 4)、SEQ ID NO :9(人 α 9) 和 SEQ ID NO :10(人 α 4) 的碱基序列一致。为了将这些 cDNA 导入动物细胞, 整合到 pcDNATM3.1(+)(Invitrogen) 中。将所得的载体分别命名为小鼠 α 9 整联蛋白 /pcDNA3.1、小鼠 α 4 整联蛋白 /pcDNA3.1、人 α 9 整联蛋白 /pcDNA3.1、人 α 4 整联蛋白 /pcDNA3.1。

[0119] 实施例 2

[0120] [α 9 整联蛋白、α 4 整联蛋白恒定表达细胞株的构建]

[0121] 为了对仓鼠进行免疫, 向来自仓鼠卵巢的细胞株 CHO-K1 细胞中导入含有 α 4 整联蛋白 cDNA 的小鼠 α 4 整联蛋白 /pcDNA3.1、或者含有小鼠 α 9 整联蛋白 cDNA 的 α 9 整联蛋白 /pcDNA3.1, 通过利用与 OPN 的 SVVYGLR 肽的粘附效果的筛选, 构建恒定表达小鼠 α 9 整联蛋白的 CHO-K1 细胞(小鼠 α 9/CHO-K1 细胞)的三个克隆(6F1、12C3、4N2)、NIH3T3 细胞(小鼠 α 9/NIH3T3 细胞)的四个克隆(21H、7A3、11C3、21D3)。

[0122] 作为小鼠 α 9 整联蛋白的对照, 将同属整联蛋白亚家族的 α 4 整联蛋白从小鼠 12.5 天的胚胎克隆, 构建恒定表达小鼠 α 4 整联蛋白的 NIH3T3 细胞(小鼠 α 4/NIH3T3 细胞)的三个克隆(3G1、4A10、19F2)。

[0123] 为了对构建的小鼠 α 9 整联蛋白表达细胞的 α 9 整联蛋白表达量进行定量分析, 使用由 α 9/NIH3T3 细胞、α 9/CHO-K1 细胞提取的 cDNA 进行实时 PCR。结果, 如图 1A 和图 1B 所示, 在 α 9/NIH3T3 细胞中 21D3、在 α 9/CHO-K1 细胞中 12C3 显示最高的 α 9 整联蛋白表达。另外, 通过 FACS, 对 α 4/NIH3T3 细胞进行蛋白质表达量分析, 结果如图 1C 所示。在 4A10 中可见最高的小鼠 α 4 整联蛋白表达升高。

[0124] 按照同样的方法, 构建恒定表达人 α 9 整联蛋白的 CHO-K1 细胞(人 α 9/CHO-K1 细胞)的一个克隆(20J1)、恒定表达人 α 4 整联蛋白的 CHO-K1 细胞(人 α 4/CHO-K1 细胞)的一个克隆(9A5)。

[0125] 实施例 3

[0126] [使用抗 α 9 整联蛋白抗体进行的 FACS 分析]

[0127] 使用小鼠 α 9/CHO-K1 细胞本身作为抗原, 对 3 只金黄仓鼠(7-8 周龄、雌性)以 1×10^7 细胞 / 次 / 只共免疫 5 次。取出脾细胞, 通过 PEG 法与小鼠骨髓瘤细胞 X63-Ag8-653 进行细胞融合, 在 HAT 培养基上进行选择。单克隆抗体的产生通过细胞 ELISA 法进行筛选。将在免疫中使用的细胞用于筛选, 预想其背景增高或假阳性变多, 因此将与小鼠 α 9/NIH3T3 细胞反应且与小鼠 α 4/NIH3T3 细胞不反应的克隆作为抗 α 9 整联蛋白抗体。通过

将有限稀释法重复 2 次,构建单克隆抗体。结果,构建了产生抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的杂交瘤细胞的四个克隆 (11L2B、12C4' 58、18R18D、55A2C)。

[0128] 人 $\alpha 9$ 整联蛋白的抗体的制备是参考消减免疫 (subtractive immunization) 法 (Williams CV, Stechmann CL, Mcloon SC. Biotechniques. (1992) 12 :842-7.), 对 3 只 BALB/c 小鼠进行免疫。首先,以 4×10^6 细胞 / 只腹腔内施与 CHO-K1 细胞,第二天和第三天以 4mg / 只腹腔内施与环磷酰胺。施与环磷酰胺两周后,以 2×10^6 细胞 / 只腹腔内施与人 $\alpha 9$ / CHO-K1 细胞,再过两周后,以 3×10^6 细胞 / 只腹腔内施与人 $\alpha 9$ / CHO-K1 细胞。以与人 $\alpha 9$ / CHO-K1 细胞反应、且不与小鼠 $\alpha 4$ / CHO-K1 细胞反应的克隆作为抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。结果,构建了产生抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的杂交瘤细胞的四个克隆 (1K11、21C5、24I11、25B6)。

[0129] 这里所得的产生抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的杂交瘤细胞 11L2B 于 2004 年 12 月 28 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (邮政编码 305-8566)、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心,保藏编号为 FERM BP-10197。

[0130] 这里所得的杂交瘤细胞 12C4' 58 于 2004 年 12 月 28 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (邮政编码 305-8566)、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心,保藏编号为 FERM BP-10196。

[0131] 这里所得的杂交瘤细胞 18R18D 于 2004 年 12 月 28 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (邮政编码 305-8566)、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心,保藏编号为 FERM BP-10195。

[0132] 这里所得的杂交瘤细胞 55A2C 于 2004 年 12 月 28 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (邮政编码 305-8566)、独立行政法人产业技术综合研究所特许生物寄托中心,保藏编号为 FERM BP-10198。

[0133] 抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体是否可用于 FACS,这使用小鼠 $\alpha 9$ / NIH3T3 细胞、小鼠 $\alpha 4$ / NIH3T3 细胞进行了研究。均以细胞数为 1.0×10^5 个进行,与抗体的反应在冰上进行。另外,为了阻断与 Fc 受体的非特异性反应,在添加抗 Fc γ RII 抗体 (2.4G2) 后添加第一抗体。向经 2.4G2 处理的 $\alpha 9$ / NIH3T3 细胞、 $\alpha 4$ / NIH3T3 细胞或表达内源性 $\alpha 9$ 整联蛋白的小鼠黑素瘤细胞株 B16-BL6 细胞中添加 $50 \mu\text{L}$ 制备的抗体 ($5 \mu\text{g/ml}$) 作为第一抗体,反应 30 分钟。接着添加 $50 \mu\text{L}$ 经 FITC 标记的抗仓鼠 IgG 抗体,反应 30 分钟,然后过尼龙网 (nylon mesh) 后,用 FACSCalibur™ (ベクトンアンドドイツキンソン) 进行 FACS 分析。使用生物素化抗体时,为了封闭 Fc 受体向进行了 2.4G2 处理的细胞中添加 $50 \mu\text{L}$ 生物素化抗体 ($5 \mu\text{g/ml}$), 反应 30 分钟,然后添加 $50 \mu\text{L}$ 经 APC 标记或 FITC 标记的链霉亲和素 (ストレプトアビジン), 进行 FACS 分析。

[0134] [0134] 结果如图 2 所示,用所有的抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均可检测出小鼠 $\alpha 9$ / NIH3T3 细胞和 B16-BL6 细胞上的 $\alpha 9$ 整联蛋白。另外,所有的抗体均不与小鼠 $\alpha 4$ / NIH3T3 细胞反应。由上述结果可知,所有的抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均可通过 FACS 检测出在细胞上表达的小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白蛋白质。

[0135] 实施例 4

[0136] [细胞染色的研究]

[0137] 为了进行免疫组织化学,由小鼠摘除各种生物体组织,用 O. C. T. 复合物 (O. C. T. compound) (テイシユ—テツク) 包埋,用液氮冷冻后,然后用冷切片刀 (コールド

トーム)(サクラ)切成 $5\mu\text{m}$ 厚。将切薄的组织风干一昼夜,然后用 -20°C 的丙酮固定,用正常山羊血清进行非特异性反应的阻断。接着,以抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体克隆12C4'58分别作为第一抗体,以 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度在室温下反应1小时,添加用PBS稀释500倍的生物素化山羊抗金黄仓鼠IgG抗体(ジヤクソン)作为第二抗体,在室温下反应30分钟。使用vector stain ABC kit(ベクターラボトリー),在室温下反应30分钟,然后在室温下用DAB+底物试剂盒(DAB+基質キット)(ダコ)反应1-5分钟左右,进行检测。组织在其后通过苏木精(和光)进行核染色,用盖玻片和包埋剂封固。小鼠脑、肝脏、肺、肌肉的染色图像如图3所示。如染色图像一览(图4)所示,在脑的脉络丛、肺的血管内皮·平滑肌·肺泡巨噬细胞、肝脏的窦状隙细胞(類洞細胞)、肾脏的血管内皮·平滑肌·肾小球、胃的平滑肌·粘膜肌层(粘膜筋板)、肌肉的血管内皮·肌成纤维细胞·淋巴管以及子宫血管内皮·平滑肌·动脉平滑肌等细胞中可见 $\alpha 9$ 整联蛋白表达。由本结果可知,本发明所发现的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可应用于免疫染色,有望作为诊断药使用。

[0138] 实施例5

[0139] [细胞粘附抑制效果的研究]

[0140] 为了调查所构建的四种抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体是否具有细胞粘附抑制活性,使用GRGDS、腱生蛋白C、SVVYGLR肽和小鼠 $\alpha 9/\text{NIH3T3}$ 细胞进行细胞粘附抑制实验。GRGDS肽中所含的RGD序列是在很多ECM中共同存在的细胞粘附部位。腱生蛋白C的细胞粘附部位AEIDGIEL肽可以与 $\alpha 9$ 整联蛋白粘附,但是不能与 $\alpha 4$ 整联蛋白粘附。人OPN的SVVYGLR肽可以与 $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 整联蛋白粘附。研究各抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体在这三种肽固相与小鼠 $\alpha 9/\text{NIH3T3}$ 细胞的细胞粘附中的抑制粘附的能力。

[0141] 将OPN细胞粘附区SVVYGLR序列(SEQ ID NO:15)、GRGDS序列(SEQ ID NO:16)、腱生蛋白C的AEIDGIEL序列(SEQ ID NO:17)固定($10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50\mu\text{L}/\text{孔}$),在用封闭液(0.5%BSA/PBS)封闭的ELISA板中添加在DMEM/0.25%BSA培养基中预先与抗体反应的 $\alpha 9/\text{NIH3T3}$ 细胞(1.0×10^5 个/ ml)。在 37°C 培养1小时,用PBS洗涤未粘附细胞,粘附细胞用0.5%结晶紫/20%甲醇固定并染色,在室温下放置30分钟,添加20%乙酸溶液进行转溶解,粘附活性通过测定波长590nm的OD来定量。

[0142] 其结果如图5所示,对于GRGDS肽的固相, $\alpha 9$ 整联蛋白的粘附是RGD非依赖性的,因此所有的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均未能抑制。将腱生蛋白C功能部位AEIDGIEL肽和OPN功能部位SVVYGLR肽固定在固相时,在11L2B、12C4'58、55A2C三种中可见显著的细胞粘附抑制。18R18D几乎不显示抑制能力。

[0143] 下面,对在图5中见到抑制效果的11L2B、12C4'58、55A2C这三种的抑制效果进行比较。以 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 将AEIDGIEL肽和SVVYGLR肽的固相进行固定,通过细胞粘附抑制实验对抑制抗体的浓度进行比较研究。如图6所示,55A2C的抑制能力最高。50%抑制浓度(IC50)也示于图6。

[0144] 实施例6

[0145] [通过竞争抑制实验进行表位分析]

[0146] 通过实施例5的细胞粘附抑制实验,可以得到各抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的抑制活性有差异的结论。这显示,这些抗体识别 $\alpha 9$ 整联蛋白上各不相同的表位。因此,进行抗体的生物素化,通过竞争抑制实验进行表位分析。作为生物素化抗体,使用12C4'58和18R18D,

研究该两个克隆与全部克隆的表位的差异。如图 7 所示,两种抗体在利用同一克隆的竞争中,生物素化抗体的结合完全受到抑制。使用生物素化 18R18D 时,所有克隆都不能抑制。而对于 12C4' 58,被 55A2C 部分抑制,这显示 12C4' 58 和 55A2C 中部分表位重叠。

[0147] 实施例 7

[0148] [培养细胞株中 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达分析]

[0149] 为了研究培养细胞上 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达,采用小鼠黑素瘤培养细胞 B16-F1 和 B16-F10、B16-BL6 进行 FACS 分析。结果如图 8 所示,在 B16-F1、B16-F10、B16-BL6 全部细胞中均可以确认 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达。

[0150] 另外,在人外周血单核细胞中可见低水平的表达,因此对小鼠骨髓单核细胞性白血病细胞 WEHI-3B 细胞和类巨噬细胞 (マクロファージ様細胞) RAW264.7 细胞进行 FACS 分析。如图 9 所示,在 WEHI-3B 细胞中未检测出表达,但在 RAW264.7 细胞中可见强表达。

[0151] 实施例 8

[0152] [嗜中性粒细胞中的 $\alpha 9$ 整联蛋白表达分析]

[0153] 已有报告指出 $\alpha 9$ 整联蛋白在人嗜中性粒细胞中高表达。因此,为了分析小鼠嗜中性粒细胞中的 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达,回收巯基乙酸 (チオグチコレート) 诱导腹腔细胞,将其用于小鼠嗜中性粒细胞的表达分析。以 Mac-1⁺Gr-1⁺ 细胞作为嗜中性粒细胞,对该细胞群的 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达进行 FACS 分析。如图 10 所示,在 C57BL/6、BALB/c、CBA、C3H 整个系统的小鼠中均未见到 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达。由该结果可知,在小鼠嗜中性粒细胞上通常 $\alpha 9$ 整联蛋白不表达。

[0154] 实施例 9

[0155] [$\alpha 4$ 整联蛋白和 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达方式的分析]

[0156] $\alpha 4$ 整联蛋白和 $\alpha 9$ 整联蛋白同属于整联蛋白亚家族,共有很多配体,因此表明发挥类似的功能。另外,通过 mRNA 水平分析,已有报告指出:存在于小鼠肝内白细胞中的 NKT 细胞同时表达 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 整联蛋白 (Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onoe K, Denhardt D, Rittling S, T. U. 2004. Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity* 21:539-50)。因此,为了确认 $\alpha 4$ 整联蛋白和 $\alpha 9$ 整联蛋白是否实际在同一细胞上表达,分离小鼠肝浸润白细胞,通过两种整联蛋白抗体进行双重染色。结果如图 11 所示, $\alpha 4$ 整联蛋白在全部肝内白细胞的约 39% 左右中表达, $\alpha 9$ 整联蛋白在全部肝浸润白细胞的约 12% 左右中表达。 $\alpha 4$ 整联蛋白表达细胞的约 74% 表达 $\alpha 9$ 整联蛋白。

[0157] 实施例 10

[0158] [OPN 与 B16-BL6 细胞的粘附方式的研究]

[0159] 以 B16-BL6 细胞为代表,很多细胞都可同时表达 $\alpha 4$ 整联蛋白和 $\alpha 9$ 整联蛋白。另外, $\alpha 4$ 整联蛋白和 $\alpha 9$ 整联蛋白共同具有 OPN 或 VCAM-1 等配体,因此可以预想,如果只是目前正在临床应用的抑制 $\alpha 4$ 整联蛋白功能,该功能可被 $\alpha 9$ 整联蛋白补偿。因此,研究并用抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对抑制 SVVYGLR 肽与 B16-BL6 细胞的粘附效果方面的协同效果。

[0160] 具体地, $\alpha 4$ 、 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对 B16-BL6 细胞的粘附抑制效果通过 SVVYGLR 序

列固相 (5 μ g/ml) 的细胞粘附试验进行研究。粘附时,向培养基中添加 1mM $MnCl_2$ 进行反应。抗体使用抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体 (克隆 R1-2) (Pharmingen) 和抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (克隆 11L2B) 进行。作为抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体的对照抗体,使用正常大鼠抗体 (NRG),作为抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的对照抗体,使用正常仓鼠抗体 (NHG)。抑制活性使用 50 μ g/ml 抗体、两种并用时分别使用 25 μ g/ml 抗体进行研究。

[0161] 结果如图 12 所示,抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体分别单独使用时,几乎未发现抑制效果。而将抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体并用时发现了抑制效果。该结果显示: $\alpha 4$ 整联蛋白、 $\alpha 9$ 整联蛋白单独即对 SVVYGLR 序列具有几乎完全的细胞粘附能力。表明在生物体内,表达 $\alpha 4$ 和 $\alpha 9$ 两种整联蛋白的细胞 (嗜中性粒细胞或 NKT 细胞等) 与疾病发病相关,并且,考虑到这两种整联蛋白共同具有很多配体,可推测通过将抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体并用,可以更有效地获得疾病治疗效果,有成为新的治疗方法的可能性。

[0162] 实施例 11

[0163] [抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体对肝炎的治疗效果]

[0164] 目前我们已知通过抑制 OPN 功能可以治疗肝炎 (专利文献 1)。因此,使用抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体克隆 11L2B 和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体 R1-2 (Pharmingen) 进行治疗实验。肝炎是静脉内施与 200 μ g 伴刀豆球蛋白 A (ConA) (Vector 公司),使用 GPT/ALT-PIII 和 GOT/AST-PIII (富士フィルム) 测定 12 小时后血液中的 AST 值、ALT 值。抗体是在施与 ConA 3 小时前静脉内施与 200 μ g。如图 13 所示,通过抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可见 AST 值、ALT 值的减少,发现其具有治疗效果。并且,该治疗效果通过并用抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体而得到促进。可知通过抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可以治疗肝炎。

[0165] 实施例 12

[0166] [使用腱成纤维细胞的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体导致的 MMP-13 变化]

[0167] 从小鼠膝腱回收腱成纤维细胞,通过 FACS 和细胞染色研究 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达。抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体使用克隆 18R18D、抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体使用 R1-2。如图 14 所示,可知在腱成纤维细胞中表达 $\alpha 9$ 整联蛋白。 $\alpha 4$ 整联蛋白未表达。

[0168] 将重组全长型 OPN 和凝血酶切断型 OPN (分别为 10 μ g/ml) 固定于固相,将腱成纤维细胞培养 48 小时,使用实时 PCR 对 MMP-13mRNA 进行定量。可知用凝血酶切断型 OPN 刺激腱成纤维细胞时,MMP-13 的转录得到促进 (图 15)。接着,将抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 55A2C 添加到培养液中,使其达到 30 μ g/ml,研究 MMP-13mRNA 量的变化。如图 16 所示,抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 (克隆 55A2C) 抑制了 MMP-13 转录量。使用仓鼠 IgG 作为对照抗体。

[0169] MMP-13 也被称为胶原酶,对于小鼠中的胶原酶,MMP-13 是代表性的 MMP,而对于人,为 MMP-1、MMP-8 和 MMP-13。MMP-13 显示与关节炎 (特别是类风湿性关节炎 (RA)、变形性关节炎 (OA)) 的恶化强烈相关 (Skotnicki JS, DiGrandi MJ, Levin JI. Design strategies for the identification of MMP-13 and Tace inhibitors. Curr Opin Drug Discov Devel. (2003) 6:742-59. Review.)。由上述抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可抑制 MMP-13 的转录的认识,强烈表明通过使用抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体,可以治疗关节炎。

[0170] 实施例 13

[0171] [癌细胞株增殖中抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的功能]

[0172] 如图 2 所示, B16-BL6 强烈表达 $\alpha 9$ 整联蛋白。还有报告指出 MMP-13 与癌的恶化相关 (Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. Biochimie. (2005) 87 :273-86. Review.)。因此, 对构建的四种抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制癌细胞的细胞增殖的活性进行了研究。用 10% FCS/DMEM 将 B16-BL6 细胞调制成 5×10^4 细胞 /ml, 以 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体、抗小鼠 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体, 然后将细胞-抗体悬浮液分别添加到细胞培养用 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。在 37°C 、5% CO_2 存在下培养 24 小时, 向各孔中分别添加 $10 \mu\text{L}$ 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit8) (同仁化学研究所), 再在 37°C 、5% CO_2 存在下培养 1 小时, 测定 O. D. 450 的吸光度, 定量分析细胞数。如图 17 所示, 12C4'58 的抑制活性最高, 抑制 35% 左右的 B16-BL6 细胞的增殖。55A2C 和 R1-2 可抑制 20% 左右增殖。

[0173] 接着, 为了对更接近于生物体条件下的细胞增殖抑制效果进行分析, 将 VCAM-1 固定于固相, 进行同样的研究。VCAM-1 是 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体, 使用 VCAM-1 的可溶重组蛋白—rhVCAM-1-Fc chimera (ロシユ)。以 $10 \mu\text{g/ml}$ 将 rhVCAM-1-Fc chimera 固定于固相使用, 用 0.5% BSA/PBS 阻断非特异性反应。抗体单独使用时以 $10 \mu\text{g/ml}$ 添加, 并用时分别以 $5 \mu\text{g/ml}$ 的浓度添加。然后按照与图 17 相同的方法进行。结果如图 18 所示, 单独施与 12C4'58 抗体以及单独施与作为 $\alpha 4$ 抑制抗体的克隆 R1-2 时, 完全得不到效果, 或者只得到微弱的效果, 而将 12C4'58 和 R1-2 同时施与时, 显示约 20% 左右的明显的细胞增殖抑制效果。

[0174] 实施例 14

[0175] [抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的功能分析]

[0176] 使用人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞、CHO-K1 细胞、内源性表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的人嗜中性粒细胞研究抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体是否可用于 FACS。对于人嗜中性粒细胞, FACS 方法按照与图 2 同样的方法进行, 与 Fc 受体非特异性反应的阻断使用 50% 山羊血清进行。第二抗体使用经 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体。结果如图 19 所示, 所有的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均可以检测出人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞和人嗜中性粒细胞上的 $\alpha 9$ 整联蛋白。并且所有的抗体均不与人 $\alpha 4$ /CHO-K1 细胞反应。由这些结果可知, 所有的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体均可以通过 FACS 检测出在细胞上表达的人 $\alpha 9$ 整联蛋白蛋白质。

[0177] 实施例 15

[0178] 使用作为 $\alpha 9$ 整联蛋白的配体的 OPN 和腱生蛋白 -C 功能肽进行细胞粘附实验。细胞使用人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞, 对各种抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体的抑制能力进行研究。将肽以 $5 \mu\text{g/ml}$ 固定于固相, 用 $5 \mu\text{g/ml}$ 抗体进行抑制。如图 20 所示, 在抑制对于 OPN 的粘附实验中, 克隆 21C5 显示了最有效的抑制活性。1K11、24I11 的抑制效果低。而关于抑制对于腱生蛋白 -C 粘附的能力, Y9A2 显示最有效的抑制活性。而本次制备的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体四个克隆对腱生蛋白 -C 未怎么显示抑制活性。

[0179] 已经报道了人 $\alpha 9$ 整联蛋白的中和抗体 Y9A2, Chemicon 公司将其制成产品, Y9A2 是采用通常的免疫法 (腹腔内施与), 由导入人 $\alpha 9$ 整联蛋白基因的小鼠成纤维细胞株 L 细胞 (L cell) 制备的。本发明的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体通过消减免疫法制备, 免疫方法不同。并且如图 19 所示, 克隆 21C5 的人 $\alpha 9$ /CHO-K1 细胞的 FACS 图的检测图谱不同, 另外如图 20 所示, 细胞粘附试验的抑制效果样式也不同, 因此本次制备的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体四个克隆与 Y9A2 的表位不同。

[0180] 总结

[0181] 为了制备抑制小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白功能的抗体、以及了解疾病、病态中 $\alpha 9$ 整联蛋白的功能,制备了四种小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白的单克隆抗体和四种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体。使用这些抗体进行的研究中了解到以下内容。

[0182] (1) 所制备的四种抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体全部可以用于 FACS 分析,具有分别不同的抑制细胞粘附的能力。

[0183] (2) 抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体克隆 12C4' 58 可用于免疫染色。

[0184] (3) 在类巨噬细胞 RAW264.7 细胞、黑素瘤细胞 B16-F1、B16-F10、B16-BL6 细胞中表达 $\alpha 9$ 整联蛋白。在小鼠嗜中性粒细胞中未观察到 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达,但在人中可见其表达,这显示嗜中性粒细胞上的 $\alpha 9$ 整联蛋白的表达存在种间差异。脾细胞的 B220⁻CD3⁻ 细胞群、B220⁺CD3⁺ 细胞群中存在一部分表达 $\alpha 9$ 整联蛋白的细胞群。另外,肝脏浸润白细胞的 $\alpha 9$ 整联蛋白表达在 $\alpha 4$ 整联蛋白表达细胞上多见。

[0185] (4) 同时存在 $\alpha 9$ 和 $\alpha 4$ 整联蛋白、并且存在识别两者的配体时,其粘附能力是互补的。

[0186] (5) 发现抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体具有肝炎治疗效果,其效果因抗小鼠 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体而亢进。

[0187] (6) 可知在腱成纤维细胞上表达 $\alpha 9$ 整联蛋白,如用凝血酶切断型 OPN 刺激腱成纤维细胞,则 MMP-13 的表达亢进。可知该 MMP-13 亢进被抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体抑制。

[0188] (7) 可知抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体可抑制 B16-BL6 细胞的增殖。另外,由于 VCAM-1 刺激导致的细胞增殖通过同时并用施与抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体,与单独施与相比,增殖抑制效果亢进。

[0189] (8) 制备的四种抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体全部可用于 FACS 分析,分别具有不同的抑制细胞粘附的能力。另外,通过 FACS、粘附抑制实验,显示与现有的抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体 Y9A2 不同的反应性,因此可认为其表位不同。

[0190] 产业实用性

[0191] 本发明的单克隆抗体通过抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白功能,对癌例如癌细胞的增殖、转移,炎症性疾病例如类风湿性关节炎、变形性关节炎,肝炎、支气管哮喘、纤维变性、糖尿病、癌转移、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿、炎症性肠疾病(溃疡性结肠炎、克罗恩病)、自身免疫性疾病等发挥治疗效果。另外,含有本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体和抗 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体两者的药物组合物可发挥更为改善的癌、炎症性疾病的治疗效果。本发明的单克隆抗体也识别小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白,因此也可以利用于使用小鼠的动物实验中。

序列表

<110>Gene Techno Science Co.,Ltd

<120> 抗 $\alpha 9$ 整联蛋白单克隆抗体

<130>PCT05-0103

<150>2005-6348

<151>2005-01-13

<160>17

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>1035

<212>PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400>1

```

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

```

Arg Trp Lys Asn Ile Tyr Tyr Glu Ala Asp His Ile Leu Pro His Gly
 145 150 155 160
 Phe Cys Tyr Ile Ile Pro Ser Asn Leu Gln Ala Lys Gly Arg Thr Leu
 165 170 175
 Ile Pro Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Lys Lys Tyr Gly Glu Glu His Gly
 180 185 190
 Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ala Gly Phe Phe Thr Glu Glu Leu Val Val
 195 200 205
 Met Gly Ala Pro Gly Ser Phe Tyr Trp Ala Gly Thr Ile Lys Val Leu
 210 215 220
 Asn Leu Thr Asp Asn Thr Tyr Leu Lys Leu Asn Asp Glu Val Ile Met
 225 230 235 240
 Asn Arg Arg Tyr Thr Tyr Leu Gly Tyr Ala Val Thr Ala Gly His Phe
 245 250 255
 Ser His Pro Ser Thr Ile Asp Val Val Gly Gly Ala Pro Gln Asp Lys
 260 265 270
 Gly Ile Gly Lys Val Tyr Ile Phe Arg Ala Asp Arg Arg Ser Gly Thr
 275 280 285
 Leu Ile Lys Ile Phe Gln Ala Ser Gly Lys Lys Met Gly Ser Tyr Phe
 290 295 300
 Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Gly Asp Gly Leu Ser Asp
 305 310 315 320
 Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp Glu Gly Gln
 325 330 335
 Val Thr Val Tyr Ile Asn Arg Gly Asn Gly Ala Leu Glu Glu Gln Leu
 340 345 350
 Ala Leu Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Asn Ala His Phe Gly Glu Ser Ile
 355 360 365
 Ala Ser Leu Asp Asp Leu Asp Asn Asp Gly Phe Pro Asp Val Ala Ile
 370 375 380
 Gly Ala Pro Lys Glu Asp Asp Phe Ala Gly Ala Val Tyr Ile Tyr His
 385 390 395 400
 Gly Asp Ala Gly Gly Ile Val Pro Gln Tyr Ser Met Lys Leu Ser Gly
 405 410 415
 Gln Lys Ile Asn Pro Val Leu Arg Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser Gly
 420 425 430
 Gly Ile Asp Met Asp Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Val Thr Val Gly Ala
 435 440 445
 Phe Met Ser Asp Ser Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr

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

<210>2

<211>1036

<212>PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400>2

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

290	295	300
Phe Gly Ser Ser Leu Cys Ala Val Asp Leu Asn Met Asp Gly Leu Ser		
305	310	315
Asp Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Phe Ser Glu Ile Arg Asp Glu Gly		
325	330	335
Gln Val Thr Val Tyr Leu Asn Gln Gly His Gly Ala Leu Glu Glu Gln		
340	345	350
Leu Thr Leu Thr Gly Asp Ala Ala Tyr Asn Ala His Phe Gly Glu Ser		
355	360	365
Ile Ala Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asp Asp Gly Phe Pro Asp Val Ala		
370	375	380
Val Gly Ala Pro Lys Glu Glu Asp Phe Ala Gly Ala Val Tyr Ile Tyr		
385	390	395
His Gly Asp Ala Asn Gly Ile Val Pro Lys Tyr Ser Met Lys Leu Ser		
405	410	415
Gly Arg Arg Leu Asn Pro Thr Leu Arg Met Phe Gly Gln Ser Ile Ser		
420	425	430
Gly Gly Ile Asp Met Asp Gly Asn Gly Tyr Pro Asp Val Thr Ile Gly		
435	440	445
Ala Phe Leu Ser Asp Ser Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro Val Ile		
450	455	460
Thr Val Asp Val Ser Ile Phe Leu Pro Gly Ser Ile Asn Ile Thr Ala		
465	470	475
Pro Gln Cys His Asp Gly Gln Gln Pro Val Asn Cys Leu Asn Val Thr		
485	490	495
Val Cys Phe Arg Phe His Gly Lys Asn Val Pro Gly Glu Ile Gly Leu		
500	505	510
Asn Tyr Asn Leu Thr Ala Asp Val Ala Gln Lys Glu Lys Gly Gln Leu		
515	520	525
Pro Arg Val Tyr Phe Val Leu Phe Gly Glu Thr Ala Gly Gln Val Ser		
530	535	540
Glu Arg Leu Gln Leu Ser His Met Asp Glu Val Cys His His Tyr Val		
545	550	555
Ala His Val Lys Arg Arg Val Gln Asp Val Ile Ser Pro Ile Val Phe		
565	570	575
Glu Ala Ala Tyr Ser Leu Asp Glu His Val Met Gly Glu Glu Asp Arg		
580	585	590
Glu Leu Pro Asp Leu Thr Pro Val Leu Arg Trp Lys Lys Gly Gln Arg		
595	600	605

Ile Ser Gln Lys Asn Gln Thr Val Phe Glu Arg Asn Cys Gln Ser Glu
 610 615 620
 Asp Cys Ala Ala Asp Leu Gln Leu Arg Gly Lys Leu Leu Leu Ser Ser
 625 630 635 640
 Val Asp Glu Lys Thr Pro His Leu Ala Leu Gly Ala Val Lys Asn Ile
 645 650 655
 Ser Leu Asn Ile Ser Ile Ser Asn Leu Gly Asp Asp Ala Tyr Asp Ala
 660 665 670
 Asn Val Ser Phe Asn Val Ser Arg Glu Leu Phe Phe Ile Asn Met Trp
 675 680 685
 Gln Lys Glu Glu Met Gly Ile Ser Cys Glu Leu Leu Glu Ser Asp Phe
 690 695 700
 Leu Lys Cys Ser Val Gly Phe Pro Phe Met Arg Ser Lys Ser Lys Tyr
 705 710 715 720
 Glu Phe Ser Val Ile Phe Asp Thr Ser His Leu Ser Gly Glu Glu Glu
 725 730 735
 Ile Leu Ser Phe Ile Val Thr Ala Gln Ser Gly Asn Leu Glu Arg Ser
 740 745 750
 Glu Ala Leu His Asp Asn Thr Leu Thr Leu Thr Val Pro Leu Val His
 755 760 765
 Glu Val Asp Thr Ser Ile Thr Gly Ile Val Ser Pro Thr Ser Phe Val
 770 775 780
 Tyr Gly Glu Ser Val Asp Ala Ser Asn Phe Ile Gln Leu Asp Asp Gln
 785 790 795 800
 Glu Cys His Phe Gln Pro Val Asn Ile Thr Leu Gln Val Tyr Asn Met
 805 810 815
 Gly Pro Ser Thr Leu Pro Gly Ser Ser Val Ser Ile Ser Phe Pro Ser
 820 825 830
 Arg Leu Ser Pro Gly Gly Ala Glu Met Phe Gln Val Gln Asp Met Val
 835 840 845
 Val Ser Gln Glu Lys Gly Asn Cys Ser Leu Gln Arg Asn Pro Thr Pro
 850 855 860
 Cys Ile Ile Pro Gln Glu Gln Glu Asn Ile Phe His Thr Ile Phe Ala
 865 870 875 880
 Phe Phe Ser Lys Ser Gly Arg Lys Val Leu Asp Cys Glu Lys Pro Gly
 885 890 895
 Ser Phe Cys Leu Thr Leu His Cys Asn Leu Ser Ala Leu Pro Lys Glu
 900 905 910
 Glu Ser Arg Thr Ile Asn Leu Tyr Met Leu Leu Asn Thr Glu Ile Leu

915	920	925
Lys Lys Asp Ser Ser Ser Val Ile Gln Phe Met Ala Arg Ala Lys Val		
930	935	940
Lys Val Glu Pro Ala Leu Arg Val Val Glu Ile Ala Asn Gly Asn Pro		
945	950	955
Glu Glu Thr Leu Val Val Phe Glu Ala Leu His Asn Leu Glu Pro Arg		
965	970	975
Gly Trp Ile Ile Ala Ile Ser Leu Leu Val Gly Ile		Gly Tyr Val Val
980	985	990
Leu Ala Val Leu Leu Trp Lys Met Gly Phe Phe		Leu Ile Phe Leu Leu
995	1000	1005
Lys Glu Ile Ile Glu Ala Glu Lys Asn Arg Lys		Arg Arg Arg Tyr
1020		1015
Glu Asn Glu Asp Gly Trp Asp Trp Val Gln Lys Asn Gln		
1025	1030	1035

<210>3

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的 (Artificial)

<220>

<223> 引物 (Primer)

<400>3

cgtggatccg agcgcgatggc tgcggaagcg aggtgc

36

<210>4

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>4

cagctcgagt cagtcacat tgcttttgct gttgac

36

<210>5

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>5

gtcaagcttc tgggatggg cggcccggct gggctg 36

<210>6

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>6

cggtctagac acggtgggtc actggttttt ctggac 36

<210>7

<211>4941

<212>DNA

<213> 小鼠

<400>7

cgggcccggg accgctcctt ccgagagcgc agacctctcg gcgggcatcg agaggacgcg 60
 gggcgctggc ggccgtccct ggccttgctc cggctctcga ctgtagccca tcgccgcgtc 120
 ccgggcttag actcgtgagc gtacggctcc cgccccgggc agcggcgtgt cccgggagcc 180
 ccgatctgcg gggcagggcg cagggcggct ggccggctgg ggatgggcgg cccggctgcg 240
 gcgcggaccg gcgccggagg gctccgcgcg ctgctgctgg cgctgggtggc cgcgggggtc 300
 ccggccggcg cctacaacct ggacgcgcag cgcccggtac gcttccaggg cccctcagge 360
 tcctttcttg gctacgcggt gctggagcac ttccacgaca acacgcgctg ggtcctcgtg 420
 ggtgcaccga aggcagattc taaatatagc acttcagtaa agtctcctgg agctgtgttt 480
 aagtgtcgtg tccataccaa ccctgaccgg agatgcaccg agctggacat ggctcgaggg 540
 aggactcgtg gtgcgccctg tgggaagacc tgcaggggag accgggatga cgagtggatg 600
 ggggtgagcc tggcccggca gccagagca gatggccgtg ttttggcctg tgcccatcgt 660
 tggaaaaaca tctactacga agcagaccac atcctgcccc atggattctg ctacctcate 720
 ctttccaacc tccaggccaa aggcaaggtg ctgattccct gctacgaaga gtataagaag 780
 aagtatgggg aagaacatgg ctctgcccag gccggaatag caggcttctt cacagaggaa 840

ctggtggtca tgggtgcccc aggctcgttt tattgggctg ggacactcaa ggtgctgaac 900
 ctcacggaca acacatattt taagttgaac gatgaagcga ttatgaacag acggtatact 960
 tatctgggct atgcagtgac ggctggccac ttctctcadc catccatcac tgatgtggta 1020
 gggggtgccc cacaggatga aggcatggga aaggtttata tatttagagc tgaccgaaga 1080
 tcagggacct taataaagat ctttcaggca tcaggaaaaa agatgggctc ttacttcggc 1140
 tcctccttgt gtgcagtcga cctgaacatg gacggcctct ctgacttgct cgtgggggct 1200
 cccatgtttt ctgagatcag agatgagggg caggtcaccg tctacctcaa ccaaggacat 1260
 ggagccctcg aggaacagct gaccctgact ggagatgccg cctacaacgc gcactttggg 1320
 gagagcatcg ccaacctggg cgacattgat gatgacgggt tcccagatgt ggctgtcggg 1380
 gcacctaaagg aggaggactt tgctggcgca gtctacatct atcatggtga tgccaatggg 1440
 attgtcccca agtactcaat gaagctgtct gggaggaggc taaacccgac cctgcggatg 1500
 tttgggcagt ccatatcagg gggcattgat atggatggaa atggctatcc tgatgtcacc 1560
 atcggagcct tcctgtccga cagcgtgggt ctctcaggg ccagaccggt catcacgggtg 1620
 gatgtctcca tcttctgcc aggctccatc aacatcacag cacctcagtg tcacgatgga 1680
 caacagcctg tgaactgcct gaatgtcacc gtgtgcttcc ggttccatgg caagaatgta 1740
 ccaggagaaa tgggtctgaa ctacaatctg acggctgatg tggcacagaa ggagaagggc 1800
 cagctgcccc gagtctattt tgtgttgttt ggagagacgg cagggcaggt ctcagaaagg 1860
 ctgcagctgt cccacatgga cgaagtgtgt catcactacg tggcccacgt caagcggaga 1920
 gtccaggatg tcatcagccc catttgtttt gaagccgcct acagcctgga tgagcatgtg 1980
 atgggtgagg aagaccggga gctgccagac ctgacaccag tgcttcgctg gaagaagggg 2040
 caaaggatct cccagaagaa tcagacagtt ttgaaagga attgccaatc tgaggactgt 2100
 gctgccgacc tgcagcttcg ggggaaactc ctgctttcca gtgttgacga gaaaacccca 2160
 cacctggctt tgggggctgt gaaaaatata tctctaaaca tctccatctc caaccttga 2220
 gacgacgcct atgatgcaa cgtgtccttt aatgtctcca gggaacttct tcttcatcaa 2280
 catgtggcag aaggaggaga tgggcatttc ctgtgagctg ctggaatcag acttctctca 2340
 gtgcagtggt ggatttctt tcatgaggtc aaagtctaag tatgaattca gtgtcatctt 2400
 tgatacaagc cacctgtctg gggaagagga aattctcagc ttcatcgtga ctgtcagag 2460
 tggcaacttg gagegctctg aagccctaca tgacaacact ctcacactga cagtgccct 2520
 ggtgcatgaa gtggacacgt ccatcactgg aattgtgtcc ccaacctcct tcgtgtatgg 2580
 cgagtctgtg gacgcatcca acttcattca gctggatgac caggagtgtc atttccaacc 2640
 agtcaacatt actctccagg tctacaacat gggctcccagc acccttcctg ggteatctgt 2700
 cagcatctcc ttecccagcc ggctgtcacc tgggtggcgca gagatgtttc aggtccagga 2760
 catggtgggtg agccaagaga aggtaactg ctctctacaa agaaacccga cccctgcat 2820
 catccctcaa gaacaagaga acatcttcca cccatattt gctttcttct ccaagtctgg 2880
 aagaaaagtg ttggactgtg aaaagccagg gagcttctgc ctaacgttgc actgcaacct 2940
 tagtgctctt ccgaaagagg agagccgcac catcaaccta tacatgctac tgaacacaga 3000
 gatactgaag aaggacagct cctctgtcat ccagttcatg gctcgagcca aggtgaaggt 3060
 ggagcctgcc ctgagagtgg tggagatagc taacgggaac ccagaagaga ctctgggtgt 3120
 ctteggagcc ttgcacaatc tggaaccccc tggctacgtt gtgggggtgga tcatcgccat 3180

cagtttgctg gtggggatcc tcatttttct gctgctggct gtgctcctgt ggaagatggg 3240
 cttcttccgc agaaggtaca aagagatcat tgaagctgag aaaaaccgga aagagaatga 3300
 agatggttgg gactgggtcc agaaaaacca gtgaccacc gtgccagtca tgtgatgccc 3360
 tcatgtcccc atcaccagcc tgtggtcctt gatctttgta tctttcatat ttggaagaaa 3420
 gaaatcttct ccagatTTTT cggaggcccc actgatgctg ttctcttctt catccccgtca 3480
 agccccgtgc cgacctgaga tggccacccc tccagccagg tcacatgact ggggccacca 3540
 ccactcccct tctcaagatg aacttagaac tttggaaagg caagctacag agcaaagcaa 3600
 tatttatgga tgcaacattg cgtgggtcaac cctcagggga aaactgttac ctaaagtat 3660
 tttttataaa tgtaagcctt ttatattgat catgtcttta tatttgtatc aatgttttat 3720
 tatttctatt aatagttctt ataattcact caagcactga aatcttggaa atacatgtcc 3780
 ctgcatacaa attttaaaag agaaggaact tattctactt tggaacttgt tgttagggaa 3840
 gaaaaaaaaa acttgcagat aaaacaaact gaagaaacct catgaaatga atccaccaag 3900
 ctggaggcac tgggaaagca caaaggacat ggcaaggccg cctaagacat ttattcccca 3960
 ttgttaccac ceggagttaa gttcagagag cttgaagtat cgggtgtttc tcttatggac 4020
 ctctcactgg gagattctca gcaggaactg ggatggaaag cttggtttcc tctcagcagt 4080
 tgctctgtac cacactgata catgcagcag gcactaaacc ctcttctgga gtcagcaagt 4140
 gctggatgga caactggtea acctcagaat agcatctcat cctaaacaac atgtgtcaga 4200
 gttcagagcc caggaccgaa gctgtgctct ctcagcaaag gcctgttttc tctgtgtgta 4260
 agctgttacc ttgtggtata atgttaacac aagactctcc atttcctctg tcaactctgc 4320
 tgtecccaac tgggtggtgct gcagatacct cccagagag gatcacccca catggtttgt 4380
 gtttatgtct taggtggaat tctcaagagt cgaaccctga aataggactt ggggtgaaat 4440
 aatttattga ggaagtcttc ccagaaggta acagtgagga agttgagaat acaagacagg 4500
 agagtacagg gagccaggca acagtgtect ttcaggggac aaccacagag gtggcttcaa 4560
 accagttgga tctaatgagc aagtcagact caggaacctg gacttttgtg atgccacgcc 4620
 tgcaggggat ataaactttc tgcccttagg tcttgctgac aagatgactc tgcctctag 4680
 aggagaactt tggggggcac cctcaagtaa ggagatccac aatcatgca aagaactctg 4740
 agccaagagc tttagtgtc cctccccca cacaagtga tgctaccttc agctttgtgt 4800
 agccaaaaaa gccatgagtc taagctggtc ctaggagtca aacattacat ctgacctatg 4860
 accaagtcaa actcactaca aggaaggggc agcccccca aaaaaaaaaa acagtgcaca 4920
 cccagctctt ttaagtttat c 4941

<210>8

<211>7272

<212>DNA

<213> 小鼠

<400>8

ctccaccaag agegcatggc tgccggaagcg aggtgcagac cgaggctccc agggategce 60
 ctccgggaag cggatgatgct gttgtttgac ttcgggggtgc caaccgggca ctctacaac 120

ctggaccg	agaatgcact	gctgtaccag	ggccccccg	gcacgctgtt	tggtactcg	180
gtggtgctgc	acagccacgg	gtcgaagcgc	tggtcatcg	tgggggctcc	cactgccagc	240
tggtctctcta	atgcctcagt	ggtcaatcct	ggggcgattt	acagatgcgg	gatcagaaaag	300
aatccaaacc	agacctgcga	acagctccag	ctgggtagcc	ccagtggaga	gccttgtggg	360
aagacatgcc	tggaggagag	ggataaccag	tggttggggg	tcaccctttc	cagacagcct	420
ggagaaaatg	gctctatcgt	gacttgtggg	cacaggtgga	aaaatatttt	ttacatgaag	480
agcgataaca	aactccccac	tggcatttgc	tacgtcatgc	cttctgattt	gcggacagaa	540
ctgagtaaaa	ggatggcccc	gtgttacaaa	gattatacga	gaaaatttgg	agaaaatttt	600
gcatcatgtc	aagctggaat	atctagtttt	tacacacagg	atttaattgt	gatggggggc	660
ccgggatcat	cgtactggac	tggcaccgtc	ttgtctaca	atataactac	aaaccaatac	720
aaagcatttg	tagacagaca	gaaccaagta	aaatttggaa	gctacttagg	ctactcagtt	780
ggagctggac	atthtgaag	tccacatact	accgaagtcg	tgggaggagc	ccctcaacac	840
gaacagatag	gaaaagcata	tatatttagc	attgatgaaa	acgaactgaa	catcgtatat	900
gaaatgaaag	gtaaaaagct	tggtcatac	tttggagctt	ctgtctgcgc	tgtggacctc	960
aatgcagatg	gcttctcaga	tctccttggt	ggagctccca	tgcagagcac	catcagggag	1020
gaaggaagag	tattcgtgta	catcaactct	ggcatgggag	ctgtgatggt	tgaaatggaa	1080
agggtccttg	tcggaagtga	caaatatgct	gcaagatttg	gggagtctat	agcgaatctt	1140
ggcgacattg	acaatgacgg	ctttgaagat	attgctattg	gtgcaccaca	agaagacgac	1200
ttgcgaggtg	ctgtctacat	ttacaatggc	cgagtcgatg	gaatctcctc	cacctactca	1260
cagagaattg	aaggacagca	aatcagcaaa	tcattaagga	tgtttggaca	atctatctca	1320
ggacaaattg	atgcagacaa	caatggatat	gttgatgtag	ccattgggtgc	atttactctt	1380
gattctgcag	tgttgctaag	gacaaggcct	gtagtgattg	ttgaagcatc	tttaagccat	1440
cctgagtctg	taaataggac	aaagtttgac	tgtactgaaa	atggacttcc	atctgtgtgc	1500
atgcatctta	cactgtgttt	ctcatataaa	ggcaaagagg	tcccaggcta	catcgttttg	1560
ttttacaatg	tgagcttgga	tgtgcacagg	aaggcagagt	ctccgtcaag	atthttattc	1620
ttctctaattg	ggacttctga	cgtgattaca	ggaagcatac	gagtttcaag	cagtggagag	1680
aaatgtagga	cacaccaggc	attcatgcgg	aaagatgtgc	gagacatcct	tacccccatt	1740
catgtagagg	ccacatacca	ccttgggcat	catgtgatca	ccaaacgaaa	cactgaggaa	1800
ttccaccac	tccagccgat	ccttcagcag	aagaaagaaa	aagacgttat	tagaaaaatg	1860
ataaaccttg	caaggttttg	tgccatgaa	aattgctctg	ctgatctcca	agtttctgca	1920
aaagttggat	ttttgaagcc	atatgaaaat	aaaacctatc	ttgctgttgg	gagcatgaag	1980
accataatgc	taaactgtgc	cttgttcaac	gctggcgatg	atgcttacga	aaccactctg	2040
aatgtccaac	tccccacagg	cctttatttc	attaagatct	tagacctgga	agagaaacaa	2100
ataaactgcg	aagtgactga	gagctcaggc	atagtgaagc	ttgcctgcag	cctaggttac	2160
atataatgtg	atgcctctc	aaggatagac	attagctttc	tcctggatgt	gagctcactc	2220
agcagggcac	atgaggacct	cagcatcagt	gtgcatgcct	cctgtgaaaa	cgagggtgaa	2280
ttgaccaag	tgagggacaa	cagagtaacc	ttaacgatac	ctctaaggta	tgaggttatg	2340
ctgactgttc	atgggcttgt	gaaccaact	tcatttgtgt	atggatctag	cgaagaaaac	2400
gagccagaaa	catgcatggc	cgagaagctg	aacctcactt	tccatgttat	aaacactggg	2460

attagcatgg ctccaaatgt tagtgtgaaa ataatggtac caaattcttt tctccctcaa 2520
 gatgataagt tgttcaacgt tttggatgtc cagacaacta cagggcaatg ccattttaa 2580
 cactatggaa gagagtgtac atttgcacag caaaaaggca tagcggggac gttgaccgat 2640
 atagtcaaat tcctatcaaa gactgataag agactcctgt attgcatgaa agctgatcaa 2700
 cactgttttag atttcttatg caatttcgga aaaatggaaa gtgggaagga agccagcgtt 2760
 catattcagc tggagggcag gccatccatc ttggaaatgg atgagacctc atcactcaag 2820
 tttgaaataa aagcaacagc ttttcagag ccacacccaa aagttattga actaaataaa 2880
 gatgagaacg tggcccatgt tttcttgaa gggctccatc atcaaagacc caaacgacat 2940
 ttcaccatca ttattattac catcagcttg ctacttggac ttattgtact tttattaatt 3000
 tcatgtgtta tgtggaagge tggattcttt aaaagacagt acaaatctat cctacaagaa 3060
 gaaaacagga gagacagctg gagttatgtc aacagcaaaa gcaatgatga ctgaagactt 3120
 ctacactgag agaactgaaa aactcagggt aggaaaaaga aatcctgttc agaagaccg 3180
 tcagaatttc ttctttttt ccatgtgctt atgattttgt gacatactct tagtgcaggg 3240
 gaaatcttca agaaagaagc tacccaaagg tggcttgtca gcttcggtgg atgagtgaag 3300
 caaaacacta aagctctgga tgtaccggag aggtgacctg ttaagacaa cttaaagcta 3360
 gagagaatcc agactcagca gggccgactt aaagggatg atttttcaac atcactgatg 3420
 aagtggctca tctcagtga atggatgcca tgatgtggaa acttgttggc ttcaaatact 3480
 tttatcttca aactatgate atgatctttg aattcactga gactctttca aatggctgtt 3540
 ccaagattgt ctaatggata agtcattttt tattagatat tttctttatt tacatttcaa 3600
 atgttatecc ctttcttagt tteacteca aaaatcccct atcctctccc ctgtcccctg 3660
 ctcccate gaccactcc cgcttctgg ccaaggcgtt cccctatact ggggaataga 3720
 acctcacag gaccaagggc ctctctctct attgacagag cacagggtcc ccaatgaagg 3780
 agttagagaa aatacccaag gagctgaagg ggtttgcagc cccataggag gaacaacaat 3840
 atgaactaac cagtaacccc agagctcctt gggactaaac caccaaccaa agaaaacaca 3900
 cggagagacg catggctcta gctggatcaa tcattttaa gcagaggacc tgaagactgc 3960
 tcttgggtgt gctgcatccc tgggctgtgt ccctacagcc cttttactct gcagatagga 4020
 actgtaaaat cctaaagaac aaaatccgtt tgcagcagga tggcttctgg ggaaatggtc 4080
 agctgcggac tcttgtgtgt atgtacatat acttttttaa aggataaaaa tctcaatcta 4140
 cttctttatt aagaacacce aggaatagtt tgcacttct aagcttcacc ttaatacca 4200
 attcttaaga attttatect catagcagat tataaatatc gcactttagc tgatacacac 4260
 tgatacaaca tgaactgcag ctactgatg atcgaaaatt gtgtgaagag agatttagga 4320
 accaatattt cataaaacat tcaactgcac aaattatgca aacatgagta tctgctagga 4380
 tattgttgtt tctcttggtc tggttgaata tacataaact aggactctaa aacaccacat 4440
 tctgtcatag aaatggagac acaaaaatca tagttggaac tgcaaatcac tgatcaagtt 4500
 tgtgtgcagt ggcatcaaaa ttcccatgcg ataatgcatg cttgatgttg ttgaacaaga 4560
 tactatttta aaatgaaata gcttctacct gggtttcaca taatttgtct gtaattacaa 4620
 tcatttttgt agtatttatt tcatatatgt agtttgataa atgtaagttt tcatttgaat 4680
 ctgttatgtg taagcaagct aaggccagac tttgaacatg tgctgggtaa aaggggcage 4740
 cttcagtggt gtgaagaaag atcgctttac aggaagggtt tgatgccage tggcccttc 4800

tcagatttcc tgacttgtga ggatggcttg ttcacaagcc tctggctgga gccgtggagg 4860
 gaggttttga gtgctgaaac ttgagcatag agcatcagat ctgggtgagc agaaaccata 4920
 ttttaattaga tgcttatatt ttttaaggat gcttttttgt gtaaaagggt taagttgatg 4980
 gttttcttat aaaaattcaa gtagttatntt catgaggatg ccaaagttaa tagatgagaa 5040
 atcaatatca ttttagacct accgtttcaa ggaatggctt ctgaggagag ttaaagtgtg 5100
 atcattgcac tgaaaaccga ctctgcctt tcaggtacaa aagaacgtag ctacctcctg 5160
 ggccacattt tgccaatta gaaagaaata tttttatatt tattaataaa acttagaatt 5220
 ttatataagc tttaaaatgt agttatnttca aaagatgctg ttatgggatg ggtagtagaa 5280
 tagtagccta agaggaaaga atgtttttta agtgggtgtt cgtggttatg ttactatctc 5340
 actgtgaagt ctgagatntt acagaagntt tgttttacta ggttacagga gatactaaag 5400
 aattatcttc aacagtattg agagagcaca atgttgntaa aattagatct aacaacacc 5460
 ttccaaaaat caaaactttg atttttttca ttaatttcat attttttgat tttcaaac 5520
 ctggctacta ttttaattat attaaaatat ttttaattgca ttaaagtaga tactttaatt 5580
 atattaaata gatagcttca ttaaaatgtg ttgcagtaaa tctctccaac ccaaatatgc 5640
 cttggcaatg aaaacacaac acagttaata tgattgcatg ctgtgcgcct agattgggca 5700
 gatctactgc tacactactg tcttccacag cttatgagac cccttagaac ttgcgnttc 5760
 tccaggccat gtgcttctgc tctgcttcaac ttcattctcc tccccctctg catcctctcc 5820
 ctcttccatt ttctcttct tttctctccc tacctctggc tccgccttcc cttttatctg 5880
 cccaatcate agctctctt tatttttcaa attaagggtg gaatcaggnt tacaggaaat 5940
 cacctgagtg ctgactcatt ccttgntcaac aaccgctcat gggagaacag aattaacatc 6000
 aaatataant agccccagg ctatcttcaa cttttacccc cttctgtcca attaaaagac 6060
 tattttatct cagatataat tgaacataac aattattatt ttgtaattta taaagtacag 6120
 gagacctaac acccagntca tcatctttgt taattaaata aaaatctctg tcatctatcc 6180
 ttacttaaaa gactatagnt ctgcacctgg ctagtntctgc atctgaaaac catcctctca 6240
 aatctatntc tctcaaagtg aaaagcctgg gctcgcctga gactatgtag ttttcaacc 6300
 tcaacataaa tccaagaatg actgatatta actgaaaata tataggaagc ctaacatagc 6360
 ttccaaaant tagataantt gttgagacca ctggntcactt ggacagntcc ttactntcaac 6420
 agggntggagc tttgatcttc aggctactgg ccttagntcat ctgacaagac ttagagaaac 6480
 aagaatatta aggactagcc tactgtctcg gcagaatcaa gctgtcctaa cctgtagntg 6540
 tgtcctttct ttggacagta ctatatctgt agatgaaatg agccaatntc tgcctagnta 6600
 ctttaccac aactagagta actcaaagat gctcagnttc tcttttgaat ccaagacagg 6660
 gaaagctgntc aggagcagac tagntctcaac aacaagntga taaataacat caaactntcaac 6720
 attctgtgga cttctgatgt ttttgaaaa ccaattatct atatgaagta atctgaactg 6780
 ttctctgaac ctctctcagc cattctgat taaaataact gaaaacaccc taacaataaa 6840
 ctgagagcca agaattntct atctgacct taactcacag gcttaaacat ctgagctctg 6900
 tttatcataa cagcaantga aggactgggt ctaagccttg tactntcaaaa ttttagntat 6960
 caaagacaac ctataataac caccgcagc cgcaaagctt agggaaactg gatgatgaat 7020
 cttcataact tcttcaagct gatatggcg ttgagatant tttgaaggaa gggggaagaa 7080
 tagggaaagg gggagnttagt tggccttagg aaggccccac catgattnta ttagnttctg 7140

atgtctctgt cctgactgga tccggatgaa aaaccaagat atcagttcag gcaagtcagt 7200
 tcagcatgtc tgatgatgaa attcaccaag gctgtatatt ctgtaatata taaatctcaa 7260
 aaaaaaaaaa aa 7272

<210>9

<211>3588

<212>DNA

<213> 智人

<400>9

ccgcgctcgg cgccctgctc gccgggcaga ggggaaggcg gccggctggg gatgggcggc 60
 ccggctgcgc cgaggggcgc cgggaggctc cgcgcgctgc tgctggcgct ggtggtcgcg 120
 gggatccccg cgggcgccta caacctcgac ccgcagcgcc ccgtgcactt ccagggcccc 180
 gctgactcgt tcttcggcta cgcagttctg gagcatttcc acgacaacac gcgctgggtc 240
 cttgtgggcg caccaaaggc agattccaaa tacagccctt cagtgaagtc tcctggggct 300
 gtgtttaagt gccgtgttca caccaacctt gaccggagat gcaccgaact ggacatggct 360
 cgaggggaaga atcggggcac gtectgcgga aagacctgcc gggaaagaccg cgatgatgag 420
 tggatggggg tgagcctggc ccgacagccc aaggctgatg gccgtgtgtt ggctgtgtct 480
 catcgctgga agaacateta ctatgaagcc gaccacatcc taccatgg cttctgctac 540
 atcatccctt ccaacctcca ggccaaaggc aggacactga tcccttgcta tgaagagtat 600
 aagaagaagt acggagagga acacggctcc tgccaggctg ggatagcggg cttcttcaact 660
 gaggagctgg tggatgatggg tgctccaggg tcattttatt gggctggaac catcaaagtg 720
 ctgaacctta cggacaacac ctatttaaaa ctgaacgacg aagtgatcat gaacaggcgg 780
 tacacctacc tgggctacgc agtgaccgct ggccacttct ctcaccgctc caccattgat 840
 gtggtaggag gtgccccaca ggacaaagc atcggcaagg tttatatattt cagagctgac 900
 cgaagatcag gcaccttaat taagatcttt caagcatcag gtaaaaagat gggctcttac 960
 ttcggctcct ccttgtgcgc agttgacctg aatggggacg gcctctctga cctgctgggtg 1020
 ggggccccca tgttttctga gatcagggat gagggacagg tcaactgtcta catcaacaga 1080
 ggaaatggag ccctcgagga gcagctggct ctgactgggg atgggtgccta caatgcgcac 1140
 tttggagaga gcattgccag cctggacgat ctggacaatg atgggttccc agatgtggcc 1200
 attggtgcac ccaaggagga tgacttcgca ggggcggctc atatctatca tggatgatgcc 1260
 ggtgggatag tccctcagta ctcaatgaaa ctgtctgggc agaagataaa tccagtgtct 1320
 cggatgtttg gtcagtccat atcgggagc attgatatgg atggaaatgg ctatcctgat 1380
 gtcactgttg gagccttcat gtccgacagc gtggttcttc tcagagcaag gcctgtcatt 1440
 acggtgatg tetccatctt cctcccgggc tccatcaaca tcacagcgc tcagtgtcac 1500
 gacggacagc agcctgtgaa ctgcctgaac gtcaccacct gcttcagctt ccatggcaaa 1560
 cacgttccag aagagattgg cctgaattat gttctgatgg ctgacgtggc caaaaaggag 1620
 aagggccaga tgcccagggt ctactttgtg ctgctggggag agaccatggg tcaggtcaca 1680
 gagaagctgc agctgactta catggaggag acgtgtcgtc actatgtggc ccatgtgaag 1740

cggagggtgc	aggacgtcat	cagcccgatc	gtgtttgaag	cagcctacag	cctcagtgag	1800
catgtgactg	gagaggagga	gaggaactg	ccgcctctga	caccagttct	ccgctggaaa	1860
aagggacaaa	agattgcca	aaagaatcag	actgtttttg	aaaggaattg	ccgttcagag	1920
gactgtgccg	cagacctgca	gcttcagggt	aaactgctgc	tctccagtat	ggatgagaaa	1980
accctgtatc	tagctttggg	ggctgtgaag	aacatctccc	taaacatctc	tatctccaac	2040
ctcggagatg	atgcctatga	tgccaacgtg	tccttcaatg	tttcccggga	gctcttcttc	2100
atcaacatgt	ggcagaagga	ggagatgggc	atctcctgtg	agctgctgga	atcggacttc	2160
ctcaaagtca	gcgtgggatt	tcctttcatg	aggctaaagt	caaagtatga	attcagcgtg	2220
atctttgata	caagccacct	gtctggggaa	gaggaagttc	tcagcttcat	tgttactgct	2280
cagagtggca	acacggagcg	ctctgaatcc	ctgcatgaca	acaccctcgt	gctgatggtg	2340
ccactgatgc	acgaggtgga	cacgtccatc	accggaatca	tgtctccaac	ctcctttgta	2400
tatggcgagt	ccgtggacgc	agccaacttc	attcagctgg	atgacctgga	gtgtcacttt	2460
cagcccatca	atataccct	tcaggtctac	aacactggcc	caagcacctc	tccagggtca	2520
tctgtcagca	tctctttccc	taatcgactc	tcctctgggtg	gtgcagagat	gtttcatgct	2580
caggaaatgg	tggtgggcca	agagaaggga	aactgctctt	tccagaaaaa	cccaactccc	2640
tgcatcatcc	ctcaagaaca	agaaaatata	ttccacacaa	tatttgcttt	ttcacaaaag	2700
tctggaagaa	aagtcttggg	ctgtgaaaaa	ccaggaatth	cttgcctaac	agcacactgt	2760
aacttttagtg	ctcttgctaa	agaagaaagt	cgtactatag	acatttacat	gctgctgaac	2820
acagaaatac	tgaaaaagga	cagttcgtct	gtcatccagt	tcattgtccc	cgccaagggtg	2880
aagggtgatac	ctgccctaag	ggtggtggaa	atagctcatg	ggaaccacaga	agaggtgacg	2940
gtggtcttcg	aggccctgca	caatctggag	ccccgtggct	acgtcgtggg	gtggatcatc	3000
gccatcagtt	tgttgggtggg	aatcctcacc	ttcctgctgc	tggccgtgct	gctctggaag	3060
atgggcttct	ttcgccgaag	gtacaaagaa	attatcgaag	ctgagaagaa	ccggaaagag	3120
aatgaagaca	gttgggactg	ggtccagaaa	aaccagttag	ctgccacacc	agtcacatga	3180
cctgateact	agcctgtcat	ccttggctct	tgtatcttcc	atatttggaa	aaaaaaaaatc	3240
ttctccagat	tttctggagg	ccccactgat	gctgttctct	tcttcattct	atcaagccca	3300
ggtgccagcc	tgaggcagcc	acttcggcca	ggtcacacga	ccgggggcag	caccacttcg	3360
ctttaaagac	tctgaacttt	ggagagttag	agagccgagc	aatatttagg	atgcaaacag	3420
catggtcacc	ctcaggggaa	aactgttaaa	gtatttttat	aaatataagc	cttttatact	3480
gattattctt	ttatatttgt	atcgatatta	ttctatttaa	atagttataa	ttcactcaag	3540
cactgattct	ggcctaaaat	cttgggaagtc	catgaataca	aatttttaa		3588

<210>10

<211>4932

<212>DNA

<213> 智人

<400>10

ggcagggcac acctggattg cattagaatg agactcacta cccagttcag gtgtgttgcg 60

ttgtgggtct	ccggcacatt	tcagaggctg	attaggaccc	tgaccccaca	ctggggttta	120
caccctaaa	agcaggtgtg	tcccgtggca	actgagtggg	tgcgtagaaa	gggggatca	180
tcaattacca	gctggagcaa	tcgaatcggg	taaatgtgaa	tcaagtcaca	gtgcttcctt	240
aaccaacct	ctctgttggg	gtcagccaca	gcctaaaccg	cctgccgttc	agcctgagag	300
gctgctgcta	gcctgctcac	gcatgcagcc	cgggctgcag	aggaagtgtg	gggaggaagg	360
aagtgggtat	agaagggtgc	tgagatgtgg	gtcttgaaga	gaatagccat	aacgtctttg	420
tcactaaaat	gttccccagg	ggccttcggc	gagtcttttt	gtttggtttt	ttgtttttaa	480
tctgtggctc	ttgataatth	atctagtggg	tgccacacc	tgaaaaaaa	gacacagtgt	540
ttactatca	acgaaagaac	tggacggctc	cccgccgcag	tcccactccc	cgagtttgtg	600
gctggcattt	gggccacgcc	gggctggggc	gctcacagcg	aggggcgcgc	agtttggggg	660
cacacagctc	cgcttctagg	ccccaaccc	cgtaaaaagg	ggaagcccgt	gccccatcag	720
gtccgctctt	gctgagccca	gagccatccc	gcgctctgcg	ggctgggagg	cccgggccag	780
acgcgagtc	tgccagccg	aggttcccc	gcgccccctg	cagccgcgcg	taggcagaga	840
cggagcccgg	ccctgcgcct	ccgcaccacg	cccgggaccc	caccagcgg	cccgtaccgg	900
gagaagcagc	gcgagcacc	gaagctccc	gctcggcggc	agaaaccggg	agtggggccg	960
ggcgagtgcg	cggcatecca	ggccggcccc	aacgtccgcc	cgcggtgggc	cgacttcccc	1020
tcctcttccc	tctctcttc	ctttagccc	ctggcgccgg	acacgctgcg	cctcatctct	1080
tggggcgctt	ttcccgttg	gccaaccgct	gcatcccgtg	caactttggg	gtagtggccg	1140
cttagtggtg	aatgttcccc	accgagagcg	catggcttgg	gaagcgaggc	gcgaaccggg	1200
gccccgaagc	cgccgtccgg	gagacgggtg	tgctgttgct	gtgcctgggg	gtcccgaccg	1260
gccgcccta	caacgtggac	actgagagcg	cgctgcttta	ccaggcccc	cacaacacgc	1320
tgttcggcta	ctcggctcgtg	ctgcacagcc	acggggcgaa	ccgatggctc	ctagtgggtg	1380
cgcccactgc	caactggctc	gccaacgctt	cagtgatcaa	tcccggggcg	atttacagat	1440
gcaggatcgg	aaagaatccc	ggccagacgt	gcgaacagct	ccagctgggt	agccctaattg	1500
gagaaccttg	tggaaagact	tgtttggaa	agagagacaa	tcagtggttg	ggggtcacac	1560
ttccagaca	gccaggagaa	aatggatcca	tcgtgacttg	tggcataga	tggaaaaata	1620
tattttacat	aaagaatgaa	aataagctcc	ccactgggtg	ttgctatgga	gtgccccctg	1680
atttacgaac	agaactgagt	aaaagaatag	ctccgtgtta	tcaagattat	gtgaaaaaat	1740
ttggagaaaa	ttttgcatca	tgtcaagctg	gaatatccag	tttttacaca	aaggatttaa	1800
ttgtgatggg	ggccccagga	tcatcttact	ggactggctc	tctttttgtc	tacaataata	1860
ctacaaataa	atacaaggct	tttttagaca	aacaaaatca	agtaaaattt	ggaagttatt	1920
taggatattc	agtcggagct	ggctatcttc	ggagccagca	tactaccgaa	gtagtcggag	1980
gagctctca	acatgagcag	attggtaagg	catatatatt	cagcattgat	gaaaaagaac	2040
taaatacttt	acatgaaatg	aaaggtaaaa	agcttggatc	gtactttgga	gcttctgtct	2100
gtgctgtgga	cctcaatgca	gatggcttct	cagatctgct	cgtagggagca	cccatgcaga	2160
gcaccatcag	agaggaagga	agagtgtttg	tgtacatcaa	ctctggctcg	ggagcagtaa	2220
tgaatgcaat	ggaaacaaac	ctcgttggaa	gtgacaaata	tgctgcaaga	tttggggaat	2280
ctatagttaa	tcttggcgac	attgacaatg	atggctttga	agatgttgct	atcggagctc	2340
cacaagaaga	tgacttgcga	ggtgctatth	atatttaca	tggccgtgca	gatgggatct	2400

cgtcaacctt	ctcacagaga	attgaaggac	ttcagatcag	caaatcgta	agtatgtttg	2460
gacagtctat	atcaggacaa	attgatgcag	ataataatgg	ctatgtagat	gtagcagttg	2520
gtgcttttcg	gtctgattct	gctgtcttgc	taaggacaag	acctgtagta	attgttgacg	2580
cttctttaag	ccaccctgag	tcagtaaata	gaacgaaatt	tgactgtgtt	gaaaatggat	2640
ggccttctgt	gtgcatagat	ctaacacttt	gtttctcata	taagggcaag	gaagttccag	2700
gttacattgt	tttgttttat	aacatgagtt	tggatgtgaa	cagaaaggca	gagtctccac	2760
caagattcta	tttctcttct	aatggaactt	ctgacgtgat	tacaggaagc	atacaggtgt	2820
ccagcagaga	agctaactgt	agaacacatc	aagcattttat	gcggaaagat	gtgcgggaca	2880
tcctcacccc	aattcagatt	gaagctgctt	accaccttgg	tcctcatgtc	atcagtaaac	2940
gaagtacaga	ggaattccca	ccacttcagc	caattcttca	gcagaagaaa	gaaaaagaca	3000
taatgaaaaa	aacaataaac	tttgaagggt	tttgtgcca	tgaaaattgt	tctgctgatt	3060
tacaggtttc	tgcaaagatt	gggtttttga	agcccatga	aaataaaaaca	tatcttgctg	3120
ttgggagtat	gaagacattg	atgttgaatg	tgtccttggt	taatgctgga	gatgatgcat	3180
atgaaacgac	tctacatgtc	aaactaccgc	tgggtcttta	tttcattaag	attttagagc	3240
tggaagagaa	gcaaataaac	tgtgaagtca	cagataactc	tggcgtggta	caacttgact	3300
gcagtattgg	ctatatatat	gtagatcadc	tctcaaggat	agatattagc	tttctcctgg	3360
atgtgagctc	actcagcaga	gcggaagagg	acctcagtat	cacagtgcac	gctacctgtg	3420
aaaatgaaga	ggaaatggac	aatctaaagc	acagcagagt	gactgtagca	atacctttaa	3480
aatatgaggt	taagctgact	gttcatgggt	ttgtaaacc	aacttcattt	gtgatggat	3540
caaatgatga	aatgagcct	gaaacgtgca	tgggtggagaa	aatgaactta	actttccatg	3600
ttatcaacac	tggcaatagt	atggctccca	atgttagtgt	ggaaataatg	gtaccaaat	3660
cttttagccc	ccaaactgat	aagctgttca	acattttgga	tgtccagact	actactggag	3720
aatgccactt	tgaaaattat	caaagagtgt	gtgcattaga	gcagcaaaag	agtgcaatgc	3780
agaccttgaa	aggcatagtc	cggttcttgt	ccaagactga	taagaggcta	ttgtactgca	3840
taaaagctga	tccacattgt	ttaaatttct	tgtgtaattt	tgggaaaatg	gaaagtggaa	3900
aagaagccag	tgttcatatc	caactggaag	gccggccatc	catttttagaa	atggatgaga	3960
cttcagcact	caagtttgaa	ataagagcaa	caggttttcc	agagccaaat	ccaagagtaa	4020
ttgaactaaa	caaggatgag	aatgttgcgc	atgttctact	ggaaggacta	catcatcaaa	4080
gacccaaacg	ttatttcacc	atagtgatta	tttcaagtag	cttgctactt	ggacttattg	4140
tacttctgtt	gatctcatat	gttatgtgga	aggctggctt	ctttaaaga	caatacaaat	4200
ctatcctaca	agaagaaaac	agaagagaca	gttggagtta	tatcaacagt	aaaagcaatg	4260
atgattaagg	acttctttca	aattgagaga	atggaaaaca	gactcaggtt	gtagtaaaga	4320
aatttaaaag	acactgttta	caagaaaaaa	tgaattttgt	ttggacttct	tttactcatg	4380
atcttgtgac	atattatgtc	ttcatgcaag	gggaaaatct	cagcaatgat	tactctttga	4440
gatagaagaa	ctgcaaagggt	aataatacag	ccaaagataa	tctctcagct	tttaaatggg	4500
tagagaaaca	ctaaagcatt	caatttattc	aagaaaagta	agcccttgaa	gatatcttga	4560
aatgaaagta	taactgagtt	aaattatact	ggagaagtct	tagacttgaa	atactactta	4620
ccatatgtgc	ttgcctcagt	aaaatgaacc	ccactgggtg	ggcagaggtt	catttcaaat	4680
acatctttga	tacttgttca	aaatatgttc	tttaaaaata	taatttttta	gagagctggt	4740

cccaaatttt ctaacgagtg gaccattatc actttaaagc cctttattta taatacattt 4800
 cctacgggct gtgttccaac aaccattttt tttcagcaga ctatgaatat tatagtatta 4860
 taggccaac tggcaaactt cagactgaac atgtacactg gtttgagctt agtgaaatga 4920
 cttccggaat ct 4932

<210>11

<211>36

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>11

acgctcgagt gtaccatggt ccccaccgag agcgca 36

<210>12

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>12

tcatctagat taatcatcat tgcttttact 30

<210>13

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>13

tcgaagcttc tggggatggg cggccccgct 30

<210>14

<211>30

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引物

<400>14

acctctagat cactggtttt tctggacca

30

<210>15

<211>7

<212>PRT

<213> 智人

<400>15

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

5

<210>16

<211>5

<212>PRT

<213> 智人

<400>16

Gly Arg Gly Asp Ser

5

<210>17

<211>8

<212>PRT

<213> 智人

<400>17

Ala Glu Ile Asp Gly Ile Glu Leu

5

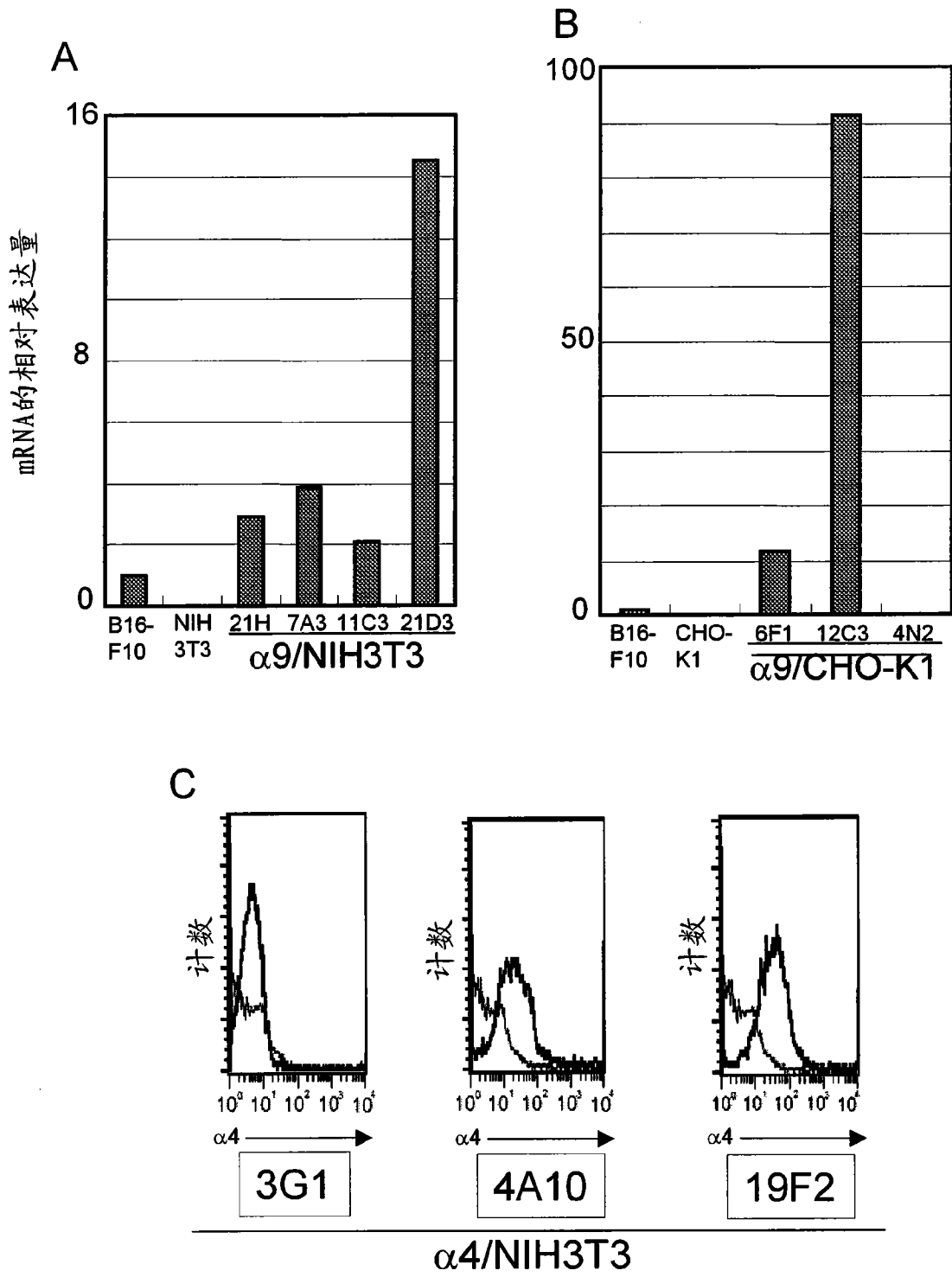


图 1

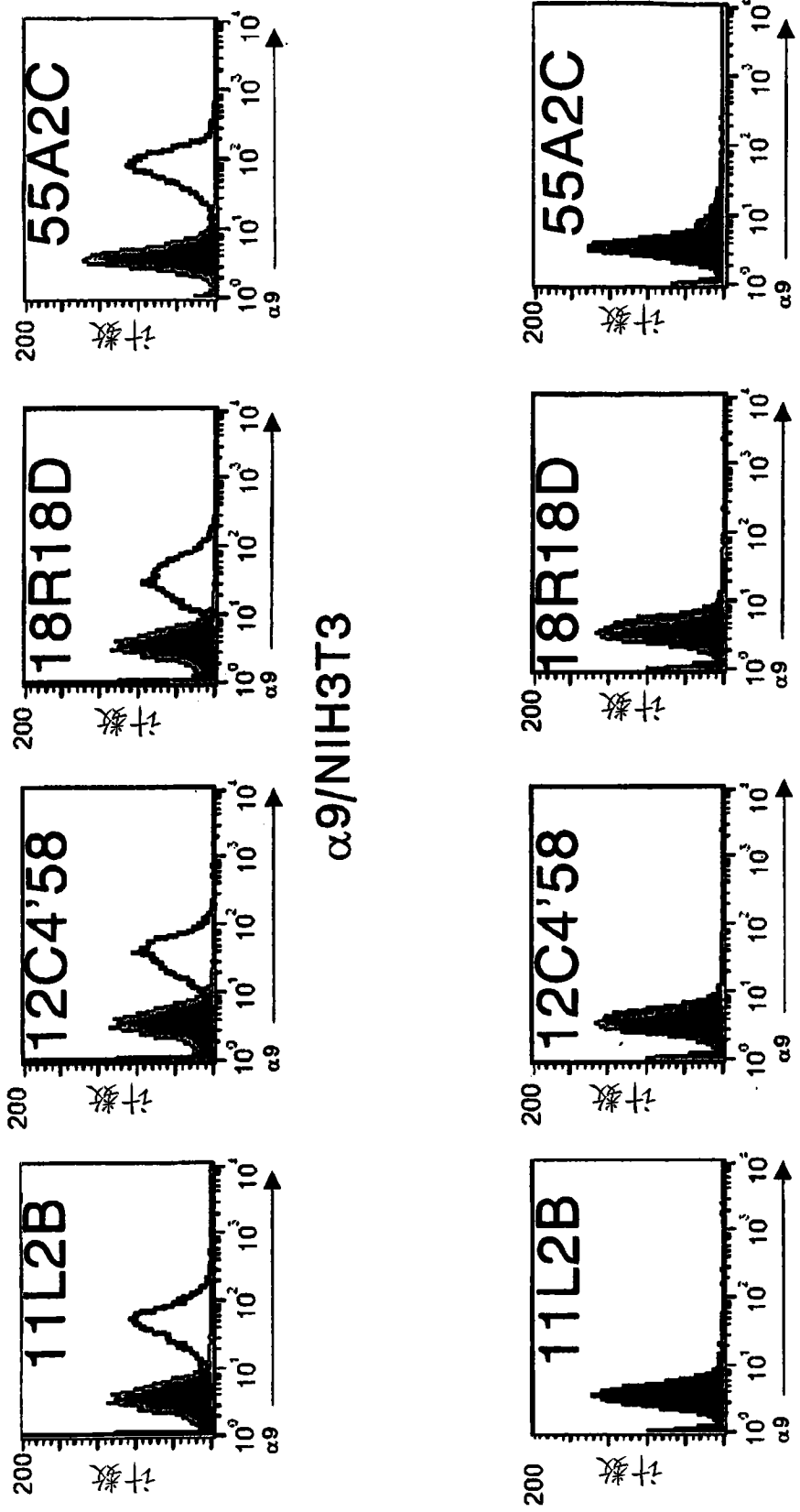
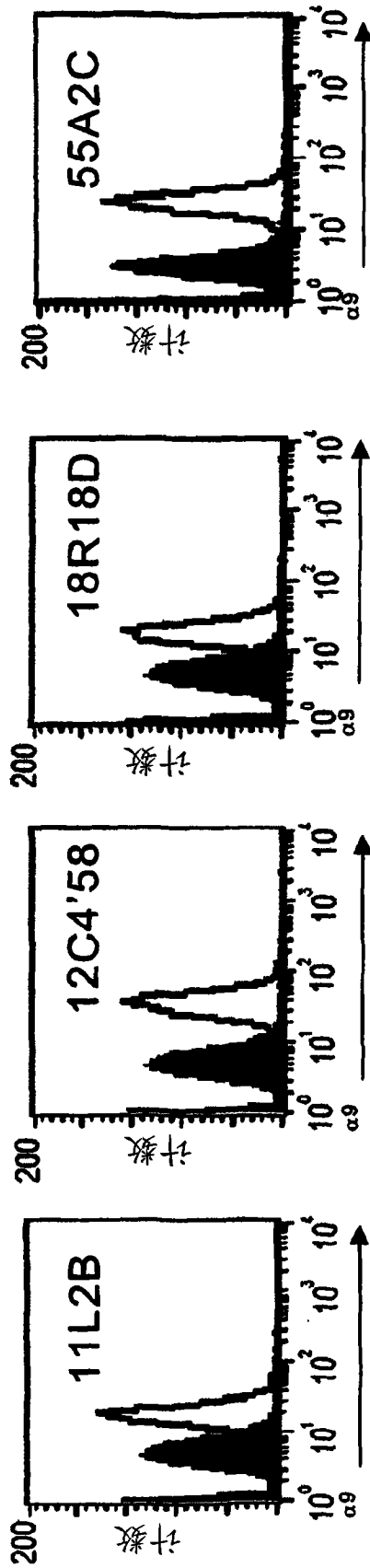


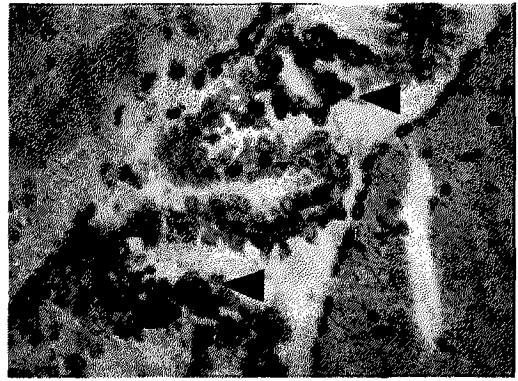
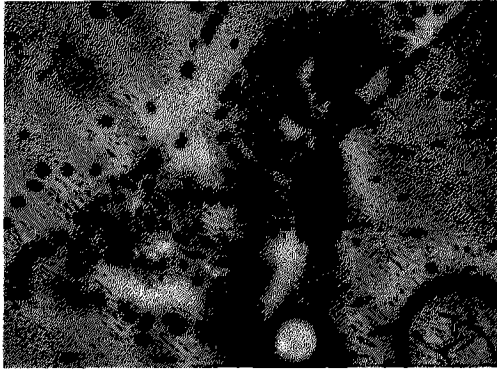
图 2(之一)



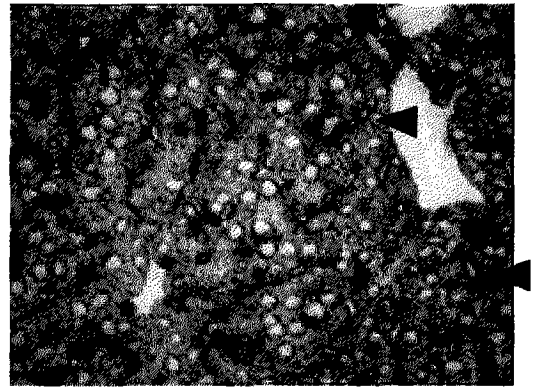
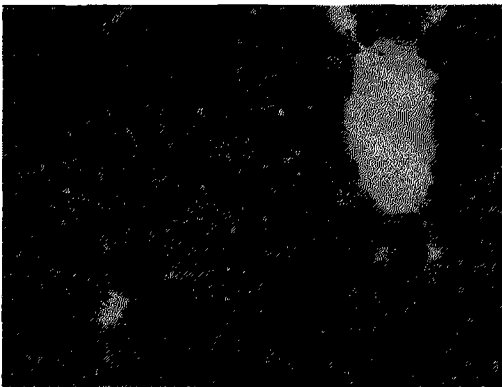
B16-BL6

图 2 (之二)

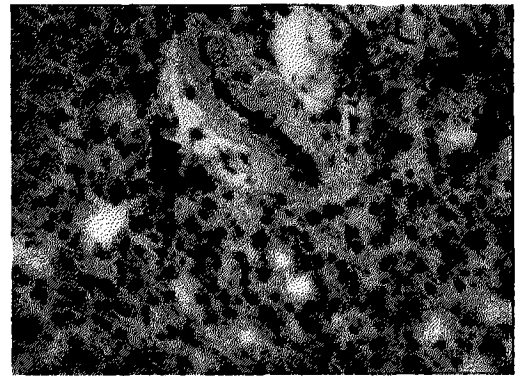
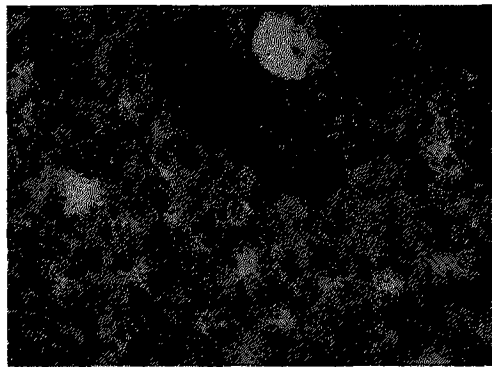
脑室 脉络丛



肝脏 窦状隙细胞



肺泡 巨噬细胞



肌肉 肌成纤维细胞

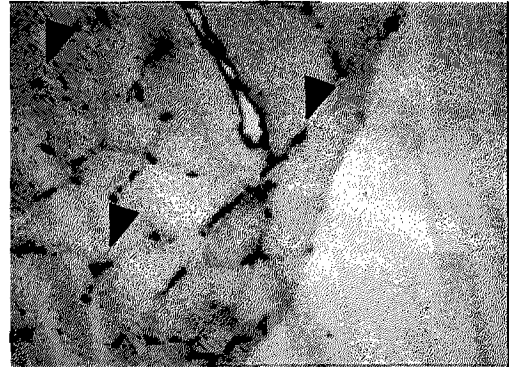
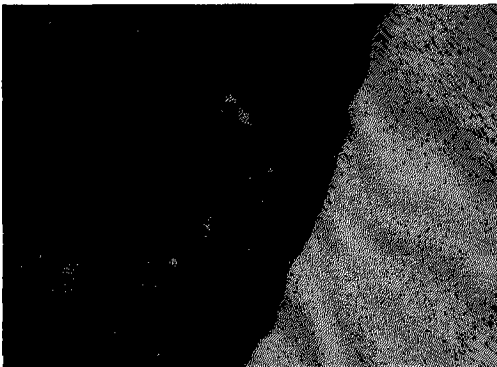


图 3

组织	$\alpha 9$ 染色性
脑	脉络丛
眼球	—
肺	十、血管内皮·平滑肌·肺泡巨噬细胞
肝脏	十、窦状隙细胞
心脏	—、(血管内皮)
肾脏	十、血管内皮·平滑肌·肾小球
胃	十、平滑肌·粘膜肌层
肌肉	十、血管内皮·成肌细胞·淋巴管
子宫	十、血管内皮·平滑肌·动脉平滑肌

图 4

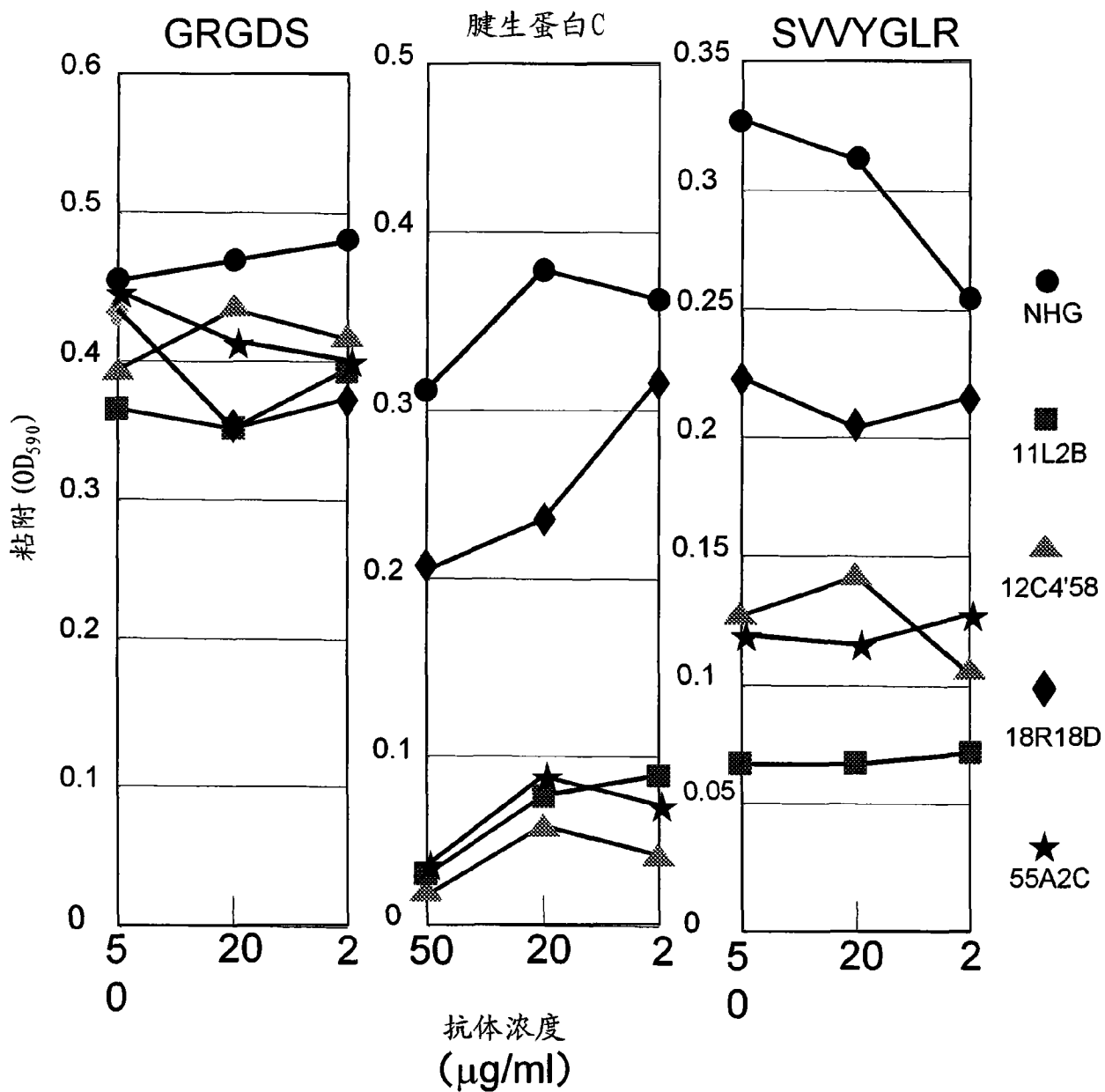


图 5

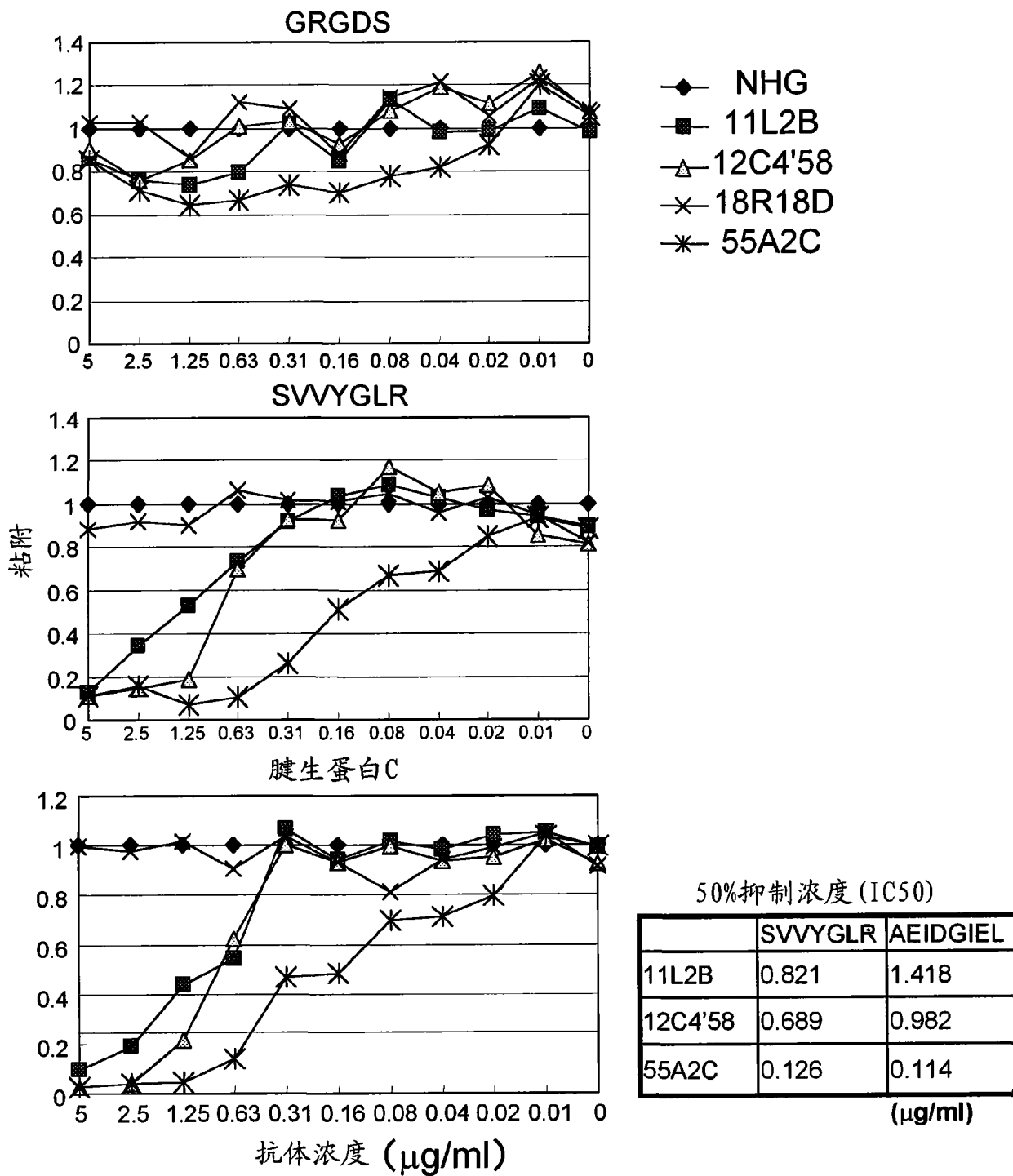


图 6

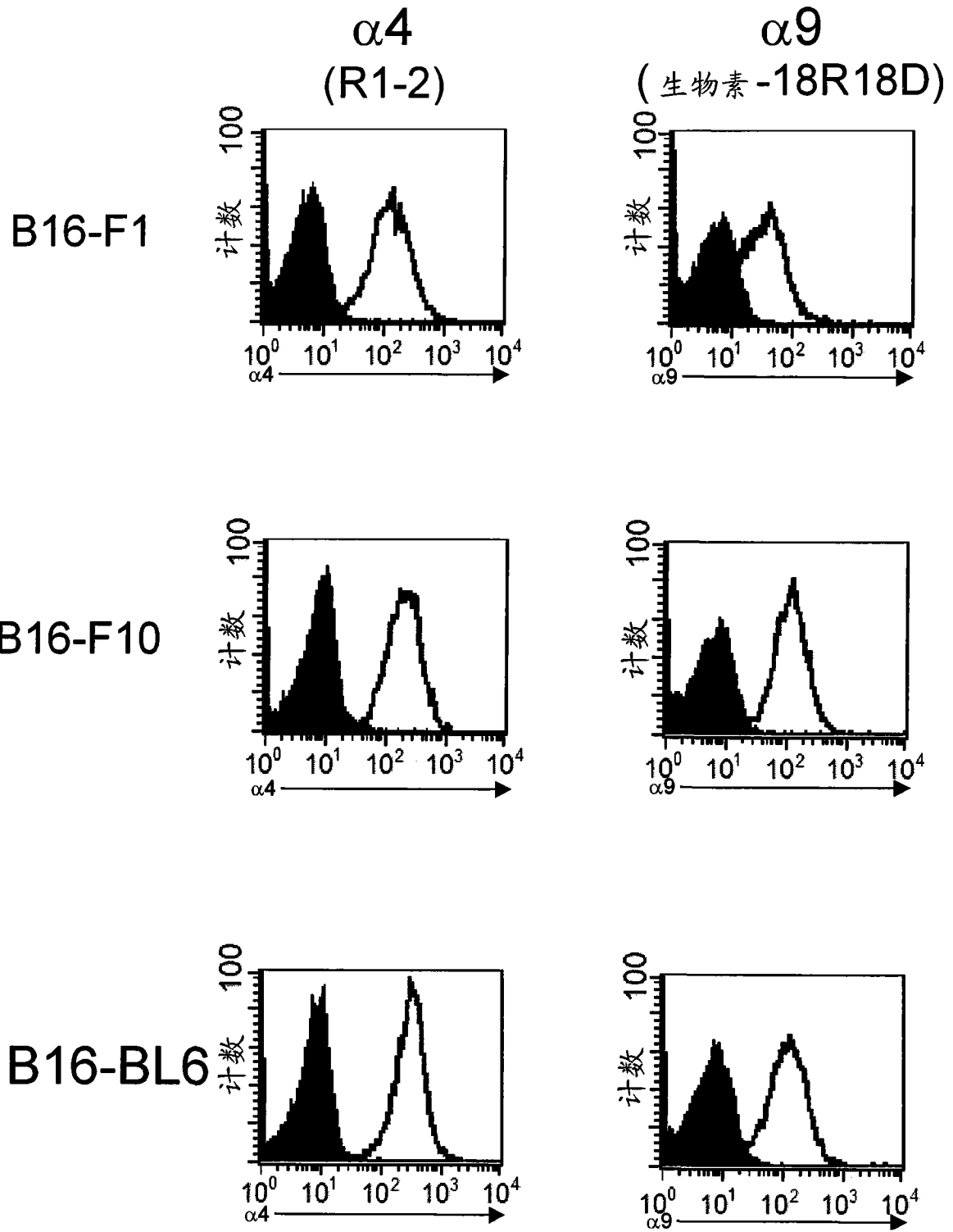


图 8

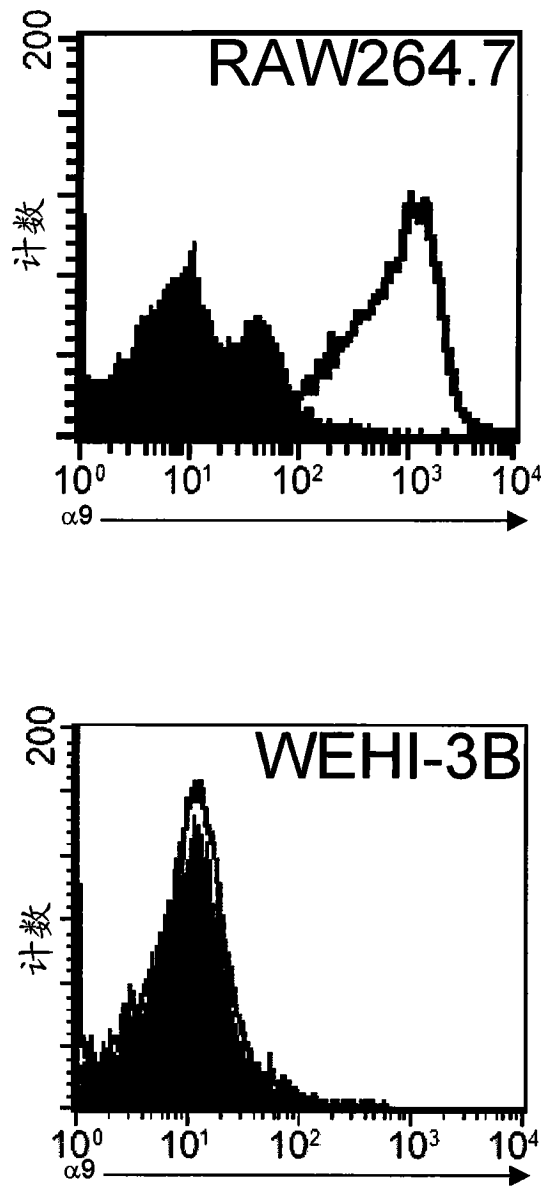


图 9

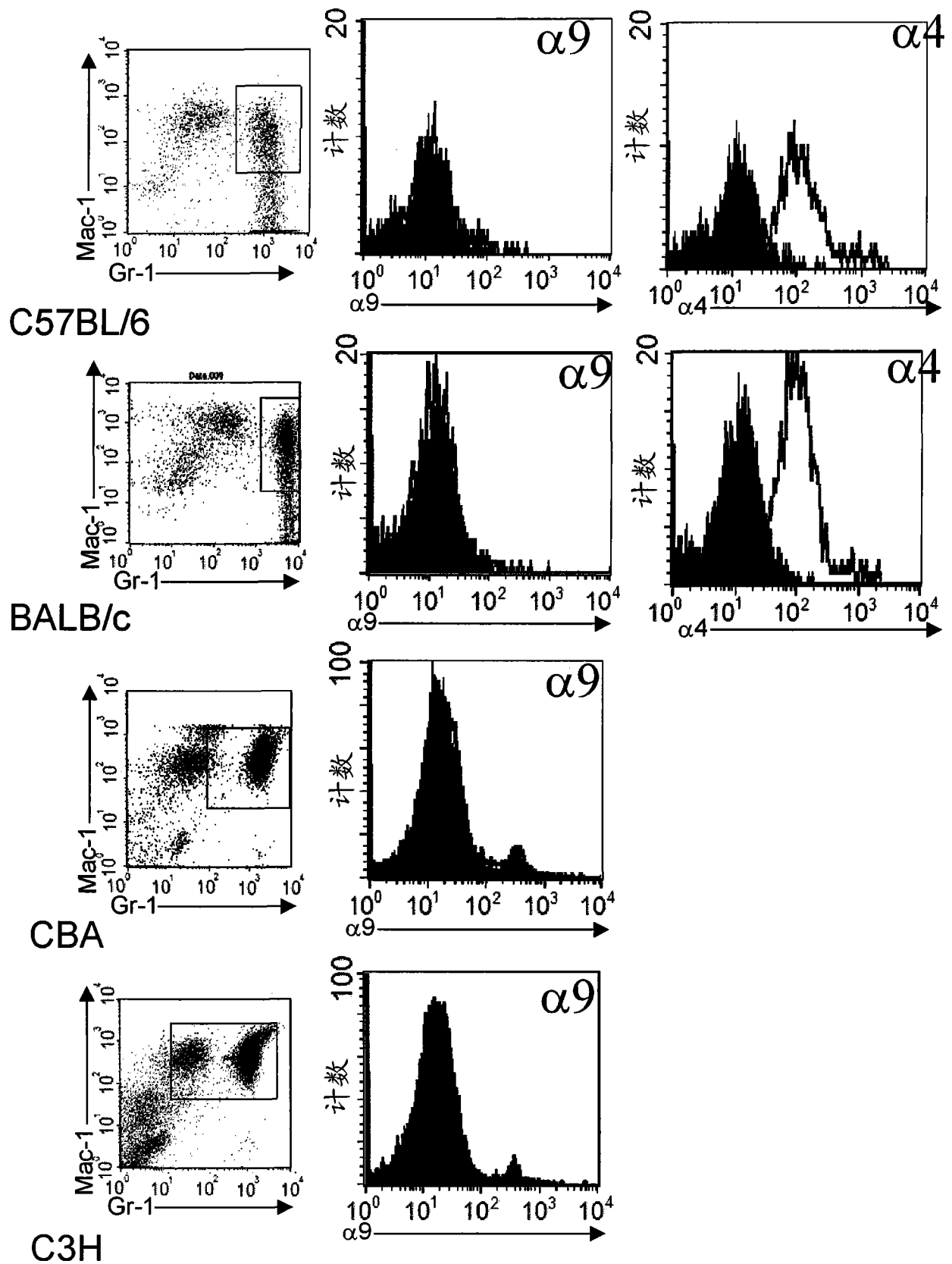
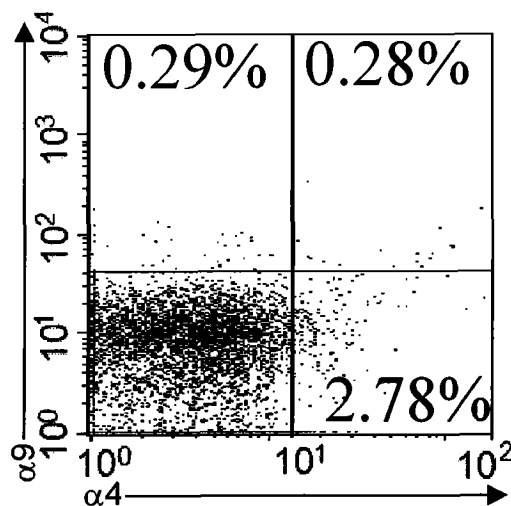
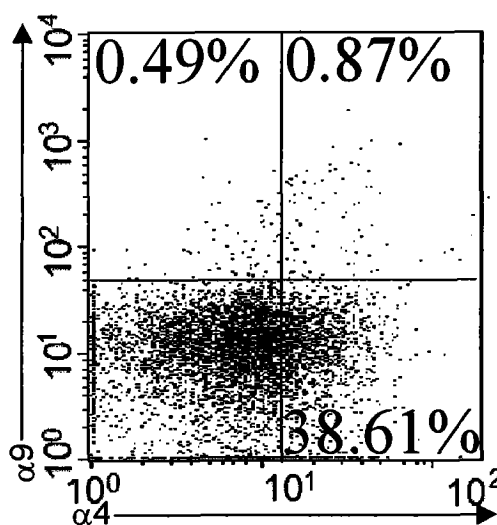


图 10

A
 $\alpha 9$ Ab(-)
 $\alpha 4$ Ab(-)



B
 $\alpha 9$ Ab(-)
 $\alpha 4$ Ab(+)



C
 $\alpha 9$ Ab(+)
 $\alpha 4$ Ab(+)

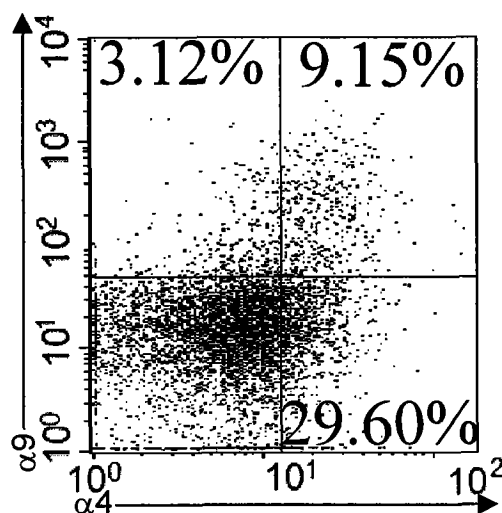
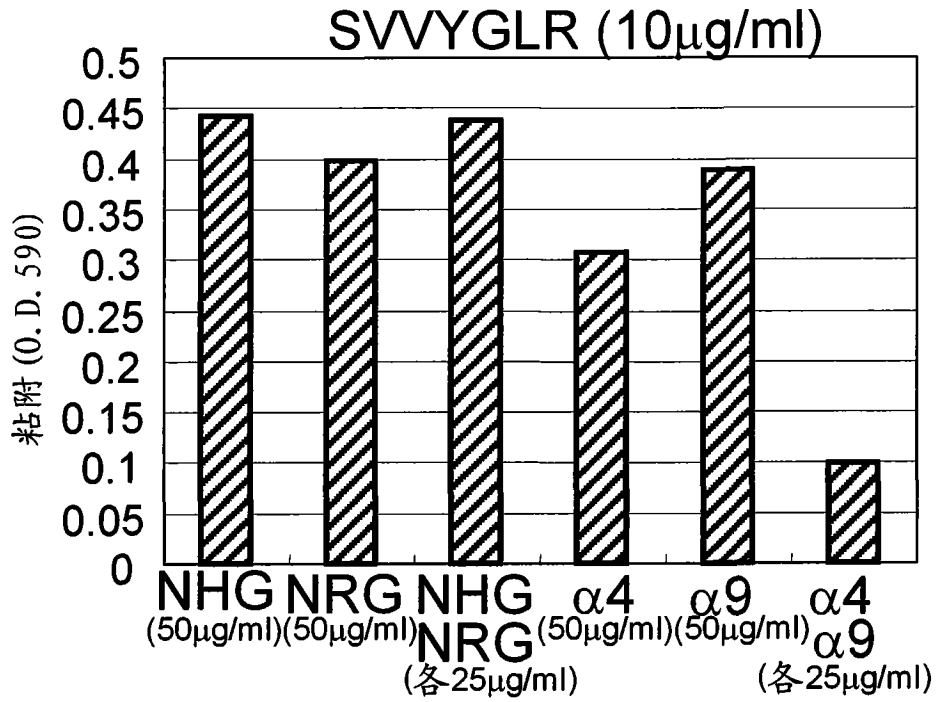


图 11

实验1



实验2

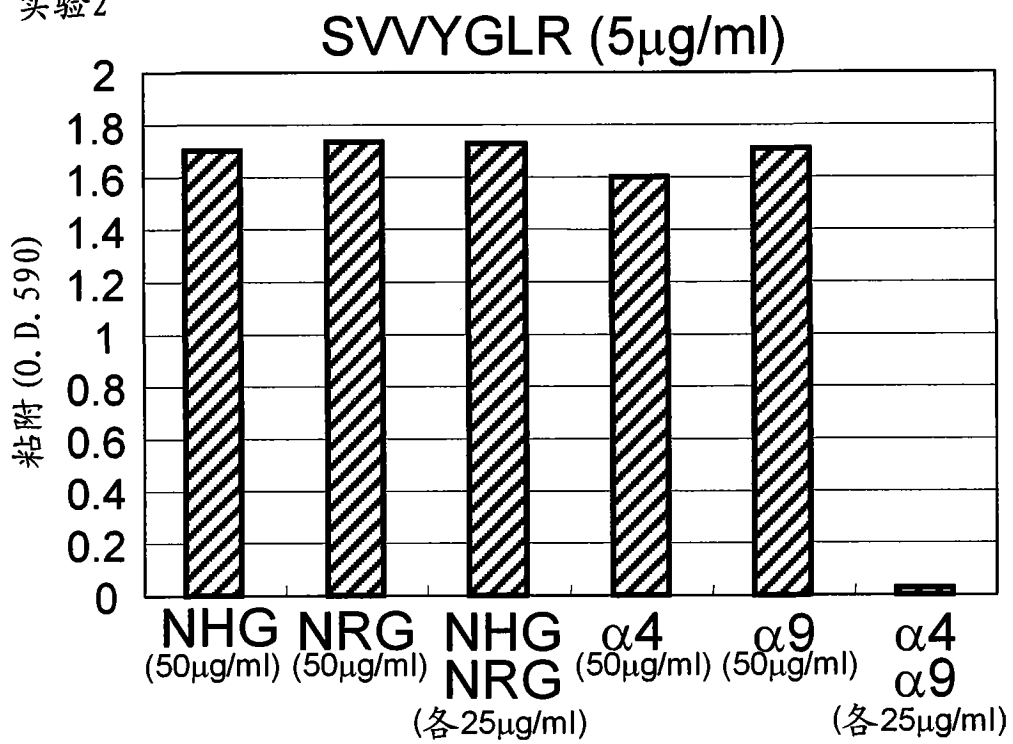


图 12

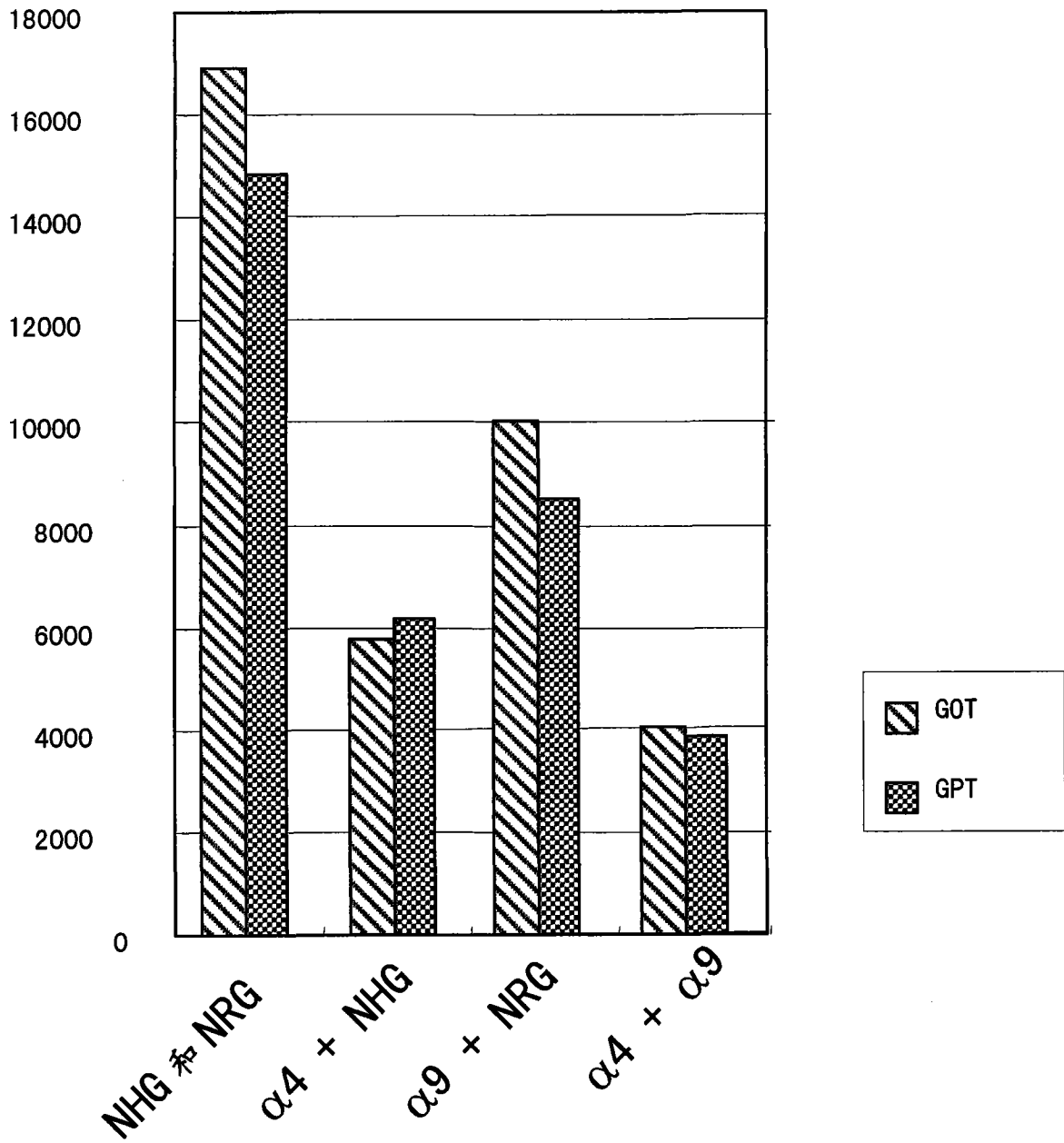
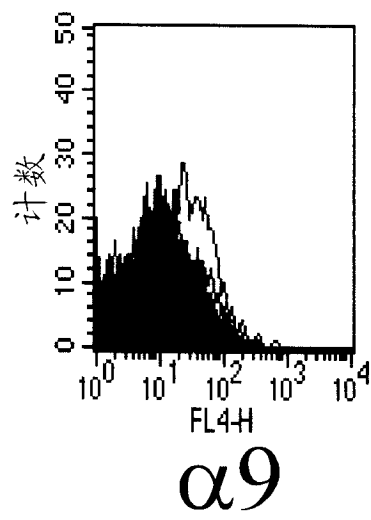
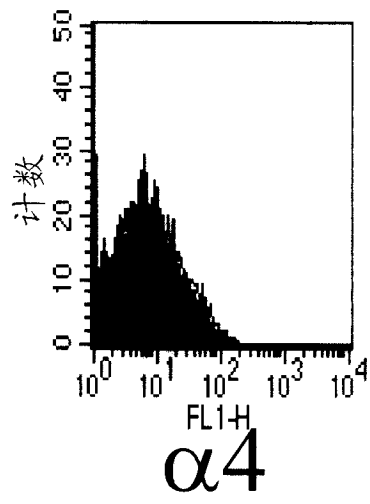


图 13



鬼笔环肽+DAPI

$\alpha 9$ + DAPI

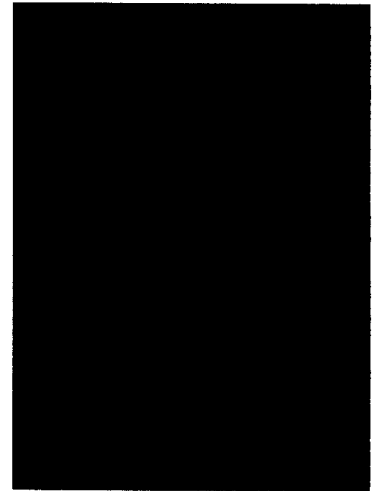
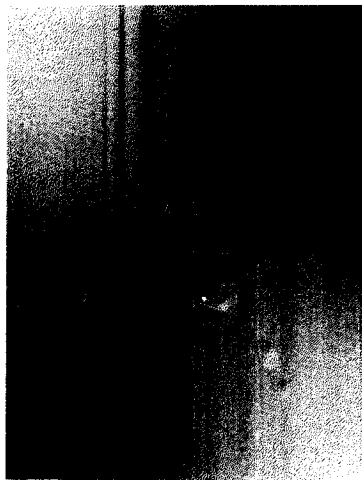


图 14

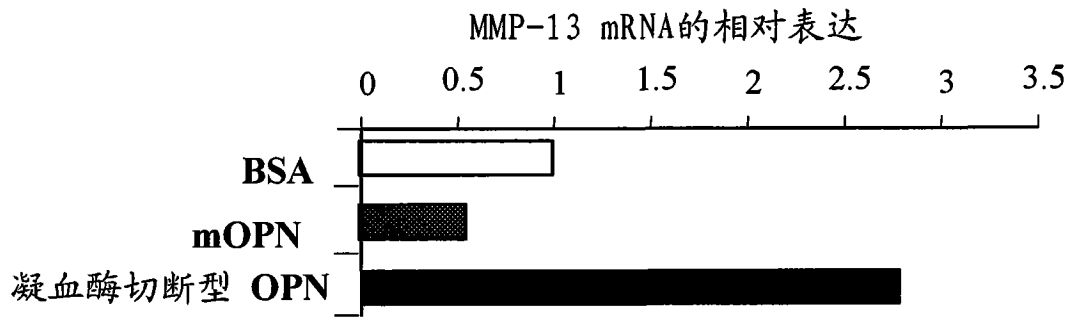


图 15

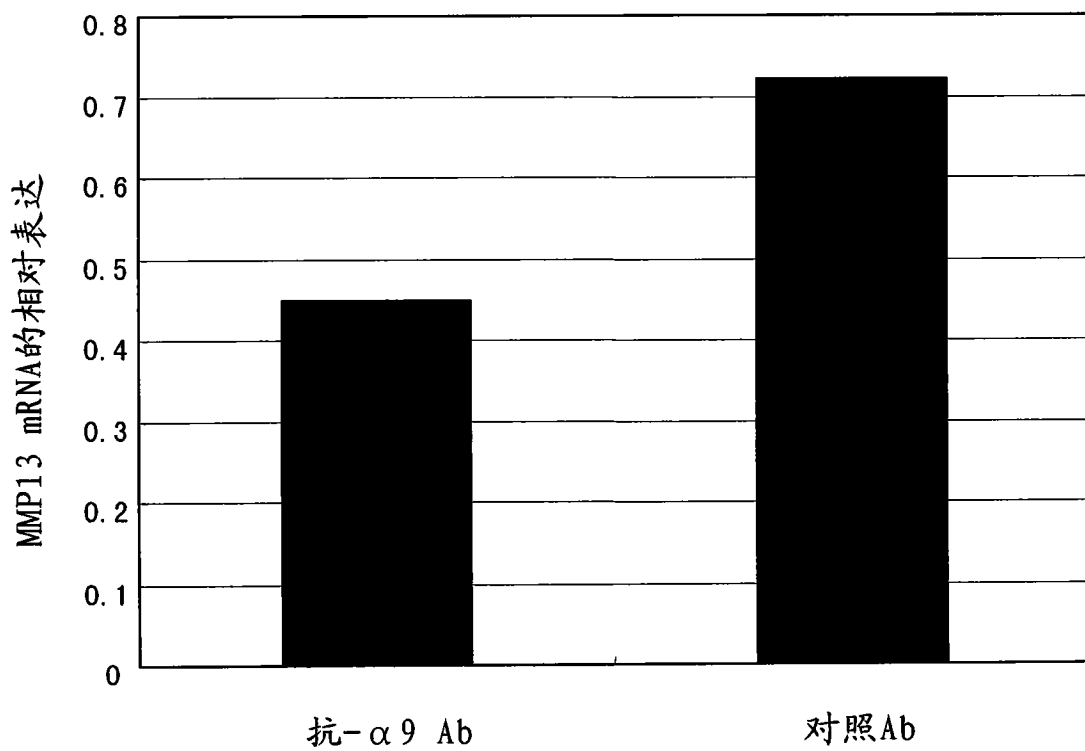


图 16

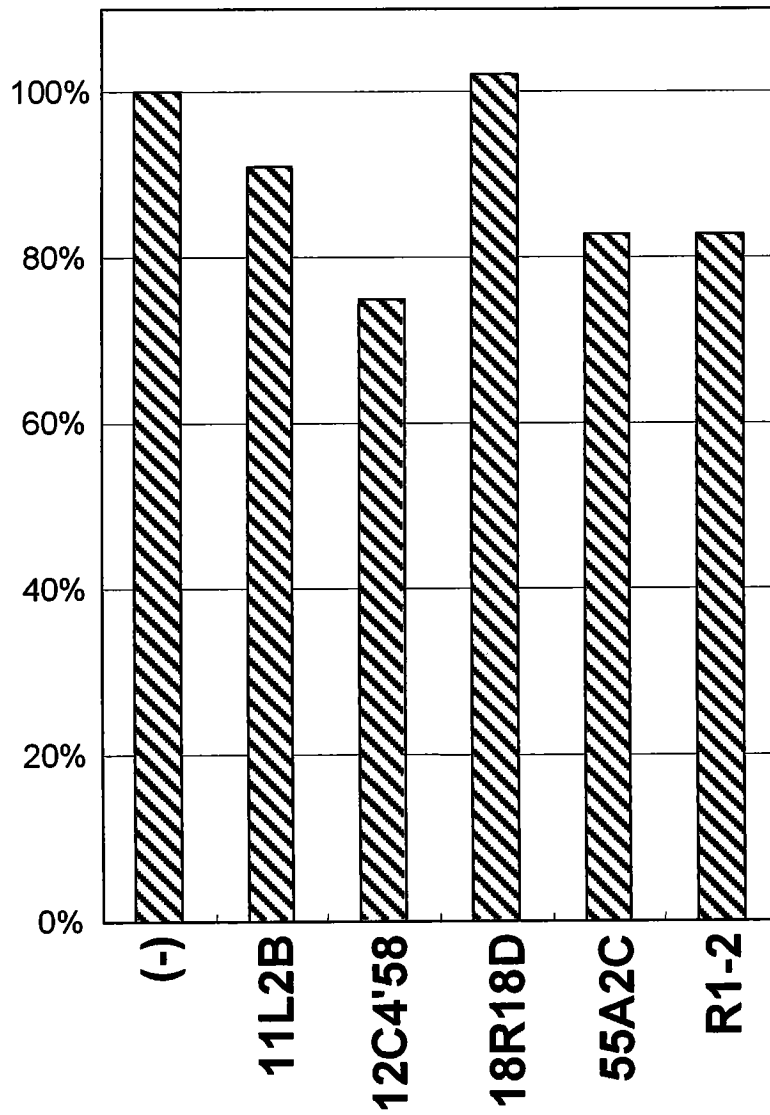


图 17

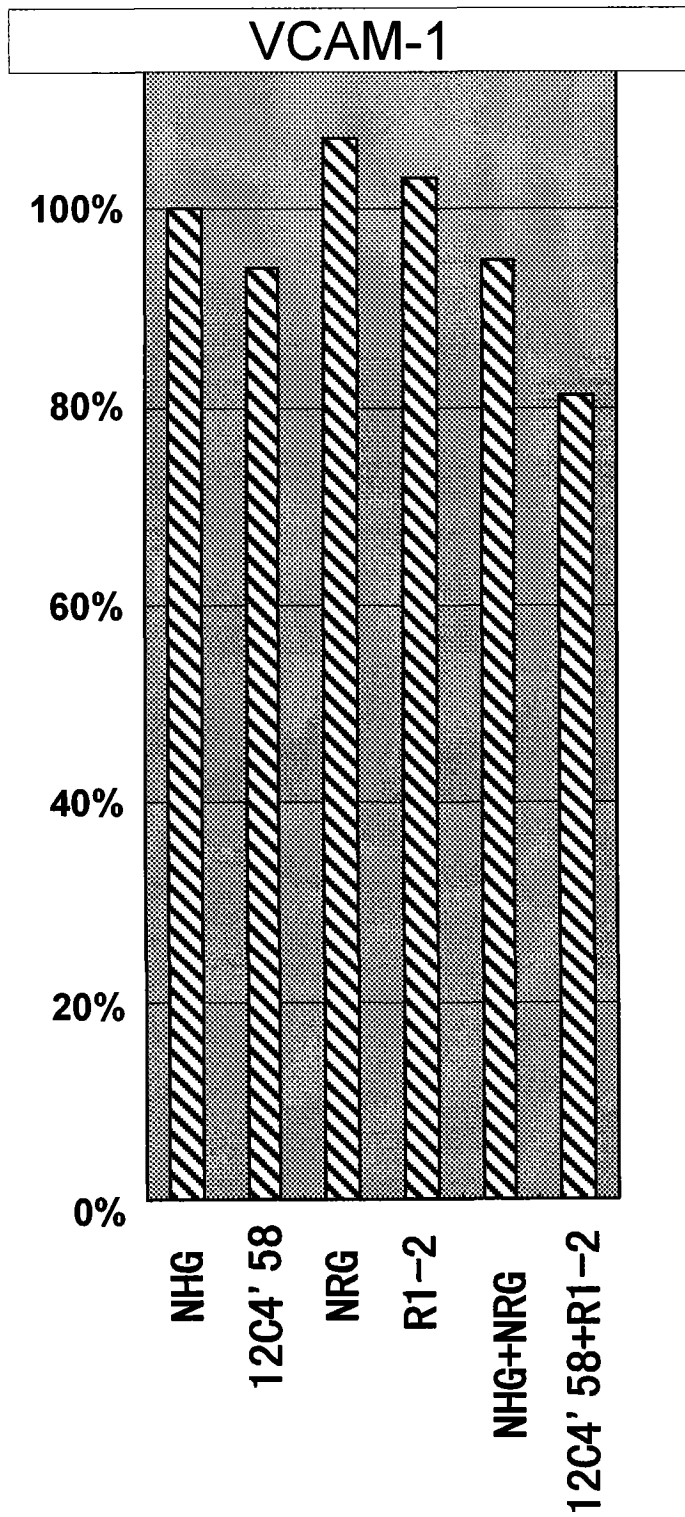


图 18

人 α 9/CHO-K1

Y9A2

1K11

21C5

24I11

25B6

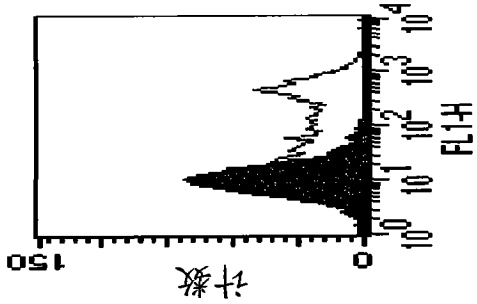
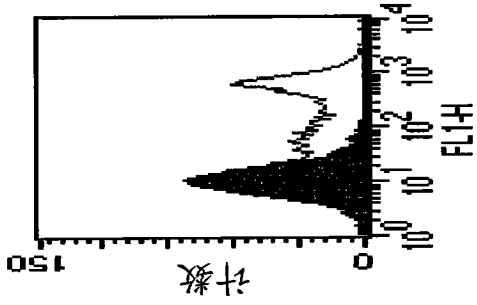
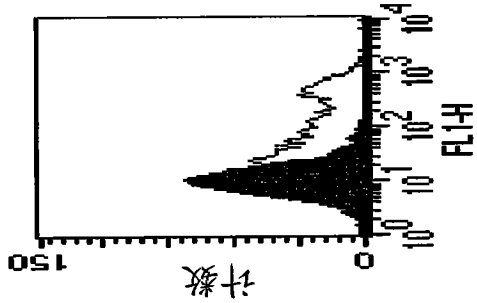
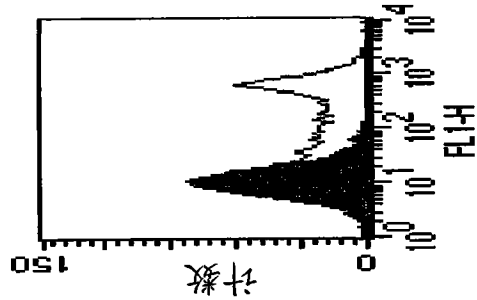
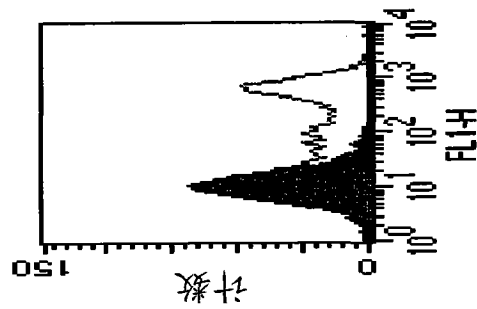


图 19(之一)

人 α 4/CHO-K1

Y9A2

1K11

21C5

24I11

25B6

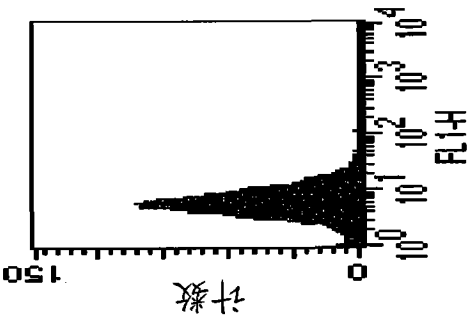
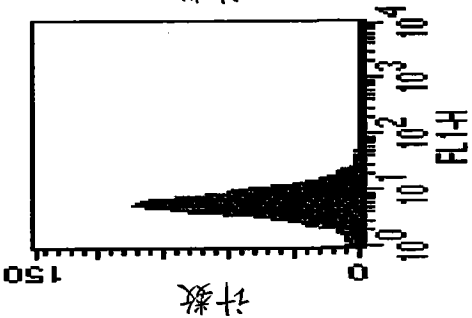
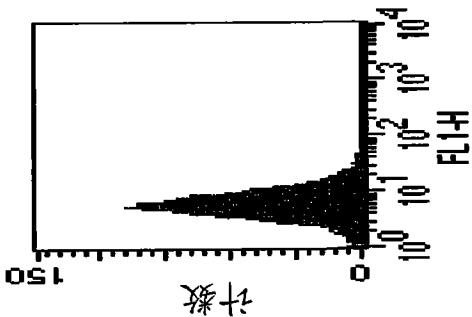
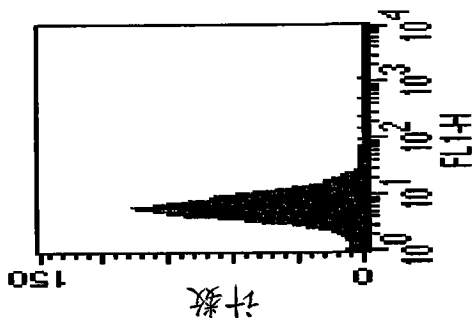
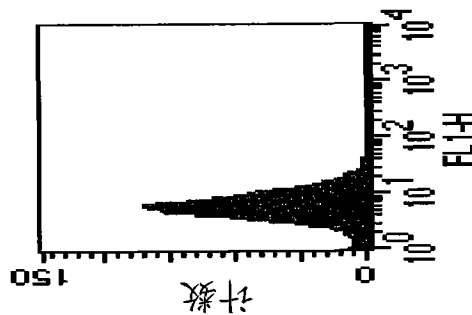


图 19(之二)

嗜中性粒细胞

Y9A2

1K11

21C5

24I11

25B6

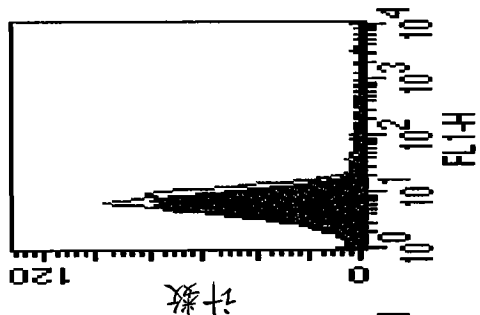
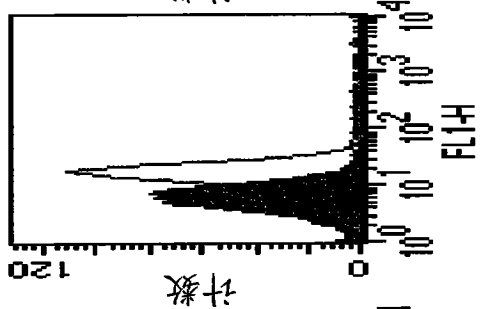
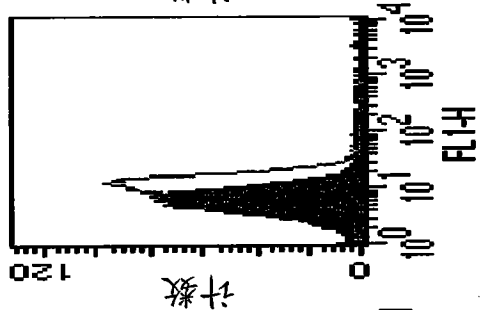
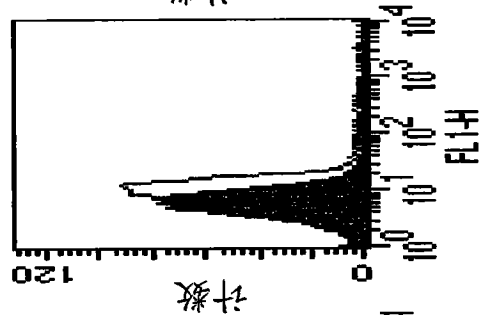
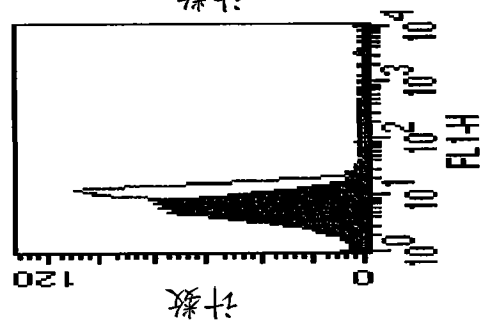


图 19(之三)

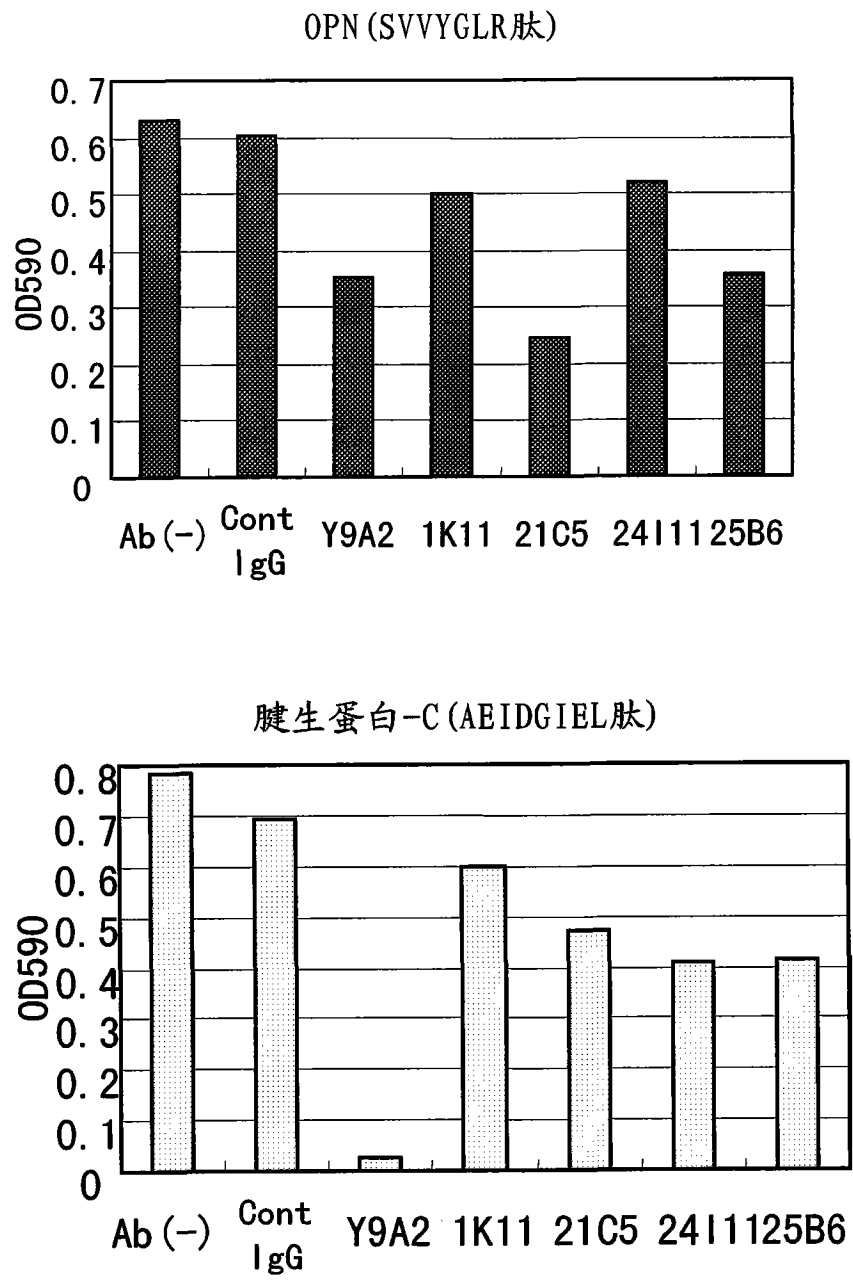


图 20

专利名称(译)	抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体及其用途		
公开(公告)号	CN101103044B	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN200680002252.1	申请日	2006-01-12
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社遗传科技		
申请(专利权)人(译)	株式会社遗传科技		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社遗传科技		
[标]发明人	黑泷大翼 金山刚士 今重之 上出利光		
发明人	黑泷大翼 金山刚士 今重之 上出利光		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K39/395 G01N33/74 G01N2800/32 C07K16/2839 G01N33/6893 G01N33/564 G01N2333/70546 A61K2039/505 G01N33/574 G01N2800/065 C07K2317/73 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00		
代理人(译)	庞立志 李平英		
优先权	2005006348 2005-01-13 JP		
其他公开文献	CN101103044A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供抗小鼠 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体、抗人 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体、产生上述抗体的杂交瘤细胞、上述抗体和杂交瘤细胞的制备方法、含有上述抗体的药物组合物等。本发明的抗 $\alpha 9$ 整联蛋白抗体通过抑制 $\alpha 9$ 整联蛋白功能，对于癌例如癌细胞的增殖、转移、炎症性疾病例如类风湿性关节炎、变形性关节炎、肝炎、支气管哮喘、纤维变性、糖尿病、动脉硬化、多发性硬化症、肉芽肿、炎症性肠疾病(溃疡性结肠炎、克罗恩病)、以及自身免疫性疾病等发挥治疗效果。

