



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 114524878 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202011325843.0

(22) 申请日 2020.11.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114524878 A

(43) 申请公布日 2022.05.24

(73) 专利权人 康诺亚生物医药科技(成都)有限公司

地址 610219 四川省成都市双流区成都天府国际生物城中路18号D2号楼

(72) 发明人 徐刚 陈博 王常玉

(74) 专利代理机构 北京植德律师事务所 11780
专利代理师 唐华东

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103261220 A, 2013.08.21

审查员 杨佳倩

权利要求书3页 说明书66页
序列表55页 附图24页

(54) 发明名称

一种双特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本公开涉及一种双特异性抗体及其用途。所述双特异性抗体或其抗原结合片段包含：(a) 第一抗原结合部分或其抗原结合片段，所述第一抗原结合部分包含第一轻链和第一重链，所述第一轻链为 κ 型轻链，所述第一抗原结合部分包含与第一抗原结合的第一结合结构域；和 (b) 第二抗原结合部分或其抗原结合片段，所述第二抗原结合部分包含第二轻链和第二重链，所述第二轻链为 λ 型轻链，所述第二抗原结合部分包含与第二抗原结合的第二结合结构域。所述双特异抗体的重链和轻链的错配率低，其纯化收率高，且不与 Fc γ R 受体结合，减低了产生细胞因子风暴的风险，耐受良好，其疗效和安全性均优于同类抗体。

1. 一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含:

(a) 第一抗原结合部分或其抗原结合片段,所述第一抗原结合部分包含第一轻链和第一重链,所述第一轻链为 κ 型轻链,所述第一抗原结合部分包含与第一抗原结合的第一结合结构域;和

(b) 第二抗原结合部分或其抗原结合片段,所述第二抗原结合部分包含第二轻链和第二重链,所述第二轻链为 λ 型轻链,所述第二抗原结合部分包含与第二抗原结合的第二结合结构域;

所述第二抗原为CD3抗原;

所述第二结合结构域的第二轻链CDR为:

由氨基酸序列SEQ ID NO: 7构成的第二轻链CDR1;

由氨基酸序列SEQ ID NO: 8构成的第二轻链CDR2;

由氨基酸序列SEQ ID NO: 21构成的第二轻链CDR3;

所述第二结合结构域的第二重链CDR为:

由氨基酸序列SEQ ID NO: 26构成的第二重链CDR1;

由氨基酸序列SEQ ID NO: 27构成的第二重链CDR2;

由氨基酸序列SEQ ID NO: 28构成的第二重链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述第二抗原结合部分的第二轻链可变区具有Gln40Glu突变(V λ CD3: Gln40Glu);所述第二抗原结合部分的第二重链可变区具有Gln39Lys突变(VHCD3: Gln39Lys)。

3. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO: 18或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO: 50或其任何变体的第二重链可变区。

4. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO: 58;和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO: 60;或者

所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO: 66;和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO: 68。

5. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述第一抗原为肿瘤抗原。

6. 根据权利要求5所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述肿瘤抗原选自: CD19、CD20、CD22、CD30、CD38、CD72、CD180、CD171 (L1CAM)、CD123、CD133、CD138、CD37、CD70、CD79a、CD79b、CD56、CD74、CD166、CD71、CLL-1/CLECK12A、ROR1、BCMA、GPC3、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSCA、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1、Her2、Her3、MUC1、MUC17、Claudin18或MAGEA3。

7. 根据权利要求5所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述肿瘤抗原为CD20、BCMA或GPC3。

8. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中,所述双特异抗体的Fc部分具有Ser228Pro、Leu235Glu和Pro329Ala突变。

9. 编码根据权利要求1-8任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段的核酸。

10. 根据权利要求9所述的核酸, 其中, 所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸为核苷酸序列SEQ ID NO: 59, 和所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸为核苷酸序列SEQ ID NO: 61; 或者

所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸为核苷酸序列SEQ ID NO: 67, 和所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸为核苷酸序列SEQ ID NO: 69。

11. 含有权利要求9或10所述核酸的载体。

12. 含有权利要求9或10所述的核酸或权利要求11所述载体的细胞。

13. 一种组合物, 其包含权利要求1-8任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段、权利要求9或10所述的核酸、权利要求11所述的载体和/或权利要求12所述的细胞。

14. 一种抗体-药物偶联物, 其包含共价附着至治疗部分的权利要求1-8任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段。

15. 根据权利要求14所述的抗体-药物偶联物, 其中, 所述治疗部分为细胞毒性部分、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。

16. 根据权利要求15所述的抗体-药物偶联物, 其中, 所述细胞毒性部分选自以下:

紫杉醇; 细胞松弛素B; 短杆菌肽D; 溴化乙锭; 吐根碱; 丝裂霉素; 依托泊苷; 替尼泊苷; 长春新碱; 长春碱; 秋水仙碱; 多柔比星; 柔红霉素; 二羟基蒽二酮; 美登素; 抗有丝分裂剂; 海兔毒素10或15; 伊立替康; 米托蒽醌; 光辉霉素; 放线菌素D; 1-脱氢睾酮; 糖皮质激素; 普鲁卡因; 丁卡因; 利多卡因; 普萘洛尔; 嘌呤霉素; 卡奇霉素; 抗代谢药;

二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀 (BSNU)、洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪 (DTIC)、丙卡巴嗪;

铂类衍生物; 多卡霉素A、多卡霉素SA、雷切霉素 (CC-1065);

放线菌素、博来霉素、伊达比星、光霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素 (AMC); 吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓 (PDB);

白喉毒素及相关分子、蓖麻毒素、霍乱毒素、志贺样毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、蒴莲根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -sarcin、PAPI、PAPII、PAP-S泻果素、巴豆毒素、肥皂草 (sapaonaria officinalis) 抑制剂、白树毒素、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素毒素; 核糖核酸酶 (RNase); DNase I、葡萄球菌内毒素A; 商陆抗病毒蛋白; 假单胞菌内毒素;

所述细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、安西司亭和TNF α ;

所述放射性同位素选自 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。

17. 根据权利要求16所述的抗体-药物偶联物, 其中,

所述抗有丝分裂剂为单甲基奥瑞他汀E或F;

所述抗代谢药为甲氨喋呤、6巯基嘌呤、6巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5氟尿嘧啶、癸二嗪、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨;

所述铂类衍生物为顺铂或卡铂;

所述白喉毒素及相关分子为白喉A链及其活性片段和杂合分子;

所述蓖麻毒素为蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素；

所述志贺样毒素为SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素或志贺毒素。

18. 一种试剂盒, 其包含其包含权利要求1-8任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段、权利要求9或10所述的核酸、权利要求11所述的载体、或权利要求12所述的细胞、权利要求13所述的组合物和/或权利要求14-17任一项所述的抗体-药物偶联物。

19. 含权利要求1-8任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段、权利要求9或10所述的核酸、权利要求11所述的载体、或权利要求12所述的细胞、权利要求13所述的组合物和/或权利要求14-17任一项所述的抗体-药物偶联物在制备用于诊断、治疗或预防与肿瘤抗原相关疾病药物或试剂盒中的用途。

20. 根据权利要求19所述的用途, 其中, 所述肿瘤抗原为CD20, 所述肿瘤抗原相关疾病为与CD20相关疾病; 与CD20相关的疾病包括B细胞疾病, 所述疾病选自非霍奇金淋巴瘤(NHL), 急性淋巴细胞性白血病(ALL), 慢性淋巴细胞性白血病(CLL), 弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL), 滤泡性淋巴瘤(FL), 套细胞淋巴瘤(MCL), 边缘区淋巴瘤(MZL), 以及多发性骨髓瘤(MM)和霍奇金淋巴瘤(HL); 或者

所述肿瘤抗原为BCMA, 所述肿瘤抗原相关疾病为与BCMA相关疾病; 与BCMA相关的疾病是B-细胞相关癌症, 其选自多发性骨髓瘤、恶性浆细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤、Kahler's病和骨髓性白血病、浆细胞白血病、浆细胞瘤、B-细胞幼淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B-细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、前体B-淋巴细胞淋巴瘤、髓性白血病、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、原发性纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B-细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、富含T细胞/组织细胞的大B-细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性皮肤弥漫性大B-细胞淋巴瘤(腿型)、老年人EBV阳性弥漫性大B-细胞淋巴瘤、炎症相关的弥漫性大B-细胞淋巴瘤、血管内大B-细胞淋巴瘤、ALK阳性大B-细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、HHV8相关的多中心Castleman病中产生的大B-细胞淋巴瘤、未分类的具有弥漫性大B-细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤中间特征的B-细胞淋巴瘤、未分类的具有弥漫性大B-细胞淋巴瘤和经典霍奇金淋巴瘤中间特征的B-细胞淋巴瘤以及其他B-细胞相关淋巴瘤; 或者, 所述B细胞疾病是B细胞障碍; 浆细胞障碍选自: 多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球蛋白血症、淀粉样变性、华氏巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性骨髓瘤、重链病、意义不明的单克隆丙种球蛋白病以及郁积型多发性骨髓瘤; , 所述疾病是系统性红斑性狼疮或类风湿性关节炎; 或者

所述肿瘤抗原为GPC3, 所述肿瘤抗原相关疾病为与GPC3相关疾病; 与GPC3相关的疾病包括肿瘤为GPC3阳性肝癌、GPC3阳性肝细胞癌、GPC3阳性胰腺癌、GPC3阳性肺癌、GPC3阳性结肠癌、GPC3阳性乳腺癌、GPC3阳性前列腺癌、GPC3阳性白血病或GPC3阳性淋巴瘤。

一种双特异性抗体及其用途

技术领域

[0001] 本公开涉及一种双特异性抗体及其用途,特别是结合CD3及另一种抗原的双特异性抗体及其用途。

背景技术

[0002] T细胞双特异抗体(或称T细胞衔接器),是一种特殊的抗体分子,可通过其一端识别靶细胞表面抗原(抗原臂),通过另一端结合T细胞CD3受体(CD3臂),以一种类似于TCR/肽/HLA的方式,使T细胞上的CD3发生聚集,从而活化T细胞并杀伤肿瘤。上世纪80年代,即有报道利用双特异抗体杀伤肿瘤细胞(Nature.1985Apr 18-24;314(6012):628-31;Nature.1985Jul 25-31;316(6026):354-6)。经过30多年的研究,基本解决了抗体的错配问题,有3个双特异抗体药物陆续获得批准上市。尽管在批准的适应症中显示了非常好的疗效,但随之带来的副作用和使用上的局限性,阻碍了早期这些双特异抗体的广泛应用。例如:早期上市的catumaxomab由于Fc段与肝脏Kupffer细胞表达的Fc γ 受体结合,引发了快速的细胞因子释放,目前已退市;而2014年上市的blinatumomab,由于采用Fv抗体片段,生物半衰期仅为2小时,需低剂量持续静脉输注,同时FDA批准伴有细胞因子释放综合征和神经毒性的黑框警告。

[0003] 正常免疫应答过程中,TCR以低亲和力(约1-100 μ M)结合感染或突变细胞上的外源肽-人白细胞抗原复合物(HLA),通过CD3信号传导复合物(包括CD3 ϵ γ 、CD3 ϵ δ 和CD3 $\zeta\zeta$),将活化信号传导到核内,激活转录因子及其下游蛋白(细胞因子、颗粒酶、穿孔素等)的表达,其中TCR复合物产生的信号强度将决定T细胞的命运。早期开发的CD3双特异抗体,多基于OKT3、L2K、UCHT1和TR66等少数鼠源抗体,亲和力较高,导致T细胞过度活化,释放大量的细胞因子,产生细胞因子风暴综合征;同时,高亲和力也会导致双特异抗体在二级淋巴器官的富集,减低在肿瘤组织的暴露。

[0004] 抗体Fc部分与Fc γ 受体的结合能力是另一个对影响药物安全的重要因素,由于Fc γ 受体在多种正常组织表达,双特异抗体通过Fc与细胞膜上的Fc γ 受体结合后,可导致另一端结合的CD3受体因Fc γ 受体聚集而交联活化,从而产生严重的脱靶毒性。通过使用Fc γ 受体结合能力较弱的人IgG2亚型或IgG4亚型,或者进一步在CH2相应位点进行氨基酸替换,如:Armour等将IgG1和IgG4的第233-236位点(EU序列编号)替换成IgG2相应序列,减少了和Fc γ 受体的结合(Eur.J.Immunol.1999),Newman等在IgG4引入突变Ser228Pro和Leu235Glu,稳定IgG4结构同时减少与Fc γ 受体的结合(Clin Immunol.2001),Idusogie等发现将Asp270、Lys322、Pro329或Pro331分别替换成Ala,可减少IgG1与补体C1q的结合(J Immunol.2000)等。

[0005] 链间错配是天然IgG样双特异抗体开发的主要工艺难点。Merchant AM等发明的共同轻链(1998),或Fischer N等开发的共同重链(2015),通常都需要进行复杂的蛋白质工程改造,或者利用转基因动物产生(McWhirter J,2012);Carter P等(1997)通过在抗体Fc段引入knobs-into-holes互补突变,以解决重链间的错配;Schaefer G等(2011)开发了将轻、

重链的Fab部分或全长进行交换的CrossMab技术,解决轻链错配问题,其中部分交换的CrossMab^{VH-VL}和CrossMab^{CH1-CL}需要引入额外肽段以实现正确配对,而Fab全长交换的CrossMab^{Fab}正确配对率不足50%。

发明内容

[0006] 在表达双特异抗体的过程中,本发明人意外发现,将具有 λ 轻链的人源化CD3抗体和具有 κ 轻链的靶向抗体进行组合,CD3抗体 λ 轻链更倾向于和同源的CD3重链进行配对,而靶向抗体kappa轻链倾向于和同源的靶向抗体重链配对。通过进一步在轻、重链间设计互补电荷对,可以提高正确配对效率。并且,实验证明,利用CD20、BCMA和GPC3等多个靶点抗体和人源化CD3抗体构建的新型T细胞连接器,经三步纯化均实现98-100%的单体纯度,错配比例极低(<1%)。

[0007] 本公开提供了一种新型T细胞连接器,采用不同类型轻链 $\kappa\lambda$ 双特异抗体设计,和全长IgG构型,其中:结合靶细胞和T细胞CD3的抗体臂分别采用kappa轻链和lambda轻链,与其同源的重链进行配对,同时引入互补电荷对增强正确配对率;通过亲和力优化,新型T细胞连接器低浓度下即可募集活化T细胞,对靶细胞产生有效杀伤,无靶细胞存在时不激活T细胞;同时,新型T细胞 $\kappa\lambda$ 双特异抗体不与Fc γ R受体结合,减低了产生细胞因子风暴的风险。采用本公开方法构建的新型CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体、BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体和GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体纯化收率高,通过三步法纯化可实现>99%纯度。动物对新型CD20-CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体耐受良好,新型T细胞连接器的疗效和安全性均优于同类抗体。

[0008] 因此,在一方面,本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分。

[0009] 在一方面,本公开提供了编码如前述方面的双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸。

[0010] 在一方面,本公开提供了包含前述方面的核酸的载体。

[0011] 在一方面,本公开提供了包含前述方面的载体的细胞。

[0012] 根据前述任一方面的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化的。

[0013] 在一方面,本公开提供了包含如前述任一方面的抗体或其抗原结合部分或其编码核酸和药学上可接受的载体的药物组合物或试剂盒。

[0014] 在一方面,本公开提供了包含共价附着至治疗部分的前述任一方面所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子的抗体-药物偶联物。

[0015] 在一方面,本公开提供了治疗与相关病症的方法,其包括下述步骤:向所述哺乳动物施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞和/或药物组合物。

[0016] 在一方面,本公开提供了前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞和/或药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中与肿瘤抗原相关病症的药物或试剂盒中的用途。

[0017] 本公开的抗体可以用于多种应用,包括检测肿瘤抗原,诊断、治疗或预防与肿瘤抗原相关的疾病。

附图说明

- [0018] 图1示出了本公开的第一抗原×CD3κλ双特异抗体。
- [0019] 图2示出了CD3人源化抗体与人CD3ε γ 蛋白的结合。
- [0020] 图3示出了CD3人源化抗体与Jurkat细胞的结合。
- [0021] 图4示出了CD3人源化抗体与人CD3ε[©]和食蟹猴CD3ε[©]蛋白的结合。
- [0022] 图5示出了本公开的κλ001、κλ002、κλ003、κλ004、κλ005的结构。
- [0023] 图6示出了CD20×CD3κλ双特异抗体经Protein A纯化的结果。
- [0024] 图7示出了CD20×CD3κλ双特异抗体的SEC-HPLC检测结果。
- [0025] 图8示出了CD20×CD3κλ双特异抗体同源二聚体检测结果。
- [0026] 图9示出了CD20×CD3κλ双特异抗体与CD20稳转细胞的结合。
- [0027] 图10示出了CD20×CD3κλ双特异抗体与肿瘤细胞SU-DHL-4、Raji和NALM-6的结合。
- [0028] 图11示出了CD20×CD3κλ双特异抗体与Jurkat细胞的结合。
- [0029] 图12示出了CD20×CD3κλ双特异抗体与外周血T细胞的结合。
- [0030] 图13示出了CD20×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用,图13A显示对Nalm-6细胞的杀伤,图13B显示对T细胞的活化。
- [0031] 图14示出了CD20×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用,图14A显示对TMD-8细胞的杀伤,图14B显示对T细胞的活化。
- [0032] 图15示出了CD20×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用,图15A显示对Toledo细胞的杀伤,图15B显示对T细胞的活化。
- [0033] 图16示出了CD20×CD3κλ双特异抗体对T细胞NFAT信号通路的作用。
- [0034] 图17示出了CD20×CD3κλ双特异抗体在免疫重建小鼠Raji移植瘤模型中的抑制作用。
- [0035] 图18示出了CD20×CD3κλ双特异抗体在免疫缺陷型小鼠皮下Raji与人PBMC混合接瘤模型中的抑制作用。
- [0036] 图19示出了CD20×CD3κλ双特异抗体在食蟹猴中的药效。
- [0037] 图20示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体与BCMA稳转细胞的结合。
- [0038] 图21示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体与肿瘤细胞NCI-H929和RPMI-8226的结合。
- [0039] 图22示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体与Jurkat细胞的结合。
- [0040] 图23示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体与外周血T细胞的结合。
- [0041] 图24示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用,图24A显示对NCI-H929细胞的杀伤,图24B显示对T细胞的活化。
- [0042] 图25示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用,图25A显示对RPMI-8226细胞的杀伤,图25B显示对T细胞的活化。
- [0043] 图26示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体对T细胞NFAT信号通路的作用。
- [0044] 图27示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体对PBMC的非特异激活。
- [0045] 图28示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体与Fc受体的结合。
- [0046] 图29示出了BCMA×CD3κλ双特异抗体在免疫缺陷型小鼠皮下NCI-H929移植瘤模型中的抑制作用。
- [0047] 图30示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体与GPC3稳转细胞的结合。

- [0048] 图31示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体与肿瘤细胞HepG2的结合。
- [0049] 图32示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体与Jurkat细胞的结合。
- [0050] 图33示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体与外周血T细胞的结合。
- [0051] 图34示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用,图34A显示对HepG2细胞的杀伤,图34B显示对T细胞的活化。
- [0052] 图35示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体对T细胞NFAT信号通路的作用。
- [0053] 图36示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体对PBMC的非特异激活。
- [0054] 图37示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体在免疫重建小鼠皮下HepG2移植瘤模型中的抑制作用。
- [0055] 图38示出了GPC3×CD3κλ双特异抗体在CD3人源化鼠Hepa1-6/人GPC3移植瘤模型中的抑制作用。

具体实施方式

[0056] I. 定义

[0057] 在本公开中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时,为了更好地理解本公开,下面提供相关术语的定义和解释。

[0058] 如本文中使用的,“肿瘤抗原”优选地是指存在于(或结合于)肿瘤细胞上而一般不存在于正常细胞上的任何抗原或抗原决定簇,或以比正常(非肿瘤)细胞上更大的量存在于或结合于肿瘤细胞上的抗原或抗原决定簇,或以不同于在正常(非肿瘤)细胞上发现的形式存在于肿瘤细胞上的抗原或抗原决定簇。该术语因此包括肿瘤特异性抗原,包括肿瘤特异性抗原(TSA)或肿瘤相关抗原(TAA),包括肿瘤相关膜抗原、肿瘤上的胚胎抗原、生长因子受体、生长因子配体和与癌症有关的任何其它类型的抗原。肿瘤抗原可以是,例如,B细胞分化抗原(例如,CD19、CD20和CD37)、B细胞成熟抗原(B-cell maturation antigen,BCMA)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、上皮癌抗原(例如,乳癌、胃肠癌、肺癌)、前列腺特异性癌抗原(PSA)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)、膀胱癌抗原、肺(例如,小细胞肺)癌抗原、结肠癌抗原、卵巢癌抗原、脑癌抗原、胃癌抗原、肾细胞癌抗原、胰腺癌抗原、肝癌抗原、食道癌抗原、头颈癌抗原或结肠直肠癌抗原。

[0059] TSA对于肿瘤细胞是(或者被认为是)独特的,并且不发生在体内的其他细胞上(例如,在其他细胞上不在显著的程度发生)。TAA对于肿瘤细胞不是独特的,并且相反也在正常细胞上表达(例如,在不能诱导对抗原的免疫耐受状态的条件表达)。例如,当免疫系统不成熟并且不能应答时,TAA可以是在胎儿发育过程中在正常细胞上表达的抗原,或者它们可以是正常地在正常细胞上在极低水平下存在但是在肿瘤细胞上在更高水平下表达的抗原。

[0060] TSA或TAA抗原的非限制性实例包括分化抗原,诸如MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、酪氨酸酶、TRP-1、TRP-2和肿瘤特异性多谱系抗原诸如MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15;过表达的胚胎抗原,诸如CEA;过表达的致癌基因和突变的肿瘤抑制基因,诸如p53、Ras、HER-2/neu;由染色体易位导致的独特肿瘤抗原,诸如BCR-ABL、

E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR;以及病毒抗原,诸如爱泼斯坦巴尔病毒抗原EBVA以及人类乳头瘤病毒(HPV)抗原E6和E7。其他肿瘤抗原包括TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、erbB、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、 β -连环蛋白、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、甲胎蛋白、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3、CA 27.29、BCAA、CA 195、CA242、CA-50、CAM43、CD68、P1、C0-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2结合蛋白、亲环蛋白C-相关蛋白、TAAL6、TAG72、TLP、MUC16、IL13R α 2、FR α 、VEGFR2、Lewis Y、FAP、EphA2、CEACAM5、EGFR、CA6、CA9、GPNMB、EGP1、FOLR1、内皮受体、STEAP1、SLC44A4、结合素-4、AGS-16、胍基环化酶C、MUC-1、CFC1B、整联蛋白 α 3链(α 3b1的链,即层粘连蛋白受体链)和TPS。其他肿瘤抗原还包括CD19、CD20、CD22、CD30、CD72、CD180、CD171(L1CAM)、CD123、CD133、CD138、CD37、CD70、CD79a、CD79b、CD56、CD74、CD166、CD71、CLL-1/CLECK12A、ROR1、BCMA、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、间皮素、CD33/IL3R α 、c-Met、PSCA、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1或MAGEA3。

[0061] 如本文中使用的,术语“CD20”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,诸如灵长动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD20。

[0062] 术语“抗CD20抗体”和“结合CD20的抗体”指能够以足够亲和力结合CD20,使得该抗体作为诊断剂和/或治疗剂在靶向CD20中是有用的抗体。在一个实施方案中,抗CD20抗体对无关非CD20蛋白的结合程度小于该抗体对CD20的结合的约10%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中,结合CD20的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中,抗CD20抗体结合在来自不同物种的CD20间保守的CD20表位。

[0063] 如本文中使用的,术语“BCMA”可以指共同指代存在于动物中并且优选地存在于人体中的BCMA本身及其任何变体、同种型和旁系同源物的概念。

[0064] 术语“人BCMA”是指人来源的BCMA,并且可以优选具有但不限于Genbank登录号AB052772.1的氨基酸序列。

[0065] 术语“抗BCMA抗体”和“结合BCMA的抗体”指能够以足够亲和力结合BCMA,使得该抗体作为诊断剂和/或治疗剂在靶向BCMA中是有用的抗体。在一个实施方案中,抗BCMA抗体对无关非BCMA蛋白的结合程度小于该抗体对BCMA的结合的约10%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中,结合BCMA的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中,抗BCMA抗体结合在来自不同物种的BCMA间保守的BCMA表位。

[0066] 如本文中使用的,术语“GPC3”可以指共同指代存在于动物中并且优选地存在于人体中的GPC3本身及其任何变体、同种型和旁系同源物的概念。

[0067] 术语“人GPC3”是指人来源的GPC3。

[0068] 术语“抗GPC3抗体”和“结合GPC3的抗体”指能够以足够亲和力结合GPC3,使得该抗体作为诊断剂和/或治疗剂在靶向GPC3中是有用的抗体。在一个实施方案中,抗GPC3抗体对

无关非GPC3蛋白的结合程度小于该抗体对GPC3的结合的约10%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中,结合GPC3的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$, 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M , 例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中,抗GPC3抗体结合在来自不同物种的GPC3间保守的GPC3表位。

[0069] “CD3”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,诸如灵长动物(例如人),非人灵长动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD3,除非另外指明。该术语涵盖“全长”未加工的CD3以及源自细胞中加工的任何形式的CD3。该术语还涵盖CD3的天然发生变体,例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中,CD3是人CD3,特别是人CD3的厄普西隆亚基(CD3 ϵ)。人CD3 ϵ 的氨基酸序列显示于UniProt (www.uniprot.org) 登录号P07766(版本144),或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1。食蟹猴[*Macaca fascicularis*]CD3 ϵ 的氨基酸序列显示于NCBI GenBank no.BAB71849.1。

[0070] 术语“细胞表面”的使用是根据其在本领域的正常含义,因此包括可通过与蛋白和其它分子结合而接近的细胞外部。

[0071] 如本文使用的和除非另作说明,术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的加或减10%之内。在需要整数的情况下,该术语是指在给定值或范围的加或减10%之内、向上或向下舍入到最接近的整数。

[0072] 就抗体链多肽序列而言,短语“基本相同”可理解为表现出与参照多肽序列至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的抗体链。就核酸序列而言,该术语可理解为表现出与参照核酸序列至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核苷酸序列。

[0073] 序列“相同性”或“同一性”具有本领域公认的含义,并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法,但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073(1988))。

[0074] “取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的,其中该分子中仅有一个氨基酸被取代;或可为多个的,其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样,一个氨基酸可被多个残基取代,其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或

多个氨基酸被除去的变体。通常情况下,缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

[0075] 就抗体的可变结构域而言,术语“可变”系指抗体之间有广泛序列差异的相关分子的某些部分,且被用于针对其特异靶的特定抗体的特异识别和结合。但是,可变性在抗体的整个可变结构域内不是均匀分布的。可变性集中在被称为互补决定区域(CDRs;即CDR1、CDR2和CDR3)或超变区的三个区段,它们均位于轻链和重链的可变结构域内。可变结构域内保守程度更高的部分被称为构架(FR)区或构架序列。天然重链和轻链的每个可变结构域均包括四个FR区,其主要采用 β -折叠构型,它们籍三个CDRs连接起来,CDRs形成环,所述环连接 β -折叠结构并在某些情形下形成部分的 β -折叠结构。每条链的CDRs通常被FR区在邻近连接起来,并且借助于来自其它链的CDR,有助于抗体靶结合位点(表位或决定簇)的形成(参看Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,National Institute of Health,Bethesda,MD(1987))。正如本文所使用,免疫球蛋白氨基酸残基的编号是依据Kabat等人的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统而进行的,除非另有说明。一个CDR可具有特异结合关联表位的能力。

[0076] 如本文所用,抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”指全长抗体的任何部分,其少于全长,但是至少包含结合抗原的所述抗体的部分可变区(例如一个或多个CDR和/或一个或多个抗体结合位点),并且因此保留结合特异性以及所述全长抗体的至少部分特异性结合能力。因此,抗原结合片段指包含与衍生抗体片段的抗体结合相同抗原的抗原结合部分的抗体片段。抗体片段包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物,以及合成产生的衍生物,例如重组产生的衍生物。抗体包括抗体片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd和Fd'片段以及其他片段,包括修饰的片段(参见,例如,Methods in Molecular Biology,Vol 207:Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols(2003);Chapter 1;p 3-25,Kipriyanov)。所述片段可以包括连接在一起的多条链,例如通过二硫键和/或通过肽接头。抗体片段一般包含至少或约50个氨基酸,并且典型至少或约200个氨基酸。抗原结合片段包括任何抗体片段,其在被插入抗体框架(例如通过置换相应区域)时获得免疫特异性地结合(即表现出至少或至少约 10^7 - 10^8 M⁻¹的K_a)抗原的抗体。“功能片段”或“抗体的类似物”是可防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段或类似物。正如本文所使用,功能片段一般与“抗体片段”含义相同,且就抗体而论,可指能防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段,例如Fv、Fab、F(ab')₂等等。“Fv”片段由一条重链的可变结构域和一条轻链的可变结构域籍非共价结合方式而形成的二聚体(V_H-V_L二聚体)组成。在该构型中,每个可变结构域的三个CDRs相互作用,以确定V_H-V_L二聚体表面上的靶结合位点,与完整抗体的情况一样。所述六个CDRs共同赋予完整抗体的靶结合特异性。但是,即使是单个可变结构域(或仅包括3个靶特异的CDRs的Fv的一半),仍可具有识别和结合靶的能力。

[0077] 如本文中所用,术语“双特异性”(Bispecific antibody,BsAb)指抗体和/或抗原结合分子能够特异性结合两种不同的抗原性决定簇,通常,双特异性抗体和/或抗原结合分子包含两种抗原结合位点,其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中,所述双特异性抗体和/或抗原结合分子能够同时结合两种抗原决定簇,特别是在两种不同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。

[0078] 如本文所用,“单克隆抗体”指相同抗体的群体,表示单克隆抗体群体中的每个单独的抗体分子与其他抗体分子相同。这种特性与抗体的多克隆群体的特性相反,所述抗体的多克隆群体包含具有多种不同序列的抗体。单克隆抗体可以通过许多公知的方法来制备(Smith et al. (2004) J.Clin.Pathol.57,912-917;和Nelson et al.,J Clin Pathol (2000),53,111-117)。例如,单克隆抗体可以通过永生B细胞来制备,例如通过与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系或者通过用诸如EBV的病毒感染B细胞。重组技术还可以用来在体外通过用携带编码抗体的核苷酸的人工序列的质粒转化宿主细胞来从宿主细胞的克隆群体制备抗体。

[0079] 如本文中所用,术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”指由融合产抗体的淋巴细胞和不产抗体的癌细胞而产生的细胞或细胞系(通常为骨髓瘤或淋巴瘤细胞)。如本领域普通技术人员所知的,杂交瘤可增殖并持续供应产生特定单克隆抗体。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知的(见例如,Harlow&Lane,1988)。当提及术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”时,其还包括杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

[0080] 如本文所用,全长抗体是具有两条全长重链(例如VH-CH1-CH2-CH3或VH-CH1-CH2-CH3-CH4)和两条全长轻链(VL-CL)和铰链区的抗体,例如通过抗体分泌B细胞天然产生的抗体以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

[0081] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中可变区序列源自一个物种,恒定区序列源自另一物种,如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

[0082] “人源化”抗体是指非人(例如小鼠)抗体形式,其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段(如Fv、Fab、Fab’、F(ab’)₂或者抗体的其它抗原结合亚序列),含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中接受者抗体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或者兔的CDR残基置换。

[0083] 此外,在人源化中,还可能对VH和/或VL的CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基进行突变,由此改善抗体的一或多种结合特性(例如亲和性)。可进行例如PCR介导的突变引入突变,其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常,引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外,CDR内的突变通常不超过一个或两个。因此,本公开所述人源化抗体还涵盖CDR内包含1或2两个氨基酸突变的抗体。

[0084] 如本文所用,术语“CDR”指互补决定区(complementarity-determining region),已知抗体分子的每个重链和轻链具有3个CDR。CDR也称作高变区,且存在于抗体的每个重链和轻链的可变区中,在CDR的一级结构中具有非常高的变异性位点。本说明书中,重链的CDR由来自重链的氨基端序列的氨基端的CDR1、CDR2、CDR3表示,轻链的CDR由来自轻链的氨基端序列的氨基端的CDR1、CDR2、CDR3表示。这些位点在三级结构中彼此临近,并决定抗体所结合的抗原的特异性。

[0085] 如本文所用,术语“表位”指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常包含分子的化学活性表面分型,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0086] 如本文所用,关于抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”或“免疫特异性地结合”

在本文中可交换使用,并且指抗体或抗原结合片段通过抗体和抗原的抗体结合位点之间的非共价相互作用与同种抗原形成一个或多个非共价键的能力。所述抗原可以是分离的抗原或存在于肿瘤细胞。通常,免疫特异性地结合(或特异性结合)抗原的抗体是以约或 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 或 $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 或更大的亲和常数 K_a (或者 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的解离常数(K_d))结合所述抗原。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来测定,例如,免疫测定、表面等离子共振(SPR)(Rich and Myszka (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599)、等温滴定量热法(ITC)或本领域已知的其他动力学相互作用测定(参见,例如,Paul, ed., Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, pages 332-336 (1989); 还参见描述用于计算抗体的结合亲和力的示例性SPR和ITC方法的美国专利第7,229,619号)。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是已知的,并且可商购(参见, BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem. Soc. Trans. 27:335)。

[0087] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物,包括通常通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。如本文所使用,术语“核酸分子”意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可为单链或双链,且可为cDNA。

[0088] 如本文所用,分离的核酸分子是从存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。诸如cDNA分子的“分离的”核酸分子可以在通过重组技术制备时基本上不含其他细胞物质或培养基,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学成分。本文所提供的示例性分离的核酸分子包括编码所提供的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子。

[0089] 如本文所用,关于核酸序列、区域、元件或结构域的“可操作地连接”表示核酸区域互相功能相关。例如,启动子可以可操作地连接至编码多肽的核酸,从而所述启动子调控或介导所述核酸的转录。

[0090] 亦提供本文所述序列表中所述序列的“保守序列修饰”,即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸及氨基酸序列修饰。这些保守序列修饰包括保守核苷酸及氨基酸取代以及核苷酸及氨基酸添加及缺失。例如,可通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变及PCR介导的诱变)将修饰引入本文所述的序列表中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代,其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是本领域中已有定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β 分枝侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,抗CD20、BCMA或GPC3抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的核苷酸及氨基酸保守取代的方法为本领域所熟知(例如,参见Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997))。

[0091] 作为另一选择,在另一实施方案中,可通过例如饱和诱变沿抗GCD20、BCMA或PC3抗体编码序列的全部或一部分随机引入突变,且可针对改良的结合活性筛选所得经修饰抗CD20、BCMA或GPC3抗体。

[0092] 如本文所用,“表达”指通过多核苷酸的转录和翻译产生多肽的过程。多肽的表达水平可以利用本领域已知的任何方法来评价,包括例如测定从宿主细胞产生的多肽的量的方法。这类方法可以包括但不限于通过ELISA定量细胞裂解物中的多肽,凝胶电泳之后考马斯蓝染色,Lowry蛋白测定以及Bradford蛋白测定。

[0093] 如本文所用,“宿主细胞”是用于接受、保持、复制和扩增载体的细胞。宿主细胞还可以用来表达载体所编码的多肽。当宿主细胞分裂时,载体中所含的核酸复制,从而扩增核酸。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。合适的宿主细胞包括但不限于CHO细胞、各种COS细胞、HeLa细胞、HEK细胞例如HEK 293细胞。

[0094] 如本文所用,“载体”是可复制的核酸,当载体转化入适当的宿主细胞时,可以从该载体表达一种或多种异源蛋白。关于载体包括那些通常通过限制酶切消化和连接可以将编码多肽或其片段的核酸引入其中的载体。关于载体还包括那些包含编码多肽的核酸的载体。载体用来将编码多肽的核酸引入宿主细胞,用于扩增核酸或者用于表达/展示核酸所编码的多肽。载体通常保持游离,但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。还考虑人工染色体的载体,例如酵母人工载体和哺乳动物人工染色体。这类媒介物的选择和用途是本领域技术人员公知的。

[0095] 如本文所用,载体还包括“病毒载体”或“病毒的载体”。病毒的载体是工程化的病毒,其可操作地连接至外源基因以将外源基因转移(作为媒介物或穿梭(shuttle))入细胞。

[0096] 如本文所用,“表达载体”包括能够表达DNA的载体,所述DNA与诸如启动子区的能够影响这类DNA片段表达的调控序列可操作地连接。这类额外的片段可以包括启动子和终止子序列,并且任选地可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体一般来源于质粒或病毒DNA,或者可以包含这两者的元件。因此,表达载体指重组DNA或RNA构建体,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体,当引入适当的宿主细胞时,导致克隆DNA的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的,并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

[0097] 如本文所用,“治疗”患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解,或者在治疗后保持不变。因此,治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药学用途。

[0098] 如本文所用,“疗效”表示由个体的治疗所导致的效果,其改变、通常改良或改善疾病或疾病状况的症状,或者治愈疾病或疾病状况。

[0099] 如本文所用,“治疗有效量”或“治疗有效剂量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量。因此,其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

[0100] 如本文所用,“预防有效量”或“预防有效剂量”指在施用于对象时会具有预期的预防效果的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量,例如,防止或延迟疾病或症状的

发生或复发,减少疾病或症状发生或复发的可能性。完全预防有效剂量不必通过施用一个剂量发生,并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此,预防有效量可以在一次或多次施用中施用。

[0101] 如本文中所使用的,术语“患者”是指哺乳动物,例如人。

[0102] II. 具体实施方案详述

[0103] 在一方面,本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0104] (a) 第一抗原结合部分或其抗原结合片段,所述第一抗原结合部分包含第一轻链和第一重链,所述第一轻链为 κ 型轻链,所述第一抗原结合部分包含与第一抗原结合的第一结合结构域;和

[0105] (b) 第二抗原结合部分或其抗原结合片段,所述第二抗原结合部分包含第二轻链和第二重链,所述第二轻链为 λ 型轻链,所述第二抗原结合部分包含与第二抗原结合的第二结合结构域。

[0106] 在一些实施方案中,所述第二抗原为CD3抗原。

[0107] 在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链可变区具有Gln₄₀Glu突变(V λ_{CD3} :Gln₄₀Glu);所述第二抗原结合部分的第二重链可变区具有Gln₃₉Lys突变(VH $_{CD3}$:Gln₃₉Lys)。

[0108] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:7-9、14、15、20、21或其任何变体的第二轻链CDR;和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:26-28、31、34、40、43、46、47或其任何变体的第二重链CDR。

[0109] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:7、14或其任何变体的第二轻链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:8、15、20或其任何变体的第二轻链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:9、21或其任何变体的第二轻链CDR3;和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:26、31、46或其任何变体的第二重链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:27、47或其任何变体的第二重链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:28、34、37、40、43或其任何变体的第二重链CDR3。

[0110] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域的第二轻链CDR选自:分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:7、8、9的第二轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:14、15、9的第二轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:7、8、21的第二轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:7、20、21的第二轻链CDR1、CDR2及CDR3序列;和/或所述第二结合结构域的重链CDR选自:分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:26、27、28的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:31、27、28的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:31、27、34的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:31、27、37的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:31、27、40的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:31、27、43的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列;分别包含氨基酸序列SEQ ID NO:46、47、28的第二重链CDR1、CDR2及CDR3序列。

[0111] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:5、10、12、16、18、22或其任何变体的第二轻链可变区;和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:24、29、32、35、38、41、44、48、50、52或其任何变体的第二重链可变区。

[0112] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:24或其任何变体的第二重链可变区。

[0113] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:5或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:48或其任何变体的第二重链可变区。

[0114] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:48或其任何变体的第二重链可变区。

[0115] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:5或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。

[0116] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:10或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。

[0117] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。

[0118] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的第二轻链可变区;和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。

[0119] 在一些实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链选自氨基酸序列SEQ ID NO:58和66;和/或所述第二抗原结合部分的第二重链选自氨基酸序列SEQ ID NO:60和68。在一些优选的实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:58;和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:60。在一些优选的实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66;和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0120] 在一些实施方案中,所述第一抗原为肿瘤抗原。

[0121] 在一些优选实施方案中,所述肿瘤抗原选自:CD19、CD20、CD22、CD30、CD38、CD72、CD180、CD171 (L1CAM)、CD123、CD133、CD138、CD37、CD70、CD79a、CD79b、CD56、CD74、CD166、CD71、CLL-1/CLECK12A、ROR1、BCMA、GPC3、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSCA、PSMA、糖脂F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1、Her2、Her3、MUC1、MUC17、Claudin18或MAGEA3。

[0122] 在一个具体实施方案中,所述肿瘤相关抗原选自CD20、BCMA和GPC3。

[0123] 在一些实施方案中,所述第一抗原为CD20抗原。

[0124] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链可变区具有Gln₃₈Lys突变(V_K_{CD20}:Gln₃₈Lys)。在一些优选的实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一重链可变区具有Gln₃₉Glu突变(V_H_{CD20}:Gln₃₉Glu)。

[0125] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链可变区具有Gln₃₈Lys突变(V_K_{CD20}:Gln₃₈Lys),且第一轻链恒定区具有Glu₁₂₃Lys和Gln₁₂₄Lys突变(V_K-C_K_{CD20}:Gln₃₈Lys\Glu₁₂₃Lys\Gln₁₂₄Lys)。在一些优选的实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一重链可变区具有Gln₃₉Glu突变(V_H_{CD20}:Gln₃₉Glu),且第一重链恒定区具有Lys₁₅₂Glu和Lys₂₁₈Glu突变(V_H-C_H_{1CD20}:Gln₃₉Glu\Lys₁₅₂Glu\Lys₂₁₈Glu)。

[0126] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链选自氨基酸序列SEQ ID NO:54、62和70;和/或所述第一抗原结合部分的第一重链选自氨基酸序列SEQ ID NO:56、64和72。

[0127] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID

NO:54,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:56。

[0128] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:62,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:64。

[0129] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:70,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:72。

[0130] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:54,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:56,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:58,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:60。

[0131] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:62,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:64,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:58,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:60。

[0132] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:70,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:72,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0133] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:62,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:64,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:58,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:60。

[0134] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:54,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:56,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0135] 在一些实施方案中,所述第一抗原为BCMA抗原。

[0136] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链可变区具有Gln₄₂Lys突变(V_K_{BCMA}:Gln₄₂Lys)。在一些优选的实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一重链可变区具有Gln₃₉Glu突变(VH_{BCMA}:Gln₃₉Glu)。

[0137] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链选自氨基酸序列SEQ ID NO:80和84;和/或所述第一抗原结合部分的第一重链选自氨基酸序列SEQ ID NO:82和86。

[0138] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:80;和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:82。

[0139] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:84;和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:82。

[0140] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:80;和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:86。

[0141] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:84;和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:86。

[0142] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:80,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:82,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0143] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:84,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:82,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0144] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:80,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:86,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0145] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:84,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:86,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0146] 在一些实施方案中,所述第一抗原为GPC3抗原。

[0147] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链可变区具有Gln₄₃Lys和Gln₃₉Glu突变(V_K_{GPC3}:Gln₄₃Lys;V_H_{GPC3}:Gln₃₉Glu)。

[0148] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链选自氨基酸序列SEQ ID NO:88和92;和/或所述第一抗原结合部分的第一重链选自氨基酸序列SEQ ID NO:90和94。

[0149] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:88,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:90。

[0150] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:92,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:94。

[0151] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:88,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:90,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0152] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:92,和所述第一抗原结合部分的第一重链为氨基酸序列SEQ ID NO:94,所述第二抗原结合部分的第二轻链为氨基酸序列SEQ ID NO:66,和所述第二抗原结合部分的第二重链为氨基酸序列SEQ ID NO:68。

[0153] 在一些实施方案中,所述双特异抗体的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分的Fc部分采用knob-into-hole结构。在一些优选的实施方案中,采用人IgG4 knob-into-hole结构。

[0154] 在一些实施方案中,所述双特异抗体的第一抗原结合部分和/或第二抗原结合部分还具有Ser₂₂₈Pro、Leu₂₃₅Glu和/或Pro₃₂₉Ala突变。

[0155] 在一方面,本公开提供了编码前述双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸。

[0156] 在一些优选实施方案中,所述第二抗原结合部分结合CD3抗原,所述第二抗原结合部分的第二轻链可变区的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:6、11、13、17、19和23;和/或所述第二抗原结合部分的第二重链可变区的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:25、30、33、36、39、42、45、49、51和53。在一些优选实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:59和67;和/或所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:61和69。在一些优选实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:59,和所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:61。在一些优选实施方案中,所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:67,和所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:69。

[0157] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分结合CD20抗原,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:55、63和71;和/或所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:57、65和73。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:55,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:57。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:63,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:65。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:71,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:73。

[0158] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分结合BCMA抗原,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:81和85;和/或所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:83和87。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:81,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:83。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:85,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:83。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:81,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:87。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:85,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:87。

[0159] 在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分结合GPC3抗原,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:89和93;和/或所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:91和95。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:89,和所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:91。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:93,和

序列SEQ ID NO:69。

[0162] 在一些优选实施方案中,所述双特异性抗体的所述第一抗原结合部分结合GPC3抗原,所述第二抗原结合CD3抗原,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:89,所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:91,所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:67,和所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:69。在一些优选实施方案中,所述第一抗原结合部分的第一轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:93,所述第一抗原结合部分的第一重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:95,所述第二抗原结合部分的第二轻链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:67,和所述第二抗原结合部分的第二重链的编码核酸选自核苷酸序列SEQ ID NO:69。

[0163] 在一方面,本公开提供了包含前述核酸的载体。

[0164] 在一方面,本公开提供了包含前述核酸或载体的细胞。

[0165] 在一方面,本公开提供了包含前述双特异性抗体或其抗原结合部分、核酸、载体和/或细胞的组合物。

[0166] 在一方面,本公开提供了包含共价附着至治疗部分的前述双特异性抗体或其抗原结合部分的抗体-药物偶联物。

[0167] 优选地,所述治疗部分选自细胞毒性部分、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。

[0168] 本公开的抗体在各种肿瘤抗原被不利地表达或发现的疾病中可用作治疗或诊断工具。

[0169] 在一个与肿瘤抗原相关的疾病实施方案中,肿瘤抗原在患病组织或器官的细胞中的表达与在健康组织或器官中的状态相比有所增加。增加是指增加至少10%、特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。在一个实施方案中,表达仅在患病组织中发现,而在相应健康组织中的表达受阻抑。根据本公开,与肿瘤抗原相关的疾病包括肿瘤。

[0170] 在一些实施方案中,所述与肿瘤抗原相关的疾病为与CD20相关疾病。在一些优选的实施方案中,与CD20相关的疾病包括B细胞疾病,例如B细胞增殖性病症,特别是CD20阳性B细胞病症;优选地,所述疾病选自非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤(MZL),以及多发性骨髓瘤(MM)和霍奇金淋巴瘤(HL)。

[0171] 在一些实施方案中,所述与肿瘤抗原相关的疾病为与BCMA相关疾病;优选地,与BCMA相关的疾病包括B细胞疾病;优选地,所述疾病是癌症;更优选地,所述癌症是B-细胞相关癌症,其选自多发性骨髓瘤、恶性浆细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤、Kahler's病和骨髓性白血病、浆细胞白血病、浆细胞瘤、B-细胞幼淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B-细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、前体B-淋巴细胞淋巴瘤、髓性白血病、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、原发性纵隔(胸

腺)大B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B-细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、富含T细胞/组织细胞的大B-细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性皮肤弥漫性大B-细胞淋巴瘤(腿型)、老年人EBV阳性弥漫性大B-细胞淋巴瘤、炎症相关的弥漫性大B-细胞淋巴瘤、血管内大B-细胞淋巴瘤、ALK阳性大B-细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、HHV8相关的多中心Castleman病中产生的大B-细胞淋巴瘤、未分类的具有弥漫性大B-细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤中间特征的B-细胞淋巴瘤、未分类的具有弥漫性大B-细胞淋巴瘤和经典霍奇金淋巴瘤中间特征的B-细胞淋巴瘤以及其他B-细胞相关淋巴瘤;更优选地,所述B细胞疾病是B细胞障碍;优选地,浆细胞障碍选自:多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球蛋白血症、淀粉样变性、华氏巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性骨髓瘤、重链病、意义不明的单克隆丙种球蛋白病以及郁积型多发性骨髓瘤;优选地,所述疾病是自身免疫性病症,如系统性红斑性狼疮或类风湿性关节炎。

[0172] 在一些实施方案中,该治疗剂包含特异性结合活化性T细胞抗原的抗体。

[0173] 在一个实施方案中,该治疗剂包含特异性结合CD3,特别是CD3 ϵ 的抗体。

[0174] 用本公开的双特异性抗体治疗的疾病和症状方法包括下述步骤:向所述哺乳动物施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物。

[0175] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合GPC3的抗体,其中施用所述抗体以提供至少40 μ g/ml的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供至少50 μ g/ml、至少150 μ g/ml、至少300 μ g/ml、至少400 μ g/ml或至少500 μ g/ml的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供不超过800 μ g/ml、700 μ g/ml、600 μ g/ml、550 μ g/ml或500 μ g/ml的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为40 μ g/ml至700 μ g/ml,优选为40 μ g/ml至600 μ g/ml,优选为50 μ g/ml至500 μ g/ml,如150 μ g/ml至500 μ g/ml或者300 μ g/ml至500 μ g/ml。如本说明书中使用的术语“血清水平”,其意指所讨论的物质在血清中的浓度。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少7天或至少14天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少300mg/m²的抗体剂量,如至少600mg/m²,且优选至多1500mg/m²,至多1200mg/m²或至多1000mg/m²。

[0176] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合GPC3的抗体,其中以至少300mg/m²,如至少600mg/m²,且优选至多1500mg/m²,至多1200mg/m²或至多1000mg/m²的剂量施用所述抗体。

[0177] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合GPC3的抗体,其中所述患者的至少50%,优选为60%、70%、80%或90%的癌细胞为GPC3阳性和/或所述患者的至少40%,优选为50%或60%的癌细胞为GPC3的表面表达阳性。在该方面,本公开还提供治疗或预防癌症疾病的方法,所述方法包括:a. 鉴定显示至少50%,优选为60%、70%、80%或90%的GPC3阳性癌细胞和/或至少40%,优选为50%或60%的癌细胞的患者的患者,所述癌细胞为GPC3的表面表达阳性;以及b. 向所述患者施用能够结合GPC3的抗体。在一个实施方案中,所述患者的至少95%或至少98%的癌细胞为GPC3阳性的。在一个实施方案中,所述患者的至少70%、至少80%或至少90%的癌细胞为GPC3的表面表达阳性。

[0178] 在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,癌症疾病的治疗结果是实现病情稳定。在一个实施方案中,病情稳定实现至少2个月、至少3个月或至少6个月。

[0179] 在一些实施方案中,本公开提供实现癌症患者的病情稳定的方法,其包括向所述患者施用能够结合GPC3的抗体。在一个实施方案中,病情稳定实现至少2个月、至少3个月或至少6个月。

[0180] 在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,以单剂量或多剂量施用抗体。

[0181] 在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合GPC3的抗体,其中以多剂量施用所述抗体。

[0182] 如果根据本公开以多次剂量施用所述抗体,则优选以至少3次剂量、至少4次剂量、至少5次剂量、至少6次剂量、至少7次剂量、至少8次剂量、至少9次剂量或至少10次剂量且优选至多30次剂量、25次剂量、20次剂量、15次剂量或10次剂量施用所述抗体。优选以至少7天、至少10天、至少14天或至少20天的时间间隔施用所述抗体的剂量。优选以7至30天、10至20天且优选为约14天的时间间隔施用所述抗体的剂量。

[0183] 在一个实施方案中,施用所述抗体以便提供至少40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以便提供至少50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或至少500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以便提供不超过800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至700 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至600 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少7天或至少14天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少300 mg/m^2 ,如至少600 mg/m^2 且优选至多1500 mg/m^2 、至多1200 mg/m^2 或至多1000 mg/m^2 的抗体的剂量。

[0184] 前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中GPC3相关病症的药物中的用途。

[0185] 根据前述任一方面,任选地,所述抗体偶联其他药物,例如带标记或具有细胞毒性的偶联物。

[0186] 在一方面,本公开还包括试剂盒,例如所述试剂盒包括本公开的抗体、其片段、同源物、其衍生物、核酸、载体、细胞、组合物等,例如带标记或具有细胞毒性的缀合物,以及抗体使用说明书、杀死特定类型细胞的偶联物等等。该说明书可包括在体外、体内或离体使用抗体、偶联物等的指导。抗体可以是液体形式或固体,通常是冻干的。该试剂盒可包含其它适宜的试剂,如缓冲液、重构溶液以及为了预定用途的其它必要成分。考虑了以预定量包装好的试剂组合与用于其用途的说明书,所述用途例如用于治疗用途或用于进行诊断测定。当抗体是带标记的时,例如用酶标记的,那么该试剂盒可包括底物和酶所需的辅因子(例如提供可检测生色团或荧光团的底物前体)。此外,其它添加剂,如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等也可包括在内。多种试剂的相对量可以改变而提供试剂溶液的浓缩物,这就提供了用户灵活性、节省空间、节省试剂等。这些试剂也可以干粉形式提供,通常是冻干形式,包括赋形剂,它在溶解时可提供具有适当浓度的试剂溶液。

[0187] 前述任一方面的抗体或其功能片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物或试剂盒在制备用于抑制GPC3结合的试剂中的用途。

[0188] 此外,本公开的抗体还可用于免疫测定、纯化方法以及其它用到免疫球蛋白或其

片段的方法。此类用途在本领域为人所熟知。

[0189] 相应地,本公开还提供包含本公开的抗GPC3的抗体或其片段的组合物,所述抗体方便地和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合,这是本领域的常规做法。

[0190] 本公开所使用的术语“药物组合物”系指多种制备物的制剂。含有治疗有效量的多价抗体的制剂为无菌液体溶液、液体悬浮剂或冻干形式,任选地包含稳定剂或赋形剂。

[0191] 本公开的抗体可以作为单独施用的组合物使用,或可与其它活性剂联合使用。

[0192] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体与治疗部分(即药物)缀合。治疗部分可以是例如细胞毒素、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。此类偶联物在本文中称为“抗体-药物偶联物”或“ADC”。

[0193] 在一些实施方案中,抗体与细胞毒性部分偶联。细胞毒性部分可以例如选自以下:紫杉醇;细胞松弛素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;吐根碱;丝裂霉素;依托泊苷;替尼泊苷;长春新碱;长春碱;秋水仙碱;多柔比星;柔红霉素;二羟基蒽二酮;微管蛋白抑制剂如美登素或其类似物或衍生物;抗有丝分裂剂如单甲基奥瑞他汀E或F或其类似物或衍生物;海兔毒素10或15或其类似物;伊立替康或其类似物;米托蒽醌;光辉霉素;放线菌素D;1-脱氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉素;卡奇霉素或其类似物或衍生物;抗代谢药,如甲氨喋呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、癸二氮、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨;烷化剂,如二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴嗪、丝裂霉素C;铂类衍生物,如顺铂或卡铂;多卡霉素A、多卡霉素SA、雷切霉素(CC-1065)或其类似物或衍生物;抗生素,如放线菌素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素(AMC);吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB);白喉毒素及相关分子如白喉A链及其活性片段和杂合分子、蓖麻毒素如蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素、霍乱毒素、志贺样毒素如SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、蒴莲根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -sarcin、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白如PAPI、PAPII和PAP-S、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素毒素;核糖核酸酶(RNase);DNase I、葡萄球菌内毒素A;商陆抗病毒蛋白;白喉毒素和假单胞菌内毒素。

[0194] 在一些实施方案中,抗体与奥瑞他汀或其肽类似物、衍生物或前药偶联。已经表明,奥瑞他汀干扰微管动力学、GTP水解以及核和细胞分裂并具有抗癌和抗真菌活性。例如,奥瑞他汀E可以与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其他典型的奥瑞他汀衍生物包括AFP、MMAF(单甲基奥瑞他汀F)和MMAE(单甲基奥瑞他汀E)。合适的奥瑞他汀和奥瑞他汀的类似物、衍生物和前药,以及用于将奥瑞他汀与Ab偶联的合适接头描述于例如美国专利号5,635,483、5,780,588和6,214,345以及国际专利申请公开W002088172、W02004010957、W02005081711、W02005084390、W02006132670、W003026577、W0200700860、W0207011968和W0205082023。

[0195] 在一些实施方案中,抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB)或其肽类似

物、衍生物或前药偶联。合适的PDB以及PDB衍生物和相关技术描述于例如Hartley J.A.等, *Cancer Res* 2010;70(17):6849-6858;Antonow D.等, *Cancer J* 2008;14(3):154-169;Howard P.W.等, *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:6463-6466和Sagnou等, *Bioorg Med Chem Lett* 2000;10(18):2083-2086。

[0196] 在一些实施方案中,抗体与选自以下的细胞毒性部分偶联:蒽环类抗生素、美登素、卡奇霉素、多卡霉素、雷切霉素(CC-1065)、海兔毒素10、海兔毒素15、伊立替康、单甲基奥瑞他汀E、单甲基奥瑞他汀F、PDB,或它们任何的类似物、衍生物或前药。

[0197] 在一些实施方案中,抗体与蒽环类抗生素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与美登素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与卡奇霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与多卡霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与雷切霉素(CC-1065)或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与海兔毒素10或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与海兔毒素15或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与单甲基奥瑞他汀E或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与单甲基奥瑞他汀F或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与伊立替康或其类似物、衍生物或前药偶联。

[0198] 在一些实施方案中,抗体与细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF α)偶联。

[0199] 在一些实施方案中,抗体与放射性同位素或含放射性同位素的螯合物偶联。例如,抗体可以与允许抗体与放射性同位素络合的螯合剂接头(例如DOTA、DTPA或噻西坦)偶联。抗体还可以或可选地包含一个或多个放射性标记的氨基酸或其他放射性标记的分子或与之偶联。放射性同位素的非限制性实例包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。为了治疗目的,可以使用发射 β 或 α 颗粒辐射的放射性同位素,例如 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 和 ^{212}Pb 。

[0200] 将分子与抗体偶联的技术是本领域熟知的。通常,核酸分子分别通过N-羟基琥珀酰亚胺酯或马来酰亚胺官能团与抗体上的赖氨酸或半胱氨酸共价连接。据报道,使用工程化半胱氨酸或整合非天然氨基酸的偶联方法可改进偶联物的同质性。特别地,本领域技术人员还可以预期用含酰基供体谷氨酰胺的标签(例如含有Gln肽的标签或Q-标签)或通过多肽工程(例如通过多肽上的氨基酸缺失、插入、取代或突变)产生反应性的内源性谷氨酰胺工程化的含Fc多肽。然后,转谷氨酰胺酶可与胺供体剂(例如,包含或连接于反应性胺的小分子)共价交联,以形成稳定且均质的工程化含Fc多肽偶联物群,其中胺供体剂通过含酰基供体谷氨酰胺标签或可接近/暴露/反应性的内源性谷氨酰胺位点特异性地与含Fc多肽偶联(WO2012059882)。

[0201] 应当理解,根据所述实施方案的治疗剂将与合适的药学上可接受的载体、赋形剂、以及其它被掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的试剂一同施用。大量适当的制剂可见于所有药物化学工作者已知的药典中:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)),特别是其中Blaug、Seymour的第87

章。这些制剂包括例如粉末、糊剂、膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)载体(例如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸浆、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固态凝胶以及含有聚乙二醇的半固态混合物。任何前述混合物均可适用于根据本公开的治疗或疗法,条件是制剂中的活性成分不被制剂灭活并且制剂在生理学上是相容的并耐受给药途径。

[0202] 在一个实施方案中,可将所述抗体用作治疗剂。此类试剂将通常用于治疗、缓解和/或预防受试者的与异常肿瘤抗原表达、活性和/或信号传导相关的疾病或病理。可使用标准方法通过鉴定受试者,例如患有(或处于风险或发展)与异常肿瘤抗原表达、活性和/或信号传导相关的疾病或障碍,例如肿瘤抗原相关病症的人患者来实施治疗方案。将抗体制剂,优选对其靶抗原具有高特异性和高亲和性的抗体制剂施用给受试者并且将通常因其与靶标结合而产生效应。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如肿瘤抗原)的表达、活性和/或信号传导功能。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如肿瘤抗原)与其所天然结合的内源性的配体结合。例如,抗体与靶标结合并调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和/或以其它方式妨碍肿瘤抗原表达、活性和/或信号传导。在一些实施方案中,为治疗与异常肿瘤抗原表达相关的疾病或障碍,可将具有重链和轻链CDR的抗体施用给受试者。

[0203] 在另一个实施方案中,针对肿瘤抗原的抗体可用于本领域中已知的与肿瘤抗原定位和/或定量相关的方法(例如,用于测定适当生理样品中的肿瘤抗原和/或肿瘤抗原的水平,用于诊断方法,用于蛋白成像等等)。在一个给定实施方案中,对肿瘤抗原或其衍生物、片段、类似物或同系物具有特异性的、包含源于抗体的抗原结合结构域的抗体,被用作药理学活性化合物(下文称为“治疗剂”)。

[0204] 在另一个实施方案中,可通过标准技术例如免疫亲和、色谱或免疫沉淀,使用对肿瘤抗原具有特异性的抗体来分离肿瘤抗原多肽。针对肿瘤抗原蛋白质的抗体(或其片段)可用于检测生物样品中的蛋白质。在一些实施方案中,在生物样品中可检测肿瘤抗原作为临床测试过程的一部分,例如,用于确定给定治疗方案的功效。将抗体偶联(即物理连接)到可检测物质可有利于检测。可检测物质的示例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的示例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的示例包括链霉亲和素/生物素亲和素/生物素;合适的荧光材料的示例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪氨荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的一个示例包括鲁米诺;生物发光材料的示例包括荧光素酶、荧光素和水母蛋白,并且合适放射性材料的示例包括¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S或³H。

[0205] 在另一个实施方案中,根据本公开的抗体可用作检测样品中肿瘤抗原或其蛋白质片段存在的试剂。在一些实施方案中,抗体包含可检测标记。抗体为多克隆抗体,或更优选单克隆抗体。使用完整的抗体或其片段(例如Fab、scFv或F(ab')₂)。关于抗体的术语“标记”旨在包括通过将可检测物质偶联(即物理连接)到该抗体来直接标记该抗体,以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记该抗体。间接标记的示例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体,以及用生物素进行末端标记抗体,以便能够用荧光标记的链霉亲和素进行检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物学流体,以及受试者体内存在的组织、细胞和流体。因此,使用的术语“生物样品”包括血液和血液中的级分或组分,包括血清、血浆、或淋巴液。换言之,所述实施方案的检测方法可用于在体外及体内检测

生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如,分析物mRNA体外检测技术包括Northern杂交和原位杂交。分析物蛋白质体外检测技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀、以及免疫荧光。分析物基因组DNA体外检测技术包括Southern杂交。用于进行免疫测定的过程描述于例如“ELISA:Theory and Practice:Methods in Molecular Biology”,第42卷,J.R.Crowther(编辑)Human Press,Totowa,N.J.,1995;“Immunoassay”,E.Diamandis和T.Christopoulus,Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.,1996;以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985。此外,分析物蛋白质的体内检测技术包括向受试者体内导入标记的抗分析物蛋白抗体。例如,可以用放射性标记标记抗体,然后通过标准成像技术检测受试者体内该放射性标记物的存在和位置。

[0206] 可将本文所述抗体和其衍生物、片段、类似物和同系物掺入适于施用的药物组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑事项以及选择组分的指南在本领域中是熟知的,例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro等人编辑)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.:1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;以及Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York。

[0207] 此类组合物通常包含抗体和药学上可接受的载体。当使用抗体片段时,与靶蛋白结合结构域特异性结合的最小抑制片段可为优选的。例如,基于抗体的可变区序列,可以设计保留结合靶蛋白质序列能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生(参见例如Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。

[0208] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。合适的药学上可接受的载体描述于最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences中,这是本领域的标准参考书目,其以引用方式并入本文。此类载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体,例如固定化油。将此类介质和试剂用于药物活性物质是本领域熟知的。除去任何常规的介质或试剂与抗体不相容之外,设想其在组合物中的用途。

[0209] 将所述实施方案的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。给药途径的示例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部的)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:注射用无菌稀释剂例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,例如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及调节渗透压的试剂,例如氯化钠或右旋糖。pH可用酸或碱进行调节,例如盐酸或氢氧化钠。可将肠胃外制剂包装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制多剂量小瓶内。

[0210] 适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(在此是水溶性的)或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的药学上可接受的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水

(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且应当为流动性达到易于注射的程度。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须能防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质,及其适宜的混合物。例如通过利用涂层例如卵磷脂,在分散体情况下维持所需颗粒尺寸,以及利用表面活性剂,可以保持适宜的流动性。对微生物作用的防止可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨醇)、氯化钠。注射用组合物的延长吸收可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来达到。

[0211] 根据需要,可以通过将抗体以所需量掺入具有上文所列成分中的一种或组合(按需要)的合适溶剂中来制备无菌注射溶液,然后过滤消毒。一般来讲,通过将抗体掺入含有碱性分散介质和上文所列那些中的所需其它成分的无菌载体中来制备分散体。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言,制备方法是获得粉末的真空干燥和冷冻干燥,该粉末包含活性成分和任何另外的期望成分,它们来自前述的这些成分的无菌过滤溶液。

[0212] 对于吸入给药,从包含合适推进剂如二氧化碳等气体的加压容器或分配器或者喷雾器以气溶胶喷雾形式递送化合物。

[0213] 还可以通过经粘膜或透皮方式全身给药。对于经粘膜或透皮给药,在制剂中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域是通常所知的,并且包括如用于经粘膜给药的去污剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用喷鼻剂或栓剂来实现。对于透皮给药,可将一种或多种所述抗体配制成如本领域通常所知的膏剂、软膏、凝胶、或霜膏。

[0214] 还可将化合物以栓剂(例如,具有常规栓剂基质,如可可脂或其它甘油酯)或滞留性灌肠剂形式进行制备以用于经直肠递送。

[0215] 在一个实施方案中,所述抗体可用防止其不被身体迅速消除的载体制备,例如缓释/控释制剂,包括植入体和微胶囊化递送体系。可使用可生物降解、可生物相容的聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0216] 尤其有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以易于施用和剂量的一致性。如本文所用,剂量单位形式是指用于待治疗的受试者,适合作为单位剂量的物理上可分离的单位;每个单位含有经计算与所需药物载体结合产生期望治疗效果的预定量的一种或多种所述抗体。所述实施方案的剂量单位形式的规格由以下指示并直接取决于:抗体的独特特征和待实现的具体治疗效果,和用于治疗个体的此类抗体的调配领域中固有的局限性。

[0217] 所述药物组合物可与给药说明书一起放于容器、包装、或分配器中。

[0218] 本文所述制剂还可根据要治疗的具体情况而包含多于一种所述抗体,优选具有互补活性但对彼此无负面影响的那些。另选地或除此之外,组合物可例如包含增强其功能的试剂,诸如细胞毒素试剂、细胞因子、化学治疗剂、或生长抑制剂。此类分子以对预期目的有效的量适当地联合存在。例如,可以在试剂盒中联合存在,也可以在使用中联合存在。

[0219] 在一个实施方案中,一种或多种所述抗体可在联合治疗中施用,即与其它试剂例如治疗剂(其可用于治疗病理学病症或障碍,例如各种形式的癌症、自身免疫性障碍和炎性

疾病)联合。术语“联合”在本文中是指将试剂基本上同步地,同时地或顺次地给予。如果顺次给予,则在开始施用第二种化合物时,两种化合物中的第一种仍优选在治疗位点处以有效浓度被检测到。在一种情况下,“联合”也可以是在试剂盒中同时包含本公开的抗体和其他治疗剂。

[0220] 例如,联合治疗可包含本文所述一种或多种抗体与一种或多种附加治疗剂(例如一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂,如下更详述的)共同配制和/或共同施用。此类联合治疗可有利地利用较低剂量的施用的治疗剂,因而避免了与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0221] 在一个实施方案中,与相应的不施用抗肿瘤抗原抗体的治疗方案相比该治疗方案有效降低该受试者中与该T细胞活化性治疗剂的施用相关的细胞因子释放。

[0222] 为了达到清楚和简洁描述的目的,本文中作为相同的或分开的一些实施方案的一部分来描述特征,然而,将要理解的是,本公开的范围可包括具有所描述的所有或一些特征的组合的一些实施方案。

[0223] 图1示出了新型第一抗原×CD3κλ双特异抗体的结构。

[0224] 本公开实验证明,在自由组合情况下,人源化CD3臂的λ轻链倾向于与同源的重链进行配对,与异源重链的配对比率较低;同样,人源化抗原臂的κ轻链也倾向于与同源的重链进行配对,与人源化CD3重链的配对比率极低;同时,在Fv引入互补电荷变异体,进一步减少了可能产生的轻链错配。CD20×CD3κλ双特异抗体的Fc部分采用人IgG4 knob-into-hole结构,通过突变Ser₂₂₈Pro、Leu₂₃₅Glu和Pro₃₂₉Ala,保持铰链区稳定并减弱与Fc γ受体以及C1q的相互作用。

[0225] 实施例

[0226] 实施例1:CD3抗体的优化和对T细胞的激活作用

[0227] 1.重组蛋白的合成

[0228] 合成人CD3 γ (UniProt P09693,Gln23-Asn116)和CD3ε(UniProt P07766,Gln23-Asp126)胞外区核苷酸序列,C端分别与人IgG Fc hole或Fc knob融合,表达形成人CD3ε γ -Fc异源二聚体(人CD3 γ IgG Fc(hole)的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,人CD3εIgG Fc(knob)的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示);同样合成食蟹猴CD3 γ (UniProt Q95LI7,Gln23-Asn110)和CD3ε(UniProt Q95LI5,Gln22-Asp117),C端分别与食蟹猴IgG Fc hole或Fc knob融合,表达形成食蟹猴CD3ε γ -Fc异源二聚体(食蟹猴CD3 γ IgG Fc(hole)的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,食蟹猴CD3 γ IgG Fc(knob)的氨基酸序列如SEQ ID NO.4)。将表达CD3 γ -Fc和CD3ε-Fc的重组质粒与3mg/mL PEI (Polysciences,#24765-2)混合,共转染HEK293E细胞(培养基OPM-293CD03 DPM),37°C120rpm 5%CO2培养7天后,收集培养基上清液,经Protein A亲和层析纯化,得到人或食蟹猴CD3ε γ -Fc重组蛋白。

[0229] 2.CD3抗体人源化

[0230] 鼠源杂交瘤CD3抗体(EMBO J.1985.4(2):337-344;J.Immunol.1986,137(4):1097-100;J.Exp.Med.1991,174:319-326;J.Immunol.1991,147(9):3047-52)识别人和食蟹猴CD3受体,其序列如下:

[0231] 抗CD3鼠单抗轻链氨基酸序列:

[0232] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLI
GDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0233] 抗CD3鼠单抗重链氨基酸序列:

[0234] EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYCYVRHGNFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

[0235] 将抗CD3鼠单抗人源化,选择同源性最高的人胚系基因IMGT_hVL7-43进行轻链CDR移植,FM4选用人IGLJ3*02;选择人IMGT_hVH3-73进行重链CDR移植,FM4选用人IGHJ4*01。设计共得到不同的重链变体和轻链变体(表1)。

[0236] 表1、CD3人源化抗体的可变区序列

CD3 人源化抗体 轻链可变区	SEQ ID NOs: 5-23				
	LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
	氨基酸 序列	核苷酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列
hVL1	5	6	7	8	9
hVL2	10	11	7	8	9
hVL3	12	13	14	15	9
hVL4	16	17	14	15	9
hVL5	18	19	7	8	21
hVL6	22	23	7	20	21

CD3 人源化抗体 重链可变区	SEQ ID NOs: 24-53				
	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3
	氨基酸 序列	核苷酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列
hVH1	24	25	26	27	28
hVH2	29	30	31	27	28
hVH3	32	33	31	27	34
hVH4	35	36	31	27	37
hVH5	38	39	31	27	40
hVH6	41	42	31	27	43
hVH7	44	45	46	47	28
hVH8	48	49	26	27	28
hVH9	50	51	26	27	28
hVH10	52	53	26	27	28

[0238] hVL1的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示,其编码核酸如SEQ ID NO.6所示,其LCDR1、LCDR2和LCDR3分别如SEQ ID NO.7、8、9所示。

[0239] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLI
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0240] 核酸序列

[0241] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTG

[0242] hVL2的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示,其编码核酸如SEQ ID NO.11所示,其LCDR1、LCDR2和LCDR3分别如SEQ ID NO.7、8、9所示。

[0243] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLI

GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVL

[0244] 核酸序列

[0245] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAG_gAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTG

[0246] hVL3的氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示,其编码核酸如SEQ ID NO.13所示,其LCDR1、LCDR2和LCDR3分别如SEQ ID NO.14、15、9所示。

[0247] EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCESSDGA¹VTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKEAPWTPARFSGSLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVL

[0248] 核酸序列

[0249] GAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTGAGTCTTCTGACGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGGAGGCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTG

[0250] hVL4的氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示,其编码核酸如SEQ ID NO.17所示,其LCDR1、LCDR2和LCDR3分别如SEQ ID NO.14、15、9所示。

[0251] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCESSDGA¹VTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKEAPWTPARFSGSLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVL

[0252] 核酸序列

[0253] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTGAGTCTTCTGACGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGGAGGCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGTGCTCAGCCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTG

[0254] hVL5的氨基酸序列如SEQ ID NO.18所示,其编码核酸如SEQ ID NO.19所示,其LCDR1、LCDR2和LCDR3分别如SEQ ID NO.7、8、21所示。

[0255] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGA¹VTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLGGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSLWVFGGGTKLTVL

[0256] 核酸序列

[0257] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAG_gAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTG

[0258] hVL6的氨基酸序列如SEQ ID NO.22所示,其编码核酸如SEQ ID NO.23所示,其LCDR1、LCDR2和LCDR3分别如SEQ ID NO.7、20、21所示。

[0259] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQEKPGQAPRGLIYGTKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTLGAQAEDAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0260] 核酸序列

[0261] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGTTCCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCTACGGAACAAACAAGAGAGCCCTTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACACTTTCTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTC
GGCGGAGGCACCAAAGTACAGTTCTG

[0262] hVH1的氨基酸序列如SEQ ID NO.24所示,其编码核酸如SEQ ID NO.25所示,其
HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.26、27、28所示。

[0263] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0264] 核酸序列

[0265] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0266] hVH2的氨基酸序列如SEQ ID NO.29所示,其编码核酸如SEQ ID NO.30所示,其
HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.31、27、28所示。

[0267] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0268] 核酸序列

[0269] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGC
CGCCAGCGGCTTCACCTTCTCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAaagGCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTG
TCCAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAG
GGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCA
GACACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0270] hVH3的氨基酸序列如SEQ ID NO.32所示,其编码核酸如SEQ ID NO.33所示,其
HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.31、27、34所示。

[0271] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0272] 核酸序列

[0273] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCA
CACGGCAACTTCGGCGAGAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0274] hVH4的氨基酸序列如SEQ ID NO.35所示,其编码核酸如SEQ ID NO.36所示,其

HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.31、27、37所示。

[0275] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0276] 核酸序列

[0277] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCCAGAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0278] hVH5的氨基酸序列如SEQ ID NO.38所示,其编码核酸如SEQ ID NO.39所示,其
HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.31、27、40所示。

[0279] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0280] 核酸序列

[0281] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCGACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0282] hVH6的氨基酸序列如SEQ ID NO.41所示,其编码核酸如SEQ ID NO.42所示,其
HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.31、27、43所示。

[0283] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0284] 核酸序列

[0285] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCTCCACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCACCAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0286] hVH7的氨基酸序列如SEQ ID NO.44所示,其编码核酸如SEQ ID NO.45所示,其
HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.46、47、28所示。

[0287] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVEDR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

[0288] 核酸序列

[0289] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCTCCGACTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGGAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0290] hVH8的氨基酸序列如SEQ ID NO.48所示,其编码核酸如SEQ ID NO.49所示,其HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.26、27、28所示。

[0291] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

[0292] 核酸序列

[0293] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0294] hVH9的氨基酸序列如SEQ ID NO.50所示,其编码核酸如SEQ ID NO.51所示,其HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.26、27、28所示。

[0295] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

[0296] 核酸序列

[0297] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0298] hVH10的氨基酸序列如SEQ ID NO.52所示,其编码核酸如SEQ ID NO.53所示,其HCDR1、HCDR2和HCDR3分别如SEQ ID NO.26、27、28所示。

[0299] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

[0300] 核酸序列

[0301] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGC
CAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCT

[0302] 将轻、重链人源化变体分别进行全序列合成后,克隆到含有抗体lambda轻链恒定区或人IgG4重链恒定区CH1-CH3的真核表达载体,共转染HEK293E细胞,37°C120rpm 5%CO₂培养5-6天后,收集培养基上清液,通过Protein A层析柱进行纯化。

[0303] 3.CD3人源化抗体的亲和力

[0304] 包被人CD3ε γ 重组蛋白,4°C过夜。2%脱脂牛奶封闭后,每孔加入不同稀释倍数的CD3抗体,孵育1小时;二抗加入HRP标记的山羊抗人IgG Fc,TMB溶液显色后,以浓硫酸终止反应并在450nm处读出吸光度。图2显示CD3人源化抗体(包括aCD3-hVH1/VL5、aCD3-hVH8/VL1、aCD3-hVH8/VL5、aCD3-hVH9/VL1、aCD3-hVH9/VL2、aCD3-hVH9/VL3、aCD3-hVH9/VL5)与人CD3ε γ 蛋白的结合,CD3人源化抗体高亲和力结合CD3ε γ 重组蛋白。

[0305] 取对数生长期的Jurkat细胞,3%BSA封闭30分钟,以每孔 5×10^4 细胞加入96孔U型板,离心弃上清,每孔加入50 μ L梯度稀释的抗体(抗体浓度从30 μ g/mL起,3倍稀释5个梯度),4 $^{\circ}$ C孵育1小时。洗去一抗后,二抗加入1:300稀释的Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(Jackson ImmunoResearch,109-606-170),4 $^{\circ}$ C孵育45分钟,洗涤后每孔重悬于50 μ L PBS进行FACS(iQue,Intellicyt)检测。结果如图3所示,CD3人源化抗体与Jurkat细胞结合,其中CD3人源化抗体hVH9/VL5(aCD3-hVH9/VL5)和hVH9/VL2(aCD3-hVH9/VL2)均显著弱于对照抗体OKT3,以中度亲和力结合Jurkat细胞。

[0306] 表2显示CD3人源化抗体与CD3重组蛋白和Jurkat细胞的亲和力。

[0307] 表2、CD3人源化抗体的亲和力

[0308]	ELISA (CD3 ϵ γ)	FACS (Jurkat)
aCD3-hVH1/VL5	0.60 nM	10nM
aCD3-hVH8/VL1	0.65nM	15nM
aCD3-hVH8/VL5	0.74nM	较弱
aCD3-hVH9/VL1	0.49 nM	7nM
aCD3-hVH9/VL2	0.44nM	25nM
aCD3-hVH9/VL3	0.70nM	弱
aCD3-hVH9/VL5	0.42nM	20nM
OKT3-hIgG1	ND	0.27nM
KLH-hIgG4	-	-

[0309] ND:未检测。

[0310] -:不结合

[0311] 4.CD3人源化抗体与人、食蟹猴CD3 ϵ γ 抗原的交叉识别

[0312] 分别包被人CD3 ϵ γ 蛋白和食蟹猴CD3 ϵ γ 蛋白,4 $^{\circ}$ C过夜。2%脱脂牛奶封闭后,每孔加入不同稀释倍数的CD3抗体,孵育1小时;二抗加入HRP标记的山羊抗人IgG Fc,TMB溶液显色后,以浓硫酸终止反应并在450nm处读出吸光度。图4显示CD3人源化抗体hVH9/VL5(aCD3-hVH9/VL5)和hVH9/VL2(aCD3-hVH9/VL2)均可同时结合人CD3 ϵ 和食蟹猴CD3 ϵ 蛋白。

[0313] 实施例2构建不同类型轻链形成的CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体

[0314] 1.CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的构建

[0315] 以CD3人源化抗体hVH9/VL5(λ 轻链和配对重链)和人源化CD20抗体(κ 轻链和配对重链),构建具有天然IgG构型的新型T细胞 $\kappa\lambda$ 双特异抗体。

[0316] 如图5所示,设计并构建了下述5种CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体:

[0317] 1)CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 001:保留CD3臂和CD20抗原臂的天然序列;

[0318] 2)CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 002:同时在CD20抗原臂和CD3臂引入电荷变异体($V_{\kappa_{CD20}}:Gln_{38}Lys$; $VH_{CD20}:Gln_{39}Glu$; $V\lambda_{CD3}:Gln_{40}Glu$; $VH_{CD3}:Gln_{39}Lys$);

[0319] 3)CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 003:基于CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 002,在CH1/C κ 之间增加互补电荷对($V_{\kappa-}Ck_{CD20}:Gln_{38}Lys\backslash Glu_{123}Lys\backslash Gln_{124}Lys$; $V_H-C_H1_{CD20}:Gln_{39}Glu\backslash Lys_{152}Glu\backslash Lys_{218}Glu$; $V\lambda_{CD3}:Gln_{40}Glu$; $VH_{CD3}:Gln_{39}Lys$);

[0320] 4)CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 004:仅在CD20抗原臂引入电荷变异体($V_{\kappa_{CD20}}:Gln_{38}Lys$; $VH_{CD20}:Gln_{39}Glu$);

[0321] 5) CD20×CD3κλ005:仅在CD3臂引入电荷变异体($V_{\lambda_{CD3}}:Gln_{40}Glu$; $VH_{CD3}:Gln_{39}Lys$)。

[0322] 相应序列见表3,对照抗体CD20×CD3-crossFab参考CrossFab方法构建(Schaefer W等,PNAS 2011)。

[0323] 表3、CD20×CD3κλ双特异抗体的序列

	CD20臂轻链	CD20臂重链	CD3臂轻链	CD3臂重链
CD20×CD3κλ001	SEQ ID NO.54	SEQ ID NO.56	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.60
CD20×CD3κλ002	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.64	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
CD20×CD3κλ003	SEQ ID NO.70	SEQ ID NO.72	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
CD20×CD3κλ004	SEQ ID NO.62	SEQ ID NO.64	SEQ ID NO.58	SEQ ID NO.60
CD20×CD3κλ005	SEQ ID NO.54	SEQ ID NO.56	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
CD20×CD3-crossFab	SEQ ID NO.70	SEQ ID NO.74	SEQ ID NO.76	SEQ ID NO.78

[0325] CD20×CD3κλ001:

[0326] CD20臂κ轻链SEQ ID NO.54

[0327] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0328] 核苷酸序列SEQ ID NO.55

[0329] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGT
AGAGCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATCTA
CGACGCCAGCAACAGAGCCACAGGCATCCCCGATAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTCACCCTGACAA
TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGAAGCAACTGGCCCATCACATTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0330] CD20臂重链(重链1)SEQ ID NO.56

[0331] EVQLLESQGGVVQPGGSLRLSAAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0332] 核苷酸序列SEQ ID NO.57

[0333] GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGCGGAGTTGTTACGCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCT
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTC
CACCATCAGCTGGAACAGCGGCTCTATCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAACA
GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATC
CAGTACGGCAACTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAA

GGGCCCCAGCGTGTTCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA
CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA
CGTGACGGCGTGGAAGTGATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0334] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.58

[0335] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0336] 核苷酸序列SEQ ID NO.59

[0337] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTGGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTC
GGCGGAGGCACAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0338] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.60

[0339] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHIALHNHYTQKSLSLSLGK

[0340] 核苷酸序列SEQ ID NO.61

[0341] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAATACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA

CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGACCAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTACAGTGTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0342] CD20×CD3κλ002:

[0343] CD20臂κ轻链SEQ ID NO.62

[0344] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0345] 核苷酸序列SEQ ID NO.63

[0346] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGT
AGAGCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGAAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATCTA
CGACGCCAGCAACAGAGCCACAGGCATCCCCGATAGATTCAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA
TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGAAGCAACTGGCCCATCACATTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0347] CD20臂重链(重链1)SEQ ID NO.64

[0348] EVQLLESGGKVVPQGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNSGSIQYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK
YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK

[0349] 核苷酸序列SEQ ID NO.65

[0350] GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGCGGAGTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCT
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGAGAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTC

CACCATCAGCTGGAACAGCGGCTCTATCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAACA
GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATC
CAGTACGGCAACTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACCGTTAGCTCTGCTAGCACAA
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA
CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGTGACACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0351] CD3 λ 轻链SEQ ID NO.66

[0352] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGKTLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0353] 核苷酸序列SEQ ID NO.67

[0354] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGTCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTC
GGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0355] CD3 μ 重链(重链2)SEQ ID NO.68

[0356] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0357] 核苷酸序列SEQ ID NO.69

[0358] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC

GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCAGCTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTTGACAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0359] CD20×CD3κλ003:

[0360] CD20臂κ轻链SEQ ID NO.70

[0361] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKKLKSQTASVVCLLNMFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0362] 核苷酸序列SEQ ID NO.71

[0363] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGT
AGAGCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGAAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATCTA
CGACGCCAGCAACAGAGCCACAGGCATCCCCGATAGATTACAGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA
TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGAAGCAACTGGCCCATCACATTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATAAGAAATTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0364] CD20臂重链(重链1)SEQ ID NO.72

[0365] EVQLLESGGKVVPQGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDERSK
YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0366] 核苷酸序列SEQ ID NO.73

[0367] GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGCGGAGTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGAGAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCACCATCAGCTGGAACAGCGGCTCTATCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATCAGTACGGCAACTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGCAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTGAAGGCGGACCTAGCGTGTCTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTTCCTCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0368] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.66

[0369] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLGGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWQKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0370] 核苷酸序列SEQ ID NO.67

[0371] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGGACACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0372] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.68

[0373] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0374] 核苷酸序列SEQ ID NO.69

[0375] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0376] CD20×CD3κλ004:

[0377] CD20臂κ轻链SEQ ID NO.62

[0378] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPIITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0379] 核苷酸序列SEQ ID NO.63

[0380] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGGCCACACTGAGCTGT
AGAGCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGAAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATCTA
CGACGCCAGCAACAGAGCCACAGGCATCCCCGATAGATTACGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA
TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGAAGCAACTGGCCCATCACATTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0381] CD20臂重链(重链1)SEQ ID NO.64

[0382] EVQLLESQGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNSGSIQYADSVKGRFT
ISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK

YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

[0383] 核苷酸序列SEQ ID NO.65

[0384] GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGCGGAGTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCTGCCAGCGCTTCACCTTCAACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGAGAGGCCCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCACCATCAGCTGGAACAGCGGCTCTATCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATCAGTACGGCAACTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGCAGAAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTTCCTCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0385] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.58

[0386] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGKKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0387] 核苷酸序列SEQ ID NO.59

[0388] CAGGCTGTGGTACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTGGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGACCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGAAGTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0389] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.60

[0390] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES

TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVNFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

[0391] 核苷酸序列SEQ ID NO.61

[0392] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGCAGGACAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0393] CD20×CD3κλ005:

[0394] CD20臂κ轻链SEQ ID NO.54

[0395] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPIITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0396] 核苷酸序列SEQ ID NO.55

[0397] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGT
AGAGCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGGCTCCCAGACTGCTGATCTA
CGACGCCAGCAACAGAGCCACAGGCATCCCCGATAGATTACGCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA
TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGAAGCAACTGGCCCATCACATTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0398] CD20臂重链(重链1)SEQ ID NO.56

[0399] EVQLLESQGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIQYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0400] 核苷酸序列SEQ ID NO.57

[0401] GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGCGGAGTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCT GCCAGCGGCTTCACCTTCAACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTC CACCATCAGCTGGAACAGCGGCTCTATCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAACA GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATC CAGTACGGCAACTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGAGCAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATC AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC CCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGTCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT CCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0402] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.66

[0403] QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLG GKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTTAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0404] 核苷酸序列SEQ ID NO.67

[0405] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGGCCAGGCTCCTAGAGGACT GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTT CCGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0406] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.68

[0407] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVNFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0408] 核苷酸序列SEQ ID NO.69

[0409] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCCTCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0410] CD20×CD3-crossFab

[0411] CD20臂κ轻链SEQ ID NO.70

[0412] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0413] 核苷酸序列SEQ ID NO.71

[0414] GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTGGCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCCACACTGAGCTGT
AGAGCCAGCCAGAGCGTGTCTCTTACCTGGCCTGGTATCAGAAGAAGCCTGGACAGGCTCCAGACTGCTGATCTA
CGACGCCAGCAACAGAGCCACAGGCATCCCCGATAGATTACGCGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAA
TCAGCAGACTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAGAAGCAACTGGCCCATCACATTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATAAGAAATTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATA
ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC

ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0415] CD20臂重链(重链1)SEQ ID NO.74

[0416] EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVD ERVESK
YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFAS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0417] 核苷酸序列SEQ ID NO.75

[0418] GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGTGGCGGAGTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCT
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGAGAGGCCCTGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTC
CACCATCAGCTGGAACAGCGGCTCTATCGGCTACGCCGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGAGACAACA
GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGACATC
CAGTACGGCAACTACTACTACGGCATGGACTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTTACCGTTAGCTCTGCTAGCACAA
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTG CAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGG
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA
CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTGAAGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCGCCAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCT
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0419] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.76

[0420] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRV

[0421] 核苷酸序列SEQ ID NO.77

[0422] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAAC TACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTG CAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT

GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TCCCCCGCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG

[0423] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.78

[0424] QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESKYGP
PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTYRV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0425] 核苷酸序列SEQ ID NO.79

[0426] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCGTGACCAACAGCAACTACGTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTT
GGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTACAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCC
CCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCC
GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA
AGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCGCCAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC
TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAG
ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCACCTTGTCAGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCC
AGCCCCGAGAACAATAAGACACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACC
GTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC
CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0427] 2. CD20×CD3κλ双特异抗体的表达和纯化

[0428] 将编码相应抗体片段的质粒,按CD20臂轻链:CD3臂轻链:CD20臂重链(重链1):CD3臂重链(重链2)=2:2:1:1的比率混合,与3mg/mL PEI混合后,共同转染CHO-S细胞,在500mL CD CHO AGT培养基(Gibco#12490-001) 37°C 5%CO₂ 150rpm培养,分别在瞬转第2、4和6天,加入4%CHO Feed C+补料(Gibco#A25031-05)。当细胞活率降至85%左右,收获发酵液,过滤后经Protein A亲和层析纯化。基于不同轻链类型构建的CD20×CD3κλ双特异抗体,Protein A一步纯化后单体纯度接近或高于90%,而对照抗体CD20×CD3-crossFab的单体纯度低于80%(表4),κλ轻链的比率接近1:1(图6)。

[0429] 表4、CD20×CD3κλ双特异抗体的纯度(SEC-HPLC)

双特异抗体	SEC-HPLC (%)		
	聚体	单体	片段
CD20×CD3 κλ001	4.1	92.5	3.5
CD20×CD3 κλ002	4.6	90.8	4.5
CD20×CD3 κλ003	3.1	88.3	8.6
CD20×CD3 κλ004	4.8	91.1	4.0
CD20×CD3 κλ005	6.0	90.5	3.5
CD20×CD3-crossFab	7.6	76.0	16.4

[0431] 使用Capto S ImpAct离子交换层析,对CD20×CD3κλ双特异抗体进一步精制纯化,通过50-300mM NaCl,50mM磷酸盐,pH6.4梯度洗脱,合并洗脱峰,SEC-HPLC单体含量显示高于99% (图7)。CD20×CD3κλ002和CD20×CD3κλ003纯化样品中,轻链错配比率极低(<1%),未检测到CD3同源二聚体或CD20同源二聚体(图8)。

[0432] 3. CD20×CD3κλ双特异抗体的结合活性

[0433] 分别通过检测与CD20过表达稳转细胞或CD20+肿瘤细胞的结合,确定双特异抗体CD20抗原臂的亲合力,通过检测与CD3重组抗原、Jurkat细胞或新鲜分离的外周血T细胞的结合,确定双特异抗体CD3臂的亲合力。检测结果显示,新型CD20×CD3κλ双特异抗体与肿瘤细胞的亲合力高于与T细胞的亲合力约3~5倍。阳性对照抗体bsAB1按文献US20170174781合成并表达制备。

[0434] (1) CD20×CD3κλ双特异抗体与人和食蟹猴CD20稳转细胞的结合

[0435] 取对数生长期的实施例1制备的CHO-人CD20和CHO-食蟹猴CD20稳转细胞,用4%小牛血清(Hyclone, SH30626.06)调整细胞至 5×10^5 个细胞/mL,加入100μL/孔细胞悬液至96孔U型板,300g离心5分钟,弃上清,每孔加入100μL梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4℃孵育60分钟。二抗加入50μL/孔Alexa Fluoro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50μL/孔碘化丙啶(PI)溶液(1:300),孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。图9和表5显示,CD20×CD3κλ双特异抗体高亲合力结合细胞CD20受体,在人和食蟹猴CD20稳转细胞上的亲合力相当。

[0436] 表5、CD20×CD3κλ双特异抗体和CD20稳转细胞的结合

EC ₅₀	人CD20-CHO	食蟹猴CD20-CHO
CD20×CD3κλ001	10 nM	12nM
CD20×CD3κλ002	9 nM	8nM
CD20×CD3κλ003	7 nM	8nM
CD20×CD3κλ004	8nM	10nM
CD20×CD3κλ005	9nM	14nM
KLH×CD3	-	-

[0438] “-”:不结合

[0439] (2) CD20×CD3κλ双特异抗体与人CD20⁺肿瘤细胞的结合

[0440] 取对数生长期的SU-DHL-4、Raji和NALM-6细胞,加入200μg/mL鼠IgG(Jackson ImmunoResearch, 115-005-03)冰浴封闭30分钟,用4%小牛血清调整细胞至 5×10^5 细胞/mL,每孔100μL加入96孔U型板,300g离心5分钟,弃上清,每孔加入100μL梯度稀释的抗体(起

始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4℃孵育60分钟。洗去一抗,加入50μL/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50μL/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。检测结果见图10和表6,CD20×CD3κλ双特异抗体高亲和力结合CD20+肿瘤细胞SU-DHL-4、Raji和NALM-6。

[0441] (3) CD20×CD3κλ双特异抗体与Jurkat细胞的结合

[0442] 取对数生长期的Jurkat细胞,加入200μg/mL鼠IgG(Jackson ImmunoResearch, 115-005-03),冰浴30分钟。用4%小牛血清调整细胞至 5×10^5 细胞/mL,每孔100μL加入96孔U型板,300g离心去上清,每孔加入100μL梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4℃孵育60分钟。二抗加入50μL/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50μL/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD C6)进行检测。检测结果如图11和表6,CD20×CD3κλ双特异抗体以中等亲和力结合人白血病T细胞系Jurkat细胞, EC_{50} 约71-120nM,低于CD20抗原臂与CD20受体的结合力约10倍。

[0443] (4) CD20×CD3κλ双特异抗体与人外周血T细胞的结合

[0444] 取新鲜外周血,通过Ficoll.Paque Plus(GE,17-1440-03)分离得到PBMC。将PBMC用4%小牛血清(Hyclone,SH30626.06)调整细胞至 5×10^5 个细胞/mL,100μL/孔加入96孔U型板,离心弃上清,每孔加入100μL梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4℃孵育60分钟。二抗加入50μL/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰浴20分钟,洗1次后加入50μL/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD C6)进行检测。检测结果见图12和表6,CD20×CD3κλ双特异抗体识别人外周血CD4⁺T和CD8⁺T细胞,与人T细胞亲和力约65-98nM,弱于CD20抗原臂与CD20受体的结合力约10倍,有利于双特异抗体优先富集到肿瘤细胞。

[0445] 表6、CD20×CD3κλ双特异抗体与人细胞的结合力(nM)

EC_{50} (nM)	SU-DHL-4	Raji	NALM-6	Jurkat	CD4T	CD8T
CD20×CD3κλ002	7	23	10	71	73	98
CD20×CD3κλ003	6	25	8	120	69	65
bsAB1	19	115	48	ND	25	22
KLH×CD3	-	-	-	33	62	65

[0447] ND:高浓度条件下未达到饱和

[0448] 4. CD20×CD3κλ双特异抗体介导的TDCC作用

[0449] 取新鲜分离得到的PBMC分别与处于对数生长期的靶细胞NALM-6、TMD-8和Toledo细胞混合,效应/靶细胞=8:1,每孔加入50μL梯度稀释的抗体(抗体浓度从66.7nM起,10倍稀释,7个梯度),5%CO₂ 37℃培养24小时。培养结束后,将50μL上清转移至新的黑色酶标板,加入50μL/孔LDH检测底物,10分钟后终止反应并检测LDH释放;孔内剩余细胞用4%小牛血清洗2次后,加入100μg/mL人IgG孵育10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-PE,CD4-APC,CD69-FITC和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60μL/孔PI,置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。图13A、13B分别显示CD20×CD3κλ双特异抗体对人B淋巴白血病细胞Nalm-6的杀伤和对T细胞的活化。图14A、14B分别显示CD20×CD3κλ双特异抗体对TMD-8细胞的杀伤和对T细胞的活化。图15A、15B分别显示CD20×CD3κλ双特异抗体对Toledo细胞的杀伤和对T细胞的活化。对于CD20表达水平不同的肿瘤细胞Nalm-6、TMD-8和Toledo,

CD20×CD3κλ002和CD20×CD3κλ003均可介导T细胞产生有效杀伤作用,杀伤活性与对照抗体bsAB1相当或略强,且对T细胞的激活较后者更为温和。

[0450] 5. CD20×CD3κλ双特异抗体对T细胞活化通路的激活

[0451] 取对数生长期的Jurkat-NFAT-luc报告细胞和CD20阳性靶细胞(SU-DHL-4、Raji和NALM-6细胞),离心弃上清,重悬至 2×10^6 个细胞/ml。 $50 \mu\text{l}$ /孔接种靶细胞至96孔板,300g离心5分钟弃上清, $50 \mu\text{l}$ /孔接种Jurkat-NFAT-luc报告细胞至96孔板,每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 梯度稀释的CD20×CD3κλ双特异抗体或对照抗体KLH×CD3(起始浓度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$,10倍稀释,10个梯度),5%CO₂,37℃培养6小时。培养结束后,按照ONE-Glo Luciferase Assay System说明书,每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 检测试剂,室温放置3分钟,于酶标仪(Biotek Synergy HT)检测。检测结果见图16和表7,CD20×CD3κλ双特异抗体以不同CD20表达水平的肿瘤细胞为靶细胞时,均可激活T细胞的NFAT信号通路。

[0452] 表7、CD20×CD3κλ双特异抗体对T细胞NFAT通路的激活

EC ₅₀ (nM)	SU-DHL-4	Raji	NALM-6
CD20×CD3κλ002	0.10	0.02	0.14
CD20×CD3κλ003	0.11	0.02	0.14
KLH×CD3	-	-	-

[0454] 6. CD20×CD3κλ双特异抗体与Fc γ 受体的结合

[0455] 将 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ His-Tag抗体通过氨基偶联到CM5芯片,分别捕获带有His标签的Fc γ RI、Fc γ RIIA_{H131}和Fc γ RIIIA_{V158}重组蛋白(Sino Biological, #10256-H08H/10374-H08H1/10389-H08H1),捕获时间40秒,流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$,基线平稳后,将梯度稀释的抗体(起始浓度 $37.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,2倍稀释)以 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速流过芯片,结合时间120秒,解离时间200秒,用Biacore evaluation软件拟合得到亲和力常数。由表8可见,CD20×CD3κλ双特异抗体与Fc γ RI、Fc γ RIIA_{H131}和Fc γ RIIIA_{V158}均无结合;野生型IgG4对照抗体以较强亲和力结合Fc γ RI,与Fc γ RIIA_{H131}有微弱结合。

[0456] 表8、CD20×CD3κλ双特异抗体与Fc γ 受体的亲和力

KD	Fc γ RI	Fc γ RIIA _{H131}	Fc γ RIIIA _{V158}
CD20×CD3κλ002	不结合	不结合	不结合
CD20×CD3κλ003	不结合	不结合	不结合
IgG4同型对照	14nM	微弱	不结合

[0458] 7. 免疫重建小鼠皮下Raji移植瘤模型

[0459] 选择6~8周雌性B-NGD小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),皮下接种 3×10^6 Raji细胞,待肿瘤长至 60mm^3 时,随机分组,分别设定为给药组 $3.0 \text{mg}/\text{kg}$ 、给药组 $0.6 \text{mg}/\text{kg}$ 、给药组 $0.12 \text{mg}/\text{kg}$ 和阴性对照组KLH×CD3 $3 \text{mg}/\text{kg}$ 。每只小鼠尾静脉注射 1×10^7 个PBMC细胞,3天后开始第一次小鼠给药,给药间隔为5天一次,共给药3次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。结果见图17,CD20×CD3κλ双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性,中剂量和高剂量抑瘤率分别为82%和89%。荷瘤小鼠对以上剂量耐受良好,无体重减轻等不良反应。

[0460] 8. 免疫缺陷型小鼠皮下Raji与人PBMC混合接瘤模型

[0461] 选择6~8周雌性B-NGD小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),将Raji (3×10^6 个)和

人PBMC (5×10^6 个) 混合后接种于小鼠皮下,待肿瘤成瘤体积到达60-100mm³时,随机分组。分别设定为给药组3.0mg/mL、给药组0.6mg/mL、给药组0.12mg/mL和阴性对照组KLH×CD3 3mg/kg。给药间隔为5天一次,共给药2次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。结果见图18,CD20×CD3κλ双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性,低、中和高剂量抑瘤率分别为65%、98%和162%,高、中剂量组肿瘤完全抑制或消退。

[0462] 9.CD20×CD3κλ双特异抗体在食蟹猴中的药效

[0463] 将8只食蟹猴分配至4个剂量组,每个剂量组由2只猴子组成,雌雄各半。各剂量组接受的给药剂量分别为0.3、1、3mg/kg (每周1次,给药3周,共4次给药) 和1mg/kg (单次给药) CD20×CD3κλ002双特异抗体,给药方案见表9。给药期及恢复期,各组所有猴一般状况良好,未见毒性反应,未见死亡或濒死。各剂量组体温未见明显异常改变,II导联心电图波形正常,其心率、R-R间期、P-R间期、QT间期、QRS时限、收缩压、舒张压等指标未见明显异常。在给药后不同时间点,通过流式细胞技术分析外周血中B和T细胞群体数量的变化,B细胞使用细胞表面标记物CD20鉴定 (CD20+细胞),T细胞使用CD3鉴定 (CD3+细胞)。给药后8小时,外周血中B被快速清除,24小时已低于检测下限 (图19)。

[0464] 表9、CD20×CD3κλ双特异抗体给药方案

[0465]	组别	剂量	给药途径及频率	性别	动物号
	低剂量组	0.3 mg/kg	IV, 每周 1 次/3 周, D1、D8、D15、D22	雄	2016221
				雌	2016222
	中剂量组	1 mg/kg	IV, 每周 1 次/3 周, D1、D8、D15、D22	雄	2016223
				雌	2016224
	高剂量组	3 mg/kg	IV, 每周 1 次/3 周, D1、D8、D15、D22	雄	2016225
				雌	2016226
	中剂量组	1 mg/kg	IV, D1 单次给药	雌	2016227
				雄	2016228

[0466] 实施例3:构建不同类型轻链形成的BCMA×CD3κλ双特异抗体

[0467] 1.BCMA×CD3κλ双特异抗体的构建

[0468] 以含κ轻链的BCMA人源化抗体,与含λ轻链的人源化CD3抗体,参考实施例2构建具有天然IgG构型的新型BCMA-CD3κλ人源化双特异抗体,同时在BCMA抗原臂和CD3臂引入电荷变异体 ($V_{\kappa_{BCMA}}:Gln_{42}Lys;V_{H_{BCMA}}:Gln_{39}Glu;V_{\lambda_{CD3}}:Gln_{40}Glu;V_{H_{CD3}}:Gln_{39}Lys$) (序列见表10);双特异抗体的Fc部分采用人IgG4 knob-into-hole结构,以实现异源二聚体配对,并且通过突变Ser₂₂₈Pro、Leu₂₃₅Glu和Pro₃₂₉Ala,保持铰链区稳定并减弱与Fc γ R受体和C1q的相互作用。

[0469] 表10、BCMA×CD3κλ双特异抗体

[0470]	蛋白序列	BCMA臂轻链	BCMA臂重链	CD3臂轻链	CD3臂重链
	BCMA×CD3κλ003	SEQ ID NO.80	SEQ ID NO.82	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
	BCMA×CD3κλ004	SEQ ID NO.84	SEQ ID NO.82	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
	BCMA×CD3κλ005	SEQ ID NO.80	SEQ ID NO.86	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
	BCMA×CD3κλ006	SEQ ID NO.84	SEQ ID NO.86	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68

[0471] BCMA×CD3κλ003

[0472] BCMA臂κ轻链:SEQ ID NO.80

[0473] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS
GSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0474] 核苷酸序列:SEQ ID NO.81

[0475] GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCTTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCCAGAGAGCCACCATCACCTGT
AGAGCCAGCAAGAGCGTGTCCACCAGCGGCTACTCTTACATGCACTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAA
GCTGCTGATCTACCTGGCTAGCAACCTCGAAAGCGGAGTGCCTGCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACT
TCACCCTGACAATCAACCCCGTGAAGCCGAAGACACCGCCAACTACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCCTGG
ACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA
GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0476] BCMA臂重链(重链1):SEQ ID NO.82

[0477] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYIFTNFGMNWVREAPGQGLEWMGWINTYTGEQIYADGFTGRFV
FSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGEIYYGYDVG FVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0478] 核苷酸序列:SEQ ID NO.83

[0479] CAGGTTACAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG
GCTAGCGGCTACATCTTCACCAACTTCGGCATGAACTGGGTCCGAGAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCAGATCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTCTGTGTTACAGCCTGGACACCA
GCGCCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAGGCGAG
ATCTACTACGGCTACGACGTGGGCTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAA
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA
CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT

GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0480] CD3臂λ轻链:SEQ ID NO.66

[0481] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0482] 核苷酸序列:SEQ ID NO.67

[0483] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTT
GGCGGAGGCACAAACTGACAGTTCTGGGTGACCCAAAGGCGGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGAAGTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCCTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0484] CD3臂重链(重链2):SEQ ID NO.68

[0485] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0486] 核苷酸序列:SEQ ID NO.69

[0487] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC

TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0488] BCMA $\times$ CD3 κ 004

[0489] BCMA臂 κ 轻链:SEQ ID NO.84

[0490] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVTTSGYSYIHWHYQKKPGQPPKLLIYLASDLEAGVPARFSGS
GSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0491] 核苷酸序列:SEQ ID NO.85

[0492] GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCTTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCCAGAGAGCCACCATCACCTGT
AGAGCCAGCAAGAGCGTGACCACCAGCGGCTACTCTTACATCCACTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAA
GCTGCTGATCTACCTGGCCAGCGATCTGGAAGCTGGCGTGCCAGCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACT
TCACCCTGACAATCAACCCCGTGGAAGCCGAAGACACCGCCAACTACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCCTGG
ACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA
GGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0493] BCMA臂重链(重链1):SEQ ID NO.86

[0494] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYIFTNFGMNWVREAPGQGLEWMGWINTYTGEQIYADGFTGRFV
FSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGEIYYGYDVGFFVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK

[0495] 核苷酸序列:SEQ ID NO.87

[0496] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG
GCTAGCGGCTACATCTTACCAACTTCGGCATGAACTGGGTCCGAGAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCAGATCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTCTGTGTTACAGCTGGACACCA
GCGCCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAGGCGAG
ATCTACTACGGCTACGACGTGGGCTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTTAGCTCTGCTAGCACCA
GGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCTTGACGAGAAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA
CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGTGTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA

AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0497] CD3臂λ轻链:SEQ ID NO.66

[0498] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0499] 核苷酸序列:SEQ ID NO.67

[0500] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTT
GGCGGAGGCACCAAACCTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0501] CD3臂重链(重链2):SEQ ID NO.68

[0502] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0503] 核苷酸序列:SEQ ID NO.69

[0504] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGCAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG

GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTC AAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0505] BCMA $\times$ CD3 κ 005

[0506] BCMA臂 κ 轻链:SEQ ID NO.80

[0507] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGYSYMHWYQKKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGS
GSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0508] 核苷酸序列:SEQ ID NO.81

[0509] GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCTTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCCAGAGAGCCACCATCACCTGT
AGAGCCAGCAAGAGCGTGTCCACCAGCGGCTACTCTTACATGCACTGGTATCAGAAGAAGCCCGCCAGCCTCCTAA
GCTGCTGATCTACCTGGCTAGCAACCTCGAAAGCGGAGTGCCTGCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACT
TCACCCTGACAATCAACCCCGTGGAAGCCGAAGACACCGCCAACTACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCCTGG
ACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCA
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0510] BCMA臂重链(重链1):SEQ ID NO.86

[0511] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYIFTNFGMNWVREAPGQGLEWMGWINTYTGEQIYADGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGEIYYGYDVG FVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0512] 核苷酸序列:SEQ ID NO.87

[0513] CAGGTTACAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG
GCTAGCGGCTACATCTTACCAACTTCGGCATGAACTGGGTCCGAGAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCAGATCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTCTGTGTTACAGCCTGGACACCA
GCGTCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAGGCGAG
ATCTACTACGGCTACGACGTGGGCTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAA
GGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCTTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA
CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAGGCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA

CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0514] CD3 λ 轻链:SEQ ID NO.66

[0515] QAVVTQEPLSLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0516] 核苷酸序列:SEQ ID NO.67

[0517] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTT
GGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGACCCCAAGGCGGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGAAGTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGACCACACCCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0518] CD3 μ 重链(重链2):SEQ ID NO.68

[0519] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVKDRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0520] 核苷酸序列:SEQ ID NO.69

[0521] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACACTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCAAGGAC

ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0522] BCMA $\times$ CD3 κ 006

[0523] BCMA臂 κ 轻链:SEQ ID NO.84

[0524] DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVTTSYGYSYIHWHYQKKPGQPPKLLIYLASDLEAGVPARFSGS
GSGTDFTLTINPVEAEDTANYYCQHSRELPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0525] 核苷酸序列:SEQ ID NO.85

[0526] GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCTTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCCAGAGAGCCACCATCACCTGT
AGAGCCAGCAAGAGCGTGACCACCAGCGGCTACTCTTACATCCACTGGTATCAGAAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAA
GCTGCTGATCTACCTGGCCAGCGATCTGGAAGCTGGCGTGCCAGCTAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACT
TCACCCTGACAATCAACCCCGTGGAAGCCGAAGACACCGCCAACCTACTACTGCCAGCACAGCAGAGAGCTGCCCTGG
ACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA
TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA
GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0527] BCMA臂重链(重链1):SEQ ID NO.86

[0528] QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYIFTNFGMNWVREAPGQGLEWMGWINTYTGEQIYADGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGEIYYGYDVG FVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK

[0529] 核苷酸序列:SEQ ID NO.87

[0530] CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAG
GCTAGCGGCTACATCTTCACCAACTTCGGCATGAACTGGGTCCGAGAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAATGGATGGG
CTGGATCAACACCTACACCGGCGAGCAGATCTACGCCGATGGCTTACAGGCAGATTCTGTGTTACAGCTGGACACCA
GCGTCAGCACAGCTTACCTGCAGATCAGCTCTCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGTGCCAGAGGCGAG
ATCTACTACGGCTACGACGTGGGCTTTGTGTACTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTTAGCTCTGCTAGCACCA
GGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCTTGACGAGAAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCC
GTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA

CACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCC
CCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG
ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCC
AGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCA
AGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG
GTTTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0531] CD3臂λ轻链:SEQ ID NO.66

[0532] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGLTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0533] 核苷酸序列:SEQ ID NO.67

[0534] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGTCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTC
GGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0535] CD3臂重链(重链2):SEQ ID NO.68

[0536] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPPAPEFEFGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0537] 核苷酸序列:SEQ ID NO.69

[0538] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGACA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTTGACGAGCAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC

TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
 CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
 CTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGAC
 ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
 TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
 GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
 GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
 ACCTTGTCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCG
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
 TTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
 CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0539] 2. BCMA×CD3κλ双特异抗体的表达和纯化

[0540] 将编码相应抗体片段的质粒,按BCMA臂轻链(κ轻链):CD3臂轻链(λ轻链):BCMA臂重链(重链1):CD3臂重链(重链2)=2:2:1:1的比率混合,与3mg/mL PEI混合后,共同转染CHO-S细胞,在500mL CD CHO AGT培养基(Gibco#12490-001)37℃5%CO₂ 150rpm培养,分别在瞬转第2、4和6天,加入4%CHO Feed C+补料(Gibco#A25031-05)。当细胞活率降至85%左右,收获发酵液,过滤后经Protein A亲和和层析初步纯化,SEC-HPLC单体含量显示接近或高于92%;经Capto S ImpAct离子交换层析,单体含量进一步提高至98-99%以上(表11)。

[0541] 表11、BCMA×CD3κλ双特异抗体的纯度

HPLC 检测	HPLC-SEC (Protein A 后)			HPLC-SEC (阳离子交换层析后)		
	聚体	单体	片段	聚体	单体	片段
[0542] BCMA×CD3 κλ003	2.3%	94.4%	3.3%	1.8%	98.2%	0.0%
BCMA×CD3 κλ004	1.4%	95.2%	3.4%	1.0%	99.0%	0.0%
BCMA×CD3 κλ005	2.0%	91.9%	6.2%	1.6%	98.4%	0.0%
BCMA×CD3 κλ006	0.5%	96.4%	3.1%	0.6%	99.4%	0.0%

[0543] 3. BCMA×CD3κλ双特异抗体的结合活性

[0544] (1) BCMA×CD3κλ双特异抗体与抗原的亲合力测定

[0545] 将10μg/mL人或食蟹猴BCMA或CD3ε γ 重组抗原通过氨基偶联结合到CM5芯片(GE healthcare),控制抗原结合量约200RU。基线平稳后,将梯度稀释的抗体(从10μg/mL起,2倍稀释7个梯度),以30μL/min的流速流过芯片,结合时间350秒,解离时间600秒。用Biacore T200 evaluation软件以1:1结合模型,拟合得到动力学常数。亲和力测定结果见表12。

[0546] 表12、BCMA×CD3κλ双特异性抗体与抗原的亲合力

[0547]	KD (nM)	人BCMA	食蟹猴BCMA	人CD3ε γ	食蟹猴CD3ε γ
	BCMA×CD3κλ003	1.3	0.16	31	43
	BCMA×CD3κλ004	1.0	0.12	32	43
	BCMA×CD3κλ005	1.1	0.09	28	20
	BCMA×CD3κλ006	1.2	0.10	27	33

[0548] (2) BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体与 BCMA+ 细胞的结合

[0549] 分别取对数生长期的 CHO- 人 BCMA 稳转细胞 (CHO-hBCMA) 和 CHO- 食蟹猴 BCMA 稳转细胞 (CHO-cynoBCMA), 和肿瘤细胞 NCI-H929 和 RPMI-8226, 封闭后每孔加入 100 μ L 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM, 3 倍稀释, 10 个梯度), 4 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。二抗加入 50 μ L/孔 Alexa Fluro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释), 冰上孵育 20 分钟, 洗 1 次后加入 50 μ L/孔 PI 溶液 (1:300), 孵育 5 分钟, 用流式细胞仪进行检测。图 20 显示, BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体高亲和力结合人、食蟹猴 BCMA 稳转细胞; 图 21 显示, BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体高亲和力结合 BCMA+ 肿瘤细胞 NCI-H929 和 RPMI-8226。BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体与细胞的结合常数 EC₅₀ 见表 13。

[0550] 表 13、BCMA × CD3 κ λ 双特异性抗体和 BCMA 稳转细胞的结合

EC ₅₀ (nM)	人 BCMA-CHO	食蟹猴 BCMA-CHO	NCI-H929	RPMI-8226
BCMA × CD3 κ λ003	16	3	34	34
BCMA × CD3 κ λ004	22	3	36	39
BCMA × CD3 κ λ005	24	3	33	38
BCMA × CD3 κ λ006	16	3	32	19
KLH × CD3	-	-	-	-

[0552] (3) BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体与 Jurkat 细胞的结合

[0553] 取对数生长期的 Jurkat 细胞, 加入 200 μ g/mL 鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03), 冰浴 30 分钟。用 4% 小牛血清调整细胞至 5 × 10⁵ 细胞/mL, 每孔 100 μ L 加入 96 孔 U 型板, 300g 离心去上清, 每孔加入 100 μ L 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM, 3 倍稀释, 10 个梯度), 4 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。二抗加入 50 μ L/孔 Alexa Fluro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释), 冰上孵育 20 分钟, 洗 1 次后加入 50 μ L/孔 PI, 孵育 5 分钟, 用流式细胞仪 (BD C6) 进行检测。检测结果如图 22 和表 14, BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体以中亲和力结合人白血病 T 细胞系 Jurkat 细胞。

[0554] (4) BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体与外周血 T 细胞的结合

[0555] 取新鲜人外周血, 通过 Ficoll.Paque Plus (GE, 17-1440-03) 分离得到 PBMC。将 PBMC 用 4% 小牛血清 (Hyclone, SH30626.06) 调整细胞至 5 × 10⁵ 个细胞/mL, 100 μ L/孔加入 96 孔 U 型板, 离心弃上清, 每孔加入 100 μ L 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM, 3 倍稀释, 10 个梯度), 4 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。二抗加入 50 μ L/孔 Alexa Fluro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释), 冰浴 20 分钟, 洗 1 次后加入 50 μ L/孔 PI, 孵育 5 分钟, 用流式细胞仪 (BD C6) 进行检测。对照抗体 REGN5458 参照 US20200024356 合成并制备。检测结果见图 23 和表 14 所示, BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体识别人外周血 CD4+T 和 CD8+T 细胞, 与人 T 细胞亲和力约 60-97nM, 均弱于 BCMA 抗原臂与 BCMA 受体的结合力, 有利于双特异抗体优先富集到肿瘤细胞。

[0556] 表 14、BCMA × CD3 κ λ 双特异抗体与 Jurkat 细胞的结合

EC ₅₀ (nM)	Jurkat	CD4+T	CD8+T
BCMA × CD3 κ λ003	66	89	97
BCMA × CD3 κ λ004	61	79	67
BCMA × CD3 κ λ005	51	66	60
BCMA × CD3 κ λ006	56	91	93
KLH × CD3	76	57	62

[0558] 4. BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体介导的TDCC作用

[0559] 取新鲜分离得到的PBMC分别与处于对数生长期的靶细胞NCI-H929和RPMI-8226细胞混合,效应/靶细胞=8:1,每孔加入50 μ L梯度稀释的抗体(抗体浓度从66.7nM起,10倍稀释,7个梯度),5%CO₂ 37 $^{\circ}$ C培养24小时。培养结束后,将50 μ L上清转移至新的黑色酶标板,加入50 μ L/孔LDH检测底物,10分钟后终止反应并检测LDH释放;孔内剩余细胞用4%小牛血清清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG孵育10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-PE,CD4-APC,CD69-FITC和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60 μ L/孔PI,置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。图24A、24B分别显示BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对NCI-H929细胞的杀伤和对T细胞的活化。图25A、25B分别显示BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对RPMI-8226细胞的杀伤和对T细胞的活化。对于BCMA表达水平不同的肿瘤细胞NCI-H929和RPMI-8226,BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体均可介导T细胞产生有效杀伤作用,杀伤活性与对照抗体REGN5458相当。

[0560] 5. BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对T细胞活化通路的激活

[0561] 取对数生长期的Jurkat-NFAT-luc报告细胞和BCMA阳性靶细胞RPMI-8226,离心弃上清,重悬至 2×10^6 个细胞/ml。50 μ L/孔接种靶细胞至96孔板,300g离心5分钟弃上清,50 μ L/孔接种Jurkat-NFAT-luc报告细胞至96孔板,每孔加入50 μ L梯度稀释的BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体或对照抗体KLH $\times$ CD3(起始浓度20 μ g/ml,10倍稀释,10个梯度),5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养6小时。培养结束后,按照ONE-Glo Luciferase Assay System说明书,每孔加入100 μ L检测试剂,室温放置3分钟,于酶标仪(Biotek Synergy HT)检测。检测结果见图26,BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体以RPMI-8226肿瘤细胞为靶细胞时,可激活T细胞的NFAT信号通路;无靶细胞时,不激活NFAT信号通路。

[0562] 6. BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对PBMC的非特异激活

[0563] 取新鲜分离得到的PBMC,每孔加入50 μ L梯度稀释的抗体(抗体浓度从66.7nM起,10倍稀释,7个梯度),5%CO₂ 37 $^{\circ}$ C培养24小时。培养结束后,将50 μ L上清转移至新的黑色酶标板,加入50 μ L/孔LDH检测底物,10分钟后终止反应并检测LDH释放;孔内剩余细胞用4%小牛血清清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG孵育10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-PE,CD4-APC,CD69-FITC和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60 μ L/孔PI,置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。检测结果见图27,在缺乏靶细胞的条件下,BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对外周血T细胞无激活作用,与阴性对照KLH $\times$ CD3相当。

[0564] 7. BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 人源化双特异抗体与Fc受体的结合

[0565] 将50 μ g/ml His-Tag抗体通过氨基偶联到CM5芯片,分别捕获带有His6标签的Fc γ RI、Fc γ RIIA_{H131}和Fc γ RIIIA_{V158}重组蛋白,捕获时间40秒,流速10 μ L/min,基线平稳后,将梯度稀释的抗体(起始浓度37.5 μ g/mL,2倍稀释)以30 μ L/min的流速流过芯片,结合时间120秒,解离时间200秒,用Biacore evaluation软件拟合得到亲和力常数。由图28可见,BCMA $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与Fc γ RI、Fc γ RIIA_{H131}和Fc γ RIIIA_{V158}均无结合;野生型IgG4对照抗体以较强亲和力结合Fc γ RI,与Fc γ RIIA_{H131}有弱结合。

[0566] 8. 免疫缺陷型小鼠皮下NCI-H929移植瘤模型

[0567] 选择6~8周雌性B-NGD小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),皮下接种 2×10^6 NCI-H929细胞(与基质胶(Matrigel)1:1混合),待肿瘤长至60mm³时,随机分组,分别为给药组

3.0mg/kg、给药组0.6mg/kg和阴性对照组KLH×CD33mg/kg。每只小鼠尾静脉注射 1×10^7 个PBMC细胞,3天后开始第一次小鼠给药,给药间隔为5天一次,共给药2次。每2天监测一次小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。结果见图29,BCMA×CD3 κ λ双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性,3.0mg/kg给药组和0.6mg/kg给药组抑瘤率分别为95%和108%(BCMA×CD3 κ λ005)以及94%和108%(BCMA×CD3 κ λ006)。荷瘤小鼠对以上剂量耐受良好,无体重减轻等不良反应。

[0568] 实施例4:构建不同类型轻链形成的GPC3×CD3 κ λ双特异抗体

[0569] 1.GPC3×CD3 κ λ双特异抗体的构建

[0570] 将含 κ 轻链的人源化GPC3抗体,与含 λ 轻链的人源化CD3抗体,参考实施例2构建具有天然IgG构型的新型GPC3-CD3 κ λ人源化双特异抗体,同时在GPC3抗原臂和CD3臂引入电荷变异体($V_{\kappa_{GPC3}}$:Gln₄₃Lys; VH_{GPC3} :Gln₃₉Glu; $V_{\lambda_{CD3}}$:Gln₄₀Glu; VH_{CD3} :Gln₃₉Lys)(序列见表15)。双特异抗体的Fc部分采用人IgG4 knob-into-hole结构,以实现异源二聚体配对,并且通过突变Ser₂₂₈Pro、Leu₂₃₅Glu和Pro₃₂₉Ala,保持铰链区稳定并减弱与Fc γ 受体和C1q的相互作用。

[0571] 表15、GPC3×CD3 κ λ人源化双特异抗体

	CD20臂轻链	CD20臂重链	CD3臂轻链	CD3臂重链
GPC3×CD3 κ λ002	SEQ ID NO.88	SEQ ID NO.90	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68
GPC3×CD3 κ λ003	SEQ ID NO.92	SEQ ID NO.94	SEQ ID NO.66	SEQ ID NO.68

[0573] GPC3×CD3 κ λ002:

[0574] GPC3臂 κ 轻链SEQ ID NO.88

[0575] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLKKPGQSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCLQVTHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0576] 核苷酸序列SEQ ID NO.89

[0577] GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAACGGCAACACATACCTGGAGTGGTATCTGAAGAAGCCCGGCCAGTCTCC TCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTGACGCGCGTGCCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTCTCCAGGTACACACGTGCCC CTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0578] GPC3臂重链(重链1)SEQ ID NO.90

[0579] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVREAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYAQKFQGRVTLTADESSTTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSQEE MTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0580] 核苷酸序列SEQ ID NO.91

[0581] CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG
GCTAGCGGCTACACCTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGAGAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGG
CGCTATCCATCCTGGCTCTGGCGGCACAGCTTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACGAGT
CTAGCACCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTACTAC
AGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGTCACAGTCAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCT
GGCCCCCTTGAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG
TGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTG
TACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAA
GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGT
TCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTG
ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA
TAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATC
AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG
AGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGGTTTCCAAGCTGACCGTGGAC
AAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA
GTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0582] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.66

[0583] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0584] 核苷酸序列SEQ ID NO.67

[0585] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTT
GGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0586] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.68

[0587] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0588] 核苷酸序列SEQ ID NO.69

[0589] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAGCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0590] GPC3×CD3κλ003:

[0591] GPC3臂κ轻链SEQ ID NO.92

[0592] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLKPKGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADVGVYFCLQVTHVPLTFGQGTLKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKKLSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0593] 核苷酸序列SEQ ID NO.93

[0594] GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGT
AGAAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAACGGCAACACATACCTGGAGTGGTATCTGAAGAAGCCCGGCCAGTCTCC
TCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTACGCGGCGTGCCCGACAGATTCTCTGGCTCTGGATCTGGCACCG
ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTTCTGTCTCCAGGTCACACACGTGCCC
CTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC
TGATAAGAAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0595] GPC3臂重链(重链1)SEQ ID NO.94

[0596] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFADYEIHWVREAPGQGLEWMGAIHPGSGGTAYAQKFQGRVT
LTADESSTTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYYSFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVED
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDERVERESKYGPCCPP

CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLKG

[0597] 核苷酸序列SEQ ID NO.95

[0598] CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAG
GCTAGCGGCTACACCTTCGCCGACTACGAGATCCACTGGGTCCGAGAGGCTCCAGGACAGGGACTTGAATGGATGGG
CGCTATCCATCCTGGCTCTGGCGGCACAGCTTACGCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACGAGT
CTAGCACCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTACTAC
AGCTTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGTCACAGTCAGCTCTGCTAGACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCT
GGCCCCCTTGACGAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAGGACTACTTCCCCGAGCCCG
TGACCGTGCTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTCCCCGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGACTG
TACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAA
GCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAGAGTGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGT
TCGAAGGCGGACCTAGCGTGTTCTCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTG
ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTCCAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA
TAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATC
AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTGCACCCTGCCACCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCTTCTATCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG
AGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGGTTTCCAAGCTGACCGTGAC
AAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA
GTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0599] CD3臂λ轻链SEQ ID NO.66

[0600] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA
VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0601] 核苷酸序列SEQ ID NO.67

[0602] CAGGCTGTGGTCACACAAGAGCCTAGCCTGACAGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACCTGTAGA
TCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCTAATTGGGTGCAGGAGAAGCCCGCCAGGCTCCTAGAGGACT
GATCGGCGGAACAAACAAGAGAGCCCTTGACACCCGCCAGATTCTCTGGATCTCTGCTCGGCGGAAAGGCCGCTC
TGACAATCACTGGTGCTCAGGCTGAGGACGAGGCCGAGTACTATTGTGTGCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTT
GGCGGAGGCACCAAACTGACAGTTCTGGGTGAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGA
GGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGAAGTCTATCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGA
AGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGAGAGACCACACCCCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCC
AGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG
CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

[0603] CD3臂重链(重链2)SEQ ID NO.68

[0604] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES

TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGRVNFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0605] 核苷酸序列SEQ ID NO.69

[0606] GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCC
GCCAGCGGCTTACCTTCAACACCTACGCTATGAACTGGGTCCGAAAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGGTGGG
AAGAATCAGGTCCAAGTACAACAACCTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTACCATCAGCAGGG
ACGACAGCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTCAGA
CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCTGC
TAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCTTGACGAGAGAGCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCATACC
TTCCCCGCCGTGTCTCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGCAGCCTGGGCAC
CAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCC
CTCCCTGCCCCCTTGCCTTCCCCCGAGTTCGAGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGAC
ACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTT
TAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACA
GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAG
GGCCTGGCCAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCC
ACCTTGTCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTATCCAGCGATATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGC
TTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGCAACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCA
CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG

[0607] 将编码相应抗体片段的质粒,按GPC3臂轻链(κ 轻链):CD3臂轻链(λ 轻链):GPC3臂重链(重链1):CD3臂重链(重链2)=2:2:1:1的比率混合,与3mg/mL PEI混合后,共同转染CHO-S细胞,在500mL CD CHO AGT培养基(Gibco#12490-001)37°C5%CO₂ 150rpm培养,分别在瞬转第2、4和6天,加入4%CHO Feed C+补料(Gibco#A25031-05)。当细胞活率降至85%左右,收获发酵液,过滤后经Protein A亲和层析初步纯化,SEC-HPLC单体含量显示高于92%;经Butyl HP疏水层析和Capto Q阴离子层析,单体含量进一步提高至99.5%以上(表16)。

[0608] 表16、GPC3-CD3人源化双特异抗体的纯化

HPLC 检测	HPLC-SEC (Protein A 后)			HPLC-SEC (阴离子层析后)		
	聚体	单体	片段	聚体	单体	片段
GPC3×CD3 $\kappa\lambda$ 002	2.6%	94.2%	3.1%	0.0%	100.0%	0.0%
GPC3×CD3 $\kappa\lambda$ 003	2.2%	93.2%	4.5%	0.1%	99.5%	0.4%

[0610] 2.GPC3×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与GPC3稳转细胞的结合

[0611] 取对数生长期的CHO-人GPC3、CHO-食蟹猴GPC3稳转细胞或人肝细胞癌HepG2肿瘤细胞,封闭后调整细胞至 5×10^5 个细胞/mL,加入100 μ L/孔细胞悬液至96孔U型板,300g离心5分钟,弃上清,每孔加入100 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4°C

孵育60分钟。二抗加入50 μ L/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50 μ L/孔PI溶液(1:300),孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。结果见图30-31和表17, GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体高亲和力结合GPC3+细胞。

[0612] 表17、GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异性抗体和GPC3+细胞的结合

EC ₅₀	人GPC3-CHO	食蟹猴GPC3-CHO	HepG2
GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 002	2.8nM	3.0nM	2.1nM
GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 003	2.9nM	3.0nM	2.5nM
KLH $\times$ CD3	不结合	不结合	不结合

[0614] 3. GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与Jurkat细胞的结合

[0615] 取对数生长期的Jurkat细胞,加入200 μ g/mL鼠IgG(Jackson ImmunoResearch, 115-005-03),冰浴30分钟。用4%小牛血清调整细胞至5 $\times$ 10⁵细胞/mL,每孔100 μ L加入96孔U型板,300g离心去上清,每孔加入100 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4 $^{\circ}$ C孵育60分钟。二抗加入50 μ L/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50 μ L/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD C6)进行检测。检测结果如图32和表18, GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体以中等亲和力结合人白血病T细胞系Jurkat细胞,EC₅₀约20-40nM。

[0616] 4. GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与外周血T细胞的结合

[0617] 取新鲜人或食蟹猴外周血,通过Ficoll.Paque Plus(GE,17-1440-03)分离得到PBMC。将PBMC用4%小牛血清(Hyclone,SH30626.06)调整细胞至5 $\times$ 10⁵个细胞/mL,100 μ L/孔加入96孔U型板,离心弃上清,每孔加入100 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,10个梯度),4 $^{\circ}$ C孵育60分钟。二抗加入50 μ L/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰浴20分钟,洗1次后加入50 μ L/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD Celesta)进行检测。检测结果见图33和表18, GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体以低亲和力结合人外周血T细胞。

[0618] 表18、GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与T细胞的结合

EC ₅₀	Jurkat	CD4+T	CD8+T
GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 002	36nM	65nM	65nM
GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 003	26nM	56nM	69nM
KLH $\times$ CD3	27nM	77nM	84nM

[0620] 5. GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体介导的TDCC作用

[0621] 取新鲜分离得到的PBMC分别与处于对数生长期的靶细胞HepG2细胞混合,效应/靶细胞=10:1,每孔加入50 μ L梯度稀释的抗体(抗体浓度从66.7nM起,10倍稀释,7个梯度),5%CO₂ 37 $^{\circ}$ C培养24小时。培养结束后,将50 μ L上清转移至新的黑色酶标板,加入50 μ L/孔LDH检测底物,10分钟后终止反应并检测LDH释放;孔内剩余细胞用4%小牛血清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG孵育10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-BV421,CD4-FITC,CD69-BV605和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60 μ L/孔PI,置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。图34A、34B分别显示GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对HepG2细胞的杀伤和对T细胞的活化。

[0622] 6. GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对T细胞活化通路的激活

[0623] 取对数生长期的靶细胞CHO-人GPC3,离心弃上清,重悬至 2×10^5 个细胞/ml。50 μ L/孔接种靶细胞至96孔板,5%CO₂,37℃培养过夜。取对数生长期的Jurkat-NFAT-luc报告细胞300g离心5分钟弃上清,重悬至 4×10^6 个细胞/ml,取出96孔板,弃上清,25 μ L/孔接种Jurkat-NFAT-luc报告细胞至96孔板,每孔加入25 μ L梯度稀释的GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体或对照抗体KLH $\times$ CD3(起始浓度20 μ g/ml,3倍稀释,10个梯度),5%CO₂,37℃培养6小时。培养结束后,按照ONE-Glo Luciferase Assay System说明书,每孔加入100 μ L检测试剂,于酶标仪(MD SpectraMax i3x)检测。检测结果见图35,GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体以CHO-人GPC3为靶细胞时,可激活T细胞的NFAT信号通路。

[0624] 7. GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体PBMC的非特异激活

[0625] 取新鲜分离得到的PBMC,加入100 μ L抗体(10 μ g/mL),5%CO₂ 37℃培养24小时。孔内细胞用4%小牛血清清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG孵育10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-BV421,CD4-FITC,CD69-BV605和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60 μ L/孔PI,置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。阳性对照抗体ERY974参照US20170267783制备。检测结果见图36,在缺乏靶细胞的条件下,GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对外周血T细胞无激活作用,与阴性对照KLH $\times$ CD3相当。

[0626] 8. 免疫重建小鼠皮下HepG2移植瘤模型

[0627] 选择6~8周雌性B-NGD小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),皮下接种HepG2细胞(7×10^6 /只),待肿瘤长至60-100mm³时,随机分组,分别设定为高剂量给药组3.0mg/kg、中剂量给药组1.0mg/kg、低剂量给药组0.3mg/kg、阳性对照组ERY974和阴性对照组KLH $\times$ CD3 3mg/kg。每只小鼠尾静脉注射 1×10^7 PBMC细胞,3天后开始第一次小鼠给药,给药间隔为5天一次,共给药2次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。结果见图37,GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性,抑瘤率(低剂量到高剂量)分别为:76.7%、81.3%和95.9%。荷瘤小鼠对以上剂量耐受良好,无体重减轻等不良反应。

[0628] 9. CD3人源化鼠Hepa1-6/人GPC3移植瘤模型

[0629] 选择6周雌性C57/BL6-hCD3小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),将Hepa1-6/人GPC3(6×10^6 /只)接种于小鼠皮下,待肿瘤成瘤体积到达60-100mm³时,随机分组。分别设定为高剂量给药组10mg/mL、中剂量给药组3mg/mL、低剂量给药组1mg/mL、阳性对照组ERY974和阴性对照组KLH $\times$ CD3 10mg/kg。给药间隔为3天一次,共给药3次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。结果见图38,GPC3 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体可显著介导免疫细胞杀死肿瘤细胞,减小荷瘤体积;其10mg/kg剂量与ERY974药效相当。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 康诺亚生物医药科技(成都)有限公司
 [0003] <120> 一种双特异性抗体及其用途
 [0004] <130> MTI20179
 [0005] <160> 95
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 306
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> Homo sapiens
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr
 [0015] 20 25 30
 [0016] Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys
 [0017] 35 40 45
 [0018] Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln
 [0019] 50 55 60
 [0020] Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 [0023] 85 90 95
 [0024] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 [0025] 100 105 110
 [0026] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 [0027] 115 120 125
 [0028] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 [0029] 130 135 140
 [0030] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 [0033] 165 170 175
 [0034] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu
 [0035] 180 185 190
 [0036] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 [0037] 195 200 205
 [0038] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 [0039] 210 215 220
 [0040] Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[0043]	245 250 255
[0044]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0045]	260 265 270
[0046]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0047]	275 280 285
[0048]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[0049]	290 295 300
[0050]	Gly Lys
[0051]	305
[0052]	<210> 2
[0053]	<211> 339
[0054]	<212> PRT
[0055]	<213> Homo sapiens
[0056]	<400> 2
[0057]	Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
[0058]	1 5 10 15
[0059]	Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
[0060]	20 25 30
[0061]	Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
[0062]	35 40 45
[0063]	Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
[0064]	50 55 60
[0065]	Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
[0066]	65 70 75 80
[0067]	Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
[0068]	85 90 95
[0069]	Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
[0070]	100 105 110
[0071]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0072]	115 120 125
[0073]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[0074]	130 135 140
[0075]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0076]	145 150 155 160
[0077]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
[0078]	165 170 175
[0079]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0080]	180 185 190
[0081]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu
[0082]	195 200 205
[0083]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

[0084]	210	215	220
[0085]	Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0086]	225	230	235 240
[0087]	Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[0088]	245	250	255
[0089]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[0090]	260	265	270
[0091]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
[0092]	275	280	285
[0093]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0094]	290	295	300
[0095]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
[0096]	305	310	315 320
[0097]	Gly Lys Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu		
[0098]	325	330	335
[0099]	Trp His Glu		
[0100]	<210> 3		
[0101]	<211> 305		
[0102]	<212> PRT		
[0103]	<213> Macaca fascicularis		
[0104]	<400> 3		
[0105]	Gln Ser Phe Glu Glu Asn Arg Lys Leu Asn Val Tyr Asn Gln Glu Asp		
[0106]	1 5 10 15		
[0107]	Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys His Val Lys Asn Thr Asn Ile Thr Trp		
[0108]	20 25 30		
[0109]	Phe Lys Glu Gly Lys Met Ile Asp Ile Leu Thr Ala His Lys Asn Lys		
[0110]	35 40 45		
[0111]	Trp Asn Leu Gly Ser Asn Thr Lys Asp Pro Arg Gly Val Tyr Gln Cys		
[0112]	50 55 60		
[0113]	Lys Gly Ser Lys Asp Lys Ser Lys Thr Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met		
[0114]	65 70 75 80		
[0115]	Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
[0116]	85 90 95		
[0117]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[0118]	100 105 110		
[0119]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
[0120]	115 120 125		
[0121]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[0122]	130 135 140		
[0123]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[0124]	145 150 155 160		
[0125]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		

[0126]		165		170		175
[0127]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys					
[0128]		180		185		190
[0129]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr					
[0130]		195		200		205
[0131]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser					
[0132]		210		215		220
[0133]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
[0134]	225		230		235	240
[0135]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
[0136]		245		250		255
[0137]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
[0138]		260		265		270
[0139]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
[0140]		275		280		285
[0141]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
[0142]		290		295		300
[0143]	Lys					
[0144]	305					
[0145]	<210> 4					
[0146]	<211> 330					
[0147]	<212> PRT					
[0148]	<213> Macaca fascicularis					
[0149]	<400> 4					
[0150]	Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln					
[0151]	1	5		10		15
[0152]	Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu					
[0153]		20		25		30
[0154]	Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser					
[0155]		35		40		45
[0156]	Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly					
[0157]		50		55		60
[0158]	Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His					
[0159]	65		70		75	80
[0160]	His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp					
[0161]		85		90		95
[0162]	Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys					
[0163]		100		105		110
[0164]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val					
[0165]		115		120		125
[0166]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr					
[0167]		130		135		140

[0168]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[0169]	145 150 155 160
[0170]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[0171]	165 170 175
[0172]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[0173]	180 185 190
[0174]	Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[0175]	195 200 205
[0176]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
[0177]	210 215 220
[0178]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[0179]	225 230 235 240
[0180]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[0181]	245 250 255
[0182]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[0183]	260 265 270
[0184]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
[0185]	275 280 285
[0186]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[0187]	290 295 300
[0188]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
[0189]	305 310 315 320
[0190]	Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
[0191]	325 330
[0192]	<210> 5
[0193]	<211> 109
[0194]	<212> PRT
[0195]	<213> Homo sapiens
[0196]	<400> 5
[0197]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0198]	1 5 10 15
[0199]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0200]	20 25 30
[0201]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[0202]	35 40 45
[0203]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[0204]	50 55 60
[0205]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
[0206]	65 70 75 80
[0207]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0208]	85 90 95
[0209]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0210]	100	105
[0211]	<210> 6	
[0212]	<211> 327	
[0213]	<212> DNA	
[0214]	<213> Homo sapiens	
[0215]	<400> 6	
[0216]	caggetgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60	
[0217]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcagcag 120	
[0218]	aagcccggcc aggctcctag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttgagaca 180	
[0219]	cccgcagat tctctggata tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacact ttctgggtgct 240	
[0220]	cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300	
[0221]	ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327	
[0222]	<210> 7	
[0223]	<211> 14	
[0224]	<212> PRT	
[0225]	<213> Homo sapiens	
[0226]	<400> 7	
[0227]	Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn	
[0228]	1 5 10	
[0229]	<210> 8	
[0230]	<211> 8	
[0231]	<212> PRT	
[0232]	<213> Homo sapiens	
[0233]	<400> 8	
[0234]	Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro	
[0235]	1 5	
[0236]	<210> 9	
[0237]	<211> 9	
[0238]	<212> PRT	
[0239]	<213> Homo sapiens	
[0240]	<400> 9	
[0241]	Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val	
[0242]	1 5	
[0243]	<210> 10	
[0244]	<211> 109	
[0245]	<212> PRT	
[0246]	<213> Homo sapiens	
[0247]	<400> 10	
[0248]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly	
[0249]	1 5 10 15	
[0250]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
[0251]	20 25 30	

[0252]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[0253]	35 40 45
[0254]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[0255]	50 55 60
[0256]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
[0257]	65 70 75 80
[0258]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0259]	85 90 95
[0260]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0261]	100 105
[0262]	<210> 11
[0263]	<211> 327
[0264]	<212> DNA
[0265]	<213> Homo sapiens
[0266]	<400> 11
[0267]	caggetgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
[0268]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
[0269]	aagcccggcc aggtccttag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttgagaca 180
[0270]	cccggcagat tctctggata tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacact ttctgggtgt 240
[0271]	cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
[0272]	ggcggaggca ccaactgac agttctg 327
[0273]	<210> 12
[0274]	<211> 109
[0275]	<212> PRT
[0276]	<213> Homo sapiens
[0277]	<400> 12
[0278]	Glu Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0279]	1 5 10 15
[0280]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Ser Ser Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0281]	20 25 30
[0282]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[0283]	35 40 45
[0284]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Glu Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[0285]	50 55 60
[0286]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
[0287]	65 70 75 80
[0288]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0289]	85 90 95
[0290]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0291]	100 105
[0292]	<210> 13
[0293]	<211> 327

[0294] <212> DNA
 [0295] <213> Homo sapiens
 [0296] <400> 13
 [0297] gaggtgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0298] acctgtgagt cttctgacgg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0299] aagcccggcc aggtctcctag aggactgacg ggcggaacaa acaaggaggc cccttgga 180
 [0300] cccgccagat tctctggatc tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacact ttctggtgct 240
 [0301] cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0302] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0303] <210> 14
 [0304] <211> 14
 [0305] <212> PRT
 [0306] <213> Homo sapiens
 [0307] <400> 14
 [0308] Glu Ser Ser Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 [0309] 1 5 10
 [0310] <210> 15
 [0311] <211> 8
 [0312] <212> PRT
 [0313] <213> Homo sapiens
 [0314] <400> 15
 [0315] Gly Gly Thr Asn Lys Glu Ala Pro
 [0316] 1 5
 [0317] <210> 16
 [0318] <211> 109
 [0319] <212> PRT
 [0320] <213> Homo sapiens
 [0321] <400> 16
 [0322] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0323] 1 5 10 15
 [0324] Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Ser Ser Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0325] 20 25 30
 [0326] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0327] 35 40 45
 [0328] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Glu Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0329] 50 55 60
 [0330] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0331] 65 70 75 80
 [0332] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0333] 85 90 95
 [0334] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0335] 100 105

[0336] <210> 17
 [0337] <211> 327
 [0338] <212> DNA
 [0339] <213> Homo sapiens
 [0340] <400> 17
 [0341] caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0342] acctgtgagt cttctgacgg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0343] aagcccgccc aggtccctag aggactgac gccggaacaa acaaggagc cccttgga 180
 [0344] cccgccagat tctctggatc tctgctcgcc ggaaaggccg ctctgacact ttctggtgct 240
 [0345] cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0346] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0347] <210> 18
 [0348] <211> 109
 [0349] <212> PRT
 [0350] <213> Homo sapiens
 [0351] <400> 18
 [0352] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0353] 1 5 10 15
 [0354] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0355] 20 25 30
 [0356] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0357] 35 40 45
 [0358] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0359] 50 55 60
 [0360] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 [0361] 65 70 75 80
 [0362] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0363] 85 90 95
 [0364] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0365] 100 105
 [0366] <210> 19
 [0367] <211> 327
 [0368] <212> DNA
 [0369] <213> Homo sapiens
 [0370] <400> 19
 [0371] caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0372] acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0373] aagcccgccc aggtccctag aggactgac gccggaacaa acaagagagc cccttgga 180
 [0374] cccgccagat tctctggatc tctgctcgcc ggaaaggccg ctctgacaat cactggtgct 240
 [0375] caggctgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0376] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0377] <210> 20

[0378] <211> 8
 [0379] <212> PRT
 [0380] <213> Homo sapiens
 [0381] <400> 20
 [0382] Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 [0383] 1 5
 [0384] <210> 21
 [0385] <211> 9
 [0386] <212> PRT
 [0387] <213> Homo sapiens
 [0388] <400> 21
 [0389] Val Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 [0390] 1 5
 [0391] <210> 22
 [0392] <211> 109
 [0393] <212> PRT
 [0394] <213> Homo sapiens
 [0395] <400> 22
 [0396] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0397] 1 5 10 15
 [0398] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0399] 20 25 30
 [0400] Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0401] 35 40 45
 [0402] Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0403] 50 55 60
 [0404] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0405] 65 70 75 80
 [0406] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0407] 85 90 95
 [0408] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0409] 100 105
 [0410] <210> 23
 [0411] <211> 327
 [0412] <212> DNA
 [0413] <213> Homo sapiens
 [0414] <400> 23
 [0415] caggetgtgg tcacacaaga gcttagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0416] acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg gttccaggag 120
 [0417] aagcccggcc aggctcctag aggactgata tacggaacaa acaagagagc cccttgagaca 180
 [0418] cccgccagat tctctggata tctgtctggc ggaaaggccg ctctgacact ttctgggtgct 240
 [0419] caggetgagg acgaggccga gtactattgt gtctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

[0420] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0421] <210> 24
 [0422] <211> 125
 [0423] <212> PRT
 [0424] <213> Homo sapiens
 [0425] <400> 24
 [0426] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0427] 1 5 10 15
 [0428] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0429] 20 25 30
 [0430] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0431] 35 40 45
 [0432] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0433] 50 55 60
 [0434] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0435] 65 70 75 80
 [0436] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0437] 85 90 95
 [0438] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0439] 100 105 110
 [0440] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0441] 115 120 125
 [0442] <210> 25
 [0443] <211> 375
 [0444] <212> DNA
 [0445] <213> Homo sapiens
 [0446] <400> 25
 [0447] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0448] tcttgtgccg ccagcggtt caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgacaggcc 120
 [0449] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0450] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0451] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0452] caggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [0453] gtcacagtta gctct 375
 [0454] <210> 26
 [0455] <211> 6
 [0456] <212> PRT
 [0457] <213> Homo sapiens
 [0458] <400> 26
 [0459] Asn Thr Tyr Ala Met Asn
 [0460] 1 5
 [0461] <210> 27

[0462]	<211> 18
[0463]	<212> PRT
[0464]	<213> Homo sapiens
[0465]	<400> 27
[0466]	Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0467]	1 5 10 15
[0468]	Lys Asp
[0469]	<210> 28
[0470]	<211> 14
[0471]	<212> PRT
[0472]	<213> Homo sapiens
[0473]	<400> 28
[0474]	His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
[0475]	1 5 10
[0476]	<210> 29
[0477]	<211> 125
[0478]	<212> PRT
[0479]	<213> Homo sapiens
[0480]	<400> 29
[0481]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0482]	1 5 10 15
[0483]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
[0484]	20 25 30
[0485]	Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0486]	35 40 45
[0487]	Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
[0488]	50 55 60
[0489]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
[0490]	65 70 75 80
[0491]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[0492]	85 90 95
[0493]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[0494]	100 105 110
[0495]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0496]	115 120 125
[0497]	<210> 30
[0498]	<211> 375
[0499]	<212> DNA
[0500]	<213> Homo sapiens
[0501]	<400> 30
[0502]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
[0503]	tcttgtgccg ccagcggcctt cacccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120

[0504] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcagggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0505] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0506] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0507] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacactg 360
 [0508] gtcacagtta gctct 375
 [0509] <210> 31
 [0510] <211> 6
 [0511] <212> PRT
 [0512] <213> Homo sapiens
 [0513] <400> 31
 [0514] Ser Thr Tyr Ala Met Asn
 [0515] 1 5
 [0516] <210> 32
 [0517] <211> 125
 [0518] <212> PRT
 [0519] <213> Homo sapiens
 [0520] <400> 32
 [0521] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0522] 1 5 10 15
 [0523] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0524] 20 25 30
 [0525] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0526] 35 40 45
 [0527] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0528] 50 55 60
 [0529] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0530] 65 70 75 80
 [0531] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0532] 85 90 95
 [0533] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Glu Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0534] 100 105 110
 [0535] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0536] 115 120 125
 [0537] <210> 33
 [0538] <211> 375
 [0539] <212> DNA
 [0540] <213> Homo sapiens
 [0541] <400> 33
 [0542] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0543] tcttgtgccg ccagcggctt caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0544] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcagggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0545] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

[0546] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0547] cacggcaact tcggcgagag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [0548] gtcacagtta gctct 375
 [0549] <210> 34
 [0550] <211> 14
 [0551] <212> PRT
 [0552] <213> Homo sapiens
 [0553] <400> 34
 [0554] His Gly Asn Phe Gly Glu Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0555] 1 5 10
 [0556] <210> 35
 [0557] <211> 125
 [0558] <212> PRT
 [0559] <213> Homo sapiens
 [0560] <400> 35
 [0561] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0562] 1 5 10 15
 [0563] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0564] 20 25 30
 [0565] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0566] 35 40 45
 [0567] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0568] 50 55 60
 [0569] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0570] 65 70 75 80
 [0571] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0572] 85 90 95
 [0573] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Gln Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0574] 100 105 110
 [0575] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0576] 115 120 125
 [0577] <210> 36
 [0578] <211> 375
 [0579] <212> DNA
 [0580] <213> Homo sapiens
 [0581] <400> 36
 [0582] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0583] tcttgtgccg ccagcggett caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0584] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0585] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0586] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0587] cacggcaact tcggccagag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360

[0588] gtcacagtta gctct 375
 [0589] <210> 37
 [0590] <211> 14
 [0591] <212> PRT
 [0592] <213> Homo sapiens
 [0593] <400> 37
 [0594] His Gly Asn Phe Gly Gln Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0595] 1 5 10
 [0596] <210> 38
 [0597] <211> 125
 [0598] <212> PRT
 [0599] <213> Homo sapiens
 [0600] <400> 38
 [0601] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0602] 1 5 10 15
 [0603] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0604] 20 25 30
 [0605] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0606] 35 40 45
 [0607] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0608] 50 55 60
 [0609] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0610] 65 70 75 80
 [0611] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0612] 85 90 95
 [0613] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0614] 100 105 110
 [0615] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0616] 115 120 125
 [0617] <210> 39
 [0618] <211> 375
 [0619] <212> DNA
 [0620] <213> Homo sapiens
 [0621] <400> 39
 [0622] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0623] tcttgtgccg ccagcggett caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0624] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0625] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0626] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0627] cacggcaact tcggcgacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacactg 360
 [0628] gtcacagtta gctct 375
 [0629] <210> 40

[0630] <211> 14
 [0631] <212> PRT
 [0632] <213> Homo sapiens
 [0633] <400> 40
 [0634] His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0635] 1 5 10
 [0636] <210> 41
 [0637] <211> 125
 [0638] <212> PRT
 [0639] <213> Homo sapiens
 [0640] <400> 41
 [0641] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0642] 1 5 10 15
 [0643] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0644] 20 25 30
 [0645] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0646] 35 40 45
 [0647] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0648] 50 55 60
 [0649] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0650] 65 70 75 80
 [0651] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0652] 85 90 95
 [0653] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Thr Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0654] 100 105 110
 [0655] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0656] 115 120 125
 [0657] <210> 42
 [0658] <211> 375
 [0659] <212> DNA
 [0660] <213> Homo sapiens
 [0661] <400> 42
 [0662] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0663] tcttgtgccg ccagcggett caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0664] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0665] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0666] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0667] cacggcaact tcggcaccag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacactg 360
 [0668] gtcacagtta gctct 375
 [0669] <210> 43
 [0670] <211> 14
 [0671] <212> PRT

[0672] <213> Homo sapiens
 [0673] <400> 43
 [0674] His Gly Asn Phe Gly Thr Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0675] 1 5 10
 [0676] <210> 44
 [0677] <211> 125
 [0678] <212> PRT
 [0679] <213> Homo sapiens
 [0680] <400> 44
 [0681] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0682] 1 5 10 15
 [0683] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 [0684] 20 25 30
 [0685] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0686] 35 40 45
 [0687] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0688] 50 55 60
 [0689] Ser Val Glu Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0690] 65 70 75 80
 [0691] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0692] 85 90 95
 [0693] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0694] 100 105 110
 [0695] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0696] 115 120 125
 [0697] <210> 45
 [0698] <211> 375
 [0699] <212> DNA
 [0700] <213> Homo sapiens
 [0701] <400> 45
 [0702] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0703] tcttgtgccg ccagcggctt caccttctcc gactacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0704] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0705] tactacgccg acagcgtgga ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0706] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0707] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacactg 360
 [0708] gtcacagtta gctct 375
 [0709] <210> 46
 [0710] <211> 6
 [0711] <212> PRT
 [0712] <213> Homo sapiens
 [0713] <400> 46

[0714] Ser Asp Tyr Ala Met Asn
 [0715] 1 5
 [0716] <210> 47
 [0717] <211> 18
 [0718] <212> PRT
 [0719] <213> Homo sapiens
 [0720] <400> 47
 [0721] Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0722] 1 5 10 15
 [0723] Glu Asp
 [0724] <210> 48
 [0725] <211> 125
 [0726] <212> PRT
 [0727] <213> Homo sapiens
 [0728] <400> 48
 [0729] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0730] 1 5 10 15
 [0731] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0732] 20 25 30
 [0733] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0734] 35 40 45
 [0735] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0736] 50 55 60
 [0737] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [0738] 65 70 75 80
 [0739] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0740] 85 90 95
 [0741] Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0742] 100 105 110
 [0743] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0744] 115 120 125
 [0745] <210> 49
 [0746] <211> 375
 [0747] <212> DNA
 [0748] <213> Homo sapiens
 [0749] <400> 49
 [0750] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0751] tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0752] cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0753] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240
 [0754] ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgccaga 300
 [0755] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgccct actggggcca gggcacactg 360

[0756] gtcacagtta gctct 375
 [0757] <210> 50
 [0758] <211> 125
 [0759] <212> PRT
 [0760] <213> Homo sapiens
 [0761] <400> 50
 [0762] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0763] 1 5 10 15
 [0764] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0765] 20 25 30
 [0766] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0767] 35 40 45
 [0768] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0769] 50 55 60
 [0770] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [0771] 65 70 75 80
 [0772] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0773] 85 90 95
 [0774] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0775] 100 105 110
 [0776] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0777] 115 120 125
 [0778] <210> 51
 [0779] <211> 375
 [0780] <212> DNA
 [0781] <213> Homo sapiens
 [0782] <400> 51
 [0783] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0784] tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0785] cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0786] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240
 [0787] ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0788] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [0789] gtcacagtta gctct 375
 [0790] <210> 52
 [0791] <211> 125
 [0792] <212> PRT
 [0793] <213> Homo sapiens
 [0794] <400> 52
 [0795] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0796] 1 5 10 15
 [0797] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0798]	20	25	30
[0799]	Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0800]	35	40	45
[0801]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp		
[0802]	50	55	60
[0803]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser		
[0804]	65	70	75
[0805]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[0806]	85	90	95
[0807]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe		
[0808]	100	105	110
[0809]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0810]	115	120	125
[0811]	<210> 53		
[0812]	<211> 375		
[0813]	<212> DNA		
[0814]	<213> Homo sapiens		
[0815]	<400> 53		
[0816]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg	60	
[0817]	tcttgtgccg ccagcggtt caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc	120	
[0818]	cctggcaaag gactggaatg ggtggccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc	180	
[0819]	tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc	240	
[0820]	ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga	300	
[0821]	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg	360	
[0822]	gtcacagtta gctct	375	
[0823]	<210> 54		
[0824]	<211> 214		
[0825]	<212> PRT		
[0826]	<213> Homo sapiens		
[0827]	<400> 54		
[0828]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0829]	1	5	10
[0830]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
[0831]	20	25	30
[0832]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
[0833]	35	40	45
[0834]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
[0835]	50	55	60
[0836]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro		
[0837]	65	70	75
[0838]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile		
[0839]	85	90	95

[0840]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
[0841]	100	105 110
[0842]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
[0843]	115	120 125
[0844]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
[0845]	130	135 140
[0846]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
[0847]	145	150 155 160
[0848]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
[0849]	165	170 175
[0850]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
[0851]	180	185 190
[0852]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
[0853]	195	200 205
[0854]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[0855]	210	
[0856]	<210> 55	
[0857]	<211> 642	
[0858]	<212> DNA	
[0859]	<213> Homo sapiens	
[0860]	<400> 55	
[0861]	gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca	60
[0862]	ctgagctgta gagccagcca gagcgtgtcc tcttacctgg cctggtatca gcagaagcct	120
[0863]	ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat	180
[0864]	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcacctga caatcagcag actggaaccc	240
[0865]	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag	300
[0866]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca	360
[0867]	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
[0868]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
[0869]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
[0870]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
[0871]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt	642
[0872]	<210> 56	
[0873]	<211> 449	
[0874]	<212> PRT	
[0875]	<213> Homo sapiens	
[0876]	<400> 56	
[0877]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly	
[0878]	1	5 10 15
[0879]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr	
[0880]	20	25 30
[0881]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	

[0882]	35	40	45
[0883]	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
[0884]	50	55	60
[0885]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0886]	65	70	75
[0887]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0888]	85	90	95
[0889]	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp		
[0890]	100	105	110
[0891]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[0892]	115	120	125
[0893]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr		
[0894]	130	135	140
[0895]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[0896]	145	150	155
[0897]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[0898]	165	170	175
[0899]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[0900]	180	185	190
[0901]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp		
[0902]	195	200	205
[0903]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr		
[0904]	210	215	220
[0905]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro		
[0906]	225	230	235
[0907]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[0908]	245	250	255
[0909]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp		
[0910]	260	265	270
[0911]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[0912]	275	280	285
[0913]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[0914]	290	295	300
[0915]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[0916]	305	310	315
[0917]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys		
[0918]	325	330	335
[0919]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
[0920]	340	345	350
[0921]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser		
[0922]	355	360	365
[0923]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		

[0924]	370	375	380
[0925]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0926]	385	390	395 400
[0927]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0928]	405	410	415
[0929]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0930]	420	425	430
[0931]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[0932]	435	440	445
[0933]	Lys		
[0934]	<210> 57		
[0935]	<211> 1347		
[0936]	<212> DNA		
[0937]	<213> Homo sapiens		
[0938]	<400> 57		
[0939]	gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcgga gttgttcagc ctggcggtc tctgagactg	60	
[0940]	tcttgtgctg ccagcggtt cacttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgacaggcc	120	
[0941]	cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggtc tatcggtac	180	
[0942]	gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac	240	
[0943]	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc	300	
[0944]	cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaaact ggttaccgtt	360	
[0945]	agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg tccccctgg ccccttgag cagaagcacc	420	
[0946]	agcgagagca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagc	480	
[0947]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgtccag	540	
[0948]	agcagcgac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc	600	
[0949]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagt	660	
[0950]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccctgccc ccgagttcga gggcgacac	720	
[0951]	agcgtgttcc tggtcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag	780	
[0952]	gtgacctgag tgggtgtgga cgtgtccag gaggacccc aggtccagtt taattggtac	840	
[0953]	gtggacggcg tggaagtga taacgccaag accaagcca gagaggagca gttcaacagc	900	
[0954]	acctacagag tgggtgtcgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	960	
[0955]	tacaagtga aggtctccaa caaggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag	1020	
[0956]	gccaaaggcc agccacggga gcccaggtc tgcacctgc cacctagcca agaggagatg	1080	
[0957]	accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggt tctatcccag cgatatgcc	1140	
[0958]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	1200	
[0959]	gacagcgacg gcagcttctt cctggttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag	1260	
[0960]	gagggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag	1320	
[0961]	aagtcctga gcctgagcct gggcaag	1347	
[0962]	<210> 58		
[0963]	<211> 215		
[0964]	<212> PRT		
[0965]	<213> Homo sapiens		

[0966]	<400> 58
[0967]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0968]	1 5 10 15
[0969]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0970]	20 25 30
[0971]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[0972]	35 40 45
[0973]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[0974]	50 55 60
[0975]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
[0976]	65 70 75 80
[0977]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
[0978]	85 90 95
[0979]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
[0980]	100 105 110
[0981]	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
[0982]	115 120 125
[0983]	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
[0984]	130 135 140
[0985]	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
[0986]	145 150 155 160
[0987]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
[0988]	165 170 175
[0989]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
[0990]	180 185 190
[0991]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
[0992]	195 200 205
[0993]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[0994]	210 215
[0995]	<210> 59
[0996]	<211> 645
[0997]	<212> DNA
[0998]	<213> Homo sapiens
[0999]	<400> 59
[1000]	caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
[1001]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcagcag 120
[1002]	aagcccgccc aggtccttag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttgga 180
[1003]	cccgcagat tctctggatc tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacaat cactggtgct 240
[1004]	caggctgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
[1005]	ggcggaggca ccaactgac agttctgggt cagcccaagg cggcgccctc ggtcactctg 360
[1006]	ttcccgcct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 420
[1007]	gacttctatc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 480

[1008] ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 540
 [1009] ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 600
 [1010] gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca 645
 [1011] <210> 60
 [1012] <211> 452
 [1013] <212> PRT
 [1014] <213> Homo sapiens
 [1015] <400> 60
 [1016] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1017] 1 5 10 15
 [1018] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [1019] 20 25 30
 [1020] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1021] 35 40 45
 [1022] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [1023] 50 55 60
 [1024] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [1025] 65 70 75 80
 [1026] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [1027] 85 90 95
 [1028] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [1029] 100 105 110
 [1030] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 [1031] 115 120 125
 [1032] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 [1033] 130 135 140
 [1034] Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 [1035] 145 150 155 160
 [1036] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 [1037] 165 170 175
 [1038] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 [1039] 180 185 190
 [1040] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 [1041] 195 200 205
 [1042] Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 [1043] 210 215 220
 [1044] Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
 [1045] 225 230 235 240
 [1046] Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 [1047] 245 250 255
 [1048] Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 [1049] 260 265 270

[1050]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	
[1051]	275	280 285
[1052]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr	
[1053]	290	295 300
[1054]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn	
[1055]	305	310 315 320
[1056]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser	
[1057]	325	330 335
[1058]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
[1059]	340	345 350
[1060]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val	
[1061]	355	360 365
[1062]	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val	
[1063]	370	375 380
[1064]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro	
[1065]	385	390 395 400
[1066]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	
[1067]	405	410 415
[1068]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	
[1069]	420	425 430
[1070]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu	
[1071]	435	440 445
[1072]	Ser Leu Gly Lys	
[1073]	450	
[1074]	<210> 61	
[1075]	<211> 1356	
[1076]	<212> DNA	
[1077]	<213> Homo sapiens	
[1078]	<400> 61	
[1079]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg	60
[1080]	tcttgtgccg ccagcggtt caccctcaac acctacgcta tgaactgggt ccgacaggcc	120
[1081]	cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc	180
[1082]	tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc	240
[1083]	ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga	300
[1084]	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgcct actggggcca gggcacactg	360
[1085]	gtcacagtta gctctgctag caccaagggc cccagcgtgt tccccctggc cccttgcagc	420
[1086]	agaagcacca gcgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag	480
[1087]	cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcgt ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc	540
[1088]	gtgtccaga gcagcggact gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc	600
[1089]	ctgggcacca agacctacac ctgcaacgtg gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac	660
[1090]	aagagagtgg agagcaagta cggccctccc tgccccctt gccctgcccc cgagttcgag	720
[1091]	ggcggaccta gcgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcaga	780

[1092]	acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgtcccagg aggaccccca ggtccagttt	840
[1093]	aattggtacg tggacggcgt ggaagtgc at aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900
[1094]	ttcaacagca cctacagagt ggtgtccgtg ctgacctgc tgcaccagga ctggctgaac	960
[1095]	ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aagggcctgg ccagcagcat cgagaagacc	1020
[1096]	atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtct acacctgcc accttgtcaa	1080
[1097]	gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg tggtgtctgg tgaaaggctt ctatcccagc	1140
[1098]	gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccaga acaactacaa gaccaccccc	1200
[1099]	cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtactcca agctgacctg ggacaagtcc	1260
[1100]	agatggcagg agggcaacgt cttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320
[1101]	tacaccaga agtccctgag cctgagcctg ggcaag	1356
[1102]	<210>	62
[1103]	<211>	214
[1104]	<212>	PRT
[1105]	<213>	Homo sapiens
[1106]	<400>	62
[1107]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[1108]	1 5 10 15	
[1109]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
[1110]	20 25 30	
[1111]	Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[1112]	35 40 45	
[1113]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
[1114]	50 55 60	
[1115]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro	
[1116]	65 70 75 80	
[1117]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile	
[1118]	85 90 95	
[1119]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
[1120]	100 105 110	
[1121]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
[1122]	115 120 125	
[1123]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
[1124]	130 135 140	
[1125]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
[1126]	145 150 155 160	
[1127]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
[1128]	165 170 175	
[1129]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
[1130]	180 185 190	
[1131]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
[1132]	195 200 205	
[1133]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	

[1134]	210
[1135]	<210> 63
[1136]	<211> 642
[1137]	<212> DNA
[1138]	<213> Homo sapiens
[1139]	<400> 63
[1140]	gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
[1141]	ctgagctgta gagccagcca gagcgtgtcc tcttacctgg cctggtatca gaagaagcct 120
[1142]	ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180
[1143]	agattcagcg gctctggtc tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag actggaaccc 240
[1144]	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag 300
[1145]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 360
[1146]	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
[1147]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
[1148]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
[1149]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
[1150]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
[1151]	<210> 64
[1152]	<211> 449
[1153]	<212> PRT
[1154]	<213> Homo sapiens
[1155]	<400> 64
[1156]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[1157]	1 5 10 15
[1158]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
[1159]	20 25 30
[1160]	Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1161]	35 40 45
[1162]	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
[1163]	50 55 60
[1164]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1165]	65 70 75 80
[1166]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1167]	85 90 95
[1168]	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
[1169]	100 105 110
[1170]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[1171]	115 120 125
[1172]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[1173]	130 135 140
[1174]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1175]	145 150 155 160

[1176]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[1177]		165	170
[1178]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[1179]		180	185
[1180]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp		
[1181]		195	200
[1182]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr		
[1183]		210	215
[1184]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro		
[1185]		225	230
[1186]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[1187]		245	250
[1188]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp		
[1189]		260	265
[1190]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[1191]		275	280
[1192]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[1193]		290	295
[1194]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[1195]		305	310
[1196]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys		
[1197]		325	330
[1198]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
[1199]		340	345
[1200]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser		
[1201]		355	360
[1202]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[1203]		370	375
[1204]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[1205]		385	390
[1206]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[1207]		405	410
[1208]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[1209]		420	425
[1210]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[1211]		435	440
[1212]	Lys		
[1213]	<210> 65		
[1214]	<211> 1347		
[1215]	<212> DNA		
[1216]	<213> Homo sapiens		
[1217]	<400> 65		

[1218]	gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcga gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg	60
[1219]	tcttgtgctg ccagcggtt caccitcaac gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc	120
[1220]	cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tateggctac	180
[1221]	gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac	240
[1222]	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc	300
[1223]	cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaacact ggttaccgtt	360
[1224]	agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccttgagcagaagcacc	420
[1225]	agcgagagca cagccgcctt gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc	480
[1226]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgtctccag	540
[1227]	agcagcggac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc	600
[1228]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtg	660
[1229]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccctt tgccctgccc ccgagttcga gggcggacct	720
[1230]	agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag	780
[1231]	gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt taattgttac	840
[1232]	gtggacggcg tggaagtgca taacgccaaag accaagccca gagaggagca gttcaacagc	900
[1233]	acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	960
[1234]	tacaagtgca aggtctccaa caagggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag	1020
[1235]	gccaaaggcc agccacggga gccccagtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg	1080
[1236]	accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatcgcc	1140
[1237]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	1200
[1238]	gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag	1260
[1239]	gagggaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag	1320
[1240]	aagtcctga gcctgagcct gggcaag	1347
[1241]	<210>	66
[1242]	<211>	215
[1243]	<212>	PRT
[1244]	<213>	Homo sapiens
[1245]	<400>	66
[1246]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly	
[1247]	1 5 10 15	
[1248]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
[1249]	20 25 30	
[1250]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly	
[1251]	35 40 45	
[1252]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe	
[1253]	50 55 60	
[1254]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
[1255]	65 70 75 80	
[1256]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn	
[1257]	85 90 95	
[1258]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
[1259]	100 105 110	

[1260]	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu		
[1261]	115	120	125
[1262]	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro		
[1263]	130	135	140
[1264]	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala		
[1265]	145	150	155 160
[1266]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala		
[1267]	165	170	175
[1268]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg		
[1269]	180	185	190
[1270]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr		
[1271]	195	200	205
[1272]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
[1273]	210	215	
[1274]	<210> 67		
[1275]	<211> 645		
[1276]	<212> DNA		
[1277]	<213> Homo sapiens		
[1278]	<400> 67		
[1279]	caggetgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg	60	
[1280]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag	120	
[1281]	aagcccggcc aggctcctag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttgga	180	
[1282]	cccgccagat tctctggatc tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacaat cactgggtgt	240	
[1283]	caggetgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc	300	
[1284]	ggcggaggca ccaactgac agttctgggt cagcccaagg cggcgccctc ggtaactctg	360	
[1285]	ttcccgccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactgggtgtg tctcataagt	420	
[1286]	gacttctatc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg	480	
[1287]	ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac	540	
[1288]	ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtaacgcat	600	
[1289]	gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca	645	
[1290]	<210> 68		
[1291]	<211> 452		
[1292]	<212> PRT		
[1293]	<213> Homo sapiens		
[1294]	<400> 68		
[1295]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1296]	1	5	10 15
[1297]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr		
[1298]	20	25	30
[1299]	Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1300]	35	40	45
[1301]	Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp		

[1302]	50	55	60
[1303]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser		
[1304]	65	70	75
[1305]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[1306]	85	90	95
[1307]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe		
[1308]	100	105	110
[1309]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
[1310]	115	120	125
[1311]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser		
[1312]	130	135	140
[1313]	Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
[1314]	145	150	155
[1315]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
[1316]	165	170	175
[1317]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
[1318]	180	185	190
[1319]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys		
[1320]	195	200	205
[1321]	Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu		
[1322]	210	215	220
[1323]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu		
[1324]	225	230	235
[1325]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[1326]	245	250	255
[1327]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[1328]	260	265	270
[1329]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[1330]	275	280	285
[1331]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
[1332]	290	295	300
[1333]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[1334]	305	310	315
[1335]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser		
[1336]	325	330	335
[1337]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[1338]	340	345	350
[1339]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
[1340]	355	360	365
[1341]	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[1342]	370	375	380
[1343]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		

[1344]	385	390	395	400
[1345]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
[1346]	405	410	415	
[1347]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
[1348]	420	425	430	
[1349]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
[1350]	435	440	445	
[1351]	Ser Leu Gly Lys			
[1352]	450			
[1353]	<210> 69			
[1354]	<211> 1356			
[1355]	<212> DNA			
[1356]	<213> Homo sapiens			
[1357]	<400> 69			
[1358]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg	60		
[1359]	tcttgtgccg ccagcggtt caccctcaac acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc	120		
[1360]	cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc	180		
[1361]	tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc	240		
[1362]	ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga	300		
[1363]	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg	360		
[1364]	gtcacagtta gctctgctag caccaagggc ccagcgtgt tccccctggc cccttgcagc	420		
[1365]	agaagcacca gcgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag	480		
[1366]	cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcgct ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc	540		
[1367]	gtgctccaga gcagcggact gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc	600		
[1368]	ctgggcacca agacctacac ctgcaacgtg gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac	660		
[1369]	aagagagtgg agagcaagta cggccctccc tgccccctt gccctgcccc cgagttcgag	720		
[1370]	ggcggaccta gcgtgttcct gttccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcaga	780		
[1371]	acccccgagg tgacctgctg ggtggtggac gtgtcccagg aggaccccga ggtccagttt	840		
[1372]	aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag	900		
[1373]	ttcaacagca cctacagagt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac	960		
[1374]	ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aagggcctgg ccagcagcat cgagaagacc	1020		
[1375]	atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag cccaggtct acaccctgcc accttgtcaa	1080		
[1376]	gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg tgggtgtctg tgaaaggctt ctatcccagc	1140		
[1377]	gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc	1200		
[1378]	cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtactcca agctgaccgt ggacaagtcc	1260		
[1379]	agatggcagg agggcaacgt cttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac	1320		
[1380]	tacaccacga agtccctgag cctgagcctg ggcaag	1356		
[1381]	<210> 70			
[1382]	<211> 214			
[1383]	<212> PRT			
[1384]	<213> Homo sapiens			
[1385]	<400> 70			

[1386]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[1387]	1 5 10 15	
[1388]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	
[1389]	20 25 30	
[1390]	Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
[1391]	35 40 45	
[1392]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly	
[1393]	50 55 60	
[1394]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro	
[1395]	65 70 75 80	
[1396]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile	
[1397]	85 90 95	
[1398]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
[1399]	100 105 110	
[1400]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly	
[1401]	115 120 125	
[1402]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
[1403]	130 135 140	
[1404]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
[1405]	145 150 155 160	
[1406]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
[1407]	165 170 175	
[1408]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
[1409]	180 185 190	
[1410]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
[1411]	195 200 205	
[1412]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[1413]	210	
[1414]	<210> 71	
[1415]	<211> 642	
[1416]	<212> DNA	
[1417]	<213> Homo sapiens	
[1418]	<400> 71	
[1419]	gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca	60
[1420]	ctgagctgta gagccagcca gacgctgtcc tcttacctgg cctggtatca gaagaagcct	120
[1421]	ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat	180
[1422]	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcacctga caatcagcag actggaacct	240
[1423]	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag	300
[1424]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca	360
[1425]	tctgataaga aattgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
[1426]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
[1427]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540

[1428] ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 [1429] ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
 [1430] <210> 72
 [1431] <211> 449
 [1432] <212> PRT
 [1433] <213> Homo sapiens
 [1434] <400> 72
 [1435] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 [1436] 1 5 10 15
 [1437] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1438] 20 25 30
 [1439] Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1440] 35 40 45
 [1441] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1442] 50 55 60
 [1443] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1444] 65 70 75 80
 [1445] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1446] 85 90 95
 [1447] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 [1448] 100 105 110
 [1449] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 [1450] 115 120 125
 [1451] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 [1452] 130 135 140
 [1453] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 [1454] 145 150 155 160
 [1455] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 [1456] 165 170 175
 [1457] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 [1458] 180 185 190
 [1459] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 [1460] 195 200 205
 [1461] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 [1462] 210 215 220
 [1463] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
 [1464] 225 230 235 240
 [1465] Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 [1466] 245 250 255
 [1467] Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 [1468] 260 265 270
 [1469] Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn

[1470]	275	280	285
[1471]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[1472]	290	295	300
[1473]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[1474]	305	310	315
[1475]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys		
[1476]	325	330	335
[1477]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
[1478]	340	345	350
[1479]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser		
[1480]	355	360	365
[1481]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[1482]	370	375	380
[1483]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[1484]	385	390	395
[1485]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[1486]	405	410	415
[1487]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[1488]	420	425	430
[1489]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[1490]	435	440	445
[1491]	Lys		
[1492]	<210> 73		
[1493]	<211> 1347		
[1494]	<212> DNA		
[1495]	<213> Homo sapiens		
[1496]	<400> 73		
[1497]	gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcgga gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg	60	
[1498]	tcttgtgctg ccagcggett caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc	120	
[1499]	cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tateggctac	180	
[1500]	gccgattccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac	240	
[1501]	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc	300	
[1502]	cagtacggca actactacta cggcattggac tactggggcc agggaacact ggttaccgtt	360	
[1503]	agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccttgagcagaagcacc	420	
[1504]	agcgagagca cagccgccct gggctgcctg gtggaggact acttccccga gcccgtagacc	480	
[1505]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag	540	
[1506]	agcagcggac tgtactccct gaggcagctg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc	600	
[1507]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga cgagagagt	660	
[1508]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccctt tgccctgccc ccgagttcga aggcggacct	720	
[1509]	agcgtgttcc tgttcccccc caagccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag	780	
[1510]	gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt taattgttac	840	
[1511]	gtggacggcg tggaagtgca taacgccaag accaagccca gagaggagca gttcaacagc	900	

[1512] acctacagag tgggtgccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
 [1513] tacaagtgcag aggtctccaa caagggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag 1020
 [1514] gccaaaggcc agccacggga gccccagtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg 1080
 [1515] accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatcgcc 1140
 [1516] gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
 [1517] gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag 1260
 [1518] gagggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 1320
 [1519] aagtcctga gcctgagcct gggcaag 1347
 [1520] <210> 74
 [1521] <211> 449
 [1522] <212> PRT
 [1523] <213> Homo sapiens
 [1524] <400> 74
 [1525] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 [1526] 1 5 10 15
 [1527] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1528] 20 25 30
 [1529] Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1530] 35 40 45
 [1531] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1532] 50 55 60
 [1533] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1534] 65 70 75 80
 [1535] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1536] 85 90 95
 [1537] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 [1538] 100 105 110
 [1539] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 [1540] 115 120 125
 [1541] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 [1542] 130 135 140
 [1543] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 [1544] 145 150 155 160
 [1545] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 [1546] 165 170 175
 [1547] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 [1548] 180 185 190
 [1549] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 [1550] 195 200 205
 [1551] His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr
 [1552] 210 215 220
 [1553] Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro

[1554]	225	230	235	240
[1555]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
[1556]		245	250	255
[1557]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp			
[1558]		260	265	270
[1559]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
[1560]		275	280	285
[1561]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val			
[1562]		290	295	300
[1563]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
[1564]	305	310	315	320
[1565]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys			
[1566]		325	330	335
[1567]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr			
[1568]		340	345	350
[1569]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser			
[1570]		355	360	365
[1571]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
[1572]		370	375	380
[1573]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
[1574]	385	390	395	400
[1575]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
[1576]		405	410	415
[1577]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
[1578]		420	425	430
[1579]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
[1580]		435	440	445
[1581]	Lys			
[1582]	<210> 75			
[1583]	<211> 1347			
[1584]	<212> DNA			
[1585]	<213> Homo sapiens			
[1586]	<400> 75			
[1587]	gaagtcgacg tgctggaatc tggtggcgga gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg 60			
[1588]	tcttgtgctg ccagcggtt cacttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc 120			
[1589]	cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tatcggtac 180			
[1590]	gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240			
[1591]	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300			
[1592]	cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaaact ggttaccgtt 360			
[1593]	agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccttgtag cagaagcacc 420			
[1594]	agcgagagca cagccgccct gggctgcctg gtggaggact acttccccga gcccgtagcc 480			
[1595]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag 540			

[1596]	agcagcggac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc	600
[1597]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga cgagagagtg	660
[1598]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccctt tgccctgccc ccgagttcga aggcggacct	720
[1599]	agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag	780
[1600]	gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgtcccgaggaggacccg aggtccagtt taattggtac	840
[1601]	gtggacggcg tggaagtga taacgccaag accaagccca gagaggagca gttcgccagc	900
[1602]	acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	960
[1603]	tacaagtga aggtctccaa caagggcctg cctagcagca tcgagaagac catcagcaag	1020
[1604]	gccaaagggcc agccacggga gccccaggtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg	1080
[1605]	accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatcgcc	1140
[1606]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	1200
[1607]	gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag	1260
[1608]	gagggaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag	1320
[1609]	aagtccctga gcctgagcct gggcaag	1347
[1610]	<210>	76
[1611]	<211>	223
[1612]	<212>	PRT
[1613]	<213>	Homo sapiens
[1614]	<400>	76
[1615]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1616]	1 5 10 15	
[1617]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr	
[1618]	20 25 30	
[1619]	Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1620]	35 40 45	
[1621]	Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp	
[1622]	50 55 60	
[1623]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser	
[1624]	65 70 75 80	
[1625]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
[1626]	85 90 95	
[1627]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe	
[1628]	100 105 110	
[1629]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr	
[1630]	115 120 125	
[1631]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser	
[1632]	130 135 140	
[1633]	Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
[1634]	145 150 155 160	
[1635]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His	
[1636]	165 170 175	
[1637]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser	

[1638]	180	185	190
[1639]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys		
[1640]	195	200	205
[1641]	Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val		
[1642]	210	215	220
[1643]	<210> 77		
[1644]	<211> 669		
[1645]	<212> DNA		
[1646]	<213> Homo sapiens		
[1647]	<400> 77		
[1648]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60		
[1649]	tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120		
[1650]	cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180		
[1651]	tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240		
[1652]	ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300		
[1653]	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360		
[1654]	gtcacagtta gctctgctag caccaagggc cccagcgtgt tccccctggc cccttgcagc 420		
[1655]	agaagcacca gcgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag 480		
[1656]	cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcgct ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc 540		
[1657]	gtgtccaga gcagcgact gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc 600		
[1658]	ctgggcacca agacctacac ctgcaacgtg gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660		
[1659]	aagagagtg 669		
[1660]	<210> 78		
[1661]	<211> 444		
[1662]	<212> PRT		
[1663]	<213> Homo sapiens		
[1664]	<400> 78		
[1665]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
[1666]	1 5 10 15		
[1667]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
[1668]	20 25 30		
[1669]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly		
[1670]	35 40 45		
[1671]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe		
[1672]	50 55 60		
[1673]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala		
[1674]	65 70 75 80		
[1675]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn		
[1676]	85 90 95		
[1677]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro		
[1678]	100 105 110		
[1679]	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu		

[1680]	115	120	125
[1681]	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro		
[1682]	130	135	140
[1683]	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala		
[1684]	145	150	155
[1685]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala		
[1686]	165	170	175
[1687]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg		
[1688]	180	185	190
[1689]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr		
[1690]	195	200	205
[1691]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
[1692]	210	215	220
[1693]	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[1694]	225	230	235
[1695]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[1696]	245	250	255
[1697]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
[1698]	260	265	270
[1699]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[1700]	275	280	285
[1701]	Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[1702]	290	295	300
[1703]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[1704]	305	310	315
[1705]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
[1706]	325	330	335
[1707]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln		
[1708]	340	345	350
[1709]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly		
[1710]	355	360	365
[1711]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[1712]	370	375	380
[1713]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[1714]	385	390	395
[1715]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu		
[1716]	405	410	415
[1717]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[1718]	420	425	430
[1719]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[1720]	435	440	
[1721]	<210> 79		

[1722]	<211> 1332
[1723]	<212> DNA
[1724]	<213> Homo sapiens
[1725]	<400> 79
[1726]	caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
[1727]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
[1728]	aagcccggcc aggtccctag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttggaca 180
[1729]	cccgccagat tctctggata tctgtctggc ggaaaggccg ctctgacaat cactgggtgt 240
[1730]	caggctgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
[1731]	ggcggaggca ccaaactgac agttctgggt cagcccaagg cggcgccctc ggtcactctg 360
[1732]	ttccccccct cctctgagga gcttcaagcc aacaaggcca cactgggtgtg tctcataagt 420
[1733]	gacttctatc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 480
[1734]	ggagtggaga ccaccacacc ctccaaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 540
[1735]	ctgagcctga cgcctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 600
[1736]	gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcagagag caagtacggc 660
[1737]	cctccctgcc ccccttgccc tgcccccgag ttcgaggcg gacctagcgt gttcctgttc 720
[1738]	cccccaagc ccaaggacac cctgatgata agcagaacct ccgaggtgac ctgcgtggtg 780
[1739]	gtggacgtgt cccaggagga ccccgaggtc cagtttaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
[1740]	gtgcataacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttcg ccagcaccta cagagtgggtg 900
[1741]	tccgtgtctga ccgtgtctga ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc 960
[1742]	tccaacaagg gcctgcctag cagcatcgag aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1020
[1743]	cgggagcccc aggtctacac cctgccacct tgtcaagagg agatgaccaa gaaccagggtg 1080
[1744]	tccctgtggt gtctggtgaa aggttctat cccagcgata tcgccgtgga gtgggagagc 1140
[1745]	aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggcagc 1200
[1746]	ttcttcctgt actccaagct gaccgtggac aagtccagat ggcaggagg caacgtcttc 1260
[1747]	agctgtccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgagcctg 1320
[1748]	agcctgggca ag 1332
[1749]	<210> 80
[1750]	<211> 218
[1751]	<212> PRT
[1752]	<213> Homo sapiens
[1753]	<400> 80
[1754]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
[1755]	1 5 10 15
[1756]	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
[1757]	20 25 30
[1758]	Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[1759]	35 40 45
[1760]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[1761]	50 55 60
[1762]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
[1763]	65 70 75 80

[1764]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
[1765]		85	90
[1766]	Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		95
[1767]		100	105
[1768]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		110
[1769]		115	120
[1770]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		125
[1771]		130	135
[1772]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		140
[1773]	145	150	155
[1774]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		160
[1775]		165	170
[1776]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		175
[1777]		180	185
[1778]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		190
[1779]		195	200
[1780]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		205
[1781]		210	215
[1782]	<210> 81		
[1783]	<211> 654		
[1784]	<212> DNA		
[1785]	<213> Homo sapiens		
[1786]	<400> 81		
[1787]	gacatcgtgc tgacacagag ccctgcttct ctggctgtgt ctcttgcca gagagccacc	60	
[1788]	atcacctgta gagccagcaa gacggtgtcc accagcgct actcttacat gcactggtat	120	
[1789]	cagaagaagc ccggccagcc tcctaagctg ctgatctacc tggctagcaa cctcgaaagc	180	
[1790]	ggagtgcctg ctagattttc tggcagcggc tctggcaccg acttcaccct gacaatcaac	240	
[1791]	cccggtgaag ccgaagacac cgccaactac tactgccagc acagcagaga gctgcctgg	300	
[1792]	acatttgcc agggcaccaa ggtggaaatc aagcgaactg tggctgcacc atctgtcttc	360	
[1793]	atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	420	
[1794]	aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg	480	
[1795]	ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540	
[1796]	agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600	
[1797]	acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654	
[1798]	<210> 82		
[1799]	<211> 449		
[1800]	<212> PRT		
[1801]	<213> Homo sapiens		
[1802]	<400> 82		
[1803]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[1804]	1	5	10
[1805]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Phe		15

[1848]	355	360	365
[1849]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[1850]	370	375	380
[1851]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[1852]	385	390	395 400
[1853]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[1854]	405	410	415
[1855]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[1856]	420	425	430
[1857]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[1858]	435	440	445
[1859]	Lys		
[1860]	<210> 83		
[1861]	<211> 1347		
[1862]	<212> DNA		
[1863]	<213> Homo sapiens		
[1864]	<400> 83		
[1865]	caggttcagc tgggtgcagtc tggcagcgag ctgaagaaac ctggcgcctc tgtgaagggtg	60	
[1866]	tcctgcaagg ctagcggcta catcttcacc aacttcggca tgaactgggt ccgagaggct	120	
[1867]	cctggacagg gactcgaatg gatgggctgg atcaacacct acaccggcga gcagatctac	180	
[1868]	gccgatggct tcacaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcggcag cacagcttac	240	
[1869]	ctgcagatca gctctctgaa ggccgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaggcgag	300	
[1870]	atctactacg gctacgacgt gggctttgtg tactggggcc agggaaact ggtcacctgt	360	
[1871]	agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccttgag cagaagcacc	420	
[1872]	agcgagagca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagc	480	
[1873]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgtctccag	540	
[1874]	agcagcggac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc	600	
[1875]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagt	660	
[1876]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcga gggcggaacct	720	
[1877]	agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag	780	
[1878]	gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccg aggtccagtt taattgttac	840	
[1879]	gtggacggcg tggaagtgca taacgccaag accaagccca gagaggagca gttcaacagc	900	
[1880]	acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	960	
[1881]	tacaagtgca aggtctccaa caagggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag	1020	
[1882]	gccaagggcc agccacggga gccccaggtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg	1080	
[1883]	accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatcgcc	1140	
[1884]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg	1200	
[1885]	gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag	1260	
[1886]	gagggaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag	1320	
[1887]	aagtcctga gcctgagcct gggcaag	1347	
[1888]	<210> 84		
[1889]	<211> 218		

[1890]	<212> PRT
[1891]	<213> Homo sapiens
[1892]	<400> 84
[1893]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
[1894]	1 5 10 15
[1895]	Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Thr Thr Ser
[1896]	20 25 30
[1897]	Gly Tyr Ser Tyr Ile His Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[1898]	35 40 45
[1899]	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asp Leu Glu Ala Gly Val Pro Ala
[1900]	50 55 60
[1901]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
[1902]	65 70 75 80
[1903]	Pro Val Glu Ala Glu Asp Thr Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
[1904]	85 90 95
[1905]	Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1906]	100 105 110
[1907]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
[1908]	115 120 125
[1909]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
[1910]	130 135 140
[1911]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[1912]	145 150 155 160
[1913]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
[1914]	165 170 175
[1915]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
[1916]	180 185 190
[1917]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
[1918]	195 200 205
[1919]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1920]	210 215
[1921]	<210> 85
[1922]	<211> 654
[1923]	<212> DNA
[1924]	<213> Homo sapiens
[1925]	<400> 85
[1926]	gacatcgtgc tgacacagag ccctgcttct ctggctgtgt ctcctggcca gagagccacc 60
[1927]	atcacctgta gagccagcaa gacgctgacc accagcgct actcttacat ccactggtat 120
[1928]	cagaagaagc ccggccagcc tcctaagctg ctgatctacc tggccagcga tctggaagct 180
[1929]	ggcgtgccag ctagattttc tggcagcggc tctggcaccg acttcaccct gacaatcaac 240
[1930]	cccgtggaag ccgaagacac cgccaactac tactgccagc acagcagaga gctgcacctg 300
[1931]	acatttggcc agggcaccaa ggtggaaatc aagcgaactg tggctgcacc atctgtcttc 360

[1932]	atcttccccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	420
[1933]	aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg	480
[1934]	ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540
[1935]	agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600
[1936]	acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654
[1937]	<210>	86
[1938]	<211>	449
[1939]	<212>	PRT
[1940]	<213>	Homo sapiens
[1941]	<400>	86
[1942]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala	
[1943]	1 5 10 15	
[1944]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Phe	
[1945]	20 25 30	
[1946]	Gly Met Asn Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[1947]	35 40 45	
[1948]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Gln Ile Tyr Ala Asp Gly Phe	
[1949]	50 55 60	
[1950]	Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr	
[1951]	65 70 75 80	
[1952]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
[1953]	85 90 95	
[1954]	Ala Arg Gly Glu Ile Tyr Tyr Gly Tyr Asp Val Gly Phe Val Tyr Trp	
[1955]	100 105 110	
[1956]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	
[1957]	115 120 125	
[1958]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr	
[1959]	130 135 140	
[1960]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	
[1961]	145 150 155 160	
[1962]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	
[1963]	165 170 175	
[1964]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	
[1965]	180 185 190	
[1966]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp	
[1967]	195 200 205	
[1968]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr	
[1969]	210 215 220	
[1970]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro	
[1971]	225 230 235 240	
[1972]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser	
[1973]	245 250 255	

[1974]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[1975]	260 265 270
[1976]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[1977]	275 280 285
[1978]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
[1979]	290 295 300
[1980]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[1981]	305 310 315 320
[1982]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys
[1983]	325 330 335
[1984]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
[1985]	340 345 350
[1986]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
[1987]	355 360 365
[1988]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[1989]	370 375 380
[1990]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[1991]	385 390 395 400
[1992]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[1993]	405 410 415
[1994]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[1995]	420 425 430
[1996]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[1997]	435 440 445
[1998]	Lys
[1999]	<210> 87
[2000]	<211> 1347
[2001]	<212> DNA
[2002]	<213> Homo sapiens
[2003]	<400> 87
[2004]	caggttcagc tgggtgcagtc tggcagcgag ctgaagaaac ctggcgcctc tgtgaagggt 60
[2005]	tcctgcaagg ctagcggcta catcttcacc aacttcggca tgaactgggt ccgagaggct 120
[2006]	cctggacagg gactcgaatg gatgggcttg atcaacacct acaccggcga gcagatctac 180
[2007]	gccgatggct tcacaggcag attcgtgttc agcctggaca ccagcgccag cacagcttac 240
[2008]	ctgcagatca gctctctgaa ggccgaggat accgccgtgt acttctgtgc cagaggcgag 300
[2009]	atctactacg gctacgacgt gggctttgtg tactggggcc agggaaact ggtcaccgtt 360
[2010]	agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccttgag cagaagcacc 420
[2011]	agcgagagca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagacc 480
[2012]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgtctccag 540
[2013]	agcagcggac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc 600
[2014]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaagtgga caagagagt 660
[2015]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcga gggcggacct 720

[2016]	agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag	780
[2017]	gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggaccccg aggtccagtt taattggtac	840
[2018]	gtggacggcg tggaagtga taacgccaa accaagccca gagaggagca gttcaacagc	900
[2019]	acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa	960
[2020]	tacaagtga aggtctccaa caagggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag	1020
[2021]	gccaaagggcc agccacggga gccccaggtc tgcacctgc cacctagcca agaggagatg	1080
[2022]	accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatgcc	1140
[2023]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg	1200
[2024]	gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag	1260
[2025]	gagggaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag	1320
[2026]	aagtcctga gcctgagcct gggcaag	1347
[2027]	<210>	88
[2028]	<211>	219
[2029]	<212>	PRT
[2030]	<213>	Homo sapiens
[2031]	<400>	88
[2032]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[2033]	1 5 10 15	
[2034]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser	
[2035]	20 25 30	
[2036]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser	
[2037]	35 40 45	
[2038]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[2039]	50 55 60	
[2040]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[2041]	65 70 75 80	
[2042]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val	
[2043]	85 90 95	
[2044]	Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[2045]	100 105 110	
[2046]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
[2047]	115 120 125	
[2048]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
[2049]	130 135 140	
[2050]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
[2051]	145 150 155 160	
[2052]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
[2053]	165 170 175	
[2054]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
[2055]	180 185 190	
[2056]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
[2057]	195 200 205	

[2058]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2059]	210 215
[2060]	<210> 89
[2061]	<211> 657
[2062]	<212> DNA
[2063]	<213> Homo sapiens
[2064]	<400> 89
[2065]	gacgtggtca tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc 60
[2066]	atcagctgta gaagcagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacacata cctggagtgg 120
[2067]	tatctgaaga agcccggcca gtctcctcag ctgctgatct acaaggtgtc caacagattc 180
[2068]	agcggcgtgc ccgacagatt ctctggctct ggatctggca ccgacttcac cctgaagatc 240
[2069]	tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tactttctgtc tccaggtcac acacgtgccc 300
[2070]	ctgacatttg gccagggcac caagctggaa atcaagcgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
[2071]	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
[2072]	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
[2073]	tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
[2074]	agcagcaccc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
[2075]	gtcaccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657
[2076]	<210> 90
[2077]	<211> 442
[2078]	<212> PRT
[2079]	<213> Homo sapiens
[2080]	<400> 90
[2081]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[2082]	1 5 10 15
[2083]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Tyr
[2084]	20 25 30
[2085]	Glu Ile His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[2086]	35 40 45
[2087]	Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
[2088]	50 55 60
[2089]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
[2090]	65 70 75 80
[2091]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2092]	85 90 95
[2093]	Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[2094]	100 105 110
[2095]	Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
[2096]	115 120 125
[2097]	Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
[2098]	130 135 140
[2099]	Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

[2100]	145	150	155	160
[2101]	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly			
[2102]		165	170	175
[2103]	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly			
[2104]		180	185	190
[2105]	Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys			
[2106]		195	200	205
[2107]	Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys			
[2108]	210	215	220	
[2109]	Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
[2110]	225	230	235	240
[2111]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
[2112]		245	250	255
[2113]	Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp			
[2114]		260	265	270
[2115]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
[2116]		275	280	285
[2117]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
[2118]	290	295	300	
[2119]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
[2120]	305	310	315	320
[2121]	Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
[2122]		325	330	335
[2123]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu			
[2124]		340	345	350
[2125]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr			
[2126]		355	360	365
[2127]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
[2128]	370	375	380	
[2129]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
[2130]	385	390	395	400
[2131]	Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn			
[2132]		405	410	415
[2133]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[2134]		420	425	430
[2135]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
[2136]		435	440	
[2137]	<210> 91			
[2138]	<211> 1326			
[2139]	<212> DNA			
[2140]	<213> Homo sapiens			
[2141]	<400> 91			

[2142]	caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaagggtg	60
[2143]	tcctgcaagg ctagcgcta caccttcgcc gactacgaga tccactgggt ccgagaggct	120
[2144]	ccaggacagg gacttgaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cacagcttac	180
[2145]	gcccagaaat tccagggcag agtgaccctg accgccgacg agtctagcac caccgcctac	240
[2146]	atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcac ccggtactac	300
[2147]	agcttcgcct actggggaca gggaaccctg gtcacagtca gctctgctag caccaagggc	360
[2148]	cccagcgtgt tccccctggc cccttgacg agaagcacca gcgagagcac agccgccttg	420
[2149]	ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcgct	480
[2150]	ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc gtgctccaga gcagcggact gtactccctg	540
[2151]	agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc ctgggcacca agacctacac ctgcaacgtg	600
[2152]	gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagtgg agagcaagta cggccctccc	660
[2153]	tgccccctt gccctgcccc cgagttcgag ggcgaccta gcgtgttctt gtccccccc	720
[2154]	aagcccaagg acacctgat gatcagcaga acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac	780
[2155]	gtgtcccagg aggacccga ggtccagttt aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac	840
[2156]	aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag ttcaacagca cctacagagt ggtgtccgtg	900
[2157]	ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac	960
[2158]	aagggcctgg ccagcagcat cgagaagacc atcagcaagg ccaaggcca gccacgggag	1020
[2159]	ccccaggtct gcacctgcc acctagccaa gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg	1080
[2160]	agctgtgccg tgaagggctt ctatcccagc gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc	1140
[2161]	cagcccagaga acaactacaa gaccaccccc cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc	1200
[2162]	ctggtttcca agctgaccgt ggacaagtcc agatggcagg agggcaacgt cttcagctgc	1260
[2163]	tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacaccaga agtcctgag cctgagcctg	1320
[2164]	ggcaag	1326
[2165]	<210>	92
[2166]	<211>	219
[2167]	<212>	PRT
[2168]	<213>	Homo sapiens
[2169]	<400>	92
[2170]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[2171]	1 5 10 15	
[2172]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser	
[2173]	20 25 30	
[2174]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser	
[2175]	35 40 45	
[2176]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
[2177]	50 55 60	
[2178]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[2179]	65 70 75 80	
[2180]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val	
[2181]	85 90 95	
[2182]	Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[2183]	100 105 110	

[2184]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys		
[2185]	115	120	125
[2186]	Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[2187]	130	135	140
[2188]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[2189]	145	150	155
[2190]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[2191]	165	170	175
[2192]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[2193]	180	185	190
[2194]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[2195]	195	200	205
[2196]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[2197]	210	215	
[2198]	<210> 93		
[2199]	<211> 657		
[2200]	<212> DNA		
[2201]	<213> Homo sapiens		
[2202]	<400> 93		
[2203]	gacgtggtca tgacacagag ccctctgagc ctgcctgtga cacctggcga acctgccagc	60	
[2204]	atcagctgta gaagcagcca gagcatcgtg cacagcaacg gcaacacata cctggagtgg	120	
[2205]	tatctgaaga agcccgcca gtctcctcag ctgctgatct acaaggtgtc caacagattc	180	
[2206]	agcggcgtgc ccgacagatt ctctggctct ggatctggca ccgacttcac cctgaagatc	240	
[2207]	tccagagtgg aagccgagga cgtgggcgtg tacttctgtc tccaggtcac acacgtgccc	300	
[2208]	ctgacatttg gccaggcac caagctggaa atcaagcgaa ctgtggctgc accatctgtc	360	
[2209]	ttcatcttcc cgccatctga taagaaattg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420	
[2210]	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa	480	
[2211]	tcggttaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540	
[2212]	agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagteta cgctgcgaa	600	
[2213]	gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt	657	
[2214]	<210> 94		
[2215]	<211> 442		
[2216]	<212> PRT		
[2217]	<213> Homo sapiens		
[2218]	<400> 94		
[2219]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
[2220]	1	5	10
[2221]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asp Tyr		
[2222]	20	25	30
[2223]	Glu Ile His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[2224]	35	40	45
[2225]	Gly Ala Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe		

[2226]	50	55	60
[2227]	Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Thr Thr Ala Tyr		
[2228]	65	70	75
[2229]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2230]	85	90	95
[2231]	Thr Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
[2232]	100	105	110
[2233]	Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
[2234]	115	120	125
[2235]	Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
[2236]	130	135	140
[2237]	Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
[2238]	145	150	155
[2239]	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
[2240]	165	170	175
[2241]	Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
[2242]	180	185	190
[2243]	Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
[2244]	195	200	205
[2245]	Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys		
[2246]	210	215	220
[2247]	Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[2248]	225	230	235
[2249]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[2250]	245	250	255
[2251]	Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp		
[2252]	260	265	270
[2253]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[2254]	275	280	285
[2255]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[2256]	290	295	300
[2257]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[2258]	305	310	315
[2259]	Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[2260]	325	330	335
[2261]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu		
[2262]	340	345	350
[2263]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr		
[2264]	355	360	365
[2265]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[2266]	370	375	380
[2267]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		

[2268]	385	390	395	400
[2269]	Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn			
[2270]		405	410	415
[2271]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[2272]		420	425	430
[2273]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
[2274]		435	440	
[2275]	<210> 95			
[2276]	<211> 1326			
[2277]	<212> DNA			
[2278]	<213> Homo sapiens			
[2279]	<400> 95			
[2280]	caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg	60		
[2281]	tcctgcaagg ctagcggtta caccttcgcc gactacgaga tccactgggt ccgagaggct	120		
[2282]	ccaggacagg gacttgaatg gatgggcgct atccatcctg gctctggcgg cacagcttac	180		
[2283]	gcccagaaat tccagggcag agtgacctg accgccgacg agtctagcac caccgcctac	240		
[2284]	atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcac ccggtactac	300		
[2285]	agcttcgcct actggggaca gggaacctg gtcacagtca gctctgctag caccaagggc	360		
[2286]	cccagcgtgt tccccctggc cccttgacgc agaagcacca gcgagagcac agccgccctg	420		
[2287]	ggctgcctgg tggaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcgct	480		
[2288]	ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc gtgctccaga gcagcggact gtactccctg	540		
[2289]	agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc ctgggcacca agacctacac ctgcaacgtg	600		
[2290]	gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac gagagagtgg agagcaagta cggccctccc	660		
[2291]	tgccccctt gccctgcccc cgagttcgaa ggcggaacct gctgttcct gttccccccc	720		
[2292]	aagcccaagg acacctgat gatcagcaga acccccagg tgacctgcgt ggtggtggac	780		
[2293]	gtgtccagg aggacccga ggtccagttt aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcatt	840		
[2294]	aacccaaga ccaagcccag agaggagcag ttcaacagca cctacagagt ggtgtccgtg	900		
[2295]	ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggaaat acaagtgcaa ggtctccaac	960		
[2296]	aagggcctgg ccagcagcat cgagaagacc atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag	1020		
[2297]	ccccaggtct gcacctgcc acctagccaa gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg	1080		
[2298]	agctgtgccg tgaaggctt ctatcccagc gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc	1140		
[2299]	cagcccagaga acaactacaa gaccaccccc cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc	1200		
[2300]	ctggtttcca agctgaccgt ggacaagtcc agatggcagg agggcaacgt cttcagctgc	1260		
[2301]	tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacaccaga agtccttgag cctgagcctg	1320		
[2302]	ggcaag	1326		

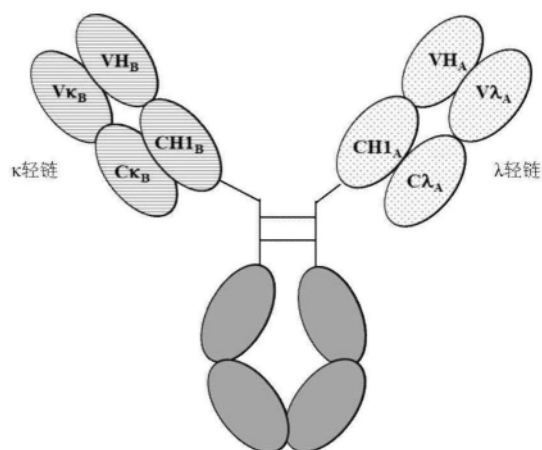


图1

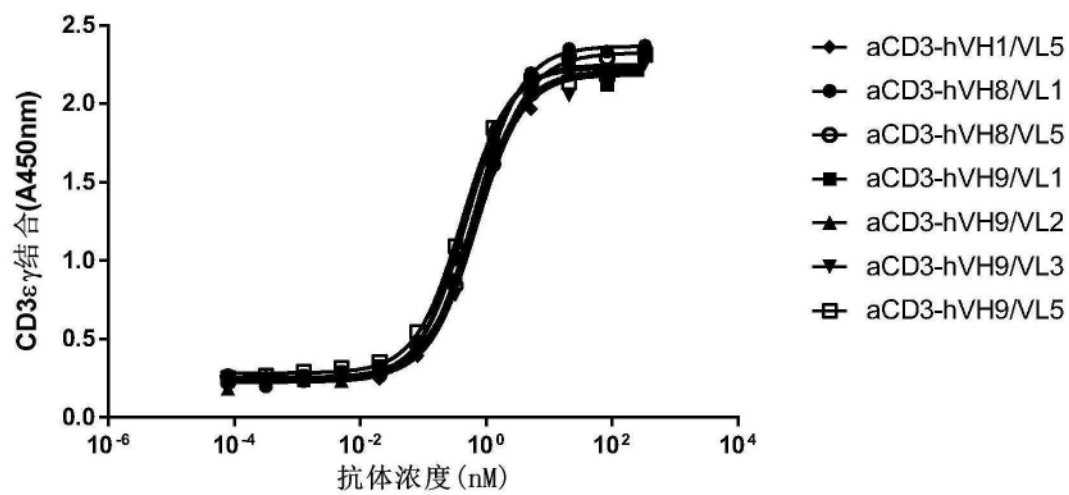


图2

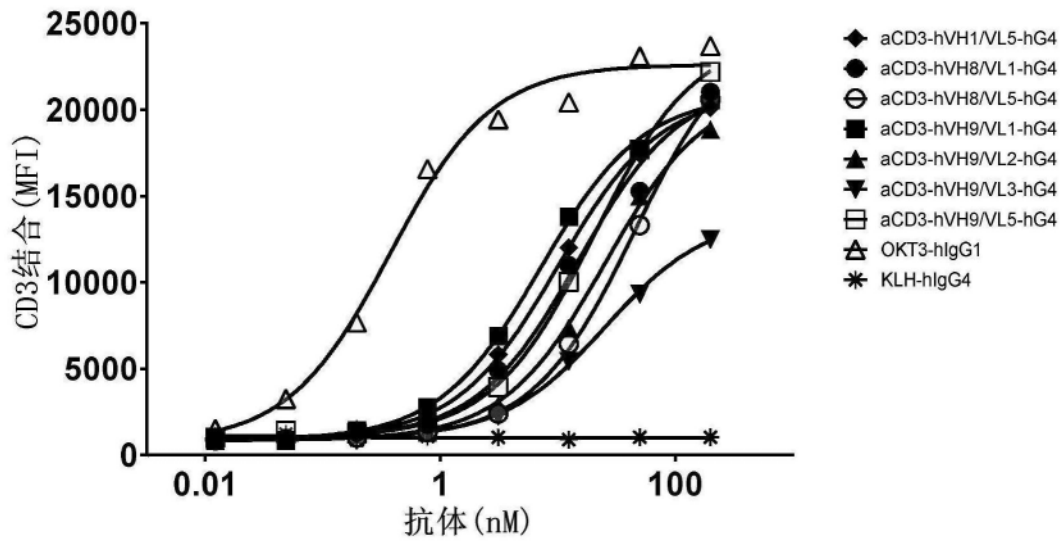


图3

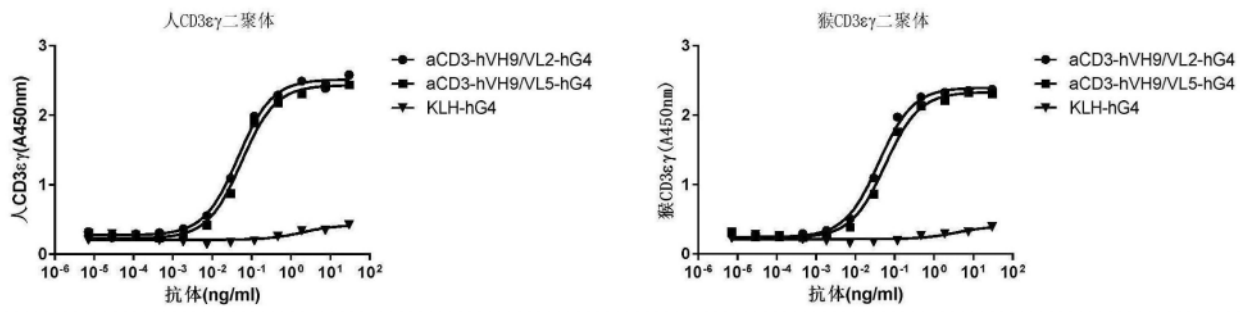


图4

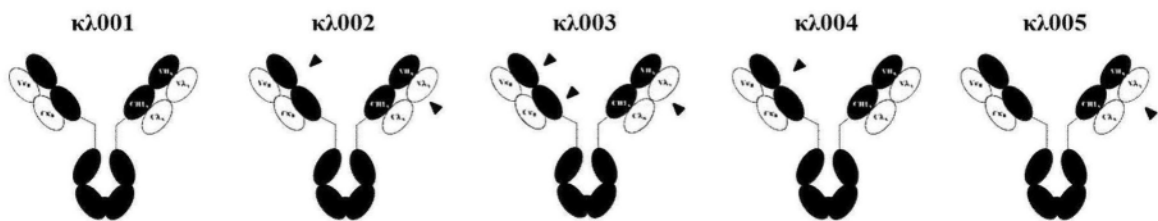


图5

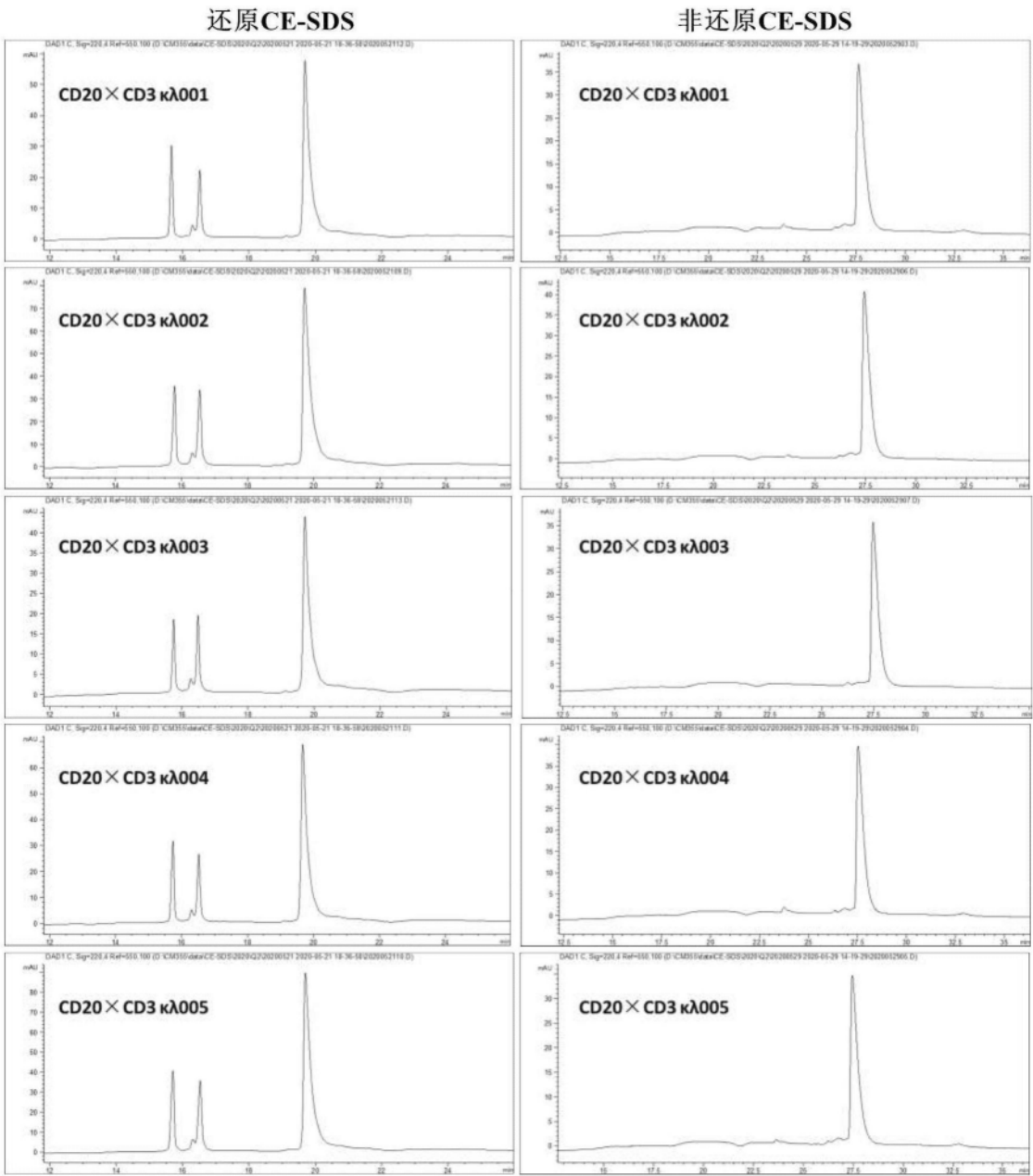


图6

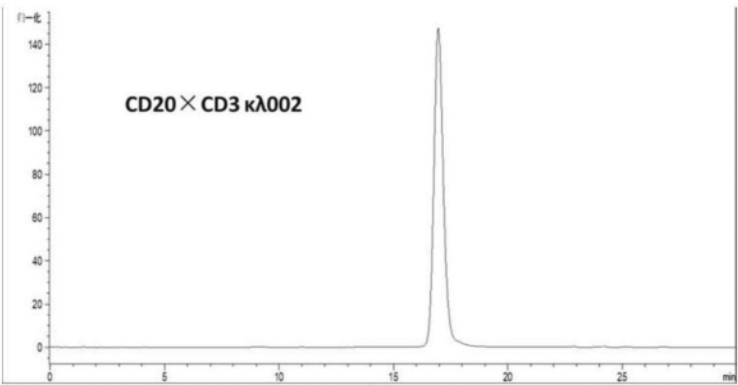


图7

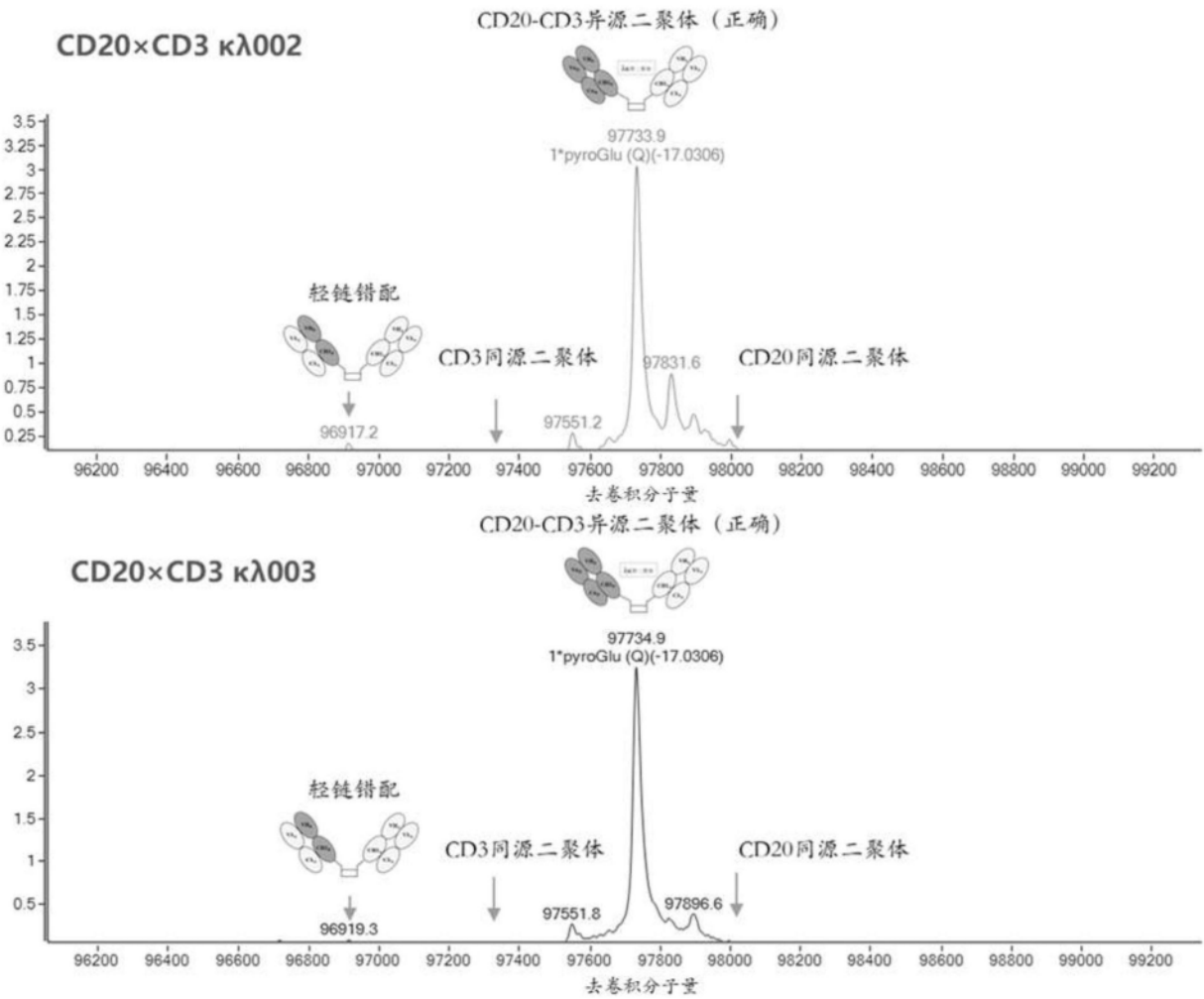


图8

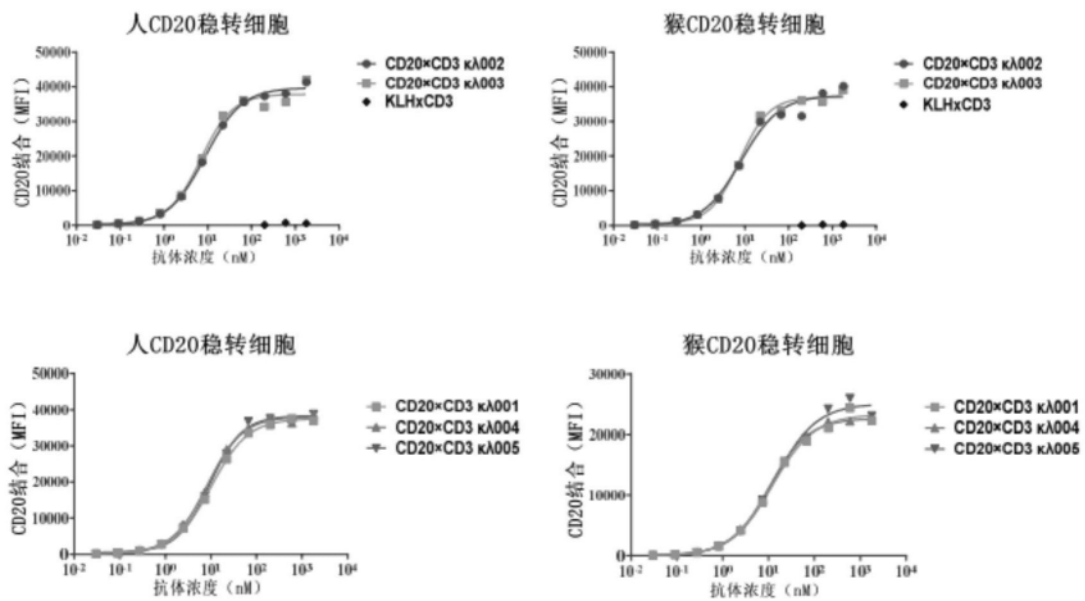


图9

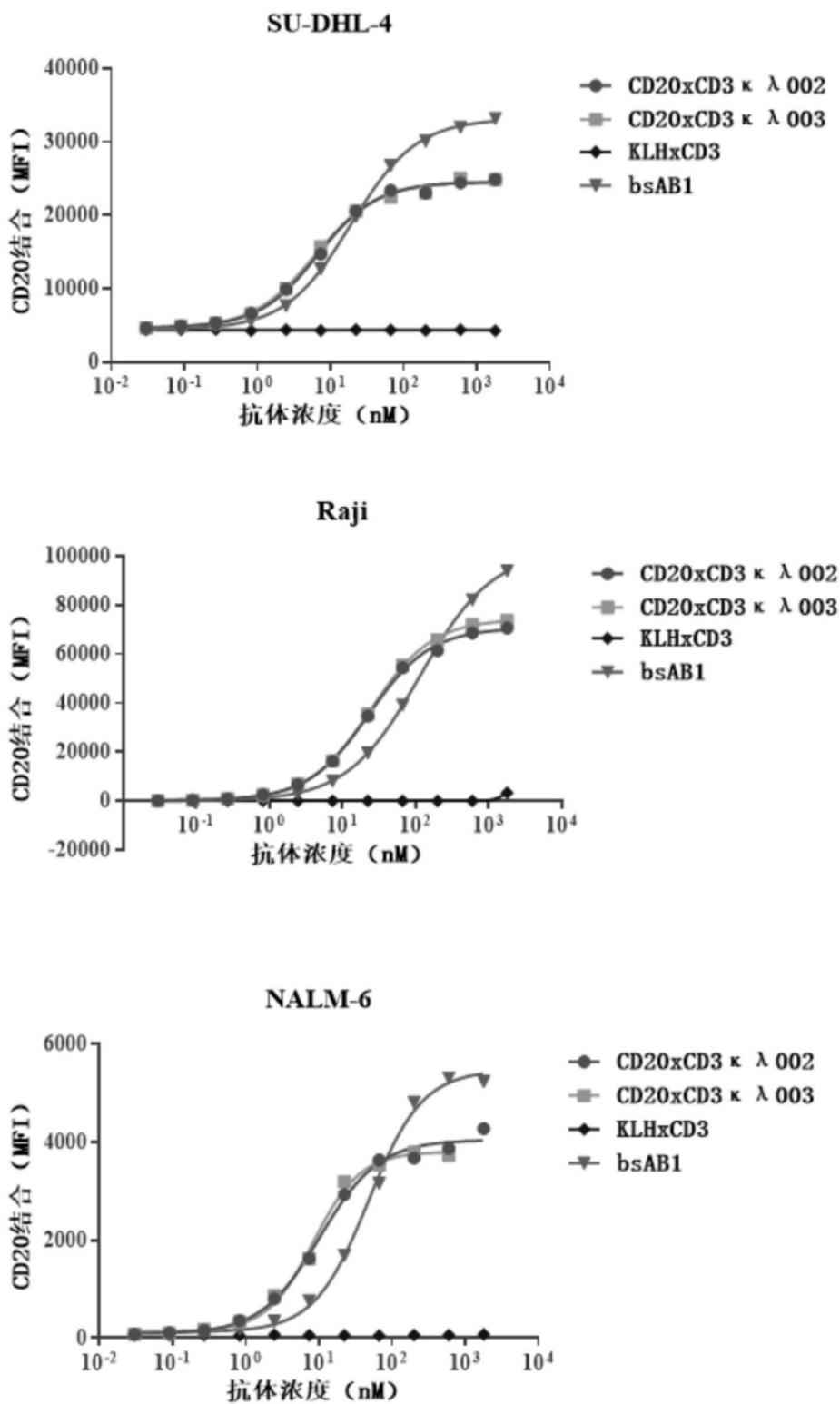


图10

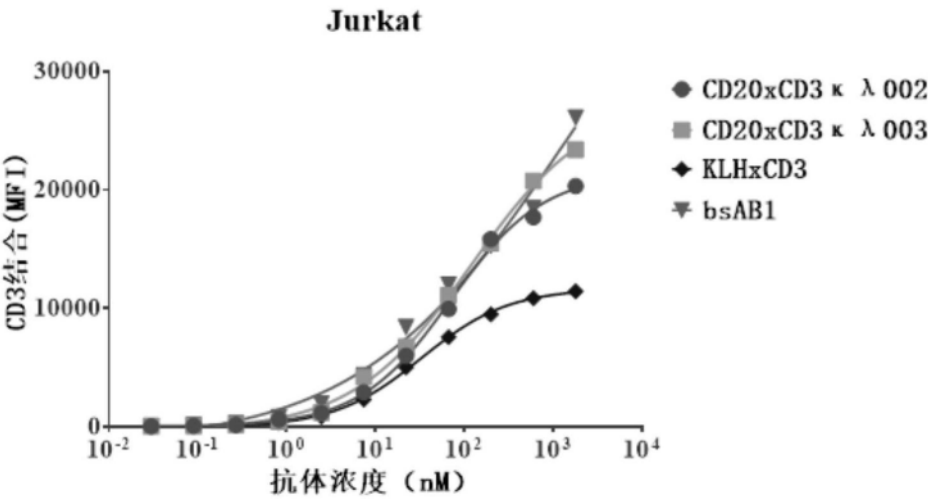


图11

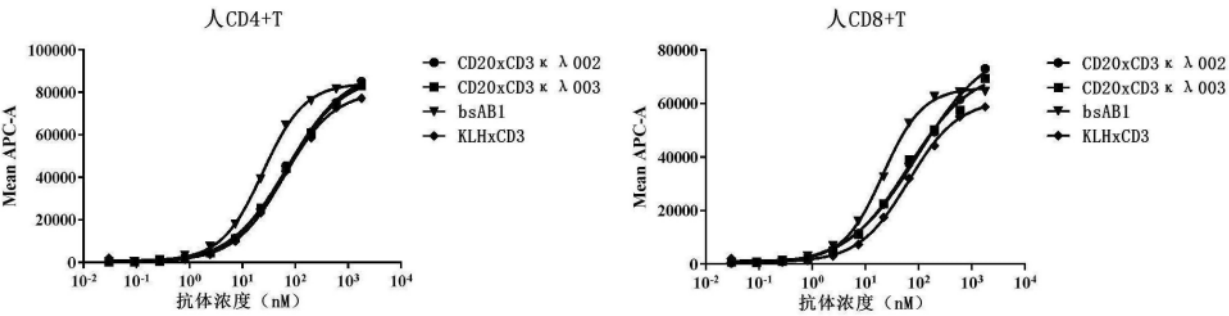


图12

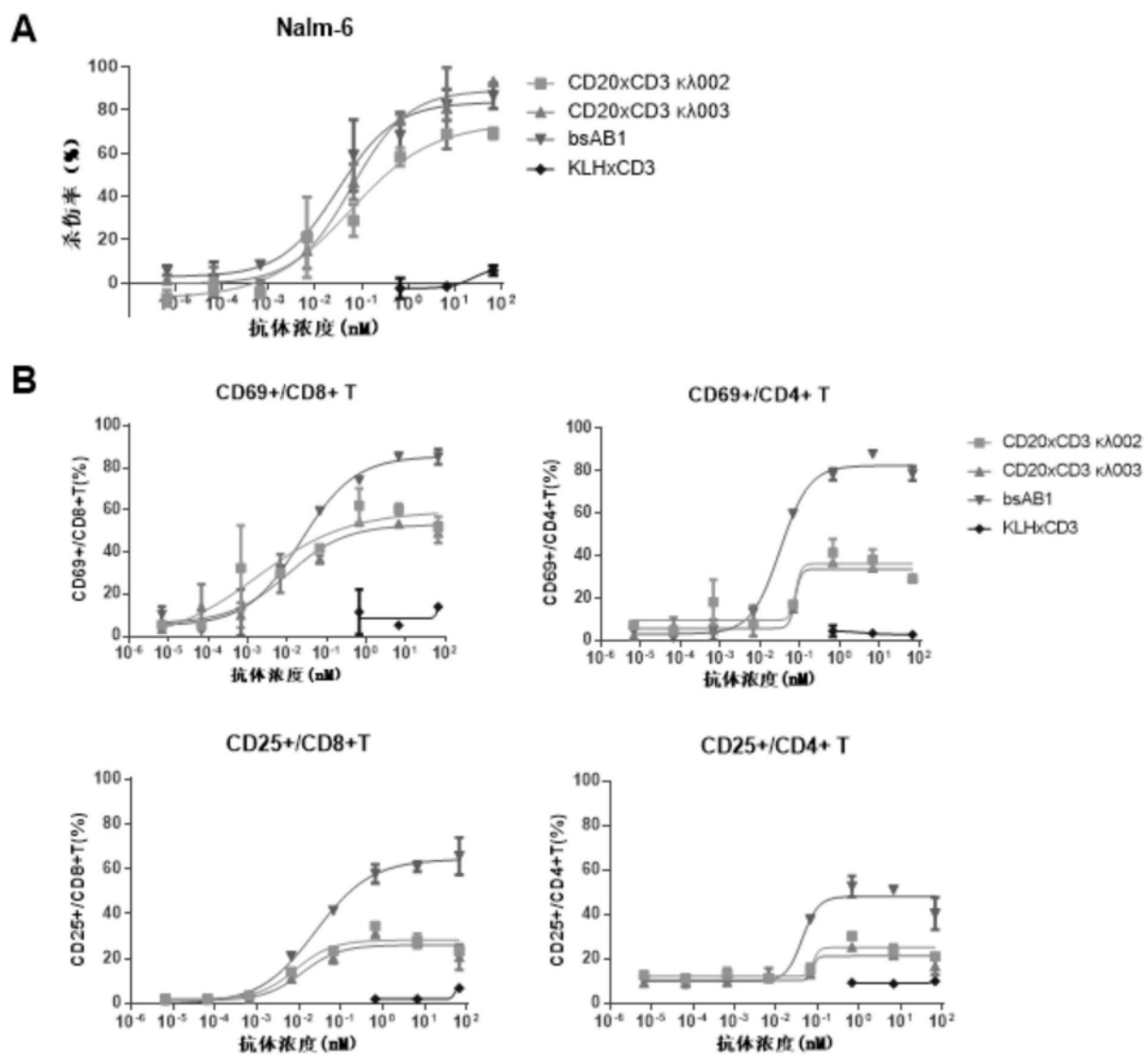


图13

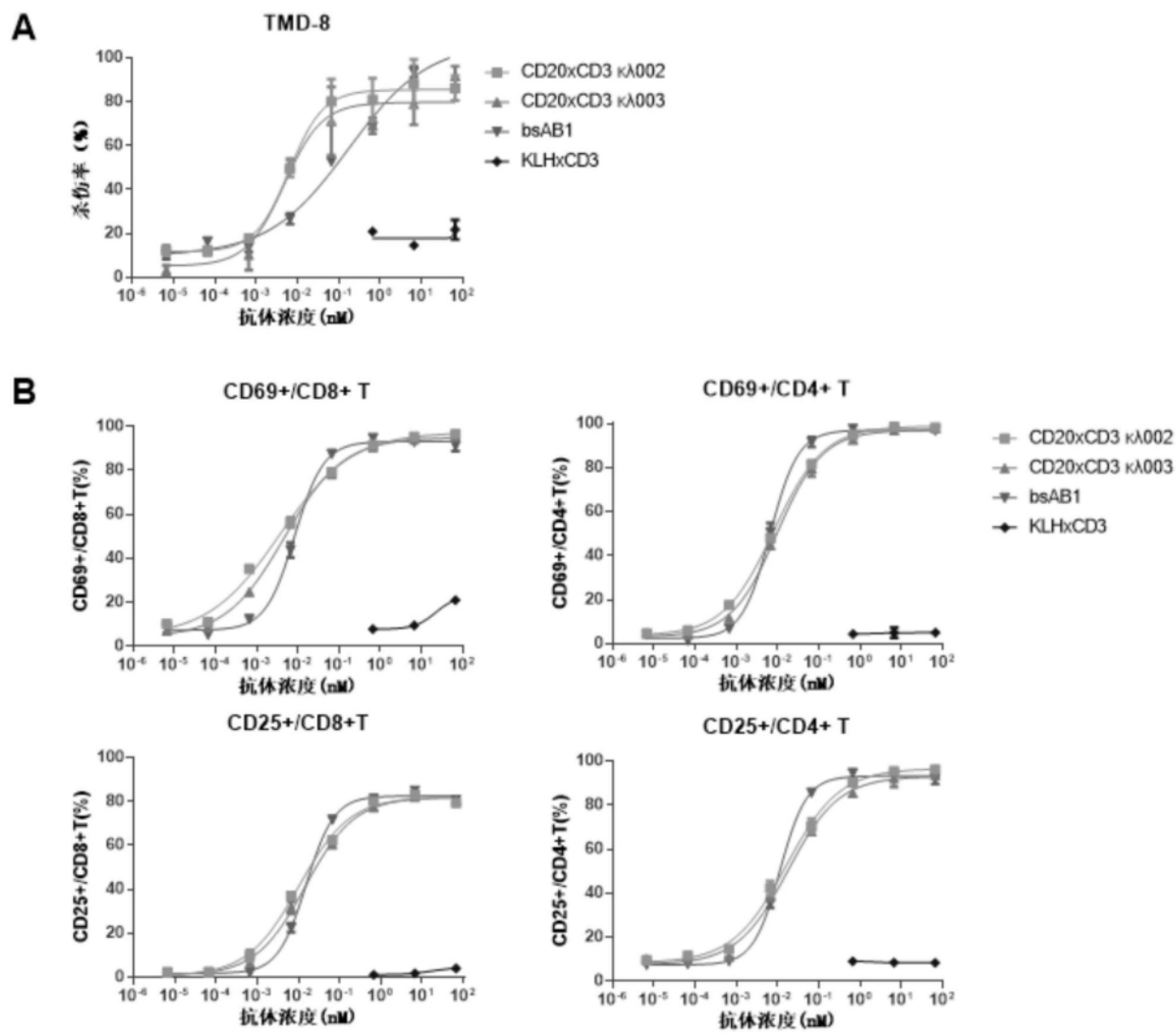


图14

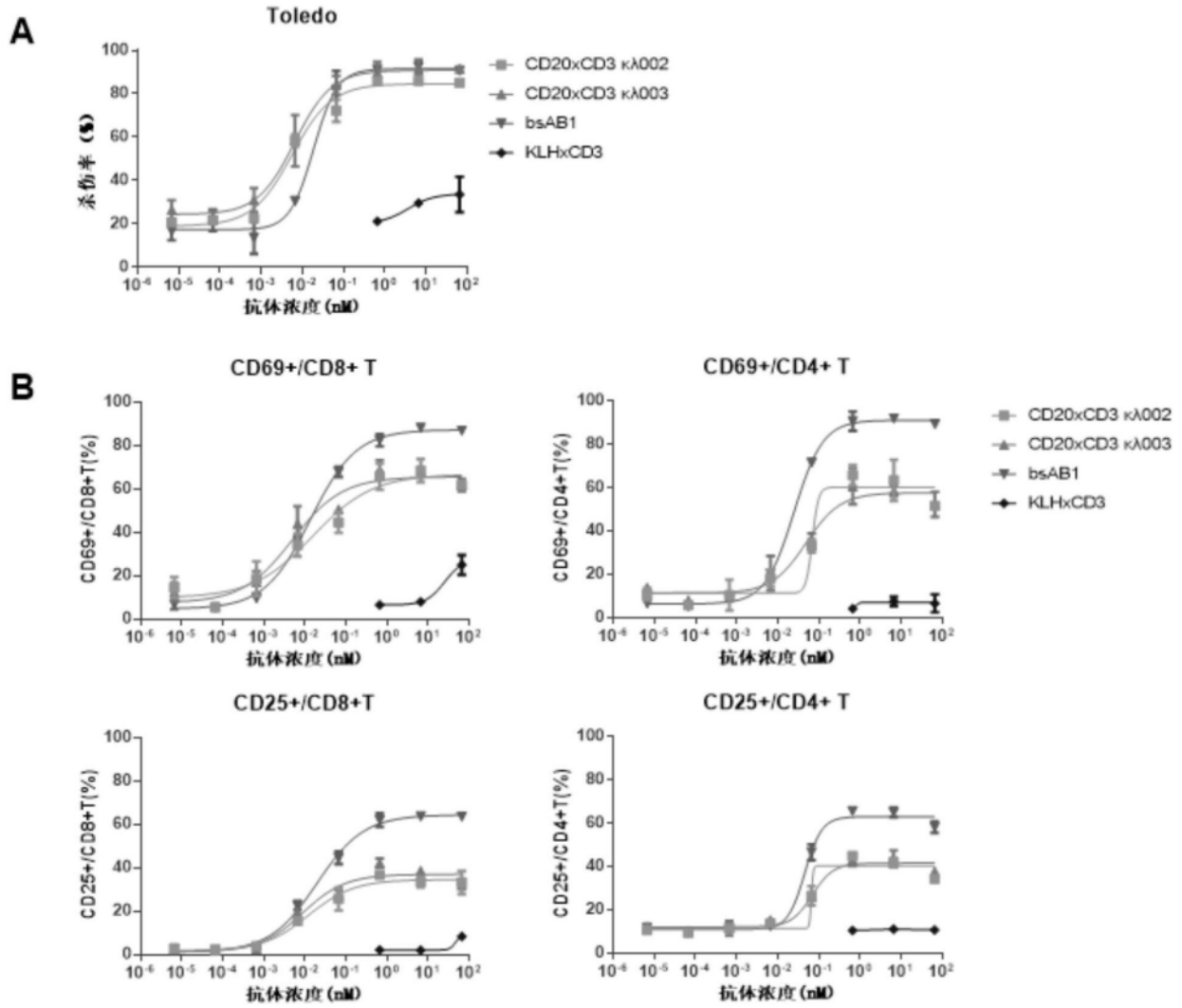


图15

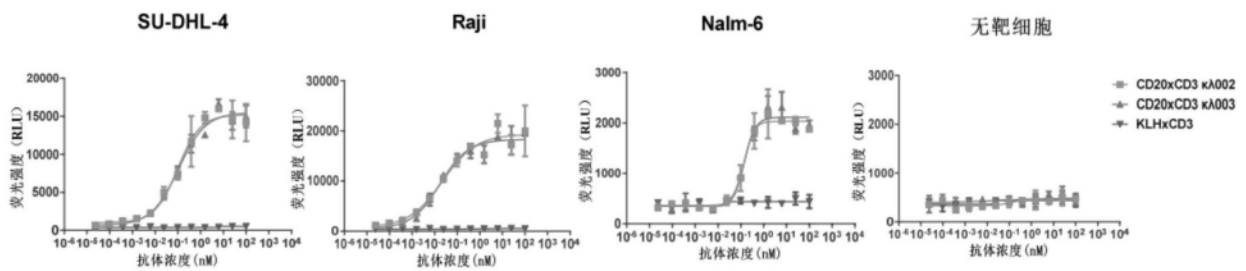


图16

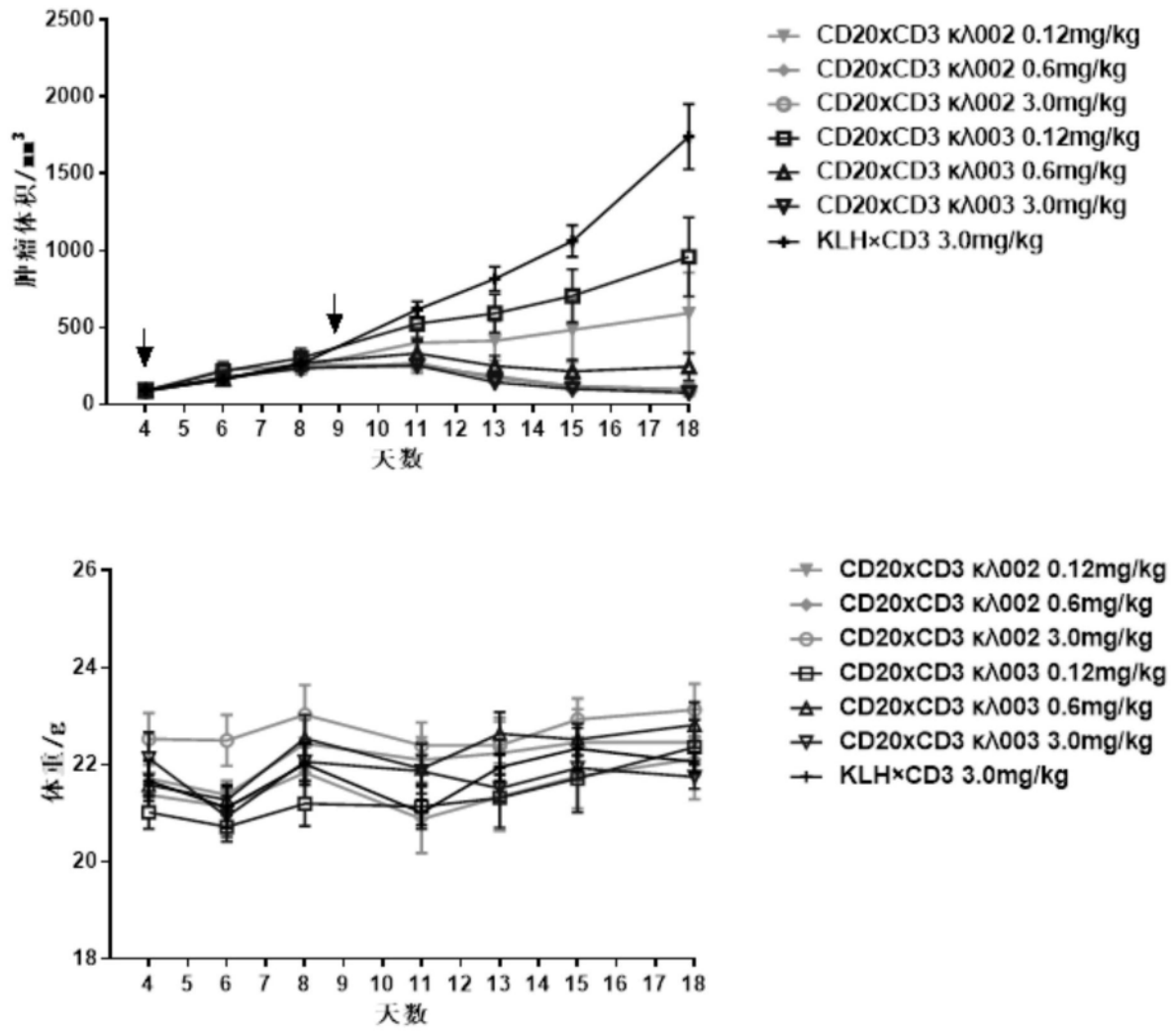


图17

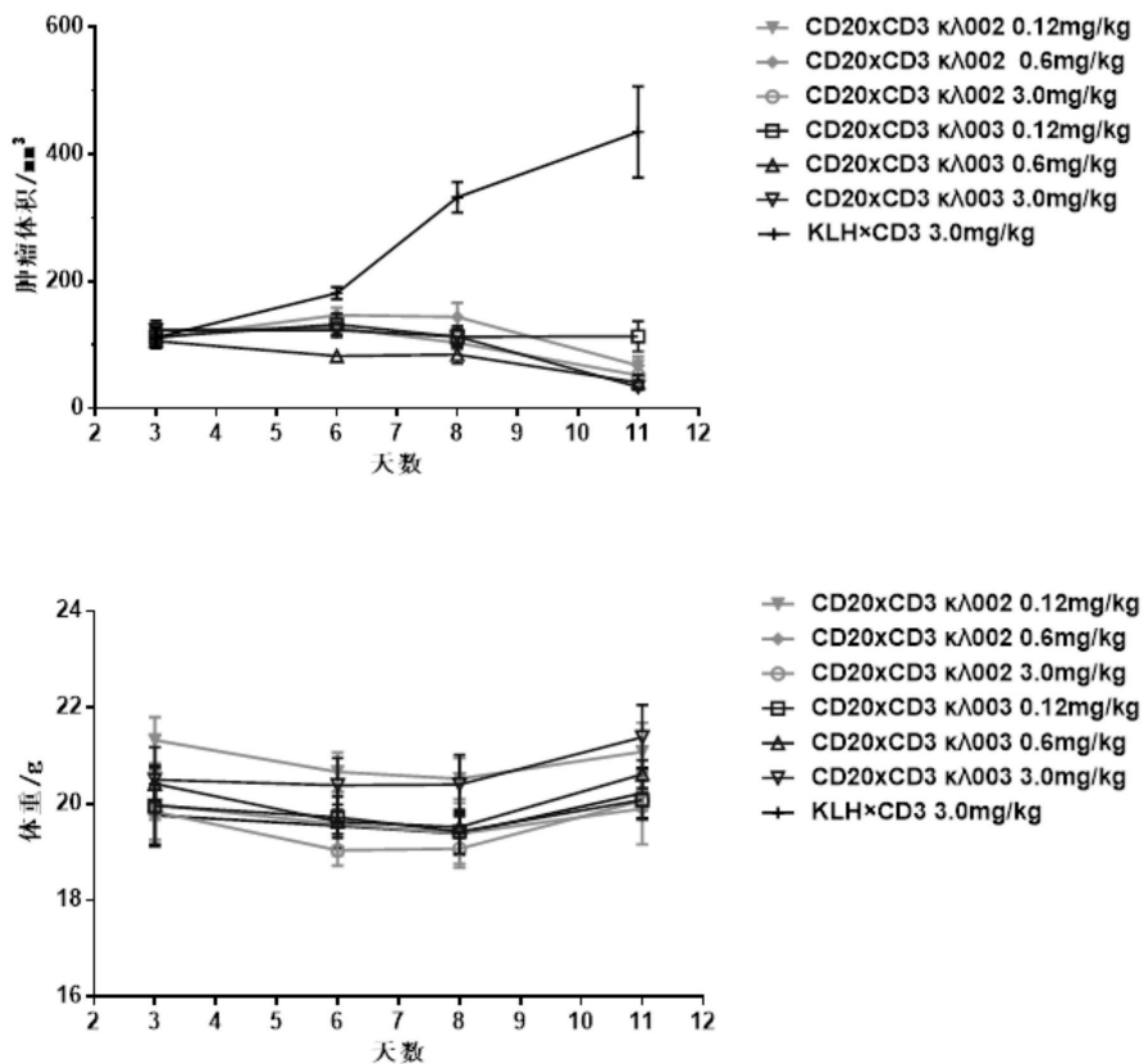


图18

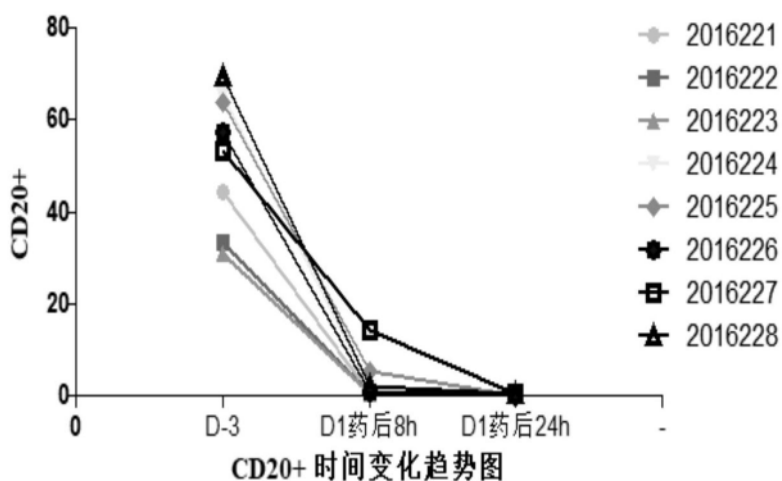


图19

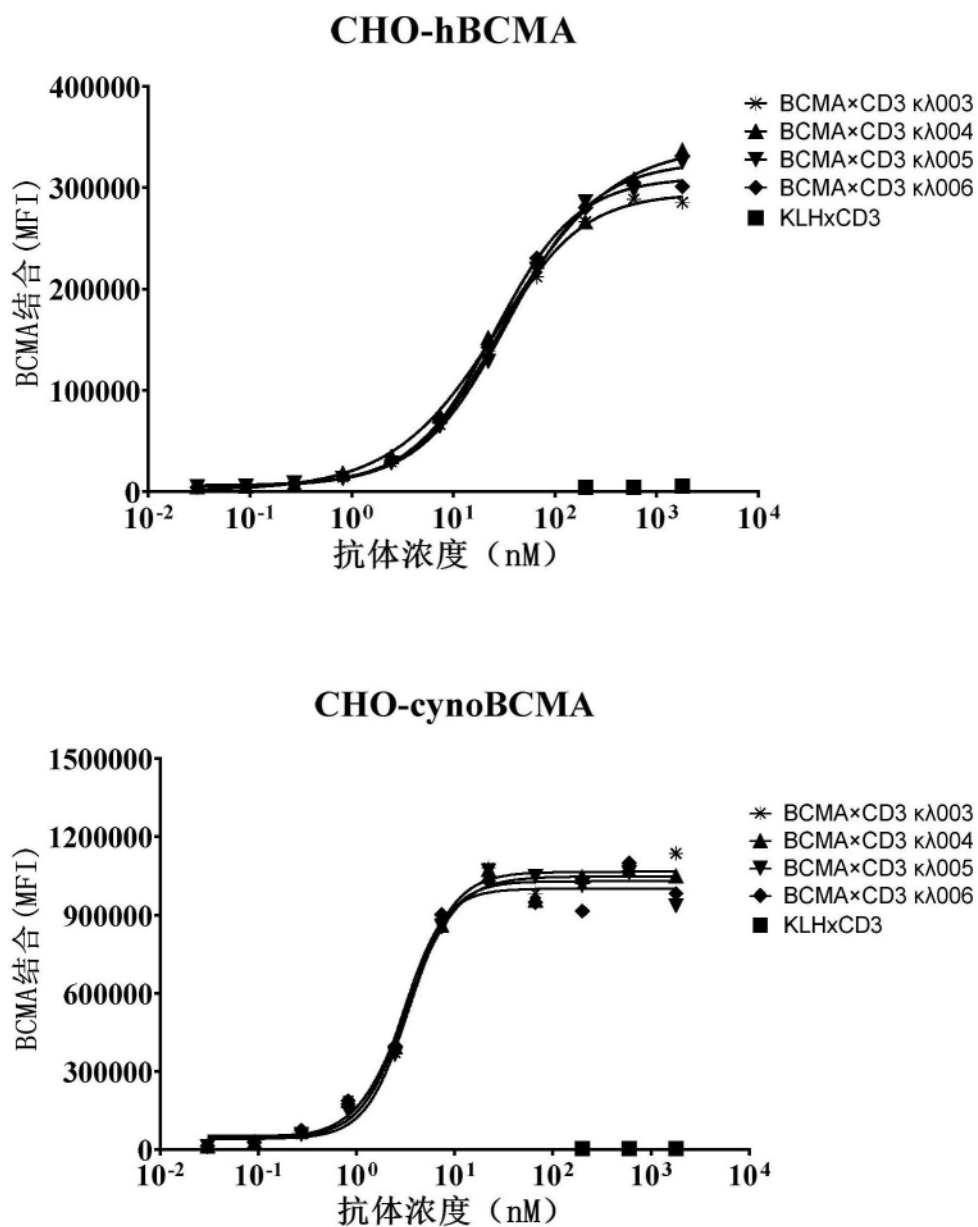


图20

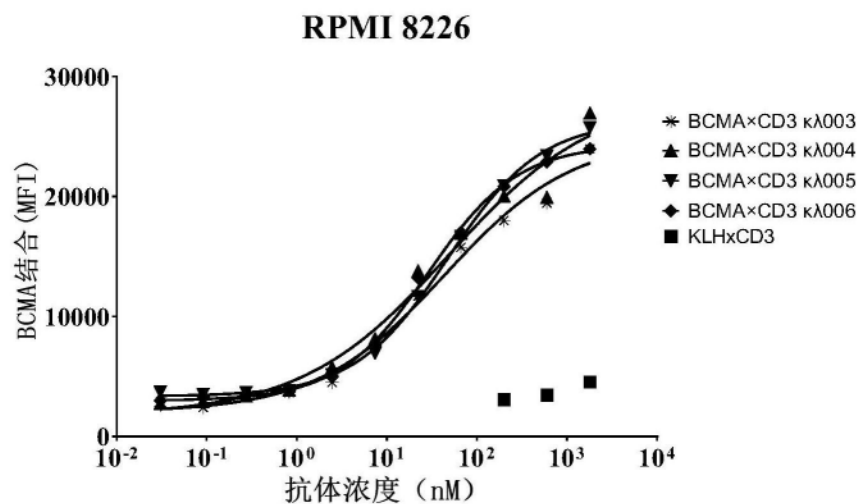
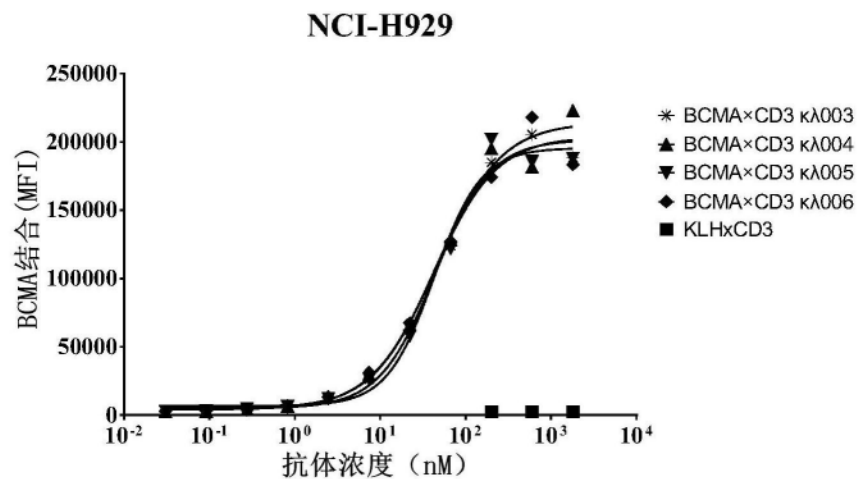


图21

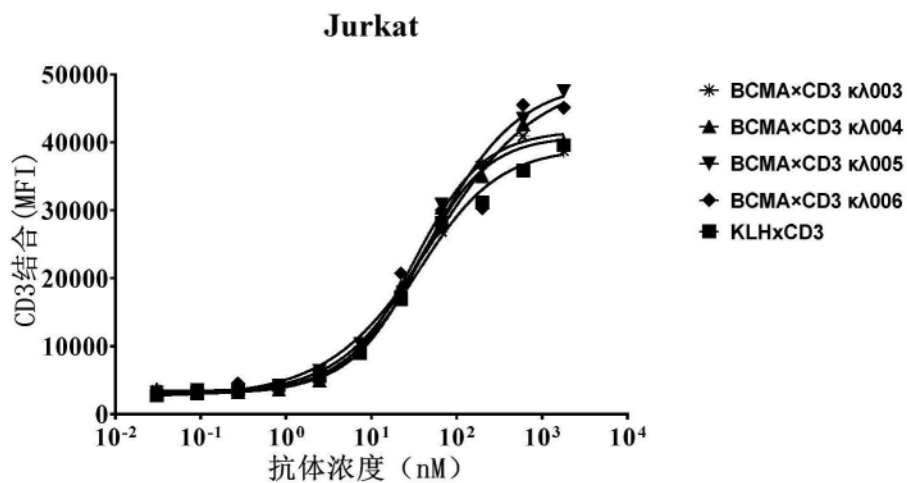


图22

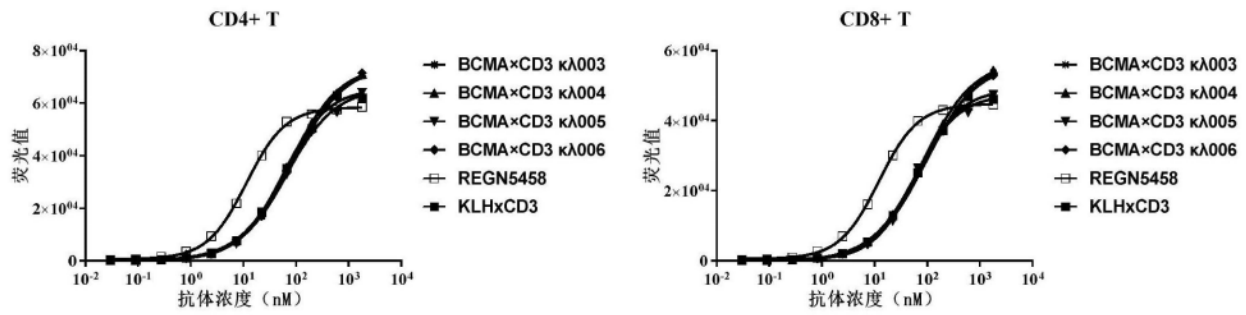


图23

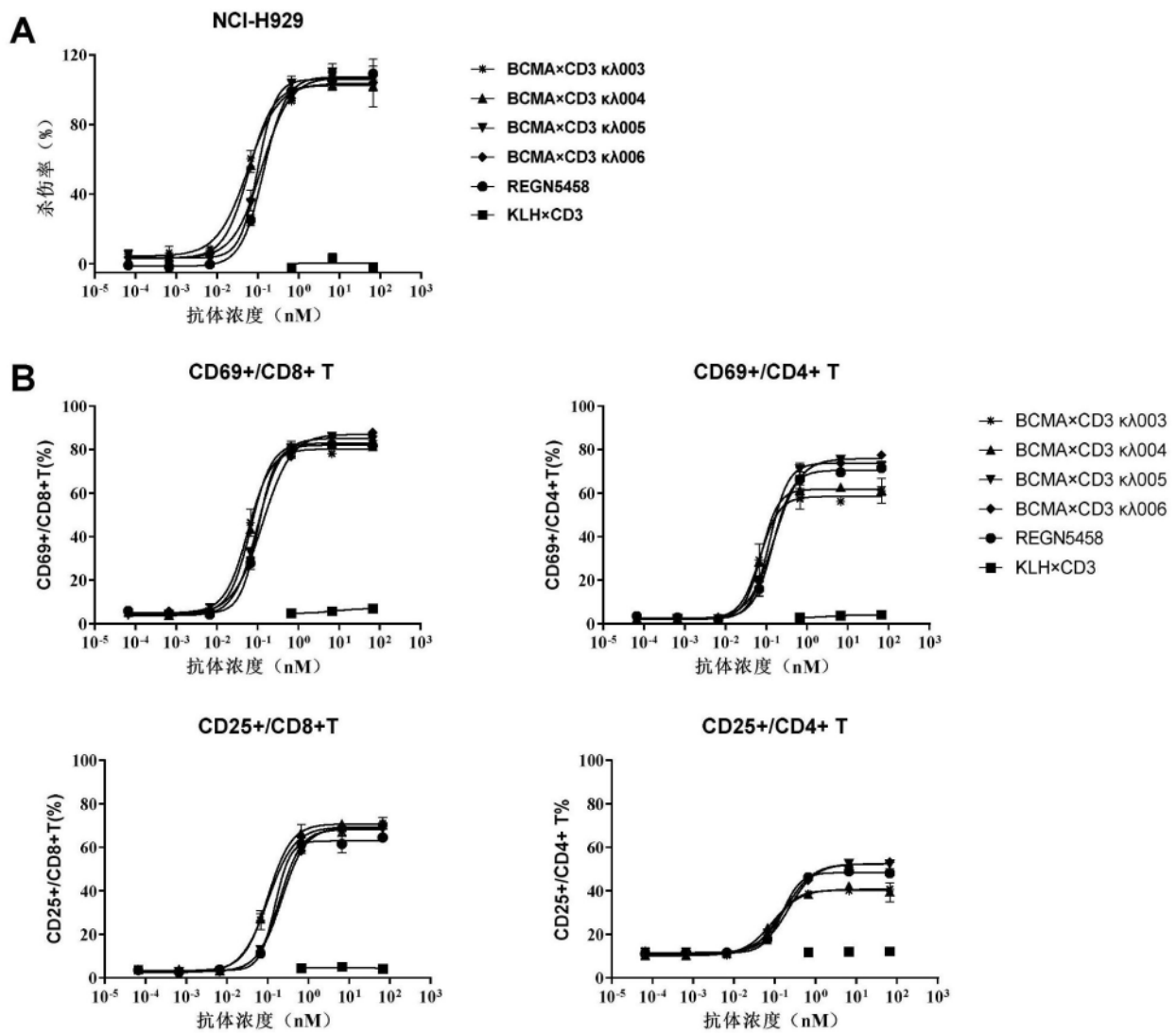


图24

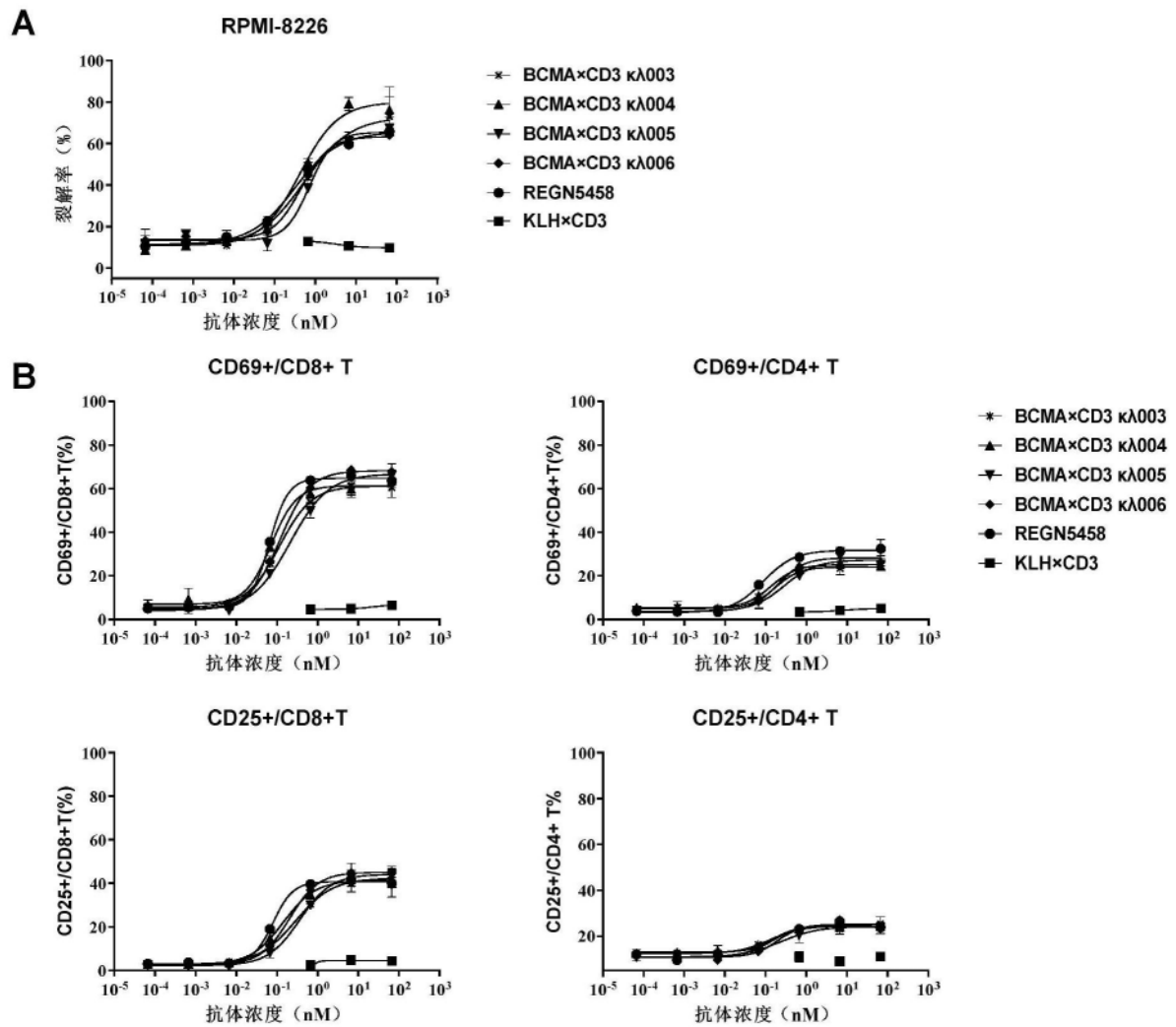


图25

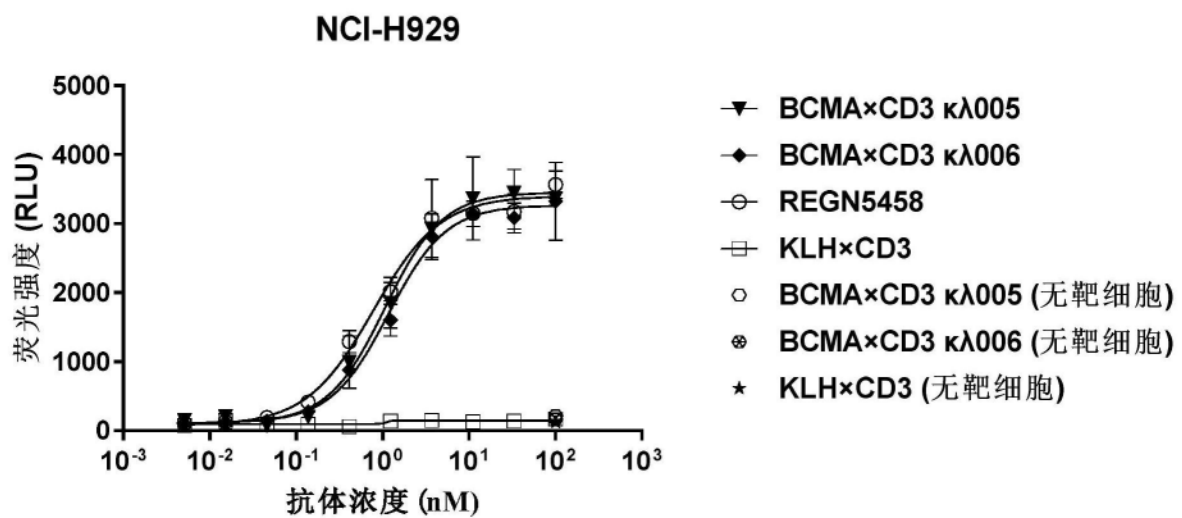


图26

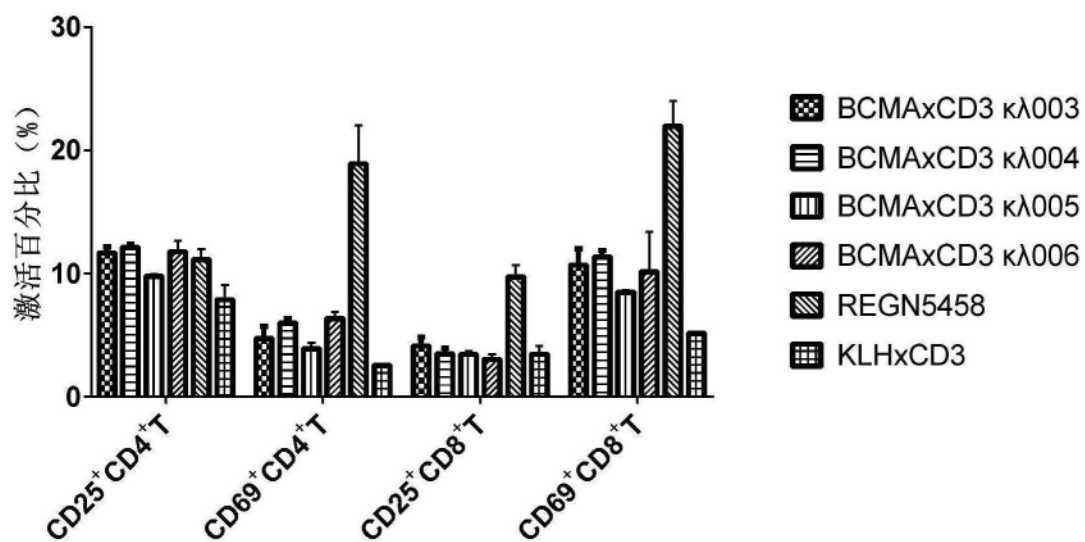


图27

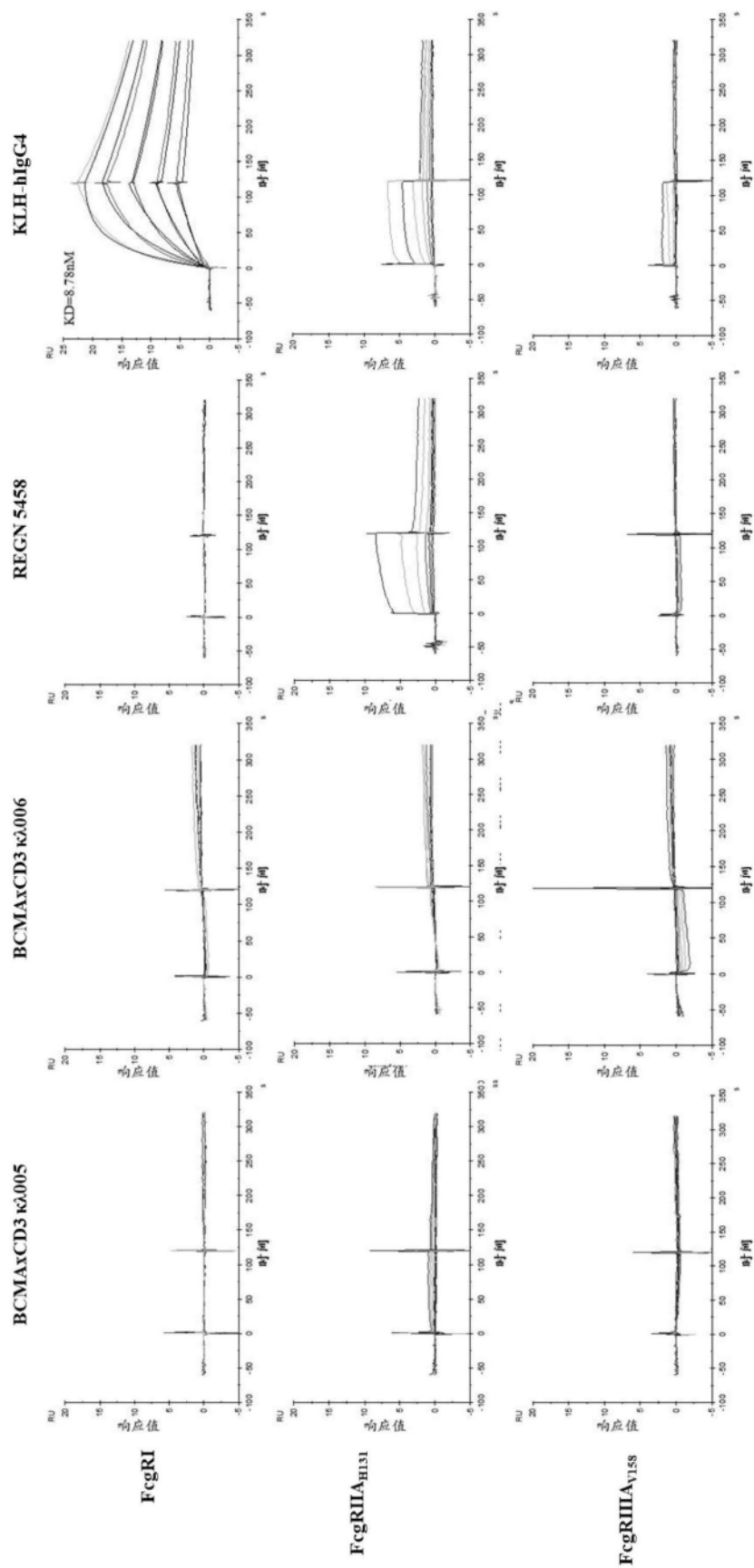


图28

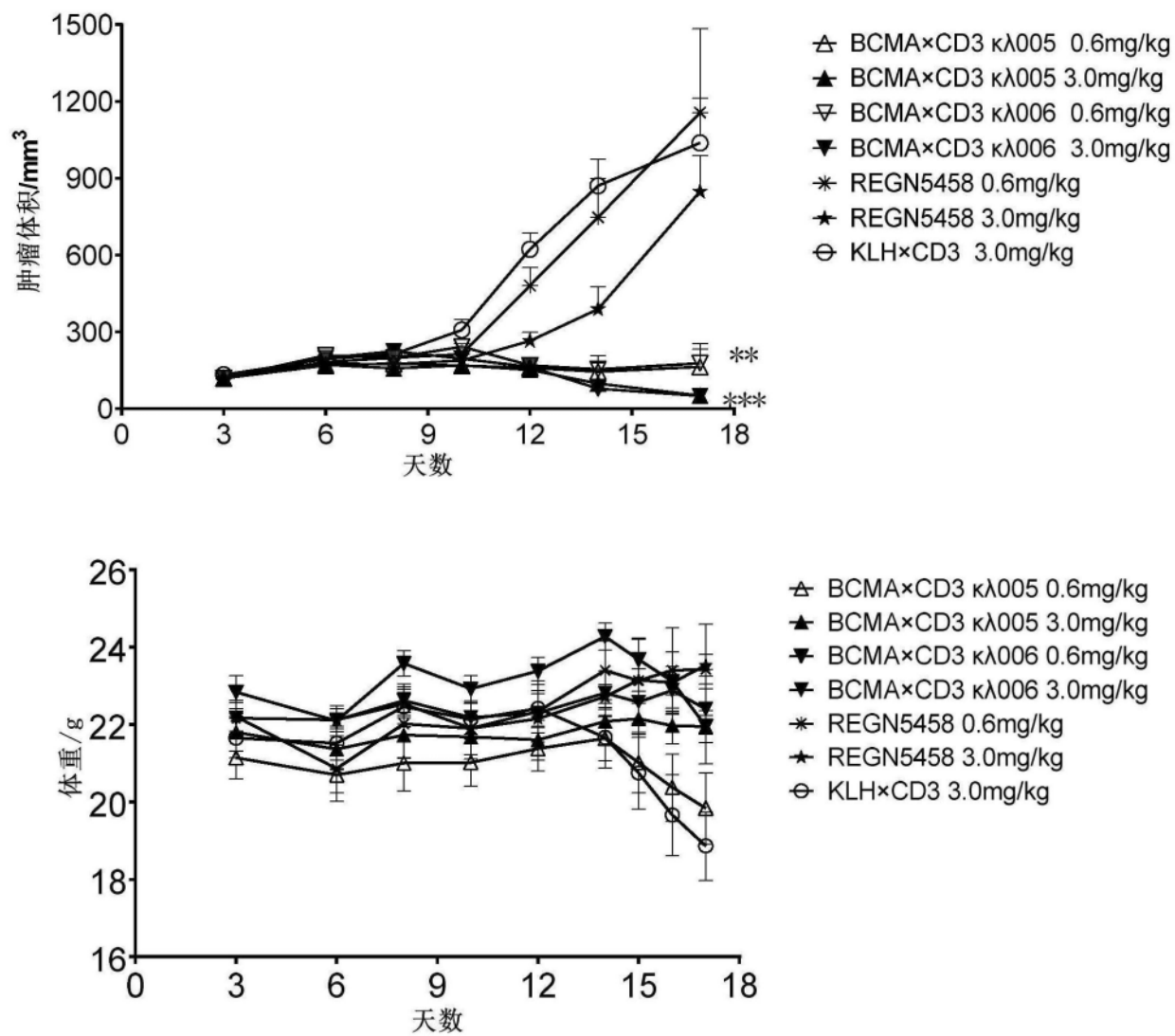


图29

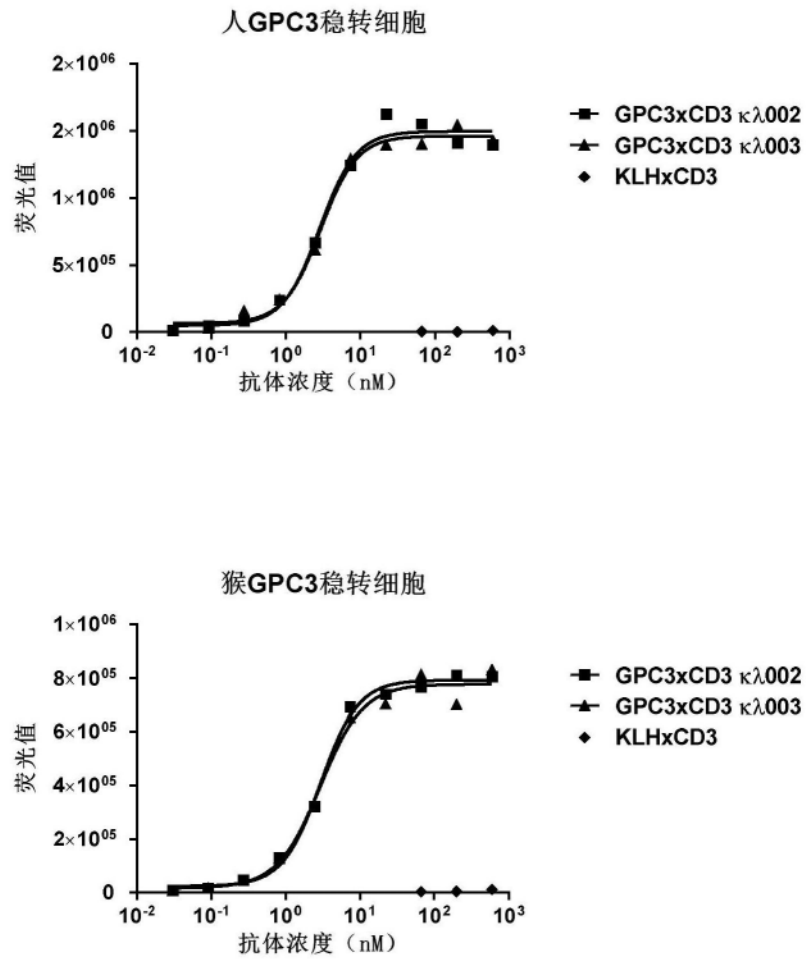


图30

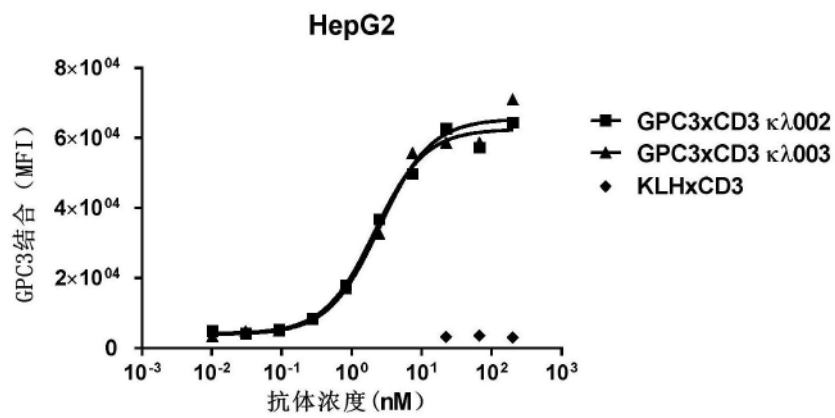


图31

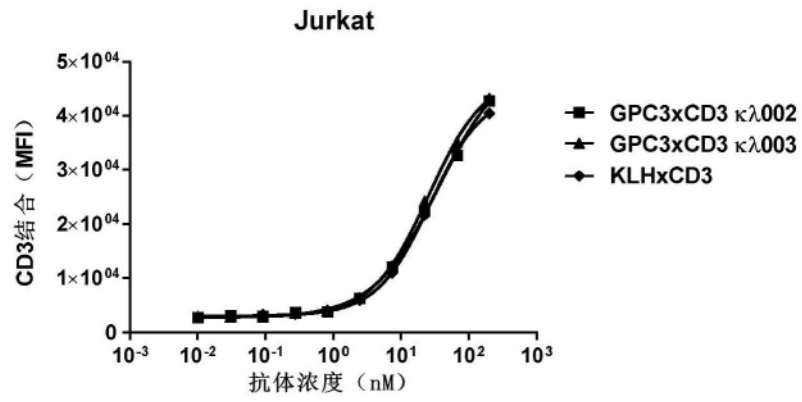


图32

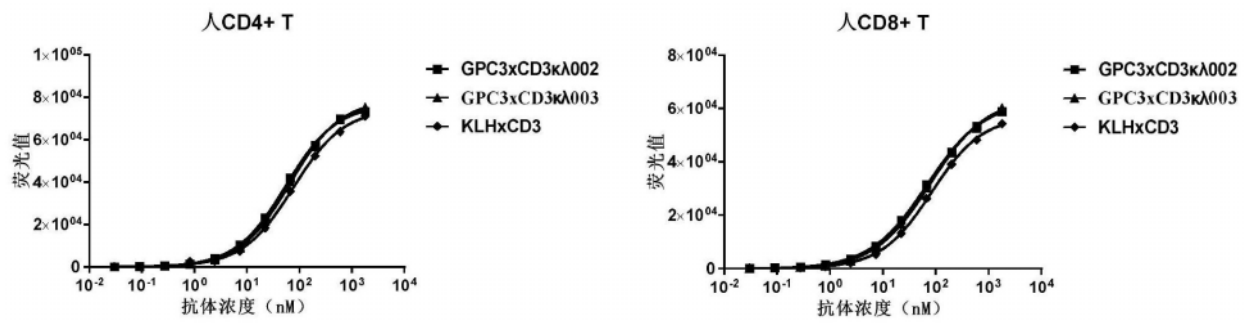


图33

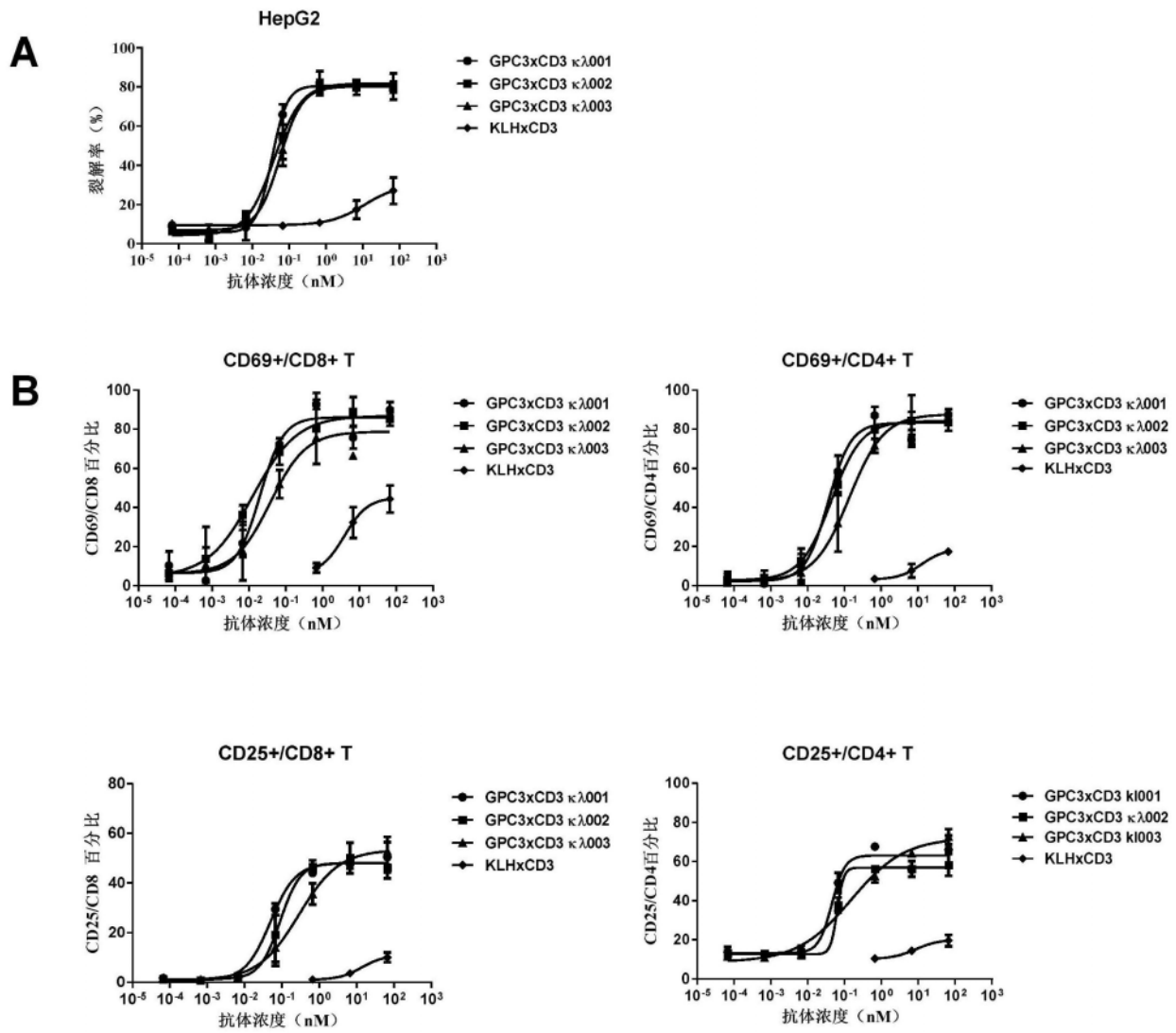


图34

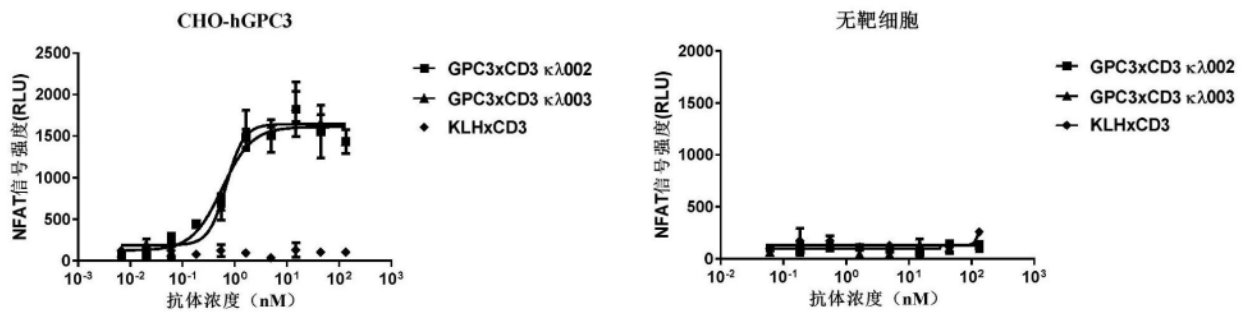


图35

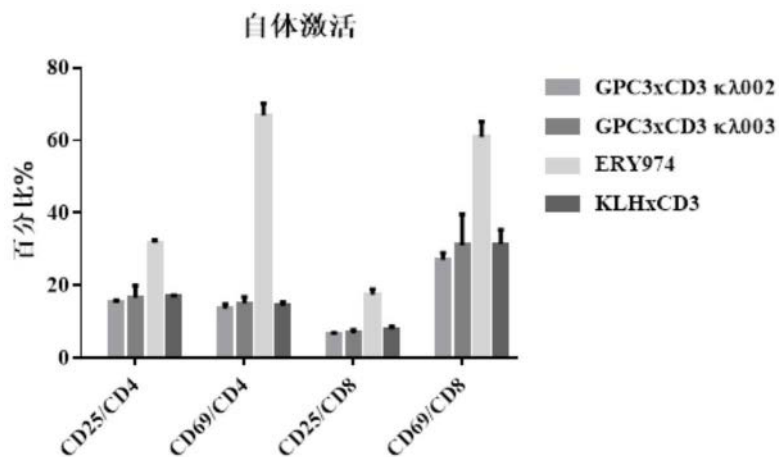


图36

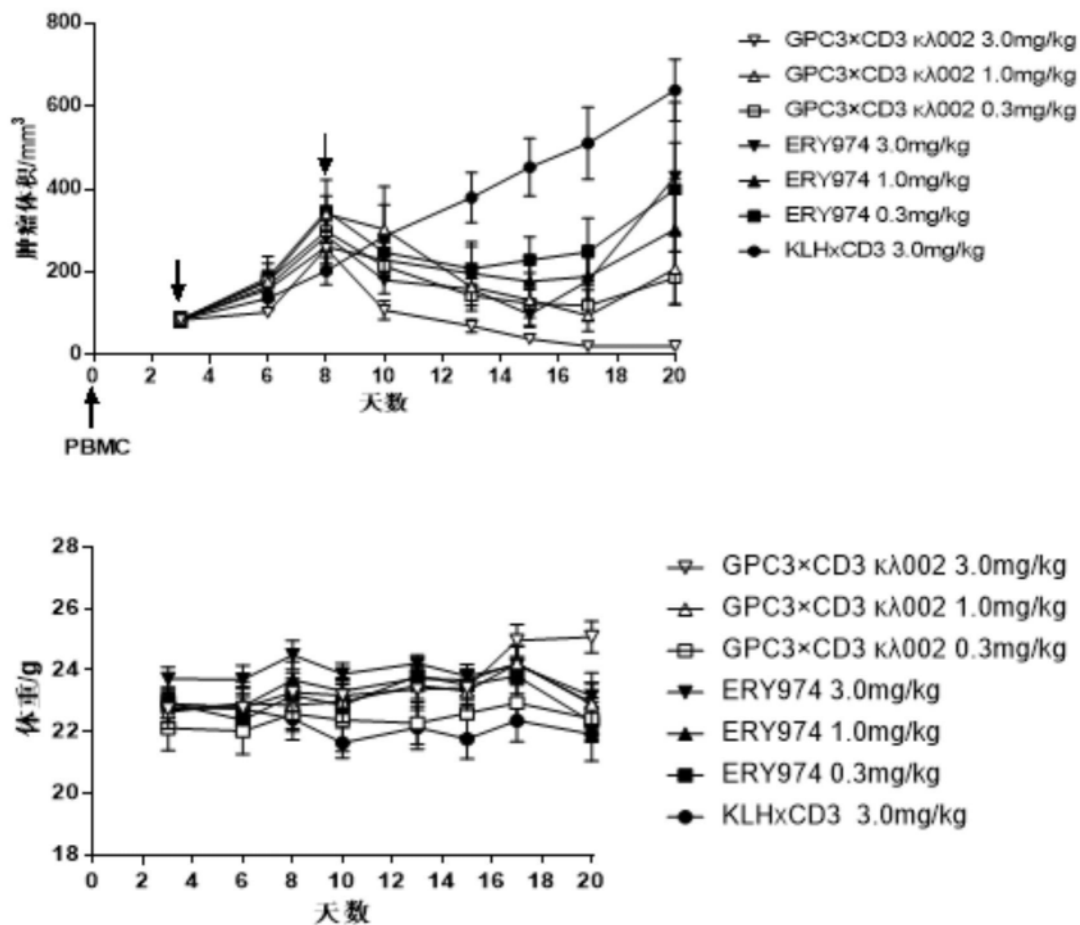


图37

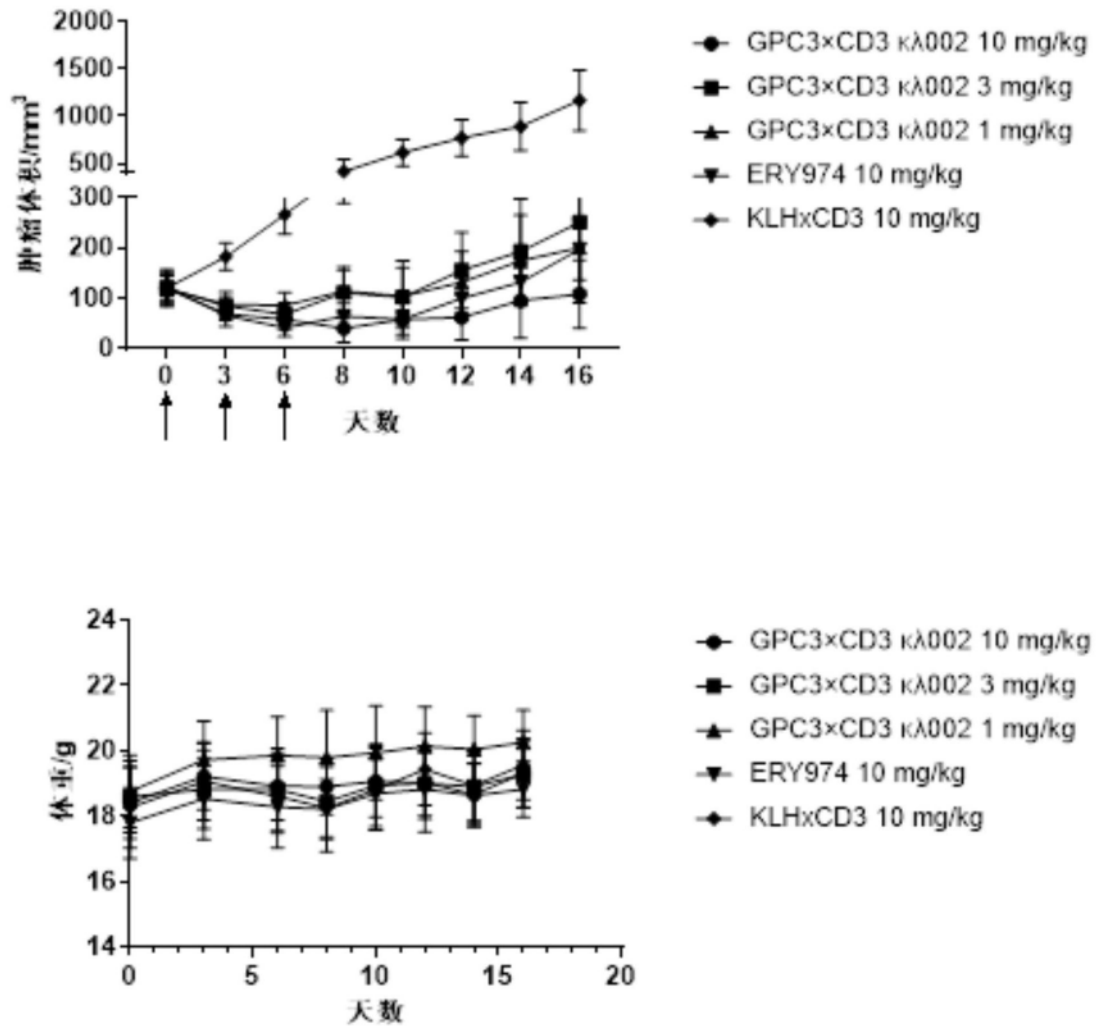


图38