



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103819561 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201410027795. 5

(22) 申请日 2014. 01. 22

(71) 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639 号

(72) 发明人 王旻 涂孝洁 何花 张娟 罗晨

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006. 01)

A61K 47/42 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

序列表26页 附图2页

(54) 发明名称

抗 CD24 单克隆抗体、其可变区序列及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种具有中和人白细胞分化抗原 CD24 生物活性的单克隆抗体以及该单克隆抗体的可变区序列。本发明以抗原肽与血蓝蛋白偶联物 CD24-KLH 作为免疫原, 免疫注射 BALB/c 小鼠, 取免疫小鼠脾脏细胞并将其与骨髓瘤细胞融合, 获得了可表达抗 CD24 抗体的杂交瘤细胞株, 此细胞株可用于制备抗 CD24 单克隆抗体。本发明同时克隆了抗 CD24 抗体可变区氨基酸序列。本发明的抗 CD24 抗体可与 CD24 特异性结合, 因此可以用于治疗与 CD24 表达过量、异常、失控相关的疾病。

1. 一种抗 CD24 单克隆抗体的可变区序列,其特征在于,所述可变区序列具有 SEQ ID No. 1 和 5 所示重链和轻链的氨基酸序列,其中重链、轻链可变区中分别包含 SEQ ID No. 2 ~ 4 和 SEQ ID No. 6 ~ 8 所示 CDR1 ~ 3 区氨基酸序列。

2. 一种抗 CD24 的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的结构中包括具有 SEQ ID No. 1 和 5 所示重链和轻链的氨基酸序列。

3. 一种抗 CD24 单克隆抗体的可变区序列,其特征在于,所述可变区序列具有 SEQ ID No. 9 和 13 所示重链和轻链的氨基酸序列,其中重链、轻链可变区中分别包含 SEQ ID No. 10 ~ 12 和 SEQ ID No. 14 ~ 16 所示 CDR1 ~ 3 区氨基酸序列。

4. 一种抗 CD24 的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的结构中包括具有 SEQ ID No. 9 和 13 所示重链和轻链的氨基酸序列。

5. 一种抗 CD24 单克隆抗体的可变区序列,其特征在于,所述可变区序列具有 SEQ ID No. 17 和 21 所示重链和轻链的氨基酸序列,其中重链、轻链可变区中分别包含 SEQ ID No. 18 ~ 20 和 SEQ ID No. 22 ~ 24 所示 CDR1 ~ 3 区氨基酸序列。

6. 一种抗 CD24 的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的结构中包括具有 SEQ ID No. 17 和 21 所示重链和轻链的氨基酸序列。

7. 一种抗 CD24 单克隆抗体的可变区序列,其特征在于,所述可变区序列具有 SEQ ID No. 25 和 29 所示重链和轻链的氨基酸序列,其中重链、轻链可变区中分别包含 SEQ ID No. 26 ~ 28 和 SEQ ID No. 30 ~ 32 所示 CDR1 ~ 3 区氨基酸序列。

8. 一种抗 CD24 的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的结构中包括具有 SEQ ID No. 25 和 29 所示重链和轻链的氨基酸序列。

9. 一种抗 CD24 单克隆抗体的可变区序列,其特征在于,所述可变区序列具有 SEQ ID No. 33 和 37 所示重链和轻链的氨基酸序列,其中重链、轻链可变区中分别包含 SEQ ID No. 34 ~ 36 和 SEQ ID No. 38 ~ 40 所示 CDR1 ~ 3 区氨基酸序列。

10. 一种抗 CD24 的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的结构中包括具有 SEQ ID No. 33 和 37 所示重链和轻链的氨基酸序列。

11. 一种基因工程抗体,其特征在于,它所含的重链和轻链可变区序列与权利要求书 1、3、5、7 和 9 所述的任一可变区序列是一致的;该基因工程抗体包括但不限于:人-鼠嵌合抗体(chimeric antibody);或者是人源化抗体(humanized antibody, HAb);或者是抗体的功能性片段 Fab(Fragment of antigen binding, Fab);或者是单链抗体(single-chain variable fragment, scFv);或者是重链可变区和完整轻链融合的抗体功能性片段 VH-L;或者是重链和轻链的一个或多个 CDR 的排列、串联或组合而成的抗体功能性片段;或者是上述抗体和抗体功能片段和其他各种蛋白或多肽进行连接、拼接、融合而得到的类抗体的功能性的融合蛋白。

12. 一种抗体偶联物,其特征在于,将权利要求 1 ~ 11 中所述任意一项单克隆抗体或者基因工程抗体作为靶向部分,与放射性核素或化学药物或毒素偶联。

13. 权利要求 1 ~ 11 中所述任意一项单克隆抗体或者基因工程抗体,其特征在于,选择性地与 CD24 结合或抑制 CD24 与 CD24 配体的结合或中和 CD24。

14. 权利要求 1 ~ 12 中所述单克隆抗体或者基因工程抗体或者抗体偶联物,其特征在于,能够用于制备与 CD24 表达异常或过量、失控相关疾病的药物。

15. 一种抗 CD24 单克隆抗体制备方法,其特征在于,以 CD24 核心区多肽(氨基酸序列如 SEQ ID No. 41 所示)与血蓝蛋白 KLH 偶联物作为抗原。

抗 CD24 单克隆抗体、其可变区序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种能特异性结合人白细胞分化抗原 CD24 的单克隆抗体、其可变区序列及其应用。

背景技术

[0002] 人白细胞分化抗原 CD24(cluster of differentiation 24) 是一种新近发现并重点研究的肿瘤标志物。

[0003] 当前研究表明, CD24 分子是表观分子量介于 30 ~ 70kDa 之间的高度糖基化唾液酸糖蛋白。CD24 包含 33 个氨基酸残基组成的核心蛋白骨架结构,具有 16 个潜在的 O- 或 N- 糖基化位点,与小鼠热稳定抗原高度同源;其成熟多肽能够通过羧基端的磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl-inositol, GPI) 锚定在细胞膜的表面。

[0004] 在生理情况下, CD24 分子仅在未成熟 B 细胞、成熟粒细胞以及少数上皮细胞和神经细胞上低水平表达;而当机体处于病理状态时,多数恶性肿瘤细胞的表面均能检测到显著高水平表达的 CD24 分子,其表达水平的高低与肿瘤的发生和发展密切相关。

[0005] P 选择素表达于活化的血小板与内皮细胞表面, CD24 是其配体之一。CD24 分子高表达增强了肿瘤细胞对血小板及内皮细胞的粘附作用,促进了肿瘤的复发与转移。当然,作为细胞膜表面信号转导分子, CD24 能够通过多种作用机制介导肿瘤细胞的增殖、粘附、转移和侵袭。研究进一步发现, CD24 表达与肝癌细胞的干性紧密相关, CD24 可能成为一种新的肝癌干细胞表面标志物。

[0006] 由此可见, CD24 有望成为研究肿瘤发生机制及开发相关诊断试剂的新靶标。

发明内容

[0007] 本发明目的一在于提供一种抗 CD24 单克隆抗体制备方法。

[0008] 本发明目的二在于提供了一种抗 CD24 单克隆抗体。

[0009] 本发明目的三在于提供抗 CD24 单克隆抗体的可变区氨基酸序列。

[0010] 本发明以 CD24 核心区多肽与血蓝蛋白 KLH 偶联物 (CD24-KLH) 作为免疫原,免疫注射 BALB/c 小鼠,取免疫小鼠脾脏细胞并将其与骨髓瘤细胞融合,获得了可表达抗 CD24 抗体的杂交瘤细胞株,此细胞株可用于制备抗 CD24 单克隆抗体。

[0011] 本发明克隆的抗体重链、轻链可变区氨基酸序列及其高变区如有 SEQ ID No. 1 ~ 16 所示。

[0012] 本发明的单克隆抗体可与 CD24 特异性结合。

附图说明

[0013] 图 1 为 SDS-PAGE 检测 Protein G 亲和层析柱纯化产物结果。泳道 M 为标准分子量蛋白;泳道 1 为腹水样品;泳道 2 为上样收集液;泳道 3 为 20mM 磷酸钠缓冲液洗柱收集液;泳道 4 ~ 6 为 100mM 甘氨酸缓冲液 (pH3.5) 洗脱收集液(每分钟收集 1 ml,共收集 3ml),

泳道 7 ~ 10 为 100mM 甘氨酸缓冲液 (pH2.7) 洗脱收集液 (每分钟收集 1ml, 共收集 4ml)。

[0014] 图 2 为 Western Blot 鉴定纯化后抗体与 CD24 之间相互作用。泳道 M 为标准分子量蛋白;泳道 1 市售 CD24-Fc (购自北京义翘神州);泳道 2 为市售 Fc (购自北京义翘神州)。

[0015] 图 3 为 PCR 扩增抗体重链可变区基因琼脂糖电泳结果。泳道 M 为标准分子量 DNA;泳道 1 为 PCR 扩增抗体重链可变区基因产物;泳道 2 为 PCR 扩增抗体轻链可变区基因产物。

[0016] 图 4 为竞争性 ELISA 测定单克隆抗体 G7、A7、E4、G5、B4 亲和力。

具体实施方式

[0017] 实施例 1 抗 CD24 单克隆抗体杂交瘤细胞的制备

[0018] 1. 免疫原

[0019] CD24 核心区由 33 个氨基酸残基组成,其分子量约为 3.2kD,免疫原性较弱。本发明将抗原肽 CD24 与血蓝蛋白 KLH 偶联,以偶联物 CD24-KLH 作为免疫原,增强了 CD24 核心区多肽的免疫原性。本发明所用 CD24-KLH 由生工生物(上海)有限公司合成,纯度 > 90%。

[0020] 2. 免疫动物

[0021] 本发明所用免疫动物为 BALB/c 小鼠,为 SPF 级别,由扬州大学比较医学院提供。免疫佐剂为 QuickAntibody,购自北京康碧泉公司。免疫流程参照 QuickAntibody 说明书进行,具体如表 1 所示。

[0022] 表 1. 免疫途径与周期

	方法	途径	剂量 (μg)	佐剂 (μl)	时间间隔 (w)
	首次免疫	肌肉注射	50	50	0
[0023]	加强免疫	肌肉注射	50	50	3
	冲击免疫	肌肉注射	20	20	2

[0024] 3. 细胞融合

[0025] 1) 细胞准备

[0026] A. 饲养层细胞

[0027] 于融合前一天取 ICR 小鼠 (SPF 级,购自扬州大学比较医学院) 腹腔巨噬细胞,重悬于 HAT 培养液 (购自 GIBCO 公司,含有黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶脱氧核苷)。接种于 96 孔板,置 37°C,5% CO₂ 培养箱中培养 24h。

[0028] B. 骨髓瘤细胞

[0029] 小鼠骨髓瘤细胞株 SP20-Ag14 (本实验室保存) 不合成和分泌任何一种小鼠免疫球蛋白重链和轻链,此细胞对 8-氮杂鸟嘌呤具有抗性,而在 HAT 选择性培养基不能生长。融合前一个星期,用普通的 DMEM 完全培养基 (含 15% FBS,购自 GIBCO 公司) 分瓶培养杂交瘤细胞,以使细胞能生长良好。每一个融合准备 250ml 生长密度为 2×10^6 cells/ml 处于对数生长中期的健康细胞。

[0030] C. 免疫小鼠脾脏细胞

[0031] 处死免疫的小鼠,用酒精浸润后取出脾脏。预先准备好 10cm² 无菌培养皿,放入细

胞筛网,并加入 10ml 无血清 DMEM 培养基。把脾脏置于细胞筛网上,并用无菌手术剪将脾脏剪成碎片。注射器内芯挤压研磨脾脏后,用 5 ml DMEM 不完全培养基冲洗,使细胞通过筛网进入 50ml 离心管中。收集脾脏细胞悬液,用于融合。

[0032] 2) 融合

[0033] A. 准备 20ml 无血清的 DMEM 培养基和 1ml PEG1450(购自 Sigma 公司)放于 37℃ 保温。

[0034] B. 收集骨髓瘤细胞及脾脏细胞,常温下 1500rpm 离心 5min,用无血清培养基洗两次,然后将其悬浮于 10ml 无血清培养基中。将 5×10^8 脾细胞和 1×10^8 骨髓瘤细胞充分混合,1500rpm 离心 5min,弃上清。轻轻敲击管子底部使细胞松散。

[0035] C. 取出在 37℃ 预热的培养基和 PEG,把细胞置于 37℃ 水浴中,1min 内匀速缓慢逐滴加 1ml PEG,加完后及时用无血清的培养基终止。离心弃上清并用 50ml HAT 培养液重悬细胞,轻轻混匀。

[0036] D. 将细胞加入 5 块已铺有滋养细胞的 96 孔板中,每孔 $100 \mu\text{l}$ 。置 37℃,5% CO_2 培养箱中培养 4 天。根据细胞生长状态,在筛选前用 HAT 培养液半换液 1~3 次,避免孔内培养基变黄。

[0037] E. 融合后 7 天后,改用含有 HT 培养液全换液。24h 后,吸取细胞培养上清,间接 ELISA 检测筛选阳性克隆。

[0038] 3) 杂交瘤的单克隆化

[0039] 挑选阳性值较高的克隆孔,采用有限稀释法将孔中的细胞分别稀释至每毫升含 5、10 和 50 个细胞,然后接种于 96 孔板中,每孔接种 $100 \mu\text{l}$ 。37℃、5% CO_2 湿润培养 7~10 天,出现肉眼可见的克隆即可检测细胞培养上清。在倒置显微镜下观察,标出只有单个克隆生长的孔,取上清作抗体检测。取抗体检测阳性孔的细胞扩大培养,并冻存。

[0040] 实施例 2CD24 特异性抗体的制备和纯化

[0041] 1. 腹水收集

[0042] 提前一周用 0.5ml 石蜡油(购自 Sigma 公司)注射小鼠腹腔。致敏一周后,将生长旺盛的杂交瘤细胞离心弃去培养基,用 PBS 或者不完全培养基重悬,调整细胞浓度至 2×10^6 cells/ml,注射 0.5ml 细胞悬液至小鼠腹腔中。7~10 天后小鼠腹腔明显肿大,此时采集腹水。4℃,5000g 离心 20min,去除腹水中细胞碎片与油脂,然后加入等体积甘油保存于 -20℃。

[0043] 2. CD24 特异性抗体的纯化

[0044] 采用 Protein G 亲和层析柱纯化抗体。具体步骤如下:A. 用 10 倍柱体积水清洗 ProteinG 亲和层析柱。B. 用 10 倍柱体积 20mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 冲洗 ProteinG 亲和层析柱。C. 将所需纯化样品泵入层析柱。D. 用 100mM 甘氨酸缓冲液 (pH3.5, pH2.7) 洗脱,收集洗脱峰;并用 1M Tris 缓冲液 (pH9.0) 中和收集物。E. 10mM pH7.2 缓冲液透析脱盐。F. 用 SDS-PAGE 电泳初步鉴定抗体,图 1 结果显示 50kD 及 25kD 处出现目的条带。

[0045] 3. CD24 特异性抗体的特征分析

[0046] 1) 免疫球蛋白亚型鉴定

[0047] 采用武汉三鹰生物技术有限公司的小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒,鉴定细胞株 G7、A7、E4、G5、B4 分泌抗体亚型,结果为:此 5 株细胞株分泌的免疫球蛋白重链亚型均为

IgG1,轻链亚型均为 Kappa。

[0048] 2)Western Blot 鉴定单克隆抗体的特异性

[0049] 以纯化抗体作为一抗,鉴定其与CD24的反应,图2显示所得抗体可与市售CD24-Fc融合蛋白中CD24部分特异性结合。

[0050] 3) 竞争性 ELISA 测定抗体亲和力

[0051] 根据 Friguet 等测定亲和力的方法,设计抗原竞争结合抗体实验测定亲和常数,固定抗体浓度为 $10\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$,改变抗原浓度形成一系列反应系统。7个不同浓度的 $50\ \mu\text{L}$ 抗原 ($0, 1.95 \times 10^{-11}, 3.91 \times 10^{-11}, 7.81 \times 10^{-11}, 1.56 \times 10^{-10}, 3.13 \times 10^{-10}, 6.25 \times 10^{-10}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别与 $50\ \mu\text{L}$ 单克隆抗体 G7、A7、E4、G5、B4 混合, 4°C 过夜反应。将 CD24 多肽溶解在 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸缓冲液 (pH9.6) 中,终质量浓度为 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,加到 96 孔板中,每孔 $100\ \mu\text{L}$, 4°C 包被 15h。5%脱脂奶粉封闭 2h。分别加入过夜反应的反应液, 37°C 孵育 90min, PBST 和 PBS 分别洗 3 次。加入 1 : 5000 稀释 HRP 标记的山羊抗鼠抗体。TMB 显色液显色,每孔加入 $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ $50\ \mu\text{L}$ 终止反应,采用双波长法于酶标仪上读取数据,各单克隆抗体“ $A_{450\text{nm}}-A_{630\text{nm}}$ ”值。抗原初始浓度为 a_0 ,抗体初始浓度为 b_0 , A_0 和 A_i 分别为初始抗体和结合抗原的抗体的吸收度值。 $B = (A_0 - A_i) / A_0$, B 为抗体结合率。 $K_D = (1 - B)(a_0 - b_0 B) / B$ 。测出每个反应系统的 B 值,以 $B / (1 - B)$ 为横坐标, $(a_0 - b_0 * B)$ 为纵坐标作图 (图 4),斜率就是亲和力常数 K_D 。根据线性回归结果,单克隆抗体 G7、A7、E4、G5、B4 亲和力分别为 0.8nM 、 0.72nM 、 0.84nM 、 0.82nM 、 0.76nM 。

[0052] 实施例 3 杂交瘤细胞株 G7、A7、E4、G5、B4 重轻链可变区基因的克隆

[0053] 1. 抗 CD24 单抗重轻链可变区基因提取、扩增及初步鉴定

[0054] 1) 提取总 RNA

[0055] 收集对数期杂交瘤细胞,用 RNA 提取试剂盒 (购自生工生物) 提取总 RNA,溶于 $20 \sim 50\ \mu\text{L}$ 无 RNA 酶水, -70°C 保存。

[0056] 2) RT-PCR 合成 cDNA 第一链

[0057] 以总 RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链,试剂盒购自生工生物公司,反应按产品说明书进行。

[0058] 3) PCR 扩增轻重链可变区基因

[0059] 聚合酶为 PrimerSTAR 高保真聚合酶。所用引物为文献中根据杂交瘤细胞株抗体轻重链可变区上游及下游基因序列所设计的简并引物,其中轻链 VL F (上游引物) 和 VL B (下游引物) 以及重链 VH F1、VH F2 和 VHB 两对引物序列为:

[0060] VL F:gg gag ctc gay att gtg mts acm car wet me a ;

[0061] VL B:ggt gca tgc gga tac agt tgg tgc agc atc ;

[0062] VH F1:ctt ccg gaa ttc sar gtn mag ctg sag tc

[0063] VH F2:ctt ccg gaa ttc sar gtn mag ctg sag tew gg

[0064] VH B:gga aga tct ata gac aga tgg ggg tgt cgt ttt ggc

[0065] (简并密码子说明:r = a, g ; y = c, t ; m = a, c ; s = c, g ; w = a, t)

[0066] 反应体积 $50\ \mu\text{L}$,反应条件为: 94°C 5min ; 94°C 30s, 58°C 1min, 72°C 1min,循环 30 次 ; 72°C 10min。取 $5\ \mu\text{L}$ 终产物在 100g/L 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。图 3 显示,PCR 扩增获得 380bp 左右轻重链基因。用胶回收试剂盒 (购自生工生物) 对 PCR 产物进行纯化。

[0067] 4) 胶回收 DNA 产物 3' 端加腺嘌呤 (A)

[0068] 取 1 μ l (5U/ μ l) rTaq 酶, 4 μ l dNTP, 5 μ l 10 \times PCR buffer 和 40 μ l 纯化电泳产物, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 10min, 70 $^{\circ}$ C 作用 40min, 4 $^{\circ}$ C, 10min。

[0069] 5) PCR 产物连接至 T 载体

[0070] 取 4.5 μ l PCR 产物, 0.5 μ l pMD18-T 载体, 5 μ l ligation buffer solution I, 16 $^{\circ}$ C 连接 4h。

[0071] 6) 连接产物的转化与初步鉴定

[0072] 采用 CaCl₂ 转化法将连接产物转化至感受态 DH5 α 。具体操作如下:

[0073] A. 将 200 μ l 感受态细胞与 10 μ l DNA 轻轻混合, 冰浴 30min。

[0074] B. 在 42 $^{\circ}$ C 循环水浴中放置 90s, 随即将离心管转移至冰浴 3min。

[0075] C. 每管加入 1ml 无抗性的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

[0076] D. 离心 4000rpm, 10min, 并重悬于 300 μ l LB 培养基当中。将 300 μ l 细菌悬液用已无菌处理的玻璃涂菌棒, 均匀涂布于 Amp⁺(100 μ g/ml) 抗性琼脂板上。

[0077] E. 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养 12h 后, 观察结果。

[0078] F. 挑取克隆, 加入 Amp⁺(100 μ g/ml) LB 培养基当中振荡过夜。

[0079] G. 取 1 μ l 菌液作为模板, 同原 PCR 步骤进行菌落 PCR 验证。选取阳性克隆, 送由生工生物测序。

[0080] 2. 抗 CD24 单克隆抗体轻重链可变区基因测序及分析

[0081] 测序结果显示, 成功获得五株杂交瘤细胞株抗体可变区基因。利用 IMGT-VQUEST 数据库 (<http://www.imgt.org/>) 分析抗 CD24 单克隆抗体轻重链可变区基因, 分析结果表明: A7 杂交瘤细胞株抗体重轻链可变区氨基酸序列及其高变区序列如 SEQ ID No. 1 ~ 8 所示; G7 杂交瘤细胞株抗体重轻链可变区氨基酸序列及其高变区序列如 SEQ ID No. 9 ~ 16 所示; E4 杂交瘤细胞株抗体重轻链可变区氨基酸序列及其高变区序列如 SEQ ID No. 17 ~ 24 所示; G5 杂交瘤细胞株抗体重轻链可变区氨基酸序列及其高变区序列如 SEQ ID No. 25 ~ 32 所示; B4 杂交瘤细胞株抗体重轻链可变区氨基酸序列及其高变区序列如 SEQ ID No. 33 ~ 40 所示。

[0001]

序列表

<110> 中国药科大学

<120> 抗 CD24 单克隆抗体、其可变区序列及其应用

<130> 1660912A

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(113)

<223> VH1

<400> 1

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

[0002]

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50

55

60

Arg Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Tyr Glu Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH1CDR1

<400> 2

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp

1

5

<210> 3

<211> 8

[0003]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH1CDR2

<400> 3

Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile

1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(6)

<223> VH1CDR3

<400> 4

Ala Arg Gln Gly Asp Tyr

1 5

<210> 5

<211> 112

<212> PRT

[0004]

<213> 人工序列

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(112)

<223> VL1

<400> 5

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(11)

<223> VL1CDR1

<400> 6

Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(3)

<223> VL1CDR2

<400> 7

Leu Val Ser

1

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(9)

<223> VL1CDR3

<400> 8

Trp Gln Gly Ala His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(113)

<223> VH2

<400> 9

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Phe Asp Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

[0007]

Arg Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Tyr Glu Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gln Gly Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH2CDR1

<400> 10

Gly Phe Phe Asp Ser Arg Tyr Trp

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0008]

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH2CDR2

<400> 11

Ile Asn Asn Asp Ser Ser Thr Ile

1 5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(6)

<223> VH2CDR3

<400> 12

Ala Arg Gln Gly Asn Tyr

1 5

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0009]

<221> V_region

<222> (1)..(112)

<223> VL2

<400> 13

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu His Leu Ser

 20 25 30

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

 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105 110

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(11)

[0010]

<223> VL2CDR1

<400> 14

Gln Ser Leu His Leu Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(3)

<223> VL2CDR2

<400> 15

Leu Val Ser

1

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(9)

[0011]

<223> VL2CDR3

<400> 16

Trp Gln Ser Ala His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(113)

<223> VH3

<400> 17

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Tyr Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

Arg Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

[0012]

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Tyr Glu Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr Cys

85

90

95

Val Arg Gln Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

100

105

110

Ser

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH3CDR1

<400> 18

Gly Pro Asp Phe Ser Arg Tyr Trp

1

5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

[0013]

<222> (1)..(8)

<223> VH3CDR2

<400> 3

Ile Asn Pro Asp Tyr Ser Thr Ile

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(6)

<223> VH3CDR3

<400> 20

Val Arg Gln Gly Asp Tyr

1 5

<210> 21

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(112)

<223> VL3

<400> 21

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Arg Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Val Leu Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0015]

<221> D-segment

<222> (1)..(11)

<223> VL3CDR1

<400> 6

Gln Ser Leu Leu Arg Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1

5

10

<210> 23

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(3)

<223> VL3CDR2

<400> 7

Val Leu Ser

1

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0016]

<221> D-segment

<222> (1)..(9)

<223> VL3CDR3

<400> 24

Ser Gln Gly Ala His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(113)

<223> VH4

<400> 25

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Ala Phe Phe Asp Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Met Pro Asp Tyr Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

[0017]

Arg Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Tyr Glu Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH4CDR1

<400> 26

Ala Phe Phe Asp Ser Arg Tyr Trp

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

[0018]

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH4CDR2

<400> 27

Ile Met Pro Asp Ser Ser Thr Ile

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(6)

<223> VH4CDR3

<400> 28

Ala Arg Gln Gly Asp Tyr

1 5

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0019]

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(112)

<223> VL4

<400> 29

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Val Leu Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0020]

<221> D-segment

<222> (1)..(11)

<223> VL4CDR1

<400> 30

Gln Ser Val Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 31

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(3)

<223> VL4CDR2

<400> 31

Val Leu Ser

1

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0021]

<221> D-segment

<222> (1)..(9)

<223> VL4CDR3

<400> 32

Trp Gln Gly Gly His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(112)

<223> VH5

<400> 33

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Tyr Arg Tyr

20 25 30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Trp Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

[0022]

Arg Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Tyr Glu Asp Thr Ser Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala His Gln Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH5CDR1

<400> 34

Gly Phe Asp Phe Tyr Arg Tyr Ser

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

[0023]

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(8)

<223> VH5CDR2

<400> 35

Ile Asn Pro Asp Trp Ser Thr Ile

1 5

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(6)

<223> VH5CDR3

<400> 36

Ala His Gln Gly Asp Tyr

1 5

<210> 37

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0024]

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(112)

<223> VL5

<400> 37

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Glu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ala Val Ala Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

[0025]

<222> (1)..(11)

<223> VL5CDR1

<400> 38

Gln Asn Glu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr

1 5 10

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(3)

<223> VL5CDR2

<400> 39

Ala Val Ala

1

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0026]

<220>

<221> D-segment

<222> (1)..(9)

<223> VL5CDR3

<400> 40

Trp Gln Leu Leu His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 41

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Ser Glu Thr Thr Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ser Ser Gln Ser Thr Ser

1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Pro Asn Pro Thr Asn Ala Thr Thr Lys Ala Ala

 20 25 30

Gly

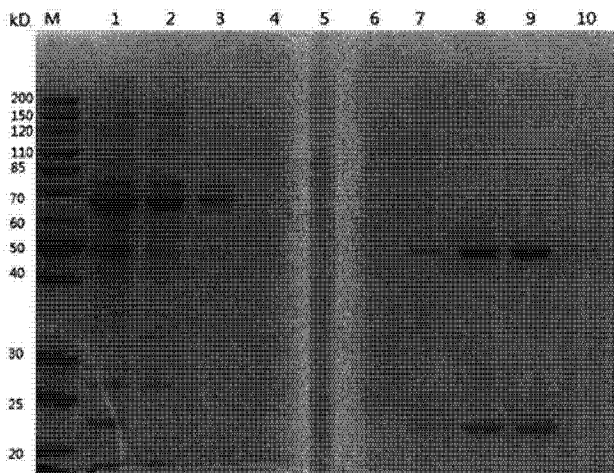


图 1

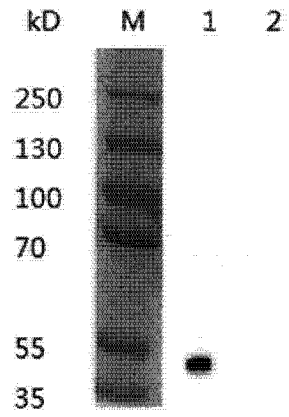


图 2

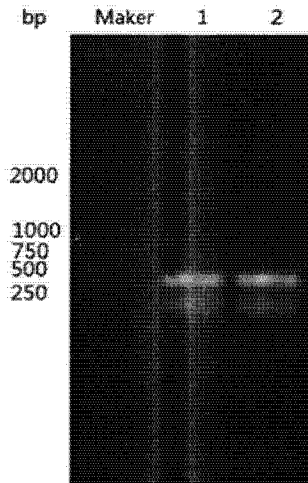


图 3

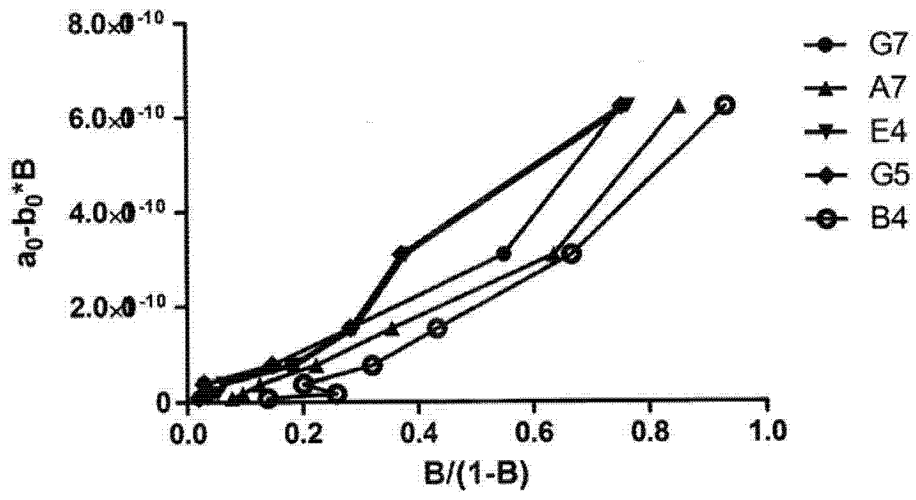


图 4