



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106008714 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201610345750.1

A61P 37/00(2006.01)

(22)申请日 2016.05.24

A61P 31/12(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

(71)申请人 瑞阳(苏州)生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物纳米园B1楼609单元

(72)发明人 李戈 郭树华 张佳春 朱一翔

(74)专利代理机构 北京同辉知识产权代理事务所(普通合伙) 11357

代理人 谢彬

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

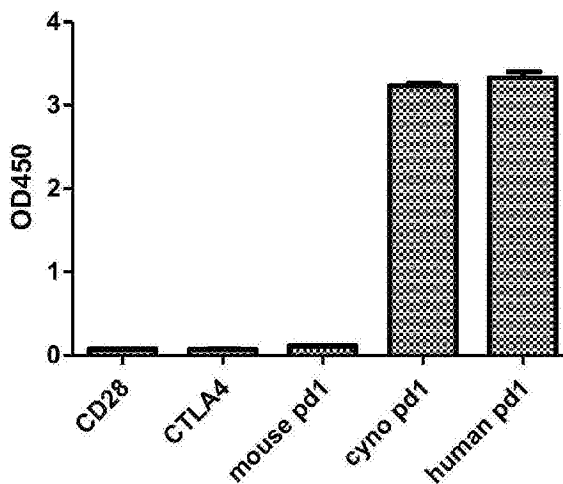
权利要求书2页 说明书15页  
序列表21页 附图6页

(54)发明名称

抗人PD-1人源化单克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及生物医药领域,尤其涉及一种抗人PD-1人源化单克隆抗体及其应用。本发明通过筛选得到了具有良好特异性、较高的亲和性和稳定性的抗人PD-L1人源化单克隆抗体,该抗体能够特异性地与人PD-1结合,并且不结合CD28家族其它成员,阻断PD-L1与PD-1相结合,部分恢复T细胞的功能,对肿瘤生长具有显著的抑制作用。



1. 一种抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于:包括选自于如下的一组CDR区:

重链CDR1、CDR2、CDR3的序列分别如SEQ ID NO:17-19所示,轻链CDR1、CDR2、CDR3的序列分别如SEQ ID NO:35-37所示,或与上述序列结合相同抗原表位的序列。

2. 根据权利要求1所述的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于:还包括选自于如下的重链可变区框架区:FR1、FR2、FR3、FR4的序列分别如SEQ ID NO:20-23所示,或分别与上述序列的同一性大于70%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

3. 根据权利要求2所述的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于:其重链的序列如SEQ ID NO:8所示。

4. 根据权利要求1所述的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于:还包括选自于如下的轻链可变区框架区:FR1、FR2、FR3、FR4的序列分别如SEQ ID NO:38-41所示,或分别与上述序列的同一性大于70%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

5. 根据权利要求4所述的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于:其轻链的序列如SEQ ID NO:25所示。

6. 一种核酸分子,其特征在于:其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列,所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

(1)SEQ ID NO:17-19;

(2)与前述(1)序列相比满足以下二者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位;b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%。

7. 根据权利要求6所述的核酸分子,其特征在于:所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

SEQ ID NO:16,或与前述序列相比满足以下三者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位、b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%、c)与前述序列框架区中含有一个到几个核苷酸的替换。

8. 一种核酸分子,其特征在于:其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列,所述轻链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

(1)SEQ ID NO:35-37;

(2)与前述(1)序列相比满足以下二者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位;b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%。

9. 根据权利要求8所述的核酸分子,其特征在于:所述轻链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

SEQ ID NO:34,或与前述序列相比满足以下三者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位、b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%、c)与前述序列框架区中含有一个到几个核苷酸的替换。

10. 一种载体,其特征在于:其含有权利要求6-9任一项的核酸分子。

11. 一种宿主细胞,其特征在于:其含有权利要求6-9任一项的核酸分子或权利要求10的载体。

12. 一种偶联物,其特征在于:其含有权利要求1-5任一项的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,以及其它生物活性物质,所述抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原

结合部分直接或通过连接片段与其它生物活性物质偶联。

13. 一种组合物,其特征在于:其含有权利要求1-5任一项的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分、权利要求6-9的核酸分子、权利要求10的载体、权利要求11的宿主细胞、或者权利要求12的偶联物,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的其它生物活性物质。

14. 权利要求1-5任一项的抗人PD-L1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分、权利要求6-9的核酸分子、权利要求10的载体、权利要求11的宿主细胞、权利要求12的偶联物、或者权利要求13的组合物用于制备预防或治疗肿瘤、免疫系统相关疾病(T细胞功能障碍)、微生物或病毒引起的感染的用途。

## 抗人PD-1人源化单克隆抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,尤其涉及一种抗人PD-1人源化单克隆抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] T细胞活化需要两个信号,第1信号来自T细胞抗原受体(TCR)与抗原肽-MHC复合物的结合,为抗原特异性的;第2信号即协同刺激信号,由T细胞上粘附分子的受体与抗原提呈细胞(APC)上相应的配体结合,为抗原非特异性的。第2信号在T细胞活化中具有重要的作用,若无协同刺激分子提供第2信号,T细胞识别抗原后将处于无应答状态或凋亡。CD28/CTLA-4与其配体B7-1、B7-2的结合为T细胞活化所必需的协同刺激通路,参与机体抗原特异性体液免疫和细胞免疫。CD28-B7家族的新成员,包括:ICOS(inducible costimulator)及其配体B7RP-1以及PD-1(programmed death-1)及其配体PD-L1和PD-L2。CD28和ICOS可传递协同刺激(阳性)信号;而CTLA-4和PD-1则传递抑制性(阴性)信号。T细胞活化的阳性和阴性信号之间的平衡,对机体抵抗外来抗原的入侵,防止自身免疫反应的发生起着关键作用。

[0003] PD-1是55KD的跨膜蛋白,与CD28、ICOS和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)相关抗原4(CTLA-4)同属免疫球蛋白超家族成员。其胞外区只有1个IgV样区,与CTLA-4有23%的同源性,但无结合B7-1/B7-2必需的MYPPPY基序;胞浆区有2个酪氨酸残基,尾部有1个ITIM(immunoreceptor tryosine-based inhibitory motif),而无YXXM基序。其他CD28家族中的成员以二硫键连接的同源二聚体形式而存在,而PD-1则以单体形式存在。与CD28、CTLA-4的局限性表达(主要在T细胞)不同,PD-1可表达于活化的T细胞、B细胞和骨髓细胞,以及CD4-CD8-胸腺细胞。

[0004] PD-1有两个配体,PD-L1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC),均为B7家族中的新成员,胞外都有1个IgV样区和1个IgC样区。PD-L1含有290个氨基酸,其胞外区与B7-1、B7-2分别有20%和15%的同源性,胞浆区变化多样,但二级结构同B7-1、B7-2非常相似。在基因水平上PD-L2与PD-L1有37.4%的同源性。PD-L1和PD-L2的表达与调节不同。PD-L1mRNA在非淋巴组织(如胎盘、心、肺和骨骼肌)中含量丰富,但除巨噬样细胞和胎盘滋养层外,PD-L1蛋白在正常组织中几乎检测不到。在APC、T细胞和内皮细胞上经诱导可表达PD-L1,而且多种人类的肿瘤中富含PD-L1。相反,PD-L2仅在树突状细胞(DC)和单核细胞上表达。用IFN- $\gamma$ 处理DC和单核细胞后,PD-L1和PD-L2的表达均上调。但是,实际上PD-L1和PD-L2分别受Th1和Th2型细胞的调节。在巨噬细胞上,Th1细胞分泌的IFN- $\gamma$ 可经转录因子STAT1上调PD-L1的表达;而IFN- $\gamma$ 需经IL-4才能诱导PD-L2表达,STAT6参与了IL-4下游的信号传导,提示PD-L2的表达受Th2细胞的调节。

[0005] PD-1是免疫抑制性受体,与其配体PD-L1、PD-L2相互作用传递抑制性信号,在免疫应答中发挥负向调控作用。PD-1与PD-L1/PD-L2的结合,可抑制TCR介导的淋巴细胞增殖和细胞因子(IL-2、IFN- $\gamma$ 及IL-10)产生,导致细胞周期停滞,但不增加细胞死亡。分别阻断DC上PD-L1、PD-L2的表达,可导致T细胞增殖和细胞因子(IFN- $\gamma$ 和IL-10)产生增加,且同时阻断二者表现的作用相加,表明PD-L1和PD-L2的功能是抑制T细胞活化。PD-1也可参与B细胞

应答的负调节。PD-1信号传导的作用是抑制B细胞增殖、分化、Ig类型转换,在建立和/或维持外周自身耐受中起重要作用。PD-1抑制BCR介导的信号转导的分子机制(Molecular Mechanisms)是:PD-1通过其所含SH2区的酪氨酸磷酸酶2(SHP-2),使BCR信号转导的重要信号换能器去磷酸化,从而抑制效应分子的酪氨酸磷酸化,包括Ig $\beta$ 、Syk、PLC- $\gamma$  2及ERK1/2。该抑制作用不需要ITIM N-末端的酪氨酸,而需要C-末端的其他酪氨酸残基。

[0006] PD-1在抑制TCR介导的T细胞活化的同时,可减弱ICOS、IL-4和IL-21的作用,但不影响CD28、IL-7和IL-15的效应。然而PD-1信号传导能够抑制亚理想水平的CD28介导的协同刺激作用。在某些情况下,PD-1—PD-L通路可能是第2位的或后备的,只有当CD28-B7协同刺激通路缺乏或处于亚理想水平时,该通路才能发挥调节T细胞应答的作用。在其他情况下,该通路对T细胞活化或分化起核心作用,这可能有赖于正在进行的免疫应答的特定阶段。APC上抑制性PD-L1/PD-L2和协同刺激B7-1/B7-2信号的相对水平,可能影响T细胞活化的程度,决定产生耐受还是自身免疫。PD-L1在非淋巴组织上的表达,提示PD-1—PD-L可能是通过抑制自身反应性T、B细胞和效应T细胞而诱导免疫耐受及调节局部的炎症反应。

[0007] 肿瘤细胞所具有的逃避免疫系统的能力,是通过在其表面产生的程序性死亡配体(PD-L1)结合到T细胞的PD-1蛋白上实现的。机体内的肿瘤微环境会诱导浸润的T细胞高表达PD-1分子,肿瘤细胞会高表达PD-1的配体PD-L1和PD-L2,导致肿瘤微环境中PD-1通路持续激活,T细胞功能被抑制而不能发现肿瘤以至于不能向免疫系统发出需要攻击肿瘤和杀伤肿瘤细胞的治疗。

[0008] PD-1抗体是针对PD-1的一种抗体蛋白,使得前两种蛋白不能发生结合,阻断这一通路,部分恢复T细胞的功能,使这些细胞能够继续杀伤肿瘤细胞。2014年7月,PMDA批准全人源化IgG4抗PD-1单克隆抗体Nivolumab在日本上市,用于治疗晚期黑色素瘤,成为首个获得主要监管机构批准的PD-1抗体。2015年,FDA先后批准默沙东的Keytruda (pembrolizumab)和百时美施贵宝的OPDIVO(nivolumab)两种PD-1抗体上市。

## 发明内容

[0009] 为解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种具有良好特异性、较高的亲和性和稳定性的抗人PD-1人源化单克隆抗体。

[0010] 本发明第一方面涉及抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括选自于如下一组的CDR区:

[0011] 重链CDR1、CDR2、CDR3的序列分别如SEQ ID NO:17-19所示,轻链CDR1、CDR2、CDR3的序列分别如SEQ ID NO:35-37所示,或与上述序列结合相同抗原表位的序列。

[0012] 进一步的,本发明中抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其还包括选自于如下的重链可变区框架区:FR1、FR2、FR3、FR4的序列分别如SEQ ID NO:20-23所示,或分别与上述序列的同一性大于70%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

[0013] 进一步的,本发明中抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其还包括选自于如下的轻链可变区框架区:FR1、FR2、FR3、FR4的序列分别如SEQ ID NO:38-41所示,或分别与上述序列的同一性大于70%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

[0014] 进一步的,本发明中抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括选自于如下的重链可变区:其序列如SEQ ID NO:16所示,或与上述序列结合相同抗原表位的序

列。

[0015] 进一步的,本发明中抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其包括选自如下的轻链可变区:其序列如SEQ ID NO:34所示,或者分别与上述序列的同一性大于70%、80%、85%、90%、95%、99%的序列。

[0016] 具体的,本发明中抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其重链的序列如SEQ ID NO:8所示。

[0017] 具体的,本发明中抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,其轻链的序列如SEQ ID NO:25所示。

[0018] 根据本发明第二方面任一项的核酸分子,其包含能够编码抗体重链可变区的核酸序列,所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

[0019] (1)SEQ ID NO:17-19;

[0020] (2)与前述(1)序列相比满足以下二者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位;b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%。

[0021] 进一步的,所述重链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

[0022] SEQ ID NO:16,或与前述序列相比满足以下三者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位、b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%、c)与前述序列框架区中含有一个到几个核苷酸的替换。

[0023] 在本发明的实施方案中所述核酸分子包含选自如SEQ ID NO:5所示的序列。

[0024] 进一步的,所述核酸分子包含选自如SEQ ID NO:7所示的序列。

[0025] 根据本发明第三方面任一项的核酸分子,其包含能够编码抗体轻链可变区的核酸序列,所述轻链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

[0026] (1)SEQ ID NO:35-37;

[0027] (2)与前述(1)序列相比满足以下二者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位;b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%。

[0028] 进一步的,所述轻链可变区包含选自如下一组的氨基酸序列:

[0029] SEQ ID NO:34,或与前述序列相比满足以下三者中至少一个的序列:a)结合相同抗原表位、b)同一性大于70%、80%、85%、90%或97%、c)与前述序列框架区中含有一个到几个核苷酸的替换。

[0030] 在本发明的实施方案中,所述核酸分子包含选自如SEQ ID NO:26所示的序列。

[0031] 进一步的,所述核酸分子包含选自如SEQ ID NO:24所示的序列。

[0032] 本发明第四方面涉及载体,其含有本发明第二或第三方面任一项的核酸分子。

[0033] 进一步的,本发明中所指的载体含有本发明第二方面任一项的核酸分子和第三方面任一项的核酸分子。

[0034] 本发明第五方面涉及宿主细胞,其含有本发明第二或第三方面任一项的核酸分子或本发明第四方面任一项的载体。

[0035] 本发明第六方面涉及偶联物,其含有本发明第一方面任一项的抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,以及其它生物活性物质,所述抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分直接或通过连接片段与其它生物活性物质偶联。

[0036] 在本发明的实施方案中,所述其它生物活性物质选自可直接或间接抑制细胞生长

或杀灭细胞、或通过激活机体免疫反应从而抑制或杀灭细胞,从而达到治疗肿瘤的化学物质、毒素、多肽、酶、同位素、细胞因子或其他具有生物活性的单一物质或混合物。

[0037] 本发明第七方面涉及组合物(例如药物组合物),其含有本发明第一方面任一项的抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分、第二方面或第三方面任一项的核酸分子、第四方面任一项的载体、第五方面任一项的宿主细胞、或者本发明第六方面任一项的偶联物,以及任选的药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的其它生物活性物质。

[0038] 根据本发明第七方面任一项的组合物(例如药物组合物),所述其它生物活性物质包括但不限于其它抗体、融合蛋白或药物(例如抗肿瘤药物,如放、化疗药物)。

[0039] 本发明还涉及诊断试剂或试剂盒,其含有本发明第一方面任一项的抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分,所述诊断试剂或试剂盒用于在体外(例如细胞或组织)或体内(例如人或动物模型)诊断与PD-1相关的疾病(例如肿瘤或病毒感染,例如PD-L1高表达的病毒感染或PD-L1高表达的肿瘤)。

[0040] 在本发明的实施方案中,所述肿瘤包括但不限于肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体癌、骨肉瘤、甲状腺癌、前列腺癌;所述病毒感染包括但不限于急性、亚急性或慢性HBV、HCV、HIV感染。

[0041] 本发明还涉及本发明第一方面任一项的抗人PD-1人源化单克隆抗体或其抗原结合部分、第二方面或第三方面任一项的核酸分子、第四方面任一项的载体、第五方面任一项的宿主细胞、第六方面任一项的偶联物或第七方面任一项组合物用于制备预防或治疗与PD-1相关的疾病(例如肿瘤,微生物或病毒感染,例如PD-L1高表达的肿瘤或PD-L1高表达的病毒感染)的药物的用途。

[0042] 在本发明的实施方案中,所述肿瘤包括但不限于肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体癌、骨肉瘤、甲状腺癌、前列腺癌;所述微生物感染包括但不限于细菌、真菌、原生动物感染;所述病毒感染包括但不限于急性、亚急性或慢性HBV、HCV、HIV感染。

[0043] 以下对本发明做进一步描述:在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所述的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0044] 在本发明中,术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 $\kappa$ 和 $\lambda$ 轻链。重链可分类为 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 或 $\epsilon$ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区( $V_H$ )和重链恒定区( $C_H$ )组成。重链恒定区由3个结构域( $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 和 $C_{H3}$ )组成。各轻链由轻链可变区( $V_L$ )和轻链恒定区( $C_L$ )组成。轻链恒定区由一个结构域 $C_L$ 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。 $V_H$ 和 $V_L$ 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各

VH和VL由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人(1989) Nature 342:878-883的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG(例如, IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0045] 在本发明中, 术语抗体的“抗原结合部分”是指全长抗体的一个或多个部分, 所述部分保持结合抗体所结合的相同抗原(例如, PD-1)的能力, 与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第2版, Raven Press, N. Y. (1989)), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些情况下, 抗原结合部分包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分。

[0046] 借由上述方案, 本发明至少具有以下优点: 本发明通过筛选得到了具有良好特异性、较高的亲和性和稳定性的抗人PD-1人源化单克隆抗体, 该抗体能够特异性地与人PD-1结合, 并且不结合CD28家族其它成员, 对肿瘤生长具有显著的抑制作用。

[0047] 上述说明仅是本发明技术方案的概述, 为了能够更清楚了解本发明的技术手段, 并可依照说明书的内容予以实施, 以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

## 附图说明

[0048] 图1是鼠源PD-1抗体的ELISA结合活性结果图;

[0049] 图2是鼠源PD-1抗体的ELISA抑制活性结果图;

[0050] 图3是鼠源PD-1抗体的细胞结合活性结果图;

[0051] 图4是鼠源PD-1抗体的细胞抑制活性结果图;

[0052] 图5是鼠源PD-1抗体的MLR实验结果图;

[0053] 图6是人源化PD-1抗体的ELISA直接结合活性结果图;

[0054] 图7是人源化PD-1抗体的ELISA抑制结合活性结果图;

[0055] 图8是人源化PD-1抗体细胞结合活性结果图;

[0056] 图9是人源化PD-1抗体人源化PD-1抗体在混合淋巴细胞反应中对细胞因子IFN- $\gamma$ 分泌的影响图;

[0057] 图10是人源化PD-1抗体人源化PD-1抗体在混合淋巴细胞反应中对细胞因子IL-2分泌的影响图;

[0058] 图11是人源化PD-1抗体在血清中的稳定性结果图;

[0059] 图12是人源化PD-1抗体与人CD28、CTLA-4的结合特异性及与不同物种的PD-1蛋白的结合结果图。



### 具体实施方式

[0060] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0061] 实施例一鼠源抗体筛选

[0062] 1.1动物免疫

[0063] 采用经典的免疫时间表,对BALB/c小鼠免疫,免疫原为hPD-1(人源PD-1)蛋白(购自北京义翘神州生物技术有限公司),以使动物产生抗hPD-1的抗体,具体方案如表1所示:

[0064] 表1hPD-1蛋白动物免疫方案

[0065]

步骤	天数	方法
免疫前血清采集	-4	眼眶采血, 预期获血清 15-30 $\mu$ L, 存放-20 $^{\circ}$ C
初次免疫	0	细胞免疫原: PD1 过表达细胞
第一次加强免疫	14	细胞免疫原: PD1 过表达细胞
第二次加强免疫	35	同加强免疫 1, 细胞免疫原: PD1 过表达细胞
采血清测效价	42	眼眶采血, 获血清 15-30 $\mu$ L
终免	56	免疫原 (PD1-FC) 量 50 $\mu$ g, 注射方法: IV (静脉注射)
准备饲养细胞	58	<p>每次需要 6 只小鼠 (年龄 10 周左右)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 取未免疫的普通小鼠, 摘除眼球采血, 并分离血清作为抗体检测时的阴性对照血清。同时通过颈脱位致死小鼠, 浸泡于 75%酒精中 5 分钟, 于解剖台板上固定。</li> <li>2. 用消毒剪镊从后腹掀起腹部皮肤, 暴露腹膜, 用酒精棉球擦拭腹膜消毒。</li> <li>3. 用注射器注射 10mL 培养基至腹腔, 注意避免穿入肠管, 右手固定注射器, 使针头留置在腹腔内, 左手持酒精棉球轻轻按摩腹部 1 分钟, 随后吸出注</li> </ol>

[0066]

		入的培养液。
收获脾脏	59	处死小鼠，收获脾脏，放置加入 10 mL 无血清培养基的平皿中，用针头划破脾脏，用注射器轻轻挤压脾脏，收集免疫脾细胞，200 目滤网过滤，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清，用红细胞裂解液重悬脾细胞，1200 rpm 离心 5 分钟，然后，用无血清培养基洗 1 次，用 20 mL 无血清培养基重悬，计数，放置 4°C。

[0067] 1.2 细胞融合及杂交瘤细胞筛选

[0068] 融合前调整小鼠骨髓瘤 SP2/0 的状态，保证其生长密度不超过  $1.0 \times 10^6$  个细胞，提前 3 天进行终免，终免采用尾静脉注射的方式，提前一天准备饲养细胞，铺板数量为  $2.0 \times 10^4$  个细胞/孔。通过 PEG 融合，保证脾细胞与 SP2/0 细胞的数量比在 10:1 到 5:1 之间，每孔所铺脾细胞数量不超过  $1.0 \times 10^5$ 。融合 7 天以后收获上清液并更换培养基。

[0069] 收获的上清液首先通过直接 ELISA 结合方法进行初筛，将筛得的阳性克隆扩增后收上清液进行复筛。

[0070] 复筛采用细胞结合以及细胞抑制实验进行两轮筛选，筛选得到的阳性克隆采用有限稀释法进行亚克隆，铺 96 孔板，分别为 5 个/孔，2 个/孔和 1 个/孔。培养 7 天后采用直接 ELISA 结合实验进行筛选，挑选阳性亚克隆进行扩增并保种。

[0071] 其中，所涉及的各项实验方法的具体步骤如下：

[0072] A、ELISA 结合方法

[0073] 包被 hPD-1-Fc 在板上，加入梯度稀释的抗体，孵育洗涤后，再加入羊抗鼠-HRP，显色，读数拟合出反应曲线，计算出 EC50 值。

[0074] B、细胞结合实验

[0075] 提前一天将 hPD-1-Fc 过表达细胞铺至用于检测培养的细胞板，次日封闭后加入梯度稀释的抗体，再加入 anti-mouse-EU，读数即可。

[0076] C、细胞抑制实验

[0077] 提前一天将 hPD-1-Fc 过表达细胞铺至用于检测培养的细胞板，次日封闭后加入梯度稀释的抗体，再加入 PD1-Fc-Biotin，再加入 Europium-labeled streptavidin，读数即可。

[0078] 1.3 鼠源抗体的制备及活性鉴定

[0079] 将挑选阳性亚克隆的杂交瘤细胞接种至 SFM 培养基内，培养 7 天左右，收集上清，离心过滤后用 Protein G 纯化柱纯化，纯化抗体分别进行 ELISA 结合活性、ELISA 抑制活性、细胞结合活性、细胞抑制活性检测和 MLR 实验。经过筛选，获得活性最高的一株鼠源抗 PD-1 单克隆抗体，命名为 mouse anti-PD-1。

[0080] 其中，所涉及的各项实验方法的具体步骤如下：

[0081] A、ELISA 结合活性

[0082] 包被 PD1-His 在板上，加入梯度稀释的抗体，孵育洗涤后，再加入羊抗鼠-HRP，显色，读数拟合出反应曲线，结果如图 1 所示，计算出 EC50 值，其与 hPD-1 结合活性 EC50 为

2.402ng/mL。

[0083] B、ELISA抑制活性

[0084] 梯度稀释的抗体和一定浓度的PD1-Fc-His预先孵育,再将混合物加入到包被PD1-Fc的板上,孵育洗涤后再加入anti-His-HRP,显色,读数拟合出反应曲线,结果如图2所示,计算IC50值,其抑制活性IC50为3.827nM。

[0085] C、细胞结合活性

[0086] 提前一天将PD1-27(PD1过表达CHO-K1稳转细胞)铺至用于检测培养的细胞板,次日封闭后加入梯度稀释的抗体,洗涤再加入anti-mouse-EU,然后洗涤加入荧光增强液,读数即可,拟合出反应曲线,结果如图3所示,计算出其细胞结合活性EC50为87.80ng/mL。

[0087] D、细胞抑制活性

[0088] 提前一天将PD1-27(PD1过表达CHO-K1稳转细胞)铺至用于检测培养的细胞板,次日封闭后加入梯度稀释的抗体,再加入PD1-Fc,洗涤加入anti-Human-EU,然后洗涤加入荧光增强液,拟合出反应曲线,结果如图4所示,计算出其细胞抑制活性IC50为284.1ng/mL。

[0089] E、MLR实验

[0090] 将磁珠分选出来的CD4+T细胞和DC细胞以一定比例混合铺板,再加入不同浓度的anti-PD1鼠单抗,培养5天后,用试剂盒检测IFN- $\gamma$ 的浓度,结果如图5所示,anti-PD1鼠单抗能显著促进IFN- $\gamma$ 的表达

[0091] 实施例二鼠源抗体人源化及亲和力成熟

[0092] 2.1鼠源抗体基因获取

[0093] 采用Purelink RNA Micro kit提取mouse anti-PD-1杂交瘤总RNA,之后用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit逆转录总RNA制备cDNA。分别用Leader primer扩增抗体的重链及轻链可变区,反应体系及PCR条件分别如表2和表3所示。

[0094] 表2 鼠源抗体基因cDNA PCR反应体系

[0095]

试剂名称	添加体积
10×Buffer	5 $\mu$ L
10 $\mu$ M dNTP Mix	1 $\mu$ L
50mM MgSO4	2 $\mu$ L
上下游引物	各1 $\mu$ L
cDNA模板	1 $\mu$ L
Taq	0.2 $\mu$ L
ddH2O	up to 50 $\mu$ L

[0096] 表3 鼠源抗体基因cDNA PCR反应条件

[0097]	温度	时间	
	94 °C	5 min	
	94 °C	30 s	共 30 个循 环
	50 °C	30 s	
	68 °C	45 s	
	68 °C	7 min	
	冷却至 4 °C		

[0098] 电泳分析PCR结果,在有扩增产物的反应管中加入0.5 $\mu$ l LA Taq酶,72°C反应10min。之后进行酶连,反应体系如表4所示。

[0099] 表4 酶连反应体系

[0100]	试剂名称	添加体积
	PMD18-T	1 $\mu$ L
	反应产物	4 $\mu$ L
	Solution I	5 $\mu$ L
	16 °C 反应 1 个小时	

[0101] 酶连完成后转化,挑克隆,保种,得到鼠源抗人PD-1抗体。测序后,得到其重链可变区核酸序列和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1和2所示,轻链可变区核酸序列和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:3和4所示。

[0102] 2.2人源化设计

[0103] 分析鼠源抗体序列,与人胚系(germ line)基因比对,最终确定重链FR1模板来源于HM855688(IGHV3-21\*04),重链FR2模板来源于L06614(IGHV3-30\*07),重链FR3模板来源于M77327(IGHV3-30\*15),并确定轻链的人源化模板为X63397(IGKV2-28\*01)。通过CDR-grafting,将重链和轻链的CDR并置到构架序列,构建人源化抗体,基因合成人源化抗体可变区的片段。得到其重链可变区核酸序列如SEQ ID NO:5所示,轻链可变区核酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0104] 2.3抗体库构建

[0105] 分析鼠源抗体CDR的DNA序列,确定可变区CDR中的突变位点。设计引物序列,将突变位点所在的位置设计为NNS,使之编码任意的氨基酸。以人源化抗体scFv为模板,PCR扩增scFv抗体库,将scFv的抗体库,通过sfiI酶切位点,构建到噬菌体质粒中,构建二级抗体库。

[0106] 2.4抗体库筛选

[0107] 然后通过噬菌体展示进行高亲和力抗体筛选,具体方法如下:

[0108] A、通过电转化,将含scFv的抗体库的噬菌体质粒转化到大肠杆菌TG1中,经过37 °C,220rpm,1h的恢复后,将辅助噬菌体(helper phage)加入到剩余的菌液中,另加入氨苄

西林, 37℃, 220rpm, 1h。2500rpm×5min离心去上清, 用2×YT-AK培养基吹悬菌泥, 37℃, 220rpm过夜培养;

[0109] B、包被抗原: 用包被缓冲液稀释PD1-Fc-His, 混匀加入到免疫管中, 4℃包被过夜;

[0110] C、重组噬菌体收集: 上述过夜培养菌液, 2500rpm×5min离心, 收集上清10ml, 加入2ml PEG/NaCl, 混匀放置冰上30-60min, 10000g×20min离心, 去上清, 用2×YT培养基溶解噬菌体库;

[0111] D、封闭: 免疫管用PBS洗两次, 加入封闭液, 室温1h。另外, 取等体积封闭液与噬菌体库混合, 室温封闭10-15min;

[0112] E、孵育噬菌体库: 免疫管用PBS洗2次, 加入封闭好的噬菌体库, 37℃培养箱2-3h;

[0113] F、洗脱: 取100μl TG1菌液(前一天接种)到10ml 2×YT中, 37℃, 220rpm培养到A600值0.4-0.5。用PBST洗涤免疫管8次, 再用PBS洗2次, 加入5ml对数期生长的菌液, 37℃, 220rpm, 1h;

[0114] G、OUTPUT: 稀释上述菌液至 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ , 分别取100ul涂平板;

[0115] H、下一轮筛选: 取200μl helper phage加入到5ml洗脱后的菌液中, 同时加入5μl 氨苄西林, 37℃, 220rpm, 1h。2500rpm×5min离心去上清, 用10ml 2×YT-AK吹悬菌泥, 37℃, 220rpm过夜培养。

[0116] 重复步骤B-H。

[0117] 经过三轮筛选, 挑选单克隆, 制备重组噬菌体, 通过Phage ELISA方法, 检测重组噬菌体活性, 具体如下:

[0118] A、包被hPD-1-FC, 4℃过夜;

[0119] B、PBST洗两次, 加入phage上清, 25℃, 1h;

[0120] C、PBST洗三次, 加入稀释的anti-M13-biotinAb, 25℃, 1h;

[0121] D、PBST洗三次, 加入稀释的HRP-streptavidin, 25℃, 1h;

[0122] E、PBST洗三次, 加入预热的TMB, 25℃, 10min, 加入1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中止反应, OD<sub>450</sub>检测吸光值。挑选阳性克隆, 送测序, 通过PCR, 重链可变区或轻链可变区拼接至其对应的人源抗体的恒定区序列, 扩增的抗体重链和轻链全长片段(包含信号肽)分别克隆入pcDNA3.1GS。共转染轻链质粒、重链质粒至EXPI 293细胞株, 培养7天后, 用Protein A(GE)纯化上清, 最终获得亲和力成熟抗体。亲和力成熟抗体分别进行Elisa结合活性、Elisa抑制活性和Cell结合活性检测。

[0123] A、ELISA结合活性

[0124] 包被PD1-His在板上, 加入梯度稀释的抗体, 孵育洗涤后, 再加入羊抗鼠-HRP, 显色, 读数拟合出反应曲线, 结果如图6所示, 计算出EC<sub>50</sub>值, 其与hPD-1结合活性EC<sub>50</sub>为6.094ng/mL。

[0125] B、ELISA抑制活性

[0126] 梯度稀释的抗体和一定浓度的PD1-Fc-His预先孵育, 再将混合物加入到包被PD1-Fc的板上, 孵育洗涤后再加入anti-His-HRP, 显色, 读数拟合出反应曲线, 结果如图7所示, 计算IC<sub>50</sub>值, 其抑制活性IC<sub>50</sub>为406.1nM。

[0127] C、细胞结合活性

[0128] 提前一天将PD1-27(PD1过表达CHO-K1稳转细胞)铺至用于检测培养的细胞板, 次

日封闭后加入梯度稀释的抗体,洗涤再加入anti-mouse-EU,然后洗涤加入荧光增强液,读数即可,拟合出反应曲线,结果如图8所示,计算出其细胞抑制活性IC50为103.2ng/mL。

[0129] 2.5抗体筛选结果

[0130] 经过三轮筛选,挑选单克隆76个进行检测,选择其中40个克隆测序,结果显示,克隆序列与原始的人源化抗体可变区序列一致。将人源化抗体可变区序列与人源抗体的恒定区序列拼接,形式全抗体序列,构建表达质粒P3.1GS-hup01-HC和P3.1GS-hup01-LC,瞬转293细胞制备抗体并检测抗体活性。

[0131] anti-PD-1重链核苷酸序列和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7和8所示。其中,重链可变区核苷酸序列为:

[0132]

GAGGTGCAACTGGTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGAAGCCCGGAGGATCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGCTCCGG  
CTTCACCTTCAGCAGCTACACCATGTCCTGGGTGAGGCAGGCTCCCGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCTACCATCA  
GCAACGGAGGCTCCTTCACCTATTACCCTGACTCCATGAAGGGCAGGTTACAATCTCCCGGACAACCTCCAAGAAC  
ACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGGACAGCGACTATTA  
CGGCATCTTCGACTACTGGGGCCAGGGAACAACCGTGACAGTGAGCTCC(SEQ ID NO:5)

[0133] 横线部分分别为CDR1、CDR2、CDR3,其序列编号分别为SEQ ID NO:9-11;未划横线部分分别为FR1、FR2、FR3、FR4,其序列编号分别为SEQ ID NO:12-15。

[0134] 对应的,重链可变区氨基酸序列为:

[0135]

EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISNGGSFTYYPDSMKGRFTISRDN SKN  
TLYLQMSLRAEDTAVYYCARDSDYYGIFDYWGQGTITVTVSS(SEQ ID NO:16)

[0136] 横线部分分别为CDR1、CDR2、CDR3,其序列编号分别为SEQ ID NO:17-19;未划横线部分分别为FR1、FR2、FR3、FR4,其序列编号分别为SEQ ID NO:20-23。

[0137] anti-PD-1轻链核苷酸序列和氨基酸序列分别如SEQ ID NO:24和25所示。其中,轻链可变区核苷酸序列为:

[0138]

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTCTGTCCCTGCCTGTGACACCCGGAGAGCCTGCCTCCATCAGCTGCAGGAGCTC  
CAAGAGCCTGCTGTACAAAGACGGCAAGACCTACCTGAACTGGTATTTACAGAAGCCTGGCCAGTCCCCCAGCTGC  
TGATCTACCTCATGTCCACCAGGGCCTCCGGAGTGCTGATCGGTTACAGCGGATCCGGCAGCGGCACCGATTTACACC  
CTCAAGATCTCCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGAGTGACTATTGCCAGCAGCTGGTGGAGGACCCCTTCACCTT  
CGGCCAAGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGGACTGTG(SEQ ID NO:26)

[0139] 横线部分分别为CDR1、CDR2、CDR3,其序列编号分别为SEQ ID NO:27-29;未划横线部分分别为FR1、FR2、FR3、FR4,其序列编号分别为SEQ ID NO:30-33。

[0140] 对应的,轻链可变区氨基酸序列为:

[0141]

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLYKDGKTYLWNWYLPKPGQSPQLLIYLMSTRASGVPRDFSGSGSDFT  
LKISRVEAEDVGVYYCQQLVEDPFTFGQGTKLEIKRTV(SEQ ID NO:34)

[0142] 横线部分分别为CDR1、CDR2、CDR3,其序列编号分别为SEQ ID NO:35-37;未划横线部分分别为FR1、FR2、FR3、FR4,其序列编号分别为SEQ ID NO:38-41。

[0143] 实施例三人源化抗体表达质粒构建

[0144] 以P3.1GS-hup01-HC和P3.1GS-hup01-LC为模板,通过PCR扩增全长抗体重链片段和轻链片段,构建人源化抗体表达质粒。

[0145] 轻链和重链上下游引物、反应体系及PCR条件如表5、表6和表7所示。

[0146] 表5 人源化抗体轻链和重链PCR反应的上下游引物

[0147]

引物	序列
重链上游	5'GGGGTACCGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGT ACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAGGTGCAACTGGTGG AAAG 3' (SEQ ID NO: 42)
重链下游	5' GGCTCTAGATCATTTTCCGAGGGACAGGG 3' (SEQ ID NO: 43)
轻链上游	5'GGGGTACCGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGT ACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACATCGTGATGACCCA GTC 3' (SEQ ID NO: 44)
轻链下游	5' GGCTCTAGATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC 3' (SEQ ID NO: )

[0148] 表6 人源化抗体轻链和重链PCR反应体系

[0149]

试剂名称	添加体积
重链/轻链模板	1 $\mu$ L
5 $\times$ Buffer	10 $\mu$ L
2.5 $\mu$ M dNTP Mix	4 $\mu$ L
上下游引物(10 $\mu$ M)	各1 $\mu$ L
Taq	0.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ L

[0150] 表7 人源化抗体轻链和重链PCR反应条件

温度	时间	共 30 个 循环
94 °C	5 min	
94 °C	30 s	
50 °C	30 s	
72 °C	1 min 45 s	
72 °C	7 min	
冷却至 4 °C		

[0152] 用PCR产物回收试剂盒回收轻链、重链的全长序列。对抗体片段轻链、重链以及质

粒分别进行双酶切,电泳后胶回收抗体酶切和质粒酶切片段,之后对片段进行酶连。酶连之后的人源化抗体表达质粒命名为P3.1GS-PD-1。反应体系如表8-表10所示。

[0153] 表8 人源化抗体轻链和重链双酶切反应体系

试剂名称	添加体积
片段	22 $\mu\text{L}$
Buffer	3 $\mu\text{L}$
[0154] KpnI	1.5 $\mu\text{L}$
Xba I	1.5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	up to 30 $\mu\text{L}$
37 °C 水浴过夜	

[0155] 表9 表达质粒双酶切反应体系

试剂名称	添加体积
质粒 pcDNA3.1GS	1 $\mu\text{g}$
Buffer	2 $\mu\text{L}$
[0156] KpnI	1 $\mu\text{L}$
Xba I	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	up to 20 $\mu\text{L}$
37 °C 水浴过夜	

[0157] 表10 抗体片段与表达质粒片段酶连反应体系

试剂名称	添加体积
质粒片段	1 $\mu\text{L}$
[0158] 轻链/重链片段	4 $\mu\text{L}$
Solution I	5 $\mu\text{L}$
16 °C 反应 1 小时	

[0159] 将上述酶连产物加入到100 $\mu\text{L}$  XL1-10感受态中,冰上30分钟,然后,42 °C热击90秒,迅速放置冰上2分钟,接着加入500 $\mu\text{L}$  LB培养基,37 °C摇床培养1小时,将菌液于4000rpm离心5分钟,弃500 $\mu\text{L}$ 上清,用枪吹悬菌泥,涂布于含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP的LB固体平板上,37 °C过夜培养。挑单菌落到5mL LB液体培养基(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  AMP),37 °C 250rpm培养6小时,PCR验证克隆,用15%灭菌甘油保藏阳性菌种,每个克隆2根,取一份冻存管送测序,另一份保存-20 °C。

[0160] 实施例四稳定细胞系构建

[0161] 人源化抗体表达质粒P3.1GS-PD-1,转染前采用PvuI对其进行线性化;采用电转染的方法,将含有人源化抗体轻链、重链基因的线性化质粒转染至CHO-KSM4,转染了四次,将



转染后的细胞分别命名为20150703T, 20150704T, 20150708T及20150714T。

[0162] 转染后撤谷氨酰胺进行加压筛选, 其中20150708T及20150714T待转染细胞恢复2天后进行加压铺板。培养约30-40天后, 96孔板可观察到克隆长出, 此时进行产量鉴定。将高产克隆转移并扩增培养。待细胞数目达到 $2 \times 10^6$  cells/mL左右接种进行补料分批培养, 培养结束后收获上清进行产量鉴定, 获得备选母克隆。而20150703T及20150704T的母克隆由半固体铺板方法筛选获得。将高产的克隆开展亚克隆筛选: 半固体铺板, 6孔板每孔3000-5000个细胞, 培养基2.5mL, 铺板后置于37℃、5%CO<sub>2</sub>静置培养, 培养7-12天可挑选单克隆。将挑选的单克隆进行产量鉴定, 获得备选克隆。

[0163] 通过补料筛选获得高产细胞株, 摇瓶补料方案为: 采用CDM4CHO为基础培养基进行接种, 接种密度为 $5 \times 10^5$  cells/mL, 接种后置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、120rpm培养, 接种当天记为第0天, 培养至第3天开始补加70g/L的cell Boost 5, 每天补加接种体积的6%直至细胞收获。根据补料筛选结果, 选择不同转染中相对高产的细胞株建立PCB, 冻存保种, 并进行传代稳定性研究。表达的抗体名anti-PD-1。

[0164] 实施例五抗体的结合特异性和结合动力学比较

[0165] 采用Biacore分析实施例四中的细胞株表达抗体的亲和力及结合动力学。利用标准胺偶联化学和由Biacore提供的试剂盒, 经伯胺将羊抗人IgG共价连接至CM5芯片。将抗体以30μL/min的流速在HBS EP缓冲液中流动而测量结合。结合时间300秒, 解离时间7200秒。测定的ka、kd和KD值如表11所示。

[0166] 表11 人源化抗体anti-PD-1的结合动力学结果

[0167]

样品	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
anti-PD-1	$4.567 \times 10^4$	$1.926 \times 10^{-5}$	$4.218 \times 10^{-10}$

[0168] 实施例六抗体在混合淋巴细胞反应中对细胞因子分泌的影响

[0169] 先用PBS缓冲液1:1稀释血液, 移取3mL的LSM至离心管内, 加入稀释过的血液4mL, 注意加入的时候, 确保使稀释后的血液至于LSM的上层, 不可混匀。400g, RT离心30-40min。最后吸出分离出的上层的PBMC, 100g离心10min。BD公司CD4+细胞分离磁珠分离CD4+T细胞, 使用BD公司DC细胞分离磁珠分离DC细胞。96孔板每孔CD4+T细胞数量 $1 \times 10^5$ , DC数量 $1 \times 10^4$ , 体积共计100μL共培养。加入梯度稀释的抗体, 培养5天后检测IFN-γ, IL-2的浓度。

[0170] 结果分别如图9和图10所示, 抗体能有效的促进混合淋巴细胞分泌IFN-γ和IL-2。

[0171] 实施例七抗体在血清中的稳定性

[0172] 用猴血清稀释人源化抗体anti-PD-1, 浓度为0.5mg/mL。37℃分别放置0天、1天、4天、7天。

[0173] 重组人PD-1融合蛋白以0.5μg/mL的浓度在包被缓冲液中4℃过夜。次日弃去孔内溶液用PBST洗两次。然后加入1%BSA, 37℃封闭1小时然后用PBST洗两次。稳定性抗体样品以1μg/mL起始依次进行3倍稀释共8个浓度梯度, 37℃孵育1小时, PBST洗三次。用羊抗人FAB-HRP, 1:10000稀释, 37℃孵育1小时, PBST洗三次。加入TMB显色15min, 以0.5M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中止反应并在450nm读出吸光度。

[0174] 结果如图11所示, 人源化抗体anti-PD-1显示出了良好的血清稳定性, 7天之内均未显示明显的活性衰减。

[0175] 实施例八ELISA测定与人CD28、CTLA-4的结合特异性及与不同物种的PD-1蛋白的结合

[0176] 测试重组CD28家族成员重组人CD28、重组人CTLA-4、重组鼠PD-1、重组食蟹猴PD-1、重组人PD-1蛋白与抗体结合。不同蛋白以0.5 $\mu$ g/mL的浓度在包被缓冲液中4 $^{\circ}$ C过夜。次日弃去孔内溶液用PBST洗两次。然后加入1%BSA,37 $^{\circ}$ C封闭1小时然后用PBST洗两次。加入0.5 $\mu$ g/mL抗体样品,孵育1小时,PBST洗三次。用羊抗人FAB-HRP,1:10000稀释,37 $^{\circ}$ C孵育1小时,PBST洗三次。加入TMB显色15min,以0.5M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中止反应并在450nm读出吸光度。

[0177] 结果如图12所示,抗体不结合CD28家族其它成员。抗体以类似的亲和力结合人和食蟹猴重组PD-1蛋白。

[0178] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

## SEQUENCE LISTING

<110> 瑞阳（苏州）生物科技有限公司

<120> 抗人 PD-1 人源化单克隆抗体及其应用

<130> 2016

<160> 45

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gacgtgaagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc ccigaaaactc 60

tccgtgtcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact 120

[0001]

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtaatg gtggtagttt cacctaactat 180

ccagacagta tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtetgaa gctctgaggac acagccatgt attactgtac aagagattct 300

gattactaeg gtatctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met  
 50 55 60

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

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

Thr Arg Asp Ser Asp Tyr Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

[0002]

<210> 3

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gatatgtga taaccaggga tgaactcicc aatcctgtca cttctggaga atcagtttcc 60

atctctgca ggtctagtaa gagtctccta tataaggatg ggaagacata ctggaattgg 120

ttctgcaga gaccaggaca atctctcag ctctgatct atttgatgtc caccctgca 180

tcaggagtct cagaccggtt tagtggcagt ggtcaggaa cagatttcac cctggaaatc 240

agtagagtga aggctgagga tgtgggigt tttactgtc aacaattgt agaggatcca 300

ttcaagtteg gctcggggac aaagttggaa ataaaacgg 339

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys  
                  20                   25                   30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser  
      50                   55                   60

[0003] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile  
      65                   70                   75                   80

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

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
          100                   105                   110

Arg

<210> 5

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gagtgcaac tggtgaaag cggcggagga ctggtgaagc ccggaggate cctgaggetg       60

	tccctgtgccg cctccggcct caccttcagc agctacacca tgcctctgggt gaggcaggct	120
	cccggaaagg gcctggagtg ggtggctacc atcagcaacg gagctectt cacctattac	180
	cctgactcca tgaaggcag gttcacaatc tcccgggaca actccaagaa caccctgtac	240
	ctgcagatgt ccagcctgag ggctgaggac accgcegtgt attactgcgc caggacagc	300
	gactattacg gcattcttga ctactggggc cagggaacaa cctgacagt gagetcc	357
	<210> 6	
	<211> 340	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 6	
	cgacatcgtg atgaccagc cccctctgtc cctgcctgtg acaccggag agcctgctc	60
	catcagctgc aggagctcca agagcctgct gtacaaagac ggcaagacct acctgaactg	120
[0004]	gtatttacag aagcctggcc agtccccca gctgctgate tacctcatgt ccaccagggc	180
	ctccggagtg cctgateggt tcagcggate cggcagegge accgatttca cctcaagat	240
	ctccagggtg gaggcggagg acgtgggagt gtactattgc cagcagctgg tggaggacct	300
	cttcaccttc ggccaaggca caaagctgga gatcaagagg	340
	<210> 7	
	<211> 1407	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 7	
	gccaccatgt acaggatgca actcctgtct tgcattgcac taagtcttgc acttgtcagc	60
	aattcggagg tgcaactggt ggaaagcggc ggaggactgg tgaagcccgg aggatccctg	120
	aggetgtcct gtgccgctc cggettccac ttcagcagct acaccatgtc ctgggtgagg	180
	caggctcccg gaaaggcct ggagtgggtg gctaccatca gcaacggagg ctccctcacc	240

	tattacctg actccatgaa gggcaggttc acaatctccc gggacaacte caagaacacc	300
	ctgtacctgc agatgtccag cctgagggtc gaggacaccg ccgtgtatta ctgcccagg	360
	gacagcgact attacggcat ctccgactac tggggcccagg gaacaaccgt gacagtgage	420
	tccgctagca caaaaggccc ctccgtgitt cccctggctc cctgttccag gagcaccagc	480
	gaatccacag ctgcccctgg ctgcccggtc aaggattact tcccagagcc cgtgaccgtc	540
	agetggaact cggagccct gacatccggc gtccacacct ttctgtctgt gctgcagagc	600
	tccggcctgt acagcctctc cagcgtctc acagtccctt ccagctccct cggcaccaag	660
	acctatact gcaacgtcga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagggtggag	720
	agcaagtacg gacctccttg tccccctgt cctgtctctg agtttctcgg cggcccttcc	780
	gtttttctct tccccccaa acctcaaggac acctgatga tcagcaggac acctgaggtc	840
	acctgtgtcg tctctcagct ctcccaggaa gaccccagg tgcagttcaa ttggtatgtg	900
[0005]	gacggcglgg aggtgcacaa cgcacaagacc aaaccaggg aggagcagtt taacagcacc	960
	tacagggtgg tgagcgtgct gacagctctg caccaggact ggctcaacgg caaggagtac	1020
	aagtcaagg tgagcaataa gggactcccc agcagcatcg agaaaacct cagcaaggcc	1080
	aaagcccagc ccagagagcc ccagggtgtac aactgcctc ctagccagga ggagatgaca	1140
	aagaaccagg tgagcctgac ctgtctggtg aagggttctt acctcagcga tattgcccgtg	1200
	gaatgggagt ccaacggcca acctcagaat aactacaaga ccaccctcc tgtccctgat	1260
	agcgacggca gttttttct gtactccaga ctgaccgtgg ataagagcag gtggcaggag	1320
	ggaaacgtct teagctgtag cgtcatgca gggcccctgc acaaccacta caccagaag	1380
	agcctgtccc tgtccctcgg aaaatga	1407
	<210> 8	
	<211> 446	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

&lt;400&gt; 8

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met  
50                   55                   60

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

[0006]

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

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
          100                   105                   110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
          115                   120                   125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
130                   135                   140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145                   150                   155                   160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
          165                   170                   175



Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

[0007] Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

[0008]

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

ggcttcacct tcagcagcta cacc

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

atcagcaacg gaggctcctt cacc

24

<210> 11

<211> 36

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 11	
	gccagggaca gcactatla cggealettie gactac	36
	<210> 12	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 12	
	gaggtgcaac tggfggaaag cggcggagga ctggtgaagc ccggaggatc cctgaggetg	60
	tectgtgccg cctce	75
	<210> 13	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0009]	<400> 13	
	atgtcctggg tgaggcaggc tcccggaaag ggcctggagt ggggtgctac c	51
	<210> 14	
	<211> 114	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 14	
	tattaccctg actccatgaa gggcaggttc acaatctccc gggacaacte caagaacacc	60
	ctgtacctgc agatgtccag cctgagggc gaggacaccg ccgtgtatla ctgc	114
	<210> 15	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 15	
	tggggccagg gaacaaccgt gacagtgagc tcc	33

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

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

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

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

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met  
                                  50                                   55                                   60

[0010]

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

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

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                                  100                                   105                                   110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                                  115

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 17

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr  
1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

Ile Ser Asn Gly Gly Ser Phe Thr  
1 5

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

[0011]

<400> 19

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 21

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

Thr

<210> 22

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 22

[0012] Tyr Tyr Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn  
1                   5                   10                   15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
                  20                   25                   30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                  35

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 23

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
1                   5                   10

<210> 24

<211> 726  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 24  
 gccaccatgt acaggatgca actcctgtct tgcattgcaac taagtettgc acttgtcacc 60  
 aattcggaca tctgatgac ccagtcctct ctgtccctgc ctgtgacacc cggagagcct 120  
 gccctcatca gctgcaggag ctccaagagc ctgetgtaca aagacggcaa gacctacctg 180  
 aactggtatt tacagaagcc tggccagtc cccagctgc tgatctacct catgtccacc 240  
 agggcctecg gagtgcctga tgggttcagc ggatecggca gcggcaccga tttcaccctc 300  
 aagatctcca ggggtggagc cgaggactg ggagtgtact attgccagca gctgggtggag 360  
 gacccttca ccttcggcca aggcacaaaag ctggagatca agaggactgt ggetgcacca 420  
 tctgtcttca tcttcctccc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgtgtg 480  
 tgcctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtgggaaggt ggalaacgcc 540  
 ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac 600  
 agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc 660  
 tgogaagtea cccatcaggg cctgagcteg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag 720  
 tgtaa 726

[0013]

<210> 25  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 25  
  
 Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Asp Ile Val Met Thr  
 1                    5                    10                    15  
  
 Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile  
                   20                    25                    30

Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr  
 35 40 45

Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
 50 55 60

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala  
 85 90 95

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Val Glu Asp Pro Phe  
 100 105 110

[0014] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 130 135 140

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 145 150 155 160

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 165 170 175

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 180 185 190

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 195 200 205



Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 210 215 220

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 26

<211> 345

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

gacatcgtga tgacceagtc cctctgtcc ctgcctgtga caeccggaga gctgctcc 60

atcagctgca ggagctccaa gagectgctg tacaaagacg gcaagacctt cctgaactgg 120

tatttacaga agcctggcca gtececcag ctgctgatct acctcatgtc caccagggcc 180

tccggagtgc ctgatcggtt cagcggatcc ggcagcggca ccgatctcac cctcaagatc 240

[0015]

tccagggtgg aggccgagga cgtgggagtg tactattgcc agcagctggt ggaggacccc 300

ttcaccttcg gcccaaggcac aaagctggag atcaagagga ctgig 345

<210> 27

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 27

aggagetcca agagcctgct gtacaaagac ggcaagacct acctgaac 48

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 28

ctcatgtcca ccaggcctc c 21

	<210> 29	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 29	
	cagcagctgg tggaggaccc ettcacc	27
	<210> 30	
	<211> 69	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 30	
	gacatcgtga tgacccagtc cctctgtcc ctgectgtga cacceggaga gctgectcc	60
	atcagctgc	69
[0016]	<210> 31	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 31	
	tggtatttac agaagcctgg ccagtccecc cagetgetga tctac	45
	<210> 32	
	<211> 96	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 32	
	ggagtgcctg atcggttcag cggatccggc agcggcaccg attcacct caagatctcc	60
	agggtggagg ccgaggacgt gggagtgtac tattgc	96
	<210> 33	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<400> 33

ttcggccaag gcacaaagct ggagatcaag aggactgtg

39

<210> 34

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

[0017]

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu

85 90 95

Val Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val

115

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 35

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn  
1                    5                    10                    15

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 36

Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser  
1                    5

[0018]

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 37

Gln Gln Leu Val Glu Asp Pro Phe Thr  
1                    5

<210> 38

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 38

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
20

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 39

Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 40

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 40

Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10						15

[0019]

Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25						30	

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 41

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val
1				5					10			

<210> 42

<211> 97

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 42

Gly Gly Gly Gly Thr Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys  
 1 5 10 15

Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala  
 20 25 30

Cys Thr Cys Cys Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Gly Thr Ala Cys  
 35 40 45

Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Thr Thr Cys Cys  
 50 55 60

Ala Gly Gly Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly  
 65 70 75 80

Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala  
 85 90 95

[0020]

Gly

<210> 43

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 43

Gly Gly Cys Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Cys Ala Thr Thr Thr Thr  
 1 5 10 15

Cys Cys Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly  
 20 25

<210> 44

<211> 97

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 44

gggtaccgc cgccacatg gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg 60

ttecaggttc cactggtgac atcgtgatga cccagtc 97

[0021]

<210> 45

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 45

ggetctagat taacactctc cctgttgaa gc 32

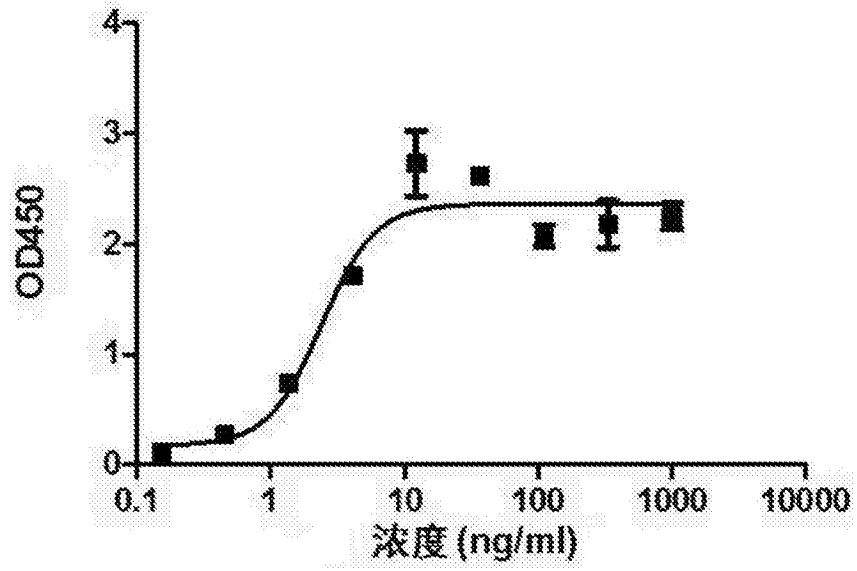


图1

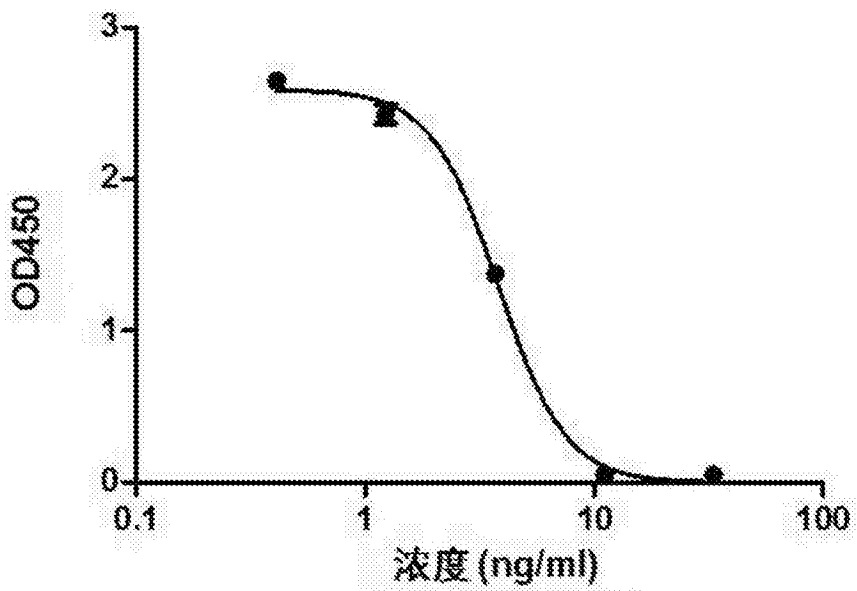


图2



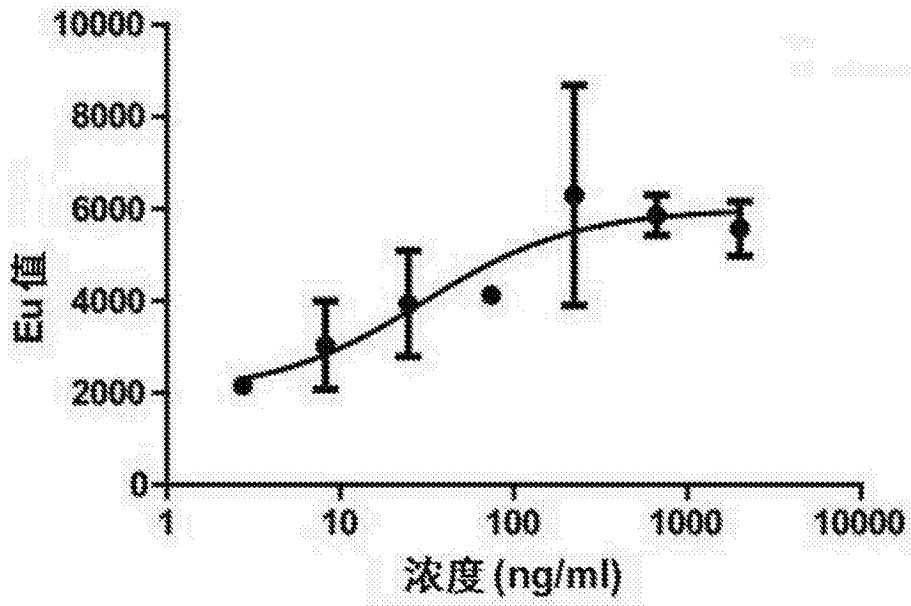


图3

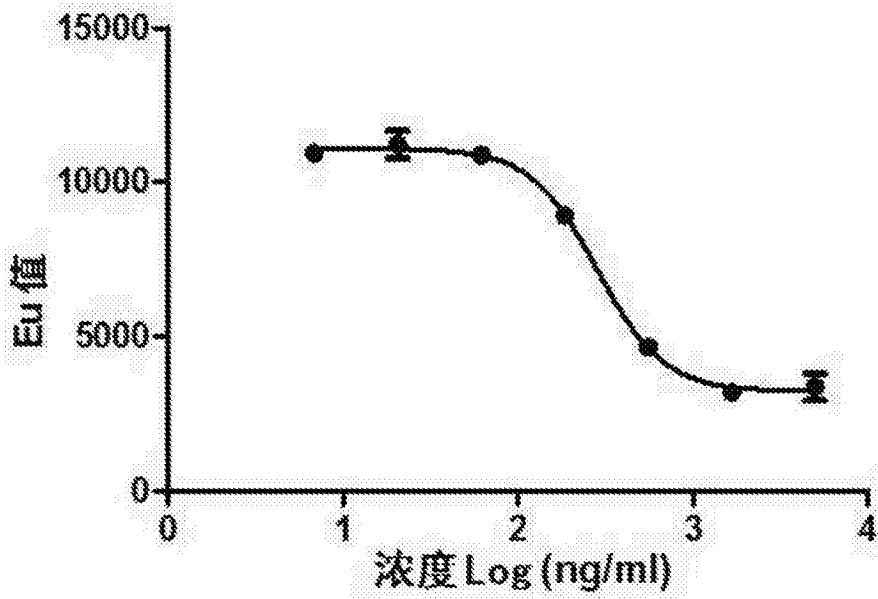


图4

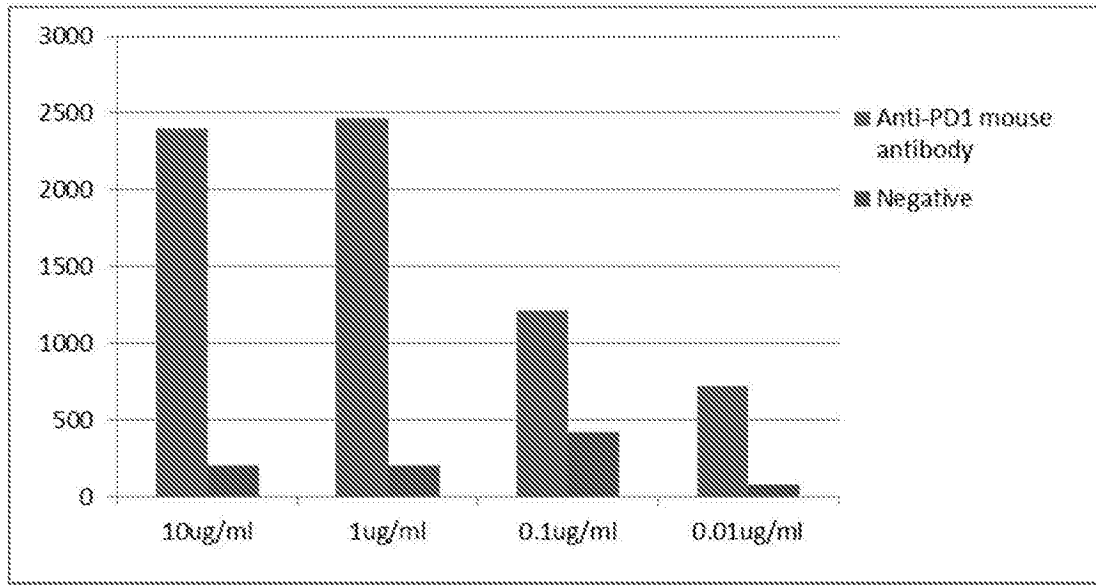


图5

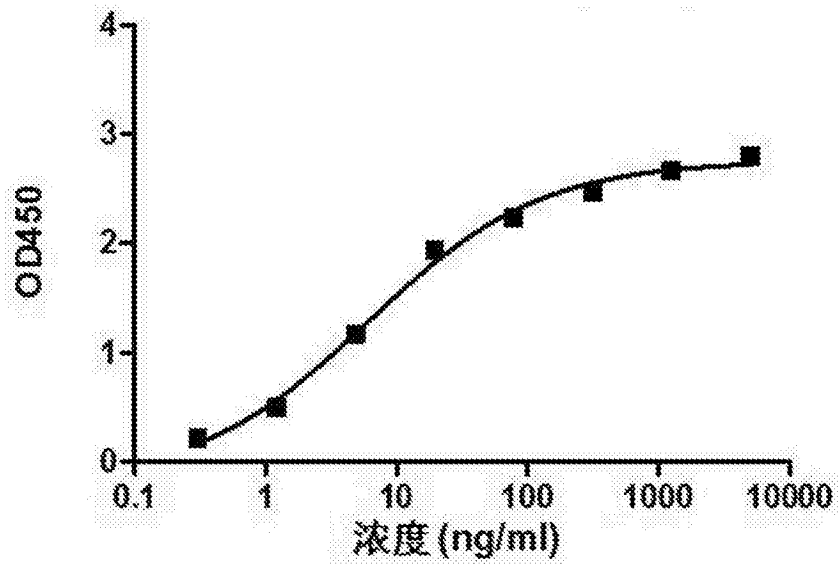


图6

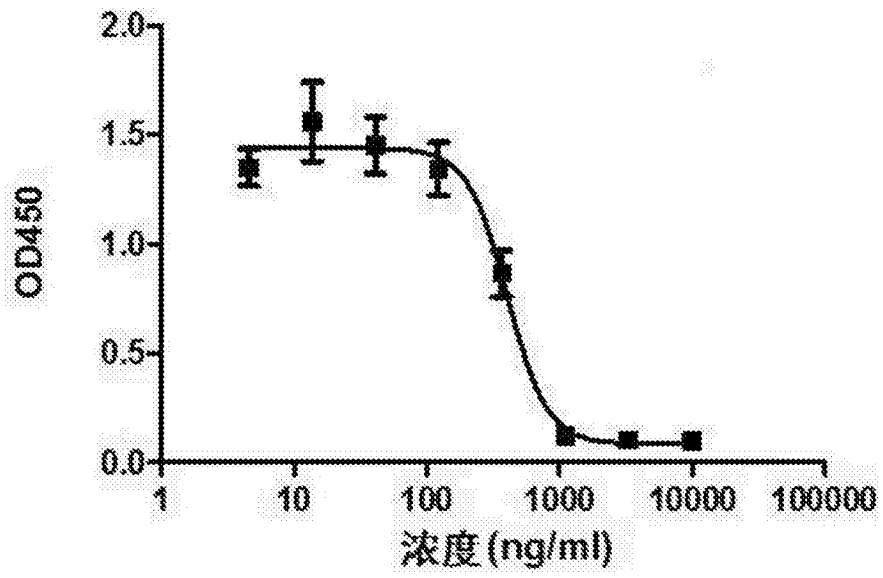


图7

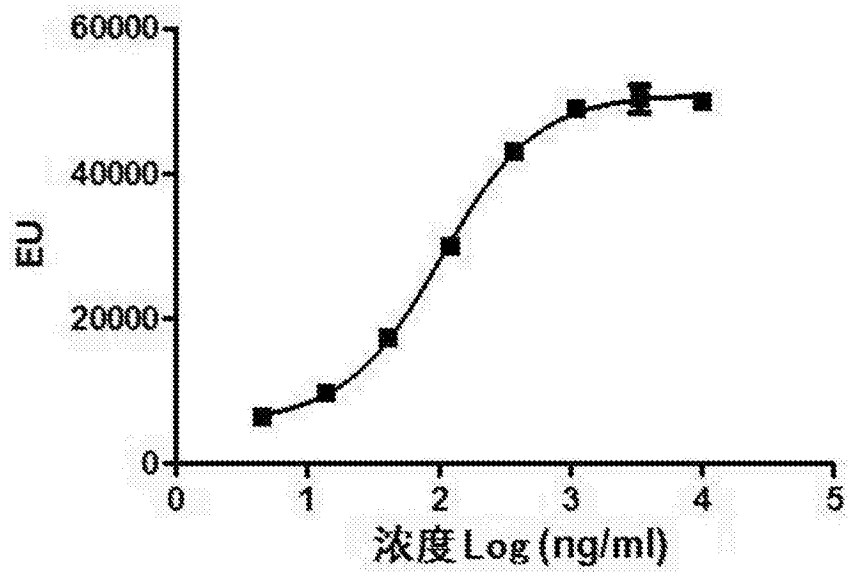


图8

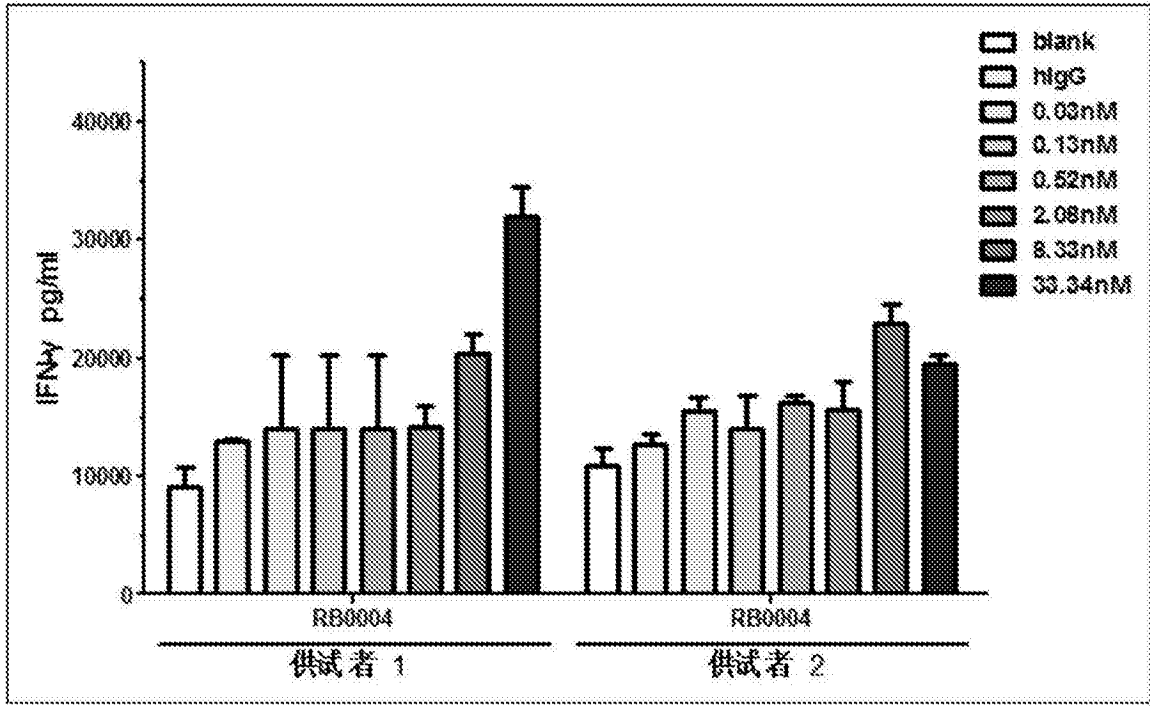


图9

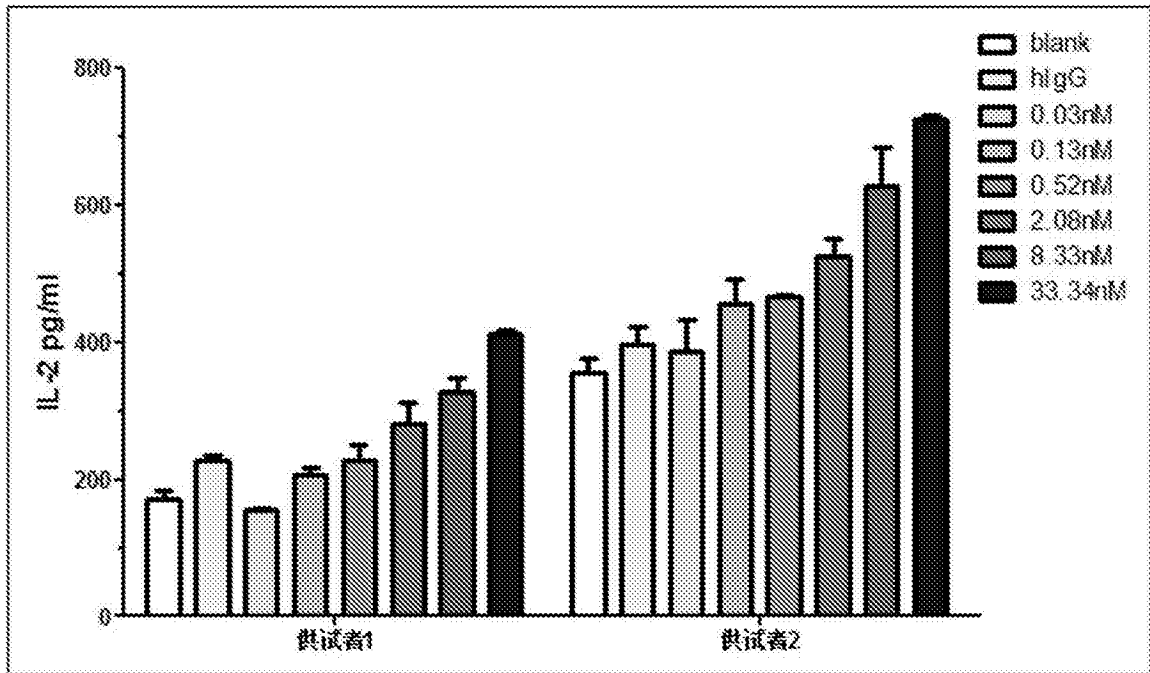


图10

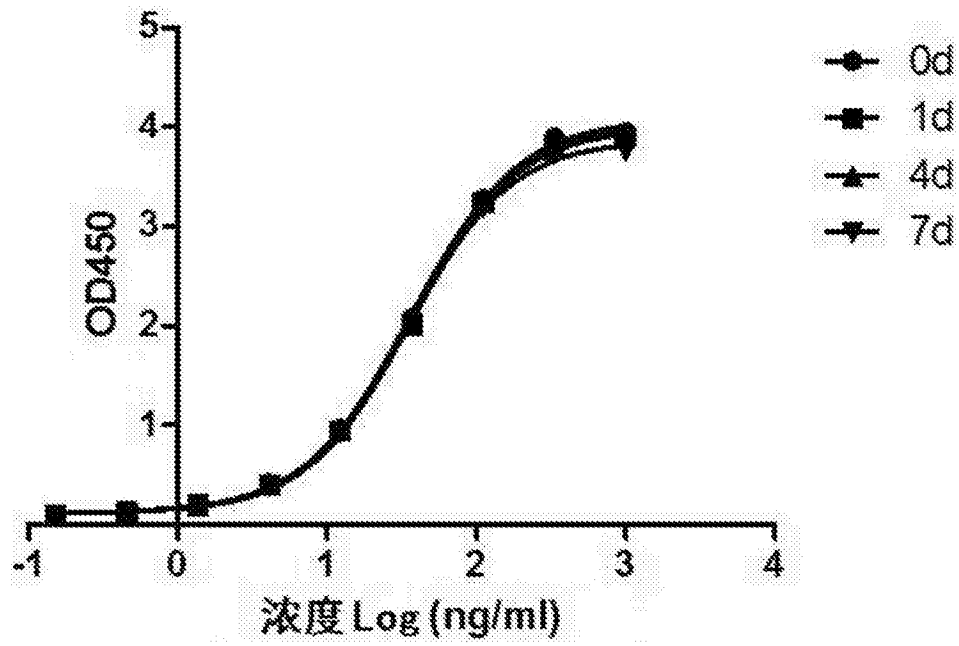


图11

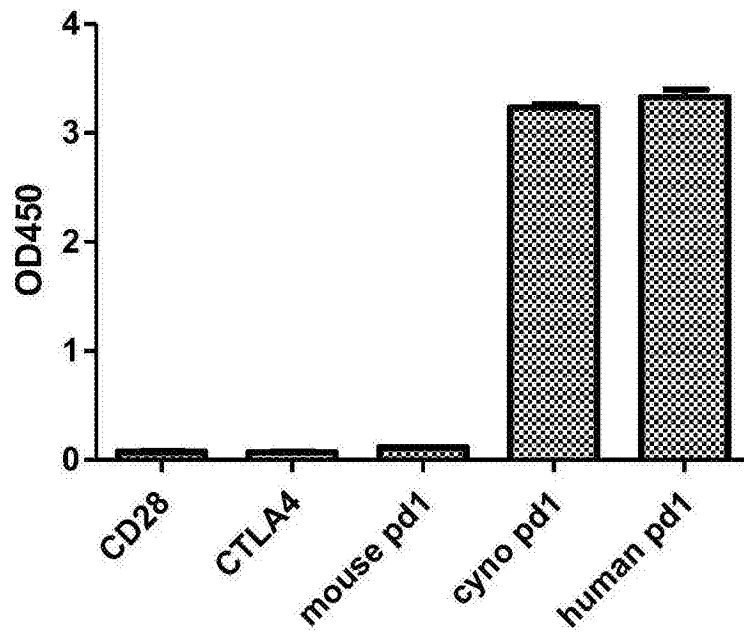


图12