



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114605529 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 10

(21) 申请号 202210259412.1

(22) 申请日 2016.06.10

(30) 优先权数据

10-2015-0082132 2015.06.10 KR

PCT/KR2015/005917 2015.06.12 KR

(62) 分案原申请数据

201680034171.3 2016.06.10

(71) 申请人 疫免医学有限公司

地址 韩国江原道

(72) 发明人 金允源 金泳辰 洪孝贞 朴相珍

金民雨 朴成万

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

专利代理师 钟锦舜 王奕勋

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

权利要求书3页 说明书35页

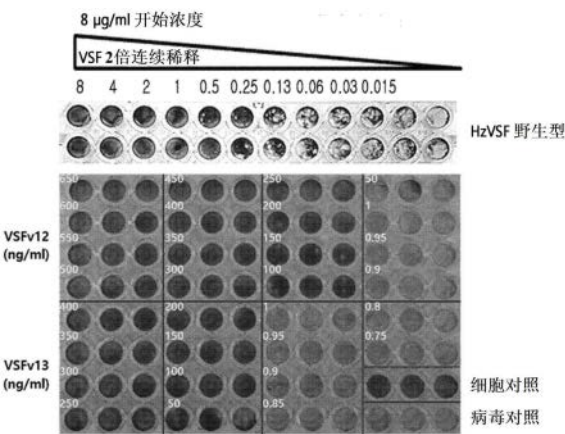
序列表105页 附图53页

(54) 发明名称

特异性结合衍生自波形蛋白的肽的抗体或片段

(57) 摘要

本发明涉及与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体,更具体地,涉及:与分离的SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或该肽的结合片段;编码该抗体或该肽的结合片段的多核苷酸;含有多核苷酸的载体;已导入了载体的细胞;使用细胞产生抗体或肽的结合片段的方法;通过该产生方法产生的抗体或肽的结合片段;含有该抗体或肽的结合片段的抗病毒性组合物;用于预防或治疗炎症性疾病的含有该抗体或肽的结合片段的组合物;以及使用该组合物治疗病毒感染的方法或治疗炎症性疾病的方法。



1. 与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的人源化抗体或其片段。

2. 根据权利要求1所述的与肽结合的抗体或片段,其中与肽结合的人源化抗体或片段包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:2的重链CDR1;SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:14的重链CDR2;和SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:15的重链CDR3;和

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:5的轻链CDR1;SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的轻链CDR2;和SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的轻链CDR3。

3. 根据权利要求1所述的与肽结合的抗体或片段,其中与肽结合的人源化抗体或片段进一步包含:

重链可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链框架区1 (FR1);SEQ ID NO:21的重链FR2;SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的重链FR3;和SEQ ID NO:23的重链FR4;和

轻链可变区,其包含SEQ ID NO:24的轻链FR1;SEQ ID NO:25的轻链FR2;SEQ ID NO:26的轻链FR3;和SEQ ID NO:27的轻链FR4。

4. 根据权利要求1所述的与肽结合的抗体或片段,其中与肽结合的人源化抗体或片段包含:

(a) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;以及分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

(b) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

(c) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

(d) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

(e) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

(f) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

(g) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;

(h) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链

CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;

(i) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;

(j) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;

(k) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;

(l) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;

(m) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1、重链FR2、重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1、轻链FR2、轻链FR3和轻链FR4;或者

(n) 分别为SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3。

5. 根据权利要求1所述的与肽结合的抗体或片段,其中所述人源化抗体包含分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:34;SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:50;SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:54;SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58;SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:62;SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:66;SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:70;SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:74;SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:78;或SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:82的重链可变区和轻链可变区。

6. 一种多核苷酸,其编码根据权利要求1所述的与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或其片段。

7. 一种载体,其包含根据权利要求6所述的多核苷酸。

8. 一种细胞,其导入有根据权利要求7所述的载体。

9. 使用根据权利要求8所述的细胞制造与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或其片段的方法。

10. 由根据权利要求9所述的制造方法制造的与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或其片段。

11. 一种抗病毒组合物,其包含根据权利要求1所述的与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或其片段。

12. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述组合物用于通过抗病毒作用预防或治疗感染性病毒疾病。

13. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述组合物特异性作用于感染病毒的细胞。

14. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述组合物抑制免疫细胞浸润。

15. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述组合物抑制炎症反应。

16. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述病毒的特征在于通过病毒感染使波形蛋白的部分暴露于宿主细胞中的宿主细胞膜的表面。

17. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述病毒选自正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、丝状病毒科(Filoviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、嗜肝病毒科(Hepadnaviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)和布尼亚病毒科(Bunyaviridae)。

18. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物,其中所述病毒选自流感病毒、肝炎病毒、脑心肌炎病毒、门戈病毒、呼肠孤病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、埃博拉病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS)、人巨细胞病毒(HCMV)和汉坦病毒。

19. 一种预防或治疗炎性疾病的组合物,其包含根据权利要求1所述的与肽特异性结合的抗体或其片段。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述炎性疾病是由病毒感染引起的。

21. 根据权利要求11所述的抗病毒组合物在制备用于治疗感染性病毒疾病的药物中的用途。

22. 根据权利要求19所述的组合物在制备用于治疗炎性疾病的药物中的用途。

特异性结合衍生自波形蛋白的肽的抗体或片段

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请号为CN201680034171.3的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体,具体涉及与分离的SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或与肽结合的片段、编码与肽结合的片段或抗体的多核苷酸、含有该多核苷酸的载体、导入该载体的细胞、使用该细胞产生与肽结合的片段或抗体的方法、由该方法生产的与肽结合的片段或重组抗体、含有与肽结合的片段或抗体的抗病毒组合物、预防或治疗炎症性疾病的含有与肽结合的片段或抗体的组合物、以及使用该组合物治疗感染性病毒疾病或炎症性疾病的方法。

背景技术

[0004] 与细菌性疾病不同,病毒性疾病难以治疗,因为抗生素对病毒并不是特别有效,并且病毒性疾病一直是人类疾病和死亡的主要原因之一。另外,感染性病毒疾病诱发炎症,由此引起各种炎症性疾病。

[0005] 开发用于治疗这种感染性病毒疾病的治疗剂可以分为化学材料和生物衍生材料,并且大部分化学材料被开发为仅对特定病毒性疾病有效,表现出各种副作用和缺点,例如频繁出现耐药病毒。

[0006] 同时,生物衍生材料的众所周知的例子可以包括细胞因子如干扰素(IFN)。其中,首先在感染病毒的细胞中产生的细胞因子中发现了干扰素,并且被称为具有优异的抗病毒活性的细胞因子。据报道,干扰素能够用于治疗各种疾病例如慢性乙型肝炎或丙型肝炎、血癌、多发性硬化症等。最近报道了IFN对人免疫缺陷病毒(HIV)患者的作用。因此,过去的几年来,为了开发抗病毒剂和免疫促进剂,正在进行大量生产干扰素的基因工程或生物工程方法的研究,并且近来已经积极地进行研究以寻找能够从天然或合成材料诱导干扰素表达的化合物(Alcaro S等,Bioorg Med Chem.2005,13(10),3371-3378)。因此,3M Pharmaceuticals开发了一种名为咪喹莫特(Imiquimod)的强干扰素诱导剂,但由于在临床试验中观察到各种副作用,其开发已经停止。

[0007] 尽管已知干扰素是强效的抗病毒剂,但干扰素具有不能使用超过6个月的缺点,因为它引起免疫细胞浸润等炎症反应;几乎所有细胞始终表达干扰素受体,表现出各种副作用例如抗细胞作用;而且在临床试验中治疗需要的量大。

[0008] 因此,需要开发能选择性作用于感染病毒的细胞而不是正常细胞的治疗剂;它适用于少量和各种类型的病毒,而不是特定类型的病毒;并且通过抑制免疫细胞的浸润同时具有抗病毒和抗炎活性。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明人已经努力开发能够特异性地作用于感染病毒的细胞的治疗剂,并且通过抑制免疫细胞的浸润而具有能够抑制炎症的抗病毒和抗炎活性。结果,本发明人已经证实,其为新型人源化抗体的人源化病毒抑制因子(hzVSF)不仅具有对各种病毒特异性作用的能力,以及具有抑制免疫细胞浸润的抑制活性并且抗病毒活性优异,而且作为免疫原性降低的人源化抗体,是对人施用时没有任何不良影响的安全剂,从而完成了本发明。

[0011] 技术方案

[0012] 本发明的一个目的是提供与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的新型抗体或与该肽结合的片段。

[0013] 本发明的另一个目的是提供编码与肽结合的片段或抗体的多核苷酸、含有该多核苷酸的载体、导入该载体的细胞、使用该细胞生产该与肽结合的片段或抗体的方法、以及通过该方法产生的与肽结合的片段或抗体。

[0014] 本发明的另一个目的是提供含有与肽结合的片段或抗体的抗病毒组合物。

[0015] 本发明的另一个目的是提供使用抗病毒组合物预防或治疗感染性病毒疾病的方法。

[0016] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗炎性疾病的含有与肽结合的片段或抗体的组合物。

[0017] 本发明的另一个目的是提供使用用于预防或治疗炎性疾病的组合物治疗炎性疾病的方法。

[0018] 有益效果

[0019] 与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或与该肽结合的片段能够提供作为具有优异的抗病毒和抗炎活性的新的人源化抗体治疗剂,因为它们能够选择性作用于感染病毒的细胞,在治疗时只需要少量,没有任何副作用,并且还能够通过抑制免疫细胞的浸润来抑制炎症。

附图说明

[0020] 图1显示了制备嵌合病毒抑制因子(VSF)的载体的示意图。

[0021] 图2显示了嵌合VSF的示意图。

[0022] 图3显示了证实嵌合VSF表达的结果。

[0023] 图4显示了说明VSF的单链Fv(scFv)的DNA序列的结果。

[0024] 图5显示了说明将VSF的scFv克隆到载体中的示意图。

[0025] 图6显示了证实纯化后VSF的scFv的结果。

[0026] 图7显示了基于病毒感染后剩余的活细胞的量证实VSF、scFv和抗EMC-D病毒抗体的抗病毒活性的结果。

[0027] 图8显示了证实嵌合VSF的抗病毒活性的结果。

[0028] 图9显示了制备人源化抗体hzVSF的载体的示意图。

[0029] 图10显示了本发明的人源化抗体hzVSF的示意图。

[0030] 图11显示了证实人源化抗体hzVSF表达的结果。

[0031] 图12显示了证实人源化抗体hzVSF的抗病毒活性的结果。

[0032] 图13显示了证实人源化抗体hzVSF_var13的物理特性的还原和非还原SDS-PAGE的

结果。

[0033] 图14显示了证实人源化抗体hzVSF_var13的物理特性的LC/MS结果。

[0034] 图15显示了证实人源化抗体hzVSF_var13的物理特性的SEC-HPLC结果。

[0035] 图16显示了证实人源化抗体hzVSF_var13的物理特性的等电聚焦 (IEF) 的结果。

[0036] 图17显示了说明51个血液供体中响应于KLH、hzVSF_var12和hzVSF_var13的具有T细胞增殖的供体的数目的结果。

[0037] 图18显示了说明51个供体响应于人源化抗体hzVSF的代表性变体hzVSF_var12和hzVSF_var13的T细胞增殖程度的结果。

[0038] 图19显示了说明由平均刺激指数 (SI) 表示的由KLH、hzVSF_var12和hzVSF_var13诱导的T细胞增殖的结果。

[0039] 图20显示了人源化抗体hzVSF的代表性变体hzVSF_var12和hzVSF_var13的SDS-PAGE结果。

[0040] 图21显示了证实人源化抗体hzVSF的代表性变体hzVSF_var12和hzVSF_var13的物理特性的HPLC结果。

[0041] 图22显示了说明人源化抗体hzVSF的代表性变体hzVSF_var13的药效学的结果。

[0042] 图23显示了证实hzVSF、人源化抗体hzVSF的代表性变体hzVSF_var12和hzVSF_var13的抗病毒活性的结果。

[0043] 图24显示了证实hzVSF_var13 (人源化抗体) 和hIFN- α 在人细胞中的细胞活力的结果。

[0044] 图25显示了证实人源化抗体hzVSF抑制病毒性糖尿病中炎性细胞浸润的抑制活性的图像。

[0045] 图26显示了证实mVSF的抗HBV作用的结果。

[0046] 图27显示了证实HBV感染的人肝脏组织中VSF受体表达特征的图像。

[0047] 图28显示了证实HCV感染的人肝脏组织中VSF受体表达特征的图像。

[0048] 图29显示了证实流感病毒感染的细胞中VSF受体表达的图像。

[0049] 图30显示了证实EMC-D病毒感染的细胞中VSF受体表达的图像。

[0050] 图31显示了使用实时定量PCR证实由cccDNA量表示的hzVSF_var13对乙型肝炎病毒的抗病毒作用的结果。

[0051] 图32显示了使用实时定量PCR证实由细胞外HBV DNA量表示的hzVSF_var13对乙型肝炎病毒的抗病毒作用的结果。

[0052] 图33显示了使用实时定量PCR证实由细胞内HBV DNA量表示的hzVSF_var13对乙型肝炎病毒的抗病毒作用的结果。

[0053] 图34显示了使用FACS证实hzVSF抗丙型肝炎病毒的抗病毒作用的结果。

[0054] 图35显示了使用实时定量PCR证实hzVSF抗丙型肝炎病毒的抗病毒作用的结果。

[0055] 图36显示了使用实时定量PCR和蛋白质印迹证实hzVSF_var13对丙型肝炎病毒基因型1a的抗病毒作用的结果。

[0056] 图37显示了使用实时定量PCR证实hzVSF_var13对丙型肝炎病毒基因型1a的长期抗病毒作用的结果。

[0057] 图38显示了使用实时定量PCR和蛋白质印迹证实hzVSF_var13对丙型肝炎病毒基

因型1b的抗病毒作用的结果。

[0058] 图39显示了使用实时定量PCR和蛋白质印迹证实hzVSF_var13对丙型肝炎病毒基因型2a的抗病毒作用的结果。

[0059] 图40显示了使用实时定量PCR证实hzVSF_var13对丙型肝炎病毒基因型2a的长期抗病毒作用的结果。

[0060] 图41显示人源化抗体hzVSF_var13对小鼠证实的流感病毒(H1N1)增殖的抑制作用。

[0061] 图42显示了证实在施用于流感病毒感染的小鼠后hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对肺组织的治疗效果的结果。

[0062] 图43显示了证实hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对感染流感病毒的小鼠的粘膜上皮细胞和纤毛的保护作用的结果。

[0063] 图44显示了根据施用时间和剂量证实hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对流感病毒感染小鼠中的肺炎的抑制作用的结果。

[0064] 图45显示了施用于流感病毒感染(100,000pfu)小鼠后hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对CD4免疫细胞浸润的抑制作用。

[0065] 图46显示了施用于流感病毒感染(10,000,000pfu)小鼠后hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对CD4免疫细胞浸润的抑制作用。

[0066] 图47显示了施用于流感病毒感染(100,000pfu)小鼠后hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对巨噬细胞浸润的抑制作用。

[0067] 图48显示了施用于流感病毒感染(10,000,000pfu)小鼠后hzVSF的代表性变体hzVSF_var13对巨噬细胞浸润的抑制作用。

[0068] 图49显示了说明hzVSF抑制小鼠中病毒感染后抗炎性细胞因子分泌的作用的结果。

[0069] 图50显示了在野生型VR和突变型VR在其中过表达后用病毒感染不表达VSF受体的MCF-7细胞后,通过MVIT测定证实hzVSF_v13的抗病毒活性的结果。

[0070] 图51显示了在野生型VR和突变型VR在其中过表达后用病毒感染不表达VSF受体的MCF-7细胞后,通过WST测定证实hzVSF_v13的抗病毒活性的结果。

[0071] 图52显示了在野生型VR和突变型VR在其中过表达后用病毒感染不表达VSF受体的MCF-7细胞后,通过MVIT测定证实hzVSF_v13的抗病毒活性的结果。

[0072] 图53显示了在野生型VR和突变型VR在其中过表达后用病毒感染不表达VSF受体的MCF-7细胞后,通过免疫荧光染色证实的VSF受体与hzVSF_v13之间的结合的图像。

[0073] 图54显示了通过拉下(pull-down)测定证实在大肠杆菌中过表达后纯化的hzVSF_v13与野生型和突变型VSF受体(波形蛋白)之间的结合的图像。

[0074] 图55显示了通过免疫沉淀证实在HEK293T细胞中过表达后纯化的hzVSF_v13与野生型和突变型VSF受体(波形蛋白)之间的结合的图像。

[0075] 图56显示了模拟波形蛋白和VSF之间的结合区域的示意图。

[0076] 图57显示了模拟波形蛋白和VSF之间的结合的示意图。

[0077] 图58显示了模拟波形蛋白和hzVSF_v13之间的结合区域的示意图。

具体实施方式

[0078] 为了实现上述目的,一方面,本发明提供了与分离的肽SEQ ID NO:1特异性结合的抗体或与肽结合的片段。

[0079] 抗体的实例可以包括小鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体,但不限于此。

[0080] 本发明的与肽结合的人源化抗体或片段抑制人体中的人抗小鼠抗体(HAMA)反应方面具有优越性,同时通过将直接结合抗原的小鼠单克隆或单克隆抗体的可变区的互补决定区(CDR)移植至人抗体主链来维持小鼠抗体的原始亲和力和特异性。此外,本发明的人源化抗体通过去免疫降低了免疫原性,并且因此通过显著降低免疫原性而能够用作施用于人的安全剂。也就是说,本发明的人源化抗体能够通过与人免疫系统更好地相互作用而更有效地治疗靶细胞,同时对SEQ ID NO:1的肽区暴露于细胞膜表面的细胞起反应和影响例如在对感染病毒的细胞起反应的同时阻止补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。此外,本发明的人源化抗体的优点在于,由于免疫原性降低,人免疫系统不能将人源化抗体识别为外源蛋白。

[0081] 此外,本发明的人源化抗体还具有如下优点:人源化抗体在人体循环系统中的半衰期与天然产生的抗体的半衰期类似,甚至当药物以较小剂量或较少频率施用的时候。

[0082] 在本发明中,可以将与分离的肽SEQ ID NO:1特异性结合的小鼠抗体统称为“小鼠病毒抑制因子(mVSF)”;将嵌合抗体称为“嵌合病毒抑制因子(chVSF)”;将人源化抗体称为“人源化病毒抑制因子(hzVSF)”。如本文所用,术语“人源化抗体hzVSF”或“其变体”可以互换使用,并且hzVSF可以与野生型hzVSF(hzVSF_{wt})和hzVSF的变体(例如,表示为hzVSF_{var1}、hzVSF_{v1}、hzVSF₁等)互换使用。

[0083] 在本发明中,分离的肽SEQ ID NO:1对应于在氨基酸位置142-294的波形蛋白的氨基酸序列,并且该肽不仅可以包括上述氨基酸序列,而且还可以包括任何与上述序列具有80%或更高,优选为90%或更高,更优选为95%或更高,以及甚至更优选为97%或更高的同源性的氨基酸序列,只要本发明的抗体或其肽结合片段能够结合到其上即可。分离的肽SEQ ID NO:1是包含表位的抗原区域,它可以是氨基酸位置142-211处或氨基酸位置211-294处的波形蛋白的氨基酸序列,只要肽能够通过抗体或肽结合片段结合而显示出与本发明相似的功能即可。此外,显而易见的是,具有上述任何同源性的任何氨基酸序列都可以属于本发明的范围,尽管该序列可以具有部分序列的缺失、修饰、置换或添加。波形蛋白是由VIM基因编码的蛋白质,支持并原地锚定细胞内的细胞器,并且已知主要参与维持细胞形状、蛋白质转运和细胞信号传导。波形蛋白也被称为用作癌症标志物;然而,不知道能够结合波形蛋白的抗体是否能够显示出抗病毒活性。

[0084] 与本发明的分离的肽SEQ ID NO:1特异性结合的抗体或与肽结合的片段特异性地对感染病毒的细胞有反应,抗体和结合片段均与感染病毒的细胞中暴露于细胞表面的病毒抑制因子(VSF)的受体结合。与本发明的肽结合的抗体或片段通过与感染病毒的细胞的特异性结合而显示出抗病毒和抗炎活性,并且因此能够有效地用作预防或治疗感染性病毒疾病和炎症疾病的抗病毒组合物和领域。

[0085] 具体地,与肽结合的抗体或片段可以是与SEQ ID NO:1的肽的第9、第45、第54、第76、第94或第129位的氨基酸残基特异性结合的抗体或片段,更具体而言,是与SEQ ID NO:1的肽的第9、第45、第54、第76、第94和第129位的氨基酸残基特异性结合的蛋白质,但不限于

此,只要它们能够与分离的肽SEQ ID NO:1特异性结合即可。

[0086] 如本文所用,术语“抗体”在免疫学上是指具有特异性识别抗原的配体的作用的蛋白质分子,包括对特定抗原具有反应性的免疫球蛋白分子,并且其可以包括多克隆抗体、单克隆抗体、完整抗体和抗体片段的全部。此外,术语“抗体”可以包括嵌合抗体(例如,人源化鼠抗体)和二价或双特异性分子(例如双特异性抗体)、双抗体、三抗体和四抗体。此外,术语“抗体”可以包括具有FcRn结合亲和力的单链抗体、scAb、抗体恒定区的衍生物和基于蛋白质支架的人造抗体。整个抗体具有由两条全长轻链和两条全长重链组成的结构,其中每条轻链通过二硫键与重链连接。整个抗体包括IgA、IgD、IgE、IgM和IgG,并且IgG的亚型包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。如本文所用,术语“片段”、“与肽结合的片段”和“抗体片段”是指具有抗原结合活性的本发明的抗体或肽结合片段的任何片段,并且这些术语可以互换使用。在示例性的实施方案中,抗体片段可以包括单链抗体、Fd、Fab、Fab'、F(ab')₂、dsFv或scFv,但不限于此。

[0087] Fd是指包含在Fab片段中的重链部分。Fab具有由重链和轻链的可变区,轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1结构域)组成的结构,并且具有单个抗原结合位点。Fab'与Fab的区别在于Fab'具有在重链CH1结构域的C末端含有至少一个半胱氨酸残基的铰链区。当Fab'的铰链区中的半胱氨酸残基形成二硫键时,产生F(ab')₂抗体。如本文所用,术语“可变片段(Fv)”是指仅具有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段。二硫键稳定的Fv(dsFv)的特征在于重链可变区和轻链可变区通过二硫键连接,而单链Fv(scFv)的特征在于重链可变区和轻链可变区通常通过接头由共价键连接。可以使用蛋白酶获得这些抗体片段(例如,木瓜蛋白酶限制性切割整个抗体能够产生Fab,而胃蛋白酶切割整个抗体能够产生F(ab')₂片段),并且可以优选使用基因重组技术进行制备。

[0088] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指由从基本上相同的抗体组获得的单个分子组成的抗体分子,并且单克隆抗体对特定表位显示单一结合特异性和亲和力。

[0089] 通常,免疫球蛋白具有重链和轻链,并且每条重链和轻链包含恒定区和可变区(也称为结构域)。轻链和重链的可变区包括称为互补决定区(以下称为“CDR”)的三个高度可变区和四个框架区(以下称为“FR”)。CDR主要具有结合抗原表位的作用。每条链中的CDR称为CDR1、CDR2和CDR3,通常从N端开始按该顺序,并且这些由具体CDR所处的链来标识。

[0090] 另外,在本发明的抗体含有恒定区的情况下,也可以包含衍生自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM的恒定区或其组合的恒定区或其杂合体。

[0091] 如本文所用,术语“组合”是指当形成二聚体或多聚体时形成相同来源的编码单链免疫球蛋白恒定区的多肽与不同来源的单链多肽之间的结合。例如,二聚体或多聚体可以由选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的恒定区中的两个或更多个恒定区形成。

[0092] 如本文所用,术语“杂合体”是指在单链免疫球蛋白重链恒定区内存在对应于不同来源的两个或更多个免疫球蛋白重链恒定区的序列,例如,由选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的CH1、CH2、CH3和CH4的一至四个结构域组成的杂合体是可能的。

[0093] 本发明的人源化抗体可以基于人免疫球蛋白γ4进行人源化,尽管人源化不限于此,并且可以具有由于缺乏补体激活而不引起CDC的优点。

[0094] 与肽结合的片段或人源化抗体可以包括:

[0095] 重链可变区,其包含SEQ ID NO:2的重链CDR1;SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:14的重

链CDR2(其中SEQ ID NO:3的第9个氨基酸苏氨酸被天冬氨酸置换);和SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:15的重链CDR3(其中SEQ ID NO:4的第4个氨基酸苏氨酸被天冬酰胺置换);和

[0096] 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:5的轻链CDR1;SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:16(其中SEQ ID NO:6的第3个氨基酸苏氨酸被天冬氨酸置换)、SEQ ID NO:17(其中SEQ ID NO:6的第3个氨基酸苏氨酸被天冬氨酸置换,并且SEQ ID NO:6的第6个氨基酸丙氨酸被甘氨酸置换)、或SEQ ID NO:18(其中SEQ ID NO:6第3个氨基酸苏氨酸被天冬氨酸置换;SEQ ID NO:6的第5个氨基酸亮氨酸被精氨酸置换;SEQ ID NO:6的第6个氨基酸丙氨酸被甘氨酸置换)的轻链CDR2;和SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:19的轻链CDR3(其中SEQ ID NO:7的第6个氨基酸丝氨酸被苏氨酸置换)。

[0097] 此外,包含人框架区(FR)的与肽结合的片段或人源化抗体可以是SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31的人免疫球蛋白 γ ,或者是重链可变区,其包含SEQ ID NO:20的重链框架区1(FR1)、SEQ ID NO:21的重链FR2、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:28的重链FR3(其中SEQ ID NO:22的第8个氨基酸赖氨酸被苏氨酸置换;并且SEQ ID NO:22的第10个氨基酸异亮氨酸被丙氨酸置换)和SEQ ID NO:23的重链FR4;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:24的轻链框架区1(FR1)、SEQ ID NO:25的轻链FR2、SEQ ID NO:26的轻链FR3和SEQ ID NO:27的轻链FR4,但不限于此。

[0098] 具体而言,与肽结合的片段或人源化抗体可以包括:

[0099] (a) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3;以及分别为SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3;

[0100] (b) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;

[0101] (c) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;

[0102] (d) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;以及分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;

[0103] (e) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;

[0104] (f) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;以及分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;

[0105] (g) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:

27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;

[0106] (h) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;

[0107] (i) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;

[0108] (j) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;

[0109] (k) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;

[0110] (l) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;

[0111] (m) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;分别为SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:21,SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:23的重链FR1,重链FR2,重链FR3和重链FR4;分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3;和分别为SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27的轻链FR1,轻链FR2,轻链FR3和轻链FR4;和

[0112] (n) 分别为SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:4的重链CDR1,重链CDR2和重链CDR3;和分别为SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:7的轻链CDR1,轻链CDR2和轻链CDR3。

[0113] 抗体(a)可以包括hzVSF_WT,抗体(b)可以包括hzVSF_var1,抗体(c)可以包括hzVSF_var2,抗体(d)可以包括hzVSF_var3,抗体(e)可以包括hzVSF_var4,抗体(f)可以包括hzVSF_var5,抗体(g)可以包括hzVSF_var6,抗体(h)可以包括hzVSF_var7,抗体(i)可以包括hzVSF_var8,抗体(j)可以包括hzVSF_var9,抗体(k)可以包括hzVSF_var10,抗体(l)可以包括hzVSF_var11,抗体(m)可以包括hzVSF_var12,抗体(n)可以包括hzVSF_var13。

[0114] 与肽结合的片段或人源化抗体可以包括分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:34; SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:38; SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:42; SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:46; SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:50; SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:54; SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:58; SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:62; SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:66; SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:70; SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:74; SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:78;或SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:82的重链可变区和轻链可变区,但不限于此。

[0115] 具体而言,小鼠抗体可以包括重链可变区,其包含SEQ ID NO:137的重链CDR1;SEQ ID NO:138的重链CDR2;和SEQ ID NO:139的重链CDR3;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:134的轻链CDR1;SEQ ID NO:135的轻链CDR2;和SEQ ID NO:136的轻链CDR3,更具体地,包括SEQ ID NO:9的重链可变区和SEQ ID NO:8的轻链可变区,但不限于此。

[0116] 具体而言,嵌合抗体可以包括SEQ ID NO:141或SEQ ID NO:142的重链可变区和SEQ ID NO:140的轻链可变区,并且更具体地,SEQ ID NO:146或SEQ ID NO:148的重链和SEQ ID NO:144的轻链,但不限于此。

[0117] scFv也可以包括为了mVSF的安全而制备的scFv,但是不限于此,例如scFv可以通过图4所示的序列制备。另外,scFv可以是其中SEQ ID NO:131的重链可变区和SEQ ID NO:133的轻链可变区通过接头连接的形式。此外,scFv可以通过接头连接编码SEQ ID NO:130的核苷酸序列的重链可变区和编码SEQ ID NO:132的核苷酸序列的轻链可变区的形式。这些scFv可被克隆到具有SEQ ID NO:150的大肠杆菌表达载体中。

[0118] 在示例性实施方案中,本发明人制备了人源化抗体(即hzVSF_wt,三种替代品及其13种变体),并证实了其抗病毒活性(实施例6)。另外,作为人源化抗体的抗原性与已经获得FDA批准并且可商购的治疗性抗体的比较的结果,证实人源化抗体的抗原性与在上述商品化治疗用抗体(表7)中具有最低抗原性的Humira的抗原性相似,证实了作为抗病毒剂或抗炎剂使用时人源化抗体能够用作没有产生任何不良影响的安全抗病毒物或药物。另外,证实了上述人源化抗体不会显著影响通过使用hzVSF_变体的T细胞分析的T细胞增殖(表8),因此证实了它们在临床试验中作为抗原使用时具有低的不良反应风险。另外,通过药代动力学分析,证实人源化抗体的体内半衰期持续时间足够长(实施例8)。另外,作为人源化抗体与干扰素的细胞毒性的比较的结果,其在4nM或更高的浓度下没有表现出任何细胞毒性,从而证实了与干扰素不同,人源化抗体具有更少的不利影响(实施例11)。另外,证实了本发明的hzVSF抗体(野生型和变体)具有抗EMC-D病毒感染的抗病毒作用和对小鼠免疫细胞浸润的抑制作用,因此hzVSF抗体可以显著抑制朗格汉斯胰岛的破坏并治疗由病毒感染引起的糖尿病(实施例12)。另外,证实了hzVSF抗体也能够显著抑制肝炎病毒(实施例13至16)。另外,证实了hzVSF抗体针对流感病毒具有抗病毒和抗炎作用而没有免疫细胞浸润(实施例17),并且对各种病毒具有抗病毒作用(表15),并且因此证实了hzVSF抗体可以被用作通用抗病毒剂。另外,证实了hzVSF抗体能够在病毒感染小鼠模型中抑制促炎性细胞因子的分泌(实施例19),因此可以将hzVSF抗体用作治疗各种炎症性疾病的治疗剂。

[0119] 本发明的另一方面提供编码与肽结合的片段或抗体的多核苷酸、含有该多核苷酸的载体、导入该载体的细胞、使用该细胞产生与肽结合的片段或抗体的方法、以及与由该方法产生的与肽结合的片段或抗体。

[0120] 与肽结合的片段和抗体与上面描述的相同。

[0121] 含有编码本发明提供的抗体的多核苷酸的载体可以是能够在真核细胞或原核细胞(包括哺乳动物细胞(例如人、猴、兔、大鼠、仓鼠、小鼠等的细胞),植物细胞,酵母细胞,昆虫细胞或细菌细胞(例如大肠杆菌))中复制和/或表达该多核苷酸,并且优选可以在宿主细胞中可操作地连接至合适的启动子以表达核苷酸和具有至少一个选择性标记的载体,但不具体限于此。例如,载体可以是多核苷酸导入的噬菌体、质粒、粘粒、微型染色体、病毒或逆转录病毒载体等的形式。

[0122] 包含编码抗体的多核苷酸的载体可以是包含分别编码抗体重链的多核苷酸或编码抗体轻链的多核苷酸的表达载体或包含编码抗体的重链和轻链二者的多核苷酸的表达载体。

[0123] 用本发明提供的表达载体(转化体/转染子)导入的细胞的实例可以包括导入表达载体并转化的细菌如大肠杆菌(*E.coli*)、链霉菌(*Streptomyces*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的细胞;酵母细胞,真菌细胞如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*);昆虫如果蝇(*Drosophila*)和夜蛾Sf9(*Spodoptera Sf9*)的细胞;动物如中国仓鼠卵巢(CHO),SP2/0(小鼠骨髓瘤),人类淋巴母细胞样细胞,COS,NSO(小鼠骨髓瘤),293T,黑素瘤,HT-1080,幼仓鼠肾(BHK),人胚胎肾(HEK)和PERC.6(人视网膜)的细胞;或植物细胞,但不特别限于此。

[0124] 如本文所用,术语“导入”是指将含有编码上述抗体的多核苷酸的载体递送至宿主细胞的方法。导入可以通过本领域已知的各种方法进行,例如磷酸钙-DNA共沉淀,DEAE-葡聚糖介导的转染,凝聚胺介导的转染,电穿孔,显微注射,脂质体融合,lipofectamine转染和原生质体融合。另外,转导是指通过使用病毒颗粒的感染将靶物质递送到细胞中。另外,可以通过诸如基因轰击等方法将载体导入宿主细胞。在本发明中,术语导入可以与转化互换使用。

[0125] 又一方面,本发明提供了含有与肽结合的片段或抗体的抗病毒组合物。

[0126] 与肽结合的片段和抗体与上面解释的相同。

[0127] 如本文所用,术语“抗病毒”是指通过抑制病原性病毒的增殖或复制而减轻,抑制或预防病毒感染的效果,但不限于此。其增殖或复制受到抗病毒活性的抑制的“病原性病毒”,其特征在于宿主细胞中的波形蛋白的一部分通过病毒感染而暴露于宿主细胞膜表面,但不限于此。在动物或人类中引起疾病的病原性病毒的实例可以包括正粘病毒科(Orthomyxoviridae)病毒、小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)病毒、逆转录病毒科(Retroviridae)病毒、疱疹病毒科(Herpesviridae)病毒、丝状病毒科(Filoviridae)病毒、冠状病毒科(Coronaviridae)病毒科、嗜肝病毒科(Hepadnaviridae)病毒、黄病毒科(Flaviviridae)病毒、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)病毒等。病原性病毒的实例可以包括流感病毒、肝炎病毒、脑心肌炎病毒、门戈病毒、呼肠孤病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)、埃博拉病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS)、人巨细胞病毒(HCMV)和汉坦病毒,但不限于此。具体而言,根据本发明的hzVSF不仅在小核糖核酸病毒科的门戈病毒中显示出抗病毒活性,而且在基因组结构和生命周期与小核糖核酸病毒科的EMC病毒显著不同的正粘病毒科的流感病毒中也显示出抗病毒活性,另外,hzVSF显示出通用的抗病毒活性,包括有效抑制HIV(属于逆转录病毒科)增殖(表15)。

[0128] 该组合物可以是药物组合物、准药物组合物和功能性保健食品组合物的形式。

[0129] 药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。

[0130] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”是指不会抑制待施用于生物体的化合物的生物学活性或性质而不引起对生物体的刺激的载体或稀释剂。作为适用于灭菌和体内使用的药学上可接受的载体,待配制成的液体溶液中的组合物中使用的药学上可接受的载体的实例,盐水、无菌水、林格氏溶液、缓冲盐水、白蛋白注射液、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇、及其至少一种组分的混合物,以及其它常规添加剂如抗氧化剂、缓冲剂和抑菌剂,可根据需要进一步添加。另外,可以通过另外添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂、润滑剂等将组合物配制成注射制剂(例如水溶液,混悬剂,乳剂等),丸剂,胶囊剂,颗粒剂或片剂。

[0131] 药物组合物可以制备成各种口服或肠胃外制剂。为了制备这些制剂,可以将药物组合物与稀释剂或赋形剂如填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等组合配制。用于口服施用的固体制剂可以包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,并且这些固体制剂可通过加入至少一种赋形剂如淀粉、碳酸钙、蔗糖或乳糖、明胶等来制备。除了简单的赋形剂之外,可以使用润滑剂如硬脂酸镁、滑石等。用于口服施用的液体制剂可以包括混悬剂、口服溶液、乳剂、糖浆剂等,并且除了简单的稀释剂如水或液体石蜡之外,各种赋形剂如保湿剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等可以包含在液体制剂中。用于肠胃外施用的制剂可以包括无菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、乳剂、冻干制剂、栓剂。非水溶剂和混悬剂的实例可以包括丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油,可注射酯如油酸乙酯等。栓剂基质的实例可以包括Witepsol、聚乙二醇(macrogol)、吐温61、可可脂,laurinum、甘油明胶等。

[0132] 药物组合物可以具有选自片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、口服溶液、乳剂、糖浆剂、无菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、冻干制剂和栓剂的任何制剂类型。

[0133] 本发明的组合物以药学有效剂量施用。

[0134] 如本文所用,术语“药学有效剂量”是指足以在适用于医学治疗的合理利益/风险比下治疗疾病的量,并且有效剂量的水平可以基于包括疾病的严重程度、年龄、性别、疾病种类、药物活性、药物敏感性、施用时间、施用途径和溶出率、治疗持续时间、包括同时用于组合使用的药物在内的各种因素、以及医学领域中众所周知的因素。本发明的组合物可以作为单独的治疗剂,与其他治疗剂组合并且与常规治疗剂依次或同时施用,并且可以单剂量或多剂量施用。考虑到上述因素,施用一定量以获得最小量而没有不利影响的最大效果是重要的,并且这些因素可以容易地由本领域的普通技术人员确定。其他治疗剂可以是干扰素,但不限于此。

[0135] 该组合物可以通过抗病毒作用而预防或治疗感染性病毒疾病的组合物。

[0136] 在本发明中,感染性病毒疾病可以包括在病毒感染时导致宿主细胞中波形蛋白的一部分暴露于宿主细胞膜的疾病,例如,它们不仅可以包括肝炎、AIDS、肺炎和糖尿病,而且包括由正粘病毒科病毒、小核糖核酸病毒科病毒、逆转录病毒科病毒、丝状病毒科病毒、冠状病毒科病毒、嗜肝病毒科病毒科、黄病毒科病毒、布尼亚病毒科病毒和疱疹病毒科病毒的感染而发生的所有疾病。

[0137] 如本文所用,术语“预防”可以指通过施用组合物而导致抑制或延迟疾病发作的任何作用,术语“治疗”可以指与改善相关的所有种类的作用或通过施用组合物有利于疾病症

状的改变。

[0138] 该组合物可以是特异性作用于感染病毒的细胞的组合物。

[0139] 该组合物可以是抑制免疫细胞浸润的组合物,也可以是抑制炎症反应的组合物(图45至图48)。证实本发明的组合物显著抑制促炎性细胞因子如IL-6, TNF- α , IFN- γ 和CCL2 (MCP-1) (图49)。

[0140] 又一方面,本发明提供了治疗感染性病毒疾病的方法,包括将抗病毒组合物施用于有需要的受试者。

[0141] 抗病毒组合物和感染性病毒疾病与上面解释的相同。

[0142] 用于治疗感染性病毒疾病的方法可以是包括将含有抗体或另外的药学上可接受的载体的药物组合物施用于患有感染性病毒疾病或疑似患有感染性病毒疾病的受试者的方法。药学上可接受的载体与上面解释的相同。优选地,用于治疗感染性病毒疾病的方法可以是这样的用于治疗感染性病毒疾病的方法,其包括向感染了感染性病毒疾病的受试者施用含有抗体的组合物。

[0143] 受试者可以包括哺乳动物、鸟等,例如牛、猪、羊、鸡、狗和人类,并且可以包括但不限于可以通过施用本发明的组合物治疗感染性病毒疾病的任何受试者。

[0144] 特别地,组合物可以药学上可接受的剂量以单次或多次施用施用。组合物可以以液体、散剂、气雾剂、胶囊剂、肠溶衣片剂、胶囊剂或栓剂的形式施用。施用途径的实例可以包括腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下、内皮、口服、局部、鼻内、肺内或直肠内施用等,但不限于此。然而,由于肽在口服施用时被消化,所以必须配制口服组合物以使得活性成分可以被包衣或被保护免于在胃中降解。另外,药物组合物可以使用能将活性成分转运到靶细胞的任何装置施用。

[0145] 另一方面,本发明提供用于预防或治疗炎症性疾病的含有与肽结合的片段或抗体的组合物。

[0146] 用于预防或治疗炎症性疾病的组合物可以是药物组合物、准药物组合物和功能性保健食品组合物的形式。

[0147] 炎症性疾病可能是由病毒感染引起的。

[0148] 另一方面,本发明提供用于治疗炎症性疾病的方法,其包括将用于预防或治疗炎症性疾病的组合物施用于有需要的受试者。

[0149] 另一方面,本发明提供与肽结合的片段或抗体的抗病毒用途。

[0150] 实施例

[0151] 下面将参照附图对本发明进行详细描述。然而,这里公开的实施例仅用于说明的目的,不应被解释为限制本发明的范围。

[0152] 实施例1:新的人源化抗体VSF的制备

[0153] 实施例1-1:嵌合VSF (chVSF) 的制备

[0154] 基于小鼠VSF (mVSF) 的主要功能部分是单克隆抗体的假设,使用mVSF和人免疫球蛋白通过遗传工程改造使小鼠/人嵌合抗体 (chAb) 嵌合。

[0155] 具体而言,为了制备嵌合抗体,将mVSF的轻链和重链的恒定区替换为人免疫球蛋白抗体 (κ 、 γ 2或 γ 4) 的恒定区。对于chVSF,使用pCAGGS载体作为模板制备表达载体(图1)。通过PCR扩增包括SacI和KpnI限制酶位点的mVSF的重链可变区 (mVH) (SEQ ID NO:9)。通过

PCR扩增包括ClaI和XhoI限制酶位点的轻链可变区(mVL) (SEQ ID NO:8)。PCR中使用的引物如表1中所示,进行总共35个循环(94℃45秒,60℃45秒,72℃45秒)和72℃10分钟。

[0156] 表1

引物	序列	SEQ ID NO
mVH F	cgagctcatgggatggagctggatc	124
mVH R	cggtagctgaggagacgggtgactg	125
KpnI_delR	gggcccttggtggaagctgaggagacgggtgactgagg	126
mVL F	catcgatatgagtgtgccactcag	127
mVL R	cctcgagtttgatttccagcttgg	128
Xho_modR	agatggtgcagccaccgtgcgtttgatttccagcttggtgcc	129

[0158] 使用KpnI和SphI限制酶位点克隆人重链(SEQ ID NO:11),使用XhoI和BglI限制酶位点克隆轻链(SEQ ID NO:13)。为了同时表达重链和轻链二者,使用SphI和ClaI限制酶位点将内部核糖体进入位点(IRES)克隆在轻链和重链之间。将可选择标记插入SalI限制酶位点。如此,如图2的示意图所示制备chVSF。

[0159] 实施例1-2:使用双载体表达系统表达chVSF

[0160] 使用1mg/mL的聚乙烯亚胺(PEI)将15μg的pCAGGS-GFP转染到HEK293T细胞中以检查转染和表达的水平。以相同的方式将实施例1-1中制备的chVSF转染到HEK293T细胞中,6小时后,培养基用含有2%FBS的培养基进行替换。每3天收集一次细胞培养上清液,使用过滤器(0.45μm)除去其中所含的杂质。使用nProtein A Sepharose®珠纯化chVSF。用0.2M甘氨酸/HCl缓冲液(pH2.5)洗脱chVSF,并使用1M Tris-Cl缓冲液(pH9.0)作为中和缓冲液。具体而言,使用相对于树脂体积的10倍体积的1M Tris-Cl缓冲液(pH8.0)的均匀的树脂使VSF培养物上清液通过柱子。通过流入相对于柱体积的至少5倍体积的0.1M Tris-Cl缓冲液(pH8.0)来洗涤所得物。通过流入相对于树脂体积的5倍体积的0.2M甘氨酸/盐酸缓冲液(pH2.5)来洗脱所得物,由此在预先添加了中和缓冲液的管中获得纯化的VSF。通过SDS-PAGE证实纯化的VSF。

[0161] 结果,如图3中所示,证实了chVSF具有由具有免疫球蛋白特征的重链(50kDa)和轻链(25kDa)组成的结构。

[0162] 实施例2:单链可变片段(scFv)的制备及其抗病毒作用的证实

[0163] 使用VSF的可变区制备单链可变片段(scFv)。scFv具有SEQ ID NO:150的DNA序列,scFv是通过将DNA克隆到大肠杆菌表达载体pET-22b(+)中制备的(图4和5)。

[0164] 具体而言,通过用接头连接mVSF的VH和VL,插入到细菌表达载体pET-22b(+)中,用IPTG处理以诱导其表达,并用Ni-NTA柱纯化scFv来制备scFv(图6)。

[0165] 使用纯化的scFv证实了scFv的抗病毒活性。具体来说,将感染有EMC-D病毒的L929细胞与scFv、VSF或抗EMC-D病毒抗体在37℃孵育30小时。然后,去除上清液,用CellTiter96 Aqueous One Solution处理,在OD₄₅₀下测定吸光度。结果证实,用VSF(5ng至500ng)、scFv(5μg至10μg)和抗EMC-D病毒抗原(1:20稀释)处理的所有组均显示出抗病毒作用(图7)。

[0166] 实施例3:chVSF抗病毒活性的证实

[0167] 为了证实实施例1中制备的chVSF的抗病毒活性,进行MVIT测定。

[0168] 具体而言,使用包含2%胎牛血清(FBS)的Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM),用EMC-D病毒(100pfu)将小鼠成纤维细胞的L929细胞以 2×10^4 细胞的量接种到96孔板中感染1小时,然后用2倍稀释的VSF(4 μ g/mL)处理。48小时后,将细胞用10%福尔马林固定10分钟,并用1%结晶紫染色10分钟。染色的细胞用PBS洗涤,根据染色程度评价细胞的活力。当病毒增殖受到抑制时,所有细胞都变得有活力并形成均匀的层,其也被结晶紫染色。相反,当细胞被病毒感染裂解时,细胞脱落,因此几乎没有染色层。

[0169] 结果,如图8中所示,本发明的chVSF对EMC-D病毒显示出抗病毒活性。这些结果不仅支持现有的小鼠VSF,而且支持通过现有小鼠VSF与人免疫球蛋白抗体的恒定区的嵌合制备的本发明的chVSF(基于mVSF是单克隆抗体的假设),也可以用作抗病毒剂。

[0170] 实施例4:人源化抗体VSF的制备

[0171] 使用基于实施例1和3的chVSF制备人源化抗体hzVSF。

[0172] 具体地,使用对应于双基因表达载体的pdCMV-dhfr载体(即用于使用真核细胞表达两种不同种类的重组蛋白的表达系统)(图9)。该载体由一个载体中两种不同的基因的两个不同的转录单元组成,从而在每个转录单元中利用启动子和polyA信号表达两个不同的基因,它是利用强大的哺乳动物启动子巨细胞病毒(CMV)启动子的载体系统。如图10中所示,使用该启动子制备hzVSF。

[0173] 在这点上,hzVSF的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:10表示,重链区的氨基酸序列由SEQ ID NO:11表示,而轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:12表示,轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:13表示。

[0174] 使用1mg/mL的聚乙烯亚胺(PEI)将15 μ g的pCAGGS-GFP转染到HEK293T细胞中以检查转染和表达的水平。以相同的方式将chVSF和hzVSF转染到HEK293T细胞中,6小时后,培养基用含有2%FBS的培养基进行替换。每3天收集一次细胞培养上清液,使用过滤器(0.45 μ m)除去其中所含的杂质。使用nProtein A Sepharose[®]珠纯化chVSF和hzVSF。用0.2M甘氨酸/HCl缓冲液(pH2.5)洗脱chVSF和hzVSF,并使用1M Tris-Cl缓冲液(pH9.0)作为中和缓冲液。具体而言,使用具有相对于树脂体积的10倍体积的1M Tris-Cl缓冲液(pH8.0)的均匀的树脂使VSF培养物通过柱子。通过流入相对于柱体积的至少5倍体积的0.1M Tris-Cl缓冲液(pH8.0)来洗涤所得物。通过流入相对于树脂体积的5倍体积的0.2M甘氨酸/盐酸缓冲液(pH2.5)来洗脱所得物,由此在预先添加了中和缓冲液的管中获得纯化的VSF。通过SDS-PAGE证实纯化的VSF,并通过MVIT测定证实其活性。

[0175] 实验中使用的VSF如下表2所示。

[0176] 表2

[0177]	VSF 类型	表达的细胞	mg/L (收获的上清)
	mVSF	小鼠杂交瘤	4.14
	*rmVSF	HEK293T	5.71
	chVSF γ 2	HEK293T	5.15
	chVSF γ 4	HEK293T	7.32
[0178]	hzVSF γ 2	HEK293T	5.01
	hzVSF γ 4	HEK293T	9.38

[0179] *rmVSF:小鼠VSF的重组体

[0180] 结果,如图11所示,证实chVSF γ 2和chVSF γ 4、hzVSF γ 2和hzVSF γ 4分别由具有免疫球蛋白特征的重链(50kDa)和轻链(25kDa)组成。

[0181] 另外,如图12中所示,证实了hzVSF也具有抗病毒作用。这些结果表明人源化抗体hzVSF具有类似于VSF的抗病毒作用。

[0182] 实施例5:人源化抗体VSF的物理特性的证实

[0183] 如下证实实施例4中制备的hzVSF的物理特性。

[0184] 实施例5-1:基本分子量模式和纯度的证实

[0185] 通过还原和非还原SDS-PAGE证实分子量模式和纯度。具体而言,根据分子量在SDS-PAGE中通过考马斯染色对hzVSF_v13进行染色,从而证实分子量和纯度。

[0186] 结果,如图13中所示,泳道1是非还原凝胶,在预期出现IgG抗体(150kDa)的位置观察到主带。在还原凝胶的泳道2中,观察到与免疫球蛋白G(IgG)抗体的重链(约50kDa)和轻链(约25kDa)的位置对应的条带,证实hzVSF_v13显示一般IgG抗体模式。

[0187] 实施例5-2:分子量、糖基化模式、大小变化等的证实

[0188] 为了证实hzVSF_v13的分子量、糖基化模式、大小变化等,进行液相色谱/质谱分析。将少量hzVSF_v13注入HPLC中并观察峰。

[0189] 结果证实hzVSF_v13显示IgG的特征(图14)。在完整质量(Intact Mass)中,观察到hzVSF_v13的总分子量(约140kDa),并观察到与一般糖基化IgG(例如G0/G0,G0F/G1,G1/G1等)对应的峰图案。另外,观察到去糖基化后的重链(约49kDa)和轻链(约23kDa)。总结通过用PNGase F处理去除聚糖的重链和不用PNGase F处理的重链的分子量,可以证实IgG的一般聚糖模式(G0F,G1F和G2F)。

[0190] 实施例5-3:纯度和聚集的证实

[0191] 为了证实hzVSF_v13的纯度和聚集,进行SEC-HPLC。

[0192] SEC-HPLC条件如下:

[0193] -HPLC系统:Dionex Ultimate 3000

[0194] -柱:Tosoh TSKgel G3000 SWxl

[0195] -流动相:磷酸盐缓冲液,0.5mL/分钟

[0196] -注射体积:10 μ L

[0197] 结果,在与典型的IgG抗体的单体相对应的位置(约16分钟的保留时间)观察到92.44%的主峰,并且在对应于典型的IgG抗体的二聚体的位置处观察到约6.84%的峰(保留时间约13分钟)(图15)。

[0198] 实施例5-4:等电点和电荷的异质性的证实

[0199] 为了证实hzVSF_v13的等电点,使用呈现pH3至pH10的梯度的凝胶进行电泳。

[0200] 结果,如图16中所示,显示hzVS_v13F具有7.7的等电点,并且除了主要带之外还观察到酸性/碱性同种型。这对应于在IgG抗体中通常观察到的异构体(例如,在C末端区域的脱氨基)。

[0201] 上述结果支持本发明的人源化抗体hzVSF_v13s具有与IgG抗体相似的物理特性。

[0202] 实施例6:制备hzVSF变体,其是具有降低的免疫原性同时保持或增强其病毒抑制活性的人源化抗体

[0203] 实施例6-1:制备hzVSF替代品

[0204] 基于实施例4中制备的hzVSF制备三种hzVSF替代品。每种替代品的活性类似于或低于野生型的活性 ($0.5 \leq \leq 1U < 1mg/mL$) (表3和4)。表3中示出了每个替代品的CDR1至CDR3的氨基酸序列,而且表4中示出了每个变体的FR1至FR4的氨基酸序列。

[0205] 表3

抗体		CDR1	CDR2	CDR3
[0206]	hzVSF_WT 重链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTT Y <u>A</u> QKF <u>Q</u> G (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAM DY (SEQ ID NO: 4)
	轻链	RASENIYS NLA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGS PRT (SEQ ID NO: 7)

[0207]	hzVSF_a1 重链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTT Y <u>A</u> QKF <u>Q</u> G (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAM DY (SEQ ID NO: 4)
	轻链	RASENIYS NLA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGS PRT (SEQ ID NO: 7)
	hzVSF_a2 重链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTT Y <u>A</u> QKF <u>Q</u> G (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAM DY (SEQ ID NO: 4)
	轻链	RASENIYS NLA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGS PRT (SEQ ID NO: 7)
	hzVSF_a3 重链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTT Y <u>A</u> QKF <u>Q</u> G (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAM DY (SEQ ID NO: 4)
	轻链	RASENIYS NLA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGS PRT (SEQ ID NO: 7)

[0208] 表4

[0209]

抗体		FR1	FR2	FR3	FR4
hzVSF _WT	重 链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻 链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _a1	重 链	SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻 链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _a2	重 链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻 链	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

[0210]

	链	NO: 24	NO: 25	NO: 26	NO: 27
hzVSF _a3	重 链	SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻 链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27

[0211] 实施例6-2:制备hzVSF变体

[0212] 基于实施例4中制备的hzVSF,通过免疫原性降低和亲和力成熟制备用于体内实际使用的hzVSF变体。结果,总共制备了13个变体(表5和6)。各个变体的CDR1-CDR3的氨基酸序列如表5所示,各个变体的FR1-FR4的氨基酸序列如表6所示。

[0213] 表5

[0214]

抗体		CDR1	CDR2	CDR3
hzVSF_ WT	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTTY <u>A</u> QKF <u>Q</u> G (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var1	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTTYAQKF QG (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VADNLAD (SEQ ID NO: 16)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var2	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTTYAQKF QG (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VADNLGD (SEQ ID NO: 17)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var3	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTTYAQKF QG (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VADNRGD (SEQ ID NO: 18)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)

[0215]

hzVSF_ var4	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTTYAQKF QG (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VADNRGD (SEQ ID NO: 18)	QHFYGTPT (SEQ ID NO: 19)
hzVSF_ var5	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSDTYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var6	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSTTYAQKF QG (SEQ ID NO: 3)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var7	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSDTYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var8	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSDTYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGNRAMD (SEQ ID NO: 15)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VATNLAD (SEQ ID NO: 6)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var9	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSDTYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VADNRGD (SEQ ID NO: 18)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var10	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSDTYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGNRAMDY (SEQ ID NO: 15)
	轻 链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VADNRGD (SEQ ID NO: 18)	QHFYGSPT (SEQ ID NO: 7)
hzVSF_ var10	重 链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGSDTYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)

[0216]

var11	链	(SEQ ID NO: 2)	QG (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 4)
	轻链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VAD <u>N</u> RGD (SEQ ID NO: 18)	QHFYGT <u>P</u> RT (SEQ ID NO: 19)
hzVSF_ var12	重链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGN <u>R</u> AMDY (SEQ ID NO: 15)
	轻链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VAD <u>N</u> RGD (SEQ ID NO: 18)	QHFYGT <u>P</u> RT (SEQ ID NO: 19)
hzVSF_ var13	重链	GYNMN (SEQ ID NO: 2)	NIDPYYGS <u>D</u> TYAQKF QG (SEQ ID NO: 14)	ETGTRAMDY (SEQ ID NO: 4)
	轻链	RASENIYSN LA (SEQ ID NO: 5)	VAD <u>N</u> LAD (SEQ ID NO: 16)	QHFYGS <u>P</u> RT (SEQ ID NO: 7)

[0217] 表6

[0218]

抗体		FR1	FR2	FR3	FR4
hzVSF_ _WT	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF_ _var1	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF_ _var2	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF_ _var3	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF_ _var4	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF	重	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID

[0219]

_var5	链	NO: 20	NO: 21	NO: 22	NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var6	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var7	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var8	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var9	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var10	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var11	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var12	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 28 (K74T, I76A)	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
hzVSF _var13	重链	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
	轻链	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27

[0220] 已经证实,与野生型相比,上述制备的全部13种变体具有降低的免疫原性,同时具有维持或增强的抗病毒活性和抗炎活性。

[0221] 在上述变体中具有最低免疫原性的hzVSF_var12显示出抗病毒活性,使得1单位显示与hzVSF野生型相同的500ng/单位的抗病毒活性。相反,具有相对低的免疫原性但相对高的抗病毒活性的hzVSF_var13显示250ng/单位的抗病毒活性。

[0222] 实施例6-3:hzVSF野生型及其变体的表位计数的证实

[0223] 比较了hzVSF野生型;野生型免疫原性降低的变体中的代表性变体hzVSF_var12和

hzVSF_var13;和药物市场上现有的四种重磅抗体药物的表位计数。结果如表7所示,证实了每个II类HLA中相对免疫原性的可能性。

[0224] 表7

[0225]

蛋白类型	DRB1	DRB 3/4/5	DQ	DP	总值
hzVSF_w	31	17	1	3	52
hzVSF_var1	30	18	1	3	52
hzVSF_var2	30	17	0	3	50
hzVSF_var3	30	16	0	3	49
hzVSF_var4	28	16	0	3	47
hzVSF_var5	30	16	1	3	50
hzVSF_var6	29	16	1	3	49
hzVSF_var7	28	15	1	3	47
hzVSF_var8	27	14	1	3	45
hzVSF_var9	27	14	0	3	44
hzVSF_var10	26	13	0	3	42
hzVSF_var11	25	14	0	3	42
hzVSF_var12	24	13	0	3	40
hzVSF_var13	29	17	0	3	49
Humira (人)	25	12	4	1	42
Remicade (嵌合)	74	37	3	1	115
Rituxan (嵌合)	65	33	9	3	110
Herceptin (人源化)	40	20	3	1	64

[0226] 在表7中,总值越高意味着II类HLA引起的不良反应的可能性越高。从以上结果可以证实,本发明的免疫原性降低的hzVSF_var12和hzVSF_var13的表位计数与四种药物的表位计数最低的Humira的表位计数类似。这些结果表明,本发明的人源化抗体在用作抗病毒剂时可能产生的严重副作用水平非常低,因此支持本发明的人源化抗体作为安全的抗病毒剂或抗炎药物。

[0227] 另外,每种变体(从var1到var12)的生物学活性与野生型(0.5mg/U)的相似,但是显示var13的活性高于野生型的活性。

[0228] 实施例6-4:hzVSF变体的T细胞分析的证实

[0229] 为了评估hzVSF_var12和hzVSF_var13的免疫原性,通过使用51个健康供体的血液样品证实Lonza的体外T细胞分析检查的材料是否能够对T细胞增殖具有影响。

[0230] 用hzVSF_var12、hzVSF_var13或Keyhole 肽基蓝蛋白(KLH)处理每个供体的总外周血单核细胞(PBMC),并培养7天。KLH是一种携氧金属蛋白,可作为抗体产生的载体蛋白,并且其作为有效引发免疫应答的阳性对照。然后,测量带有CD3⁺CD4⁺Edu⁺染色的T细胞的比例。结果,相应于材料,KLH在45个血液供体中显示T细胞增殖(应答率为88%),而hzVSF_var12和hzVSF_var13仅在3个受试者中诱导T细胞增殖(应答率为5.8%)(图17)。

[0231] 同时,用培养7天的对照PBMC计算KLH,hzVSF_v12或hzVSF_v13诱导的T细胞增殖的刺激指数(SI)。当SI值大于2时,应用于人体时预计免疫原性较大。相反,当SI值小于0.5时,

预期T细胞增殖受到抑制。结果证实,hzVSF_v12和hzVSF_v13分别显示出1.12和1.03的低SI值,并且还显示SI值在等于或大于0.6且等于或小于2的范围内。相反,用作阳性对照的KLH显示出3.91的高SI值(图18和19;以及表8)。

[0232] 表8

[0233]	产品 (抗原)	平均SI	p-值
	hzVSF_var12	1.12	0.008
	hzVSF_var13	1.05	0.3229
	KLH	3.91	<0.0001

[0234] 从以上的结果预计,hzVSF_v12和hzVSF_v13对病毒感染患者的免疫原性较低,其后续副作用较小。

[0235] 实施例7:hzVSF及其变体的结合表位的证实

[0236] 试图鉴定在上述实施例中制备的hzVSF及其变体所结合的肽。

[0237] 结果证实,上述实施例中制备的hzVSF及其变体与分离的肽SEQ ID NO:1结合,对应于氨基酸位置142至294的波形蛋白的氨基酸序列(图54到58)。

[0238] 实施例8:hzVSF变体的物理特性和药代动力学的证实

[0239] 为了证实实施例6中制备的hzVSF变体的物理特性和药代动力学,对代表性变体hzVSF_var12和hzVSF_var13进行了实验。

[0240] 实施例8-1:hzVSF变体的分子量模式和纯度的证实

[0241] 通过SDS-PAGE证实hzVSF_var12和hzVSF_var13的分子量模式和纯度。通过将分别与hzVSF_var12和hzVSF_var13混合的NuPage 4X LDS样品缓冲液(Invitrogen,NP0007)和NuPage 10X样品还原剂(Invitrogen,NP0009)制备还原的样品,然后在70℃下加热10分钟。通过省略添加还原剂和加热的步骤来制备非还原样品。分别将浓度为1mg/mL的各10μL对照抗体hzVSF_var12和hzVSF_var13在4%至12%SDS-PAGE上进行电泳,凝胶用InstantBlue (TripleRed,ISB01L)染色,纯度证实了hzVSF_var12和hzVSF_var13的纯度。

[0242] 结果如图20中所示,在泳道2和4(非还原样品)中,在预期出现IgG抗体(约150kDa)的位置观察到主要条带,在泳道3和5(还原样品)中,观察到与免疫球蛋白G(IgG)抗体的重链(约50kDa)和轻链(约25kDa)的位置对应的条带,从而证实hzVSF变体也显示出一般的IgG抗体模式,如hzVSF的情况一样。此外,当使用IgG4作为对照时,观察到的模式与泳道6(非还原样品)和泳道7(还原样品)中观察到的模式相同。另外,证实了hzVSF_var12和hzVSF_var13二者都显示出良好的纯度。

[0243] 另外,为了证实hzVSF_var12和hzVSF_var13的纯度和聚集,使用HPLC和Zorbax GF-250μm 9.2mm ID×25cm柱(Agilent 1200系列),通过尺寸排除高效液相色谱(SE-HPLC)分析hzVSF_var12和hzVSF_var13。在注入HPLC之前,将浓度为1mg/mL的样品通过0.2μm过滤器纯化以除去杂质。每个样品(100μL)被注射,并且HPLC以1mL/min的速率运行15分钟。使用Chemstation软件进行分析。

[0244] 结果,在与典型的IgG抗体的单体对应的位置(保持时间约8.65分钟)观察到主峰,hzVSF_var12和hzVSF_var13的纯度证实为95%或更高(图21)。在与典型的IgG抗体的二聚体对应的位置(保留时间为约7.89至7.93分钟)观察到约3.72%和4.43%的峰,从而证实峰形与IgG抗体的峰形状相同;这个结果与SDS-PAGE结果一致。

[0245] 实施例8-2:hzVSF变体的药代动力学分析

[0246] 进行以下实验以通过定量预测hzVSF_var13在施用于小鼠后的体内性能,即血液中浓度,半衰期,代谢率等,确定适合的hzVSF_var13的体内剂量,施用间隔和施用制剂,以在临床测试期间获得用于参考的客观指标。

[0247] 使用6.25 μ g (0.31mg/kg) 的人IgG (多克隆) 作为对照,而实验组中将6.25 μ g (25U; 0.31mg/kg)、62.5 μ g (250U; 3.10mg/kg) 和625 μ g (2500U; 31.0mg/kg) 的hzVSF_var13注射到小鼠尾静脉中。注射后,在1、2、4、8、14、21、28和35天从小鼠采集血液样品,分离血清并用ELISA法测定hzVSF_var13的血药浓度。

[0248] 对于ELISA试验,将抗人IgG (γ -特异性) 在37 $^{\circ}$ C下在平板上固定2小时或在4 $^{\circ}$ C过夜,然后在37 $^{\circ}$ C下与3%牛血清白蛋白 (BSA) 一起孵育2小时,以封闭未包被的部分。由从小鼠收集的血液获得的血清在37 $^{\circ}$ C下反应1小时,并在37 $^{\circ}$ C下与缀合有辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗人IgG (κ 特异性) 反应30分钟。使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶液作为底物,将所得物在室温的暗室中孵育9.5分钟,根据其450纳米的OD值,测量血液中hzVSF_var13的量。当在每个浓度对小鼠施用单剂量hzVSF_var13时的PK参数显示在表9和图22的图中。

[0249] 表9

	假处理对照 (IgG 0.31 mg/kg)	hzVSF_v ar13 (0.31 mg/ kg)	hzVSF_v ar13 (3.10 mg/ kg)	hzVSF_var 13 (31.0 mg/k g)
雌性				
N	6	6	6	6
Cmax (μ g/mL)	5.5 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.2	57.2 $\pm$ 1.0	607.2 $\pm$ 22.2
AUC (μ g·天/mL)	178.1 $\pm$ 53.9	113.0 $\pm$ 17.8	948.3 $\pm$ 296.7	8686.9 $\pm$ 2958.8
t1/2 (天)	20.1 $\pm$ 2.9	13.4 $\pm$ 2.4	10.8 $\pm$ 3.8	10.2 $\pm$ 3.0
CL	1.8 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 1.5
(mL/天/kg)				
雄性				
N	5	5	5	5
Cmax (μ g/mL)	5.5 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.3	54.6 $\pm$ 1.4	563.0 $\pm$ 8.2
AUC (μ g·天/mL)	121.8 $\pm$ 15.3	78.8 $\pm$ 20.8	798.1 $\pm$ 274.5	6939.9 $\pm$ 2311.8
t1/2 (天)	16.6 $\pm$ 2.4	10.1 $\pm$ 3.1	9.0 $\pm$ 4.0	8.9 $\pm$ 3.7
CL (mL/天/kg)	2.6 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 1.0	4.9 $\pm$ 1.2

[0252] 结果,当以25U单剂量施用hzVSF_var13时,血液中hzVSF浓度的趋势以与以相同剂量施用的假处理对照 (IgG) 相同的方式降低。最大浓度 ($C_{\max}$) 和浓度曲线下面积 (AUC) 随着施用剂量的增加而增加,因此证实是剂量依赖性的。hzVSF_var13 (25U) 的体内半衰期 ($t_{1/2}$) 为男性为10天,女性为13天,略低于假处理对照 (男性为16天,女性为20天),半衰期随着施用剂量的增加呈现略微下降的趋势。在各施用浓度下,雌性的 $C_{\max}$, AUC, 体内半衰期 ($t_{1/2}$), 体内全身和清除值 (CLt) 都显示出高于雄性。施用后35天,对全部小鼠进行尸体解剖测定,进行脏器重量的测定,组织病理学检查,免疫毒性测试,中和能力,以检查hzVSF_var13引起

的体内毒性的存在,但没有观察到不良反应。

[0253] 上述结果支持本发明的hzVSF及其变体具有与其他人源化抗体类似的半衰期,并且它们在临床应用中将没有问题。

[0254] 实施例9:hzVSF及其变体的病毒抑制活性的证实

[0255] 用EMC-D病毒感染小鼠L929细胞,用hzVSF野生型和hzVSF变体的代表性变体hzVSF_var12和hzVSF_var13处理,并且通过实施例2的MVIT测定法证实其抗病毒效果。

[0256] 结果如图23中所示,hzVSF野生型在0.5 μ g/mL的浓度下显示100%的抗病毒效果;而hzVSF_var12和hzVSF_var13分别在0.2 μ g/mL和0.1 μ g/mL的浓度下显示100%的抗病毒效果。

[0257] 因此,当用EMC-D病毒感染L929细胞并同时用VSF处理时,显示100%抗病毒效果的1mL VSF中所含的最小量被确定为1单位的生物学活性。

[0258] 就此而言,每种VSF的生物学活性显示在下表10中。

[0259] 表10

[0260]

VSF类型	生物学活性 (1单位)	MW (kDa)
mVSF	0.09 μ g	163
hzVSF_wt	0.5 μ g	147
hzVSF_var12	0.2 μ g	147
hzVSF_var13	0.1 μ g	147

[0261] 这些结果表明,尽管制备的hzVSF变体也具有比mVSF更低的效价,通过进行单克隆抗体的人源化,降低免疫原性和亲和力成熟而新制备的hzVSF变体能够表现出优异的抗病毒和抗炎效果,与hzVSF_wt相比几乎没有不利影响。

[0262] 实施例10:hzVSF的亲和力证实

[0263] 通过下述方法测量对hzVSF受体的亲和力。

[0264] L929细胞接种 6×10^5 个细胞,用2MOI的EMC-D病毒分别感染0、2、6和10小时。向其中加入4单位的配体(mVSF,hzVSF_wt和hzVSF_v13)并培养1小时,收集培养上清液,获得它们的Ka值。加入的各配体的量与反应后收集的配体的量之间的差值是与受体结合的配体的量,并且基于该结果计算亲和常数(Ka)和解离常数(Kd)(表11)。

[0265] 表11

[0266]

VSF类型	亲和常数 (Ka)	解离常数 (Kd)
mVSF	2.1×10^{10} L/mol	4.7×10^{-11} M
hzVSF wt	8.2×10^9 L/mol	1.2×10^{-10} M
hzVSF v13	1.7×10^{10} L/mol	5.9×10^{-11} M

[0267] 对应于潜在的生物制剂,结果证实hzVSF的亲和常数(Ka)为 1×10^9 以上,因此作为生物制剂,hzVSF及其变体也证实对受体具有高结合亲和性。

[0268] 实施例11:人细胞中hIFN- α 和hzVSF_wt的抗细胞活性证实

[0269] 用EMC-D感染人成纤维细胞WI-38细胞,用不同浓度的人干扰素和hzVSF_wt处理,用MTS法测定各细胞的抗病毒效果和活力。

[0270] 详细地,将细胞接种到96孔板中并在贴附于底部的情况下培养24小时。用EMC-D病毒(100pfu)感染细胞并用干扰素或hzVSF处理。培养48小时后,用[3-(4,5-二甲基噻唑-2-

基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑磷] (MTS) 处理细胞。将细胞进一步孵育2或3小时,通过测量490nm处的吸光度来证实它们的活力。如图24所示,用人干扰素处理的细胞即使用量少于用hzVSF_wt处理的细胞也显示出约90%的活力;然而,当细胞以高浓度(4nM或更高)的人干扰素处理时,细胞显示细胞毒性。相反,当用hzVSF_wt处理细胞时,细胞在约4nM的浓度下显示约100%活力,且在4nM或更高的浓度下细胞不显示任何细胞毒性。

[0271] 从以上结果可以预计,与人干扰素不同,hzVSF具有较少的副作用。

[0272] 实施例12:hzVSF_wt对病毒性糖尿病中免疫细胞浸润和炎症反应的抑制活性的证实

[0273] 为了根据hzVSF的浓度检查hzVSF对小鼠糖尿病的效果,通过腹膜内注射用EMC-D病毒(100pfu)感染5周龄雄性DBA/2N小鼠。然后,将浓度分别为2、4和16单位的hzVSF_wt注射到尾静脉,并在感染后第3天检查血液和尿液中的葡萄糖水平。另外,在感染后第3天和第7天处死小鼠,通过手术切除它们的胰脏并进行活组织检查,然后进行组织学检查。

[0274] 结果如图25中所示,当用EMC-D病毒感染它们并用苏木精-伊红染色后,将小鼠的胰脏取出时,仅感染病毒(病毒对照)的组显示免疫细胞浸润并且由于破坏其胰岛而胰岛的大小减小,而给予至少4单位hzVSF_wt(病毒+hzVSF)的组没有显示出免疫细胞的浸润,并且胰岛也保持正常。因此,推测hzVSF_wt抑制EMC-D的增殖并抑制免疫细胞的浸润,从而保护胰岛免于被破坏。

[0275] 另外,作为血糖水平的检测结果,在给予至少4单位hzVSF_wt的组中,没有发展糖尿病,并且血糖水平低于200mg/dL,这对应于正常小鼠的范围。关于尿液,在施用至少8单位hzVSF_wt的组中未检测到尿葡萄糖(表12至14)。

[0276] 在病毒性糖尿病中,表12中示出根据hzVSF_wt的浓度的糖尿病的发病率,表13中示出根据hzVSF_wt的浓度的血液葡萄糖水平,表14示出了根据hzVSF_wt的浓度的尿液葡萄糖水平。

[0277] 表12

	组	感染后					糖尿病发病率
		3 天	4 天	5 天	6 天	7 天	
[0278]	病毒对照	-	4/4	4/4	4/4	4/4	100%
	2 单位/小鼠	-	-	-	4/4	4/4	100%
	4 单位/小鼠	-	-	-	-	-	0%
	8 单位/小鼠	-	-	-	-	-	0%
[0279]	16 单位/小鼠	-	-	-	-	-	0%

[0280] *当小鼠的血糖水平为300mg/dL或更高并且尿糖水平为“+”或更高时,小鼠被认为患有糖尿病。

[0281] 表13

组	感染后				
	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天
病毒对照	157 ± 25	541 ± 84	540 ± 84	526 ± 91	529 ± 100
2 单位/小鼠	162 ± 24	157 ± 23	186 ± 53	484 ± 21	505 ± 26
4 单位/小鼠	149 ± 42	148 ± 6	135 ± 11	145 ± 8	122 ± 16
8 单位/小鼠	171 ± 42	148 ± 6	135 ± 11	145 ± 8	122 ± 16
16 单位/小鼠	163 ± 21	160 ± 4	144 ± 9	139 ± 8	157 ± 22

[0283] *当小鼠的血糖水平为300mg/dL或更高并且尿糖水平为“+”或更高时,小鼠被认为患有糖尿病。

[0284] 表14

组	感染后				
	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天
病毒对照	-	++++	++++	++++	++++
2 单位/小鼠	-	-	-	+++	+++
4 单位/小鼠	-	-	-	-	-
8 单位/小鼠	-	-	-	-	-
16 单位/小鼠	-	-	-	-	-

[0286] 上述结果证实,本发明的hzVSF及其各种变体由于其对抗EMC-D病毒感染的抗病毒作用和免疫细胞浸润的抑制活性而显著抑制朗格汉斯胰岛的破坏,并且被证实是有能力的显著治疗由病毒感染诱发的糖尿病。也就是说,上述结果表明,本发明的hzVSF及其各种变体不仅在不诱导免疫细胞浸润的情况下表现出抗病毒作用,而且还具有治疗病毒性糖尿病的能力,因此可用作治疗剂治疗各种炎性疾病。

[0287] 实施例13:mVSF的抗HBV作用的证实

[0288] 为了证实mVSF抗人乙型肝炎病毒(HBV)的抗病毒作用,使用了表达HBV的人肝癌细胞HepG2.2.15细胞。

[0289] 将HepG2.2.15细胞接种于板并用mVSF处理,并且使用ELISA每3天定量在细胞中增殖并释放到培养物中的HBV表面抗原(HBsAg)的量。结果转化为每个细胞的病毒数量。同时计数细胞的数量并测量每个细胞的相对病毒量。

[0290] 结果证实,mVSF处理明显减少了HBsAg的量,因此表明mVSF具有抗HBV效应(图26)。这些结果支持了本发明的hzVSF及其各种变体可有效抑制肝炎病毒如HBV的事实,从而对各种病毒具有抗病毒作用。此外,显示了9天的mVSF处理抑制每种细胞中的病毒复制达80%或更高,并预期进一步抑制人类的炎症,由此表明其将特别有效地治疗临床症状。

[0291] 实施例14:感染病毒的细胞中VSF受体的表达模式的证实

[0292] 首先,为了证实VSF受体是否能够在感染病毒的细胞中表达,将乙型肝炎患者的人肝脏组织(没有癌症肝脏组织的一部分,虽然肝脏由于乙型肝炎进展为癌症)和用mVSF抗体染色丙型肝炎患者的人肝脏组织(没有癌症的肝脏组织的一部分,虽然肝脏由于丙型肝炎

进展为癌症)。使用未感染病毒(没有癌症)的人肝脏组织作为对照。结果显示VSF受体在感染HBV或HCV的患者的肝脏组织中表达,但VSF受体在对照组织中不表达,因此表明VSF受体以病毒感染特异性方式表达。当使用从其他患者获得的人肝脏组织重复进行实验时,以相同的模式显示这些结果(图27和28)。

[0293] 随后,为了根据病毒感染证实VSF受体的表达期,将H1N1流感病毒感染到MDCK细胞系中,通过荧光染色观察病毒复制和VSF受体的表达。结果证实,流感病毒感染后随着时间的推移发生病毒复制,感染后VSF受体的表达增加(图29)。基于这些结果,证实了VSF受体是由病毒感染诱导的。

[0294] 另外,用EMC-D病毒感染人WI-38成纤维细胞,然后检查VSF受体的表达和VSF的抗病毒作用(图30)。图30左图显示了EMC-D感染的VSF受体的表达,右图显示hzVSF_wt处理的抗EMC-D作用和VSF受体的表达。基于上述结果,证实了VSF可以表现出抗病毒作用,并且也以相对于EMC-D病毒感染的感染特异性方式表达其受体。

[0295] 结论证实感染病毒的细胞能够表达VSF受体,虽然其表达时间可以根据细胞而变化,并且VSF处理能够诱导抗病毒作用,虽然它不影响受体的表达。

[0296] 实施例15:hzVSF抗乙型肝炎病毒的抗病毒效果的证实

[0297] 为了检查hzVSF对人乙型肝炎病毒(HBV)的作用,使用hzVSF的代表性变体hzVSF_var13进行如下所述的实验。

[0298] 实施例15-1:共价闭合环状DNA(cccDNA)的分析

[0299] 将HBV感染的HepG2.2.15细胞系按照每种剂量用hzVSF_var13和HBV药物(拉米夫定;Lami)处理,每周计数细胞数,并收获相同量的细胞。

[0300] 为了从上述细胞中获得HBV的cccDNA,将HepG2.2.15细胞恢复后,重悬于裂解缓冲液(25mM EDTA,10mM Tris-HCl;pH7.5,100mM NaCl,1%SDS,0.1mg/mL蛋白酶K),并在55℃下反应1小时。使用MEGA快速旋转总片段DNA纯化试剂盒(Intron)纯化总HBV DNA后,将所得物在37℃与质粒安全的依赖ATP的DNA酶反应1小时,并使酶在70℃30分钟而失活。然后,去除HBV松弛环状DNA(rcDNA),仅回收HBV cccDNA。随后,使用Accupower 2x greenstar qPCR Master混合物(Bioneer,韩国),通过qPCR对HBV cccDNA进行定量分析。

[0301] 使用的PCR引物是正向引物5'-TGAATCCYGCGGACGACC-3'(SEQ ID NO:153)和反向引物5'-CAGCTTGAGGCTTGAACAG-3'(SEQ ID NO:154)(核苷酸1862-1881)(Y=C/T)。

[0302] 结果证明,当用hzVSF_var13处理时,HBV感染的细胞的cccDNA含量以浓度依赖性方式降低,并且特别地,当用10μg/mL的hzVSF_var13处理时,几乎没有cccDNA含量(图31)。

[0303] 因此,证实了hzVSF施用可以显著降低细胞内cccDNA的量,因此作为治疗HBV的药剂具有优异的效果。

[0304] 实施例15-2:证实对HBV DNA的抑制

[0305] 将HBV感染HepG2.2.15细胞系按照每种剂量用hzVSF_var13和一种HBV药物(拉米夫定;Lami)处理,每周计数细胞数,并收获相同量的细胞。

[0306] 细胞内HBV DNA如下纯化。将以上获得的HepG2.2.15细胞重悬于裂解缓冲液(25mM EDTA,10mM Tris-HCl;pH7.5,100mM NaCl,1%SDS,0.1mg/mL蛋白酶K)中,并在55℃下反应1小时。使用MEGA快速旋转总片段DNA纯化试剂盒(Intron)纯化细胞内HBV DNA。

[0307] 为了获得细胞外HBV DNA,获得一定量的细胞培养上清液,用裂解缓冲液处理并提

取。然后,使用Accupower 2x greenstar qPCR Master mix (Bioneer, 韩国), 通过qPCR对HBV总DNA进行定量分析。

[0308] 使用的PCR引物是正向引物5'-CCTCTTCATCCTGCTGCT-3' (SEQ ID NO:155) 和反向引物5'-AACTGAAAGCCAAACAGTG-3' (SEQ ID NO:156)。

[0309] 结果在细胞外HBV DNA的情况下, 与用拉米夫定处理的对照相比, 用非常低浓度(0.1 μ g/mL)的hzVSF_var13处理时, HBV DNA的量显著降低(图32)。在细胞内HBV DNA的情况下, HBV DNA以hzVSF_var13的剂量依赖性方式被抑制, 并且与用拉米夫定处理的对照相比, hzVSF_var13治疗显示出显著优异的功效(图33)。

[0310] 结果证实, hzVSF的施用可以显著降低细胞内和细胞外HBV DNA的量, 因此hzVSF作为HBV治疗的治疗剂具有优异的活性。

[0311] 实施例16: 证实hzVSF抗丙型肝炎病毒的抗病毒效果

[0312] 实施例16-1: 证实hzVSF_wt对丙型肝炎病毒的抗病毒作用

[0313] 为了检查hzVSF_wt对人类丙型肝炎病毒(HCV)的影响, 如下进行实验。

[0314] 丙型肝炎病毒JFH-1株在0.1感染复数(MOI)的浓度感染到人类的肝细胞Huh7.5细胞, 并用干扰素 β 处理(3ng/mL)和在感染后第3天用hzVSF_wt(500、1000和2000单位)处理, 第4天收集细胞培养上清和细胞。通过FACS分析使用HCV NS5A的抗HCV NS5A抗体染色来测量细胞, 并通过实时定量PCR测量细胞培养上清液的HCV RNA滴度。

[0315] 结果, 在FACS分析中, hzVSF_wt(1000U/mL)处理显示出类似于干扰素- β 的抗HCV效应(图34)。另外, 当通过实时定量PCR测量病毒滴度时, hzVSF_wt在1000U/mL时显示出约50%的抗-HCV效果, 但是与干扰素- β 相比, 其效果显示更弱(图35)。

[0316] 然而, 虽然干扰素在体内实际上具有不利影响, 但是hzVSF不具有任何不利作用, 并且也期望治疗由于炎症的症状, 因此hzVSF将在实际应用中显示出显著的优异性。因此, 在病毒感染的早期阶段, 化学药物和干扰素的组合对于抑制病毒生长是必需的; 并且从病毒感染的中期或症状的出现, 化学试剂和hzVSF的组合对于不仅抑制免疫病理现象而且抑制病毒生长都是必需的。也就是说, 上述结果表明对具有优异的抗病毒生长抑制作用的化学药物(或干扰素)和hzVSF_wt及其各种变体的联合治疗具有优异的抑制免疫病理学现象的可能性。然而, 这些结果也表明单独应用本发明的hzVSF_wt及其各种变体作为抗病毒剂而没有副作用。

[0317] 实施例16-2: 证实hzVSF变体对丙型肝炎病毒(HCV 1a)的抗病毒作用

[0318] 然后, 为了检查hzVSF变体对人类丙型肝炎病毒(HCV)的作用, 如下所述, 使用hzVSF的代表性变体hzVSF_var13进行实验。

[0319] 首先, 为了证实针对HCV 1a中复制hzVSF变体的抑制作用, 感染用HCV TN细胞培养物(TNcc)(基因型1a)感染的Huh7.5细胞根据每个剂量用hzVSF_var13处理, 将细胞在第3天, 第6天, 第9天和第12天收集。然后, 在收集HCV感染的细胞后, 使用trizol提取总RNA。随后, 通过逆转录合成cDNA, 使用Accupower 2x greenstar qPCR Master混合物(Bioneer, 韩国)通过qPCR对HCV RNA和用于标准化的GAPDH(管家基因)进行定量分析。

[0320] 所使用的HCV-定向PCR引物为正向引物5'-GGGCTATAAGGTGCTAGTGC-3' (SEQ ID NO:157) 和反向引物5'-GGCTGCCAGTGGAATTGTT-3' (SEQ ID NO:158), 和GAPDH的PCR引物使用是正向引物5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3' (SEQ ID NO:159) 和反向引物5'-

GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3' (SEQ ID NO:160)。

[0321] 结果证明,当hzVSF_var13以0.1U/mL或更高的浓度处理时,HCV 1a RNA的含量随时间降低,并且还证实hzVSF_var13对HCV 1a复制的抑制作用呈剂量依赖性(图36A)。

[0322] 此外,当处理hzVSF_var13时,通过蛋白质印迹分析证实HCV核心蛋白的含量,结果证实蛋白质含量以剂量依赖性方式降低(图36B)。

[0323] 然后,检查hzVSF_var13与HCV药物相比的效果。根据剂量用hzVSF_var13和HCV药物(sofosbuvir和simeprevir)处理感染HCV TNcc(基因型1a)的Huh7.5细胞,并且每周回收感染HCV的细胞,并且使用trizol提取总RNA。然后,通过逆转录合成cDNA,使用Accupower 2x greenstar qPCR Master混合物(Bioneer,韩国),通过qPCR对HCV总RNA(使用SEQ ID NOS:157和158的引物)和用于标准化的GAPDH(管家基因)进行定量分析混合。

[0324] 结果证实,当hzVSF_var13以1μg/mL的浓度处理时,与对照药物相比,针对HCV 1a复制的抑制率显著更高(图37)。

[0325] 因此,向HCV TNcc(基因型1a)感染细胞施用hzVSF变体可减少HCV基因(RNA)和HCV核心蛋白,从而证实hzVSF变体具有抗HCV的抗病毒作用。

[0326] 实施例16-3:证实hzVSF变体对丙型肝炎病毒(HCV 1b)的抗病毒作用

[0327] 然后,为了证实hzVSF变体对HCV 1b复制的抑制作用,将表达HCV基因型1b的亚基因组复制子的Huh7细胞根据剂量用hzVSF_var13和HCV药物(sofosbuvir和simeprevir)处理,每周回收HCV感染的细胞,并使用trizol提取总RNA。然后,通过逆转录合成cDNA,使用Accupower 2x greenstar qPCR Master混合物(Bioneer,韩国),通过qPCR对HCV总RNA和用于标准化的GAPDH(管家基因)进行定量分析。

[0328] 使用的HCV靶向PCR引物是正向引物5'-ATGCAGCCCAAGGGTATAAG-3'(SEQ ID NO:161)和反向引物5'-GGTTCTGATGTTAGGGTCGATAC-3'(SEQ ID NO:162),并使用的GAPDH PCR引物是SEQ ID NO:159和160的引物。

[0329] 结果证实,hzVSF_var13处理以剂量依赖性方式抑制HCV 1b复制,特别是当hzVSF_var13以1μg/mL的浓度处理时,抑制与对照药物(sofosbuvir和simeprevir)的抑制水平类似(图38B)。另外,根据hzVSF_var13处理浓度,通过蛋白质印迹证实HCV NS5A的水平时,证实HCV NS5A的量以剂量依赖性方式下降(图38A)。

[0330] 因此,向HCV复制子(基因型1b)表达细胞施用hzVSF_var13减少了HCV基因(RNA)和HCV NS5A蛋白的量,从而证实hzVSF_var13具有抗HCV的抗病毒活性。

[0331] 实施例16-4:证实hzVSF变体对丙型肝炎病毒(HCV2a)的抗病毒作用

[0332] 然后,为了证实hzVSF变体对HCV2a复制的抑制效果,将HCV基因型2a感染的JFH-1细胞根据剂量用hzVSF_var13和HCV药物(sofosbuvir和simeprevir)处理,每周回收HCV感染的细胞,并使用trizol提取总RNA。然后,通过逆转录合成cDNA,随后使用Accupower 2x greenstar qPCR Master混合物(Bioneer,韩国),通过qPCR对HCV总RNA和用于标准化的GAPDH(管家基因)进行定量分析。所用的HCV靶向PCR引物是SEQ ID NO:157和158的引物,所用的GAPDH PCR引物是SEQ ID NO:159和160的引物。

[0333] 结果证实,当hzVSF_var13处理时,对于HCV2a复制的抑制作用与对照药物的抑制作用相似,在7周时间点的处理浓度没有显著差异(图39B)。另外,若长期观察上述结果即至多第21周,则可证实当hzVSF_var13以1μg/mL的浓度处理时,对HCV2a复制的抑制效果维持

在与用sofosbuvir和simeprevir治疗时相似的水平(图40)。

[0334] 总结上述结果,证实向HCV JFH-1(基因型2a)感染的细胞施用hzVSF_var13降低了HCV基因(RNA)和HCV核心蛋白的量(图39A),因此hzVSF_var13具有抗HCV的抗病毒活性。

[0335] 实施例17:证实hzVSF对流感病毒感染的治疗效果

[0336] 为了证实hzVSF的代表性变体hzVSF_var13针对流感病毒的抗病毒和抗炎作用,如下在小鼠中进行实验。

[0337] 将4周龄雌性Balb/c小鼠用H1N1甲型流感病毒/波多黎各/8/34病毒(1×10^5 pfu)感染鼻腔,并在感染后的第2、4或6天将25、100和400单位的hzVSF_var13施用于尾静脉。在病毒感染后的第7天和第9天,将小鼠处死。此后,通过H&E染色检查肺和身体,粘膜上皮细胞和纤毛的重量,并通过免疫组织化学染色检查免疫细胞的浸润。

[0338] 结果,与对照组相比,施用500U的hzVSF_var13的组表现出流感滴度降低至少100倍(图41)。

[0339] 此外,感染H1N1流感病毒的组显示免疫细胞浸润在肺泡囊中,而无论用药期限如何,施用100U和400U hzVSF_var13的组表现出类似于未感染组的肺组织(健康的肺)的流感病毒恢复症状。即使施用25U的hzVSF_var13也表现出抑制免疫细胞的浸润,虽然根据施用时期有所不同,因此显示25U的hzVSF_var13的施用具有治疗效果(图42)。

[0340] 此外,当观察小鼠肺的呼吸上皮细胞中的纤毛时,未感染组和用hzVSF_var13(400U)处理的组显示在肺中的气管上具有纤毛的上皮细胞,而上皮层显示为在病毒感染的肺中由于病毒感染而被破坏(图43)。

[0341] 另外,在测量小鼠的肺重量与体重的比例时,病毒感染组由于充满流体的肺的肺部症状而显示肺重量相对于体重的比例增加,而用hzVSF_var13处理的组显示出与一定程度的hzVSF_var13浓度成比例的肺重量相对于健康小鼠体重的比例下降(图44)。

[0342] 最后,通过使用CD4⁺ T细胞(图45和46)和巨噬细胞(图47和48)标志物的免疫组织化学方法证实了hzVSF_var13对免疫细胞浸润的抑制作用(特别是在图46和48中 10^7 pfu的感染)。当H1N1流感病毒感染后第7天(10^7 pfu)对小鼠肺进行染色时,观察到CD4⁺ T细胞和巨噬细胞的浸润,而用hzVSF_var13处理的组显示CD4⁺ T细胞浸润和巨噬细胞的显著降低(图45至48)。

[0343] 这些结果证实,本发明的hzVSF及其各种变体不仅对流感病毒具有优异的抗病毒效果,而且具有能够抑制免疫细胞浸润的抗炎作用,由此表明它们可以用作抗病毒药物和抗炎剂而没有副作用。

[0344] 实施例18:证实hzVSF抗各种病毒的抗病毒效果

[0345] 为了证实本发明的hzVSF_wt及其变体是否具有抗各种病毒的抗病毒作用,在体外和体内检查了hzVSF_wt和hzVSF_wt的代表性变体hzVSF_var13的作用。体外实验与抗病毒作用有关,体内实验与抗病毒和抗炎作用有关。

[0346] 结果如表15所示。

[0347] 表15

	病毒	抗病毒作用	
		体外	体内
[0348]	脑心肌炎病毒(EMCV)	+++	+++
	门戈病毒	+++	NT
	呼肠孤病毒	+	NT
	流感病毒	+	+++
	HIV	++	NT
	HCMV	+	NT
[0349]	小鼠肝炎病毒(MHV)	++	+++
	汉坦病毒	++	NT
	HBV	++	NT
	HCV	++	NT

[0350] *NT: 未测试

[0351] 结果表明, hzVSF在体外和体内均对脑心肌炎病毒 (EMCV) 具有优异的抗病毒和抗炎作用。hzVSF在体外对门戈病毒具有优异的抗病毒作用。hzVSF在体外也表现出对呼肠孤病毒的抗病毒作用。hzVSF在体外也表现出对HIV的抗病毒作用。hzVSF也显示对HCMV的抗病毒和抗炎作用。hzVSF在体外也显示出抗汉坦病毒的作用, 并显示出对乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的体外抗病毒作用。hzVSF还表现出对通过与小鼠中引起肝炎的小鼠肝炎病毒 (MHV) 的抗病毒和抗炎作用, 特别是在体内的抗病毒和抗炎作用。hzVSF在体外和体内均表现出对流感病毒的抗病毒和抗炎作用, 在体内效果更为显著。

[0352] 实施例19: 证实mVSF施用对小鼠模型中炎性细胞因子分泌的抑制作用

[0353] 为了证实mVSF对炎性细胞因子产生的影响, 用EMC-D病毒感染小鼠并施用mVSF, 并且在3天后, 通过ELISA测量血清中的炎性细胞因子的量。如表16所示, 病毒感染后炎性细胞因子如IL-6, TNF- α , IFN- γ 和MCP-1的水平增加; 然而, mVSF施用抑制这些炎性细胞因子的表达。

[0354] 表16

	样品	细胞因子(pg/mL): 病毒感染后 3 天测量				
		IL-12	IL-6	TNF- α	IFN- γ	CCL2 (MCP-1)
[0355]	正常	ND	2.9	4.6	1.3	13.8
	EMC-B	1.1	190.3	44.3	91.4	1752.7
	EMC-D	1.6	21.3	15.8	29.2	609.3
	EMC-D + VSF (1000 单位)	1.2	6.5	8.8	6.2	124.9

[0356] *ND: 未检测到

[0357] 以上结果证实, mVSF具有抑制由病毒感染引起的炎症的抗炎作用。

[0358] 另外, 为了证实mVSF对急性肝炎小鼠的炎症性细胞因子的产生的影响, 用小鼠肝炎病毒感染小鼠, 用VSF处理, 感染后的1或3天后, 通过ELISA测量血清中炎性细胞因子的量。如表17所示, 病毒感染后炎性细胞因子如IL-6, TNF- α , IFN- γ 和MCP-1的水平增加; 然而, VSF施用抑制了这些炎性细胞因子的表达。此外, IFN- α 单次联合施用显示出更显著的协

同效应。

[0359] 表17

[0360]

	细胞因子(pg/mL)						
	样品	IL-12	TNF- α	INF- γ	CCL2 (MCP-1)	IL-10	IL-6
感染后第1天	正常	ND	5.4	1.2	ND	ND	1.2
	病毒感染	14.2	40.0	166.2	1165.5	ND	205.6
	病毒+VSF	ND	8.4	1.9	16.9	ND	5.0
	病毒+IFN- α 一次+VSF	ND	9.1	1.6	13.0	ND	1.5
感染后第2天	正常	ND	2.1	ND	ND	ND	ND
	病毒感染	8.7	38.0	724.3	344.5	ND	13.7
	病毒+VSF	ND	32.4	74.5	129.9	ND	9.2
	病毒+IFN- α 一次+VSF	ND	4.0	20.3	13.9	ND	1.4

[0361] 以上结果证实,VSF也具有能够抑制由病毒感染引起的炎症的抗炎作用。

[0362] 实施例20:证实hzVSF在小鼠模型中抑制抗炎性细胞因子分泌的作用

[0363] 为了证实本发明的hzVSF是否能够抑制炎性细胞因子的分泌来进行炎性疾病的治疗,如下进行实验。

[0364] 收获流感病毒感染一天后感染H1N1 (Influenza A/PR8) 流感病毒 (1×10^5 pfu) 的小鼠的肺和施用hzVSF_var13 (500单位) 的小鼠的肺。将Greenberger溶解缓冲液 (GLB) 与肺匀浆,将所得物置于冰上30分钟,并在4℃以 $3,470 \times g$ 离心7分钟。收集上清后,于4℃以 $420 \times g$ 离心10分钟,以1:1:1的比例混合各自50 μ L的肺标本的上清液,捕获珠,PE检测试剂,并在室温下遮光反应2小时。反应后,将珠重悬于洗涤缓冲液中,使用FACS canto II测量样品,并收集数据。

[0365] 结果证实,存在于小鼠的肺中的属于促炎细胞因子的IL-6,TNF- α ,INF- γ 和CCL2 (MCP-1) 的量在流感病毒感染后的第7天显著增加。但是,证实了本发明的hzVSF_var13的处理显著抑制了小鼠肺中细胞因子的产生(图49)。

[0366] 即,表明本发明的hzVSF_var13能够抑制各种炎性细胞因子,因此能够用作治疗由病毒感染引起的各种炎性疾病的药剂。

[0367] 实施例21:在波形蛋白过表达细胞系(稳定的细胞系)中,EMC-D感染后hzVSF的作用的证实

[0368] 用波形蛋白(wt)或其中hzVSF-结合结构域被突变的波形蛋白(mt)转染不表达波形蛋白的MCF-7细胞,以制备波形蛋白(wt)过表达细胞系或波形蛋白(mt)过表达细胞系。然后,使用具有相似水平的波形蛋白表达的所选细胞进行MVIT测定。

[0369] 具体而言,每孔接种 2×10^4 个细胞,用EMC-D病毒(2MOI)感染细胞,并且其后2小时,用从256U开始并4倍连续稀释的浓度的hzVSF_var13处理,并且培养2天。然后,将培养的细胞用甲醇固定,用0.5%结晶紫染色,并风干用于观察。

[0370] 结果证实,在MCF-7亲本细胞,模拟物和波形蛋白(mt)中没有观察到hzVSF抗EMC-D病毒感染的作用,而能表达波形蛋白(wt)的MCF-7细胞通过病毒感染诱导波形蛋白的结构改变进入VSF受体(VR),由此证实了hzVSF的抗病毒作用(图50和51)。

[0371] 然后,另外进行WST测定以证实EMC-D感染的细胞毒性。

[0372] 在与MVIT测定相同的条件下培养波形蛋白(wt)细胞和波形蛋白(mt)细胞三天,用四唑鎓盐(WST-1)处理,再培养4小时,测量在450nm处的吸光度。测量后,去除上清,用甲醇固定细胞,用0.5%结晶紫染色20分钟,然后风干。将染色的细胞溶解在甲醇中,测量在540nm处的吸光度。

[0373] 结果证实,在MCF-7亲本细胞,模拟物和波形蛋白(mt)中没有观察到hzVSF抗EMC-D病毒感染的作用,而能表达波形蛋白(wt)的MCF-7细胞通过病毒感染诱导波形蛋白的结构改变进入VSF受体(VR),由此证实了hzVSF的抗病毒作用(图52)。

[0374] 然后,在波形蛋白过表达细胞系(稳定细胞系)中检查了EMC-D感染后VSF受体(VR)的表达特征。就此而言,用EMC-D(5MOI)感染每种稳定的MCF-7细胞,即波形蛋白(wt)和波形蛋白(mt)细胞9小时,然后用hzVSF_var13对细胞进行免疫染色。然后将细胞固定并透化,将以1:250之比稀释的hzVSF_var13与细胞反应。然后,使细胞与作为二抗的FITC缀合的山羊人IgG反应,并在荧光显微镜下($500 \times$ 放大倍数)检查细胞中hzVSF的VSF受体(VR)的表达。

[0375] 结果,如图55中所示,证实了hzVSF_var13不与其中模拟物和hzVSF结合结构域发生突变的表达波形蛋白的细胞结合,但是通过病毒感染在野生型波形蛋白表达细胞中表达VR(图53)。

[0376] 实施例22:用在大肠杆菌中纯化的VR WT和VR MT证实结合VSF

[0377] 通过Ni-NTA系统纯化的波形蛋白重组蛋白(5mg)和hzVSF_var13以2:1的摩尔比混合并用磷酸盐缓冲盐水(PBS)填充至700mL的终体积,并在定轨摇床4℃孵育3小时。然后,向其中加入Protein A珠(50%浆液),在4℃孵育1小时,并将Protein A-hzVSF-VR复合物在4℃以 $3,000 \times g$ 离心3分钟。然后,去除上清,用PBS洗涤珠,再次在4℃以 $3,000 \times g$ 离心3分钟,并且重复该过程3次。随后,向其中加入 $2 \times$ SDS-样品缓冲液,煮沸5分钟以进行SDS-PAGE和蛋白质印迹分析。

[0378] 结果证实,波形蛋白的6个氨基酸残基Y150、R186、Q195、R217、K235和R270被分别置换突变为F、K、N、K、R和K,显示蛋白质与hzVSF结合的明显降低(图54)。因此,证实了hzVSF能够与波形蛋白的Y150、R186、Q195、R217、K235和R270结合。

[0379] 实施例23:证实在HEK293T细胞中过度表达的VR与VSF之间的结合

[0380] 用波形蛋白WT或波形蛋白MT转染HEK293T细胞以检查它们与hzVSF_v13的结合。

[0381] 具体而言,将HEK293T细胞(2×10^6)接种到100mm培养皿中,用波形蛋白WT(野生型)和MT(突变型)DNA(载体:pcDNA3.1mycHisC)转染,并孵育48小时。然后,收获细胞,用1% CHAPS裂解缓冲液(1mL)处理,并置于冰上20分钟以裂解细胞。将裂解的细胞在4℃下以13,000rpm离心15分钟,然后将上清液转移至新管中。

[0382] 用含50%浆液的Protein A珠处理上清液(700mg)中的蛋白质,并使其在4℃预澄

清1小时。然后,将所得物在4℃下以3,000×g离心3分钟,并将上清液转移至新管中。以1:100的比例用hzVSF_var13处理所得物,并在4℃下孵育过夜以允许VSF和VR之间的结合。然后,向其中加入含有50%浆液的Protein A珠,并在4℃下反应1小时。结果获得Protein A-VSF-VR复合物,并且洗涤珠,以3,000×g,4℃离心3分钟,并去除上清液。随后,通过向其中加入1%CHAPS裂解缓冲液将沉淀的复合物洗涤3次。所得物用2×SDS-样品缓冲液处理,并煮沸以进行SDS-PAGE和免疫印迹分析。

[0383] 结果证实,波形蛋白的6个氨基酸Y150、R186、Q195、R217、K235和R270被分别置换突变为F、K、N、K、R和K,显示蛋白质与hzVSF结合的明显降低(图55)。因此,证实了hzVSF能够与波形蛋白的Y150、R186、Q195、R217、K235和R270结合。

[0384] 泳道中与野生型VSF的弱结合,其中6个氨基酸残基被突变置换,推测归因于HEK293T细胞内源性的野生型波形蛋白的二聚化和四聚化和过表达的突变体波形蛋白。

[0385] 除了上述结果之外,使用计算机程序检查了波形蛋白-VSF结合模型(图56至58)。下面显示了用于分析的具体程序。

[0386] VR二聚体建模:Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0

[0387] (组件软件模板检测:HHpred 1.51

[0388] 二级结构预测:Psi-pred 2.5

[0389] 障碍预测:Disopred 2.4

[0390] 跨膜预测:Memsat_SVM

[0391] 多模板建模和从头计算:Poing 1.0

[0392] 结构重新定向以方便查看:OVOP)

[0393] VR二聚体和VSF的复杂建模:Pymol

[0394] VR二聚体和化学的复杂建模:autodock vina

[0395] 通过VR二聚体模型推断VR和hzVSF结合在一起的结构,结果证实hzVSF与残基Y150、R186、Q195、R217、K235和R270的结合。

[0396] 上述结果表明,本发明的与SEQ ID NO:1的肽特异性结合的抗体或与肽特异性结合的结合肽的片段能够展现抗广谱病毒性疾病的范围的抗病毒和抗炎作用。与现有的抗病毒剂如干扰素或化学治疗剂不同,它们能够选择性地施加于感染病毒的细胞而没有任何副作用,治疗只需要少的量,并且通过抑制免疫细胞的浸润而具有抗炎活性,从而表明它们能够用作治疗各种病毒性疾病的药剂。

[0397] 从以上,本发明所属领域的技术人员将能够理解,本发明可以其他具体形式来实施,而不改变本发明的技术概念或本质特征。就这一点而言,这里公开的示例性实施方案仅用于说明的目的,而不应被解释为限制本发明的范围。相反,本发明旨在不仅覆盖示例性实施方案,而且覆盖可包括在由所附权利要求书限定的本发明的精神和范围内的各种替换,修改,等同物和其他实施方案。

<110> 疫免医学有限公司
 <120> 特异性结合衍生自波形蛋白的肽的抗体或片段
 <130> OPA16118-PCT
 <150> KR10-2015-0082132
 <151> 2015-06-10
 <150> PCT/KR 2015/005917
 <151> 2015-06-12
 <160> 162
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 分离的波形蛋白片段 (142-294)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR1

<400> 2

Gly Tyr Asn Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR2

<400> 3

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR3

<400> 4

Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR1

<400> 5

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR2

<400> 6

Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR3

<400> 7

Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 8

<211> 169

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF_VL

<400> 8

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Asn Glu Asp Ser Thr Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu His Ser Val

20 25 30

Leu Leu Gly Leu Asn Glu Asn Ser Leu Val Arg Glu Leu Ile Met Trp

35 40 45

Val Ser Val Phe Asn Phe Pro Ile Val Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln

50 55 60

Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val

65 70 75 80

Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp

85 90 95

Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala

100 105 110

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

115 120 125

Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe

130 135 140

Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg Thr Phe Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 165

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF_VH

<400> 9

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

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_WT

<400> 10

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

35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr	Gly Ser Thr Thr Tyr	Ala Gln Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr	Val Asp Lys Ser Ile Ser	Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg	Ser Asp Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg	Ala Met Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 11		
<211> 445		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> H ₂ VSF_HC_WT - H ₂ VSF hVH.hCgamma4_WT		
<400> 11		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly	Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly	Ala
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys	Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	Thr Gly Tyr
20	25	30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly Leu	Glu Trp Met
35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr	Gly Ser Thr Thr Tyr	Ala Gln Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr	Val Asp Lys Ser Ile Ser	Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg	Ser Asp Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg	Ala Met Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser	Thr Ser Glu Ser Thr Ala	Ala Leu Gly
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr Val	Ser Trp Asn
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln

				165						170					175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				180						185					190
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
				195						200					205
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
				210						215					220
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225						230				235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245						250					255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260						265					270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				275						280					285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
				290						295					300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305						310				315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325						330					335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
				340						345					350
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				355						360					365
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				370						375					380
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385						390				395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				405						410					415
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				420						425					430
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
				435						440					445

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_WT

<400> 12

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

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_WT

<400> 13

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

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

210

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR2

<400> 14

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln			
1	5	10	15

Gly

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的CDR3

<400> 15

Glu Thr Gly Asn Arg Ala Met Asp	
1	5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR2

<400> 16

Val Ala Asp Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR2

<400> 17

Val Ala Asp Asn Leu Gly Asp

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR2

<400> 18

Val Ala Asp Asn Arg Gly Asp

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的CDR3

<400> 19

Gln His Phe Tyr Gly Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的FR1

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

	20	25	30
<210> 21			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重链的FR2			
<400> 21			
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly			
1	5	10	
<210> 22			
<211> 32			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重链的FR3			
<400> 22			
Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu			
1	5	10	15
Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
	20	25	30
<210> 23			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 重链的FR4			
<400> 23			
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
1	5	10	
<210> 24			
<211> 23			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 轻链的FR1			
<400> 24			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的FR2

<400> 25

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

1 5 10 15

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的FR3

<400> 26

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链的FR4

<400> 27

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的FR3

<400> 28

Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1	5	10	15
Leu Ser Arg	Leu Arg Ser Asp Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg
20	25	30	
<210> 29			
<211> 445			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HzVSF_a1_gamma4			
<400> 29			
Glu Ile Gln	Leu Val Gln Ser Gly	Ala Glu Val Lys Lys	Pro Gly Ala
1	5	10	15
Ser Val Lys	Val Ser Cys Lys Ala	Ser Gly Tyr Thr Phe	Thr Gly Tyr
20	25	30	
Asn Met Asn	Trp Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Met
35	40	45	
Gly Asn Ile	Asp Pro Tyr Tyr	Gly Ser Thr Thr	Tyr Ala Gln Lys Phe
50	55	60	
Gln Gly Arg	Val Thr Met Thr	Val Asp Lys Ser	Ile Ser Thr Ala Tyr
65	70	75	80
Met Glu Leu	Ser Arg Leu Arg	Ser Asp Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys
85	90	95	
Ala Arg Glu	Thr Gly Thr Arg	Ala Met Asp Tyr	Trp Gly Gln Gly Thr
100	105	110	
Leu Val Thr	Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly	Pro Ser Val Phe Pro
115	120	125	
Leu Ala Pro	Cys Ser Arg Ser	Thr Ser Glu Ser	Thr Ala Ala Leu Gly
130	135	140	
Cys Leu Val	Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val	Thr Val Ser Trp Asn
145	150	155	160
Ser Gly Ala	Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe	Pro Ala Val Leu Gln
165	170	175	
Ser Ser Gly	Leu Tyr Ser Leu	Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser
180	185	190	
Ser Leu Gly	Thr Lys Thr Tyr	Thr Cys Asn Val	Asp His Lys Pro Ser
195	200	205	
Asn Thr Lys	Val Asp Lys Arg	Val Glu Ser Lys	Tyr Gly Pro Pro Cys
210	215	220	
Pro Ser Cys	Pro Ala Pro Glu	Phe Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu

225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
	290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
	340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
	355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
	370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
	420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	445
<210> 30			
<211> 445			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HzVSF_a2_gamma4			
<400> 30			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
	20	25	30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			

35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr	Gly Ser Thr Thr Tyr	Ala Gln Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr	Val Asp Lys Ser Ile Ser	Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg	Ser Asp Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg	Ala Met Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser	Thr Ser Glu Ser Thr Ala	Ala Leu Gly
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr Val	Ser Trp Asn
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe Pro Ala	Val Leu Gln
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	Ser Ser Val Val Thr Val	Pro Ser Ser
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr	Thr Cys Asn Val Asp His	Lys Pro Ser
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg	Val Glu Ser Lys Tyr Gly	Pro Pro Cys
210	215	220
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu	Phe Leu Gly Gly Pro Ser	Val Phe Leu
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	Thr Leu Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp	Val Ser Gln Glu Asp Pro	Glu Val Gln
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly	Val Glu Val His Asn Ala	Lys Thr Lys
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn	Ser Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro	Ser Ser Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser
340	345	350

Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
355				360				365							
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
370				375				380							
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385				390				395				400			
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
405				410				415							
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
420				425				430							
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
435				440				445							

<210> 31
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HzVSF_a3_gamma4
 <400> 31

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

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V1

<400> 32

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

<210> 33

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V1

<400> 33

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

Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		

<400> 35

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

Tyr Val Ala Asp Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V2

<400> 36

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 37
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> HzVSF_HC_V2
 <400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys			
210	215	220	
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
325	330	335	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
340	345	350	
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
355	360	365	
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
370	375	380	
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
405	410	415	
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
420	425	430	
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
435	440	445	
<210> 38			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HzVSF_VL_V2			
<400> 38			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15

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

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V2

<400> 39

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

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 40

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V3

<400> 40

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

<210> 41

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V3

<400> 41

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

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys			
210	215	220	
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
260	265	270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
290	295	300	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320

Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
				340					345					350	
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				355					360					365	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				370										380	
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385						390					395				400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
						405				410					415
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
						420								430	
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
				435				440						445	

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V3

<400> 42

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

<210> 43

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V3

<400> 43

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Val Ala Asp Asn Arg Gly Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
          145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V4

<400> 44

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

<210> 45

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V4

<400> 45

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

115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V4

<400> 46

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

<210> 47

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V4

<400> 47

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

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Thr Pro Arg			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
	130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			
<210> 48			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HzVSF_VH_V5			
<400> 48			
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
	20	25	30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Tyr Ala Gln Lys Phe			
	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 49		
<211> 445		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HzVSF_HC_V5		
<400> 49		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		
20 25 30		
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Tyr Ala Gln Lys Phe		
50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100 105 110		
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115 120 125		
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130 135 140		
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145 150 155 160		
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165 170 175		
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180 185 190		
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195 200 205		
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210 215 220		
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		

225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu			
	245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln			
	260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
	275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu			
	290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys			
305	310	315	320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys			
	325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser			
	340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
	355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln			
	370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
	420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	445
<210> 50			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> HzVSF_VL_V5			
<400> 50			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			

35	40	45
Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 51		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HzVSF_LC_V5		
<400> 51		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		

	180		185		190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
195		200		205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
210					
<210> 52					
<211> 118					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> HzVSF_VH_V6					
<400> 52					
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5	10	15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr					
20	25	30			
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met					
35	40	45			
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe					
50	55	60			
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr					
65	70	75	80		
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
85	90	95			
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr					
100	105	110			
Leu Val Thr Val Ser Ser					
115					
<210> 53					
<211> 445					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> HzVSF_HC_V6					
<400> 53					
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
1	5	10	15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr					
20	25	30			

Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
35				40				45							
Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
50				55				60							
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65				70				75				80			
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Thr	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100				105				110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
				115				120				125			
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
130				135				140							
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145				150				155				160			
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165				170				175			
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				180				185				190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
195				200				205							
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
210				215				220							
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225				230				235				240			
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245				250				255			
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260				265				270			
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
275				280				285							
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
290				295				300							
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305				310				315				320			
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325				330				335			
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser

340							345							350													
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys												
355							360							365													
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln												
370							375							380													
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly												
385							390							395							400						
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln												
405							410							415													
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn												
420							425							430													
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys															
435							440							445													

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

⟨223⟩ HzVSF VL V6

<400> 54

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

⟨210⟩ 55

214

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> HzVSF_LC_V6

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V7

<400> 56

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

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

<210> 57

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V7

<400> 57

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

Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
			165					170						175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
		210				215						220			
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225				230						235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			245						250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
		275					280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
		290				295					300				
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305				310						315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
			325						330					335	
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340					345					350		
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
		355					360					365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
		370				375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385				390						395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			405						410					415	
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			420					425					430		
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
		435				440						445			

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V7

<400> 58

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

<210> 59

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V7

<400> 59

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

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
100					105					110						
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
115					120					125						
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
130					135					140						
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
145					150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
165					170					175						
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
180					185					190						
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
195					200					205						
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
210																
<210> 60																
<211> 118																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> HzVSF_VH_V8																
<400> 60																
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1		5				10				15						
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	
20					25					30						
Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
35					40					45						
Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Asp	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
50					55					60						
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65		70				75				80						
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
85					90					95						
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
100					105					110						
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
115																

<210> 61

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V8

<400> 61

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25						30	
Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40						45	
Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Asp	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
			50				55							60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
				100						105					110
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
				115						120					125
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
				130											140
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150						155				160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165							170				175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				180							185				190
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
				195							200				205
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
				210											220
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230						235				240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245											255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445

<210> 62

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V8

<400> 62

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V9

<400> 64

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 65

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V9

<400> 65

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 66

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V9

<400> 66

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

<210> 67

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V9

<400> 67

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

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Arg	Ala Ser Glu Asn	Ile Tyr Ser Asn
20	25	30	
Leu Ala Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Lys Ala Pro	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr Val Ala Asp	Asn Arg Gly Asp	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser	Ser Ser Leu Gln Pro
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala	Thr Tyr Tyr Cys	Gln His Phe Tyr	Gly Ser Pro Arg
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Arg	Thr Val Ala Ala
100	105	110	
Pro Ser Val Phe	Ile Phe Pro Pro	Ser Asp Glu Gln	Leu Lys Ser Gly
115	120	125	
Thr Ala Ser Val	Val Cys Leu Leu	Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala
130	135	140	
Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn	Ala Leu Gln Ser	Gly Asn Ser Gln
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser	Lys Asp Ser Thr	Tyr Ser Leu Ser
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys	His Lys Val Tyr
180	185	190	
Ala Cys Glu Val	Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro	Val Thr Lys Ser
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly	Glu Cys		
210			
<210>	68		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	HzVSF_VH_V10		
<400>	68		
Glu Val Gln Leu	Val Gln Ser Gly	Ala Glu Val Lys	Lys Pro Gly Ala
1	5	10	15
Ser Val Lys Val	Ser Cys Lys Ala	Ser Gly Tyr Thr	Phe Thr Gly Tyr
20	25	30	
Asn Met Asn Trp	Val Arg Gln Ala	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Met

35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr	Gly Ser Asp Thr Tyr	Ala Gln Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr	Val Asp Thr Ser Ala Ser	Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg	Ser Asp Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Asn Arg	Ala Met Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 69		
<211> 445		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HzVSF_HC_V10		
<400> 69		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly	Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly	Ala
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys	Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	Thr Gly Tyr
20	25	30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln	Ala Pro Gly Lys Gly Leu	Glu Trp Met
35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr	Gly Ser Asp Thr Tyr	Ala Gln Lys Phe
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr	Val Asp Thr Ser Ala Ser	Thr Ala Tyr
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg	Ser Asp Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Asn Arg	Ala Met Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser	Ala Ser Thr Lys Gly Pro	Ser Val Phe Pro
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser	Thr Ser Glu Ser Thr	Ala Ala Leu Gly
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser	Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val Leu Gln

				165						170					175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				180						185					190
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
				195						200					205
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
				210						215					220
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225						230				235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245						250					255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260						265					270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
				275						280					285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
				290						295					300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305						310				315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325						330					335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
				340						345					350
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				355						360					365
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
				370						375					380
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385						390				395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
				405						410					415
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				420						425					430
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
				435						440					445

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V10

<400> 70

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

<210> 71

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V10

<400> 71

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

115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		
<210> 72		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HzVSF_VH_V11		
<400> 72		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr		
20	25	30
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Asp Thr Tyr Ala Gln Lys Phe		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 73		
<211> 445		
<212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V11

<400> 73

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
			20					25						30	
Asn	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40						45		
Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Asp	Thr	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55				60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90						95
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Thr	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105						110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
			115					120						125	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
			130				135					140			
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165						170				175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
			195				200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
			210				215					220			
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225					230					235					240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys

275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
385	390	395
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 74		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> HzVSF_VL_V11		
<400> 74		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Val Ala Asp Asn Arg Gly Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Thr Pro Arg		

				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
				100				105							
<210> 75															
<211> 214															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> HzVSF_LC_V11															
<400> 75															
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45		
Tyr	Val	Ala	Asp	Asn	Arg	Gly	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50					55					60		
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Tyr	Gly	Thr	Pro	Arg
				85					90						95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100				105						110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			115					120					125		
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
			130					135					140		
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180						185					190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
			195					200						205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
			210												
<210> 76															

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V12

<400> 76

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

<210> 77

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_HC_V12

<400> 77

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

Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Glu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					100				105					110	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
					115				120					125	
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
							130						135		140
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145							150							155	160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
							165							170	175
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
							180							185	190
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
							195							200	205
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
							210							215	220
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225							230							235	240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
							245							250	255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
							260							265	270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
							275							280	285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
							290							295	300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305							310							315	320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
							325							330	335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
							340							345	350
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
							355							360	365
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
							370							375	380
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly

385	390	395	400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	405	410	415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
	420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	435	440	445

<210> 78

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V12

<400> 78

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

<210> 79

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V12

<400> 79

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Asp Asn Arg Gly Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr Gly Thr Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 80

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VH_V13

<400> 80

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

Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
195								200					205		
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
210							215					220			
Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225						230					235				240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
						245				250					255
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
						260				265					270
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
						275				280					285
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
						290				295					300
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305						310					315				320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
						325					330				335
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
						340					345				350
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
						355						360			365
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
						370						375			380
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385						390					395				400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
						405					410				415
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
						420					425				430
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
						435					440				445

<210> 82

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_VL_V13

<400> 82

```

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

```

<210> 83

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_LC_V13

<400> 83

```

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

```

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tactacctat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240

atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggctctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agacagttga gcgcaaattgt 660
 tgtgtcgagt gcccaccgtg cccagcacca cctgtggcag gaccgtcagt ctctctcttc 720
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgate tcccggaccc ctgaggtcac gtgctgggtg 780
 gtggacgtga gccacgaaga ccccagggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag gagcagttca acagcacgtt ccgtgtgggtc 900
 agcgtcctca ccgtcgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggctc 960
 tccaacaaag gcctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc 1020
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggctc 1080
 agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaacacc acacctccca tgctggactc cgacggctcc 1200
 ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320
 tctccgggta aatga 1335

<210> 86

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hVH.hCgamma4

<400> 86

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcett actatggtag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gccatcatg cccagcacct gaggttctgg ggggaccatc agtcttctctg 720
 ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780

gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggettc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 87

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF a1 gamma4

<400> 87

gagatccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catccgtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg 720
 ttccccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgctgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggettc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320

ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 88

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF a2 gamma4

<400> 88

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gattggaaat attgatectt actatggtag tactacctat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catccgtctt ccccttggeg ccctgtctca ggagcacctc cgagagcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgg gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
gggtccccat gcccatcatg cccagcacct gaggttcctgg ggggaccatc agtcttctctg 720
ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcag gtaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa ggcctctcc 1320
ctgtctctgg gtaaatga 1338

```

<210> 89

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF a3 gamma4

<400> 89

```

gagatccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

```

tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gattggaaat attgatcctt actatggtag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccct gcccatcatg cccagcacct gaggttcttg ggggaccatc agtcttctctg 720
 ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gaggcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaata 1338

<210> 90

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LC1

<400> 90

gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagtcct gatctatgtt gcagacaact tagcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatggtt ctctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat ctcccccca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 91

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> LC4

<400> 91

gacatccaga tgacccagtc tccatectec ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatggta cccctcggac gtteggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 92

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH1

<400> 92

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcett actatggtag tgatacctat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 93

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VH4

<400> 93

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgacctt actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggaataggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 94

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V1_HC

<400> 94

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgacctt actatggtag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cgggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggttc taccacagc acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtctct cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 95

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V1_LC

<400> 95

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaact tagcagatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctccctcgac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645
```

<210> 96

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V2_HC

<400> 96

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tactacctat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
ggtcccccac gcccatcatg cccagcacct gaggctctgg ggggaccatc agtcttctctg 720
ttcccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
```

ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa ggcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 97

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V2_LC

<400> 97

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaact taggagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 98

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V3_HC

<400> 98

gaggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggctc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaaat attgatcctt actatggtag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcacatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgtcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacagggtga caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 99

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V3_LC

<400> 99

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatggt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 100

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V4_HC

<400> 100

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccatcatg cccagcacct gatttcttg ggggaccatc agtcttcttg 720
 ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa ggcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaata 1338

<210> 101

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V4_LC

<400> 101

gacatccaga tgaccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagtcctt gatctatgtt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatggta cccctcggac gtteggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat ctcccccca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 102

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V5_HC

<400> 102

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatectt actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt ccccttggcg ccctgtctca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cgggtgacgg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggc gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg 720
 ttccccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 103

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V5_LC

<400> 103

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatggt gcaacaaact tagcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctccctcgac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 104

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V6_HC

<400> 104

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcttgata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagt gatgggaaat attgatcctt actatggttag tactacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctacagcttc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccttgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctacaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttccccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gaggctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaata 1338

<210> 105

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V6_LC

<400> 105

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcaacaaact tagcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgcc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 106

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V7_HC

<400> 106

gaggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgacett actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cwtccsmag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctggggtcaa ggaacctgg tcaccgtctc ctacgttcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgg gtctgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tcctacagtc ctacgactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660

ggtcccccat gcccatcatg ccacgacacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttccccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagtcca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc taccacgagc acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tcctttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 107

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V7_LC

<400> 107

gacatccaga tgaccacgac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatctac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcaacaaact tagcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 108

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V8_HC

<400> 108

gaggtgcagc tgggtgcagc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120

cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggaataggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccttgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gccatcatg ccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttccccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctcttg gtaaata 1338

<210> 109

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V8_LC

<400> 109

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcaacaaact tagcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 ccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 110

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V9_HC

<400> 110

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatectt actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccac gcccatcatg cccagcacct gaggttcctg ggggaccatc agtcttctctg 720
 ttccccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacagggtga caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacgagc acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gaggcctctc 1320
 ctgtctcttg gtaaatga 1338

<210> 111

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V9_LC

<400> 111

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctccctcgac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcga 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 112

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V10_HC

<400> 112

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
 gggaataggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccacatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
 ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 113

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V10_LC

<400> 113

```

gacatccaga tgacccagtc tccatectcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctctcggac gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgtacgggt gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645

```

<210> 114

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V11_HC

<400> 114

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tgatacctat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gccgccctgg gctgcctgggt caaggactac ttccccgaac cgggtgacgggt gtcgtggaac 480
tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtgggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
gggtccccat gcccatcatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctctg 720
ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840

```

gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacagggtga caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tcctttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa ggcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 115

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V11_LC

<400> 115

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatggta cccctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 116

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V12_HC

<400> 116

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggte 60
 tcttgcaagg cttctggata caccctcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgacctt actatggtag tgatacctat 180
 gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca cttccgcaag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300

gggaataggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaaccctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
 accaaggggcc catccgtctt cccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
 tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
 ggtcccccat gcccacatg cccagcacct gagttcctgg ggggaccatc agtcttctg 720
 ttccccccaa aacccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgctg 780
 gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
 gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
 ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccctcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggttc taccacagc acatcgccgt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctctgg gtaaatga 1338

<210> 117

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V12_LC

<400> 117

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagcaagtga gaatatctac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagtcct gatctatgtt gcagacaacc gcggagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactetca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacat ttttatggta cccctcggac gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgtacggg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 118

<211> 1338

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V13_HC

<400> 118

```

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctacaaca tgaactgggt gcgacaggct 120
cctggaaaag ggcttgagtg gatgggaaat attgatcctt actatggtag tgatacctat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgtagaca aatccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagagact 300
gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctgg tcaccgtctc ctcagcttcc 360
accaagggcc catccgtctt cccctggcg cctgtctcca ggagcacctc cgagagcaca 420
gccgccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcacgaa gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gtccaaatat 660
gggtccccat gcccatcatg cccagcacct gaggttcctgg ggggaccatc agtcttcctg 720
ttcccccaa aaccaagga cactctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 780
gtgggtggacg tgagccagga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 960
gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagagc cacagggtga caccctgccc ccatcccagg aggagatgac caagaaccag 1080
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tccttcttcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga ggggaatgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 1320
ctgtctctgg gtaaatga 1338

```

<210> 119

<211> 645

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF_V13_LC

<400> 119

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagcaagtga gaatatctac agtaatttag catggtatca gcagaaacca 120
gggaaagctc ctaagctcct gatctatgtt gcagacaact tagcagatgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagatcttg caacttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctcctcggac gttcggcgga 300

```

gggaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccccca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 120

<211> 1417

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF V12_HC_最优化

<400> 120

aagcttgccg ccacatgga atggtcctgg gtgttctgt tcttctgtc cgtgaccacc 60
 ggcgtgcact ccgaagtga gctggtgcag tctggcgccg aagtgaagaa acctggcgcc 120
 tccgtgaagg tgcctgcaa ggcttccggc tacaccttta ccggctacaa catgaactgg 180
 gtgcgacagg cccctggcaa gggcctggaa tggatgggca acatcgacc ctactacggc 240
 tccgacacct acgcccagaa attccagggc agagtacca tgaccgtgga cacctctgcc 300
 tccaccgcct acatggaact gtcccggctg agatccgacg acaccgccgt gtactactgc 360
 gccagagaga caggcaaccg ggccatggat tattggggcc agggcaccct cgtgaccgtg 420
 tctagcgctt ctaccaaggg cccctccgtg ttccctctgg ccccttgctc cagatccacc 480
 tccgagtcta ccgccgtctt gggctgcctc gtgaaggact acttccccga gcccgtgaca 540
 gtgtcctgga actctggcgc tctgacctct ggctgcaca ccttccctgc tgtgtgcag 600
 tcctccggcc tgtactccct gtcctccgtc gtgactgtgc cctccagctc tctgggcacc 660
 aagacctaca cctgtaacgt ggaccacaag ccctccaaca ccaaggtgga caagcgggtg 720
 gaatctaagt acggccctcc ctgccctagc tgccctgccc ctgagtttct gggaggccct 780
 tctgtgtttc tgttcccccc aaagcccaag gacacctga tgatctcccg gacccccgaa 840
 gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtcccag gaagatcccc aggtgcagtt caattggtac 900
 gtggacggcg tggaagtga caacgccaag accaagccta gagaggaaca gttcaactcc 960
 acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag 1020
 tacaagtga aggtgtccaa caagggactg cccagctcca tcgaaaagac catctccaag 1080
 gccaaaggcc agccccggga accccaggtg tacacactgc ctccaagcca ggaagagatg 1140
 accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaaagget tctaccctc cgatatcgcc 1200
 gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1260
 gactccgacg gtccttctt tctgtactct cggctgacag tggacaagtc ccggtggcag 1320
 gaaggcaacg tgttctcctg cagcgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1380
 aagtcctgt ccctgtctct gggaaagtga tgaattc 1417

<210> 121

<211> 727

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF V12_LC_最优化

<400> 121

```

aagcttgccg ccaccatgtc cgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
accgacgcca gatgcgacat ccagatgacc cagtccccct ccagcctgtc tgcttccgtg 120
ggcgacagag tgaccatcac ctgtcgggcc tccgagaaca tctactccaa cctggcctgg 180
tatcagcaga agccccgcaa ggcccccaag ctgctgatct acgtggccga caatagaggc 240
gacggcgtgc cctccagatt ctccggtctt ggctctggca ccgactttac cctgaccatc 300
agctccctgc agccccgagga cttcgccacc tactactgcc agcacttcta cggcaccccc 360
cggacatttg gcggaggcac caaggtggaa atcaagcgga ccgtggccgc tccttccgtg 420
ttcatcttcc caccttccga cgagcagctg aagtccggca ccgttctgtg cgtgtgcctg 480
ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540
tccggcaact cccaggaatc cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 600
tcctccaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaagtgta cgcctgcgaa 660
gtgaccaccc agggcctgtc tagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg cgagtgtga 720
tgaattc 727

```

<210> 122

<211> 1417

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF V13_HC_最优化

<400> 122

```

aagcttgccg ccaccatgga atggctcctgg gtgttcctgt tcttcctgtc cgtgaccacc 60
ggcgtgcact ccgaagtgcg gctgggtgcag tctggcgccc aagtgaagaa acctggcgcc 120
tccgtgaagg tgcctgcaa ggcttccggc tacaccttta ccggctacaa catgaactgg 180
gtgcgacagg cccctggcaa gggcctggaa tggatgggca acatcgaccc ctactacggc 240
tccgacacct acgcccagaa attccagggc agagtgacca tgaccgtgga caagtccatc 300
tccaccgcct acatggaact gtcccggctg agatccgacg acaccgccgt gtactactgc 360
gccagagaga caggcacccc ggccatggat tattggggcc agggcacccct cgtgaccgtg 420
tcctctgctt ctaccaaggg cccctccgtg ttccctctgg ccccttgctc cagatccacc 480
tccgagtcta ccgcccgtct gggtgcctc gtgaaggact acttccccga gcccgtagca 540
gtgtcttgga actctggcgc cctgacctct ggctgcaca cctttccagc tgtgtgcag 600
tcctccggcc tgtactccct gtccctccgtc gtgactgtgc cctccagctc tctgggcacc 660
aagacctaca cctgtaacgt ggaccacaag ccctccaaca ccaagtgga caagcgggtg 720
gaatctaagt acggccctcc ctgccctagc tgccctgccc ctgagtttct gggaggccct 780
tctgtgtttc tgttcccccc aaagcccaag gacaccctga tgatctcccg gacccccgaa 840

```

gtgacctgcg tgggtggtgga tgtgtcccag gaagatcccg aggtgcagtt caattggtac 900
 gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccta gagaggaaca gttcaactcc 960
 acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaagag 1020
 tacaagtgca aggtgtccaa caagggactg cccagctcca tcgaaaagac catctccaag 1080
 gccaaagggcc agccccggga accccaggtg tacacactgc ctccaagcca ggaagagatg 1140
 accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaaaggct tctaccctc cgatatcgcc 1200
 gtggaatggg agtccaacgg ccagcctgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt tctgtactct cggtgacag tggataagtc ccggtggcag 1320
 gaaggcaacg tgttctcctg cagcgtgatg cagcaggccc tgcacaacca ctacaccag 1380
 aagtcctgt ccctgtctct gggaaagtga tgaattc 1417

<210> 123

<211> 727

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HzVSF V13_LC_最优化

<400> 123

aagcttgccg ccacatgtc cgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60
 accgacgcca gatgcgacat ccagatgacc cagtccccct ccagcctgtc tgcttccgtg 120
 ggcgacagag tgacatcac ctgtcgggcc tccgagaaca tctactccaa cctggcctgg 180
 tatcagcaga agccccgcaa ggcccccaag ctgctgatct acgtggccga taacctggcc 240
 gacggcgtgc cctctagatt ctccggtctt ggctctggca ccgactttac cctgaccatc 300
 agctccctgc agccccgagga cttcgccacc tactactgcc agcacttcta cggctccccc 360
 cggacatttg gcggaggcac caaggtggaa atcaagcgga ccgtggccgc tccctccgtg 420
 ttcatcttcc caccttccga cgagcagctg aagtccggca ccgcttctgt cgtgtgcctg 480
 ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 540
 tccggcaact cccaggaatc cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg 600
 tcctccaccc tgacctgtc caaggccgac tacgagaagc acaagtgta cgcctgcgaa 660
 gtgacccacc agggcctgtc tagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg cgagtgtga 720
 tgaattc 727

<210> 124

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mVH F 引物

<400> 124

cgagctcatg ggatggagct ggatc 25

<210> 125

<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mVH R 引物
<400> 125
cgggtacctga ggagacggtg actg 24
<210> 126
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> KpnI_delR 引物
<400> 126
gggcccttgg tggagctga ggagacggtg actgagg 37
<210> 127
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mVL F 引物
<400> 127
catcgatatg agtgtgcca ctcag 25
<210> 128
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> mVL R 引物
<400> 128
cctcgagttt gatttccagc ttgg 24
<210> 129
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> Xho_modR 引物
<400> 129
agatggtgca gccaccgtgc gtttgatttc cagcttggtg cc 42

<210> 130

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> ScFv VSF H

<400> 130

gagatccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact ggctacaaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggaaat attgatectt actatggtag tactacctac 180
 aatcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcttccag cacagcctac 240
 atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagagact 300
 gggacgaggg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 131

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv VSF H

<400> 131

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

<210> 132

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv VSF L3

<400> 132

```
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atgacatgtc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgtt gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttatgggt ctcctcggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
```

<210> 133

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv VSF L3

<400> 133

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

<210> 134

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF CDR-L1

<400> 134

```
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr
```

1 5 10

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF CDR-L2

<400> 135

Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5 10

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF CDR-L3

<400> 136

Gln His Phe Tyr Gly Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 137

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF CDR-H1

<400> 137

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn

1 5 10

<210> 138

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF CDR-H2

<400> 138

Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mVSF CDR-H3

<400> 139

Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 140

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> chVSFk

<400> 140

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro

50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr

100 105 110

Gly Ser Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

145 150

<210> 141

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> chVSFg4

<400> 141

```

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

```

<210> 142

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> chVSFg2

<400> 142

```

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

```


Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 144
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> hCk - mVL
 <400> 144
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Met Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Tyr
 100 105 110
 Gly Pro Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Leu
 115 120 125
 Glu Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

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

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

<210> 145

<211> 705

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hCk - mVL

<400> 145

atgagtgtgc ccactcaggt ccggggggtg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 atgacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgtt gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga tgatcaacag cctgcagcct 300
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttatggtc ctctcggac gttcggtgga 360
 ggcaccaagc tggaaatcaa actcgaggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 146

<211> 465

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hCr2 - mVH

<400> 146

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Asn

65	70	75	80
Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser			
	85	90	95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val			
	100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Gly Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
	115	120	125
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Thr Ala Ser Thr Lys Gly			
	130	135	140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser			
145	150	155	160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
	165	170	175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
	180	185	190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
	195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val			
210	215	220	
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys			
225	230	235	240
Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro			
	245	250	255
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	260	265	270
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
	275	280	285
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
290	295	300	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val			
305	310	315	320
Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
	325	330	335
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	340	345	350
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	355	360	365
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
370	375	380	

Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
385					390				395					400	
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu
			405					410						415	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			420					425					430		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			435				440					445			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
			450				455					460			

Lys

465

<210> 147

<211> 1398

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> hCr2 - mVH

<400> 147

```

atgggatgga gctggatctt tctcttcctt ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
atccagctgc agcagtctgg agctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
tgcaaggctt ctgggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa gcagagccat 180
ggaaagagcc ttgagtggat tggaaatatt gatccttact atggtagtac tacctacaat 240
cagaagttca agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cttccagcac agcctacatg 300
cagctcaaca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag agagactggg 360
acgagggcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc aggtaccgcc 420
tccaccaagg gcccacggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 660
acctgcaacg tagatcacia gcccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720
tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
ttccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacgtgcgtg 840
gtgggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 1020
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggtctt taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200

```


Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys			
225	230	235	240
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly			
	245	250	255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	260	265	270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu			
	275	280	285
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	290	295	300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg			
305	310	315	320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	325	330	335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu			
	340	345	350
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	355	360	365
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	370	375	380
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
385	390	395	400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	405	410	415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp			
	420	425	430
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	435	440	445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu			
	450	455	460
Gly Lys			
465			
<210> 149			
<211> 1401			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> hCr4 - mVH			
<400> 149			

atgggatgga gctggatctt tctcttcctt ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactctgag 60
 atccagctgc agcagtctgg agctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctgggttactc attcactggc tacaacatga actgggtgaa gcagagccat 180
 ggaaagagcc ttgagtggat tggaaatatt gatccttact atggtagtac tacctacaat 240
 cagaagttca agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cttccagcac agcctacatg 300
 cagctcaaca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag agagactggg 360
 acgagggcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctctc aggtaccgct 420
 tccaccaagg gcccattcgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtccctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 660
 acctgcaacg tagatcaciaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa 720
 tatggtcccc catgcccacg atgcccagca cctgagttcc tgggggggacc atcagtcttc 780
 ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 840
 gtgggtgggtg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 900
 gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1320
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1380
 tccctgtctc tgggtaaatg a 1401

<210> 150

<211> 851

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv VSF DNA

<400> 150

cgctgacgag atccagctgc agcagtctga gatccagctg cagcagtctg gagctgagct 60
 ggtgaagcct ggggcttcag tgaagatatc ctgcaaggct tctggttact cattcactgg 120
 ctacaacatg aactgggtga agcagagcca tggaaagagc cttgagtgga ttgaaatat 180
 tgatccttac tatggtagta ctacctaaa tcagaagttc aagggaagg ccacattgac 240
 ttagacaaa tcttcagca cagcctacat gcagctcaac agcctgacat ctgaggactc 300
 tgcagtctat tactgtgcaa gagagactgg gacgagggt atggactact ggggtcaagg 360
 aacctcagtc accgtctcct caccttgag tcaaggcag aggagtccac ctcacgagac 420
 caccctcct aggccacctc aggaggatcc ggtggaggtg gctctgggtg aggtggctct 480

gacatccaga tgactcagtc gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat 540
ctgtgggaga aactgtcacc atgacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag 600
catggatatca gcagaaacag ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatggt gcaacaaact 660
tagcagatgg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga 720
agatcaacag cctgcagcct gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttatgggt 780
ctcctcggac gttcgggtga ggcaccaagc tggaaatcaa acccgtgggt cgacctttag 840
tttgagctc c 851

<210> 151

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的FR1

<400> 151

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

<210> 152

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链的FR2

<400> 152

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 153

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> HBV cccDNA 引物

<400> 153

tgaatccygc ggacgacc 18

<210> 154

<211> 20

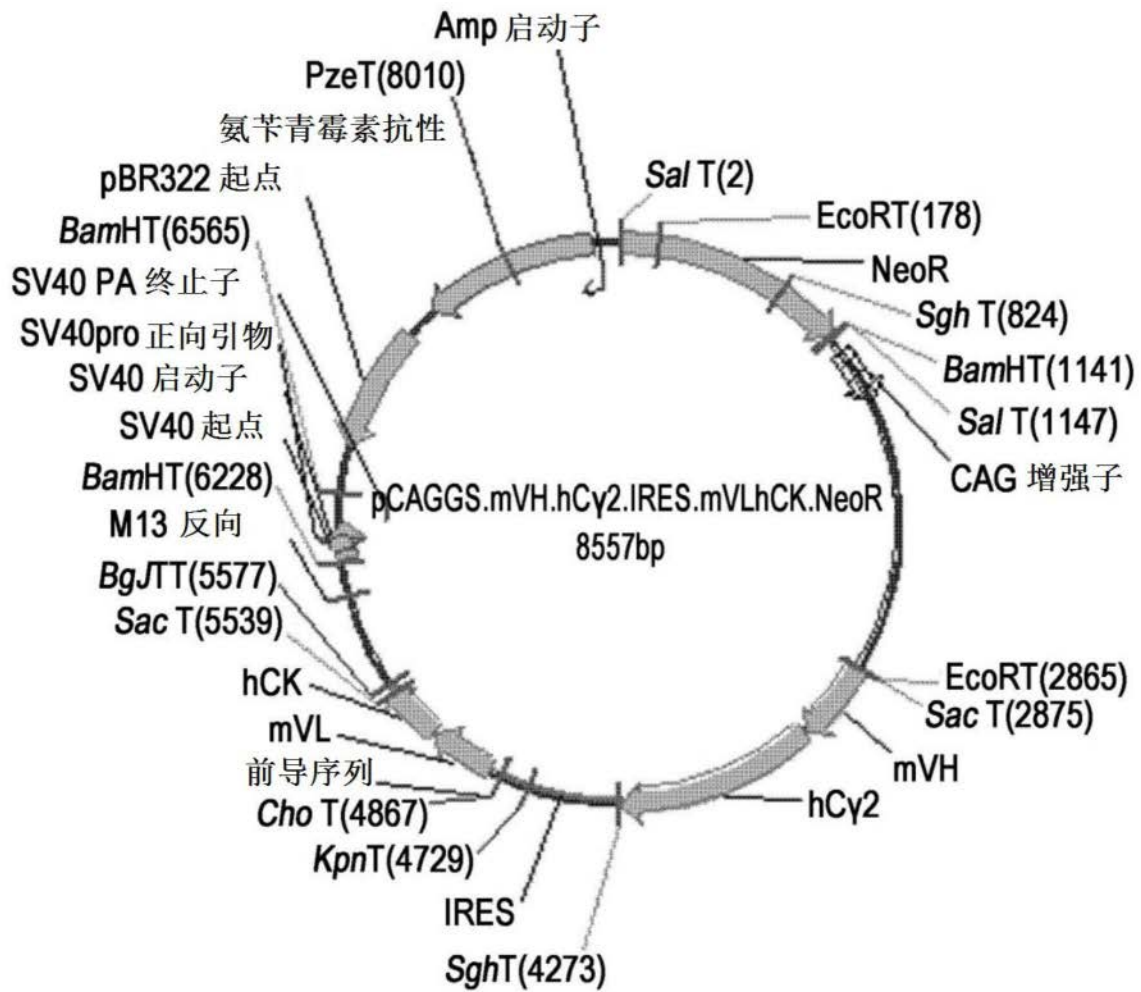
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> HBV cccDNA 引物 R
<400> 154
cagcttggag gcttgaacag 20
<210> 155
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV总DNA引物 F
<400> 155
cctcttcatc ctgctgct 18
<210> 156
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HBV总DNA引物 R
<400> 156
aactgaaagc caaacagtg 19
<210> 157
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HCV靶引物F
<400> 157
gggctataag gtgctagtgc 20
<210> 158
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HCV靶引物R
<400> 158
ggctgccagt ggtaattgtt 20
<210> 159
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> GAPDH引物F
<400> 159
tccctgagct gaacgggaag 20
<210> 160
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> GAPDH引物R
<400> 160
ggaggagtgg gtgtcgctgt 20
<210> 161
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HCV靶引物F-2
<400> 161
atgcagccca agggataag 20
<210> 162
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> HCV靶引物R-2
<400> 162
ggttctgatg ttaggtcga tac 23

pCAGGS.Ck.mVL.IRES.Cy₂.mVH.neo



chVSF HC 和 LC (同时表达载体)

图1

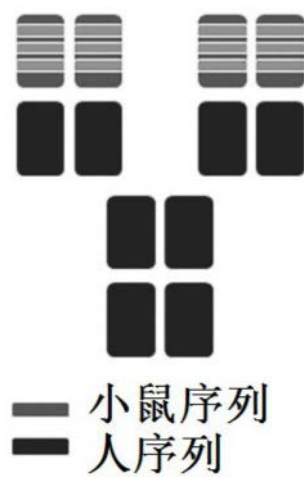


图2

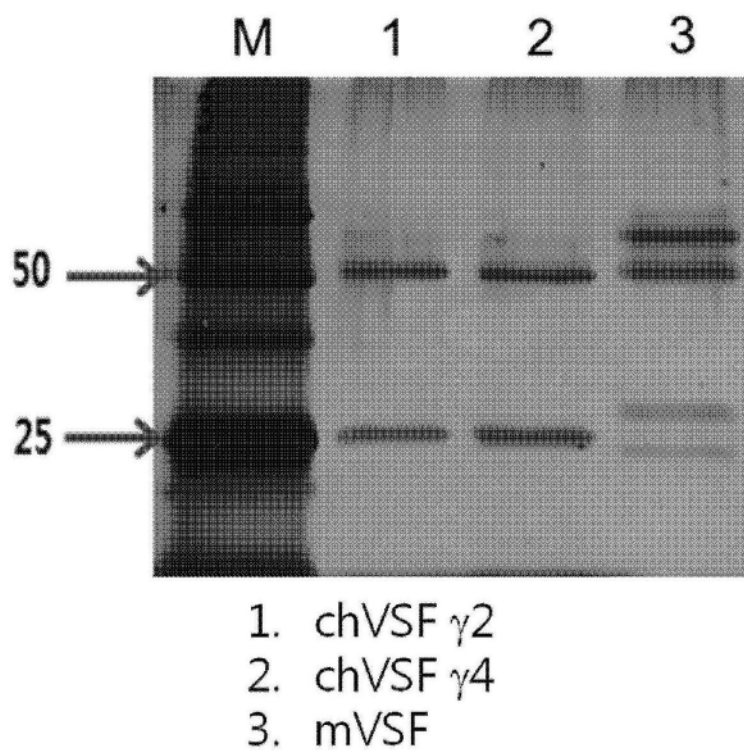
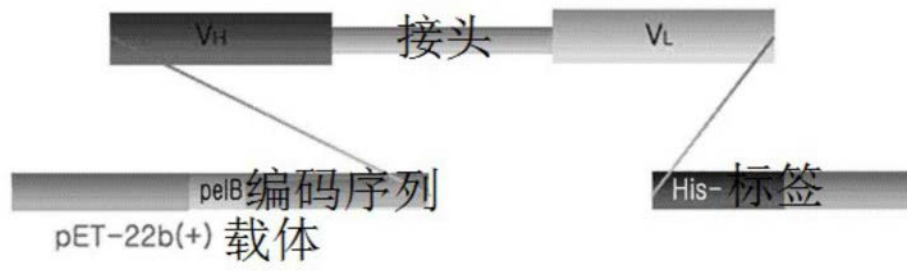


图3

CGTCGACGAGATCCAGCTGCAGCAGTCT
GAGATCCAGCTGCAGCAGTCT
GGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACT
CATTCACTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATT
GGAAATATTGATCCTTACTATGGTAGTACTACTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACA
TTGACTGTAGACAATCTTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGA
CTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAGACTGGGACGAGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA
GGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
CCTTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTCCACCTCCACCGAGACCACTCCTCCTAGGCCACCT
CAGGAGGATCCGGTGA
GGTGGCTCTGGTGGAGGTGGCTCTGACATCCAGATGACTCAGTC
GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG
CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATGACATGTGAGCAAGTGAGAAATTTACAGTAATTTAG
CATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGTTGCAACAACTTAG
CAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATC
AACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTATGGTTCTCCTCGG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAC
CCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGGAGCTCC

图4

(A)



(B)

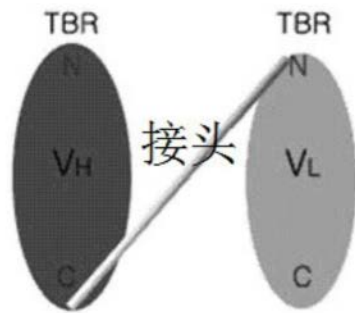
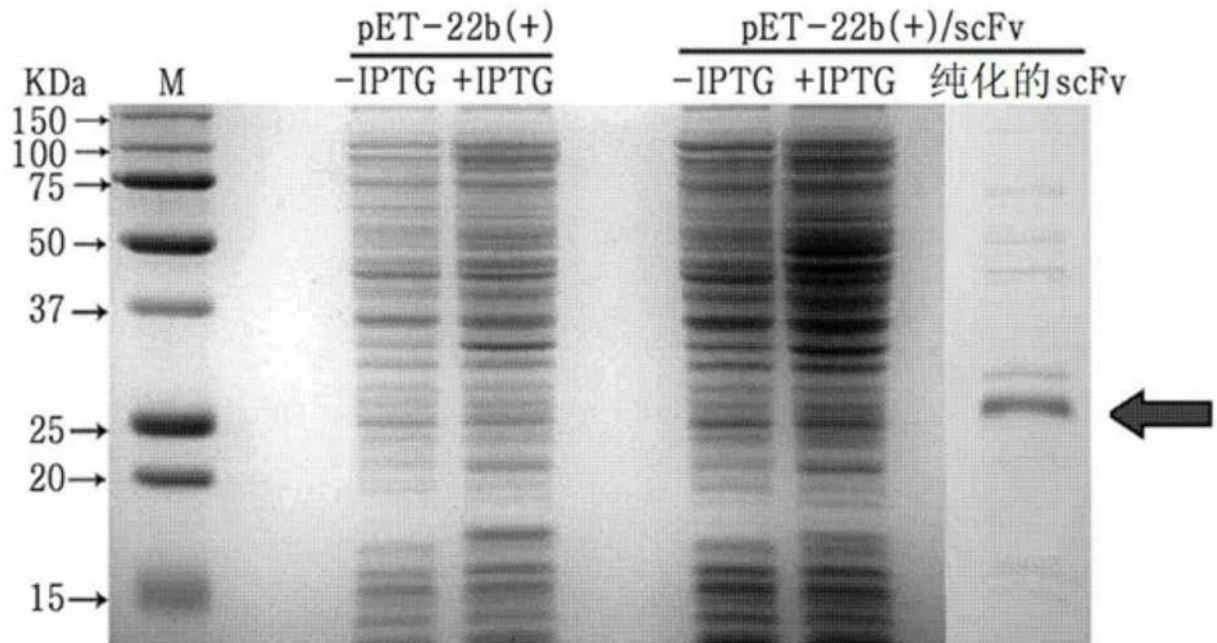


图5



泳道1: 分子量标记

泳道2: pET-22b (+) (无诱导)

泳道3: pET-22b (+) (IPTG诱导)

泳道4: pET-22b (+)/scFv (无诱导)

泳道5: pET-22b (+)/scFv (IPTG诱导)

泳道6: 通过Ni-NTA柱纯化的scFv (IPTG诱导)

图6

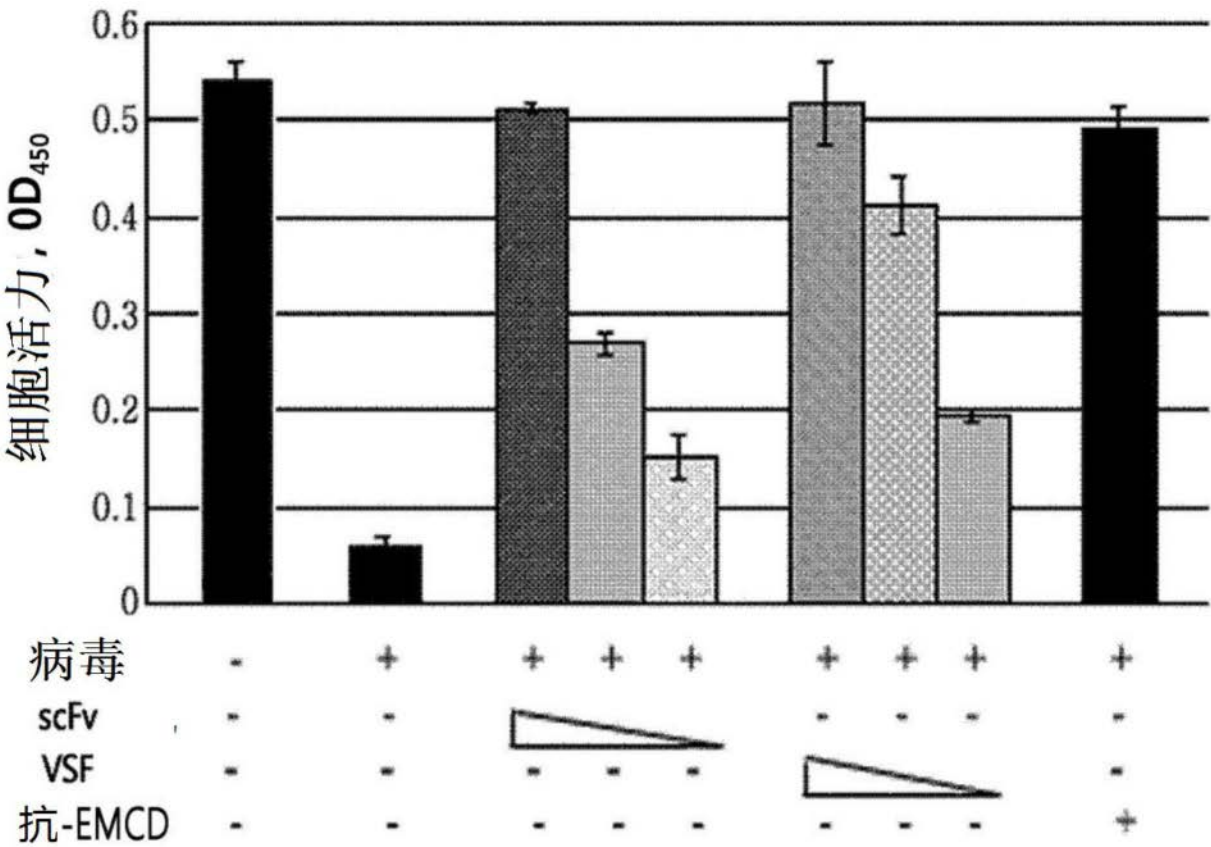


图7

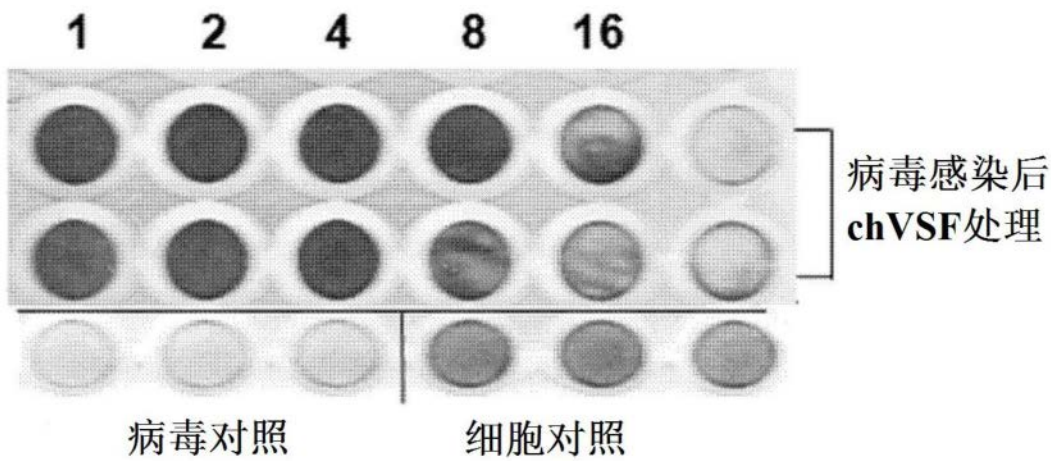


图8

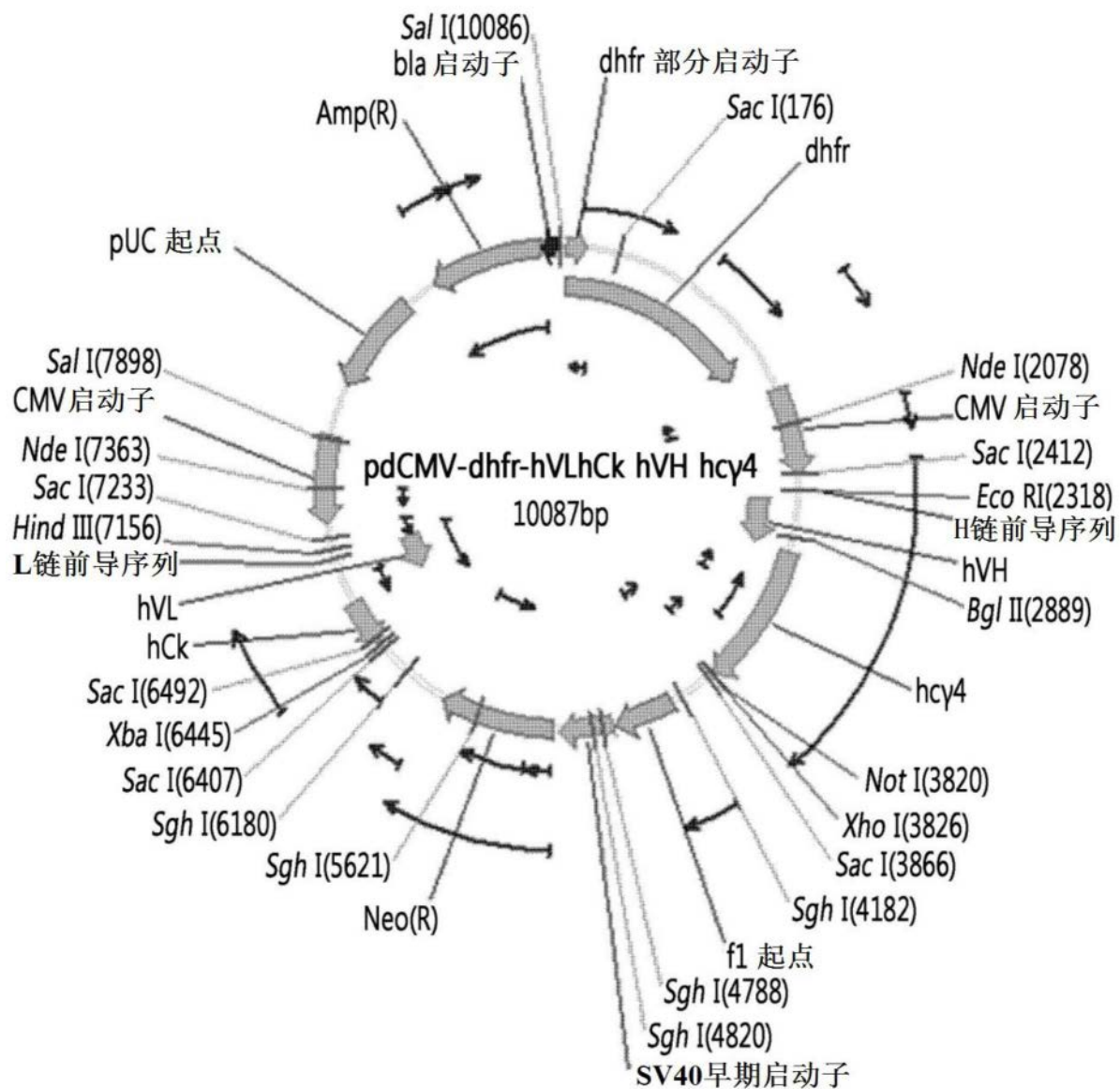


图9

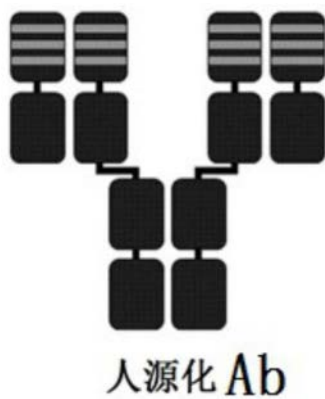


图10

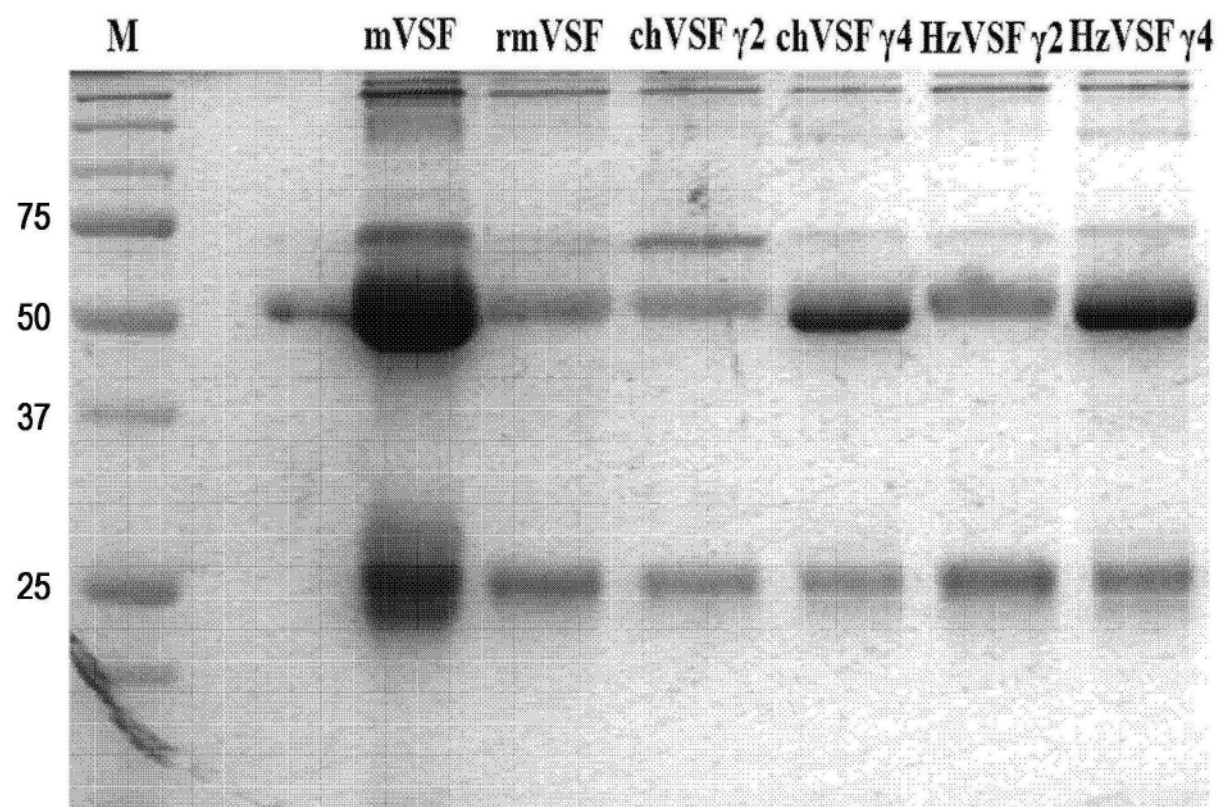


图11

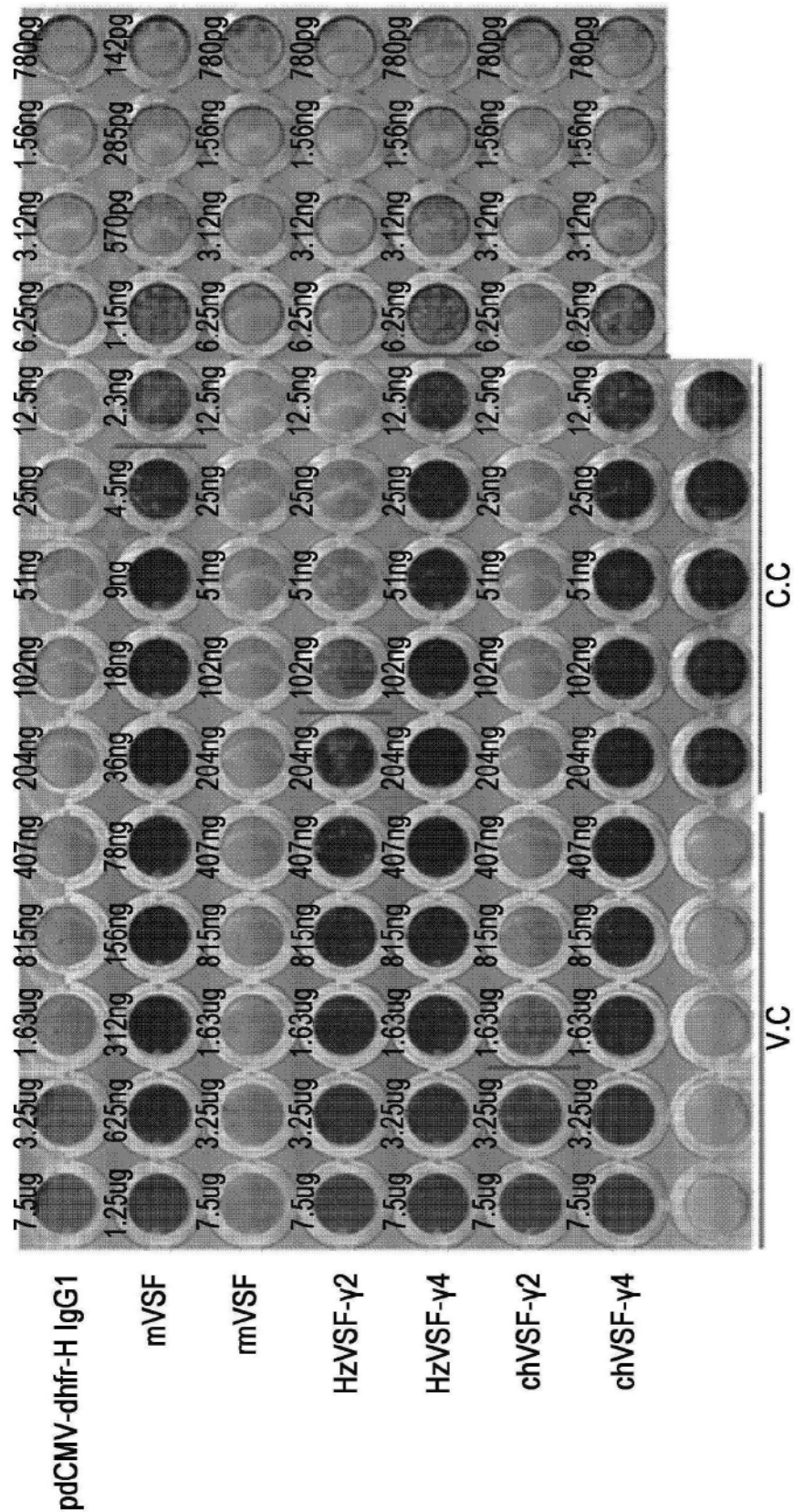


图12

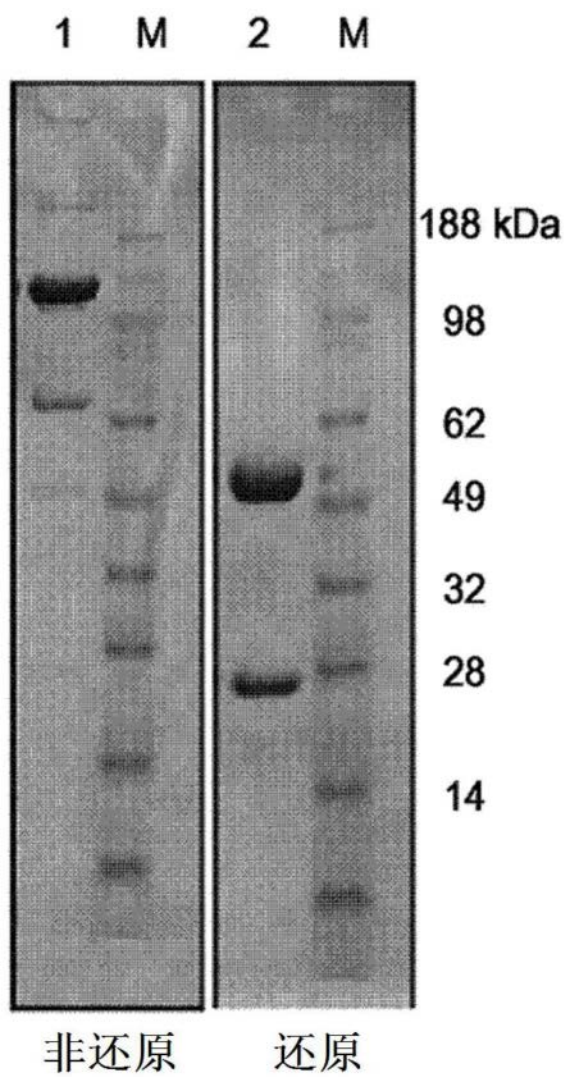
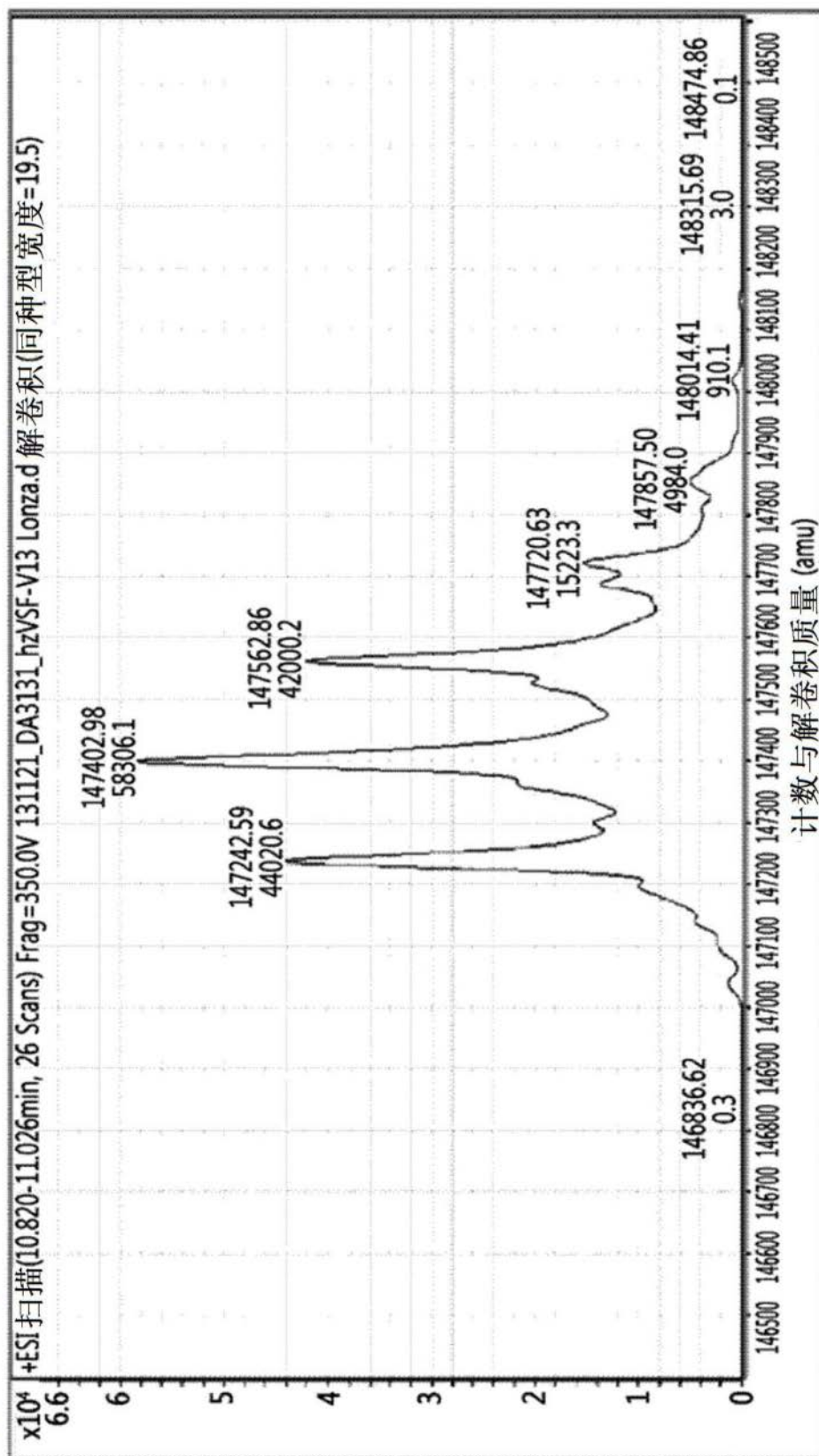


图13

完整质量



主要 147242.59, 147402.98, 147562.86 Da ...

图14A

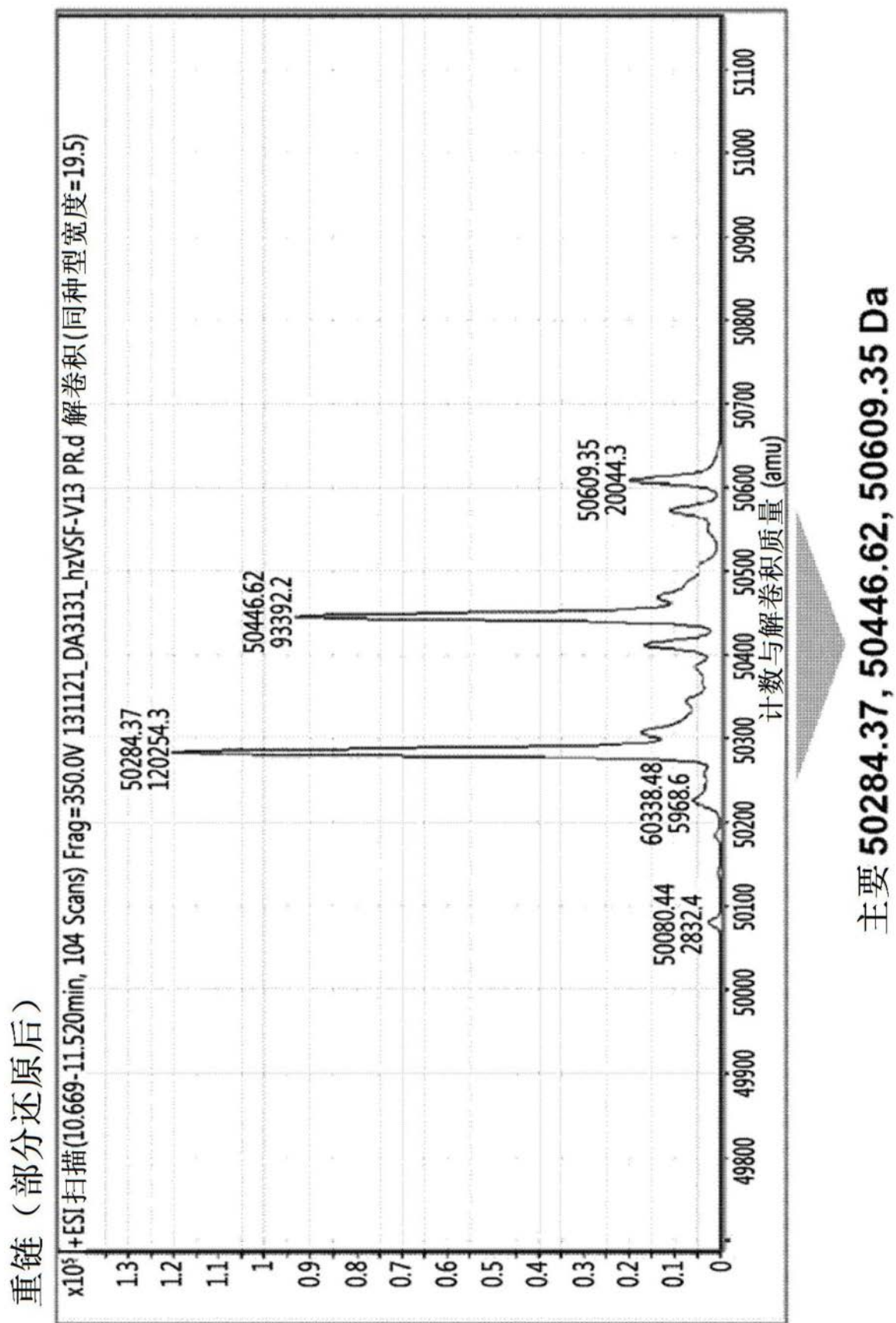
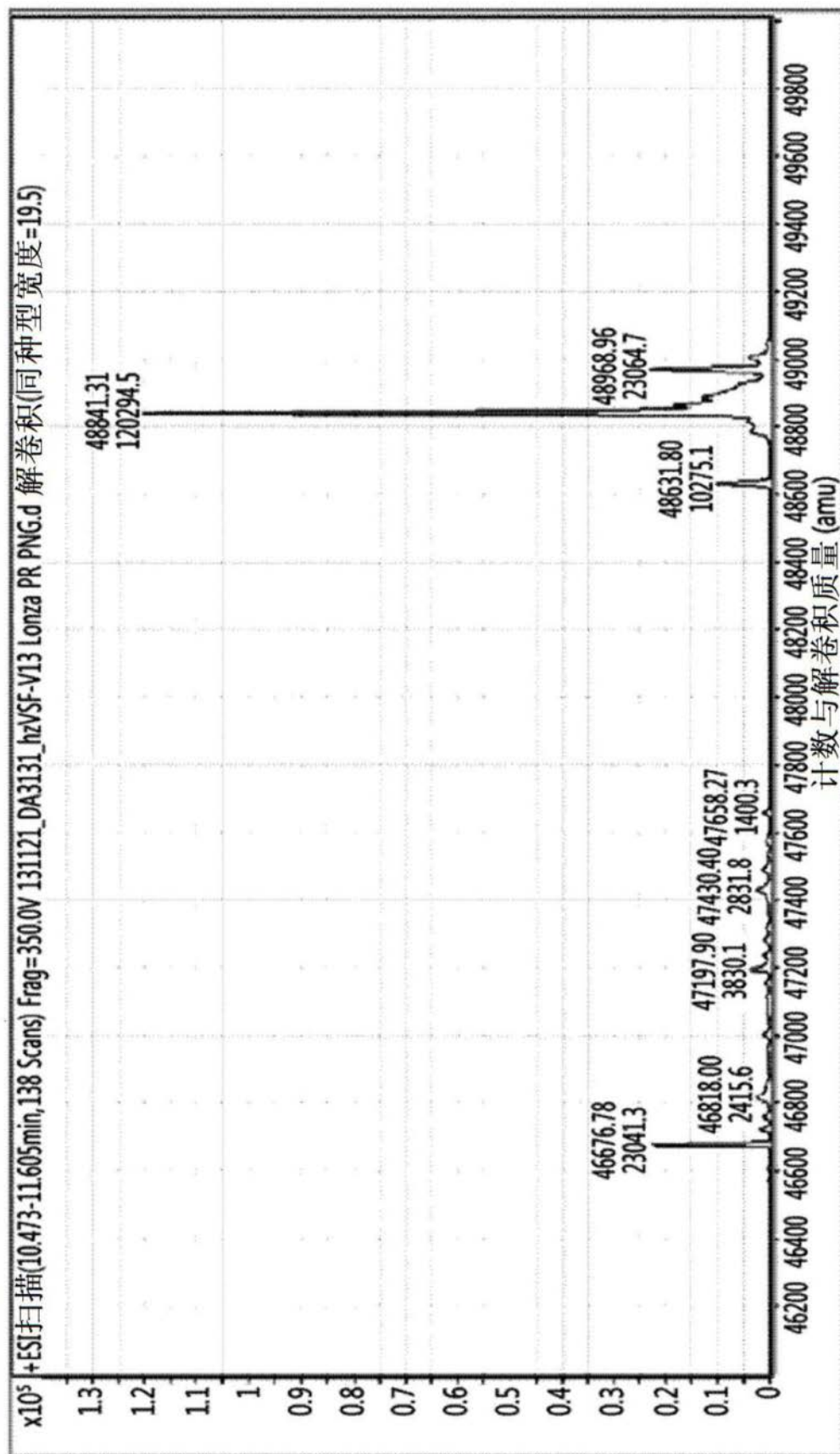


图14B

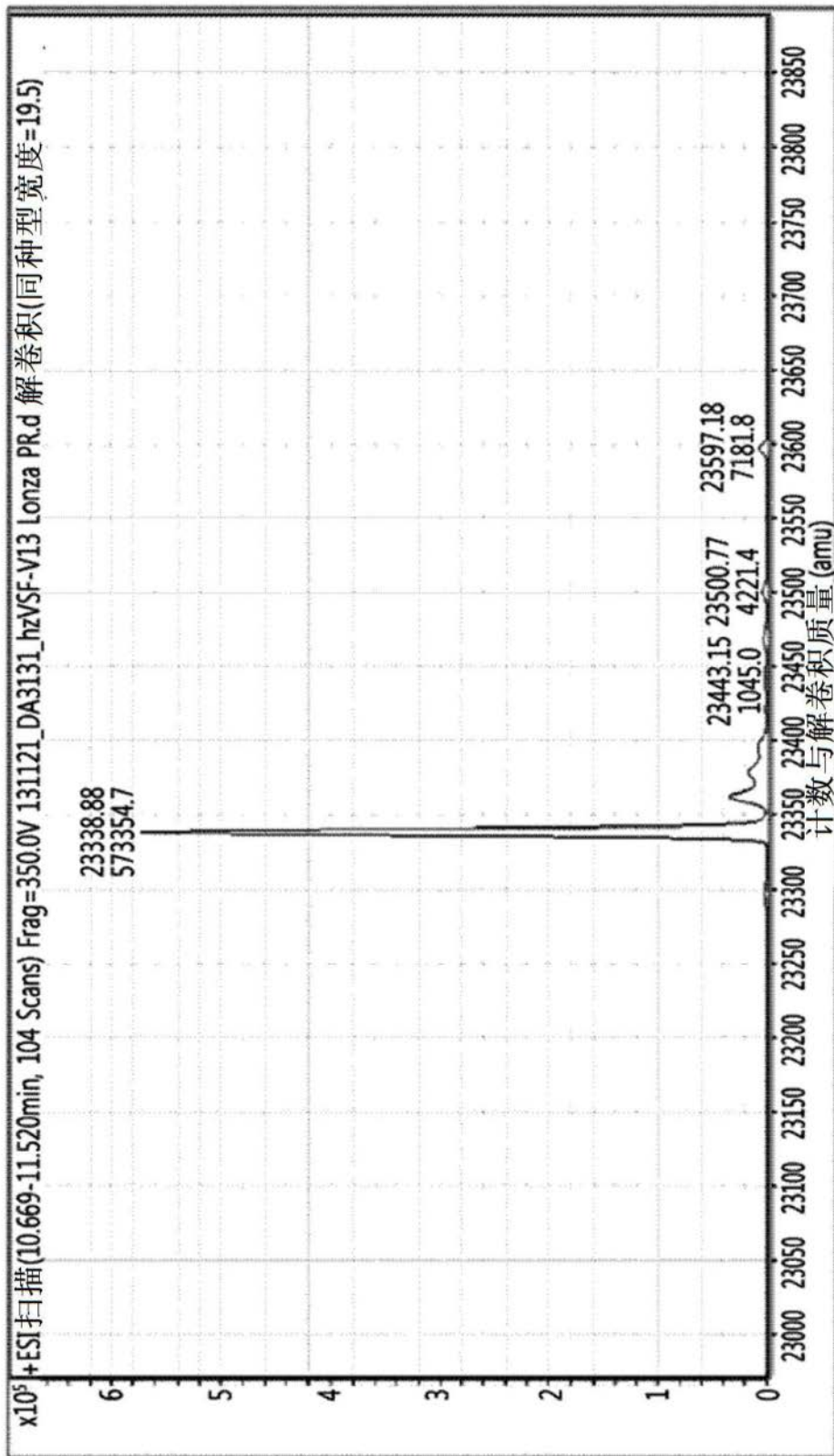
重链（部分还原后）+ PNGase F处理（以去除N连接的聚糖）



主要 48841.31 Da

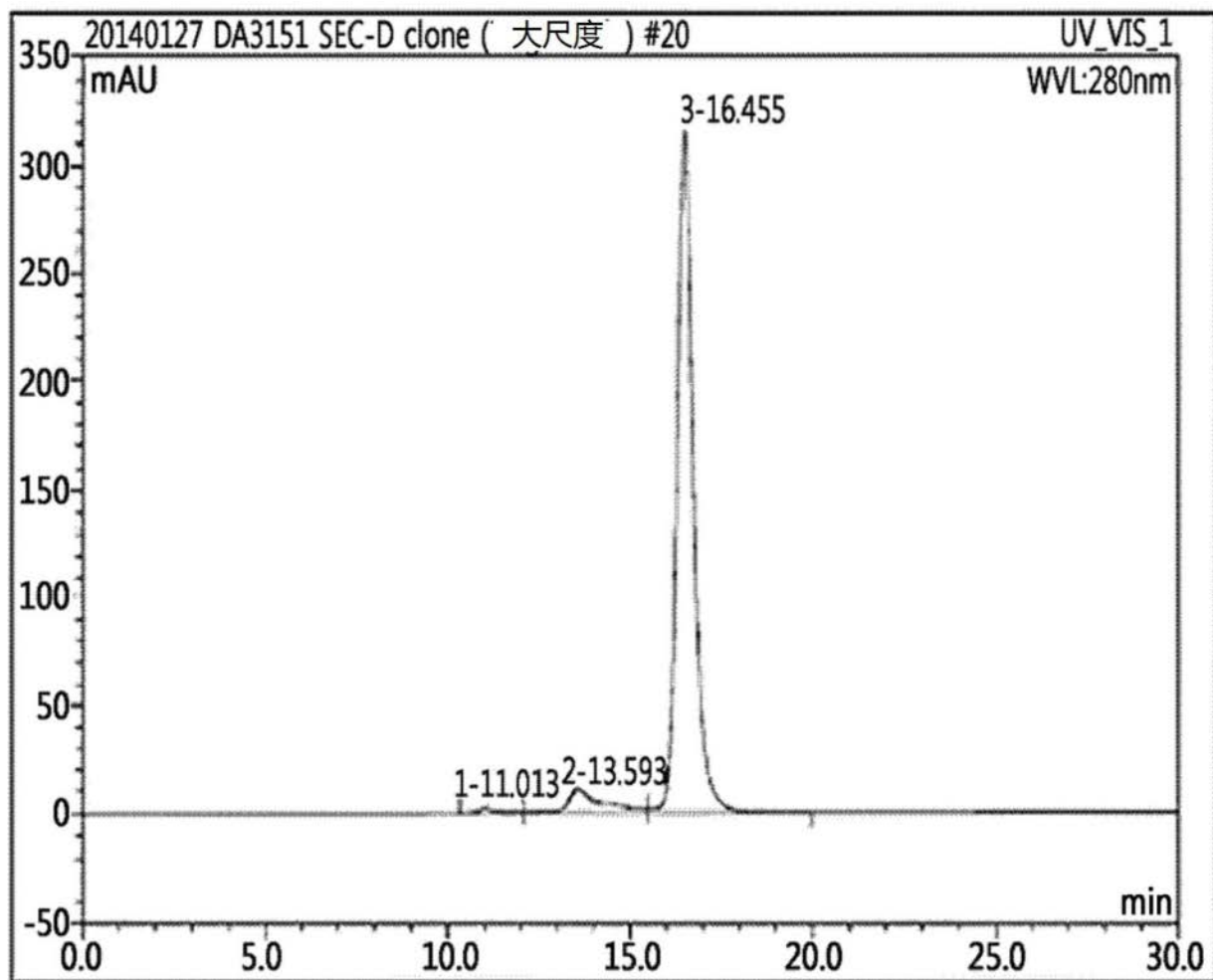
图14C

轻链（部分还原后）



主要 23338.88 Da

图14D



No.	保留时间 min	峰名称	高 mAU	面积 mAU*min	相对面积 %	量	类型
1	11.01	n.a.	2.262	1.304	0.72	n.a.	BM
2	13.59	n.a.	11.330	12.308	6.84	n.a.	M
3	16.49	n.a.	316.673	116.343	92.44	n.a.	MB
总计:			330.265	179.955	100.00	0.000	

图15

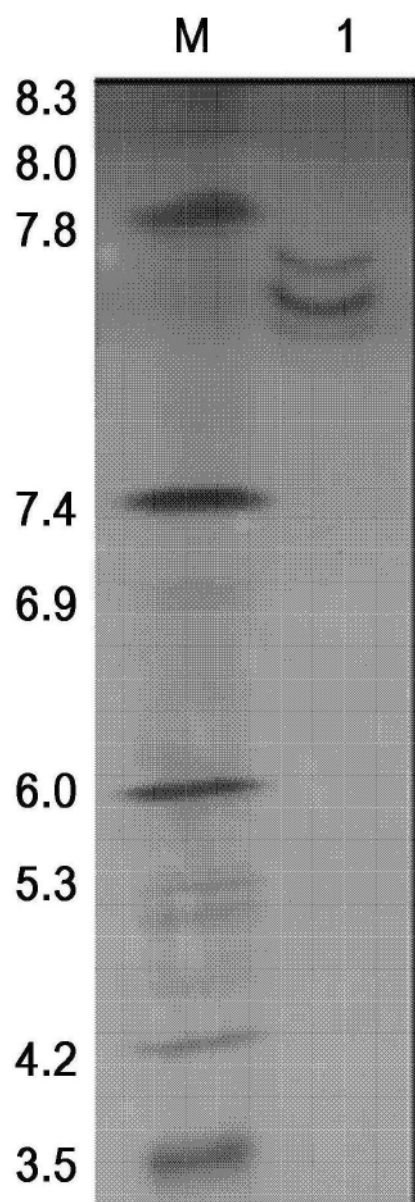


图16

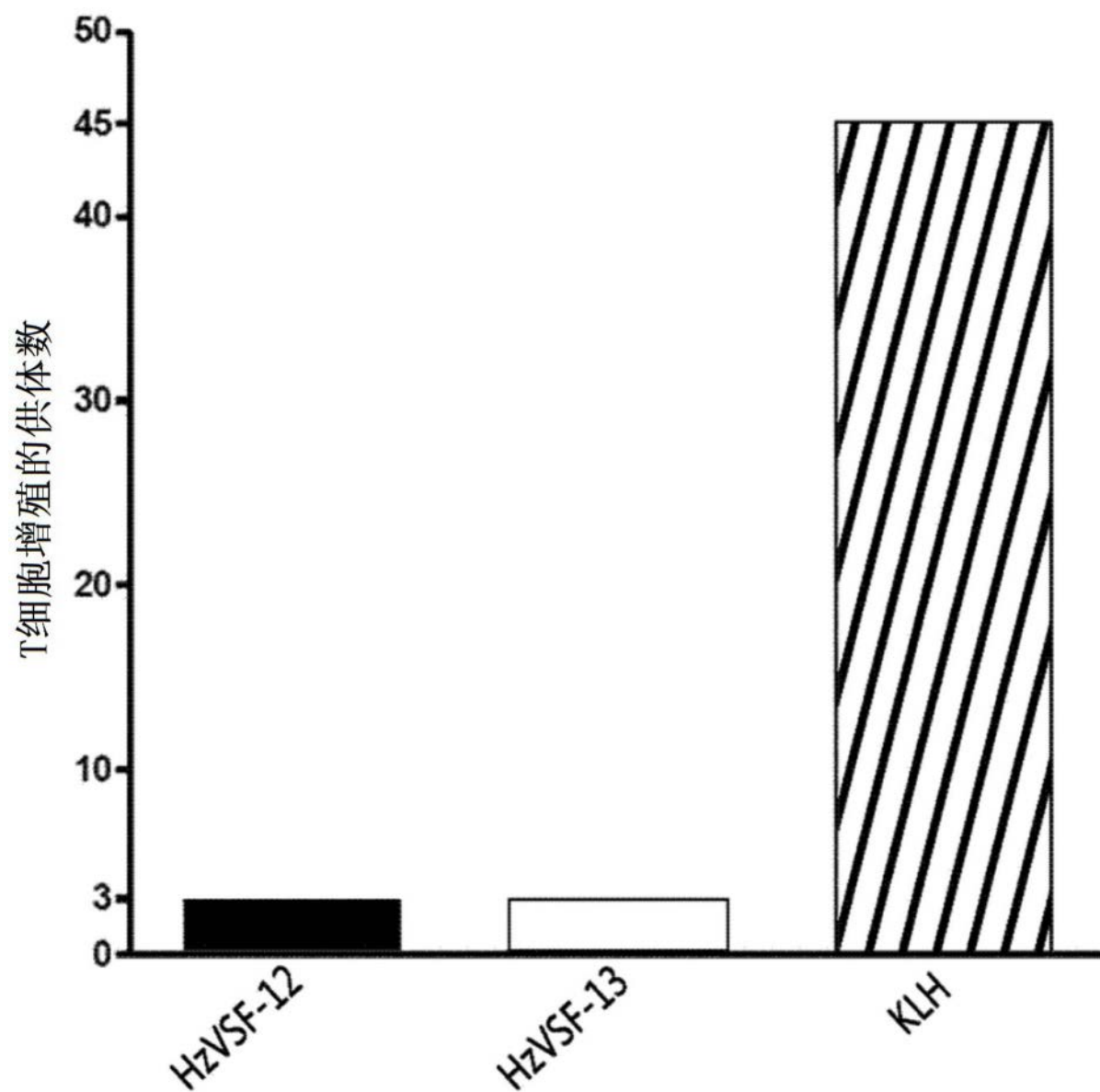


图17

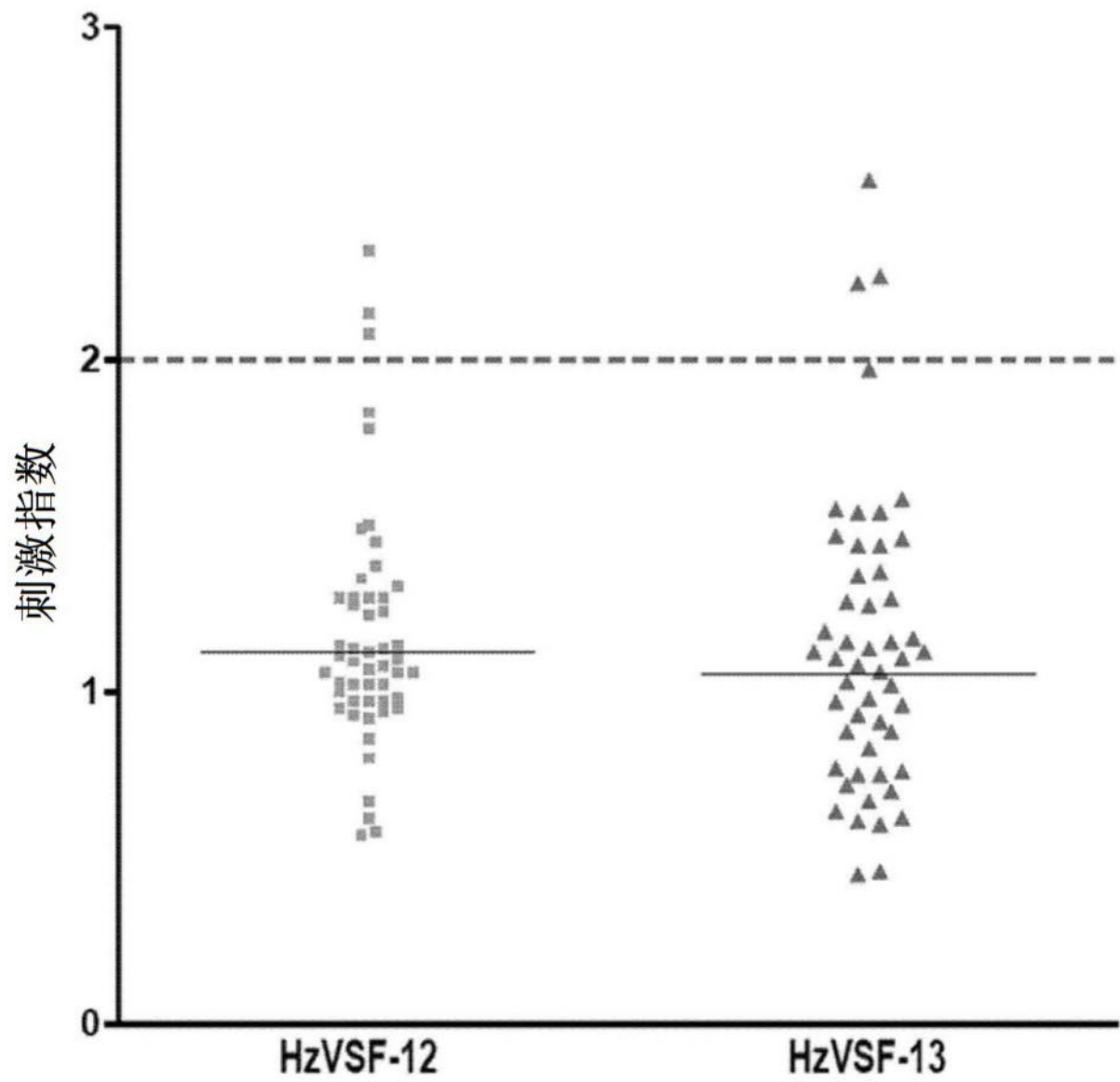


图18

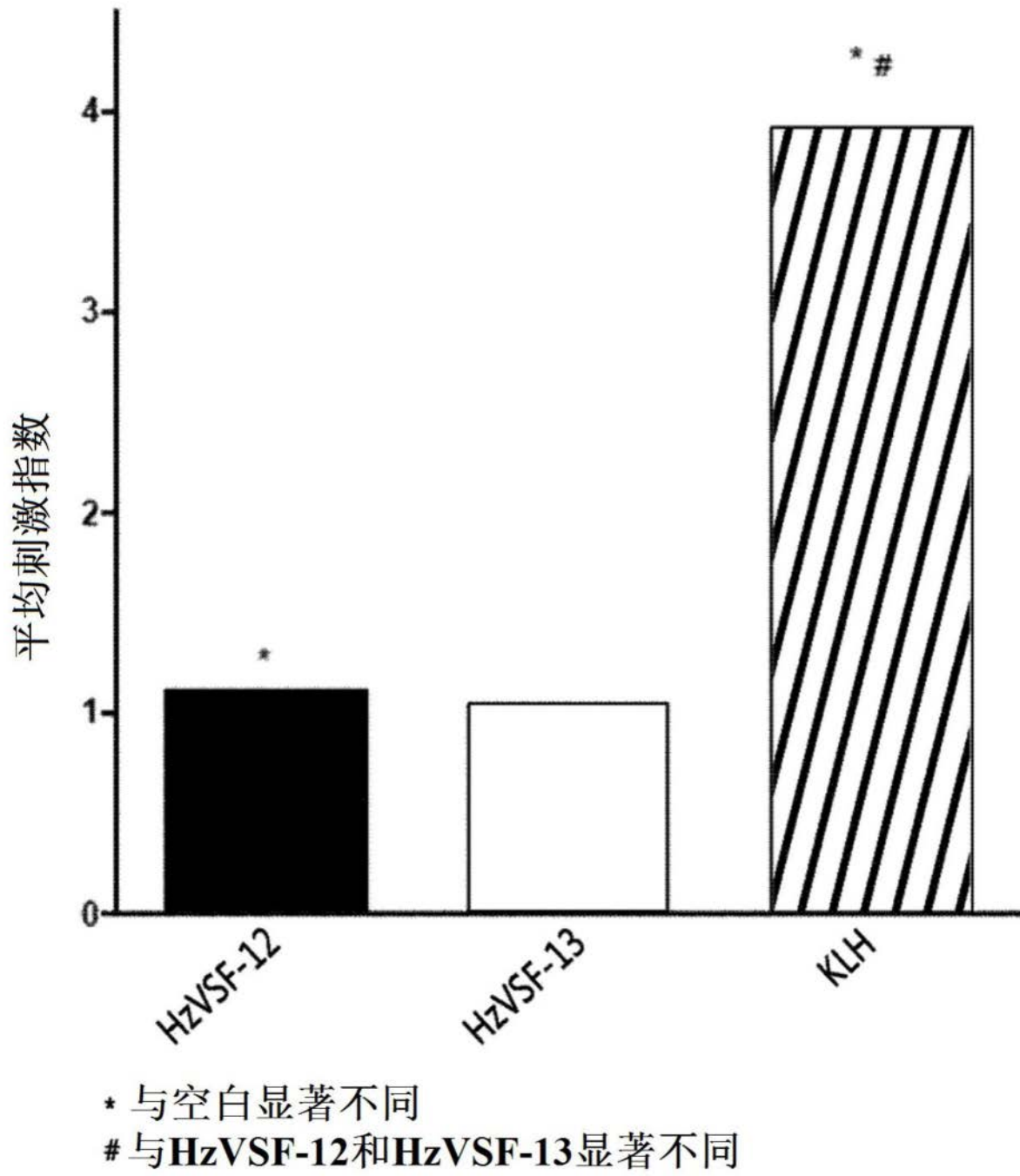


图19

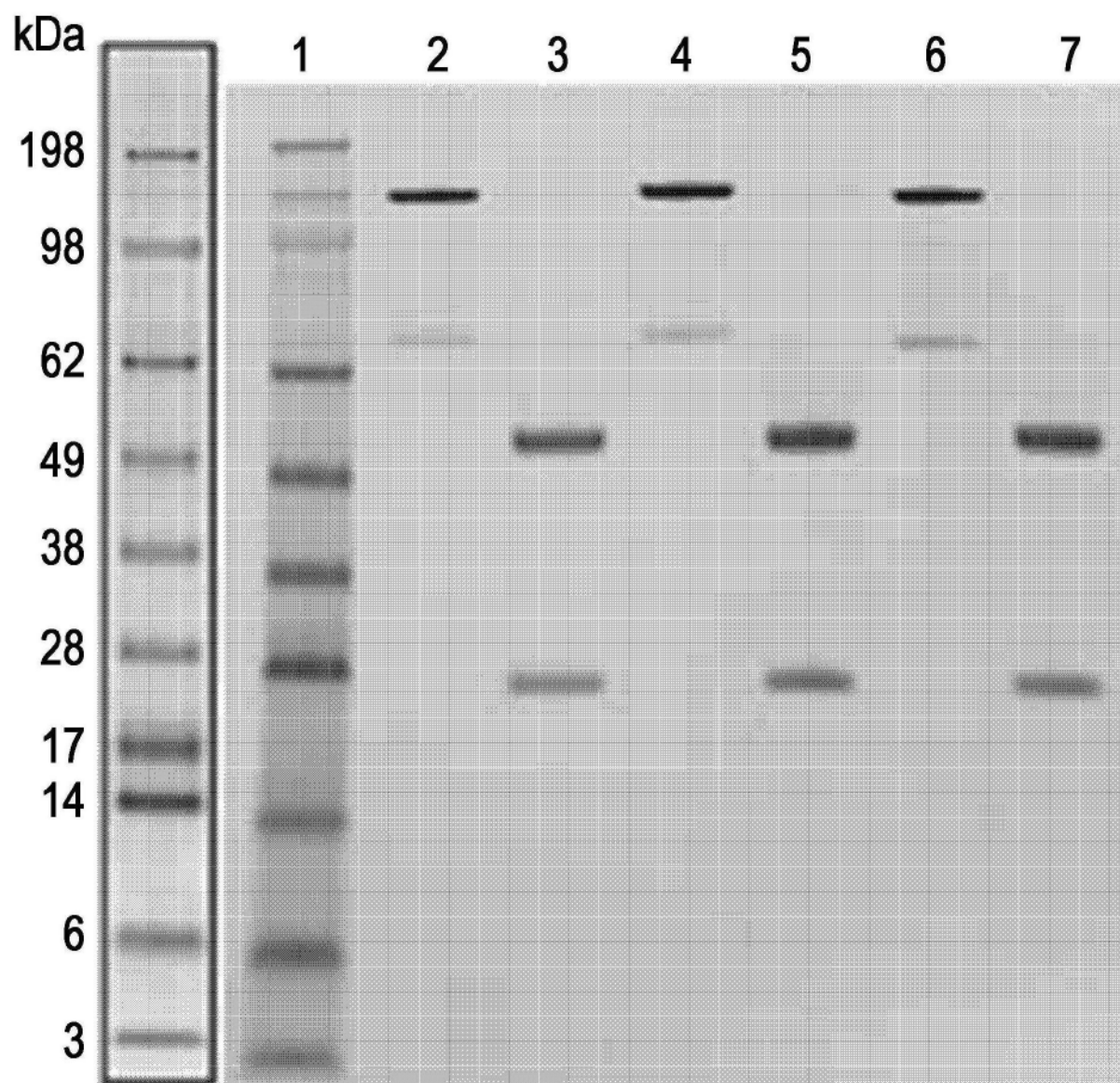


图20

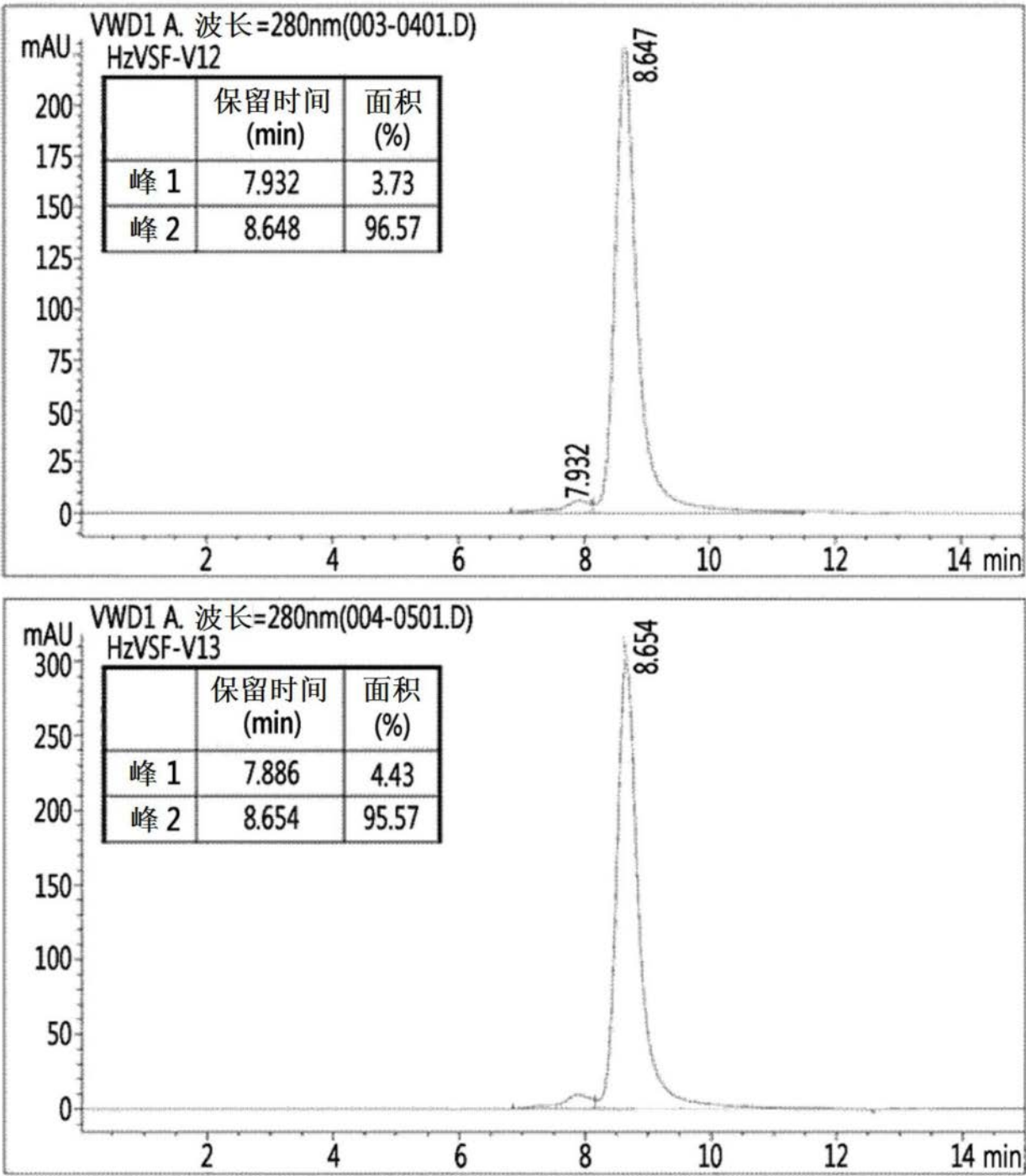


图21

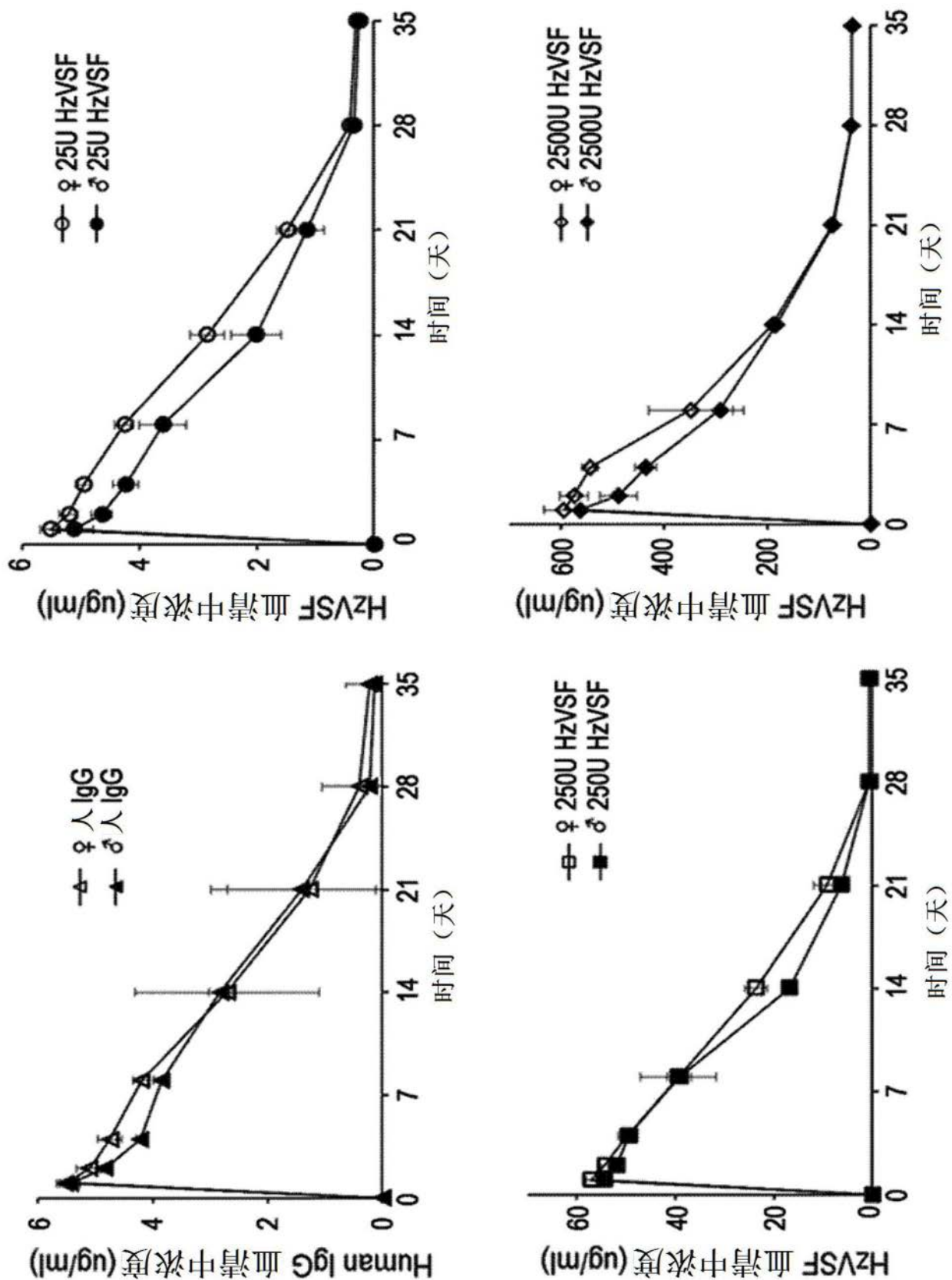


图22

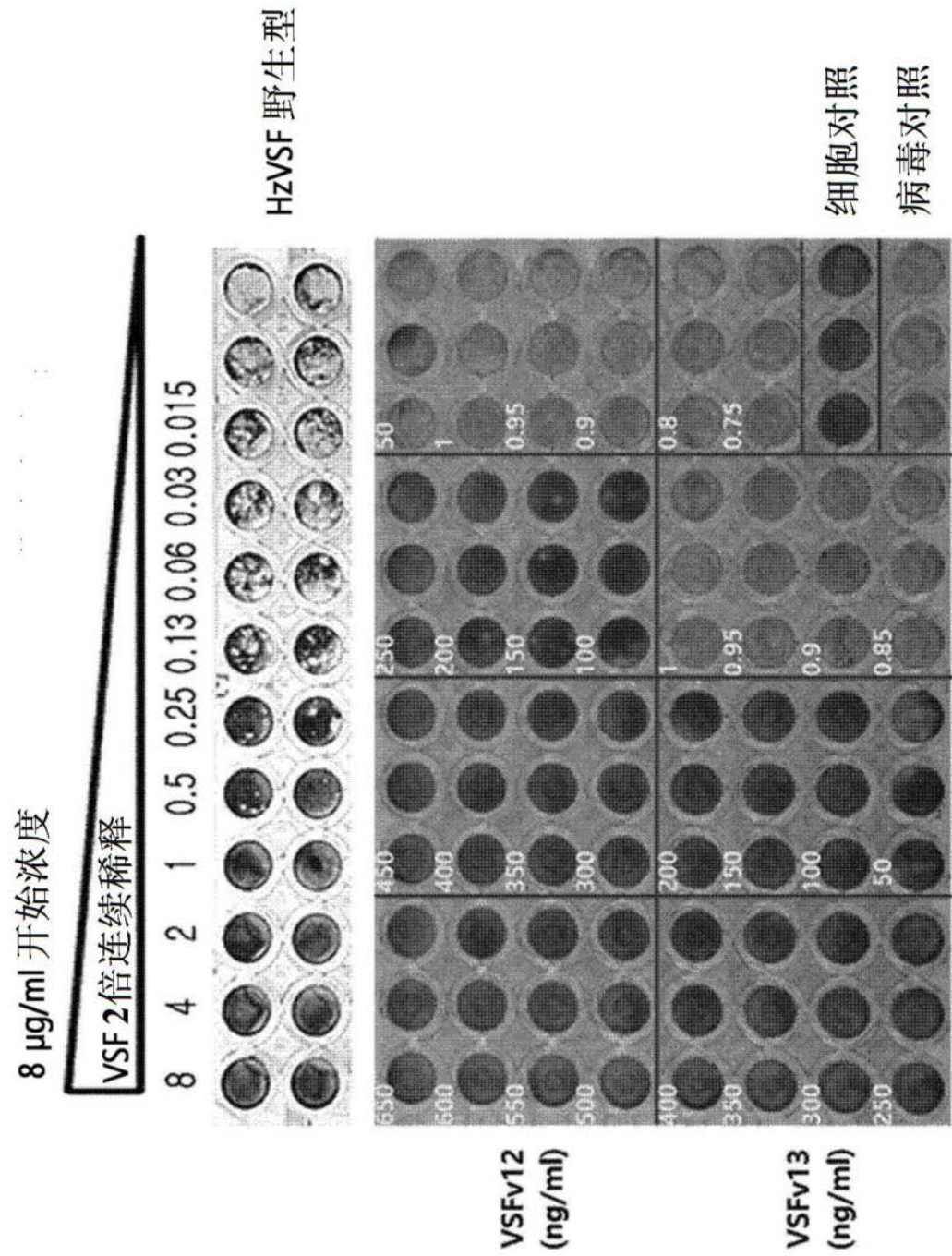


图23

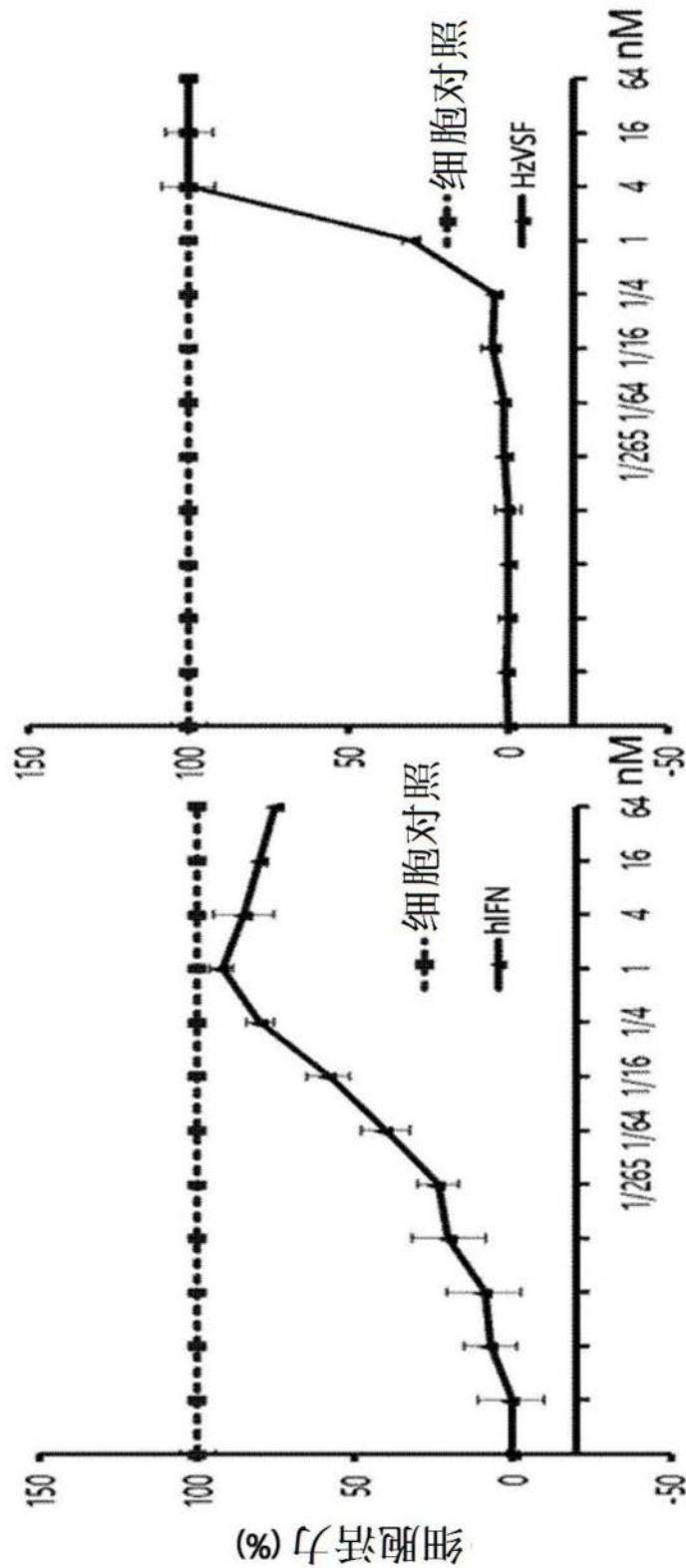


图24

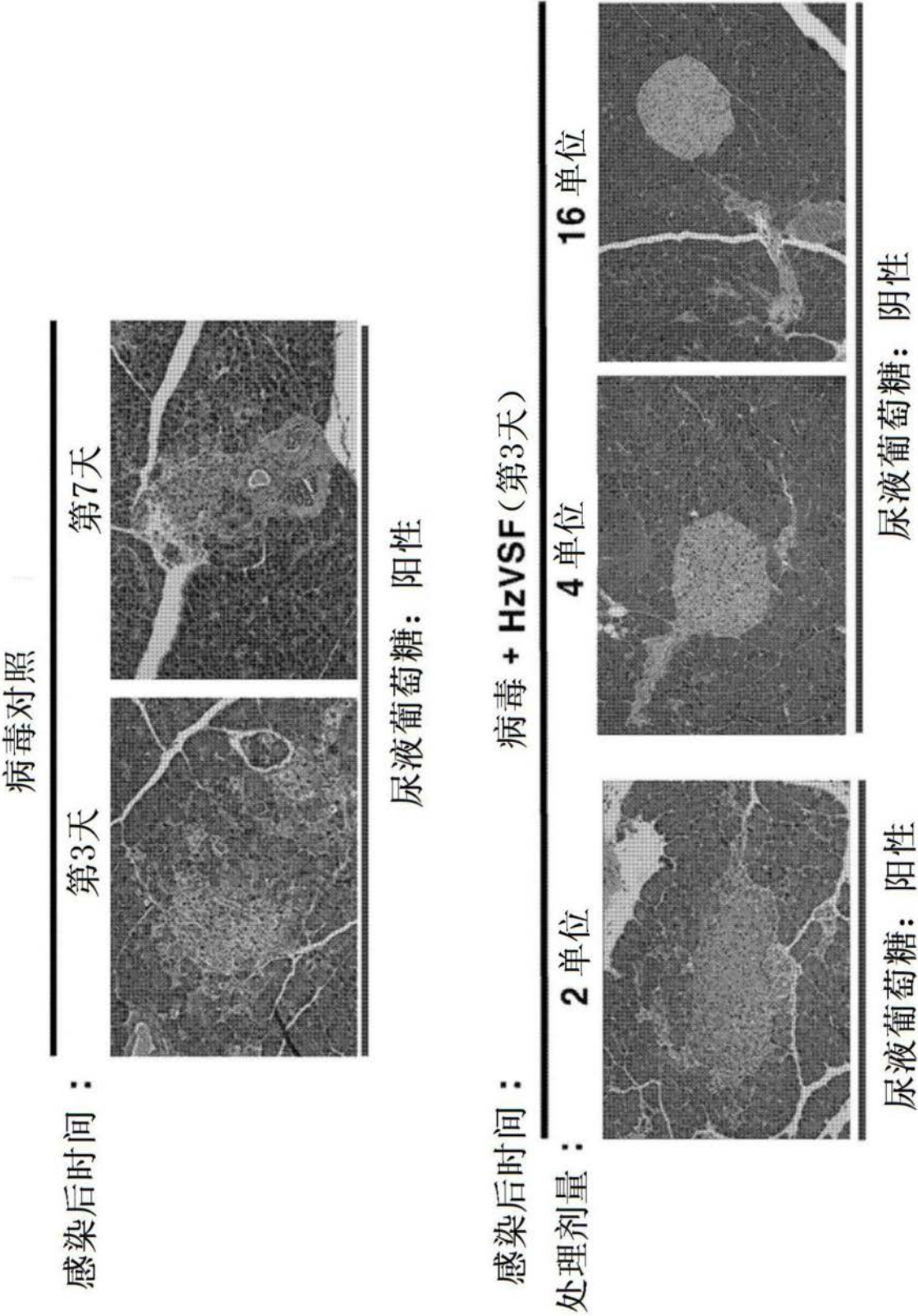


图25

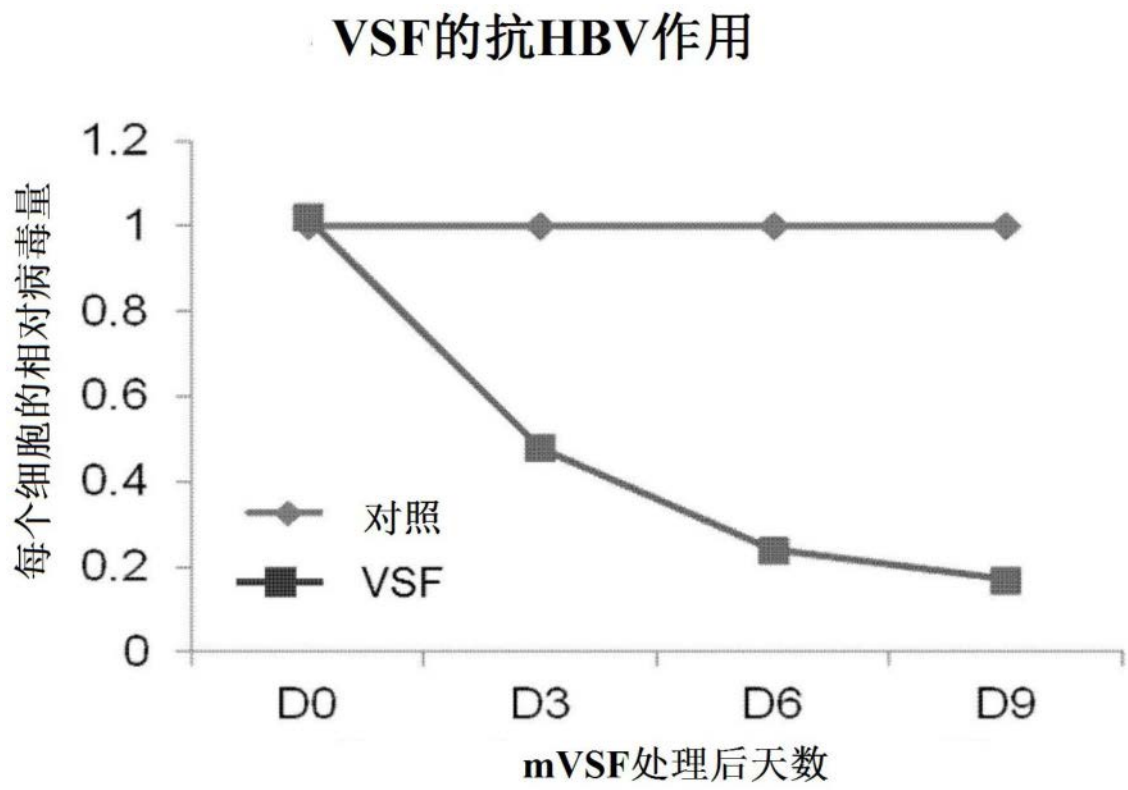


图26

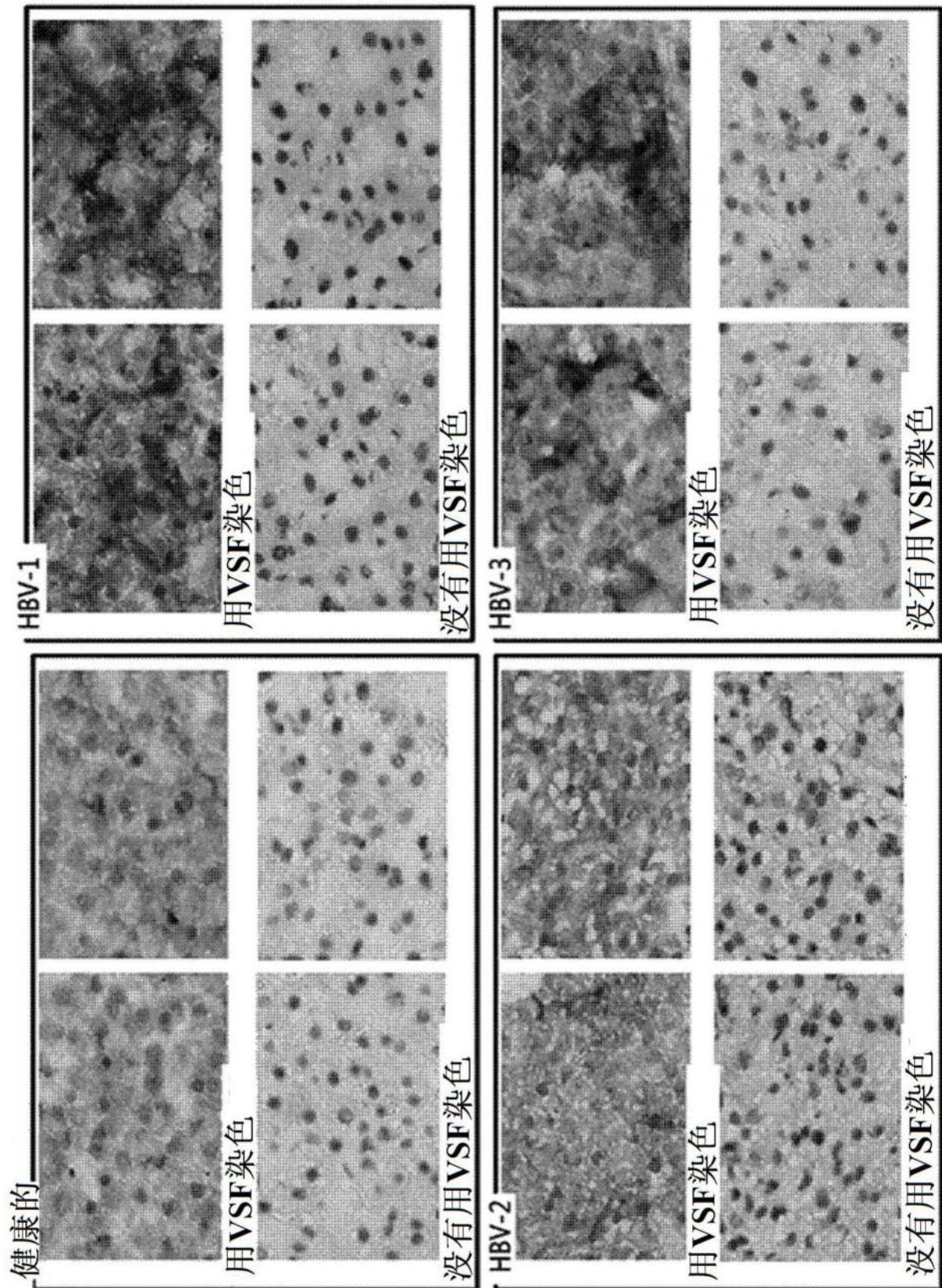


图27

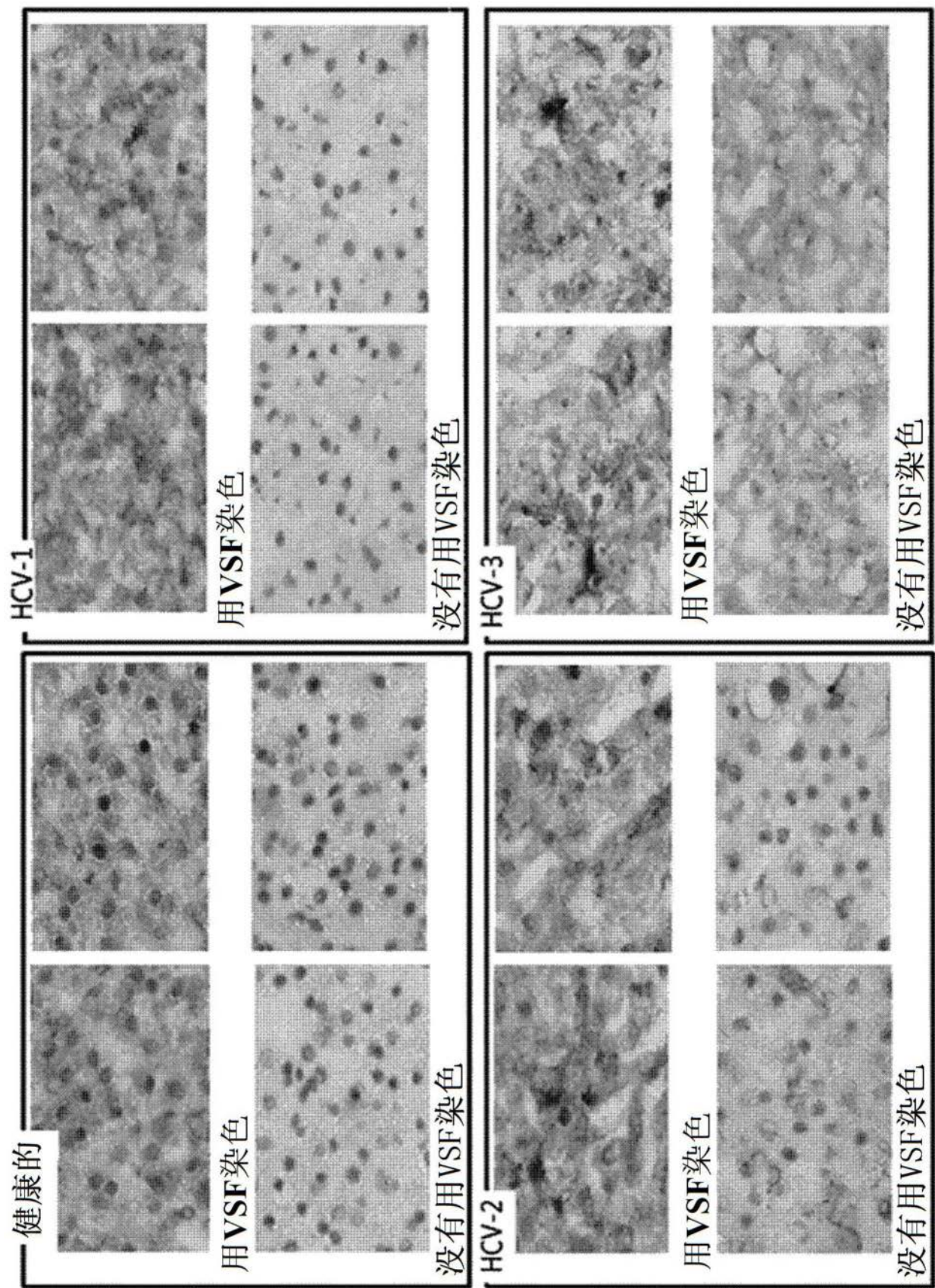


图28

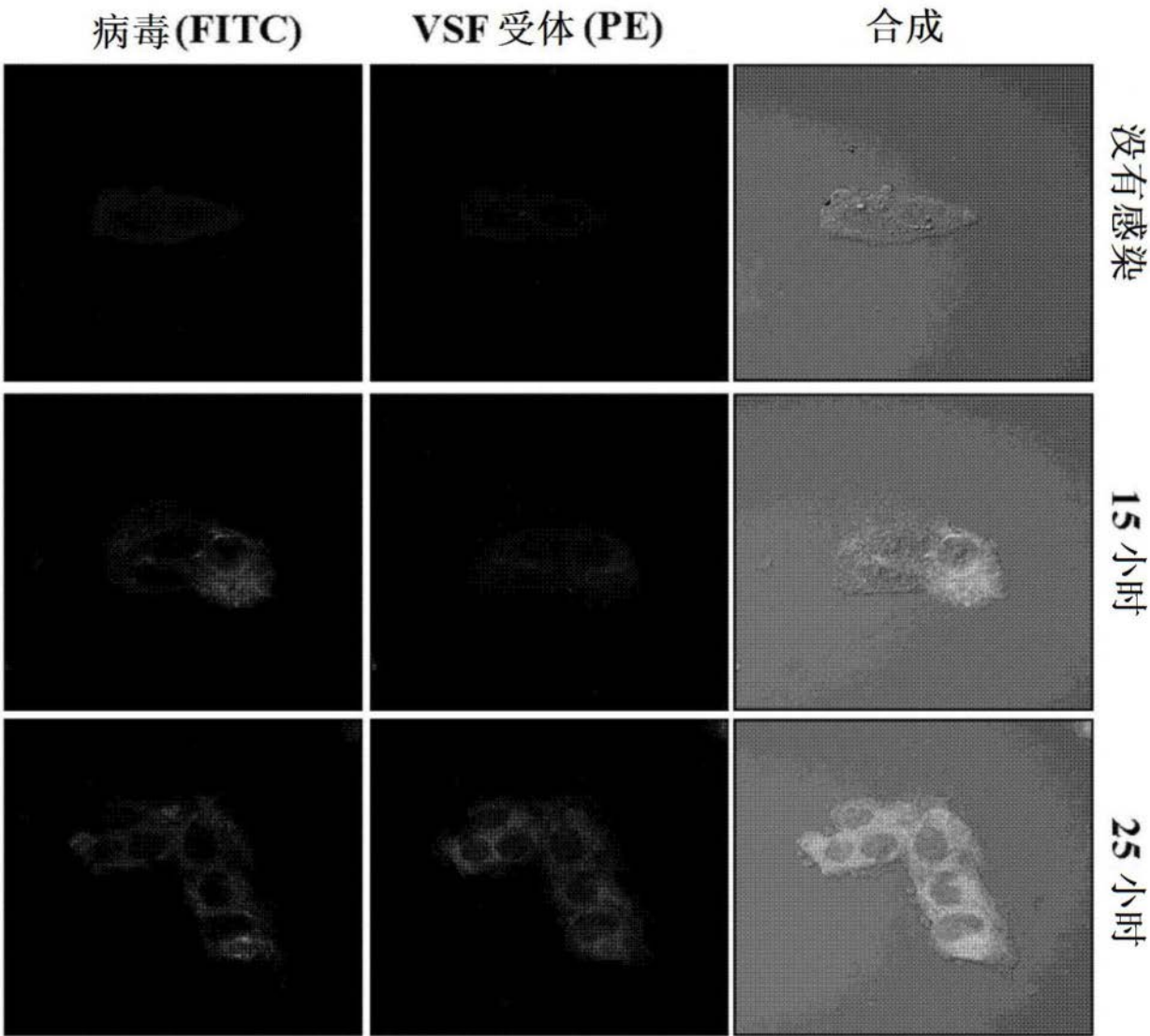


图29

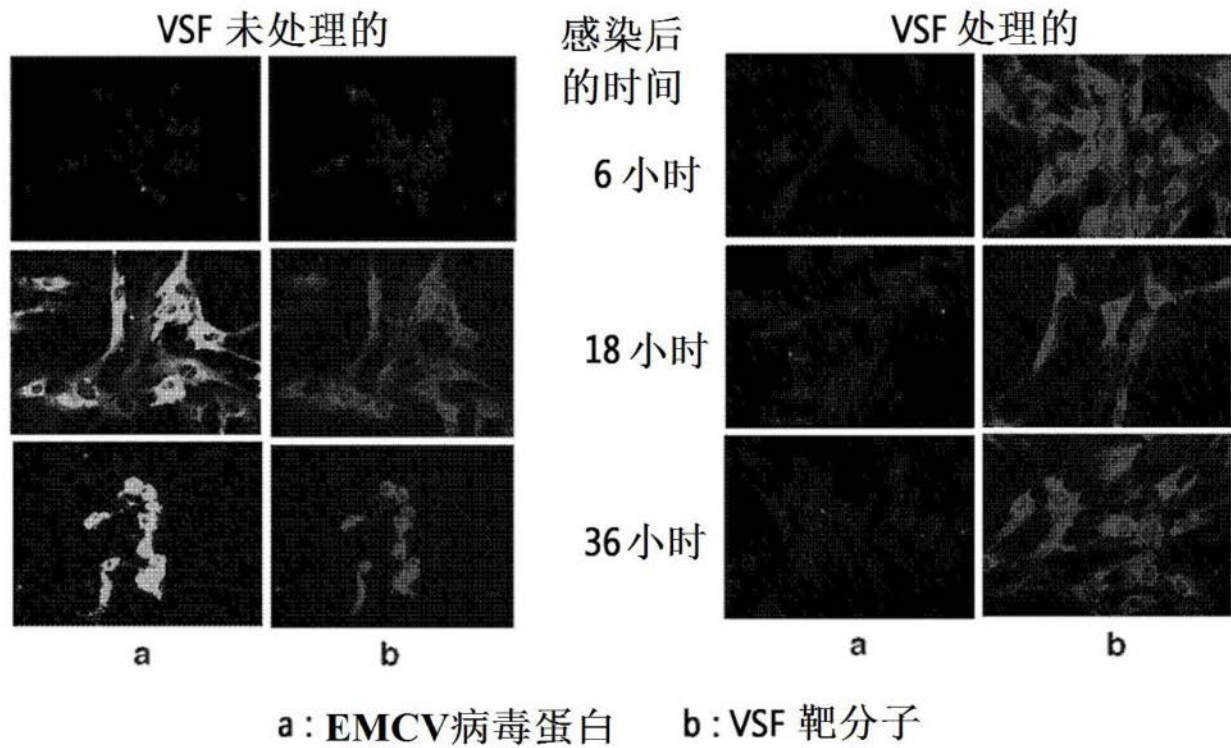


图30

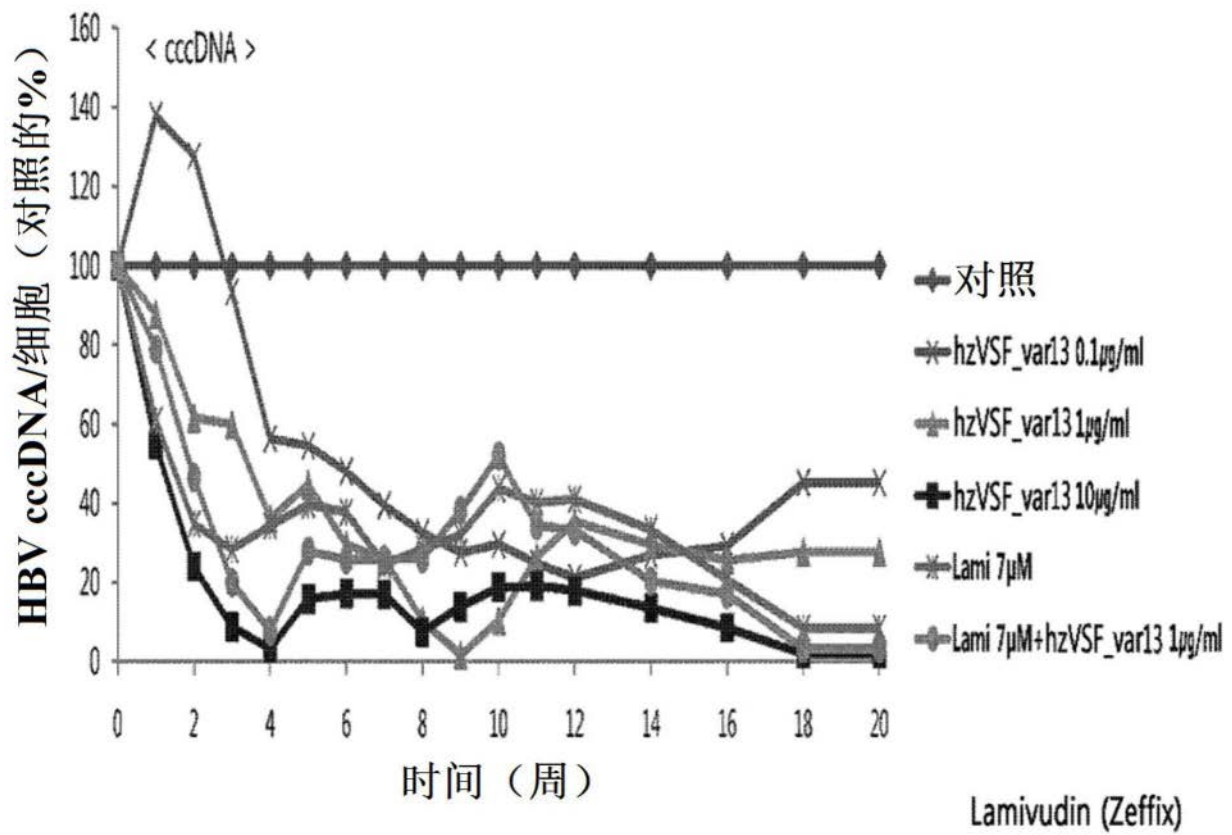


图31

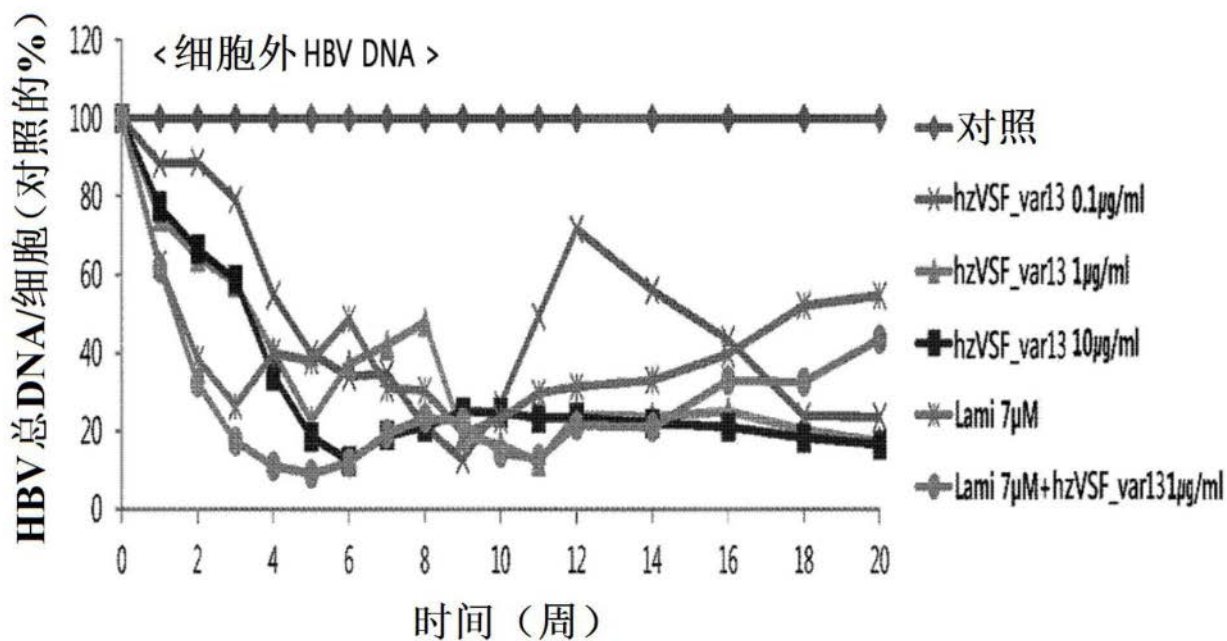


图32

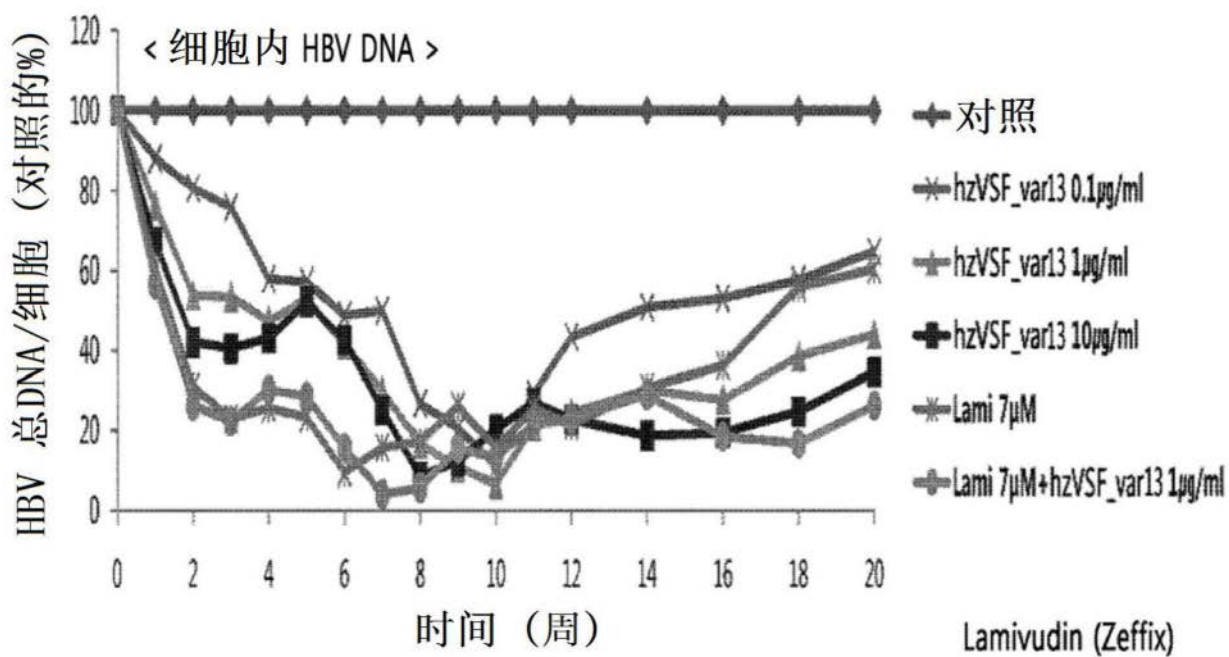


图33

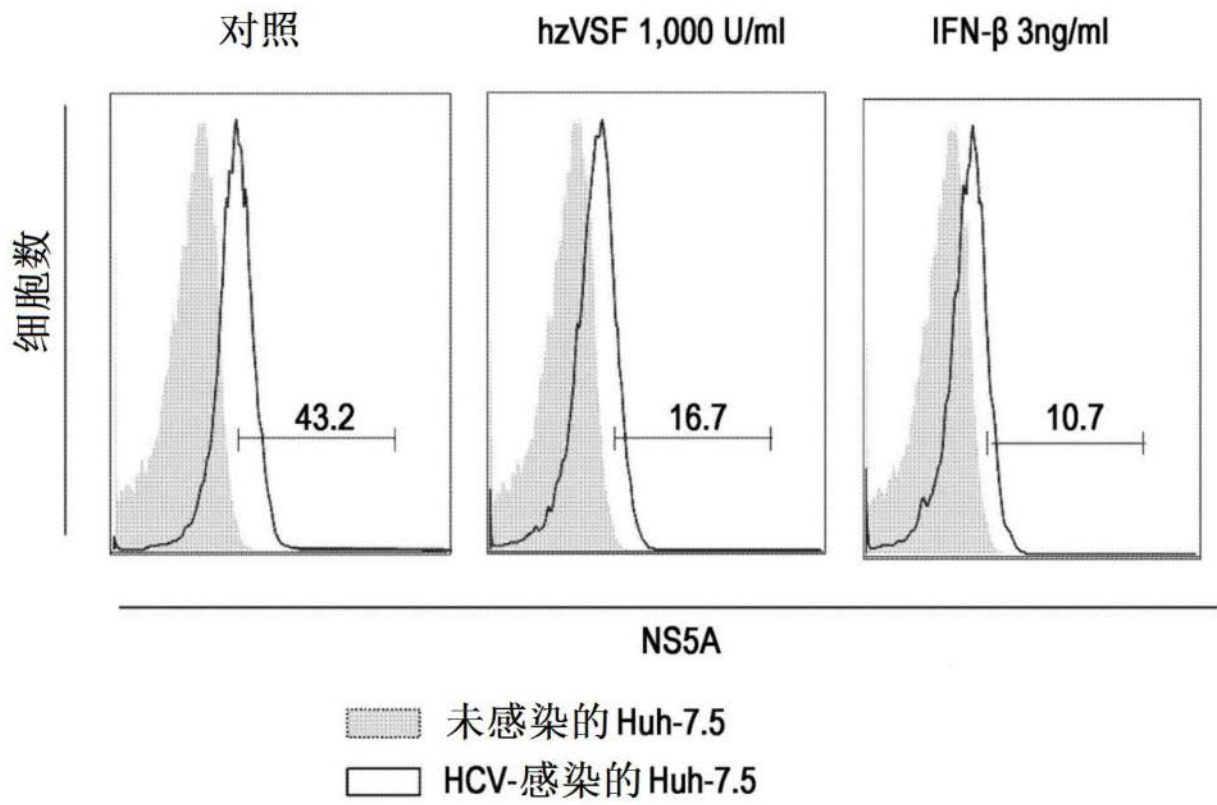


图34

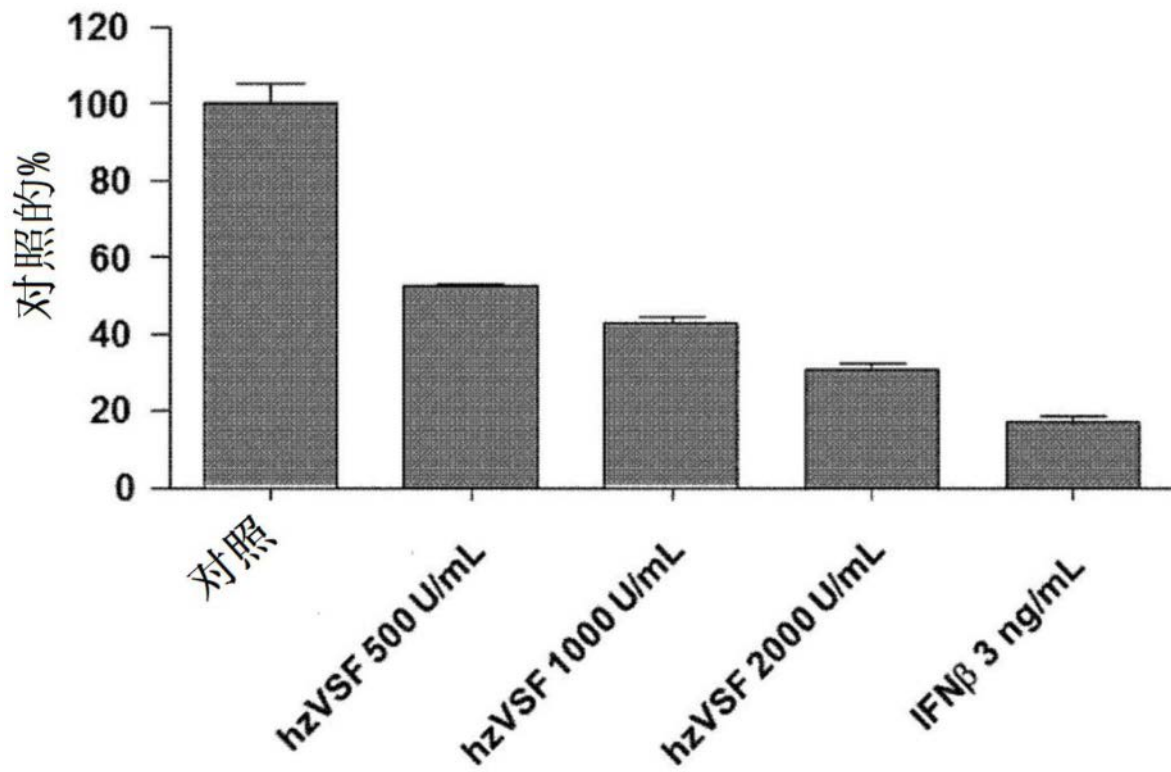


图35

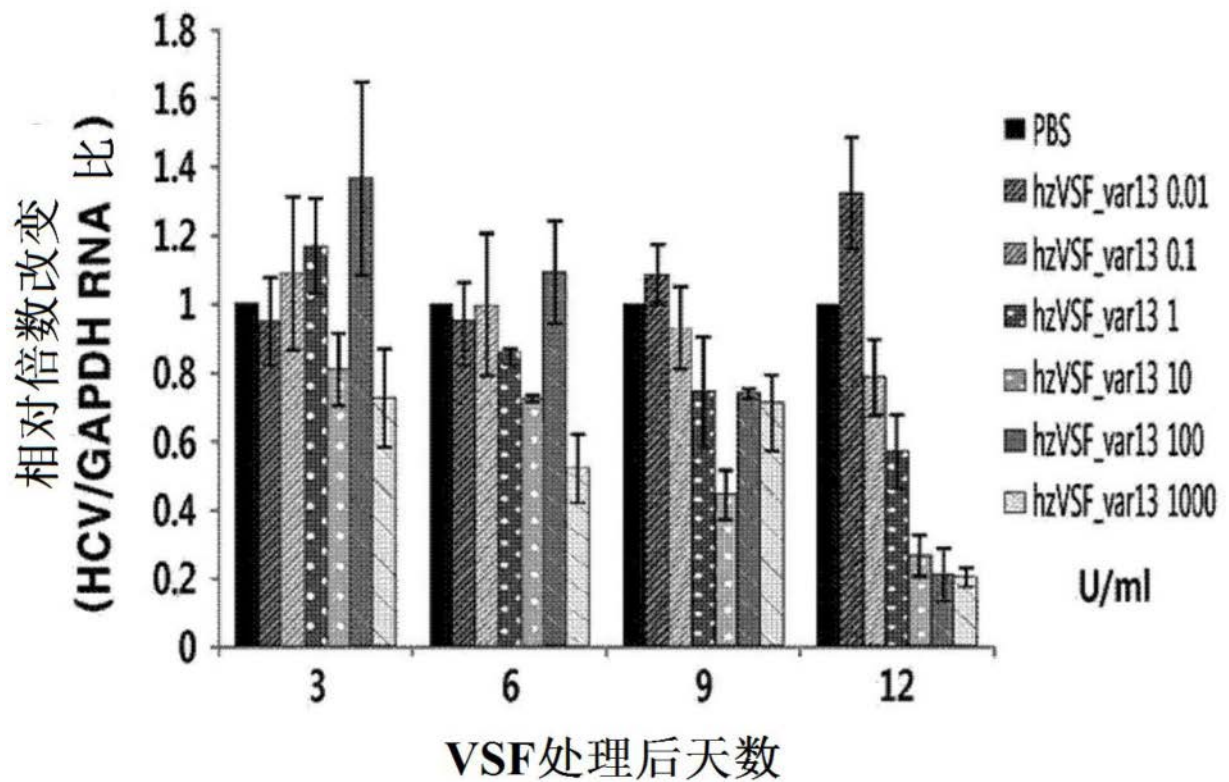
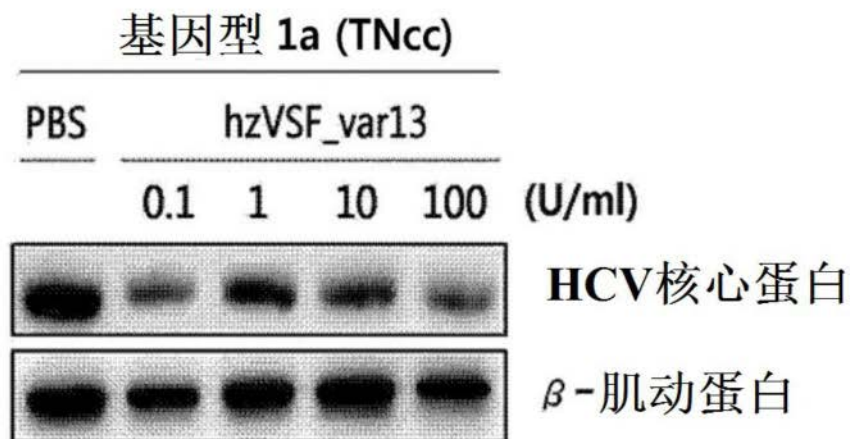
A. 实时RT-PCR**B. 蛋白质印迹**

图36

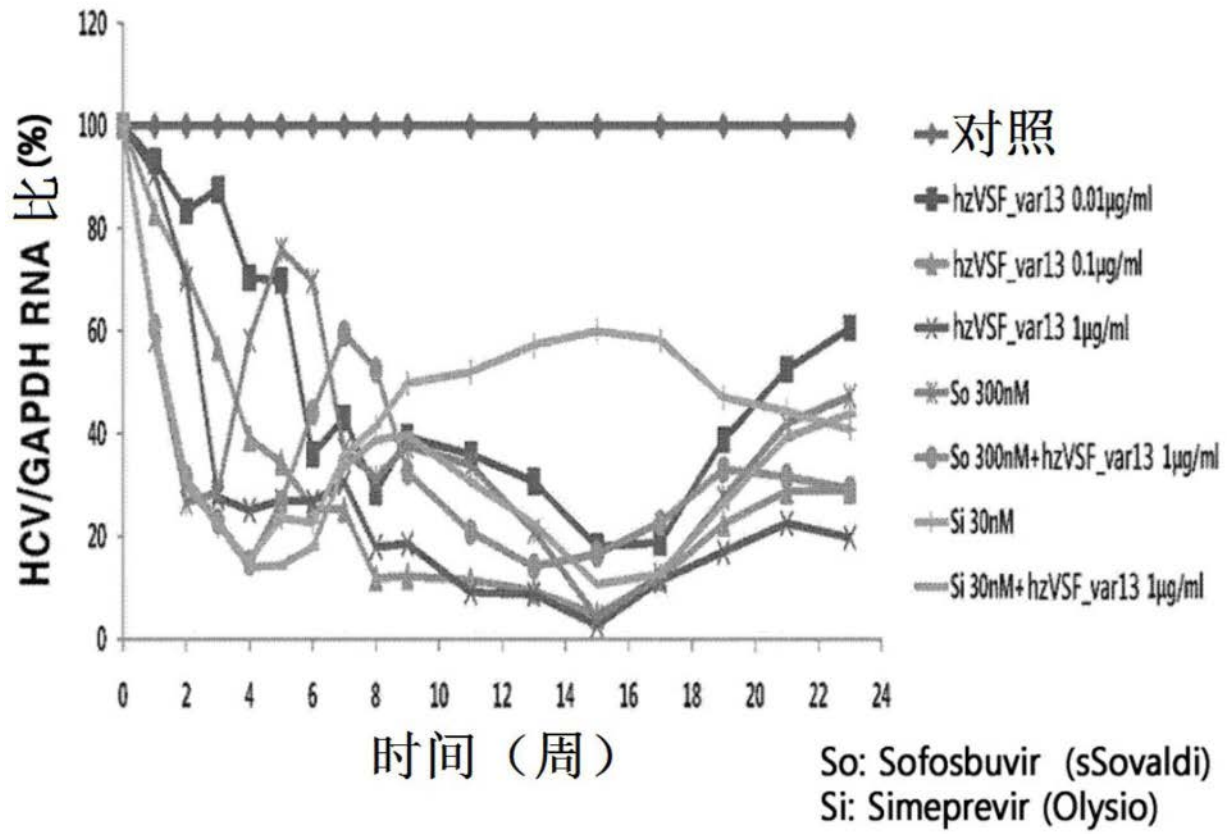


图37

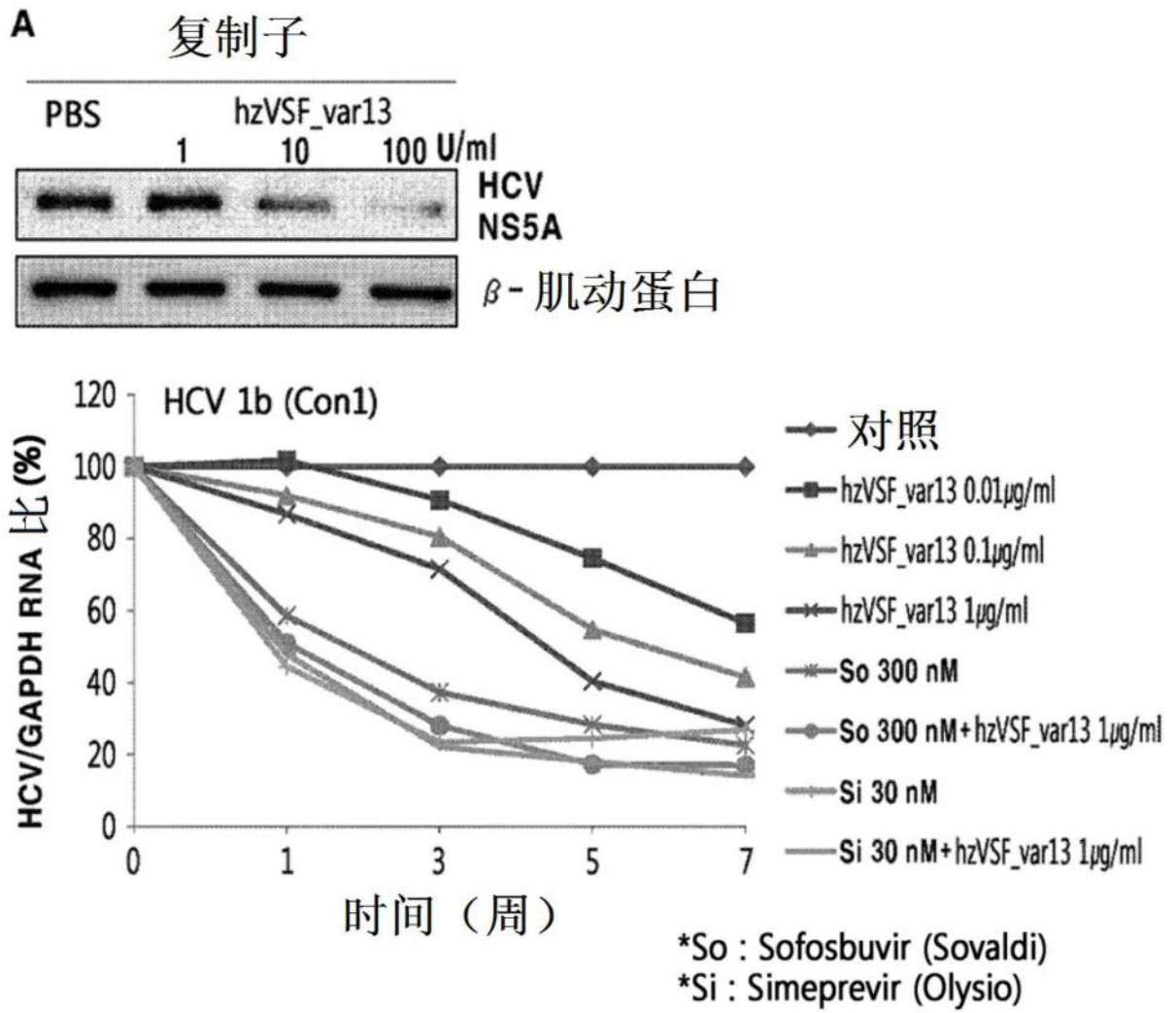


图38

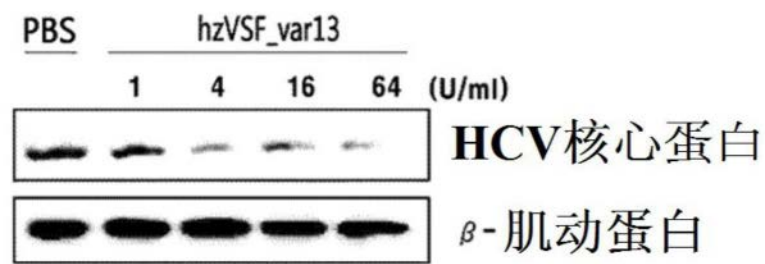
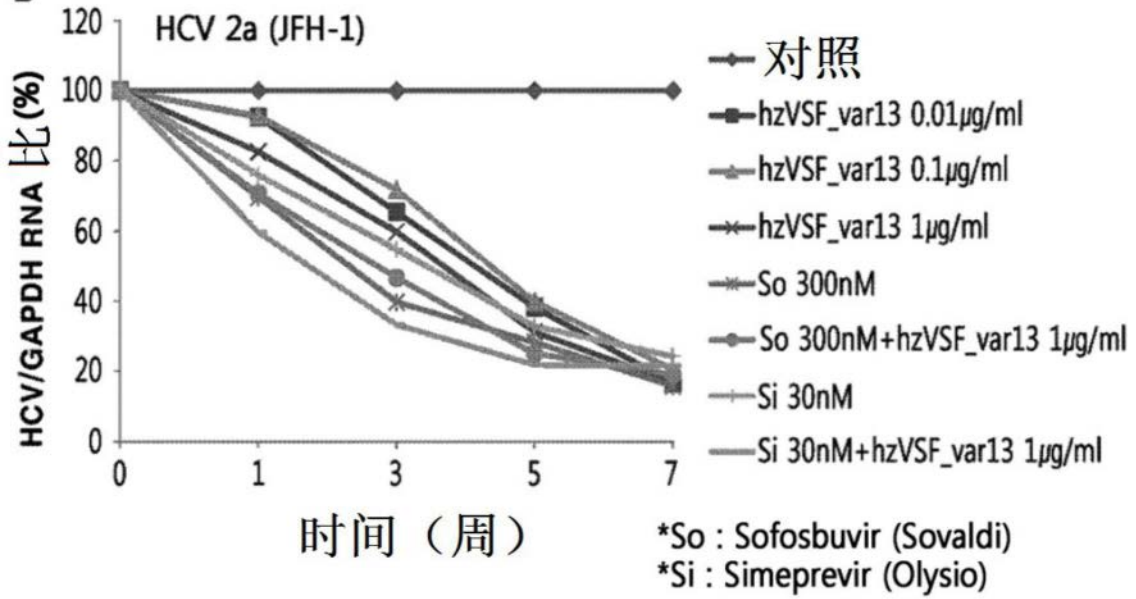
A 基因型 2a (JFH-1)**B**

图39

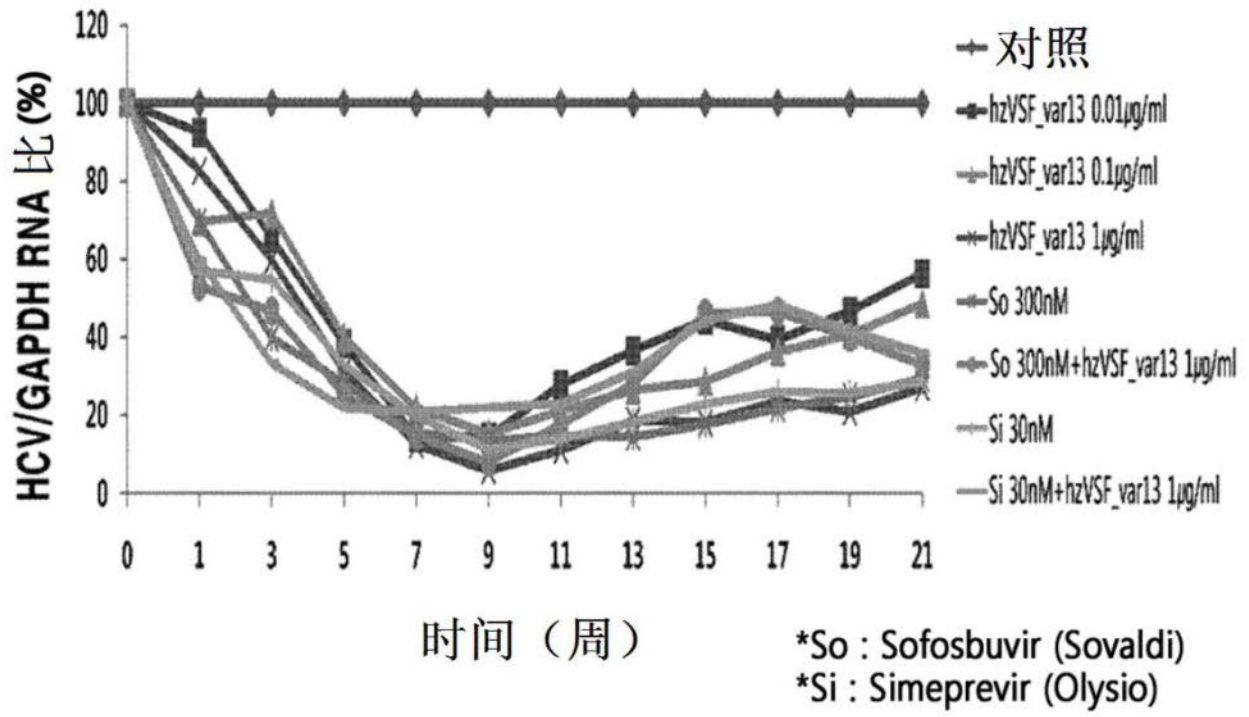


图40

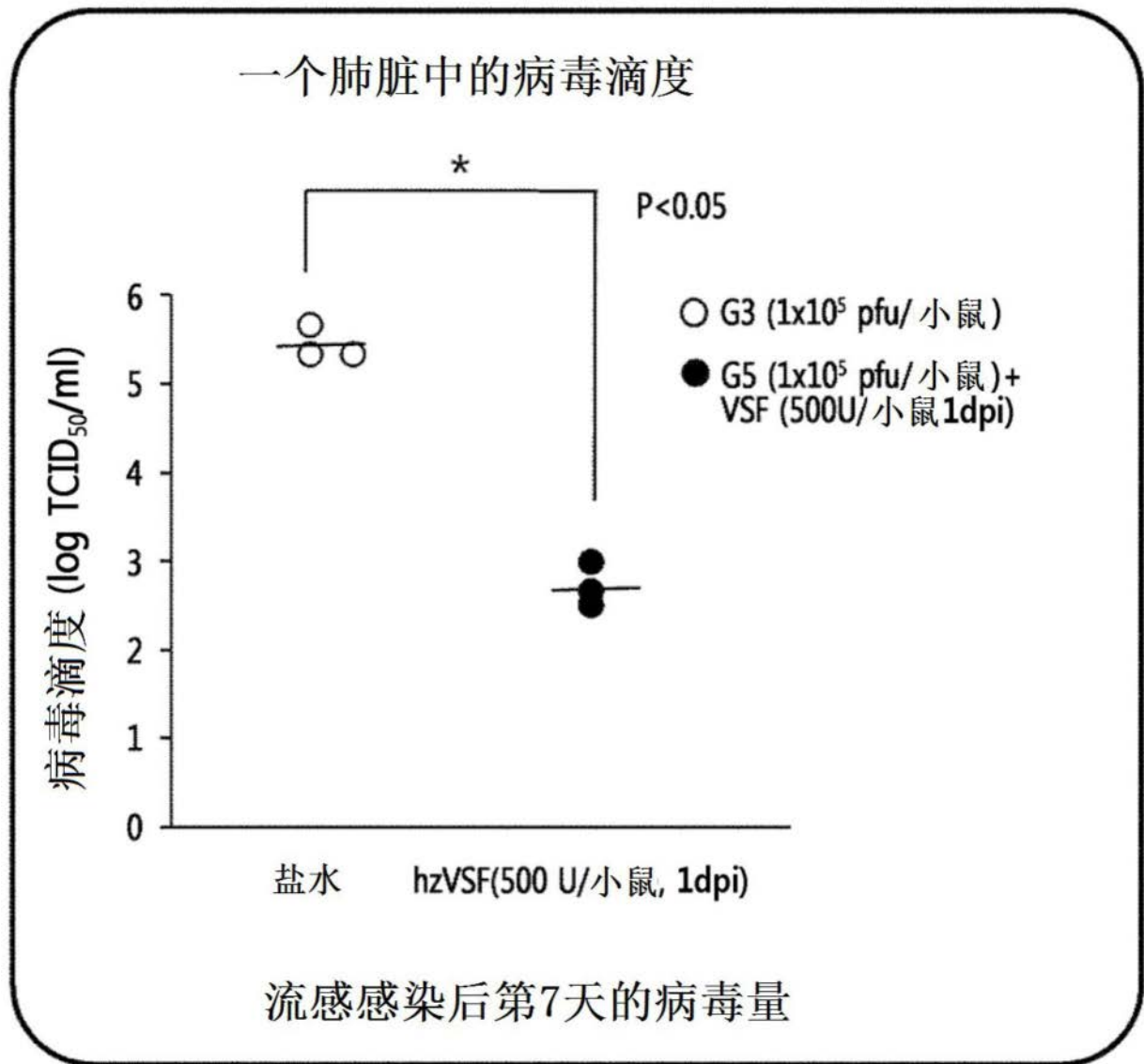


图41

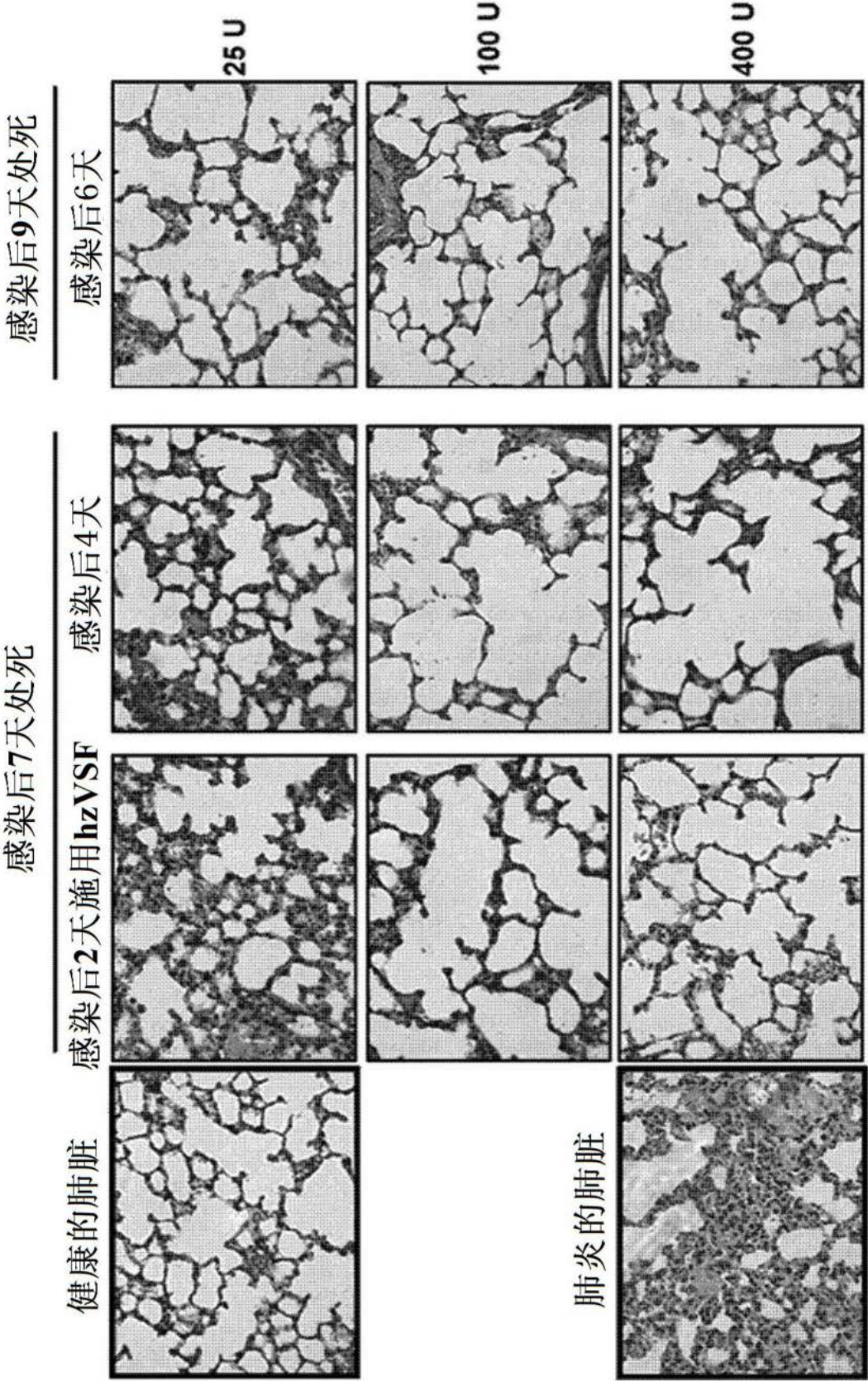


图42

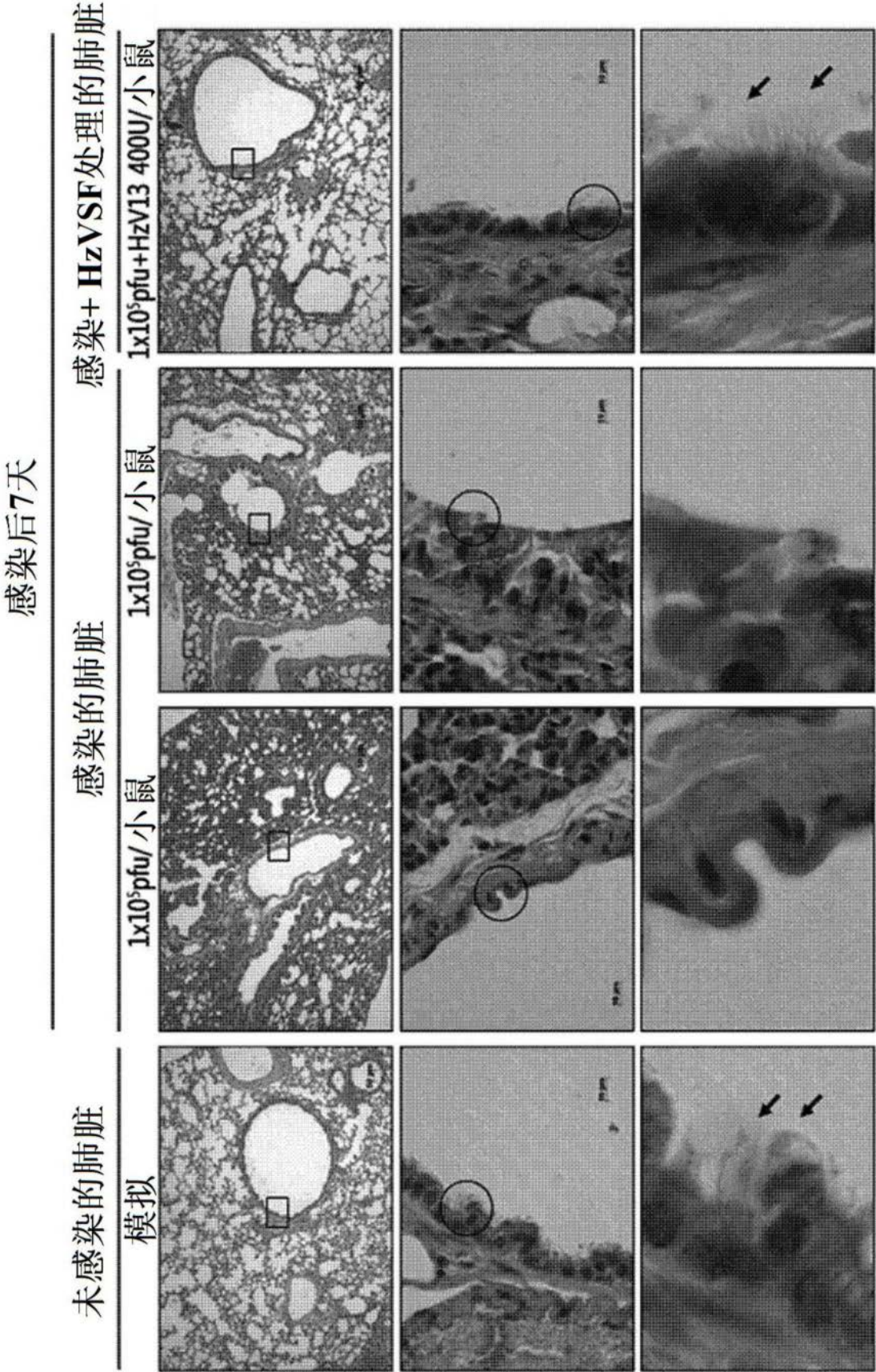


图43

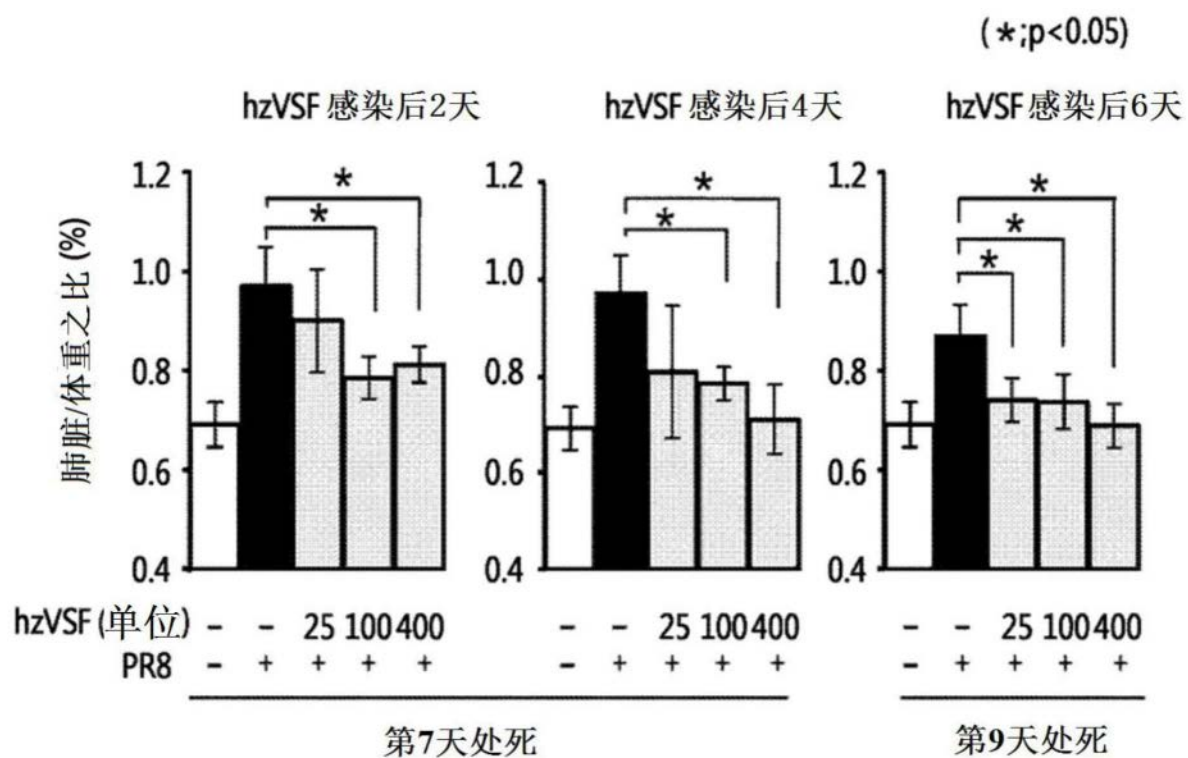
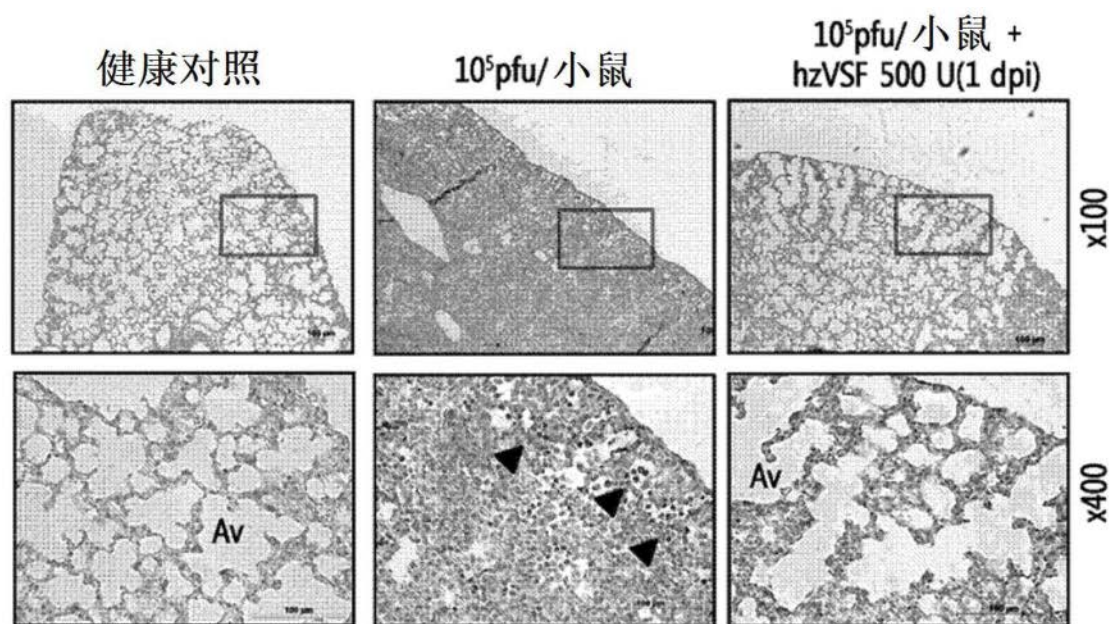


图44



▲: CD4细胞的浸润 感染后7天用抗小鼠CD4的抗体染色的肺脏

图45

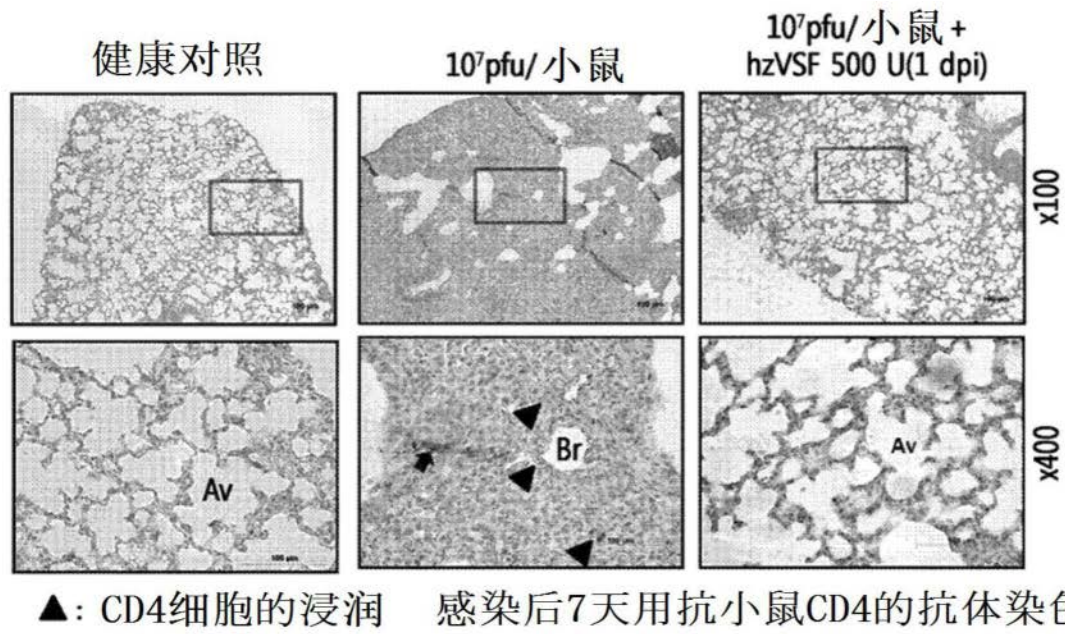


图46

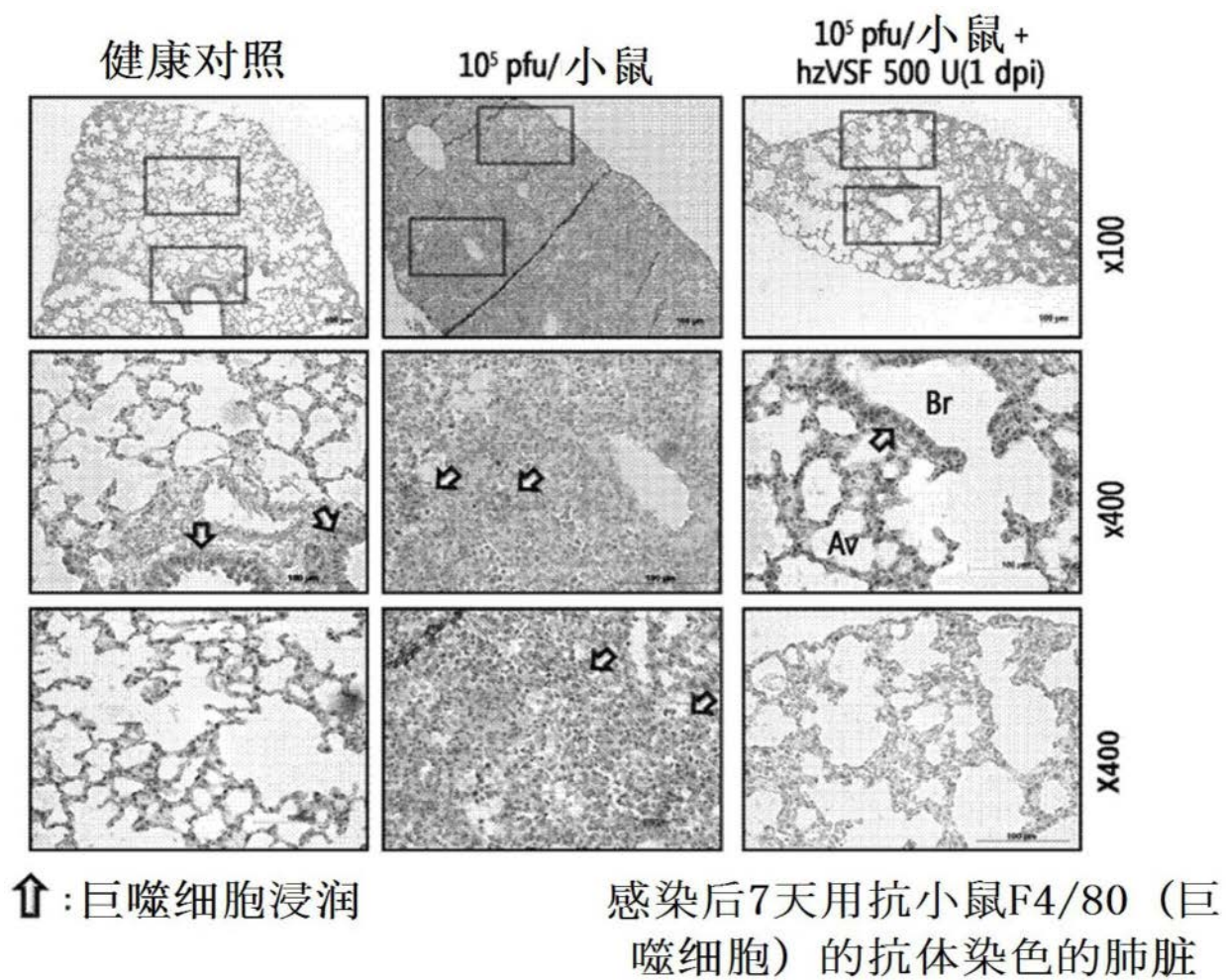
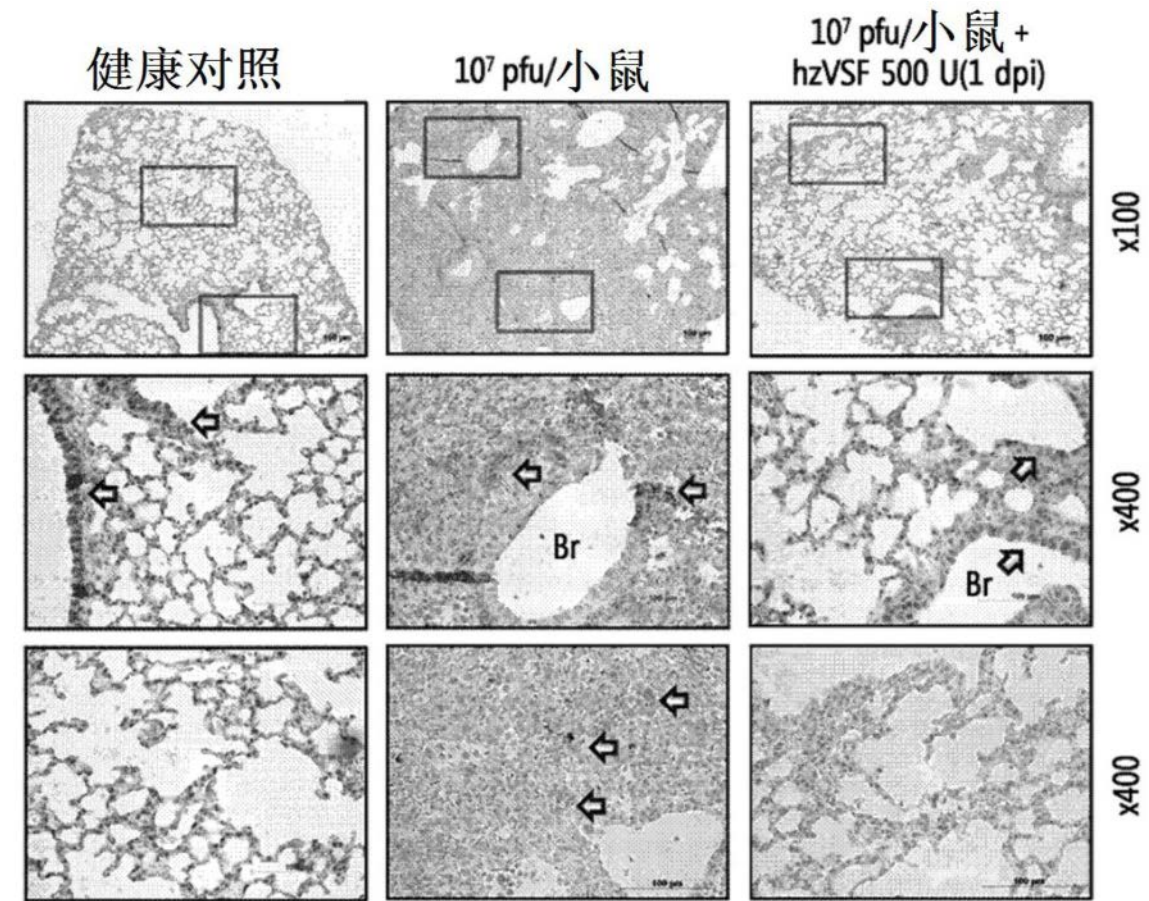


图47



↑: 巨噬细胞浸润

感染后7天用抗小鼠F4/80 (巨噬细胞) 的抗体染色的肺脏

图48

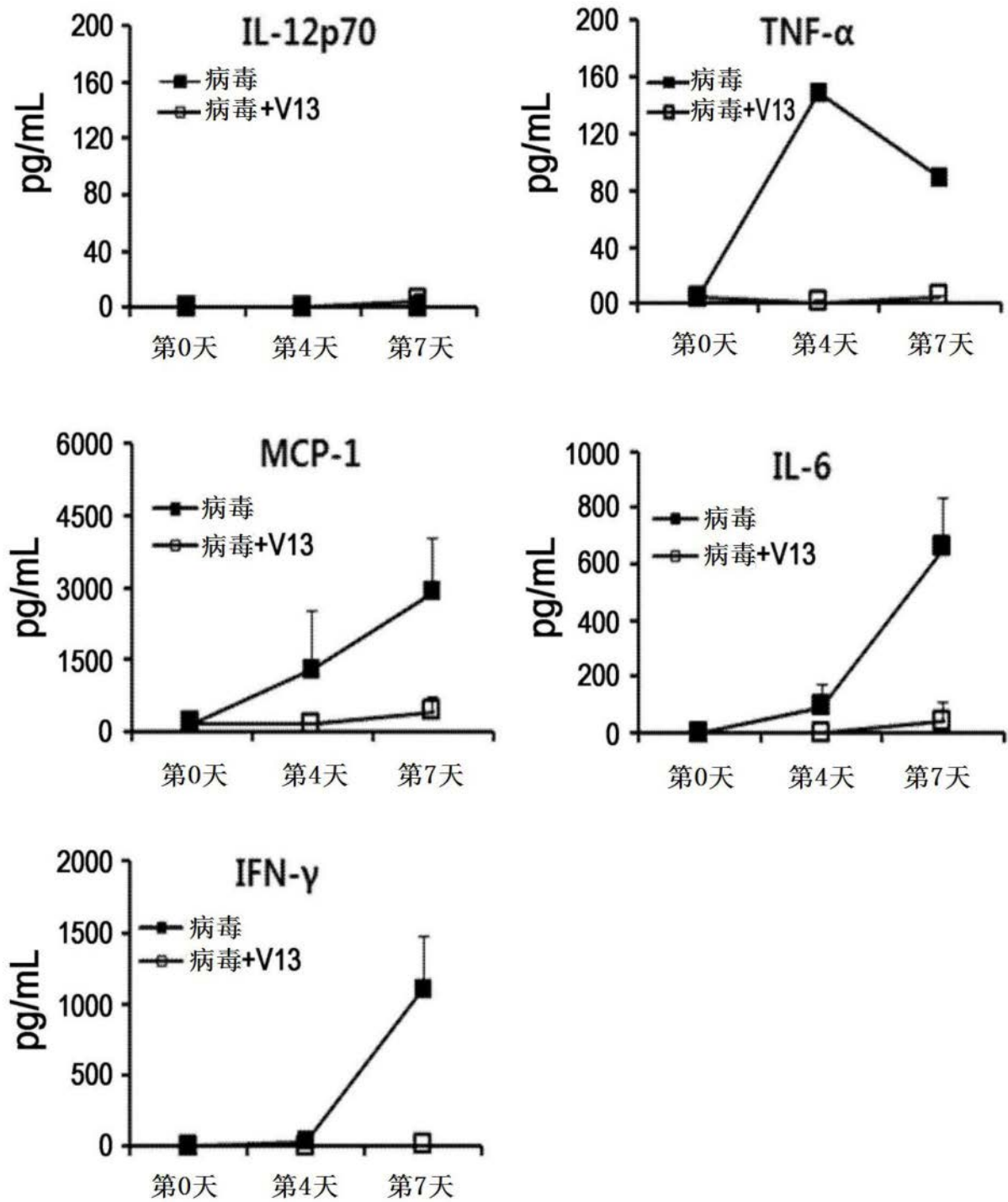


图49

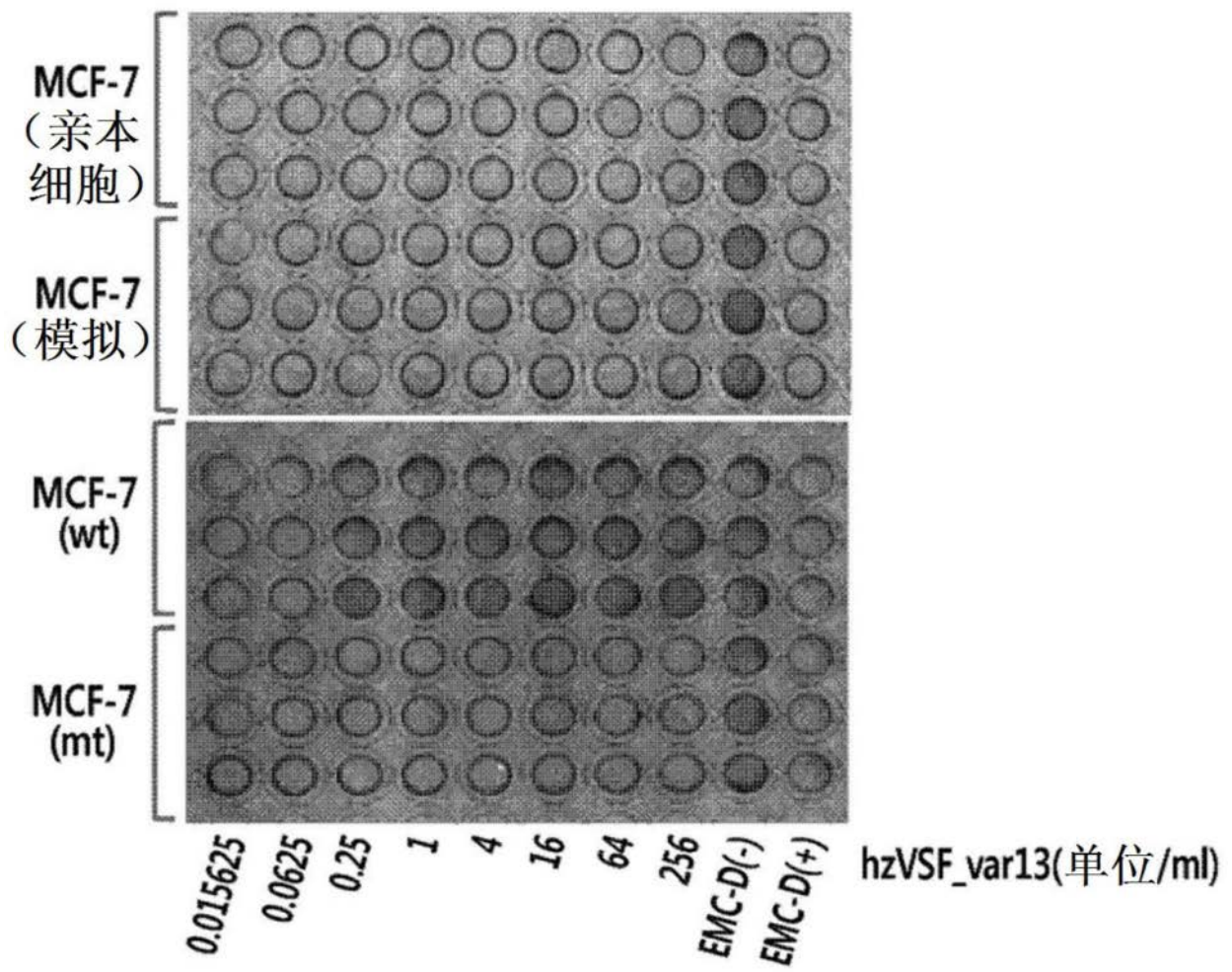
MVIT 测定

图50

WST 测定

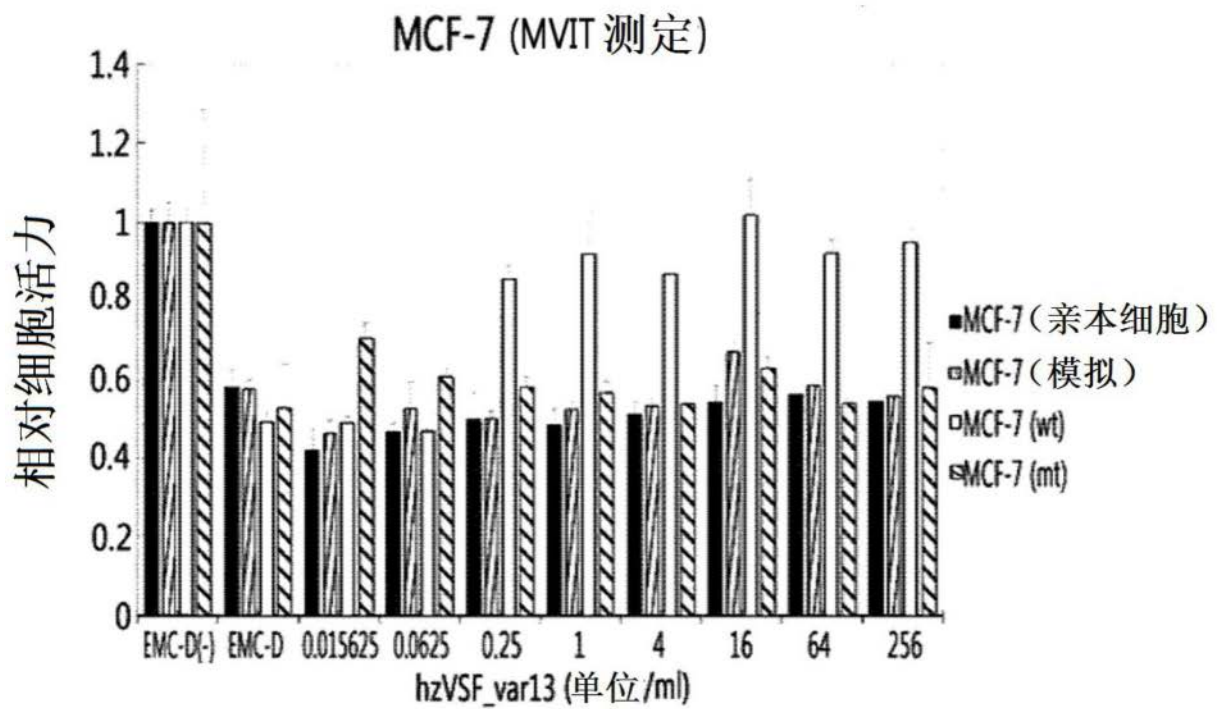
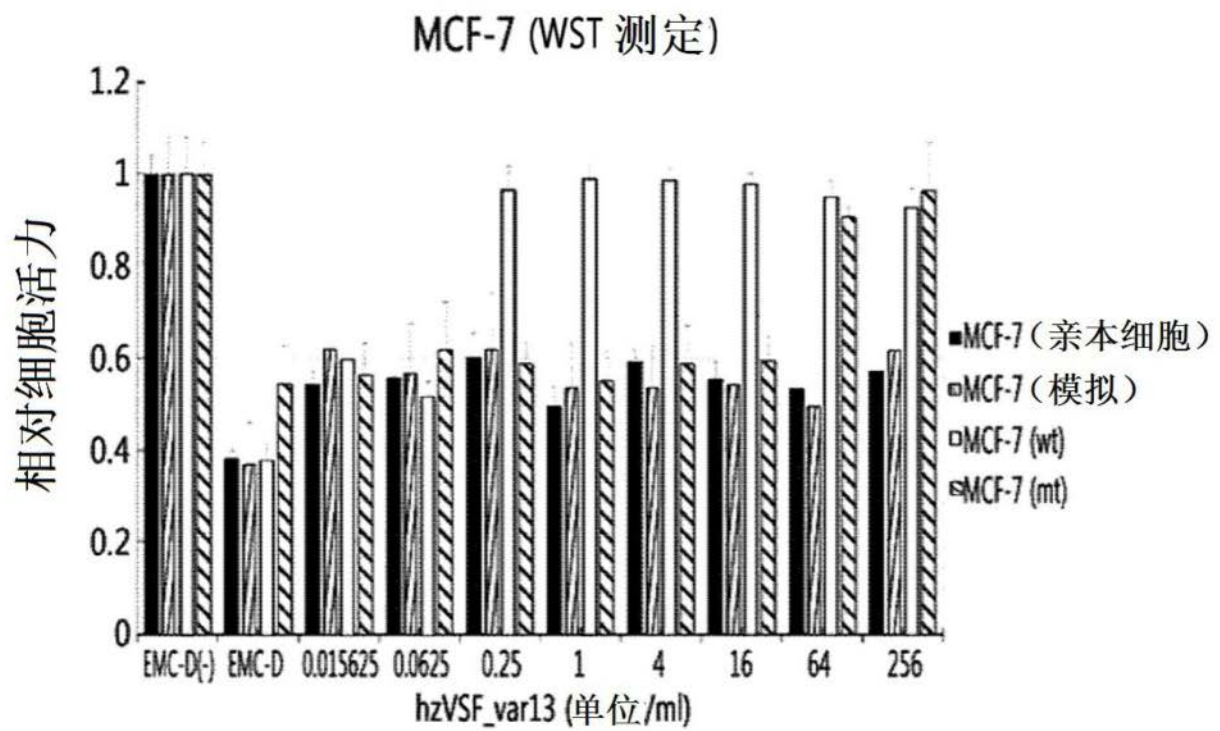


图51

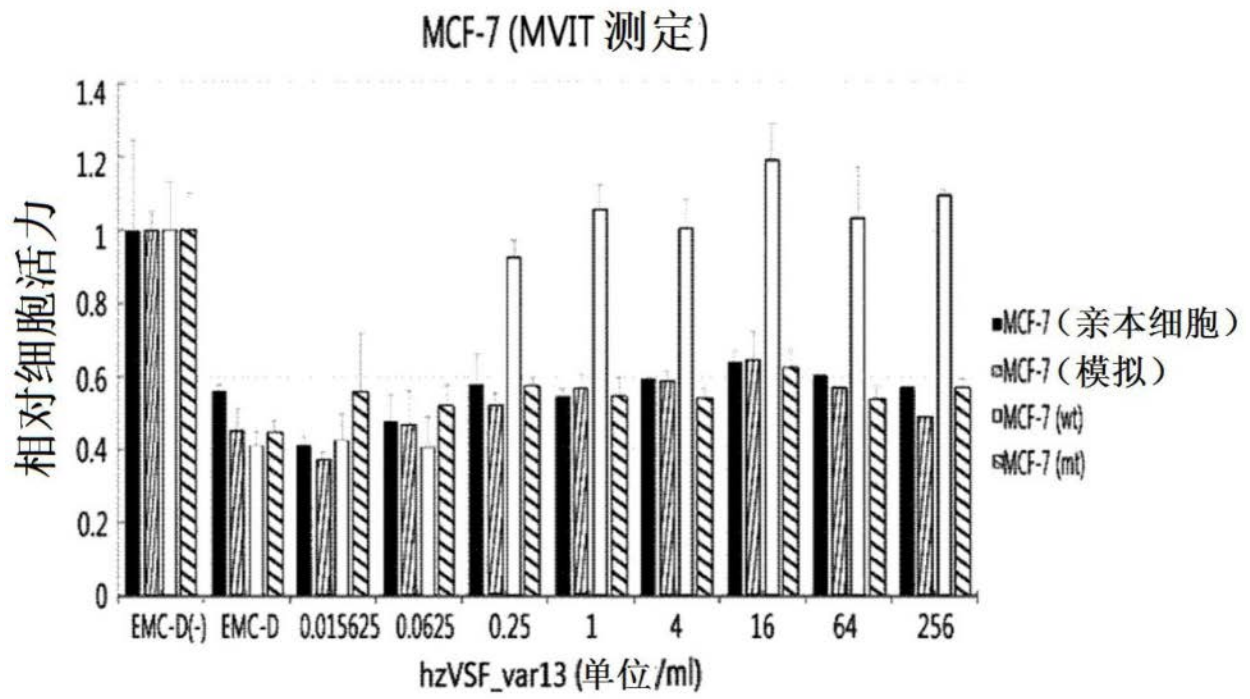
MVIT 测定

图52

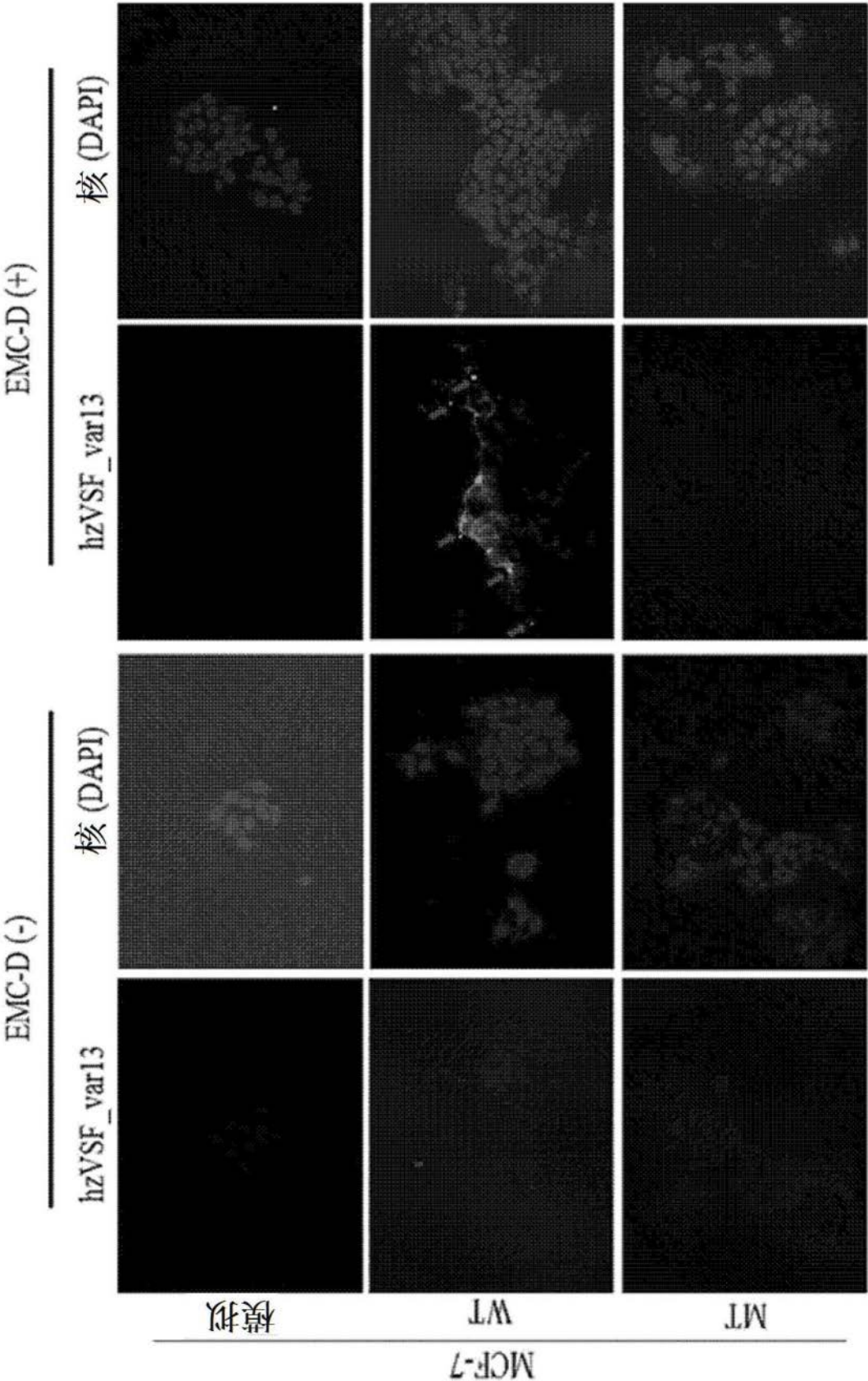
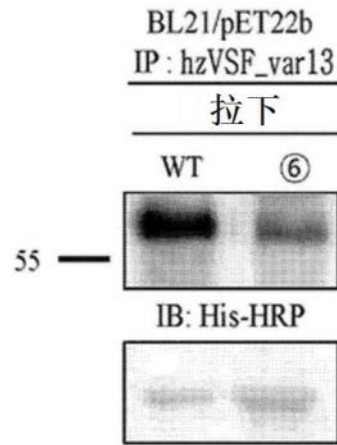


图53



输入, 考马斯染色

野生型 (WT) 和 Y150F/R186K/Q195N/R217K/K235R/R270K (⑥)

图54

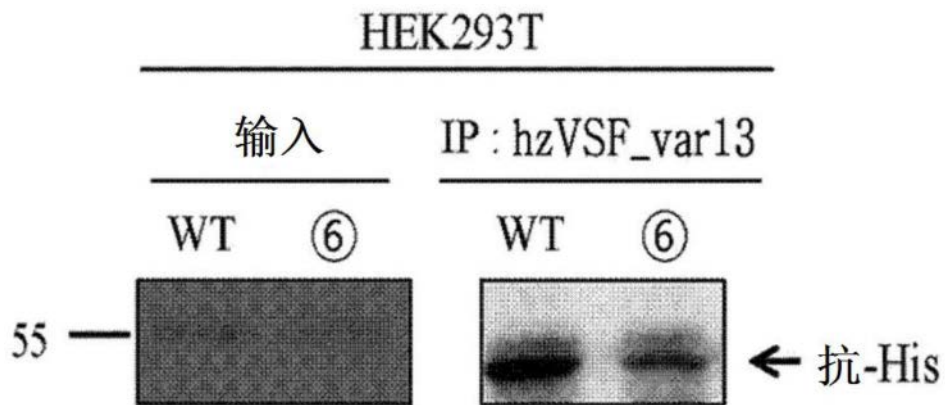
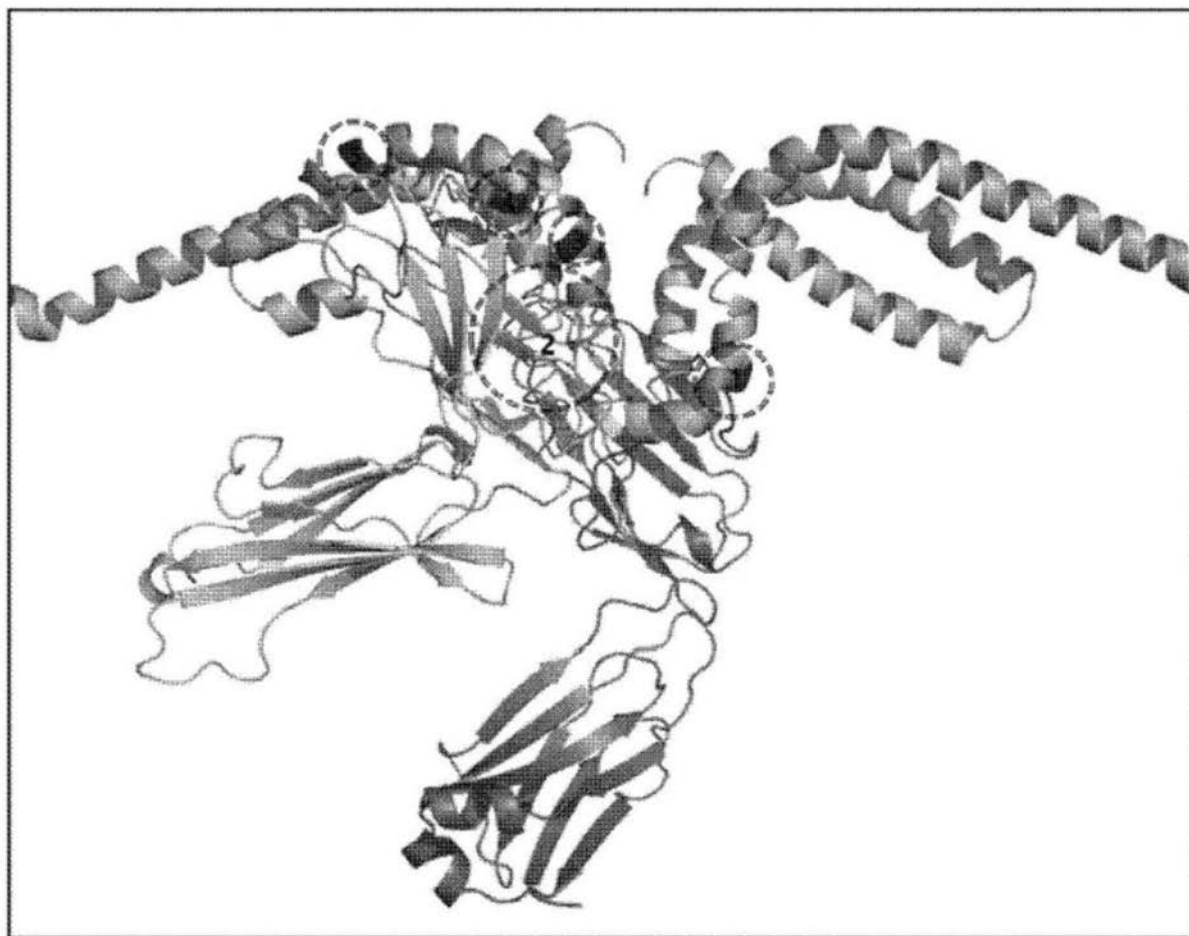


图55

波形蛋白-VSF结合模型



绿色: p60

青色: VSF_HC

品红: VSF_LC

红色: **P60**中的结合残基 (R186, Q195, R217, K235, R270)

图56

波形蛋白-VSF结合模型

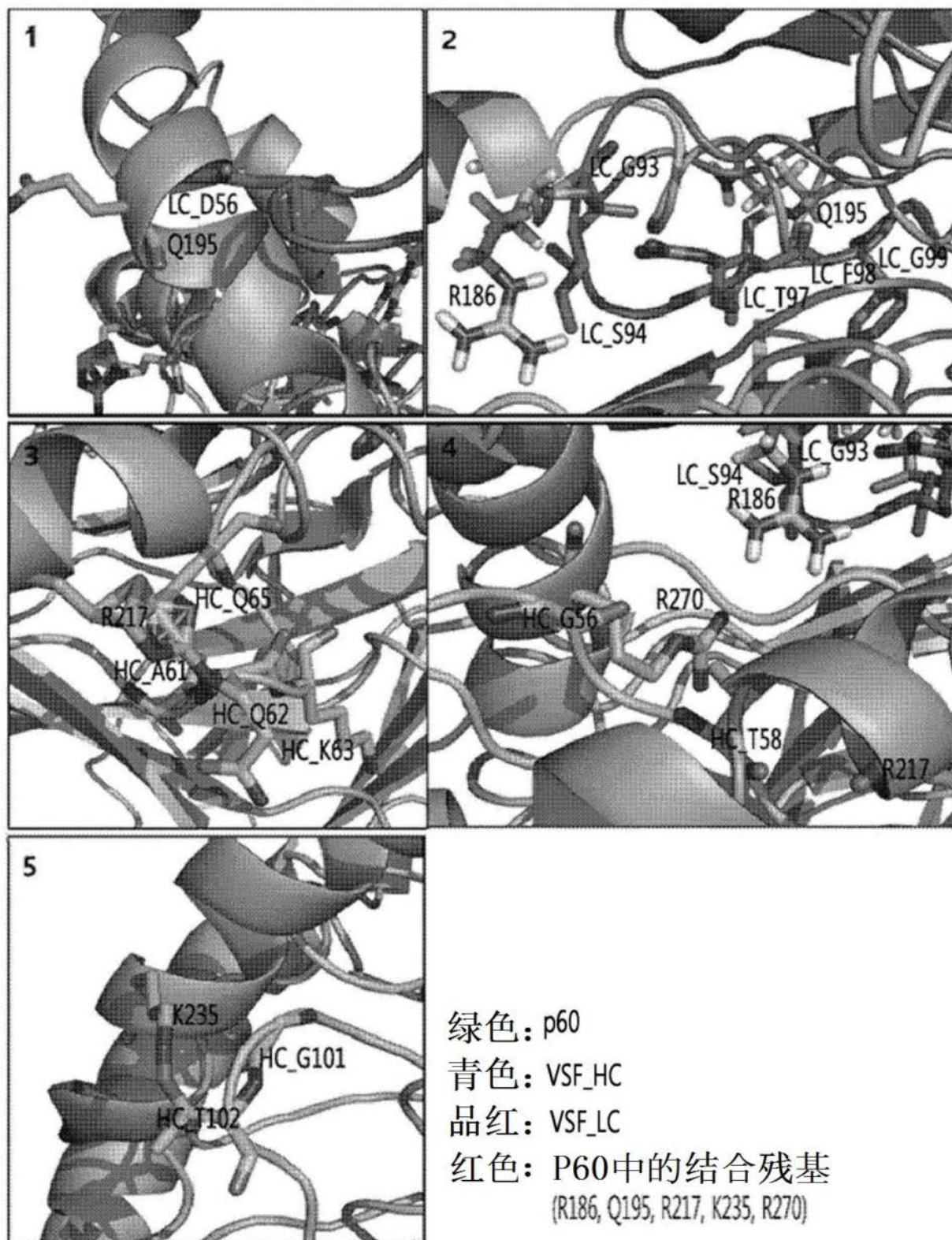
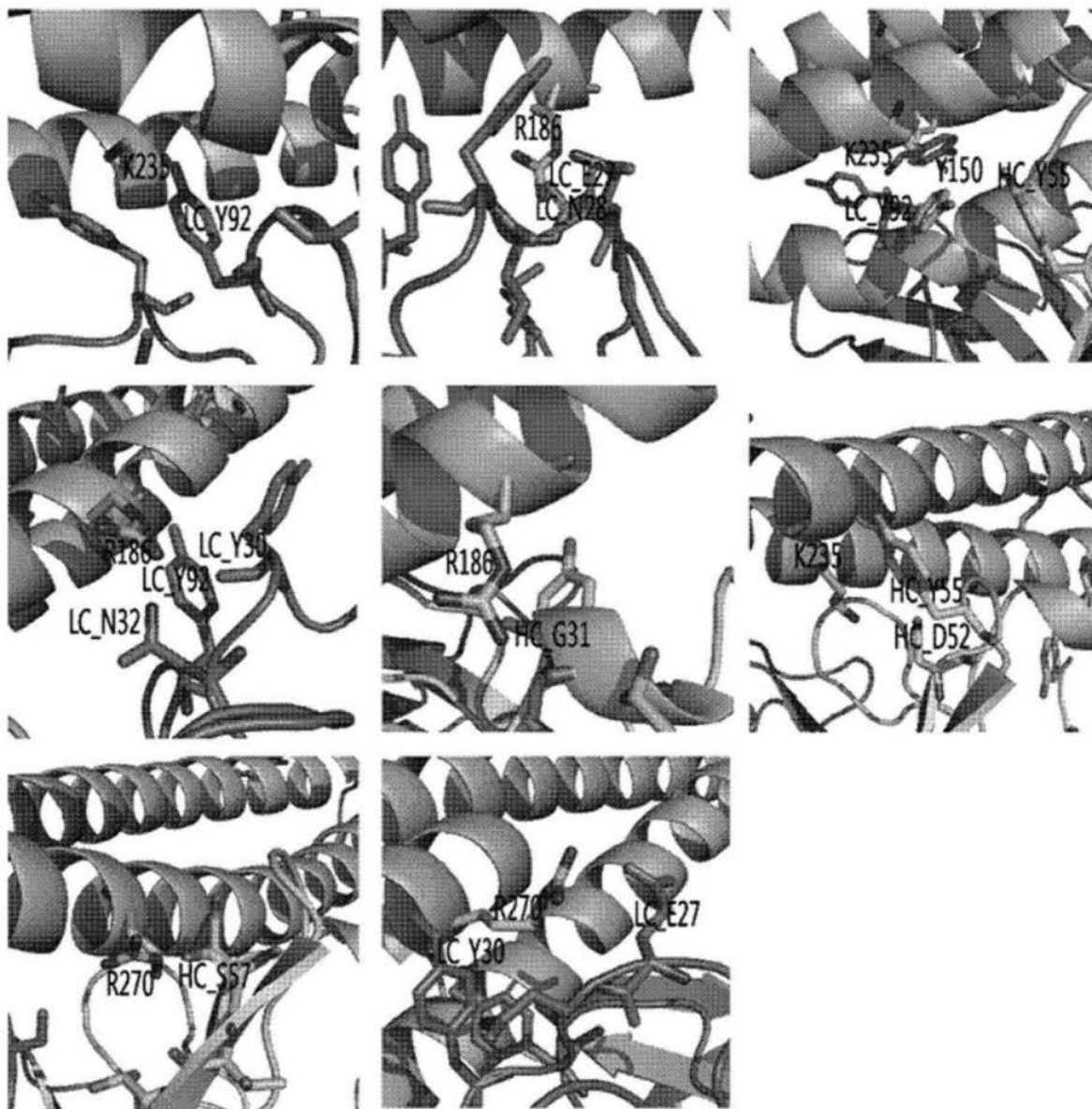


图57

波形蛋白-VSF结合模型



- 绿色:p60, 青色:HC, 品红: LC
- 就P60中的结合残基证实四聚体VSF的结合残基 (Y150, R186, K235, R270)
- 在该复杂建模中, 没有观察到与Q195和R217的结合。

图58