



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111615519 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 11

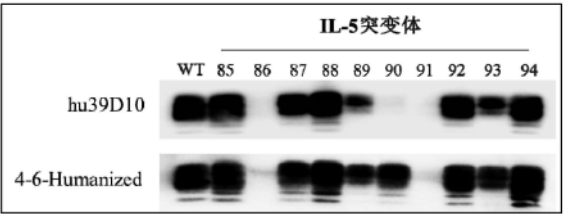
(21) 申请号 201880081391.0
(22) 申请日 2018.11.30
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111615519 A
(43) 申请公布日 2020.09.01
(66) 本国优先权数据
 201711393147.1 2017.12.21 CN
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.06.16
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2018/118534 2018.11.30
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/120060 ZH 2019.06.27
(73) 专利权人 三生国健药业(上海)股份有限公司
 地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)
 自由贸易试验区李冰路399号
(72) 发明人 赵杰 黄浩旻 朱祯平 蒋良丰
(51) Int.Cl.
 C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 103429261 A, 2013.12.04
 US 5683892 A, 1997.11.04
 US 2004265957 A1, 2004.12.30
 WO 9004979 A2, 1990.05.17
 CN 1077991 A, 1993.11.03
 Ji Zhang等.Mapping and
characterization of the epitope(s) of Sch
55700, a humanized mAb, that inhibits
human IL-5.《International Immunology》
.1999,第11卷(第11期),第1935-1943页.
审查员 徐烜

权利要求书1页 说明书12页
序列表9页 附图7页

(54) 发明名称
结合人IL-5的单克隆抗体、其制备方法和用途

(57) 摘要
本发明公开了一种结合人IL-5的单克隆抗体,具有良好的抑制IL-5诱导的TF-1细胞增殖以及阻断IL-5与IL-5RA的相互作用的生物学活性,并且具有与已知的抗人IL-5抗体不同的抗原表位,可应用于制备治疗嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病(例如哮喘)的药物,具有良好的临床应用前景。



1. 一种结合人IL-5的单克隆抗体,其特征在于,所述的结合人IL-5的单克隆抗体包含:
 - (a) 重链,所述重链包含重链互补决定区H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3,所述的H-CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述的H-CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述的H-CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,和
 - (b) 轻链,所述轻链包含轻链互补决定区L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3,所述的L-CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述的L-CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,所述的L-CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。
2. 如权利要求1所述的结合人IL-5的单克隆抗体,其特征在于,所述的结合人IL-5的单克隆抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。
3. 如权利要求1或2所述的结合人IL-5的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的重链包含氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的重链可变区,所述单克隆抗体的轻链包含氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的轻链可变区;或
所述单克隆抗体的重链包含氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示的重链可变区,所述单克隆抗体的轻链包含氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示的轻链可变区。
4. 如权利要求3所述的结合人IL-5的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。
5. 一种分离的核苷酸分子,其特征在于,所述的核苷酸分子编码如权利要求1-4中任一所述结合人IL-5的单克隆抗体。
6. 如权利要求5所述的核苷酸分子,其特征在于,所述的核苷酸分子包含:
如SEQ ID NO:2所示的编码重链可变区的核苷酸序列,
如SEQ ID NO:4所示的编码轻链可变区的核苷酸序列;或
如SEQ ID NO:12所示编码重链可变区的核苷酸序列,
如SEQ ID NO:14所示的编码轻链可变区的核苷酸序列。
7. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体含有如权利要求5或6所述的核苷酸分子。
8. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有如权利要求7所述的表达载体。
9. 如权利要求1-4中任一所述结合人IL-5的单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:
 - (a) 在表达条件下,培养如权利要求8所述的宿主细胞,从而表达所述的结合人IL-5的单克隆抗体;
 - (b) 分离并纯化(a)所述的结合人IL-5的单克隆抗体。
10. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有如权利要求1-4中任一所述结合人IL-5的单克隆抗体和药学上可接受的载体。
11. 如权利要求1-4中任一所述结合人IL-5的单克隆抗体或如权利要求10所述的药物组合物在制备治疗嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病的药物中的用途。
12. 如权利要求11所述的用途,其特征在于,所述嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病包括哮喘、伴随多发性血管炎的肉芽肿病、慢性阻塞性肺病、鼻息肉、过敏性皮炎或高嗜酸性细胞增多综合征。
13. 如权利要求12所述的用途,其特征在于,所述嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病为哮喘。

结合人IL-5的单克隆抗体、其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体领域,更具体地,本发明公开了一种结合人IL-5的单克隆抗体、其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 支气管哮喘(bronchial asthma,简称哮喘)是由多种炎症细胞如肥大细胞和嗜酸粒细胞(E0)等,以及免疫细胞如T淋巴细胞等共同参与的一种以气道慢性炎症为主要特征的呼吸系统疾病。其主要表现为支气管分泌物聚集和淋巴细胞、巨噬细胞及嗜酸性粒细胞渗透等炎症反应。哮喘患者往往表现为气道的高反应性和可逆性气流受限,如反复喘息、胸闷或咳嗽,严重者可伴有呼吸困难症状,并由于呼吸道阻塞(尽管可逆)进而引发非特异性支气管过敏。

[0003] 近年来哮喘的患病率和病死率呈不断上升趋势。据统计,全世界约有3亿人患哮喘,我国估计约有3000万哮喘患者。目前,临床治疗哮喘的基本方法是采用抗炎治疗,包括吸入糖皮质激素、 β_2 受体激动剂、白三烯调节剂、抗胆碱药物、磷酸二酯酶抑制剂、茶碱类药物、抗组胺药及其他抗过敏药物等,但对于重症哮喘患者仍不能有效的控制症状,甚至需要全身应用糖皮质激素治疗,并因此可能产生骨质疏松、感染和生长受限等全身性副作用。因此,寻找哮喘治疗的新靶点,减少激素不敏感型哮喘患者急性发作,改善哮喘症状、缓解肺功能,以及提高哮喘患者的生活质量,已成为临床哮喘治疗的新策略。

[0004] 嗜酸性粒细胞被认为在众多由炎症引发的疾病中起到关键的作用,其中包括哮喘。其中,嗜酸性粒细胞在引发分泌物聚集中起到关键作用。活化的嗜酸性粒细胞数量在慢性哮喘病人的血液、支气管分泌物以及肺腺细胞组织中都大大增加,并与疾病的严重程度成正比。在用类固醇药物进行治疗中发现,病情的缓解与嗜酸性粒细胞数量的减少相关联。

[0005] 白细胞介素-5(IL-5)是一种能形成同源二聚体的糖基化蛋白类细胞因子,主要是由激活的CD4⁺T淋巴细胞产生的。在人体内,嗜酸性粒细胞的生长与分化主要是通过IL-5与在其细胞表面的IL-5受体相互作用来完成的。IL-5有 α (RA)和 β (RB)两个受体亚基,IL-5首先与IL-5RA相结合,但此相互作用并不能介导信号传导,IL-5与IL-5RA结合后,再与IL-5RB结合将提高IL-5与其受体复合物的亲和力并启动信号传导,对于信号传导而言,IL-5RA和IL-5RB两个亚基都是必须的。在动物模型中,IL-5转基因鼠在没有抗原刺激的情况下,其外周血和组织中的嗜酸性粒细胞数量都大大提高。在用鼠和猴的过敏性哮喘模型进行研究中,注射抗IL-5单克隆抗体到动物中能有效抑制嗜酸性粒细胞渗透进入呼吸道,并能遏制支气管过敏反应的发展(参考文献:Hart T K,Cook R M,Ziaamirhosseini P,et al.Preclinical efficacy and safety of mepolizumab(SB-240563),a humanized monoclonal antibody to IL-5,in cynomolgus monkeys[J].The Journal of Allergy and Clinical Immunology,2001,108(2):250-257;Egan R W,Athwal D,Bodmer M W,et al.Effect of Sch 55700,a humanized monoclonal antibody to human interleukin-5,on eosinophilic responses and bronchial hyperreactivity[J]

.Arzneimittelforschung,1999,49(09):779-790.)。在临床上,严重嗜酸性粒细胞增多型哮喘病人对用药的反应和疗效与其外周血中的嗜酸性粒细胞数量呈正相关;嗜酸性粒细胞数量越高的病人,疗效越好。国外同类药临床试验数据表明,在以哮喘恶化率作为主要指标时,与对照组相比,抗IL-5单克隆抗体药物能降低恶化率达50%以上,以及改善肺功能、减少糖皮质激素用量和改善哮喘患者的生活质量(参考文献:Ortega H,Liu M C,Pavord I D,et al.Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma[J].The New England Journal of Medicine,2014,371(13):1198-1207;Bjermer L,Lemiere C,Maspero J F,et al.Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels:A Randomized Phase 3 Study[J].Chest,2016,150(4):789-798.)。

[0006] 目前,GSK的Mepolizumab和TEVA的Reslizumab已获FDA批准上市,用于治疗重症高嗜酸性粒细胞型哮喘。然而,仍亟待开发新型、特异、高效的以IL-5为靶点的药物填补同类药物市场空白,从而能够改善哮喘患者的生活质量,造福患者。

发明内容

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明的发明人进行了大量试验,从抗原免疫、杂交瘤筛选、抗体表达纯化到生物活性鉴定,最终获得一个具有全新CDR序列的抗人IL-5抗体。与已知的抗人IL-5抗体相比,该抗体对于IL-5依赖的细胞增殖的抑制以及IL-5与其受体IL-5RA的阻断具有更高的生物学活性。并且,在抗原结合表位分析上可以看到,本发明的抗人IL-5抗体具有与已知抗人IL-5抗体不同的抗原表位结合位点。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0009] 本发明的第一个方面提供了一种结合人IL-5的单克隆抗体,当与人IL-5结合时,所述的单克隆抗体结合下列残基中的至少一个:SEQ ID NO:1的86C、91R、96F或104L,并且所述的单克隆抗体能够阻断IL-5与IL-5RA的结合作用。

[0010] 优选的,当与人IL-5结合时,所述的单克隆抗体结合下列残基中的至少两个:SEQ ID NO:1的86C、91R、96F或104L。

[0011] 更优选的,当与人IL-5结合时,所述的单克隆抗体结合下列残基中的至少三个:SEQ ID NO:1的86C、91R、96F或104L。

[0012] 最优选的,当与人IL-5结合时,所述的单克隆抗体仅结合下列四个残基:SEQ ID NO:1的86C、91R、96F和104L。

[0013] 本发明的第二个方面提供了一种结合人IL-5的单克隆抗体,所述的结合人IL-5的单克隆抗体包含:(a)重链,所述重链包含重链互补决定区H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3,所述的H-CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示,所述的H-CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述的H-CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示,和(b)轻链,所述轻链包含轻链互补决定区L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3,所述的L-CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述的L-CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示,所述的L-CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0014] 优选的,所述的结合人IL-5的单克隆抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0015] 更优选的,所述结合人IL-5的单克隆抗体的重链包含重链可变区,其氨基酸序列

如SEQ ID NO:3所示,所述轻链包含轻链可变区,其氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0016] 更优选的,所述的结合人IL-5的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。

[0017] 优选的,所述的结合人IL-5的单克隆抗体的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示,轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO:17所示。

[0018] 本发明的第三个方面提供了一种分离的核苷酸分子,所述的核苷酸分子编码如上所述的结合人IL-5的单克隆抗体。

[0019] 优选的,所述的核苷酸分子编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0020] 优选的,所述的核苷酸分子编码重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示,编码轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示。

[0021] 本发明的第四个方面提供了一种表达载体,所述表达载体含有如上所述的核苷酸分子。

[0022] 本发明的第五个方面提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有如上所述的表达载体。

[0023] 本发明的第六个方面提供了如上所述的结合人IL-5的单克隆抗体的制备方法,所述方法包括以下步骤:(a)在表达条件下,培养如上所述的宿主细胞,从而表达所述的结合人IL-5的单克隆抗体;(b)分离并纯化(a)所述的结合人IL-5的单克隆抗体。

[0024] 本发明的第七个方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物含有如上所述的结合人IL-5的单克隆抗体和药学上可接受的载体。

[0025] 本发明的第八个方面提供了如上所述的结合人IL-5的单克隆抗体或如上所述的药物组合物在制备治疗嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病的药物中的用途。

[0026] 优选的,所述嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病包括哮喘、伴随多发性血管炎的肉芽肿病、慢性阻塞性肺病、鼻息肉、过敏性皮炎、高嗜酸性细胞增多综合征等,更优选的,所述嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病为哮喘。

[0027] 有益效果:

[0028] 本发明筛选获得的抗人IL-5单克隆抗体能够特异性与人IL-5结合,与已知的抗人IL-5抗体相比,具有更好的抑制IL-5诱导的TF-1细胞增殖以及阻断IL-5与IL-5RA的相互作用的生物学活性,并且具有与已知的抗人IL-5抗体不同的抗原表位,可应用于制备治疗嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病(例如哮喘)的药物,具有良好的临床应用前景。

附图说明

[0029] 图1为鼠源抗人IL-5单克隆抗体对IL-5抗原的相对亲和力的测定结果图。

[0030] 图2为鼠源抗人IL-5单克隆抗体对IL-5诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的测定结果图。

[0031] 图3为4-6-Humanized和4-6-Chimeric抑制IL-5诱导的TF-1细胞增殖结果图,其中,空白对照为不加入IL-5,但加入无关同型对照抗体,用于确定细胞增殖的下限;阳性对照为加入IL-5的同时也加入无关同型对照抗体,用于确定细胞增殖的上限;所述无关同型对照抗体是指该对照抗体不识别IL-5,但是其恒定区与待测抗体相同。

[0032] 图4为4-6-Humanized和4-6-Chimeric阻断IL-5与其受体的相互作用结果图,其中,对照抗体4-4-Humanized为能够结合IL-5但是不能够阻断IL-5与其受体相互作用的一个抗体。

[0033] 图5为4-6-Humanized的抗原表位分析的ELISA结果图,其中,定义OD450低于0.5表明抗体抗原之间的结合显著变弱,每个数值代表四个复孔的平均值。

[0034] 图6为4-6-Humanized的抗原表位分析的western blot结果图。

[0035] 图7为4-6-Humanized的药代动力学研究结果图。

[0036] 图8为4-6-Humanized的体内药效学研究结果图。

具体实施方式

[0037] 本发明中,术语“单克隆抗体(单抗)”指从一类基本均一的群体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且,与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0038] 本发明中,术语“抗体”和“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。

[0039] 本发明中,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0040] 本发明中,术语“抗人IL-5抗体”、“抗人IL-5单抗”、“抗人IL-5单克隆抗体”或“结合人IL-5的单克隆抗体”是指能够与人IL-5抗原结合的单克隆抗体。优选的,人IL-5抗原具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。进一步的,本发明的抗人IL-5单克隆抗体能够阻断IL-5与IL-5RA的结合作用。

[0041] 本发明中,术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重和轻链可变区序列以及来自另一个物种的恒定区序列的抗体,例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的抗体。

[0042] 本发明中,术语“人源化抗体”是指其CDR来源于非人物种(优选小鼠)抗体,抗体分子中残余的部分(包括框架区和恒定区)来源于人抗体。此外,框架区残基可被改变以维持结合亲和性。

[0043] 本发明中,任何合适的表达载体都可以使用,可以为pTT5,pSECtag系列,pCDNA系列载体等,以及其它用于哺乳动物表达系统的载体等,表达载体中包括连接有合适的转录和翻译调节序列的融合DNA序列。

[0044] 本发明中,可用的宿主细胞为含有上述表达载体的细胞,可以是真核细胞,如哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统均可用于本发明的融合蛋白的表达,CHO(中国仓鼠卵巢,Chinese Hamster Ovary),HEK293,COS,BHK,SP2/0,NIH3T3等均可适用于本发明;也可以为含有上述表达载体的原核细胞,可以为E.coli等。

[0045] 本发明中的抗人IL-5单克隆抗体可以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效,这些制剂可以保证本发明公开的抗人IL-5单克隆抗体的氨基酸核心序列的构像完整性,同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解(包括但不限于凝聚、脱氨或氧化)。通常情况下,对于液体制剂,通常可以在2℃-8℃条件下保存至少稳定一年,对于冻干制剂,在30℃至少六个月保持稳定。所述抗人IL-5单克隆抗体制剂可为制药领域常用的混悬、水针、冻干等制剂,优选水针或冻干制剂,对于本发明公开的上述抗人IL-5单克隆抗体的水针或冻干制剂,药学上可以接受的辅料包括但不限于:表面活性剂、溶液稳定剂、等渗调节剂和缓冲液之一或其组合。其中表面活性剂包括但不限于:非离子型表面活性剂如聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯(吐温20或80);poloxamer(如poloxamer 188);Triton;十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;十四烷基、亚油基或十八烷基肌氨酸;Pluronic;MONAQUAT™等,其加入量应使抗人IL-5单克隆抗体的颗粒化趋势最小。溶液稳定剂包括但不限于以下列举之一或其组合:糖类,例如,还原性糖和非还原性糖;氨基酸类,例如,谷氨酸单钠或组氨酸;醇类,例如:三元醇、高级糖醇、丙二醇、聚乙二醇等,溶液稳定剂的加入量应该使最后形成的制剂在本领域的技术人员认为达到稳定的时间内保持稳定状态。等渗调节剂包括但不限于氯化钠、甘露醇之一或其组合。缓冲液包括但不限于:Tris、组氨酸缓冲液、磷酸盐缓冲液之一或其组合。

[0046] 本发明所指的嗜酸性粒细胞过表达介导的疾病,包括但不限于:哮喘、伴随多发性血管炎的肉芽肿病、慢性阻塞性肺病(COPD)、鼻息肉、过敏性皮炎、高嗜酸性细胞增多综合征(HES)等。

[0047] 以下实施例、实验例是对本发明进行进一步的说明,不应理解为对本发明的限制。实施例不包括对传统方法的详细描述,如那些用于构建载体和质粒的方法,将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的,并且在许多出版物中都有所描述,包括Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold spring Harbor Laboratory Press。

[0048] 实施例1 IL-5抗原以及阳性对照抗体的制备

[0049] 人IL-5抗原序列来自于<http://www.uniprot.org>,氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。上述氨基酸序列经过密码子优化,然后在人IL-5编码基因的末端添加一个6×His标签,将基因合成之后构建到pTT5瞬时转染载体(购自NRC biotechnology Research

Institute)中。将上述载体按照标准操作流程转染到HEK293细胞(购自NRC biotechnology Research Institute)中,在Freestyle 293 Expression Medium(购自Gibco)培养基中进行培养,5天之后从细胞上清中纯化表达的人IL-5-His-tag抗原。先用镍亲和层析柱进行第一步纯化,后用离子交换色谱进行精纯,最终通过SDS-PAGE分析制备好的人IL-5-His-tag的纯度,并用TF-1细胞检测人IL-5-His-tag的生物活性。最终纯化的人IL-5-His-tag的纯度可以达到95%以上,并且生物活性与市售类似产品无明显差异。阳性对照抗体Nucala (Mepolizumab)购买自GSK/100mg。另一个阳性对照抗体hu39D10按照US9505826B2中公开的序列制备获得,其中重链来自US9505826B2中的SEQ ID NO:2,轻链来自US9505826B2中的SEQ ID NO:8,重链恒定区选用IgG4(S228P),该抗体基因合成之后构建到pTT5载体中,用HEK293E系统(购自NRC biotechnology Research Institute)表达,然后用Protein A亲和层析纯化。

[0050] 其中,用TF-1细胞检测人IL-5-His-tag的生物活性的方法说明如下:用37℃预热的RPMI1640培养基(购自Gibco)将处于对数生长期的TF1细胞(购自 ATCC® CRL-2003™)洗涤2遍,每次300g离心5min;TF1细胞计数,用含10%FBS的RPMI1640培养基调整到适当密度,接种到96孔板中,10⁴个/150μl/孔;在10%FBS的RPMI1640培养基中对人IL-5进行梯度稀释;然后加入到上述96孔细胞培养板中,50μl/孔,每个浓度设置三个复孔;96孔板周围用200μl/孔的蒸馏水补齐;在37℃、5%CO₂条件的孵箱中孵育培养3天;3天后96孔细胞培养板每孔加入20μl CCK-8溶液(购自Dojindo),在37℃孵箱中继续培养8h;混匀后酶标仪读OD450值,GraphPad Prism6进行数据分析,作图并计算EC50。

[0051] 实验例2 IL-5抗原免疫小鼠以及杂交瘤的制备和筛选

[0052] 将实施例1中制备的人IL-5-His-tag抗原用生理盐水稀释成到合适的浓度,与等体积的弗氏完全佐剂混合,并经超声乳化完全后对4-5周龄的Balb/c小鼠(购自上海灵畅生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0018)进行皮下多点注射,每只小鼠注射50μg抗原/100μl。三周后,等量蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合,超声乳化完全后对小鼠进行皮下多点免疫,两周后再次重复此免疫步骤。所有小鼠在第三次免疫后的第七天取一滴血,分离血清,利用ELISA进行血清滴度的检测。对于血清抗体效价>100000的小鼠,在滴度测定后一周进行冲击免疫:尾静脉注射10μg抗原蛋白/100μl生理盐水/鼠。

[0053] 其中,利用ELISA进行血清滴度检测的方法说明如下:用碳酸钠缓冲液(1.59g Na₂CO₃和2.93g NaHCO₃溶于1L纯水中)将IL-5-His-tag稀释至1000ng/ml,然后100μl每孔加入ELISA板中;室温孵育4小时;用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(简称为PBST:KH₂PO₄0.2g,Na₂HPO₄•12H₂O2.9g,NaCl8.0g,KCl0.2g,Tween-200.5ml,加纯水至1000ml)洗板;每孔加入含有1%牛血清白蛋白(BSA)的PBST进行封闭;用PBST洗板,加入梯度稀释的小鼠血清,孵育适当时间;用PBST洗板,加入适当稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗,孵育适当时间;洗板后加入显色液(底物显色A液:醋酸钠•三水13.6g,柠檬酸•一水1.6g,30%双氧水0.3ml,纯水500ml;底物显色B液:乙二胺四乙酸二钠0.2g,柠檬酸•一水0.95g,甘油50ml,TMB:0.15g溶于3ml DMSO中,纯水500ml;使用前A和B液等体积混匀)进行显色,用终止液(2M硫酸溶液)终止显色反应;用酶标仪读取OD450;用GraphPad Prism6进行数据分析,作图并计算血清滴度。

[0054] 小鼠冲击免疫三天后取脾细胞进行融合。生长状态良好的杂交瘤sp2/0细胞(来源

自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)在37℃、5%CO₂孵箱中培养,融合前一天换液。融合与筛选过程如下:取小鼠脾脏,研磨洗涤后计数。按照脾细胞:sp2/0细胞=2:1混合两种细胞,1500rpm离心7分钟。洗去上清液。以1000rpm离心5min的条件,加入20ml细胞融合缓冲液(购自BTX)洗涤细胞三次。细胞沉淀以 1×10^7 个/ml的密度悬浮于细胞融合缓冲液中。加2ml细胞悬液于融合池中,置于电融合仪ECM2001上,30秒内按一定条件(AC60V,30S;DC1700V,40μS,3X;POST AC60V,3S)进行电融合。电融合后轻轻地将融合细胞转移至37度预热的含有10%血清(购自Gibco)的RPMI1640培养基中,室温继续放置60min。100μl/孔,将细胞按 10^4 个/孔接种入96孔板。次日每孔补加100μl的含有2×HAT(购自Gibco)和10%血清的RPMI1640培养基。于融合后第四天用含有1×HAT和10%血清的RPMI1640培养基半量换液一次。于融合后第七天用含有1×HAT和10%血清的RPMI1640培养基全量换液一次。于融合后第九天取样ELISA检测。挑选出阳性杂交瘤克隆于24孔板中扩大培养并通过有限稀释法进行亚克隆。获得稳定表达目的抗体的杂交瘤株后进行保种建库。建株之后的稳定细胞系用无血清培养基HybriGRO SF(购自Corning)培养7天,然后用Protein A/G亲和层析柱从培养上清中纯化鼠源抗人IL-5单克隆抗体。

[0055] 实施例3鼠源抗人IL-5单克隆抗体对IL-5抗原的相对亲和力的测定

[0056] 本实施例用ELISA方法对实施例2中纯化所得的40个鼠源抗人IL-5单克隆抗体进行了分析。实验方法参见实施例2第二段。区别在于用碳酸钠缓冲液将IL-5-His-tag稀释至100ng/ml。

[0057] 结果如图1所示,根据EC50数据,选择具有较高相对亲和力的抗体(EC50越小表明相对亲和力越高),在此共选取10个抗体(4-6、10、13、22、26、32、41、45、46、47号)推进到下一个筛选环节。

[0058] 实施例4鼠源抗人IL-5单克隆抗体对IL-5诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的测定

[0059] 本实施例对实施例3中筛选所得的鼠源抗人IL-5单克隆抗体进行细胞水平的功能评价,方法如下:处于对数生长期的TF1细胞用37℃预热的RPMI1640培养基洗2遍,1000rpm,离心5min;TF1细胞计数,用含10%FBS的RPMI1640培养基悬浮到适当密度,接种到96孔板中, 10^4 个/150μl/孔;在10%FBS的RPMI1640培养基中加入人IL-5蛋白(购自北京义翘神州)使其浓度达到40ng/ml;然后用加有IL-5的培养基将鼠源抗人IL-5单克隆抗体稀释到适当浓度,然后按照适当倍率再稀释9个梯度,同时设立Nucala (Mepolizumab)为阳性对照,不结合IL-5的人IgG1同型抗体为阴性对照;将稀释好的抗体加入上述含有TF1细胞的96孔细胞培养板中,50μl/孔;96孔周围用200μl/孔的蒸馏水补齐;在37℃、5%CO₂条件的孵箱中孵育培养3天;3天后96孔细胞培养板每孔加入20μl CCK-8溶液,在37℃孵箱中继续培养8h;混匀后酶标仪读OD450值,GraphPad Prism6进行数据分析,作图并计算IC50。上述优选的鼠源抗人IL-5单克隆抗体经过细胞水平的功能评价之后,选取功能活性比较优异的抗体进行下一步实验。

[0060] 实施例5鼠源抗人IL-5单克隆抗体的核苷酸和氨基酸序列的测定

[0061] 根据上述ELISA和细胞水平的功能实验筛选结果,最终挑取了4-6、13、22、26、32、41、45、46、47号克隆作为先导抗体。使用Trizol(购自Life technologies)从上述单抗对应的杂交瘤单克隆细胞株中提取总RNA,用逆转录试剂盒(购自Takara公司)将mRNA逆转录成cDNA,通过文献报道的组合引物(《Antibody Engineering》Volume 1,Edited by Roland

Kontermann and Stefan Dübel,组合引物的序列来自第323页)用PCR扩增鼠源的抗人IL-5单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区基因,然后将PCR产物克隆入pMD18-T载体,测序并分析可变区基因序列。对各个克隆的可变区序列进行对比分析后发现,4-6号抗体的序列比较适合进行人源化,因此选择4-6号克隆作为最终的候选抗体。其序列信息如下:重链可变区基因序列全长357bp,编码119个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;轻链可变区基因序列全长321bp,编码107个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示。在GenBank中对氨基酸序列进行比对分析,二者均符合小鼠IgG可变区基因的特征。

[0062] 实施例6鼠源抗人IL-5单克隆抗体的人源化

[0063] 分别将鼠源4-6号抗体的重链可变区和轻链可变区利用overlapping PCR与人IgG1的轻重链恒定区拼接,构建成4-6号的嵌合抗体(4-6-Chimeric)。

[0064] 对轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列进行分析,依据Kabat规则确定4-6号抗体的3个抗原互补决定区(complementarity-determining region,CDR)和4个框架区(frame region,FR)。其中,重链互补决定区的氨基酸序列为H-CDR1:NHHIN(SEQ ID NO:6)、H-CDR2:YINPYNDYSRYNQKFKG(SEQ ID NO:7)和H-CDR3:DYGNFWYFDV(SEQ ID NO:8),轻链互补决定区的氨基酸序列为L-CDR1:KASQDINSYLS(SEQ ID NO:9)、L-CDR2:RADRLID(SEQ ID NO:10)和L-CDR3:LQYDDFPYT(SEQ ID NO:11)。

[0065] 通过在NCBI IgBlast与人IgG胚系序列(Germline)进行同源性比较,选择IGHV1-46*01为重链CDR移植模板,将鼠源的4-6号抗体的重链CDR移植入IGHV1-46*01骨架区,构建成重链CDR移植抗体。同样地,经过与人IgG胚系序列同源性比较,选择IGKV1-39*01为轻链CDR移植模板,将鼠源4-6号抗体的轻链CDR移植入IGKV1-39*01的骨架区,构建成轻链的CDR移植抗体,所得的抗体定义为4-6-Grafted。同时,在此基础上,对一些框架区的氨基酸位点进行了回复突变,回复突变就是将人源框架区的某些氨基酸突变成鼠源框架区同一位置的氨基酸。在进行回复突变时,将氨基酸序列进行了Kabat编码,位点的位置由Kabat码指示。优选的,对于重链可变区序列,将Kabat编码第48位的M回复为鼠源的I,第67位的V回复为A,第69位的M回复为L,第71位的R回复为V,第78位的V回复为A。对于轻链可变区序列,将Kabat编码第36位的Y回复为I,第46位的L回复为T,第49位的Y回复为H,第69位的T回复为Q。上述可变区基因序列由苏州金唯智公司按照Cricetulus griseus的密码子使用偏好进行密码子优化并合成。将合成的人源化可变区序列与人IgG1恒定区相连,此抗体定义为4-6号的人源化抗体(4-6-Humanized)。

[0066] 将4-6号人源化抗体的轻重链基因构建到pTT5表达载体中,将上述轻重链表达载体组合后利用HEK293E系统进行瞬时转染并表达抗体。HEK293细胞在Free Style 293 Expression Medium培养基中培养,利用PEI转染法将质粒转入细胞5天后收取细胞上清,利用Protein A亲和层析后获得纯化抗体。

[0067] 最终,4-6-Humanized的重链可变区基因序列全长357bp,编码119个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示;4-6-Humanized的轻链可变区基因序列全长321bp,编码107个氨基酸残基,核苷酸序列如SEQ ID NO:14所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示。与人IgG1恒定区相连后,最终得到449个氨基酸的4-6-Humanized的重链(序列如SEQ ID NO:16所示)和214个氨基酸的4-6-Humanized的轻链(序

列如SEQ ID NO:17所示)。

[0068] 实施例7本发明的抗人IL-5单克隆抗体对IL-5诱导的TF-1细胞增殖的抑制作用的测定

[0069] 本实施例采用TF-1细胞增殖的抑制实验对4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)和4-6号嵌合抗体(4-6-Chimeric)之间的功能进行了详细对比,实施步骤按照实施例4进行。实验结果如图3所示,Nucala、hu39D10、4-6-Chimeric、4-6-Humanized(293)和4-6-Humanized(CH0)(采用ExpiCH0 Expression System制备,购自Thermo Scientific,操作步骤按照供货商提供的操作说明进行)抑制IL-5诱导的TF-1细胞增殖的IC50分别是70.85ng/ml、47.62ng/ml、28.93ng/ml、34.12ng/ml和29.37ng/ml。上述结果说明,4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)和4-6号嵌合抗体(4-6-Chimeric)抑制IL-5诱导的TF-1细胞增殖的能力几乎完全一样,说明人源化工作是成功的,并且本发明的4-6-Humanized和4-6-Chimeric在功能活性方面明显强于阳性对照抗体Nucala和hu39D10。

[0070] 实施例8本发明的抗人IL-5单克隆抗体对IL-5与IL-5RA的相互作用的阻断能力的测定

[0071] 本实施例用ELISA方法评估4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)和4-6号嵌合抗体(4-6-Chimeric)阻断IL-5与IL-5RA相互作用的能力。首先在基因水平上将IL-5和IL-5RA的胞外段(ECD, Extracellular domain)基因(IL-5RA, Interleukin-5 receptor subunit alpha, 氨基酸序列来源:<http://www.uniprot.org/uniprot/Q01344>, 委托苏州金唯智公司进行基因合成工作)通过重组PCR的方法分别与人IgG1的Fc段融合在一起,采用pTT5构建成IL-5-hFc和IL-5RA-ECD-hFc的表达载体,然后瞬转表达HEK293E细胞,并通过Protein A亲和层析纯化。然后用in-house制备的人IL-5-hFc包被酶标板,封闭后加入生物素化的IL-5RA-ECD-hFc和梯度稀释的待检测抗体的混合物,经过一段时间的孵育之后,洗板并最终加入Streptavidin-HRP进行显色检测。其中,对照抗体4-4-Humanized的重链可变区序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:18所示,轻链可变区序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:19所示,恒定区序列与本发明的4-6-Humanized一致。

[0072] 实验结果如图4所示,Nucala、4-6-Chimeric和4-6-Humanized阻断IL-5与其受体相互作用的IC50分别是3172ng/ml、979.9ng/ml和1097ng/ml,这说明本发明的4-6-Chimeric和4-6-Humanized阻断IL-5与其受体相互作用的能力明显强于阳性对照抗体Nucala。

[0073] 实施例9本发明的抗人IL-5单克隆抗体对抗原亲和力的测定

[0074] 4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)和4-6号嵌合抗体(4-6-Chimeric)与IL-5之间的亲和力测定通过Biacore T200(GE healthcare)检测。具体实验方法为:利用Amine Coupling Kit(GE healthcare)激活CM5传感芯片(GE healthcare)并将Protein A/G融合蛋白(ThermoPierce)固定于芯片上,标记量为2000RU。以FC3(Flow cell 3)为参照通道,FC4(Flow cell 4)为样品通道。在FC4通道分别捕获4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)和4-6号嵌合抗体(4-6-Chimeric)或对照抗体(Nucala和hu39D10),随后注射不同浓度的人IL-5蛋白(购自北京义翘神州)。循环条件为:在FCs所有通道中以50μl/min注射4min分析物,解离时间为20min,以10μl/min速率注射6M盐酸胍(国药集团化学试剂有限公司)30s进行表面再生,然后利用Biacore T200 Evaluation Software Ver 1.0计算捕获抗体的信号

和无捕获抗体的信号差值及相互作用的亲和力。

[0075] 实验结果见表1,结果表明本发明的4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)和4-6号嵌合抗体(4-6-Chimeric)对IL-5的亲和力高于目前在市场上处主导地位的阳性抗体Nucala (Mepolizumab),主要是因为本发明的4-6-Humanized和4-6-Chimeric能够比阳性对照抗体更加快速地结合IL-5。并且与另一阳性对照抗体hu39D10处于同一水平,都具10pM级的高亲和力。

[0076] 表1、本发明的抗人IL-5单抗对人IL-5的亲和力测定

[0077]		Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
	Nucala (Mepolizumab)	7.34E+05	1.47E-04	2.01E-10
	hu39D10	1.15E+07	1.56E-04	1.36E-11
	4-6-Chimeric	1.51E+07	1.96E-04	1.30E-11
	4-6-Humanized	1.45E+07	1.91E-04	1.32E-11

[0078] 实施例10本发明的抗人IL-5单克隆抗体的表位分析

[0079] IL-5的氨基酸编码如下:

IPTEIPTSALVKETLALLSTHRTLIIANETLRIPVPVHKNHQLCTEEIFQGIGTLESQTVQGGT

[0080] VERLFKNLSLIKKYIDGQKKKCGEERRRVNQFLDYLQEF LGVMNTEWIIIES (SEQ ID NO: 1)。

[0081] 根据文献报道,下划线部分的氨基酸对IL-5与其受体的相互作用比较关键,我们对这些位点进行了定点诱变,将它们分别突变成丙氨酸(Alanine),然后将这23个带有his-Tag的IL-5突变体用HEK293E细胞进行瞬转表达,用鼠源anti-His的抗体捕获表达上清中的IL-5突变体(所有的IL-5突变体均带有His-tag),然后用待测试的抗体(Nucala、hu39D10和4-6-Humanized)结合被捕获的IL-5突变体,然后用Goat-anti-Human-Fc-Specific-HRP检测待测抗体有没有结合捕获的IL-5突变体,如果待测抗体没有结合某个突变体,就认为该突变位点对此抗体的结合功能是十分重要的。结果如图5所示,最终发现,所有23个突变体中,只有86C、90R、91R、96F、104L的突变对测试的抗体的结合有显著影响,并且这五个突变对每个抗体的影响都不相同,结果总结到表2中。我们可以发现,本发明的4-6号人源化抗体(4-6-Humanized)的表位与Nucala和hu39D10均存在差异,并不相同。

[0082] 表2、本发明的抗人IL-5单抗对IL-5突变体的结合作用

[0083]		Nucala (Mepolizumab)	hu39D10	4-6-Humanized
	86C	-	-	-
	90R	+	-	+
	91R	+	-	-
	96F	-	-	-
	104L	-	-	-

[0084] 注:“+”表示该位点突变对抗体的结合没有明显影响,“-”表示该位点突变能够显著削弱或完全消除抗体对突变体的结合。

[0085] 为了验证上述ELISA表位分析结果,利用Westernblot对上述结果进行进一步的确认。Westernblot的操作方法按照Cell Signalling Technologies公司提供的方案实施(<https://www.cellsignal.com/contents/resources-protocols/western-blotting-protocol/western>)。凝胶电泳和转印系统以及化学发光成像系统均购自Bio-Rad。对85至

94位10个突变体进行Westernblot分析,分别用hu39D10和4-6-Humanized抗体作为一抗,用HRP偶联的羊抗人Fc-Specific的酶标抗体作为二抗,最终用化学发光法显影并用化学发光成像系统进行拍照。实验结果如图6所示,86C、90R和91R任一氨基酸突变后均能导致hu39D10不能结合IL-5,而86C和91R任一氨基酸突变后导致4-6-Humanized不能结合IL-5。

[0086] 实施例11本发明的抗人IL-5单克隆抗体的种属交叉反应的验证

[0087] 为了后续的药理和毒理研究提供信息,本实施例对4-6-Humanized抗体的种属交叉反应进行了验证。将大鼠、小鼠、豚鼠和兔的IL-5基因合成并分别构建到pTT5瞬转载体中(上述基因的序列均来自<http://www.uniprot.org>,小鼠的编号为P04401,大鼠的编号为Q08125,豚鼠的编号为008987,兔的编号为G1SL79),然后分别在HEK293E中瞬转表达。用鼠源anti-His的抗体捕获表达上清中不同种属的IL-5(不同种属的IL-5均带有His-tag),然后用待测试的抗体(Nucala、hu39D10和4-6-Humanized)结合被捕获的IL-5,然后用Goat-anti-Human-Fc-Specific-HRP检测待测抗体对IL-5的结合。实验结果如表3所示,本发明的4-6-Humanized和hu30D10均能够有效识别豚鼠和小鼠的IL-5,但是它们两者对大鼠IL-5的结合作用比较弱。另外,它们均不识别兔的IL-5。Nucala不能识别大鼠、小鼠、豚鼠和兔的IL-5,故此处结果未予显示。

[0088] 表3、本发明的抗人IL-5单抗的种属交叉反应

[0089]

	hu39D10				4-6-Humanized			
种属	人	豚鼠	小鼠	大鼠	人	豚鼠	小鼠	大鼠
EC50 (ng/ml)	78.03	53.14	61.84	132.1	83.89	55.76	52.13	2131

[0090] 实施例12本发明的抗人IL-5单克隆抗体的药代动力学研究

[0091] 本实施例采用大鼠进行静脉注射(Intravenous Injection, I.V.)检测4-6-Humanized的药代动力学。

[0092] 每组四只大鼠,体重200g左右,每只大鼠通过静脉注射剂量为1mg的抗人IL-5单克隆抗体或人IgG1同型对照抗体;分别在给药后的特定时间眼眶取血,血液自然凝固后离心取血清。血清中抗体药物浓度的测量方法如下:用羊抗人Fc段抗体(购自Sigma;该抗体经过种属交叉吸附处理,不结合大鼠内源抗体)包被ELISA板,浓度为1000ng/ml,100 μ l/孔;包被完毕后用PBST+1%BSA封闭;然后加入适当稀释的大鼠血清;经过一段时间的孵育之后,洗板并最终加入HRP标记的羊抗人抗体(购自Sigma;该抗体经过种属交叉吸附处理,不识别大鼠内源抗体);再经过一段时间的孵育之后,洗板并加入显色液进行显色,用终止液终止显色反应后检测OD450;用标准曲线将OD450换算成抗体浓度;用GraphPad Prism6进行数据整理分析和作图;用Phoenix软件计算抗体药物在大鼠体内的半衰期。

[0093] 如图7所示,静脉注射药代动力学结果显示,4-6-Humanized抗体在大鼠体内的半衰期与人IgG1同型对照抗体基本相当,分别是13.90天和12.65天。

[0094] 实施例13本发明的抗人IL-5单克隆抗体的体内药效学研究

[0095] 本实施例采用鸡卵清蛋白(Ovalbumin)诱导的小鼠哮喘模型对体内药效学进行研究。

[0096] 实验过程如下:将Balb/c小鼠随机分组,每组10只,共6组,组别如下:非造模对照

组、造模对照组、4-6-Humanized抗体组(分低剂量和高剂量组)和阳性对照抗体组;然后将Ovalbumin(购买自Sigma)和Inject Alum(免疫佐剂,购买自Thermo Fisher)混合制备成混悬液,在第1天和第14天腹腔注射小鼠(阴性对照组腹腔注射PBS),使小鼠致敏;在第28、29和30天,实验组动物用雾化的含有1%Ovalbumin的PBS溶液刺激小鼠,诱导哮喘(对照组用雾化PBS刺激小鼠),在第20天和第28天(Ovalbumin溶液雾化刺激小鼠前2h),对小鼠进行皮下注射给药,给药方案如下:非造模对照组注射不含抗体的辅料溶液,造模对照组注射不含抗体的辅料溶液,4-6-Humanized抗体低剂量和高剂量组分别注射0.4和2mg/kg的本发明的抗人IL-5单克隆抗体,阳性对照抗体组注射2mg/kg的Reslizumab(商品名Cinqair,购买自Teva Pharmaceutical Industries);在第32天动物取血,使用流式细胞仪检测血样中嗜酸性粒细胞的含量(用荧光基团APC-eFluor780标记的抗Ly-6G抗体、PE标记的抗CD193抗体和eFluor 506标记的抗CD45抗体对血细胞进行染色,三种抗体染色均显阳性的细胞认为是嗜酸性粒细胞,上述荧光标记的抗Ly-6G抗体和抗CD193抗体购自eBioscience,抗CD45抗体购自BioLegend)。

[0097] 数据采集和统计分析方法如下:将各组动物的嗜酸性粒细胞数等用GraphPad Prism 6软件进行分析,利用T-test比较组间差异, $p < 0.05$ 认为有显著性差异, $p < 0.01$ 认为有极显著差异。

[0098] 实验结果如图8所示,与非造模组相比,造模后血样中嗜酸性粒细胞含量明显升高,表明造模成功。与造模对照组相比,4-6-Humanized抗体低剂量和高剂量组以及阳性对照抗体组的嗜酸性粒细胞比例均显著下降,并且4-6-Humanized抗体低剂量和高剂量组与阳性对照抗体组相比p值分别为0.0069和0.0004,具有极显著差异,表明4-6-Humanized抗体在体内的药效要明显优于阳性对照抗体Reslizumab。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 三生国健药业(上海)股份有限公司
[0003]	<120> 结合人IL-5的单克隆抗体、其制备方法和用途
[0004]	<130> 2017
[0005]	<160> 19
[0006]	<170> PatentIn version 3.5
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 115
[0009]	<212> PRT
[0010]	<213> Homo
[0011]	<400> 1
[0012]	Ile Pro Thr Glu Ile Pro Thr Ser Ala Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala
[0013]	1 5 10 15
[0014]	Leu Leu Ser Thr His Arg Thr Leu Leu Ile Ala Asn Glu Thr Leu Arg
[0015]	20 25 30
[0016]	Ile Pro Val Pro Val His Lys Asn His Gln Leu Cys Thr Glu Glu Ile
[0017]	35 40 45
[0018]	Phe Gln Gly Ile Gly Thr Leu Glu Ser Gln Thr Val Gln Gly Gly Thr
[0019]	50 55 60
[0020]	Val Glu Arg Leu Phe Lys Asn Leu Ser Leu Ile Lys Lys Tyr Ile Asp
[0021]	65 70 75 80
[0022]	Gly Gln Lys Lys Lys Cys Gly Glu Glu Arg Arg Arg Val Asn Gln Phe
[0023]	85 90 95
[0024]	Leu Asp Tyr Leu Gln Glu Phe Leu Gly Val Met Asn Thr Glu Trp Ile
[0025]	100 105 110
[0026]	Ile Glu Ser
[0027]	115
[0028]	<210> 2
[0029]	<211> 357
[0030]	<212> DNA
[0031]	<213> Mus musculus
[0032]	<400> 2
[0033]	caggtccagc tgcagcagtc tggggccgag ctggtgaggc ctggggcctc agtgaagatt 60
[0034]	tcctgcaagg ctttttggeta caccttcaca aaccatcata taaactgggt gcagcagagg 120
[0035]	cctggacagg gcctggactg gatttgatat attaatectt ataagtatta tagtaggtac 180
[0036]	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctat 240
[0037]	atggagctta gcggcctgac atctgaagac tctgcagtct attactgtgc aagagactat 300
[0038]	ggtaacttct ggtacttcga tgtctggggc gcagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

[0039]	<210> 3
[0040]	<211> 119
[0041]	<212> PRT
[0042]	<213> Mus musculus
[0043]	<400> 3
[0044]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
[0045]	1 5 10 15
[0046]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His
[0047]	20 25 30
[0048]	His Ile Asn Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
[0049]	35 40 45
[0050]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
[0051]	50 55 60
[0052]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0053]	65 70 75 80
[0054]	Met Glu Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0055]	85 90 95
[0056]	Ala Arg Asp Tyr Gly Asn Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
[0057]	100 105 110
[0058]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
[0059]	115
[0060]	<210> 4
[0061]	<211> 321
[0062]	<212> DNA
[0063]	<213> Mus musculus
[0064]	<400> 4
[0065]	gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
[0066]	atcacttgca aggcgagtca ggacattaat agctatttaa gctggatcca gcagaaacca 120
[0067]	gggaaatctc ctaagaccct gatccatcgt gcagacagat tgatagatgg ggtcccatca 180
[0068]	aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat ttttctctca ccatcagcag cctggagtat 240
[0069]	gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300
[0070]	gggaccaagc tggaataaaa a 321
[0071]	<210> 5
[0072]	<211> 107
[0073]	<212> PRT
[0074]	<213> Mus musculus
[0075]	<400> 5
[0076]	Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
[0077]	1 5 10 15

[0078]	Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
[0079]	20 25 30
[0080]	Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
[0081]	35 40 45
[0082]	His Arg Ala Asp Arg Leu Ile Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0083]	50 55 60
[0084]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
[0085]	65 70 75 80
[0086]	Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
[0087]	85 90 95
[0088]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0089]	100 105
[0090]	<210> 6
[0091]	<211> 5
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> Mus musculus
[0094]	<400> 6
[0095]	Asn His His Ile Asn
[0096]	1 5
[0097]	<210> 7
[0098]	<211> 17
[0099]	<212> PRT
[0100]	<213> Mus musculus
[0101]	<400> 7
[0102]	Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0103]	1 5 10 15
[0104]	Gly
[0105]	<210> 8
[0106]	<211> 10
[0107]	<212> PRT
[0108]	<213> Mus musculus
[0109]	<400> 8
[0110]	Asp Tyr Gly Asn Phe Trp Tyr Phe Asp Val
[0111]	1 5 10
[0112]	<210> 9
[0113]	<211> 11
[0114]	<212> PRT
[0115]	<213> Mus musculus
[0116]	<400> 9

[0117]	Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser
[0118]	1 5 10
[0119]	<210> 10
[0120]	<211> 7
[0121]	<212> PRT
[0122]	<213> Mus musculus
[0123]	<400> 10
[0124]	Arg Ala Asp Arg Leu Ile Asp
[0125]	1 5
[0126]	<210> 11
[0127]	<211> 9
[0128]	<212> PRT
[0129]	<213> Mus musculus
[0130]	<400> 11
[0131]	Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
[0132]	1 5
[0133]	<210> 12
[0134]	<211> 357
[0135]	<212> DNA
[0136]	<213> Synthetic oligonucleotide
[0137]	<400> 12
[0138]	caggtgcagc tgggtgcagtc cggcgctgag gtgaaaaagc ccggcgcctc cgtgaaggtg 60
[0139]	tcctgcaaag cctccggcta caccttcacc aaccaccaca tcaactgggt gaggcaggct 120
[0140]	cctggccagg gactggagtg gatcggtac atcaaccct acaacgacta ctcccgttac 180
[0141]	aaccagaagt tcaagggcag ggccaccctg accgtggaca agtccacctc caccgcctac 240
[0142]	atggagctgt cctccctgag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggactac 300
[0143]	ggcaacttct ggtacttcga cgtgtggggc cagggcaccc tggtgacagt gtcctcc 357
[0144]	<210> 13
[0145]	<211> 119
[0146]	<212> PRT
[0147]	<213> Synthetic Protein
[0148]	<400> 13
[0149]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0150]	1 5 10 15
[0151]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His
[0152]	20 25 30
[0153]	His Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0154]	35 40 45
[0155]	Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Tyr Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

[0156]	50	55	60
[0157]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0158]	65	70	75
[0159]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0160]		85	90
[0161]	Ala Arg Asp Tyr Gly Asn Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly		95
[0162]		100	105
[0163]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		110
[0164]		115	
[0165]	<210> 14		
[0166]	<211> 321		
[0167]	<212> DNA		
[0168]	<213> Synthetic Oligonucleotide		
[0169]	<400> 14		
[0170]	gacatccaga tgaccagtc cccttcagc ctgtccgcta gcgtgggcga cagggtgacc	60	
[0171]	atcacctgca aggcctccca ggacatcaac tcctacctgt cctggatcca gcagaagccc	120	
[0172]	ggcaaggccc ccaagaccct gatccacagg gccgataggc tgatcgacgg cgtgccctcc	180	
[0173]	aggttttccg gctccggatc cggccaggac ttcaccctga ccatctcctc cctgcagccc	240	
[0174]	gaggacttcg ccacctacta ctgcctgcag tacgacgact tcccctacac cttcggccag	300	
[0175]	ggcaccaagg tggagatcaa g	321	
[0176]	<210> 15		
[0177]	<211> 107		
[0178]	<212> PRT		
[0179]	<213> Synthetic Protein		
[0180]	<400> 15		
[0181]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0182]	1	5	10
[0183]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr		15
[0184]		20	25
[0185]	Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile		30
[0186]		35	40
[0187]	His Arg Ala Asp Arg Leu Ile Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		45
[0188]	50	55	60
[0189]	Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0190]	65	70	75
[0191]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr		80
[0192]		85	90
[0193]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
[0194]		100	105

[0195]	<210> 16															
[0196]	<211> 449															
[0197]	<212> PRT															
[0198]	<213> Synthetic Protein															
[0199]	<400> 16															
[0200]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0201]	1				5					10					15	
[0202]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	His
[0203]				20					25					30		
[0204]	His	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0205]			35					40					45			
[0206]	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0207]		50					55					60				
[0208]	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0209]	65					70				75						80
[0210]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0211]					85				90						95	
[0212]	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Asn	Phe	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly
[0213]				100					105					110		
[0214]	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
[0215]			115					120					125			
[0216]	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
[0217]		130					135					140				
[0218]	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
[0219]	145					150				155						160
[0220]	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
[0221]					165					170					175	
[0222]	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
[0223]				180					185					190		
[0224]	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
[0225]			195					200					205			
[0226]	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
[0227]		210					215					220				
[0228]	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
[0229]	225					230				235						240
[0230]	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
[0231]					245					250					255	
[0232]	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
[0233]				260					265					270		

[0234]	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
[0235]				275				280					285			
[0236]	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
[0237]				290				295					300			
[0238]	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
[0239]	305						310				315					320
[0240]	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
[0241]					325					330					335	
[0242]	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
[0243]				340					345					350		
[0244]	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
[0245]				355				360					365			
[0246]	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
[0247]				370				375				380				
[0248]	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
[0249]	385					390				395						400
[0250]	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
[0251]					405					410					415	
[0252]	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
[0253]				420					425					430		
[0254]	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
[0255]				435				440						445		
[0256]	Lys															
[0257]	<210>	17														
[0258]	<211>	214														
[0259]	<212>	PRT														
[0260]	<213>	Synthetic Protein														
[0261]	<400>	17														
[0262]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0263]	1				5				10					15		
[0264]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr
[0265]				20					25					30		
[0266]	Leu	Ser	Trp	Ile	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Thr	Leu	Ile
[0267]				35					40					45		
[0268]	His	Arg	Ala	Asp	Arg	Leu	Ile	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0269]				50					55					60		
[0270]	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[0271]	65						70				75					80
[0272]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	Asp	Phe	Pro	Tyr

[0273]					85					90					95				
[0274]	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala			
[0275]					100					105					110				
[0276]	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly			
[0277]					115					120					125				
[0278]	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala			
[0279]					130					135					140				
[0280]	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln			
[0281]	145						150					155				160			
[0282]	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser			
[0283]					165					170					175				
[0284]	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr			
[0285]					180					185					190				
[0286]	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser			
[0287]					195					200					205				
[0288]	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys													
[0289]					210														
[0290]	<210>	18																	
[0291]	<211>	118																	
[0292]	<212>	PRT																	
[0293]	<213>	Synthetic Protein																	
[0294]	<400>	18																	
[0295]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala			
[0296]	1				5					10					15				
[0297]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr			
[0298]					20					25					30				
[0299]	Tyr	Ile	Asn	Trp	Leu	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile			
[0300]					35					40					45				
[0301]	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser	Glu	Lys	Phe			
[0302]					50					55					60				
[0303]	Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr			
[0304]	65						70				75				80				
[0305]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Val	Cys			
[0306]					85					90					95				
[0307]	Val	Arg	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr			
[0308]					100					105					110				
[0309]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser													
[0310]					115														
[0311]	<210>	19																	

[0312] <211> 113
 [0313] <212> PRT
 [0314] <213> Synthetic Protein
 [0315] <400> 19
 [0316] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 [0317] 1 5 10 15
 [0318] Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Asn
 [0319] 20 25 30
 [0320] Tyr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 [0321] 35 40 45
 [0322] Pro Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 [0323] 50 55 60
 [0324] Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 [0325] 65 70 75 80
 [0326] Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
 [0327] 85 90 95
 [0328] His Tyr Ser Pro Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 [0329] 100 105 110
 [0330] Lys

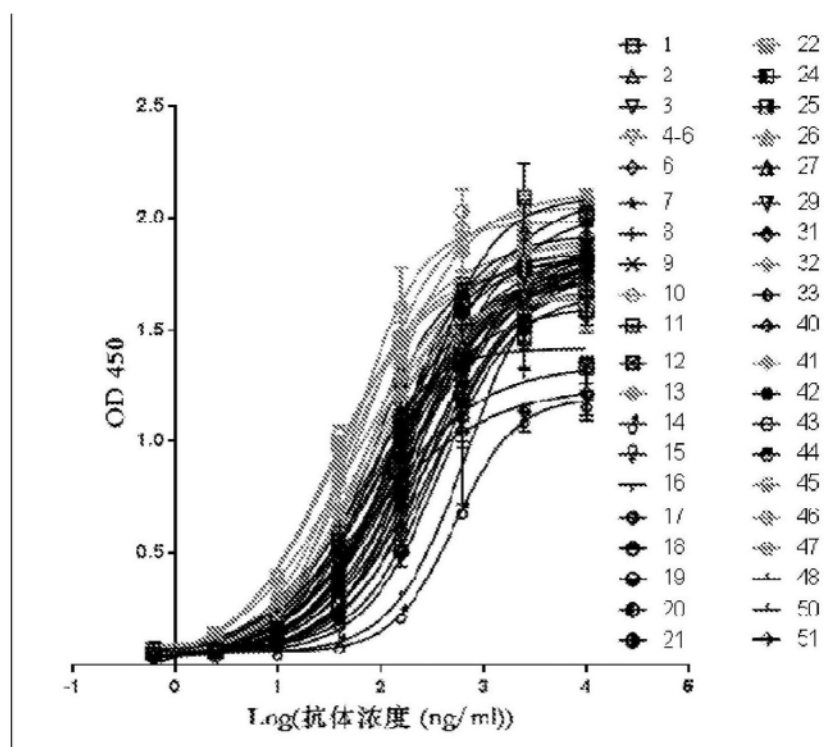


图1

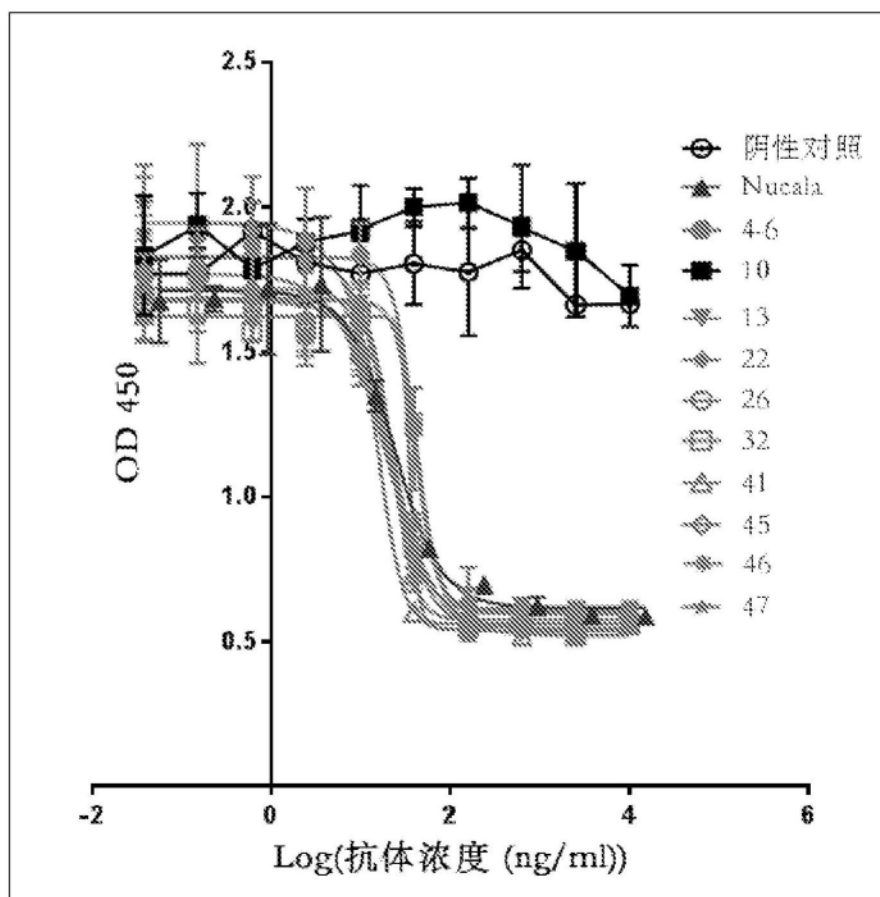


图2

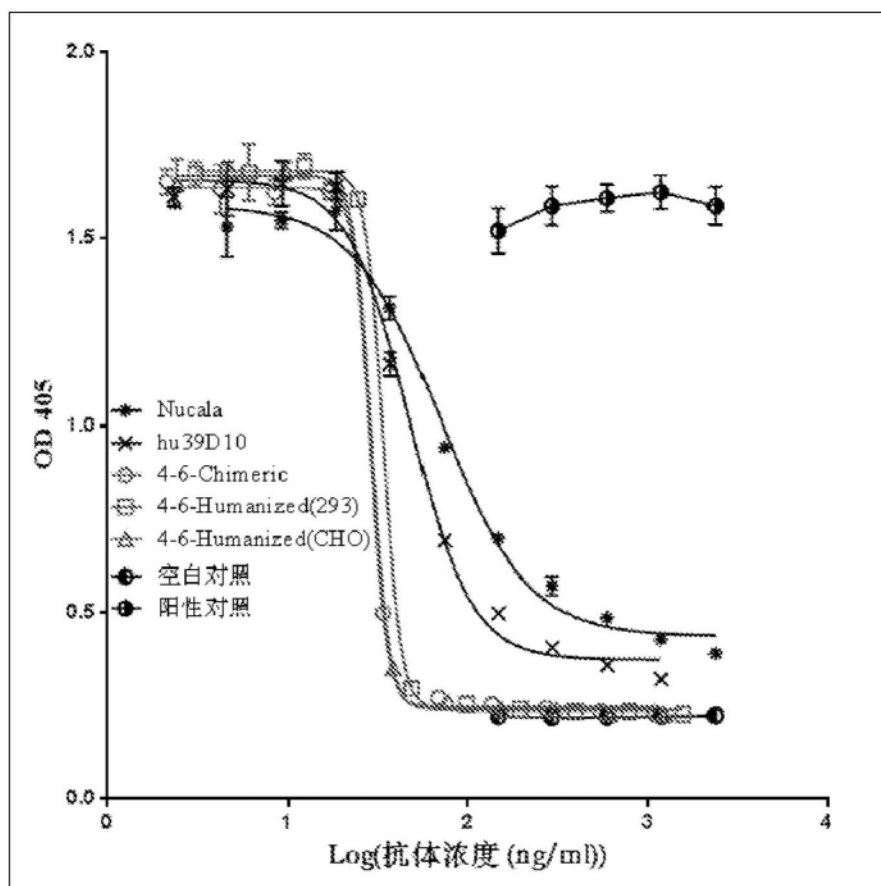


图3

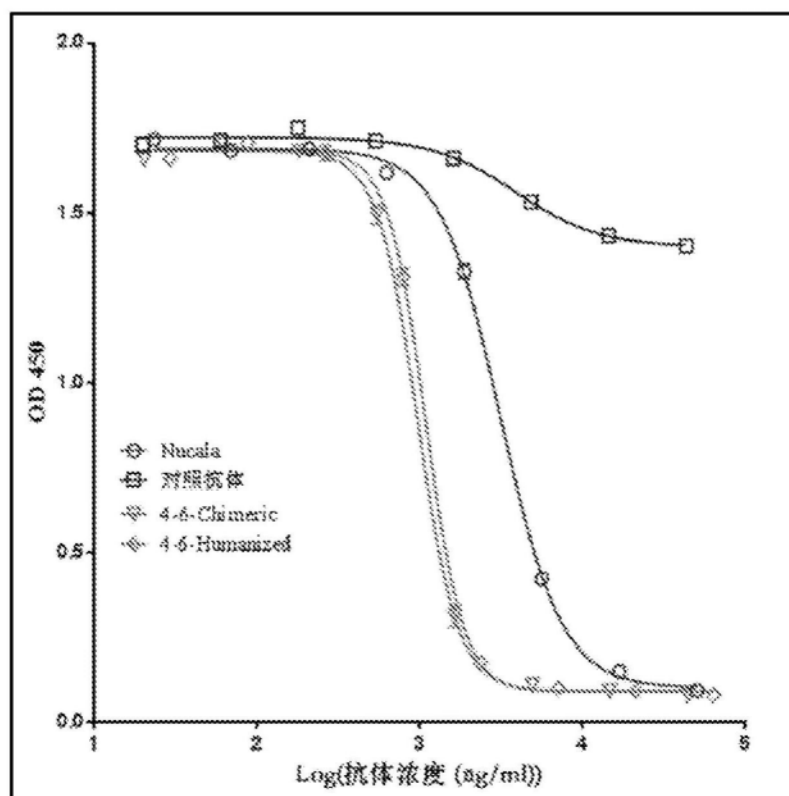


图4

	Nucada	Hn39D10	4-6 Humanized
人野生型IL-5 (对照)	1.4766	1.5130	1.3152
85K	1.4904	1.5469	1.3944
86C	0.0967	0.1301	0.0954
87G	1.4478	1.5152	1.3535
88E	1.4492	1.4804	1.2716
89E	1.3949	1.2639	1.2422
90R	1.4216	0.4987	1.3094
91R	1.4093	0.1707	0.0844
92R	1.2997	1.2779	0.9284
93V	1.2590	1.4079	1.0929
94N	1.2828	1.4177	1.1925
95Q	1.2063	1.1022	1.2015
96F	0.1903	0.4559	0.3469
97L	0.8159	0.8937	0.8753
98D	1.0782	1.0438	1.0033
99Y	0.9927	1.1209	1.0147
100L	0.7201	0.9356	0.7860
101Q	0.8597	1.1009	1.0664
102E	1.1826	1.2590	1.1147
103F	1.0009	1.2409	1.1423
104L	0.1091	0.1102	0.1238
109T	0.9374	1.1943	1.1023
110E	1.1223	1.2505	1.1584
111W	0.9823	1.2416	1.1489

图5

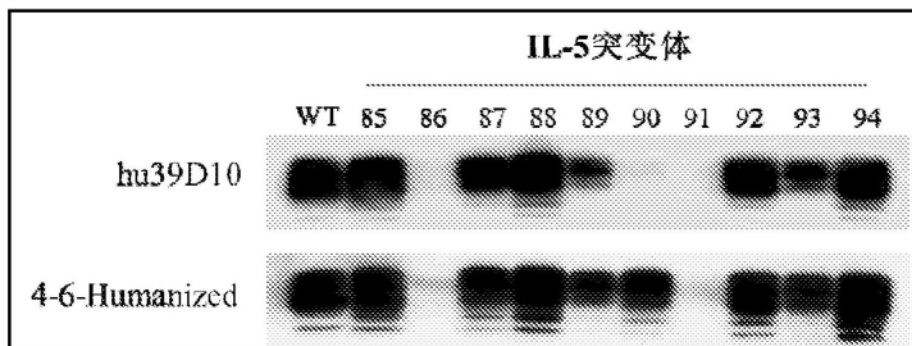


图6

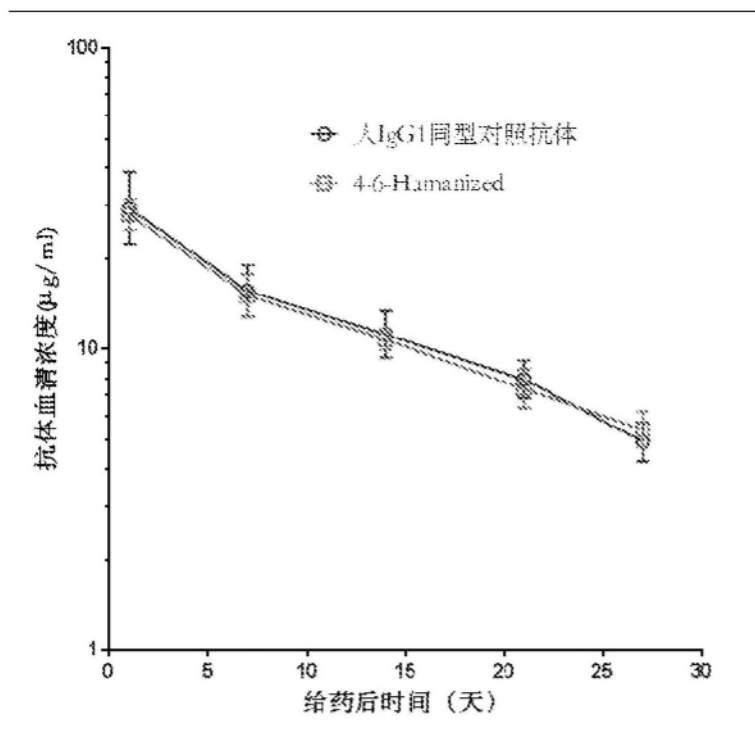


图7

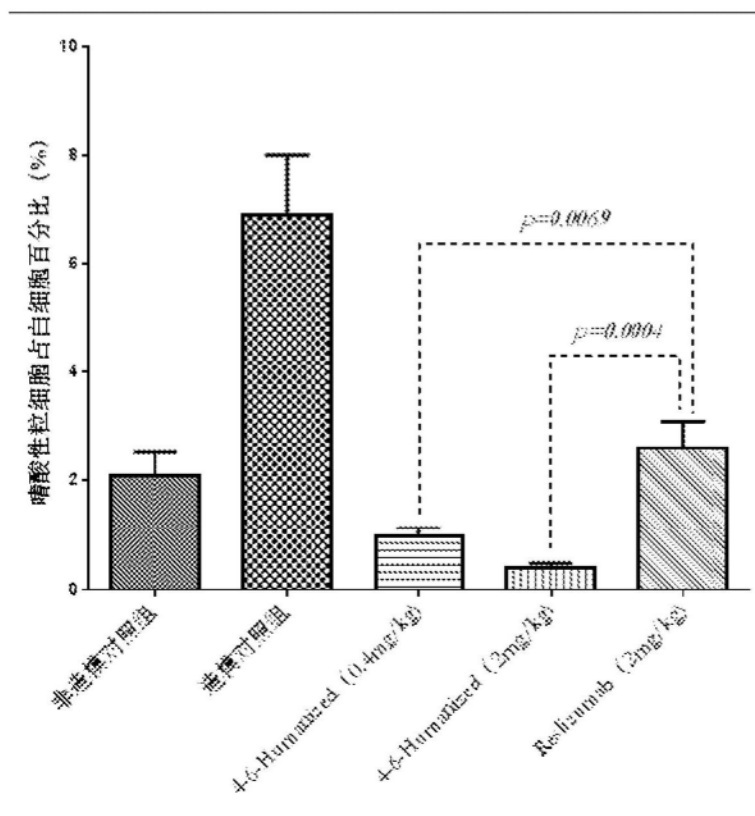


图8