

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年3月16日 (16.03.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/036305 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C07K 16/18* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/118162

(22) 国际申请日: 2022年9月9日 (09.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202111068177.1 2021年9月13日 (13.09.2021) CN

(71) 申请人: 沈阳眼产业技术研究院有限公司 (SHENYANG EYE INDUSTRY TECHNOLOGY INSTITUTE LTD.) [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。

(72) 发明人: 李雪娇 (LI, Xuejiao); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 何伟 (HE, Wei); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 张朔 (ZHANG, Shuo); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 赵航 (ZHAO, Hang); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 冯铃 (FENG, Ling); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 刘辉 (LIU, Hui); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 赵洪礼 (ZHAO, Hongli); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。 何向东 (HE, Xiangdong); 中国辽宁省沈阳市浑南区泗水街66号, Liaoning 110163 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW CO., LTD.); 中国北京市朝阳区建国门外大街22号赛特广场7层, Beijing 100004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) Title: ANTI-PERIOSTIN HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODY, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗periostin人源化单克隆抗体及其制备方法与应用

(57) Abstract: Provided in the present application are an anti-periostin humanized monoclonal antibody, and a preparation method therefor and the use thereof. The anti-periostin humanized monoclonal antibody has a relatively high expression level, and also has a better binding specificity and affinity to an antigen.

(57) 摘要: 本申请提供了抗periostin人源化单克隆抗体及其制备方法与应用, 所述抗periostin人源化单克隆抗体的表达量较高, 与抗原结合的特异性和亲和性较好。



WO 2023/036305 A1

## 抗 periostin 人源化单克隆抗体及其制备方法与应用

本申请要求于 2021 年 09 月 13 日提交中国专利局、申请号为 202111068177.1、  
发明名称为“抗 periostin 人源化单克隆抗体及其制备方法与应用”的中国专利申请的优  
5 先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

### 技术领域

本发明涉及抗体药物技术领域，尤其涉及抗 periostin 人源化单克隆抗体及其制备  
10 方法与应用。

### 背景技术

增生型糖尿病性视网膜病变( proliferative diabetic retinopathy, PDR)、增生性玻璃  
体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR) 和年龄相关性黄斑变性(age-related  
15 macular degeneration, AMD)等玻璃体视网膜疾病是现阶段导致相应人群视力下降和  
丧失的主要原因，也是世界性医学难题。因此，寻玻璃体视网膜疾病的新的生物学标  
记物和治疗靶点对疾病的早期发现、早期诊断及早期治疗至关重要。

骨膜蛋白(periostin) 是于 1993 年发现于小鼠胚胎成骨细胞前体细胞中的细胞黏  
附蛋白，命名为成骨细胞特异性因子-2(OSF-2)，因其在成年小鼠牙周膜和骨膜可以  
20 特异性表达，故更名为骨膜蛋白。骨膜蛋白(periostin) 是一种独特的细胞外基质蛋白，  
参与人体各组织器官的相应免疫炎症反应，如心肌梗死后重塑、骨髓纤维化、牙周组  
织再生修复、皮肤伤口愈合、肿瘤细胞转移、肾脏损伤、以及可诱导慢性过敏性疾  
病等。近年以 periostin 为靶点的药物研究与生产成为热点，大量上市药物在肿瘤治疗  
过程中取得了令人瞩目的成绩。

骨膜蛋白在眼部的主要作用包括促进细胞增殖、分化、迁移和粘附，诱导纤维形  
成以及促进新生血管等。越来越多的国内外研究证明，骨膜蛋白是各玻璃体视网膜疾  
25 病中的关键因子，骨膜蛋白有望成为玻璃体视网膜疾病的新的生物学标志物，以此提  
供新的治疗策略。例如，有报道称：Periostin 抗体已被证实对眼科诸多领域对年龄相  
关性黄斑变以及糖尿病视网膜病变所引发的眼内部的新生血管性增生、黄斑水肿等治  
30 疗起到关键作用。

但此前的 Periostin 抗体皆为鼠源单抗，鼠源性抗体作为异源蛋白应用于人体会引  
起针对异源蛋白的免疫排斥反应，诱发产生人抗鼠抗体，缩短抗体在体内的半衰期影  
响抗体的治疗效果。因此，在保持对特异性抗原表位高亲和力的基础上对 Periostin 抗  
35 体进行人源化改造，能够减少异源抗体的免疫原性，提高与抗原结合的特异性和亲和  
性，从而起到更好的治疗作用。

### 发明内容

有鉴于此，本发明要解决的技术问题在于提供抗 periostin 人源化单克隆抗体及其  
40 制备方法与应用。

本发明提供的抗 periostin 人源化单克隆抗体，其重链可变区具有如 SEQ ID NO:1  
所示的氨基酸序列；其轻链可变区具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

本发明提供的抗 periostin 人源化单克隆抗体，其重链的恒定区为人 IgG1；其轻  
链的恒定区为人κ型。

一些具体实施例中，所述人源化抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，

-2-

其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

本发明利用 periostin 鼠源单抗，对其进行人源化改造，成功构建真核表达质粒，转染哺乳动物细胞 CHO 进行分泌表达，通过 SDS-PAGE、ELISA、WB 等在体外进行了亲和力、结合活性等生物学功能评价，为 CHO 细胞大规模表达抗 periostin 人源化单克隆抗体研究提供了理论基础。

本发明提供的抗 periostin 人源化单克隆抗体以上述重链及轻链组成，经人源化后，比现有技术中的嵌合抗体或其他鼠源 periostin 单克隆抗体更加安全可靠的、功能更显著。经检测，该人源化抗体对人 periostin 具有良好的特异性。鉴于 Periostin 抗体已被证实对眼科诸多领域对年龄相关性黄斑变以及糖尿病视网膜病变所引发的眼内部的新生血管性增生、黄斑水肿等治疗起到关键作用。因此，本发明提供的抗体具有潜在的治疗组织纤维化病变的作用。

本发明还提供了编码所述的单克隆抗体的核酸。具体的，本发明提供了编码所述单克隆抗体重链的核酸、编码所述单克隆抗体轻链的核酸、编码所述单克隆抗体重链可变区的核酸和/或编码所述单克隆抗体轻链可变区的核酸。一些实施例中，编码所述抗体重链的核酸具有如 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列。编码所述抗体轻链的核酸具有如 SEQ ID NO:6 所示的核酸序列。为了方面蛋白的表达，本发明提供的编码核酸的 5'端还包括接头序列。因此，一些具体实施例中，编码所述抗 periostin 人源化单克隆抗体重链的核酸具有如 SEQ ID NO:7 所示的核酸序列；编码抗 periostin 人源化单克隆抗体的轻链核酸具有如 SEQ ID NO:8 所示的核酸序列。

本发明还提供了一种表达载体，包括编码所述的单克隆抗体的核酸。本发明中，所述表达载体中还包括骨架载体；一些实施例中，所述骨架载体为 pCDNA3.4。

本发明还提供了转化或转染所述表达载体的宿主细胞。本发明中，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，一些具体实施例中，所述宿主细胞为 CHO-K1 细胞。

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的制备方法包括：培养本发明宿主细胞、诱导抗 periostin 人源化单克隆抗体的表达。

本发明还提供了抗 periostin 人源化单克隆抗体在制备药物或检测试剂中的应用，所述药物为治疗组织纤维化病变和/或恶性肿瘤的药物。所述试剂为诊断组织纤维化病变和/或恶性肿瘤的试剂。一些实施例中，所述组织纤维化病变为视网膜纤维化。

本发明提供了一种药物，其包括本发明所述的抗 periostin 人源化单克隆抗体。

本发明还提供了一种试剂盒，其含有抗 periostin 人源化单克隆抗体，或包括将该抗体与化学标记或生物标记形成的结合物，或包括所述抗 periostin 人源化单克隆抗体与固体介质或半固体介质偶联制得的偶联物。

本发明中所述化学标记为同位素、免疫毒素和/或化学药物；所述生物标记为生物素、亲和素或酶标记。所述酶标记优选为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。所述免疫毒素优选为黄曲霉毒素、白喉毒素、绿脓杆菌外毒素、蓖麻毒蛋白、相思子毒蛋白、榭寄生凝集素、莨菪根毒素、PAP、造草素、白树毒素或丝瓜毒素。所述偶联物中的固体介质或非固体介质选自胶体金、聚苯乙烯平板或珠粒。该试剂盒能够用于组织纤维化病变和/或恶性肿瘤的诊断。所述诊断的方法采用免疫学检测方法，例如 ELISA、western blot、免疫荧光技术、免疫组化检测等。

本发明还提供了一种治疗组织纤维化病变和/或恶性肿瘤的方法，其为给予本发明所述的药物。

本发明还提供了一种诊断组织纤维化病变和/或恶性肿瘤的方法，其为以本

发明所述的诊断试剂进行诊断

本发明提供提供了抗 periostin 人源化单克隆抗体, 该抗体仅保留鼠源性 McAb 可变区中与抗原结合的互补决定区, 制备 CDR 移植抗体。与嵌合抗体相比, 其免疫原性更低。相对于实验中的其他抗体, 本发明筛选获得的抗体表达量更高, 与抗原结合的特异性和亲和性更好, 能更好地参与人体免疫反应。

### 附图说明

- 图 1 示鼠杂交瘤细胞 (45-2-G3-1-G7-B7) VH 和 VL PCR 扩增结果;  
图 2 示克隆后 PCR 结果;  
10 图 3-1 和图 3-2 示重链和轻链的质粒图谱;  
图 4 示纯化效果;  
图 5 示 18 个人源化抗体的 ELISA 结果;  
图 6 示表达载体电泳检测结果;  
图 7 示线性化表达载体电泳检测结果;  
15 图 8 示加压筛选后蛋白表达纯化结果;  
图 9 示筛选获得细胞表达蛋白纯化结果;  
图 10 示人源化抗 periostin 抗体 5-G4、5-G6、5-G9 鉴定;  
图 11 示微管抑制实验结果, 其中, Periostin 抗体为人源化单抗, 对照 Periostin 为小鼠单抗;  
20 图 12 示细胞迁移实验结果;  
图 13 示相对于空白对照组的细胞迁移率;  
图 14 示细胞侵袭实验结果;  
图 15 示相对于空白对照组的细胞侵袭率;  
图 16 示细胞划痕实验结果;  
25 图 17 示细胞相对迁移距离 (%);  
图 18 示不同组别 RPE 细胞中 VEGFA、 $\alpha$ -SMA、Col I、Col III、Fibronectin 蛋白的表达 WB 检测图;  
图 19 示不同组别 RPE 细胞中 VEGFA、 $\alpha$ -SMA、Col I、Col III、Fibronectin 蛋白的表达水平;  
30 图 20 示各组血管内皮细胞膜上的 $\alpha$ v $\beta$ 3、 $\alpha$ v $\beta$ 5 整合素, VEGFR-2、FAK、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的 mRNA 表达量;  
图 21 示不同组别 HUVEC 细胞中各个蛋白的 Western blot 检测图;  
图 22 示不同组别 HUVEC 细胞中各个蛋白的表达水平;  
图 23 示 IF 检测 HUVEC 细胞中 FAK 蛋白的表达;  
35 图 24 示 IF 检测 HUVEC 细胞中 VEGFR2 蛋白的表达;  
图 25 示 IF 检测 HUVEC 细胞中 $\alpha$ v $\beta$ 3 蛋白的表达;  
图 26 示 IF 检测 HUVEC 细胞中 $\alpha$ v $\beta$ 5 蛋白的表达。

### 具体实施方式

本发明提供了抗 periostin 人源化单克隆抗体及其制备方法与应用, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的

方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文的方法和/或应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

除非另有定义, 本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的含义。关于本领域的定义及术语, 专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。

“抗体”是指由能特异结合抗原的一种或多种多肽构成的蛋白质。抗体的一种形式构成了抗体的基本结构单元。这种形式是四聚物, 它由两对完全相同的抗体链构成, 每一对都有一个轻链和一个重链。在每对抗体链中, 轻链和重链的可变区联合在一起共同负责结合抗原, 而恒定区则负责抗体的效应器功能。所述“单克隆抗体”系指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和性。

抗体重链或轻链的“可变区”是该链的 N 端成熟区域。目前已知的抗体类型包括  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链, 以及  $\alpha$ ,  $\gamma$  (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4),  $\delta$ ,  $\epsilon$  和  $\mu$  重链或它们的其它类型等价物。全长的免疫球蛋白“轻链”(大约 25kDa 或大约 214 个氨基酸) 包含一个由 NH<sub>2</sub>-末端上大约 110 个氨基酸形成的可变区, 以及一个 COOH-末端上的  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区。全长的免疫球蛋白“重链”(大约 50kDa 或大约 446 个氨基酸), 同样包含一个可变区(大约 116 个氨基酸), 以及重链恒定区之一, 例如  $\gamma$  (大约 330 个氨基酸)。

“抗体”包括任何同型体的抗体或免疫球蛋白, 或保持与抗原特异结合的抗体片段, 包括但不限于 Fab, Fv, scFv 和 Fd 片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体以及包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白质的融合蛋白质。本发明提供的为 periostin 的人源化单克隆抗体。从培养的杂交瘤细胞 45-2-G3-1-G7-B7 中提取总 RNA, 用寡核苷酸引物反转录合成 cDNA, 用 IgG 简并引物和 kappa 特异性引物分别扩增 VH 和 VL 片段, 用凝胶电泳观察到结果(图 1)。然后将 PCR 产物亚克隆到标准载体中, 进行克隆采摘和 PCR 验证(图 2), 最后对阳性克隆进行测序。采用基因合成法, 将抗 Periostin 鼠单克隆抗体的可变区基因的框架区替换为人抗体的框架区, 人源化抗体可变区基因片段, 重组入含有调控序列和人抗体恒定区基因的载体中, 构建抗 Periostin 人源化单克隆抗体的完整基因及包含所述基因的真核表达载体, 再转染 CHO-K1 细胞。经 GS 系统加压筛选, 获得持续稳定分泌人源化抗体的 CHO-K1 细胞。

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为:  
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFTDYFMNWVRQMPGKGLEWIGRINPYS  
GDTLYNQRLQGQVTLADKISISTAYLQLSSLKASDTAMYCYCGRSGVSGLDYWGQG  
TLVTVSS (SEQ ID NO:1)。

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为:  
DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSASYMHYQQKPGKAPKNWIYDTSKLSG  
VPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID  
NO:2)。

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的重链恒定区的氨基酸序列为:  
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

-5-

QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV  
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK。

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的轻链恒定区的氨基酸序列为：  
RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
5 TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的重链的氨基酸序列为：  
MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFTDYFMNW  
VRQMPGKGLEWIGRINPYS GDTLYNQRLQGQVTL SADKSISTAYLQLSSLKASDTA  
MYYCGRSGVSGLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  
10 DYFPEPVTVSWNSGALTS GVTFAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  
KPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS  
15 VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:3)。

本发明所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的轻链的氨基酸序列为：  
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSASYMHWYQQ  
KPGKAPKNWIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSN  
PPTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVD  
20 NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGEC (SEQ ID NO:4)。

为了方便抗体的表达和纯化，在载体构建和蛋白表达的过程中，分别在重链片段和轻链片段的 N 端添加接头片段。该片段在后续纯化过程中被去掉。一些实施例中，所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的重链的 N 端添加的接头的氨基酸序列为  
25 MKHLWFFLLLVAAPRWLS，所述抗 periostin 人源化单克隆抗体的轻链的 N 端添加的接头的氨基酸序列为 MVLQTQVFISLLLWISGAYG。

抗体可以被标记和检测，例如，可以通过放射性同位素、能产生可检测物的酶、荧光蛋白质、生物素等等进行标记并被检测。抗体还可以结合于固相载体，包括但不限于聚苯乙烯平板或珠粒等等。

本发明所述药物中含有至少一种功能成分，还包括可药用的载体。优选地，所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如 PBS (磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌肉或静脉施用。根据本  
35 发明的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。

本发明采用的试材皆为普通市售品，皆可于市场购得。下面结合实施例，进一步阐述本发明：

## 40 实施例 1

### 1、抗体人源化设计

#### (1)、CDR 区序列鉴定

由鼠杂交瘤细胞 (45-2-G3-1-G7-B7，构建方法参见《抗人 periostin 单克隆嵌合

-6-

抗体及应用》，申请号：202010788885.1，来自沈阳何氏眼产业集团有限公司或沈阳眼产业技术研究院有限公司)分离出全部 mRNA，以此作为合成 cDNA 的模板，从 cDNA 中分离重链可变区 DNA 片段及轻链可变区 DNA 片段，再将这些得到的 DNA 片段克隆进载体并测序得到序列结果如下：

5 氨基酸序列：

>45-2-G3-1-G7-B7-VL1

DIVLTQSPAIMSASPGDKVTMTCSASSSASYMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKL  
ASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

>45-2-G3-1-G7-B7-VL2 and VL3

10 QIVLTQSPVIMSASPGDKVTMTCSASSSASYMHWYQKSGTSPKRWIYDTSKL  
ASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK

>45-2-G3-1-G7-B7-VH

15 EVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYSFTDYFMNWKQSHGRSLEWIGRINP  
YSGDTLYNQRLK GKATLTVDKSSSTAHEMELLSLTSEDSAVYYCGRSGVSGLDYWG  
QGTSVTVSS

轻链可变区中的 3 个 CDR 区的氨基酸序列依次为：SSASY、DTS、QQWSSNPPT。

重链可变区中的 3 个 CDR 区的氨基酸序列依次为：GYSFTDYF、INPYSGDT、GRSGVSGLDY。

(2) 序列比对及鼠源抗体 CDR 移植

20 使用 NCBI 开发的 Igbblast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 搜索 IMGT 小鼠和人类 V 基因数据库，输入小鼠抗体可变区序列，序列比对后确定同源性最高的人抗体可变区，然后将小鼠抗体 CDR 区域移植到的人类框架受体区域，以此完成 CDR 移植。

2、18 个人源化抗体载体构建及表达

25 (1) 基因合成

将可变区序列与人恒定区 DNA 序列链接，插入 pcDNA3.4 表达载体，得到质粒图谱(图 3-1 和图 3-2)，periostin 抗体的重链和轻链核酸序列、氨基酸序列如下所示。

(2) 亚克隆到表达载体

基因合成后对 CHO 系统密码子优化，并亚克隆到表达载体 PATX1。

30 核酸序列信息包括：

**DNA 序列**

>12-VHA-1423bp

gaattgccgccaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTTCCTGCTGCTGGTGGCCGCCCC  
AGGTGGGTTCTGTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAA  
35 GCCTGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTATAGCTTTACCGAT  
TATTTTCATGAAGTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCTTGGAGTGGATCGGC  
AGGATCAACCCTTACTCCGGCGACACCCTGTATAACCAGAGGCTGAAGGGCCGG  
GCCACCCTGACCGTGGATAAGAGCATCAGCACCGCTTATATGGAGCTGTCCCGG  
CTGCGGTCCGACGACACCGCTGTGTATTACTGCGGCAGGTCCGGCGTGTCCGGC  
40 CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCgctagcACCAAGG  
GACCTTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCCACTTCCGGTGGTACAGC  
AGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCAGAACCAGTGAAGTGTGTCCTG  
GAACTCCGGAGCTCTGACTTCTGGAGTGCATACTTCCAGCAGTGTGCAATC

-7-

TAGCGGACTGTACTCTCTGTCTTCCGTGGTGACTGTGCCTTCTTCTTCCCTGGGG  
ACTCAAACCTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGA  
CAAGAAGGTGGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTGTC  
CAGCTCCAGAAGTGTGGGTGGGCCTTCTGTGTTTCTGTTCCACCTAAGCCAA  
5 AGGATACCCTGATGATCTCTAGGACCCCAGAAGTGACCTGTGTGGTCGTCGATG  
TGTCTCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAA  
GTGCATAACGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAGCAATACAACCTCCACCTACAG  
GGTGGTCTCCGTCTGACAGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA  
CAAGTGCAAGGTCTCCAATAAAGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATTAG  
10 CAAAGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCCCCAGCA  
GGGAGGAGATGACAAAAAATCAGGTCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGGCTTT  
TATCCCAGCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAATAAT  
TATAAAACAACACCCCCCGTCCTGGACAGCGACGGCAGCTTTTTTCTGTATAGC  
AAACTGACAGTCGATAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGCAG  
15 CGTCATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACTCAGAAAAGCCTGAGCCTGTC  
CCCCGGGAAATGAGCGGCCGC

**>12-VHB-1423bp**

gaattcgccgaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCT  
CGGTGGGTGCTGTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAA  
20 GCCTGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCTGTAAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGA  
CTACTTTATGAACTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
CAGGATCAACCCCTATAGCGGCGACACCCTGTACAATCAGAAGCTGCAGGGCCG  
GGTGACCATGACCGTGGACAAGTCCATCAGCACCGCTTACATGGAGCTGTCCCG  
GCTGCGGAGCGACGATAACCGCTGTGTATTACTGCGGCCGGTCCGGCGTGAGCGG  
25 CTTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCTCCgctagcACCAAGG  
GACCTTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCCACTTCCGGTGGTACAGC  
AGCTCTGGGTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAACCAGTGACTGTGTCTG  
GAACTCCGGAGCTCTGACTTCTGGAGTGCATACTTCCCAGCAGTGCTGCAATC  
TAGCGGACTGTACTCTCTGTCTTCCGTGGTGACTGTGCCTTCTTCTTCCCTGGGG  
30 ACTCAAACCTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGA  
CAAGAAGGTGGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTGTC  
CAGCTCCAGAAGTGTGGGTGGGCCTTCTGTGTTTCTGTTCCACCTAAGCCAA  
AGGATACCCTGATGATCTCTAGGACCCCAGAAGTGACCTGTGTGGTCGTCGATG  
TGTCTCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAA  
35 GTGCATAACGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAGCAATACAACCTCCACCTACAG  
GGTGGTCTCCGTCTGACAGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA  
CAAGTGCAAGGTCTCCAATAAAGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATTAG  
CAAAGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCCCCAGCA  
GGGAGGAGATGACAAAAAATCAGGTCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGGCTTT  
40 TATCCCAGCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAATAAT  
TATAAAACAACACCCCCCGTCCTGGACAGCGACGGCAGCTTTTTTCTGTATAGC  
AAACTGACAGTCGATAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGCAG  
CGTCATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACTCAGAAAAGCCTGAGCCTGTC

CCCCGGGAAATGAGCGGCCGC

**>459-VHA-1423bp**

gaattcgccgccaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCCTGCTGCTGGTGGCCGCCCCCGG  
 TGGGTGCTGTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCC  
 5 CAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGCTTCCGGCTACAGCTTCACCGATTA  
 CTTCATGAACTGGGTGCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCTTGGAGTGGATCGGCA  
 GGATCAACCCTTACAGCGGCGACACCCTGTATAATCAGCGGCTGAAGGGCAGGG  
 TGACCCTGAGCGTGGATAAGAGCAAGAACCAGGCCAGCCTGAAGCTGAGCAGC  
 GTGACCGCTGCCGATACCGCCGTGTATTATTGTGGCCGGTCCGGCGTGAGCGGC  
 10 CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCgctagcACCAAGG  
 GACCTTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCCACTTCCGGTGGTACAGC  
 AGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAACCAGTGACTGTGTCCCTG  
 GAACTCCGGAGCTCTGACTTCTGGAGTGCATACTTTCCCAGCAGTGCTGCAATC  
 TAGCGGACTGTACTCTCTGTCTTCCGTGGTGACTGTGCCTTCTTCTTCCCTGGGG  
 15 ACTCAAACCTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGA  
 CAAGAAGGTGGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTGTG  
 CAGCTCCAGAAGTCTGGGTGGGCCTTCTGTGTTTCTGTTCCCACCTAAGCCAA  
 AGGATACCCTGATGATCTCTAGGACCCCAGAAGTGACCTGTGTGGTCGTGATG  
 TGTCTCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGGAA  
 20 GTGCATAACGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAGCAATACTCCACCTACAG  
 GGTGGTCTCCGTCCCTGACAGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA  
 CAAGTGCAAGGTCTCCAATAAAGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATTAG  
 CAAAGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCCCCAGCA  
 GGGAGGAGATGACAAAAAATCAGGTCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGGCTTT  
 25 TATCCCAGCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAATAAT  
 TATAAAACAACACCCCCGTCTGGACAGCGACGGCAGCTTTTTTCTGTATAGC  
 AAAGTACAGTCGATAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGTCAG  
 CGTCATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACTCAGAAAAGCCTGAGCCTGTC  
 CCCCCGGGAAATGAGCGGCCGC

**>459-VHB-1423bp**

gaattcgccgccaccATGAAGCACCTGTGGTTTTTCCTGCTGCTGGTGGCTGCTCCT  
 CGGTGGGTGCTGAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGA  
 AGCCTAGCGAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGCCAGCGGCTATTCTTTACCG  
 ATTATTTTCATGAACTGGATCCGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCG  
 35 GCCGGATCAACCCCTATTCCGGCGATAACCCTGTACAACCAGCGGCTGAAGTCCA  
 GGGTGACCCTGAGCGTGGACAAGTCCAAGAACCAGGCTTCCCTGAAGCTGTCC  
 AGCGTGACCGCTGCTGATAACCGCTGTGTACTACTGCGGCCGGAGCGGCGTGTCC  
 GGCTTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCgctagcACCAA  
 GGGACCTTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCCACTTCCGGTGGTACA  
 40 GCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAACCAGTGACTGTGTCC  
 TGGAACCTCCGGAGCTCTGACTTCTGGAGTGCATACTTTCCCAGCAGTGCTGCAA  
 TCTAGCGGACTGTACTCTCTGTCTTCCGTGGTGACTGTGCCTTCTTCTTCCCTGG  
 GGACTCAAACCTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTG

-9-

GACAAGAAGGTGGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTG  
 TCCAGCTCCAGAACTGCTGGGTGGGCCTTCTGTGTTTCTGTTCCCACCTAAGCC  
 AAAGGATACCCTGATGATCTCTAGGACCCCAGAAGTGACCTGTGTGGTTCGTCGA  
 TGTGTCTCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGG  
 5 AAGTGCATAACGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAGCAATACAACCTCCACCTAC  
 AGGGTGGTCTCCGTCCTGACAGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGA  
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAATAAAGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCAT  
 TAGCAAAGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCCCCA  
 GCAGGGAGGAGATGACAAAAAATCAGGTCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGGC  
 10 TTTTATCCCAGCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCAGAGAAT  
 AATTATAAAACAACACCCCCGTCCTGGACAGCGACGGCAGCTTTTTTCTGTATA  
 GCAAACCTGACAGTCGATAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGC  
 AGCGTCATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACTCAGAAAAGCCTGAGCCTG  
 TCCCCCGGGAAATGAGCGGCCGC

15 **>459-VHC-1423bp**  
 gaattcgccgccaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCCCC  
 AGGTGGGTTCTGAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCCGGACTGGTGAA  
 GCCTAGCGAGACCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGTCCGGCGGCTCCATCACCGA  
 TTATTTTCATGAACTGGATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG  
 20 CCGGATCAATCCCTATAGCGGCGACACCCTGTACAATCAGCGGCTGAAGAGCAG  
 GGTGACCCTGAGCGTGGATAAGTCCAAGAATCAGGCCAGCCTGAAGCTGTCCT  
 CCGTGACCGCCGCCGACACCGCTGTGTACTACTGCGGCCGGTCCGGCGTGAGC  
 GGCTTGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGC<sub>gctagc</sub>ACCAA  
 GGGACCTTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCCACTTCCGGTGGTACA  
 25 GCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAACCAGTGACTGTGTCC  
 TGGAACCTCCGGAGCTCTGACTTCTGGAGTGCATACTTCCCAGCAGTGCTGCAA  
 TCTAGCGGACTGTACTCTCTGTCTTCCGTGGTACTGTGCCTTCTTCTTCCCTGG  
 GGACTCAAACCTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTG  
 GACAAGAAGGTGGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTG  
 30 TCCAGCTCCAGAACTGCTGGGTGGGCCTTCTGTGTTTCTGTTCCCACCTAAGCC  
 AAAGGATACCCTGATGATCTCTAGGACCCCAGAAGTGACCTGTGTGGTTCGTCGA  
 TGTGTCTCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTGG  
 AAGTGCATAACGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAGCAATACAACCTCCACCTAC  
 AGGGTGGTCTCCGTCCTGACAGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGA  
 35 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAATAAAGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCAT  
 TAGCAAAGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCCCCA  
 GCAGGGAGGAGATGACAAAAAATCAGGTCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGGC  
 TTTTATCCCAGCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCAGAGAAT  
 AATTATAAAACAACACCCCCGTCCTGGACAGCGACGGCAGCTTTTTTCTGTATA  
 40 GCAAACCTGACAGTCGATAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTGC  
 AGCGTCATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACTCAGAAAAGCCTGAGCCTG  
 TCCCCCGGGAAATGAGCGGCCGC

**>551-VHB-1423bp**

—10—

gaattcgccgccaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTGCTGCTGGTGGCTGCTCCT  
AGGTGGGTGCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGA  
AGCCCGGCGAGAGCCTGAAGATCTCCTGTAAGGCTTCCGGCTACTCCTTCACCG  
ACTACTTTATGAATTGGGTGCGGCAGATGCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCG  
5 GCAGAATCAATCCTTACAGCGGCGACACCCTGTACAACCAGCGGCTGCAGGGC  
CAGGTGACCCTGTCCGCTGATAAGAGCATCTCCACCGCCTACCTGCAGCTGTCC  
TCCCTGAAGGCCTCCGACACCGCCATGTACTACTGTGGCAGGAGCGGCGTGAGC  
GGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCgctagcACCA  
AGGGACCTTCTGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCTTCTAAGTCCACTTCCGGTGGTAC  
10 AGCAGCTCTGGGTGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCAGAACCAGTGACTGTGTC  
CTGGA ACTCCGGAGCTCTGACTTCTGGAGTGCATACTTTCCCAGCAGTGCTGCA  
ATCTAGCGGACTGTACTCTCTGTCTTCCGTGGTGACTGTGCCTTCTTCTCCCTG  
GGGACTCAA ACTTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGT  
GGACAAGAAGGTGGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACCCACACCTGTCCACCTT  
15 GTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGTGGGCCTTCTGTGTTTCTGTTCCACCTAAGC  
CAAAGGATACCCTGATGATCTCTAGGACCCCAAGTACCTGTGTGGTCTGTCG  
ATGTGTCTCATGAAGACCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTG  
GAAGTGCATAACGCAAAGACCAAGCCCAGGGAAGAGCAATACTCCACCTA  
CAGGGTGGTCTCCGTCCTGACAGTCCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGG  
20 AGTACAAGTGAAGGTCTCCAATAAAGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCA  
TTAGCAAAGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCCCCC  
AGCAGGGAGGAGATGACAAAAAATCAGGTCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGG  
CTTTTATCCCAGCGACATTGCCGTCGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCAGAA  
TAATTATAAAACAACACCCCCGTCCTGGACAGCGACGGCAGCTTTTTTCTGTAT  
25 AGCAA ACTGACAGTCGATAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCTG  
CAGCGTCATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTATACTCAGAAAAGCCTGAGCCT  
GTCCCCCGGAAATGAGCGGCCGC

**>621-VLA-725bp**

gaattcgccgccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTATCTCCCTGCTGCTGTGG  
30 ATCAGCGGCGCCTATGGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGATTTCCAGAGC  
GTGACCCCTAAGGAGAAGGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCTCCGCCAG  
CTATATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGACCAGTCCCCTAAGCGGTGGATCTAT  
GACACCAGCAAGCTGGCTAGCGGCGTGCTAGCAGGTTCTCCGGCAGCGGCAG  
CGGCACCGACTACACCCTGACCATCAACTCCCTGGAGGCTGAGGACGCCGCCA  
35 CCTATTACTGCCAGCAGTGGAGCTCCAACCCCCCTACCTTTGGCGGCGGCACCA  
AGGTGGAGATCAAGCgctagcGTGGCTGCACCTTCTGTGTTTCATCTTCCCTCCATCTG  
ATGAGCAGCTGAAGTCTGGAACCGCATCTGTCTGTCTGTCTGCTGAACA ACTTTT  
ACCCAGGGAGGCTAAGGTCCAATGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCTGGT  
AATAGCCAGGAAAGCGTGACCGAACAGGATTCCAAGGACTCCACCTACTCCCT  
40 GTCCTCCACACTGACACTGAGCAAAGCCGACTATGAAAAGCACAAAGTGTATG  
CCTGCGAGGTCACTCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACTAAAAGCTTTAATA  
GGGGGGAGTGCTGAGCGGCCGC

**>311-VLA-725bp**

gaattgccgccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTATCAGCCTGCTGCTGTGG  
 ATCAGCGGCGCCTACGGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCC  
 CTGTCCCCAGGAGAGAGGGCTACCCTGAGCTGCTCCGCCAGCTCCAGCGCCTC  
 CTACATCCACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCCTCGGAGATGGATGTA  
 5 CGATACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCATCCCCGCCAGATTCAGCGGCAGCGGCAG  
 CGGAACCGATTACACCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGCCTGAGGACGCCGCCGT  
 GTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGCAACCCTCCTACCTTCGGCGGCGGCACCA  
 AGGTGGAGATCAAGcgtacgGTGGCTGCACCTTCTGTGTTTCATCTTCCCTCCATCTG  
 ATGAGCAGCTGAAGTCTGGAACCGCATCTGTCTGTCTGTCTGCTGAACAACCTTTT  
 10 ACCCCAGGGAGGCTAAGGTCCAATGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCTGGT  
 AATAGCCAGGAAAGCGTGACCGAACAGGATTCCAAGGACTCCACCTACTCCCT  
 GTCCTCCACACTGACACTGAGCAAAGCCGACTATGAAAAGCACAAAGTGTATG  
 CCTGCGAGGTCACTCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACTAAAAGCTTTAATA  
 GGGGGGAGTGCTGAGCGGCCGC

15 >139-VLA-725bp

gaattgccgccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTATCAGCCTGCTGCTGTGG  
 ATCAGCGGCGCTTACGGCGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGAGC  
 GCTAGCGTGGGCGACCGGGTGACCATCACCTGCTCCGCCTCCAGCTCCGCCAGC  
 TACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGAAGTGGATCTAT  
 20 GATACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTC  
 CGGCACCGATTACACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGATGCTGCCAC  
 CTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCCCTACCTTTGGCGGCGGCACCAA  
 GGTGGAGATCAAGcgtacgGTGGCTGCACCTTCTGTGTTTCATCTTCCCTCCATCTGA  
 TGAGCAGCTGAAGTCTGGAACCGCATCTGTCTGTCTGTCTGCTGAACAACCTTTTA  
 25 CCCCAGGGAGGCTAAGGTCCAATGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCTGGTA  
 ATAGCCAGGAAAGCGTGACCGAACAGGATTCCAAGGACTCCACCTACTCCCTGT  
 CCTCCACACTGACACTGAGCAAAGCCGACTATGAAAAGCACAAAGTGTATGCCT  
 GCGAGGTCACTCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACTAAAAGCTTTAATAGGG  
 GGGAGTGCTGAGCGGCCGC

30 >12-VHA

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYF  
 MNWVRQAPGQGLEWIGRINPYSQDLYNQRLKGRATLTVDKISISTAYMELSRRLSD  
 DTAVYYCGRSGVSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV  
 35 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; SIP:[1:19], Human IgG1 constant region:[137:466]

40 >12-VHB

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYF  
 MNWVRQAPGQGLEWIGRINPYSQDLYNQKLQGRVTMTVDKISISTAYMELSRRLS  
 DDTAVYYCGRSGVSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC

LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
 VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
 5 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; SIP:[1:19], Human IgG1 constant region:[137:466]  
 >459-VHA

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTASGYSFTDYFM  
 NWVRQPPGKGLEWIGRINPYSGDTLYNQRLKGRVTLSDKSKNQASLKLSSVTA  
 10 DTAVYYCGRSGVSGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL  
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV  
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
 WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL  
 15 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; SIP:[1:19], Human IgG1 constant region:[137:466]  
 >459-VHB

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTASGYSFTDYFM  
 NWIRQPPGKGLEWIGRINPYSGDTLYNQRLKSRVTLSDKSKNQASLKLSSVTAAD  
 20 TAVYYCGRSGVSGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN  
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
 25 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK; SIP:[1:19], Human IgG1 constant region:[137:466]  
 >459-VHC

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITDYFM  
 NWIRQPPGKGLEWIGRINPYSGDTLYNQRLKSRVTLSDKSKNQASLKLSSVTAAD  
 30 TAVYYCGRSGVSGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN  
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  
 35 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK, SIP:[1:19], Human IgG1 constant region:[137:466]  
 >551-VHB

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSITDYFM  
 MNWVRQMPGKGLEWIGRINPYSGDTLYNQRLQGGVTLSDKSKNQASLKLSSVTAAD  
 40 SDTAMYYCGRSGVSGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG  
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC  
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK, SIP:[1:19], Human IgG1 constant region:[137:466]

5 >621-VLA  
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSASYMHWYQQKPDQSPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC, SIP:[1:20], Human kappa constant region:[127:233]

10 >311-VLA  
MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSASYIHWYQQKPGQAPRRWYDTSKLAGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDAAVYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC, SIP:[1:20], Human kappa constant region:[127:233]

15 >139-VLA  
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSASYMHWYQQKPGKAPKNWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC, SIP:[1:20], Human kappa constant region:[127:233]

(3) 瞬转

25 无内毒素质粒 DNA 提取, 将构建的载体共转染 CHO-K1 细胞, 培养至存活率下降到 50% 以下。取部分细胞收集培养上清, 用 protein G 纯化后跑 SDS-PAGE 胶, 用抗原蛋白进行 ELISA 检测抗体的活性。

转染方法:

①转染前一天, 接种  $27 \times 10^6$  个细胞到完全培养基中培养 (不含抗生素及抗聚集试剂), 使细胞在转染当天处于对数生长期。

30 ②转染复合物的准备

a 稀释 DNA 至完全培养基中, 轻柔混匀。

b 稀释 PEI 转染试剂至完全培养基中, 轻柔混匀, 室温孵育 5min。

c 加稀释的 PEI 到稀释的 DNA 中, 转染混合物总体积为 3ml, 轻柔混匀, 室温孵育 20-30min。

35 ③转染: 加入 3ml 转染混合物到 27ml 细胞悬液中, 轻柔混匀, 在 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 130rpm 条件下培养至细胞活率降到 50% 以下收样。

转染信息:

	转染组合 (抗体名称)	HC	LC
1	45-2-G3-1-G7-B7-12-VHA / 621-VLA		621-VLA
2	45-2-G3-1-G7-B7-12-VHA / 311-VLA	12-VHA	311-VLA
3	45-2-G3-1-G7-B7-12-VHA / 139-VLA		139-VLA

4	45-2-G3-1-G7-B7-12-VHB / 621-VLA		621-VLA
5	45-2-G3-1-G7-B7-12-VHB / 311-VLA	12-VHB	311-VLA
6	45-2-G3-1-G7-B7-12-VHB / 139-VLA		139-VLA
7	45-2-G3-1-G7-B7-459-VHA / 621-VLA		621-VLA
8	45-2-G3-1-G7-B7-459-VHA / 311-VLA	459-VHA	311-VLA
9	45-2-G3-1-G7-B7-459-VHA / 139-VLA		139-VLA
10	45-2-G3-1-G7-B7-459-VHB / 621-VLA		621-VLA
11	45-2-G3-1-G7-B7-459-VHB / 311-VLA	459-VHB	311-VLA
12	45-2-G3-1-G7-B7-459-VHB / 139-VLA		139-VLA
13	45-2-G3-1-G7-B7- 459-VHC / 621-VLA		621-VLA
14	45-2-G3-1-G7-B7- 459-VHC / 311-VLA	459-VHC	311-VLA
15	45-2-G3-1-G7-B7- 459-VHC / 139-VLA		139-VLA
16	45-2-G3-1-G7-B7- 551-VHB / 621-VLA		621-VLA
17	45-2-G3-1-G7-B7- 551-VHB / 311-VLA	551-VHB	311-VLA
18	45-2-G3-1-G7-B7- 551-VHB / 139-VLA		139-VLA

(4) 纯化

离心收集上清，装填 18 个 1ml 蛋白 A 纯化柱，填料用 PBS pH 7.5 平衡，最后将蛋白 A 树脂与培养上清混匀孵育过夜，孵育结束后纯化。用 PBS, pH 7.5 的缓冲液清洗，用 20 mM 柠檬酸 pH 2.7 缓冲液洗脱，中和缓冲液为 1 M Tris HCl, pH 9.0 中和至 6.0。纯化完成后取 IN、FT、洗涤和洗脱的样各 20ul 跑 SDS-PAGE，根据 SDS-PAGE 收集样品透析过夜，然后将样品汇集并进行缓冲液交换和浓缩，最终结果如图 4 所示。  
样品信息

序号	Antibody	Concentration	Quantity	Number	Yield
1	12-VHA / 621-VLA	1.05mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
2	12-VHA / 311-VLA	1.16mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
3	12-VHA / 139-VLA	1.31mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
4	12-VHB / 621-VLA	1.01mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
5	12-VHB / 311-VLA	1.00mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
6	12-VHB / 139-VLA	1.13mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
7	459-VHA / 621-VLA	0.96mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
8	459-VHA / 311-VLA	1.02mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
9	459-VHA / 139-VLA	1.07mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
10	459-VHB / 621-VLA	0.80mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
11	459-VHB / 311-VLA	1.13mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
12	459-VHB / 139-VLA	1.25mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
13	459-VHC / 621-VLA	0.69mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
14	459-VHC / 311-VLA	1.00mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
15	459-VHC / 139-VLA	1.16mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
16	551-VHB / 621-VLA	1.78mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
17	551-VHB / 311-VLA	1.71mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg
18	551-VHB / 139-VLA	1.80mg/ml	0.50mg/vial	1vial	0.50mg

Western Blot 验证特异性结合，其中 1-18 为 18 个人源化单抗，19009414P 11(human IgG1)为 periostin 嵌合抗体，45-2-G3-1-G7-B7 为 periostin 鼠单抗，结果如下表和图 5 所示。

Periostin-Mouse	Primary antibody	Secondary antibody
-----------------	------------------	--------------------

1	12-VHA / 621-VLA	Goat Anti Human	Positive
2	12-VHA / 311-VLA		Positive
3	12-VHA / 139-VLA		Positive
4	12-VHB / 621-VLA		positive
5	12-VHB / 311-VLA		Positive
6	12-VHB / 139-VLA		Positive
7	459-VHA / 621-VLA		Positive
8	459-VHA / 311-VLA		Positive
9	459-VHA / 139-VLA		Positive
10	459-VHB / 621-VLA		Positive
11	459-VHB / 311-VLA		Positive
12	459-VHB / 139-VLA		Positive
13	459-VHC / 621-VLA		Positive
14	459-VHC / 311-VLA		Positive
15	459-VHC / 139-VLA		Positive
16	551-VHB / 621-VLA		Positive
17	551-VHB / 311-VLA		Positive
18	551-VHB / 139-VLA		Positive
19	19009414P 11(human IgG1)		Positive
20	45-2-G3-1-G7-B7	Goat Anti Mouse	Positive

人源化抗体 ELISA 的排板情况

1	2	3	4	5	6	7	8
12-VHA/ 621-VLA	12-VHA/ 621-VLA	12-VHA/ 621-VLA	459-VHA/ 139-VLA	459-VHA/ 139-VLA	459-VHA/ 139-VLA	551-VHB/ 311-VLA	19009414P1 1
12-VHA/ 311-VLA	12-VHA/ 311-VLA	12-VHA/ 311-VLA	459-VHB/ 621-VLA	459-VHB/ 621-VLA	459-VHB/ 621-VLA	551-VHB/ 311-VLA	19009414P1 1
12-VHA/ 139-VLA	12-VHA/ 139-VLA	12-VHA/ 139-VLA	459-VHB/ 311-VLA	459-VHB/ 311-VLA	459-VHB/ 311-VLA	551-VHB/ 311-VLA	19009414P1 1
12-VHB/ 621-VLA	12-VHB/ 621-VLA	12-VHB/ 621-VLA	459-VHB/ 139-VLA	459-VHB/ 139-VLA	459-VHB/ 139-VLA	551-VHB/ 139-VLA	45-2-G3-1-G 7-B7
12-VHB/ 311-VLA	12-VHB/ 311-VLA	12-VHB/ 311-VLA	459-VHC/ 621-VLA	459-VHC/ 621-VLA	459-VHC/ 621-VLA	551-VHB/ 139-VLA	45-2-G3-1-G 7-B7
12-VHB/ 139-VLA	12-VHB/ 139-VLA	12-VHB/ 139-VLA	459-VHC/ 311-VLA	459-VHC/ 311-VLA	459-VHC/ 311-VLA	551-VHB/ 139-VLA	45-2-G3-1-G 7-B7
459-VHA/ 621-VLA	459-VHA/ 621-VLA	459-VHA/ 621-VLA	459-VHC/ 139-VLA	459-VHC/ 139-VLA	459-VHC/ 139-VLA	阴性对照	阴性对照
459-VHA/ 311-VLA	459-VHA/ 311-VLA	459-VHA/ 311-VLA	551-VHB/ 621-VLA	551-VHB/ 621-VLA	551-VHB/ 621-VLA	阴性对照	阴性对照

ELISA 检测结果

1	2	3	4	5	6	7	8
2.2676	2.1962	2.1325	1.0578	1.0122	1.0485	2.0413	1.7380
2.3149	2.2910	2.1548	1.9094	1.9964	1.9358	1.9902	1.6759

-16-

1.8726	1.9203	1.8613	2.0560	1.8604	1.8602	1.9714	1.6779
2.1021	1.9955	1.9839	0.4797	0.4511	0.4934	1.7166	0.7665
2.1828	2.1139	2.0769	1.1582	1.0934	1.0282	1.7625	0.7699
2.0264	2.1278	2.1131	0.6429	0.5133	0.5998	1.7652	0.6939
1.8504	1.9261	1.9378	0.0641	0.0639	0.0626	0.0619	0.0555
2.0901	2.2168	2.1762	2.0171	2.1129	2.0738	0.0554	0.0567

### 3、人源化抗体稳转株构建及表达

#### (1) 载体构建

由上一步瞬转测试结果可得，18号抗体 551-VHB / 139-VLA 的表达量最高，且结合能力能够满足要求，因此，综合考虑表达量和抗体结合能力后，以 551-VHB 和 139-VLA 作为 periostin 人源化抗体的重链和轻链，亚克隆到表达载体 pATX-GS2 中，后共同转染 CHO 细胞表达抗体蛋白。琼脂糖凝胶电泳跑胶结果如图 6。

#### (2) periostin 人源化抗体表达

将目的片段经双酶切 (EcoR I/Not I)、连接后亚克隆到表达载体 pATX-GS2 中，然后稳定转染 CHO 细胞，经 MSX 加压筛选、ELISA 有限稀释得到稳定的细胞株。在 37℃、5%二氧化碳的摇床中培养 7d 后收集上清液，用琼脂糖凝胶 ProteinA 层析填料纯化上清液中的人源化抗体。

##### ① 质粒线性化

将提取好的质粒 PATX-GS2-139-VLA-551-VHB 提前取出 10ul 备份(用于验证线性化是否成功)，将酶，buffer 依次加入质粒，并混匀；EP 管插入浮漂，放入 37 度水浴锅中酶切大概 1-2h。酶切成功后需进行回收：根据质粒体积加入 0.75 倍的异丙醇，混匀；4 度离心 30min 后弃上清；加入 1ml 70%乙醇 4 度离心 5min，跑胶测浓度 (图 7)。

酶切体系：

试剂名称	体积 (ul)
酶切 buffer	10
质粒	全部
酶	6-10

##### ② 转染

为了获得稳定的表达重组抗体的转染细胞池，用 PVUI 线性化的质粒 pATX-GS2-139-VLA-551-VHB 转染 CHO-K1 细胞，化学方法进行转染 (FectoCHO™ 表达系统转染试剂盒)。

#### (3) 加压筛选

转染 48 小时后，对转染后的宿主细胞施加相应的选择压力筛选，本发明选用 GS 筛选系统 (glutamine synthetase Gene Expression System)。对细胞进行加压处理，并用 30um 浓度的 MSX 处理细胞：采用 6 孔平板标准分批培养法分别测定 CHO-K1 细胞株对 MSX 的自然抗性，测定 MSX 对未转染细胞株 CHO-K1 的最低杀灭浓度为 20uM。加入 30um 浓度的 MSX，每 3~4 天更换新的筛选培养基，直至有抗性的稳定细胞出现，MSX 筛选 2~3 周后，产生 3 个稳定池。

在 125ml 摇瓶中，细胞培养在 30ml 选择性培养基中，标准条件下培养 (37℃、5%CO<sub>2</sub>、130rpm)。当细胞在摇瓶中处于良好状态时，进行 30ml 补料分批表达试验，在 D3、D5、D7 和 D9 上添加进料培养基并全程监测血糖。连续培养 3 代，直到细胞

活力下降到 50%以下结束培养，收集培养液上清，进行纯化分析。纯化结果如图 8 所示，其中 reduced 示还原 SDS-PAGE 电泳结果，non-reduced 示非还原 SDS-PAGE 电泳结果。

样品信息：

Antibody	Concentration	Specification	Quantity	Yield
18-stable 1	0.86mg/ml	1.75ml/vial	4vials	6.02mg/30ml
18-stable 2	0.94mg/ml	1.80ml/vial	4vials	6.76mg/30ml
18-stable 3	1.62mg/ml	1.80ml/vial	4vials	11.66mg/30ml

5 (4) 有限稀释法分离单克隆抗体：挑选 Stable pool 3 多克隆细胞株进行有限稀释单克隆加压铺板，将获得的稳定转染池的细胞悬液稀释到很低的密度，使每个孔平均接种 1 个细胞。用 ELISA 法筛选出表达量较高的 5-G4、5-E6、5-G6、5-D7、5-G9、2-H3、2-C7 共 7 株单克隆细胞株进行后续的扩大培养。以 1:3 倍稀释梯度，抗体浓度依次为 1、0.33、0.11、0.037、0.012、0.004、0.0014ug/ml，以及空白对照共 8 个梯度。  
10 显微镜下观察单克隆，ELISA 法检测阳性单克隆，结果见下表。

抗体 ELISA 结果：

	5-E6	2-C7	5-G4	5-G6	5-G9	2-H3	5-D7	Ab18								
A	3.396	3.3316	3.4232	3.5079	3.3039	3.4063	3.3018	3.4721	3.2732	3.2581	3.5402	3.5486	3.2889	3.3281	2.288	2.3394
B	2.6476	2.546	2.9524	2.9827	2.5342	2.6667	2.6281	2.8172	2.5232	2.4339	3.0076	3.0135	2.6347	2.66	1.1352	1.2038
C	2.0211	2.0248	2.4196	2.4409	1.9811	2.1821	1.7536	1.8631	1.7679	1.7009	2.4923	2.578	1.8413	1.84	0.5058	0.5265
D	1.2649	1.2504	1.6714	1.703	1.2489	1.3418	0.8885	0.9864	0.9552	0.9643	1.7786	1.7678	1.0517	1.0929	0.2432	0.2399
E	0.5966	0.6148	0.8319	0.9243	0.6348	0.6621	0.3714	0.4403	0.3928	0.4166	0.9525	0.9749	0.4927	0.4684	0.1247	0.1345
F	0.2681	0.2774	0.3728	0.419	0.2898	0.2986	0.1667	0.2001	0.1851	0.1931	0.44	0.4441	0.2196	0.2178	0.0837	0.0885
G	0.1589	0.1475	0.1692	0.178	0.1513	0.166	0.1023	0.1171	0.1076	0.1142	0.2294	0.2096	0.1256	0.1277	0.0746	0.075
H	0.0725	0.07	0.0714	0.0737	0.072	0.0747	0.0714	0.0768	0.0806	0.0734	0.0752	0.0748	0.0765	0.0771	0.0706	0.072

15 将克隆 5-G4、2-C7、5-E6、5-G9、2-H3、5-D7、5-G6 的细胞培养于 125ml 摇瓶中的 30ml 选择性培养基中，并在标准条件下培养（37℃，5%二氧化碳，130 转/分）3 代。当细胞在摇瓶中处于良好状态时，进行 30ml 补料分批表达试验。在 D3、D5、D7 和 D9 上添加进料培养基。全程监测血糖。收集培养基，直到细胞活力下降到 50% 以下。纯化结果如图 9：

样品信息：

Antibody	Concentration	Volume	Quantity	Yield	Yield
5-E6	4.49mg/ml	1.63ml/vial	7 vials	51.23mg/30ml	1.70g/L
5-G4	7.13mg/ml	1.64ml/vial	7 vials	81.86mg/30ml	2.72g/L
2-H3	3.91mg/ml	1.67ml/vial	7 vials	45.71mg/30ml	1.52g/L
5-D7	4.63mg/ml	1.55ml/vial	6 vials	43.06mg/30ml	1.44g/L
2-C7	3.64mg/ml	1.63ml/vial	7 vials	41.53mg/30ml	1.38g/L
5-G6	5.07mg/m	1.65ml/vial	7 vials	58.56mg/30ml	1.95g/L
5-G9	6.14mg/m	1.61ml/vial	7 vials	69.20mg/30ml	2.31g/L

(5)、人源化抗 periostin 抗体鉴定

20 从表达量和 ELISA 筛选结果，选三株稳转株 5-G4、5-G6、5-G9 进行 WB 检测，验证结合特异性。

实验条件：抗原 1ug，一抗 1:1000 稀释，孵育 1h，二抗 1:10000 稀释，孵育

45min。结果如图 10。

由图 10 可见，5-G4、5-G6、5-G9 三株稳转株均与 periostin 抗原蛋白特异性结合。

#### 4、抗 periostin 人源化抗体抗纤维化作用研究

##### 4.1 研究方法

将 5-G6 稳转株的抗体在体内外分别进行成纤维细胞的跨孔迁移试验、迁移细胞数量研究，免疫组化分析小鼠的成纤维细胞的迁移；以及 HE 和 Masson 染色观察小鼠组织病理变化，研究纤维化面积比率；荧光定量聚合酶链式反应(PCR) 法分别检测小鼠纤维化模型中 I 型胶原蛋白 (Col1a1 和 Col1a2) 和 III 型胶原蛋白 (Col3a1) mRNA 的表达情况；实验以含 periostin+对照 IgG 的条件培养基为对照 IgG 组，将含 periostin+人源化 periostin 抗体的条件培养基受试组记做 Postn nAb 组。

Wilcoxon 秩和检验比较纤维化面积比率、阳性浸润成纤维细胞数量及成纤维细胞比率和迁移成纤维细胞数量的中值。

最后统计学方法：采用 SPSS 统计软件进行实验数据处理，采用方差对组间分析，在所有统计分析中，显著性定义为  $p < 0.05$ 。

##### 4.2 研究结果

4.2.1、跨孔迁移实验中，空白对照组中的成纤维细胞数量远远大于 Postn nAb 组，即 Postn nAb 组能够有效抑制成纤维细胞的迁移，这一结果证明了 Postn nAb 在体外的有效性。

4.2.2、与空白对照组相比，在 14 dpi 时，免疫组织学分析显示 Postn nAb 减少浸润成纤维细胞的数量。

4.2.3、纤维化面积比率 28dpi，与空白对照组小鼠相比，Postn nAb 组小鼠中纤维化面积显著减少。

4.2.4、Postn nAb 组小鼠中 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白 mRNA 表达量与空白对照组小鼠明显降低 ( $P < 0.05$ )。

研究结论：本研究成功制备了抗 periostin 人源化单克隆抗体，且制备的抗 periostin 人源化单克隆抗体能够特异性结合体内 periostin 蛋白，从而有效的抑制体内纤维化作用，因此抗 periostin 人源化单克隆抗体有望成为治疗视网膜纤维化的新型药物。

#### 5、Periostin 人源化单抗体外活性实验

##### 5.1 微管抑制实验

体外培养 HUVEC 细胞，分别以 50000 个/孔 (24h) 进行 12 孔板铺板，5% CO<sub>2</sub>，37℃ 过夜培养后进行加药处理 16h，进行血管形成实验，观察并在适当时间点拍照记录，并统计实验结果得下表和图 11。

HUVEC	Number of tubes	HUVEC	Number of tubes
分组 (μg/mL)	16h	分组 (μg/mL)	16h
对照 periostin 0	121	periostin 抗体 1	162
对照 periostin 1	108	periostin 抗体 10	57
对照 periostin 10	91	periostin 抗体 100	41
对照 periostin 100	26	periostin 抗体 1000	2

由表可知，随着抗体浓度增高，微管数量减少，且在相同浓度下人源化单抗的抑制微管率大于鼠单抗，可以证实上述 periostin 人源化单抗可抑制 periostin 对人血管内皮细胞微管形成作用。

##### 5.2 体外培养 RPE 细胞并分组，分别进行细胞迁移、细胞侵袭以及细胞划痕实验

a 空白对照组 (Control): 不含重组 periostin 蛋白或抗体

b periostin 组: 只含 periostin

c 对照 IgG 组: 含 periostin+对照 IgG

d periostin 抗体组: 含 periostin+Postn nAb

5 Postn nAb: 本发明制备的 periostin 人源化抗体

**5.2.1 细胞迁移实验**

Transwell 检测

(1) 细胞离心完成之后弃去培养液, 用 PBS 洗 1-2 遍, 用无血清 DMEM 培养基重悬, 调整细胞密度至  $1 \times 10^5$  个/ml;

10 (2) 取细胞悬液 200 $\mu$ l 加入 Transwell 小室, 24 孔板下室加入 600 $\mu$ l 含 10%FBS 的培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 16-24h;

(3) 取出 transwell 小室, 弃去孔中培养液, PBS 洗 2 次;

(4) 4%PFA 固定, 10min, PBS 洗 2 次;

(5) 结晶紫染色 10min, PBS 洗 2 次;

15 (6) 显微镜下观察迁移的细胞(图 12), 随机选取 3 个视野进行拍照, 并用 image J 软件进行计数, 作图 (图 13)。

实验结果

	Migration cell number			平均	% of control			AVERAGE
Control	133	142	139	138.00	96.38%	102.90%	100.72%	100.00%
Periositin	177	168	168	171.00	128.26%	121.74%	121.74%	123.91%
Periositin+IgG	161	167	170	166.00	116.67%	121.01%	123.19%	120.29%
Periositin+Postn nAb	94	90	97	93.67	38.12%	65.22%	70.29%	67.87%

实验结果显示, 与空白对照组 (Control) 相比, periostin 处理组细胞迁移率和迁移细胞数显著增大 ( $P < 0.001$ ), 而 periostin+Postn nAb 处理组显著低于空白对照组 ( $P < 0.001$ ), periostin+IgG 处理组比 periostin 处理组细胞迁移程度略小, 说明 periostin 人源化单抗可抑制 periostin 引起的 RPE 细胞的迁移。

**5.2.2 细胞侵袭实验**

25 Transwell 小室预先涂好 Matrigel 基质胶, 加入一定浓度的细胞悬液, 并于下室中加入含 FBS 的培养基, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48h 后观察、拍照 (图 14), 统计迁移细胞数 (图 15)。

	Invasion cell number			平均	% of control			AVERAGE
Control	78	84	80	80.67	96.69%	104.13%	99.17%	100.00%
periositin	100	103	110	104.33	123.97%	127.69%	136.36%	129.34%
periostin+IgG	106	104	98	102.67	131.40%	128.93%	121.49%	127.27%
periostin+Postn nAb	52	65	53	56.67	64.46%	80.58%	65.70%	70.25%

结果显示, 与空白对照组相比, periostin 处理组细胞迁移率和侵袭细胞数显著增高 ( $P < 0.01$ ), 而 periostin+Postn nAb 处理组显著降低 ( $P < 0.01$ ), 同时 periostin+IgG 处理组比 periostin 处理组 RPE 细胞迁移程度略小, 结果表明 periostin 人源化单抗有抑制 periostin 的作用。

30 **5.2.3 划痕实验**

(1) 细胞经上述分组处理后用 10 $\mu$ l 枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 尽量保证各个划痕宽度一致;

(2) 吸去细胞培养液, 用 PBS 冲洗孔板三次, 洗去划痕产生的细胞碎片, 加入

相应无血清培养基;

(3) 将培养板放入培养箱培养 0、6h、24h、48h 分别取出拍照;

根据收集图片数据分析实验结果 (图 16~17)。实验结果与分析: 细胞经上述分组处理后用 10 μl 枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 将培养板放入培养箱培养 0、6h、24h、48h 分别取出拍照。

	距离(um)												
	0h			平均	6h			24h			48h		
Control	368.51	358.02	370.85	365.793	359.18	341.69	362.68	243.73	240.23	256.56	138.78	159.77	153.94
periostin	377.84	368.51	342.86	363.070	353.35	352.19	347.52	201.75	205.25	209.91	88.63	78.13	94.46
periostin+IgG	359.18	362.68	351.02	357.627	338.19	345.19	338.19	206.41	219.24	197.08	77.3	88.63	97.79
periostin+Postn nAb	358.02	369.68	360.35	362.683	359.18	344.02	364.34	313.7	297.38	316.03	267.06	246.06	226.24

	相对迁移距离(%)											
	0h			6h			24h			48h		
Control	-0.74%	2.13%	-1.38%	1.81%	6.59%	0.85%	33.37%	34.33%	29.86%	62.06%	56.32%	57.92%
periostin	-4.07%	-1.50%	5.57%	2.68%	3.00%	4.28%	44.43%	43.47%	42.18%	75.59%	78.48%	73.98%
periostin+IgG	-0.43%	-1.41%	1.85%	5.43%	3.48%	5.43%	42.28%	38.70%	44.89%	78.39%	75.22%	72.66%
periostin+Postn nAb	1.29%	-1.93%	0.64%	0.97%	5.15%	-0.46%	13.51%	18.01%	12.86%	26.37%	32.16%	37.62%

实验结果显示, 培养 48h 时与空白对照组相比, periostin 处理组细胞相对迁移距离显著增高 (P < 0.01), 而 periostin+Postn nAb 处理组显著低于空白对照组 (P < 0.001), 同时 periostin+IgG 处理组比 periostin 处理组 RPE 细胞迁移程度略小, 结果表明 periostin 人源化单抗可抑制 periostin 诱导的 RPE 细胞的作用。

5.3 Western Blot 检测结果

检测不同组别 RPE 细胞中 VEGFA、α-SMA、Col I、Col III、Fibronectin 蛋白的表达。

VEGFA (血管内皮生长因子) A: VEGFA 诱导血管生成反应, 促进血管再生。

α-SMA (α-平滑肌肌动蛋白): 存在于血管壁、肠粘膜肌层和固有肌层以及各种组织间质中, 在肌成纤维细胞和肌上皮细胞中高表达, 有研究表明在器官纤维化的研究中随纤维化程度加重而增加。

Col II、Col III (I 型胶原和 III 型胶原蛋白): 与皮肤损伤修复过程和修复质量紧密相关。促使真皮层成纤维母细胞增生, 主要存在皮肤、肌腱、韧带、血管等结缔组织, 构成细胞外基质网状结构, 起到支撑器官、保护机体的作用, 还与细胞附着、细胞迁移有关。

Fibronectin 纤维粘连素: 促进细胞的黏连生长, 影响细胞的黏附、迁移或肿瘤转移、胚胎发育、生长和分化等。

分组	VEGFA			GAPDH			VEGFA:GAPDH			平均值	相对灰度值		
Control	581015	556895	602545	1053645	1075620	1035685	0.55	0.52	0.58	0.55	1.00	0.94	1.06
periostin	1082105	1036598	1125416	1030138	1012536	1053265	1.05	1.02	1.07	1.05	1.91	1.86	1.94
periostin+IgG	1059098	992547	1076853	956898	932658	986852	1.11	1.06	1.09	1.09	2.01	1.93	1.98
periostin+Postn nAb	381691	426452	402541	1019821	998652	1036895	0.37	0.43	0.39	0.40	0.68	0.78	0.71

分组	α-SMA			GAPDH			α-SMA:GAPDH			平均值	相对灰度值		
Control	519129	536588	557410	1053645	1075620	1035685	0.49	0.50	0.54	0.51	0.97	0.98	1.06

periostin	917194	938752	897452	1030138	1012536	1053265	0.89	0.93	0.85	0.89	1.75	1.82	1.67
periostin+IgG	873202	845685	901254	956898	932658	986852	0.91	0.91	0.91	0.91	1.79	1.78	1.79
periostin+PostnAb	320513	302125	356420	1019821	998652	1036895	0.31	0.30	0.34	0.32	0.62	0.59	0.67

分组	Col I			GAPDH			Col I :GAPDH			平均值	相对灰度值		
Control	501679	535627	545896	1053645	1075620	1035685	0.48	0.50	0.53	0.50	0.95	1.00	1.05
periostin	847771	865986	893568	1030138	1012536	1053265	0.82	0.86	0.85	0.84	1.64	1.71	1.70
periostin+IgG	895815	850241	876231	956898	932658	986852	0.94	0.91	0.89	0.91	1.87	1.82	1.77
periostin+PostnAb	298207	275410	315221	1019821	998652	1036895	0.29	0.28	0.30	0.29	0.58	0.55	0.61

分组	Col III			GAPDH			Col III:GAPDH			平均值	相对灰度值		
Control	653408	685412	613154	1053645	1075620	1035685	0.62	0.64	0.59	0.62	1.01	1.03	0.96
periostin	1041617	1085265	1102458	1030138	1012536	1053265	1.01	1.07	1.05	1.04	1.64	1.74	1.70
periostin+IgG	954461	975521	1003545	956898	932658	986852	1.00	1.05	1.02	1.02	1.62	1.70	1.65
periostin+PostnAb	399965	421352	455482	1019821	998652	1036895	0.39	0.42	0.44	0.42	0.64	0.68	0.71

分组	Fibronectin			GAPDH			Fibronectin:GAPDH			平均值	相对灰度值		
Control	597721	622547	566214	1053645	1075620	1035685	0.57	0.58	0.55	0.56	1.01	1.03	0.97
periostin	915085	936542	956223	1030138	1012536	1053265	0.89	0.92	0.91	0.91	1.57	1.64	1.61
periostin+IgG	944392	968725	923574	956898	932658	986852	0.99	1.04	0.94	0.99	1.75	1.84	1.66
periostin+PostnAb	337385	356854	387931	1019821	998652	1036895	0.33	0.36	0.37	0.35	0.59	0.63	0.66

实验结果显示 (图 18~19), 与空白对照组 (Control) 相比, periostin 处理组、periostin+IgG 处理组、periostin+Postn nAb 处理组蛋白表达差异均有统计学意义, (P<0.001), 与空白对照组 (Control) 相比, periostin 处理组蛋白表达量均显著增高 (P<0.001), 而 periostin+Postn nAb 处理组的 VEGFA、 $\alpha$ -SMA、Col I、Col III、Fibronectin 蛋白表达量均显著降低 (P<0.001), 由此可说明 periostin 单抗可抑制 VEGFA、 $\alpha$ -SMA、Col I、Col III、Fibronectin 蛋白的表达。

**6 HUVEC 细胞体外荧光定量 PCR、WB、IF 检测**

periostin 可通过整合素 (Integrin)-局部黏着斑激酶 (FAK)-磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (AKT/PKB) 信号通路促进视网膜血管的形成和纤维化, 通过荧光定量 PCR 技术, 免疫荧光和蛋白质印记法测定人血管内皮细胞膜上的整合素 ( $\alpha$ v $\beta$ 3、 $\alpha$ v $\beta$ 5), 内皮生长因子受体-2 (VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor-2)、FAK、PI3K、AKT 的 mRNA 表达量及蛋白表达水平的差异变化, 从而证实 periostin 人源化单抗对玻璃体视网膜纤维化性病变具有治疗作用。

体外培养人 HUVEC 细胞并分组:

- a 空白对照组 (Control): 不含重组 periostin 蛋白或抗体
- b periostin 组: 只含 periostin
- c 对照 IgG 组: 含 periostin+对照 IgG
- d periostin 抗体组: 含 periostin+Postn nAb

Postn nAb: 本发明制备的 periostin 人源化抗体

人 periostin 蛋白以及抗体先孵育 1h 后, 再加入到细胞里再次处理 24h 后进行下述检测, 对照 IgG 的工作浓度同抗 periostin 人源化单抗的浓度。

### 6.1 荧光定量 PCR 测定

检测血管内皮细胞膜上的 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 整合素，VEGFR-2、FAK、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT的mRNA表达量

由图 20 可知，与空白对照组相比，periostin 处理组 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 、VEGFR-2、FAK、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 基因表达增多，periostin+Postn nAb 处理组的基因表达量均降低，尤其 VEGFR-2 的 mRNA 表达量显著低于空白对照组 ( $P < 0.001$ )，由此可说明 periostin 人源化单抗可抑制 VEGFR-2、FAK、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的 mRNA 基因的表达。

6.2 Western blot 检测 HUVEC 细胞中 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 、VEGFR-2、FAK、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白的表达

取正常培养的 HUVEC 细胞，以  $10^6$  个/皿 (6cm 皿) 进行铺板，5%  $\text{CO}_2$ ，37℃ 过夜培养。细胞过夜贴壁后，按照分组进行处理；BCA 试剂盒检测总蛋白含量，SDS-PAGE 电泳后转膜，封闭液封闭，洗涤后一抗 4℃ 冰箱过夜，洗膜，二抗室温摇床孵育 1h，显色。计算各组灰度值与同条件下内参灰度值之比作为各种蛋白的相对表达量。

不同组别 HUVEC 细胞中各个蛋白的表达及灰度分析见图 21~22，实验结果显示，与空白对照组相比，periostin 处理组 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 、VEGFR-2、FAK、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白的表达增多，而 periostin+Postn nAb 处理组的蛋白表达量降低，且均低于 periostin 处理组，由此可说明 periostin 人源化单抗可抑制 periostin 的作用。

6.3 IF 检测 HUVEC 细胞中 $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 、VEGFR-2、FAK 蛋白的表达

在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗，4% 的多聚甲醛固定爬片，0.5% Triton X-100 室温通透 20min，加一抗放入湿盒 4℃ 孵育过夜，加荧光二抗，湿盒中 20-37℃ 孵育 1h，滴加 DAPI 核复染，封片并置于荧光显微镜下观察 (图 23~26)。

荧光显微镜下可见，periostin 蛋白在 HUVEC 细胞胞浆表达， $\alpha\text{v}\beta 3$ 、 $\alpha\text{v}\beta 5$ 、VEGFR-2、FAK 蛋白的空白对照组细胞胞浆呈现弱荧光；periostin 处理组细胞胞浆显示强荧光；periostin+Postn nAb 处理组细胞荧光信号较 periostin 处理组明显减弱，且与空白对照组相比无明显差异，由此可以说明 periostin 人源化单抗可通过阻断 Integrin-FAK-PI3K-AKT/PKB 信号通路进而阻断 periostin 的作用，从而抑制视网膜纤维化。

以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

-23-

权利要求

- 1、抗 periostin 人源化单克隆抗体，其特征在于，  
其重链可变区具有如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列；  
5 其轻链可变区具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。
- 2、根据权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于，  
其重链的恒定区为人 IgG1；  
其轻链的恒定区为人 κ 型。
- 3、根据权利要求 1 所述的单克隆抗体，其特征在于，其重链的氨基酸序列如 SEQ  
10 ID NO:3 所示，其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。
- 4、编码权利要求 1~3 任一项所述的单克隆抗体的核酸。
- 5、根据权利要求 4 所述的核酸，其特征在于，  
编码其重链的核酸具有如 SEQ ID NO:5 所示的核酸序列；  
编码其轻链的核酸具有如 SEQ ID NO:6 所示的核酸序列。
- 15 6、根据权利要求 5 所述的核酸，其特征在于，  
编码其重链的核酸具有如 SEQ ID NO:7 所示的核酸序列；  
编码其轻链的核酸具有如 SEQ ID NO:8 所示的核酸序列。
- 7、包括权利要求 4~6 任一项所述的核酸的表达载体。
- 8、根据权利要求 7 所述的表达载体，其特征在于，其骨架载体为 PATX-GS2。
- 20 9、转化或转染权利要求 8 所述的表达载体的宿主细胞。
- 10、权利要求 1~3 任一项所述的抗 periostin 人源化单克隆抗体的制备方法，包括：  
培养权利要求 9 所述的宿主细胞、诱导抗 periostin 人源化单克隆抗体的表达。
- 11、权利要求 1~3 任一项所述抗 periostin 人源化单克隆抗体在制备药物或检测试剂  
25 中的应用，所述药物为治疗组织纤维纤维化病变和/或恶性肿瘤的药物，所述试剂  
为诊断组织纤维纤维化病变和/或恶性肿瘤的试剂。
- 12、根据权利要求 11 所述的应用，其特征在于，所述组织纤维化病变为视网膜  
纤维化。
- 13、一种治疗组织纤维纤维化病变和/或恶性肿瘤的药物，其特征在于，包括权  
利要求 1~3 任一项所述抗 periostin 人源化单克隆抗体。
- 30 14、一种诊断组织纤维纤维化病变和/或恶性肿瘤的试剂盒，其特征在于，  
包括：权利要求 1~3 任一项所述的抗 periostin 人源化单克隆抗体，  
或包括将权利要求 1~3 任一项所述的抗 periostin 人源化单克隆抗体与化学标记或  
生物标记形成的结合物；  
或包括权利要求 1~3 任一项所述的抗 periostin 人源化单克隆抗体与固体介质或半  
35 固体介质偶联制得的偶联物。





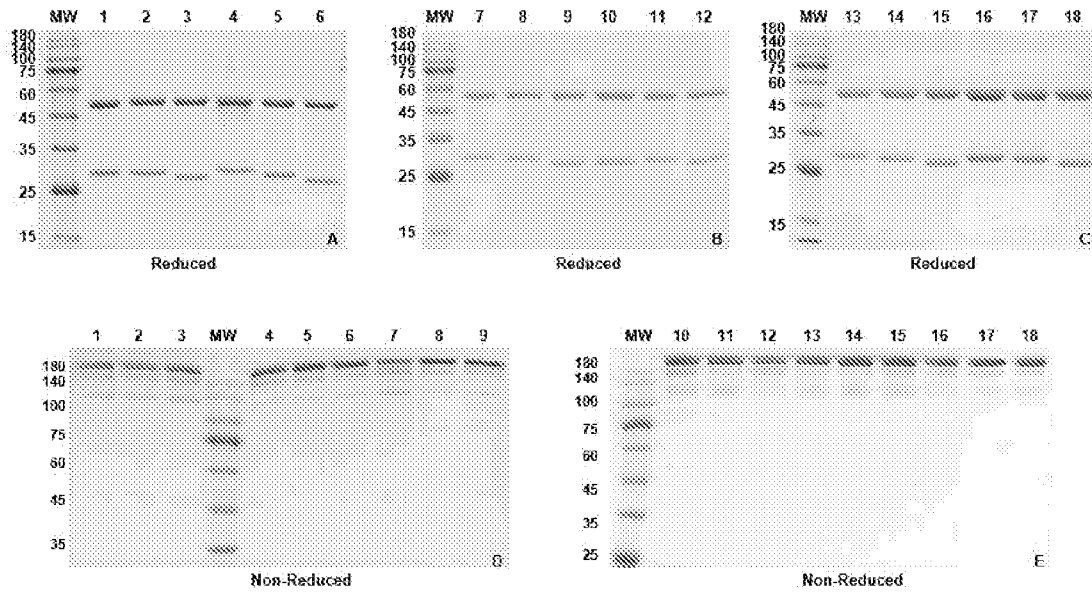


图 4

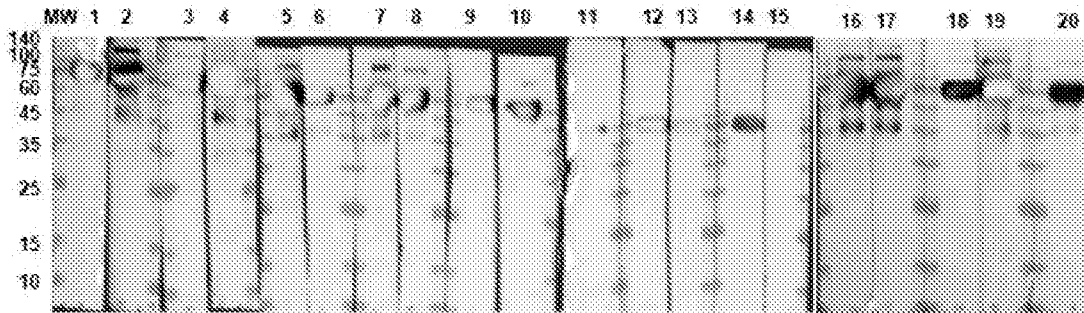
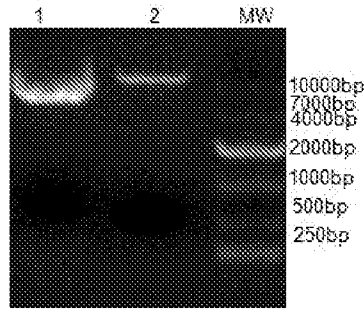


图 5



图 6

-4/14-



Lane 1/2: 9808P-2+551-VHB-139-VLA

MW: DL10000

PVUI线性化

图 7

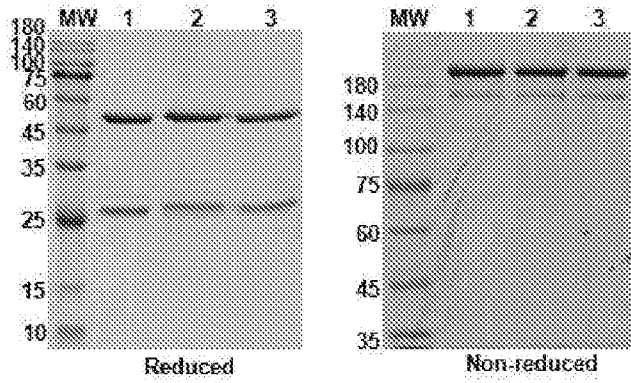


图 8

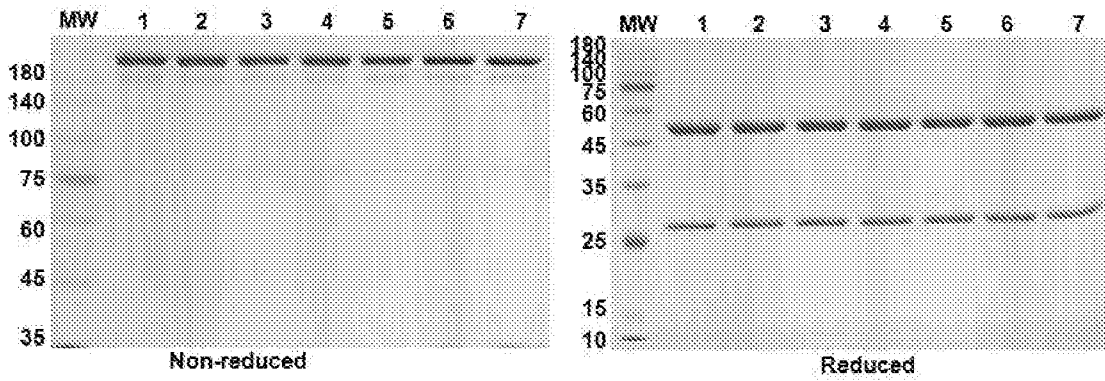


图 9

-5/14-

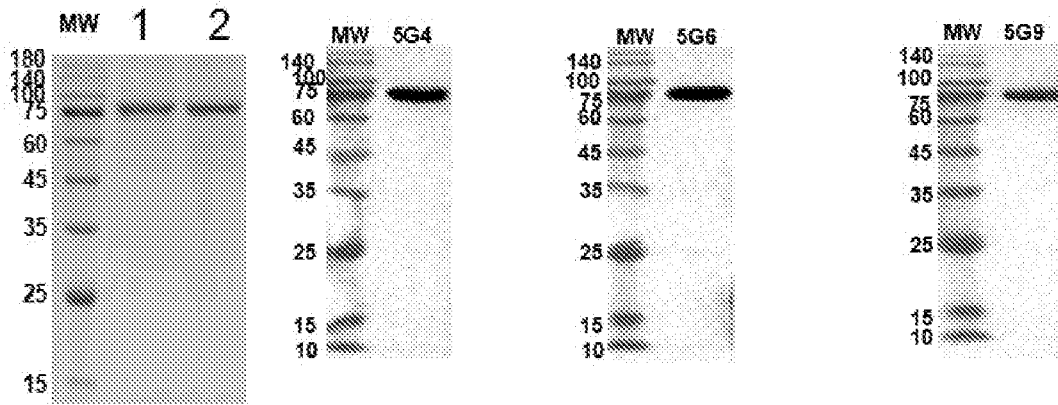


图 10

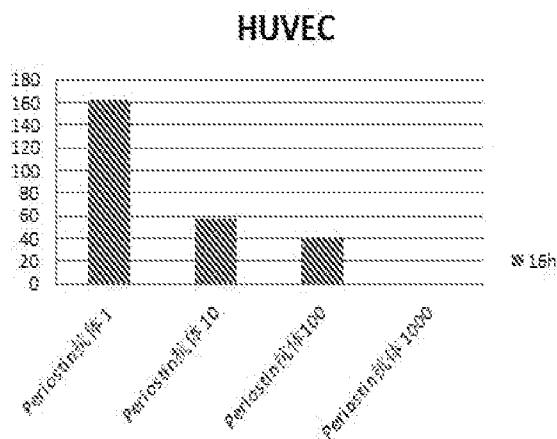
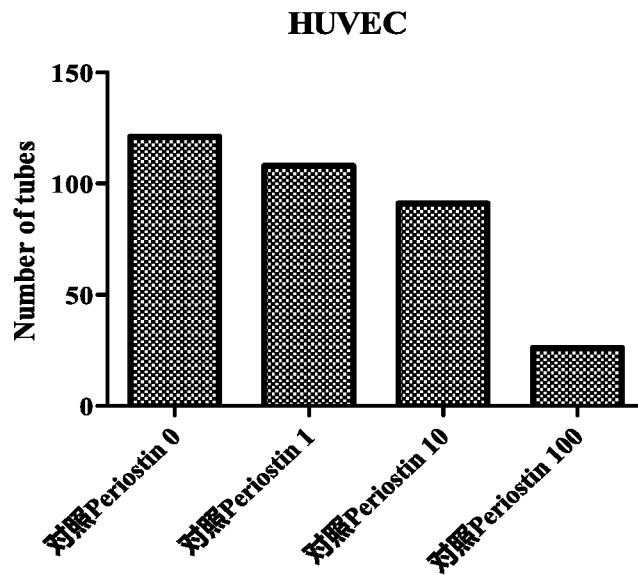


图 11

-6/14-

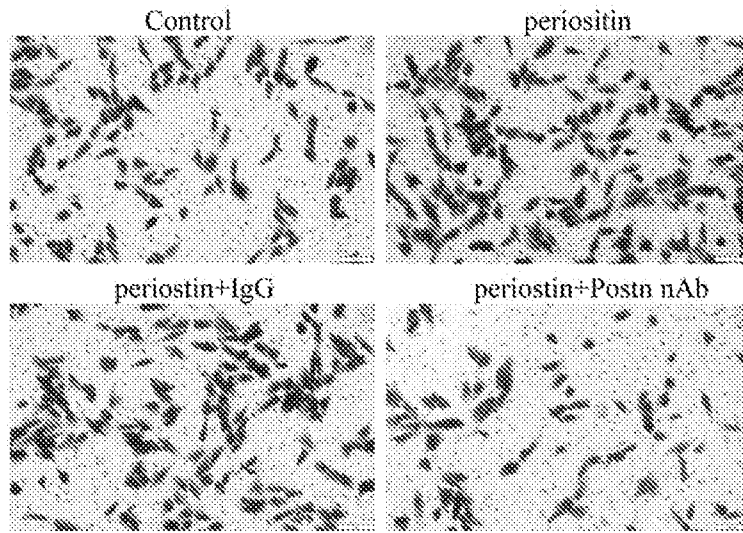


图 12

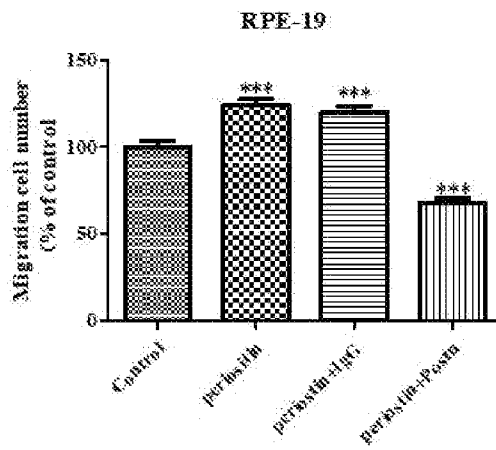


图 13

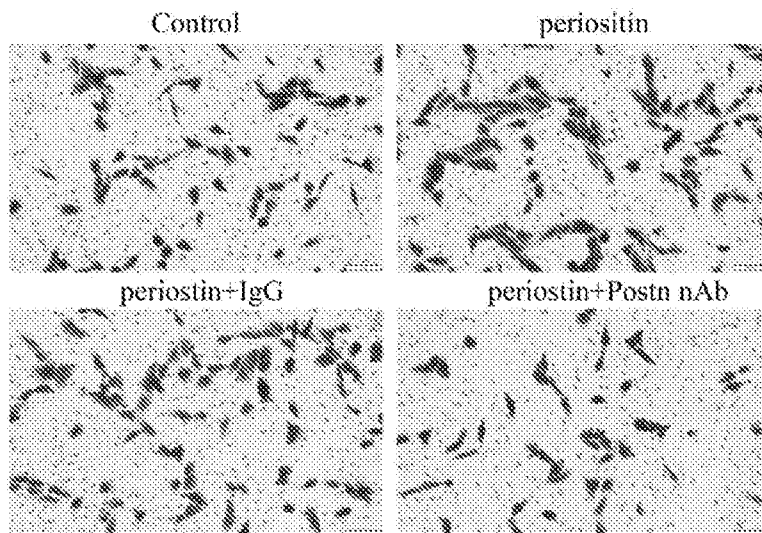


图 14

-7/14-

### RPE-19

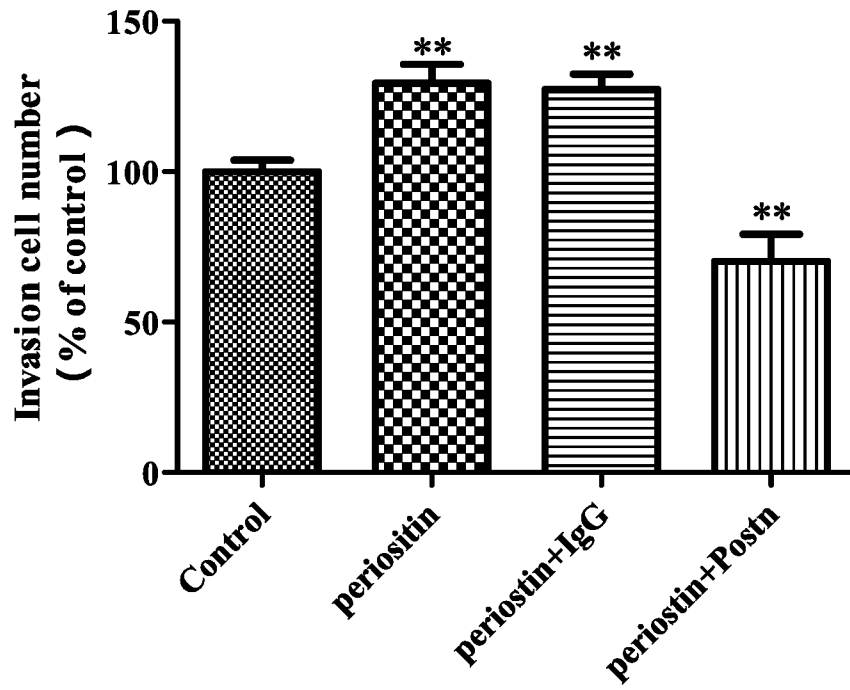


图 15

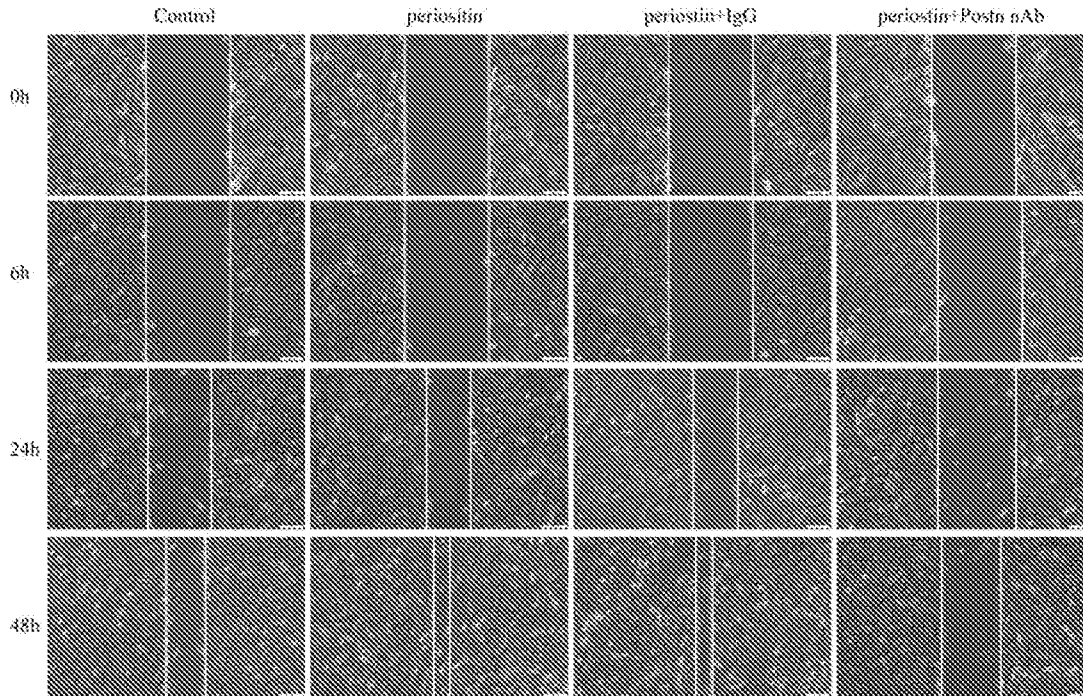


图 16

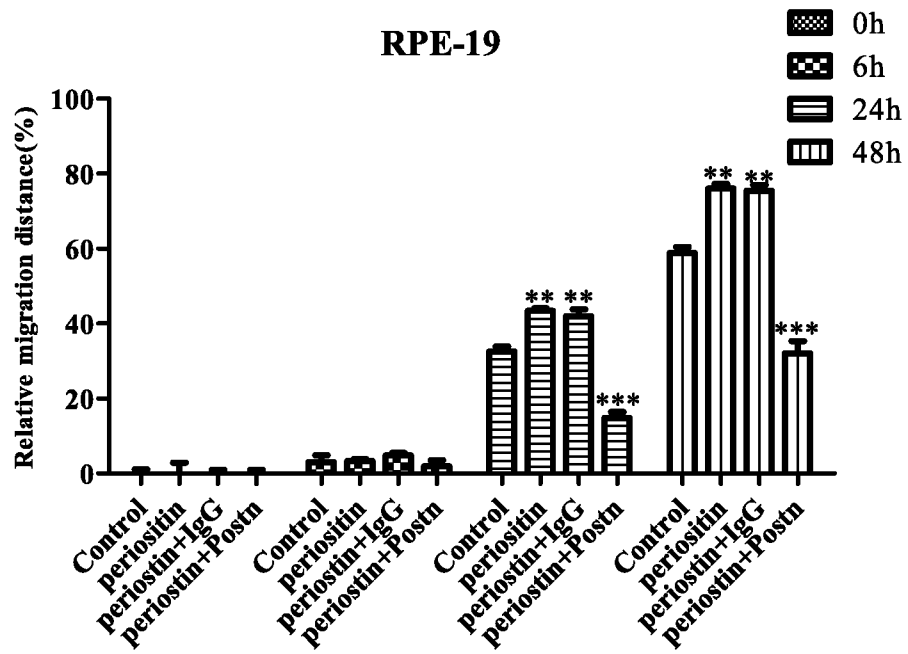


图 17

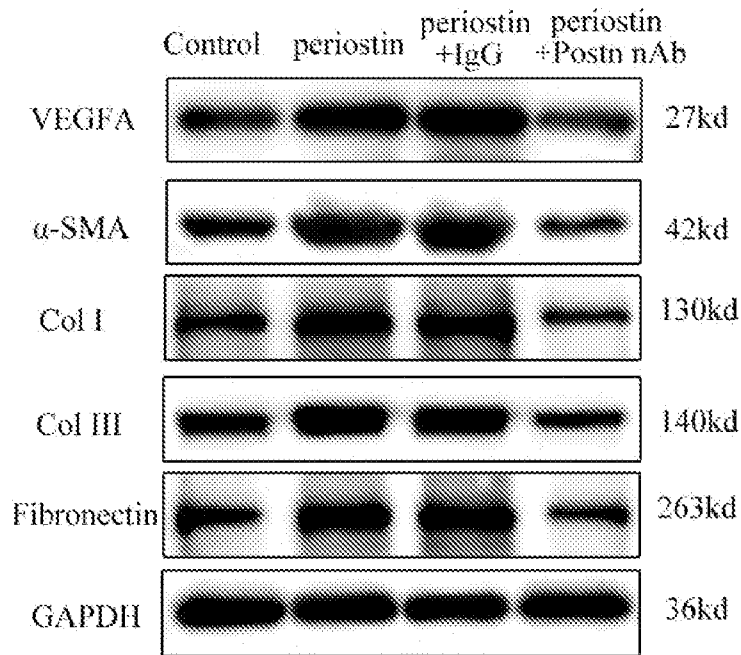


图 18

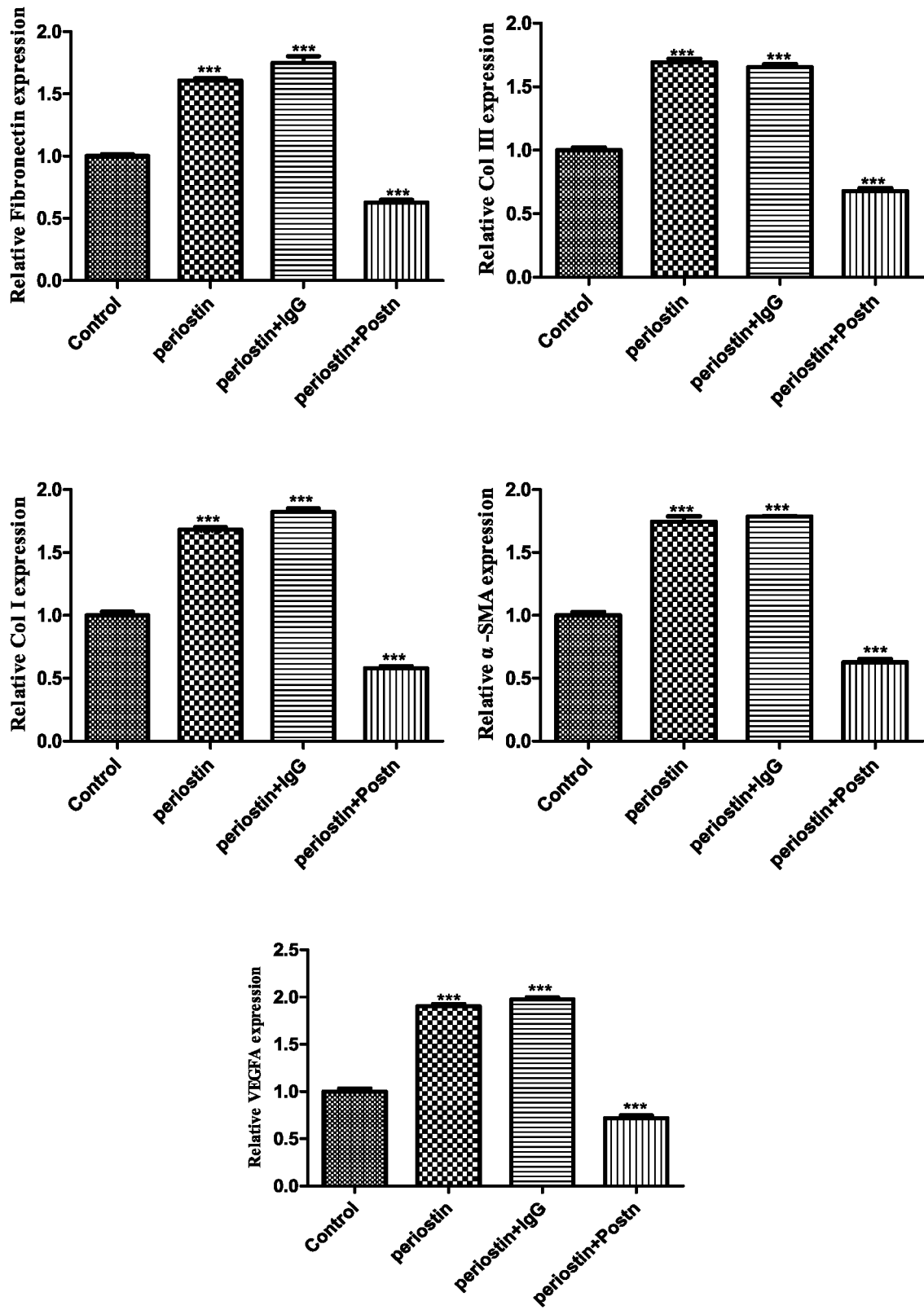


图 19

-10/14-

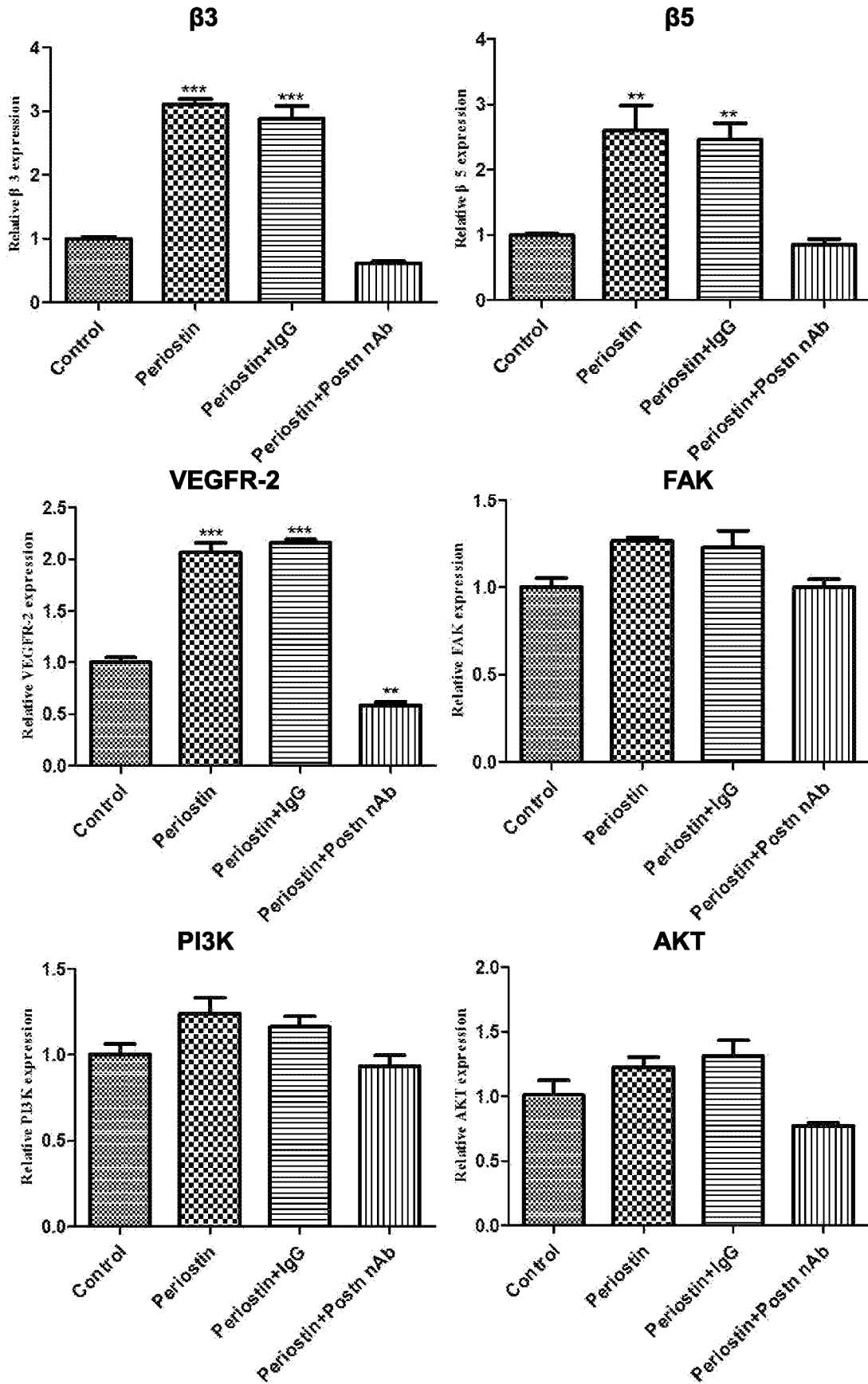


图 20

-11/14-

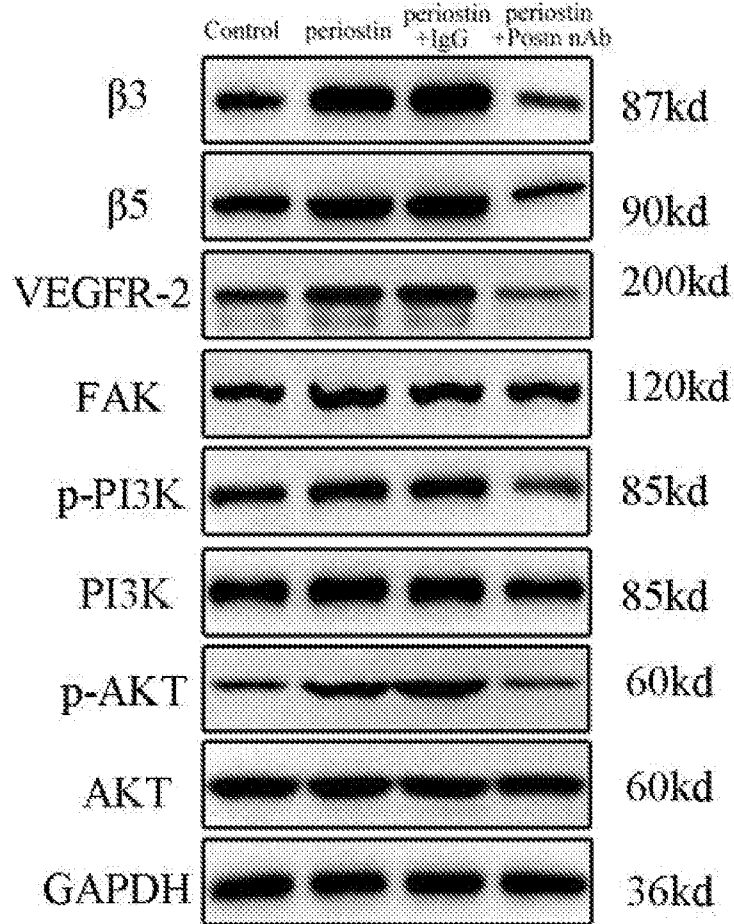


图 21

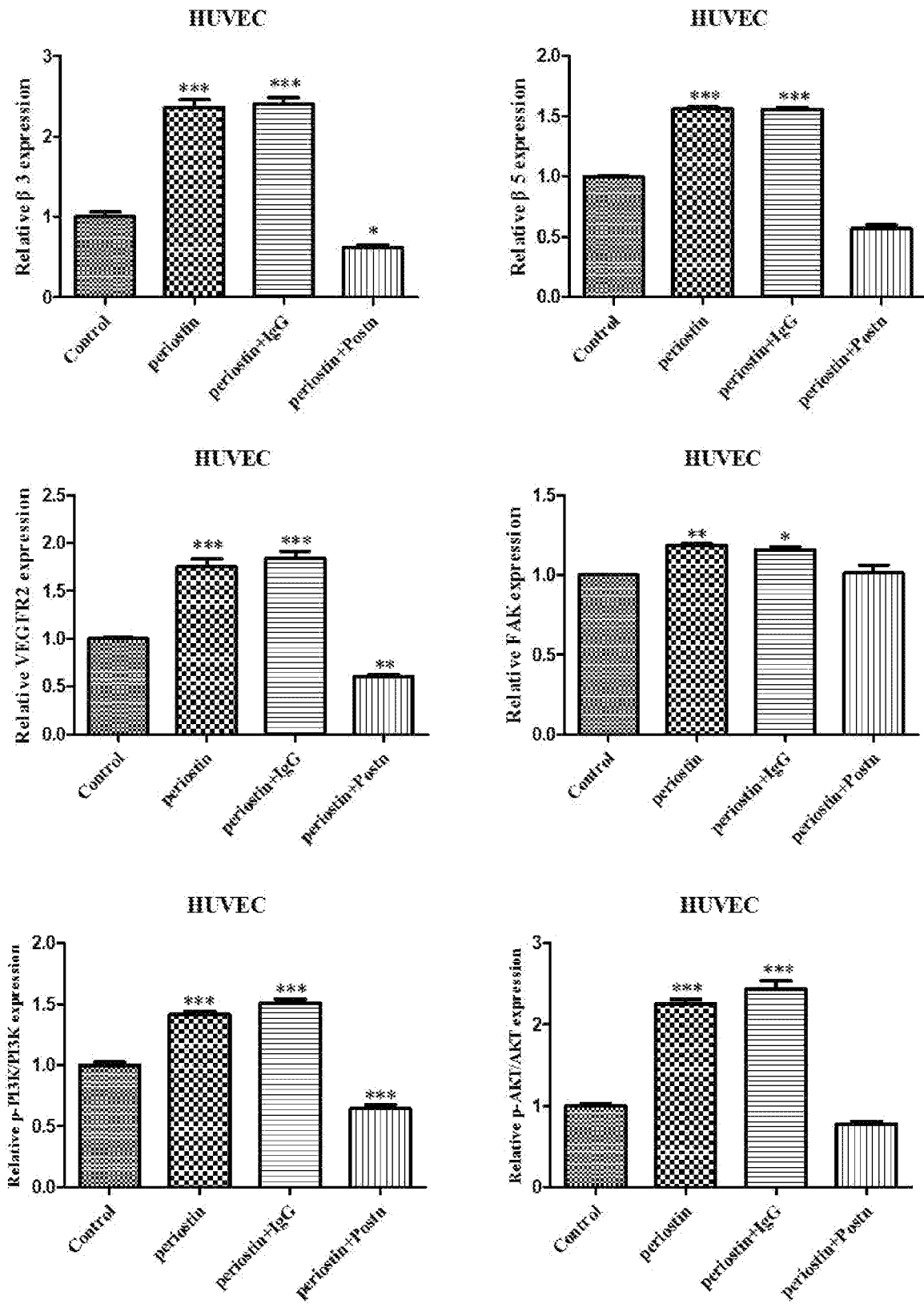


图 22

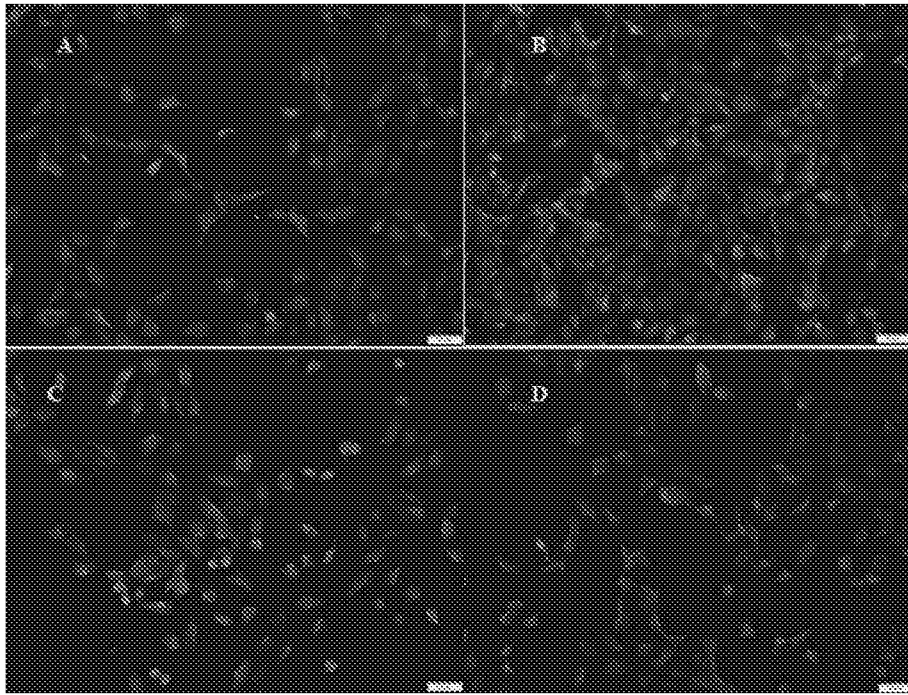


图 23

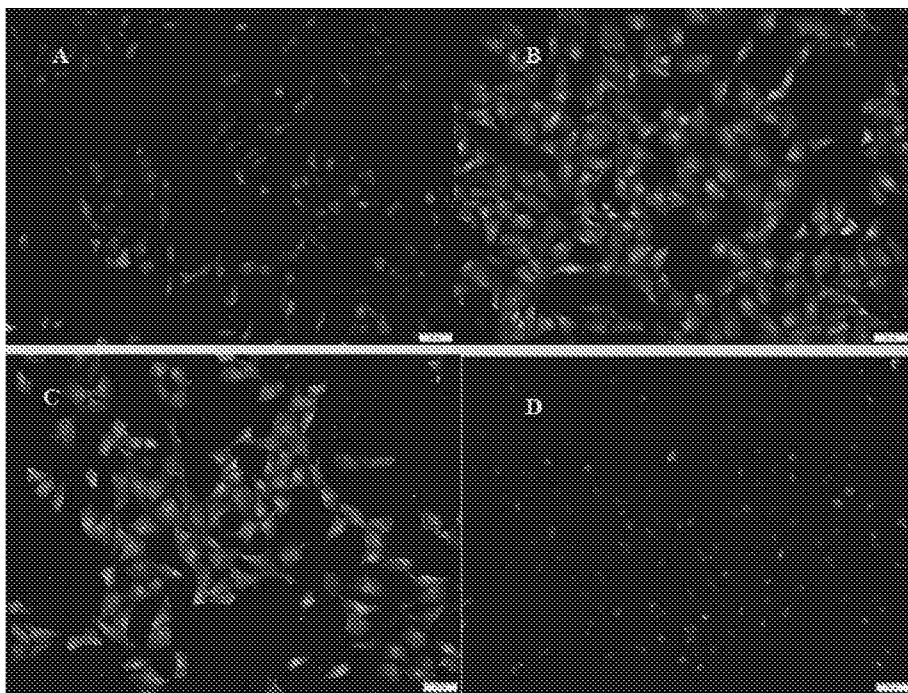


图 24

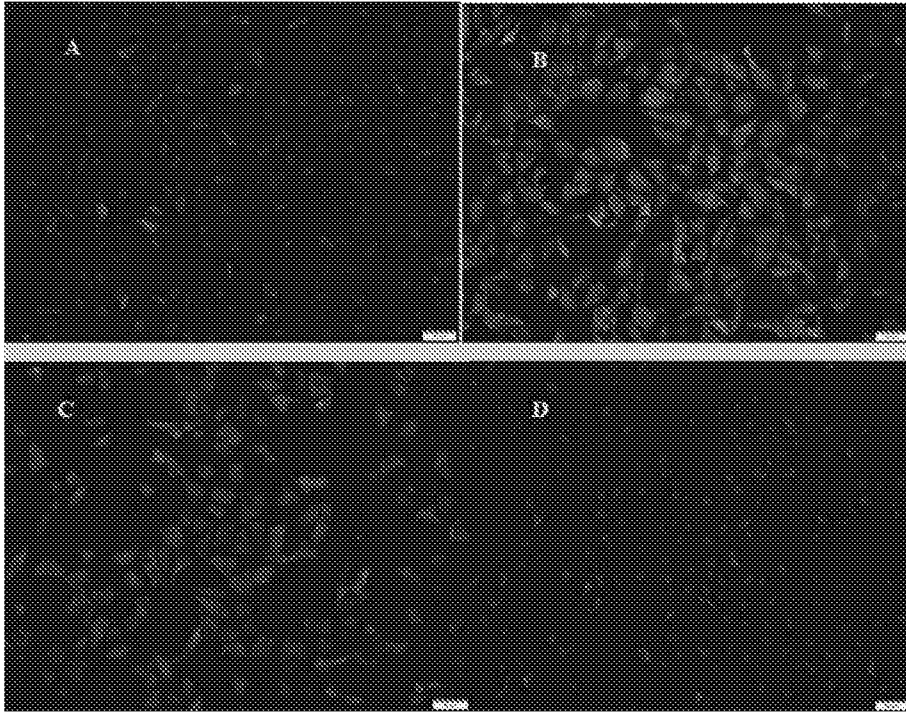


图 25

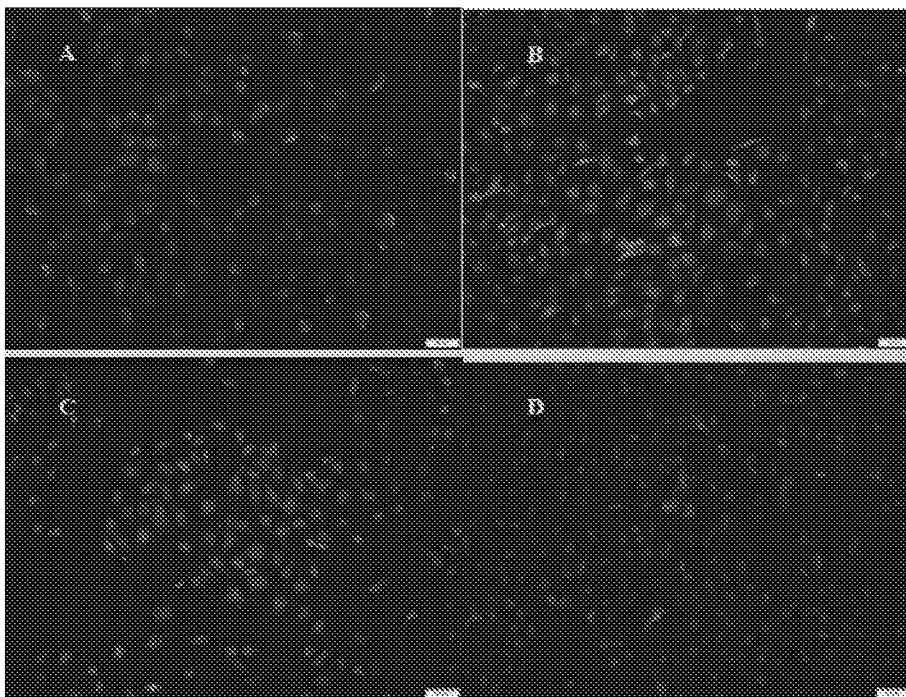


图 26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/118162

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, C12N, G01N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, CNABS, WPABSC, ENTXT, WPABS, DWPI, CNKI, 万方 WANFANG, ISI Web of Science, BAIDU: periostin, 骨膜素, 骨膜蛋白, Osteoblast-specific factor 2, 抗体, 人源化, antibody, B7, humanized等; GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, Chinese patent biological sequence retrieval system, STN, 全文库和检索的序列; SEQ ID NOS: 1-8, retrieval sequence: SEQ ID NOS: 1-8.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114057871 A (SHENYANG HESHI EYE INDUSTRY GROUP CO., LTD.; SHENYANG YANCHANYE TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) 18 February 2022 (2022-02-18) see claims 1-10, and description, paragraphs 7-12	1-14
A	CN 110551214 A (YANG LAN) 10 December 2019 (2019-12-10) see claims 1-10, and embodiments 1-6	1-14
A	CN 103550790 A (RUIJIN HOSPITAL AFFILIATED TO SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 05 February 2014 (2014-02-05) see claims 1-5, and embodiments 2-3	1-14
A	CN 109879963 A (HE UNIVERSITY) 14 June 2019 (2019-06-14) see abstract, and claims 1-10	1-14
A	CN 101389656 A (ASUBIO PHARMA CO., LTD.; OSAKA UNIVERSITY) 18 March 2009 (2009-03-18) see claims 1-34	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>09 October 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>17 November 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2022/118162**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101888855 A (ASUBIO PHARMA CO., LTD.; OSAKA UNIVERSITY) 17 November 2010 (2010-11-17) see claims 1-12	1-14
A	WO 2013035799 A1 (SHINO-TEST CORP. et al.) 14 March 2013 (2013-03-14) see claims 1-22, and embodiments 1-18	1-14

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
  - [1] The actually submitted sequence table is an XML file of the standard ST.26.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/118162**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	114057871	A	18 February 2022	None	
CN	110551214	A	10 December 2019	None	
CN	103550790	A	05 February 2014	None	
CN	109879963	A	14 June 2019	None	
CN	101389656	A	18 March 2009	BR PI0620747 A2	22 November 2011
				WO 2007077934 A1	12 July 2007
				JP WO2007077934 A1	11 June 2009
				KR 20080099248 A	12 November 2008
				EP 1978034 A1	08 October 2008
				CA 2635849 A1	12 July 2007
				AU 2006334029 A1	12 July 2007
				RU 2008130898 A	10 February 2010
CN	101888855	A	17 November 2010	EP 2168599 A1	31 March 2010
				JP WO2009001940 A1	26 August 2010
				WO 2009001940 A1	31 December 2008
				KR 20100023869 A	04 March 2010
				CA 2690888 A1	31 December 2008
WO	2013035799	A1	14 March 2013	US 2014308685 A1	16 October 2014
				EP 2754672 A1	16 July 2014
				JP WO2013035799 A1	23 March 2015
				US 2016313351 A1	27 October 2016

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, C12N, G01N, A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXT, CNABS, WPABSC, ENTXT, WPABS, DWPI, CNKI, 万方, ISI Web of Science, BAIDU和检索词: periostin, 骨膜素, 骨膜蛋白, Osteoblast-specific factor 2, 抗体, 人源化, antibody, B7, humanized等; GenBank, EMBL, 中国专利生物序列检索系统, STN, 全文库和检索的序列: SEQ ID N0s:1-8.</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 114057871 A (沈阳何氏眼产业集团有限公司, 沈阳眼产业技术研究院有限公司) 2022年2月18日 (2022 - 02 - 18) 参见权利要求1-10, 说明书第7-12段</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110551214 A (杨澜) 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10) 参见权利要求1-10, 实施例1-6</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103550790 A (上海交通大学医学院附属瑞金医院) 2014年2月5日 (2014 - 02 - 05) 参见权利要求1-5, 实施例2-3</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109879963 A (辽宁何氏医学院) 2019年6月14日 (2019 - 06 - 14) 参见摘要, 权利要求1-10</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101389656 A (阿斯比奥制药株式会社, 国立大学法人大阪大学) 2009年3月18日 (2009 - 03 - 18) 参见权利要求1-34</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 101888855 A (阿斯比奥制药株式会社, 国立大学法人大阪大学) 2010年11月17日 (2010 - 11 - 17) 参见权利要求1-12</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 114057871 A (沈阳何氏眼产业集团有限公司, 沈阳眼产业技术研究院有限公司) 2022年2月18日 (2022 - 02 - 18) 参见权利要求1-10, 说明书第7-12段	1-14	A	CN 110551214 A (杨澜) 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10) 参见权利要求1-10, 实施例1-6	1-14	A	CN 103550790 A (上海交通大学医学院附属瑞金医院) 2014年2月5日 (2014 - 02 - 05) 参见权利要求1-5, 实施例2-3	1-14	A	CN 109879963 A (辽宁何氏医学院) 2019年6月14日 (2019 - 06 - 14) 参见摘要, 权利要求1-10	1-14	A	CN 101389656 A (阿斯比奥制药株式会社, 国立大学法人大阪大学) 2009年3月18日 (2009 - 03 - 18) 参见权利要求1-34	1-14	A	CN 101888855 A (阿斯比奥制药株式会社, 国立大学法人大阪大学) 2010年11月17日 (2010 - 11 - 17) 参见权利要求1-12	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 114057871 A (沈阳何氏眼产业集团有限公司, 沈阳眼产业技术研究院有限公司) 2022年2月18日 (2022 - 02 - 18) 参见权利要求1-10, 说明书第7-12段	1-14																					
A	CN 110551214 A (杨澜) 2019年12月10日 (2019 - 12 - 10) 参见权利要求1-10, 实施例1-6	1-14																					
A	CN 103550790 A (上海交通大学医学院附属瑞金医院) 2014年2月5日 (2014 - 02 - 05) 参见权利要求1-5, 实施例2-3	1-14																					
A	CN 109879963 A (辽宁何氏医学院) 2019年6月14日 (2019 - 06 - 14) 参见摘要, 权利要求1-10	1-14																					
A	CN 101389656 A (阿斯比奥制药株式会社, 国立大学法人大阪大学) 2009年3月18日 (2009 - 03 - 18) 参见权利要求1-34	1-14																					
A	CN 101888855 A (阿斯比奥制药株式会社, 国立大学法人大阪大学) 2010年11月17日 (2010 - 11 - 17) 参见权利要求1-12	1-14																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&amp;” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年10月9日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年11月17日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>马振莲</p> <p>电话号码 62412131</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2013035799 A1 (SHINO TEST CORP等) 2013年3月14日 (2013 - 03 - 14) 参见权利要求1-22, 实施例1-18	1-14

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的:
    - 附件C/ST. 25文本文件形式
    - 纸件或图形文件形式
  - b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
  - c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
    - 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
    - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:
  - [1] 实际提交的序列列表是ST. 26标准的XML文件。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/118162

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114057871	A	2022年2月18日	无			
CN	110551214	A	2019年12月10日	无			
CN	103550790	A	2014年2月5日	无			
CN	109879963	A	2019年6月14日	无			
CN	101389656	A	2009年3月18日	BR	PI0620747	A2	2011年11月22日
				WO	2007077934	A1	2007年7月12日
				JP	W02007077934	A1	2009年6月11日
				KR	20080099248	A	2008年11月12日
				EP	1978034	A1	2008年10月8日
				CA	2635849	A1	2007年7月12日
				AU	2006334029	A1	2007年7月12日
				RU	2008130898	A	2010年2月10日
CN	101888855	A	2010年11月17日	EP	2168599	A1	2010年3月31日
				JP	W02009001940	A1	2010年8月26日
				WO	2009001940	A1	2008年12月31日
				KR	20100023869	A	2010年3月4日
				CA	2690888	A1	2008年12月31日
WO	2013035799	A1	2013年3月14日	US	2014308685	A1	2014年10月16日
				EP	2754672	A1	2014年7月16日
				JP	W02013035799	A1	2015年3月23日
				US	2016313351	A1	2016年10月27日