



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111909265 B

(45) 授权公告日 2022. 02. 11

(21) 申请号 202010863237.8

(22) 申请日 2020.08.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111909265 A

(43) 申请公布日 2020.11.10

(73) 专利权人 中国人民解放军军事科学院军事
医学研究院

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

(72) 发明人 陈薇 于长明 张冠英 于蕊
李建民 迟象阳 范鹏飞 房婷
刘渝娇 郝勐 董韵竹 宋小红
陈旖 刘树玲

(74) 专利代理机构 北京市众天律师事务所
11478

代理人 李新军

(51) Int.Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

审查员 王奇

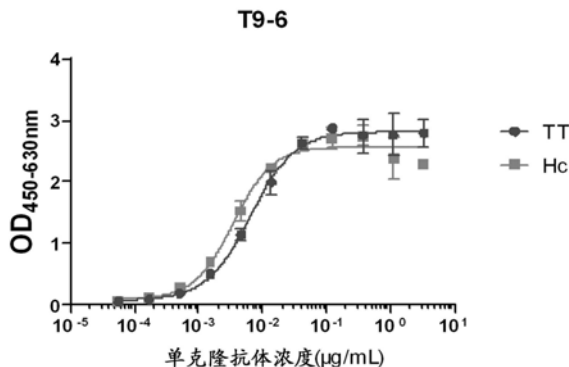
权利要求书1页 说明书12页
序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

一种结合破伤风毒素重链C端结构域的人源
抗体及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种结合破伤风毒素重链C端
结构域的人源抗体,所述抗体具有独特的CDR区,
与抗原的亲合力达到0.397nM。所述抗体能够有效
中和破伤风毒素,可以完全保护破伤风毒素攻
毒的小鼠。本发明提供的抗体具有独特的作用位
点,不同于现有技术中的抗破伤风毒素单克隆抗
体的作用位点,提示其具有与其他中和抗体组成
鸡尾酒组合疗法的潜力。



1. 一种抗破伤风毒素的人源单克隆抗体,其特征在于,所述抗体重链可变区CDR1、CDR2和CDR3区氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1第26-33,51-57,96-118位序列所示;所述抗体轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3区氨基酸序列分别如SEQ ID NO:5第27-32,50-52,89-97位序列所示。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述抗体轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

3. 根据权利要求2所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗体重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,所述抗体轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9所示。

4. 一种编码权利要求1-3任一所述单克隆抗体重链和轻链的多核苷酸,其特征在于,编码所述抗体的重链可变区的多核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,编码所述抗体的轻链可变区的多核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

5. 根据权利要求4所述的多核苷酸,其特征在于,编码所述抗体重链恒定区的多核苷酸的序列如SEQ ID NO:4所示,编码所述抗体轻链恒定区的多核苷酸的序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10所示。

6. 一种表达权利要求5所述编码单克隆抗体重链和轻链的多核苷酸的功能元件。

7. 根据权利要求6所述的功能元件,其特征在于,所述功能元件为线性表达框或者哺乳动物表达载体。

8. 一种含有权利要求7所述功能元件的宿主细胞。

9. 根据权利要求8所述的细胞,其特征在于,所述细胞为Expi 293F细胞或者CHO-S细胞。

10. 一种含有权利要求1-3任一所述的单克隆抗体的组合物。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其特征在于,所述组合物还含有抗破伤风毒素重链N端结构域的抗体。

12. 权利要求1-3任一所述的单克隆抗体在制备破伤风预防和/或治疗药物中的应用。

一种结合破伤风毒素重链C端结构域的人源抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一种单克隆抗体,属于免疫学及微生物学技术领域。

背景技术

[0002] 破伤风(tetanus)是由破伤风梭菌(*C.tetani*)引起的细菌性感染。破伤风梭菌经由皮肤或黏膜伤口侵入人体,在缺氧环境下生长繁殖,产生毒素而引起肌肉痉挛和自主神经系统功能障碍,若无医疗干涉,死亡率极高。破伤风梭菌的孢子广泛存在于环境中,可以感染伤口、轻微擦伤,在新生儿破伤风中,可以感染新生儿的脐带残端。尽管破伤风在发达国家中很少见,但是在许多中低收入国家中仍然是一个巨大的诊断和治疗挑战。据估计,2015年新生儿破伤风造成的死亡人数为34019人。在许多国家,新生儿期以外发生的破伤风不属于一种应报告的疾病,破伤风常见的国家很少有健全的报告制度或准确的发病率数据。尽管如此,国际出版的文献中仍有大量病例报道,表明破伤风仍然是一个重大问题。根据全球疾病负担(Global Burden of Disease,GBD)调查,2015年破伤风死亡人数估计为56743人。在发达国家,偶尔报告破伤风病例,最常发生在老年人口(≥ 60 岁)或注射吸毒者中。

[0003] 幸运的是,破伤风是一种可用疫苗预防的疾病。1924年,破伤风类毒素(TT)疫苗问世。一剂破伤风类毒素几乎不能产生持久的免疫力,第二次免疫可在2-4周内保护约90%的个体,但许多个体的免疫力是短暂的,第三次免疫可以确保至少5年的普遍保护。由于该疫苗可有效预防破伤风,由它与百日咳菌苗、白喉类毒素组成的百白破疫苗已成为儿童免疫计划的一部分。但是由于致病因子破伤风梭菌在环境中广泛存在,因此破伤风不可能根除。

[0004] 破伤风毒素(TeNT)是一种强效的神经毒素,以150kDa的单链蛋白质的形式产生,经过翻译后修饰,形成由二硫键连接的重链HC和轻链LC,其HC进一步细分为C端结构域 H_C 和N端结构域 H_N 。 H_C 介导毒素与细胞表面的受体结合,这是毒素进入细胞的第一步; H_N 介导轻链向胞浆的转位,轻链是一种50kDa的金属蛋白酶,负责发挥毒素作用。破伤风毒素在神经肌肉连接处与突触前膜结合,随后通过内源性微管轴突途径在运动神经元内内化和逆行转运。这种毒素经过细胞转运,被突触前抑制神经元吸收,在那里轻链被释放到胞浆中。这种毒素的底物是囊泡相关膜蛋白2(vesicle-associated membrane protein 2,VAMP2),是突触囊泡对接和神经递质释放所必需的可溶性NSF附着蛋白受体(soluble NSF attachment protein receptor,SNARE)复合物的一部分。破伤风毒素在VAMP2一个特定的肽键(Gln76和Phe77之间)处的切割阻止了SNARE复合体的形成,从而阻止了钙离子介导的胞吐作用。因此,运动神经的抑制信号减少,导致破伤风症状中的特征性痉挛。破伤风毒素与中枢兴奋性突触也有结合活性,能与交感肾上腺素能神经元结合,这可能导致了破伤风临床症状中的自主神经失调。因此,抗TeNT- H_C 抗体可以阻断毒素与细胞表面受体的结合,从而阻止毒素进入细胞发挥中和作用;抗TeNT- H_N 抗体可以通过抑制轻链向胞浆转位而发挥中和作用。

[0005] 破伤风的治疗包括预防毒素吸收、控制肌肉痉挛和支持性护理,抗毒素和抗生素是目前仅有的特异性治疗方法。抗毒素是由破伤风类毒素免疫人或动物(一般是马)所得的

血浆,经胃蛋白酶消化后纯化制成的抗毒素球蛋白制剂,可以特异性地中和破伤风毒素,有效治疗破伤风。但是,动物(马)来源的抗毒素对于人体来说属于异源蛋白,容易引起过敏反应,也存在传播人畜共患传染病的风险。免疫健康人所得的人破伤风免疫球蛋白(TIG)相比马抗毒素不易引起过敏反应,但仍存在生产规模小、成本高的局限和传染病传播的风险。

[0006] 中和抗体作为抗毒素的有效成分可以发挥有效的保护效果。随着基因工程的发展,全人源的单克隆抗体越来越显示出优势,其安全性、有效性和在人类疾病的相关性与传统的多抗或者鼠单抗相比有了明显的提高。已有文献报道针对炭疽杆菌保护性抗原、肉毒毒素等细菌蛋白的单克隆抗体可以在动物体内对相应的病原体提供完全的保护效果。本发明的目的是提供一种能够针对破伤风毒素的全人源单克隆中和抗体,进而提供其在制备破伤风预防和/或治疗药物中的应用。

发明内容

[0007] 基于上述目的,本发明首先提供了一种抗破伤风毒素的人源单克隆抗体,所述抗体重链可变区CDR1、CDR2和CDR3区氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1第26-33,51-57,96-118位序列所示;所述抗体轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3区氨基酸序列分别如SEQ ID NO:5第27-32,50-52,89-97位序列所示。

[0008] 在一个优选的实施方案中,所述抗体重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述抗体轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。在本申请中具有该所述重链可变区和轻链可变区的单克隆抗体被命名为“T9-6”。

[0009] 在一个更为优选的实施方案中,所述抗体重链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,所述抗体轻链恒定区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9所示。

[0010] 其次,本发明还提供了一种编码上述单克隆抗体重链和/或轻链的多核苷酸,编码所述抗体的重链可变区的多核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,编码所述抗体的轻链可变区的多核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0011] 在一个优选的实施方案中,编码所述抗体重链恒定区的多核苷酸的序列如SEQ ID NO:4所示,编码所述抗体轻链恒定区的多核苷酸的序列如SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10所示。

[0012] 第三,本发明还提供了一种表达上述编码单克隆抗体重链和/或轻链的多核苷酸的功能元件。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述功能元件为线性表达框。

[0014] 在另一个优选的实施方案中,所述功能元件为哺乳动物表达载体。

[0015] 第四,本发明还提供了一种含有上述功能元件的宿主细胞。

[0016] 在一个优选的实施方案中,所述细胞为Expi 293F细胞。

[0017] 在另一个优选的实施方案中,所述细胞为CHO-S细胞,本发明可以使用CHO-S细胞构建稳转工程细胞株,实现产业化生产。

[0018] 第五,本发明提供了一种含有上述单克隆抗体的组合物。

[0019] 在一个优选的实施方案中,所述组合物还含有抗破伤风毒素重链N端结构域的抗体。

[0020] 最后,本发明提供了上述单克隆抗体在制备破伤风预防和/或治疗药物中的应用。

[0021] 本发明提供的人源抗破伤风毒素的单克隆抗体T9-6具有独特的CDR区,结合于破伤风毒素的重链C端结构域,亲和力达到0.397nM。所述抗体能够有效中和破伤风毒素,可以完全保护破伤风毒素攻毒的小鼠。本发明提供的抗体具有独特的作用位点,不同于现有技术中的抗破伤风毒素单克隆抗体的作用位点,提示其具有与其他非结合于破伤风毒素的重链C端结构域的中和抗体,尤其是特异性结合破伤风毒素重链N端结构域的中和抗体组成鸡尾酒组合疗法的潜力。

附图说明

- [0022] 图1.流式细胞分选仪分选流程图;
[0023] 图2.扩增抗体可变区基因核酸电泳图;
[0024] 图3.线性表达框示意图;
[0025] 图4.抗体表达上清与TT的结合活性图;
[0026] 图5.T9-6与TT和TeNT-H_C的结合曲线图;
[0027] 图6.T9-6对攻毒小鼠保护率随时间变化的曲线图;
[0028] 图7.抗体竞争结合TT实验结果图;
[0029] 图8.T9-6与TT的结合动力学曲线图。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的权利要求所限定的保护范围构成任何限制。

[0031] 实施例1.单克隆抗体的筛选和制备

[0032] 1.血液样品的采集

[0033] 在获得知情同意后,采集重组破伤风疫苗(主要成分为重组破伤风毒素重链C端结构域TeNT-H_C,GenBank:AF154828)临床试验受试者第二次免疫28天后血液样品10mL,用于后续实验。

[0034] 2.FITC标记破伤风类毒素(TT)

[0035] 需要通过荧光标记的抗原来分选特异的记忆B细胞,FITC标记破伤风类毒素(TT)方法如下:

[0036] 1) Fluorescein Isothiocyanate_FITC (SIGMA, F4274) 溶于DMSO,浓度为20mg/mL。

[0037] 2) 取100μL 3.3mg/mL的TT溶液,加pH 9.6碳酸盐缓冲液至400μL。

[0038] 3) 加8μL FITC至TT溶液中,4℃避光孵育3小时。

[0039] 4) 用50kDa的超滤管对溶液加PBS换液,直到滤过液为透明无色。将标记好的蛋白用锡箔纸包好,4℃存放待用。

[0040] 3.流式分选记忆B细胞

[0041] 将采集的血样利用Ficoll密度梯度离心法分离PBMC,过程如下:

[0042] 1) 取新鲜抗凝全血,EDTA抗凝;用等体积PBS稀释全血。

[0043] 2) 在离心管中加入一定体积的分离液,将稀释后的血样平铺到分离液液面上方,保持两液面界面清晰;分离液、抗凝未经稀释全血、PBS(或生理盐水)体积为1:1:1。

[0044] 3) 配平,室温,水平转子800g,加速度3acc,离心30分钟。

[0045] 4) 离心结束后,管底是红细胞,中间层是分离液,最上层是血浆/组织匀浆层,血浆层与分离液层之间是一层薄且较致密的白膜,即:单个核细胞(包括淋巴细胞和单核细胞)层;小心吸取白膜层到另一离心管中。

[0046] 5) 用PBS稀释到一定体积,颠倒混匀;室温,水平转子300g,离心10分钟,弃上清;重复洗涤2次。

[0047] 6) 用PBS将淋巴细胞重悬备用。

[0048] 7) 将用来分选的细胞计数,取 1×10^6 个细胞,体积为100 μ L,加入表1推荐量的5种荧光染料,4 $^{\circ}$ C避光孵育1小时。

[0049] 表1. 流式分选荧光抗体/抗原

[0050]

标记	荧光	公司/货号	体积(每 1×10^6 cells)
TT	FITC	SIGMA, F4274	2 μ L
IgG	PE	BD, 555787	40 μ L
CD19	Alexa Fluor 700	Beckman, IM2470	10 μ L
CD3	PerCP	BD, 552851	20 μ L
CD27	PE-Cy7	Beckman, A54823	10 μ L

[0051] 8) 使用含2%FBS的PBS重复洗涤2-3次,400 μ L FPBS重悬,用40 μ m细胞筛去除细胞团,4 $^{\circ}$ C避光保存供分选。

[0052] 9) 使用细胞分选仪(SONY, SH800S)分选TT特异的单个记忆B细胞;分选策略为:CD3 $^-$ /CD19 $^+$ /IgG $^+$ /CD27 $^+$ /TT $^+$;如图1所示,A圈出淋巴细胞,B圈出CD3 $^-$ /CD19 $^+$ 的B细胞,C圈出IgG $^+$ /CD27 $^+$ 的记忆B细胞,D圈出TT $^+$ 的记忆B细胞。直接将单个记忆B细胞分选至96孔板中,96孔板中每孔含有5U RNA酶抑制剂及19.8 μ L去RNA酶的水,-80 $^{\circ}$ C保存。

[0053] 4. 单细胞PCR扩增全人源单抗

[0054] 1) 反转录PCR

[0055] 分选得到180个TT特异的记忆B细胞,向每个反应体系中同时加入以下全部的针对重链(H)、 κ 轻链、 λ 轻链各亚型的特异引物(引物序列见表2)。

[0056] 引物:

[0057] H:5' $^{\prime}$ L-VH 1、5' $^{\prime}$ L-VH 3、5' $^{\prime}$ L-VH 4/6、5' $^{\prime}$ L-VH 5、HuIgG-const-anti、3' $^{\prime}$ Cm CH1。

[0058] κ :5' $^{\prime}$ L V κ 1/2、5' $^{\prime}$ L V κ 3、5' $^{\prime}$ L V κ 4、3' $^{\prime}$ C κ 543-566。

[0059] λ :5' $^{\prime}$ L V λ 1、5' $^{\prime}$ L V λ 2、5' $^{\prime}$ L V λ 3、5' $^{\prime}$ L V λ 4/5、5' $^{\prime}$ L V λ 6、5' $^{\prime}$ L V λ 7、5' $^{\prime}$ L V λ 8、3' $^{\prime}$ C λ 。

[0060] 表2. 反转录PCR引物

引物名称	序列
5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
HuIgG-const-anti	TCTTGTCCACCTTGGTGTGCT
3' Cm CH1	GGGAATTCTCACAGGAGACGA
[0061] 5' L Vk 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
5' L Vk 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
5' L Vk 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
3' Ck 543-566	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
5' L Vλ 1	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG
5' L Vλ 2	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG
5' L Vλ 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
5' L Vλ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
5' L Vλ 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG
5' L Vλ 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG
[0062] 5' L Vλ 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG
3' Cλ	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG

[0063] PCR反应体系中包含:5×缓冲液6μL、dNTP 1.2μL、反转录酶1.2μL,引物如上,模板为单细胞,水补齐至30μL。

[0064] PCR反应条件为:50℃反转录30分钟,95℃预变性15分钟,接着95℃40秒,55℃30秒,72℃1分钟,40个循环,最后72℃延伸10分钟。

[0065] 2) 巢式PCR

[0066] 以反转录产物为模板,分别进行3次巢式PCR反应扩增H、κ、λ,具体过程如下:

[0067] 引物:

[0068] H:VH3a-sense、VH3b-sense、MuD、PW-Cgamma。

[0069] κ:5'Pan Vk、3'Cκ494-516。

[0070] λ:5'AgeI Vλ1、5'AgeI Vλ2、5'AgeI Vλ3、5'AgeI Vλ4/5、5'AgeI Vλ6、5'AgeI Vλ7/8、3'XhoI Cλ。

[0071] 表3.巢式PCR引物

引物名称	序列
VH3a-sense	SARGTGCAGCTCGTGGAG
VH3b-sense	GAGGTGCAGCTGTTGGAG
MuD	GGAATTCTCACAGGAGACGA
PW-Cgamma	AGTAGTCCTTGACCAGGCAGCCCAG
5' Pan Vk	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG
3' Ck 494-516	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
[0072] 5' AgeI Vλ 1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
5' AgeI Vλ 2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
5' AgeI Vλ 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
5' AgeI Vλ 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA
5' AgeI Vλ 6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG
5' AgeI Vλ 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG
3' XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG

[0073] PCR反应体系中包含:10×缓冲液2.5μL、10mM dNTP 0.5μL、DNA聚合酶0.25μL,引物如上,模板为反转录产物1μL,水补齐至25μL。

[0074] PCR反应条件为:94℃预变性4分钟,接着94℃30秒,57℃30秒,72℃45秒,40个循环,最后72℃延伸10分钟。

[0075] 3) 琼脂糖凝胶电泳

[0076] 一个单细胞中重链和轻链基因均扩增成功的克隆,被认为是配对成功的克隆。取5μL巢式PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,取配对的阳性克隆进行测序,测序获得的抗体可变区序列用Vector NTI软件及IMGT网站进行分析,并进行抗体蛋白表达和功能验证。图2是对H、κ、λ三种链基因的巢式PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳的鉴定图谱。只有当重链和轻链可变区基因从同一个记忆B细胞中扩增获得时,认为是自然配对的抗体基因,并将对应巢式PCR产物测序做进一步研究。

[0077] 5. 线性表达框表达抗体

[0078] 通过上述反转录反应,单细胞克隆中获得了25个配对的抗体序列,如果采用传统的克隆表达方法费时费力,通过构建线性表达框的方法可以快速表达抗体。该方法的基本原理是直接通过重叠延伸PCR将启动子序列(GenBank号:X03922.1)、抗体前导肽的编码序列、抗体可变区(从单细胞中扩增获得)、抗体恒定区(生工生物合成,重链恒定区序列由SEQ ID NO:3所示,DNA编码序列由SEQ ID NO:4所示,κ链恒定区序列由SEQ ID NO:7所示,DNA编码序列由SEQ ID NO:8所示,λ链恒定区序列由SEQ ID NO:9所示,DNA编码序列由SEQ ID NO:10)、多聚A尾(GenBank号:X03896.1)连接起来,将该线性形式的DNA转染进入细胞中进行抗体表达。

[0079] 具体过程如下:

[0080] 1) 以pSec Tag2 (Invitrogen) 为模板, 扩增启动子-前导序列片段、多聚A尾片段。

[0081] 扩增启动子-前导序列片段的PCR反应体系中包含: 模板质粒pSec Tag2 (Invitrogen) 1ng、10×缓冲液5μL、10mM dNTP 1μL、DNA聚合酶0.5μL、引物5' CMV-FORWARD (CGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTG)、引物3' leader-sequence (GTCACCAGTGGAACTGGAACCCA), 水补齐至50μL。

[0082] 扩增多聚A尾片段的PCR反应体系中包含: 模板质粒pSec Tag2 (Invitrogen) 1ng, 10×缓冲液5μL、10mM dNTP 1μL、DNA聚合酶0.5μL、引物5' POLY(A) (GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC)、引物3' POLY(A) (TCCCAGCATGCCTGCTATTGTCT), 水补齐至50μL。

[0083] PCR反应条件为: 94℃预变性4分钟, 接着94℃30秒, 60℃30秒, 72℃1分钟, 30个循环, 最后72℃延伸10分钟。

[0084] 2) 扩增抗体恒定区。

[0085] H链恒定区PCR体系中包含: 重链恒定区模板10ng、10×缓冲液5μL、10mM dNTP 1μL、DNA聚合酶0.5μL、引物5' CH (ACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCC)、引物3' CH (GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTTTACCCGGAGACAGGGA), 水补齐至50μL。

[0086] κ链恒定区PCR体系中包含: κ链恒定区模板10ng、10×缓冲液5μL、10mM dNTP 1μL、DNA聚合酶0.5μL、引物5' Cκ (ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC)、引物3' Cκ (GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCA CACTCTCCCTGTTGAAGCT), 水补齐至50μL。

[0087] λ链恒定区PCR体系中包含: λ链恒定区模板10ng、10×缓冲液5μL、10mM dNTP 1μL、DNA聚合酶0.5μL、引物5' Cλ (GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACA)、引物3' Cλ (GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGAACATTCTGTAGGGGCCAC)、水补齐至50μL。

[0088] PCR反应条件为: 94℃预变性4分钟, 接着94℃30秒, 60℃60秒, 72℃3分钟, 30个循环, 最后72℃延伸10分钟。

[0089] 3) 扩增抗体可变区。

[0090] PCR体系中包含: 模板为反转录PCR产物10ng, 10×缓冲液5μL、10mM dNTP 1μL、DNA聚合酶0.5μL、引物如表4中所示 (将重链和轻链引物分别混合后加入体系中), 水补齐至50μL。

[0091] PCR反应条件为: 94℃预变性4分钟, 接着94℃30秒, 60℃30秒, 72℃3分钟, 30个循环, 最后72℃延伸10分钟。

[0092] 表4. 线性表达框构建扩增可变区PCR引物

	H链引物	序列
[0093]	5'VH1/5/7	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAGGTGCAGCTGGTGCAG
	5'VH3	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAGGTGCAGCTGGTGGAG

5'VH3-23	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAGGTGCAGCTGTTGGAG
5'VH4	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGGTGCAGCTGCAGGAG
5'VH4-34	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGGTGCAGCTACAGCAGTG
5'VH1-18	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGGTTACAGCTGGTGCAG
5'VH1-24	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGGTCCAGCTGGTACAG
5'VH3-9/30/33	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAAGTGCAGCTGGTGGAG
5'VH6-1	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGGTACAGCTGCAGCAG
3'JH1/2/4/5	GGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGAC CAG
3'JH3	GGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAGACGGTGAC CATTG
3'JH6	GGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGAC CGTG
5'CH	ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
[0094] Kappa 链引物	序列
5'V κ 1	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGACATCCAGATGACCCAGTC
5'V κ 1-9/1-13	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGACATCCAGTTGACCCAGTCT
5'V κ 1D-43/1-8	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCCATCCGGATGACCCAGTC
5'V κ 2	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGATATTGTGATGACCCAGAC
5'V κ 2-28/2-30	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGATATTGTGATGACTCAGTC
5'V κ 3-11/3D-11	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAAATTGTGTTGACACAGTC
5'V κ 3-15/3D-15	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAAATAGTGATGACGCAGTC
5'V κ 3-20/3D-20	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGAAATTGTGTTGACGCAGTCT
5'V κ 4-1	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGACATCGTGATGACCCAGTC
3'J κ 1/2/4	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATYTCCACCTTGGTC
3'J κ 3	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTGATATCCACTTGGTC
3'J κ 5	GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTACGTTTAATCTCCAGTCGTGTC
Lamda 链引物	序列
5'V λ 1	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGTCTGTGCTGACKCAG
5'V λ 2	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGTCTGCCCTGACTCAG

	5'Vλ3	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACTCCTATGAGCTGACWCAG
	5'Vλ4/5	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGCYTGTGCTGACTCA
[0095]	5'Vλ6	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACAATTTTATGCTGACTCAG
	5'Vλ7/8	TGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACCAGRCTGTGGTGACYCAG
	3'V-Cλ	TGTGGCCTTGTGGCTTGAAGCTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGA GTG

[0096] 4) PCR产物回收纯化:将以上PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳后,切胶并使用OMEGA公司回收试剂盒回收。

[0097] 5) 分别扩增重链和轻链的线性表达框。

[0098] 线性表达框的拼接顺序示意图如图3所示。图3中,A为H链线性表达框,B为κ链线性表达框,C为λ链线性表达框。

[0099] PCR反应体系中包括:

[0100] 模板:纯化后的启动子-前导序列片段10ng、重链/轻链可变区片段10ng、重链/轻链恒定区片段10ng、多聚A尾片段10ng,10×缓冲液2.5μL、10mM dNTP 0.5μL、DNA聚合酶0.25μL、引物5' CMV-FORWARD (CGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTG) 和3' POLY (A) (TCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCT),水补齐至25μL。

[0101] PCR反应条件为:94℃预变性4分钟,接着94℃30秒,60℃30秒,72℃3分钟,30个循环,最后72℃延伸10分钟。

[0102] 6) PCR产物回收纯化:PCR反应产物直接用OMEGA公司回收试剂盒回收。

[0103] 7) DNA定量:用Nano (GE Healthcare) 对PCR回收产物进行定量。

[0104] 8) 细胞接种:将293T细胞以 2×10^5 /mL接种于24孔细胞培养板中,在含有5%CO₂的细胞温箱中,37℃培养过夜。

[0105] 9) 细胞共转染:次日,向200μL无血清的MEM培养基中,加入构建成功的重链和轻链线性表达框PCR产物各1μg,混匀后加入4μL转染试剂Turbofect (Thermo Scientific, R0531),共同孵育15-20分钟后逐滴加至过夜培养的293T细胞培养孔中。在含有5%CO₂的细胞温箱中,37℃培养48小时后收细胞培养上清备用。

[0106] 6. ELISA筛选具有结合活性的抗体

[0107] 1) 实验前一天96孔酶联板,包被1μg/mL的破伤风类毒素TT (购自中国食品药品检定研究院),每孔100μL包被。将包被的酶联板放入湿盒,4℃过夜。

[0108] 2) 实验当天用洗板机 (BIO-TEK, 405_LS) 洗5次,每孔加入100μL封闭液,室温下放置1小时。

[0109] 3) 洗板5次,加入100μL的转染细胞培养上清,室温静置1小时。

[0110] 4) 洗板5次,将HPR标记的羊抗人IgG二抗 (Abcam, ab97225) 以1:10000用稀释液进行稀释,每孔100μL加入到ELISA板对应孔中,室温孵育1小时。

[0111] 5) 洗板5次,每孔加入100μL的TMB单组份显色液,显色6分钟,室温避光,之后每孔加入50μL终止液终止反应。

[0112] 6) 用酶标仪上检测450-630nm处的OD值,保存记录原始数据。

[0113] 结果:将22株单抗进行表达,并对TT的结合活性进行鉴定。结果显示有15株单抗与

TT能够特异性结合。图4显示了15株单抗的结合活性。

[0114] 7. T9-6抗体序列说明

[0115] 对具有结合活性的抗体T9-6进行研究,其序列描述如下。

[0116] T9-6重链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.1第26-33,51-57,96-118位序列所示,T9-6重链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;T9-6重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示:T9-6重链恒定区核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;T9-6轻链可变区氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示,其CDR1、CDR2和CDR3分别如SEQ ID NO.5第27-32,50-52,89-97位序列所示,T9-6轻链可变区核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示;T9-6轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示,T9-6轻链恒定区核苷酸序列如SEQ ID NO.8所示。

[0117] 8. 表达质粒构建与抗体制备

[0118] 对T9-6构建表达质粒,进行单抗的表达制备。方法如下:

[0119] 1) 将T9-6H和T9-6K线性表达框全长基因用EcoR I (NEB, R3101) 和Not I (NEB, R3189) 双酶切,连接至pcDNA3.4表达质粒。

[0120] 2) 取pcDNA3.4-T9-6H和pcDNA3.4-T9-6K各15 μ g,转染至30mL Expi 293体系(Life, A14524)中,125rpm,5%CO₂培养72小时。

[0121] 3) 3000 \times g,离心10分钟收取表达上清,经0.22 μ m针头滤器抽滤后,采用rProtein A亲和纯化。

[0122] 用PBS对收集的抗体进行换液,然后用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific, 23225)测定抗体浓度。

[0123] 实施例2. ELISA检测抗体结合活性

[0124] 1. 实验前一天96孔酶联板包被1 μ g/mL的破伤风类毒素TT(购自中国食品药品检定研究院)和破伤风毒素重链C端结构域(TeNT-H_C, GenBank: AF154828),每孔100 μ L进行包被。将包被的酶联板放入湿盒,4 $^{\circ}$ C过夜。

[0125] 2. 实验当天用洗板机洗5次。每孔加入100 μ L封闭液,室温下放置1小时。

[0126] 3. 洗板5次。首孔加入150 μ L浓度为3.3 μ g/mL的T9-6单抗,其余孔加入100 μ L的稀释液。从首孔吸出50 μ L加入到次孔,以此类推,按1:3梯度稀释每孔终体积为100 μ L。室温静置1小时。

[0127] 4. 洗板5次。将HPR标记的羊抗人IgG二抗以1:10000用稀释液进行稀释,每孔100 μ L加入到ELISA板对应孔中,室温1小时。

[0128] 5. 洗板5次。每孔加入100 μ L的TMB单组份显色液,显色6分钟,室温避光,之后每孔加入50 μ L终止液终止反应。

[0129] 6. 用酶标仪上检测450-630nm处的OD值,保存记录原始数据。

[0130] 结合活性曲线见图5。结果显示:T9-6可以与破伤风类毒素TT很好地结合(EC₅₀为6.183ng/mL),也可以结合破伤风毒素重链C端结构域(TeNT-H_C)(EC₅₀为3.446ng/mL)。说明T9-6结合的表位位于TeNT-H_C,H_C为毒素的受体结合区,提示T9-6单抗很有可能是通过抑制毒素与受体结合而发挥中和作用的。

[0131] 实施例3. 小鼠攻毒保护实验

[0132] 在小鼠体内评价T9-6的中和毒素效果,评价方法如下:

- [0133] 1. 小鼠: BALB/c, 每组10只, 雌雄各半, 6-8周。
- [0134] 2. 样品准备: 硼酸缓冲液: NaCl 8.5g, 硼酸4.5g, 十水四硼酸钠0.5g, 加水至1L, 0.22 μ m过滤除菌, pH 7.4左右; 破伤风毒素用硼酸缓冲液进行稀释, 在小鼠体内的LD₅₀为15.8ng/kg。
- [0135] 3. T9-6给药组: 10 μ g抗体 (50 μ L PBS稀释) + 2LD₅₀破伤风毒素 (总体系0.5mL); 对照组: 50 μ L PBS + 2LD₅₀破伤风毒素 (总体系0.5mL), 37 $^{\circ}$ C孵育1小时。
- [0136] 4. 小鼠腹腔注射毒素/抗体混合物, 每只小鼠0.5mL。
- [0137] 5. 观察10日。
- [0138] 结果: 对照组小鼠在2天之内全部死亡, 而T9-6给药组可以在2LD₅₀破伤风毒素攻毒的小鼠中达到100%的保护效果 (随时间变化的存活曲线参见图6)。
- [0139] 实施例4. 抗体表位竞争实验
- [0140] 采用竞争结合ELISA方法分析T9-6与本实验室制备的其他破伤风抗体是否存在相同的抗原表位。通过考察检测抗体与TT的结合是否会被同孵育的竞争抗体所阻断, 来反映这些抗体的结合表位是否存在交叠。方法如下:
- [0141] 1. 称取生物素 (Thermo Scientific, 21335) 4mg, 溶于2mL超纯水中, 浓度为2mg/mL。
- [0142] 2. 取抗体各200 μ g, 体积控制在200 μ g左右。以生物素比抗体为20:1的摩尔比标记抗体。将抗体和生物素混合, 室温孵育1小时, 用50kDa的0.5mL离心超滤管换液, 每次更换PBS约400 μ L, 换液3次以上。
- [0143] 3. 最后一次用PBS将超滤管中剩余的液体统一补齐至100 μ L左右, 测定抗体浓度。
- [0144] 4. 96孔酶联板以1 μ g/mL的浓度包被TT, 4 $^{\circ}$ C包被过夜。
- [0145] 5. 洗板机洗板5次, 每孔加入100 μ L封闭液, 37 $^{\circ}$ C孵育1小时。
- [0146] 6. 实验中检测抗体为生物素标记的抗体, 竞争抗体为非生物素标记抗体; 稀释液稀释竞争抗体至100 μ g/mL; 稀释检测抗体至1 μ g/mL。
- [0147] 7. 洗板5次, 每孔加入50 μ L检测抗体和50 μ L竞争抗体, 每孔终体积100 μ L。
- [0148] 8. 洗板5次, HRP标记的链霉亲和素 (Thermo Scitntific, 21126) 以1:1000稀释, 每孔加入100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育1小时。
- [0149] 9. 洗板5次, 每孔加入100 μ L TMB单组份显色液, 避光显色6分钟, 加入50 μ L终止液; 读取450-630nm OD值。
- [0150] 结果: 竞争结合值小于30认为强竞争; 大于30小于60认为弱竞争; 大于60认为不竞争。各抗体自身之间很好地竞争结合, T9-6与T7存在竞争关系, 说明这两株抗体针对的表位存在交叠; T9-6与其他抗体没有竞争关系, 提示T9-6具有与除T7外其他中和抗体组成鸡尾酒组合疗法的潜力 (参见图7)。
- [0151] 实施例5抗体亲和力测定 (BLI):
- [0152] 1. 抗体T9-6用PBST (PBS+0.5% Tween-20) 稀释到5 μ g/mL。
- [0153] 2. 使用ForteBio Octet仪器, 对AHC的sensor进行包被。
- [0154] 3. 将包被好的sensor在PBST中进行基线校准。
- [0155] 4. 将sensor浸入梯度稀释的TT中进行结合, 时间300秒。
- [0156] 5. 将sensor浸入PBST中进行解离, 时间600秒。

[0157] 6.对数据进行拟合,得到平衡解离常数(K_D)。

[0158] 结果:T9-6与TT的平衡解离常数为0.397nM,显示该中和抗体与TT具有很好的亲和力,使其发展成破伤风预防或治疗用抗体成为可能。(参见图8)。

[0159] 仅一种单抗作为治疗药物面临病原体突变的可能,导致单抗对突变体失去中和作用,多种靶向不同表位的单抗联合使用(鸡尾酒疗法)可以避免这种问题。因此使用本发明提供的抗破伤风毒素的重链C端结构域的抗体T9-6与其它不结合破伤风毒素重链C端结构域抗体的组合物用于破伤风预防或治疗可以成为这一鸡尾酒疗法的具体技术方案。在本发明的进一步验证中,抗体T3结合的表位位于破伤风毒素的重链N端结构域TeNT-H_N,H_N在促进毒素轻链向胞浆转位中发挥作用,提示T3很可能通过抑制轻链向胞浆转位发挥中和作用。T9-6与T3不存在竞争关系,说明这两个抗体靶向抗原的不同表位,它们可以作为鸡尾酒疗法的候选抗体与其他针对不同表位的单抗联合使用以发挥更好的保护效果。T9-6与T3具有对破伤风毒素的高亲和力和高中和活性,在对破伤风疾病的预防、治疗和诊断中可以发挥重要作用。因此,使用抗体T9-6与抗破伤风毒素的重链N端结构域TeNT-H_N抗体组成用于鸡尾酒疗法的抗体组合物;仅作为举例,例如将抗体T9-6和抗体T3作为一个具体的实施方案,这种抗体组合方案可以成为很有一种很有潜力的破伤风预防或治疗方案。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	中国人民解放军军事科学院军事医学研究院														
[0003]	<120>	一种结合破伤风毒素重链C端结构域的人源抗体及应用														
[0004]	<160>	10														
[0005]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0														
[0006]	<210>	1														
[0007]	<211>	129														
[0008]	<212>	PRT														
[0009]	<213>	Homo sapiens														
[0010]	<400>	1														
[0011]	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Ile	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu
[0012]	1			5					10						15	
[0013]	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Phe	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
[0014]				20					25						30	
[0015]	Tyr	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[0016]			35					40					45			
[0017]	Ala	Val	Ile	Tyr	Arg	Asn	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Arg
[0018]		50					55					60				
[0019]	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Phe	Val
[0020]	65				70						75				80	
[0021]	Gln	Met	Asn	Arg	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
[0022]				85						90					95	
[0023]	Arg	Asp	Phe	Val	Val	Val	Val	Ser	Thr	Gly	Pro	Glu	Val	Ser	Tyr	Tyr
[0024]				100						105					110	
[0025]	Ser	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Gly	Ser
[0026]			115							120					125	
[0027]	Ser															
[0028]	<210>	2														
[0029]	<211>	387														
[0030]	<212>	DNA														
[0031]	<213>	Homo sapiens														
[0032]	<400>	2														
[0033]	cagctggtgc	agtctggagg	aggcttgatc	cagccggggg	ggtccctgag	actctcctgt	60									
[0034]	gcagcctcag	ggtctggatt	cagtgtcagt	agtaattaca	tgacctgggt	ccgccagget	120									
[0035]	ccaggaagg	ggctggagtg	ggtcgcagtt	atztatagga	atggcagtac	aaactacgca	180									
[0036]	gactccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagataaatt	ccaagaacac	ggtgtttgtt	240									
[0037]	caaatgaaca	gactgagagt	cgaggacacg	gccgtttatt	actgtgcgag	agatttcgtc	300									
[0038]	gtggtggtga	gtactggtcc	ggaggtgtcg	tactactcct	acgggatgga	cgtctggggc	360									

[0039]	caggggacca tggtcaccgg ctcctca	387
[0040]	<210> 3	
[0041]	<211> 330	
[0042]	<212> PRT	
[0043]	<213> Homo sapiens	
[0044]	<400> 3	
[0045]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
[0046]	1 5 10 15	
[0047]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
[0048]	20 25 30	
[0049]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
[0050]	35 40 45	
[0051]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
[0052]	50 55 60	
[0053]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
[0054]	65 70 75 80	
[0055]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
[0056]	85 90 95	
[0057]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
[0058]	100 105 110	
[0059]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
[0060]	115 120 125	
[0061]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
[0062]	130 135 140	
[0063]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
[0064]	145 150 155 160	
[0065]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
[0066]	165 170 175	
[0067]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Pro	
[0068]	180 185 190	
[0069]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
[0070]	195 200 205	
[0071]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
[0072]	210 215 220	
[0073]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Phe Arg Asp Glu	
[0074]	225 230 235 240	
[0075]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
[0076]	245 250 255	
[0077]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	

[0078]	260	265	270
[0079]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[0080]	275	280	285
[0081]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[0082]	290	295	300
[0083]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[0084]	305	310	315 320
[0085]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0086]	325	330	
[0087]	<210> 4		
[0088]	<211> 990		
[0089]	<212> DNA		
[0090]	<213> Homo sapiens		
[0091]	<400> 4		
[0092]	gcgtcgacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60	
[0093]	ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120	
[0094]	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtcctca	180	
[0095]	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240	
[0096]	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300	
[0097]	aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga	360	
[0098]	ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacce aaggacacce tcatgatctc ccggaccct	420	
[0099]	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg	480	
[0100]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540	
[0101]	agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gteccgcacc aggactggct gaatggcaaa	600	
[0102]	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660	
[0103]	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatt ccgggatgag	720	
[0104]	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaagg gcttctatcc cagcgacatc	780	
[0105]	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840	
[0106]	ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900	
[0107]	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa cactacacg	960	
[0108]	cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990	
[0109]	<210> 5		
[0110]	<211> 107		
[0111]	<212> PRT		
[0112]	<213> Homo sapiens		
[0113]	<400> 5		
[0114]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0115]	1	5	10 15
[0116]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asp Tyr		

[0156] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0157] 100 105
 [0158] <210> 8
 [0159] <211> 321
 [0160] <212> DNA
 [0161] <213> Homo sapiens
 [0162] <400> 8
 [0163] cgtactgtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 [0164] ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 [0165] tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 [0166] agcaaggaca gcacctacag cctcagcagt accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 [0167] aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagttcgcc cgtcacaaag 300
 [0168] agcttcaaca ggggagagtg t 321
 [0169] <210> 9
 [0170] <211> 106
 [0171] <212> PRT
 [0172] <213> Homo sapiens
 [0173] <400> 9
 [0174] Arg Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 [0175] 1 5 10 15
 [0176] Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 [0177] 20 25 30
 [0178] Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 [0179] 35 40 45
 [0180] Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 [0181] 50 55 60
 [0182] Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 [0183] 65 70 75 80
 [0184] Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 [0185] 85 90 95
 [0186] Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 [0187] 100 105
 [0188] <210> 10
 [0189] <211> 318
 [0190] <212> DNA
 [0191] <213> Homo sapiens
 [0192] <400> 10
 [0193] cgtcagccca aggctgcccc ctcggctact ctgttcccac cctcgagtga ggagcttcaa 60
 [0194] gccacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120

[0195]	gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctcaaaa	180
[0196]	caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag	240
[0197]	tcccacaaaa gctacagctg ccaggtcacg catgaagga gcaccgtgga gaagacagtg	300
[0198]	gccctacag aatgttca	318

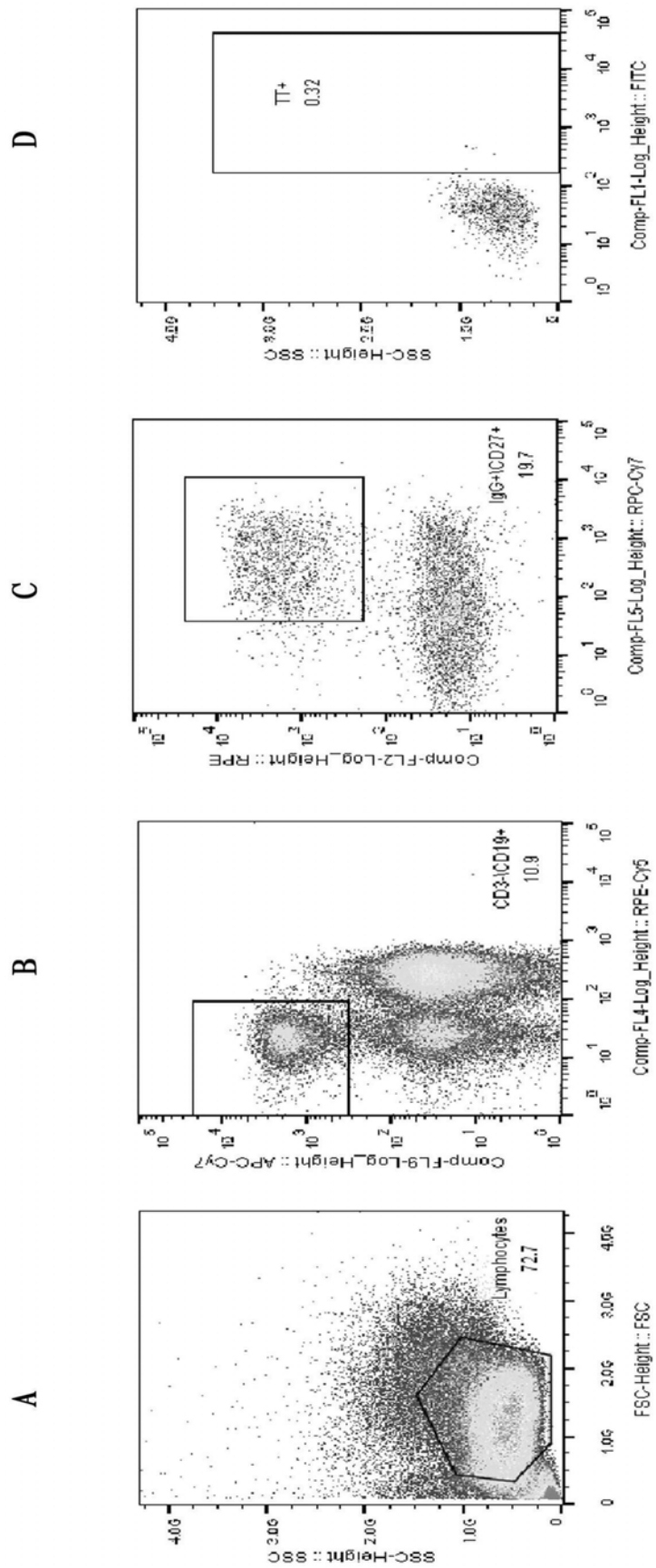


图1

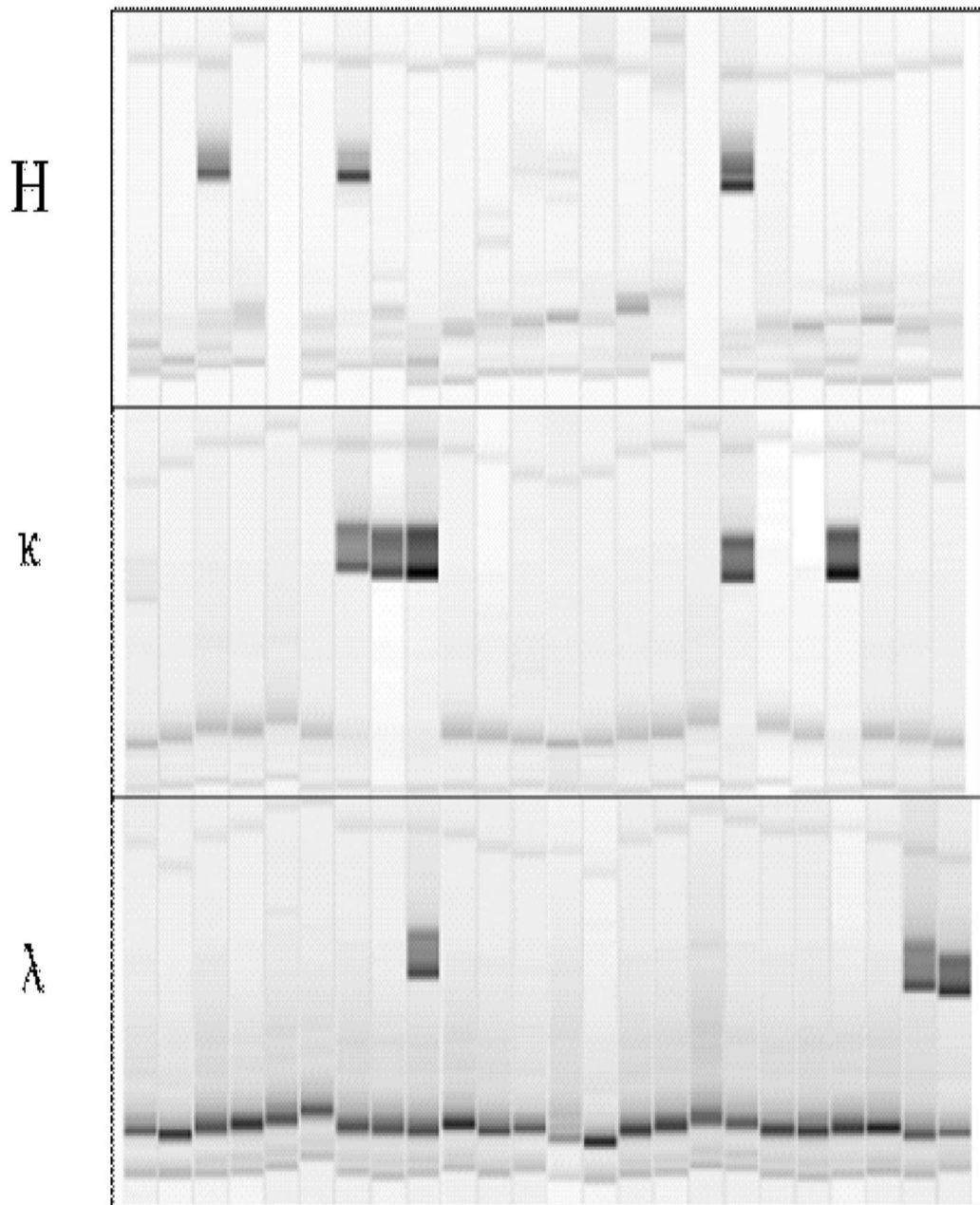


图2

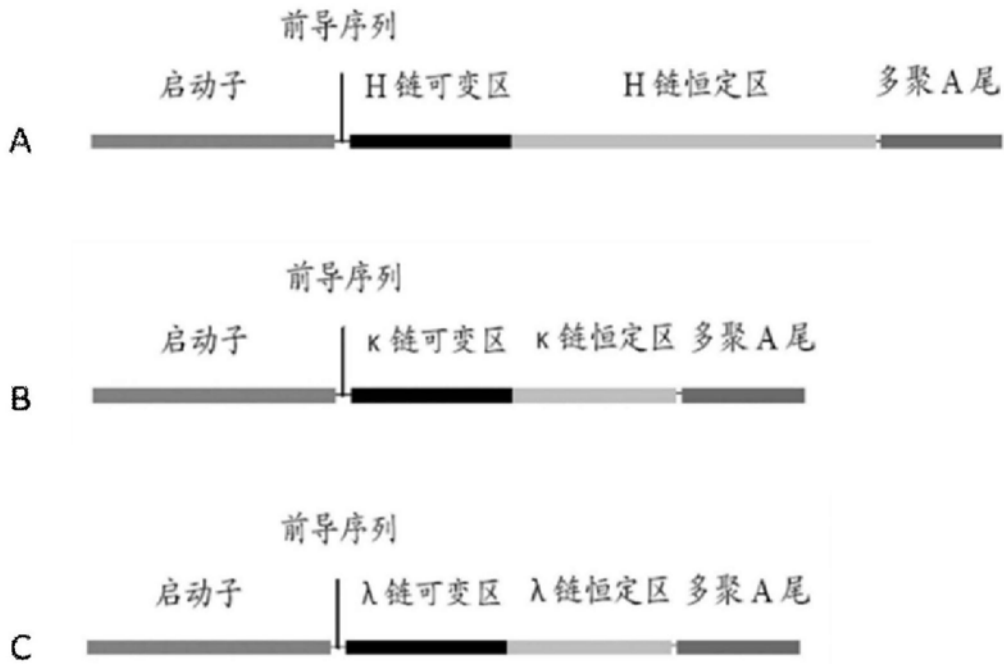


图3

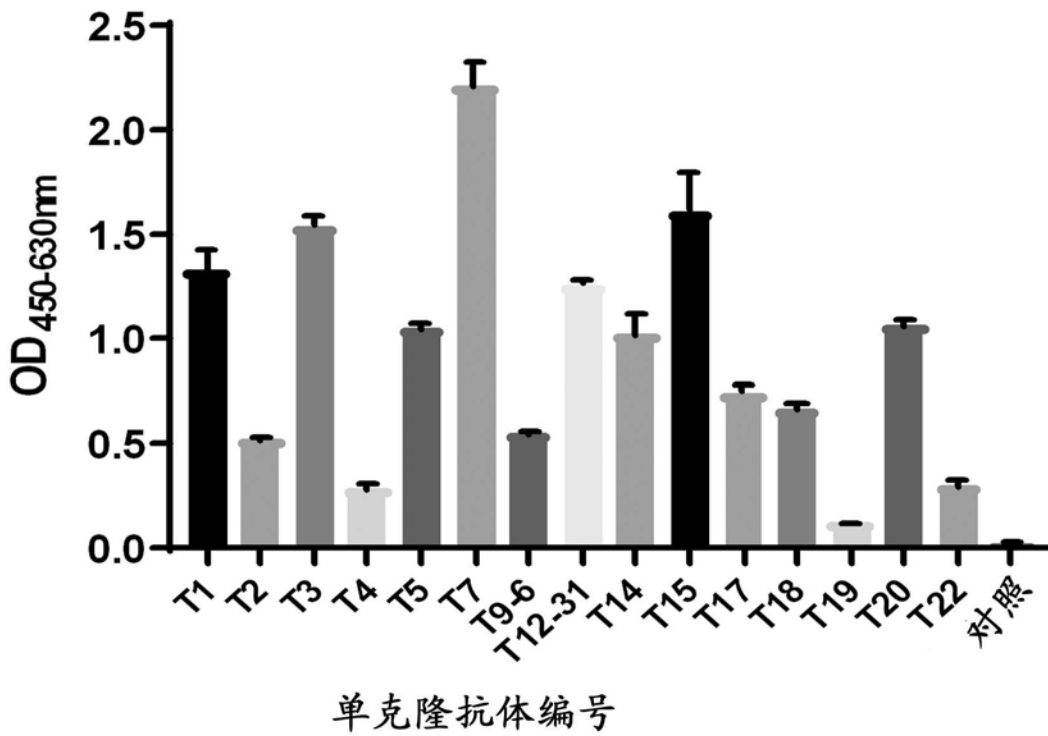


图4

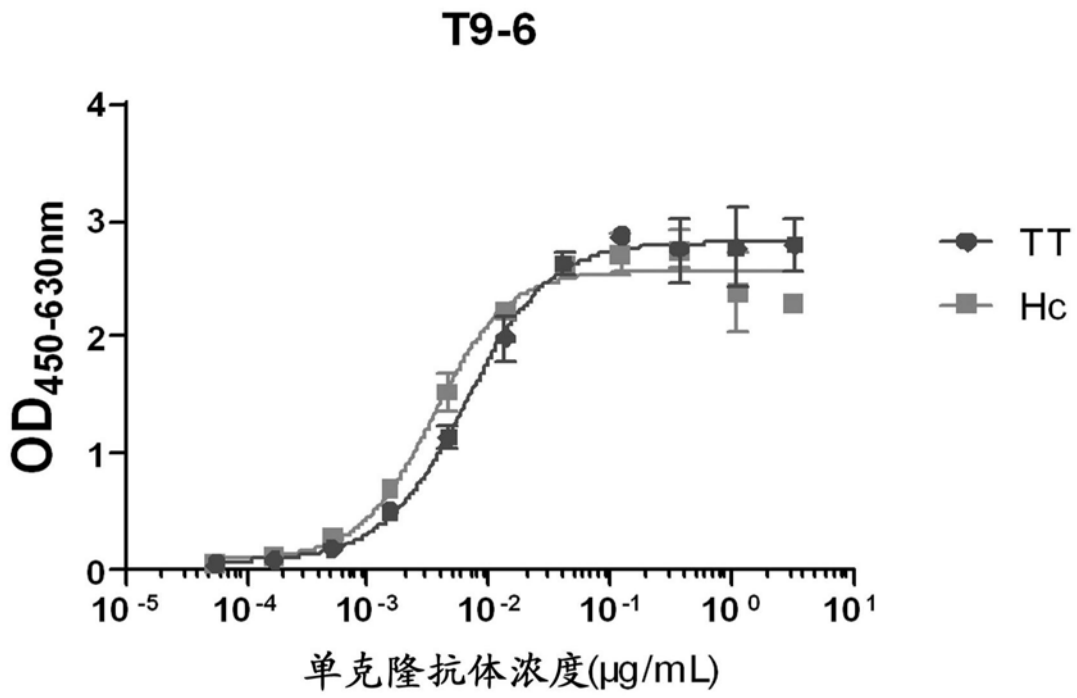


图5

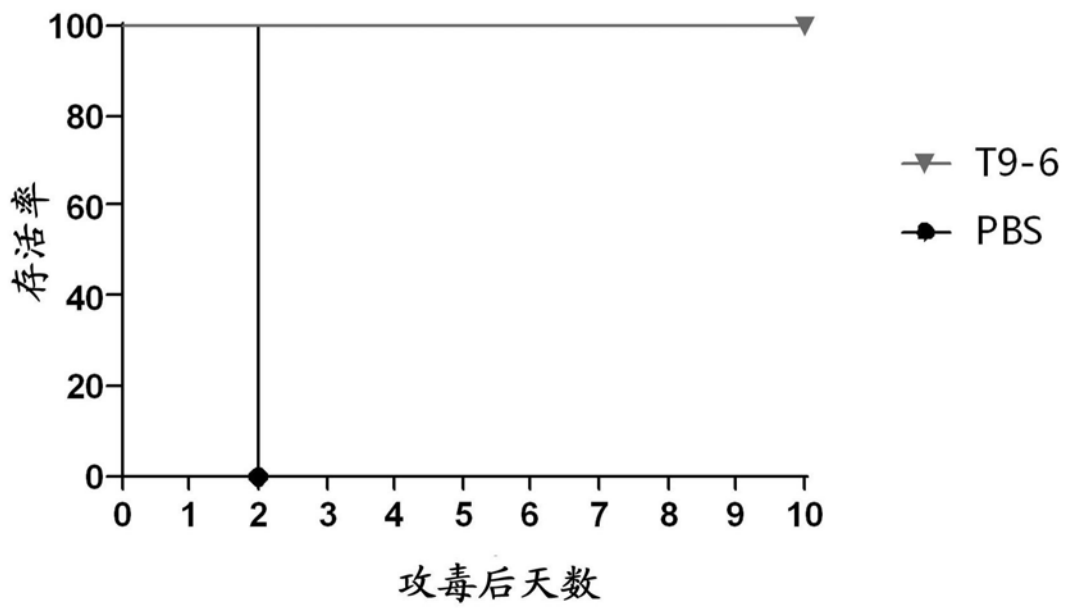


图6

检测抗体

		检测抗体					
		mAb	T2	T3	T7	T9-6	T18
阻断抗体	T2		1	97	108	97	113
	T3		51	4	95	90	78
	T7		104	96	1	2	96
	T9-6		97	102	1	1	98
	T18		107	102	103	94	3

图7

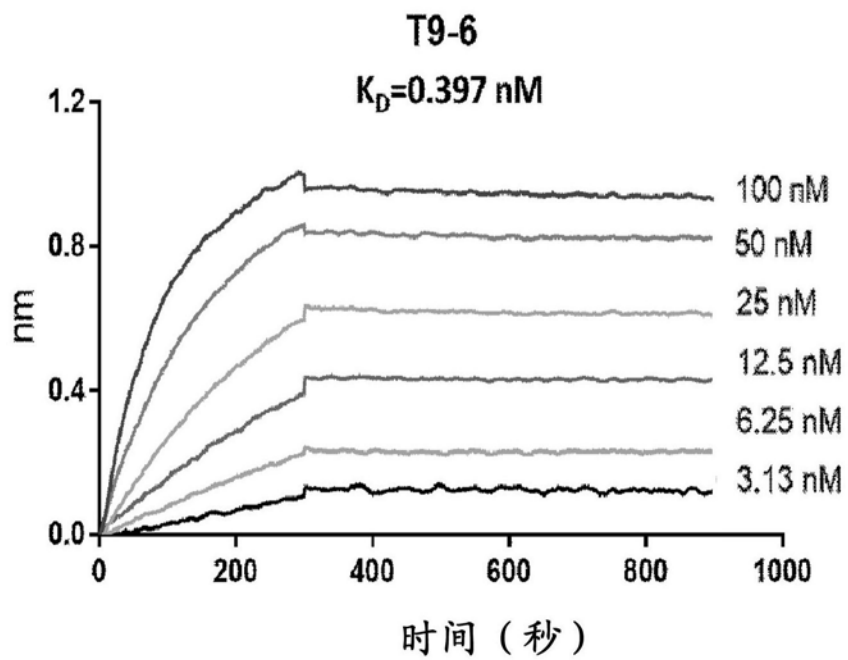


图8