



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105732809 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(21)申请号 201511030295.8

A61K 39/395(2006.01)

(22)申请日 2015.12.30

A61P 35/00(2006.01)

(66)本国优先权数据

A61P 9/10(2006.01)

201410855430.1 2014.12.31 CN

(71)申请人 广东众生药业股份有限公司

地址 523320 广东省东莞市石龙镇西湖工
业区信息产业园广东众生药业股份有
限公司

(72)发明人 杨金亮 姚于勤 陈小新 龙超峰

(74)专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通
合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51)Int.Cl.

C07K 16/22(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

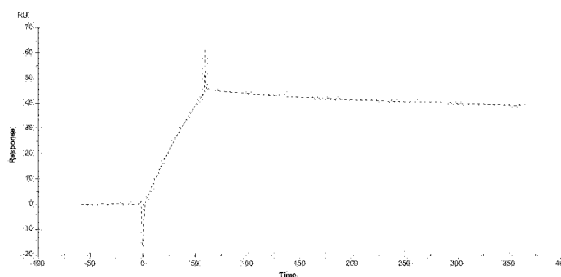
权利要求书1页 说明书6页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

抗血小板衍生因子的抗体

(57)摘要

本发明专利涉及免疫学领域。要解决的技术问题是提供一种抗血小板衍生因子的抗体。技术方案为：该抗体包括a)重链可变结构域，其包括与选定抗体的重链CDR区基本上相同的CDR区和b)轻链可变结构域，其包括与选定抗体的轻链CDR区基本上相同的CDR区。此抗体可用于诊断和治疗治疗肿瘤、视网膜疾病和纤维化疾病的药物，具有很好的应用前景。



1. 抗血小板衍生因子抗体,其特征在于该抗体包括:重链可变结构域,其包括与选定抗体的重链CDR区基本上相同的CDR区。

2. 根据权利要求1所述的抗血小板衍生因子抗体,其特征在于该抗体包括轻链可变结构域,其包括与选定抗体的轻链CDR区基本上相同的CDR区。

3. 根据权利要求1所述的抗血小板衍生因子抗体,其特征在于所述的重链可变结构域的氨基酸序列为:

DVQLQESGPELVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWIMGYISYDGNPNYNSLKNRISITRD
TSKNQFFLKLISVTTEDTATYYCANDYDALAWFASWGQGLVTVSA。

4. 根据权利要求2所述的抗血小板衍生因子抗体,其特征在于所述的轻链可变结构域的氨基酸序列为:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVDFSGSGGT
DFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK。

5. 编码权利要求1~4任一项所述的抗血小板衍生因子抗体的基因。

6. 含有权利要求5所述基因的载体。

7. 根据权利要求6所述的载体,其特征为,所述的载体为表达载体。

8. 含有权利要求6或7所述载体的宿主细胞。

9. 根据权利要求1~4任一项所述的抗血小板衍生因子抗体、权利要求5所述的基因、权利要求6或7所述的载体或者权利要求8所述的宿主细胞在制备治疗肿瘤、视网膜疾病和纤维化疾病的药物中的用途。

10. 根据权利要求1-4任一项所述的抗血小板衍生因子抗体、权利要求5所述的基因、权利要求6或7所述的载体或者权利要求8所述的宿主细胞在制备诊断肿瘤、视网膜疾病和纤维化疾病的诊断试剂中的用途。

抗血小板衍生因子的抗体

技术领域

[0001] 本发明属于抗体制备领域,具体涉及抗血小板衍生因子的抗体及其用途。

背景技术

[0002] 血小板衍生因子(platelet-derived growth factor,PDGF)自1970年被报道以来,现已发现其4个亚型:PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C和PDGF-D;其中,PDGF-A和PDGF-B是以其活性形式被分泌出来,而PDGF-C和PDGF-D是以非活性形式分泌需激活;PDGF要同源二聚化或异源二聚化形成二聚体才能与其受体PDGFR结合发挥促进成纤维细胞、平滑肌细胞等多种组织细胞的分裂、增殖、迁移、合成并分泌细胞外基质、增加细胞黏附力等生理功能。目前报道的PDGF的二聚体形式有PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC和PDGF-DD。单核/巨噬细胞是合成PDGF的主要细胞,血管内皮细胞在细胞因子刺激下也分泌PDGF。在生理状态下,PDGF以 α 颗粒的形式储存于血小板中,肝脏受损时,巨噬细胞、血小板、浸润的炎细胞、受损的内皮细胞及激活的肝星形细胞均可以分泌PDGF,以自分泌、旁分泌的方式发挥作用。PDGF的氨基酸序列为SEQ ID No.5所示。

[0003] PDGF的受体(PDGFR)是典型的酪氨酸激酶受体,多表达于平滑肌细胞、周细胞、纤维母细胞、神经胶质细胞和肿瘤细胞等。它包括两类:PDGFR α 和PDGFR β ;其中PDGFR α 的配体是PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB和PDGF-CC,它的异常激活与许多疾病密切相关,如神经损伤、肿瘤、视网膜疾病、纤维化疾病、皮肤创伤等;而PDGFR β 却对PDGF-BB、PDGF-AB和PDGF-DD的亲合力较高,它的异常激活与肿瘤和视网膜新生血管生成关系密切。PDGFR是一种跨膜糖蛋白,具有酪氨酸蛋白激酶活性,由细胞外N端与PDGF特异识别的结构域、单链顺序跨膜的中间疏水结构域和细胞内C端具有酪氨酸蛋白激酶活性的肽段结构域组成。当受体与其配体结合后促使两个受体分子形成二聚体,激活细胞内结构域酪氨酸残基自身磷酸化,或促使激活特殊靶蛋白的酪氨酸残基磷酸化,从而将信号传入细胞内,经级联式放大瀑布效应调控细胞的生命活动,包括靶细胞的分裂增殖,其下游信号通路等。PDGF/PDGFR信号的下游通路大多参与肿瘤的发生与发展,尤其在肿瘤新生血管生成,肿瘤迁移等方面,故被视为致癌基因^[1]。在新生血管形成过程中,血管内皮细胞中的端细胞分泌的PDGF主要作用于周细胞使周细胞表面的PDGFR,有PDGF/PDGFR介导的信号通路使周细胞快速增值并促使周细胞粘附于新血管内皮细胞上,起到保护和稳定新生血管的作用,。抗PDGF-BB抗体能有效的阻止PDGF-BB与PDGFR的信号通路,在治疗肿瘤、视网膜疾病和纤维化疾病等方面具有重要意义。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是提供一种抗血小板衍生因子抗体。

[0005] 该抗血小板衍生因子抗体包括:重链可变结构域。

[0006] 进一步的,上述重链可变结构域的氨基酸序列为(SEQ ID No.2):

[0007]

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWWMGYISYDGNNDYNP SLKNRISITRDTSKN

QFFLKLISVTTEDTATYYCANDYDALAWFASWGQGLVTVSA。

[0008] 其中,该抗血小板衍生因子抗体还包括:轻链可变结构域。

[0009] 进一步的,上述的轻链可变结构域的氨基酸序列为(SEQ ID No.4):

[0010]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK。

[0011] 本发明还提供了编码上述的抗血小板衍生因子抗体的基因。

[0012] 本发明还提供了含有上述基因的载体。所述的载体可为表达载体。可以使用常见的质粒载体或者病毒载体。

[0013] 本发明还提供了含有上述载体的宿主细胞。

[0014] 此外,本发明,还提供了上述的抗血小板衍生因子抗体、载体、宿主细胞等在制备治疗肿瘤、视网膜疾病和纤维化疾病的药物中的用途。

[0015] 本发明专利通过杂交瘤技术,制备获得了1种抗PDGF-BB的抗体,该抗体通过Biocore亲和力检测,该抗体的 $K_d=8.305 \times 10^{-4} S^{-1}$, $KD=1.79 \times 10^{-11} M$ 。通过体外抗PDGFR受体阳性细胞人脑静脉微血管细胞(HBVP)增殖实验证实,该抗体的ED50值在0.1-1微摩尔之间。通过基因测序,我们确定了抗PDGF-BB中和性抗体的重链可变区和轻链可变区基因序列以及该抗体的序列。此抗体可用于诊断和治疗治疗肿瘤、视网膜疾病和纤维化疾病的药物,具有很好的应用前景。

附图说明

[0016] 图1.Biocore亲和力检测。

[0017] 图2.抗HBVP增殖能力检测

具体实施方式

[0018] 本发明设计并构建了一种抗PDGF-BB抗体,其具有足够的靶向性。可以提高药物的利用效率和治疗效果。

[0019] 人体内的天然抗体是由重链和轻链组成,其中重链可变区和轻链可变区结构对于抗原的结合特别重要。本发明鉴定得到了该抗体的重链可变区(SEQ ID No.2)和轻链可变区(SEQ ID No.4)的序列。显然,以目前的技术水平,本领域技术人员在知晓上述的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列之后,已经很容易采用基因工程等常规的技术手段来制备得到本发明的抗体。

[0020] 该抗血小板衍生因子抗体包括:重链可变结构域,其包括与选定抗体的重链CDR区基本上相同的CDR区。

[0021] 进一步的,上述重链可变结构域的氨基酸序列为(SEQ ID No.2):

[0022]

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGNNDYNSPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLISVTTEDTATYYCANDYDALAWFASWGQGLVTVSA。

[0023] 其中,该抗血小板衍生因子抗体还包括:轻链可变结构域,其包括与选定抗体的轻链CDR区基本上相同的CDR区。

[0024] 进一步的,上述轻链可变区结构域的氨基酸序列为(SEQ ID No.4):

[0025]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTL
NIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK。

[0026] 本发明的抗PDGF-BB抗体可以与其他蛋白进一步融合,以达到其他额外的作用。

[0027] 比如本发明的抗PDGF-BB抗体可以与其他抗肿瘤抗体或毒素分子融合,从而更好地发挥其抗肿瘤的作用。

[0028] 本发明的抗体也可以与荧光分子连接,所形成的抗体可以诊断肿瘤、视网膜疾病和其他纤维化疾病。

[0029] 本发明描述的抗体可通过常规杂交瘤细胞分泌获得,也可以通过常规的基因重组技术所构建,具体实验步骤如《分子克隆》第三版(Joseph Sambrook,科学出版社)及类似的实验手册所记载。

[0030] 本发明的抗体可以按照药剂学常规技术制备成各种形式的药物制剂,较优选的是注射剂,最优选的是冷冻干燥注射剂。

[0031] 本发明的抗体可以与其他药物形成药物组合物,所述组合物可以和其他治疗方法一起治疗疾病,所述其他治疗方法包括化学疗法、放射疗法、生物疗法。

[0032] 以下实例对本发明所涉及的抗体的构建、试验和应用作了详细说明。但是本发明的内容和用途并不仅限于实例的范畴。

[0033] 实例一:通过杂交瘤技术制备抗PDGF-BB抗体及序列鉴定

[0034] 1、动物免疫

[0035] 选择与所用骨髓瘤细胞同源的Ba1b/c健康雌性小鼠,鼠龄在8~12周。初次免疫用10 μ g的PDGF-BB蛋白加100 μ l的QuickAntibody系列免疫佐剂,充分混匀佐剂。通过后腿小腿肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠注射100 μ l。第21天按同样方式加强免疫一针。第35天采微量尾血进行ELISA测定,抗体滴度应在1:10000~1:100000000范围内,随后通过静脉注射10 μ gPDGF-BB经行抗原冲击免疫。

[0036] 2、饲养细胞制备

[0037] 将Ba1b/c小鼠拉颈脱臼处死,浸泡于75%酒精5分钟,随即放入超净工作台内,腹部朝上放于平皿内或固定于解剖板上。用眼科镊子夹起小鼠腹部皮肤,用剪刀剪一小口,注意切勿剪破腹膜,以免腹腔液外流。然后用剪刀向上下两侧做钝性分离,充分暴露腹膜。用酒精棉球擦拭腹膜消毒。用注射器吸取5ml RPMI1640基础培养液,注入小鼠腹腔,注射器停留不动,晃动小鼠或反复抽吸几次。用原注射器抽回腹腔内液体,注入离心管。如此反复操作3~4次。1000rpm离心10min,弃上清。用20~50ml完全培养液重悬细胞,100 μ l/孔滴加到培养板,置培养箱备用。观察饲养细胞的生长状态,一般生长良好的饲养细胞和巨嗜细胞呈梭形或多角形、细胞透亮、折光性强。

[0038] 3、细胞融合

[0039] 脾细胞制备:取加强免疫小鼠一只,眼眶采血后脱臼处死,在75%酒精中消毒后取脾脏,去除结缔组织,制备脾细胞悬液,转移到50ml离心管中,加RPMI1640至30ml,1500~2000rpm离心5分钟,弃上清,加RPMI1640至30ml,白细胞稀释液稀释20倍,计数,取1 \times 10⁸个细胞待用。

[0040] 骨髓瘤细胞制备:取3瓶生长状态良好的(活细胞数>95%)骨髓瘤细胞,将之完全吹下,转移到50ml离心管中,加RPMI1640至30ml,1500~2000rpm离心5分钟,弃上清,加RPMI-1640至30ml,RPMI1640稀释10倍,计数,取 2×10^7 个细胞待用。

[0041] 细胞混合:脾细胞:骨髓瘤=5:1,混合,1500~2000rpm离心5分钟。

[0042] 细胞融合:将离心上清倒干,把沉淀细胞块弹成糊状,置37℃水浴,在1分钟内加入1ml融合剂,并搅拌细胞,37℃水浴放置45秒,在1分钟内加入1ml的1640并搅拌细胞,2分钟内加入5ml的1640并搅拌细胞终止融合剂的融合作用,2分钟内加入10ml的1640并搅拌细胞500rpm离心7分钟,弃上清。2分钟内加入10ml的1640并搅拌细胞

[0043] 细胞培养:轻轻将细胞弹匀,缓缓加入HAT培养液至所需体积,将细胞重悬,轻轻地将之混匀,加到预先准备好的饲养细胞板中。10ml吸管滴加1滴(配8ml/板),排枪滴加80~100微升(配10ml/板),37℃,CO₂培养箱培养、观察。

[0044] 细胞培养、换液:细胞融合后第一天开始,对细胞进行仔细观察,记录好细胞的生长状态、每孔杂交细胞瘤个数、块数、培养液有无污染、饲养细胞的状况。培养3~5天HAT培养液换液一次,10天换HT培养液培养至20天,换1640完全培养液。

[0045] 4、克隆化培养

[0046] 经检测的杂交细胞虽然分泌抗体,但它可能是一个杂交细胞,也可能是多个杂交细胞的后代所分泌的抗体,因此必须进行克隆化培养,以获得得一个既有克隆原性又分泌抗体的杂交瘤细胞株。融合早期的杂交细胞很不稳定,易丧失分泌抗体能力,因此尽早克隆化培养(细胞生长约占孔底面积的1/4~1/3)。通常经过2~3次克隆化培养杂交细胞即可稳定下来。为防止杂交细胞变异或污染等情况,在克隆化同时要冻结保存以防失种。

[0047] (1)亚克隆培养基:RPMI1640+20%FBS+双抗+生长因子(1×)

[0048] (2)准备一块有饲养细胞生长的96孔板(2.5×10^4 细胞/0.1ml/孔)。

[0049] (3)将阳性孔杂交细胞计数制成细胞悬液。

[0050] (4)将细胞悬液按倍比法稀释成4组溶液,即每组每毫升含10、5个细胞,以0.1ml/孔加板培养。

[0051] (5)约10天左右选择单克隆孔,检测抗体,如阳性者,再克隆,直至100%孔分泌抗体。此时选择抗体阳性强、细胞生长好的克隆,进行扩大培养,建系,保存。

[0052] 4、Elisa法检测阳性克隆

[0053] 采用常规Elisa法,用10mM 1×PBS配置1μg/ml的PDGF-BB,才用96孔板,每个孔包被体积为50μl,悬空加入并铺满孔底,水平放置,用封板膜封口,4℃放置过夜。用洗涤液将包被过夜的Elisa板清洗3次,用2%的BSA封闭Elisa板。将杂交瘤培养上清加入Elisa检测板中37℃孵育2个小时。洗板3次后加入检测二抗37℃孵育1个小时。洗板3次后加入TMB显色,用酶标仪读取OD值。

[0054] 5、抗体可变区基因序列鉴定

[0055] 收集对数生长期单克隆杂交瘤细胞株,用Trizol裂解细胞,提取单克隆杂交瘤细胞株的mRNA,通过逆转录PCR获得cDNA,再通过常规PCR获得抗体可变区片段,通过基因测序鉴定抗体重链可变区和轻链可变区基因序列。

[0056] 经鉴定,上述重链可变区结构域的氨基酸序列为(SEQ ID No.2):

[0057]

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGNNDYNNPSLKNRISITRDTSKN
QFFLKLISVTTEDTATYYCANDYDALAWFASWGQGLVTVSA。

[0058] 编码此段结构域的核苷酸序列为(SEQ ID No.1):

[0059]

GATGTACAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGCTCTGTCACTGG
CTATTCATCACCAGTGGTTATTACTGGAACCTGGATCCGGCAGTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGCTACA
TAAGCTACGACGGTAATGATAATTACAACCCATCTCTCAAAAATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAAC
CAGTTTTTCTGAAGTTGATTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCTACGTATTACTGTGCGAATGATTACGACGCCCT
GGCCTGGTTTGCTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA。或者,为该序列的简并序列。

[0060] 经鉴定,该抗体的轻链可变区结构域的氨基酸序列为(SEQ ID No.4):

[0061]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTL
NIHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK。

[0062] 编码此段结构域的核苷酸序列为(SEQ ID No.3):

[0063]

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATACAGGGCCAG
CAAAAGTGTGCTAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCA
TCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTC
AACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGCTTACACGTTCCGGAGGG
GGGACCAAGCTGGAAA。或者,为该序列的简并序列。

[0064] 显然,以目前的技术水平,本领域技术人在知晓上述的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列之后,已经很容易采用基因工程等常规的技术手段来制备得到本发明的抗体。

[0065] 实例二:通过小鼠腹水的方法制备杂抗PDGF-BB的抗体

[0066] 1、腹水制备

[0067] 选取健康8~12周龄同源Ba1b/c小鼠三只。用1ml注射器腹腔注射不完全福氏佐剂,0.2~0.3ml/只。3天后可以腹腔注射鼠杂交瘤细胞制备腹水。收集对数生长期的抗PDGF-BB阳性单克隆鼠杂交瘤细胞 10^7 个。按照动物接种细胞要求,用无血清杂交瘤培养基洗3次。用无血清杂交瘤培养基将细胞配成 $1\sim 3 \times 10^6$ 个细胞/0.3ml的细胞浓度待用。用1ml注射器将制备好的杂交瘤细胞悬液注射入小鼠腹腔内 $1\sim 3 \times 10^6$ 个细胞/0.3ml/只小鼠。8天后,如腹部明显膨大,以手触摸时,皮肤有紧张感,即可用16号针头采集腹水。将腹水离心(13000rpm 4摄氏度离心5min),吸去最上层的脂肪组织,除去细胞成分和其他的沉淀物,收集上清。

[0068] 2、从腹水中纯化抗PDGF-BB抗体

[0069] 将初处理过的小鼠腹水用结合buffer 5倍稀释,将稀释后的样品13000RMP,4摄氏度离心5分钟取上清,将上清用0.22微米的滤膜过滤得滤液待用。将预装柱按规范方法装到AKTA系统上。用超纯水以1ml/min的流速洗10个柱体积(10ml),用结合buffer(20mM sodium phosphate,pH 7.0)洗10个柱体积(平衡),以1ml/min的流速将溶解在结合buffer中的腹水

样品流过预装柱(上样)。用结合buffer已1ml/min的流速冲洗挂有IgG的柱子,直至在280nm没有蛋白流出。用洗脱buffer(0.1M glycine-HCl,pH 2.7)已1ml/min的流速洗脱柱子。向接目标蛋白的4ml EP管里面300微升中和buffer(1M Tris-HClpH 9.0)每管接2ml流份。用洗脱buffer继续洗脱,直至基线持平。收集目标蛋白样品组。

[0070] 3、抗PDGF-BB抗体的亚型测定

[0071] 抗PDGF-BB抗体的亚型测定采用抗体亚型测定试剂盒(Pierce Rapid Isotyping Kits-Mouse)。实验方法如下:将已知浓度的纯抗体样品用稀释buffer稀释至建议浓度100ng/ml,500 μ l;按照150 μ l/孔将样品稀释液加入对应的轻链/重链检测孔中,10min后记录指示颜色所处位置,抗体重轻链亚型在相应的轻链/重链亚型指示处出现一条深色带。通过检测表明该抗PDGF-BB抗体的亚型是IgG_{2a} κ 。

[0072] 实例三:亲和力测试以及抗HBVP细胞增殖检测抗PDGF-BB抗体的生物活性

[0073] 通过Biocore亲和力检测,结果参见图1,该抗体的Kd=8.305*10⁻⁴S⁻¹,KD=1.79*10⁻¹¹M,表明,该抗体具有很高的亲和力。

[0074] 本发明还通过体外抗PDGFR受体阳性细胞人脑静脉微血管细胞(HBVP)增殖实验测试其生物活性。

[0075] HBVP抗增殖实验设计如下:计数8000个HBVP(15代以内)铺96孔板,用上述制备的抗体以100 μ g/ml依次作4倍浓度梯度稀释与刺激终浓度为50ng/ml的PDGF-BB因子共孵,条件37 $^{\circ}$ C,30min~120min,共孵后加入铺有HBVP细胞的96孔板中,作用48小时后做CCK-8检测抗增殖效果。整个培养体系及抗体因子配制皆用PM基础培养液(science11)。

[0076] 试验结果参见图2,该抗体的ED50值在0.1~1微摩尔之间,结果表明具有很好的抗增殖效果。

SEQUENCE LISTING

<110> 广东众生药业股份有限公司
 <120> 抗血小板衍生因子的抗体
 <130> AI51052K

<150> 201410855430.1
 <151> 2014-12-31

<160> 5
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 重链可变结构域的氨基酸序列

[0001] <400> 1
 gatgtacagc ttcaggagtc aggacctggc ctctgtaaac cttctcagtc tctgtctctc 60
 acctgctctg tcaactggcta ttccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag 120
 tttccaggaa acaaaactgga atggatgggc tacataagct acgaeggtaa tgataattac 180
 aacccatctc tcaaaaatcg aatctecate actctgaca catctaagaa ccagtttttc 240
 ctgaagtiga tttctgtgac tactgaggac acagctacgt attactgtgc gaatgattac 300
 gacgccctgg cctggtttgc ttctggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 上述重链可变区结构域的氨基酸序列
 <400> 2

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Thr
 225 230 235 240
 Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly
 245 250 255
 Ala Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Thr Ala Thr Thr Ala
 260 265 270
 Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ala Gly Cys Thr Thr Ala Cys Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly
 290 295 300
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly
 305 310 315 320
 Gly Ala Ala Ala

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 轻链可变区结构域的氨基酸序列
 <400> 4

[0003]

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
 85 90 95
 Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PDGF 的氨基酸序列
 <400> 5

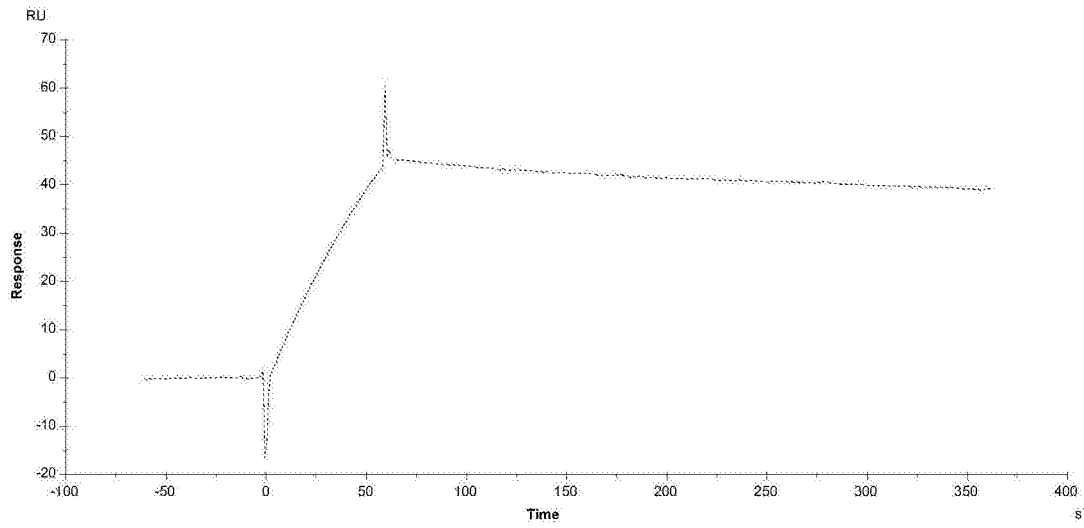


图1

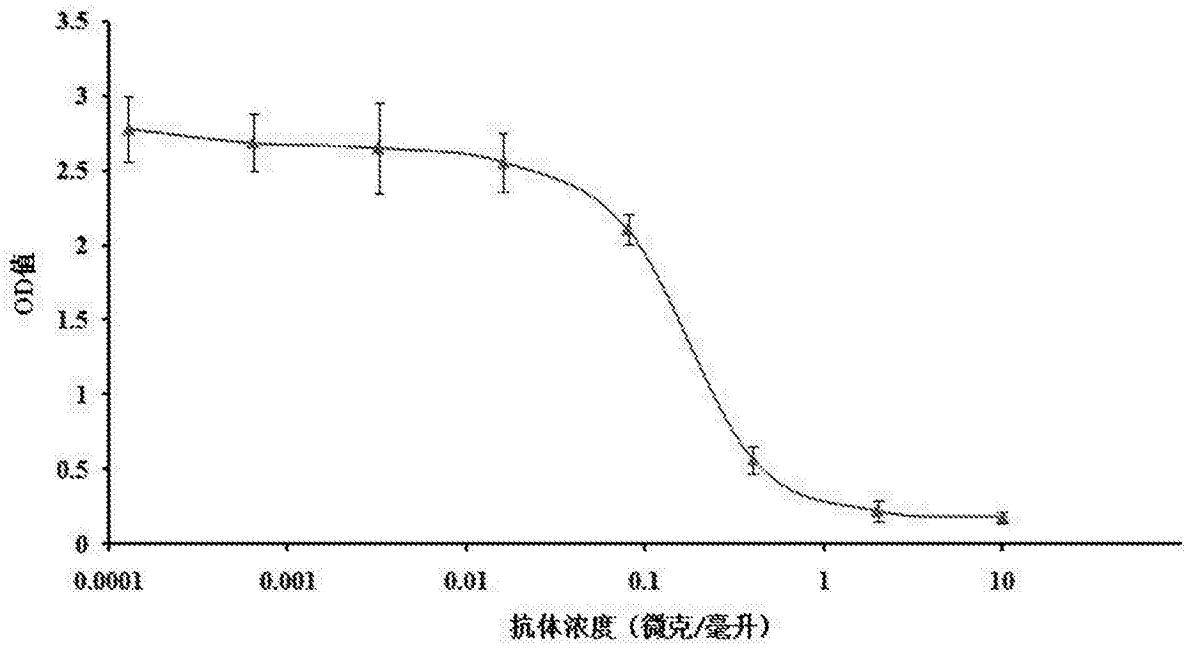


图2