



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103421113 B

(45)授权公告日 2018.01.19

(21)申请号 201210160474.3

C12N 15/63(2006.01)

(22)申请日 2012.05.22

C12N 1/21(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 1/19(2006.01)

申请公布号 CN 103421113 A

C12N 1/15(2006.01)

(43)申请公布日 2013.12.04

C12N 5/10(2006.01)

(73)专利权人 武汉华鑫康源生物医药有限公司

A61K 39/395(2006.01)

地址 430075 湖北省武汉市东湖新区高新

A61P 29/00(2006.01)

大道666号

A61P 19/02(2006.01)

专利权人 上海君实生物医药科技股份有限
公司

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(72)发明人 陈博 舒红兵

(56)对比文件

CN 101851291 A,2010.10.06,

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413

石晓娟等.B淋巴细胞刺激物单克隆抗体的
制备与特性鉴定.《细胞与分子免疫学杂志》
.2005,(第3期),第328-329页.

代理人 刘继富

审查员 程静之

(51)Int.Cl.

C07K 16/24(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

C12N 15/13(2006.01)

序列表16页 附图4页

(54)发明名称

抗BLyS抗体

(57)摘要

本发明属于生物医药领域,公开了抗BLyS抗体,所述抗BLyS抗体特异性针对BLyS,能够与B淋巴细胞刺激因子结合并且能够抑制B淋巴细胞刺激因子与其受体BR3-Fc结合。本发明还提供了所述抗BLyS抗体在制备预防和/或治疗如系统性红斑狼疮等B细胞增殖过量引起的疾病的药物中的应用。

1. 抗BLyS抗体,其轻链CDR1、CDR2和CDR3以及重链CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列选自以下各组中的一组:

	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
A	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.2	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6
B	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12
C	SEQ ID NO.13	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.18
D	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.20	SEQ ID NO.21	SEQ ID NO.22	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.24
E	SEQ ID NO.25	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.27	SEQ ID NO.28	SEQ ID NO.29	SEQ ID NO.30

2. 根据权利要求1所述抗BLyS抗体,其轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区的氨基酸序列选自以下各组中的一组:

- a:SEQ ID NO.31和SEQ ID NO.32所示的氨基酸序列;
- b:SEQ ID NO.33和SEQ ID NO.34所示的氨基酸序列;
- c:SEQ ID NO.35和SEQ ID NO.36所示的氨基酸序列;
- d:SEQ ID NO.37和SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列;
- e:SEQ ID NO.39和SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述抗BLyS抗体,其轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区的氨基酸序列选自以下各组中的一组:

- I:SEQ ID NO.41和SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列;
- II:SEQ ID NO.43和SEQ ID NO.44所示的氨基酸序列;
- III:SEQ ID NO.45和SEQ ID NO.46所示的氨基酸序列;
- IV:SEQ ID NO.47和SEQ ID NO.48所示的氨基酸序列;

4. 根据权利要求3所述抗BLyS抗体,其特征在于,还含有人类轻链恒定区和重链恒定区,且所述轻链可变区及重链可变区分别连接至人类轻链恒定区和重链恒定区。

5. 根据权利要求4所述抗BLyS抗体,其特征在于,所述人类轻链恒定区为人类轻链κ恒定区。

6. 根据权利要求4所述抗BLyS抗体,其特征在于,所述人类重链恒定区为人类重链Fc片段。

7. 编码权利要求1~6任意一项所述抗BLyS抗体的DNA分子。

8. 一种重组DNA载体,其特征在于,含有权利要求7所述DNA分子。

9. 一种宿主细胞,其特征在于,含有权利要求8所述重组DNA载体。

10. 权利要求1~6任意一项所述抗BLyS抗体在制备预防和/或治疗B细胞增殖过量引起的疾病的药物中的应用。

11. 根据权利要求10所述应用,其特征在于,所述B细胞增殖过量引起的疾病为系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、强制性关节炎或B细胞淋巴瘤。

12. 一种药物组合物,其特征在于,由有效剂量的权利要求1~6任意一项所述抗体和药

学上可接受的辅料组成。

抗BLyS抗体

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及抗BLyS抗体及其应用,所述抗BLyS抗体能够与B淋巴细胞刺激因子结合并且能够抑制B淋巴细胞刺激因子与其受体BR3-Fc结合。进一步涉及与MHC II因子亲和力低的人源化抗BLyS抗体及其应用。

背景技术

[0002] 系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)是一种累及全身多个系统如皮肤、关节、心脏、肺、肾、血液以及大脑的弥漫性进行性、常以缓解和复发交替出现的自身免疫性疾病。系统性红斑狼疮主要影响非洲-加勒比人、亚洲人和西班牙裔人,而高加索人(白种人)受其影响的程度则较小。美国狼疮基金会认为,保守预测系统性红斑狼疮在美国影响到30万人。而Datamonitor公司估计,仅在中国、印度和墨西哥三国就有220万系统性红斑狼疮患者,其中中国系统性红斑狼疮患者超过100万,为全球之最。由于系统性红斑狼疮初期症状比较隐蔽,因此实际病患人数可能远大于目前估计。由此可见临床在系统性红斑狼疮的诊断和治疗方面均存在极大的客观需求。

[0003] 系统性红斑狼疮的成因复杂且不明确,并非单一因素引起,可能与遗传、环境、性激素及免疫等多种因素有关。目前,世界科学界公认的系统性红斑狼疮的病因是由于在细胞水平上,自反应B细胞在外周组织中存在时间过长,产生人体自身抗原而造成自身免疫。所以如果可以抑制早期B细胞的生长增殖,则可以治疗红斑狼疮疾病。

[0004] B淋巴细胞刺激因子(B Lymphocyte Stimulator,BLyS),又称Tall-1(TNF and Apol related leukocyte expressed ligand 1)、BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)、THANK(TNF homologues that activate apoptosis,NF- κ B and JNK),属肿瘤坏死因子(TNF)家族,是由舒红兵等人于1999年首先发现并克隆的一种新的细胞因子。BLyS作为一种B淋巴细胞的共刺激因子,在anti-IgM和IL-4存在下,它可以专一刺激B细胞增殖和分化,在体液免疫中起着极其重要作用;而其在体内的过量表达又与自身免疫性疾病密切相关。

[0005] 体外实验表明,在用IgM预活化B细胞后,BLyS能诱导其大量增殖并分泌大量IgM和IgA,但是,对于静息期间B细胞,这种刺激作用却不明显(3)。进一步的研究表明,BLyS主要作用于前B淋巴细胞、未成熟B淋巴细胞、激活淋巴细胞,而对浆细胞、淋巴多功能干细胞没有作用。同大多数细胞因子相同,BLyS主要是通过B细胞表面受体而刺激下游信号传导。多个研究小组证实与BLyS结合的受体是:B细胞活化因子受体(BR3、BLyS receptor 3或BAFF-R)、穿膜蛋白活化物(transmembrane activator-land calcium modulator and cyclophilin ligand-interactor,TACI)和B细胞成熟抗原(B cell maturation Antigen,BCMA)。这种特异性决定了BLyS是针对B细胞抗体介导的自身免疫疾病和淋巴瘤中一个很好的靶。

[0006] 抗BLyS的治疗性抗体在体内和体外已经被证明可以有效抑制B细胞生长、IgA和IgM分泌从而达到治疗系统性红斑狼疮的效果(Edwards BM等,The remarkable

flexibility of the human antibody repertoire;isolation of over one thousand different antibodies to a single protein,BLyS.J Mol Biol.2003 Nov 14;334(1):103-18;Baker KP等,Generation and characterization of LymphoStat-B,a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator.Arthritis Rheum.2003Nov;48(11):3253-65)。美国人类基因组公司开发的抗BLyS抗体Benlysta成为过去60年来世界首个治疗红斑狼疮的新型药物。Benlysta只针对BLyS刺激的B细胞,与化疗药物相比,大大降低了治疗过程中的副作用,因此为系统性红斑狼疮患者提供了一个安全有效的治疗方法。近年来针对BLyS的靶向治疗研究与临床应用迅速发展,除美国人类基因组公司外,其他公司均是采用在BLyS或其受体基础上改造的融合蛋白。美国基因泰克(Genentech)公司开发了BR3-FC药物、Zymogenetics公司开发了TACI-FC药物、安晋(AMGEN)公司开发了多肽-FC药物。与Benlysta相比,它们的特异性差,结合力弱,疗效相对较差,毒性较强。这三种药物均停止或终止在临床实验二期。所以,抗BLyS的抗体药物才是针对此靶点的有效药物方法。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供抗BLyS抗体,所述抗体能够与B淋巴细胞刺激因子结合并且能够抑制B淋巴细胞刺激因子与其受体BR3-Fc的结合。

[0008] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0009] 本发明通过基因工程技术,提取人外周血RNA,以人外周血RNA为模板反转录获得人BLyS的cDNA,然后以人BLyS的cDNA为模板分别扩增获得人的BLyS基因片段,克隆到真核表达系统中转染宿主细胞表达并纯化获得人的BLyS纯化蛋白。

[0010] 以人的BLyS纯化蛋白为抗原免疫小鼠获得2000株不同单克隆杂交瘤细胞,通过酶标反应,共选出211株分泌的抗体可结合BLyS蛋白的克隆。在这211株杂交瘤细胞中,通过检测与BJAB上BLyS受体结合能力获得5株分泌的抗体可以不同能力的抑制生物素标记的BLyS与BJAB上BLyS受体结合的单克隆杂交瘤细胞,分别命名为1D12、2B10、2G3、5A5和13G8。

[0011] 用ELISA对所获得的5个单克隆杂交瘤细胞株分泌的抗体进行免疫学特性进行鉴定,结果显示本发明筛选得到的克隆杂交瘤细胞株分泌的抗体均特异性针对BLyS,而对其他TNF家族抗原如TNF- α 、TNF- β ,则没有反应性。

[0012] 进一步的,本发明提取各杂交瘤细胞RNA反转录获得cDNA,然后以cDNA为模板扩增各杂交瘤细胞所对应的可变区DNA序列,测序后利用www.expasy.ch对所得的序列进行系列分析,根据推导的氨基酸序列进行Kabat分类分析,确定各杂交瘤细胞分泌的抗体的轻链和重链的FR区和CDR区。其中,其轻链CDR1、CDR2和CDR3以及重链CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列选自以下各组中的一组:

[0013]

	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
A	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.2	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6
B	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9	SEQ ID NO.10	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.12
C	SEQ ID NO.13	SEQ ID NO.14	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.16	SEQ ID NO.17	SEQ ID NO.18
D	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.20	SEQ ID NO.21	SEQ ID NO.22	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.24
E	SEQ ID NO.25	SEQ ID NO.26	SEQ ID NO.27	SEQ ID NO.28	SEQ ID NO.29	SEQ ID NO.30

[0014] 其中,在一个实施方案中,所述单克隆杂交瘤细胞1D12分泌的抗BLyS抗体,含有SEQ ID NO.31所示氨基酸序列的轻链可变区和SEQ ID NO.32所示的氨基酸序列重链可变区,命名为单克隆抗体1D12。

[0015] 在一个实施方案中,所述单克隆杂交瘤细胞2B10分泌的抗BLyS抗体,含有SEQ ID NO.33所示氨基酸序列的轻链可变区和SEQ ID NO.34所示的氨基酸序列重链可变区,命名为单克隆抗体2B10。

[0016] 在一个实施方案中,所述单克隆杂交瘤细胞2G3分泌的抗BLyS抗体,含有SEQ ID NO.35所示氨基酸序列的轻链可变区和SEQ ID NO.36所示的氨基酸序列重链可变区,命名为单克隆抗体2G3。

[0017] 在一个实施方案中,所述单克隆杂交瘤细胞5A5分泌的抗BLyS抗体,含有SEQ ID NO.37所示氨基酸序列的轻链可变区和SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列重链可变区,命名为单克隆抗体5A5。

[0018] 在另一个实施方案中,所述单克隆杂交瘤细胞13G8分泌的抗BLyS抗体,含有SEQ ID NO.39所示氨基酸序列的轻链可变区和SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列重链可变区,命名为单克隆抗体13G8。

[0019] 当然,在不影响抗体活性的前提下,本领域技术人员根据上述SEQ ID NO.31~40所示的氨基酸序列进行各种取代、添加和/或一个或几个氨基酸获得具有同等功能的氨基酸序列,它们都被视为包括在本发明保护的范围内。如在可变区将具有类似性质的氨基酸进行替换。

[0020] 然而,给予治疗性抗体的最大隐患是人体对外源抗体蛋白所引起的免疫应答,而产生抗抗体反应(AAR)。鼠源抗体作为外源蛋白,反复刺激人体,可引起超敏反应,被称为人抗鼠抗体反应(HAMA)。因此鼠源抗体在体内可能被抗抗体中和,进而被快速清除,甚至导致严重的过敏反应而致死。另外鼠源单克隆抗体缺乏人抗体具有的免疫效应功能,如ADCC和CDC作用,而使疗效不佳。因此为了进一步减低免疫原性,本发明将制备得到的鼠源抗体人源化,获得人源化抗BLyS抗体,其轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区的氨基酸序列选自以下各组中的一组:

[0021] I:SEQ ID NO.41和SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列;

[0022] II:SEQ ID NO.43和SEQ ID NO.44所示的氨基酸序列;

[0023] III:SEQ ID NO.45和SEQ ID NO.46所示的氨基酸序列;

[0024] IV:SEQ ID NO.47和SEQ ID NO.48所示的氨基酸序列;

[0025] 本发明所述人源化抗BLyS抗体不仅能够与B淋巴细胞刺激因子结合抑制B淋巴细胞刺激因子与其受体BR3-Fc的结合,而且与MHC II因子亲和力低,从而在保证亲和力的前提下,使免疫应答减低到最小。

[0026] 本发明所述人源化抗BLyS抗体还含有人类轻链恒定区和重链恒定区,且所述轻链可变区及重链可变区分别连接至人类轻链恒定区和重链恒定区。即所述人源化抗BLyS抗体含有完整的轻链和完整的重链,其中所述完整的轻链由抗BLyS抗体所含有的轻链可变区与人类轻链恒定区连接而成,所述完整的重链由抗BLyS抗体所含有的重链可变区与人类重链恒定区连接而成。

[0027] 优选的,所述人类轻链恒定区为人类轻链 κ 恒定区。

[0028] 优选的,所述人类重链恒定区为人类重链Fc片段。

[0029] 其中,所述人类轻链 κ 恒定区和人类重链Fc片段,均来源于健康人B淋巴细胞。通过基因工程技术,重叠延伸PCR连接可变区和恒定区得到完整的人源化抗BLyS抗体的轻链和重链。

[0030] 本发明还提供了编码本发明所述抗BLyS抗体或人源化抗BLyS抗体的DNA分子。由于密码子的简并性,可以存在很多种能够编码本发明所述的抗体的DNA分子。

[0031] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.31所示的氨基酸序列的轻链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.49。

[0032] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.32所示的氨基酸序列的重链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.50。

[0033] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列的轻链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.51。

[0034] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.34所示的氨基酸序列的重链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.52。

[0035] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.35所示的氨基酸序列的轻链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.53。

[0036] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.36所示的氨基酸序列的重链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.54。

[0037] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.37所示的氨基酸序列的轻链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.55。

[0038] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.38所示的氨基酸序列的重链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.56。

[0039] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.39所示的氨基酸序列的轻链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.57。

[0040] 在一个实施方案中,本发明提供了编码具有SEQ ID NO.40所示的氨基酸序列的重链可变区的DNA分子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.58。

[0041] 进一步的,本领域技术人员可以将编码本发明所述抗BLyS抗体的DNA分子克隆到载体中,进而转化宿主细胞。因此,本发明还提供了一种重组DNA载体,其含有编码本发明所述抗BLyS抗体的DNA分子。

[0042] 优选的,所述重组DNA载体是一种表达载体,本领域技术人员将所述抗体的DNA分子克隆到表达载体中,转化宿主细胞,通过诱导表达获得单链抗体。

[0043] 在一个实施方案中,本发明所述重组DNA载体含有编码本发明所述人源化抗BLyS抗体的DNA分子。编码的人源化抗BLyS抗体的DNA分子可被重组构建用于哺乳动物转录表达的载体,本发明的表达载体含有编码的人源抗BLyS单克隆抗体的重链和轻链可变区和恒定区的DNA序列。然而,也可有分别构建两种表达载体,一种含有重量可变区和恒定区,另一种是含有轻链可变区和恒定区的,一同转染哺乳动物。

[0044] 表达载体进一步含有启动子和编码分泌信号肽的DNA序列,以及至少一种用于筛选的抗药基因。所用方法包括DNA合成技术和体外重组技术。

[0045] 本发明还提供了一种宿主细胞,其含有本发明所述的重组DNA载体。本发明所述宿主细胞可以为其为原核宿主细胞、真核宿主细胞或噬菌体。

[0046] 其中,所述原核宿主细胞可以为大肠杆菌、枯草杆菌、链霉菌或奇异变形菌等。所述真核宿主细胞,可以为如巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉等真菌,如草地粘虫等昆虫细胞,如烟草等植物细胞,如BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞等哺乳动物细胞。

[0047] 在一些实施方案中,本发明所述宿主优选为哺乳动物细胞,更优选的是BHK细胞、CHO细胞、NSO细胞或COS细胞。

[0048] 采用体外细胞学实验测定了本发明所述人源化抗BLyS抗体的免疫中和活性,结果显示本发明所述人源化抗BLyS抗体可以不同程度的抑制B细胞增殖,因此本发明还提供了所述抗BLyS抗体或人源化抗BLyS抗体在制备预防和/或治疗B细胞增殖过量引起的疾病的药物中的应用。所述B细胞增殖过量引起的疾病为系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、强制性关节炎或B细胞淋巴瘤。

[0049] 本发明还提供了一种药物制剂,由有效剂量的本发明所述任意一种抗BLyS抗体或人源化抗BLyS抗体和药学上可接受的辅料组成。所述药物制剂可以通过常规方法用本发明所述抗BLyS抗体或人源化抗BLyS抗体中的任意一种与一种或多种药学上可接受的辅料混合制成药物制剂。其中“药学上可接受的辅料”是指一种或多种本领域技术人员公知的有机或无机、天然或合成的、与抗体联合可促进其稳定和临床应用的载体。合适的载体包括本领域技术人员已知到药学上可接受的无菌盐水及含水或无水等渗无菌液和无菌混悬液。

[0050] 本发明所述有效剂量和使用方法取决于诸多因素,包括患者的年龄、体重、性别、自然健康状况、营养状况、化合物的活性强度、给药时间、代谢速率、病程严重程度以及诊治医师的主观判断。本领域的技术人员根据上述因素可以容易地决定有效剂量和使用方法。

附图说明

[0051] 图1示实施例1SDS-PAGE检测图,其中泳道A为本发明所述重组质粒表达的蛋白,泳道B空白载体重组质粒,泳道C为蛋白分子量Marker;

[0052] 图2示实施例2不同浓度生物素标记his-hBLyS重组蛋白与BJAB细胞结合的流式细

胞图,其中线条1为200ng/mL生物素标记his-hBLyS重组蛋白组,线条2为100ng/mL生物素标记his-hBLyS重组蛋白组,线条3为50ng/mL生物素标记his-hBLyS重组蛋白组,线条4为25ng/mL生物素标记his-hBLyS重组蛋白组,线条5为不含生物素标记his-hBLyS重组蛋白仅含有SA-APC组;

[0053] 图3示实施例3免疫小鼠的血清与BJAB细胞结合的流式细胞图;

[0054] 图4示实施例4单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体与BJAB细胞上BLyS受体结合的流式细胞图,其中线条1为负对照IgG组,线条2为不含生物素标记his-hBLyS重组蛋白仅含有SA-APC组,线条3为单克隆杂交瘤细胞3H9,线条4为单克隆杂交瘤细胞13G8;

[0055] 图5示实施例4单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体与BJAB细胞上BLyS受体结合的流式细胞图,其中线条1为负对照IgG组,线条2为单克隆杂交瘤细胞1D12组,线条3为单克隆杂交瘤细胞2B10,线条4为单克隆杂交瘤细胞2G3;

[0056] 图6示实施例4单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体与BJAB细胞上BLyS受体结合的流式细胞图,其中线条1为负对照IgG组,线条2为单克隆杂交瘤细胞5A5组,线条3为单克隆杂交瘤细胞1D7组,线条4为单克隆杂交瘤细胞4D3组;

[0057] 图7示实施例4单克隆杂交瘤细胞1D12、2B10、2G3、5A5和13G8分泌的抗体与his-hBLyS重组蛋白和肿瘤坏死因子(TNF)家族蛋白酶联免疫吸附试验结果图;

[0058] 图8示实施例9人源化抗BLyS抗体体外抑制B细胞增殖结果图,其中横坐标为人源化抗BLyS抗体浓度,纵坐标为荧光值。

具体实施方式

[0059] 本发明实施例公开了抗BLyS抗体及其应用。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。本发明的产品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所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0060] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明提供进行详细说明。

[0061] 实施例1:人BLyS基因的克隆与表达

[0062] 分离健康人外周血,以商用RNA试剂盒(Qiagen公司)提取总RNA并纯化。以纯化的总RNA为模板,进行逆转录合成cDNA第一链cDNA反应体系如下:

	RNase free dH ₂ O	9.5μL
	5×RT buffer(with 25mM Mg ²⁺)	4μL
	dNTP(10mM each)	2μL
[0063]	RNase Inhibitor(10U/μL)	0.5μL
	Oligo(dT) ₂₀ (10μmol/L)	1μL
	总RNA模板	2μL
	ReverTra Ace	1μL

[0064] 加入灭菌蒸馏水补足体系总量20μL。

[0065] 反应条件为:30℃ 10min,42℃ 30min,99℃ 5min,4℃ 5min。反应结束后冰浴

5min。

[0066] 根据人的BLyS的全长DNA序列,设计合成克隆分泌型BLyS引物P1和P2,以逆转录合成的cDNA为模板,以上游引物P1和下游引物P2进行PCR扩增。其中P1和P2为的核苷酸序列如下:

[0067] P1:5' tacgaagctt gcatcatcat catcatcatg gcggcggctc cggcggcggc tccccgttca ggggtccagaa gaa;

[0068] P2:5' cgacgtcgac tcacagcagt ttcaatgcac caaaaaatgt gacatc。

[0069] PCR扩增反应体系为:

	10×taq buffer(with 1.5mM Mg ²⁺)	5μL
	dNTP(5mM)	4μL
[0070]	上游引物(100ng/μL)	1μL
	下游引物(100ng/μL)	1μL
	模板(5-50ng/μL)	1μL
	Taq酶(2U/μL)	0.5μL

[0071] 加入灭菌蒸馏水补足体系总量50μL。

[0072] PCR反应程序为:

	94℃预变性	300s	
	94℃变性	45s	} 32个循环
[0073]	55℃退火	45s	
	72℃延伸	45s	
	72℃延伸	200s	

[0074] 将PCR扩增产物凝胶电泳回收,用Sal I和Hind III双酶切,克隆到pCDNA3.1真核表达质粒系统,以空白载体转化质粒作对照,转染293T细胞(中国典型培养物保藏中心)3天后,收集培养基上清液,所得上清通过His亲和层析纯化得到his-hBLyS纯化蛋白,SDS-PAGE检测,结果见图1。

[0075] 由图1结果可见,本发明所述重组质粒有蛋白表达,但是空白载体重组质粒却没有明显蛋白表达条带。本发明所述重组质粒蛋白大小约为23Kb,与根据人BLyS氨基酸序列推断的分子量23Kb接近。

[0076] 实施例2:检测与BJAB细胞上受体结合的能力

[0077] 1、生物素标记his-hBLyS重组蛋白

[0078] 将实施例1纯化得到his-hBLyS重组蛋白与溶解于DMSO中的生物素-xx-NHS按ng/mL计以1:4的重量体积比混合,室温放置1小时,将反应混合物通过凝胶柱,分离生物素标记的his-hBLyS和游离生物素。

[0079] 2、生物素标记his-hBLyS重组蛋白与BJAB细胞结合

[0080] 将分离得到的生物素标记的his-hBLyS重组蛋白分为25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL和200ng/mL四个不同浓度组,分别与1×10⁶的伯基特淋巴瘤细胞(BJAB)细胞混合,在4摄氏度孵育15分钟,PBS洗涤3次,加入straptavidin allophycocyanin(SA-APC)使其终浓度为

0.2 μ g/mL,在4℃孵育20分钟。以PBS洗涤3次后上细胞流式仪检测,检测结果见图2。

[0081] 由图2结果可见,生物素标记的重组人BLyS蛋白在不同浓度下均可以和BJAB细胞结合。

[0082] 实施例3:免疫小鼠

[0083] 将实施例1纯化得到his-hBLyS重组蛋白作为抗原与等量免疫佐剂(福氏佐剂)混合,取4只6周大雌性FVB小鼠,其中3只进行免疫,另一只进行对照模拟实验。在初次免疫以后,每一周进行一次加强免疫。在最后一针加强免疫前,从免疫的小鼠心脏取血,将其血清中与生物素标记的his-hBLyS重组蛋白(浓度50ng/mL)混合并在室温孵育20分钟。然后将混合物与BJAB细胞在4℃孵育15分钟,以生理盐水洗脱3次后,加入0.2 μ g/mL的straptavidin allophycocyanin并在4℃孵育15分钟。以生理盐水洗脱3次后,将样品上流式细胞仪检测所免疫小鼠的血清其是否可以抑制BLyS和其受体BR3-Fc结合,结果见图3。

[0084] 由图3结果可见三只免疫小鼠中小鼠1所取得血清可有效抑制生物素标记的his-hBLyS重组蛋白与BJAB细胞结合,所以选取小鼠1作为后续实验个体,进行下一步融合实验。

[0085] 实施例4:细胞融合与单克隆杂交瘤细胞筛选

[0086] 在最后一针加强免疫后,取小鼠大腿根处淋巴结,在生理盐水中碾磨后取富含B细胞的悬浮液,按常规方法电转与骨髓瘤细胞SP2/0融合。将融合细胞分配于96孔盘,在含有HAT的RPMI-1640完全培养基中置于5%CO₂、37℃条件下培养。在不同单克隆杂交瘤细胞中,通过酶标反应,筛选出211个分泌的抗体可结合BLyS蛋白的克隆。

[0087] 将可结合BLyS蛋白的211个克隆产生的抗体分别与生物素标记的his-hBLyS重组蛋白混合室温孵育20分钟。然后将混合物与BJAB细胞在4℃孵育15分钟,以生理盐水洗脱3次后,加入0.2 μ g/mL的straptavidin allophycocyanin并在4℃孵育15分钟。以生理盐水洗脱3次后,将样品上流式细胞仪检测以筛选可以抑制生物素标记的his-hBLyS重组蛋白和BJAB细胞结合的单克隆杂交瘤细胞。结果共有11个单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体可以不同程度的抑制生物素标记的his-hBLyS重组蛋白与BJAB上BLyS受体结合,如表1所示,其中命名为1D12、2B10、2G3、5A5和13G8的单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体比3H9,1D7,4D3的单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体有更强的抑制力。1D12、2B10、2G3、5A5和13G8的检测结果见图4-6。

[0088] 表1 抑制生物素标记的his-hBLyS重组蛋白与BJAB上BLyS受体结合的细胞分泌的抗体亚型

[0089]

	克隆	亚型
1	1D12	IgG2b/kappa
2	2B10	IgG2b/kappa
3	2G3	IgG2a/kappa
4	5A5	IgG3/kappa
5	13G8	IgG2a/kappa
6	1D7	IgG2a/kappa
7	2A9	IgG1/kappa
8	4D3	IgG2a/kappa
9	5E5	IgG3/kappa

10	5F4	IgG1/kappa
11	5H5	IgG2b/kappa

[0090] 实施例5:检验与其它肿瘤坏死因子(TNF)家族蛋白的结合

[0091] 为进一步检验候选抗体的结合特异性,分别在96孔酶标板加入上1 μ g/mL的his-hBLyS重组蛋白、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、肿瘤坏死因子(TNF- β)和BSA,在0.05M PH9.0的碳酸盐包被缓冲液中,4 $^{\circ}$ C静置过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次。然后加入含有3%BSA的PBS溶液封闭20分钟。用洗涤缓冲液洗3次后加入100 μ L稀释后的1D12、2B10、2G3、5A5和13G8单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体,室温孵育1小时后用洗涤缓冲液冲洗3次,用洗涤缓冲液以1:10000倍稀释辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase,HRP)交联羊抗小鼠抗体,室温孵育1小时,经洗涤缓冲液冲洗3次后,加入50 μ L 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine,TMB)底物溶液显色,室温反应10分钟后,以25 μ L 0.5M的硫酸溶液终止反应并在450nm处读出吸光度,统计结果见图7。

[0092] 由图7结果可见,1D12、2B10、2G3、5A5和13G8单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体均识别结合BLyS,但它们均不识别TNF- α 或者TNF- β 。

[0093] 实施例6:单克隆杂交瘤细胞分泌的抗体可变区序列的确定

[0094] 将筛选获得的单克隆杂交瘤细胞1D12、2B10、2G3、5A5和13G8进行培养,1000rpm离心收集细胞,按实施例1所述方法提取的各杂交瘤细胞RNA反转录合成cDNA第一链。以合成cDNA第一链为模板扩增杂交瘤细胞所对应的可变区DNA序列。扩增反应中所使用的引物序列如下:

[0095] 重链扩增所需引物:

[0096] 引物1:5' atg g (ag) a tg (cg) agctg (tg) gt (ca) at (cg) ctc tt;

[0097] 引物2:5' ggg gatatc cacc atg (ag) ac ttc ggg (tc) tg agc t (tg) g gtt tt;

[0098] 引物3:5' ggg tatatc cacc atg gct gtc ttg gggctg ctcttct;

[0099] 轻链扩增所需引物:

[0100] 引物1:5' atg gag aca gac aca ctctgctat;

[0101] 引物2:5' atg gattttcaa gtg cag a tt tic ag;

[0102] 引物3:5' atg gag (ta) ca ca (gt) (ta) ct cag gtc ttt (ga) t a;

[0103] 引物4:5' atg (gt) cc coat) (ga) ct cag (ct) t (ct) ct (tg) gt;

[0104] 扩增反应体系为

10 $\times$ PCR buffer(with 25mM Mg²⁺) 5 μ L

dNTP(5mM) 1 μ L

[0105] 重链引物混合物或轻链引物混合物(每个引物100ng/ μ L) 1 μ L

cDNA (5-50ng/ μ L) 1 μ L

Taq酶(2U/ μ L) 1 μ L

[0106] 加入灭菌蒸馏水补足体系总量50 μ L。

[0107] PCR反应程序为:

	95℃预变性	10min	
	94℃变性	1min	} 30个循环
[0108]	55℃退火	1min	
	72℃延伸	115min	
	72℃延伸	10min	

[0109] 将PCR扩增产物凝胶电泳回收,送生物公司测序,测序后利用www.expasy.ch对所得的序列进行系列分析,其轻链可变区和重链可变区氨基酸序列如表2所示,根据推导的氨基酸序列进行Kabat分类分析,确定1D12、2B10、2G3、5A5和13G8各杂交瘤细胞轻链和重链的FR区和CDR区,其中,1D12、2B10、2G3、5A5和13G8各杂交瘤细胞轻链可变区的氨基酸序列和重链可变区的氨基酸序列见表2:

[0110] 表2 抗BLyS抗体轻链可变区和重链可变区氨基酸序列

[0111]

	轻链可变区氨基酸序列	重链可变区氨基酸序列
1D12	SEQ ID NO.31	SEQ ID NO.32
2B10	SEQ ID NO.33	SEQ ID NO.34
2G3	SEQ ID NO.35	SEQ ID NO.36
5A5	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.38
13G8	SEQ ID NO.39	SEQ ID NO.40

[0112] 实施例7:抗BLyS抗体的人源化

[0113] 根据各杂交瘤细胞分泌的抗体的可变区序列,进行人源化改造。

[0114] 人源化改造过程主要涉及以下几个关键步骤:

[0115] A、把各杂交瘤细胞分泌的抗体的基因序列与人胚胎系抗体基因序列进行比对,找出同源性高的序列;

[0116] B、根据in silicon分析考察HLA-DR亲和性,选出亲和力低的人胚胎系框架序列;

[0117] C、利用计算机模拟技术,应用分子对接分析可变区及其周边的框架氨基酸序列,考察其空间立体结合方式。通过计算静电力,范德华力,亲疏水性和熵值,分析各杂交瘤细胞分泌的抗体基因序列中可能与BLyS作用以及维护空间构架的关键氨基酸个体,将其嫁接回已经选择的人胚胎系基因框架。在其基础上,获得4个不同人源化抗BLyS抗体,其轻链可变区和重链可变区序列如表3所示。

[0118] 表3 人源化抗BLyS抗体轻链可变区和重链可变区序列

	轻链可变区氨基酸序列	重链可变区氨基酸序列
[0119]	I SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.42
	II SEQ ID NO.43	SEQ ID NO.44
[0120]	III SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.46
	IV SEQ ID NO.47	SEQ ID NO.48

[0121] 实施例8:人源化抗BLyS抗体表达载体的构建

[0122] 用上游引物VH5和下游引物VH3从人血细胞中扩增重链恒定区Fc片段,用上游引物

VL5和下游引物VL3从人血细胞中扩增轻链κ恒定区,并在重链引入Xho I和Age I酶切位点,轻链片段引入Sma I和Dra III酶切位点。联入pCDNA3.1质粒,并经测序确定正确克隆。后续的实验材料均由此系列质粒转染细胞后,提存获得。其中VH5、VH3、VL5和VL3的核苷酸序列如下:

[0123] VH5:5' gcggaattc (c/g) a ggtg (a/c) agct (g/t) c a (c/g) (c/g) a (a/g) tc (a/t) gg;

[0124] VH3:5' accgccggat ccaccaccgc ccg agccacc gccacctgcg gagacgatga cc (a/g) tgg tccc;

[0125] VL5:5' ggtggtggatccggcggtgg cggttccgacattgtgatgacccagtctcca;

[0126] VL3:5' ggatacagttggtgcagcctcgagctacc gttt。

[0127] 制备得到四个人源化抗体,分别命名为BLyS-I、BLyS-II、BLyS-III和BLyS-IV。

[0128] 实施例9:人源化抗BLyS抗体体外抑制B细胞增殖

[0129] 将CD19标记的MACS磁珠从人外周血中提取B细胞,以100000/孔接种于96孔盘中培养。完全培养基中加入重组BLyS (10ng/mL), Fab片段羊抗人IgM (4μg/mL) 以刺激B细胞生长。在此培养基础上,加入不同浓度的实施例8制备得到的不同人源化抗BLyS抗体,培养6天以后,用Promega公司出品的Celltiter Glo测试B细胞数量。依据荧光计数所读数(RLU),统计结果见图8。

[0130] 由图8结果可见,实施例8制备的四个抗体人源化抗BLyS抗体BLyS-I、BLyS-II、BLyS-III和BLyS-IV均可在不同程度上抑制B细胞增长。

[0131] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。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,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

[0001] 序 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> 武汉华鑫康源生物医药有限公司

<120> 抗 BLYS 抗体

<130> MP1202342

<160> 58

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

[0002] <212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Gln His Phe Trp Gly Ile Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Asn Thr Tyr Ile His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Arg Ile Asp Leu Ala Asn Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Asp

1 5 10 15

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列
 <400> 6
 Ser Pro Leu Thr Thr Ile Val Glu Ala Trp Phe Leu Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 7
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 8
 Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ser
 1 5

[0003] <210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 9
 Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Arg Ile Phe Thr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 10
 Ser Tyr Arg Leu His
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 11
 Leu Ile His Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

	<400>	12
	Glu Gly Asp Leu Leu Phe Arg Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr	
	1	5 10
	<210>	13
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<400>	13
	Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala	
	1	5 10
	<210>	14
	<211>	7
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<400>	14
	Ser Gly Ser Ser Leu Gln Ser	
	1	5
	<210>	15
	<211>	9
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
[0004]	<400>	15
	Gln Gln His His Glu Ser Pro Tyr Thr	
	1	5
	<210>	16
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<400>	16
	Asp Tyr Ala Ile His	
	1	5
	<210>	17
	<211>	17
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<400>	17
	Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp	
	1	5 10 15
	<210>	18
	<211>	19
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<400>	18

His Glu Trp Asp His Leu Leu Arg Ser Ser Thr Arg Gly Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 19

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 20

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 21

[0005] Gln Glu His His Glu Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 22

Asp Tyr Thr Ile His

1 5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 23

Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Asp Asn Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

1 5 10 15

<210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 24

His Glu Trp Asp His Leu Leu Arg Ser Ser Thr Arg Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr

	1	5	10	15
	<210> 25 <211> 11 <212> PRT <213> 人工序列 <400> 25 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ile Tyr Leu Asn 1 5 10			
	<210> 26 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列 <400> 26 Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser 1 5			
	<210> 27 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列 <400> 27 Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr 1 5			
[0006]	<210> 28 <211> 5 <212> PRT <213> 人工序列 <400> 28 Asp Ala Trp Met Asp 1 5			
	<210> 29 <211> 19 <212> PRT <213> 人工序列 <400> 29 Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Gln Ala Glu Ser Val Lys Gly 1 5 10 15			
	<210> 30 <211> 16 <212> PRT <213> 人工序列 <400> 30 Ala Pro Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Gly Tyr Tyr Ile Met Asp Tyr 1 5 10 15			

<210> 31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Lys Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Ile Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

[0007] <210> 32
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 32
 Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Val Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asn Ile Arg Asn Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Leu Ala Asn Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Ser Pro Leu Thr Thr Ile Val Glu Ala Trp Phe Leu Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 33
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 33
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly

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

<210> 34
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 34

[0008]

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ser 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
 Arg Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile His Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Asp Leu Leu Phe Arg Lys Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 35

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

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

<210> 36
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Glu Trp Asp His Leu Leu Arg Ser Ser Thr Arg Gly Asp
 100 105 110
 Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

[0009]

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 37

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

<210> 38

<211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 38
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser 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 Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Asp Asn Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Glu Trp Asp His Leu Leu Arg Ser Ser Thr Arg Gly Asp
 100 105 110
 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 39
 <211> 107
 <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列
 <400> 39
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser His Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 40
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 40
 Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Gln Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Ala Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Ala Pro Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Gly Tyr Tyr
 100 105 110
 Ile Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Ser Ser
 115 120 125

<210> 41
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 41

[0011]

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

<210> 42
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 42

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

85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Leu Thr Thr Ile Val Glu Ala Trp Phe Leu Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 43

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

[0012]

<210> 44
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Glu Trp Asp His Leu Leu Arg Ser Ser Thr Arg Gly Asp
 100 105 110
 Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 45
 <211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Ile Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Glu His His Glu Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 46

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 46

[0013]

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Asp Asn Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Glu Trp Asp His Leu Leu Arg Ser Ser Thr Arg Gly Asp

100 105 110

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 47

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Ile Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30
 Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr Gln Ala Glu
 50 55 60
 [0014] Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Ala Pro Phe Asp Leu Leu Val Arg Arg Gly Tyr Tyr
 100 105 110
 Ile Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 49
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 49

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
 ggaaaatctc ctcagctect ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 180
 aggttcagtg gcagtaaate aggcacacag tattecctca agatcaccag cctgcagtct 240
 gaagattttg ggaattatta ctgtcaacat ttftggggta ttccgtggac gtccggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 50
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工序列

	<400> 50	
	gagggtcaac tgctgcagtc tgggcagag ctgtgcggc caggggcctc agtcaagttg	60
	tctgcacaa ctctggcct caacattaga aacacctata ttactgggt gaagcagagg	120
	cctgagcagg gectggactg gattggaagg attgatctg cgaatgatta tgctaattat	180
	gacccgaagt tccaggacaa ggccactatg actgtagaca catectccaa cacagcctac	240
	ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac actgccatct actactgtgc tggatcgccg	300
	cttactacga tagtagaagc ctggtttctt tactggggcc aagggactct ggctactgtc	360
	tctgca	366
	<210> 51	
	<211> 324	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 51	
	caaattgttc tctcccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ctccagggga gaaggtcaca	60
	atgacttga gggccagctc aagtgtagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga	120
	tcttcccca taccctggat ttatgccaca tcaagttga ctctggagt cctgtctgc	180
	ttcagtgga gtgggtctgg gacctctac tcttcacaa tcagcagagt ggaggctgaa	240
	gatgttgca ctattactg ccagcagtg agtaataacc cacgaatatt cagttcggc	300
	tcggggacaa agttggacat aaga	324
[0015]	<210> 52	
	<211> 366	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 52	
	cagggtcaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtcaagt ctggggcttc agtgaagttg	60
	tcttgaagg ctctggcta cacttccacc agctaccggt tgcactgggt gaagcagagg	120
	cctggccaag gecttgactg gattggacta attatccta atagtggca tactaactac	180
	attgagaagt tcaagagcag ggccacactg actgtagaca aatctccag cacagcctac	240
	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagggg	300
	gatttattat tccgaaaaga ctacttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc	360
	tctca	366
	<210> 53	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 53	
	gatgtccaga taaccagtc tccatcttat ctgtctgcat ctcttgaga aaccattact	60
	attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatattag cctggtatca ggagaaacct	120
	gggaaaacta ataagctct tatctactct ggatctctt tgcaatctgg aattccatca	180
	aggttcagtg gcagtggatc tggttcagat ttactctca ccatcagtag cctggagcct	240
	gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag catcatgaat ccccgtaac gtctgggggg	300
	gggacceaac tggaaafaaa a	321
	<210> 54	
	<211> 384	
	<212> DNA	

	<213>	人工序列	
	<400>	54	
	caggccaac tgcagcagtc tggagctgac ctggtgaaac ccggggcacc agtgaagctg	60	
	tctgcaagg ctctggcta caccctcact gactatgcta tacattggat aaagcagagg	120	
	tctggacagg gtcttgagtg gattgggtgg ttaccctg gaagtggctg tataaagtac	180	
	aatgagaaat tcaaagacaa ggccacattg actgcggaca aatctccag cacagtctat	240	
	atggagctta gtagattgac atctgaagac tctgcggtct attctgtgc aagacacgaa	300	
	tgggaccatt tactacggtc gtctaccagg ggggactatg ctctggacta ttggggctaa	360	
	ggaacctcag tcacctctc ctca	384	
	<210>	55	
	<211>	321	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	55	
	gatgtccaga taaccagtc tccatttat ctgtctgeat ctctggaga aaccattact	60	
	attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aagtatttag cctggatca agagaaacct	120	
	gggaaaacta ttaagctct tatctactct ggaacctt tacaatctgg aattccatca	180	
	aggttcagtg gcagtggatc tggtagatc ttactctca ccatcagtag cctggagcct	240	
	gaagattttg caatgtatta ctgtcaagag catcatgaat acccgatac gtctggagg	300	
	gggaccacgc tggaaataaa a	321	
[0016]	<210>	56	
	<211>	384	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	56	
	caggccaac tgcagcagtc tggagctgag ttggtgaaac ccggggcacc agtgaagctg	60	
	tctgcaagg ctctggcta caccctcact gactatacta tacactggat aaagcagagg	120	
	tctggacagg gtcttgactg gattgggtgg ttaccctg gaaatgataa tataaagtac	180	
	aatgagaaat tcaaggacaa ggccacattg actgcggaca aatctccaa cacagtctat	240	
	atggagctta gtagattgac atctgaggac tctgcggtct attctgtgc aagacacgaa	300	
	tgggaccatt tactacggtc gtctaccagg ggggactatg ctatggacta ctggggctaa	360	
	ggaacctcag tcacctctc ctca	384	
	<210>	57	
	<211>	322	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	57	
	gatatecaga tgacacagac gacatctcc ctgtctgct ctctgggaga cagagtcacc	60	
	atcagttgca ggacaagtca ggacatcagt atttatataa actggtatca gcagaaacca	120	
	gatggaactg ttaactctct gatctactac acgtcaagat tacgttcagg agtcccatca	180	
	aggttcagtg gcagtgggtc tggacacagat ttctctca ccattagcca cctggaacaa	240	
	gaagattttg ccacttactt ttgccaacag ggtagtacac ttccgtggac gtccggtgga	300	
	ggcaccaagc tggaaatcaa ac	322	
	<210>	58	
	<211>	381	

	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<400>	58	
[0017]	gaagtgaagc ttgaggaatc tggaggaggc ttgtgcaac ctggaggatc catgaaactc		60
	tcctgtgctg cctctggatt cacctttagt gacgcctgga tggactgggt cgcgcagctc		120
	ccagagaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaataa tcatgcaaca		180
	taccaagctg agtctgtgaa agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt		240
	gtctacctgc aaatgaacag cttagacct gaggacgctg gcatttatta ctgtaccagg		300
	gcccccttcg atttattagt acggaggggt tactatatta tggactactg gggtaagga		360
	acctcagtc a cgtctctc a		381

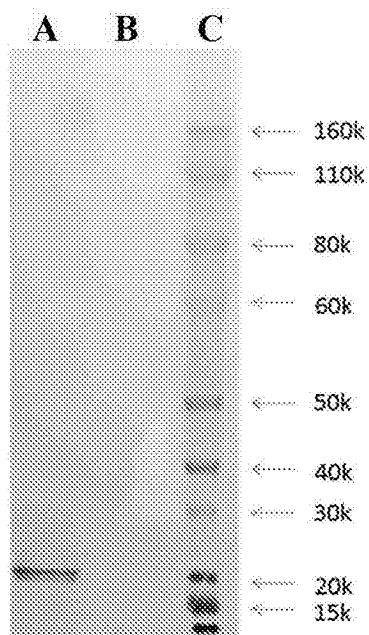


图1

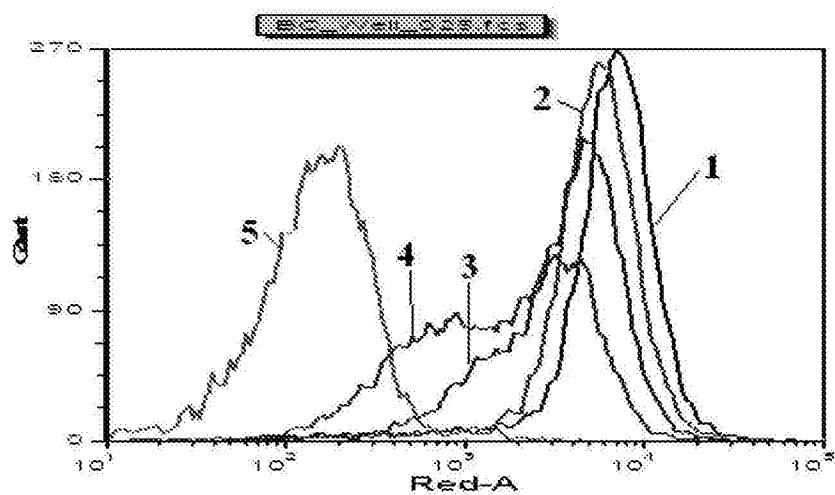


图2

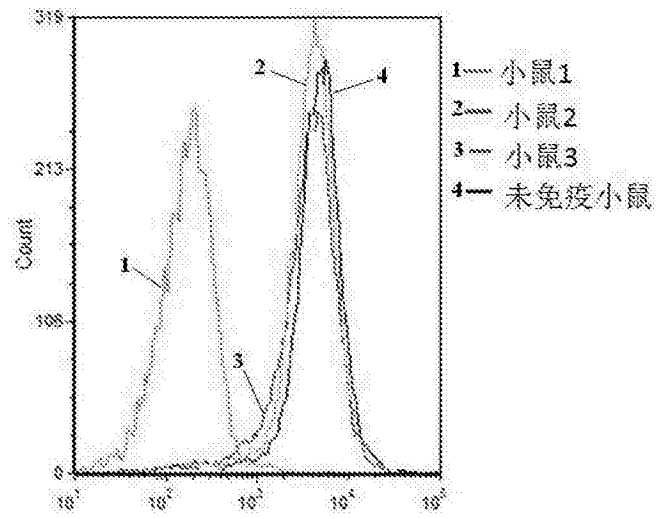


图3

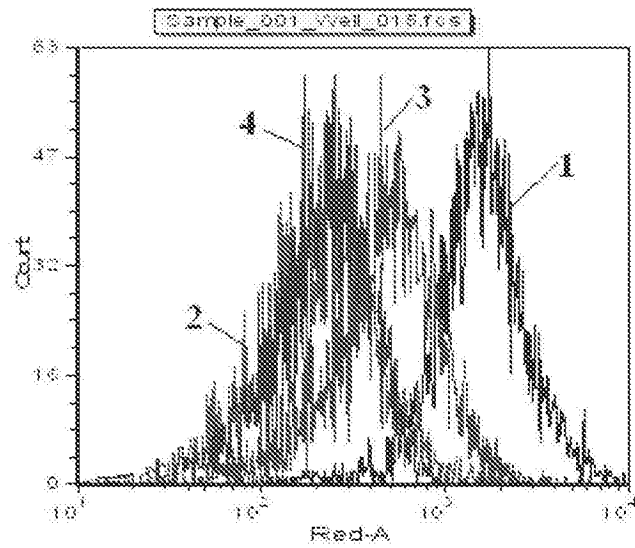


图4

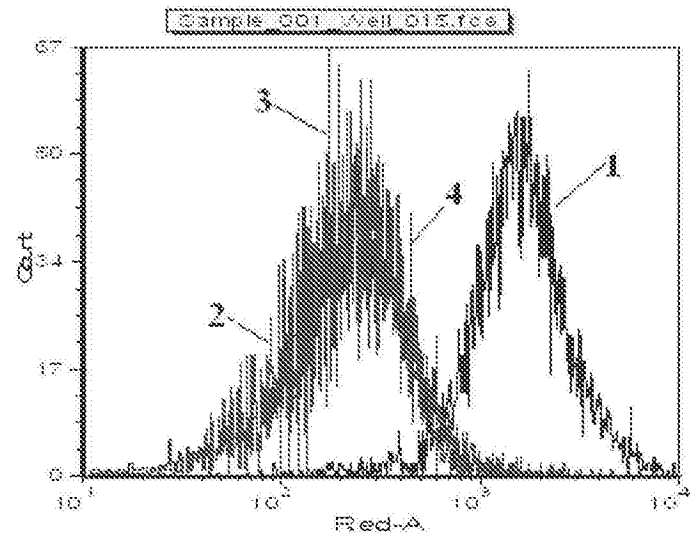


图5

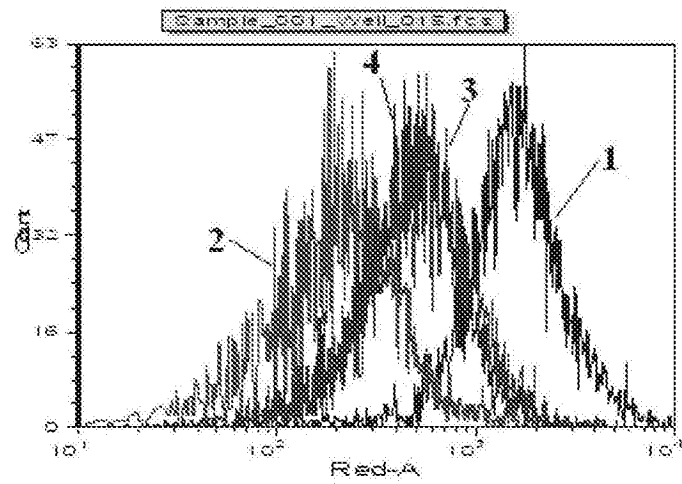


图6

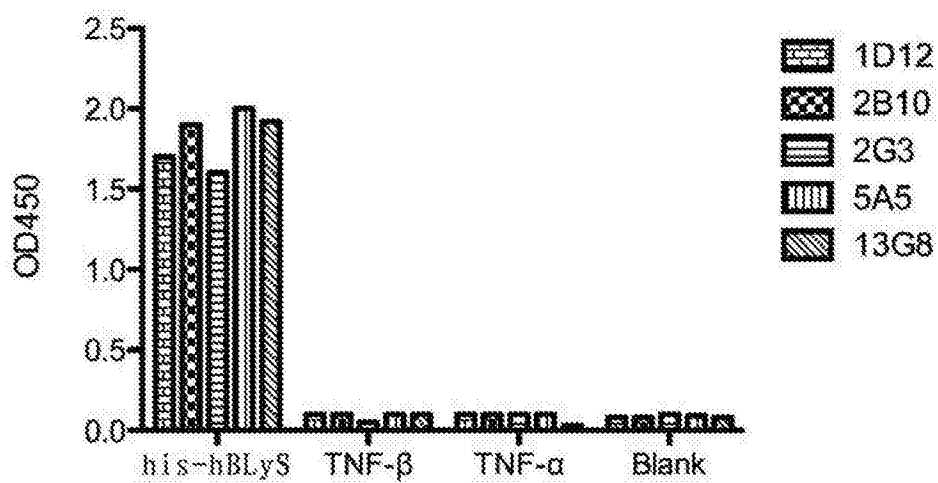


图7

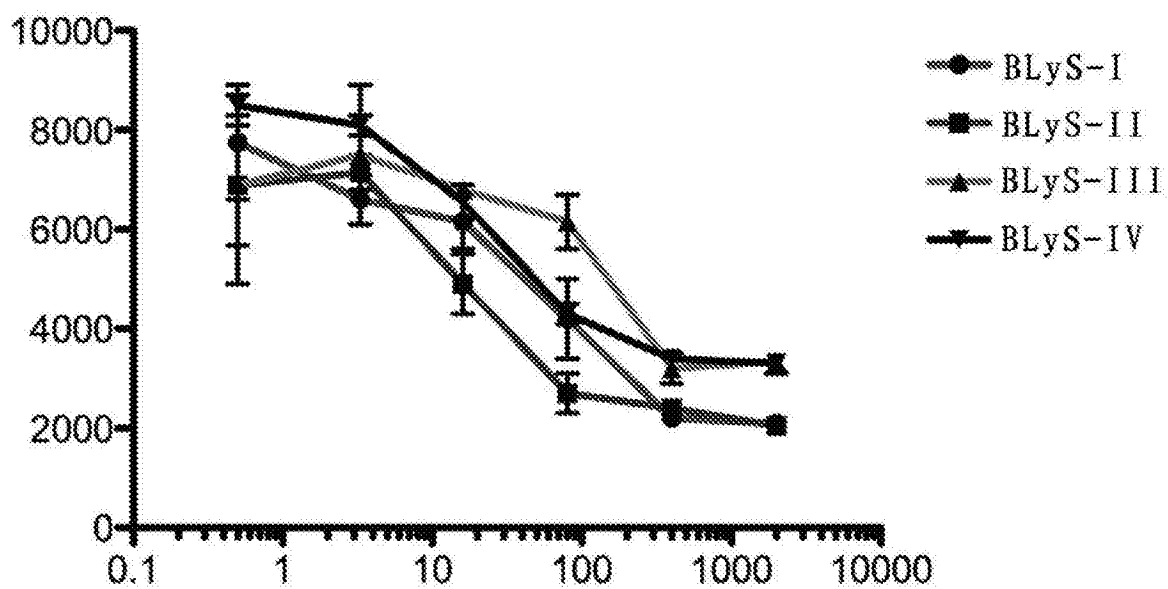


图8