



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106661117 B

(45) 授权公告日 2020.11.17

(21) 申请号 201580001260.3
 (22) 申请日 2015.12.30
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106661117 A
 (43) 申请公布日 2017.05.10
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.12.31
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2015/099847 2015.12.30
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02017/113181 ZH 2017.07.06
 (73) 专利权人 深圳先进技术研究院
 地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大
 学城学苑大道1068号
 (72) 发明人 赵琦 徐天殊
 (74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
 11430
 代理人 范盈

C12N 15/13 (2006.01)
 C12N 5/10 (2006.01)
 C12P 21/02 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01)
 A61P 19/02 (2006.01)
 A61P 29/00 (2006.01)
 A61P 1/00 (2006.01)
 A61P 17/06 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2014137961 A1, 2014.09.12
 CN 101198698 A, 2008.06.11
 CN 103889452 A, 2014.06.25
 CN 104428315 A, 2015.03.18
 CN 103889452 A, 2014.06.25
 US 2007041905 A1, 2007.02.22
 CN 101370525 A, 2009.02.18

审查员 刘俊

(51) Int. Cl.
 C07K 16/46 (2006.01)

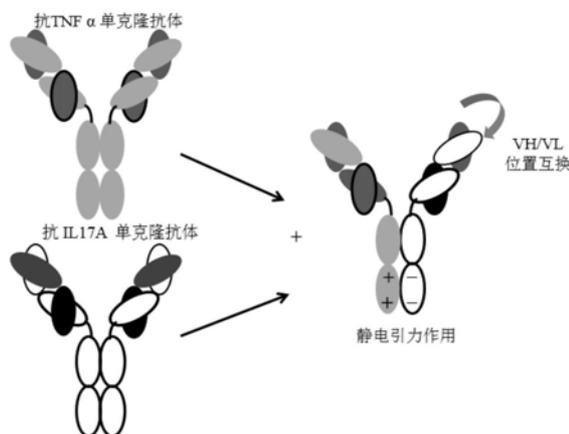
权利要求书1页 说明书15页
 序列表24页 附图7页

(54) 发明名称

IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体

(57) 摘要

本发明提供IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体,其具有人源IgG型特异性结合TNF α 的第一重链及第一轻链,及人源IgG型特异性结合IL-17A的第二重链及第二轻链。所述第二重链的可变区与第二轻链的可变区交换,和/或第一重链的可变区与第一轻链的可变区交换;第一重链与第二重链的恒定区依靠增强的静电作用或疏水作用相互结合。



1. 一种IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该双特异性抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段,所述双特异性抗体具有人源IgG型用于特异性结合TNF α 的第一重链及第一轻链,及人源IgG型用于特异性结合IL-17A的第二重链及第二轻链;

其中,所述第一重链中的可变区为人源IgG型TNF α 的抗体中的轻链的可变区;所述第一轻链中的可变区为该人源IgG型TNF α 的抗体的重链中的可变区;和

所述第二重链中的可变区为人源IgG型IL-17A抗体的轻链中的可变区;所述第二轻链中的可变区为该人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的可变区;

所述第一重链与第二重链中的恒定区依靠增强的静电作用和/或疏水作用相互结合,

所述第一重链为如SEQ ID NO:3的氨基酸序列,所述第一轻链为SEQ ID NO:4的氨基酸序列,所述第二重链为如SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述第二轻链为如SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

2. 一种编码权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的DNA分子,所述编码如SEQ ID NO:3的氨基酸的核苷酸序列为SEQ ID NO:7。

3. 一种编码权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的DNA分子,所述编码如SEQ ID NO:5的氨基酸的核苷酸序列为SEQ ID NO:9。

4. 一种编码权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的DNA分子,所述编码如SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列为SEQ ID NO:10。

5. 分泌权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的HEK293F人肾胚细胞,其包含权利要求2所述的DNA分子、权利要求3所述的DNA分子、权利要求4所述的DNA分子,以及编码如SEQ ID NO:4的氨基酸的核苷酸序列,该核苷酸序列为SEQ ID NO:8。

6. 根据权利要求5所述的HEK293F人肾胚细胞,其中,编码具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列被整合在质粒上;该质粒可通过化学转染方法转染到HEK293F细胞中进行表达。

7. 一种产生IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的方法,其包含在使得该双特异性抗体表达的条件下培养权利要求6所述的HEK293F人肾胚细胞,及回收所表达的双特异性抗体。

8. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段。

9. 权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段或权利要求8所述的药物组合物在制备用于治疗类风湿关节炎、克罗恩病、牛皮癣、银屑病或肿瘤的药物中的应用。

10. 一种检测TNF α 或IL-17A水平的试剂盒,其含有权利要求1所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒,所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物,以及缓冲液。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒,所述第二抗体为抗权利要求1所述双特异性抗体的抗抗体或抗TNF α 或IL-17A的多抗。

IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体地涉及能同时结合肿瘤坏死因子 α (TNF α) 及白细胞介素17A (IL-17A) 的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体。

背景技术

[0002] 目前采用基因工程技术生产的单克隆抗体在生物医学领域中发挥着重要的作用,但是由于许多重大疾病并不是由单一抗原引起的,例如肿瘤及自身免疫性疾病,往往是由多种细胞因子(包括肿瘤坏死因子 α (TNF α) 及白细胞介素17A (IL-17A) 等驱动的,单克隆抗体用于治疗这类疾病具有一定的局限性。因此,如能够生产可以结合两种或两种以上抗原的抗体,则可大大降低单克隆抗体治疗疾病的局限性,十分有利于肿瘤及自身免疫性疾病的治疗。

[0003] 双特异性抗体含有两种不同抗原结合位点,是可以结合两种不同的抗原分子的抗体,双特异性抗体在生物医学领域发展迅速,并且在生物医学领域也取得了较大的成就,如肿瘤与自身免疫性疾病的治疗。在双特异性抗体临床应用中,许多需要完整的IgG结构,所以双特异性抗体载体的构建与宿主细胞的表达对于其疗效以及临床应用起到了决定性的作用。

[0004] 目前,广泛用于研究抗体表达的宿主系统是大肠杆菌和哺乳动物细胞。然而,诸多的已经报道的抗体表达系统如大肠杆菌、酵母以及昆虫细胞均存在蛋白活性低、系统无法进行连续性表达、对纯化工艺要求严格等缺点。哺乳动物细胞具有高效表达内源性重、轻链基因,将抗体糖基化、正确折叠和装配以及分泌活性抗体的能力,便于对抗体亲和力、特异性等的鉴定。其中HEK293F表达系统具有准确的转录后修饰功能,表达的蛋白接近于天然蛋白分子;具有产物胞外分泌功能,并且很少分泌自身的内源蛋白,便于下游产物分离纯化;能以悬浮培养方式或在无血清培养基中达到高密度培养,产量较高。

[0005] 虽然双特性抗体的构型与种类越来越多,但是现有双特异性抗体也存在许多相应的问题。首先构型方面,现有的双特异性抗体许多构型与天然存在的抗体构型差别较大,使得抗体的稳定性差,特异性差,容易产生同源二聚体,没有良好的药代动力学特征,甚至产生免疫原性。因此,提供一种与人的IgG的分子量、构型接近的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体是本领域亟待解决的技术问题之一。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于提供一种IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段。

[0007] 本发明的另一目的在于提供编码所述IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的核苷酸序列。

[0008] 本发明的另一目的在于提供分泌本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的哺乳动物细胞系。

[0009] 本发明的另一目的在于提供一种产生本发明所述IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的方法。

[0010] 本发明的另一目的在于提供包含本发明所述IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性或其生物活性片段的药物组合物。

[0011] 本发明的另一目的在于提供本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段或所述的药物组合物的应用。

[0012] 本发明的另一目的在于提供一种检测TNF α 或IL-17A水平的试剂盒。

[0013] 为实现上述目的,一方面,本发明提供一种IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该双特异性抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段,所述双特异性抗体具有人源IgG型用于特异性结合TNF α 的第一重链及第一轻链,及人源IgG型用于特异性结合IL-17A的第二重链及第二轻链;

[0014] 其中,所述第一重链中的可变区为人源IgG型TNF α 的抗体中的轻链的可变区;所述第一轻链中的可变区为该人源IgG型TNF α 的抗体的重链中的可变区;和/或

[0015] 所述第二重链中的可变区为人源IgG型IL-17A抗体的轻链中的可变区;所述第二轻链中的可变区为该人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的可变区;

[0016] 所述第一重链与第二重链中的恒定区依靠增强的静电作用和/或疏水作用相互结合。

[0017] 优选地,所述增强的静电作用是通过将所述人源IgG型TNF α 的抗体的重链中的恒定区进行D360K和/或D403K突变,将人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的恒定区进行K402D和/或K419D突变得以实现的。

[0018] 更优选地,所述人源IgG型TNF α 的抗体的重链为SEQ ID NO:1,在该人源IgG型TNF α 的抗体的重链中的第360、403位氨基酸均由Asp替换为Lys;所述人源IgG型IL-17A的抗体的重链为SEQ ID NO:2,所述人源IgG型IL-17A的抗体的重链中的第402、419位由Lys替换为Asp。

[0019] 由于天然的抗体是同源二聚体,为了产生异源二聚体并使异源二聚体的表达量远远大于同源二聚体的表达量,本发明解决了重链的异源二聚体的结合以及轻链异源二聚体的结合的技术问题,具体而言,本发明通过增强的静电作用或疏水作用使得异源的所述第一重链与第二重链的结合大于同源重链之间的结合,例如将抗体的Fc段用定点突变的方法,改变抗体Fc段的作用力,使得同源二聚体相互排斥,而异源二聚体相互作用力增强;更具体地,例如将人源IgG型TNF α 的抗体的重链的Fc段进行D360K/D403K的突变,将人源IgG型IL-17A的抗体的重链的Fc段进行K402D/K419D的突变,从而使得第一重链与第二重链通过静电作用结合形成异源二聚体。为了防止轻链与重链之间的错配,本发明将重链可变区与该重链对应的轻链的可变区互换,例如将IL-17A抗体的轻链可变区V_L与该IL-17A抗体的重链可变区V_H位置互换,又由于抗体分子轻链只与重链作用,从而防止了轻链之间的错配。与现有双特异性抗体相比,本发明所述双特异性抗体在构型方面,尤其是Fc段的构型设计上,其稳定性及异源二聚体结合的特异性方面优于现有技术。

[0020] 本发明采用ELISA检测双特异性抗体对IL-17A与TNF α 的亲合力,相较于抗TNF α 、抗IL-17A的单克隆抗体,本发明所述双特异性抗体与抗原亲和力与单克隆抗体相比没有显著的差异;采用圆二色谱CD检测双特异性抗体的热稳定性,发现其热稳定性与天然的单克

隆抗体几乎没有差别。

[0021] 根据本发明的具体实施方案,在本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或来源于该抗体的能够特异性结合TNF α 和IL-17A的生物活性片段中,其中,所述第一重链具有如SEQ ID NO:3的氨基酸序列,所述第一轻链具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列,所述第二重链具有如SEQ ID NO:5的氨基酸序列,所述第二轻链具有如SEQ ID NO:6的氨基酸序列;

[0022] 本发明提供的具有SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:6的双特异性抗体具有较小的分子量(150kDa),相较于现有技术提供的大于200kDa的双特异性抗体,本发明提供双特异性抗体更接近天然的人源IgG抗体分子,使其有更好的生物相容性。

[0023] 另一方面,本发明提供一种编码本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段的DNA分子,其包含编码具有SEQ ID NO:3的氨基酸的核苷酸序列,优选地,该核苷酸序列为SEQ ID NO:7。

[0024] 本发明提供一种编码本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段的DNA分子,其包含编码具有SEQ ID NO:5的氨基酸的核苷酸序列,优选地,该核苷酸序列为SEQ ID NO:9。

[0025] 本发明提供一种编码本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段的DNA分子,其包含编码具有SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列,优选地,该核苷酸序列为SEQ ID NO:10。

[0026] 另一方面,本发明提供分泌本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的HEK293F人肾胚细胞,其包含编码具有SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列,以及编码具有SEQ ID NO:4的氨基酸的核苷酸序列,优选地,该核苷酸序列为SEQ ID NO:8;

[0027] 优选地,编码具有所述SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5及SEQ ID NO:6的氨基酸的核苷酸序列被整合在质粒上;该质粒可通过电转化方法或化学转染方法转染到293F细胞株中进行表达。本发明通过SDS-PAGE及western blot检测表明抗体表达的结构功能正确。

[0028] 另一方面,本发明提供一种产生IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体的方法,其包含在使得该双特异性抗体表达的条件下培养本发明所述的HEK293F人肾胚细胞,及回收所表达的双特异性抗体。

[0029] 另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包含本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段。

[0030] 另一方面,本发明提供本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段或所述的药物组合物在制备用于治疗类风湿关节炎、克罗恩病、牛皮癣、银屑病或肿瘤的药物中的应用。

[0031] 另一方面,本发明提供一种检测TNF α 或IL-17A水平的试剂盒,其含有本发明所述的IgG杂合型抗TNF α 和IL-17A双特异性抗体或其生物活性片段;优选所述的试剂盒还含有第二抗体和用于检测的酶或荧光或放射标记物,以及缓冲液;优选所述第二抗体为抗本发明所述双特异性抗体的抗抗体或抗TNF α 或IL-17A的多抗。

[0032] 本发明开发的新型稳定人源IgG型双特异性抗体(BiAbs),是针对TNF α 和IL-17A这

两种抗原的分子,既保留了抗TNF α 的抗体结合的功能特性,又具有和T细胞的细胞因子IL-17A结合的附加活性,因此这种分子相较于单纯针对其中一个分子的单克隆抗体对于炎症性疾病以及自身免疫性疾病都有更好的治疗效果,本发明通过体外实验证明可以阻断炎症因子对细胞的损伤,与单克隆抗体相比,有明显的优势,具有广阔的应用前景。更为重要的是,本发明所述的双特异性抗体具有较小的分子量(150kDa),相较于现有技术提供的大于200kDa的双特异性抗体,更接近天然的人源IgG抗体分子,使其有更好的生物相容性。

[0033] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0034] (1) 本发明所述双特异性抗体在构型方面,尤其是Fc段的构型设计上,其稳定性,及异源二聚体结合的特异性方面优于现有技术;

[0035] (2) 与抗TNF α 或抗IL-17A单克隆抗体相比,本发明所述双特异性抗体在亲和力、稳定性、纯度方法无差异;

[0036] (3) 与现有技术提供的双特异性抗体比较,具有SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:6的的双特异性具有较小的分子量(150kDa),更接近天然的人源IgG抗体分子,使其有更好的生物相容性;

[0037] (4) 与现有的原核表达载体比较,本发明的载体为真核表达系统,符合国家FDA临床审批药物的标准。

附图说明

[0038] 图1为构建本发明双特异抗体的示意图;

[0039] 图2为实施例1中所使用的pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒的结构图;

[0040] 图3A~图3D为实施例1ELISA实验结果图;

[0041] 图4为实施例1SDS-PAGE实验结果图;

[0042] 图5为实施例1用L929细胞检测双特异性抗体对TNF- α 的拮抗作用的实验结果图;

[0043] 图6A~6E为实施例1实时PCR实验结果图;

[0044] 图7为实施例1圆二色谱CD测量抗体的T_m值的实验结果图。

具体实施方式

[0045] 为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解,现结合具体实施例及附图对本发明的技术方案进行以下详细说明,应理解这些实例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。实施例中,各原始试剂材料均可商购获得,未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件,或按照仪器制造商所建议的条件。

[0046] 实施例1

[0047] (1) 质粒的构建

[0048] (1.1) 抗TNF α 抗体基因的重组载体构建

[0049] (1.1.1) 含抗TNF α V_H基因(SEQ ID NO:11)的重组载体pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-C_H的构建

[0050] (1.1.1.1) 全基因合成抗TNF α 的V_H(SEQ ID NO:11)核苷酸序列DNA分子,提取其质粒分别采用BamHI以及NheI限制性内切酶进行酶切,分别于37℃酶切过夜,酶切后胶回收450bp酶切片段;

[0051] (1.1.1.2) 提取pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒(该质粒的结构如图2所示,该质粒中CH即为TNF α 的C_H基因),将步骤(1.1.1.1)回收的V_H基因及所述pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒分别采用BamHI以及NheI内切酶进行酶切,分别于37°C酶切过夜酶切后胶回收酶切片段,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0052] (1.1.1.3) 抗TNF α V_H基因和pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒的连接;

[0053] 取酶切后回收的pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒,与胶回收的V_H基因采用Thermo货号为EL0011的T4连接酶进行连接;

[0054] 22°C恒温金属浴上连接1h后转化DH5 α ,涂布Amp⁺LB平板,37°C恒温培养箱中倒置过夜培养;

[0055] (1.1.1.4) 菌液PCR鉴定

[0056] 涂布于含Amp的LB固体平板培养基,挑取6个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中,37°C 200rpm培养4h后进行菌落PCR鉴定是否含有阳性克隆,阳性克隆即表示抗TNF α V_H基因与pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒成功连接。

[0057] (1.1.2) 含抗TNF α V_L-C_L基因的重组载体pcDNA3.1(+)-GS-intron-LC-IRES-V_H-CH的构建

[0058] (1.1.2.1) V_L基因(SEQ ID NO:12)的克隆

[0059] a) 提供上游引物和下游引物,其中,该上游引物的碱基序列tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG(SEQ ID NO:13),该下游引物的碱基序列gagggggcgccacggctcttgatttccaccttggt(SEQ ID NO:14);

[0060] b) 全基因合成核苷酸序列V_L(SEQ ID NO:12)为PCR模板,采用PCR扩增V_L基因;

[0061] PCR完成后,胶回收400bp附近的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0062] (1.1.2.2) C_L基因(SEQ ID NO:15)的克隆

[0063] a) 提供上游引物accaaggtggaaatcaagaccgtggccgccccctc(SEQ ID NO:16)和下游引物agaCTCGAGCTAGCACTCG(SEQ ID NO:17);

[0064] b) 全基因合成核苷酸序列C_L基因(SEQ ID NO:15)的DNA分子作为PCR模板,采用PCR扩增C_L基因;

[0065] PCR完成后,胶回收400bp附近的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书。

[0066] (1.1.2.3) 重叠PCR扩增V_L(SEQ ID NO:12)和C_L(SEQ ID NO:15)

[0067] 配置扩增体系如下:

	V _L (上述 V _L 溶液稀释 5 倍)	0.5 μ l
	C _L	0.5 μ l
	dNTP	4 μ l
[0068]	5 \times 引物 STAR 缓冲液	10 μ l
	引物 STAR	1 μ l
	ddH ₂ O	32 μ l

[0069] PCR扩增程序为:

	98°C	2min	
[0070]	98°C	15s	} 5 循环
	57°C	15s	
	72°C	45s	
	72°C	5min	
	10°C	∞	

[0071] 循环结束后加入如下引物V_L-F及引物C_L-R,继续扩增;

[0072] 引物V_L-F:tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG (SEQ ID NO:18);

[0073] 引物C_L-R:agaCTCGAGCTAGCACTCG (SEQ IN NO:19);

[0074] 上述引物V_L-F (20mM) 0.5μl

[0075] 上述引物C_L-R (20mM) 0.5μl

[0076] PCR扩增程序如下:

	98°C	2min	
[0077]	98°C	20s	} 30 循环
	57°C	20s	
	72°C	45s	
	72°C	5min	
	10°C	∞	

[0078] PCR完成后,胶回收700bp附件的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0079] (1.1.2.4) pcDNA3.1 (+) -GS-intron-IRES-V_H-CH质粒的酶切;

[0080] 提取由步骤(1.1.1)获得的含抗TNF α V_H基因 (SEQ ID NO:11) 的重组载体pcDNA3.1 (+) -GS-intron-IRES-V_H-CH质粒,将步骤(1.1.2.3)回收的V_L-C_L基因及所述pcDNA3.1 (+) -GS-intron-IRES-V_H-CH质粒分别采用NotI以及XhoI内切酶进行酶切;

[0081] 37°C过夜酶切约6h后胶回收酶切片段;

[0082] (1.1.2.5) V_L-C_L基因和pcDNA3.1 (+) -GS-intron-IRES-V_H-CH质粒的连接;

[0083] 取酶切后回收的pcDNA3.1 (+) -GS-intron-IRES-V_H-CH质粒,与胶回收的V_L-C_L基因采用Thermo货号为EL0011的T4连接酶进行连接;

[0084] 22°C恒温金属浴上连接1h后转化DH5 α ,涂布Amp⁺LB平板,37°C恒温培养箱中倒置过夜培养;

[0085] (1.1.2.6) 菌液PCR鉴定

[0086] 涂布于含Amp的LB固体平板培养基,挑取4个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中,37°C 200rpm培养4h后进行菌落PCR鉴定是否含有阳性克隆,阳性克隆即表示抗TNF α V_L-C_L基因与pcDNA3.1 (+) -GS-intron-IRES-V_H-C_H质粒成功连接,即构建好抗TNF α 单克隆抗体质粒。

[0087] (1.2) 抗IL-17A抗体基因的重组载体的构建

[0088] (1.2.1) 含抗IL-17A V_H基因 (SEQ ID NO:20) 的重组载体pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH的构建

[0089] (1.2.1.1) 全基因合成抗IL-17A的V_H核苷酸序列 (SEQ ID NO:20) DNA分子, 提取其质粒分别采用BamHI以及NheI限制性内切酶进行酶切, 分别于37°C酶切过夜酶切后胶回收450bp酶切片段;

[0090] (1.2.1.2) 提取pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒 (该质粒的结构如图2所示, 该质粒中CH即为IL-17A的C_H基因), 将步骤(1.2.1.1)回收的V_H基因及所述pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒分别采用BamHI以及NheI内切酶进行酶切; 分别于37°C酶切过夜酶切后胶回收酶切片段; 胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0091] (1.2.1.3) 抗IL-17A V_H基因和pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒的连接;

[0092] 取酶切后回收的pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒, 与胶回收的V_H基因采用Thermo货号为EL0011的T4连接酶进行连接;

[0093] 22°C恒温金属浴上连接1h后转化DH5 α , 涂布Amp⁺LB平板, 37°C恒温培养箱中倒置过夜培养;

[0094] (1.2.1.4) 菌液PCR鉴定

[0095] 涂布于含Amp的LB固体平板培养基, 挑取6个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中, 37°C 200rpm培养4h后进行菌落PCR鉴定是否含有阳性克隆, 阳性克隆即表示抗IL-17A V_H基因与pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-CH质粒成功连接。

[0096] (1.2.2) 含抗IL-17A V_L-C_L基因的重组载体pcDNA3.1(+)-GS-intron-LC-IRES-V_H-C_H的构建

[0097] (1.2.2.1) V_L基因 (SEQ ID NO:21) 的克隆

[0098] a) 提供上游引物和下游引物, 其中, 该上游引物的碱基序列tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG (SEQ ID NO:22), 该下游引物的碱基序列gagggggcgccacggtcgcgttgatttccagtcT (SEQ ID NO:23);

[0099] b) 全基因合成V_L核苷酸序列 (SEQ ID NO:21) 为PCR模板, 采用PCR扩增V_L基因;

[0100] PCR完成后, 胶回收400bp附近的条带, 胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0101] (1.2.2.2) C_L基因 (SEQ ID NO:15) 的克隆

[0102] a) 提供上游引物Agactggaaatcaagcggaccgtggccgcccctc (SEQ ID NO:24) 和下游引物agaCTCGAGCTAGCACTCG (SEQ ID NO:25);

[0103] b) 全基因合成C_L核苷酸序列 (SEQ ID NO:15) 的DNA分子作为PCR模板, 采用PCR扩增C_L基因。

[0104] PCR完成后, 胶回收400bp附近的条带, 胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书。

[0105] (1.2.2.3) 重叠PCR扩增V_L (SEQ ID NO:21) 和C_L (SEQ ID NO:15)

[0106] 配置扩增体系如下:

	V _L (上述 V _L 溶液稀释 5 倍)	0.5 μl
	C _L	0.5 μl
[0107]	dNTP	4 μl
	5×引物 STAR 缓冲液	10μl
	引物 STAR	1μl

[0108] ddH₂O 32μl

[0109] PCR扩增程序为:

	98°C	2min	
[0110]	98°C	15s	} 5 循环
	57°C	15s	
	72°C	45s	
	72°C	5min	
	10°C	∞	

[0111] 循环结束后加入如下引物V_L-F及引物C_L-R,继续扩增;

[0112] 该引物V_L-F具有序列:tctGCGGCCGCGCCGCCACCATG (SEQ ID NO:26);

[0113] 该引物C_L-R具有序列:agaCTCGAGCTAGCACTCG (SEQ ID NO:27);

[0114] 上述引物V_L-F (20mM) 0.5μl

[0115] 上述引物C_L-R (20mM) 0.5μl

[0116] PCR扩增程序如下:

	98°C	2min	
[0117]	98°C	20s	} 30 循环
	57°C	20s	
	72°C	45s	
	72°C	5min	
	10°C	∞	

[0118] PCR完成后,胶回收700bp附件的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书。

[0119] (1.2.2.4) pcDNA3.1 (+)-GS-intron-IRES-V_H-CH质粒的酶切;

[0120] 提取步骤(1.2.1)制得的含抗IL-17A V_H基因 (SEQ ID NO:20) 的重组载体 pcDNA3.1 (+)-GS-intron-IRES-V_H-CH质粒,将步骤(1.2.2.3)回收的V_L-C_L基因及所述 pcDNA3.1 (+)-GS-intron-IRES-V_H-CH质粒分别采用NotI以及XhoI内切酶进行酶切。

[0121] 37°C过夜酶切约6h,后胶回收酶切片段。

[0122] (1.2.2.5) V_L-C_L和pcDNA3.1 (+)-GS-intron-IRES-V_H-CH质粒的连接;

[0123] 取酶切后回收的pcDNA3.1 (+)-GS-intron-IRES-V_H-CH质粒,与胶回收的V_L-C_L因采用Thermo货号为EL0011的T4连接酶进行连接;

[0124] 22℃恒温金属浴上连接1h后转化DH5 α ,涂布Amp⁺LB平板,37℃恒温培养箱中倒置过夜培养。

[0125] (1.2.2.6) 菌液PCR鉴定

[0126] 涂布于含Amp的LB固体平板培养基,挑取4个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中,37℃200rpm培养4h后进行菌落PCR鉴定是否含有阳性克隆,阳性克隆即表示抗IL-17A V_L-C_L基因与pcDNA3.1(+)-GS-intron-IRES-V_H-CH质粒成功连接,即构建好抗IL-17A单克隆抗体质粒。

[0127] 以上构建了抗TNF α 单克隆抗体质粒及抗IL-17A的单克隆抗体的质粒。

[0128] (1.3) 双特异性抗体质粒的构建(构建过程如图1所示):

[0129] (1.3.1) CH基因片段定点突变

[0130] (1.3.1.1) 将构建完成的如上的抗TNF α 单克隆抗体的质粒的CH片段处DNA序列进行定点突变,第一个突变点为:

[0131] D360K

[0132] 引物对1

[0133] 上游引物:5'CTGCCCCATCCCGGAAGGAGCTGACCAAGAAC 3' (SEQ ID NO:28)

[0134] 下游引物:5'GTTCTTGGTCAGCTCCTTCCGGGATGGGGGCAG 3' (SEQ ID NO:29)

[0135] 配置扩增体系如下:

模板	1 μ l
dNTP	4 μ l
5 \times 引物 STAR 缓冲液	10 μ l
[0136] 引物 STAR	1 μ l
ddH ₂ O	32 μ l
引物对 1 中的上游引物	1 μ l
引物对 1 中的下游引物	1 μ l

[0137] PCR扩增程序如下:

98℃	2min	} 16 循环
98℃	20s	
[0138] 57℃	20s	
72℃	10min	
72℃	10min	
[0139] 10℃	∞	

[0140] 扩增16个循环以后将PCR产物用NEB的Dpn1酶进行切割,去除PCR模板37℃恒温金属浴上连接1h后转化DH5 α ;

[0141] 37℃过夜培养挑取4个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中,37℃200rpm培养4h送去测序公司进行测序。

[0142] (1.3.1.2) 测序正确后进行第二个定点突变D403K

- [0143] 引物序列如下：
- [0144] 引物对2
- [0145] 上游引物:5'GCCTCCCGTGCTGAAGTCCGACGGCTCC 3' (SEQ ID NO:30)；
- [0146] 下游引物:5'GGAGCCGTCGGACTTCAGCACGGGAGGC 3' (SEQ ID NO:31)；
- [0147] 突变过程同上步骤(1.3.1.1)；
- [0148] (1.3.1.3)将构建完成如上的抗IL-17A单克隆抗体的质粒的CH片段DNA序列进行定点突变
- [0149] 第一个突变点为K402D
- [0150] 引物对3
- [0151] 上游引物:5'CCGAGAACAACACTACGACACCACGCCTCCCGTG 3' (SEQ ID NO:32)；
- [0152] 下游引物:5'CACGGGAGGCGTGTTGTCGTAGTTGTTCTCCGG 3' (SEQ ID NO:33)；
- [0153] (1.3.1.4)第二个突变点为K419D
- [0154] 引物对4
- [0155] 上游引物:5'CCTTCTTCTCTACAGCGACCTCACCGTGGACAAGAG 3' (SEQ ID NO:34)
- [0156] 下游引物:5'CTCTTGCCACGGTGAGGTGCGCTGTAGAGGAAGAAGG 3' (SEQ ID NO:35)
- [0157] 实验过程同上步骤(1.3.1.1)；
- [0158] (1.3.2)将CH基因序列含有抗IL-17A的区域突变的质粒的V_L(SEQ ID NO:21)区域交换到V_H(SEQ ID NO:20)区域
- [0159] (1.3.2.1)将V_L区域进行PCR
- [0160] a) 提供上游引物和下游引物，其中，该上游引物的碱基序列tctGGATCCCCGCCACCATGGGCTG(SEQ ID NO:36)，该下游引物的碱基序列TCTGCTAGCTTGGTGGAGGCccgcttgatttccagt(SEQ ID NO:37)；
- [0161] b) 全基因合成V_L核苷酸序列为PCR模板，采用PCR扩增V_L基因。
- [0162] PCR完成后，胶回收400bp附近的条带，胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书；
- [0163] (1.3.2.2)片段与质粒进行酶切
- [0164] a) 将PCR片段分别采用BamHI以及NheI限制性内切酶进行酶切，分别于37℃酶切过夜酶切后胶回收400bp酶切片段；
- [0165] b) 将构建好的CH基因序列突变的抗IL-17A的质粒分别采用BamHI以及NheI限制性内切酶进行酶切，分别于37℃酶切过夜酶切后胶回收酶切片段；
- [0166] (1.3.2.3)将酶切好的片段及质粒的连接，采用Thermo货号为EL0011的T4连接酶进行连接；
- [0167] 22℃恒温金属浴上连接1h后转化DH5α，涂布Amp⁺LB平板，37℃恒温培养箱中倒置过夜培养；
- [0168] (1.3.2.4)菌液PCR鉴定
- [0169] 涂布于含Amp的LB固体平板培养基，挑取6个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中，37℃200rpm培养4h后进行菌落PCR鉴定是否含有阳性克隆，阳性克隆表示已通过PCR将连接进去的片段PCR扩增出来。
- [0170] (1.3.3)将CH基因序列含有抗IL-17A的区域突变的质粒的V_H(SEQ ID NO:20)区域

交换到V_L (SEQ ID NO:21) 区域

[0171] (1.3.3.1) 全基因合成V_H核苷酸序列为PCR模板,采用PCR扩增V_H基因;提供上游引物和下游引物,其中,该上游引物的碱基序列tctGGATCCCCGCCACCATGGGCTG (SEQ ID NO:38),该下游引物的碱基序列CGGAGGGGGCGGCCACGGTAGATGACACGGTCACG (SEQ ID NO:39);PCR完成后,胶回收450bp附近的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0172] (1.3.3.2) C_L (SEQ ID NO:15) 基因的克隆

[0173] 本实施例所有的C_L基因均是相同的,抗体的轻链恒定区都是C_L,轻链恒定区在抗体里是恒定的,本实施例抗TNF α 的单克隆抗体的C_L与抗IL-17A的单克隆抗体的C_L以及后续双特异性抗体(BsAb)的C_L都是一个C_L序列,即SEQ ID NO:15;

[0174] a) 提供上游引物CGTGACCGTGTCTACCGTGGCCGCCCCCTCCG (SEQ ID NO:40) 和下游引物agaCTCGAGCTAGCACTCG (SEQ ID NO:41);

[0175] b) 全基因合成C_L核苷酸序列的DNA分子作为PCR模板,采用PCR扩增C_L基因;PCR完成后,胶回收400bp附近的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0176] (1.3.3.3) 然后用重叠PCR将V_H区域C_L连接在一起

[0177] 配置扩增体系如下:

	V _L (上述 V _L 溶液稀释 5 倍)	0.5 μ l
	C _L	0.5 μ l
	dNTP	4 μ l
[0178]	5 \times 引物 STAR 缓冲液	10 μ l
	引物 STAR	1 μ l
	ddH ₂ O	32 μ l

[0179] PCR扩增程序为:

	98 $^{\circ}$ C	2min	
	98 $^{\circ}$ C	15s	} 5 循环
[0180]	57 $^{\circ}$ C	15s	
	72 $^{\circ}$ C	45s	
	72 $^{\circ}$ C	5min	
	10 $^{\circ}$ C	∞	

[0181] 循环结束后加入上下游引物引物,继续扩增;

[0182] 引物序列:

[0183] TctGGATCCCCGCCACCATGGGCTG (SEQ ID NO:42)

[0184] AgaCTCGAGCTAGCACTCG (SEQ ID NO:43)

[0185] PCR扩增程序如下:

	98°C	2min	
	98°C	20s	} 30 循环
[0186]	57°C	20s	
	72°C	45s	
	72°C	5min	
	10°C	∞	

[0187] PCR完成后,胶回收800bp附件的条带,胶回收步骤参见Genstar货号为D205-04的说明书;

[0188] (1.3.3.4) 将重叠PCR产物与CH基因序列突变的抗IL-17A质粒进行双酶切

[0189] 分别采用NotI以及XhoI内切酶进行酶切;

[0190] 37°C过夜酶切约6h,后胶回收酶切片段;

[0191] (1.3.3.5) 取酶切后回收的重叠PCR产物与CH基因序列突变的抗IL-17A质粒用Thermo货号为EL0011的T4连接酶进行连接,22°C恒温金属浴上连接1h后转化DH5 α ,涂布Amp⁺LB平板,37°C恒温培养箱中倒置过夜培养;

[0192] (1.3.3.6) 菌液PCR鉴定以及酶切鉴定

[0193] 涂布于含Amp的LB固体平板培养基,挑取4个Amp⁺LB平板上的单菌落接种至4ml Amp⁺LB培养基中,37°C 200rpm培养4h后进行菌落PCR鉴定是否含有阳性克隆,阳性克隆表示已通过PCR将连接进去的片段PCR扩增出来。

[0194] (2) 将构建好的质粒转染到HEK293F细胞中进行表达

[0195] 本实施例采用瞬时转染的方法将步骤(1)中构建好的质粒分别转染至HEK293F细胞株内,其中,所述质粒分别为如上构建好的抗TNF α 单克隆抗体的质粒及抗IL-17A单克隆抗体的质粒,用于分别表达两个单克隆抗体,以及如上构建好的CH突变的抗TNF α 质粒与CH突变的且V_H与V_L互换的抗IL-17A的质粒,其中,CH突变的抗TNF α 质粒与CH突变的且V_H与V_L互换的抗IL17A的质粒质量比为1:1,即每种质粒25 μ g,总量50 μ g进行转染,用来表达双特异性抗体(BsAb);

[0196] 瞬时转染所用转染试剂为PEI25000,且质粒:PEI25000转染的质量比例为1:2,转染步骤包括:

[0197] (2.1) 转染前24h细胞稀释到5 \times 10⁵个/ml;

[0198] (2.2) 转染的时候,将PBS预热到25-37 \square ,解冻DNA和PEI25000;

[0199] (2.3) 用细胞计数器确认细胞的密度和活性,细胞密度应该在5 \times 10⁸个/ml到1.2 \times 10⁶个/ml之间,活性应该大于95%;

[0200] (2.4) 取45ml细胞放到一个新的摇瓶当中;

[0201] (2.5) 取5mlPBS放到15ml离心桶当中,分别取20 μ g取步骤(1)制备好的质粒加入到15ml离心桶当中混匀;

[0202] (2.6) 加入40 μ l浓度为1mg/ml的PEI25000溶液,放入离心桶当中,混匀,涡旋震荡3次,每次3秒钟;

[0203] (2.7) 将溶液放置室温15分钟;将细胞培养瓶取出,加入质粒/PEI25000混合溶液,边震荡边加入,将细胞放入培养箱中震荡培养,培养时间为4天;

- [0204] (2.8) 4天后,将细胞离心,收集细胞上清液。
- [0205] (3) ELISA检测
- [0206] (3.1) 细胞因子TNF α 与IL-17A用包被液稀释后,每孔加入50ng的细胞因子,4℃冰箱过夜包;
- [0207] (3.2) 用PBST洗涤5次;
- [0208] (3.3) 加10g/LBSA,于37℃封闭2h;
- [0209] (3.4) 用PBST洗涤5次;
- [0210] (3.5) 加入三种抗体上清液,每个浓度的抗体设两个复孔,抗-TNF α 、抗-IL-17A、双特异性抗体,三种抗体上清液3倍3倍用PBS进行稀释,最高浓度为上清原液;以未转入HEK293F细胞上清液为阴性对照,以BSA稀释液为空白对照;37℃1h。抗-TNF α 抗体只加入到细胞因子TNF α 包被的孔中,抗-IL 17A的抗体只加入到细胞因子IL17A包被的孔中,而BsAb则分别加入到这两种细胞因子包被的孔中;
- [0211] (3.6) 用PBST洗涤5次;
- [0212] (3.7) 加入HRP抗-人-IgG;
- [0213] (3.8) 用PBST洗涤5次;
- [0214] (3.9) 加入TMD底物显色;
- [0215] (3.10) 加入2mol/L硫酸终止反应;
- [0216] (3.11) 用酶联仪测OD450nm的吸光值;
- [0217] 阳性孔ELISA的实验结果如图3A~3D所示,从图3A~3D中可以看出所构建表达的抗TNF α 抗体与抗原TNF α 有很强的结合作用,所构建表达的抗IL17A抗体与抗原IL17A有很强的结合作用,所构建表达的双特异性抗体与两种抗原都有很强的结合作用,而且结合作用与单克隆抗体类似。
- [0218] (4) 抗体的纯化:将收集的上清液,准备纯化抗体蛋白。所有表达,纯化,都是三种抗体同时进行的,抗-TNF α ,抗-IL17A及双特异性抗体(BsAb);
- [0219] 用蛋白质A(Protein A)纯化IgG
- [0220] (4.1) 纯化前将细胞上清液用0.45 μ m的滤膜过滤一下;
- [0221] (4.2) 准备0.3ml蛋白质A放入浓缩色谱柱中(BIO-RAD poly-prep chromatography columns),用pH7.4的PBS洗涤柱子一次;
- [0222] (4.3) 用细胞上清液过柱子两次;
- [0223] (4.4) 2 \times 10mL PBS清洗;
- [0224] (4.5) 用1ml浓度为的醋酸钠(pH3)和0.25mL 1M Tris-HCl pH8.0进行中和。醋酸的浓度为50mM,氯化钠的浓度为0.15M;
- [0225] (4.6) 用10K的超滤管对浓缩后的抗体进一步进行超滤浓缩;
- [0226] (5) SDS-PAGE鉴定:其中分离胶的质量分数为12%
- [0227] 分别取适量样品加等量2 \times SDS上样缓冲液,用微量移液器加入加样槽,以8v/cm电压电泳,当溴酚蓝前沿进入分离胶后,以12v/cm电压电泳,溴酚蓝电泳至分离胶底部后,取出凝胶,考马斯亮蓝染色液染色,脱色液脱色至蛋白条带清晰,所得结果如图4所示,图4中左侧是变性蛋白,右侧是未变性蛋白,该未变性的蛋白是蛋白电泳中的上样缓冲液(loading Buffer)没有加巯基乙醇,蛋白电泳上样前,没有煮样,该变性蛋白是上样缓冲液

(loading buffer)里边加了巯基乙醇,上样之前在105℃下煮样10min,从图4可以看出抗体的总大小150KD左右,其与天然抗体的大小相似;

[0228] 本实施例所得抗TNF α 的单克隆抗体即为阿达木单抗(Adalimumab),参见US6090382;

[0229] 本实施例所得抗IL-17A的单克隆抗体即为secukinumab单抗,参见US20130202610;

[0230] 本实施例所得双特异性抗体(BsAb)具有SEQ ID NO:3~SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0231] (6)用L929细胞检测双特异性抗体对TNF- α 的拮抗作用

[0232] L929细胞对TNF- α 敏感,用人重组TNF- α 及放线菌素D对细胞进行联合诱导,细胞迅速死亡,加入抗体后,细胞存活率明显升高;细胞培养条件:RPMI1640+10%FBS,37℃培养,CO₂浓度为5%;当细胞处于对数生长期的时候将细胞用胰酶消化,用完全培养基将细胞的密度调整为 1×10^5 个/mL,将细胞均匀加入96孔板中,每孔100 μ l,过夜培养;将细胞分为空白组,双特异性抗体组(BsAb),TNF α 抗体组及IL-17A抗体组,这三种抗体均为本实施例所得;空白组用人重组TNF α 及放线菌素D进行联合诱导,其余四组先用人重组TNF α 及放线菌素D与抗体蛋白混合,其中,放线菌素D终浓度为4 μ g/mL,人重组TNF α 为25ng/mL,抗体蛋白浓度为50ng/mL;37℃放置1h后,加入L929细胞当中;24h后用MTT方法检测细胞的存活率,所得结果如图5所示,从图5中可以看出双特异性抗体与抗原TNF α 的结合能力与TNF α 抗体与抗原结合能力几乎一直,都能阻碍人重组蛋白TNF α 与L929细胞的结合。

[0233] (7)实时PCR实验

[0234] 该实验用于检测本实施例所得双特异性抗体(BsAb)、TNF α 抗体及IL-17A抗体对HT-29细胞分泌趋化因子的效果;

[0235] HT-29为人结肠癌细胞,同时具有IL17A及TNF α 蛋白的受体,当与这两种蛋白结合的时候,细胞当中趋化因子的含量会显著提高,为了检测本实施例所得双特异性抗体对这两种细胞因子的拮抗作用,设计了如下实验:

[0236] HT-29细胞培养条件:RPMI1640+10%FBS,37℃,5%CO₂;当细胞处于对数生长期时,用胰酶将细胞消化,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,将细胞放入6孔板当中,每孔加入2mL细胞,细胞培养24h后,将细胞培养基上清去掉,换成含0.5%血清的培养基,过夜培养后,将细胞分为五组,空白组,诱导组,TNF α 抗体组,IL-17A抗体组,双特异性抗体(BsAb)组,加药处理;空白组不加任何药品,诱导组加入重组人TNF α 及IL-17A细胞因子,TNF α 浓度为0.5ng/mL,IL-17A浓度为50ng/mL;其余几组除加入上述浓度的重组人细胞因子外,还需要加入相应抗体,抗体的浓度均为100ng/mL;加药处理12h后,提取细胞的总RNA,用实时PCR检测HT-29细胞趋化因子表达情况,所得结果如图6A~6E所示,其分别代表趋化因子CXCL1,CXCL2,CXCL6,IL8,CCL20的结果图,从图6A~6E中可以看出在重组人TNF α 及IL-17A细胞因子的诱导下,HT-29细胞趋化因子CXCL1,CXCL2,CXCL6,IL8,CCL20的表达量明显上调,在抗TNF α 抗体和抗IL17A抗体的以及双特异性抗体的作用下,这几种趋化因子的表达量都显著下调,而且还可以看出,双特异性抗体的作用要比单克隆抗体的效果更好。

[0237] (8)圆二色谱CD测量抗体的T_m值的实验

[0238] 采用圆二色谱CD测量本实施例所得抗体的T_m值,该实验采用的仪器型号为JASCO

J-815,其包括如下步骤:

[0239] (8.1) 样品浓度为0.5mg/ml,将200 μ l样品加入到样品杯当中,样品杯靠近左侧放置,用后面的卡槽卡紧;

[0240] (8.2) T_m 值的测定是在222nm波长下进行的;

[0241] (8.3) 在软件页面处选择温度/波长 (temperature/wave lengthe) 界面进入 T_m 值测定;

[0242] 选择手型工具进行参数设定

取样 (Sampling) 1.0

目标 (Target) 30 秒

[0243] 效率 10 摄氏度/分钟

等待 (Wait) 0 秒

[0244] 温度选择从0度到100度,开始执行即可;

[0245] 所测得的结果如图7所示,从图7中可以看出抗IL-17A抗体的 T_m 值在82 $^{\circ}$ C左右,双特异性抗体与抗TNF α 抗体的 T_m 值相近,大约在68 $^{\circ}$ C左右,发现其热稳定性与天然的单克隆抗体几乎没有差别。

序列表

<110> 深圳先进技术研究院

<120> IgG 杂合型抗 TNF α 和 IL-17A 双特异性抗体

<130> GAI15CN3262P-CN

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 451

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

[0001] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 2

<211> 457

<212> PRT

[0003]

<213> 智人

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320

[0005] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 3

<211> 451

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

[0006]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

[0007] Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

	85	90	95
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro		
	100	105	110
	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
	115	120	125
	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	130	135	140
	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
	145	150	155 160
	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170	175
	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180	185	190
[0009]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	195	200	205
	Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 5		
	<211> 439		
	<212> PRT		
	<213> 智人		
	<400> 5		
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
	20 25 30		
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
	35 40 45		
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		

	50		55		60														
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu			
	65				70					75					80				
	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro			
				85					90					95					
	Cys	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ser	Thr			
			100					105					110						
	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser			
			115				120						125						
	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu			
		130				135					140								
	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His			
	145				150						155					160			
	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser			
[0010]				165					170					175					
	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys			
			180						185					190					
	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu			
			195				200						205						
	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro			
		210				215						220							
	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys			
	225				230					235					240				
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
				245					250					255					
	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp			
			260					265						270					
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr			
		275				280							285						

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asp
 370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400

[0011]

Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp
 100 105 110

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

[0012]

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 7

<211> 1417

<212> DNA

	<213> 智人	
	<400> 7	
	ggateccgcc accatgggct ggtcctgcat catcctgttc ctggtggcca cggccaccgg	60
	cgaagtgcag ctggtggaat ctggcggcgg actggtgcag cctggcagat ccctgagact	120
	gtcttgtgcc gcctccggct tcacctega cgactacgct atgcaactggg tgcgacagge	180
	ccctggcaag ggactggaat ggggtgccc catcacctgg aactccggcc acatcgacta	240
	cgccgactct gtggaaggcc ggttcacat ctctcgggac aacgccaaga actccctgta	300
	cctgcagatg aacagcctgc gggccgagga caccgcccgtg tactactgtg ccaaggtgtc	360
	ctacctgtcc accgcctcct ccttgatta ttggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc	420
	ctctgcctcc accaagggcc catcggtctt ccccctggca cctcctcca agagcacctc	480
	tgggggcaca gggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt	540
[0013]	gtcgtggaac tcaggcggcc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggccg tctacagtc	600
	ctcaggactc tactcctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca	660
	gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagtgagaca agagagtga	720
	gccccaatct tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcactg aactcctggg	780
	gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac acctcatga tctcccggac	840
	ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa	900
	ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta	960
	caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg	1020
	caaggagtac aagtgaagg tctccaaca agccctccca gccccatcg agaaaacct	1080
	ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccggaa	1140
	ggagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaagcttct atcccagcga	1200

catgccegtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc	1260
cgtgctgaag tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag	1320
gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgeat gaggtctctgc acaaccacta	1380
cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga	1417
<210> 8	
<211> 707	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 8	
geggccgcgc egccaccatg ggctggctct gcatcatcct gttcctggtg gccaccgcca	60
ccggcgacat ccagatgacc cagtccccct ccagectgtc tgcctctgtg ggcgacagag	120
tgaccatcac ctgtcgggcc tcccagggca tcagaaacta cctggcctgg taccagcaga	180
agccccgcaa ggcccccaag ctgctgatct acgctgcctc cacactgcag tccggcgtgc	240
[0014] cctctagatt ctccggctct ggctctggca ccgactttac cctgaccatc agctccctgc	300
agccccgagga tgtggccacc tactactgcc agcgggtacaa cagagccccc tacaccttg	360
gccagggcac caaggtggaa atcaagaccg tggccgcccc ctccgtgttc atcttcccc	420
cctccgacga gcagctgaag tccggcaccg cctccgtggt gtgcctctgt aacaacttct	480
acccccggga ggccaagtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagtcc ggcaactccc	540
aggagtccgt gaccgagcag gactccaagg actccaccta ctccctgtcc tccaccctga	600
ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaggtg acccaccagg	660
gcctgtctct ccccgtgacc aagtcttca accggggcga gtgctag	707
<210> 9	
<211> 1385	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 9	

	gcggccgcgc cgccaccatg ggctggctct gcatcatcct gttcctggtg gccaccgcca	60
	ccggcgagat cgtgctgacc cagtctcttg gcacctgtc tetgagccct ggcgagagag	120
	ctacctgtc ctgcagagcc tcccagtcgg tgctctctc ttacctggcc tggatcagc	180
	agaagcccgg ccaggtccc cgctgctga tctatggcgc ctcttctaga gccaccggca	240
	tccccgacag attctccggc tetggctctg gcaccgactt cacctgacc atctccggc	300
	tggaaccgga ggacttcgcc gtgtactact gccagcagta cggtctctcc cctgcacct	360
	ttggccaggg caccagactg gaaatcaagc gggcctccac caagctagca tcggtcttc	420
	ccttggcacc ctctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgcttggtca	480
	aggactactt cccgaaccg gtgacggtgt cgtggaacte aggcgcctg accagcggcg	540
	tgcacacett cccggccgtc ctacagtctt caggacteta ctccctcagc agcgtggtga	600
	ccgtgccctc cagcagcttg ggcaccaga cctacatctg caactgaat cacaagccca	660
[0015]	gcaacaccaa ggtggacaag agagttgagc ccaatcttg tgacaaaact cacacatgcc	720
	caccgtgccc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctctc cccccaaac	780
	ccaaggacac cctcatgate tcccggacce ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga	840
	gccacgaaga ccctgaggtc aagtccaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg	900
	ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca	960
	ccgtctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggtc tccaacaaag	1020
	ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac	1080
	aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct	1140
	gccttggtcaa aggettctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc	1200
	eggagaacaa ctacgacacc acgcctcccg tgctggactc cgacggetcc ttctctctt	1260
	acagcgacct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgetccg	1320

	tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta	1380
	aatga	1385
	<210> 10	
	<211> 763	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 10	
	ggatcccgcc accatgggct ggtcctgcat catcctgttc ctggtggcca cggccaccgg	60
	cgaagtgcag ctggtggaat ctggcggcgg actggtgcag cctggcggat ctctgagact	120
	gtcttgtgcc gcctccggct tcaccttctc caactactgg atgaactggg tgcgacagge	180
	ccctggcaag ggcttggat gggtgccgc catcaaccag gacggetccg agaagtaeta	240
	cgtgggctct gtgaagggcc ggttcacat ctctcgggac aacgccaaga actccctgta	300
[0016]	cctgcagatg aacagcctgc gggtggaaga taccgccgtg tactactgcg tgcgggacta	360
	ctacgacatc ctgaccgact actacatcca ctactggtac ttcgacctgt ggggcagagg	420
	caccctcgtg accgtgtcat ctaccgtggc cgecccctcc gtgttcatct tccccctc	480
	cgacgagcag ctgaagtccg gcaccgctc cgtggtgtgc ctgctgaaca acttctacce	540
	ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg cagtcggca actcccagga	600
	gtccgtgacc gagcaggact ccaaggactc cacctactcc ctgtctcca ccctgacct	660
	gtccaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc gagtgacce accaggcct	720
	gtctctcccc gtgaccaagt ccttcaaccg gggcgagtgc tag	763
	<210> 11	
	<211> 442	
	<212> DNA	
	<213> 智人	

<400> 11	
ggatcccgcc accatgggct ggtcctgcat catcctgttc ctggtggcca cgcaccgg	60
cgaagtgcag ctggtggaat ctggcggcgg actggtgcag cctggcagat ccctgagact	120
gtcttgtgcc gcctccggct tcacctcga cgactacgt atgcaactgg tgcgacaggc	180
ccctggcaag ggactggaat ggggtgcegc catcacctgg aactccggcc acatcgacta	240
cgccgactct gtggaaggcc ggttcacat ctctcgggac aacgccaaga actccctgta	300
cctgcagatg aacagcctgc gggccgagga caccgccgtg tactactgtg ccaaggtgtc	360
ctacctgtcc accgcctcct ccctggatta ttggggccag ggcaccctcg tgaccgtgtc	420
ctctgectcc accaagggcc ca	442

<210> 12
 <211> 386
 <212> DNA
 <213> 智人

[0017]

<400> 12	
gcgccgcgc cgcaccatg ggctggtcct gcatcctct gttcctggtg gccaccgcca	60
cggcgacat ccagatgacc cagteccct ccagcctgtc tgctctgtg ggcgacagag	120
tgaccatcac ctgtcgggcc tcccagggca tcagaaacta cctggcctgg tatcagcaga	180
agccccgcaa ggcccccaag ctgctgatct acgctgctc cacactgcag tccggcgtgc	240
cctctagatt ctccggtct ggctctggca ccgacttac cctgaccatc agctccctgc	300
agccccgagga tgtggccacc tactactgcc agcggtaaa cagagcccc tacaccttg	360
gccagggcac caagtgga atcaag	386

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 13

	tctgcgccg cgccgccacc atg	23
	<210> 14	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 14	
	gagggggcgg ccacggtcct gatttcacc ttggt	35
	<210> 15	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 15	
	accgtggcgg ccccctcctg gtteatette ccccctcgg acgagcagct gaagtccggc	60
	accgcctcgg tgggtgcct gctgaacaac ttctacccc gggaggccaa ggtgcagtgg	120
	aaggtggaca acgcctgca gtccggcaac tcccaggagt ccgtgaccga gcaggactcc	180
[0018]	aaggactcca cctactcct gtctccacc ctgacctgt ccaaggccga ctacgagaag	240
	cacaagggtg acgcctgcga ggtgaccac caggcctgt cctcccctg gaccaagtcc	300
	ttcaaccggg gcgagtgcta g	321
	<210> 16	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 16	
	accaaggtgg aatcaagac cgtggccgcc ccctc	35
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 17	
	agactcgagc tagcactcg	19

<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	18	
	tctgcggccg cgccgccacc atg	23
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	19	
	agactcgagc tagcactcg	19
<210>	20	
<211>	460	
<212>	DNA	
<213>	智人	
[0019]	<400>	20
	ggatcccc accatgggct ggtcctgcat catcctgttc ctggtggcca cggccaccgg	60
	cgaagtgcag ctggtggaat ctggcgccgg actggtgcag cctggcggat ctctgagact	120
	gtcttgtgcc gcctccggt tcaccttctc caactactgg atgaactggg tgcgacaggc	180
	ccctggcaag ggctggaat gggtgccgc catcaaccag gacggctccg agaagtacta	240
	cgtgggctct gtgaagggcc ggttcacat ctctcgggac aacgccaaga actccctgta	300
	cctgcagatg aacagcctgc gggggaaga taccgccgtg tactactgcg tgcgggacta	360
	ctacgacatc ctgaccgact actacatcca ctactggtac ttcgacctgt ggggcagagg	420
	caccctcgtg accgtgtcat ctgcctccac caagctagca	460
<210>	21	
<211>	392	
<212>	DNA	
<213>	智人	

	<400> 21	
	gcggccgcgc cgccaccatg ggctggctct geatcactct gttcctgggtg gccaccgcca	60
	ccggcgagat cgtgctgacc cagtctcttg gcacctgtc tctgagccct ggcgagagag	120
	ctacctgtc ctgcagagcc tcccagtcg tgtcctctc ttacctggcc tggtatcage	180
	agaagcccgg ccaggctccc cggtgctga tctatggcgc ctcttctaga gccaccgcca	240
	tccccgacag attctccggc tctggctctg gcaccgactt cacctgacc atctcccggc	300
	tggaaccgga ggacttcgcc gtgtactact gccagcagta cggtctctcc cctgcacct	360
	ttggccaggg caccagactg gaaatcaagc gg	392
	<210> 22	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
[0020]	<400> 22	
	tctgcggcgc cgccgccacc atg	23
	<210> 23	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213>智人	
	<400> 23	
	gagggggcgc ccacggtcgc cttgatttcc agtct	35
	<210> 24	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 24	
	agactggaat tcaagcggac cgtggccgcc ccctc	35
	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> DNA	

	<213> 智人	
	<400> 25	
	agactcgagc tagcactcg	19
	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 26	
	tctgcggccg cgccgccacc atg	23
	<210> 27	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 27	
	agactcgagc tagcactcg	19
[0021]	<210> 28	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 28	
	ctgccccat cccggaagga gctgaccaag aac	33
	<210> 29	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 29	
	gttcttggtc agctccttcc gggatggggg cag	33
	<210> 30	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 30	

	gcctcccgctg ctgaagtccg acggctcc	28
	<210> 31	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 31	
	ggagccgctcg gacttcagca cgggagge	28
	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 32	
	ccggagaaca actacgacac cacgcctccc gtg	33
	<210> 33	
	<211> 33	
	<212> DNA	
[0022]	<213> 智人	
	<400> 33	
	cacgggagge gtggtgctgt agttgtctc cgg	33
	<210> 34	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 34	
	cctttctct ctacagcgac ctcaccgtgg acaagag	37
	<210> 35	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 35	
	ctcttgcca cggtaggtc gctgtagagg aagaagg	37
	<210> 36	

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 36	
	tctggatccc cgccaccatg ggctg	25
	<210> 37	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 37	
	tctgctagct tggaggagc ccgcttgatt tccagt	36
	<210> 38	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
[0023]	<400> 38	
	tctggatccc gccaccatgg gctg	24
	<210> 39	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 39	
	eggagggggc ggccacggta gatgacacgg tcacg	35
	<210> 40	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 40	
	cgtgaccgtg tcattaccg tggccgcccc ctccg	35
	<210> 41	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人	

	<400> 41	
	agactcgagc tagcactcg	19
	<210> 42	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
[0024]	<400> 42	
	tctggatecc cgccacccatg ggctg	25
	<210> 43	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 43	
	agactcgagc tagcactcg	19

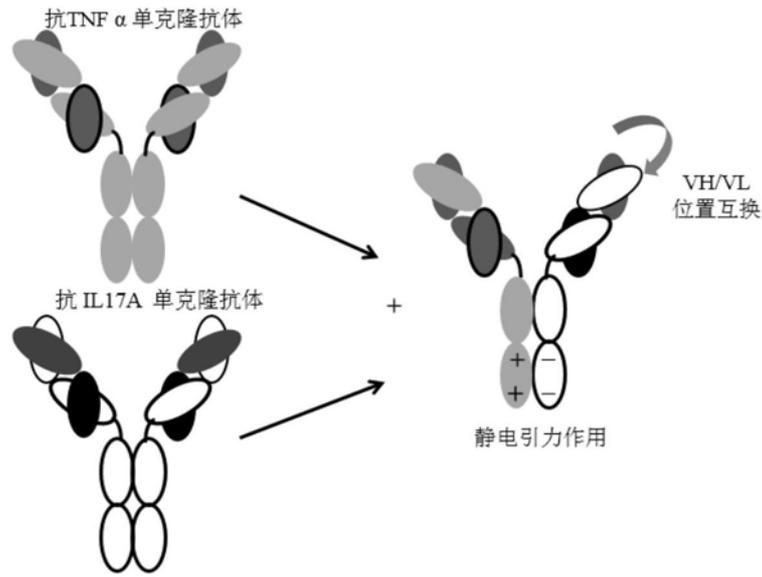


图1

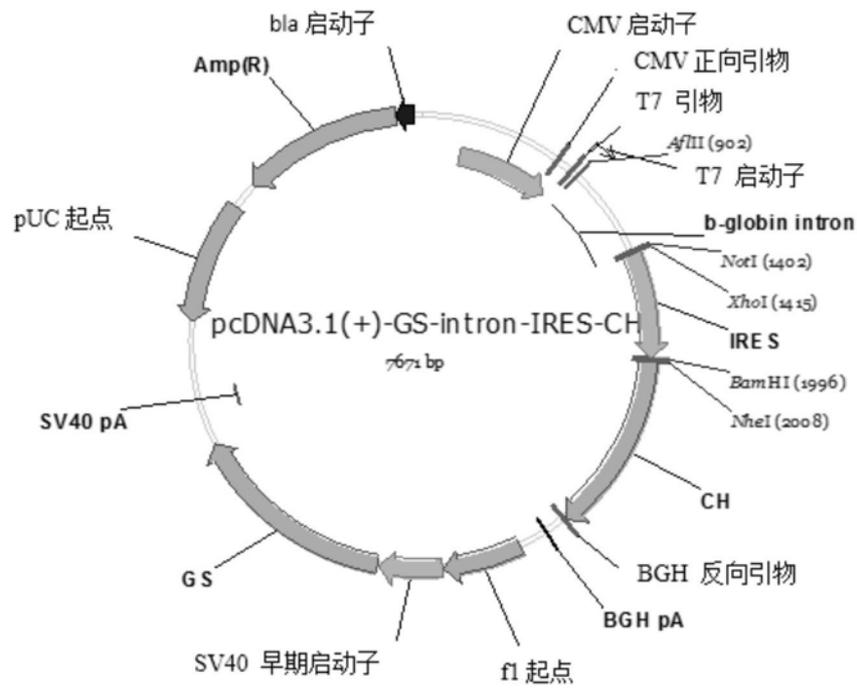


图2

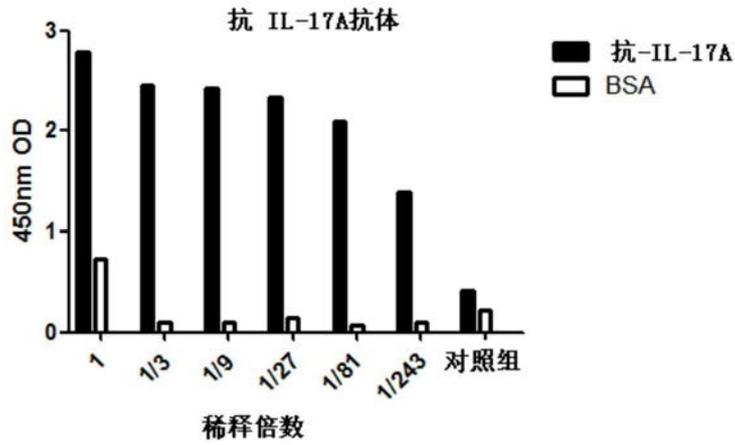


图3A

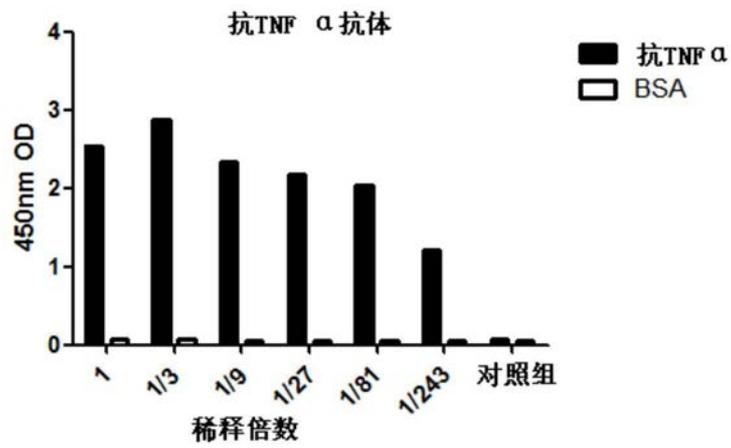


图3B

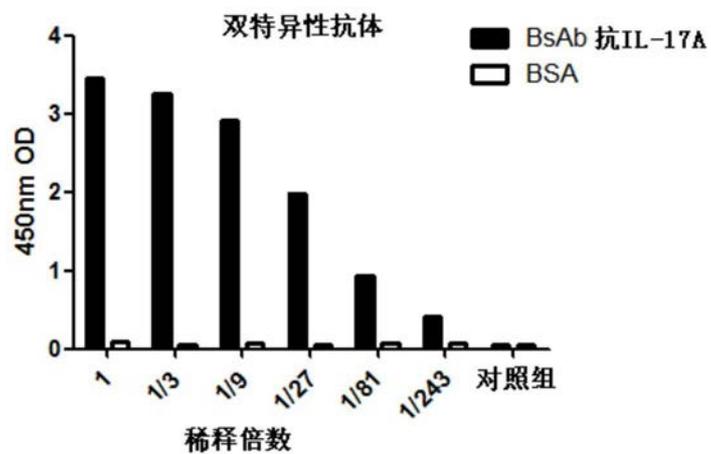


图3C

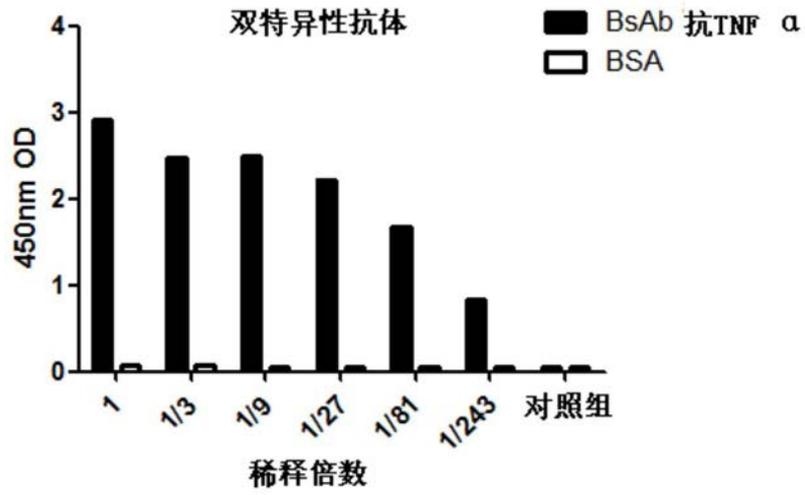


图3D

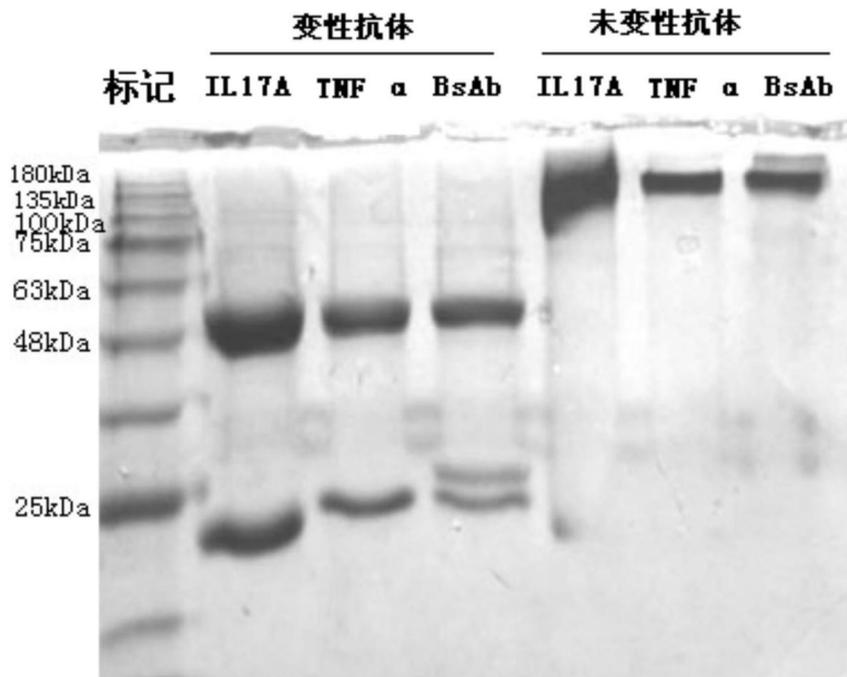


图4

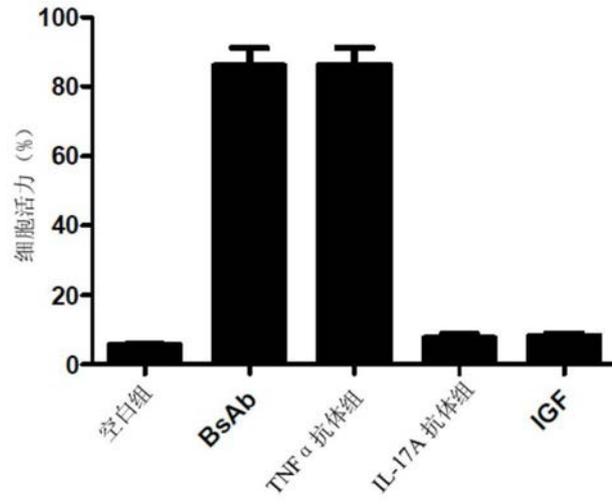


图5

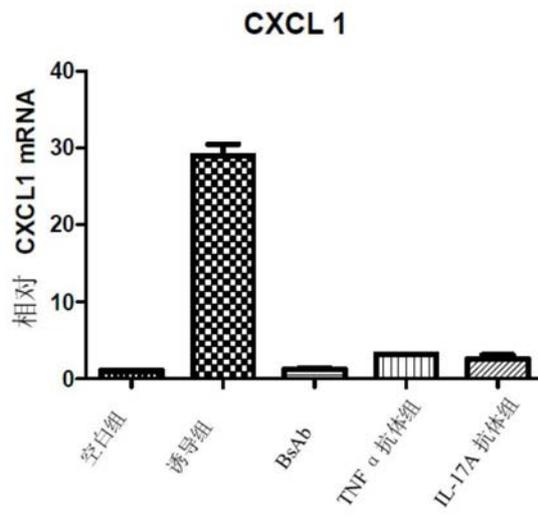


图6A

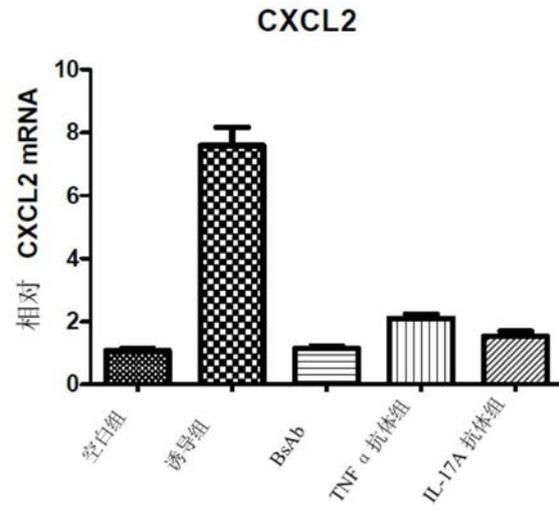


图6B

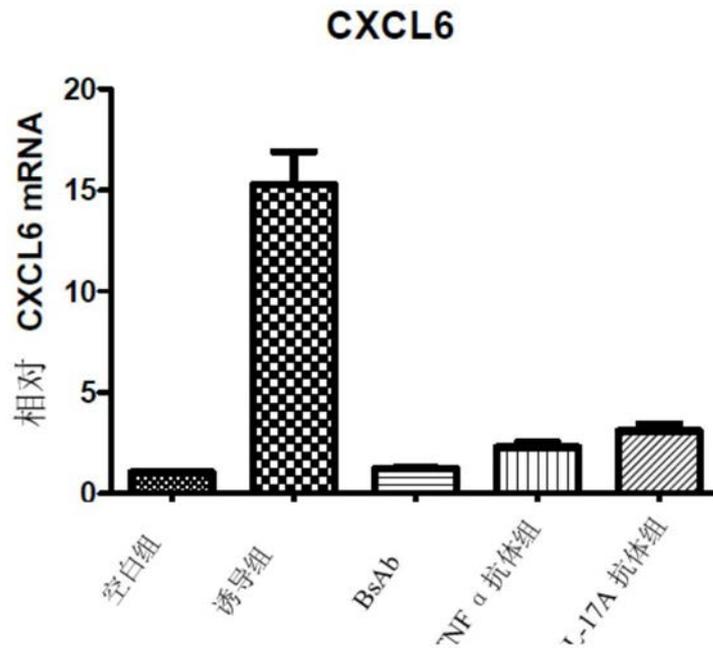


图6C

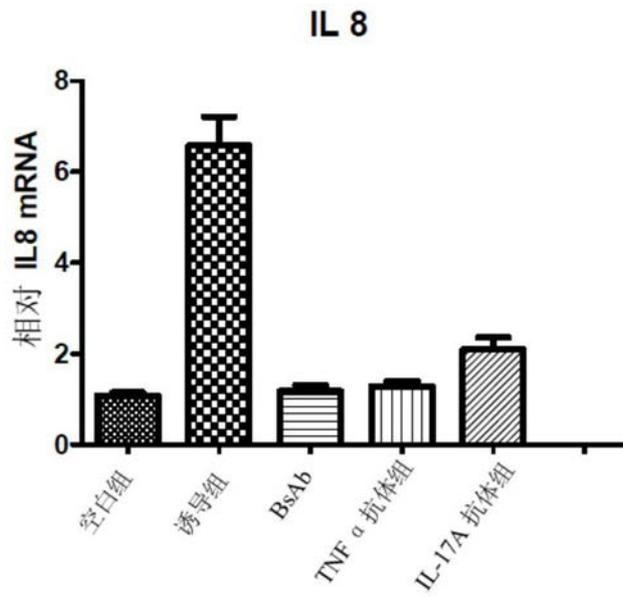


图6D

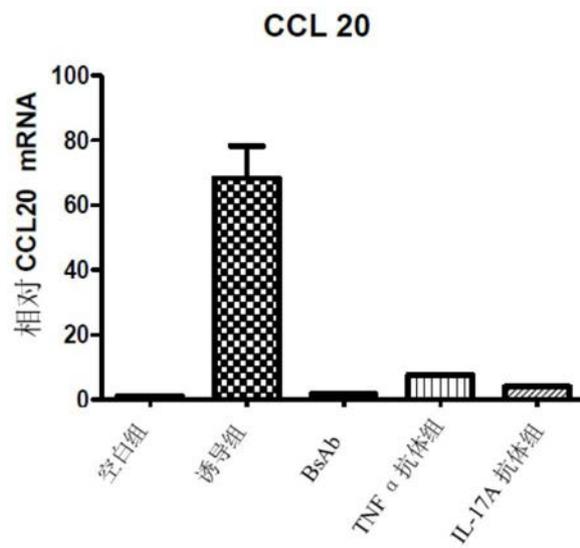


图6E

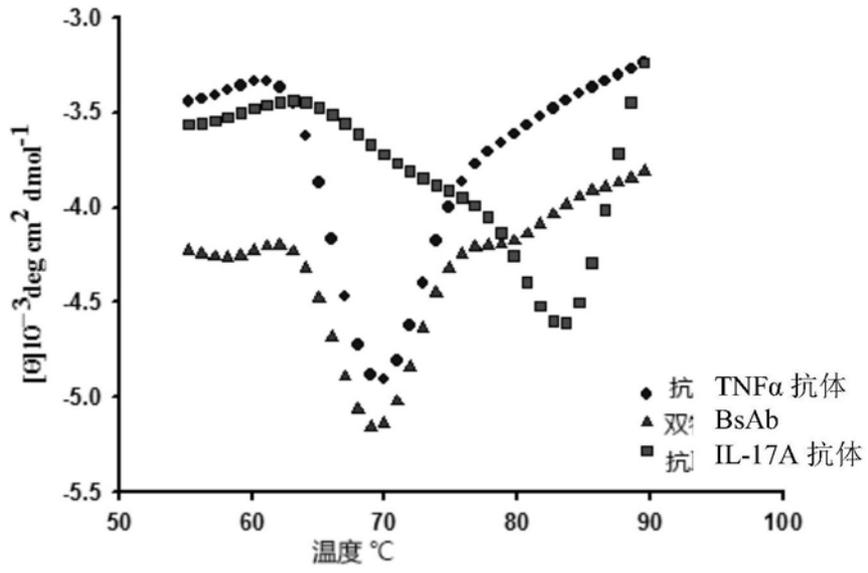


图7