



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113637073 B

(45) 授权公告日 2024.04.12

(21) 申请号 202010394296.5

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.11

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/02 (2006.01)

申请公布号 CN 113637073 A

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.11.12

(73) 专利权人 上海赛比曼生物科技有限公司

地址 201210 上海市浦东新区(上海)自由贸易试验区法拉第路85号3号楼

(72) 发明人 黄家琪 姚意弘 朱恃贵 姚昕

季昀 薛威 魏雨恬 陈骋
张朝璨

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 黄革生

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

(56) 对比文件

IN 201617034864 A, 2017.02.24

CA 3070539 A1, 2019.02.07

CN 105777911 A, 2016.07.20

CN 108350076 A, 2018.07.31

高晓云等.血清B细胞成熟抗原在多发性骨髓瘤中的研究现状.《临床血液学杂志》.2020,(第03期),第77-80页.

B细胞成熟抗原的抗肿瘤免疫治疗研究进展.《药物生物技术》.2018,第25卷(第01期),第1-6页.

S.F. Marino等.A complex water network contributes to high-affinity binding in an antibody-antigen interface.《Data in Brief》.2016,第6卷第394-397页.

审查员 关维

权利要求书2页 说明书39页

序列表39页 附图18页

(54) 发明名称

BCMA抗体及其制备和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种BCMA抗体及其制备和应用。具体地,本发明提供了一种BCMA单克隆抗体,以及利用该抗体制备的嵌合抗原受体和免疫细胞。本发明还提供了抗体以及免疫细胞的制备方法和应用。本发明的BCMA单克隆抗体可识别可溶性和细胞膜表面的人BCMA分子胞外段。并且,本发明的嵌合抗原受体对BCMA阳性的靶细胞具有不同的反应活性,并对靶细胞具有较好的特异性杀伤能力。

1. 一种抗BCMA抗体,其特征在于,
 - (1) 所述抗体包含:
由SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列编码的重链可变区和由SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列编码的轻链可变区,
由SEQ ID NO:26所示的核苷酸序列编码的重链可变区和由SEQ ID NO:27所示的核苷酸序列编码的轻链可变区,或
由SEQ ID NO:30所示的核苷酸序列编码的重链可变区和由SEQ ID NO:31所示的核苷酸序列编码的轻链可变区;或者,
 - (2) 所述抗体包含:
氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:42所示的轻链;或者,
 - (3) 所述抗体包含:
氨基酸序列如SEQ ID NO:56所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示的轻链可变区,
氨基酸序列如SEQ ID NO:64所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:63所示的轻链可变区,或
氨基酸序列如SEQ ID NO:68所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示的轻链可变区。
2. 一种重组蛋白,其特征在于,所述的重组蛋白包括如权利要求1所述的抗体。
3. 如权利要求2所述的重组蛋白,其特征在于,所述的重组蛋白还包括协助表达和/或纯化的标签序列。
4. 一种嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白,其特征在于,其从N末端到C末端包含:
 - (i) 靶向BCMA的scFv,
 - (ii) 跨膜结构域,
 - (iii) 至少一个共刺激域,和
 - (iv) 激活域;其中,所述的靶向BCMA的scFv包含:
氨基酸序列如SEQ ID NO:56所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:55所示的轻链可变区;
氨基酸序列如SEQ ID NO:64所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:63所示的轻链可变区;或
氨基酸序列如SEQ ID NO:68所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:67所示的轻链可变区。
5. 一种多核苷酸,其特征在于,所述多核苷酸编码选自下组的多肽:
 - (1) 如权利要求1所述的抗体;
 - (2) 如权利要求2或3所述的重组蛋白;和
 - (3) 如权利要求4所述的嵌合抗原受体融合蛋白。
6. 一种载体,其特征在于,所述载体含有权利要求5中任一项所述的多核苷酸。
7. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有权利要求6所述的载

体、或基因组中整合有外源的权利要求5所述的多核苷酸、或表达权利要求1所述的抗体、或表达权利要求2或3所述的重组蛋白、或表达权利要求4所述的嵌合抗原受体融合蛋白。

8. 一种抗体偶联物,其特征在于,该抗体偶联物含有:

(a) 抗体部分,所述抗体部分选自下组:如权利要求1所述的抗体;和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

9. 一种制备工程化细胞的方法,其特征在于,所述的工程化细胞表达权利要求1所述的抗体、权利要求2或3所述的重组蛋白、或权利要求4所述的嵌合抗原受体融合蛋白,包括以下步骤:将权利要求5所述的多核苷酸或权利要求6所述的载体转导入宿主细胞内,从而获得所述的工程化细胞。

10. 一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含权利要求1所述的抗体、权利要求2或3所述的重组蛋白、权利要求4所述的CAR融合蛋白、权利要求6所述的载体、权利要求7所述的宿主细胞、或权利要求8所述的抗体偶联物,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

11. 一种活性成分的用途,其特征在于,所述活性成分选自下组:权利要求1所述的抗体、权利要求2或3所述的重组蛋白、权利要求4所述的CAR融合蛋白、权利要求6所述的载体、权利要求7所述的宿主细胞、或权利要求8所述的抗体偶联物,用于(a)制备诊断多发性骨髓瘤的试剂或试剂盒;和/或(b)制备预防和/或治疗多发性骨髓瘤的药物或制剂。

BCMA抗体及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,更具体地涉及一种BCMA抗体及其制备和应用。

背景技术

[0002] 多发性骨髓瘤(MM)是仅次于非霍奇金淋巴瘤的第二大常见血液学恶性肿瘤。近年来,尽管在化疗、蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂(沙利度胺衍生物)和CD38靶向抗体方面取得了很大的进展,但几乎所有患者最终仍会复发。因此,对新治疗方案存在着迫切需求。

[0003] B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen,BCMA)又称为肿瘤坏死因子受体超家族17,是广泛表达于成熟B细胞上的膜蛋白。BCMA的一个重要特点是它在所有MM细胞上高度表达,而且它不在其它正常组织中表达(除了浆细胞)。因此,这一靶点已经成为多家医药公司和研究机构开发治疗复发或难治性多发性骨髓瘤(R/R MM患者)的热门靶点。

[0004] 目前,针对BCMA靶点开发的免疫疗法主要分为3大类:嵌合抗原受体T细胞疗法(CAR-T,新基/蓝鸟生物、诺华为代表)、双特异性抗体(BsAb,安进为代表)、抗体药物偶联物(ADC,GSK为代表)。在CAR-T疗法方面,新基和蓝鸟生物联合开发的bb2121已经进入3期临床阶段,有望成为首款获批的靶向BCMA的CAR-T细胞疗法。靶向BCMA的双特异性抗体都属于双特异性T细胞接合器,它们一端与BCMA抗原结合,另一端与T细胞表面的CD3 T细胞受体结合,从而将T细胞募集到肿瘤细胞周围杀伤肿瘤细胞。目前,安进的AMG-420在临床开发方面处于领先地位。在去年ASH年会上首次公布的临床数据表明,AMG-420在治疗R/R MM患者时,最佳剂量可达到70%的ORR。在抗体偶联药物方面,葛兰素史克(GSK)公司的GSK-2857916在多项临床试验中治疗不同类型的MM患者。其中,作为3/4线疗法治疗R/R MM患者的关键性临床试验已经获得了中期结果,近日在《Blood Cancer Journal》上发表的结果表明,GSK-2857916治疗的患者ORR为60%,完全缓解率达到15%,无进展生存期达到12个月。GSK公司预计在今年年底前获得支持监管申请的关键性数据。

[0005] 然而,目前可用于R/R MM患者治疗选择的治疗方法仍然很有限,本领域仍需开发新的用于R/R MM患者治疗的药物和方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种BCMA抗体及其制备和应用。

[0007] 在本发明的第一方面,提供了一种抗BCMA抗体,所述抗体包含由SEQ ID NO:1、3、5、7、9、10、11、12、14、15、16、17、19、20、21、22、24、26、28、30、32、34、37所示的核苷酸序列编码的重链可变区和由SEQ ID NO:2、4、6、8、13、18、23、25、27、29、31、33、35、36、38所示的核苷酸序列编码的轻链可变区;

[0008] 或者,所述抗体包含氨基酸序列如SEQ ID NO:39、41、43、45、47、49所示的重链和氨基酸序列如SEQ ID NO:40、42、44、46、48、50、51所示的轻链;

[0009] 或者,所述抗体包含氨基酸序列如SEQ ID NO:54、56、58、60、62、64、66、68、70所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:53、55、57、59、61、63、65、67、69所示的轻链可变

区；

[0010] 其中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留BCMA结合亲和力的衍生序列。

[0011] 在另一优选例中,所述抗体包含选自下组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

杂交瘤编号	编码重链可变区的核苷酸序列	编码轻链可变区的核苷酸序列
6G10-1D7 (CP01)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
99B3G3(CP02)	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
102A12H6	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
105C10F1(CP03)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
107A11F1	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 10	
	SEQ ID NO: 11	
	SEQ ID NO: 12	
107B11E1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 18
	SEQ ID NO: 15	
	SEQ ID NO: 16	
	SEQ ID NO: 17	
[0012] 107A9A4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 23
	SEQ ID NO: 20	
	SEQ ID NO: 21	
	SEQ ID NO: 22	
113B3F12	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
100H2D12C6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
109C5F3C1(CP06)	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
143D6F4(CP07)	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
151A9A4(CP08)	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
152D8E8(CP09)	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
107A11F1B7(CP04)	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107A9A4D2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107B11E1D7(CP05)	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
[0013] 97B8G8D12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4;

[0014] 较佳地,所述的抗体为鼠源抗体。

[0015] 在另一优选例中,所述抗体包含氨基酸序列选自下组的重链和轻链:

杂交瘤编号	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
6G10-1D7 (CP01)	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO.:40
99B3G3(CP02)	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42
105C10F1(CP03)	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44
113B3F12	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
107B11E1D7(CP05)	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
107A9A4D2	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50
		SEQ ID NO: 51;

[0017] 较佳地,所述的抗体为嵌合抗体。

[0018] 在另一优选例中,所述抗体包含氨基酸序列选自下组的重链可变区和轻链可变区:

抗体编号	重链可变区的氨基酸序列	轻链可变区的氨基酸序列
CP01	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO.:53
CP02	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 55
CP03	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 57
CP04	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 59
CP05	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 61
CP06	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 63
CP07	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 65
CP08	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 67
CP09	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 69;

[0020] 较佳地,所述的抗体为单链抗体。

[0021] 在另一优选例中,所述抗体结合于人BCMA蛋白和/或食蟹猴BCMA蛋白。

[0022] 在另一优选例中,所述抗体结合于BCMA蛋白的胞外段。

[0023] 在另一优选例中,所述抗体不与肿瘤坏死因子受体超家族13B结合。

[0024] 在另一优选例中,所述的抗体还包括重链恒定区和/或轻链恒定区。

[0025] 在另一优选例中,所述重链恒定区为人源或鼠源的。

[0026] 在另一优选例中,所述重链恒定区为人源抗体重链IgG1恒定区。

[0027] 在另一优选例中,所述轻链恒定区为人源或鼠源的。

[0028] 在另一优选例中,所述轻链恒定区为人源抗体轻链kappa恒定区。

[0029] 在另一优选例中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为1-5个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)。

[0030] 在另一优选例中,所述的经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留BCMA结合亲和力的衍生序列为同源性或序列相同性为至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列。

[0031] 在另一优选例中,所述的抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗

体、或其组合。

[0032] 在另一优选例中,所述的嵌合抗体在人中的免疫原性Z1与非嵌合的抗体(如鼠源抗体)在人中的免疫原性Z0之比($Z1/Z0$)为0-0.5,较佳地0-0.2,更佳地0-0.05(如0.001-0.05)。

[0033] 在另一优选例中,所述的抗体是部分或全人源化、或全人的单克隆抗体。

[0034] 在另一优选例中,所述的抗体为双链抗体、或单链抗体。

[0035] 在另一优选例中,所述抗体为抗体全长蛋白、或抗原结合片段。

[0036] 在另一优选例中,所述抗体为双特异性抗体、或多特异性抗体。

[0037] 在另一优选例中,所述的抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0038] 在本发明的第二方面,提供了一种重组蛋白,所述的重组蛋白包括:

[0039] (i) 如本发明第一方面所述的抗体;以及

[0040] (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

[0041] 在另一优选例中,所述的标签序列包括6His标签。

[0042] 在另一优选例中,所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

[0043] 在另一优选例中,所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

[0044] 在本发明的第三方面,提供了一种嵌合抗原受体(CAR)融合蛋白,其从N末端到C末端包含:

[0045] (i) 靶向BCMA的scFv,

[0046] (ii) 跨膜结构域,

[0047] (iii) 至少一个共刺激域,和

[0048] (iv) 激活域;

[0049] 其中,所述的靶向BCMA的scFv包含氨基酸序列如SEQ ID NO:54、56、58、60、62、64、66、68、70所示的重链可变区和氨基酸序列如SEQ ID NO:53、55、57、59、61、63、65、67、69所示的轻链可变区。

[0050] 在另一优选例中,所述的scFv包含氨基酸序列选自下组的重链可变区和轻链可变区:

抗体编号	重链可变区的氨基酸序列	轻链可变区的氨基酸序列
CP01	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO.:53
CP02	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 55
CP03	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 57
[0051] CP04	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 59
CP05	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 61
CP06	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 63
CP07	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 65
CP08	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 67
CP09	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 69。

[0052] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体融合蛋白具有下式I结构:

- [0053] L-scFv-H-TM-C-CD3 ζ (I)
- [0054] 式中,
- [0055] 各“-”独立地为连接肽或肽键;
- [0056] L为任选的信号肽序列;
- [0057] scFv为靶向BCMA的scFv;
- [0058] H为任选的铰链区;
- [0059] TM为跨膜结构域;
- [0060] C为共刺激信号分子;
- [0061] CD3 ζ 为CD3 ζ 胞浆信号传导序列。
- [0062] 在另一优选例中,所述的L为选自下组蛋白的信号肽:CD8、GM-CSF、CD4、CD137、或其组合。
- [0063] 在另一优选例中,所述的L为CD8来源的信号肽。
- [0064] 在另一优选例中,所述信号肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示。
- [0065] 在另一优选例中,所述的scFv具有下式II或III结构:
- [0066] VL-L1-VH(II)
- [0067] VH-L2-VL(III)
- [0068] 式中,
- [0069] VL为重链可变区;
- [0070] VH为轻链可变区;
- [0071] L1和L2各自独立地为连接肽。
- [0072] 在另一优选例中,所述连接肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:71所示。
- [0073] 在另一优选例中,所述的H为选自下组蛋白的铰链区:CD8、CD28、CD137、或其组合。
- [0074] 在另一优选例中,所述的H为CD8来源的铰链区。
- [0075] 在另一优选例中,所述铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:72所示。
- [0076] 在另一优选例中,所述的TM为选自下组的蛋白的跨膜区:CD28、CD3 epsilon、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、或其组合。
- [0077] 在另一优选例中,TM包括CD8来源的跨膜区。
- [0078] 在另一优选例中,所述跨膜区的氨基酸序列如SEQ ID NO:73所示。
- [0079] 在另一优选例中,所述的C为选自下组的蛋白的共刺激信号分子:OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD134、4-1BB(CD137)、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、NKG2D、GITR、TLR2、或其组合。
- [0080] 在另一优选例中,C包括4-1BB来源的共刺激信号分子。
- [0081] 在另一优选例中,所述共刺激信号分子的氨基酸序列如SEQ ID NO:74所示。
- [0082] 在另一优选例中,所述CD3 ζ 胞浆信号传导序列如SEQ ID NO:75所示。
- [0083] 在本发明的第四方面,提供了一种多核苷酸,所述多核苷酸编码选自下组的多肽:
- [0084] (1) 如本发明第一方面所述的抗体;
- [0085] (2) 如本发明第二方面所述的重组蛋白;和
- [0086] (3) 如本发明第三方面所述的嵌合抗原受体融合蛋白。

[0087] 在另一优选例中,编码所述抗体的重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO.1、3、5、7、9、10、11、12、14、15、16、17、19、20、21、22、24、26、28、30、32、34、37所示;和/或编码所述抗体的轻链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:2、4、6、8、13、18、23、25、27、29、31、33、35、36、38所示。

[0088] 在另一优选例中,编码所述重链可变区序列的多核苷酸和编码所述轻链可变区序列的多核苷酸选自下组:

杂交瘤编号	编码重链可变区的核苷酸序列	编码轻链可变区的核苷酸序列
6G10-1D7 (CP01)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO.:2
99B3G3(CP02)	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
102A12H6	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
105C10F1(CP03)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
107A11F1	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 10	
	SEQ ID NO: 11	
	SEQ ID NO: 12	
107B11E1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 18
	SEQ ID NO: 15	
	SEQ ID NO: 16	
	SEQ ID NO: 17	
[0089] 107A9A4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 23
	SEQ ID NO: 20	
	SEQ ID NO: 21	
	SEQ ID NO: 22	
113B3F12	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
100H2D12C6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
109C5F3C1(CP06)	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
143D6F4(CP07)	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
151A9A4(CP08)	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
152D8E8(CP09)	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
107A11F1B7(CP04)	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107A9A4D2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107B11E1D7(CP05)	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
97B8G8D12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4。

[0090] 在本发明的第五方面,提供了一种载体,所述载体含有本发明第四方面中任一项

所述的多核苷酸。

[0091] 在另一优选例中,所述的载体包括:细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

[0092] 在另一优选例中,所述的载体包括慢病毒载体。

[0093] 在本发明的第六方面,提供了一种遗传工程化的宿主细胞,所述宿主细胞含有本发明第五方面所述的载体、或基因组中整合有外源的本发明第四方面所述的多核苷酸、或表达本发明第一方面所述的抗体、或表达本发明第二方面所述的重组蛋白、或表达本发明第三方面所述的嵌合抗原受体融合蛋白。

[0094] 在另一优选例中,所述细胞为分离的细胞,和/或所述细胞为基因工程化的细胞。

[0095] 在另一优选例中,所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物(如鼠)。

[0096] 在另一优选例中,所述细胞包括T细胞、NK细胞。

[0097] 在另一优选例中,所述的宿主细胞为工程化的免疫细胞。

[0098] 在另一优选例中,所述的工程化的免疫细胞包括T细胞或NK细胞,较佳地为(i)嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞);或(ii)嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞)。

[0099] 在本发明的第七方面,提供了一种抗体偶联物,该抗体偶联物含有:

[0100] (a) 抗体部分,所述抗体部分选自下组:如本发明第一方面所述的抗体;和

[0101] (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

[0102] 在另一优选例中,所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

[0103] 在另一优选例中,所述的抗体偶联物为抗体药物偶联物。

[0104] 在本发明的第八方面,提供了一种制备工程化细胞的方法,所述的工程化细胞表达本发明第一方面所述的抗体、本发明第二方面所述的重组蛋白、或本发明第三方面所述的嵌合抗原受体融合蛋白,包括以下步骤:将本发明第四方面所述的多核苷酸或本发明第五方面所述的载体转导入宿主细胞内,从而获得所述的工程化细胞。

[0105] 在另一优选例中,所述的方法还包括对获得的工程化细胞进行功能和有效性检测的步骤。

[0106] 在本发明的第九方面,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明第一方面所述的抗体、本发明第二方面所述的重组蛋白、本发明第三方面所述的CAR融合蛋白、本发明第五方面所述的载体、本发明第六方面所述的宿主细胞、或本发明第七方面所述的抗体偶联物,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0107] 在另一优选例中,所述的药物组合物为液态制剂。

[0108] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂。

[0109] 在另一优选例中,所述的药物组合物还包含抗肿瘤的第三活性成分,较佳地包括第二抗体、或化疗剂。

[0110] 在另一优选例中,所述的化疗剂选自下组:多西他赛、卡铂、或其组合。

[0111] 在本发明的第十方面,提供了一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:本发明第一方面所述的抗体、本发明第二方面所述的重组蛋白、本发明第三方面所述的CAR融合蛋白、本发明第五方面所述的载体、本发明第六方面所述的宿主细胞、或本发明第七方面所

述的抗体偶联物,用于(a)制备诊断试剂或试剂盒;和/或(b)制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

[0112] 在另一优选例中,所述的肿瘤为BCMA阳性肿瘤。

[0113] 在另一优选例中,所述肿瘤选自下组:血液肿瘤、实体瘤、或其组合。

[0114] 在另一优选例中,所述血液肿瘤选自下组:急性髓细胞白血病(AML)、多发性骨髓瘤(MM)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴白血病(ALL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、或其组合。

[0115] 在另一优选例中,所述实体瘤选自下组:胃癌、胃癌腹膜转移、肝癌、肾脏肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、宫颈癌、卵巢癌、淋巴瘤、鼻咽癌、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、脑胶质瘤、子宫内膜癌、睾丸癌、结直肠癌、尿路肿瘤、甲状腺癌、或其组合。

[0116] 在另一优选例中,所述肿瘤为多发性骨髓瘤。

[0117] 在另一优选例中,所述的诊断试剂为检测片或检测板。

[0118] 在另一优选例中,所述诊断试剂或试剂盒用于:

[0119] (1)检测样品中BCMA蛋白;和/或

[0120] (2)检测肿瘤细胞中内源性的BCMA蛋白;和/或

[0121] (3)检测表达BCMA蛋白的肿瘤细胞。

[0122] 在本发明的第十一方面,提供了一种体外检测(包括诊断性或非诊断性)样品中BCMA蛋白的方法,所述方法包括步骤:

[0123] (1)在体外,将所述样品与本发明第一方面所述的抗体、本发明第二方面所述的重组蛋白、或本发明第七方面所述的抗体偶联物接触;

[0124] (2)检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在BCMA蛋白。

[0125] 在本发明的第十二方面,提供了一种检测板,所述的检测板包括:基片(支撑板)和测试条,所述的测试条含有本发明第一方面所述的抗体、本发明第二方面所述的重组蛋白、或本发明第七方面所述的抗体偶联物、或其组合。

[0126] 在本发明的第十三方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒中包括:

[0127] (1)第一容器,所述第一容器中含有本发明第一方面所述的抗体;和/或

[0128] (2)第二容器,所述第二容器中含有抗本发明第一方面所述抗体的二抗;

[0129] 或者,

[0130] 所述试剂盒含有本发明第十二方面所述的检测板。

[0131] 在本发明的第十四方面,提供了一种重组多肽的制备方法,该方法包括:

[0132] (a)在适合表达的条件下,培养本发明第六方面所述的宿主细胞;

[0133] (b)从培养物中分离出重组多肽,所述的重组多肽是本发明第一方面所述的抗体或本发明第二方面所述的重组蛋白。

[0134] 在本发明的第十五方面,提供了一种治疗疾病的方法,向有需要的对象施用有效量的本发明第一方面所述的抗体、或本发明第二方面所述的重组蛋白、或本发明第七方面所述的抗体偶联物、或本发明第六方面所述的宿主细胞、或本发明第九方面所述的药物组合物、或其组合。

[0135] 在另一优选例中,所述疾病为BCMA阳性肿瘤。

[0136] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0137] 图1显示ELISA分析第一次加强免疫后小鼠血清和hBCMA-ECD-Fc及cynoBCMA-ECD-Fc结合效价。

[0138] 图2显示流式细胞术分析第一次加强免疫后小鼠血清和K562-BCMA+及K562细胞结合效价。

[0139] 图3显示ELISA分析第二次加强免疫后小鼠血清和hBCMA-ECD-Fc及cynoBCMA-ECD-Fc结合效价。

[0140] 图4显示流式细胞术分析第二次加强免疫后小鼠血清和K562-BCMA+及K562细胞结合效价。

[0141] 图5显示ELISA分析第三次加强免疫后小鼠血清和hBCMA-ECD-Fc及cynoBCMA-ECD-Fc结合效价。

[0142] 图6显示流式细胞术分析第三次加强免疫前后小鼠血清和L-BCMA+及L细胞结合效价。

[0143] 图7显示杂交瘤细胞筛选流程(所有挑选的克隆均不与NC-Fc结合)。

[0144] 图8显示小批量生产纯化抗体SDS-PAGE分析。

[0145] 图9显示ELISA分析杂交瘤抗体与hBCMA-ECD-Fc结合能力。

[0146] 图10显示ELISA分析杂交瘤抗体与cynoBCMA-ECD-Fc结合能力。

[0147] 图11显示ELISA分析杂交瘤抗体与hTACI-ECD-Fc结合能力。

[0148] 图12显示流式细胞术分析杂交瘤抗体与L-BCMA+细胞的结合能力。

[0149] 图13显示流式细胞术分析杂交瘤抗体与L细胞的结合能力。

[0150] 图14显示流式细胞术分析可溶性BCMA竞争性结合mAb001。

[0151] 图15显示ELISA分析嵌合抗体与hBCMA-ECD-Fc结合活性。

[0152] 图16显示流式细胞术分析嵌合抗体与L-BCMA+和L细胞结合活性。

[0153] 图17显示了靶向人BCMA嵌合型抗原受体工程化T细胞转染效率的检测。重组人BCMA蛋白Fc段染色方法鉴定培养到第7天的CART-BCMA_s细胞中CAR基因编码蛋白在T细胞膜表面的表达水平。

[0154] 图18显示流式细胞术检测T细胞膜表面CD137的表达水平。

[0155] 图19显示ELISA方法检测培养上清中IFN γ 的分泌水平。

[0156] 图20显示了RTCA实时无标记细胞分析检测CART-BCMA_s对靶细胞的杀伤作用。分别与BCMA阳性的A549-BCMA-1D6肿瘤细胞系,猴BCMA阳性的A549-BCMA-M肿瘤细胞系,以及BCMA阴性的A549肿瘤细胞系,在200 μ l CBMG-RC-09a培养基中按照不同效靶比共培养培养8h后计算得到杀伤率。

具体实施方式

[0157] 本发明人经过广泛而深入地研究,经过大量筛选,意外地获得一种抗BCMA单克隆抗体。本发明还提供了靶向BCMA嵌合抗原受体结构的构建、靶向BCMA嵌合抗原受体工程化T细胞的制备方法及其活性鉴定。具体地,发明人成功筛选到9株杂交瘤细胞(6G10-1D7、99B3G3、105C10F1、113B3F12、109C5F3C1、143D6F4、151A9A4、107B11E1D7和107A9A4D2),其分泌的抗体均可识别可溶性和细胞膜表面的人BCMA分子胞外段。除了105C10F1和113B3F12,其余7株细胞分泌的抗体还可以交叉识别可溶性食蟹猴BCMA分子胞外段。发明人还采用以上筛选得到的9个抗体的轻链和重链分别构建了18个嵌合抗原受体(CAR),这些CAR对于BCMA阳性的靶细胞具有不同的反应活性,并对靶细胞具有较好的特异性杀伤能力。

[0158] 具体地,本申请使用人BCMA分子胞外段(Met1-Ala54)和人IgG1 Fc段(Pro100-Lys330)的融合蛋白(hBCMA-ECD-Fc)免疫小鼠,利用杂交瘤技术筛选抗人BCMA的单克隆抗体。该抗体须能交叉识别食蟹猴BCMA(cynoBCMA-ECD-Fc),且不识别肿瘤坏死因子受体超家族13B(TACI,该受体与BCMA有共同的配体)。

[0159] 抗体

[0160] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0161] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0162] 脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0163] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相

互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0164] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0165] 在本发明中,抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体,例如嵌合的和人源化的单克隆抗体,包括人的和非人的部分,可以通过标准的DNA重组技术获得,它们都是有用的抗体。嵌合抗体是一个分子,其中不同的部分来自不同的动物种,例如具有来自鼠的单克隆抗体的可变区,和来自人免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体(见例如美国专利4,816,567和美国专利4,816,397,在此通过引用方式整体引入本文)。人源化的抗体是指来源于非人物种的抗体分子,具有一个或多个来源于非人物种的互补决定区(CDRs)和来源于人免疫球蛋白分子的框架区域(见美国专利5,585,089,在此通过引用方式整体引入本文)。这些嵌合和人源化的单克隆抗体可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

[0166] 在本发明中,抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

[0167] 在本发明中,本发明的抗体还包括其保守性变异体,指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0168] 表A

[0169]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe

Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu
---------	---------------------	-----

[0170] 抗BCMA抗体

[0171] 本发明提供一种针对BCMA的高特异性和高亲和力的抗体,其包括重链和轻链,所述重链含有重链可变区 (VH) 氨基酸序列,所述轻链含有轻链可变区 (VL) 氨基酸序列。

[0172] 在另一优选例中,所述抗体包含选自下组的核苷酸序列编码的重链可变区和轻链可变区:

杂交瘤编号	编码重链可变区的核苷酸序列	编码轻链可变区的核苷酸序列
6G10-1D7 (CP01)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
99B3G3(CP02)	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
102A12H6	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
105C10F1(CP03)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
107A11F1	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 10	
	SEQ ID NO: 11	
	SEQ ID NO: 12	
107B11E1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 18
	SEQ ID NO: 15	
	SEQ ID NO: 16	
	SEQ ID NO: 17	
[0173] 107A9A4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 23
	SEQ ID NO: 20	
	SEQ ID NO: 21	
	SEQ ID NO: 22	
113B3F12	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
100H2D12C6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
109C5F3C1(CP06)	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
143D6F4(CP07)	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
151A9A4(CP08)	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
152D8E8(CP09)	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
107A11F1B7(CP04)	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107A9A4D2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107B11E1D7(CP05)	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
97B8G8D12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4;

[0174] 较佳地,所述的抗体为鼠源抗体。

[0175] 在另一优选例中,所述抗体包含氨基酸序列选自下组的重链和轻链:

杂交瘤编号	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
[0176] 6G10-1D7 (CP01)	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO.:40
99B3G3(CP02)	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42
105C10F1(CP03)	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44

[0177] 113B3F12	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 46
107B11E1D7(CP05)	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48
107A9A4D2	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 50
		SEQ ID NO: 51;

[0178] 较佳地,所述的抗体为嵌合抗体。

[0179] 在另一优选例中,所述抗体包含氨基酸序列选自下组的重链可变区和轻链可变区:

抗体编号	重链可变区的氨基酸序列	轻链可变区的氨基酸序列
[0180] CP01	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO.:53
CP02	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 55
CP03	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 57
CP04	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 59
CP05	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 61
CP06	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 63
CP07	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 65
CP08	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 67
CP09	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 69;

[0181] 较佳地,所述的抗体为单链抗体。

[0182] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留BCMA结合亲和力的衍生序列。

[0183] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。更优选地,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,可以是1-7个,更优选为1-5个,更优选为1-3个,更优选为1-2个。

[0184] 本发明的抗体可以是双链或单链抗体,并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体,更优选为全人源化抗体。

[0185] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')₂或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

[0186] 其中,所述动物优选为哺乳动物,如鼠。

[0187] 本发明抗体可以是靶向人BCMA的嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗

体。

[0188] 具体地,在本申请的实施例中,进行了四轮杂交瘤细胞融合,共挑选了14个杂交瘤细胞(6G10-1D7、99B3G3、102A12H6、107A11F1、107A9A4、107B11E1、100H2D12C6、105C10F1、113B3F12、109C5F3C1、97B8G8D12、143D6F4、151A9A4和152D8E8)进行抗体小批量生产纯化,其中,97B8G8D12抗体生产失败,剩余13个克隆均成功得到相应抗体。除了152D8E8(CP09),剩余12个杂交瘤抗体均可与可溶性人BCMA分子胞外段结合;除了105C10F1(CP03)、152D8E8(CP09)和113B3F12,剩余10个杂交瘤抗体均可交叉识别可溶性食蟹猴BCMA分子胞外段;除了102A12H6和152D8E8(CP09),剩余11个杂交瘤抗体均可识别细胞表面的人BCMA分子胞外段。

[0189] 一共对17株杂交瘤细胞进行了抗体可变区测序。12株杂交瘤细胞测序为单克隆:6G10-1D7、99B3G3、102A12H6、100H2D12C6、105C10F1、113B3F12、109C5F3C1、97B8G8D12、143D6F4、151A9A4、152D8E8和107B11E1D7,其中99B3G3、100H2D12C6和97B8G8D12的抗体可变区序列相同。5株杂交瘤细胞测序为多克隆:107A11F1、107A9A4、107B11E1、107A9A4D2和107A11F1B7,其中107A11F1、107A9A4和107B11E1各有4条重链和一条轻链;107A9A4D2和107A11F1B7各有一条重链和两条轻链,且二者序列相同。从中挑选5株单克隆杂交瘤细胞(6G10-1D7、99B3G3、105C10F1、113B3F12和107B11E1D7)和1株多克隆杂交瘤细胞(107A9A4D2)进行嵌合抗体表达。其中107A9A4D2VH分别与107A9A4D2VL-1和107A9A4D2VL-2配对表达。ELISA和流式细胞术检测结果表明,杂交瘤6G10-1D7、99B3G3、105C10F1和107B11E1D7的嵌合抗体与可溶性和细胞表面的人BCMA分子胞外段均有结合。杂交瘤107A9A4D2的重链107A9A4D2VH与轻链107A9A4D2VL-2配对的嵌合抗体与可溶性和细胞表面的人BCMA分子胞外段均有结合,107A9A4D2VH与107A9A4D2VL-1配对的嵌合抗体与可溶性和细胞表面的人BCMA分子胞外段均不结合。

[0190] 抗体的制备

[0191] 本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术,比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外,还可将轻链和重链的编码序列融合在一起,形成单链抗体。

[0192] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0193] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0194] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0195] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0196] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但并不限于):CHO-S、HEK-293细胞。

[0197] 通常,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤,如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得

到本发明的抗体。

[0198] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如,单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用Munson等,Anal.Biochem.,107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

[0199] 本发明的抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0200] 抗体-药物偶联物(ADC)

[0201] 本发明还提供了基于本发明抗体的抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)。

[0202] 典型地,所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子,所述抗体与所述效应分子偶联,并优选为化学偶联。其中,所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外,所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

[0203] 本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物,如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂(如顺乌头酸酐)、酰基脲类偶联剂(偶联位点为酰基脲)中的任意一种或几种。

[0204] 抗体上某些残基(如Cys或Lys等)用于与多种功能基团相连,其中包括成像试剂(例如发色基团和荧光基团),诊断试剂(例如MRI对比剂和放射性同位素),稳定剂(例如乙二醇聚合物)和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂(例如药物,检测试剂,稳定剂)被偶联(共价连接)至抗体上。功能剂可以直接地、或者是通过接头间接地连接于抗体。

[0205] 抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(ADCs)。典型地,ADC包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解,例如在目标位点处接头发生降解,从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括,例如酶降解的接头,其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头,或者糖接头例如,可以被葡萄糖苷酸酶降解的含葡萄糖苷酸的接头。肽基接头可以包括,例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括,例如,pH敏感接头(例如pH小于5.5时水解的接头,例如脲接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

[0206] 连接到抗体之前,接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团,连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的,并包括:例如马来酰亚胺类化合物,卤代酰胺(例如碘、溴或氯代的);卤代酯(例如碘、溴或氯代的);卤代甲基酮(例如碘、溴或氯代),苄基卤代物(例如碘、溴或氯代的);乙烯基砜,吡啶基二硫化物;汞衍生物例如

3,6-二-(汞甲基)二氧六环,而对离子是醋酸根、氯离子或者硝酸根;和聚亚甲基二甲基硫醚硫代磺酸盐。接头可以包括,例如,通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

[0207] 药物可以是任何细胞毒性,抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中,接头连接抗体和药物,而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如,药物可以具有可以和连接物成键的氨基,羧基,巯基,羟基,或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在连接到抗体之前,具有反应的活性基团。

[0208] 有用的药物类别包括,例如,抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs),吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))和长春花生物碱(vinca alkaloids)。

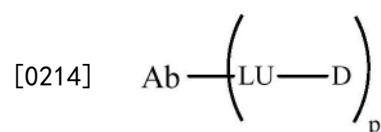
[0209] 在本发明中,药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成ADC。在其它实施方式中,双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成ADC。例如,半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应,并且在随后的步骤中,接头上的功能性基团与药物反应,从而形成ADC。

[0210] 通常,选择接头上功能性基团,以利于特异性地与药物部分上的合适的反应活性基团进行反应。作为非限制性的例子,基于叠氮化合物的部分可以用于特异性地与药物部分上的反应性炔基基团反应。药物通过叠氮和炔基之间的1,3-偶极环加成,从而共价结合于接头。其它的有用的功能性基团包括,例如酮类和醛类(适合与酰肼类和烷氧基胺反应),膦(适合与叠氮反应);异氰酸酯和异硫氰酸酯(适合与胺类和醇类反应);和活化的酯类,例如N-羟基琥珀酰亚胺酯(适合与胺类和醇类反应)。这些和其它的连接策略,例如在《生物偶联技术》,第二版(Elsevier)中所描述的,是本领域技术人员所熟知的。本领域技术人员能够理解,对于药物部分和接头的选择性反应,当选择了一个互补对的反应活性功能基团时,该互补对的每一个成员既可以用于接头,也可以用于药物。

[0211] 本发明还提供了制备ADC的方法,可进一步地包括:将抗体与药物-接头化合物,在足以形成抗体偶联物(ADC)的条件下进行结合。

[0212] 在某些实施方式中,本发明方法包括:在足以形成抗体-接头偶联物的条件下,将抗体与双功能接头化合物进行结合。在这些实施方式中,本发明方法还进一步地包括:在足以将药物部分通过接头共价连接到抗体的条件下,将抗体接头偶联物与药物部分进行结合。

[0213] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



[0215] 其中：

[0216] Ab是抗体，

[0217] LU是接头；

[0218] D是药物；

[0219] 而且下标p是选自1到8的值。

[0220] 嵌合抗原受体

[0221] 本发明的嵌合抗原受体 (CAR) 包括细胞外结构域、跨膜结构域、和细胞内结构域。胞外结构域包括靶-特异性结合元件 (也称为抗原结合结构域)。细胞内结构域包括共刺激信号传导区和 ζ 链部分。共刺激信号传导区指包括共刺激分子的细胞内结构域的一部分。共刺激分子为淋巴细胞对抗原的有效应答所需要的细胞表面分子,而不是抗原受体或它们的配体。

[0222] 在CAR的胞外结构域和跨膜结构域之间,或在CAR的胞浆结构域和跨膜结构域之间,可并入接头。如本文所用的,术语“接头”通常指起到将跨膜结构域连接至多肽链的胞外结构域或胞浆结构域作用任何寡肽或多肽。接头可包括0-300个氨基酸,优选地2至100个氨基酸和最优选地3至50个氨基酸。

[0223] 在本发明的一个较佳的实施方式中,本发明提供的CAR的胞外结构域包括靶向BCMA的抗原结合结构域。本发明的CAR当在T细胞中表达时,能够基于抗原结合特异性进行抗原识别。当其结合其关联抗原时,影响肿瘤细胞,导致肿瘤细胞不生长、被促使死亡或以其他方式被影响,并导致患者的肿瘤负荷缩小或消除。抗原结合结构域优选与来自共刺激分子和 ζ 链中的一个或多个的细胞内结构域融合。优选地,抗原结合结构域与4-1BB信号传导结构域、和CD3 ζ 信号结构域组合的细胞内结构域融合。

[0224] 如本文所用,“抗原结合结构域”“单链抗体片段”均指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')₂片段,或单一Fv片段。Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的,Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。抗原结合结构域通常是scFv (single-chain variable fragment)。scFv的大小一般是一个完整抗体的1/6。单链抗体优选是由一条核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。作为本发明的优选方式,所述scFv特异性识别BCMA。

[0225] 对于绞链区和跨膜区(跨膜结构域),CAR可被设计以包括融合至CAR的胞外结构域的跨膜结构域。在一个实施方式中,使用天然与CAR中的结构域之一相关联的跨膜结构域。在一些例子中,可选择跨膜结构域,或通过氨基酸置换进行修饰,以避免将这样的结构域结合至相同或不同的表面膜蛋白的跨膜结构域,从而最小化与受体复合物的其他成员的相互作用。

[0226] 本发明的CAR中的胞内结构域包括4-1BB的信号传导结构域和CD3 ζ 的信号传导结构域。

[0227] 基于本发明筛选得到的9个抗体的轻链和重链,发明人分别构建了18个嵌合抗原受体 (CAR),这些CAR对于BCMA阳性的靶细胞具有不同的反应活性,并对靶细胞具有较好的特异性杀伤能力。具体地,前述的9种抗体包含氨基酸序列选自下组的重链可变区和轻链可变区：

抗体编号	重链可变区的氨基酸序列	轻链可变区的氨基酸序列
CP01	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO.:53
CP02	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 55
CP03	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 57
[0228] CP04	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 59
CP05	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 61
CP06	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 63
CP07	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 65
CP08	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 67
CP09	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 69。

[0229] 在优选的实施方式中,本发明CAR的基因结构包括前导序列、抗原识别序列、连接区、跨膜区、共刺激因子信号区和CD3zeta信号传导区,连接顺序如下:

[0230] [CD8 LS]-[VL-Linker-VH]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]或

[0231] [CD8 LS]-[VH-Linker-VL]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]。

[0232] 本发明鉴定了不同CAR结构在病毒感染后细胞膜表面表达时间和表达强度的相关性,进而鉴定出不同CAR结构蛋白表达难易程度的差异,这一发现预示不同CAR结构在相同感染条件下CAR蛋白在膜表面的表达水平和CART体内活性持久性的差异。

[0233] 载体

[0234] 编码期望分子的核酸序列可利用在本领域中已知的重组方法获得,诸如例如通过从表达基因的细胞中筛选文库,通过从已知包括该基因的载体中得到该基因,或通过利用标准的技术,从包含该基因的细胞和组织中直接分离。可选地,感兴趣的基因可被合成生产。

[0235] 本发明也提供了其中插入本发明的表达盒的载体。源于逆转录病毒诸如慢病毒的载体是实现长期基因转移的合适工具,因为它们允许转基因长期、稳定的整合并且其在子细胞中增殖。慢病毒载体具有超过源自致癌逆转录病毒诸如鼠科白血病病毒的载体的优点,因为它们可转导非增殖的细胞,诸如肝细胞。它们也具有低免疫原性的优点。

[0236] 简单概括,通常可操作地连接本发明的表达盒或核酸序列至启动子,并将其并入表达载体。该载体适合于复制和整合真核细胞。典型的克隆载体包含可用于调节期望核酸序列表达的转录和翻译终止子、初始序列和启动子。

[0237] 本发明的表达构建体也可利用标准的基因传递方案,用于核酸免疫和基因疗法。基因传递的方法在本领域中是已知的。见例如美国专利号5,399,346、5,580,859、5,589,466,在此通过引用全文并入。在另一个实施方式中,本发明提供了基因疗法载体。

[0238] 该核酸可被克隆入许多类型的载体。例如,该核酸可被克隆入如此载体,其包括但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特定的感兴趣载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0239] 进一步地,表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold

Spring Harbor Laboratory, New York) 和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如,W001/96584;W001/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0240] 已经开发许多基于病毒的系统,用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如,逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用在本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多逆转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方式中,使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方式中,使用慢病毒载体。

[0241] 额外的启动子元件,例如增强子,可以调节转录开始的频率。通常地,这些位于起始位点上游的30-110bp区域中,尽管最近已经显示许多启动子也包含起始位点下游的功能元件。启动子元件之间的间隔经常是柔性的,以便当元件相对于另一个被倒置或移动时,保持启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间隔可被增加隔开50bp,活性才开始下降。取决于启动子,表现出单个元件可合作或独立地起作用,以启动转录。

[0242] 合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列为能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1 α (EF-1 α)。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地,本发明不应被限于组成型启动子的应用。诱导型启动子也被考虑为本发明的一部分。诱导型启动子的使用提供了分子开关,其能够当这样的表达是期望的时,打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达,或当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0243] 为了评估CAR多肽或其部分的表达,被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者,以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面,可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列,以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因,诸如neo等等。

[0244] 报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。通常地,报道基因为以下基因:其不存在于受体有机体或组织或由受体有机体或组织进行表达,并且其编码多肽,该多肽的表达由一些可容易检测的性质例如酶活性清楚表示。在DNA已经被引入受体细胞后,报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白的基因(例如,Ui-Tei等,2000FEBS Letters 479:79-82)。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。通常,显示最高水平的报道基因表达的具有最少5个侧翼区的构建体被鉴定为启动子。这样的启动子区可被连接至报道基因并用于评价试剂调节启动子-驱动转录的能力。

[0245] 将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。在表达载体的内容中,载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞,例如,哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如,表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

[0246] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。生产包括载体和/或外源核酸的细胞的方法在本领域中是公知的。见例如Sambrook等(2001,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。将多核苷酸引入宿主细胞的优选方法为磷酸钙转染。

[0247] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,特别是逆转录病毒载体,已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自慢病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。见例如美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0248] 将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠;和基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。用作体外和体内传递工具(delivery vehicle)的示例性胶体系统为脂质体(例如,人造膜囊)。

[0249] 在使用非病毒传递系统的情况下,示例性传递工具为脂质体。考虑使用脂质制剂,以将核酸引入宿主细胞(体外、离体(ex vivo)或体内)。在另一方面,该核酸可与脂质相关联。与脂质相关联的核酸可被封装入脂质体的水性内部中,散布在脂质体的脂双层内,经与脂质体和寡核苷酸两者都相关联的连接分子附接至脂质体,陷入脂质体,与脂质体复合,分散在包含脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质联合,作为悬浮液包含在脂质中,包含在胶束中或与胶束复合,或以其他方式与脂质相关联。与组合物相关联的脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体不限于溶液中的任何具体结构。例如,它们可存在于双分子层结构中,作为胶束或具有“坍塌的(collapsed)”结构。它们也可简单地被散布在溶液中,可能形成大小或形状不均一的聚集体。脂质为脂肪物质,其可为天然发生或合成的脂质。例如,脂质包括脂肪小滴,其天然发生在细胞质以及包含长链脂肪族烃和它们的衍生物诸如脂肪酸、醇类、胺类、氨基醇类和醛类的该类化合物中。

[0250] 在本发明的一个优选地实施方式中,所述载体为慢病毒载体。

[0251] CART的治疗性应用

[0252] 本发明包括用编码本发明表达盒的慢病毒载体(LV)转导的细胞(例如,T细胞)进行的治疗性应用。转导的T细胞可靶向肿瘤细胞的标志物BCMA,协同激活T细胞,引起T细胞免疫应答,从而显著提高其对肿瘤细胞的杀伤效率。

[0253] 因此,本发明也提供了刺激对哺乳动物的靶细胞群或组织的T细胞-介导的免疫应答的方法,其包括以下步骤:给哺乳动物施用本发明的CAR-T细胞。

[0254] 在一个实施方式中,本发明包括一类细胞疗法,分离病人自体T细胞(或者异源供体),激活并进行基因改造产生CAR-T细胞,随后注入同一病人体内。这种方式患移植物抗宿主病概率极低,抗原被T细胞以无MHC限制方式识别。此外,一种CAR-T就可以治疗表达该抗原的所有癌症。不像抗体疗法,CAR-T细胞能够体内复制,产生可导致持续肿瘤控制的长期持久性。

[0255] 在一个实施方式中,本发明的CAR-T细胞可经历稳固的体内T细胞扩展并可持续延长的时间量。另外,CAR介导的免疫应答可为过继免疫疗法步骤的一部分,其中CAR-修饰T细

胞诱导对CAR中的抗原结合结构域特异性的免疫应答。例如,抗BCMA的CAR-T细胞引起抗表达BCMA的细胞的特异性免疫应答。

[0256] 尽管本文公开的数据具体公开了包括抗-BCMAscFv、铰链和跨膜区、和4-1BB和CD3 ζ 信号传导结构域的慢病毒载体,但本发明应被解释为包括对构建体组成部分中的每一个的任何数量的变化。

[0257] 可治疗的癌症包括没有被血管化或基本上还没有被血管化的肿瘤,以及血管化的肿瘤。癌症可包括非实体瘤(诸如血液学肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可包括实体瘤。用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤,和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性瘤,例如肉瘤、癌和黑素瘤。也包括成人肿瘤/癌症和儿童肿瘤/癌症。

[0258] 血液学癌症为血液或骨髓的癌症。血液学(或血原性)癌症的例子包括白血病,包括急性白血病(诸如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞性、前髓细胞性、粒-单核细胞型、单核细胞性和红白血病)、慢性白血病(诸如慢性髓细胞(粒细胞性)白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤(无痛和高等级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、多毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0259] 实体瘤为通常不包含囊肿或液体区的组织的异常肿块。实体瘤可为良性或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名(诸如肉瘤、癌和淋巴瘤)。实体瘤诸如肉瘤和癌的例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤间皮瘤、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌卵巢癌。

[0260] 本发明的CAR-修饰T细胞也可用作对哺乳动物离体免疫和/或体内疗法的疫苗类型。优选地,哺乳动物为人。

[0261] 对于离体免疫,以下中的至少一项在将细胞施用进入哺乳动物前在体外发生:i) 扩增细胞,ii) 将编码CAR的核酸引入细胞,和/或iii) 冷冻保存细胞。

[0262] 离体程序在本领域中是公知的,并在以下更完全地进行讨论。简单地说,细胞从哺乳动物(优选人)中分离并用表达本文公开的CAR的载体进行基因修饰(即,体外转导或转染)。CAR-修饰的细胞可被施用给哺乳动物接受者,以提供治疗益处。哺乳动物接受者可为人,和CAR-修饰的细胞可相对于接受者为自体的。可选地,细胞可相对于接受者为同种异基因的、同基因的(syngeneic)或异种的。

[0263] 除了就离体免疫而言使用基于细胞的疫苗之外,本发明也提供了体内免疫以引起针对患者中抗原的免疫应答的组合物和方法。

[0264] 本发明提供了治疗肿瘤的方法,其包括施用给需要其的对象治疗有效量的本发明的CAR-修饰的T细胞。

[0265] 本发明的CAR-修饰的T细胞可被单独施用或作为药物组合物与稀释剂和/或其他组分诸如IL-2、IL-17或其他细胞因子或细胞群结合施用。简单地说,本发明的药物组合物可包括如本文所述的靶细胞群,与一种或多种药学或生理学上可接受载体、稀释剂或赋形剂结合。这样的组合物可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐水等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制用于静脉内施用。

[0266] 本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率将由这样的因素确定,如患者的病症、和患者疾病的类型和严重程度——尽管适当的剂量可由临床试验确定。

[0267] 当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定,其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出:包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以 10^4 至 10^9 个细胞/kg体重的剂量,优选 10^5 至 10^6 个细胞/kg体重的剂量(包括那些范围内的所有整数)施用。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如Rosenberg等, *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

[0268] 对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内(i.v.)注射或腹膜内施用给患者。在一个实施方式中,本发明的T细胞组合物通过皮内或皮下注射被施用给患者。在另一个实施方式中,本发明的T细胞组合物优选通过i.v.注射施用。T细胞的组合物可被直接注入肿瘤,淋巴结或感染位置。

[0269] 在本发明的某些实施方式中,利用本文描述的方法或本领域已知的其他将T细胞扩展至治疗性水平的方法活化和扩展的细胞,与任何数量的有关治疗形式结合(例如,之前、同时或之后)施用给患者,所述治疗形式包括但不限于用以下试剂进行治疗:所述试剂诸如抗病毒疗法、西多福韦和白细胞介素-2、阿糖胞苷(也已知为ARA-C)或对MS患者的那他珠单抗治疗或对牛皮癣患者的厄法珠单抗治疗或对PML患者的其他治疗。在进一步的实施方式中,本发明的T细胞可与以下结合使用:化疗、辐射、免疫抑制剂,诸如,环孢菌素、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、麦考酚酯和FK506,抗体或其他免疫治疗剂。在进一步的实施方式中,本发明的细胞组合物与骨髓移植、利用化疗剂诸如氟达拉滨、外部光束放射疗法(XRT)、环磷酰胺结合(例如,之前、同时或之后)而施用给患者。例如,在一个实施方式中,对象可经历高剂量化疗的标准治疗,之后进行外周血干细胞移植。在一些实施方式中,在移植后,对象接受本发明的扩展的免疫细胞的注入。在一个额外的实施方式中,扩展的细胞在外科手术前或外科手术后施用。

[0270] 施用给患者的以上治疗的剂量将随着治疗病症的精确属性和治疗的接受者而变化。人施用的剂量比例可根据本领域接受的实践实施。通常,每次治疗或每个疗程,可将 1×10^6 个至 1×10^{10} 个本发明经修饰的T细胞(如,CAR-T20细胞),通过例如静脉回输的方式,施用于患者。

[0271] CART制剂

[0272] 本发明提供了一种含有本发明的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。在一个实施方式中,所述制剂为液态制剂。优选地,所述制剂为注射剂。优选地,所述制剂中所述CAR-T细胞的浓度为 1×10^3 - 1×10^8 个细胞/ml,更优地 1×10^4 - 1×10^7 个细胞/ml。

[0273] 在一个实施方式中,所述制剂可包括缓冲液诸如中性缓冲盐水、硫酸盐缓冲盐等等;碳水化合物诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸诸如

甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明的制剂优选配制用于静脉内施用。

[0274] 药物组合物

[0275] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC或相应的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0276] 本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗,比如,所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

[0277] 本发明的药物组合物可直接用于结合TF蛋白分子,因而可用于预防和治疗肿瘤等疾病。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0278] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0279] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0280] 检测用途和试剂盒

[0281] 本发明的抗体或其偶联物可用于检测应用,例如用于检测样本,从而提供诊断信息。

[0282] 本发明中,所采用的样本(样品)包括细胞、组织样本和活检标本。本发明使用的术语“活检”应包括本领域技术人员已知的所有种类的活检。因此本发明中使用的活检可以包括例如肿瘤的切除样本、通过内窥镜方法或器官的穿刺或针刺活检制备的组织样本。

[0283] 本发明中使用的样本包括固定的或保存的细胞或组织样本。

[0284] 本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。在优选例中,本发明的抗体可以固定于检测板。

[0285] 本发明还提供了本发明抗体的用途,例如用于制备诊断制剂、或制备用于预防和/或治疗BCMA阳性肿瘤的药物。

[0286] 本发明的主要优点包括:

[0287] (a) 本发明的抗体可识别可溶性和细胞膜表面的人BCMA分子胞外段,部分抗体还可以交叉识别可溶性食蟹猴BCMA分子胞外段。

[0288] (b) 本发明的CART不识别肿瘤坏死因子受体超家族13B。

[0289] (c) 本发明的CART对于BCMA阳性的靶细胞具有较好的特异性杀伤能力。

[0290] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0291] 通用材料和方法

[0292] 实施例中所使用的材料与方法如下:

[0293] 1细胞及小鼠来源

[0294] K562-BCMA⁺:K562-BCMA-B22D8(由西比曼提供)

[0295] K562(ATCC;由西比曼提供)

[0296] L-BCMA⁺:L-BCMA-1E6-A4(由西比曼提供)

[0297] L Cells(小鼠成纤维细胞,ATCC:cat.CRL-2648TM;lot,63903687;由西比曼提供)

[0298] Sp2/0-Ag14细胞(ATCC;由睿智化学提供)

[0299] Balb/c小鼠(由上海斯莱克提供)

[0300] SJL小鼠(由上海斯莱克提供)

[0301] 2主要试剂和耗材

[0302] 表1试剂和耗材

名称	厂商	货号	批号
hBCMA-ECD-Fc	ChemPartner	---	171030004
cynoBCMA-ECD-Fc	ChemPartner	---	171030003
[0303] 重组 hFc 融合蛋白对照 (NC-Fc)	ChemPartner	---	---
重组人 TACI/TNFRSF13B Fc 嵌合蛋白, CF (hTACI-ECD-Fc)	R&D Systems	174-TC	EFN0417051
工具抗体 (tAb, anti-hBCMA)	Biologend	357502	B206531
mIgG	Invitrogen	026502	1623974A

[0304] 3主要实验仪器

[0305] 表2实验仪器

名称	厂商	型号
酶标仪	Molecular Devices	Plus 384
[0306] ELISA 洗板机	BioTek	ELx406UCWS
离心机	Eppendorf	5810R
流式细胞仪	BD	FACSVerse

[0307] 4实验设计

[0308] 4.1小鼠免疫及血清效价检测

[0309] Balb/c和SJL各5只小鼠按照表3方式分为两组用hBCMA-ECD-Fc免疫。如表4所示,初次免疫后至少进行两次加强免疫(第三次加强免疫使用K562-BCMA⁺细胞),免疫后,用

ELISA和FACS检测小鼠血清效价。血清效价达到要求(ELISA达到1:10,000稀释或者FACS达到1:1,000稀释)后进行杂交瘤细胞融合筛选。

[0310] 表3小鼠免疫分组

	动物种属	数量	免疫方式	编号
[0311]	Balb/c 小鼠	5	腹腔注射	5061, 5062, 5063, 5064, 5065
	SJL 小鼠	5	腹腔注射	5066, 5067, 5068, 5069, 5070

[0312] 表4免疫策略

[0313]	第 0 天	免疫前取血(PB, 15-30 μ l 血清/只) 初次免疫: hBCMA-ECD-Fc, 50 μ g/只(CFA 佐剂)
	第 14 天	加强免疫: hBCMA-ECD-Fc, 25 μ g/只(IFA 佐剂)
	第 21 天	小鼠取血(TB1, 15-30 μ l 血清/只)
	第 22 天	ELISA/FACS 检测血清效价
	第 35 天	加强免疫: hBCMA-ECD-Fc, 25 μ g/只(IFA 佐剂)
	第 42 天	小鼠取血(TB2, 15-30 μ l 血清/只)
	第 43 天	ELISA/FACS 检测血清效价
	第 56 天	融合前免疫: hBCMA-ECD-Fc, 25 μ g/只(IFA 佐剂)
	第 60 天	杂交瘤细胞电融合

[0314] 4.2筛选杂交瘤细胞株

[0315] 4.2.1杂交瘤细胞融合

[0316] 通过FACS检测,确定血清效价最高的小鼠(Balb/c和SJL各一只),采用电融合的方法,融合脾脏和淋巴结淋巴细胞与Sp2/0-Ag14细胞,得到杂交瘤细胞。

[0317] 4.2.2杂交瘤细胞单克隆筛选

[0318] 每只小鼠的融合细胞经裂红处理后,铺96孔板,每块板铺 2.5×10^6 个细胞,共20块。10天后进行初次筛选:用ELISA检测培养基上清与hBCMA-ECD-Fc protein的结合能力,将检测结果呈阳性的克隆转移至24孔板扩增培养。

[0319] 扩增培养后的细胞,用ELISA检测其培养基上清与hBCMA-ECD-Fc和cynoBCMA-ECD-Fc的结合能力,用FACS检测培养基上清与L-BCMA⁺细胞的结合能力(二次筛选)。最终挑选与L-BCMA⁺细胞结合较强的克隆进行亚克隆筛选。

[0320] 4.2.3杂交瘤细胞亚克隆筛选

[0321] 用4.2.2中获得的单克隆细胞铺2块96孔板,重复4.2.2中的ELISA和FACS筛选过程,最终得到亚克隆细胞株。将目的克隆转移至培养瓶中扩增培养,构建种子库,每株细胞冻存4-6支($0.5-1 \times 10^7$ 细胞/支)。

[0322] 4.3杂交瘤抗体的生产纯化

[0323] 挑选与人和食蟹猴BCMA均有结合的单克隆细胞用于小批量试生产。在250-500ml的细胞培养摇瓶中培养细胞,产生的抗体依次经过Protein A亲和柱纯化和去内毒素处理,获得3-5mg的抗体用于特性分析。

[0324] 4.4纯化的杂交瘤抗体的鉴定

[0325] 抗体鉴定包括以下三点:

[0326] a) 与hBCMA-ECD-Fc, cynoBCMA-ECD-Fc和hTACI-ECD-Fc的结合特异性分析(ELISA)

[0327] b) 与L细胞和L-BCMA⁺细胞的结合能力分析(FACS)

[0328] c) 与可溶性BCMA竞争结合分析(FACS)

[0329] 4.5抗体可变区测序

[0330] 提取目的克隆杂交瘤细胞的RNA, 逆转录成cDNA, PCR扩增抗体VH/VL基因片段, 测序得到目的克隆的抗体可变区基因序列。

[0331] 4.6嵌合抗体表达鉴定

[0332] 将测序得到的抗体重链可变区克隆到IgG1, κ 重组抗体重链表达载体上, 轻链可变区克隆到IgG1, κ 重组抗体轻链表达载体上构建嵌合抗体的表达质粒, 同时用这两个质粒转染HEK 293T细胞。培养三天后, 收集培养基上清液。检测上清液与hBCMA-ECD-Fc(ELISA)和L-BCMA⁺细胞(FACS)的结合能力。

[0333] 实施例1小鼠免疫及血清效价检测

[0334] 小鼠免疫参考通用方法中的记载进行。本实施例共进行了三次加强免疫, 四次融合。如表5所示, 前两次加强免疫使用hBCMA-ECD-Fc免疫小鼠, 然后进行融合F0109和F0227。第三次加强免疫使用K562-BCMA⁺细胞免疫小鼠, 然后进行融合F0508和F0614。

[0335] 表5小鼠免疫及融合时间表

Strain	Mouse#	Prime	1st boost	bleed 1	2nd boost	bleed 2	3rd boost	bleed 3	Final boost	Fusion	Note	
Balb/c	5061	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017	3/20/2018	3/27/2018	6/11/2018	6/14/2018	F0614	
	5062	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017			1/5/2018		dead after final boost	
	5063	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017			2/23/2018	2/27/2018	F0227	
	5064	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017	3/20/2018	3/27/2018	5/4/2018	5/8/2018	F0508	
	5065	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017			1/5/2018	1/9/2018	F0109	
SJL	5066	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017	3/20/2018	3/27/2018	6/11/2018	6/14/2018	F0614	
	5067	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017			1/5/2018	1/9/2018	F0109	
	5068	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017			2/23/2018	2/27/2018	F0227	
	5069	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017	3/20/2018	3/27/2018	5/4/2018	5/8/2018	F0508	
	5070	11/7/2017	11/21/2017	11/28/2017	12/12/2017	12/19/2017			2/23/2018		dead after final boost	
免疫原:		hBCMA-ECD-Fc				K562 BCMA ⁺ cell line						

[0336] [0337] 第一次加强免疫后小鼠血清效价的ELISA分析结果如图1所示, 用hBCMA-ECD-Fc

[0338] 第一次加强免疫后, ELISA检测10只小鼠血清在1:10k稀释度下与hBCMA-ECD-Fc和cynoBCMA-ECD-Fc均有结合能力, 其中SJL#5066效价较低, 剩余9只小鼠效价相近。

[0339] FACS检测结果如图2所示, 除SJL#5066, 剩余小鼠血清在1:1,000稀释度下与K562-BCMA⁺均有较高结合能力。

[0340] 第二次加强免疫后小鼠血清效价的ELISA分析结果如图3所示, 用hBCMA-ECD-Fc第二次加强免疫后, ELISA检测10只小鼠血清1:10k稀释度下与hBCMA-ECD-Fc和cynoBCMA-ECD-Fc均有很好的结合能力, 且效价相近。

[0341] FACS检测结果如图4所示, 10只小鼠血清在1:1,000稀释度下与K562-BCMA⁺均有结合, 两组小鼠中Balb/c#5062和SJL#5067效价最高。

[0342] 由于融合前免疫后小鼠Balb/c#5062死亡, 挑选Balb/c#5065和SJL#5067两只小鼠进行第一次融合F0109。由于融合前免疫后小鼠SJL#5070死亡, 挑选Balb/c#5063和SJL#5068两只小鼠进行第二次融合F0227(该融合未能筛选到阳性克隆)。

[0343] 由于F0109只得到一个克隆, F0227没有得到阳性克隆, 因此, 用K562-BCMA⁺细胞进

行第三次加强免疫。免疫前取小鼠血清(TB2-2),免疫一周后取小鼠血清(TB3)。

[0344] 第三次加强免疫后小鼠血清效价的ELISA分析结果如图5所示,4只小鼠免疫前后的血清1:10k稀释度下与hBCMA-ECD-Fc和cynoBCMA-ECD-Fc均有很好的结合能力,且效价相近。

[0345] FACS检测结果如图6所示,4只小鼠血清在1:1,000稀释度下与L-BCMA⁺细胞均有结合,两组小鼠中Balb/c#5064和SJL#5069效价最高。

[0346] 第三次加强免疫后挑选Balb/c#5064和SJL#5069进行第三次融合F0508,挑选Balb/c#5061和SJL#5066进行第四次融合F0614。

[0347] 实施例2筛选杂交瘤细胞株

[0348] 2.1融合F0109杂交瘤细胞筛选

[0349] 电融合后的细胞铺40块96孔板,其中,Balb/c#5065铺板#1-#20,SJL#5067铺板#21-#40。初次筛选:ELISA检测培养基上清与hBCMA-ECD-Fc的结合能力,阴性对照组为NC-Fc,设定阈值为Dvalue>0.8同时OD450(hBCMA ECD-Fc)-OD450(hFc)>0.5,共得68个克隆。扩增培养后进行二次筛选,Balb/c#5065的6G10与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和K562-BCMA⁺细胞均有较高的结合能力;SJL#5067的34D1与K562-BCMA⁺细胞有一定的结合能力,挑选这两个克隆作为母克隆进行亚克隆筛选。

[0350] 亚克隆筛选得到来源于Balb/c#5065的单克隆6G10-1D7和6G10-1H2,混合克隆6G10-1B11和6G10-1D3与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和K562-BCMA⁺均有较强的结合能力;来源于SJL#5067的亚克隆34D1-2H2与hBCMA-ECD-Fc和K562-BCMA⁺有较强的结合能力。挑选这5个克隆冻存,并挑选克隆6G10-1D7进行小批量抗体生产。

[0351] 2.2融合F0227杂交瘤细胞筛选

[0352] 融合F0227亚克隆筛选未得到可与hBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺细胞结合的阳性克隆。

[0353] 2.3融合F0508杂交瘤细胞筛选

[0354] 电融合后的细胞铺40块96孔板,其中,Balb/c#5064铺板#81-#100,SJL#5069铺板#101-#120。初次筛选:用ELISA检测培养基上清与hBCMA-ECD-Fc的结合能力,阴性对照组为NC-Fc,设定阈值为Dvalue≥2,共得79个克隆。扩增培养后进行二次筛选,得到19个克隆(109C5、107A11、107B11、116H6、102G2、102A12、111F11、107A9、111D5、105F9、114C6、97B8、97C4、104H4、115G7、116A9、100H2、99B3、110A11)与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺细胞均有较高的结合能力;得到4个克隆(120D6、120A10、105C10、113B3)与hBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺细胞均有较高的结合能力,挑选这23个克隆作为母克隆进行亚克隆筛选,如图7所示。

[0355] 每个母克隆铺1块96孔板进行亚克隆筛选,初次筛选中有6个克隆105F9、111F11、120D6、104H4、115G7、110A11的亚克隆全部都是阴性;120A10有一个亚克隆呈现ELISA阳性,其他克隆全部是阴性的。120A10在亚克隆前筛选时,没有与食蟹猴BCMA的交叉反应活性,所以这个克隆就没有进行二次筛选。以上7个克隆所铺的96孔板继续培养两天后又进行了一次ELISA筛选,筛选结果仍为阴性。故这7个母克隆将停止进行亚克隆筛选。

[0356] 剩余16个母克隆进行二次筛选。结果显示,筛选得到5个亚克隆99B3G3、102A12H6、107A11F1、107A9A4和107B11E1与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺细胞均有较强的结合能力,不与NC-Fc结合;2个亚克隆105C10F1和113B3F12与hBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺均

有较强的结合能力,不与cynoBCMA-ECD-Fc,NC-Fc结合。挑选上述7个亚克隆进行抗体小批量生产。

[0357] 另外,4个克隆97B8G8、100H2D12、109C5F3和114C6C8镜检不是单克隆,将进行第二轮亚克隆。第二轮亚克隆初次筛选结果如下,114C6C8未得到阳性亚克隆,该克隆不再保留;挑选克隆97B8G8D12、97B8G8E6、97B8G8F7、97B8G8G2、100H2D12B10、100H2D12C6、100H2D12D5、100H2D12H3、109C5F3C1、109C5F3D2、109C5F3D4和109C5F3H3进行二次筛选,结果显示,得到2个克隆100H2D12C6和109C5F3C1与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺细胞均有较强的结合能力,不与NC-Fc结合;得到1个克隆97B8G8D12与hBCMA-ECD-Fc和cynoBCMA-ECD-Fc有较强的结合能力,与L-BCMA⁺细胞均有较弱的结合能力,挑选上述3个克隆进行抗体小批量生产。

[0358] 因为大多数来源于克隆116A9,111D5和116H6的亚克隆与NC-hFc的结合很强,FACS筛选来源于上述3个克隆的所有亚克隆:116A9来源的均为阴性克隆;116H6C10为阳性克隆,但同时与NC-hFc也有较强的结合;从111D5中挑选了10个亚克隆进行二次筛选,所有亚克隆都有较强的NC-hFc结合。故克隆116A9,111D5和116H6及其亚克隆不再保留。

[0359] 克隆97C4F2、102G2B5、102G2D1、102G2F3与L-BCMA⁺细胞没有结合,也不再保留。

[0360] 由于测序得到107A11F1、107B11E1和107A9A4各有四条重链和一条轻链,故对这三株细胞进行第二轮亚克隆筛选,结果显示,107A11F1的亚克隆107A9A4D2、107A11F1B7和107B11E1D7与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺细胞有较强的结合能力,挑选这3个克隆进行测序;亚克隆107A9A4B2、107A9A4D8、107A9A4E9、107A11F1C5、107A11F1E6、107A11F1E7、107B11E1A8、107B11E1B10和107B11E1C11将冻存。

[0361] 2.4融合F0614杂交瘤细胞筛选

[0362] 电融合后的细胞铺40块96孔板,其中,Ba1b/c#5061铺板#121-#140,SJL#5066铺板#141-#160。初次筛选用ELISA检测培养基上清与hBCMA-ECD-Fc的结合能力,设定阈值为Dvalue \geq 0.8,共得33个克隆。扩增培养后二次筛选,得到5个克隆(151A9、156E11、149H4、143D6和154B8)与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺均有的结合能力,不与NC-Fc结合;得到1个克隆(152D8)与hBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺均有较高的结合能力,不与NC-Fc结合,挑选这6个克隆作为母克隆进行亚克隆筛选。

[0363] 每个母克隆铺1块96孔板进行亚克隆筛选,初次筛选结果见附表27,其中3个克隆156E11、149H4和154B8亚克隆全部都是阴性,故这3个母克隆将没有亚克隆不进行二次筛选。

[0364] 剩余3个母克隆中挑选亚克隆进行二次筛选的结果显示,3个亚克隆143D6F4、151A9A4和152D8E8与hBCMA-ECD-Fc,cynoBCMA-ECD-Fc和L-BCMA⁺均有较强的结合能力,不与NC-Fc结合,挑选这3个亚克隆进行抗体小批量生产。143D6D8和151A9F1将冻存。

[0365] 2.5杂交瘤细胞筛选结果总结

[0366] 如图7所示,共进行了四轮杂交瘤细胞融合,经过亚克隆筛选,共挑选14株杂交瘤细胞(6G10-1D7、99B3G3、102A12H6、107A11F1、107A9A4、107B11E1、100H2D12C6、105C10F1、113B3F12、109C5F3C1、97B8G8D12、143D6F4、151A9A4和152D8E8)进行杂交瘤抗体小批量生产纯化及抗体可变区测序。

[0367] 测序结果表明100H2D12C6和97B8G8D12的抗体可变区序列与99B3G3相同;

107A11F1、107A9A4和107B11E1不是单克隆,这三个杂交瘤进行第二轮亚克隆,挑选107A9A4D2、107A11F1B7和107B11E1D7进行抗体可变区测序。107A9A4D2和107A11F1B7抗体可变区序列相同,且各有一条重链和两条轻链。以上各杂交瘤上清筛选数据如表6所示。

[0368] 表6杂交瘤细胞上清筛选结果

克隆	ELISA (OD450 nm)			FACS (MFI)	
	hBCMA- ECD-Fc	cynoBCMA- ECD-Fc	NC-Fc	BCMA ⁺ cells	BCMA ⁻ cells
6G10-1D7	2.9	1.95	0.08	3882.8	104.9
99B3G3	3.68	3.65	0.14	1929.4	106.1
102A12H6	3.6	3.53	0.12	762.2	105.4
105C10F1	3.42	0.18	0.1	1958.2	104.9
107A11F1	3.63	3.65	0.1	4997.3	102.6
107B11E1	3.56	3.61	0.09	3521.4	105.9
[0369] 107A9A4	3.33	3.61	0.09	2655.8	101.8
113B3F12	3.9	0.18	0.14	3888.1	102.5
100H2D12C6	3.37	3.48	0.13	1142.5	96.1
109C5F3C1	3.57	3.41	0.57	2891.9	101.1
143D6F4	3.26	3.4	0.2	1507.9	114.5
151A9A4	3.34	3.4	0.24	2915.3	103.9
152D8E8	3.35	3.31	0.23	1184.7	103.9
97B8G8D12	3.06	3.37	0.13	357.5	95.8
107A9A4D2	3.5093	3.583	0.4596	4645.2	97.5
107A11F1B7	3.5267	3.5005	0.4413	5181	114.9
107B11E1D7	2.9167	3.5361	0.4431	3513.9	128.1

[0370] 实施例3杂交瘤抗体的生产纯化

[0371] 共挑选了14个杂交瘤细胞进行抗体小批量生产,其中,97B8G8D12抗体生产失败,剩余13个克隆均成功得到相应抗体,如表7所示。SDS-PAGE结果表明纯化得到了较纯的抗体,如图8。

[0372] 表7小批量生产纯化抗体信息

	抗体编号	克隆	亚型	conc (mg/ml)	总量 (mg)	动物来源
	mAb001	6G10-1D7	IgG1, κ	0.847	5.929	Balb/c #5065
	mAb002	99B3G3	IgG1, κ	0.847	7.1995	Balb/c #5064
	mAb003	102A12H6	IgG1, κ	0.686	6.517	SJL #5069
	mAb004	105C10F1	IgG2b, κ	0.861	10.332	SJL #5069
[0373]	mAb005	107A11F1	IgG2b, κ	1.139	14.2375	SJL #5069
	mAb006	107B11E1	IgG1, κ	0.993	11.4195	SJL #5069
	mAb007	107A9A4	IgG2b, κ	2.248	30.348	SJL #5069
	mAb008	113B3F12	IgG2b, κ	0.832	10.4	SJL #5069
	mAb009	100H2D12C6	IgG1, κ	0.453	2.9445	Balb/c #5064
	mAb010	109C5F3C1	IgG2c, κ	0.73	5.11	SJL #5069
	mAb011	143D6F4	IgG2b, κ	0.73	10.95	SJL #5066
[0374]	mAb012	151A9A4	IgG2b, κ	0.569	5.69	SJL #5066
	mAb013	152D8E8	IgG1, κ	0.058	0.29	SJL #5066

[0375] 实施例4纯化的杂交瘤抗体的鉴定

[0376] 分别用1.0 μ g/ml hBCMA-ECD-Fc, cynoBCMA-ECD-Fc和hTACI-ECD-Fc铺板做ELISA检测杂交瘤抗体的特异性。

[0377] ELISA分析结果如图9、图10和图11所示,纯化的杂交瘤抗体mAb001 (6G10-1D7) 可以结合人BCMA胞外段,但与食蟹猴BCMA胞外段结合能力弱,只有在高浓度下与食蟹猴BCMA分子胞外段结合;mAb013 (152D8E) 对人BCMA和食蟹猴BCMA胞外段均无结合。mAb004 (105C10F1) 和mAb008 (13B3F12) 可以结合人BCMA胞外段,但不能识别食蟹猴BCMA胞外段,其它所有的纯化杂交瘤抗体都可以结合人BCMA胞外段与食蟹猴BCMA胞外段。所有的杂交瘤抗体均不识别hTACI-ECD-Fc。各抗体结合hBCMA-ECD-Fc, cynoBCMA-ECD-Fc和hTACI-ECD-Fc的EC50总结如表8所示。

[0378] 表8杂交瘤抗体结合特异性分析

抗体编号	克隆	亚型	EC50 (nM)		
			hBCMA-ECD-Fc	cynoBCMA-ECD-Fc	hTACI-ECD-Fc
mAb001	6G10-1D7	IgG1, κ	0.034	Low bind	No bind
mAb002	99B3G3	IgG1, κ	0.032	0.23	No bind
mAb003	102A12H6	IgG1, κ	0.058	0.062	No bind
mAb004	105C10F1	IgG2b, κ	0.038	No bind	No bind
mAb005	107A11F1	IgG2b, κ	0.134	0.144	No bind
[0379] mAb006	107B11E1	IgG1, κ	0.029	0.019	No bind
mAb007	107A9A4	IgG2b, κ	0.21	0.17	No bind
mAb008	113B3F12	IgG2b, κ	0.15	No bind	No bind
mAb009	100H2D12C6	IgG1, κ	0.033	0.033	No bind
mAb010	109C5F3C1	IgG2c, κ	0.18	0.18	No bind
mAb011	143D6F4	IgG2b, κ	0.15	0.17	No bind
mAb012	151A9A4	IgG2b, κ	0.17	0.15	No bind
mAb013	152D8E8	IgG1, κ	No bind	No bind	No bind

[0380] 流式检测结果如图12和图13所示,除了mAb003和mAb013,剩余11个杂交瘤抗体与L-BCMA+细胞均有很好的结合能力,且与L细胞没有非特异性结合。

[0381] 杂交瘤抗体与可溶BCMA的竞争性结合分析的结果如图14所示,当hBCMA-ECD-Fc浓度大于240ng/ml时,可以竞争性抑制K562-BCMA+细胞与mAb001(终浓度EC80:1 μ g/ml)的结合,IC50为731ng/ml,对应摩尔比为1.7:1;当K562-BCMA+培养基上清sBCMA浓度大于120ng/ml时,可以竞争性抑制K562-BCMA+细胞与mAb001(终浓度EC80:1 μ g/ml)的结合,IC50为466ng/ml,对应摩尔比为10.4:1。

[0382] 实施例5抗体可变区测序

[0383] 一共对17株杂交瘤细胞进行了抗体可变区测序。12株杂交瘤细胞测序为单克隆:6G10-1D7(CP01)、99B3G3(CP02)、102A12H6、100H2D12C6、105C10F1(CP03)、113B3F12、109C5F3C1(CP06)、97B8G8D12、143D6F4(CP07)、151A9A4(CP08)、152D8E8(CP09)和107B11E1D7(CP05),其中99B3G3(CP02)、100H2D12C6和97B8G8D12的抗体可变区序列相同。5株杂交瘤细胞测序为多克隆:107A11F1、107A9A4、107B11E1、107A9A4D2和107A11F1B7(CP04),其中107A11F1、107A9A4和107B11E1各有4条重链和一条轻链;107A9A4D2和107A11F1B7(CP04)各有一条重链和两条轻链,且二者序列相同。

[0384] 测序得到的各抗体可变区的核苷酸序列编号如下表9所示。

[0385] 表9抗体可变区的核苷酸序列

杂交瘤编号	重链可变区	轻链可变区
6G10-1D7 (CP01)	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO.:2
99B3G3(CP02)	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
102A12H6	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
105C10F1(CP03)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
107A11F1	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 10	
	SEQ ID NO: 11	
	SEQ ID NO: 12	
107B11E1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 18
	SEQ ID NO: 15	
	SEQ ID NO: 16	
	SEQ ID NO: 17	
[0386] 107A9A4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 23
	SEQ ID NO: 20	
	SEQ ID NO: 21	
	SEQ ID NO: 22	
113B3F12	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
100H2D12C6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
109C5F3C1(CP06)	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
143D6F4(CP07)	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
151A9A4(CP08)	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31
152D8E8(CP09)	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
107A11F1B7(CP04)	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
107A9A4D2	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
		SEQ ID NO: 36
[0387] 107B11E1D7(CP05)	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38
97B8G8D12	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

[0388] 实施例6嵌合抗体表达与鉴定

[0389] 将测序得到的抗体重链可变区克隆到IgG1,κ重组抗体重链表达载体上,轻链可变区克隆到IgG1,κ重组抗体轻链表达载体上构建嵌合抗体的表达质粒。共挑选5株单克隆杂交瘤细胞(6G10-1D7、99B3G3、105C10F1、113B3F12和107B11E1D7)和1株多克隆杂交瘤细胞(107A9A4D2)进行嵌合抗体表达。其中107A9A4D2VH分别与107A9A4D2VL-1和107A9A4D2VL-2配对表达。重组表达的嵌合抗体的重链和轻链序列如下(下划线部分为抗体可变区序列):

[0390] 1. 杂交瘤6G10-1D7

[0391] >6G10-1D7VH重链(SEQ ID NO:39):

[0392] MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASDYSFTDYIMTWVKQSHGKNLEWIGL
INPYNGGTTYNQKFKDKATFTVDKSSTAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRGITTDYYTMDYWGQTSVTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

[0393] 其中,下划线区域为重链可变区

[0394] >6G10-1D7VL轻链 (SEQ ID NO:40):

[0395] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIVMTQSQRFMSTSVGDRVSITCKASQSVGTAVAWYQQTPGQFPKL
LIYSTSNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSTYPLTFGSGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC2. 杂交瘤99B3G3

[0396] >99B3G3VH重链 (SEQ ID NO:41):

[0397] MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFDLYMNWVKQSHGKSLEWIGV
INPYNGGTSYNQKFKAKATLTVDKSSITAYMELNSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQTSVTVSSASTKGPSV
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

[0398] 其中,下划线区域为重链可变区

[0399] >99B3G3VL轻链 (SEQ ID NO:42):

[0400] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSIQKNYLAWYQQKPG
QSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSSPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0401] 其中,下划线区域为轻链可变区

[0402] 3. 杂交瘤105C10F1

[0403] >105C10F1VH重链 (SEQ ID NO:43):

[0404] MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVKLLQSGGLVQPGGSLKLSAASGIDFSRYWMSWRRAPGKLEWIGE
INPDSSTINYAPSLKDKFIISRDAAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCATLYDYDGDYAMDYWGQTSVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

[0405] 其中,下划线区域为重链可变区

[0406] >105C10F1VL轻链 (SEQ ID NO:44):

[0407] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIVMTPSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKAL
IYSASYRYSQVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQHYNYSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC

[0408] 其中,下划线区域为轻链可变区

[0409] 4. 杂交瘤113B3F12

[0410] >113B3F12VH重链 (SEQ ID NO:45):

[0411] MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYIMNWKQSHGKSLEWIGV
INPYNGGTDYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARRRESYGTSYQGAYFDSWGQGTTLTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0412] 其中,下划线区域为重链可变区

[0413] >113B3F12VL轻链 (SEQ ID NO:46):

[0414] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLL
IYYTSRLHSGVPSRFSGSGGTDYSLISDLEQEDIATYFCQQVITLPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC

[0415] 其中,下划线区域为轻链可变区

[0416] 5. 杂交瘤107B11E1D7

[0417] >107B11E1D7VH重链 (SEQ ID NO:47):

[0418] MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDLYMNWLKQSHGKRLEWIGV
INPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN
 HYTQKSLSLSPGK

[0419] 其中,下划线区域为重链可变区

[0420] >107B11E1D7VL轻链 (SEQ ID NO:48):

[0421] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCEENVLTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWI
YDTSKLSGVPGRFSGSGSKSYSLTSSMEADVATYYCFQGSYPLFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC

[0422] 其中,下划线区域为轻链可变区

[0423] 6. 杂交瘤107A9A4D2

[0424] >107A9A4D2VH重链 (SEQ ID NO:49):

[0425] MEFGLSWLFLVAITLKGVCQCEVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFDLYMNWLKQSHGKRLEWIGV
INPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQGTSTFTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHN
 HVTQKSLSLSPGK

[0426] 其中,下划线区域为重链可变区

[0427] >107A9A4D2VL-1轻链(SEQ ID NO:50):

[0428] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSSTSPKLWI
YDTSKLSSGVPGRFSGSGSGKSYSLTISSMEAEDVATYYCFQSGSYPLFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC

[0429] 其中,下划线区域为轻链可变区

[0430] >107A9A4D2VL-2轻链(SEQ ID NO:51):

[0431] MDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRCDIVMTQSPSSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSIQKNYLAWYQQKPG
QSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0432] 其中,下划线区域为轻链可变区

[0433] 实施例7嵌合抗体表达鉴定

[0434] 嵌合抗体表达鉴定的ELISA分析结果如图15所示,流式细胞术检测结果如图16所示,杂交瘤6G10-1D7、99B3G3、105C10F1和107B11E1D7的嵌合抗体与可溶性和细胞表面的人BCMA分子胞外段均有结合。杂交瘤107A9A4D2的重链107A9A4D2VH与轻链107A9A4D2VL-2配对的嵌合抗体与可溶性和细胞表面的人BCMA分子胞外段均有结合;107A9A4D2VH与107A9A4D2VL-1配对的嵌合抗体与可溶性和细胞表面的人BCMA分子胞外段均不结合。详细数据如表10所示。

[0435] 表10嵌合抗体上清检测结果

clones	Elisa (OD450 nm)	FACS (MFI)	
	hBCMA-ECD-Fc	L-BCMA ⁺	L
6G10-1D7	2.35	3467.5	31
99B3G3	2.3	2180	31
[0436] 105C10F1	2.39	1801	32
113B3F12	0.09	37.5	32
107A9A4D2VH/VL-1	0.13	42.5	36
107A9A4D2VH/VL-2	2.45	525	35
107B11E1D7	2.38	565.5	34

[0437] 实施例8包含CAR结构的慢病毒表达载体的构建

[0438] 采用表11中所示的以上筛选得到的9个抗体的轻链和重链分别构建了18个嵌合抗

原受体 (CAR), CAR的结构包括前导序列、抗原识别序列、连接区、跨膜区、共刺激因子信号区和CD3zeta信号传导区,连接顺序如下:

[0439] [CD8 LS]-[VL-Linker-VH]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]或

[0440] [CD8 LS]-[VH-Linker-VL]-[hinge-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3zeta]

[0441] 表11利用筛选得到的抗体构建的嵌合抗原受体

[0442]	Clones	Re-named	VL-Linker-VH	VH-Linker-VL
	6G10-1D7	CP01	BCMA-CP01	BCMA-CP01R
	99B3G3	CP02	BCMA-CP02	BCMA-CP02R
	105C10F1	CP03	BCMA-CP03	BCMA-CP03R
	107A11F1B7	CP04	BCMA-CP04	BCMA-CP04R
[0443]	107B11E1D7	CP05	BCMA-CP05	BCMA-CP05R
	109C5F3C1	CP06	BCMA-CP06	BCMA-CP06R
	143D6F4	CP07	BCMA-CP07	BCMA-CP07R
	151A9A4	CP08	BCMA-CP08	BCMA-CP08R
	152D8E8	CP09	BCMA-CP09	BCMA-CP09R

[0444] 基于以上构建的各个嵌合抗原受体的序列,委托上海西图生物科技有限公司通过全长DNA合成和克隆构建各表达载体。表达载体选用的是pWPT慢病毒载体,克隆位点为BamH I和Sal I位点。各个CAR具体序列如下:

[0445] (1)前导序列为CD8抗原的前导序:

[0446] MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO:52)

[0447] (2)BCMA-CP01抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0448] DIVMTQSQRFMSTSVGDRVSITCKASQSVGTAVAWYQQTPGQFPKLLIYSTSNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSTYPLTFGSGTKLELK (SEQ ID NO:53)

[0449] (3)BCMA-CP01抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0450] EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASDYSFTDYIMTWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTTYNQKFKDKA TFTVDKSSITAYMDLLSLTSEDSAVYYCARRGITTDYITMDYWGQGSVTVSS (SEQ ID NO:54)

[0451] (4)BCMA-CP02抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0452] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSIQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRF IGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSSPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:55)

[0453] (5)BCMA-CP02抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0454] EVQLQQSGPVLVKGASVKMSCKASGYTFTDLYMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNGGTSYNQKFKAKA TLTVDKSSITAYMELNSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQGSVTVSS (SEQ ID NO:56)

[0455] (6)BCMA-CP03抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0456] DIVMTQSPQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQHYNSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:57)

[0457] (7)BCMA-CP03抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0458] EVKLLQSGGGLVQPGGSLKLSAASGIDFSRYWMSWRRAPGKGLEWIGEINPDSSTINYAPSLKDKF

IISRDAAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCATLYYDYDGDYAMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO:58)

[0459] (8)BCMA-CP04抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0460] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSIQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRF
IGSGSGTDFTLTISVVAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:59)

[0461] (9)BCMA-CP04抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0462] EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDLYMNWLKQSHGKRLEWIGVINPYNGGTSYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQTSFTVSS (SEQ ID NO:60)

[0463] (10)BCMA-CP05抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0464] ENVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSSSTSPKLWIYDTSKLSSGVPGRFSGSGSGK
SYSLTISSMEAEDVATYYCFQSGYPLFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:61)

[0465] (11)BCMA-CP05抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0466] EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDLYMNWLKQSHGKRLEWIGVINPYNGGTSYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQTSFTVSS (SEQ ID NO:62)

[0467] (12)BCMA-CP06抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0468] DIVMTQSPSSLALSVGQKVTMSCKSSQSLDNSNQKHYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRF
IGSGSGTDFTLTISVVAEDLADYFCQQHYTAPLTFGAGTKLALK (SEQ ID NO:63)

[0469] (13)BCMA-CP06抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0470] EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKVSGYTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGVITPYNGANRYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCARGDSIYVMDYWGQTSVIVSS (SEQ ID NO:64)

[0471] (14)BCMA-CP07抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0472] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSIQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRF
IGSGSGTDFTLTISVVAEDLADYFCQQHYSTPLTFGGGKLELK (SEQ ID NO:65)

[0473] (15)BCMA-CP07抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0474] EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYSLNWVKQSHGKSLEWIGVNPYNGGTSYHNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARPDSIYVMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO:66)

[0475] (16)BCMA-CP08抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0476] DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSNIQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRESGVPDRF
IGSGSGTDFTLTISVVAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:67)

[0477] (17)BCMA-CP08抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0478] EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYSLNWVKQSHGKSLEWIGVNPYNGGTTYNQKFKGKA
TLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARPDSIYVMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO:68)

[0479] (18)BCMA-CP09抗体来源的单链可变区轻链 (VL) 序列:

[0480] DIKMTQSPSSMYVSLGERVTITCKASQDINRNLWVQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPLRFSGSGSG
QDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPRFTFGGKLEIK (SEQ ID NO:69)

[0481] (19)BCMA-CP09抗体来源的单链可变区重链 (VH) 序列:

[0482] QVTLKESGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLNTSGMGNWIRQSSGKDLWLAHIWVNDKRYNPSLKS
LTISKDTSRNQVFLRITSDATDTATYFCCRSRSLFDYWGHTTLTVSS (SEQ ID NO:70)

[0483] (20)BCMA-CP01/R,02/R,03/R,04/R,05/R,06/R,07/R,08/R,09/R单链可变区重链
与轻链之间的连接序列为:

- [0484] GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:71)
- [0485] (21) 铰链区和连接区的序列:
- [0486] FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:72)
- [0487] (22) 跨膜区为CD8 (CD8TM) 抗原的跨膜区序列:
- [0488] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO:73)
- [0489] (23) 共刺激因子信号区,来自4-1BB的胞内信号传导基序的序列:
- [0490] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO:74)
- [0491] (24) CD3 zeta的信号传导区,来自TCR复合体中CD3 zeta的以酪氨酸为中心的免疫受体激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的序列: R VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:75)
- [0492] 实施例9CAR-T细胞的制备
- [0493] (1) 取健康人静脉血,密度梯度离心方法分离获得单个核细胞 (PBMCs)。
- [0494] (2) 第0天,将PBMCs接种于预先经过终浓度为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ CD3单克隆抗体 (OKT3) 及终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Retronectin (购自TAKARA公司) 包被的细胞培养瓶中,培养基为含1%人血白蛋白的CBMG-RC-09a细胞培养基,培养基里添加终浓度为 $1000\text{U}/\text{mL}$ 的重组人白介素2 (CBMG-RC-05b),在 37°C ,饱和湿度为5% CO_2 培养箱中培养。
- [0495] (3) 第1天,缓慢吸弃培养PBMCs的上清液,并加入新的含1%人血白蛋白的CBMG-RC-09a细胞培养基,培养基里添加终浓度为 $1000\text{U}/\text{mL}$ 的重组人白介素2 (CBMG-RC-05b),在 37°C ,饱和湿度为5% CO_2 培养箱继续培养。
- [0496] (4) 第3天,加入新鲜培养液,浓缩纯化的CAR-BCMAs慢病毒液,protamine sulfate ($12\mu\text{g}/\text{mL}$),以及终浓度为 $1000\text{U}/\text{mL}$ 的CBMG-RC-05b。置于 37°C ,5% CO_2 培养箱中感染12小时后,弃培养液,加入新鲜的培养基,于 37°C ,5% CO_2 培养箱继续进行培养。
- [0497] (5) 第6天开始,可取CART-BCMAs细胞做相应的活性检测试验。
- [0498] 实施例10CAR基因在T细胞基因组整合率及其编码蛋白在膜表面表达水平的检测。
- [0499] 分别取 0.5×10^6 实施例9中培养到第7天的CART-BCMAs细胞样品,经过重组人BCMA蛋白Fc段染色在流式细胞仪上分析CAR-BCMA蛋白在T细胞膜表面的表达水平。
- [0500] 结果如图17所示,除了BCMA-CP01、CP09、CP09R三种CAR-T慢病毒不具有转染率,其余15个BCMA-CP CAR-T转染7天后都有较高的T细胞表面表达BCMA蛋白,6C和8C为阳性对照。
- [0501] 实施例11CART-BCMAs体外激活能力的检测
- [0502] 采用实施例9中培养到第7天CART-BCMAs细胞作细胞被激活水平指标蛋白CD137和IFN γ 的检测。依次取 1×10^5 培养到第7天的CART-BCMA细胞,分别与人BCMA阳性的A549-BCMA-1D6,MM.1S,RPMI822 6肿瘤细胞系,猴BCMA阳性的A549-BCMA-M,以及BCMA阴性的A549肿瘤细胞系或不添加肿瘤细胞,在 $200\mu\text{l}$ CBMG-RC-09a培养基中按照1:1比例培养18h后流式方法检测T细胞膜表面CD137的表达水平,ELISA方法检测培养上清中IFN γ 的分泌水平。
- [0503] 结果如图18和图19所示,BCMA-CP01R、CP03、CP03R只对A549-BCMA-1D6细胞表现出特异性较高的IFN- γ 的释放能力和CD137激活特异性上调表达,BCMA-CP02/R,CP04/R,CP05/R对A549-BCMA-1D6和A549-BCMA-M细胞都表现出特异性较高的IFN- γ 的释放能力和CD137激活特异性上调表达。

[0504] 实施例12CART-BCMA_s细胞对靶细胞的杀伤能力检测

[0505] 采用RTCA实时无标记细胞分析检测实施例9中培养到第14天CART细胞(BCMA-CP01/R~05/R),第12天CART细胞(BCMA-CP06/R~09/R)对靶细胞的杀伤能力。按图4所示比例分别与BCMA阴性细胞(A549)或人BCMA阳性的自构细胞A549-BCMA-1D6,或猴BCMA阳性的自构细胞A549-BCMA-M在200 μ l CBMG-RC-09a培养基中共培养8h后,分析CART细胞对各个靶细胞的杀伤能力。

[0506] 结果如图20所示,BCMA-CP01R,CP03,CP03R具有对A549-BCMA-1D6较强的杀伤能力。BCMA-CP02/R,04/R,05/R具有对A549-BCMA-1D6和A549-BCMA-M细胞较强的杀伤能力,对阴性靶细胞A549则没有明显杀伤作用,未转染对照组(NT)对靶细胞也没有明显杀伤作用。

[0507] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 上海赛比曼生物科技有限公司
- [0003] 无锡赛比曼生物科技有限公司
- [0004] <120> BCMA抗体及其制备和应用
- [0005] <130> P2019-1392
- [0006] <160> 75
- [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 363
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0012] <400> 1
- [0013] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
- [0014] tcctgcaagg cttctgatta ctcattcact gactacatca tgacctgggt gaagcagagc 120
- [0015] catggaaga accttgagtg gattggactt attaatacctt acaatgggtg tactacctac 180
- [0016] aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattt actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240
- [0017] atggacctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaaggggg 300
- [0018] attacgacgg attactatac tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
- [0019] tca 363
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 321
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0024] <400> 2
- [0025] gacattgtga tgaccagtc tcaaagattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
- [0026] atcacctgca aggccagtca gagtgtgggt actgctgtag cctggatatca acagacacca 120
- [0027] ggacaattcc ctaaacttct gatttactcg acatccaatc gatacactgg agtccctgat 180
- [0028] cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tatgcagtct 240
- [0029] gaagacctgg cagattattt ctgccaacaa tatagcacct atccgctcac gttcggttct 300
- [0030] gggaccaagc tggagctgaa a 321
- [0031] <210> 3
- [0032] <211> 354
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0035] <400> 3
- [0036] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
- [0037] tcctgtaagg cttctggata cacattcact gacctctata tgaactgggt gaagcagagt 120
- [0038] catggaaga gccttgagtg gattggagtt attaatacctt acaacgggtg tacaagctac 180

[0039] aaccagaaat tcaaggccaa ggccacattg actgttgaca agtcctccat cacagcctac 240
[0040] atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtctt attactgtgc aagaggatgat 300
[0041] agtatctatg tcatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354
[0042] <210> 4
[0043] <211> 339
[0044] <212> DNA
[0045] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0046] <400> 4
[0047] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60
[0048] atgagctgca agtccagtca gaggcctttta aatagtagca ttcaaaagaa ctattttggcc 120
[0049] tggtagcagc agaaaccagg acagtctctt aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
[0050] gaatctgggg tcctgatcg cttcataggg agtggatctg ggacagattt cactcttacc 240
[0051] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttatagcagt 300
[0052] ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339
[0053] <210> 5
[0054] <211> 354
[0055] <212> DNA
[0056] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0057] <400> 5
[0058] gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctgggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
[0059] tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggctactata tgaactgggt gaagcaaagt 120
[0060] cctgaaaaga gccttgagtg gattggagag attaattcta gactgggtgg tactacgtac 180
[0061] aaccagaagt tcaaggccaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccaa cacagcctac 240
[0062] atggagctca agagcctgac atctgaggac tctgcagtctt attattgtcg gtactacggt 300
[0063] agtgactggc acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354
[0064] <210> 6
[0065] <211> 318
[0066] <212> DNA
[0067] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0068] <400> 6
[0069] caaattgttc tcaccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
[0070] atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccaaga 120
[0071] tcctccccca aacctggat ttatctcaca tccagcctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
[0072] ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccat ggaggtgaa 240
[0073] gatgctgcca cttattactg ccagcagtg agtagtgacc cactcacgtt cgggtgctggg 300
[0074] accaagctgg agctgaaa 318
[0075] <210> 7
[0076] <211> 366
[0077] <212> DNA

[0078]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0079]	<400> 7	
[0080]	gaggtgaagc ttctccagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc	60
[0081]	tcctgtgcag cctcaggaat cgatttttagt agatactgga tgagttgggt tcggcgggct	120
[0082]	ccagggaaag gactagaatg gatttgagaa attaatccag atagcagtac aataaactat	180
[0083]	gcacatctc taaaggataa attcatcadc tccagagacg ccgcaaaaaa tacgctgtac	240
[0084]	ctgcaaatga gcaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aaccctctac	300
[0085]	tatgattacg acggcgacta tgctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc	360
[0086]	tcctca	366
[0087]	<210> 8	
[0088]	<211> 321	
[0089]	<212> DNA	
[0090]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0091]	<400> 8	
[0092]	gacattgtga tgaccccgtc tcaaaaattc atgtccacct cagtaggaga cagggtcagc	60
[0093]	gtcacctgta aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaaacca	120
[0094]	gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatacctacc ggtacagtgg agtcctgat	180
[0095]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct	240
[0096]	gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcat tataacagct atccattcac gttcggctcg	300
[0097]	gggacaaagt tggaaataaa a	321
[0098]	<210> 9	
[0099]	<211> 375	
[0100]	<212> DNA	
[0101]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0102]	<400> 9	
[0103]	gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
[0104]	tcctgtaagg cttctggata cacattcact gactactata tgaactgggt gaagcagagc	120
[0105]	catggaaaga gccttgagtg gatttgagtt attaatcctt acaacgggtg tactgactac	180
[0106]	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac	240
[0107]	atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaagaaga	300
[0108]	gaatcctacg gtactagcta ccagggggct tactttgact cctggggcca aggcaccact	360
[0109]	ctcacagtct cctca	375
[0110]	<210> 10	
[0111]	<211> 354	
[0112]	<212> DNA	
[0113]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0114]	<400> 10	
[0115]	gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
[0116]	tcctgtaagg cttctggata tacattcact gacctctata tgaactgggt gaagcagagc	120

[0117] catggaagc gccttgagt gattggagtt attaatecctt acaacgggtg tactagctac 180
 [0118] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
 [0119] atggacctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggatgat 300
 [0120] agtatctatg ttatggacta ctggggctcaa ggaacctcat tcaccgtctc ctca 354
 [0121] <210> 11
 [0122] <211> 363
 [0123] <212> DNA
 [0124] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0125] <400> 11
 [0126] caggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
 [0127] acctgcacag tctctggttt ctcatctaact agttatgggtg tacactgggtg tcgccagtct 120
 [0128] ccaggaaagg gtctggagt gctgggagtg atatggaatg gtggaagtac agactataat 180
 [0129] gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt 240
 [0130] aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt actgtgccag aaggaactac 300
 [0131] ggtagtacct attacttttg tatggactac tggggctcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
 [0132] tca 363
 [0133] <210> 12
 [0134] <211> 354
 [0135] <212> DNA
 [0136] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0137] <400> 12
 [0138] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
 [0139] tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agccattgga tgcagtgggtg aaaacagagg 120
 [0140] cctggacagg gccttgagt gatcggagag attgatecctt ctgataactc tgctgactat 180
 [0141] aatcaaaagt tcaagggcag ggctcattg actgtagaca cgtcctccag cacaacctac 240
 [0142] atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtct attactgtgc aagagagatt 300
 [0143] agtacggtag ggtttactta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354
 [0144] <210> 13
 [0145] <211> 321
 [0146] <212> DNA
 [0147] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0148] <400> 13
 [0149] gaaaatgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60
 [0150] atgacctgca gtgccagctc aagtgtgaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaagc 120
 [0151] acctceccca aactctggat ttatgacaca tccaaactgt cttctggagt cccaggctgc 180
 [0152] ttcaagtggca gtgggtctgg aaagtcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggtgaa 240
 [0153] gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cactattcac gttcggctcg 300
 [0154] gggacaaagt tggaaataaa a 321
 [0155] <210> 14

[0156] <211> 363
[0157] <212> DNA
[0158] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0159] <400> 14
[0160] caggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
[0161] acctgcacag tctctggttt ctcattaact agttatgggtg tacactgggt tcgccagtct 120
[0162] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggaatg gtggaagtac agactataat 180
[0163] gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt 240
[0164] aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt actgtgccag aaggaactac 300
[0165] ggtagtagctt attacttttg tatggactac tggggcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
[0166] tca 363
[0167] <210> 15
[0168] <211> 357
[0169] <212> DNA
[0170] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0171] <400> 15
[0172] cagatccagt tggtagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
[0173] tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca acctatggaa tgagctgggt gaaacaggct 120
[0174] ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct actctggagt gccaacatat 180
[0175] ggtgatgact tcaagggacg gtttgccctc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat 240
[0176] ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgt aagatattac 300
[0177] tacggtagta ccccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357
[0178] <210> 16
[0179] <211> 360
[0180] <212> DNA
[0181] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0182] <400> 16
[0183] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaggctg 60
[0184] tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
[0185] cctggacgag gccttgagtg gattggaagg attgatccta atagtgggtg tactaagtac 180
[0186] aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aaccctccag cacagcctac 240
[0187] atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagaaatggg 300
[0188] gtagtagttt cgtactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360
[0189] <210> 17
[0190] <211> 336
[0191] <212> DNA
[0192] <213> 小鼠 (Mus musculus)
[0193] <400> 17
[0194] gatgtacagc ttcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60

[0195]	acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgattatt tctggagctg gatccggcag	120
[0196]	tttccaggaa acaaaatgga atggatgggc tacattagtt acgatggtcg caataactac	180
[0197]	aaccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc	240
[0198]	ctgaagttga attctgtgac ttctgaggac acagccacgt attactgtgc aagacatgac	300
[0199]	ttctggggcc aaggcaccac tctcacagtc tectca	336
[0200]	<210>	18
[0201]	<211>	321
[0202]	<212>	DNA
[0203]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0204]	<400>	18
[0205]	aatattgtgg tgaccagac tccaaattc ctgcttgtat caccaggaga cagggttacc	60
[0206]	ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca acagaagcca	120
[0207]	gggcagtctc ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctatactgg agtccctgat	180
[0208]	cgcttcaactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct	240
[0209]	gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgctcac gttcgggtgct	300
[0210]	gggaccaagc tggagctgaa a	321
[0211]	<210>	19
[0212]	<211>	354
[0213]	<212>	DNA
[0214]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0215]	<400>	19
[0216]	gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
[0217]	tcctgtaagg cttctggata tacattcact gacctctata tgaactgggtt gaagcagagc	120
[0218]	catggaaagc gccttgagtg gattggagtt attaatecctt acaacgggtg tactagctac	180
[0219]	aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac	240
[0220]	atggacctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggatgat	300
[0221]	agtatctatg ttatggacta ctgggggtcaa ggaacctcat tcaccgtctc ctca	354
[0222]	<210>	20
[0223]	<211>	363
[0224]	<212>	DNA
[0225]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0226]	<400>	20
[0227]	caggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc	60
[0228]	acctgcacag tctctggttt ctcatctaact agttatggtg tactactgggt tcgccagtct	120
[0229]	ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggaatg gtggaagtac agactataat	180
[0230]	gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacaatt ccaagagcca agttttcttt	240
[0231]	aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatatt actgtgccag aaggaactac	300
[0232]	ggtagtacct attacttttg tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	360
[0233]	tca	363

[0234]	<210> 21	
[0235]	<211> 360	
[0236]	<212> DNA	
[0237]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0238]	<400> 21	
[0239]	caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaggctg	60
[0240]	tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg	120
[0241]	cctggacgag gccttgagtg gattggaagg attgatccta atagtgggtg tactaagtac	180
[0242]	aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aacctccag cacagcctac	240
[0243]	atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagaaatggg	300
[0244]	gtagtagttt cgtactactt tgactactgg ggccaaggca ccaactctcac agtctcctca	360
[0245]	<210> 22	
[0246]	<211> 351	
[0247]	<212> DNA	
[0248]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0249]	<400> 22	
[0250]	gaggtgaagc ttctccagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc	60
[0251]	tcctgtgcag cctcaggaat cgattttagt agatactgga tgagttgggt tcggcgggct	120
[0252]	ccagggaaag gactagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac aataaactat	180
[0253]	gcaccatctc taaaggataa attcatcadc tccagagaca acgccccaaa tacgctgtac	240
[0254]	ctgcaaatga gcaaagtgag atctgaggac acagtccttt attactgtgc aagagataat	300
[0255]	atgggggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacgggtca cegtctcctc a	351
[0256]	<210> 23	
[0257]	<211> 339	
[0258]	<212> DNA	
[0259]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0260]	<400> 23	
[0261]	gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact	60
[0262]	atgagctgca agtccagtca gaggctttta aatagtagca ttcaaaagaa ctatttggcc	120
[0263]	tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctga tatactttgc atccactagg	180
[0264]	gaatctgggg tcctgatcg cttcatagge agtggatctg ggacagattt cactcttacc	240
[0265]	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttatagcact	300
[0266]	ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa	339
[0267]	<210> 24	
[0268]	<211> 375	
[0269]	<212> DNA	
[0270]	<213> 小鼠 (Mus musculus)	
[0271]	<400> 24	
[0272]	gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60

[0273] tcctgtaagg cttctggata cacattcact gactactata tgaactgggt gaagcagagc 120
 [0274] catggaaga gccttgagtg gattggagtt attaatecctt acaacgggtg tactgactac 180
 [0275] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
 [0276] atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaagaaga 300
 [0277] gaatcctacg gtactagcta ccagggggct tactttgact cctggggcca aggcaccact 360
 [0278] ctcacagtct cctca 375
 [0279] <210> 25
 [0280] <211> 321
 [0281] <212> DNA
 [0282] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0283] <400> 25
 [0284] gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc 60
 [0285] atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 [0286] gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 [0287] aggttcagtg gcagtggtc tggaacagat tattctctca gcattagcga cctggagcaa 240
 [0288] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag gttattacgc ttccgtggac gttcgggtga 300
 [0289] ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
 [0290] <210> 26
 [0291] <211> 354
 [0292] <212> DNA
 [0293] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0294] <400> 26
 [0295] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 [0296] tcctgtaagg tttctggata cacattcact gactactata tgaactgggt gaagcagagc 120
 [0297] catggaaga gccttgaatg gattggagtt attactcctt acaacgggtc taataggtac 180
 [0298] aaccagaaat tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
 [0299] atggaggtct ccagcctgac atcggaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggtgat 300
 [0300] agtatatatg ttatggacta ttgggggtcaa ggaacctcag tcatcgtctc ctca 354
 [0301] <210> 27
 [0302] <211> 339
 [0303] <212> DNA
 [0304] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0305] <400> 27
 [0306] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctctgt cagtaggaca gaaggtcact 60
 [0307] atgagctgca agtccagtca gagcctttta gataattcca atcaaaagca ctatttgccc 120
 [0308] tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
 [0309] gaatctgggg tcctgatcg ctccataggc agtggctctg ggacagattt cactcttacc 240
 [0310] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcagca ttataaccgt 300
 [0311] ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gcgctgaaa 339

- [0312] <210> 28
- [0313] <211> 354
- [0314] <212> DNA
- [0315] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0316] <400> 28
- [0317] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
- [0318] tcctgtaagg cttctggata cacattcact gactactctt tgaactgggt gaagcagagc 120
- [0319] catggaaaaa gccttgagtg gattggagtt gttaatcctt acaacgggtg tactagccac 180
- [0320] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
- [0321] atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagacccgat 300
- [0322] agtatatatg ttatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354
- [0323] <210> 29
- [0324] <211> 339
- [0325] <212> DNA
- [0326] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0327] <400> 29
- [0328] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60
- [0329] atgagctgca agtccagtca gagcctttta aatagtagca ttcaaaagaa ctatttggcc 120
- [0330] tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
- [0331] gaatctgggg tcctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagattt cactcttacc 240
- [0332] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttatagcact 300
- [0333] ccgctcacgt tcggtggtgg gaccaagctg gagctgaaa 339
- [0334] <210> 30
- [0335] <211> 354
- [0336] <212> DNA
- [0337] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0338] <400> 30
- [0339] gaggtccaac tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
- [0340] tcctgtaagg cttctggata cacattcact gactactctc tgaactgggt gaagcagagc 120
- [0341] catggaaaga gccttgagtg gattggagtt gttaatcctt acaacgggtg tactacctac 180
- [0342] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
- [0343] atggagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagacccgat 300
- [0344] agtatctatg ttatggactc ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354
- [0345] <210> 31
- [0346] <211> 339
- [0347] <212> DNA
- [0348] <213> 小鼠 (Mus musculus)
- [0349] <400> 31
- [0350] gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60

[0351] atgagctgca agtccagtca gagcctttta aatagtaaca ttcaaaagaa ctatttggcc 120
 [0352] tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
 [0353] gaatctgggg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagattt cactcttacc 240
 [0354] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttatagcact 300
 [0355] ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339
 [0356] <210> 32
 [0357] <211> 351
 [0358] <212> DNA
 [0359] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0360] <400> 32
 [0361] caggttactc tgaaagagtc tggccctggg attttgcagt cctcccagac cctcagtctg 60
 [0362] acctgttctt tttctgggtt ttcgctgaac acctctggta tgggtgtgaa ctggattcgt 120
 [0363] cagtcttcag gaaaggatct ggagtggctg gcacacattt actggaatga tgacaagcgc 180
 [0364] tataatccat ccttgaagag ccggctcaca atttccaagg acacctccag aaatcaggtc 240
 [0365] ttctcagga tcaccagtgt ggacgctaca gacactgcca cttatttctg ttgtcgaagt 300
 [0366] agactctcct ttgactactg gggccacggc accactctca cagtctcctc a 351
 [0367] <210> 33
 [0368] <211> 321
 [0369] <212> DNA
 [0370] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0371] <400> 33
 [0372] gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgtat ctctaggaga gagagtcact 60
 [0373] atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aggaatttaa gctggttcca gcagaaacca 120
 [0374] gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatta 180
 [0375] aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
 [0376] gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttctcggac gttcgggtgga 300
 [0377] ggcaccaagt tggaaatcaa a 321
 [0378] <210> 34
 [0379] <211> 354
 [0380] <212> DNA
 [0381] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0382] <400> 34
 [0383] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 [0384] tcttgtaagg cttctggata tacattcact gacctctata tgaactgggt gaagcagagc 120
 [0385] catggaaagc gccttgagtg gattggagtt attaatecctt acaacgggtg tactagctac 180
 [0386] aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtctccag cacagcctac 240
 [0387] atggacctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagaggatgat 300
 [0388] agtatctatg ttatggacta ctgggggtcaa ggaacctcat tcaccgtctc ctca 354
 [0389] <210> 35

[0390]	<211>	321
[0391]	<212>	DNA
[0392]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0393]	<400>	35
[0394]		gaaaatgttc tcaccagtc tccagcaate atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60
[0395]		atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaagc 120
[0396]		acctcccca aactctggat ttatgacaca tccaaactgt cttctggagt cccaggtcgc 180
[0397]		ttcagtggca gtgggtctgg aaagtcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa 240
[0398]		gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cactattcac gttcggctcg 300
[0399]		gggacaaagt tggaaataaa a 321
[0400]	<210>	36
[0401]	<211>	339
[0402]	<212>	DNA
[0403]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0404]	<400>	36
[0405]		gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60
[0406]		atgagctgca agtccagtca ggccttttta aatagtagca ttcaaaagaa ctatttggcc 120
[0407]		tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctga tatactttgc atccactagg 180
[0408]		gaatctgggg tcctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagattt cactcttacc 240
[0409]		atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttatagcact 300
[0410]		ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339
[0411]	<210>	37
[0412]	<211>	354
[0413]	<212>	DNA
[0414]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0415]	<400>	37
[0416]		gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgtg ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
[0417]		tcctgtaagg tttctggata cacattcact gactactata tgaactgggt gaagcagagc 120
[0418]		catggaaaga gccttgaatg gattggaatt attactcctt acaacggcgc tactaactac 180
[0419]		aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240
[0420]		atggagctca acagcctgac atctgaagac tctgcagtct attactgtgc aagaggtgat 300
[0421]		agtatctatg ttatggacta ttgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354
[0422]	<210>	38
[0423]	<211>	339
[0424]	<212>	DNA
[0425]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0426]	<400>	38
[0427]		gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60
[0428]		atgagctgca agtccagtca ggccttttta aatagtgcca atcaaaagaa ctatttggcc 120

[0429] tggtaccagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
 [0430] gaatctgggg tccccgatcg cttcataggc agtgactctg ggacagattt cactcttacc 240
 [0431] atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gattacttct gtcagcaaca ttataccgct 300
 [0432] ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339
 [0433] <210> 39
 [0434] <211> 470
 [0435] <212> PRT
 [0436] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0437] <400> 39
 [0438] Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 [0439] 1 5 10 15
 [0440] Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 [0441] 20 25 30
 [0442] Pro Gly Ala Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Ser Phe
 [0443] 35 40 45
 [0444] Thr Asp Tyr Ile Met Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu
 [0445] 50 55 60
 [0446] Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
 [0447] 65 70 75 80
 [0448] Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 [0449] 85 90 95
 [0450] Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 [0451] 100 105 110
 [0452] Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Asp Tyr Tyr Thr Met Asp
 [0453] 115 120 125
 [0454] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 [0455] 130 135 140
 [0456] Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 [0457] 145 150 155 160
 [0458] Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 [0459] 165 170 175
 [0460] Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 [0461] 180 185 190
 [0462] Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 [0463] 195 200 205
 [0464] Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 [0465] 210 215 220
 [0466] Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 [0467] 225 230 235 240

[0468]	Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
[0469]	245 250 255
[0470]	Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
[0471]	260 265 270
[0472]	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
[0473]	275 280 285
[0474]	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
[0475]	290 295 300
[0476]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
[0477]	305 310 315 320
[0478]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
[0479]	325 330 335
[0480]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
[0481]	340 345 350
[0482]	Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
[0483]	355 360 365
[0484]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
[0485]	370 375 380
[0486]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
[0487]	385 390 395 400
[0488]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
[0489]	405 410 415
[0490]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
[0491]	420 425 430
[0492]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
[0493]	435 440 445
[0494]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
[0495]	450 455 460
[0496]	Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0497]	465 470
[0498]	<210> 40
[0499]	<211> 236
[0500]	<212> PRT
[0501]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0502]	<400> 40
[0503]	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
[0504]	1 5 10 15
[0505]	Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe
[0506]	20 25 30

[0507]	Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
[0508]	35 40 45
[0509]	Gln Ser Val Gly Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln
[0510]	50 55 60
[0511]	Phe Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val
[0512]	65 70 75 80
[0513]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0514]	85 90 95
[0515]	Ile Ser Asn Met Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
[0516]	100 105 110
[0517]	Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu
[0518]	115 120 125
[0519]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[0520]	130 135 140
[0521]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
[0522]	145 150 155 160
[0523]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
[0524]	165 170 175
[0525]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
[0526]	180 185 190
[0527]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
[0528]	195 200 205
[0529]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
[0530]	210 215 220
[0531]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0532]	225 230 235
[0533]	<210> 41
[0534]	<211> 467
[0535]	<212> PRT
[0536]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0537]	<400> 41
[0538]	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
[0539]	1 5 10 15
[0540]	Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys
[0541]	20 25 30
[0542]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0543]	35 40 45
[0544]	Thr Asp Leu Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
[0545]	50 55 60

[0546]	Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn
[0547]	65 70 75 80
[0548]	Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile
[0549]	85 90 95
[0550]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[0551]	100 105 110
[0552]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly
[0553]	115 120 125
[0554]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0555]	130 135 140
[0556]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0557]	145 150 155 160
[0558]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0559]	165 170 175
[0560]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0561]	180 185 190
[0562]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0563]	195 200 205
[0564]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
[0565]	210 215 220
[0566]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
[0567]	225 230 235 240
[0568]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
[0569]	245 250 255
[0570]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
[0571]	260 265 270
[0572]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
[0573]	275 280 285
[0574]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0575]	290 295 300
[0576]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0577]	305 310 315 320
[0578]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0579]	325 330 335
[0580]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0581]	340 345 350
[0582]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0583]	355 360 365
[0584]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

[0585]	370	375	380
[0586]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0587]	385	390	395
[0588]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0589]	405	410	415
[0590]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0591]	420	425	430
[0592]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0593]	435	440	445
[0594]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0595]	450	455	460
[0596]	Pro Gly Lys		
[0597]	465		
[0598]	<210> 42		
[0599]	<211> 242		
[0600]	<212> PRT		
[0601]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0602]	<400> 42		
[0603]	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp		
[0604]	1	5	10
[0605]	Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser		
[0606]	20	25	30
[0607]	Leu Ala Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser		
[0608]	35	40	45
[0609]	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr		
[0610]	50	55	60
[0611]	Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser		
[0612]	65	70	75
[0613]	Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly		
[0614]	85	90	95
[0615]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala		
[0616]	100	105	110
[0617]	Asp Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala		
[0618]	115	120	125
[0619]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe		
[0620]	130	135	140
[0621]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val		
[0622]	145	150	155
[0623]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp		

[0624]		165		170		175
[0625]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr					
[0626]		180		185		190
[0627]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr					
[0628]		195		200		205
[0629]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val					
[0630]		210		215		220
[0631]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly					
[0632]		225		230		235
[0633]	Glu Cys					
[0634]	<210> 43					
[0635]	<211> 471					
[0636]	<212> PRT					
[0637]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0638]	<400> 43					
[0639]	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly					
[0640]		1		5		10
[0641]	Val Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln					
[0642]		20		25		30
[0643]	Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe					
[0644]		35		40		45
[0645]	Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu					
[0646]		50		55		60
[0647]	Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala					
[0648]		65		70		75
[0649]	Pro Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Ala Ala Lys Asn					
[0650]		85		90		95
[0651]	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu					
[0652]		100		105		110
[0653]	Tyr Tyr Cys Ala Thr Leu Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Ala Met					
[0654]		115		120		125
[0655]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr					
[0656]		130		135		140
[0657]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser					
[0658]		145		150		155
[0659]	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu					
[0660]		165		170		175
[0661]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His					
[0662]		180		185		190

[0663]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[0664]	195 200 205
[0665]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
[0666]	210 215 220
[0667]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
[0668]	225 230 235 240
[0669]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[0670]	245 250 255
[0671]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[0672]	260 265 270
[0673]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[0674]	275 280 285
[0675]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[0676]	290 295 300
[0677]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
[0678]	305 310 315 320
[0679]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[0680]	325 330 335
[0681]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
[0682]	340 345 350
[0683]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[0684]	355 360 365
[0685]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
[0686]	370 375 380
[0687]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0688]	385 390 395 400
[0689]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0690]	405 410 415
[0691]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0692]	420 425 430
[0693]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
[0694]	435 440 445
[0695]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0696]	450 455 460
[0697]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0698]	465 470
[0699]	<210> 44
[0700]	<211> 236
[0701]	<212> PRT

[0702]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0703]	<400> 44															
[0704]	Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp
[0705]	1			5					10					15		
[0706]	Phe	Pro	Gly	Ser	Arg	Cys	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Pro	Ser	Gln	Lys	Phe
[0707]			20					25						30		
[0708]	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser
[0709]			35					40						45		
[0710]	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
[0711]		50						55					60			
[0712]	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val
[0713]	65					70					75				80	
[0714]	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
[0715]					85					90					95	
[0716]	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	His
[0717]				100						105					110	
[0718]	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
[0719]			115							120					125	
[0720]	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp
[0721]		130							135						140	
[0722]	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn
[0723]	145					150						155			160	
[0724]	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu
[0725]					165						170				175	
[0726]	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp
[0727]				180						185					190	
[0728]	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr
[0729]			195							200					205	
[0730]	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser
[0731]		210							215						220	
[0732]	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys				
[0733]	225					230						235				
[0734]	<210> 45															
[0735]	<211> 474															
[0736]	<212> PRT															
[0737]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0738]	<400> 45															
[0739]	Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
[0740]	1			5						10					15	

[0741]	Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Lys
[0742]				20					25					30		
[0743]	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
[0744]				35					40					45		
[0745]	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu
[0746]				50					55					60		
[0747]	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Asp	Tyr	Asn
[0748]				65					70					75		80
[0749]	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
[0750]														85		90
[0751]	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
[0752]														100		105
[0753]	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	Ser	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Gln	Gly
[0754]																110
[0755]	Ala	Tyr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
[0756]																130
[0757]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[0758]																145
[0759]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[0760]																165
[0761]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[0762]																180
[0763]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[0764]																195
[0765]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[0766]																210
[0767]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[0768]																225
[0769]	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[0770]																245
[0771]	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[0772]																260
[0773]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
[0774]																275
[0775]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[0776]																290
[0777]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
[0778]																305
[0779]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu

[0780]		325		330		335										
[0781]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[0782]		340		345		350										
[0783]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[0784]		355		360		365										
[0785]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
[0786]		370		375		380										
[0787]	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[0788]	385		390		395	400										
[0789]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[0790]		405		410		415										
[0791]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[0792]		420		425		430										
[0793]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[0794]		435		440		445										
[0795]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[0796]		450		455		460										
[0797]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[0798]	465		470													
[0799]	<210>	46														
[0800]	<211>	236														
[0801]	<212>	PRT														
[0802]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[0803]	<400>	46														
[0804]	Met	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp
[0805]	1		5		10		15									
[0806]	Phe	Pro	Gly	Ser	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser
[0807]		20		25		30										
[0808]	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser
[0809]		35		40		45										
[0810]	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly
[0811]		50		55		60										
[0812]	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val
[0813]	65		70		75	80										
[0814]	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Ser
[0815]		85		90		95										
[0816]	Ile	Ser	Asp	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln
[0817]		100		105		110										
[0818]	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile

[0819]	115	120	125
[0820]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
[0821]	130	135	140
[0822]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
[0823]	145	150	155
[0824]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
[0825]	165	170	175
[0826]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
[0827]	180	185	190
[0828]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
[0829]	195	200	205
[0830]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
[0831]	210	215	220
[0832]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0833]	225	230	235
[0834]	<210> 47		
[0835]	<211> 467		
[0836]	<212> PRT		
[0837]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0838]	<400> 47		
[0839]	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly		
[0840]	1	5	10
[0841]	Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys		
[0842]	20	25	30
[0843]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
[0844]	35	40	45
[0845]	Thr Asp Leu Tyr Met Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu		
[0846]	50	55	60
[0847]	Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn		
[0848]	65	70	75
[0849]	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser		
[0850]	85	90	95
[0851]	Thr Ala Tyr Met Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val		
[0852]	100	105	110
[0853]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly		
[0854]	115	120	125
[0855]	Gln Gly Thr Ser Phe Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0856]	130	135	140
[0857]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		

[0858]	145	150	155	160
[0859]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
[0860]		165	170	175
[0861]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
[0862]		180	185	190
[0863]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
[0864]		195	200	205
[0865]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
[0866]		210	215	220
[0867]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
[0868]		225	230	240
[0869]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly			
[0870]		245	250	255
[0871]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
[0872]		260	265	270
[0873]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His			
[0874]		275	280	285
[0875]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
[0876]		290	295	300
[0877]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr			
[0878]		305	310	315
[0879]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly			
[0880]		325	330	335
[0881]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile			
[0882]		340	345	350
[0883]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val			
[0884]		355	360	365
[0885]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			
[0886]		370	375	380
[0887]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu			
[0888]		385	390	395
[0889]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
[0890]		405	410	415
[0891]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
[0892]		420	425	430
[0893]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
[0894]		435	440	445
[0895]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
[0896]		450	455	460

[0897] Pro Gly Lys
 [0898] 465
 [0899] <210> 48
 [0900] <211> 236
 [0901] <212> PRT
 [0902] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0903] <400> 48
 [0904] Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 [0905] 1 5 10 15
 [0906] Phe Pro Gly Ser Arg Cys Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 [0907] 20 25 30
 [0908] Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 [0909] 35 40 45
 [0910] Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser
 [0911] 50 55 60
 [0912] Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro
 [0913] 65 70 75 80
 [0914] Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 [0915] 85 90 95
 [0916] Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 [0917] 100 105 110
 [0918] Ser Gly Tyr Pro Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 [0919] 115 120 125
 [0920] Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 [0921] 130 135 140
 [0922] Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 [0923] 145 150 155 160
 [0924] Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 [0925] 165 170 175
 [0926] Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 [0927] 180 185 190
 [0928] Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 [0929] 195 200 205
 [0930] Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 [0931] 210 215 220
 [0932] Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0933] 225 230 235
 [0934] <210> 49
 [0935] <211> 467

[0936]	<212>	PRT
[0937]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0938]	<400>	49
[0939]	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
[0940]	1	5 10 15
[0941]	Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys	
[0942]		20 25 30
[0943]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
[0944]		35 40 45
[0945]	Thr Asp Leu Tyr Met Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu	
[0946]		50 55 60
[0947]	Glu Trp Ile Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn	
[0948]		65 70 75 80
[0949]	Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser	
[0950]		85 90 95
[0951]	Thr Ala Tyr Met Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
[0952]		100 105 110
[0953]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly	
[0954]		115 120 125
[0955]	Gln Gly Thr Ser Phe Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
[0956]		130 135 140
[0957]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	
[0958]		145 150 155 160
[0959]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	
[0960]		165 170 175
[0961]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
[0962]		180 185 190
[0963]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	
[0964]		195 200 205
[0965]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	
[0966]		210 215 220
[0967]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	
[0968]		225 230 235 240
[0969]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
[0970]		245 250 255
[0971]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
[0972]		260 265 270
[0973]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
[0974]		275 280 285

[0975]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
[0976]	290 295 300
[0977]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
[0978]	305 310 315 320
[0979]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
[0980]	325 330 335
[0981]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
[0982]	340 345 350
[0983]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
[0984]	355 360 365
[0985]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
[0986]	370 375 380
[0987]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
[0988]	385 390 395 400
[0989]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
[0990]	405 410 415
[0991]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
[0992]	420 425 430
[0993]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0994]	435 440 445
[0995]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0996]	450 455 460
[0997]	Pro Gly Lys
[0998]	465
[0999]	<210> 50
[1000]	<211> 236
[1001]	<212> PRT
[1002]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1003]	<400> 50
[1004]	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
[1005]	1 5 10 15
[1006]	Phe Pro Gly Ser Arg Cys Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
[1007]	20 25 30
[1008]	Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
[1009]	35 40 45
[1010]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser
[1011]	50 55 60
[1012]	Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro
[1013]	65 70 75 80

[1014]	Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
[1015]	85 90 95
[1016]	Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
[1017]	100 105 110
[1018]	Ser Gly Tyr Pro Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[1019]	115 120 125
[1020]	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
[1021]	130 135 140
[1022]	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
[1023]	145 150 155 160
[1024]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
[1025]	165 170 175
[1026]	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
[1027]	180 185 190
[1028]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
[1029]	195 200 205
[1030]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
[1031]	210 215 220
[1032]	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1033]	225 230 235
[1034]	<210> 51
[1035]	<211> 242
[1036]	<212> PRT
[1037]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1038]	<400> 51
[1039]	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
[1040]	1 5 10 15
[1041]	Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
[1042]	20 25 30
[1043]	Leu Ala Met Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser
[1044]	35 40 45
[1045]	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ser Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
[1046]	50 55 60
[1047]	Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser
[1048]	65 70 75 80
[1049]	Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly
[1050]	85 90 95
[1051]	Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
[1052]	100 105 110

[1053]	Asp Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala
[1054]	115 120 125
[1055]	Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
[1056]	130 135 140
[1057]	Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
[1058]	145 150 155 160
[1059]	Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
[1060]	165 170 175
[1061]	Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
[1062]	180 185 190
[1063]	Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
[1064]	195 200 205
[1065]	Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
[1066]	210 215 220
[1067]	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
[1068]	225 230 235 240
[1069]	Glu Cys
[1070]	<210> 52
[1071]	<211> 21
[1072]	<212> PRT
[1073]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1074]	<400> 52
[1075]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[1076]	1 5 10 15
[1077]	His Ala Ala Arg Pro
[1078]	20
[1079]	<210> 53
[1080]	<211> 107
[1081]	<212> PRT
[1082]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1083]	<400> 53
[1084]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[1085]	1 5 10 15
[1086]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ala
[1087]	20 25 30
[1088]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Phe Pro Lys Leu Leu Ile
[1089]	35 40 45
[1090]	Tyr Ser Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[1091]	50 55 60

[1092]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser
[1093]	65 70 75 80
[1094]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu
[1095]	85 90 95
[1096]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[1097]	100 105
[1098]	<210> 54
[1099]	<211> 121
[1100]	<212> PRT
[1101]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1102]	<400> 54
[1103]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1104]	1 5 10 15
[1105]	Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
[1106]	20 25 30
[1107]	Ile Met Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
[1108]	35 40 45
[1109]	Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
[1110]	50 55 60
[1111]	Lys Asp Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
[1112]	65 70 75 80
[1113]	Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1114]	85 90 95
[1115]	Ala Arg Arg Gly Ile Thr Thr Asp Tyr Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
[1116]	100 105 110
[1117]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1118]	115 120
[1119]	<210> 55
[1120]	<211> 113
[1121]	<212> PRT
[1122]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1123]	<400> 55
[1124]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
[1125]	1 5 10 15
[1126]	Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1127]	20 25 30
[1128]	Ser Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1129]	35 40 45
[1130]	Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[1131]	50	55	60
[1132]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[1133]	65	70	75 80
[1134]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln		
[1135]	85	90	95
[1136]	His Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu		
[1137]	100	105	110
[1138]	Lys		
[1139]	<210> 56		
[1140]	<211> 118		
[1141]	<212> PRT		
[1142]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1143]	<400> 56		
[1144]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[1145]	1 5 10 15		
[1146]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Leu		
[1147]	20 25 30		
[1148]	Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile		
[1149]	35 40 45		
[1150]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[1151]	50 55 60		
[1152]	Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Tyr		
[1153]	65 70 75 80		
[1154]	Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1155]	85 90 95		
[1156]	Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[1157]	100 105 110		
[1158]	Ser Val Thr Val Ser Ser		
[1159]	115		
[1160]	<210> 57		
[1161]	<211> 107		
[1162]	<212> PRT		
[1163]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1164]	<400> 57		
[1165]	Asp Ile Val Met Thr Pro Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
[1166]	1 5 10 15		
[1167]	Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn		
[1168]	20 25 30		
[1169]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile		

[1170]	35	40	45
[1171]	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
[1172]	50	55	60
[1173]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser		
[1174]	65	70	75
[1175]	Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln His Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe		
[1176]	85	90	95
[1177]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[1178]	100	105	
[1179]	<210> 58		
[1180]	<211> 122		
[1181]	<212> PRT		
[1182]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1183]	<400> 58		
[1184]	Glu Val Lys Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1185]	1	5	10
[1186]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser Arg Tyr		
[1187]	20	25	30
[1188]	Trp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[1189]	35	40	45
[1190]	Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu		
[1191]	50	55	60
[1192]	Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Ala Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1193]	65	70	75
[1194]	Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
[1195]	85	90	95
[1196]	Ala Thr Leu Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp		
[1197]	100	105	110
[1198]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[1199]	115	120	
[1200]	<210> 59		
[1201]	<211> 113		
[1202]	<212> PRT		
[1203]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1204]	<400> 59		
[1205]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly		
[1206]	1	5	10
[1207]	Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
[1208]	20	25	30

[1209]	Ser Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1210]	35 40 45
[1211]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[1212]	50 55 60
[1213]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1214]	65 70 75 80
[1215]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
[1216]	85 90 95
[1217]	His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
[1218]	100 105 110
[1219]	Lys
[1220]	<210> 60
[1221]	<211> 118
[1222]	<212> PRT
[1223]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1224]	<400> 60
[1225]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1226]	1 5 10 15
[1227]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Leu
[1228]	20 25 30
[1229]	Tyr Met Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
[1230]	35 40 45
[1231]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[1232]	50 55 60
[1233]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1234]	65 70 75 80
[1235]	Met Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1236]	85 90 95
[1237]	Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1238]	100 105 110
[1239]	Ser Phe Thr Val Ser Ser
[1240]	115
[1241]	<210> 61
[1242]	<211> 107
[1243]	<212> PRT
[1244]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1245]	<400> 61
[1246]	Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[1247]	1 5 10 15

[1248]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[1249]	20 25 30
[1250]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
[1251]	35 40 45
[1252]	Asp Thr Ser Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
[1253]	50 55 60
[1254]	Gly Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
[1255]	65 70 75 80
[1256]	Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Phe
[1257]	85 90 95
[1258]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1259]	100 105
[1260]	<210> 62
[1261]	<211> 118
[1262]	<212> PRT
[1263]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1264]	<400> 62
[1265]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1266]	1 5 10 15
[1267]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Leu
[1268]	20 25 30
[1269]	Tyr Met Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
[1270]	35 40 45
[1271]	Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
[1272]	50 55 60
[1273]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1274]	65 70 75 80
[1275]	Met Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1276]	85 90 95
[1277]	Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1278]	100 105 110
[1279]	Ser Phe Thr Val Ser Ser
[1280]	115
[1281]	<210> 63
[1282]	<211> 113
[1283]	<212> PRT
[1284]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1285]	<400> 63
[1286]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Leu Ser Val Gly

[1287]	1	5	10	15
[1288]	Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Asn			
[1289]	20	25	30	
[1290]	Ser Asn Gln Lys His Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
[1291]	35	40	45	
[1292]	Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
[1293]	50	55	60	
[1294]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
[1295]	65	70	75	80
[1296]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln			
[1297]	85	90	95	
[1298]	His Tyr Thr Ala Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ala Leu			
[1299]	100	105	110	
[1300]	Lys			
[1301]	<210> 64			
[1302]	<211> 118			
[1303]	<212> PRT			
[1304]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1305]	<400> 64			
[1306]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[1307]	1	5	10	15
[1308]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[1309]	20	25	30	
[1310]	Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
[1311]	35	40	45	
[1312]	Gly Val Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Asn Arg Tyr Asn Gln Lys Phe			
[1313]	50	55	60	
[1314]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[1315]	65	70	75	80
[1316]	Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1317]	85	90	95	
[1318]	Ala Arg Gly Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[1319]	100	105	110	
[1320]	Ser Val Ile Val Ser Ser			
[1321]	115			
[1322]	<210> 65			
[1323]	<211> 113			
[1324]	<212> PRT			
[1325]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			

[1326]	<400> 65
[1327]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
[1328]	1 5 10 15
[1329]	Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
[1330]	20 25 30
[1331]	Ser Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[1332]	35 40 45
[1333]	Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
[1334]	50 55 60
[1335]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[1336]	65 70 75 80
[1337]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
[1338]	85 90 95
[1339]	His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
[1340]	100 105 110
[1341]	Lys
[1342]	<210> 66
[1343]	<211> 118
[1344]	<212> PRT
[1345]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1346]	<400> 66
[1347]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
[1348]	1 5 10 15
[1349]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[1350]	20 25 30
[1351]	Ser Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[1352]	35 40 45
[1353]	Gly Val Val Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser His Asn Gln Lys Phe
[1354]	50 55 60
[1355]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[1356]	65 70 75 80
[1357]	Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[1358]	85 90 95
[1359]	Ala Arg Pro Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1360]	100 105 110
[1361]	Ser Val Thr Val Ser Ser
[1362]	115
[1363]	<210> 67
[1364]	<211> 113

[1365]	<212>	PRT
[1366]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1367]	<400>	67
[1368]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly	
[1369]	1	5 10 15
[1370]	Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser	
[1371]		20 25 30
[1372]	Asn Ile Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
[1373]		35 40 45
[1374]	Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
[1375]		50 55 60
[1376]	Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
[1377]		65 70 75 80
[1378]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln	
[1379]		85 90 95
[1380]	His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu	
[1381]		100 105 110
[1382]	Lys	
[1383]	<210>	68
[1384]	<211>	118
[1385]	<212>	PRT
[1386]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1387]	<400>	68
[1388]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[1389]	1	5 10 15
[1390]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[1391]		20 25 30
[1392]	Ser Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile	
[1393]		35 40 45
[1394]	Gly Val Val Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe	
[1395]		50 55 60
[1396]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[1397]		65 70 75 80
[1398]	Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1399]		85 90 95
[1400]	Ala Arg Pro Asp Ser Ile Tyr Val Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr	
[1401]		100 105 110
[1402]	Ser Val Thr Val Ser Ser	
[1403]		115

[1404] <210> 69
 [1405] <211> 107
 [1406] <212> PRT
 [1407] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1408] <400> 69
 [1409] Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Val Ser Leu Gly
 [1410] 1 5 10 15
 [1411] Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Asn
 [1412] 20 25 30
 [1413] Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 [1414] 35 40 45
 [1415] Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 [1416] 50 55 60
 [1417] Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 [1418] 65 70 75 80
 [1419] Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Arg
 [1420] 85 90 95
 [1421] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [1422] 100 105
 [1423] <210> 70
 [1424] <211> 117
 [1425] <212> PRT
 [1426] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1427] <400> 70
 [1428] Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln
 [1429] 1 5 10 15
 [1430] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Ser
 [1431] 20 25 30
 [1432] Gly Met Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Ser Ser Gly Lys Asp Leu Glu
 [1433] 35 40 45
 [1434] Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ser
 [1435] 50 55 60
 [1436] Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
 [1437] 65 70 75 80
 [1438] Phe Leu Arg Ile Thr Ser Val Asp Ala Thr Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 [1439] 85 90 95
 [1440] Cys Cys Arg Ser Arg Leu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr
 [1441] 100 105 110
 [1442] Leu Thr Val Ser Ser

[1482] Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 [1483] 35 40
 [1484] <210> 75
 [1485] <211> 113
 [1486] <212> PRT
 [1487] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1488] <400> 75
 [1489] Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 [1490] 1 5 10 15
 [1491] Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 [1492] 20 25 30
 [1493] Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 [1494] 35 40 45
 [1495] Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 [1496] 50 55 60
 [1497] Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 [1498] 65 70 75 80
 [1499] Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 [1500] 85 90 95
 [1501] Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 [1502] 100 105 110
 [1503] Arg

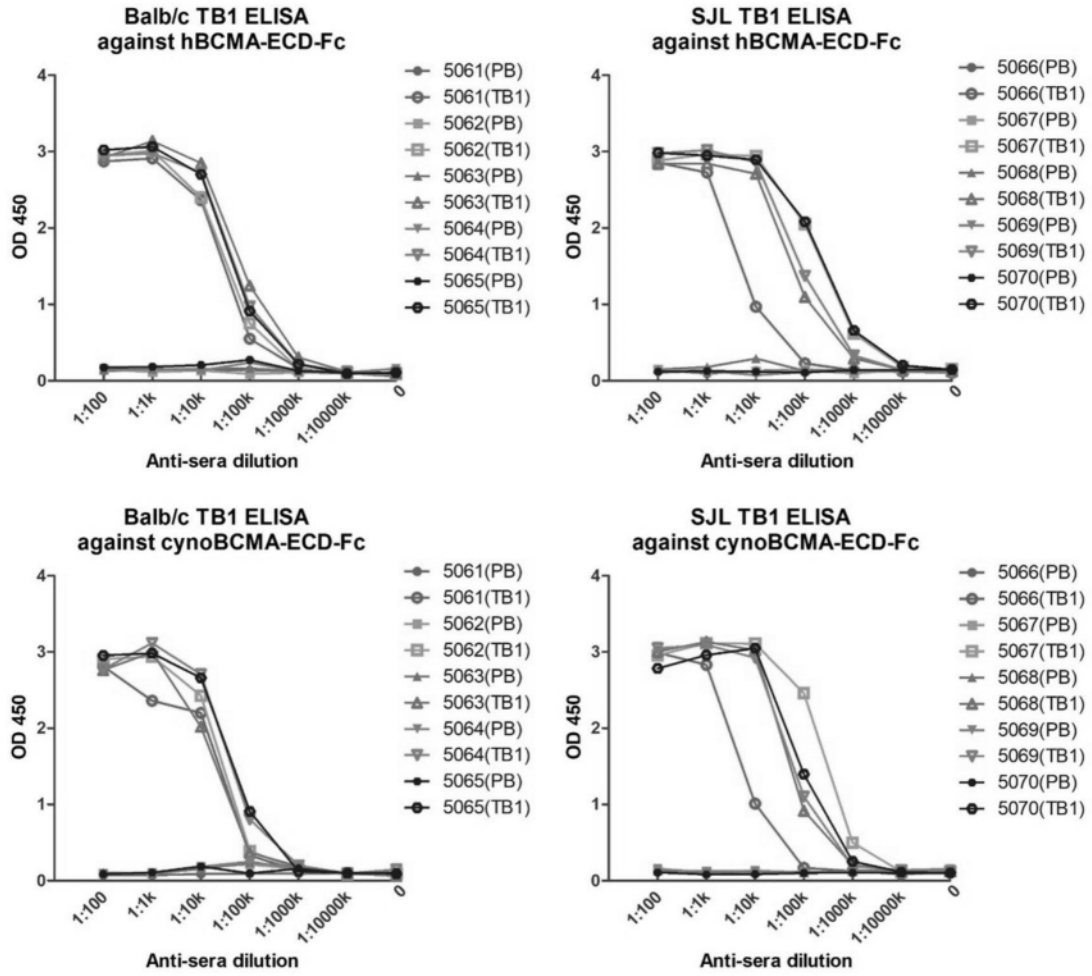


图1

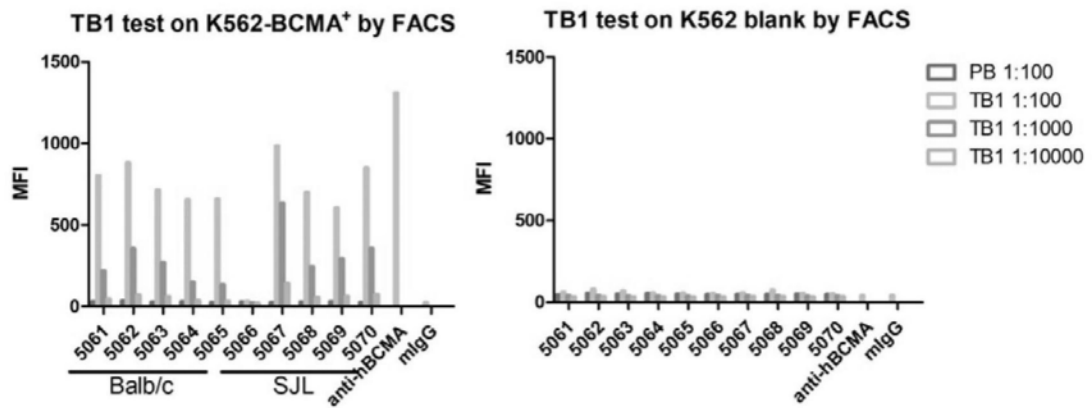


图2

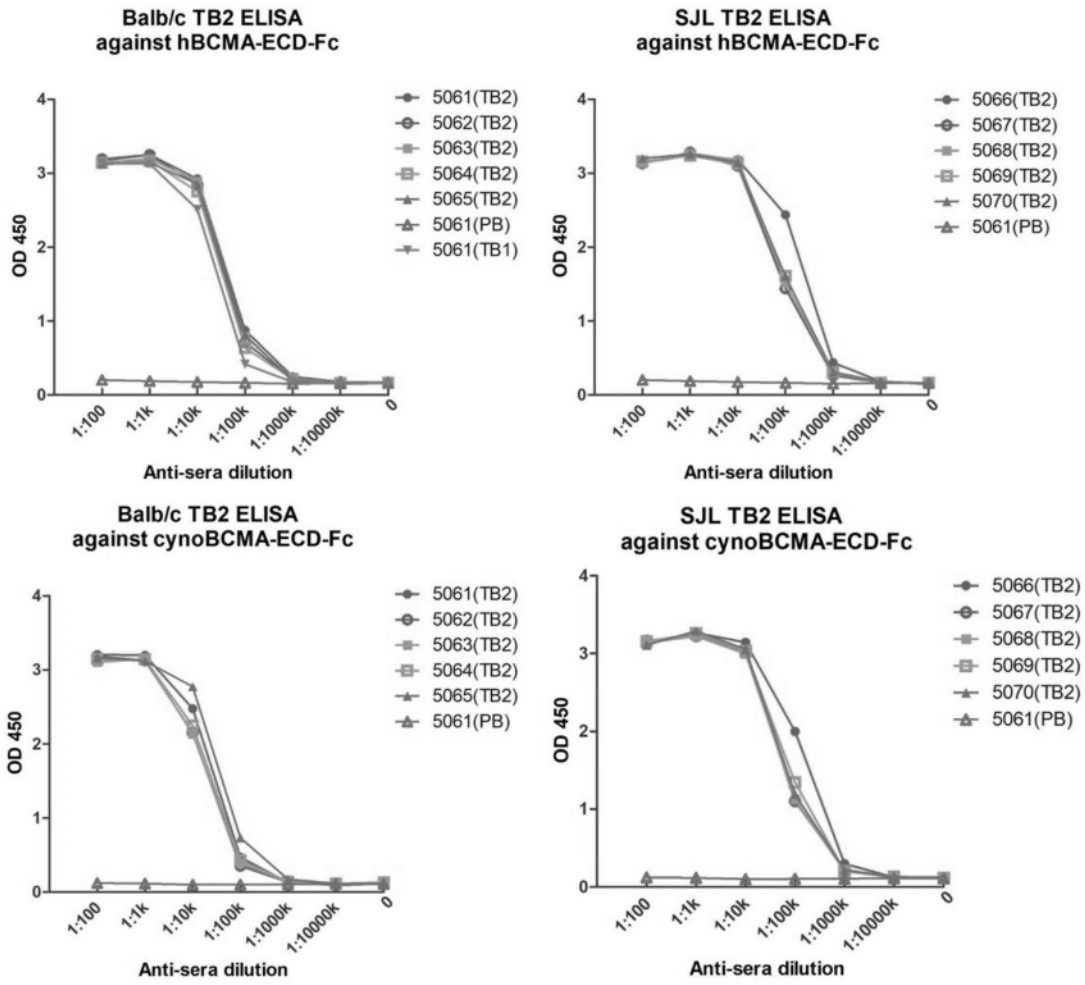


图3

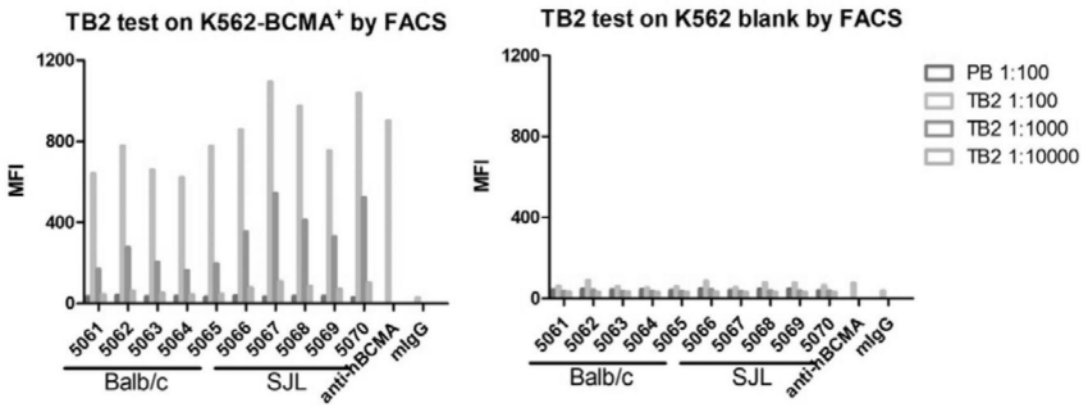


图4

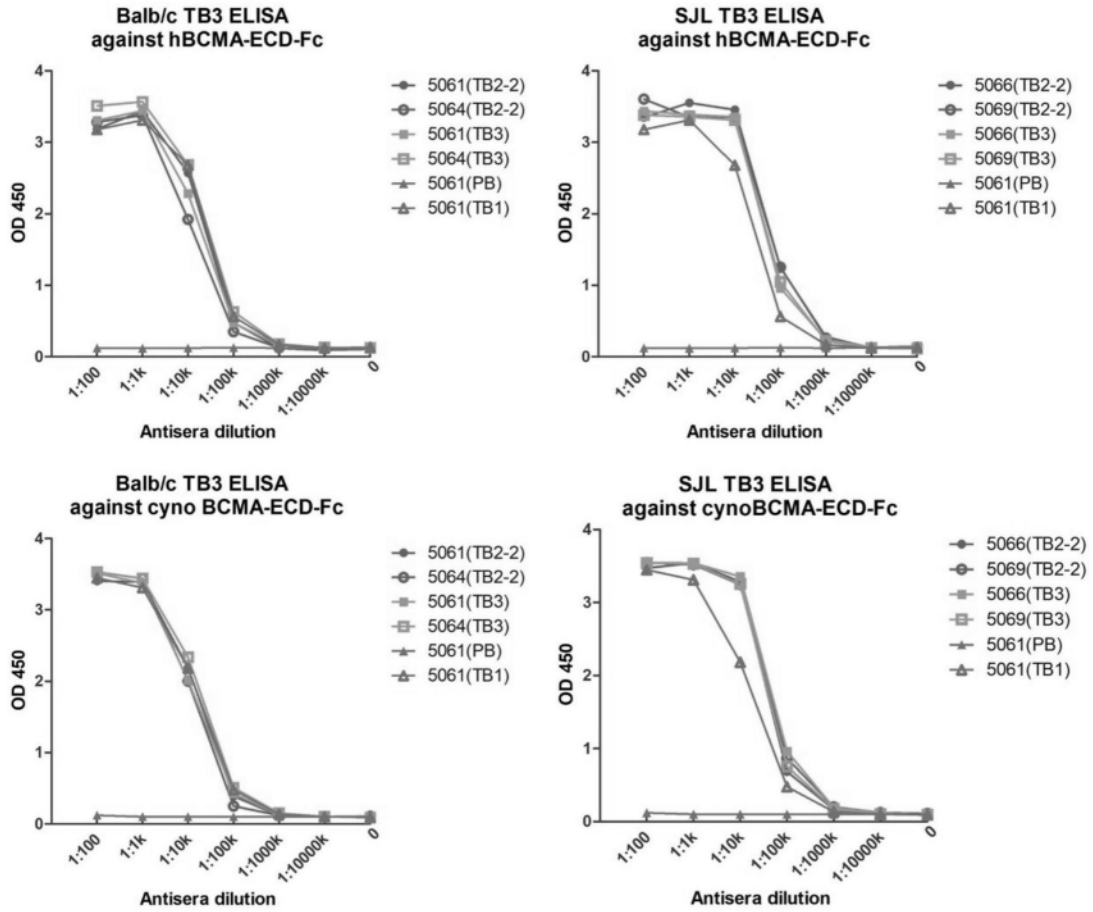


图5

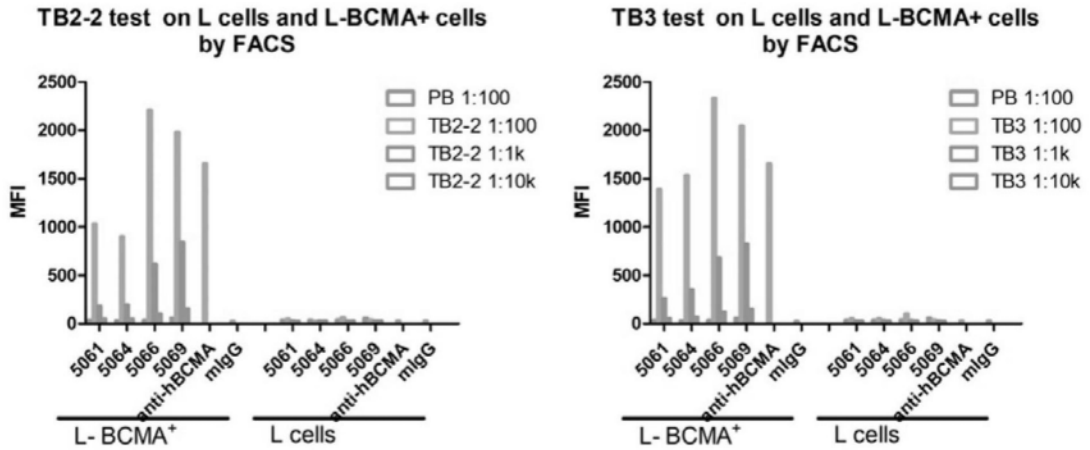
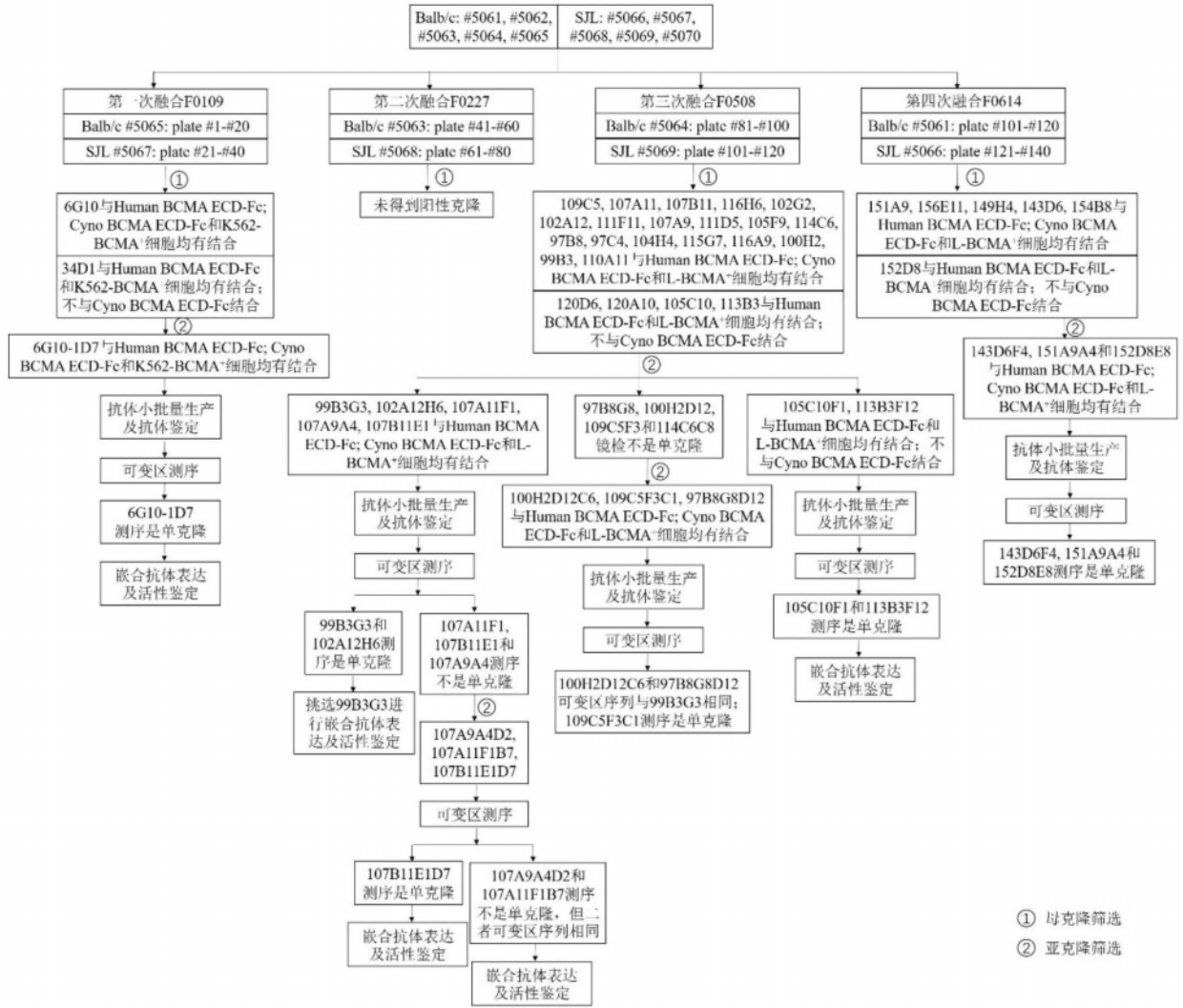


图6



① 母克隆筛选
 ② 亚克隆筛选

图7

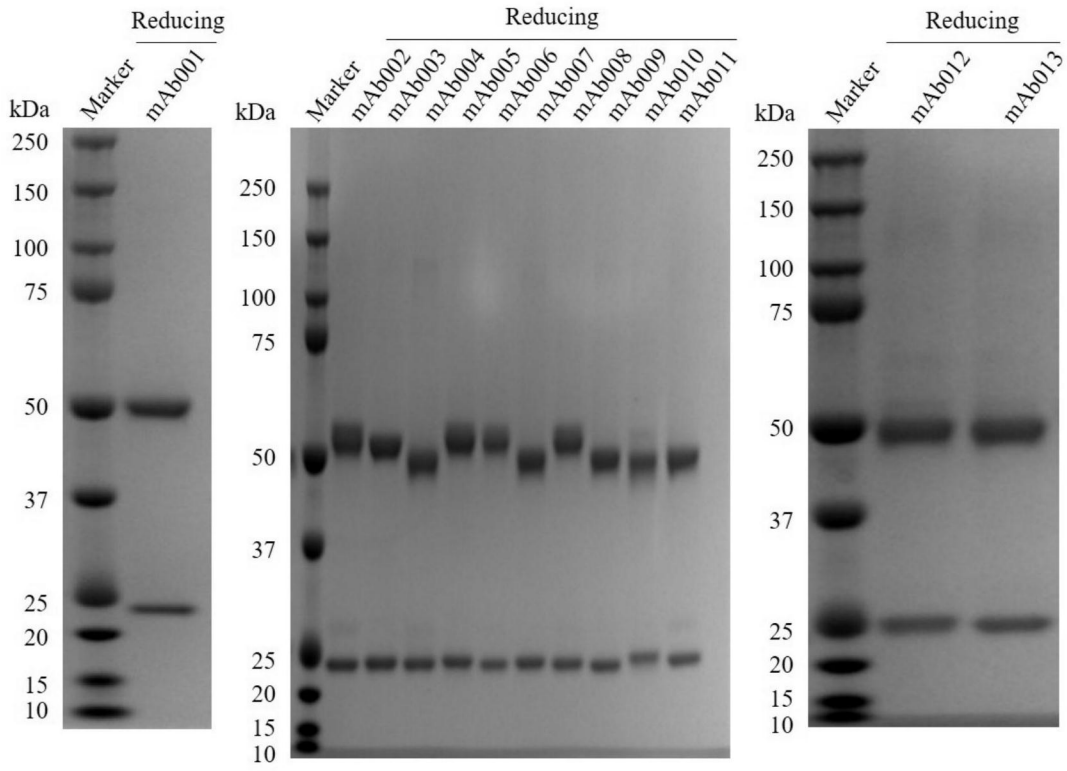


图8

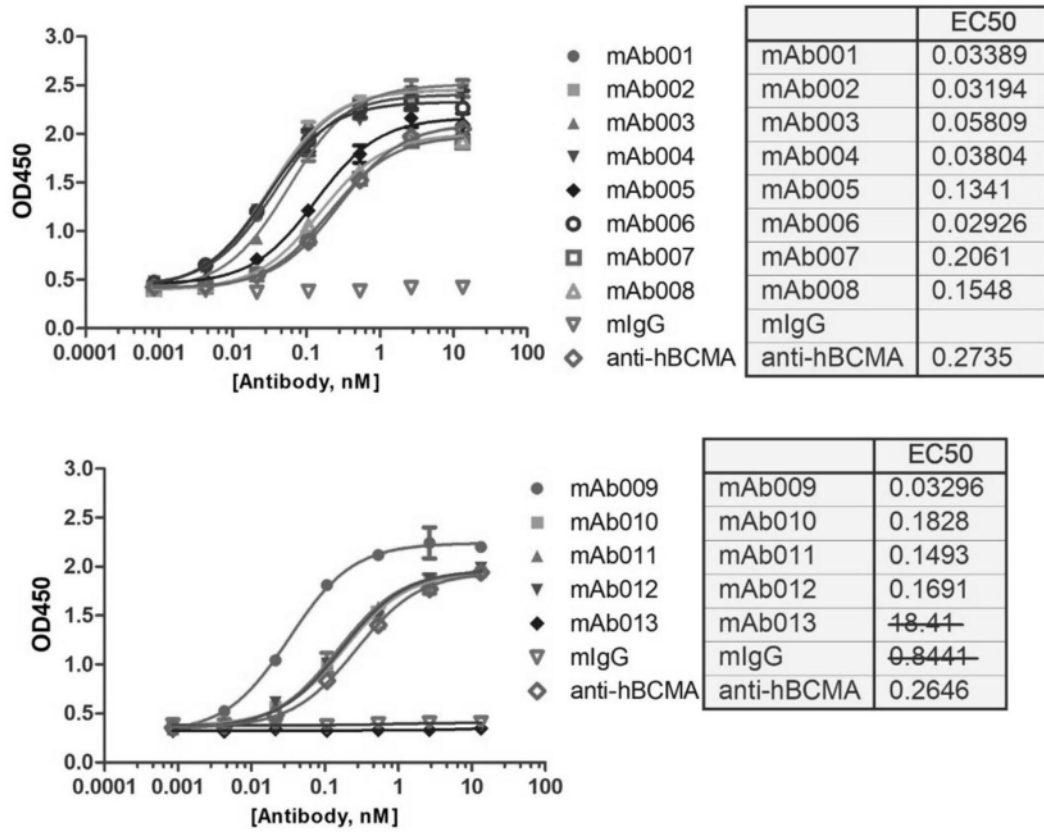


图9

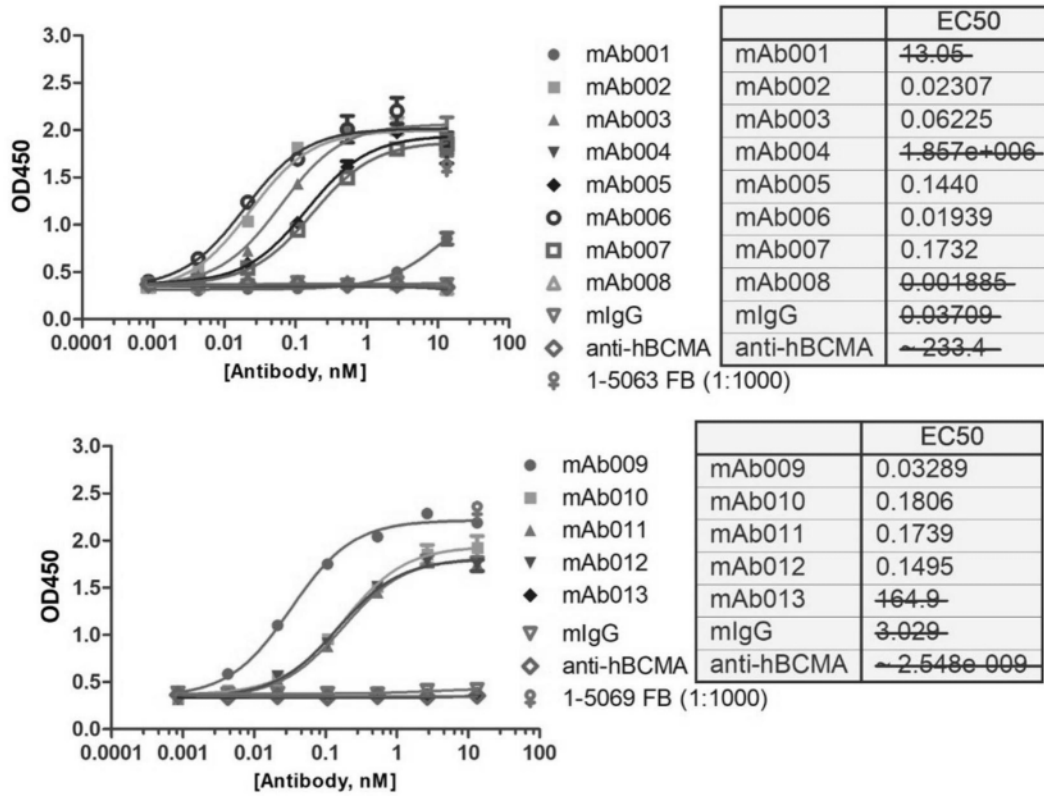


图10

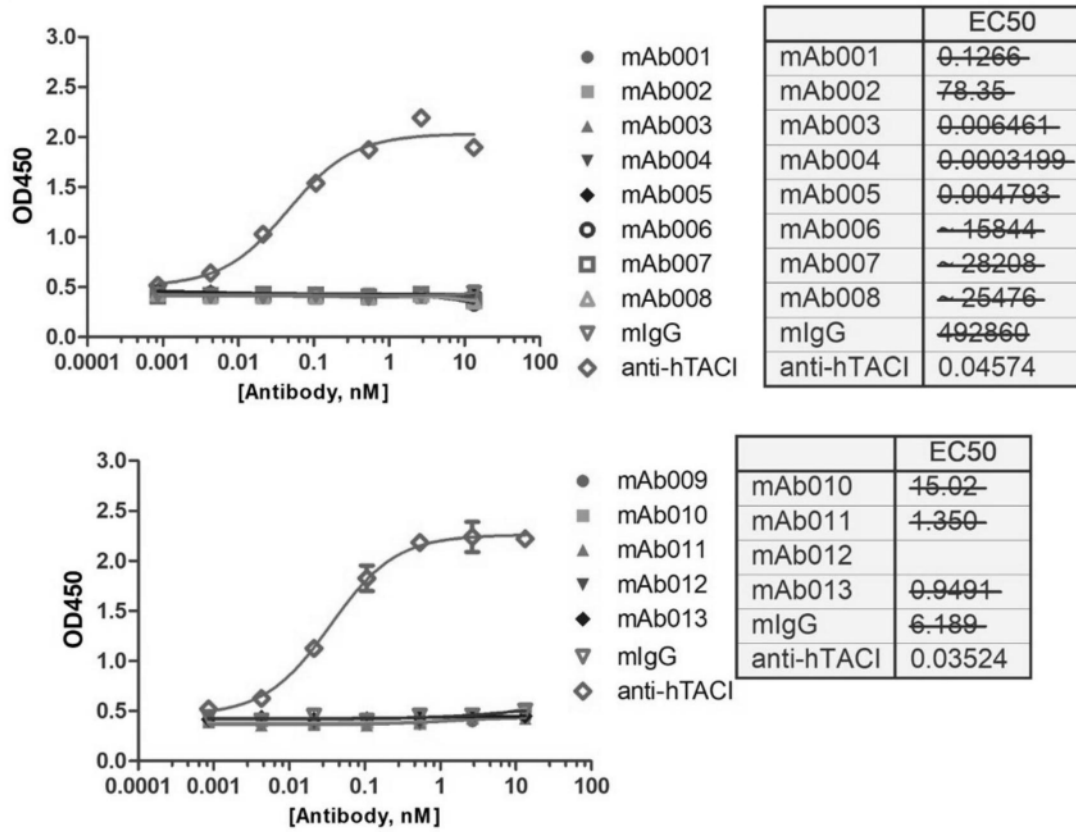


图11

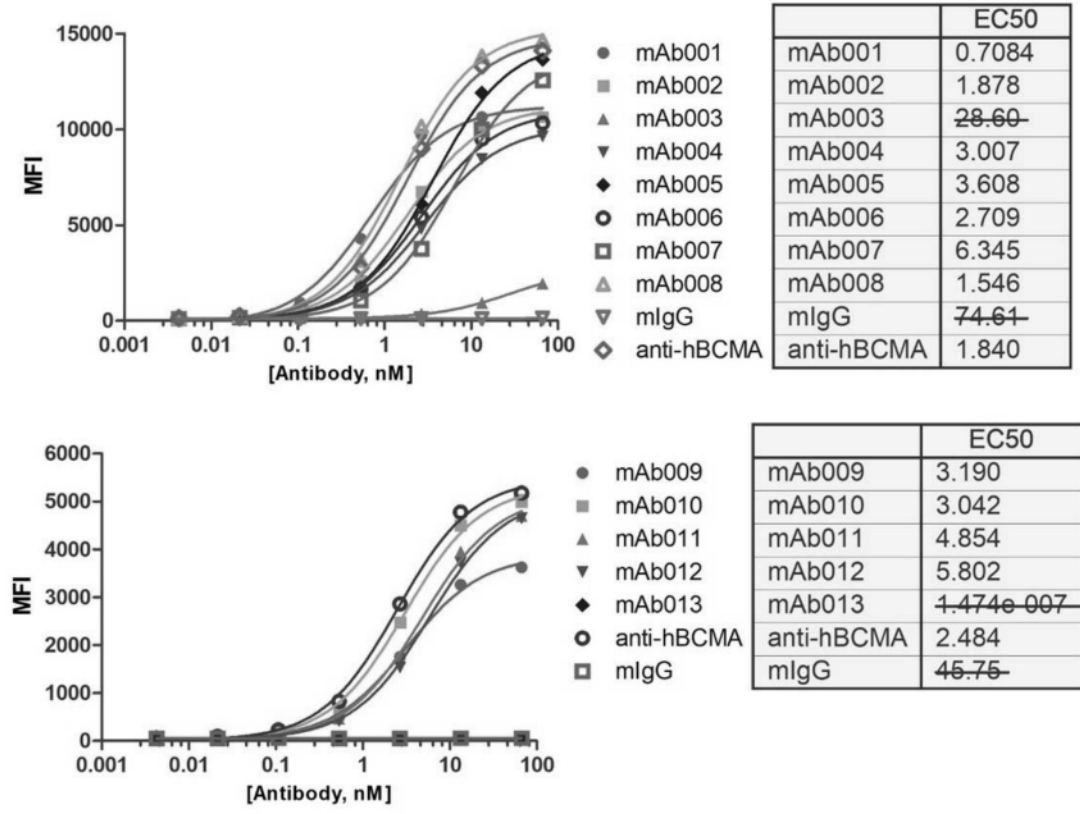


图12

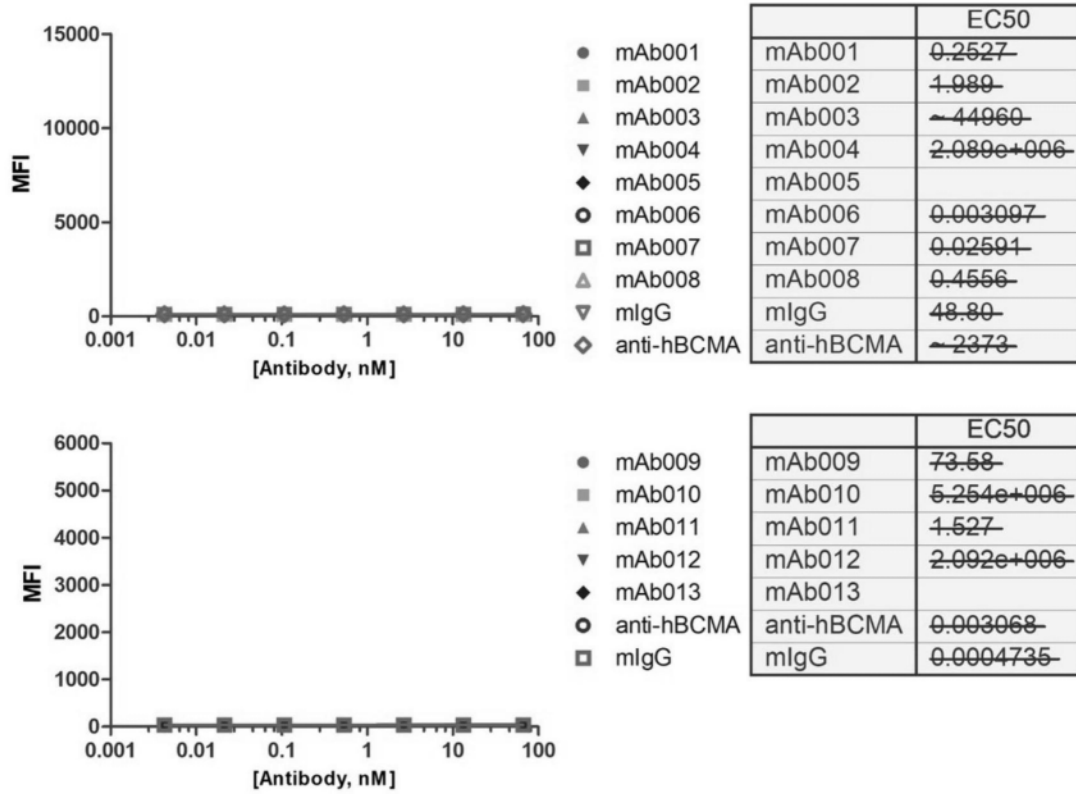


图13

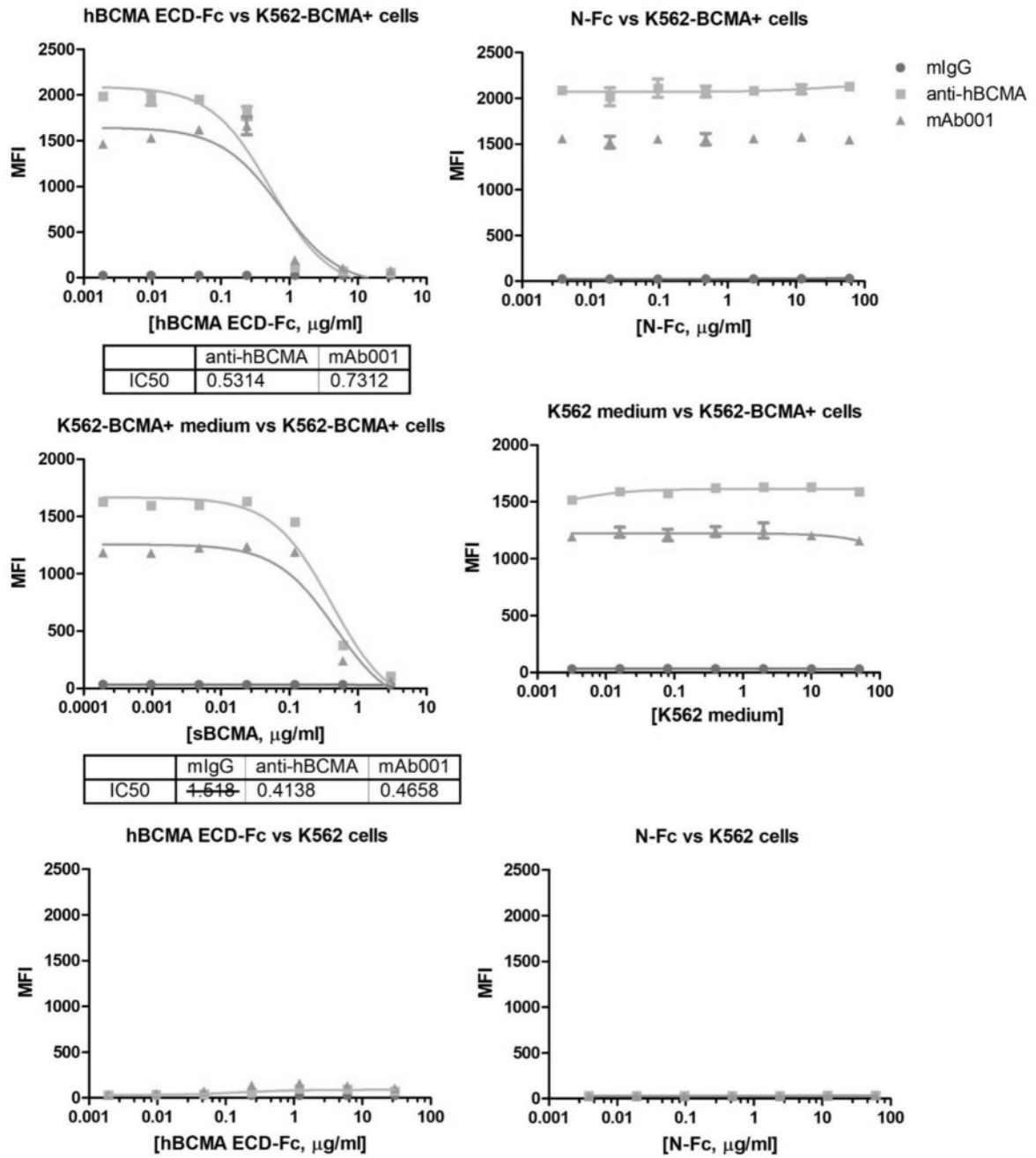


图14

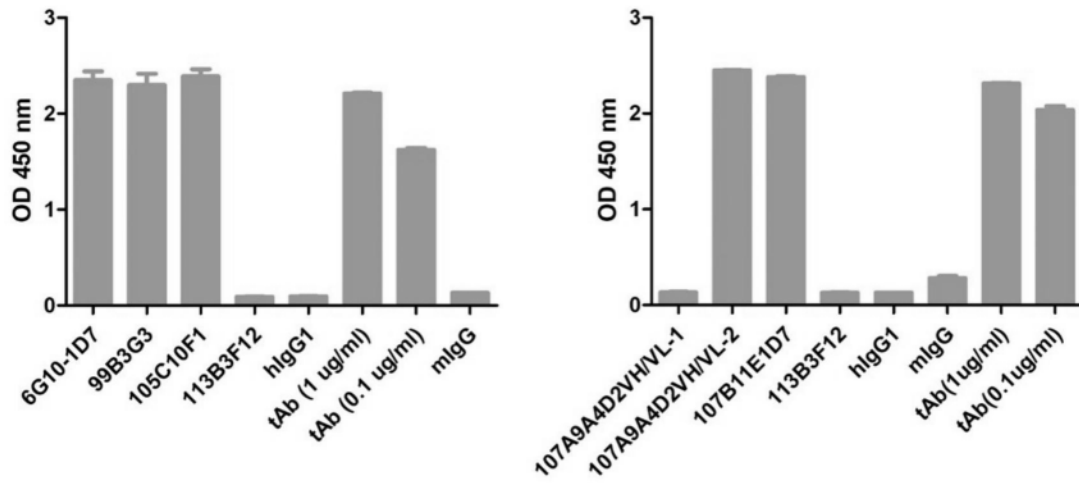


图15

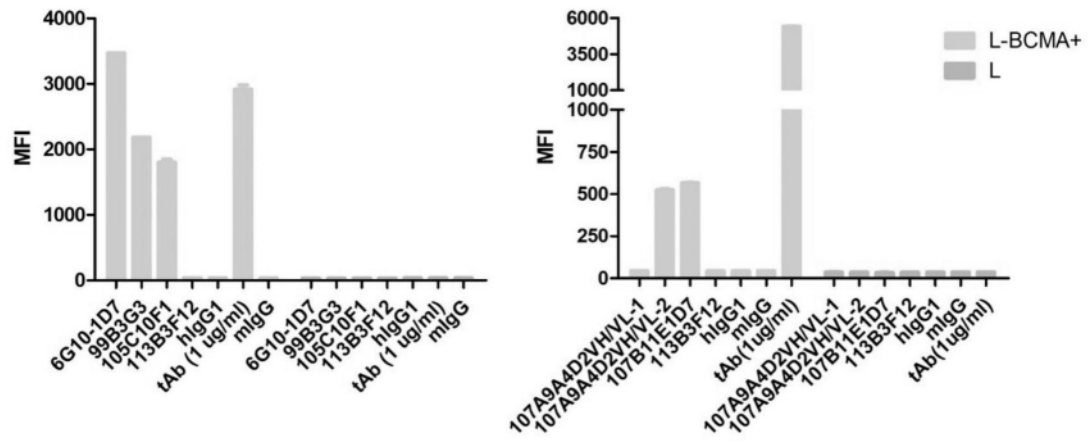


图16

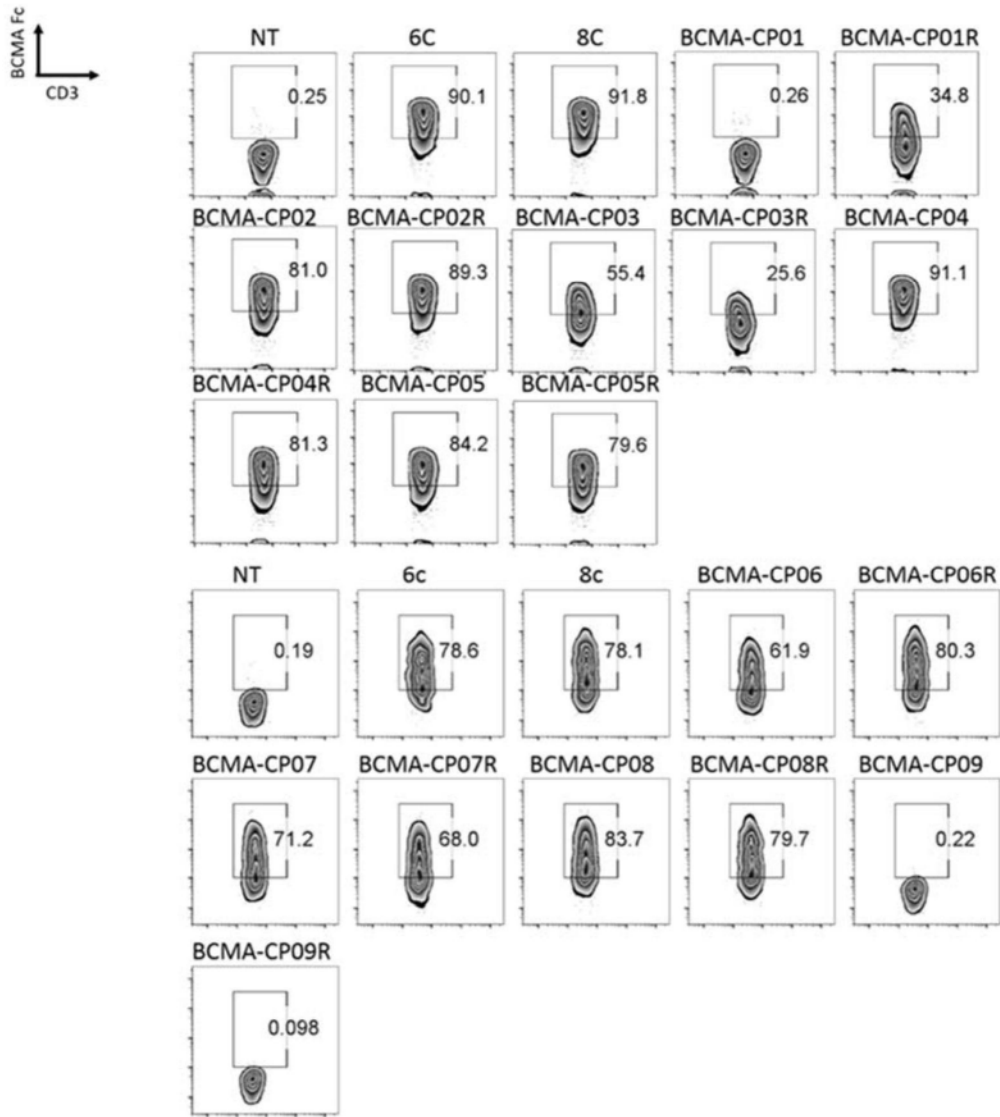


图17

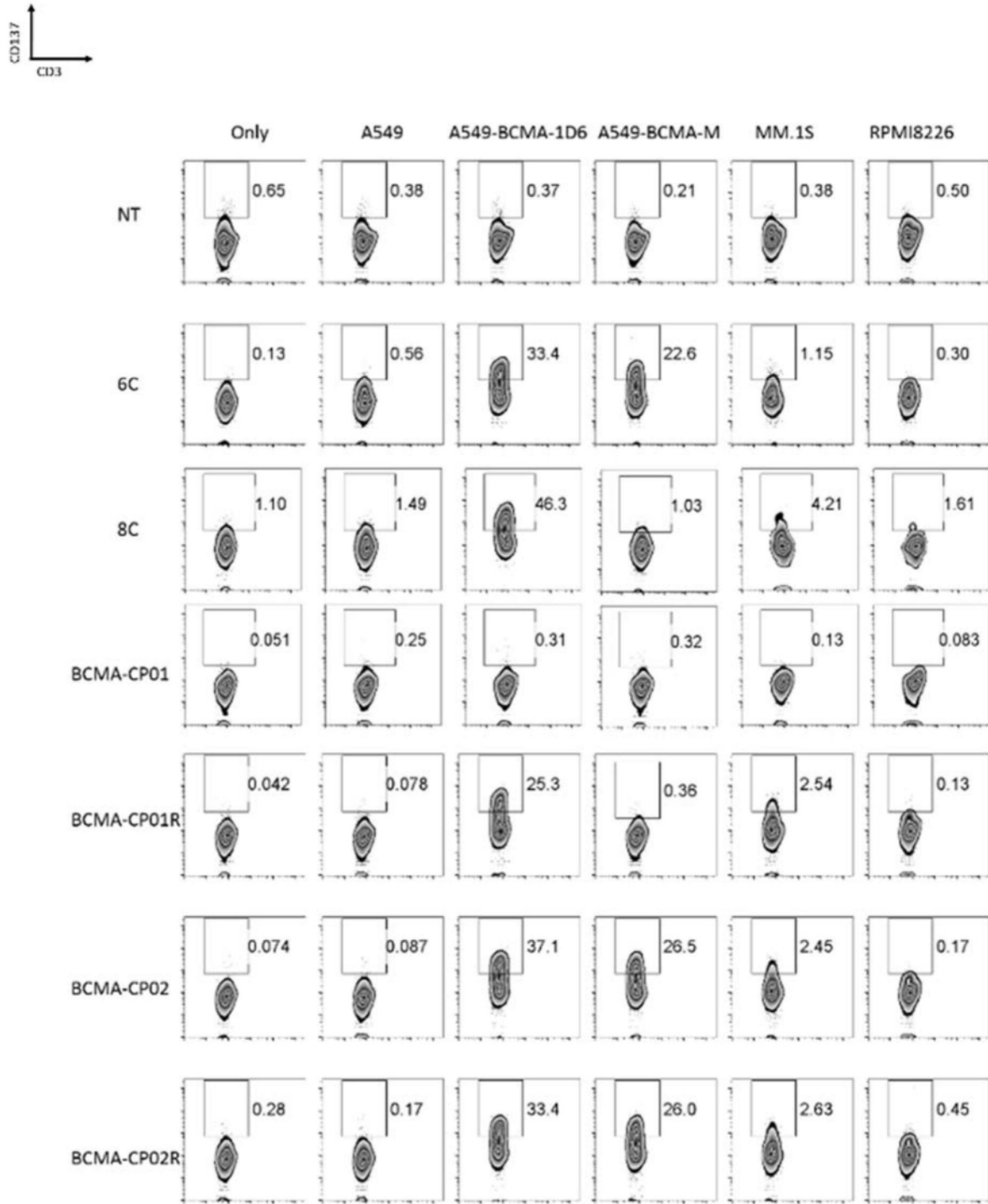


图18

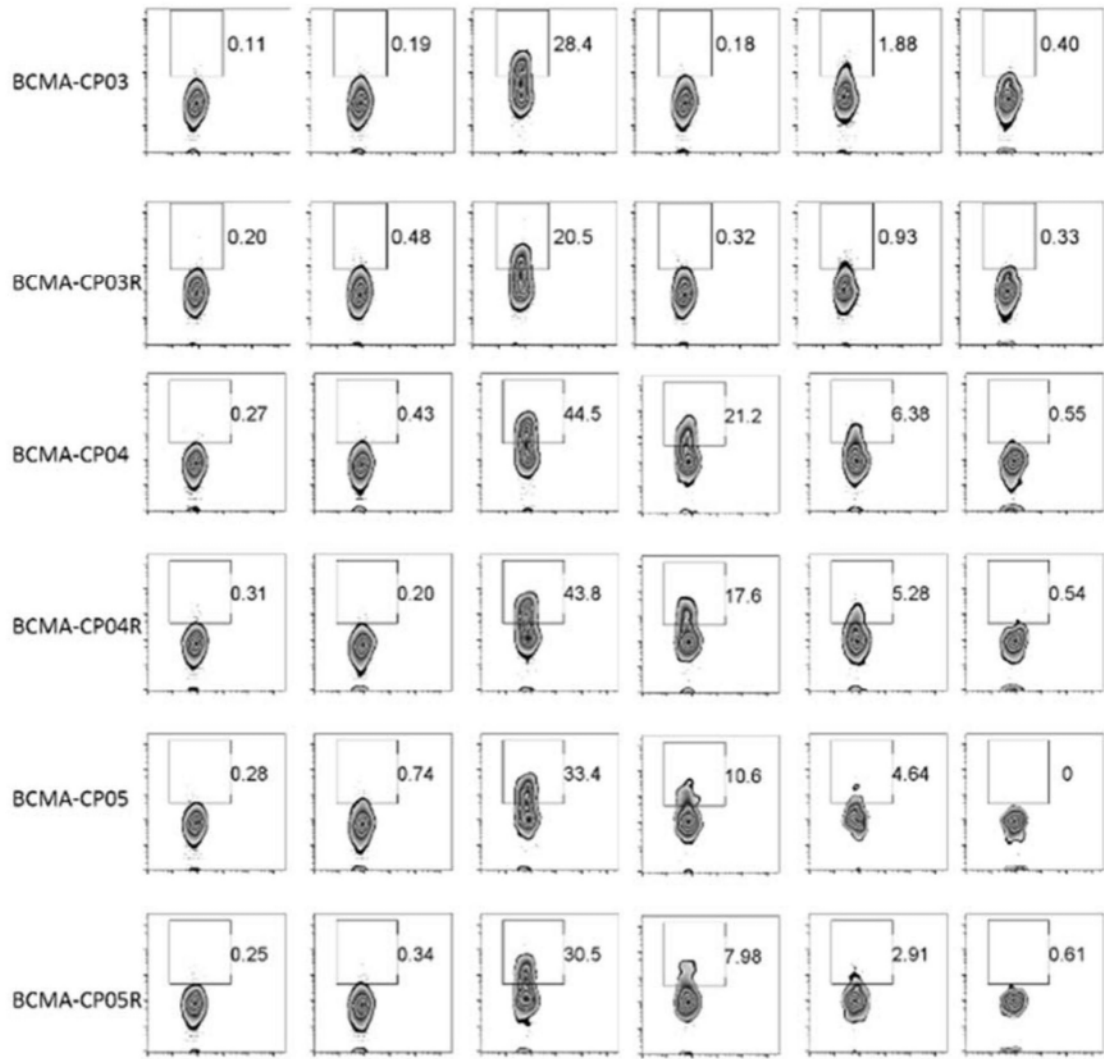


图18(续)

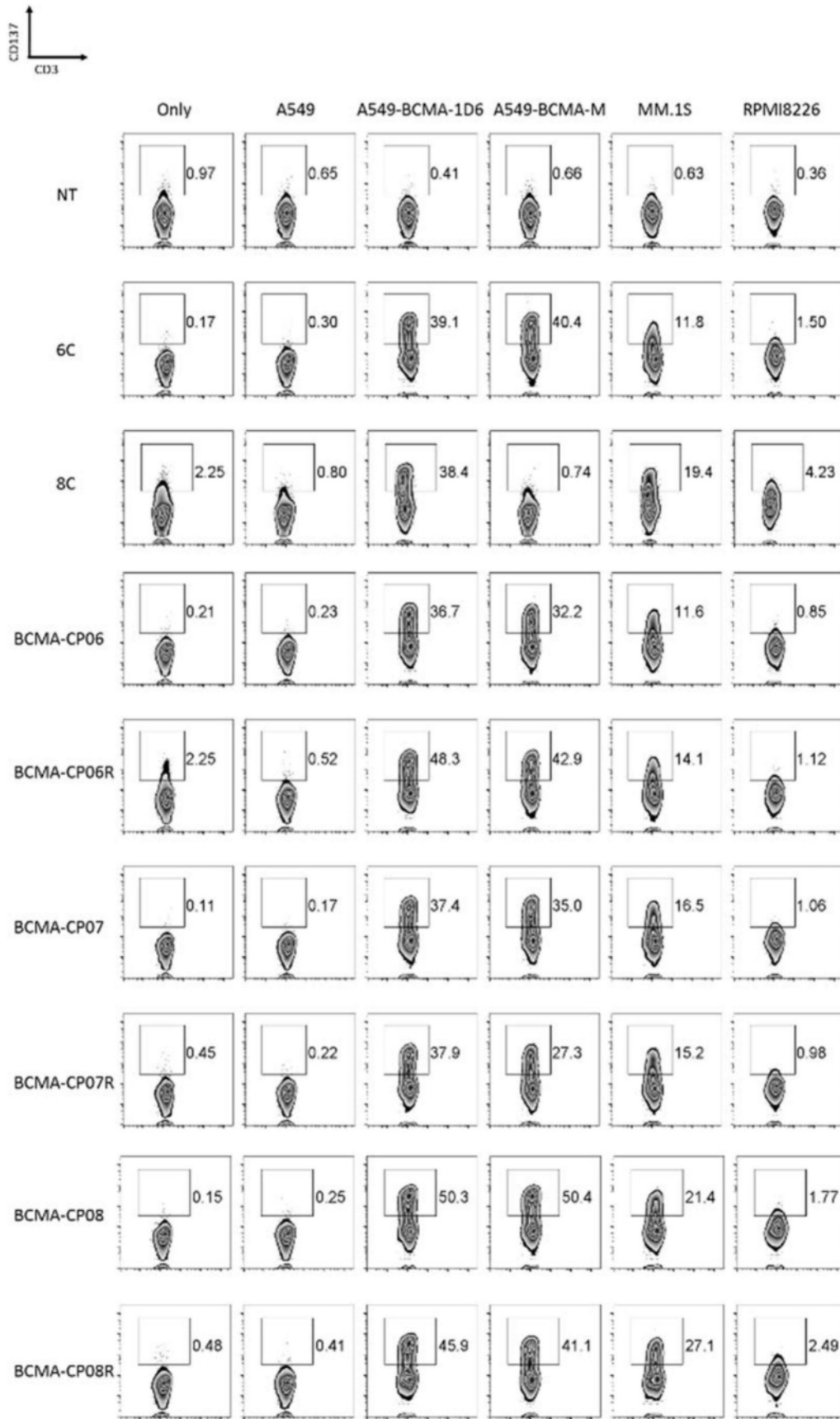


图18(续)

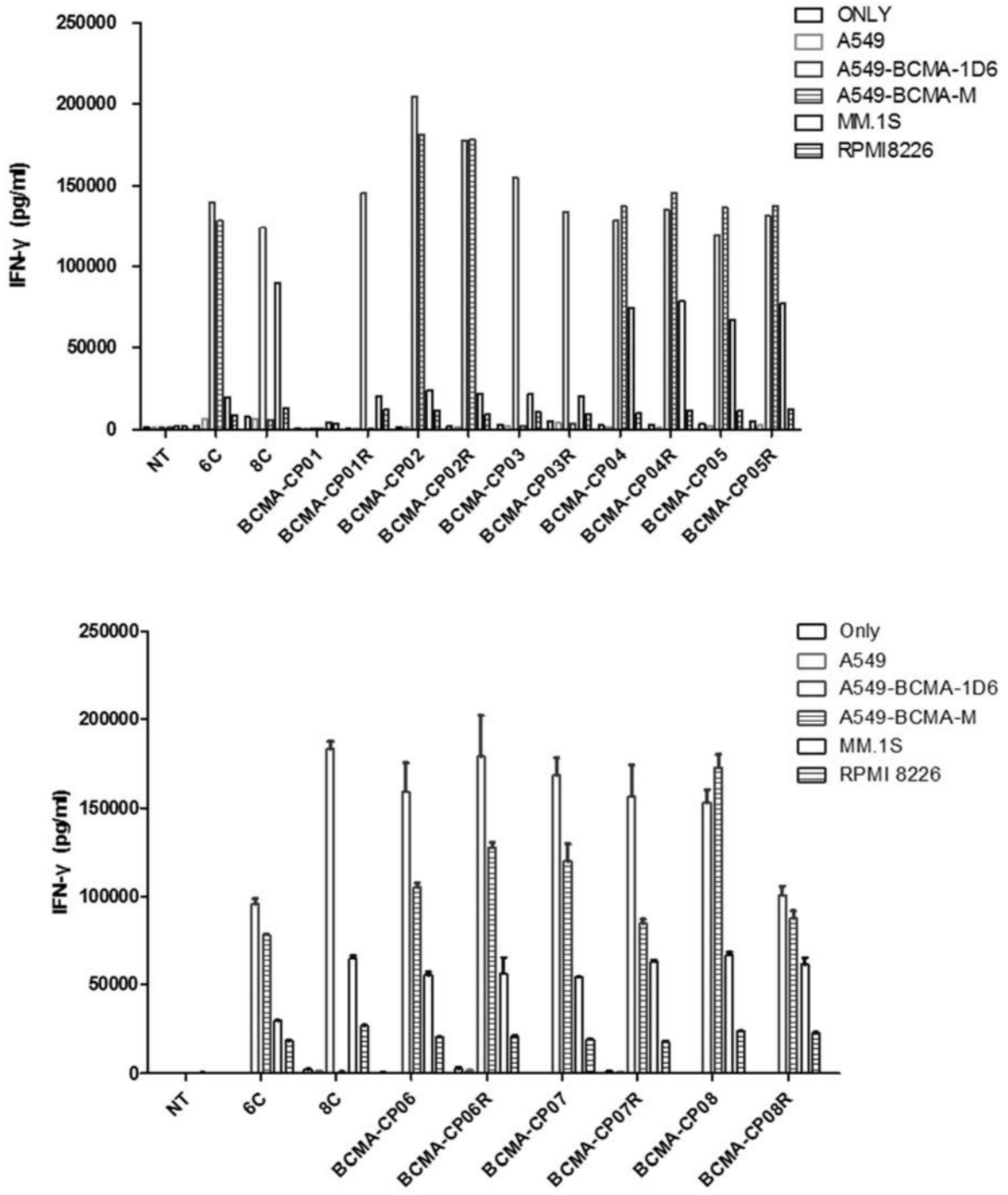


图19

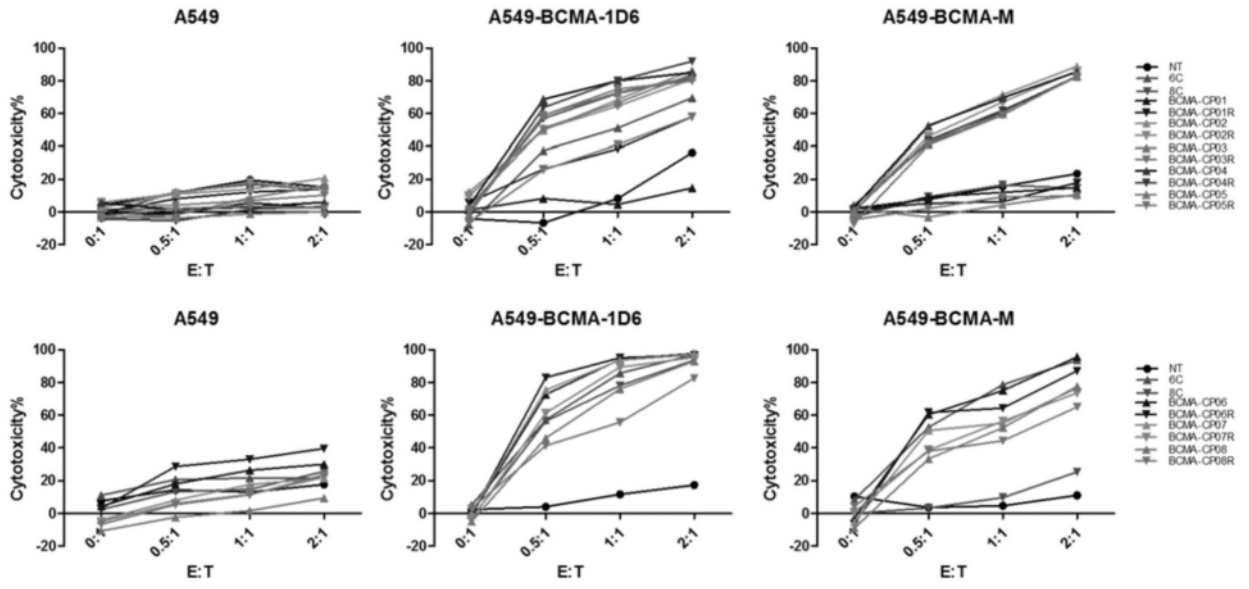


图20