



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111018986 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 18

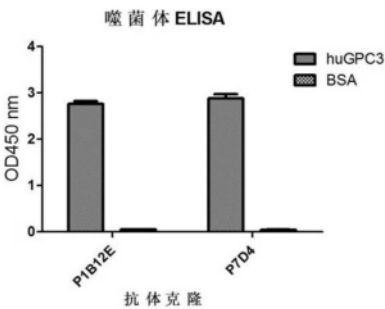
(21) 申请号 201910736574.8
(22) 申请日 2016.08.02
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111018986 A
(43) 申请公布日 2020.04.17
(66) 本国优先权数据
 201510481235.1 2015.08.03 CN
(62) 分案原申请数据
 201610626384.7 2016.08.02
(73) 专利权人 科济生物医药(上海)有限公司
 地址 200231 上海市徐汇区银都路388号12幢
(72) 发明人 王华茂 宋波
(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
 专利代理师 崔佳佳 马莉华
(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C07K 16/30 (2006.01)
 C12N 15/13 (2006.01)
 C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 103833852 A, 2014.06.04
CN 104140974 A, 2014.11.12
CN 101287492 A, 2008.10.15
CN 101068836 A, 2007.11.07
CA 2895333 A1, 2014.06.26
WO 2014180306 A1, 2014.11.13
审查员 邱棋

权利要求书4页 说明书28页
序列表34页 附图5页

(54) 发明名称
 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用
(57) 摘要

本发明涉及抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (GPC3) 的抗体及其应用。本发明揭示了新的特异性识别GPC3的抗体。本发明的抗体可以被应用于制备靶向性抗肿瘤药物以及诊断肿瘤的药物。



1. 一种特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体,其特征在于,该抗体具有轻链可变区和重链可变区,

所述的抗体选自:

抗体(a),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:12所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

抗体(b),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:60所示的CDR1、SEQ ID NO:61所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

抗体(c),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:62所示的CDR1、SEQ ID NO:63所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

抗体(d),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:64所示的CDR1、SEQ ID NO:65所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

抗体(e),其轻链可变区具有SEQ ID NO:67所示的CDR1、SEQ ID NO:68所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:66所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

抗体(f),其轻链可变区具有SEQ ID NO:69所示的CDR1、SEQ ID NO:70所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:66所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

抗体(g),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;和其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:71所示的CDR2、SEQ ID NO:72所示的CDR3。

2. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,

抗体(a)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4中第137-247位所示;

抗体(b)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中第137-247位所示;

抗体(c)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27中第137-247位所示;

抗体(d)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29中第137-247位示;

抗体(e)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31中第137-247位所示;

抗体(f)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33中第137-247位所示;或

抗体(g)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35中第1-121位所示;和所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35中第137-247位所示。

3. 编码权利要求1或2所述的抗体的核酸。
4. 一种表达载体,其包含权利要求3所述的核酸。
5. 一种宿主细胞,其包含权利要求4所述的表达载体或基因组中整合有权利要求3所述的核酸。
6. 权利要求1或2所述的抗体的用途,用于制备特异性靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤细胞的靶向性药物,抗体药物偶联物或多功能抗体;或
用于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或
用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。
7. 一种多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的多功能免疫缀合物包括:
权利要求1或2所述的抗体;以及
与之连接的功能性分子;所述的功能性分子选自:靶向肿瘤表面标志物的分子,抑制肿瘤分子,靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。
8. 如权利要求7所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述抗体和与之连接的功能性分子之间还具有连接肽。
9. 如权利要求7或8所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的靶向肿瘤表面标志物的分子是结合肿瘤表面标志物的抗体或配体;或
所述的抑制肿瘤分子是抗肿瘤的细胞因子或抗肿瘤的毒素;或
所述的可检测标记物包括:荧光标记物、显色标记物;或
所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合免疫细胞表面标志物的抗体,其与权利要求1或2所述的抗体形成T细胞参与的双功能抗体。
10. 如权利要求9所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的细胞因子包括:IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。
11. 如权利要求9所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的结合肿瘤表面标志物的抗体是指:识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3以外的其它抗原的抗体,所述的其它抗原包括:EGFR,EGFRvIII,mesothelin,HER2,EphA2,Her3,EpCAM,MUC1,MUC16,CEA,Claudin 18.2,叶酸受体,Claudin 6,WT1,NY-ESO-1,MAGE 3,ASGPR1或CDH16。
12. 如权利要求9所述的多功能免疫缀合物,其特征在于,所述的结合免疫细胞表面标志物的抗体是抗CD3抗体。
13. 编码权利要求7-12任一所述的多功能免疫缀合物的核酸。
14. 权利要求7-12任一所述的多功能免疫缀合物的用途,用于制备抗肿瘤药物,或
用于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或
用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。
15. 如权利要求14所述的用途,其特征在于,所述免疫细胞包括:T淋巴细胞、NK细胞或者NKT淋巴细胞。
16. 包含权利要求1或2所述的抗体的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的:权利要求1或2所述的抗体,跨膜区和胞内信号区。
17. 如权利要求16所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的胞内信号区选自:CD3 ζ ,Fc ϵ RI γ ,CD27,CD28,CD137,CD134,MyD88,CD40的胞内信号区序列,或其组合。
18. 如权利要求16所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的跨膜区包含CD8或CD28的

跨膜区。

19. 如权利要求16所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体包括如下的顺序连接的抗体,跨膜区和胞内信号区:

权利要求1或2所述的抗体、CD8和CD3 ζ ;

权利要求1或2所述的抗体、CD8、CD137和CD3 ζ ;

权利要求1或2所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区和CD3 ζ ;或

权利要求1或2所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区、CD137和CD3 ζ 。

20. 如权利要求16-19中任一项所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的抗体是单链抗体或单结构域抗体。

21. 如权利要求20所述的嵌合抗原受体,其特征在于,所述的嵌合抗原受体具有:

SEQ ID NO:49或其中第22-346位所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO:50或其中第22-447位所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO:51或其中第22-491位所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO:52或其中第22-494位所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO:53或其中第22-536位所示的氨基酸序列。

22. 编码权利要求16-21任一所述的嵌合抗原受体的核酸。

23. 一种表达载体,其特征在于,其包含权利要求22所述的核酸。

24. 一种病毒,其特征在于,所述的病毒包含权利要求23所述载体。

25. 权利要求16-21任一所述的嵌合抗原受体、或权利要求22所述的核酸、或权利要求23所述的表达载体、或权利要求24所述的病毒的用途,用于制备靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤的基因修饰的免疫细胞。

26. 如权利要求25所述的用途,其特征在于,所述的表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤包括:肝癌,黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤、神经母细胞瘤。

27. 一种基因修饰的免疫细胞,其特征在于,其转导有权利要求22所述的核酸,或权利要求23所述的表达载体或权利要求24所述的病毒;或

其表面表达权利要求16-21任一所述的嵌合抗原受体。

28. 如权利要求27所述的免疫细胞,其特征在于,所述的免疫细胞选自T淋巴细胞,NK细胞或NKT细胞。

29. 如权利要求27所述的免疫细胞,其特征在于,其还携带外源的细胞因子的编码序列。

30. 如权利要求29所述的免疫细胞,其特征在于,所述的细胞因子包括:IL-12,IL-15或IL-21。

31. 如权利要求27所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达另一种嵌合抗原受体,该受体不含有CD3 ζ ,但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。

32. 如权利要求27所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达趋化因子受体。

33. 如权利要求32所述的免疫细胞,其特征在于,所述的趋化因子受体包括:CCR2。

34. 如权利要求27所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达能降低PD-1表达的siRNA或者阻断PD-L1的蛋白。

35. 如权利要求27所述的免疫细胞,其特征在于,其还表达安全开关。

36. 如权利要求35所述的免疫细胞,其特征在于,所述的安全开关包括:iCaspase-9, Truncated EGFR或RQR8。

37. 权利要求27-36任一所述的基因修饰的免疫细胞的用途,其特征在于,用于制备抑制肿瘤的药物,所述的肿瘤是表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤。

38. 药物组合物,其特征在于,其包括:

权利要求1或2所述的抗体或编码该抗体的核酸;或

权利要求7-12任一所述的免疫缀合物或编码该缀合物的核酸;或

权利要求16-21任一所述的嵌合抗原受体或编码该嵌合抗原受体的核酸;或

权利要求27-36任一所述的基因修饰的免疫细胞。

抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用

[0001] 本申请是申请日为2016年8月2日,申请号为201610626384.7,发明名称为“抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及肿瘤免疫治疗或诊断领域,更具体地,涉及特异识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体及其应用。

背景技术

[0003] 目前,基于免疫效应细胞的过继性免疫治疗在部分肿瘤中取得了一定的效果,并且该种免疫治疗方法可以克服抗体治疗的上述缺陷,但在大多数肿瘤的疗效仍不能令人满意[Grupp SA, et al. Adoptive cellular therapy. Curr Top Microbiol Immunol., 2011; 344:149-72.]. 近年来,根据细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)对靶细胞的识别特异性依赖于T淋巴细胞受体(T Cell Receptor, TCR)的发现,将针对肿瘤细胞相关抗原的抗体的scFv与T淋巴细胞受体的CD3 ζ 或Fc ϵ RI γ 等胞内信号激活基序融合成嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor, CAR),并将其通过如慢病毒感染等方式基因修饰在T淋巴细胞表面。这种CAR T淋巴细胞能够以主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex, MHC)非限制性方式选择性地将T淋巴细胞定向到肿瘤细胞并特异性地杀伤肿瘤。CAR T淋巴细胞是肿瘤免疫治疗领域的一个新的免疫治疗策略。设计CAR修饰的免疫效应细胞,特别T细胞时,所靶向的抗原基因实际上是一种关键性的选择,鉴于体内基因表达的复杂性以及各种不可控因素,选择到一个合适的用于CAR的基因是非常困难的。并且,很多肿瘤特异性的抗原,很难找到针对其的且适合于构建CAR修饰的免疫效应细胞的特异性分子。

[0004] 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(Glypican-3, GPC3, 又称DGSX, GTR2-2, MXR7, OCI-5, SDYS, SGB, SGBS或SGBS1)是一种细胞表面蛋白,属于硫酸乙酰肝素蛋白多糖家族。GPC3基因编码产生70-kDa左右的前体核心蛋白,该前体蛋白能够被弗林蛋白酶(furin)剪切产生40-kDa左右的可溶性的能够进入血液的氨基端(N末端)肽和30-kDa左右含有2个硫酸乙酰肝素(HS)糖链的膜结合的羧基端(C末端)肽。GPC3蛋白通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚依附在细胞膜上。

[0005] GPC3高度表达于胎儿肝脏,而不表达于正常成年人的肝组织,但在肝细胞肝癌中恢复表达,与肝癌的发生发展有十分密切的关系,不仅在肝癌发生的早期检出率较高,而且随着肝癌的发展,其检出率也随之增高。而GPC3的表达在肝腺癌,胆管细胞癌,肝转移癌和12种常见实体瘤和21种非肝癌细胞系中均未检测出。此外,GPC3也在例如黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤、神经母细胞瘤等肿瘤中表达。考虑到GPC3在肝细胞肝癌,黑色素瘤等肿瘤中特异性的高表达,其被认为是肿瘤免疫治疗的一个候选靶标。

[0006] 虽然,利用抗GPC3抗体进行肝癌检测和利用抗GPC3抗体的抗体依赖的(ADCC)或补体依赖的(CDC)细胞毒性研究方案已有报道,但目前仍没有药用的抗GPC3抗体,仅有中外制

药公司在CN200580000807.4公开的GC33抗体在进行一期临床研究,临床应用情况仍有待商榷。

[0007] 另外,抗GPC3抗体不仅可以直接作为治疗性抗体,而且还有望用于诊断、嵌合抗原受体修饰(CAR)的T淋巴细胞等免疫治疗等等。现有研究表明不同的抗体可能会有不同的免疫原性,这种免疫原性会导致抗体或其衍生出来的治疗制剂的疗效及副作用。如基于小鼠抗mesothelin抗体的CAR T细胞会导致过敏反应,影响其在人体内的长期存活。基于这些考虑,本领域需要进一步优化及制备新的抗GPC3抗体,使其实体瘤的应用中具有良好的肿瘤杀伤活性和极佳的临床应用前景,从而使得GPC3抗体可以切实地被用于肿瘤的诊断和治疗中,惠及广大患者。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用。

[0009] 在本发明的第一方面,提供一种特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体,该抗体具有轻链可变区和重链可变区,且,

[0010] 其轻链可变区的CDR1具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:67,SEQ ID NO:69;

[0011] 其轻链可变区的CDR2具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:68,SEQ ID NO:70;

[0012] 其轻链可变区的CDR3具有氨基酸序列:SEQ ID NO:20;

[0013] 其重链可变区的CDR1具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:62,SEQ ID NO:64;

[0014] 其重链可变区的CDR2具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:61,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:65,SEQ ID NO:66,SEQ ID NO:71;

[0015] 其重链可变区的CDR3具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:72。

[0016] 在一个优选例中,所述的抗体包括:

[0017] 抗体(a)(P7D4),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:12所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0018] 抗体(b)(am4),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:60所示的CDR1、SEQ ID NO:61所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0019] 抗体(c)(am14),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:62所示的CDR1、SEQ ID NO:63所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0020] 抗体(d)(am20),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:18所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:64所示的CDR1、SEQ ID NO:65所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0021] 抗体(e)(am35),其轻链可变区具有SEQ ID NO:67所示的CDR1、SEQ ID NO:68所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID

NO:66所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0022] 抗体(f) (am42),其轻链可变区具有SEQ ID NO:69所示的CDR1、SEQ ID NO:70所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:66所示的CDR2、SEQ ID NO:14所示的CDR3;

[0023] 抗体(g) (T2-23),其轻链可变区具有SEQ ID NO:16所示的CDR1、SEQ ID NO:70所示的CDR2、SEQ ID NO:20所示的CDR3;或其重链可变区具有SEQ ID NO:10所示的CDR1、SEQ ID NO:71所示的CDR2、SEQ ID NO:72所示的CDR3;

[0024] 抗体(h),其识别与(a)~(g)中任一项所述的抗体所识别的抗原决定部位相同的抗原决定部位。

[0025] 在另一优选例中,所述的特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体可以是:单链抗体(scFv),单克隆抗体,结构域抗体,Fab片段,Fd片段,Fv片段,F(ab')₂片段和其衍生物,或其它形式的抗体;较佳地为单链抗体。

[0026] 在另一优选例中,所述的特异性识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3(GPC3)的抗体是人源化的或全人的;较佳地为全人的。

[0027] 在另一优选例中,抗体(a) (P7D4)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:4中第137-247位所示;

[0028] 抗体(b) (am4)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:25中第137-247位所示;

[0029] 抗体(c) (am14)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:27中第137-247位所示;

[0030] 抗体(d) (am20)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:29中第137-247位所示;

[0031] 抗体(e) (am35)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:31中第137-247位所示;

[0032] 抗体(f) (am42)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:33中第137-247位所示;或

[0033] 抗体(g) (T2-23)的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35中第1-121位所示;或所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:35中第137-247位所示。

[0034] 在本发明的另一方面,提供编码前面任一所述的抗体的核酸。

[0035] 在本发明的另一方面,提供一种表达载体,其包含所述的核酸。

[0036] 在本发明的另一方面,提供一种宿主细胞,其包含所述的表达载体或基因组中整合有所述的核酸。

[0037] 在本发明的另一方面,提供前面任一所述的抗体的用途,用于制备特异性靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤细胞的靶向性药物,抗体药物偶联物或多功能抗体;或用于制备诊断肿瘤的试剂,该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3;或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。

[0038] 在本发明的另一方面,提供一种多功能免疫缀合物,所述的多功能免疫缀合物包括:前面任一所述的抗体;以及与之连接(包括共价连接、偶联、附着、吸附)的功能性分子;

所述的功能性分子选自：靶向肿瘤表面标志物的分子，抑制肿瘤分子，靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。

[0039] 在一个优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的靶向肿瘤表面标志物的分子是结合肿瘤表面标志物的抗体或配体；或所述的抑制肿瘤分子是抗肿瘤的细胞因子或抗肿瘤的毒素；较佳地，所述的细胞因子包括（但不限于）：IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。

[0040] 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的可检测标记物包括：荧光标记物、显色标记物。

[0041] 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的结合肿瘤表面标志物的抗体是指：识别磷脂酰肌醇蛋白多糖-3以外的其它抗原的抗体，所述的其它抗原包括：EGFR，EGFRvIII，mesothelin，HER2，EphA2，Her3，EpCAM，MUC1，MUC16，CEA，Claudin18.2，叶酸受体，Claudin 6，WT1，NY-ESO-1，MAGE 3，ASGPR1或CDH16。

[0042] 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的靶向免疫细胞的表面标志物的分子是结合T免疫细胞表面标志物的抗体，其与前面任一所述的抗体形成T细胞参与的双功能抗体（Bispecific T cell engager，BiTE）。

[0043] 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物中，所述的结合免疫细胞表面标志物的抗体是抗CD3抗体。

[0044] 在另一优选例中，所述的抗CD3抗体是单链抗体（scFV），单克隆抗体，Fab片段，Fd片段，Fv片段，F(ab')₂片段和其衍生物，或其它形式的抗体；较佳地为单链抗体。

[0045] 在另一优选例中，所述的抗CD3抗体是人源化的，嵌合的，全人源的或鼠源的。

[0046] 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物是融合多肽，前面任一所述的抗体以及与之连接的功能性分子之间，还包括连接肽（接头）。

[0047] 在另一优选例中，所述的连接肽的序列为（GlyGlyGlyGlySer）_n，其中n为1到5的整数；更佳地，n=3。

[0048] 在另一优选例中，所述的多功能免疫缀合物采用多肽给药或基因给药的方式。

[0049] 在本发明的另一方面，提供编码前面任一所述的多功能免疫缀合物的核酸。

[0050] 在本发明的另一方面，提供所述的多功能免疫缀合物的用途，用于制备抗肿瘤药物，或用于制备诊断肿瘤的试剂，该肿瘤表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3；或用于制备嵌合抗原受体修饰的免疫细胞；较佳地，所述免疫细胞包括：T淋巴细胞、NK细胞或者NKT淋巴细胞。

[0051] 在本发明的另一方面，提供包含前面任一所述的抗体的嵌合抗原受体（Chimeric antigen receptor，CAR），所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的：前面任一所述的抗体，跨膜区和胞内信号区；所述的胞内信号区选自：CD3ζ，FcεRI γ，CD27，CD28，CD137，CD134，MyD88，CD40的胞内信号区序列，或其组合。

[0052] 在另一优选例中，所述的嵌合抗原受体中，所述的跨膜区包含CD8或CD28的跨膜区。

[0053] 在另一优选例中，所述的嵌合抗原受体中，所述的嵌合抗原受体包括如下的顺序连接的抗体，跨膜区和胞内信号区：前面任一所述的抗体、CD8和CD3ζ；前面任一所述的抗体、CD8、CD137和CD3ζ；前面任一所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区和CD3ζ；或前面任一所述的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区、CD137和CD3ζ。

- [0054] 在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体中,所述的抗体是单链抗体或结构域抗体。在另一优选例中,所述的嵌合抗原受体具有:
- [0055] SEQ ID NO:49或其中第22-346位所示的氨基酸序列;
- [0056] SEQ ID NO:50或其中第22-447位所示的氨基酸序列;
- [0057] SEQ ID NO:51或其中第22-491位所示的氨基酸序列;
- [0058] SEQ ID NO:52或其中第22-494位所示的氨基酸序列;
- [0059] SEQ ID NO:53或其中第22-536位所示的氨基酸序列。
- [0060] 在本发明的另一方面,提供编码所述的嵌合抗原受体的核酸。在另一优选例中,编码所述的嵌合抗原受体的核酸具有:
- [0061] SEQ ID NO:44或其中第380-1420位或其中第443-1420位所述的核苷酸序列;
- [0062] SEQ ID NO:45或其中第380-1723位或其中第443-1723位所述的核苷酸序列;
- [0063] SEQ ID NO:46或其中第380-1855位或其中第443-1855位所述的核苷酸序列;
- [0064] SEQ ID NO:47或其中第380-1864位或其中第443-1864位所述的核苷酸序列;
- [0065] SEQ ID NO:48或其中第380-1990位或其中第443-1990位所述的核苷酸序列。
- [0066] 在本发明的另一方面,提供一种表达载体,其包含编码所述的嵌合抗原受体的核酸。在另一优选例中,所述的表达载体来源于慢病毒质粒pWPT(或pWPT-eGFP)。
- [0067] 在本发明的另一方面,提供一种病毒,所述的病毒包含所述载体。
- [0068] 所述的嵌合抗原受体、或编码其的核酸、或包含该核酸的表达载体或病毒的用途,用于制备靶向表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤的基因修饰的免疫细胞。
- [0069] 在另一优选例中,所述的表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤包括(但不限于):肝癌,黑色素瘤,卵巢透明细胞癌、卵黄囊瘤、神经母细胞瘤。
- [0070] 在本发明的另一方面,提供一种基因修饰的免疫细胞,其转导有编码所述的嵌合抗原受体的核酸,或含有该核酸的表达载体或病毒;或其表面表达所述的嵌合抗原受体。
- [0071] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还携带外源的细胞因子的编码序列;较佳地,所述的细胞因子包括:IL-12,IL-15或IL-21。
- [0072] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达另一种嵌合抗原受体,该受体不含有CD3 ζ ,但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。
- [0073] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达趋化因子受体;较佳地,所述的趋化因子受体包括:CCR2。
- [0074] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达能降低PD-1表达的siRNA或者阻断PD-L1的蛋白。
- [0075] 在另一优选例中,所述的免疫细胞还表达安全开关;较佳地,所述的安全开关包括:iCaspase-9,Truncated EGFR或RQR8。
- [0076] 在另一优选例中,所述的免疫细胞包括:T淋巴细胞,NK细胞或NKT细胞。
- [0077] 在本发明的另一方面,提供所述的基因修饰的免疫细胞的用途,用于制备抑制肿瘤的药物,所述的肿瘤是表达磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的肿瘤。
- [0078] 在本发明的另一方面,提供药物组合物(包括药物或诊断试剂),其包括:
- [0079] 前面任一所述的抗体或编码该抗体的核酸;或
- [0080] 前面任一所述的免疫缀合物或编码该缀合物的核酸;或

- [0081] 前面任一所述的嵌合抗原受体或编码该嵌合抗原受体的核酸;或
- [0082] 前面任一所述的基因修饰的免疫细胞。
- [0083] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

- [0084] 图1、在单噬菌体ELISA实验中抗体P1B12E和P7D4对人类GPC3和对照BSA的结合情况。抗体P1B12E和P7D4对人类GPC3和阴性对照BSA的值证明筛选到的两个抗体能特异性结合人类GPC3。
- [0085] 图2、人类GPC3的抗体纯化电泳图。
- [0086] 图3、抗体scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc对GPC3表达阳性的HepG2细胞结合活性分析。
- [0087] 图4、P7D4系列抗体对GPC3结合能力的SPR分析。
- [0088] 图5、P7D4系列抗体特异性结合重组人GPC3。
- [0089] 图6、表达纯化的GPC3蛋白的SDS PAGE电泳鉴定。
- [0090] 图7、抗体Y035对人GPC3的结合动力学分析。
- [0091] 图8、抗体5A5对人GPC3的结合动力学分析。
- [0092] 图9、抗体Y035特异性结合GPC3表达阳性的HepG细胞。

具体实施方式

- [0093] 本发明人经过深入的研究筛选,获得了特异性识别GPC3的抗体。本发明的抗体可以被应用于制备各种靶向性抗肿瘤药物以及诊断肿瘤的药物。
- [0094] 抗GPC3抗体
- [0095] 本发明人从全人源天然抗体库中筛选获得对于GPC3结合性能良好的特异性抗体,进一步还对其进行氨基酸突变获得了亲和力进一步呈现显著性提高的抗GPC3抗体,并且找到了其发挥结合性能的关键CDR区。
- [0096] 本发明人还利用杂交瘤技术获得了抗GPC3的鼠源抗体,对其进行人源化,经过反复比较,获得对于GPC3结合性能极其优异的人源化抗GPC3抗体,并且找到了其发挥结合性能的关键CDR区。
- [0097] 本发明的抗体可以是完整的免疫球蛋白分子,也可以是抗原结合片段,包括但不限于Fab片段,Fd片段,Fv片段,F(ab')₂片段、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、结构域抗体,二价单链抗体、单链噬菌体抗体、双特异双链抗体、三链抗体、四链抗体。
- [0098] 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,称为互补决定区(complementarity determining region,CDR),所述的CDR区将可变区间隔成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。CDR区是免疫学感兴趣的蛋白质的序列,本发明的抗体的CDR区是全新的。所述抗体可包含本文揭示的二、三、四、五或者所有六个CDR区。

[0099] 本发明的另一方面包括本文所述抗体的功能变体。所述变体能与亲代抗体竞争特异性结合GPC3,且其识别肿瘤细胞表达的GPC3的能力接近于本发明实施例中提供的具体的抗体。所述功能变体可以具有保守序列修饰,包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。这些修饰可以通过本领域已知的标准技术导入,例如定向诱变和随机PCR介导的诱变,并且可包含天然以及非天然核苷酸和氨基酸。较佳地,序列的修饰发生在所述抗体的CDR区以外的区域上。

[0100] 免疫缀合物

[0101] 本发明还提供了多功能免疫缀合物,其包含本文所述抗体以及进一步包含至少一种其它类型的功能性分子。所述的功能性分子选自但不限于:靶向肿瘤表面标志物的分子,抑制肿瘤分子,靶向免疫细胞的表面标志物的分子或可检测标记物。所述抗体与所述功能性分子可以通过共价连接、偶联、附着、交联等方式构成缀合物。

[0102] 作为一种优选方式,所述免疫缀合物可包含:本发明的抗体以及至少一种靶向肿瘤表面标志物的分子或抑制肿瘤分子。所述的抑制肿瘤分子可以是抗肿瘤的细胞因子,或抗肿瘤的毒素;较佳地,所述的细胞因子包括(但不限于):IL-12、IL-15、IFN-beta、TNF-alpha。所述的靶向肿瘤表面标志物的分子例如可以与本发明的抗体协同作用,更精准地靶向肿瘤细胞。

[0103] 作为一种优选方式,所述免疫缀合物可包含:本发明的抗体以及可检测标记物。所述的可检测标记物包括但不限于:荧光标记物、显色标记物;如:酶、辅基、荧光材料、发光材料,生物发光材料、放射性材料、正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。也可包含一个以上的标记物。为了检测和/或分析和/或诊断目的用于标记抗体的标记依赖于使用的特定检测/分析/诊断技术和/或方法例如免疫组织化学染色(组织)样品、流式细胞计量术等。对于本领域已知的检测/分析/诊断技术和/或方法合适的标记为本领域技术人员所熟知。

[0104] 作为一种优选方式,所述免疫缀合物可包含:本发明的抗体以及靶向免疫细胞的表面标志物的分子。所述靶向免疫细胞的表面标志物的分子可识别免疫细胞,其携带本发明的抗体达到免疫细胞,同时本发明的抗体可将免疫细胞靶向于肿瘤细胞,从而引发免疫细胞特异性地杀伤肿瘤。

[0105] 作为通过直接或间接(例如通过接头)缀合而化学产生免疫缀合物的一种方式,所述免疫缀合物可以作为融合蛋白而产生,所述融合蛋白包含本发明的抗体及合适的其它蛋白。融合蛋白可以通过本领域已知方法产生,例如通过构建核酸分子以及随后表达所述核酸分子而重组产生,所述核酸分子包含符合读框的编码抗体的核苷酸序列以及编码合适标记的核苷酸序列。

[0106] 本发明另一方面提供了编码本发明的至少一种抗体、其功能变体或者免疫缀合物的核酸分子。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。

[0107] 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。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。

[0108] 嵌合抗原受体及基因修饰的免疫细胞

[0109] 本发明提供了一种表达于免疫效应细胞(免疫细胞)表面的嵌合抗原受体,所述的嵌合抗原受体包含顺序连接的:胞外结合区,跨膜区和胞内信号区,其中所述胞外结合区包含本发明的抗体。将该嵌合抗原受体表达于免疫效应细胞的表面,可使得免疫效应细胞对表GPC3的肿瘤细胞具有高度特异性的细胞毒性作用。

[0110] 如本文所用,所述的“免疫细胞”与“免疫效应细胞”可互换使用,其包括:T淋巴细胞,NK细胞或NKT细胞等,优选的,为NK细胞和T淋巴细胞。

[0111] 作为本发明的优选方式,所述的嵌合抗原受体中,包含的抗体为单链抗体,其通过CD8铰链区与CD8或者CD28的跨膜区相连接,跨膜区后紧接胞内信号区。

[0112] 本发明也包括编码所述嵌合抗原受体的核酸。本发明还涉及上述多核苷酸的变异体,其编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。

[0113] 嵌合抗原受体的跨膜区可以选自CD8或CD28等蛋白的跨膜区。人CD8蛋白是个异二聚体,由 $\alpha\beta$ 或者 $\gamma\delta$ 两条链组成。在本发明的一个实施方案中,跨膜区选自CD8 α 或者CD28的跨膜区。此外,CD8 α 铰链区(hinge)是一个柔性区域,因此,CD8或CD28和跨膜区加上铰链区被用于将嵌合抗原受体CAR的靶点识别结构域scFv和胞内信号区连接起来。

[0114] 胞内信号区可以选自CD3 ζ ,Fc ϵ RI γ ,CD27,CD28,CD137,CD134,MyD88,CD4蛋白的胞内信号区,及其组合。CD3分子由五个亚单位组成,其中CD3 ζ 亚单位(又称CD3zeta,简称Z)含有3个ITAM基序,该基序是TCR-CD3复合体中重要的信号转导区。CD3 δ Z是截短的不具有ITAM基序的CD3 ζ 序列,在实践中一般作为阴性对照的构建。Fc ϵ RI γ 主要分布在肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面,其含有一个ITAM基序,在结构、分布及功能上与CD3 ζ 类似。此外如前所述,CD28,CD137,CD134是共刺激信号分子,在与各自配体结合后其胞内信号区段产生的共刺激作用引起免疫效应细胞(主要是T淋巴细胞)的持续增殖,并能够提高免疫效应细胞分泌IL-2和IFN- γ 等细胞因子的水平,同时提高CAR免疫效应细胞在体内的存活周期和抗肿瘤效果。

[0115] 本发明的嵌合抗原受体可以按如下方式顺序连接:

[0116] 本发明的抗体、CD8和CD3 ζ ;

[0117] 本发明的抗体、CD8、CD137和CD3 ζ ;

[0118] 本发明的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区和CD3 ζ ;或

[0119] 本发明的抗体、CD28分子的跨膜区、CD28分子的胞内信号区、CD137和CD3 ζ 。

[0120] 及其组合,其中相关嵌合抗原受体蛋白中CD28a代表CD28分子的跨膜区,CD28b代表CD28分子的胞内信号区。上述各种嵌合抗原受体统称为scFv(GPC3)-CAR。

[0121] 本发明还提供了包含上述编码表达于免疫效应细胞表面的嵌合抗原受体蛋白的核酸的载体。在一个具体实施方案中,本发明使用的载体是一种慢病毒质粒载体pWPT-eGFP。该质粒属于第三代自灭活慢病毒载体系统,该系统共有三个质粒即编码蛋白Gag/Pol、编码Rev蛋白的包装质粒psPAX2;编码VSV-G蛋白的包膜质粒PMD2.G;及空载体pWPT-eGFP,其可以用于重组引入目的核酸序列,即编码CAR的核酸序列。空载体pWPT-eGFP中由延长因子-1 α (elongation factor-1 α ,EF-1 α)启动子调控增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,eGFP)的表达。而包含编码CAR的目的核酸序列的重组表达载体pWPT-eGFP-F2A-CAR是通过由来自口蹄疫病毒(food-and-mouth disease virus,FMDV)

的核糖体跳跃序列(ribosomal skipping sequence 2A) (简称F2A)实现eGFP与CAR的共表达的。

[0122] 本发明还包括包含上述载体的病毒。本发明的病毒包括包装后的具有感染力的病毒,也包括包含包装为具有感染力的病毒所必需成分的待包装的病毒。本领域内已知的其它可用于将外源基因转导入免疫效应细胞的病毒及其对应的质粒载体也可用于本发明。

[0123] 本发明还提供了基因修饰的免疫效应细胞,其被转导有本发明的核酸或被转导有本发明的上述包含所述含有该核酸的重组质粒,或包含该质粒的病毒。本领域常规的核酸转导方法,包括非病毒和病毒的转导方法都可以用于本发明。基于非病毒的转导方法包括电穿孔法和转座子法。近期Amaya公司研发的Nucleofector核转染仪能够直接将外源基因导入细胞核获得目的基因的高效转导。另外,基于睡美人转座子(Sleeping Beauty system)或PiggyBac转座子等转座子系统的转导效率较普通电穿孔有较大提高,将nucleofector转染仪与睡美人转座子系统联合应用已有报道[Davies JK., et al. Combining CD19 redirection and alloantigenization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. Cancer Res, 2010, 70 (10) : 0F1-10.], 该方法既具有较高的转导效率又能够实现目的基因的定点整合。在本发明的一个实施方案中,实现嵌合抗原受体基因修饰的免疫效应细胞的转导方法是基于病毒如逆转录病毒或慢病毒的转导方法。该方法具有转导效率高,外源基因能够稳定表达,且可以缩短体外培养免疫效应细胞到达临床级数量的时间等优点。在该转基因免疫效应细胞表面,转导的核酸通过转录、翻译表达在其表面。通过对各种不同的培养的肿瘤细胞进行体外细胞毒实验证明,本发明的免疫效应细胞具有高度特异性的肿瘤细胞杀伤效果(亦称细胞毒性)。因此本发明的编码嵌合抗原受体蛋白的核酸,包含该核酸的质粒,包含该质粒的病毒和转导有上述核酸,质粒或病毒的转基因免疫效应细胞可以有效地用于肿瘤的免疫治疗。

[0124] 本发明所述的免疫细胞还可以携带外源的细胞因子的编码序列;所述的细胞因子包括但不限于:IL-12, IL-15或IL-21等。这些细胞因子具有免疫调节或抗肿瘤的活性,能增强效应T细胞及活化的NK细胞的功能,或直接发挥抗肿瘤作用。因此,本领域技术人员可以理解,这些细胞因子的运用有助于所述的免疫细胞更好地发挥作用。

[0125] 本发明所述的免疫细胞还可以表达除了上述嵌合抗原受体以外的另一种嵌合抗原受体,该受体不含有CD3 ζ ,但含有CD28的胞内信号结构域、CD137的胞内信号结构域或者这两者的组合。

[0126] 本发明所述的免疫细胞还可以表达趋化因子受体;所述的趋化因子受体包括但不限于CCR2。本领域技术人员可以理解,所述的CCR2趋化因子受体可以使得体内的CCR2与之竞争性结合,对于阻断肿瘤的转移是有利的。

[0127] 本发明所述的免疫细胞还可以表达能降低PD-1表达的siRNA或者阻断PD-L1的蛋白。本领域技术人员可以理解,竞争性阻断PD-L1与其受体PD-1的相互作用,有利于恢复抗肿瘤T细胞反应,从而抑制肿瘤生长。

[0128] 本发明所述的免疫细胞还可以表达安全开关;较佳地,所述的安全开关包括:iCaspase-9, Truncated EGFR或RQR8。

[0129] 药物组合物

[0130] 本发明的抗体、包含该抗体的免疫缀合物以及基因修饰的免疫细胞可以应用于制备药物组合物或诊断试剂。所述的组合物除了包括有效量的所述抗体、免疫缀合物或免疫细胞,还可包含药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指当分子本体和组合物适当地给予动物或人时,它们不会产生不利的、过敏的或其它不良反应。

[0131] 可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体例子是糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和土豆淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素;西黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石;固体润滑剂,如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇,如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,如 Tween®;润湿剂,如月桂基硫酸钠;着色剂;调味剂;压片剂、稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等渗盐溶液;和磷酸盐缓冲液等。

[0132] 本发明的组合物可根据需要制成各种剂型,并可由医师根据患者种类、年龄、体重和大致疾病状况、给药方式等因素确定对病人有益的剂量进行施用。给药方式例如可以采用注射或其它治疗方式。

[0133] 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不适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,通常按照常规条件如J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0134] 实施例1、结合人类GPC3的特异性单链抗体(scFv)的制备

[0135] 1.1 基于噬菌体展示的GPC3特异性结合抗体的筛选

[0136] 利用噬菌体展示技术,从全人源天然抗体库中筛选人类GPC3(以下简称huGPC3)特异性抗体。为此目的,在400ml 2×YT/氨苄青霉素培养基接种噬菌体展示全人源单链抗体天然库的甘油菌(购自上海锐劲生物技术有限公司),使细胞密度达到 $OD_{600}=0.1$,在37℃和200rpm条件下振荡培养直至细胞密度达到 $OD_{600}=0.5$ 。用 10^{12} pfu的M13K07辅助噬菌体(购自Invitrogen)感染,在30℃和50rpm条件下培养30分钟。加入50mg/L卡那霉素后在37℃和200rpm条件下振荡培养30分钟后,通过离心(15分钟,1600×g,4℃)分离沉淀,重悬于400ml 2×YT/氨苄青霉素/卡那霉素培养基,在37℃和200rpm条件下振荡培养16小时。最后细胞通过离心(20分钟,5000×g,4℃)分离沉淀并丢弃,上清用0.45μm规格滤膜过滤后,加入1/4体积20% (w/v) PEG8000、2.5M NaCl溶液并在冰浴中保温1小时沉淀噬菌体颗粒。随后离心沉淀(20分钟,8000×g,4℃),弃上清,将噬菌体重悬于25ml预冷PBS(137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na_2HPO_4 ,2mM KH_2PO_4)中,离心(5分钟,20000×g,4℃)。向上清液加入1/4体积20% (w/v) PEG8000、2.5M NaCl溶液,并冰浴30分钟再次沉淀噬菌体颗粒。离心沉淀(30分钟,20000×g,4℃),再次将噬菌体沉淀重悬于2ml预冷PBS中,在冰上保持30分钟并离心(30分钟,17000×g,4℃)。上清液与含4% (w/v) BSA的PBS溶液以1:1混合,置于旋转混合器上,室温下保温30分钟,然后直接用于筛选。

[0137] 利用上述噬菌体抗体库,针对生物素标记的人类GPC3重组蛋白(购自上海锐劲生物技术有限公司),实施了四轮定向筛选,筛选方案如下:该噬菌体抗体库与生物素标记的抗原GPC3,在室温下保温2小时,然后与经封闭液2% (w/v) BSA(牛血清白蛋白,购自上海生工)封闭过的链霉亲和素磁珠MyOne C1(购自Invitrogen)在室温下保温30分钟。随后用

PBST (含0.1%吐温-20) 缓冲液洗涤磁珠, 除去非特异性结合或结合能力较弱的噬菌体。结合能力强的噬菌体, 则用甘氨酸-盐酸(pH 2.2) 从磁珠上洗脱下来, 用Tris中和液(pH 9.1) 中和后, 用于感染处于对数生长中期的大肠杆菌ER2738, 并被用于下一轮筛选。在四轮筛选中, 磁珠的用量分别为50 μ l、20 μ l、10 μ l和10 μ l, 生物素标记的抗原GPC3浓度分别为200nM、10nM、5nM和1nM, PBST的洗涤次数分别为10次、10次、15次和20次。

[0138] 1.2 GPC3特异性结合抗体的鉴定

[0139] 从第四轮筛选所得的克隆中随机挑选96个, 并用单噬菌体ELISA(酶联免疫吸附实验) 分析其与人类GPC3的结合能力。为此目的, 每个单菌落接种300 μ l 2 $\times$ YT/氨苄青霉素培养基(含2%葡萄糖) 于96孔深孔培养板, 并在37 $^{\circ}$ C和250rpm下振荡培养16小时。用20 μ l培养物接种到500 μ l 2 $\times$ YT/氨苄青霉素培养基(含0.1%葡萄糖), 在37 $^{\circ}$ C和250rpm下振荡培养1.5小时。准备辅助噬菌体溶液, 取75 μ l的M13K07(滴度为 3×10^{12} pfu/ml) 混入到15ml 2 $\times$ YT培养基中, 50 μ l/孔加到培养板中。在37 $^{\circ}$ C和150rpm条件培养30分钟, 然后加入准备好的卡那霉素溶液50 μ l/孔(取180 μ l的50mg/ml卡那霉素, 加入到15ml 2 $\times$ YT培养基), 在37 $^{\circ}$ C和250rpm下振荡培养16小时。最后离心沉淀细胞(30分钟, 5000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C), 上清转移到新的96孔深孔培养板。

[0140] 为进行单噬菌体ELISA, 在96孔MediSorp ELISA板(购自Nunc) 上分别使用100ng/孔抗原GPC3以及阴性对照蛋白BSA(100 μ l/孔), 在4 $^{\circ}$ C包被过夜。每个孔用含2%BSA(w/v) 的PBST封闭。随后用PBST清洗孔三次并排净。然后加入100 μ l/孔上面制备的每种噬菌体溶液到板上各孔中。37 $^{\circ}$ C保温2小时后, 用PBST洗涤三次。为了检测结合的噬菌体, 将抗M13抗体过氧化物歧化酶偶联物(购自GE Healthcare) 以1:5000稀释于PBST中, 并取100 μ l加到每个孔中。37 $^{\circ}$ C保温1小时后用PBST漂洗孔三次, 然后用PBS漂洗三次。最后吸取50 μ l TMB底物加入到孔中, 并在室温下显色10分钟, 随后加入每孔50 μ l的2M H₂SO₄终止显色反应。用酶联免疫检测仪(Bio-Rad) 在450nm测量消光值。

[0141] 结合测序分析, 观察到两个不同的单链抗体P1B12E(SEQ ID NO:1(核苷酸), 2(氨基酸)) 和P7D4(SEQ ID NO:3(核苷酸), 4(氨基酸)), 在ELISA实验中对人类GPC3(huGPC3) 结合信号显著较强, 对BSA没有结合(图1)。

[0142] 实施例2、抗GPC3的单链抗体的表达和纯化

[0143] 根据标准方案, 使用引物对V5-P1B12E-F(SEQ ID NO:5) 和V5-P1B12E-R(SEQ ID NO:6) 从筛选得到的克隆P1B12E的质粒(pCantab 5E-P1B12E) 中扩增出scFv-P1B12E片段, 使用引物对V5-P7D4-F(SEQ ID NO:7) 和V5-P7D4-R(SEQ ID NO:8) 从筛选得到的克隆P7D4的质粒(pCantab 5E-P7D4) 扩增出scFv-P7D4片段, 通过NheI/BamHI(购自NEB) 双酶切, 以T4 DNA连接酶(购自NEB) 于同样以NheI/BamHI双酶切载体质粒pCMV-V5-Fc(该载体在多克隆位点下游融合表达人抗体IgG1的Fc片段, 以下简称V5-Fc, 购自上海锐劲生物技术有限公司) 连接并转化于宿主菌TOP10中, 挑取克隆通过PCR鉴定阳性克隆并通过测序确认, 分别获得V5-scFv-P1B12E-Fc和V5-scFv-P7D4-Fc真核表达质粒。

[0144] 将上述表达质粒分别转染生长良好的HEK-293F细胞, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 125rpm摇床连续培养7天, 4000rpm离心10min, 去除沉淀, 收集上清, 并用0.45 μ m滤膜过滤, 将处理好的样品以protein A(购自GE) 亲和柱进行亲和纯化, 最终获得纯化的抗体-Fc融合蛋白scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc, 鉴定结果如图2所示, 其分子量在50kD左右。

[0145] 实施例3、流式细胞学分析各个细胞系与抗GPC3单链抗体的结合情况

[0146] 通过荧光激活细胞分选仪 (FACS) (BD公司, FACSCalibur) 分析抗体scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc各自与GPC3阳性的肝癌HepG2细胞系 (ATCC) 的结合能力。

[0147] 具体方法如下:

[0148] 1). 取对数生长期的肝癌HepG2细胞系接种到6cm平皿中, 接种细胞密度约为90%, 37℃孵箱过夜培养。

[0149] 2). 使用10mM的EDTA消化细胞, 200g×5min离心收集细胞。以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL的浓度重悬于1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液 (NBS PBS) 中, 按100ul/管的量加入流式专用管中。

[0150] 3). 200g×5min离心, 弃上清。

[0151] 4). 分别加入待测抗体scFv-P1B12E-Fc和scFv-P7D4-Fc, 同时以PBS作为阴性对照, 抗体终浓度为10μg/ml, 每管加入100ul。冰浴, 45分钟。

[0152] 5). 每管加入2ml 1%NBS PBS, 以200g×5min离心, 共二遍。

[0153] 6). 弃上清, 加入1:50稀释的FITC荧光标记的羊抗人抗体 (来自上海康成生物工程有限公司), 每管加入100ul。冰浴, 45分钟。

[0154] 7). 每管加入2ml 1%NBS PBS, 以200g×5min离心, 共二遍。

[0155] 8). 弃上清, 重悬于300ul 1%NBS PBS中, 流式细胞仪检测。

[0156] 9). 应用流式细胞仪数据分析软件WinMDI 2.9分析数据。

[0157] 结果如图3, 流式细胞分析结果表明, 抗体scFv-P7D4-Fc可以特异识别表达GPC3的HepG2细胞, 抗体scFv-P1B12E-Fc与HepG2细胞不结合。

[0158] 实施例4、GPC3结合能力提高的P7D4单链抗体变体的筛选和制备

[0159] 为提高P7D4单链抗体对GPC3结合能力, 分别对其重链CDR1和CDR2区域、或者轻链CDR1和CDR2的部分氨基酸进行随机突变, 并构建对应的亲和力成熟文库H12和L12。

[0160] 4.1、P7D4轻链和重链及其CDR区

[0161] P7D4 scFv核苷酸序列如下 (SEQ ID NO:3; 其中, 第76-105位为重链CDR1, 第148-198位为重链CDR2, 第295-330位为重链CDR3; 第475-516位为轻链CDR1; 第562-582位为轻链CDR2, 第679-708位为轻链CDR3; 其中, 第1-363位为重链核苷酸序列, 第409-741为轻链核苷酸序列, 第364-408位为(Gly₄Ser)₃连接序列)。

[0162] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACATGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA
GGGGCTGGAGTGGGTCTCACTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC
CTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATATCGACGAGGGAGCCACGCTGAT
GCTTTTGATGTCATGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGAGGGCGGTTCAGGGCG
GAGGTGGTTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCT
CCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCCTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATACTATG
TCTCCATGGTACCAACAGTACCCAGGCAAAAGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCG
GCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCA
CTGGGCTCCAGGCTGAGGATGGGGCTGATTATTACTGCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGT
GGTAATTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCTAGGT

[0164] P7D4 scFv氨基酸序列如下 (SEQ ID NO:4):

[0165] QVQLQESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISC TGTSSDVGGYNYVS WYQQYPGKAPKLLIYGNSNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGGTKVTVLG

[0166] P7D4 VH CDR1:

[0167] 核苷酸序列:GGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC (SEQ ID NO:9);

[0168] 氨基酸序列:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10)。

[0169] P7D4 VH CDR2:

[0170] 核苷酸序列:gctattagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggc (SEQ ID NO:11);

[0171] 氨基酸序列:AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:12)。

[0172] P7D4 VH CDR3:

[0173] 核苷酸序列:gatcgacgaggagccacgctgatgcttttgatgtc (SEQ ID NO:13);

[0174] 氨基酸序列:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)。

[0175] P7D4 VL CDR1:

[0176] 核苷酸序列:actggaaccagcagtgacgttggtggttataactatgtctcc (SEQ ID NO:15);

[0177] 氨基酸序列:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)。

[0178] P7D4 VL CDR2:

[0179] 核苷酸序列:ggtaacagcaatcgccctca (SEQ ID NO:17);

[0180] 氨基酸序列:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)。

[0181] P7D4 VL CDR3:

[0182] 核苷酸序列:cagtcctatgacagcagcctgcgtgtggta (SEQ ID NO:19);

[0183] 氨基酸序列:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)。

[0184] 4.2、H12亲和力成熟库的构建

[0185] 通过对P7D4单链抗体进行序列比对和分析,P7D4重链第一个和第二个CDR区域的部分氨基酸被选定,通过引物引入随机化突变,用于构建重链亲和力成熟文库。

[0186] 为制备编码P7D4突变体文库的DNA片段,以质粒pCantab 5E-P7D4为模板,通过PCR方法分别得到两段DNA片段,随后通过搭桥PCR的方式拼接而成。具体使用以下操作步骤:为合成基因,在50μl体积中进行PCR反应,每个反应使用质粒pCantab 5E-P7D4作为模板,每条引物的终浓度为0.2μM,以及5μl 10×KOD Plus缓冲液、4μl dNTPs (dATP、dCTP、dGTP和dTTP,每种2mM)、2μl 25mM MgSO₄和1 U KOD Plus (购自Takara),用水补足体积后,在热循环仪中开始PCR程序。反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94℃30秒、56℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。第一个片段的扩增利用引物S1 (SEQ ID NO:21,CAACGTGAAAAATTATTATTCGC) 和74H12F1r (SEQ ID NO:22,CCAGCCCCTTGCC TGGAGCCTGGCGGACCCAMNNCATAGCATAMNNACTGAAGGTGAATCCAG),第二个片段利用引物74H12F2f (SEQ ID NO:23,GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTAGTNNKNNKGNTNNKNNK ACATACTACGCAGACTCC) 和S6 (SEQ ID NO:21,GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG)。

[0187] 预期PCR产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒 (购自Promega) 从样品中纯化回收。两个片段以等摩尔比加入到第二轮搭桥PCR中作为模板,反应体系仍然使用上述提到的KOD Plus体系,反应先加热样品到94℃预

变性5分钟,然后保温10个循环,每个循环反应条件是94℃30秒、60℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。随后在反应体系中直接加入终浓度为0.2μM的引物S1和S6,并开始PCR程序。反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94℃30秒、56℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。预期PCR产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒根据制造商的说明纯化回收。

[0188] 完整的文库DNA片段两端分别含有sfiI和NotI限制性内切酶识别位点,经限制性内切酶sfiI/NotI进行限制性消化,插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体pCANTAB 5E中。连接产物使用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒分离样品中的DNA并脱盐,用于电转化。在电转化时,使用电转化杯和电穿孔仪Gene Pulser II (购自Bio-Rad),转化到自制的感受态大肠杆菌ER2738(购自NEB)。最终确认得到一个含有 8.9×10^9 个突变体的文库。

[0189] 4.3、L12亲和力成熟库的构建

[0190] 通过对P7D4单链抗体进行序列比对和分析,P7D4轻链第一个和第二个CDR区域的部分氨基酸被选定,通过引物引入随机化突变,用于构建轻链亲和力成熟突变体文库。

[0191] 为制备编码P7D4突变体文库的DNA片段,以质粒pCantab 5E-P7D4为模板,通过PCR方法分别得到两段DNA片段,随后通过搭桥PCR的方式拼接而成。具体使用以下操作步骤:为合成基因,在50μl体积重进行PCR反应,每个反应使用质粒pCantab 5E-P7D4作为模板,每条引物的终浓度为0.2μM,以及5μl 10×KOD Plus缓冲液、4μl dNTPs (dATP、dCTP、dGTP和dTTP,每种2mM)、2μl 25mM MgSO₄和1 U KOD Plus,用水补足体积后,在热循环仪中开始PCR程序。反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94℃30秒、56℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。第一个片段的扩增利用引物S1和74L12F1r (SEQ ID NO:83, GTTTGGGGGCTTTGCCTGGGTACTGTTGGTACCAGGAGACMNNAHNMNNAHNACCAACGTCACTGCTG),第二个片段利用引物74L12F2f (SEQ ID NO:84, ACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCCTCATCTATNNKNNKNNKNNKCGGCCCTCAGGGGTC)和S6。

[0192] 预期PCR产物通过分析琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒从样品中纯化回收。两个片段以等摩尔比加入到第二轮搭桥PCR中作为模板,反应体系仍然使用上述提到的KOD Plus体系,在没有引物存在的情况下,反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温10个循环,每个循环反应条件是94℃30秒、60℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。随后在反应体系中直接加入终浓度为0.2μM的引物S1和S6,并开始PCR程序。反应先加热样品到94℃预变性5分钟,然后保温25个循环,每个循环是94℃30秒、56℃30秒和68℃30秒。最后在68℃保温10分钟。预期PCR产物通过制备性琼脂糖凝胶电泳分离,并用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒根据制造商的说明纯化回收。

[0193] 完整的文库DNA片段两端分别含有sfiI和NotI限制性内切酶识别位点,经限制性内切酶sfiI/NotI进行限制性消化,插入到经过同样双酶切的噬菌粒载体pCANTAB 5E中。连接产物使用Wizard SV Gel and PCR Clean-up试剂盒分离样品中的DNA并脱盐,用于电转化。在电转化时,使用电转化杯和电穿孔仪Gene Pulser II,转化到自制的感受态大肠杆菌ER2738。最终确认得到一个含有 1.1×10^{10} 个突变体的文库。

[0194] 另外,本发明人也采用error prone PCR的策略,对整个P7D4片段进行随机突变,构建了库容为 7.9×10^9 的文库T2,其中扩增引物对为S1和S6,克隆和构建方式与上述H12和

L12一致。

[0195] 以上三个亲和力成熟文库的筛选与实施例1中的筛选过程一致。通过筛选,本发明人鉴定得到六个高亲和力P7D4系列突变体克隆am4、am14、am20、am35、am42和T2-23,其序列信息如下:

[0196] am4核苷酸序列(SEQ ID NO:24,其中,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列,第364-408位为(Gly₄Ser)₃连接序列):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGCTATGACGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACTATTAGTAGTAGTGGTGAAAGTACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATCGA
[0197] CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTCCTGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCCTGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCTCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
[0198] GGGGCTGATTATTACTGCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0199] am4氨基酸序列(SEQ ID NO:25):

QVQLQESGGGLVQPGRSRLRSCAASGFTFSTYAMTWVRQAPGKGLEWVSSISSGESTYY
[0200] ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS
SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCCTGTSSDVGGYNYVSWYQQYPGK
APKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFFGGG
TKVTVLG

[0201] 重链CDR1:GFTFSTYAMT(SEQ ID NO:60)

[0202] 重链CDR2:SISSGESTYYADSVKG(SEQ ID NO:61)

[0203] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV(SEQ ID NO:14)

[0204] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS(SEQ ID NO:16)

[0205] 轻链CDR2:GNSNRPS(SEQ ID NO:18)

[0206] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV(SEQ ID NO:20)

[0207] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为(Gly₄Ser)₃连接序列。

[0208] am14核苷酸序列(SEQ ID NO:26,其中,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列,第364-408位为(Gly₄Ser)₃连接序列):

[0209] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGCTATGGCTTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GAAATTAGTAGTTCTGGTAGTAGGACATACTAC]
GCAGACTCCGTGAAGGGC[CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTATGATGTC[GGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTAGGCGGAGGTGGTTCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC[GGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCA]GGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGC[CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA]TCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0210] am14氨基酸序列 (SEQ ID NO:27) :

[0211] QVQLQESGGGLVQPGRLRLSCAAS[GFTFSTYAMA]WVRQAPGKGLEWVS[EISSSGSRTYY]
[ADSVKG]RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK[DRRGSHADAFDV]WGQGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGQSALTQPPSASGSPGQSVTISC[GTSSDVGGYNYVS]WYQQYPGK
APKLLIY[GNSNRPS]GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC[QSYDSSLRVV]FGGG
TKVTVLG

[0212] 重链CDR1:GFTFSTYAMA (SEQ ID NO:62)

[0213] 重链CDR2:EISSSGSRTYYADSVKG (SEQ ID NO:63)

[0214] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0215] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)

[0216] 轻链CDR2:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)

[0217] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0218] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列,第122-136为 (Gly₄Ser)₃连接序列。

[0219] am20核苷酸序列 (SEQ ID NO:28,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第364-408位为 (Gly₄Ser)₃连接序列) :

[0220] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACGTATGCTATGAATTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCA[GCGATTAGTATGTCTGGTGAATCTACATACTAC]
GCAGACTCCGTGAAGGGC[CGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAA[GATCGA]
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTATGATGTC[GGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTAGGCGGAGGTGGTTCGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGC[ACTGGA]
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCC[GGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCA]GGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGC[CAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTA]TCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0221] am20氨基酸序列 (SEQ ID NO:29) :

[0222] QVQLQESGGGLVQPGRLRLSCAAS[GFTFSTYAMN]WVRQAPGKGLEWVS[AISMSGESTYY]
[ADSVKG]RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK[DRRGSHADAFDV]WGQGLTVTS
SGGGGSGGGGSGGGGQSALTQPPSASGSPGQSVTISC[GTSSDVGGYNYVS]WYQQYPGK
APKLLIY[GNSNRPS]GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYC[QSYDSSLRVV]FGGG
TKVTVLG

[0223] 重链CDR1:GFTFSTYAMA (SEQ ID NO:64)

[0224] 重链CDR2:AISMSGESTYYADSVKG (SEQ ID NO:65)

[0225] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0226] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)

[0227] 轻链CDR2:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)

[0228] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0229] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列,第122-136为(Gly4Ser)₃连接序列。

[0230] am35核苷酸序列 (SEQ ID NO:30,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第364-408位为(Gly₄Ser)₃连接序列):

[0231] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACATGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTGATGTCATGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
AGTGGTGGAGGCGGTTAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCATGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTCATAAGTTTCTGTCTCTTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATAAGAATCTTTTGCGGCCCTCAAGGGGTCCCTGACCGATTCT
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGTCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG

[0232] ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0233] am35氨基酸序列 (SEQ ID NO:31):

[0234] QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISSGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLVTVS
SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCITGTSSDVGHKFPVSWYQQYPGK
APKLLIYKNLLRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG

[0235] 重链CDR1:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10)

[0236] 重链CDR2:AISSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:66)

[0237] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0238] 轻链CDR1:TGTSSDVGHKFPVS (SEQ ID NO:67)

[0239] 轻链CDR2:KNLLRPS (SEQ ID NO:68)

[0240] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0241] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为(Gly4Ser)₃连接序列。

[0242] am42核苷酸序列 (SEQ ID NO:32,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第364-408位为(Gly₄Ser)₃连接序列):

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACATGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTTATGATGCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
[0243] AGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCATGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTCTTATGCATAATGTCTCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATAGTCTTCGTCCTCGGCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATTC
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0244] am42氨基酸序列 (SEQ ID NO:33) :

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISSGGSTYY
[0245] ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADAFDVWGQGLTVTS
SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCITGSSDVGLMHNVSWYQQYPGK
APKLLIYKSSSRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG

[0246] 重链CDR1:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10)

[0247] 重链CDR2:AISSSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:66)

[0248] 重链CDR3:DRRGSHADAFDV (SEQ ID NO:14)

[0249] 轻链CDR1:TGTSSDVGLMHNVS (SEQ ID NO:69)

[0250] 轻链CDR2:KSSSRPS (SEQ ID NO:70)

[0251] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0252] 其中,第1-121为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为
(Gly₄Ser)₃连接序列。

[0253] T2-23核苷酸序列 (SEQ ID NO:34,第76-105位为重链CDR1,第148-198位为重链
CDR2,第295-330位为重链CDR3;第475-516位为轻链CDR1;第562-582位为轻链CDR2,第679-
708位为轻链CDR3;其中,第1-363位为重链核苷酸序列,第409-741为轻链核苷酸序列。第
364-408位为(Gly₄Ser)₃连接序列) :

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGGGGAGGCTTAGTTCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACATGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACTATTAGTAGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC
GCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAATATCGA
CGAGGGAGCCACGCTGATGCTTTAAATGCTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG
[0254] AGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGTCTGCCCTG
ACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAGTCACCATCTCCTGCATGGA
ACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGTCTCTGGTACCAACAGTACCCAGGCAAA
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAAGGGTCCCTGACCGATTC
TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGAT
GGGGCTGATTATTACTGCAGTCCTATGACAGCAGCCTGCGTGTGGTAATTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTCACCGTCCTAGGT

[0255] T2-23氨基酸序列 (SEQ ID NO:35) :

QVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAISSGRSTYY
[0256] ADSVEGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRGSHADALNVWGQGLTVTS
SGGGSGGGSGGGGSQSALTQPPSASGSPGQSVTISCITGSSDVGGYNYVSWYQQYPGK
APKLLIYGNSSRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDGADYYCQSYDSSLRVVFGGG
TKVTVLG

[0257] 重链CDR1:GFTFSSYAMH (SEQ ID NO:10)

[0258] 重链CDR2:AISSSGRSTYYADSVEG (SEQ ID NO:71)

[0259] 重链CDR3:DRRGSHADALNV (SEQ ID NO:72)

[0260] 轻链CDR1:TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:16)

[0261] 轻链CDR2:GNSNRPS (SEQ ID NO:18)

[0262] 轻链CDR3:QSYDSSLRVV (SEQ ID NO:20)

[0263] 其中,第1-121位为重链氨基酸序列,第137-247为轻链氨基酸序列。第122-136为(Gly₄Ser)₃连接序列。

[0264] 4.4、P7D4系列抗体对GPC3结合能力的SPR分析

[0265] 为定量分析P7D4系列抗体与GPC3的结合,使用Biacore T200系统(购自GE)通过捕获法分别测量P7D4系列单链抗体的亲和力和动力学参数。根据制造商的说明,用NHS/EDC偶联通过伯氨基将抗人IgG (Fc)的抗体(购自GE)偶联到传感器芯片CM5的羧甲基葡聚糖表面。测量在25℃、30μl/min、1×HBS-EP+工作缓冲液中进行,再生条件为3M MgCl₂、10μl/min作用30秒。在每一轮测试循环中,待测试抗体首先被捕获到芯片上,一定浓度的分析物GPC3流过芯片表面,人GPC3与被捕获的抗体相互作用而导致传感片表面分子浓度的变化将由SPR信号的改变而得到测定,并以共振单位(RU)表示。以时间对共振单位(RU)连续作图,得到的传感图记录了整个反应过程包括结合和解离过程(图4)。在所有的单循环动力学中,GPC3的浓度分别为5nM、10nM、20nM、40nM和80nM。用Biacore T200 evaluation software评估所得作用曲线,并计算亲和力KD值。所有P7D4系列单链抗体分别对GPC3的结合数据总结在表1中。

[0266] 表1、P7D4系列单链抗体对GPC3的结合数据

	抗体样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
	P7D4	9.31E+04	6.17E-03	6.64E-08
	am4	5.39E+05	4.08E-05	7.56E-11
[0267]	am14	6.73E+05	4.43E-05	6.46E-11
	am20	2.12E+05	6.47E-05	3.06E-10
	am35	7.38E+05	5.2 E-05	7.14E-11
	am42	8.16E+05	6.70E-05	8.21E-11
	T2-23	8.86E+05	5.19E-05	5.85E-11

[0268] 由表1可见,改造获得的P7D4系列突变体单链抗体具有良好的亲和力,相对于P7D4单链抗体具有极其显著的提高。

[0269] 4.5、P7D4系列抗体的识别特异性分析

[0270] 为了分析P7D4系列抗体对GPC3蛋白的结合特异性,通过ELISA实验,分别测定P7D4系列单链抗体分别对人GPC家族成员,包括重组人GPC1 (rhGPC1)、GPC2 (rhGPC2)、GPC3 (rhGPC3)、GPC5 (rhGPC5)和GPC6 (rhGPC6) (购自安迪生物科技(上海)有限公司)的结合活性。

[0271] 为此目的,用0.1M NaHCO₃ (pH 9.6)包被液稀释以上5种抗原,每孔包被100ng,50μl/孔,4℃包被过夜,并用含2% (w/v) BSA的PBST于室温下封闭2小时。然后用PBST漂洗平板

三次并去除干净。随后,向每个孔板加入100ng各抗体蛋白的PBST溶液,每个样品的测定使用平行复孔分析。37℃保温2小时后,用PBST漂洗三次,随后加入1:20000稀释的HRP标记的兔抗人Fc抗体(购自上海锐劲生物技术有限公司)100μl/孔,37℃反应1小时。为了检测,用PBST漂洗孔三次,然后用PBS漂洗三次,最后加入TMB显示10分钟,用每孔50μl的2M H₂SO₄终止显色反应,用酶联免疫检测仪(Bio-Rad)在450nm测量消光值。

[0272] 结果如图5所示,所有P7D4系列的单链抗体均只特异性结合人GPC3,不与人GPC1、GPC2、GPC5和GPC6结合。

[0273] 实施例5、人GPC3抗原及抗该抗原的人源化单克隆抗体的制备

[0274] 5.1 人GPC3在真核表达系统中表达及纯化

[0275] 5.1.1 GPC3载体构建及鉴定

[0276] 以人肝癌细胞系Huh-7cDNA为模板,以如下引物GPC3-F:GATCGCTAGCACAGCCCCGCCGCCGC(SEQ ID NO:54),GPC3-R:GTACGGATCCTTCAGCGGGGAATGAA CGTTC(SEQ ID NO:55)进行PCR扩增,获得两端带有酶切位点NheI/BamHI的GPC3片段(1.6kb),将获得的PCR片段用内切酶NheI/BamHI(购自Fermentas公司)双酶切,同时将质粒载体V5H(购自Raygene公司),同样经内切酶NheI/BamHI双酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收载体和插入片段,再通过T4 DNA ligase(购自NEB公司)连接并转化于宿主菌TOP10(购自LIFE公司)中,经氨苄抗性进行筛选,挑取克隆抽提质粒内切酶NheI/BamHI(购自Fermentas公司)双酶切鉴定含插入片段的阳性克隆,并通过测序验证,得到含有正确的人GPC3基因序列的真核表达质粒V5H-GPC3。

[0277] 5.1.2 人GPC3蛋白的表达与纯化

[0278] 5.1.2.1.V5H-GPC3质粒的脂质体转染和培养

[0279] 将生长良好的HEK293F细胞(HEK293F,购自LIFE公司)以1×10⁶细胞/毫升的密度接种于细胞三角培养瓶,37℃5%CO₂ 120rpm培养过夜备用;将上述步骤获得的质粒V5H-GPC3与脂质体293Fectin(购自LIFE公司)分别用DMEM稀释并温和混合,室温孵育20min,将孵育好的DNA-脂质体复合物加至293F细胞中,37℃5%CO₂ 120rpm培养72h。收集细胞培养液,4500g离心15min,除去细胞,取上清。

[0280] 5.1.2.2.GPC3蛋白纯化

[0281] 取1ml的Ni-NTA Agarose亲和填料装柱,将Ni-NTA亲和柱用平衡缓冲液(50mM PB、0.3M NaCl、10mM咪唑、pH8.0)平衡10个柱体积。将离心后的细胞培养液上清以1ml/min通过Ni-NTA亲和柱,收集流穿液4℃保存。用清洗缓冲液1(50mM PB、0.3M NaCl、20mM咪唑、pH8.0)洗10个柱体积,收集流穿液于4℃保存。用洗脱缓冲液(50mM PB、0.3M NaCl、250mM咪唑、pH8.0)洗4-5个柱体积,收集洗脱液,在透析液(50mM PB,pH7.8,0.3M NaCl,5%甘油)中4℃透析过夜,即获得GPC3(H)蛋白,取少量进行SDS PAGE电泳(图6)。

[0282] 5.2 人GPC3抗原免疫

[0283] 重组蛋白免疫:将上述实施例5.1中得到的1ml纯化人GPC3蛋白GPC3(H)(1.0mg/mL)作为抗原与1mL完全弗氏佐剂(购自Sigma-aldrich公司)充分乳化混合皮下免疫6-8周龄BALB/c小鼠,每只小鼠免疫100μg人GPC3(H)蛋白抗原。4周后人GPC3抗原与不完全弗氏佐剂乳化混合,腹腔注射免疫小鼠,50μg每只小鼠,其后间隔2周,继续腹腔50μg抗原加强免疫。在第4次加强免疫1周后,以GPC3(H)蛋白进行包被,通过ELISA法检测小鼠抗血清效价,继续加强免疫,直至小鼠的抗血清效价达到>10⁵。

[0284] 最后一次加强免疫3周后,脾内免疫上述人GPC3(H)蛋白20 μ g,备用。

[0285] 5.3 抗人GPC3杂交瘤细胞株建立

[0286] 小鼠经脾内加强免疫后4天,在无菌情况下取脾,用100目滤网滤过分离淋巴细胞,与骨髓瘤细胞系SP2/0融合,经次黄嘌呤、氨基蝶呤与胸苷(hypoxanthine,aminop terin and thymidine,HAT)选择性培养3天后,补加HT培养基,继续培养1周。

[0287] 以GPC3(H)抗原包被,ELISA筛选阳性克隆,以有限稀释法进行3次亚克隆,继续连续培养2个月,最后获得稳定杂交瘤细胞系(克隆号分别命名为:5A5,7C9,11D3)。

[0288] 5.4 腹水生产及抗体的纯化

[0289] 将8-10周龄F1小鼠腹腔注射100 μ L降植烷(购自Sigma-aldrich公司),1周后,取上述实施例5.4杂交瘤细胞克隆以 5×10^5 细胞/小鼠的量注射小鼠腹腔以制备腹水,7到10天后采集腹水,10000g离心10min,取上清备用。取蛋白G亲和柱(购自GE公司)回复室温,用PBS(0.01M PB,0.15M NaCl,pH 7.4)平衡5个柱体积。将腹水上清与等体积用PBS(0.01M PB,0.15M NaCl,pH 7.4)混匀,0.22 μ m滤器过滤,过滤的腹水上清液上蛋白G亲和柱,PBS洗5个柱体积。以洗脱缓冲液(0.1M Glycine HCl,pH2.7)洗脱,洗脱液加入1/10体积中和缓冲液(1M NaH₂PO₄,pH9.0)中和。将溶液用PBS(0.01M PB,0.15M NaCl,pH 7.4)透析,其间换液两次,两次换液时间间隔时间大于5小时。将透析溶液于10000g离心10min,上清液通过0.22 μ m滤膜过滤保存,得到纯化的对应各克隆产生的抗人GPC3单抗的溶液。根据分析5A5具有良好的抗原结合能力。

[0290] 5.5 GPC3克隆5A5的人源化

[0291] 5.5.1 5A5抗体的序列分析

[0292] 5A5具有良好的抗原结合能力。测定5A5抗体基因可变区序列VL与VH,综合Kabat、Chothia以及IMGT三种抗体CDRs区的命名方案,确定抗体轻链与重链的六个CDRs区序列。

[0293] 5A5重链的核苷酸序列如下(SEQ ID NO:56,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3):

[0294] CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAG
GCTTTGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAGTGGATTGG
AGCTATTTCATCCAGGAAGTGGTGATACTGCCTACAATCAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAAT
CTTCCAGCACAGCCTACATGGAGTACAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGATTTTAT
TCCTATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

[0295] 5A5轻链的核苷酸序列如下(SEQ ID NO:57,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3):

[0296] GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGC
AGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAGTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCC
AAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGAGGATCAGGGACAG
ATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTATATATGTTCCG
TACACGTTTCGGAGGAGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

[0297] 5A5重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:81,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3):

[0298] QVQLQQSGTELVRPGASVKLSCKALGYFTFDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIHPGSGDTAYNQRFK GK

ATLTADKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCTRFYSYAYWGQGLTVTVSA

[0299] 5A5轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:82,其中,下划线的三个区段依次为CDR1、CDR2、CDR3)

[0300] DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGRSGTDFTLKISRVEADLG VYFCSQSIYVPYTFGGGTKLEIKR

[0301] 5.5.2抗体模板的选择

[0302] 抗体模板框架区的选择主要有4个重要因素:免疫原性,抗原结合特性,表达以及抗体的稳定性。

[0303] (1)根据专利W02008021156确定抗体轻重链可变区中支持抗体loop结构的氨基酸残基以及轻重链结合区域的氨基酸残基。

[0304] (2)将5A5的轻链或者重链可变区全长与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0305] (3)将5A5的轻链或者重链可变区中CDR区内的loop支持相关的氨基酸残基去掉,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0306] (4)将5A5的轻链或者重链可变区中CDR区的氨基酸残基去掉,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0307] (5)只保留5A5的轻链或者重链序列中的与支持loop相关的氨基酸残基,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0308] (6)只保留5A5的轻链或者重链framework中与支持loop相关的氨基酸残基,然后与来自IMGT,V BASE或者NCBI的抗体种系进行序列相似性比对。

[0309] (7)综合序列相似性比对的结果,选取相似度最高的抗体种系作为抗体模板。

[0310] (8)重链的序列相似度比对结果:根据相似度,选取VH1_69*06(IMGT,Accession numbers:L22583)作为5A5重链的抗体模板。

[0311] (9)轻链的序列相似对比结果:根据相似度,选取VK2D_29*02(IMGT,Accession numbers:U41644)作为5A5轻链的抗体模板。

[0312] 5.5.3 CDR移植

[0313] 将5A5抗体的轻链或者重链CDR区替换掉抗体模板的CDR区。最终确定人源化抗体(Y035)。其氨基酸序列如下:

[0314] 人源化Y035重链(SEQ ID NO:58):

[0315] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS¹DYEMHWVRQAPGQGLEWMGAIHPGSGDTAYNQRF² KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFYSYAYWGQGLTVTVSA

[0316] 重链CDR1氨基酸序列为:Asp Tyr Glu Met His(SEQ ID NO:73);

[0317] 重链CDR2氨基酸序列为:Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly(SEQ ID NO:74);

[0318] 重链CDR3氨基酸序列为:Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr(SEQ ID NO:75)。

[0319] 人源化Y035轻链(SEQ ID NO:59):

[0320] DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCSQSIYVPYTFGQGTKLEIKR

[0321] 轻链CDR1氨基酸序列为:Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn

Thr Tyr Leu Gln(SEQ ID NO:76) ;

[0322] 轻链CDR2氨基酸序列为:Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser(SEQ ID NO:77) ;

[0323] 轻链CDR3氨基酸序列为:Ser Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr(SEQ ID NO:78)。

[0324] 5.5.4表达和纯化人源化的抗体

[0325] (1)根据人源化的抗体(Y035)的氨基酸序列,设计核苷酸序列并合成

[0326] 合成的轻链核苷酸序列(SEQ ID NO:79,包括信号肽编码序列):

[0327] GGATCGATATCCACCATGGACATGATGGTGCTGGCCCAGTTCCTGGCCTTCCTGCTGCTGTGGTTCCCA
GGCGCTAGATGCGACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCCCGGCGAGCCCCGCCAGCATCAG
CTGCCGGAGCAGCCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAACACCTACCTGCAGTGGTACCTGCAGAAGCCCCGGCCAGA
GCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGGTTACGCGCGTGCCCCACCGGTTACGCGGCAGCGGCAGCGGC
ACCGACTTACCCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGAGCATCTACGT
GCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT

[0328] 合成的重链核苷酸序列(SEQ ID NO:80,包括信号肽编码序列):

[0329] GGATCGATATCTGCGGCCTATCTAGCCACCATGCGGGTGCTGATCCTGCTGTGGCTGTTTACCGCCTTC
CCCGGCTTCCTGAGCGAGGTGCAGCTGGTGACAGCGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAG
CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCAGCGACTACGAGATGCACTGGGTGCGGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGT
GGATGGGCGCCATCCACCCCGGCAGCGGCGACACCGCCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGCC
GACAAGAGCACCAGCACCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCG
GTTCTACAGCTACGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCCGCTAGCACCAAA

[0330] (2)把合成的抗体核苷酸序列(信号肽是第16-81位(轻链)第31-84位(重链)),抗体的可变区,恒定区插入到哺乳动物细胞表达载体中从而分别构建出含有重链和轻链的抗体表达载体,通过测序鉴定抗体序列跟设计一致。具体为:

[0331] 以EcoRV和BsiWI双酶切合成的轻链以及pIK-hu12L(购自上海锐劲生物技术有限公司),将轻链插入pIK-hu12L。

[0332] 以EcoRV和NheI双酶切合成的重链以及改造过的pIH-hu12H(购自上海锐劲生物技术有限公司在CH1上通过同义突变增加了一个NheI酶切位点),将重链插入pIH-hu12H。

[0333] 经酶切连接好的载体转化至TOP10感受态细胞,PCR鉴定阳性克隆,经测序鉴定确定序列正确的克隆。将载体通过293Fectin瞬时转染至293F细胞中并表达。离心收集293F培养上清,通过0.45um滤器过滤,通过Protein A柱亲和层析。利用分光光度计测定A280来确定纯化抗体的浓度。

[0334] 5.6 人源化抗体Y035对人GPC3结合能力的SPR分析

[0335] 为定量分析抗体Y035与抗原蛋白人GPC3的结合,使用Biacore T200系统(购自GE)通过多循环动力学测定方法,测量抗体Y035的亲合力和动力学参数。根据制造商的说明,用NHS/EDC偶联通过伯氨基将抗原蛋白人GPC3(购自上海锐劲生物技术有限公司)偶联到传感器芯片CM5的羧甲基葡聚糖表面,配体最终偶联量为305RU。动力学测量在25℃、30μl/min、1×HBS-EP+工作缓冲液中进行,再生条件为10mM Glycine-HCl(pH2.5)、10μl/min作用25秒。在每一个测量循环中,特定浓度的抗体Y035流过芯片表面,抗体与被固定在芯片上的抗原蛋白人GPC3相互作用而导致传感片表面分子浓度的变化将由SPR信号的改变而得到测定,

并以共振单位 (RU) 表示。以时间对共振单位 (RU) 连续作图,并扣除了未固定抗原的参比通道的RU数值后,得到的传感图记录了整个反应过程包括结合和解离过程。抗体Y035及抗体5A5对人GPC3的结合动力学分析如图7-8。在动力学测定的不同循环实验中,抗体Y035的浓度分别为6.25nM、12.5nM、25nM、50nM和100nM。用Biacore T200 evaluation software评估所得作用曲线,并计算亲和力KD值。采用同样的方法,对Y035进行人源化改造前的亲本鼠单克隆抗体5A5的亲和力和动力学参数也进行了测定分析。抗体Y035和5A5分别对人GPC3蛋白的结合数据总结在表2中,经过人源化改造后的抗体Y035对人GPC3蛋白的结合能力大大优于鼠源的5A5。

[0336] 表2、抗体Y035与5A5对人GPC3的结合动力学参数

	抗 体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
[0337]	Y035	3.96E+05	2.51E-05	6.34E-11
	5A5	2.80E+05	2.30E-05	8.19E-11

[0338] 5.7 抗体Y035的细胞结合活性FACS分析

[0339] 通过荧光激活细胞分选仪 (FACS) 分析抗体Y035与GPC3阳性的肝癌HepG2细胞系(ATCC)的结合能力,使用GPC3表达阴性的293T(ATCC)细胞作阴性对照。

[0340] 具体方法如下:

[0341] 1) 取对数生长期的细胞HepG2和293T分别接种到6cm平皿中,接种细胞密度约为90%,37℃孵箱过夜培养。

[0342] 2) 使用10mM的EDTA消化细胞,200g×5min离心收集细胞。以 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mL的浓度重悬于1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液(NBS PBS)中,按100ul/管的量加入流式专用管中。

[0343] 3) 200g×5min离心,弃上清。

[0344] 4) 两个细胞系的实验组分别加入待测抗体Y035,另一个对照为不加抗体的PBS空白对照。抗体的终浓度均为20μg/ml,每管加入100ul。冰浴,45分钟。

[0345] 5) 每管加入2ml 1%NBS PBS,以200g×5min离心,共二遍。

[0346] 6) 弃上清,加入1:100稀释的羊抗人抗体-FITC(来自上海业力生物科技有限公司),每管加入100ul。冰浴,45分钟。

[0347] 7) 每管加入2ml 1%NBS PBS,以200g×5min离心,共二遍。

[0348] 8) 弃上清,重悬于300ul 1%NBS PBS中,流式细胞仪检测。

[0349] 应用流式细胞仪数据分析软件Flowjo7.6分析数据,结果如图9所示,流式细胞分析结果标明,抗体Y035可以特异性识别表达GPC3的HepG2细胞,与GPC3表达阴性的293T细胞不结合。

[0350] 实施例6、基于P7D4单链抗体的CAR表达载体的构建和慢病毒制备

[0351] 作为示例,以下构建本发明的慢病毒质粒载体使用的载体系统属于第三代自灭活慢病毒载体系统,该系统共有四个质粒:即编码蛋白Gag/Pol的包装质粒pMDLg RRE(购自addgene),编码Rev蛋白的包装质粒pRSV-REV(购自addgene),编码VSV-G蛋白的包膜质粒pCMV-VSV-G(购自addgene)及基于空载体pRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE(购自addgene)的编码目的基因CAR的重组表达载体,该系统可以有效降低形成可复制性慢病毒颗粒的风险。

[0352] 在本系统中, 本发明人首先通过常规分子克隆的技术方式, 对空载体pRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE进行改造, 用延长因子-1 α (elongation factor-1 α , 简称EF-1 α) 的启动子替代了原载体的启动子, 并在启动子和CD8 α sp信号肽之间增加了MluI酶切位点。具体地, 使用ClaI/SalI (购自NEB) 双酶切载体pWPT-EGFP (购自addgene), 回收1.1Kb的DNA片段, 用T4 DNA连接酶连接于经ClaI/SalI双酶切的载体pRRLSIN-cPPT.PGK-GFP.WPRE, 并转化于宿主菌TOP10中, 挑取克隆通过菌落PCR鉴定阳性克隆并通过测序确认, 获得重组质粒pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -EGFP.WPRE。

[0353] 利用前述优化获得的P7D4 scFv制备嵌合抗原受体。表3解释了本发明示例的嵌合抗原受体各部分的连接顺序。

[0354] 表3

[0355]	嵌合抗原受体	胞外结合区-跨膜区-胞内信号区1-胞内信号区2etc	描述
	P7D4- δ Z	P7D4 scFv-CD8-CD3 δ zeta	阴性对照
	P7D4-Z	P7D4 scFv-CD8-CD3 zeta	第一代
	P7D4-BBZ	P7D4 scFv-CD8-CD137-CD3 zeta	第二代
	P7D4-28Z	P7D4 scFv-CD28a-CD28b-CD3 zeta	第二代
	P7D4-28BBZ	P7D4 scFv-CD28a-CD28b-CD137-CD3 zeta	第三代

[0356] 注: CD28a代表CD28分子的跨膜区, CD28b代表CD28分子的胞内信号区。

[0357] 1、核酸片段的扩增

[0358] (1) scFv序列的扩增

[0359] 分别以V5-scFv-P7D4-Fc质粒为模板, 采用正向引物P7D4fd (SEQ ID NO:36, 包含部分CD8 signal peptide (CD8sp) 的序列, 引物序列为: ctccacgccgccaggccgcaggtgcagctgcaggag) 和反向引物P7D4re (SEQ ID NO:37, 包含部分CD8 hinge的序列, 引物序列为: CGGCGCT GCGTCGTGGTACCTAGGACGGTGACCTTGG) 为引物对, PCR扩增获得P7D4 scFv片段。

[0360] (2) 嵌合抗原受体其他部分的核酸序列

[0361] 抗GPC3嵌合抗原受体蛋白的除P7D4 scFv外其它部分的核酸序列以专利申请号为201310164725.X中公开的序列SEQ ID NO:26, 27, 28, 29和30为模板通过PCR方式获得。

[0362] 具体地, 其中包含CD8 α sp序列的片段F1以本实施例中构建的质粒pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -EGFP.WPRE为模板, 以引物对PWXL (SEQ ID NO:38, 引物序列: gcaggggaaagaatagtagaca) 和PRRL-CD8SP-R1 (SEQ ID NO:39, 引物序列: CGGCCTGGCGGCTGGAG) 进行PCR扩增获得。

[0363] 包含CD8-CD3 δ zeta (δ Z) 的片段F3- δ Z以申请专利201310164725.X中SEQ ID NO:26质粒为模板, 采用引物对PRRL-CD8hinge (SEQ ID NO:40, 引物序列: accacgacgccagcgccg) 和 δ Z re (SEQ ID NO:41, 引物序列: GAGGTCGACCTACGCGGGGGCGTCTGCGCTCCTGCTGAACCTTCACTCT) 通过PCR扩增获得。

[0364] 包含CD8-CD3 zeta (Z) 的片段F3-Z、包含CD8-CD137-CD3 zeta (BBZ) 的片段F3-BBZ、包含CD28a-CD28b-CD3 zeta (28Z) 的片段F3-28Z和包含CD28a-CD28b-CD137-CD3zeta (28BBZ) 的片段F3-28BBZ序列分别以申请专利201310164725.X中SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30对应的质粒为模板, 采用引物对PRRL-CD8hinge (SEQ ID NO:42, 引物序列: accacgacgccagcgccg) 和R3R (SEQ ID NO:43, 引物序列: aatccagaggt

tgattgtcgcacctagcgagggggcagggcctgc)通过PCR扩增获得。

[0365] 2、核酸片段的拼接

[0366] 分别将如前述获得的F1核酸片段,与等摩尔的P7D4 scFv核酸片段以及等摩尔的F3- δ Z或F3-Z或F3-BBZ或F3-28Z或F3-28BBZ核酸片段,进行三片段拼接PCR,拼接条件为:预变性:94℃,4min;变性:94℃,40s;退火:60℃,40s;延伸:68℃,140s,进行5个循环,然后总延伸68℃,10min,补充DNA聚合酶及正向引物PWXL和反向引物R3R(CD8-CD3 δ zeta对应的反向引物为 δ Z re,其余的皆为R3R)后PCR扩增30个循环,扩增条件为预变性:94℃,4min;变性:94℃,40s;退火:60℃,40s;延伸:68℃,140s,进行30个循环,然后总延伸68℃,10min。本实施例构建的由F1片段、P7D4 scFv或P7D4突变体scFv、以及各类F3片段所组成的片段可以简称为CAR片段,扩增获得的片段分别称为:

[0367] P7D4 scFv- δ Z (SEQ ID NO:44),

[0368] P7D4 scFv-Z (SEQ ID NO:45),

[0369] P7D4 scFv-BBZ (SEQ ID NO:46),

[0370] P7D4 scFv-28Z (SEQ ID NO:47),

[0371] P7D4 scFv-28BBZ (SEQ ID NO:48)。

[0372] 3、慢病毒质粒载体的构建

[0373] 本实施例构建了由F1片段、P7D4 scFv、以及F3片段组件简称为CAR)通过MluI/SalI限制性内切酶双酶切,连入同样双酶切的pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -EGFP.WPRE载体中,从而构建表达各嵌合抗原受体的慢病毒载体pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -CAR。构建成功的载体经MluI/SalI酶切鉴定及序列测定正确后,可以准备用于慢病毒包装。如前所述,相关CAR基因经转录翻译为一条肽链,在CD8 α 信号肽的引导下,抗GPC3嵌合抗原受体将定位在细胞膜上。

[0374] 通过以上构建,分别可获得五个CAR多肽序列,称为:

[0375] P7D4- δ Z (SEQ ID NO:49);

[0376] P7D4-Z (SEQ ID NO:50);

[0377] P7D4-BBZ (SEQ ID NO:51);

[0378] P7D4-28Z (SEQ ID NO:52);

[0379] P7D4-28BBZ (SEQ ID NO:53)。

[0380] 4、质粒转染293T包装慢病毒

[0381] 以 6×10^6 的密度接种培养至第6~10代的HEK-293T细胞(ATCC:CRL-11268)于10cm培养皿中,37℃,5%CO₂培养过夜准备用于转染。培养基为含10%胎牛血清和DMEM(均购自Life公司)。

[0382] 转染的步骤如下:

[0383] 4.1 A液配制:将5.2 μ g的各目的基因质粒pRRLSIN-cPPT.EF-1 α -CAR,分别与6.2 μ g包装质粒pMDLg RRE和pRSV-REV、以及2.4 μ g包膜质粒pCMV-VSV-G,溶入800 μ L的无血清DMEM培养液中,混匀。

[0384] 4.2 B液配制:将60 μ g PEI(聚乙烯亚胺1 μ g/ μ l,购自Polysciences公司)溶解于800 μ L的无血清DMEM培养液中,轻轻混匀,室温孵育5min。

[0385] 4.3 转染复合物的形成:将A液加入B液中轻轻混合,加入后立即涡旋混合或轻轻混匀,室温下孵育20min。

[0386] 4.4 将转染复合物1.6ml滴加入HEK-293T细胞中,4-5h小时后,用2%FBS的DMEM培养基给转染的293T细胞换液。

[0387] 在转染孵育72h后,使用0.45 μ m滤器(购自Millipore公司)过滤收集病毒,然后采用Beckman Optima L-100XP超速离心机28000rpm,4℃离心2小时,弃离心上清,离心所得沉淀用1/10~1/50原液体积的AIM-V培养液(购自Life公司)进行重悬,以100 μ L/管分装冻存于-80℃,以待病毒滴定或感染T淋巴细胞。

[0388] 实施例7、重组慢病毒感染CTL细胞

[0389] 由健康人外周血通过密度梯度离心法获得人外周血单个核细胞(上海市血液中心提供),以约 2×10^6 /mL密度加入AIM-V淋巴细胞培养基(购自Invitrogen公司)培养,并以细胞:磁珠比例为1:1加入包被有抗CD3和CD28抗体的磁珠(Invitrogen公司),同时加入终浓度300U/mL的重组人IL-2(购自上海华新生物高技术有限公司)刺激培养48h,然后以用上述重组慢病毒(MOI $\approx$ 10)感染T细胞。感染后的细胞每隔一天采用 5×10^5 /mL的密度进行传代,同时在淋巴细胞培养液中补加终浓度300U/mL的重组人IL-2。

[0390] 感染的CTL细胞在培养第8天时通过流式细胞检测各不同嵌合抗原受体表达。采用带His-tag的人类GPC3重组蛋白(购自上海锐劲生物技术有限公司)进行FACS检测;首先将细胞与该蛋白(50ug/ml)孵育1hr,D-PBS洗涤2次,然后加入抗His-tag的抗体(1:50稀释,购自上海睿星生物技术有限公司),孵育1hr,然后用D-PBS洗涤2次,然后加入FITC标记的羊抗鼠二抗(上海康成生物技术有限公司),孵育50min,D-PBS洗涤3次后,FACS检测。以未感染的T淋巴细胞作为阴性对照,表达不同嵌合抗原受体的病毒感染T细胞其阳性率如表4所示。该阳性率结果表明,通过慢病毒感染的方法能够获得一定阳性率的CAR⁺T细胞。

[0391] 表4

转染有下列CAR的T细胞	T细胞转染阳性率
P7D4- δ Z(阴性对照)	59%
P7D4-Z	65%
P7D4-BBZ	53%
P7D4-28Z	61%
P7D4-28BBZ	54%

[0393] T细胞在分别感染包装有不同嵌合抗原受体的病毒后,以细胞密度为 5×10^5 /ml隔天传代培养、计数、并对传代的细胞培养液补加IL-2(终浓度为300U/ml),培养第11天约有100~1000倍的扩增,表明表达不同嵌合抗原受体的T细胞在体外能够进行一定数量的扩增,为后续体外毒性试验及体内试验提供了保证。

[0394] 实施例8、表达嵌合抗原受体的T淋巴细胞的体外毒性效果实验

[0395] 体外毒性实验使用的材料如下:

[0396] 如表5所示的GPC3阳性肝癌细胞(HepG2和Huh-7)以及GPC3阴性肝癌细胞(SK-HEP-1)作为靶细胞,效应细胞为如实施例7所验证的体外培养12天的FACS检测嵌合抗原受体表达的阳性细胞记为嵌合抗原受体阳性(CAR⁺)的CTL,效靶比视情况分别为3:1,1:1和1:3,靶细胞数量为10000个/孔,根据不同效靶比对应效应细胞。各组均设5个复孔,取5个复孔的平均值。检测时间为第18h。

[0397] 其中各实验组和各对照组如下:

[0398] 各实验组:各靶细胞+表达不同嵌合抗原受体的CTL,

[0399] 对照组1:靶细胞最大释放LDH,

[0400] 对照组2:靶细胞自发释放LDH,

[0401] 对照组3:效应细胞自发释放LDH。

[0402] 检测方法:采用CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒(Promega公司)进行。该方法是基于比色法的检测方法,可替代⁵¹Cr释放法。CytoTox 96[®]检测定量地测量乳酸脱氢酶(LDH)。LDH是一种稳定的胞质酶,在细胞裂解时会释放出来,其释放方式与⁵¹Cr在放射性分析中的释放方式基本相同。释放出的LDH培养基上清中,可通过30分钟偶联的酶反应来检测,在酶反应中LDH可使一种四唑盐(INT)转化为红色的甲臍(formazan)。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。具体参照CytoTox 96非放射性细胞毒性检测试剂盒说明书。

[0403] 细胞毒性计算公式为:

$$[0404] \quad \text{细胞毒性}\% = \frac{\text{实验组} - \text{对照组 2} - \text{对照组 3}}{\text{对照组 1} - \text{对照组 2}} \times 100\%$$

[0405] 具体如表5所示,本发明的P7D4的单链抗体的CAR均有明显的杀伤GPC3阳性肝癌细胞的活性,其中第二代和第三代的P7D4 CAR T细胞比第一代抗肿瘤活性略强。此外,所有CAR T细胞对GPC3阴性的SK-HEP-1阳性肝癌细胞均没有杀伤活性。这些结果表明P7D4可以选择性地针对GPC3阳性的肝癌细胞,并进行有效的杀伤。此外,本发明的表达P7D4的第一、二、三代CAR T对GPC3阳性肿瘤细胞呈现效靶比梯度依赖性即效靶比越高细胞毒性作用越强。

[0406] 表5、融合表达单链抗体P7D4的CAR T细胞的细胞毒性

[0407]

细胞毒性 (%)	P7D4-28BBZ			P7D4-BBZ			P7D4-28Z			P7D4-Z			P7D4-δZ		
	不同效靶比			不同效靶比			不同效靶比			不同效靶比			不同效靶比		
	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3	3:1	1:1	1:3
HuH-7	75.3	48.4	17.2	69.2	32.2	10.2	62.4	31.3	7.8	42.9	20.2	5.6	3.2	1.3	5.3
HepG2	85.8	59.1	21.9	71.3	38.6	13.9	68.2	35.6	6.5	48.5	25.9	7.2	4.8	2.5	3.2
SK-HEP-1	2.5	3.2	3.9	4.5	2.1	3.8	1.9	2.4	3.6	2.3	3.7	4.8	3.1	2.3	1.2

[0408] 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> 科济生物医药(上海)有限公司
[0003]	<120> 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3的抗体及其应用
[0004]	<130> P2019-1222
[0005]	<150> 201510481235.1
[0006]	<151> 2015-08-03
[0007]	<160> 84
[0008]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 729
[0011]	<212> DNA
[0012]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0013]	<400> 1
[0014]	caggtgcagc tgggtggaatc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
[0015]	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
[0016]	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
[0017]	gcacagaagt tccaggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
[0018]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaagtcccca 300
[0019]	tttagtggga cccccgggga gtactggggc agaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtggg 360
[0020]	ggaggcgggt caggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaattgt gttgacacag 420
[0021]	tctccaggea ccctgtcttt atctccaggg gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt 480
[0022]	cagagtgtta gcagcaacta cttagcctgg tatcagcaga aacctggcca ggctcccaga 540
[0023]	ctcctcatct atggtgcac cgcagggcc actggcatcc cagacagggt cagtggcagt 600
[0024]	gggtctggga cagacttcac tctcaccatc agcagagtgg agcctgaaga ctttgcaagt 660
[0025]	tatcactgtc agcagtatgg tgcctcacct aagactttcg gccaaaggac caagctggag 720
[0026]	atcaaacgt 729
[0027]	<210> 2
[0028]	<211> 243
[0029]	<212> PRT
[0030]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0031]	<400> 2
[0032]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0033]	1 5 10 15
[0034]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0035]	20 25 30
[0036]	Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0037]	35 40 45
[0038]	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0039]	50 55 60
[0040]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0041]	65 70 75 80

[0042]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0043]	85 90 95
[0044]	Ala Lys Ser Pro Phe Ser Gly Thr Pro Gly Glu Tyr Trp Gly Arg Gly
[0045]	100 105 110
[0046]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
[0047]	115 120 125
[0048]	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
[0049]	130 135 140
[0050]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
[0051]	145 150 155 160
[0052]	Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0053]	165 170 175
[0054]	Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly
[0055]	180 185 190
[0056]	Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
[0057]	195 200 205
[0058]	Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr His Cys Gln
[0059]	210 215 220
[0060]	Gln Tyr Gly Ala Ser Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
[0061]	225 230 235 240
[0062]	Ile Lys Arg
[0063]	<210> 3
[0064]	<211> 741
[0065]	<212> DNA
[0066]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0067]	<400> 3
[0068]	caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
[0069]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
[0070]	ccagcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
[0071]	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
[0072]	ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
[0073]	cgaggagacc acgctgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360
[0074]	agtgttgagg gcggttcagg cggaggtggt tctggcgggt gcggatcgca gtctgccttg 420
[0075]	actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcaactga 480
[0076]	accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
[0077]	gccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600
[0078]	tctggctcca agtctggcac ctacagctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660
[0079]	ggggctgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720
[0080]	accaaggtca ccgtcctagg t 741
[0081]	<210> 4
[0082]	<211> 247
[0083]	<212> PRT

[0084]	<213> 人工序列(Artificial sequence)																			
[0085]	<400> 4																			
[0086]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg				
[0087]	1			5						10					15					
[0088]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr				
[0089]				20						25					30					
[0090]	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
[0091]				35						40					45					
[0092]	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
[0093]		50						55						60						
[0094]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
[0095]	65					70						75				80				
[0096]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
[0097]				85						90					95					
[0098]	Ala	Lys	Asp	Arg	Arg	Gly	Ser	His	Ala	Asp	Ala	Phe	Asp	Val	Trp	Gly				
[0099]				100						105					110					
[0100]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly				
[0101]				115						120					125					
[0102]	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro				
[0103]		130						135						140						
[0104]	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly				
[0105]	145					150						155				160				
[0106]	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln				
[0107]				165						170					175					
[0108]	Tyr	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg				
[0109]				180						185					190					
[0110]	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser				
[0111]				195						200					205					
[0112]	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Gly	Ala	Asp	Tyr				
[0113]		210						215						220						
[0114]	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	Arg	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly				
[0115]	225					230						235				240				
[0116]	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly													
[0117]				245																
[0118]	<210> 5																			
[0119]	<211> 28																			
[0120]	<212> DNA																			
[0121]	<213> 人工序列(Artificial sequence)																			
[0122]	<400> 5																			
[0123]	acagtgctag cacaggtgca gctggtgg 28																			
[0124]	<210> 6																			
[0125]	<211> 27																			

[0126]	<212>	DNA
[0127]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0128]	<400>	6
[0129]	ttgtcggatc cacgtttgat ctccagc	27
[0130]	<210>	7
[0131]	<211>	28
[0132]	<212>	DNA
[0133]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0134]	<400>	7
[0135]	acagtgctag cacaggtgca gctgcagg	28
[0136]	<210>	8
[0137]	<211>	27
[0138]	<212>	DNA
[0139]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0140]	<400>	8
[0141]	ttgtcggatc cacctaggac ggtgacc	27
[0142]	<210>	9
[0143]	<211>	30
[0144]	<212>	DNA
[0145]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0146]	<400>	9
[0147]	ggattcacct tcagtagcta tgctatgcac	30
[0148]	<210>	10
[0149]	<211>	10
[0150]	<212>	PRT
[0151]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0152]	<400>	10
[0153]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His	
[0154]	1	5 10
[0155]	<210>	11
[0156]	<211>	51
[0157]	<212>	DNA
[0158]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0159]	<400>	11
[0160]	gctattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c	51
[0161]	<210>	12
[0162]	<211>	17
[0163]	<212>	PRT
[0164]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0165]	<400>	12
[0166]	Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
[0167]	1	5 10 15

[0168] Gly
[0169] <210> 13
[0170] <211> 36
[0171] <212> DNA
[0172] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0173] <400> 13
[0174] gatcgacgag ggagccacgc tgatgctttt gatgtc 36
[0175] <210> 14
[0176] <211> 12
[0177] <212> PRT
[0178] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0179] <400> 14
[0180] Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val
[0181] 1 5 10
[0182] <210> 15
[0183] <211> 42
[0184] <212> DNA
[0185] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0186] <400> 15
[0187] actggaacca gcagtgcagt tgggtggttat aactatgtct cc 42
[0188] <210> 16
[0189] <211> 14
[0190] <212> PRT
[0191] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0192] <400> 16
[0193] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
[0194] 1 5 10
[0195] <210> 17
[0196] <211> 21
[0197] <212> DNA
[0198] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0199] <400> 17
[0200] ggtaacagca atcggccctc a 21
[0201] <210> 18
[0202] <211> 7
[0203] <212> PRT
[0204] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0205] <400> 18
[0206] Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
[0207] 1 5
[0208] <210> 19
[0209] <211> 30

[0210]	<212> DNA
[0211]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0212]	<400> 19
[0213]	cagtcctatg acagcagcct gcgtgtggta 30
[0214]	<210> 20
[0215]	<211> 10
[0216]	<212> PRT
[0217]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0218]	<400> 20
[0219]	Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val
[0220]	1 5 10
[0221]	<210> 21
[0222]	<211> 24
[0223]	<212> DNA
[0224]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0225]	<400> 21
[0226]	caacgtgaaa aaattattat tcgc 24
[0227]	<210> 22
[0228]	<211> 63
[0229]	<212> DNA
[0230]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0231]	<400> 22
[0232]	ccagcccctt gcctggagcc tggcggaccc amnncatagc atamnactg aaggtgaatc 60
[0233]	cag 63
[0234]	<210> 23
[0235]	<211> 72
[0236]	<212> DNA
[0237]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0238]	<400> 23
[0239]	gctccaggca aggggctgga gtgggtctca nnkattagtn nknnkgntnn knnkacatac 60
[0240]	tacgcagact cc 72
[0241]	<210> 24
[0242]	<211> 741
[0243]	<212> DNA
[0244]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0245]	<400> 24
[0246]	caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
[0247]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acgtatgcta tgacgtgggt ccgccagget 120
[0248]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcatct attagtagta gtggtgaaag tacatactac 180
[0249]	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgttat 240
[0250]	ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
[0251]	cgagggagcc acgtgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360

[0252] agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcgggtg gcggatcgca gtctgccctg 420
 [0253] actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480
 [0254] accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
 [0255] gcccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600
 [0256] tctggctcca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660
 [0257] ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720
 [0258] accaaggtca ccgtcctagg t 741
 [0259] <210> 25
 [0260] <211> 247
 [0261] <212> PRT
 [0262] <213> 人工序列(Artificial sequence)
 [0263] <400> 25
 [0264] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0265] 1 5 10 15
 [0266] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0267] 20 25 30
 [0268] Ala Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0269] 35 40 45
 [0270] Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0271] 50 55 60
 [0272] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0273] 65 70 75 80
 [0274] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0275] 85 90 95
 [0276] Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
 [0277] 100 105 110
 [0278] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0279] 115 120 125
 [0280] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
 [0281] 130 135 140
 [0282] Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
 [0283] 145 150 155 160
 [0284] Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 [0285] 165 170 175
 [0286] Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg
 [0287] 180 185 190
 [0288] Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
 [0289] 195 200 205
 [0290] Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
 [0291] 210 215 220
 [0292] Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
 [0293] 225 230 235 240

[0294] Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 [0295] 245
 [0296] <210> 26
 [0297] <211> 741
 [0298] <212> DNA
 [0299] <213> 人工序列(Artificial sequence)
 [0300] <400> 26
 [0301] caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 [0302] tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acttatgcta tggcttgggt ccgccaggct 120
 [0303] ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagaa attagtagtt ctggtagtag gacatactac 180
 [0304] gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 [0305] ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
 [0306] cgagggagcc acgctgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360
 [0307] agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgca gtctgccctg 420
 [0308] actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480
 [0309] accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
 [0310] gccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 600
 [0311] tctggctcca agtctggcac ctacgctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660
 [0312] ggggctgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720
 [0313] accaaggtca ccgtcctagg t 741
 [0314] <210> 27
 [0315] <211> 247
 [0316] <212> PRT
 [0317] <213> 人工序列(Artificial sequence)
 [0318] <400> 27
 [0319] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0320] 1 5 10 15
 [0321] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0322] 20 25 30
 [0323] Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0324] 35 40 45
 [0325] Ser Glu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0326] 50 55 60
 [0327] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0328] 65 70 75 80
 [0329] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0330] 85 90 95
 [0331] Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
 [0332] 100 105 110
 [0333] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0334] 115 120 125
 [0335] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro

[0336]	130	135	140
[0337]	Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly		
[0338]	145	150	155
[0339]	Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln		
[0340]	165	170	175
[0341]	Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg		
[0342]	180	185	190
[0343]	Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser		
[0344]	195	200	205
[0345]	Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr		
[0346]	210	215	220
[0347]	Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly		
[0348]	225	230	235
[0349]	Thr Lys Val Thr Val Leu Gly		240
[0350]	245		
[0351]	<210> 28		
[0352]	<211> 741		
[0353]	<212> DNA		
[0354]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0355]	<400> 28		
[0356]	cagggtcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
[0357]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acgtatgcta tgaattgggt ccgccaggct	120	
[0358]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagcg attagtatgt ctggtgaatc tacatactac	180	
[0359]	gcagactccg tgaagggccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat	240	
[0360]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga	300	
[0361]	cgagggagcc acgctgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg	360	
[0362]	agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgca gtctgccctg	420	
[0363]	actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga	480	
[0364]	accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctctggt accaacagta cccaggcaaa	540	
[0365]	gccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc	600	
[0366]	tctggctcca agtctggcac ctacgcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat	660	
[0367]	ggggctgatt attactgcca gtcctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg	720	
[0368]	accaaggtca ccgtcctagg t	741	
[0369]	<210> 29		
[0370]	<211> 247		
[0371]	<212> PRT		
[0372]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0373]	<400> 29		
[0374]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
[0375]	1	5	10
[0376]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr		
[0377]	20	25	30

[0378]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0379]	35 40 45
[0380]	Ser Ala Ile Ser Met Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0381]	50 55 60
[0382]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0383]	65 70 75 80
[0384]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0385]	85 90 95
[0386]	Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
[0387]	100 105 110
[0388]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0389]	115 120 125
[0390]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
[0391]	130 135 140
[0392]	Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
[0393]	145 150 155 160
[0394]	Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln
[0395]	165 170 175
[0396]	Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg
[0397]	180 185 190
[0398]	Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
[0399]	195 200 205
[0400]	Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
[0401]	210 215 220
[0402]	Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
[0403]	225 230 235 240
[0404]	Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
[0405]	245
[0406]	<210> 30
[0407]	<211> 741
[0408]	<212> DNA
[0409]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0410]	<400> 30
[0411]	caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
[0412]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
[0413]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtggttag cacatactac 180
[0414]	gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
[0415]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
[0416]	cgagggagcc acgctgatgc ttttgatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360
[0417]	agtgggtggag gcggttcagg cggaggtggt tctggcggtg gcggatcgca gtctgccctg 420
[0418]	actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480
[0419]	accagcagtg acgttggtca taagtttcct gtctctctggt accaacagta cccaggcaaa 540

[0420] gcccccaaac tcctcatcta taagaatctt ttgcggccct caggggtccc tgaccgattc 600
 [0421] tctggtcca agtctggcac ctcagcctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660
 [0422] ggggctgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720
 [0423] accaaggtca ccgtcctagg t 741
 [0424] <210> 31
 [0425] <211> 247
 [0426] <212> PRT
 [0427] <213> 人工序列(Artificial sequence)
 [0428] <400> 31
 [0429] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 [0430] 1 5 10 15
 [0431] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0432] 20 25 30
 [0433] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0434] 35 40 45
 [0435] Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0436] 50 55 60
 [0437] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0438] 65 70 75 80
 [0439] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0440] 85 90 95
 [0441] Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
 [0442] 100 105 110
 [0443] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 [0444] 115 120 125
 [0445] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
 [0446] 130 135 140
 [0447] Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
 [0448] 145 150 155 160
 [0449] Thr Ser Ser Asp Val Gly His Lys Phe Pro Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 [0450] 165 170 175
 [0451] Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Asn Leu Leu Arg
 [0452] 180 185 190
 [0453] Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
 [0454] 195 200 205
 [0455] Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr
 [0456] 210 215 220
 [0457] Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly
 [0458] 225 230 235 240
 [0459] Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 [0460] 245
 [0461] <210> 32

[0462]	<211> 741
[0463]	<212> DNA
[0464]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0465]	<400> 32
[0466]	caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc 60
[0467]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
[0468]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtggtag cacatactac 180
[0469]	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
[0470]	ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga 300
[0471]	cgagggagcc acgctgatgc tttttagtgc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg 360
[0472]	agtgttgtag gcggttcagg cggaggtggt tctggcgggt gcggatcgca gtctgccctg 420
[0473]	actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga 480
[0474]	accagcagtg acgttggtct tatgcataat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa 540
[0475]	gcccccaaac tcctcatcta taagtcttcg tctcggccct caggggtccc tgaccgattc 600
[0476]	tctggtccca agtctggcac ctacgctccc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat 660
[0477]	ggggttgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg 720
[0478]	accaaggtca ccgtcctagg t 741
[0479]	<210> 33
[0480]	<211> 247
[0481]	<212> PRT
[0482]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0483]	<400> 33
[0484]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
[0485]	1 5 10 15
[0486]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0487]	20 25 30
[0488]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0489]	35 40 45
[0490]	Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0491]	50 55 60
[0492]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0493]	65 70 75 80
[0494]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0495]	85 90 95
[0496]	Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly
[0497]	100 105 110
[0498]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0499]	115 120 125
[0500]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro
[0501]	130 135 140
[0502]	Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
[0503]	145 150 155 160

[0504]	Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Met His Asn Val Ser Trp Tyr Gln Gln		
[0505]		165	170
[0506]	Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ser Ser Ser Arg		175
[0507]		180	185
[0508]	Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser		190
[0509]		195	200
[0510]	Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr		205
[0511]		210	215
[0512]	Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly		220
[0513]		225	230
[0514]	Thr Lys Val Thr Val Leu Gly		235
[0515]		245	240
[0516]	<210> 34		
[0517]	<211> 741		
[0518]	<212> DNA		
[0519]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0520]	<400> 34		
[0521]	caggtgcagc tgcaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
[0522]	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct	120	
[0523]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtagta gtggtcgtag cacatactac	180	
[0524]	gcagactccg tggagggccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
[0525]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcga	300	
[0526]	cgagggagcc acgctgatgc tttaaatgtc tggggccaag gaaccctggt caccgtctcg	360	
[0527]	agtgggtggag gcggttcagg cggagggtgt tctggcggtg gcggatcgca gtctgccctg	420	
[0528]	actcagcctc cctccgcgtc cgggtctcct ggacagtcag tcaccatctc ctgcactgga	480	
[0529]	accagcagtg acgttggtgg ttataactat gtctcctggt accaacagta cccaggcaaa	540	
[0530]	gccccaaac tcctcatcta tggtaacagc aatcggccct caggggtccc tgaccgattc	600	
[0531]	tctggctcca agtctggcac ctacagctcc ctggccatca ctgggctcca ggctgaggat	660	
[0532]	ggggtgatt attactgcca gtctatgac agcagcctgc gtgtggtatt cggcggaggg	720	
[0533]	accaaggtca ccgtcctagg t	741	
[0534]	<210> 35		
[0535]	<211> 247		
[0536]	<212> PRT		
[0537]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0538]	<400> 35		
[0539]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg		
[0540]		1	5
[0541]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		10
[0542]		20	25
[0543]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		30
[0544]		35	40
[0545]	Ser Ala Ile Ser Ser Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		45

[0546]	50	55	60
[0547]	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0548]	65	70	75
[0549]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0550]	85	90	95
[0551]	Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Leu Asn Val Trp Gly		
[0552]	100	105	110
[0553]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
[0554]	115	120	125
[0555]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro		
[0556]	130	135	140
[0557]	Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly		
[0558]	145	150	155
[0559]	Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln		
[0560]	165	170	175
[0561]	Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg		
[0562]	180	185	190
[0563]	Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser		
[0564]	195	200	205
[0565]	Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Gly Ala Asp Tyr		
[0566]	210	215	220
[0567]	Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Phe Gly Gly Gly		
[0568]	225	230	235
[0569]	Thr Lys Val Thr Val Leu Gly		
[0570]	245		
[0571]	<210> 36		
[0572]	<211> 36		
[0573]	<212> DNA		
[0574]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0575]	<400> 36		
[0576]	ctccacgccg ccaggccgca ggtgcagctg caggag 36		
[0577]	<210> 37		
[0578]	<211> 38		
[0579]	<212> DNA		
[0580]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0581]	<400> 37		
[0582]	cggcgtgtggc gtcgtggtac ctaggacggt gaccttgg 38		
[0583]	<210> 38		
[0584]	<211> 22		
[0585]	<212> DNA		
[0586]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0587]	<400> 38		

[0588] gcaggggaaa gaatagtaga ca 22
[0589] <210> 39
[0590] <211> 18
[0591] <212> DNA
[0592] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0593] <400> 39
[0594] cggcctggcg gcgtggag 18
[0595] <210> 40
[0596] <211> 18
[0597] <212> DNA
[0598] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0599] <400> 40
[0600] accacgacgc cagcgccg 18
[0601] <210> 41
[0602] <211> 48
[0603] <212> DNA
[0604] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0605] <400> 41
[0606] gaggtcgacc tacgcggggg cgtctgcgct cctgctgaac ttcactct 48
[0607] <210> 42
[0608] <211> 18
[0609] <212> DNA
[0610] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0611] <400> 42
[0612] accacgacgc cagcgccg 18
[0613] <210> 43
[0614] <211> 44
[0615] <212> DNA
[0616] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0617] <400> 43
[0618] aatccagagg ttgattgtcg acctagcgag ggggcagggc ctgc 44
[0619] <210> 44
[0620] <211> 1442
[0621] <212> DNA
[0622] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[0623] <400> 44
[0624] gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa 60
[0625] caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc 120
[0626] acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtcgctag 180
[0627] agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc 240
[0628] gaggggtgggg gagaaccgta tataagtgca gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac 300
[0629] gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggctaagct tacgcgtcct 360

[0630]	agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt	420
[0631]	gctgctccac gccgccaggc cgcagggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca	480
[0632]	gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc	540
[0633]	tatgcaactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
[0634]	tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga	660
[0635]	caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
[0636]	atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgctgat gcttttgatg tctggggcca	780
[0637]	aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgggtg aggcggttca ggcgagggtg gttctggcgg	840
[0638]	tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
[0639]	agtcaccatc tcctgcaactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg	960
[0640]	gtaccaacag taccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgcc	1020
[0641]	ctcaggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat	1080
[0642]	caactgggtc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
[0643]	gcgtgtggta ttccggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgcc	1200
[0644]	gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagaggc	1260
[0645]	gtgccggcca gcggcgggg gcgcagtga cagcagggg ctggacttcg cctgtgatat	1320
[0646]	ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac	1380
[0647]	cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctag gtcgacaac aacctctgga	1440
[0648]	tt	1442
[0649]	<210>	45
[0650]	<211>	1745
[0651]	<212>	DNA
[0652]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0653]	<400>	45
[0654]	gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
[0655]	caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc	120
[0656]	acatgcccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtgcctag	180
[0657]	agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc	240
[0658]	gagggtgggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgaac	300
[0659]	gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
[0660]	agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt	420
[0661]	gctgctccac gccgccaggc cgcagggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca	480
[0662]	gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc	540
[0663]	tatgcaactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
[0664]	tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga	660
[0665]	caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
[0666]	atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgctgat gcttttgatg tctggggcca	780
[0667]	aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgggtg aggcggttca ggcgagggtg gttctggcgg	840
[0668]	tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
[0669]	agtcaccatc tcctgcaactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg	960
[0670]	gtaccaacag taccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcgcc	1020
[0671]	ctcaggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat	1080

[0672]	cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
[0673]	gcgtgtggta ttggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgcc	1200
[0674]	gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagaggc	1260
[0675]	gtgccggcca gcggcgggg gcgcagtga cagcagggg ctggacttcg cctgtgatat	1320
[0676]	ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac	1380
[0677]	cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgctac cagcagggcc agaaccagct	1440
[0678]	ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg	1500
[0679]	ccgggaccct gagatgggg gaaagccga gagaaggaag aaccctcagg aaggcctgta	1560
[0680]	caatgaactg cagaaagata agatggcgga ggcctacagt gagattggga tgaaaggcga	1620
[0681]	gcgccggagg ggcaaggggc acgatggcct ttaccagggt ctcagtacag ccaccaagga	1680
[0682]	cacctacgac gcccttcaca tgcaggccct gcccctcgc taggtcgaca atcaacctct	1740
[0683]	ggatt	1745
[0684]	<210>	46
[0685]	<211>	1877
[0686]	<212>	DNA
[0687]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0688]	<400>	46
[0689]	gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
[0690]	caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc	120
[0691]	acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtagcctag	180
[0692]	agaagtggtg gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actgggtccg cttttttccc	240
[0693]	gaggttgggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgcc tgaacgttct ttttcgaac	300
[0694]	gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
[0695]	agcgtaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt	420
[0696]	gctgctccac gccgccaggc cgcaggtga gctgcaggag tccgggggag gcttagttca	480
[0697]	gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttacattca gtagctatgc	540
[0698]	tatgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
[0699]	tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga	660
[0700]	caattccaag aacacgtgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
[0701]	atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgtgat gcttttgatg tctggggcca	780
[0702]	aggaacctg gtcaccgtct cgagtgttg aggcggttca ggcggagtg gttctggcgg	840
[0703]	tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
[0704]	agtcaccatc tctgcaactg gaaccagcag tgacgttggg ggttataact atgtctcctg	960
[0705]	gtaccaacag taccaggca aagccccaa actctcctc tatggttaaca gcaatcgcc	1020
[0706]	ctcaggggtc cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat	1080
[0707]	cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
[0708]	gcgtgtggta ttggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgcc	1200
[0709]	gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagaggc	1260
[0710]	gtgccggcca gcggcgggg gcgcagtga cagcagggg ctggacttcg cctgtgatat	1320
[0711]	ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac	1380
[0712]	cctttactgc aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag	1440
[0713]	accagtacaa actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga	1500

[0714]	aggaggatgt gaactgagag tgaagttcag caggagcgca gacgccccg cgtacaagca	1560
[0715]	gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga agagaggagt acgatgtttt	1620
[0716]	ggacaagaga cgtggccggg accctgagat ggggggaaag ccgagaagga agaaccctca	1680
[0717]	ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg gaggcctaca gtgagattgg	1740
[0718]	gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc ctttaccagg gtctcagtac	1800
[0719]	agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc ctgccccctc gctaggtcga	1860
[0720]	caatcaacct ctggatt	1877
[0721]	<210>	47
[0722]	<211>	1886
[0723]	<212>	DNA
[0724]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0725]	<400>	47
[0726]	gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
[0727]	caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccgggtg cccgtcagtg ggcagagcgc	120
[0728]	acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag	180
[0729]	agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc	240
[0730]	gaggttgggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac	300
[0731]	gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
[0732]	agcgtaccg gtccgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt	420
[0733]	gctgctccac gccgccagge cgcaggtgca gctgcaggag tccgggggag gcttagttca	480
[0734]	gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcaccttca gtagctatgc	540
[0735]	tatgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
[0736]	tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga	660
[0737]	caattccaag aacacgtgt atctgcaaat gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
[0738]	atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgtgat gcttttgatg tctggggcca	780
[0739]	aggaacctg gtcaccgtct cgagtgttg aggcggttca ggcggagggt gttctggcgg	840
[0740]	tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
[0741]	agtcaccatc tctgcaactg gaaccagcag tgacgttggt ggttataact atgtctcctg	960
[0742]	gtaccaacag taccaggca aagccccca actcctcctc tatggtaaca gcaatcgcc	1020
[0743]	ctcaggggtc cctgaccgat tctctggtc caagtctggc acctcagcct ccttgccat	1080
[0744]	cactgggctc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
[0745]	gcgtgtggtg ttccggcgag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgcc	1200
[0746]	gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagaggc	1260
[0747]	gtgccggcca gcggcggggg gcgcagtga cagcagggg ctggacttcg cctgtgattt	1320
[0748]	ttgggtgctg gtggtggtg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc	1380
[0749]	ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagtg actacatgaa	1440
[0750]	catgactccc cgccgccccg ggccaacctg caagcattac cagccctatg cccaccacg	1500
[0751]	cgacttcgca gcctatcgct ccagagtga gttcagcagg agcgcagacg cccccgcgta	1560
[0752]	ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta ggacgaagag aggagtacga	1620
[0753]	tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccgc agagaaggaa	1680
[0754]	gaacctcag gaaggcctgt acaatgaact gcagaaagat aagatggcgg aggcctacag	1740
[0755]	tgagattggg atgaaaggcg agcggcgag gggcaagggg cacgatggcc tttaccaggg	1800

[0756]	tctcagtaca gccaccaagg acacctacga cgcccttcac atgcaggccc tgccccctcg	1860
[0757]	ctaggtcgac aatcaacctc tggatt	1886
[0758]	<210>	48
[0759]	<211>	2012
[0760]	<212>	DNA
[0761]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0762]	<400>	48
[0763]	gcaggggaaa gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa	60
[0764]	caaattacaa aaattcaaaa ttttatcgat ggctccgggtg cccgtcagtg ggcagagcgc	120
[0765]	acatcgccca cagtccccga gaagttgggg ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag	180
[0766]	agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cttttttccc	240
[0767]	gagggtgggg gagaaccgta tataagtga gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac	300
[0768]	gggtttgccg ccagaacaca ggtgtcgtga cgcggatcca ggcctaagct tacgcgtcct	360
[0769]	agcgctaccg gtcgccacca tggccttacc agtgaccgcc ttgctcctgc cgctggcctt	420
[0770]	gctgctccac gccgccaggc cgcagggtga gctgcaggag tccgggggag gcttagttca	480
[0771]	gcctgggagg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga ttcacctca gtagctatgc	540
[0772]	tatgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa ggggctggag tgggtctcag ctattagtgg	600
[0773]	tagtggtggt agcacatact acgcagactc cgtgaagggc cggttcacca tctccagaga	660
[0774]	caattccaag aacacgctgt atctgcaa at gaacagcctg agagccgagg acacggccgt	720
[0775]	atattactgt gcgaaagatc gacgaggag ccacgtgat gcttttgatg tctggggcca	780
[0776]	aggaacctg gtcaccgtct cgagtgggtg aggcgggtca ggcggaggtg gttctggcgg	840
[0777]	tggcggatcg cagtctgccc tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc	900
[0778]	agtcaccatc tcctgactg gaaccagcag tgacgttggt gggtataact atgtctcctg	960
[0779]	gtaccaacag taccaggca aagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc	1020
[0780]	ctcaggggtc cctgaccgat tctctggtc caagtctggc acctcagcct ccttgccat	1080
[0781]	cactgggtc caggctgagg atggggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct	1140
[0782]	gcgtgtggta ttcggcggag ggaccaaggt caccgtccta ggtaccacga cgccagcgc	1200
[0783]	gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagaggc	1260
[0784]	gtgccggcca gcggcgggg gcgcagtga cagcagggg ctggacttcg cctgtgattt	1320
[0785]	ttgggtgctg gtggtggtg gtggagtcct ggcttgctat agcttgctag taacagtggc	1380
[0786]	ctttattatt ttctgggtga ggagtaagag gagcaggctc ctgcacagt actacatgaa	1440
[0787]	catgactccc cgccgccccg ggccaacccg caagcattac cagccctatg cccaccacg	1500
[0788]	cgacttcgca gcctatcgct ccaaacggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca	1560
[0789]	accatttatg agaccagtac aaactactca agaggaagat ggctgtagct gccgatttcc	1620
[0790]	agaagaagaa gaaggaggat gtgaactgag agtgaagttc agcaggagcg cagacgccc	1680
[0791]	cggtaccag cagggccaga accagctcta taacgagctc aatctaggac gaagagagga	1740
[0792]	gtacgatgtt ttggacaaga gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgcagag	1800
[0793]	aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc	1860
[0794]	ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta	1920
[0795]	ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgc cttcacatgc aggcctgccc	1980
[0796]	ccctcgctag gtcgacaatc aacctctgga tt	2012
[0797]	<210>	49

[0798]	<211>	346
[0799]	<212>	PRT
[0800]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0801]	<400>	49
[0802]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu	
[0803]	1	5 10 15
[0804]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu	
[0805]	20 25 30	
[0806]	Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe	
[0807]	35 40 45	
[0808]	Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys	
[0809]	50 55 60	
[0810]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr	
[0811]	65 70 75 80	
[0812]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser	
[0813]	85 90 95	
[0814]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr	
[0815]	100 105 110	
[0816]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala	
[0817]	115 120 125	
[0818]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly	
[0819]	130 135 140	
[0820]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala	
[0821]	145 150 155 160	
[0822]	Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr	
[0823]	165 170 175	
[0824]	Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val	
[0825]	180 185 190	
[0826]	Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
[0827]	195 200 205	
[0828]	Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
[0829]	210 215 220	
[0830]	Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu	
[0831]	225 230 235 240	
[0832]	Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val	
[0833]	245 250 255	
[0834]	Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro	
[0835]	260 265 270	
[0836]	Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu	
[0837]	275 280 285	
[0838]	Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His	
[0839]	290 295 300	

[0840]	Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu
[0841]	305 310 315 320
[0842]	Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Arg Val
[0843]	325 330 335
[0844]	Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
[0845]	340 345
[0846]	<210> 50
[0847]	<211> 447
[0848]	<212> PRT
[0849]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0850]	<400> 50
[0851]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
[0852]	1 5 10 15
[0853]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu
[0854]	20 25 30
[0855]	Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
[0856]	35 40 45
[0857]	Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
[0858]	50 55 60
[0859]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
[0860]	65 70 75 80
[0861]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
[0862]	85 90 95
[0863]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
[0864]	100 105 110
[0865]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala
[0866]	115 120 125
[0867]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
[0868]	130 135 140
[0869]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala
[0870]	145 150 155 160
[0871]	Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr
[0872]	165 170 175
[0873]	Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val
[0874]	180 185 190
[0875]	Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[0876]	195 200 205
[0877]	Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
[0878]	210 215 220
[0879]	Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu
[0880]	225 230 235 240
[0881]	Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val

[0882]	245	250	255
[0883]	Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro		
[0884]	260	265	270
[0885]	Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
[0886]	275	280	285
[0887]	Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
[0888]	290	295	300
[0889]	Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
[0890]	305	310	315
[0891]	Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Arg Val		
[0892]	325	330	335
[0893]	Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn		
[0894]	340	345	350
[0895]	Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val		
[0896]	355	360	365
[0897]	Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln		
[0898]	370	375	380
[0899]	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp		
[0900]	385	390	395
[0901]	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg		
[0902]	405	410	415
[0903]	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr		
[0904]	420	425	430
[0905]	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
[0906]	435	440	445
[0907]	<210> 51		
[0908]	<211> 491		
[0909]	<212> PRT		
[0910]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0911]	<400> 51		
[0912]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu		
[0913]	1	5	10
[0914]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu		
[0915]	20	25	30
[0916]	Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe		
[0917]	35	40	45
[0918]	Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys		
[0919]	50	55	60
[0920]	Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr		
[0921]	65	70	75
[0922]	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser		
[0923]	85	90	95

[0924]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
[0925]	100	105	110
[0926]	Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala		
[0927]	115	120	125
[0928]	Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly		
[0929]	130	135	140
[0930]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala		
[0931]	145	150	155
[0932]	Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Val Thr		
[0933]	165	170	175
[0934]	Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val		
[0935]	180	185	190
[0936]	Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		
[0937]	195	200	205
[0938]	Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser		
[0939]	210	215	220
[0940]	Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu		
[0941]	225	230	235
[0942]	Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val		
[0943]	245	250	255
[0944]	Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro		
[0945]	260	265	270
[0946]	Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu		
[0947]	275	280	285
[0948]	Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His		
[0949]	290	295	300
[0950]	Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu		
[0951]	305	310	315
[0952]	Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr		
[0953]	325	330	335
[0954]	Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe		
[0955]	340	345	350
[0956]	Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg		
[0957]	355	360	365
[0958]	Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser		
[0959]	370	375	380
[0960]	Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
[0961]	385	390	395
[0962]	Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
[0963]	405	410	415
[0964]	Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
[0965]	420	425	430

[0966]	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys	Asp	Lys	Met	Ala	Glu
[0967]			435					440					445			
[0968]	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly
[0969]			450				455						460			
[0970]	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr
[0971]	465					470					475					480
[0972]	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg					
[0973]					485					490						
[0974]	<210> 52															
[0975]	<211> 494															
[0976]	<212> PRT															
[0977]	<213> 人工序列(Artificial sequence)															
[0978]	<400> 52															
[0979]	Met	Ala	Leu	Pro	Val	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu
[0980]	1				5					10					15	
[0981]	His	Ala	Ala	Arg	Pro	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
[0982]					20					25					30	
[0983]	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
[0984]					35				40					45		
[0985]	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
[0986]					50				55					60		
[0987]	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
[0988]	65					70					75					80
[0989]	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
[0990]					85					90						95
[0991]	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
[0992]					100					105						110
[0993]	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Arg	Arg	Gly	Ser	His	Ala	Asp	Ala
[0994]					115					120						125
[0995]	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
[0996]					130					135						140
[0997]	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Ala
[0998]	145					150					155					160
[0999]	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Val	Thr
[1000]					165						170					175
[1001]	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val
[1002]					180						185					190
[1003]	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
[1004]					195					200						205
[1005]	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
[1006]					210						215					220
[1007]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu

[1008]	225	230	235	240
[1009]	Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val			
[1010]		245	250	255
[1011]	Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Thr Thr Thr Pro			
[1012]		260	265	270
[1013]	Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu			
[1014]		275	280	285
[1015]	Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His			
[1016]		290	295	300
[1017]	Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val			
[1018]	305	310	315	320
[1019]	Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile			
[1020]		325	330	335
[1021]	Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr			
[1022]		340	345	350
[1023]	Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln			
[1024]		355	360	365
[1025]	Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys			
[1026]		370	375	380
[1027]	Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln			
[1028]	385	390	395	400
[1029]	Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu			
[1030]		405	410	415
[1031]	Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg			
[1032]		420	425	430
[1033]	Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys			
[1034]		435	440	445
[1035]	Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg			
[1036]		450	455	460
[1037]	Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys			
[1038]	465	470	475	480
[1039]	Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
[1040]		485	490	
[1041]	<210> 53			
[1042]	<211> 536			
[1043]	<212> PRT			
[1044]	<213> 人工序列(Artificial sequence)			
[1045]	<400> 53			
[1046]	Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
[1047]	1	5	10	15
[1048]	His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu			
[1049]		20	25	30

[1050]	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
[1051]			35				40					45				
[1052]	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
[1053]			50				55					60				
[1054]	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr
[1055]	65					70					75					80
[1056]	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
[1057]					85					90					95	
[1058]	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr
[1059]				100						105				110		
[1060]	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Asp	Arg	Arg	Gly	Ser	His	Ala	Asp	Ala
[1061]				115						120				125		
[1062]	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
[1063]				130						135				140		
[1064]	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Ala
[1065]	145					150						155				160
[1066]	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Val	Thr
[1067]					165					170					175	
[1068]	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val
[1069]				180						185				190		
[1070]	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Tyr	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
[1071]				195						200				205		
[1072]	Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
[1073]				210						215			220			
[1074]	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Glu
[1075]	225					230						235				240
[1076]	Asp	Gly	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	Arg	Val
[1077]					245						250				255	
[1078]	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Thr	Thr	Thr	Pro
[1079]					260						265				270	
[1080]	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu
[1081]				275							280			285		
[1082]	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His
[1083]				290							295			300		
[1084]	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	Phe	Ala	Cys	Asp	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val
[1085]	305					310					315					320
[1086]	Gly	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile
[1087]					325						330				335	
[1088]	Ile	Phe	Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr
[1089]				340							345			350		
[1090]	Met	Asn	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln
[1091]				355						360				365		

[1092]	Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly
[1093]	370 375 380
[1094]	Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
[1095]	385 390 395 400
[1096]	Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
[1097]	405 410 415
[1098]	Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
[1099]	420 425 430
[1100]	Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
[1101]	435 440 445
[1102]	Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
[1103]	450 455 460
[1104]	Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
[1105]	465 470 475 480
[1106]	Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
[1107]	485 490 495
[1108]	Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
[1109]	500 505 510
[1110]	Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
[1111]	515 520 525
[1112]	His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[1113]	530 535
[1114]	<210> 54
[1115]	<211> 27
[1116]	<212> DNA
[1117]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1118]	<400> 54
[1119]	gatcgctagc acagcccccg ccgccgc 27
[1120]	<210> 55
[1121]	<211> 31
[1122]	<212> DNA
[1123]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1124]	<400> 55
[1125]	gtacggatcc ttcagcgggg aatgaacgtt c 31
[1126]	<210> 56
[1127]	<211> 345
[1128]	<212> DNA
[1129]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1130]	<400> 56
[1131]	caggttcaac tgcagcagtc tgggactgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60
[1132]	tcctgcaagg ctttgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120
[1133]	cctgtgcatg gcctggagtg gattggagct attcatccag gaagtgggtga tactgcctac 180

[1134]	aatcagaggt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcttccag cacagcctac	240
[1135]	atggagtaca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtct attactgtac aagattttat	300
[1136]	tcctatgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca	345
[1137]	<210>	57
[1138]	<211>	339
[1139]	<212>	DNA
[1140]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1141]	<400>	57
[1142]	gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
[1143]	atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacagtgg	120
[1144]	tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caatcgattt	180
[1145]	tctggggtcc cagacaggtt cagtggcaga ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
[1146]	agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtat atatgttccg	300
[1147]	tacacgttcg gaggaggac caagctggaa ataaaacgg	339
[1148]	<210>	58
[1149]	<211>	115
[1150]	<212>	PRT
[1151]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1152]	<400>	58
[1153]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[1154]	1 5 10 15	
[1155]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr	
[1156]	20 25 30	
[1157]	Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[1158]	35 40 45	
[1159]	Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe	
[1160]	50 55 60	
[1161]	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[1162]	65 70 75 80	
[1163]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1164]	85 90 95	
[1165]	Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
[1166]	100 105 110	
[1167]	Val Ser Ala	
[1168]	115	
[1169]	<210>	59
[1170]	<211>	113
[1171]	<212>	PRT
[1172]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[1173]	<400>	59
[1174]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[1175]	1 5 10 15	

[1176]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
[1177]	20 25 30
[1178]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[1179]	35 40 45
[1180]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1181]	50 55 60
[1182]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1183]	65 70 75 80
[1184]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
[1185]	85 90 95
[1186]	Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1187]	100 105 110
[1188]	Arg
[1189]	<210> 60
[1190]	<211> 10
[1191]	<212> PRT
[1192]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1193]	<400> 60
[1194]	Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Thr
[1195]	1 5 10
[1196]	<210> 61
[1197]	<211> 17
[1198]	<212> PRT
[1199]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1200]	<400> 61
[1201]	Ser Ile Ser Ser Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1202]	1 5 10 15
[1203]	Gly
[1204]	<210> 62
[1205]	<211> 10
[1206]	<212> PRT
[1207]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1208]	<400> 62
[1209]	Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Ala
[1210]	1 5 10
[1211]	<210> 63
[1212]	<211> 17
[1213]	<212> PRT
[1214]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1215]	<400> 63
[1216]	Glu Ile Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1217]	1 5 10 15

[1218]	Gly
[1219]	<210> 64
[1220]	<211> 10
[1221]	<212> PRT
[1222]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1223]	<400> 64
[1224]	Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Ala
[1225]	1 5 10
[1226]	<210> 65
[1227]	<211> 17
[1228]	<212> PRT
[1229]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1230]	<400> 65
[1231]	Ala Ile Ser Met Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1232]	1 5 10 15
[1233]	Gly
[1234]	<210> 66
[1235]	<211> 17
[1236]	<212> PRT
[1237]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1238]	<400> 66
[1239]	Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1240]	1 5 10 15
[1241]	Gly
[1242]	<210> 67
[1243]	<211> 14
[1244]	<212> PRT
[1245]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1246]	<400> 67
[1247]	Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly His Lys Phe Pro Val Ser
[1248]	1 5 10
[1249]	<210> 68
[1250]	<211> 7
[1251]	<212> PRT
[1252]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1253]	<400> 68
[1254]	Lys Asn Leu Leu Arg Pro Ser
[1255]	1 5
[1256]	<210> 69
[1257]	<211> 14
[1258]	<212> PRT
[1259]	<213> 人工序列(Artificial sequence)

[1260]	<400> 69
[1261]	Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Leu Met His Asn Val Ser
[1262]	1 5 10
[1263]	<210> 70
[1264]	<211> 7
[1265]	<212> PRT
[1266]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1267]	<400> 70
[1268]	Lys Ser Ser Ser Arg Pro Ser
[1269]	1 5
[1270]	<210> 71
[1271]	<211> 17
[1272]	<212> PRT
[1273]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1274]	<400> 71
[1275]	Ala Ile Ser Ser Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
[1276]	1 5 10 15
[1277]	Gly
[1278]	<210> 72
[1279]	<211> 12
[1280]	<212> PRT
[1281]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1282]	<400> 72
[1283]	Asp Arg Arg Gly Ser His Ala Asp Ala Leu Asn Val
[1284]	1 5 10
[1285]	<210> 73
[1286]	<211> 5
[1287]	<212> PRT
[1288]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1289]	<400> 73
[1290]	Asp Tyr Glu Met His
[1291]	1 5
[1292]	<210> 74
[1293]	<211> 17
[1294]	<212> PRT
[1295]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1296]	<400> 74
[1297]	Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
[1298]	1 5 10 15
[1299]	Gly
[1300]	<210> 75
[1301]	<211> 6

[1302]	<212> PRT
[1303]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1304]	<400> 75
[1305]	Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr
[1306]	1 5
[1307]	<210> 76
[1308]	<211> 16
[1309]	<212> PRT
[1310]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1311]	<400> 76
[1312]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
[1313]	1 5 10 15
[1314]	<210> 77
[1315]	<211> 7
[1316]	<212> PRT
[1317]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1318]	<400> 77
[1319]	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
[1320]	1 5
[1321]	<210> 78
[1322]	<211> 9
[1323]	<212> PRT
[1324]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1325]	<400> 78
[1326]	Ser Gln Ser Ile Tyr Val Pro Tyr Thr
[1327]	1 5
[1328]	<210> 79
[1329]	<211> 429
[1330]	<212> DNA
[1331]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[1332]	<400> 79
[1333]	ggatcgatat ccaccatgga catgatggtg ctggcccagt tcctggcctt cctgctgctg 60
[1334]	tggttcccag gcgctagatg cgacatcgtg atgaccaga cccccctgag cctgcccgtg 120
[1335]	acccccggcg agcccgccag catcagctgc cggagcagcc agagcctggt gcacagcaac 180
[1336]	ggcaacacct acctgcagtg gtacctgcag aagccccggc agagccccca gctgctgata 240
[1337]	tacaaggtga gcaaccggtt cagcggcgtg cccgaccggt tcagcggcag cggcagcggc 300
[1338]	accgacttca ccctgaagat cagccgggtg gaggccgagg acgtgggcgt gtactactgc 360
[1339]	agccagagca tctactgcc ctacacctt gccagggca ccaagctgga gatcaaactg 420
[1340]	acggtggct 429
[1341]	<210> 80
[1342]	<211> 441
[1343]	<212> DNA

- [1344] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [1345] <400> 80
- [1346] ggatcgatat ctgcggccta tctagccacc atgcgggtgc tgatcctgct gtggctgttt 60
- [1347] accgccttcc ccggcttcc gagcgaggtg cagctggtgc agagcggcgc cgaggtgaag 120
- [1348] aagcccggcg ccagcgtgaa ggtgagctgc aaggccagcg gctacacctt cagcgactac 180
- [1349] gagatgcact ggggtgcggca ggccccggc cagggcctgg agtggatggg cgccatccac 240
- [1350] cccggcagcg gcgacaccgc ctacaaccag cggttcaagg gccgggtgac catcaccgcc 300
- [1351] gacaagagca ccagcaccgc ctacatggag ctgagcagcc tgcggagcga ggacaccgcc 360
- [1352] gtgtactact gcgcccgtt ctacagctac gcctactggg gccagggcac cctggtgacc 420
- [1353] gtgagcgccg ctagcaccaa a 441
- [1354] <210> 81
- [1355] <211> 115
- [1356] <212> PRT
- [1357] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [1358] <400> 81
- [1359] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
- [1360] 1 5 10 15
- [1361] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
- [1362] 20 25 30
- [1363] Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
- [1364] 35 40 45
- [1365] Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Asp Thr Ala Tyr Asn Gln Arg Phe
- [1366] 50 55 60
- [1367] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
- [1368] 65 70 75 80
- [1369] Met Glu Tyr Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
- [1370] 85 90 95
- [1371] Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
- [1372] 100 105 110
- [1373] Val Ser Ala
- [1374] 115
- [1375] <210> 82
- [1376] <211> 113
- [1377] <212> PRT
- [1378] <213> 人工序列(Artificial sequence)
- [1379] <400> 82
- [1380] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
- [1381] 1 5 10 15
- [1382] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
- [1383] 20 25 30
- [1384] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
- [1385] 35 40 45

[1386] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[1387] 50 55 60
[1388] Asp Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[1389] 65 70 75 80
[1390] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[1391] 85 90 95
[1392] Ile Tyr Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[1393] 100 105 110
[1394] Arg
[1395] <210> 83
[1396] <211> 68
[1397] <212> DNA
[1398] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[1399] <400> 83
[1400] gtttgggggc ttgcctggg tactgttgg accaggagac mnnahnmnna hnaccaacgt 60
[1401] cactgctg 68
[1402] <210> 84
[1403] <211> 59
[1404] <212> DNA
[1405] <213> 人工序列(Artificial sequence)
[1406] <400> 84
[1407] acccaggcaa agccccaaa ctctcatct atnnknnknn knkcgccc tcagggtc 59

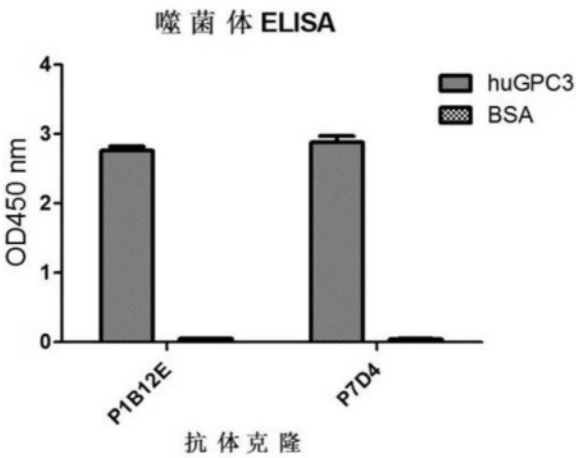


图1

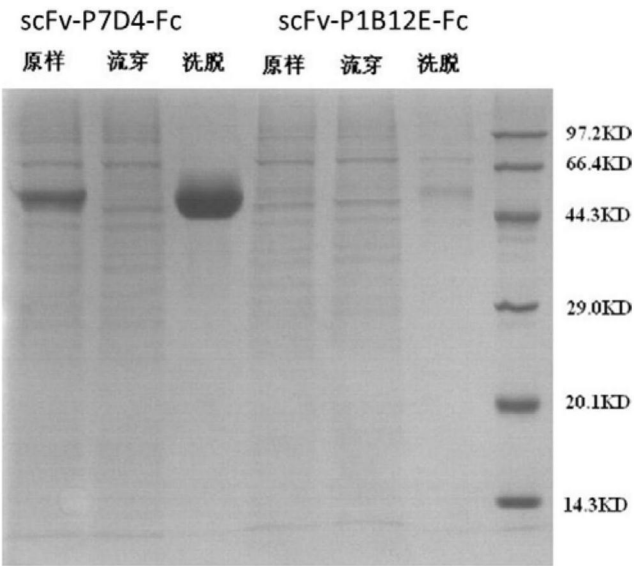


图2

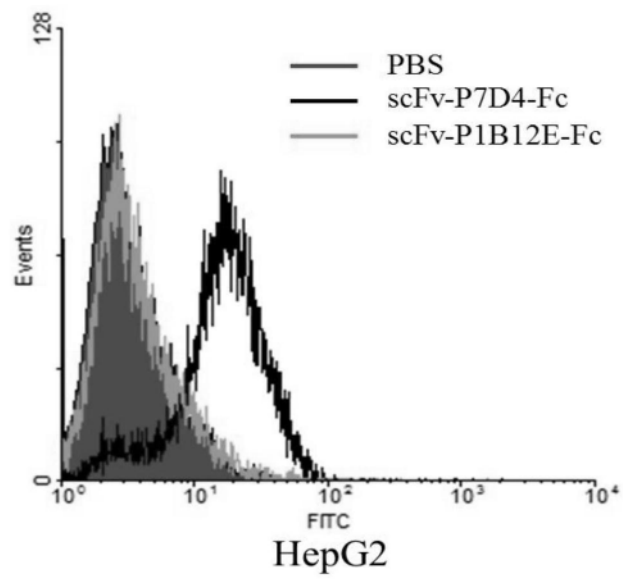


图3

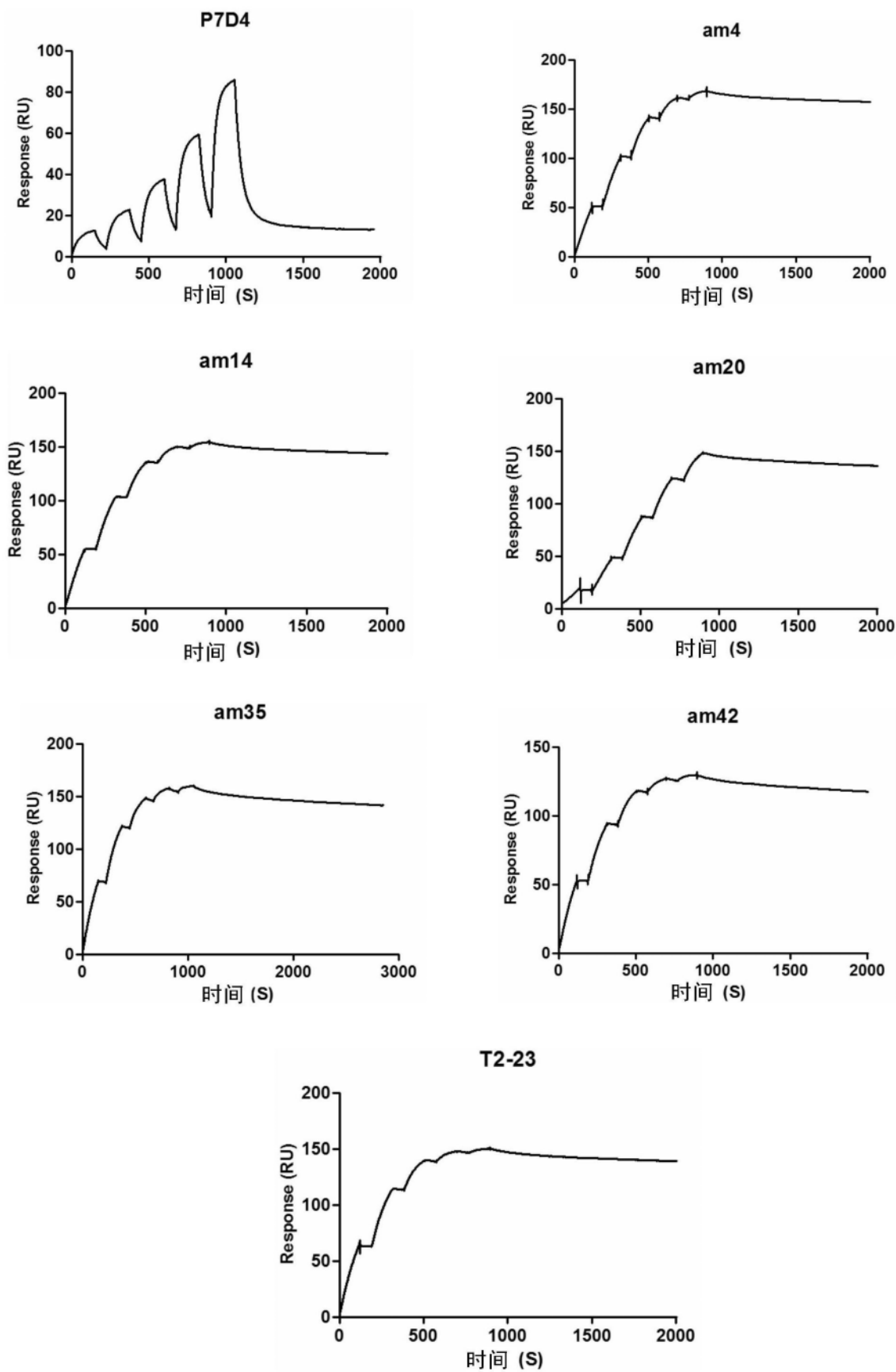


图4

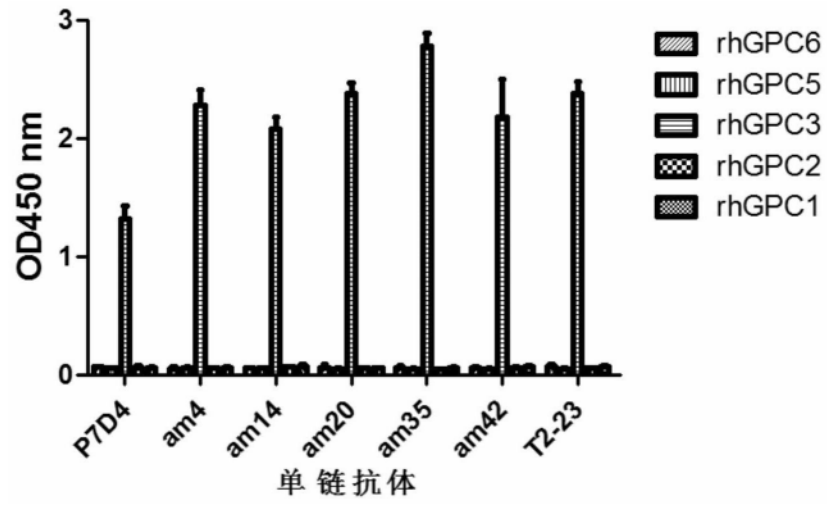


图5

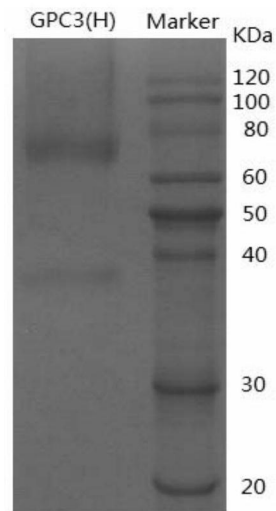


图6

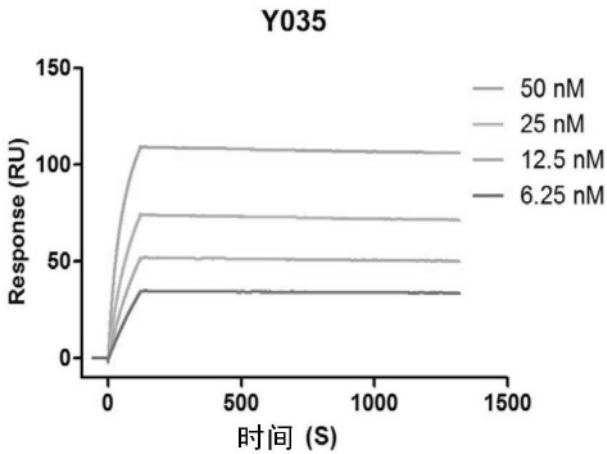


图7

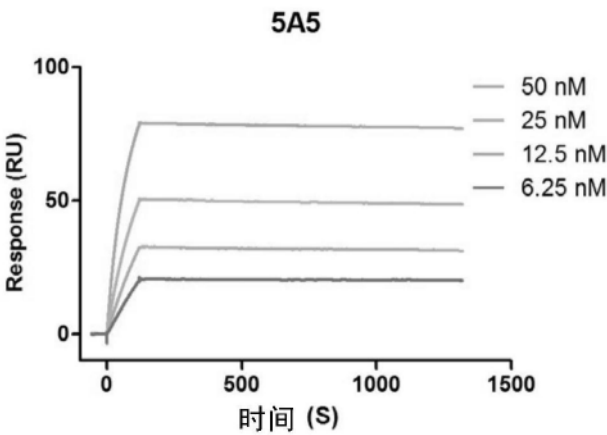


图8

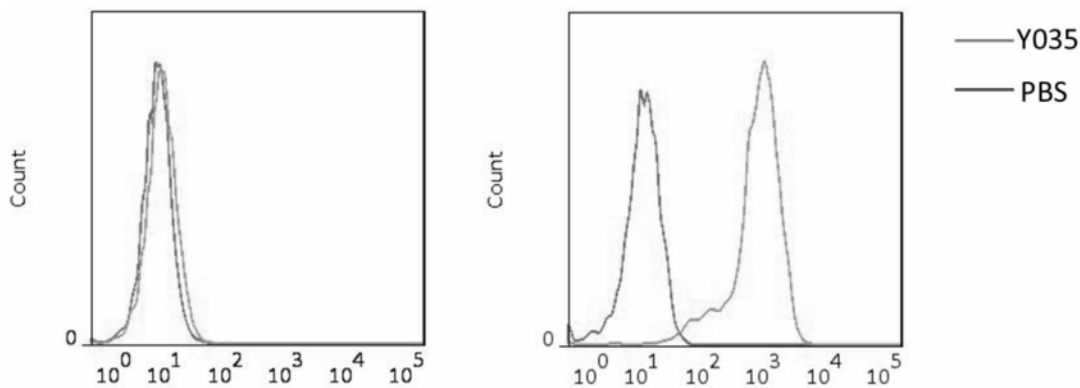


图9