

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97194390.7

C12N 15/62
C12N 15/13 C07K 16/30
C07K 16/46 A61K 47/48
C07K 19/00 C07K 14/705
C12N 9/64 C12N 5/10
C12N 1/21 C12N 5/20

[43]公开日 1999年5月26日

[11]公开号 CN 1217750A

[22]申请日 97.4.29 [21]申请号 97194390.7

[30]优先权

[32]96.5.4 [33]GB [31]9609405.7

[32]97.2.14 [33]GB [31]9703103.3

[86]国际申请 PCT/GB97/01165 97.4.29

[87]国际公布 WO97/42329 英 97.11.13

[85]进入国家阶段日期 98.11.4

[71]申请人 曾尼卡有限公司

地址 英国英格兰伦敦

[72]发明人 C·G·库普莱 M·D·埃德格

S·C·埃梅赖

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 齐曾度

权利要求书 3 页 说明书 165 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 抗 CEA 的单克隆抗体,包括所述抗体的偶联物及其在 ADEPT 系统中的治疗应用

[57]摘要

本发明涉及鼠源的用于癌症诊断和治疗的抗-CEA 单克隆抗体(命名为“8 06.077 抗体”)。该抗体的互补性决定区(CDRs)具有下面的序列:重链:CDR1DNMH、CDR2WIDPENGDT EYAPKFRG、CDR3LIYAGYLAMDY;和轻链;CDR1SASSSVTYM H、CDR2STS NLAS、CDR3QQRSTYPLT。描述了人源化的抗体。该抗体优选是与适于用于 ADEPT 系统的酶,特别是羧肽酶的偶联物形式或与共刺激分子如人 B7.1 细胞外区域的偶联物形式。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 包括互补决定区 (CDRs) 的抗 - CEA 抗体 (“ 806.077 Ab ”), 其中的 CDRs 包括下面的序列:

a) 重链

5 CDR1 DNVMH (SEQ ID NO : 29)
CDR2 WIDPENGDT E YAPKFRG (SEQ ID NO : 31)
CDR3 LIYAGYLAMD Y (SEQ ID NO : 32); 和

b) 轻链

10 CDR1 SASSSVTYMH (SEQ ID NO : 26)
CDR2 STSNLAS (SEQ ID NO : 27)
CDR3 QQRSTYPLT (SEQ ID NO : 28)

2. 根据权利要求 1 的抗体, 其中的重链 CDRs 1 和 3 进一步定义为:

CDR1 FNIKDNVMH (SEQ ID NO : 30); 和
CDR3 HVLIYAGYLAMDY (SEQ ID NO : 33) .

15 3. 根据权利要求 1 的抗体, 其中包括下面的结构任选地为人源化的:

重链可变区序列 (SEQ ID NO : 11) :

20 EVQLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DNVMHWVKQR 40
PEQGLEWIAW IDPENGDT EY APKFRGKATL TADSSNTAY 80
LHLSSLTSED TAVYYCHVLI YAGYLAMDYW GQGTSVAVSS 120

和,

轻链可变区序列 (SEQ ID NO : 9) :

25 DIELTQSPAI MSASPGKVT ITCSASSSVT YMHWFQQKPG 40
TSPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGGTSY SLTISRMEAE 80
DAATYYCQR STYPLTFGAG TKLELKRA 108.

4. 根据权利要求 3 的人源化抗体, 包括至少一种下面的序列:

重链可变区序列 VH1 (SEQ ID NO : 55);

轻链可变区序列 VK4 (SEQ ID NO : 71);

人 CH1 重链 IgG3 恒定区;

30 人 κ 轻链 CL 区; 和

人 IgG3 铰链区;

它们任选为 F(ab')₂ 片段的形式。

5. 包括根据前面任一权利要求的抗体和效应部分的偶联物。

6. 根据权利要求 5 的偶联物, 其中的效应部分选自下面任何一种成分:

- a) 适用于 ADEPT 系统中的酶;
- 5 b) CPG2;
- c) [G251T, D253K] HCPB;
- d) [A248S, G251T, D253K] HCPB;
- e) 共刺激分子;
- f) B7 的细胞外区域;
- 10 g) 人 B7.1 的细胞外区域; 和
- h) 人 B7.2 的细胞外区域;

它们任选为融合蛋白的形式。

7. 根据权利要求 6 的偶联物, 其为选自下面任何一种偶联物的融合蛋白, (序列从 N - 末端到 C - 末端方向列出):

- 15 a) 人源化的 806.077 F(ab')₂ - { [A248S, G251T, D253K] HCPB }₂ 融合, 包括:

结构为 VH1 (SEQ ID NO : 55) /IgG3 CH1 恒定区/IgG3 铰链区的抗体 Fd'链;

- 20 Fd'链通过其 C - 末端融合至 [A248S, G251T, D253K] HCPB N - 末端; 和

通式为 VK4 (SEQ ID NO : 71) /κ 轻链 CL 区的抗体轻链;

- b) { [A248S, G251T, D253K] HCPB }₂ - 人源化 806.077 F(ab')₂ 融合, 包括:

[A248S, G251T, D253K] HCPB;

- 25 HCPB 经其 C - 末端通过(GGGS)₃ 接头融合至结构为 VH1 (SEQ ID NO : 55) /IgG3 CH1 恒定区/IgG3 铰链区的抗体 Fd'链 N - 末端上; 和
- 式 VK4 (SEQ ID NO : 71) /κ 轻链 CL 区域的抗体轻链; 和
- c) (人 B7.1 细胞外区域)₂ - 人源化 806.077 F(ab')₂ 融合, 包括: 人 B7.1 细胞外区域;

- 30 B7.1 在其 C - 末端融合至结构为 VH1 (SEQ ID NO : 55) /IgG3 CH1 恒定区/IgG3 铰链区的抗体 Fd'链 N - 末端上; 和
- 式 VK4 (SEQ ID NO : 71) /κ 轻链 CL 区的抗体轻链。



8. 能够编码在前面任一权利要求中定义的抗体多肽或偶联物的多核苷酸序列。

9. 包括权利要求 8 中定义的多核苷酸的载体。

5 10. 用权利要求 8 中定义的多核苷酸序列转化的宿主细胞或用该宿主细胞形成的转基因非-人动物或转基因植物。

11. 以保藏号 96022936 保藏于 ECACC 的杂交瘤 806.077。

12. 药物组合物，包括在前面任一权利要求中定义的偶联物和药学上可接受的稀释剂或载体，任选适于静脉内用药。

13. 在前面任一权利要求中描述的偶联物用作药剂。

10 14. 制备在前面任一权利要求中定义的抗体或偶联物的方法，包括：

a) 将权利要求 10 中定义的宿主细胞，转基因非-人哺乳动物或转基因植物或权利要求 11 的杂交瘤置于有利于抗体或偶联物表达及任选有利于分泌的环境下；和任选地

15 b) 至少部分纯化该抗体或偶联物。

15. 对有需要的人或动物的治疗方法，包括给人或动物施用药学上有效量的前面任一权利要求中定义的偶联物。

说明书

抗 CEA 的单克隆抗体，包括所述抗体的
偶联物及其在 ADEPT 系统中的治疗应用

5 本发明涉及用于癌症诊断和治疗的新的抗 - CEA 单克隆抗体（本
文命名为“806.077 抗体”或“806.077Ab”）。

已确证正常组织细胞向癌细胞的转化与细胞表面的结构改变有
关。改变的细胞表面可用作抗原并且肿瘤修饰的结构代表一种所谓的肿
瘤相关抗原（见例如肿瘤细胞中改变的糖基化，编. Reading, Hakamori
10 和 Marcus 1988, Arthur R. Liss 出版社）。这种抗原可，例如，通
过用 Kohler 和 Mrlstein 首先描述（自然，256, 495 - 497, 1975）
的现已得到公认的杂交瘤技术产生单特异性抗体而被利用。

一种肿瘤相关的抗原为 CEA（癌胚抗原），其由 Gold 和 Freedman
在实验医学杂志，121, 439, 1965 中首先描述过。该抗原存在于肿
15 瘤细胞表面并且也可存在于血清中。

在癌症治疗中用抗体靶向肿瘤相关抗原的概念已被认识了一段时
间（Herlyn 等., (1980) 癌症研究 40, 717）。抗体可用于将各种化
学和生物药剂定向至肿瘤并且这种偶联物在形成体外和体内诊断的许
多方法的基础中特别成功。在癌症治疗中免疫偶联物的使用也是令人满
20 意的（Lord 等（1985）生物技术趋势 3, 175；Vitetla 等（1987）
科学，238, 1098）。该方法在技术上较诊断应用要求更高并且需要
在这种免疫治疗方法中被定向的肿瘤相关抗原是高度肿瘤特异性的并
且在致命的人组织中不以显著的水平表达。虽然不希望与理论方面以及
具有特异性肿瘤相关组织分布的特性相结合，但对有些应用来说，抗原
25 结合后抗体仍然保留于细胞表面而不迅速内化（internalised）是理想
的。例如在 ADEPT（抗体引导的酶前体药物治疗，见美国专利 4975278
和 5405990）中，认为抗体保留了细胞表面以利于前体药物通过抗体 -
酶偶联物的激活。

抗体偶联物在肿瘤免疫治疗中也有应用。下面几段陈述此种应用的
30 科学背景。为了对免疫刺激应答，T 细胞需要 2 种信号。一种这样的信
号由 T - 细胞受体（TCR）对 MHC 显示肽（displayed pepdides）
的识别所提供。然而已证实仅仅 TCR 刺激没有导致 T - 细胞的反应性

或导致无反应且需要第二种或共刺激信号 (co - stimulatory signal) 刺激特异性 T - 细胞激活和增殖 (Schwartz R. H.综述, 实验医学杂志, 1996, 184, 1 - 8)。当接收到两种信号时, 得到的细胞毒性 T - 细胞通过杀死靶细胞而介导免疫反应。已鉴定出许多潜在的共刺激分子(如 B7、ICAMs、LFA - 1 和 3、CD40、CD70 和 CD24, Galea - Lauri J 等综述, 癌症基因治疗, 1996, 3, 202 - 213)。主要的共刺激功能似乎由可与两种受体 CD28 和 CTLA - 4 相互作用的相关分子 B7.1 (也称为 CD80) 和 B7.2 (也称为 CD86) 提供 (Hellstrom K. E.等, 免疫学综述, 1995, 145, 123 - 145 和 Lenschow D. J. 等, 免疫学年鉴, 1996, 14, 233 - 258)。B7.1 和 B7.2 在抗原呈递细胞 (APC) 如树突细胞中表达而 CD28 和 CTLA - 4 存在于 T - 细胞。B7.2 在 APCs 表面似乎是组成性表达但与 T - 细胞接触后, B7.1 的表达受到上调。类似地, CD28 在 T - 细胞中表面但激活后受到下调并且由 CTLA - 4 的表达所替代。由 B7.1 和 B7.2 对 CD28 和 CTLA - 4 的刺激代表了信号处理的复杂模式, 其不仅控制 T - 细胞的激活, 而且随后控制增殖以调节免疫反应 (Greene J.等., 生物化学杂志, 1996, 271, 26762 - 26771)。该现象可省解释由研究这些共 - 刺激分子的研究人员所报导的相互矛盾的数据。

在癌症中, 肿瘤浸润的淋巴细胞已被鉴定但对肿瘤免疫反应的缺乏可能是由于 T - 细胞的无反应性。肿瘤细胞在其表面可显示特异性或选择性的抗原但缺乏 B7.1/B7.2 使它们逃避了免疫监视。的确, 体内实验已证实 B7.1/B7.2 转染的肿瘤细胞较相同细胞系未转染的细胞具有较少的致瘤性并且转染的细胞能够诱导对亲代细胞重新攻击的保护性免疫性 (Townsend S. E.和 Allison J. P., 1993, 科学, 259, 368 - 370)。这证明一旦被刺激, 免疫应答可变为是 B7.1/B7.2 非依赖性的。Hellstrom 提议通过基因治疗在肿瘤细胞中表达 B7.1/B7.2 具有刺激可降低或排除疾病的宿主免疫应答的可能性。Gejewski (免疫学杂志, 1996, 156, 465 - 472) 和 Matulonis 等(免疫学杂志, 1996, 156, 1126 - 1131) 已报导 B7.1 在 T - 细胞激活中优于 B7.2。已有报导在溶液中 B7.1 (与抗体恒定区融合) 的使用仅对通过独立来源而接受 TCR 刺激的 T - 细胞提供较少的共 - 刺激 (Linsley P. S. 等实验医学杂志, 1991, 173, 721 - 730)。

需要有进一步改善的用于癌症诊断和治疗的抗 - CEA 抗体。

本发明基于发现一种本文称为 806.077 抗体的新的抗 - CEA 抗体。

5 根据本发明的一个方面，提供了包括互补性决定区（CDRs）的抗 - CEA 抗体，其中的 CDRs 具有下面的序列：

a) 重链

CDR1 DNYMH (SEQ ID NO : 29)

CDR2 WIDPENGDT E YAPKFRG (SEQ ID NO : 31)

CDR3 LIYAGYLAMD Y (SEQ ID NO : 32) ;

10 b) 轻链

CDR1 SASSSVTYMH (SEQ ID NO : 26)

CDR2 STSNLAS (SEQ ID NO : 27)

CDR3 QQRSTYPLT (SEQ ID NO : 28) 。

CDRs 或互补性决定区为认为在决定抗原抗体相互作用的特异性中
15 至关重要的抗体可变区中高度可变环中的序列（Kabat, E. A., Lu, T. T.,
Reid - Miller, M., Perry, H. M. 和 Gottesman, K. S. (1987)。免疫学感
兴趣蛋白的序列。第 4 版。华盛顿特区：美国卫生和人类服务部；读者
也可参考该文献中 Kabat 抗体残基编号的细节）。然而，本文所定义的
CDRs 包括其促进结合的框架残基。对于 806.077 抗体来说，通过与其
20 它鼠抗体高度可变序列的类比而测定其 CDRs。在该说明书中，术语
“VK”和“VH”分别指抗体轻链和重链的可变区。抗体分子的解剖
学已由 Padlan (1994) 在分子免疫学 31, 169 - 217 中综述过。

轻链 CDRs 为：

VK CDR1 Kabat 残基, 包括位点第 24 - 34: SASSSVTYMH (SEQ
25 ID NO : 26) ;

VK CDR2 Kabat 残基, 包括位点第 50 - 56: STSNLAS (SEQ ID
NO : 27) ;

VK CDR3 Kabat 残基, 包括位点第 89 - 97: QQRSTYPLT (SEQ
ID NO : 28) ;

30 重链 CDRs 为：

VH CDR1 Kabat 残基, 包括位点第 31 - 35B: DNYMH (SEQ ID
NO : 29) ; 优选的 VH CDR1 kabat 残基为包括位点第 27 - 35B ,

FNIKDNYMH (SEQ ID NO:30);

VH CDR2 Kabat 残基, 包括位点第 50 - 65 : WIDPENGDT
YAPKFTG (SEQ ID NO:31);

VH CDR3 Kabat 残基, 包括位点第 95 - 102: LIYAGYLAMD Y
5 (SEQ ID NO:32); 并且优选的 VH CDR3 kabat 残基包括位
点第 93 - 102, HVLIIYAGYLAMDY (SEQ ID NO:33)。

对 CEA 抗原优选的结合亲和性为至少 $10E-5M$, 对 CEA 更优选的
结合亲和性至少为 $10E-6M$, 对 CEA 更优选的结合亲和性为至少 $10E-7M$,
10 对 CEA 的更优选的结合亲和性为至少 $10E-7M$, 对 CEA 的更为
优选的结合亲和性为至少 $10E-9M$, 对 CEA 更为优选的结合亲和性为
至少 $10E-10M$ 且特别优选的对 CEA 的结合亲和性至少为 $10E-10M$ 。

本文使用的术语“抗体”一般意为免疫球蛋白分子(或其片段或其
修饰的抗体构建体如保持特异性 CEA 抗原结合的 scFv)。CDRs 主要
负责抗原结合, 虽然非 - CDR 蛋白序列一般源自免疫球蛋白但可源自
15 免疫球蛋白超家族成员的免疫球蛋白区域。

根据本发明的另一方面, 提供了包括下面结构任选人源化的 CEA
抗体:

重链可变区序列 (SEQ ID NO:11):

EVQLQQSGAE LVRSGASVKL SCTASGFNIK DNYMHWVKQR 40
20 PEQGLEWIAW IDPENGDT EY APKFRGKATL TADSSSNTAY 80
LHLSLTS E D TAVYYCHVLI YAGYLAMDYW GQGTSVAVSS 120

和;

轻链可变区序列 (SEQ ID NO:9):

DIELTQSPAI MSASPGEKVT ITCSASSSVT YMHWFQQKPG 40
25 TSPKLWIYST SNLASGVPAR FSGSGSGT SY SLTISRMEAE 80
DAATYYCQR STYPLTFGAG TKLELKRA 108;

或其任何一种下面的构建体:

$F(ab')_2$; $F(ab')$, Fab, Fv, 单链 Fv 及 V - min。

$F(ab')_2$ 片段是优选的。可以考虑保留有 806.077 抗体结合特征的任
30 何合适的抗体片段。例如, 最近描述的抗体片段为由 Zapata (1995)
在蛋白质工程, 8, 1057 - 1062 中描述的“L - $F(ab)_2$ ”。也可考虑
二硫键结合的 Fvs。任选地该抗体形成下述偶联物的一部分。

优选人源化的抗体包括至少一种下面的序列：
重链可变区序列， VH1 (SEQ ID NO : 55) ；
轻链可变区序列， VK4 (SEQ ID NO : 71) ；
人 CH1 重链 IgG3 恒定区；
5 人κ 轻链 CL 区； 和
人 IgG3 铰链区；
任选为 F(ab')₂ 片段的形式。

根据本发明的另一方面提供了能够编码本发明 CEA 抗体重链或轻链可变区的多核苷酸序列。优选该重链或轻链可变区融合（任选通过一些连接序列）至编码蛋白效应部分（作为偶联物的一部分，见下文）的基因上，优选融合经过抗体重链。一般地，融合可以在抗体链的 N 或 C 末端进行。对于 B7 偶联物来说，在抗体链 N - 末端的融合是优选的。

CPB 具有 N - 末端区域原（ pro domain ），认为该区域原在被去除而释放活性酶之前可帮助纠正蛋白的折叠。如果前 CPB 在其 C - 末端融合至抗体链的 N - 末端上，那么这允许区域原从融合构建体的 N - 末端去除（如，通过胰蛋白酶处理）。或者，如果前 CPB 附着到抗体链的 C - 末端时，则产生了不得不从该构建体“中部”去除区域原而不破坏该融合蛋白的问题。解决方案是单独共表达该区域原（反向）。一旦细胞系已被建立时，这具有无需胰蛋白酶激活表达的融合蛋白以去除 CPB 区域原的优势。前 CPB 在其 C - 末端融合至抗体链 N - 末端的构建体具有无需构建其表达细胞系的优势，后者需要区域原与其它蛋白一起高水平的表达。

在该说明书中，考虑到了特异性氨基酸序列的保守氨基酸类似物，它们保留本发明 CEA 抗体的结合特性但序列中有一个或更多个保守氨基酸替代、缺失或添加的不同。然而特异性列出的氨基酸序列是优选的。典型的保守氨基酸替代列表如下：
保守替代

	原始的	典型替代	优选替代
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
5	Asp (D)	Glu	Glu
	Cys (C)	Ser	Ser
	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
	Gly (G)	Pro	Pro
10	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
15	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala	Leu
	Pro (P)	Gly	Gly
	Ser (S)	Thr	Thr
20	Thr (T)	Ser	Ser
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

25 在该说明书中考虑到了特异保留核酸序列的核酸变异（缺失、替代和添加），该变异保留在严格的条件下与本文讨论的特定序列杂交的能力。杂交测试在后面的实施例 9 中列出。然而特异性列出的核酸序列是优选的。认为肽核酸可以是多核苷酸序列可接受的等价物，至少是为了无需翻译成蛋白的目的（Wittung（1994）自然 368, 561）。

30 根据本发明的另一方面提供了本文所述的特征在于人源化了的抗体或抗体片段。

人源化的抗体、相关的片段或抗体结合结构为主要由在抗原结合位点（互补决定区或 CDRs；该技术称为 CDR 嫁接，其通常地包括一些

框架改变，见下面的实施例）中或其周围支持非人源氨基酸序列的人源免疫球蛋白序列的结构框架所组成的多肽。虽然也考虑过其它的人源化方法如抗体的表面残基镶盖（antibody veneering）（EP 519596，Meck/NIH, Padlan 等），但合适的方法学如下文献中有详细描述，例如
5 WO 91/09967，EP 0328404 和 Queen 等，美国自然科学院院报 86，10029，Mountain 和 Adair（1989）生物技术和遗传工程综述 10，1（1992）。优选人源化的 806.077 抗体为实施例 11 - 47 或 107 - 22 中任何一种抗体。优选人源化的重链可变区为 VH1（见实施例）。优选的轻链可变区为任选掺入有任何一种实施例 107 - 109 中所述其它的变化
10 的 VK4。优选的人重链恒定区为 IgG3。

嵌合的人源化抗体代表本发明的另一方面。抗体 806.077 抗体嵌合人源化抗体片段的制备描述于本文的实施例 8 中。嵌合抗体一般通过一物种的可变区与不同物种的另一种抗体的恒定区连接而构建。

本文使用的关于抗体的术语“人源化”（humanised）包括任何一种人源化方法例如 CDR 嫁接或嵌合抗体的制备或其任何一种杂合体例如嫁接 CDR 的重链与嵌合的轻链连接（见实施例 110 中合适的实施方案）。

特别地，在人体内单独或作为偶联物而重复施用的啮齿类抗体将导致受体中抗啮齿类抗体的免疫应答，所谓的 HAMA 应答（人抗小鼠抗体）。如果需要重复的剂量，HAMA 应答可限制药物的有效性。通过用亲水聚合物如聚乙二醇对抗体进行化学修饰或通过用遗传工程的方法使抗体结合结构更象人类抗体的结构可降低抗体的免疫原性。例如，结合 CEA 啮齿类抗体可变区的基因序列可由人杂交瘤蛋白的可变区所替代，因而产生了重组的嵌合抗体。这些方法详细描述于 EP 194276、
25 EP 0120694、EP 0125023、EP 0171496、EP 0173494 和 WO 86/01533。或者可分离或合成结合 CEA 啮齿类抗体 CDRs 的基因序列并以同源的人抗体基因相应的序列替代，产生具有原始啮齿类抗体特异性的人抗体。这些方法描述于 EP 023940、WO 09/07861 和 WO 91/09967 中。或者，啮齿类抗体可变区大量的表面残基可变成同源的人
30 抗体中常见的残基，产生具有表面残基“镶盖”且将因此自身由人体所识别的啮齿类抗体。该方法已由 Padlan 等（1991）在分子免疫学，28，489 中所证实。

根据本发明的另一方面提供了从多核苷酸序列转化的宿主细胞或从其中的多核苷酸序列编码本文所述任选偶联物形式的至少本发明 CEA 抗体重链或轻链可变区的宿主细胞形成的转基因非人动物或转基因植物。

5 根据本发明的另一方面，提供了杂交瘤 806.077，保藏于 ECACC，保藏号为 96022936 及其变异的细胞系。

杂交瘤 806.077 抗体已于 1996 年 2 月 29 日根据布达佩斯条约以登记号 96022936 保藏于欧洲动物细胞保藏中心（ECACC），应用微生物和研究 PHLS 中心，Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP40JG, 英国。
10

根据本发明的另一方面，提供了保藏于 NCIMB 且保藏号为 40798 的质粒 pNG3 - Vkss - HuCk。

质粒 pNG3 - Vkss - HuCk 已于 1996 年 4 月 11 日根据布达佩斯条约以保藏参考号 NCIMB 40798 保藏于国立工业和海洋微生物保藏有限公司（NCIMB），23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, 苏格兰，英国。
15

根据本发明的另一方面提供了保藏于 NCIMB 中且保藏号为 40797 的质粒 pNG4 - VHss - HuIgG2CH1'。

质粒 pNG4 - VHss - HuIgG2CH1' 已于 1996 年 4 月 11 日根据布达佩斯条约以保藏参考号 NCIMB 40797 保藏于国立工业和海洋微生物保藏有限公司（NCIMB），23 St Machar Drive Aberdeen AB2 1RY, 苏格兰，英国。
20

根据本发明的另一方面提供了保藏于 NCIMB 且保藏号为 40799 的质粒 pNG3 - Vkss - HuCk-NEO。

质粒 pNG3 - Vkss - HuCk - NEO 已于 1996 年 4 月 11 日根据布达佩斯条约以保藏参考号 NCIMB 40797 保藏于国立工业和海洋微生物保藏有限公司（NCIMB），23 St Machar Drive Aberdeen AB2 1RY, 苏格兰，英国。
25

根据本发明的另一方面提供了制备至少本文定义的抗 - CEA 抗体重链或轻链的可变区的方法，包括：
30

a) 以编码至少抗 - CEA 抗体重链或轻链可变区的多核苷酸序列转化宿主细胞并任选将转化的宿主细胞开发成转基因的非 - 人哺乳动物或植

物;

b) 将宿主细胞、转基因非-人哺乳动物或转基因植物置于利于至少可变区表达且任选分泌的条件下并任选;

c) 至少部分可变区。

5 根据本发明的另一个方面, 提供了制备本文定义的抗体或偶联物的方法, 包括:

a) 将本文定义的宿主细胞、转基因非-人哺乳动物或转基因植物或 806.077 杂交瘤置于利于抗体或偶联物表达和任选分泌的条件下; 并且任选地

10 b) 至少部分纯化抗体或偶联物。

优选地, 重链和轻链可变区均在相同的细胞中表达和装配从而形成抗-CEA 抗体。优选地, 该重链和轻链可变区融合(任选地经过一些连接序列)至编码蛋白效应部分(作为偶联物的一部分, 见下文)的基因上, 优选融合是经过抗体重链。一般地, 融合可以在抗体链的 N 或 C 15 末端进行。对于 B7 偶联物来说, 在抗体链 N-末端的融合是优选的。CPB 具有 N-末端区域原, 该区域被认为在去除区域原以释放活性酶之前帮助校正蛋白的折叠。如果前体 CPB 在其 C-末端融合至抗体链的 N-末端, 那么这允许从融合构建体的 N-末端去除区域原(如通过胰蛋白酶处理)。或者, 如果前体 CPB 附着到抗体链的 C-末端, 20 那么产生了不得不从该构建体“中部”去除区域原而不破坏融合蛋白的问题。解决方案是单独共表达区域原(反向)。一旦建立细胞系, 这具有无需胰蛋白酶激活表达的融合蛋白以去除 CPB 区域原的优势。用前 CPB 在其 C-末端融合至抗体链 N-末端的构建体具有无需构建需要同时高水平表达区域原和其它蛋白的共表达细胞系的优势。

25 根据本发明的另一方面, 提供了制备单克隆抗体 806.077 的方法, 包括:

a) 在培养基中利于抗体在其中表达的条件下培养在 ECACC 中保藏号为 96022936 的杂交瘤 806.077 抗体和;

b) 从该培养基中获取抗体 806.077 抗体和任选地;

30 c) 通过酶消化制备抗体 806.077 的抗体 F(ab')₂ 片段。

根据本发明的另一方面, 提供了包括效应部分(effector moiety)的偶联物和本文所述的本发明抗 CEA 806.077 抗体。效应部分是这样的

一个整体，即具有在形成偶联物中赋予 806.077 抗体另一种活性（如，酶、毒物或放射性配体）的效应的部分。

5 在一个实施方案中，优选地，该效应部分为适合用于 ADEPT 系统中的酶。在 96 年 7 月 4 日公开的国际专利申请 WO 96/20011 中，我们提出了一种“反极性”（reversed polarity）的 ADEPT 系统，其基于与例如，细菌酶相比具有低免疫原性优势的突变的人的酶。特别的宿主酶为人胰 CPB（见例如，实施例 15 [D253K] 人 CPB 和其中的 16 [D253R] 人 CPB）和其前体药物（见其中的实施例 18 和 19）。将宿主酶突变以得到在底物识别方面与天然宿主酶相比在酶和前体药物相互作用的模式发生变化。在我们随后的国际专利申请 No PCT/GB 10 96/01975（97 年 3 月 6 日公开为 WO 97/07796）中，描述了关于用于 ADEPT 突变的 CPB 酶/前体药物结合的工作。适于 ADEPT 的优选酶为任何一种 CPG2 或反极性 CPB 酶，例如 [D253K] HCPB、[G251T, D253K] HCPB 或 [A248S, G251T, D253K] HCPB 中的任何一种。 15 种。

806.077 抗体偶联物在肿瘤免疫治疗中也有应用。因此，在另一个优选的实施方案中，偶联物效应部分为共刺激分子，优选该共刺激分子为 B7，更优选为 B7.1 或 B7.2 且特别优选为人 B7.1。优选该偶联物为融合蛋白的形式，优选其中的融合蛋白经共刺激分子的 C - 末端与 20 806.077 抗体缺乏 Fc 抗体区域，更优选缺乏 F(ab')₂ 抗体片段，更优选抗体为人源化或人的抗体。特别优选的偶联物描述于下面实施例 104 中。

预计使用抗体将共刺激分子定向运输至肿瘤细胞具有将抗原呈递给肿瘤细胞的功能从而使 T - 细胞接受肿瘤细胞本身的特异性 TCT 刺激和抗体定向运输分子的共 - 刺激信号。人或人源化抗体的使用优选用于治疗人类肿瘤因为当用于人时鼠抗体可诱发这样的免疫反应，即当重 25 复治时其可导致反应性的下降。肿瘤抗原结合区域与共刺激分子细胞外部分连接的融合蛋白的使用是新奇的。Hayden 等(组织抗原, 1996, 48, 242 - 254)报导了抗 - 肿瘤抗原结合区与抗 - CD28 结合区相连接的双特异性抗体分子的使用。尽管该分子能够与 T - 细胞上的 CD28 30 相互作用，但其可运送信号具有与天然 CD28 配体提供的信号具有质的不同的劣势，例如，其结合亲和性大于 B7.1 和 CD28 之间的亲和性。B7.1、B7.2 和 CD28、CTLA - 4 之间的种间同源性表明结合区序列

的进化保守性。因此，认为，例如人的 B7.1 可小鼠的 CD28 相互作用并可传导类似的共 - 刺激信号。对于人类疾病的治疗，人或人源化的蛋白是优选的。然而，在动物模型中人或人源化的蛋白的使用可产生与在人中预期的类似的效应，并且这种动物模型应该提供有关在人类疾病治疗中

5 人/人源化抗体与人 B7.1/B7.2 融合蛋白效应的数据。

效应部分和抗体的结合可以通过任何合适的方法，例如，通过异源双功能性 (heterokifunctional) 接头的化学键或重组基因融合技术。一般地，融合蛋白为优选的偶联物，特别是与 HCPB 或 B7 的偶联物。

10 优选的偶联物为其中的效应部分选自以下任何一种组分的偶联物：

- a) 适合用于 ADEPT 系统的酶；
 - b) CTG2 ；
 - c) [G251T , D253K] HCPB ；
 - d) [A248S , G251T , D253K] HCPB ；
 - 15 e) 共刺激分子；
 - f) B7 的细胞外区域；
 - g) 人 B7.1 的细胞外区域； 和
 - h) 人 B7.2 的细胞外区域；
- 它们任选以融合蛋白的形式。

20 应该理解本发明的偶联物不一定由一个效应部分和一个抗体分子所组成。例如，此偶联物可包括每个抗体分子一个以上的效应分子。一般地，抗体与酶或 B7 细胞外区域融合的 F(ab')₂ 抗体偶联物将具有每摩尔抗体 2 摩尔的酶或 B7。

25 特别优选的偶联物为选自以下任何一种偶联物的融合蛋白 (序列从 N 末端向 C 末端方向列出) ：

- a) 人源化的 806.077F(ab')₂ - { [A248S , G251T , D253K] HCPB }₂ 融合, 包括: 结构为 VH1 (SEQ ID NO : 55) / IgG3 CH1 恒定区 / IgG3 铰链区的抗体 Fd' 链; Fd' 链经其 C - 末端融合至 [A248S , G251T , D253K] HCPB 的 N - 末端; 和
- 30 式 VK4 (SEQ ID NO : 71) / κ 轻链 CL 区域的抗体轻链;
- b) { [A248S , G251T , D253K] HCPB }₂ - 人源化的 806.077F(ab')₂ 融合; 包括:

[A248S, G251T, D253K] HCPB;

HCPB 在其 C 末端经(GGGG)₃ 接头融合至结构为 VH1 (SEQ ID NO: 55) /IgG3 CH1 恒定区/IgG3 铰链区的抗体 Fd'链 N 末端; 和

式 VK4 (SEQ ID NO: 71) /κ 轻链 CL 区域的抗体轻链; 和

5 c) (人 B7.1 细胞外区域)₂ - 人源化 806.077 F(ab')₂ 融合, 包括:
人 B7.1 细胞区域;

在其 C 末端融合至结构为 VH1 (SEQ ID NO: 55) /IgG3 CH1 恒定区/IgG3 铰链区的抗体 Fd'链 N 末端的 B7.1; 和

式 VK4 (SEQ ID NO: 71) /κ 轻链 CL 区域的抗体轻链。

10 在该说明书中有关偶联物中的抗体铰链区按 Padlan (1994) 在分子免疫学 31, 169 - 217 中提出的原则来定义; 特别见于表 2 中。在这些特别优选的偶联物中, 每摩尔的 F(ab')₂ 有 2 摩尔的酶或 B7.1。正斜线 (“/”) 仅为分隔物以表示由偶联物各部分构成的肽键所连接的不同结构元件。

15 VH1 和/或 VK4 可变区人源化序列具有保存良好的结合特性而只需要人框架中最少其它改变的优势。 IgG3 铰链区具有得到良好 F(ab')₂ 产量水平和产物均一性的优势。

在有关特别优选上述偶联物的另一个优选的实施方案中, 融合经抗体轻链完成, 在有关特别优选上述偶联物的另一个优选的实施方案中,

20 IgG3 恒定区/IgG3 铰链区的结构元件可由相应的 IgG2 元件所替代。

当效应成分为毒素时, 该毒素成分一般包括具有细胞毒性特性并且因此能够在内化后杀死细胞的成分。

毒素成分和抗 - CEA 抗体可直接相互偶联或者它们可间接偶联。

一般地, 毒素部分和抗 - CEA 抗体偶联从而使该偶联物的几何结构允许抗 - CEA 抗体结合其靶细胞。优选地, 该毒素成分和抗 - CEA 抗体偶联从而使偶联物在细胞外是稳定的, 且在细胞内是不稳定的从而使该毒素部分和抗 - CEA 抗体在靶细胞外保持偶联, 但内化后, 将毒素部分释放。因此, 优选地, 该偶联物具有细胞内可切割/细胞外稳定的位点。

30 其中的毒素部分直接偶联至靶细胞结合部分的偶联物实例包括这样的偶联物, 即其中的毒素部分与抗 - CEA 抗体通过毒素部分上的巯基与抗 - CEA 抗体上的巯基之间形成的二硫键加以偶联。免疫毒素和

其它偶联物的制备和特性细节列于欧洲专利专利申请 EP 528 527 (公开号) 中, 在本文公开此内容仅供参考。

5 根据本发明的另一方面, 提供了能够编码在前面任一权利要求中定义抗体或偶联物多肽的多核苷酸序列。术语“能够编码”欲包括考虑进遗传密码简并后的多核苷酸序列因为有些氨基酸由一个以上密码子所编码。

根据本发明的另一方面, 提供了包括上述多核苷酸的载体。

根据本发明的另一方面, 提供了以上述多核苷酸序列转化的宿主细胞或由该宿主细胞形成的转基因非-人动物或转基因植物。

10 根据本发明的另一方面, 本发明提供了药物组合物, 其中包括本文所述的本发明偶联物和药学上可接受的稀释剂或载体, 任选适于静脉给药的形式。

根据本发明的另一方面, 提供了本文所述的用作药剂的偶联物。

15 根据本发明的另一方面, 提供了本文所述的偶联物在制备治疗肿瘤疾病药剂中的使用。

应该理解剂量和剂量制度将依赖于所用的特定效应部分、靶细胞群和病人的历史。施用偶联物的剂量将一般为 0.1 - 1 mg/kg 病人体重。

20 本发明的偶联物将一般以药物组合物的形式施用。因此, 根据本发明也提供了包括偶联物(本文所述)与药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。这种制剂的实例在此列于实施例 10 中。

25 本发明的药物组合物可以各种剂量形式配制。一般地, 本发明的偶联物将通过肠道外、优选静脉内施用。特别的肠道外药物组合物为以单位剂量形式配制的适于注射施用的组合物。因此, 特别合适的组合物包括免疫毒素的溶液、乳液或悬液与药物上可接受的肠道外载体或稀释剂。合适的载体或稀释剂包括水性载体, 例如水或盐或非-水性载体, 例如固定的油或脂质体。该组合物可包括增强组合物中偶联物稳定性的试剂。例如, 该组合物可包括缓冲液。偶联物的浓度将会改变, 但一般地, 该偶联物将以约 1 - 10mg/ml 的浓度配制。

30 根据本发明的另一方面, 提供了编码本文所述的本发明抗-CEA 抗体的表达载体。

根据本发明的另一方面, 提供了编码本文所述的至少抗-CEA 抗体重链或轻链可变区的表达载体。

根据本发明的另一方面，提供了以本文所述的并且与在其中的表达相容的载体转化的宿主细胞。

根据本发明的另一方面，提供了以本文所述的多核苷酸序列转化的宿主细胞。

5 哺乳动物细胞（CHO、COS、骨髓瘤）用作共表达抗体 H 和 L 链 cDNAs 及其片段以制备具有特异结合活性的抗体（Bebbington, C., 1991, 方法, 第 2 卷, 第 136 - 145 页, 和 Adair, J., 1992, 免疫学综述, 130 卷）。对于导致直接表达活性 CPB 的构建体的表达, COS 或 CHO 细胞系统是优选的。cDNAs 可导入到质粒上并使其整合至特别是
10 CHO 细胞的染色体 DNA 上或使其尤其在 COS 细胞中以很高的拷贝数复制。该质粒一般需要用于维持于转染宿主中的可筛选标记、使高水平从 cDNAs 转录的有效的真核启动子, 用于克隆和多聚腺苷酸化的方便的限制酶位点和用于信息稳定性的转录终止信号。文献中（Bebbington, C,等, 1992 生物/技术, 10 卷, 169 - 175 页, 和 Wright, A.,1991, 方法, 2 卷, 125 - 135 页）描述了几种这样的载体并且有商业上可得到的合适载体,（如 pRc/CMV, Invitrogen 公司）。

抗体片段范围在大肠杆菌中的表达有很好的记录（Pluckthnn, A.综述, 免疫学综述, 1992, 130 卷, 151 - 188 页和 Skerra, A.,当前免疫学观点, 1993, 5 卷, p256 - 262）。Fd 和 L 链的细胞内表达已有
20 描述（Cabilly, S.,1989, 基因, 85 卷, p 553 - 557）但这需要该链的体外折叠和重新连接（Buchner, J 和 Rudolph, R.,1991, 生物/技术, 9 卷, 157 - 162 页）以产生结合活性。获得活性抗体片段更为有效的途径是经周质分泌（Better, M.等, 1988, 科学, 240 卷, 1041 - 1043 页）。抗体片段的 H 和 L 链组分从单一质粒上共表达。提供的每种抗
25 体链具有指导其进入大肠杆菌周质的细菌前导肽, 在该周质中切除前导肽并且自由链连接以产生可溶和活性的抗体片段。该过程认为是模仿了真核细胞中的天然过程, 在后者表达的抗体链在连接成完整的抗体之前进入内质网的管腔。该过程常导致了培养上清中结合活性的存在。

有些表达系统包括以载体转化宿主细胞; 这种系统是众所周知的如
30 在大肠杆菌、酵母和哺乳动物宿主中(见酶学方法, 185, 学术出版社, 1990)。也考虑过其它的表达系统如转基因非 - 人的哺乳动物, 其中的感兴趣基因(优选从载体中切下并且优选与哺乳动物启动子连接以指

导表达的蛋白进入动物的乳汁中) 导入哺乳动物分子的原核中 (pronucleus) (通常通过显微注射到原核中两个核中的一个通常为雄性的核) 中且之后移植到代孕母亲中。由代孕母亲产生的动物将带有和表达整合至染色体中的导入基因。通常整合的基因通过常规的育种传递给子代并且因此允许牲畜方便的扩增。优选地, 感兴趣蛋白简单地从雌雄转基因动物的乳汁中收获。读者可参考下面的文献: Simons 等 (1988), 生物/技术 6: 179 - 183; Wright 等 (1991) 生物/技术 9: 830 - 834; 美国 4, 873, 191 和; 美国 5, 322, 775。小鼠胚胎的操作描述于 Hogan 等, “操作小鼠胚胎; 实验指南”, 冷泉港实验室 1986。

也考虑到转基因植物技术, 例如在下面的文献中所述: Swain W. F. (1991) TIBTECH 9: 107 - 109; Ma J. K. C. 等 (1994) 欧洲免疫学杂志 24: 131 - 138; Hiatt A. 等 (1992) FEBS 通讯 307: 71 - 75; Hein M. B. 等 (1991) 生物技术进展 7: 455 - 461; Duering K. (1990) 植物分子生物学 15: 281 - 294。

如果必要, 宿主基因可用下面简述的标准方法加以失活或修饰并且描述于如“基因靶向; 实践方法”, IRL 出版社 1993。靶基因或其部分优选克隆入具有筛选标记(如新霉素 (Neo)) 插入到该基中以破裂其功能的载体中。将该载体线性化然后转化(常通过电穿孔)入胚胎干 (ES) 细胞(例如源于小鼠 129/O1a 菌株的细胞) 并且之后在一定比例的干细胞中发生同源重组。扩增含有破裂基因的干细胞并注射入胚泡(例如源自 C57BL/6J 的小鼠的胚泡) 且移植入代孕母亲中发育。通过外表颜色标记可鉴定嵌合体的子代。繁殖嵌合体以通过将小鼠与能够区分 ES 来源和宿主胚泡来源配子的遗传标记匹配而确证是否 ES 细胞分布到精子系中。一半 ES 细胞来源的配子将带有基因修饰。筛选子代(如通过 Southern 印迹) 以鉴定带有破裂基因的个体(约妊娠的 50%)。这些筛选出的子代将是杂合的并且因此可与另一种杂合子交配且之后筛选出纯合的子代(约妊娠的 25%)。具有基因敲除的转基因动物可与通过已知的技术如显微注射 DNA 至原核、原生质球融合 (Jakobovits 等 (1993) 自然 362: 255 - 258) 或 ES 细胞脂质介导的转染 (Lamb 等., (1993) 自然遗传学 5: 22 - 29) 而产生的转基因动物杂交以得到具有内源性基因敲除和外源性基因替代的转基因动物。

含有靶向破裂基因的 ES 细胞可通过从含有特异性改变的靶基因序

列转化而进一步加以修饰，该靶基因序列优选克隆入载体中并在转化之前线性化。同源重组以后将改变的基因导入基因组中。这些胚胎干细胞可随后用于建立上述的转基因学（transgenics）。

5 术语“宿主细胞”包括适于表达技术的任何原核或真核细胞例如细菌、酵母、植物细胞和非-人的哺乳动物合子、卵母细胞、胚泡、胚胎干细胞和任何其它用于转基因技术的合适细胞。如果上下文允许，术语“宿主细胞”也包括从转化的非-人哺乳动物合子、卵母细胞、胚泡、胚胎干细胞、植物细胞和任何其它用于转基因技术的合适细胞而形成的转基因植物或非-人哺乳动物。

10 根据本发明的另一方面，提供了治疗需要下面的治疗的人或动物的方法，即该治疗包括给人或动物施用本文所述的药物上有效量的偶联物。

根据本发明的另一方面，提供了在需要下面的治疗的哺乳动物中定向运送效应部分于显示抗原 CEA 细胞的方法，即其中的治疗包括施用
15 本文所述的药学上有效量的本发明偶联物。

根据本发明的另一方面，提供了前述抗体在诊断方法中的使用。

一种诊断方法为免疫测定。基于本发明新的抗体的用于体外测试免疫测定可根据本领域常规的免疫学技术来设计，该技术包括标记或未标记形式的根据本发明的抗体和测定该抗体与待测样品中 CEA 之间复合物的形成。在一种情况，抗体可用可检测的标记，如放射标记、化学发光物质、荧光物质或酶标记加以标记。通过与标记的物质形成复合物或通过非标记技术，如生物传感器方法如根据表面胞质基因共振来测定抗体。该样品可以是，例如体液的形式，如血清或组织制品（组织化学测定）。

25 为了体内诊断的目的，根据本发明的抗体以具有合适外部可检测到的标记，如放射标记或重金属原子的形式提供并施用至这样的受试者，即在其身体中检测到抗体可能的局部积累。

为了体外诊断癌症，抗-CEA 抗体可交联至酶如辣根过氧化物酶上和可产生可被检测到信号的细菌荧光素酶上或可直接检测和定量的
30 荧光标记或放射性同位素上。在标准的免疫测定系统中，这种偶联物提供了测定身体组织中 CEA 存在与否的方法并且随后提供了用于诊断肿瘤疾病的快速而方便的测试。见下面文献中的一般性描述，包括酶免疫

测定中的方法学, E. T. Maggio, CRC 出版社和美国 3690 8334, 美国 3 791 932, 美国 3 817 837, 美国 3 850 578, 美国 3 853 987, 美国 3 867 517, 美国 3 901 654, 美国 3 935 074, 美国 3 984 533, 美国 3 996 345 和美国 4 098 876。

5 为了癌症的体内诊断, 抗 - CEA 抗体可交联至可通过整个身体成像照片加以检测的同位素如, 钇、镓或铟或重金属同位素上 (见 Larson, S. M. 1987, 放射学, 165, 297 - 304)。

对于癌症的治疗, 优选的实施方案包括可交联至效应部分的抗 - CEA 抗体, 该效应部分可直接杀死癌细胞或特别地在 APEPT 系统中经过适当前体药物的激活而杀死癌细胞。在 ADEP 中, 肿瘤细胞的选择性杀死是通过交联抗 - CEA 抗体至酶上得以完成, 其中的酶能够催化非 - 毒性剂量的前体药物向潜在的有毒药物化合物的转变。该偶联物的施用导致酶活性在肿瘤位点的集中 (localization)。该前体药物随后的施用导致有毒药物局部的产生并在该肿瘤位点选择性杀死。此方法描述于 WO 85/07378、美国 4,975,278, 美国 5,405,990 和 WO 89/10140。抗体 806.077 也可交联至用于上述肿瘤免疫治疗的共 - 刺激分子上而加以使用。

20 肿瘤细胞的选择性杀死也可通过抗 - CEA 抗体直接或通过大环整合试剂化学衍生而与含有高能放射性同位素如 ^{90}Y 、 ^{131}I 和 ^{111}I 的交联而完成。该抗 - CEA 抗体用于将同位素集中到肿瘤处并且由同位素发出的放射破坏周围细胞的 DNA 且杀死肿瘤。

25 选择性杀死肿瘤细胞也可通过抗 - CEA 抗体与细胞毒和细胞静止药物如氨甲蝶呤、苯丁酸氮芥、阿霉素、道诺红霉素和长春新碱的交联而完成。这些药已用于临床多年并且它们提供的治疗常受非特异性毒性的限制。这些药物与 CEA 抗体的交联使这些药物集中于肿瘤位点, 并且因此增加可被运送至肿瘤的药物剂量而不导致该药物对其它组织如骨髓或神经系统的不可接受的副作用。

30 抗体的效应在许多应用中通过降低抗体结合结构的大小且因此改善此药物组合物的组织穿透和其它药物动力学特性而得以改进。这可通过以酶去除抗体分子的 Fc 区域或通过遗传工程方法产生重组 Fab' 或 F(ab')₂ 片段加以完成。

遗传工程方法也可用于进一步减小抗 - CEA 抗体的大小。含有

CDRs 的 Fv 可经遗传工程操作并单独表达且通过如二硫桥的使用而化学交联。或者，构成 Fv 结构的轻链和重链区可通过用接头肽序列将 Fv 区从一个区域的天然 C - 末端融合至另一区域的 N - 末端而制备成单一的多肽链 (SCFv) (见 PCT/美国/87/02208 和美国 4704692)。或者，如 Ward 等自然 (1989) 341, 544 中所述，单一的 Fv 区可单独表达以形成单一区的抗体或 dAb。另一种考虑到的抗 - CEA 抗体为由国际专利申请 WO 94/12625 (发明者 Slater 和 Trmms) 中公开的 V - min 构建体。

本文使用的简写包括：

10	ADEPT	抗体介导的酶前体药物治疗
	APC	抗原呈递细胞
	CDRs	互补性决定区
	CEA	癌胚抗原
	CL	抗体轻链恒定区
15	CPB	羧肽酶 B
	CPG2	羧肽酶 G2
	DAB	底物 3, 3' - 二氨基联苯胺四盐酸
	DEPC	焦碳酸二乙酯
	DMEM	Dulbecco 改进的 Eagle 培养基
20	ECACC	欧洲动物细胞保藏中心
	EIA	酶免疫测定
	ELISA	酶联免疫吸附测定
	FCS	胎牛血清
	Fd	Fab、Fab' 或 F(ab') ₂ 重链，任选含有铰链
25	HAMA	人抗小鼠抗体
	HCPB	人羧肽酶 B，优选为胰来源
	(IgG) 的铰链区	含有将 2 条重链交联在一起的半胱氨酸的短的富含脯氨酸的肽
	HRPO	辣根过氧化物酶
30	NCA	非特异性交叉反应抗原
	NCIMB	国立工业和海洋微生物保藏有限公司
	PBS	磷酸缓冲盐液

PCR	聚合酶链式反应
preproCPB	具有 N - 末端前导序列的前体 CPB (proCPB)
proCPB	具有其 N - 末端区域原的 CPB
SDS - PAGE	十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
5 TBS	Tris 缓冲盐溶液
VH	抗体重链的可变区
VK	抗体轻链的可变区

10 本发明通过下面的非 - 限制性实施例 (由实施例后的参考实施例所支持) 加以说明, 其中:

图 1 显示在 ADEPT 模型中 806.077 抗体 - CPG2 偶联物的抗肿瘤活性;

图 2 显示 pCF009 的质粒图谱;

15 图 3 显示结合到固定 CTLA4 - Ig 上的抗体 - B7.1 融合蛋白的 BIAcore 数据, 如果没有特别说明, 其中的实线代表测试结合且点线代表空白对照;

20 用 GENE CLEAN™II 试剂盒 (Stratech 科学公司或 Brol 101 公司) 回收和纯化 DNA。此试剂盒含有: 1) 6M 碘化钠; 2) 浓缩的氯化钠溶液, 用于制备氯化钠/乙醇/水洗液的 Tris 和 EDTA; 3) 在水中含有 1.25ml 特别制备的硅基质 (silica matrix) 悬液的 1.5ml - Glass milk 小瓶。这是基于美国自然科学院院报 (1979) 76 卷, 615 页中发表的 Vogelstein 和 Gillespie 方法的 DNA 纯化技术。简言之, 该试剂盒方法如下。向 1 体积的凝胶切片中加入试剂盒中 3 体积的碘化钠溶液。通过于 55 °C 加热 10 分钟融化琼脂糖然后加入 Glass milk (5 - 10ml), 充分混合并于室温静置 10 分钟。将 Glass milk 离心并以 3 25 体积试剂盒中的 NEW WASH (0 - 5ml) 洗 3 次。从 Glass milk 中去除洗用的缓冲液并空气中干燥。通过将干燥的 Glass milk 与水 (5 - 10ml) 于 55 °C 孵育 5 - 10 分钟而洗脱 DNA。通过离心回收含有洗脱 DNA 的水上清。可重复洗脱步骤并收集上清;

30 感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞获自生命技术公司 (最大效率的 DH5 感受态细胞);

用 Bio 101 公司的 RPM™DNA 制备试剂盒 (目录号 2070 - 400) 或类似的产品微量制备双链质粒 DNA - 该试剂盒含有碱性裂解液以从

细菌细胞和 Spinfilter 中的 Glass milk 中释放质粒 DNA 以吸附释放的 DNA，然后以无菌水或 10mM Tris - HCl, 1mM EDTA, pH 7.5 洗脱该 DNA。

5 无血清培养基为 OPTIMEM™ I 减少血清的培养基, GibcoBRL 目录号 31985。

LIPOFECTIN™ 试剂 (GibcoBRL 目录号 18292 - 011) 为在膜过滤的水中阳离子型脂 N - [1 - (2,3 - 二油酰氧基) 丙基] - n, n, n - 氯化三甲胺 (DOTMA) 和二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 的 1 : 1 (w/w) 脂质体制剂。其自发与 DNA 结合以形成脂质 - DNA 复合物 - 见 Felgner 等。美国自然科学院院报 (1987) 84, 7431;

G418 (硫酸盐) 为 GENETICIN™, GibcoBRL 目录号 11811, 为一种与庆大霉素有关用作分子遗传实验中筛选试剂的氨基糖苷类抗生素。

15 可从 Perkin - Elmer Cetus 得到的 AMPLITAQ™ 用作热稳定 DNA 聚合酶的来源; 且

常规的分子生物学方法可遵从“分子克隆 - 实验指南”第二版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis (冷泉港实验室, 1989) 中描述的任何一种方法。

实施例 1

20 杂交瘤细胞系 806.077 的发现和建立

将 8 - 10 周龄的 BALB/c 小鼠皮下以磷酸缓冲盐溶 (0.1ml) 和弗氏完全佐剂 (0.1ml) 中的初次剂量的 CEA (10 μ g) 免疫。2 周后再过 2 周, 将该动物以磷酸缓冲盐 (0.1ml) 混合以弗氏不完全佐剂 (0.1ml) 中进一步剂量的 CEA (10 μ g) 加强。32 周后, 给予该动物最后一次磷酸缓冲盐中的静脉内免疫 CEA (10 μ g) 并于 3 周后杀死。去除和制备胰脏并通过标准的方法 (Kohler 和 Mrlstein, 自然 (1975) 256, 495) 与 NS40 细胞 (可从欧洲动物细胞保藏中心获得, 登记号 85110503) 融合。将得到的细胞分散于 96 孔培养板中并孵育 2 周。通过 EIA (酶免疫测定) 筛选得到杂交瘤的上清中。总 5 个融合产生的总共 1,824 孔中, 102 孔为对天然 CEA 阳性的。在融合 806 中, 发现 17 个孔为阳性的。通过有限稀释克隆在这些孔中含有的细胞, 并通过 EIA 测定得到的克隆。10/17 原初孔中的细胞系被成功克隆。一

种名为 806.077 的细胞系已以许可号 96022936 保藏于欧洲动物细胞保藏中心。下表提供了导致 806.077 抗体杂交瘤发现的抗体产生程序的小结。

抗原	圈养	安静周数	融合数月	测试的孔数	EIA CEA*	最终筛选到的数目
					阳性数	
未处理的 CEA	正常	8 - 20	28	13.920	99	0
desialated CEA	正常	8 - 12	14	5.568	12*	0
交联的 CEA	正常	10 - 12	8	3.168	1	0
未处理的 CEA	隔离	>30	5	1.824	102	3

- 5 * 测试抗未处理的 CEA，desialated 免疫在以免疫原测试时产生大量的阳性。

实施例 2

从保藏的杂交瘤细胞系 ECACC No. 96022936 中 806.077 抗体的制备

2.1 从含有培养基的血清中的制备

- 10 从液氮中取出 1ml 深低温保藏的安瓿并于 37 °C 水浴中迅速融化。将内容物灭菌转移至无菌的 15ml 离心管中。通过逐滴加入含有 10 % (v/v) 胎牛血清 (FCS) 的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM) 伴随以混合而重悬细胞。悬液以 50×g 离心 10 分钟，无菌去除上清并将沉淀物重悬于以 95 % 空气 5 % CO₂ 预冲气的 25ml 组织培养瓶中的 5ml
- 15 DMEM、10 % FCS 和 1 % 谷氨酰胺中。培养瓶于 36.5 °C 在黑暗中孵育。

- 3 天后通过以 DMEM、10 % FCS 和 1 % 谷氨酰胺稀释该培养瓶而将其中的全部内容物转至更大的 75ml 培养瓶中而传代培养 (最终存活密度 = $2 - 3 \times 10^5$ 细胞/ml)。以类似的方式进一步扩增至 162ml 的培养瓶中。
- 20

在 850ml 滚瓶中的 500ml 滚动培养物制备用于纯化的培养上清。在预冲气的滚瓶中以 2×10^5 个活细胞/ml 接种培养物，以 3rpm 旋转并于

36.5 °C 孵育。将培养物培养至成熟并且当细胞存活低于 10 % 且 IgG 浓度达到最大时一般为接种后的 500 - 800 小时收获。

2.2 培养收获物的处理

收获后，通过以 60×g 30 分钟离心澄清滚瓶培养上清。加入叠氮钠 (0.02 % w/v) 作为防腐剂以澄清上清，并在黑暗处贮存于 4 °C 直至纯化。

2.3 806.077 抗体的纯化

以稀释水溶性氢氧化钠将 806.077 抗体杂交瘤上清 (31) 调至 pH 7.5 并经 0.45µm 滤膜过滤 (Millipore MILLIDISK™)。将过滤的抗体上清上样至 G 蛋白亲和柱 (例如，G 蛋白快速流 SEPHAROSE™，发玛西亚产品，号为 17.0618.03；5cm i.d × 6.5cm = 130ml；) 该柱在 4 °C 以 4ml/分钟的流速以磷酸缓冲盐 (“PBS”；8mM 同 Na₂HPO₄，1.5mM KH₂PO₄，150mM NaCl，2.5mM KCl，pH 7.3，例如可获自 Oxford 的片剂形式用于重新调制) 平衡。以相同的流速用 PBS (260ml) 洗柱并以 pH 2.6 的 10mM 柠檬酸钠洗脱抗体，收集馏份并通过紫外吸收 (280nm) 监测洗脱液。合并含有抗体的 UV 吸收馏份，并立即调至 pH 7 并通过用 30kDa 截断膜 (如，Amicon YM30) 的超滤而浓缩至约 2mg/ml。用 6 - 8kDa 孔隙度的截断膜 (如 SPECTRAPOR™1) 透析至 50mM pH 7.0 的 Tris - HCl 缓冲液中产生 110mg 806.077 抗体，通过 SDS - PAGE 检测，纯度大于 95 %。

实施例 3

806.077 抗体的选择性

为了分析选择性，用灵敏的三级间接免疫组织学在丙酮 - 固定的冷冻恒冷箱切片上筛选许多人正常和肿瘤组织与抗体 806.077 之间的反应性。

免疫组织学在通过切除手术或尸体中获得的人组织切片上进行。为了保持最佳的形态学和抗原性，组织尽可能新鲜获得，切成小块 (约 0.5cm³) 并在 - 80 °C 贮藏前瞬时冷冻于液氮中。组织切片 (6µm) 在恒冷箱中进行，置于聚赖氨酸包被的载玻片上 (如，蓝色的 TECHMATE™ 载玻片，Dako) 并于冰冷的丙酮中固定 2 分钟后包裹于箔片中并贮存于 - 80 °C。

在使用前即刻从箔片中解包装之前将载玻片于室温中除霜。每张切

片以金刚石标记 (diamond marker) 加以限定, 并向每张切片加入在 Tris - 缓冲盐 (TBS) 中稀释至 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 $100\mu\text{l}$ 806.077 抗体, 或 TBS 中 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 $100\mu\text{l}$ CEA/NCA 反应对照 (A5B7 抗体, 或 TBS 中 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 $100\mu\text{l}$ MOPC 同型对照 (西格玛化学公司, 圣路易斯, 美国, 目录号 M9269 或相关的阳性对照如 LP34 (Dako))。所有随后的孵育在潮湿小室中室温进行 30 分钟: 所有清洗步骤均在 TBS 中并 2 次换液。孵育后, 清洗载玻片并向每张切片中加入 $100\mu\text{l}$ 二级抗体试剂, 其中包括 TBS 中交联至辣根过氧化物酶上的 $1/50$ 兔抗 - 小鼠免疫球蛋白 (Dako Patts) 和 $1/5$ 的正常人血清 (西格玛)。

10 将载玻片再次孵育并于 TBS 中清洗。向每张切片上加入最后的检测抗体, 交联至辣根过氧化物酶上的 $100\mu\text{l}$ 猪抗 - 兔免疫球蛋白 (在 TBS 中以 $1/5$ 的正常人血清进行 $1/50$ 稀释), 孵育并彻底清洗。用 TBS (17ml) 中具有过氧化氢 ($17\mu\text{l}$) 的 1DAB 片剂 (西格玛) 制备 DAB 底物 (3, 3' - 二氨基联苯胺四盐酸盐), 并经快速滤纸 (如, Whatman 15 4 号) 逐滴加入。孵育 3 分钟后去除载玻片上过量的 DAB 并将其 TBS 中清洗。以苏木精 (如 Mayer's 苏木精, Shandon) 负染后, 将切片于乙醇和二甲苯中脱水, 并在显微镜检查前置于非水性合成的浸片剂 (如, E - Z 浸片剂, Shandon) 中。

20 抗体结合面积通过切片上的棕色染色而加以观察。使用计分系统评估 806.077 抗体与组织的结合程度:

+++ (强) = 抗体结合至 $>75\%$ 肿瘤细胞
++ (适中) = 抗体结合至 $50\% - 75\%$ 的肿瘤细胞
+ (弱) = 抗体结合至 $25\% - 50\%$ 的肿瘤细胞
+/- (最低) = 没有结合到小面积肿瘤细胞的集中抗体
25 - = 没有染色

癌胚抗原 (CEA) 为免疫球蛋白基因超家族成员, 具有一个预定的可变区 (N 区; 108 个氨基酸) 和三套恒定区 A1B1、A2B2 和 A3B3; A 区 92 个氨基酸且 B 区 86 个氨基酸 (Hefta, 1992, 癌症研究 52 : 5647 - 5655)。此外, CEA 具有 2 个信号肽, 一个在氨基末端且另一个在羧基末端。两者均在翻译后加工过程中被去除, 羧基端的信号肽由糖基磷脂酰肌醇部分所替代。

已报导大量的具有与 CEA 各种同源性的 CEA - 相关蛋白

(Thompson, 1991, 临床实验室分析杂志, 5: 344 - 366)。这些包括非 - 特异性的交叉反应抗原, NCA1 和 2。这些相关的蛋白在多种正常组织中表达, 包括粒细胞和正常肺上皮细胞。到目前为止产生的大多数抗 - CEA 单克隆抗体与这些相关蛋白中的一种起交叉反应并且因此与多种正常组织起反应并且常与粒细胞或肺上皮细胞强烈反应。

抗 - CEA 抗体, 806.077 被鉴定为 CEA 选择性的, 对粒细胞没有显示出交叉反应性且对测试的 4/14 正常肺组织仅具有最少的染色。

最初筛选 806.077 抗体用于肿瘤和组织培养上清的 NCA 选择性。筛选用清洁且以 1:10 稀释的上清进行并与 A5B7 比较时, 显示出抗体对结肠癌相当的结合, 但与相同的抗体比较时, 抗体对正常的肺和胰组织的结合大大下降。亲和纯化抗体 (如实施例 2 中所述) 并反复筛选和延伸以包括进一步的肿瘤和组织类型。

抗体在结肠 - 直肠肿瘤切片上进行滴定并且此筛选显示 806.077 抗体的最佳筛选浓度为 2 μ g/ml。所有随后的筛选用此浓度的抗体完成。

这些筛选的结果如下。806.077 抗体的反应性与抗下面肿瘤/正常组织的 A5B7 (也以 2 μ g/ml 筛选) 作比较:

806.077 抗体肿瘤反应性:

结肠癌 (n = 17)。

在所有 17 个测试的肿瘤中见到适中至强的反应性 (+ + / + + + 相当于 A5B7)。

乳腺癌 (n = 6)

适中/微弱染色 (+ / + +), 2/6 肿瘤; 最低染色 (+ / -), 2/6 肿瘤。

NSCLC 癌 (n = 6)。

强的染色 (+ + +), 2/6 肿瘤; 适中染色 (+ +), 1/6, 和微弱染色 (+), 2/6 肿瘤。

胃癌 (n = 2)。

强染色 (+ + +), 1/2 肿瘤; 弱染色 (+) 1/2 肿瘤。

卵巢癌 (n = 3) 和前列腺癌 (n = 3)。

在任何这类癌中没见到染色。

在所有的情况中, 均见到与 A5B7 相当的反应性。

正常组织反应性: -

肺 (NCA 反应性) (n = 14)。

弱染色 (+), 4/14 肺组织; 没有染色 (-) 10/14 组织。

A5B7 结合适中 (++) , 1/14 肺组织; 弱 (+) , 10/14 组织且最低 (+/-) , 1/14 组织。

胰 (粒细胞/NCA 反应性) (n = 6) 。

5 在任何一种测试的胰组织中没有见到染色。

A5B7 结合适中 (++) , 1/6 组织和弱 (+) , 5/6 组织。

尸体正常组织 (n = 13) 。

10 适中/微弱的反应性 (++/+) 仅见于食管、皮肤、结肠和胰组织 (CEA 表达正常组织)。见到与 A5B7 类似的结合。除了阳性组织结肠、皮肤、食管和胰脏外, 阴性组织有: 小脑、中脑、大脑、平滑肌、肝脏、肾脏、主动脉、胃、心脏。

实施例 4

806.077 抗体 F(ab')₂ 片段的产生

15 将无花果蛋白酶 (10mg) 悬浮于 50mM 半胱氨酸 (3ml; BDH 37218) 和 50mM tris - HCl pH 7.0 的溶液中并于 37 °C 孵育 30 分钟。在 50mM tris - HCl pH 7.0 缓冲液中通过大小排阻层析 (Sephadex™ G - 25 柱, 1.5cm × 25cm; 发玛西亚) 去除过多的半胱氨酸。通过在 A280nm 处监测 UV 吸收来测定降低的无花果蛋白酶浓度 (1mg/ml 溶液在 1cm 样品池中具有 2 的吸收读数) 并发现其为 20 1.05mg/ml 。

25 于 50mM tris - HCl 缓冲液 pH 7.0 (50ml) 中的 806.077 抗体 (100mg) 溶液和新减少的无花果蛋白酶 (5mg; 3ml 上述溶液) 于 37 °C 消化 20 小时。然后以等体积的 PBS 稀释消化产物并以 3ml/分钟的恒定流速上样至 G 蛋白亲和柱 (发玛西亚 SEPHAROSE™ FAST Flow 25 5.0cm I. d × 6.5cm = 125ml; 预先在 4 °C 以 pH 7.0 的 50mM tris - HCl 平衡)。以 pH 4.0 的 50mM 的醋酸钠 (250ml) 洗柱以去除低分子量的片段, 然后以 50mM 的柠檬酸钠 pH 2.8 洗脱 F(ab')₂, 在 A280nm 处监测洗脱液的 UV 吸收。将含有洗脱液的 F(ab')₂ 调至 pH 7 且通过透析将缓冲液更换为 100mM 磷酸钠/100mM 氯化钠/1mM EDTA 并且用 30 10kDa 截断的膜过滤 (如 Amicon™ YM10) 将其浓缩至 8mg/ml, 认为在 1cm 样品池中 280nm 处的吸收读数为 1.4。得到 42mg 95 % 纯度 F(ab')₂ 的 65 % 产量。

实施例 5

806.077 抗体 F(ab')₂ - 羧肽酶 G2 偶联物的制品

用于 806.077 抗体 F(ab')₂ 衍生的接头为 STAT (S - 乙酰硫代羧基乙酸 N - 羧基琥珀酰亚胺酯 (N - hydroxysuccinimideester, 西格玛, 产品号 A9043)。用于羧肽酶 G2 (CPG2) 衍生的接头为 SMPB [4 - (对 - 马来酰亚胺苯基) 丁酸 N - 羧基琥珀酰亚胺酯, 西格玛, 产品号 M6139]。

5.1 F(ab')₂ 的获得

向 pH 7.2 的 100mM 磷酸盐/100mM NaCl/1mM EDTA (缓冲液 A; 5ml) 中的 F(ab')₂ 片段 (40mg, 前面实施例 4 中制备) 溶液中混合以 DMSO (28 μ l) 中的 SATA (0.28mg)。室温中 40 分钟后, 将得到的溶液以 1.2ml/分钟的流速应用于脱盐柱 (SEPHADEX™ G - 25, 1.5cm i.d \times 50cm = 100ml; 在缓冲液 A 中于 4 °C 平衡) 以去除过多的试剂。于 A280nm 处通过 UV 吸收监测洗脱液。合并 SATA 衍生的 F(ab')₂。并在室温混合以 pH 8.0 的 10 % v/v 的 500mM 羧胺盐酸/500mM 磷酸钠/30mM pH 8.0 的 EDTA 60 分钟从脱乙酰基衍生的 F(ab')₂。蛋白浓度通过于 280nm 处的 UV 吸收加以监测, 认为 1mg/ml 溶液具有在 1cm 样品池中 1.4 的吸收读数。以缓冲液 A 将该溶液稀释至约 1mg/ml。通过 Ellman's - SH 分析测定接头上样并发现为 1.8 - 2.0 接头/摩尔 F(ab')₂。

5.2 CPG2 的获得:

从假单胞菌 RS - 16 中 CPG2 的大规模纯化描述于 Sherwood 等, (1995), 欧洲生物化学杂志, 148, 447 - 453。F(ab')₂ 和偶联至 CPG 酶上的 IgG 抗体的制备通过已知方法完成并已描述于例如 PCT WO 89/10140 中。CPG 可获自应用微生物研究中心, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, 英国。CPG2 也可通过重组技术获得。CPG2 的核苷酸编码序列已由 Mrnton N. P. 等, 在基因, (1984) 31, 31 - 38 中发表。已报导该编码序列在大肠杆菌 (Chambers S. P. 等, 应用微生物学生物技术, (1988), 29, 572 - 578) 和酿酒酵母 (Clarke, L. E. 等, 基因微生物学杂志, (1985) 131, 897 - 904) 中的表达。完整的基因合成已由 M. Eclwards 在美国生物技术实验室 (1987), 5, 38 - 44 中描述。异源蛋白在大肠杆菌中的表达已由

F. A. O. Marston 在 DNA 克隆第 III 卷, 实践方法系列, (IRL 出版社 (编者 D. M. Glover), 1987, 59 - 88) 中综述过。蛋白在酵母中的表达已在酶学方法, 第 194 卷, (学术出版社, 1991, C. Grothrie 和 G. R. Fink 编) 中综述过。

5 CPG 酶可从西格玛化学公司, (Fancy Road, Pook, Dorset, 英国) 获得。CPG 酶描述于: Golman, P. 和 Levy, C. C., PNAS 美国, 58: 1299 - 1306 (1967) 和 Levy, C. C. 和 Goldman P., 生物化学杂志, 242: 2933 - 2938 (1967)。羧肽酶 G3 酶已描述于 Yasuda, N. 等, 生物科学、生物技术、生物化学, 56: 1536 - 1540 (1992)。羧肽酶 G2 酶
10 已描述于欧洲专利 121 352。

将 CPG2 (50mg; 来自大肠杆菌的重组酶) 透析至 100mM 的磷酸钠/100mM 氯化钠 pH 7.2 (二缓冲液 B) 并稀释至 8mg/ml, 认为 1mg/ml 的溶液在 1cm 的样品池中 280nm 处具有 0.6 的吸收读数。

将 SMPB (西格玛) 以 10mg/ml 溶解于 DMSO 中。将 CPG2 (50mg
15 以 8mg/ml 位于缓冲液中) 与 SMPB 溶液混合 (0.108ml; 1.08mg), 并于室温反应 120 分钟。在脱盐柱 (Sephadex G - 25, 1.5cm i.d × 50cm = 100ml; 在 4 °C 以缓冲液 B 平衡) 上以 1.2ml/分钟去除过多的试剂。合并得到的 CPG2 并通过 UV A280nm 测定其浓度, 认为 1mg/ml 溶液在 1cm 样品池中于 280nm 处具有 0.6 吸收读数。将该溶液稀释至约
20 1mg/ml 的 CPG2 浓度。通过加入已知量的 2 - 巯基乙醇至马来酰亚胺得到的 CPG2 并分析未反应的 SH, 通过 “反相” Ellman 分析测定接头上样。发现了 2.0 - 2.4 接头/摩尔 CPG2 的接头上样。

5.3 交联:

将相等重量的脱乙酰化得到的 F(ab')₂ 和得到的 CPG2 在氮气中混合
25 并将混合物 (约 80ml, 总蛋白浓度约 1mg/ml) 置于室温中 20 小时。通过加入 10 % v/v 100mM 的水中甘氨酸而终止反应。粗交联混合物为通过透析至低盐缓冲液 (50mM 醋酸钠 pH 6.0) 中而交换的缓冲液并应用至于 4 °C 以相同缓冲液平衡的染料 - 配体亲和柱 (其中的染料结合至 CPG2, 如 ACL Mimetic Green 1, 2.5cm i.d × 10cm = 50ml)
30 以去除未反应的得到的 F(ab')₂。偶联物和得到的 CPG2 以 pH 6.0 的 50mM 醋酸盐/500mM NaCl 以 2.0ml/分钟的流速洗脱, 通过 UV (A280nm) 监测洗脱。

疗组的肿瘤体积增加4倍时花费的时间减去对照组肿瘤体积增加4倍所花费的时间，又定义为T/C值，即施用前体药物14天后治疗组肿瘤体积除以对照组肿瘤的体积。抗肿瘤效应的统计显著性用方差分析（单因素）检验加以判定。

5 806.077 抗体 F(ab')₂ - CPG2 偶联物与 PGP 前体药物的抗肿瘤活性显示于图 1 中并且抗肿瘤数据总结如下。

在 LoVo 肿瘤异体移植中 806.077 抗体 F(ab')₂ - CPG2 偶联物与 PGP 前体药物的抗肿瘤活性。

偶联物	剂量 (U/kg)	T/C (%)	生长延缓 (天)	显著性 (P)
806.077F(ab') ₂ - CPG2	250	16.5	14	<0.01
	500	4.7	22	<0.01

10 结果显示 806.077 抗体 F(ab')₂ - CPG2 偶联物与 PGP 前体药物一起与对照组相比较产生统计学显著的肿瘤抑制和延长的生长延缓。

实施例 7

806.077 抗体重链和轻链基因可变区的克隆和测序

7.1 细胞质 RNA 的制备

15 有几种从真核细胞中分离 poly A⁺mRNA 的方法 (Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 分子克隆: 实验指南, 冷泉港实验室出版社, 第 2 版, 1989, 第 8 章, 第 3 页, 本文指 “Maniatis”)。在本特定的情况中, 按 Favoloro 等, 酶学方法 65, 718 - 749 中所述的方法从贮存于 - 80 °C 含有 1 × 10⁹ 个细胞的杂交瘤细胞沉淀中制备细胞质
20 RNA。

将细胞重悬于含有 400U 核糖核酸酶抑制剂 (RNAGuard; 发玛西亚, 目录号.27 - 0815 - 01) 的 5ml 冰冷的裂解液 (140mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM pH 8.6 的 Tris - HCl 和 0.5 % 的 NP40 (聚乙二醇醚非离子去污剂; 壬基苯氧基聚氧乙基醇西格玛, 目录号 127087 - 87 - 01) 中并旋转 10 秒。将此溶液以相等体积的含有 24 % (w/v) 蔗糖和 1 % NP - 40 的冰冷裂解液体镶盖并保存于冰中 5 分钟。将该制品然后于 4 °C 于台式离心机 (Sorval RT6000B) 中以 4000rpm 离心
25 30 分钟, 然后将上层细胞质相移入等体积的 2 × PK 缓冲液 (200mM

Tris (pH 7.5), 25mM EDTA, 300mM NaCl 和 2 % (w/v) SDS) 中。加入蛋白酶 K (西格玛, 目录号 p2308) 至 200 μ g/ml 的终浓度并将该混合物于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。

5 以等体积的酚/氯仿抽提该制品, 去除水相并加入 2.5 体积的乙醇并混合。然后将该溶液贮存于 - 20 $^{\circ}$ C 过夜。离心 (台式离心机, Sorval RT6000B, 中于 4 $^{\circ}$ C 30 分钟, 4000rpm) 收集 RNA, 弃上清并于真空干燥器中将沉淀干燥, 然后将其溶解于 250 μ l 的焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水中 (按上述的 Maniatis 描述的制备)。通过分光光度法测定 RNA 含量并且认为 260nm 处的吸收值 1 = 40 μ g/ml 来计算其
10 浓度。

7.2 第一条链可变区 cDNA 的制备

许多用于 cDNA 合成的方法由 Maniatis 综述 (第 8 章)。所用的寡核苷酸引物主要基于 Marks 等, 分子生物学杂志 (1991) 222, 581 - 597 中提到的序列。本文的 cDNA 按如下制备。RNA 在微量离心管
15 中与以下成分混合, 包括 10 μ l 5 \times 反转录酶缓冲液 [250mM Tris (pH 8.3), 40mM MgCl₂ 和 50mM DTT], 1 μ l 正向引物 (25 pM), 10 μ l 1.25mM dNTPs, 5 μ l 10mM DTT, 0.5 μ l RNAGuard (发玛西亚), 向其中加入 DEPC 处理的 H₂O 以得到 50 μ l 的终体积。将反应混合物加热至 70 $^{\circ}$ C 10 分钟且然后缓慢冷却至 37 $^{\circ}$ C,
20 然后加入 100 μ (0.5 μ l) M - MLV 反转录酶 (发玛西亚, 目录号 27 - 0925 - 01) 并将反应物与 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用于产生轻链 cDNA 正向引物为设计与鼠 κ 轻链基因 CK 恒定区杂交的寡核苷酸 CK2FOR (SEQ ID NO : 1)。对于重链 cDNA, 使用了与鼠 IgG1 的 CH1 恒定区杂交的正向引物 CG1FOR (SEQ ID NO : 2)。

25 7.3 氨基酸测序

806.077 抗体重链和轻链通过 SDS - PAGE 加以分离和 Western 印迹并用于 N - 末端氨基酸测序。结果显示轻链的 N - 末端被化学封闭, 然而, 获得了重链头 34 个 N - 末端残基的序列 (SEQ ID NO : 3)。根据此氨基酸序列设计用于 806.077 抗体重链可变区 PCR 的特异性
30 DNA 反向引物 (back primer), 这些引物称为 SP1 back (SEQ ID NO : 7)。

7.4 通过 PCR 对抗体基因片段的分离

用按前述制备的 cDNA 为模板分离 806.077 重链和轻链可变区基因。一般反应条件如下。

向 5 μ l 的 cDNA 反应物中加入 5 μ l dNTPs (2.5mM)、5 μ l 10 \times 酶缓冲液 (500mM KCl , 100mM Tris (pH 8.3) , 15mM MgCl₂ 和 0.1 % 明胶) , 1 μ l 25pM/ μ l 的反向引物, 1 μ l 25pM/ μ l 的正向引物, 0.5 μ l 热稳定的 DNA 聚合酶和 DEPC - 处理的水以获得 50 μ l 的体积。PCR 条件设定为 25 个循环, 94 $^{\circ}$ C 90 秒; 55 $^{\circ}$ C 60 秒; 72 $^{\circ}$ C 120 秒, 以进一步的 72 $^{\circ}$ C 10 分钟孵育结果最后一个循环。

10 用常规的反应条件, 用于产生轻链 cDNA 的正向引物为寡核苷酸 CK2FOR (SEQ ID NO : 1) 且用于重链 cDNA 的为寡核苷酸 CG1FOR (SEQ ID NO : 2)。对重链和轻链进行用多种不同反向引物的多个反应以获得所需的特异性 PCR 产物。

在 806.077 轻链情况中, 用反向引物 VK1 (SEQ ID NO : 4) 反向和 VK4 (SEQ ID NO : 5) 反向引物获得对特异性 PCR 产物的分析。同样地, 用 VH1 (SEQ ID NO : 6) 反向引物和 SP1 反向引物 (SEQ ID NO : 7) 获得重链的特异性 PCR 产物。反应产物于 2 % 的琼脂糖凝胶上分析。切下预期大小的产物并纯化 DNA。

7.5 PCR 产物向 Bluescript KS+载体中的克隆

20 对于每种抗体片段, 将 5' 区 (反向引物) 和 3' 区 (正向引物) 均导入限制性位点。VH 和 VK PCR 反应的各自 PCR 产物因此能够用标准的 DNA 操作方法 (如, PCR 产物 VH1back/CG1For 通过 PstI/Hind III 克隆且 VK4back/CK2For 通过 SacI/Hind III 克隆) 通过适当的酶限制性位点克隆入 Bluescript 载体 KS⁺ (Stratagene 克隆系统) 中。从获得的克隆中制备 DNA 并用自动荧光测序仪 (应用生物系统) 对至少 12 个克隆的每个构建体进行精确的测序。用适当的计算机软件对序列进行评价, 比较和对齐。获得了 VH 和 VK 基因连续序列并随后翻译成其相应的氨基酸序列。

30 获得的 806.077 轻链可变区 (VK) 的 DNA 和氨基酸序列分别描述于 SEQ ID NO : 8 和 SEQ ID NO : 9 中。获得的 806.077 重链可变区 (VH) 的 DNA 和氨基酸序列分别描述于 SEQ ID NO : 10 和 SEQ ID NO : 11 中。含有轻链序列的克隆命名为 VK4, 且含有重链序列的

克隆命名为 VH14A。

实施例 8

嵌合轻链和重链 Fd 基因的构建

用能够不仅特异性扩增可变区适当基因而且导入新独特酶限制性
5 位点的引物通过 PCR 分离克隆入 Bluescript (实施例 7 中的 VK4 和
VH14A) 中的重链和轻链基因。这些限制性位点能够使可变区基因片
段克隆入既编码适当的抗体信号序列又编码人恒定区的 DNA 片段框架
中。轻链和重链 Fd 的信号和恒定区序列以前分别被克隆入真核质粒表
达载体 pSG5 的衍生物 pNG3 和 pNG4 中。

10 载体 pNG3 如下制备。质粒 pSG5 (Stratagene, 目录号 216201)
以 Sal I 和 Xba I 消化以去除存在的 SV 40 启动子和多连接序列。通过使
用能够杂交的寡核苷酸 SEQ NOS : 34 和 35 将新的多连接导入并克隆
入 Sal I 和 Xba I cut pSG5 质粒以得到质粒 pNG1。将 pNG1 质粒以
15 Bgl II 和 Hind III 切割并将 pcDNA3 (Invitrogen, 目录号 V790 - 20)
的 Bgl II - Hind III CMV 启动子片段克隆入此位点以得到质粒
pNG2。最后, 用寡核苷酸序列 SEQ ID NOS : 36 和 37 及质粒 pSG5
通过实施例 7 7.4 节中所述的 PCR 从 pSG5 中分离 polyA 区域。PCR
产物以 Xma I 和 Bam HI 切割, 通过于 2 % 琼脂糖凝胶上的电泳加以纯
化, 分离 (如, 用 GENE CLEAN, 见实施例 7) 然后连接至 Xma I -
20 Bam HI cut pNG2 质粒以得到 pNG3。

pNG4 载体按如下制备。将 pNG3 载体进一步修饰从而使克隆的
CMV 启动子片段中 Sac I 限制酶识别位点通过改变 DNA 序列加以破坏
(corrupted)。这通过使用 pNG3 载体作为模板的 2 步 PCR 诱变反应
加以完成。该 PCR 用两条互补的寡核苷酸引物 (SEQ ID NOS : 38
25 和 39) 以突变 Sac I 的识别序列和用于产物扩增的 2 个侧翼引物 (SEQ
ID NOS : 40 和 41)。将 2 个引物对 (SEQ ID NOS : 38 和 41)
和 (SEQ ID NOS : 39 和 40) 用于标准的 PCR 反应 (和实施例 7,
7.4 节中所述) 以获得起初的 2 个 PCR 产物, 通过 2 % 琼脂糖凝胶上的
电泳将此产物分离。将等摩尔量的每种产物产物混合并用侧翼引物
30 (SEQ ID NOS : 40 和 41) 在标准的 PCR 反应条件下重新扩增以一
起剪接和扩增最终的 PCR 产物。该产物随后以限制酶 Nco I 和 Hind III
消化并克隆入适当限制且制备的 pNG3 载体中, 从而使突变的 (Sac I

位点负型) 片段替代最初的 pNG3 Nco I - Hind III (Sac I 位点 +) 片段。将此新的载体命名为 pNG4。

取 Bluescript KS+载体中的 806.077 鼠轻链的克隆 (VK4) 并用寡核苷酸引物 077 VK - UP (SEQ ID NO:12) 和 077 VK - DOWN (SEQ ID NO:13) 扩增。同样地, 用 077 VH - UP (SEQ ID NO:14) 和 077 VH - DOWN (SEQ ID NO:15) 扩增 806.077 重链克隆 (VH14A)。PCR 按如下进行: 向 100ng 质粒 DNA 中加入 5 μ l dNTPs (2.5mM), 5 μ l 10 \times 酶缓冲液 (见上), 1 μ l 25pM/ μ l 反向引物, 1 μ l 25pM/ μ l 正向引物, 0.5 μ l 热稳定的 DNA 聚合酶和 DEPC - 处理的水以得到 50 μ l 的体积。PCR 条件设定为 94 $^{\circ}$ C 90 秒; 55 $^{\circ}$ C 60 秒; 72 $^{\circ}$ C 120 秒, 15 轮循环, 以 72 $^{\circ}$ C 进一步 10 分钟的孵育结束最后一轮循环。产物于 2 % 琼脂糖凝胶上分析。纯化 DNA 且以有关的限制酶消化该 DNA 片段以备用于以后的载体克隆。

为了抗体轻链的分泌, 设计既含有 Kozak 识别序列信息又含有轻链信号序列的双链 DNA 盒。该盒由两个单独的寡核苷酸 (SEQ ID NOS:42 和 43) 所组成, 这两个寡核苷酸被杂交且随后克隆入质粒 pNG3 (已用标准的方法加以适当的限制和分离) 中的 Hind III 和 Sac I 限制位点之间以产生载体 pNG3 - Vkss。含有人轻链 κ 恒定区序列的 SEQ ID NO:46 的 DNA 序列以 Xma I 和 Xho I 消化并插入到 Xho I 和 Xma I 切割的 pNG - Vkss 质粒以得到载体 pNG3 - Vkss - HuCK (NCIMB no. 40798)。此外, 将新霉素抗性基因表达盒克隆入 pNG3 - Vkss - HuCK (来自 pSG5 质粒变体 pSG5 - Neo 载体, 获自 S. Green, Zeneca Pharmaceuticals, 其它来源包括载体如 pMClneo, Stratagene, 目录号 213201)。将新霉素抗性基因表达盒克隆为 Xba I 片段并克隆入 pNG3 - Vkss - HuCK 的 Xba I 位点中且用限制酶消化检查方向。这得到了质粒 pNG3 - Vkss - HuCK - Neo (NCIMB 40799)。通过在 pNG3Vkss HuCK - neo 载体的 Sac II 和 Xho I 位点之间的直接克隆将上述轻链基因序列插入阅读框中。将获得的轻链基因的 PCR 片段用 Sac II 和 Xho I 限制酶消化并克隆入含有 VK 信号序列和 HuCK 恒定区编码序列的类似限制的表达载体中。产生的嵌合的 806.077 轻链序列显示于 SEQ ID NOS:16 和 17 中。

同样地, 对于抗体重链的分泌, 设计既含有 Kozak 识别序列信息又

实施例 9

特异性核酸序列变异的杂交测试

9.1 杂交测试

5 描述了用于测定含有与特异性 806.077 抗体序列有关序列的变异核酸的方法。这些变异的核酸可以多种形式存在如在 cDNA 文库筛选中固定于上述膜上的细菌菌落 DNA 或真核细胞 DNA/RNA 或通过凝胶电泳分离并然后转移至适当的膜上用于 Northern (Maniatis 等, 第 7 章, p 39) 或 Southern (Maniatis, 第 9 章, p 31) 杂交技术的纯化核酸片段。

10 9.2 杂交探针

杂交探针可从编码特异性 806.077 抗体的目的核酸序列、更为特异地是从可变区,特别是编码该区域 CDR3 区域的任何 DNA 或 RNA 片段产生。合成的寡核苷酸或其互补序列可用作 CDR3 编码区的特异性探针。

15 通过 T4 多核苷酸激酶的作用加入 $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ ATP 的 5'放射性磷酸基团而从合成的寡核苷酸中产生杂交探针。将 20 pmoles 的寡核苷酸加入到 20 μl 的反应物中,其中含有 100mM Tris, pH 7.5, 10mM MgCl_2 , 0.1mM 精胺, 20mM 二硫苏糖醇 (DTT), 7.55 μM 的 ATP, 55 μCi $[\gamma - ^{32}\text{P}]$ ATP 和 2.5 μl 的 T4 多核苷酸激酶 (发玛西亚生物技术公司, Uppsala, 瑞典)。将反应于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 分钟且用于杂交前于 70 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 分钟。用于从寡核苷酸 (第 11 章) 或 DNA 和 RNA 片段 (第 10 章) 产生杂交探针的方法列于 Maniatis 中。许多专用的试剂盒也可用于这些方法中。

9.3 杂交条件

25 含有此核酸的滤膜在适当密闭瓶中的 100ml 溶液于 65 $^\circ\text{C}$ 预杂交最少 1 小时,其中的溶液含有 6 \times SSC、0.1% SDS 和 0.25% 的干脱脂牛奶 (MarvelTM)。专用的杂交仪如 HB - 1 型 (Techne 公司) 杂交仪提供用于该实验的可重复条件。

30 然后将预杂交液以含有 6 \times SSC、0.1% SDS、0.25% 的干脱脂牛奶 (MarvelTM) 和上面产生的寡核苷酸探针的 10ml 探针溶液替代。使温度逐渐降至 30 $^\circ\text{C}$ 以下之前,将该滤膜于此溶液于 65 $^\circ\text{C}$ 孵育 5 分钟。然后丢弃探针溶液并将滤膜于室温中在 100ml 6 \times SSC、0.1% SDS

中洗 5 分钟。然后于 30 °C 于新鲜各批的相同溶液中进行进一步洗膜且然后每次 5 分钟洗膜增加 10 °C 直至 60 °C。

5 洗完后，将滤膜干燥并用于在轻度 - 固定的胶片盒中于 - 70 °C 用快速的钨酸盐增感屏以增强图象生成而暴露至 X - 射线胶片如 Hyperfilm™ MP (Amersham International)。在显影以显示滤膜上放射活性区图象生成之前将胶片曝光适当的时间（一般过夜）。通过与不应该产生图象的完全无关序列相比图象生成的存在而鉴定相关的核酸序列。一般地，在最高的洗膜温度（60 °C）时相关的序列将出现阳性。然而，仅在较低的洗膜温度（50、40 或 30 °C）时相关的序列可
10 显示阳性。

这些结果也将依赖于所用探针的性质。较长核酸片段探针将需要在高温下杂交更长的时间但在较高的洗膜温度和/或较低的盐浓度下可保持与相关序列的结合。较短、混合或简并的寡核苷酸探针可需要较少严格的洗膜条件如较低的温度和/或更高的 Na⁺ 浓度。杂交方法的讨论列于
15 Maniatis 中（第 11 章）。

实施例 10

药物组合物

下面说明含有可与适当的前体药物一起用于治疗 806.077 抗体的代表性药物剂量形式。

20 用于 ADEPT 的可注射溶液

用于注射的无菌水溶液，每 ml 溶液含有：

806.077 抗体 - CPG2 偶联物	1.0mg
三水醋酸钠	6.8mg
氯化钠	7.2mg
25 Tween 20	0.05mg

用于成人的偶联物的典型剂量为 30mg，3 天后以 1 小时间隔施用 3 个 1g 的前体药物剂量。适当的 CPG2 偶联物为描述于实施例 105 和 106 中的任何一种偶联物。在表中具有 HCPB 的偶联物可替代 CPG2 偶联物。适当的 HCPB 偶联物为描述于实施例 48 - 101 中的任何一种偶联
30 物。

用于肿瘤免疫治疗的可注射溶液

用于注射的无菌水溶液，每 ml 溶液含有：

806.077 抗体 - B7 偶联物	1.0mg
三水醋酸钠	6.8mg
5 氯化钠	7.2mg
Tween 20	0.05mg

用于成人的偶联物的典型剂量为 30mg。适当的偶联物描述于实施例 104 中。

实施例 11

10 起始 806.077 人源化抗体重链和轻链可变区基因的构建

首先在下文中提出人源化策略的概述。抗体人源化的目的是将非 - 人抗体的结合位点连接到人抗体的支持框架右而同时维持特征性的抗原结合亲和性和母本抗体的特异性。这种抗体工程的可行性是不同种哺乳动物免疫球蛋白密切相关的序列和结构同源性的结果。

15 在其最基本的形式中，如首先由 Jones 等在自然 (1986) 321, 522 - 525 中所述的，该方法包括将一种抗体 Fv 区的 6 个高度可变区或互补性决定区 (CDRs) 转移至另一种抗体上。然而，经验已显示除了 CDRs 之外，为了此过程成功，抗体框架中的氨基酸也需要转移常是必要的因为这样的残基有时似乎接触并影响 CDR 环的构型。

20 在 806.077 抗体中，制备包括 6 个鼠 CDRs 和多个框架残基替代的该抗体的“起始”人源化版本。此构建体用作模板，从中通过导入额外的“鼠”残基替代而进一步制备变体 (实施例 12 - 47)。该实施例的其余部分详细描述了起始人源化的构建体。

挑选人抗体重链可变区 NEWM (Poljak, R. J.等 (1974) pNAS 25 71, 3440 - 3444) 和轻链κ 可变区 REI (Palm, W.和 Hrlschmann, N. Z. (1975) 生理化学 356, 167 - 191) 以形成受体人抗体的框架。用该 Fv 框架成功人源化的众多实施区描述于文献中且这 2 个蛋白区的 3 维结构已经解决。根据鼠 806.077 重链和轻链可变区蛋白序列与其最密切相关的 Kabat 鼠亚基连续序列 (和单个序列成员) 和人 NEWM 和 REI 30 蛋白序列的比较，设计编码起始人源化抗体的单个 DNA 序列，其中掺入有鼠 CDRs 和认为是重要的任何额外的框架替代。

掺入的鼠 806.077 CDR 序列对于轻链可变区描述于 SEQ ID

NOS : 26 ; 27 和 28 中且分别发现于位点 24 - 34 (CDR1) 、 50 - 56 (CDR2) 和 89 - 97 (CDR3) 。掺入到重链可变区的 CDRs 分别描述于 SEQ ID NOS : 29 、 31 和 32 的位点 31 - 35 (CDR1) 、 50 - 65 (CDR2) 、 95 - 102 (CDR3) 中 (用 Kabat 命名法) 。在重链可变区造成 NEWM 框架额外的改变 V24A ; S27F ; T28N ; F29I ; S30K ; V71A ; A92H ; R93V (Kabat 命名法) 且在轻链可变区中没有造成额外的框架改变。

设计编码 806.077 人源化抗体重链 (806.077HuVH1) 和轻链 (806.077 HuVK1) 可变区其中掺入有 CDRs 和任何额外框架残基改变的单个合成 DNA 序列。显示于 SEQ ID NOS : 48 和 53 中的该抗体可变区基因序列可通过多种方法制备, 包括由 Edwards (1987) 美国生物技术实验室, 5, 38 - 44, Jayaraman 等, (1991) 美国自然科学院院报 88, 4084 - 4088, Foguet 和 Lubbert (1992) 生物技术 13, 674 - 675 和 Pierce (1994) 生物技术 16, 708 所述的方法。

优选地, 显示于 SEQ ID NOS : 48 和 53 中的 DNA 序列通过类似于由 Jayaraman 等, (1991) 在美国自然科学院院报 88, 4084 - 4088 中所述的 PCR 方法制备。

通过将克隆入 pNG3 - Vkss - HuCK - Neo (NCIMB no. 40789) 表达载体而将人源化的 806.077 抗体可变区轻链基因序列 (SEQ ID NOS : 49 和 50) 插入框架中。为了完成此过程, 编码人源化可变轻链基因 (SEQ ID NO : 48) 的合成 PCR DNA 片段以 Sac II 和 Xho I 限制酶消化并克隆入含有 VK 信号序列和 HuCK 恒定区编码序列的类似限制的 pNG3 - Vkss - HuCK - Neo 载体中。制备的完全人源化的 806.077 轻链序列 (806.077 HuVK1 - HuCK) 的 DNA 和蛋白序列与其信号序列一起分别显示于 SEQ ID NOS : 51 和 52 中并将该载体命名为 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK1 - HuCK - Neo 。

类似地, 对于人源化的抗体重链, 通过直接克隆入 pNG4 - VHss - HuIgG2CH1' (NCIMB no. 40794) 表达载体中而将人源化可变区重链基因序列 SEQ ID NOS : 54 和 55 插入到框架中。为了完成此过程, 获得的用于人源化重链基因 (SEQ ID NO : 53) 的合成 PCR 片段以 Eco RI 和 Sac I 限制酶消化并克隆入含有 VH 信号序列和 HuIgG2CH1' 恒定区编码序列的类似限制的 pNG4 - VHss - HuIgG2CH1' 载体中。

制备的完全人源化的 806.077Fd 重链序列 (806.077 HuVH1 - HuIgG2Fd)的 DNA 和蛋白序列与其信号序列一起分别显示于 SEQ ID NOS : 56 和 57 中并将该载体命名为 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG2CH1'.

5 通过构建既含有 806.077 HuVK1 轻链又含有 806.077 HuVH1 重链可变区抗体基因的其表达质粒而制备起始的人源化抗体构建体。含有人源化轻链可变区 HuVK1 (SEQ ID NOS : 49 和 50) 的质粒 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK1 - HuCK - Neo 载体用限制酶 Bam HI 和 Sal I 消化且将载体走 1 % 的琼脂糖凝胶, 切下并纯化载体带。质粒 pNG4
10 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG2CH1' (含有人源化的 806.077 HuVH1 重链可变区 (SEQ ID NOS : 56 和 56)) 用限制酶 Bgl II 和 Sal I 消化, 反应于 2 % 的琼脂糖上电泳并切下和纯化该片段。将回收的 DNA 片段随后连接至制备的 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK1 - HuCK - Neo 载体中以制备所需 HuVH1/HuVK1 共表达载体的克隆。

15 通过标准的电穿孔技术将这些构建体转染至 NSO 骨髓瘤细胞 (ECACC No. 85110503) 中并筛选出具有 G418 抗生素抗性的转化子。在下述的抗 - 人抗体 Fd ELISA 和 CEA 结合 ELISA 分析中测定获得克隆 2 种抗体的表达。

对于 CEA ELISA, 将 96 孔免疫板 (NUNC MAXISORB™) 的
20 每只孔以 pH 9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液 (缓冲液胶囊 - 西格玛 C3041) 中的 50ng 的 CEA 包被并于 4 °C 孵育过夜。将该平板从 PBS + 0.05 % Tween 20 洗三次且然后于室温以每孔 PBS + 0.05 % Tween 20 中的 150µl 1 % BSA 封闭 1 小时。按前述洗板, 每孔加入 100µl 测试样品且于室温孵育 2 小时。再次以 PBS + 0.05 % Tween 20 洗板 3 次,
25 每孔加入 1 % BSA PBS - Tween 20 中的 100µl 1/500 稀释的 HRPO 标记的羊抗 - 人修饰抗体 (西格玛 A 7164), 并于室温于振摇的平台上孵育至少 1 小时。按前述洗板且然后再以 PBS 洗一次。为了测定结合, 每孔加入 100µl 显影液 (一个胶囊的磷酸 - 柠檬酸缓冲液 - 西格玛 P4922 - 溶于 100ml H₂O 中, 向其中加入 30mg 的片剂 O - 次二苯基二胺二盐酸 (O - phenylenediamine dihydrochloride - 西格玛
30 P8412) 并孵育达 15 分钟。通过加入 75µl 2M 的 H₂SO₄ 终止反应, 并于 490nm 处读吸收值。

在抗-人抗体 Fd ELISA 中, 96 孔免疫板的每孔以 pH 9.6 的 50mM 碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液 (缓冲液胶囊 - 西格玛 C3041) 中的 1.2 μ g 单抗-人 Fd 抗体 (Binding Site PC 075) 包被于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。以 PBS + 0.05% Tween 20 洗板三次且然后以每孔 150 μ l 的 PBS + 0.05% Tween 20 中的 1% BSA 在室温封闭 1 小时。按前述洗板, 每孔加入 100 μ l 测试样品并于室温孵育 2 小时。再次以 PBS + 0.05% Tween 20 洗板 3 次, 并每孔加入 1% BSA PBS - Tween 20 中 100 μ l 的 HRPO - 标记的羊抗-人 κ 抗体 (西格玛 A 7164) 且于振摇的平台上室温孵育至少 1 小时。按前述洗板且然后再以 PBS 洗板一次。为了检测结合, 按前述加入显影液等用于 CEA 结合分析。

筛选出发现显示出最佳表达和 CEA 结合水平的克隆用于进一步扩增至 24 孔板并重新测试。筛选并扩增根据这些分析标准的最佳克隆从而进行滴度制备并进一步培养 14 天, 其中的滴度制备用 1:10 稀释的汇合生长培养物接种 (即: 100ml 加入 900ml 的新鲜培养基)。然后按实施例 102 中所述从培养上清中纯化人 F(ab')₂ 抗体片段。

实施例 12 - 38

人源化重链和轻链可变区基因变异的进一步连接 806.077 人源化重链和轻链可变区变异体的构建

起始人源化 806.077 可变区基因也用于随后的含有额外鼠框架残基进一步基因构建体的构建。通过盒式诱变得到对该基因序列的修饰 (在大多数情况下)。在此技术中, 部分的原始基因通过以两种适当的特定酶切割从完整的质粒载体中去除且然后以双链 DNA 盒 (由 2 个互补的寡核苷酸所组成, 它们杂交到一起以与适当的粘性末端形成 DNA 片段) 通过直接连接到该制备的质粒中而替代, 因此重组了基因但现在含有所需的 DNA 变化。重链或轻链内突变的进一步连接也可通过利用可得到的独特限制酶位点以适当的变异体之间简单 DNA 片段的交换而制备。

除了原始的序列 HuVK1 (SEQ ID NOS: 49 和 50) 外进一步制备人源化轻链可变区的变异体且这些分别称为 HuVK2、HuVK3 和 HuVK4。为了制备氨基酸改变 M4L (Kabat 命名), 轻链可变区变异体 HuVK2 为原始 HuVK1 编码序列的修饰, 其中的基因 (SEQ ID NO: 49) 通过盒式诱变加以突变。将质粒 pNG3 - Vkss -

806.077HuVK1 - HuCK - Neo (其含有完整酸的人源化轻链 (SEQ ID NOS : 49 和 50) 用限制酶 Sac II 和 Nhe I 消化。然后将消化产物上样至 2 % 的琼脂糖凝胶上并切下从余下载体中分离出的片段。然后将载体从凝胶中切出, 回收并贮存于 - 20 °C 直至需要。设计和合成 2 条寡核苷酸 (含有所需的碱基改变) (SEQ ID NOS : 58 和 59)。通过加入 200pmol 的每种寡核苷酸至总共 30µl 的 H₂O 中, 加热至 95 °C 且使该溶液缓慢冷却至 30 °C 而将这 2 条寡核苷酸杂交。然后将 100pmol 退火的 DNA 产物直接连接至前面制备的载体中。此 DNA “盒” 交换在表达载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK2 - HuCK - Neo 中的适当位点产生了所需的 HuVK2 DNA 和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 60 和 61)。

同样地, 用合成寡核苷酸 (SEQ ID NOS : 62 和 63) 构建具有氨基酸改变 DIQ; Q3V; M4L (Kabat 命名法) 的 HuVK3 以再次产生在表达载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK3 - HuCK - Neo 中的适当位点具有所需的 HuVK3 DNA 和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 64 和 65)。

通过不同的技术制备轻链可变区变体 HuVK4, 因为在靠近突变位点处没有独特的限制酶位点。通过 PCR 诱变技术制备具有氨基酸改变 L47W 的 HuVK4。载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK1 - HuCK - Neo 用作 2 个 PCR 反应的模板 (94 °C, 90 秒; 55 °C, 60 秒; 72 °C, 120 秒, 15 个循环, 所有缓冲液按前述)。反应 A 使用合成寡核苷酸序列引物 SEQ ID NOS : 66 和 67 且反应 B 使用合成寡核苷酸序列引物 SEQ ID NOS : 68 和 69。这些 PCR 反应 (A 和 B) 的产物分别为 535 个碱基对和 205 个碱基对长度的片段。这些反应产物于 2 % 的琼脂糖凝胶上电泳且与任何背景产物分离。从凝胶中切下预期大小的带并回收。制备产物 A 和 B 各种量的混合物并且用合成的寡核苷酸 SEQ ID NO : 66 和 58 进行 PCR 反应。以限制酶 Sac II 和 Xho I 消化得到的产物 (Ca. 700 个碱基对) 并于 2 % 的琼脂糖凝胶上将切割产物分离。从凝胶中切下并回收预期 310 碱基对大小的条带。然后将此片段连接到载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK1 - HuVK - Neo 载体 (以前以限制酶 Sac II/Xho I 切割并随后分离) 中且因此在表达载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK4 - HuCK - Neo 中产生所需的 HuVK4 DNA 和蛋白序

列 (SEQ ID NOS : 70 和 71) 。

除了原始的 HuVH1 序列 (SEQ ID NOS : 54 和 55) 外, 制备
人源化重链可变区的 6 个其它变异体且这些分别称为 HuVH2 至
HuVK7。为了产生氨基酸改变 G49A (Kabat 命名), 重链可变区变异
5 体 HuVH2 为原始 HuVH1 编码序列的修饰, 其中的基因 (SEQ ID
NO : 54) 由盒式诱变加以突变。质粒 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1
- HuIgG2CH1' (其中含有完整的人源化 IgG2 重链 Fd (SEQ ID
NOS : 56 和 57)) 以限制酶 Stu I 和 Not I 消化。然后将消化产物上样
10 于 2 % 琼脂糖凝胶中且从余下的载体中分离切出的片段。从凝胶中切下
并回收载体 DNA 并贮存至 - 20 °C 直至需要使用。设计合成 2 条寡核苷
酸 (SEQ ID NOS : 72 和 73), 杂交并将产物直接连接至以前制备
的载体中。该 DNA “盒” 交换在表达载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1
- HuIgG2CH1' 中的适当位点产生所需的 HuVH2 DNA 和蛋白序列
(SEQ ID NOS : 74 和 75) 。

15 类似地, 用合成的寡核苷酸 (SEQ ID NOS : 76 和 77) 构建具
有氨基酸改变 T73S ; F78A 的 HuVH3 (Kabat 命名), 然而, 在此情
况, 载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG2CH1' 用限制酶 Not
I 和 Sac II 消化。将合成的 DNA 盒直接连接至前面制备的载体中以在表
达载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH3 - HuIgG2CH1' 中产生所需的
20 HuVH3 DNA 和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 78 和 79) 。

具有氨基酸改变 G49A ; T73S ; 和 F78A (Kabat 命名) 的 HuVH4
连接了 HuVH2 (SEQ ID NOS : 74 和 75) 和 HuVH3 (SEQ ID
NOS : 78 和 79) 的变异体。这通过以酶 Not I 和 Nhe I 消化 pNG4 -
VHss - 806.077HuVH3 - HuIgG2CH1' 载体且于 2 % 的琼脂糖凝胶上分
25 离后分离出 ca. 200 碱基对的 Not I/Nhe I 限制性片段而完成。回收该片
段并且随后连接至 pNG4 - VHss - 806.077HuVH2 - HuIgG2CH1' 载体
(以相同的 Not I 和 Nhe I 限制酶消化并纯化载体片段) 中。得到的克
隆在表达载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH4 - HuIgG2CH1' 中含有所
需的 HuVH4 DNA 和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 80 和 81) 。

30 用合成的寡核苷酸 (SEQ ID NOS : 82 和 83) 构建具有氨基酸
改变 V67A (Kabat 命名) 的 HuVH5。再次将载体 pNG4 - VHss -
806.077HuVH1 - HuIgG2CH1' 用限制酶 Not I 和 Sac II 消化。将合成的

DNA 盒直接连接至前面制备的载体以在表达载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH5 - HuIgG2CH1'中产生所需的 HuVH5 DNA和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 84 和 85) 。

5 用合成的寡核苷酸 (SEQ ID NOS : 86 和 87) 构建具有酸改变 V67A ; T73S 和 F78A (Kabat 命名) 的 HuVH6 且对于该突变, 将载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG2CH1'用限制酶 Not I 和 Sac II 消化。将合成的 DNA 盒直接连接至前面制备的载体中以在表达载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH6 - HuIgG2CH1'中产生所需的 HuVH6 DNA 和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 88 和 89) 。

10 具有氨基酸改变 G49A ; V69A ; T73S ; 和 F78A (Kabat 命名) 的 HuVH7 连接 HuVH2 (SEQ ID NOS : 74 和 75) 和 HuVH6 (SEQ ID NOS : 88 和 89) 变异体。这通过以酶 Not I 和 Nhe I 消化 pNG4 - VHss - 806.077HuVH6 - HuIgG2CH1'载体并于 2 % 的琼脂糖凝胶中分离后分离出 ca. 200 个碱基对的 Not I/Nhe I 限制性片段而完成。回收该
15 片段并连接至 pNG4 - VHss - 806.077HuVH2 - HuIgG2CH1'载体(以相同的 Not I 和 Nhe I 限制酶消化并纯化载体片段)。得到的克隆在表达载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH7 - HuIgG2CH1'中含有所需的 HuVH7 DNA 和蛋白序列 (SEQ ID NOS : 90 和 91) 。

20 这种人源化重链和轻链可变区基因变异体的连接通过切下重链 Fd 基因变异体表达盒 (既包括启动子又包括基因, 切成 Bgl II/Sal I 片段) 并将该片段克隆入轻链变异载体的 Bam HI/Sal I 位点以制备共表达载体构建体而完成。基于前述人源化重链和轻链变异体的各种可能连接条目列于下表中。

25

30

表 人源化重链和轻链可变区变异体的连接

实施 例 号	重链 可变区	SEQ ID NOS:	轻链 可变区	SEQ ID NOS:	共表达质粒载体
11	HuVH1	54 和 55	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH1/HuVK1/HuIgG2
12	HuVH1	54 和 55	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH1/HuVK2/HuIgG2
13	HuVH1	54 和 55	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH1/HuVK3/HuIgG2
14	HuVH1	54 和 55	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH1/HuVK4/HuIgG2
15	HuVH2	74 和 75	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH2/HuVK1/HuIgG2
16	HuVH2	74 和 75	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH2/HuVK2/HuIgG2
17	HuVH2	74 和 75	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH2/HuVK3/HuIgG2
18	HuVH2	74 和 75	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH2/HuVK4/HuIgG2
19	HuVH3	78 和 79	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH3/HuVK1/HuIgG2
20	HuVH3	78 和 79	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH3/HuVK2/HuIgG2
21	HuVH3	78 和 79	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH3/HuVK3/HuIgG2
22	HuVH3	78 和 79	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH3/HuVK4/HuIgG2
23	HuVH4	80 和 81	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH4/HuVK1/HuIgG2
24	HuVH4	80 和 81	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH4/HuVK2/HuIgG2
25	HuVH4	80 和 81	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH4/HuVK3/HuIgG2
26	HuVH4	80 和 81	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH4/HuVK4/HuIgG2
27	HuVH5	84 和 85	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH5/HuVK1/HuIgG2
28	HuVH5	84 和 85	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH5/HuVK2/HuIgG2
29	HuVH5	84 和 85	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH5/HuVK3/HuIgG2
30	HuVH5	84 和 85	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH5/HuVK4/HuIgG2
31	HuVH6	88 和 89	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH6/HuVK1/HuIgG2
32	HuVH6	88 和 89	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH6/HuVK2/HuIgG2
33	HuVH6	88 和 89	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH6/HuVK3/HuIgG2
34	HuVH6	88 和 89	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH6/HuVK4/HuIgG2
35	HuVH7	90 和 91	HuVK1	49 和 50	pNG 806HuVH7/HuVK1/HuIgG2
36	HuVH7	90 和 91	HuVK2	60 和 61	pNG 806HuVH7/HuVK2/HuIgG2
37	HuVH7	90 和 91	HuVK3	64 和 65	pNG 806HuVH7/HuVK3/HuIgG2
38	HuVH7	90 和 91	HuVK4	70 和 71	pNG 806HuVH7/HuVK4/HuIgG2

与实施例 11 类似, 通过构建既含 806.077HuVK4 轻链又含有 806.077HuVH1 重链可变区抗体基因的共表达质粒完成实施例 14。在此

实施例中，含有人源化轻链可变区 HuVK1 (SEQ ID NOS : 70 和 71) 的质粒 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK4 - HuCK - Neo 载体用限制酶 Bam HI 和 Sal I 消化并将载体于 1 % 琼脂糖凝胶上电泳并纯化载体带。质粒 pNG4 - VHss - 806.077HuVH2 - HuIgG2CH1' (含有人源化的 806.077HuVH1 重链可变区 (SEQ ID NOS : 56 和 57)) 用限制酶 Bgl II 和 Sal I 消化，反应产物与 2 % 琼脂糖凝胶上电泳并切下和纯化该片段的条带。将回收的 DNA 片段连接至制备的 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK4 - HuCK - Neo 载体以制备所需 HuVH1/HuVK4 共表达载体的克隆。

10 如在实施例 11 中所述，通过标准的电穿孔技术将这些构建体转染入 NSO 骨髓瘤细胞 (ECACC No. 85110503) 中并筛选具有 G418 抗性的转化子。在抗 - 人抗体中 Fd ELISA 和 CEA 结合 ELISA 分析中测定获得克隆 2 种抗体的表达。筛选和扩增发现是表现出最佳表达和 CEA 结合水平的克隆并进行产物表达。然后按实施例 102 中所述从培养上清中纯化人 F(ab')₂ 抗体片段。

15 实施例 39 - 47

具有各种类型人重链恒定区的人源化 F(ab')₂ 片段的表达

可使用其它类型嵌合的重链 Fd 构建体。因此，制备含有 HuIgG1CH1' (SEQ ID NOS : 20 和 21) 或 HuIgG3CH1' (SEQ ID NOS : 24 和 25) 重链载体的其它变体，其中的恒定区由 HuIgG2CH1' 基因 (SEQ ID NOS : 22 和 23) 所替代。产生的载体分别为 pNG4 - VHss - HuIgG1CH1' 和 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1'。本文讨论的重链抗体可变区可通过从 Eco RI 和 Sac I 限制酶消化而从适当的 pNG4 - VHss - “VH 可变区” - HuIgG2CH1' 质粒中切下并克隆入类似限制的 pNG4 - VHss - HuIgG1CH1' 或 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1' 载体中且因此制备完整的重链 Fd 序列。如上述，一旦构建出单个的重链和轻链序列，重链 Fd 基因表达盒 (既包括启动子又包括基因) 可通过限制性消化切下并将该片段克隆入轻链载体的适当位点中以制备最终的共表达载体。下表描述了实施例 33 - 47 中各种重链和轻链可变区已 30 与多种不同类型的人重链恒定区发生连接。

在实施例 44 中，载体 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1' 以限制酶 Eco RI 和 Sac I 消化并按前述分离载体片段。通过以 Eco RI 和 Sac I 限制酶消

化从 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG2CH1' 质粒中切下 HuVH1 重链抗体可变区 (SEQ ID NOS : 54 和 55) 并将该片段克隆入类似限制的 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1' 载体中以在完整的载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG3CH1' 中制备完整的人源化 IgG3 重链 Fd 序列 (SEQ ID NOS : 94 和 95) 。将重链 Fd 基因表达盒 (既包括启动子又包括基因) 切成 Bgl II/Sac I 片段并克隆入轻链载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK1 - HuCK - Neo (含有 HuVK1 - HuCK 人源化轻链 SEQ ID NOS : 51 和 52) 的 Bam HI/Sal I 位点, 其中的载体已用限制酶 Bam HI 和 Sal I 消化, 1 % 琼脂糖上电泳并纯化了该载体带。这便制备了可表达人源化 806.077HuVH1/HuVK1 - HuIgG3/Kappa. Fd 抗体片段的共表达载体 (pNG806HuVH1/HuVK3/HuIgG3) 。

表

实施例号	人源化重链	SEQ ID NOS	人源化轻链	SEQ ID NOS	共表达质粒载体
39	HuVH1-HuIgG1	92 和 93	HuVK1-HuCK	51 和 52	Png 806HuVH1/HuVK1/HuIgG1
40	HuVH1-HuIgG2	56 和 57	HuVK1-HuCK	51 和 52	pNG 806HuVH1/HuVK1/HuIgG2
41	HuVH1-HuIgG3	94 和 95	HuVK1-HuCK	51 和 52	pNG 806HuVH1/HuVK1/HuIgG3
42	HuVH1-HuIgG1	92 和 93	HuVK3-HuCK	96 和 97	pNG 806HuVH1/HuVK3/HuIgG1
43	HuVH1-HuIgG2	56 和 57	HuVK3-HuCK	96 和 97	pNG 806HuVH1/HuVK3/HuIgG2
44	HuVH1-HuIgG3	94 和 95	HuVK3-HuCK	96 和 97	pNG 806HuVH1/HuVK3/HuIgG3
45	HuVH1-HuIgG1	92 和 93	HuVK4-HuCK	98 和 99	pNG 806HuVH1/HuVK4/HuIgG1
46	HuVH1-HuIgG2	56 和 57	HuVK4-HuCK	98 和 99	pNG 806HuVH1/HuVK4/HuIgG2
47	HuVH1-HuIgG3	94 和 95	HuVK4-HuCK	98 和 99	pNG 806HuVH1/HuVK4/HuIgG3

在实施例 47 中, 载体 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1' 以 Eco RI 和 Sac

I 限制酶消化并分离该载体片段。通过以 Eco RI 和 Sac I 限制酶消化从 pNG4 - VHss - HuVH1 - HuIgG2CH1' 质粒中切下 HuVH1 重链抗体可变区 (SEQ ID NOS : 54 和 55) 并将该片段克隆入类似限制的 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1' 载体中。这便在完整的载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG3CH1' 中产生了完整的人源化 IgG3 重链 Fd (SEQ ID NOS : 94 和 95)。将该重链 Fd 基因表达盒 (包括启动子和基因) 切成 Bgl II/Sal I 片段并克隆入轻链载体 pNG3 - Vkss - 806.077HuVK4 - HuCK - Neo 载体 (含有 HuVK4 - HuCK 人源化轻链 SEQ ID NOS : 98 和 99) 的 Bam HI/Sac I 位点中, 其中的轻链载体已用限制酶 Bam HI 和 Sal I 消化, 1 % 琼脂糖上电泳且纯化载体带。这产生了可表达人源化 HuVH1/HuVK1HuIgG3/Kappa. Fd 抗体片段的共表达载体构建体 pNG806HuVH1/HuVK4/HuIgG3。

列于上表中的其它实施例均以与实施例 44 和 47 中所述的类似方式加以制备。然而, 在含有人 IgG1 的构建体实施例中, 最终共表达载体的构建通过克隆切成 Bgl II/Bam HI 片段 (因在 HuIgG1CH1' 恒定区基因中有一个内部的 Sal I 限制位点) 的重链 Fd 基因表达盒 (包括启动子和基因) 并克隆入适当制备轻链载体的 Bam HI 位点中加以完成。这通过限制性消化 (如以限制酶 Hind III) 和琼脂糖凝胶电泳分析加以完成, 在电泳中看到得到的片段与类似消化的 HuIgG2 版本 (实施例 11 - 38) 基本一致。当比较 2 种构建体的带型时, 我们可确定该重链盒的方向是正确的。

如在前面实施例 11 中所述, 通过标准的电穿孔技术将这些构建体转染入 NSO 骨髓细胞 (ECACC No. 85110503) 中并筛选具有 G418 抗性的转染子。在抗 - 人抗体 Fd ELISA 和 CEA 结合 ELISA 分析中测试获得克隆两种抗体的表达并筛选和扩增发现是表现出最佳表达和 CEA 结合水平的克隆并培养而用于基因表达。如前面一样, 然后按实施例 102 中所述从培养上清中纯化人 F(ab')₂ 抗体片段。

实施例 48

人源化的 806.077F(ab')₂ - [A248S, G251T, D253K] HCPB 融合蛋白的制备

该实施例描述了编码连接到 [A248S, G251T, D253K] HCPB 上的人源化 806.077 Fd 重链片段基因的制备和其与编码人源化 806.077

轻链基因和编码人羧肽酶 B 前体区基因的共表达以得到在每个重链片段的 C - 末端具有 [A248S, G251T, D253K] HCPB 分子的 F(ab')₂ 蛋白。人源化 Fd 重链片段的恒定区和铰链区来自人 IgG3 抗体的同型。表达的蛋白也称为抗体 - 酶融合蛋白。

5 (a) 编码连接到 [A248S, G251T, D253K] HCPB 人源化的 806.077 Fd 重链片段基因的制备及其向 pEE6 中的克隆

编码连接到 [A248S, G251T, D253K] HCPB 上人源化 806.077 Fd 的基因通过从 pEEN1921 (参考实施例 2) 的 PCR 产生。第一次 PCR 以模板 pEEN1921 (2ng) 和寡核苷酸 SEQ ID NO:100 和 SEQ ID
10 NO:101 (每种 100pM) 在含有 10mM Tris - HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.125mM 每种 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的缓冲液中 (100μl) 进行。该反应物于 94 °C 孵育 5 分钟且然后加入热稳定的 DNA 聚合酶 (2.5μ, 0.5μl) 且将混合物镶盖以矿物油 (100μl) 且将反应混合物于 94 °C 孵育 1 分钟, 53 °C 孵育 1 分钟且 72
15 °C 孵育 2.5 分钟 25 轮循环, 再加上 72 °C 孵育 10 分钟。通过于 1 % 琼脂糖 (琼脂糖 I 型, 西格玛 A - 6013) 上的电泳分离 536 碱基对的 PCR 产物然后从凝胶中切下该条带并分离该 DNA 片段。

第二次 PCR 以模板 IgG3 - pBSIIKS + (8.7ng, 描述于参考实施例 4 中) 和寡核苷酸 SEQ ID NO:102 和 SEQ ID NO:103 进行
20 并按上述分离 954 个碱基对的片段。合并上述 2 次 PCR 缓冲液中的 PCR 产物 (以 0.2、1.0 或 5.0ng/μl)。将混合物于 94 °C 孵育 5 分钟, 然后 94 °C 1 分钟和 63 °C 4 分钟进行 10 个循环。向 PCR 缓冲液中 (50μl) 加入寡核苷酸 SEQ ID NOS:101 和 102 (每种 100pM)。94 °C 孵育 3 分钟后, 将混合物进一步于 94 °C 孵育 1.5 分钟, 53 °C 孵育 2 分钟
25 和 72 °C 孵育 2 分钟进行 25 轮循环再于 72 °C 孵育 10 分钟。在此过程中, SEQ ID NO:115 中位点 508 处的 G 碱基变为 A 碱基。

将 1434 个碱基对的 PCR 产物通过于 1 % 的琼脂糖凝胶上的电泳加以分离、纯化并于 37 °C 在含有 100mM Tris - HCl (pH 7.9)、50mM NaCl、10mM MgCl₂、1mM DTT 和 BSA (100μg/ml) 的 100μl
30 总体积中以 Nhe I 和 Xba I (80μ) (New England Biolabs Inc.) 消化 4 小时。再次于 1 % 琼脂糖凝胶上分离并纯化得到的片段。以类似的消化, 将载体 pNG4 - VHss - 806.077HuVH1 - HuIgG2CH1'

(10 μ g , 实施例 11) 以 Nhe I 和 Xba I 切割然后加入牛小肠碱性磷酸酶 (1 μ l ; New England Biolabs , 10 μ / μ l) 以消化质粒从而去除 5' 磷酸基并于 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 30 分钟。通过于 70 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟破坏磷酸酶活性。从琼脂糖凝胶中纯化 Nhe I - Xba I 切割的质粒。将上面的 Nhe I - Xba I 消化的 PCR 产物 (约 500ng) 与上面切割过的质粒 DNA (约 200ng) 在 20 μ l 溶液中于 25 $^{\circ}$ C 连接 4 小时, 其中的溶液含有 50mM Tris - HCl (pH 7.8) 、 10mM MgCl₂、 10mM DTT、 1mM ATP、 50 μ g/ml BSA 和 400 μ T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs Inc.) 将 1 μ l 的反应液用于转化 20 μ l 感受态的大肠杆菌 DH5 α 细胞。转化的细胞铺板至具有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 L - 琼脂上。通过 PCR 鉴定含有人源化 806.077 Fd - [A248S , G251T , D253K] HCPB 基因的潜在克隆。按上述以寡核苷酸 SEQ ID NOS : 104 和 105 对每个克隆进行 PCR 。通过于 1 % 琼脂糖凝胶上的电泳分析 PCR 反应样品 (10 μ l) 。通过 512 个碱基对 PCR 产物的存在鉴定含有所需基因的克隆。产生 512 个碱基对条带的克隆用于 DNA 的小量制备。通过以 Hind III 和 Xba I 消化后 3751 个碱基对和 1862 个碱基对片段的的存在而确证 (checked) 该 DNA 样品。在 DNA 以 Hind III 和 Xba I 消化后含有这些片段的克隆用于大规模的质粒 DNA 制备并通过 DNA 序列分析证实插入的序列。预期的插入序列显示于 SEQ ID NO : 112 中。上面检测过的克隆中, 2 个含有预期的序列但具有单碱基突变。克隆 54 (也称为 pMF 195) 在 SEQ ID NO : 112 中的 605 位点中以 T 碱基代替 A 碱基, 而克隆 68 (也称为 pMF 198) 在位点 1825 中以 C 碱基代替预期的 T 碱基。通过在含有 20mM Tris 醋酸盐 (pH 7.9) 、 50mM 醋酸钾、 10mM 醋酸镁、 1mM DTT 和 BSA (100 μ g/ml) 的缓冲液 (100 μ l) 中以 (每种 10 μ g) Xma I (10 μ) 和 Xba I (100 μ) (New England Biolabs) 消化而从 pMF 195 和 pMF 198 中制备显示于 SEQ ID NO : 112 中的序列。将来自 pMF 195 的 25 个碱基对的片段和来自 pMF 198 的载体片段 (以碱性磷酸酶处理后) 于 1 % 的琼脂糖凝胶上分离并按前述连接到一起。将连续混合物用于转化感受态的 DH5 α 细胞。将转化的细胞铺板于具有氨苄青霉素的 L - 琼脂上并通过以 Xma I 和 Xba I 消化后 5400 个碱基对和 215 个碱基对片段的的存在而筛选得到的克隆。阳性克隆用于大规模质粒 DNA 的制备且插入的序列通过 DNA 序列



分析加以确证。含有克隆号 102 的 (806.077) Fd - [A248S , G251T , D253K] HCPB 基因的质粒命名为 pMF213。将 pMF213 的 Hind III - Xba I 片段克隆入 DH5 α 中的 pEE6 中 [这是 pEE6.hCMV 的衍生物 - Stephens 和 Cockett (1989) 核酸研究 17, 7110 - 其中 hCMV 启动子上游的 Hind III 位点已转变为 Bgl II 位点] (通过 PCR 筛选具有寡核苷酸 SEQ ID NOS : 106 和 107 的 2228 个碱基对的插入子) 以得到 pMF221。

(b) 用于抗体 - 酶融合蛋白表达的共表达载体的制备

为了产生能在真核细胞中表达抗体 - 酶融合蛋白的载体, 使用了 GS - SystemTM (Celltech Biologics) (WO 87/04462 , WO 89/01036 , WO 86/05807 和 WO 89/10404)。该方法需要将人源化抗体轻链基因克隆入载体 pEE14 的 Hind III - Xma I 区域。此载体由 Bebbington 在方法: 酶学方法的伴侣 (companion) (1991) 2, 136 - 145 中描述过。为了构建该表达, 按上述将质粒 pEE14 和 pNG3 - Vks - 806.077HuVK4 - HuCK - Neo (实施例 14) 以 Hind III 和 Xma I 消化。每个消化产物的适当载体 (来自 pEE 14) 和插入子 (来自 pNG3 - Vks - 806.077HuVK4 - HuCK - Neo) 在 1 % 的琼脂糖凝胶上分离并连接在一起且用于转化感受态的 DH5 α 细胞。将转化的细胞铺板至具有氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的 L - 琼脂上。在以 Hind III 和 Xma I 消化 DNA 后通过限制性分析分离 DNA 中 732 个碱基对片段的存在而筛选菌落。产生 732 个碱基对限制性片段的克隆用于大规模质粒 DNA 的制备且通过 DNA 序列分析确证插入子的序列。将含有 pEE14 中 SEQ ID NO : 70 的人源化轻链序列的质粒命名为 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK。

为了制备共表达载体, 在含有 10mM Tris - HCl (pH 7.9) , 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT 和 BSA (100 μ g/ml) 的缓冲液中以 Bgl II (20 μ) 和 Sal I (40 μ) 切割 pMF221 (10 μ g) 并且通过琼脂糖凝胶电泳分离和纯化 4560 个碱基对的片段。同样地, pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 以 Bam HI (40 μ) 和 Sal I (40 μ) , 切割且分离 9.95kb 的载体片段并连接至 pMF221 的 Bgl II - Sal I 片段中且克隆入 DH5 α 。通过以 2 套寡核苷酸 (SEQ ID NOS : 104 和 105 , 和 SEQ ID NOS : 108 和 109) 的 PCR 筛选菌落。通过 DNA

测序对分别产生 185 个碱基对和 525 个碱基对的 PCR 产物的克隆进行特征分析。具有正确序列的克隆命名为 pMF228 - DH5 α 中轻链/Fd - 突变体 HCPB 的共表达载体。人源化的 Fd - 突变 HCPB 序列显示于 SEQ ID NO:113 中。残基 1 至 19 为信号序列, 残基 20 至 242 为 5 可变区和 IgG3 CH1 区域, 残基 243 至 306 为 IgG3 铰链区且残基 307 至 613 为在人 HCPB 序列的残基 248、251 和 253 处具有变化的突变 HCPB 序列。在 HCPB 序列中的改变分别发生于 SEQ ID NO:113 中的位点 554 (Ser)、557 (Thr) 和 559 (Lys)。

(c) 用于 pro HCPB 区域原表达载体的制备

10 按照参考实施例 17 中的国际专利申请号 WO 96/20011 中所述制备第二种真核表达质粒, pEE12, 其中含有用于在 pre - proHCPB (preproHCPB) 中具有额外的 C - 末端亮氨酸残基 (称为 pro - L) 的区域原分泌的 pre - pro (prepro) 序列的基因。按对未修饰的 pre - pro 序列中所述但用寡核苷酸 SEQ ID NOS:110 和 111 从 pMF18 15 中通过 PCR 制备质粒 pMF161。将 359 个碱基对的片段克隆入 pBluescript 以得到 pMF141 且随后克隆入 pEE12 以得到 pMF161。pro - L 的蛋白序列显示于 SEQ ID NO:114。

(d) 抗体 - 酶融合蛋白在真核细胞中的表达

为了在真核细胞中表达, 将含有能够表达抗体酶 - 融合蛋白的基因 20 (pMF228) 和 pro - L 序列 (pMF161) 的载体转染入 COS - 7 细胞中。COS 细胞为以起始点 - 缺失的 SV40 病毒转化的非洲绿猴肾细胞系 CU - 1 并且由于其具有将含有 SV40 复制起点的环状质粒复制至很高拷贝数的能力而广泛用于各种蛋白短期暂时的表达。有 2 种广泛使用的 COS 细胞克隆, COS - 1 和 COS - 7。用于 COS 细胞转染的基本方 25 法学由 Bebbington 在方法: 酶学方法伴侣 (1991), 2, p 141 中描述过。为了 HCPB 的表达, 通过已知的脂质体转染方法 - 阳离子脂 - 介导的多核苷酸运输 [Felgner 等, 在方法: 酶学方法伴侣 (1993) 5, 67 - 75] 在 6 - 孔培养板中含有 10 % 热灭活的胎牛血清 (FCS) 的 2ml Dulbecco 改进的 Eagle 培养基中, 将质粒载体 pMF48 和 pMF67 30 (每种 2 μ g) 用于转染 COS - 7 细胞 (2×10^5)。将细胞于 CO₂ 培养箱中孵育 20 小时。无血清培养基 (200 μ l) 中质粒 DNA 的混合物与 LIPOFECTIN™ 试剂 (12 μ l) 轻轻混合并于环境温度中孵育 15 分钟。



从无血清培养基 (2ml) 洗细胞。将无血清培养基 (600 μ l) 加入到 DNA/LIPOFECTIN™ 中并将混合物覆盖于细胞上面并于 CO₂ 培养箱中于 37 °C 孵育 6 小时。含有培养基的 DNA 以含有 10 % FCS 的正常 DMEM 替代并将细胞按前述孵育 72 小时。基本上按实施例 103 中所述分析细胞上清 (以 0.025M 的 Tris - HCl pH 7.5 1 : 10 稀释; 125 μ l) 的抗 Hipp - Glu 活性 (5 小时分析, 在 250 μ l 的总体积中)。稀释的上清导致 Hipp - Glu 底物 18.4 % 的水解。

或者, 在上面的实验中, 未修饰的区域原 (来自质粒 pMF67, 描述于参考实施例 17 中的国际专利申请号 WO 96/20011) 可用于代替 pro - L 表达质粒。

COS 细胞中蛋白的大规模表达由 Ridder 等 (1995) 在基因 166, 273 - 276 中和由 Blasey 等 (1996) 在细胞技术 18, 183 - 192 中描述过。

至于在 CHO 细胞中的稳定表达, 使用了由 Bebbington 在方法: 酶学方法伴侣 (1991) 2, 136 - 145 中所述的用通过 25 μ M 和 50 μ M MSX 的 GS 筛选的方法。或者, 基本上按上面所述的用于 COS 细胞转染的脂质体转染也可用于转染 CHO 细胞。细胞以质粒 pMF228 和 pMF161 或 pMF228 和 pMF67 的混合物转染。通过 CEA ELISA (描述于实施例 11 中) 和 Western 分析 (下述) 相应所需抗体酶融合蛋白 17kDa 条带的存在而筛选存活克隆的上清。也按实施例 103 中所述筛选适当稀释的上清的酶活性。以所需的规模培养表达所需抗体酶融合蛋白的菌落 (见例如由 M. E. Reff (1993) 在当前生物技术观点 4, 573 - 576 中的文献及其中引用的文献) 并通过实施例 102 中描述的一种或更多的方法从细胞培养上清中纯化融合的蛋白。

25 (e) Western 分析

按下述进行 Western 印迹分析。(将 20 μ l) 的每种上清样品与具有和不具有还原剂的相同体积的样品缓冲液 (62.5mM Tris, pH 6.8, 1 % SDS, 10 % 的蔗糖和 0.05 % 的溴酚蓝) 混合。样品于 65 °C 孵育 10 分钟后, 根据制造商的说明在 MULTIPHOR™ II 电泳仪中进行 8 - 18 % 丙烯酰胺梯度胶 (发玛西亚生物技术产品的 EXCEL™ 凝胶系统) 电泳。电泳后, 根据制造商提供的方法用 NOVABIOL™ 仪 (LKB Produkter AB) 将分离的蛋白转移至膜 (HYBOND™ C - Super,

Amersham International) 上。印迹后, 将膜空气干燥。

通过用 1:2500 稀释的抗-人 κ 抗体(西格玛 A 7164, 羊抗-人 κ 轻链过氧化物酶偶联物) 检测抗体片段的存在。用化学发光系统 (ECL™检测系统, Amersham International) 观察人抗体片段的存在。

5 实施例 49 - 74

其它人源化 806.077F(ab')₂ - 突变体 HCPB 融合蛋白的制备

10 这些实施例描述了编码连接到突变体 HCPB (D253K; G251T, D253K; A248S, G251T, D253K) 上的人源化 806.077 Fd 重链片段基因的制备和其与编码人源化 806.077 轻链基因的共表达以及编码人羧肽酶 B 区域原的基因从得到在每个重链片段的 C - 末端具有突变体 HCPB 分子的 F(ab')₂ 蛋白。人源化 Fd 重链片段的恒定区和铰链区来自人 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 抗体同型 (isotype)。表达的蛋白也称为抗体 - 酶融合蛋白。

15 用显示于下表中的适当序列重复实施例 48 中描述的方法。用于 PCR 构建和克隆筛选的寡核苷酸容易地从这些适当的序列中得到。

20 为了改变突变体 HCPB 序列, 实施例 48 中的 (a) 部分中的 PCR 模板、质粒 pEEN1921 以 pEEN1860 的 [G251T, D253K] HCPB (描述于参考实施例 1 中) 或 pICI1713 的 [D253K] HCPB (描述于国际专利申请号 WO 96/20011) 代替。

为了改变抗体重链的恒定区和铰链区, 实施例 48 的 (a) 部分中的 PCR 模板、载体 IgG3 - pBSIIKS⁺ 以 pNG4 - VHss - HuIgG1CH' (描述于实施例 39 - 47 中) 或 pNG4 - VHss - HuIgG2CH' (NCIMB No. 40797) 代替。

25 为了改变人源化抗体轻链序列, 实施例 48 中 (b) 部分中的载体 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 以 pEE14 - 806.077HuVK1 - HuCK 或 pEE14 - 806.077HuVK3 - HuCK 代替。载体 pEE14 - 806.077HuVK1 - HuCK 和 pEE14 - 806.077HuVK3 - HuCK 按实施例 48 (b) 部分中用于描述 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 的方法制备但分别用 pNG
30 - VHss - 806.077HuVK1 - Neo 和 pNG - VHss - 806.077HuVK3 - Neo 中的 732 个碱基对的 Hind III - Xma I 片段替代 pNG - VHss - 806.077HuVK4 - Neo 中的 Hind III - Xma I 片段。

每个实施例抗体-酶融合蛋白变异体显示于下表中。

表

5
10
15
20
25
30

实施例号	人源化重链	人源化轻链	突变的 HCPB 酶
49	HuVH1-HulgG3	HuVK4-HuCK	[D253K]HCPB
50	HuVH1-HulgG3	HuVK4-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
51	HuVH1-HulgG3	HuVK1-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
52	HuVH1-HulgG3	HuVK1-HuCK	[D253K]HCPB
53	HuVH1-HulgG3	HuVK1-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
54	HuVH1-HulgG3	HuVK3-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
55	HuVH1-HulgG3	HuVK3-HuCK	[D253K]HCPB
56	HuVH1-HulgG3	HuVK3-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
57	HuVH1-HulgG1	HuVK4-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
58	HuVH1-HulgG1	HuVK4-HuCK	[D253K]HCPB
59	HuVH1-HulgG1	HuVK4-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
60	HuVH1-HulgG1	HuVK1-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
61	HuVH1-HulgG1	HuVK1-HuCK	[D253K]HCPB
62	HuVH1-HulgG1	HuVK1-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
63	HuVH1-HulgG1	HuVK3-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
64	HuVH1-HulgG1	HuVK3-HuCK	[D253K]HCPB
65	HuVH1-HulgG1	HuVK3-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
66	HuVH1-HulgG2	HuVK4-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
67	HuVH1-HulgG2	HuVK4-HuCK	[D253K]HCPB
68	HuVH1-HulgG2	HuVK4-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
69	HuVH1-HulgG2	HuVK1-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
70	HuVH1-HulgG2	HuVK1-HuCK	[D253K]HCPB
71	HuVH1-HulgG2	HuVK1-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
72	HuVH1-HulgG2	HuVK3-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
73	HuVH1-HulgG2	HuVK3-HuCK	[D253K]HCPB
74	HuVH1-HulgG2	HuVK3-HuCK	[G251T,D253K]HCPB

实施例 75

[A248S, G251T, D253K] HCPB - (人源化 806.077) F(ab')₂ 融合蛋白的制备

本实施例描述了编码连接于人源化的抗体 806.077 (具有人 IgG3 的版本 1VH) Fd 重链片段上的 [A248S, G251T, D253K] HCPB 基因的制备及其与编码人源化的 806.077 抗体轻链 (具有 CK 的版本 4VK) 基因的共表达。这得到了在每个重链片段 N - 末端具有前 - [A248S, G251T, D253K] HCPB 分子的 F(ab')₂ 蛋白。该酶通过用胰蛋白酶去除区域原而得到。

标准的分子生物学技术, 如限制酶消化、连接、激酶反应、去磷酸化、聚合酶链式反应 (PCR)、细菌转化、凝胶电泳、缓冲液制备和 DNA 产生、纯化和分离按 Maniati, 等 (1989) 在分子克隆, 实验指南; 第二版: 冷泉港实验室, 冷泉港, 纽约中所述进行或遵循特定产品制造商建议的方法进行。在大多数情况下, 酶购自 New England Biolabs, 但也可使用其它的供应商及相应的方法。根据应用生物系统提供的方法, 在应用生物系统 380A DNA 合成仪上从用 5'二甲氧三苯甲基进行碱基保护的核苷 - 2 - 氰乙基 - N, N' - 双 - 异丙基 - 亚磷酰胺制备寡核苷酸序列并将保护的核苷以 0.2 μ mol 的量连接到可控孔度玻璃支持物上。

按实施例 103 中或国际专利申请号 WO 96/20011 实施例 20 中所述用基于 HPLC 的分析测定 HCPB 突变体、天然 HCPB 及 HCPB 融合蛋白将马尿酸基 (hippuryl) - L - 谷氨酸或马尿酸基 - L - 精氨酸转变为马尿酸的能力。

用基于下面的方法进行免疫测定技术, 包括 Tijssen, (1985) 酶免疫测定的实践和理论, 生化和分子生物学实验技术, 第 15 卷, Elsevier 科学出版社, Amsterdam, 或遵循特定产品制造商建议的方法。

为了产生能在真核细胞中表达抗体 - 酶融合蛋白的质粒, 使用了 GS - 系统 (Celltech Biologics) (详述于国际专利申请号 WO 87/04462, WO 89/01036, WO 86/05807 和 WO 89/10404) 及两种质粒 pEE6 (pEE6.hCMV 的衍生物, 其中的 hCMV 启动子的上游的 Hind III 限制位点已变为 Bgl II 位点 {Stephens 和 Cockett, 1989, 核酸研究, 17, 7110}) 和 pEE12 (pSV2.GS 衍生物, 去除了其中的多个限制位

点{Bebbington 等, 1992, 生物/技术, 10.169})。

a) 前-原-pre-pro-HCPB 向限制酶 Xma I 切割位点 (SEQ ID NO:124 中的位点 1048) 的克隆。

用标准的 DNA 技术 (Qiagen 质粒试剂盒或类似产品) 制备质粒 pMF18 (在国际专利申请号 WO 96/20011 参考实施例 19) 的双链 DNA、由克隆入载体 pBluescript II KS + (Stratagene) 中的 pre-pro-HCPB 所组成的构建体, 并用 Hind III 和 Xma I 酶进行限制性消化, 操作时应谨慎以确保完全的消化。限制酶 Hind III 在 HCPB 基因前序列的起点之前处切割且 Xma I 在成熟蛋白的氨基酸 240 (脯氨酸) 密码子处切割, Hind III 到 Xma I DNA 的片段称为 pre-pro-HCPB 片段。纯化含有 pre-pro-HCPB 片段正确大小 (约 1061 个碱基对) 的 DNA。

以类似 pre-pro-HCPB 片段的方式制备质粒载体 pUC19 (New England Biolabs) 的双链 DNA, 以 Hind III 和 Xma I 限制性消化并纯化 (约 2651 个碱基对)。用 1 载体对 2.5 插入子的摩尔比且约 2.5ng/ml 的终 DNA 浓度、在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 和酶缓冲液的存在下制备连续混合物以将 HCPB 基因片段克隆入 pUC19 载体中。连接反应后, 将此 DNA 混合物用于转化大肠杆菌 DH5 α 菌株。将细胞等份铺板于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素作为质粒载体筛选标记的 L-琼脂培养基上, 并于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。挑取多个菌落用于小量制备双链质粒 DNA。通过限制酶消化分析这些 DNA 样品, 并鉴定具有正确构型的构建体。在成熟基因中的 Xma I 位点含有前-原-HCPB 片段的质粒称为 pCF003。

b) 从 VH 的位点 G241 + 接头和 5 个氨基酸克隆 [A248S, G251T, D253K] HCPB

25 为了从 Fd 序列中分离 HPCB, 将由 (甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-比氨酸)₃ 所组成的中性接头在 PCR 过程中导入该序列。为了产生突变体 [A248S, G251T, D253K] HCPB 序列 (参考实施例 2 中描述) 的片段并添加肽接头和人源化 806.077 VH 的头 5 个氨基酸, PCR 在下面的条件下建立, 即用 100pMol 的引物 CME 00971 和 CME 00972 (SEQ ID NOS:122 和 123) 在约 5ng pZen1921 DNA、终浓度为 200 μ M 的 dNTP、Taq 聚合酶反应缓冲液和 2.5U 的 Taq 聚合酶存在下在 100 μ l 的终体积中。在加入 Taq 酶之前将此混合物于 94 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟, 并且

用 30 轮的循环的 94 °C 1 分钟、 55 °C 2 分钟和 72 °C 2 分钟进行 PCR 孵育，在最后一个反应中再于 72 °C 孵育 10 分钟。通过琼脂糖凝胶电泳分析含有 [A248S, G251T, D253K] HCPB 片段的 PCR 产物 (约 298 个碱基对) 中正确大小的 DNA 并发现其含有正确大小的显著的带。

5 用微量浓缩柱 (Centricon™ 100, Amicon) 从过多的试剂中从反应混合物中将产物的剩余物进行纯化和分离，然后通过乙醇/醋酸钠沉淀、离心而分离 DNA、真空干燥且重悬于蒸馏水中。以酶 Xma I 和 Eco RI 限制性消化此分离的 DNA，并纯化正确大小的条带 (约 271 个碱基对)。

10 用标准的 DNA 技术 (Qiagen 质粒试剂盒或类似的产品) 制备的质粒 pCF003 (上述) 的双链 DNA 用 Xma I 和 Eco RI 酶限制性消化，并纯化具有正确大小的条带 (约 2696 个碱基对)。

在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 和酶缓冲液的存在下用约 1 载体对 2.5 插入子 (1pCF003 对 2.5 [A248S, G251T, D253K] HCPB 片段 PCR 产物) 的摩尔比且约 2.5/μl 的终 DNA 浓度制备连接混合物从而将突变体 HCPB 基因片段克隆入载体中。连接反应后，将此 DNA 混
15 合物用于转化大肠杆菌 DH5α 菌株。将细胞等份铺板于含有 100μg/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L - 琼脂营养培养基上并于 37 °C 孵育过夜。挑取约 200 个菌落并铺板至 2 份无菌硝酸 - 纤维素膜 (Schleicher 和 Schull) 上，在含有 100μg/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L -
20 琼脂营养培养平板上预湿 (pre - wet)，并于 37 °C 孵育过夜。将一份复制平板贮存于 4 °C 用于菌落的活细胞来源，将另一平板处理从而将单个菌落的 DNA 变性并固定至硝酸 - 纤维素上。从琼脂板上取出硝酸 - 纤维素膜并依次置于浸入下面物质的滤纸 (Whatman) 上： 1. 10 % SDS 2 分钟； 2. 0.5M NaOH； 1.5M NaCl 7 分钟； 3. 0.5M
25 NaOH； 1.5M NaCl 4 分钟； 4. 0.5M NaOH； 1.5M NaCl 2 分钟； 5. 0.5M Tris pH 7.4, 1.5M NaCl 2 分钟；和 6.2 × SSC (标准的柠檬酸盐) 2 分钟。然后将此滤膜置于浸于 10 × SSC 中的滤纸 (Whatman) 上并通过紫外光处理 (Spectrolinker XL - 1500 UV 交联仪) 将此变性的 DNA 交联至硝酸 - 纤维素上。让滤膜于室温干燥，
30 且然后于 6 × SSC 溶液中缓缓振摇而于 60 °C 预杂交 1 小时 (例如用 Techne HB - 1D 杂交仪)。注意预杂交封闭了滤膜上非 - 特异性的 DNA 结合位点。

为了测定哪个菌落含有目的 DNA 插入子，将交联至硝酸-纤维素膜上的 DNA 与从 [A248S, G251T, D253K] HCPB 纯化的 PCR DNA 片段 (见上) 制备的放射-标记的 ³²P - DNA 探针杂交。在 50μl 的总体积中用 T7 DNA 聚合酶以 50μ Ci 的 ³²P - dCTP (>3000 Ci/mMol) 标记约 50ng DNA (发玛西亚 T7 Quickprime 试剂盒) 并让此反应在 37 °C 进行 15 分钟。将标记的探针加热至 95 °C 2 分钟以变性双链 DNA，立即加入 60 °C 的 10ml 6 × SSC 中并将此溶液用于代替滤膜上的预杂交液。继续于 60 °C 轻轻振荡孵育约 3 小时。然后倾倒在杂交液，并将该滤膜于 60 °C 以 2 × SSC 洗 2 次，每次 15 分钟。然后将滤膜轻轻印干，镶盖以粘附胶片 (Saran™ wrap 或类似产品) 并于室温曝光至 X - 射线胶片 (例如 Kodak X - OMAT - ARS™) 过夜。胶卷显影后，在 X - 射线胶片上具有最强曝光 (最黑的点) 的菌落被鉴定为含有目的插入子的菌落。在该系列的实验中，约 15 % 的菌落得到阳性杂交。挑选这 12 个菌落用于进一步的筛选。从复制的滤膜上挑取这些菌落，划盘并维持于含有 100μg/ml 氨苄青霉素的 L - 琼脂营养培养基上并于含有 100μg/ml 氨苄青霉素的 L - B 营养培养基中含有。

选出的菌落用于小量制备双链质粒 DNA。通过限制酶消化分析这些 DNA 样品，并鉴定具有正确构型的构建体。为了确保不在 PCR 过程中导入变化到此 DNA 序列中，具有正确图谱的许多克隆被取出而用标准的技术 (Qiagen 质粒试剂盒或类似产物) 进行 DNA 制备，且用几个单独的寡核苷酸引物对插入子测序。鉴定具有正确序列的构建体，并将该在 Pst I 位点 (氨基酸 5) (SEQ ID NO:124 中位点 1301) 含有 pre - pro - [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - 人源化 806.077 VH 基因的质粒命名为 pCF004。

25 c. 克隆人源化的 806.077 Fd

用标准的 DNA 技术 (Qiagen 质粒试剂盒或类似的产品) 制备质粒 pNG4 - VHss - HuVH1 - 806.077 - IgG3CH1' 的双链 DNA、具有克隆入载体 pNG5 中人 IgG3CH1 和铰链区 (见实施例 44) 且由人源化的 806.077 版本 1 VH 所组成的构建体，并以 Pst I 和 Xma I 酶限制性消化。纯化含有人源化 806.077 Fd 片段具有正确大小的 DNA (约 854 个碱基对)。以与人源化 806.077 Fd 片段类似的方式制备质粒载体 pUC19 (New England Biolabs) 的双链 DNA，以 Pst I 和 Xma I 限制性消

化并纯化（约 2659 个碱基对）。

用琼脂糖凝胶电泳与已知的标准比较来检查限制且纯化 DNA 样品的纯度且进行浓度估计。根据这些估计，在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 及酶缓冲液存在下，用约 1 载体对 2.5 插入子的摩尔比及约 2.5ng/ml 的 DNA 终浓度制备连接混合物从而将人源化的 806.077 Fd 基因片段克隆入 pUC19 载体中。

连接反应后，将该 DNA 混合物用于转化大肠杆菌 DH5 α 菌株。将细胞等份铺板于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L - 琼脂营养培养基中并于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。挑取多个菌落并用于双链质粒 DNA 的小量制备。通过限制酶消化分析这些 DNA 样品，并鉴定具有正确构型的构建体。在 Pst I 位点至 Xma I 位点之间含有人源化 806.077 Fd 片段的质粒称为 pCF005。

d) 将人源化的 806.077 Fd 克隆入 pre - pro - [A248S , G251T , D253K] HCPB - 接头构建体中

用标准的 DNA 技术（Qiagen 质粒试剂盒或类似产品）制备质粒 pCF005（上述）的双链 DNA，并以 Pst I 和 Eco RI 酶限制性消化。纯化含有人源化 806.077 Fd 片段的正确大小的 DNA（约 870 个碱基对）。以与人源化 806.077 Fd 片段类似的方式制备质粒载体 pCF004（如上述）的双链 DNA，以 Pst I 和 Eco RI 限制性消化及纯化（约 3950 个碱基对）。在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 及酶缓冲液的存在下用约 1 载体对 2.5 插入子的摩尔比制备连接混合物以将人源化的 806.077 Fd 基因片段克隆和 pCF004 载体中。

连接反应后，将此 DNA 混合物用于转化大肠杆菌 DH5 α 菌株。将细胞等份铺板于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L - 琼脂营养培养基中，并于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。挑取多个菌落并用于小量制备双链质粒 DNA。通过限制酶消化分析这些 DNA 样品，并鉴定具有正确构型的构建体。在 pUC19 中含有 pre - pro - [A248S , G251T , D253K] HCPB - 接头 - Fd（人源化 806.077）的质粒称为 pCF006。

e) 将 pre - pro - [A248S , G251T , D253K] HCPB - 接头 -（人源化 806.077）Fd 克隆入 pEE6 hCMV 载体

用标准的技术（Qiagen 质粒试剂盒或类似产品）制备质粒 pCF006（上述）的双链 DNA，并以 Hind III 和 Eco RI 酶限制性消化。纯化含

有该融合蛋白的正确大小的 DNA (约 2185 个碱基对)。

以与融合蛋白类似的方式制备质粒载体 pEE6 (上述) 的双链 DNA, 以 Hind III 和 Eco RI 限制性消化并纯化 (约 4775 个碱基对)。在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 及酶缓冲液的存在下用 1 载体对 2.5 插入子的摩尔比及约 2.5ng/ μ l 的终 DNA 浓度制备连接混合物以将人源化的 806.077 融合蛋白克隆入 pEE6 载体中。连接反应后, 将此 DNA 混合物用于转化大肠杆菌 DH5 α 菌株。将细胞等份铺板于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L - 琼脂营养培养基上并于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。挑取多个克隆于小量制备双链质粒 DNA。这些 DNA 样品通过限制酶消化分析并鉴定具有正确构型的构建体。在 pEE6 中含有 pre - pro - [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - Fd(人源化 806.077) 的质粒称为 pCF007。

f) 将人源化的 806.077 轻链版本 4 克隆入 pEE12 载体

用标准的 DNA 技术 (Qiagen 质粒试剂盒或类似的产品) 制备质粒 pNG3 - VKss - 806.077 - HuVK4 - HuCK - Neo 的双链 DNA、由具有克隆入载体 pNG3 (见实施例 12 - 38) 的人 CK 的人源化 806.077 版本 HuVK4 所组成的构建体, 并用 Hind III 和 Eco RI 酶限制性消化。纯化含有人源化 806.077 轻链的正确大小的 DNA (约 2022 个碱基对)。以与人源化 806.077 轻链类似的方式制备质粒载体 pEE12 的双链 DNA、以 Hind III 和 Eco RI 限制性消化并纯化 (约 7085 个碱基对)。在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 和酶缓冲液存在下, 用约 1 载体对 2.5 插入子的摩尔比及约 2.5ng/ μ l 的终 DNA 浓度制备混合物从而将人源化的 806.077 轻链克隆入 pEE12 载体中。连接反应后, 将该 DNA 混合物用于转化大肠杆菌 DH5 α 菌株中。将细胞等份铺板于含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L - 琼脂营养培养基上, 并于 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。挑取多个菌落用于小量制备双链质粒 DNA。通过限制性酶消化分析这些 DNA 样品, 且鉴定具有正确构型的构建体。含有人源化 806.077 轻链版本 4 的质粒称为 pCF008/4。

g) 将 CMVp - pre - pro - [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - (人源化 806.077) Fd 克隆入 pCF008/4

用标准的 DNA 技术 (Qiagen 质粒试剂盒或类似产品) 制备质粒 pCF007 (上述) 的双链 DNA, 并以 Bgl II 和 Sal I 酶限制性消化。限

制酶 Bgl II 在 CMV MIE 异肽、融合蛋白的启动子和基因的起始点之前切割 pCF007 质粒, 限制酶 Sal I 在成熟蛋白的终止密码子之后切下约 520 个碱基对。纯化含有该融合蛋白的正确大小的 DNA (约 4844 个碱基对)。以与融合蛋白类似的方式制备质粒载体 pCF008/4 的双链 DNA、
5 以 Bam HI 和 Sal I 限制性消化并纯化(约 7436 个碱基对)。在 T4 DNA 连接酶、1mM ATP 和酶缓冲液的存在下用约 1 载体对 2.5 插入子的摩尔比, 和约 2.5ng/μl 的 DNA 终浓度制备连接混合物从而将 [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - (人源化 806.077) Fd 融合基因克隆入 pCF008/4 载体中。连接反应后, 将 DNA 混合物用于转化大肠杆菌
10 DH5α 菌株。将细胞等份铺板于含有 100μg/ml 氨苄青霉素用于质粒载体筛选的 L - 琼脂营养培养基上, 并于 37 °C 孵育过夜。挑取多个菌落并用于小量制备双链质粒 DNA。通过限制酶消化分析这些 DNA 样品, 且鉴定具有正确构型的构建体。在 GS 表达载体 pEE12 中含有 pro - [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - F(ab')₂ (人源化 806.077
15 抗体)基因的质粒称为 pCF009 并将此质粒图谱显示于 SEQ ID NOS: 70 和 71 中。pre - pro - [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - Fd (人源化 806.077) 的 DNA 序列显示于 SEQ ID NO: 124 中并且相应的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO: 125 中。

h) Pro - [突变体] HCPB - 接头 - F(ab')₂ (人源化 806.077) 在小
20 鼠骨髓瘤细胞中的表达

下面的方法已用于所有 (D253K 和 G251T, D253K 和 A248S, G251T, D253K) 突变体 pro - HCPB 酶融合蛋白在骨髓瘤中的表达, 优选的小鼠骨髓瘤细胞系为 NSO (Galfre 和 Milstein, 1981, 酶学方法, 73, 3 - 46), 且可获自欧洲动物细胞保藏中心, PHLS
25 CAMR, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG (ECACC 目录号 85110503)。将这些细胞培养于含有 10 % 热灭活胎牛血清 (FCS) 的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM; Grbco/BRL) 中。

对于 pro - [A248S, G251T, D253K] HCPB - 接头 - F(ab')₂ (人源化 806.077) 的表达, 使用 2 种质粒 pCF009 (上述) 及 pRc/RSVC
30 来自 Invitrogen, 目录号 V780 - 20), 其中含有新霉素抗性基因用于筛选 G418 抗性稳定的细胞系。通过包括阳离子脂质介导的多核苷酸向真核细胞中的转动的脂质体转染方法 (Felgner 等, 方法: 酶学方法伴

5 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

侣, 1993, 5, 67 - 65), 将约 5 μ g 的每种质粒 (0.5 - 10 μ g) 用于转染约 8×10^6 个 NSO 细胞。离心收获细胞, 以无血清培养基 (30ml) 洗, 重悬于 800 μ l 的培养基中并于 37 $^{\circ}$ C 保存于组织培养瓶中直至加入 DNA。无血清培养基 (450 μ l) 与 LIPOFECTIN™ 试剂 (50 μ l) 轻轻混合并于室温孵育 30 到 45 分钟。将此混合物加入到含有质粒 DNA 混合物 (不到 100 μ l) 的 500 μ l 培养基中并于室温放置 15 分钟。将无血清培养基 (600 μ l) 加入到质粒 DNA - LIPOFECTIN™ 混合物中, 并将该混合物加入细胞中且于 CO₂ 培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 孵育约 5 小时。然后以含有 10% FCS 的正常 DMEM 培养基 (8ml) 代替含有培养基的 DNA 并将细胞孵育过夜。然后再次将培养基以含有 10% FCS 的正常 DMEM 培养基 (8ml) 代替并按前述没有筛选将细胞孵育 24 小时。此时段结束时将培养基换为含有 10% FCS 及 G418 筛选 (1.5mg/ml) 的 DMEM, 并以相同的培养基将细胞稀释 (在 1:4 至 1:20 之间) (约每板 0.5 至 1.5×10^6 个细胞) 至微滴定孔 (150 μ l 每孔; 每次稀释 2 或更多板) 中。将此微滴定板于 CO₂ 培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 孵育至少 2 周且然后有规则地检查存活克隆的形成。

取出含有单个存活克隆孔中的培养基用于测试并以新鲜培养基 (含有 G418) 代替。在 ELISA 中测试取出培养基对 CEA 的抗体结合 (除了二级抗体溶液从抗 - 小鼠更换为抗 - 人 (羊抗 - 人 κ 轻链过氧化物酶偶联物, 西格玛 A7164) 外, 以与参考实施例 5 第 1 部分中国际专利申请号 WO 96/20011 中描述的相同的方式)。也测定 CEA ELISA 阳性样品在以胰蛋白酶 (在 pH 7.6 50mM Tris - HCl 和 150mM NaCl 中 700 μ g/ml 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 反应通过加入 5 倍过量的大豆胰蛋白酶抑制剂而终止) 激活后 (去除融合蛋白的区域原) 的 [A248S, G251T, D253K] HCPB 酶活性均为阳性培养基的克隆。这些克隆通过非还原性 Western 印迹分析进一步加以测定 (除了抗体溶液从抗 - 小鼠更换为抗 - 人 (羊 - 抗 - 人 κ 轻链过氧化物酶偶联物, 西格玛 A7164 外, 以与参考实施例 5 第 1 部分的国际专利申请号 WO 96/20011 中所述的相同的方式) 以鉴定出显著产生 F(ab')₂ (806.077) 融合蛋白的克隆。然后扩增这些克隆, 测试经多代后融合蛋白的稳定产生, 并收集 (bulk up) 最高产量的克隆且用标准的技术于液氮中冷冻保存。

融合蛋白在 NSO 骨髓瘤细胞中的扩增、高水平表达和发酵以与

Bebbington 等 (1992) 在生物/技术 10, 169 - 175 中所述的类似的方式进行。按实施例 102 中所述纯化融合蛋白及去除前体序列。

实施例 76 至 101

pro - HCPB - 接头 - (人源化 806.077) Fd + (人源化的 806.077)

5 Fd + (人源化 806.077) 轻链其它变异体的克隆与表达

除了实施例 75 的 b 部分中以 [D253K] HCPB 或 [G251T, D253K] HCPB 代替 [A248S, G251T, D253K] HCPB 外且用于 PCR 反应中的质粒 DNA 分别为 pICI1713 (描述于实施例 15 中的国际专利申请号 WO 96/20011 中) 或 pZEN1860 (参考实施例 1) 外, 产生
10 与其它 HCPB 突变体融合蛋白的方法类似于在实施例 75 (上面) 中详述的方法。克隆、鉴定和序列确定后, 将得到的含有 pre - pro - [D253K] HCPB - 接头或 pre - pro - [G251T, D253K] HCPB - 接头的质粒和 pUC19 载体背景中 Pst I 位点 (氨基酸位点 5 处) 中的人源化 806.077 VH 基因在随后的克隆反应中用于代替 pCF004。

15 除了实施例 75 的 c 部分中以人 IgG1 或 IgG2 CH 代替含有人源化 806.077 VH 版本 1 的质粒且从铰链区代替 806.077 - HuVH1 - IgG3CH1' (分别为 SEQ ID NOS : 92 和 56) 外, 与其它 CH1 区域产生融合蛋白的方法类似于在实施例 75 (上面) 中详述的方法。克隆、鉴定和序列确证后, 得到的含有 IgG1 或 IgG2 序列的质粒在随后的克隆
20 反应中用于代替 pCF005。

除了实施例 75 的 f 部分中以含有人源化 806.077 Lc 版本 1 或版本 3 代替 806.077 - HuVK4 - HuVK (分别为 SEQ ID NOS : 51 和 96) 外, 产生与其它人源化 806.077 轻链变异体融合蛋白的方法类似于在实施例 75 (上面) 中详述的方法。克隆、鉴定和序列确证后, 得到
25 的含有其它轻链序列的质粒在随后的克隆反应中用于代替 pCF008/4 中。每个实施例 (76 至 101) 融合蛋白变异体显示于下表中。

表

实施例号	人源化重链	人源化轻链	突变的 HCPB 酶
5 76	HuVH1-HulgG3	HuVK4-HuCK	[D253K]HCPB
77	HuVH1-HulgG3	HuVK4-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
78	HuVH1-HulgG3	HuVK1-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
79	HuVH1-HulgG3	HuVK1-HuCK	[D253K]HCPB
80	HuVH1-HulgG3	HuVK1-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
10 81	HuVH1-HulgG3	HuVK3-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
82	HuVH1-HulgG3	HuVK3-HuCK	[D253K]HCPB
83	HuVH1-HulgG3	HuVK3-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
84	HuVH1-HulgG1	HuVK4-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
85	HuVH1-HulgG1	HuVK4-HuCK	[D253K]HCPB
86	HuVH1-HulgG1	HuVK4-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
15 87	HuVH1-HulgG1	HuVK1-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
88	HuVH1-HulgG1	HuVK1-HuCK	[D253K]HCPB
89	HuVH1-HulgG1	HuVK1-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
90	HuVH1-HulgG1	HuVK3-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
91	HuVH1-HulgG1	HuVK3-HuCK	[D253K]HCPB
92	HuVH1-HulgG1	HuVK3-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
20 93	HuVH1-HulgG2	HuVK4-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
94	HuVH1-HulgG2	HuVK4-HuCK	[D253K]HCPB
95	HuVH1-HulgG2	HuVK4-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
96	HuVH1-HulgG2	HuVK1-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
97	HuVH1-HulgG2	HuVK1-HuCK	[D253K]HCPB
98	HuVH1-HulgG2	HuVK1-HuCK	[G251T,D253K]HCPB
25 99	HuVH1-HulgG2	HuVK3-HuCK	[A248S,G251T,D253K]HCPB
100	HuVH1-HulgG2	HuVK3-HuCK	[D253K]HCPB
101	HuVH1-HulgG2	HuVK3-HuCK	[G251T,D253K]HCPB

30 实施例 102

含有 806.077 抗体序列蛋白的纯化

重组 F(ab')₂ 或抗体-酶融合蛋白的纯化或富集可通过几种方法单

独使用或联合使用从骨髓瘤细胞、 CHO 细胞或 COS 细胞上清中完成。通过一种或更多种不同的方法；亲和层析或阴离子交换层析或蛋白 A/蛋白 G 层析纯化鼠 806.077F(ab')₂、嵌合 806.077F(ab')₂ 构建体和完全人源化的 806.077F(ab')₂ 构建体以及掺入到这些 F(ab')₂ 构建体中的抗体 - 酶融合蛋白构建体。这些技术也可用于纯化 806.077 抗体 - B7 融合(见实施例 104)。

a) 抗原亲和层析

将产生抗该蛋白的母本鼠 806.077 抗体的癌胚抗原 (CEA) 固定于柱上 (用发玛西亚产品)。简言之, 固定通过结合至 Sepharose™ High Performance 介质在柱中 (HiTrap™) 以 NHS - 激活预装柱上的稳定酯; CEA 向激活基质的偶联用该产品提供的标准说明书方法进行。

1ml 亲和柱的制备

将 CEA 贮备液 (8mg/ml) 以偶联缓冲液 (0.2M 碳酸氢钠、0.5M 氯化钠; pH 8.3) 首先稀释至 0.5mg/ml 的终浓度。新柱以 6ml 冰冷的 1mM HCl 以不超过 1ml/1 分钟的流速洗。洗柱后即刻, 将 CEA 配体 (1mL 以 0.5mg/ml) 注射至柱上。在两端封柱且于室温放置 30 分钟。将没有偶联至配体的过多活性基因失活且通过三轮交替的高和低 pH 清洗将任何非特异性结合的配体洗出柱外。所用的缓冲液为 0.5M 的乙醇胺, 0.5M 氯化钠 (pH 8.3) 和 0.1M 醋酸钠、0.5M 氯化钠 (pH 4.0)。在每轮清洗中, 将 6ml 每种缓冲液洗出柱基质。最后, 将柱清洗入贮备缓冲液 (0.05M Na₂HPO₄, 0.1% NaN₃, pH 7.0)。

纯化方法

将含有所需 F(ab')₂ 或融合构建体如嵌合的 806.077F(ab')₂, 人源化的 806.077F(ab')₂ 或抗体 - 酶融合蛋白的细胞培养上清以磷酸缓冲盐 (pH 7.2) 1:1 稀释并以 1ml/分钟的流速流经该 1ml 的亲和柱。该柱预先以磷酸缓冲盐 (pH 7.2; 50mM 磷酸钠、150mM 氯化钠) 加以平衡。细胞上清流完后将柱以 10 倍柱床体积的磷酸缓冲液洗。以 5 倍柱床体积的 100mM 柠檬酸钠 (pH 3.0) 洗脱结合的 F(ab')₂, 收集 1ml 的洗脱馏份。通过用适当抗体过氧化物酶偶联物 (在完全人源化 F(ab')₂ 情况下抗 - 人κ 轻链 - 过氧化物酶偶联物, 西格玛 A - 7164) 并以过氧化氢和 4 - 氯 - 1 - 萘酚显色的 Western 印迹分析完成对洗脱 F(ab')₂ 的检测。必要时, 用离心式浓缩器 (Centricon™ 30) 合并和浓缩适当

的馏份。

b) 阴离子交换层析

将含有所需的 $F(ab')_2$ 或融合构建体如嵌合 806.077 $F(ab')_2$ 、人源化 806.077 $F(ab')_2$ 或抗体-酶融合蛋白的细胞培养上清渗滤至 50mM Tris (用具有 10,000 分子量截断膜的搅拌细胞) 中直至溶液的离子强度等于柱平衡缓冲液为止。将 40ml 渗滤上清的等份以 2ml/分钟上样至适当的柱(发玛西亚 Mono Q™ 10/10HR)。该柱预先以 50mM Tris (pH 8.0) 平衡。一旦上清流经该亲和柱, 以平衡缓冲液将该柱洗回基线。然后以 15 倍柱床体积的 0 - 50 % 缓冲液 B (50mM Tris, 1M 氯化钠 pH 8.0) 洗脱结合于柱上的物质。收集洗脱馏份(每馏份 4ml) 且通过用适当抗体过氧化物酶偶联物(在完全人源化的 $F(ab')_2$ 情况下, 抗-人 κ 轻链-过氧化物酶偶联物, 西格玛 A - 7164) 并以过氧化氢和 4-氯-1-萘酚显色的 Western 印迹分析鉴定含有 $F(ab')_2$ 的馏份。必要时, 用离心式浓缩器 (Centricon™ 30) 合并和浓缩适当的馏份。

c) 蛋白 A 和蛋白 G 纯化

在上样至预先以磷酸缓冲液 (pH 7.2) 平衡的柱之前, 将含有所需 $F(ab')_2$ 或融合构建体(如 806.077 $F(ab')_2$, 嵌合 806.077 IgG1 或 IgG2 或 IgG3; pro - HCPB - 接头 - 806.077 $F(ab')_2$, 806.077 $F(ab')_2$ - HCPB) 的细胞培养上清以磷酸缓冲液 1 : 1 稀释。在 $F(ab')_2$ 和 50mM 甘氨酸、100mM 氯化钠 (pH 10.8) 在融合蛋白情况下以 100mM 柠檬酸钠 (pH 3.0) 洗脱结合 $F(ab')_2$ 或融合蛋白之前, 以磷酸缓冲液洗柱。收集洗脱馏份并通过每 1ml 洗液体积添加 125 μ l 2M Tris 而将其中和。必要时, 用离心式浓缩器合并和浓缩含有 $F(ab')_2$ 的馏份。

d) 前 (Pro) 序列切割:

对于含有共价连接前 (Pro) - 序列的融合蛋白(如 Pro - HCPB - 接头 - 806.077 $F(ab')_2$), 前序列通过将融合体与胰蛋白酶共同孵育而切割。毫克级(融合体)的该方法包括如下步骤。将胰蛋白酶与融合蛋白以 1 : 1000 的比例(胰蛋白酶 : 融合蛋白)混合。将混合物于室温 (约 22 °C) 中孵育 24 小时, 然后前序列的切割完成。通过在一个同类 (generic) 层析纯化或富集方法中再循环 (recirculating) 该混合物而将融合蛋白与前序列分离。

实施例 103

抗 Hipp - Glu 前体药物类似物含有突变体人 CPB 抗体 - 酶融合蛋白活性的测定

用基于 HPLC 的分析测定细胞培养上清或含有人 CPB 突变体 (D253K ; G252T , D253K ; A248S , G251T , D253K ; 实施例 48 - 101) 的纯化抗体 - 酶融合蛋白将马尿酸基 - L - 谷氨酸 (Hipp - Glu) 参考实施例 9 中国际专利申请号 WO 96/20011) 转变为马尿酸的能力。

该反应混合物 (250 μ l) 在 pH 7.5 的 0.025M Tris - HCl 中含有 4 μ g 纯化的融合蛋白或细胞培养上清 (直接使用或以 pH 7.5 的 0.025M Tris - HCl 稀释后使用; 125 μ l) 和 0.5mM 的 Hipp - Glu 。样品于 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 小时。反应通过加入 250 μ l 30 % 甲醇、 70 % 磷酸缓冲液 (50mM ; pH 6.5)、 0.2 % 三氟乙酸加以终止且产生的马尿酸的量通过 HPLC (用 Hewlett Packard 1090 Series 11 二级管排列系统 (diode array system)) 加以定量。

将样品 (50 μ l) 注射至柱 (25cm ; HICHRONTM Hi - RPB) 并用流动相 15 % 甲醇、 85 % 磷酸缓冲液 (50mM ; pH 6.5) 以 1ml/分钟的流速加以分离。根据已知量马尿酸 (西格玛 - H6375) 产生的校正曲线测定产生产物 (马尿酸) 的量。结果表示为 37 $^{\circ}$ C 底物向产物的百分转换, 依据转换速度时间为 30 分钟 - 24 小时。

对于具有 N - 末端 proCPB 的抗体 - 酶融合蛋白区域原首先通过在 50mM Tris - HCl (pH 7.6) , 150mM NaCl 中于 4 $^{\circ}$ C 以胰蛋白酶 (700 μ g/ml) 处理 1 小时而去除。

实施例 104

人 B7.1 - 人源化 806.077F(ab')₂ 融合蛋白 (hB7 - 806) 的制备

如参考实施例 3 中一样, 用 PCR 技术构建由信号序列和直接融合至人源化 806.077 抗体 Fd 链 5' 编码区人 B7.1 细胞外区域所组成的融合蛋白。产生含有天然信号序列和融合至人源化 806.077 抗体重链 VH 区域的人 B7.1 细胞外区域的 Hind III - Nhe I 片段。将其克隆入适当的载体, 例如, pNG4 - VHss - HuIgG2CH1' 或 pNG4 - VHss - HuIgG3CH1' (见实施例 39 - 47) (在 SEQ ID NO : 18 中代替 1 - 423 碱基) 以产生人 B7.1 - 人源化 806.077 Fd 融合基因。构建共表达

载体后用表达系统如本文所述完成该融合体与人源化 806.077 L 链的共表达（含有人源化 806.077 轻链 VK4 版本的合适的载体为 pCF008/4；见实施例 75）。将这种载体用于转染 NSO 骨髓瘤细胞且筛选培养上清中具有 CEA 结合活性的菌落。其它人源化的序列描述于实施例 39 - 47 中。

按参考实施例 3 中所述或实施例 102 中所述的其中一种方法在合适的细胞系中表达 hB7 - 806 融合蛋白并用蛋白 A 柱加以纯化。应该注意非蛋白 A 柱的纯化方法对于人源化 806.077 抗体片段及其融合蛋白是优选的。当结合至 LS174T 细胞时用参考实施例 3 中所提出的分析方法可测定该融合蛋白的抗原及受体结合特性和 T - 细胞共刺激活性。

实施例 105

嵌合和人源化 806.077F(ab')₂ - CPG2 偶联物的制备

用描述于实施例 8 中的一个嵌合版本或描述于实施例 39 - 47 中的一个人源化版本代替鼠 F(ab')₂ 蛋白重复实施例 5 中描述的方法。

实施例 106

人源化 806.077 Fab - CPG2 酶融合蛋白的制备

用类似于在实施例 12 - 38 中描述的用于 HuVK4 构建的 PCR 方法构建人源化 806.077 抗体和细菌 CPG2 酶融合蛋白构建体，其中特异性设计的引物用于 PCR 反应中以扩增出抗体和酶基因成分（从而得到的 DNA 产物含有重叠的互补序列），然后将它们通过进一步“剪接/连接”PCR 反应而连接以制备完全的抗体 - 酶融合基因。通过将 Fd 人源化 806.077 抗体重链基因的 3' 末端连接至 CPG2 结构编码基因的 5' 末端以产生 Fab - CPG2 融合蛋白编码基因而产生该融合蛋白。在此构建体中，人源化 806.077 抗体重链基因成分对于 HuVH1 - Hu IgG1 Fd 重链（SEQ ID NO: 93）可在残基 K236 后终止，对于 HuVH1 - Hu IgG2 Fd 重链（SEQ ID NO: 57）来说可在残基 Val 237 后终止，或者在 HuVH1 - Hu IgG3 Fd 重链（SEQ ID NO: 95）中可在重链残基 Val 237 后终止可连接到信号序列切割位点 C - 末端的第一个 CPG2 残基上（Minton 等（1984）基因 31, 31 - 38）。然而，为了获得最佳的抗体结合和酶特性，但也应正视在两种成分连接处掺入其它的残基也许是必要的。

然后将融合基因克隆入适当的载体，例如 pNG4 - VHss -

HuIgG2CH1' (NCIMB no. 40797), 在此之前将载体以适当的限制酶消化、分离并制备融合基因 DNA 片段因而以融合蛋白基因代替原始的抗体基因。以类似于实施例 11 中所述的方式构建共表达载体后完成对与人源化 806.077 轻链融合蛋白的共表达。将此共表达载体用于转染 NSO 骨髓瘤细胞并按前述筛选在培养上清中具有 CEA 和 Fd 结合活性的菌落。该融合蛋白可用蛋白 - A 柱加以纯化且用标准的测试技术显示其既具有抗原特性又具有酶特性。

实施例 107

人源化重链和基于轻链序列 VK4 的轻链可变区的进一步组合

10 以改变的序列代替人源化轻链 VK4 可变区序列 (SEQ ID NO : 71) 重复描述于实施例 12 - 38 中的方法, 其中改变的序列中在 SEQ ID NO : 71 位点 35 处的酪氨酸残基 (Tyr) 以苯丙氨酸残基 (Phe) 替代。

实施例 108

人源化重链和基于轻链序列 VK4 的轻链可变区的进一步组合

15 以改变的序列代替人源化轻链 VK4 可变区序列 (SEQ ID NO : 71) 重复描述于实施例 12 - 38 中的方法, 其中改变的序列的苯丙氨酸残基(在 SEQ ID NO : 71 的位点 72 处的 Phe) 由亮氨酸残基 (Leu) 所替代。

实施例 109

20 人源化重链和基于轻链序列 VK4 的轻链可变区的进一步组合

以改变的序列代替人源化轻链 VK4 可变区序列 (SEQ ID NO : 71) 重复描述于实施例 12 - 38 中的方法, 其中的改变序列 SEQ ID NO : 71 中的位点 35 的酪氨酸残基 (Tyr) 和位点 72 的苯丙氨酸残基 (Phe) 分别以苯丙氨酸残基 (Phe) 和亮氨酸残基 (Leu) 替代。

实施例 110

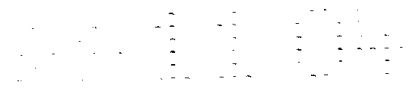
人源化重链可变区和嵌合轻链序列的组合

以实施例 8 中描述的 SEQ ID NO : 17 嵌合序列代替人轻链可变区序列而重复描述于实施例 12 - 38 中的方法。

实施例 111 - 113

30 具有修饰的轻链 VK4 可变区序列的人源化 F(ab')₂ 片段的表达

用描述于实施例 107 中的可变区轻链序列代替 SEQ ID NO : 99 的人源化轻链序列重复描述于实施例 39 - 47 中的方法, 其中 SEQ ID



NO:99 的 57 位点的酪氨酸残基 (Tyr) 由苯丙氨酸残基 (Phe) 所替代。

实施例 111 为 HuVH1 - HuIgG1 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

5 实施例 112 为 HuVH1 - HuIgG2 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

实施例 113 为 HuVH1 - HuIgG3 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

实施例 114 - 116

10 具有修饰的轻链 VK4 可变区序列的人源化 F(ab')₂ 片段的表达

用描述于实施例 108 中的可变区轻链序列代替 SEQ ID NO:99 的人源化轻链序列而重复描述于实施例 39 - 47 中的方法, 其中 SEQ ID NO:99 中位点 94 的苯丙氨酸残基 (Phe) 由亮氨酸残基 (Leu) 代替。

15 实施例 114 为 HuVH1 - HuIgG1 和上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

实施例 115 为 HuVH1 - HuIgG2 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

20 实施例 116 为 HuVH1 - HuIgG3 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

实施例 117 - 119

具有修饰的轻链 VK4 可变区序列的人源化 F(ab')₂ 片段的表达

25 以描述于实施例 109 中的可变区轻链序列代替 SEQ ID NO:99 的人源化轻链序列而重复描述于实施例 39 - 47 中的方法, 其中 SEQ ID NO:99 中的位点 57 的酪氨酸残基 (Tyr) 和位点 94 的苯丙氨酸残基 (Phe) 分别以苯丙氨酸残基 (Phe) 和亮氨酸残基 (Leu) 所替代。

实施例 117 为 HuVH1 - HuIgG1 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

30 实施例 118 为 HuVH1 - HuIgG2 与上述修饰的 SEQ ID NO:99 的组合。

实施例 119 为 HuVH1 - HuIgG3 与上述修饰的 SEQ ID NO:99

的组合。

实施例 120 - 122

具有嵌合轻链序列的人源化 F(ab')₂ 片段的表达

- 5 以描述于实施例 110 中的嵌合轻链序列代替用于实施例 39 - 47 中的人源化轻链序列而重复描述于实施例 39 - 47 中的方法

实施例 120 为 HuVH1 - HuIgG1 与上述嵌合的轻链序列的组合。

实施例 121 为 HuVH1 - HuIgG2 与上述嵌合的轻链序列的组合。

实施例 122 为 HuVH1 - HuIgG3 与上述嵌合的轻链序列的组合。

实施例 123

- 10 基于修饰的轻链 VK4 序列的人源化融合蛋白的制备

以含有实施例 107 和 111 至 113 修饰的 VK4 序列的质粒代替 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 质粒而重复描述于实施例 48 中的方法。

实施例 124

基于修饰的轻链 VK4 序列的人源化融合蛋白的制备

- 15 以含有实施例 108 和 114 至 116 修饰的 VK4 序列的质粒代替质粒 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 质粒而重复描述于实施例 48 中的方法。

实施例 125

基于修饰的轻链 VK4 序列的人源化融合蛋白的制备

- 20 以含有实施例 109 和 117 至 119 中修饰的 VK4 序列的质粒代替质粒 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 质粒而重复描述于实施例 48 中的方法。

实施例 126

基于嵌合轻链 VK4 序列人源化融合蛋白的制备

- 25 以含有实施例 110 和 120 至 122 中嵌合轻链序列的质粒代替质粒 pEE14 - 806.077HuVK4 - HuCK 质粒而重复描述于实施例 48 中的方法。

实施例 127

基于修饰轻链 VK4 序列的人源化融合蛋白的制备

- 30 以含有实施例 107 和 111 至 113 中修饰的 VK4 序列的质粒代替质粒 pCF008/4 而重复描述于实施例 75 中的方法。

实施例 128

基于修饰轻链 VK4 序列的人源化融合蛋白的制备

以含有实施例 108 和 114 至 116 中修饰的 VK4 序列的质粒代替质粒 pCF008/4 而重复描述于实施例 75 中的方法。

5 实施例 129

基于修饰的轻链 VK4 序列的人源化融合蛋白的制备

以含有实施例 109 和 117 至 119 中修饰 VK4 序列的质粒代替质粒 pCF008/4 而重复描述于实施例 75 中的方法。

实施例 130

10 基于嵌合轻链 VK4 序列人源化融合蛋白的制备

以含有实施例 110 和 120 至 122 嵌合轻链序列质粒代替质粒 pCF008/4 而重复描述于实施例 75 中的方法。

参考实施例 1

[G251T、 D253K] HCPB 基因序列的制备

15 在大肠杆菌中克隆 [G251T、 D253K] HCPB 的方法很类似于实施例 15, 国际专利申请号 WO 96/20011 中所述的方法。又一以将 pICI266 用作克隆载体, 但用于 PCR 定点诱变的起始原料为在质粒 pICI1713 中的 [D253K] HCPB 基因(如实施例 15 中国际专利申请号 WO 96/20011 中所述)。然而在此实施例中, 在 PCR 扩增基因过程中使用定点诱变
20 以将成熟基因中氨基酸位点 251 处的密码子以甘氨酸变为苏氨酸 (GGC 至 ACT), G251T 改变。同样在此突变产生过程中, 通过使用具有 G251 密码子改善的寡核苷酸混合物在相同的 (G251) 位点产生许多其它的突变。在全基因测序之前经转化和横跨该突变点序列的杂交而鉴定单个的突变体基因。在此实施例中, 仅考虑导入 G251T 突变的寡核苷酸。以与国际专利申请号 WO 96/20011 实施例 15 中所述的类似方法制备 2 种 PCR 混合物。在第一种反应中引物为 CAN 00402 (SEQ ID NO : 116) 和 CAN 00734 (SEQ ID NO : 117)。在第二种反应中引物为 CAN 00284 (SEQ ID NO : 118) 和 CAN 01076 (SEQ ID NO : 119)。在 2 种反应中起始 DNA 为 pICI1713。

30 通过琼脂糖凝胶电泳分析 2 种 PCR 产物等份中正确大小的 DNA(约 750 和 250 个碱基对) 并估计浓度, 并发现显著含有具有正确大小的条带。用头 2 种 PCR 产物中的每一种和 2 个末端引物 { CAN 00402 (SEQ

ID NO : 116) 和 CAN 00284 (SEQ ID NO : 118) } 进行另一种 PCR。通过琼脂糖凝胶电泳分析该 PCR 产物等份正确大小 (约 1000 个碱基对) 的 DNA 并发现显著含有正确大小的条带。纯化该反应混合物中的剩余产物, 将分离的 DNA 以酶 Nco I 和 Eco RI 限制性消化且以与
5 实施例 16 中国际专利申请号 WO 96/20011 中所述的类似方式纯化此正确大小的 (约 1000 个碱基对) 的条带。

以 Nco I 和 Eco RI 酶限制性消化 pICI266 双链 DNA, 且纯化具有正确大小 (约 5600 个碱基对) 的 DNA。用琼脂糖凝胶电泳, 与已知的标准比较而检测限制性消化过且纯化过载体等份及插入 DNA 样品的纯
10 度和浓度估计。根据这些估计, 以与国际专利申请号 WO 96/20011 实施例 16 中所述的类似方式制备连接混合物以将 HCPB 基因克隆入 pICI266 载体中。

连接反应后, 将此 DNA 混合物用于转化大肠杆菌 DH5 α 菌株, 挑取菌落并通过杂交而测试。然后以与国际专利申请号 WO 96/20011 实施
15 例 16 中所述的类似方式取出多个克隆用于质粒 DNA 制备, 且对 PCR 突变区进行测序以鉴定出具有 G251T 改变的克隆。从测试结果中筛选出。含有具有所需 [G251T : D253K] HCPB 基因序列质粒的克隆, 并将此质粒称为 pZEN1860。

参考实施例 2

20 [A248S、 G251T、 D253K] HCPB 基因序列的制备

在大肠杆菌中克隆 [A248S、 G251T、 D253K] HCPB 的方法很类似于参考实施例 1 描述的方法, 用于 PCR 定点诱变的起始原料为质粒 pZEN1860 中的 [G251T, D253K] HCPB 基因 (描述于参考实施例 1 中) 代替 pICI1713。然而, 在此实施例中, 在基因 PCR 扩增过程
25 中用定点诱变从将成熟基因位点 248 氨基酸的密码子以丙氨酸变为丝氨酸 (GCT 至 TTC), A248S 改变。以类似于参考实施例 1 中所述的方式制备 2 种 PCR 混合物。在第一种反应中引物为 CAN 00402 (SEQ ID NO : 116) 和 CAN 00720 (SEQ ID NO : 120)。在第二种反应中引物为 CAN 00284 (SEQ ID NO : 118) 和 CAN 00726 (SEQ
30 ID NO : 121)。在 2 种反应中, 起始 DNA 为 pZEN1860。

PCR、克隆、表达和鉴定的方法与参考实施例 1 相同。根据测序结果, 筛选出含有具有 [A248S, G251T, D253K] HCPB 基因序列的

质粒的克隆并将此质粒称为 pZEN1921。

参考实施例 3

人 B7.1 - 鼠 A5B7 F(ab')₂ 融合蛋白 (AB7) 的制备和特征分析

5 用于重组鼠 A5B7 F(ab')₂ 抗体制备, 纯化和特征分析的方法已经公开 (WO 96/20011, 参考实施例 5)。人 B7.1 抗原 (也称 CD80) 的 cDNA 序列已经分离和描述过 (Frceman G. J 等, 免疫学杂志, 1989, 143, 2714 - 2722)。在该实施例中 “ AB7 ” 指人 B7.1 - 鼠 A5B7 F(ab')₂ 融合蛋白且 “ A5B7 ” 指称为 A5B7 的抗 - CEA 抗体。

10 基于 PCR 的策略, 我们从培养的 Raji 细胞 (ATCC No. CCL 80) 的 cDNA 中分离了人 B7.1 的天然信号序列和细胞外区域 (编码氨基酸 1 - 242) 并将其直接融合至鼠 A5B7 Fd 片段成熟 5' 编码序列的上游。这包括以 PCR 引物 187/96 和 204/96 (SEQ ID NOS : 126 和 127) 分离 B7.1 序列和以 PCT 引物 203/96 和 205/96 (SEQ ID NOS : 128 和 129) 分离部分的 A5B7 Fd 序列。PCR 产物纯化后, 将它们以大约等
15 摩尔量混合并以引物 187/96 和 205/96 通过 PCR 加以融合。用标准的方法纯化得到的 PCR 产物, 以 Hind III 和 Bst EII (New England Biolabs (UK) Ltd., Wilbury, Hitchin, SG4 OTY) 消化并克隆入 pAF1 的 Hind III - Bst EII 区域以产生全长的人 B7.1 - 鼠 A5B7 Fd 融合。根据 WO 96/20011, 参考实施例 5 中所述的方法将此 Eco RI - Hind
20 III 片段的融合基因 (SEQ ID NOS : 130 - 131) 克隆入 GS - 系统™ 表达载体 pEE6 (Celltech Biologics, Bath Road, Slough, SL14EN) 中以产生载体 pAB7.1。

然后将含有 B7.1 - A5B7 Fd 表达盒的 Bgl II - Sal I 片段克隆入前述 pAF6 载体的 Bgl II 和 Sal I 位点之间以产生能够共表达融合蛋白和
25 A5B7 L 链的载体 (pAB7.2)。然后将载体 pAB7.2 用于转化 NSO 骨髓瘤细胞并筛选出能够在无谷氨酰胺时生长的菌落。用上述的 ELISA 测定培养上清中 CEA 结合活性而鉴定出表达融合蛋白的细胞系。筛选出表达适当水平融合蛋白 (1D4) 的细胞系用 AB7 融合蛋白的纯化和特征分析。

30 AB7 融合蛋白的纯化和特征分析

用蛋白 - A 琼脂糖基质如发玛西亚生产的蛋白 - A Sepharose 4 fast flow (Pharmacia Biotech, 23 Grosvenor Rd, St Albans, Hert,

AL1 3AW) 从培养上清中纯化分泌的重组 B7.1 (35 - 242) A5B7 F(ab')₂, AB7, 物质。以 2 × 8 基质体积的结合缓冲液 (3M NaCl, 1.5M 甘氨酸, pH 8.9) 洗基质。含有 AB7 的培养上清以结合缓冲液 1:1 稀释。将洗过的基质加入稀释过的培养上清 (每 40ml 稀释的上清 1ml 固定的基质体积) 中并于 4 °C 孵育 2 小时, 同时轻轻振荡。将基质离心且小心倾倒约 75 % 的上清。然后将此基质重悬于剩余的上清中并将得到混合物装柱。洗 5 - 6 倍柱床体积的 150mM NaCl、10mM NaH₂PO₄ (pH 7.4) 洗柱。然后将缓冲液换为 100mM pH 2.8 的柠檬酸钠且收集洗脱馏份。通过添加 pH 8.5 的 2M Tris 缓冲液将这些馏份滴定至约 pH 7.0。通过非 - 还原性 SDS - PAGE 分析洗脱馏份且将峰值 AB7 馏份保留为产物。

N - 末端测序

将 AB7 样品于还原性的 SDS - PAGE 上电泳并印迹至 PCDF (聚偏二氟乙烯) 膜 (设备、凝胶、印迹膜及方法根据 NOVEX, 4202 Sorrento Valley Blvd, 圣地亚哥, CA 92121, 美国) 上。将蛋白带以考马斯蓝染色并对约 70kD 的条带 (即 B7.1 - Fd 融合) 进行 N - 末端测序 (应用生物系统, 494 蛋白测序仪 (Perkin Elmer, ABI division, kelvin close, Birchwood Science Park North, Warrington WA3 7PB)。得到的序列与成熟 B7 的预期序列 (即, SEQ ID NO: 131 中氨基酸 35 处切割的前导序列后, Val Ile His Val 等) 相一致。

BIAcore 分析

根据 Greene JL, Leytze GMEmsutler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, 和 Linsley PS (1996) 生物化学杂志, 271, 26762 - 26771 中的 CD80/CTLA - 4 相互作用的 BIAcore 分析方法, 用 Biacore (23 Grosvenor Rd, St, Albans, Herts., AL1 3AW, 美国) 制造的 BIAcore 胞质基因组表面共振装置 (surface plasmon resonance equipment) 分析 AB7。将纯化的 AB7 产品样品注射于 CTLA4 - Ig 胺偶联的表面和空白 (对照) 胺偶联的表面。CTLA4 - Ig 表面与对照表面相比可清楚地见到结合 (见图 3)。当 CTLA4 - Ig 注射于胺偶联的 AB7 表面时也可见到 CTLA4 - Ig 和 AB7 之间的结合。

结合抗 - CEA ELISA 中的数据, 这些数据证实了此纯化的 AB7 融合蛋白具有两种组分, 即抗原和受体结合活性的生物学特征。

AB7 融合蛋白的共 - 刺激活性

用前述的适当调整后的共刺激分析形式的适当 (Jenkins 等 (1991) 免疫学杂志 147 : 2461) 测定当结合至表达 CEA 的肿瘤细胞时 AB7 融合蛋白对 T 细胞提供共 - 刺激信号的能力。在含有 0.5 % 人血清 (西格玛 AB, 西格玛化学公司, Dorset, 英国) 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, 生命技术, Paisley, 苏格兰) 中于 4 °C 将表达 CEA 的 LS174T 结肠 - 直肠癌细胞 (在室温中用 0.5 % 的多聚甲醛混合 5 分钟) 与 10µg/ml 的 AB7 融合蛋白振荡孵育 2 小时。用前将细胞洗 2 次并用异硫氰酸荧光素 (FITC) - 交联的羊 - 抗 - 鼠 Ig (Becton - Dickinson UK Ltd., Oxford) 和流式细胞术 (Facscan, Becton - Dickinson) 证实融合蛋白的结合。为了使在此分析中使用未引发 (unprimed) 的人 T 细胞, 通过事先包装 96 孔板小孔的抗 T - 细胞受体抗体 (抗 - CD3 抗体, OKT - 3 Orthoclinal Diagnostics, Amersham, 英国) 提供 T 细胞受体 (TCR) 刺激。通过在 96 孔平底的微滴定板 (Costar 公司, Cambridge MA, 美国) 中将纯化的抗体 (以 2µg/ml 存在于 pH 9.6 的于碳酸氢盐包被缓冲液 (现成的胶囊, 西格玛)) 于 4 °C 孵育过夜而固定 OKT - 3, 然后以 PBS 洗板三到四次。纯化的外周血 T 细胞 (用磁珠 (Dynabeads, Dynal A. S., Oslo, Norway) 从供体血中负去除尽 (即排除非 T 细胞组分) 而得到) 以 2×10^5 /孔加入到小孔中, 每孔中具有 50µl 含有 5 % 人血清的 RPMI 1640 培养基。将结合融合蛋白的 LS1747 细胞以 5×10^4 /孔加入到具有 50µl 含有 5 % 人血清 RPMI 1640 培养基的小孔中。最后用含 5 % 血清的 RPMI 1640 培养基将所有小孔的终体积调至 200µl, 48 小时后将培养物以 1.25µ Ci 的 [³H]胸腺嘧啶核苷 (Amersham International) 脉冲标记且 16 小时后用半自动细胞收获器 (Tom Tec 收获器 (havvester), Wallac 英国) 收获。用液闪计数 (Betaplate Scint 和 Betaplate 计数器, Wallac 英国) 定量掺入到 DNA 中的 [³H]胸腺嘧啶核苷。典型共刺激分析中的数据显示于下表中。

表: 共刺激数据

	α CD3 包被的孔@2 μ g/ml(cpm)
仅为 T 细胞	3582
T 细胞 + α CD28	28178
5 T 细胞 + LS174T	12303
T 细胞 + LS174T + α CD28	25759
T 细胞 + LS174T/融合蛋白	41755

α D3 = 抗 - CD3 抗体; α CD28 = 抗 - CD28 抗体

10 未引发的 T - 细胞既需要 T - 细胞受体又需要共刺激信号。在此分析中, T - 细胞受体信号由 α CD3 抗体提供。当单独的 α CD3 相比, 经 α CD28 (Becton - Dickinson 以 0.6 μ g/ml) 提供的共刺激刺激 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶核苷的吸收比前者多 8 倍。肿瘤细胞的存在对该刺激没有显著的效应。由结合到肿瘤细胞 AB7 融合蛋白而提供的共刺激信号刺激 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶核苷的摄入较单独的肿瘤细胞多 3 倍且较无共刺激时高出 11
15 倍。仅由肿瘤细胞提供的明显刺激也许是源自纯化 T - 细胞种群中残余的辅助细胞。在 5 个分析中的每一个中在含有结合肿瘤细胞的融合蛋白的小孔中观察到的 T 细胞增殖的增加与含有 T 细胞和未结合肿瘤细胞的小孔相同。

参考实施例 4

20 IgG3 - pBSIIKS+的制备

该实施例描述了含有人 IgG3 重链恒定区和铰链区基因的载体的制备。

25 用与 Jayaraman 等 (1991) 美国自然科学院院报 88, 4084 - 4088 中所述的类似方法通过 PCR 制备含有显示于 SEQ ID NO : 115 中序列的基因 [其含有类似于 SEQ ID NO : 25 的序列 (残基 8 至 508), 但 SEQ ID NO : 25 中的残基 312 和 501 分别变为 C 和 G]。

30 该基因被制成 2 部分, 称为 IgG3 和 IgG3B。将它们分别克隆入 pBluescript KS⁺ (Stratagene Cloning System) 的 Sac I 和 Xma I 位点以分别得到载体 IgG3A - pBSIIKS⁺克隆 A7 和 IgG3B - pBSIIKS⁺克隆。制备 IgG3A 以延伸跨越 Pma CI 限制位点 (SEQ ID NO : 115 中的位点 334' - 339 的 CACGTG)。同样地, 制备 IgG3B 从而使该序列的 5' 末端位于 Pma CI 限制位点的上游。为了获得所需的 IgG3 基因序

列，将中间的 IgG3A 和 IgG3B 载体以 Afl III 和 Pma CI 切割。通过 1 % 琼脂糖凝胶中的电泳分离和纯化 IgG3A - pBSIIKS⁺克隆 A7 的载体片段 (2823bp) 和 IgG3B - pBSIIKS⁺克隆 B17 的插入片段 (666bp)。将片段连接并用此连接混合物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株。通过以 Sac I 和 Xma I 消化分离的 DNA 以得到 520bp 片段而鉴定含有所需基因的克隆。插入子的序列通过 DNA 序列分析加以确证并将克隆号 F3 命名为 IgG3 - pBSIIKS⁺。

10

15

20

25

30

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

- (A) 名字: ZENECA LIMIED
- 5 (B) 街道: 15 STANHOPE GATE
- (C) 城市: 伦敦
- (E) 国家: 英国
- (F) 邮编: WIY 6LN
- (G) 电话: 0171 304 5000
- 10 (H) 电传: 0171 304 5151
- (I) 电报: 0171 834 2042

(ii) 发明题目:

(iii) 序列数目: 131

(iv) 计算机可读形式:

- 15 (A) 介质类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC - DOS/MS - DOS
- (D) 软件: 专利发布#1.0, #1.30 版 (EPO)

(2) SEQ ID NO : 1 信息:

20 (i) 序列特征:

- (A) 长度: 32 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

25 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 1

GGAAGCTTGA AGATGGATAC AGTTGGTGCA GC

32

(2) SEQ ID NO : 2 信息:

(i) 序列特征:

- 30 (A) 长度: 31 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链



(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

GGAAGCTTAG ACAGATGGGG GTGTCGTTTT G

31

5 (2) SEQ ID NO: 3 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 34 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

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

1 5 10 15

15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn

20 25 30

Tyr Met

20 (2) SEQ ID NO: 4 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

25 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCA

24

(2) SEQ ID NO: 5 信息:

30 (i) 序列特征:

(A) 长度: 24 个碱基对

(B) 类型: 核酸

- (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 5
- 5 GACATTGAGC TCACCCAGTC TCCA 24
 (2) SEQ ID NO : 6 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 22 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 10 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 6
- AGGTSMARCT GCAGSAGTCW GG 22
 15 (2) SEQ ID NO : 7 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 41 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 20 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 7
- ACTAGTGSAA TTCAGTGTGA GGTSCARCTG CAGCARTCWG G 41
- 25 (2) SEQ ID NO : 8 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 357 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 30 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 8

1110

GACATTGAGC TCACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGTCACC 60

ATAACCTGCA GTGCCAGCTC AAGTGTAAC TACATGCACT GGTCCAGCA GAAGCCAGGC 120

5 ACTTCTCCCA AACTCTGGAT TTATAGCACA TCCAACCTGG CTTCTGGAGT CCCTGCTCGC 180

TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACCTCTTAC TCTCTCACA TCAGCCGAAT GGAGGCTGAA 240

GATGCTGCCA CTTATTACTG CCAGCAAAGG AGTACTTACC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG 300

10 ACCAAGCTGG AGCTGAAACG GGCTGATGCT GCACCAACTG TATCCATCTT CAAGCTT 357

(2) SEQ ID NO : 9 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 108 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 9

20 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
 20 25 30

25 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

30 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala

100

105

(2) SEQ ID NO : 10 信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 360 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

10 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 10

GAGGTGCAGC TGCAGCARTC WGGGGCAGAG CTTGTGAGGT CAGGGGCCTC AGTCAAGTTG 60

TCCTGCACAG CTTCTGGCTT CAACATTAAG GACAACATA TGCCTGGGT GAAGCAGAGG 120

15

CCTGAACAGG GCCTGGAGTG GATTGCATGG ATTGATCCTG AGAATGGTGA TACTGAATAT 180

GGCCCGAAGT TCCGGGGCAA GGCCACTTTG ACTGCAGACT CATCCTCCAA CACAGCCTAC 240

CTGCACCTCA GCAGCCTGAC ATCTGAGGAC ACTGCCGTCT ATTACTGTCA TGTCCTGATC 300

20

TATGCTGGTT ATTTGGCTAT GGACTACTGG GGTCAAGGAA CCTCAGTCGC CGTCTCCTCA 360

(2) SEQ ID NO : 11 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

25

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 11

30

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

1

5

10

15



Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn
 20 25 30

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

Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

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

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

15 His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Ala Val Ser Ser
 115 120

20 (2) SEQ ID NO : 12 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 39 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

25 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 12

AAGCTTTCCC GCGGGGACAT TGAGCTCACC CAGTCTCCA 39

(2) SEQ ID NO : 13 信息:

30 (i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

- (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 13
- 5 AAGCTTCTCG AGCTTGGTCC CAGCACCGAA 30
 (2) SEQ ID NO : 14 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 36 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 10 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 5
 AAGCTTGGAA TTCAGTGTGA GGTGCAGCTG CAGCAG 36
 15 (2) SEQ ID NO : 15 信息:
 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 33 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 20 (D) 拓扑学: 线性
 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 15
 AAGCTTCGAG CTCACGGCGA CTGAGGTTCC TTG 33
 (2) SEQ ID NO : 16 信息:
 25 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 705 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性
 30 (ii) 分子类型: 其它核酸
 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 16

0110

5
 10
 15
 20

```

ATGGATTTTC AAGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC      60
CGCGGGGACA TTGAGCTCAC CCAGTCTCCA GCAATCATGT CTGCATCTCC AGGGGAGAAG      120
GTCACCATAA CCTGCAGTGC CAGCTCAAGT GTAACCTACA TGCACCTGGT CCAGCAGAAG      180
CCAGGCACTT CTCCCAAAC CTGGATTTAT AGCACATCCA ACCTGGCTTC TGGAGTCCCT      240
GCTCGCTTCA GTGGCAGTGG ATCTGGGACC TCTTACTCTC TCACAATCAG CCGAATGGAG      300
GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTA CTGCCAG CAAAGGAGTA CTTACCCGCT CACGTTCCGT      360
GCTGGGACCA AGCTCGAGAT CAAACGGACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG      420
CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAC TGCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC      480
TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAA GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC      540
CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG      600
ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG      660
GGCCTGAGTT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT                          705
  
```

(2) SEQ ID NO : 17 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 235 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

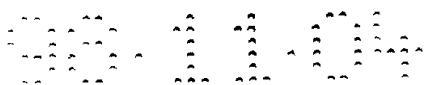
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 17:

```

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15
  
```



Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

5 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Thr Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50 55 60

10 Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

15 Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

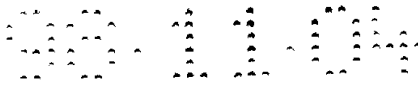
20 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

25 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

30 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205



Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

5 (2) SEQ ID NO:18 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 765 个碱基对

(B) 类型: 核酸

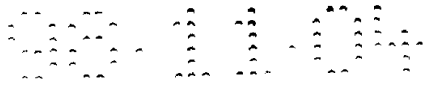
(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:18:

ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGAAT TCAGTGTGAG 60
GTGCAGCTGC AGCARTCAGG GGCAGAGCTT GTGAGGTCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC 120
15 TGCACAGCTT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC AACTATATGC ACTGGGTGAA GCAGAGGCCT 180
GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGCATGGATT GATCCTGAGA ATGGTGATAC TGAATATGCC 240
CCGAAGTTCC GGGGCAAGGC CACTTTGACT GCAGACTCAT CCTCCAACAC AGCCTACCTG 300
20 CACCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCGTCTATT ACTGTCATGT CCTGATCTAT 360
GCTGGTTATT TGGCTATGGA CTA CTG GGGGT CAAGGAACCT CAGTCGCCGT GAGCTCGGCT 420
AGCACCAAGG GACCATCGGT CTTCCCCCTG GCCCCCTGCT CCAGGAGCAC CTCCGAGAGC 480
25 ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG 540
AACTCAGGCG CTCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCC GG CTGTCTTACA GTCCTCAGGA 600
CTCTACTCCC TCAGCAGCGT CGTGACGGTG CCCTCCAGCA ACTTCGGCAC CCAGACCTAC 660
30 ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGACAGT TGAGCGCAA 720
TGTTGTGTCG AGTGCCCAACC GTGCCCGGCG CCACCTGTGG CCGGC 765



(2) SEQ ID NO : 19 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 255 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 19 :

10 Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Ile Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30
15 Ser Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45
Lys Asp Asn Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60
20 Glu Trp Ile Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala
65 70 75 80
Pro Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn
85 90 95
25 Thr Ala Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr
115 120 125
30 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ala Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160



Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 225 230 235 240

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 245 250 255

(2) SEQ ID NO : 20 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 121 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 20 :

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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



Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Asn Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 115 120

5

10

(2) SEQ ID NO : 21 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 369 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 21 :

15

20

GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 60

GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTGC 120

TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA 180

25

GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACT GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 240

TACATCTGCA ACGTGAATCA CAACCCGAGC AACACCAAGG TCGACAAGAA AGTTGAGCCC 300

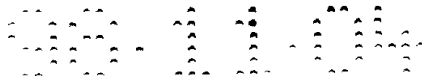
AAATCTTGTG ACAAGACGCA CACGTGCCCG CCGTGCCCGG CTCGGAACT GCTGGGTGGC 360

30

CCGTAATAG 369

(2) SEQ ID NO : 22 信息:

(i) 序列特征:



(A) 长度: 116 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

5 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 22 :

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

10

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

15

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

20

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

25

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

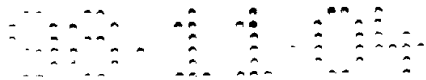
Pro Val Ala Gly
115

(2) SEQ ID NO : 23 信息:

30 (i) 序列特征:

(A) 长度: 348 个碱基对

(B) 类型: 核酸



(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 23 :

5

GCTAGCACCA AGGGACCATC GGTCTTCCCC CTGGCCCCCT GCTCCAGGAG CACCTCCGAG 60

AGCACAGCCG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTGG 120

TGGAACTCAG GCGCTCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA 180

10

GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTCGTGACG GTGCCCTCCA GCAACTTCGG CACCCAGACC 240

TACACCTGCA ACGTAGATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAC AGTTGAGCGC 300

AAATGTTGTG TCGAGTGCCC ACCGTGCCCC GCGCCACCTG TGGCCGGC 348

15

(2) SEQ ID NO : 24 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 167 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

20

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 24 :

25

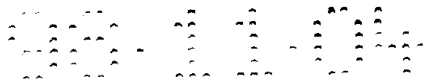
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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



TACACCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAG AGTGGAGCTG 300

AAAACCCCAC TTGGTGACAC AACTCACACG TGCCCTAGGT GTCCTGAACC TAAATCTTGT 360

5 GACACACCTC CCCCCTGCCC ACGGTGCCCA GAGCCCAAAT CTTGCGACAC GCCCCCACCG 420

TGTCCCAGAT GTCCTGAACC AAAGAGCTGT GACACTCCAC CGCCCTGCCC GAGGTGCCCA 480

GCACCTGAAC TCCTGGGAGG A 501

(2) SEQ ID NO : 26 信息:

10

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 10 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

15

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 26 :

Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met His
1 5 10

20

(2) SEQ ID NO : 27 信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 7 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

25

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 27 :

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

30

(2) SEQ ID NO : 28 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

5 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 28 :

Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr

1 5

10 (2) SEQ ID NO : 29 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 5 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

15 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 29 :

Asp Asn Tyr Met His

1 5

20

(2) SEQ ID NO : 30 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

25 (C) 链型: 单链

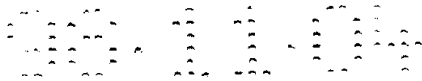
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 30 :

Phe Asn Ile Lys Asp Asn Tyr Met His

30 1 5



(2) SEQ ID NO : 31 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 17 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 31 :

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Arg

10 1 5 10 15

Gly

(2) SEQ ID NO : 32 信息:

(i) 序列特征:

15 (A) 长度: 11 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 32

Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr

1 5 10

(2) SEQ ID NO : 33 信息:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 13 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

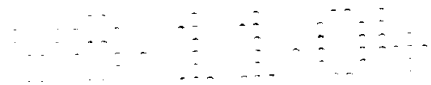
(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

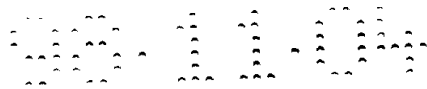
30 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 33 :

- (2) SEQ ID NO : 37 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 29 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 37:
- ACTAGTGGAT CCCAGACATG ATAAGATAC 29
- 10 (2) SEQ ID NO : 38 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 39 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 38
- GGTCTATATA AGCAGAGCTG TCTGGCTAAC TAGAGAACC 39
- (2) SEQ ID NO : 39 信息:
- 20 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 39 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 39
- GGTTCTCTAG TTAGCCAGAC AGCTCTGCTT ATATAGACC 39
- (2) SEQ ID NO : 40 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 19 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
- 30



- (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 40
- GGACTTTCCT ACTTGGCAG 19
- 5 (2) SEQ ID NO : 41 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 20 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- 10 (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 41 :
- GGCAACTAGA AGGCACAGTC 20
- (2) SEQ ID NO : 42 信息:
- 15 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 77 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性
- 20 (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 42 :
- AGCTTGCCGC CACCATGGAT TTTCAAGTGC AGATTTTCAG CTCCTGCTA ATCAGTGCTT 60
- CAGTCATAAT GTCCCGC 77
- 25 (2) SEQ ID NO : 43 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 71 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- 30 (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 43 :



GGGACATTAT GACTGAAGCA CTGATTAGCA GGAAGCTGAA AATCTGCACT TGAAAATCCA 60

TGGTGGCGGC A 71

5 (2) SEQ ID NO:44 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 61 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:44:

AGCTTGCCGC CACCATGAAG TTGTGGCTGA ACTGGATTTT CCTTGTAACA CTTTAAATG 60

15 G 61

(2) SEQ ID NO:45 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 61 个碱基对

20 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:45:

25 AATTCCATTT AAAAGTGTTA CAAGGAAAAT CCAGTTCAGC CACAACCTCA TGGTGGCGGC 60

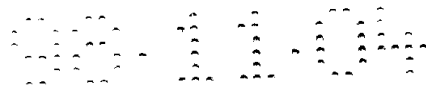
A 61

(2) SEQ ID NO:46 信息:

30 (i) 序列特征:

(A) 长度: 357 个碱基对

(B) 类型: 核酸



(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO :46 :

5 AAGCTTCTCG AGATCAAACG GACTGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT 60
GATGAGCAGT TGAATCTGG AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC 120
AGAGAGGCCA AAGTACAGTG GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG 180
10 AGTGTACACAG AGCAGGACAG CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG 240
AGCAAAGCAG ACTACGAGAA ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG 300
AGTTCGCCCCG TCACAAAGAG CTTCAACAGG GGAGAGTGT AATAGCCCCG GACTAGT 357

15 (2) SEQ ID NO : 47 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 381 个碱基对

(B) 类型: 核酸

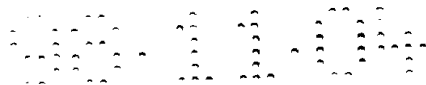
(C) 链型: 单链

20 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 47 :

GGAAGCTTGA GCTCGGCTAG CACCAAGGGA CCATCGGTCT TCCCCCTGGC CCCCTGCTCC 60
25 AGGAGCACCT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG TCAAGGACTA CTTCCCCGAA 120
CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCT CTGACCAGCG GCGTGCACAC CTTCCCGGCT 180
GTCCTACAGT CCTCAGGACT CTA CTCCCTC AGCAGCGTCG TGACGGTGCC CTCCAGCAAC 240
30 TTCGGCACCC AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC 300



AAGACAGTTG AGCGCAAATG TTGTGTCGAG TGCCACCGT GCCCGGCGCC ACCTGTGGCC 360

GGCTAATAGC CCGGGACTAG T 381

(2) SEQ ID NO : 48 信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 342 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

10 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 48 :

AAGCTTTCCC GCGGCGACAT CCAGATGACC CAGAGCCCAA GCAGCCTGAG CGCTAGCGTG 60

GGTGACAGAG TGACCATCAC GTGTAGTGCC AGCTCAAGTG TAACTTACAT GCACTGGTAC 120

15

CAGCAGAAGC CAGGTAAGGC TCCAAAGCTG CTGATCTACA GCACATCCAA CCTGGCTTCT 180

GGTGTGCCAA GCAGATTCTC CGGAAGCGGT AGCGGCACCG ACTACACCTT CACCATCAGC 240

AGCCTCCAGC CAGAGGATAT CGCCACCTAC TACTGCCAGC AGAGGAGTAC TTACCCGCTC 300

20

ACGTTCCGGCC AAGGGACCAA GCTCGAGATC AAACGGACTA GT 342

(2) SEQ ID NO : 49 信息:

(i) 序列特征:

25 (A) 长度: 321 个碱基对

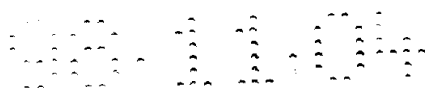
(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 49 :



GACATCCAGA TGACCCAGAG CCCAAGCAGC CTGAGCGCTA GCGTGGGTGA CAGAGTGACC 60
 ATCACGTGTA GTGCCAGCTC AAGTGTA ACT TACATGCACT GGTACCAGCA GAAGCCAGGT 120
 5 AAGGCTCCAA AGCTGCTGAT CTACAGCACA TCCAACCTGG CTTCTGGTGT GCCAAGCAGA 180
 TTCTCCGAA GCGGTAGCGG CACCGACTAC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT CCAGCCAGAG 240
 GATATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGAGG AGTACTTACC CGCTCAGTT CGGCCAAGGG 300
 ACCAAGCTCG AGATCAAACG G 321

(2) SEQ ID NO : 50 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 50 :

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

25 35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

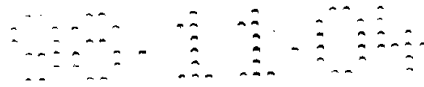
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu

30 65 70 75 80

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr

85 90 95



Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

(2) SEQ ID NO : 51 信息:

5

(i) 序列特征:

(A) 长度: 705 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

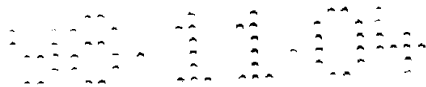
(D) 拓扑学: 线性

10

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 51 :

```
ATGGATTTTC AAGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC      60
CGCGGGCACA TCCAGATGAC CCAGAGCCCA AGCAGCCTGA GCGCTAGCGT GGGTGACAGA      120
15 GTGACCATCA CGTGTAGTGC CAGCTCAAGT GTAACCTACA TGCACCTGGTA CCAGCAGAAG      180
CCAGGTAAGG CTCCAAAGCT GCTGATCTAC AGCACATCCA ACCTGGCTTC TGGTGTGCCA      240
AGCAGATTCT CCGGAAGCGG TAGCGGCACC GACTACACCT TCACCATCAG CAGCCTCCAG      300
20 CCAGAGGATA TCGCCACCTA CTA CTGCCAG CAGAGGAGTA CTTACCCGCT CACGTTGGGC      360
CAAGGGACCA AGCTCGAGAT CAAACGGACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG      420
) CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGA ACT GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC      480
25 TATCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC      540
CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCCCTG      600
;
ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG      660
30 GGCTGAGTT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT      705
```



(2) SEQ ID NO : 52 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 235 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

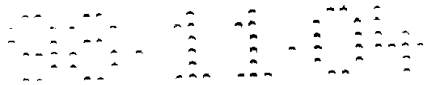
5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 52 :

10 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
15 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
20 65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile
85 90 95
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
25 100 105 110
Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
30 130 135 140
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160



Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

5

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

10

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

(2) SEQ ID NO : 53 信息:

15

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 385 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

20

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 53 :

GAAGCTTGGG ATTCAGTGTG AGGTGCAGCT GCAGCAGAGC GGTCCAGGTC TCGTACGGCC 60

TAGCCAGACC CTGAGCCTCA CGTGCACCGC ATCTGGCTTC AACATTAAGG ACAATTACAT 120

25 GCACTGGGTG AGACAGCCAC CTGGACGAGG CCTTGAGTGG ATTGGATGGA TTGACCCTGA 180

GAATGGTGAC ACTGAGTACG CACCTAAGTT TCGCGGCCGC GTGACAATGC TGGCAGACAC 240

TAGTAAGAAC CAGTTCAGCC TGAGACTCAG CAGCGTGACA GCCGCCGACA CCGCGGTCTA 300

30 TTATTGTCAC GTCCTGATAT ACGCCGGGTA TCTGGCAATG GACTACTGGG GCCAAGGGAC 360

CCTCGTCACC GTGAGCTCGA CTAGT 385

(2) SEQ ID NO : 54 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 360 个碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 54 :

10 GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60

ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120

CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGGATGG ATTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180

GCACCTAAGT TTCGCGGCCG CGTGACAATG CTGGCAGACA CTAGTAAGAA CCAGTTCAGC 240

15 CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300

TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

(2) SEQ ID NO : 55 信息:

20 (i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

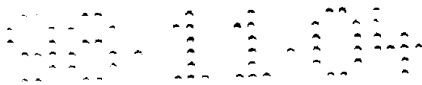
25 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 55 :

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn
20 25 30

30



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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

5

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

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

10

His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 (2) SEQ ID NO: 56 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 765 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

20

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 56:

ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGAAT TCAGTGTGAG 60

25

GTGCAGCTGC AGCAGAGCGG TCCAGGTCTC GTACGGCCTA GCCAGACCCT GAGCCTCAGG 120

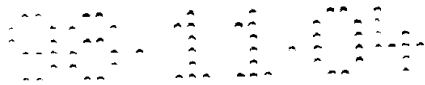
TGCACCGCAT CTGGCTTCAA CATTAAAGGAC AATTACATGC ACTGGGTGAG ACAGCCACCT 180

GGACGAGGCC TTGAGTGGAT TGGATGGATT GACCCTGAGA ATGGTGACAC TGAGTACGCA 240

30

CCTAAGTTTC GCGGCCGCGT GACAATGCTG GCAGACACTA GTAAGAACCA GTTCAGCCTG 300

AGACTCAGCA GCGTGACAGC CGCCGACACC GCGGTCTATT ATTGTCACGT CCTGATATAC 360



GCCGGGTATC TGGCAATGGA CTA CTACTGGGGC CAAGGGACCC TCGTCACCGT GAGCTCGGCT 420

AGCACCAAGG GACCATCGGT CTTCCCCCTG GCCCCCTGCT CCAGGAGCAC CTCCGAGAGC 480

5

ACAGCCGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG 540

AACTCAGGCG CTCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA 600

CTCTACTCCC TCAGCAGCGT CGTGACGGTG CCCTCCAGCA ACTTCGGCAC CCAGACCTAC 660

10

ACCTGCAACG TAGATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGACAGT TGAGCGCAAA 720

TGTTGTGTCG AGTGCCCACC GTGCCCGGCG CCACCTGTGG CCGGC 765

(2) SEQ ID NO : 57 信息:

(i) 序列特征:

15

(A) 长度: 255 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 57 :

20

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

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

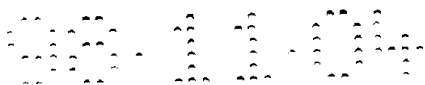
25

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Asn Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
50 55 60

30

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala
65 70 75 80



Pro Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Leu Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110

5

Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

10

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

15

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

20

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 225 230 235 240

25

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 245 250 255

(2) SEQ ID NO : 58 信息:

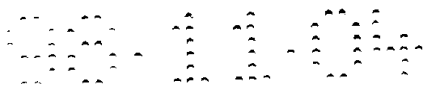
(i) 序列特征:

30

(A) 长度: 40 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链



(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 58 :

GGCGACATCC AGCTGACCCA GAGCCCAAGC AGCCTGAGCG

5

40

(2) SEQ ID NO : 59 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 46 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 59 :

CTAGCGCTCA GGCTGCTTGG GCTCTGGGTC AGCTGGATGT CGCCGC

15

46

(2) SEQ ID NO : 60 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 321 个碱基对

(B) 类型: 核酸

20

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 60 :

GACATCCAGC TGACCCAGAG CCCAAGCAGC CTGAGCGCTA GCGTGGGTGA CAGAGTGACC

25

60

ATCACGTGTA GTGCCAGCTC AAGTGTA ACT TACATGCACT GGTACCAGCA GAAGCCAGGT

120

AAGGCTCCAA AGCTGCTGAT CTACAGCACA TCCAACCTGG CTTCTGGTGT GCCAAGCAGA

180

TTCTCCGGAA GCGGTAGCGG CACCGACTAC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT CCAGCCAGAG

30

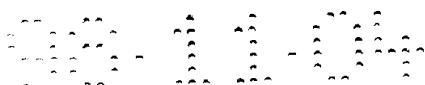
240

GATATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGAGG AGTACTTACC CGCTCACGTT CGGCCAAGGG

300

ACCAAGCTCG AGATCAAACG G

321



(2) SEQ ID NO : 61 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 61

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

15 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

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

(2) SEQ ID NO : 62 信息:

(i) 序列特征:

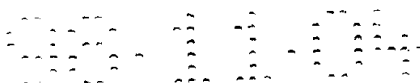
(A) 长度: 40 个碱基对

30 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸



(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 62 :

GGCCAGATCG TGCTGACCCA GAGCCCAAGC AGCCTGAGCG

40

(2) SEQ ID NO : 63 信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 46 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

10 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 63 :

CTAGCGCTCA GGCTGCTTGG GCTCTGGGTC AGCAGATCT GGCCGC

46

(2) SEQ ID NO : 64 信息:

15 (i) 序列特征:

(A) 长度: 321 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

20 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 64 :

CAGATCGTGC TGACCCAGAG CCCAAGCAGC CTGAGCGCTA GCGTGGGTGA CAGAGTGACC 60

ATCACGTGTA GTGCCAGCTC AAGTGTA ACT TACATGCACT GGTACCAGCA GAAGCCAGGT 120

25 AAGGCTCCAA AGCTGCTGAT CTACAGCACA TCCAACCTGG CTTCTGGTGT GCCAAGCAGA 180

TTCTCCGGAA GCGGTAGCGG CACCGACTAC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT CCAGCCAGAG 240

GATATCGCCA CCTACTACTG. CCAGCAGAGG AGTACTTACC CGCTCACGTT CGGCCAAGGG 300

30 ACCAAGCTCG AGATCAAACG G 321

(2) SEQ ID NO : 65 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 65 :

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

15 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

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

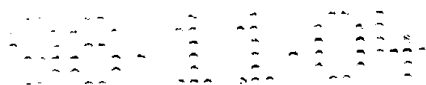
(2) SEQ ID NO : 66 信息:

(i) 序列特征:

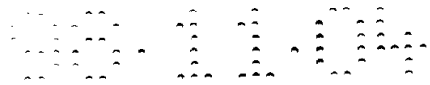
30 (A) 长度: 22 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链



- (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 66 :
- CGTATTAGTC ATCGCTATTA CC 22
- 5 (2) SEQ ID NO : 67 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 39 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- 10 (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 67
- GTTGGATGTG CTGTAGATCC ACAGCTTTGG AGCCTTACC 39
- (2) SEQ ID NO : 68 信息:
- 15 (i) 序列特征:
- (A) 长度: 21 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性
- 20 (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 68 :
- TCCGTTTGAT CTCGAGCTTG G 21
- (2) SEQ ID NO : 69 信息:
- (i) 序列特征:
- 25 (A) 长度: 39 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- 30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 69 :
- GGTAAGGCTC CAAAGCTGTG GATCTACAGC ACATCCAAC 39



(2) SEQ ID NO : 70 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 321 个碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 70 :

GACATCCAGA TGACCCAGAG CCCAAGCAGC CTGAGCGCTA GCGTGGGTGA CAGAGTGACC 60

10 ATCACGTGTA GTGCCAGCTC AAGTGTA ACT TACATGCACT GGTACCAGCA GAAGCCAGGT 120

AAGGCTCCAA AGCTGTGGAT CTACAGCACA TCCAACCTGG CTTCTGGTGT GCCAAGCAGA 180

TTCTCCGGAA GCGGTAGCGG CACCGACTAC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT CCAGCCAGAG 240

15 GATATCGCCA CCTACTACTG CCAGCAGAGG AGTACTTACC CGCTCACGTT CGGCCAAGGG 300

ACCAAGCTCG AGATCAAACG G 321

(2) SEQ ID NO : 71 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 107 氨基酸

20 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

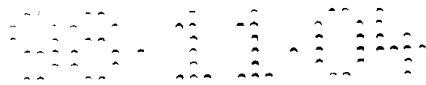
(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 71 :

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

30 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45



Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95

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

(2) SEQ ID NO : 72 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 64 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 72 :

CCTTGAGTGG ATTGCATGGA TTGACCCTGA GAATGGTGAC ACTGAGTACG CACCTAAGTT 60

TCGC 64

(2) SEQ ID NO : 73 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 68 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

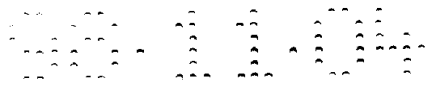
(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 73

GGCCGCGAAA CTTAGGTGCG TACTCAGTGT CACCATTCTC AGGGTCAATC CATGCAATCC 60

ACTCAAGG 68



(2) SEQ ID NO : 74 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 360 个碱基对

(B) 类型: 核酸

5 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 74 :

10 GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60

ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120

CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGCATGG ATTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180

15 GCACCTAAGT TTCGCGGCCG CGTGACAATG CTGGCAGACA CTAGTAAGAA CCAGTTCAGC 240

CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300

TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

(2) SEQ ID NO : 75 信息:

20 (i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

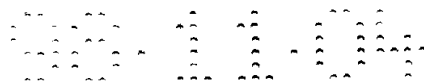
25 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 75 :

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn
20 25 30

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



GGTGTGCGCG GCTGTCACGC TGCTGAGTCT CAGGCTGGCC TGGTCTTAC TTGAGTCTGC 60

] CAGCATTGTC ACGC 74

(2) SEQ ID NO : 78 信息:

5 (i) 序列特征:

(A) 长度: 360 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

10 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 78

GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60

ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120

15 CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGGATGG ATTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180

GCACCTAAGT TTCGCGGCCG CGTGACAATG CTGGCAGACT CAAGTAAGAA CCAGGCCAGC 240

CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300

20 TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

(2) SEQ ID NO : 79 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

25 (B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 79 :

30 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15



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

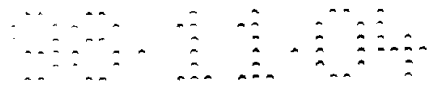
(2) SEQ ID NO : 80 信息:

- 20 (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 360 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性

25 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 80

GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60
 ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120
 30 CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGCATGG ATTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180
 GCACCTAAGT TTCGCGGCCG CGTGACAATG CTGGCAGACT CAAGTAAGAA CCAGGCCAGC 240



CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300

TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

5 (2) SEQ ID NO:81 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

10 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:81

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

15 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn
20 25 30

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

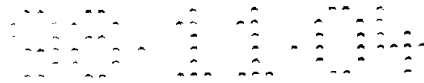
20 Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

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

25 Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120



(2) SEQ ID NO : 82 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 80 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 82 :

5

10

GGCCGCGCCA CAATGCTGGC AGACACTAGT AAGAACCAGT TCAGCCTGAG ACTCAGCAGC 60

GTGACAGCCG CCGACACCGC 80

(2) SEQ ID NO : 83 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 74 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 83 :

15

20

GGTGTGGCG GCTGTCACGC TGCTGAGTCT CAGGCTGAAC TGGTTCTTAC TAGTGTCTGC 60

CAGCATTGTG GCGC 74

25 (2) SEQ ID NO : 84 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 360 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 84 :

30

]
 GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60
 ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120
 5 CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGGATGG ATTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180
 GCACCTAAGT TTCGCGGCCG CGCCACAATG CTGGCAGACA CTAGTAAGAA CCAGTTCAGC 240
 CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300
 10 TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

(2) SEQ ID NO : 85 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

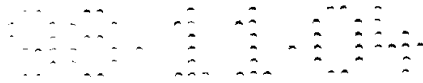
(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 85 :

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



His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5

(2) SEQ ID NO : 86 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 80 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 86 :

GGCCGCGCCA CAATGCTGGC AGACTCAAGT AAGAACCAGG CCAGCCTGAG ACTCAGCAGC 60

15

GTGACAGCCG CCGACACCGC 80

(2) SEQ ID NO : 87 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 74 个碱基对

20

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 87 :

25

GGTGTGCGCG GCTGTCACGC TGCTGAGTCT CAGGCTGGCC TGGTTCTTAC TTGAGTCTGC 60

CAGCATTGTG GCGC 74

(2) SEQ ID NO : 88 信息:

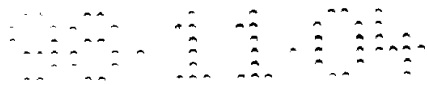
(i) 序列特征:

30

(A) 长度: 360 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链



(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO :88 :

5 GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60

ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120

CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGGATGG ATTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180

GCACCTAAGT TTCGGGGCCG CGCCACAATG CTGGCAGACT CAAGTAAGAA CCAGGCCAGC 240

10 CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300

TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

(2) SEQ ID NO : 89 信息:

15 (i) 序列特征:

(A) 长度: 120 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

20 (ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 89 :

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn
25 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
30 50 55 60

Arg Gly Arg Ala Thr Met Leu Ala Asp Ser Ser Lys Asn Gln Ala Ser
65 70 75 80

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

His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

(2) SEQ ID NO : 90 信息:

- 10 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 360 个碱基对
 (B) 类型: 核酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性

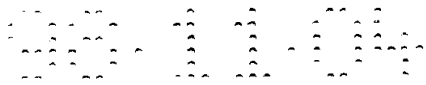
- 15 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 90

GAGGTGCAGC TGCAGCAGAG CGGTCCAGGT CTCGTACGGC CTAGCCAGAC CCTGAGCCTC 60
 ACGTGCACCG CATCTGGCTT CAACATTAAG GACAATTACA TGCACTGGGT GAGACAGCCA 120
 20 CCTGGACGAG GCCTTGAGTG GATTGCATGG APTGACCCTG AGAATGGTGA CACTGAGTAC 180
 GCACCTAAGT TTCGCGGCCG CGCCACAATG CTGGCAGACT CAAGTAAGAA CCAGGCCAGC 240
 CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTCT ATTATTGTCA CGTCCTGATA 300
 25 TACGCCGGGT ATCTGGCAAT GGACTACTGG GGCCAAGGGA CCCTCGTCAC CGTGAGCTCG 360

(2) SEQ ID NO : 91 信息:

- 30 (i) 序列特征:
 (A) 长度: 120 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型: 单链
 (D) 拓扑学: 线性



(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 91:

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

5

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn
20 25 30

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

10

Ala Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Ala Thr Met Leu Ala Asp Ser Ser Lys Asn Gln Ala Ser
65 70 75 80

15

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

His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

20

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

(2) SEQ ID NO: 92 信息:

(i) 序列特征:

25

(A) 长度: 780 个碱基对

(B) 类型: 核酸

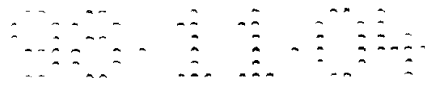
(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 92:



5
 10
 15
 20

ATGAAGTTGT GGCTGAACTG GATTTTCCTT GTAACACTTT TAAATGGAAT TCAGTGTGAG 60
 GTGCAGCTGC AGCAGAGCGG TCCAGGTCTC GTACGGCCTA GCCAGACCCT GAGCCTCAGG 120
 TGCACCGCAT CTGGCTTCAA CATTAAGGAC AATTACATGC ACTGGGTGAG ACAGCCACCT 180
 GGACGAGGCC TTGAGTGGAT TGGATGGATT GACCCTGAGA ATGGTGACAC TGAGTACGCA 240
 CCTAAGTTTC GCGGCCGCGT GACAATGCTG GCAGACACTA GTAAGAACCA GTTCAGCCTG 300
 AGACTCAGCA GCGTGACAGC CGCCGACACC GCGGTCTATT ATTGTCACGT CCTGATATAC 360
 GCCGGGTATC TGGCAATGGA CTACTGGGGC CAAGGGACCC TCGTCACCGT GAGCTCGGCC 420
 TCCACCAAGG GCCCATCGGT CTCCCCCTG GCACCCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGGC 480
 ACAGCGGCCC TGGGCTGCCT GGTCAAGGAC TACTTCCCCG AACCGGTGAC GGTGTCGTGG 540
 AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCCG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA 600
 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACTGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC CCAGACCTAC 660
 ATCTGCAACG TGAATCACAA CCCCAGCAAC ACCAAGGTCG ACAAGAAAGT TGAGCCCCAA 720
 TCTGTGACA AGACGCACAC GTGCCCGCCG TGCCCGGCTC CGGAACTGCT GGGTGGCCCC 780

(2) SEQ ID NO : 93 信息:

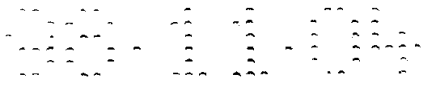
(i) 序列特征:

- (A) 长度: 260 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 93 :

30 Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15



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

5

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

Lys Asp Asn Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

10

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Leu Ala Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110

15

Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

20

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

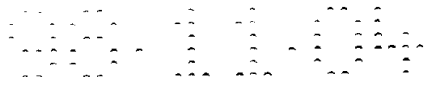
25

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

30

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220



AACTCAGGCG CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCGG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA 600
 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT GGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC CCAGACCTAC 660
 ACCTGCAACG TGAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG ACAAGAGAGT GGAGCTGAAA 720
 5 ACCCCACTCG GTGACACAAC TCACACGTGC CCTAGGTGTC CTGAACCTAA ATCTTGTGAC 780
 ACACCTCCCC CGTGCCCACG GTGCCCAGAG CCCAAATCTT GCGACACGCC CCCACCGTGT 840
 CCCAGATGTC CTGAACCAAA GAGCTGTGAC ACTCCACCGC CCTGCCCGAG GTGCCCAGCA 900
 10 CCTGAACTCC TGGGAGGG 918

(2) SEQ ID NO : 95 信息:

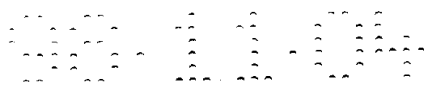
(i) 序列特征:

- (A) 长度: 306 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 95

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



Pro Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Leu Ala Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

5 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr
115 120 125

10 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

15 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

20 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

25 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys
225 230 235 240

Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
245 250 255

30 Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys
260 265 270

Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
275 280 285



Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
290 295 300

Gly Gly
305

5

(2) SEQ ID NO : 96 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 705 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10

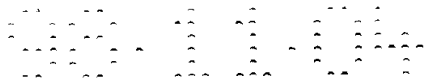
(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 96 :

ATGGATTTTC AAGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC 60
15 CGCGGCCAGA TCGTGCTGAC CCAGAGCCCA AGCAGCCTGA GCGCTAGCGT GGGTGACAGA 120
GTGACCATCA CGTGTAGTGC CAGCTCAAGT GTAACCTACA TGCCTGGTA CCAGCAGAAG 180
CCAGGTAAGG CTCCAAAGCT GCTGATCTAC AGCACATCCA ACCTGGCTTC TGGTGTGCCA 240
20 AGCAGATTCT CCGGAAGCGG TAGCGGCACC GACTACACCT TCACCATCAG CAGCCTCCAG 300
CCAGAGGATA TCGCCACCTA CTA CTGCCAG CAGAGGAGTA CTTACCCGCT CACGTTCCGG 360
CAAGGGACCA AGCTCGAGAT CAAACGGACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG 420
25 CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGA ACT GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC 480
TATCCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC 540
CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG 600
30 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG 660
GGCCTGAGTT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT 705



(2) SEQ ID NO : 97 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 235 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

5

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 97 :

10

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

15

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
50 55 60

20

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile
85 90 95

25

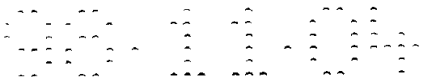
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

30

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160



Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

5

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

10

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

(2) SEQ ID NO : 98 信息:

15

(i) 序列特征:

(A) 长度: 705 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

20

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 98 :

ATGGATTTTC AAGTGCAGAT TTTCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC 60

CGCGGCGACA TCCAGATGAC CCAGAGCCCA AGCAGCCTGA GCGCTAGCGT GGGTGACAGA 120

25

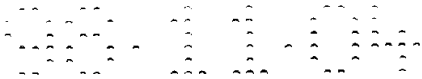
GTGACCATCA CGTGTAGTGC CAGCTCAAGT GTAACCTACA TGCACTGGTA CCAGCAGAAG 180

CCAGGTAAGG CTCCAAGCT GTGGATCTAC AGCACATCCA ACCTGGCTTC TGGTGTGCCA 240

AGCAGATTCT CCGGAAGCGG TAGCGGCACC GACTACACCT TCACCATCAG CAGCCTCCAG 300

30

CCAGAGGATA TCGCCACCTA CTA CTACTGCCAG CAGAGGAGTA CTTACCCGCT CACGTTCCGGC 360



CAAGGGACCA AGCTCGAGAT CAAACGGACT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG 420

CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAAct GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC 480

5

TATCCAGAG AGGCCAAAGT ACAGTGGAAAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC 540

CAGGAGAGTG TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG 600

ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT CACCCATCAG 660

10

GGCCTGAGTT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG AGTGT 705

(2) SEQ ID NO : 99 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 235 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

15

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 99 :

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

20

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser

25

35 40 45

Ser Ser Val Thr Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala

50 55 60

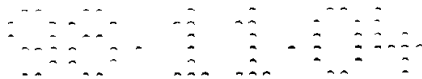
Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

30

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile

85 90 95



Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

5

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

10

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

15

Ser Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

20

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

(2) SEQ ID NO : 100 信息:

(i) 序列特征:

25

(A) 长度: 54 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

30

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 100

CCCAGCACCT GAACTCCTGG GAGGAGCAAC AGGACACAGT TATGAGAAGT ACAA

54

(2) SEQ ID NO : 101 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 50 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 101 :

GGGGGTCTAG ATTATTAGTA CAGGTGTTCC AGGACGTAGC TGGCAACATA

50

10

(2) SEQ ID NO : 102 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 46 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 102 :

GGGGGAGCTC GGCTAGCACC AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGC

46

20

(2) SEQ ID NO : 103 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 55 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 103 :

TTGTA CTCT CATAACTGTG TCCTGTTGCT CCTCCCAGGA GTTCAGGTGC TGGGC

55

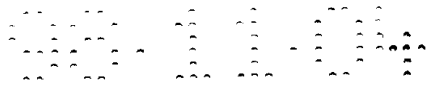
30

(2) SEQ ID NO : 104 信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 21 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- 5 (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 104
- GCCTGTGCTC AATATTGATG G 21
- (2) SEQ ID NO : 105 信息:
- (i) 序列特征:
- 10 (A) 长度: 21 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- 15 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 105 :
- GGAGAAAGCC ATATCTGCCT G 21
- (2) SEQ ID NO : 106 信息:
- (i) 序列特征:
- 20 (A) 长度: 30 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 106 :
- 25 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC 30
- (2) SEQ ID NO : 107 信息:
- (i) 序列特征:
- 30 (A) 长度: 23 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸

- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 107 :
GGCTGGATTC TCAGTGGCGA CTT 23
- (2) SEQ ID NO : 108 信息:
- (i) 序列特征:
- 5 (A) 长度: 18 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- 10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 108
CACAAACAGAG GCAGTTCC 18
- (2) SEQ ID NO : 109 信息:
- (i) 序列特征:
- 15 (A) 长度: 20 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 109 :
20 CACCTTCACC ATCAGCAGCC 20
- (2) SEQ ID NO : 110 信息:
- (i) 序列特征:
- 25 (A) 长度: 19 个碱基对
(B) 类型: 核酸
(C) 链型: 单链
(D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 110
GGACCTGCTG CAGAGTCTG 19
- 30 (2) SEQ ID NO : 111 信息:
- (i) 序列特征:
- (A) 长度: 47 个碱基对



(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:111:

GGCTGCAGGA ATTCTTATTA TAGACGAACC CGGCTATCAA ACTGAGC

47

(2) SEQ ID NO:112 信息:

(i) 序列特征:

10 (A) 长度: 1870 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

15 (xi) 序列描述: SEQ ID NO:112:

AAGCTTGCCG CCACCATGAA GTTGTGGCTG AACTGGATT TCCTTGTAAC ACTTTTAAAT 60

GGAATTCAGT GTGAGGTGCA GCTGCAGCAG AGCGGTCCAG GTCTCGTACG GCCTAGCCAG 120

ACCCTGAGCC TCACGTGCAC CGCATCTGGC TTCAACATTA AGGACAATTA CATGCACTGG 180

20

GTGAGACAGC CACCTGGACG AGGCCTTGAG TGGATTGGAT GGATTGACCC TGAGAATGGT 240

GACACTGAGT ACGCACCTAA GTTTCGCGGC CGCGTGACAA TGCTGGCAGA CACTAGTAAG 300

AACCAGTTCA GCCTGAGACT CAGCAGCGTG ACAGCCGCCG ACACCGCGGT CTATTATTGT 360

25

CACGTCCTGA TATACGCCGG STATCTGGCA ATGGACTACT GGGGCCAAGG GACCCCTCGTC 420

ACCGTGAGCT CGGCTAGCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG 480

AGCACCTCTG GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG 540

30

GTGACGGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC 600



CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG 660

GGCACCCAGA CCTACACCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG 720

5 AGAGTGGAGC TGAAAACCCC ACTCGGTGAC ACAACTCACA CGTGCCCTAG GTGTCCTGAA 780

CCTAAATCTT GTGACACACC TCCCCCGTGC CCACGGTGCC CAGAGCCCAA ATCTTGCGAC 840

ACGCCCCCAC CGTGTCCTAG ATGTCCTGAA CCAAAGAGCT GTGACACTCC ACCGCCCTGC 900

10 CCGAGGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGA GGAGCAACAG GACACAGTTA TGAGAAGTAC 960

AACAAGTGGG AAACGATAGA GGCTTGGACT CAACAAGTCG CCACTGAGAA TCCAGCCCTC 1020

ATCTCTCGCA GTGTTATCGG AACCACATTT GAGGGACGCG CTATTACCT CCTGAAGTT 1080

15 GGCAAAGCTG GACAAAATAA GCCTGCCATT TTCATGGACT GTGGTTTCCA TGCCAGAGAG 1140

TGGATTTCTC CTGCATTCTG CCAGTGGTTT GTAAGAGAGG CTGTTCTGAC CTATGGACGT 1200

GAGATCCAAG TGACAGAGCT TCTCGACAAG TTAGACTTTT ATGTCCTGCC TGTGCTCAAT 1260

20 ATTGATGGCT ACATCTACAC CTGGACCAAG AGCCGATTTT GGAGAAAGAC TCGCTCCACC 1320

CATACTGGAT CTAGCTGCAT TGGCAGAGAC CCCAACAGAA ATTTTGATGC TGGTTGGTGT 1380

GAAATGGAG CCTCTCGAAA CCCCTGTGAT GAAACTTACT GTGGACCTGC CGCAGAGTCT 1440

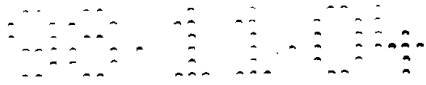
25 GAAAAGGAGA CCAAGGCCCT GGCTGATTTT ATCCGCAACA AACTCTCTC CATCAAGGCA 1500

TATCTGACAA TCCACTCSTA CTCCCAATG ATGATCTACC CTTACTCATA TGCTTACAAA 1560

CTCGGTGAGA ACAATGCTGA GTTGAATGCC CTGGCTAAAG CTA CTGTGAA AGAACTTGCC 1620

30 TCACTGCACG GCACCAAGTA CACATATGGC CCGGGAGCTA CAACAATCTA TCCTTCTGCT 1680

GGGACTTCTA AAGACTGGGC TTATGACCAA GGAATCAGAT ATTCCTTAC CTTTGAACCT 1740



CGAGATACAG GCAGATATGG CTTTCTCCTT CCAGAATCCC AGATCCGGGC TACCTGCGAG 1800

GAGACCTTCC TGGCAATCAA GSTATGTTGCC AGCTACGTCC TGGAACACCT GTACTAATAA 1860

5 TCTAGAGAGA 1870

(2) SEQ ID NO : 113 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 613 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 113 :

15 Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

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

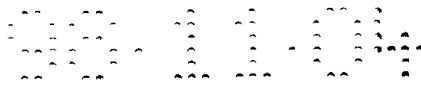
20 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Asn Tyr Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
50 55 60

25 Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Lys Phe Arg Gly Arg Val Thr Met Leu Ala Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

30 Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110



Tyr Tyr Cys His Val Leu Ile Tyr Ala Gly Tyr Leu Ala Met Asp Tyr
115 120 125

5

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

10

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

15

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Leu Lys
225 230 235 240

20

Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro
245 250 255

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys
260 265 270

25

Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser
275 280 285

Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
290 295 300

30

Gly Gly Ala Thr Gly His Ser Tyr Glu Lys Tyr Asn Lys Trp Glu Thr
305 310 315 320



Ile Glu Ala Trp Thr Gln Gln Val Ala Thr Glu Asn Pro Ala Leu Ile
325 330 335

Ser Arg Ser Val Ile Gly Thr Thr Phe Glu Gly Arg Ala Ile Tyr Leu
340 345 350

Leu Lys Val Gly Lys Ala Gly Gln Asn Lys Pro Ala Ile Phe Met Asp
355 360 365

Cys Gly Phe His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Gln Trp
370 375 380

Phe Val Arg Glu Ala Val Arg Thr Tyr Gly Arg Glu Ile Gln Val Thr
385 390 395 400

Glu Leu Leu Asp Lys Leu Asp Phe Tyr Val Leu Pro Val Leu Asn Ile
405 410 415

Asp Gly Tyr Ile Tyr Thr Trp Thr Lys Ser Arg Phe Trp Arg Lys Thr
420 425 430

Arg Ser Thr His Thr Gly Ser Ser Cys Ile Gly Thr Asp Pro Asn Arg
435 440 445

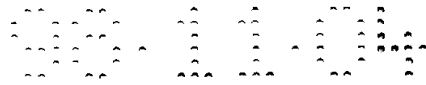
Asn Phe Asp Ala Gly Trp Cys Glu Ile Gly Ala Ser Arg Asn Pro Cys
450 455 460

Asp Glu Thr Tyr Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys
465 470 475 480

Ala Leu Ala Asp Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser Ile Lys Ala Tyr
485 490 495

Leu Thr Ile His Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr
500 505 510

Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala Leu Ala Lys
515 520 525



Ala Thr Val Lys Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr
 530 535 540

Gly Pro Gly Ala Thr Thr Ile Tyr Pro Ser Ala Gly Thr Ser Lys Asp
 545 550 555 560

Trp Ala Tyr Asp Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg
 565 570 575

Asp Thr Gly Arg Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Ala
 580 585 590

Thr Cys Glu Glu Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val Ala Ser Tyr Val
 595 600 605

Leu Glu His Leu Tyr
 610

15 (2) SEQ ID NO : 114 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 96 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 114 :

His His Gly Gly Glu His Phe Glu Gly Glu Lys Val Phe Arg Val Asn
 1 5 10 15

Val Glu Asp Glu Asn His Ile Asn Ile Ile Arg Glu Leu Ala Ser Thr
 20 25 30

Thr Gln Ile Asp Phe Trp Lys Pro Asp Ser Val Thr Gln Ile Lys Pro
 35 40 45

His Ser Thr Val Asp Phe Arg Val Lys Ala Glu Asp Thr Val Thr Val
 50 55 60



(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:116:

5 GTTATTACTC GCTGCCCAAC CAGCCATGGC G

31

(2) SEQ ID NO:117 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 23 个碱基对

(B) 类型: 核酸

10 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:117:

GCAGCAGGAT AGATTGTTGT AGC

23

15 (2) SEQ ID NO:118 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 88 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

20 (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO:118

CCGGAATTCT TATTAGTTCA GGTCTCTCTC AGAGATCAGC TTCTGCTCCT CGAACTCATG

60

GTGGTGATGG TGGTGGTACA GGTGTTC

25

88

(2) SEQ ID NO:119 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 个碱基对

(B) 类型: 核酸

30 (C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸



(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 119 :
CAATCTATCC TGCTGCTGGG ACTTCTAAAG 30

(2) SEQ ID NO : 120 信息:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 20 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

10 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 120 :
GATTGTTGTA GCTCCCGGGC 20

(2) SEQ ID NO : 121 信息:

(i) 序列特征:

- 15 (A) 长度: 30 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

20 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 121
GGAGCTACAA CAATCTATCC TTCTGCTGGG 30

(2) SEQ ID NO : 122 信息:

(i) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 22 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性

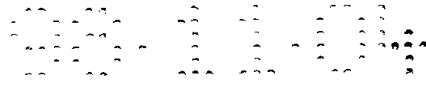
(ii) 分子类型: 其它核酸

30 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 122 :
ACGGCACCAA GTACACATAT GG 22

(2) SEQ ID NO : 123 信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 90 个碱基对



(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 其它核酸

5 (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 123

ACGAGAATTC GACCGCTCTG CTGCAGCTGC ACCTCGGAAC CGCCACCGCT GCCACCGCCA 60

GAACCGCCAC CGTACAGGTG TTCCAGGACG 90

(2) SEQ ID NO : 124 信息:

10 (i) 序列特征:

(A) 长度: 2154 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

15 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 124

ATGTTGGCAC TCTTGGTTCT GGTGACTGTG GCCCTGGCAT CTGCTCATCA TGGTGGTGAG 60

20 CACTTTGAAG GCGAGAAGGT GTTCCGTGTT AACGTTGAAG ATGAAAATCA CATTACATA 120

ATCCGCGAGT TGGCCAGCAC GACCCAGATT GACTTCTGGA AGCCAGATTC TGTCACACAA 180

ATCAAACCTC ACAGTACAGT TGA CT TCCGT GTTAAAGCAG AAGATACTGT CACTGTGGAG 240

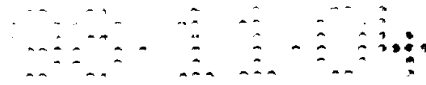
25 AATGTTCTAA AGCAGAATGA ACTACAATAC AAGGTACTGA TAAGCAACCT GAGAAATGTG 300

GTGGAGGCTC AGTTTGATAG CCGGGTTCGT GCAACAGGAC ACAGTTATGA GAAGTACAAC 360

AAGTGGGAAA CGATAGAGGC TTGGACTCAA CAAGTCGCCA CTGAGAATCC AGCCCTCATC 420

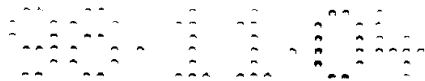
30 TCTCGCAGTG TTATCGGAAC CACATTTGAG GGACCGGCTA TTTACCTCCT GAAGGTTGGC 480

AAAGCTGGAC AAAATAAGCC TGCCATTTTC ATGGACTGTG GTTTCCATGC CAGAGAGTGG 540



5
10
15
20
25
30

ATTTCTCCTG CATTCTGCCA GTGGTTTGTG AGAGAGGCTG TTCGTACCTA TGGACGTGAG 600
ATCCAAGTGA CAGAGCTTCT CGACAAGTTA GACTTTTATG TCCTGCCTGT GCTCAATATT 660
GATGGCTACA TCTACACCTG GACCAAGAGC CGATTTTGGG GAAAGACTCG CTCCACCCAT 720
ACTGGATCTA GCTGCATTGG CACAGACCCC AACAGAAATT TTGATGCTGG TTGGTGTGAA 780
ATTGGAGCCT CTCGAAACCC CTGTGATGAA ACTTACTGTG GACCTGCCGC AGAGTCTGAA 840
AAGGAGACCA AGGCCCTGGC TGATTTTCATC CGCAACAAAC TCTCTTCCAT CAAGGCATAT 900
CTGACAATCC ACTCGTACTC CCAAATGATG ATCTACCCTT ACTCATATGC TTACAAACTC 960
GGTGAGAACA ATGCTGAGTT GAATGCCCTG GCTAAAGCTA CTGTGAAAGA ACTTGCCTCA 1020
CTGCACGGCA CCAAGTACAC ATATGGCCCG GGAGCTACAA CAATCTATCC TTCTGCTGGG 1080
ACTTCTAAAG ACTGGGCTTA TGACCAAGGA ATCAGATATT CCTTCACCTT TGAACTTCGA 1140
GATACAGGCA GATATGGCTT TCTCCTTCCA GAATCCCAGA TCCGGGCTAC CTGCGAGGAG 1200
ACCTTCCTGG CAATCAAGTA TGTGCCAGC TACGTCCTGG AACACCTGTA CGGTGGCGGT 1260
TCTGGCGGTG GCAGCGGTGG CGGTCCGAG GTGCAGCTGC AGCAGAGCGG TCCAGGTCTC 1320
GTACGGCCTA GCCAGACCCT GAGCCTCAGG TGCACCGCAT CTGGCTTCAA CATTAAAGAC 1380
AATTACATGC ACTGGGTGAG ACAGCCACCT GGACGAGGCC TTGAGTGGAT TGGATGGATT 1440
GACCCTGAGA ATGGTGACAC TGAGTACGCA CCTAAGTTTC GCGGCCCGGT GACAATGCTG 1500
GCAGACACTA GTAAGAACCA GTTCAGCCTG AGACTCAGCA GCGTGACAGC CGCCGACACC 1560
GCGGTCTATT ATTGTCACGT CCTGATATAC GCCGGGTATC TGGCAATGGA CTACTGGGGC 1620
CAAGGGACCC TCGTCACCGT GAGCTCGGCT AGCACCAAGG GCCCATCGGT CTTCCTCCCTG 1680



Cys Gly Pro Ala Ala Glu Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ala Leu Ala Asp
275 280 285

Phe Ile Arg Asn Lys Leu Ser Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Thr Ile His
290 295 300

Ser Tyr Ser Gln Met Met Ile Tyr Pro Tyr Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu
305 310 315 320

Gly Glu Asn Asn Ala Glu Leu Asn Ala Leu Ala Lys Ala Thr Val Lys
325 330 335

Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Thr Lys Tyr Thr Tyr Gly Pro Gly Ala
340 345 350

Thr Thr Ile Tyr Pro Ser Ala Gly Thr Ser Lys Asp Trp Ala Tyr Asp
355 360 365

Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Phe Thr Phe Glu Leu Arg Asp Thr Gly Arg
370 375 380

Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Glu Ser Gln Ile Arg Ala Thr Cys Glu Glu
385 390 395 400

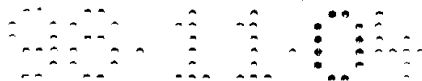
Thr Phe Leu Ala Ile Lys Tyr Val Ala Ser Tyr Val Leu Glu His Leu
405 410 415

Tyr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
420 425 430

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln Thr Leu Ser
435 440 445

Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asn Tyr Met His
450 455 460

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile
465 470 475 480



Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro
675 680 685

5 Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro
690 695 700

Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
705 710 715

(2) SEQ ID NO : 126 信息:

10 (i) 序列特征:

(A) 长度: 42 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

15 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 126 :

TATATAAAGC TTGCCGCCAC CATGGGCCAC ACACGGAGGC AG

42

(2) SEQ ID NO : 127 信息:

20 (i) 序列特征:

(A) 长度: 45 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

25 (ii) 分子类型: 其它核酸

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 127 :

ACTCCACCAG CTTACCTCG TTATCAGGAA AATGCTCTTG CTGG

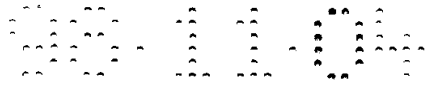
45

(2) SEQ ID NO : 128 信息:

30 (i) 序列特征:

(A) 长度: 45 个碱基对

(B) 类型: 核酸



- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 128 :

5

AGAGCATT TT CCTGATAACG AGGTGAAGCT GGTGGAGTCT GGAGG

45

(2) SEQ ID NO : 129 信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 40 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 129 :

10

15

CCAGGCATCC CAGGGTCACC ATGGAGTTAG TTTGGGCAGC

40

(2) SEQ ID NO : 130 信息:

- (i) 序列特征:
 - (A) 长度: 1446 个碱基对
 - (B) 类型: 核酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 其它核酸
- (ix)
 - (A) 名称/关键词: COS
 - (B) 位点: 16..1435
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO : 130

20

25

AAGCTTGCCG CCACC ATG GGC CAC ACA CGG AGG CAG GGA ACA TCA CCA TCC

51

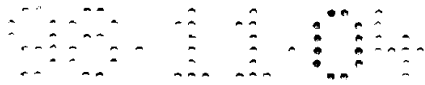
Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser

30

1

5

10



AAG TGT CCA TAC CTC AAT TTC TTT CAG CTC TTG GTG CTG GCT GGT CTT 99
Lys Cys Pro Tyr Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu
15 20 25

TCT CAC TTC TGT TCA GGT GTT ATC CAC GTG ACC AAG GAA GTG AAA GAA 147
Ser His Phe Cys Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu
5 30 35 40

GTG GCA ACG CTG TCC TGT GGT CAC AAT GTT TCT GTT GAA GAG CTG GCA 195
Val Ala Thr Leu Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala
45 50 55 60

CAA ACT CGC ATC TAC TGG CAA AAG GAG AAG AAA ATG GTG CTG ACT ATG 243
Gln Thr Arg Ile Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met
10 65 70 75

ATG TCT GGG GAC ATG AAT ATA TGG CCC GAG TAC AAG AAC CGG ACC ATC 291
Met Ser Gly Asp Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile
15 80 85 90

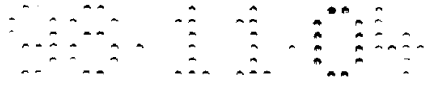
TTT GAT ATC ACT AAT AAC CTC TCC ATT GTG ATC CTG GCT CTG CGC CCA 339
Phe Asp Ile Thr Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro
95 100 105

TCT GAC GAG GGC ACA TAC GAG TGT GTT GTT CTG AAG TAT GAA AAA GAC 387
Ser Asp Glu Gly Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp
20 110 115 120

GCT TTC AAG CGG GAA CAC CTG GCT GAA GTG ACG TTA TCA GTC AAA GCT 435
Ala Phe Lys Arg Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala
25 125 130 135 140

GAC TTC CCT ACA CCT AGT ATA TCT GAC TTT GAA ATT CCA ACT TCT AAT 483
Asp Phe Pro Thr Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn
145 150 155

ATT AGA AGG ATA ATT TGC TCA ACC TCT GGA GGT TTT CCA GAG CCT CAC 531
Ile Arg Arg Ile Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His
30 160 165 170



CTC TCC TGG TTG GAA AAT GGA GAA GAA TTA AAT GCC ATC AAC ACA ACA 579
Leu Ser Trp Leu Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr
175 180 185

5 GTT TCC CAA GAT CCT GAA ACT GAG CTC TAT GCT GTT AGC AGC AAA CTG 627
Val Ser Gln Asp Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu
190 195 200

GAT TTC AAT ATG ACA ACC AAC CAC AGC TTC ATG TGT CTC ATC AAG TAT 675
Asp Phe Asn Met Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr
10 205 210 215 220

GGA CAT TTA AGA GTG AAT CAG ACC TTC AAC TGG AAT ACA ACC AAG CAA 723
Gly His Leu Arg Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln
225 230 235

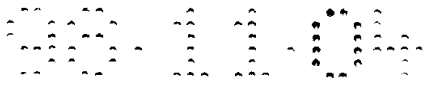
15 GAG CAT TTT CCT GAT AAC GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC 771
Glu His Phe Pro Asp Asn Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
240 245 250

20 TTG GTA CAG CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACT TCT GGG 819
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly
255 260 265

TTC ACC TTC ACT GAT TAC TAC ATG AAC TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGA 867
Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
270 275 280

25 AAG GCA CTT GAG TGG TTG GGT TTT ATT GGA AAC AAA GCT AAT GGT TAC 915
Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr
285 290 295 300

30 ACA ACA GAG TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC TCC AGA 963
Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
305 310 315



GAC AAA TCC CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG AGA GCT 1011
Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala
320 325 330

5 GAG GAC AGT GCC ACT TAT TAC TGT ACA AGA GAT AGG GGG CTA CGG TTC 1059
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe
335 340 345

TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA GCC 1107
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala
350 355 360

10 AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT GCT GCC 1155
Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala
365 370 375 380

15 CAA ACT AAC TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAT TTC 1203
Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe
385 390 395

CCT GAG CCA GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCT CTG TCC AGC GGT 1251
Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly
400 405 410

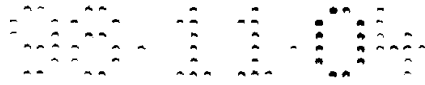
20 GTG CAC ACC TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG AGC 1299
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser
415 420 425

25 AGC TCA GTG ACT GTC CCC TCC AGC ACC TGG CCC AGC GAG ACC GTC ACC 1347
Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr
430 435 440

TGC AAC GTT GCC CAC CCG GCC AGC AGC ACC AAG GTG GAC AAG AAA ATT 1395
Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile
445 450 455 460

30 GTG CCC AGG GAT TGT GGT TGT AAG CCT TGC ATA TGT ACA T AGTAAGAATT 1445
Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
465 470

c 1446



(2) SEQ ID NO : 131 信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 473 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO : 131 :

5

10

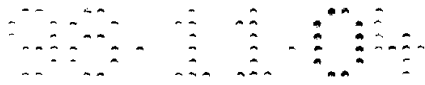
Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80



Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190

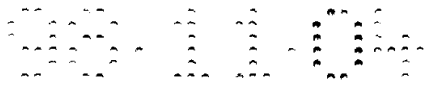
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225 230 235 240

Asp Asn Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
245 250 255

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr
260 265 270



Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
275 280 285

Trp Leu Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr
290 295 300

Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln
305 310 315 320

Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala
325 330 335

Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
340 345 350

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro
355 360 365

Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser
370 375 380

Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val
385 390 395 400

Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe
405 410 415

Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr
420 425 430

Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala
435 440 445

His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp
450 455 460

Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
465 470

说明书附图

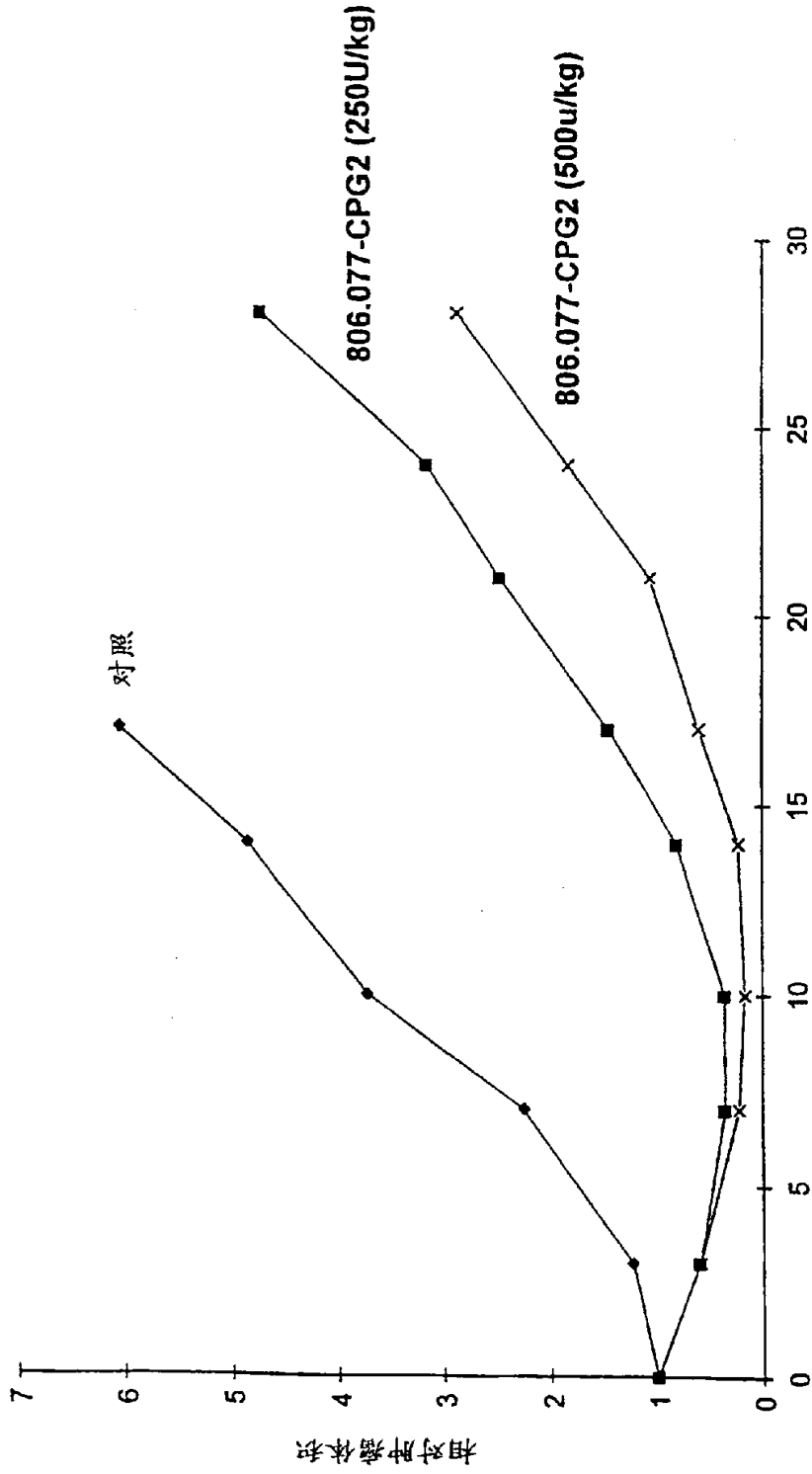


图 1

时间 (天)

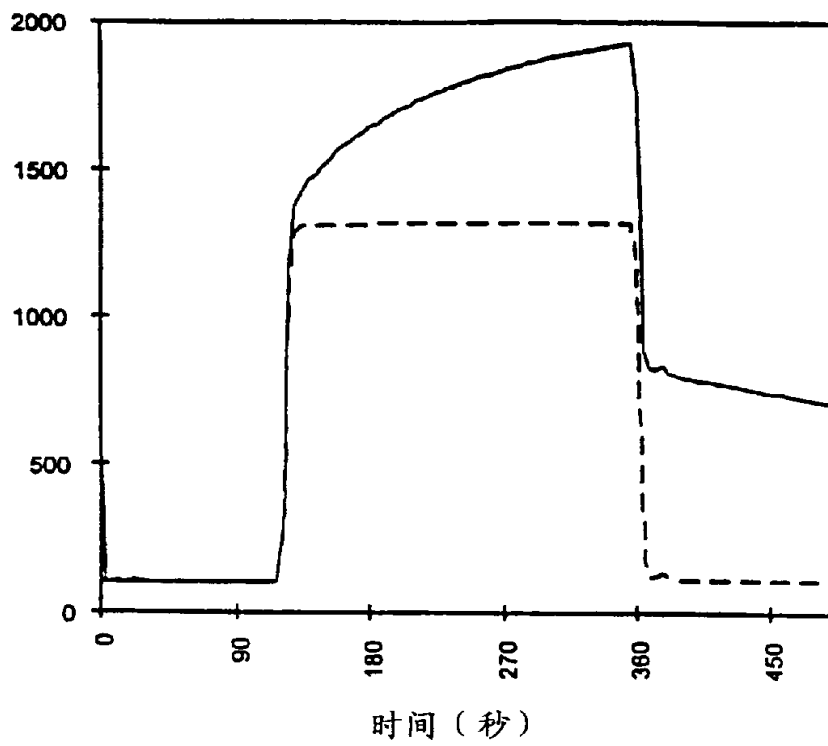


图 3