



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111378037 B

(45)授权公告日 2020.09.01

(21)申请号 202010481666.9

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2020.06.01

A61P 35/02(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 37/02(2006.01)

申请公布号 CN 111378037 A

A61P 11/06(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

(43)申请公布日 2020.07.07

A61P 29/00(2006.01)

(73)专利权人 南京诺艾新生物技术有限公司

A61P 1/00(2006.01)

地址 210032 江苏省南京市江北新区新锦

A61P 11/02(2006.01)

湖路3-1号中丹生态生命科学产业园B

A61P 25/00(2006.01)

座11楼1105室

(56)对比文件

(72)发明人 熊新辉 张弢 仲恺 吴伟

CN 107172879 A,2017.09.15

黄倩卉 徐辉 王青 潘红

CN 108064236 A,2018.05.22

CN 105980556 A,2016.09.28

(51)Int.Cl.

审查员 张智贤

C07K 16/24(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

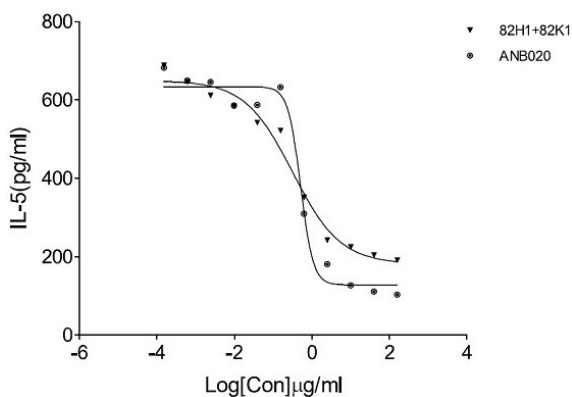
序列表25页 附图2页

(54)发明名称

一种抗hIL-33人源化单抗及其应用

(57)摘要

为了提供具有临床应用前景的抗hIL-33抗体,本发明基于现有技术中IL-33在炎症和肿瘤中作用机理、IL-33调控细胞因子分泌的功能、以及参与炎症和肿瘤的细胞因子,采用免疫小鼠B细胞淘筛技术获得高亲和力鼠抗人IL-33抗体,经过鼠源抗体重组表达、生物活性初筛、人源化改造、亲和力成熟和生物活性复筛,获得一株抗hIL-33人源化单克隆抗体,具有稳定性高、亲和力强、生物活性好、临床应用前景广等特点。



1. 一种抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其特征在于:所述抗体的重链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、7、3所示,轻链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。

2. 如权利要求1所述抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其特征在于:所述抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

3. 如权利要求1所述抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其为鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv。

4. 一种多核苷酸,其编码权利要求1-3中任一所述的抗体或其抗原结合片段。

5. 核酸构建体,其包括权利要求4所述多核苷酸。

6. 宿主细胞,其包含权利要求4所述的多核苷酸或权利要求5所述的核酸构建体。

7. 权利要求1-3中任一所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求4所述多核苷酸、权利要求5所述核酸构建体、权利要求6所述宿主细胞在制备治疗炎症和/或肿瘤药物中的应用。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于所述炎症和/或肿瘤选自哮喘、类风湿性关节炎、炎性肠病、特应性皮炎、过敏性鼻炎、鼻息肉、全身性硬化症、上皮癌、慢性髓性白血病、乳腺癌、胃肠癌。

## 一种抗hIL-33人源化单抗及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于抗体工程领域,具体涉及一种针对炎症和/或肿瘤的治疗性单抗,特别是涉及一种特异性结合并抑制抗IL-33功能的人源化单抗及其应用。

### 背景技术

[0002] 白介素33(IL-33)是一种与IL-1和IL-18相关的细胞因子,又被称为NF-HEV或IL-1F11。IL-33已被描述为“警报素”,因为在内稳态过程中其以全长形式存在于上皮细胞和内皮细胞的细胞核中,但在细胞坏死过程中可被裂解并释放。IL-33诱导的细胞反应的实例包括诸如IL-5、IL-6、IL-13、TNF、IFN- $\gamma$ 和GM-CSF的炎性细胞因子的产生,以及诸如CXCL8、CCL17和CCL24的趋化因子的产生。IL-33还展示通过加强由IgE受体信号转导或其它肥大细胞和嗜碱性粒细胞活化剂引发的肥大细胞和嗜碱性粒细胞的活化而增强急性过敏反应。IL-33还会增强表达ST2的免疫细胞的募集、存活和粘附特性,因此在激发和维持局部组织中的细胞炎症方面具有重要意义。IL-33通过与ST2受体(又称IL1RL1)和IL-1受体辅助蛋白(IL1RAP)相互作用介导其生物效应以活化NF- $\kappa$ B和MAP激酶信号通路中的胞内分子,诱导2型细胞因子释放。ST2受体的唯一已知配体是IL-33(参见例如,Schmitz等,Immunity.23(5)479-90(2005);Chackerian等,J.Immunol.179(4):2551-5(2007))。ST2受体在基线由Th2细胞和肥大细胞表达,两种细胞类型已知是过敏性哮喘的重要介质。胞外IL-33形式通过与ST2结合且随后激活NF $\kappa$ B和MAP激酶途径而刺激靶细胞,导致包括产生细胞因子和趋化因子的一系列功能反应。可溶性ST2(sST2)被认为是诱饵受体,阻止IL-33信号传导。现有技术文献已提出了ST2、IL-33和IL-1RAcP相互作用以及IL-1R1与IL-1RAcP之间相互作用的模型(Lingel等人,Cell 17:1398-1410,2009;Wang等人,Nat Immunol,11:905-11,2010)。IL-33的体内表达模式以及其细胞靶标均提示IL-33在Th2驱动病理学中的作用。例如,在中度至重度哮喘、异位性皮炎、过敏性鼻炎、食物过敏、类风湿性关节炎、多发性硬化和克罗恩病患者的炎症组织中已检测到IL-33表达。此外,ST2(IL-33R)远端启动子区域中的功能性单核苷酸多态性(SNP)已显示出与异位性皮炎显著相关(参见,例如,Shimizu等人,Hum Mol Genet.,14(19):2919-2927(2005))。全基因组关联研究(GWAS)也已显示出在多种族组多项研究中哮喘与IL-33和ST2(IL-33R)基因SNP的强相关性(参见,例如,Gudbjartsson等人,Nat Genet.,41(3):342-347(2009);Melén等人,JAAllergy Clin.Immunol.,126(3)631-637(2010);Moffatt等人,New Engl J Med.,363(13):1211-1221(2010);以及Torgerson等人,Nat.Genet.,43(9):887-92(2011))。IL-33(可能与IL-25和TSLP联合)还活化天然淋巴细胞(ILC2细胞),其导致Th2细胞因子分泌、抗寄生响应和组织免疫病理。

[0003] 已有研究表明IL-33/ST2途径失调与多种免疫介导的疾病有关,包括哮喘、类风湿性关节炎、炎性肠病、特应性皮炎、过敏性鼻炎、鼻息肉以及全身性硬化症(Palmer和Gabay,Nat Rev Rheumatol 7:321-9,2011和Lloyd,Curr Opin Immunol 22:800-6,2010;Shimizu等人,Hum Molec Gen 14:2919-27,2005;Kamekura等人,Clin Exp Allergy 42:218-28,2012;Manetti 等人,Ann Rheum Dis 69:598-605,2010)。研究还提示IL-33通过充当癌细

胞存活或生长因子而在表达IL-33受体的一些癌症如上皮癌(即,肿瘤)中发挥直接作用。这种IL-33响应性可能有助于某些癌细胞类型逃脱当前标准治疗(例如,慢性髓性白血病(CML)、乳腺癌和胃肠癌)。此外,IL-33可通过减少免疫系统在控制肿瘤细胞中的防护活性而在癌症进展中发挥间接作用。由于现有技术中较为明确的研究了IL-33与多种炎症、肿瘤等疾病相关,因此围绕IL-33激活剂、抑制剂的研究开发持续至今。随着抗体药物研究技术的进展,抗IL-33抗体逐渐成为研究的热点之一。

[0004] 尽管机理明确、研究方向清楚,但是由于抗体药物研发过程中的诸多不可控因素,导致抗IL-33抗体作为临床用药物仍有待深入研究。赛诺菲和再生元开发的全人源抗IL-33单抗REGN3500进行了一系列临床试验,包括哮喘、特异性皮炎、慢性阻塞性肺炎等,但临床应用前景仍不明朗。REGN3500与Dupixent(anti-IL-4R $\alpha$ )联合治疗哮喘的临床试验(NCT03112577)结果表明,单独使用REGN3500表现优于安慰剂组,但是REGN3500与Dupixent联用并未展现出比单用Dupixent更好的治疗效果;另外,全人源抗体REGN3500在临床上导致不良反应率较高,单独使用REGN3500的不良事件(AEs)发生率为61.6%。现有技术中尽管还有其它关于抗IL33抗体的报道,但在人源化程度、亲和力强度、影响细胞因子分泌等方面产生的效果均存在差异。

## 发明内容

[0005] 为了提供具有临床应用前景的抗hIL-33抗体,本发明基于现有技术中IL-33在炎症和肿瘤中作用机理、IL-33调控细胞因子分泌的功能、以及参与炎症和肿瘤的细胞因子,采用免疫小鼠B细胞淘筛技术获得高亲和力鼠抗人IL-33抗体,经过鼠源抗体重组表达、生物活性初筛、人源化改造、亲和力成熟和生物活性复筛,获得一株抗hIL-33人源化单克隆抗体,具有稳定性高、亲和力强、生物活性好、临床应用前景广阔等特点。具体而言:

[0006] 一方面,本发明提供一种抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其特征在于:所述抗体的重链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1-3所示,轻链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。

[0007] HCDR1 (SEQ ID NO:1):GYTFTSYWMH

[0008] HCDR2 (SEQ ID NO:2):EINPRX<sub>1</sub>GX<sub>2</sub>RX<sub>3</sub>YDX<sub>4</sub>KFKR,

[0009] 其中X<sub>1</sub>选自T、S、N, X<sub>2</sub>选自R、N, X<sub>3</sub>选自H、D, X<sub>4</sub>选自R、E

[0010] HCDR3 (SEQ ID NO:3):GNWFAY

[0011] LCDR1 (SEQ ID NO:4):TLVHSDGN

[0012] LCDR2 (SEQ ID NO:5):KVSNRFS

[0013] LCDR3 (SEQ ID NO:6):SQSTYV

[0014] 进一步,本发明所述抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其中

[0015] 所述抗体的重链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、7、3所示,轻链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示;

[0016] 所述抗体的重链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、8、3所示,轻链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示;或

[0017] 所述抗体的重链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、9、3所示,轻链可变区CDR1-3的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4-6所示。

[0018] HCDR2 (SEQ ID NO:7) :EINPRTGRRHYDRKFKR

[0019] HCDR2 (SEQ ID NO:8) :EINPRSGNRDYDEKFKR

[0020] HCDR2 (SEQ ID NO:9) :EINPRNGNRDYDEKFKR

[0021] 进一步,本发明所述抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其中

[0022] 所述抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示;

[0023] 所述抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示;

[0024] 所述抗体的重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示,轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

[0025] 进一步,本发明所述抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段,其至少包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv。

[0026] 第二方面,本发明提供一种多核苷酸,其编码第一方面所述的抗hIL-33单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0027] 第三方面,本发明提供核酸构建体,其包括第二方面所述多核苷酸。

[0028] 第四方面,本发明提供宿主细胞,其包含第二方面所述的多核苷酸或第三方面所述的核酸构建体。

[0029] 第五方面,本发明提供第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、第二方面所述多核苷酸、第三方面所述核酸构建体、第四方面所述宿主细胞在制备治疗免疫介导疾病药物中的应用。

[0030] 进一步,本发明所述的应用,其特征在于所述免疫介导的疾病包括炎症和肿瘤。

[0031] 其中,所述的炎症包括哮喘、类风湿性关节炎、炎性肠病、特应性鼻炎、过敏性鼻炎、鼻息肉、全身性硬化症等。

[0032] 所述的肿瘤包括上皮癌、慢性髓性白血病、乳腺癌、胃肠癌等。

[0033] 为更好理解本发明,首先定义一些术语。其他定义则贯穿具体实施方式部分而列出。

[0034] 术语“IL-33”是2005年新发现的一种白细胞介素,其分子量约18kDa,具有270个氨基酸,包含一个N末端核定位信号、螺旋-转角-螺旋的motif和C段与IL-1同源的结构,属于IL-1家族,常表达于屏障组织细胞,如皮肤、肠、肺等。当这些细胞发生损伤时,IL-33的胞外域能够被中性粒细胞丝氨酸蛋白酶、组织蛋白酶G和弹性蛋白酶酶切,产生活性形式的酶切片段,激活肥大细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞从而产生Th2类细胞因子。IL-33在炎症、感染、自身免疫性疾病中发挥着十分重要的作用。

[0035] 术语“特异性”是指在蛋白和/或其他生物异质群体中确定是否存在所述蛋白,例如本发明所述单抗与hIL-33的结合反应。因此,在所指定的条件下,特定的配体/抗原与特定的受体/抗体结合,并且并不以显著的量与样本中存在的其它蛋白结合。

[0036] 本文中的术语“抗体”意在包括全长抗体及其任何抗原结合片段(即,抗原结合部分)或单链。全长抗体是包含至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,重链和轻链由二硫键连接。各重链由重链可变区(简称VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成,即CH1、CH2和CH3。各轻链由轻链可变区(简称VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结

构域CL构成。VH和VL区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区,其由较为保守的框架区(FR)区分隔开。各VH和VL由三个CDR以及四个FR构成,从氨基端到羧基端以FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括多种免疫系统细胞(例如,效应细胞)和传统补体系统的第一组分(C1q)。

[0037] 术语“单克隆抗体”或“单抗”或“单克隆抗体组成”是指单一分子组成的抗体分子制品。单克隆抗体组成呈现出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0038] 本文中的术语,抗体的“抗原结合片段”(或简称为抗体部分),是指抗体的保持有特异结合抗原能力的一个或多个片段。已证实,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。包含在抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1构成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含较链区二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1构成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂VL和VH构成的Fv片段;(v) 由VH构成的dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); (vi) 分离的互补决定区(CDR); 以及(vii) 纳米抗体,一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,它们可以通过重组法经由使两者成为单蛋白链的合成接头而连接,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fc(scFv); 参见例如Bird et al., (1988) Science 242:423-426; and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这些单链抗体也意在包括在术语涵义中。这些抗体片段可以通过本领域技术人员已知的常用技术而得到,且片段可以通过与完整抗体相同的方式进行功能筛选。

[0039] 本发明的抗原结合片段包括能够特异性结合冠状病毒RBD的那些。抗体结合片段的实例包括例如但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv片段、单链Fv(scFv)片段和单结构域片段。

[0040] Fab片段含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端处的少数残基的添加,包括来自抗体较链区的一个或多个半胱氨酸。通过切割在F(ab')<sub>2</sub>胃蛋白酶消化产物的较链半胱氨酸处的二硫键产生Fab'片段。抗体片段的另外化学偶联是本领域普通技术人员已知的。Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段缺乏完整抗体的片段可结晶(Fc)区,从动物的循环中更快速地清除,并且可能具有比完整抗体更少的非特异性组织结合(参见例如,Wahl等人,1983, J. Nucl. Med. 24: 316)。

[0041] 如本领域通常理解的,“Fc”区是不包含抗原特异性结合区的抗体的片段可结晶恒定区。在IgG、IgA和IgD抗体同种型中,Fc区由两个相同的蛋白质片段组成,衍生自抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(分别为CH2和CH3结构域)。IgM和IgE Fc区在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域(CH2、CH3和CH4结构域)。

[0042] “Fv”片段是含有完整靶识别和结合位点的抗体的最小片段。该区域由以紧密的非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体(VH-VL二聚体)组成。在该构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用,以限定在VH-VL二聚体的表面上的靶结合位点。通常,六个CDR对抗体赋予靶结合特异性。然而,在一些情况下,甚至单个可变结构域(或仅包含对于靶特异性的三个CDR的Fv的一半)可以具有识别且结合靶的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0043] “单链Fv”或“scFv”抗体结合片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。一般地,Fv多肽进一步包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,其致使scFv能够形成有利于靶结合的结构。

[0044] “单结构域片段”由对冠状病毒RBD显示出足够亲和力的单个VH或VL结构域组成。在一个具体实施方案中,单结构域片段是骆驼化的(参见例如,Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38)。

[0045] 本发明的抗hIL-33的抗体包括衍生化抗体。例如,衍生化抗体通常通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白酶解切割、与细胞配体或其它蛋白质的连接来修饰。可以通过已知技术进行众多化学修饰中的任一种,所述技术包括但不限于特定的化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外,衍生物可以含有一种或多种非天然氨基酸,例如,使用ambrx技术(参见例如,Wolfson,2006,Chem.Biol. 13(10):1011-2)。

[0046] 术语“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体”在本文中术语“特异结合抗原的抗体”交替使用。

[0047] 术语“IC50”,又叫半抑制浓度,是指对指定的生物过程或该生物过程中的某个组份(例如酶、受体、细胞等)抑制一半时所需的药物或抑制剂的浓度。在竞争ELISA中是表征竞争抑制能力的一个重要指标。

[0048] 与现有技术相比,本发明的技术方案具有以下优点:

[0049] 第一,由于hIL-33是人体自身蛋白,利用人源抗体噬菌体展示文库筛选等方式获得的人源抗hIL-33抗体亲和力较低,这将导致体内复杂环境下调控IL-33/ST2途径的功能降低或丧失。本发明采用异源宿主小鼠制备鼠抗hIL-33抗体,然后进行人源化改造和亲和力成熟,既降低了对抗hIL-33抗体人体的异源性,又确保了对hIL-33的亲和力。

[0050] 第二,本发明采用了酵母展示技术对抗体分子进行亲和力成熟,与原核系统的噬菌体表面展示技术相比,酵母展示技术能对抗体分子进行糖基化,真核表达的抗体更接近人类抗体的天然结构,因而本发明采用酵母展示技术进行亲和力成熟的抗体更适应人体真核环境中发挥作用。

[0051] 第三,本发明通过小鼠B细胞克隆扩增测序、生物活性初筛、人源化改造、亲和力成熟、生物活性复筛获得的人源化抗hIL-33抗体不仅对人IL-33亲和力高,并且还能有效阻断IL-33刺激KU812细胞生成炎性细胞因子,从而预期能通过免疫调节达到抗炎、抗癌的效果。

## 附图说明

[0052] 通过阅读下文优选实施方式的详细描述,各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的,而并不认为是对本发明的限制。而且在整个附图中,用相同的参考符号表示相同的部件。在附图中:

[0053] 图1:鼠抗IL-33单抗结合hIL-33的ELISA检测结果曲线图

[0054] A为鼠抗IL-33单抗8141-252H+L2、8141-253H+L、8141-257H1+L、8141-48H1+L1、8141-259H1+L2、对照抗体LY3375880的ELISA检测结果;

[0055] B为鼠抗IL-33单抗8142-20H+L、8142-270H+L、8141-279H1+L1、8140-82H1+L1、对照抗体LY3375880的ELISA检测结果。

[0056] 图2:亲和力成熟的人源化抗体8140-82H1K1、对照抗体ANB020对IL-33刺激KU812细胞产生IL-5的抑制作用。

### 具体实施方式

[0057] 下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式,然而应当理解,可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反,提供这些实施方式是为了能够更透彻地理解本公开,并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0058] 材料和设备

[0059] Human IL33-his(南京诺艾新生物技术有限公司制备,lot. NAE05-20170824-ST)

[0060] Human IL33-his(南京诺艾新生物技术有限公司制备,lot. NAE05-20170604-GF-1-3-UF)

[0061] Human IL33-fc(南京诺艾新生物技术有限公司制备,lot. NAE05-20170604-GF-2-4-UF)

[0062] cyno ST2-fc(南京诺艾新生物技术有限公司制备,lot. NAE05-20171211-GF-4-5-UF)

[0063] 饲养细胞(南京诺艾新生物技术有限公司制备)

[0064] 巯基乙醇(sigma,cat. M3148-100ML,lot.SHBF0646V)

[0065] SAC, PANSORBIN Cells(MERCK,cat.507858-10GM,lot.D00175578)

[0066] DMEM/F12(GE,cat .SH30023.01,lot.AC10207067)

[0067] FBS(thermo,cat.10099-141,lot.1618862)

[0068] Human IL-5 DuoSet ELISA 试剂盒(R&D,cat.DY205-05, lot.P151330)

[0069] KU812(中国科学院细胞库,cat. TCHu189)

[0070] pGL4.32[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] 质粒(promega,cat. E8491,lot. 0000111050)

[0071] Bright-glo(promega,cat. E2620,lot. 0000181742)

[0072] Neon 10 $\mu$ L transfection kit (invitrogen,cat. MPK1096,lot. 2K10302)

[0073] PureLink™ RNA Mini Kit(invitrogen, cat. 12183018A,lot. 1884060)

[0074] PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(takara,cat.6210A, lot.AK4401)

[0075] Human IL-6 DuoSet ELISA 试剂盒(R&D,cat.DY206-05,lot.P181340)

[0076] HUVEC(Sciencell,德思特力赠送)

[0077] Human IL-8 DuoSet ELISA 试剂盒(R&D,cat.DY208-05, lot.P184392)

[0078] HMC-1(泽叶生物)

[0079] CO<sub>2</sub>孵箱(Thermo,型号3111)

[0080] 生物安全柜(Thermo,型号FORMA 1374)

[0081] 超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司,型号JB-CJ-2FC)

[0082] 低速台式离心机(湘仪,型号TDZ4-WS)

[0083] 洗板机(Biotek,型号Elx508)



- [0084] 电转仪(Bio-Rad,型号Gene Pulser Xcell)
- [0085] 超纯水仪(millipore,型号milli Q)
- [0086] 摇床(Kuhner,型号ISF1-XC)
- [0087] 酶标仪(MD,型号SpectraMax® i3X)
- [0088] 精密电子天平(Sartorius,型号Q224)
- [0089] 凝胶成像仪(Bio-Rad,型号Gel Doc EZ Imager)
- [0090] 对照抗体LY3375880来源于US20180118821A1 (SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 10所示的抗体)
- [0091] 对照抗体ANB020来源于专利CN106103480A (SEQ ID NO 136和SEQ ID NO 171)
- [0092] 实施例1:鼠源抗hIL-33单抗轻重链可变区氨基酸序列的确定
- [0093] 1.1动物免疫
- [0094] 采用大肠杆菌表达C末端融合了6个组氨酸标签的Human IL33 (NP\_254274.1) (Ser 112-Thr270) 按照常规弗氏佐剂免疫程序免疫6只BALB/c 小鼠,分两批进行免疫,每批免疫3只动物,两批之间间隔两周。每批动物进行4次免疫,用Human IL33-his进行ELISA检测,如果动物血清效价>1:100,000, 则进行动物终免,3-4天之后收集脾脏。
- [0095] 1.2 B细胞淘选及培养
- [0096] 在进行正式实验前2d将饲养细胞使用培养基铺到4个10cm培养皿(corning, cat.430167)中,在正式实验前1d使用25 $\mu$ g/mL MMC对两瓶饲养细胞进行处理6h,然后按照10000个/孔铺96孔板20块(corning, cat.3599),100 $\mu$ L/孔;同时使用六孔板包被抗原Human IL33 his,4 $^{\circ}$ C包被过夜。将收集的免疫后小鼠脾脏研磨过滤离心,采用红细胞裂解液去除红细胞,多次反复直到无明显红细胞。然后,将脾细胞加入到T75方瓶中去掉DC细胞。将一个脾脏获得的脾细胞均匀加入铺到上述已经包被抗原的六孔板中进行淘选,用胰酶将经过抗原淘选后的B细胞收集下来计数,并铺到上述已经铺有饲养细胞的96孔板中。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养10~14d左右,取B细胞培养上清进行ELISA和cell-based assay筛选。
- [0097] 1.3鼠抗上清筛选
- [0098] (1)鼠抗结合Human IL33-his ELISA筛选:将上述的免疫原Human IL33-his采用包被缓冲液稀释到1 $\mu$ g/mL,50 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜;第二天将包被板取出用PBST洗涤3次,再用封闭液室温孵育1h,PBST再洗涤3次,将已经形成明显克隆的B细胞孔内上清加入到ELISA板中,具体布局如表1所示;室温孵育1h,PBST洗涤三次,加入羊抗鼠二抗(1:10000),50 $\mu$ L/孔;室温孵育1h,PBST洗涤三次,加入TMB 50 $\mu$ L/孔,避光显色10min,2M硫酸100 $\mu$ L/孔终止;在酶标仪上读取OD450值,以阴性对照OD值10倍以上作为阳性判定标准。
- [0099] 1.4 B细胞测序
- [0100] 按照PureLink™ RNA Mini Kit试剂盒说明书提取B细胞克隆mRNA,并分装保存于-80 $^{\circ}$ C;以上述提取的mRNA作为模板采用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒方案逆转录成cDNA,并分装保存于-80 $^{\circ}$ C。按照表1和表2在苏州金唯智生物科技有限公司合成重链VH的引物和轻链VL的引物。以上述cDNA为模板,采用Extaq酶和重轻链可变区引物扩增VH和VL,然后连接到pMD18T载体送测序。
- [0101] 表1重链VH的引物

[0102]

VH-F-Mix1	OVH1	SAGGTCCAGCTGCAGCAGYYTGG
	OVH2	CAGGTRCAGCTGAAGSAGTCAGG
	OVH3	GAKGTGCAGCTTCAGCAGTCRGG
	OVH5	GAVGTGAWGCTGGTGGAGTCTGR
	OVH11	GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGG
	OVH14	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGK
	OVH15	CAGGTTACCTACAACAGTCTGG
VH-F-Mix2	OVH4	GAGGTGAAGCTTCTCGAGTCTGG
	OVH7	GAGGTGAAGCTGRTGGARTCTGR
	OVH8	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGG
	OVH9	CAGATCCAGTTGGYGCAGTCTGG
	OVH10	GAGGTGCAGCTTGTTGAGWCTGG
	OVH12	CAGATGCAGCTTCAGGAGTCAGG
	OVH13	GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGG
VH-F-Mix3	OVH6a	GAAGTGMAMTTKSWGCACTCTGG
	OVH6b	GAGGTGMAMTTKSWGCTGTCTGG
	OVH6c	GATGTGMAMTTKSWGCACTCTGG
	OVH6d	GAAGTGMAMTTKSWGCTGTCTGG
	OVH6e	GAGGTGMAMTTKSWGCACTCTGG
	OVH6f	GATGTGMAMTTKSWGCTGTCTGG
	OVH6g	GAAGTGMAMTTKSWGAGTCTGG
	OVH6h	GAGGTGMAMTTKSWGGTGTCTGG
	OVH6i	GATGTGMAMTTKSWGAGTCTGG
	OVH6j	GAAGTGMAMTTKSWGGTGTCTGG
	OVH6K	GAGGTGMAMTTKSWGAGTCTGG
	OVH6l	GATGTGMAMTTKSWGGTGTCTGG
VH-R-Mix	HF-1	GAGGAAACGGTGACCGTGGT
	HF-2	GAGGAGACTGTGAGAGTGGT
	HF-3	GCAGAGACAGTGACCAGAGT
	HF-4	GAGGAGACGGTGACTIONAGGT

[0103] 表2轻链VL钩取引物

[0104]

VLk-F-Mix1	OVK1	GATGYTKTKVTGACCCAAACTCC
	OVK3	RACATTGTGCTGACMCAATCTCC
	OVK4a	SAAAWTGTKCTCWCCAGTCTCC
	OVK4b	SAAAWTCTKCTCWCCAGTCTCC
	OVK4c	SAAAWTTTKCTCWCCAGTCTCC
	OVK6a	ARCATTGTGATGACCCAGWCTCA
	OVK6b	ARCATTGTGATGACCCAGWCTCC
	OVK6c	GRCATTGTGATGACCCAGWCTCA
	OVK6d	GRCATTGTGATGACCCAGWCTCC
	OVK10	GATATCCAGATGACACAGACTAC
	OVK14	GAMATCMWGATGACCCARTCTCC
VLk-F-Mix2	OVK2a	GATATTGTGATRACBCAGGYTGA
	OVK2b	GATATTGTGATRACBCAGGYTGC
	OVK5a	GAYATYCTGATRACRCAGTCTCC
	OVK5b	GAYATYGTGATRACRCAGTCTCC
	OVK5c	GAYATYTTGATRACRCAGTCTCC
	OVK5d	GAYATYCTGCTRACRCAGTCTCC
	OVK5e	GAYATYGTGCTRACRCAGTCTCC
	OVK5f	GAYATYTTGCTRACRCAGTCTCC
	OVK7	GACATTGTGATGACTCAGTCTCC
	OVK9	GACATCCAGATGAYYCAGTCTCC
	OVK11-16	GATGTCCAGATRAYYCAGTCTCC
	OVK12-13	GACATCCAGATGACWCARTCTYC
	OVK15-19	GACATCCAGATGAMMCAGTCTCC
	OVK17	GAAACAACTGTGACCCAGTCTCC
OVK18	ACTGGAGAAACAACACAGGCTCC	

[0105]

VLk-F-Mix3	OVK8a	RAMATTATGWTGWACAGTCTAC
	OVK8b	RAMATTATGWTGWACAGTCTAT
	OVK8c	RAMATTGTGWTGWACAGTCTAC
	OVK8d	RAMATTGTGWTGWACAGTCTAT
	OVK8e	RAMATTTTGWGTGWACAGTCTAC
	OVK8f	RAMATTTTGWGTGWACAGTCTAT
	OVK8g	RAMATTATGWTGWACAGTCTCC
	OVK8h	RAMATTATGWTGWACAGTCTCT
	OVK8i	RAMATTGTGWTGWACAGTCTCC
	OVK8j	RAMATTGTGWTGWACAGTCTCT
	OVK8k	RAMATTTTGWGTGWACAGTCTCC
	OVK8l	RAMATTTTGWGTGWACAGTCTCT
VLk-R-Mix	LF1	ACGTTTGATTCCAGCTTGG
	LF2	ACGTTTATTCCAGCTTGG
	LF4	ACGTTTATTCCAACTTGG
	LF5	ACGTTTCAGCTCCAGCTTGG

[0106] 实施例2:鼠源抗hIL-33单抗的重组表达及活性检测

[0107] 2.1鼠源抗hIL-33单抗的重组表达

[0108] 将来自相同克隆的轻重链搭配转染CHO-K1细胞,转染24h后加入10 $\mu$ g/mL MSX加压筛选,待细胞密度和活力恢复后接种进行Feed-batch表达,将表达完成后的上清离心并经protein A纯化,采用BCA法定量抗体浓度后用于定量筛选。

[0109] 鼠抗的命名以包含的轻重链(H+L)所来自的细胞克隆编号表示,例如鼠抗“8140-82H1+L1”表示来自8140-82细胞克隆的鼠抗,其重链为8140-82H1,轻链为8140-82L1。

[0110] 2.2鼠源抗hIL-33单抗的结合活性

[0111] Human IL33-his用包被缓冲液稀释到1 $\mu$ g/mL,按照50 $\mu$ L/孔加入96孔板内,4 $^{\circ}$ C包被过夜;第二天将包被板取出用PBST洗涤3次;再用封闭液室温孵育1h,PBST再洗涤3次。鼠源抗体从1000ng/mL起始3倍稀释,共8个浓度,按照50 $\mu$ L/孔加入该96孔板内;室温孵育1h,PBST洗涤三次,加入羊抗鼠二抗(1:10000),按照50 $\mu$ L/孔加入96孔板内;室温孵育1h,PBST洗涤三次,按照50 $\mu$ L/孔加TMB到96孔板内,避光显色10min,2M硫酸100 $\mu$ L/孔终止;在酶标仪上读取OD450值。结果如表3和图1所示。经分析发现,在ELISA结合实验中8141-252H+L2、8142-270H+L、8141-279H1+L1等鼠抗在ELISA水平结合human IL33强于对照LY3375880。

[0112] 表3鼠源抗human IL-33抗体的ELISA检测结果

[0113]

鼠抗	EC50(ng/mL)	相对活性 (%)
8141-252H+L2	5.59	110.53
8141-253H+L	11.50	53.76
8141-257H1+L	13.88	44.54
8141-48H1+L1	10.71	57.72
8141-259H1+L2	9.25	66.82
LY3375880	6.18	
8142-20H+L	8.05	73.98
8142-270H+L	5.03	118.34
8141-279H1+L1	5.23	113.97
8140-82H1+L1	6.95	85.77
LY3375880	5.96	

[0114] 表3中抗体8141-252H+L2、8141-253H+L、8141-257H1+L、8141-48H1+L1、8141-259H1+L2、8142-20H+L、8142-270H+L、8141-279H1+L1、8140-82H1+L1的轻重链可变区序列如表4所示。

[0115] 表4鼠源抗human IL-33抗体的轻重链可变区序列

[0116]

鼠抗	重链	轻链
8141-25 2H+L2	QVQLQQSVAELVKPGAPVKLSCK ASGYTFTSHWMNWVKQRPGRGL EWIGRIDPSDSETHYNQKFKDKAT LTVDKSSNTAYIQLISLTSEDSAVY YCARGTGGYWGQGTTLVSS	DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSS QSIVHRNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYNVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPW TFGGGTKLEIK
8141-25 3H+L	QVQLQQFGAELVKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGL EWIGEINPSNGRRNYNEKFKSKAT LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCASYTWFAFWGQGLTVTSA	DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHSDGNTYLHWFLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYFCSQSTYVPPA FGGGTKLEIK
8141-25 7H1+L	QVQLKESGPGLVAPSQNLSTCTVS GFSLINYDIAWIRQSPGKGLEWLG AIWAGGGTSYNSAFMSRLSIRKDN SKSQIFLKMNSLQTDITAIYYCVR PVADYWGQGTSTVSS	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPK LQIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYFCSQSTYVPW TFGGGTKLEIK
8141-48 H1+L1	EVQLQQGAELVKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGL EWIGEINPSNGRTNYIEKFKNKATL TVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVY YCASYTWFAFWGQGLTVTSA	DAVVTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHSNGNTYLHWFLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYFCSQSTLVPPA FGGGTKLEIK
8141-25 9H1+L 2	QVQLQQSVAELVKPGASVKLSCK ASGYTFSDYWMNWVKQRPGQGL EWIGEINPRNGRTNYNEKFKTKAT LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCVSYIWFAYWGQGLTVTSA	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QSLVHSDGNTYLHWFLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVYLCQSTHVPPA FGGGTKLEIK

[0117]

8142-20 H+L	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAA SGFTFSTYGMSWVRQTPDKRLEW VASISSGGGYIYYPDSVKGRFTISR DNGKNTLYLQMSSLKSEDTAMYY CARLGPYFDYWGQGTTTLTVSS	DIVMTQSPASLAVSLGQRATIFCRAS QSVDYNGISYIHWFQQKPGQPPKLL IYTASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLN IHPVEEEDAATYYCQQTIDDPLTFGA GAKLELK
8142-27 0H+L	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAA SGFTFSTYGMSWVRQTPDKRLEW VASISSGGSYIYYPDSVKGRFTISR DNGKNTLFLQMSSLKSEDTATYYC ARLGPYFDYWGQGTTTLTVSS	DIVLTQSPASLAVSLGQRATFFCRAS QSVDYNGISYMHWFQQKPGQPPKLL LIYTASNLESGIPARFSGSGSGTDFTL NIHPVEEEDAATYYCQQTIDDPLTFG AGAKLELK
8141-27 9H1+L 1	QVQLQQPGAELVKPGAPVKLSCK ASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGL EWIGRIDPSDSETHYNQKFKDKAT LTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVY YCTRGIGGYWGQGTTTLTVSS	DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSS QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLL LIYNVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVWT FGGGTKLEIK
8140-82 H1+L1	QVQLQQFGAEVVKPGASVTLKCK ASGYTFTSYWMHWVKVRPGQGF EWIGEINPRNGNRDYDEKFKRKAT LTVDKSSSTVYMQSSLTSEDSAV YYCMMSGNWFAYWGQGLTVTSA	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS QTLVHSDGNTYLHWYLQKPDQSPK LLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFT TFKINRVEAEDLGVYFCSQSTYVPY TFGGGTKLEIK

[0118] 注：黑体下划线的氨基酸序列为重轻链可变区中的CDR区，划分依据为“根据增强Chothia/AbM CDR的定义”。

[0119] 2.3鼠源抗hIL-33单抗的免疫调节活性

[0120] 将human IL33-his用培养基稀释到80ng/mL，抗体用培养基稀释到40μg/mL，4倍稀释，共8个浓度，将二者1:1混合后50μL/孔加到96孔板中。取对数生长期的KU812细胞离心，按照100000个/孔，50μL/孔加到上述96孔板中，孵育48h。

[0121] 按照Human IL-5 DuoSet ELISA试剂盒说明书提前一天包被捕捉抗体（为将240μg/mL储液120倍稀释（PBS）到2μg/mL的工作液），4℃包被过夜，50μL/孔。封闭液封闭1h，洗涤三次。将120ng/mL的标准液400倍稀释到300pg/mL，然后2倍稀释，共7个浓度。吸取各50μL的细胞培养上清和稀释好的标准液，加入到ELISA孔板中，孵育2h。洗涤三次，加入检测抗体（7.5μg/mL储液）60倍稀释到125ng/mL的工作液，50μL/孔，孵育2h。洗涤三次，加入SA-HRP 40倍稀释到125ng/mL的工作液，50μL/孔，孵育20-30min。加入50μL/孔显色液，闭光显色5-10min，加入100μL/孔2M硫酸终止，采用酶标仪读取OD450和OD650值。

[0122] 表5鼠源抗hIL-33单抗的免疫调节活性(A)

鼠抗	IC50( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相对活性
8141-252H+L2	2.007	25.62%
8141-253H+L	5.176	9.93%
[0123] 8141-257H1+L	1.401	36.70%
8141-48H1+L1	3.351	15.34%
8141-259H1+L2	3.632	14.15%
ANB020	0.5141	

[0124] 表6鼠源抗hIL-33单抗的免疫调节活性(B)

鼠抗	IC50( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相对活性
8142-20H+L	1.318	32.00%
[0125] 8142-270H+L	N/A	N/A
8141-279H1+L1	105.7	0.40%
ANB020	0.4217	

[0126] 表7鼠源抗hIL-33单抗的免疫调节活性(C)

鼠抗	IC50( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	相对活性
[0127] 8140-82H1+L1	9.907	8.84%
ANB020	0.876	

[0128] 实施例3:鼠源抗hIL-33单抗8140-82H1+L1的人源化

[0129] 将鼠源抗体8140-82H1+L1的重链和轻链可变区序列与人种系序列进行比较,该比较是对IMGT数据库进行的blast搜索。从该组人种系基因中去除冗余基因以及那些具有未配对半胱氨酸的基因。在框架和CDR区两者中选择其余最接近匹配人种系基因作为受体人框架。基于IGHJ/IGJK种系基因的序列相似性选择FR-4。经人源化设计及筛选获得了抗hIL-33的人源化抗体8140-82H2L1,其重轻链可变区的氨基酸序列如表8所示。

[0130] 表8人源化抗hIL-33抗体8140-82H2L1

	重链	轻链
[0131] 8140-82	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTLVHS
H2L1	<b>SYWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPRSGNR</b>	<b>DGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV</b>
	<b>DYDEKFKRRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRS</b>	<b>PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQS</b>
	EDTAVYYCM <b>SGNWFAYWGQGL</b> TVSS	<b>TYVPYTFGGG</b> TKVEIK

[0132] 注:黑体下划线的氨基酸序列为重轻链可变区中的CDR区,划分依据为“根据增强Chothia/AbM CDR的定义”。



[0133] 实施例4:人源化抗hIL-33单抗8140-82H2L1的亲合力成熟

[0134] 对获得的人源化抗hIL-33抗体8140-82H2L1进行亲合力成熟。采用酵母展示技术,对8140-82H2L1分子的重链可变区和轻链可变区的6个CDR区氨基酸进行随机突变建库,然后从中筛选出亲合力更高的候选抗体分子。

[0135] 4.1亲合力成熟抗体库的设计和构建

[0136] 亲合力成熟的亲本抗体分子8140-82H2L1,将其重链可变区和轻链可变区通过GS linker连接构建成单链抗体(single-chain variable fragment, scFv)。该单链抗体的CDR区是亲合力成熟改造的目标,而骨架区序列在亲合力成熟改造中将保持不变。将亲本抗体的重轻链共6个CDR区分别构建成单独的抗体库。

[0137] 4.2亲合力成熟抗体库的分选

[0138] 将得到的抗体库进行磁珠分选和流式分选:首先用100nM生物素化的抗原孵育1小时,进行磁珠分选(Invitrogen Cat:11206D),然后将磁珠分选后得到的抗体库进行流式分选。在随后进行的流式分选中,将生物素化的抗原室温下与抗体库孵育40min,然后洗去未结合的生物素化抗原,4℃条件下14,000rpm离心1min离心收集细胞,用预冷的含1%BSA的PBS洗涤1次。加入100μL 1:500稀释的荧光二抗,冰上孵育30min。4℃条件下14,000rpm离心1min离心收集细胞,用预冷的含1%BSA的PBS洗涤2次,然后进行流式分选。每一轮所用的抗原浓度逐渐降低,每一轮分选都只收集文库的0.1~0.5%的克隆进行培养,再进行下一轮的分选,最后经过总共3-4轮分选,从每个抗体库中挑选96个酵母菌进行测序分析,最终从重链抗体库和轻链抗体库中得到若干个独特的突变体克隆。亲合力成熟的人源化抗hIL-33抗体8140-82H1K1的重轻链可变区序列如表9所示。

[0139] 表9亲合力成熟的人源化抗hIL-33抗体8140-82H1K1

	重链	轻链
[0140]	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQTLVHS
	<b>8140-8</b> YWMHWVRQAPGQGLEWMGEINPRTGRRHY	DGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV
	<b>2H1K1</b> DRKFKRRVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSED	PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQ
	AVYYCMMSGNWFAYWGQGLTVTVSS	STYVPYTFGGGTKVEIK

[0141] 注:黑体下划线的氨基酸序列为重轻链可变区中的CDR区,划分依据为“根据增强Chothia/AbM CDR的定义”。

[0142] 4.3突变体克隆与抗原的结合检测

[0143] 将突变体克隆的酵母菌接种在酵母培养基中,诱导相关单链抗体的表达。14,000rpm离心1min收集酵母细胞,用含1%BSA的PBS洗涤1次。重悬酵母细胞为密度为5,000,000个每毫升,于96 U形孔板中每孔加入100ul的细胞。加入100ul梯度稀释的抗原溶液,室温震荡孵育30min后。4℃条件下14,000rpm离心1min离心收集细胞,用预冷的含1%BSA的PBS洗涤1次。加入100μL 1:500稀释的荧光二抗,冰上孵育30min。4℃条件下14,000rpm离心1min离心收集细胞,用预冷的含1%BSA的PBS洗涤2次,用流式细胞仪分析细胞群的平均荧光读值,结果显示8140-82的突变体在流式结合力上较8140-82突变前提高了3~5倍。

[0144] 4.4亲合力成熟后抗体体外药理研究

[0145] 将human IL33-his用培养基稀释到80ng/mL,抗体用培养基稀释到640 $\mu$ g/mL,4倍稀释,共8个浓度,将二者1:1混合后50 $\mu$ L/孔加到96孔板中。取对数生长期的KU812细胞离心,按照100000个/孔,50 $\mu$ L/孔加到上述96孔板中,孵育48h。

[0146] 按照Human IL-5 DuoSet ELISA试剂盒说明书提前一天包被捕捉抗体(为将240 $\mu$ g/mL储液120倍稀释(PBS)到2 $\mu$ g/mL的工作液),4 $^{\circ}$ C包被过夜,50 $\mu$ L/孔。封闭液封闭1h,洗涤三次。将120ng/mL的标准液400倍稀释到300pg/mL,然后2倍稀释,共7个浓度。吸取各50 $\mu$ L的细胞培养上清和稀释好的标准液,加入到ELISA孔板中,孵育2h。洗涤三次,加入检测抗体(7.5 $\mu$ g/mL储液)60倍稀释到125ng/mL的工作液,50 $\mu$ L/孔,孵育2h。洗涤三次,加入SA-HRP 40倍稀释到125ng/mL的工作液,50 $\mu$ L/孔,孵育20-30min。加入50 $\mu$ L/孔显色液,闭光显色5-10min,加入100 $\mu$ L/孔2M硫酸终止,采用酶标仪读取OD450和OD650值。由图2可知亲和力成熟后人源化抗体8140-82H1K1在抑制IL33刺激KU812 IL5生成实验中的IC50值(0.35 $\mu$ g/mL)比其鼠源抗体分子8140-82H1L1的IC50值(9.907 $\mu$ g/mL)降低25倍以上,也显著低于对照抗体ANB020(0.51 $\mu$ g/mL)。

[0147] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

[0001] 序列表

[0002] <110> 申请人名称

[0003] <120> 一种抗hIL-33人源化单抗及其应用

[0004] <130> 无

[0005] <160> 103

[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0007] <210> 1

[0008] <211> 10

[0009] <212> PRT

[0010] <213> HCDR1

[0011] <400> 1

[0012] Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

[0013] 1 5 10

[0014] <210> 2

[0015] <211> 17

[0016] <212> PRT

[0017] <213> HCDR2

[0018] <400> 2

[0019] Glu Ile Asn Pro Arg Xaa Gly Xaa Arg Xaa Tyr Asp Xaa Lys Phe Lys

[0020] 1 5 10 15

[0021] Arg

[0022] <210> 3

[0023] <211> 6

[0024] <212> PRT

[0025] <213> HCDR3

[0026] <400> 3

[0027] Gly Asn Trp Phe Ala Tyr

[0028] 1 5

[0029] <210> 4

[0030] <211> 8

[0031] <212> PRT

[0032] <213> LCDR1

[0033] <400> 4

[0034] Thr Leu Val His Ser Asp Gly Asn

[0035] 1 5

[0036] <210> 5

[0037] <211> 7

[0038] <212> PRT

[0039] <213> LCDR2  
 [0040] <400> 5  
 [0041] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 [0042] 1 5  
 [0043] <210> 6  
 [0044] <211> 6  
 [0045] <212> PRT  
 [0046] <213> LCDR3  
 [0047] <400> 6  
 [0048] Ser Gln Ser Thr Tyr Val  
 [0049] 1 5  
 [0050] <210> 7  
 [0051] <211> 17  
 [0052] <212> PRT  
 [0053] <213> HCDR2  
 [0054] <400> 7  
 [0055] Glu Ile Asn Pro Arg Thr Gly Arg Arg His Tyr Asp Arg Lys Phe Lys  
 [0056] 1 5 10 15  
 [0057] Arg  
 [0058] <210> 8  
 [0059] <211> 17  
 [0060] <212> PRT  
 [0061] <213> HCDR2  
 [0062] <400> 8  
 [0063] Glu Ile Asn Pro Arg Ser Gly Asn Arg Asp Tyr Asp Glu Lys Phe Lys  
 [0064] 1 5 10 15  
 [0065] Arg  
 [0066] <210> 9  
 [0067] <211> 17  
 [0068] <212> PRT  
 [0069] <213> HCDR2  
 [0070] <400> 9  
 [0071] Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Asn Arg Asp Tyr Asp Glu Lys Phe Lys  
 [0072] 1 5 10 15  
 [0073] Arg  
 [0074] <210> 10  
 [0075] <211> 115  
 [0076] <212> PRT  
 [0077] <213> 8140-82H1K1-VH

[0078] <400> 10  
 [0079] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0080] 1 5 10 15  
 [0081] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0082] 20 25 30  
 [0083] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0084] 35 40 45  
 [0085] Gly Glu Ile Asn Pro Arg Thr Gly Arg Arg His Tyr Asp Arg Lys Phe  
 [0086] 50 55 60  
 [0087] Lys Arg Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 [0088] 65 70 75 80  
 [0089] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0090] 85 90 95  
 [0091] Met Ser Gly Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0092] 100 105 110  
 [0093] Val Ser Ser  
 [0094] 115  
 [0095] <210> 11  
 [0096] <211> 112  
 [0097] <212> PRT  
 [0098] <213> 8140-82H1K1-VL  
 [0099] <400> 11  
 [0100] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 [0101] 1 5 10 15  
 [0102] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val His Ser  
 [0103] 20 25 30  
 [0104] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0105] 35 40 45  
 [0106] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0107] 50 55 60  
 [0108] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0109] 65 70 75 80  
 [0110] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0111] 85 90 95  
 [0112] Thr Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0113] 100 105 110  
 [0114] <210> 12  
 [0115] <211> 115  
 [0116] <212> PRT

[0117] <213> 8140-82H2L1-VH  
 [0118] <400> 12  
 [0119] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0120] 1 5 10 15  
 [0121] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0122] 20 25 30  
 [0123] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0124] 35 40 45  
 [0125] Gly Glu Ile Asn Pro Arg Ser Gly Asn Arg Asp Tyr Asp Glu Lys Phe  
 [0126] 50 55 60  
 [0127] Lys Arg Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 [0128] 65 70 75 80  
 [0129] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0130] 85 90 95  
 [0131] Met Ser Gly Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0132] 100 105 110  
 [0133] Val Ser Ser  
 [0134] 115  
 [0135] <210> 13  
 [0136] <211> 112  
 [0137] <212> PRT  
 [0138] <213> 8140-82H2L1-VL  
 [0139] <400> 13  
 [0140] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 [0141] 1 5 10 15  
 [0142] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val His Ser  
 [0143] 20 25 30  
 [0144] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0145] 35 40 45  
 [0146] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0147] 50 55 60  
 [0148] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0149] 65 70 75 80  
 [0150] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0151] 85 90 95  
 [0152] Thr Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0153] 100 105 110  
 [0154] <210> 14  
 [0155] <211> 115

[0156] <212> PRT  
 [0157] <213> 8140-82H1L1-VH  
 [0158] <400> 14  
 [0159] Gln Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala  
 [0160] 1 5 10 15  
 [0161] Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0162] 20 25 30  
 [0163] Trp Met His Trp Val Lys Val Arg Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile  
 [0164] 35 40 45  
 [0165] Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Asn Arg Asp Tyr Asp Glu Lys Phe  
 [0166] 50 55 60  
 [0167] Lys Arg Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr  
 [0168] 65 70 75 80  
 [0169] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0170] 85 90 95  
 [0171] Met Ser Gly Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0172] 100 105 110  
 [0173] Val Ser Ala  
 [0174] 115  
 [0175] <210> 15  
 [0176] <211> 112  
 [0177] <212> PRT  
 [0178] <213> 8140-82H1L1- VL  
 [0179] <400> 15  
 [0180] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [0181] 1 5 10 15  
 [0182] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val His Ser  
 [0183] 20 25 30  
 [0184] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Asp Gln Ser  
 [0185] 35 40 45  
 [0186] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0187] 50 55 60  
 [0188] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Lys Ile  
 [0189] 65 70 75 80  
 [0190] Asn Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0191] 85 90 95  
 [0192] Thr Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0193] 100 105 110  
 [0194] <210> 16

[0195] <211> 114  
 [0196] <212> PRT  
 [0197] <213> 8141-252HL2-VH  
 [0198] <400> 16  
 [0199] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0200] 1 5 10 15  
 [0201] Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His  
 [0202] 20 25 30  
 [0203] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0204] 35 40 45  
 [0205] Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe  
 [0206] 50 55 60  
 [0207] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 [0208] 65 70 75 80  
 [0209] Ile Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0210] 85 90 95  
 [0211] Ala Arg Gly Thr Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 [0212] 100 105 110  
 [0213] Ser Ser  
 [0214] <210> 17  
 [0215] <211> 112  
 [0216] <212> PRT  
 [0217] <213> 8141-252HL2-VL  
 [0218] <400> 17  
 [0219] Asp Val Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [0220] 1 5 10 15  
 [0221] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Arg  
 [0222] 20 25 30  
 [0223] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0224] 35 40 45  
 [0225] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0226] 50 55 60  
 [0227] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0228] 65 70 75 80  
 [0229] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 [0230] 85 90 95  
 [0231] Ser His Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0232] 100 105 110  
 [0233] <210> 18



[0234] <211> 115  
 [0235] <212> PRT  
 [0236] <213> 8141-253HL-VH  
 [0237] <400> 18  
 [0238] Gln Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0239] 1 5 10 15  
 [0240] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0241] 20 25 30  
 [0242] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0243] 35 40 45  
 [0244] Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Arg Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 [0245] 50 55 60  
 [0246] Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0247] 65 70 75 80  
 [0248] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0249] 85 90 95  
 [0250] Ala Ser Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0251] 100 105 110  
 [0252] Val Ser Ala  
 [0253] 115  
 [0254] <210> 19  
 [0255] <211> 112  
 [0256] <212> PRT  
 [0257] <213> 8141-253HL-VL  
 [0258] <400> 19  
 [0259] Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [0260] 1 5 10 15  
 [0261] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 [0262] 20 25 30  
 [0263] Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0264] 35 40 45  
 [0265] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0266] 50 55 60  
 [0267] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0268] 65 70 75 80  
 [0269] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0270] 85 90 95  
 [0271] Thr Tyr Val Pro Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0272] 100 105 110

[0273] <210> 20  
 [0274] <211> 113  
 [0275] <212> PRT  
 [0276] <213> 8141-257H1L-VH  
 [0277] <400> 20  
 [0278] Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 [0279] 1 5 10 15  
 [0280] Asn Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Asn Tyr  
 [0281] 20 25 30  
 [0282] Asp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 [0283] 35 40 45  
 [0284] Gly Ala Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Ser Ala Phe Met  
 [0285] 50 55 60  
 [0286] Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Ile Phe Leu  
 [0287] 65 70 75 80  
 [0288] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val  
 [0289] 85 90 95  
 [0290] Arg Pro Val Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 [0291] 100 105 110  
 [0292] Ser  
 [0293] <210> 21  
 [0294] <211> 112  
 [0295] <212> PRT  
 [0296] <213> 8141-257H1L-VL  
 [0297] <400> 21  
 [0298] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [0299] 1 5 10 15  
 [0300] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg  
 [0301] 20 25 30  
 [0302] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Leu Ser  
 [0303] 35 40 45  
 [0304] Pro Lys Leu Gln Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0305] 50 55 60  
 [0306] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0307] 65 70 75 80  
 [0308] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0309] 85 90 95  
 [0310] Thr Tyr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0311] 100 105 110

[0312] <210> 22  
 [0313] <211> 115  
 [0314] <212> PRT  
 [0315] <213> 8141-48H1L1-VH  
 [0316] <400> 22  
 [0317] Glu Val Gln Leu Gln Gln Leu Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 [0318] 1 5 10 15  
 [0319] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 [0320] 20 25 30  
 [0321] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0322] 35 40 45  
 [0323] Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe  
 [0324] 50 55 60  
 [0325] Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0326] 65 70 75 80  
 [0327] Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0328] 85 90 95  
 [0329] Ala Ser Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr  
 [0330] 100 105 110  
 [0331] Val Ser Ala  
 [0332] 115  
 [0333] <210> 23  
 [0334] <211> 112  
 [0335] <212> PRT  
 [0336] <213> 8141-48H1L1-VL  
 [0337] <400> 23  
 [0338] Asp Ala Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 [0339] 1 5 10 15  
 [0340] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
 [0341] 20 25 30  
 [0342] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0343] 35 40 45  
 [0344] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 [0345] 50 55 60  
 [0346] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0347] 65 70 75 80  
 [0348] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 [0349] 85 90 95  
 [0350] Thr Leu Val Pro Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0351]		100		105		110
[0352]	<210>	24				
[0353]	<211>	115				
[0354]	<212>	PRT				
[0355]	<213>	8141-259H1L2-VH				
[0356]	<400>	24				
[0357]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala					
[0358]	1	5		10		15
[0359]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr					
[0360]		20		25		30
[0361]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[0362]		35		40		45
[0363]	Gly Glu Ile Asn Pro Arg Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe					
[0364]		50		55		60
[0365]	Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
[0366]	65	70		75		80
[0367]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0368]		85		90		95
[0369]	Val Ser Tyr Ile Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr					
[0370]		100		105		110
[0371]	Val Ser Ala					
[0372]		115				
[0373]	<210>	25				
[0374]	<211>	112				
[0375]	<212>	PRT				
[0376]	<213>	8141-259H1L2-VL				
[0377]	<400>	25				
[0378]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly					
[0379]	1	5		10		15
[0380]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser					
[0381]		20		25		30
[0382]	Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser					
[0383]		35		40		45
[0384]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro					
[0385]		50		55		60
[0386]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
[0387]	65	70		75		80
[0388]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Leu Cys Ser Gln Ser					
[0389]		85		90		95

[0390] Thr His Val Pro Pro Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0391] 100 105 110  
 [0392] <210> 26  
 [0393] <211> 116  
 [0394] <212> PRT  
 [0395] <213> 8142-20HL-VH  
 [0396] <400> 26  
 [0397] Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 [0398] 1 5 10 15  
 [0399] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 [0400] 20 25 30  
 [0401] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 [0402] 35 40 45  
 [0403] Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Gly Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 [0404] 50 55 60  
 [0405] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Leu Tyr  
 [0406] 65 70 75 80  
 [0407] Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0408] 85 90 95  
 [0409] Ala Arg Leu Gly Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 [0410] 100 105 110  
 [0411] Thr Val Ser Ser  
 [0412] 115  
 [0413] <210> 27  
 [0414] <211> 111  
 [0415] <212> PRT  
 [0416] <213> 8142-20HL-VL  
 [0417] <400> 27  
 [0418] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 [0419] 1 5 10 15  
 [0420] Gln Arg Ala Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asn  
 [0421] 20 25 30  
 [0422] Gly Ile Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 [0423] 35 40 45  
 [0424] Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 [0425] 50 55 60  
 [0426] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 [0427] 65 70 75 80  
 [0428] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ile

[0429]		85		90		95
[0430]	Asp Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Ala Lys Leu Glu Leu Lys					
[0431]		100		105		110
[0432]	<210> 28					
[0433]	<211> 116					
[0434]	<212> PRT					
[0435]	<213> 8142-270HL-VH					
[0436]	<400> 28					
[0437]	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly					
[0438]	1	5		10		15
[0439]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr					
[0440]		20		25		30
[0441]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val					
[0442]		35		40		45
[0443]	Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val					
[0444]	50			55		60
[0445]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Asn Thr Leu Phe					
[0446]	65			70		75
[0447]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys					
[0448]		85		90		95
[0449]	Ala Arg Leu Gly Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu					
[0450]		100		105		110
[0451]	Thr Val Ser Ser					
[0452]		115				
[0453]	<210> 29					
[0454]	<211> 111					
[0455]	<212> PRT					
[0456]	<213> 8142-270HL-VL					
[0457]	<400> 29					
[0458]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly					
[0459]	1	5		10		15
[0460]	Gln Arg Ala Thr Phe Phe Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asn					
[0461]		20		25		30
[0462]	Gly Ile Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro					
[0463]		35		40		45
[0464]	Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala					
[0465]	50			55		60
[0466]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His					
[0467]	65			70		75
						80

[0468]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ile
[0469]	85 90 95
[0470]	Asp Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Ala Lys Leu Glu Leu Lys
[0471]	100 105 110
[0472]	<210> 30
[0473]	<211> 114
[0474]	<212> PRT
[0475]	<213> 8141-279H1L1-VH
[0476]	<400> 30
[0477]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0478]	1 5 10 15
[0479]	Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0480]	20 25 30
[0481]	Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
[0482]	35 40 45
[0483]	Gly Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
[0484]	50 55 60
[0485]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0486]	65 70 75 80
[0487]	Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0488]	85 90 95
[0489]	Thr Arg Gly Thr Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
[0490]	100 105 110
[0491]	Ser Ser
[0492]	<210> 31
[0493]	<211> 112
[0494]	<212> PRT
[0495]	<213> 8141-279H1L1-VL
[0496]	<400> 31
[0497]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0498]	1 5 10 15
[0499]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
[0500]	20 25 30
[0501]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0502]	35 40 45
[0503]	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0504]	50 55 60
[0505]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0506]	65 70 75 80

[0507] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
 [0508] 85 90 95  
 [0509] Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0510] 100 105 110  
 [0511] <210> 32  
 [0512] <211> 23  
 [0513] <212> DNA  
 [0514] <213> OVH1  
 [0515] <400> 32  
 [0516] saggtccagc tgcagcagyy tgg 23  
 [0517] <210> 33  
 [0518] <211> 23  
 [0519] <212> DNA  
 [0520] <213> OVH2  
 [0521] <400> 33  
 [0522] caggtrcagc tgaagsagtc agg 23  
 [0523] <210> 34  
 [0524] <211> 23  
 [0525] <212> DNA  
 [0526] <213> OVH3  
 [0527] <400> 34  
 [0528] gaktgtcagc ttcagcagtc rgg 23  
 [0529] <210> 35  
 [0530] <211> 23  
 [0531] <212> DNA  
 [0532] <213> OVH5  
 [0533] <400> 35  
 [0534] gavgtgawgc tgggtggagtc tgr 23  
 [0535] <210> 36  
 [0536] <211> 23  
 [0537] <212> DNA  
 [0538] <213> OVH11  
 [0539] <400> 36  
 [0540] gaagtgcagc tgttggagac tgg 23  
 [0541] <210> 37  
 [0542] <211> 23  
 [0543] <212> DNA  
 [0544] <213> OVH14  
 [0545] <400> 37



[0546] gaggttcagc tgcagcagtc tgk 23  
[0547] <210> 38  
[0548] <211> 23  
[0549] <212> DNA  
[0550] <213> OVH15  
[0551] <400> 38  
[0552] caggttcacc tacaacagtc tgg 23  
[0553] <210> 39  
[0554] <211> 23  
[0555] <212> DNA  
[0556] <213> OVH4  
[0557] <400> 39  
[0558] gaggtgaagc ttctcgagtc tgg 23  
[0559] <210> 40  
[0560] <211> 23  
[0561] <212> DNA  
[0562] <213> OVH7  
[0563] <400> 40  
[0564] gaggtgaagc tgrtggartc tgr 23  
[0565] <210> 41  
[0566] <211> 23  
[0567] <212> DNA  
[0568] <213> OVH8  
[0569] <400> 41  
[0570] caggttactc tgaaagagtc tgg 23  
[0571] <210> 42  
[0572] <211> 23  
[0573] <212> DNA  
[0574] <213> OVH9  
[0575] <400> 42  
[0576] cagatccagt tggycagtc tgg 23  
[0577] <210> 43  
[0578] <211> 23  
[0579] <212> DNA  
[0580] <213> OVH10  
[0581] <400> 43  
[0582] gaggtgcagc ttgttgagwc tgg 23  
[0583] <210> 44  
[0584] <211> 23

[0585] <212> DNA  
[0586] <213> OVH12  
[0587] <400> 44  
[0588] cagatgcagc ttcaggagtc agg 23  
[0589] <210> 45  
[0590] <211> 23  
[0591] <212> DNA  
[0592] <213> OVH13  
[0593] <400> 45  
[0594] gaagtgaagc ttgaggagtc tgg 23  
[0595] <210> 46  
[0596] <211> 23  
[0597] <212> DNA  
[0598] <213> OVH6a  
[0599] <400> 46  
[0600] gaagtgmamt tkswgagtc tgg 23  
[0601] <210> 47  
[0602] <211> 23  
[0603] <212> DNA  
[0604] <213> OVH6b  
[0605] <400> 47  
[0606] gaggtgmamt tkswgctgtc tgg 23  
[0607] <210> 48  
[0608] <211> 23  
[0609] <212> DNA  
[0610] <213> OVH6c  
[0611] <400> 48  
[0612] gatgtgmamt tkswgagtc tgg 23  
[0613] <210> 49  
[0614] <211> 23  
[0615] <212> DNA  
[0616] <213> OVH6d  
[0617] <400> 49  
[0618] gaagtgmamt tkswgctgtc tgg 23  
[0619] <210> 50  
[0620] <211> 23  
[0621] <212> DNA  
[0622] <213> OVH6e  
[0623] <400> 50

[0624] gaggtgmamt tkswgctgtc tgg 23  
[0625] <210> 51  
[0626] <211> 23  
[0627] <212> DNA  
[0628] <213> OVH6f  
[0629] <400> 51  
[0630] gatgtgmamt tkswgctgtc tgg 23  
[0631] <210> 52  
[0632] <211> 23  
[0633] <212> DNA  
[0634] <213> OVH6g  
[0635] <400> 52  
[0636] gaagtgmamt tkswggagtc tgg 23  
[0637] <210> 53  
[0638] <211> 23  
[0639] <212> DNA  
[0640] <213> OVH6h  
[0641] <400> 53  
[0642] gaggtgmamt tkswggctgtc tgg 23  
[0643] <210> 54  
[0644] <211> 23  
[0645] <212> DNA  
[0646] <213> OVH6i  
[0647] <400> 54  
[0648] gatgtgmamt tkswggagtc tgg 23  
[0649] <210> 55  
[0650] <211> 23  
[0651] <212> DNA  
[0652] <213> OVH6j  
[0653] <400> 55  
[0654] gaagtgmamt tkswggctgtc tgg 23  
[0655] <210> 56  
[0656] <211> 23  
[0657] <212> DNA  
[0658] <213> OVH6K  
[0659] <400> 56  
[0660] gaggtgmamt tkswggagtc tgg 23  
[0661] <210> 57  
[0662] <211> 23

[0663] <212> DNA  
[0664] <213> OVH61  
[0665] <400> 57  
[0666] gatgtgmamt tkswggtgtc tgg 23  
[0667] <210> 58  
[0668] <211> 20  
[0669] <212> DNA  
[0670] <213> HF-1  
[0671] <400> 58  
[0672] gaggaaacgg tgaccgtggt 20  
[0673] <210> 59  
[0674] <211> 20  
[0675] <212> DNA  
[0676] <213> HF-2  
[0677] <400> 59  
[0678] gaggagactg tgagagtgggt 20  
[0679] <210> 60  
[0680] <211> 20  
[0681] <212> DNA  
[0682] <213> HF-3  
[0683] <400> 60  
[0684] gcagagacag tgaccagagt 20  
[0685] <210> 61  
[0686] <211> 20  
[0687] <212> DNA  
[0688] <213> HF-4  
[0689] <400> 61  
[0690] gaggagacgg tgactgaggt 20  
[0691] <210> 62  
[0692] <211> 23  
[0693] <212> DNA  
[0694] <213> OVK1  
[0695] <400> 62  
[0696] gatgytktkv tgacceaaac tcc 23  
[0697] <210> 63  
[0698] <211> 23  
[0699] <212> DNA  
[0700] <213> OVK3  
[0701] <400> 63

[0702] racattgtgc tgacmcaatc tcc 23  
[0703] <210> 64  
[0704] <211> 23  
[0705] <212> DNA  
[0706] <213> OVK4a  
[0707] <400> 64  
[0708] saaawtgtkc tcwcccagtc tcc 23  
[0709] <210> 65  
[0710] <211> 23  
[0711] <212> DNA  
[0712] <213> OVK4b  
[0713] <400> 65  
[0714] saaawtctkc tcwcccagtc tcc 23  
[0715] <210> 66  
[0716] <211> 23  
[0717] <212> DNA  
[0718] <213> OVK4c  
[0719] <400> 66  
[0720] saaawtttkc tcwcccagtc tcc 23  
[0721] <210> 67  
[0722] <211> 23  
[0723] <212> DNA  
[0724] <213> OVK6a  
[0725] <400> 67  
[0726] arcattgtga tgacccagwc tca 23  
[0727] <210> 68  
[0728] <211> 23  
[0729] <212> DNA  
[0730] <213> OVK6b  
[0731] <400> 68  
[0732] arcattgtga tgacccagwc tcc 23  
[0733] <210> 69  
[0734] <211> 23  
[0735] <212> DNA  
[0736] <213> OVK6c  
[0737] <400> 69  
[0738] grcattgtga tgacccagwc tca 23  
[0739] <210> 70  
[0740] <211> 23

- [0741] <212> DNA  
[0742] <213> OVK6d  
[0743] <400> 70  
[0744] grcattgtga tgacccagwc tcc 23  
[0745] <210> 71  
[0746] <211> 23  
[0747] <212> DNA  
[0748] <213> OVK10  
[0749] <400> 71  
[0750] gatatccaga tgacacagac tac 23  
[0751] <210> 72  
[0752] <211> 23  
[0753] <212> DNA  
[0754] <213> OVK14  
[0755] <400> 72  
[0756] gamatcmwga tgacccartc tcc 23  
[0757] <210> 73  
[0758] <211> 23  
[0759] <212> DNA  
[0760] <213> OVK2a  
[0761] <400> 73  
[0762] gatattgtga tracbcaggy tga 23  
[0763] <210> 74  
[0764] <211> 23  
[0765] <212> DNA  
[0766] <213> OVK2b  
[0767] <400> 74  
[0768] gatattgtga tracbcaggy tgc 23  
[0769] <210> 75  
[0770] <211> 23  
[0771] <212> DNA  
[0772] <213> OVK5a  
[0773] <400> 75  
[0774] gayatyctga tracrcagtc tcc 23  
[0775] <210> 76  
[0776] <211> 23  
[0777] <212> DNA  
[0778] <213> OVK5b  
[0779] <400> 76

[0780] gayatygtga tracrcagtc tcc 23  
[0781] <210> 77  
[0782] <211> 23  
[0783] <212> DNA  
[0784] <213> OVK5c  
[0785] <400> 77  
[0786] gayatyttga tracrcagtc tcc 23  
[0787] <210> 78  
[0788] <211> 23  
[0789] <212> DNA  
[0790] <213> OVK5d  
[0791] <400> 78  
[0792] gayatyctgc tracrcagtc tcc 23  
[0793] <210> 79  
[0794] <211> 23  
[0795] <212> DNA  
[0796] <213> OVK5e  
[0797] <400> 79  
[0798] gayatygtgc tracrcagtc tcc 23  
[0799] <210> 80  
[0800] <211> 23  
[0801] <212> DNA  
[0802] <213> OVK5f  
[0803] <400> 80  
[0804] gayatyttgc tracrcagtc tcc 23  
[0805] <210> 81  
[0806] <211> 23  
[0807] <212> DNA  
[0808] <213> OVK7  
[0809] <400> 81  
[0810] gacattgtga tgactcagtc tcc 23  
[0811] <210> 82  
[0812] <211> 23  
[0813] <212> DNA  
[0814] <213> OVK9  
[0815] <400> 82  
[0816] gacatccaga tgayycagtc tcc 23  
[0817] <210> 83  
[0818] <211> 23

[0819] <212> DNA  
[0820] <213> OVK11-16  
[0821] <400> 83  
[0822] gatgtccaga trayycagtc tcc 23  
[0823] <210> 84  
[0824] <211> 23  
[0825] <212> DNA  
[0826] <213> OVK12-13  
[0827] <400> 84  
[0828] gacatccaga tgacwcartc tyc 23  
[0829] <210> 85  
[0830] <211> 23  
[0831] <212> DNA  
[0832] <213> OVK15-19  
[0833] <400> 85  
[0834] gacatccaga tgammcagtc tcc 23  
[0835] <210> 86  
[0836] <211> 23  
[0837] <212> DNA  
[0838] <213> OVK17  
[0839] <400> 86  
[0840] gaaacaactg tgacccagtc tcc 23  
[0841] <210> 87  
[0842] <211> 23  
[0843] <212> DNA  
[0844] <213> OVK18  
[0845] <400> 87  
[0846] actggagaaa caacacaggc tcc 23  
[0847] <210> 88  
[0848] <211> 23  
[0849] <212> DNA  
[0850] <213> OVK8a  
[0851] <400> 88  
[0852] ramattatgw tgwcacagtc tac 23  
[0853] <210> 89  
[0854] <211> 23  
[0855] <212> DNA  
[0856] <213> OVK8b  
[0857] <400> 89



[0858] ramattatgw tgwcacagtc tat 23  
[0859] <210> 90  
[0860] <211> 23  
[0861] <212> DNA  
[0862] <213> OVK8c  
[0863] <400> 90  
[0864] ramattgtgw tgwcacagtc tac 23  
[0865] <210> 91  
[0866] <211> 23  
[0867] <212> DNA  
[0868] <213> OVK8d  
[0869] <400> 91  
[0870] ramattgtgw tgwcacagtc tat 23  
[0871] <210> 92  
[0872] <211> 23  
[0873] <212> DNA  
[0874] <213> OVK8e  
[0875] <400> 92  
[0876] ramattttgw tgwcacagtc tac 23  
[0877] <210> 93  
[0878] <211> 23  
[0879] <212> DNA  
[0880] <213> OVK8f  
[0881] <400> 93  
[0882] ramattttgw tgwcacagtc tat 23  
[0883] <210> 94  
[0884] <211> 23  
[0885] <212> DNA  
[0886] <213> OVK8g  
[0887] <400> 94  
[0888] ramattatgw tgwcacagtc tcc 23  
[0889] <210> 95  
[0890] <211> 23  
[0891] <212> DNA  
[0892] <213> OVK8h  
[0893] <400> 95  
[0894] ramattatgw tgwcacagtc tct 23  
[0895] <210> 96  
[0896] <211> 23

[0897] <212> DNA  
[0898] <213> OVK8i  
[0899] <400> 96  
[0900] ramattgtgw tgwcacagtc tcc 23  
[0901] <210> 97  
[0902] <211> 23  
[0903] <212> DNA  
[0904] <213> OVK8j  
[0905] <400> 97  
[0906] ramattgtgw tgwcacagtc tct 23  
[0907] <210> 98  
[0908] <211> 23  
[0909] <212> DNA  
[0910] <213> OVK8k  
[0911] <400> 98  
[0912] ramattttgw tgwcacagtc tcc 23  
[0913] <210> 99  
[0914] <211> 23  
[0915] <212> DNA  
[0916] <213> OVK8l  
[0917] <400> 99  
[0918] ramattttgw tgwcacagtc tct 23  
[0919] <210> 100  
[0920] <211> 20  
[0921] <212> DNA  
[0922] <213> LF1  
[0923] <400> 100  
[0924] acgtttgatt tccagcttgg 20  
[0925] <210> 101  
[0926] <211> 20  
[0927] <212> DNA  
[0928] <213> LF2  
[0929] <400> 101  
[0930] acgttttatt tccagcttgg 20  
[0931] <210> 102  
[0932] <211> 20  
[0933] <212> DNA  
[0934] <213> LF4  
[0935] <400> 102

- 
- [0936] acgttttatt tccaactttg 20  
[0937] <210> 103  
[0938] <211> 20  
[0939] <212> DNA  
[0940] <213> LF5  
[0941] <400> 103  
[0942] acgtttcagc tccagcttgg 20

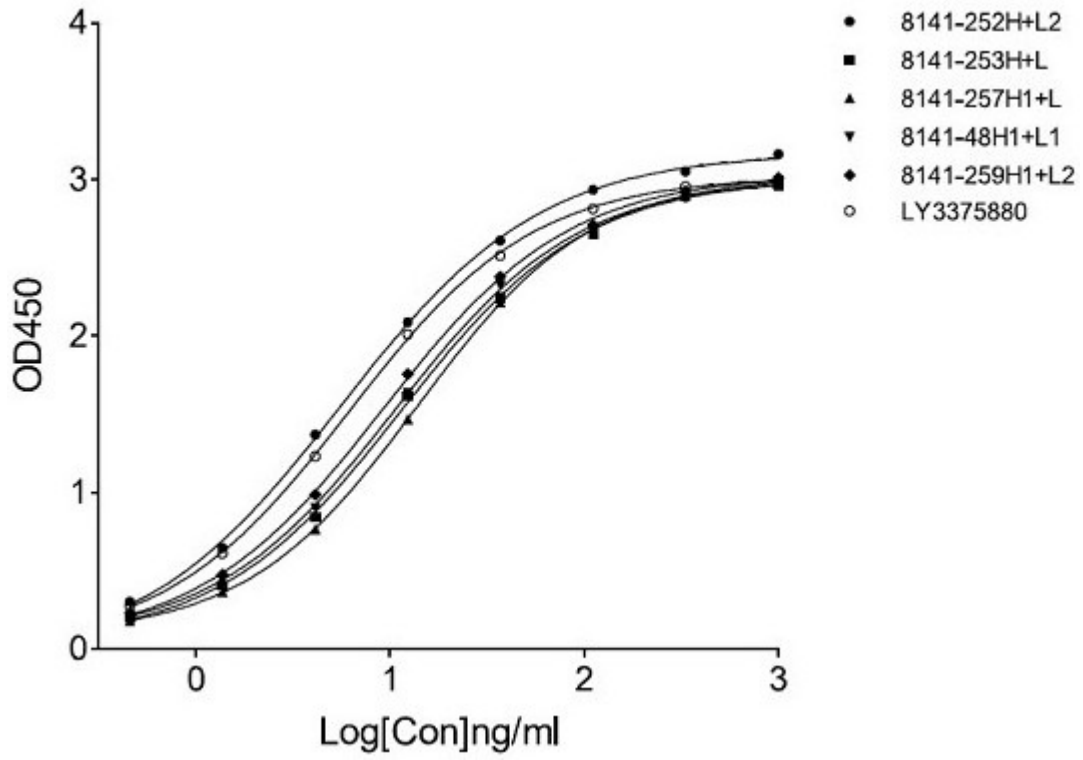


图1A

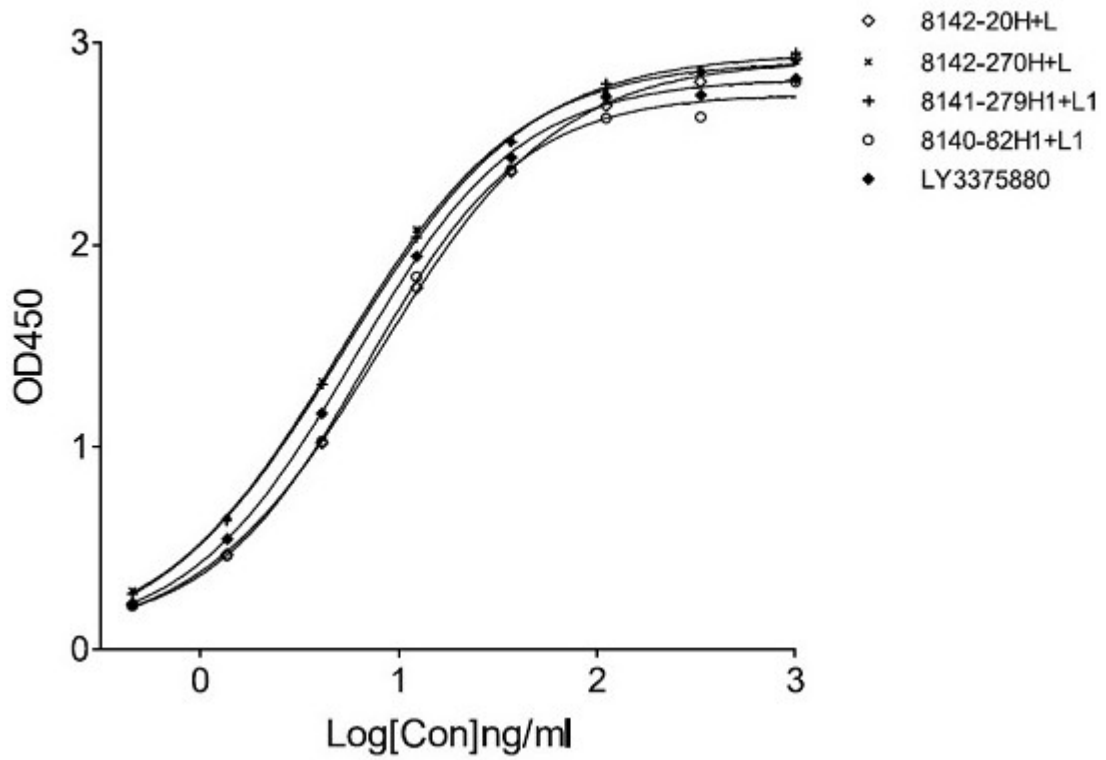


图1B

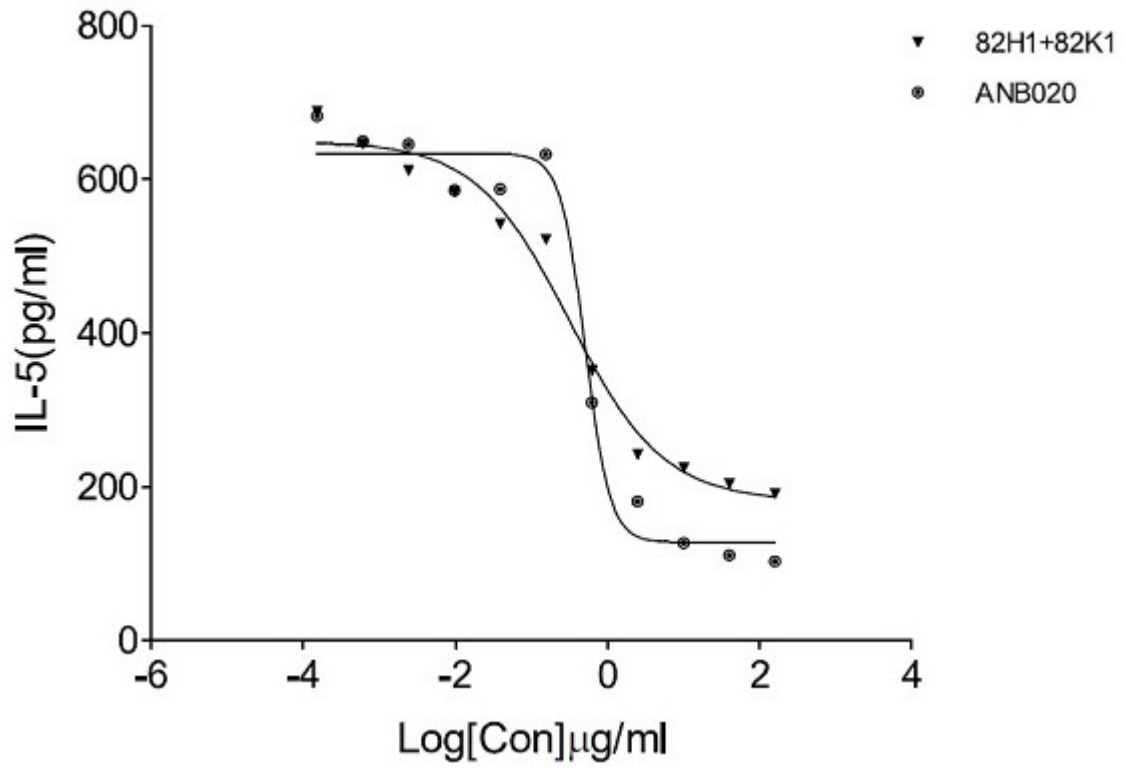


图2