



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101891817 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201010122565. 9

A61P 29/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 03. 03

A61P 11/00 (2006. 01)

(66) 本国优先权数据

A61P 37/02 (2006. 01)

200910078824. X 2009. 03. 03 CN

A61P 19/04 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

A61P 9/10 (2006. 01)

CGMCC No. 2907 2009. 02. 27

A61P 1/16 (2006. 01)

(73) 专利权人 中国科学院生物物理研究所

(56) 对比文件

地址 100101 北京市朝阳区大屯路中国科学院生物物理研究所

CN 101132811 A, 2008. 02. 27,

CN 1878793 A, 2006. 12. 13,

CN 1850863 A, 2006. 10. 25,

(72) 发明人 唐捷 周洪哲 王惟 王云波

王维等. 高迁移率族蛋白B1单克隆抗体制备与竞争 ELISA 测定法的建立. 《现代检验医学杂志》. 2007, 5-8.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

审查员 徐俊

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 5/20 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 9 页

序列表 13 页 附图 3 页

(54) 发明名称

抗高迁移率族蛋白 B-1 的单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了抗高迁移率族蛋白 B-1 的单克隆抗体及其应用。一种抗体,其重链可变区具有序列表中序列 1 所示的氨基酸残基序列,其轻链可变区具有序列表中序列 2 所示的氨基酸残基序列。实验证明杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体、衍生于该单克隆抗体的单链抗体 3B1scFv、人-鼠嵌合抗体 ch-3B1 或 Fab 片段与人 HMGB1 的解离常数分别为 7. 8nM, 100nM, 7. 8nM, 40nM。上述单克隆抗体及其衍生物能够高亲和力特异性识别高迁移率族蛋白 B1, 并中和其生物学活性,可以用于治疗败血症,全身炎症反应综合征或急性肺损伤等炎症反应;可以用于治疗类风湿性关节炎,糖尿病或红斑狼疮等自身免疫性疾病。还可用于临床检验 HMGB1 的水平。

CN 101891817 B

1. 由杂交瘤细胞株鼠杂交瘤 CGMCC No. 2907 分泌产生的单克隆抗体。
2. 杂交瘤细胞株鼠杂交瘤,其保藏编号为 CGMCC No. 2907。
3. 一种抗体,其重链可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 1 所示,其轻链可变区的氨基酸残基序列如序列表中序列 2 所示。
4. 一种抗体,其轻链的氨基酸残基序列如序列表中序列 8 所示,重链的氨基酸残基序列如序列表中序列 9 所示。
5. 一种抗体,其氨基酸残基序列如序列表中序列 3 所示。
6. 由杂交瘤细胞株鼠杂交瘤 CGMCC No. 2907 分泌产生的单克隆抗体的 Fab 片段。
7. 权利要求 3 中所述重链可变区的编码基因和所述轻链可变区的编码基因。
8. 权利要求 4 中所述重链和轻链的编码基因。
9. 权利要求 3 所述抗体的编码基因。
10. 权利要求 1、3 或 4 所述的抗体、或权利要求 6 所述的 Fab 片段在制备以人高迁移率族蛋白 B1 为靶点的药物中的应用；
11. 权利要求 1、3 或 4 所述的抗体、或权利要求 6 所述的 Fab 片段在制备预防和 / 或治疗 LPS 诱导的小鼠败血症药物中的应用。

抗高迁移率族蛋白 B-1 的单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗高迁移率族蛋白 B-1 的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] HMGB-1(high mobility group box, I) 是染色体蛋白中高迁移率家族的成员之一。HMGB-1 是一条由 219 个氨基酸残基构成的、分子量为 30kDa 的单链多肽,其表达普遍而且量也较大。蛋白可被分为三大部分:两个同源的 DNA 结合区域(Boxes A 和 B) 及酸性 C 末端。HMG boxes A 和 B 是由相似的 80 个氨基酸片段形成的 L 型结构。

[0003] HMGB-1 结合于双链 DNA 的小沟内,结合部位与 DNA 序列无关,但与其结构密切相关,通常位于节状 DNA、弯曲 DNA 或交叉交叉点处。HMGB-1 可以迅速地弯曲 DNA,促成核蛋白复合体的形成,进而促成 DNA 结合蛋白与其各自对应位点的相互作用。如 p53 转录因子不能直接与直线 DNA 结合,只有在 HMGB-1 先与 DNA 结合并使其弯曲后,p53 才能有效地与其对应位点相结合,然后 HMGB-1 从复合体中脱离出来。HMGB1^{-/-} 鼠在 GR 应答基因的激活上有缺陷,因此会因血糖过低而在出生后不久就死去,此结果进一步支持了 HMGB-1 作为转录调控因子的结论。

[0004] HMGB-1 存在于神经细胞的细胞间隙中,可以刺激神经突起的生长。HMGB1 刺激平滑肌细胞(SMC) 和原纤维细胞的迁移,还能够引起细胞骨架肌动蛋白的重组以及运动型细胞的形态改变。此外, HMGB-1 与纤维蛋白酶原活化系统相关,因此在细胞外蛋白水解、细胞迁移、炎症、纤维蛋白溶解、伤口愈合和肿瘤入侵的调控中发挥作用。

[0005] HMGB-1 不具有信号序列,它的分泌过程不通过经典的“粗面内质网-高尔基体”途径。在活化的单核细胞中, HMGB-1 经过一个从核内到分泌小泡的再分配过程,然后经细胞外分泌得以释放。

[0006] 研究表明,用 LPS 刺激 RAW264.7 细胞,应用 SDS-PAGE 分析细胞培养液中成分变化,18 个小时后,发现有分子量为 30-KD 的蛋白出现。根据该因子的 N 端序列分析,将其归属于 HMG-1,一种 DNA 结合的非组蛋白。HMG-1 后改名为 HMGB-1。

[0007] 小鼠实验证实,注射 LPS、IL-1 或 TNF-8 小时后,单核巨噬细胞开始分泌 HMGB1,并在随后的 24 h 中血清 HMGB1 浓度维持较高水平, HMGB1 抗体可以改善 LPS 引起的内毒素血症;反过来, HMGB1 也可刺激单核巨噬细胞分泌某些促炎因子,如 TNF-、IL-1、IL-6、IL-8 等。注射 HMGB1 小鼠出现内毒素休克样症状。人体检测也发现,脓毒症患者血清 HMGB1 水平升高,并且升高的程度与感染严重性相关。

[0008] 当细胞坏死或受损时,核内的 HMGB1 可释放到胞外,引发单核巨噬细胞分泌促炎因子;而促炎因子又反过来促进 HMGB1 的分泌,这样正反馈环就形成了。在炎症反应的后期,这种正反馈效应对炎症反应的维持起到了相当重要的作用。在近期研究中,发现 HMGB1 的功能与全身炎症反应综合症,急性肺损伤,类风湿性关节炎,糖尿病以及脏器缺血造成的梗塞密切相关。

[0009] 因此,需要一种有效抑制 HMGB1 行使促炎症因子功能的物质,以治疗炎症相关疾

病。

发明内容

[0010] 本发明的一个目的是提供分泌特异性结合人高迁移率族蛋白 B1 的单克隆抗体。

[0011] 本发明所提供的抗体可以为如下 1)、2)、3) 或 4) 所述的抗体：

[0012] 1) 一种抗体，其重链可变区具有序列表中序列 1 所示的氨基酸残基序列，其轻链可变区具有序列表中序列 2 所示的氨基酸残基序列。

[0013] 2) 一种抗体，其轻链具有序列表中序列 8 所示的氨基酸残基序列，重链具有序列表中序列 9 所示的氨基酸残基序列。此抗体为人-鼠嵌合抗体。

[0014] 3) 一种抗体，其氨基酸残基序列如序列表中序列 3 所示。此抗体为单链抗体。

[0015] 4) 由杂交瘤细胞株抗人 HMGB1 杂交瘤 3B1 CGMCC No. 2907 分泌得到的单克隆抗体。

[0016] 由杂交瘤细胞株抗人 HMGB1 杂交瘤 3B1 CGMCC No. 2907 分泌得到的单克隆抗体的 Fab 片段也属于本发明的保护范围。

[0017] 上述 1) 中所述抗体的重链可变区的编码基因和轻链可变区的编码基因也属于本发明的保护范围。

[0018] 上述 2) 中所述抗体的重链和轻链的编码基因也属于本发明的保护范围。所述抗体的轻链编码基因具体具有序列表中序列 6 的核苷酸序列，重链编码基因具体具有序列表中序列 7 的核苷酸序列。

[0019] 上述 3) 中所述抗体的编码基因也属于本发明的保护范围。

[0020] 上述任一所述抗体在制备以人高迁移率族蛋白 B1 为靶点的药物中的应用也属于本发明的保护范围。

[0021] 所述以人高迁移率族蛋白 B1 为靶点的药物可以为用于治疗由人高迁移率族蛋白 B1 参与的炎症反应的药物、用于治疗由人高迁移率族蛋白 B1 参与的自身免疫性疾病的药物、或用于治疗由人高迁移率族蛋白 B1 参与的器官损伤性疾病的药物。

[0022] 所述炎症反应为败血症、全身炎症反应综合症或急性肺损伤；所述自身免疫性疾病为类风湿性关节炎、糖尿病或红斑狼疮；所述器官损伤性疾病为心肌梗塞、脑梗、药物性或病毒性肝损伤。

[0023] 上述任一所述抗体在检验人高迁移率族蛋白 B1 中的应用。

[0024] 本发明的另一个目的是提供一种分泌特异性结合人高迁移率族蛋白 B1 的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0025] 该杂交瘤细胞系为鼠杂交瘤抗人 HMGB1 杂交瘤 3B1，已于 2009 年 2 月 27 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（简称 CGMCC，地址：北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所，邮编 100101），保藏号为 CGMCC No. 2907。

[0026] 实验证明杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体、衍生于该单克隆抗体的单链抗体 3B1scFv、人-鼠嵌合抗体 ch-3B1 或 Fab 片段与人 HMGB1 的解离常数分别为 7.8nM, 100nM, 7.8nM, 40nM。杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体、衍生于该单克隆抗体的单链抗体 3B1scFv、人-鼠嵌合抗体 ch-3B1 或 Fab 片段可以阻断人 HMGB1 刺激 Raw264.7 细胞产生的 IL-6 上调，在 LPS 诱导的小鼠败血症模型中具有保护作用。

[0027] 上述单克隆抗体及其衍生物能够高亲和力特异性识别高迁移率族蛋白 B1, 并中和其生物学活性, 可以用于治疗败血症, 全身炎症反应综合征或急性肺损伤等炎症反应; 可以用于治疗类风湿性关节炎, 糖尿病或红斑狼疮等自身免疫性疾病。还可用于临床检验 HMGB1 的水平。

附图说明

[0028] 图 1 为 ELISA 检测杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体与人 HMGB1 的解离曲线 (纵坐标是 ELISA 显色后的光吸收值)

[0029] 图 2 为杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体在 HMGB1 上的结合位点鉴定。

[0030] 图 3 为杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体特异性鉴定。

[0031] 图 4 为杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体抑制人 HMGB1 刺激 Raw264.7 细胞产生的 IL-6 mRNA 上调。

[0032] 图 5 为注射 LPS 和注射 LPS 和杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的小鼠的存活情况。

具体实施方式

[0033] 下述实验方法, 如无特别说明, 均为常规方法。

[0034] 下述实施例中所使用的试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径购买。

[0035] 实施例 1、鼠杂交瘤 CGMCC No. 2907 及其分泌的抗高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的单克隆抗体的制备和鉴定

[0036] 一、杂交瘤细胞株鼠杂交瘤 CGMCC No. 2907 的制备

[0037] 1、抗原的制备:

[0038] 人 HMGB1 与结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MT) PstS-1 蛋白氨基酸 326-344 小肽 (DQVHFQPLPPAVVKLSDAL) 的融合蛋白 (HMGB1-MT) 的获得: 将编码人 HMGB1 端 181 氨基酸的 cDNA 与小肽通过 PCR 方法重组, 得到融合基因 HMGB1-MT; 将融合基因克隆至删除了 GST 编码区的 PET-41a 载体 (Novagen, USA), 克隆的质粒在 DH5 α 里扩增, 再经由 BL21 中表达, 得到融合蛋白 HMGB1-MT。融合蛋白中带有 6 \times hisTag, 通过 Ni-NTA 亲和层析纯化。

[0039] 2、免疫:

[0040] 以步骤 1 得到的融合蛋白作为抗原免疫 NZB/W F1 小鼠, 共免疫三次: 10 微克 HMGB1-MT 加完全弗氏佐剂皮下免疫 (第一次免疫), 14 天后 5 微克 HMGB1-MT 加不完全弗氏佐剂皮下免疫 (第二次免疫)。14 天后 5 微克 HMGB1-MT 加不完全弗氏佐剂皮下第三次免疫; 3 天后的 NZB/W F1 小鼠取脾中的免疫细胞与鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞以 5 : 1 比例混合, 用聚乙二醇进行融合, HAT 筛选后得到杂交瘤。

[0041] 3、杂交瘤筛选

[0042] GST-HMGB1 重组蛋白的制备: 将人 HMGB1 的编码区 (序列如序列表中序列 11 所示) 克隆至 PET-41a 载体 (Novagen, USA) 的 EcoR I 和 HindIII 酶切位点, 转化至 DH5 α , 抗性筛选得到阳性克隆, 提取阳性克隆的质粒, 测序, 结果质粒中 HMGB1 的序列及插入方向

正确;将阳性质粒转入大肠杆菌BL21,1mM IPTG 诱导表达;纯化:融合蛋白中带有GST Tag,通过谷胱甘肽亲和层析纯化,具体步骤是,将诱导后的菌液 5000rpm10min 离心收集,弃上清,用 PBS 将菌体重悬,超声破碎,5000rpm 离心 10min,弃沉淀,将上清缓慢通过谷胱甘肽层析柱(Sigma),用谷胱甘肽洗脱液将挂在谷胱甘肽层析柱上的融合蛋白洗脱下来,得到 GST-HMGB1 重组蛋白。

[0043] 分泌特异性结合 HMGB1 抗体的杂交瘤检测:以 GST-HMGB1 重组蛋白(10 微克/毫升)作为包被原包板,杂交瘤上清(进行梯度稀释)为一抗,HRP 偶联的羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体(R&D Systems)为二抗进行 ELISA 检测。

[0044] 亚克隆:用限制性稀释法多次克隆分泌特异性抗体的杂交瘤细胞,最后获得杂交瘤细胞株鼠杂交瘤抗人 HMGB1 杂交瘤 3B1。该细胞株已于 2009 年 2 月 27 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所,邮编 100101),保藏号为 CGMCC No. 2907。

[0045] 4、单克隆抗体的制备

[0046] 体外培养方法:

[0047] 将已经建立的杂交瘤细胞 CGMCC No. 2907 置于细胞培养基中,置于 37℃ 和 5% CO₂ 孵箱中培养,每隔 2d 换一次细胞培养液,待细胞浓度大于 10⁵ 个/ml 时停止换液,持续培养到细胞全部死亡。1500rpm,离心 10 分钟,收集培养上清,上清含有高水平的单克隆抗体,-20℃ 保存备用。所述细胞培养基为向 DMEM 培养基中添加胎牛血清,使胎牛血清在细胞培养基中的终浓度为 20% (体积百分含量),所述细胞培养基的 pH 为 7.4。

[0048] 纯化:将体外培养得到的上清进行如下纯化,将上述上清缓慢通过蛋白 A/G 亲和层析柱(Pierce),再用 0.1M Glycine/HCl(pH2.5) 将挂在层析柱上的目的蛋白洗脱下来,得到纯化后的蛋白。

[0049] 5、杂交瘤 CGMCC No. 2907 分泌的抗体的性能检测

[0050] (1)ELISA 检测杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体与 HMGB1 的解离曲线。

[0051] 实验方法:用 HMGB1-MT(制备方法见步骤 1)(2ug/ml) 作为包被抗原,步骤 4 制备纯化的杂交瘤细胞 CGMCC No. 2907 分泌的单抗作为一抗(以 160ug/ml 为起始浓度,二倍二倍进行稀释),羊抗小鼠 IgG-HRP(R&D)(1 : 2000) 为二抗进行 ELISA 测定。

[0052] 实验设 3 次重复,结果如图 1 所示,ELISA 最大读数的 50% 相对应的抗体浓度为抗体的解离常数。表明杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体与 HMGB1 的解离常数为 7.8nM。图 1 的横坐标是杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的浓度。

[0053] (2) 抗体亚型鉴别实验:以 GST-HMGB1 重组蛋白(10 微克/毫升)包板,杂交瘤上清为一抗,HRP 偶联的大鼠抗小鼠 IgG1, IgG2a, 或 IgG2b 单克隆抗体(BD Pharmingen) 为二抗进行 ELISA 检测。实验证明杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体为 IgG2b 亚型。

[0054] (3) 抗体结合位点鉴定:利用 GST-A box、GST-B box 和 GST-A+B Box 分别包板,实验方法:用 GST-A box、GST-B box 和 GST-A+B Box 分别以 2ug/ml 作为包被抗原包板,步骤 4 制备的杂交瘤细胞 CGMCC No. 2907 分泌的单抗作为一抗,羊抗小鼠 IgG-HRP(R&D)

(1 : 2000) 为二抗进行 ELISA 测定。

[0055] GST-A box 的制备步骤:将人 HMGB1 A box 的编码区(序列如序列表中序列 14 所示)克隆至 PET-41a 载体(Novagen,USA)的 BamHI 和 HindIII 酶切位点,转化至 DH5 α ,抗性筛选得到阳性克隆,提取阳性克隆的质粒,测序,结果质粒中 HMGB1 的序列及插入方向正确;将阳性质粒转入大肠杆菌 BL21,1mM IPTG 诱导表达;纯化:融合蛋白中带有 GST Tag,通过谷胱甘肽亲和层析纯化,具体步骤是,将诱导后的菌液 5000rpm 10min 离心收集,弃上清,用 PBS 将菌体重悬,超声破碎,5000rpm 离心 10min,弃沉淀,将上清缓慢通过谷胱甘肽层析柱(Sigma),用谷胱甘肽洗脱液将挂在谷胱甘肽层析柱上的融合蛋白洗脱下来,得到 GST-A box 重组蛋白。

[0056] GST-B box 的制备步骤:将人 HMGB1 B box 的编码区(序列如序列表中序列 15 所示)克隆至 PET-41a 载体(Novagen,USA)的 BamHI 和 HindIII 酶切位点,转化至 DH5 α ,抗性筛选得到阳性克隆,提取阳性克隆的质粒,测序,结果质粒中 HMGB1 的序列及插入方向正确;将阳性质粒转入大肠杆菌 BL21,1mM IPTG 诱导表达;纯化:融合蛋白中带有 GST Tag,通过谷胱甘肽亲和层析纯化,具体步骤是,将诱导后的菌液 5000rpm 10min 离心收集,弃上清,用 PBS 将菌体重悬,超声破碎,5000rpm 离心 10min,弃沉淀,将上清缓慢通过谷胱甘肽层析柱(Sigma),用谷胱甘肽洗脱液将挂在谷胱甘肽层析柱上的融合蛋白洗脱下来,得到 GST-B box 重组蛋白。

[0057] GST-A+B Box 的制备步骤:将人 HMGB1 A+Bbox 的编码区(序列如序列表中序列 11 所示)克隆至 PET-41a 载体(Novagen,USA)的 BamHI 和 HindIII 酶切位点,转化至 DH5 α ,抗性筛选得到阳性克隆,提取阳性克隆的质粒,测序,结果质粒中 HMGB1 的序列及插入方向正确;将阳性质粒转入大肠杆菌 BL21,1mM IPTG 诱导表达;纯化:融合蛋白中带有 GST Tag,通过谷胱甘肽亲和层析纯化,具体步骤是,将诱导后的菌液 5000rpm 10min 离心收集,弃上清,用 PBS 将菌体重悬,超声破碎,5000rpm 离心 10min,弃沉淀,将上清缓慢通过谷胱甘肽层析柱(Sigma),用谷胱甘肽洗脱液将挂在谷胱甘肽层析柱上的融合蛋白洗脱下来,得到 GST-A+B box 重组蛋白。

[0058] 实验设 3 次重复,结果如图 2 所示,3B1 只结合 HMGB1 中间的 A Box。

[0059] (4) 抗体特异性鉴定:用 SDS-PAGE 电泳分离人 PBMC 或 HeLa 细胞的裂解液,以生物素标记的抗体进行 western 检测,Streptavidin-HRP 为二抗,ECL 显色。

[0060] 人 PBMC,用 Ficoll 密度梯度离心法从人全血中分离得到(血液由北京市红十字血液中心提供);HeLa 细胞购自协和细胞中心,产品目录号为 CCC0011。

[0061] Streptavidin-HRP 购自中杉金桥,产品目录号为 ZB-2404。

[0062] 细胞裂解缓冲液:购自上海碧云天生物技术有限公司。

[0063] 人 PBMC 或 HeLa 细胞的裂解液的获得方法:人 PBMC 或 HeLa 细胞用 PBS 洗 2-3 遍,离心收集细胞,按 50 万个细胞加 100 μ l 细胞裂解缓冲液比例加入,同时加入 PMSF,4 度裂解 30 分钟后,12000rpm 4 度离心 15 分钟,取上清即可。

[0064] western 检测方法:细胞裂解中获得的的上清经 10% SDS-PAGE 电泳,转膜后用 10% 脱脂牛奶-TBS 封闭(室温 2 小时),用 TBS-T 洗 3 遍,同 3B1-biotin(1 : 1000TBS 稀释)室温反应 1 小时,再用 TBS-T 洗 3 遍,与 streptavidin-HRP(1 : 8000)室温反应 1 小时,用 TBS-T 洗 3 遍后曝光。

[0065] 实验设 3 次重复,结果如图 3 所示。(图 3 中 CTL 表示 TBS) 表明 3B1 抗体可以与细胞裂解液中内源性的 HMGB1 (大约 30kd 条带) 特异性结合。

[0066] TBS 配方:Tris-HCl 缓冲液 (0.5M pH7.6) 100ml, NaCl 8.5~9g (0.15mol/L), 双蒸水加至 1000ml。

[0067] 6、杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的生物活性鉴定

[0068] 将 Raw264.7 细胞接种于细胞培养基中,向其中分别加入不同的刺激物,培养 4 小时;用 real-time RT-PCR 检测细胞中 IL-6mRNA 水平,所用引物序列为 5' TGG GAAATC GTG GAA ATG AG 3'、5' CTC TGA AGG ACT CTG GCT TTG 3'。实验设 3 次重复。

[0069] 细胞培养基组成:添加了 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。

[0070] Raw264.7 细胞购自协和细胞中心,产品目录号为 CCC0146。

[0071] GST-HMGB1 重组蛋白的制备方法:见步骤 3

[0072] 各实验设如下处理:

[0073] 处理 1:不加任何刺激物;

[0074] 处理 2:只添加 GST-HMGB1 重组蛋白,其在培养体系中的终浓度为 1ug/ml;

[0075] 处理 3:只添加 3B1 单抗(其在培养体系中的终浓度为 50ug/ml);

[0076] 处理 4:添加 GST-HMGB1 重组蛋白(其在培养体系中的终浓度为 1ug/ml)和步骤 4 制备的杂交瘤细胞 CGMCC No. 2907 分泌的单抗(其在培养体系中的终浓度为 50ug/ml),具体方法是先将 GST-HMGB1 重组蛋白和杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体混合,再刺激 Raw264.7 细胞。

[0077] 实验结果如图 4 所示(1 表示处理 1,2 表示处理 2,3 表示处理 3,4 表示处理 4),表明 1ug/ml HMGB-1 能显著上调 IL-6mRNA 的表达水平(处理 2),50ug/ml 的杂交瘤细胞 CGMCC No. 2907 分泌的单抗可以中和 HMGB-1 活性,显著降低 1ug/ml HMGB-1 诱导的 IL-6mRNA 上调(处理 4)。杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体可以阻断人 HMGB1 刺激 Raw264.7 细胞产生的 IL-6mRNA 上调。

[0078] 7、抗 HMGB1 抗体在败血症小鼠模型中的应用

[0079] C57BL/6 雌性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。LPS 购自 Sigma,产品目录号为 L2880。

[0080] 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 16 只,重 19.5g--20.5g,按体重匹配均分为 2 组:PBS 组(LPS+PBS)和抗体组(LPS+3B1)。实验前在 SPF 级动物房中同笼 48 小时,自由进食及水。注射前 2 小时禁食。PBS 组和抗体组小鼠依体重给予 LPS(Sigma 0111:B4) 22.5mg/kg。抗体组在给 LPS 后,给予步骤 4 制备的杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体 5mg/kg,用无菌 PBS 缓冲液将抗体稀释到终体积 200ul。PBS 组在给 LPS 后,给予 PBS 缓冲液,200ul/kg。腹腔内注射。将两组分笼喂养,喂养条件相同。观察给药后情况。实验设 3 次重复。两组小鼠在注射后 12 小时后,观察无明显异常。但在 20hr 后,均出现相似的颤抖,体毛直立,对外界刺激不敏感表现。24 小时后,LPS 组开始有小鼠死亡;各组动物存活情况变化见图 5。说明杂交瘤细胞株 3B1CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体在 LPS 诱导的小鼠败血症模型中具有保护作用。

[0081] 实施例 2、抗 HMGB1 人-鼠嵌合抗体 ch-3B1 的制备

[0082] 鼠抗体在人体内会产生免疫排斥反应,因此只能用于急症的治疗,一旦人体内产

生针对鼠抗体的抗抗体,作为药物的鼠抗体就会失效。为了克服这一缺点,本发明对鼠抗体进行了人源化,制备了人-鼠嵌合抗体 ch-3B1。该抗体的可变区序列来自鼠抗体-杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体,不变区序列来自人 IgG1。这种抗体保持了鼠单抗的抗原结合特异性,同时降低了在人体内诱导的免疫排斥反应。

[0083] 制备嵌合抗体的步骤如下:

[0084] 从杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 中分离纯化 mRNA,用 oligo-dT 合成第一链 cDNA。用 PCR 方法分别扩增抗体轻链和重链可变区,轻链引物为 5' GAY ATT GTG MTSACM CAR WCT MCA 3' 和 5' CTC CAG ATG TTA ACT GCT CAC 3';重链引物为:5' ATGSAR GTN MAG CTG SAG SAG TC 3' 和 5' GGT CAA GGT CAC TGG CTC AGG3'。其中, R = G 或 A, Y = T 或 C, M = A 或 C, S = G 或 C, W = T 或 A, N = G 或 A 或 C 或 T。将 PCR 产物分别克隆到 T 载体中测序。结果表明杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的重链可变区的编码基因具有序列表中序列 4 的核苷酸序列,编码具有序列表中序列 1 的氨基酸残基序列的重链可变区;杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的轻链可变区的编码基因具有序列表中序列 5 的核苷酸序列,编码具有序列表中序列 2 的氨基酸残基序列的轻链可变区。

[0085] 人的轻链和重链不变区基因的获得方法:从人 PBMC 中分离纯化 mRNA,用 oligo-dT 合成第一链 cDNA,用 PCR 方法分别扩增人轻链和重链不变区基因,轻链引物为 5' ttccat act cca gcg ctg cac cat ctg tct tca tct tcc cg3' 和,5' cct cac tct agagtc gcg gcc gcc taa cac tct ccc ctg ttg aag ctc ttt g 3',重链引物为 5' gcgtcg acc aag ggc cca tcg gtc ttc c 3'和5'acc ctc act cta gag teg cgg ccgctc att tac ccg gag aca ggg aga ggc t 3'。

[0086] 单克隆抗体的轻链可变区基因与人的轻链不变区基因的连接:用 PCR 方法先将轻链可变区基因的 3' 端加上人轻链不变区基因 5' 端的一段序列,引物为 5' gct gct gctgtg gtt ccc cgg ctc gcg atg cga tgt ttt gat gac cca aac tcc act ct 3' 和 5' gac aga tgg tgc agc cac agt ccg ttt gat ttc cag ctt g3',再以带有一段人轻链不变区基因的轻链可变区基因和人轻链不变区基因为模板进行 PCR 反应,引物为 5'gct gct gct gtg gtt ccc cgg ctc gcg atg cga tgt ttt gat gac cca aac tcc actct 3' 和 5' cct cac tct aga gtc gcg gcc gcc taa cac tct ccc ctg ttg aag ctcttt g 3'。因轻链可变区基因的 3' 端已带有人轻链不变区基因 5' 端的一段序列,因此在 PCR 的退火阶段,两段基因可自行连接。

[0087] 单克隆抗体的重链可变区基因与人的重链不变区基因的连接:用 PCR 方法先将重链可变区基因的 3' 端加上人重链不变区基因 5' 端的一段序列,引物为 5' ttt tcttgt cgc gat ttt aaa agg tgt cca gtg cca ggt cca act gca gca gcc t 3' 和 5' ggc cct tgg tcg acg ctg agg aga ctg tga gag tgg tgc c3',再以带有一段人重链不变区基因的重链可变区基因和人重链不变区基因为模板进行 PCR 反应,引物为 5'ttt tct tgt cgc gat ttt aaa agg tgt cca gtg cca ggt cca act gca gca gcc t 3' 和 5' acc ctc act cta gag tcg cgg ccg ctc att tac ccg gag aca ggg aga ggc t3'。因重链可变区基因的 3' 端已带有人重链不变区基因 5' 端的一段序列,因此在 PCR 的退火阶段,两段基因可自行连接。

[0088] 将杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的轻链和重链可变区基因

分别与人的轻链和重链不变区基因连接,构建可编码嵌合抗体 ch-3B1 的融合基因,该嵌合抗体轻链的编码基因具有序列表中序列 6 的核苷酸序列,其编码序列为自序列 6 的 5' 端第 1 位 -657 位核苷酸,编码具有序列表中序列 8 的氨基酸残基序列的 ch-3B1 轻链;该嵌合抗体重链的编码基因具有序列表中序列 7 的核苷酸序列,其编码序列为自序列 7 的 5' 端第 1 位 -1341 位核苷酸,编码具有序列表中序列 9 的氨基酸残基序列的 ch-3B1 重链。

[0089] 嵌合抗体轻链表达载体 pCI-gpt-3B1L 的构建:将该嵌合抗体轻链的编码基因(序列 5 所示)插入到有选择性标记(鸟嘌呤磷酸核糖转移酶, gpt)和基因表达调控区(CMV 启动子,终止子)的表达载体 pCI-gpt 的 Nru I 和 Afe I 位点中,得到该嵌合抗体轻链表达载体 pCI-gpt-3B1L。

[0090] 表达载体 pCI-gpt 的构建方法(以 promega 载体 pCI 为模版构建):从 HeLa 细胞(购自协和细胞中心,产品目录号为 CCC0011)中分离纯化 mRNA,用 oligo-dT 合成第一链 cDNA。用 PCR 方法扩增出 gpt(gpt 基因序列见序列表中序列 12),引物为 5' ccgtcg cga agc gct atg agc gaa aaa tac atc gtc acc tgg gac3' 和 5' tta gcg accgga gat tgg cgg gac gaa tac 3'。将 gpt 插入 pCI 的 HindIII 和 BamHI 位点。

[0091] 嵌合抗体重链表达载体 pCI-DHFR-3B1H 的构建:将该嵌合抗体重链的编码基因(序列 4 所示)插入到有选择性标记(二氢叶酸还原酶 DHFR)和基因表达调控区(CMV 启动子,终止子)的表达载体 pCI-DHFR 的 Nru I 和 NotI 位点,得到该嵌合抗体重链表达载体 pCI-DHFR-3B1H。

[0092] 表达载体 pCI-DHFR 的构建方法(以 promega 载体 pCI 为模版构建):从 HeLa 细胞(购自协和细胞中心,产品目录号为 CCC0011)中分离纯化 mRNA,用 oligo-dT 合成第一链 cDNA。用 PCR 方法扩增出 DHFR(DHFR 基因序列见序列表中序列 13),引物为 5' ccg gtc gcg agc ggc cgc atg gtt cga cca ttg aac tgc atc gtc gcc3' 和 5' aagttt gaa gtc tac gag aag aaa gac taa 3'。将 DHFR 插入 pCI 的 HindIII 和 BamHI 位点。

[0093] 用电转染的方法将含有嵌合抗体基因的表达载体 pCI-gpt-3B1L 和 pCI-DHFR-3B1H 一同导入到哺乳动物细胞 NS/0(ECACC 购买)中。用霉酚酸酯(Mycophenolate)在含黄嘌呤(Xanthine)的培养基中筛选转化细胞,获得稳定转染的细胞株,记作 NS/3B1。

[0094] 细胞 NS/3E8 的培养方法:用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。

[0095] 按照实施例 1 的方法用 ELISA 鉴定抗体的分泌。

[0096] 实验设 3 次重复。

[0097] 结果显示得到的 ch-3B1 抗体保留了杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的特异性和亲和力, ch-3B1 抗体与 HMGB1 的解离常数为 7.8nM。

[0098] 实施例 3、抗 HMGB1 单链抗体 3B1 scFV 的制备

[0099] PCR 方法分别扩增杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的轻链和重链可变区基因,然后用 PCR 方法将重链和轻链可变区用富含甘氨酸和丝氨酸的 15 氨基酸片段连接起来,获得抗 HMGB1 单链抗体 3B1 scFV 的编码基因序列(序列 10)。将 3B1 scFV 的编码基因序列克隆到表达载体 pET-26b(Novagen, USA)的 BamH I 和 Xho I 位点,克隆的质粒在 DH5 α 里扩增,再经由 BL21 中表达。表达条件为用 1mM IPTG(购自北京好友新创科技发展有限公司)诱导 2 小时。融合蛋白中带有 6 \times his Tag,通过 Ni-NTA 亲和层析纯化。

表达的 3B1 scFV 具有序列表中序列 3 的氨基酸残基序列。

[0100] 按照实施例 1 的方法用 ELISA 鉴定抗 HMGB1 单链抗体 3B1scFV, 实验设 3 次重复。结果显示抗 HMGB1 单链抗体 3B1scFV 保留了杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的特异性和亲和力, 抗 HMGB1 单链抗体 3B1scFV 与 HMGB1 的解离常数为 100nM。

[0101] 实施例 4、抗 HMGB1 的 Fab 片段 3B1Fab 的制备

[0102] 利用 ImmunoPure[®]Fab 制备试剂盒 (Pierce) 中的固定化木瓜蛋白酶消化杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体, 将全长抗体降解成为 Fab 和 Fc 片段。酶解后的产物用试剂盒中提供的固定化蛋白 A 柱纯化得到 Fab 的抗体片段。按照实施例 1 的方法用 ELISA 鉴定杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的 Fab 片段 3B1Fab。实验设 3 次重复。结果显示杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的 Fab 片段 3B1Fab 保留了杂交瘤细胞株 3B1 CGMCC No. 2907 分泌的单克隆抗体的特异性和亲和力, 抗 HMGB1 单链抗体 3B1Fab 与 HMGB1 的解离常数为 40nM。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 抗高迁移率族蛋白 B-1 的单克隆抗体及其应用

<160>15

<210>1

<211>115

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>1

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
           20           25           30
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
           50           55           60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Lys Arg Gly Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
           100          105          110
Leu Thr Val
           115

```

<210>2

<211>113

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>2

Asp	Val	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Ala	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70						75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	
Ala	His	Val	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100						105					110	

Arg

<210>3

<211>245

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Arg Gly Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Gly
 115 120 125
 Ser Gly Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro
 130 135 140
 Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 145 150 155 160
 Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys
 165 170 175
 Ala Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 210 215 220
 Cys Phe Gln Gly Ala His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210>4

<211>345

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>4

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gccttgaatg gattggtaat attgaccctt ctgatagtga aactcactac	180
aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcagctca acagtctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaaaggggg	300
tactacggct acgactactg gggccaagge accactctca cagtc	345

<210>5

<211>339

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>5

gatgttttga tgacceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgcga gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga aagcaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt	180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagate	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttctt	300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg

339

<210>6

<211>657

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>6

gatgttttga tgacceaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg	120
tacctgcaga aagcaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt	180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctggggagt tattactgct ttcaagggtc acatgttcct	300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgga ctgtggctgc accatctgtc	360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa	480
tcggtgtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt	657

<210>7

<211>1341

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>7

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gccttgaatg gattggtaat attgaccctt ctgatagtga aactcactac	180
aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240
atgcagctca acagtctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaaaggggg	300
tactacggct acgactactg gggccaagge accactctca cagtctcctc agcgtcgacc	360
aagggcccat cggctctccc cctggcacce tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca	480
ggcgcctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac	540
tcctcagca gcgtggtgac cgtgcccctc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctggggggg accgtcagtc	720
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag	1080
aaccaggtea gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
gacggctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag ggtctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtaa a	1341

<210>8

<211>219

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>8

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ala His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210>9

<211>447

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Arg Gly Tyr Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
	325	330
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
	340	345
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
	355	360
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
	370	375
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	405	410
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Gly Leu		
	420	425
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440
		445

<210>10

<211>735

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>10

caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg	60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg	120
cctggacaag gccttgaatg gattggtaat attgaccctt ctgatagtga aactcactac	180
aatcaaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac	240

atgcagctca acagtctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaaaggggg	300
tactacggct acgactactg gggccaagge accactctca cagtctcctc aggtcttggc	360
tcttctggct ctggctcttc tggtcttggc tcttctgatg ttttgatgac ccaaactcca	420
ctctccctgc ctgtcagtct tggagatcaa gcctccatct cttgcagatc tagtcagagc	480
attgtacata gtaatggaaa cacctattta gaatggtacc tgcagaaagc aggccagtct	540
ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac cgattttctg gggcccaga caggttcagt	600
ggcagtgat caggacaga tttcacactc aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg	660
ggagtttatt actgcttca aggtgcacat gttcctcgga cgttcgggtg aggcaccaag	720
ctggaatca aacgg	735

<210>11

<211>510

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>11

atgggcaaag gagatcctaa gatgggcaaa ggagatccta agaagccgag aggcaaaatg	60
tcatcatatg cttttttgt gcaaacttgt cgggaggagc ataagaagaa gcaccagat	120
gcttcagtca acttctcaga gttttctaag aagtgtcag agaggtggaa gaccatgtct	180
gctaaagaga aaggaaaatt tgaagatatg gcaaaagcgg acaaggcccg ttatgaaaga	240
gaaatgaaaa cctatatccc tccc aaagg gagacaaaaa agaagttcaa ggatcccaat	300
gcaccaaga ggcctccttc ggccttcttc ctcttctgct ctgagtatcg cccaaaaatc	360
aaaggagaac atcctggcct gtccattggg gatgttgcga agaaactggg agagatgtgg	420
aataacactg ctgcagatga caagcagcct tatgaaaaga aggctgcgaa gctgaaggaa	480
aaatacgaaa aggatattgc tgcatatcga	510

<210>12

<211>459

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>12

atgagcga	aaatacat	cgctcac	ctgggac	atgttcaga	tccatgcac	gtaaac	tcgca	60
agccgact	gagtcctt	ctgaca	acaatgg	aaaggc	attattg	ccgtaag	ccgtgg	120
gtaccggg	tgcttact	ggcgc	gactg	aaactg	ggtattc	gcatc	gatac	180
tccagctac	gatacag	caaa	ccagcgc	gagctta	aaagtgc	tgaaac	gcgc	240
ggcgaagg	cttcatt	gatgac	ctgtg	ataccg	gtggta	ctgc	gatt	300
cgtgaaat	gtatcca	aaagc	gcacttt	gcatc	cttcg	caaaac	cggc	360
ctggttg	atgact	gttg	atcccc	caagata	ctgg	attgaa	ca	420
atgggcg	tcgtat	ccca	atctcc	ggtcg	ctaa			459

<210>13

<211>564

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>13

atggttcg	acattgaa	ctgac	ctgcc	gtgtccca	aaatatg	gggat	tgcaaga	ac	60
ggagaccg	acctggc	ctccg	ctcagga	acgag	ttcaagt	acttcca	aaag	aatgacc	120
acctcttc	agtgga	aggtaa	acagaat	ctgtg	attatg	gtaggaa	aac	ctggtt	180
attcctga	gagaaga	atcgacc	tttaaag	gac	agaatta	aatag	ctcag	tagaga	240
aaagaacc	acacgag	gagctc	attttct	tggca	aaagt	tggatg	atgc	cttaaga	300
attgaaca	aaccgga	attggc	aaagta	agatg	gttt	ggatag	tcgg	aggcag	360
gtttacc	agga	atgaa	tcaacc	agc	cacctc	agac	tctttg	tgc	420
								aagga	420

caggaatttg aaagtgacac gtttttcecca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc	480
ccagaatacc caggcgtcct ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt	540
gaagtctacg agaagaaaga ctaa	564

<210>14

<211>237

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>14

atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg	60
caaacttgtc gggaggagca taagaagaag cacccagatg cttcagtcaa cttctcagag	120
ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt	180
gaagatatgg caaaagcgga caaggcccggt tatgaaagag aatgaaaac ctatatac	237

<210>15

<211>207

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>15

cccaagagge ctcttctegge cttcttctctc ttctgtctctg agtatcgccc aaaaatcaaa	60
ggagaacate ctggcctgtc cattgggtgat gttgcaaga aactgggaga gatgtggaat	120

aacactgctg cagatgacaa gcagccttat gaaaagaagg ctgcgaagct gaaggaaaa	180
tacgaaaagg atattgctgc atatega	207

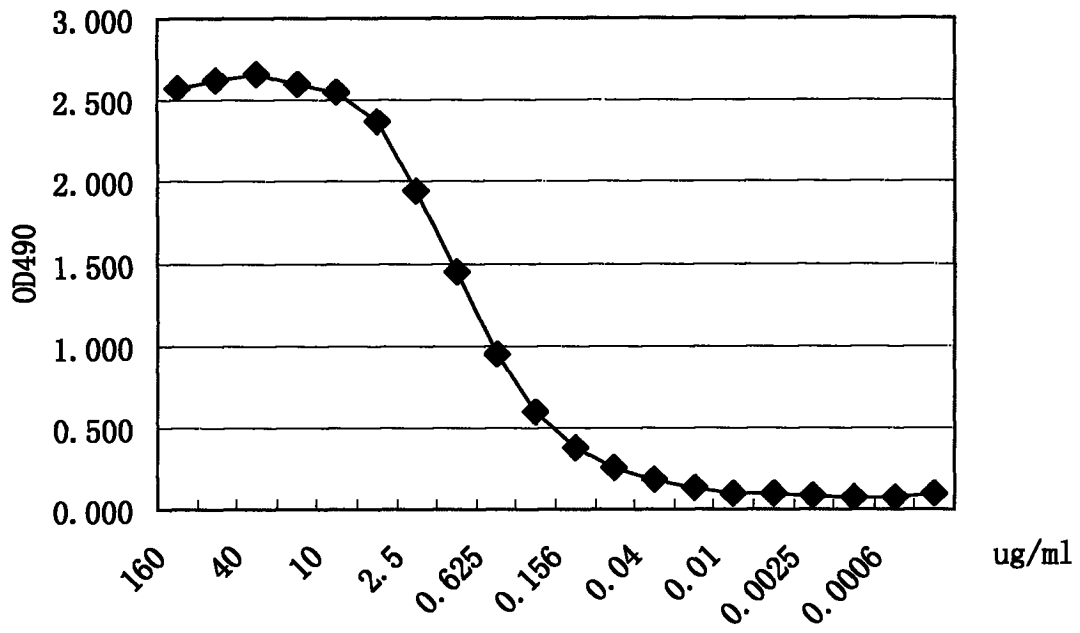


图 1

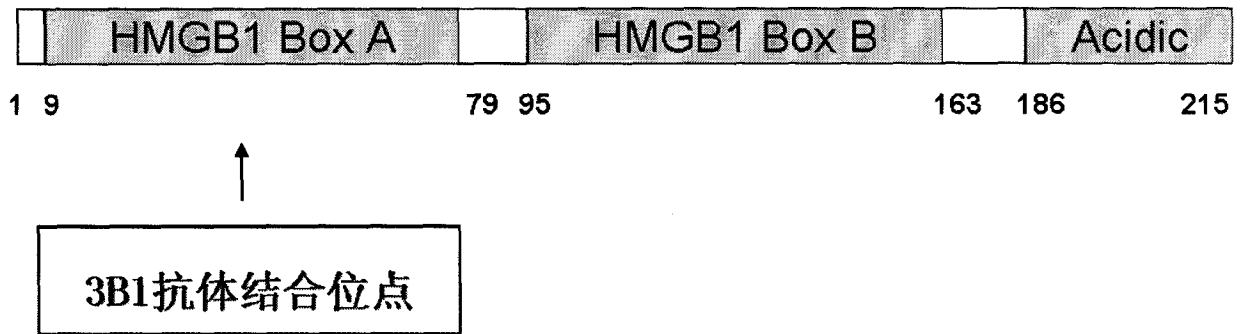


图 2

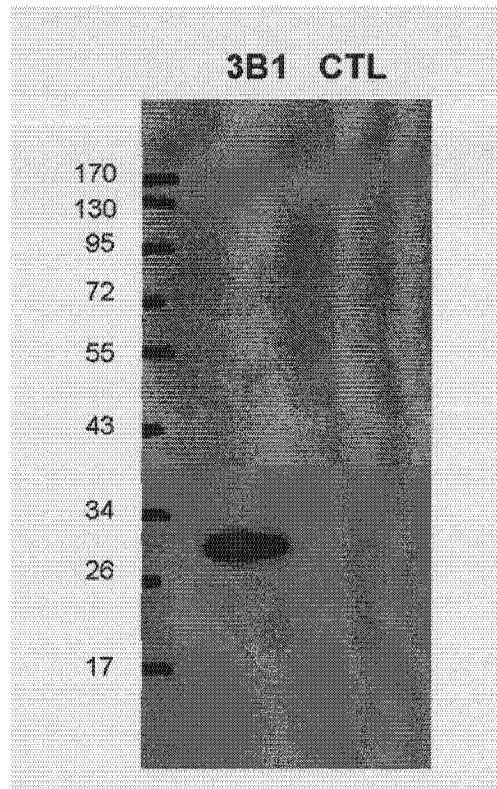


图 3

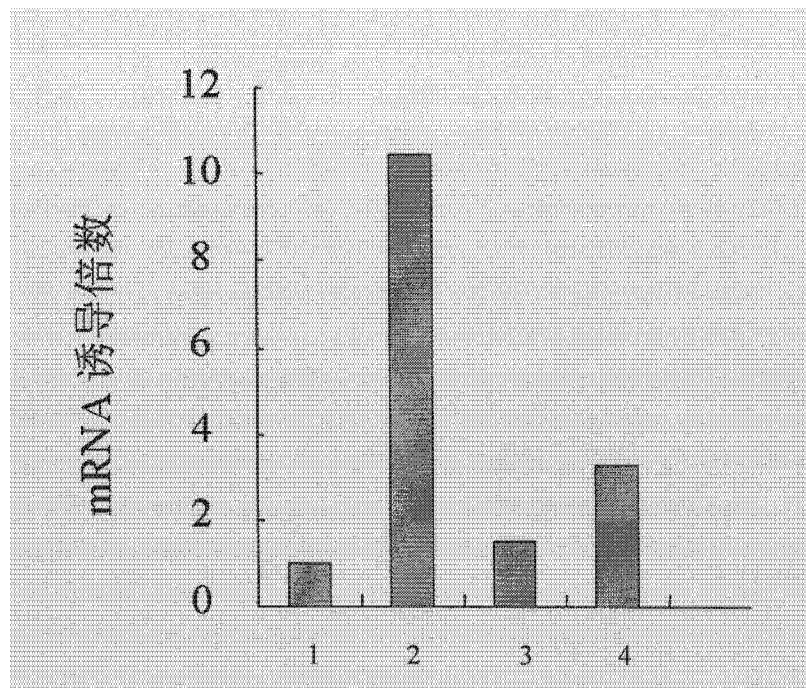


图 4

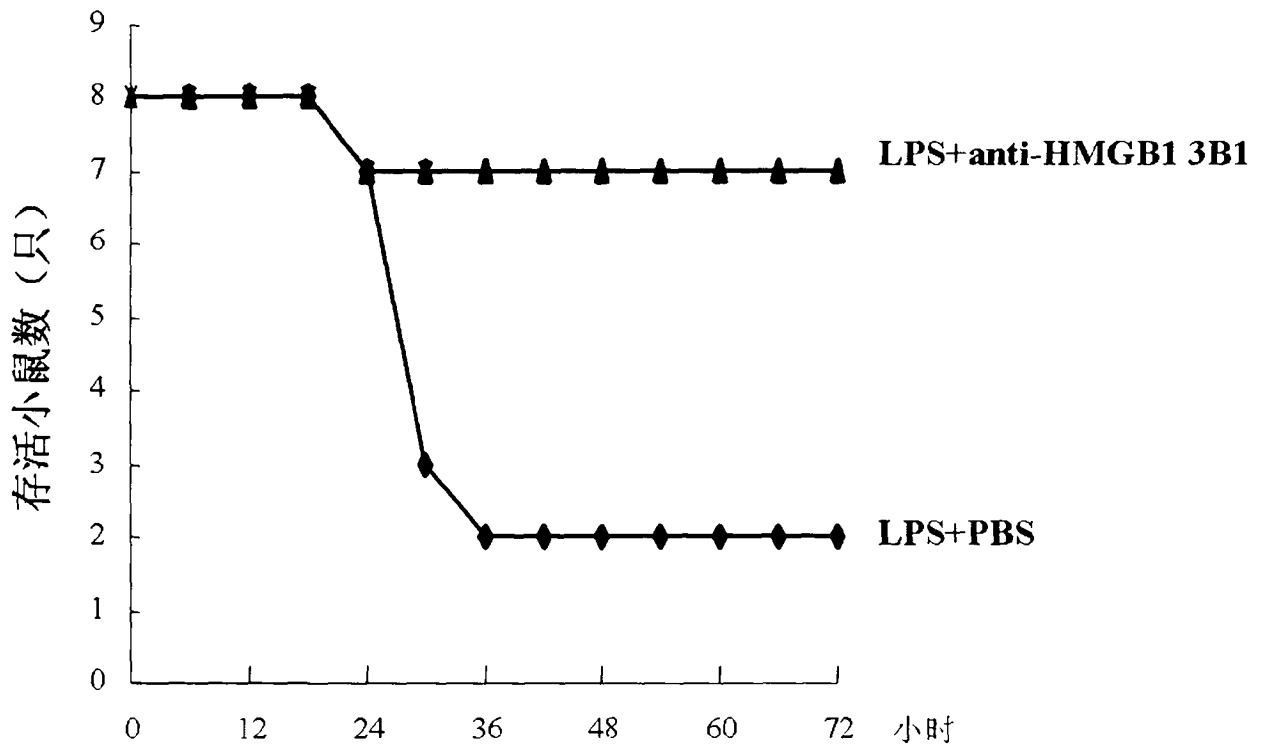


图 5