



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115838425 B

(45) 授权公告日 2024.06.18

(21) 申请号 202211054756.5

C12N 5/20 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.31

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115838425 A

GenBank.immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Mus musculus]. GenBank.2016, GenBank: AAZ73253.1.

(43) 申请公布日 2023.03.24

GenBank.immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Mus musculus]. GenBank.2018, GenBank: AUK50702.1.

(73) 专利权人 首都医科大学

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条10号

审查员 程呈

(72) 发明人 刘慧荣 张苏丽 张茜 武焯

白丽娜 王鹏丽

(74) 专利代理机构 太原晋科知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 14110

专利代理师 翟冲燕

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

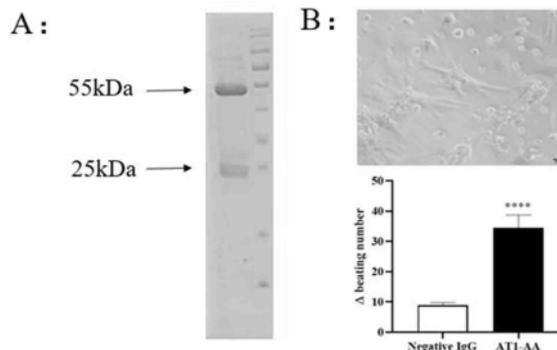
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种靶向血管紧张素II 1型受体细胞外第二环的抗体及其应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程技术领域,为了实现大规模量产理化性质高度均一的AT1-AA,提供了一种靶向血管紧张素II1型受体细胞外第二环的抗体及其应用。所述抗体可变区基因为336bp;其重链的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;重链氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;轻链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。通过提取杂交瘤细胞的RNA,逆转录cDNA后,PCR扩增抗体基因,确定抗体重链、轻链氨基酸序列及CDR区。通过上述方法原创性获得AT1-AA的氨基酸序列,从而为后期采用重组蛋白表达的方法制备批量生产低成本的单克隆AT1-AA提供了必要的基础工作。



1. 一种靶向血管紧张素 II1 型受体细胞外第二环的抗体,其特征在于:其重链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示;重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示;轻链可变区的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示;轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

一种靶向血管紧张素II 1型受体细胞外第二环的抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种靶向血管紧张素II1型受体细胞外第二环的抗体及其应用。

背景技术

[0002] 目前,心血管疾病仍是全球最主要死亡原因,肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)对心血管系统维持稳定、正常发育,以及血压调节等均有重要作用。RAAS的主要效应物是血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II),Ang II通过激活血管紧张素II 1型受体(Angiotensin II type 1 receptor, AT1R)信号传导发挥各种生理和病理生理作用。

[0003] AT1R是典型的GPCR七次跨膜 α -螺旋结构,具有一个细胞外N端、三个细胞外环(ECL1-3)、三个细胞内环(ICL1-3)、一个两亲性螺旋VIII(H8)和一个细胞内C末端,其中ECL2免疫原性最强。AT1R的过度活化可导致脉管系统功能障碍,如血管张力增加、炎症、纤维化和血栓形成等。在病理生理条件下,Ang II会慢性激活AT1R,导致受体过度激活,随后会引发高血压、心力衰竭、血管重塑、糖尿病肾病和动脉粥样硬化等多种疾病。但是在部分心血管疾病中发现,AT1R过度活化,Ang II水平却并不高,这提示可能存在其他因素参与其中。

[0004] 20世纪末,研究者陆续在子痫前期、冠心病、高血压、外周动脉病等多种心血管疾病患者血清中,发现存在一种针对AT1R的自身抗体(angiotensin II type 1 receptor autoantibody, AT1-AA)。该自身抗体可以发挥类Ang II的受体激动剂样效应。越来越多的研究证实,尽管均可以激活AT1R,但Ang II与AT1-AA结合AT1R的位点及激活受体的模式均有差异。Ang II结合于AT1R的第5、6跨膜区,引起AT1R一过性激活;而AT1-AA可以特异性识别AT1R的细胞外第二环(AT1R-ECL2),导致AT1R及下游信号持续激活,引发内皮损伤、血管平滑肌细胞转型、心肌肥厚等病理效应。因此目前认为AT1-AA是导致多种心血管疾病中AT1R过度活化的重要原因。但是AT1-AA参与心血管疾病的分子调控机制尚未完全阐明,给针对性干预带来困难。

[0005] 获得足够量且高纯度的AT1-AA是研究其病理意义和具体分子机制的首要前提。目前获取AT1-AA的方式主要有两种:一是从临床患者血清中提纯出AT1-AA。但是临床患者血清来源有限、滴度低、采集困难,若提纯不及时可造成AT1-AA滴度下降或损失,故难以为AT1-AA的机制研究提供充足保障;二是通过主动免疫获得AT1-AA,即复制免疫反应,但是主动免疫耗时较长,且抗体是多克隆的,难以开展精细的分子调控机制研究。因此,获得具有高效力和特异性且成本相对较低的AT1-AA是限制本领域发展的重要瓶颈问题。为此,我们利用人的AT1R-ECL2肽段制备了可产生单克隆抗体AT1-AA的杂交瘤细胞。尽管杂交瘤细胞可以生产高纯度的单克隆AT1-AA,但提纯成本较高,限制了其应用。

发明内容

[0006] 本发明为了实现大规模量产理化性质高度均一的AT1-AA,提供了一种靶向血管紧张素II1型受体细胞外第二环的抗体及其应用。通过提取杂交瘤细胞的RNA,逆转录cDNA后,PCR扩增抗体基因,确定抗体重链、轻链氨基酸序列及CDR区。通过上述方法原创性获得AT1-AA的氨基酸序列,从而为后期采用重组蛋白表达的方法制备批量生产低成本的单克隆AT1-AA提供了必要的基础工作。

[0007] 本发明由如下技术方案实现的:一种靶向血管紧张素II1型受体细胞外第二环的抗体,所述抗体可变区基因为336bp;其重链的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;重链氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;轻链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0008] 制备所述靶向血管紧张素II1型受体细胞外第二环的抗体的方法,提取杂交瘤细胞的RNA,逆转录cDNA后,PCR扩增抗体基因,确定抗体重链、轻链氨基酸序列及CDR区;获得靶向血管紧张素II1型受体细胞外第二环的抗体AT1-AA的氨基酸序列。

[0009] 具体方法为:

[0010] (1) 杂交瘤细胞的获得:用血管紧张素II1型受体细胞外第二环 AT1R-ECL2的主动免疫Balb/C小鼠;将小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,产生分泌AT1-AA的单克隆杂交瘤并培养,然后将处于对数期的细胞注入小鼠腹腔取腹水。用 1×10^7 注射后从小鼠腹水中分离出高度纯化的AT1-AA杂交瘤。参考文献(《Wei M, Zhao C, Zhang S, Wang L, Liu H, Ma X. Preparation and Biological Activity of the Monoclonal Antibody against the Second Extracellular Loop of the Angiotensin II Type 1 Receptor.》J Immunol Res. 2016;2016:1858252.)所述方法。

[0011] (2) 杂交瘤细胞中提取和纯化AT1-AA:利用亲和层析,从杂交瘤细胞中得到AT1-AA,使用Mab TrapTM Protein G HP 5 mL高效纯化柱(GE Healthcare Life Sciences)进行提取和纯化,获得高纯度的AT1-AA;具体为:将杂交瘤细胞悬液注射到小鼠腹腔内,待小鼠腹部出现膨隆14-18天后,抽取腹水用于提纯。先用结合缓冲液润洗纯化柱,将腹水与结合缓冲液等体积混合后过纯化柱,继续用结合缓冲液洗杂,最后用洗脱缓冲液将结合到柱子上的IgG洗脱下来,用结合缓冲液润洗以复兴纯化柱;

[0012] 利用分离培养的原代乳鼠心肌细胞对获得的AT1-AA进行乳鼠心肌细胞跳动频率的检测,验证所纯化的AT1-AA的生物活性;具体为:将出生0-4天的乳鼠快速断头,取出心脏洗涤血液并去除结缔组织,将心脏剪成小块,加入混合酶液反复消化组织,过滤得到单细胞组悬液后接种在培养皿中,贴壁2小时后收集主要含有心肌细胞的悬液,离心后用新的培养基重悬,贴壁36小时后换液;

[0013] 将正常培养在6孔板中的乳鼠心肌细胞撤去含胎牛血清的培养基,更换为普通的DMEM高糖培养基,24小时后先进行心肌细胞基础跳动频率的计数,之后分别加入浓度为 1×10^6 的AT1-AA和negative IgG,37°C孵育5分钟后每组分别计数,每次计数时间为15秒,最后得出每分钟乳鼠心肌细胞跳动频率;

[0014] (3) 扩增抗体基因:对已验证生物活性的杂交瘤细胞进行RNA提取、cDNA合成,PCR扩增抗体基因;将杂交瘤细胞复苏后,使用Qiagen的RNeasyMiniKit提取细胞中的RNA,使用Roche公司的第一链合成试剂盒配制10 μ l的扩增反应体系,合成cDNA后,采用2-20ug总RNA

反转录形成的cDNA作为模板,通过30个总体系、27个反应体系PCR扩增重链和轻链基因,扩增产物经1.5%琼脂糖电泳验证,均为330bp条带。

[0015] 本发明获得AT1-AA的氨基酸序列,从而为后期采用重组蛋白表达的方法制备批量生产低成本的单克隆AT1-AA提供了必要的基础工作,通过重组蛋白表达方法制备的AT1-AA,不仅低成本,且质量均一,可为后期病理实验提供充足原材料。

附图说明

[0016] 图1为鉴定杂交瘤细胞产生AT1-AA纯度及生物活性图;图中:A为SDS-PAGE结果;B为利用分离培养的原代乳鼠心肌细胞用来进行乳鼠心肌细胞跳动频率的检测结果图;

[0017] 图2为PCR对已扩增的抗体基因进行验证结果;图中:泳道1-3号为不同重链引物PCR结果,泳道4对应轻链PCR结果;

[0018] 图3为重链CDR区及FR区和轻链CDR区及FR区;图中A为重链CDR区及FR区;B为轻链CDR区及FR区;

[0019] 图4为VH和VL模板;图中:A为VH模板,B为VL模板;

[0020] 图5为VH同源建模评估结果;图中:A为VH的ERRAT结果;B为VH的VERIFY3D结果;C为VH的PROCHECK中的拉氏图评估结果;

[0021] 图6为VL同源建模评估结果;图中:A为VL的ERRAT结果;B为VL的VERIFY3D结果;C为VL的PROCHECK中的拉氏图评估结果;

[0022] 图7为可变区3D结构;

[0023] 图8为利用AlphaFold中的AT1R结构使用Zdock进行AT1-AA可变区与AT1R分子对接图。

具体实施方式

[0024] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例;基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0025] 除非另有定义,所有在此使用的技术和科学术语,和本发明所属领域内的技术人员所通常理解的意思相同,在此公开引用及他们引用的材料都将以引用的方式被并入。

[0026] 本领域技术人员意识到的通过常规实验就能了解到的描述的特定实施方案的等同技术,都将包含在本申请中。

[0027] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的仪器设备,如无特殊说明,均为实验室常规仪器设备;下述实施例中所用的实验材料,如无特殊说明,均为由常规生化试剂商店购买得到的。

[0028] 1、鉴定杂交瘤细胞产生AT1-AA纯度及生物活性。通过亲和层析的方法,从杂交瘤细胞产生的腹水中获得AT1-AA,使用Mab TrapTM Protein G HP 5 mL高效纯化柱(GE Healthcare Life Sciences)进行提取和纯化,获得高纯度的AT1-AA。具体方法为:

[0029] A、杂交瘤细胞产生的小鼠腹水中AT1-AA的纯化

[0030] (1)将合成的人AT1受体细胞外第二环抗原表位肽段免疫Balb/c小鼠,制备出高滴

度的多抗血清,进行细胞融合,制备出杂交瘤细胞株。

[0031] (2) 选取清洁级经检测AT1-AA阴性的10-12周龄 Ba1b/c小鼠,性别不限。室温18℃-22℃,湿度40%-70%,光照和黑暗每12小时交替。自由饮食、饮水喂养。适应性喂养3-5天。

[0032] (3) 将小鼠随机分为两组,进行预免疫化处理:其中一组每只小鼠腹腔注射石蜡0.4mL-0.5mL,另一组小鼠腹腔注射弗氏不完全佐剂(0.02mL/g),石蜡和弗氏不完全佐剂都是对小鼠进行预免疫化处理。继续正常喂养一周。

[0033] (4) 一周后,处理正在培养的生长至对数生长期的杂交瘤细胞。将培养皿里的细胞吹打下来,转移到50mL离心管中,800RPM,离心5分钟,弃掉培养基,制成细胞悬液的终浓度为 $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 个细胞/mL。

[0034] (5) 将处理好的杂交瘤细胞悬液注射到已经预免疫化处理的小鼠腹腔内,每只小鼠注射0.5mL,继续正常喂养。14-18天时,小鼠出现明显的腹水后,抽取腹水。

[0035] (6) 用结合缓冲液润洗纯化柱,将腹水与结合缓冲液等体积混合后过纯化柱,后用结合缓冲液洗杂,洗脱缓冲液将柱子上的IgG洗脱下来,流下来的洗脱液接收于预先置入中性缓冲液的Ep管中检测浓度后备用。

[0036] 缓冲液配方:

[0037] 10×结合缓冲液A液(10×Na₂HP0₄·12H₂O溶液):38.5g Na₂HPO₄·12H₂O充分溶解于490mL双蒸水中,定容至500 ml,混匀后0.22μm滤膜过滤,4℃保存。

[0038] 10×结合缓冲液B液(10×NaH₂P0₄·2H₂O溶液):15.6g的NaH₂P0₄·2H₂O粉末充分溶解于450mL双蒸水中,定容至500mL,混匀后0.22μm滤膜过滤,4℃保存。

[0039] 结合缓冲液(20mmol/L Na₂HP0₄, pH=7.0):量取27mL的10×Na₂HP0₄·12H₂O溶液和23mL的10×Na₂HPO₄·12H₂O溶液,加入440mL双蒸水,充分溶解,调节pH至7.0,再用双蒸水定容至500ml,混匀后0.22μm滤器过滤,4℃保存。

[0040] 洗脱缓冲液(100mmol/L Glycine-HCl, pH=2.7):3.75g甘氨酸充分溶解于450mL双蒸水中,调节pH至2.7,定容至500mL,混匀后0.22μm滤器过滤,4℃保存。

[0041] 中性缓冲液(1mol/L Tris, pH=8.0):60.57g Tris充分溶解于450mL双蒸水中,调节pH至8.0,定容至500mL,混匀后0.45μm滤器过滤,4℃保存。

[0042] B、乳鼠心肌细胞提取及加药处理:

[0043] (1) 准备50 mL的无菌离心管,向离心管内加入25 ml的10% FBS/PS/DMED高糖培养基;取出生0-4天的乳鼠,75%酒精浸泡消毒。右手持大镊将乳鼠取出,用左手大拇指和食指固定乳鼠的身体,留出头部,右手用组织剪沿颈部快速断头,滴出3-4滴血(尽量去除血细胞)。换眼科剪从剑突左缘剪开胸骨,暴露心脏后用弯镊夹出置于预冷的PBS中清洗。

[0044] (2) 取出的心脏连续过2-3个盛有预冷PBS的平皿,以充分洗涤血液;换干净的眼科剪将洗净的心脏去除结缔组织;接着置入小玻璃瓶内,加入适量PBS,用眼科剪将心脏组织剪成1mm³的组织块,静置5分钟,弃上清,重复3-4次,至PBS清澈,目的是去除之前没有泵出去的血液。

[0045] (3) 弃掉玻璃瓶内PBS(注意不要吸走组织块),放入小转子,向组织中加入2-3 mL混合酶液,用温控磁力搅拌器37℃恒温恒速转动反复消化组织,转速控制在每分钟60 RPM,振荡消化5分钟,弃去第一次的消化液;消化组织短时多次,总消化次数最好不超过10次,每次消化时间不超过7分钟,每次的消化也收集在装有培养基的离心管中,以终止消化反应。

[0046] (4)待全部消化完成后用200目的筛网过滤混合液,得到单细胞悬液。800RPM离心5分钟,弃上清,用新的10% FBS/PS/DMED高糖培养基重悬细胞,接种培养在10cm²培养皿中,放进37°C、5% CO₂孵箱中进行差速贴壁2小时(去除大量的成纤维细胞)。

[0047] (5)2小时后,成纤维细胞已贴壁,而心肌细胞还未贴壁,收集主要含有心肌细胞的悬液,离心后用新的培养基重悬,并加入0.1 mmol/L的5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU),细胞计数后以合适的浓度接种培养在6孔板或者96孔板中。36小时后首次换液,期间不要晃动孔板,防止心肌细胞贴壁不牢。

[0048] (6)将种在6孔板内的乳鼠心肌细胞72小时后撤去含胎牛血清的培养基,更换成普通DMEM高糖培养基继续培养。24小时后先进行心肌细胞基础跳动频率的计数,之后分别加入浓度为1×10⁶的AT1-AA和negative IgG,37°C孵育5分钟后每组分别计数,每次计数时间为15秒,最后得出每分钟乳鼠心肌细胞跳动频率。

[0049] SDS-PAGE结果如图1中A所示,结果显示,两者均有明显的55 kDa重链和25 kDa轻链条带,表示纯度较高。原代乳鼠心肌细胞如图1中B上图所示,利用分离培养的原代乳鼠心肌细胞用来进行乳鼠心肌细胞跳动频率的检测,检测结果如图1中B下图所示,结果显示AT1-AA可明显刺激乳鼠心肌细胞跳动频率加快。

[0050] (2)验证已扩增的抗体基因。对已验证活性的杂交瘤细胞RNA提取、cDNA合成后,通过PCR对已扩增的抗体基因进行验证。结果如图2所示,目的抗体基因为300bp,泳道1-3号为不同重链引物PCR结果,泳道4对应轻链PCR结果。

[0051] RNA提取(QIAGEN, RNeasy Mini Kit)方法:

[0052] (1)将杂交瘤细胞复苏,转移至50mL离心管中,加入20mLDMEM,300g离心10min。

[0053] (2)弃去上清,向50mL离心管中加入30mLPBS,300g离心 10min后,弃去上清,向细胞沉淀中加入700uL RLT,充分吹打使细胞完全裂解。

[0054] (3)从上面裂解液中吸取 350uL的淋巴细胞样本充分吹打,并均质化,振荡混悬使之彻底裂解;加入350uL 70%乙醇,来回吹打混合均匀。

[0055] (4)将此700uL液体加入柱子中央,室温离心15s,弃废液;加入700uL Buffer RW1于柱中,室温离心15s,弃废液及收集管。

[0056] (5)将柱子置于一个新的收集管,加入500uL Buffer RPE(首次使用需向Buffer RPE加入4倍体积的乙醇)室温离心15s,弃废液。再加入500uL Buffer RPE,室温离心2min。空离1min,弃收集管。50uL DEPC水洗脱。

[0057] cDNA合成(20uL 体系):采用Roche公司的第一链合成试剂盒(Transcriptor First Strand cDNASynthesis Kit.)。扩增体系配制与反应如表1所示。

[0058] 表1:扩增体系配制与反应

[0059]

细胞总 RNA ^o	(1pg-5μg) ^o	5-8μL ^o
oligo-dT ^o	(10μM) ^o	1μL ^o
dNTPs Mix ^o	(10mM) ^o	1μL ^o
DEPC- water ^o	终体积 10μL ^o	
65°C变性 5 分钟 ^o		
迅速放至冰浴至少 1 分钟 ^o		
准备反应混合液 (master reaction mix) ^o		
10×RT buffer ^o	2μL ^o	
0.1M DTT ^o	2μL ^o	
RNaseOUT (40U/μl) ^o	1μL ^o	
25mM MgCl ₂ ^o	4μL ^o	
SuperScriptIII ^o	1μL ^o	
50°C 50min ^o		
85°C 5min 终止(chill on ice and centrifuge) ^o		
加入 1uL RNaseH ^o		
37°C 20min ^o		
置冰浴或-20°C保存 ^o		

[0060] PCR扩增抗体基因:采用2-20ug总RNA反转录形成的cDNA作为模板,按表2配置PCR反应体系来扩增抗体轻链和重链基因(30个总体系,27个反应体系PCR):

[0061] 表2:扩增体系配制与反应

[0062]

Comonent ^o	Volume(μL) ^o
Template ^o	0.2 ^o
10×EX Buffer ^o	5 ^o
dNTP ^o	4 ^o
Primer-F (10 pmol) ^o	2 ^o
Primer-R (10 pmol) ^o	2 ^o
EX Taq ^o	0.5 ^o
H ₂ O ^o	36.3 ^o
Programe ^o	^o
94°C 3min ^o	^o
94°C 30s ^o	30 cycles
55°C 30s ^o	
72°C 1min ^o	
72°C 10min ^o	
4°C ∞ ^o	^o

[0063] PCR产物经1.5% 琼脂糖电泳, VH、VL均应为330bp左右的条带, 回收定量后进行下一轮 PCR或冻于-20℃待用。

[0064] (3) AT1-AA的重链碱基序列及氨基酸序列。重链的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;重链氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;轻链的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;重链CDR区及FR区和轻链CDR区及FR区如图3所示。

[0065] 为分析AT1-AA与AT1R结合模式, 首先根据测得AT1-AA可变区序列进行同源建模, 利用Swiss-model在线对VH和VL进行建模, 建模结果如图4所示, 经过序列比对, VH的建模模板的PDB号是6j5d, 序列一致性达80.36%(大于30%为建模合理), GMQE(全局模型质量评估)为0.87(可信度范围为0-1之间, 值越大表示质量越好)。VL的建模模板的PDB号是5myx, 序列一致性达90.18%, GMQE为0.89。

[0066] 随后通过SAVES v6.0评估VH和VL建模结果, 结果如图5、图6所示。ERRAT结果中Overall quality factor值越高越好, 得分>85较好, 晶体可达到95, VH的得分为94.2308, VL的得分为100。VERIFY3D结果超过80%的残基拥有大于0.2的3D/1D值, 则模型质量合格, VH和VL均为100%。PROCHECK结果中的拉氏图评估, 落于核心区域的氨基酸残基达90%以上即为合理, VH有91个氨基酸残基均位于核心区域(95.8%), 落在允许区的有4个残基(4.2%), 无落在禁止区和大致允许区的残基; VL有87个氨基酸残基均位于核心区域(94.6%), 落在允许区的有4个残基(4.3%), 无落在大致允许区的残基, 落在禁止区的残基有1个残基(1.1%)。综上所述, VH和VL建模合理, 后通过pymol的叠加命令(aligned)获得AT1-AA可变区的同源建模最终结构。

[0067] 利用AlphaFold中的AT1R结构使用Zdock进行AT1-AA可变区与AT1R分子对接。结果发现, VL的S32与AT1R的T190形成两个氢键, VH的S56与AT1R的T94形成氢键, VH的G98和AT1R的D9形成氢键。AT1R的G10、I11、K12、R13、P95、N98、F171、N176、T178、H183、E185具有疏水作用, VL的D31、D33、Y37、F99、R101具有疏水作用, VL的T30、Y31、W32、N34、Q49、F51、S54、Y58具有疏水作用。

[0068] 通过对AT1-AA可变区域的测序结果进行同源建模和分子对接实验, 证明AT1-AA可与AT1R形成氢键和疏水相互作用及序列有效性, 为后续根据此序列批量生产AT1-AA提供理论依据。

[0069] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案, 而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明, 本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换, 并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

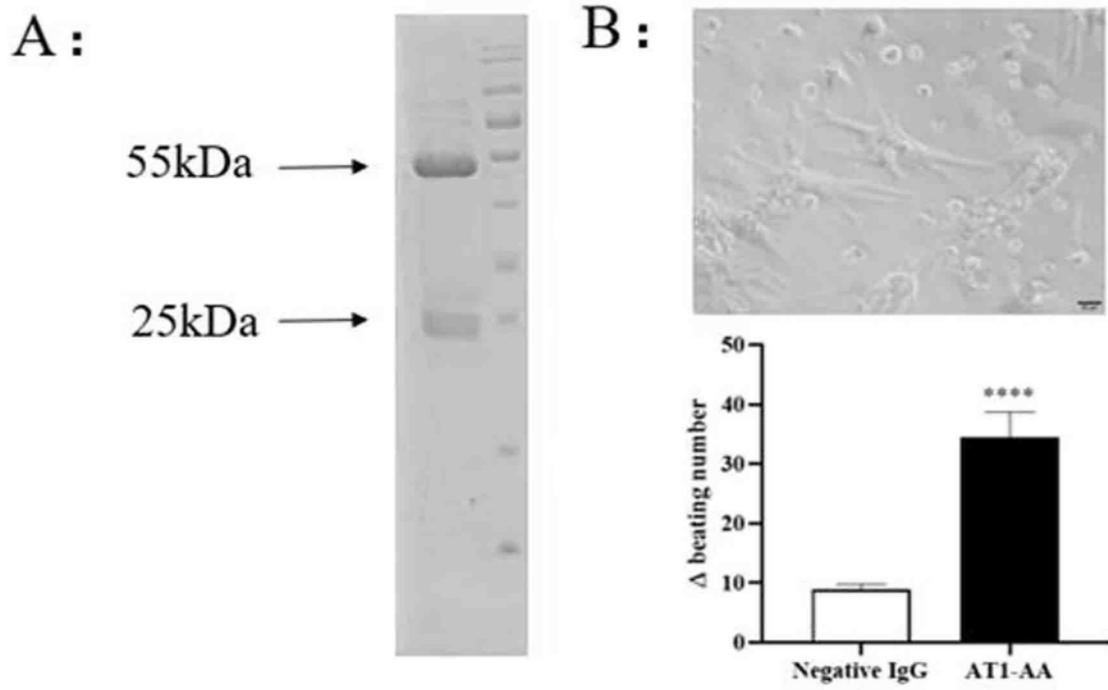


图1

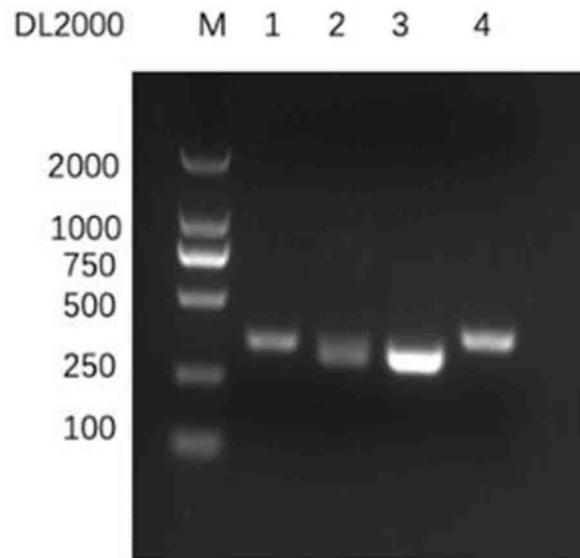


图2

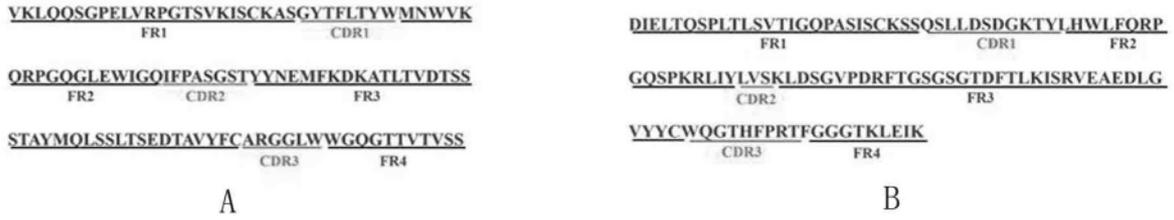
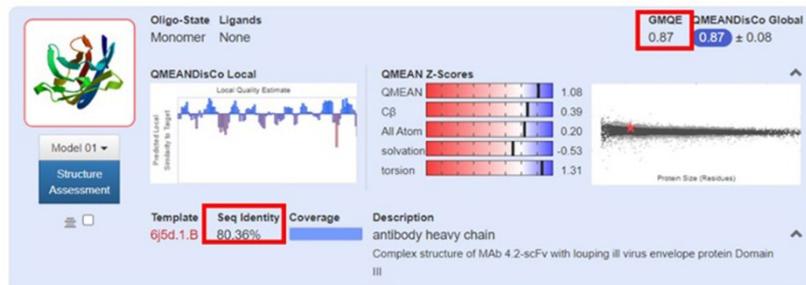


图3

A VH model



B VL model

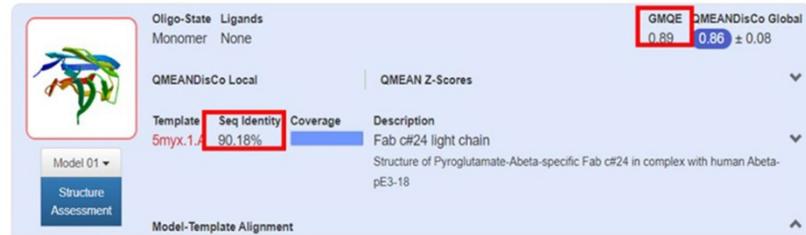


图4

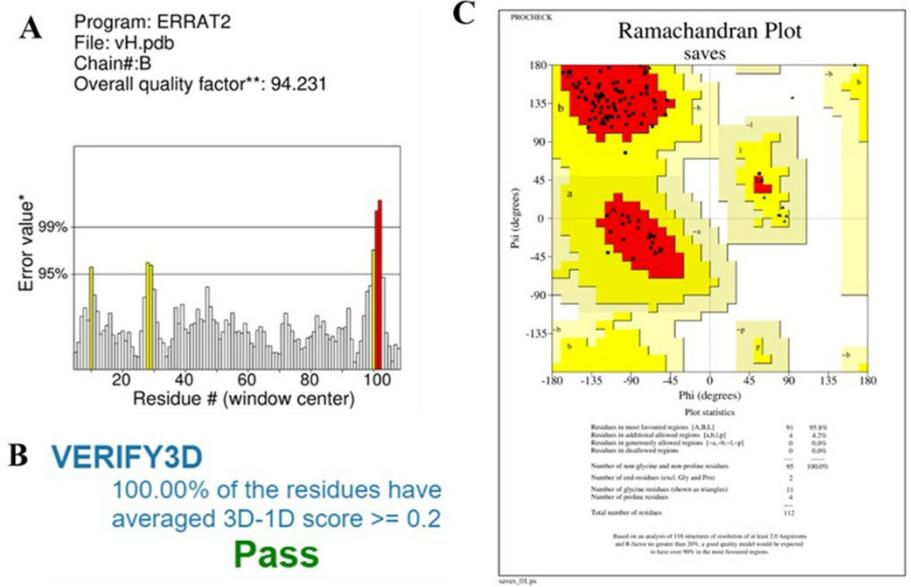


图5

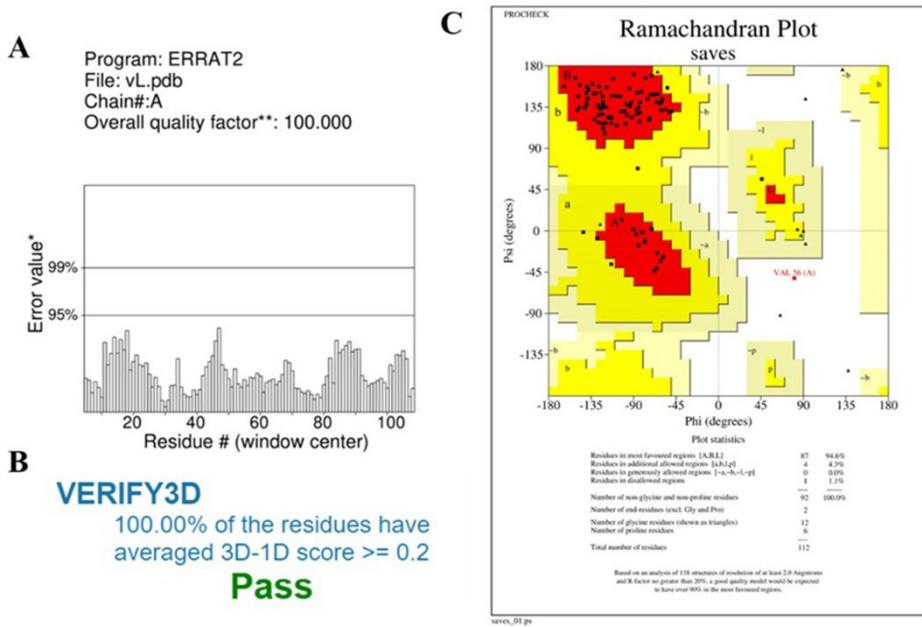


图6

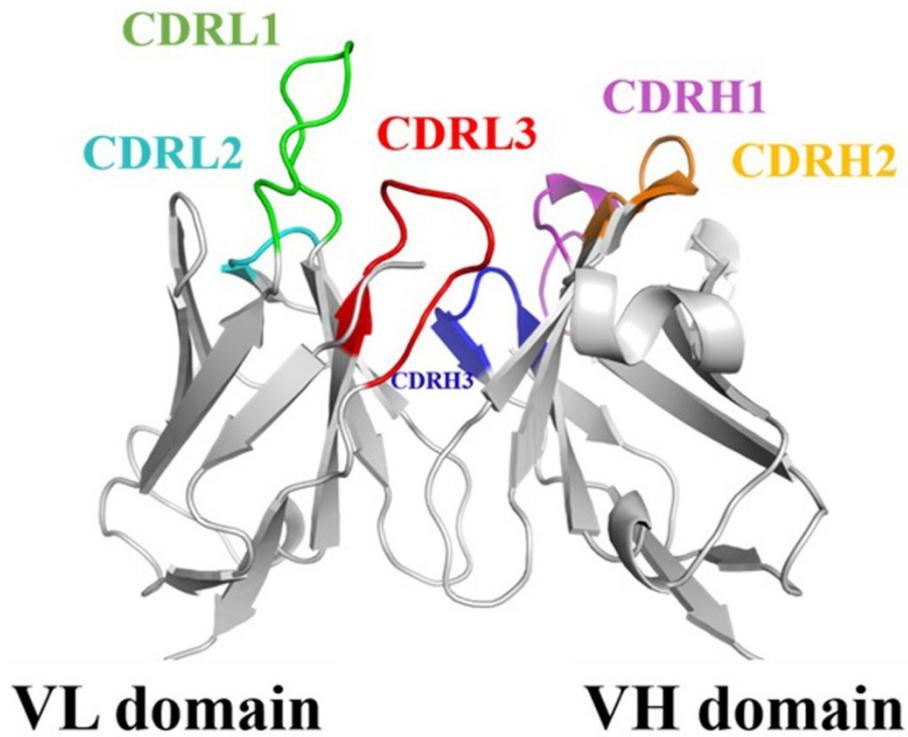


图7

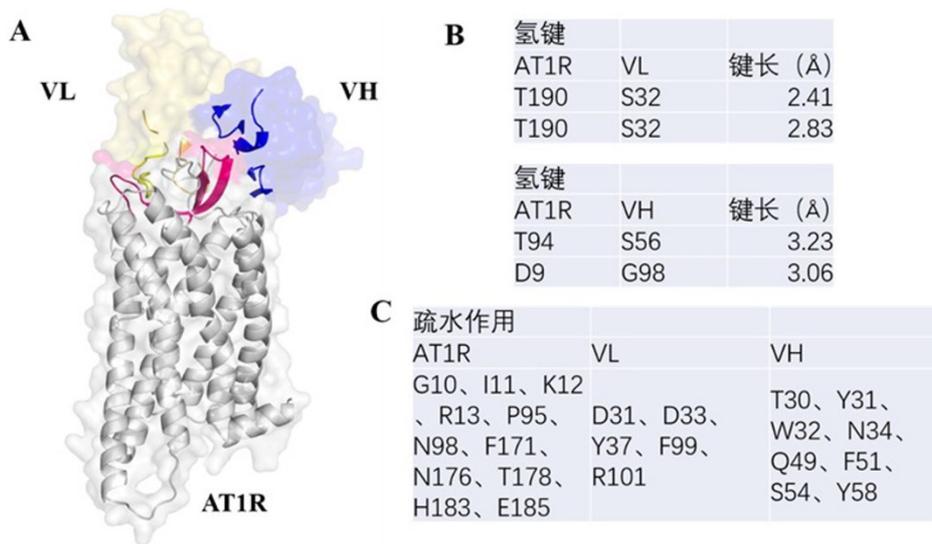


图8