



(21) 申请号 201980086662.6

(22) 申请日 2019.12.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113226371 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(30) 优先权数据
2018-248334 2018.12.28 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/051594 2019.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/138487 JA 2020.07.02

(73) 专利权人 协和麒麟株式会社
地址 日本东京都

(72) 发明人 三田村圭祐 中野了辅 甲斐正之
高桥信明

(74) 专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688
专利代理师 闫桑田 刘磊

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 47/64 (2006.01)
A61K 47/65 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2009131239 A1, 2009.10.29
W0 2012075037 A1, 2012.06.07
W0 2013177062 A2, 2013.11.28
W0 2014189973 A2, 2014.11.27

Ulrich Brinkmann等.The making of
bispecific antibodies.MABS.2017,第9卷(第2
期),摘要、第182页左栏第1段-第202页右栏第2
段.

审查员 李素荣

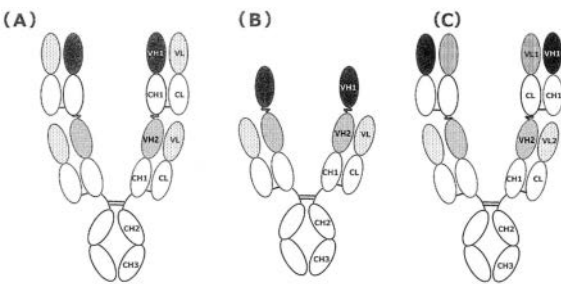
权利要求书2页 说明书69页
序列表98页 附图19页

(54) 发明名称

与TfR结合的双特异性抗体

(57) 摘要

本发明涉及与TfR结合的IgG部分结合有N末端侧多肽的双特异性抗体、该双特异性抗体片段、编码该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的DNA、包含该DNA的载体、生产该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的杂交瘤和转化株、该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的制造方法、包含该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的治疗和诊断药物、使用该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的治疗和诊断方法、以及包含该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的检测或测定试剂。



1. 一种与转铁蛋白受体TfR和细胞表面抗原结合的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其包含:与转铁蛋白受体TfR结合的IgG部分和与细胞表面抗原结合的N末端侧多肽,且该N末端侧多肽直接或经由接头与该IgG部分的重链的N末端结合;其中

所述IgG部分包括:以下(ai)的VH以及含有分别由序列编号17~19所示的氨基酸序列组成的CDR1~3的VL,

(ai) 含有分别由序列编号32~34所示的氨基酸序列组成的CDR1~3的VH,

所述细胞表面抗原为EGFR;并且

所述N末端侧多肽为针对EGFR的抗体的Fab,且该抗体包括:含有分别由序列编号60~62或分别由序列编号65~67所示的氨基酸序列组成的CDR1~3的VH,以及含有分别由序列编号17~19所示的氨基酸序列组成的CDR1~3的VL。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其以二价分别与所述转铁蛋白受体TfR和细胞表面抗原结合。

3. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述IgG部分包括:由序列编号31所示的氨基酸序列组成的VH以及由序列编号16所示的氨基酸序列组成的VL。

4. 根据权利要求3所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其以二价分别与所述转铁蛋白受体TfR和细胞表面抗原结合。

5. 根据权利要求1或3所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述IgG部分的重链恒定区由序列编号84或序列编号86所示的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求1或3所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述针对EGFR的抗体为选自以下的(a)中的一种抗体:

(a) 包括由序列编号59或序列编号64所示的氨基酸序列组成的VH以及由序列编号16所示的氨基酸序列组成的VL的抗体。

7. 根据权利要求1或3所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述Fab的重链C末端与所述IgG部分的重链N末端直接结合。

8. 根据权利要求1或3所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述Fab的重链C末端与IgG部分的重链N末端经由接头结合。

9. 根据权利要求8所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述接头的氨基酸序列由IgG的铰链区的氨基酸序列的一部分或全部构成。

10. 根据权利要求1或3所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述Fab和所述IgG部分含有由相同氨基酸序列构成的轻链。

11. 根据权利要求2所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,

所述IgG部分包括:由序列编号31所示的氨基酸序列组成的VH以及由序列编号16所示的氨基酸序列组成的VL;并且

所述针对EGFR的抗体包括:由序列编号64所示的氨基酸序列组成的VH以及由序列编号16所示的氨基酸序列组成的VL。

12. 根据权利要求11所述的双特异性抗体或其双特异性抗体片段,其中所述N末端侧多肽直接与所述IgG部分的重链的N末端结合。

13. 一种DNA,其编码权利要求1~12中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片

段。

14. 一种重组载体,其含有权利要求13所述的DNA。

15. 一种权利要求1~12中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的制造方法,其特征在于,在培养基中培养将权利要求14所述的重组载体导入宿主细胞而得到的转化株,使培养物中生产并累积权利要求1~12中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,从该培养物采集双特异性抗体或该双特异性抗体片段。

与TfR结合的双特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及包含与转铁蛋白受体 (TfR) 结合的抗原结合部位和与细胞表面抗原结合的抗原结合部位的双特异性抗体、该双特异性抗体片段、编码该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的DNA、包含该DNA的载体、生产该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的杂交瘤和转化株、该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的制造方法、包含该双特异性抗体或双特异性抗体片段的治疗和诊断药物、使用该双特异性抗体或双特异性抗体片段的治疗和诊断方法、以及包含该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的检测或测定用试剂。

背景技术

[0002] 抗体是存在于所有哺乳动物的血清或组织体液中的糖蛋白,在生物体内识别外来抗原。抗体经由补体系统的激活、或与细胞表面存在的受体 (FcR) 结合,而将FcR表达细胞的吞噬能力、抗体依赖性细胞毒性、介体 (Mediator) 的游离能力和抗原提呈能力等效应子功能激活,以参与生物体防御。

[0003] 1分子的抗体由2条相同的轻链 (L链) 和2条相同的重链 (H链) 构成,具备2个抗原结合部位。抗体的类和亚类由H链决定,各类和亚类具有不同的固有功能。人的抗体存在5个不同的类IgG、IgA、IgM、IgD和IgE。IgG进一步被分为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚类,IgA被分为IgA1和IgA2的亚类 (Charles A.J.et al.,Immunobiology,1997,Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.)。

[0004] 多价抗体是在1个分子内具备多个抗原结合部位的抗体。作为多价抗体的例子,报道有使用二次杂交瘤,在一个细胞中表达来自两种不同的抗体的H链和L链,由此制作分别以一价与不同的两种抗原结合的二价抗体 (非专利文献1)。然而,在本方法中,会产生10个左右抗体的H链和L链的组合。因此,具有所需的H链和L链的组合的多价抗体的生成量低,而且也难以选择性分离纯化这样的多价抗体,因此所需的抗体的产量减少。

[0005] 为了克服该问题,报告有尝试将多个抗原结合部位连结作为单一的多肽链来表达,从而减少亚单元间的组合的变体,以生产具有所需的组合的抗体。

[0006] 作为一例,已知有包含以一个多肽连结H链和L链的抗原结合部位而成的单链 (single chain Fv,scFv) 的抗体 (非专利文献2)。进而,报告有使用IgG1的H链恒定区的CH1结构域或该结构域的部分片段及L链恒定区、或者柔性接头 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser),使两个抗原结合部位相连结而成的抗体等 (专利文献1、专利文献2)。

[0007] 这些现有的多价抗体具有容易凝集、稳定性或生产性低的缺点。但是,另一方面,发现在单一的H链多肽中具有多个抗原结合部位,且抗体重链可变区经由具有免疫球蛋白结构域或其片段的氨基酸序列的接头而结合的多价抗体的稳定性高,生产性也良好 (专利文献3)。

[0008] 转铁蛋白受体 (以下也记作TfR) 被鉴定为在网织红细胞表面表达的细胞膜结构。TfR具有将与转铁蛋白 (以下也记作Tf) 结合的铁摄入细胞内的功能。铁是细胞稳态的维持和细胞增殖必不可少的金属,因此用于摄入其的TfR在胎盘的滋养层细胞、网织红细胞、激

活的淋巴细胞或频繁摄入铁的正常组织中大量表达。另外,已知在增殖活跃的各种肿瘤细胞(非专利文献3、非专利文献4)中也大量表达。TfR如果在细胞膜上交联,则会促进网格蛋白依赖性的胞吞作用引起的内在化而被分解(非专利文献5、非专利文献6)。

[0009] 已知骨髓细胞以外的正常细胞中的TfR的表达量低,增殖活跃的癌细胞中表达较高,因此TfR以往被识别为癌治疗的分子靶标。作为以TfR为靶标的分子,例如已知在小鼠荷瘤模型中显示较强药效的TfR中和抗体(专利文献4)。

[0010] 已知与正常细胞相比,在癌细胞中,特定的膜蛋白质的表达增强。开发了具有通过选择性识别这样的膜蛋白的抗体来仅杀死癌细胞的功能的医药品。例如,以表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor,以下记作EGFR)作为靶标的抗体医药品在临床被确认了对于大肠癌或头颈癌的有效性(非专利文献7)。

[0011] EGFR是作为表皮生长因子(Epidermal growth factor,以下记作EGF)的受体被发现的酪氨酸激酶型的受体。EGFR是分子量为170kDa的跨膜型膜糖蛋白,如果与配体结合则形成二聚体,通过使下游的细胞内信号转导通路激活来促进细胞的增殖、分化、浸润、转移等。

[0012] EGFR在上皮系统、间质系统、神经系统的多种细胞中表达,但在脑肿瘤或扁平上皮癌等多种癌细胞中高表达(非专利文献8、非专利文献9),因此作为癌抗原为人所知。

[0013] 已知通过使用能够与两种膜蛋白结合的分子,能够以一个抗原分子作为支架,使另一个抗原分子内在化、分解(专利文献5、专利文献6)。另外,报告有如果使识别癌细胞特异性的膜蛋白的肽与识别TfR的肽化学结合、或利用杂交瘤融合法连结,则在添加铁螯合剂的条件下对于表达两种抗原的细胞显示出增殖抑制活性(专利文献7)。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献1:美国专利申请公开第2007/0071675号说明书

[0017] 专利文献2:国际公开第2001/077342号

[0018] 专利文献3:国际公开第2009/131239号

[0019] 专利文献4:国际公开第2012/153707号

[0020] 专利文献5:国际公开第2013/138400号

[0021] 专利文献6:欧洲专利申请公开第2808035号说明书

[0022] 专利文献7:美国专利第570561号说明书

[0023] 非专利文献

[0024] 非专利文献1:Suresh et al.,Methods Enzymol.121,210-228,1986非专利文献2:Kranz et al.,J.Hematother.5,403-408,1995

[0025] 非专利文献3:Hamilton TA et al.,PNAS USA 76 6406-10,1979

[0026] 非专利文献4:Larson SM et al.,J Natl Cancer Inst.64 41-53,1980非专利文献5:Liu AP et al.,J Cell Biol.191 1381-93,2010

[0027] 非专利文献6:Weissman AM et.al.,J Cell Biol.102 951-8,1986

[0028] 非专利文献7:Erbix美国附录(2018年6月修订)

[0029] 非专利文献8:Libermann TA et al.,Cancer Res.44 753-60,1984

[0030] 非专利文献9:Hendler FJ et al.,J Clin Invest.74 647-51,1984

发明内容

[0031] 发明要解决的问题

[0032] 本发明的目的在于提供与TfR和细胞表面抗原结合的新型双特异性抗体、该双特异性抗体片段、编码该双特异性抗体或双特异性抗体片段的DNA、包含该DNA的载体、生产该双特异性抗体或双特异性抗体片段的杂交瘤和转化株、该双特异性抗体或双特异性抗体片段的制造方法、包含该双特异性抗体或双特异性抗体片段的治疗和诊断药物、使用该双特异性抗体或双特异性抗体片段的治疗和诊断方法、以及包含该双特异性抗体或双特异性抗体片段的检测或测定用试剂。

[0033] 解决问题的方法

[0034] 作为解决上述问题的方法,本发明提供与TfR和细胞表面抗原结合的双特异性抗体或该双特异性抗体片段等,其中,具有针对细胞表面抗原的抗原结合部位的多肽(也称为N末端侧多肽)直接或经由接头结合于与TfR结合的IgG部分的N末端侧。

[0035] 即本发明涉及以下内容。

[0036] 1.一种与TfR和细胞表面抗原结合的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其包含与转铁蛋白受体(TfR)结合的IgG部分、和与细胞表面抗原结合的N末端侧多肽,该多肽直接或经由接头与该IgG部分的重链的N末端结合。

[0037] 2.根据上述1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述IgG部分包括:

[0038] 重链可变区(VH),其含有:

[0039] 互补决定区(complementarity determining region;CDR)1,其包含序列编号32所示的氨基酸序列或在序列编号32所示的氨基酸序列中,通过选自第2位的酪氨酸被取代为丙氨酸或苯丙氨酸以及第3位的苏氨酸被取代为丙氨酸或甘氨酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列、

[0040] CDR2,其包含序列编号33所示的氨基酸序列或在序列编号33所示的氨基酸序列中,通过选自第1位的缬氨酸被取代为丙氨酸、第2位的异亮氨酸被取代为丙氨酸或亮氨酸、第7位的缬氨酸被取代为谷氨酸、第10位的天冬氨酸被取代为丙氨酸以及第13位的天冬氨酸被取代为脯氨酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列、和

[0041] CDR3,其包含序列编号34所示的氨基酸序列或在序列编号34所示的氨基酸序列中,通过选自第3位的谷氨酰胺被取代为丙氨酸或天冬氨酸、第4位的脯氨酸被取代为任意的天然氨基酸、第5位的色氨酸被取代为丙氨酸、苯丙氨酸、组氨酸或酪氨酸、第7位的酪氨酸被取代为丙氨酸或苯丙氨酸以及第13位的缬氨酸被取代为亮氨酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列;以及

[0042] 轻链可变区(VL),其含有分别包含序列编号17~19所示的氨基酸序列的CDR1~3。

[0043] 3.根据上述1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述IgG部分包括:选自以下的(ai)~(ci)中的一种VH、和含有分别包含序列编号17~19所示的氨基酸序列的CDR1~3的VL。

[0044] (ai)含有分别包含序列编号32~34所示的氨基酸序列的CDR1~3的VH、

[0045] (bi)含有分别包含序列编号42~44所示的氨基酸序列的CDR1~3的VH、

[0046] (ci)含有分别包含序列编号47~49所示的氨基酸序列的CDR1~3的VH。

[0047] 4. 根据上述1或2所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段, 其中, 上述IgG部分包括: 包含序列编号26、31、36、41和46中的任意1个所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL。

[0048] 5. 根据上述1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段, 其中, 上述IgG部分包括: 含有分别包含序列编号17~19所示的氨基酸序列的CDR1~3的VL、和选自以下的(a)~(m)中的一种VH。

[0049] (a) 含有分别包含序列编号33和34所示的氨基酸序列的CDR2和3、以及在包含序列编号32所示的氨基酸序列中, 通过第2位的酪氨酸被取代为丙氨酸或苯丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR1的VH、

[0050] (b) 含有分别包含序列编号33和34所示的氨基酸序列的CDR2和3、以及包含在序列编号32所示的氨基酸序列中, 通过第3位的苏氨酸被取代为丙氨酸或甘氨酸而改变的氨基酸序列的CDR1的VH、

[0051] (c) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中, 通过第1位的缬氨酸被取代为丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH、

[0052] (d) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中, 通过第2位的异亮氨酸被取代为丙氨酸或亮氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH、

[0053] (e) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中, 通过第7位的缬氨酸被取代为谷氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH、

[0054] (f) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中, 通过第10位的天冬氨酸被取代为丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH、

[0055] (g) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中, 通过第13位的天冬氨酸被取代为脯氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH、

[0056] (h) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中, 通过第3位的谷氨酰胺被取代为丙氨酸或天冬氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH、

[0057] (i) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中, 通过第4位的脯氨酸被取代为任意的天然氨基酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH、

[0058] (j) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中, 通过第4位的脯氨酸被取代的为丙氨酸、酪氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、苏氨酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸或组氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH、

[0059] (k) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中, 通过第5位的色氨酸被取代为丙氨酸、苯丙氨酸、组氨酸或酪

氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH、

[0060] (1) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中,通过第7位的酪氨酸被取代为丙氨酸或苯丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH、

[0061] (m) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中,通过缬氨酸被取代为亮氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH。

[0062] 6. 根据上述1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述IgG部分包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、以及包含在序列编号31所示的氨基酸序列中,通过选自Kabat等人的EU索引(以下,称为EU索引)所示的Y32A、Y32F、T33A、T33G、L45A、V48A、V50A、I51A、I51L、V55E、D58A、D61P、Q97A、Q97D、W99A、W99F、W99H、W99Y、Y100AA、Y100AF、V102L和P98被取代为任意的氨基酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列的VH。

[0063] 7. 根据上述1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述IgG部分包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、以及包含在序列编号31所示的氨基酸序列中,通过选自EU索引所示的Y32A、Y32F、T33A、T33G、L45A、V48A、V50A、I51A、I51L、V55E、D58A、D61P、Q97A、Q97D、W99A、W99F、W99H、W99Y、Y100AA、Y100AF、V102L、P98A、P98Y、P98S、P98D、P98Q、P98E、P98T、P98R、P98G、P98K、P98M、P98V、P98L、P98I、P98W、P98F和P98H中的任意一种取代而改变的氨基酸序列的VH。

[0064] 8. 根据上述1所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述IgG部分识别序列编号6所示的TfR的氨基酸序列的选自第352位的Asp、第355位的Ser、第356位的Asp和第358位的Lys中的至少1个氨基酸残基、以及选自第365位的Met、第366位的Val和第369位的Glu中的至少1个氨基酸残基。

[0065] 9. 根据上述1~8中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述IgG部分的重链恒定区包含序列编号84或序列编号86所示的氨基酸序列。

[0066] 10. 根据上述1~9中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述细胞表面抗原为EGFR或GPC3。

[0067] 11. 根据上述1~10中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述细胞表面抗原为EGFR。

[0068] 12. 根据上述1~11中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述N末端侧多肽为针对上述细胞表面抗原的抗体的Fab、Fab'、scFv、dsFv和VHH的任意一种。

[0069] 13. 根据上述1~12中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述N末端侧多肽为针对上述细胞表面抗原的抗体的Fab。

[0070] 14. 根据上述1~9中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述N末端侧多肽为针对EGFR的抗体的Fab,该抗体为包括:含有分别包含序列编号60~62或分别包含序列编号65~67所示的氨基酸序列的CDR1~3的VH、和含有分别包含序列编号17~19所示的氨基酸序列的CDR1~3的VL的抗体。

[0071] 15. 根据上述14所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述针对EGFR的抗体为选自以下的(a)~(e)中的一种抗体。

- [0072] (a) 包括包含序列编号59或序列编号64所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL的抗体、
- [0073] (b) 包括包含序列编号110所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号111所示的氨基酸序列的VL的抗体、
- [0074] (c) 包括包含序列编号112所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号113所示的氨基酸序列的VL的抗体、
- [0075] (d) 包括包含序列编号114所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号115所示的氨基酸序列的VL的抗体、
- [0076] (e) 包括包含序列编号116所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号117所示的氨基酸序列的VL的抗体。
- [0077] 16. 根据上述13~15中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述Fab的重链C末端直接结合于上述IgG部分的重链N末端。
- [0078] 17. 根据上述13~15中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述Fab的重链C末端经由接头结合于IgG部分的重链N末端。
- [0079] 18. 根据上述17所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,上述接头的氨基酸序列由IgG的铰链区的氨基酸序列的一部分或全部构成。
- [0080] 19. 根据上述13~18中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中上述Fab和上述IgG部分含有由相同的氨基酸序列构成的轻链。
- [0081] 20. 一种DNA,其编码上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。
- [0082] 21. 一种重组载体,其含有上述20所述的DNA。
- [0083] 22. 一种转化株,其是将上述21所述的重组载体导入至宿主细胞而得到的。
- [0084] 23. 一种上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的制造方法,其~特征在于,在培养基中培养上述22所述的转化株,使培养物中生产并累积上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,从该培养物采集双特异性抗体或该双特异性抗体片段。
- [0085] 24. 一种与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病的治疗和/或诊断药物,其含有上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段作为有效成分。
- [0086] 25. 根据上述24所述的治疗药和/或诊断药物,其中,与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病为癌症。
- [0087] 26. 一种与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病的治疗和/或诊断方法,其使用上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。
- [0088] 27. 根据上述26所述的方法,其中,与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病为癌症。
- [0089] 28. 根据上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其用于治疗人和/或诊断与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病。
- [0090] 29. 根据上述28所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,其中,与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病为癌症。
- [0091] 30. 上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段在用于制造

与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病的治疗和/或诊断剂中的用途。

[0092] 31. 根据上述30所述的用途, 其中, 与人TfR和细胞表面抗原的至少一者有关的疾病为癌症。

[0093] 32. 一种用于检测或测定人TfR和细胞表面抗原的至少一者的试剂, 其包含上述1~19中任一项所述的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。

[0094] 发明的效果

[0095] 根据本发明, 能够提供与TfR和细胞表面抗原结合的新型的双特异性抗体、该双特异性抗体片段、编码该双特异性抗体或双特异性抗体片段的DNA、包含该DNA的载体、生产该双特异性抗体或双特异性抗体片段的杂交瘤和转化株、该双特异性抗体或双特异性抗体片段的制造方法、包含该双特异性抗体或双特异性抗体片段的治疗和诊断药物、使用该双特异性抗体或双特异性抗体片段的治疗和诊断方法、以及包含该双特异性抗体或双特异性抗体片段的检测或测定用试剂。

附图说明

[0096] 图1表示本发明的双特异性抗体的结构的一例。图1 (A) 表示N末端侧多肽为Fab, 且包含Fab的VH的多肽结合于IgG部分的N末端的双特异性抗体。图1 (B) 表示N末端侧多肽为VHH的双特异性抗体。图1 (C) 表示N末端侧多肽为Fab, 且包含Fab的VL的多肽结合于IgG部分的N末端的双特异性抗体。

[0097] 图2表示利用流式细胞法评价各种癌细胞株中的抗原表达量而得到的结果。图2 (A) ~ (C) 分别表示利用流式细胞仪评价OE21细胞、T. Tn细胞和U-937细胞中的EGFR的表达量而得到的结果。图2 (D) ~ (F) 分别表示利用流式细胞仪评价OE21细胞、T. Tn细胞和U-937细胞中的TfR的表达量而得到的结果。纵轴表示细胞数, 横轴表示荧光强度。实线表示抗TfR抗体或抗EGFR抗体的结合性, 用灰色涂满的直方图表示阴性对照的同型抗体的结合性。

[0098] 图3表示利用流式细胞法评价肝癌细胞株中的抗原表达量而得到的结果。图3 (A) ~ (C) 分别表示利用流式细胞仪评价HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的GPC3的表达量而得到的结果。图3 (D) ~ (F) 分别表示利用流式细胞仪评价HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的TfR表达量而得到的结果。图3 (G) ~ (I) 分别表示利用流式细胞仪评价HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的EGFR表达量而得到的结果。纵轴表示细胞数, 横轴表示荧光强度。实线表示抗GPC3抗体、抗TfR抗体或抗EGFR抗体的结合性, 用灰色涂满的直方图表示阴性对照的同型抗体或抗DNP抗体的结合性。

[0099] 图4 (A) ~ (I) 表示利用流式细胞仪评价各抗体对OE21细胞的结合性而得到的结果。纵轴表示细胞数, 横轴表示荧光强度。实线表示抗EGFR抗体或抗TfR抗体的结合性, 用灰色涂满的直方图表示阴性对照的二次抗体的结合性。

[0100] 图5表示评价各TfR抗体对OE21细胞的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值表示的细胞的存活率。黑色的柱状图表示仅添加单克隆抗体时的结果, 白色的柱状图表示添加交联抗体 (crosslink antibody) 将单克隆抗体交联时的结果。

[0101] 图6表示评价各EGFR抗体对OE21细胞的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0102] 图7A表示评价各种双特异性抗体对OE21细胞的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0103] 图7B表示评价各种双特异性抗体对OE21细胞的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0104] 图7C表示评价各种双特异性抗体对OE21细胞的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0105] 图8A表示评价EGFR-TfR双特异性抗体对表达EGFR的癌细胞株OE21的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0106] 图8B表示评价EGFR-TfR双特异性抗体对表达EGFR的癌细胞株T.Tn的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0107] 图8C表示评价EGFR-TfR双特异性抗体对表达EGFR的癌细胞株U-937的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0108] 图9表示评价GPC3-TfR双特异性抗体对HepG2细胞的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0109] 图10A表示评价GPC3-TfR双特异性抗体对表达GPC3的肝癌细胞株HepG2的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0110] 图10B表示评价GPC3-TfR双特异性抗体对表达GPC3的肝癌细胞株HuH-7的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0111] 图10C表示评价GPC3-TfR双特异性抗体对表达GPC3的肝癌细胞株HLE的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。

[0112] 图11(A)~(E)表示评价各抗体或双特异性抗体对OE21细胞上的TfR与Tf的结合的抑制活性而得到的结果。纵轴表示细胞数,横轴表示荧光强度。细实线表示添加阴性对照后添加经荧光标记的转铁蛋白时的结合活性,粗实线表示添加抗体或双特异性抗体后添加经荧光标记的转铁蛋白时的结合活性,用灰色涂满的直方图表示没有添加经荧光标记的转铁蛋白的阴性对照。

[0113] 图12表示利用蛋白质印迹法(Western blotting)评价对OE21细胞添加EGFR-TfR双特异性抗体时对EGFR下游信号和TfR表达量的影响而得到的结果。各个条带表示以图的上部所记载的浓度添加各双特异性抗体或抗体时图的右侧所记载的各蛋白质的表达量。pEGFR表示磷酸化后的EGFR蛋白,AKT表示EGFR的下游信号的蛋白,pAKT表示磷酸化后的AKT蛋白,TFRC表示TfR蛋白质,ACTB表示 β -肌动蛋白。

[0114] 图13(A)~(D)表示利用流式细胞仪评价对OE21细胞添加EGFR-TfR双特异性抗体时的细胞表面上的TfR表达量而得到的结果。纵轴表示细胞数,横轴表示荧光强度。细实线表示添加阴性对照培养24小时后添加经荧光标记的转铁蛋白时的结合活性,粗实线表示添

加抗体或双特异性抗体培养24小时后添加经荧光标记的转铁蛋白时的结合活性,用灰色涂满的直方图表示没有添加经荧光标记的转铁蛋白的阴性对照。

[0115] 图14表示评价对OE21细胞添加EGFR-TfR双特异性抗体时的增殖抑制活性是否是由铁枯竭导致的而得到结果。纵轴表示以活细胞中ATP量相对于添加PBS但不添加FAS的条件的阴性对照的相对值所表示的细胞的存活率。黑色的柱状图表示仅添加抗体或双特异性抗体时的存活率,斜线的柱状图表示与抗体或双特异性抗体一起添加FAS时的存活率。

[0116] 图15表示评价对OE21细胞添加EGFR-TfR双特异性抗体时的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示细胞在孔中所占的比例(%)。黑色的柱状图表示在抗体或双特异性抗体存在下培养7天培养时细胞在孔中所占的比例(%),斜线的柱状图表示在抗体或双特异性抗体存在下培养7天,通过更换培养基而除去抗体再培养7天时细胞在孔中所占的比例(%)。

[0117] 图16表示评价在GEMM中添加EGFR-TfR双特异性抗体时的增殖抑制活性而得到的结果。纵轴表示将添加PBS时的活细胞中ATP量设为100%时的存活率。

[0118] 图17A表示评价EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果。

[0119] 图17B表示评价EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果。

[0120] 图18(A)是表示实施例6中制作的EGFR-TfR双特异性抗体的结构的示意图。图18(B)是表示实施例23中制作的异源二聚体抗体的结构的示意图。

[0121] 图19A表示评价EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果。

[0122] 图19B表示评价EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果。

[0123] 图20表示以对癌细胞株的增殖抑制活性为指标,评价EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果。

[0124] 图21表示评价EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果。

[0125] 发明的具体实施方式

[0126] 本发明涉及与TfR和细胞表面抗原结合的双特异性抗体或该双特异性抗体片段(以下,记作本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段),其中,具有针对细胞表面抗原的抗原结合部位的多肽(也称为N末端侧多肽)直接或经由接头结合于与TfR结合的IgG部分的N末端侧。()

[0127] 本发明中的TfR以与CD71、TFR1、TR、T9、p90、IMD46相同的含义使用。作为TfR,例如可以列举:包含NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中GenBank accession No.(GenBank登录号)NP_003225或序列编号6所示的氨基酸序列的人TfR、以及包含序列编号8所示的氨基酸序列的猴TfR等。另外,例如可以列举由序列编号6、GenBank accession No.NP_003225或序列编号8所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加1个以上的氨基酸的氨基酸序列构成且具有TfR的功能的多肽。

[0128] 包含与序列编号6、GenBank accession No.NP_003225或序列编号8所示的氨基酸序列通常具有70%以上、优选为80%以上、更加优选为90%以上的同源性的氨基酸序列的多肽、由最优选具有95%、96%、97%、98%和99%以上的同源性的氨基酸序列构成且具有TfR的功能的多肽也包括在本发明的TfR中。

[0129] 具有序列编号6、GenBank accession No.NP_003225或序列编号8所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加1个以上的氨基酸残基的氨基酸序列的多肽能够通过使用定点突

变导入法[Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons(1987-1997)、Nucleic Acids Research,10,6487(1982)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,79,6409(1982)、Gene,34,315(1985)、Nucleic Acids Research,13,4431(1985)、Proceeding of the National Academy of Sciences in USA,82,488(1985)]等,例如在编码序列编号6、GenBank accession No.NP_003225或序列编号8所示的氨基酸序列的DNA中导入定点突变而得到。缺失、取代或添加的氨基酸的数量没有特别限定,优选为1个~数十个,例如为1~20个,更优选为1个~数个,例如为1~5个氨基酸。

[0130] 作为编码TfR的基因,例如可以列举:序列编号5或GenBank accessionNo.NM_003234所示的人TfR的碱基序列和序列编号7所示的猴TfR的碱基序列等。另外,例如包含由序列编号5、GenBank accession No.NM_003234或序列编号7所示的碱基序列中缺失、取代或添加1个以上的碱基的碱基序列构成且编码具有TfR的功能的多肽的DNA的基因;包含由与序列编号5、GenBank accession No.NM_003234或序列编号7所示的碱基序列优选具有60%以上的同源性的碱基序列、更优选具有80%以上的同源性的碱基序列、更加优选具有95%以上的同源性的碱基序列构成且编码具有TfR的功能的多肽的DNA的基因;以及包含由与由序列编号5、GenBank accessionNo.NM_003234或序列编号7所示的碱基序列构成的DNA在严格条件下杂交的DNA构成且编码具有TfR的功能的多肽的DNA的基因等也包括在本发明的编码TfR的基因中。

[0131] 作为在严格条件下杂交的DNA,例如是指通过将具有序列编号5或GenBank accession No.NM_003234所示的碱基序列的DNA用于探针的菌落杂交法、噬菌斑杂交法、Southern印迹法、或DNA微阵列法等获得的能够杂交的DNA。具体而言,能够列举可以如下鉴定的DNA:通过使用固定有源自杂交的菌落或噬菌斑的DNA、或具有该序列的PCR产物或寡聚DNA的滤片或载玻片,在0.7~1.0mol/L的氯化钠存在下,在65℃进行杂交[Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons(1987-1997)、DNA Cloning 1:Core Techniques,A Practical Approach,Second Edition,Oxford University(1995)]后,使用0.1~2倍浓度的SSC溶液(1倍浓度的SSC溶液的组成包含150mmol/L氯化钠、15mmol/L柠檬酸钠),在65℃条件下清洗滤片或载玻片,由此能够鉴定DNA。作为能够杂交的DNA,例如能够列举:与序列编号5或GenBank accession No.NM_003234所示的碱基序列优选具有60%以上的同源性的DNA、更优选具有80%以上的同源性的DNA、更加优选具有95%以上的同源性的DNA。

[0132] 在编码真核生物的蛋白质的基因的碱基序列中经常见到基因多态性。本发明中使用的基因内因这样的多态性而在碱基序列中产生了小规模变异的基因也包括在本发明的编码TfR的基因中。

[0133] 除了特别说明的情况以外,本发明中的同源性的数值可以为本领域技术人员使用公知的同源性检索程序算出的数值,关于碱基序列,可以列举BLAST[J.Mol.Biol.,215,403(1990)]中使用默认参数算出的数值等,关于氨基酸序列,可以列举BLAST2[Nucleic Acids Research,25,3389(1997)、Genome Research,7,649(1997)、http://

www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html]中使用默认参数算出的数值等。

[0134] 作为默认参数,G(Cost to open gap,起始空位罚分)在碱基序列的情况下为5,在氨基酸序列的情况下为11,-E(Cost to extend gap,空位扩展罚分)在碱基序列的情况下为2,在氨基酸序列的情况下为1,-q(Penalty for nucleotide mismatch,核苷酸错配罚分)为-3,-r(reward for nucleotide match,核苷酸匹配得分)为1,-e(expect value,期望值)为10,-W(wordsize,字长)在碱基序列的情况下为11残基,在氨基酸序列的情况下为3残基,-y[Dropoff (X) for blast extensions in bits,非空位延伸下降的阈值]在blastn的情况下为20,在blastn以外的程序时为7,-X(X dropoff value for gapped alignment in bits,空位比对的下降值)为15,且-Z(final X dropoff value for gapped alignment in bits,最终空位比对的下降值)在blastn的情况下为50,在blastn以外的程序时为25(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

[0135] 由TfR的氨基酸序列的部分序列构成的多肽能够通过本领域技术人员公知的方法来制作,例如,能够通过使编码序列编号6、GenBank accession No.NP_003225或序列编号8所示的氨基酸序列的DNA的一部分缺失,培养导入了包含其的表达载体的转化体来制作。另外,能够根据利用上述的方法制作的多肽或DNA,通过与上述同样的方法,获得例如具有序列编号6、GenBank accession No.NP_003225或序列编号8所示的氨基酸序列的部分序列中缺失、取代或添加了1个以上的氨基酸的氨基酸序列的多肽。进而,由TfR的氨基酸序列的部分序列构成的多肽、或具有TfR的氨基酸序列的部分序列中缺失、取代或添加了1个以上的氨基酸的氨基酸序列的多肽也能够通过茱基甲氧基羰基(Fmoc)法、叔丁基氧基羰基(tBoc)法等化学合成法制造。

[0136] 作为本发明中的TfR的细胞外区域,例如可以列举:对GenBank accession No.NP_003225所示的人TfR的氨基酸序列使用公知的跨膜区域预测程序SOSUI(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>)、TMHMM ver.2(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)或ExPASy Proteomics Server(<http://Ca.expasy.org/>)等所预测的区域等。具体而言,可以列举序列编号2或GenBank accession No.NP_003225的第89位~第760位所示的氨基酸序列。

[0137] 作为TfR的功能,可以列举细胞的存活、增殖所必须的铁的摄入。铁与转铁蛋白的复合体如果结合于TfR,则通过胞吞作用被摄入细胞内。若内体内的pH降低,则铁从转铁蛋白游离,经由DMT1转移至细胞质内,用于细胞增殖或能量产生。已知铁游离后的转铁蛋白与TfR的复合体通常不被分解,会再次移动到细胞表面(文献:Yamashiro DJ et al.,Cell 37 789-800,1984)。

[0138] 表达TfR的细胞例如可以列举以骨髓、胎盘细胞为代表的多种正常组织的细胞、或以大肠癌、头颈部癌、脑肿瘤、造血器官肿瘤、肝癌、食道癌为代表的多种癌细胞、或HT29、HSC-2、RAMOS、K562、HepG2、OE21、T. Tn、U-937、HuH-7、HLE等多种癌细胞株。

[0139] 本发明的细胞表面抗原是指在癌细胞等的细胞膜上表达的蛋白质或肽链等的抗原中除TfR以外的抗原。作为本发明的细胞表面抗原,只要为能够与抗体等蛋白质或多肽结合则可以为任意抗原,优选通过抗体等蛋白质或多肽的结合而被内化和/或分解的细胞表面抗原。另外,作为本发明的细胞表面抗原,优选在癌细胞或参与特定疾病的细胞群中高表

达的蛋白质。作为这样的细胞表面抗原的优选例,可以列举:EGFR、GPC3等。

[0140] 本发明中的EGFR以与ERBB、ERBB1、HER1、PIG61、MENA、NISBD2、SA7、c-Erb-1相同含义使用。

[0141] 作为EGFR,例如可以列举:包含GenBank accession No.NP005219或序列编号14所示的氨基酸序列的人EGFR;包含GenBank accession No.XP__005549616.1所示的氨基酸序列的猴EGFR。另外,例如可以列举:由序列编号14、NP005219或GenBank accession No.XP__005549616.1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加了1个以上的氨基酸的氨基酸序列构成且具有EGFR的功能的多肽。

[0142] 包含与序列编号14、NP005219或GenBank accession No.XP__005549616.1所示的氨基酸序列具有优选70%以上、更优选为80%以上、更加优选为90%以上的同源性的氨基酸序列的多肽、由最优选具有95%、96%、97%、98%和99%以上的同源性的氨基酸序列构成且具有EGFR的功能的多肽也包括在本发明的EGFR中。

[0143] 具有序列编号14、NP005219或GenBank accession No.XP__005549616.1所示的氨基酸序列中缺失、取代、或添加了1个以上的氨基酸残基的氨基酸序列的多肽能够通过使用上述定点突变导入法等,在编码例如序列编号14、NP005219或GenBank accession No.XP__005549616.1所示的氨基酸序列的DNA中导入定点突变而获得。缺失、取代或添加的氨基酸的数量没有特别限定,优选为1个~数十个,例如为1~20个,更优选为1个~数个,例如为1~5个氨基酸。

[0144] 作为本发明中的编码EGFR的基因,例如可以列举包含Genbank accession No.NM__005228或序列编号13所示的碱基序列的人EGFR的基因。

[0145] 另外,例如包含由序列编号13、Genbank accession No.NM__005228所示的碱基序列中缺失、取代或添加了1个以上的碱基的碱基序列构成且编码具有EGFR的功能的多肽的DNA的基因;包含由与序列编号13或Genbank accession No.NM__005228所示的碱基序列具有60%以上的同源性的碱基序列、优选具有80%以上的同源性的碱基序列、更加优选具有95%以上的同源性的碱基序列构成且编码具有EGFR的功能的多肽的DNA的基因;以及包含由与由序列编号13或Genbank accession No.NM__005228所示的碱基序列的DNA在严格条件下杂交的DNA构成且编码具有EGFR的功能的多肽的DNA的基因等也包括在本发明的编码EGFR的基因中。

[0146] 作为本发明中的EGFR的细胞外区域,例如可以列举对GenBank accession No.NP005219所示的人EGFR的氨基酸序列使用公知的跨膜区域预测程序SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>)、TMHMM ver.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)或ExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>)等所预测出的区域等。具体而言,可以列举序列编号10或GenBank accession No.NP005219的第25位~第645位所示的氨基酸序列。

[0147] 作为EGFR的功能,例如可以列举:作为与EGF的受体的功能;与EGF结合后形成二聚体并经由Ras/Raf/MAPK通路、PI3K/Akt通路、Jak/STAT通路等的信号,促进细胞增殖、存活、浸润、迁移等。已知细胞膜上的EGFR通过与EGF结合而内化,通过胞吞作用而向溶酶体转移并被分解(Ebner R et al., Cell Regul. 2 599-612, 1991)。

[0148] 表达EGFR的细胞例如可以列举以皮肤、大肠、肺为代表的正常组织的上皮细胞、或

以大肠癌、头颈部癌、肺癌、食道癌为代表的上皮癌细胞、或HT29、HSC-2、NCI-H1975、OE21、T.Tn、A431等的癌细胞株。

[0149] 本发明中的GPC3以与DGSX、GTR2-2、MXR7、OCI-5、SDYS、SGB、SGBS、SGBS1相同含义使用。

[0150] 作为GPC3的功能,例如可以列举:与和Wnt通路或Frizzled通路相关的蛋白质结合,参与例如肝癌等的癌细胞的细胞分裂或增殖。

[0151] 作为GPC3,例如可以列举包含Genbank accession No.P51654所示的氨基酸序列的人GPC3。

[0152] 作为本发明中的GPC3的细胞外区域,例如可以列举对GenBank accession No.P51654所示的人GPC3的氨基酸序列使用公知的跨膜区域预测程序SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>)、TMHMM ver.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)或ExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>)等所预测出的区域等。具体而言,可以列举GenBank accession No.P51654的第1位~第559位所示的氨基酸序列。

[0153] 表达GPC3的细胞例如可以列举胎儿期的肝脏的细胞、或肝癌等的癌细胞、HepG2或HuH-7等的癌细胞株等。

[0154] 抗体是指源自编码构成免疫球蛋白的重链的可变区和重链的恒定区、以及编码轻链的可变区和轻链的恒定区的全部或一部分的基因(称为“抗体基因”)的蛋白质。本发明的抗体也包括具有任意免疫球蛋白类和亚类的抗体或抗体片段。

[0155] 重链(H链)是指构成免疫球蛋白分子的2种多肽中分子量较大的多肽。重链决定抗体的类和亚类。IgA、IgD、IgE、IgG和IgM分别具有 α 链、 δ 链、 ϵ 链、 γ 链和 μ 链作为重链,重链的恒定区的特征在于不同的氨基酸序列。轻链(L链)是指构成免疫球蛋白分子的2种多肽中分子量较小的多肽。人的抗体的情况下,轻链存在 κ 链和 λ 链这2种。

[0156] 可变区(V区)通常是指在免疫球蛋白的N末端侧的氨基酸序列内存在的富于多样性的区域。可变区以外的部分采取多样性较少的结构,因此被称为恒定区(C区)。重链和轻链的各可变区缔合而形成抗原结合部位,决定抗体向抗原的结合特性。

[0157] 在人的抗体的重链中,可变区对应于Kabat等的EU索引(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition)中第1位至第117位的氨基酸序列,恒定区对应于第118位以后的氨基酸序列。在人的抗体的轻链中,Kabat等人所制定的编号(Kabat numbering)中的第1位至第107位的氨基酸序列对应于可变区,第108位以后的氨基酸序列对应于恒定区。以下,将重链可变区或轻链可变区简记作VH或VL。

[0158] 抗原结合部位是指抗体中识别抗原并与其结合的部位,且是与抗原决定基(表位)形成互补的立体结构的部位。抗原结合部位在与抗原决定基之间产生较强的分子间相互作用。抗原结合部位由包含至少3个互补决定区(CDR)的VH和VL构成。人的抗体的情况下,VH和VL分别具有3个CDR。这些CDR分别从N末端侧起依次称为CDR1、CDR2和CDR3。

[0159] 恒定区中,重链恒定区或轻链恒定区分别记作CH或CL。CH根据作为重链的亚类的 α 链、 δ 链、 ϵ 链、 γ 链和 μ 链分类。CH由从N末端侧起依次排列的CH1结构域、铰链区、CH2结构域、CH3结构域构成,将CH2结构域和CH3结构域一并称为Fc区。另一方面,CL被分类为被称为C λ 链和C κ 链的2个亚类。

[0160] 单克隆抗体是保持有单一性(monoclonality,单克隆性)的抗体产生细胞所分泌的抗体,识别单一的表位(也称为抗原决定基)。单克隆抗体分子彼此具有同一氨基酸序列(1级结构),呈单一的结构。多克隆抗体是指不同克隆的抗体产生细胞所分泌的抗体分子的群。寡克隆抗体是指混合由多种不同的单克隆抗体的抗体分子的群。

[0161] 表位是抗体识别并结合的抗原的结构部位。作为表位,例如可以列举:单克隆抗体识别并结合的单一的氨基酸序列、由氨基酸序列构成的立体结构、结合有糖链的氨基酸序列和由结合有糖链的氨基酸序列构成的立体结构等。

[0162] 作为本发明中的单克隆抗体,能够列举:由杂交瘤产生的抗体、以及通过由包含抗体基因的表达载体转化得到的转化体所产生的基因重组抗体。

[0163] 杂交瘤例如能够通过制备抗原,从用该抗原免疫的动物获取具有抗原特异性的抗体产生细胞,进而使该抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合来制备。能够通过培养该杂交瘤、或者将该杂交瘤向动物给药使该杂交瘤腹水癌化,将该培养液或腹水分离、纯化,由此取得所需的单克隆抗体。作为用抗原免疫的动物,只要能够制作杂交瘤,则能够使用任何动物,优选使用小鼠、大鼠、仓鼠和兔等。另外,也能够从这样的被免疫动物取得具有抗体产生能力的细胞,对该细胞在体外(in vitro)实施免疫后,与骨髓瘤细胞融合,从而制作杂交瘤。

[0164] 作为本发明中的基因重组抗体,例如可以列举:重组小鼠抗体、重组大鼠抗体、重组仓鼠抗体、重组兔抗体、人型嵌合抗体(也称为嵌合抗体)、人源化抗体(也称为CDR移植抗体)和人抗体等通过基因重组技术制造的抗体。在基因重组抗体中,可以根据作为对象的动物种类或目的,确定适用来自哪种动物的重链和轻链的可变区和恒定区。例如,在作为对象的动物种类为人的情况下,能够使可变区源自人或小鼠等的非人动物,使恒定区和接头源自人。

[0165] 嵌合抗体是指由人以外的动物(非人动物)的抗体的VH和VL与人抗体的CH和CL构成的抗体。作为非人动物,只要能够制作杂交瘤,则可以小鼠、大鼠、仓鼠和兔等任何动物。嵌合抗体能够通过如下方式制造:从生成单克隆抗体的源自非人动物的杂交瘤取得编码VH和VL的cDNA,分别插入至具有编码人抗体的CH和CL的DNA的动物细胞用表达载体,构建嵌合抗体表达载体,并导入至动物细胞使其表达。

[0166] 人源化抗体是指将非人动物抗体的VH和VL的CDR移植到人抗体的VH和VL的对应CDR而成的抗体。VH和VL的CDR以外的区域被称为框架区(以下记作FR)。人源化抗体能够通过如下方式制造:构建编码由非人动物抗体的VH的CDR的氨基酸序列和任意的人抗体的VH的FR的氨基酸序列构成的VH的氨基酸序列的cDNA、和编码由非人动物抗体的VL的CDR的氨基酸序列和任意的人抗体的VL的FR的氨基酸序列构成的VL的氨基酸序列的cDNA,将其分别导入具有编码人抗体的CH和CL的DNA的动物细胞用表达载体中,构建人源化抗体表达载体,将其导入动物细胞使其表达。

[0167] 人抗体原本是指在人体内天然存在的抗体,但也包括从人抗体噬菌体文库和人抗体产生转基因动物中得到的抗体等,该人抗体噬菌体文库和人抗体产生转基因动物是由于近来基因工程、细胞工程、发育工程技术的进步而制得的。

[0168] 在人体内天然存在的抗体例如能够通过如下方式获得:通过使人末梢血淋巴细胞感染EB病毒等而永生化并进行克隆,从而培养产生该抗体的淋巴细胞,由该培养上清纯化该抗体。

[0169] 人抗体噬菌体文库是通过将由人B细胞制备的抗体基因插入噬菌体基因,而使Fab、scFv等抗体片段在噬菌体表面表达的文库。能够以对固定有抗原的底物的结合活性为指标,从该文库中回收表面表达有具有所需的抗原结合活性的抗体片段的噬菌体。该抗体片段能够进一步通过基因工程方法转换成由2条完整的H链和2条完整的L链构成的人抗体分子。

[0170] 人抗体产生转基因动物是指细胞内整合有人抗体基因的动物。具体而言,例如能够通过向小鼠ES细胞导入人抗体基因,将该ES细胞移植到小鼠的早期胚胎后,使个体发育,从而制作产生人抗体的转基因小鼠。源自产生人抗体的转基因动物的人抗体能够通过如下方式制备:通过使用通常的非人动物所进行的杂交瘤制作法取得杂交瘤,进行培养,在培养上清中产生、累积抗体。

[0171] 作为基因重组抗体的CH,只要属于人免疫球蛋白则任意CH均可,优选人免疫球蛋白human immunoglobulin G (hIgG)类的CH。此外,属于hIgG类的hIgG1、hIgG2、hIgG3和hIgG4等亚类的任意一者均能够使用。另外,作为基因重组抗体的CL,只要属于人免疫球蛋白则任意CL均可,可以使用 κ 类或 λ 类的CL。

[0172] 在本发明中,双特异性抗体是指与不同的2种表位分别特异性结合的多肽或蛋白质。双特异性抗体的各个抗原结合部位可以与单一抗原的不同表位结合,也可以与不同的抗原结合。

[0173] 在本发明中,例如能够通过使用公知的免疫学检测法、优选荧光细胞染色法等确认想要评价的表达细胞表面抗原或TfR的细胞与抗体的结合性这一方法来确认多肽、抗体或该抗体片段或者双特异性抗体或该双特异性抗体片段与EGFR或GPC3等细胞表面抗原和TfR的任意1个结合。另外,也可以将公知的免疫学检测法[Monoclonal Antibodies-Principles and Practice, Third Edition, Academic Press (1996)、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、单克隆抗体实验手册、讲谈社Scientific (1987)]等组合使用。

[0174] 在本发明中,与EGFR或GPC3等细胞表面抗原或TfR结合的抗原结合部位只要为分别特异性识别EGFR或GPC3等细胞表面抗原或TfR并与之结合的部位则可以为任意部位。例如,可以为抗体、配体、受体、和天然存在的相互作用分子等能够通过基因重组技术制作的多肽、蛋白质分子及其片段、以及该蛋白质分子的与低分子或天然物的缀合体等任意形态。

[0175] 另外,作为抗原结合部位,可以为利用抗体、配体和受体等已知的结合分子的结合结构域而重组的结合蛋白,具体而言,可以列举:包含与各抗原结合的抗体的CDR的重组蛋白、包含CDR的抗体可变区、包含与抗体可变区和各抗原结合的配体的结合结构域的重组蛋白等。其中,在本发明中,优选抗原结合部位为抗体的可变区。

[0176] 作为本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,例如可以列举具有TfR的内化和/或分解活性的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。作为本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,优选对不表达EGFR或GPC3等细胞表面抗原的细胞不显示TfR的内化和/或分解活性,而仅对表达了EGFR或GPC3等细胞表面抗原的细胞显示TfR的内化和/或分解活性的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。这样的双特异性抗体或该双特异性抗体片段由于对表达EGFR或GPC3等细胞表面抗原的癌细胞等病原细胞选择性地显示TfR的内化和/或分解活性,所以在不产生伴随非特异性的TfR的内化和/或分解的副作用的方面而言

为优选。

[0177] 本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段所具有的TfR的内化和/或分解活性是指通过双特异性抗体或该双特异性抗体片段与细胞上的EGFR或GPC3等细胞表面抗原和TfR的双方结合,而将TfR导入细胞表面抗原的内化和/或分解通路,进而诱导内化和/或分解的活性等。

[0178] 本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段可以与在同一细胞上表达的EGFR或GPC3等细胞表面抗原和TfR结合,也可以与在不同的细胞上表达的EGFR或GPC3等细胞表面抗原和TfR结合,优选与在同一细胞上表达的EGFR或GPC3等细胞表面抗原和TfR结合的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。

[0179] 作为本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,优选通过诱导TfR的内化和/或分解来诱导作为靶标的表达EGFR或GPC3等细胞表面抗原的细胞的细胞死亡的双特异性抗体或该双特异性抗体片段。

[0180] 本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段所具有的TfR的内化和/或分解活性例如能够通过评价OE21、T.Tn、TE-8、U-937、HepG2、HuH-7和HLE等表达TfR的细胞的细胞表面和细胞内的TfR蛋白量、存活细胞数、细胞的增殖率、细胞的存活率或细胞的铁的摄入等来确认。

[0181] 即,作为本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,具体而言,可以列举与EGFR或GPC3等细胞表面抗原和TfR的双方结合时,诱导TfR的分解的双特异性抗体或该双特异性抗体片段等。

[0182] 将一分子的双特异性抗体所具有的对于某个抗原的结合结构域的数量称为结合的价数。例如,在本发明中,在一分子的双特异性抗体各具有两个与EGFR结合的抗原结合部位和与TfR结合的抗原结合部位的情况下,该双特异性抗体分别以二价与EGFR和TfR结合。

[0183] 另外,含有经由包含免疫球蛋白结构域或其片段的接头等适当的接头而结合的多个抗原结合部位的抗体也包括在本发明的双特异性抗体中。

[0184] 本发明的双特异性抗体能够通过现有的制作技术([Nature Protocols,9,2450-2463 (2014)]、国际公开第1998/050431号、国际公开第2001/7734号、国际公开第2002/002773号和国际公开第2009/131239号)等来制作。

[0185] 本发明的双特异性抗体具有对细胞表面抗原具有结合能力的多肽(也称为N末端侧多肽)直接或经由接头结合于与TfR结合的IgG部分的重链N末端的结构。

[0186] 在本发明中,免疫球蛋白结构域是以具有与免疫球蛋白类似的氨基酸序列且由存在至少2个半胱氨酸残基的约100个氨基酸残基构成的肽作为最小单位。在本发明中,免疫球蛋白结构域也包括包含多个上述的最小单位的免疫球蛋白结构域的多肽。作为免疫球蛋白结构域,例如可以列举:免疫球蛋白重链的VH、CH1、CH2和CH3、以及免疫球蛋白轻链的VL和CL等。

[0187] 免疫球蛋白的动物种类没有特别限定,优选为人。另外,免疫球蛋白重链的恒定区的亚类可以为IgD、IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2和IgE的任意一种,优选列举源自IgG和源自IgM。另外,免疫球蛋白轻链的恒定区的亚类可以为 κ 和 λ 的任意一种。

[0188] 另外,免疫球蛋白结构域也存在于免疫球蛋白以外的蛋白质中,例如可以列举:主要组织相容性抗原(MHC)、CD1、B7和T细胞受体(TCR)等属于免疫球蛋白超家族的蛋白质所

包含的免疫球蛋白结构域。作为本发明的双特异性抗体所使用的免疫球蛋白结构域,任意免疫球蛋白结构域都能够适用。

[0189] 在人的IgG的情况下,CH1是指具有EU索引所示的第118位至第215位的氨基酸序列的区域。同样地,CH2是指具有Kabat等的EU索引所示的第231位至第340位的氨基酸序列的区域,CH3是指具有Kabat等的EU索引所示的第341位至第447位的氨基酸序列的区域。在CH1与CH2之间存在被称为铰链(hinge)区(以下有时也记作铰链)的富于柔软性的氨基酸区域。铰链区是指具有Kabat等的EU索引所示的第216位至第230位的氨基酸序列的区域。

[0190] 在人的抗体的 κ 链的情况下,CL是指具有Kabat numbering所示的第108位至第214位的氨基酸序列的区域,在 λ 链的情况下,CL是指具有第108位至第215位的氨基酸序列的区域。

[0191] 本发明的IgG型抗体也称为IgG部分,是指对构成本发明的双特异性抗体的IgG或Fc部分进行了改变的IgG的部分结构,具有2个由1条轻链和1条重链构成的异源二聚体缔合而成的异源四聚体结构。本发明的与TfR结合的IgG部分是指识别TfR的IgG部分,即具有特异性识别并结合TfR的细胞外区域的功能的IgG部分。

[0192] 上述IgG的重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的任何亚类。另外,也可以将这些氨基酸序列的一部分缺失、添加、取代和/或插入。另外,也可以将由IgG的重链的CH1、铰链、CH2和CH3构成的氨基酸序列的全部或将一部分片段适当组合使用。另外,也可以将这些氨基酸序列部分缺损、或改变顺序来使用。另外,IgG部分中所使用的IgG的亚类没有特别限定,优选为IgG4、将IgG4的重链恒定区的第228位的Ser残基取代成Pro、将第235位的Leu残基取代成Asn的IgG4突变体(以下也记作IgG4PE)、或将IgG4的重链恒定区的第228位的Ser残基取代成Pro、将第235位的Leu残基取代成Asn、且将第409位的Arg残基取代成Lys的IgG4突变体(以下记作IgG4PE R409K)。

[0193] 例如,重链的恒定区(从N末端侧起依次为CH1-铰链-CH2-CH3)优选为由包含序列编号86所示的氨基酸序列的IgG4PE构成的IgG部分、或由包含序列编号84所示的氨基酸序列的IgG4PE R409K构成的IgG部分。

[0194] 本发明的IgG部分所含的2个可变区优选识别同一抗原。另外,优选具有相同结构和氨基酸序列。

[0195] 在本发明中,与细胞表面抗原结合的N末端侧多肽是构成本发明的双特异性抗体的部分结构,是指存在于IgG部分的重链或轻链的N末端侧,且特异性识别并结合各细胞表面抗原的细胞外区域的多肽。

[0196] 本发明的双特异性抗体可以在构成IgG部分的2个异源二聚体双方的重链或轻链的N末端各具有一个N末端侧多肽,也可以仅在1个异源二聚体的N末端具有1个N末端侧多肽,优选在两个重链或轻链的N末端各具有1个N末端侧多肽。在两个重链或轻链的N末端各具有1个N末端侧多肽的情况下,它们可以相同也可以不同,优选为相同N末端侧多肽。

[0197] 本发明的N末端侧多肽只要具有对细胞表面抗原的抗原结合能力,则可以为单链,也可以为由多个多肽链构成的多聚物。作为N末端侧多肽,例如可以列举:针对细胞表面抗原的抗体的Fab、Fab'、scFv、dsFv和VHH,优选为Fab或VHH。另外,也可以同样使用针对细胞表面抗原的配体分子或受体分子。

[0198] 针对细胞表面抗原的抗体是指分别特异性识别并结合各细胞表面抗原的细胞外

区域的单克隆抗体。例如抗EGFR抗体和抗GPC3抗体是指分别特异性识别并结合EGFR和GPC3的细胞外区域的单克隆抗体。

[0199] 本发明中,接头只要是可使IgG部分与N末端侧多肽结合的分子结构则可以为任意接头,优选肽链。作为肽链的氨基酸序列,例如可以列举:由ES、ESKYG、ESKYGPP、GGGGS或GGGGS的重复序列构成的肽链、或由抗体的铰链区和CH1结构域等恒定区的一部分或全部的序列构成的肽链等。

[0200] 在本发明的双特异性抗体具有针对细胞表面抗原的抗体的Fab作为N末端侧多肽的情况下,该Fab所含的轻链和IgG部分的轻链可以相同也可以不同,优选相同。另外,轻链可以为λ链和κ链的任一种,优选为κ链。

[0201] 在构成本发明的双特异性抗体或该抗体片段的氨基酸序列中,缺失、添加、取代或插入有1个以上的氨基酸残基,且具有与上述的抗体或其抗体片段同样活性的抗体或其抗体片段也包括在本发明的双特异性抗体或其抗体片段中。

[0202] 缺失、取代、插入和/或添加的氨基酸的数量为1个以上,其数量没有特别限定,为通过Molecular Cloning, The Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等所记载的定点突变导入法等公知的技术而能够缺失、取代、插入或添加的程度的数量。例如通常为1~数十个,优选为1~20个,更优选为1~10个,更加优选为1~5个。

[0203] 在上述的本发明的双特异性抗体的氨基酸序列中,缺失、取代、插入或添加1个以上的氨基酸残基表示如下。意味着在同一序列中的任意且1个或多个氨基酸序列中有1个或多个氨基酸残基的缺失、取代、插入或添加。另外,也有同时产生缺失、取代、插入或添加的情况,也有取代、插入或添加的氨基酸残基为天然型和非天然型的任意一种的情况。

[0204] 作为天然型氨基酸残基,例如可以列举:L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸和L-半胱氨酸等。

[0205] 以下示出能够互换的氨基酸残基的优选例。同一组中包含的氨基酸残基能够互换。

[0206] A组:亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、甲硫氨酸、0-甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸

[0207] B组:天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸

[0208] C组:天冬酰胺、谷氨酰胺

[0209] D组:赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸 E组:脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸

[0210] F组:丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸

[0211] G组:苯丙氨酸、酪氨酸

[0212] 本发明的双特异性抗体或该抗体片段也包括包含经翻译后修饰的任何氨基酸残

基的抗体。作为翻译后修饰,例如可以列举H链的C末端上的赖氨酸残基的缺失[赖氨酸剪切(lysine clipping)]和多肽的N末端上的谷氨酰胺残基向焦谷氨酰胺(pyroGlu)的取代等[Beck et al, Analytical Chemistry, 85, 715-736 (2013)]。

[0213] 作为本发明的双特异性抗体,具体而言,例如可以列举选自下述(1)~(4)中的任意一种双特异性抗体等。

[0214] (1) 包括针对细胞表面抗原的抗体的包含可变区的Fab和与TfR结合的IgG部分的双特异性抗体,其中,该Fab与IgG部分的重链的N末端直接结合;

[0215] (2) 包括针对细胞表面抗原的抗体的包含含有VH的CDR1~3的VH和含有VL的CDR1~3的VL的Fab、以及与TfR结合的IgG部分的双特异性抗体,其中,该Fab与IgG部分的重链的N末端直接结合;

[0216] (3) 包括针对细胞表面抗原的抗体的包含VH和VL的Fab、以及与TfR结合的IgG部分的双特异性抗体,其中,该Fab与IgG部分的重链的N末端直接结合;以及

[0217] (4) 包括与细胞表面抗原结合的VHH和与TfR结合的IgG部分的双特异性抗体,其中,该VHH与IgG部分的重链的N末端直接结合。

[0218] 上述(1)~(3)所记载的双特异性抗体中,与TfR结合的IgG部分的VL和Fab的VL可以相同也可以不同,优选为相同。

[0219] 作为本发明的与TfR结合的IgG部分的一例,可以列举包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及包含以下的1)~3)所示的CDR1~3的VH的、与TfR结合的IgG部分。

[0220] 1) 包含序列编号32所示的氨基酸序列或在序列编号32所示的氨基酸序列中,通过选自将第2位的酪氨酸取代为丙氨酸或苯丙氨酸以及将第3位的苏氨酸取代为丙氨酸或甘氨酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列的CDR1。

[0221] 2) 包含序列编号33所示的氨基酸序列或在序列编号33所示的氨基酸序列中,通过选自将第1位的缬氨酸取代为丙氨酸、将第2位的异亮氨酸取代为丙氨酸或亮氨酸、将第7位的缬氨酸取代为谷氨酸、将第10位的天冬氨酸取代为丙氨酸以及将第13位的天冬氨酸取代为脯氨酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列的CDR2。

[0222] 3) 包含序列编号34所示的氨基酸序列或在序列编号34所示的氨基酸序列中,通过选自将第3位的谷氨酰胺取代为丙氨酸或天冬氨酸、将第4位的脯氨酸取代为任意的天然氨基酸、将第5位的色氨酸取代为丙氨酸、苯丙氨酸、组氨酸或酪氨酸、将第7位的酪氨酸取代为丙氨酸或苯丙氨酸以及将第13位的缬氨酸取代为亮氨酸中的至少一种的取代而改变的氨基酸序列的CDR3。作为将第4位的脯氨酸取代为任意的天然氨基酸,例如可以列举取代为丙氨酸、酪氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、苏氨酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸或组氨酸。

[0223] 本发明的与TfR结合的IgG部分也包括:包含与分别由序列编号32、33和34所示的VH的CDR1~3的氨基酸序列、和与分别由序列编号17~19所示的VL的CDR1~3的氨基酸序列分别至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同源的VH和VL的CDR1~3的氨基酸序列的、与TfR结合的IgG部分。

[0224] 本发明的与TfR结合的IgG部分也包括下述(ai)或(aii)所记载的抗体。

[0225] (ai) 与抗TfR抗体竞争性地与TfR结合的与TfR结合的IgG部分,其中,所述抗TfR抗体包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及含有分别包含序列编号32、33和34所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0226] (a ii) 与抗TfR抗体结合于相同表位的、与TfR结合的IgG部分,其中,抗TfR抗体包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及含有分别包含序列编号32、33和34所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0227] 本发明的与TfR结合的IgG部分也包括下述 (bi) 或 (b ii) 所记载的抗体。

[0228] (bi) 与抗TfR抗体竞争性地与TfR结合的IgG部分,其中,包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及含有分别包含序列编号42、43和44所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0229] (b ii) 与抗TfR抗体结合于相同表位的、与TfR结合的IgG部分,其中,包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及含有分别包含序列编号42、43和44所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0230] 本发明的与TfR结合的IgG部分也包括下述 (ci) 或 (c ii) 所记载的抗体。

[0231] (ci) 与抗TfR抗体竞争性地与TfR结合的IgG部分,其中,包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及含有分别包含序列编号47、48和49所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0232] (c ii) 与抗TfR抗体结合于相同表位的、与TfR结合的IgG部分,其中,包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及含有分别包含序列编号47、48和49所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0233] 作为本发明的与TfR结合的IgG部分的另一例,可以列举含有包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、和包含26、31、36、41、46或106所示的氨基酸序列的VH的、与TfR结合的IgG部分。

[0234] 作为本发明的与TfR结合的IgG部分的一例,可以列举包括:含有分别包含序列编号17~19所示的氨基酸序列的CDR1~3的VL、和选自以下的一种VH的、与TfR结合的IgG部分。

[0235] (a) 含有分别包含序列编号33和34所示的氨基酸序列的CDR2和3、以及包含在序列编号32所示的氨基酸序列中通过将第2位的酪氨酸取代为丙氨酸或苯丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR1的VH

[0236] (b) 含有分别包含序列编号33和34所示的氨基酸序列的CDR2和3、以及包含在序列编号32所示的氨基酸序列中通过将第3位的苏氨酸取代为丙氨酸或甘氨酸而改变的氨基酸序列的CDR1的VH

[0237] (c) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中通过将第1位的缬氨酸取代为丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH

[0238] (d) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中通过将第2位的异亮氨酸取代为丙氨酸或亮氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH

[0239] (e) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列

编号33所示的氨基酸序列中通过将第7位的缬氨酸取代为谷氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH

[0240] (f) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中通过将第10位的天冬氨酸取代为丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH

[0241] (g) 含有分别包含序列编号32和34所示的氨基酸序列的CDR1和3、以及包含在序列编号33所示的氨基酸序列中通过将第13位的天冬氨酸取代为脯氨酸而改变的氨基酸序列的CDR2的VH

[0242] (h) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中通过将第3位的谷氨酰胺取代为丙氨酸或天冬氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH

[0243] (i) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中通过将第4位的脯氨酸取代为任意的天然氨基酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH

[0244] (j) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中通过将第4位的脯氨酸取代为丙氨酸、酪氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、苏氨酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸或组氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH

[0245] (k) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中通过将第5位的色氨酸取代为丙氨酸、苯丙氨酸、组氨酸或酪氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH

[0246] (l) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中通过将第7位的酪氨酸取代为丙氨酸或苯丙氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH

[0247] (m) 含有分别包含序列编号32和33所示的氨基酸序列的CDR1和2、以及包含在序列编号34所示的氨基酸序列中通过将缬氨酸取代为亮氨酸而改变的氨基酸序列的CDR3的VH

[0248] 作为本发明的与TfR结合的IgG部分的一例,可以列举包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、以及包含在序列编号31所示的氨基酸序列中通过选自Kabat等人的EU索引(以下称为EU索引)所示的Y32A、Y32F、T33A、T33G、L45A、V48A、V50A、I51A、I51L、V55E、D58A、D61P、Q97A、Q97D、W99A、W99F、W99H、W99Y、Y100AA、Y100AF、V102L、和P98的取代为任意的氨基酸中的至少一种取代而改变的氨基酸序列的VH的、与TfR结合的IgG部分。

[0249] 作为本发明的与TfR结合的IgG部分的一例,可以列举包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、以及包含在序列编号31所示的氨基酸序列中通过选自EU索引所示的Y32A、Y32F、T33A、T33G、L45A、V48A、V50A、I51A、I51L、V55E、D58A、D61P、Q97A、Q97D、W99A、W99F、W99H、W99Y、Y100AA、Y100AF、V102L、P98A、P98Y、P98S、P98D、P98Q、P98E、P98T、P98R、P98G、P98K、P98M、P98V、P98L、P98I、P98W、P98F、和P98H中的任意一种取代而改变的氨基酸序列的VH的、与TfR结合的IgG部分。

[0250] 作为本发明的与TfR结合的IgG部分的一例,可以列举识别序列编号6所示的TfR的氨基酸序列的选自第352位的Asp、第355位的Ser、第356位的Asp和第358位的Lys中的至少1

个氨基酸残基、以及选自第365位的Met、第366位的Val和第369位的Glu中的至少1个氨基酸残基的、与TfR结合的IgG部分。作为该与TfR结合的IgG部分的一种形式,例如可以列举:识别第352位的Asp、第355位的Ser、第356位的Asp和第358位的Lys中的至少2个氨基酸残基、以及第365位的Met、第366位的Val和第369位的Glu中的至少2个氨基酸残基的、与TfR结合的IgG部分;识别选自第352位的Asp、第355位的Ser、第356位的Asp和第358位的Lys中的至少3个氨基酸残基、以及识别第365位的Met、第366位的Val和第369位的Glu的所有氨基酸残基的、与TfR结合的IgG部分;识别第352位的Asp、第355位的Ser、第356位的Asp和第358位的Lys的所有氨基酸残基、以及识别第365位的Met、第366位的Val和第369位的Glu的所有氨基酸残基的、与TfR结合的IgG部分。

[0251] 作为本发明的抗EGFR抗体的一例,可以列举包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及选自以下的(2a)~(2b)中的任意一个VH的抗EGFR抗体。

[0252] (2a) 含有分别包含序列编号60、61和62所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH、

[0253] (2b) 含有分别包含序列编号65、66和67所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH。

[0254] 本发明的抗EGFR抗体也包括包含与上述(2a)~(2b)的任意一个所示的VH的CDR1~3的氨基酸序列、和与分别由序列编号17~19所示的VL的CDR1~3的氨基酸序列分别至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同源的VH和VL的CDR1~3的氨基酸序列的抗EGFR抗体。

[0255] 本发明的抗EGFR抗体也包括下述(i)或(ii)所记载的抗体。

[0256] (i) 与抗EGFR抗体竞争性地与EGFR结合的抗体,其中,包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及上述(2a)~(2b)中的任一者所示的VH。

[0257] (ii) 与抗EGFR抗体结合于相同表位的抗体,其中,包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及上述(2a)~(2b)中的任一者所示的VH。

[0258] 作为本发明的抗EGFR抗体的另一例,可以列举选自以下的(a)~(e)中的一种双特异性抗体。

[0259] (a) 包括包含序列编号59或序列编号64所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL的抗体

[0260] (b) 包括包含序列编号110所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号111所示的氨基酸序列的VL的抗体

[0261] (c) 包括包含序列编号112所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号113所示的氨基酸序列的VL的抗体

[0262] (d) 包括包含序列编号114所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号115所示的氨基酸序列的VL的抗体

[0263] (e) 包括包含序列编号116所示的氨基酸序列的VH、和包含序列编号117所示的氨基酸序列的VL的抗体

[0264] 作为本发明的一个方式,也可以列举如下的双特异性抗体:其包含N末端侧多肽和

与TfR结合的IgG部分,该N末端侧多肽为Fab,且该Fab的VH-CH1的C末端直接或经由接头结合于与上述TfR结合的IgG部分的重链N末端。

[0265] 另外,作为本发明的一个方式,也可以列举如下的双特异性抗体:其包含N末端侧多肽和与TfR结合的IgG部分,该N末端侧多肽为Fab,且该Fab的VL-CL的C末端直接或经由接头结合于与上述TfR结合的IgG部分的重链N末端。

[0266] 作为本发明的一个方式,可以列举包含与TfR结合的IgG部分和与EGFR结合的N末端侧多肽的双特异性抗体。

[0267] 作为本发明的双特异性抗体,更具体而言,可以列举以下的(i)至(iv)所示的双特异性抗体。

[0268] (i) 如下的双特异性抗体,其包括:抗EGFR抗体的Fab,其包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL以及分别由序列编号60、61和62所示的VH;以及与TfR结合的IgG部分,其包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及以下的(a)~(f)中任何一种VH;

[0269] 且该Fab直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。

[0270] (a) 含有分别包含序列编号22、23和24所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0271] (b) 含有分别包含序列编号27、28和29所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0272] (c) 含有分别包含序列编号32、33和34所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0273] (d) 含有分别包含序列编号37、38和39所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0274] (e) 含有分别包含序列编号42、43和44所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0275] (f) 含有分别包含序列编号47、48和49所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0276] (ii) 如下的双特异性抗体,其包括:抗EGFR抗体的Fab,其包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及分别由序列编号65、66和67所示的VH;以及与TfR结合的IgG部分,其包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及以下的(a)~(f)中任何一种VH;

[0277] 且该Fab直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。

[0278] (a) 含有分别包含序列编号22、23和24所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0279] (b) 含有分别包含序列编号27、28和29所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0280] (c) 含有分别包含序列编号32、33和34所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0281] (d) 含有分别包含序列编号37、38和39所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0282] (e) 含有分别包含序列编号42、43和44所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0283] (f) 含有分别包含序列编号47、48和49所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0284] (iii) 如下的双特异性抗体,其包括:抗EGFR抗体的Fab,其包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及分别由序列编号70、71和72所示的VH;以及与TfR结合的IgG部分,其包括:含有分别包含序列编号17、18和19所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VL、以及以下的(a)~(f)中的任何一种VH;

[0285] 且该Fab直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。

[0286] (a) 含有分别包含序列编号22、23和24所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0287] (b) 含有分别包含序列编号27、28和29所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

[0288] (c) 含有分别包含序列编号32、33和34所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH

- [0289] (d) 含有分别包含序列编号37、38和39所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH
- [0290] (e) 含有分别包含序列编号42、43和44所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH
- [0291] (f) 含有分别包含序列编号47、48和49所示的氨基酸序列的CDR1、2和3的VH
- [0292] (iv) 如下的双特异性抗体,其包括:抗EGFR抗体的Fab,其包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL和序列编号59所示的氨基酸序列的VH;以及与TfR结合的IgG部分,其包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、和包含序列编号21、26、31、36、41或46所示的氨基酸序列的VH;
- [0293] 且该Fab直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。
- [0294] (v) 如下的双特异性抗体,其包括:抗EGFR抗体的Fab,其包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL和包含序列编号64所示的氨基酸序列的VH;以及与TfR结合的IgG部分,其包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、和包含序列编号21、26、31、36、41或46所示的氨基酸序列的VH,
- [0295] 且该Fab直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。
- [0296] (vi) 如下的双特异性抗体,其包括:抗EGFR抗体的Fab,其包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL和包含序列编号69所示的氨基酸序列的VH;以及与TfR结合的IgG部分,其包括:包含序列编号16所示的氨基酸序列的VL、和包含序列编号21、26、31、36、41或46所示的氨基酸序列的VH;
- [0297] 且该Fab直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。
- [0298] 作为上述(i) ~ (vi)所示的双特异性抗体,直接或经由接头结合于与上述TfR结合的IgG部分的重链N末端的可以为上述Fab的VH-CH1,也可以为VL-CL,优选为VH-CH1。
- [0299] 作为本发明的一个方式,可以列举如下的双特异性抗体,其是N末端侧多肽直接或经由接头结合于与TfR结合的IgG部分的重链C末端的双特异性抗体,且该与TfR结合的IgG部分的恒定区为IgG1、IgG4或它们的改变体。作为本发明的更加优选的一个方式,可以列举如下的双特异性抗体,该与TfR结合的IgG部分的重链恒定区包含IgG4PE或IgG4PE R409K,
- [0300] 且N末端侧多肽直接或经由接头结合于与该TfR结合的IgG部分的重链N末端。
- [0301] 作为本发明的一个方式,可以列举如下的双特异性抗体,其包含与TfR结合的IgG部分和与EGFR结合的N末端侧多肽,N末端侧多肽为Fab,且Fab经由接头结合于IgG部分的重链N末端。作为更加优选的一个方式,可以列举上述接头的氨基酸序列为选自ES、ESKYG、ESKYGPP、GGGGS、或GGGGS的重复序列中的一种的双特异性抗体。
- [0302] 作为本发明的双特异性抗体的例子,可以列举E08-TfR1071或E12-TfR1071。
- [0303] 本发明的双特异性抗体或该抗体片段中也包括具有效应子活性的抗体或该抗体片段。
- [0304] 效应子活性是指经由抗体的Fc区而引起的抗体依赖性的细胞毒活性,例如可以列举:抗体依赖性细胞毒活性(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity activity;ADCC活性)、补体依赖性细胞毒活性(Complement-Dependent Cytotoxicity activity;CDC活性)、巨噬菌体或树突状细胞等吞噬细胞所引起的抗体依赖性吞噬活性(Antibody-dependent cellular phagocytosis activity;ADCP活性)和调理素效应等。
- [0305] 在本发明中,ADCC活性和CDC活性能够使用公知的测定方法[Cancer Immunol.Immunother.,36,373(1993)]来测定。

[0306] ADCC活性是指已与靶标细胞上的抗原结合的抗体经由抗体的Fc区与免疫细胞的Fc受体结合,从而使免疫细胞(自然杀伤细胞等)激活,以毒杀靶标细胞的活性。

[0307] Fc受体(FcR)是与抗体的Fc区结合的受体,通过抗体的结合诱发各种效应子活性。各FcR对应于抗体的亚类,IgG、IgE、IgA、IgM分别与Fc γ R、Fc ϵ R、Fc α R、Fc μ R特异性结合。此外,Fc γ R存在Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)的亚型,各亚型存在Fc γ RIIA、Fc γ RIB、Fc γ RIC、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIC、Fc γ RIIIA和Fc γ RIIIB的同种型。这些不同的Fc γ R存在于不同的细胞上[Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)]。在人类中,Fc γ RIIIB在中性粒细胞特异性表达,Fc γ RIIIA在单核细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)、巨噬细胞和一部分T细胞中表达。经由抗体对Fc γ RIIIA的结合诱发NK细胞依赖性的ADCC活性。

[0308] CDC活性是指已与靶标细胞上的抗原结合的抗体使血液中的由补体相关蛋白质群构成的一系列级联反应(补体激活通路)激活,并毒杀靶标细胞的活性。另外,通过由补体的激活而产生的蛋白片段诱导免疫细胞的迁移和激活。CDC活性的级联反应通过C1q首先与Fc区结合,其次与2个丝氨酸蛋白酶C1r和C1s结合而开始形成C1复合体。

[0309] 本发明的双特异性抗体或该抗体片段对抗原表达细胞的CDC活性、或ADCC活性能够通过公知的测定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]评价。

[0310] 作为控制本发明的双特异性抗体的效应子活性的方法,已知控制与抗体的Fc区(由CH2和CH3域构成的恒定区)的第297位的天冬酰胺(Asn)结合的N-结合复合型糖链的还原末端存在的N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)进行 α -1,6结合的岩藻糖(也称为核心岩藻糖)的量的方法(国际公开第2005/035586号、国际公开第2002/31140号和国际公开第00/61739号)、或通过抗体的Fc区的氨基酸残基的改变来控制的方法(国际公开第00/42072号)等。

[0311] 通过控制向双特异性抗体添加的岩藻糖的量,能够使抗体的ADCC活性增加或降低。例如,作为使与结合于抗体的Fc的N-结合复合型糖链结合的岩藻糖的含量降低的方法,能够通过使用 α 1,6-岩藻糖转移酶基因缺损的宿主细胞表达双特异性抗体而取得具有高ADCC的双特异性抗体。另一方面,作为使与结合于双特异性抗体的Fc的N-结合复合型糖链结合的岩藻糖的含量增加的方法,能够通过使用导入有 α 1,6-岩藻糖转移酶基因的宿主细胞表达抗体而取得具有低ADCC活性的双特异性抗体。

[0312] 另外,通过改变双特异性抗体的Fc区的氨基酸残基,能够使ADCC活性或CDC活性增加或降低。例如通过使用美国专利申请公开第2007/0148165号说明书中记载的Fc区的氨基酸序列,能够使双特异性抗体的CDC活性增加。另外,通过进行美国专利第6,737,056号说明书、美国专利第7,297,775号说明书或美国专利第7,317,091号说明书等中记载的氨基酸改变,也能够使ADCC活性或CDC活性增加或降低。

[0313] 进而,也可以通过组合上述方法而获得控制了效应子活性的双特异性抗体。

[0314] 本发明的双特异性抗体的稳定性能够通过测定纯化过程或一定条件下保存的样品中形成的凝集体(寡聚物)量来评价。即,在相同条件下凝集体量降低的情况评价为抗体的稳定性提高。凝集体量能够通过使用包括凝胶过滤色谱在内的适当的色谱将凝集的抗体和没有凝集的抗体分离来测定。

[0315] 本发明的双特异性抗体的生产率能够通过测定由抗体产生细胞产生培养液中产生的抗体量来进行评价。更具体而言,能够通过HPLC法或ELISA法等适当的方法测定从培养液去除产生细胞后的培养上清所含的抗体的量来进行评价。

[0316] 在本发明中,抗体片段是指包含抗原结合部位且具有对该抗原的抗原结合活性的蛋白质。例如可以列举Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Diabody、dsFv、VHH或包含CDR的肽等。

[0317] Fab是对IgG抗体利用蛋白分解酶木瓜蛋白酶进行处理所得到的片段中(在H链的第224位的氨基酸残基被切断)H链的N末端侧约一半与L链整体由二硫键(S-S键)结合的、分子量约5万的具有抗原结合活性的抗体片段。将包含VH和CH1的Fab的H链记作VH-CH1。另外,将包含VL和CL的Fab的L链记作VL-CL。

[0318] F(ab')₂是对IgG利用蛋白质分解酶胃蛋白酶进行处理所得到的片段中(在H链的第234位的氨基酸残基被切断)略大于Fab经由铰链区的S-S键而结合的片段的、分子量约10万的具有抗原结合活性的抗体片段。

[0319] Fab'是将上述F(ab')₂的铰链区的S-S键切断所得到的分子量约5万的具有抗原结合活性的抗体片段。

[0320] scFv是将1条VH和1条VL使用12个残基以上的适当的肽接头(P)连结而成的VH-P-VL或VL-P-VH多肽,且是具有抗原结合活性的抗体片段。

[0321] 双功能抗体(Diabody)是抗原结合特异性相同或不同的scFv形成二聚物所得的抗体片段,且是对相同抗原具有2价抗原结合活性、或对不同的抗原分别具有特异性的抗原结合活性的抗体片段。

[0322] dsFv是指使将VH和VL中的各1个氨基酸残基取代为半胱氨酸残基所得到的多肽经由该半胱氨酸残基间的S-S键结合而成的片段。

[0323] VHH(也称为纳米抗体)是指VHH抗体中的重链可变区,能够在不存在其它多肽的情况下与抗原结合。

[0324] VHH抗体是存在于羊驼等骆驼科的动物和鲨鱼等软骨鱼中的抗体,没有轻链和CH1,仅由重链构成。

[0325] 包含CDR的肽是包含VH或VL的CDR的至少1个区域而构成的。包含多个CDR的肽能够通过使CDR彼此直接或经由适当的肽接头结合而制作。包含CDR的肽能够通过构建编码本发明的双特异性抗体的VH和VL的CDR的DNA,将该DNA插入至原核生物用表达载体或真核生物用表达载体中,将该表达载体导入至原核生物或真核生物而使其表达来制造。另外,包含CDR的肽也能够通过Fmoc法或tBoc法等化学合成法来制造。

[0326] 在本发明中,双特异性抗体片段是指本质上由双特异性抗体的部分结构构成,具有对2种抗原的抗原结合活性的双特异性抗体片段。

[0327] 本发明的双特异性抗体的Fc与抗体片段结合而成的融合蛋白、该Fc与天然存在的配体或受体结合而成的Fc融合蛋白(也称为免疫粘附素)、和使多个Fc区融合而成的Fc融合蛋白等也包括在本发明中。另外,包含以抗体的效应子活性的增强或缺损、抗体的稳定化、和血中半衰期的控制为目的的氨基酸残基改变的Fc区也能够用于本发明的双特异性抗体。

[0328] 作为本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段,包含对本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段化学地或基因工程地结合放射性同位素、低分子的药剂、高分子的药剂、蛋白质或抗体医药等而成的抗体的衍生物。

[0329] 本发明中的抗体的衍生物能够通过对本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的H链或L链的N末端侧或C末端侧、该抗体或其抗体片段中的适当的取代基或侧链、进而该抗体或其抗体片段中的糖链等通过化学的方法[抗体工学入门、地人书馆(1994)]结合

放射性同位素、低分子的药剂、高分子的药剂、免疫赋活剂、蛋白质或抗体医药等来制造。

[0330] 另外,本发明中的抗体的衍生物能够通过使编码本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的DNA与编码所需的蛋白质或抗体医药的DNA连结并插入至表达载体,将该表达载体导入至适当的宿主细胞并使其表达的基因工程的方法来制造。

[0331] 作为放射性同位素,例如可以列举 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 或 ^{211}At 等。放射性同位素能够通过氯胺T法等与抗体直接结合。另外,也可以使抗体与螯合放射性同位素的物质结合。作为螯合剂,例如可以列举1-异硫氰酸酯苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)等。

[0332] 作为低分子的药剂,例如可以列举:烷基化剂、硝基脲剂、代谢拮抗剂、抗生素、植物碱、拓扑异构酶抑制剂、激素疗法剂、激素拮抗剂、芳香酶抑制剂、P糖蛋白抑制剂、铂配位化合物衍生物、M期抑制剂或激酶抑制剂等抗癌剂[临床肿瘤学、癌与化学疗法社(1996)]、氢化可的松或强的松等类固醇剂、阿司匹林或吲哚美辛等非类固醇剂、金硫醇盐或青霉胺等免疫调节剂、环磷酰胺或硫唑嘌呤等免疫抑制剂或马来酸氯苯那敏或克马西汀这样的抗组胺剂等抗炎剂[炎症与抗炎疗法、医齿药出版株式会社(1982)]等。

[0333] 作为抗癌剂,例如可以列举:阿米福汀(氮磷汀)、顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、放线菌素、双氯乙基甲胺(氮芥)、链脲佐菌素、环磷酰胺、异环磷酰胺、卡莫斯汀(BCNU)、洛莫斯汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、表柔比星、吉西他滨(健择)、柔红霉素、甲基苄肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊、5-氟尿嘧啶、氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、道诺霉素、丙霉素、雌莫司汀、紫杉醇(泰素)、多西紫杉醇(Taxotex)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、克拉屈滨、喜树碱、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、依达比星、美司钠、伊立替康(CPT-11)、拓扑替康、米托蒽醌、托泊替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、羟基脲(Hydroxycarbamide)、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、链脲佐菌素、他莫昔芬、戈舍瑞林、柳菩林、氟他胺、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、噻替哌、尿嘧啶氮介、长春瑞滨、苯丁酸氮芥、氢化可的松、泼尼松龙、甲基泼尼松龙、长春地辛、尼莫斯汀、司莫司、卡培他滨、雷替曲塞、阿扎胞苷、UFT、奥沙利铂、吉非替尼(易瑞沙)、伊马替尼(STI571)、厄洛替尼、FMS样酪氨酸激酶(FMS-like tyrosine kinase 3, Flt3)抑制剂、血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)抑制剂、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)抑制剂、特罗凯等的表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、根赤壳菌素、17-烯丙基氨基-17-去甲基格尔德霉素、雷帕霉素、安吡啶、全反式维甲酸、沙利度胺、来那度胺、阿那曲唑、法倔唑、来曲唑、依西美坦、金硫醇盐、D-青霉胺、布西拉明、硫唑嘌呤、咪唑立宾、环孢菌素、雷帕霉素、氢化可的松(Hydrocortisone)、贝沙罗汀(他格雷汀)、他莫昔芬、地塞米松、黄体素类、雌激素类、阿那曲唑(瑞宁)、巯基嘌呤、阿司匹林、吲哚美辛、塞来昔布、硫唑嘌呤、青霉胺、金硫醇盐、马来酸氯苯那敏、氯苯那敏、克马西汀、维生素A酸、贝沙罗汀、砷、硼替佐米、别嘌醇、卡奇霉素、伊布利妥单抗、塔格列汀、奥唑米星、克拉霉素、亚叶酸、酮康唑、氨基谷氨酰胺、苏拉明、甲氨蝶呤或美登木素生物碱或其衍生物等。

[0334] 作为使低分子的药剂与本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段结合的方法,例如可以列举经由戊二醛使药剂与该抗体的氨基间结合的方法、或经由水溶性碳二酰亚胺使药剂的氨基与该抗体的羧基结合的方法等。

[0335] 作为高分子的药剂,可以列举:聚乙二醇(PEG)、白蛋白、葡聚糖、聚氧乙烯、苯乙烯马来酸共聚物、聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、或羟基丙基甲基丙烯酰胺等。通过使这些高分子化合物与本发明的双特异性抗体或抗体片段结合,可以期待如下效果等:(1)提高化学性、物理性或生物性的各种因子的稳定性;(2)显著延长血中半衰期;或(3)抑制免疫原性的消失或抗体产生[生物缀合医药品、广川书店(1993)]。

[0336] 例如,作为使PEG与本发明的双特异性抗体结合的方法,可以列举使其与PEG化修饰试剂反应的方法等[生物缀合医药品、广川书店店(1993)]。作为PEG化修饰试剂,可以列举:赖氨酸向 ϵ -氨基的修饰剂(日本特开昭61-178926号公报)、天冬氨酸和谷氨酸向羧基的修饰剂(日本特开昭56-23587号公报)、或精氨酸向胍基的修饰剂(日本特开平2-117920号公报)等。

[0337] 作为免疫赋活剂,可以为作为免疫佐剂所已知的天然物,作为具体例,可以列举使免疫增强的药剂,如 β (1 $\rightarrow$ 3)葡聚糖(例如,香菇多糖或裂褶菌素)、或 α 半乳糖神经酰胺(KRN7000)等。

[0338] 作为蛋白质,例如可以列举使NK细胞、巨噬细胞或中性粒细胞等负责免疫的细胞激活的细胞因子或增殖因子或毒素蛋白等。

[0339] 作为细胞因子或增殖因子,例如可以列举:干扰素(以下记作IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 、白介素(以下记作IL)-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)或巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等。

[0340] 作为毒素蛋白,例如可以列举:蓖麻毒素、白喉毒素或ONTAK等,也包括为了调节毒性而在蛋白质中导入了变异的蛋白毒素。

[0341] 与蛋白质或抗体医药融合的融合抗体能够通过使编码蛋白质的cDNA与编码本发明的双特异性抗体或抗体片段的cDNA连结,构建编码融合抗体的DNA,将该DNA插入原核生物或真核生物用表达载体,并将该表达载体导入原核生物或真核生物并使其表达来制造。

[0342] 在将上述抗体的衍生物作为检测方法、定量方法、检测用试剂、定量用试剂或诊断药物使用的情况下,作为与本发明的双特异性抗体或其抗体片段结合的药剂,可以列举通常的免疫学检测或测定法中使用的标记物。作为标记物,例如可以列举:碱性磷酸酶、过氧化物酶或荧光素酶等酶、吖啶酯或咯吩等发光物质、或荧光素异硫氰酸酯(FITC)或四甲基罗丹明异硫氰酸酯(RITC)、Alexa(注册商标)Fluor 488、R-藻红蛋白(R-phycoerythrin,R-PE)等荧光物质等。

[0343] 本发明包含具有CDC活性或ADCC活性等细胞毒活性的双特异性抗体和该双特异性抗体片段。本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段对抗原表达细胞的CDC活性或ADCC活性能够通过公知的测定方法[Cancer Immunol.Immunother.,36,373(1993)]来评价。

[0344] 另外,本发明涉及包含特异性识别并结合TfR和EGFR等细胞表面抗原的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的组合物、或含有该双特异性抗体或该双特异性抗体片段作为有效成分的、与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者有关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病的治疗药。

[0345] 作为与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者相关的疾病,只要为与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者相关的疾病,则可以为任何疾病,例如可以列举恶性肿瘤和癌症

等。

[0346] 在本发明中,作为恶性肿瘤和癌症,例如可以列举:大肠癌、结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、恶性黑色素瘤(Melanoma)、甲状腺癌、肾细胞癌、白血病、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、胃癌、胰腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胆管癌、食道癌、肝癌、头颈部癌、皮肤癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、绒毛膜癌、咽癌、喉癌、间皮瘤、胸膜瘤、男性胚胎瘤、子宫内膜增生、子宫内膜异位症、胚组织瘤、纤维肉瘤、卡波济肉瘤、血管瘤、海绵状血管瘤、血管母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、星状细胞瘤、神经纤维瘤、寡突胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、横纹肌肉瘤、胶质母细胞瘤、骨原性肉瘤、平滑肌肉瘤和威尔姆斯瘤等。

[0347] 含有本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段、或它们的衍生物的治疗药可以认为仅包含作为有效成分的该双特异性抗体或该双特异性抗体片段、或它们的衍生物的药物,通常优选作为与药理学上可接受的一种以上的载体一起混合,通过制剂学的技术领域中公知的任意的的方法制造的医药制剂来提供。

[0348] 给药途径优选使用治疗时最有效的途径,例如可以列举:口服给药、或口腔内、气管内、直肠内、皮下、肌肉内或静脉内等的非口服给药。其中,优选静脉内给药。

[0349] 作为给药形式,例如可以列举:喷雾剂、胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏或贴剂等。

[0350] 给药量或给药次数根据目标治疗效果、给药方法、治疗时长、年龄和体重等而不同,通常成人每天为 $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0351] 此外,本发明涉及含有本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的、TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的免疫学检测用或测定用试剂、或与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者有关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病的诊断药物。另外,本发明涉及使用本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的、TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的免疫学检测用或测定用方法、与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者有关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病的治疗方法、或与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者有关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病的诊断方法。

[0352] 作为本发明中检测或测定TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的量的方法,可以列举任意公知的方法。例如可以列举免疫学检测或测定方法等。

[0353] 免疫学检测或测定方法是指使用施加了标记的抗原或抗体来检测或测定抗体量或抗原量的方法。作为免疫学检测或测定方法,例如可以列举放射免疫测定法(RIA)、酶免疫测定法(EIA或ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法(luminescent immunoassay)、蛋白质印迹法或理化方法等。

[0354] 通过使用本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段来检测或测定表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞,能够诊断与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者有关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病。

[0355] 在表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞的检测中,能够使用公知的免疫学检测法,例如可以列举:免疫沉降法、免疫细胞染色法、免疫组织染色法或荧光抗体染色法等。另外,例如也可以列举FMAT8100HTS系统(Applied Biosystems公司制)等的荧光

抗体染色法等。

[0356] 作为本发明中作为检测或测定TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的对象的生物体试样,例如为组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿、粪便、组织液或培养液等,只要具有包含表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞的可能性,则没有特别限定。

[0357] 含有本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段、或者它们的衍生物的诊断药物可以根据目标诊断方法而包含用于进行抗原抗体反应的试剂、该反应的检测用试剂。作为用于进行抗原抗体反应的试剂,例如可以列举缓冲剂、盐等。

[0358] 作为检测用试剂,例如可以列举与上述双特异性抗体或该双特异性抗体片段、或者它们的衍生物结合的标记后的二次抗体、或与标记对应的底物等通常的免疫学检测或测定法所使用的试剂。

[0359] 以下,对本发明的双特异性抗体的制作方法、该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的活性评价方法、以及使用该双特异性抗体或该双特异性抗体片段的疾病的治疗方法和诊断方法具体地进行记载。

[0360] 1. 单克隆抗体的制作方法

[0361] 本发明中的单克隆抗体的制造方法包括下述的作业步骤。即,(1)进行作为免疫原使用的抗原的纯化和在细胞表面过度表达抗原的细胞的制作的至少一者;(2)用抗原使动物免疫后,采集血液,检验其抗体效价,确定摘出脾脏等的时间,制备抗体产生细胞;(3)制备骨髓瘤细胞(myeloma);(4)使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合;(5)筛选产生目标抗体的杂交瘤群;(6)从杂交瘤群分离(克隆)单克隆(monoclonal)细胞;(7)根据情况,培养用于大量制造单克隆抗体的杂交瘤、或饲养移植了杂交瘤的动物;(8)对这样制造得到的单克隆抗体的生理活性及其抗原结合特异性进行研究,或鉴定作为标记试剂的特性等。

[0362] 以下,按照上述的步骤对本发明中的用于制作与TfR和EGFR等细胞表面抗原结合的双特异性抗体的、与TfR结合的单克隆抗体和EGFR等细胞表面抗原结合的单克隆抗体的制作方法进行详细叙述。该抗体的制作方法不限于此,例如也可以使用脾脏细胞以外的抗体产生细胞和骨髓瘤细胞。

[0363] (1) 抗原的纯化

[0364] 表达EGFR等细胞表面抗原或TfR的细胞能够通过将包含编码EGFR等细胞表面抗原或TfR的全长或其部分长度的cDNA的表达载体导入大肠杆菌、酵母、昆虫细胞或动物细胞等而得到。另外,可以从大量表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的各种人肿瘤培养细胞或人组织等之中纯化TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者并将其用作抗原。另外,也可以将该肿瘤培养细胞或该组织等直接作为抗原使用。此外,也可以通过Fmoc法或tBoc法等化学合成法制备具有EGFR等细胞表面抗原或TfR的部分序列的合成肽并将其用于抗原。

[0365] 本发明中使用的EGFR等细胞表面抗原或TfR能够通过使用Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 或 Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) 等中记载的方法等,例如通过以下的方法,使编码该EGFR等细胞表面抗原或TfR的DNA在宿主细胞中表达而制造。

[0366] 通过将包含编码EGFR等细胞表面抗原或TfR的部分的全长cDNA插入至适当的表达载体的启动子的下游来制作重组载体。也可以代替上述全长cDNA,而使用基于全长cDNA所

制备的包含编码多肽的部分的适当长度的DNA片段。然后,将所得到的该重组载体导入至适合该表达载体的宿主细胞,由此能够获得生产EGFR等细胞表面抗原或TfR的转化体。

[0367] 作为表达载体,只要能够在使用的宿主细胞中自主复制或整合到染色体中且在能够转录编码EGFR等细胞表面抗原或TfR的DNA的位置含有适当的启动子,则能够使用任何载体。

[0368] 作为宿主细胞,例如大肠杆菌等属于埃希氏菌属等的微生物、酵母、昆虫细胞或动物细胞等,只要能够表达目标基因,则能够使用任意宿主细胞。

[0369] 在使用大肠杆菌等原核生物作为宿主细胞的情况下,重组载体优选为能够在原核生物中进行自主复制,并且含有启动子、核糖体结合序列、包含编码EGFR等细胞表面抗原或TfR的部分的DNA、以及转录终止序列的载体。另外,该重组载体并不一定需要转录终止序列,但优选在结构基因的正下方配置转录终止序列。此外,该重组载体也可以包含控制启动子的基因。

[0370] 作为该重组载体,优选使用将作为核糖体结合序列的SD序列(Shine-Dargarno序列)与起始密码子之间调节为适当的距离(例如,6~18个碱基)的质粒。

[0371] 另外,作为编码该EGFR等细胞表面抗原或TfR的DNA的碱基序列,能够以成为最适于宿主内的表达的密码子的方式取代碱基,由此,能够提高目标EGFR等细胞表面抗原或TfR的生产率。

[0372] 作为表达载体,只要能够在使用的宿主细胞中发挥功能,则能够使用任何表达载体,例如可以列举:pBTrp2、pBTac1、pBTac2(以上由Roche Diagnostics公司制)、pKK233-2(Pharmacia公司制)、pSE280(Invitrogen公司制)、pGEMEX-1(Promega公司制)、pQE-8(Qiagen公司制)、pKYP10(日本特开昭58-110600号公报)、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry,48,669(1984)]、pLSA1[Agric.Biol.Chem.,53,277(1989)]、pGEL1[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82,4306(1985)]、pBluescript II SK(-)(Stratagene公司制)、pTrs30[由大肠杆菌JM109/pTrS30(FERM BP-5407)制备]、pTrs32[由大肠杆菌JM109/pTrS32(FERM BP-5408)制备]、pGHA2[由大肠杆菌IGHA2(FERM BP-400)制备、日本特开昭60-221091号公报]、pGKA2[由大肠杆菌IGKA2(FERM BP-6798)制备、日本特开昭60-221091号公报]、pTerm2(美国专利第4,686,191号说明书、美国专利第4,939,094号说明书、美国专利第5,160,735号说明书)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400[J.Bacteriol.,172,2392(1990)]、pGEX(Pharmacia公司制)、pET体系(Novagen公司制)或pME18SFL3(东洋纺株式会社制)等。

[0373] 作为启动子,只要是能够在使用的宿主细胞中发挥功能,则可以为任何启动子。例如可以列举:trp启动子(Ptrp)、lac启动子、PL启动子、PR启动子或T7启动子等源自大肠杆菌或噬菌体等的启动子。另外,例如也可以列举:2个Ptrp串联的串联启动子、tac启动子、lacT7启动子、或let I启动子等人为设计改变的启动子等。

[0374] 作为宿主细胞,例如可以列举:大肠杆菌XL1-Blue、大肠杆菌XL2-Blue、大肠杆菌DH1、大肠杆菌MC1000、大肠杆菌KY3276、大肠杆菌W1485、大肠杆菌JM109、大肠杆菌HB101、大肠杆菌No.49、大肠杆菌W3110、大肠杆菌NY49、或大肠杆菌DH5 α 等。

[0375] 作为向宿主细胞导入重组载体的导入方法,只要是能够在使用的宿主细胞中导入DNA的方法,则都可以使用,例如可以列举使用钙离子的方法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,

69,2110(1972)、Gene,17,107(1982)、Molecular&General Genetics,168,111(1979)]。

[0376] 在使用动物细胞作为宿主的情况下,作为表达载体,只要在动物细胞中发挥功能,则可以使用任意表达载体,例如可以列举:pcDNA1(Invitrogen公司制)、pcDM8(Funakoshi公司制)、pAGE107[日本特开平3-22979号公报;Cytotechnology,3,133(1990)]、pAS3-3(日本特开平2-227075号公报)、pcDM8[Nature,329,840(1987)]、pcDNA1/Amp(Invitrogen公司制)、pcDNA3.1(Invitrogen公司制)、pREP4(Invitrogen公司制)、pAGE103[J.Biochemistry,101,1307(1987)]、pAGE210、pME18SFL3或pKANTEX93(国际公开第97/10354号)等。

[0377] 作为启动子,只要能够在动物细胞中发挥功能,则可以使用任意启动子,例如可以列举:巨细胞病毒(CMV)的立即早期(immediate early,IE)基因的启动子、SV40的初期启动子、逆转录病毒的启动子、金属硫蛋白启动子、热休克启动子、SR α 启动子或莫洛尼(moloney)小鼠白血病病毒的启动子或增强子。另外,也可以将人CMV的IE基因的增强子与启动子一起使用。

[0378] 作为宿主细胞,例如可以列举:人伯基特淋巴瘤细胞Namalwa、源自非洲绿猴肾脏的细胞COS、源自中国仓鼠卵巢的细胞CHO、或人白血病细胞HBT5637(日本特开昭63-000299号公报)等。

[0379] 作为向宿主细胞导入重组载体的导入方法,只要为在动物细胞中导入DNA的方法,则都可以使用,例如可以列举:电穿孔法[Cytotechnology,3,133(1990)]、磷酸钙法(日本特开平2-227075号公报)、或脂质转染法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)]等。

[0380] 将如上得到的源自保有整合了编码EGFR等细胞表面抗原或TfR的DNA的重组载体的微生物、或动物细胞等的转化体在培养基中培养,在培养物中生成并累积该TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者,从该培养物中获取,由此能够制造EGFR等细胞表面抗原或TfR。在培养基中培养该转化体的方法能够根据宿主的培养中使用的通常的方法进行。

[0381] 在源自真核生物的细胞中表达的情况下,能够得到添加有糖或糖链的EGFR等细胞表面抗原或TfR。

[0382] 在培养由使用诱导性启动子的重组载体转化后的微生物时,可以根据需要在培养基中添加诱导剂。例如在培养由使用lac启动子的重组载体转化后的微生物的情况下,可以在培养基中添加异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷等,在培养由使用trp启动子的重组载体转化后的微生物的情况下,可以在培养基中添加吡啶丙烯酸等。

[0383] 作为培养以动物细胞作为宿主而得到的转化体的培养基,例如可以列举:一般所使用的RPMI1640培养基[The Journal of the American Medical Association,199,519(1967)]、Eagle的MEM培养基[Science,122,501(1952)]、Dulbecco改良MEM培养基[Virology,8,396(1959)]、199培养基[Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,73,1(1950)]、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)培养基、或在这些培养基中添加了胎牛血清(FBS)等的培养基等。培养通常在pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等条件下进行1~7天。另外,培养期间,可以根据需要在培养基中添加卡那霉素、青霉素等抗生素。

[0384] 作为编码EGFR等细胞表面抗原或TfR的基因的表达方法,除了直接表达以外,还能够使用分泌生产或融合蛋白表达等方法[Molecular Cloning,A Laboratory Manual, Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]。作为EGFR等细胞表面

抗原或TfR的生产方法,可以列举例如:在宿主细胞内生产的方法、分泌到宿主细胞外的方法、或在宿主细胞外膜上生产的方法,能够通过改变使用的宿主细胞、或生产的EGFR等细胞表面抗原或TfR的结构来选择适当的方法。

[0385] 例如,能够通过制作在编码细胞外区域的氨基酸序列的DNA上连结编码抗体的Fc区的DNA、编码谷胱甘肽S-转移酶(GST)的DNA、或编码FLAG标签的DNA或编码组氨酸标签的DNA等而成的DNA,并使其表达并纯化,从而制作抗原融合蛋白。具体而言,例如可以列举:使EGFR等细胞表面抗原或TfR的细胞外区域结合于人IgG的Fc区而成的Fc融合蛋白、EGFR等细胞表面抗原或TfR的细胞外区域与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白。

[0386] 在EGFR等细胞表面抗原或TfR在宿主细胞内或宿主细胞外膜上生产的情况下,能够通过使用Paulson等人的方法[J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、Law等人的方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本特开平05-336963号公报、或国际公开第94/23021号等中记载的方法,使EGFR等细胞表面抗原或TfR积极地分泌至宿主细胞外。另外,也能够利用使用二氢叶酸还原酶基因等的基因扩增体系(日本特开平2-227075号公报)使EGFR等细胞表面抗原或TfR的生产量升高。

[0387] 所生产的EGFR等细胞表面抗原或TfR例如能够如下分离、纯化。

[0388] 在EGFR等细胞表面抗原或TfR在细胞内以溶解状态表达的情况下,在培养结束后将细胞通过离心分离回收,悬浮于水系缓冲液后,使用超声波破碎机、法式压滤壶、Menton-Gaulin匀浆机、或Dyno-Mill等破碎细胞,获得无细胞提取液。通过将通常的蛋白质的分离纯化法、即溶剂提取法、利用硫酸铵等的盐析法、脱盐法、利用有机溶剂的沉淀法、使用二乙基氨基乙基(DEAE)-琼脂糖、DIAION HPA-75(三菱化学株式会社制)等树脂的阴离子交换色谱法、使用S-Sepharose FF(Pharmacia公司制)等树脂的阳离子交换色谱法、使用丁基琼脂糖、苯基琼脂糖等树脂的疏水性色谱法、使用分子筛的凝胶过滤法、亲和色谱法、色谱聚焦法、或等电点电泳等电泳法等方法单独或组合使用,能够从将该无细胞提取液离心分离得到的上清中获得纯化蛋白质。

[0389] 在EGFR等细胞表面抗原或TfR在细胞内形成不溶体而表达的情况下,通过与上述同样将细胞回收后进行破碎、离心分离,作为沉淀组分回收该EGFR等细胞表面抗原或TfR的不溶体。将回收后的该EGFR等细胞表面抗原或TfR的不溶体利用蛋白质变性剂可溶化。通过将该可溶化液稀释或透析,使该EGFR等细胞表面抗原或TfR恢复正常的立体结构后,能够通过上述同样的分离纯化法得到多肽的纯化蛋白质。

[0390] 在EGFR等细胞表面抗原或TfR或其糖修饰体等衍生物被分泌到细胞外的情况下,能够在培养上清中回收该EGFR等细胞表面抗原或TfR、或其糖修饰体等衍生物。通过与上述同样地使用离心分离等方法对该培养上清进行处理,获得可溶性组分,能够使用与上述同样的分离纯化法从该可溶性组分得到纯化蛋白质。

[0391] 另外,本发明中使用的EGFR等细胞表面抗原或TfR也可以通过Fmoc法或tBoc法等化学合成法来制造。具体而言,例如可以利用Advanced Kemtec公司、Perkin Elmer公司、Pharmacia公司、Protein Technology Instrument公司、Synthecell-Vega公司、PerSeptive公司、或株式会社岛津制作所等制造的肽合成机等进行化学合成。

[0392] (2) 抗体产生细胞的制备步骤

[0393] 用(1)中获得的抗原来免疫小鼠、大鼠、仓鼠、兔、牛、或羊驼等动物,采集该动物的

脾脏、淋巴结或末梢血中的抗体产生细胞。另外,作为动物,例如可以列举富塚等人的文献[Tomizuka et al., Proc Natl Acad Sci USA., 97, 722, (2000)]中记载的产生源自人的抗体的转基因小鼠、作为作为被免疫动物的、为了提高免疫原性而进行了TfR或EGFR等细胞表面抗原的条件性基因敲除的小鼠等。

[0394] 免疫通过与弗氏完全佐剂、或氢氧化铝凝胶和百日咳菌疫苗等适当的佐剂一起给药原来进行。小鼠免疫时的免疫原给药法可以为皮下注射、腹腔内注射、静脉内注射、皮内注射、肌肉内注射或足跖注射等之中的任意一种,优选腹腔内注射、足跖注射或静脉内注射。在抗原为部分肽的情况下,制作与BSA(牛血清白蛋白)、或KLH(Keyhole Limpet hemocyanin)等的载体蛋白质的缀合物,将其用作免疫原。

[0395] 抗原的给药在第1次给药后,每隔1~2周进行5~10次。在各给药后的第3~7天从眼底静脉丛采血,对其血清的抗体效价使用酶免疫测定法[Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]等来测定。如果将上述的血清对免疫中使用的抗原显示充分的抗体效价的动物用作融合用抗体的产生细胞的供给源,则能够提高后续操作的效果。

[0396] 在抗原的最终给药后的第3~7天,从免疫后的动物中摘出脾脏等包含抗体产生细胞的组织,采集抗体产生细胞。抗体产生细胞是浆细胞和作为其前体细胞的淋巴细胞,其可以从个体的任意部位获得,一般可以从脾脏、淋巴结、骨髓、扁桃体、末梢血、或它们的适当组合等中获得,脾脏细胞最常使用。在使用脾脏细胞的情况下,将脾脏切碎分散后,离心分离,再除去红细胞,由此取得融合用抗体产生细胞。

[0397] (3) 骨髓瘤细胞的制备步骤

[0398] 作为骨髓瘤细胞,可以使用源自小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔或人等哺乳动物的没有自我抗体产生能力的细胞,一般使用从小鼠得到的株化细胞、例如,8-氮鸟嘌呤耐性小鼠(源自BALB/c)骨髓瘤细胞细胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)[European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2)[Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)[J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、或P3-X63-Ag8(X63)[Nature, 256, 495 (1975)]等。该细胞株可以利用适当的培养基、例如8-氮鸟嘌呤培养基[添加了谷氨酰胺、2-巯基乙醇、庆大霉素、FCS和8-氮鸟嘌呤的RPMI-1640培养基]、Iscove改良Dulbecco培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下称为“IMDM”)、或Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下称为“DMEM”)等的培养基来传代培养。在细胞融合的3~4天前将上述的细胞株用正常培养基(例如包含10%FCS的DMEM培养基)传代培养,在进行融合的当天确保 2×10^7 个以上的细胞数。

[0399] (4) 细胞融合

[0400] 将(2)中得到的融合用抗体产生细胞和(3)中得到的骨髓瘤细胞细胞用最低限度基础培养基Minimum Essential Medium(MEM)培养基或PBS(磷酸二钠1.83g、磷酸一钾0.21g、食盐7.65g、蒸馏水1升、pH7.2)充分清洗,以使融合用抗体产生细胞:骨髓瘤细胞细胞=5:1~10:1的方式混合,离心分离后,除去上清。将沉淀的细胞团充分分散后,在37℃下一边搅拌一边加入聚乙二醇-1000(PEG-1000)、MEM培养基和二甲基亚砷的混合液。再每1~2分钟添加MEM培养基1~2mL数次后,加入MEM培养基使得总量达到50mL。离心分离后,除去

上清,将沉淀的细胞团缓慢分散后,将细胞缓慢地分散在HAT培养基[添加有次黄嘌呤、胸苷和氨基蝶呤的正常培养基]中。将该悬浊液在5%CO₂培养箱中于37℃培养7~14天。

[0401] 另外,也能够用以下的方法进行细胞融合。将脾脏细胞和骨髓瘤细胞细胞用无血清培养基(例如DMEM)、或磷酸缓冲生理盐水(以下称为“磷酸缓冲液”)充分清洗,以使脾脏细胞与骨髓瘤细胞细胞的细胞数之比达到5:1~10:1左右的方式进行混合,并离心分离。除去上清,将沉淀的细胞团充分分散后,一边搅拌一边滴加1mL的包含50%(w/v)聚乙二醇(分子量1000~4000)的无血清培养基。然后,缓慢加入10mL的无血清培养基后,离心分离。再次弃掉上清,将沉淀的细胞悬浮于适量的包含次黄嘌呤·氨基蝶呤·胸苷(HAT)液和人白介素-2(IL-2)的正常培养基(以下称为HAT培养基)中,分注至培养用板(以下称为板)的各孔中,在5%二氧化碳气体存在下,以37℃培养2周左右。途中适当补充HAT培养基。

[0402] (5) 杂交瘤群的选择

[0403] 在融合所使用的骨髓瘤细胞细胞为8-氮鸟嘌呤耐性株的情况下,即为次黄嘌呤·鸟嘌呤·磷酸核糖基转移酶(HGPRT)缺损株的情况下,没有融合的骨髓瘤细胞细胞和骨髓瘤细胞细胞彼此的融合细胞无法在HAT培养基中存活。另一方面,抗体产生细胞彼此的融合细胞和抗体产生细胞与骨髓瘤细胞细胞的杂交瘤能够在HAT培养基中存活,但抗体产生细胞彼此的融合细胞最终会达到寿命。因此,通过在HAT培养基中继续培养,仅抗体产生细胞与骨髓瘤细胞细胞的杂交瘤存活,最终能够获得杂交瘤。

[0404] 关于以集落状生长的杂交瘤,进行从HAT培养基向去除了氨基蝶呤的培养基(以下称为HT培养基)的培养基更换。然后,采集培养上清的一部分,使用后述的抗体价测定法,能够选择产生抗体的杂交瘤。作为抗体效价的测定方法,例如可以列举:放射性同位素免疫定量法(RIA法)、固相酶免疫定量法(ELISA法)、荧光抗体法和被动红细胞凝集反应法等各种公知技术,从检测灵敏度、迅速性、准确性和操作的自动化的可能性等的观点考虑,优选RIA法或ELISA法。

[0405] 将通过测定抗体效价而判明了会产生所需抗体的杂交瘤移至其它板进行克隆。作为该克隆法,例如可以列举在板的1个孔中包含1个细胞的方式进行稀释并培养的极限稀释法、在软琼脂培养基中进行培养并回收集落的软琼脂法、通过显微操作将1个细胞分离的方法、通过细胞分选仪将1个细胞分离的方法等。

[0406] 对确认到抗体效价的孔,反复进行2~4次例如利用极限稀释法的克隆,选择稳定确认到抗体效价的克隆作为产生针对TfR或EGFR等细胞表面抗原的单克隆抗体的杂交瘤株。

[0407] (6) 单克隆抗体的制备

[0408] 对经过姥鲛烷处理[腹腔内给药2,6,10,14-四甲基十五烷(Pristane)0.5mL并饲养2周]的8~10周龄的小鼠或裸小鼠腹腔内注射(5)中得到的单克隆抗体产生杂交瘤。在10~21天杂交瘤发生腹水癌化。从该小鼠采集腹水,进行离心分离将固体成分除去后,用40~50%硫酸铵进行盐析,利用辛酸沉淀法、DEAE-琼脂糖柱、蛋白A柱或凝胶过滤柱进行纯化,收集IgG或IgM组分,作为纯化单克隆抗体。另外,通过在上述品系的小鼠(例如,BALB/c)或Nu/Nu小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠或兔等的腹腔内使该杂交瘤增殖,能够得到大量包含与TfR或EGFR等细胞表面抗原结合的单克隆抗体的腹水。

[0409] 将(5)中得到的单克隆抗体产生杂交瘤在添加有10%FBS的RPMI1640培养基等中

培养后,通过离心分离去除上清,悬浮于GIT培养基、或添加有5%Daigo GF21的杂交瘤SFM培养基等,通过烧瓶培养、旋转培养或反向培养等培养3~7天。将所得到的细胞悬浊液离心分离,从所得到的上清进行利用蛋白A柱或蛋白G柱的纯化,收集IgG组分,也能够得到纯化单克隆抗体。作为纯化的简便方法,也能够利用市售的单克隆抗体纯化试剂盒(例如,MAbTrap GII试剂盒;Amersham Pharmacia Biotech公司制)等。

[0410] 抗体的亚类的确定通过亚类分类试剂盒利用酶免疫测定法来进行。蛋白量的定量通过Lowry法和根据280nm处的吸光度 $[1.4(OD_{280}) = \text{免疫球蛋白} 1\text{mg/mL}]$ 进行计算的方法来进行。

[0411] (7) 单克隆抗体对TfR或EGFR等细胞表面抗原的结合试验

[0412] 单克隆抗体对TfR或EGFR等细胞表面抗原的结合活性能够通过免疫双扩散(Ouchterlony)法、ELISA法、RIA法、流式细胞法法(FCM)或表面等离子共振法(SPR)等的结合试验体系进行测定。

[0413] 免疫双扩散法虽然简便,但在抗体的浓度较低的情况下需要浓缩操作。另一方面,在使用ELISA法或RIA法的情况下,通过使培养上清直接与抗原吸附固相反应,进而使用与各种免疫球蛋白同型、亚类对应的抗体作为二抗,能够鉴定抗体的同型、亚类,并且测定抗体的结合活性。

[0414] 作为程序的具体例,使纯化或部分纯化的重组EGFR等细胞表面抗原或TfR吸附于ELISA用96孔板等的固相表面,再对没有吸附抗原的固相表面通过与抗原无关的蛋白质、例如牛血清白蛋白(BSA)进行封闭。将ELISA板利用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)和包含0.05% Tween20的PBS(Tween-PBS)等清洗后,与阶段稀释后的第1抗体(例如小鼠血清、培养上清等)反应,使抗体与固定于板的抗原结合。然后,分注作为第2抗体的生物素、酶(辣根过氧化物酶, horse radish peroxidase; HRP、碱性磷酸酶, alkaline phosphatase; ALP等)、化学发光物质或放射线化合物等标记后的抗免疫球蛋白抗体,使第2抗体与在板上结合的第1抗体反应。用Tween-PBS充分清洗后,进行与第2抗体的标记物质相应的反应,选择对靶标抗原特异性反应的单克隆抗体。

[0415] 用FCM法能够测定抗体对抗原表达细胞的结合活性[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373(1993)]。抗体结合于在细胞膜上表达的膜蛋白质抗原表示该抗体识别并结合天然存在的抗原的立体结构。

[0416] 作为SPR法,可以列举通过Biacore的动力学(kinetics)分析。例如,使用Biacore T100,测定抗原与被测物质之间的结合的动力学,将其结果用机器附带的分析软件分析。作为程序的具体例,将抗小鼠IgG抗体用胺偶联法固定于传感器芯片CM5后,通入杂交瘤培养上清或纯化单克隆抗体等被测物质以结合适当量,再通入浓度已知的多种浓度的抗原,测定结合和解离。然后,使用机器附带的软件对所得到的数据进行通过1:1结合模型的动力学分析,获得各种参数。或者,将EGFR等细胞表面抗原或TfR例如利用胺偶联法固定于传感器芯片上后,通入浓度已知的多种浓度的纯化单克隆抗体,测定结合和解离。使用机器附带的软件对所得到的数据进行利用二价结合模型的动力学分析,获得各种参数。

[0417] 另外,在本发明中,与针对TfR或EGFR等细胞表面抗原的抗体竞争性地与TfR或EGFR等细胞表面抗原结合的抗体能够通过使被测抗体在上述的结合试验体系中共存并反应来选择。即通过筛选在加入被测抗体时抑制与抗原的结合的抗体,能够获得与上述获得

的抗体竞争性地与TfR或EGFR等细胞表面抗原结合的抗体。

[0418] (8) 单克隆抗体对TfR或EGFR等细胞表面抗原的表位的鉴定

[0419] 在本发明中,抗体识别并结合的表位的鉴定能够如下进行。

[0420] 例如,制作抗原的部分缺损体、改变了物种间不同的氨基酸残基的突变体、或改变了特定的结构域的突变体,如果抗体对该缺损体或突变体的反应性降低,则表明缺损部位或氨基酸改变部位为该抗体的表位。这样的抗原的部分缺损体和突变体可以使用适当的宿主细胞例如大肠杆菌、酵母、植物细胞或哺乳动物细胞等作为分泌蛋白而取得,也可以在宿主细胞的细胞膜上表达而作为抗原表达细胞制备。在膜型抗原的情况下,为了在保持抗原的立体结构不变的情况下表达,优选在宿主细胞的膜上表达。另外,也可以制作模拟抗原的1级结构或立体结构的合成肽,以确认抗体的反应性。合成肽可以列举使用公知的肽合成技术来制作其分子的各种部分肽的方法等。

[0421] 例如,对于人和小鼠的TfR或EGFR等细胞表面抗原的细胞外区域,制作将构成各区域的结构域适当组合而成的嵌合蛋白,确认抗体对该蛋白的反应性,由此能够鉴定抗体的表位。然后,更加细致地,使用本领域技术人员公知的寡肽合成技术合成各种其对应部分的寡肽、或该肽的突变体等,确认抗体对该肽的反应性,由此能够确定表位。作为用于得到多种寡肽的简便的方法,也能够利用市售的试剂盒[例如,SPOTs试剂盒(Genosys Biotechnology公司制)、使用多中心合成法的一系列的多中心·肽合成试剂盒(Chiron公司制)等]。

[0422] 作为结合于与和TfR或EGFR等细胞表面抗原结合的抗体所结合的表位相同表位的抗体,其能够通过鉴定在上述的结合试验体系中得到的抗体的表位,制作该表位的部分合成肽、模拟该表位的立体结构的合成肽、或该表位的重组体等并进行免疫而取得。

[0423] 例如,如果表位为膜蛋白,则通过制作将全细胞外区域或一部分细胞外结构域连接于适当的标签例如FLAG标签、组氨酸标签、GST蛋白质或抗体Fc区等的重组融合蛋白,用该重组蛋白质进行免疫,从而能够更有效地制作该表位特异性的抗体。

[0424] 2. 基因重组抗体的制作

[0425] 作为基因重组抗体的制作例,在P.J.Delves.,ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES.,1997WILEY、P.Shepherd and C.Dean.Monoclonal Antibodies.,2000OXFORD UNIVERSITY PRESS和J.W.Goding.,Monoclonal Antibodies:principles and practice.,1993ACADEMIC PRESS等中进行了简要说明,以下示出嵌合抗体、人源化抗体和人抗体的制作方法。另外,关于基因重组小鼠、大鼠、仓鼠和兔抗体,也能够用同样的方法制作。

[0426] (1) 从杂交瘤取得编码单克隆抗体的V区的cDNA

[0427] 编码单克隆抗体的VH和VL的cDNA例如能够如下进行取得。

[0428] 首先,从产生单克隆抗体的杂交瘤提取mRNA,并合成cDNA。然后,将合成的cDNA克隆到噬菌体或质粒等载体,制作cDNA文库。从该文库中,将编码抗体的C区部分或V区部分的DNA用作探针,分别分离具有编码VH或VL的cDNA的重组噬菌体或重组质粒。确定分离得到的重组噬菌体或重组质粒内的VH或VL的全碱基序列,从该碱基序列推测VH或VL的全氨基酸序列。

[0429] 作为用于制作杂交瘤的非人动物,使用小鼠、大鼠、仓鼠或兔等,但只要能够制作杂交瘤,则能够使用任何动物。

[0430] 从杂交瘤制作全RNA时,使用硫氰酸胍-三氟乙酸铯法[Methods in Enzymol., 154,3(1987)]、或RNA easy kit(Qiagen公司制)等的试剂盒等。

[0431] 从全RNA制备mRNA时,使用寡(dT)固定化纤维素柱法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]、或Oligo-dT30<Super>mRNA Purification Kit(Takara Bio公司制)等的试剂盒等。另外,也可以使用Fast Track mRNA Isolation Kit(Invitrogen公司制)或QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia公司制)等的试剂盒来制备mRNA。

[0432] cDNA的合成和cDNA文库的制作使用公知的方法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley&Sons(1987-1997)]或SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Invitrogen公司制)或ZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene公司制)等的试剂盒等。

[0433] 在制作cDNA文库时,作为供整合入以从杂交瘤提取的mRNA为模板合成的cDNA的载体,只要为能够整合入该cDNA的载体即可,可以使用任何载体。

[0434] 例如使用ZAP Express[Strategies, 5, 58(1992)]、pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)]、λZAPII(Stratagene公司制)、λgt10、λgt11[DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49(1985)]、Lambda BlueMid(Clontech公司制)、λExCell、pT7T3-18U(Pharmacia公司制)、pcD2[Mol. Cell. Biol., 3, 280(1983)]或pUC18[Gene, 33, 103(1985)]等。

[0435] 供导入由噬菌体或质粒载体构建的cDNA文库的大肠杆菌只要能够导入、表达和维持该cDNA文库,则可以使用任何大肠杆菌。例如使用XL1-Blue MRF'[Strategies, 5, 81(1992)]、C600[Genetics, 39, 440(1954)]、Y1088、Y1090[Science, 222, 778(1983)]、NM522[J. Mol. Biol., 166, 1(1983)]、K802[J. Mol. Biol., 16, 118(1966)]、或JM105[Gene, 38, 275(1985)]等。

[0436] 从cDNA文库中选择编码非人抗体的VH或VL的cDNA克隆使,使用利用经同位素或荧光标记的探针的集落杂交法、或噬菌斑杂交法[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)]等。

[0437] 另外,也可以通过制备引物,以从mRNA合成的cDNA或cDNA文库为模板,进行聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)法[以下记作PCR法、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley&Sons(1987-1997)],由此来制备编码VH或VL的cDNA。

[0438] 将所选择的cDNA利用适当的限制酶等切断后,克隆到pBluescript SK(-)(Stratagene公司制)等质粒,通过通常使用的碱基序列分析方法等来确定该cDNA的碱基序列。例如,进行双脱氧法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)]等反应后,使用A.L.F. DNA测序仪(Pharmacia公司制)等碱基序列自动分析装置等来分析。

[0439] 从确定的全碱基序列分别推测VH和VL的全氨基酸序列,通过与已知的抗体的VH和VL的全氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]比较,确定所取得的cDNA是否编码包含分泌

信号序列的抗体的VH和VL各自的完整的氨基酸序列。

[0440] 关于包含分泌信号序列的抗体的VH和VL各自的完整的氨基酸序列,通过与已知的抗体的VH和VL的全氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, USDept.Health and Human Services(1991)]比较,能够推测分泌信号序列的长度和N末端氨基酸序列,进而能够鉴定它们所属的亚群。

[0441] 另外,VH和VL的各CDR的氨基酸序列能够通过已知的抗体的VH和VL的氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest,USDept.Health and Human Services(1991)]比较来推测。

[0442] 另外,关于所得到的VH和VL的完整的氨基酸序列,例如可以通过使用SWISS-PROT或PIR-Protein等任意的数据库,进行利用BLAST法[J.Mol.Biol.,215,403(1990)]等的同源性检索,确认该VH和VL的完整的氨基酸序列是否为新的序列。

[0443] (2) 基因重组抗体表达用载体的构建

[0444] 基因重组抗体表达用载体能够通过向动物细胞用表达载体克隆编码人抗体的CH和CL的至少一者的DNA来构建。

[0445] 作为人抗体的C区,能够使用任意的人抗体的CH和CL,例如能够使用人抗体的 γ 1亚类的CH和 κ 类的CL等。作为编码人抗体的CH和CL的DNA,使用cDNA,但也可以使用由外显子和内含子构成的染色体DNA。

[0446] 作为动物细胞用表达载体,只要能够整合入编码人抗体的C区的基因并表达的载体即可,可以使用任何载体,例如可以使用pAGE107[Cytotechnol.,3,133(1990)]、pAGE103[J.Biochem.,101,1307(1987)]、pHSG274[Gene,27,223(1984)]、pKCR[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,78,1527(1981)]、pSG1bd2-4[Cytotechnol.,4,173(1990)]、或pSE1UK1Sed1-3[Cytotechnol.,13,79(1993)]、INPEP4(Biogen-IDEC公司制)、N5KG1val(美国专利第6,001,358号说明书)、N5KG4PE R409K(国际公开第2006/033386号中记载)、N5KG2载体(国际公开第2003/033538号中记载)、转座子载体(国际公开第2010/143698号)等。

[0447] 作为动物细胞用表达载体的启动子和增强子,可以使用SV40的初始启动子[J.Biochem.,101,1307(1987)]、Moloney小鼠白血病病毒LTR[Biochem.Biophys.Res.Comm.,149,960(1987)]、CMV启动子(美国专利第5,168,062号说明书)或免疫球蛋白H链的启动子[Cell,41,479(1985)]和增强子[Cell,33,717(1983)]等。

[0448] 从载体的构建的容易性、向动物细胞导入的容易性、细胞内的抗体H链和L链的表达量的均衡性等的观点出发,基因重组抗体的表达使用搭载有抗体H链和L链的两基因的载体(串联型型载体)[J.Immunol.Methods,167,271(1994)],但也可以将分别搭载有抗体H链和L链的各基因的多个载体(分离型载体)组合使用。

[0449] 作为串联型的基因重组抗体表达用载体,使用pKANTEX93(国际公开第97/10354号)、pEE18[Hybridoma,17,559(1998)]、N5KG1val(美国专利第6,001,358号说明书)、N5KG4PE R409K(国际公开第2006/033386号中记载)、N5KG2载体(国际公开第2003/033538号中记载)、To12转座子载体(国际公开第2010/143698号)等。

[0450] (3) 嵌合抗体表达载体的构建

[0451] 通过在(2)所获得的基因重组抗体表达用载体内的编码人抗体的CH或CL的基因的各自的上游分别克隆(1)中得到的编码非人抗体的VH或VL的cDNA,能够构建嵌合抗体表达

载体。

[0452] 首先,为了将编码非人抗体的VH或VL的cDNA的3'末端侧与人抗体的CH或CL的5'末端侧连结,制作以连结部分的碱基序列编码适当的氨基酸且成为适当的限制酶识别序列的方式设计的VH和VL的cDNA。然后,将制作得到的VH和VL的cDNA分别以适当的形式表达的方式克隆到(2)中得到的基因重组抗体表达用载体内的编码人抗体的CH或CL的基因的各自的上游,从而构建嵌合抗体表达载体。

[0453] 另外,也可以通过将编码非人抗体的VH或VL的cDNA使用两端具有适当的限制酶的识别序列的合成DNA通过PCR法分别扩增,并克隆到(2)中得到的基因重组抗体表达用载体,从而构建嵌合抗体表达载体。

[0454] (4) 编码人源化抗体的V区的cDNA的制作

[0455] 编码人源化抗体的VH或VL的cDNA能够如下制作。首先,分别选择移植(1)中得到的非人抗体的VH或VL的CDR的氨基酸序列的人抗体的VH或VL的框架区(以下记作FR)的氨基酸序列。

[0456] 选择的FR的氨基酸序列只要为源自人抗体,则能够使用任何序列。例如,使用Protein Data Bank等数据库中注册的人抗体的FR的氨基酸序列、或人抗体的FR的各亚群的共通氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]等。为了抑制抗体的结合活性的降低,选择与原本的非人抗体的VH或VL的FR的氨基酸序列具有尽可能高的同源性(60%以上)的人FR的氨基酸序列。

[0457] 然后,在所选择的人抗体的VH或VL的FR的氨基酸序列中分别移植原本的非人抗体的CDR的氨基酸序列,分别设计人源化抗体的VH或VL的氨基酸序列。考虑到抗体基因的碱基序列中所见的密码子的使用频度将所设计的氨基酸序列[Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services(1991)]转换成DNA序列,由此分别设计人源化抗体的VH或VL的cDNA序列。

[0458] 基于所设计得到的cDNA序列,合成由100~150个碱基左右的长度构成的数条合成DNA,使用它们进行PCR反应。该情况下,从PCR反应的反应效率和能够合成的DNA长度的观点出发,优选针对H链和L链各设计4~6条合成DNA。另外,也可以合成可变区全长的合成DNA来使用。

[0459] 此外,通过在位于两端的合成DNA的5'末端导入适当的限制酶的识别序列,能够在(2)中得到的基因重组抗体表达用载体中容易地克隆入编码人源化抗体的VH或VL的cDNA。PCR反应后,将扩增产物分别克隆到pBluescript SK(-)(Stratagene公司制)等质粒,通过与(1)中记载的方法同样的方法确定碱基序列,取得具有所需的编码人源化抗体的VH或VL的氨基酸序列的DNA序列的质粒。

[0460] (5) 人源化抗体的V区的氨基酸序列的改变

[0461] 人源化抗体如果仅将非人抗体的VH和VL的CDR移植到人抗体的VH和VL的FR,则其抗原结合活性与原本的非人抗体相比会降低[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]。因此,鉴定出人抗体的VH和VL的FR的氨基酸序列中直接参与向抗原的结合的氨基酸残基、与CDR的氨基酸残基相互作用的氨基酸残基、和维持抗体的立体结构并间接参与向抗原的结合的氨基酸残基,将这些氨基酸残基取代为原本的非人抗体的氨基酸残基,由此能够使降低的人源

化抗体的抗原结合活性升高。

[0462] 为了鉴定与抗原结合活性相关的FR的氨基酸残基,可以通过使用X射线结晶分析[J.Mol.Biol.,112,535(1977)]或电脑建模[Protein Engineering,7,1501(1994)]等来进行抗体的立体结构的构建和分析。另外,通过对各个抗体制作数种改变体,反复研究各自与抗原结合活性的相关性,并进行试错,能够取得具有所需的抗原结合活性的改变人源化抗体。

[0463] 人抗体的VH和VL的FR的氨基酸残基能够通过使用改变用合成DNA进行(4)中记载的PCR反应来改变。关于PCR反应后的扩增产物,通过(1)中记载的方法,确定碱基序列,确认实施了目标改变。

[0464] (6) 人源化抗体表达载体的构建

[0465] 向(2)中得到的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游分别克隆入所构建的编码人源化抗体的VH或VL的cDNA,从而能够构建人源化抗体表达载体。

[0466] 例如,通过向(4)和(5)中得到的构建人源化抗体的VH或VL时所使用的合成DNA中位于两端的合成DNA的5'末端导入适当的限制酶的识别序列,从而将它们以适当的形式表达的方式分别克隆到(2)中得到的基因重组抗体表达用载体内的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游。

[0467] (7) 人抗体表达载体的构建

[0468] 在使用产生人抗体的动物作为被免疫动物建立了产生单克隆抗体的杂交瘤的情况下,在(1)中,能够获得人抗体的VH和VL的氨基酸序列和cDNA序列。因此,通过在(2)中得到的基因重组抗体表达用载体的编码人抗体的CH或CL的各基因的上游分别克隆入(1)中得到的编码人抗体的VH或VL的基因,能够构建人抗体表达载体。

[0469] (8) 基因重组抗体的瞬时表达

[0470] 使用(3)、(6)和(7)中得到的基因重组抗体表达用载体、或将它们改变得到的表达载体使基因重组抗体瞬时表达,能够有效地评价所得到的多种基因重组抗体的抗原结合活性。

[0471] 供导入表达载体的宿主细胞只要为能够表达基因重组抗体的宿主细胞,则可以使用任何细胞,例如使用COS-7细胞[美国典型培养物保藏中心American Type Culture Collection(ATCC)编号:CRL1651]。向COS-7细胞导入表达载体时使用DEAE-葡聚糖法[Methods in Nucleic Acids Res.,CRC press(1991)]、或脂质转染法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84,7413(1987)]等。

[0472] 导入表达载体后,使用酶免疫抗体法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies-A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)、单克隆抗体实验手册,Kodansha Scientific(1987)]等来测定培养上清中的基因重组抗体的表达量和抗原结合活性。

[0473] (9) 基因重组抗体的稳定表达株的取得和基因重组抗体的制备

[0474] 通过将(3)、(6)和(7)中得到的基因重组抗体表达载体导入适当的宿主细胞,能够得到稳定表达基因重组抗体的转化株。

[0475] 作为表达载体向宿主细胞的导入,例如可以列举:电穿孔法[日本特开平2-257891

号公报、Cytotechnology,3,133(1990)]、钙离子方法、电穿孔法、原生质球法、乙酸锂法、磷酸钙法、脂质转染法等。另外,作为向后述的动物导入基因的方法,例如可以列举:显微注射法、使用电穿孔或脂质转染法向ES细胞导入基因的方法、和核移植法等。

[0476] 作为供导入基因重组抗体表达载体的宿主细胞,只要是能够使基因重组抗体表达的宿主细胞,则可以使用任何细胞。例如,使用小鼠SP2/0-Ag14细胞(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC CRL1580)、中国仓鼠CHO-K1细胞(ATCC CCL-61)、DUKXB11(ATCC CCL-9096)、Pro-5细胞(ATCC CCL-1781)、CHO-S细胞(Life Technologies,Cat No.11619)、二氢叶酸还原酶基因(dhfr)缺损的CHO细胞(CHO/DG44细胞)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77,4216(1980)]、获得了凝集素耐性的Lec13细胞[Somatic Cell and Molecular genetics,12,55(1986)]、 α 1,6-岩藻糖转移酶基因缺损的CHO细胞(国际公开第2005/035586号、国际公开第02/31140号)、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞(ATCC编号:CRL1662)等。

[0477] 另外,也可以使用参与细胞内糖核苷酸GDP-岩藻糖的合成的酶等蛋白质、参与使岩藻糖的1位以 α 键结合于N-糖苷键复合型糖链的还原末端的N-乙酰基葡萄糖胺的6位的糖链修饰的酶等蛋白质、或参与细胞内糖核苷酸GDP-岩藻糖向高尔基体输送的蛋白质等的活性降低或缺失的宿主细胞、例如 α 1,6-岩藻糖转移酶基因缺损的CHO细胞(国际公开第2005/035586号、国际公开第02/31140号)等。

[0478] 导入表达载体后,通过在包含G418硫酸盐(以下记作G418)等药剂的动物细胞培养用培养基中培养来选择稳定表达基因重组抗体的转化株(日本特开平2-257891号公报)。

[0479] 动物细胞培养用培养基使用RPMI1640培养基(Invitrogen公司制)、GIT培养基(日本制药株式会社制)、EX-CELL301培养基(JRH公司制)、EX-CELL302培养基(JRH公司制)、EX-CELL325培养基(JRH公司制)、IMDM培养基(Invitrogen公司制)或杂交瘤SFM培养基(Invitrogen公司制)、或在这些培养基中添加有FBS等各种添加物的培养基等。通过将所得到的转化株在培养基中培养,使基因重组抗体在培养上清中表达、累积。培养上清中的基因重组抗体的表达量和抗原结合活性能够通过ELISA法等测定。另外,可以利用DHFR扩增体系(日本特开平2-257891号公报)等,使转化株所产生的基因重组抗体的表达量升高。

[0480] 基因重组抗体能够由转化株的培养上清使用蛋白A柱进行纯化[Monoclonal Antibodies-Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies-A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]。另外,也可以将凝胶过滤、离子交换色谱和超滤等蛋白质的纯化中使用的方法组合进行纯化。

[0481] 纯化后的基因重组抗体的H链、L链或抗体分子整体的分子量能够使用聚丙烯酰胺凝胶电泳法[Nature,227,680(1970)]、或蛋白质印迹法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、Antibodies-A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]等测定。

[0482] 3.双特异性抗体的设计

[0483] 本发明的双特异性抗体能够通过分别设计N末端侧多肽和IgG部分,并设计将它们连结而成的双特异性抗体来制作。

[0484] 3-1.IgG部分的设计

[0485] IgG部分可以通过使用上述1.中记载的方法取得单克隆抗体,使用上述2.中记载

的方法确定各抗体的CDR和可变区的cDNA序列,设计包含抗体的CDR或可变区的IgG部分来获得。

[0486] 3-2.N末端侧多肽的设计

[0487] 在N末端侧多肽包含抗体的CDR或可变区的情况下,能够利用上述1.和2.中记载的方法确定抗体的CDR或可变区的DNA序列,设计包含它们的N末端侧多肽来制作。作为这样的N末端侧多肽,也可以使用:如scFv等那样使VH与VL直接或经由适当的接头结合而成的单链的多肽、设计成如Fab和dsFv等那样以双链表达并在表达后进行S-S结合的多肽、或VHH等。可以利用上述方法评价N末端侧多肽的抗原结合活性,并选择保持有抗原结合活性的多肽。

[0488] 4.双特异性抗体的制作

[0489] 4-1.轻链相同型双特异性抗体的制作

[0490] N末端侧多肽为Fab且该Fab和IgG部分的轻链相同的双特异性抗体具体能够如下制作。

[0491] 能够通过合成编码将N末端侧多肽的VH-CH1和IgG部分的VH连结而成的多肽的DNA,并且合成编码各抗体的VL的DNA,将这些DNA整合入上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,使该双特异性抗体表达来制作。在IgG部分与N末端侧多肽经由接头结合的情况下,也合成包括编码该接头序列的DNA在内的部分。

[0492] 4-2.N末端侧多肽包含CDR的轻链非相同型双特异性抗体的制作

[0493] (1)N末端侧多肽为Fab的轻链非相同型双特异性抗体具体能够如下制作。

[0494] 能够通过合成编码将N末端侧多肽的VL-CL和IgG部分的VH连结而成的多肽的DNA、编码N末端侧多肽的VH-CH1的DNA、和编码IgG部分的VL的DNA,将这些DNA整合入上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,使该双特异性抗体表达来制作。在IgG部分和N末端侧多肽经由接头结合的情况下,也合成包括编码该接头序列的DNA在内的部分。

[0495] (2)N末端侧多肽为VHH的双特异性抗体具体能够如下制作。

[0496] 能够通过合成编码将VHH和IgG部分的VH连结而成的多肽的DNA、和编码IgG部分的VL的DNA,将这些DNA整合入上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,使该双特异性抗体表达来制作。在该VHH和IgG部分经由接头结合的情况下,也合成包括编码该接头序列的DNA在内的部分。

[0497] (3)N末端侧多肽为包含scFv、dsFv或CDR的上述(1)、(2)以外的多肽的双特异性抗体具体能够如下制作。

[0498] 在N末端侧多肽为单链的情况下,合成将编码N末端侧多肽的DNA和编码IgG部分的VH的DNA连结而成的DNA。在N末端侧多肽为包含2个单链多肽的缔合体的情况下,将构成N末端侧多肽的一个单链多肽连结于编码IgG部分的VH的DNA进行合成,并且也合成编码构成N末端侧多肽的另一个单链多肽的DNA。另外,也合成编码IgG部分的VL的DNA。在IgG部分和N末端侧多肽经由接头结合的情况下,也合成包括编码该接头序列的DNA在内的部分。能够通过将这些DNA整合入上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,使该双特异性抗体表达来制作。

[0499] 4-3.N末端侧多肽为上述以外的情况的双特异性抗体的制作

[0500] 在N末端侧多肽为上述以外的情况的多肽的情况下,本发明的双特异性抗体具体能够如下制作。

[0501] 在N末端侧多肽为单链的情况下,合成编码N末端侧多肽的DNA和编码IgG部分的VH的DNA连结而成的DNA。在N末端侧多肽为由2条以上的单链多肽构成的缔合体的情况下,将构成N末端侧多肽中的1条单链多肽连结于编码IgG部分的VH的DNA进行合成,并且也合成编码构成N末端侧多肽的剩余的单链多肽的DNA。另外,也合成编码IgG部分的VL的DNA。在IgG部分与N末端侧多肽经由接头结合的情况下,也合成包括编码该接头序列的DNA在内的部分。能够通过将这些DNA整合入上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,使该双特异性抗体表达来制作。

[0502] 能够通过将这些DNA整合入上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,使该双特异性抗体表达来制作。在IgG部分和N末端侧多肽经由接头结合的情况下,也合成包括编码该接头序列的DNA在内的部分。

[0503] 抗原结合部位除了上述1.中记载的使用杂交瘤的方法以外,还能够通过噬菌体展示(Phage Display)法、酵母展示(Yeast display)法等技术进行分离并取得[Emmanuelle Laffy et al., Human Antibodies 14, 33-55, (2005)]。

[0504] 另外,在制作由多个VH和单一的VL构成的双特异性抗体(也称为轻链相同型双特异性抗体)的情况下,以双特异性抗体所含的各抗原结合部位与各特异性抗原反应的方式,进行使用噬菌体展示法等筛选,选择最适于单一VL的各个VH。

[0505] 具体而言,首先,使用上述1.中记载的方法,用第1抗原免疫动物并由其脾脏制作杂交瘤,克隆编码第1抗原结合部位的DNA序列。然后,用第2抗原免疫动物,由其脾脏制备cDNA文库,通过PCR从该文库中取得编码VH的氨基酸序列的DNA。

[0506] 接下来,制作表达将第2抗原的免疫所得到的VH与第1抗原结合部位的VL连结而成的scFv的噬菌体文库,使用该噬菌体文库进行淘选,选择提呈与第2抗原特异性结合的scFv的噬菌体。从所选择的噬菌体中克隆编码第2抗原结合部位的VH的氨基酸序列的DNA序列。

[0507] 此外,在N末端侧多肽为Fab的情况下,设计编码将第1抗原结合部位的VH与第2抗原结合部位的VH由CH1或CH1和接头连结而成的多肽的氨基酸序列的DNA序列,将该DNA序列与编码单一VL的氨基酸序列的DNA序列插入至例如上述2.(2)中记载的基因重组抗体表达载体,由此能够构建本发明的双特异性抗体的表达载体。

[0508] 5. 本发明的双特异性抗体或其抗体片段的活性评价

[0509] 纯化后的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的活性评价能够如下进行。

[0510] 本发明的双特异性抗体对表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞株的结合活性能够使用上述的1.(7)记载的结合试验体系进行测定。

[0511] 对表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞的CDC活性、或ADCC活性能够通过公知的测定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]测定。

[0512] 本发明的双特异性抗体的抗细胞活性(也称为增殖抑制活性)能够用如下的方法测定。例如将细胞接种于96孔板,添加抗体培养一定时间后,使其与WST-8试剂(Dojindo公司制)反应,利用酶标仪测定450nm的吸光度,由此测定细胞的存活率。

[0513] 从TfR或EGFR等细胞表面抗原向细胞内的信号转导能够通过利用蛋白质印迹法等检测细胞内的蛋白质的磷酸化来评价。

[0514] 6. 使用本发明的双特异性抗体或其抗体片段的疾病的治疗方法

[0515] 本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段能够用于治疗与TfR和EGFR等细胞

表面抗原的至少一者相关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病。作为与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者相关的疾病,例如可以列举恶性肿瘤和癌症等。

[0516] 作为恶性肿瘤和癌症,例如可以列举:大肠癌、结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、恶性黑色素瘤(Melanoma)、甲状腺癌、肾细胞癌、白血病、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、胃癌、胰腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胆管癌、食道癌、肝癌、头颈部癌、皮肤癌、尿道癌、膀胱癌、前列腺癌、绒毛膜癌、咽癌、喉癌、间皮瘤、胸膜瘤、男性胚胎瘤、子宫内膜增生、子宫内膜异位症、胚组织瘤、纤维肉瘤、卡波济肉瘤、血管瘤、海绵状血管瘤、血管母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、星状细胞瘤、神经纤维瘤、寡突胶质细胞瘤、髓母细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、横纹肌肉瘤、胶质母细胞瘤、骨原性肉瘤、平滑肌肉瘤和威尔姆斯瘤等。

[0517] 含有本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段、或这些的衍生物的治疗药可以仅包含作为有效成分的该抗体或该抗体片段、或这些的衍生物,但通常作为与药理学上可接受的一种以上的载体一起混合,通过制剂学的技术领域中公知的方法制造的医药制剂来提供。

[0518] 作为给药途径,例如可以列举:口服给药、或口腔内、气管内、直肠内、皮下、肌肉内或静脉内等非口服给药。作为给药形态,例如可以列举:喷雾剂、胶囊剂、片剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、乳剂、栓剂、注射剂、软膏或贴剂等。各种制剂可以使用通常所用的赋形剂、填充剂、结合剂、浸润剂、崩解剂、表面活性剂、润滑剂、分散剂、缓冲剂、保存剂、助溶剂、防腐剂、着色料、香味剂、和稳定剂等通过常规方法来制造。

[0519] 作为赋形剂,例如可以列举:乳糖、果糖、葡萄糖、玉米淀粉、山梨糖醇、结晶纤维素、灭菌水、乙醇、甘油、生理盐水和缓冲液等。作为崩解剂,例如可以列举:淀粉、海藻酸钠、明胶、碳酸钙、柠檬酸钙、糊精、碳酸镁和合成硅酸镁等。

[0520] 作为结合剂,例如可以列举:甲基纤维素或其盐、乙基纤维素、阿拉伯胶、明胶、羧基丙基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮等。作为润滑剂,例如可以列举:滑石、硬脂酸镁、聚乙二醇和氢化植物油等。

[0521] 作为稳定剂,例如可以列举:精氨酸、组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸等氨基酸、人血清白蛋白、明胶、葡聚糖40、甲基纤维素、亚硫酸钠、偏亚硫酸钠等。

[0522] 作为其它的添加剂,例如可以列举:糖浆、凡士林、甘油、乙醇、丙二醇、柠檬酸、氯化钠、亚硝酸钠和磷酸钠等。

[0523] 作为适于口服给药的制剂,例如可以列举:乳剂、糖浆剂、胶囊剂、片剂、散剂或颗粒剂等。

[0524] 乳剂或糖浆剂这样的液体制备物使用水、蔗糖、山梨糖醇或果糖等糖类、聚乙二醇或丙二醇等二醇类、芝麻油、橄榄油或大豆油等油类、对羟基苯甲酸酯类等防腐剂、或草莓香料或薄荷等香料类等作为添加剂制造。

[0525] 胶囊剂、片剂、散剂或颗粒剂等使用乳糖、葡萄糖、蔗糖或甘露醇等赋形剂、淀粉或海藻酸钠等崩解剂、硬脂酸镁或滑石等润滑剂、聚乙二醇、羧基丙基纤维素或明胶等结合剂、脂肪酸酯等表面活性剂、或甘油等增塑剂等作为添加剂制造。

[0526] 作为适于非口服给药的制剂,例如可以列举:注射剂、栓剂或喷雾剂等。注射剂使用由盐溶液、葡萄糖溶液、或这两者的混合物构成的载体等制造。

[0527] 栓剂使用可可脂、氢化脂肪或羧酸等载体制造。喷雾剂使用不刺激接受者的口腔和气管粘膜且使本发明的单克隆抗体或其抗体片段分散为微细颗粒而使其容易吸收的载体等制造。作为载体,例如可以列举:乳糖或甘油等。另外,也可以作为气溶胶或干粉进行制造。此外,在上述非口服剂中,也可以添加在适于口服给药的制剂中作为添加剂例示的成分。

[0528] 作为本发明的双特异性抗体的有效量与适当的稀释剂和药理学上能够使用的载体的组合给药的有效量为每次单位体重1kg为0.0001mg~100mg,、从第2天起以8周间隔给药。

[0529] 7. 使用本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段的疾病的诊断方法

[0530] 通过使用本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段检测或测定表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞,能够诊断与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者相关的疾病、优选TfR和EGFR等细胞表面抗原的表达细胞参与的疾病。

[0531] 作为与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者相关的疾病的恶性肿瘤或癌症的诊断例如能够以如下检测或测定TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者来进行。

[0532] 首先,对从多个健康者的生物体采集的生物体试样,使用本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段、或它们的衍生物,利用下述的免疫学方法,进行TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的检测或测定,调查健康者的生物体试样中的TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的存在量。

[0533] 接着,对被测者的生物体试样中也同样调查TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的存在量,将其存在量与健康者的存在量比较。在被测者的TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的存在量与健康者相比增加的情况下,该被测者被诊断为患癌。关于其它的与TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者相关的疾病的诊断也能够用同样的方法诊断。

[0534] 免疫学方法是指使用施加了标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。例如可以列举:放射性物质标记免疫抗体法、酶免疫测定法、荧光免疫测定法、发光免疫测定法、蛋白质印迹法或理化方法等。

[0535] 作为放射性物质标记免疫抗体法,例如可列举如下方法:使抗原或表达抗原的细胞等与本发明的双特异性抗体或该抗体片段反应,进而与施加了放射线标记的抗免疫球蛋白抗体或结合片段反应后,利用闪烁计数器等进行检测。

[0536] 作为酶免疫测定法,例如可列举如下方法:使抗原或表达抗原的细胞等与本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段反应,进而与施加了标记的抗免疫球蛋白抗体或结合片段反应后,用吸光光度计测定显色色素。例如可以列举夹心ELISA法等。

[0537] 作为酶免疫测定法中使用的标记体,能够使用公知的酶标记[酶免疫测定法、医学书院(1987)]。例如使用碱性磷酸酶标记、过氧化物酶标记、荧光素酶标记、或生物素标记等。

[0538] 夹心ELISA法是使抗体与固相结合后,截留作为检测或测定对象的抗原,使截留的抗原与第2抗体反应的方法。在该ELISA法中,准备与要检测或测定的抗原结合且抗原结合部位不同的2种抗体或抗体片段,其中,使第1抗体或抗体片段预先吸附于板(例如,96孔板),然后将第2抗体或抗体片段先用FITC等荧光物质、过氧化物酶等酶、或生物素等标记。使上述的吸附了抗体的板与从生物体内分离的细胞或其破碎液、组织或其破碎液、细胞

培养上清、血清、胸水、腹水、或眼液等反应后,与标记后的抗体或抗体片段反应,进行根据标记物质的检测反应。根据将浓度已知的抗原阶段性稀释制作的标准曲线,计算被测样品中的抗原浓度。

[0539] 作为夹心ELISA法中使用的抗体,可以使用多克隆抗体或单克隆抗体的任意一者,也可以使用Fab、Fab' 或F(ab)₂等抗体片段。作为夹心ELISA法中使用的2种抗体的组合,可以为结合于不同的表位的单克隆抗体或该抗体片段的组合,也可以为多克隆抗体与单克隆抗体或其抗体片段的组合。

[0540] 作为荧光免疫测定法,例如利用文献[Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、单克隆抗体实验手册、Kodansha Scientific(1987)]等中记载的方法测定。作为荧光免疫测定法中使用的标记体,可以使用公知的荧光标记[荧光抗体法、Soft Science公司(1983)]。例如使用FITC或RITC等。

[0541] 作为发光免疫测定法,例如利用文献[生物发光和化学发光临床检查42、广川书店(1998)]等中记载的方法测定。作为发光免疫测定法中使用的标记体,可以列举公知的发光体标记,例如使用吖啶鎓酯或咯吩等。

[0542] 作为蛋白质印迹法,可以通过如下方法测定:利用SDS(十二烷基硫酸钠)-PAGE [Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]将抗原或表达抗原的细胞等分级后,使该凝胶印迹于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜或硝基纤维素膜,使该膜与和抗原结合的抗体或抗体片段反应,进而与施加了FITC等荧光物质、过氧化物酶等酶标记、或生物素标记等的抗IgG抗体或其抗体片段反应后,使该标记可视化。以下示出一例。

[0543] 首先,将表达具有所需的氨基酸序列的多肽的细胞或组织溶解,在还原条件下以每个泳道的蛋白量计使0.1~30μg通过SDS-PAGE法泳动。然后,将泳动后的蛋白质转印至PVDF膜,用包含1~10%BSA的PBS(以下记作BSA-PBS)在室温反应30分钟进行封闭操作。这里,使本发明的双特异性抗体反应,用包含0.05~0.1%的Tween-20的PBS(Tween-PBS)清洗,与过氧化物酶标记后的山羊抗小鼠IgG在室温下反应2小时。用Tween-PBS清洗,用ECL蛋白质印迹检测试剂(Western Blotting Detection Reagents)(Amersham公司制)等检测该抗体所结合的条带,由此检测抗原。作为利用蛋白质印迹法的检测中使用的抗体,可以使用能够与没有保持天然型的立体结构的多肽结合的抗体。

[0544] 作为理化方法,例如可以通过使作为抗原的TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者与本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段结合形成凝集体,并检测该凝集体。作为其它理化方法,也可以使用毛细管法、一维免疫扩散法、免疫比浊法或乳胶免疫比浊法[临床检查法提要、金原出版(1998)]等。

[0545] 在乳胶免疫比浊法中,如果使用使抗体或抗原敏化的粒径0.1~1μm左右的聚苯乙烯乳胶等载体,利用对应的抗原或抗体产生抗原抗体反应,则反应液中的散射光增加,透射光减少。将该变化作为吸光度或积分球浊度进行检测,由此测定被测样品中的抗原浓度等。

[0546] 另一方面,表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞的检测或测定中能够使用公知的免疫学检测法,优选使用免疫沉降法、免疫细胞染色法、免疫组织染色法或荧光抗体染色法等。

[0547] 作为免疫沉降法,使表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞等与本发明的双特异性抗体或其抗体片段反应后,加入蛋白G琼脂糖等具有与免疫球蛋白特异性结

合能力的载体,使抗原抗体复合体沉降。

[0548] 或者,也能够通过如下方法进行。首先,使本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段固相化于ELISA用96孔板,然后,用BSA-PBS封闭。然后,弃掉BSA-PBS,用PBS充分清洗后,与表达TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者的细胞或组织的溶解液反应。从充分清洗后的板上利用SDS-PAGE用样品缓冲液提取免疫沉降物,通过上述的蛋白质印迹法来检测。

[0549] 免疫细胞染色法或免疫组织染色法是指如下方法:使表达抗原的细胞或组织等与本发明的双特异性抗体反应,进而与施加了FITC等荧光标记、过氧化物酶等酶标记或生物素标记等的抗免疫球蛋白抗体或其结合片段反应后,将该标记可视化,利用显微镜进行观察,其中,为了使抗体的透过性良好,表达抗原的细胞或组织等有时用表面活性剂或甲醇等处理后再进行反应。另外,可以通过使荧光标记的抗体与细胞反应,通过利用流式细胞仪进行分析的荧光抗体染色法[Monoclonal Antibodies-Principles and practice,Third edition,Academic Press(1996)、单克隆抗体实验手册、Kodansha Scientific(1987)]进行检测。特别是本发明的双特异性抗体或该双特异性抗体片段可以通过荧光抗体染色法检测在细胞膜上表达的TfR和EGFR等细胞表面抗原的至少一者。

[0550] 另外,荧光抗体染色法中,在使用FMAT8100HTS系统(Applied Biosystems公司制)等的情况下,可以不分离所形成的抗体-抗原复合体与没有参与抗体-抗原复合体的形成的游离的抗体或抗原而测定抗原量或抗体量。

实施例

[0551] 以下,利用实施例具体说明本发明,但本发明不限于下述实施例。

[0552] [实施例1]可溶性人和猴TfR抗原以及可溶性人、猴EGFR抗原的制备

[0553] 1.人TfR和猴TfR的可溶性抗原的制备

[0554] 分别利用以下记载的方法制作在N末端添加有FLAG-Fc的人和猴TfR的细胞外结构域蛋白。将编码人TfR细胞外结构域的碱基序列示于序列编号1,将由该碱基序列推测的氨基酸序列示于序列编号2,将编码猴TfR细胞外结构域的碱基序列示于序列编号3,将由该碱基序列推测的氨基酸序列示于序列编号4。

[0555] (1)FLAG-Fc-人TfR和FLAG-Fc-猴TfR载体的制作

[0556] 基于人TfR基因序列(Genbank登录编号(Accession Number):NM_003234.2、序列编号5;将该基因所编码的氨基酸序列示于序列编号6)合成包含序列编号1所示的碱基序列的人TfR的细胞外结构域的基因片段。

[0557] 利用内切酶BamHI和KpnI消化包含FLAG-tag和人IgG的Fc区的INPEP4载体(Biogen-IDEA公司制),插入序列编号1所示的碱基序列,制作FLAG-Fc-人TfR表达载体。

[0558] 通过同样的方法,基于猴TfR的基因序列(序列编号7;将该基因所编码的氨基酸序列示于序列编号8)制作含有由序列编号3所示的碱基序列构成的猴TfR的细胞外结构域的基因片段的FLAG-Fc-猴TfR表达载体。

[0559] (2)FLAG-Fc-人TfR和FLAG-Fc-猴TfR蛋白质的制作

[0560] 使用FreeStyle(商标)293表达系统(Thermo Fisher公司制),将1-(1)中制作的FLAG-Fc-人TfR表达载体导入HEK293细胞进行培养,利用瞬时表达体系表达蛋白质。在载体导入5天后回收培养上清,用孔径0.22 μ m的膜过滤器(Millipore公司制)过滤。

[0561] 将该培养上清用蛋白A树脂(MabSelect、GE health care公司制)进行亲和纯化。将吸附于蛋白A的抗体用Dulbecco磷酸缓冲生理盐水[D-PBS(-)无Ca和Mg,液体;以下记作D-PBS(-)。Nacalai Tesque公司制]清洗,用100mM柠檬酸钠缓冲液(pH3.5)洗脱,回收包含2MTris-HCl(pH8.5)的试管中。

[0562] 然后,通过利用VIVASPIN(Sartorius stealin公司制)的超滤置换为D-PBS(-)后,用孔径0.22 μ m的膜过滤器Millex-Gv(Millipore公司制)过滤灭菌,制作FLAG-Fc-人TfR蛋白。用同样的方法,使用1-(1)中制作的FLAG-Fc-猴TfR表达载体制作FLAG-Fc-猴TfR蛋白。取得的蛋白质的浓度通过测定波长280nm的吸光度,并使用根据各蛋白质的氨基酸序列推测的吸光系数来计算。

[0563] 2. 人EGFR和猴EGFR的可溶性抗原的制备

[0564] 分别利用以下记载的方法制作在C末端添加有FLAG-Fc或GST的人或猴EGFR的细胞外结构域蛋白。将编码人EGFR的信号序列和细胞外结构域的碱基序列示于序列编号9,将由该碱基序列推测的氨基酸序列示于序列编号10,将编码猴EGFR的信号序列和细胞外结构域的碱基序列示于序列编号11,将由该碱基序列推测的氨基酸序列示于序列编号12。

[0565] 基于人EGFR基因序列(Genbank登录编号:NM_005228.4、序列编号13;将该基因所编码的氨基酸序列示于序列编号14)合成由序列编号9所示的碱基序列构成的人EGFR的细胞外结构域的基因片段。同样合成由序列编号11所示的碱基序列构成的猴EGFR的细胞外结构域的基因片段。与1-(1)和(2)中记载的方法同样分别获得人和猴EGFR-FLAG-Fc蛋白和人和猴EGFR-GST蛋白。

[0566] 获得蛋白质的浓度通过测定波长280nm的吸光度,并使用从各蛋白质的氨基酸序列推测的吸光系数来计算。

[0567] [实施例2]人或猴TfR膜表达CHO细胞的制作

[0568] 将序列编号5所示的人TfR基因克隆到pKANTEX(记载于美国专利第6423511号说明书中),得到膜表达用人TfR表达载体pKANTEX-人TfR全长。

[0569] 将取得的表达载体pKANTEX-人TfR全长导入CHO细胞进行培养,用瞬时表达体系表达蛋白质。基因导入后,进行单细胞克隆,得到人TfR/CHO细胞。

[0570] 利用同样的方法克隆序列编号7所示的猴TfR基因,得到猴TfR/CHO细胞。

[0571] 羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(Carboxyl fluorescein succinimidyl ester, CFSE)染色后的细胞的制备根据以下的方法进行。将人TfR/CHO细胞、猴TfR/CHO细胞用0.02% EDTA-PBS(Nacalai Tesque公司)剥离并回收后,以最终浓度成为0.2 μ M的方式添加CFSE(Sigma-Aldrich公司),在室温下反应10分钟后,添加含有10%胎牛血清的D-PBS(-)(Nacalai Tesque公司),在37℃下孵育10分钟。将反应后的细胞离心分离后,用含有0.02% EDTA、0.05%NaN₃的1%BSA-PBS(Nacalai Tesque公司)清洗。将所得到的CFSE染色细胞用Cell Banker 1(日本全药工业株式会社)冷冻保存。

[0572] [实施例3]对人抗体产生动物的免疫

[0573] 为了获得针对人TfR、人EGFR的单克隆抗体,对人抗体产生动物利用由佐剂混合的FLAG-Fc-人TfR、人EGFR-FLAG-Fc共计免疫4~5次。从被免疫动物中回收血清,利用ELISA分析对人TfR、人EGFR的结合活性,确认了抗体效价上升。

[0574] [实施例4]抗TfR抗体的取得

[0575] 1.轻链为A27的TfR免疫人抗体M13噬菌体文库的制作

[0576] ()使用RNeasy Mini kit (QIAGEN公司制) 从由免疫动物得到的脾脏细胞或未梢血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell;PBMC)提取RNA,用SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech公司制)扩增cDNA,再用PCR扩增VH基因片段。将该VH基因片段和作为人的抗体种系(germ-line)序列的由序列编号15所示的碱基序列构成的A27序列插入噬菌粒pCANTAB 5E(Amersham Pharmacia公司制),转化到大肠杆菌TG1 (Lucigen公司制),从而得到质粒。

[0577] 需要说明的是,A27序列编码由序列编号16所示的氨基酸序列构成的人抗体的轻链可变区(VL),该VL的CDR1、2和3(分别也表示为LCDR1、2和3)的氨基酸序列分别由序列编号17、18和19表示。

[0578] 通过使所得到的质粒感染VCSM13抗干扰辅助噬菌体(Interference Resistant Helper Phage) (Agilent Technologies公司制),得到具有由A27序列构成的VL基因且VH基因被文库化的TfR免疫人抗体M13噬菌体文库。

[0579] 2.轻链为A27的抗TfR单克隆抗体的取得

[0580] 使用该TfR免疫人抗体M13噬菌体文库,通过下述的噬菌体展示法,取得具有被A27编码的VL的抗TfR单克隆抗体。

[0581] (1)使用蛋白质固相化试管的蛋白质淘选

[0582] 使将人TfR(BBI Solutions公司制)固相化并使用SuperBlock封闭缓冲液(Blockig Buffer) (Thermo Fisher公司制)封闭没有结合人TfR的部位的MAXISORP STARTUBE(NUNC公司制)与人抗体M13噬菌体文库在室温下反应1~2小时,利用D-PBS(-)和含有0.1%Tween20的PBS(以下记作PBS-T.和光纯药工业株式会社制)分别清洗3次后,用0.1M的Gly-HCl(pH2.2)将噬菌体洗脱,将洗脱液用2M的Tris-HCl(pH8.5)中和。

[0583] (2)膜表达人TfR或猴TfR表达CHO细胞淘选

[0584] 使人抗体M13噬菌体文库与CHO细胞在冰上反应30分钟,回收通过离心分离去除了细胞的上清,从而制备与CHO细胞反应后的噬菌体溶液。使该噬菌体液与实施例1中取得的经CFSE染色的人TfR/CHO在冰上反应30分钟~1小时后,通过离心分离去除上清。用含有5%胎牛血清、1mM的EDTA和0.1%NaN₃的D-PBS(-)(以下记作SM缓冲液)反复清洗多次后,加入抗M13抗体(GE health care公司)作为一抗,在冰上反应30分钟。通过离心分离去除上清,反复进行多次利用SM缓冲液的清洗后,加入APC标记Goat抗mouse IgG(H+L)抗体(Southern Biotech公司)作为二抗,在冰上反应30分钟。通过离心分离去除上清,反复进行多次利用SM缓冲液的清洗后,添加7-氨基放线菌素D(7-aminoactinomycin D,AAD)(BD Biosciences公司),在冰上反应10分钟后,用流式细胞仪(BD Bioscience公司、FACS AriaIII)进行7-AAD阴性的活细胞组分(同时是CFSE阳性的抗原表达细胞组分)的分选。需要说明的是,在确认到抗原表达细胞结合噬菌体的浓缩的一轮中,除了上述以外,还分选APC阳性的噬菌体结合组分。利用0.1M的Gly-HCl(pH2.2)将噬菌体从分选得到的细胞洗脱,将洗脱液用2M的Tris-HCl(pH8.5)中和。

[0585] 使用猴/CHO细胞的细胞淘选也用同样的方法进行。使洗脱的噬菌体感染TG1感受态细胞,并扩增噬菌体。反复进行上述(1)或(2)的操作2次或3次,将提呈与人TfR特异性结合的scFv的噬菌体浓缩。使浓缩的噬菌体感染TG1,接种于SOBAG板(2.0%胰蛋白胨、0.5%

酵母提取物 (Yeast extract)、0.05%NaCl、2.0%葡萄糖、10mM MgCl₂、100μg/mL氨苄西林、1.5%琼脂),形成集落。

[0586] 将集落植菌培养后,感染VCSM13抗干扰辅助噬菌体,再次培养,由此得到单克隆的噬菌体。使用所得到的单克隆的噬菌体,用流式细胞法 (Millipore公司、Guava Easy Cyte HT) 选择与人和猴TfR均结合的克隆。

[0587] 流式细胞法是在实施例2的人或猴TfR/CHO中加入噬菌体克隆而进行的。在4℃下反应30分钟后,将各孔用PBS-T清洗3次。

[0588] ELISA是为了确认单克隆化的噬菌体的TfR反应性而进行的。具体而言,通过以下方式进行:在固相化有抗原蛋白的96孔免疫板 (Nunc公司) 中添加用含有10%Block Ace (大日本制药株式会社公司制) 的PBS-T稀释后的噬菌体溶液,在室温下反应1小时后,用PBS-T清洗,添加用1%BSA-PBS稀释后的利用辣根过氧化物酶标记的抗M13抗体 (GE health care公司制),在室温下反应1小时。将板用PBS-T清洗后,加入TMB显色底物液 (DAKO公司制),在室温下反应,加入2N的HCl溶液停止显色反应,用酶标仪 (Emax;Molecular Devices公司) 测定波长450nm (参照波长570nm) 处的吸光度。

[0589] 对与人和猴TfR均结合的克隆,进行序列分析,取得具有被A27编码的VL的抗TfR抗体。表1示出编码取得的各抗TfR抗体的VH的全碱基序列和由该碱基序列推测的氨基酸序列、以及VH的CDR1~3 (以下有时记作HCDR1~3) 的氨基酸序列的序列编号。需要说明的是,表中的“-”表示没有记载序列信息。

[0590] [表1]

[0591] 抗TfR抗体VH的序列编号

[0592]

克隆名称	PSM4072	R327	TfR1071	TfR4016	cyno186	cyno292	TfR1007	cyno163	T14
VH的碱基序列	20	25	30	35	40	45	-	-	-
VH的氨基酸序列	21	26	31	36	41	46	50	51	52
HCDR1的氨基酸序列	22	27	32	37	42	47	107	-	-
HCDR2的氨基酸序列	23	28	33	38	43	48	108	-	-
HCDR3的氨基酸序列	24	29	34	39	44	49	109	-	-

[0593] 3. 轻链为A27以外的序列的抗TfR抗体的取得

[0594] (1) 利用细胞融合制作杂交瘤

[0595] 将小鼠骨髓瘤细胞细胞株P3-U1 (P3X63Ag8U.1、ATCC CRL-1597) 用S-Clone克隆培养基 (EIDIA公司) 培养以进行无血清驯化后,用作细胞融合的母株。无菌地采集被免疫动物的脾脏,用红细胞裂解缓冲液 (RED BLOOD CELL LYSING BUFFER) (Sigma-Aldrich公司) 溶血后,用PBS清洗2次,以脾细胞与P3-U1的细胞数成为脾脏细胞:P3-U1=8:1的方式混合,离心分离 (1200rpm、5分钟)。

[0596] 将所得到的沉淀组分的细胞群充分分散后,一边搅拌一边在37℃下添加1g聚乙二醇-1000 (PEG-1000、纯正化学株式会社)、1mL MEM培养基 (Nacalai Tesque公司) 和0.35mL 二甲基亚砷 (Sigma-Aldrich公司) 的混合液0.5mL,每1分钟向其中加入1mL MEM培养基5次后,加入MEM培养基,使总量达到50mL。

[0597] 将细胞悬浊液离心分离 (900rpm、5分钟),使所得到的沉淀组分的细胞缓慢分散后,利用添加有HAT SUPPLEMENT (Thermo Fisher Scientific公司) 的S-Clone克隆培养基以脾脏细胞的浓度成为 1.5×10^7 细胞/9mL的方式悬浮。在96孔培养用板中事先以100μL/孔

分注添加了HAT的克隆培养基,向其中将细胞悬浊液各分注100 μ L/孔,用CO₂培养箱(5%CO₂、37℃)培养8~10天。

[0598] (2) 杂交瘤的筛选

[0599] 利用ELISA评价杂交瘤培养上清所含的抗体对TfR的结合活性。被测样品使用杂交瘤培养上清,测定通过与上述2.(2)同样的程序来实施。

[0600] (3) 杂交瘤的亚克隆

[0601] 对筛选为阳性的孔的细胞进行亚克隆,在克隆培养基中培养约7~10天。

[0602] (4) 抗体可变区基因的克隆和测序

[0603] 使用Rneasy mini kit (Qiagen公司)从克隆出的杂交瘤中提取总RNA,通过5'-RACE法扩增抗体基因。RACE用cDNA的合成中使用SMARTer RACE Kit (Clontech公司)。将扩增的抗体可变区片段使用TOPO TA cloning (Invitrogen公司)进行克隆,确认该DNA片段的碱基序列。

[0604] 将由对所取得的抗TfR抗体中的克隆2230的重链和轻链的可变区进行编码的碱基序列所推测的氨基酸序列分别示于序列编号53和序列编号54。

[0605] 4. 表达所取得的抗TfR抗体的载体的构建

[0606] 分别制作整合有取得的抗TfR抗体的基因的可溶性IgG的表达载体。首先,将编码相同的VL的A27基因亚克隆到N5KG4PE (IDEC Pharmaceuticals) 或N5KG4PE R409K (记载在国际公开第2006/033386号中)。

[0607] 然后,将VH基因亚克隆到N5KG4PE或N5KG4PE R409K,得到具有人IgG4PE的恒定区或人IgG4PE R409K的恒定区的抗TfR单克隆抗体的表达载体。

[0608] 另外,为了将国际公开第2012/153707号中记载的作为TfR中和抗体的抗TfR单克隆抗体TfR434和TfR435作为抗TfR抗体的阳性对照抗体使用,制作表达载体。将TfR434和TfR435的VH的氨基酸序列示于序列编号55和56,将VL的氨基酸序列示于序列编号57。

[0609] 合成编码TfR435的VH和VL的基因,亚克隆到N5KG1载体(国际公开第2003/033538号中记载),得到具有人IgG1的恒定区的抗TfR单克隆抗体TfR435的表达载体。

[0610] 以下,单克隆抗体以克隆名称记载。

[0611] [实施例5] 针对细胞表面抗原的抗体的取得

[0612] (1) EGFR抗体的制作

[0613] 1. EGFR免疫人抗体M13噬菌体文库的制作

[0614] 通过与实施例4的1.同样的方法,得到具有由A27序列构成的VL基因或抗TfR抗体2230的VL基因且VH基因被文库化的EGFR免疫人抗体M13噬菌体文库。

[0615] 2. 抗EGFR抗体的取得

[0616] 使用使实施例1中取得的人EGFR-Fc或猴EGFR-Fc固相化且使用SuperBlock封闭缓冲液(Thermo Fisher公司制)封闭了没有结合抗原的部位的MAXISORP STARTUBE (NUNC公司制)、和EGFR免疫人抗体M13噬菌体文库,通过与实施例4的2同样的方法,将提呈与人EGFR和猴EGFR特异性结合的scFv的噬菌体单克隆化。

[0617] 将该操作反复3次~5次,使提呈与人和猴EGFR-Fc特异性结合的scFv的噬菌体浓缩。

[0618] 特异性识别人和猴EGFR-Fc的克隆的确认利用ELISA法进行。ELISA是使实施例1的

人或猴EGFR-Fc固相化,通过与实施例4同样的方法进行。

[0619] 从与人和猴EGFR均结合的克隆中选择亲和性与西妥昔单抗(Cetuximab)为同等程度高的以下的3个克隆。进行该3个克隆的序列分析,取得具有被A27编码的VL的抗EGFR抗体。用与表1同样的表示方法将各抗EGFR抗体的VH的序列信息表示于表2。

[0620] [表2]

[0621] EGFR抗体的VH的序列信息

[0622]		E08	E12	E17
	VH的碱基序列	序列编号58	序列编号63	序列编号68
	VH的氨基酸序列	序列编号59	序列编号64	序列编号69
	HCDR1的氨基酸序列	序列编号60	序列编号65	序列编号70
	HCDR2的氨基酸序列	序列编号61	序列编号66	序列编号71
	HCDR3的氨基酸序列	序列编号62	序列编号67	序列编号72

[0623] 同样地取得具有与抗TfR抗体2230相同的VL的抗EGFR抗体。将由对所取得的抗EGFR抗体中的克隆KME07、KME09和KME11的重链的可变区进行编码的碱基序列推测的氨基酸序列分别示于序列编号73、序列编号74和序列编号75。

[0624] 利用与实施例4同样的方法分别制作整合了所取得的抗EGFR抗体的基因的可溶性IgG的表达载体。恒定区使用人IgG4PE或人IgG4PE R409K的恒定区。

[0625] 另外,作为抗EGFR抗体的阳性对照抗体,制作具有国际公开第1996/040210号中记载的抗EGFR单克隆抗体C225的可变区的抗体(以下记作Cetuximab)。将西妥昔单抗的VH的氨基酸序列示于序列编号76。另外,将西妥昔单抗的VL的氨基酸序列示于序列编号77。

[0626] 合成编码西妥昔单抗的VH和VL的基因,通过与实施例4同样的方法亚克隆到N5KG1载体,得到具有人IgG1的恒定区的西妥昔单抗的表达载体。

[0627] (2) 抗磷脂酰肌醇聚糖-3(Glypican-3)抗体抗体的制作

[0628] 制作具有国际公开第2012/145469号中记载的抗Glypican-3单克隆抗体HN3的可变区的抗体。将HN3的VH的氨基酸序列示于序列编号78。合成编码HN3的VH的基因,利用与实施例4同样的方法亚克隆到N5KG4PE R409K,得到具有人IgG4PE R409K的恒定区的抗Glypican-3单克隆抗体HN3的表达载体。

[0629] [实施例6] 与TfR和细胞表面抗原结合的双特异性抗体的表达载体的构建

[0630] 利用以下的方法制作具有图1(A)中记载的结构的与人和猴TfR以及人和猴EGFR结合的双特异性抗体。在图1(A)~(C)中,将N末端侧多肽所含的VH称为VH1,将C末端侧的IgG部分所含的VH称为VH2。双特异性抗体的形状采用国际公开第2009/131239号中记载的形状。

[0631] VH1和VH2是实施例4或实施例5中得到的抗体的VH的任一者,VH1和VH2是针对不同抗原的抗体的VH。

[0632] 在以下的记载中,在N末端侧多肽与IgG型抗体经由接头结合的情况下,将编码该接头的氨基酸序列的基因称为接头基因。

[0633] 作为由以下的步骤制作的双特异性抗体的接头序列,使用将IgG4的铰链区的一部分(ES(序列编号79)、ESKYG(序列编号80)和ESKYGPP(序列编号81)等)连结而成的序列、或者GS接头(GGGGS(序列编号82)或GGGGS的3次重复序列)。另外,作为IgG部分的重链恒定区,

使用IgG4PE或国际公开第2006/033386号记载的IgG4PE R409K的重链恒定区(将碱基序列示于序列编号83,将氨基酸序列示于序列编号84)。

[0634] 以下,将N末端侧多肽包含抗EGFR抗体的可变区且IgG部分包含抗TfR抗体的可变区的双特异性抗体记作EGFR-TfR双特异性抗体。另外,将例如包含抗EGFR抗体E12的可变区和抗TfR抗体TfR1071的可变区的EGFR-TfR双特异性抗体记作E12-TfR1071。同样地,将N末端侧多肽包含抗TfR抗体的可变区且IgG部分包含抗EGFR抗体的可变区的双特异性抗体记作TfR-EGFR双特异性抗体。

[0635] 另外,将例如包含抗TfR抗体TfR1071的可变区和抗EGFR抗体E12的可变区的TfR-EGFR双特异性抗体记作TfR1071-E12。将N末端侧多肽与IgG部分之间具有接头的抗体记作EGFR-接头-TfR双特异性抗体。

[0636] 另外,将例如具有抗EGFR抗体E08的可变区、抗TfR抗体TfR1071的可变区和作为接头的ES的EGFR-接头-TfR双特异性抗体记作E08-ES-TfR1071。需要说明的是,在本表述方法中,GS接头(序列编号82)记作GS,将GS接头重复三次的序列记作GS3。

[0637] 将该双特异性抗体的名称、结构、接头、该抗体制作中使用的抗TfR抗体的克隆名称和针对细胞表面抗原的抗体的克隆名称表示于表3。需要说明的是,表中的“-”表示没有使用接头而无相应序列。

[0638] [表3]

[0639]

双特异性抗体的名称	结构	VH1	接头	VH2
E08-PSM4072	图1(A)	E08	-	PSM4072
E08-R327	图1(A)	E08	-	R327
E08-TfR1071	图1(A)	E08	-	TfR1071
E08-TfR4016	图1(A)	E08	-	TfR4016
E08-cyno186	图1(A)	E08	-	cyno186
E08-cyno292	图1(A)	E08	-	cyno292
E08-T14	图1(A)	E08	-	T14
E08-ES-TfR1071	图1(A)	E08	ES	TfR1071
E08-ES-cyno186	图1(A)	E08	ES	cyno186
E08-ESKYG-TfR1071	图1(A)	E08	ESKYG	TfR1071
E08-ESKYG-cyno186	图1(A)	E08	ESKYG	cyno186
E08-ESKYGPP-TfR1071	图1(A)	E08	ESKYGPP	TfR1071
E08-ESKYGPP-cyno186	图1(A)	E08	ESKYGPP	cyno186
PSM4072-E08	图1(A)	PSM4072	-	E08
R327-E08	图1(A)	R327	-	E08
TfR1071-E08	图1(A)	TfR1071	-	E08
TfR4016-E08	图1(A)	TfR4016	-	E08
cyno186-E08	图1(A)	cyno186	-	E08
cyno292-E08	图1(A)	cyno292	-	E08
T14-E08	图1(A)	T14	-	E08
E12-PSM4072	图1(A)	E12	-	PSM4072

E12-TfR1007	图1(A)	E12	-	TfR1007
E12-cyno163	图1(A)	E12	-	cyno163
E12-R327	图1(A)	E12	-	R327
E12-TfR1071	图1(A)	E12	-	TfR1071
E12-TfR4016	图1(A)	E12	-	TfR4016
E12-cyno186	图1(A)	E12	-	cyno186
E12-cyno292	图1(A)	E12	-	cyn0292
E12-T14	图1(A)	E12	-	T14
KME07-2230	图1(A)	KME07	-	2230
KME09-2230	图1(A)	KME09	-	2230
KME11-2230	图1(A)	KME11	-	2230
HN3-TfR1071	图1(B)	HN3	-	TfR1071
HN3-GS-TfR1071	图1(B)	HN3	GS	TfR1071
HN3-GS3-TfR1071	图1(B)	HN3	GS3	TfR1071

[0640] 1.轻链相同型双特异性抗体的表达载体的制作

[0641] 利用以下记载的方法制作表3所记载的双特异性抗体中图1(A)所示的轻链相同型双特异性抗体表达载体。

[0642] 首先,将编码相同的VL的A27基因亚克隆到N5KG4PE R409K(国际公开第2006/033386号中记载)。

[0643] 然后,将编码与人IgG4的CH1相同的氨基酸序列且变更了使用密码子的基因(序列编号85)作为模板,使用KOD-Plus-Ver.2(TOYOBO公司),通过PCR扩增该基因片段。用同样的方法,以实施例4或实施例5中取得的抗体的VH基因作为模板,扩增VH2部分的基因片段。

[0644] 将这两个基因片段亚克隆到实施例4或实施例5所取得的抗体的表达载体的VH1与IgG部分的CH1之间,得到双特异性抗体表达载体。

[0645] 2.轻链非相同型双特异性抗体的表达载体的制作

[0646] 对表3所记载的双特异性抗体中的轻链非相同型双特异性抗体,利用以下记载的方法制作表达载体。

[0647] 图1(B)所示的抗体由一种载体构成。首先,将编码VL的A27基因亚克隆到包含编码人IgG4PE R409K的恒定区的碱基序列的pCI-0tCAG-G4PE R409K载体。

[0648] 将本载体记作pCI-A27。pCI-0tCAG_hG4PE R409K载体所具有的恒定区序列是将人IgG4的重链恒定区的EU-index中的第228位的Ser残基取代为Pro、将第235位的Leu残基取代为Glu且将第409位的Arg残基取代为Lys的IgG4突变体[以下记作IgG4PE R409K(国际公开第2006/033386号)]的重链恒定区。

[0649] 需要说明的是,这些载体是以Promega公司的pCI载体为相同主骨架,导入使人抗体基因表达所必需的限制酶位点,并通过全基因合成而制作的载体。

[0650] 然后,将实施例5中取得的抗体的VH基因、具有接头的情况下将接头的基因、实施例4中取得的抗TfR抗体的VH基因连结而成的多肽的碱基序列进行全基因合成得到的序列亚克隆到pCI-A27,得到表达载体。

[0651] [实施例7]与TfR结合的单克隆抗体、与细胞表面抗原结合的单克隆抗体和双特异

性抗体的制备

[0652] 利用下述的方法使实施例4至实施例6中亚克隆到抗体表达载体得到的抗TfR单克隆抗体、针对细胞表面抗原的单克隆抗体、和具有针对两抗原的结合部位的双特异性抗体分别表达、纯化。

[0653] 将抗体表达载体通过Expi293 (商标) 表达系统 (Expression System) (Thermo Fisher公司) 在Expi293细胞中进行共基因导入, 在12 ~ 16小时后添加转染增强剂 (Transfection Enhancer), 利用瞬时表达体系表达抗体或双特异性抗体。

[0654] 在载体导入4 ~ 7天后回收培养上清, 用孔径0.22 μ m的膜过滤器 (Millipore制) 过滤后, 用蛋白A树脂 (MabSelect SuRe, GE health care公司) 将抗体进行亲和性纯化。使用D-PBS (-) 作为清洗液。将吸附于蛋白A的抗体或双特异性抗体用100mM柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5) 洗脱, 回收到包含2M的Tris-HCl缓冲液 (pH8.5) 的试管中。

[0655] 然后, 使用VIVASPIN (Sartrius stealin公司制) 浓缩, 使用Nap柱 (GE health care公司制) 将缓冲液置换成D-PBS (-)。此外, 在将单体纯化的情况下, 使用AKTA FPLC (GE health care公司制) 和Superdex High-performance Columns (GE health care公司制), 从该抗体或双特异性抗体溶液中分离制备单体组分。用AKTA系统孔径0.22 μ m的膜过滤器 (Millex-GV, MILLIPORE公司制) 过滤灭菌, 由此得到纯化抗体或纯化双特异性抗体。

[0656] 测定这样得到的抗体溶液或双特异性抗体溶液的波长280nm的吸光度, 使用由各抗体或双特异性抗体的氨基酸序列推测的吸光系数算出纯化抗体或纯化双特异性抗体的浓度。

[0657] [实施例8]通过Biacore评价抗原对双特异性抗体的结合性

[0658] 为了确认实施例7中得到的EGFR-TfR双特异性抗体对人TfR和猴TfR以及人EGFR和猴EGFR各自的结合活性和物种交叉性, 使用实施例1中制作的FLAG-Fc-人TfR、FLAG-Fc-猴TfR、人EGFR-GST和猴EGFR-GST, 实施利用表面等离子共振法 (SPR法) 的结合性试验。作为测定仪器, 使用BiacoreT100 (GE health care公司制)。

[0659] 使用人类抗体捕获试剂盒 (Human Antibody Capture Kit) (GE health care公司制) 将抗人IgG抗体按照所附文件固定化于CM5传感器芯片 (GE health care公司制)。在流通池中以10 μ L/min的流速用时10秒钟添加制备为1 ~ 3 μ g/mL的被测双特异性抗体。

[0660] 然后, 将作为分析物的从1或9nM以5阶段进行3倍稀释的抗原蛋白质溶液 (用包含0.1% BSA的HBS-EP+ (GE health care公司制) 稀释) 分别以30 μ L/min的流速添加, 测定各双特异性抗体与分析物的结合反应2分钟、解离反应10分钟。

[0661] 测定通过单循环动力学法进行。将所得到的传感图 (Sensorgram) 使用Bia评价软件 (Evaluation Software) (GE health care公司制) 进行分析, 算出各抗体的动力学常数。

[0662] 将算出的各双特异性抗体对人和猴EGFR各自的解离常数[kd/ka=KD]以及对人抗原的解离常数除以对猴抗原的解离常数得到的值示于表4。表中的N/A表示没有测定。

[0663] [表4]

[0664]

	人 EGFR [nM]	猴 EGFR [nM]	人 EGFR[nM]/ 猴 EGFR[nM]	人 T f R [nM]	猴 T f R [nM]	人 T f R[nM]/ 猴 T f R[nM]
E08-TfR1071	0.13	0.15	0.87	5.79	12.0	0.48
E08-cyno186	N/A	N/A	N/A	1.56	1.97	0.79
E12-TfR1071	0.21	0.25	0.84	2.42	22.2	0.11
E12-cyno186	N/A	N/A	N/A	10.7	56.5	0.19
E17-TfR1071	0.31	0.67	0.46	4.09	26.6	0.15
E17-cyno186	N/A	N/A	N/A	4.02	5.39	0.75

[0665] 如表4所示,EGFR-TfR双特异性抗体对人TfR和猴TfR的 K_D 值为 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ M数量级。EGFR-TfR双特异性抗体对猴TfR的 K_D 值在对人TfR的 K_D 值的1/10~10倍之间,表明具有人TfR与猴TfR的物种交叉性。

[0666] 同样地,EGFR-TfR双特异性抗体对人EGFR和猴EGFR的 K_D 值为 10^{-9} M~ 10^{-10} M数量级。对猴EGFR的 K_D 值在对人EGFR的 K_D 值的1/10~10倍之间,表明具有人EGFR与猴EGFR的物种交叉性。

[0667] [实施例9]利用流式细胞仪测定癌细胞的抗原表达量和评价取得抗体的结合性

[0668] 按照以下的程序使用荧光激活细胞分选 (fluorescence activated cell sorting, FACS) 法对各种癌细胞株的各种抗原表达量进行评价。评价中使用PE标记抗人CD71抗体 (BD Pharmingen公司) 和AlexaFluor488标记抗EGFR抗体 (SantaCruz公司)。

[0669] 各种癌细胞株中的TfR和EGFR的表达量的评价如下进行。

[0670] 将OE21细胞以 1×10^6 cells/mL的浓度悬浮于含有0.1%NaN₃、1%FBS的D-PBS(-)的染色缓冲液 (Staining Buffer, SB) 中,以100 μ L/孔分注于96孔圆底板 (Falcon公司制)。离心分离 (2000rpm、4℃、2分钟) 后,除去上清,在团块 (pellet) 中加入PE标记抗人CD71抗体或AlexaFluor488标记抗EGFR抗体,在冰温下孵育30分钟。用SB清洗2次后,悬浮于SB,用流式细胞仪FACS CANTO II (BD公司制) 测定各细胞的荧光强度。同样地分别评价T.Tn细胞、U-937细胞、HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的TfR表达。

[0671] 同样地,也评价HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的GPC3的表达量。具体而言,与上述同样制备细胞,作为一抗使用HN3抗体后,加入Alexa Fluor (注册商标) 488山羊抗人IgG (H+L) (Molecular Probes公司) 作为二抗,在冰温下孵育30分钟,用同样的方法测定荧光强度。

[0672] 阴性对照使用Mol Immunol. 1996 Jun; 33 (9) : 759-68. 中记载的编码DNP-1抗体的VL和VH (GenBank登录编号: VL U16688、VH U116687) 的载体,使用根据国际公开第2006/033386号的实施例5记载的方法所制作的IgG4抗体R409K突变体 (以下记作抗DNP抗体) 和PBS。

[0673] 图2(A)~(C)分别表示利用流式细胞仪评价OE21细胞、T.Tn细胞和U-937细胞中的EGFR的表达量而得到的结果。另外,图2(D)~(F)分别表示利用流式细胞仪评价OE21细胞、T.Tn细胞和U-937细胞中的TfR的表达量而得到的结果。如图2所示,OE21细胞为EGFR高表达,T.Tn细胞为EGFR中表达,U-937细胞为EGFR低表达。

[0674] 图3(A)~(C)分别表示利用流式细胞仪评价HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的GPC3的表达量而得到的结果。另外,图3(D)~(F)分别表示利用流式细胞仪评价HepG2细胞、HuH-7细胞和HLE细胞中的TfR表达量而得到的结果。如图3所示,HepG2细胞为GPC3高表达,HuH-7细胞为GPC3中表达,HLE细胞为GPC3阴性。另外,HepG2细胞、HuH-7细胞、HLE细胞均为

EGFR低表达。

[0675] 如图2和图3所示,癌细胞株中的TfR的表达在所有细胞株中均大致不变,为低表达至中表达。

[0676] 然后,利用流式细胞法确认实施例4和实施例5中得到的抗TfR抗体和抗EGFR抗体对OE21细胞的结合性。图4(A)~(I)分别表示E08、E12、E17、KME07、KME09、KME11、TfR1071、2230和T14的结果。

[0677] 其结果,抗EGFR抗体中,仅对KME11没有确认到对OE21细胞的结合。如实施例5中所记载,KME11被选择作为与可溶性EGFR蛋白结合的抗体,但根据上述结果显示,其不与细胞表面的膜型EGFR结合。另外,抗TfR抗体中仅对T14没有确认到对OE21细胞的结合。如实施例4中所记载,T14通过ELISA被选择作为与可溶性TfR蛋白结合的抗体,但根据上述结果显示,其不与细胞表面的膜型TfR结合。

[0678] [实施例10]抗TfR抗体的增殖抑制活性的评价

[0679] 以对于癌细胞株的增殖抑制活性为指标,以如下评价实施例4中得到的TfR单克隆抗体的增殖抑制活性。

[0680] 将 1×10^3 cells的OE21细胞接种于平底96孔板(Falcon公司制),以终浓度成为 $1 \mu\text{g/ml}$ 的方式添加由包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制)稀释的被测抗体,在 37°C 、5.0%二氧化碳气体下培养4~6天后,添加CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力测定试剂盒(Luminescent CellVialbility Assay)(Promega公司),用酶标仪(1420ARVO多标签计数器;WALLAC公司制)测定荧光强度。在各条件下,利用6个独立的孔进行评价,算出平均值。所得到的荧光强度的值反映各孔的活细胞中ATP量。作为阴性对照,使用抗DNP抗体。

[0681] 另外,与被测抗体一同进入 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗人IgG多克隆抗体(Sigma公司)(以下也记作交联抗体)/,也在使被测抗体交联的条件下进行评价。将对各个抗体的评价结果表示于图5。将被测抗体中单克隆抗体单独不显示增殖抑制活性的抗体选择作为TfR非中和抗体。

[0682] 另外,如果添加交联抗体使被测抗体2分子交联,则确认到显示增殖抑制活性的克隆(TfR1071、TfR4016、cyno186、cyno292、2230)和不显示增殖抑制活性的克隆(PSM4072、TfR1007、cyno163)。

[0683] [实施例11]抗体对细胞表面抗原的增殖抑制活性的评价

[0684] 以对癌细胞株的增殖抑制活性作为指标,如下评价抗体对实施例5中得到的细胞表面抗原的增殖抑制活性。

[0685] 将 1×10^3 cells的OE21细胞接种于平底96孔板(Falcon公司制),添加由包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制)稀释成各种浓度的被测抗体,在 37°C 、5.0%二氧化碳气体下培养4~6天后,添加CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力测定试剂盒(Promega公司),用酶标仪(1420ARVO多标签计数器;WALLAC公司制)测定荧光强度。在各条件下,利用3个独立的孔进行评价,算出平均值。所得到的荧光强度的值反映各孔的活细胞中ATP量。作为阴性对照,使用抗DNP抗体。

[0686] 抗EGFR抗体的增殖抑制活性的评价中使用OE21细胞。将对OE21细胞的结果表示于图6。如图6所示,西妥昔单抗和克隆E08显示较强的增殖抑制活性,E17显示较弱的增殖抑制活性,克隆E12不显示增殖抑制活性。可以认为该结果反映各抗体的EGF中和活性。

[0687] [实施例12]双特异性抗体的增殖抑制活性的评价

[0688] 以对癌细胞株的增殖抑制活性作为指标,如下评价实施例6中得到的双特异性抗体的增殖抑制活性。

[0689] 将 1×10^3 cells的癌细胞接种于平底96孔板(Falcon公司制),添加由包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制)稀释成各种浓度的被测抗体,在37℃、5.0%二氧化碳气体下培养4~6天后,添加CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力测定试剂盒(Promega公司),用酶标仪(1420ARV0多标签计数器:WALLAC公司制)测定荧光强度。在各条件下,利用3个独立的孔进行评价,算出平均值。所得到的荧光强度的值反映各孔的活细胞中ATP量。作为阴性对照,使用抗DNP抗体。

[0690] 双特异性抗体的增殖抑制活性的评价中使用OE21细胞。将关于具有抗EGFR抗体E08的可变区的双特异性抗体、具有抗EGFR抗体E12的可变区的双特异性抗体、和具有抗TfR抗体2230的可变区的双特异性抗体的评价结果分别示于图7A~C。

[0691] 如图7A所示,将实施例10中利用交联抗体交联时具有增殖抑制活性的克隆(TfR1071等)的可变区配置于IgG部分侧,将抗EGFR抗体的可变区配置于N末端侧多肽侧时,显示强增殖抑制活性。此时,将IgG4的铰链区的氨基酸序列的一部分(ES、ESKYG或ESKYGPP)用作接头的情况也同样显示增殖抑制活性。另一方面,在N末端侧多肽包含抗TfR抗体的可变区的双特异性抗体几乎不显示增殖抑制活性。

[0692] 需要说明的是,如实施例9的结果所示,由于抗TfR抗体T14不与细胞表面的TfR反应,所以可以认为E08-T14和T14-E08所显示的增殖抑制活性纯粹来自源于E08的EGFR信号抑制活性(实施例11)。

[0693] 另外,如图7B所示,()与IgG部分包含即使用交联抗体交联也不显示增殖抑制活性的克隆(PSM4072、TfR1007和cyno163)的可变区的双特异性抗体相比,在IgG部分包含实施例10中利用交联抗体交联时显示增殖抑制活性的克隆(R327、TfR1071、TfR4016、cyno186和cyno292)的可变区的双特异性抗体的增殖抑制活性更强。

[0694] 关于具有抗TfR抗体2230的可变区的双特异性抗体,如图7C所示,KME07-2230、KME09-2230、KME11-2230显示增殖抑制活性。如实施例9所示,KME11不与细胞上的EGFR结合,由此表明,双特异性抗体KME11-2230不依赖于EGFR而发挥细胞增殖抑制活性。具有这样的特性的克隆可能会对骨髓细胞等EGFR阴性且TfR阳性的正常细胞存在毒性。

[0695] 根据以上的结果显示,在IgG部分具有R327、TfR1071、TfR4016、cyno186、cyno292这样的单独不显示增殖抑制活性,如果交联则显示增殖抑制活性的抗TfR抗体的可变区的双特异性抗体细胞表面抗原选择性地显示强增殖抑制活性。另外,显示双特异性抗体的增殖抑制活性不受接头有无的影响。

[0696] 接下来,为了验证来自EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性和EGFR表达量的关系,使用EGFR表达量不同的细胞株评价实施例6中得到的双特异性抗体E12-TfR1071的增殖抑制活性。根据实施例9的结果,作为EGFR高表达的细胞,使用OE21细胞,作为中表达的细胞,使用T.Tn细胞,作为低表达的细胞,使用U-937细胞。如图8A~C所示,E12-TfR1071对OE21细胞显示较强的增殖抑制活性,对T.Tn细胞显示中等程度的增殖抑制活性,但对U-937细胞不显示增殖抑制活性。由此可知,E12-TfR1071依赖于EGFR表达量地显示增殖抑制活性。

[0697] 各种GPC3-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性的评价中使用HepG2细胞。如图9所示,HN3-TfR1071、HN3-GS-TfR1071和HN3-GS3-TfR1071显示非常强的增殖抑制活性。

[0698] 为了验证来自GPC3-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性和GPC3表达量的关系,使用GPC3表达量不同的细胞株,用与实施例10同样的方法评价实施例6中得到的双特异性抗体HN3-TfR1071的增殖抑制活性。

[0699] 将如实施例9所示那样使用HepG2细胞作为GPC3高表达的细胞的结果表示于图10A,将使用HuH-7细胞作为中表达的细胞的结果表示于图10B,将使用HLE细胞作为阴性的细胞的结果表示于图10C。如图10A~C所示,HN3-TfR1071对GPC3高表达的HepG2细胞显示较强的增殖抑制活性,对GPC3中表达的HuH-7细胞显示中等程度的增殖抑制活性,但对GPC3阴性的HLE细胞不显示增殖抑制活性。由此可知,HN3-TfR1071依赖于GPC3表达量地显示增殖抑制活性。

[0700] 另外还表明,即使对于EGFR以外的细胞表面抗原,在IgG部分具有抗TfR抗体的可变区的双特异性抗体也依赖于细胞表面抗原地显示较强的细胞增殖抑制活性。

[0701] [实施例13]抗TfR抗体和双特异性抗体对TfR和转铁蛋白的结合抑制活性

[0702] 为了查明双特异性抗体对癌细胞的增殖抑制活性的作用机理,使用流式细胞仪如下评价EGFR-TfR双特异性抗体是否抑制癌细胞上的TfR与转铁蛋白的结合。

[0703] 将 1×10^6 cells的OE21细胞在U底96孔板(Falcon公司制)中接种于包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制),添加10 μ g/ml的被测抗体,在冰上静置1小时后,添加Alexa Fluor488标记小鼠转铁蛋白(Jackson ImmunoResearch公司),再在冰上静置1小时。用SB清洗2次后,悬浮于SB,与实施例9同样地用流式细胞仪测定各细胞的荧光强度。

[0704] 图11(A)~(D)中分别表示西妥昔单抗、TfR1071、E08-TfR1071、E12-TfR1071和TfR435的结果。其结果,阳性对照的TfR中和抗体TfR435抑制转铁蛋白与TfR的结合,但TfR抗体TfR1071以及EGFR-TfR双特异性抗体E08-TfR1071和E12-TfR1071均与阴性对象的西妥昔单抗同样,不抑制转铁蛋白与TfR的结合。

[0705] 根据该结果表明,本发明的EGFR-TfR双特异性抗体不具有TfR中和活性,不抑制细胞表面上的TfR与转铁蛋白的结合。

[0706] [实施例14]EGFR-TfR双特异性抗体的药效发挥机制验证(细胞内EGFR量、TfR量、EGFR下游信号)

[0707] 为了查明双特异性抗体对癌细胞的增殖抑制活性的作用机理,通过蛋白质印迹法如下评价向癌细胞添加EGFR-TfR双特异性抗体时的EGFR的下游信号和对TfR蛋白质的量的影响。

[0708] 将 1×10^6 cells的OE21细胞在平底6孔板(Falcon公司制)中接种于包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制),添加被测抗体,在37℃、5.0%二氧化碳气体下培养24小时。然后,在冰上静置,用PBS(-)清洗1次后,添加含有蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物(Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail)(CST Japan公司)的RIPA缓冲液(Thermo Fisher公司),使用细胞刮刀(公司)回收溶解液。

[0709] 将回收的溶解液离心分离(15000rpm、4℃、5分钟)后,回收上清,使用上清的一部分,利用Pierce 660nm Protein Assay Kit(Thermo Fisher公司)对上清中的蛋白质浓度进行定量。在上清中添加试样缓冲液(SDS-PAGE用、6倍浓缩、含有还原剂。Nacalai Tesque

公司),将蛋白质10 μ g量的容量上样于聚丙烯酰胺成品凝胶(ATTO公司),用电泳装置(ATTO公司)泳动25~80分钟。

[0710] 作为电泳的标准,使用预染蛋白分子量标记III(Wako公司)。将进行过电泳后的凝胶与滤纸(ATTO公司)、膜(ATTO公司)一起放置于转印仪(Blotter)(ATTO公司),对每1片凝胶以125mA进行1小时封闭。封闭后的膜利用封闭缓冲液(PIERCE公司)在室温振荡1小时或在4℃下振荡过夜。

[0711] 将各种蛋白质的一抗(生物素化抗Akt抗体、生物素化抗Phospho-Akt抗体、生物素化抗EGFR抗体、生物素化抗Phospho-EGFR抗体和兔抗CD71抗体;均为Cell Signaling Trechnology公司)分别添加至膜,在室温振荡1小时或在4℃下振荡过夜。

[0712] 用TBS-T(Wako公司)清洗3次后,添加针对各一抗的二抗(Streptoavidin抗体-HRP或抗兔IgG抗体-HRP;Cell Signaling Trechnology公司),在室温下振荡1小时。用TBS-T清洗3次后,添加ECL Prime Western Blotting Detection Regent(GE health care公司),利用Amersham Imager 600(GE health care公司)检测。

[0713] 如图12所示,通过添加E08-TfR1071,磷酸化的EGFR和磷酸化的AKT与阳性对照的西妥昔单抗同样地减少,但添加E12-TfR1071时未见减少。另一方面,TfR蛋白质的量因添加E08-TfR1071和E12-TfR1071而减少,但西妥昔单抗时没有减少。

[0714] 根据该结果显示,E08-TfR1071具有EGFR信号抑制活性和TfR分解活性,E12-TfR1071没有EGFR信号抑制活性,仅有TfR分解活性。

[0715] [实施例15]EGFR-TfR双特异性抗体对TfR表达的影响评价

[0716] 为了查明双特异性抗体对癌细胞的增殖抑制活性的作用机理,如下评价EGFR-TfR双特异性抗体对细胞膜上的TfR表达量是否有影响。

[0717] 将 1×10^6 cells的OE21细胞在平底6孔板(Falcon公司制)中接种于包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制),添加10 μ g/ml的被测抗体,在37℃下孵育24小时。然后,与实施例9同样地剥离细胞,添加来自人血清的转铁蛋白(Transferrin from human serum),Alexa Fluor 488conjugate(Molecular Probes公司)5 μ g/mL,在4℃下静置30分钟,与实施例9同样地进行清洗后,用流式细胞仪以各细胞的荧光强度为指标测定在细胞表面上结合的转铁蛋白量。

[0718] 图13(A)~(D)中分别示出了西妥昔单抗、TfR1071抗体、E08-TfR1071双特异性抗体、和E12-TfR1071双特异性抗体的结果。如图13所示,在添加TfR1071抗体时,在细胞表面上结合的转铁蛋白的量没有减少,相对于此,添加EGFR-TfR双特异性抗体时在细胞表面上结合的转铁蛋白的量减少。

[0719] 根据这些结果显示,本发明的EGFR-TfR双特异性抗体的经由TfR的增殖抑制活性起因于分解癌细胞的TfR蛋白质以减少细胞表面上的TfR。

[0720] [实施例16]EGFR-TfR双特异性抗体对铁摄入的影响的评价

[0721] 为了确认EGFR-TfR双特异性抗体对癌细胞的增殖抑制活性是否与铁有关,如下进行了评价。

[0722] 将 1×10^3 cells的OE21细胞在平底96孔板(Falcon公司制)中接种于包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制),以最终浓度成为10 μ M的方式与被测抗体一起添加硫酸铁铵(Ferric Ammonium Sulfate)(Nacalai公司。以下记作FAS),在37℃、5.0%二

氧化碳气体下培养4~6天后,通过与实施例10同样的方法测定活细胞中ATP量。

[0723] 如图14所示,在未添加FAS的条件下,通过添加西妥昔单抗、TfR中和抗体TfR435或双特异性抗体E12-TfR1071,抑制了细胞的增殖。另一方面,如果添加FAS,则不影响西妥昔单抗的增殖抑制活性,但失去TfR中和抗体TfR435、双特异性抗体E12-TfR1071的增殖抑制活性。

[0724] 通过添加FAS,能够以不经由TfR的通路向细胞内供给铁。因此,在添加了FAS的条件下,伴随由TfR中和抗体引起的TfR抑制或由EGFR-TfR双特异性抗体引起的TfR分解产生的铁枯竭状态被消除,由TfR引起的增殖抑制活性丧失。另一方面,由EGFR的信号抑制引起的增殖抑制活性即便通过添加FAS供给铁也不会被消除。因此显示,E12-TfR1071的增殖抑制活性不是由于EGFR的信号抑制,而是与TfR中和抗体同样地,由于铁没有被供给到细胞内。

[0725] [实施例17]EGFR-TfR双特异性抗体和EGFR信号抑制剂的药效比较

[0726] 为了比较EGFR信号抑制和TfR抑制这2种增殖抑制机制间的活性,使用IncuCyte (Sartorius公司)进行了评价。

[0727] 将 1×10^3 cells的0E21细胞在平底96孔板(公司制)中接种于包含10% FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制),在该培养基中添加稀释成 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的被测抗体,IncuCyte中设置每隔2小时对每个孔拍摄3个视野,在 37°C 下孵育5天。进行培养基更换,添加 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的被测抗体,用同样的方法再孵育2天。然后,再进行培养基更换,不添加被测抗体,用同样的方法孵育7天。测定结束后,利用IncuCyte的软件分析各拍摄点处细胞在孔中所占的比例。

[0728] 如图15所示,在添加了西妥昔单抗的条件下,如果去除抗体,则增殖再次开始,但在添加了双特异性抗体E08-TfR1071或E12-TfR1071的条件下,去除抗体后,也未见细胞的重新增殖。在添加了作为TfR中和抗体的TfR435的条件下,去除抗体后,也没有确认到细胞增殖抑制活性,但可见细胞增殖再次开始的倾向,这表明诱导TfR的分解的E08-TfR1071或E12-TfR1071在去除双特异性抗体后仍保持强增殖抑制活性。

[0729] 根据该结果显示,TfR抑制相比于EGFR信号抑制,在除去抑制剂后仍保持细胞增殖抑制活性。

[0730] [实施例18]EGFR-TfR双特异性抗体对人骨髓细胞的影响

[0731] 为了确认双特异性抗体E08-TfR1071和E12-TfR1071对正常人骨髓细胞(EGFR阴性、TfR阳性)的影响,如下进行了评价。

[0732] 将7500 cells的人骨髓细胞(AllCells公司)在96孔板(Falcon公司制)中接种于StemSpan(商标)SFEMII(STEMCELL Technologies公司),添加被测抗体,在 37°C 、5.0%二氧化碳气体下培养5天后,添加CellTiter-Glo(注册商标)发光法细胞活力测定试剂盒(Promega公司),用酶标仪(1420ARVO多标签计数器:WALLAC公司制)测定荧光强度。在各条件下,利用2个独立的孔进行评价,算出平均值。所得到的荧光强度的值反映各孔的活细胞中ATP量。

[0733] 需要说明的是,为了将人骨髓细胞分化诱导为成熟的多能造血干细胞(Mature multipotential hematopoietic stem cell)(以下记作GEMM),培养时以最终浓度 $50 \text{ ng}/\text{mL}$ 添加重组人SCF(Peprotech公司),以最终浓度 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 添加人IL-3(Miltenyi Biotec公

司),以最终浓度20ng/mL添加人IL-6(Sigma-Aldrich公司),以最终浓度20ng/mL添加人GM-CSF(Miltenyi Biotec公司),以最终浓度20ng/mL添加G-CSF(Miltenyi Biotec公司),以最终浓度50ng/mL添加人Flt3-Ligand(Miltenyi Biotec公司),以最终浓度3U/mL添加促红细胞生成素(协和发酵麒麟公司),且以最终浓度30ng/mL添加人TPO(Miltenyi Biotec公司)。

[0734] 如图16所示,TfR中和抗体TfR435显示增殖抑制活性,相对于此,双特异性抗体E08-TfR1071和E12-TfR1071均不显示增殖抑制活性。

[0735] 根据该结果确认,本发明的双特异性抗体对表达TfR的正常骨髓细胞不显示增殖抑制活性。因此,可以期待本发明的双特异性抗体相比于TfR中和抗体,骨髓毒性降低。

[0736] [实施例19]氨基酸改变的EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性

[0737] 使用OE21细胞,通过与实施例12同样的方法评价TfR1071的VH的氨基酸改变的E12-TfR1071双特异性抗体的增殖抑制活性。首先,如下制作进行了氨基酸改变的EGFR-TfR双特异性抗体。作为进行了氨基酸改变(也称为氨基酸取代)的双特异性抗体的表达载体,按照实施例6中记载的方法,制作将E12-TfR1071的表达载体中编码取代前的氨基酸的碱基序列置换为编码取代后的氨基酸的碱基序列得到的载体。进行了氨基酸改变的双特异性抗体的表达和制备按照实施例7中记载的方法进行。作为进行了氨基酸改变的双特异性抗体,制作以下的抗体。

[0738] (TfR1071改变体)

[0739] Y32A、Y32F、T33A、T33G、L45A、V48A、V50A、I51A、I51L、N52A-A、N52A-D、V55E、D58A、D61P、Q97A、Q97D、P98A、W99A、W99F、W99H、W99Y、Y100A-A、Y100A-F、V102L、P98Y、P98S、P98D、P98Q、P98E、P98T、P98R、P98G、P98K、P98M、P98V、P98L、P98I、P98W、P98F、P98H

[0740] 上述记号表示各TfR1071改变体所含的氨基酸取代,表示[取代前的氨基酸残基的单字母标记][以EU索引所示的TfR1071的VH(序列编号31)中的氨基酸残基的部位][取代后的氨基酸残基的单字母标记]。以下,同样表示氨基酸取代。

[0741] 例如,Y32A表示将EU索引中的第32位的氨基酸残基Y(酪氨酸)取代为A(丙氨酸)。另外,52A、100A分别指在EU索引中表示“第52位和第53位之间”“第100位与第101位之间”的氨基酸残基的分支编号。例如,N52A-D表示EU索引中的第52A位的氨基酸残基从N取代为A,Y100A-A表示EU索引中的第100A位的氨基酸残基从Y取代为A。

[0742] 将 1×10^3 cells的癌细胞接种于平底96孔板(Falcon公司制),添加用包含10%FBS的RPMI1640培养基(Sigma-Aldrich公司制)稀释成各种浓度的被测抗体,在37℃、5.0%二氧化碳气体下培养4~6天后,添加细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8)(Dojindo公司),用酶标仪(1420ARVO多标签计数器:WALLAC公司制)测定吸光度。在各条件下,利用3个独立的孔进行评价,算出平均值。所得到的荧光强度的值反映各孔的活细胞数。作为阴性对照,使用抗DNP抗体。将有关上述双特异性抗体的增殖抑制活性的评价结果分别表示于图17A、B。

[0743] 如图17A、B所示,在克隆TfR1071的N52A-A和N52A-D改变体中没有观察到增殖抑制活性,V55E、W99A和W99H改变体的增殖抑制活性略微降低,但其以外的改变体显示与改变前同等的强增殖抑制活性。

[0744] 根据该结果显示,在本发明的双特异性抗体E12-TfR1071中,N52对于发挥增殖抑制活性很重要。另外,关于P98,即使取代为各种其它的氨基酸,也显示同等的增殖抑制活

性,在表明能够取代成其它任意的天然氨基酸。

[0745] [实施例20]抗TfR抗体的表位鉴定

[0746] 如下鉴定抗TfR抗体1071的表位。

[0747] 根据国际公开第2014/189973号中记载的序列信息,与实施例7中记载的方法同样地制作与人TfR的Apical结构域结合的抗TfR抗体15G11v5、7A4v15、和16F6v4、以及识别蛋白酶样(Protease-like)结构域的抗TfR抗体7G7v1。

[0748] 制作实施例1中记载的人TfR的细胞外结构域蛋白质。另外,制作将人TfR的细胞外结构域中的顶端(Apical)结构域或蛋白酶样(Protease-like)结构域取代为小鼠TfR(包含GenBank accession No.NP_001344227所示的氨基酸序列或序列编号87所示的氨基酸)的对应结构域的嵌合蛋白质。具体而言,将编码这些氨基酸序列的碱基序列亚克隆到导入了His标签的pCI-0tCMV载体,得到蛋白质表达载体。使用蛋白质表达载体,通过实施例1中记载的方法,获得在各个蛋白质添加了His标签的His-huTfR、带有小鼠顶端结构域的huTfR(序列编号88)、和带有小鼠蛋白酶样结构域的huTfR(序列编号89)。

[0749] His-huTfR表示带有His标签的人TfR细胞外结构域,带有小鼠顶端结构域的huTfR表示顶端结构域被取代为小鼠的对应序列的带有His标签的人TfR细胞外结构域,带有小鼠蛋白酶样结构域的huTfR表示蛋白酶样结构域被取代为小鼠的对应序列的带有His标签的人TfR细胞外结构域。

[0750] 同样地制作将人TfR的顶端结构域的一部分氨基酸残基取代为小鼠TfR的对应的氨基酸残基的嵌合TfR A01~A16。将表5中制作的嵌合TfR在序列编号90~105中表示各自的氨基酸序列。

[0751] 在表5中,示出了各个嵌合蛋白中氨基酸取代的部位。例如,A01的Q285K-T286N-T362S表示在序列编号6所示的人TfR的氨基酸序列中将第285位的氨基酸从Q取代为K,将第286位的氨基酸从T取代为N,以及将第362位的氨基酸从T取代为S。如A08的V210那样,没有对应的小鼠氨基酸的情况缺失了氨基酸。

[0752] [表5]

[0753] 表位鉴定用的嵌合TfR

[0754]

A01	Q285K-T286N-T362S
A02	D352S-S355A-D356R-K358N
A03	D245E-K261E
A04	D245E-K261E-D356R
A05	P249S-L274F
A06	E272Q
A07	M365L-V366E-E369Q
A08	N348K-K371Q-V210-Y211D-D204Q
A09	NA225P-A226T-T227E-T229S
A10	A225P-A226T-T227E
A11	D194S-A196IG-S378K
A12	G217E-S296A
A13	D204Q-K205S

A14	D204Q-K205S-E369Q
A15	S199M-I201T-L212P-N215S
A16	S199M-T376I-T227E

[0755] 接着,进行各种TfR抗体的表位分析。首先,通过与实施例9同样的方法,利用流式细胞法分析本发明中制作的抗TfR抗体对实施例2中制成的人TfR/CHO和与实施例2同样制成的小鼠TfR/CHO的反应性。其结果,R327、TfR1071、cyno186、cyno292和2230均与人TfR结合,但不与小鼠TfR结合。另外,已知15G11v5、7A4v15、16F6v4和7G7v1不与小鼠交叉(国际公开第2014/189973号)。

[0756] 此外,通过ELISA来分析抗TfR抗体对上述制作的各种嵌合TfR的结合活性,鉴定抗TfR抗体的结合结构域和识别表位。在对某个嵌合TfR失去了结合活性的情况下,将该嵌合TfR中取代的氨基酸残基鉴定为表位。

[0757] ELISA利用以下的方法进行。在固相化有抗原蛋白的96孔免疫板(Nunc公司)中添加1% (w/v) BSA-PBS (-) pH7.0无KCl (以下记作封闭液。Nacalai Tesque公司),在室温下封闭后,添加用相同溶液稀释的抗TfR抗体,在室温下反应1小时。然后,用0.05% (w/v) -tPBS (1x) 无KCl (pH7.2) (以下记作清洗液。Nacalai Tesque公司)清洗,添加用封闭液稀释的抗人IgG (Fc) 山羊IgG Fab^o-HRP (IBL公司),在室温下反应1小时后,用清洗液清洗,加入1-Step (注册商标) Ultra TMB-ELISA底物溶液 (Thermo公司),在室温下反应,加入5N的HCl溶液,使显色反应停止,用读板仪 (EPOCH2:Bio Tek公司) 测定波长450nm (参照波长570nm) 处的吸光度。

[0758] 将结果表示于表6。表中的N/A表示没有取得数据。另外,将从波长450nm的吸光度减去参照波长570nm的吸光度得到的值看做对各种抗原蛋白的结合活性,在对于各种嵌合TfR的结合活性除以对于His-huTfR的结合活性得到的值为0.5以上时,记作++,为0.2以上且小于0.5时记作+,小于0.2时记作-。

[0759] [表6]

[0760] 各种TfR抗体的表位

克隆	ELISA结合		结合域	结合于嵌合TfR的ELISA						顶端结构域上的结合位点
	带有小鼠顶端结构域的huTfR	带有小鼠蛋白酶样结构域的huTfR		A02	A03	A04	A05	A07	A14	
T14	-	++	顶端域	++	++	+	-	++	++	A05
R327	-	++	顶端域	-	++	+	++	-	++	A02, A07
TfR1007	-	++	顶端域	-	++	+	++	-	++	A02, A07
TfR1071	-	++	顶端域	-	++	+	++	-	++	A02, A07
cyno186	-	++	顶端域	-	++	+	++	-	-	A02, A07, A14
cyno292	-	++	顶端域	-	++	++	++	-	++	A02, A07
2230	++	-	蛋白酶样域	++	++	++	++	++	++	(蛋白酶样域)
15G11v5	-	++	顶端域	-	-	-	++	+	++	A02, A03, A04
7A4v15	-	++	顶端域	-	++	+	++	+	++	A02
16F6v4	-	++	顶端域	-	++	+	++	++	++	A02
7G7v1	++	-	蛋白酶样域	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	(蛋白酶样域)

[0762] 根据该结果显示,T14、R327、TfR1071、cyno186、cyno292、15G11v5、7A4v15和16F6v4识别顶端结构域,2230和7G7v1识别蛋白酶样结构域。另外还显示,在识别顶端结构域的抗体中,T14识别A05的氨基酸取代部位,R327、TfR1007、TfR1071和cyno292识别A02和

A07的氨基酸取代部位,cyno186识别A02、A07和A14的氨基酸取代部位,15G11v5识别A02、A03、和A04的氨基酸取代部位,7A4v15和16F6v4识别A02的氨基酸取代部位。

[0763] 显示TfR1071识别的氨基酸残基为在A02和A07进行了氨基酸取代的部位。因此,表明TfR1071识别的氨基酸残基为D352、S355、D356、K358、M365、V366和E369这7个氨基酸残基。关于R327、TfR1007和cyno292也是同样的。

[0764] [实施例21]抗TfR抗体的表位和EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性

[0765] 为了分析本发明的双特异性抗体的增殖抑制活性和与TfR结合的IgG部分的可变区的表位的关联性,利用表位不同的各种抗TfR抗体制作E12-TfR双特异性抗体,评价增殖抑制活性。

[0766] 由于抗TfR抗体15G11v5、7A4v15、16F6v4和7G7v1与抗EGFR抗体E12的轻链不同,所以利用实施例6中记载的方法制作如图18(A)所示那样的结构的双特异性抗体。与实施例8相同地,将五His抗体(Penta-His Antibody)(Qiagen公司)固定化于CM5传感器芯片,添加His-huTfR后,测定作为分析物的各双特异性抗体对TfR的结合活性,算出所制作的各双特异性抗体的动力学常数。将结果示于表7。

[0767] [表7]

[0768] 双特异性抗体对TfR的结合活性

[0769]

	ka	kd	KD
E12-TfR1071	6.02E+05	9.73E-03	1.62E-08
E12-15G11v5	1.68E+05	2.03E-04	1.21E-09
E12-7A4v15	1.04E+05	8.75E-04	8.39E-09
E12-16F6v4	2.86E+04	7.88E-04	2.76E-08
E12-7G7v1	1.23E+05	1.07E-03	8.74E-09
西妥昔单抗-TfR1071	5.48E+05	1.05E-02	1.92E-08
帕尼单抗-TfR1071	4.84E+05	1.00E-02	2.07E-08
耐昔妥珠单抗-TfR1071	4.77E+05	9.19E-03	1.93E-08
尼妥珠单抗-TfR1071	5.17E+05	9.52E-03	1.84E-08

[0770] 如表7所示可知,所制作得到的双特异性抗体均与TfR较强地结合。

[0771] 将通过与实施例19同样的方法评价所得到的双特异性抗体对OE21的增殖抑制活性的结果示于图19A和B。

[0772] 如图19A和B所示,与其它双特异性抗体相比,使用R327、TfR1007、TfR1071、cyno186和cyno292的EGFR-TfR双特异性抗体的最大活性更强。根据该结果和实施例20的结果可知,使用表位为A02和A07的氨基酸取代部位的R327、TfR1007、TfR1071和cyno292、以及表位为A02、A07和A14的氨基酸取代部位的cyno186的双特异性抗体的增殖抑制活性高。因此显示,表位包含A02和A07的氨基酸取代部位对于高增殖抑制活性很重要。

[0773] 另外,如图19A所示显示,在表位包含A02和A07的氨基酸取代部位的双特异性抗体中,使用TfR1071和R327的双特异性抗体从最低浓度起显示高的活性,在这些克隆中,特别是TfR1071和R327很优异。

[0774] [实施例22]使用各种抗EGFR抗体和TfR1071的EGFR-TfR双特异性抗体的增殖抑制活性

[0775] 为了确认TfR1071对于双特异性抗体的增殖抑制活性很重要,利用市售的具有EGFR抑制活性的抗EGFR抗体和TfR抗体TfR1071制作EGFR-TfR双特异性抗体,评价增殖抑制活性。

[0776] 通过与实施例6中记载的方法同样地制作抗EGFR抗体(西妥昔单抗、帕尼单抗、耐昔妥珠单抗、尼妥珠单抗)和TfR抗体TfR1071的双特异性抗体。西妥昔单抗、帕尼单抗、耐昔妥珠单抗、尼妥珠单抗的可变区的序列分别使用国际公开第1996/040210号、国际公开第1998/050433号、国际公开第2011/116387号、美国专利申请公开第2012/0308576号说明书中记载的序列。制作得到的双特异性抗体的结构的示意图示于图1(C)。

[0777] 将对癌细胞株的增殖抑制活性为指标,与实施例20同样地评价所得到的双特异性抗体的增殖抑制活性而得到的结果示于图20。

[0778] 如图20所示,具有TfR1071的CDR的EGFR-TfR双特异性抗体即使具有任一抗EGFR抗体的可变区,也显示出强增殖抑制活性。

[0779] 根据该结果表明,IgG部分具有TfR1071的CDR对于本发明的双特异性抗体的高增殖抑制活性很重要。

[0780] [实施例23]与异源二聚体型的双特异性抗体的增殖抑制活性的比较

[0781] 在本发明的双特异性抗体的增殖抑制活性中,为了分析与TfR和EGFR结合的价数的影响,制作分别各具有一个抗EGFR抗体E12和抗TfR抗体TfR1071的抗原结合结构域的异源二聚体型双特异性抗体(以下记作异源二聚体抗体。),评价增殖抑制活性。图18(B)表示所制作的异源二聚体抗体的结构的示意图。

[0782] 用专利文献(美国专利申请公开第2014/0348839号说明书)中记载的方法制作分别各具有一个E12和TfR1071的抗原结合结构域的双特异性抗体异源(Hetero)E12-TfR1071,通过与实施例11同样的方法评价增殖抑制活性。将结果示于图21。

[0783] 如图21所示可知,与E12-TfR1071相比,异源E12-TfR1071的增殖抑制的最大活性和比活性均较弱。根据该结果显示,相比于对于TfR和EGFR的价数分别为1价的异源二聚体抗体,分别为2价的本发明的双特异性抗体具有较强的增殖抑制活性。

[0784] [实施例24]E12-TfR1071YE双特异性抗体的TfR结合活性

[0785] 通过常规方法制作具有将TfR1071的VH序列(序列编号31)的第1位的氨基酸从Y(酪氨酸)取代为E(谷氨酸)的VH序列(序列编号106)的E12-TfR1071YE双特异性抗体。与实施例20中记载的方法同样地,通过ELISA分析对人TfR蛋白的结合活性。其结果,E12-TfR1071YE显示与E12-TfR1071同等的结合活性

[0786] 使用特定的方式对本发明详细地进行了说明,但本领域技术人员应知晓可以不脱离本发明的意图和范围进行各种变更和变形。需要说明的是,本申请基于在2018年12月28日申请的日本专利申请(日本特愿2018-248334),将其整体通过引用援引在此。

[0787] [序列表自由文本]

[0788] 序列编号1:人TfR细胞外结构域的碱基序列

[0789] 序列编号2:人TfR细胞外结构域的氨基酸序列

[0790] 序列编号3:猴TfR细胞外结构域的碱基序列

[0791] 序列编号4:猴TfR细胞外结构域的氨基酸序列

[0792] 序列编号5:人TfR的碱基序列

- [0793] 序列编号6:人TfR的氨基酸序列
- [0794] 序列编号7:食蟹猴TfR的碱基序列
- [0795] 序列编号8:食蟹猴TfR的氨基酸序列
- [0796] 序列编号9:人EGFR细胞外结构域的碱基序列(包含信号序列)
- [0797] 序列编号10:人EGFR细胞外结构域的氨基酸序列(包含信号序列)
- [0798] 序列编号11:猴EGFR细胞外结构域的碱基序列(包含信号序列)
- [0799] 序列编号12:猴EGFR细胞外结构域的氨基酸序列(包含信号序列)
- [0800] 序列编号13:人EGFR的碱基序列
- [0801] 序列编号14:人EGFR的氨基酸序列
- [0802] 序列编号15:A27 VL的碱基序列
- [0803] 序列编号16:A27 VL的氨基酸序列序列编号17:A27 LCDR1的氨基酸序列序列编号18:A27 LCDR2的氨基酸序列序列编号19:A27 LCDR3的氨基酸序列序列编号20:PSM4072 VH的碱基序列序列编号21:PSM4072 VH的氨基酸序列序列编号22:PSM4072 HCDR1的氨基酸序列序列编号23:PSM4072 HCDR2的氨基酸序列序列编号24:PSM4072 HCDR3的氨基酸序列序列编号25:R327 VH的碱基序列序列编号26:R327 VH的氨基酸序列序列编号27:R327 HCDR1的氨基酸序列序列编号28:R327 HCDR2的氨基酸序列序列编号29:R327 HCDR3的氨基酸序列序列编号30:TfR1071 VH的碱基序列序列编号31:TfR1071 VH的氨基酸序列序列编号32:TfR1071 HCDR1的氨基酸序列序列编号33:TfR1071 HCDR2的氨基酸序列序列编号34:TfR1071 HCDR3的氨基酸序列序列编号35:TfR4016 VH的碱基序列序列编号36:TfR4016 VH的氨基酸序列序列编号37:TfR4016 HCDR1的氨基酸序列序列编号38:TfR4016 HCDR2的氨基酸序列序列编号39:TfR4016 HCDR3的氨基酸序列序列编号40:cyno186 VH的碱基序列序列编号41:cyno186 VH的氨基酸序列序列编号42:cyno186 HCDR1的氨基酸序列序列编号43:cyno186 HCDR2的氨基酸序列序列编号44:cyno186 HCDR3的氨基酸序列序列编号45:cyno292 VH的碱基序列序列编号46:cyno292 VH的氨基酸序列序列编号47:cyno292 HCDR1的氨基酸序列序列编号48:cyno292 HCDR2的氨基酸序列序列编号49:cyno292 HCDR3的氨基酸序列序列编号50:TfR1007 VH的氨基酸序列序列编号51:cyno163 VH的氨基酸序列序列编号52:2230VH的氨基酸序列序列编号53:2230VL的氨基酸序列序列编号54:T14 VH的氨基酸序列序列编号55:TfR434 VH的氨基酸序列序列编号56:TfR435 VH的氨基酸序列序列编号57:TfR434、435VL的氨基酸序列序列编号58:E08 VH的碱基序列序列编号59:E08 VH的氨基酸序列序列编号60:E08 HCDR1的氨基酸序列序列编号61:E08 HCDR2的氨基酸序列序列编号62:E08 HCDR3的氨基酸序列序列编号63:E12 VH的碱基序列序列编号64:E12 VH的氨基酸序列序列编号65:E12 HCDR1的氨基酸序列序列编号66:E12 HCDR2的氨基酸序列序列编号67:E12 HCDR3的氨基酸序列序列编号68:E17 VH的碱基序列序列编号69:E17 VH的氨基酸序列序列编号70:E17 HCDR1的氨基酸序列序列编号71:E17 HCDR2的氨基酸序列序列编号72:E17 HCDR3的氨基酸序列序列编号73:KME07 VH的氨基酸序列序列编号74:KME09 VH的氨基酸序列序列编号75:KME11 VH的氨基酸序列序列编号76:西妥昔单抗VH的氨基酸序列序列编号77:西妥昔单抗VL的氨基酸序列序列编号78:HN3 VH的氨基酸序列
- [0804] 序列编号79:接头的氨基酸序列
- [0805] 序列编号80:接头的氨基酸序列

- [0806] 序列编号81:接头的氨基酸序列
- [0807] 序列编号82:接头的氨基酸序列
- [0808] 序列编号83:IgG4PE R409K恒定区的碱基序列
- [0809] 序列编号84:IgG4PE R409K恒定区的氨基酸序列
- [0810] 序列编号85:IgG4 CH1的改变密码子的碱基序列
- [0811] 序列编号86:IgG4PE恒定区的氨基酸序列
- [0812] 序列编号87:小鼠TfR的氨基酸序列
- [0813] 序列编号88:人TfR细胞外结构域的顶端结构域小鼠嵌合体的氨基酸序列
- [0814] 序列编号89:人TfR细胞外结构域的蛋白酶样结构域小鼠嵌合体的氨基酸序列
- [0815] 序列编号90:A01的氨基酸序列
- [0816] 序列编号91:A02的氨基酸序列
- [0817] 序列编号92:A03的氨基酸序列
- [0818] 序列编号93:A04的氨基酸序列
- [0819] 序列编号94:A05的氨基酸序列
- [0820] 序列编号95:A06的氨基酸序列
- [0821] 序列编号96:A07的氨基酸序列
- [0822] 序列编号97:A08的氨基酸序列
- [0823] 序列编号98:A09的氨基酸序列
- [0824] 序列编号99:A10的氨基酸序列
- [0825] 序列编号100:A11的氨基酸序列
- [0826] 序列编号101:A12的氨基酸序列
- [0827] 序列编号102:A13的氨基酸序列
- [0828] 序列编号103:A14的氨基酸序列
- [0829] 序列编号104:A15的氨基酸序列
- [0830] 序列编号105:A16的氨基酸序列
- [0831] 序列编号106:以TfR1071 EVQL开始的VH的氨基酸序列
- [0832] 序列编号107:TfR1007 HCDR1的氨基酸序列
- [0833] 序列编号108:TfR1007 HCDR2的氨基酸序列
- [0834] 序列编号109:TfR1007 HCDR3的氨基酸序列
- [0835] 序列编号110:西妥昔单抗VH的氨基酸序列
- [0836] 序列编号111:西妥昔单抗VL的氨基酸序列
- [0837] 序列编号112:帕尼单抗VH的氨基酸序列
- [0838] 序列编号113:帕尼单抗VL的氨基酸序列
- [0839] 序列编号114:耐昔妥珠单抗VH的氨基酸序列
- [0840] 序列编号115:耐昔妥珠单抗VL的氨基酸序列
- [0841] 序列编号116:尼妥珠单抗VH的氨基酸序列
- [0842] 序列编号117:尼妥珠单抗VL的氨基酸序列

[0001]	序列表
[0002]	<110> 协和麒麟株式会社
[0003]	<120> 与TfR结合的双特异性抗体
[0004]	<130> W528470
[0005]	<150> JP2018-248334
[0006]	<151> 2018-12-28
[0007]	<160> 117
[0008]	<170> PatentIn version 3.5
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 1643
[0011]	<212> DNA
[0012]	<213> 智人
[0013]	<400> 1
[0014]	tggagaatcc tgggggttat gtggcgtata gtaaggctgc aacagttact ggtaaactgg 60
[0015]	tccatgctaa ttttgtact aaaaaagatt ttgaggattt atacactcct gtgaatggat 120
[0016]	ctatagtgat tgtcagagca gggaaaatca cttttgcaga aaaggttgca aatgctgaaa 180
[0017]	gcttaaatgc aattggtgtg ttgatataca tggaccagac taaatttccc attgttaacg 240
[0018]	cagaactttc attcctttgga catgctcatc tggggacagg tgacccttac acacctggat 300
[0019]	tccttcctt caatcacact cagtttccac catctcggtc atcaggattg cctaataac 360
[0020]	ctgtccagac aatctccaga gctgctgcag aaaagctgtt tgggaatatg gaaggagact 420
[0021]	gtccctctga ctggaaaaca gactctacat gtaggatggt aacctcagaa agcaagaatg 480
[0022]	tgaagctcac tgtgagcaat gtgctgaaag agataaaaat tcttaacatc tttggagtta 540
[0023]	ttaaaggctt tgtagaacca gatcactatg ttgtagttgg ggcccagaga gatgcatggg 600
[0024]	gccctggagc tgcaaaatcc ggtgtaggca cagctctcct attgaaactt gccagatgt 660
[0025]	tctcagatat ggtcttaaaa gatgggtttc agcccagcag aagcattatc tttgccagtt 720
[0026]	ggagtgtgag agactttgga tcggttggtg ccactgaatg gctagaggga tacctttcgt 780
[0027]	ccctgcattt aaaggctttc acttatatta atctggataa agcggttctt ggaaccagca 840
[0028]	acttcaaggt ttctgccagc ccactgttgt atacgcttat tgagaaaaca atgcaaaatg 900
[0029]	tgaagcatcc ggttactggg caatttctat atcaggacag caactgggcc agcaaagttg 960
[0030]	agaaactcac tttagacaat gctgctttcc ctttccttgc atattctgga atcccagcag 1020
[0031]	tttctttctg tttttgcgag gacacagatt atccttattt gggaaccacc atggacacct 1080
[0032]	ataaggaact gattgagagg attcctgagt tgaacaaagt ggcacgagca gctgcagagg 1140
[0033]	tcgctgggtca gttcgtgatt aaactaaccc atgatgttga attgaacctg gactatgaga 1200
[0034]	ggtacaacag ccaactgctt tcattttgtga gggatctgaa ccaatacaga gcagacataa 1260
[0035]	aggaaatggg cctgagttaa cagtggctgt attctgctcg tggagacttc ttccgtgcta 1320
[0036]	cttcagact aacaacagat ttcgggaatg ctgagaaaac agacagattt gtcataga 1380
[0037]	aactcaatga tcgtgtcatg agagtggagt atcacttcct ctctccctac gtatctccaa 1440
[0038]	aagagtctcc tttccgacat gtctttctggg gctccggtc tcacacgtg ccagctttac 1500
[0039]	tggagaactt gaaactgcgt aaacaaaata acggtgcttt taatgaaacg ctgttcagaa 1560
[0040]	accagttggc tctagctact tggactattc agggagctgc aaatgccctc tctggtgacg 1620
[0041]	tttgggacat tgacaatgag ttt 1643

[0084]	290	295	300
[0085]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[0086]	305	310	315
[0087]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[0088]		325	330
[0089]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[0090]		340	345
[0091]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[0092]		355	360
[0093]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[0094]	370	375	380
[0095]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[0096]	385	390	395
[0097]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[0098]		405	410
[0099]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[0100]		420	425
[0101]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[0102]		435	440
[0103]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[0104]	450	455	460
[0105]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[0106]	465	470	475
[0107]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[0108]		485	490
[0109]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[0110]		500	505
[0111]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[0112]		515	520
[0113]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		
[0114]	530	535	540
[0115]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[0116]	545	550	555
[0117]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		
[0118]		565	570
[0119]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[0120]		580	585
[0121]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[0122]		595	600
[0123]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		
[0124]	610	615	620
[0125]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		

[0126]	625	630	635	640
[0127]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly			
[0128]		645	650	655
[0129]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe			
[0130]		660	665	670
[0131]	<210> 3			
[0132]	<211> 2016			
[0133]	<212> DNA			
[0134]	<213> 猴子			
[0135]	<400> 3			
[0136]	tgtaaaagggg tagaaccaaa aactgagtgt gagagactgg caggcaccga gtctccagcg	60		
[0137]	agggaggagc cagaagagga cttccctgcg gcaccgcgct tatactggga cgacctgaag	120		
[0138]	agaaagttgt cagagaaact ggacaccaca gacttcacca gcaccatcaa gctgctgaat	180		
[0139]	gaaaatttat atgtccctcg tgaggctgga tctcaaaaag atgaaaatct tgcattgtat	240		
[0140]	attgaaaatc aatttcgtga atttaaacta agcaaagtct ggcgatgatca acattttgtt	300		
[0141]	aagattcagg tcaaggacag tgctcaaaac tcggatgatca tagttgataa gaatgggtgga	360		
[0142]	cttgittacc tgggtggagaa tcctgggggt tatgtggcat atagtaaggc tgcaacagtt	420		
[0143]	actggtaaac tgggtccatgc taattttggt actaaaaaag actttgagga tttagactct	480		
[0144]	cctgtgaatg gatctatagt gattgtcaga gcaggaaaaa tcacctttgc agaaaaggtt	540		
[0145]	gcaaagtctg aaagcttaaa tgcaattggt gtcttgatat atatggacca gactaaattt	600		
[0146]	cctattgtta aggcagacct ttcattcttt ggacatgctc atctgggaac aggtgacct	660		
[0147]	tacacacctg gattcccttc cttcaatcac actcagtttc caccatctca gtcgtcagga	720		
[0148]	ttgcctaata tacctgtcca aacgatctcc agagctgctg cagaaaagct gtttggaat	780		
[0149]	atggaggag actgtccctc tgactggaaa acagactcta cgtgtaagat ggtaacctcg	840		
[0150]	gaaaacaaga gtgtgaagct cacggtgagc aatgtgctga aagagacaaa aattcttaac	900		
[0151]	atctttggag ttattaaagg cttcgtagaa ccagatcact atgttggtgtg tggggcccg	960		
[0152]	agagatgcgt ggggccccgg agctgcaaaa tccagtgtgg ggacagctct cctgttgaaa	1020		
[0153]	cttgcccaga tgttctcaga tatggtctta aaagatgggt ttcagcccag cagaagcatt	1080		
[0154]	atctttgcca gttggagtgc tggagacttt ggatcggttg gtgccactga atggctagag	1140		
[0155]	ggataccttt catccttgea tttaaaggtt ttcacttaca ttaatctgga taaagcgggt	1200		
[0156]	cttggaaacca gcaacttcaa ggtttctgcc agcccgttgt tgtatacgct gattgagaaa	1260		
[0157]	acaatgcaag atgtgaaaca tccggttact gggcgatctc tatatcagga cagcaactgg	1320		
[0158]	gccagcaaag ttgagaaact cacttttagac aatgctgctt tccctttcct tgcgtattct	1380		
[0159]	ggaatcccag cagtttcttt ctgtttttgt gaggacacag attatcctta cttgggcacc	1440		
[0160]	accatggaca cctataagga actggtggag aggattcctg agctgaacaa agtggcacga	1500		
[0161]	gcagcggcag aagtagctgg tcagttcgtg attaaactga cccatgatac tgaattgaac	1560		
[0162]	ctggactatg agaggtacaa cagccagctg cttttgtttt tgagggatct gaaccagtac	1620		
[0163]	agagcagatg taaaggaaat gggcctgagc ttgcagtggc tgtattctgc tcgtggagac	1680		
[0164]	ttttccgtg ctacttccag gctaacaaca gatttcagga atgctgagaa aagggacaag	1740		
[0165]	tttgtcatga agaagctcaa tgatcgtgtc atgagagtcg agtattactt cctctcacc	1800		
[0166]	tatgtgtctc caaaagagtc tcctttccgg cacgtcttct ggggctcggg ctcccacacg	1860		
[0167]	ctgtccgctt tactggagag cttgaaactg cgtagacaga ataacagtgc ttttaatgaa	1920		

[0168] acgctgttca gaaaccagct ggctctcgcg acttggacta ttcaggagc tgcaaagcc 1980
 [0169] ctttctggtg acgtttggga cattgacaat gagttt 2016
 [0170] <210> 4
 [0171] <211> 672
 [0172] <212> PRT
 [0173] <213> 猴子
 [0174] <400> 4
 [0175] Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
 [0176] 1 5 10 15
 [0177] Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro
 [0178] 20 25 30
 [0179] Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
 [0180] 35 40 45
 [0181] Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr
 [0182] 50 55 60
 [0183] Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
 [0184] 65 70 75 80
 [0185] Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
 [0186] 85 90 95
 [0187] Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val
 [0188] 100 105 110
 [0189] Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
 [0190] 115 120 125
 [0191] Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu
 [0192] 130 135 140
 [0193] Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser
 [0194] 145 150 155 160
 [0195] Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe
 [0196] 165 170 175
 [0197] Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu
 [0198] 180 185 190
 [0199] Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser
 [0200] 195 200 205
 [0201] Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly
 [0202] 210 215 220
 [0203] Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly
 [0204] 225 230 235 240
 [0205] Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys
 [0206] 245 250 255
 [0207] Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp
 [0208] 260 265 270
 [0209] Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr

[0210]	275	280	285
[0211]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[0212]	290	295	300
[0213]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[0214]	305	310	315
[0215]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala		
[0216]	325	330	335
[0217]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[0218]	340	345	350
[0219]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[0220]	355	360	365
[0221]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[0222]	370	375	380
[0223]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[0224]	385	390	395
[0225]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[0226]	405	410	415
[0227]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg		
[0228]	420	425	430
[0229]	Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[0230]	435	440	445
[0231]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[0232]	450	455	460
[0233]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[0234]	465	470	475
[0235]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[0236]	485	490	495
[0237]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[0238]	500	505	510
[0239]	Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[0240]	515	520	525
[0241]	Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val		
[0242]	530	535	540
[0243]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[0244]	545	550	555
[0245]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu		
[0246]	565	570	575
[0247]	Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[0248]	580	585	590
[0249]	Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[0250]	595	600	605
[0251]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu		

[0252]	610	615	620
[0253]	Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu		
[0254]	625	630	635 640
[0255]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		
[0256]	645	650	655
[0257]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[0258]	660	665	670
[0259]	<210> 5		
[0260]	<211> 2280		
[0261]	<212> DNA		
[0262]	<213> 智人		
[0263]	<400> 5		
[0264]	atgatggatc aagctagatc agcattctct aacttgtttg gtggagaacc attgtcatat	60	
[0265]	acccggttca gcctggctcg gcaagtagat ggcgataaca gtcattgtga gatgaaactt	120	
[0266]	gctgtagatg aagaagaaaa tgctgacaat aacacaaagg ccaatgtcac aaaacaaaaa	180	
[0267]	aggtgtagtg gaagtatctg ctatgggact attgctgtga tcgtcttttt cttgattgga	240	
[0268]	tttatgattg gctacttggg ctattgtaaa ggggtagaac caaaaactga gtgtgagaga	300	
[0269]	ctggcaggaa ccgagctctc agtgaggag gagccaggag aggacttccc tgcagcacgt	360	
[0270]	cgcttatatt gggatgacct gaagagaaag ttgtcggaga aactggacag cacagacttc	420	
[0271]	accggcacca tcaagctgct gaatgaaaat tcatatgtcc ctctgtaggc tggatctcaa	480	
[0272]	aaagatgaaa atcttgcgtt gtatgttgaa aatcaatttc gtgaatttaa actcagcaaa	540	
[0273]	gtctggcgtg atcaacattt tgtaagatt caggtcaaag acagcgtca aaactcgggtg	600	
[0274]	atcatagttg ataagaacgg tagacttggt tacctgggtg agaatcctgg gggttatgtg	660	
[0275]	gcgtatagta aggctgcaac agttactggt aaactgggtc atgctaattt tggactataa	720	
[0276]	aaagattttg aggatttata cactcctgtg aatggatcta tagtgattgt cagagcaggg	780	
[0277]	aaaatcacct ttgcagaaaa ggttgcaaat gctgaaagct taaatgcaat tgggtgtgtg	840	
[0278]	atatacatgg accagactaa atttccatt gttaacgcag aactttcatt ctttgacat	900	
[0279]	gctcatctgg ggacaggatg cccttacaca cctggattcc cttccttcaa tcacactcag	960	
[0280]	tttccaccat ctcggtcatc aggattgcct aatatactg tccagacaat ctccagagct	1020	
[0281]	gctgcagaaa agctgttttg gaatatggaa ggagactgtc cctctgactg gaaaacagac	1080	
[0282]	tctacatgta ggatggtaac ctcaaaaagc aagaatgtga agctcactgt gagcaatgtg	1140	
[0283]	ctgaaagaga taaaaattct taacatcttt ggagttatta aaggctttgt agaaccagat	1200	
[0284]	cactatgttg tagttggggc ccagagagat gcatggggcc ctggagctgc aaaatccggt	1260	
[0285]	gtaggcacag ctctcctatt gaaacttgcc cagatgttct cagatatggt cttaaaagat	1320	
[0286]	gggtttcagc ccagcagaag cattatcttt gccagttgga gtgctggaga ctttgatcg	1380	
[0287]	gttggtgcca ctgaatggct agagggatac ctttcgtccc tgcatttaaa ggctttcact	1440	
[0288]	tatattaatc tggataaagc ggttcttggt accagcaact tcaaggtttc tgccagccca	1500	
[0289]	ctgttgata cgcttattga gaaaacaatg caaatgtga agcatccggt tactgggcaa	1560	
[0290]	tttctatata aggacagcaa ctgggccagc aaagttgaga aactcacttt agacaatgct	1620	
[0291]	gctttccctt tccttgcata ttctggaatc ccagcagttt ctttctgttt ttgcgaggac	1680	
[0292]	acagattata cttatttggg taccacatg gacacctata aggaactgat tgagaggatt	1740	
[0293]	cctgagttga acaaagtggc acgagcagct gcagaggtcg ctggtcagtt cgtgattaaa	1800	

[0294]	ctaaccatg atgttgaatt gaacctggac tatgagaggt acaacagcca actgctttca	1860
[0295]	tttgtgaggg atctgaacca atacagagca gacataaagg aaatgggcct gagtttacag	1920
[0296]	tggtgtatt ctgctcgtgg agacttcttc cgtgctactt ccagactaac aacagatttc	1980
[0297]	gggaatgctg agaaaacaga cagatttgtc atgaagaaac tcaatgatcg tgtcatgaga	2040
[0298]	gtggagtatc acttcctctc tccctacgta tctccaaaag agtctccttt ccgacatgtc	2100
[0299]	ttctggggct ccgctctca cacgtgccca gctttactgg agaacttgaa actgcgtaaa	2160
[0300]	caaaataacg gtgcttttaa tgaaacgtg ttcagaaacc agttggctct agctacttgg	2220
[0301]	actattcagg gagctgcaaa tgccctctct ggtgacgttt gggacattga caatgagttt	2280
[0302]	<210> 6	
[0303]	<211> 760	
[0304]	<212> PRT	
[0305]	<213> 智人	
[0306]	<400> 6	
[0307]	Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu	
[0308]	1 5 10 15	
[0309]	Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp	
[0310]	20 25 30	
[0311]	Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala	
[0312]	35 40 45	
[0313]	Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly	
[0314]	50 55 60	
[0315]	Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly	
[0316]	65 70 75 80	
[0317]	Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr	
[0318]	85 90 95	
[0319]	Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro	
[0320]	100 105 110	
[0321]	Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys	
[0322]	115 120 125	
[0323]	Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile	
[0324]	130 135 140	
[0325]	Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln	
[0326]	145 150 155 160	
[0327]	Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe	
[0328]	165 170 175	
[0329]	Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val	
[0330]	180 185 190	
[0331]	Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg	
[0332]	195 200 205	
[0333]	Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys	
[0334]	210 215 220	
[0335]	Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys	

[0336]	225	230	235	240
[0337]	Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile			
[0338]		245	250	255
[0339]	Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu			
[0340]		260	265	270
[0341]	Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe			
[0342]		275	280	285
[0343]	Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly			
[0344]		290	295	300
[0345]	Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln			
[0346]	305	310	315	320
[0347]	Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr			
[0348]		325	330	335
[0349]	Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp			
[0350]		340	345	350
[0351]	Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser			
[0352]		355	360	365
[0353]	Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile			
[0354]		370	375	380
[0355]	Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp			
[0356]	385	390	395	400
[0357]	His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala			
[0358]		405	410	415
[0359]	Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met			
[0360]		420	425	430
[0361]	Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile			
[0362]		435	440	445
[0363]	Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr			
[0364]		450	455	460
[0365]	Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr			
[0366]	465	470	475	480
[0367]	Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val			
[0368]		485	490	495
[0369]	Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn			
[0370]		500	505	510
[0371]	Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp			
[0372]		515	520	525
[0373]	Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe			
[0374]		530	535	540
[0375]	Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp			
[0376]	545	550	555	560
[0377]	Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu			

[0378]	565	570	575
[0379]	Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu		
[0380]	580	585	590
[0381]	Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn		
[0382]	595	600	605
[0383]	Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp		
[0384]	610	615	620
[0385]	Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln		
[0386]	625	630	635
[0387]	Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu		
[0388]	645	650	655
[0389]	Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys		
[0390]	660	665	670
[0391]	Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro		
[0392]	675	680	685
[0393]	Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser		
[0394]	690	695	700
[0395]	Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys		
[0396]	705	710	715
[0397]	Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala		
[0398]	725	730	735
[0399]	Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp		
[0400]	740	745	750
[0401]	Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[0402]	755	760	
[0403]	<210> 7		
[0404]	<211> 2280		
[0405]	<212> DNA		
[0406]	<213> 食蟹猴		
[0407]	<400> 7		
[0408]	atgatggatc aagctagatc agcattctct aacttgtttg gtggagaacc attgtcatat 60		
[0409]	acccggttca gcctggctcg gcaagtagac ggcgataaca gtcattgtgga gatgaaactt 120		
[0410]	gctgtagatg atgaagaaaa tgctgacaat aacacaaagg ccaatggcac aaaacaaaaa 180		
[0411]	aggtgtggtg gaaatatctg ctatgggact attgccgtga tcattctttt cttgattggg 240		
[0412]	tttatgattg gctacttggg ctattgtaaa ggggtagaac caaaaactga gtgtgagaga 300		
[0413]	ctggcaggca ccgagtctcc agcgaggag gagccagaag aggacttccc tgcggcaccg 360		
[0414]	cgcttatact gggacgacct gaagagaaag ttgtcagaga aactggacac cacagacttc 420		
[0415]	accagcacca tcaagctgct gaatgaaaat ttatatgtcc ctctgtaggc tggatctcaa 480		
[0416]	aaagatgaaa atcttgcatg gtatatgtga aatcaatttc gtgaatttaa actaagcaaa 540		
[0417]	gtctggcgtg atcaacattt tgtaagatt caggtcaagg acagtgtca aaactcgggtg 600		
[0418]	atcatagttg ataagaatgg tggacttggt tacctgggtg agaatcctgg gggttatgtg 660		
[0419]	gcataatagta aggtctgcaac agttactggt aaactgggtc atgctaattt tggactactaa 720		

[0420]	aaagactttg aggatttaga ctctcctgtg aatggatcta tagtgattgt cagagcagga	780
[0421]	aaaatcacct ttgcagaaaa ggttgcaaat gctgaaagct taaatgcaat tgggtgtcttg	840
[0422]	atatatatgg accagactaa atttcctatt gttaaggcag acctttcatt ctttggacat	900
[0423]	gctcatctgg gaacagggtga cccttacaca cctggattcc cttccttcaa tcacactcag	960
[0424]	tttccaccat ctcatcgctc aggattgcct aatatacctg tccaaacgat ctccagagct	1020
[0425]	gctgcagaaa agctgtttgg aaatatggag ggagactgtc cctctgactg gaaaacagac	1080
[0426]	tctacgtgta agatggtaac ctcggaatac aagagtgtga agctcacggt gagcaatgtg	1140
[0427]	ctgaaagaga caaaaattct taacatcttt ggagttatta aaggcttcgt agaaccagat	1200
[0428]	cactatgttg tggttggggc ccagagagat gcgtggggcc ccggagctgc aaaatccagt	1260
[0429]	gtggggacag ctctcctgtt gaaacttgcc cagatgttct cagatatggt cttaaaagat	1320
[0430]	gggtttcagc ccagcagaag cattatcttt gccagttgga gtgctggaga ctttggatcg	1380
[0431]	gttgggtgcca ctgaatggct agagggatac ctttcatcct tgcatttaaa ggctttcact	1440
[0432]	tacattaatc tggataaagc ggtgcttga accagcaact tcaaggttcc tgccagcccc	1500
[0433]	ttgttgata cgctgattga gaaaacaatg caagatgtga aacatccggt tactgggcga	1560
[0434]	tctctatatac aggacagcaa ctgggccagc aaagttgaga aactcacttt agacaatgct	1620
[0435]	gctttccctt tccttgcgta ttctggaatc ccagcagttt ctttctgttt ttgtgaggac	1680
[0436]	acagattatc cttacttggg caccaccatg gacacctata aggaactggt ggagaggatt	1740
[0437]	cctgagctga acaaagtggc acgagcagcg gcagaagtag ctggtcagtt cgtgattaaa	1800
[0438]	ctgacccatg atactgaatt gaacctggac tatgagaggt acaacagcca gctgcttttg	1860
[0439]	tttttgaggg atctgaacca gtacagagca gatgtaaagg aaatgggcct gagcttgcat	1920
[0440]	tggctgtatt ctgctcgtgg agacttttcc cgtgctactt ccaggctaac aacagatttc	1980
[0441]	aggaatgctg agaaaaggga caagtttgtc atgaagaagc tcaatgatcg tgtcatgaga	2040
[0442]	gtcgagtatt acttctctc accctatgtg tctccaaaag agtctccttt ccggcacgtc	2100
[0443]	ttctggggct cgggctccca cacgctgtcc gctttactgg agagcttgaa actgcgtaga	2160
[0444]	cagaataaca gtgcttttaa tgaaacgtg ttcagaaacc agctggctct cgcgacttgg	2220
[0445]	actattcagg gagctgcaaa tgccctttct ggtgacgttt gggacattga caatgagttt	2280
[0446]	<210> 8	
[0447]	<211> 760	
[0448]	<212> PRT	
[0449]	<213> 食蟹猴	
[0450]	<400> 8	
[0451]	Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu	
[0452]	1 5 10 15	
[0453]	Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp	
[0454]	20 25 30	
[0455]	Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Asp Glu Glu Asn Ala	
[0456]	35 40 45	
[0457]	Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly	
[0458]	50 55 60	
[0459]	Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly	
[0460]	65 70 75 80	
[0461]	Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr	

[0462]		85		90		95
[0463]	Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro					
[0464]		100		105		110
[0465]	Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys					
[0466]		115		120		125
[0467]	Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile					
[0468]		130		135		140
[0469]	Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln					
[0470]		145		150		155
[0471]	Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe					
[0472]		165		170		175
[0473]	Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val					
[0474]		180		185		190
[0475]	Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly					
[0476]		195		200		205
[0477]	Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys					
[0478]		210		215		220
[0479]	Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys					
[0480]		225		230		235
[0481]	Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile					
[0482]		245		250		255
[0483]	Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu					
[0484]		260		265		270
[0485]	Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe					
[0486]		275		280		285
[0487]	Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly					
[0488]		290		295		300
[0489]	Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln					
[0490]		305		310		315
[0491]	Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr					
[0492]		325		330		335
[0493]	Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp					
[0494]		340		345		350
[0495]	Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser					
[0496]		355		360		365
[0497]	Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr					
[0498]		370		375		380
[0499]	Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp					
[0500]		385		390		395
[0501]	His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala					
[0502]		405		410		415
[0503]	Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met					

[0504]	420	425	430
[0505]	Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile		
[0506]	435	440	445
[0507]	Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr		
[0508]	450	455	460
[0509]	Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr		
[0510]	465	470	475
[0511]	Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val		
[0512]	485	490	495
[0513]	Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp		
[0514]	500	505	510
[0515]	Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp		
[0516]	515	520	525
[0517]	Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe		
[0518]	530	535	540
[0519]	Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp		
[0520]	545	550	555
[0521]	Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu		
[0522]	565	570	575
[0523]	Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu		
[0524]	580	585	590
[0525]	Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn		
[0526]	595	600	605
[0527]	Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp		
[0528]	610	615	620
[0529]	Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln		
[0530]	625	630	635
[0531]	Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu		
[0532]	645	650	655
[0533]	Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys		
[0534]	660	665	670
[0535]	Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro		
[0536]	675	680	685
[0537]	Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser		
[0538]	690	695	700
[0539]	Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg		
[0540]	705	710	715
[0541]	Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala		
[0542]	725	730	735
[0543]	Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp		
[0544]	740	745	750
[0545]	Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		

[0546]	755	760
[0547]	<210> 9	
[0548]	<211> 1914	
[0549]	<212> DNA	
[0550]	<213> 智人	
[0551]	<400> 9	
[0552]	atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctcttgccgc tgctggctgc gctctgcccc 60	
[0553]	gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag 120	
[0554]	ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg 180	
[0555]	gtccttgga atttggaaat tacctatgtg cagaggaatt atgatcttc cttcttaaag 240	
[0556]	accatccagg aggtggctgg ttatgtctc attgccctca acacagtgga gcgaattcct 300	
[0557]	ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca 360	
[0558]	gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgccccat gagaaattta 420	
[0559]	caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag 480	
[0560]	agcatccagt ggccggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc 540	
[0561]	cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg 600	
[0562]	ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtcc 660	
[0563]	gggcgtgcc gtggcaagtc cccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc 720	
[0564]	acaggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc 780	
[0565]	aaggacacct gccccccact catgctctac aaccaccaca cgtaccagat ggatgtgaac 840	
[0566]	cccaggggca aatacagctt tgggtgccacc tgcgtgaaga agtgtcccc taattatgtg 900	
[0567]	gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa 960	
[0568]	gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata 1020	
[0569]	ggtattgtg aatttaaaga ctactctcc ataatgtcta cgaatattaa acacttcaaa 1080	
[0570]	aactgcacct ccatcagtgg cgatctccac atcctgccgg tggcatttag gggtgactcc 1140	
[0571]	ttcacacata ctctctctt ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa 1200	
[0572]	atcacagggt ttttctgat tcaggcttg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt 1260	
[0573]	gagaacctag aatcatacgc cggcaggacc aagcaacatg gtcagtttc tcttgcatc 1320	
[0574]	gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat 1380	
[0575]	gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg 1440	
[0576]	tttgggacct ccggtcagaa aaccaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag 1500	
[0577]	gccacaggcc aggtctgcca tgccttgctc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc 1560	
[0578]	agggactgcg tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgaac 1620	
[0579]	cttctggagg gtgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgataca gtgccacca 1680	
[0580]	gagtgcctgc ctgagccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc 1740	
[0581]	cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgccccgc aggagtcatg 1800	
[0582]	ggagaaaaca acacctgggt ctggaagtac gcagacgccg gccatgtgtg ccacctgtgc 1860	
[0583]	catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtcc aacg 1914	
[0584]	<210> 10	
[0585]	<211> 638	
[0586]	<212> PRT	
[0587]	<213> 智人	

[0588]	<400> 10															
[0589]	Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
[0590]	1				5				10					15		
[0591]	Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys	Gln
[0592]				20				25						30		
[0593]	Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His	Phe
[0594]			35					40					45			
[0595]	Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn
[0596]		50					55					60				
[0597]	Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys
[0598]	65					70					75					80
[0599]	Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val
[0600]					85					90					95	
[0601]	Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr
[0602]				100					105					110		
[0603]	Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn
[0604]			115					120					125			
[0605]	Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu
[0606]		130					135					140				
[0607]	His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu
[0608]	145					150					155					160
[0609]	Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met
[0610]				165						170					175	
[0611]	Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro
[0612]				180					185					190		
[0613]	Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln
[0614]			195					200					205			
[0615]	Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg
[0616]		210					215					220				
[0617]	Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys
[0618]	225					230					235					240
[0619]	Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp
[0620]				245						250					255	
[0621]	Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro
[0622]				260					265					270		
[0623]	Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly
[0624]			275					280					285			
[0625]	Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His
[0626]		290					295					300				
[0627]	Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu
[0628]	305					310					315					320
[0629]	Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val

[0630]	325	330	335
[0631]	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
[0632]	340	345	350
[0633]	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
[0634]	355	360	365
[0635]	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
[0636]	370	375	380
[0637]	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
[0638]	385	390	395
[0639]	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
[0640]	405	410	415
[0641]	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
[0642]	420	425	430
[0643]	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
[0644]	435	440	445
[0645]	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
[0646]	450	455	460
[0647]	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
[0648]	465	470	475
[0649]	Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		
[0650]	485	490	495
[0651]	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		
[0652]	500	505	510
[0653]	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn		
[0654]	515	520	525
[0655]	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly		
[0656]	530	535	540
[0657]	Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro		
[0658]	545	550	555
[0659]	Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro		
[0660]	565	570	575
[0661]	Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val		
[0662]	580	585	590
[0663]	Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp		
[0664]	595	600	605
[0665]	Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys		
[0666]	610	615	620
[0667]	Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr		
[0668]	625	630	635
[0669]	<210> 11		
[0670]	<211> 1914		
[0671]	<212> DNA		

[0672]	<213> 猴子	
[0673]	<400> 11	
[0674]	atgcgaccct cggggacggc cggggccgcg ctcttggcgc tgcctggctgc gctctgcccc	60
[0675]	gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa actcacgcag	120
[0676]	ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg	180
[0677]	gtccttgga atttggaaat tacctacgtg cagaggaatt atgatctttc cttcttaaag	240
[0678]	accatccagg aggtggctgg ttatgtctc atcgccctca acacagtga gcgattcct	300
[0679]	ttggaaaacc tgcagatcat cagaggaac atgtactatg aaaattccta tgccttagca	360
[0680]	gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgcccac gagaaactta	420
[0681]	caggaaatcc tgcatggcgc cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag	480
[0682]	agcatccagt ggcgggacat agtcagcagc gagtttctca gcaacatgtc gatggacttc	540
[0683]	cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg	600
[0684]	ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtcc	660
[0685]	gggcgctgcc gcggcaagtc cccagtgac tgcctgccaca accagtgtgc cgcgggctgc	720
[0686]	acgggcccc gggagagcga ctgcctggtc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc	780
[0687]	aaggacacct gccccccact catgctctac aaccacacca cataccagat ggatgtgaac	840
[0688]	cccaggggca aatacagctt tgggtgccacc tgcgtgaaga agtgtcccc taattatgtg	900
[0689]	gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgcggggccg acagctatga gatggaggaa	960
[0690]	gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taatggaata	1020
[0691]	ggtattggtg aatttaaaga cacactctcc ataatgtca caaatattaa acatttcaa	1080
[0692]	aactgcacct ccatcagtg cgatctccac atcttgccg tggcatttag gggtgactcc	1140
[0693]	ttcacacaca ctccgcctct ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa	1200
[0694]	atcacagggt ttttgtgat tcaggcttg cctgaaaaca ggacggacct ccatgctttt	1260
[0695]	gagaacctag aaatcatacg tggcaggacc aagcaacacg gtcagttttc tcttgcggtc	1320
[0696]	gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag cgatggagat	1380
[0697]	gtgataatct caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg	1440
[0698]	tttgggacct ccagtcagaa aaccaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag	1500
[0699]	gccacgggcc aggtctgcca tgcctgtgc tccccgagg gctgctgggg ccgagagccc	1560
[0700]	agggactgcg tctctgtca gaatgtcagc cgaggcagag aatgcgtgga caagtgaac	1620
[0701]	atcctggagg gcgagccaag ggagtttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca	1680
[0702]	gaatgcctgc cccaggtcat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc	1740
[0703]	cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccagc aggagtcatg	1800
[0704]	ggagaaaaca acacctgggt ctggaagtac gcagacgccg gccacgtgtg ccacttgtgc	1860
[0705]	catccaaact gcacctacgg atgcactggg ccaggtcttg aaggctgtgc aagg	1914
[0706]	<210> 12	
[0707]	<211> 638	
[0708]	<212> PRT	
[0709]	<213> 猴子	
[0710]	<400> 12	
[0711]	Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala	
[0712]	1 5 10 15	
[0713]	Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln	

[0714]	20	25	30
[0715]	Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe		
[0716]	35	40	45
[0717]	Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn		
[0718]	50	55	60
[0719]	Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys		
[0720]	65	70	75
[0721]	Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val		
[0722]	85	90	95
[0723]	Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr		
[0724]	100	105	110
[0725]	Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn		
[0726]	115	120	125
[0727]	Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu		
[0728]	130	135	140
[0729]	His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu		
[0730]	145	150	155
[0731]	Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Glu Phe Leu Ser Asn Met		
[0732]	165	170	175
[0733]	Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
[0734]	180	185	190
[0735]	Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
[0736]	195	200	205
[0737]	Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		
[0738]	210	215	220
[0739]	Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
[0740]	225	230	235
[0741]	Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		
[0742]	245	250	255
[0743]	Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		
[0744]	260	265	270
[0745]	Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
[0746]	275	280	285
[0747]	Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
[0748]	290	295	300
[0749]	Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
[0750]	305	310	315
[0751]	Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
[0752]	325	330	335
[0753]	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Thr Leu Ser Ile Asn		
[0754]	340	345	350
[0755]	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		

[0756]	355	360	365
[0757]	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
[0758]	370	375	380
[0759]	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
[0760]	385	390	395
[0761]	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
[0762]	405	410	415
[0763]	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
[0764]	420	425	430
[0765]	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
[0766]	435	440	445
[0767]	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
[0768]	450	455	460
[0769]	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
[0770]	465	470	475
[0771]	Phe Gly Thr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		
[0772]	485	490	495
[0773]	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		
[0774]	500	505	510
[0775]	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Gln Asn		
[0776]	515	520	525
[0777]	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Ile Leu Glu Gly		
[0778]	530	535	540
[0779]	Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro		
[0780]	545	550	555
[0781]	Glu Cys Leu Pro Gln Val Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro		
[0782]	565	570	575
[0783]	Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val		
[0784]	580	585	590
[0785]	Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp		
[0786]	595	600	605
[0787]	Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys		
[0788]	610	615	620
[0789]	Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Ala Arg		
[0790]	625	630	635
[0791]	<210> 13		
[0792]	<211> 3630		
[0793]	<212> DNA		
[0794]	<213> 智人		
[0795]	<400> 13		
[0796]	atgcgaccct ccgggacggc cggggcagcg ctcctggcgc tgctggctgc gctctgcccg	60	
[0797]	gcgagtcggg ctctggagga aaagaaagtt tgccaaggca cgagtaacaa gctcacgcag	120	

[0798]	ttgggcactt ttgaagatca ttttctcagc ctccagagga tgttcaataa ctgtgaggtg	180
[0799]	gtccttgga atttggaat tacctatgtg cagaggaatt atgatcttc cttcttaaag	240
[0800]	accatccagg aggtggctgg ttatgtctc attgccctca acacagtga gcaattcct	300
[0801]	ttgaaaacc tgcagatcat cagaggaaat atgtactacg aaaattccta tgccttagca	360
[0802]	gtcttatcta actatgatgc aaataaaacc ggactgaagg agctgccc atgagaaattta	420
[0803]	caggaaatcc tgcattggcg cgtgcggttc agcaacaacc ctgccctgtg caacgtggag	480
[0804]	agcatccagt ggcgggacat agtcagcagt gactttctca gcaacatgtc gatggacttc	540
[0805]	cagaaccacc tgggcagctg ccaaaagtgt gatccaagct gtcccaatgg gagctgctgg	600
[0806]	ggtgcaggag aggagaactg ccagaaactg accaaaatca tctgtgcca gcagtgtcc	660
[0807]	gggcgtgcc gtggcaagtc cccagtgac tgctgccaca accagtgtgc tgcaggctgc	720
[0808]	acaggcccc gggagagcga ctgcctgttc tgccgcaaat tccgagacga agccacgtgc	780
[0809]	aaggacacct gccccact catgctctac aacccacca cgtaccagat ggatgtgaac	840
[0810]	cccaggggca aatacagctt tgggtgccacc tgcgtgaaga agtgctccc taattatgtg	900
[0811]	gtgacagatc acggctcgtg cgtccgagcc tgtggggccg acagctatga gatggaggaa	960
[0812]	gacggcgtcc gcaagtgtaa gaagtgcgaa gggccttgcc gcaaagtgtg taacggaata	1020
[0813]	ggtattgtg aatttaaaga ctactctcc ataatgtcta cgaatattaa acacttcaaa	1080
[0814]	aactgcacct ccatcagtg cgatctccac atctgcccgg tggcatttag gggtgactcc	1140
[0815]	ttcacacata ctctctctt ggatccacag gaactggata ttctgaaaac cgtaaaggaa	1200
[0816]	atcacagggt ttttctgat tcaggcttg cctgaaaaca ggacggacct ccatgccttt	1260
[0817]	gagaacctag aatcatacag cggcaggacc aagcaacatg gtcagtttc tcttgcatc	1320
[0818]	gtcagcctga acataacatc cttgggatta cgctccctca aggagataag tgatggagat	1380
[0819]	gtgataattt caggaaacaa aaatttgtgc tatgcaaata caataaactg gaaaaaactg	1440
[0820]	tttgggacct ccggtcagaa aaccaaatt ataagcaaca gaggtgaaaa cagctgcaag	1500
[0821]	gccacaggcc aggtctgcca tgccttgtgc tccccgagg gctgctgggg cccggagccc	1560
[0822]	agggactgag tctcttgccg gaatgtcagc cgaggcaggg aatgcgtgga caagtgaac	1620
[0823]	cttctggagg gtgagccaag ggagttgtg gagaactctg agtgcataca gtgccacca	1680
[0824]	gagtgcctgc ctgagccat gaacatcacc tgcacaggac ggggaccaga caactgtatc	1740
[0825]	cagtgtgccc actacattga cggccccac tgcgtcaaga cctgcccggc aggagtcatg	1800
[0826]	ggagaaaaca acacctggc ctggaagtac gcagacgcc gccatgtgtg ccacctgtgc	1860
[0827]	catccaaact gcacctacg atgactggg ccaggtcttg aaggctgtcc aacgaatggg	1920
[0828]	cctaagatcc cgtccatgc cactgggatg gtggggggcc tctcttctg gctggtggtg	1980
[0829]	gccctgggga tcggcctctt catgcgaagg cgccacatcg ttcggaagcg cagctgcgg	2040
[0830]	aggctgctgc aggagaggga gcttgtggag cctcttacac ccagtggaga agctcccaac	2100
[0831]	caagctctct tgaggatctt gaaggaaact gaattcaaaa agatcaaagt gctgggctcc	2160
[0832]	ggtgcgttcg gcacggtgta taagggactc tggatcccag aaggtgagaa agttaaatt	2220
[0833]	ccgtcgcta tcaaggaatt aagagaagca acatctccga aagccaacaa ggaaatcctc	2280
[0834]	gatgaagcct acgtgatggc cagcgtggac aacccccac tgtgccgct gctgggcatc	2340
[0835]	tgcctcacct ccacctgca gctcatcac cagctcatgc ccttcggctg cctcctggac	2400
[0836]	tatgtccggg aacacaaaga caatattggc tcccagtacc tgctcaactg gtgtgtgcag	2460
[0837]	atgcaaagg gcatgaacta cttggaggac cgtcgcttg tgcaccgca cctggcagcc	2520
[0838]	aggaacgtac tggtagaaac accgcagcat gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa	2580
[0839]	ctgctgggtg cggaagagaa agaataccat gcagaaggag gcaaagtgc tatcaagtgg	2640

[0840]	atggcattgg aatcaatttt acacagaatc tatacccacc agagtgatgt ctggagctac	2700
[0841]	ggggtgactg tttgggagtt gatgaccttt ggatccaagc catatgacgg aatccctgcc	2760
[0842]	agcgagatct cctccatcct ggagaaagga gaacgcctcc ctcagccacc catatgtacc	2820
[0843]	atcgatgtct acatgatcat ggtcaagtgc tggatgatag acgcagatag tcgccccaaag	2880
[0844]	ttccgtgagt tgatcatcga attctccaaa atggcccagc acccccagcg ctacctgtgc	2940
[0845]	attcaggggg atgaaagaat gcatttgcca agtcctacag actccaactt ctaccgtgcc	3000
[0846]	ctgatggatg aagaagacat ggacgacgtg gtggatgccg acgagtacct catcccacag	3060
[0847]	cagggtttct tcagcagccc ctccacgtca cggactcccc tcctgagctc tctgagtga	3120
[0848]	accagcaaca attccaccgt ggcttgcatg gatagaaatg ggctgcaaag ctgtcccatc	3180
[0849]	aaggaagaca gcttcttgca gcgatacagc tcagacccca caggcgcctt gactgaggac	3240
[0850]	agcatagacg acaccttctt cccagtgcct gaatacataa accagtccgt tcccaaaagg	3300
[0851]	cccgtggtct ctgtgcagaa tcctgtctat cacaatcagc ctctgaacct cgcgccagc	3360
[0852]	agagaccac actaccagga cccccacagc actgcagtgg gcaaccccgatgtatctcaac	3420
[0853]	actgtccagc ccacctgtgt caacagcaca ttgcacagcc ctgcccactg ggcccagaaa	3480
[0854]	ggcagccacc aaattagcct ggacaaccct gactaccagc aggacttctt tcccaaggaa	3540
[0855]	gccaaagcaa atggcatctt taagggtccc acagctgaaa atgcagaata cctaagggtc	3600
[0856]	gcgccacaaa gcagtgaatt tattggagca	3630
[0857]	<210>	14
[0858]	<211>	1210
[0859]	<212>	PRT
[0860]	<213>	智人
[0861]	<400>	14
[0862]	Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala	
[0863]	1 5 10 15	
[0864]	Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln	
[0865]	20 25 30	
[0866]	Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe	
[0867]	35 40 45	
[0868]	Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn	
[0869]	50 55 60	
[0870]	Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys	
[0871]	65 70 75 80	
[0872]	Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val	
[0873]	85 90 95	
[0874]	Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr	
[0875]	100 105 110	
[0876]	Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn	
[0877]	115 120 125	
[0878]	Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu	
[0879]	130 135 140	
[0880]	His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu	
[0881]	145 150 155 160	

[0882]	Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met		
[0883]		165	170 175
[0884]	Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
[0885]		180	185 190
[0886]	Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
[0887]		195	200 205
[0888]	Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		
[0889]		210	215 220
[0890]	Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
[0891]		225	230 235 240
[0892]	Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		
[0893]		245	250 255
[0894]	Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		
[0895]		260	265 270
[0896]	Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
[0897]		275	280 285
[0898]	Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
[0899]		290	295 300
[0900]	Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
[0901]		305	310 315 320
[0902]	Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
[0903]		325	330 335
[0904]	Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
[0905]		340	345 350
[0906]	Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
[0907]		355	360 365
[0908]	Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
[0909]		370	375 380
[0910]	Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
[0911]		385	390 395 400
[0912]	Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
[0913]		405	410 415
[0914]	Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
[0915]		420	425 430
[0916]	His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
[0917]		435	440 445
[0918]	Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
[0919]		450	455 460
[0920]	Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
[0921]		465	470 475 480
[0922]	Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		
[0923]		485	490 495

[0924]	Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
[0925]	500 505 510
[0926]	Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
[0927]	515 520 525
[0928]	Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
[0929]	530 535 540
[0930]	Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
[0931]	545 550 555 560
[0932]	Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
[0933]	565 570 575
[0934]	Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
[0935]	580 585 590
[0936]	Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
[0937]	595 600 605
[0938]	Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
[0939]	610 615 620
[0940]	Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
[0941]	625 630 635 640
[0942]	Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
[0943]	645 650 655
[0944]	Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
[0945]	660 665 670
[0946]	Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
[0947]	675 680 685
[0948]	Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
[0949]	690 695 700
[0950]	Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
[0951]	705 710 715 720
[0952]	Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
[0953]	725 730 735
[0954]	Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
[0955]	740 745 750
[0956]	Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
[0957]	755 760 765
[0958]	Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
[0959]	770 775 780
[0960]	Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
[0961]	785 790 795 800
[0962]	Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
[0963]	805 810 815
[0964]	Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
[0965]	820 825 830

[0966]	Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
[0967]	835 840 845
[0968]	Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
[0969]	850 855 860
[0970]	Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
[0971]	865 870 875 880
[0972]	Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
[0973]	885 890 895
[0974]	Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
[0975]	900 905 910
[0976]	Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
[0977]	915 920 925
[0978]	Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
[0979]	930 935 940
[0980]	Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
[0981]	945 950 955 960
[0982]	Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
[0983]	965 970 975
[0984]	Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
[0985]	980 985 990
[0986]	Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
[0987]	995 1000 1005
[0988]	Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
[0989]	1010 1015 1020
[0990]	Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
[0991]	1025 1030 1035
[0992]	Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
[0993]	1040 1045 1050
[0994]	Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
[0995]	1055 1060 1065
[0996]	Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
[0997]	1070 1075 1080
[0998]	Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
[0999]	1085 1090 1095
[1000]	Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
[1001]	1100 1105 1110
[1002]	Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
[1003]	1115 1120 1125
[1004]	His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
[1005]	1130 1135 1140
[1006]	Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
[1007]	1145 1150 1155

[1008]	Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
[1009]	1160 1165 1170
[1010]	Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
[1011]	1175 1180 1185
[1012]	Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
[1013]	1190 1195 1200
[1014]	Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
[1015]	1205 1210
[1016]	<210> 15
[1017]	<211> 327
[1018]	<212> DNA
[1019]	<213> 人工序列
[1020]	<220>
[1021]	<223> 人工序列的描述: A27 VL的碱基序列
[1022]	<400> 15
[1023]	gaaatagtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
[1024]	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagccttgta ccagcagaaa 120
[1025]	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
[1026]	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
[1027]	cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcc gtggacgttc 300
[1028]	ggccaaggga ccaagtgga aatcaaa 327
[1029]	<210> 16
[1030]	<211> 109
[1031]	<212> PRT
[1032]	<213> 人工序列
[1033]	<220>
[1034]	<223> 人工序列的描述: A27 VL的氨基酸序列
[1035]	<400> 16
[1036]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1037]	1 5 10 15
[1038]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
[1039]	20 25 30
[1040]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[1041]	35 40 45
[1042]	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[1043]	50 55 60
[1044]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
[1045]	65 70 75 80
[1046]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
[1047]	85 90 95
[1048]	Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1049]	100 105

[1050] <210> 17
 [1051] <211> 12
 [1052] <212> PRT
 [1053] <213> 人工序列
 [1054] <220>
 [1055] <223> 人工序列的描述: A27 LCDR1的氨基酸序列
 [1056] <400> 17
 [1057] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 [1058] 1 5 10
 [1059] <210> 18
 [1060] <211> 7
 [1061] <212> PRT
 [1062] <213> 人工序列
 [1063] <220>
 [1064] <223> 人工序列的描述: A27 LCDR2的氨基酸序列
 [1065] <400> 18
 [1066] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 [1067] 1 5
 [1068] <210> 19
 [1069] <211> 10
 [1070] <212> PRT
 [1071] <213> 人工序列
 [1072] <220>
 [1073] <223> 人工序列的描述: A27 LCDR3的氨基酸序列
 [1074] <400> 19
 [1075] Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Trp Thr
 [1076] 1 5 10
 [1077] <210> 20
 [1078] <211> 366
 [1079] <212> DNA
 [1080] <213> 人工序列
 [1081] <220>
 [1082] <223> 人工序列的描述: PSM4072 VH的碱基序列
 [1083] <400> 20
 [1084] gaggtgcagc tgggtggagac tgggggaggc ttggtgcaac ctgggggggtc cctgagactc 60
 [1085] tcctgtacag cctctggatt cacctttgaa agtcatgccca tgtactgggt ccggaagct 120
 [1086] ccagggaagg ggctggagtg ggtctcgggt attagtaatg gaggtagtag cacagagtag 180
 [1087] gcagactccg tgaggggccg gttcaccatt tccagagaca attccaagaa tacggtgtat 240
 [1088] ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagaccaaga 300
 [1089] tctccatata tcttctacga tgctgctggt gtctggggcc aaggaccct ggtcaccgtc 360
 [1090] tcctca 366
 [1091] <210> 21

[1092]	<211> 122
[1093]	<212> PRT
[1094]	<213> 人工序列
[1095]	<220>
[1096]	<223> 人工序列的描述: PSM4072 VH的氨基酸序列
[1097]	<400> 21
[1098]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1099]	1 5 10 15
[1100]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Ser His
[1101]	20 25 30
[1102]	Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1103]	35 40 45
[1104]	Ser Gly Ile Ser Asn Gly Gly Ser Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val
[1105]	50 55 60
[1106]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
[1107]	65 70 75 80
[1108]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1109]	85 90 95
[1110]	Ala Arg Pro Arg Ser Pro Tyr Leu Phe Tyr Asp Ala Ala Gly Val Trp
[1111]	100 105 110
[1112]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1113]	115 120
[1114]	<210> 22
[1115]	<211> 5
[1116]	<212> PRT
[1117]	<213> 人工序列
[1118]	<220>
[1119]	<223> 人工序列的描述: PSM4072 HCDR1的氨基酸序列
[1120]	<400> 22
[1121]	Ser His Ala Met Tyr
[1122]	1 5
[1123]	<210> 23
[1124]	<211> 17
[1125]	<212> PRT
[1126]	<213> 人工序列
[1127]	<220>
[1128]	<223> 人工序列的描述: PSM4072 HCDR2的氨基酸序列
[1129]	<400> 23
[1130]	Gly Ile Ser Asn Gly Gly Ser Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val Arg
[1131]	1 5 10 15
[1132]	Gly
[1133]	<210> 24

[1134]	<211> 13
[1135]	<212> PRT
[1136]	<213> 人工序列
[1137]	<220>
[1138]	<223> 人工序列的描述: PSM4072 HCDR3的氨基酸序列
[1139]	<400> 24
[1140]	Pro Arg Ser Pro Tyr Leu Phe Tyr Asp Ala Ala Gly Val
[1141]	1 5 10
[1142]	<210> 25
[1143]	<211> 366
[1144]	<212> DNA
[1145]	<213> 人工序列
[1146]	<220>
[1147]	<223> 人工序列的描述: R327 VH的碱基序列
[1148]	<400> 25
[1149]	gaggtgcagc tgggtggagac cgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
[1150]	tcctgtgcag cctctggatt cagctttgac aagtatacca tgaactgggt ccgccaggct 120
[1151]	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttctaata ggggagtttc tacagactac 180
[1152]	gcagactccg ttaagggccg gttcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacactgtac 240
[1153]	ctgcaaata acagcctgag agccgaggat atggccacat attactgtgc gcgtgcgagc 300
[1154]	cagccgtggc tctataggac cgggtgcggat gtgtggggcc aggggacaat ggtcaccgtc 360
[1155]	tcttca 366
[1156]	<210> 26
[1157]	<211> 122
[1158]	<212> PRT
[1159]	<213> 人工序列
[1160]	<220>
[1161]	<223> 人工序列的描述: R327 VH的氨基酸序列
[1162]	<400> 26
[1163]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1164]	1 5 10 15
[1165]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Lys Tyr
[1166]	20 25 30
[1167]	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1168]	35 40 45
[1169]	Ser Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
[1170]	50 55 60
[1171]	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1172]	65 70 75 80
[1173]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys
[1174]	85 90 95
[1175]	Ala Arg Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val Trp

[1176]	100	105	110
[1177]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
[1178]	115	120	
[1179]	<210> 27		
[1180]	<211> 5		
[1181]	<212> PRT		
[1182]	<213> 人工序列		
[1183]	<220>		
[1184]	<223> 人工序列的描述: R327 HCDR1的氨基酸序列		
[1185]	<400> 27		
[1186]	Lys Tyr Thr Met Asn		
[1187]	1 5		
[1188]	<210> 28		
[1189]	<211> 17		
[1190]	<212> PRT		
[1191]	<213> 人工序列		
[1192]	<220>		
[1193]	<223> 人工序列的描述: R327 HCDR2的氨基酸序列		
[1194]	<400> 28		
[1195]	Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[1196]	1 5 10 15		
[1197]	Gly		
[1198]	<210> 29		
[1199]	<211> 13		
[1200]	<212> PRT		
[1201]	<213> 人工序列		
[1202]	<220>		
[1203]	<223> 人工序列的描述: R327 HCDR3的氨基酸序列		
[1204]	<400> 29		
[1205]	Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val		
[1206]	1 5 10		
[1207]	<210> 30		
[1208]	<211> 366		
[1209]	<212> DNA		
[1210]	<213> 人工序列		
[1211]	<220>		
[1212]	<223> 人工序列的描述: TfR1071 VH的碱基序列		
[1213]	<400> 30		
[1214]	tacgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60		
[1215]	tcctgtgcag cctctggatt cagctttgac aagtatacca tgaactgggt ccgccaggct 120		
[1216]	ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagtt atttctaattg ggggagtttc tacagactac 180		
[1217]	gcagactccg ttaagggccg gttcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacactgtac 240		

[1218]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggat atggccacat attactgtgc gcgtgcgagc 300
[1219]	cagccgtggc tctataggac cggatgcggat gtgtggggcc aggggaccct ggtcaccgtc 360
[1220]	tcctca 366
[1221]	<210> 31
[1222]	<211> 122
[1223]	<212> PRT
[1224]	<213> 人工序列
[1225]	<220>
[1226]	<223> 人工序列的描述: TfR1071 VH的氨基酸序列
[1227]	<400> 31
[1228]	Tyr Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1229]	1 5 10 15
[1230]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Lys Tyr
[1231]	20 25 30
[1232]	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1233]	35 40 45
[1234]	Ser Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
[1235]	50 55 60
[1236]	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1237]	65 70 75 80
[1238]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys
[1239]	85 90 95
[1240]	Ala Arg Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val Trp
[1241]	100 105 110
[1242]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1243]	115 120
[1244]	<210> 32
[1245]	<211> 5
[1246]	<212> PRT
[1247]	<213> 人工序列
[1248]	<220>
[1249]	<223> 人工序列的描述: TfR1071 HCDR1的氨基酸序列
[1250]	<400> 32
[1251]	Lys Tyr Thr Met Asn
[1252]	1 5
[1253]	<210> 33
[1254]	<211> 17
[1255]	<212> PRT
[1256]	<213> 人工序列
[1257]	<220>
[1258]	<223> 人工序列的描述: TfR1071 HCDR2的氨基酸序列
[1259]	<400> 33

[1260]	Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1261]	1 5 10 15
[1262]	Gly
[1263]	<210> 34
[1264]	<211> 13
[1265]	<212> PRT
[1266]	<213> 人工序列
[1267]	<220>
[1268]	<223> 人工序列的描述: TfR1071 HCDR3的氨基酸序列
[1269]	<400> 34
[1270]	Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val
[1271]	1 5 10
[1272]	<210> 35
[1273]	<211> 366
[1274]	<212> DNA
[1275]	<213> 人工序列
[1276]	<220>
[1277]	<223> 人工序列的描述: TfR4016 VH的碱基序列
[1278]	<400> 35
[1279]	tacgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
[1280]	tcctgtgcag cctctggatt cagctttgac aagtatacca tgaactgggt ccgccagget 120
[1281]	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttctaata ggggagtttc tacagactac 180
[1282]	gcagactccg ttaagggccg gtccaccgtc tccagagaca attccaagaa cacactgtac 240
[1283]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggat atggccacat attactgtgc gcgtgcgagc 300
[1284]	cagccgtggc tctataggac cgggtgcggat gtgtggggcc aggggaccac ggtcaccgtc 360
[1285]	tcctca 366
[1286]	<210> 36
[1287]	<211> 122
[1288]	<212> PRT
[1289]	<213> 人工序列
[1290]	<220>
[1291]	<223> 人工序列的描述: TfR4016 VH的氨基酸序列
[1292]	<400> 36
[1293]	Tyr Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1294]	1 5 10 15
[1295]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Lys Tyr
[1296]	20 25 30
[1297]	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1298]	35 40 45
[1299]	Ser Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
[1300]	50 55 60
[1301]	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[1302]	65	70	75	80
[1303]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys			
[1304]		85	90	95
[1305]	Ala Arg Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val Trp			
[1306]		100	105	110
[1307]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[1308]		115	120	
[1309]	<210> 37			
[1310]	<211> 5			
[1311]	<212> PRT			
[1312]	<213> 人工序列			
[1313]	<220>			
[1314]	<223> 人工序列的描述: Tfr4016 HCDR1的氨基酸序列			
[1315]	<400> 37			
[1316]	Lys Tyr Thr Met Asn			
[1317]	1	5		
[1318]	<210> 38			
[1319]	<211> 17			
[1320]	<212> PRT			
[1321]	<213> 人工序列			
[1322]	<220>			
[1323]	<223> 人工序列的描述: Tfr4016 HCDR2的氨基酸序列			
[1324]	<400> 38			
[1325]	Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
[1326]	1	5	10	15
[1327]	Gly			
[1328]	<210> 39			
[1329]	<211> 13			
[1330]	<212> PRT			
[1331]	<213> 人工序列			
[1332]	<220>			
[1333]	<223> 人工序列的描述: Tfr4016 HCDR3的氨基酸序列			
[1334]	<400> 39			
[1335]	Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val			
[1336]	1	5	10	
[1337]	<210> 40			
[1338]	<211> 366			
[1339]	<212> DNA			
[1340]	<213> 人工序列			
[1341]	<220>			
[1342]	<223> 人工序列的描述: cyno186 VH的碱基序列			
[1343]	<400> 40			

[1344] caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagaa ttcgtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 [1345] tcctgtgcag cctctggatt cccctttaa ggctatgcc a tgaattgggt ccgccagget 120
 [1346] ccaggaagg gattggagtg ggtctcaaga ataagtaatg gtggtagcta catagactac 180
 [1347] gcagactccg taaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 [1348] ttgcaaatac acagcctgag aaccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagcgaag 300
 [1349] gacgcctata ggtggaacaa cgctatagac gaatggggcc aaggaccct ggtcaccgtc 360
 [1350] tcctca 366
 [1351] <210> 41
 [1352] <211> 122
 [1353] <212> PRT
 [1354] <213> 人工序列
 [1355] <220>
 [1356] <223> 人工序列的描述: cyno186 VH的氨基酸序列
 [1357] <400> 41
 [1358] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Phe Val Gln Pro Gly Gly
 [1359] 1 5 10 15
 [1360] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Lys Gly Tyr
 [1361] 20 25 30
 [1362] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1363] 35 40 45
 [1364] Ser Arg Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 [1365] 50 55 60
 [1366] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1367] 65 70 75 80
 [1368] Leu Gln Ile Asp Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1369] 85 90 95
 [1370] Ala Lys Ala Lys Asp Ala Tyr Arg Trp Asn Asn Ala Ile Asp Glu Trp
 [1371] 100 105 110
 [1372] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1373] 115 120
 [1374] <210> 42
 [1375] <211> 5
 [1376] <212> PRT
 [1377] <213> 人工序列
 [1378] <220>
 [1379] <223> 人工序列的描述: cyno186 HCDR1的氨基酸序列
 [1380] <400> 42
 [1381] Gly Tyr Ala Met Asn
 [1382] 1 5
 [1383] <210> 43
 [1384] <211> 17
 [1385] <212> PRT

- [1386] <213> 人工序列
- [1387] <220>
- [1388] <223> 人工序列的描述: cyno186 HCDR2的氨基酸序列
- [1389] <400> 43
- [1390] Arg Ile Ser Asn Gly Gly Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
- [1391] 1 5 10 15
- [1392] Gly
- [1393] <210> 44
- [1394] <211> 13
- [1395] <212> PRT
- [1396] <213> 人工序列
- [1397] <220>
- [1398] <223> 人工序列的描述: cyno186 HCDR3的氨基酸序列
- [1399] <400> 44
- [1400] Ala Lys Asp Ala Tyr Arg Trp Asn Asn Ala Ile Asp Glu
- [1401] 1 5 10
- [1402] <210> 45
- [1403] <211> 366
- [1404] <212> DNA
- [1405] <213> 人工序列
- [1406] <220>
- [1407] <223> 人工序列的描述: cyno292 VH的碱基序列
- [1408] <400> 45
- [1409] caggtgcagc tgggtcaatc tgggggaggc ctggtcaagc ctggggggtc cctgagaatc 60
- [1410] tcctgtacaa cctctggatt cccctttgat ggctatacca tgacctgggt ccgccaggt 120
- [1411] ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaagt attagtaatg gtggtagcac cattttcgtc 180
- [1412] tcagactcag tgagaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ttcactgtat 240
- [1413] ctccaaatga acaacgtggg agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagctcga 300
- [1414] gatgcgtatg gctggacgt tcctttctgac atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
- [1415] tcttca 366
- [1416] <210> 46
- [1417] <211> 122
- [1418] <212> PRT
- [1419] <213> 人工序列
- [1420] <220>
- [1421] <223> 人工序列的描述: cyno292 VH的氨基酸序列
- [1422] <400> 46
- [1423] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
- [1424] 1 5 10 15
- [1425] Ser Leu Arg Ile Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Pro Phe Asp Gly Tyr
- [1426] 20 25 30
- [1427] Thr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[1428]	35	40	45
[1429]	Ser Ser Ile Ser Asn Gly Gly Ser Thr Ile Phe Val Ser Asp Ser Val		
[1430]	50	55	60
[1431]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[1432]	65	70	75
[1433]	Leu Gln Met Asn Asn Val Gly Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1434]	85	90	95
[1435]	Ala Arg Ala Arg Asp Ala Tyr Gly Trp Thr Leu Pro Ser Asp Ile Trp		
[1436]	100	105	110
[1437]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
[1438]	115	120	
[1439]	<210> 47		
[1440]	<211> 5		
[1441]	<212> PRT		
[1442]	<213> 人工序列		
[1443]	<220>		
[1444]	<223> 人工序列的描述: cyno292 HCDR1的氨基酸序列		
[1445]	<400> 47		
[1446]	Gly Tyr Thr Met Thr		
[1447]	1	5	
[1448]	<210> 48		
[1449]	<211> 17		
[1450]	<212> PRT		
[1451]	<213> 人工序列		
[1452]	<220>		
[1453]	<223> 人工序列的描述: cyno292 HCDR2的氨基酸序列		
[1454]	<400> 48		
[1455]	Ser Ile Ser Asn Gly Gly Ser Thr Ile Phe Val Ser Asp Ser Val Arg		
[1456]	1	5	10
[1457]	Gly		15
[1458]	<210> 49		
[1459]	<211> 13		
[1460]	<212> PRT		
[1461]	<213> 人工序列		
[1462]	<220>		
[1463]	<223> 人工序列的描述: cyno292 HCDR3的氨基酸序列		
[1464]	<400> 49		
[1465]	Ala Arg Asp Ala Tyr Gly Trp Thr Leu Pro Ser Asp Ile		
[1466]	1	5	10
[1467]	<210> 50		
[1468]	<211> 122		
[1469]	<212> PRT		

[1470]	<213>	人工序列
[1471]	<220>	
[1472]	<223>	人工序列的描述: TfR1007 VH的氨基酸序列
[1473]	<400>	50
[1474]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1475]	1 5 10 15	
[1476]	Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Lys Gly Tyr	
[1477]	20 25 30	
[1478]	Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1479]	35 40 45	
[1480]	Ser Ser Leu Ser Asn Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[1481]	50 55 60	
[1482]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[1483]	65 70 75 80	
[1484]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1485]	85 90 95	
[1486]	Ala Lys Thr Leu Gly Ala Tyr Tyr Ile Lys Ser Ala Met Asp Val Trp	
[1487]	100 105 110	
[1488]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
[1489]	115 120	
[1490]	<210>	51
[1491]	<211>	122
[1492]	<212>	PRT
[1493]	<213>	人工序列
[1494]	<220>	
[1495]	<223>	人工序列的描述: cyno163 VH的氨基酸序列
[1496]	<400>	51
[1497]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1498]	1 5 10 15	
[1499]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr	
[1500]	20 25 30	
[1501]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1502]	35 40 45	
[1503]	Ser Gly Ile Ser Asn Gly Gly Ser Ser Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val	
[1504]	50 55 60	
[1505]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr	
[1506]	65 70 75 80	
[1507]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1508]	85 90 95	
[1509]	Ala Arg Pro Arg Ser Pro Tyr Leu Phe Tyr Asp Ala Ala Gly Val Trp	
[1510]	100 105 110	
[1511]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	

[1512]	115	120
[1513]	<210> 52	
[1514]	<211> 123	
[1515]	<212> PRT	
[1516]	<213> 人工序列	
[1517]	<220>	
[1518]	<223> 人工序列的描述: 22-30 VH的氨基酸序列	
[1519]	<400> 52	
[1520]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
[1521]	1	15
[1522]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr	
[1523]	20	30
[1524]	Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[1525]	35	45
[1526]	Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	
[1527]	50	60
[1528]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	
[1529]	65	80
[1530]	Arg Leu Ser Ser Val Thr Thr Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Thr	
[1531]	85	95
[1532]	Arg Glu Ala Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Phe Asp Tyr	
[1533]	100	110
[1534]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[1535]	115	120
[1536]	<210> 53	
[1537]	<211> 107	
[1538]	<212> PRT	
[1539]	<213> 人工序列	
[1540]	<220>	
[1541]	<223> 人工序列的描述: 22-30 VL的氨基酸序列	
[1542]	<400> 53	
[1543]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[1544]	1	15
[1545]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	
[1546]	20	30
[1547]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	
[1548]	35	45
[1549]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[1550]	50	60
[1551]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[1552]	65	80
[1553]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Tyr	

[1554]		85		90		95
[1555]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[1556]		100		105		
[1557]	<210> 54					
[1558]	<211> 114					
[1559]	<212> PRT					
[1560]	<213> 人工序列					
[1561]	<220>					
[1562]	<223> 人工序列的描述: T14 VH的氨基酸序列					
[1563]	<400> 54					
[1564]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
[1565]	1	5		10		15
[1566]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asn Phe					
[1567]		20		25		30
[1568]	Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
[1569]		35		40		45
[1570]	Ser Tyr Ile Ser Gly Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val					
[1571]		50		55		60
[1572]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr					
[1573]	65		70		75	80
[1574]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[1575]		85		90		95
[1576]	Val Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val					
[1577]		100		105		110
[1578]	Ser Ser					
[1579]	<210> 55					
[1580]	<211> 123					
[1581]	<212> PRT					
[1582]	<213> 人工序列					
[1583]	<220>					
[1584]	<223> 人工序列的描述: TfR434 VH的氨基酸序列					
[1585]	<400> 55					
[1586]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg					
[1587]	1	5		10		15
[1588]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Lys Ser Tyr					
[1589]		20		25		30
[1590]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
[1591]		35		40		45
[1592]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val					
[1593]		50		55		60
[1594]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr					
[1595]	65		70		75	80

[1596]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1597]					85					90					95	
[1598]	Ala	Arg	Asp	Ser	Asn	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Val	Asp	Val
[1599]					100					105					110	
[1600]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
[1601]					115					120						
[1602]	<210> 56															
[1603]	<211> 123															
[1604]	<212> PRT															
[1605]	<213> 人工序列															
[1606]	<220>															
[1607]	<223> 人工序列的描述: TfR435 VH的氨基酸序列															
[1608]	<400> 56															
[1609]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
[1610]	1				5					10					15	
[1611]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Phe	Lys	Ser	Tyr
[1612]					20					25				30		
[1613]	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[1614]					35					40				45		
[1615]	Ala	Val	Ile	Ser	Phe	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[1616]					50					55				60		
[1617]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[1618]	65					70					75				80	
[1619]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1620]					85					90					95	
[1621]	Ala	Arg	Asp	Ser	Asn	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Val	Asp	Val
[1622]					100					105					110	
[1623]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
[1624]					115					120						
[1625]	<210> 57															
[1626]	<211> 111															
[1627]	<212> PRT															
[1628]	<213> 人工序列															
[1629]	<220>															
[1630]	<223> 人工序列的描述: TfR434,435 VL的氨基酸序列															
[1631]	<400> 57															
[1632]	Asn	Phe	Met	Leu	Thr	Gln	Pro	His	Ser	Val	Ser	Glu	Ser	Pro	Gly	Lys
[1633]	1				5					10					15	
[1634]	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Ile	Ala	Ser	Asn
[1635]					20					25				30		
[1636]	Ser	Val	Gln	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Thr	Val
[1637]					35					40				45		

[1638]	Ile Tyr Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[1639]	50 55 60
[1640]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
[1641]	65 70 75 80
[1642]	Leu Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
[1643]	85 90 95
[1644]	Ala Tyr His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Ala Val Leu
[1645]	100 105 110
[1646]	<210> 58
[1647]	<211> 366
[1648]	<212> DNA
[1649]	<213> 人工序列
[1650]	<220>
[1651]	<223> 人工序列的描述: E08 VH的碱基序列
[1652]	<400> 58
[1653]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
[1654]	tcctgtgcag cctctggatt cagctttaac aacaatgcca tgaactgggt ccgtcaggct 120
[1655]	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attcgtgccg atggcggtac gacatactac 180
[1656]	gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactgtat 240
[1657]	ctgcaaatac acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgg aaagacgcct 300
[1658]	gactgggaaa tcttctacta cgctatggac gcctggggcc aaggaccac ggtcaccgtc 360
[1659]	tcctca 366
[1660]	<210> 59
[1661]	<211> 122
[1662]	<212> PRT
[1663]	<213> 人工序列
[1664]	<220>
[1665]	<223> 人工序列的描述: E08 VH的氨基酸序列
[1666]	<400> 59
[1667]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1668]	1 5 10 15
[1669]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Asn Asn
[1670]	20 25 30
[1671]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1672]	35 40 45
[1673]	Ser Gly Ile Arg Ala Asp Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1674]	50 55 60
[1675]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1676]	65 70 75 80
[1677]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
[1678]	85 90 95
[1679]	Gly Lys Thr Pro Asp Trp Glu Ile Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Ala Trp

[1680]	100	105	110
[1681]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[1682]	115	120	
[1683]	<210> 60		
[1684]	<211> 5		
[1685]	<212> PRT		
[1686]	<213> 人工序列		
[1687]	<220>		
[1688]	<223> 人工序列的描述: E08 HCDR1的氨基酸序列		
[1689]	<400> 60		
[1690]	Asn Asn Ala Met Asn		
[1691]	1 5		
[1692]	<210> 61		
[1693]	<211> 17		
[1694]	<212> PRT		
[1695]	<213> 人工序列		
[1696]	<220>		
[1697]	<223> 人工序列的描述: E08 HCDR2的氨基酸序列		
[1698]	<400> 61		
[1699]	Gly Ile Arg Ala Asp Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
[1700]	1 5 10 15		
[1701]	Gly		
[1702]	<210> 62		
[1703]	<211> 13		
[1704]	<212> PRT		
[1705]	<213> 人工序列		
[1706]	<220>		
[1707]	<223> 人工序列的描述: E08 HCDR3的氨基酸序列		
[1708]	<400> 62		
[1709]	Thr Pro Asp Trp Glu Ile Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Ala		
[1710]	1 5 10		
[1711]	<210> 63		
[1712]	<211> 363		
[1713]	<212> DNA		
[1714]	<213> 人工序列		
[1715]	<220>		
[1716]	<223> 人工序列的描述: E12 VH的碱基序列		
[1717]	<400> 63		
[1718]	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60		
[1719]	tcctgtgcag cctctagatt cacctttagc gcctatgcca tgggctgggt gcgccaggct 120		
[1720]	ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcaatt attgatagtg gtgggtgtgta cacatactac 180		
[1721]	gcagactcca tgaagggccg cttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240		

[1722] ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gagagatcat 300
 [1723] tatgggtgttg tttggggact tggagattac tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc 360
 [1724] tca 363
 [1725] <210> 64
 [1726] <211> 121
 [1727] <212> PRT
 [1728] <213> 人工序列
 [1729] <220>
 [1730] <223> 人工序列的描述: E12 VH的氨基酸序列
 [1731] <400> 64
 [1732] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1733] 1 5 10 15
 [1734] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
 [1735] 20 25 30
 [1736] Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1737] 35 40 45
 [1738] Ser Ile Ile Asp Ser Gly Gly Val Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
 [1739] 50 55 60
 [1740] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1741] 65 70 75 80
 [1742] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1743] 85 90 95
 [1744] Ala Arg Asp His Tyr Gly Val Val Trp Gly Leu Gly Asp Tyr Trp Gly
 [1745] 100 105 110
 [1746] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1747] 115 120
 [1748] <210> 65
 [1749] <211> 5
 [1750] <212> PRT
 [1751] <213> 人工序列
 [1752] <220>
 [1753] <223> 人工序列的描述: E12 HCDR1的氨基酸序列
 [1754] <400> 65
 [1755] Ala Tyr Ala Met Gly
 [1756] 1 5
 [1757] <210> 66
 [1758] <211> 17
 [1759] <212> PRT
 [1760] <213> 人工序列
 [1761] <220>
 [1762] <223> 人工序列的描述: E12 HCDR2的氨基酸序列
 [1763] <400> 66

[1764]	Ile Ile Asp Ser Gly Gly Val Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Met Lys
[1765]	1 5 10 15
[1766]	Gly
[1767]	<210> 67
[1768]	<211> 12
[1769]	<212> PRT
[1770]	<213> 人工序列
[1771]	<220>
[1772]	<223> 人工序列的描述: E12 HCDR3的氨基酸序列
[1773]	<400> 67
[1774]	Asp His Tyr Gly Val Val Trp Gly Leu Gly Asp Tyr
[1775]	1 5 10
[1776]	<210> 68
[1777]	<211> 354
[1778]	<212> DNA
[1779]	<213> 人工序列
[1780]	<220>
[1781]	<223> 人工序列的描述: E17 VH的碱基序列
[1782]	<400> 68
[1783]	caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcgagac tctgtccctc 60
[1784]	acctgcgcac tgtacagtg gtccttcagt gtcaggact ggagctggat ccgccagtcc 120
[1785]	ccagagaagg ggctggagtg gattggggaa atctggcaag ggggaaaaac caactacaac 180
[1786]	ccgtccctca agagtcgagt tagtatatca agagacaact ccaagaacca gttgtccctg 240
[1787]	cagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag ggtggactgg 300
[1788]	tcttatcgtg tttttgaaat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354
[1789]	<210> 69
[1790]	<211> 118
[1791]	<212> PRT
[1792]	<213> 人工序列
[1793]	<220>
[1794]	<223> 人工序列的描述: E17 VH的氨基酸序列
[1795]	<400> 69
[1796]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
[1797]	1 5 10 15
[1798]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Leu Tyr Ser Gly Ser Phe Ser Ala Gln
[1799]	20 25 30
[1800]	Asp Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1801]	35 40 45
[1802]	Gly Glu Ile Trp Gln Gly Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
[1803]	50 55 60
[1804]	Ser Arg Val Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu
[1805]	65 70 75 80

[1806]	Gln Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[1807]	85 90 95
[1808]	Arg Val Asp Trp Ser Tyr Arg Val Phe Glu Ile Trp Gly Gln Gly Thr
[1809]	100 105 110
[1810]	Met Val Thr Val Ser Ser
[1811]	115
[1812]	<210> 70
[1813]	<211> 5
[1814]	<212> PRT
[1815]	<213> 人工序列
[1816]	<220>
[1817]	<223> 人工序列的描述: E17 HCDR1的氨基酸序列
[1818]	<400> 70
[1819]	Ala Gln Asp Trp Ser
[1820]	1 5
[1821]	<210> 71
[1822]	<211> 16
[1823]	<212> PRT
[1824]	<213> 人工序列
[1825]	<220>
[1826]	<223> 人工序列的描述: E17 HCDR2的氨基酸序列
[1827]	<400> 71
[1828]	Glu Ile Trp Gln Gly Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
[1829]	1 5 10 15
[1830]	<210> 72
[1831]	<211> 10
[1832]	<212> PRT
[1833]	<213> 人工序列
[1834]	<220>
[1835]	<223> 人工序列的描述: E17 HCDR3的氨基酸序列
[1836]	<400> 72
[1837]	Val Asp Trp Ser Tyr Arg Val Phe Glu Ile
[1838]	1 5 10
[1839]	<210> 73
[1840]	<211> 123
[1841]	<212> PRT
[1842]	<213> 人工序列
[1843]	<220>
[1844]	<223> 人工序列的描述: KME07 VH的氨基酸序列
[1845]	<400> 73
[1846]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[1847]	1 5 10 15

[1848]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Phe
[1849]	20 25 30
[1850]	Ala Phe Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1851]	35 40 45
[1852]	Gly Glu Val Arg Pro Gly Phe Gly Thr Glu Ile Leu Thr Gln Asn Phe
[1853]	50 55 60
[1854]	Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr
[1855]	65 70 75 80
[1856]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1857]	85 90 95
[1858]	Ala Arg Gly Leu Leu Arg Gly Gly Tyr Ile Glu Asn Pro Phe Glu Ile
[1859]	100 105 110
[1860]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1861]	115 120
[1862]	<210> 74
[1863]	<211> 123
[1864]	<212> PRT
[1865]	<213> 人工序列
[1866]	<220>
[1867]	<223> 人工序列的描述: KME09 VH的氨基酸序列
[1868]	<400> 74
[1869]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[1870]	1 5 10 15
[1871]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Phe
[1872]	20 25 30
[1873]	Ala Trp Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1874]	35 40 45
[1875]	Gly Glu Ile Arg Pro Gly Phe Gly Thr Glu Ile Tyr Ala Gln Asn Phe
[1876]	50 55 60
[1877]	Gln Asp Arg Val Thr Phe Ile Thr Asp Glu Ala Thr Ser Thr Thr Tyr
[1878]	65 70 75 80
[1879]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1880]	85 90 95
[1881]	Ala Arg Gly Leu Leu Arg Ser Gly Tyr Ile Asp Asn Pro Cys Asp Ile
[1882]	100 105 110
[1883]	Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[1884]	115 120
[1885]	<210> 75
[1886]	<211> 125
[1887]	<212> PRT
[1888]	<213> 人工序列
[1889]	<220>

[1890]	<223> 人工序列的描述: KME11 VH的氨基酸序列															
[1891]	<400> 75															
[1892]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
[1893]	1				5									10		15
[1894]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Tyr
[1895]					20					25				30		
[1896]	Gly	Ile	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Phe	Ala	Trp	Met
[1897]					35					40				45		
[1898]	Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
[1899]					50					55				60		
[1900]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
[1901]	65					70						75				80
[1902]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Tyr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[1903]						85						90				95
[1904]	Ala	Gly	Asp	Glu	Leu	Ser	Glu	Gly	His	Ser	Glu	Tyr	Tyr	His	Gly	Met
[1905]					100					105				110		
[1906]	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
[1907]					115					120				125		
[1908]	<210> 76															
[1909]	<211> 119															
[1910]	<212> PRT															
[1911]	<213> 人工序列															
[1912]	<220>															
[1913]	<223> 人工序列的描述: Cetuximab VH的氨基酸序列															
[1914]	<400> 76															
[1915]	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln
[1916]	1				5									10		15
[1917]	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr
[1918]					20					25				30		
[1919]	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
[1920]					35					40				45		
[1921]	Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr
[1922]					50					55				60		
[1923]	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe
[1924]	65					70						75				80
[1925]	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala
[1926]					85					90				95		
[1927]	Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
[1928]					100					105				110		
[1929]	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
[1930]					115											
[1931]	<210> 77															

[1932]	<211>	107
[1933]	<212>	PRT
[1934]	<213>	人工序列
[1935]	<220>	
[1936]	<223>	人工序列的描述: Cetuximab VL的氨基酸序列
[1937]	<400>	77
[1938]	Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly	
[1939]	1 5 10 15	
[1940]	Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn	
[1941]	20 25 30	
[1942]	Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile	
[1943]	35 40 45	
[1944]	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[1945]	50 55 60	
[1946]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser	
[1947]	65 70 75 80	
[1948]	Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr	
[1949]	85 90 95	
[1950]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
[1951]	100 105	
[1952]	<210>	78
[1953]	<211>	117
[1954]	<212>	PRT
[1955]	<213>	人工序列
[1956]	<220>	
[1957]	<223>	人工序列的描述: HN3 VH的氨基酸序列
[1958]	<400>	78
[1959]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1960]	1 5 10 15	
[1961]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Tyr Phe Asp Phe Asp Ser Tyr	
[1962]	20 25 30	
[1963]	Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[1964]	35 40 45	
[1965]	Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	
[1966]	50 55 60	
[1967]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu	
[1968]	65 70 75 80	
[1969]	Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala	
[1970]	85 90 95	
[1971]	Arg Val Asn Met Asp Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
[1972]	100 105 110	
[1973]	Thr Val Ser Ser Ser	

[1974]	115
[1975]	<210> 79
[1976]	<211> 2
[1977]	<212> PRT
[1978]	<213> 人工序列
[1979]	<220>
[1980]	<223> 人工序列的描述: 接头的氨基酸序列
[1981]	<400> 79
[1982]	Glu Ser
[1983]	1
[1984]	<210> 80
[1985]	<211> 5
[1986]	<212> PRT
[1987]	<213> 人工序列
[1988]	<220>
[1989]	<223> 人工序列的描述: 接头的氨基酸序列
[1990]	<400> 80
[1991]	Glu Ser Lys Tyr Gly
[1992]	1 5
[1993]	<210> 81
[1994]	<211> 7
[1995]	<212> PRT
[1996]	<213> 人工序列
[1997]	<220>
[1998]	<223> 人工序列的描述: 接头的氨基酸序列
[1999]	<400> 81
[2000]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
[2001]	1 5
[2002]	<210> 82
[2003]	<211> 5
[2004]	<212> PRT
[2005]	<213> 人工序列
[2006]	<220>
[2007]	<223> 人工序列的描述: 接头的氨基酸序列
[2008]	<400> 82
[2009]	Gly Gly Gly Gly Ser
[2010]	1 5
[2011]	<210> 83
[2012]	<211> 981
[2013]	<212> DNA
[2014]	<213> 人工序列
[2015]	<220>

[2016]	<223> 人工序列的描述: IgG4PE R409K恒定区碱基序列
[2017]	<400> 83
[2018]	gctagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
[2019]	agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
[2020]	tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
[2021]	ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
[2022]	tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
[2023]	aaatatggtc ccccatgccc accatgcccga gcacctgagt tcgagggggg accatcagtc 360
[2024]	ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcacg 420
[2025]	tgcggtgggg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
[2026]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgaggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
[2027]	cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
[2028]	tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
[2029]	gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
[2030]	aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggctttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
[2031]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctctccgt gctggactcc 840
[2032]	gacggctcct tcttcctcta cagcaagcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
[2033]	aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
[2034]	ctctccctgt ctctgggtaa a 981
[2035]	<210> 84
[2036]	<211> 327
[2037]	<212> PRT
[2038]	<213> 人工序列
[2039]	<220>
[2040]	<223> 人工序列的描述: IgG4PE R409K恒定区的氨基酸序列
[2041]	<400> 84
[2042]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
[2043]	1 5 10 15
[2044]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[2045]	20 25 30
[2046]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[2047]	35 40 45
[2048]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[2049]	50 55 60
[2050]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[2051]	65 70 75 80
[2052]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[2053]	85 90 95
[2054]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[2055]	100 105 110
[2056]	Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[2057]	115 120 125

[2058]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[2059]	130 135 140
[2060]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[2061]	145 150 155 160
[2062]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[2063]	165 170 175
[2064]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[2065]	180 185 190
[2066]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[2067]	195 200 205
[2068]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[2069]	210 215 220
[2070]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[2071]	225 230 235 240
[2072]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[2073]	245 250 255
[2074]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[2075]	260 265 270
[2076]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[2077]	275 280 285
[2078]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[2079]	290 295 300
[2080]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[2081]	305 310 315 320
[2082]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[2083]	325
[2084]	<210> 85
[2085]	<211> 294
[2086]	<212> DNA
[2087]	<213> 人工序列
[2088]	<220>
[2089]	<223> 人工序列的描述: IgG4 CH1的修饰密码子的碱基序列
[2090]	<400> 85
[2091]	gctagcacca aaggaccttc tgtatttcct cttgcgccat gctctcgctc tacgtcagaa 60
[2092]	tcaactgccg ctctgggggtg cctgggttaa gactacttcc cggagcctgt gacagtgagt 120
[2093]	tggaactccg gcgccctgac atcaggagtg catacatttc ccgccgtgct tcagagcagc 180
[2094]	ggactttata gcctcagcag tgtgggtgacc gtgccatctt ccagcctggg gaccaagacc 240
[2095]	tacacctgta acgtggacca caaaccagc aacaccaagg ttgataagag ggctc 294
[2096]	<210> 86
[2097]	<211> 327
[2098]	<212> PRT
[2099]	<213> 人工序列

[2100]	<220>
[2101]	<223> 人工序列的描述: IgG4PE恒定区的氨基酸序列
[2102]	<400> 86
[2103]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
[2104]	1 5 10 15
[2105]	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[2106]	20 25 30
[2107]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[2108]	35 40 45
[2109]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[2110]	50 55 60
[2111]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
[2112]	65 70 75 80
[2113]	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[2114]	85 90 95
[2115]	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
[2116]	100 105 110
[2117]	Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
[2118]	115 120 125
[2119]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
[2120]	130 135 140
[2121]	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
[2122]	145 150 155 160
[2123]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
[2124]	165 170 175
[2125]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
[2126]	180 185 190
[2127]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
[2128]	195 200 205
[2129]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
[2130]	210 215 220
[2131]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[2132]	225 230 235 240
[2133]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[2134]	245 250 255
[2135]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[2136]	260 265 270
[2137]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[2138]	275 280 285
[2139]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[2140]	290 295 300
[2141]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

[2142]	305	310	315	320
[2143]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
[2144]	325			
[2145]	<210> 87			
[2146]	<211> 763			
[2147]	<212> PRT			
[2148]	<213> 小鼠			
[2149]	<400> 87			
[2150]	Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu			
[2151]	1	5	10	15
[2152]	Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp			
[2153]	20	25	30	
[2154]	Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Ala Asp Glu Glu Glu Asn Ala			
[2155]	35	40	45	
[2156]	Asp Asn Asn Met Lys Ala Ser Val Arg Lys Pro Lys Arg Phe Asn Gly			
[2157]	50	55	60	
[2158]	Arg Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ala Leu Val Ile Phe Phe Leu Ile Gly			
[2159]	65	70	75	80
[2160]	Phe Met Ser Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu			
[2161]	85	90	95	
[2162]	Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr			
[2163]	100	105	110	
[2164]	Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp			
[2165]	115	120	125	
[2166]	Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp			
[2167]	130	135	140	
[2168]	Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly			
[2169]	145	150	155	160
[2170]	Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His			
[2171]	165	170	175	
[2172]	Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile			
[2173]	180	185	190	
[2174]	Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser			
[2175]	195	200	205	
[2176]	Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr Val Ala Phe			
[2177]	210	215	220	
[2178]	Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly			
[2179]	225	230	235	240
[2180]	Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Ser Tyr Ser Val Asn Gly Ser Leu			
[2181]	245	250	255	
[2182]	Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn			
[2183]	260	265	270	

[2184]	Ala	Gln	Ser	Phe	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Tyr	Met	Asp	Lys	Asn
[2185]			275					280					285			
[2186]	Lys	Phe	Pro	Val	Val	Glu	Ala	Asp	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	His	Ala	His
[2187]			290					295					300			
[2188]	Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His
[2189]	305					310					315					320
[2190]	Thr	Gln	Phe	Pro	Pro	Ser	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val
[2191]					325					330					335	
[2192]	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Leu	Phe	Gly	Lys	Met	Glu
[2193]				340					345					350		
[2194]	Gly	Ser	Cys	Pro	Ala	Arg	Trp	Asn	Ile	Asp	Ser	Ser	Cys	Lys	Leu	Glu
[2195]			355					360					365			
[2196]	Leu	Ser	Gln	Asn	Gln	Asn	Val	Lys	Leu	Ile	Val	Lys	Asn	Val	Leu	Lys
[2197]	370						375						380			
[2198]	Glu	Arg	Arg	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Gly	Val	Ile	Lys	Gly	Tyr	Glu	Glu
[2199]	385				390					395						400
[2200]	Pro	Asp	Arg	Tyr	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gln	Arg	Asp	Ala	Leu	Gly	Ala
[2201]				405						410					415	
[2202]	Gly	Val	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser	Val	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu
[2203]				420						425					430	
[2204]	Ala	Gln	Val	Phe	Ser	Asp	Met	Ile	Ser	Lys	Asp	Gly	Phe	Arg	Pro	Ser
[2205]			435						440				445			
[2206]	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Ala	Ser	Trp	Thr	Ala	Gly	Asp	Phe	Gly	Ala	Val
[2207]	450						455					460				
[2208]	Gly	Ala	Thr	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Leu	His	Leu	Lys
[2209]	465					470					475					480
[2210]	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ile	Asn	Leu	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Asn
[2211]				485						490					495	
[2212]	Phe	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr	Leu	Met	Gly	Lys	Ile
[2213]			500						505					510		
[2214]	Met	Gln	Asp	Val	Lys	His	Pro	Val	Asp	Gly	Lys	Ser	Leu	Tyr	Arg	Asp
[2215]			515						520				525			
[2216]	Ser	Asn	Trp	Ile	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Asp	Asn	Ala	Ala
[2217]	530						535						540			
[2218]	Tyr	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Val	Ser	Phe	Cys	Phe
[2219]	545					550					555					560
[2220]	Cys	Glu	Asp	Ala	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Thr	Tyr
[2221]				565						570					575	
[2222]	Glu	Ala	Leu	Thr	Gln	Lys	Val	Pro	Gln	Leu	Asn	Gln	Met	Val	Arg	Thr
[2223]				580						585					590	
[2224]	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Leu	Ile	Ile	Lys	Leu	Thr	His	Asp	Val
[2225]			595					600						605		

[2226]	Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Met Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Ser Phe
[2227]	610 615 620
[2228]	Met Lys Asp Leu Asn Gln Phe Lys Thr Asp Ile Arg Asp Met Gly Leu
[2229]	625 630 635 640
[2230]	Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Phe Arg Ala Thr
[2231]	645 650 655
[2232]	Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe His Asn Ala Glu Lys Thr Asn Arg Phe
[2233]	660 665 670
[2234]	Val Met Arg Glu Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Val Glu Tyr His Phe
[2235]	675 680 685
[2236]	Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Arg Glu Ser Pro Phe Arg His Ile Phe
[2237]	690 695 700
[2238]	Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Val Glu Asn Leu Lys
[2239]	705 710 715 720
[2240]	Leu Arg Gln Lys Asn Ile Thr Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn
[2241]	725 730 735
[2242]	Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Val Ala Asn Ala Leu
[2243]	740 745 750
[2244]	Ser Gly Asp Ile Trp Asn Ile Asp Asn Glu Phe
[2245]	755 760
[2246]	<210> 88
[2247]	<211> 672
[2248]	<212> PRT
[2249]	<213> 人工序列
[2250]	<220>
[2251]	<223> 人工序列的描述: 人TfR胞外域的顶端域小鼠嵌合体的氨基酸序列
[2252]	<400> 88
[2253]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
[2254]	1 5 10 15
[2255]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg
[2256]	20 25 30
[2257]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
[2258]	35 40 45
[2259]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr
[2260]	50 55 60
[2261]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
[2262]	65 70 75 80
[2263]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
[2264]	85 90 95
[2265]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Met
[2266]	100 105 110
[2267]	Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro

[2268]	115	120	125
[2269]	Glu Gly Tyr Val Ala Phe Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu		
[2270]	130	135	140
[2271]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Ser Tyr		
[2272]	145	150	155
[2273]	Ser Val Asn Gly Ser Leu Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe		
[2274]	165	170	175
[2275]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Gln Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu		
[2276]	180	185	190
[2277]	Ile Tyr Met Asp Lys Asn Lys Phe Pro Val Val Glu Ala Asp Leu Ala		
[2278]	195	200	205
[2279]	Leu Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[2280]	210	215	220
[2281]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly		
[2282]	225	230	235
[2283]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[2284]	245	250	255
[2285]	Leu Phe Gly Lys Met Glu Gly Ser Cys Pro Ala Arg Trp Asn Ile Asp		
[2286]	260	265	270
[2287]	Ser Ser Cys Lys Leu Glu Leu Ser Gln Asn Gln Asn Val Lys Leu Ile		
[2288]	275	280	285
[2289]	Val Lys Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[2290]	290	295	300
[2291]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[2292]	305	310	315
[2293]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[2294]	325	330	335
[2295]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[2296]	340	345	350
[2297]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[2298]	355	360	365
[2299]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[2300]	370	375	380
[2301]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[2302]	385	390	395
[2303]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[2304]	405	410	415
[2305]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[2306]	420	425	430
[2307]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[2308]	435	440	445
[2309]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		

[2310]	450	455	460
[2311]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[2312]	465	470	475 480
[2313]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[2314]		485	490 495
[2315]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[2316]		500	505 510
[2317]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[2318]		515	520 525
[2319]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		
[2320]	530	535	540
[2321]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[2322]	545	550	555 560
[2323]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		
[2324]		565	570 575
[2325]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[2326]		580	585 590
[2327]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[2328]		595	600 605
[2329]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		
[2330]	610	615	620
[2331]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		
[2332]	625	630	635 640
[2333]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		
[2334]		645	650 655
[2335]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[2336]		660	665 670
[2337]	<210> 89		
[2338]	<211> 675		
[2339]	<212> PRT		
[2340]	<213> 人工序列		
[2341]	<220>		
[2342]	<223> 人工序列的描述：人TfR胞外域的蛋白酶样域小鼠嵌合体的氨基酸序列		
[2343]	<400> 89		
[2344]	Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr		
[2345]	1	5	10 15
[2346]	Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr		
[2347]		20	25 30
[2348]	Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys		
[2349]		35	40 45
[2350]	Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn		
[2351]	50	55	60

[2352]	Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala		
[2353]	65	70	75 80
[2354]	Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp		
[2355]		85	90 95
[2356]	Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn		
[2357]		100	105 110
[2358]	Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu		
[2359]		115	120 125
[2360]	Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly		
[2361]		130	135 140
[2362]	Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu		
[2363]		145	150 155 160
[2364]	Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile		
[2365]		165	170 175
[2366]	Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly		
[2367]		180	185 190
[2368]	Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu		
[2369]		195	200 205
[2370]	Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr		
[2371]		210	215 220
[2372]	Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser		
[2373]		225	230 235 240
[2374]	Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala		
[2375]		245	250 255
[2376]	Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys		
[2377]		260	265 270
[2378]	Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys		
[2379]		275	280 285
[2380]	Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Arg Arg Ile Leu Asn Ile Phe		
[2381]		290	295 300
[2382]	Gly Val Ile Lys Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Arg Tyr Val Val Val Gly		
[2383]		305	310 315 320
[2384]	Ala Gln Arg Asp Ala Leu Gly Ala Gly Val Ala Ala Lys Ser Ser Val		
[2385]		325	330 335
[2386]	Gly Thr Gly Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile		
[2387]		340	345 350
[2388]	Ser Lys Asp Gly Phe Arg Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp		
[2389]		355	360 365
[2390]	Thr Ala Gly Asp Phe Gly Ala Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly		
[2391]		370	375 380
[2392]	Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp		
[2393]		385	390 395 400

[2394]	Lys Val Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu
[2395]	405 410 415
[2396]	Leu Tyr Thr Leu Met Gly Lys Ile Met Gln Asp Val Lys His Pro Val
[2397]	420 425 430
[2398]	Asp Gly Lys Ser Leu Tyr Arg Asp Ser Asn Trp Ile Ser Lys Val Glu
[2399]	435 440 445
[2400]	Lys Leu Ser Phe Asp Asn Ala Ala Tyr Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly
[2401]	450 455 460
[2402]	Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Ala Asp Tyr Pro Tyr
[2403]	465 470 475 480
[2404]	Leu Gly Thr Arg Leu Asp Thr Tyr Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val Pro
[2405]	485 490 495
[2406]	Gln Leu Asn Gln Met Val Arg Thr Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Leu
[2407]	500 505 510
[2408]	Ile Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg
[2409]	515 520 525
[2410]	Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg
[2411]	530 535 540
[2412]	Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala
[2413]	545 550 555 560
[2414]	Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly
[2415]	565 570 575
[2416]	Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg
[2417]	580 585 590
[2418]	Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys
[2419]	595 600 605
[2420]	Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu
[2421]	610 615 620
[2422]	Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala
[2423]	625 630 635 640
[2424]	Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr
[2425]	645 650 655
[2426]	Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp
[2427]	660 665 670
[2428]	Asn Glu Phe
[2429]	675
[2430]	<210> 90
[2431]	<211> 672
[2432]	<212> PRT
[2433]	<213> 人工序列
[2434]	<220>
[2435]	<223> 人工序列的描述: A01的氨基酸序列

[2436]	<400> 90
[2437]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
[2438]	1 5 10 15
[2439]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg
[2440]	20 25 30
[2441]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
[2442]	35 40 45
[2443]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr
[2444]	50 55 60
[2445]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
[2446]	65 70 75 80
[2447]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
[2448]	85 90 95
[2449]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val
[2450]	100 105 110
[2451]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
[2452]	115 120 125
[2453]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu
[2454]	130 135 140
[2455]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr
[2456]	145 150 155 160
[2457]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe
[2458]	165 170 175
[2459]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu
[2460]	180 185 190
[2461]	Ile Tyr Met Asp Lys Asn Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser
[2462]	195 200 205
[2463]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly
[2464]	210 215 220
[2465]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly
[2466]	225 230 235 240
[2467]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys
[2468]	245 250 255
[2469]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp
[2470]	260 265 270
[2471]	Ser Ser Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr
[2472]	275 280 285
[2473]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val
[2474]	290 295 300
[2475]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln
[2476]	305 310 315 320
[2477]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala

[2478]	325								330						335				
[2479]	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Met	Phe	Ser	Asp	Met	Val	Leu	Lys	Asp			
[2480]	340								345						350				
[2481]	Gly	Phe	Gln	Pro	Ser	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Ala	Ser	Trp	Ser	Ala	Gly			
[2482]	355								360						365				
[2483]	Asp	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser			
[2484]	370								375						380				
[2485]	Ser	Leu	His	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr	Tyr	Ile	Asn	Leu	Asp	Lys	Ala	Val			
[2486]	385								390						395			400	
[2487]	Leu	Gly	Thr	Ser	Asn	Phe	Lys	Val	Ser	Ala	Ser	Pro	Leu	Leu	Tyr	Thr			
[2488]	405								410						415				
[2489]	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Met	Gln	Asn	Val	Lys	His	Pro	Val	Thr	Gly	Gln			
[2490]	420								425						430				
[2491]	Phe	Leu	Tyr	Gln	Asp	Ser	Asn	Trp	Ala	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Leu	Thr			
[2492]	435								440						445				
[2493]	Leu	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala			
[2494]	450								455						460				
[2495]	Val	Ser	Phe	Cys	Phe	Cys	Glu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr			
[2496]	465								470						475			480	
[2497]	Thr	Met	Asp	Thr	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	Ile	Pro	Glu	Leu	Asn			
[2498]	485								490						495				
[2499]	Lys	Val	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Phe	Val	Ile	Lys			
[2500]	500								505						510				
[2501]	Leu	Thr	His	Asp	Val	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Asn	Ser			
[2502]	515								520						525				
[2503]	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Asn	Gln	Tyr	Arg	Ala	Asp	Ile			
[2504]	530								535						540				
[2505]	Lys	Glu	Met	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Trp	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	Asp			
[2506]	545								550						555			560	
[2507]	Phe	Phe	Arg	Ala	Thr	Ser	Arg	Leu	Thr	Thr	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Glu			
[2508]	565								570						575				
[2509]	Lys	Thr	Asp	Arg	Phe	Val	Met	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Val	Met	Arg			
[2510]	580								585						590				
[2511]	Val	Glu	Tyr	His	Phe	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Pro	Lys	Glu	Ser	Pro			
[2512]	595								600						605				
[2513]	Phe	Arg	His	Val	Phe	Trp	Gly	Ser	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu			
[2514]	610								615						620				
[2515]	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Leu	Arg	Lys	Gln	Asn	Asn	Gly	Ala	Phe	Asn	Glu			
[2516]	625								630						635			640	
[2517]	Thr	Leu	Phe	Arg	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Trp	Thr	Ile	Gln	Gly			
[2518]	645								650						655				
[2519]	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	Val	Trp	Asp	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe			

[2520]	660	665	670
[2521]	<210> 91		
[2522]	<211> 672		
[2523]	<212> PRT		
[2524]	<213> 人工序列		
[2525]	<220>		
[2526]	<223> 人工序列的描述: A02的氨基酸序列		
[2527]	<400> 91		
[2528]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[2529]	1 5 10 15		
[2530]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		
[2531]	20 25 30		
[2532]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		
[2533]	35 40 45		
[2534]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		
[2535]	50 55 60		
[2536]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		
[2537]	65 70 75 80		
[2538]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		
[2539]	85 90 95		
[2540]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val		
[2541]	100 105 110		
[2542]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro		
[2543]	115 120 125		
[2544]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu		
[2545]	130 135 140		
[2546]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr		
[2547]	145 150 155 160		
[2548]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe		
[2549]	165 170 175		
[2550]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu		
[2551]	180 185 190		
[2552]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser		
[2553]	195 200 205		
[2554]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[2555]	210 215 220		
[2556]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[2557]	225 230 235 240		
[2558]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[2559]	245 250 255		
[2560]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Ser Cys Pro Ala Arg Trp Asn Thr Asp		
[2561]	260 265 270		

[2562]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr		
[2563]	275	280	285
[2564]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[2565]	290	295	300
[2566]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[2567]	305	310	315
[2568]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[2569]	325	330	335
[2570]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[2571]	340	345	350
[2572]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[2573]	355	360	365
[2574]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[2575]	370	375	380
[2576]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[2577]	385	390	395
[2578]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[2579]	405	410	415
[2580]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[2581]	420	425	430
[2582]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[2583]	435	440	445
[2584]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[2585]	450	455	460
[2586]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[2587]	465	470	475
[2588]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[2589]	485	490	495
[2590]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[2591]	500	505	510
[2592]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[2593]	515	520	525
[2594]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		
[2595]	530	535	540
[2596]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[2597]	545	550	555
[2598]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		
[2599]	565	570	575
[2600]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[2601]	580	585	590
[2602]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[2603]	595	600	605

[2604]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu
[2605]	610 615 620
[2606]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu
[2607]	625 630 635 640
[2608]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly
[2609]	645 650 655
[2610]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
[2611]	660 665 670
[2612]	<210> 92
[2613]	<211> 672
[2614]	<212> PRT
[2615]	<213> 人工序列
[2616]	<220>
[2617]	<223> 人工序列的描述: A03的氨基酸序列
[2618]	<400> 92
[2619]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
[2620]	1 5 10 15
[2621]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg
[2622]	20 25 30
[2623]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
[2624]	35 40 45
[2625]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr
[2626]	50 55 60
[2627]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
[2628]	65 70 75 80
[2629]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
[2630]	85 90 95
[2631]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val
[2632]	100 105 110
[2633]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
[2634]	115 120 125
[2635]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu
[2636]	130 135 140
[2637]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Tyr Thr
[2638]	145 150 155 160
[2639]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe
[2640]	165 170 175
[2641]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu
[2642]	180 185 190
[2643]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser
[2644]	195 200 205
[2645]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly

[2646]	210	215	220
[2647]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[2648]	225	230	235
[2649]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[2650]		245	250
[2651]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp		
[2652]		260	265
[2653]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr		
[2654]		275	280
[2655]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[2656]	290	295	300
[2657]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[2658]	305	310	315
[2659]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[2660]		325	330
[2661]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[2662]		340	345
[2663]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[2664]		355	360
[2665]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[2666]		370	375
[2667]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[2668]	385	390	395
[2669]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[2670]		405	410
[2671]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[2672]		420	425
[2673]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[2674]		435	440
[2675]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[2676]		450	455
[2677]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[2678]	465	470	475
[2679]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[2680]		485	490
[2681]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[2682]		500	505
[2683]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[2684]		515	520
[2685]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		
[2686]		530	535
[2687]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		

[2688]	545	550	555	560
[2689]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu			
[2690]		565	570	575
[2691]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg			
[2692]		580	585	590
[2693]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro			
[2694]		595	600	605
[2695]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu			
[2696]	610	615	620	
[2697]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu			
[2698]	625	630	635	640
[2699]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly			
[2700]		645	650	655
[2701]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe			
[2702]		660	665	670
[2703]	<210> 93			
[2704]	<211> 672			
[2705]	<212> PRT			
[2706]	<213> 人工序列			
[2707]	<220>			
[2708]	<223> 人工序列的描述: the amino acid sequence			
[2709]	of A04			
[2710]	<400> 93			
[2711]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr			
[2712]	1	5	10	15
[2713]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg			
[2714]		20	25	30
[2715]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp			
[2716]		35	40	45
[2717]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr			
[2718]		50	55	60
[2719]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr			
[2720]	65	70	75	80
[2721]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp			
[2722]		85	90	95
[2723]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val			
[2724]		100	105	110
[2725]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro			
[2726]		115	120	125
[2727]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu			
[2728]		130	135	140
[2729]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Tyr Thr			

[2730]	145	150	155	160
[2731]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe			
[2732]		165	170	175
[2733]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu			
[2734]		180	185	190
[2735]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser			
[2736]		195	200	205
[2737]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly			
[2738]		210	215	220
[2739]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly			
[2740]		225	230	235
[2741]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys			
[2742]		245	250	255
[2743]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Arg Trp Lys Thr Asp			
[2744]		260	265	270
[2745]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr			
[2746]		275	280	285
[2747]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val			
[2748]		290	295	300
[2749]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln			
[2750]		305	310	315
[2751]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala			
[2752]		325	330	335
[2753]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp			
[2754]		340	345	350
[2755]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly			
[2756]		355	360	365
[2757]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser			
[2758]		370	375	380
[2759]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val			
[2760]		385	390	395
[2761]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr			
[2762]		405	410	415
[2763]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln			
[2764]		420	425	430
[2765]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr			
[2766]		435	440	445
[2767]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala			
[2768]		450	455	460
[2769]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr			
[2770]		465	470	475
[2771]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn			

[2772]	485	490	495
[2773]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[2774]	500	505	510
[2775]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[2776]	515	520	525
[2777]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		
[2778]	530	535	540
[2779]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[2780]	545	550	555
[2781]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		
[2782]	565	570	575
[2783]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[2784]	580	585	590
[2785]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[2786]	595	600	605
[2787]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		
[2788]	610	615	620
[2789]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		
[2790]	625	630	635
[2791]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		
[2792]	645	650	655
[2793]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[2794]	660	665	670
[2795]	<210> 94		
[2796]	<211> 672		
[2797]	<212> PRT		
[2798]	<213> 人工序列		
[2799]	<220>		
[2800]	<223> 人工序列的描述: A05的氨基酸序列		
[2801]	<400> 94		
[2802]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[2803]	1	5	10
[2804]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		
[2805]	20	25	30
[2806]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		
[2807]	35	40	45
[2808]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		
[2809]	50	55	60
[2810]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		
[2811]	65	70	75
[2812]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		
[2813]	85	90	95

[2814]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val
[2815]	100 105 110
[2816]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
[2817]	115 120 125
[2818]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu
[2819]	130 135 140
[2820]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr
[2821]	145 150 155 160
[2822]	Ser Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe
[2823]	165 170 175
[2824]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu
[2825]	180 185 190
[2826]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser
[2827]	195 200 205
[2828]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly
[2829]	210 215 220
[2830]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly
[2831]	225 230 235 240
[2832]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys
[2833]	245 250 255
[2834]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp
[2835]	260 265 270
[2836]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr
[2837]	275 280 285
[2838]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val
[2839]	290 295 300
[2840]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln
[2841]	305 310 315 320
[2842]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala
[2843]	325 330 335
[2844]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp
[2845]	340 345 350
[2846]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly
[2847]	355 360 365
[2848]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser
[2849]	370 375 380
[2850]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val
[2851]	385 390 395 400
[2852]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr
[2853]	405 410 415
[2854]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln
[2855]	420 425 430

[2856]	Phe	Leu	Tyr	Gln	Asp	Ser	Asn	Trp	Ala	Ser	Lys	Val	Glu	Lys	Leu	Thr
[2857]		435						440					445			
[2858]	Leu	Asp	Asn	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
[2859]		450						455					460			
[2860]	Val	Ser	Phe	Cys	Phe	Cys	Glu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr
[2861]	465					470					475					480
[2862]	Thr	Met	Asp	Thr	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	Ile	Pro	Glu	Leu	Asn
[2863]					485					490					495	
[2864]	Lys	Val	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Val	Ala	Gly	Gln	Phe	Val	Ile	Lys
[2865]			500					505					510			
[2866]	Leu	Thr	His	Asp	Val	Glu	Leu	Asn	Leu	Asp	Tyr	Glu	Arg	Tyr	Asn	Ser
[2867]		515						520					525			
[2868]	Gln	Leu	Leu	Ser	Phe	Val	Arg	Asp	Leu	Asn	Gln	Tyr	Arg	Ala	Asp	Ile
[2869]		530						535					540			
[2870]	Lys	Glu	Met	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Trp	Leu	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly	Asp
[2871]	545					550					555					560
[2872]	Phe	Phe	Arg	Ala	Thr	Ser	Arg	Leu	Thr	Thr	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Glu
[2873]					565					570					575	
[2874]	Lys	Thr	Asp	Arg	Phe	Val	Met	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Arg	Val	Met	Arg
[2875]			580					585					590			
[2876]	Val	Glu	Tyr	His	Phe	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Pro	Lys	Glu	Ser	Pro
[2877]		595						600					605			
[2878]	Phe	Arg	His	Val	Phe	Trp	Gly	Ser	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu
[2879]		610					615					620				
[2880]	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Leu	Arg	Lys	Gln	Asn	Asn	Gly	Ala	Phe	Asn	Glu
[2881]	625					630					635					640
[2882]	Thr	Leu	Phe	Arg	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Trp	Thr	Ile	Gln	Gly
[2883]					645					650					655	
[2884]	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	Val	Trp	Asp	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe
[2885]			660					665						670		
[2886]	<210> 95															
[2887]	<211> 672															
[2888]	<212> PRT															
[2889]	<213> 人工序列															
[2890]	<220>															
[2891]	<223> 人工序列的描述: the amino acid sequence															
[2892]	of A06															
[2893]	<400> 95															
[2894]	Cys	Lys	Gly	Val	Glu	Pro	Lys	Thr	Glu	Cys	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Thr
[2895]	1				5				10					15		
[2896]	Glu	Ser	Pro	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Arg
[2897]					20				25					30		

[2898]	Arg	Leu	Tyr	Trp	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp
[2899]			35					40					45			
[2900]	Ser	Thr	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Tyr
[2901]			50					55					60			
[2902]	Val	Pro	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Gln	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Tyr
[2903]	65					70					75					80
[2904]	Val	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Trp	Arg	Asp
[2905]					85					90					95	
[2906]	Gln	His	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Ala	Gln	Asn	Ser	Val
[2907]					100					105					110	
[2908]	Ile	Ile	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Arg	Leu	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Asn	Pro
[2909]					115					120					125	
[2910]	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Tyr	Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Leu
[2911]			130					135						140		
[2912]	Val	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Thr	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Asp	Leu	Tyr	Thr
[2913]	145					150					155					160
[2914]	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Ile	Val	Arg	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe
[2915]					165					170						175
[2916]	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asn	Ala	Gln	Ser	Leu	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu
[2917]					180					185					190	
[2918]	Ile	Tyr	Met	Asp	Gln	Thr	Lys	Phe	Pro	Ile	Val	Asn	Ala	Glu	Leu	Ser
[2919]					195					200				205		
[2920]	Phe	Phe	Gly	His	Ala	His	Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly
[2921]			210					215						220		
[2922]	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His	Thr	Gln	Phe	Pro	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly
[2923]	225					230					235					240
[2924]	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys
[2925]					245						250				255	
[2926]	Leu	Phe	Gly	Asn	Met	Glu	Gly	Asp	Cys	Pro	Ser	Asp	Trp	Lys	Thr	Asp
[2927]					260					265					270	
[2928]	Ser	Thr	Cys	Arg	Met	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	Thr
[2929]					275					280				285		
[2930]	Val	Ser	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Ile	Lys	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Gly	Val
[2931]			290					295						300		
[2932]	Ile	Lys	Gly	Phe	Val	Glu	Pro	Asp	His	Tyr	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gln
[2933]	305					310					315					320
[2934]	Arg	Asp	Ala	Trp	Gly	Pro	Gly	Ala	Ala	Lys	Ser	Gly	Val	Gly	Thr	Ala
[2935]					325					330					335	
[2936]	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Met	Phe	Ser	Asp	Met	Val	Leu	Lys	Asp
[2937]					340					345				350		
[2938]	Gly	Phe	Gln	Pro	Ser	Arg	Ser	Ile	Ile	Phe	Ala	Ser	Trp	Ser	Ala	Gly
[2939]			355					360						365		

[2940]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser
[2941]	370 375 380
[2942]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val
[2943]	385 390 395 400
[2944]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr
[2945]	405 410 415
[2946]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln
[2947]	420 425 430
[2948]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr
[2949]	435 440 445
[2950]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala
[2951]	450 455 460
[2952]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr
[2953]	465 470 475 480
[2954]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn
[2955]	485 490 495
[2956]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys
[2957]	500 505 510
[2958]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser
[2959]	515 520 525
[2960]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile
[2961]	530 535 540
[2962]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp
[2963]	545 550 555 560
[2964]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu
[2965]	565 570 575
[2966]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg
[2967]	580 585 590
[2968]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro
[2969]	595 600 605
[2970]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu
[2971]	610 615 620
[2972]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu
[2973]	625 630 635 640
[2974]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly
[2975]	645 650 655
[2976]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
[2977]	660 665 670
[2978]	<210> 96
[2979]	<211> 672
[2980]	<212> PRT
[2981]	<213> 人工序列

[2982]	<220>
[2983]	<223> 人工序列的描述: A07的氨基酸序列
[2984]	<400> 96
[2985]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
[2986]	1 5 10 15
[2987]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg
[2988]	20 25 30
[2989]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
[2990]	35 40 45
[2991]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr
[2992]	50 55 60
[2993]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
[2994]	65 70 75 80
[2995]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
[2996]	85 90 95
[2997]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val
[2998]	100 105 110
[2999]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
[3000]	115 120 125
[3001]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu
[3002]	130 135 140
[3003]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr
[3004]	145 150 155 160
[3005]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe
[3006]	165 170 175
[3007]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu
[3008]	180 185 190
[3009]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser
[3010]	195 200 205
[3011]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly
[3012]	210 215 220
[3013]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly
[3014]	225 230 235 240
[3015]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys
[3016]	245 250 255
[3017]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp
[3018]	260 265 270
[3019]	Ser Thr Cys Arg Leu Glu Thr Ser Gln Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr
[3020]	275 280 285
[3021]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val
[3022]	290 295 300
[3023]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln

[3024]	305	310	315	320
[3025]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala			
[3026]		325	330	335
[3027]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp			
[3028]		340	345	350
[3029]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly			
[3030]		355	360	365
[3031]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser			
[3032]		370	375	380
[3033]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val			
[3034]	385	390	395	400
[3035]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr			
[3036]		405	410	415
[3037]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln			
[3038]		420	425	430
[3039]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr			
[3040]		435	440	445
[3041]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala			
[3042]		450	455	460
[3043]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr			
[3044]	465	470	475	480
[3045]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn			
[3046]		485	490	495
[3047]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys			
[3048]		500	505	510
[3049]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser			
[3050]		515	520	525
[3051]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile			
[3052]		530	535	540
[3053]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp			
[3054]	545	550	555	560
[3055]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu			
[3056]		565	570	575
[3057]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg			
[3058]		580	585	590
[3059]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro			
[3060]		595	600	605
[3061]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu			
[3062]		610	615	620
[3063]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu			
[3064]	625	630	635	640
[3065]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly			

[3066]	645	650	655
[3067]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[3068]	660	665	670
[3069]	<210> 97		
[3070]	<211> 671		
[3071]	<212> PRT		
[3072]	<213> 人工序列		
[3073]	<220>		
[3074]	<223> 人工序列的描述: A08的氨基酸序列		
[3075]	<400> 97		
[3076]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[3077]	1 5 10 15		
[3078]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		
[3079]	20 25 30		
[3080]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		
[3081]	35 40 45		
[3082]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		
[3083]	50 55 60		
[3084]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		
[3085]	65 70 75 80		
[3086]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		
[3087]	85 90 95		
[3088]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val		
[3089]	100 105 110		
[3090]	Ile Ile Val Gln Lys Asn Gly Arg Leu Asp Leu Val Glu Asn Pro Gly		
[3091]	115 120 125		
[3092]	Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val		
[3093]	130 135 140		
[3094]	His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro		
[3095]	145 150 155 160		
[3096]	Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala		
[3097]	165 170 175		
[3098]	Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile		
[3099]	180 185 190		
[3100]	Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe		
[3101]	195 200 205		
[3102]	Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe		
[3103]	210 215 220		
[3104]	Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu		
[3105]	225 230 235 240		
[3106]	Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu		
[3107]	245 250 255		

[3108]	Phe Gly Lys Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser		
[3109]		260	265
[3110]	Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Gln Asn Val Lys Leu Thr Val		270
[3111]		275	280
[3112]	Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile		285
[3113]		290	295
[3114]	Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg		300
[3115]		305	310
[3116]	Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu		315
[3117]		325	330
[3118]	Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly		335
[3119]		340	345
[3120]	Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp		350
[3121]		355	360
[3122]	Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser		365
[3123]		370	375
[3124]	Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu		380
[3125]		385	390
[3126]	Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu		395
[3127]		405	410
[3128]	Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe		415
[3129]		420	425
[3130]	Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu		430
[3131]		435	440
[3132]	Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val		445
[3133]		450	455
[3134]	Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr		460
[3135]		465	470
[3136]	Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys		475
[3137]		485	490
[3138]	Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu		495
[3139]		500	505
[3140]	Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln		510
[3141]		515	520
[3142]	Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys		525
[3143]		530	535
[3144]	Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe		540
[3145]		545	550
[3146]	Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys		555
[3147]		565	570
[3148]	Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val		575
[3149]		580	585
			590

[3150]	Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe
[3151]	595 600 605
[3152]	Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu
[3153]	610 615 620
[3154]	Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr
[3155]	625 630 635 640
[3156]	Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala
[3157]	645 650 655
[3158]	Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
[3159]	660 665 670
[3160]	<210> 98
[3161]	<211> 672
[3162]	<212> PRT
[3163]	<213> 人工序列
[3164]	<220>
[3165]	<223> 人工序列的描述: A09的氨基酸序列
[3166]	<400> 98
[3167]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
[3168]	1 5 10 15
[3169]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg
[3170]	20 25 30
[3171]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
[3172]	35 40 45
[3173]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr
[3174]	50 55 60
[3175]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
[3176]	65 70 75 80
[3177]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
[3178]	85 90 95
[3179]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val
[3180]	100 105 110
[3181]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
[3182]	115 120 125
[3183]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu
[3184]	130 135 140
[3185]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr
[3186]	145 150 155 160
[3187]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe
[3188]	165 170 175
[3189]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu
[3190]	180 185 190
[3191]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser

[3192]	195	200	205
[3193]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[3194]	210	215	220
[3195]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[3196]	225	230	235
[3197]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[3198]	245	250	255
[3199]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp		
[3200]	260	265	270
[3201]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr		
[3202]	275	280	285
[3203]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[3204]	290	295	300
[3205]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[3206]	305	310	315
[3207]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[3208]	325	330	335
[3209]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[3210]	340	345	350
[3211]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[3212]	355	360	365
[3213]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[3214]	370	375	380
[3215]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[3216]	385	390	395
[3217]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[3218]	405	410	415
[3219]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[3220]	420	425	430
[3221]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[3222]	435	440	445
[3223]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[3224]	450	455	460
[3225]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[3226]	465	470	475
[3227]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[3228]	485	490	495
[3229]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[3230]	500	505	510
[3231]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[3232]	515	520	525
[3233]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		

[3234]	530	535	540
[3235]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[3236]	545	550	555 560
[3237]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		
[3238]	565	570	575
[3239]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[3240]	580	585	590
[3241]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[3242]	595	600	605
[3243]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		
[3244]	610	615	620
[3245]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		
[3246]	625	630	635 640
[3247]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		
[3248]	645	650	655
[3249]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[3250]	660	665	670
[3251]	<210> 99		
[3252]	<211> 672		
[3253]	<212> PRT		
[3254]	<213> 人工序列		
[3255]	<220>		
[3256]	<223> 人工序列的描述: A10的氨基酸序列		
[3257]	<400> 99		
[3258]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[3259]	1	5	10 15
[3260]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		
[3261]	20	25	30
[3262]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		
[3263]	35	40	45
[3264]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		
[3265]	50	55	60
[3266]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		
[3267]	65	70	75 80
[3268]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		
[3269]	85	90	95
[3270]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val		
[3271]	100	105	110
[3272]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro		
[3273]	115	120	125
[3274]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Glu Val Thr Gly Lys Leu		
[3275]	130	135	140

[3276]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr		
[3277]	145	150	155 160
[3278]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe		
[3279]		165 170	175
[3280]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu		
[3281]		180 185	190
[3282]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser		
[3283]		195 200	205
[3284]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[3285]	210	215	220
[3286]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[3287]	225	230	235 240
[3288]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[3289]		245 250	255
[3290]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp		
[3291]		260 265	270
[3292]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr		
[3293]		275 280	285
[3294]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[3295]	290	295	300
[3296]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[3297]	305	310	315 320
[3298]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[3299]		325 330	335
[3300]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[3301]		340 345	350
[3302]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[3303]		355 360	365
[3304]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[3305]	370	375	380
[3306]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[3307]	385	390	395 400
[3308]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[3309]		405 410	415
[3310]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[3311]		420 425	430
[3312]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[3313]		435 440	445
[3314]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[3315]	450	455	460
[3316]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[3317]	465	470	475 480

[3318]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[3319]		485	490
[3320]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		495
[3321]		500	505
[3322]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		510
[3323]		515	520
[3324]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		525
[3325]		530	535
[3326]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		540
[3327]		545	550
[3328]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		555
[3329]		565	570
[3330]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		575
[3331]		580	585
[3332]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		590
[3333]		595	600
[3334]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		605
[3335]		610	615
[3336]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		620
[3337]		625	630
[3338]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		635
[3339]		645	650
[3340]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		655
[3341]		660	665
[3342]	<210> 100		670
[3343]	<211> 673		
[3344]	<212> PRT		
[3345]	<213> 人工序列		
[3346]	<220>		
[3347]	<223> 人工序列的描述: A11的氨基酸序列		
[3348]	<400> 100		
[3349]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[3350]	1	5	10
[3351]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		15
[3352]		20	25
[3353]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		30
[3354]		35	40
[3355]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		45
[3356]		50	55
[3357]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		60
[3358]		65	70
[3359]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		75
			80

[3360]		85		90		95
[3361]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Ser					
[3362]		100		105		110
[3363]	Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn					
[3364]		115		120		125
[3365]	Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys					
[3366]		130		135		140
[3367]	Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr					
[3368]	145		150		155	160
[3369]	Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr					
[3370]		165		170		175
[3371]	Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val					
[3372]		180		185		190
[3373]	Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu					
[3374]		195		200		205
[3375]	Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro					
[3376]		210		215		220
[3377]	Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser					
[3378]	225		230		235	240
[3379]	Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu					
[3380]		245		250		255
[3381]	Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr					
[3382]		260		265		270
[3383]	Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu					
[3384]		275		280		285
[3385]	Thr Val Lys Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly					
[3386]		290		295		300
[3387]	Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala					
[3388]	305		310		315	320
[3389]	Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr					
[3390]		325		330		335
[3391]	Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys					
[3392]		340		345		350
[3393]	Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala					
[3394]		355		360		365
[3395]	Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu					
[3396]		370		375		380
[3397]	Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala					
[3398]	385		390		395	400
[3399]	Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr					
[3400]		405		410		415
[3401]	Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly					

[3402]	420	425	430
[3403]	Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu		
[3404]	435	440	445
[3405]	Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro		
[3406]	450	455	460
[3407]	Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly		
[3408]	465	470	475 480
[3409]	Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu		
[3410]	485	490	495
[3411]	Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile		
[3412]	500	505	510
[3413]	Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn		
[3414]	515	520	525
[3415]	Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp		
[3416]	530	535	540
[3417]	Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly		
[3418]	545	550	555 560
[3419]	Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala		
[3420]	565	570	575
[3421]	Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met		
[3422]	580	585	590
[3423]	Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser		
[3424]	595	600	605
[3425]	Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala		
[3426]	610	615	620
[3427]	Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn		
[3428]	625	630	635 640
[3429]	Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln		
[3430]	645	650	655
[3431]	Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu		
[3432]	660	665	670
[3433]	Phe		
[3434]	<210> 101		
[3435]	<211> 672		
[3436]	<212> PRT		
[3437]	<213> 人工序列		
[3438]	<220>		
[3439]	<223> 人工序列的描述: A12的氨基酸序列		
[3440]	<400> 101		
[3441]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[3442]	1	5	10 15
[3443]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		

[3444]	20	25	30
[3445]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		
[3446]	35	40	45
[3447]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		
[3448]	50	55	60
[3449]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		
[3450]	65	70	75
[3451]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		
[3452]	85	90	95
[3453]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val		
[3454]	100	105	110
[3455]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro		
[3456]	115	120	125
[3457]	Glu Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu		
[3458]	130	135	140
[3459]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr		
[3460]	145	150	155
[3461]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe		
[3462]	165	170	175
[3463]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu		
[3464]	180	185	190
[3465]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ala		
[3466]	195	200	205
[3467]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[3468]	210	215	220
[3469]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[3470]	225	230	235
[3471]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[3472]	245	250	255
[3473]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp		
[3474]	260	265	270
[3475]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr		
[3476]	275	280	285
[3477]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[3478]	290	295	300
[3479]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[3480]	305	310	315
[3481]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[3482]	325	330	335
[3483]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[3484]	340	345	350
[3485]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		

[3486]	355	360	365
[3487]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[3488]	370	375	380
[3489]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[3490]	385	390	395
[3491]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[3492]	405	410	415
[3493]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[3494]	420	425	430
[3495]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[3496]	435	440	445
[3497]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[3498]	450	455	460
[3499]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[3500]	465	470	475
[3501]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[3502]	485	490	495
[3503]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[3504]	500	505	510
[3505]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[3506]	515	520	525
[3507]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile		
[3508]	530	535	540
[3509]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp		
[3510]	545	550	555
[3511]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu		
[3512]	565	570	575
[3513]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg		
[3514]	580	585	590
[3515]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[3516]	595	600	605
[3517]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		
[3518]	610	615	620
[3519]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		
[3520]	625	630	635
[3521]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		
[3522]	645	650	655
[3523]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[3524]	660	665	670
[3525]	<210> 102		
[3526]	<211> 672		
[3527]	<212> PRT		

[3528]	<213> 人工序列																			
[3529]	<220>																			
[3530]	<223> 人工序列的描述: A13的氨基酸序列																			
[3531]	<400> 102																			
[3532]	Cys	Lys	Gly	Val	Glu	Pro	Lys	Thr	Glu	Cys	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Thr				
[3533]	1				5				10					15						
[3534]	Glu	Ser	Pro	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Arg				
[3535]					20				25					30						
[3536]	Arg	Leu	Tyr	Trp	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp				
[3537]					35				40					45						
[3538]	Ser	Thr	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Tyr				
[3539]					50				55					60						
[3540]	Val	Pro	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Gln	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Tyr				
[3541]	65					70					75					80				
[3542]	Val	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Trp	Arg	Asp				
[3543]					85					90					95					
[3544]	Gln	His	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Ala	Gln	Asn	Ser	Val				
[3545]					100					105					110					
[3546]	Ile	Ile	Val	Gln	Ser	Asn	Gly	Arg	Leu	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Asn	Pro				
[3547]					115					120					125					
[3548]	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Tyr	Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Leu				
[3549]					130					135					140					
[3550]	Val	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Thr	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Asp	Leu	Tyr	Thr				
[3551]	145					150					155					160				
[3552]	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Ile	Val	Arg	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe				
[3553]					165						170					175				
[3554]	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asn	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu				
[3555]					180						185					190				
[3556]	Ile	Tyr	Met	Asp	Gln	Thr	Lys	Phe	Pro	Ile	Val	Asn	Ala	Glu	Leu	Ser				
[3557]					195						200					205				
[3558]	Phe	Phe	Gly	His	Ala	His	Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly				
[3559]					210						215					220				
[3560]	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His	Thr	Gln	Phe	Pro	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly				
[3561]	225					230						235				240				
[3562]	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys				
[3563]					245						250					255				
[3564]	Leu	Phe	Gly	Asn	Met	Glu	Gly	Asp	Cys	Pro	Ser	Asp	Trp	Lys	Thr	Asp				
[3565]					260						265					270				
[3566]	Ser	Thr	Cys	Arg	Met	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	Lys	Asn	Val	Lys	Leu	Thr				
[3567]					275						280					285				
[3568]	Val	Ser	Asn	Val	Leu	Lys	Glu	Ile	Lys	Ile	Leu	Asn	Ile	Phe	Gly	Val				
[3569]					290						295					300				

[3570]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln
[3571]	305 310 315 320
[3572]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala
[3573]	325 330 335
[3574]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp
[3575]	340 345 350
[3576]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly
[3577]	355 360 365
[3578]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser
[3579]	370 375 380
[3580]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val
[3581]	385 390 395 400
[3582]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr
[3583]	405 410 415
[3584]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln
[3585]	420 425 430
[3586]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr
[3587]	435 440 445
[3588]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala
[3589]	450 455 460
[3590]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr
[3591]	465 470 475 480
[3592]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn
[3593]	485 490 495
[3594]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys
[3595]	500 505 510
[3596]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser
[3597]	515 520 525
[3598]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile
[3599]	530 535 540
[3600]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp
[3601]	545 550 555 560
[3602]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu
[3603]	565 570 575
[3604]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg
[3605]	580 585 590
[3606]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro
[3607]	595 600 605
[3608]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu
[3609]	610 615 620
[3610]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu
[3611]	625 630 635 640

[3612]	Thr	Leu	Phe	Arg	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	Thr	Trp	Thr	Ile	Gln	Gly
[3613]					645					650					655	
[3614]	Ala	Ala	Asn	Ala	Leu	Ser	Gly	Asp	Val	Trp	Asp	Ile	Asp	Asn	Glu	Phe
[3615]					660					665					670	
[3616]	<210> 103															
[3617]	<211> 672															
[3618]	<212> PRT															
[3619]	<213> 人工序列															
[3620]	<220>															
[3621]	<223> 人工序列的描述: A14的氨基酸序列															
[3622]	<400> 103															
[3623]	Cys	Lys	Gly	Val	Glu	Pro	Lys	Thr	Glu	Cys	Glu	Arg	Leu	Ala	Gly	Thr
[3624]	1				5					10					15	
[3625]	Glu	Ser	Pro	Val	Arg	Glu	Glu	Pro	Gly	Glu	Asp	Phe	Pro	Ala	Ala	Arg
[3626]					20					25					30	
[3627]	Arg	Leu	Tyr	Trp	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp
[3628]					35					40					45	
[3629]	Ser	Thr	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Tyr
[3630]		50						55							60	
[3631]	Val	Pro	Arg	Glu	Ala	Gly	Ser	Gln	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Tyr
[3632]	65					70					75					80
[3633]	Val	Glu	Asn	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Trp	Arg	Asp
[3634]					85					90						95
[3635]	Gln	His	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Val	Lys	Asp	Ser	Ala	Gln	Asn	Ser	Val
[3636]					100					105						110
[3637]	Ile	Ile	Val	Gln	Ser	Asn	Gly	Arg	Leu	Val	Tyr	Leu	Val	Glu	Asn	Pro
[3638]					115					120						125
[3639]	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Tyr	Ser	Lys	Ala	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Lys	Leu
[3640]					130					135						140
[3641]	Val	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Thr	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Asp	Leu	Tyr	Thr
[3642]	145					150					155					160
[3643]	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Ile	Val	Arg	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe
[3644]					165						170					175
[3645]	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Asn	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Ala	Ile	Gly	Val	Leu
[3646]					180					185						190
[3647]	Ile	Tyr	Met	Asp	Gln	Thr	Lys	Phe	Pro	Ile	Val	Asn	Ala	Glu	Leu	Ser
[3648]					195					200						205
[3649]	Phe	Phe	Gly	His	Ala	His	Leu	Gly	Thr	Gly	Asp	Pro	Tyr	Thr	Pro	Gly
[3650]					210					215						220
[3651]	Phe	Pro	Ser	Phe	Asn	His	Thr	Gln	Phe	Pro	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly
[3652]	225					230						235				240
[3653]	Leu	Pro	Asn	Ile	Pro	Val	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys

[3654]		245		250		255
[3655]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp					
[3656]		260		265		270
[3657]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Gln Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr					
[3658]		275		280		285
[3659]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val					
[3660]		290		295		300
[3661]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln					
[3662]	305		310		315	320
[3663]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala					
[3664]		325		330		335
[3665]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp					
[3666]		340		345		350
[3667]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly					
[3668]		355		360		365
[3669]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser					
[3670]		370		375		380
[3671]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val					
[3672]	385		390		395	400
[3673]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr					
[3674]		405		410		415
[3675]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln					
[3676]		420		425		430
[3677]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr					
[3678]		435		440		445
[3679]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala					
[3680]		450		455		460
[3681]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr					
[3682]	465		470		475	480
[3683]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn					
[3684]		485		490		495
[3685]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys					
[3686]		500		505		510
[3687]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser					
[3688]		515		520		525
[3689]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile					
[3690]		530		535		540
[3691]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp					
[3692]	545		550		555	560
[3693]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu					
[3694]		565		570		575
[3695]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg					

[3696]	580	585	590
[3697]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro		
[3698]	595	600	605
[3699]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu		
[3700]	610	615	620
[3701]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu		
[3702]	625	630	635
[3703]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly		
[3704]	645	650	655
[3705]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe		
[3706]	660	665	670
[3707]	<210> 104		
[3708]	<211> 672		
[3709]	<212> PRT		
[3710]	<213> 人工序列		
[3711]	<220>		
[3712]	<223> 人工序列的描述: A15的氨基酸序列		
[3713]	<400> 104		
[3714]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr		
[3715]	1	5	10
[3716]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg		
[3717]	20	25	30
[3718]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp		
[3719]	35	40	45
[3720]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr		
[3721]	50	55	60
[3722]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr		
[3723]	65	70	75
[3724]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp		
[3725]	85	90	95
[3726]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Met Val		
[3727]	100	105	110
[3728]	Thr Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Pro Val Glu Ser Pro		
[3729]	115	120	125
[3730]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu		
[3731]	130	135	140
[3732]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr		
[3733]	145	150	155
[3734]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe		
[3735]	165	170	175
[3736]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu		
[3737]	180	185	190

[3738]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser		
[3739]	195	200	205
[3740]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[3741]	210	215	220
[3742]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[3743]	225	230	235 240
[3744]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[3745]	245	250	255
[3746]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp		
[3747]	260	265	270
[3748]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr		
[3749]	275	280	285
[3750]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[3751]	290	295	300
[3752]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[3753]	305	310	315 320
[3754]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[3755]	325	330	335
[3756]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[3757]	340	345	350
[3758]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[3759]	355	360	365
[3760]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[3761]	370	375	380
[3762]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[3763]	385	390	395 400
[3764]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[3765]	405	410	415
[3766]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[3767]	420	425	430
[3768]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[3769]	435	440	445
[3770]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[3771]	450	455	460
[3772]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		
[3773]	465	470	475 480
[3774]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn		
[3775]	485	490	495
[3776]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys		
[3777]	500	505	510
[3778]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser		
[3779]	515	520	525

[3780]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile
[3781]	530 535 540
[3782]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp
[3783]	545 550 555 560
[3784]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu
[3785]	565 570 575
[3786]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg
[3787]	580 585 590
[3788]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro
[3789]	595 600 605
[3790]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu
[3791]	610 615 620
[3792]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu
[3793]	625 630 635 640
[3794]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly
[3795]	645 650 655
[3796]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
[3797]	660 665 670
[3798]	<210> 105
[3799]	<211> 672
[3800]	<212> PRT
[3801]	<213> 人工序列
[3802]	<220>
[3803]	<223> 人工序列的描述: A16的氨基酸序列
[3804]	<400> 105
[3805]	Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr
[3806]	1 5 10 15
[3807]	Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg
[3808]	20 25 30
[3809]	Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp
[3810]	35 40 45
[3811]	Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr
[3812]	50 55 60
[3813]	Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr
[3814]	65 70 75 80
[3815]	Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp
[3816]	85 90 95
[3817]	Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Met Val
[3818]	100 105 110
[3819]	Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro
[3820]	115 120 125
[3821]	Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Glu Val Thr Gly Lys Leu

[3822]	130	135	140
[3823]	Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr		
[3824]	145	150	155
[3825]	Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe		
[3826]		165	170
[3827]	Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu		
[3828]		180	185
[3829]	Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser		
[3830]		195	200
[3831]	Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly		
[3832]	210	215	220
[3833]	Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly		
[3834]	225	230	235
[3835]	Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys		
[3836]		245	250
[3837]	Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp		
[3838]		260	265
[3839]	Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Ile		
[3840]		275	280
[3841]	Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val		
[3842]	290	295	300
[3843]	Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln		
[3844]	305	310	315
[3845]	Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala		
[3846]		325	330
[3847]	Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp		
[3848]		340	345
[3849]	Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly		
[3850]		355	360
[3851]	Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser		
[3852]		370	375
[3853]	Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val		
[3854]	385	390	395
[3855]	Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr		
[3856]		405	410
[3857]	Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln		
[3858]		420	425
[3859]	Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr		
[3860]		435	440
[3861]	Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala		
[3862]		450	460
[3863]	Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr		

[3864]	465	470	475	480
[3865]	Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn			
[3866]		485	490	495
[3867]	Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys			
[3868]		500	505	510
[3869]	Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser			
[3870]		515	520	525
[3871]	Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile			
[3872]		530	535	540
[3873]	Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp			
[3874]	545	550	555	560
[3875]	Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu			
[3876]		565	570	575
[3877]	Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg			
[3878]		580	585	590
[3879]	Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro			
[3880]		595	600	605
[3881]	Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu			
[3882]		610	615	620
[3883]	Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu			
[3884]	625	630	635	640
[3885]	Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly			
[3886]		645	650	655
[3887]	Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe			
[3888]		660	665	670
[3889]	<210> 106			
[3890]	<211> 122			
[3891]	<212> PRT			
[3892]	<213> 人工序列			
[3893]	<220>			
[3894]	<223> 人工序列的描述: 以 Tfr1071 EVQL 开始的 VH 的氨基酸序列			
[3895]	<400> 106			
[3896]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[3897]	1	5	10	15
[3898]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Lys Tyr			
[3899]		20	25	30
[3900]	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[3901]		35	40	45
[3902]	Ser Val Ile Ser Asn Gly Gly Val Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val			
[3903]		50	55	60
[3904]	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[3905]	65	70	75	80

[3906]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Thr Tyr Tyr Cys
[3907]	85 90 95
[3908]	Ala Arg Ala Ser Gln Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Gly Ala Asp Val Trp
[3909]	100 105 110
[3910]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[3911]	115 120
[3912]	<210> 107
[3913]	<211> 5
[3914]	<212> PRT
[3915]	<213> 人工序列
[3916]	<220>
[3917]	<223> 人工序列的描述: Tfr1007 HCDR1的氨基酸序列
[3918]	<400> 107
[3919]	Gly Tyr Ser Met Ser
[3920]	1 5
[3921]	<210> 108
[3922]	<211> 17
[3923]	<212> PRT
[3924]	<213> 人工序列
[3925]	<220>
[3926]	<223> 人工序列的描述: Tfr1007 HCDR2的氨基酸序列
[3927]	<400> 108
[3928]	Ser Leu Ser Asn Gly Gly Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[3929]	1 5 10 15
[3930]	Gly
[3931]	<210> 109
[3932]	<211> 13
[3933]	<212> PRT
[3934]	<213> 人工序列
[3935]	<220>
[3936]	<223> 人工序列的描述: Tfr1007 HCDR3的氨基酸序列
[3937]	<400> 109
[3938]	Thr Leu Gly Ala Tyr Tyr Ile Lys Ser Ala Met Asp Val
[3939]	1 5 10
[3940]	<210> 110
[3941]	<211> 119
[3942]	<212> PRT
[3943]	<213> 人工序列
[3944]	<220>
[3945]	<223> 人工序列的描述: Cetuximab VH的氨基酸序列
[3946]	<400> 110
[3947]	Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

[3948]	1	5					10					15					
[3949]	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Asn	Tyr	
[3950]	20					25					30						
[3951]	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	
[3952]	35					40					45						
[3953]	Gly	Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	
[3954]	50					55					60						
[3955]	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Asn	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	
[3956]	65	70					75					80					
[3957]	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
[3958]	85					90					95						
[3959]	Arg	Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
[3960]	100					105					110						
[3961]	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala										
[3962]	115																
[3963]	<210>	111															
[3964]	<211>	107															
[3965]	<212>	PRT															
[3966]	<213>	人工序列															
[3967]	<220>																
[3968]	<223>	人工序列的描述：Cetuximab VL的氨基酸序列															
[3969]	<400>	111															
[3970]	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	
[3971]	1	5					10					15					
[3972]	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn	
[3973]	20					25					30						
[3974]	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
[3975]	35					40					45						
[3976]	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
[3977]	50					55					60						
[3978]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser	
[3979]	65	70					75					80					
[3980]	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr	
[3981]	85					90					95						
[3982]	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys						
[3983]	100					105											
[3984]	<210>	112															
[3985]	<211>	119															
[3986]	<212>	PRT															
[3987]	<213>	人工序列															
[3988]	<220>																
[3989]	<223>	人工序列的描述：Panitumumab VH的氨基酸序列															

[3990]	<400> 112
[3991]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
[3992]	1 5 10 15
[3993]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
[3994]	20 25 30
[3995]	Asp Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[3996]	35 40 45
[3997]	Trp Ile Gly His Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
[3998]	50 55 60
[3999]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Thr Gln Phe
[4000]	65 70 75 80
[4001]	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
[4002]	85 90 95
[4003]	Cys Val Arg Asp Arg Val Thr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
[4004]	100 105 110
[4005]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[4006]	115
[4007]	<210> 113
[4008]	<211> 107
[4009]	<212> PRT
[4010]	<213> 人工序列
[4011]	<220>
[4012]	<223> 人工序列的描述: Panitumumab VL的氨基酸序列
[4013]	<400> 113
[4014]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[4015]	1 5 10 15
[4016]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[4017]	20 25 30
[4018]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[4019]	35 40 45
[4020]	Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[4021]	50 55 60
[4022]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[4023]	65 70 75 80
[4024]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Asp His Leu Pro Leu
[4025]	85 90 95
[4026]	Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[4027]	100 105
[4028]	<210> 114
[4029]	<211> 121
[4030]	<212> PRT
[4031]	<213> 人工序列

[4032]	<220>
[4033]	<223> 人工序列的描述: Necitumumab VH的氨基酸序列
[4034]	<400> 114
[4035]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[4036]	1 5 10 15
[4037]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
[4038]	20 25 30
[4039]	Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[4040]	35 40 45
[4041]	Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
[4042]	50 55 60
[4043]	Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
[4044]	65 70 75 80
[4045]	Ser Leu Lys Val Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[4046]	85 90 95
[4047]	Cys Ala Arg Val Ser Ile Phe Gly Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
[4048]	100 105 110
[4049]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[4050]	115 120
[4051]	<210> 115
[4052]	<211> 107
[4053]	<212> PRT
[4054]	<213> 人工序列
[4055]	<220>
[4056]	<223> 人工序列的描述: Necitumumab VL的氨基酸序列
[4057]	<400> 115
[4058]	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[4059]	1 5 10 15
[4060]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[4061]	20 25 30
[4062]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[4063]	35 40 45
[4064]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[4065]	50 55 60
[4066]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[4067]	65 70 75 80
[4068]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Thr Pro Leu
[4069]	85 90 95
[4070]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Ala Glu Ile Lys
[4071]	100 105
[4072]	<210> 116
[4073]	<211> 123

[4074]	<212>	PRT
[4075]	<213>	人工序列
[4076]	<220>	
[4077]	<223>	人工序列的描述: Nimotuzumab VH的氨基酸序列
[4078]	<400>	116
[4079]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[4080]	1 5 10 15	
[4081]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
[4082]	20 25 30	
[4083]	Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[4084]	35 40 45	
[4085]	Gly Gly Ile Asn Pro Thr Ser Gly Gly Ser Asn Phe Asn Glu Lys Phe	
[4086]	50 55 60	
[4087]	Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Thr Thr Ala Tyr	
[4088]	65 70 75 80	
[4089]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[4090]	85 90 95	
[4091]	Thr Arg Gln Gly Leu Trp Phe Asp Ser Asp Gly Arg Gly Phe Asp Phe	
[4092]	100 105 110	
[4093]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
[4094]	115 120	
[4095]	<210>	117
[4096]	<211>	112
[4097]	<212>	PRT
[4098]	<213>	人工序列
[4099]	<220>	
[4100]	<223>	人工序列的描述: Nimotuzumab VL的氨基酸序列
[4101]	<400>	117
[4102]	Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
[4103]	1 5 10 15	
[4104]	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser	
[4105]	20 25 30	
[4106]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[4107]	35 40 45	
[4108]	Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro	
[4109]	50 55 60	
[4110]	Asp Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[4111]	65 70 75 80	
[4112]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Tyr	
[4113]	85 90 95	
[4114]	Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[4115]	100 105 110	

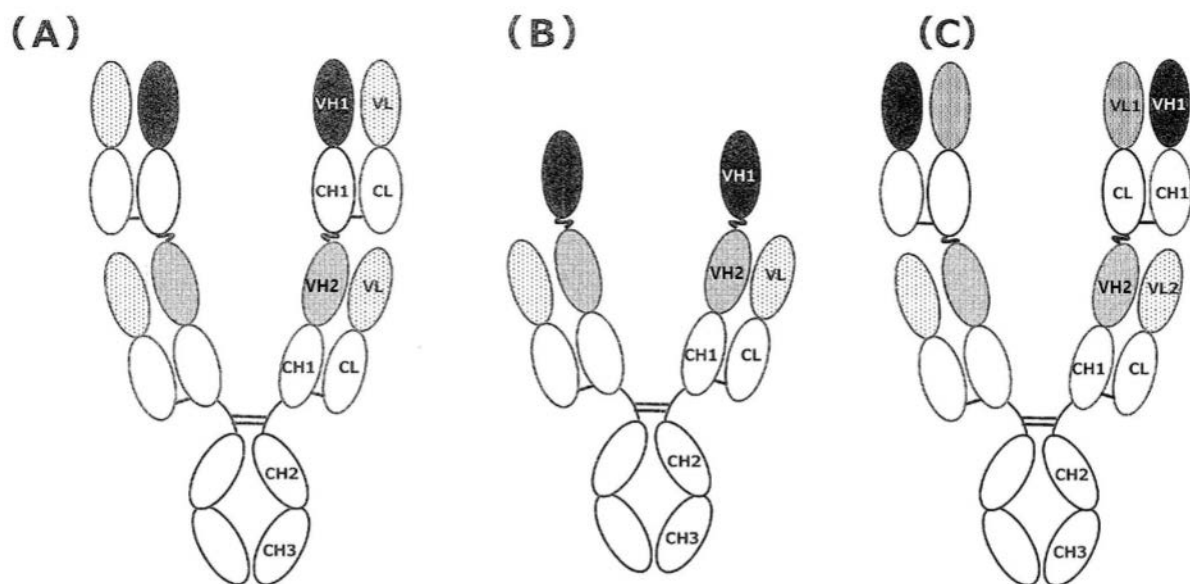


图1

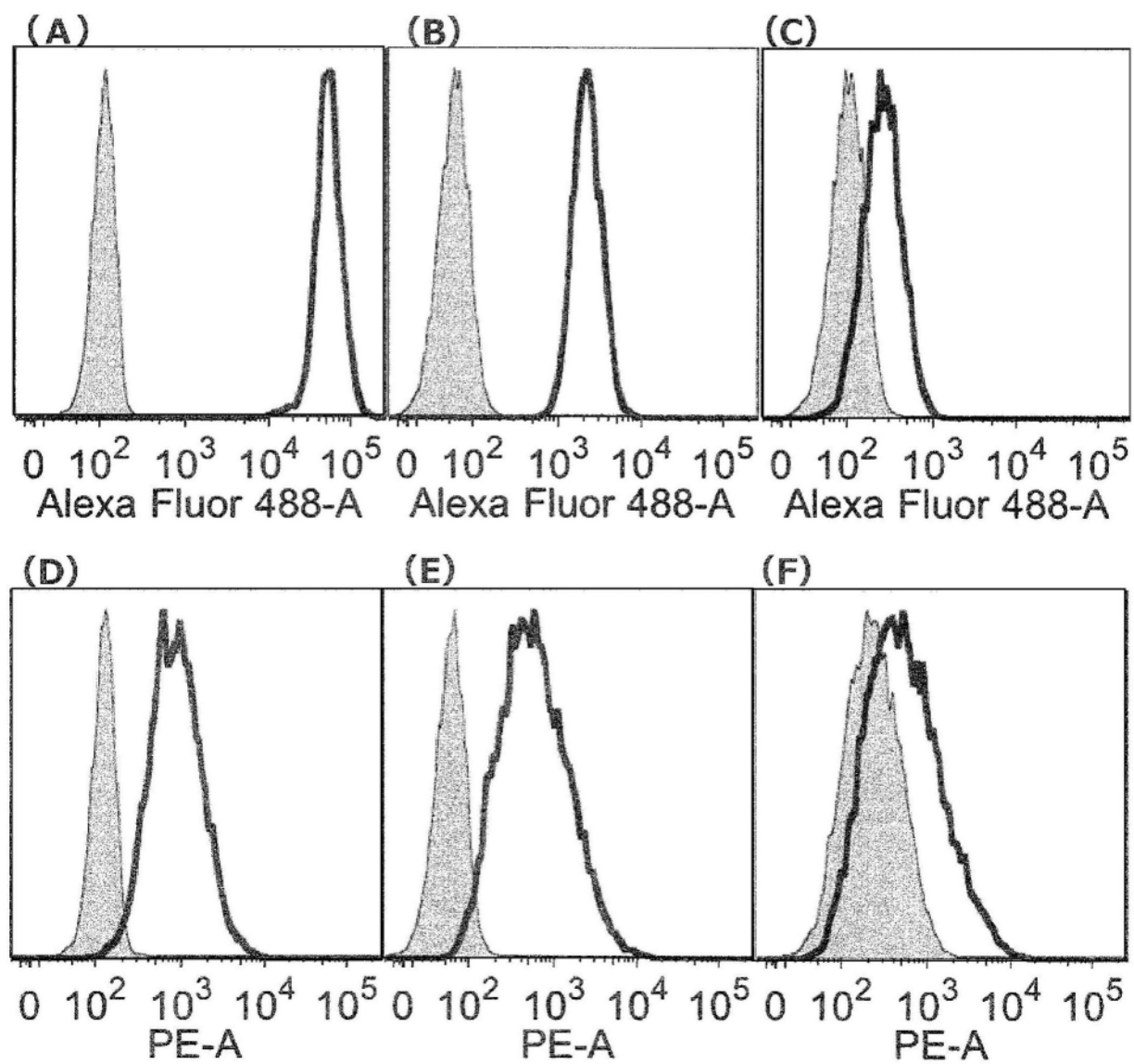


图2

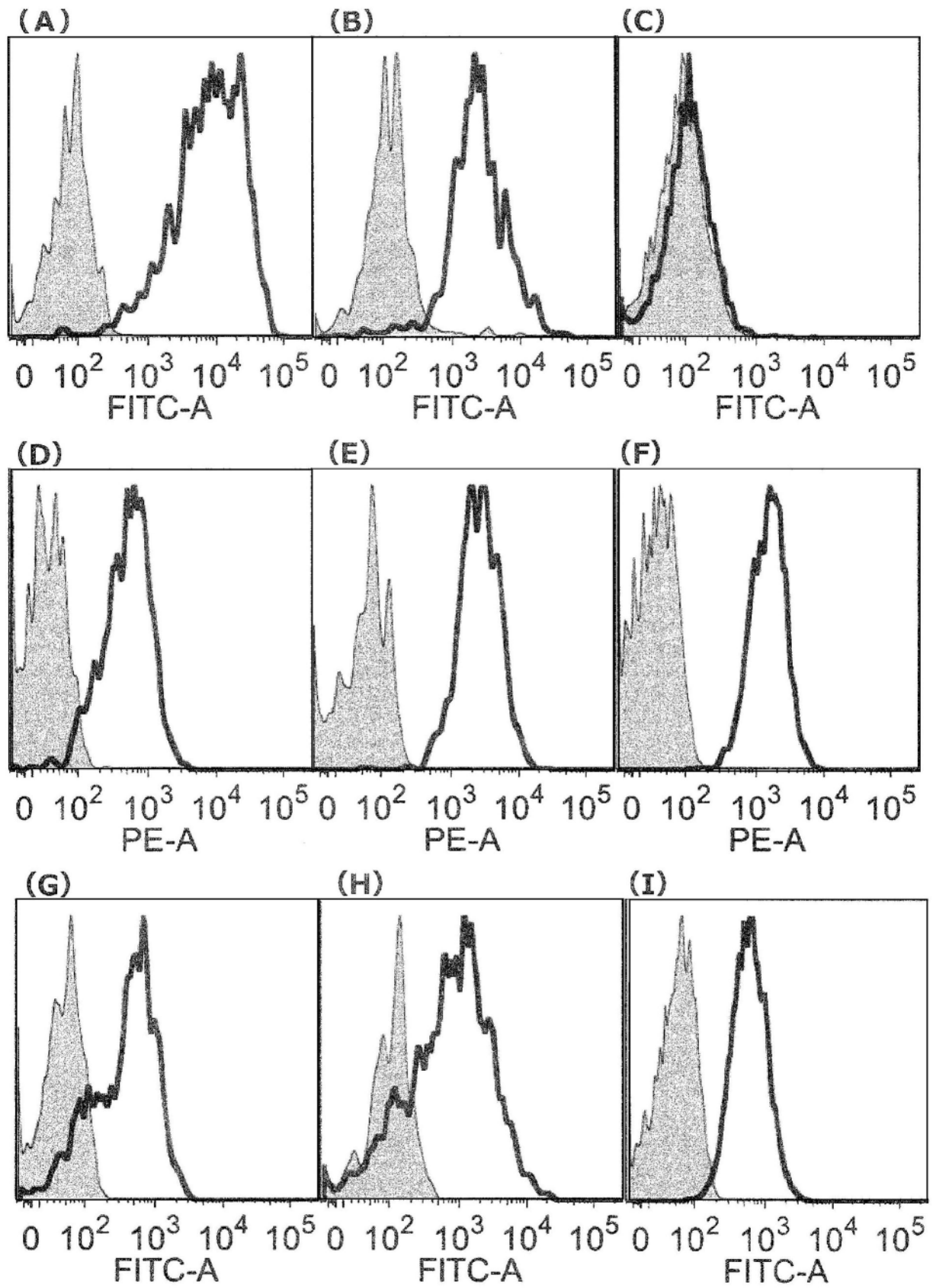


图3

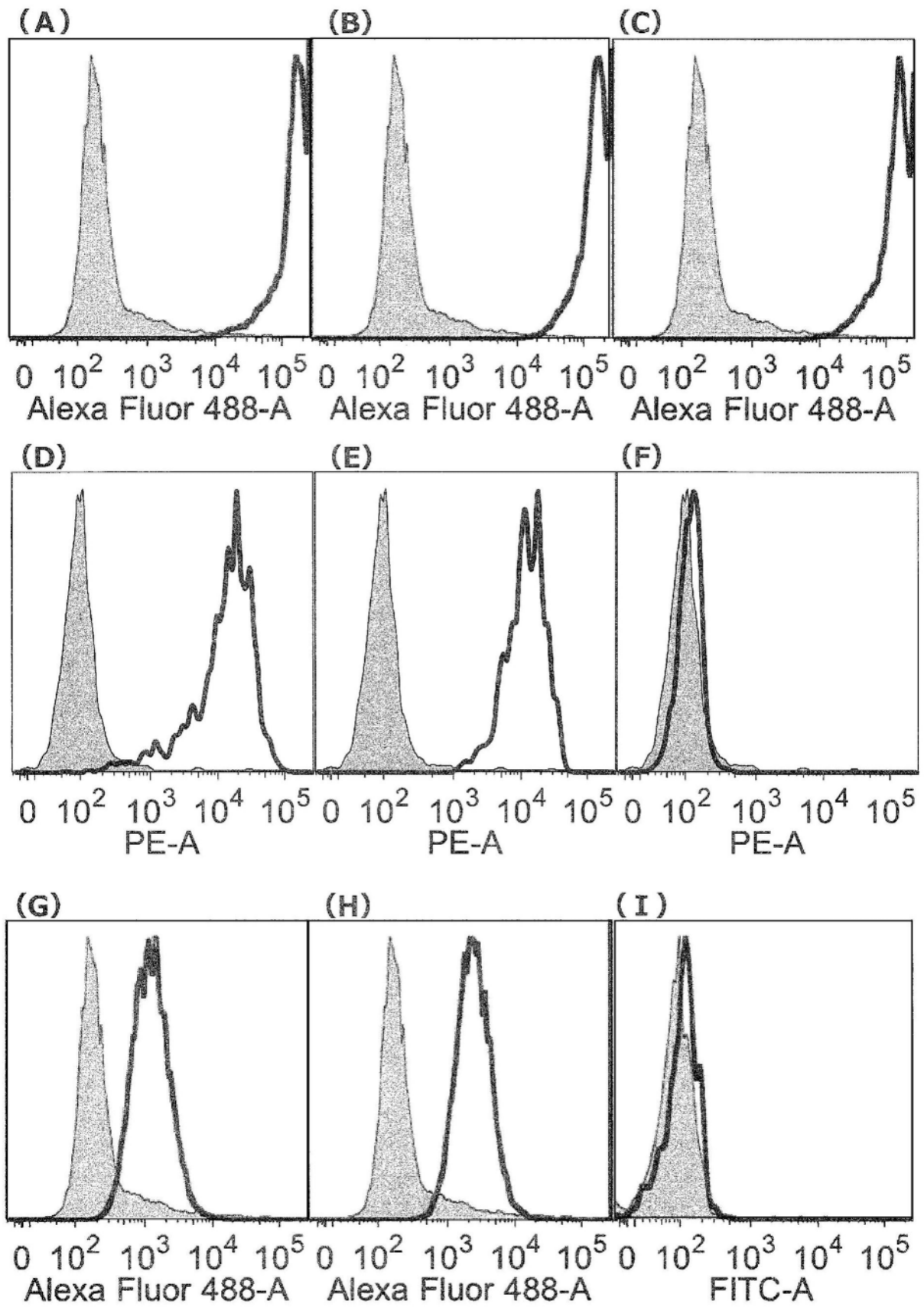


图4

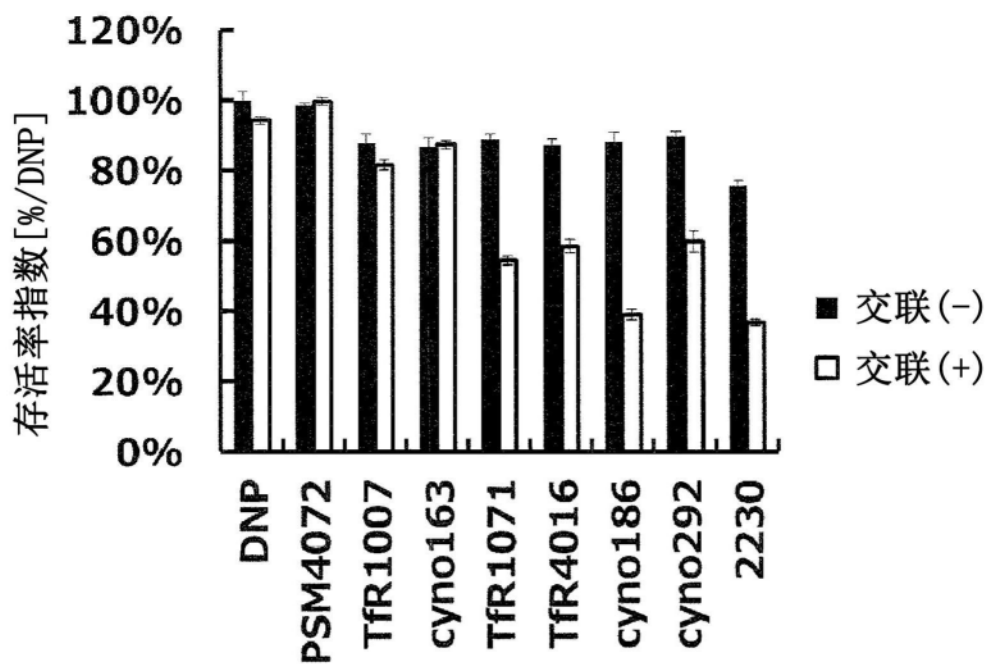


图5

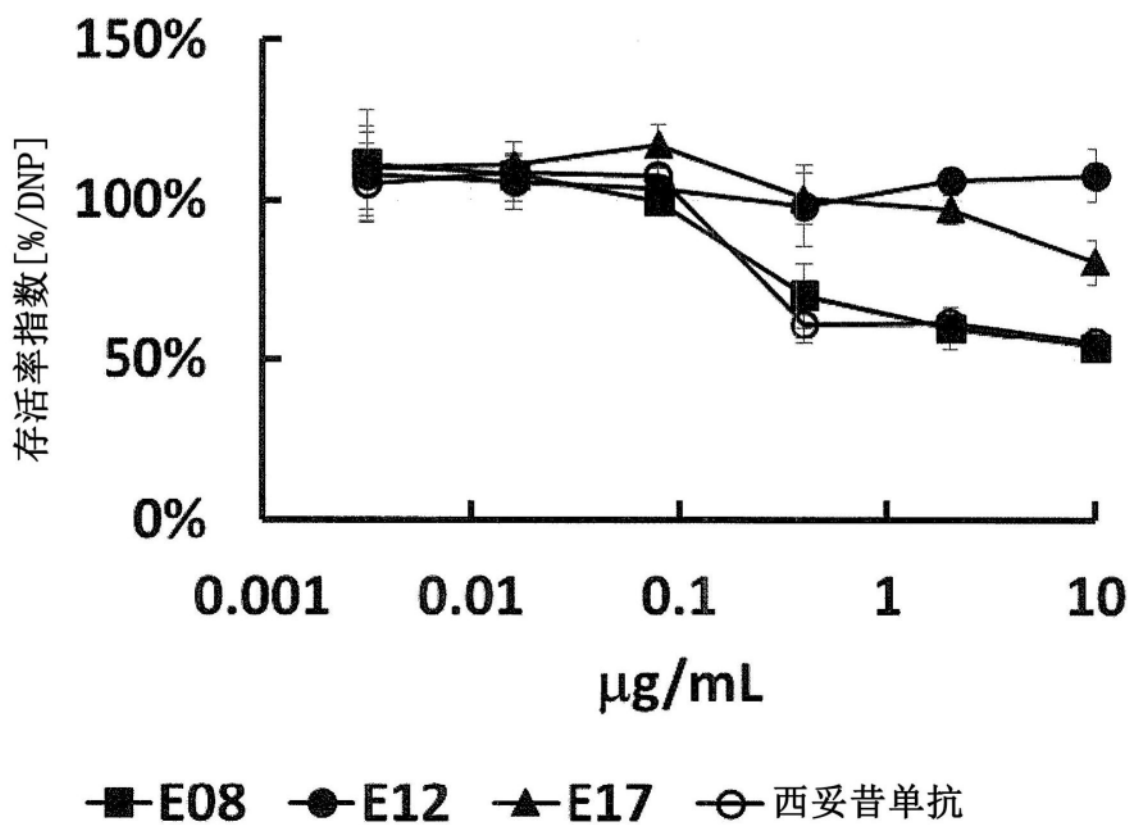


图6

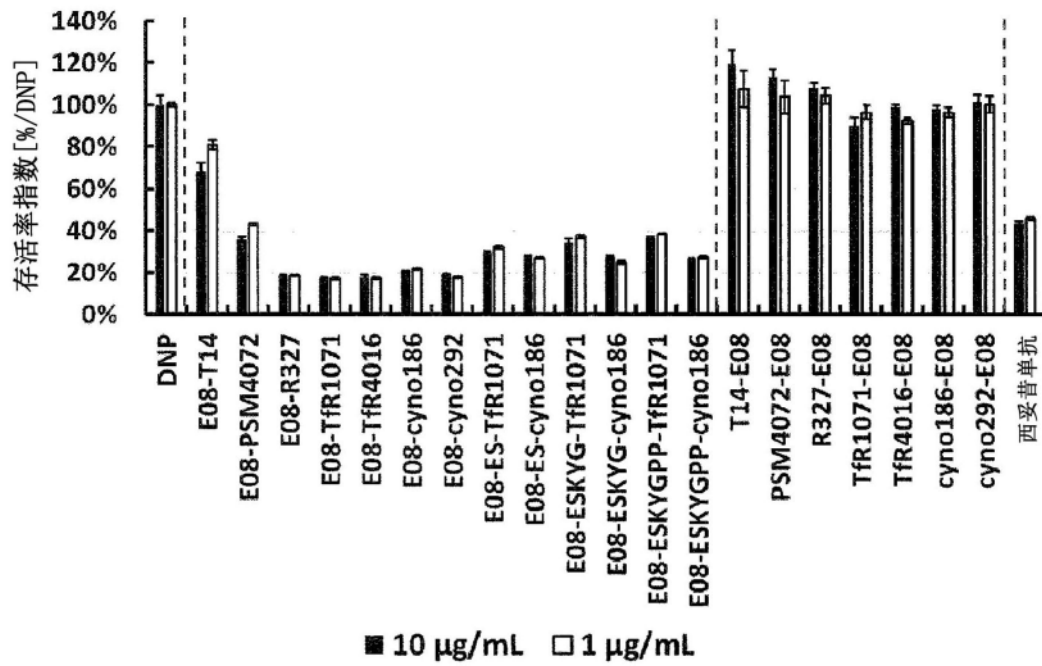


图7A

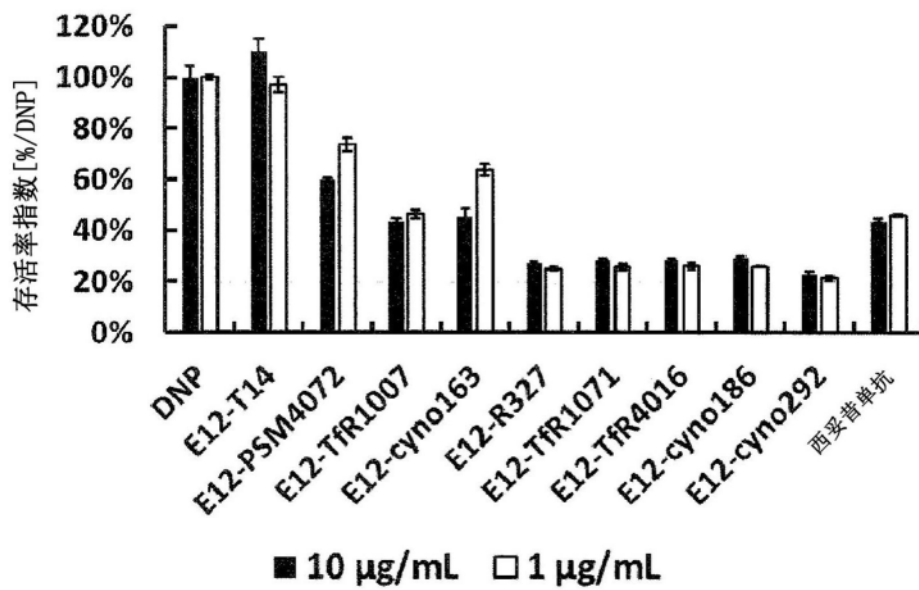


图7B

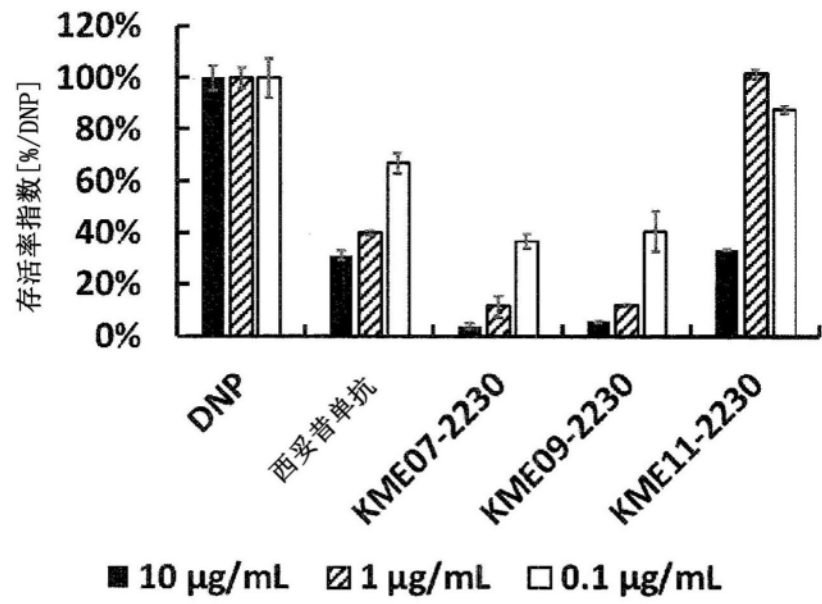


图7C

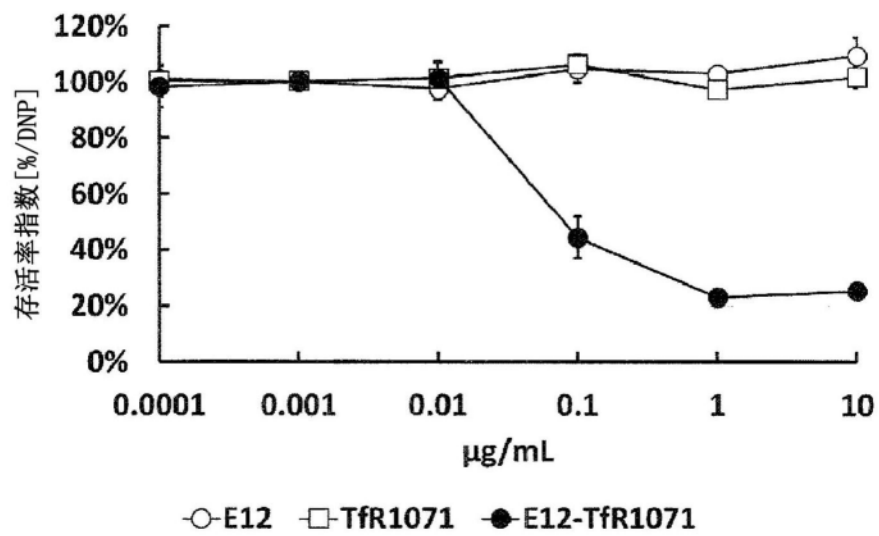


图8A

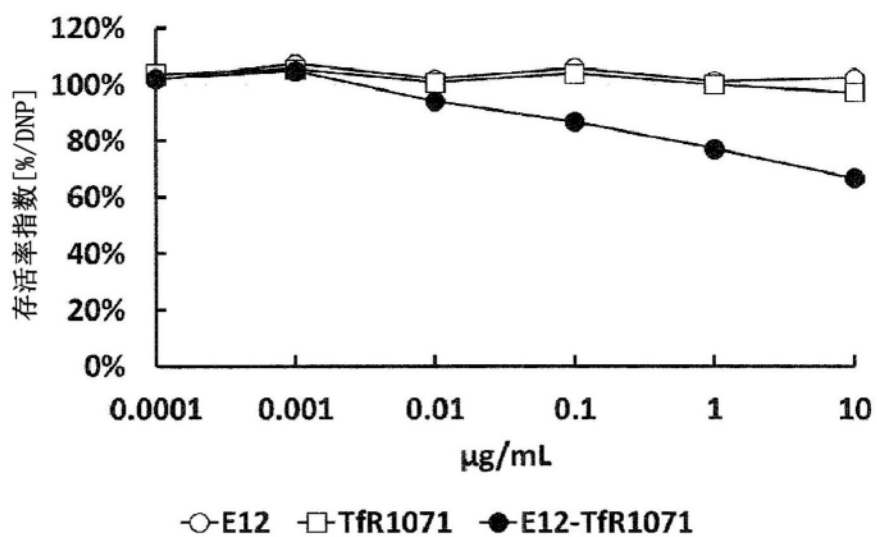


图8B

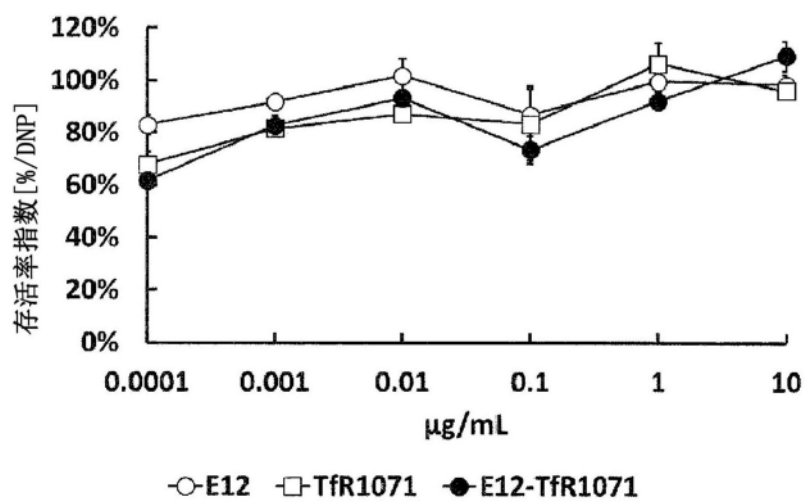


图8C

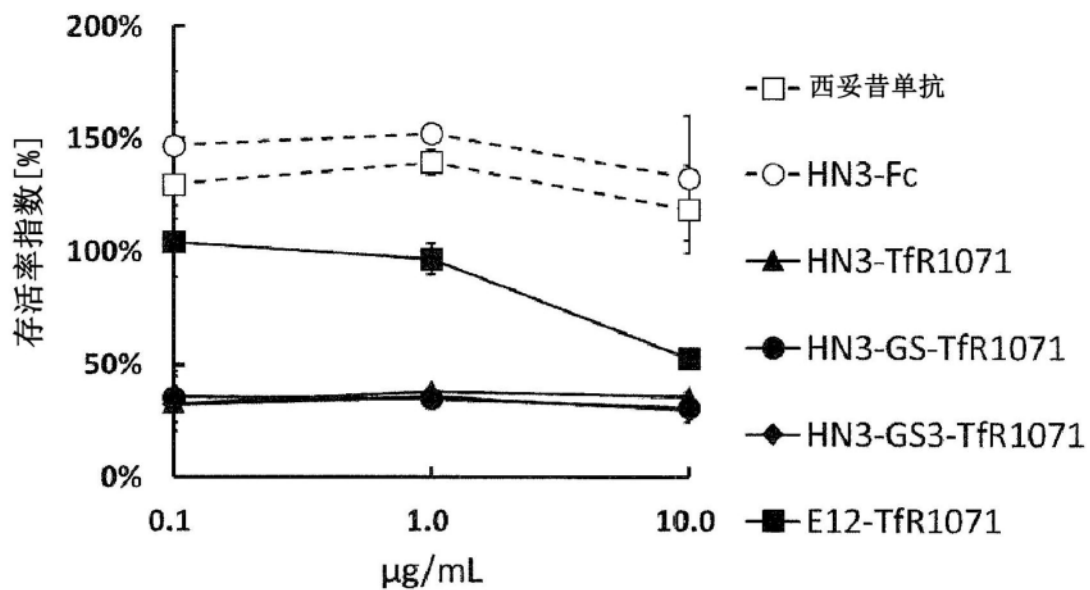


图9

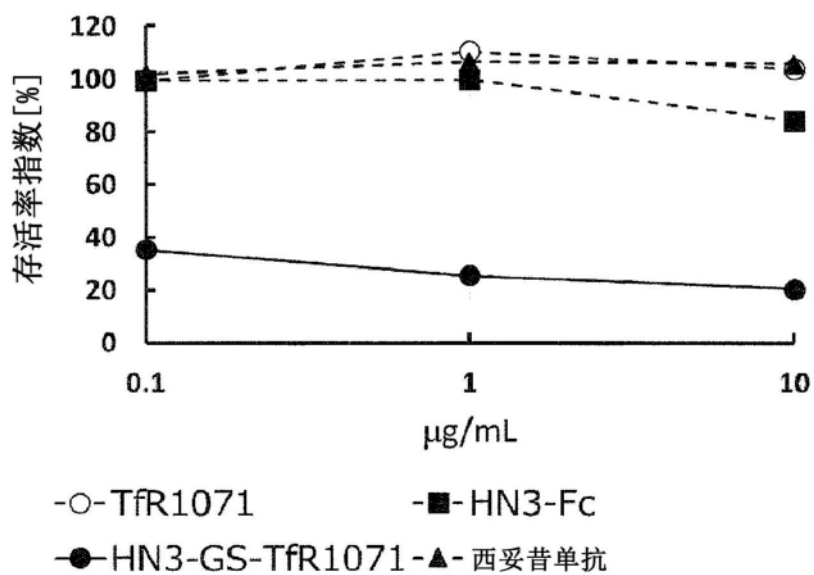


图10A

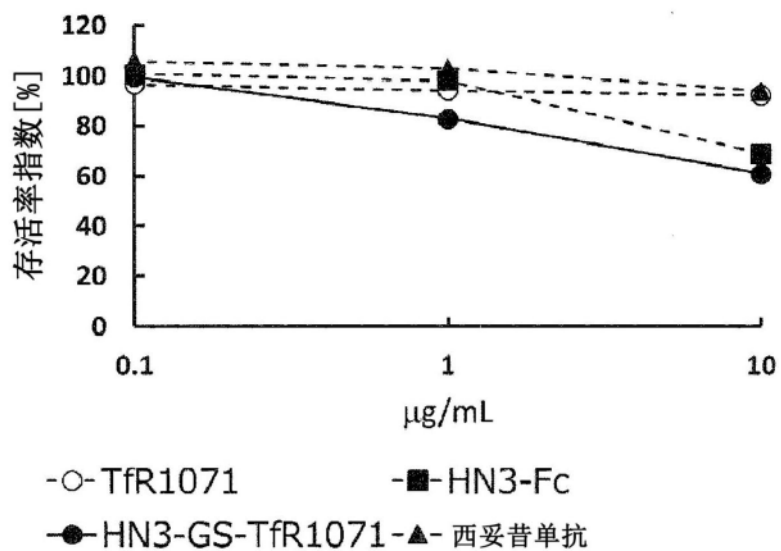


图10B

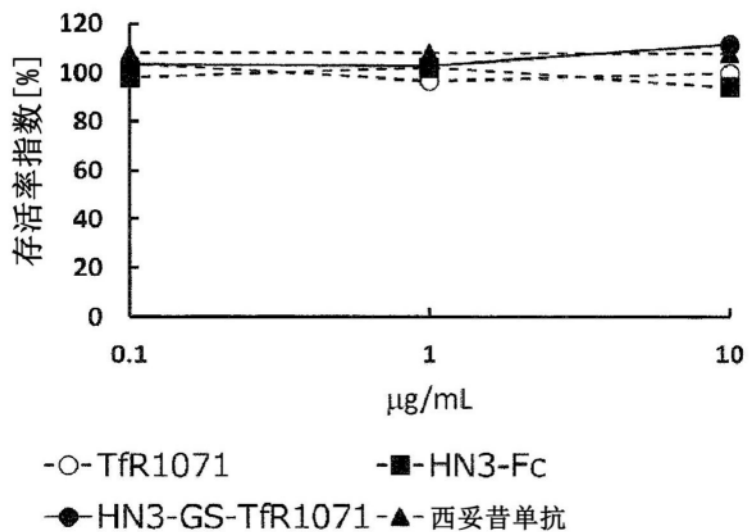


图10C

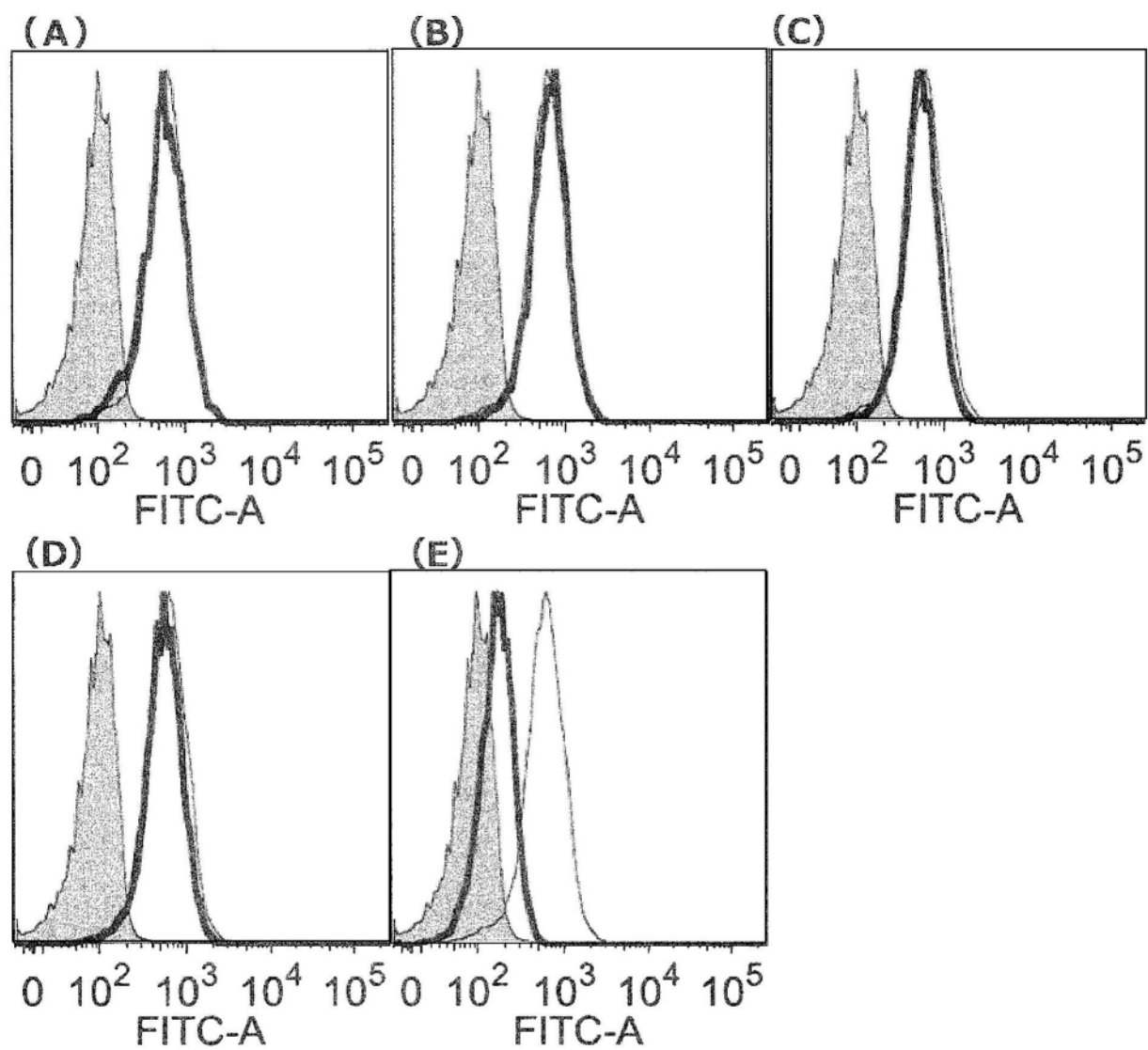


图11

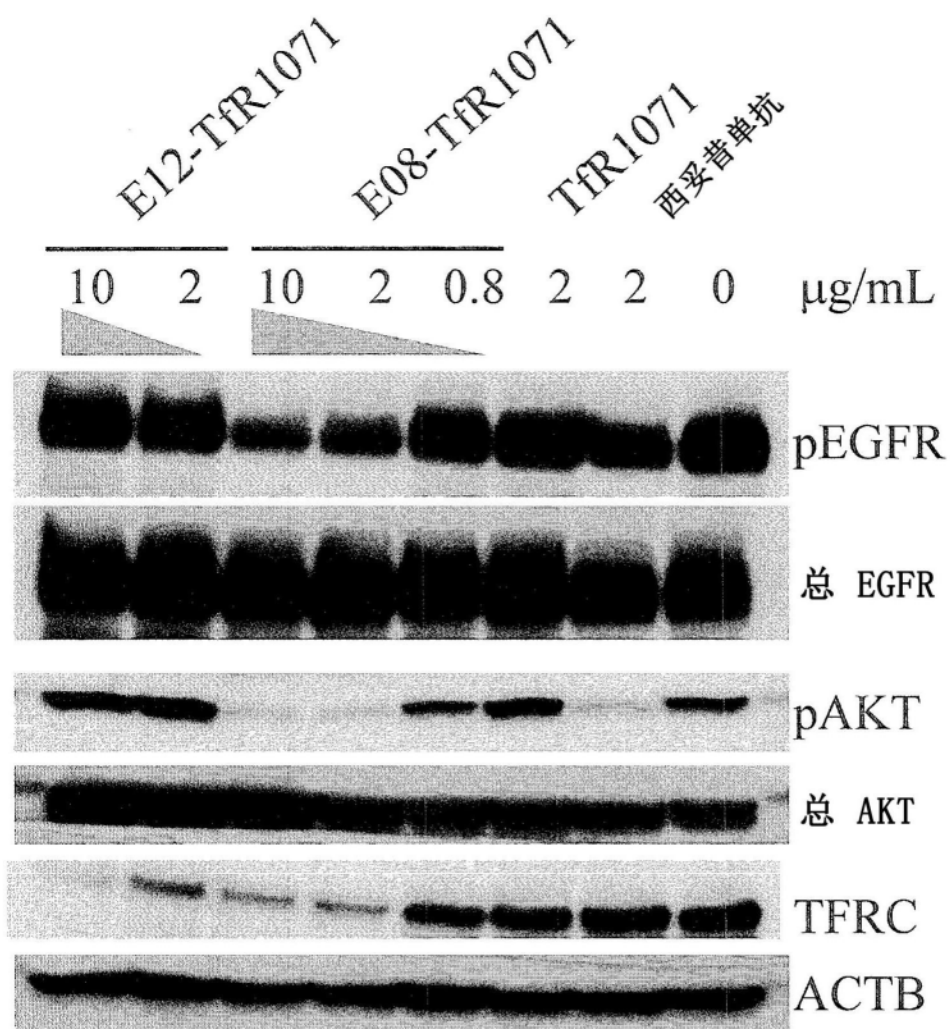


图12

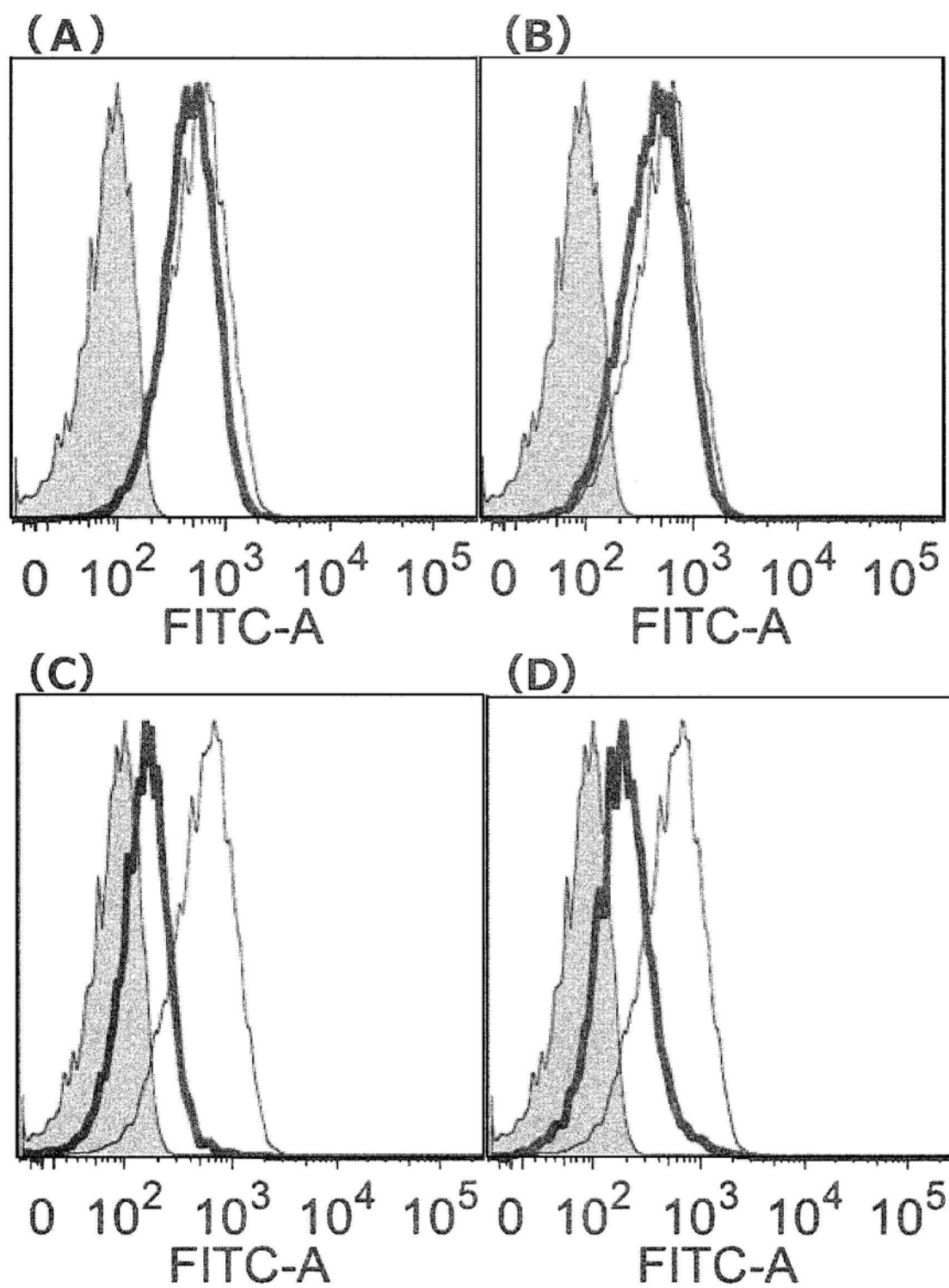


图13

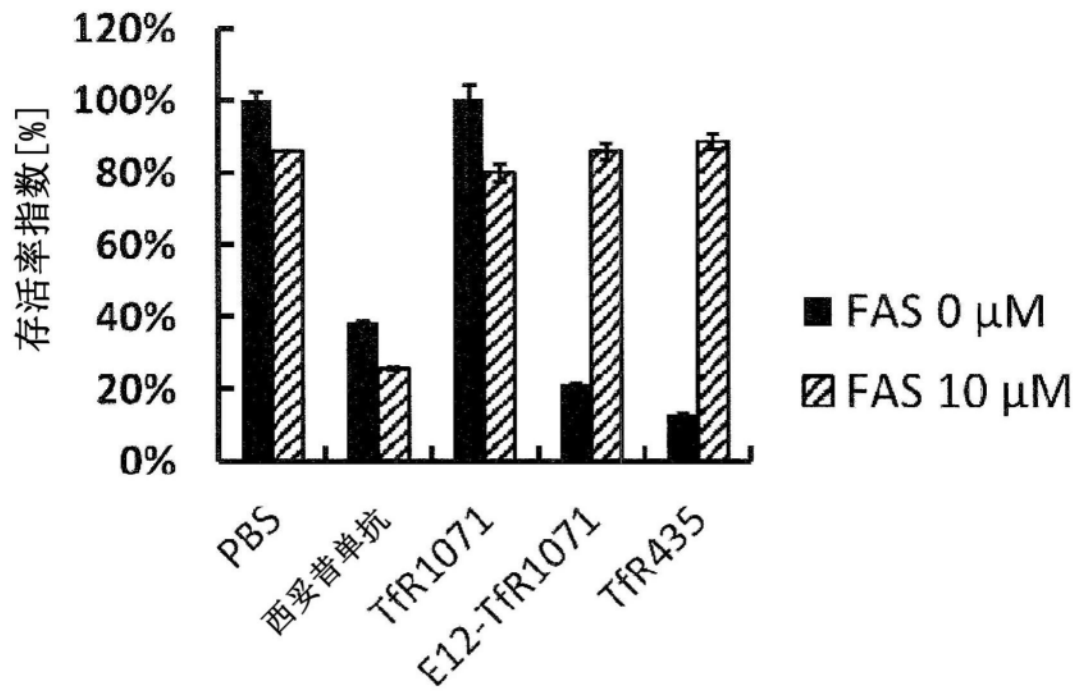


图14

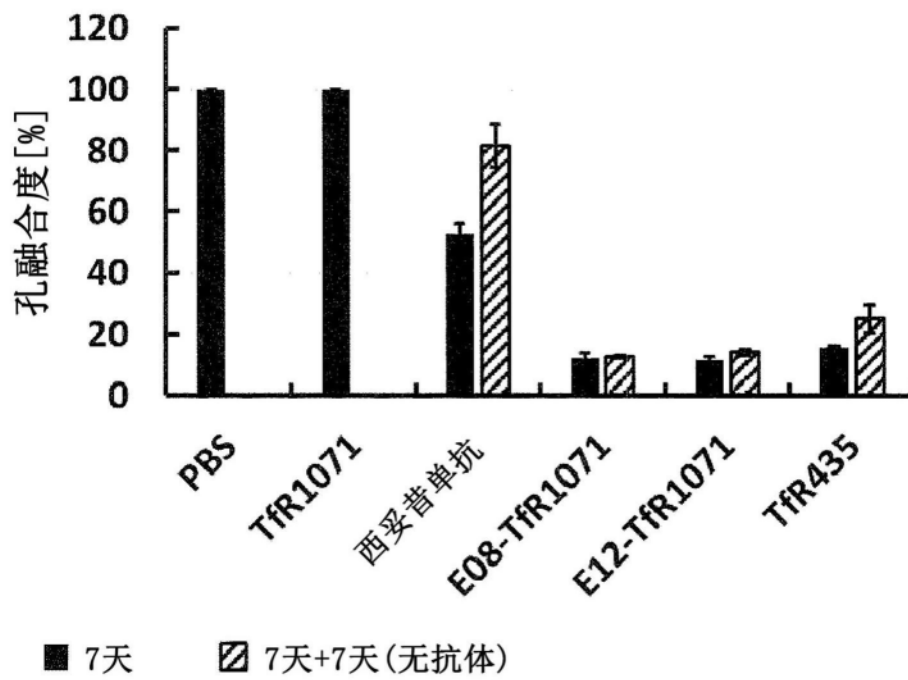


图15

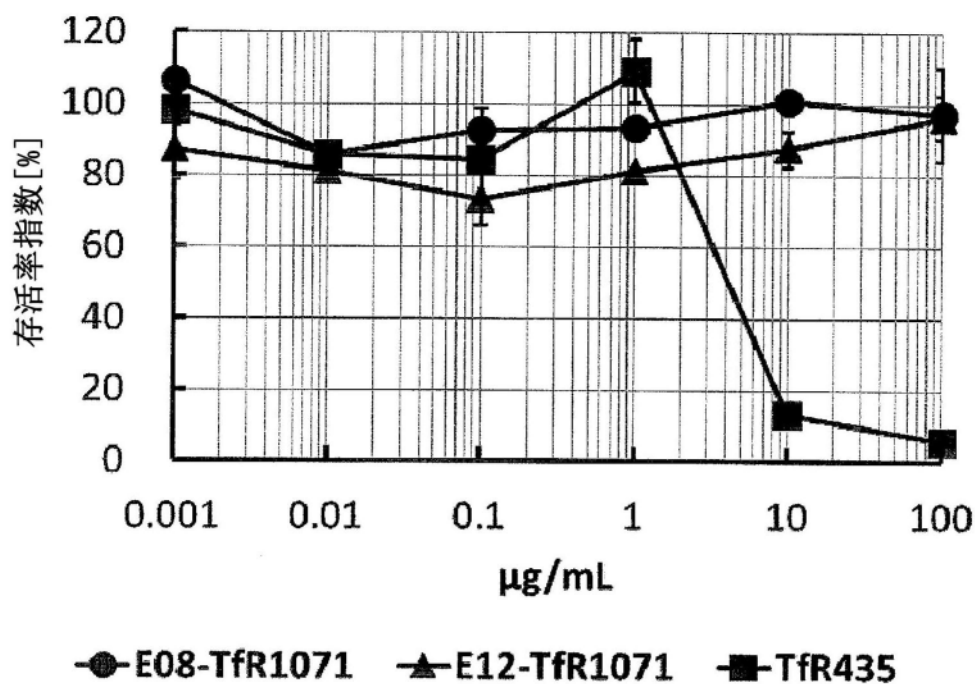


图16

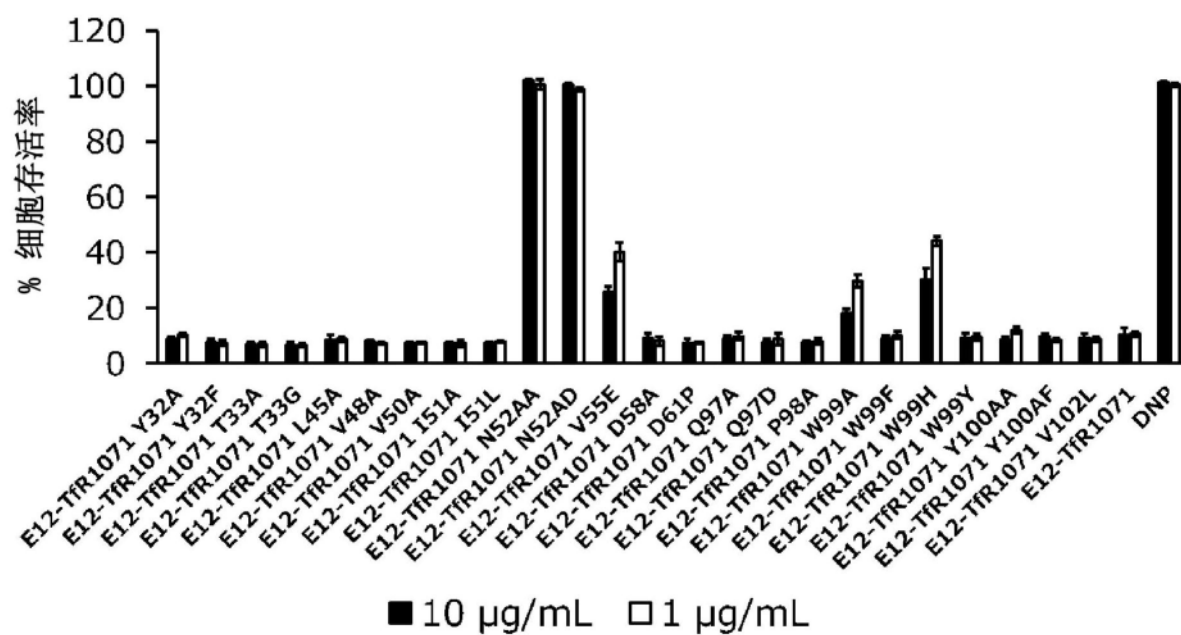


图17A

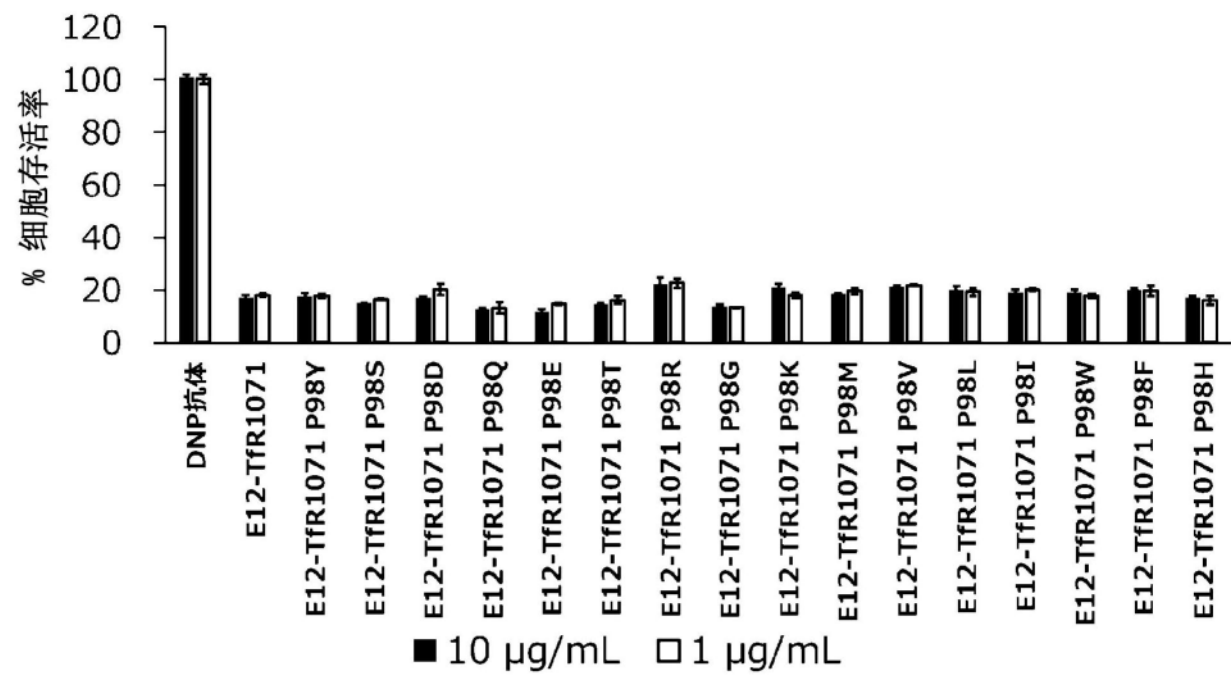
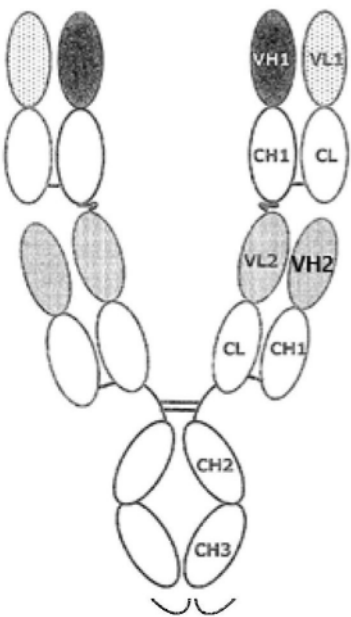


图17B

(A)



(B)

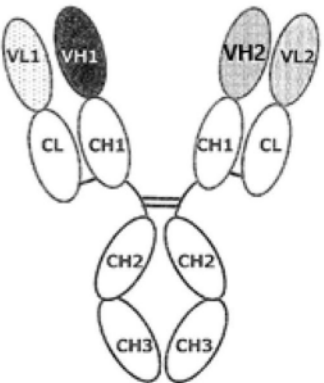


图18

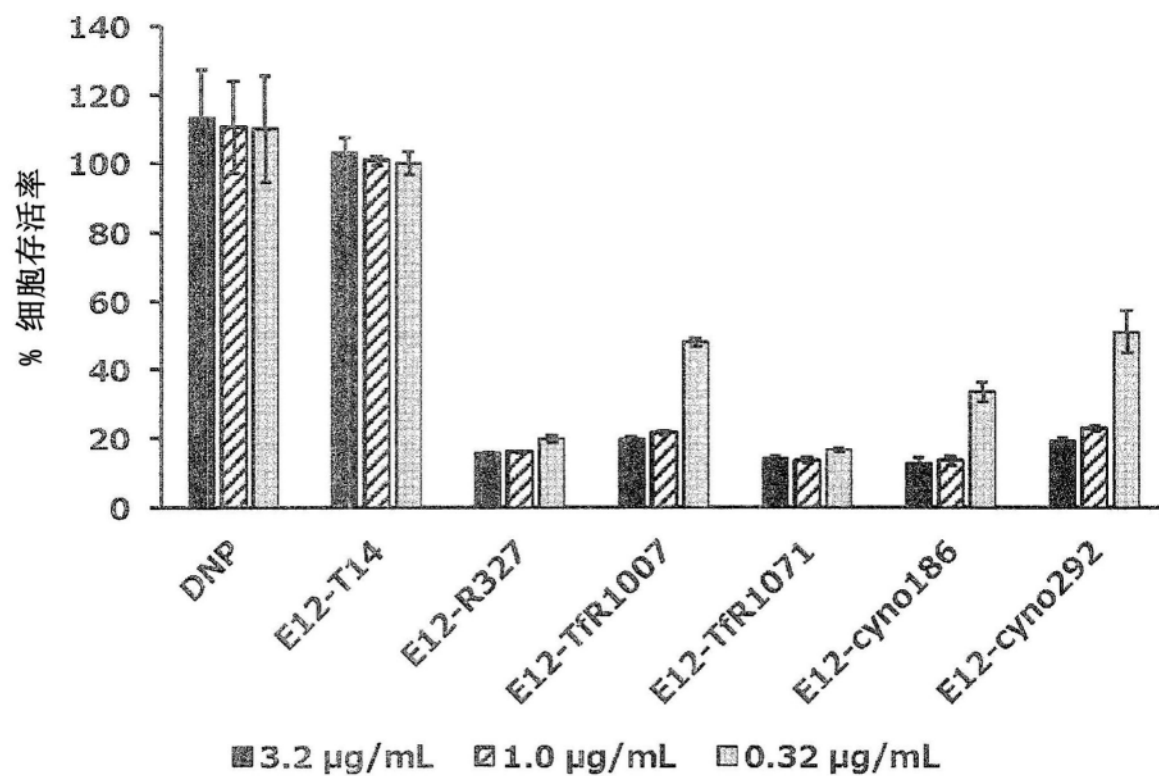


图19A

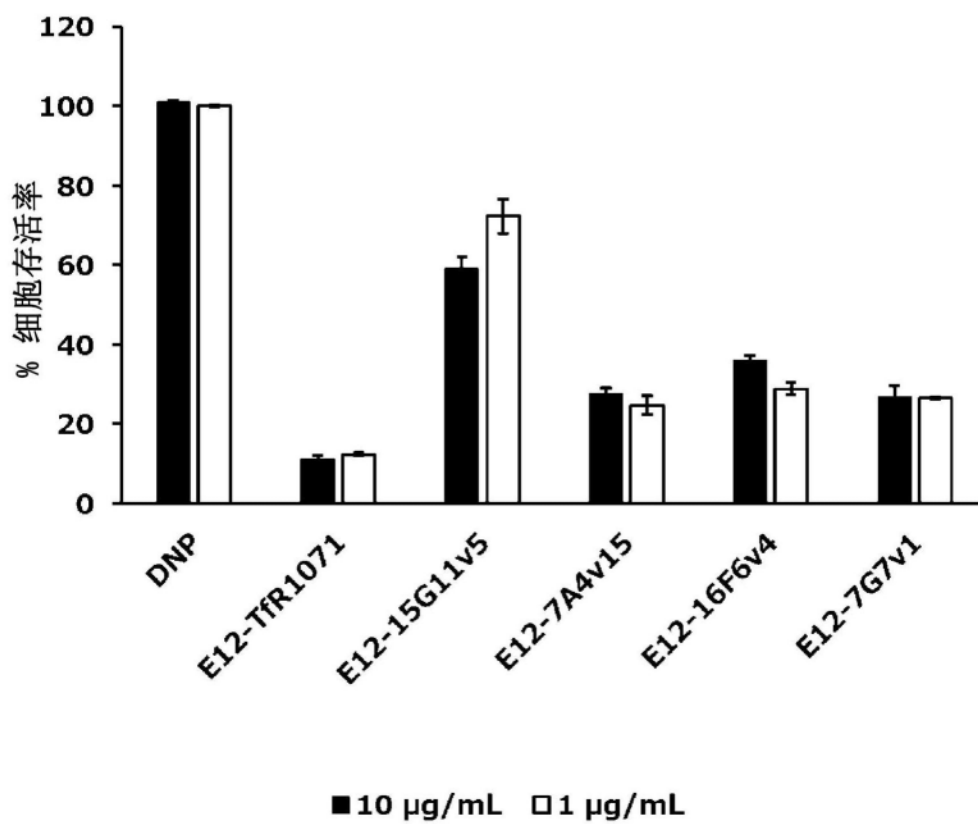


图19B

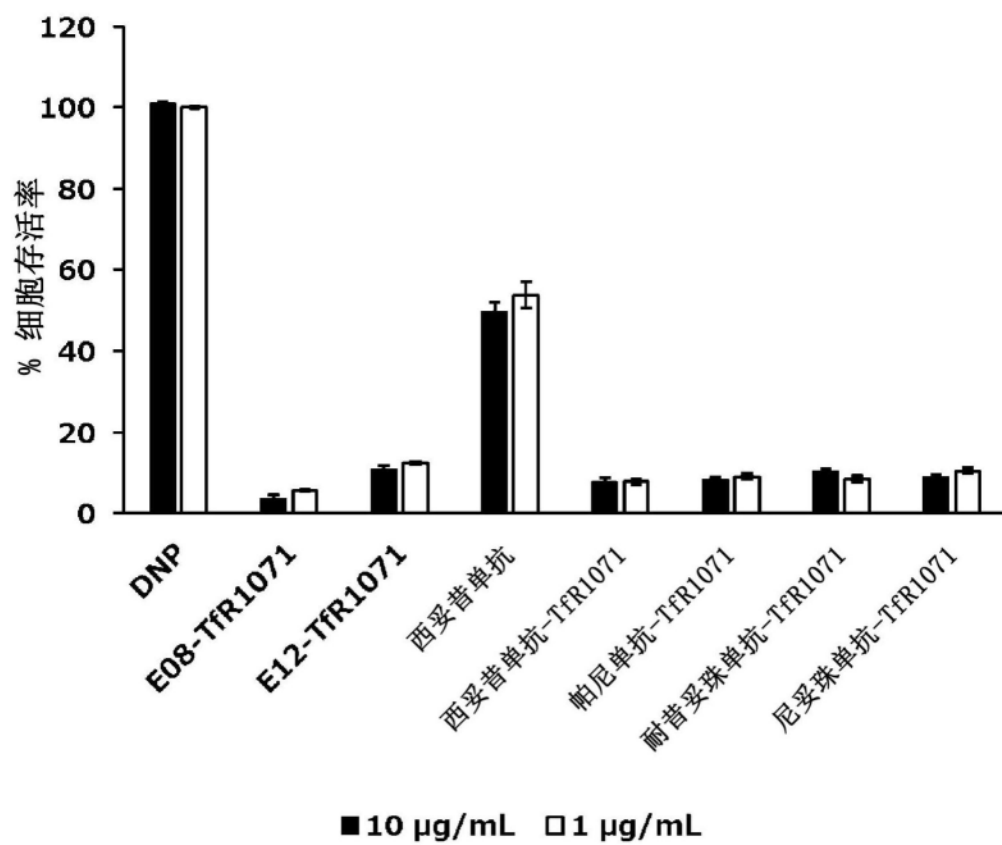


图20

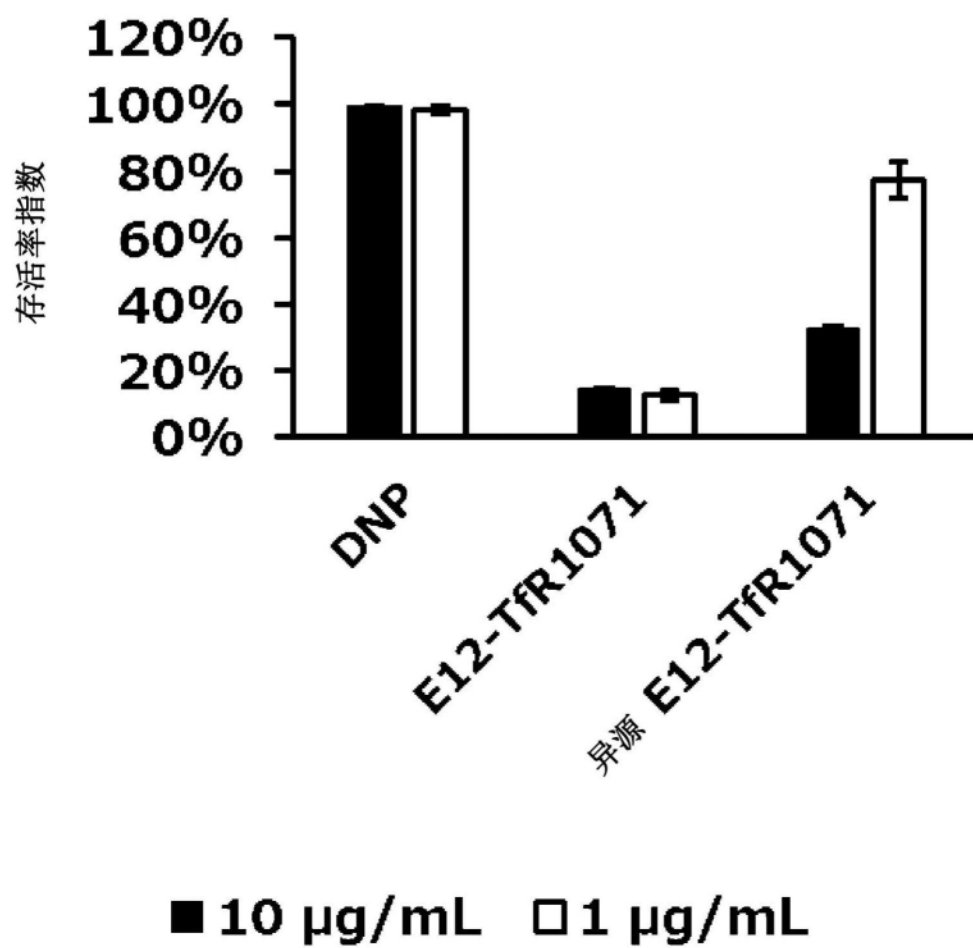


图21