



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1461310 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 01807735.8

(22) 申请日 2001.02.09

(85) PCT申请进入国家阶段日
2002.10.08

(86) PCT申请的申请数据
PCT/US2001/004170 2001.02.09

(87) PCT申请的公布数据
W001/58956 EN 2001.08.16

(73) 专利权人 雅培制药有限公司
地址 德国路德维希港

(72) 发明人 T·哈于尔 R·W·迪克松
M·罗古斯卡 M·怀特
B·拉布科夫斯基 J·萨菲尔德
A·R·敦坎
S·M·布洛克勒胡尔斯特
J·曼科维奇 C·P·索尔罗克
J·E·汤普森 S·N·伦纳德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 徐雁漪

(51) Int. Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

(56) 对比文件

Griffiths AD等.Human anti-self
antibodies with high specificity from
phagedisplay libraries.The EMBO Journal12
2. 1993, 12(2), 725-734.

审查员 田甜

权利要求书2页 说明书9页
序列表26页 附图4页

(54) 发明名称

结合人白介素-18的抗体及制备和使用方法

(57) 摘要

本发明提供结合人白介素-18(hIL-18)的抗体、尤其是结合人IL-18表位的抗体。所述抗体可以是例如完整的人抗体、重组抗体或单克隆抗体。优选抗体对hIL-18具有高亲和力并且在体外和体内均中和hIL-18活性。本发明的抗体可以全长抗体或其抗原结合部分。本发明也提供本发明抗体的制备方法和应用方法。本发明的抗体或抗体部分可用于检测hIL-18和可用于抑制hIL-18活性,例如抑制罹患其中hIL-18活性是有害的疾病的人体内的hIL-18活性。

1. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,

所述重链可变区包含:

由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR1 结构域;

由 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR2 结构域;

由 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR3 结构域;

所述轻链可变区包含:

由 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR1 结构域;

由 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR2 结构域;

由 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR3 结构域;以及

其中所述抗体或其抗原结合部分任选地具有选自下述的一组置换:在 Kabat 位置 L34 处的 S;在 Kabat 位置 H53 处的 R;在 Kabat 位置 H53 处的 Y;在 Kabat 位置 H58 处的 Q;在 Kabat 位置 L34 处的 S 和在 Kabat 位置 H53 处的 R;在 Kabat 位置 L34 处的 S 和在 Kabat 位置 H58 处的 Q;在 Kabat 位置 L34 处的 S 和在 Kabat 位置 H53 处的 Y;在 Kabat 位置 H53 处的 R 和在 Kabat 位置 H58 处的 Q;在 Kabat 位置 H53 处的 Y 和在 Kabat 位置 H58 处的 Q;在 Kabat 位置 L34 处的 S、在 Kabat 位置 H53 处的 R 和 Kabat 位置 H58 处的 Q;在 Kabat 位置 L34 处的 S、在 Kabat 位置 H53 处的 Y 和在 Kabat 位置 H58 处的 Q;在 Kabat 位置 L90 处的 C;在 Kabat 位置 L93 处的 C;在 Kabat 位置 L94 处的 P;在 Kabat 位置 L94 处的 Q;在 Kabat 位置 L94 处的 R;在 Kabat 位置 L95 处的 R;在 Kabat 位置 L95 处的 Y;在 Kabat 位置 L95b 处的 E;或在 Kabat 位置 L95b 处的 W。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体是中和抗体。

3. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,所述抗体是重组抗体。

4. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,所述抗体是单克隆抗体。

5. 权利要求 1 的分离抗体或其抗原结合部分,其中根据表面等离子共振测定,所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下;或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 以下。

6. 权利要求 1 的分离抗体或其抗原结合部分,其中根据表面等离子共振测定,所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 以下;或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下。

7. 权利要求 1 的分离抗体或其抗原结合部分,其中根据表面等离子共振测定,所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 以下;或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下。

8. 权利要求 1 的分离抗体或其抗原结合部分,其中根据表面等离子共振测定,所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 以下;或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 以下。

9. 权利要求 1 的分离抗体或其抗原结合部分,其中根据表面等离子共振测定,所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 以下;或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 以下。

10. 一种分离的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可

变区和轻链可变区，

所述重链可变区包含：

由 SEQ ID NO :20 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR1 结构域；

由 SEQ ID NO :21 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR2 结构域；

由 SEQ ID NO :22 所示的氨基酸序列组成的重链 CDR3 结构域；

所述轻链可变区包含：

由 SEQ ID NO :23 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR1 结构域；

由 SEQ ID NO :24 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR2 结构域；

由 SEQ ID NO :25 所示的氨基酸序列组成的轻链 CDR3 结构域；

其中所述抗体或其抗原结合部分任选地具有选自下述的一种置换：在 Kabat 位置 H54 处的 Q 或在 Kabat 位置 H58 处的 W。

11. 权利要求 10 的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体是中和抗体。

12. 权利要求 10 的抗体或其抗原结合部分，所述抗体是重组抗体。

13. 权利要求 10 的抗体或其抗原结合部分，所述抗体是单克隆抗体。

14. 权利要求 10 的分离抗体或其抗原结合部分，其中根据表面等离子共振测定，所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 以下；或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 以下。

15. 权利要求 10 的分离抗体或其抗原结合部分，其中根据表面等离子共振测定，所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 以下；或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下。

16. 权利要求 10 的分离抗体或其抗原结合部分，其中根据表面等离子共振测定，所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 以下；或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下。

17. 权利要求 10 的分离抗体或其抗原结合部分，其中根据表面等离子共振测定，所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 以下；或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 以下。

18. 权利要求 10 的分离抗体或其抗原结合部分，其中根据表面等离子共振测定，所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 以下；或者它抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 以下。

结合人白介素-18 的抗体及制备和使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2000 年 2 月 10 日申请的、题目是“结合人白介素-18 的抗体及制备和使用方法”的美国临时专利申请顺序号 60/181,608 的非临时专利申请的优先权,该专利申请的内容通过引用结合到本文中。另外,整个本申请引用的包括参考文献、授予的专利和公布的专利申请的所有引用参考文献的内容均通过引用结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 白介素-18(IL-18)最早于 1989 年被描述为干扰素- γ 诱导因子(IGIF),它是除了能够诱导干扰素 γ 外还具有各种功能的促炎细胞因子。这些生物学特性包括激活 NF- κ b、Fas 配体表达、诱导 CC 趋化因子和 CXC 趋化因子以及增加产生感受态人免疫缺陷病毒。

[0005] 由于 IL-18 能够诱导 T 细胞和巨噬细胞内产生干扰素 γ ,因此它在 Th1 型免疫应答中起重要作用且参与先天性免疫和获得性免疫。IL-18 在结构和功能上与 IL-1 家族有关。有关 IL-18 结构、功能和生物活性的综述,参见例如 Dinarello, C. 等 (1998) J. Leukoc. Biol. 63 :658-654 ;Dinarello, C. A. (1999) Methods 19 :121-132 和 Dinarello, C. A. (1999) J. Allergy Clin. Immunol. 103 :11-24。

[0006] 特别需要调节各种各样的人免疫应答中的 IL-18。具体来说,与 IL-18 结合并中和 IL-18 的抗体是特别理想的。此外,由于存在小鼠抗体给予人体的相关问题,例如血清半寿期短、不能触发某些人类效应子功能并且在人体内诱发针对小鼠抗体不需要的免疫应答(“人抗小鼠抗体”(HAMA)反应),因此小鼠 IL-18 抗体的体内应用受到限制。

[0007] 一般而言,尝试克服与将完全小鼠抗体用于人类相关的问题,已经涉及对所述抗体进行基因工程改造以使其更“人样化(human-like)”。例如,已经制备出这样的嵌合抗体:其中所述抗体链的可变区来源于小鼠,而所述抗体链的恒定区来源于人(Junghans 等 (1990) Cancer Res. 50 :1495-1502 ;Brown 等 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88 :2663-2667 ;Kettleborough 等 (1991) Protein Engineering. 4 :773-783)。然而,因为这些嵌合人源化抗体仍保留某些小鼠序列,所以它们仍可能诱发不需要的免疫反应、人抗嵌合抗体(HAMA)反应,当长期给予时情况尤其如此。

[0008] 针对小鼠抗体或其衍生物(例如嵌合抗体或人源化抗体)的优选 IL-18 抑制剂将完全是人抗 IL-18 抗体,由于这样的药物不会诱发 HAMA 反应,因此即使长期应用也不会诱发 HAMA 反应。然而,这样的抗体本领域尚未见介绍,因此仍然需要这样的抗体。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明涉及结合人 IL-18 的诸如抗体的化合物以及制备和应用这类化合物或抗体的方法。

[0011] 一方面,本发明涉及能够结合人 IL-18 氨基酸序列或其部分的化合物,其中所述氨基酸包含 SEQ ID NO :70 或 SEQ ID NO :71 提供的人 IL-18 的 N 末端部分或 C 末端部分。在一个实施方案中,所述化合物是一种小分子、肽、多肽、抗体或抗体片段,例如完全人抗体或片段。

[0012] 另一方面,本发明涉及能够与人 IL-18 结合的人单克隆抗体或其抗原结合部分。在其它实施方案,根据表面等离子体共振(surface plasmon resonance)测定,所述抗体或其片段与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 0.1s^{-1} 或以下、 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 或以下、 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或以下、 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或以下、 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或以下、 $1 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 或以下;或者抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 1×10^{-6} 或以下、 1×10^{-7} 或以下、 1×10^{-8} 或以下、 1×10^{-9} 或以下、 1×10^{-10} 或以下、或 1×10^{-11} 或以下。

[0013] 另一方面,本发明涉及这样的分离抗体或其抗原结合部分:它结合包含氨基酸 PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1)、VIRNLNDQVLFDIQ (SEQ ID NO:33) 或二者任何一个的一部分的人 IL-18 表位。所述抗体最好是中和抗体。所述抗体最好是人抗体。在各种实施方案中,所述抗体是重组抗体(例如单链抗体(scFv))或单克隆抗体。

[0014] 在其它实施方案中,所述分离抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 表位或二者任何一个的一部分结合,其中根据表面等离子体共振测定,所述抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 0.1s^{-1} 或以下;或者其抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 或以下。或者,根据表面等离子体共振测定,所述抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 或以下;或者抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或以下。或者,根据表面等离子体共振测定,所述抗体或其抗原结合部分可以与人 IL-18 解离,其 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或以下;或者可以抑制人 IL-18 活性,其 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或以下。或者,根据表面等离子体共振测定,所述抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或以下;或者抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或以下。或者,根据表面等离子体共振测定,所述抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或以下;或者抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或以下。或者,根据表面等离子体共振测定,所述抗体或其抗原结合部分与人 IL-18 解离的 k_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 或以下;或者抑制人 IL-18 活性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 或以下。

[0015] 本发明的另一方面涉及含有能够结合 IL-18 表位的至少一个可变区 CDR 结构域的分离的人抗体或其抗原结合部分。在相关实施方案中,所述分离抗体或其抗原结合部分的可变区含有如表 6 或表 9 所示的重链和/或轻链 CDR1 结构域、CDR2 结构域或 CDR3 结构域,所述结构域可以在表 7-8 和表 10-11 中所示的任一 Kabat 位置上或邻近所述位置具有例如一个或多个氨基酸取代或插入。在一个优选实施方案中,所述分离抗体或其抗原结合部分含有一个含氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的轻链可变区(LCVR)和一个含氨基酸序列 SEQ ID NO:26 的重链可变区(HCVR)。在另一个优选实施方案中,所述分离抗体或其抗原结合部分含有一个具有氨基酸序列 SEQ ID NO:29 的轻链可变区(LCVR)和一个具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27 的重链可变区(HCVR)。

[0016] 本发明的另一方面涉及包含本发明的抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药用组合物。在一个实施方案中,所述药用组合物还包含至少一种另外的治疗其中 IL-18 活性是有害的疾病的药物。

[0017] 本发明的另一方面涉及制备结合人白介素-18(IL-18)的抗体的方法。本发明提供的方法包括将抗体库(antibody repertoire)暴露于包含含氨基酸 PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ ID NO:1)、VIRNLNDQVLFDIQ (SEQ ID NO:33) 或二者任何一个的一部分的人 IL-18 表位的抗原;并且从所述抗体库选择结合包含氨基酸 PLFEDMTDSDCRDNA (SEQ

ID NO:1)、VIRNLNDQVLFDQ(SEQ ID NO:33) 或者二者任何一个的一部分的人 IL-18 表位的抗体。

[0018] 在一个实施方案中,所述抗体库是动物体内的体内抗体库,所述方法包括用包含以下组分的抗原免疫所述动物:包含氨基酸 PLFEDMTSDCRDNA(SEQ ID NO:1)、VIRNLNDQVLFDQ(SEQ ID NO:33) 的人 IL-18 表位、人 IL-18 的 N 末端部分或 C 末端部分(SEQ ID NO:70-71) 或这些表位中任一表位的一部分。在另一个实施方案中,所述抗体库是重组抗体文库,所述方法包括用含有以下组分的抗原筛选所述文库:具有氨基酸 PLFEDMTSDCRDNA(SEQ ID NO:1)、VIRNLNDQVLFDQ(SEQ ID NO:33) 的人 IL-18 表位、SEQ ID NO:31-32 和 SEQ ID NO:34-60 表示的肽或任一前述组分的一部分。所述文库最好是人抗体文库。

[0019] 另一方面,本发明提供编码任一上述方面的抗体(例如重链和/或轻链可变区)或其部分的分离核酸。在相关实施方案中,所述编码抗 IL-18 抗体或其部分的分离核酸位于重组表达载体中,例如在宿主细胞中表达。

[0020] 因此,另一方面,本发明涉及采用已经导入所述重组表达载体中的前述宿主细胞合成结合人 IL-18 的抗体的方法,所述方法包括在培养基中培养所述宿主细胞直到所述细胞合成结合人 IL-18 的抗体。

[0021] 本发明的另一方面涉及抑制人 IL-18 活性的方法,所述方法包括将人 IL-18 与本发明的抗体或其抗原结合部分接触,使得人 IL-18 活性被抑制。

[0022] 本发明的再一方面涉及抑制罹患其中人 IL-18 活性是有害的疾病的病人体内的人 IL-18 活性的方法,所述方法包括给予所述病人本发明的抗体或其抗原结合部分,使得所述病人体内的人 IL-18 活性被抑制。在一个实施方案中,可以例如在给予另外的药物之前、同时或之后,给予所述抗 IL-18 抗体,所述另外的药物例如抗 IL-12 抗体或其抗原结合片段、氨甲蝶呤、抗 TNF 抗体或其抗原结合片段、皮质类固醇、环孢菌素、雷帕霉素、FK506 或非甾体消炎药。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1 显示与 IL-1 β (左) 和 IL1RA (右) 相比的 IL-18 (中间) 的结构模型。

[0025] 图 2 显示与 IL-18 受体复合的 IL-18 的结构模型,其中 IL-18 的包含氨基酸 PLFEDMTSDCRDNA(SEQ ID NO:1) 的肽表位以深灰色表示。该肽表位被抗 IL-18 抗体 2E1 结合。

[0026] 图 3 显示与 IL-18 受体复合的 IL-18 的结构模型,其中 IL-18 的包含氨基酸 VIRNLNDQVLFDQ(SEQ ID NO:33) 的肽表位以深灰色表示。该肽表位被抗 IL-18 抗体 LT28 结合。

[0027] 图 4 显示与 IL-18 受体复合的全长 IL-18 的结构模型。球形浅灰色和深灰色表位代表 IL-18 的 N 末端和 C 末端接触表位(分别为 SEQ ID NO:70 和 71)。

[0028] 图 5 显示三种不同的抗 IL-18 抗体中和 IL-18 的生物效应的效价与抑制 KG1 细胞内 IFN- γ 诱导作用的关系。抗体 125H (方框) 和 2E1IgG 抗体 (圆形) 或 2E1 单链抗体 (三角形) 的 IC₅₀ 值分别为 2.1E-10、9.0E-10 和 3.3E-9。

[0029] 发明详述

[0030] 本发明涉及选择能够对 IL-18 介导的信号转导产生中和作用的抗体的肽表位、制

备抗这些表位的抗体以及这些抗体的应用,包括用来治疗涉及 IL-18 的疾病。选择表位的策略必须构建 IL-18 蛋白及其相应的受体的同源性模型。然后组合应用目测和计算估计选择用于合成和抗体产生的代表性肽区段。本文所示的氨基酸序列运用标准单字母缩写代码。

[0031] IL-18 表位的选择

[0032] 运用程序 Modeler(Sali, A. 等,通过 MODELLER 评价比较性蛋白质建模(Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER)。Proteins:Struct., Funct., Genet. (1995),23(3),第 318-26 页。CODEN:PSFGEY;ISSN:0887-3585)产生用于 IL-18 和 IL-18 受体两者的同源性模型。IL-1 β (Priestle, J. 等,人白介素-1 β 的三维结构精确到 2.0.Å.分辨率(The three-dimensional structure of human interleukin-1.beta.refined to 2.0.Å.resolution)。Prog.Clin.Biol.Res. (1990),349(Cytokines Lipocortins Inflammation Differ.),第 297-307 页)和 IL-1RA(Schreuder, H. 等,白介素-1 受体拮抗剂的精细晶体结构:二硫键和顺式脯氨酸的存在(Refined crystal structure of the interleukin-1 receptor antagonist: presence of a disulfide link and a cis-proline)。Eur. J. Biochem. (1995)),227(3),第 838-47 页)的 X 射线晶体结构是可得到的并且用作 IL-18 模型构建的参考坐标。应用 IL-1 受体结构(Viger, G. 等,与白介素-1 β 复合的 I 型白介素-1 受体的晶体结构(Crystal structure of the type-1 interleukin-1-receptor complexed with interleukin-1. beta)。Nature(London) (1997),386(6621),第 190-194 页)对 IL-18 受体建模。

[0033] 下文进一步描述 IL-18 和 IL-18 受体的结构模型建立。

[0034] IL-18 模型建立

[0035] 与所述两种蛋白质(即 IL-1 β 和 IL-18)的总体序列同源性低,然而,令人信服的证据是 IL-18 是 IL-1 家族成员(参见 Dinarello, C.A. IL-18:一种 TH1 诱导型促炎细胞因子及 IL-1 家族新成员(IL-18:a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family)。J. Allergy Clin. Immunol. (1999)),103(1, Pt. 1),第 11-24 页),并且总体蛋白质折叠非常相似。和 IL-1 β 一样,IL-18 最初以前体形式分泌出来。前体 IL-1 β (pro-IL-1 β) 和前体 IL-18 (pro-IL-18) 两者均被 IL-1 β 转化酶(ICE)激活(Fantuzzi, G. 和 Dinarello, C.A. 白介素-18 和白介素-1 β : ICE(caspase-1)的两种细胞因子底物(Interleukin-18 and Interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE(caspase-1))。J. Clin. Immunol. (1999)),19(1),第 1-11 页)。还知道 IL-1 受体和 IL-18 受体相似(Dinarello, C.A. 等,白介素-18 的综述:不止是一种干扰素 γ 诱导因子(Overview of interleukin-18: more than an interferon- γ inducing factor)。J. Leukocyte Biol. (1998),63(6),658-664)。IL-1 β 能够与 IL-18 受体结合。虽然这两种蛋白质间的总体序列同源性和 IL-18 的序列同源性相同,但是作为最终论证,IL-1 β 和 IL-1RA 显示出相同的折叠。对这三种蛋白质(即 IL-18、IL-1 β 和 IL-1RA)间的序列比对运用程序 InsightII 人工进行。该序列比对可以参见表 1:

[0036] 表 1: IL-18 与 IL-1 β 和 IL-1RA 的序列比对

[0037]

重链突变	
CDR/Kabat 位置	取代的残基
CDR1	
H31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H32	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H33	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H35	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
CDR2	
H50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H51	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H52	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H52a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H53	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H54	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H56	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H58	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
CDR3	
H95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H98	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H99	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H100	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H100a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H101	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C
H102	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, or C

[0038] [0155] 表 11. 引入 LT28 的轻链氨基酸取代

[0039]

轻链突变	
CDR/位置	取代的残基
CDR1	
L30	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L31	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L32	R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C, G
L34	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
CDR2	
L50	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, C
L52	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C
L53	A, R, E, S, Y, V, H, P, W, C, N
L55	A, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
CDR3	
L89	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L90	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L91	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L92	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L93	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L94	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95a	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L95b	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L96	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C
L97	A, R, E, Q, S, Y, V, H, P, W, C

[0040] 如上所述引入取代。然后对得自每个诱变反应的多个代表性克隆测序,并将代表来自亲代 LT28 单链抗体序列改变的那些克隆在细菌中表达,然后将其纯化,供如下所述的进一步测试用。

[0041] 实施例 3

[0042] 人抗体与 IL-18 的结合活性

[0043] 采用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ), 通过表面等离子体共振 (SPR), 测定配体 (固定在生物传感器基体上的生物素化重组人 IL-18(rhIL-18)) 和分析物 (抗体溶液) 之间的实时结合相互作用。所述系统利用 SPR 的光学性能检测葡聚糖生物传感器基体中的蛋白质浓度改变。使蛋白质以已知浓度与所述葡聚糖基体共价结合。将抗体通过所述葡聚糖基体注入, 在注入抗体和固定配体间的特异性结合导致基体蛋

白质浓度增加和 SPR 信号产生变化。SPR 信号变化以共振单位 (RU) 记录,并相对于时间沿 sensorgram 的 y 轴显示。

[0044] 为了有利于将生物素化 rhIL-18 固定在生物传感器基体上,首先用 100mM N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 400mM N- 乙基 -N' -(3- 二乙基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC), 使链霉抗生物素蛋白通过游离氨基与所述基体共价连接。接下来,穿过所述活化基体注入链霉抗生物素蛋白。穿过所述活化生物传感器注入 35 μ l 在乙酸钠、pH 4.5 中稀释的链霉抗生物素蛋白 (25 μ g/ml), 所述蛋白上的游离胺直接与所述活化羧基结合。未反应的基体 EDC- 酯通过注射 1M 乙醇胺而去活化。另外,链霉抗生物素蛋白偶联的生物传感器芯片是可商业性获得的 (Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)。

[0045] 生物素化 rhIL-18 如下制备:首先将 5.0mg 生物素 (D- 生物素基 - ϵ - 氨基己酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯;Boehringer Mannheim Cat.No.1008960) 溶于 500 μ l 二甲亚砜中, 制备 10mg/ml 溶液。每毫升 rhIL-18 加入 10 μ l 生物素 (2.65mg/ml), 生物素与 rhIL-18 的摩尔比为 2 : 1。将反应物温和地混合,然后于室温下避光孵育 2 小时。将 PD-10 柱子 Sephadex G-25M(Pharmacia Catalog No.17-0851-01) 用 25ml 冷 PBS 平衡,然后每个柱子上样 2ml rhIL-18- 生物素。用 10x1ml 冷 PBS 洗脱所述柱子。收集流分,然后在 OD280 读数 (1.0 OD = 1.25mg/ml)。合并合适流分,然后于 -80 $^{\circ}$ C 贮藏待用。

[0046] 将需通过链霉抗生物素蛋白固定在所述基体上的生物素化 rhIL-18 在补充 0.05 % (BIAcore) 表面活性剂 P20 (Pharmacia BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ) 的 PBS 运行缓冲液 (Gibco Cat.No.14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY) 中稀释。为了测定 rhIL-18 特异性抗体结合固定化 rhIL-18 的能力,如下进行结合测定。等份生物素化 rhIL-18 (25nM; 10 μ l 等份样品) 以流速 5 μ l/min 注射通过链霉抗生物素蛋白偶联的葡聚糖基体。注入所述蛋白之前和不久以后, PBS 缓冲液单独流过每个流式测定池。在基线和完成生物素化 rhIL-18 注入后约 30 秒之间信号的净差值代表结合值。测定直接与固定生物素化 rhIL-18 结合的 rhIL-18 特异性抗体。将抗体 (20 μ g/ml) 在 PBS 运行缓冲液中稀释,将 25 μ l 等份样品以流速 5 μ l/min 注射通过所述固定化蛋白质基体。注入抗体之前和不久以后, PBS 缓冲液单独流过每个流式测定池。在基线信号和完成抗体注入后的信号的净差值代表所述特定样品的结合值。在注入下一个样品前,生物传感器基体用 100mM HCl 再生。为了测定解离速率 (K_{off}) 常数、缔合速率 (K_{on}) 常数、缔合速率 (K_a) 常数和解离速率 (K_d) 常数,运用 BIAcore 动力学评价软件 (version 2.1)。

[0047] 与亲代抗体 2E1 和 LT28 (和小鼠对照) 相比,改进候选抗 IL-18 抗体与生物素化 rhIL-18 结合的代表性结果示于下表 12 中。为了比较,也包括基于细胞的中和测定的 IC50 值,这些均在实施例 4 中有描述。所有克隆均作为单链 Fv 抗体制备,用以采用 Biacore 分析进行测试,基于细胞的测定如下所述。列出的亲代克隆包含未突变的亲代重链和轻链,而单链突变体含有一条亲代链和一条突变链,其中所述突变链以重 (H) 链或轻 (L) 链显示,其后氨基酸取代的 Kabat 位置和性质。

[0048] 表 12. 来源于 2E1 和 LT28 的抗 IL-18 抗体的结合

[0049]

抗体 克隆	缔合速率 ($M^{-1}s^{-1}$)	解离速率 (s^{-1})	Kd (M)	IC50 值*
2E1 亲代抗体和突变体				
2E1 (亲代) ScFv	2.6E+3	6.42E-03	1.5E-07	3.3E-8M
2E1 (亲代) IgG				9.0E-10M
L34S		1.69E-04		1.5E-8M
H53R		2.34E-03		2.5E-8M
H53Y		-		1.5E-8M
H58Q		-		1.6E-8M
L34S + H53R (2E1RS)	2.7E+03	6.82E-05	2.3E-08	3.0E-09M
L34S + H58Q		-		1.5E-8M
L34S + H53Y		5.28E-05		6.7E-9M
H53R + H58Q		-		1.2E-8M
H53Y + H58Q		-		1.2E-8M
L34S + H53R + H58Q		6.18E-05		2.8E-9M
L34S + H53Y + H58Q		-		8.0E-9M
L90C				4x
L93C				2-4x
L94P、Q 或 R				2-4x
L95R, Y				3-8x
L95bE, W				2-4x
LT28 亲代抗体和突变体				
LT28 (亲代)	1.3E+04	4.8E-04	3.9E-08	9.0E-8M
H54Q				2-3x
H58W				2-3x
I				
125-2H	1.7E+05	1.1E-04	6.2E-10	2.E-10M
318-M	1.2E+04	1.1E-04	9.6E-09	4.0E-9M

[0050] * 某些数值为与亲代相比改进的倍数。

[0051] 实施例 4

[0052] 抗 IL-18 抗体的中和活性

[0053] 为了检查本发明的抗人 IL-18 抗体的中和活性,使用本领域公知的测定来监测 IL-18 活性。

[0054] 概括地讲,所述测定利用按照标准技术培养的 KG1 细胞(ATCC#CCL-246,髓性白血病骨髓细胞)(例如使用 RPMI 1640 培养基 Gibco#21870-076;(补充 10%胎牛血清(BioWhittaker#14-501F);2mM L 谷氨酰胺(Gibco#25030-081);50 单位/ml 青霉素,50 μg/ml 链霉素(Gibco#15070-063)和 0.75%碳酸氢钠)。

[0055] 为了测试对 IL-18 的中和作用,用 20ng/ml hTNF-α (Lot#19130132) 刺激的 3x10⁵ KG-1 细胞与 50 μl 抗 IL-18 抗体(4x Conc.)和 50 μl IL-18(4x Conc. = 8ng/ml)一起孵育并且于 37°C 孵育 1 小时或 16-20 小时。为了测定随诱导的 hIFN-γ 产生而发生中和作用的 IL-18 含量,采用市售 Elisa Kit(R&D#DIF00/Endogen#EH-IFNG),按照生产商的说明,进行 ELISA,然后根据标准曲线计算 hIFN-γ 的产量(pg/ml)。

[0056] 总之,4 种突变抗体,即 2E1 衍生的 L34S、H53R、H53Y 和 H58Q 比亲代 2E1 抗体显示更强的 IL-18 中和效力(参见表 12)。采用 KG-1 测定 IC₅₀ 值改进 2-5 倍,并且采用 BIAcore 分析测得相似的改进结合结果。

[0057] 也制备出各种突变组合的克隆,并对其进行测试,该数据概述于表 12 中。最佳组合克隆 L34S-H53R 在基于 KG-1 细胞的测定和采用 BIAcore 分析两者显示比亲代抗体 2E1 有 10 倍改进。将所得抗体命名为 2E1RS。

[0058] 根据采用 KG-1 测定确定,2E1 的几个其它突变克隆显示效能增强,即 IL-18 中和作用增强。突变体 L95Y 比亲代 2E1 抗体 IC₅₀ 值增加 5-8 倍。几个其它突变体提高 2-3 倍,它们是 2E1 突变体 H96A、H96Q、H96S、H98S、L90C、L90W、L93C、L94P、L94P、L94Q、L94R、L94W、L95R、L95aA、L95aH、L95aP、L95aR、L95aW、L95bE、L95bW、L95bY、L97C 和 L97E。

[0059] 也比较了 2E1 以 ScFv 抗体或 IgG 抗体形式的结合(参见图 5)。

[0060] 再者,衍生自 LT28 亲代的两个突变体与所述亲代抗体相比,其 IL-18 中和活性改善。

[0061] 这些结果证明完全人 IL-18 中和抗体可以采用本发明的方法和组合物获得。

[0062] 等同实施方案

[0063] 本领域技术人员知道,或者采用常规实验能够确定与本文所述的本发明的具体实施方案等同的许多实施方案。下文的权利要求将包括这样的等同实施方案。

[0001]

CPCH0261983P 说明书的核苷酸和氨基酸序列表

序 列 表

<110> Ghayur, Tarig 等

<120> 结合人白介素-18 的抗体及制备和使用方法

<130> BBI-149

<140>

<141>

<150> 60/181,608

<151> 2000-02-10

<160> 71

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala
1				5					10					15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Cys	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg
1				5					10		

[0002]

<210> 4

<211> 157

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125

Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140

Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

<210> 5

<211> 153

<212> PRT

<213> 人

[0003]

<400> 5

```

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys
 1              5              10              15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln
      20              25              30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln
      35              40              45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu
 50              55              60

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu
 65              70              75              80

Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu
      85              90              95

Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe
      100              105              110

Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu
      115              120              125

Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr
 130              135              140

Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser
145              150

```

<210> 6

<211> 145

<212> PRT

<213> 人

[0004]

<400> 6

```

Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr
 1           5           10           15

Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro
          20           25           30

Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His
          35           40           45

Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val
 50           55           60

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

Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg
          85           90           95

Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly
          100          105          110

Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr
          115          120          125

Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu
 130          135          140

```

<210> 7

<211> 297

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

```

Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu Gly Glu Pro Phe Tyr
 1           5           10           15

Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu Ile Glu Thr Thr Thr
          20           25           30

Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu His Val Glu Leu Asn
          35           40           45

Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp Cys Val Leu Glu Phe
          50           55           60

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

Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile Arg Arg Asn Lys His

```

[0005]

85	90	95
Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys Ile Val Glu Val Lys 100	105	110
Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr Tyr Gln Thr Leu Val 115	120	125
Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys Leu Leu Leu Glu Asn 130	135	140
Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu Phe Glu Asp Gln Gly 145	150	155 160
Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn Gly Lys Leu Phe Asn 165	170	175
Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu Asp Arg Ser Asn Ile 180	185	190
Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His Val Ala Val Glu Leu 195	200	205
Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu Leu Asn Glu Glu Asp 210	215	220
Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly Ser Asp Pro Asn Ile 225	230	235 240
His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro Glu Gly Lys Trp His 245	250	255
Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly Glu Ser Asn Leu Asn 260	265	270
Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly Gly Thr Asp Thr Lys 275	280	285
Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp 290	295	
<210> 8		
<211> 310		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 8		
Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser Ala Asn Glu 1	5	10 15
Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His Lys Gly Thr 20	25	30
Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser Thr Glu Gln 35	40	45
Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe Val Pro Ala 50	55	60
Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg Asn Ser Ser		

[0006]

65	70	75	80
Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu Asn Glu Pro	85	90	95
Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys Leu Pro Val	100	105	110
Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe Phe Lys Asn	115	120	125
Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp Cys Lys Pro	130	135	140
Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp Arg Leu Ile	145	150	155
Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr Cys His Ala	165	170	175
Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg Val Ile Glu	180	185	190
Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val Ile Val Ser	195	200	205
Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln Ile Gln Leu	210	215	220
Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr Trp Lys Trp	225	230	235
Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly Glu Asp Tyr	245	250	255
Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr Leu Ile Thr	260	265	270
Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys His Pro Phe	275	280	285
Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala Tyr Ile Gln	290	295	300
Leu Ile Tyr Pro Val Thr	305	310	

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Thr Gly Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

[0007]

<213> 人

<400> 10

Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe
1 5 10 15

Gln

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Lys Glu Gly Ala
1

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro Asn
1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His Val Val
1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

[0008]

<400> 15

Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Ser Asn
1 5 10

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Gly Arg Leu Asn Pro Arg Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe
1 5 10 15

Gln

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Gly Arg Leu Asn Pro Arg Thr Gly Asp Ala Gln Phe Ala Glu Lys Phe
1 5 10 15

Gln

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

[0009]

<400> 18

```

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

```

Ser .

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

```

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

```

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

```

Ser Tyr Ala Met
 1

```

[0010]

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Gly Asn Asp Gln Arg Pro
1 5

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

<210> 26

[0011]

<211> 17
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 26

Ala Ile Ser Gly Ser Gln Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 27

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 28

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 1 5 10 15

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

20

25

30

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

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp
 85 90 95

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 100 105

<210> 29
 <211> 111
 <212> PRT

[0012]

<213> 人

<400> 29

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

<210> 30

<211> 235

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
1 5 10 15
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
35 40 45

[0013]

```

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp
                      85                      90                      95

Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
                      100                      105                      110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ser Val Leu
                      115                      120                      125

Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile
                      130                      135                      140

Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Ala Val Asn Trp
145                      150                      155                      160

Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn
                      165                      170                      175

Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
                      180                      185                      190

Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu
                      195                      200                      205

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
210                      215                      220

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
225                      230                      235

```

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 31
 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn
 1 5 10

<210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 32
 Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val
 1 5 10

<210> 33
 <211> 14
 <212> PRT

[0014]

<213> 人

<400> 33

Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln
1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 34

Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu
1 5 10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 35

Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
1 5 10

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 36

Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg
1 5 10

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 37

Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

[0015]

<400> 38

Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	Ile
1				5					10				

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 39

Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp
1				5					10				

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 40

Ile	Phe	Ile	Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly
1				5					10				

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 41

Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
1				5					10				

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 42

Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	Glu
1				5					10				

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

[0016]

<400> 43

Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu
1 5 10

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 44

Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys
1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 45

Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 46

Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro
1 5 10

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 47

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp
1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

[0017]

<400> 48

Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile
1				5					10				

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 49

Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg
1				5					10				

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 50

Lys	Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His
1				5					10				

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 51

Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	Met	Gln
1				5					10				

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 52

Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser
1				5					10				

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

[0018]

<400> 53

Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe
1 5 10

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys
1 5 10

<210> 55

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 55

Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe
1 5 10

<210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 56

Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys
1 5 10

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 57

Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
1 5 10

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

[0019]

<400> 58

Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile
 1 5 10

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 59

Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln
 1 5 10

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 60

Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 1 5 10

<210> 61

<211> 157

<212> PRT

<213> 人

<400> 61

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30

Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60

Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125

[0020]

Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
130						135						140			
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145					150					155					

<210> 62

<211> 341

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 62

cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tgc atg aaa gtc tcc tgt aag act tct gga tac acc ttc acc ggc tat	96
Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr	
20 25 30	
tat atc cac tgg gtg cga cag gcc cct gga cag gga ttc gag tgg ata	144
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga cgg ctc aac ccc acc act ggt gac gca aat ttt gca gaa aag ttt	192
Gly Arg Leu Asn Pro Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe Ala Glu Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc agg gtc gcc ctg acc aga gac acg tcc atc agc aca gcc tat	240
Gln Gly Arg Val Ala Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
tta caa cta gac agc ctc aaa tct gac gac acg gcc gta tat tat tgt	288
Leu Gln Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg gga aaa gag ggt gcc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcg	336
Ala Gly Lys Glu Gly Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100 105 110	
agt gg	341
Ser	

<210> 63

<211> 113

<212> PRT

<213> 人

[0021]

<400> 63

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

Ser

<210> 64

<211> 327

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

[0022]

<400> 64

```

tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag   48
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
  1                      5                      10                      15

aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga cac ttt tat cca   96
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro
                20                      25                      30

aac tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat   144
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
                35                      40                      45

ggt aaa aac aat cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc   192
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
                50                      55                      60

ggc tca gga aac aca ggt tcc ttg acc atc act ggg gcc cag gcg gaa   240
Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
  65                      70                      75                      80

gat gag gct gac tat tac tgt ggc tcc cgg gac agc agt ggt atc cat   288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His
                85                      90                      95

gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag gtc acc gtc cta ggt               327
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
                100                      105

```

<210> 65

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 65

```

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg His Phe Tyr Pro
                20                      25                      30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
                50                      55                      60

Gly Ser Gly Asn Thr Gly Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
  65                      70                      75                      80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ser Arg Asp Ser Ser Gly Ile His
                85                      90                      95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
                100                      105

```

<210> 66

<211> 354

<212> DNA

<213> 人

[0023]

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 66

```

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1             5             10             15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20             25             30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35             40             45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50             55             60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65             70             75             80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85             90             95

gcg aga gat gac gat gac tac gac ttt gac tac tgg ggc cgg ggg aca 336
Ala Arg Asp Asp Asp Asp Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr
      100             105             110

atg gtc acc gtc tcg agt 354
Met Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> 人

[0024]

<400> 67

```

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

```

<210> 68

<211> 334

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(333)

<400> 68

```

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gcg tct ggg gcc ccc ggt cag   48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1             5             10             15
agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc agc tcc aac atc gga att aat   96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
 20             25             30
gct gta aac tgg tac cag cag ctc cca gga acg gcc ccc aaa ctc ctc   144
Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35             40             45
atc tat ggt aat gat cag cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc tct   192
Ile Tyr Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

```

[0025]

50	55	60	
ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag			240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
65	70	75	80
tct gag gat gag gct gat tat aac tgt gca gca tgg gat gac agc ctg			288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Asn Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu			
85	90		95
agt ggt ccg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt g			334
Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
100	105	110	

<210> 69
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人

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

<210> 70
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> 人

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

[0026]

Ser Val
65

<210> 71
<211> 34
<212> PRT
<213> 人

<400> 71

Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys
1				5					10					15	

Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn
			20					25					30		

Glu Asp

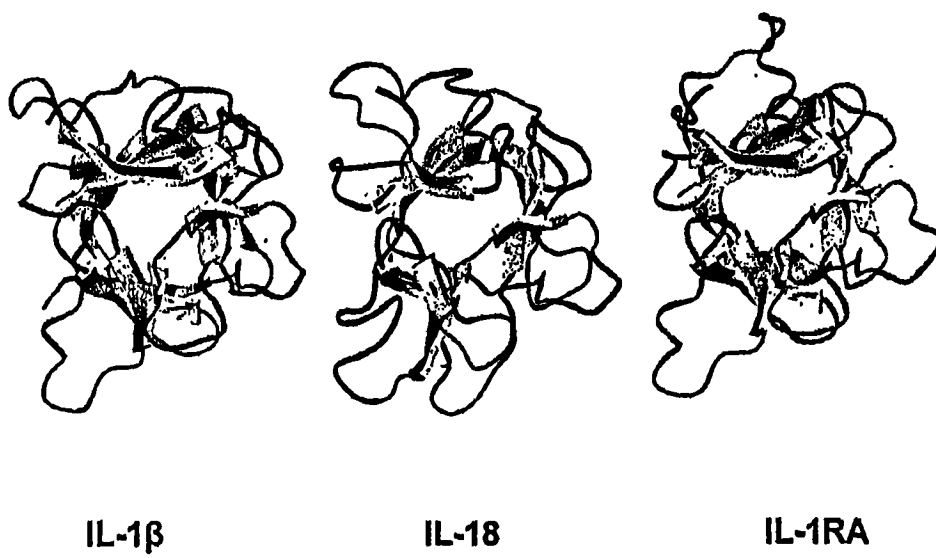


图 1



图 2

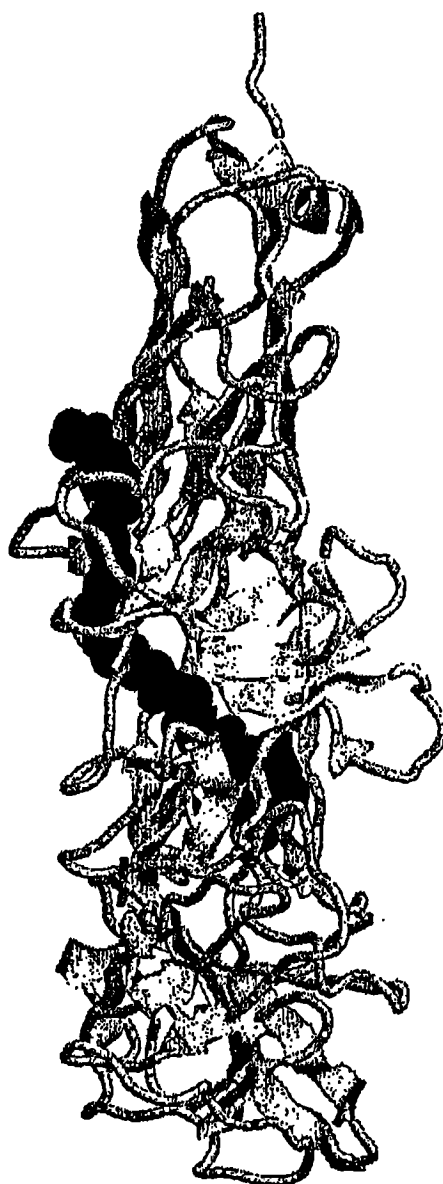


图 3

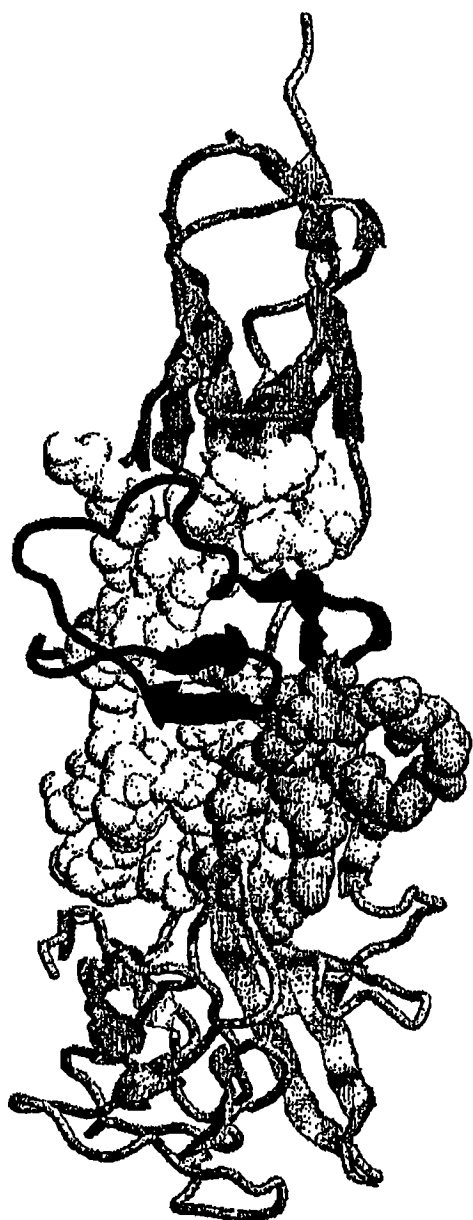


图 4

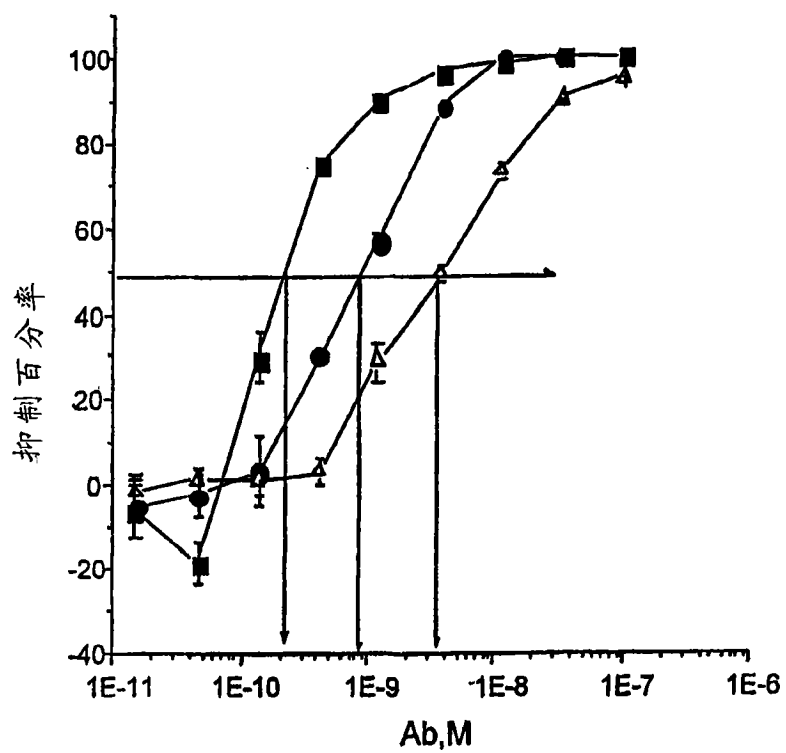


图 5