



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103958543 B

(45)授权公告日 2016.12.14

(21)申请号 201280059185.2

(22)申请日 2012.09.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103958543 A

(43)申请公布日 2014.07.30

(30)优先权数据
61/541,921 2011.09.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.05.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/057839 2012.09.28

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/049517 EN 2013.04.04

(73)专利权人 达纳-法伯癌症研究所股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 K.W.乌彻普芬尼格 B.弗朗兹

小肯尼斯.梅 G.德拉诺夫
F.S.霍迪 C.哈维

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 张文辉

(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件
WO 03089616 A2,2003.10.30,
CN 102911270 A,2013.02.06,
Yizhou Zou等.MICA is a target for
complement-dependent cytotoxicity with
mouse monoclonal antibodies and human
alloantibodies.《Human Immunology》.2002,第
63卷(第1期),30-39.

审查员 王亦秋

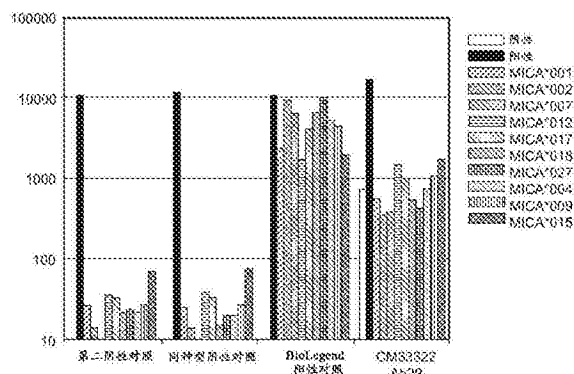
权利要求书1页 说明书41页
序列表52页 附图32页

(54)发明名称

治疗肽

(57)摘要

公开了组合物,其包含与限定的结合配偶
(defined binding partner)免疫特异性结合的
肽,其中所述肽至少包含与结合人MICA或血管发
生素-2的互补决定区相关的互补决定区。



1. 一种包含与MHC I类多肽相关序列A(MICA)免疫特异性结合的抗体或抗体片段的组合物,其中所述抗体或抗体片段包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),并且其中:

(a) V_H CDR1包含如SEQ ID NO:153所示的氨基酸;V_H CDR2包含如SEQ ID NO:156所示的氨基酸;V_H CDR3包含如SEQ ID NO:158所示的氨基酸;V_L CDR1包含如SEQ ID NO:160所示的氨基酸;V_L CDR2包含如SEQ ID NO:162所示的氨基酸;V_L CDR3包含如SEQ ID NO:164所示的氨基酸;

(b) V_H CDR1包含如SEQ ID NO:190所示的氨基酸;V_H CDR2包含如SEQ ID NO:192所示的氨基酸;V_H CDR3包含如SEQ ID NO:194所示的氨基酸;V_L CDR1包含如SEQ ID NO:197所示的氨基酸;V_L CDR2包含如SEQ ID NO:199所示的氨基酸;V_L CDR3包含如SEQ ID NO:201所示的氨基酸;

(c) V_H CDR1包含如SEQ ID NO:208所示的氨基酸;V_H CDR2包含如SEQ ID NO:210所示的氨基酸;V_H CDR3包含如SEQ ID NO:212所示的氨基酸;V_L CDR1包含如SEQ ID NO:215所示的氨基酸;V_L CDR2包含如SEQ ID NO:217所示的氨基酸;V_L CDR3包含如SEQ ID NO:219所示的氨基酸。

2. 权利要求1的组合物,其中:

(a) V_H链包含如SEQ ID NO:149所示的氨基酸序列,并且V_L链包含如SEQ ID NO:151所示的氨基酸序列;

(b) V_H链包含如SEQ ID NO:186所示的氨基酸序列,并且V_L链包含如SEQ ID NO:188所示的氨基酸序列;

(c) V_H链包含如SEQ ID NO:204所示的氨基酸序列,并且V_L链包含如SEQ ID NO:206所示的氨基酸序列。

3. 权利要求1或2的组合物,其还包含抗癌治疗剂。

4. 权利要求1-3中任一项的组合物,其配制为药物组合物。

5. 权利要求1-4中任一项的组合物,其还包含选自下组的组氨酸去乙酰化酶抑制剂(HDAC):异羟肟酸、伏立诺他、辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA)、曲古抑菌素A(TSA)、LAQ824、帕比司他(LBH589)、belinostat(PXD101)、ITF2357(italfarmaco SpA,环四肽、depsipeptide(罗米地辛,FK228)、苯酰胺;恩替诺特(SNDX-275/MS-275)、MGCD0103、短链脂肪酸、丙戊酸、丁酸苯酯、AN-9、pivanex、CHR-3996和CHR-2845。

6. 权利要求1-5中任一项的组合物,其还包含选自下组的蛋白酶体抑制剂:bortezomib、NPI-0052、carfilzomib(PR-171)、CEP 18770和MLN9708。

7. 权利要求1-6中任一项的组合物,其还包含选自下组的抗体:抗-CTLA-4抗体、抗-PD-1抗体、/或抗-PDL-1抗体、和其一种或多种组合。

治疗肽

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求获得于2011年9月30日递交的美国临时专利申请序列号61/541,921的利益,在此援引并入其全部内容。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明在政府支持下进行,基金号为No.P01AI045757,由美国国立卫生研究院资助。政府对本发明享有某些权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包括一个序列表,其通过EFS-Web以ASCII格式提交,在此援引并入其全部内容。所述ASCII拷贝于2012年9月27日生成,名称为53293W01.txt,大小为90,411字节。

技术领域

[0007] 本发明涉及与人类受试者相关的治疗组合物(例如肽)。

[0008] 背景

[0009] 暴露于病症或疾病的人类受试者为具有治疗潜力的抗体提供了来源,而且用于获得这些抗体的一般方法是本领域已知的。然而,特异性获得具有治疗潜力的抗体的方法一般受到表达这些抗体的B细胞的出现频率低、增殖速度慢、和抗体分泌水平低的限制。例如,具有限定特异性的记忆B细胞通常在每百万外周血细胞或大约每毫升血液中仅有1个细胞(Lanzavecchia et al., Curr. Opin. Immunol., 21:298-304(2009); Yoshida et al., Immunol. Rev., 237:117-139(2010))。具有治疗潜力的抗体的频率很可能在癌症患者中更低,因此有必要开发新方法以便能够以高灵敏度和高效率分离这些细胞。

[0010] 传统的方法一般依赖通过体外培养将记忆B细胞转变为抗体分泌细胞和/或使用被免疫动物模型(例如小鼠)(Crotty et al., J. Immunol., 171:4969-4973(2003); Fecteau et al., Immunology, 128:e353-e365(2009); Buisman et al., Vaccine, 28:179-186(2009); Corti et al., PLoS One, 5:e8805(2010))。例如,在体外培养达1周之后,可以使用酶联免疫吸附斑点(ELISPOT)测定在培养物上清中测量到抗体,并评估抗体分泌细胞的频率。这类方法的不足之处已有报道(Henn et al., J. Immunol., 183:31777-3187(2009); Cao et al., J. Immunol., Methods, 358:56-65(2010))。例如,体外培养的记忆B细胞会改变记忆B细胞的表型,使之类似于具有截然不同的功能性质的浆细胞(Jiang et al., Eur. J. Immunol., 37:2205-2213(2007); Huggins et al., Blood, 109:1611-1619(2007); Jourdan et al., Blood, 114:5173-5181(2009))。基于荧光抗原的方法的不足之处也有报道(Hofer et al., Immunol. Rev., 211:295-302(2006); Odendahl et al., Blood, 105:1614-1621(2005); Kunkel et al., Nat. Rev. Immunol., 3:822-829(2003); Scheid et al., Nature, 458:636-640(2009); Wu et al., Science, 329:856-861(2010))。

[0011] 需要有改进的方法,用于特异性地获得或靶定具有治疗潜力的抗体。

[0012] MICA是NKG2D的一种配体,NKG2D是在大多数NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和CD8+T细胞上表达的C型凝集素样II型跨膜受体(C-type lectin-like, type II transmembrane

receptor)。配体一旦偶联,NKG2D通过衔接蛋白(adaptor protein)DAP10传递信号,引发穿孔素依赖的细胞裂解,并提供共刺激(co-stimulation)。在人体内,NKG2D配体包括MHC I类链相关蛋白A(MICA)、紧密近缘的MICB、UL-16结合蛋白(ULBP)1-4和RAE-1G。尽管NKG2D配体在健康组织中不经常发现,但是各种形式的细胞应激,包括DNA损伤,可上调配体表达,导致它们在多种恶性实体瘤和血液恶性病(包括黑素瘤)中经常被检测到。用抗-NKG2D封闭抗体处理的NKG2D缺陷型和野生型小鼠会显示更高的肿瘤易感性,可见NKG2D通过配体阳性转化细胞的激活促进外部的肿瘤抑制。然而在患者体内,由于NKG2D配体从肿瘤细胞脱落(shed),触发表面NKG2D的内化和细胞毒性淋巴细胞的功能障碍,可能实现免疫逃逸。可溶性NKG2D配体还可以刺激调节性NKG2D+CD4+Foxp3-T细胞的扩增,这些细胞可以通过Fas配体、IL-10和TGF- β 拮抗抗肿瘤细胞毒作用。MICA是一种从肿瘤细胞脱落的配体,从肿瘤细胞脱落即从细胞表面释放到周围介质中;来自癌症患者的血清中通常含有升高水平的可溶形式(sMICA)。MICA脱落可以部分地通过与蛋白二硫键异构酶ERp5相互作用实现,其与关键的半胱氨酸形成一个二硫键,导致 $\alpha 3$ 结构域去折叠,使之容易被ADAM-10/17和MMP14蛋白水解。

[0013] 血管发生是从预先存在的血管形成新毛细管的过程,已被提示是肿瘤生长和播散的关键部分。肿瘤刺激血管新生,以满足依靠单纯扩散所难以满足的不断增加的氧气和营养需要。结果,肿瘤招募、重构和扩展现有的血管,以满足其代谢需求。生长中的肿瘤对新血管形成的依赖性,使得血管发生成为抗癌疗法的一个引人注意的靶标。许多细胞因子,包括血管内皮生长因子(VEGF)家族成员和促血管发生素,被认为在调节血管发生中发挥作用。促血管发生素是作为Ties的配体发现的,Ties是一个在血管内皮中选择性表达的酪氨酸激酶家族。已知有四种促血管发生素:促血管发生素-1(“Ang-1”)至促血管发生素-4(“Ang-4”)。研究提示,促血管发生素(例如Ang-1和Ang-2)可能参与肿瘤血管发生。根据这个信息,促血管发生素已经被鉴定作为基于免疫的癌症疗法的潜在靶标。

[0014] 有需要鉴定,其能够特异性识别并结合基于免疫的癌症疗法的靶标,例如MICA和促血管发生素的新的作用剂。这些作用剂可用于诊断筛选和治疗干预与肿瘤发生相关的疾病状态。

[0015] 概要

[0016] 本公开提供了与具有治疗潜力的抗体相关的组合物和方法。

[0017] 在一些实施方案中,本公开提供组合物,其包含与MHC I类多肽相关序列A(MICA)或其上的表位免疫特异性结合的肽。在一些方面中,该组合物的肽包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_H的互补决定区(CDR),和具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_L的CDR3。在一些方面中,这些肽包含表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_H的互补决定区(CDR)3,和表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_L的CDR3。在一些方面中,这些肽进一步包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_H的CDR2,或具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_L的CDR2,或者包含上述两者。在一些方面中,这些肽包含表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_H的CDR2,或表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_L的CDR2,或者包含上述两者。在一些方面中,这些肽进一步包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_H的CDR1,或具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1、6、7、8或9

的V_L的CDR1,或者包含上述两者。在一些方面中,这些肽包含表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_H的CDR1,或表1所示的抗体ID1、6、7、8或9的V_L的CDR1,或者包含上述两者。

[0018] 在一些方面中,肽是抗体或抗体片段,包含:与SEQ ID NO:2具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2、和CDR3的区域包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1的V_H的CDR1、CDR2、和CDR3,并且SEQ ID NO:2中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID1的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:11具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2、和CDR3的区域包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1的V_L的CDR1、CDR2、和CDR3,并且SEQ ID NO:11中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID1的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含一个含有SEQ ID NO:2的V_H链和包含SEQ ID NO:11的V_L链。在一些方面中,除了肽之外,组合物还包含一种或多种(例如12、3、4、5、6、7、8、9、10或少于20种)抗癌治疗剂。在一些方面中,组合物被配制成药物组合物(例如用于施用给受试者)。

[0019] 在一些方面中,肽是抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:149具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2、和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID6的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:149中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID6的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:151具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2、和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID6的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:151中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID6的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:149的V_H链和包含SEQ ID NO:151的V_L链。在一些方面中,除了肽之外,组合物进一步包含一种或多种(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或少于20种)抗癌治疗剂。在一些方面中,组合物被配制成药物组合物(例如用于施用给受试者)。

[0020] 在一些方面中,肽是抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:168具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID7的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:168中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID7的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:170具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID7的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:170中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID7的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:168的V_H链和包含SEQ ID NO:170的V_L链。在一些方面中,除了肽之外,组合物进一步包含一种或多种(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或少于20种)抗癌治疗剂。在一些

方面中,组合物被配制成药物组合物(例如用于施用给受试者)。

[0021] 在一些方面中,肽是抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:186具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID8的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:186中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID8的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:188具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID7的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:188中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID8的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:186的V_H链和包含SEQ ID NO:188的V_L链。在一些方面中,除了肽之外,组合物进一步包含一种或多种(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或少于20种)抗癌治疗剂。在一些方面中,组合物被配制成药物组合物(例如用于施用给受试者)。

[0022] 在一些方面中,肽是抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:204具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID9的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:204中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID9的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:206具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID9的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:206中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID9的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:204的V_H链和包含SEQ ID NO:206的V_L链。在一些方面中,除了肽之外,组合物进一步包含一种或多种(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或少于20种)抗癌治疗剂。在一些方面中,组合物被配制成药物组合物(例如用于施用给受试者)。

[0023] 在一些实施方案中,本公开提供组合物,其包含一种或多种与促血管发生素或其上的表位结合的肽。在一些方面中,所述组合物的肽包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_H的互补决定区(CDR)3,和表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_L的CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换。在一些方面中,肽可以包含表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_H的互补决定区(CDR)3,和表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_L的CDR3。在一些方面中,肽可以进一步包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_H的CDR2,或具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_L的CDR2,或者包含上述两者。在一些方面中,这些肽可以包含表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_H的CDR2,或表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_L的CDR2,或者包含上述两者。在一些方面中,肽可以进一步包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_H的CDR1,或具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_L的CDR1,或者包含上述两者。在一些方面中,这些肽可以

包含表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_H的CDR1,或表1所示的抗体ID2、3、4、5或10的V_L的CDR1,或者包含上述两者。

[0024] 在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:20具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID2的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:20中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID2的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:29具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID2的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:29中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID2的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:20的V_H链和包含SEQ ID NO:29的V_L链。

[0025] 在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:38具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID3的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:38中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID3的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:47具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID3的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:47中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID3的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:38的V_H链和包含SEQ ID NO:47的V_L链。

[0026] 在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:56具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID4的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:56中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID4的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列;和与SEQ ID NO:65具有同一性的V_L链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID4的V_L的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:65中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID4的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:包含SEQ ID NO:56的V_H链和包含SEQ ID NO:65的V_L链。

[0027] 在一些方面中,肽包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含:与SEQ ID NO:74具有同一性的V_H链,其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID5的V_H的CDR1、CDR2和CDR3,并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换,并且SEQ ID NO:74中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID5的V_H的FR1、FR2、FR3、

FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列；和与SEQ ID NO:83具有同一性的V_L链，其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID5的V_L的CDR1、CDR2和CDR3，并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换，并且SEQ ID NO:83中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID5的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中，肽包括抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包含：包含SEQ ID NO:74的V_H链和包含SEQ ID NO:83的V_L链。在一些方面中，所述肽至少免疫特异性结合促血管发生素-2。在一些方面中，所述组合物进一步包括一种或多种抗癌治疗剂。在一些方面中，所述组合物被配制成药物组合物。

[0028] 在一些方面中，肽包括抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包含：与SEQ ID NO:222具有同一性的V_H链，其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID10的V_H的CDR1、CDR2和CDR3，并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换，并且SEQ ID NO:222中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID10的V_H的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列；和与SEQ ID NO:224具有同一性的V_L链，其中对应于CDR1、CDR2和CDR3的区域包含表1所示的抗体ID10的V_L的CDR1、CDR2和CDR3，并在CDR1、CDR2和CDR3区内具有5个或更少的保守氨基酸替换，并且SEQ ID NO:224中对应于FR1、FR2、FR3、FR4的区域包含与表1所示的抗体ID10的V_L的FR1、FR2、FR3、FR4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98、99%、或100%的同一性的氨基酸序列。在一些方面中，肽包括抗体或抗体片段，所述抗体或抗体片段包含：包含SEQ ID NO:222的V_H链和包含SEQ ID NO:224的V_L链。在一些方面中，所述肽至少免疫特异性结合促血管发生素-2。在一些方面中，所述组合物进一步包括一种或多种抗癌治疗剂。在一些方面中，所述组合物被配制成药物组合物。

[0029] 在一些实施方案中，本公开包括用于治疗受试者中的癌症的方法。在一些方面中，该方法包括向受试者施用根据权利要求1-27中任一项的组合物。

[0030] 本公开还提供了在免疫治疗后从癌症患者分离人抗体的方法。

[0031] 在一些实施方案中，本公开包括从受试者获得针对自身抗原的免疫细胞的方法，该方法包括鉴定对自身抗原呈阳性免疫应答的受试者，提供多聚体形式的自身抗原，使多聚体形式的自身抗原与来自对自身抗原显示阳性免疫应答的受试者的样品相接触，和获得与多聚体形式的自身抗原结合的免疫细胞。

[0032] 在一些实施方案中，本公开包括从癌症患者获得针对自身抗原的免疫细胞的方法，该方法包括鉴定对自身抗原呈阳性免疫应答的受试者，提供多聚体形式的自身抗原，使多聚体形式的自身抗原与来自对自身抗原呈阳性免疫应答的受试者的样品相接触，和获得与多聚体形式的自身抗原结合的免疫细胞。

[0033] 除非另外指出，否则这里所用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员所公知的相同的意义。这里描述了用于在本发明中使用的方法和材料；但是也可以使用本领域已知的其它合适方法和材料。这些材料、方法和实例仅作为举例，并不意图具有限制意义。本文引用这里提到的所有公开、专利申请、专利、序列、数据库内容和其它参考文献的全部内容作为参考。当存在矛盾时，以本说明书，包括定义，为准。

[0034] 通过下面的详细说明书和附图以及权利要求，可以显见本发明的其它特征和优

点。

[0035] 附图简述

[0036] 图1.抗体ID1(抗-MHC I类多肽相关序列A(MICA)抗体)可变重链(V_H)的核酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0037] 图2.抗体ID1(抗-MICA抗体)V_H链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0038] 图3.抗体ID1(抗-MICA抗体)可变轻链(V_L)的核酸序列(SEQ ID NO:10)。

[0039] 图4.抗体ID1(抗-MICA抗体)V_L链的氨基酸序列(SEQ ID NO:11)。

[0040] 图5.抗体ID2(抗-促血管发生素-2抗体)V_H链的核酸序列(SEQ ID NO:19)。

[0041] 图6.抗体ID2(抗促血管发生素-2抗体)V_H链的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。

[0042] 图7.抗体ID2(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的核酸序列(SEQ ID NO:28)。

[0043] 图8.抗体ID2(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的氨基酸序列(SEQ ID NO:29)。

[0044] 图9.抗体ID3(抗-促血管发生素-2抗体)V_H链的核酸序列(SEQ ID NO:37)。

[0045] 图10.抗体ID3(抗促血管发生素-2抗体)V_H链的氨基酸序列(SEQ ID NO:38)。

[0046] 图11.抗体ID3(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的核酸序列(SEQ ID NO:46)。

[0047] 图12.抗体ID3(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的氨基酸序列(SEQ ID NO:47)。

[0048] 图13.抗体ID4(抗-促血管发生素-2抗体)V_H链的核酸序列(SEQ ID NO:55)。

[0049] 图14.抗体ID4(抗促血管发生素-2抗体)V_H链的氨基酸序列(SEQ ID NO:56)。

[0050] 图15.抗体ID4(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的核酸序列(SEQ ID NO:64)。

[0051] 图16.抗体ID4(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的氨基酸序列(SEQ ID NO:65)。

[0052] 图17.抗体ID5(抗-促血管发生素-2抗体)V_H链的核酸序列(SEQ ID NO:73)。

[0053] 图18.抗体ID5(抗促血管发生素-2抗体)V_H链的氨基酸序列(SEQ ID NO:74)。

[0054] 图19.抗体ID5(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的核酸序列(SEQ ID NO:82)。

[0055] 图20.抗体ID5(抗促血管发生素-2抗体)V_L链的氨基酸序列(SEQ ID NO:83)。

[0056] 图21A-21F.用于从B细胞制作抗体的示例方法。(A)表达具有用于位点特异性生物素化的BirA标签的抗原,并与荧光标记的链亲和素组成四聚体。(B)B细胞用四聚体和一组单克隆抗体染色。将四聚体⁺,类别转换的记忆B细胞单细胞分选到PCR连排反应管(PCR strip)中。(C)用T7RNA聚合酶进行mRNA扩增。(D)用300-400bp PCR产物进行PCR产物测序。(E)使用重叠PCR构建全长IgG1重链和κ/λ轻链序列,并将它们克隆到分离的载体中。将载体瞬时转染进入CHO-S细胞,用于表达全人重组抗体。(F)测试抗体的抗原结合,并评估其潜在治疗性能。

[0057] 图22A-22B.显示使用单体和四聚体抗原鉴定记忆B细胞的结果比较的图。(A)单生物素化的TTCF或CD80抗原直接用Alexa-488荧光团标记;四聚体用非标记的链亲和素产生。将从每个供体富集的B细胞分成三个部分,并用对照CD80四聚体、TTCF单体或TTCF四聚体以相同的总抗原浓度0.125μg/mL进行标记。FACS点图描绘了CD19⁺CD27⁺IgM⁻类别转换的记忆B细胞;门(gate)附近的数字代表父门(parental gate)的百分比。(B)在三个不同供体中检测到的四聚体⁺记忆B细胞的频率。数字计算为:四聚体⁺细胞个数/1x10⁶个CD19⁺记忆B细胞。

[0058] 图23A-23B.显示从浆母细胞和记忆B细胞产生的抗体与TTCF的高亲和性结合的曲线图。实施饱和结合试验以确定重组抗体的亲和性。将TTCF抗体用铕标记,铕在用螯合剂温育时会在615nm发射强荧光信号。将抗体固定在96孔板中,并与TTCF-铕(100nM-4pM)一起37

℃温育2小时。记录5nm的荧光计数,并用非线性回归分析计算 K_D 。在所有实验中均包含同样在CHO-S细胞中产生的对照抗体(克隆8.18.C5)。(A)重组TTCF抗体1和2从TTCF四聚体⁺浆母细胞(供体1)产生。(B)TTCF抗体3,4和5来自三个不同供体的TTCF四聚体⁺记忆B细胞产生。

[0059] 图24.显示抗-MICA抗体与MICA包被的luminex珠子的结合的柱状图。

[0060] 图25A-25D.显示抗-MICA抗体与MICA包被的珠子的结合的曲线图。

[0061] 图26A-26D.显示四种人促血管发生素2特异性抗体以及对照抗体与三种人促血管发生素(促血管发生素-1、2和4)和类促血管发生素-3(Ang-样3)的结合的柱状图。将重组促血管发生素固定在ELISA板中,并用销标记的链亲和素检测人重组抗体的结合。

[0062] 图27A-27C.显示了从肺癌患者分离促血管发生素特异性抗体的相关图片和凝胶。(A)通过ELISA确定的肺癌患者(L19)血清(1:1000稀释)的促血管发生素-2反应性。(B)FACS点图,以CD19⁺,CD27⁺IgM-B细胞设门的PBMC样品(时间点-10/98),X轴为CD19,Y轴为荧光标记的促血管发生素-2。(C)从患者L19分离的10个促血管发生素-2反应活性记忆B细胞的重链、轻链和铰链区的PCR产物。图片左侧指示了500碱基对的标记物。

[0063] 图28.抗体ID6(抗-MHC I类多肽相关序列A(MICA)抗体)的可变重(V_H)链的核酸序列(SEQ ID NO:148)。

[0064] 图29.抗体ID6(抗-MICA抗体) V_H 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:149)。

[0065] 图30.抗体ID6(抗-MICA抗体)可变轻(V_L)链的核酸序列(SEQ ID NO:150)。

[0066] 图31.抗体ID6(抗-MICA抗体) V_L 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:151)。

[0067] 图32.抗体ID7(抗-MHC I类多肽相关序列A(MICA)抗体)的可变重(V_H)链的核酸序列(SEQ ID NO:167)。

[0068] 图33.抗体ID7(抗-MICA抗体) V_H 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:168)。

[0069] 图34.抗体ID7(抗-MICA抗体)可变轻(V_L)链的核酸序列(SEQ ID NO:169)。

[0070] 图35.抗体ID7(抗-MICA抗体) V_L 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:170)。

[0071] 图36.抗体ID8(抗-MHC I类多肽相关序列A(MICA)抗体)的可变重(V_H)链的核酸序列(SEQ ID NO:185)。

[0072] 图37.抗体ID8(抗-MICA抗体) V_H 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:186)。

[0073] 图38.抗体ID8(抗-MICA抗体)可变轻(V_L)链的核酸序列(SEQ ID NO:187)。

[0074] 图39.抗体ID8(抗-MICA抗体) V_L 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:188)。

[0075] 图40.抗体ID9(抗-MHC I类多肽相关序列A(MICA)抗体)的可变重链(V_H)的核酸序列(SEQ ID NO:203)。

[0076] 图41.抗体ID9(抗-MICA抗体) V_H 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:204)。

[0077] 图42.抗体ID9(抗-MICA抗体)可变轻(V_L)链的核酸序列(SEQ ID NO:205)。

[0078] 图43.抗体ID9(抗-MICA抗体) V_L 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:206)。

[0079] 图44.抗体ID10(抗-促血管发生素-2抗体)的可变重链(V_H)的核酸序列(SEQ ID NO:221)。

[0080] 图45.抗体ID10(抗-促血管发生素-2抗体) V_H 链的氨基酸序列(SEQ ID NO:222)。

[0081] 图46.抗体ID10(抗-促血管发生素-2抗体)可变轻(V_L)链的核酸序列(SEQ ID NO:223)。

[0082] 图47. 抗体ID10(抗-MICA抗体)V_L链的氨基酸序列(SEQ ID NO:224)。

[0083] 图48A-G. 显示对重组抗-MICA抗体与MICA等位体的特异性结合的评估的曲线图。

[0084] 图49. 显示用抗-MICA抗体CM24002Ab2标记自体肿瘤细胞的曲线图。

[0085] 图50. 显示血清MICA对NKG2D的调节的一系列FACS点图。人NK细胞与来自患者CM24002的对照血清的1:10稀释物一起温育48小时。在温育开始时,以10 μ g/ml的浓度添加所示抗体。通过流式细胞仪评估NKG2D在CD56+NK细胞上的表达。

[0086] 图51. 显示重组MICA对NKG2D的调节的一系列FACS点图。将人NK细胞与2ng/ml的浓度的重组MICA一起温育48小时。在温育开始时,以10 μ g/ml的浓度添加所示抗体。48小时后,通过流式细胞仪评估NKG2D在CD56+NK细胞上的表达。

[0087] 图52. 证明抗-MICA抗体CM24002Ab2可提高细胞介导的细胞毒性的曲线图。在10 μ g/ml的指示抗体的存在下,将人NK细胞与重组MICA(2ng/ml)一起温育48小时。通过测量以指定比例温育4小时后LDH的释放,评估NK细胞(效应物)杀死K562靶细胞的能力。

[0088] 图53. 证明抗-MICA抗体CM24002Ab2和CM33322Ab29可提高细胞介导的毒性的柱状图。在10 μ g/ml的指示抗体的存在下,将人NK细胞与重组MICA(2ng/ml)温育48小时。通过测量在温育4小时后LDH的释放,评估NK细胞(效应物)杀死K562靶细胞的能力。在效应物与靶细胞温育4小时期间,添加NKG2D封闭抗体或Fc封闭抗体,以评估Fc受体和NKG2D对细胞介导的毒性的贡献。

[0089] 图54. 显示重组抗-MICA抗体与MICA α 3结构域的结合的一系列曲线图。重组MICA α 3结构域被生物素化,并被捕捉在链亲和素包被的珠子表面上。将10 μ g/ml的所示抗体与各个重组蛋白包被的珠子一起温育1小时。随后清洗珠子,并与FITC-偶联的抗人IgG第二抗体一起温育。通过流式细胞仪定量FITC荧光。

[0090] 图55. 证明肿瘤细胞被抗-MICA抗体CM24002Ab2和CM33322Ab29标记的曲线图。荧光通过流式细胞术测定。

[0091] 图56. 证明通过Luminex测定法确定的抗-MICA抗体CM33322Ab29的MICA等位体特异性的柱状图。

[0092] 图57. 柱状图显示了抗-促血管发生素-2特异性抗体抗-Ang6Ab2以及对照抗体对三种人促血管发生素(促血管发生素-1,2和4)和类促血管发生素-3的结合。重组促血管发生素被固定在ELISA板上,用铑-标记的链亲和素检测人重组抗体的结合。

[0093] 详细说明

[0094] 本公开部分地基于如下的观察,即通过用四聚体形式的感兴趣的抗原标记B细胞,能够从暴露于疾病的人类受试者获得针对疾病中重要治疗靶标的抗体。如上文背景部分描述的,先前方法至少在下列方面有限制:在人类受试者中鉴定合适B细胞的效率低和/或方法会诱导被捕获任何的B细胞经历表型改变,从而降低其价值。相反,本文中描述的方法允许捕获稀少的针对特定疾病相关抗原的记忆B细胞。如下文所述,该方法需要疾病相关抗原的四聚体化,正如下面的实施例中证实的那样,该过程可以提高合适记忆B细胞的鉴定。具体地,本文中的方法允许在受试者初始暴露于抗原后的更长的时间内更高效地捕获合适的记忆B细胞。本文中的方法还包括利用通过使用这里所公开的方法获得的记忆B细胞的遗传材料所产生的抗体(和从这些抗体序列产生的肽)。

[0095] 本文描述了针对MHC I类多肽相关序列A(MICA)的人抗体和靶定促血管发生素-2

的人抗体。这两种类型的人抗体均是通过涉及使用四聚体抗原的方法从接受了基于细胞的癌症疫苗(GM-CSF转导的自体肿瘤细胞)的患者中鉴定的。

[0096] 在一些情况下,本公开提供了用于从选定的人类受试者特异性获得或靶定具有治疗潜力的抗体的方法,以及由其产生的治疗组合物。这些方法可以包括:在人类受试者中获得或靶定免疫细胞,其中免疫细胞包括但不限于,例如B细胞和/或记忆B细胞,从所得的或所靶定的免疫细胞分离或纯化遗传材料(例如DNA和/或mRNA),和使用分离或纯化的遗传材料产生治疗组合物,例如本文中公开的治疗组合物。该方法的进一步描述在下文的“方法”部分中提供。

[0097] 在一些情况下,本公开提供了治疗组合物(例如包括治疗肽,包括抗体、抗体片段、抗体衍生物和/或抗体偶联物),该组合物涉及患有或者曾经患有状况或疾病、并对该状况或疾病显示阳性免疫应答的受试者中存在的抗体。治疗组合物

[0098] 在一些情况下,本文中的治疗组合物能够与状况或疾病相关的结合配偶相互作用(例如结合、特异性结合和/或免疫特异性结合),其中治疗组合物与结合配偶之间的相互作用导致针对该状况或疾病的阳性免疫应答(例如受试者中的疾病或其症状的水平降低)。

[0099] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包括(例如包含,基本上由其构成,或由其构成)表1所示的抗体ID1,2,3,4或5,6,7,8,9或10的可变重链(V_H)和/或可变轻链(V_L)的至少一个(例如1、2、3、4、5和/或6个)互补决定区(CDR)。

[0100] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包括(例如包含,基本上由其构成,或由其构成)表1所示的抗体ID1,2,3,4,5,6,7,8,9或10的可变重链(V_H)和/或可变轻链(V_L)的至少一个(例如1、2、3、4、5和/或6个)互补决定区(CDR),并且其与MHC I类多肽相关序列A(MICA(例如UniGene Hs.130838))(例如可溶MICA(sMICA))和/或促血管发生素-2(例如UniGene Hs.583870),包括其表位,相互作用(例如结合、特异性结合和/或免疫特异性结合)。

[0101] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包括表1所示的抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,所述肽可以包括至少2个CDR,其中该至少2个CDR是表1所示的不同抗体的CDR。换言之,表1所示的抗体ID1,6,7,8和9的CDR(和FR和/或AA序列)可以互换使用,并能够被组合产生肽,只要该肽能够与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)即可。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3,和表1所示的抗体ID1,6,7,8和/或9的V_H和/或V_L的至少一个FR1FR2FR3和/或FR4。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:2,149,168,186或204的其中之一和/或SEQ ID NO:11,151,170,188或206的其中之一。在每种情况下,肽能够与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和MICA之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0102] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID6的V_H和/或

V_L的至少一个CDR,其中肽与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID6的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID6的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID6的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID6的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID6的V_H和V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID6的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:149和/或SEQ ID NO:151。在每种情况下,肽能够与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和MICA之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0103] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID7的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID7的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID7的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID7的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID7的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID7的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID7的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:168和/或SEQ ID NO:170。在每种情况下,肽能够与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和MICA之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0104] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID8的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID8的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID8的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID8的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID8的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID8的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID8的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:186和/或SEQ ID NO:188。在每种情况下,肽能够与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和MICA之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0105] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID9的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID9的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID9的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID9的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID9的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID9的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID9的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:204和/或SEQ ID NO:206。在每种情况下,肽能够与MICA(例如人MICA(例如可溶MICA(sMICA)))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和MICA之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0106] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H或V_L的至少一个CDR,其中所述肽与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽可以包括至少2个CDR,其中该至少两个CDR是来自表1所示的不同抗体的CDR。换言之,表1所示的抗体ID2,3,4,5和10的CDR(和FR和/或AA序列)可以互换使用,并能够组合以产生肽,只要该肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)即可。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H和/或V_L的CDR3和表1所示的抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3,和表1所示的抗体ID2,3,4,5和/或10的V_H和/或V_L的至少一个FR1FR2FR3和/或FR4。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:20,38,56,74或222的其中之一和/或SEQ ID NO:29,47,65,83或224的其中之一。在每种情况下,肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2(例如UniGene Hs.583870))结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。

[0107] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID2的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中所述肽与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID2的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID2的V_H和/或V_L的CDR3和表1所示的抗体ID2的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID2的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID2的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID2的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:20和/或SEQ ID NO:29。在每种情况下,肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和促血管发生素-2之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0108] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID3的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID3的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID3的V_H和/或V_L的CDR3和表1所示的抗体ID3的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID3的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID3的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID3的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:47。在每种情况下,肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和促血管发生素-2之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0109] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID4的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID4的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID4的V_H和/或V_L的CDR3和表1所示的抗体ID4的

V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID4的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID4的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID4的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:56和/或SEQ ID NO:65。在每种情况下,肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽与促血管发生素-2之间的结合亲和力可为X-Y,例如X-Y, X-Y。在一些情况下,肽和促血管发生素-2之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0110] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID5的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID5的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID5的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID5的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID5的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID5的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID5的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:74和/或SEQ ID NO:83。在每种情况下,肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和促血管发生素-2之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0111] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含表1所示的抗体ID10的V_H和/或V_L的至少一个CDR,其中肽与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID10的V_H和/或V_L的CDR3。在一些情况下,这些肽包括表1所示的抗体ID10的V_H和V_L的CDR3和表1所示的抗体ID10的V_H和/或V_L的CDR1和/或CDR2。在一些情况下,这些肽包括抗体ID10的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3。在一些情况下,这些肽包括抗体ID10的V_H和/或V_L的CDR1、CDR2和CDR3和表1所示的抗体ID10的V_H和/或V_L的FR1、FR2、FR3和/或FR4中的至少一个。在一些情况下,这些肽包括SEQ ID NO:222和/或SEQ ID NO:224。在每种情况下,肽能够与促血管发生素-2(例如人促血管发生素-2)结合(例如特异性结合和/或免疫特异性结合)。在一些情况下,肽和促血管发生素-2之间的结合亲和力为大约0.1nM-1μM,例如大约10nM。

[0112] 在一些情况下,与促血管发生素-2结合的肽还能够与促血管发生素-1(例如Unigene Hs.369675)和/或促血管发生素-4(例如Unigene Hs.278973)结合。例如,在一些情况下,与促血管发生素-2结合的肽还能够与除促血管发生素-1之外的其它相关抗原(除促血管发生素-1之外)特异性和/或免疫特异性结合。在一些情况下,与促血管发生素-2结合的肽还能够与除促血管发生素-4之外的其它相关抗原(除促血管发生素-4之外)特异性和/或免疫特异性结合。

[0113] 在一些情况下,治疗组合物可以包括肽,所述肽包含:SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:149和/或SEQ ID NO:151;SEQ ID NO:168和/或SEQ ID NO:170;SEQ ID NO:186和/或SEQ ID NO:188;SEQ ID NO:204和/或SEQ ID NO:206;SEQ ID NO:20和/或SEQ ID NO:29;SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:47;SEQ ID NO:56和/或SEQ ID NO:65;SEQ ID NO:74和/或SEQ ID NO:83;和SEQ ID NO:222和/或SEQ ID NO:224

[0114]

表 1

ID	靶标	V _H V _L	FR1*	CDR1**	FR2*	CDR2**	FR3*	CDR3**	FR4*	A.A.#	核酸 ##
1	人 MICA	V _H	QVQLQQW GAGLLKP SETLALTC AVS (SEQ ID NO: 3)	GGSF ^{TDHY} (SEQ ID NO: 4)	WSWIR QAPGK GLEWIGE (SEQ ID NO: 5)	INHSGVT (SEQ ID NO: 6)	NYNPS LKSR ^{LT} ISVD ^{TS} KSQF ^{SL} RLTS ^{VT} AADTA LYYC (SEQ ID NO: 7)	AKTG LYYD DVW GTER PRGG FDS (SEQ ID NO: 8)	WGQGT LVT ^{VSS} (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 2 (见图 2)	SEQ ID NO: 1 (见图 1)
		V _L	DIVMTQSP D SLAVSLGE RATINCK S (SEQ ID NO: 12)	QSILYSSD NKNY (SEQ ID NO: 13)	LAWYQ HKPGQPP KLLFY (SEQ ID NO: 14)	WAS (SEQ ID NO: 15)	IRESG VPDRF SGGSGT DFTLT ISSLQA EDVAV YYC (SEQ ID NO: 16)	QYYSP PCS (SEQ ID NO: 17)	FGQGTK LEIQ (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 11 (见图 4)	SEQ ID NO: 10 (见图 3)
6	人 MICA	V _H	QVQLQESG PGLVEPSG TSLSTCTV S (SEQ ID NO: 152)	GGSI ^{RSN} W (SEQ ID NO: 153)	WSWVRQP PGEGL ^{EWI} GE (SEQ ID NO: 154)	IHHIGRS (SEQ ID NO: 156)	SYNPSLKS RVTMSVD KSQNQFSL RLTSVTAA DTAVYY (SEQ ID NO: 157)	CAKNGYYA MDVW (SEQ ID NO: 158)	GQGT ^{TVTV} SS (SEQ ID NO: 155)	SEQ ID NO: 149 (见图 28)	SEQ ID NO: 148 (见图 29)
		V _L	EIVLTQSPG TSLSPGE RATLSCRA S	QSVSSDF (SEQ ID NO: 160)	LAWYQK PGQAPRL IY (SEQ ID)	ATS (SEQ ID NO: 162)	FRATGISD RFGSGSG TDFSLTIN RLEPEDFA	CQHYRSSP PWYTF (SEQ ID NO: 164)	AQGTKLD MRRTVAA PSV (SEQ ID)	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:

[0115]

			{SEQ ID NO: 159}		NO: 161)		VYY (SEQ ID NO: 163)		NO: 165)	151 (见图 31)	150 (见图 30)
			QVQLQESG PGLVKPSG TSLTCAV S (SEQ ID NO: 171)	GASITNGA W (SEQ ID NO: 172)	WSWVRQP PGKGLEWI GE (SEQ ID NO: 173)	IYLNQNT (SEQ ID NO: 174)	NSNPSLKS RVIISVDK SKNHFSLT LNSVTAA DTAVYY (SEQ ID NO: 166)	CAKNAAYN LEFW (SEQ ID NO: 176)	GQGALVTV SS (SEQ ID NO: 177)	SEQ ID NO: 168 (见图 33)	SEQ ID NO: 167 (见图 32)
7	人 MICA	V _H									
		V _L	EIV _L TQSPG TSLSPGE RATLSCRA S (SEQ ID NO: 178)	QTVSSPY (SEQ ID NO: 179)	VAWYQQK RGQAPRLI IY (SEQ ID NO: 180)	GAS (SEQ ID NO: 181)	TRATGIPD RFSGSGSG TDFTLTIS RLEPEDFA VYY (SEQ ID NO: 182)	CQQYDRSY YYTF (SEQ ID NO: 183)	GQCTKLEI K (SEQ ID NO: 184)	SEQ ID NO: 170 (见图 34)	SEQ ID NO: 169 (见图 34)
8	人 MICA	V _H	QVQLQESG PGLVKPSE NLSLTCTV S (SEQ ID NO: 189)	DASMSDY H (SEQ ID NO: 190)	WSWIRQA AGKGLEWI GR (SEQ ID NO: 191)	MYSTGSP (SEQ ID NO: 192)	YYKPSLKG RVTMSIDT SKNQFSLK LASV TAADTAIY Y (SEQ ID NO: 193)	CASGQHIG GWVPPDF W (SEQ ID NO: 194)	GQCTLVTV SS (SEQ ID NO: 195)	SEQ ID NO: 186 (见图 37)	SEQ ID NO: 185 (见图 36)
		V _L	DIVMTQTP LSPVTLG QPASISCRS S (SEQ ID NO: 196)	EGLVYSDG DTY (SEQ ID NO: 197)	LSWFHQR PGQPPRLI IY (SEQ ID NO: 198)	KIS (SEQ ID NO: 199)	NRFSGVP DRFSGSGA GTDFTLKI SRVEAED VGVYY (SEQ ID NO: 200)	CMQATHFP WTF (SEQ ID NO: 201)	GQGTKVEV KR (SEQ ID NO: 202)	SEQ ID NO: 188 (见图 39)	SEQ ID NO: 187 (见图 38)
			EVQLLESG GGLVQPGG	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 197)	LTWIRQAP GKGLEWV	ISGSGNNT (SEQ ID NO: 199)	YYADSVK GRFTISR	CLGVGQ (SEQ ID NO: 201)	GHGIPVVS S	SEQ ID NO: 188 (见图 39)	SEQ ID NO: 187 (见图 38)

[0116]

9	入 MICA	V_H	SLRLSCAA S (SEQ ID NO: 207)	NO: 208)	SS (SEQ ID NO: 209)	NO: 210)	KVKKTLTYL QMDSLTV GDTAVYY (SEQ ID NO: 211)	NO: 212)	(SEQ ID NO: 213)	ID NO: 204 (见图 41)	ID NO: 203 (见图 40)
			DIVMTQTP LSSPVTLG QPASISCRS S (SEQ ID NO: 214)	QSLV _H RDG NTY (SEQ ID NO: 215)	LSWFLQRP GQAPRLLI Y (SEQ ID NO: 216)	RIS (SEQ ID NO: 217)	NRFSGV PDRFSGSGA GTDFTLKI SRVEAED VGYY (SEQ ID NO: 218)	CMQATQIP NTF (SEQ ID NO: 219)	GQGTKLEI K (SEQ ID NO: 220)	SEQ ID NO: 206 (见图 43)	SEQ ID NO: 205 (见图 42)
2	促血管发 生素-2	V_H	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA S (SEQ ID NO: 21)	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 22)	MSWVRQA PGKGLEW VSG (SEQ ID NO: 23)	IYWSGGST (SEQ ID NO: 24)	YYADSVK GRFTI SRDISKNT LYLQMNS LRADD TAVYYC (SEQ ID NO: 25)	ARGDYYGS GAHFDY (SEQ ID NO: 26)	WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 27)	SEQ ID NO: 20 (见图 6)	SEQ ID NO: 19 (见图 5)
			DIVMTQTP LSSPVTLG QPASISCRS S (SEQ ID NO: 30)	QSLV _H SDG NTY (SEQ ID NO: 31)	LSWLQQR PGQPPR LLIY (SEQ ID NO: 32)	QIS (SEQ ID NO: 33)	NRFSGV PDRFSGS GAGTDFT LKISRVEA EDVGV YYC (SEQ ID NO: 34)	MQGTQFP RT (SEQ ID NO: 35)	FGQGTKVE IK (SEQ ID NO: 36)	SEQ ID NO: 29 (见图 8)	SEQ ID NO: 28 (见图 7)
3	促血管发 生素-2	V_H	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA S (SEQ ID NO: 39)	GFTFSNN W (SEQ ID NO: 40)	MHWVRQ APGKGLE WISE (SEQ ID NO: 41)	IRSDGNFT (SEQ ID NO: 42)	RYADSMK GRFTI SRDNAKS TLYLQMN SLRVED TGLYYC (SEQ ID NO: 43)	ARDYPYSI DY (SEQ ID NO: 44)	WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 45)	SEQ ID NO: 38 (见图 10)	SEQ ID NO: 37 (见图 9)

[0118]

10	促血管发 生素-2								(SEQ ID NO: 79)				
		V _L	DIQMTQSP SS VSASVGDR VTTTCRAS (SEQ ID NO: 84)	QDIS TW (SEQ ID NO: 85)	LTWYQQR AGKAPNLL IY (SEQ ID NO: 86)	GAS (SEQ ID NO: 87)	TLEDGVPS RFSGSGS TD FTLTIDSL QPDDFAT YYC (SEQ ID NO: 88)	QQ SHSPYT (SEQ ID NO: 89)	FGQ GTQLGIS (SEQ ID NO: 90)	SEQ ID NO: 83 (见图 20)	SEQ ID NO: 82 (见图 19)		
			V _H	EVQLVESG GGLIQPGG SLRLSCAA S (SEQ ID NO: 225)	GFLISSYF (SEQ ID NO: 226)	MSWVRQA PGKGPEW VSV (SEQ ID NO: 227)	IYSDGST (SEQ ID NO: 228)	YYVDSVKG RFTISTDN SKNTLYLQ MNSLRAE DTARYY (SEQ ID NO: 229)	CATRHLNY DGDHW (SEQ ID NO: 230)	GQGTLLTV SSASTK (SEQ ID NO: 175)	SEQ ID NO: 222 (见图 45)	SEQ ID NO: 221 (见图 44)	
				V _L	DVVMTQS PLSLPVTL GQPASISC RSS (SEQ ID NO: 231)	QSLV _H SDG NTY (SEQ ID NO: 232)	LNWFHQR PGQSPRRL IY (SEQ ID NO: 233)	KVS (SEQ ID NO: 234)	KRDSGVP DRFSGSGS GSDFTLKI SRVEAED VGIYY (SEQ ID NO: 235)	CMQGTTHW PTF (SEQ ID NO: 236)	GQGTKEI KRTVAA (SEQ ID NO: 237)	SEQ ID NO: 224 (见图 47)	SEQ ID NO: 223 (见图 46)

* 序列包括与所示序列具有(至少具有) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%和/或 100%序列同一性的序列或变体。

** 序列能够包含 1、2、3、4、5 个, 少于 5 个, 或少于 10 个保守氨基酸修饰。

序列包括该序列或与所示序列具有(至少具有) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98, 99%和/或 100%序列同一性(例如在对应于 FR1, FR2, FR3 和/或 FR4 的区域内)的变体, 和/或在对应于 CDR1, 2 和/或 3 的区

[0119]

域内具有 1、2、3、4、5 个，或少于 5 个，或少于 10 个保守氨基酸修饰。

^{##}序列包括与所示序列具有(至少具有) 80%，85%，90%，95%，96%，97%，98，99%和/或 100%序列同一性的序列或变体，其中序列编码相应的 AA。

A.A.[#] 显示 V_H 或 V_L 氨基酸序列。

核酸^{##} 显示 V_H 或 V_L 核酸序列。

尽管上面显示了 CDR 和 FR 区，但是这些区域也可以根据 Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991))加以定义。抗体或抗原结合片段的氨基酸编号也可以根据 Kabat 的编号。

[0120] 在一些情况下，治疗组合物可以包括肽，包括例如抗体，包括全长和/或完整抗体，或抗体片段。“抗体”是一种能够通过位于免疫球蛋白分子可变区内的至少一个抗原识别位点特异结合靶标(例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文中

所使用的,术语“抗体”不仅包括完整多克隆或单克隆抗体,还包括其任何抗原结合片段(例如“抗原结合部分”)或单链,包含抗体的融合蛋白,和包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构象。抗体包括任何类型的抗体,例如IgG, IgA, 或IgM(或其亚类),抗体不必是任何特殊的类别。根据其重链恒定区的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分类成不同的类别。有五种主要的免疫球蛋白类别:IgA, IgD, IgE, IgG, 和IgM,其中的多个可以被进一步分成亚类(同种型(isotype)),例如IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1和IgA2。对应于不同类别免疫球蛋白的重链恒定区被分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚单位结构和三维构象是众所周知的。抗体和抗体片段的实例包括,但不仅限于,单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、由至少两种不同的表位结合片段形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、骆驼化(camelised)抗体、嵌合抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、单域抗体、域抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、显示期望生物活性的抗体片段(例如抗原结合部分)、二硫键连接的Fv(dsFv)、和抗独特型(抗Id)抗体(包括例如,抗本发明抗体的抗-Id抗体)、细胞内抗体(intrabodies),和上述任一的表位结合片段。抗体或抗体片段可以是人的或人源化的。

[0121] 抗体的片段适合于在本方法中使用,只要它们保持全长抗体的期望亲和性和特异性即可。因此,抗-MICA抗体或抗-促血管发生素抗体的片段在Fv部分中将分别保持结合MICA或促血管发生素的能力,并在Fc部分中保持结合树突细胞上Fc受体的能力。这些片段的特征是具有与相应全长抗-MICA抗体或抗促血管发生素抗体相似的性质,也就是说,片段可以分别特异性结合在人细胞表面上表达的人MICA抗原或促血管发生素抗原,或已经脱落到介质中的相应sMICA抗原。

[0122] Fv片段是含有完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密缔合的一条重链可变区和一条轻链可变区的二聚体构成,所述缔合在天然状态下,例如在ScFv中,可以是共价的。在该构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用,在V_H-V_L二聚体的表面上限定一个抗原结合位点。总体上,6个CDR,或它们的子集,为抗体提供了抗原结合特异性。然而,甚至单个可变结构域(或仅包含三个特异针对某抗原的CDR的半个Fv)也能够具有识别和结合抗原的能力,尽管通常其亲和力比完整的结合位点要低。

[0123] 单链Fv或(scFv)抗体片段包括抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链上。一般地,Fv多肽进一步包括位于V_H和V_L结构域之间的多肽接头,使得scFv能够形成用于抗原结合的期望结构。

[0124] Fab片段含有轻链的可变和恒定结构域和重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab')₂抗体片段包括一对Fab片段,它们一般在其羧基端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸共价连接在一起。抗体片段的其它化学偶联在本领域也是已知的。

[0125] 双抗体是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包括在相同多肽链中连接在一起的V_H和V_L(V_H和V_L)。通过使用非常短以致于相同链上的两个结构域之间无法形成配对的接头,结构域被强迫与另一条链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点。

[0126] 线性抗体包括一对串联的Fd片段(V_H-CH1-V_H-CH1),它们与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0127] 本公开的抗体和抗体片段可以在Fc区被修饰,从而提供期望的效应物功能或血清半衰期。在一些情况下,Fc区能够偶联PEG或白蛋白,以增加血清半衰期,或者其它可导致期

望效果的偶联。可选择地,当期望消除或降低效应物功能,以便使副作用或治疗并发症最小化时,可以使用某些其它的Fc区。

[0128] 人和人源化抗体包括具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区(或具有与来自人种系免疫球蛋白序列的抗体相同的氨基酸序列)的抗体。人抗体包含(例如,在CDR中、特别是CDR3中包含)不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点突变或体内体细胞突变所引入的突变)。

[0129] 可变区的“CDR”是超变区内的氨基酸残基,其根据Kabat、Chothia、Kabat和Chothia的累加、AbM、接触和/或构象定义或任何本领域众所周知的CDR确定方法加以鉴定。抗体CDR可以被鉴定为最初由Kabat等定义的超变区。见例如Kabat et al.,1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.。CDR的位置也可以被鉴定为最初由Chothia等人描述的结构环结构。见例如Chothia et al.,1989, *Nature* 342:877-883。其它CDR鉴定方法包括“AbM定义”,其是Kabat和Chothia方法的折中方法,并使用Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(现在是 **Accelrys®**)生成,或者根据所观察到的抗原接触进行的CDR的“接触定义”,其在MacCallum et al.,1996, *J.Mol.Biol.*, 262:732-745中提出。在另一个方法中,在本文中被称作CDR的“构象定义”,CDR的位置可以被鉴定为对抗原结合具有焓贡献的残基。见例如Makabe et al.,2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166。另外的CDR边界可以不是严格遵循上述的某一方法定义,但是仍然会与Kabat CDR的至少一部分重叠;尽管根据预测或实验发现,具体的残基或残基的基团或者甚至整个CDR对抗原结合没有显著影响,可以对它们进行延长或缩短。如本文中所使用的,CDR可以是指通过本领域已知的任何方法,包括方法组合,定义的CDR。本文中所用的方法可以使用根据任何这些方法定义的CDR。对于任何给定的包含超过1个CDR的实施例,CDR可以根据Kabat、Chothia、扩展、AbM、接触、和/或构象定义中的任一个加以定义。

[0130] 在一些情况下,本文中公开的肽的氨基酸序列可以被修饰和改变,以产生例如肽变异体(例如与本文中所公开的肽具有限定的同源性的序列的肽),只要该肽变异体的抗原结合性质被保留,或者与未经修饰的肽相比有所提高即可(任何被修饰肽的抗原结合性质均可以使用本文中描述的和/或本领域已知的技术通过体外和/或体内测定进行评估)。

[0131] 尽管肽变异体一般在氨基酸水平被观察和讨论,但是实际的修饰通常在核酸水平引入或实施。例如,与表1所示肽具有80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%氨基酸序列同一性的变异体,可以通过用本领域已知的和/或本文中公开的技术(例如克隆技术)对编码SEQ ID NOs:1,10,19,28,37,46,55,64,73和/或82的核酸进行修饰加以产生。

[0132] 氨基酸序列修饰通常可以属于三种类型中的一种或多种:替换、插入或删除修饰。插入包括氨基和/或末端融合以及序列内插入单个或多个氨基酸残基。插入通常是比氨基端或羧基端融合更小的插入,例如1-4个残基的量级。删除的特征是从蛋白序列中除去一个或多个氨基酸残基。典型地,在蛋白分子内的任何一个位置处删除不超过大约2-6个残基。氨基酸替换通常是单个残基替换,但是也可以同时多个不同位置发生;插入通常处于大约1-10个氨基酸残基的量级;删除的范围是大约1-30个残基。删除或插入可以是邻近成对的插入或删除,即二残基删除或二残基插入。替换、删除、插入或其任意组合可以组合使用,以获得最终的构建体。突变不可导致序列的阅读框错误,优选地不会产生可能导致二级

mRNA结构产生的互补区。替换修饰是指除去至少一个残基,并在其位置上插入不同的残基。在一些情况下,替换可以是保守的氨基酸替换。在一些情况下,本文中肽与表1所示的肽相比,可以包含1个或多个保守氨基酸替换。例如,变异体与表1所示的肽相比,可以包含1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,20-30,30-40,或40-50个保守氨基酸替换。可选择地,变异体与表1所示的肽相比,可以包含50个或更少的、40个或更少的、30个或更少的、20个或更少的、10个或更少的、9个或更少的、8个或更少的、7个或更少的、6个或更少的、5个或更少的、4个或更少的、3个或更少的、2个或更少的保守氨基酸替换。这些替换一般根据下面的表2实现,并被称作保守替换。用于预测蛋白对修饰的耐受性的方法是本领域已知的(见例如Guo et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,101(25):9205-9210(2004))。

[0133] 表2:保守氨基酸替换

氨基酸	替换 (其它在本领域已知)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
[0134] Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
[0135] Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[0136] 在一些情况下,替换不是保守的。例如,表1所示肽中的一个氨基酸可以被可能改变肽的一些性质或方面的氨基酸替换。在一些情况下,可进行非保守氨基酸替换以便,例如,改变肽的结构,改变肽的结合性质(例如增加或降低肽与抗原的结合亲和力,和/或增加

或降低肽与抗原的结合特异性)。

[0137] 在一些情况下,肽和/或肽变异体可以包含或者可以是表1所示肽的片段。这样的片段可以比表1所示的CDR、FR和/或AA少,例如,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,50-100,101-150个氨基酸,只要该片段仍至少保持全长肽的一部分结合性质即可(例如全长肽的至少50%,60%,70%,80%,90%,或100%的结合性质)。截短可以在本文肽的氨基、羧基和/或内部进行。

[0138] 在一些情况下,肽变异体的相互作用面可以和未经修饰的肽相同(例如基本上相同),例如与未经修饰的肽相比,改变(如增加或降低)、保留、或保持肽变异体的结合性质。用于鉴定肽相互作用面的方法是本领域已知的(Gong et al.,BMC:Bioinformatics,6:1471-2105(2007);Andrade and Wei et al.,Pure and Appl.Chem.,64(11):1777-1781(1992);Choi et al.,Proteins:Structure,Function,and Bioinformatics,77(1):14-25(2009);Park et al.,BMC:and Bioinformatics,10:1471-2105(2009))。

[0139] 本领域的技术人员会容易理解如何确定两条多肽(例如未经修饰的肽和肽变异体)的同一性。例如,可以在将两条序列进行比对从而使其同一性达到最高水平之后,计算同一性。另一种计算同一性的方法是通过公开的算法实施。用于比较的最佳序列比对,可以通过Smith and Waterman,Adv.Appl.Math,2:482(1981)的局部同一性算法,通过Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同一性比对算法,通过Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:2444(1988)的搜索相似度方法,通过这些算法的计算机实现(Genetics Computer Group(575Science Dr.,Madison,WI)的Wisconsin遗传学软件包中的GAP,BESTFIT,FASTA,和TFASTA),或通过目测来急性。

[0140] 通过例如Zuker,Science244:48-52(1989);Jaeger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:7706-10(1989);Jaeger et al.,Methods Enzymol.183:281-306(1989)中公开的算法,可以为核酸获得相同类型的同一性,本文引用其至少与核酸比对相关的材料作为参考。可以理解,通常任何方法均可以使用,并且在某些情况下,这些不同方法的结果可能不同,但是技术人员会理解,如果使用这些方法中的至少一种时发现同一性,则该序列可以被称作具有所述的同一性,并在本文中被公开。

[0141] 在一些情况下,如在下文方法部分将详细描述,本文中公开的治疗组合物可以使用从通过本文中公开的方法获得的免疫细胞(例如B细胞,包括记忆B细胞)分离和/或纯化的遗传材料(例如DNA和/或RNA)加以制备。一旦获得了这些遗传材料,则使用它们产生本文中公开的治疗组合物的方法是本领域已知的,和/或在下文中有总结。

[0142] 在一些情况下,肽可以包含可检测标记物。如本文中所使用的,“标记物”是指如下的部分,该部分中具有至少一种掺入其中的元素、同位素或功能团,其能够使该标记物所附着的肽被检测。标记物可以是直接附着的(即通过化学键),或者是通过接头(例如环状或非环状、有分枝或无分枝、取代或未取代的亚烷基;环状或非环状、有分枝或无分枝、取代或未取代的亚烯基;环状或非环状、有分枝或无分枝、取代或未取代的亚炔基;环状或非环状、有分枝或无分枝、取代或未取代的杂亚烷基(heteroalkylene);环状或非环状、有分枝或无分枝、取代或未取代的杂亚烯基(heteroalkenylene);环状或非环状、有分枝或无分枝、取代或未取代的杂亚炔基(heteroalkynylene);取代或未取代的亚芳基(arylene);取代或未取

代的杂亚芳基(heteroarylene);或取代或未取代的亚酰基(arylene),或其任何能够形成接头的组合)附着的。标记物可以附着在肽的任何位置处,只要其不会干扰所检测的本发明多肽的生物活性或特征即可。

[0143] 标记物可以包括:含有同位素部分的标记物,同位素部分可以是放射性同位素或重同位素,包括但不限于, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc-99m), ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{169}Yb ,和 ^{186}Re ;包含免疫或免疫反应性部分的标记物,免疫或免疫反应性部分可以是抗体或抗原,抗体或抗原可以和酶(例如辣根过氧化物酶)结合;有色、发光、磷光或包含荧光部分(例如荧光标记物FITC)的标记物;具备拥有一个或多个光亲和部分的标记物;具有一种或多种已知结合配偶的配体部分(例如生物素-链亲和素、FK506-FKBP等)的标记物。

[0144] 在一些情况下,标记物可以包含一种或多种光亲和部分,用于直接阐明生物系统内的分子间相互作用。可以采用多种已知的发光团(photophore),它们大多数依赖重氮化合物、叠氮化物、或双吡丙啉(diazirine)向氮烯或碳烯的光转化(见例如Bayley,H.,*Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology*(1983),Elsevier,Amsterdam,本文引用其全部内容作为参考)。在本发明某些的实施方案中,所用的光亲和标记物是含有一个或多个卤素取代的邻-、间-和对-叠氮苯甲酰(azidobenzoyl),包括但不限于,4-叠氮-2,3,5,6-四氟苯甲酸。

[0145] 标记物还可以是或者可以作为成像剂。成像剂的实例包括,但不限于,在正电子发射计算断层扫描(PET)、计算机辅助断层扫描(CAT)、单光子发射计算断层扫描、X-射线、荧光透视检查(fluoroscopy)、和磁共振成像(MRI);抗呕吐药(anti-emetics);和造影剂。诊断剂的实例包括,但不限于,荧光部分、发光部分、磁性部分、钆螯合物(例如钆与DTPA,DTPA-BMA,DOTA和HP-D03A的螯合物)、铁螯合物、镁螯合物、锰螯合物、铜螯合物、铬螯合物、用于CAT和x-射线成像的碘基材料、和放射性核素。合适的放射性核素包括,但不限于, ^{123}I , ^{125}I , ^{130}I , ^{131}I , ^{133}I , ^{135}I , ^{47}Sc , ^{72}As , ^{72}Se , ^{90}Y , ^{88}Y , ^{97}Ru , ^{100}Pd , ^{101}mRh , ^{119}Sb , ^{128}Ba , ^{197}Hg , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{67}Cu , ^{75}Br , ^{77}Br , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{14}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{32}P , ^{33}P ,和 ^{18}F 。

[0146] 荧光和发光部分包括,但不限于,各种统称为“染料”、“标签”或“指示剂”的不同有机或无机小分子。实例包括,但不限于,荧光素、若丹明、吡啶染料、Alexa染料、花青染料等。荧光部分和发光部分可以包含多种天然存在的蛋白或其衍生物,例如遗传工程变异体。例如,荧光蛋白包括绿色荧光蛋白(GFP),增强的GFP,红色、蓝色、黄色、青色和蓝宝石色荧光蛋白,珊瑚礁荧光蛋白,等。发光蛋白包括荧光素酶、水母发光蛋白及其衍生物。本领域已知有多种的荧光和发光染料和蛋白质(见例如美国专利公开2004/0067503;Valeur,B.,*Molecular Fluorescence:Principles and Applications*,John Wiley and Sons,2002;和Handbook of Fluorescent Probes and Research Products,Molecular Probes,第9版,2002)。

[0147] 如本文中所使用的,术语“纯化的”是指已经被鉴定并与其自然环境组分分离和/或从其自然环境组分被回收的其它分子,如多肽、核酸分子。因此,在一个实施方案中,本发明的抗体是纯化的抗体,其中它们已经与其自然环境的一种或多种组分分离。

[0148] 如本文中所使用的,术语“表位”是指能够结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖侧链构成,并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在去污剂存在下,与前者的结合丧失,

而后者不会丧失。

[0149] 在一些情况下,本公开提供了对应于(例如编码)所公开的肽(例如表1中公开的肽)的核苷酸序列。这些序列包括与所公开肽相关的所有简并序列,即具有编码某个特定肽或其变异体或衍生物的序列的所有核酸。因此,尽管本文中可能没有写出每个具体的核酸序列,但是应当理解,通过所公开的多肽序列,本文中实际上公开和描述了任何一个序列。

[0150] 在一些情况下,所公开的核酸可以包括表达载体。合适的载体的实例包括,但不仅限于,质粒、人工染色体,例如BAC、YAC或PAC,和病毒载体。

[0151] 所提供的载体还可以包括,例如,复制原点和/或标志物。标志物基因可以为细胞提供一种可选择的表型,例如抗生素抗性。标志物产物用于确定该载体是否被输送到细胞内,以及一旦被输送到细胞内是否正在被表达。用于哺乳动物细胞的可选择标志物的实例是二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、潮霉素、嘌呤霉素和杀稻瘟素。当这些可选择标记被成功转移到哺乳动物宿主细胞中时,被转化的哺乳动物宿主细胞当被置于选择压力下时能够存活。其它标记的实例包括,例如,大肠杆菌lacZ基因、绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶。此外,表达载体可以包括旨在便于操作或检测(例如纯化或定位)被表达多肽的标签序列。标签序列,如GFP、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、多聚组氨酸、c-myc、血凝素或FLAGTM标签(Kodak;New Haven,CT)序列,通常被表达作为与所表达多肽的融合物。这些标签可以被插入在多肽的任何位置,包括羧基端或氨基端。

[0152] 在一些情况下,本公开包括含有本文中所公开核酸(例如载体)和/或肽的细胞。细胞可以包括,例如,真核和/或原核细胞。一般地,能够在本文中使用的细胞可以从例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)(P.O.Box1549,Manassas,VA20108)商业获得。另见F.Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,NY,(1998)。可用于产生本文中所公开的细胞的转化和转染方法在例如F.Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,NY,(1998)中有描述。

[0153] 药物制剂

[0154] 在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以包括其它用于治疗癌症的化合物、药物和/或试剂。这些化合物、药物和/或试剂可以包括,例如,刺激针对给定癌症的免疫应答的化疗药、小分子药物或抗体。在一些情况下,治疗组合物可以包括,例如,本文中公开的一种或多种肽和如下的一种或多种:抗-CTLA-4抗体或肽、抗-PD-1抗体或肽、和/或抗-PDL-1抗体或肽。例如,在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以和一种或多种(例如1、2、3、4、5或少于10种)化合物组合。

[0155] 在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以包括其它的化合物,包括组蛋白去乙酰化酶抑制剂(“HDAC”)抑制剂。HDAC抑制剂的实例包括,例如,异羟肟酸、伏立诺他(Vorinostat)(Zolinza)、辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)(Merck)、曲古抑菌素(Trichostatin A)(TSA)、LAQ824(Novartis)、帕比司他(Panobinostat)(LBH589)(Novartis)、Belinostat(PXD101)(CuraGen)、ITF2357(Italfarmaco SpA(Cinisello)、环四肽;Depsipeptide(罗米地辛(romidepsin), FK228)(Gloucester Pharmaceuticals)、苯甲酰胺;恩替诺特(Entinostat)(SNDX-275/MS-275)(Syndax Pharmaceuticals)、MGCD0103(Celgene)、短链脂肪族酸、丙戊酸(Valproic

acid)、丁酸苯酯、AN-9、pivanex(Titan Pharmaceutical)、CHR-3996(Chroma Therapeutics)和CHR-2845(Chroma Therapeutics)。

[0156] 在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以包括其它化合物,包括蛋白酶体抑制剂,包括例如Bortezomib(Millennium Pharmaceuticals)、NPI-0052(Nereus Pharmaceuticals)、Carfilzomib(PR-171)(Onyx Pharmaceuticals)、CEP18770和MLN9708。

[0157] 在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以包括烷化剂如美法仑(Mephalan),并且拓扑异构酶抑制剂如阿霉素(Adriamycin)(多柔比星)已经显示可提高MICA表达,这可以提高抗-MICA单克隆抗体的效力。

[0158] 在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以配置为药物组合物或者供药物组合物中使用。这些组合物可以配置为或者调适为供通过任何路径,例如由美国食品药品监督管理局(FDA)批准的任何路径,施用给受试者。方法的实例在FDA的CDER标准数据手册,004版(CDER Data Standards Manual,version number004)(其可以在fda.give/cder/dsm/DRG/drg00301.htm获得)中有描述。

[0159] 在一些情况下,药物组合物可以包括有效量的一种或多种肽。如本文中所使用的,术语“有效量”和“治疗有效的”是指一种或多种肽在一定时间内(包括急性或慢性施用,和周期性或连续施用)内能够在其施用的具体情形下导致预期的效果或生理结果的量或浓度。

[0160] 在一些情况下,药物组合物可以包括一种或多种肽和任何可药用的载体、佐剂和/或媒介(vehicle)。在一些情况下,药物可以还包括一种或多种额外的治疗剂,所述治疗剂的量对实现疾病或疾病症状的调节是有效的。

[0161] 术语“可药用的载体或佐剂”是指可以和本发明肽一起施用给患者的载体或佐剂,它们不会破坏本发明肽的药理活性,并且在施用足以输送治疗量的化合物的剂量下没有毒性。

[0162] 可以在本发明的药物组合物中使用的可药用的载体、佐剂和媒介包括,但不限于,离子交换剂,氧化铝,硬脂酸铝,卵磷脂,自乳化药物输送系统(SEDDES)如D- α -生育酚琥珀酸聚乙二醇1000琥珀酸酯,在药物剂型中使用的表面活性剂如吐温或其它类似的高分子输送基质,血清蛋白质如人血清白蛋白,缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾,饱和植物油脂肪酸的偏甘油酯混合物,水,盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、氯化钠、锌盐,胶体二氧化硅,硅酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,纤维素类物质,聚乙二醇,羧甲基纤维素钠,聚丙烯酸酯,蜡,聚乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,聚乙二醇和羊毛脂。也可以有利地使用环糊精如 α -、 β -、和 γ -环糊精,用以提高本文中所述剂型化合物的输送。

[0163] 本发明的药物组合物可以含有任何常规的无毒药物可接受载体、佐剂或媒介。在一些情况下,制剂的pH可以用可药用的酸、碱或缓冲液调节,以提高制剂化合物或其输送形式的稳定性。如本文中所使用的,术语“胃肠外”包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0164] 药物组合物可以处于溶液或粉末形式,用于吸入和/或经鼻给药。这些组合物可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂(例如吐温80)和悬浮剂加以制备。无菌的可注射制备物也可以是用无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂制备的无菌可注射溶液或悬浮液,例如1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受媒介和溶剂包括甘露醇、水、林格

氏溶液和等张氯化钠溶液。此外,无菌不挥发油在传统上用作溶剂或悬浮介质。为了这个目的,任何品牌的不挥发油均可使用,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。脂肪酸,例如油酸及其甘油衍生物,可用于制备注射剂,同样可以使用天然的可药用的油,例如橄榄油或蓖麻油,特别是它们的聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可以含有长链醇稀释剂或分散剂,或者通常在制备可药用的剂量形式例如乳液和/或悬浮液时使用的羧甲基纤维素或类似的分散剂。为了制剂的目的,也可以使用其它通常使用的表面活性剂,例如吐温或司盘(Span),和/或其它在制造可药用的固体、液体或其它剂量形式时通常使用的类似的乳化剂或生物利用度增强剂。

[0165] 药物组合物能够以任何经口可接受的剂量形式经口给药,包括但不限于,胶囊、药片、乳剂和水悬浮液、分散液和溶液。在使用药片用于经口给药时,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还会添加润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的经口给药,可用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当经口给予水成悬浮液和/或乳剂时,活性成分可以被悬浮或溶解在油相中,并与乳化剂和/或悬浮剂组合。如果需要,可以添加某些甜味剂和/或芳香剂和/或着色剂。

[0166] 或者/并且,药物组合物可以通过鼻喷雾(nasal aerosol)或吸入给药。这些组合物的制备是根据药物制剂领域众所周知的技术,并可以被制备成生理盐水溶液,采用苯甲醇或其它合适的防腐剂,用以提高生物利用度的吸附促进剂,碳氟化合物,和/或其它本领域已知的助溶剂或分散剂。

[0167] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在如下的方法中使用本文中所公开的一种或多种肽或药物组合物(下文指示为“X”)的方法:

[0168] 用作治疗一种或多种本文中所公开的状况或疾病(例如癌症,下面的实施例中称作“Y”)的药物的物质X。物质X制备用于治疗Y的药物的用途;和用于治疗Y的物质X。

[0169] 在一些情况下,本文中公开的治疗组合物可以被制备用于在美国销售,进口到美国,和/或从美国出口。

[0170] 方法

[0171] 在一些情况下,方法可以包括选择患有或者曾经患有状况或疾病、并对该状况或疾病显示或曾经显示阳性免疫应答的人类受试者。在一些情况下,合适的受试者包括,例如,患有或曾经患有状况或疾病、但已解决该疾病或其某个方面,显示减轻的疾病症状(例如与其它患有相同状况或疾病的受试者(例如大部分受试者)相比),和/或携带该状况或疾病(例如与其它患有相同状况或疾病的受试者(例如大部分受试者)相比)存活了更长时间,例如无症状状态(例如与其它患有相同状况或疾病的受试者相比(例如大部分受试者))的受试者。在一些情况下,如果受试者已经接种了针对该状况或疾病的疫苗(例如先前已经接种疫苗和/或接种和再接种疫苗(例如接受了加强疫苗(booster vaccine))),则该受试者可以被选择。

[0172] 如本文中所使用的,术语“受试者”是指任何动物。在一些情况下,受试者是哺乳动物。在一些情况下,如本文中所使用的,术语“受试者”是指人(例如男人、女人或小孩)。用于在方法中使用的样品可以包括血清样品,例如从所选受试者获得的血清样品。

[0173] 在一些情况下,受试者选择可以包括从受试者(例如候选受试者)获得样品,并检测样品是否具有受试者适合被选择的指征。在一些情况下,受试者可以被确认或鉴定(例如

由医疗保健专业人员确认或鉴定)为曾经患有或现在患有某种状况或疾病。在一些情况下,可以根据患者记录、家族历史、和/或检测阳性免疫应答的指征,来显示针对某种状况或疾病的阳性免疫应答。在一些情况下,受试者的选择可以有多方参与。例如,可以由第一方从候选受试者获得样品,由第二方检测样品。在一些情况下,受试者可以是医疗从业人员(例如全科医生)选择和/或安排的。在一些情况下,受试者选择可以包括从所选受试者获得样品,保存样品,和/或在本文中公开的方法中使用。样品可以包括,例如,细胞或细胞群体。

[0174] 在一些情况下,获得或靶定免疫细胞可以包括例如如下的一个或多个或其组合:获得或提供能够结合(例如特异性结合)靶免疫细胞的四聚体免疫原;使该四聚体免疫原与样品接触;检测该四聚体免疫原;确定该四聚体免疫原是否与靶免疫细胞结合;和如果四聚体免疫原与靶免疫细胞结合,则获得靶免疫细胞。

[0175] 四聚体免疫原可以包括与状况或疾病相关的和/或与靶免疫细胞结合(例如特异性结合)的免疫原,例如其中靶免疫细胞与选定的状况或疾病相关。与某种状况或疾病相关的免疫原和靶免疫细胞包括,例如,存在于患有某种状况或疾病的受试者体内、但不存在于没有该状况或疾病的受试者体内的免疫原或免疫细胞;和/或存在于与没有该状况或疾病的受试者相比,在某种状况或疾病方面的水平有所改变(例如增加)的受试者体内的免疫原或免疫细胞。在一些情况下,免疫原或免疫细胞可以是癌症特异性的。免疫原可以是可溶的。四聚体免疫原可以包括四聚体(包括例如四聚体化的单体、二聚体和/或三聚体抗原免疫原(例如抗原和/或表位)的)。在一些情况下,四聚体免疫原与非四聚体化形式的免疫原相比,在相同条件下,与细胞的结合水平增加。在一些情况下,四聚体免疫原包括可检测部分,例如链亲和素部分。四聚体化方法是本领域已知的,并在本文中公开。

[0176] 四聚体免疫原和/或四聚体免疫原是否与靶细胞结合,可以使用本领域已知的和/或本文中公开的方法来加以检测。例如,方法可以包括流式细胞术。用于流式细胞术的优化方法,包括分选和设门方法,是本领域已知的和/或在本文中公开。在一些情况下,方法可以包括分析四聚体免疫原与靶免疫细胞之间结合、结合亲和力、和/或结合特异性的水平。例如,当(例如仅当)确定四聚体免疫原与靶免疫细胞之间具有预定的结合水平时,能够获得靶免疫细胞。预定的结合水平可以是具体的水平,和/或可以是相对水平。获得靶免疫细胞包括获得、提供、鉴定、选择、纯化和/或分离靶免疫细胞。这些方法可以包括,例如,细胞分选方法、细胞富集、和/或背景降低。

[0177] 在一些情况下,获得针对自身抗原的免疫细胞可以包括例如如下的一者或多者和/或其组合:鉴定对自身抗原显示阳性免疫应答的受试者;获得或提供多聚体形式的自身抗原;使多聚体形式的自身抗原与来自对该自身抗原显示阳性免疫应答的受试者的样品接触;获得与多聚体形式的自身抗原结合的免疫细胞。

[0178] 在一些情况下,方法可以包括从癌症患者获得针对自身抗原的免疫细胞,可以包括例如如下的一者或多者和/或其组合:鉴定对自身抗原显示阳性免疫应答的受试者;提供多聚体形式的自身抗原;使多聚体形式的自身抗原与来自对该自身抗原显示阳性免疫应答的受试者的样品接触;和获得与多聚体形式的自身抗原结合的免疫细胞。

[0179] 多聚体形式的自身抗原可以包括与状况或疾病相关和/或结合(例如特异性结合)靶免疫细胞的自身抗原,例如其中靶免疫细胞与所选状况或疾病相关。与状况或疾病相关的自身抗原和靶免疫细胞包括,例如,存在于患有某种状况或疾病的受试者体内、但不存在

于没有该状况或疾病的受试者体内的抗原或免疫细胞;和/或存在于与没有该状况或疾病的受试者相比,在具有某种状况或疾病的受试者中的水平有所改变(例如增加)的免疫原或免疫细胞。在一些情况下,状况或疾病可以是癌症。在一些情况下,癌症是黑素瘤、肺癌、乳腺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌和结肠癌、淋巴瘤或白血病。在一些情况下,自身抗原或免疫细胞可以是癌症特异性的。自身抗原可以是可溶的。多聚体免疫原可以包括自身抗原(例如抗原和/或表位)的四聚体形式(包括例如四聚体化的单体、二聚体和/或三聚体抗原)。在一些情况下,多聚体形式的自身抗原包括可检测部分,例如链亲和素部分。多聚体化方法是本领域已知的,并在本文中公开。

[0180] 用于从所得靶免疫细胞分离或纯化遗传材料(例如DNA和/或RNA)的方法是本领域已知的并在本文中举例说明。一旦获得了这些遗传材料,使用它产生本文中所公开的治疗组合物的方法是技术上已知的和/或在下文中有总结。如上面讨论的,遗传材料可以使用本领域已知的技术加以改变,以产生本文中公开的肽变异体。

[0181] 自靶细胞中含有的或从靶细胞获得的核酸(例如cDNA)产生肽,可以包括例如分析,例如测序来自靶免疫细胞(例如单一或分离的已鉴定靶免疫细胞)的重链和轻链可变区。在一些情况下,方法可以包括产生完全的人抗体或其片段(例如上面讨论的),和人源化非人抗体。DNA可以使用传统规程(例如使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地从所得的免疫细胞分离和/或测序。

[0182] 一旦分离,便可以将DNA置于表达载体内,其然后被转染进入宿主细胞,例如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或自身不会产生抗体蛋白的骨髓瘤细胞,从而在重组宿主细胞内合成单克隆抗体。关于在细菌内重组表达编码抗体的DNA的综述文献包括Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)和Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188(1992)。

[0183] 抗体或其变异体的重组表达一般需要构建含有编码该抗体的多核苷酸的表达载体。因此,本发明提供了可复制的载体,其包含与启动子操作连接的编码抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变区或其一部分、或重链或轻链CDR的核苷酸序列。这些载体可以包括编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(见例如美国专利Nos. 5,981,216; 5,591,639; 5,658,759和5,122,464),并且可以将抗体的可变域克隆到这种载体中,用于表达整个重链、整个轻链、或同时表达完整的重链和轻链。

[0184] 一旦通过传统技术将表达载体转移到宿主细胞内,即通过常规技术培养转化细胞以产生抗体。因此,本发明包括含有与异源启动子操作连接的编码本发明抗体或其片段、或其重链或轻链、或其一部分、或本发明单链抗体的多核苷酸。在用于表达双链抗体的某些实施方案中,可以在宿主细胞内共表达编码重链和轻链二者的载体,用于表达完整的免疫球蛋白分子,如下文所详述的。

[0185] 可获得作为表达重组抗体的宿主的哺乳动物细胞系是本领域众所周知的,并且包括许多可以从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系,包括但不限于,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾(COS)细胞、人肝细胞癌细胞(例如HepG2)、人肾上皮细胞293细胞和若干其它的细胞系。不同宿主细胞在翻译后加工和蛋白和基因产物的修饰方面具有独特和具体的机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统,以确保所表达抗体或其部分的正确修饰和加工。为此,可以使用真核宿主细胞,其具有用于

正确加工最初转录本、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制。这些哺乳动物宿主细胞包括,但不仅限于,CHO,VERY,BHK,HeLa,COS,MDCK,293,3T3,W138,BT483,Hs578T,HTB2,BT20和T47D,NS0(一种不会内源产生任何有功能的免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系),SP20,CRL7030和HsS78Bst细胞。在一个实施方案中,可以使用通过使人淋巴细胞永生化而开发出的人细胞系,用于重组产生单克隆抗体。在一个实施方案中,可以使用人细胞系PER.C6.(Crucell,Netherlands)重组产生单克隆抗体。

[0186] 在一些情况下,本文中公开的肽可以合成产生。可用于合成本文中所述肽的合成化学改性(transformation)和保护基团方法学(保护和去保护)是本领域已知的,并且包括,例如,在下列文献中描述的方法:R.Larock,Comprehensive Organic Transformations,VCH Publishers(1989);T.W.Green and P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,第3版,John Wiley and Sons(1999);L.Fieser and M.Fieser,Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1994);和L.Paquette编辑,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1995),和其后续版本。

[0187] 肽还可以通过化学合成方法制备,这是普通技术人员众所周知的。见例如Fields等,Chapter 3 in Synthetic Peptides: A User's Guide,ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, 第77页。因此,肽可以在例如430A或431型Applied Biosystems肽合成仪上使用自动化Merrifield固相合成技术合成,用侧链被保护的氨基酸通过t-Boc或Fmoc化学保护 α -NH₂。

[0188] 一种制造本文中所述肽的方式是使用固相肽合成(SPPS)。C端氨基酸用接头分子通过酸不稳定的化学键附着到交联的聚苯乙烯树脂上。该树脂在用于合成的溶剂中是不溶的,这样就能够相对简单而快速地冲洗掉过量的试剂和副产物。N端用Fmoc基团保护,该基团在酸中是稳定的,但是可以被碱除去。任何侧链功能基团用碱稳定但酸不稳定的基团保护。

[0189] 至于更长的肽,可以使用自然化学连接通过联合单独合成的肽来制备。可选择地,可以通过众所周知的重组DNA技术合成更长的合成肽。这些技术的详细规程在众所周知的标准手册中有提供。为了构建编码本发明肽的基因,将氨基酸序列逆向翻译,以获得编码该氨基酸序列的核酸序列,优选地对密码子进行优化,以适应待表达该基因的生物体。接着,制备合成基因,这通常是合成编码肽和(如果必需的话)任何调节元件的寡核苷酸。将合成基因插入到合适克隆载体内,并转染进入宿主细胞。然后在合适的适合于所选表达系统和宿主的条件下表达肽。通过标准方法对肽进行纯化和表征。

[0190] 肽可以以高通量、组合方式制备,例如使用可以从Advanced Chemtech获得的高通量多通道组合合成仪。

[0191] 肽键可以被如下的化学键替换以便,例如,提高肽的生理稳定性:逆-反键(retro-inverso bond)(C(O)-NH);还原的酰胺键(NH-CH₂);硫代亚甲基键(S-CH₂或CH₂-S);氧代亚甲基键(O-CH₂或CH₂-O);乙烯键(CH₂-CH₂);硫代酰胺键(C(S)-NH);反式-烯键(CH=CH);氟取代的反式-烯键(CF=CH);酮亚甲基键(C(O)-CHR)或CHR-C(O),其中R是H或CH₃;和氟-酮亚甲基键(C(O)-CFR或CFR-C(O),其中R是H或F或CH₃。

[0192] 肽可以进一步被如下修饰:乙酰化、酰胺化、生物素化、肉桂酰化、法尼基化、荧光

素化、甲酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、磷酸化(Ser、Tyr或Thr)、硬脂酰化、琥珀酰化和磺酰化。如上所述,肽可以偶联于,例如,聚乙二醇(PEG);烷基(例如C1-C20直链或分枝烷基);脂肪酸残基;及其组合。

[0193] 在一些情况下,肽可以通过任何本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的方法进行纯化,例如通过色谱(例如离子交换色谱,亲和色谱,特别是对特定抗原蛋白A或蛋白G的亲和色谱,和大小排阻柱色谱)、离心、差异溶解度,或通过任何其它用于纯化蛋白的标准技术。进一步,本发明的抗体或其片段可以和上文描述的或本领域已知的异源多肽序列(本文中称作“标签”)融合,以便于纯化。

[0194] 图21显示了一个示例性、非限制性的方法概览。不暗含次序。

[0195] 使用方法

[0196] 在一些情况下,本公开提供了治疗方法,其包括向受试者施用本文中公开的组合物。

[0197] 本文中提供了用于治疗 and/或预防受试者体内癌症或癌症症状的方法,包括向受试者施用治疗有效量的、包含与MHC I类多肽相关序列A(MICA)免疫特异性结合的肽的组合物,其中肽包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1,6,7,8或9的V_H的互补决定区(CDR),和具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID1,6,7,8或9的V_L的CDR3。在一些实施方案中,癌症是与MICA过表达相关的癌症。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、肺癌、乳腺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌和结肠癌、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是浆细胞恶性肿瘤,例如多发性骨髓瘤(MM)或浆细胞恶变前状态。在一些实施方案中,受试者被诊断患有癌症或者有患癌症的倾向。

[0198] 在一些情况下,本公开提供了用于治疗 and/或预防受试者体内癌症或癌症症状的方法,包括向受试者施用治疗有效量的、包含与MHC I类多肽相关序列A(MICA)特异性结合的分离合体的组合物,其中所述抗体包含:重链可变区(V_H),其包含SEQ ID NO:11,149,168,186或204的V_H序列所示的V_H CDR1,V_H CDR2,和V_H CDR3;和SEQ ID No:4,151,170,189或206的轻链可变区(V_L)序列。

[0199] 本文中还提供了用于治疗 and/或预防受试者体内癌症或癌症症状的方法,包括向受试者施用治疗有效量的、与促血管发生素免疫特异性结合的肽,其中肽包含具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2,3,4或5或10的V_H的互补决定区(CDR),和具有5个或更少的保守氨基酸替换的表1所示的抗体ID2,3,4或5的V_L的CDR3。在一些实施方案中,癌症是与MICA过表达相关的癌症。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤、肺癌、乳腺癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌和结肠癌、淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,癌症是黑素瘤。在一些实施方案中,癌症是浆细胞恶性肿瘤,例如多发性骨髓瘤(MM)或浆细胞恶变前状态。在一些实施方案中,受试者被诊断患有癌症或者有患癌倾向。

[0200] 在一些情况下,本公开提供了用于治疗 and/或预防受试者体内癌症或癌症症状的方法,包括向受试者施用治疗有效量的、包含与促血管发生素(例如促血管发生素-2)特异性结合的分离合体的组合物,其中所述抗体包含:重链可变区(V_H),其包含SEQ ID NO:20,38,56,74,222的V_H序列所示的V_HCDR1,V_H CDR2,和V_H CDR3;和29,47,65,83,或224的轻链可变区(V_L)序列。

[0201] 癌症的症状是本领域技术人员众所周知的,并且包括,但不仅限于,不常见的痣(mole)特征,痣的外形改变,包括不对称、边界(border)、颜色和/或直径(diameter)的变化,新着色的皮肤区域,异常的痣,指/趾甲(nail)下暗区域,乳房肿块,乳头变化,乳房囊肿,乳房疼痛,死亡,体重减轻,虚弱,过度疲劳,进食困难,食欲不振,长期咳嗽,呼吸困难,咳血,尿中带血,便血,恶心,呕吐,肝转移,肺转移,骨转移,腹满,腹胀,腹腔积液,阴道出血,便秘,腹胀,结肠穿孔,急性腹膜炎(感染、发烧、疼痛),疼痛,呕血,大量出汗,发热,高血压,贫血,腹泻,黄疸,头晕,寒战,肌肉痉挛,结肠转移,肺转移,膀胱转移,肝转移,骨转移,肾脏转移,和胰腺转移,吞咽困难,等。

[0202] 本文中公开的方法能够应用于多种物种,例如人、非人灵长动物(例如猴)、马、牛、猪、绵羊、鹿、麋鹿、山羊、狗、猫、鼬科动物、家兔、豚鼠、仓鼠、大鼠和小鼠。

[0203] 如本文中所使用的,术语“治疗”是指部分或完全消除、抑制、减轻和/或缓解受试者所罹患的状况或疾病。在一些情况下,治疗可导致受试者所罹患的状况或疾病持续不存在。

[0204] 一般地,方法包括选择患有或者具有罹患某种状况或疾病的危险的受试者。在一些情况下,受试者的状况或疾病能够用本文中公开的药物组合物进行治疗。例如,在一些情况下,方法包括选择患有癌症的受试者,例如其中受试者的癌症能够通过靶定MICA和/或促血管发生素-2的一种或两种加以治疗。

[0205] 在一些情况下,治疗方法可以包括根据对患者所患状况或疾病的预防或治疗的需要进行单次给药、多次给药和重复给药。在一些情况下,治疗方法可以包括在治疗前、治疗中和/或治疗后对受试者体内的疾病水平进行评估。在一些情况下,治疗能够持续,直至检测到受试者体内的疾病水平被降低。

[0206] 如本文中所使用的,术语“施用”或“给药”是指植入、吸收、消化、注射、吸入本发明的肽,而不管其形式如何。在一些情况下,可以向受试者局部(例如经鼻)和/或经口施用本文中所公开的一种或多种肽。例如,本文中的方法包括施用有效量的化合物或化合物组合物,以实现期望的或所述的效果。对于任何具体患者的具体剂量和治疗方案取决于多种因素,包括所用具体化合物的活性、年龄、体重、一般健康状态、性别、饮食、给药时间、排泄速度、药物组合,疾病、状况或病症的严重程度和进程,患者对疾病、状况或病症的倾向(disposition),和治疗医师的判断。

[0207] 给药后,可以对受试者进行评估,检查、评估或确定其疾病的水平。在一些情况下,治疗可以持续,直至检测到受试者的疾病水平发生改变(例如减轻)。

[0208] 当患者的病情发生改善(例如受试者体内的疾病水平发生改变(例如降低))时,如果需要,可以施用维持剂量的本发明化合物、组合物或其组合。随后,根据状况的情况,剂量或给药频率或者两者可以降低到可以维持该被改善的状况的水平。然而,在任何疾病症状复发时,患者可能需要长期的间歇性治疗。

[0209] 在一些情况下,本公开提供了用于检测来自人类受试者的免疫细胞,例如B细胞和/或记忆B细胞的方法。这些方法可以在例如某一事件发生后,用于例如监视人类受试者体内免疫细胞如B细胞和/或记忆B细胞的水平。事件实例可以包括,但不仅限于,检测到疾病、感染;施用本文中公开的治疗组合物,施用治疗剂或治疗方案,施用疫苗,诱发免疫应答。这些方法可作应用于临床和/或用于研究。

实施例

[0210] 本发明在下面的实施例中进一步描述,其并不对权利要求所述的本发明范围构成限制。

[0211] 本文中所述的方法允许从有限量的外周血液中灵敏、特异且可靠地检测具有限定抗原特异性的稀有B细胞。方法允许在抗原被清除(cleared)之后数月数年的时间内可视化并分离记忆B细胞。

[0212] 本文中公开方法的原理证明使用破伤风类毒素C片段(TTCF)的四聚体建立,该片段在Franz等(Blood,118(2):348-357(2011))中有详细报道,本文引用其全部内容作为参考。

[0213] 选择TTCF(即52kDa、无毒、TTCF的C端片段)作为模型抗原是因为大部分个体已经接种了破伤风类毒素疫苗,并且该疫苗诱发持久的IgG抗体滴度(Amanna et al., N.Engl.J.Med.,357:1903-1915,2007)。因此,使用TTCF提供了很大的受试者群体,可以在他们中间对本文中所公开的方法进行验证。然而,本领域的技术人员会理解,本文中的方法可以用常规技术加以调适以包含任何疾病相关抗原。如下面实施例中证明的,这些调适已经通过获得针对癌相关抗原MICA和促血管发生素-2的抗体而得以实现。

[0214] 实施例1:抗原表达和四聚体形成

[0215] 如下文中将进一步详细描述,在N端附加一个BirA位点,用于通过BirA酶进行位点特异性单生物素化。在蛋白与生物素化位点之间设置一个柔性接头,以防止抗体结合的空间位阻。TTCF通过阴离子交换色谱纯化,用BirA生物素化,并通过凝胶过滤色谱与游离的生物素和BirA分离。通过将带有荧光标签的链亲和素与生物素化的TTCF抗原以1:4的摩尔比进行温育,产生TTCF四聚体。然后,将这些四聚体与一组mAb联合使用,用于鉴定破伤风类毒素特异的记忆B细胞。

[0216] 将TTCF克隆在pET-15b(Novagen)中。在BL21(DE3)大肠杆菌中用1mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)28℃诱导蛋白表达4小时。清洗、裂解细胞,并收集所得的悬浮液。用HIS-Select亲和柱(Sigma)纯化TTCF。通过蛋白酶解除去His标签。用相似的方法制备鼠CD80近膜区。将蛋白单生物素化。对于某些实验,将Alexa-488染料分子(Molecular probes)连接在生物素化的TTCF或CD80的伯胺上。

[0217] 将生物素化的抗原与用优质级PE标记的链亲和素(Molecular Probes)在冰上以4:1的摩尔比温育至少20分钟,来制备抗原四聚体。使用前,对四聚体制备物进行离心以除去聚集体。在一些实验中,四聚体用Alexa-fluor-488标记的抗原和非荧光链亲和素以4:1的比例形成。

[0218] 实施例2:鉴定方法

[0219] 方法如Franz等.,Blood,118(2):348-357(2011)所述实施。

[0220] 细胞在BD FACS Aria II细胞分选器上进行分选。细胞被单细胞分选。样品首先以CD19⁺细胞设门,其对一系列排除标志物(CD3,CD14,CD16,7AAD)而言是阴性的;然后以浆母细胞设门,通过高水平的CD27和直接水平(immediate level)的CD19表达进行鉴定,最后以四聚体⁺CD19⁺细胞进行设门。

[0221] 由于记忆B的频率低,所以必须尽可能仔细地降低背景。首先通过阴性筛选(针对

CD2, CD3, CD14, CD16, CD56和血型糖蛋白A的抗体鸡尾酒)对B细胞进行富集,以除去大多数非特异性结合四聚体的细胞。将经过富集的细胞平均分组,并用TTCF或对照四聚体染色,随后用CD19、CD27和IgM进行标记,以特异性地筛选经过类别转换的记忆B细胞。设门策略考虑到了如下的类型转换证据,即CD19的表达、以一组排除标志物(CD3, CD14, CD16, 7AAD)缺少标记、记忆标志物CD27的表达和IgM表达的缺少。将四聚体染色相对于CD27染色进行描点作图,以便可视化具有感兴趣的抗原特异性的记忆B细胞。将四聚体阳性B细胞直接分选到含有3 μ l mRNA提取缓冲液的PCR连排反应管中。

[0222] 在分选期间,试管保持低温,将所分选的细胞冷冻,并保存于-80℃。使用CD19+CD27+IgM-B细胞作为阳性对照。

[0223] 使用先前报道的巢式PCR规程来扩增重链和轻链可变节段(Wang et al., J. Immunol. Methods., 244:217-225, 2000)。在适合于使污染最小化的条件下实施mRNA扩增。所用的引物包括:

[0224] TAATACGACTCACTATAGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG(SEQ ID NO:91);

[0225] TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTCAGCAGGCACAC(SEQ ID NO:92);

[0226] TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC(SEQ ID NO:93)。

[0227] 巢式RT-PCR如Franz等, Blood, 118(2):348-357(2011)所述实施。

[0228] 包含阴性对照以监视和确保排除污染。从总共35个用TTCF四聚体标记的单细胞扩增出了32个重链节段和30个轻链节段,并从凝胶纯化的PCR产物直接进行测序,这相当于89%的整体PCR效率。序列分析显示, TTCF四聚体⁺细胞采用多种不同的V_HD-J_H基因节段,没有某个特定的基因节段占主导地位。所观察的序列支持如下结论:这些克隆代表了由于体细胞高频突变导致的多样化的细胞。

[0229] 抗体产生和纯化包括将重链和轻链可变域DNA克隆到不同的pcDNA3.3表达载体中,所述表达载体含有牛催乳素信号肽序列以及全长IgG1重链或 κ 轻链恒定区。在100ml转瓶中,在补充有8mM Glutamax(Gibco)的CHO-S培养基(Invitrogen)内,在37℃、8%CO₂的条件下表达抗体。在转染前一天,将细胞分成6x10⁵细胞/ml。在转染当天,如果需要,将细胞调节为1x10⁶细胞/ml。用MAX转染试剂(Invitrogen)共转染25 μ g重链和轻链质粒DNA,并将被转染的细胞培养6-8天。用蛋白G Sepharose珠子获得蛋白质,用100mM甘氨酸pH2.5洗脱抗体,并用Spin-X离心管将抗体与珠子分离。用Micro Bio-Spin柱(BioRad),将纯化的抗体交换到磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。蛋白浓度通过280nm吸光度进行估算。

[0230] 对于饱和结合测定法,用铈标记未生物素化的、MonoQ纯化的TTCF,并除去游离的铈。用配制于100mM NaHCO₃缓冲液pH9.6中的20ng抗体/孔过夜包被96孔平底板。用含有牛血清白蛋白(BSA)和牛 γ 球蛋白的测试缓冲液进行封闭。TTCF-铈用测试缓冲液稀释(100nM-4pM),每孔添加200 μ l,一式三份重复。平板在37℃温育2小时,用200 μ l洗脱缓冲液(50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 20 μ M EDTA, 0.05%吐温)清洗三次。向每孔添加100 μ l强化溶液,用Victor³酶标仪在615nm测量荧光计数。

[0231] 重链和轻链可变域序列用IMGT/V-Quest和JIONSOLVER软件进行分析。流式细胞仪数据用FlowJo分析软件进行评估。统计分析用GraphPad Prism5软件使用非配对t检验进行。为了确定抗体K_D值,用GraphPad Prism5软件使用非线性回归分析对饱和结合数据进行拟合。

[0232] 实施例3:多聚体化提高记忆B细胞的鉴定

[0233] 对四聚体和单体TTCF进行比较。TTCF用Alexa-488进行荧光标记,然后以单体形式使用或者用未标记的链亲和素转变为四聚体(见上文)后使用。然后,将富集的B细胞用四聚体或单体TTCF-Alexa-488以相同的浓度进行温育。对照蛋白(CD80近膜域)用相同方式标记,也作为四聚体使用。

[0234] 如图22A和22B所示,使用来自三个供体的细胞,TTCF标记了一些记忆B细胞,但是用四聚体鉴定的频率要大得多(1.6-7.3倍)。在三个供体的其中一个中,TTCF特异性记忆B细胞能够用四聚体检测到,但是不能用单体检测到。

[0235] 这些结果证明,抗原四聚体使得基于它们的BCR的抗原特异性灵敏地检测记忆B细胞成为可能,尽管这些细胞在外周血中非常稀少。特异针对TTCF的类型转换记忆B细胞被合适的四聚体TTCF抗原高亮标记,而对照四聚体的背景标记则一直很低。

[0236] 实施例4:方法/抗体验证

[0237] 通过重叠PCR将IgG重链和 κ 链的恒定区与分离的可变节段连接,产生完全的人抗体。在瞬时、无血清哺乳动物表达系统中用CHO-S细胞表达抗体6-8天时间。抗体用蛋白G和凝胶过滤色谱纯化。

[0238] 如图23所示,从TTCF特异的浆母细胞分离的抗体对TTCF抗原显示高结合亲和性, K_D 为2.2nM(TTCF Ab1)和323pM(TTCF Ab2)(图23B)。从记忆B细胞分离的抗体也显示高结合亲和性,其他抗体(TTCF Abs3,4,和5)的 K_D 为382pM、228pM和1.4nM(图23B)。

[0239] 这些数据支持本文中所公开方法的特异性。而且,通过从三个不同供体构建了5个抗-TTCF抗体,所有这些均以高亲和力与TTCF结合,证明了本文方法的特异性。

[0240] 本文中的数据还证明,抗原四聚体使得在抗原从宿主中清除很久之后仍有可能能够灵敏地检测记忆B细胞。

[0241] 实施例5:获得抗-MICA抗体

[0242] 使用本文中的方法产生免疫特异性结合MICA的抗体。

[0243] 简而言之,将MICA抗原(UniGene Hs.130838)表达成具有C端BirA标签(GLNDIFEAQKIEWHE(SEQ ID NO:238)),其使得抗原可以被单生物素化。用R-藻红蛋白(PE)标记的链亲和素(SA)以4MICA:1SA的摩尔比将抗原四聚体化。从已经用GM-CSF表达载体(GVAX)(PNAS103:9190,2006)转导的自身肿瘤细胞进行了疫苗接种的晚期黑素瘤患者获得外周血单核细胞,随后用抗-CTLA-4单克隆抗体ipilimumab(YERVOY™(可以从Bristol Myers Squibb获得))进行处理。将外周血单核细胞快速融化、清洗,并以 5×10^6 细胞/ml悬浮在含有2%胎牛血清的磷酸盐缓冲盐水(pH7.2)中,并用大约0.1 μ g/ml四聚体在冰上染色30分钟。添加抗体以鉴定类型转换的记忆B细胞(CD19⁺,CD27⁺和IgM⁻)。包含一组标记T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和死细胞的排除抗体(CD3,CD14,CD16,7-AAD),以减少背景四聚体染色。用BDFACS Aria II将与MICA四聚体结合的单个B细胞分选到8排PCR管中。用来自Epicentre Biotechnologies的商业试剂盒(目录号:MBCL90310)使用下面显示的基因特异性引物扩增B细胞受体(BCR)mRNA:

[0244] mRNA扩增

[0245] IgG-T7:

[0246] AATACGACTCACTATAGGTTTCGGGAAGTAGTCCTTGACCAGG(SEQ ID NO:94)

- [0247] κ-T7:
- [0248] TAATACGACTCACTATAGGGATAGAAGTTATTTCAGCAGGCACAC(SEQ ID NO:95)
- [0249] λ-T7:
- [0250] TAATACGACTCACTATAGGCGTCAGGCTCAGRTAGCTGCTGGCCGC(SEQ ID NO:96)
- [0251] PCR1
- [0252] V_HL-1:TCACCATGGACTG(C/G)ACCTGGA(SEQ ID NO:97)
- [0253] V_HL-2:CCATGGACACACTTTG(C/T)TCCAC(SEQ ID NO:98)
- [0254] V_HL-3:TCACCATGGAGTTTGGGCTGAGC(SEQ ID NO:99)
- [0255] V_HL-4:AGAACATGAAACA(C/T)CTGTGGTTCTT(SEQ ID NO:100)
- [0256] V_HL-5:ATGGGGTCAACCGCCATCCT(SEQ ID NO:101)
- [0257] V_HL-6:ACAATGTCTGTCTCCTTCCTCAT(SEQ ID NO:102)
- [0258] V_kL-1:GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG(SEQ ID NO:103)
- [0259] V_kL-2:CTGGGGCTGCTAATGCTCTGG(SEQ ID NO:104)
- [0260] V_kL-3:TTCCTCCTGCTACTCTGGCTC(SEQ ID NO:105)
- [0261] V_kL-4:CAGACCCAGGTCTTCATTTCT(SEQ ID NO:106)
- [0262] V_IL-1:CCTCTCCTCCTCACCTCCT(SEQ ID NO:107)
- [0263] V_IL-2:CTCCTCACTCAGGGCACA(SEQ ID NO:108)
- [0264] V_IL-3:ATGGCCTGGA(T/C)C(C/G)CTCTCC(SEQ ID NO:109)
- [0265] C_gII:GCCAGGGGGAAGAC(C/G)GATG(SEQ ID NO:110)
- [0266] C_kII:TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG(SEQ ID NO:111)
- [0267] C_lII:AGCTCCTCAGAGGAGGG(C/T)GG(SEQ ID NO:112)
- [0268] PCR2
- [0269] V_H-1:CAGGT(G/C)CAGCTGGT(G/A)CAGTC(SEQ ID NO:113)
- [0270] V_H-2:CAG(A/G)TCACCTGAAGGAGTC(SEQ ID NO:114)
- [0271] V_H-3:(G/C)AGGTGCAGCTGGTGGAGTC(SEQ ID NO:115)
- [0272] V_H-4:CAGGTGCAGCTGCAGGAGTC(SEQ ID NO:116)
- [0273] V_H-5:GA(G/A)GTGCAGCTGGTGCAGTC(SEQ ID NO:117)
- [0274] V_H-6:CAGGTACAGCTGCAGCAGTC(SEQ ID NO:118)
- [0275] V_k-1:CG(A/C)CATCC(A/G)G(A/T)TGACCCAGT(SEQ ID NO:119)
- [0276] V_k-2:CGAT(A/G)TTGTGATGAC(C/T)CAG(SEQ ID NO:120)
- [0277] V_k-3:CGAAAT(T/A)GTG(T/A)TGAC(G/A)CAGTCT(SEQ ID NO:121)
- [0278] V_k-4:CGACATCGTGATGACCCAGT(SEQ ID NO:122)
- [0279] V_I-1:CCAGTCTGTGCTGACTCAGC(SEQ ID NO:123)
- [0280] V_I-2:CCAGTCTGCCCTGACTCAGC(SEQ ID NO:124)
- [0281] V_I-3:CTCCTATGAGCTGAC(T/A)CAGC(SEQ ID NO:125)
- [0282] C_gIII:GAC(C/G)GATGGGCCCTTGGTGGA(SEQ ID NO:126)
- [0283] C_kIII:AAGATGAAGACAGATGGTGC(SEQ ID NO:127)
- [0284] C_lIII:GGGAACAGAGTGACCG(SEQ ID NO:128)
- [0285] PCR1和2中所用的引物和PCR循环条件是从Wang和Stollar等(journal of

immunological methods2000)适用的。

[0286] 开发了一个替代的重链可变区正向引物组,以覆盖可能不会被上面的引物组充分覆盖的重链可变区序列。产生了下面的可选择引物:

[0287] PCR1

[0288] V_HL1-58:TCAGTATGGACTGGATTGGA(SEQ ID NO:129)

[0289] V_HL2-5:CCATGGACA(C/T)ACTTTG(C/T)TCCAC(SEQ ID NO:130)

[0290] V_HL3-7:GTAGGAGACATGCAAATAGGGCC(SEQ ID NO:131)

[0291] V_HL3-11:AACAAAGCTATGACATATAGATC(SEQ ID NO:132)

[0292] V_HL3-13.1:ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTT(SEQ ID NO:133)

[0293] V_HL3-13.2:AGTTGTTAAATGTTTATCGCAGA(SEQ ID NO:134)

[0294] V_HL3-23:AGGTAATTCATGGAGAAATAGAA(SEQ ID NO:135)

[0295] V_HL4-39:AGAACATGAAGCA(C/T)CTGTGGTTCTT(SEQ ID NO:136)

[0296] V_HL4-61:ATGGACTGGACCTGGAGCATC(SEQ ID NO:137)

[0297] V_HL-9:CCTCTGCTGATGAAAACCAGCCC(SEQ ID NO:138)

[0298] PCR2

[0299] V_H1-3/18:CAGGT(C/T)CAGCT(T/G)GTGCAGTC(SEQ ID NO:139)

[0300] V_H1-45/58:CA(A/G)ATGCAGCTGGTGCAGTC(SEQ ID NO:140)

[0301] V_H2-5:CAG(A/G)TCACCTTGA(A/G)GGAGTCTGGT(SEQ ID NO:141)

[0302] V_H3-9/23/43:GA(A/G)GTGCAGCTG(T/G)TGGAGTC(SEQ ID NO:142)

[0303] V_H3-16:GAGGTACAACCTGGTGGAGTC(SEQ ID NO:143)

[0304] V_H3-47:GAGGATCAGCTGGTGGAGTC(SEQ ID NO:144)

[0305] V4-34:CAGGTGCAGCTACAGCAGTG(SEQ ID NO:145)

[0306] V4-30-2/39:CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC(SEQ ID NO:146)

[0307] V_H7-4-1:CAGGTGCAGCTGGTGCAATC(SEQ ID NO:147)

[0308] 简而言之,使用通过mRNA扩增产生的2u1 cDNA作为第一轮PCR的模板,循环条件如下:3个循环的预扩增(94℃/45秒,45℃/45秒,72℃/105秒);30个循环的扩增(94℃/45秒,50℃/45秒,72℃/105秒);72℃最终延长10分钟。

[0309] 使用3u1第一轮PCR产物作为第二轮巢式PCR的模板。使用与第一轮PCR相同的循环条件,但是省略3个循环的预扩增。两个PCR步骤均使用克隆的Pfu聚合酶AD(Agilent Technologies实施。将PCR产物在1%琼脂糖凝胶上分离,用Zymoclean DNA凝胶回收试剂盒(Zymo Research)分离大小为300-400核苷酸的产物。使用用于第二轮巢式PCR的正向和反向引物进行测序。两步巢式PCR扩增了BCR重链和轻链的可变域(见上文)。从已经用GM-CSF表达载体(GVAX)(PNAS103:9190,2006)转导的自身肿瘤细胞进行疫苗接种的晚期黑素瘤患者获得外周血单核细胞。抗体在瞬时CHO-S表达系统中被表达成全长IgG1抗体。

[0310] 用两种独立的基于珠子的测定法来验证抗-MICA抗体与MICA的结合。第一种测定法使用商业可得的基于溶液的珠子测定试剂盒,其被设计用于检测与各种MICA等位体反应的抗-MICA抗体(One Lambda,目录号LSMICA001)。将不同浓度的MICA抗体与珠子进行温育,然后清洗,与藻红蛋白偶联的抗人IgG抗体一起温育。在第二个清洗步骤之后,在Luminex仪器上对珠子进行分析。阴性对照是用仅与藻红蛋白偶联的抗人IgG抗体(无抗-MICA抗体)温

育珠子。阳性对照包括用商业可得的、直接与藻红蛋白偶联的抗-MICA/MICB单克隆抗体(克隆6D4)(BioLegend目录#320906)温育珠子。第二种测定法是内部开发的,使用与链亲和素偶联的聚苯乙烯珠子。珠子用单生物素化的MICA蛋白包被,用不同浓度的抗-MICA抗体、抗-TTCF抗体(同种型阴性对照)、或直接与藻红蛋白偶联的抗-MICA/MICB抗体(阳性对照)进行温育。对用抗-MICA抗体或抗-TTCF抗体温育的珠子进行清洗,然后和与Alexa488偶联的抗-人IgG抗体一起温育。为了确定与珠子的背景结合,使用与链亲和素偶联、但没有用MICA蛋白包被的珠子进行相同的温育,用于比较。在FACS Caliber流式细胞仪上分析珠子与抗体的结合。

[0311] 如图24和25所示,抗-MICA抗体(MICA-Ab12和MICA-Ab20)以高亲和力与MICA结合。MICA-Ab20对应于表1所示的抗-MICA抗体ID-1。

[0312] 实施例6:抗-MICA抗体

[0313] 使用本文中的方法开发了额外的具有临床相关生物性质的抗-MICA抗体。在已经接受了细胞癌症疫苗(GM-CSF转导的癌细胞,称作GVAX)和阻断T细胞上抑制性CTLA-4受体的抗体ipilimumab(YERVOY™(可以从Bristol Myers Squibb获得))的患者体内,鉴定了与共有等位体(common allele)有反应性的MICA特异性抗体。然后使用MICA四聚体从具有最高血清MICA反应性的患者的外周血单核细胞分离B细胞。通过单细胞PCR从这些B细胞确定了重链和轻链序列,如实施例5中概述的。这项工作鉴定了可以识别在北美人群中普遍存在的等位体的抗体。

[0314] CM24002Ab2(表1所述的抗-MICA抗体ID-6)是一种从患有急性髓细胞样白血病(AML)的患者分离的抗体,该患者被证明对GVAX+Ipilimumab组合治疗具有显著的临床响应,并且血浆与MICA强烈反应。图中显示了CM24002Ab2轻链(图30和31)和重链(图28和29)的核苷酸和氨基酸序列,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线标示。从同一患者获得了额外的具有强烈结合的抗体,并标记为CM24002Ab4(表1所述的抗-MICA抗体ID-7)。图中显示了CM24002Ab4轻链(图34和35)和重链(图23和32)的核苷酸和氨基酸序列,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线标示。

[0315] CM33322Ab11(表1所述的抗-MICA抗体ID-8)和CM33322Ab29(表1所述的抗-MICA抗体ID-9)是从患有转移性黑素瘤、并对GVAX+Ipilimumab组合疗法显示长期(>15年)响应性的患者分离的抗体。图中显示了CM33322Ab11轻链(图38和39)和重链(图36和37)的核苷酸和氨基酸序列,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线标示。图中显示了CM33322Ab29轻链(图42和43)和重链(图40和41)的核苷酸和氨基酸序列,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线标示。由于该患者的长期临床响应,这些抗体特别令人感兴趣。

[0316] 在感兴趣的抗体被初始鉴定、克隆和表达之后,用流式微球测定法确定了这些抗体对不同MICA等位体的特异性。简而言之,具有单BirA生物素化位点的可溶重组MICA等位体002,008,009和MICB被表达、纯化、并捕获在链亲和素珠子上。然后,将所示抗-MICA抗体与包被有不同浓度的重组MICA的珠子温育1小时,然后清洗,用FITC标记的抗人IgG二抗进行温育。在第二个清洗步骤之后,通过流式细胞术完成珠子结合的FITC荧光的定量。MICA等位体002,008,009以及相关的MICB蛋白是根据在北美人群中的普遍性选择的(图48)。MICA等位体002,008,009以及相关的MICB蛋白也是根据它们在全世界的普遍性选择的(图48)。重要的是,CM24002Ab2和CM33322Ab29与所有MICA等位体以及与MICB均强烈结合。其它两种

抗体与一个子集的等位体结合:CM24002Ab4高度结合MICA*009和MICB,CM33322Ab11高度结合MICA*002,MICA*008和MICB(图48A-F)。通过使用相同技术产生的阴性人对照抗体(特异针对破伤风类毒素C端片段,TTFC)和针对MCIA的阳性对照抗体(来自BioLegend的商业品化的针对MICA的鼠抗体)佐证了特异性。这些研究鉴定了CM24002Ab2和CM33322Ab29作为临床应用的潜在候选者。

[0317] 实施例7:抗-MICA抗体与自身肿瘤细胞的结合

[0318] 通过流式细胞术检查分离的抗MICA抗体CM24002Ab2结合自身肿瘤细胞的能力(图49)。从患者CM24002获得骨髓,并测试CM24002Ab2与肿瘤细胞的结合。然后,从骨髓样品鉴定CD33+CD34+细胞作为肿瘤细胞。然后,用10 μ g/ml抗-MICA抗体CM24002Ab2、阳性对照商业MICA抗体(BioLegend)或阴性对照抗体(TTCF特异的)对肿瘤细胞进行染色。如图49所示,CM24002Ab2强烈结合这些细胞。CM24002Ab2未显示与非肿瘤细胞(CD16+和CD3+细胞)的结合,与CD14+细胞仅有背景结合,证明了其抗肿瘤特异性(数据未显示)。

[0319] 实施例8:抗-MICA抗体抑制NK细胞上的NKG2D受体

[0320] 对分离的抗-MICA抗体CM24002Ab2阻止可溶MICA介导的其同源受体(cognate receptor)NKG2D下调的能力进行检验。来自患者CM24002的血清以1:10稀释度使用,并与人NK细胞温育48小时。向这些培养物添加CM24002Ab2(浓度为10 μ g/ml)、阳性对照商业MICA抗体(BioLegend)或阴性对照抗体(TTCF特异的)。在48小时通过流式细胞术评估NKG2D的表达(图50)。来自患者CM24002的血清强烈下调NKG2D的表达(因此使该受体丧失功能)。CM24002Ab2和阳性对照MICA抗体部分地恢复NK细胞上NKG2D的表面表达。为了证明特异性,我们通过用2ng/ml重组MICA代替患者血清温育细胞,重复了上述实验(图51)。CM24002Ab2完全阻止MICA介导的NKG2D表达下调,而阴性对照抗体(对TTCF特异的)没有效果(图51)。这些数据证明,人MICA抗体能够防止人NK细胞上关键NKG2D受体的抑制。

[0321] 实施例9:抗-MICA抗体细胞介导的细胞毒性

[0322] 为了证明CM24002Ab2抗体是否能够实现细胞介导的细胞毒,在CM24002Ab2、阴性对照抗体(TTCF特异)或阳性对照抗体(BioLegend)的存在下(均为10 μ g/ml),将重组MICA(2ng/ml)和人NK细胞(效应物细胞)一起温育48小时。48小时后,清洗细胞,并以20:1,10:1和5:1的效应物:靶比例与K562肿瘤细胞温育4小时。通过从K562肿瘤细胞释放的胞浆蛋白(LDH)确定靶细胞被NK细胞的特异裂解。没有MICA抗体存在时,NK细胞没有杀伤K562肿瘤细胞。然而,CM24002Ab2大大提高NK细胞介导的K562肿瘤细胞的裂解,并且在所有效应物:靶比例下,均比阳性对照鼠MICA抗体更有效(图52)。进一步证明,K562肿瘤细胞的杀伤确实是由NKG2D通路(而不是Fc受体)介导的。重复上述实验,并添加了两个实验组:NKG2D封闭抗体和人Fc封闭。此外,也对CM33322Ab29进行了测试。数据显示,添加CM24002Ab2和CM33322Ab29实现了NK细胞介导的细胞毒。当添加封闭NKG2D抗体时,没有出现K562细胞的杀伤,而Fc封闭剂几乎没有作用(图53)。这些数据显示,CM24002Ab2和CM33322Ab29恢复了NKG2D通路的抗肿瘤功能。

[0323] 实施例10:抗-MICA抗体与 α 3MICA结构域的结合

[0324] NKG2D受体与MICA的上部 α 1和 α 2结构域结合,与相同位点结合的抗体可能与NKG2D受体竞争,借此阻断NK细胞对肿瘤细胞的杀伤。与 α 3结构域结合的抗体则特别令人感兴趣,因为它们不能阻断NKG2D受体的结合。同时,这些抗体能够干扰MICA从肿瘤细胞表面的蛋白

酶切割。用先前描述的流式细胞珠子测定法对抗-MICA抗体结合MICA α 3结构域的能力进行评估。将生物素化的重组蛋白捕获在链亲和素珠子上。然后,将10 μ g/ml的抗体CM24002Ab2, CM24002Ab4, CM33322Ab11, CM33322AB29, 阴性对照抗体(TTCF特异)或阳性对照抗体(BioLegend)与珠子温育,随后与FITC标记的抗人IgG二抗温育,并通过流式细胞术定量珠子结合的FITC荧光(图54)。如图54所示,CM33322Ab29与MICA α 3结构域结合,因此具有很大的治疗应用潜力。

[0325] 实施例11:抗-MICA抗体与肿瘤细胞的结合

[0326] 对使用CM24002Ab2和CM33322Ab29靶定多种多样的癌细胞的潜力进行了评估。对一组癌细胞进行测试,检查其是否被CM24002Ab2和CM33322Ab29标记:多发性骨髓瘤(RPMI8226和Xg-1)、卵巢癌(OVCAR3)、急性髓细胞样白血病(U937)、黑素瘤(K028)、肺癌(1792和827)、和乳腺癌(MCF7)细胞。将肿瘤细胞以1x10⁶细胞/ml的浓度悬浮在含有1%BSA的PBS中,用浓度为10 μ g/ml的CM24002Ab2和CM33322Ab29、以及阳性和阴性对照抗体(分别为鼠MICA抗体和TTCF特异性抗体)在4 $^{\circ}$ C染色1小时(直接偶联)。通过流式细胞术对标记进行评估(图55)。CM24002Ab2和CM33322Ab29均结合每一种被测试的肿瘤细胞类型,对大多数被测试的细胞系的标记强度高于商业阳性对照。

[0327] 实施例11:抗MICA抗体的MICA等位体特异性

[0328] CM33322Ab29的等位体特异性用市售的Luminex测定法进行评估。商业测试试剂盒含有与Luminex珠子直接偶联的多种重组MICA等位体(MICA*001,*002,*007,*012,*017,*018,*027,*004,*009,和*015),每一种均具有内在的荧光性质,从而能够在单一样品中对其结合进行评估。用10 μ g/ml的CM33322Ab29、BioLegend阳性对照和阴性对照(TTCF)温育包被有指示MICA等位体的Luminex珠子1小时,随后用PE偶联的抗-人IgG第二抗体温育。在用指示抗体温育60分钟,随后用抗-人PE偶联第二抗体温育之后,使用Luminex200设备确定荧光(图56)。在市售测定系统中,CM33322Ab29能够结合所有存在的等位体,表明它可以在患者中使用,而无需考虑MICA基因型。

[0329] 这些数据证明了CM24002Ab2和CM33322Ab29的高生物活性,以及它们恢复NK细胞介导的肿瘤细胞裂解的能力。这些数据证明,对免疫疗法具有响应的癌症患者产生了MICA抗体,这些抗体恢复了NK细胞的抗肿瘤活性。总之,这些结果强调了抗-MICA抗体在癌症患者体内克服免疫抑制和促进肿瘤破坏的治疗潜力。

[0330] 实施例12:获得抗-促血管发生素-2抗体

[0331] 使用本文中的方法产生了可结合促血管发生素-2的抗体。简而言之,生物素化的促血管发生素-2(UniGene Hs.583870)从R&D Systems购买。将外周血单核细胞快速融化、清洗,并以5x10⁶重新悬浮在含有2%胎牛血清的磷酸盐缓冲盐水(pH7.2)中,在冰上用大约0.5 μ g/ml的促血管发生素-2染色30分钟。用4ml PBS/2%FCS清洗细胞2次。然后添加抗体以鉴定类型转换的记忆B细胞(CD19+, CD27+, 和IgM-),并添加SA-PE以标记在细胞表面上具有生物素化促血管发生素的B细胞。包含一组标记T细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞和死细胞的排除抗体(CD3, CD14, CD16, 7-AAD),以减小背景四聚体染色。用BD FACS Aria II将与促血管发生素-2结合的单个B细胞分选到8联PCR反应管中。使用Epicentre Biotechnologies的市售试剂盒(目录号:MBCL90310),用基因特异性引物(见上文)扩增B细胞受体(BCR)mRNA。两步巢式PCR扩增重链和轻链的BCR可变域(见上文)。从已经用GM-CSF表达载体(GVAX)转导

的自身肿瘤细胞进行疫苗接种的(Cancer Res.70:10150,2010)、患有恶性非小细胞肺癌的患者获得外周血单核细胞。在瞬时CHO-S表达系统中将抗体表达成全长IgG1抗体。

[0332] 用ELISA测定法验证抗-促血管发生素-2抗体与促血管发生素-2的结合。简而言之,将促血管发生素-2在96孔平底板(PerkinElmer)中以4 μ g/ml浓度溶于100mM碳酸氢钠缓冲液pH9.6中,并在4 $^{\circ}$ C过夜包被。用含有牛血清白蛋白和牛 γ 球蛋白的测试缓冲液(PerkinElmer)在室温封闭平板3个小时。抗体以20 μ g/ml-0.16 μ g/ml稀释于测试缓冲液中,并4 $^{\circ}$ C温育1小时。用200 μ l清洗缓冲液(50mM Tris pH8,150mM NaCl,20mM EDTA,0.05% Tween)清洗平板3次。向每个孔添加100 μ l增强液(PerkinElmer),并用Victor3酶标仪(PerkinElmer)在615nm波长下测量荧光计数。同时测试人促血管发生素-1和-4的结合,二者显示相似的反应性。

[0333] 相关数据如图27A-27C所示,提供了与从肺癌患者分离促血管发生素特异性抗体相关的曲线图和凝胶图。(A)通过ELISA确定的肺癌患者(L19)血清(1:1000稀释)的促血管发生素-2反应性。X轴显示了血清收集数据。包含对照蛋白牛血清白蛋白(BSA)作为阴性对照。(B)FACS点图显示了以CD19⁺,CD27+IgM⁻B细胞设门的PBMC样品(时间点-10/98),X轴为CD19,Y轴为带荧光标签的促血管发生素-2。门大概指示了分选截止之处。从该样品中分选了10个B细胞。(C)从分离自患者L19的10个促血管发生素-2反应性记忆B细胞产生的重链、轻链和铰链区PCR产物。经过两轮巢式PCR产生的重链(上图)和轻链(下图)PCR产物大约为350个碱基对。

[0334] 实施例13:抗-促血管发生素-2抗体与人重组促血管发生素家族成员的结合

[0335] 用4 μ g/mL溶于碳酸氢钠缓冲液pH9.6的重组促血管发生素-1、-2和-4(R&D Systems)过夜包被96孔板。随后在室温下用含有牛血清白蛋白(BSA)和牛 γ 球蛋白的测定缓冲液(Perkin Elmer)封闭平板3小时。将平板用稀释到20 μ g/mL-0.16 μ g/mL的抗体ID2,3,4和5(见表1)在4 $^{\circ}$ C回转温育1小时。随后清洗平板,并与抗-人IgG-铰抗体(Perkin Elmer)一起温育。通过酶标仪获得615nm的荧光计数。使用阴性对照抗体(克隆8.18.C5)确定特异性。数据通过两次重复确定。

[0336] 如图26A-26C所示,抗体ID2,3,4和5(见表1)以高亲和性结合促血管发生素-1、-2和-4。抗体不与结构相近的蛋白——类促血管发生素-3结合(见图26D)。

[0337] 使用本文中的方法获得了另一种具有临床相关生物性质的抗-促血管发生素抗体,称作抗-Ang2Ab6(表1所述的抗-MICA抗体ID-10)。如上所述地对抗-Ang2Ab6与人重组促血管发生素家族成员的结合进行分析。简而言之,用4 μ g/mL的促血管发生素Ang-1,Ang-2,Ang4和类促血管发生素-3包被ELISA平板,并在20 μ g/ml,4 μ g/ml,0.8 μ g/ml,和0.16 μ g/ml浓度下检测抗-Ang2Ab6的结合。使用铰偶联的抗-人IgG第二抗体,45分钟后测量铰计数。如图57所示,抗-Ang2Ab6以剂量依赖的方式与所有促血管发生素结合。

[0338] 其它实施方案

[0339] 应当理解,尽管已结合其详细说明书对本发明进行了描述,但是前述的描述只是用于举例说明,对本发明的范围没有限制。本发明的范围由附加权利要求的范围限定。其它的方面、优点和修改也在下面权利要求的范围之内。

序列表

<110> DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.

<120> 治疗肽

<130> 00530-0293001

<150> PCT/US2012/057839

<151> 2012-09-28

<150> 61/541,921

<151> 2011-09-30

<160> 238

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 384

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 1

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgtgaagc cticggagac cctggccctc 60

acctgccttg tctctggtag giccttcaat gatcattact ggagttggat ccttcaggcc 120

ccagggaagg ggcctggagt gattggagaa atcaatcata gtaggagcac caactacaac 180

ccgtccctca agagtcgact caccatacca gagacacgt ccaagagcca gtctccctg 240

aggetgacct ctgtgaccgc cggggacacg gctctgtact acgtgagaa aactggcctg 300

[0001]

tattatgatg acgtttgggg gacttttcgt ccacggggcg ggttcgactc ctggggccag 360

ggaaccttgg tcacctctc ctea 384

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 2

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

Gly Gly Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 3
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ala Leu Thr Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 4
Gly Gly Ser Phe Thr Asp His Tyr
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 5
Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 6
Ile Asn His Ser Gly Val Thr
1 5

<210> 7
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 7
Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr
1 5 10 15

Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
35

<210> 8
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 8
Ala Lys Thr Gly Leu Tyr Tyr Asp Asp Val Trp Gly Thr Phe Arg Pro
1 5 10 15

Arg Gly Gly Phe Asp Ser
20

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 9
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

[0003]

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 10
gacatcgtga tgaccacagc tccggactcc ctggctgigt ctctggggcga gagggccacc 60
atcaacigca agtcacagcca gagiatttta tatagctccg acaataagaa ttacttagct 120
tggtaccagc acaagccagg acagcctcct aagctcctct ttacttgggc atctatccgg 180
gaatccgggg tccctgacgg attcagtggc ggcgggictg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agatgiggca gtttattact gtcagcaata ttatagtcct 300
ccttgcagtt tiggccaggg gaccaagctg gagatccaa 339

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Phe Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Pro Pro Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Gln

<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser
20 25

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

[0004] <220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 13
Gln Ser Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 14
Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 15
Trp Ala Ser
1

<210> 16
<211> 36

[0005]

<212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽

 <400> 16
 Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 20 25 30

 Val Tyr Tyr Cys
 35

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

 <400> 17
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Pro Cys Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

 <400> 18
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
 1 5 10

<210> 19
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

 <400> 19
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tccigtgcag cctciggatt cacccttagt agttatgcc aagcigggi ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt atttatgga gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca tatccaagaa cacgtgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agccgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggcgt 300
 tactatggil cgggggcica cttagactac tggggccagg gaacccctgt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽

 <400> 20
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0006]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 22
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 23
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 24
 Ile Tyr Trp Ser Gly Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 25
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽
 <400> 25
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile
 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 [0007] <400> 26
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 27
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
 <400> 28
 gatattgiga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca ccttggaca gccgectcc 60
 atctcttga ggctagcca aagcctcgta cacagigatg gaaacacctt ctigagttgg 120
 cticagcaga ggccaggcca gccctcaaga ctcttaattt atcagatttc taaccgggtc 180
 tctggggicc cagacagatt cagtgccagl ggggcaggga cagatttcac acigaaaaic 240
 agcaggggtg aagctgagga tctcggggtt tactactgca tgcagggtac acaatttcct 300
 cggacgttcc gccnagggac caagggtgaa atcaaa 336
 <210> 29

<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 29
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gln Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

[0008]

<210> 30
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 30
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 31
Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 32
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 33
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 33
 Gln Ile Ser
 1

<210> 34
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 34
 Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
 35

[0009]

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 35
 Met Gln Gly Thr Gln Phe Pro Arg Thr
 1 5

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 36
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 37
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 37
 gaggtgcagc tggaggagtc cgggggaggc ttagttcagc ctgggggagc ccgagagctc 60
 tccgtgtcag ccacagggtt caccittagt aataactgga tgcactgggt ccgccaggtc 120
 ccagggaagg ggcctggagt gactcagag attagaagtg atgggaattt cacaaggtag 180
 gccgactcca tgaaggccg attaccatc tccagagaca acgccaagag cacactigai 240

ttgcaaatga acagtcctgag agtcgaggac acgggtctgt attactgtgc aagagactac 300
ccctatagca ttgactactg ggccaggga accctggta ccgtccctc a 351

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Glu Ile Arg Ser Asp Gly Asn Phe Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Met
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Tyr Pro Tyr Ser Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

[0010]

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 40
Gly Phe Thr Phe Ser Asn Asn Trp
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 41
Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Glu

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 42
Ile Arg Ser Asp Gly Asn Phe Thr
1 5

<210> 43
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 43
Arg Tyr Ala Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15

[0011]

Ala Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp
20 25 30

Thr Gly Leu Tyr Tyr Cys
35

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 44
Ala Arg Asp Tyr Pro Tyr Ser Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 45
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

```

<400> 46
gataattgta tgaccagac tccactcicc tcacctgtca cccctggaca gccggccctcc 60
aictccctga catctagtca aagccctcgt cacagtaatg gaaacacctc cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gccccaaga ctccctaatt atgagatttc taagcgggtc 180
tcgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaaic 240
agcaggggtg aagctgagga tgcgggggtt tattactgca tgcaaggtaa acaacitcgg 300
acitttggcc aggggaccaa gcctggagaic aaa 333

```

```

<210> 47
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

```

```

<400> 47
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10          15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20          25          30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35          40          45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Lys Arg Val Ser Gly Val Pro
50          55          60

```

[0012]

```

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85          90          95

Lys Gln Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100         105         110

```

```

<210> 48
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

```

```

<400> 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10          15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser
20          25

```

```

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

```

```

<400> 49
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1           5           10

```

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 50
Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 51
Glu Ile Ser
1

<210> 52
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

[0013]

<400> 52
Lys Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 53
Met Gln Gly Lys Gln Leu Arg Thr
1 5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 54
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 55

<211> 363
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 55

```
gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggagcc ttggtacagc cttgggggcctc cgtgagactg      60
tcttggtcggg cctcaggcctt cattctttagc aactttgccca tgagtgggtt cgcgccaggt      120
ccagggaagg ggctggactg ggtctcaggt aattttgggt gtcgtgaaaa tacatattac      180
gcagactccg tgaaggcccg gtccaccatc tccagagaca gtccaagag cacactgtat      240
ctgcaaatga acaattttgag agccgaggac acggcccgat attactgtgc gcgaggcgat      300
taccatgggt cgggggctca ctttgactac tggggccagg gaatactggt caccgtctcc      360
tca      363
```

<210> 56

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 56

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

```
Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Ser Asn Phe
                20           25           30
```

```
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35           40           45
```

```
Ser Gly Asn Phe Gly Gly Arg Glu Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60
```

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

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

```
Ala Arg Gly Asp Tyr His Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly
100          105          110
```

```
Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120
```

<210> 57

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 57

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

```
Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20           25
```

[0014]

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 58
Gly Phe Ile Leu Ser Asn Phe Ala
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 59
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

[0015] <400> 60
Asn Phe Gly Gly Arg Glu Asn Thr
1 5

<210> 61
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 61
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser
1 5 10 15

Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 62
Ala Arg Gly Asp Tyr His Gly Ser Gly Ala His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 63
Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 64
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 64
gatattgiga tgaccagag tccactctcc tcacciglea tectlggaca gccggcctcc 60
atctcttgca ggictagica aagcctccca cacagigatg gaaacacctt ctgagattgg 120
cttcaccaga ggccaggcca gccicctaga ctcttaattt atcagatttc taaccggttc 180
tcgggggtcc cagacagatt caggggcagt gggacagga cagalltcac acigaaaac 240
agcaggttgg aagctgagga tccegggttt tattactgca tgcaggttac agaatttcct 300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 65
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val Ile Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gln Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr Glu Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 66
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 66
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val Ile Leu Gly

[0016]

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 67
Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 68
Leu Ser Trp Leu His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

[0017] <210> 69
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 69
Gln Ile Ser
1

<210> 70
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 70
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly
20 25 30

Ile Tyr Tyr Cys
35

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 71

Met Gln Gly Thr Glu Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 72
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 73
<211> 384
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 73
gaggtagcagg tggtaggagc tgggggaggc ttgatacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tccigtgcaa cctctggatt caccctttaga actctctcca tgagttaggt ccgtcgggct 120
ccaggaagg ggcaggaaag ggtctcagct attgggtctg aaagtcata cacgcactac 180
acagactccg cggagggcgc gtccaccatc tccaaagact attcaagaa cacagtatat 240
ctgcagatga acggcctgag agtcacgac acggccatat attattgtgc ccatcactat 300
tactatggct cgcggcagaa acccaaagat tggggagaag cttitgatat gggggccag 360
gggacaatgg tctcgcctc tcca 384

[0018]

<210> 74
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ala Ile Gly Ala Glu Ser His Asp Thr His Tyr Thr Asp Ser Ala
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala His His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gln Lys Pro Lys Asp Trp Gly
100 105 110

Asp Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
115 120 125

<210> 75
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser
20 25

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 76
Gly Phe Thr Phe Arg Thr Ser Ser
1 5

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

[0019] <400> 77
Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ala

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 78
Ile Gly Ala Glu Ser His Asp Thr
1 5

<210> 79
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 79
His Tyr Thr Asp Ser Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Val Asp Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys

35

<210> 80
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 80
 Ala His His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Gln Lys Pro Lys Asp Trp Gly
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Asp Met
 20

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 81
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Ser Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 82
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0020]

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 82
 gacatccaga tgaccagctc tccatctttct ggtctcgcct ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgfc ggccgagctc ggataatagc acccggctaa cctggatca gcagagagca 120
 gggaaggccc ctacctctct gatctatggt gcctccactt tggaagatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagcg gcagtcgacg cgggacagat ttactctcct ctatcgacag cctgcagcct 240
 gacgatcttg caacttacta ttgtcaacag tctcacagtt tccctacac ttctggccag 300
 gggaccacgc tggggatctc a 321

<210> 83
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 83
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Gly Ile Ser
100 105

<210> 84

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 84

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 85

Gln Asp Ile Ser Thr Trp
1 5

[0021]

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 86

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Arg Ala Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 87

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 87

Gly Ala Ser
1

<210> 88

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 88
Thr Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala
20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys
35

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 89
Gln Gln Ser His Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 90
Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Gly Ile Ser
1 5 10

[0022]

<210> 91
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 91
taatacgact cactataggt tctgggaagt agtccttgac cagg 44

<210> 92
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 92
taatacgact cactataggg atagaagtta ttcagcagcc acac 44

<210> 93
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 93
taatacgact cactataggg gtcaggetca gtagctgct ggccgc 46

<210> 94
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 94 aatacagacac actatagggt cggggaagta gfccttgacc agg	43
	<210> 95 <211> 44 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 95 taatacgact cactataggg atagaagtta ttcagcaggc acac	44
	<210> 96 <211> 46 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 96 taatacgact cactataggg gtcaggctca gtagctgct ggcgcg	46
	<210> 97 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
[0023]	<400> 97 tcaccatgga ctgsacctgg a	21
	<210> 98 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 98 ccatggacac accttgytcc ac	22
	<210> 99 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 99 tcaccatgga glltgggctg agc	23
	<210> 100 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 100 agaacatgaa acayctgigg ttctt	25
	<210> 101	

[0024]	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 101	
	atgggggtcaa ccgccatcct	20
	<210> 102	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 102	
	acaatgtctg tcctcttct cat	23
	<210> 103	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 103	
	gtcagctcc tggggctcct g	21
	<210> 104	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 104	
	ctggggctgc taatgctcig g	21
	<210> 105	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 105	
	ttctctctgc tactctgget c	21
	<210> 106	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 106	
	cagaccagg ttctcatttc t	21
	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 107	

	cctctctctcc tcacctctct	20
	<210> 108 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 108 ctctctcactc agggcaca	18
	<210> 109 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 109 atggcctgga yscctctcc	19
	<210> 110 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 110 gccaggggga agacsgaig	19
[0025]	<210> 111 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 111 tttcaactgc tcatcagatg gcgg	24
	<210> 112 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 112 agctctcag aggggggygg	20
	<210> 113 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 113 caggtscagc tggtrcagtc	20
	<210> 114 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
	<400> 114		
	cagttcacct tgaaggagtc	20	
	<210> 115		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
	<400> 115		
	saggtgcagc tgggtggagtc	20	
	<210> 116		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
	<400> 116		
	caggtgcagc tgcaggagtc	20	
	<210> 117		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
[0026]	<400> 117		
	gaggtgcagc tgggtgcagtc	20	
	<210> 118		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
	<400> 118		
	caggtacagc tgcagcagtc	20	
	<210> 119		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
	<400> 119		
	cgmcatccrg wtgacccagtc	20	
	<210> 120		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成引物		
	<400> 120		
	cgatrtttgtc atgacycag	19	
	<210> 121		

[0027]

<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 121
cgaaatwgtg wtagccagt ct 22

<210> 122
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 122
cgacatcgtg atgacccagt 20

<210> 123
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 123
ccagtcgtg ctgactcagc 20

<210> 124
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 124
ccagtcgtgc ctgactcagc 20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 125
ctcctaagag ctgacwcagc 20

<210> 126
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 126
gacsgatggg cccttggtgg a 21

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成引物

<400> 127

	aagatgaaga cagaagggtgc	20
	<210> 128 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 128 gggaacagag tgaccg	16
	<210> 129 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 129 tcactatgga ctggatttgg a	21
	<210> 130 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 130 ccaigagacay acttigyicc ac	22
[0028]	<210> 131 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 131 gtaggagaca tgcaaatagg gcc	23
	<210> 132 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 132 aacaaagcta tgacatatag atc	23
	<210> 133 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 133 atggagtigg ggcctgagcig ggtt	24
	<210> 134 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 134 agtigttaaa tgtttatcgc aga	23
	<210> 135 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 135 aggtaattca tggagaaata gaa	23
	<210> 136 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 136 agaacatgaa gcayctgtgg ttctt	25
	<210> 137 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
[0029]	<400> 137 atggactgga cctggagcat c	21
	<210> 138 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 138 cctctgtga tgaaaaccag ccc	23
	<210> 139 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 139 caggtcagc tkgtcagtc	20
	<210> 140 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 140 caratgcagc tggtcagtc	20
	<210> 141	

[0030]	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 141	
	caggtcacct tgaggagtc tggc	24
	<210> 142	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 142	
	gaggtgcagc tgktggagtc	20
	<210> 143	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 143	
	gaggtacaac tggcggagtc	20
	<210> 144	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 144	
	gaggtgcagc tggcggagtc	20
	<210> 145	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 145	
	caggtgcagc tacagcagtc	20
	<210> 146	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 146	
	cagctgcagc tgcaggagtc	20
	<210> 147	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列描述: 合成引物	
	<400> 147	

cagggtgcagc tgggtgcaatc	20
<210> 148	
<211> 351	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸	
<400> 148	
cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga cagggtggagc cttcggggac cctgtccctc	60
acctgcacig tgcicggigg ctccatcagc aggagtaact ggaggagtg ggiccggcag	120
ccccagggg aggggcigga atggattgga gaaatccatc acattgggag gtccagctac	180
aatccgtccc tcaagagtcg agtcaccaig tctgtagaca agtcccagaa ccagttctcc	240
ctgaggctga cctcigtgac cgcgcgggac acggccgtgt attactigtc gaaaaatggc	300
tactacgcta tggacgtctg gggccaaggg accacggta cccgtctctc g	351
<210> 149	
<211> 117	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成多肽	
<400> 149	
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly	
1 5 10 15	
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Arg Ser	
20 25 30	
Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp	
35 40 45	
Ile Gly Glu Ile His His Ile Gly Arg Ser Ser Tyr Asn Pro Ser Leu	
50 55 60	
Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Gln Asn Gln Phe Ser	
65 70 75 80	
Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Lys Asn Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
100 105 110	
Val Thr Val Ser Ser	
115	
<210> 150	
<211> 354	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸	
<400> 150	
gaaatgtgt tgaacagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcgacttcc tagcctggta ccagcagaaa	120
ccggccagg cccccaggct cctcatctac gctacatctt icagggccac tggcatctca	180

[0031]

gacagggtca gggcgatgg gctggggaca gactctctc icaccatca cagactggaa 240
ccgaagatt ttgcagtga ttactgtcag cactatcgt gttcacctcc ggggtacaet 300
ttggcccagg ggaccaagct ggacatgaga cgtacgggg cgcaccatc tgtc 354

<210> 151
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 151
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asp
20 25 30

Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Thr Ser Phe Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Arg Ser Ser Pro
85 90 95

[0032]

Pro Trp Tyr Thr Phe Ala Gln Gly Thr Lys Leu Asp Met Arg Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val
115

<210> 152
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 152
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 153
Gly Gly Ser Ile Ser Arg Ser Asn Trp
1 5

<210> 154

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 154
Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 155
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 156
Ile His His Ile Gly Arg Ser
1 5

[0033]

<210> 157
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 157
Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Lys
1 5 10 15

Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr
35

<210> 158
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 158
Cys Ala Lys Asn Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp
1 5 10

<210> 159
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 159
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 160
Gln Ser Val Ser Ser Asp Phe
1 5

<210> 161
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 161
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

[0034] Tyr

<210> 162
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 162
Ala Thr Ser
1

<210> 163
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 163
Phe Arg Ala Thr Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 164
<211> 13
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 164

Cys Gln His Tyr Arg Ser Ser Pro Pro Trp Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 165

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 165

Ala Gln Gly Thr Lys Leu Asp Met Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
1 5 10 15

Val

<210> 166

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 166

Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Lys
1 5 10 15

[0035]

Ser Lys Asn His Phe Ser Leu Thr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr
35

<210> 167

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 167

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggfgaagc cttcggggac cctgtccctc 60
accgcgcctg tctctgggic ctccattacc aatgggicct ggicgagttg ggiccgccag 120
cccccaggga aggggctgga gttgatigga gaaatcctac ttaatgggaa caaccaatcc 180
aacccgtccc tgaagagtcg agtcatcata tcagiggaca agtccaagaa ccacttctcg 240
ctgacctga actctgtgac cgcgcgggac acggccggtg attactgtgc gaagaaagct 300
gectacaacc ttgagttctg gggccaggga gccctggta cctctccctc a 351

<210> 168

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 168

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

```

1           5           10           15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Ala Ser Ile Thr Asn Gly
20           25           30

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

Ile Gly Glu Ile Tyr Leu Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu
50           55           60

Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn His Phe Ser
65           70           75           80

Leu Thr Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Lys Asn Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Phe Trp Gly Gln Gly Ala Leu
100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 169

<211> 327

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

[0036]

<400> 169

gaaattgtgt tgaacgagtc tccaggaacc cigtcttigt ctccagggga aagagccacc 60

ctctccctgca gggccagtc gactgttagc agccctacg tagcctggta ccagcagaaa 120

cgiggccagg ctccagget ccacatctat ggtagcatcca ccagggccac cggcatccca 180

gacaggitca gggcagtggt gtctgggaca gacttcacac tcacatcag cagactggag 240

ccigaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gatcatacta ttacatttt 300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 170

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 170

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Tyr
85 90 95

Tyr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 171
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 171
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 172
Gly Ala Ser Ile Thr Asn Gly Ala Trp
1 5

[0037]

<210> 173
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 173
Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Glu

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 174
Ile Tyr Leu Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 175
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 175
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

	1	5	10
	<210> 176		
	<211> 12		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成肽		
	<400> 176		
	Cys Ala Lys Asn Ala Ala Tyr Asn Leu Glu Phe Trp		
	1	5	10
	<210> 177		
	<211> 10		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成肽		
	<400> 177		
	Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser		
	1	5	10
	<210> 178		
	<211> 26		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成肽		
	<400> 178		
[0038]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1	5	10 15
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser		
	20 25		
	<210> 179		
	<211> 7		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成肽		
	<400> 179		
	Gln Thr Val Ser Ser Pro Tyr		
	1	5	
	<210> 180		
	<211> 17		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 人工序列描述: 合成肽		
	<400> 180		
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
	1	5	10 15
	Tyr		
	<210> 181		
	<211> 3		
	<212> PRT		

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 181
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 182
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽
 <400> 182
 Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 Val Tyr Tyr
 35
 <210> 183
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 [0039] <400> 183
 Cys Gln Gln Tyr Asp Arg Ser Tyr Tyr Tyr Thr Phe
 1 5 10
 <210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成肽
 <400> 184
 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5
 <210> 185
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多核苷酸
 <400> 185
 caggatgcagc tgcaggagtc gggcccagga cgggtgaagc cticggagaa cctgtcgcctc 60
 acccgcacig tcicigatgc cccatgagi gattalcact ggagciggat ccggcaggcc 120
 gccgggaagg gactggagtg gattggcggt atgtacagca ctgggagtc ctaactacaaa 180
 ccccccctca aagtcgggti caccatgca atagacacgt ccaagaacca gtctccctg 240
 aagctggcct ctgtgaccgc cgcagacacg gccatctatt attgtgcgag cggacaacat 300
 atlgttggti gggccccccc tgacttcagg gcccaggaaa cccaggacac cgctccctca 360
 <210> 186

<211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽

 <400> 186
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

 Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Ala Ser Met Ser Asp Tyr
 20 25 30

 His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Arg Met Tyr Ser Thr Gly Ser Pro Tyr Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

 Gly Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

 Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

 Ser Gly Gln His Ile Gly Gly Trp Val Pro Pro Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0040]

<210> 187
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

 <400> 187
 gatattgiga tgaccagac tccactctcc tcacctgca ccttggaca gccggcctcc 60
 atccctgca ggtctagiga aggcctcgia tatagtgatg gagacacctc cttagatgg 120
 ttccaccaga gccagggcca gccccaaga ctccgatatt aaaaaattc taaccggffc 180
 tctggggctcc ccgacagatt cagtggcagi ggggcaggca cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggttg aggcgtagga tgcgggggtt tattactgca tgcagctac acattttccg 300
 tggacgttcg gccaggggac caaagtgga gicauacgt 339

 <210> 188
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工序列描述: 合成多肽

 <400> 188
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Gly Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

 Asp Gly Asp Thr Tyr Leu Ser Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro

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

Arg

<210> 189

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 189

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

Asn Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

[0041]

<210> 190

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 190

Asp Ala Ser Met Ser Asp Tyr His
1 5

<210> 191

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 191

Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 192

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 192

Met Tyr Ser Thr Gly Ser Pro

1 5

<210> 193
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 193
Tyr Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Gly Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr
1 5 10 15
Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ala Ser Val Thr Ala Ala Asp
20 25 30
Thr Ala Ile Tyr Tyr
35

<210> 194
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 194
Cys Ala Ser Gly Gln His Ile Gly Gly Trp Val Pro Pro Asp Phe Trp
1 5 10 15

[0042] <210> 195
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 195
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 196
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 196
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 197
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 197
Glu Gly Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asp Thr Tyr
1 5 10

<210> 198
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 198
Leu Ser Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 199
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 199
Lys Ile Ser
1

<210> 200
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

[0043]

<400> 200
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 201
Cys Met Gln Ala Thr His Phe Pro Trp Thr Phe
1 5 10

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 202
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
1 5 10

<210> 203
<211> 333
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 203

```
gagggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt tcatatgget tgacctggat acgccagget      120
ccggggaagg gccctggagt ggctccaagt atcagtggca gggcaataa cacatactac      180
gcagactctg tgaagggcgc gttcaccatc tccagagaca aagicaagaa gacactatat      240
ctacaaatgg acagcctgac agtcggagac acggccgict attacigctt aggagtcggt      300
cagggccacg gaattccggt catctctccc tca                                     333
```

<210> 204

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 204

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

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

```
Gly Leu Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45
```

[0044]

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

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Val Lys Lys Thr Leu Tyr
65          70          75          80
```

```
Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
```

```
Leu Gly Val Gly Gln Gly His Gly Ile Pro Val Ile Val Ser Ser
100         105         110
```

<210> 205

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 205

```
gatatttgta tgaccagac tccactctcc tcaccigica cccctggaca gccggcctcc      60
atctcttcca ggtctagta gagcctctga caccgtgatg gaaacacctt cttagattgg      120
ttcttcaga ggccaggcca ggcctcaaga ctcttaattt atcggaattc taaccggttc      180
tcgggggtcc cagacagatt cagiggcagi ggggcaggga cggatttcac actgaaaatc      240
agcagggttg aagctgagga tgctggcgtt tactacigca tgcaagctac acaaatcccc      300
aacattttg gccaggggac caagctggag atcaag                                     336
```

<210> 206

<211> 112

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 206
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Thr Gln Ile Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0045]

<210> 207
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 207
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 208
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 208
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 209
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 209
Leu Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Ser

<210> 210
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 210
Ile Ser Gly Ser Gly Asn Asn Thr
1 5

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

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 211
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys
1 5 10 15

Val Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Gly Asp
20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr
35

<210> 212
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0046]

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 212
Cys Leu Gly Val Gly Gln
1 5

<210> 213
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 213
Gly His Gly Ile Pro Val Ile Val Ser Ser
1 5 10

<210> 214
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 214
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 215

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 215
Gln Ser Leu Val His Arg Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 216
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 216
Leu Ser Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

<210> 217
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 217
Arg Ile Ser
1

[0047]

<210> 218
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 218
Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Val Tyr Tyr
35

<210> 219
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 219
Cys Met Gln Ala Thr Gln Ile Pro Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 220
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 220

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5

<210> 221

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 221

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tggaggagtc ttaatccagc cggggggggtc cctaagactc      60
tccgtgtcag cctcgggctt cctcatcagt agttatttca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggcgggagtc ggctcagtt atttatagcg atggtagtac atattacgta      180
gaatccgiga agggccgati caccatctcc acagacaatt ccaagaacac actatacttt      240
cagatgaaca gcttgagagc cgaggacacg gcccgatatt actgtgcgac acggcatttg      300
aattatgagc gtgaccactg gggccaggga accctgggtca cgtctctctc agcctccacc      360
aag

```

<210> 222

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 222

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

<210> 223

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0048]

<223> 人工序列描述: 合成多核苷酸

<400> 223

```

gatgttga tgactcagtc tccactctcc cggcccgta cccctggaca gccggcctcc    60
atctccgca ggctagtc aagccctgta cacagtagc gaaacaccia ctgaaatgg    120
tttcaccaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataangtiic taagcgggac    180
tcctgggttc cagacagatt cagcggcagc gggtcaggta gtagtttca acgaaaaac    240
agcagggtgg aggcctagga tcttggaatt tattactgca tgcagggtac acattggcgc    300
acgttcggcc aagggaacca ggtggaaaic aaacgaacig tggctgca    348

```

<210> 224

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 224

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20           25           30

```

```

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35           40           45

```

```

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro
50           55           60

```

[0049]

```

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

```

```

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85           90           95

```

```

Thr His Trp Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100          105          110

```

```

Thr Val Ala Ala
115

```

<210> 225

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 225

```

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

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20           25

```

<210> 226

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0050]

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 226

Gly Phe Leu Ile Ser Ser Tyr Phe
1 5

<210> 227

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 227

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10 15

Val

<210> 228

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 228

Ile Tyr Ser Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 229

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 229

Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Thr Asp Asn
1 5 10 15Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30Thr Ala Arg Tyr Tyr
35

<210> 230

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 230

Cys Ala Thr Arg His Leu Asn Tyr Asp Gly Asp His Trp
1 5 10

<210> 231

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 231

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

<210> 232

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 232

Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 233

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 233

Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
1 5 10 15

Tyr

[0051]

<210> 234

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 234

Lys Val Ser
1

<210> 235

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成多肽

<400> 235

Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30

Ile Tyr Tyr
35

<210> 236

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 236
Cys Met Gln Gly Thr His Trp Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 237
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

[0052] <400> 237
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
1 5 10

<210> 238
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述: 合成肽

<400> 238
Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGGCGAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGGCCCTCACCTGCGCTGTCTCT
GUTGGGTCCTTCACTGATCATTTACTGGAGTTGGATCCGTCAGGCCCCAGGAGGGGCTGGAGTGGATTGGAGAA
ATCAATCATAGTGGAGTCAACCACTACAAACCCCTCCCTCAAGAGTCGACTCACCATATCATAGTACACACGTCCTCAAG
AGCCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCCCGGACACGGCTCTGTACTACTGTGCGGAAACTGGCCTG
TATTATGATGACGTTTGGGGGACTTTTCGTCCACGGGGGCTTCGACTCTCGGGGCCAGGGAACCCCTGCTCACCC
GTCTCCTCA (SEQ ID NO: 1)

图1

Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	A	L	T	C	A	V	S
G	G	S	F	T	D	H	Y	W	S	W	I	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E
I	N	H	S	G	V	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	L	T	I	S	V	D	T	S	K
S	Q	F	S	L	R	L	T	S	V	T	A	A	D	T	A	L	Y	Y	C	A	K	T	G	L
Y	Y	D	D	V	W	G	T	F	R	P	R	G	G	F	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T
V	S	S	(SEQ ID NO: 2)																					

图2

CACATCGTGATGACCCAGTCTCCGGACTCCCTGGCTGTGCTCTCTGGCGGAGAGGCCACCATCACTGCCAAGTCC
AGCCAGAGTATTTTATATAGCTCCGACAAATAAGATATTAAGTGTAGCTTGGTACACAGCACAGCCAGCAGCCTCCT
AAGCTCCTCTTTTACTGGGCATCTATCCGGGAATCCGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCGCGGCTCTGGGACA
GATTCACCTCACCATCAGCAGTCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTAAGTGTGAGCAATATATAGTCTCT
CCTTGCAGTTTTCGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCCAA (SEQ ID NO: 10)

图3

D	I	V	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	W	C	S
S	Q	S	I	L	Y	S	S	D	N	K	N	Y	L	A	W	Y	Q	H	A	K	G	Q	P
K	L	L	F	Y	W	A	S	I	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	G	S	G	T
D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S
P	C	S	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	Q	(SEQ ID NO: 11)										P

图4

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
 61 TCCTGTGCAG CCTCTGCATT CACCTTTAGT AGTTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT
 121 CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGGT ATTTATTGGA GTGGTGGTAG CACATACCTAC
 181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA TATCCAAGAA CAGCTGTAT
 241 CTGCAAAATGA ACAGTCTGAG AGCCGACGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGCGCAT
 301 TACTATGGTT CCGGGGCTCA CTTTCACTAC TGGGGCCAGG GAACCTGGT CACCGTCTCC
 361 TCA (SEQ ID NO: 19)

图5

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
 21 SCAS**SGTFS** **SY**AMSWVRQA **CDR1**
 41 PGKGLEWVSG **IYWSGGSTYY** **CDR2**
 61 ADSVKGRFTI SRDISENTLY
 81 LQMNSLRADD TAVYYC**ARGD** **CDR3**
 101 **YYSGAHFDY** WCQGTLVTVS
 121 S (SEQ ID NO: 20)

图6

1 GATATTGTGA TGACCCAGAC TCACCTCTCC TCACCTGTCA CCCTTCGACA GCGGGCTCC
 61 ATCTCCTGCA GGCTAGCCA AAGCCTCGTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTTCAGTTGG
 121 CTTACAGCAGA GGCCAGGCCA GCCTCCAAGA CTCTAAATT ATCAGATTTC TAACCGGTTC
 181 TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
 241 AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTGGGGGTT TACTACTGCA TGCAAGGTAC ACAATTTCCT
 301 CCGACGTTCC GCCAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAAA (SEQ ID NO: 28)

图7

1 DIVMTQTPLS SEVTLGQEPAS
 21 ISCRSS**QSLV** **HSDGNTYLSW** **CDR1**
 41 LQQRPGQPPR LLIY**QISNRF** **CDR2**
 61 SGVPDRFSGS GAGTDFLKI
 81 SRVEREDVGV YYCM**QGTQFP** **CDR3**
 101 **RTFGQGTKVE** IK (SEQ ID NO: 29)

图8

1 CAGGTGCAGC TGCTGGAGTC CCGGGGAGGC TTAGTTCAGC CTGGGGGATC CCTGAGACTC
 61 TCCTGTGCAG CCTCAGGGTT CACCTTAGT AATAACTGGA TGCACCTGGT CCGCCAGGCT
 121 CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GATCTCAGAG ATTAGAAGTG ATCGGAATTT CACAAGGTAC
 181 CCGGACTCCA TGAAGGCGG ATTACCATC TCCAGAGACA ACCCCAAGAG CACACTGTAT
 241 TTGCAAAATGA ACAGTCTCAG AGTCGAGGAC ACGGCTCTGT ATTACTGTGC AAGAGACTAC
 301 CCTATAGCA TTGACTACTG GGGCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCCTC A (SEQ ID NO: 37)

图9

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
 21 SCAAS**GFTFS** NNWMHWVRQA **CDR1**
 41 PGKGLEWIS**E** **IRSDGNFT**RY **CDR2**
 61 ADSMKGRFTI SRDNAKSTLY
 81 LQMNSLRVED TGLYYC**ARDY** **CDR3**
 101 **PYSIDYWGQG** TLVTVSS (SEQ ID NO: 38)

图10

1 GATATTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCTCC TCACCTGTCA CCCTTGACA GCCGGCTCC
 61 ATCTCCTGCA CATCTAGTCA AAGCCTCGTA CACAGTAATG GAAACACCTA CTGAGTTCG
 121 CPTCAGCAGA GGCCAGGCCA GCCCCAAGA CTCCTAATTT ATGAGATTTC TAAGCGGGTC
 181 TCTGGGGTCC CAGACAGATT CAGTGGCAGT GGGGCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAATC
 241 AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGTGGGGGTT TATTACTGCA TGCAAGGTAA ACAACTTCGG
 301 ACTTTTGGCC AGGGACCAA GCTGGAGATC AAA (SEQ ID NO: 46)

图11

1	DIVMTQTPLS	SPVTLGQPAS	
21	ISCTSS QSLV	HSNGNTY LSW	CDR1
41	LQQRPGQPPR	LLIYE ISKRV	CDR2
61	SGVPDRFSGS	GAGTDFTLKI	
81	SRVEAEDVGV	YYC MQGKQLR	CDR3
101	TFGQGT KLEI	K	(SEQ ID NO: 47)

图12

1 GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGCTC CGTCAGACTG
 61 TCTTGTGCGG CCTCAGGCTT CATTCITAGC AACTTTGCCA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 121 CCAGGGAAGG GGCTGGACTG GGCTCAGGT AATTITGGTG GTCGTGAAA TACATATTAC
 181 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA GTTCCAAGAG CACACTGTAT
 241 CTGCAAAATGA ACAATTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GCGAGGCGAT
 301 TACCATGGTT CGGGGGCTCA CTTTGA CTAC TGGGGCCAGG GAATACTGGT CACCGTCTCC
 361 TCA (SEQ ID NO: 55)

图13

1 EVQLVESGGG LVQPGGSVRL
 21 SCAASGFILS NFAMSWVRQA CDR1
 41 PGKGLDWSVG NFGGRENFTY CDR2
 61 ADSVKGRFTI SRDSSKSTLY
 81 LQMNILKAED TAVYYCARGD CDR3
 101 YHSGAHFDY WQGILVTVS
 121 S (SEQ ID NO: 56)

图14

1 GATATTGTGA TGACCCAGAG TCCACTCTCC TCAOCTGTCA TCCTTGGACA GCGGGCCTCC
 61 ATCTCCTGCA GGTCTAGTCA AAGCCTCCTA CACAGTGATG GAAACACCTA CTGAGTTGG
 121 CTTACACCAGA GGCCAGGCCA GCCTCCCTAGA CTCCTAATTT ATCAGATTTC TAACCCGGTTC
 181 TCTGGCGTCC CACACAGATT CAGTGGCAGT GCGACAGGCA CAGATTTCAC ACTGAAAATC
 241 AGCAGGGTGG AAGCTGAGGA TGCCGGGATT TATTACTGCA TCCAAGGTAC AGAATTTCCT
 301 CGGACGTTCC GCGAAGGGAC CAAGGTGGAA ATCAA (SEQ ID NO: 64)

图15

1 DIVMTQSPLS SEVILQEPAS
 21 ISCRSSQSLL HSDGNTYLSW CDR1
 41 LMQRFQQPER LLIYQISNRF CDR2
 61 SGVPRFSGS GTGDEFLLKI
 81 SRVEAEADAGI YYCMQGTFFP CDR3
 101 RTFCQGTKVE IK (SEQ ID NO: 65)

图16

```

1      GAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGGGAGGC TTGATACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC
61     TCCTGTGCAA CCTCTGGATT CACCTTTAGA ACTTCTTCCA TGAGTTGGGT CCGTCGGGCT
121    CCAGGGAAGG GGCTGGAATG GGTCTCAGCT ATTGGTGCTG AAGTCATGA CACGCCACTAC
181    ACAGACTCCG CGGAGGGCCG GTTCACCATC TCCAAGACT ATTCAAAGAA CACAGTATAT
241    CTGCAGATGA ACGGCTTGAG AGTCGACGAC ACGGCCATAT ATTATTGTGC CCATCACTAT
301    TACTATGGCT CGCGGCAGAA ACCCAAAGAT TGGGAGATG CTTTGTATAT GTGGGGCCAG
361    GGGACAATGG TCTCCGTCTC TTCA

```

图17

(SEQ ID NO: 73)

```

1      EVQLVESGGG LIQPGGSLRL
21     SCATSGTFR TSSMSWVRRA CDR1
41     PGKGLEWVSA IGAESHDFHY CDR2
61     TDSAEGRFTI SKDYSKNTVY
81     LQMNGLRVDD TAIYYCAHHY CDR3
101    YYGSRQKPKD WGDADFMMWQ
121    GTMVSVSS (SEQ ID NO: 74)

```

图18

```

1      GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCT GTGTCIGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC
61     ATCACTTGTC GGGCGAGTCA GGATATTAGC ACCTGGTTAA CCTGGTATCA GCAGAGAGCA
121    GGGAGGCCG CTAACCTCCT GATCTATGGT GCATCCACTT TGGAAGATGG GGTCCCATCC
181    AGGTTACAGG GCAGTGGATC CGGACACAGT TTCACICTCA CTATCGACAG CTTGCAGCCT
241    GACGATTTG CAACTTACTA TTGTCAACAG TCTCACAGTT TCCCCTACAC TTTTGGCCAG
301    GGGACCCAGC TGGGATCTC A

```

图19

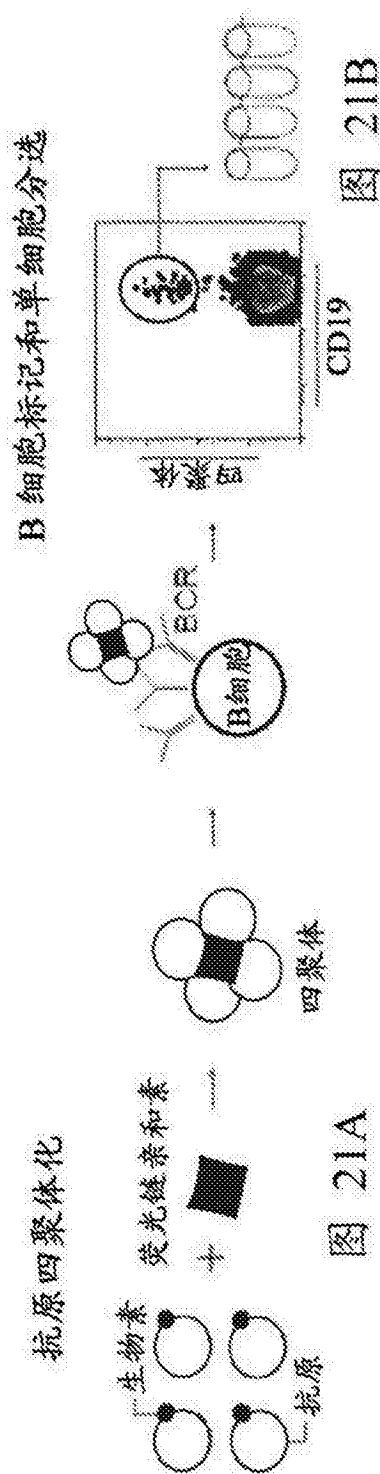
(SEQ ID NO: 82)

```

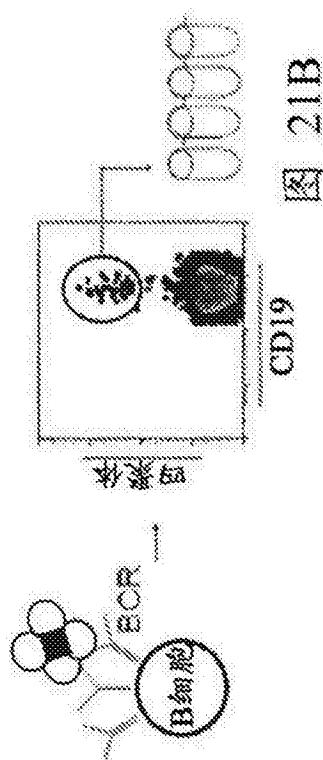
1      DIQMTQSPSS VSASVCDRVT
21     ITCRASQDIS TWLTWYQQRA CDR1
41     GKAPNLLIYG ASTLEDGVPS CDR2
61     RESGSGSGTD FTLTIDSLQP
81     DDFATYYCQQ SHSEPTFGQ CDR3
101    GTQLGIS (SEQ ID NO: 83)

```

图20



B 细胞标记和单细胞分选



巢式 RT-PCR 和测序

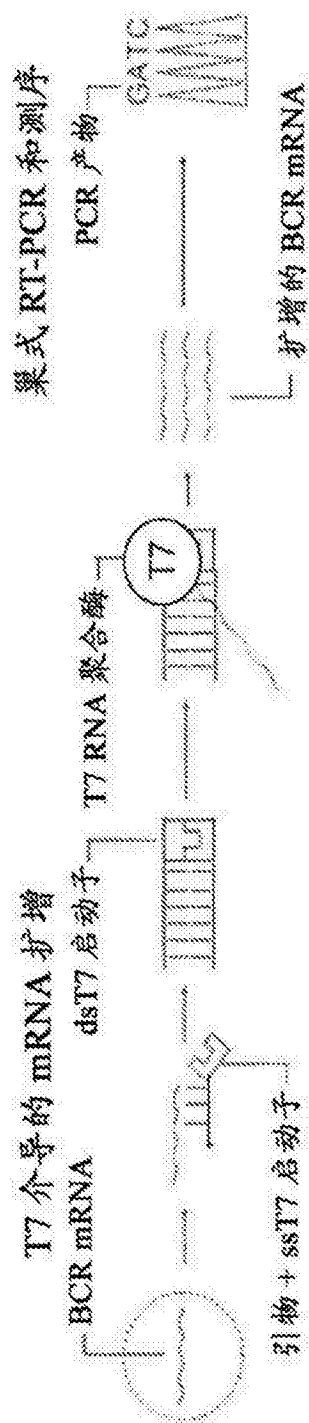


图 21C

抗体表达



活性测试



图 21E

图 21F

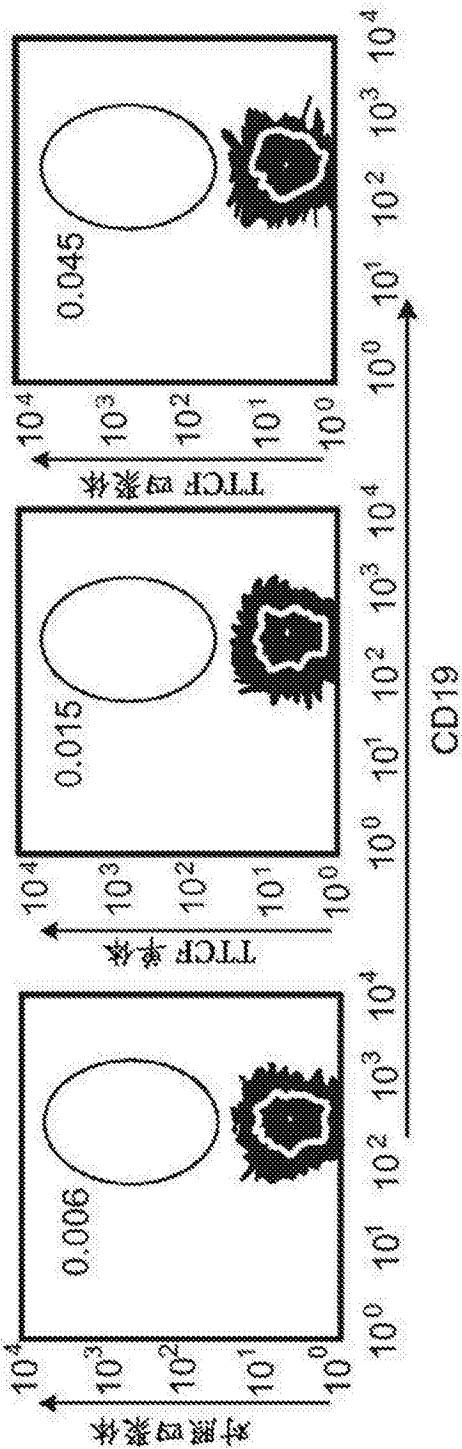


图22A

供体 1	供体 2	供体 3	对照四聚体 / 10 ⁵ B 细胞	TTCF 单体 / 10 ⁴ B 细胞	TTCF 四聚体 / 10 ⁴ B 细胞	# 四聚体 / 单体 倍数变化
			3.98	2.53	18.41	7.3
			15.03	38.64	117.18	3.1
			4.14	48.92	77.55	1.6

图22B

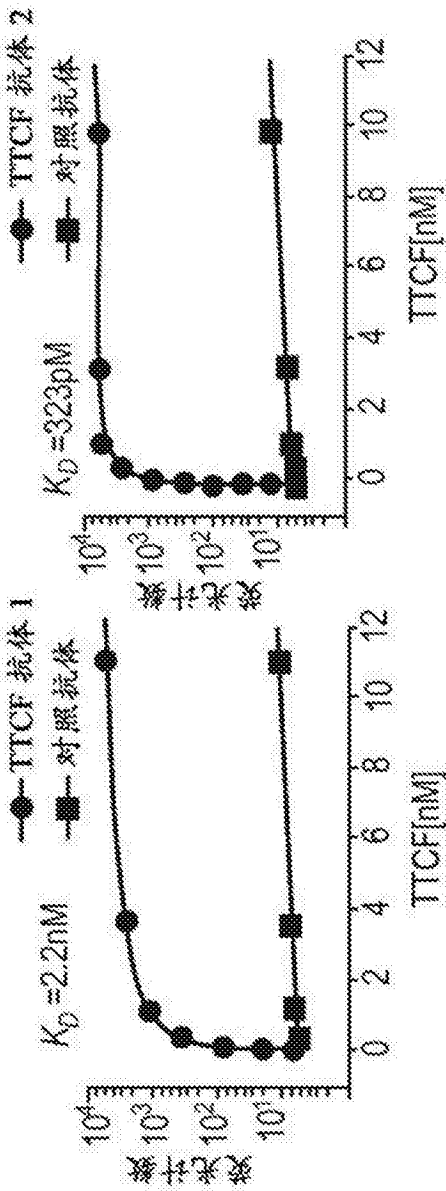


图23A

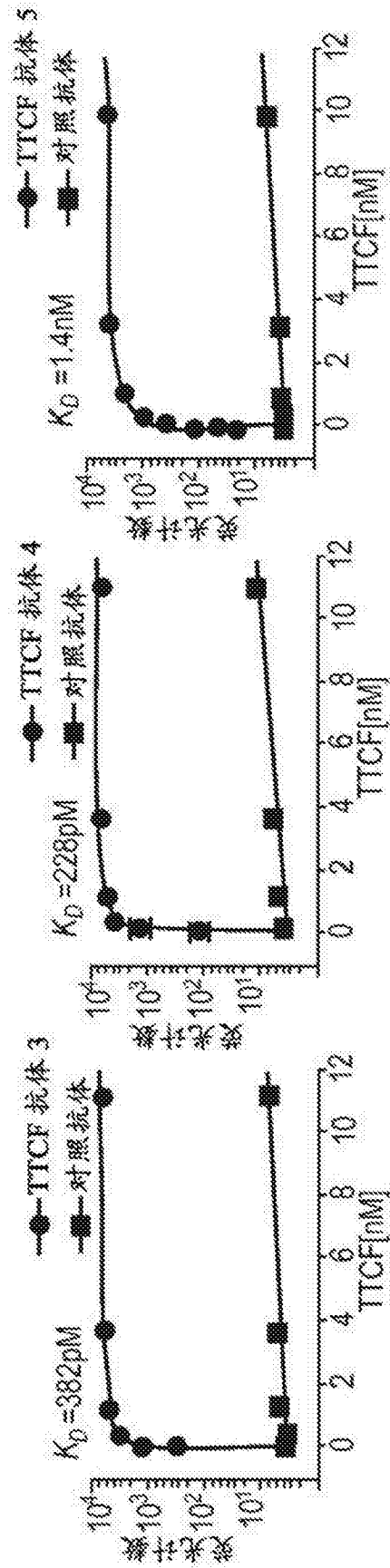


图23B

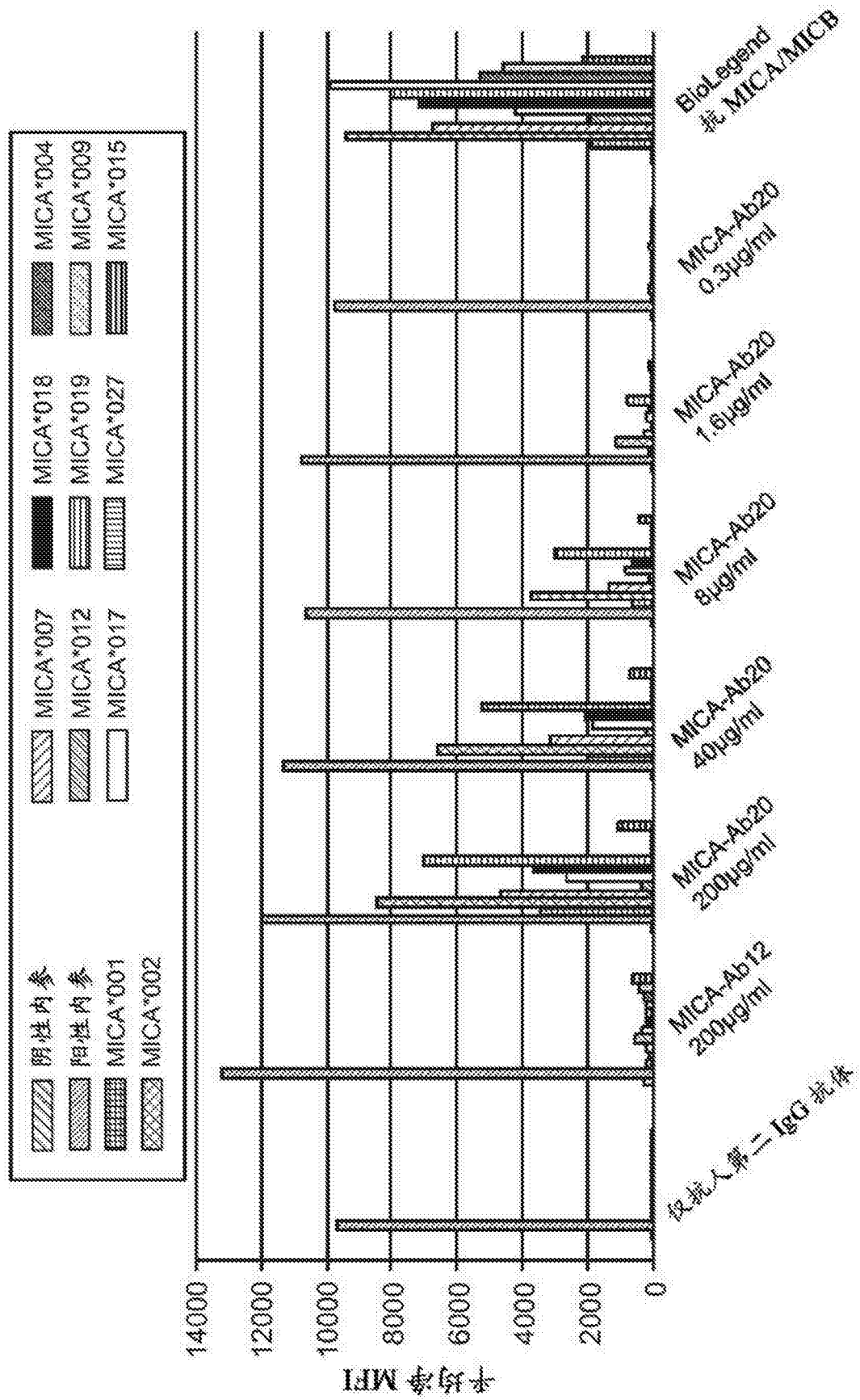


图24

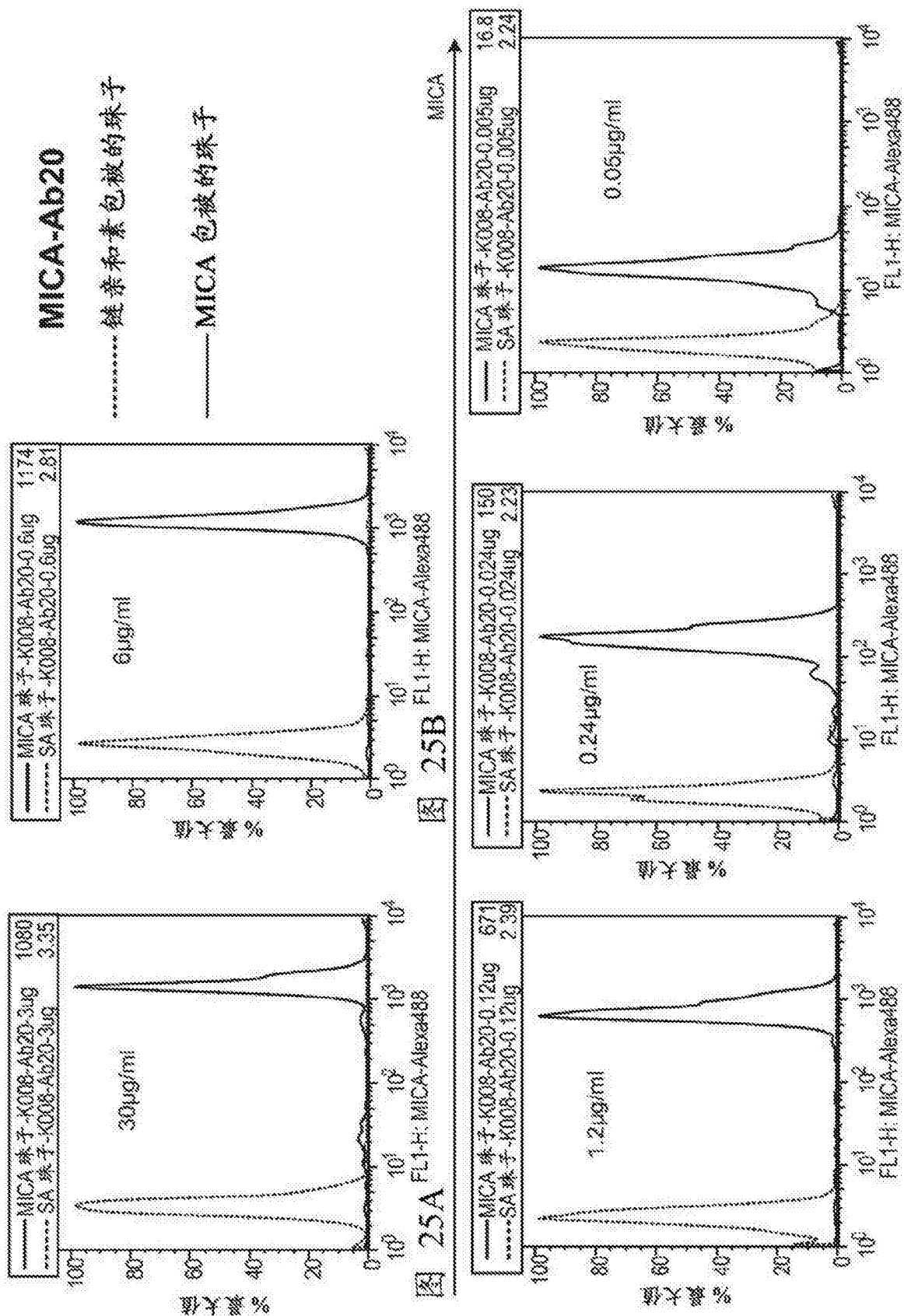
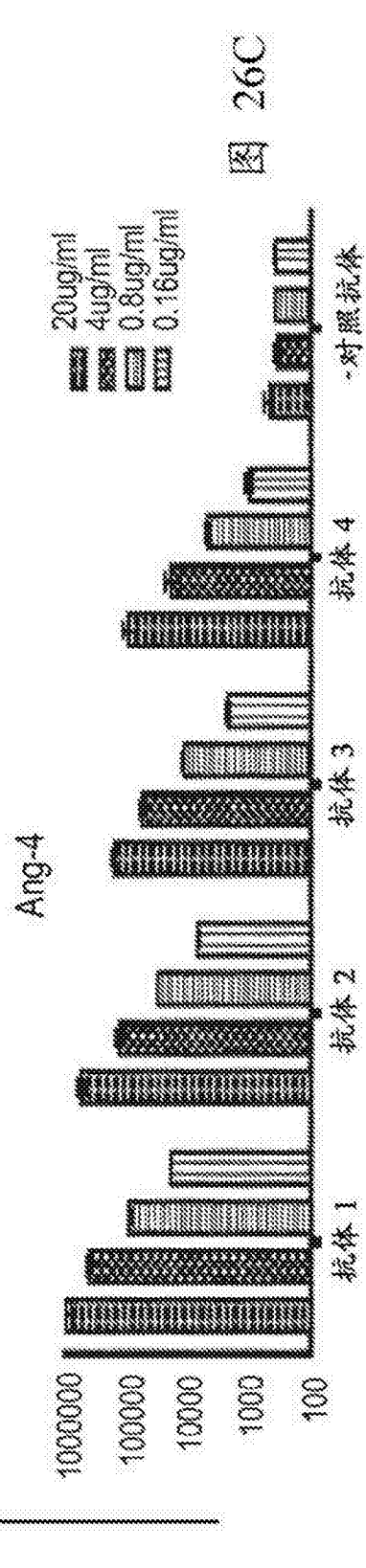
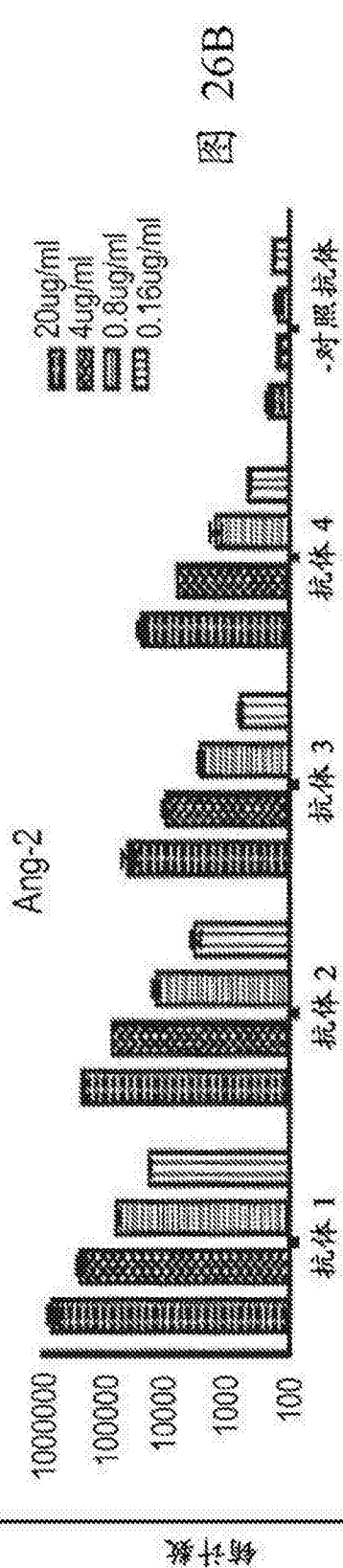
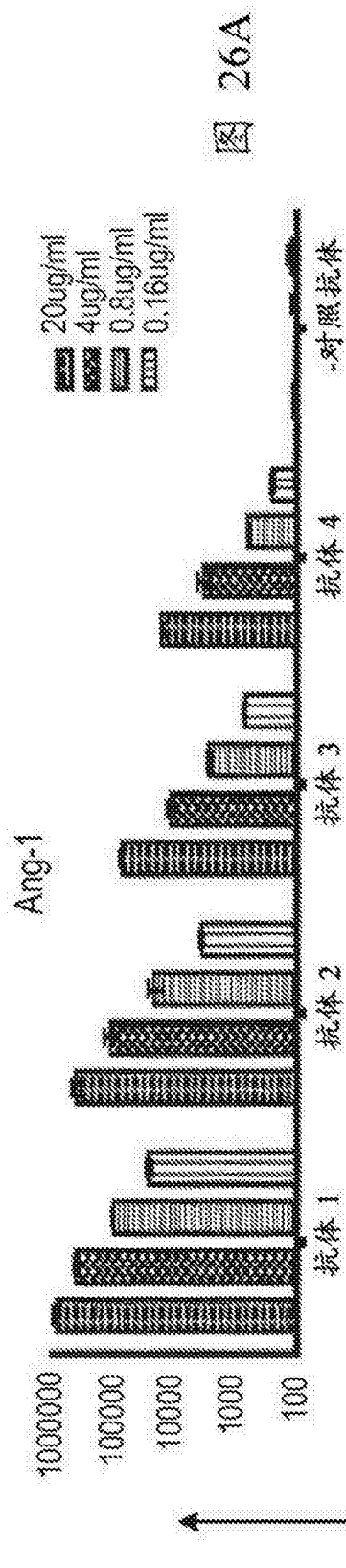


图 25E

图 25D

图 25C



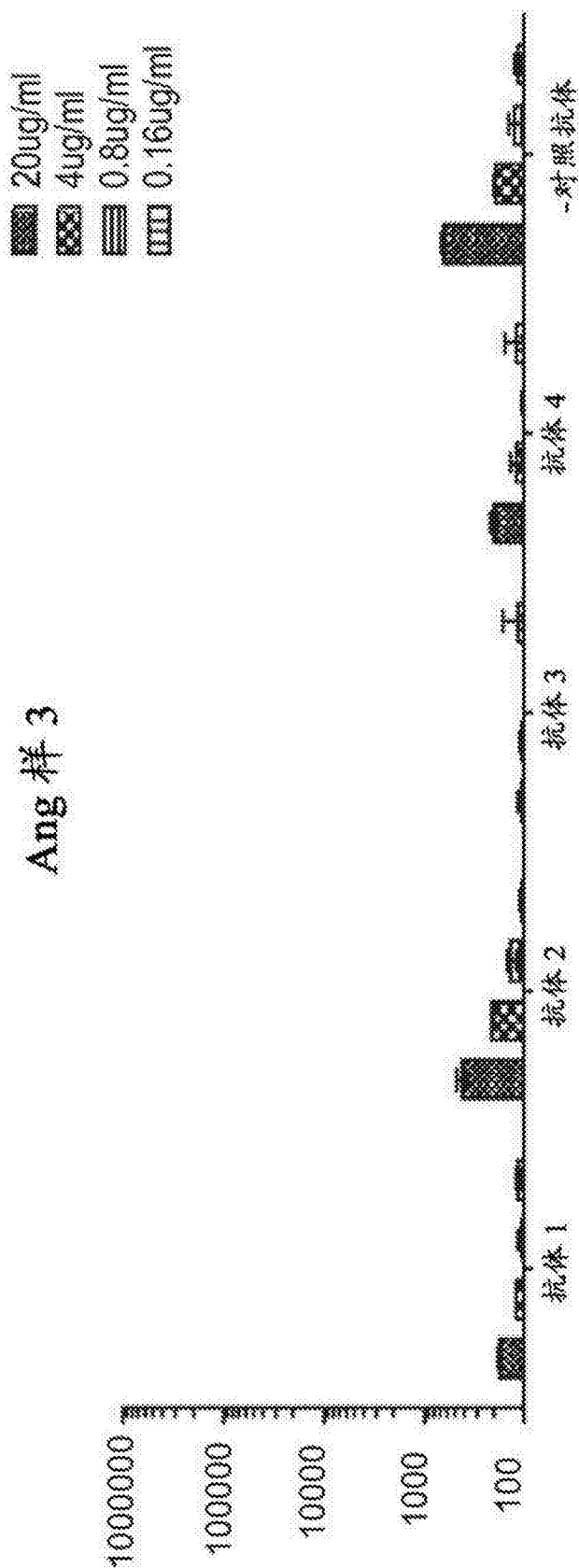


图26D

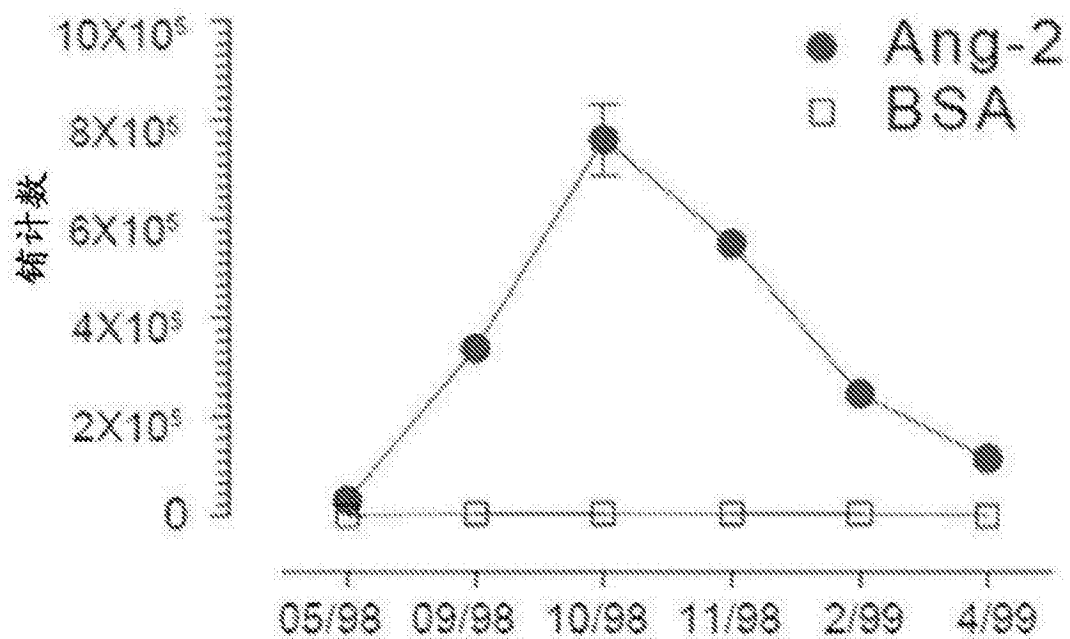


图27A

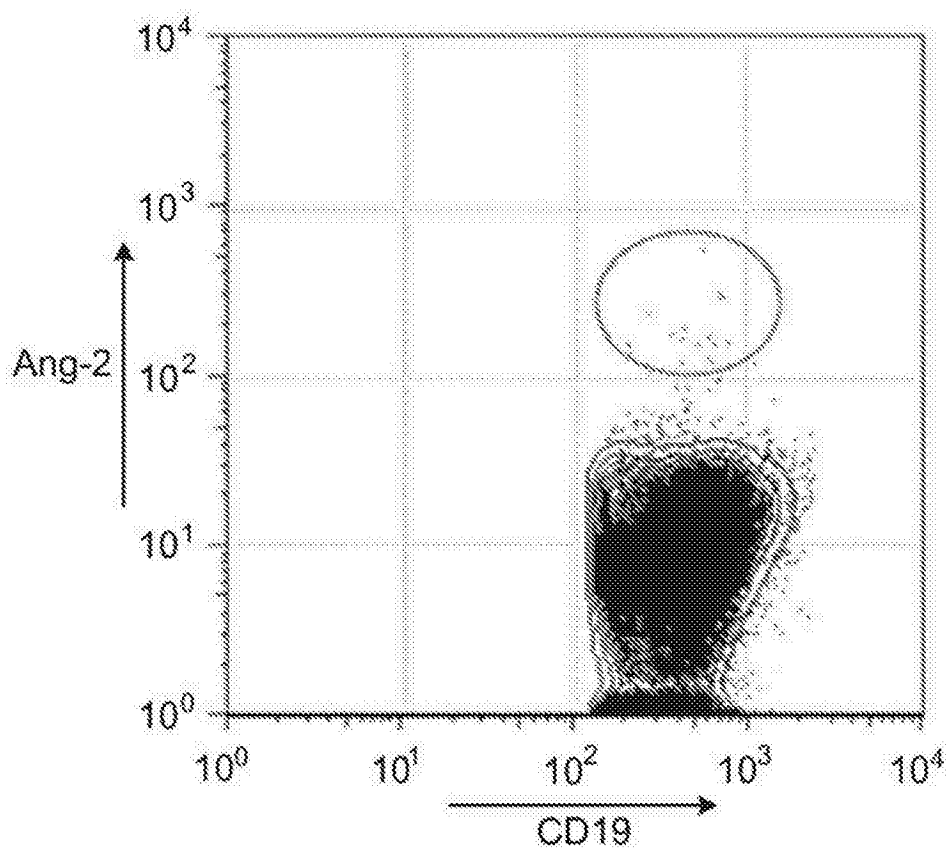


图27B

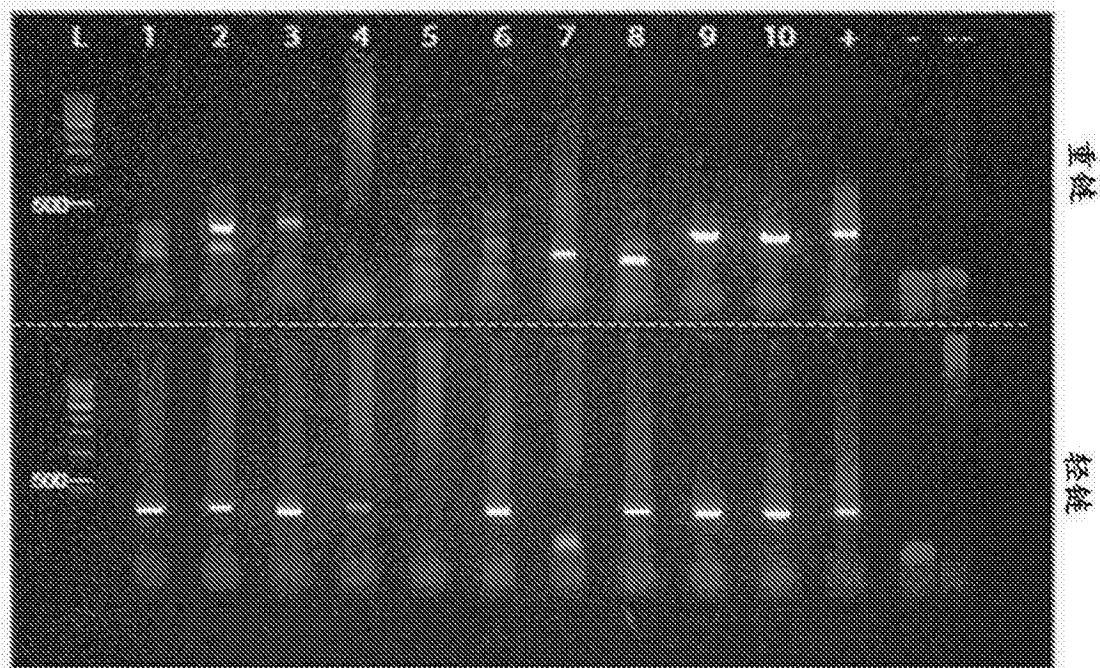


图27C

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGGAGCCTTCGGGGACCCCTGTCCCT
 CACCTGCACTGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGGAGTAACTGGTGGAGTTGGGTCCGCC
 AGCCCCAGGGAGGGGCTGGAATGGATTGGAGAAATCCATCACATTGGGAGGTCCAGC
 TACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCTGTAGACAAGTCCCAGAACCAAGTT
 CTCCCTGAGGCTGACCTCTGTGACCGCCCGGACACGGCCGTATTACTGTGCGGAAA
ATGGCTACTACGCTATGGACGCTCTGGGCCAAGGACACGGTCACCGTCTCTCTCG

(SEQ ID NO. 148)

图28

QVQLQESGPGLEPSGTLSTCTVSGGSISRSNWNWSVVRQPPGEGLEWIGEIHHRSS
 YNPSLKSRVTMSVDKSNQFSLRLTSVTAADTAVYYCAKNGYYAMDVWGQGTIVTVSS

(SEQ ID NO. 149)

图29

GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCGACTTCCTAGCCTGGTACCAGCAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTACGCTACATCCTTCAGGGCCACTGGCATC
 TCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTCTGGCACAGACTTCTCTCTCACCATCAACAGACT
 GGAACCTGAAGATTTGCAAGTGTATTACTGTACGCACTATCGTAGTTCACCTCCGTGGT
 ACACCTTTGCCCAGGGACCAAGCTGGACATGAGACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC
 (SEQ ID NO. 150)

图30

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDFLAWYQKPGQAPRLLIYATISERATGI
SDREFSGSGTDFSLTINRLEPEDEFAVYICQHYKSSPFWYTFACGTKLDMRRTVAAPSV
 (SEQ ID NO. 151)

图31

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGGGACCCCTGTCCCTC
 ACCTGGCTGTCTCTGGTGGCTCCATTACCAATGGTGGCTGGTGGAGTTGGTCCGCCAG
 CCCCAGGGAAGGGCTGGAGTGATTGGAGAAATCTATCTTAATGGGAACACCAACTCC
 AACCCGTCCCTGAAGAGTCGAGTCATCATATCAGTGGACAAAGTCCAAGAACCACTTCTCG
 CTGACCCTGAACTCTGTGACCGCCGGCACACGGCCGTGATTACTGTGGGAAGAACGCT
GCCTACAACCTTGAGTTCTGGGGCCAGGAGCCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
 167)

图32

QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGASITNGAWWSWVRQPPGKGLEWIGEILNGNTNS
 NPSLKSRVHSVDKSKNHFSLTLSVT AADTAVVYCAKNAAYNLEFWGQGALVTVSS (SEQ
 ID NO: 168)

图33

GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGCAGCCCCCTACGTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
 CGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGTTGTCATCCACCAGGGCCACCGGCATCCCAG
 ACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC
 CTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGCAGCAGTATGATAGATCATATACACTTTT
 GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 169)

图34

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSPYVAWYQQKRGQAPRLLIYGASTRATGIPDR
 FSGSGCTDFTLTISRLEPEDFAVYVCOQYDRSYVYTEGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 170)

图35

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAACCTGTGGCTC
 ACCTGCACTGTCTCTGATGCCCTCCATGAGTGAATTATCAGTGGAGCTGGATCCGGCAGGCC
 GCCGGGAAGGCACTGGAGTGGATTGGGGCGTATGTACAGCACTGGGAGTCCCCTACTACAA
 ACCCTCCCTCAAAGGTGGGTCAACCATGTCAATAGACACGTCCAAGAACCACTTCTCCCT
 GAAGCTGGCCTCTGTGACCGCGCGCAGACACGGCCATCTATTATTGTGGGAGCGGACAACA
 TATTGGTGGCTGGGTCCCGCCCTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTC
 A (SEQ ID NO: 185)

图36

QVQLQESGPGLVKPSNLSLTCTVSDASMSDYHWSWIRQAAGKGLEWIGRMYSTGSPYY
 KPSLKGRVTMSIDTSKNQFSCLKASVTAADTAIYYCASGQHIGGWVPPDEFWGGTGLVTVS
 S (SEQ ID NO: 186)

图37

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCAGCTGTCAACCCTTGGACAGCCGGCCTCCA
 TCTCCTGCAGGTCTAGTGAAGGCTCGTATATAGTGAATGGAGACACCTACTTGAGTTGGT
 TTCACCAAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTGATTTATAAAATTCTAACC GGTTCT
 CTGGGGTCCCCGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGCACAGATTTCACACTGAAAATCA
 GCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACATTTTCCGT
 GGACGTTTCGGCCAGGGGACCAAAAGTGGAAGTCAAAACGT (SEQ ID NO: 187)

图38

DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSEGLVYSDGDTYLSWFHQRPQPRLLIYKISNRFSG
 VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVVYCMQATHFPWTGQGTKVEVKR (SEQ ID NO:
 188)

图39

GAGGTGAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGCTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGAGCCTCTGGATTACCTTTAGTTCATATGGCTTGACCTGGATACGCCAGGCT
 CCGGGGAAGGGCCTGGAGTGGTCTCAAGTATCAGTGGCAGTGGCAATAACACATACTA
 CGCAGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAAGTCAAGAAAGACACTATA
 TCTACAAATGGACAGCCTGACAGTGGGAGACACGGCCGTCTATTACTGCTTAGGAGTCGG
TCAGGGCCACGGAAATTCGGGTCATCGTCTCCTCA (SEQ ID NO. 203)

图40

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGETFESSYGLTWIRQAPKGLEWVSSISGSNNITYYA
 DSVKGRFTISRDKVKKTLYLQMDSLTVGDTAVYYCLGVGGQGHGIPVIVSS (SEQ ID NO.
 204)

图41

GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGTCACCCCTTGGACAGCCGCCCTCCA
 TCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCGTACACCGTGATGGAAACACCTACTTGAGTTGGT
 TTCTGCAGAGCCAGGCCAGGCTCCAAGACTCCTAATTTATCGGATTTCTAACCGGTTCT
 CTGGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGGCGAGGACGGATTTCACACTGAAATC
 AGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGTGGCGGTTTACTACTGCATGCAAGCTACACAAATCCCC
AACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO. 205)

图42

DIVMTQTPLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHRDGNLYSWFLQRPQAPRLLIYRISNRFSG
 VPDRFSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATQIPNTEGQGTKLEIK (SEQ ID NO.
 206)

图43

GAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGAGGAGGCTTAATCCAGCCGGGGGTCCTAAGACT
 CTCCTGTGCAGCCTCGGGCTTCCTCATCAGTAGTTATTTCATGAGCTGGTCCGCCAGG
 CTCAGGGGAAGGGCCGAGTGGTCTCAGTTATTATAGCGATGCTAGTACATATTAC
 GTAGACTCCGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCACAGACAATCCAAAGAACACACTATA
 TCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGATATTACTGTCCGACACGGC
 ATTTGAATTATGACGCTGACCACCTGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCC
 TCCACCAAG (SEQ ID NO: 221)

图44

EVQLVESGGGLIQPGSLRLSCAASGFLISSYFMSWVRQAPGKPEWVSVIYSDGSTYY
 VDSVKGRFTISDNSKNTLYLQMNSLRAEDTARYYCATHRLNYDGDHWGQGLVTVSSA
 STK (SEQ ID NO: 222)

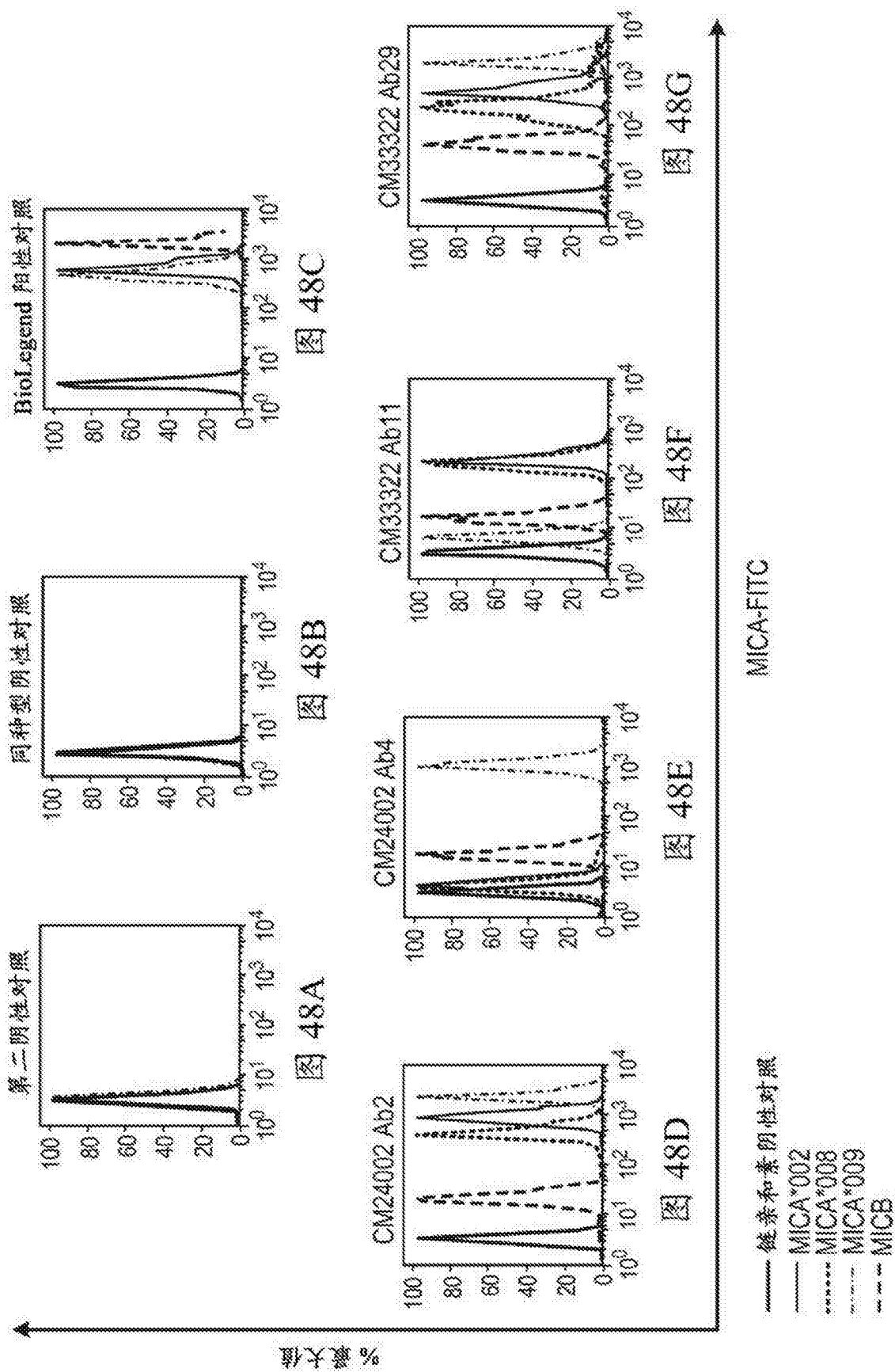
图45

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTTGGACAGCCGGCCTC
 CATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAGCCTCGTACACAGTGACGGAACACCTACTTGAATT
 GGTTTCACCAAGAGCCAGGCCAATCTCCAAGCGCCCTAATTATAGGTTTCTAAGCGG
 GACTCTGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGTCAAGTAGTATTCACACTGAA
 AATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAATTATTACTGCATGCAAGGTACACATT
 GGCCGACGTTCCGCCAAGGACCAAGGTGGAAATCAACGAACTGTGGCTGCA (SEQ
 ID NO: 223)

图46

DVVMTQSP LSLPVT L GQPA S I S C R S S Q S L V H S D G N T Y L N W F H Q R P G Q S P R R L I Y K V S K R
DSGV P D R F S G S G S D F T L K I S R V E A E D V G I Y C M O G T H W P T F G O G T K V E I K R T V A A
(SEQ ID NO: 224)

图47



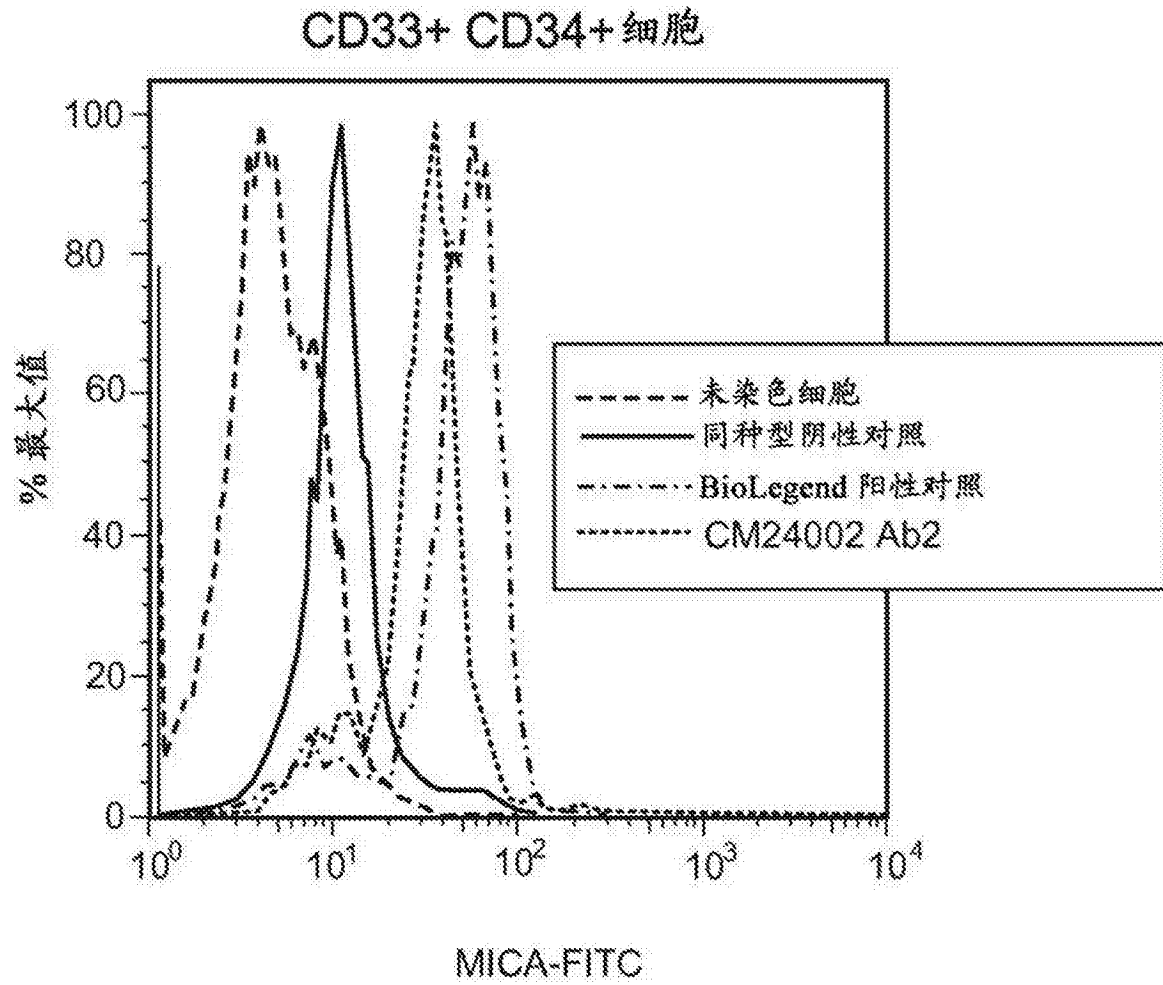


图49

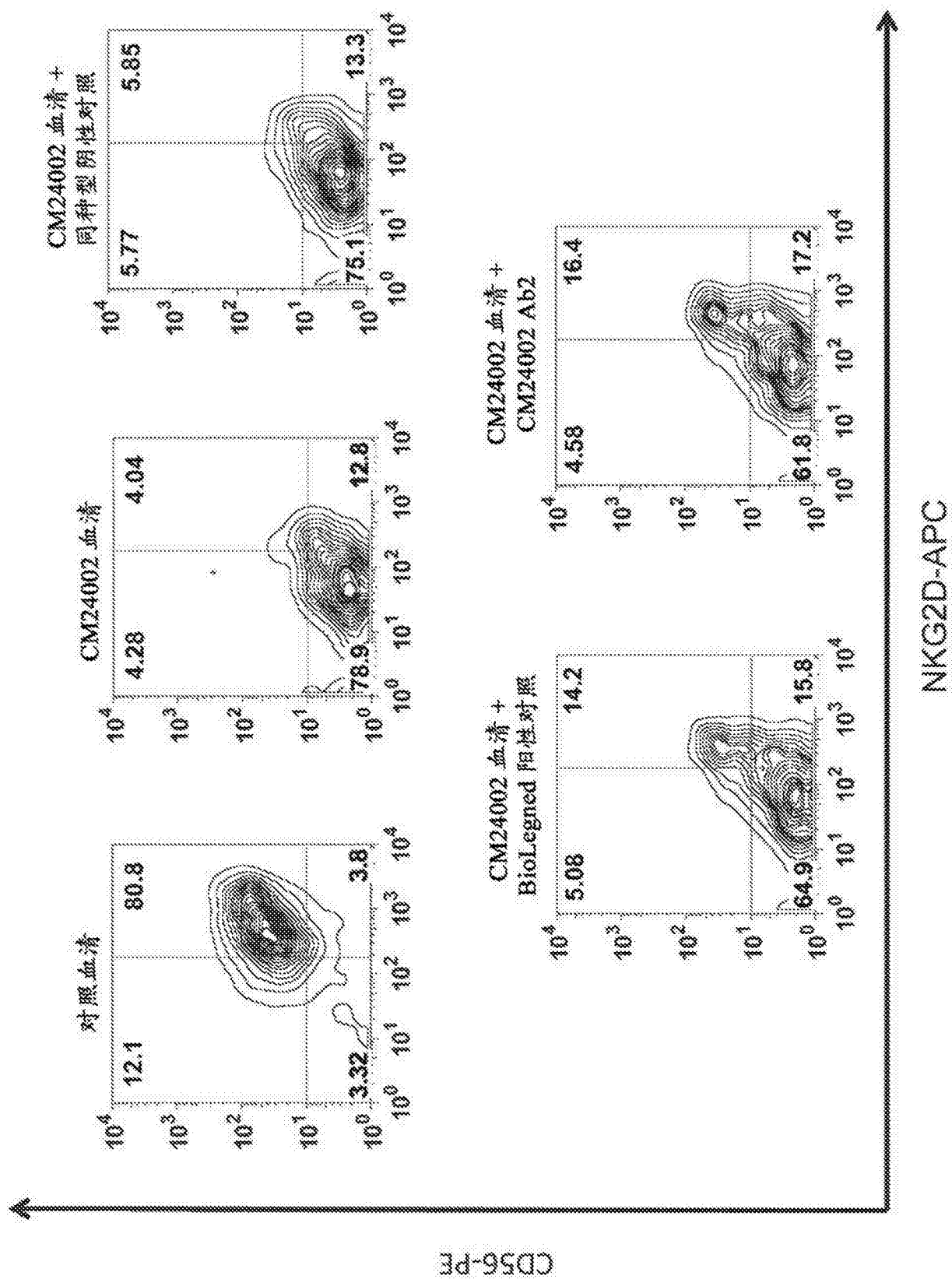


图50

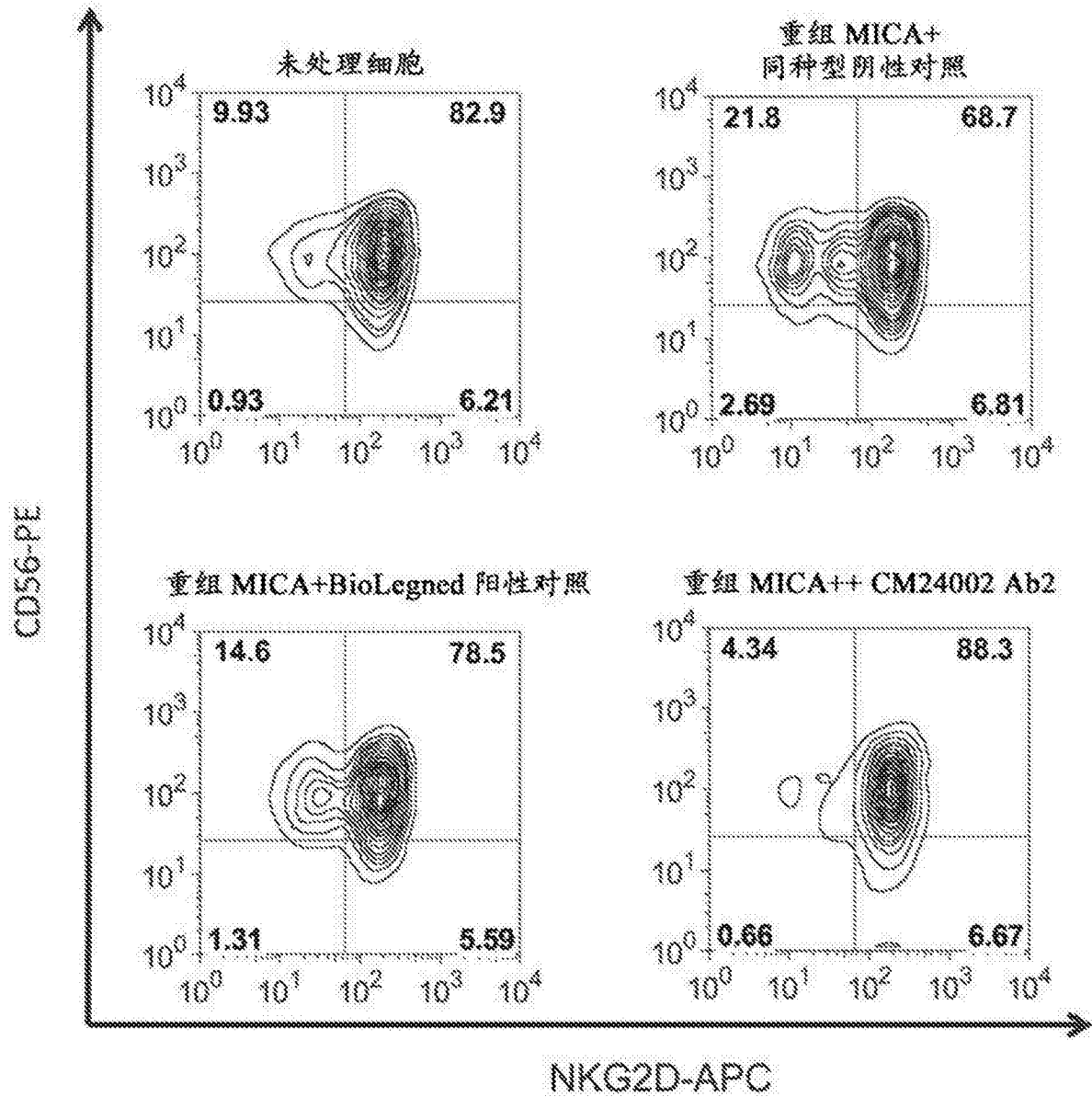


图51

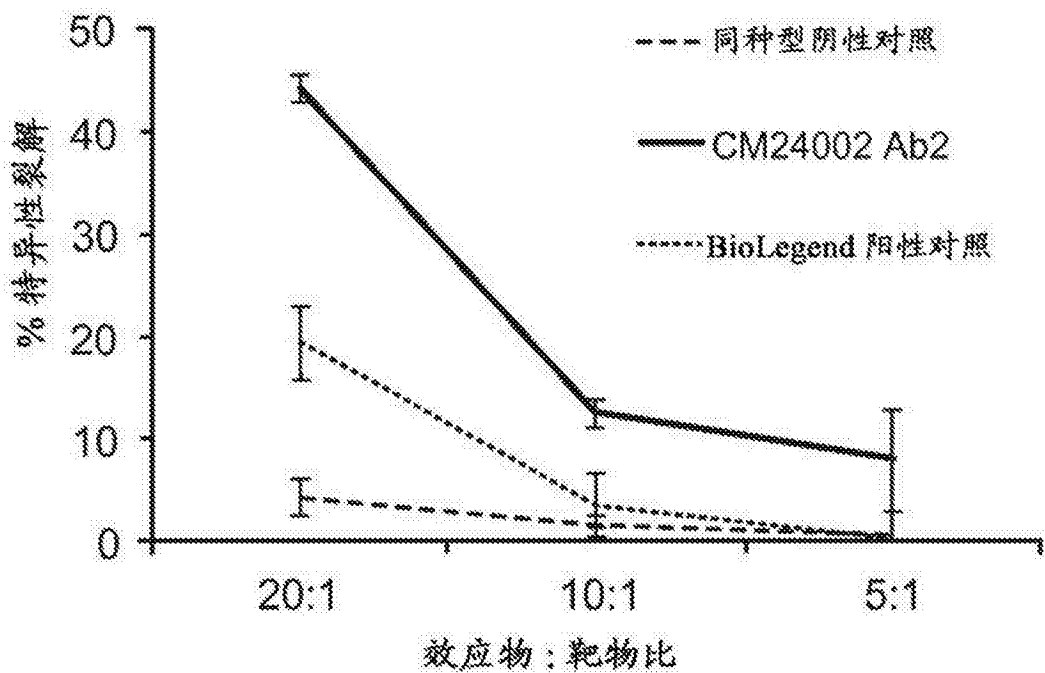


图52

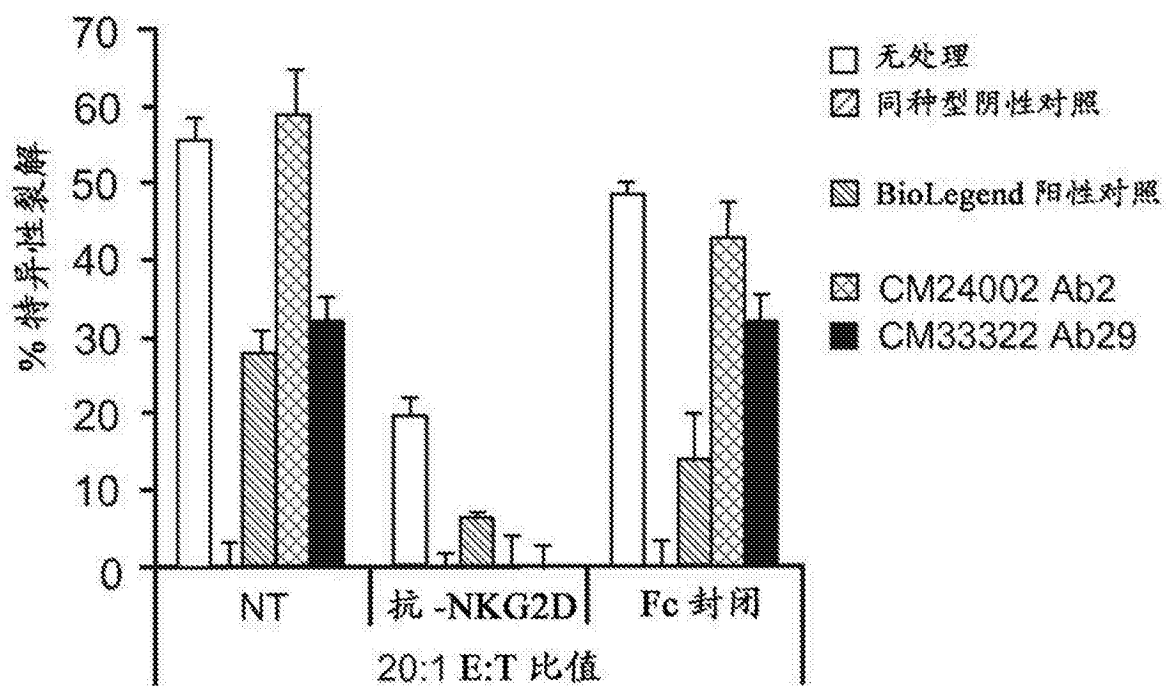


图53

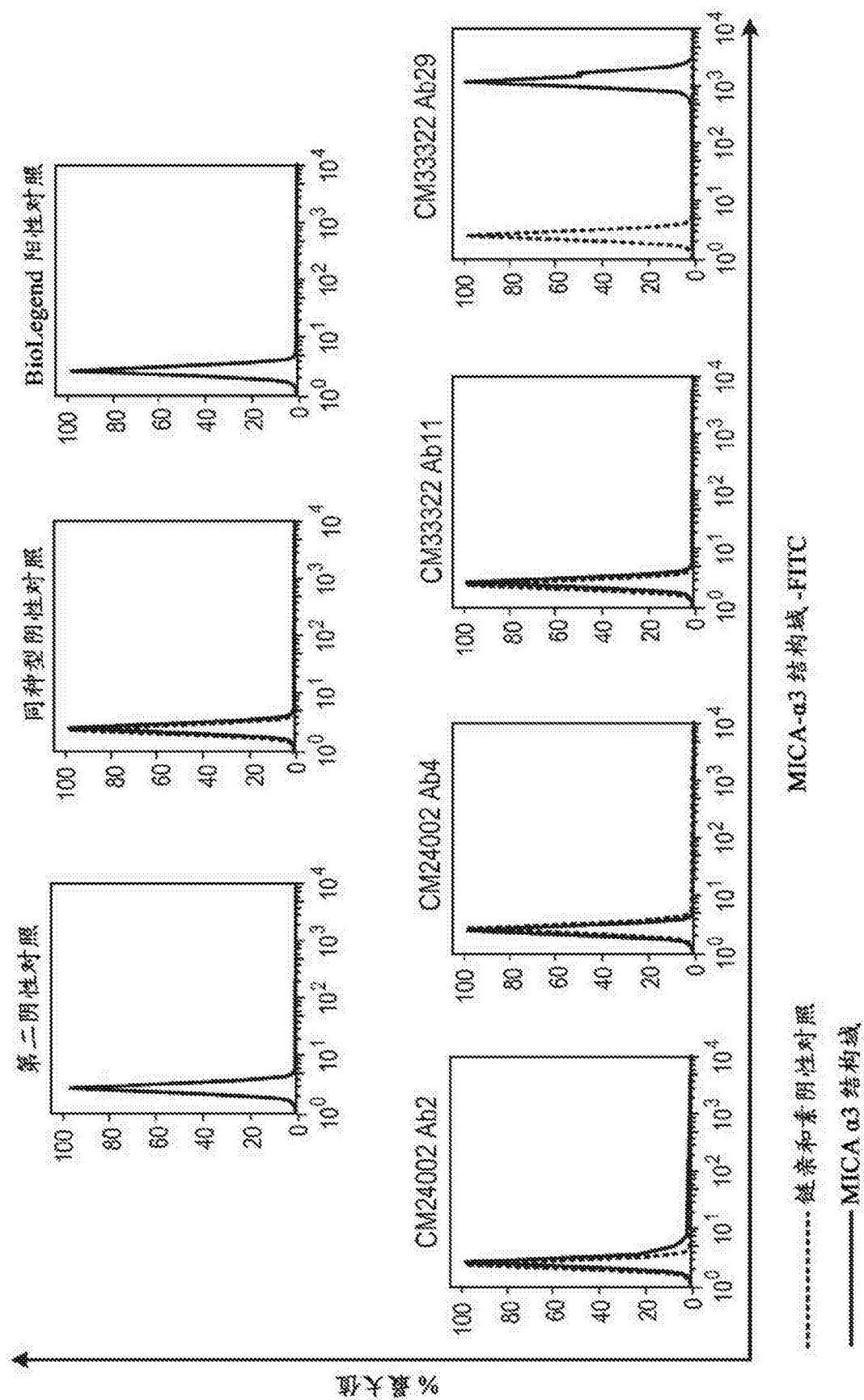


图54

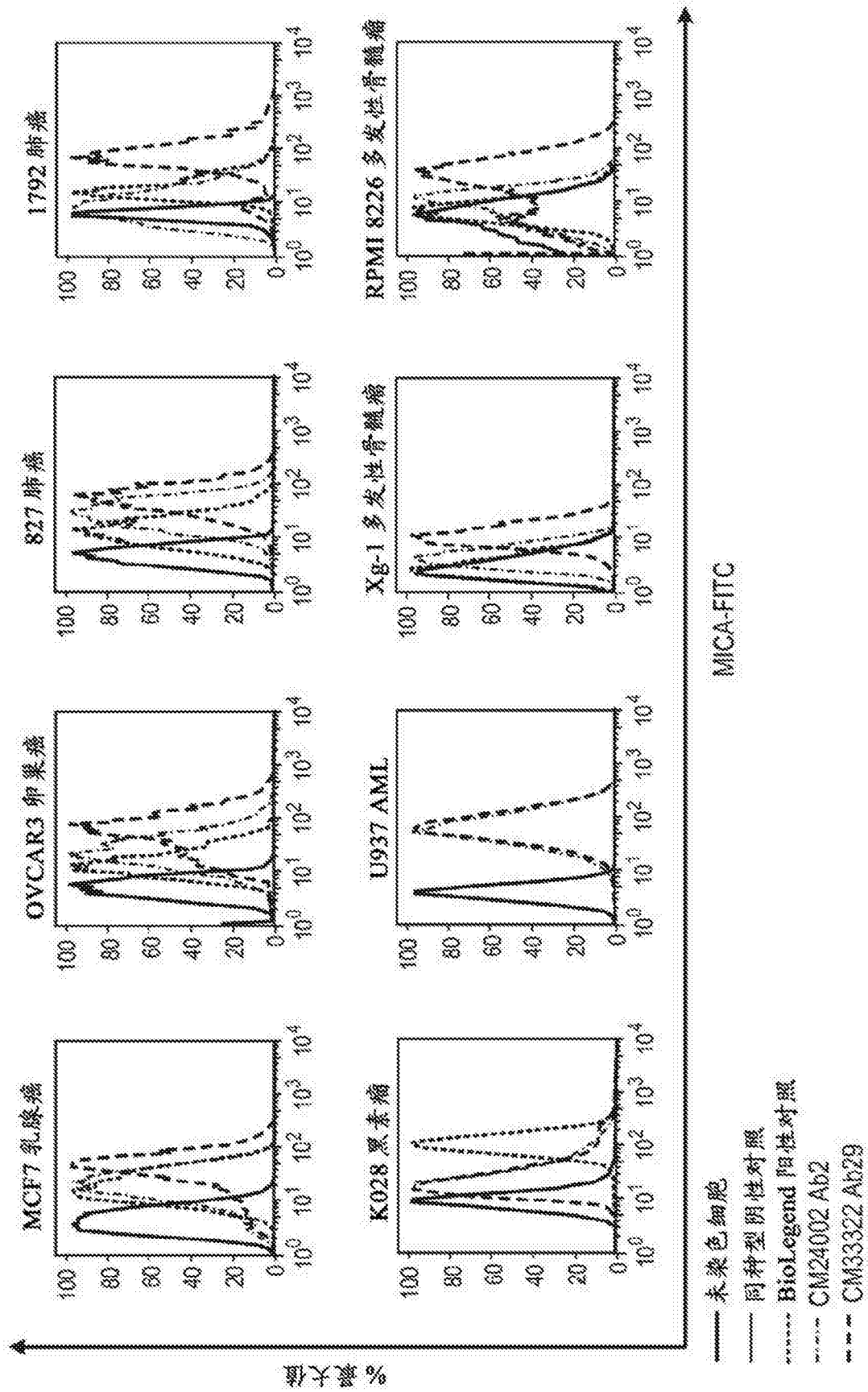


图55

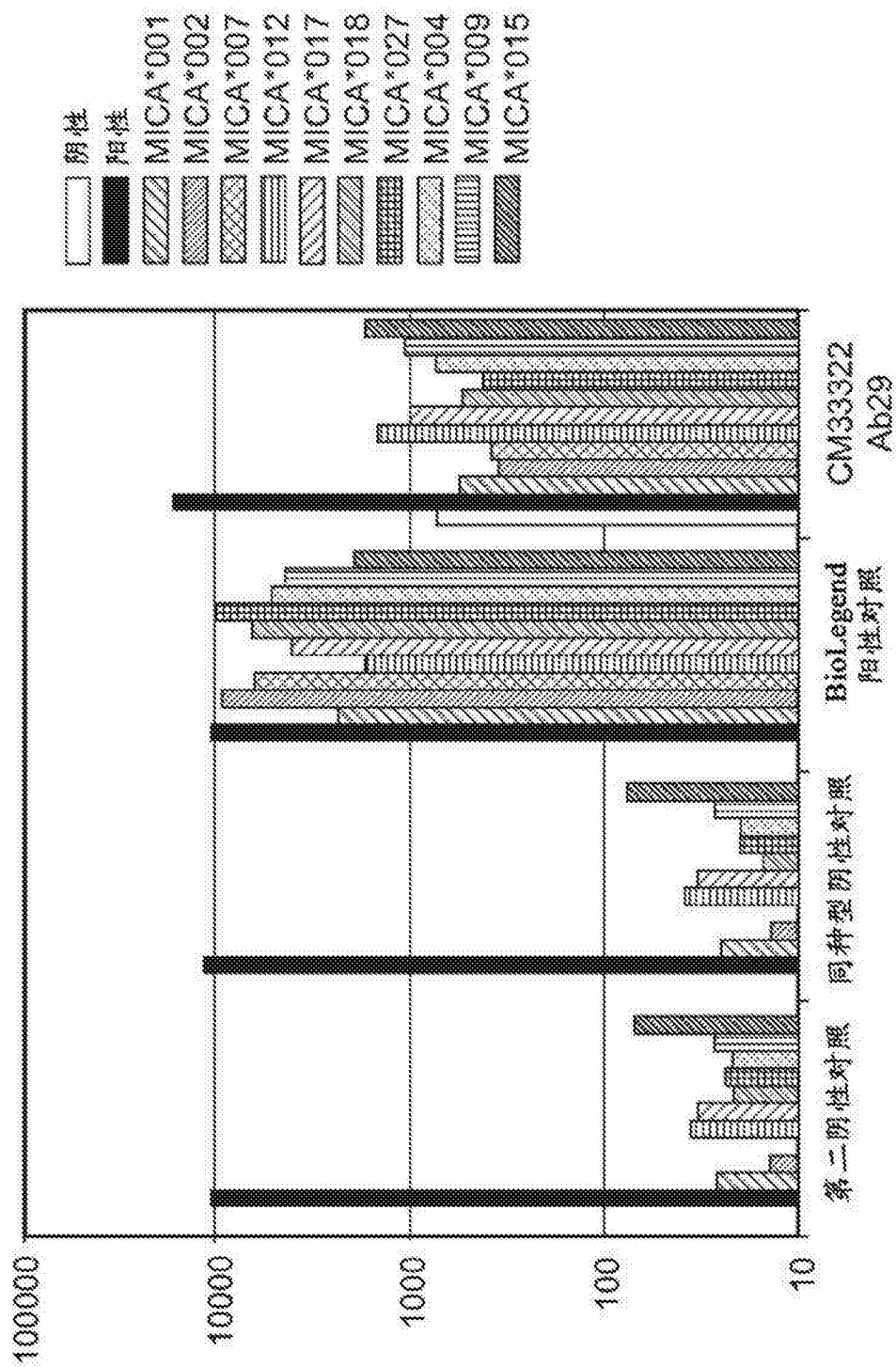


图56

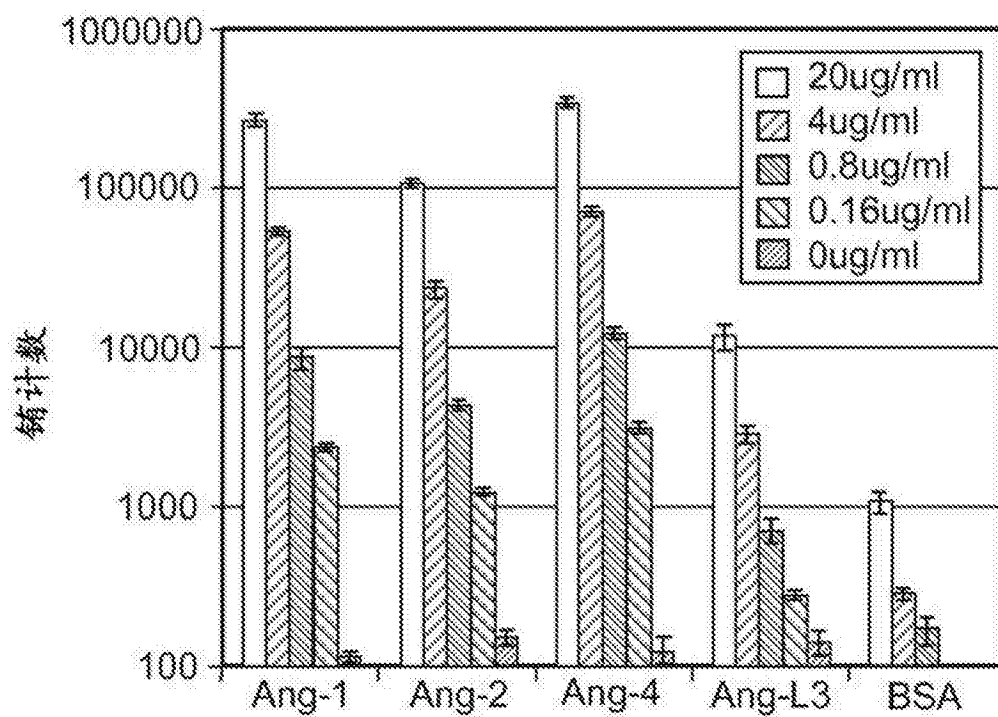


图57