



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103275212 A

(43) 申请公布日 2013.09.04

(21) 申请号 201310153614.9	<i>C12N 15/13</i> (2006.01)
(22) 申请日 2008.01.31	<i>C12N 15/63</i> (2006.01)
(62) 分案原申请数据	<i>C12N 5/20</i> (2006.01)
200810057260.7 2008.01.31	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
(83) 生物保藏信息	<i>C12P 21/08</i> (2006.01)
CGMCC NO. 2311 2007.12.28	<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
CGMCC NO. 2310 2007.12.28	<i>A61K 49/16</i> (2006.01)
(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号	<i>G01N 33/577</i> (2006.01)
(72) 发明人 阎锡蕴 张莹 郑超固 杨东玲	<i>C12R 1/91</i> (2006.01)
冯静 卢迪	
(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任	
公司 11021	
代理人 张莹	
(51) Int. Cl.	
<i>C07K 14/705</i> (2006.01)	
<i>C07K 16/28</i> (2006.01)	

权利要求书1页 说明书15页
序列表21页 附图5页

(54) 发明名称

抗人 CD146 的单克隆抗体,包含其的组合物,
检测可溶性 CD146 的方法

(57) 摘要

本发明是利用生物技术研制出的一组抗人 CD146 分子及建立的高灵敏度夹心 ELISA 检测可溶性 CD146 的方法。本发明包括:抗人 CD146 鼠单克隆抗体 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5 和 AA7,利用抗体组合及夹心 ELISA 特异性检测可溶性 CD146 的方法。这组抗体能够在分子、细胞和组织水平特异性识别人源 CD146,并基于其识别不同表位而分成两类。由抗体 AA1 与另一株抗人 CD146 鼠单抗 AA98 组合的夹心 ELISA 方法能够检测到每毫升纳克量级可溶性 CD146。这些抗体及此种检测手段将成为基础研究或临床应用中有效的检测或诊断的工具及方法,同时也将为与 CD146 相关疾病的靶向治疗提供良好载体。

1. SEQ ID NO :25 所示的氨基酸序列。
2. 一种抗人 CD146 抗体,其特征在于其能够特异性识别权利要求 1 的氨基酸序列,其由保藏号是 CGMCC NO. 2311 的杂交瘤细胞株分泌。
3. 权利要求 2 的抗人 CD146 的抗体在制备用于治疗肿瘤的药物组合物中的应用,其中所述肿瘤是黑色素瘤、肝癌,胰腺癌。
4. 权利要求 2 的抗人 CD146 的抗体在制备用于靶向 CD146 的人体肿瘤的成像定位诊断的诊断剂中的应用。
5. 一种用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含权利要求 2 的抗人 CD146 抗体和药用载体。
6. 分泌抗人 CD146 抗体的杂交瘤细胞株,保藏号分别为 CGMCC NO :2311。
7. 一种编码权利要求 2 所述抗人 CD146 抗体的核酸。
8. 一种包括按照权利要求 7 的核酸的表达载体,其能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸。
9. 一种原核或真核宿主细胞,其包括按照权利要求 8 的载体。
10. 一种制备结合人 CD146 的抗体的方法,其特征是在原核或真核宿主细胞中表达按照权利要求 7 的编码抗体重链的核酸和编码抗体轻链的核酸,并且从所述细胞中回收所述多肽。
11. 权利要求 2 的抗人 CD146 抗体在制备用于检测人 CD146 的诊断剂中的应用,其中所述检测是通过酶联免疫吸附法进行的。
12. 权利要求 11 的应用,其中所述酶联免疫吸附法是夹心酶联免疫吸附法,其中将权利要求 2 的抗人 CD146 抗体的一种或多种作为捕获抗体,将中国专利 ZL991075862 中的鼠单克隆抗体 AA98 作为检测抗体。
13. 权利要求 11 或 12 的应用,其中所述人 CD146 存在于人体液中。
14. 权利要求 12 的应用,其中所述体液是组织液,血清,淋巴液或脑脊液。
15. 权利要求 2 的抗人 CD146 的抗体的衍生物,其中所述衍生物为所述抗体与生物标记物、抗肿瘤药物、毒素、放射活性剂结合的产物,其中所述生物标记物是生物素,辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,异硫氰酸荧光素,藻红素,Cy3,Cy5 或纳米磁珠,所述抗肿瘤药物是卡铂,顺铂或五氟尿嘧啶,毒素是蓖麻毒素或淋巴毒素,放射活性剂是 ¹³¹ 碘,⁹⁰ 钷或放射性铜。

抗人 CD146 的单克隆抗体, 包含其的组合物, 检测可溶性 CD146 的方法

[0001] 本申请是申请号 200810057260.7, 发明名称为“抗人 CD146 的单克隆抗体, 包含其的组合物, 检测可溶性 CD146 的方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于分子生物学和生物技术领域。具体地说本发明涉及一组抗人 CD146 的鼠单克隆抗体, 这组抗体能够在生化、细胞和组织水平特异性识别人源 CD146 蛋白。本发明还涉及一种夹心 ELISA 检测可溶性 CD146 的方法, 在这种检测方法中捕获抗体是本发明中涉及的鼠单克隆抗体, 检测抗体是用生物素标记的发明专利 ZL991075862 中涉及的鼠单克隆抗体 AA98。

背景技术

[0003] CD146, 又名 MUC18, Me1-CAM/MCAM, 是一种属于免疫球蛋白超家族的细胞黏附分子。CD146 胞外有五个免疫球蛋白样结构域 (V-V-C2-C2-C2) (Holness and Simmons 1994), 并被高度糖基化, 介导钙离子非依赖的细胞间相互黏附。

[0004] CD146 最早发现是黑色素瘤的标志分子, 参与黑色素瘤的转移及恶化 (Lehmann, Riethmuller et al. 1989; Sers, Kirsch et al. 1993)。CD146 在黑色素肿瘤中的异常高表达增强了肿瘤细胞之间的黏附, 并对于肿瘤的侵袭和转移非常重要 (Johnson, Rothbacher et al. 1993)。研究表明, CD146 的表达与黑色素瘤细胞的转移能力直接相关, 而在不表达 CD146 的黑色素瘤细胞中过量表达 CD146 可以显著增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力 (Bani, Rak et al. 1996; Shih, Speicher et al. 1997; Xie, Luca et al. 1997)。此外, CD146 也表达在少量的正常组织中, 比如平滑肌, 血管内皮和滋养层等 (Shih 1999)。

[0005] 同时, CD146 也被广泛认为是血管内皮细胞的特异性标志分子 (Bardin, Frances et al. 1996; Bardin, Anfosso et al. 2001)。在之前的研究中, 抗人 CD146 抗体被应用检测血液中的循环内皮细胞 (George, Poncelet et al. 1991; Bardin, George et al. 1996; Solovey, Gui et al. 2001)。由于这一特征, 在伴有内皮损伤、脱落现象的某些疾病中, CD146 可作为疾病进程的参考指标。另有研究表明 CD146 分子还表达于单核细胞, 有报道在激活的 T 淋巴细胞上也有高表达 (Pickl, Majdic et al. 1997)。像其它很多黏附分子一样, 体内 CD146 分子以细胞膜和可溶形式 (soluble CD146, sCD146) 存在 (Neidhart, Wehrli et al. 1999; Bardin, Moal et al. 2003)。研究表明 sCD146 在风湿性关节炎滑液以及慢性肾衰竭患者的血清中的表达水平明显高于正常人。

[0006] 抗人 CD146 抗体在动物实验中体现出了很强的抑制肿瘤生长的治疗效果。Mills 等开发的抗 CD146 全人抗体, ABX-MA1 在裸鼠模型中显著地抑制黑色素肿瘤的生长、侵袭以及向肺部的转移 (Mills, Tellez et al. 2002)。发明专利 ZL991075862 中所述, 开发的抗 CD146 鼠单克隆抗体 AA98 具有抑制肿瘤血管生成的作用, 并在多种裸鼠荷瘤实验中明显抑制肿瘤 (例如肝癌、胰腺癌等) 的生长 (Yan, Lin et al. 2003)。进一步的研究还揭示了

AA98 的抑制肿瘤血管生成的机制是通过抑制 MAPK 磷酸化以及 NF κ B 活化实现的 (Bu, Gao et al. 2006)。

[0007] 虽然抗人源 CD146 的抗体已有一些报道,但是这些抗体对不同的血管内皮组织却有着不同的结合活性。例如 S-endo1 能够结合各种类型的血管的内皮细胞,包括动脉、细动脉、静脉、小静脉、毛细血管、高内皮微静脉和淋巴血管系统等 (George, Poncelet et al. 1991)。而另一株抗 CD146 抗体 MUC18 只结合毛细血管和高内皮微静脉 (Kuzu, Bicknell et al. 1993)。S-endo1 结合脐带静脉内皮组织而 MUC18 不结合 (Bardin, Frances et al. 1996)。此外, P1H12 能够同时结合肿瘤和正常组织的血管内皮细胞 (St Croix, Rago et al. 2000), 而 AA98 却特异性的结合肿瘤组织的血管内皮细胞 (Yan, Lin et al. 2003)。这些证据表明,很可能不同的抗体结合表位在不同的组织和微环境中的暴露情况有所差异。因此,针对 CD146 蛋白上不同表位开发抗体,并研究其对于不同组织的结合能力,对于阐明 CD146 在血管内皮细胞上的功能非常必要。

发明内容

[0008] 本发明利用天然纯化的 CD146 蛋白免疫小鼠,获得杂交瘤细胞。用 ELISA 的方法筛选与重组表达的 CD146 蛋白胞外区有强结合能力的抗体,获得六株抗体,分别命名为 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5 和 AA7,同时获得分泌这些抗体的杂交瘤细胞,依次是 8E8、8F4、A5、G10、H5 ①和 H5 ②。这六株抗体均属 IgG1, κ 亚型。ELISA 和免疫印迹的实验证实了这些抗体和 CD146 分子的特异性结合。

[0009] 利用重组表达的 CD146 蛋白胞外不同的结构域以及免疫印迹的方法,证实 AA1 和 AA2 识别表位 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 24-128) 位于第一个 IgV 结构域,而 AA3、AA4、AA5 和 AA7 识别表位 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 335-400) 位于第二个 IgC2 结构域。因此,这六株抗体依照不同的抗原表位分成两类:V1 类 (包括 AA1 和 AA2) 和 C2-2 类 (包括 AA3、AA4、AA5 和 AA7)。

[0010] 细胞免疫荧光,免疫沉淀及免疫组化实验发现 V1 类抗体能够在分子、细胞及组织水平同时识别天然构象和变性的 CD146 蛋白质,而 C2-2 类抗体只识别变性的 CD146 蛋白质。这证实了不同的抗原表位在不同情况下的暴露有所不同。

[0011] 本发明同时利用 V1 类抗体,如 AA1 和生物素标记的发明专利 ZL991075862 中涉及的鼠单克隆抗体 AA98,开发了一套夹心 ELISA 的方法,用于检测溶液和体液中可溶性 CD146 分子。相比之前提供的商业化检测方法报道 (CyQuant ELISA assay kit, Bioxytex, Marseille, France) 的双抗夹心 ELISA (灵敏度为 10ng/ml), 本发明的夹心 ELISA 方法灵敏度提高了一个数量级,达到 1ng/ml。此方法能够用于人血液及脑脊液中可溶性 CD146 的检测,并在 CD146 表达异常的病症中具有临床诊断应用价值。运用本发明中的方法,发现在系统性血管炎等自身免疫病中,病人血清中的 CD146 分子含量显著升高,对于临床诊断具有指导意义和应用价值。

[0012] 具体地,本发明涉及一种人 CD146 抗原表位,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:24 或 SEQ ID NO:25 所示。

[0013] 在一个实施方案中,本发明涉及一种抗人 CD146 抗体,其特征在于其能够特异性识别上述人 CD146 抗原表位。

[0014] 优选地,所述抗人 CD146 抗体特征在于包括抗体重链和抗体轻链,

[0015] 其中所述抗体重链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO :26 的氨基酸 序列组成的 CDR1, 由 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列组成的 CDR3 组成,

[0016] 所述抗体轻链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列组成的 CDR1, 由 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列组成的 CDR3 组成。

[0017] 更优选地,所述抗体的重链由 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列组成,轻链由 SEQ ID NO :33 的氨基酸序列组成。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种抗人 CD146 抗体,特征在于包括抗体重链和抗体轻链,

[0019] 其中所述抗体重链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO :34 的氨基酸序列组成的 CDR1, 由 SEQ ID NO :35 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO :36 的氨基酸序列组成的 CDR3 组成,

[0020] 所述抗体轻链包括作为 CDR 的由 SEQ ID NO :37 的氨基酸序列组成的 CDR1, 由 SEQ ID NO :38 的氨基酸序列组成的 CDR2 和由 SEQ ID NO :39 的氨基酸序列组成的 CDR3 组成。

[0021] 优选地,所述抗体的重链由 SEQ ID NO :40 的氨基酸序列组成,轻链由 SEQ ID NO :41 的氨基酸序列组成。

[0022] 在本发明的另一方面,还涉及上述抗人 CD146 的抗体在制备用于治疗肿瘤的药物组合物中的应用。优选地,所述肿瘤是黑色素瘤、肝癌,胰腺癌。

[0023] 在本发明的另一个方面,还涉及上述抗人 CD146 的抗体在制备用于靶向 CD146 的人体肿瘤的成像定位诊断的诊断剂中的应用。

[0024] 在另一个方面,本发明还涉及一种组合物,例如用于治疗肿瘤的药物组合物,其包含上述任一方面的抗人 CD146 抗体,和药用载体。

[0025] 用于本文时,“药用载体”包括生理适合的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延缓试剂等。优选地,所述载体适合于静脉内的、肌内的、皮下的、肠胃外的、脊柱的或表皮的施用(例如,通过注射或灌输)。

[0026] 通过许多本领域已知的方法可以施用本发明的组合物。如本领域技术人员将理解,施用路径和/或模式将取决于所需结果而变化。

[0027] 为了通过某些施用路径来施用本发明化合物,用一种材料来包被化合物,或与一种材料共同施用化合物以预防其失活可能是必需的。例如,可以以适当载体,例如脂质体或稀释剂来给受试者施用所述化合物。药用稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。

[0028] 药用载体包括用于即时制备灭菌的可注射溶液或分散体的灭菌水溶液或分散体和灭菌粉末。将这些介质和试剂用于药用活性物质的应用为本领域所知。

[0029] 在用于本文时,短语“肠胃外的施用”和“经肠胃外施用”表示除肠内的和局部施用以外的通常通过注射的施用模式,包括但不局限于,静脉内的、肌内的、动脉内的、鞘内的、囊内的、眶内的、心内的、皮内的、腹膜内的、经气管的、皮下的、表皮下的、关节内的、囊下的、蛛网膜下的、脊柱内的、硬膜外的、胸骨内的注射和灌输。

[0030] 无论选择何种施用路径,通过为本领域技术人员已知的常规方法,将可以以适合的水合形式和/或本发明的药物组合物形式使用的本发明的化合物配制成可药用剂型。

[0031] 对于特定患者、组合物和施用方式,本发明药物组合物的活性成分的实际剂量水平可以变化以获得有效实现理想的治疗反应而不会对患者具有毒性的活性成分的量。选定的剂量水平将取决于许多药物动力学因素,其包括所用的本发明特定组合物的活性,施用的路径,施用的时间,所用的特定化合物的排泄率,治疗的持续时间,与所用的特定化合物结合使用的其它药物、化合物和/或物质,待治疗的患者的年龄、性别、体重、疾病状况、一般健康和以前的疾病史和医学领域众所周知的类似因素。

[0032] 所述组合物必须是无菌且流体的,以到达组合物可以通过注射器进行传递的程度。除了水之外,载体优选是等渗缓冲盐溶液。

[0033] 在另一个方面,本发明还涉及分泌抗人 CD146 抗体的杂交瘤细胞株,保藏号分别为 CGMCC NO :2310 和 CGMCC NO :2311。

[0034] 在另一个方面,本发明还涉及编码能与下面定义的各个另外抗体链一起装配的多肽的核酸,其中所述多肽是下述多肽的任一种

[0035] a) 抗体重链,其为上述所定义的抗体重链之一;

[0036] b) 抗体轻链,其为上述所定义的抗体轻链之一。

[0037] 同时,本发明还涉及包括按照权利要求 11 的核酸的表达载体,其能够在原核或真核宿主细胞中表达所述核酸。以及包括所述表达载体的原核或真核宿主细胞。

[0038] 在本发明的另一个方面,还涉及一种制备结合人 CD146 的抗体的方法,其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达上述编码抗体重链的核酸和编码抗体轻链的核酸,并且从所述细胞中回收所述多肽。

[0039] 在本发明的另一个方面,涉及一种检测人 CD146 的方法,其利用上述的抗人 CD146 抗体,通过酶联免疫吸附法进行。优选地,所述酶联免疫吸附法是夹心酶联免疫吸附法,其中将上述的抗人 CD146 抗体的一种或多种作为捕获抗体,将中国专利 ZL991075862 中的鼠单克隆抗体 AA98 作为检测抗体。更优选地,所述人 CD146 存在于体液中。甚至更优选地,所述体液是组织液,血清,淋巴液或脑脊液。所述体液可采自系统性血管炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症以及格林巴利综合症等自身免疫性疾病病人或/和慢性肾衰等病症的病人。

[0040] 在本发明的另一个方面,还涉及所述抗人 CD146 的抗体的衍生物,其中所述衍生物为所述抗体与生物标记物(如生物素、HRP、碱性磷酸酶、FITC、PE、Cy3、Cy5 等常规荧光染料、纳米磁珠等纳米材料)、抗肿瘤药物(如现有技术已知的卡铂、顺铂、五氟尿嘧啶等)、毒素(如蓖麻毒素、淋巴毒素等)、放射活性剂(如 ¹³¹ 碘、⁹⁰ 钇、放射性铜等)结合的产物。

[0041] 本领域的普通技术人员基于说明书关于抗人 CD146 抗体的教导,结合现有技术的知识,完全可以毫无困难地获得上述衍生物,进而确定衍生物的效果。

[0042] 本发明的创新点在于:(1) 研制了一组针对人 CD146 蛋白的鼠单克隆抗体;(2) 揭示了这组抗 CD146 抗体识别的抗原表位,并证实了识别不同表位的抗体,在分子、细胞及组织水平上对于 CD146 蛋白的结合有显著差别;(3) 开发了一种高灵敏度的夹心 ELISA 方法用于可溶性 CD146 分子的检测。

附图说明

[0043] 图 1 :AA1-AA7 特异识别重组人源 CD146 分子胞外区段蛋白。

[0044] 图 2 :各种 CD146 胞外重组蛋白示意图。

[0045] 图 3 :AA1-AA5 和 AA7 的抗原表位鉴定。上图是 D1-D5 的蛋白电泳图。下图是分别利用 AA1-AA5 和 AA7 进行免疫印迹实验检测其与 D1-D5 的结合能力。

[0046] 图 4 :AA1-AA5 和 AA7 在免疫印迹中识别还原和非还原 CD146 蛋白。泳道 1-6 是非还原的 A375 细胞裂解液,泳道 7-12 是还原的 A375 细胞裂解液。

[0047] 图 5 :AA1-AA5 和 AA7 用于流式细胞术的 CD146 分子检测。图中 mIgG 作为阴性对照。只有 AA1 和 AA2 识别活细胞中的 CD146 分子。

[0048] 图 6 :AA1-AA5 和 AA7 用于细胞免疫荧光实验检测细胞膜上 CD146。AA98 作为实验的阳性对照, mIgG 作为实验的阴性对照。只有 AA1 和 AA2 以及 AA98 能够结合细胞膜上 CD146,箭头仅示其中之一。

[0049] 图 7 :AA1-AA5 和 AA7 用于免疫沉淀实验捕获细胞裂解液中的 CD146。泳道 1-7 是分别用 mIgG, AA1-5 及 AA7 进行免疫沉淀捕获的蛋白复合物,泳道 8 是细胞裂解上清,作为阳性对照,用 AA98 进行免疫印迹检测。

[0050] 图 8 :AA1-AA5 和 AA7 进行冰冻切片免疫组化实验检测组织水平的 CD146 分子。AA98 作为实验的阳性对照, CD31 用于标记血管内皮细胞(如箭头所示)。如箭头所示,只有 AA1 和 AA2 能够结合冰冻切片上组织水平的 CD146 分子。

[0051] 图 9 :夹心 ELISA 检测 5ng/ml-320ng/ml 标准样品的标准曲线。

[0052] 图 10 :夹心 ELISA 检测 5ng/ml-80ng/ml 标准样品的标准曲线,及拟合方程。

[0053] 图 11 :HMV6g 载体的图谱,其含有 MBP-His 标签。

[0054] 杂交瘤细胞株 8E8 和 G10(其分别分泌抗体 AA1 和 AA4)于 2007 年 12 月 28 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC,北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所 100101),分类命名为小鼠单克隆抗体杂交瘤细胞,保藏号分别为 CGMCC No. 2310 和 CGMCC No. 2311。

具体实施方式

[0055] 下面通过实施例详细描述本发明。本领域的普通技术人员可以理解,下述实施例仅是用于举例说明的目的。本发明的精神和范围由后附的权利要求所限定。

[0056] 实施例 1 :单克隆抗体 AA1-AA5 和 AA7 的制备及鉴定。

[0057] 应用杂交瘤技术(Kohler and Milstein 1975; Yeh, Hellstrom et al. 1979; Yeh, Hellstrom et al. 1982)产生并筛选获得抗体 AA1-AA6 和 AA7。简述如下:从人脐带静脉内皮细胞中分离天然 CD146 蛋白(其氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示),按照(Yan, Lin et al. 2003)描述的单克隆抗体 AA98 抗原纯化方法纯化,将其作为免疫原对 BALB/C 小鼠(北京实验动物中心)进行免疫接种,每次腹膜内注射 100 μg 蛋白/鼠,每两星期一次,共三次。取脾细胞之前加强免疫一次,腹膜内注射 100 μg 蛋白/鼠。加强免疫之后三天,取脾脏,并将脾细胞悬浮于 RPMI 培养基中。在聚乙二醇(PEG)存在下,将脾细胞和 SP2/0-Ag14 鼠骨髓瘤细胞(ATCC)进行融合,并用 HAT 选择性培养基对杂交瘤进行筛选。

[0058] 运用酶联免疫吸附(ELISA)的方法筛选能够大量产生高亲和力的抗人 CD146 抗体的杂交瘤细胞克隆。使用重组表达的 CD146 分子胞外区蛋白, rhCD146(序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置氨基酸 24-552)作为包被抗原,检测杂交瘤细胞培养上清。具

体的做法是,首先在 ELISA 板上过夜包被 $50 \mu\text{l}$ $1 \mu\text{g/ml}$ rhCD146 蛋白,用 PBS 洗三遍。加入 2% 牛血清白蛋白 (Ameresco) 封闭 1 小时。然后先后加入分泌抗体的杂交瘤培养上清、酶标抗体 (1 : 5000 稀释的羊抗鼠 HRP, Santa Cruz) 和底物 (200ng/ml TMB (Ameresco), 0.03% H_2O_2 (北京化学试剂公司), pH4.5), 进行 ELISA 筛选。通过三轮筛选获得了六个分泌高亲和力抗体的杂交瘤细胞株 8E8、8F4、A5、G10、H5 ①和 H5 ②,其分泌的抗体分别对应命名为 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5 和 AA7。将杂交瘤细胞株 8E8 和 G10 (其分别分泌抗体 AA1 和 AA4) 于 2007 年 12 月 28 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC, 北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所 100101), 分类命名为小鼠单克隆抗体杂交瘤细胞, 保藏号分别为 CGMCC No. 2310 和 CGMCC No. 2311。而杂交瘤细胞株 AA6 是 ELISA 筛选时的阴性杂交瘤克隆, 与 CD146 结合能力很弱。

[0059] 分别大量培养扩增杂交瘤细胞 8E8、8F4、A5、G10、H5 ①和 H5 ②, 分别收集含有 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5 和 AA7 抗体的培养上清用于抗体功能鉴定。另外分别将杂交瘤细胞 8E8、8F4、A5、G10、H5 ①和 H5 ②用无血清 RPMI-1640 培养基制成细胞悬液, 用于制备抗体腹水。腹水的制备方法简述如下: 六周龄 BALB/C 小鼠腹腔注射降植烷 (Sigma) 0.5ml/只。10 天后, 将杂交瘤细胞悬液 1×10^6 个/ml 接种于 BALB/C 小鼠腹腔, 0.5ml/只, 约十天后, 收集腹水, 离心取上清。

[0060] 通过蛋白 A 亲和层析, 从培养上清或腹水中纯化单克隆抗体 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5 和 AA7。将纯化单克隆抗体无菌过滤, 并冷藏或冷冻保存。

[0061] 应用 BD Pharmingen 公司鼠抗体亚型鉴定试剂盒 (目录号 550487), 将发明专利 ZL991075862 中所述 AA98 (下同) 作为实验阳性对照, ELISA 方法鉴定出抗体 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5 和 AA7 均属于 IgG1 亚型, 如表 1 所示。

[0062] 表 1 抗体 AA1、AA2、AA3、AA4、AA5、AA7 和 AA98 抗体分型

[0063]

抗体	重链亚型	轻链亚型
AA1	IgG1	κ
AA2	IgG1	κ
AA3	IgG1	κ
AA4	IgG1	κ
AA5	IgG1	κ
AA7	IgG1	κ
AA98	IgG2a	κ

[0064] ELISA 方法用于鉴定纯化的 AA1-AA5 和 AA7 六种抗体对于 CD146 蛋白的结合特异性。原核表达的 6xHis-tag 融合的 His-rhCD146 (由 6xHis-tag 和序列为 SEQ ID NO :1 的人 CD146 序列中的位置 24-552 的氨基酸组成) 以及真核表达的碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, 简称 AP, 其序列如 SEQ ID NO :3 所示) 融合的 sCD146-AP (由序列为 SEQ ID NO :1 的人 CD146 序列中的位置 24-559 的氨基酸和序列为 SEQ ID NO :3 的 AP 以及序列为 SEQ ID NO :42 的连接区组成) 分别在实验中被用作包被抗原 (它们的结构示意图参见图 2)。

[0065] 其中, His-rhCD146 制备方法简要介绍如下: 将人 CD146 的 cDNA 序列 (SEQ ID NO :2) 中位置 70-1656 的核苷酸克隆至 pET28b (Novagen) 载体上, 利用限制性内切酶 NdeI 和 NotI (NEB 提供) 及引物 5' -AAC ATA TGG TGC CCG GAG AGG CTG AGC AG-3' (SEQ ID

NO:4) 和 5' -AAG CGG CCG CCA GCT TTC TCT CTG TGG AG-3' (SEQ ID NO:5)。在 E. Coli BL21DE3 (Invitrogen) 菌株中表达,以包含体形式存在,洗涤及复性后获得所需抗原。蛋白表达及包涵体洗涤方法见下述 D1, D2 及 D4 蛋白表达及包涵体洗涤方法。

[0066] 包涵体复性步骤如下:

[0067] 1. 将溶解的包涵体蛋白调浓度至 1mg/ml,共 1ml 装入透析袋中,外液以 140ml 6M 脲素,200mM 精氨酸,25mM Tris(pH8.0),150mM NaCl,2mM 还原型谷胱甘肽 (GSH),1mM 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 4℃ 静置透析过夜。

[0068] 2. 倒出上述 50ml 透析外液,补入 50ml 稀释液【600mM 精氨酸,25mM Tris(pH8.0),150mM NaCl,2mM GSH,1mM GSSG.】。此时外液的的尿素浓度为 4M。4℃ 透析 6 小时。

[0069] 3. 倒出 75ml 透析外液,补入 75ml 稀释液,尿素终浓度为 2M。4℃ 透析 6 小时。

[0070] 4. 配 200ml 400mM 精氨酸,25mM Tris,150mM NaCl,2mM GSH,1mM GSSG,透析过夜。尿素浓度为 0M,精氨酸浓度为 400mM。

[0071] 5. 倒出 100ml 透析外液,补入 100ml 25mM Tris,150mM NaCl。终溶液为 200mM 精氨酸,25mM Tris,150mM NaCl,1mM GSH,0.5mM GSSG。4℃ 透析 6 小时。

[0072] 6. 重复步骤 5。

[0073] 7. 以 900ml 25mM Tris 150mM NaCl 透析过夜。

[0074] 8. 换新鲜 1L 25mM Tris 150mM NaCl 透析 6 小时。

[0075] 9. 测定蛋白含量,SDS-PAGE 法检测。浓度可达 500 μ g/ml 以上。可通过超滤或 Ni-NTA 亲和层析进一步浓缩。透析用化学试剂均由 Sigma 公司提供。)

[0076] sCD146-AP 的制备过程简单如下:融合蛋白的编码核苷酸序列 (SEQ ID NO:6) 用 XbaI 和 EcoRI (NEB) 克隆在 pCMV-SPORTS6 载体 (Open Biosystems 提供) 上,含有插入片段的质粒利用 Fugene6 (Roche) 转染试剂瞬时转染至 293T 细胞 (ATCC) 中,细胞培养上清按照 (Yan, Lin et al. 2003) 描述的单克隆抗体 AA98 抗原纯化方法纯化,获得 sCD146-AP 融合蛋白。

[0077] 利用 ELISA 检测抗体与重组蛋白的结合,简单的方法如下。

[0078] 1) 制备 Trx-His (其氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示):按照实施例 2 中关于表达 D3 和 D5 蛋白的方法,即将 pET32a (Novagen) 转化 B121 (DE3) 感受态细胞,利用 IPTG 诱导表达,经 Ni 柱纯化。用 Thrombin 蛋白酶 (15U 酶/mg 蛋白, Sigma 提供) 4℃ 酶解过夜,之后再 用 Ni-NTA 纯化带着 6xHis 标签的 Trx-His,方法与实施例 2 中纯化 D3 和 D5 蛋白类似。

[0079] 2) 制备 MBP-His (其氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示):按照实施例 2 中关于表达 D3 和 D5 蛋白的方法,即将 HMV6g 载体 (载体图谱如图 11 所示) 转化 B121 (DE3) 感受态细胞,利用 IPTG 诱导表达,经 Ni 柱纯化。用 Tev 蛋白酶 (1 μ g 酶/mg 蛋白, Invitrogen 提供) 4℃ 酶解过夜,之后再 用 Ni-NTA 纯化带着 6xHis 标签的 MBP-His,方法与实施例 2 纯化 D3 和 D5 蛋白类似。

[0080] 3) 在 ELISA 板上不同孔上分别包被 1 μ g/ml 抗原 (His-rhCD146, sCD146-AP, Trx-His 和 MBP-His), 50 μ l/孔, 4℃ 包被过夜;用 2% BSA/PBS (Ameresco) 室温封闭 2 小时,之后用 1:2000 稀释的抗体 (制备的腹水 AA1-5 和 AA7) 50 μ l/孔室温在板上孵育 2 小时,接着用 PBST 洗 5 遍, PBS 洗 1 遍。二抗用 1:5000 稀释的 HRP 偶联羊抗鼠 IgG (Santa Cruz) 室温孵育 1 小时, PBST 洗 5 遍, PBS 洗 1 遍。用 TMB 底物 (200ng/ml TMB (Ameresco),

0.03% H₂O₂ (北京化学试剂公司), pH4.5) 100 μl/孔显色, 硫酸终止。结果如图 1 所示, AA1-AA5 及 AA7 都能很强的结合重组表达的 CD146 蛋白胞外区: His-rhCD146 和 sCD146-AP, 然而却不结合 6xHis-tag 融合的硫氧还蛋白 (Trx-His) 和 6xHis-tag 融合的甘露糖结合蛋白 (MBP-His)。这证实了这六株抗体均特异性识别 CD146 蛋白而不是 His-tag。其中使用的 AA6 作为实验的阴性对照。

[0081] 实施例 2: 单克隆抗体 AA1-AA5 和 AA7 的抗原表位鉴定。

[0082] 运用分别重组表达的人源 CD146 胞外区五个结构域蛋白以及免疫印迹的方法, 鉴定了本发明中所述的六株抗体的抗原表位。

[0083] 如图 2 所示, 结构域 1-5 分别表示 CD146 从胞外到跨膜区的 V-V-C2-C2-C2 五个结构域。重叠的序列被设计来防止可能的表位丢失。结构域 1 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 24-145 的氨基酸, 如 SEQ ID NO:9 所示) 克隆在 pET30a (Novagen) 上, 表达出来的是 His6-S tag 融合 His6-S-D1 蛋白。结构域 2 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 128-248 的氨基酸, 如 SEQ ID NO:10 所示)、结构域 3 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 233-335 的氨基酸, 如 SEQ ID NO:11 所示)、结构域 4 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 313-442 的氨基酸, 如 SEQ ID NO:12 所示) 以及结构域 5 (序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 400-560 的氨基酸, 如 SEQ ID NO:13 所示) 分别克隆在 pET32a (Novagen) 上, 表达出来的分别是 Trx-His6-S tag 融合的 Trx-His6-S-D2, Trx-His6-S-D3, Trx-His6-S-D4 和 Trx-His6-S-D5。

[0084] 克隆过程简述如下: 用相应的一对引物 D1S 和 D1A (用于结构域 1), D2S 和 D2A (用于结构域 2), D3S 和 D3A (用于结构域 3), D4S 和 D4A (用于结构域 4), D5S 和 D5A (用于结构域 5), 及模板 pcDNA3.1(-)b-CD146 (通过将序列如 SEQ ID NO:2 所示来源于 Johnson, J.P. 实验室的 CD146cDNA 利用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I (NEB) 克隆至 pcDNA3.1(-)b 载体 (Invitrogen) 而获得) 作 PCR 反应, 条件为 95°C 5 分钟; 95°C 45 秒, 56°C 40 秒, 72°C 50 秒, 30 个循环; 72°C 5 分钟。分别扩增出编码结构域 1-5 的核苷酸序列。

[0085] 引物列表如下, 正义链引物带有 Nco I 酶切位点 (如下划线所示), 反义链引物带有 Hind III 酶切位点 (如下划线所示):

[0086]

引物名称	引物序列 5'至 3'
D1S	5' catg <u>CCATGGT</u> GCCCGGAGAGGCTGAG 3'(SEQ ID

[0087]

	NO:14)
D1A	5' <u>AAGCTT</u> ttaGGGGTTGACCTGGATGTTTGGC 3' (SEQ ID NO:15)
D2S	5' <u>CCATGG</u> gtATCCAGCTCCGCGTCTACAAAG 3' (SEQ ID NO:16)
D2A	5' <u>AAGCTT</u> ttaCGGGTAGAAAACAGGGACGGTG 3' (SEQ ID NO:17)
D3S	5' <u>CCATGG</u> gtAACCACATGAAGGAGTCCAGGGAAG 3' (SEQ ID NO:18)
D3A	5' <u>AAGCTT</u> ttaTGGTTCCTCAGCAGCGATATCATG 3' (SEQ ID NO:19)
D4S	5' <u>CCATGG</u> aaCACAGTGGGCGCTATGAATG 3' (SEQ ID NO:20)
D4A	5' <u>AAGCTT</u> ttaCACCCACACCTTCCTCTCCTTG 3' (SEQ ID NO:21)
D5S	5' <u>CCATGG</u> gagGCAGGAGGCGGCTATCG3'(SEQ ID NO:22)
D5A	5' <u>AAGCTT</u> ttaGACCACGCCCCGGCTCTC 3' (SEQ ID NO:23)

[0088] PCR产物用2%琼脂糖凝胶(Biowest Agarose)分离,用Tiangen公司提供的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(产品编号:DP209-03)回收PCR产物,然后用Takara公司提供的pMD18T-simple kit将片段连接到T载体(试剂盒内提供了载体和酶)上,并转化Top10感受态细胞(Tiangen提供)。加有氨苄青霉素的LB培养板上长出来的单克隆D1-T(插入了结构域1的核苷酸序列),D2-T(插入了结构域2的核苷酸序列),D3-T(插入了结构域3的核苷酸序列),D4-T(插入了结构域4的核苷酸序列)和D5-T(插入了结构域5的核苷酸序列),用带有氨苄青霉素的LB培养基培养37℃过夜,并用Tiangen提供的质粒小提试剂盒(产品编号:DP103-03)抽提质粒,用Nco I和Hind III(NEB)双酶切pET30a、pET32a、提取的质粒(即分别插入了结构域1-5的核苷酸序列的T载体)。之后用2%琼脂糖凝胶(Biowest Agarose)分离,用Tiangen公司提供的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(产品编号:DP209-03)回收T载体的酶切小片段(即结构域1-5的核苷酸序列)及pET30a和pET32a酶切开的质粒片段。D1-T的酶切小片段与pET30a酶切开的质粒片段连接,D2-T,D3-T,D4-T及D5-T的酶切小片段与pET32a酶切开的质粒片段连接,用NEB公司提供的T4DNA连接酶建立连接反应,16℃连接过夜。转化Top10感受态细胞(Tiangen),pET30a-D1用含卡那霉素(50ng/ml)的半固体LB培养板筛选,pET32a-D2,pET32a-D3,pET32a-D4,和pET32a-D5用含

氨基霉素 (100ng/ml) 的半固体 LB 培养板筛选。过夜培养获得的单克隆分别用含有抗生素的 LB 培养基培养,并抽提质粒,获得的质粒用于转化 B121 (DE3) 感受态细胞 (Tiangen)。

[0089] 重组蛋白 His6-S-D1, Trx-His6-S-D2, Trx-His6-S-D3, Trx-His6-S-D4 和 Trx-His6-S-D5 的诱导表达:转化了 pET30a-D1, pET32a-D2, pET32a-D3, pET32a-D4, 和 pET32a-D5 的 B121 (DE3) 单克隆,在含有相应抗生素的 5ml LB 培养液中 37°C 培养过夜。过夜菌 1:100 接种至相应新鲜的培养基中 37°C 培养,待细菌生长至 OD600 为 0.6 时,加入 1mM IPTG (Ameresco) 37°C 诱导表达 6 小时或者 0.2mM IPTG 16°C 诱导过夜。

[0090] D1, D2 和 D4 由 IPTG 诱导表达之后,呈现包涵体状态,不可溶。包涵体纯化和洗涤方法如下:菌体重悬于 25mM Tris-HCl (pH7.4), 300W 超声 2x99 个循环,每个循环超声 4 秒,暂停 8 秒,共 12 秒。4°C 12000g 离心 30 分钟。包涵体沉淀重悬于溶液 1 (2.5M NaCl) 中,4°C 搅拌 30 分钟,4°C 12000g 离心 30 分钟。包涵体沉淀重悬于溶液 2 (0.5% Triton X-100, 10mM EDTA, pH8.0) 中,4°C 搅拌 30 分钟,4°C 12000g 离心 30 分钟。包涵体沉淀重悬于溶液 3 (2M Urea, 50mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0) 中,4°C 搅拌 30 分钟,4°C 12000g 离心 30 分钟。随后,包涵体溶解在溶液 4 (8M Urea, 25mM Tris, 150mM NaCl, 25mM DTT, pH8.0) 中。

[0091] D3 和 D5 由 IPTG 诱导表达之后,呈现可溶状态,用 Ni 柱纯化。具体方法如下:菌体重悬于 25mM Tris-HCl (pH7.4), 300W 超声 2x99 个循环,每个循环超声 4 秒,暂停 8 秒,共 12 秒。4°C 12000g 离心 30 分钟,收集上清,过 0.45mm 滤膜去除杂质。Ni-NTA sepharose 6 Fast Flow (GE Health Care) 填柱,用超纯水洗涤后,在 50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl 的平衡溶液中平衡。然后将含有 His6-tag 的蛋白的离心可溶上清上样挂柱,用洗涤溶液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 50mM 咪唑) 洗柱。最后洗脱溶液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 300mM 咪唑) 洗脱柱上的蛋白。

[0092] 利用免疫印迹实验鉴定 AA1-AA5 及 AA7 所识别的抗原表位。简单过程如下:用 15% SDS-PAGE 分离原核表达纯化的 D1-D5 蛋白,然后用 Bio-rad 半干转印仪将胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上。用溶解在 PBST 中的 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 小时,然后用上述 5% 脱脂牛奶 /PBST 稀释 (1:2000) 的一抗溶液 (AA1-AA5 及 AA7) 4°C 孵育过夜。接着 PBST 洗 5 遍,用上述 5% 脱脂牛奶 /PBST 稀释 (1:2000) 的二抗 (辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 抗体, Pierce) 溶液室温孵育 1 小时。PBST 洗 5 遍之后,用 Pierce 公司的显色底物 (产品编号:34076, 400 μ l 13% H₂O₂+400 μ l Luminol 溶液 /miniblot) 显色。实验中,分别利用 AA1, AA2, AA3, AA4, AA5 和 AA7 作为一抗,辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG (Pierce) 作为二抗,检测不同抗体与重组表达的 CD146 胞外区五个结构域 D1-5 的结合活性。如图 3 所示,AA1 和 AA2 只结合 D1,不结合相邻的 D2,证实了其抗原表位处于序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 24-128 之间,具体序列如 SEQ ID NO:24 所示。AA3-5 和 AA7 只结合 D4,不结合相邻的 D3 和 D5,证实了其抗原表位处于序列为 SEQ ID NO:1 的人 CD146 序列中的位置 335-400 之间,具体序列如 SEQ ID NO:25 所示。

[0093] 基于不同的抗原表位把这六株抗体分成两类,V1 类和 C2-2 类。因为 AA1 和 AA2 的抗原表位位于第一个 IgV 样结构域,归为 V1 类,而 AA3, AA4, AA5 和 AA7 的抗原表位位于第二个 IgC2 样结构域,所以归为 C2-2 类。

[0094] 实施例 3:利用单克隆抗体 AA1-AA5 和 AA7 检测人 CD146

[0095] 本发明所述抗人 CD146 鼠单克隆抗体可以在分子、细胞以及组织水平检测人

CD146 蛋白。

[0096] 在全细胞蛋白免疫印迹实验中, AA1-AA5 和 AA7 均能够识别还原和非还原两种状态的 CD146 蛋白。具体的实验方法如下:收集高表达 CD146 的人源黑色素瘤细胞 A375(ATCC),用预冷的 PBS 洗涤细胞两遍,4℃ 800rpm 离心 5 分钟,细胞沉淀用裂解液(Tris-HCl 50mM pH8.0, NaCl 150mM, EDTA 1mM, NP-40 1%, Glycerol 10%, PMSF 100 μg/ml)裂解细胞,4℃ 12000g 离心 15 分钟,收集上清,分别加入含有 DTT(终浓度 100mM)(二硫苏糖醇)和不含有 DTT 的上样缓冲液(5x 上样缓冲液:0.313M Tris-HCl, pH6.8, 10% SDS, 0.05% 溴酚蓝, 50% 甘油), 100℃ 煮样。10% SDS-PAGE 分离全细胞蛋白,之后半干电转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂牛奶封闭后,分别用 AA1-AA5 和 AA7 作为一抗(1:10000 用封闭液 5% 脱脂牛奶/TBST 稀释)4℃ 孵育膜过夜,然后用辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 二抗(Pierce, 1:2000 封闭液 5% 脱脂牛奶/TBST 稀释)室温孵育 1 小时,用 Pierce 公司提供的显色底物(产品编号:34076, 400 μl 13% H₂O₂+400 μl Luminol 溶液/miniblot)检测。如图 4 所示, AA1-AA5 和 AA7 能够在分子水平结合 A375 表达的 CD146 蛋白分子。

[0097] 运用流式细胞术检测手段,证实 V1 类抗体能够识别活细胞水平中细胞膜表面的 CD146 蛋白, C2-2 类抗体不能识别。具体的实验方法如下:收集高表达 CD146 的人源黑色素瘤细胞 A375(同上),用预冷的含有 0.3% BSA 的 PBS 洗涤细胞两遍,每遍洗涤之后 4℃ 800rpm 离心 5 分钟。用羊血清稀释液(1:20 用 PBS 稀释)封闭细胞,之后加入 AA1-AA5 和 AA7,以及阳性对照 AA98 作为一抗(1:2000 PBS 稀释),冰上孵育 40 分钟。用预冷的含有 0.3% BSA 的 PBS 洗涤细胞两遍,加入 FITC 偶联的羊抗鼠 IgG 作为二抗(Sigma, 1:300 PBS 稀释),室温孵育 20 分钟,用 BD FACS Calibur flow cytometry 系统检测(BD Bioscience)。结果如图 5 所示, AA1 和 AA2 即 V1 类抗体能够结合 A375 表达的 CD146 分子,与阴性对照 mIgG(用小鼠 IgG 作为一抗使用, Sigma 提供)有明显区别。而 AA3-5 和 AA7 即 C2-2 类抗体,不能结合活细胞 A375 膜上的天然状态的 CD146 分子,可能的原因是 C2-2 类识别的抗原表位在天然状态下并不暴露在 CD146 蛋白分子的表面。

[0098] 同样,利用免疫荧光技术实验,也只有 V1 类抗体能够识别细胞水平的 CD146 分子,而 C2-2 类抗体不能, AA98 作为实验的阳性对照, mIgG 作为阴性对照,如图 6 所示。实验也证实了 CD146 分子主要分布在细胞膜表面。实验过程简述如下:用预冷 1:1 丙酮/甲醇固定长于 24 孔板的 A375 细胞 1 分钟,之后 PBS 洗涤两次。用 2% 羊血清(北京中杉金桥)于 37℃ 封闭细胞 30 分钟, PBS 洗两遍。然后加入 100 μl 1:2000 PBS 稀释的一抗(AA1-AA5 及 AA7, AA98 和 mIgG), 37℃ 孵育 2 小时。PBS 洗涤之后,用 1:300 PBS 稀释的 FITC 偶联的羊抗鼠 IgG(Sigma)作为二抗和细胞 37℃ 孵育 1 小时。PBS 洗,镜检。

[0099] V1 类抗体可以用于富集溶液中的天然 CD146 分子。利用免疫沉淀的技术, V1 类抗体可以结合并富集细胞裂解液中的 CD146 蛋白。具体的方法如下:1×10⁷ A375(同上)细胞在 0.6mL 冰预冷的上述裂解液中裂解 30 分钟, 4℃ 12000g 离心 15 分钟,收集上清。先加入 20 μl 150% slurry(50% 与 PBS 或 TE 混合)的 protein A-Agarose(Santa Cruz),进行预清除。然后分别加入 2 μg AA1-AA5 和 AA7, 4℃ 孵育过夜。之后加入 20 μl 150% slurry 的 protein A-Agarose 捕获抗原-抗体复合物,用 PBS 洗涤沉淀三次,加入 40 μl 11x 上样缓冲液(将上述 5x 上样缓冲液稀释 5 倍), 100℃ 加热煮样 10 分钟。蛋白沉淀用免疫印迹的方法检测(实验方法同上所述), AA98 作为检测一抗。如图 7 所示, AA1 和 AA2 能够沉淀富集

A375 裂解液中的 CD146 蛋白,而 C2-2 类抗体不能。

[0100] 利用免疫组织化学技术,V1 类抗体可以检测组织水平的 CD146 蛋白分子。具体做法如下:人脐带组织用 OCT(冰冻组织包埋液,Sakura 提供)包埋,进行冰冻切片。切片在预冷的丙酮里固定 5 分钟,然后在含有 0.3% H₂O₂ 的甲醇中室温闭光孵育 30 分钟去除内源性过氧化物酶的干扰。PBS 洗涤三次之后,用 5% 马血清(北京中杉金桥,PBS 稀释马血清)封闭切片,然后分别在含有 AA1-AA5,AA7,AA98 以及抗 CD31 抗体(Santa Cruz)的一抗稀释液(1:2000 封闭液稀释)中 4℃ 孵育过夜。之后用生物素标记的二抗(生物素偶联的羊抗鼠 IgG,Vector 公司,1:1000 封闭液稀释)和辣根过氧化物酶偶联的链霉抗生物素蛋白作为三抗(Vector,1:1000PBS 稀释),37℃ 孵育组织切片,最后用新鲜配置的 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥,产品编号:ZLI-9033)显色。显色完毕之后用苏木素复染细胞核。如图 8 所示,抗 CD31 抗体标记了血管内皮细胞(如箭头所示),AA1 和 AA2 能够在组织水平识别脐带静脉内皮细胞以及血管平滑肌细胞分布的 CD146 分子(如箭头所示),而 C2-2 类抗体不能。AA98 作为实验的阳性对照(如箭头所示)。

[0101] 实施例 4:高灵敏度双抗夹心 ELISA 检测人可溶性 CD146 方法

[0102] 利用本发明中所述抗人 CD146 抗体 AA1 以及发明专利 ZL991075862 中所述 AA98,本发明开发出了一种高灵敏度的双抗夹心 ELISA 方法,检测血清中的可溶性 CD146。主要方法是用 AA1(关于 AA2 的实验相同,故省略)作为捕获抗原,生物素(Biotin)标记的 AA98 作为检测抗原,真核表达的 sCD146-AP 作为标准品,检测正常人和自身免疫病患者血清中的可溶性 CD146 蛋白。实验证实了,本发明开发的夹心 ELISA 具有较高的灵敏度和较宽的线性范围。利用此方法还证实了,自身免疫病如系统性血管炎患者血清中的 CD146 蛋白含量,较健康志愿者有显著升高。

[0103] 具体实验方法如下:

[0104] 1. 样品来源及临床资料:健康志愿者血浆来自北京红十字血液中心,血管炎患者血浆来自安贞医院。

[0105] 2. 具体步骤:

[0106] 1)ELISA 板包被抗体:将抗体 AA1 以 0.02M PB(pH7.25) 稀释至 1 μg/ml,50 μl/孔 4℃ 包被过夜。

[0107] 2) 封闭非特异结合位点:200 μl/孔 2% BSA/PBS,室温孵育 2 小时。

[0108] 3) 样品孵育:将已知浓度的 sCD146-AP 梯度以封闭液(2% BSA/PBS) 稀释用来绘制标准曲线,稀释后的浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320ng/ml。待测血清稀释 20 倍,上样量 50 μl,封闭液取代样品作为阴性对照。每个样品设两次重复。室温孵育 2 小时。

[0109] 4)PBST5 次,PBS1 次洗去非特异性结合。

[0110] 5) 检测抗体孵育:检测抗体 AA98-生物素(用于标记 AA98 的生物素由 Pierce 公司提供)以 2% BSA/PB 稀释至 0.5 μg/ml,50 μl/孔室温孵育 2 小时。

[0111] 6)PBST5 次,PBS1 次洗去非特异性结合。

[0112] 7) 酶标二抗放大信号:加入合适浓度的链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(Vector,1:3000),50 μl/孔,室温孵育 1 小时。

[0113] 8)PBST5 次,PBS1 次洗去非特异性结合。

[0114] 9) 颜色反应:加入底物(200ng/ml TMB(Ameresco),0.03% H₂O₂(北京化学试剂

公司), pH4.5) 显色, 100 μ l/ 孔, 37 $^{\circ}$ C 15 分钟, 加入 50 μ l/ 孔 2M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 450nm 读数。

[0115] 10) 软件统计结果: 软件分析吸光值, 根据标准 sCD146-AP 浓度绘制标准曲线。

[0116] 11) 根据标准曲线计算出待测样品的浓度。

[0117] 3. 结果分析:

[0118] 1) 利用已知 sCD146-AP 的浓度制作标准曲线。稀释后 sCD146-AP 的浓度为 5 ~ 320ng/ml, 绘制标准曲线如图 9 示。经计算得出该方法检测范围在 5 ~ 80ng/ml 内符合线性。取 sCD146-AP 浓度 5 ~ 80ng/ml 作图所得到的标准曲线 ($R^2 = 0.9981$), 如图 10 所示。

[0119] 2) 分析健康志愿者及系统性血管炎患者血浆中 sCD146 含量。健康志愿者血浆中 sCD146 含量为 154.7ng/ml, 而血管炎患者血浆 sCD146 含量达到 383.9ng/ml, 二者差异明显, 如表 2 所示。

[0120] 表 2: 利用夹心 ELISA 检测的健康志愿者和系统性血管炎患者血清中可溶性 CD146 含量。

[0121]

检测样品	OD450	稀释液sCD146浓度(ng/ml)	原液sCD146浓度(ng/ml)
健康志愿者	0.133	7.73191	154.7
系统性血管炎患者	0.3175	19.1925	383.9

[0122] 参考文献

[0123] Bani, M. R., J. Rak, et al. (1996). " Multiple features of advanced melanoma recapitulated in tumorigenic variants of early stage (radial growth phase) human melanoma cell lines: evidence for a dominant phenotype. " Cancer Res56(13): 3075-86.

[0124] Bardin, N., F. Anfosso, et al. (2001). " Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. " Blood98(13): 3677-84.

[0125] Bardin, N., V. Frances, et al. (1996). " Identification of the S-Endo l endothelial-associated antigen. " Biochem Biophys Res Commun218(1): 210-6.

[0126] Bardin, N., F. George, et al. (1996). " S-Endo1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. " Tissue Antigens48(5): 531-9.

[0127] Bardin, N., V. Moal, et al. (2003). " Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. " Thromb Haemost90(5): 915-20.

[0128] Bu, P., L. Gao, et al. (2006). " Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor- κ B activation. " Mol Cancer Ther5(11): 2872-8.

[0129] George, F., P. Poncelet, et al. (1991). " Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo1 monoclonal

antibody. " J Immunol Methods139(1) :65-75.

[0130] Holness, C. L. and D. L. Simmons(1994). " Structural motifs for recognition and adhesion in members of the immunoglobulin superfamily. " J Cell Sci107(Pt8) :2065-70.

[0131] Johnson, J. P., U. Rothbacher, et al. (1993). " The progression associated antigen MUC18 :a unique member of the immunoglobulin supergene family. " Melanoma Res3(5) :337-40.

[0132] Kohler, G. and C. Milstein(1975). " Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. " Nature256(5517) :495-7.

[0133] Kuzu, I., R. Bicknell, et al. (1993). " Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. " Lab Invest69(3) :322-8.

[0134] Lehmann, J. M., G. Riethmuller, et al. (1989). " MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. " Proc Natl Acad Sci U S A86(24) :9891-5.

[0135] Mills, L., C. Tellez, et al. (2002). " Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. " Cancer Res62(17) :5106-14.

[0136] Neidhart, M., R. Wehrli, et al. (1999). " Synovial fluid CD146(MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis. " Arthritis Rheum42(4) :622-30.

[0137] Pickl, W. F., O. Majdic, et al. (1997). " MUC18/MCAM(CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. " J Immunol158(5) :2107-15.

[0138] Sers, C., K. Kirsch, et al. (1993). " Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18 :implications for the evolution of the immunoglobulin domains. " Proc Natl Acad Sci U S A90(18) :8514-8.

[0139] Shih, I. M. (1999). " The role of CD146(Mel-CAM) in biology and pathology. " J Pathol189(1) :4-11.

[0140] Shih, I. M., D. Speicher, et al. (1997). " Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. " Cancer Res57(17) :3835-40.

[0141] Solovey, A. N., L. Gui, et al. (2001). " Identification and functional assessment of endothelial PIH12. " J Lab Clin Med138(5) :322-31.

[0142] St Croix, B., C. Rago, et al. (2000). " Genes expressed in human tumor endothelium. " Science289(5482) :1197-202.

[0143] Xie, S., M. Luca, et al. (1997). " Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. " Cancer Res57(11) :2295-303.

- [0144] Yan, X., Y.Lin, et al. (2003). " A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. " Blood102(1) :184-91.
- [0145] Yeh, M.Y., I.Hellstrom, et al. (1982). " A cell-surface antigen which is present in the ganglioside fraction and shared by human melanomas. " Int.J Cancer29(3) :269-75.
- [0146] Yeh, M.Y., I.Hellstrom, et al. (1979). " Cell surface antigens of human melanoma identified by monoclonal antibody. " Proc Natl Acad Sci U S A76(6) : 2927-31.

[0001]

IB130807序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 抗人CD146的单克隆抗体, 包含其的组合物, 检测可溶性CD146的方法

<130> IB130807

<160> 42

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 645

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Gly Leu Pro Arg Leu Val Cys Ala Phe Leu Leu Ala Ala Cys Cys
 1 5 10 15

Cys Cys Pro Arg Val Ala Gly Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala
 20 25 30

Pro Glu Leu Val Glu Val Glu Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys
 35 40 45

Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser
 50 55 60

Val His Lys Glu Lys Arg Thr Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln
 65 70 75 80

Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp
 85 90 95

Arg Gly Ala Thr Leu Ala Leu Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg
 100 105 110

Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile
 115 120 125

Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val Asn
 130 135 140

Pro Leu Gly Ile Pro Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Glu Val Ala Thr
 145 150 155 160

[0002]

Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Gln Val Ile Trp Tyr Lys
 165 170 175
 Asn Gly Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn Arg Val His Ile Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gln Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Gln Ser Ile Leu
 195 200 205
 Lys Ala Gln Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp Ala Gln Phe Tyr Cys Glu
 210 215 220
 Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His Met Lys Glu Ser Arg Glu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val
 245 250 255
 Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys
 260 265 270
 Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro His Phe Ser Ile Ser Lys Gln Asn
 275 280 285
 Pro Ser Thr Arg Glu Ala Glu Glu Glu Thr Thr Asn Asp Asn Gly Val
 290 295 300
 Leu Val Leu Glu Pro Ala Arg Lys Glu His Ser Gly Arg Tyr Glu Cys
 305 310 315 320
 Gln Gly Leu Asp Leu Asp Thr Met Ile Ser Leu Leu Ser Glu Pro Gln
 325 330 335
 Glu Leu Leu Val Asn Tyr Val Ser Asp Val Arg Val Ser Pro Ala Ala
 340 345 350
 Pro Glu Arg Gln Glu Gly Ser Ser Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala Glu
 355 360 365
 Ser Ser Gln Asp Leu Glu Phe Gln Trp Leu Arg Glu Glu Thr Gly Gln
 370 375 380
 Val Leu Glu Arg Gly Pro Val Leu Gln Leu His Asp Leu Lys Arg Glu
 385 390 395 400
 Ala Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Val Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro Gly
 405 410 415
 Leu Asn Arg Thr Gln Leu Val Asn Val Ala Ile Phe Gly Pro Pro Trp
 420 425 430
 Met Ala Phe Lys Glu Arg Lys Val Trp Val Lys Glu Asn Met Val Leu
 435 440 445
 Asn Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Thr Ile Ser Trp
 450 455 460

[0003]

Asn Val Asn Gly Thr Ala Ser Glu Gln Asp Gln Asp Pro Gln Arg Val
 465 470 475 480

Leu Ser Thr Leu Asn Val Leu Val Thr Pro Glu Leu Leu Glu Thr Gly
 485 490 495

Val Glu Cys Thr Ala Ser Asn Asp Leu Gly Lys Asn Ser Ile Leu Phe
 500 505 510

Leu Glu Leu Val Asn Leu Thr Thr Leu Thr Pro Asp Ser Asn Thr Thr
 515 520 525

Thr Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ala Ser Pro His Thr Arg Ala Asn Ser
 530 535 540

Thr Ser Thr Glu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Glu Ser Arg Gly Val Val
 545 550 555 560

Ile Val Ala Val Ile Val Cys Ile Leu Val Leu Ala Val Leu Gly Ala
 565 570 575

Val Leu Tyr Phe Leu Tyr Lys Lys Gly Lys Leu Pro Cys Arg Arg Ser
 580 585 590

Gly Lys Gln Glu Ile Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Ser Glu Leu Val
 595 600 605

Val Glu Val Lys Ser Asp Lys Leu Pro Glu Glu Met Gly Leu Leu Gln
 610 615 620

Gly Ser Ser Gly Asp Lys Arg Ala Pro Gly Asp Gln Gly Glu Lys Tyr
 625 630 635 640

Ile Asp Leu Arg His
 645

<210> 2

<211> 1941

<212> DNA

<213> 人

<400> 2

atggggcttc ccaggtgtgt ctgcgccttc ttgctgcgcg cctgctgtgt ctgtcctcgc 60

gtcgcgggtg tgcccgaga gctgagcag cctgcgcctg agctggtgga ggtggaagtg 120

ggcagcacag cccttetgaa gtgcggcctc tcccagtcce aaggcaacct cagccatgtc 180

gaactggttt ctgtccacaa ggagaagcgg acgctcatct teegtgtgeg ccagggccag 240

ggccagagcg aacctgggga gtacgagcag cggctcagcc tccaggacag aggggtact 300

ctggccctga ctaagtcac cccccaagac gagegeatct tcttgtgcca gggcaagcgc 360

ccteggtccc aggagtacc catccagctc cgcgtctaca aagctccgga ggagccaaac 420

[0004]

```

atccaggta accccctggg catccctgtg aacagtaagg agcctgagga ggtegtace 480
tgttaggga ggaacgggta cccattctct caagtcattt ggtacaagaa tggccggcct 540
ctgaaggagg agaagaaccg ggtccacatt cagtegtccc agactgtgga gtcgagtgtt 600
ttgtacacct tgcagagtat tetgaaggea cagctgggta aagaagaaa agatgcccag 660
ttttactgtg agctcaacta ccggctgccc agtgggaacc acatgaagga gtccagggaa 720
gtcaccgtcc ctgttttcta cccgacagaa aaagtgtgce tggaaagtga gcccgtggga 780
atgtgaagg aaggggaccg cgtggaaatc aggtgttttg ctgatggcaa cctccacca 840
cacttcagca tcagcaagca gaaccccagc accagggagg cagaggaaga gacaaccaac 900
gacaacgggg tectgtgtct ggagctgccc eggaaggaac acagtgggag ctatgaatgt 960
cagggcctgg acttggaacc catgatateg ctgtgagtg aaccacagga actactgtgt 1020
aactatgtgt ctgacgtccg agtgagcccc gcagccctg agagacagga aggcagcagc 1080
ctcaccctga cctgtgagge agagagtage caggacctcg agttccagtg gctgagagaa 1140
gagacaggcc aggtgctgga aagggggccc gtgcttcagt tgcattgacct gaaacgggag 1200
gcaggaggcg gctatgctg cgtggcgtct gtgcccagea taccggcct gaaccgcaca 1260
cagctggtea acgtggccat ttttgcccc ccttgatgg cattcaagga gaggaaggtg 1320
tgggtgaaag agaataatgt gttgaatctg tttgtgaag cgtcagggca ccccggccc 1380
accattctct ggaactcaa cggcaaggca agtgaacaag accaagatcc acagcgagtc 1440
ctgagcacc cgaatgtct cgtgaacccc gagctgtttg agacaggtgt tgaatgcagc 1500
gcctccaacg acctgggeaa aaacaccagc atcctcttcc tggagctggt caatttaacc 1560
accctcacac cagactccaa cacaaccact ggctccagea ctccactgc cagtcctcat 1620
accagagcca acagcacctc cacagagaga aagetgcccg agccggagag cggggcgtg 1680
gtcatcgtgg ctgtgatgt gtcatctctg gtctggcgg tctgggcgc tctctctat 1740
ttctctata agaagggeaa gctgcccgtc aggcctcag ggaagcagga gatcacgata 1800
ccccgtctc gtaagagega actgttagtt gaagttaagt cagataaget cccagaagag 1860
atgggcctcc tgcagggeag cagcgtgac aagaggctc cgggagacca gggagagaaa 1920
tacatcgata tgageatta g 1941

```

<210> 3

<211> 471

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

Pro Val Thr Lys Ala Arg Thr Pro Glu Met Pro Val Leu Glu Asn Arg
20 25 30

Ala Ala Gln Gly Asp Ile Thr Ala Pro Gly Gly Ala Arg Arg Leu Thr
35 40 45

[0005]

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

Lys Asn Ile Ile Leu Leu Ile Gly Asp Gly Met Gly Asp Ser Glu Ile
 65 70 75 80

Thr Ala Ala Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly
 85 90 95

Ile Asp Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn
 100 105 110

Lys Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala
 115 120 125

Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly Val
 130 135 140

Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala Lys Ala
 145 150 155 160

Ala Gly Leu Ala Thr Gly Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Gln Asp Ala
 165 170 175

Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg Lys Cys Tyr Gly
 180 185 190

Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn Ala Leu Glu Lys Gly
 195 200 205

Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu Asn Ala Arg Ala Asp Val
 210 215 220

Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly
 225 230 235 240

Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr
 245 250 255

Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn
 260 265 270

Gln Gln Lys Pro Leu Leu Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val
 275 280 285

Arg Trp Leu Gly Pro Lys Ala Thr Tyr His Gly Asn Ile Asp Lys Pro
 290 295 300

Ala Val Thr Cys Thr Pro Asn Pro Gln Arg Asn Asp Ser Val Pro Thr
 305 310 315 320

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

Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp

[0006]

340	345	350
His Ala Ala Asn Pro Cys Gly	Gln Ile Gly Glu Thr	Val Asp Leu Asp
355	360	365
Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu	Glu Phe Ala Lys Lys	Glu Gly Asn Thr
370	375	380
Leu Val Ile Val Thr Ala Asp	His Ala His Ala Ser	Gln Ile Val Ala
385	390	395
Pro Asp Thr Lys Ala Pro Gly	Leu Thr Gln Ala Leu Asn	Thr Lys Asp
405	410	415
Gly Ala Val Met Val Met Ser Tyr	Gly Asn Ser Glu Glu Asp	Ser Gln
420	425	430
Glu His Thr Gly Ser Gln Leu Arg	Ile Ala Ala Tyr Gly	Pro His Ala
435	440	445
Ala Asn Val Val Gly Leu Thr Asp	Gln Thr Asp Leu Phe Tyr	Thr Met
450	455	460
Lys Ala Ala Leu Gly Leu Lys		
465	470	

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4
aacatatggt gcccgagag getgagcag

29

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5
aaggggccgc cagctttctc tetgtggag

29

<210> 6

<211> 3129

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6
atggggcttc ccaggtggt ctggccttc ttgctgcgc cctgctgctg ctgtcctgcg

60

[0007]

gtgcgggtg tgcccgaga gctgagcag cctgcgctg agctggigga ggtggaagt	120
ggcagcacag cctttctgaa gtgggcctc tcccagtece aaggcaacct cagccatgtc	180
gactggtttt ctgtccaaa ggagaagcgg acgctcatct tccgtgtgcg ccaggcccag	240
ggccagagcg aacctgggga gtacgagcag cggtcagcc tccaggacag aggggctact	300
ctggccctga cteaagtca cccccaagac gagcgcctct tcttgtgcca gggcaagcgc	360
cctcggctcc aggagtaccg cctccagctc cgcgtctaca aagctccgga ggagccaaac	420
atccaggta acccctggg cctccctgtg aacagtaagg agcctgagga ggtcgcctacc	480
tgtgtaggga ggaacgggta ccccattcct caagtcctct ggtacaagaa tgcccgccct	540
ctgaaggagg agaagaaccg ggtccacatt cagtcgctcc agactgtgga gtcgagtgtt	600
ttgtacacct tgcagagtat tetgaaggca cagctgggta aagaagaaa agatgcccag	660
ttttactgtg agctcaacta ccgctgccc agtgggaacc acatgaagga gtccagggaa	720
gtcaccgtcc ctgtttteta cccgacagaa aaagtgtgga tggaaagtga gcccgtggga	780
atgctgaagg aaggggaccg cgtggaaate aggtgttttg ctgatggcaa cctccacca	840
cacttcagca tcagcaagca gaaccccagc accaggagg cagaggaaga gacaaccaac	900
gaaacgggg tctgtgtct ggagcctgcc cggaaggaac acagtgggag ctatgaatgt	960
caggccctgg acttgacac catgatctg ctgctgagt aaccacagga actactggtg	1020
aactatgtgt ctgaagctcg agtgagctc gcagccctg agagacagga aggcagcagc	1080
ctcaccctga cctgtgagcc agagagtgc caggacctc agttccagt gctgagagaa	1140
gagacagccc aggtgctgga aaggggccc gtgcttcagt tgcctgacct gaaacgggag	1200
gcaggaggcg gctatcctg ctgtggcctt ggcgccagca taccgcccct gaaccgcaca	1260
cagctggtea acgtggccat ttttgcccc ccttggatgg cattcaagga gaggaaggtg	1320
tgggtgaaag agaatatgtt gttgaatctg tcttgtgaag cgtcaggcca ccccggccc	1380
accatctcct ggaacgtcaa cggcaccgca agtgaacaag accaagatcc acagcagctc	1440
ctgagcacc tgaatgtctt cgtgacccc gagctgtttg agacaggtgt tgaatgcacg	1500
gcctccaacg acctgggcaa aaacaccagc atcctcttcc tggagctggt caatttaacc	1560
accctcacac cagactccaa cacaaccact ggctcagca ctccactgc cagctctcat	1620
accagagcca acagcacc cccagagaga aagctgccc agccggagag cggggccgca	1680
ggcgccagcg gccggccag cggcgccgca agctgaaac aaagcaatat tgcactgcca	1740
ctctaccgt tactgtttac cctgtgaca aaagccgga caccagaaat gctgtttctg	1800
gaaaaccggg ctgctcaggc gatattact gcaaccggcg gtgctcgcg ttttaacgggt	1860
gatcagactg ccgctctgag tgattctctt agcgataaac ctgcaaaaaa tattatcttg	1920
ctgattggcg atgggatggg ggactcggaa attactgccc cagtaatta tgcccaggtt	1980
gcccgggct tttttaaagg tatagatgcc ttaccgctta cgggcaata cactcactat	2040
gcgctgaata aaaaaaccg caaacccgac taagtcaccg acteggtgca atcagcaacc	2100
gcctgtgcaa ccggtgcaa aacctatac ggcgcctggt gcgtcgatat tcacgaaaaa	2160
gacaccccaa cgattctgga aatggcaaaa cccgcaggct tggcgaccg taacgtttct	2220
accgcagagt tgcaggatgc cagcccccgt gcgctgggtg cacatgtgac ctgcgcgcaa	2280

[0008]


```

tgctaeggte egagcggac cagtgaaaaa tgteeggta acetctgga aaaaggegga 2340
aaaggatcga ttaccgaaca gctgettaac gctcgtgceg acgttacgt tggggcgge 2400
gcaaaaacct ttgetgaaac ggcaaccgt ggtgaatgac agggaaaaac gctcgtgaa 2460
caggeacagg cgggtggtta teagttggtg agcgatgctg cctcaetgaa ttcggtgacg 2520
gaagcgaate agcaaaaacc cctgcttggc ctgtttgctg acggcaatat gccagtgegc 2580
tggetaggac cgaagaacac gtaccatgge aatctgata agcccgcagt cacctgtacg 2640
ccaaatccgc aacgtaatga cagtgtacca accctggcgc agatgaccga caaagccatt 2700
gaattgttga gtaaaatga gaaagcttt ttcctgcaag ttgaaggctc gtcaatcgat 2760
aaacaggatc atgetgcgaa tccttgggg caaattggcg agacggctga tctcgatgaa 2820
gccgtacaac gggcgctgga attcctaaa aaggaggta acacgtggt catagtcacc 2880
gctgateacg cccacgccag ccagattgtt gcgccggata ccaaagctcc gggectcacc 2940
caggcgctaa ataccnaaga tggcgcagtg atggtgatga gttacgggaa ctccgaagag 3000
gattcaaacg aacataccgg cagtcagttg cgtattgccc cgtatggccc gcattgcccc 3060
aatgttgitg gactgaccga ccagaccgat ctctctaca ccattgaaagc cgctctgggg 3120
ctgaaataa 3129

```

<210> 7

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

```

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1           5           10           15

```

```

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
                20           25           30

```

```

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
                35           40           45

```

```

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

```

```

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65           70           75           80

```

```

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
                85           90           95

```

```

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
                100          105          110

```

```

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
                115          120          125

```

[0009]

Arg

<210> 8

<211> 386

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

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

[0010]

Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn Tyr Gly Val
 245 250 255

Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro Phe Val Gly
 260 265 270

Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ala
 275 280 285

Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly Leu Glu Ala
 290 295 300

Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys Ser Tyr Glu
 305 310 315 320

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

Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser Ala Phe Trp
 340 345 350

Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly Arg Gln Thr
 355 360 365

Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Gly Thr Asp Tyr Asp Ile
 370 375 380

Pro Thr
 385

<210> 9
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 9

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

Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly
 20 25 30

Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser Val His Lys Glu Lys Arg Thr
 35 40 45

Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu
 50 55 60

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

Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys
 85 90 95

[0011]

Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala
100 105 110

Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val Asn Pro
115 120

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Ile Gln Leu Arg Val Tyr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asn Ile Gln Val
1 5 10 15

Asn Pro Leu Gly Ile Pro Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Glu Val Ala
20 25 30

Thr Cys Val Gly Arg Asn Gly Tyr Pro Ile Pro Gln Val Ile Trp Tyr
35 40 45

Lys Asn Gly Arg Pro Leu Lys Glu Glu Lys Asn Arg Val His Ile Gln
50 55 60

Ser Ser Gln Thr Val Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Thr Leu Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Lys Ala Gln Leu Val Lys Glu Asp Lys Asp Ala Gln Phe Tyr Cys
85 90 95

Glu Leu Asn Tyr Arg Leu Pro Ser Gly Asn His Met Lys Glu Ser Arg
100 105 110

Glu Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro
115 120

<210> 11

<211> 103

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Asn His Met Lys Glu Ser Arg Glu Val Thr Val Pro Val Phe Tyr Pro
1 5 10 15

Thr Glu Lys Val Trp Leu Glu Val Glu Pro Val Gly Met Leu Lys Glu
20 25 30

Gly Asp Arg Val Glu Ile Arg Cys Leu Ala Asp Gly Asn Pro Pro Pro

[0012]

<400> 13

Glu Ala Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Val Ala Ser Val Pro Ser Ile Pro
1 5 10 15

Gly Leu Asn Arg Thr Gln Leu Val Asn Val Ala Ile Phe Gly Pro Pro
20 25 30

Trp Met Ala Phe Lys Glu Arg Lys Val Trp Val Lys Glu Asn Met Val
35 40 45

Leu Asn Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Thr Ile Ser
50 55 60

Trp Asn Val Asn Gly Thr Ala Ser Glu Gln Asp Gln Asp Pro Gln Arg
65 70 75 80

Val Leu Ser Thr Leu Asn Val Leu Val Thr Pro Glu Leu Leu Glu Thr
85 90 95

Gly Val Glu Cys Thr Ala Ser Asn Asp Leu Gly Lys Asn Ser Ile Leu
100 105 110

Phe Leu Glu Leu Val Asn Leu Thr Thr Leu Thr Pro Asp Ser Asn Thr
115 120 125

Thr Thr Gly Leu Ser Thr Ser Thr Ala Ser Pro His Thr Arg Ala Asn
130 135 140

Ser Thr Ser Thr Glu Arg Lys Leu Pro Glu Pro Glu Ser Arg Gly Val
145 150 155 160

Val

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

catgccatgg tgcccggaga ggctgag

27

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

aagcttttag gggttgacct g gatgtttgg c

31

[0014]

<210> 16	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 16	
ccatgggtat ccagctccgc gtctacaag	30
<210> 17	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
aagcttttac ggtagaaaa caggcaggt g	31
<210> 18	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
ccatgggtaa ccacatgaag gaggccagg aag	33
<210> 19	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 19	
aagcttttat ggttcaactca gcagcgatat catg	34
<210> 20	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 20	
ccatgaaca cagtgggcgc tatgaatg	28
<210> 21	
<211> 31	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 21	
aagcttttac acccaacacct tctctctctt g	31
<210> 22	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 22	
ccatggaggc aggaggcgge tateg	25
<210> 23	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 23	
aagcttttag acccaagcccc ggetctc	27
<210> 24	
<211> 105	
<212> PRT	
<213> 人	
<400> 24	
Val Pro Gly Glu Ala Glu Gln Pro Ala Pro Glu Leu Val Glu Val Glu	
1 5 10 15	
Val Gly Ser Thr Ala Leu Leu Lys Cys Gly Leu Ser Gln Ser Gln Gly	
20 25 30	
Asn Leu Ser His Val Asp Trp Phe Ser Val His Lys Glu Lys Arg Thr	
35 40 45	
Leu Ile Phe Arg Val Arg Gln Gly Gln Gly Gln Ser Glu Pro Gly Glu	
50 55 60	
Tyr Glu Gln Arg Leu Ser Leu Gln Asp Arg Gly Ala Thr Leu Ala Leu	
65 70 75 80	
Thr Gln Val Thr Pro Gln Asp Glu Arg Ile Phe Leu Cys Gln Gly Lys	
85 90 95	
Arg Pro Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile	

[0016]

<400> 28

Ala Arg Asn Gly Gly Asp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 29

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Glu Asn Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 30

Trp Ala Ser
1

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 31

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 32

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 32

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

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

[0018]

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asn Gly Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 33

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Glu Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Glu Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

[0019]

<213> 人工序列

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 35

Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr
1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 36

Val Arg Gly Pro Ala Phe Ala His
1 5

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 37

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 38

Leu Val Ser
1

<210> 39

[0020]

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 39

Cys Gln Gly Thr His Phe Ser Thr
1 5

<210> 40

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Pro Ala Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala

<210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 41

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

[0021]

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Thr His Phe Ser Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 42

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

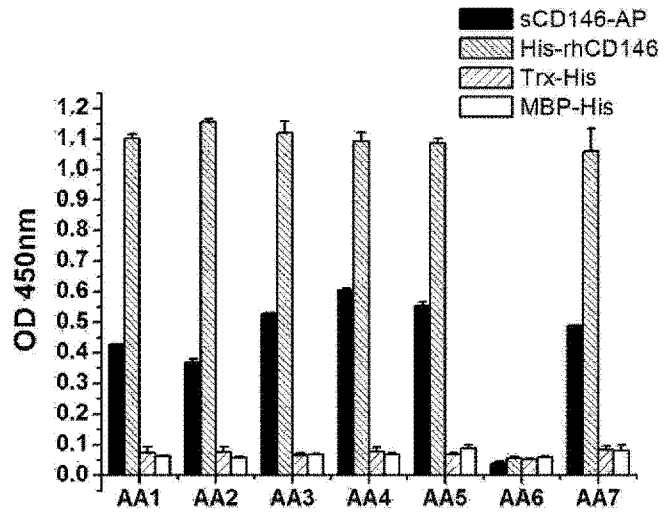


图 1

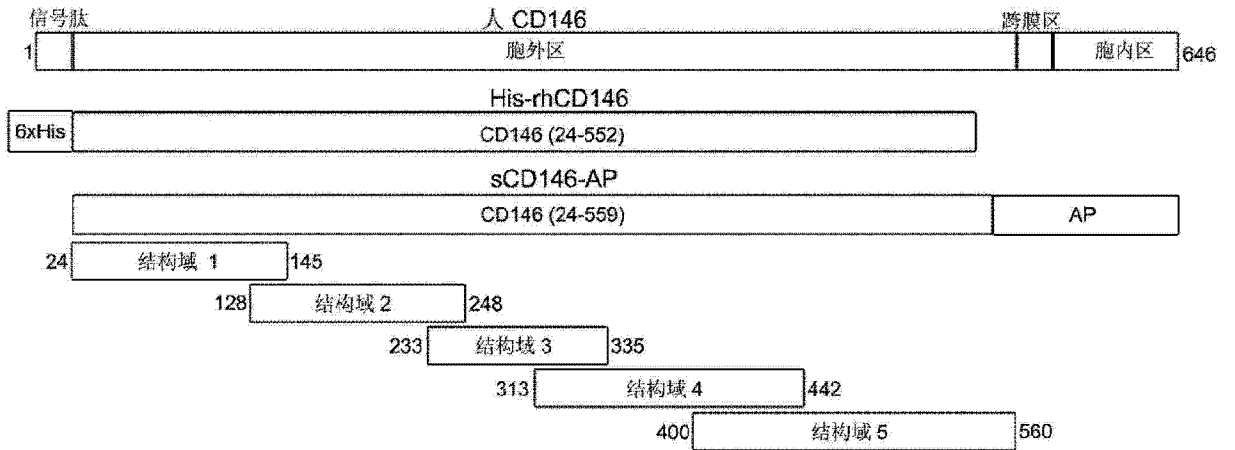


图 2

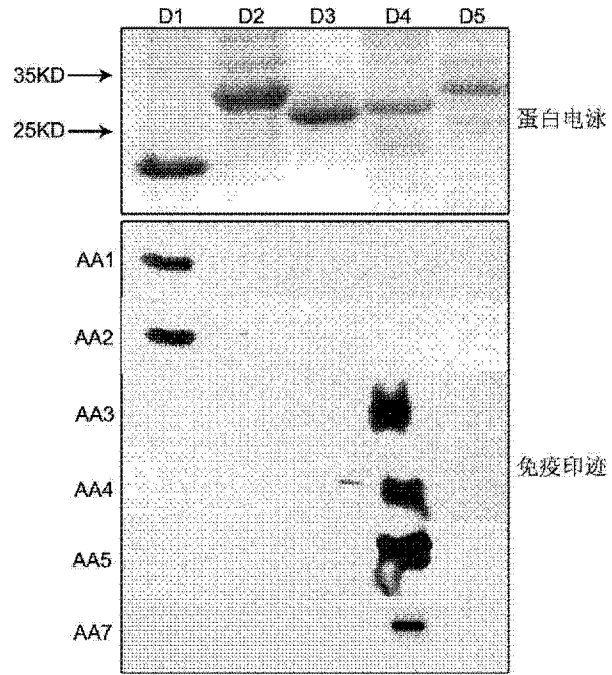


图 3

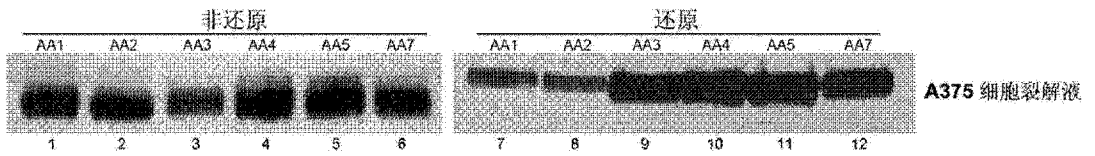


图 4

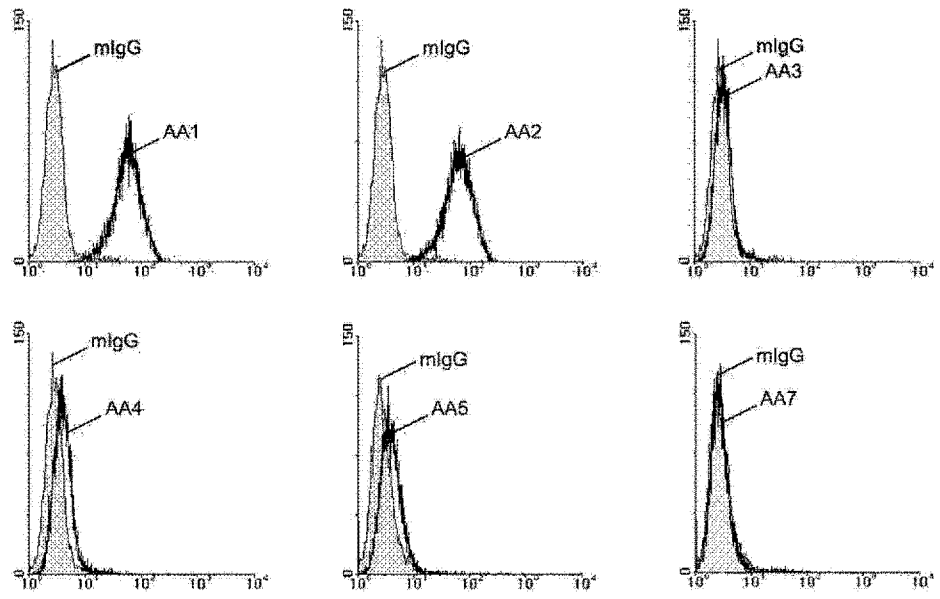


图 5

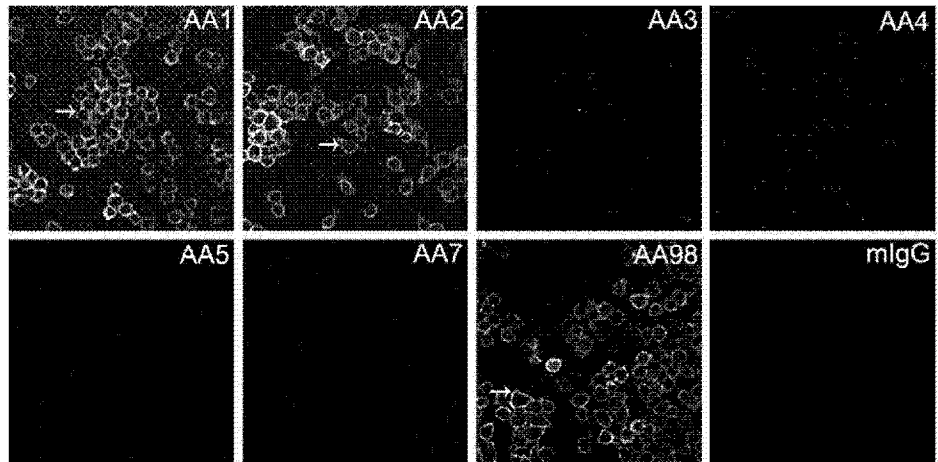


图 6

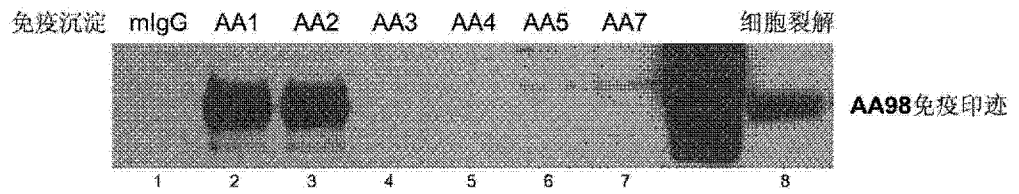


图 7

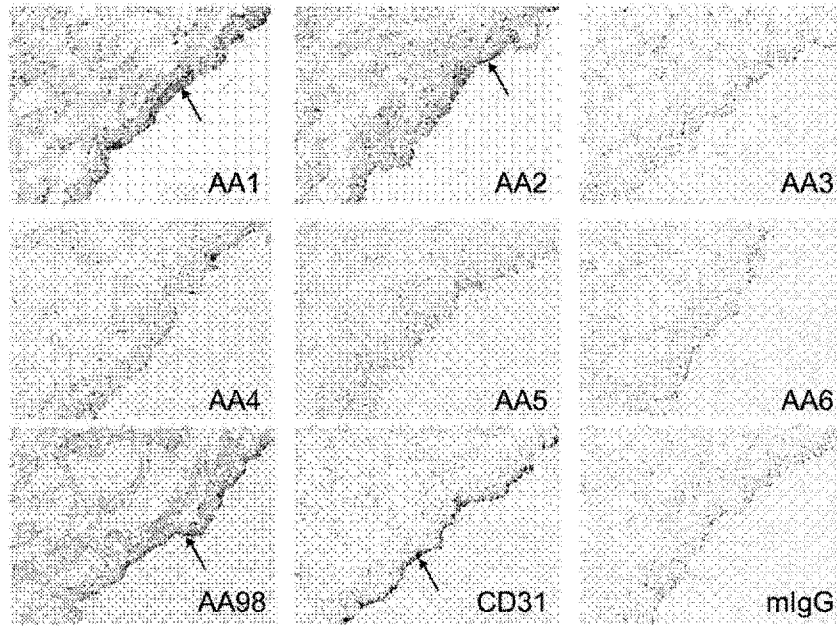


图 8

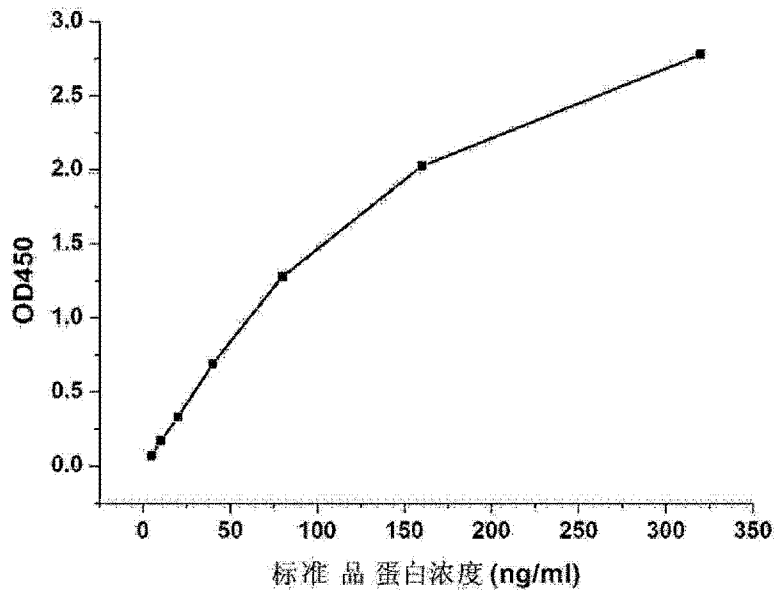


图 9

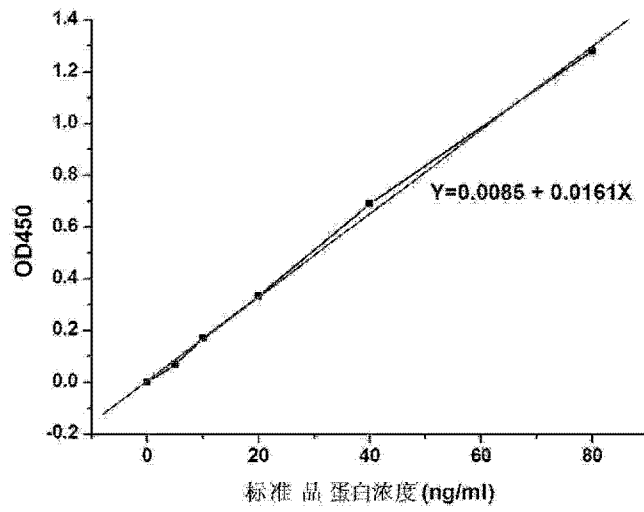


图 10

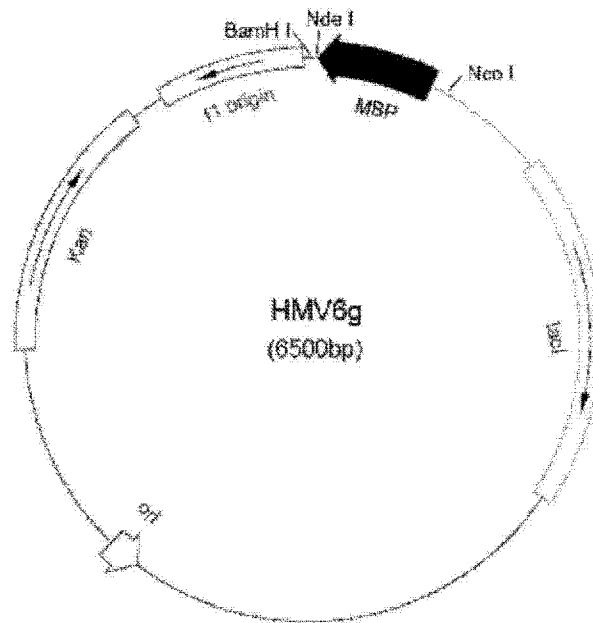


图 11