

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710039873.3

[51] Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 29 日

[11] 公开号 CN 101293924A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/04 (2006.01)

[22] 申请日 2007.4.24

[21] 申请号 200710039873.3

[71] 申请人 上海国健生物技术研究院

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区郭守敬路 351 号 1 号楼 431 室

[72] 发明人 郭亚军 戴建新 王 皓 寇 庚
侯 盛 钱卫珠 彭 玲

权利要求书 1 页 说明书 27 页 附图 7 页

[54] 发明名称

骨桥蛋白的功能表位、与其特异性结合的单克隆抗体及其在制备抗肿瘤转移药物中的用途

[57] 摘要

本发明公开了一种骨桥蛋白的功能表位 NAPS, 与这个表位特异性结合的单克隆抗体 1A12, 本发明还公开了单克隆抗体 1A12 的重链可变区氨基酸序列 SEQID NO.4 和轻链可变区氨基酸序列 SEQ ID NO.6, 本发明进一步公开了此抗体在制备抗肿瘤转移药物中的用途。

1. 骨桥蛋白的功能表位NAPS。
2. 与权利要求1所述的功能表位特异性结合的抗骨桥蛋白的单克隆抗体。
3. 权利要求2所述的单克隆抗体，其重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO. 4，轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO. 6。
4. 单克隆抗体1A12，其重链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO. 4，轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO. 6，恒定区为小鼠IgG。
5. 一种DNA分子，编码权利要求1所述的单克隆抗体。
6. 权利要求5所述的DNA分子，其包含编码重链可变区的核苷酸序列SEQ ID NO. 3和编码轻链可变区的核苷酸序列SEQ ID NO. 5。
7. 权利要求2-4任一所述的抗骨桥蛋白的单克隆抗体在制备抗肿瘤转移药物中的应用。
8. 权利要求7所述的应用，其中肿瘤为腺癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、肉瘤之一，肿瘤组织来自肾上腺、胆囊、骨、骨髓、脑、乳腺、胆管、胃肠道、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、胰腺、甲状旁腺、阴茎、前列腺、皮肤、唾液腺、脾脏、睾丸、胸腺、甲状腺和子宫。
9. 权利要求7所述的应用，其中肿瘤为中枢神经系统的肿瘤如胶质细胞多样性瘤、星细胞瘤之一。
10. 权利要求7所述的应用，其中肿瘤还可以为眼部肿瘤、内分泌腺肿瘤、神经内分泌系统肿瘤、胃肠道胰腺内分泌系统肿瘤，生殖系统肿瘤及头颈部肿瘤之一，其中眼部肿瘤可以为基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑色素瘤。

骨桥蛋白的功能表位、与其特异性结合的单克隆抗体 及其在制备抗肿瘤转移药物中的用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，更具体地，本发明公开了一种蛋白的功能表位、与这个表位特异性结合的单克隆抗体及其在制备抗肿瘤转移药物中的用途。

背景技术

肿瘤是严重危害我国人民生命健康的重大疾病，肿瘤手术切除后 5 年，生存率可达 40%左右，但仍有一半左右的病人手术后出现转移复发。如何控制肿瘤切除后很高的转移复发率以提高肿瘤患者的疗效，是国际医学研究的重点攻关课题。深入研究肿瘤细胞转移的机理有助于阐明肿瘤转移复发的分子机制，了解促进转移的信号传导通路，寻找抑制转移的有效作用环节，为新药研制和临床治疗提供更有效的阻断靶点，提高肿瘤病人的生存率。

肿瘤转移分子机理研究提示多种因素与肿瘤细胞转移密切相关，如：p16 突变、p53 突变，p21、c-erbB-2、mdm-2、转移生长因子 α (TGF α)、表皮生长因子受体 (EGF-R)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、尿激酶型纤溶酶原激活物 (uPA) 及其受体与纤溶酶原激活物抑制剂-1 (PAI-1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管内皮生长因子 (VEGF)、血小板衍化内皮生长因子 (PD-ECGF) 等为肝癌侵袭性正相关因子 (Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 ; 17(5):559-64. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct; 17(5):548-58.)。

近年来的研究发现骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 在肿瘤细胞转移过程中发挥了至关重要的作用 (Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends Cell Biol. 2006 Feb;16(2):79-87.), 在各国研究小组共同努力下, OPN 促转移信号通路领域不断有新的报道, 从不同的角度对其促肿瘤细胞转移功能的主要方面进行了解释, OPN 信号通路在促进肿瘤细胞转移方面的重要调控作用已经成为国际肿瘤转移研究领域的研究热点。

骨桥蛋白作为一种重要的促肿瘤转移糖蛋白信号分子在骨骼组织、肾脏组织、大脑组织、腺体表皮细胞、血管平滑肌细胞、活化的巨噬细胞、淋巴细胞和肿瘤细胞中均有表达 (Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). Science (Washington, DC) 1996;271: 509 - 12.)。OPN 在肿瘤组织细胞外基质中, 能够通过激活肿瘤细胞表面的 CD44 (Miyachi A, Alvarez J, Greenfield EM, et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an $\alpha v \beta 3$ integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. J Biol Chem 1991;266:20369 - 7) 和 Integrin (Teramoto H, Castellone MD, Malek RL, Letwin N, Frank B, Gutkind JS, Lee NH. Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. Oncogene. 2005 Jan 13;24(3):489-501.) 两大受体下游的信号通路, 促进肿瘤细胞对细胞外基质的降解、细胞迁移和细胞的抗凋亡能力, 包括以下几个方面: OPN 信号被受体 CD44 识别引起肿瘤细胞 Rho 家族小 G 蛋白如 Rac 的活化 (Teramoto H, Castellone MD, Malek RL, Letwin N, Frank B, Gutkind JS,

Lee NH. Autocrine activation of an osteopontin-CD44-Rac pathway enhances invasion and transformation by H-RasV12. *Oncogene*. 2005 Jan 13;24(3):489-501.), 小 G 蛋白传达细胞外化学趋化信号至下游的效应蛋白如 Wiskott - Aldrich syndrome protein (WASP) 家族成员, WASP 蛋白结合并活化 Actin 相关蛋白 (Arp2/3) 复合物, 后者催化肌动蛋白 Actin 的聚合反应, 从而诱导肿瘤细胞骨架重构以及细胞膜突起的形成, 增强细胞的迁移能力 (Wolf K, Mazo I, Leung H et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003; 160: 267 - 77.); 在迁移细胞被拉伸的前缘, 活化的 WASP 蛋白促使突出的细胞膜形成 Integrin 依赖的细胞粘附, 诱导基质金属蛋白酶在局部的积累促进细胞外基质的降解 (Nicholson, K.M. and Anderson, N.G. (2002) The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell. Signal.* 14, 381 - 395); 此外 OPN-CD44 下游通路可以激活 PI-3K, 而 PI-3K 的靶分子之一就是 Akt 激酶, Akt 激酶调控细胞周期的进行, 促进细胞存活, 细胞锚定非依赖性生长以及细胞迁移等过程, 介导了 OPN 促进肿瘤抗凋亡和细胞迁移功能 (Lin, Y.H. and Yang-Yen, H.F. (2001) The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 46024 - 46030. Philip, S. and Kundu, G.C. (2003) Osteopontin induces nuclear factor- κ B mediated pro-matrix metalloproteinase-2 activation through I κ B α /IKK signaling pathways and curcumin (diferulolylmethane) downregulates these pathways. *J. Biol. Chem.* 278,

14487 - 14497)。OPN 被受体 $\alpha v \beta 3$ 识别后激活 NIK 和 MEKK1 分别引起下游 NF- κB 和 AP-1 的活化入核诱导效应基因 uPA 和 MMPs 表达的上调,促进了对细胞外基质的降解(Rangaswami, H. et al. (2004) Nuclear factor inducing kinase plays a crucial role in osteopontin induced MAPK/IKK α kinase dependent nuclear factor κB mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. J. Biol. Chem. 279, 38921 - 38935, Rangaswami, H. et al. (2005) JNK1 differentially regulates osteopontin induced nuclear factor inducing kinase/MEKK1 dependent activating protein 1-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. J. Biol. Chem. 280, 19381 - 19392)。综上所述,OPN 信号通路功能的发挥为肿瘤转移细胞完成对细胞外基质的浸润、通过血液或者淋巴循环向外周组织器官扩散和形成转移灶的各个阶段中表现出多方面的重要调控功能。

通过抗 OPN 抗体阻断 OPN 的促转移信号传导通路,就有可能有效阻断肿瘤细胞的黏附和迁移过程,防止肿瘤细胞向细胞基质的浸润,从而防止肿瘤的转移。

发明内容

本发明的目的之一是公开了骨桥蛋白的功能表位NA1PS。

本发明的另外一个目的是公开了与上述功能表位特异性结合的抗骨桥蛋白的单克隆抗体。

本发明还公开了上述单抗的重链可变区氨基酸序列SEQ ID NO. 4, 轻链可变区氨基酸序列SEQ ID NO. 6。

更具体地,本发明公开了抗骨桥蛋白的单克隆抗体1A12, 其重链可变区氨

基酸序列为SEQ ID NO. 4, 轻链可变区氨基酸序列为SEQ ID NO. 6, 恒定区为小鼠IgG。

本发明还公开了一种DNA分子, 编码上述的抗骨桥蛋白的单克隆抗体。

本发明更进一步公开了上述编码抗骨桥蛋白单克隆抗体的DNA分子其包含编码重链可变区的核苷酸序列SEQ ID NO. 3和编码轻链可变区的核苷酸序列SEQ ID NO. 5。

本发明的另外一个目的是公开了上述抗骨桥蛋白的单克隆抗体在制备抗肿瘤转移药物中的应用。

本发明所述的与本发明中公开的上述骨桥蛋白功能表位特异性结合的抗骨桥蛋白的单克隆抗体, 包括但不限于利用重链可变区氨基酸序列 SEQ ID NO. 4 与轻链可变区氨基酸序列 SEQ ID NO. 6通过现有的分子生物学技术得到的单克隆抗体, 还包括与本发明中公开的上述骨桥蛋白功能表位特异性结合的利用现有的分子生物学技术可以得到的嵌合的单克隆抗体、人源化及全人源的单克隆抗体。

本发明所称的肿瘤, 包括但不限于腺癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、肉瘤, 肿瘤组织的来源包括但不限于肾上腺、胆囊、骨、骨髓、脑、乳腺、胆管、胃肠道、心脏、肾脏、肝脏、肺、肌肉、卵巢、胰腺、甲状旁腺、阴茎、前列腺、皮肤、唾液腺、脾脏、睾丸、胸腺、甲状腺和子宫。除了上述的肿瘤外, 还可用于中枢神经系统的肿瘤如胶质细胞多样性瘤、星细胞瘤等, 此外眼部的肿瘤包括基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑色素瘤等, 还包括内分泌腺肿瘤、神经内分泌系统肿瘤、胃肠道胰腺内分泌系统肿瘤, 生殖系统肿瘤及头颈部肿瘤等。这里不再一一列举。

本发明所称的抗肿瘤转移药物,包括但不限于预防和/或治疗肿瘤转移的药物。

具体地, 本发明的申请人首先利用分子生物技术克隆人和鼠OPN基因, 利用真核细胞表达了人和鼠的OPN蛋白, 并通过细胞融合 杂交瘤的方法制备了鼠抗人的OPN单克隆抗体1A12, 还对此单克隆抗体的基因进行了克隆并测定了其序列。

本发明的申请人利用乳腺癌细胞株MDA-MB-435s进行了一系列实验, 来验证本发明公开的鼠抗人OPN单克隆抗体1A12对肿瘤转移的抑制作用。细胞贴壁实验结果显示抗OPN抗体1A12可以有效阻断MDA MB-435s细胞和hOPN的结合, 细胞侵袭实验结果表明抗OPN抗体1A12可有效阻断MDA-MB 435s 于hOPN存在时进行的基底膜侵袭, 损伤划痕实验结果显示抗OPN抗体1A12可以有效抑制细胞损伤划痕的修复, 软琼脂克隆形成实验结果显示抗OPN抗体1A12可以抑制MDA-MB-435s细胞在软琼脂上克隆形成的大小, 相应地, 作为对照的无关抗体则没有上述作用, 从而说明了本发明公开的上述抗hOPN抗体1A12可有效抑制转移肿瘤灶的形成的作用。

本发明的申请人还利用噬菌体展示技术鉴定了抗hOPN抗体1A12作用的OPN的功能表位, 这个功能表位为NAPS, 进一步阐明了OPN分子的作用靶点。更具体地, 本发明的申请人通过单克隆抗体抗原表位的淘选、phage clones ELISA和western blot鉴定测序及序列分析推测出OPN的功能表位, 进一步通过Phage克隆与抗体结合能力分析选择结合力最强的克隆合成了系列短肽, 通过这些短肽与特异性抗体的结合实验对此表位进行了鉴定。

附图说明

图1. 人、鼠OPN真核表达纯化后的SDS-PAGE电泳图；M代表蛋白质标准分子量；

图 2. 抗 hOPN 单抗 1A12 的 Western blotting 结果；

图 3. 抗 hOPN 单抗 1A12 阻断肿瘤细胞黏附的结果；

图 4. 抗 hOPN 单抗 1A12 抑制肿瘤细胞对基底膜侵袭的结果；

图 5. 抗 OPN 单抗 1A12 抑制肿瘤细胞对损伤划痕的修复；

图 6. 抗 OPN 单抗 1A12 抑制肿瘤细胞在软琼脂上克隆形成的结果；

图 7. 抗 OPN 单抗 1A12 淘选三轮后的产出效率比较图；

图 8. 抗 OPN 单抗 1A12 阳性噬菌体 ELISA 和 WESTERN 鉴定图,图 8-1 为 phage ELISA 鉴定图, 图 8 2 为 1A12 阳性噬菌体 ELISA 和 WESTERN 鉴定图；

图 9. Align X 软件序列分析抗 OPN 单抗 1A12 的结合表位结果；

图 10. 各种序列表位与抗 OPN 单抗 1A12 结合力的比较；

图 11 抗 OPN 单抗 1A12 特异识别表位在 OPN 分子上的相对部位。

具体实施方式

以下结合实施例、实验例进一步对本发明进行说明，这些实施例、实验例不应理解为对本发明的限制。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法以及经典的细胞融合和单克隆抗体筛选及纯化的方法等。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniais, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold spring Harbor Laboratory Press.

实施例 抗 OPN 单克隆抗体的制备

实施例 1. 人 OPN cDNA 片段的克隆

参照 GENE BANK 提供的人 OPN 的资料及序列, 合成引物: OPN 引物 有义(引物 1): GGG AAGCTT ACCATGAGAAATTGCAGTGATTTG (Hind III) (SEQ ID NO.8) 和 OPN 反义(引物 2): GCC GGTACC ATTGACCTCAGAAGATGCAC (Kpn I) (SEQ ID NO.9)。扩增人肝癌细胞株 LM3 (购自上海中山医院), 用 TRISOL 试剂盒 (INVITROGEN) 提取 RNA, 通过 RT-PCR (PROMEGA) 94°C 5 分钟; 94°C 45 秒, 58°C 30 秒, 72°C 45 秒, 30 个循环; 72°C 10 分钟, 获得 963bp 的 DNA 片段。通过凝胶回收试剂盒 (上海生工) 回收片段后, 用限制型内切酶 Hind III 和 Kpn I 酶切, 凝胶电泳回收后, 与经 Hind III 和 Kpn I 双酶切的质粒载体连接, 转化大肠杆菌 DH10B 后, 筛选获得有插入片段的阳性克隆。DNA 序列测定确认, OPN 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

实施例 2. 鼠 OPN cDNA 片段的克隆

参照 GENE BANK 提供的鼠 OPN 的资料及序列, 合成引物: 鼠 OPN 引物 有 义 (引 物 3) : AT AAGCTT GGATGACGACGACAAGATGAGAATTGCAGTGATT (Hind III) (SEQ ID NO.10) 和鼠 OPN 反义(引物 4): AT CTCGAG TTAATTGACCTCAGAAGA(Kpn I)(SEQ ID NO.11)。分离鼠脾脏 T 淋巴细胞, 用 ConA 激活 30 小时后, 用 TRISOL 试剂盒 (INVITROGEN) 提取 RNA, 通过 RT-PCR (PROMEGA) PCR 反应采用热启动, 反应条件: 94°C 分钟; 94°C 45 秒, 55°C 30 秒, 72°C 45 秒, 30 个循环; 72°C 10 分钟。获得 963bp 的 DNA 片段。通过凝胶回收试剂盒 (上海生

工)回收片段后,用限制型内切酶 I Hind III 和 Kpn I 酶切,凝胶电泳回收后,与经 Hind III 和 Kpn I 双酶切的质粒载体连接,转化大肠杆菌 DH10B 后,筛选获得有插入片段的阳性克隆。DNA 序列测定确认。鼠 OPN 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

实施例 3. 人、鼠 OPN 的真核细胞表达纯化

将实施例 2 所得的序列正确的人、鼠 OPN 基因片段用相应的限制性内切酶酶切回收后,装入 pPICZ α 质粒中。转染毕式酵母细胞,挑取单个克隆酵母,诱导表达出人、鼠 OPN 蛋白,收集酵母细胞表达上清,经阴离子交换、分子筛纯化,SDS PAGE 证实得到人、鼠 OPN 纯蛋白。纯化后经 SDS PAGE 电泳,结果见附图 1。

图 1。

实施例 4. 鼠抗人 OPN 单克隆抗体的筛选与制备

100ug 人 OPN 和等体积弗氏佐剂乳化后,腹腔注射 BALB/C 小鼠免疫接种,每二周后加强免疫一次,剂量均同第一次免疫,共免疫 3 次后,选取血清中抗 OPN 抗体滴度较高小鼠,分离其脾脏淋巴细胞,利用经典的 PEG 法,将小鼠脾脏淋巴细胞与 NS-1 细胞进行细胞融合。用 10ug/ml OPN 包被 96 孔板,采用 ELISA 法反复筛选获得可稳定表达抗人 OPN 抗体的杂交瘤细胞株——1A12。大量扩增单克隆细胞株 1A12,腹腔注射 BALB/C 小鼠 5×10^6 /只,10 天左右开始收集小鼠腹水,利用 Protein A 柱,亲和层析纯化抗人 OPN 的单克隆抗体。Western blotting 试验结果显示,小鼠抗人 OPN 单克隆抗体 1A12 不但与人 OPN 蛋白特异结合,同时与鼠 OPN 蛋白也有交叉反应。结果见附图 2。

实施例 5. 鼠抗人 OPN 无关对照单克隆抗体 23C3D3 的筛选与制备

100ug 人 OPN 和等体积弗氏佐剂乳化后,腹腔注射 BALB/C 小鼠免疫接种,

每二周后加强免疫一次，剂量均同第一次免疫，共免疫3次后，选取血清中抗OPN抗体滴度较高小鼠，分离其脾脏淋巴细胞，利用经典的PEG法，将小鼠脾脏淋巴细胞与NS 1细胞进行细胞融合。用10ug/ml KLH-WLVPDP（上海业力公司合成）包被96孔板，采用ELISA法反复筛选获得可稳定表达抗人OPN特异表位抗体的杂交瘤细胞株——23C3D3。大量扩增该单克隆细胞株，腹腔注射BALB/C小鼠 5×10^6 /只，10天左右开始收集小鼠腹水，利用Protein A柱，亲和层析纯化抗人OPN特异表位的无关对照单克隆抗体23C3D3。通过测序确定其序列，其重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别为SEQ ID NO. 18和SEQ ID NO. 19，轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别为SEQ ID NO. 20和SEQ ID NO. 21，恒定区为小鼠IgG恒定区。23C3D3单抗也可以利用上述序列通过分子生物学技术得到。

实验例 鼠抗人OPN单克隆抗体1A12作用效果实验

MDA-MB-435s（购自中国科学院上海细胞学研究所）无关抗体（23C3D3，制备方法见实施例5）

实验例1 细胞贴壁实验

将96孔板（Greiner）以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的hOPN（来自实施例3）或BSA（SIGMA）包被， 4°C 过夜；用1%BSA/PBS于 37°C 封闭1小时，以阻断非特异性结合位点。MDA-MB-435s细胞用0.2%EDTA消化，重悬于0.25%BSA/DMEM中，调整细胞浓度为 5×10^5 细胞/ml。每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞，处理组同时加入 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的1A12单抗，对照组加入 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的无关抗体。将细胞在 37°C 细胞培养箱中孵育2小时后，以PBS洗2遍，洗去未贴壁的细胞。每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 1%甲醛于 4°C 固定细胞10分钟。PBS洗涤之后，每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 0.5%的结晶紫室温30分钟将

细胞染色。每孔加入 50 μ l 2%Triton X 100 裂解细胞，在 OD 595nm 处进行读数。

实验结果见图 3，抗 hOPN 的 1A12 单抗在 25 μ g/ml 可以有效阻断 MDA-MB-435s 细胞和 hOPN 的结合，而无对照抗体则无此作用。

实验例 2 细胞侵袭实验

细胞侵袭实验选用 Transwell 小室系统(Corning)进行，膜孔径大小为 8 μ m。小室的上层包被人工基底膜成分 Matrigel，在通风橱内吹干，用 DMEM 于 37 $^{\circ}$ C，1 小时对其进行水化。MDA-MB 435s 细胞用 0.2%EDTA 进行消化，重悬于 0.25%BSA/DMEM 中，调整细胞浓度为 5×10^4 细胞/ml。在小室的上层加入 100 μ l 细胞悬液（含或不含抗 OPN 单抗 1A12），在小室的下层加入 0.25%BSA/DMEM（含或不含 OPN），于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 24 小时。孵育结束，用棉拭子将小室上层的细胞刮除，穿过基底膜至下层的细胞用 PBS 洗涤之后，以 1% 甲醛固定之后，以 0.5% 的结晶紫进行染色，200 倍显微镜下观察，计数每个视野下细胞的数量。

实验结果见图 4，抗 hOPN 单抗 1A12 在 25 μ g/ml 即可有效阻断 MDA-MB-435s 于 hOPN 存在时进行的基底膜侵袭，而无对照抗体则无此作用。

实验例 3 损伤划痕实验

将 MDA MB 435s 细胞在 12 孔板中培养至接近饱和 (>90%)，用 PBS 洗涤之后，以无血清 DMEM 对细胞进行过夜血清饥饿。用 10 μ l 移液器枪头对单层细胞进行划线，用 PBS 洗去漂起的细胞。加入抗 OPN 的 1A12 单抗，使之终浓度为 25 μ g/ml，对照组采用无关抗体处理。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育 24 小时后，进行拍照。结果以穿越基准线的细胞数表示。

实验结果见图 5，抗 OPN 单抗 1A12 在 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可以有效抑制细胞损伤划痕的修复，而无关对照抗体则无此作用。

实验例 4 软琼脂克隆形成实验

软琼脂克隆形成实验使用双层软琼脂系统进行。将 2.5% 融化的琼脂粉与 37°C 预温的 DMEM 培养基混合，配制 0.5% 的琼脂粉溶液，再用 DMEM 稀释成浓度为 0.3% 琼脂粉溶液。在 24 孔细胞培养板每孔加入 500 μl 0.5% 琼脂粉溶液，置于 4°C 使其凝固后，转移至 37°C 细胞培养箱中保温。MDA-MB-435s 细胞以 0.2% EDTA 消化后，用 0.3% 琼脂粉溶液重悬，调整细胞浓度为 5×10^3 细胞/ml。在 24 孔板每孔中加入 500 μl 细胞悬液，并使其凝固。从第二日起，每隔 1 日向细胞培养板的各孔中加入 1A12 或无关抗体 (23C3D3) (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理，3 周后观察克隆形成的大小，以 >10 个细胞聚集作为 1 个克隆。

实验结果见图 6，抗 OPN 的 1A12 单抗可以抑制 MDA MB-435s 细胞在软琼脂上克隆形成的大小，而对照抗体则无此作用。说明该抗体可有效抑制转移肿瘤灶的形成。

实验例 1A12 单抗抗原表位的鉴定实验

实验例 1 1A12 单抗的可变区基因克隆和序列测定

收集 1A12 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 杂交瘤细胞；用 TRIzol (Invitrogen Cat. No. 15596-026) 抽提其总 RNA，根据小鼠抗体恒定区序列，设计引物如下：

HGSP1: 5' GATACTGTGATCTGTTG 3' (SEQ ID NO.12)

HGSP2: 5' TCGCAGATGAGTCTGGAC 3' (SEQ ID NO.13)

HGSP3: 5' ATGAACACACTCACATTG 3' (SEQ ID NO.14)

LGSP1: 5' -GAGGTTATGACTTTCATAGTCAGC-3' (SEQ ID NO.15)

LGSP2: 5' AACACTGTCCAGGACACCATCTCG-3' (SEQ ID NO.16)

LGSP3: 5' TCTGGGATAGAAGTTGTTCATGAG-3' (SEQ ID NO.17)

采用 Invitrogen 5' RACE kit (Cat.No. 18374 058), 分别以 HGSP1, LGSP1 为引物, 合成第一链 cDNA; 在 TdT 和 dCTP 作用下, 给第一链 cDNA 3' 端加 poly C 尾; 分别以 HGSP2, HGSP3、LGSP2, LGSP3 为 5' 引物, 通过巢式 PCR 得到 VH、VL 的 PCR 产物; 将 PCR 产物装入 pGEM T 载体中; 挑取克隆抽提质粒, 限制性内切酶鉴定得到阳性克隆, 通过测序确定其序列。1A12 单抗的重链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 3, 氨基酸序列为 SEQ ID NO. 4, 1A12 单抗的轻链可变区的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 5, 氨基酸序列为 SEQ ID NO. 6

实验例 2 m anti hOPN (1A12) 单克隆抗体抗原表位的淘选

采用随机肽库免疫淘选法, 整个过程在 96 孔板上进行。100ug/ml, 100ul/孔 1A12 抗体 4℃ 包被过夜, 10% 脱脂奶粉 (TBST 稀释) 封闭过夜, 1×TBST (Tween 20 0.1%) 洗涤 6 次; 噬菌体随机肽库 (购自 NEB, Ph. D. -12™ Phage Display Peptide Library Kit) 4×10^{10} pfu + 100ul 正常小鼠血清, 室温轻摇 1 小时。1×TBST (Tween-20 0.1%) 15 次; 用含 1mg/ml BSA 的 Glycine-Cl PH 2.2 洗脱, 室温轻摇 15min, 15ul Tris-Cl PH 9.1 中和。10ul 用于测滴度, 其余扩增。扩增产物经 PEG/NaCl 沉淀, 测滴度, 同时进行第二轮淘选, 相同过程进行第三轮淘选。每次 input 噬菌体数相同 (4×10^{10} pfu), 三轮淘选 output 噬菌体数分别为 6.9×10^3 pfu、 2.99×10^6 pfu、 1.69×10^8 pfu; 淘选效率分别是第一轮的 4333 和 240000 倍, 结果表明: 淘选富集效果明显, 见图 7。

实验例 3 无关对照抗体 23C3D3 对应噬菌体克隆的淘选

采用随机肽库免疫淘选法，整个过程在 96 孔板上进行。100ug/ml, 100ul/孔 23C3D3 抗体 4℃ 包被过夜，10% 脱脂奶粉 (TBST 稀释) 封闭过夜，1×TBST (Tween 20 0.1%) 洗涤 6 次；噬菌体随机肽库 (购自 NEB, Ph. D. -12™ Phage Display Peptide Library Kit) 4×10^{10} pfu + 100ul 正常小鼠血清，室温轻摇 1 小时。1×TBST (Tween 20 0.1%) 15 次；用含 1mg/ml BSA 的 Glycine-Cl PH 2.2 洗脱，室温轻摇 15min，15ul Tris Cl PH 9.1 中和。10ul 用于测滴度，其余扩增。扩增产物经 PEG/NaCl 沉淀，测滴度，同时进行第二轮淘选，相同过程进行第三轮淘选。用 23C3D3 抗体包板，ELISA 方法检测，选取阳性反应克隆——5F12，作为对照噬菌体。

实验例4 phage clones ELISA和western blot鉴定

ELISA过程在96孔板进行，100ug/ml, 50ul/孔1A12单抗4℃包被过夜，10% 脱脂奶粉 (TBST 稀释) 37℃ 封闭2小时，1×TBST (Tween 20 0.1%) 洗涤5次；各单克隆噬菌体扩增上清用1×TBS稀释后，均以 5×10^8 pfu/50ul，对照抗体为鼠抗人OPN单克隆抗体 (Santa Cruz)，阴性对照噬菌体为5F12 (该克隆为23C3D3的阳性克隆)。室温结合1小时，1×TBST (Tween-20 0.1%) 洗涤5次后，每孔加入200ul 1: 5000稀释的HRP标记的抗 M13抗体 (Pharmacia #27 9411-01)，室温震荡作用1 小时，1×TBST (Tween 20 0.1%) 洗涤5次，晶美公司ELISA检测试剂盒A:B=1:1新鲜配置的反应底物50ul/孔，室温1.5分钟。2N H₂SO₄终止反应。每个克隆对1A12和对照抗体23C3D3均设3复孔平行检测。OD₄₅₀记录结果表明，阳性克隆与抗体的反应是特异的。如图8-1。

Western blot 过程：扩增后的噬菌体单克隆上清经 20% PEG/NaCl 沉淀纯化后， 1×10^{10} pfu/lane 10% SDS PAGE 电泳，360mA 恒流 1 小时转至硝酸纤维素

膜, 10%脱脂奶粉 4℃封闭过夜或者室温封闭 2 小时; 1×TBST(Tween-20 0.1%) 洗涤 3 次, 每次 10 分钟; 与 10ug/ml 一抗室温反应 1 小时, 1×TBST(Tween-20 0.1%)洗涤 5 次, 每次 10 分钟; 1: 1000 稀释 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (北京中山公司) 室温反应 1 小时, ECL kit (Tiangen 公司) 反应 1-2 分钟, 医用 X 射线感蓝胶片压片曝光。左图为 1A12 单抗杂交, 右图为无关抗体 23C3D3 杂交; 箭头所示为目标条带; 结果显示: 阳性克隆与抗体的反应是特异的, 如图 8-2。

实验例 5 抗体识别表位的测序及序列分析

单链 DNA 提取试剂盒 (上海捷瑞公司) 制备模版, 96 引物测序, Chromas 读取序列, 100 个阳性克隆有 4 个独立序列; AlignX 分析, 结果有一致序列 NXNNAP, 又因为 G 与 A 均为非极性、芳香族氨基酸; S、T、N、P 均为极性, 不带电荷氨基酸; 在抗原 hOPN 序列上, 可以找到 NAPS 的同源 motif, 由此可见, 1A12 的可能抗原表位为: NAPS 结果见图 9

实验例 6 Phage 克隆与抗体结合能力分析

各个克隆均以 5×10^7 pfu 投入到包被有抗体的 96 孔板, 经过相同条件的淘选 (control antibody: 23C3D3; irrelative control phage : 5F12), 对洗脱后的噬菌体进行滴度测定 (参见 blood 2006 04 014639)。结果显示: hOPN 序列中表位 NAPS, 其中 APS 在介导 1A12 hOPN 的结合中起重要作用, 单独的 N 或 NN 不能介导两者的结合, 在表位 motif 的第二氨基酸位置 A、G 可以互换而不影响结合能力, 两者均为非极性、脂肪族氨基酸; 在表位 motif 的第四氨基酸位置, 只要是极性、不带电荷的氨基酸 (如: S、T、N、P) 就不会影响结合能力。该实验进一步证实: 1A12 的表位是 NAPS。结果见图 10

说明 1A12 抗体的特异识别表位位于 OPN 第七外显子处 212-215aa 处, 是一

个新的表位，表位的位置和序列如图 11 所示，序列也见 SEQ ID NO. 7。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海国健生物技术研究院

<120> 骨桥蛋白的功能表位、与其特异性结合的单克隆抗体及其用途

<130> Rangaswami H, Bulhule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. Trends Cell Biol. 2006 Feb;16(2):79-87.

<160> 7

<170> Patent'n version 3.4

<210> 1

<211> 935

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 人 OPN 核苷酸序列

<400> 1

```

atgagaattg cagigallig clittgcctc ctaggcaica cctgtgccat accngltaa 60
caggetgati clagnagtic tgaggaaag cagclitica acnaataccc agatgclgtg 120
gccacatggc taaccctga cccatcicag aagcagaatc tccagcccc acagaatgct 180
gtgtcctctg aagaaaccaa tgactttaa caagagacc tccaagtaa gtccaacgaa 240
agccatgacc acatggatga tatggatgat gaagatgat algaccatgt ggacagccag 300
gactccattg acicgaacga cictgatgat gtagatgaca ctgatgattc tcaccagict 360
gatgagtctc accattctga tgaatctgat gaaciggtca ctgattttcc cacggacctg 420
ccagcaaccg aagtlttcc tccagttgic cccacagtag acacatatga tggccgaggt 480
gatagtgtgk ttiatggact gaggtcaaaa tclaagnaag ttcgagacc tgacatccag 540
taccctgatg clacagacga ggacatcacc tcacacnigg aaagcgagga gttgaatggt 600
gcatacaagg ccatccccgt tgcccaggac ctgaaccgoc cltctgattg ggacagccgt 660
gggaaggaca glialgaac gnglcagctg gatgaccaga gigtgaaac ccacagccac 720
aagcagtcca gattatataa gcgaaagcc aatgatgaga gcaatgagca ttccgatgig 780
attgatagtc aggaacttcc caaagtcagc cgtgaattcc acagccatga atttcacagc 840
catgaagata tgciggttgt agaccccaaa agtaaggaag agataaaca cctgaaaltt 900

```

cgtatttctc atgaatlaga taglgaatct tciga 935
 <210> 2
 <211> 985
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 鼠 OPN 核苷酸序列
 <400> 2
 atgagattgg caglgallig cttttgectg ittgccattg cctcctccct cccggigaaa 60
 gtgactgatl ctggcagel aguggagaag ctllacagcc tgcaccaga tccatagcc 120
 acatggccgg tgcctgaccr atctcagaag cagaatctcc ttgcgccaca gaatgciglg 180
 tcctctgaag aataggatga cttaagcaa gaactcttc caagcaatic caatgaagc 240
 catgaccaca tggacgacga tgatgacgat gatgatgacg atggagacca tgcagagagc 300
 gaggattctg tggactcggg tgaatctgac gaactctacc atfcggatga gtcigatgag 360
 accgtcactg ctatgaacn agcagacact ttcctctcaa tgcctctac agtcgatgic 420
 cccaacggcc gaggtagatg ctggcctat ggactgaggt c magtctag gatttccag 480
 gtttctgatg aacagtalcc tgatgccaca gatgaggacc tcacctctca catgaagagc 540
 ggtgagtcta aggagtcctt cgatgtcacc cctgttgccc agcttctgag catgacctct 600
 gatcaggaca acacggaaa ggcagccat gagicagtc agctggatga accagictg 660
 gaacacaca gactlgaga ttccaaagag agccaggaga g'gccgatca gtcggatgtg 720
 atcgatagtc aagcaagtic caaagccagc ctggacatc aagccacaa gtttcacagc 780
 cacaaggaca agctagictt agaccctaag agtaaggaag atgataggtc tctgaaatic 840
 cgaatttctc atgaatlaga gaggctcatc tctgaggtca actaaagaag aggcaaaaac 900
 acagttcctt accttgcatt tagtaaaaac aagaaaagt gttagtgagg gtttaagcagg 960
 aatactaact gctcatttct cagtt 985
 <210> 3
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>

<223> 重链可变区核苷酸序列

<400> 3

```

atggcccagg tttagcigga gongtcigga cctgagcigg taagcctgg ggcctcagtg      60
aagatgtccf gcaagicttc tggatacaca ttaactaact atgttatgca ctgggigaag      120
cagaagccig ggaaggccct tgagtggatt ggatatatta atccttacaat tgaiggtagt      180
aagtacaatg agaaglitcaa aggcaaggcc aactgactt cagacaaatc ctccaacaca      240
gcctacatgg agctcagcag cctgacctct gaggactctg cggctctatta ctgigcnaagc      300
cactacggtg gtagccctgc ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctggc      357

```

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 重链可变区氨基酸序列

<400> 4

```

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

```

115

<210> 5

<211> 347

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 轻链可变区核苷酸序列

<400> 5

```

gatattttga tgaccacagac tccactctcc ctgccctgtca grettggaga tcaagccctcc    60
atctcttgcg gactctagca gagccttgta cacngtaatg gaaacaccta tttacattgg    120
tacctgcaga agccaggcca gletccaaag ctctctgatct acaaaagttc caaccgattt    180
tctggggctc cacacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagale    240
agcagagtgg agctgagga tctgggagtt tattctgct ccaaaagtac acatgltccg    300
tggacgttcg gtaggagcac caugctggaa ataaaacgtg cggccgc                    347

```

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 轻链可变区氨基酸序列

<400> 6

```

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

```


130 135 140
 Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly
 145 150 155 160
 Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg
 165 170 175
 Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His
 180 185 190
 Met Glu Ser Gln Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala
 195 200 205
 Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser
 210 215 220
 Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His
 225 230 235 240
 Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu
 245 250 255
 His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu
 260 265 270
 Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp
 275 280 285
 Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His
 290 295 300
 Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn
 305 310

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 8

gggaagctta caatgagaat tgcagtgatt tg	32
<210> 9	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
gccggtacca ttagcctcag aagatgcac	29
<210> 10	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
ataagcttgg atgacgacga caagatgaga atgcagtga !!	42
<210> 11	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
atctcgagtt aatgacctc agnaga	26
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	

<223> 引物

<400> 12

gatactgtga tc|gtttg

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 13

tcgcagatga gt|ctggac

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 14

atgaacacac tc|caatg

18

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 15

gaggttatga ct|tcatagt c|agc

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 16	
aacactgtcc aggacacccat ctcg	24
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 引物	
<400> 17	
tctgggatag aagtggttca tgag	24
<210> 18	
<211> 354	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 重链可变区	
<400> 18	
atgcccagc cagccatggc ctaggtgcag cgggaggagt clggtggagg attggcgcag	60
cctaaagggt catlgaanaa ttcattgtca gccctctggat tcacctcaa tatctacgcc	120
atgaactggg ccgccagge tccaggaaag ggtttggaat gggttgctcg cataagaagt	180
caaagtaata alinacnac atattatgcc gattcagtga aagacaggtt caccalcicc	240
agagatgatt cacaagcat gccttatctg caaatgaaca acitgaaaac tgaggacaca	300
gccatgtatt acrgtgtgag acaaatggga gactactggg gccaaaggcac cact	354
<210> 19	
<211> 118	
<212> PRT	
<213> Artificial	

<220>

<223> 重链可变区

<400> 19

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

115

<210> 20

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 轻链可变区

<400> 20

gacattgtga tgaccacagtc tccagcctcc ciatcigtat clgtgggaga aactgtcucc 60
 atcacatgtc gagcaagiga gnatatttac agtittitag cntggtatca gcagaaacag 120
 ggaaaatetc ctacgctcct ggtctatgct gcaacaaact tagctgatgg tgtgccaatca 180
 aggttcagtg gcaatggatc aggcacacag ttttccctca agatcaacag cctgcagtct 240

gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta cccattcac gttcggtcgc 300

gggacaaaagt tggaaataaa acgt 324

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 轻链可变区

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Glu Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

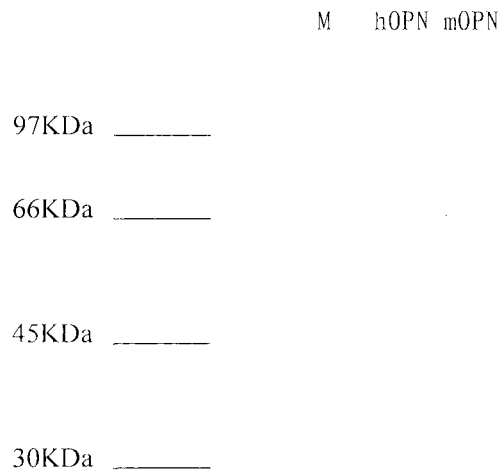


图 1

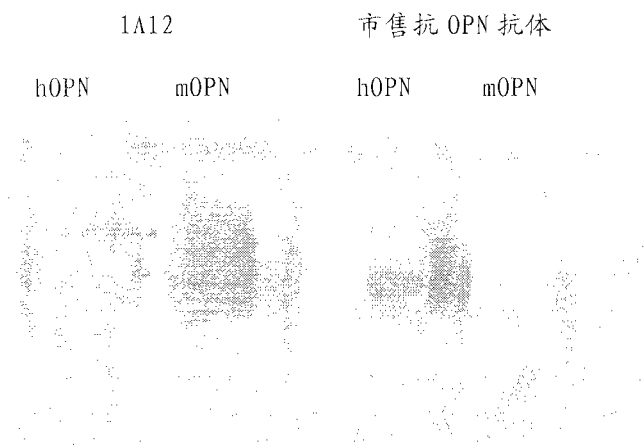


图 2

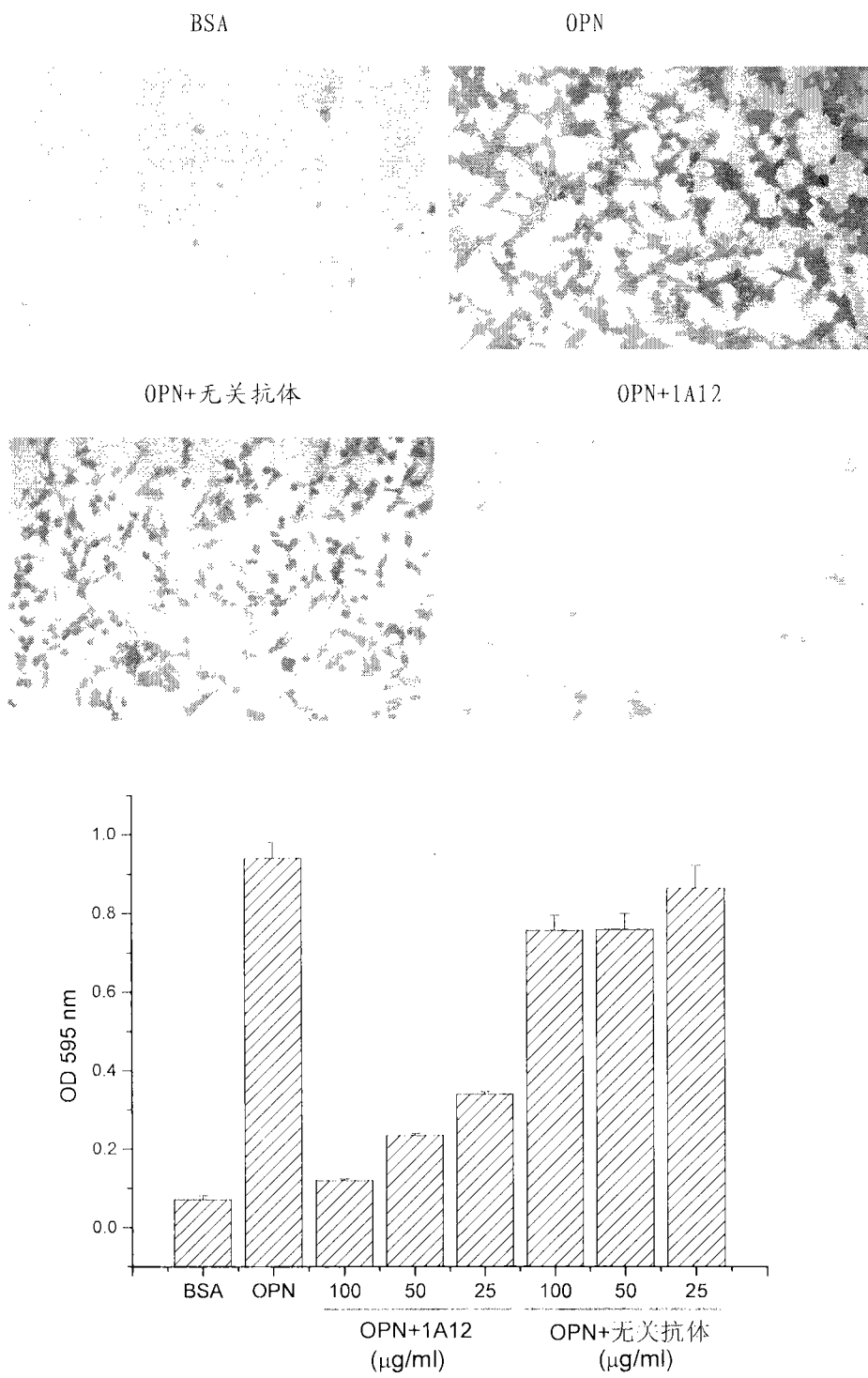


图 3

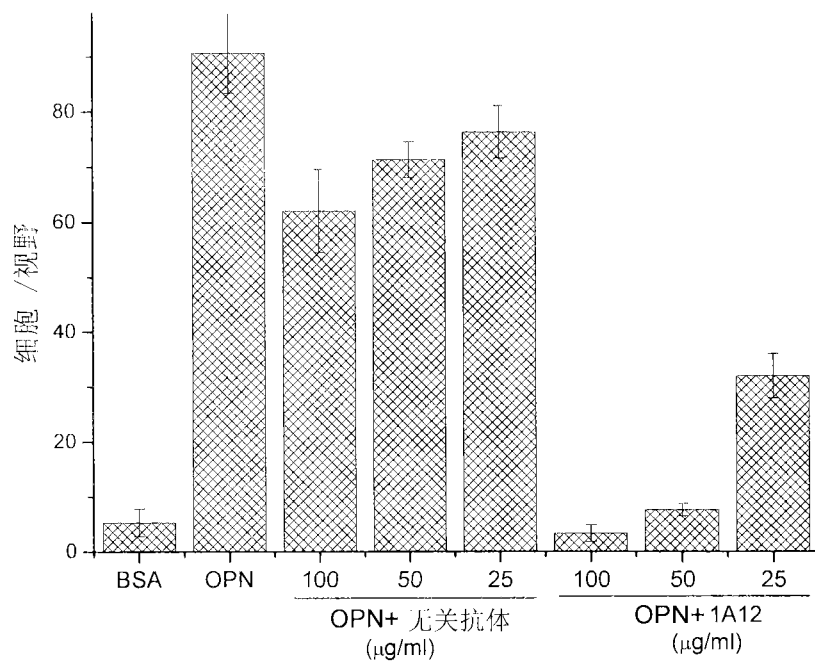
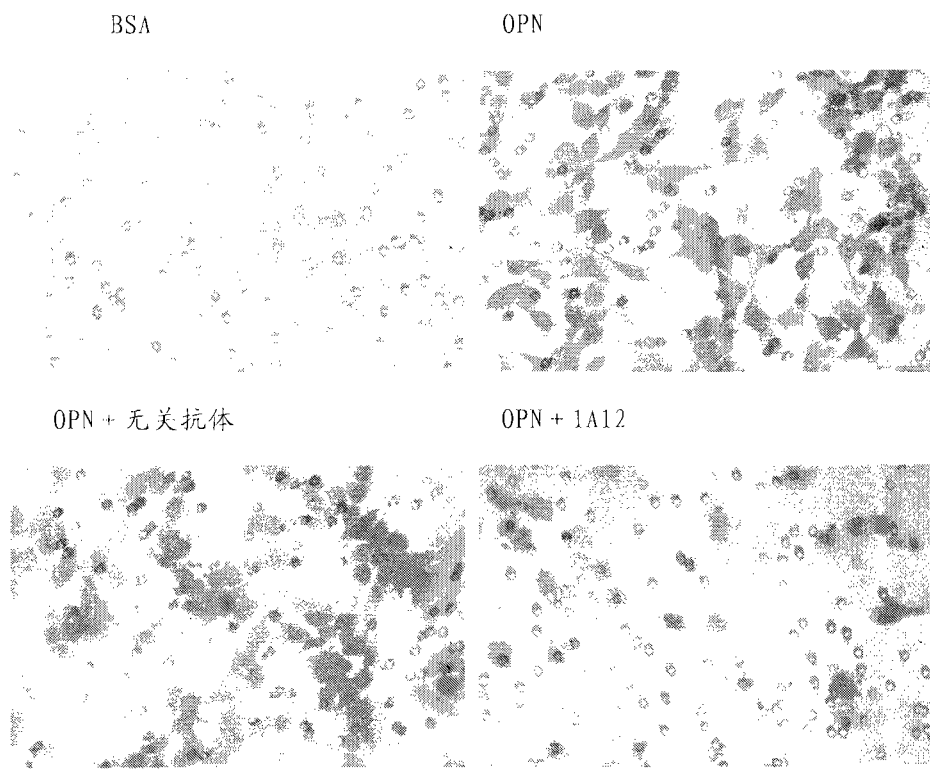


图 4

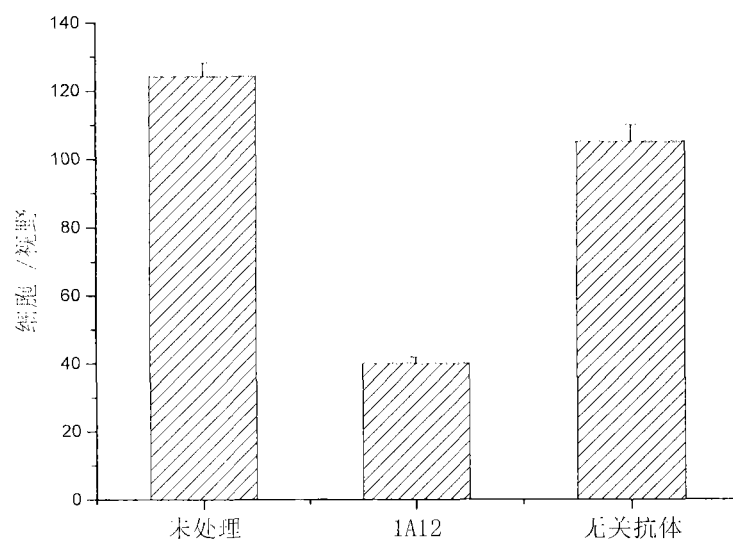
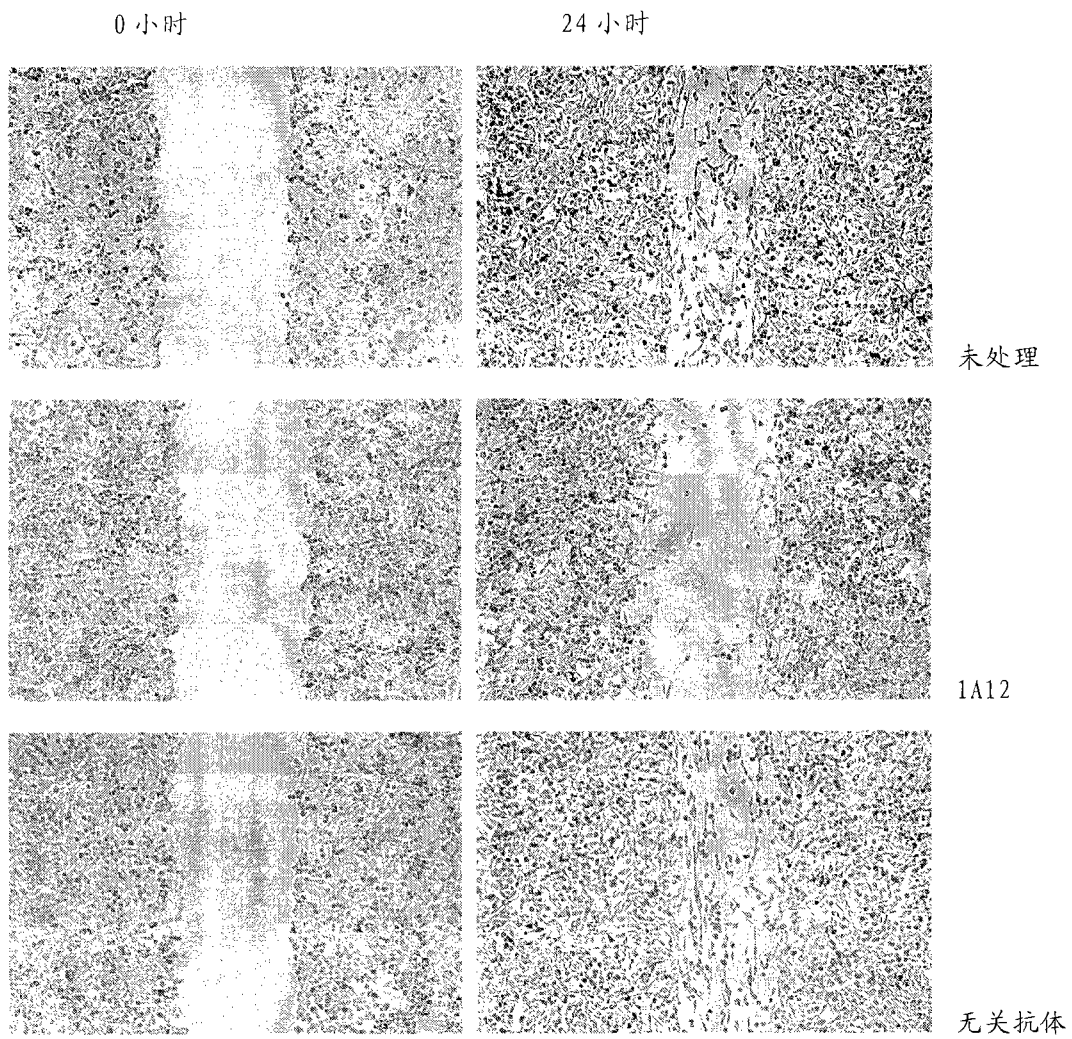


图 5

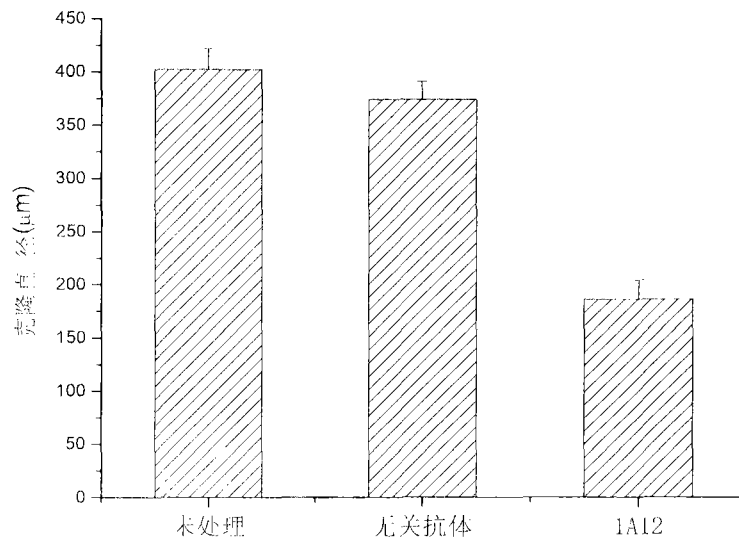


图 6

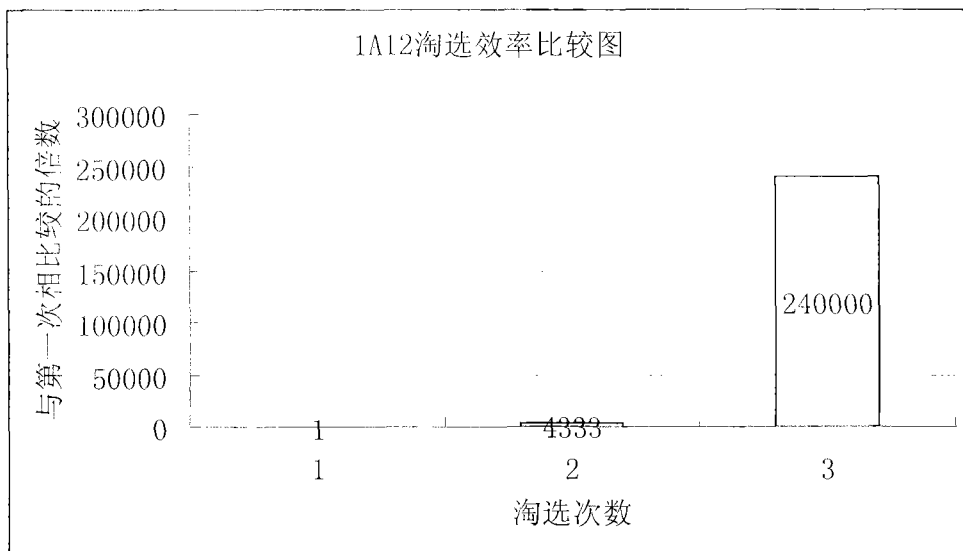


图 7

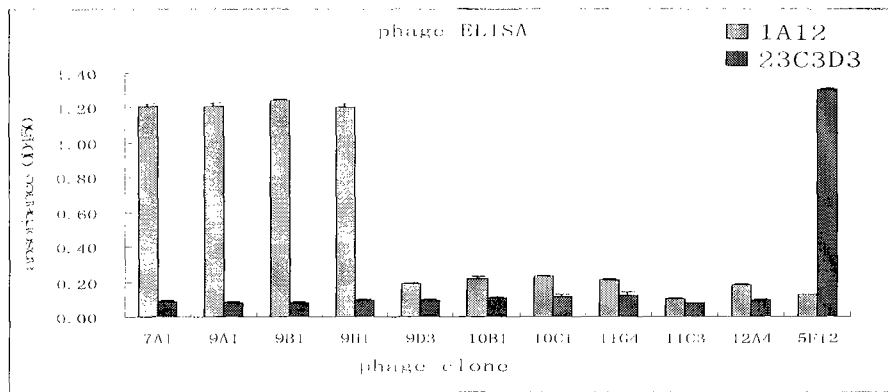


图 8-1

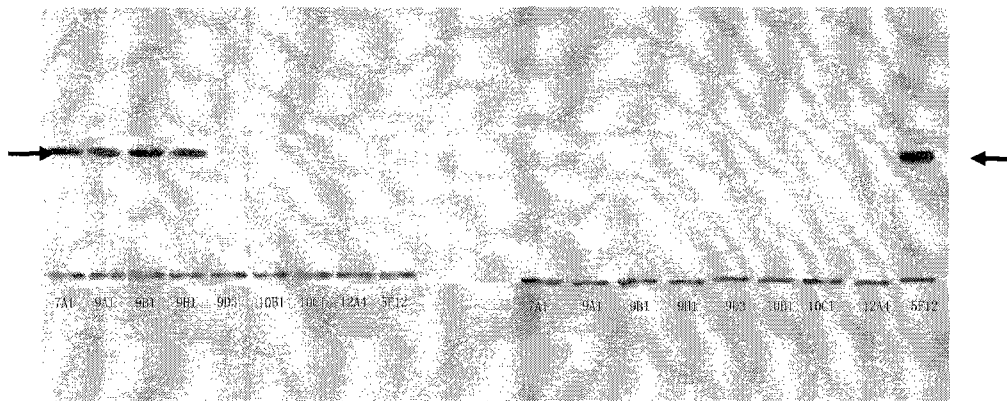


图 8-2

图 8

	1	10
10G4(2)	1	-SPIKYHOSPOGP-
11C3(2)	1	WTDRIFFDDYQGT--
12A4(1)	1	--LDHQINPROSDL
10C1(4)	1	-SISLSKHTEAS-
10B1(6)	1	--VTNTNNLWYTP
9D3(1)	1	-NALNHNNARIKQ-
hOPN seq	1	--VAQDLNAPSDWD
9H1(2)	1	-DTEMNNNGPNNX-
7A1(20)	1	--TTPNNAFTSYA
9A1(22)	1	-NAVNTNNAPNKY-
9B1 (56)	1	-NAVNTNNAPTKY-
Consensus	1	N NNAP

图 9

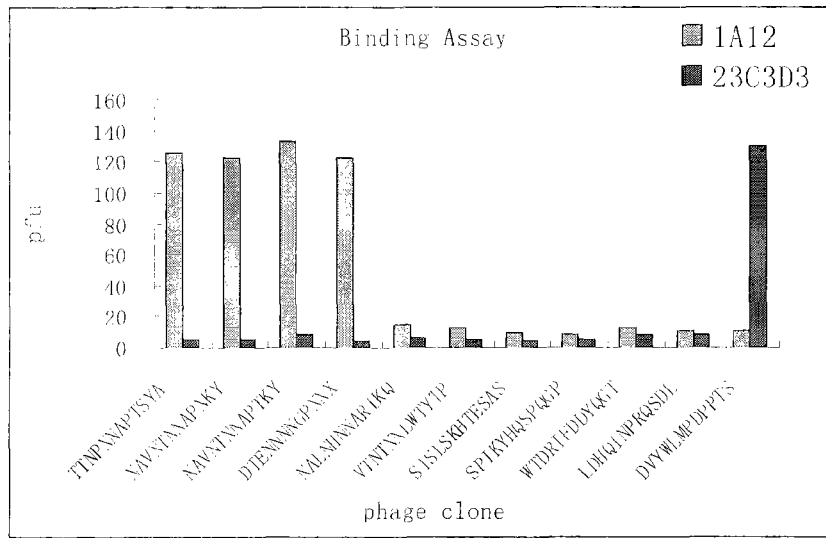


图 10

MRIAVICFLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQLYNKYPDAVATWLNPDPSQKQNLLAPQNAVSSEETNDF
 KQETLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSNDSDDVDDTDDSHQSDESHHSDESDELVTD
 FPTDLPAVEVFTPVWPTVDTYDGRGDSVVYGLRSKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHMESEELNGAYKA
 IPVAQDLNAPS¹DWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSR
 EFHSHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN

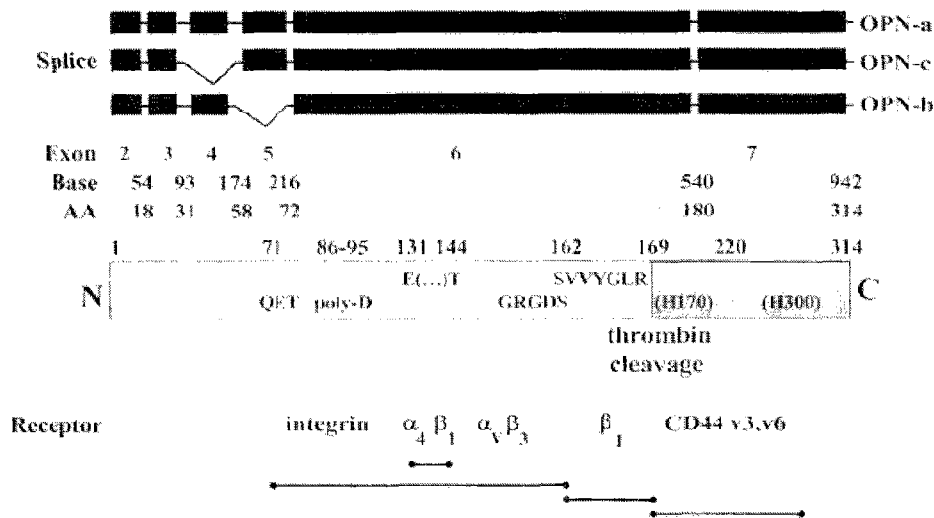


图 11