



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112521507 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 202011537007.9

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2020.08.10

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112521507 A

(43) 申请公布日 2021.03.19

(62) 分案原申请数据

202010795032.0 2020.08.10

(73) 专利权人 北京鼎成肽源生物技术有限公司

地址 102200 北京市昌平区双营西路86号

院4号楼

专利权人 焦顺昌

(72) 发明人 焦顺昌 陈静远 梁皓

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 吕纪涛

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111196853 A, 2020.05.26

CN 110770254 A, 2020.02.07

MX 2019014316 A, 2020.01.27

AU 2019283925 A1, 2020.01.16

燕吉等.“肿瘤c-Met靶向分子成像探针的研发、制备与应用进展”.《医学研究杂志》.2019,第48卷(第10期),

俞晓晴等.“c-MET通路和抑制剂在非小细胞肺癌中的研究进展”.《中国肺癌杂志》.2017,第20卷(第4期),

审查员 张宁

权利要求书1页 说明书23页

序列表7页 附图5页

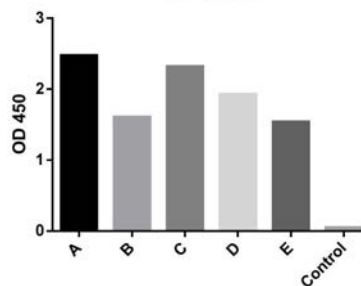
(54) 发明名称

抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供了抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用,属于酶联免疫技术领域,所述靶向c-Met的人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区、1D20轻链可变区的核苷酸序列依次如SEQ ID No.1和2所示。本发明提供的靶向c-Met的人鼠嵌合单克隆抗体能够与c-Met以高亲和力特异性结合,并嵌合了人抗体恒定区,在人体内应用时相比于鼠单克隆抗体可产生更加轻微的免疫排斥反应,提高产品的应用价值。

DI=16000



1. 抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体,其特征在于,所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

2. 根据权利要求1所述的抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体,其特征在于,所述1D20重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.7所示。

3. 根据权利要求1所述的抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体,其特征在于,所述1D20轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示。

4. 一种重组表达载体,其特征在于,包含权利要求1所述的抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列;

所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。

5. 一种宿主细胞,其特征在于,用权利要求4所述的重组表达载体转化得到。

6. 一种产生抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的方法,其特征在于,包括:培养权利要求5所述的宿主细胞,从培养物中收集抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体。

抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用

[0001] 本发明是申请号为CN202010795032.0,发明名称为“抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用”,申请日为2020年08月10日的发明专利的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于酶联免疫技术领域,尤其涉及抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0003] 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)是一种多肽生长因子,具有强促分裂、诱导上皮细胞迁移、侵袭以及诱导血管生成等作用,其生物学活性由其受体c-Met所介导。C-Met是一种由C-Met原癌基因编码的蛋白产物,具有酪氨酸激酶活性,与多种癌基因产物和调节蛋白相关,参与细胞信息传导、细胞骨架重排的调控,是细胞增殖、分化和运动的重要因素。目前认为,C-Met与多种癌的发生和转移密切相关,许多肿瘤病人在其肿瘤的发生和转移过程中均有C-Met过度表达和基因扩增。

[0004] HGF和c-Met在肺癌的形成和演进中起着至关重要的作用,因此,当异常活化的HGF/Met信号通路被阻断时,肿瘤细胞就会出现形态改变、增殖减缓、成瘤性降低、侵袭能力下降等一系列的变化,提示HGF/c-Met是一个在肿瘤治疗中有效的分子靶点。

[0005] 单克隆抗体可直接用于人类疾病的诊断、预防、治疗以及免疫机制的研究,为人类恶性肿瘤的免疫诊断与免疫治疗开辟了广阔前景。鼠源抗体能够被人体免疫系统识别,引起人抗鼠抗体反应,使得单抗药物疗效减弱,并且引起严重的不良反应。嵌合抗体用人源的抗体产生基因的恒定区序列来代替小鼠相应的抗体基因的恒定区序列,大大的降低了鼠源抗体产生的免疫原性反应,使抗体的70%成分都是人成分,避免单抗分子被免疫系统当作异源蛋白而被快速清除,提高单抗药物的药效。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用,本发明提供的抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体能够与c-Met以高亲和力特异性结合,并嵌合了人抗体恒定区,在人体内应用时相比于鼠单克隆抗体可产生更加轻微的免疫排斥反应,提高产品的应用价值,有机会应用到c-Met高表达肿瘤疾病的诊断与治疗中。

[0007] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0008] 本发明提供了抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体,所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,3C36重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示,3C36轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,3D63重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示,3D63轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示。

[0009] 优选的,所述1D20重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.7所示。

- [0010] 优选的,所述1D20轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示。
- [0011] 优选的,所述3C36重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.9所示。
- [0012] 优选的,所述3C36轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.10所示。
- [0013] 优选的,所述3D63重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.11所示。
- [0014] 优选的,所述3D63轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.12所示。
- [0015] 本发明还提供了一种重组表达载体,包含上述技术方案所述的抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的重链可变区和/或轻链可变区;
- [0016] 所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,3C36重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示,3C36轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,3D63重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示,3D63轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示。
- [0017] 本发明还提供了一种宿主细胞,用上述技术方案所述的重组表达载体转化得到。
- [0018] 本发明还提供了一种产生抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的方法,包括:培养上述技术方案所述的宿主细胞,从培养物中收集抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体。
- [0019] 本发明提供了抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体,所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,3C36重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示,3C36轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,3D63重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示,3D63轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示。

附图说明

- [0020] 图1为不同小鼠免疫后血清效价检测结果;
- [0021] 图2为噬菌体展示载体构建;
- [0022] 图3为噬菌体ELISA检测结果;
- [0023] 图4为3D63人鼠嵌合单克隆抗体载体构建示意图;
- [0024] 图5为Protein A纯化3D63嵌合抗体;
- [0025] 图6为SDS-PAGE检测3D63纯化抗体A为抗体非还原状态B为抗体还原状态;
- [0026] 图7为3D63人鼠嵌合单克隆单体WB检测结果。

具体实施方式

[0027] 本发明提供了抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体,所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,3C36重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示,3C36轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,3D63重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示,3D63轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示。

[0028] 在本发明中,所述1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,具体如下:

[0029] GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGATGATCTGGTAAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTGTCCTGCAA
GGCTTCTGGTTACTCATTTACTGGCTACTTTATGGACTGGGTGATGCAGAGCCATGAAAAGAGCCTTGAGTGGATT
GGACGTATTAATCCTAACAATGGTGATACTTTTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACA

AATCCTCTAGTACAGCCCACATGGAGCTCCGGAGCCTGGCATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGAAT
GAAGCTAATTGGGTCTATATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA。

[0030] 在本发明中,所述1D20重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.7所示,具体如下所示:

[0031] EVQLQQSGDDLKPGASVKLSCKASGYSTGYFMDWVMQSHGKSLEWIGRINPNNGDTFYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAHEMELRSLASESAVYYCARMKLIQSYMDYWGQTSVTVSS,粗体为CDR。

[0032] 在本发明中,所述1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,具体如下:

[0033] GATATCCAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTG
CAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACGTGTTAACTCCTGATC
TACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCA
CCATTAGTAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTATTACGTTCCGGCTC
GGGACAAAGTTGGAATAAAAATC。

[0034] 在本发明中,所述1D20轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示,具体如下:

[0035] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSG
TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLFTFGSGTKLEIK,粗体为CDR。

[0036] 在本发明中,所述3C36重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示,具体如下:

[0037] GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGCTGTCCTGCAA
GGCCTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATACACTGGGTGAAACAGAGACCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATT
GGAGAGATTAATCCTAGCAACGGTCATACTTACTACACTGAGAAGTTCAAGATCAAGGCCACAATGACTTTAGACA
AATCCTCCAGCACGGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCAGCGGTCTATTTTTGTGGAAGATA
TCCCAAGGGAGGGTATTTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTACCGTCTCCTCA。

[0038] 在本发明中,所述所述3C36重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.9所示,具体如下:

[0039] EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKRPGQGLEWIGEINPSNGHTYYTEKFKIKA
TMTLDKSSSTAYMQLSSLTSESAVYFCGRYPKGGYFDVWGAGTTVTVSS,粗体为CDR。

[0040] 在本发明中,所述3C36轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,具体如下:

[0041] GACATTGTGCTAACTCAGTCTCCAGGCACCCTATCTGTGACTCCAGGAGATAGCGTCAGTCTTTCTCTG
CAGGGCCAGCCAAAGTATTAGCAGCTACCTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCAAGGCTTCTCATC
AAGTATGCTTCCAGTCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCTCA
GTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGAATGTATTTCTGTCAACAGAGTAAAAGCTGGCCTTTCACGTTCCG
CTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAATCTAGTGGTGGCGGTGGTTTCG。

[0042] 在本发明中,所述3C36轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.10所示,具体如下:

[0043] DIVLTQSPGTLVTPGDSVLSLSCRASQSISSYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIQIPSRFSGSGSG
TDFTLSINSVETEDFGMYFCQQSKSWPFTFGSGTKLEIK,粗体为CDR。

[0044] 在本发明中,所述3D63重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示,具体如下:

[0045] GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAA
GGGTCTGGCTACACATTCAGTATTATGCTATGCACTGGGTAAAGCAGAGTCATGCAAAGAGTCTAGAGTGGATT
GGAGTTAGTAGTAGTTATTATGGTGAAGGCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGCCAAGGCCACAATGACTGTAGACA
AATCCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTTGCCGACTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGTAAGACA

CGACGTGGATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA。

[0046] 在本发明中,所述3D63重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.11所示,具体如下:

[0047] EVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYFTFDYAMHWVKQSHAKSLEWIGVSSSYGEANYNQKFKAKA
TMTVDKSSSTAYMELAGLTSEDSAIYYCVRHVDVAMDYWGQGTSTVTVSS,粗体为CDR。

[0048] 在本发明中,所述3D63轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示,具体如下:

[0049] GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTCGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTG
CAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCT
CCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTT
TCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAATCTAGT。

[0050] 在本发明中,所述3D63轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.12所示,具体如下:

[0051] DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFT
GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPRTFGGGKLEIK,粗体为CDR。

[0052] 本发明还提供了一种重组表达载体,包含上述技术方案所述的抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的重链可变区和/或轻链可变区;

[0053] 所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的1D20重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,1D20轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,3C36重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.3所示,3C36轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.4所示,3D63重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示,3D63轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示。

[0054] 本发明还提供了一种宿主细胞,用上述技术方案所述的重组表达载体转化得到。

[0055] 本发明还提供了一种产生抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的方法,包括:培养上述技术方案所述的宿主细胞,从培养物中收集抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体。

[0056] 在本发明中,所述抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体的制备方法优选包括以下步骤:

[0057] 1) 将所述1D20重链可变区、3C36重链可变区和3D63重链可变区分别经BamHI和XbaI双酶切,得到酶切1D20重链可变区、酶切3C36重链可变区和酶切3D63重链可变区;

[0058] 将质粒载体pcDNA3.1(+)经BamHI和XbaI双酶切,得到线性化质粒载体pcDNA3.1(+);

[0059] 将所述酶切1D20重链可变区、酶切3C36重链可变区和酶切3D63重链可变区连接到线性化质粒载体pcDNA3.1(+)中,得到重组质粒pcDNA3.1-H;

[0060] 2) 将所述1D20轻链可变区、3C36轻链可变区和3D63轻链可变区分别经BamHI和XbaI双酶切,得到酶切1D20轻链可变区、酶切3C36轻链可变区和酶切3D63轻链可变区;

[0061] 将质粒载体pcDNA3.1/zeo(+)经BamHI和XbaI双酶切,得到线性化质粒载体pcDNA3.1/zeo(+);

[0062] 将所述酶切1D20轻链可变区、酶切3C36轻链可变区和酶切3D63轻链可变区连接到线性化质粒载体pcDNA3.1/zeo(+)中,得到重组质粒pcDNA3.1/zeo-L;

[0063] 3) 将所述步骤1)得到的重组质粒pcDNA3.1-H和步骤2)得到的重组质粒pcDNA3.1/zeo-L转染到293细胞后培养3d以上,利用蛋白A亲和层析纯化,得到抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体。

[0064] 在本发明中,所述重链可变区和轻链可变区的双酶切的体系每80μL分别优选包

括:浓度为150ng/ μL 的目标基因片段15 μL 、BamHI 2 μL 、XbaI 2 μL 、10 \times NEBuffer 48 μL 、10 \times BSA 8 μL 和ddH₂O 45 μL 。在本发明中,所述双酶切的条件优选包括:37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

[0065] 在本发明中,所述质粒载体pcDNA3.1 (+)和质粒载体pcDNA3.1/zeo (+)的双酶切体系每80 μL 分别优选包括:浓度为150ng/ μL 的线性化质粒载体15 μL 、BamHI 2 μL 、XbaI 2 μL 、10 \times NEBuffer 48 μL 、10 \times BSA 8 μL 和ddH₂O 45 μL 。在本发明中,所述双酶切的条件优选包括:37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

[0066] 在本发明中,所述连接的体系每25 μL 优选包括:目标基因片段3 μL 、线性化质粒载体1 μL 、10 \times T4 DNA Ligation Buffer 2.5 μL 、T4 DNA ligase 1 μL 和ddH₂O 17.5 μL 。在本发明中,所述连接的条件优选包括:金属浴16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

[0067] 在本发明中,所述重组质粒pcDNA3.1-H的质量、重组质粒pcDNA3.1/zeo-L的质量与293细胞的个数比优选为2 μg :2 μg :1 $\times 10^5$ 个。在本发明中,所述转染还优选包括,将所述重组质粒与脂质体混合后再进行转染,所述重组质粒pcDNA3.1-H的质量的脂质体的体积比优选为2 μg :10 μL 。本发明对所述转染过程中需要的培养基培养的种类没有限定,采用本领域常规选用的即可。

[0068] 在本发明中,所述蛋白A亲和层析纯化优选包括:配置Protein A填料与装柱:1.5g Protein A-Sepharose CL-4B干粉用6-7mL三蒸水溶解,再用平衡缓冲液浸泡15min,装入层析柱中。用10倍柱床体积的平衡缓冲液过柱,流速为1mL/min,使流出液体的pH为7.4。

[0069] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0070] 实施例1

[0071] 小鼠免疫及效价检测

[0072] 免疫6-8周雌性Balb/c小鼠5只,每只小鼠每次免疫HIS标签标记的人c-met胞外抗原(NP_000236) (Met1-Thr932),剂量为50 μg ,首次免疫将免疫原与等体积的完全弗氏佐剂制成乳化剂,腹部皮下多点注射;间隔2~3周取相同剂量免疫原与等体积不完全弗氏佐剂制成乳化剂,腹部皮下多点注射。于三次免疫后一周取血测定血清效价,效价合格的小鼠进行加强免疫,加强免疫3天后取小鼠脾脏液氮冻存储备用。

[0073] 于末次免疫后一周,经小鼠眶静脉丛取血50~60 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜后,离心分离上层血清备检。取适量c-Met抗原蛋白,用包被缓冲液稀释成5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后用单道移液器在96孔板每孔中加入100 μL ,轻拍板子使样品混匀,用保鲜膜封严,4 $^{\circ}\text{C}$ 下包被过夜;用洗涤液按200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 洗板1次,扣干酶标板;再用封闭液按300 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭酶标板,室温下封闭1小时;用洗涤液按200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 洗板2次后加样(将经过梯度稀释的样品及样品稀释剂以100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加样),同时加入检测抗体,以100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加至96孔板内,室温下作用2小时;用洗涤液按200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 洗板5次,以100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入显色液室温放置12min;以50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入终止液终止反应;用酶标仪进行检测:测定波长为450nm,测定结果图1所示。经测定后5只小鼠体内均形成了较高滴度的靶向c-Met的抗体,其中小鼠A检测到的抗体效价最高,故选用鼠A用于之后的噬菌体文库构建。

[0074] 实施例2

[0075] 生物淘选可变区序列

[0076] 从免疫c-Met胞外抗原的小鼠A脾脏中用trizol法提取总RNA,用鼠抗体scFv基因

扩增试剂盒(货号:P001Z)扩增可鼠抗体可变区基因,以一段由多个甘氨酸(Gly)与丝氨酸(Ser)构成的肽连接物Linker(SEQ ID No.13:SSGGGSGGGGGSSRSS)连接抗体重链与轻链可变区,形成单链抗体基因片段scFv,将scFv单链抗体基因片段克隆到噬菌粒载体pCANTAB5E中,构建scFv噬菌体展示文库,使单链抗体scFv在噬菌体展示文库中展示表达,图2为噬菌体展示载体构建示意图。之后经过质粒提取,将噬菌体质粒电转化建库,库容 $\geq 10^8$ 。随后,用ELISA板包被特异抗原对噬菌体库进行筛选,采用“淘洗-扩增-富集”的循环方式,一般2轮以上得到阳性克隆。通过ELISA实验对挑选的阳性克隆做进一步检测,将ELISA检测的阳性克隆PCR,酶切分型后送测序,根据测序结果挑选适合的可变区序列,最终确定1D20、3C36、3D63三株效果最好的克隆株,其ELISA结果如图3所示。检测结果显示,1D20、3C36、3D63三个克隆株与c-Met抗原有极强的结合能力,而对对照抗原与细胞裂解液无显著结合,说明上述三株克隆对c-Met抗原有良好的特异性靶向功能。

[0077] 实施例3

[0078] 人鼠嵌合单克隆抗体的构建、表达与纯化

[0079] 1人鼠嵌合单克隆抗体载体构建

[0080] 1.1载体构建

[0081] 质粒构建过程如图4所示,具体步骤如下:

[0082] 1.1.1PCR扩增轻链与重链可变基因片段

[0083] 根据人重链信号肽序列与pcDNA3.1(+)表达载体相关信息,设计并合成含有酶切位点BamHI的上游引物SH.R和信号肽序列HHS;根据人轻链信号肽序列和pcDNA3.1/zeo(+)表达载体相关信息,设计并合成含有酶切位点BamHI的人轻链信号肽上游引物SL.F和信号肽序列HLS,通过引物设计软件Oligo7的设计得到引物。

[0084] 人IgG重链信号肽(HHS)

[0085] SEQ ID No.14:

[0086] 5'-atggactggacctggaggatcctcttcttggtggcgccgcccacaggcgcgactcc-3';

[0087] SEQ ID No.15:

[0088] SH.F5'-CGGGATCCatggactggacc-3'(BamHI);

[0089] SEQ ID No.16:

[0090] 人IgG轻链信号肽(HLS)5'-atggtgcatcacaactcattgggtttctgctgctctgggttccagctagccgcggt-3';

[0091] SEQ ID No.17:

[0092] SL.F5'-CGGGATCCatggtgcatc-3'(BamHI)。

[0093] 以已构建完成的重组质粒pCANTAB5E-3D63scFv为模板,设计引物,以重链可变区引物VH.F和VH.R扩增重链可变区基因片段VH,同样以轻链可变区引物VL.F和VL.R扩增轻链可变区基因片段VL。

[0094] 重链可变区引物:

[0095] SEQ ID No.18:

[0096] VH.F5'-caggcgcgactccTCTGGGGCTGAACTG-3';

[0097] SEQ ID No.19:

[0098] VH.R5'-gcccttggtgctagctgaggagacggtgact-3';

[0099] 轻链可变区引物:

[0100] SEQ ID No.20:

[0101] VL.F5'-cagctagccgcggtGATGTTGTGATGACC-3';

[0102] SEQ ID No.21:

[0103] VL.R5'-cgccgccaccgtacgtttgatttccagcttg-3'。

[0104] 按表1所示加入PCR反应体系,并瞬时离心以混匀反应体系:

[0105] 表1 VH与VL基因片段的PCR反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/μL)	0.25
10×Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
pCANTAB5E-scFv	2.5 (10ng)
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
ddH ₂ O	34.25
总体系	50

[0108] PCR反应条件为:94℃5min(循环1次);94℃1min,65℃1min;72℃1min(循环30次);72℃10min(循环1次)。分别扩增出VH与VL。

[0109] PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳回收。

[0110] 1.1.2PCR扩增人IgG重链和轻链恒定区基因片段

[0111] 根据人IgG重链和轻链恒定区基因与pcDNA3.1(+)和pcDNA3.1/zeo(+)表达载体相关信息,设计包含酶切位点XbaI的引物扩增恒定区基因片段,通过引物设计软件Oligo7的设计得到引物。

[0112] 取人外周血淋巴细胞并提取mRNA,经RT-PCR得到的cDNA。

[0113] 以得到的cDNA为模板,以CH.F和CH.R引物扩增重链恒定区CH;以CL.F和CL.R引物扩增轻链恒定区CL。

[0114] 重链恒定区引物

[0115] SEQ ID No.22:

[0116] CH.F5'-gctagcaccaagggcccatcggtc-3';

[0117] SEQ ID No.23:

[0118] CH.R5'-tgctctagatcatttaccggag-3'(XbaI);

[0119] 轻链恒定区引物

[0120] SEQ ID No.24:

[0121] CL.F5'-cgtacggtggcggcgccatctg-3';

[0122] SEQ ID No.25:

[0123] CL.R5'-tgctctagatcatttaccggag-3'(XbaI)。

[0124] 按表2所示加入PCR反应体系,并瞬时离心以混匀反应体系:

[0125] 表2 CH与CL基因片段的PCR反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
cDNA	2.5 (10ng)
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
ddH ₂ O	34.25
总体系	50

[0127] PCR反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5min(循环1次);94 $^{\circ}\text{C}$ 1min,65 $^{\circ}\text{C}$ 1min;72 $^{\circ}\text{C}$ 1min(循环30次);72 $^{\circ}\text{C}$ 10min(循环1次)。分别扩增出CH与CL。

[0128] PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳回收。

[0129] 1.1.3巢式PCR对鼠源抗体可变区与人抗体恒定区的拼接

[0130] 以已合成的重链信号肽HHS与已扩增的重链可变区VH和CH为模板,以SH.F与CH.R为引物,重叠延伸PCR(SOE-PCR)扩增出全重链基因片段;同样以已合成的轻链信号肽HLS与已扩增的轻链可变区VL和CL为模板,以SL.F与CL.R为引物,扩增出全轻链基因片段。

[0131] 按表3与表4所示加入PCR反应体系,并瞬时离心以混匀反应体系:

[0132] 表3重链基因片段的PCR反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
HHS	2.5 (10ng)
VH	2.5 (10ng)
CH	2.5 (10ng)
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
ddH ₂ O	31.75
总体系	50

[0134] 表4轻链基因片段的PCR反应体系

反应物	体积 (μL)
Pyrobest DNA Polymerase (5 U/ μL)	0.25
10 \times Pyrobest Buffer II	5
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	4
HLS	2.5 (10ng)
VL	2.5 (10ng)
CL	2.5 (10ng)
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
ddH ₂ O	31.75
总体系	50

[0136] PCR反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5min(循环1次);94 $^{\circ}\text{C}$ 1min,65 $^{\circ}\text{C}$ 1min;72 $^{\circ}\text{C}$ 1min(循环30次);72 $^{\circ}\text{C}$ 10min(循环1次)。分别完成嵌合抗体H与L的扩增拼接。

[0137] PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳回收。

[0138] 1.1.4嵌合抗体重链与轻链以及质粒pcDNA3.1(+)与pcDNA3.1(+)/zeo的双酶切

[0139] 根据目的基因片段上下游的限制性内切酶位点BamHI和XbaI,对目的基因进行双酶切反应。以限制性内切酶位点BamHI和XbaI对质粒pcDNA3.1(+)与pcDNA3.1(+)/zeo进行双酶切以形成线性质粒载体。

[0140] 酶切反应体系如表5,表6所示,加入反应体系后混匀并将其放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

[0141] 表5目的基因片段的双酶切反应体系

反应物	体积 (μL)
目的基因片段	15 (150 ng/μL)
<i>Bam</i> HI	2
<i>Xba</i> I	2
10×NEBuffer 4	8
10×BSA	8
ddH ₂ O	45
总体系	80

[0143] 表6质粒载体的双酶切反应体系

反应物	体积 (μL)
线性质粒载体	15 (150 ng/μL)
<i>Bam</i> HI	2
<i>Xba</i> I	2
10×NEBuffer 4	8
10×BSA	8
ddH ₂ O	45
总体系	80

[0146] 将酶切反应产物通过琼脂糖凝胶电泳回收。

[0147] 1.1.5质粒pcDNA3.1(+)与重链的连接

[0148] 以T4 DNA连接酶,连接回收的重链基因片段及线性化质粒载体pcDNA3.1(+),目的基因片段与线性化质粒以10:1摩尔比混合,配制25μL反应体系,如表7所示。

[0149] 表7 pcDNA3.1(+)与重链基因片段的连接体系

反应物	体积 (μL)
重链基因片段	3
pcDNA3.1(+)载体片段	1
10×T4 DNA Ligation Buffer	2.5
T4 DNA ligase	1
ddH ₂ O	17.5
总体系	25

[0151] 1.1.6质粒pcDNA3.1(+)/zeo与轻链的连接

[0152] 以T4 DNA连接酶,连接回收的轻链基因片段及线性化质粒载体pcDNA3.1/zeo(+),目的基因片段与线性化质粒以10:1摩尔比混合,配制25μL反应体系,如表8所示。金属浴16℃进行过夜连接。

[0153] 表8 pcDNA3.1/zeo(+)与轻链基因片段的连接体系

反应物	体积 (μL)
轻链基因片段	3
pcDNA3.1/zeo(+)载体片段	1
10×T4 DNA Ligation Buffer	2.5
T4 DNA ligase	1
ddH ₂ O	17.5
总体系	25

[0155] 2重组质粒的表达

[0156] 转染前一天,将 1×10^5 个293细胞接种至6孔板中,用无抗生素细胞生长液培养细胞.细胞生长丰度达90%左右时进行转染,转染前1h更换培养基,加入Opti-MEM无血清培养基.重组质粒pcDNA3.1-H与pcDNA3.1/zeo-L各2μg与250μl Opti-MEM混合,并加入10μl脂质体混合于250μl Opti-MEM中,静置5min,将两种混合液充分混合,静置20min.将脂质体复合物加入细胞中,混匀,放37℃培养箱培养5h.将培养基更换为细胞生长液,继续培养3天。

[0157] 3抗体纯化

[0158] 3D63单克隆抗体的亲和层析纯化利用蛋白A亲和层析目的抗体,纯化过程通过AKTA explorer100进行监测。配置Protein A填料与装柱:1.5gProtein A-Sepharose CL-4B干粉用6-7mL三蒸水溶解,再用平衡缓冲液浸泡15min,装入层析柱中。用10倍柱床体积的平衡缓冲液过柱,流速为1mL/min,使流出液体的pH为7.4。取得293细胞上清,经4℃,12000g离心15min,收集上清。取上清5mL,以平衡缓冲液稀释至50mL,0.45μm滤膜过滤,准备上样。上样流速为1mL/min。上样后,以10倍柱床体积的平衡缓冲液进行流洗,流速为1mL/min,直至UV至基线位置。随后用洗脱缓冲液洗脱目标抗体,当观察到基线开始上升,即出现洗脱峰时,分管收集洗脱液,以中和缓冲液中和至中性。收集洗脱液至洗脱峰回到基线后,继续用5-10倍柱床体积的平衡缓冲液平衡柱床,流速调至1mL/min。用10倍柱床体积的三蒸水平衡柱床,过程如图5所示。ProteinA是金黄色葡萄球菌的表面蛋白,可特异结合抗体Fc段的高亲和力位点,适用于细胞培养上清的单克隆抗体纯化。因此这里选用Protein A亲和层析柱纯化抗体,通过AKTA explorer100监测纯化进程。之后利用SDS不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯化结果,结果如图6所示。泳道M为蛋白Marker;N-R泳道为非还原状态的完整抗体条带,在212KD偏上位置;R泳道为还原状态的抗体条带,抗体还原成轻链26KD与重链50KD片段。结果显示条带非常清晰并单一,证明抗体具有很高的纯度。

[0159] 实施例4

[0160] 人鼠嵌合单克隆抗体Western-Blot鉴定

[0161] 为了验证所制备的人鼠嵌合抗体是否具备靶向检测c-Met抗原的能力,通过实施例3中制备纯化出的3D63单克隆抗体进行Western Blot试验验证,试验步骤如下:

[0162] 按表说明书配制好分离胶,在模具中灌入分离胶溶液。在分离胶上轻轻覆盖上一层无水乙醇,使凝胶保持平整,室温静置10~15min。待分离胶与乙醇中间清晰的分界肉眼可见后,倒掉乙醇,并用吸水纸把残余的乙醇小心吸干。将浓缩胶加至分离胶的上面,直到达到约玻璃板的顶端,将与玻璃板厚度配套的梳子插入凝胶内,室温静置约15min,直至胶凝。将玻璃板安放在蛋白垂直电泳槽里,压紧,加入1×MOPS-SDS电泳液,超过电泳槽外两块胶的刻度线,检查蛋白垂直电泳槽内是否有漏液现象。取20μLA549细胞蛋白提取样品分别加至SDS-PAGE浓缩胶样品孔中,并加入5μL蛋白预染Marker,记录加样顺序。将电泳电源设定恒压120V进行电泳,电泳约1h,至溴酚蓝指示剂跑至分离胶底部,架子绿色边缘,所需区段的蛋白Marker条带完全分开为止。根据样品区域胶块大小,剪与胶块大小一致的PVDF膜及比胶块长宽小1mm的6层滤纸,置于甲醇中6s,迅速转移至电转液中浸泡备用。按照电流由正极流向负极,膜正胶负的原则,以滤纸-膜-胶-膜的顺序放入半干式碳板转印槽中。根据公式计算电流I,转膜50min。转膜结束后,取Western Blot避光黑盒,用5%脱脂奶粉溶液封闭PVDF膜,置于水平摇床4h。弃脱脂奶粉溶液。利用TBST洗膜,直至无脱脂奶粉溶液。加入纯化的人鼠嵌合单克隆抗体作为一抗,水平摇床摇晃10min,确保PVDF膜浸入一抗溶液,4℃冰箱过夜。弃一抗溶液,用TBST溶液洗膜3次,每次水平摇床10min3次。弃TBST溶液。在避光条件下将二抗溶液倒入Western Blot避光黑盒,确保PVDF膜浸入二抗溶液,盖紧黑盒,避光摇床50min。弃二抗溶液。TBST溶液洗膜2次,每次10min。弃TBST溶液。用TBS溶液洗膜1次,水平摇床5min。扫膜分析,结果如图7所示。H1299为c-Met阳性细胞株,将其中的c-Met蛋白用CRISPR技术敲除掉作为对照细胞,WB结果显示在未敲除的H1299细胞中可检测出一条条带,

并无其他杂带,而敲除后的细胞中未能检测到任何明显调大,且未敲除组中检测出的蛋白大小与c-Met相符,证实制备的3D63人鼠嵌合抗体可以和c-Met蛋白特异结合,可用于WB的检测等实验当中。

[0163] 以上所述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。

序列表

<110> 北京鼎成肽源生物技术有限公司

<120> 抗人 c-Met 人鼠嵌合单克隆抗体及其应用

<160> 25

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0164]

<400> 1

gaggttcagc tgcagcagtc tggagatgat ctggtaaagc ctggggcctc agtgaagctg	60
tcctgcaagg cttctgggta ctcatttact ggctacttta tggactgggt gatgcagagc	120
catggaaaga gccttgagtg gattggacgt attaatccta acaatgggta tactttttac	180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctctag tacageccac	240
atggagctcc ggagcctggc atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaatgaag	300
ctaattgggt cctatatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca	357

<210> 2

<211> 344

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gatatccaga tgactcagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagtaa cctggagcaa	240
gaagatattg ccaacttactt ttgccaacag ggtaatacgc tattcacgtt cggctcgggg	300
acaaagttgg aaataaaatc	320

<210> 3

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg	60
[0165] tcttgaagg cctctggcta caccttcacc agctactgga tacactgggt gaaacagaga	120
cctggacagg gccttgagtg gattggagag attaatccta gcaacggtca tacttactac	180
actgagaagt tcaagatcaa ggccacaatg actttagaca aatcctccag cacggcctac	240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tcagcggctt atttttgtgg aagatatccc	300
aaggagggt atttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca	354

<210> 4

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gacattgtgc taactcagtc tccaggcacc ctatctgtga ctccaggaga tagcgtcagt	60
ctttcctgca gggccagcca aagtattagc agctacctac actggtatca acaaaaatca	120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc	180

aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcactctca gtatcaacag tgtggagact 240
 gaagatthttg gaatgtatth ctgtcaacag agtaaaagct ggcctthtcac gttcggctcg 300
 gggacaaaagt tggaaataaa atctagtggg ggcgggtggg cg 342

<210> 5

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gaggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggtctc agtgaagatt 60
 tcctgcaagg ggtctggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt aaagcagagt 120
 catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt agtagtagtt attatggtga ggctaactac 180
 aaccagaagt tcaaggccaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctat 240
 [0166] atggagcttg ccggactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgt aagacacgac 300
 gtggatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtca ccgtctctc a 351

<210> 6

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

gatgttgtga tgaccagac tccactcaact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 180
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg agcctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttcct 300
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaatcta gt 342

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Phe Met Asp Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

[0167] 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Met Lys Leu Ile Gly Ser Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

 115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

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 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn 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 His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Phe Thr

 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0168] 100 105

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly His Thr Tyr Tyr Thr Glu Lys Phe

100

105

<210> 11

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

[0170] Gly Val Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Glu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85 90 95

Val Arg His Asp Val Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

 85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0171]

 100 105 110

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 13

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 14

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcggccg ccacaggcgc gactcc 57

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

cgggatccat ggactggacc 20

[0172]

<210> 16

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 16

atgttgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagctag ccgcggt 57

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

cgggatccat gttgccatc

19

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

caggcgcgca ctctctggg gctgaactg

29

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0173]

<400> 19

gcccttggtg ctagctgagg agacggtgac t

31

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

cagctagccg cggatgatgtt gtgatgacc

29

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 21	
	cgccgccacc gtacgtttga tttccagctt g	31
	<210> 22	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 22	
	gctagcacca agggcccatc ggtc	24
[0174]	<210> 23	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 23	
	tgctctagat cattaccgc gag	23
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<400> 24	
	cgtacggtgg cggcgccatc tg	22

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

[0175] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 25

tgctctagat catttaccg gag

23

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京鼎成肽源生物技术有限公司
- [0003] <120> 抗人c-Met人鼠嵌合单克隆抗体及其应用
- [0004] <160> 25
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 357
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] gaggttcagc tgcagcagtc tggagatgat ctggtaaagc ctggggcctc agtgaagctg 60
- [0012] tcttgcaagg cttctgggta ctcatcttact ggctacttta tggactgggt gatgcagagc 120
- [0013] catggaaaga gccttgagtg gattggacgt attaatecta acaatgggta tactttttac 180
- [0014] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctctag tacagcccac 240
- [0015] atggagctcc ggagcctggc atctgaggac tctgcagtct attattgtgc aagaatgaag 300
- [0016] ctaattgggt cctatatgga ctactgggggt caaggaacct cagtcacctg ctctctca 357
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 344
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0021] <400> 2
- [0022] gatatccaga tgactcagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
- [0023] atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
- [0024] gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
- [0025] aggttcagtg gcagtggtgc tggaacagat tattctctca ccattagtaa cctggagcaa 240
- [0026] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc tattcacggt cggctcgggg 300
- [0027] acaaagttgg aaataaaatc 320
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 354
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0032] <400> 3
- [0033] gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
- [0034] tcttgcaagg cctctgggta caccttcacc agctactgga tacactgggt gaaacagaga 120
- [0035] cctggacagg gccttgagtg gattggagag attaatecta gcaacgggta tacttactac 180
- [0036] actgagaagt tcaagatcaa ggccacaatg acttttagaca aatcctccag cacggcctac 240
- [0037] atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tcagcgggtct atttttgtgg aagatatccc 300
- [0038] aagggagggt atttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

[0039] <210> 4
 [0040] <211> 342
 [0041] <212> DNA
 [0042] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0043] <400> 4
 [0044] gacattgtgc taactcagtc tccaggcacc ctatctgtga ctccaggaga tagcgtcagt 60
 [0045] ctttcctgca gggccagcca aagtattagc agctacctac actggtatca acaaaaatca 120
 [0046] catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
 [0047] aggttcagtg gcagtggatc aggacagat ttcactctca gtatcaacag tgtggagact 240
 [0048] gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaaaagct ggcctttcac gttcggctcg 300
 [0049] gggacaaagt tggaaataaa atctagtggg ggcgggtggt cg 342
 [0050] <210> 5
 [0051] <211> 351
 [0052] <212> DNA
 [0053] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0054] <400> 5
 [0055] gaggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggtctc agtgaagatt 60
 [0056] tcctgcaagg ggtctggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt aaagcagagt 120
 [0057] catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt agtagtagtt attatggtga ggctaactac 180
 [0058] aaccagaagt tcaaggccaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctat 240
 [0059] atggagcttg ccggactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgt aagacacgac 300
 [0060] gtggatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc a 351
 [0061] <210> 6
 [0062] <211> 342
 [0063] <212> DNA
 [0064] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0065] <400> 6
 [0066] gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60
 [0067] atctcttgca agtcaagtca ggcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 [0068] ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactt atctggtgtc taaactggac 180
 [0069] tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 [0070] agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acatcttctc 300
 [0071] cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaatcta gt 342
 [0072] <210> 7
 [0073] <211> 119
 [0074] <212> PRT
 [0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0076] <400> 7
 [0077] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Asp Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0078]	1	5	10	15
[0079]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
[0080]	20	25	30	
[0081]	Phe Met Asp Trp Val Met Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
[0082]	35	40	45	
[0083]	Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0084]	50	55	60	
[0085]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His			
[0086]	65	70	75	80
[0087]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0088]	85	90	95	
[0089]	Ala Arg Met Lys Leu Ile Gly Ser Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0090]	100	105	110	
[0091]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0092]	115			
[0093]	<210> 8			
[0094]	<211> 106			
[0095]	<212> PRT			
[0096]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0097]	<400> 8			
[0098]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
[0099]	1	5	10	15
[0100]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
[0101]	20	25	30	
[0102]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
[0103]	35	40	45	
[0104]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0105]	50	55	60	
[0106]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln			
[0107]	65	70	75	80
[0108]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Phe Thr			
[0109]	85	90	95	
[0110]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0111]	100	105		
[0112]	<210> 9			
[0113]	<211> 118			
[0114]	<212> PRT			
[0115]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0116]	<400> 9			

[0156] <400> 11
 [0157] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
 [0158] 1 5 10 15
 [0159] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 [0160] 20 25 30
 [0161] Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 [0162] 35 40 45
 [0163] Gly Val Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Glu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0164] 50 55 60
 [0165] Lys Ala Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0166] 65 70 75 80
 [0167] Met Glu Leu Ala Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 [0168] 85 90 95
 [0169] Val Arg His Asp Val Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 [0170] 100 105 110
 [0171] Val Thr Val Ser Ser
 [0172] 115
 [0173] <210> 12
 [0174] <211> 112
 [0175] <212> PRT
 [0176] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0177] <400> 12
 [0178] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 [0179] 1 5 10 15
 [0180] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 [0181] 20 25 30
 [0182] Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 [0183] 35 40 45
 [0184] Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 [0185] 50 55 60
 [0186] Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0187] 65 70 75 80
 [0188] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 [0189] 85 90 95
 [0190] Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0191] 100 105 110
 [0192] <210> 13
 [0193] <211> 18
 [0194] <212> PRT

- [0234] <400> 19
[0235] gcccttggtg ctagctgagg agacggtgac t 31
[0236] <210> 20
[0237] <211> 29
[0238] <212> DNA
[0239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0240] <400> 20
[0241] cagctagccg cggatgatggt gtgatgacc 29
[0242] <210> 21
[0243] <211> 31
[0244] <212> DNA
[0245] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0246] <400> 21
[0247] cgccgccacc gtacgtttga tttccagctt g 31
[0248] <210> 22
[0249] <211> 24
[0250] <212> DNA
[0251] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0252] <400> 22
[0253] gctagcacca agggcccatc ggtc 24
[0254] <210> 23
[0255] <211> 23
[0256] <212> DNA
[0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0258] <400> 23
[0259] tgctctagat catttaccg gag 23
[0260] <210> 24
[0261] <211> 22
[0262] <212> DNA
[0263] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0264] <400> 24
[0265] cgtacggtgg cggcgccatc tg 22
[0266] <210> 25
[0267] <211> 23
[0268] <212> DNA
[0269] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0270] <400> 25
[0271] tgctctagat catttaccg gag 23

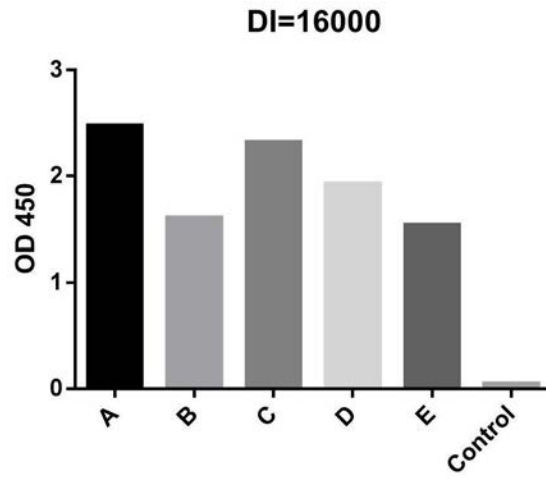


图1

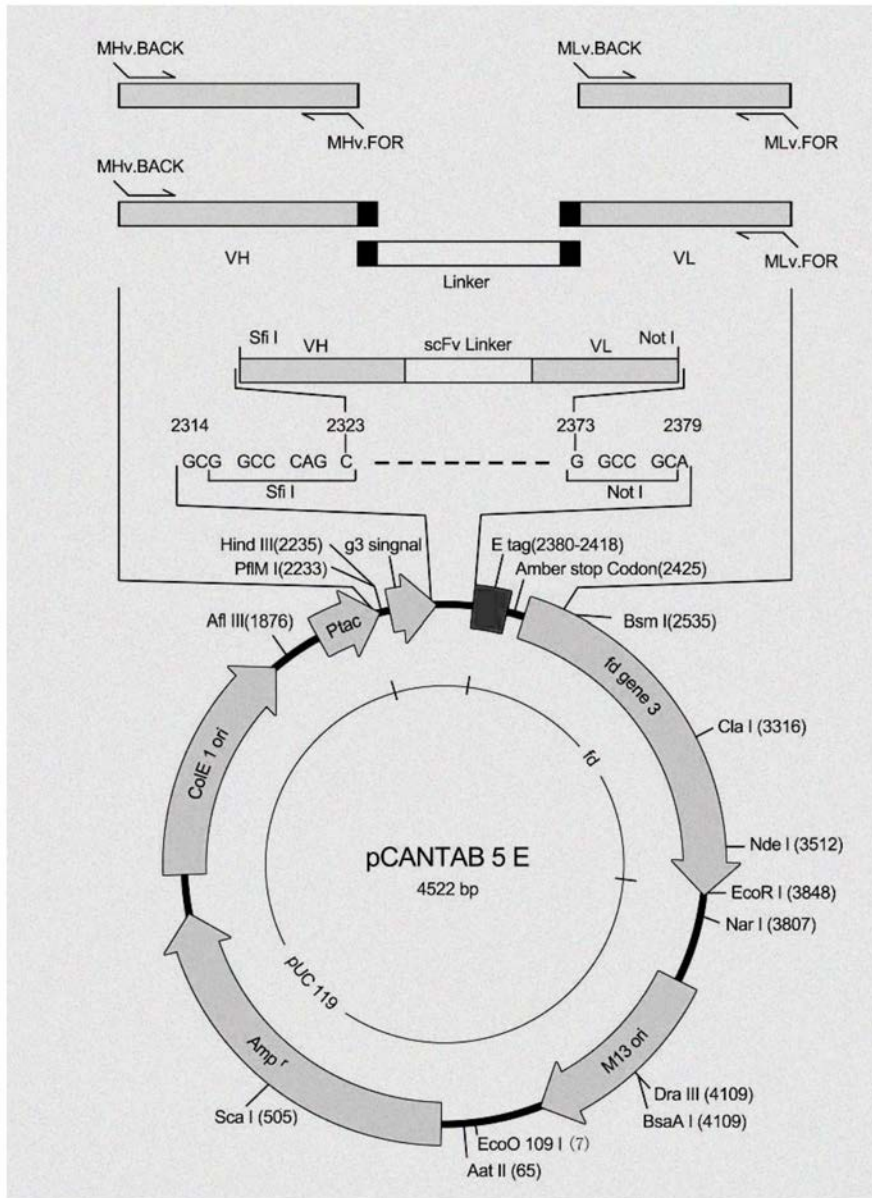


图2

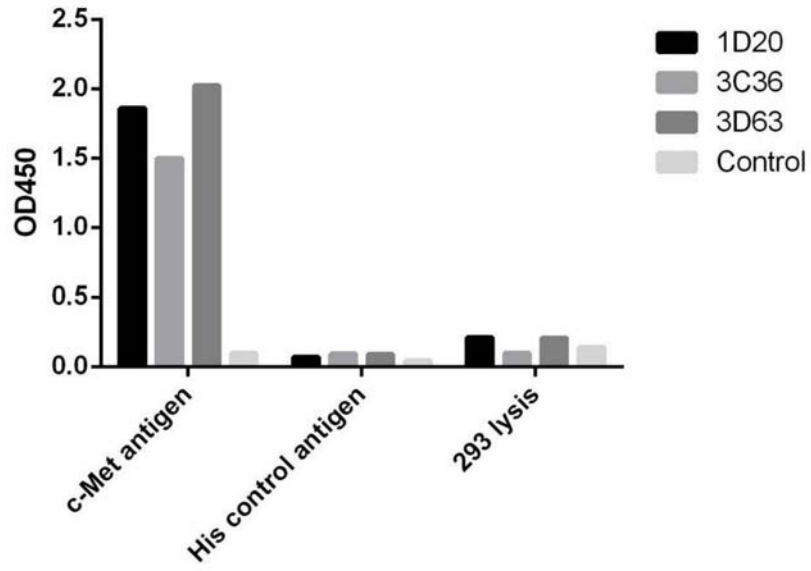


图3

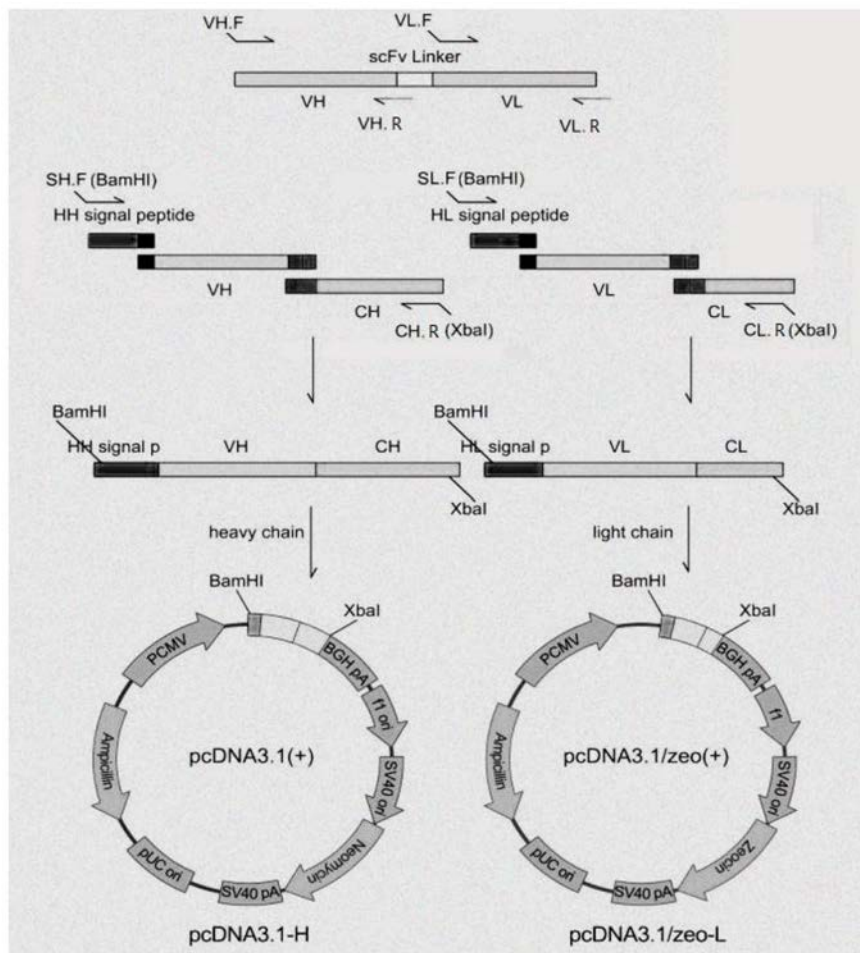


图4

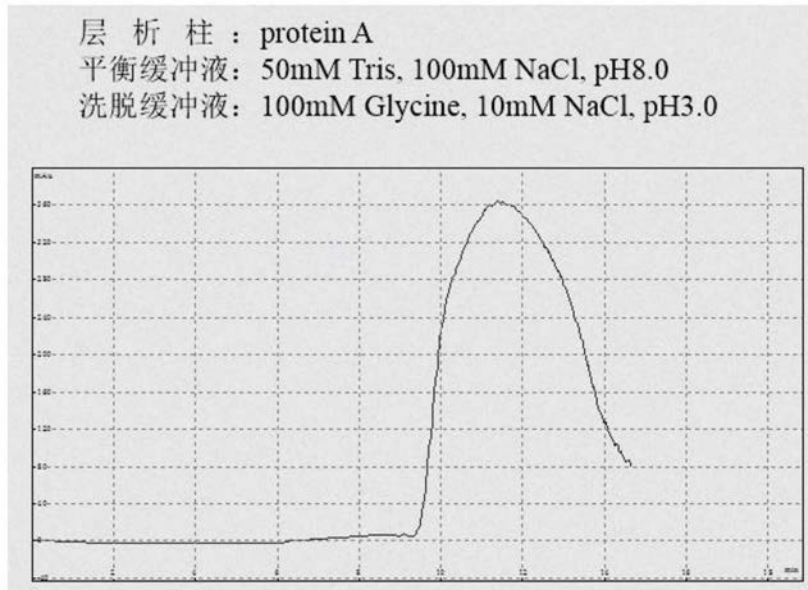


图5

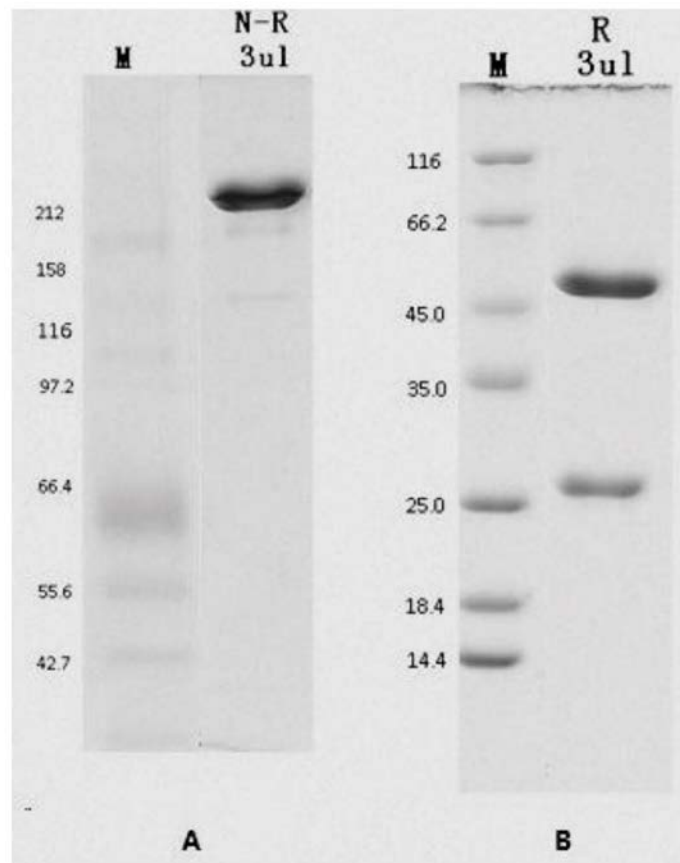


图6

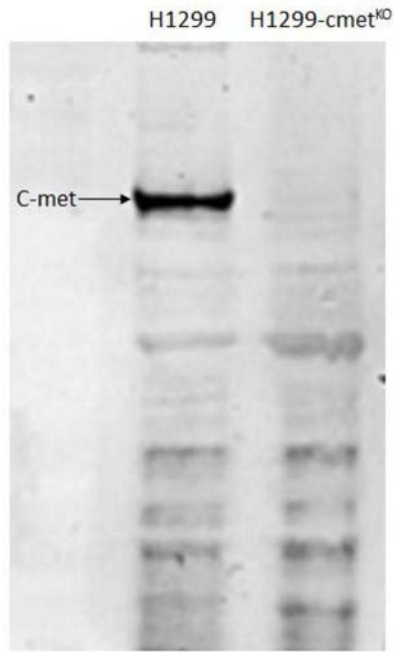


图7