



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102372773 A

(43) 申请公布日 2012.03.14

(21) 申请号 201010251384.6 *A61K 45/00* (2006.01)
(22) 申请日 2010.08.11 *A61P 35/00* (2006.01)
(83) 生物保藏信息 *A61P 13/10* (2006.01)
CGMCC No. 3845 2010.05.21 *G01N 33/574* (2006.01)
(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所 *G01N 33/577* (2006.01)
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号 *C12R 1/91* (2006.01)
(72) 发明人 李翀 范祖森 张红莲 戴中华
唐海东 陈俊
(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 吴小明
(51) Int. Cl.
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页
序列表 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

人膀胱癌肿瘤标志物及其抗体和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种新的人膀胱癌肿瘤标记物——异常糖基化的整合素 AG- $\alpha 3\beta 1$, 和产生抗该肿瘤标记物的单克隆抗体的杂交瘤细胞, 及其分泌的单克隆抗体 BCMab1, BCMab1 抗体识别的抗原表位为 [30S03]Galb1-4(Fuca1-3)[60S03]G1cNAc。该单克隆抗体与人膀胱癌细胞系 T24 及人膀胱癌组织呈强阳性反应, 而与人正常膀胱组织和其它非膀胱癌细胞无交叉反应。同时, 该单克隆抗体在体外细胞培养和动物肿瘤模型中具有抑制膀胱癌细胞系 T24 增殖的功能。本发明还提供了包含单克隆抗体 BCMab1 体外诊断试剂盒和使用单克隆抗体 BCMab1 检测尿脱落细胞中肿瘤标记物含量的方法。

人膀胱癌肿瘤标志物及其抗体和应用

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤免疫学领域。具体地说本发明涉及一种新的人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$ 及其制备 (AG:异常糖基化 (Aberrant Glycosylation)), 以及抗 AG- $\alpha 3\beta 1$ 的单克隆抗体 BCMab1。细胞和组织学水平证明:AG- $\alpha 3\beta 1$ 只表达于人膀胱肿瘤细胞膜上, BCMab1 抗体不仅能够特异性识别 AG- $\alpha 3\beta 1$, 而且在体外细胞水平和体内动物模型中能有效地抑制人膀胱肿瘤细胞的增殖。本发明还涉及一种竞争性 ELISA 检测人膀胱癌的方法。这种检测方法中的固定相抗原为本发明中的人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3\beta 1$, 检测抗体是本发明中的抗人膀胱癌整合素 $\alpha 3\beta 1$ 抗体 BCMab1。

背景技术

[0002] 膀胱癌是泌尿系统中最常见的肿瘤。尽管采用多种措施进行治疗, 但仍有**40~70%**的患者要发生一次或多次复发,**10~15%**的患者发展成更高级别的肿瘤或发生转移, 而且这些治疗方法还有明显的毒副作用。

[0003] 膀胱癌在肿瘤切除后的预防复发是临床的重要课题。目前用于膀胱灌注预防复发的药物主要分以下几类:(1) 抗肿瘤化疗药物, 如丝裂霉素 C 等;(2) 免疫增强剂, 如卡介苗 (BCG) 等。(3) 细胞因子, 如干扰素等。以上几类药物可以单独使用或联合使用, 虽在降低膀胱癌术后复发率上取得一些效果, 但因特异性差、肿瘤多耐药性 (MDR) 等问题的存在, 总体疗效并不理想, 高达**40~70%**的患者要发生一次或多次复发,**10~15%**的患者发展成更高级别的肿瘤或发生转移。且以上各类药物分子量小, 不但可非特异性地作用于全膀胱及尿道, 还可经膀胱及尿道粘膜吸收, 因而容易产生局部及全身的毒副作用。以疗效较为肯定的丝裂霉素 C 及卡介苗为例:使用卡介苗的患者 90% 有 BCG 膀胱炎, 其它的副作用有血尿、皮疹、发热、关节炎、尿道狭窄等, 还有少见而严重的肝炎及肺炎、致命性败血症等。丝裂霉素 C 的副作用相对较少, 但仍有**5~25%**的化学性膀胱炎和过敏反应, 还可见尿道狭窄、骨髓抑制、膀胱壁钙化等副作用。

[0004] 整合素 (integrin) 是一组二价阳离子依赖的细胞表面受体, 其主要功能是与相应配体结合介导细胞与基质、细胞与细胞的粘附, 进而影响细胞形态、基因表达与调控、细胞增殖分化、凋亡及肿瘤细胞的迁移、浸润和转移等。整合素 $\alpha 3$ 亚单位 (CD49c) 可与 $\beta 1$ 亚单位 (CD29) 结合形成整合素 $\alpha 3\beta 1$, 其配体为层粘连蛋白 (LN) 和 IV 型胶原蛋白 (Collagen IV)。在上皮组织中, 整合素 $\alpha 3\beta 1$ 主要参与细胞与上皮细胞基底膜的粘连, 可调节信号转导, 从而影响细胞的生物学特性。它在肿瘤细胞表面的异常修饰, 被认为会导致恶性度的改变。

[0005] 抗肿瘤靶向药物是一种具有特异性识别、杀伤肿瘤细胞的生物或化学分子 (如单克隆抗体)。膀胱癌是一种人体腔内肿瘤, 相当于一个人体的“肉试管”, 而导向药物在体外对靶细胞具有高特异和强杀伤作用。寻找一种疗效好、副作用少的新的抗人膀胱癌的导向药物, 在膀胱癌的治疗上具有重要意义。

[0006] 在膀胱肿瘤的筛查中, 膀胱癌的早期发现和正确的预后估计对临床治疗显得极为

重要。近年新用于临床的分子标记,如核基质蛋白、膀胱肿瘤抗原和卫星不稳定性等,也同样受限于灵敏度和特异性低的不足。尿脱落细胞学分析和膀胱镜检查仍然是膀胱癌诊断和监测的金标准。所以,寻求有效、便利的膀胱癌的诊断方法是非常必要的。

发明内容

[0007] 本发明利用人膀胱癌细胞系 T24 免疫小鼠,获得杂交瘤细胞。用 ELISA 的方法筛选到能与 T24 细胞高度特异结合的抗体 BCMab1。免疫组织化学和免疫荧光证实,BCMab1 抗体与人膀胱癌细胞系 T24 及人膀胱癌组织呈强阳性反应,与人正常膀胱组织和其它非膀胱癌细胞无交叉反应。

[0008] 本发明利用 BCMab1 抗体采用免疫亲和层析的方法捕获该抗体识别的抗原,经过质谱分析和糖芯片鉴定为异常糖基化修饰的整合素 $\alpha 3 \beta 1$,命名为 AG- $\alpha 3 \beta 1$,其表位为糖结构 [3OS03]Galb1-4(Fuca1-3)[6OS03]GlcNAc。用 BCMab1 抗体证实,AG- $\alpha 3 \beta 1$ 只表达于人膀胱肿瘤细胞上,并与膀胱癌的肿瘤分期和病理分级呈正相关。AG- $\alpha 3 \beta 1$ 可作为一种新的人膀胱癌肿瘤标记物。

[0009] 本发明利用 BCMab1 抗体,处理体外培养的 T24 细胞和裸鼠移植瘤模型,发现 BCMab1 抗体能有效地抑制膀胱癌细胞系 T24 的增殖。BCMab1 抗体可作为抗人膀胱癌的靶向药物。

[0010] 本发明利用 BCMab1 抗体和 AG- $\alpha 3 \beta 1$ 抗原制备成诊断试剂,即将人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3 \beta 1$ 作为固定相,与待测样品共同竞争 AbBC1 抗体,检测人尿液中的膀胱肿瘤细胞。

[0011] 本发明的创新点在于:(1) 研制了一种抗人膀胱癌的鼠单克隆抗体 BCMab1,该抗体不仅能特异性地结合人膀胱癌组织,而且在体内或体外能有效抑制膀胱癌细胞系 T24 的增殖;(2) 揭示了这种抗体识别的抗原表位 AG- $\alpha 3 \beta 1$,为一种新的人膀胱癌肿瘤标记物,并证实了该表位只表达于人膀胱肿瘤细胞上,并与膀胱癌的肿瘤分期和病理分级呈正相关;(3) 开发了一种高灵敏度的竞争 ELISA 方法用于人膀胱癌的检测。

[0012] 发明详述

[0013] 本发明提供了一种新的人膀胱癌肿瘤标记物——异常糖基化的整合素 AG- $\alpha 3 \beta 1$,和产生抗该肿瘤标记物的单克隆抗体的杂交瘤细胞,及其分泌的单克隆抗体 BCMab1,BCMab1 抗体识别的抗原表位为 [3OS03]Galb1-4(Fuca1-3)[6OS03]GlcNAc。该单克隆抗体与人膀胱癌细胞系 T24 及人膀胱癌组织呈强阳性反应,而与人正常膀胱组织和其它非膀胱癌细胞无交叉反应。同时,该单克隆抗体在体外细胞培养和动物肿瘤模型中具有抑制膀胱癌细胞系 T24 增殖的功能。本发明还提供了包含单克隆抗体 BCMab1 体外诊断试剂盒和使用单克隆抗体 BCMab1 检测尿脱落细胞中肿瘤标记物含量的方法。

[0014] 更具体地,本发明的一个目的是提供一种人膀胱癌肿瘤标志物 AG- $\alpha 3 \beta 1$,其为异常糖基化的整合素 $\alpha 3 \beta 1$,其特征在于带有作为抗原表位的糖结构 [3OS03]Galb1-4(Fuca1-3)[6OS03]GlcNAc。糖结构 [3OS03]Galb1-4(Fuca1-3)[6OS03]GlcNAc 的结构式如下:

[0015]

解后,点在膜上,经过碘酸处理,糖抗原结构被破坏,BCMab1 抗体无法识别,没有出现阳性反应;

[0029] 图 5. 糖芯片检测结果;

[0030] 图 6. BCMab1 抗体抑制肿瘤细胞的增殖;

[0031] 图 7. 整合素 $\alpha 3$ 亚单位的氨基酸序列;和

[0032] 图 8. 整合素 $\beta 1$ 亚单位的氨基酸序列。

具体实施方式

[0033] 下文将参考实施例详细描述本发明,所述实施例仅是意图举例说明本发明,而不是意图限制本发明的范围。本发明的范围由后附的权利要求具体限定。

[0034] 实施例 1: BCMab1 单克隆抗体的制备和纯化

[0035] (1) 杂交瘤的制备

[0036] 以人膀胱癌细胞系 T24(ATCC:HTB-4) 免疫 Balb/C 小鼠(商购自北京维通利华实验动物技术有限公司),以 1×10^7 个细胞/ml PBS 的剂量进行腹腔注射。2 周后对小鼠进行再次免疫,注射体积和方法不变。待小鼠血清效价达到要求后准备进行细胞融合,融合前三天对小鼠进行加强免疫。在免疫小鼠的同时准备小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0(ATCC CRL-1772)。

[0037] 将致敏的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合(《实用免疫学》,杨廷彬主编,长春出版社,1994 年 12 月出版),用 HAT 培养基(购于 Invitrogen 公司, HAT 系次黄嘌呤(hypoxantin)、氨基蝶呤(aminopterin)和胸腺嘧啶脱氧核苷(thymidin)三种物质各英文首字之缀列, HAT 培养基也就是指含有这三种物质的细胞培养基)进行选择培养(以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞)。

[0038] 接着,用 ELISA 方法检测杂交瘤细胞培养上清:以 T24 细胞(1×10^5 个/ml)包被 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{l}$, 37°C 培养过夜。细胞贴壁后,加 4% 多聚甲醛室温固定 10 分钟,洗涤 3 次,加待检上清 $100 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 1 小时。洗涤 3 次,加酶标二抗(抗小鼠 IgG-HRP)(商购自北京中杉金桥生物技术有限公司), 37°C 孵育 1 小时。洗涤 3 次,加 TMB(北京中杉金桥生物技术有限公司) $50 \mu\text{l}$ 显色,室温静置 5 分钟,加终止液 $50 \mu\text{l}$ 。结果用酶标仪测定波长 450nm 的 OD 值, OD 值高于阴性对照 2 倍以上者可视为阳性。

[0039] 然后,将选出的阳性杂交瘤细胞克隆化培养(有限稀释法,以小鼠腹腔巨噬细胞为饲养细胞)。经过 2-3 轮克隆化培养,获得稳定的能够产生高效价单抗的杂交瘤细胞克隆。将杂交瘤细胞克隆扩大培养,并冻存保种。

[0040] 本发明中的一种阳性杂交瘤细胞为抗人膀胱癌单克隆抗体杂交瘤细胞株,该杂交瘤细胞株于 2010 年 5 月 21 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,中国,北京),保藏号为 CGMCC No. 3845。

[0041] (2) BCMab1 单抗的制备和纯化

[0042] 将上述杂交瘤细胞 BCMab1 接种至 Balb/C 小鼠腹腔,制备腹水,再从腹水中提取单抗。单抗 BCMab1 的纯化:采用 Protein G 亲和层析法。首先制备 Protein G 亲和层析柱(购于“GE”公司),用 PBS(磷酸盐缓冲液)平衡柱子后,取含 BCMab1 单抗的腹水过柱,然后用 PBS 洗柱子,至 OD 值接近于零,以 0.2M 的甘氨酸-HCl 溶液(pH 2.8)洗脱,收集洗脱液,测定各收集管的 OD 值,保留峰值区的洗脱液,洗脱液经透析浓缩后 20°C 冻存。

[0043] 实施例 2 :BCMab1 单抗的鉴定

[0044] 在实施例 1 中制备的 BCMab1 单抗,按常规方法对人膀胱癌组织切片(获自北京大学第三医院)进行免疫组化染色,结果如图 1、2 所示。结果表明,人膀胱癌组织经 BCMab1 单抗、二抗(抗小鼠 IgG-HRP)及 DAB 底物(北京中杉金桥生物技术有限公司)染色后呈阳性反应,而人正常膀胱组织经 BCMab1 单抗、二抗及底物染色后呈阴性反应。

[0045] 用 BCMab1 单抗,按常规方法对膀胱癌细胞 T24 和其它细胞进行流式细胞仪检测,以及用免疫组化检测人正常组织。结果如表 1 所示。结果表明,BCMab1 单抗与 T24 细胞呈强阳性反应,与其它非膀胱癌细胞无交叉反应,与人正常组织无交叉反应。

[0046] 表 1

[0047] 流式细胞术与免疫组化检测抗人膀胱癌单抗 BCMab1 对多种细胞与组织的免疫反应

细胞系	BCMab1	正常组织	BCMab1
人膀胱癌细胞系 EJ	+	肝	-
人膀胱癌细胞系 T24	+	脑	-
人正常尿路上皮细胞 HCV29	-	肾上腺	-
人肝癌细胞系 HepG2	-	胰腺	-
人结肠癌 LoVo	-	胃	-
[0048] 人恶性黑色素瘤细胞系 A-375	-	结肠	-
人胚肾细胞系 293	-	乳腺	-
人 T 细胞瘤 Jurkat	-	肺	-
人前列腺癌细胞系 PC-1	-	卵巢	-
人乳腺癌细胞系 MCF-7	-	心肌	-
人宫颈癌细胞系 HeLa	-	甲状腺	-
人慢性白血病细胞系 K562	-	淋巴结	-
人正常外周血单核细胞	-	骨髓	-

[0049] 实施例 3 :AG- $\alpha 3 \beta 1$ 抗原的制备

[0050] 人膀胱癌细胞系 T24 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中(购于 Invitrogen 公司), 1×10^8 个 T24 细胞用 0.25% 胰酶消化后, PBS 洗涤 3 次,加入 100 μ g BCMab1 单抗,4 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时, PBS 洗涤 3 次,用 1ml 三去污裂解液(50mM Tris-HCl, pH 8.0; 150mM NaCl; 0.02% 叠氮钠; 0.1% SDS; 100 μ g/ml PMSF; 1 μ g/ml Aprotinin; 1% NP-40; 0.5% 脱氧胆酸钠)裂解 30 分钟, 12,000g 离心 10 分钟,取上清,过 Protein G 亲和层析柱。然后用 PBS 洗柱子,至 OD 值接近于零,以 0.2M 的甘氨酸-HCl 溶液(pH2.8)洗脱,收集洗脱液,测定各收集管的 OD 值,保留峰值区的洗脱液,进行质谱分析,证实为人整合素 $\alpha 3 \beta 1$ (见表 2)。用过碘酸氧化实验(Daigo Tsubokawa, Yukinobu Goso, Akira Sawaguchi, et al. A monoclonal antibody, PGM34, against 6-sulfated blood-group H type 2 antigen, on the carbohydrate moiety of mucin. FEBS J. 2007 Apr; 274(7):1833-48),结合 BCMab1 抗体的糖芯片(美国, The Consortium for Functional Glycomics)检测数据, BCMab1 抗体识别的表位是人整合素 $\alpha 3 \beta 1$ 上的糖链,该表位是 [30S03]Galb1-4(Fuca1-3) [60S03]GlcNAc(见图 3、4 和 5),并且该糖链是处在 $\alpha 3$ 亚单位的第 740 位的氨基酸 T(苏氨酸)上(STSS 中的 T 上)。由于 BCMab1 抗体只特异性地结合人膀胱癌组织,表明该抗原为异常糖基化修饰的整合素 $\alpha 3 \beta 1$ (AG- $\alpha 3 \beta 1$),其表位 [30S03]Galb1-4(Fuca1-3) [60S03]GlcNAc 只表达于膀胱癌组织细胞。经鉴定, [30S03]Galb1-4(Fuca1-3) [60S03]GlcNAc 的结

记物（如：核基质蛋白、细胞角蛋白、透明质酸等）的检测和尿脱落细胞的病理学检查。(3) 特异性强、灵敏度高,采用竞争 ELISA 法检测细胞中的膀胱癌抗原,避免了细胞病理学方法本身无法克服的人为性较高和特异性及灵敏度较低的缺点。(4) 方便快捷,适合于早期膀胱癌患者的筛查和肿瘤复发的检测。

[0059] 具体实验方法如下：

[0060] 1) 样品来源及临床资料：健康志愿者和膀胱癌患者的尿液均来自北京大学第三医院。

[0061] 2) 具体步骤：

[0062] i) ELISA 板包被抗原：将 AG- α 3 β 1 抗原用 PBS 稀释至 1 μ g/mL, 50 μ g/孔 4 $^{\circ}$ C 包被平板过夜。

[0063] ii) 封闭非特异结合位点：200 μ g/孔 2%的 BSA/PBS, 37 度孵育 2 小时。

[0064] iii) 样品孵育：待测样品为新鲜尿液,上样量 50 μ L, 健康志愿者的尿液取代样品作为阴性对照。同时每孔加入 1 μ g/mL 的 BcMab1 抗体 50 μ L, 每个样品设两次重复, 37 度孵育 1 小时。

[0065] iv) PBST 洗涤 5 次。

[0066] v) 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (Sigma 公司), 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。

[0067] vi) PBST 洗涤 5 次。

[0068] vii) 加入底物 (四甲基联苯胺, H₂O₂) 100 μ L/孔, 室温避光孵育 10-20 分钟; 加入 2M H₂SO₄ 50 μ L 中止反应; 在酶标仪上测定 OD 值 (450nm)。

[0069] 3) 结果分析：根据阴性 OD 值 /OD 临界值 \approx 2.1, 得到 OD 临界值 \approx 阴性 OD 值 /2.1, 根据 OD 临界值, 可判断其灵敏度和特异性。

		实际样品		合计
		+	-	
[0070] 检测结果	+	82	7	89
	-	18	93	111
合计		100	100	200

[0071] 临床灵敏度可用来衡量某种试验检测出有病者的能力, 灵敏度是将实际有病的人正确地判定为真阳性的比例。

[0072] 本实验灵敏度 = $82 / (82 + 18) \times \% = 82\%$ 。

[0073] 临床特异度是衡量试验正确地判定无病者的能力, 特异度是将实际无病的人正确地判定为真阴性的比例。

[0074] 本实验特异度 = $93 / (7 + 93) \times \% = 93\%$ 。

[0075] 尽管本发明的具体实施例已经描述如上, 但是可以知道本发明可以进行除了上述说明以外的实践。本发明的保护范围不受说明书的限制。

370	375	380	
Gln Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro Phe Glu Gly Leu Gly Lys Val Tyr			
385	390	395	400
Ile Tyr His Ser Ser Ser Lys Gly Leu Leu Arg Gln Pro Gln Gln Val			
	405	410	415
Ile His Gly Glu Lys Leu Gly Leu Pro Gly Leu Ala Thr Phe Gly Tyr			
	420	425	430
Ser Leu Ser Gly Gln Met Asp Val Asp Glu Asn Phe Tyr Pro Asp Leu			
	435	440	445
Leu Val Gly Ser Leu Ser Asp His Ile Val Leu Leu Arg Ala Arg Pro			
	450	455	460
Val Ile Asn Ile Val His Lys Thr Leu Val Pro Arg Pro Ala Val Leu			
465	470	475	480
Asp Pro Ala Leu Cys Thr Ala Thr Ser Cys Val Gln Val Glu Leu Cys			
	485	490	495
Phe Ala Tyr Asn Gln Ser Ala Gly Asn Pro Asn Tyr Arg Arg Asn Ile			
	500	505	510
Thr Leu Ala Tyr Thr Leu Glu Ala Asp Arg Asp Arg Arg Pro Pro Arg			
	515	520	525
Leu Arg Phe Ala Gly Ser Glu Ser Ala Val Phe His Gly Phe Phe Ser			
	530	535	540
Met Pro Glu Met Arg Cys Gln Lys Leu Glu Leu Leu Leu Met Asp Asn			
545	550	555	560
Leu Arg Asp Lys Leu Arg Pro Ile Ile Ile Ser Met Asn Tyr Ser Leu			
	565	570	575
Pro Leu Arg Met Pro Asp Arg Pro Arg Leu Gly Leu Arg Ser Leu Asp			
	580	585	590
Ala Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Ala Gln Ala Leu Glu Asn His Thr Glu			
	595	600	605
Val Gln Phe Gln Lys Glu Cys Gly Pro Asp Asn Lys Cys Glu Ser Asn			

[0004]

850	855	860
Asp Arg Pro Ser Ser Pro Gln Arg Arg Arg Arg Gln Leu Asp Pro Gly		
865	870	875
Gly Gly Gln Gly Pro Pro Pro Val Thr Leu Ala Ala Ala Lys Lys Ala		
	885	890
Lys Ser Glu Thr Val Leu Thr Cys Ala Thr Gly Arg Ala His Cys Val		
	900	905
Trp Leu Glu Cys Pro Ile Pro Asp Ala Pro Val Val Thr Asn Val Thr		
	915	920
Val Lys Ala Arg Val Trp Asn Ser Thr Phe Ile Glu Asp Tyr Arg Asp		
	930	935
Phe Asp Arg Val Arg Val Asn Gly Trp Ala Thr Leu Phe Leu Arg Thr		
945	950	955
Ser Ile Pro Thr Ile Asn Met Glu Asn Lys Thr Thr Trp Phe Ser Val		
	965	970
Asp Ile Asp Ser Glu Leu Val Glu Glu Leu Pro Ala Glu Ile Glu Leu		
	980	985
Trp Leu Val Leu Val Ala Val Gly Ala Gly Leu Leu Leu Leu Gly Leu		
	995	1000
Ile Ile Leu Leu Leu Trp Lys Cys Gly Phe Phe Lys Arg Ala Arg		
	1010	1015
Thr Arg Ala Leu Tyr Glu Ala Lys Arg Gln Lys Ala Glu Met Lys		
	1025	1030
Ser Gln Pro Ser Glu Thr Glu Arg Leu Thr Asp Asp Tyr		
	1040	1045
		1050

<210> 2

<211> 798

<212> PRT

<213> 人

[0006]

<400> 2
 Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys
 1 5 10 15
 Cys Val Phe Ala Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala
 20 25 30
 Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys
 35 40 45
 Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys
 50 55 60
 Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile
 65 70 75 80
 Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr
 85 90 95
 Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr
 100 105 110
 Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro
 115 120 125
 Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp
 130 135 140
 Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu
 145 150 155 160
 Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile
 165 170 175
 Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val
 180 185 190
 Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr
 195 200 205
 Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser
 210 215 220
 Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg
 [0007]

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

[0008]

465	470	475	480
Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val			
	485	490	495
Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met			
	500	505	510
Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn			
	515	520	525
Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr			
	530	535	540
Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys			
545	550	555	560
Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys			
	565	570	575
Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys			
	580	585	590
Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn			
	595	600	605
Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys			
	610	615	620
Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys			
625	630	635	640
Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu			
	645	650	655
Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys			
	660	665	670
Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val			
	675	680	685
Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr			
	690	695	700
Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn			

[0009]

705	710	715	720
Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val			
	725	730	735
Val Ala Gly Ile Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys			
	740	745	750
Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys			
	755	760	765
Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys			
	770	775	780
Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys			
785	790	795	

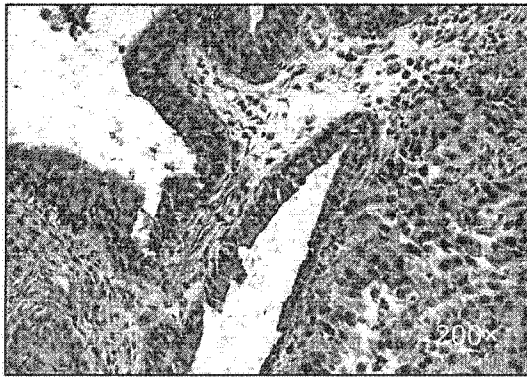


图 1



图 2

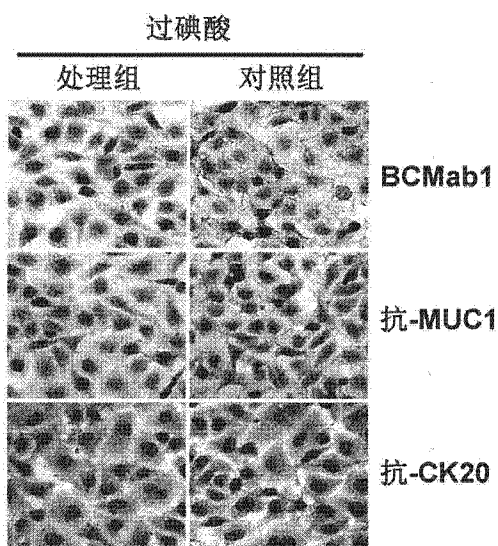


图 3

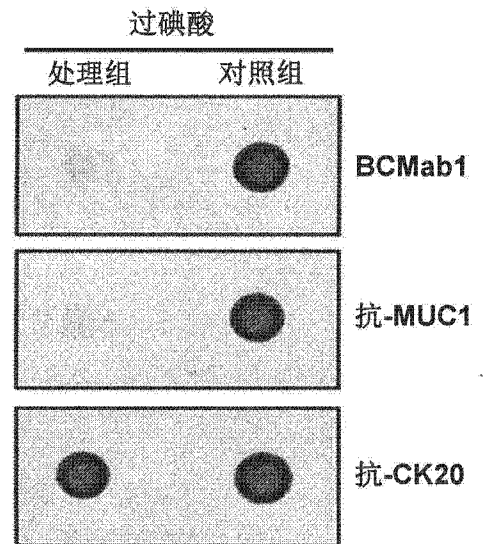


图 4

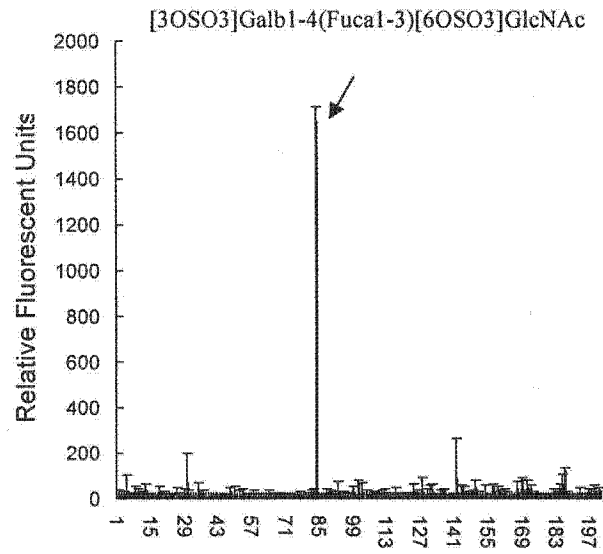


图 5

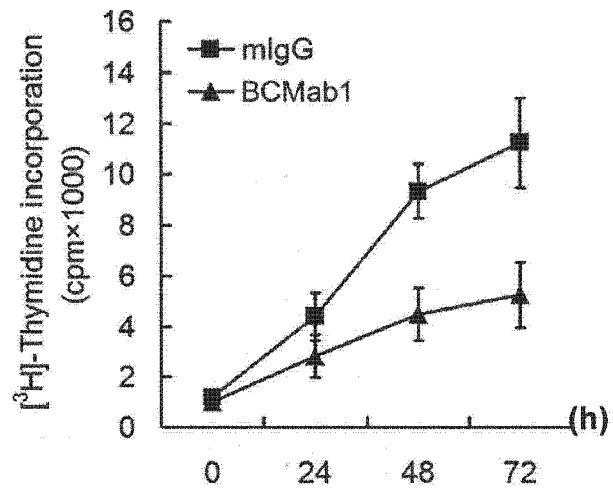


图 6

整合素 $\alpha 3$ 氨基酸序列:

MGPGPSRAPRAPRLMLCALALMVAAGGCVVSAFNLDTRFLVVKEAGNPGSLFGYSVALHRQTERQQRYLLLAGAPRELAVPDGY
 TNRTGAVYLCPLTAHKDDCERMNITVKNDFGHHI IEDMWLGVTVASQGPAGRVLVCAHRYTQVLWSGSEDQRRMVGKCYVRGND
 LELDSSDDWQTYHNEMCNSNTDYLETGMCQLGTSGGFTQNTVYFGAPGAYNWKGNYSYMIQRKEWDLSEYSYKDPEDQGNLYIGY
 TMQVGSFILHPKNITIVTGAPRHRHMGAVFLLSQEAGGDLRRRQVLEGSQVQVGFSAIALADLNNDGWQDLLVGAPYYFERKE
 EVGGAIYVFMNQAGTSFPAHPSLLLHGSPGSFAFGLSVASIGDINQDGFQDIAGVAPFEGLGKVYIYHSSSKGLLRQPQV IHGE
 KLGLPGLATFGYSLSGQMDVDENFYPDLLVGSLSDHIVLLRARPVINIVHKTLPVPRPAVLDPALCTATSCVQVELCFAYNQSAG
 NPNYRRNITLAYTLEADRRRPPRLRFAGSESAVFHGFSSMPEMRCQKLELLMDNLRDKLRPIIISMNYSPLRMPDRPRLGL
 RSLDAYPILNQAQALENHTEVQFQKECGPDNKCESNLQMAAFVSEQQKLSRLQYSRDRVKLLSINVTNTRTSERSGEDAHE
 ALLTLVPPALLSSVRPPGACQANETIFCELGNPFKRNQRMELLIAFEVIGVTLHTRDLQVQLQLSTSSHQDNLWPMILTLLV
 DYTLLQTSLSMVNHLQSFQGGTVMGESGMKTVEDVGSPLKYEFQVGPMEGLVGLGLVGLGLEWVPEVSNQKWLLYPTEITVHG
 NGSWPCRPDGLINPLNLTSDPGDRPSSPQRRRRQLDPGGGQPPPVTLAAAKKAKSETVLTTCATGRAHCWLECPIDAPVV
 TNVTVKARVWNSTFIEDYRDFDRVRVNGWATLFLRTSIPTINMENKTTWFSVDIDSELVEELPAEIELWLVLVAVGAGLLLLGL
 IILLWKCFFKRARTRALYEAKRQKAEMKSPSETERLTDY

图 7

整合素 $\beta 1$ 氨基酸序列:

MNLQPIFWIGLISSVCCVFAQTDENRCLKANAKSCGECIQAGPNCGWCTNSTFLQEGMPTSARCDDLEALKKKGCPPDDIENPR
 GSKDIKKNKNTNRSGTAEKLPEDITQIQPQLVLRRLRSGEPQFTLKFKAEDYPIDLYYLMDSLYSMKDDLENVKS LGTD
 LMNEMRRI TSDFRIGFGSFVEKTVMPYISTTPAKLRNPCTSEQNCTSPFSYKNVLSL TNKGEVFNELVGKQRISGNLDSPEGGF
 DAIMQVAVCGSLIGWRNVTRLLVFSTDAGFHFAGDGKLGIVLPNDGQCHLENNMYTMSHYDYPSIAHLVQKLENNIQTIFA
 VTEEFQPVYKELKNLIPKSAVGTLSANSSNVIQLI IDAYNSLSSEVILENGKLESGVTISYKSYCKNGVNGTGNGRKCNSISI
 GDEVQFEISITSNKCPKSDSDFKIRPLGFTEEEVILQYICECECQSEGIPESPKCHEGNGTFECGACRCNEGRVGRHCECST
 DEVNSEDMDAYCRKENSSEICSNNGECVCGQCVCRKRDNTNEIYSGKFCECDNFNCDRSGLICGGNGVCKCRVCECNPNYTG
 ACDCSLDTSTCEASNGQICNGRGICEGVCCKCTDPKFGQTCEMCQTC LGVCAEHKECVQCRAFNGEKKDTCTQEC SYFNITK
 VESRDKLPQPVQDPVSHCKEKDVDDCFYFTYSVNGNNEVMHVVENPECPTGPDIPVAVGVAGIVLIGLALLLIWKLLMI
 IHDRREFAKFEKEKMNKWDGTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK

图 8