



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103980361 B

(45)授权公告日 2017.06.23

(21)申请号 201410209919.1 *C12N 15/13*(2006.01)  
(22)申请日 2005.05.10 *C12N 15/63*(2006.01)  
(65)同一申请的已公布的文献号 *C12N 1/15*(2006.01)  
申请公布号 CN 103980361 A *C12N 1/19*(2006.01)  
(43)申请公布日 2014.08.13 *C12N 1/21*(2006.01)  
(30)优先权数据 *C12N 5/10*(2006.01)  
60/569,892 2004.05.10 US *A61K 39/395*(2006.01)  
(62)分案原申请数据 *A61P 37/00*(2006.01)  
200580023307.2 2005.05.10 *A61P 35/00*(2006.01)  
*A61P 37/06*(2006.01)

(73)专利权人 艾比吉诺米克斯合作公司  
地址 荷兰阿姆斯特丹  
(72)发明人 林荣华 张重男 陈佩君 黄久珍  
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105  
代理人 闵丹

### (56)对比文件

CN 1333123 A,2002.01.30,  
CN 1342085 A,2002.03.27,  
CN 1473052 A,2004.02.04,

审查员 李子东

(51)Int.Cl.  
*C07K 16/00*(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页  
序列表35页

### (54)发明名称

抗体

### (57)摘要

免疫球蛋白链或抗体,其具有与P-选择蛋白糖蛋白配体-1结合的抗体的轻链或重链互补决定区。还公开了编码免疫球蛋白链的核酸、具有核酸的载体和宿主细胞,以及诱导活化T细胞死亡的方法和在受试者中调节T细胞介导的免疫应答的方法。

1. 抗体, 包含轻链和重链, 其中
  - (i) 所述轻链依次包含轻链互补决定区 (CDR) SEQ ID NO:7-9和所述重链依次包含重链 CDR SEQ ID NO:10-12;或
  - (ii) 所述轻链依次包含轻链CDR SEQ ID NO:13-15和所述重链依次包含重链CDR SEQ ID NO:16-18。
2. 权利要求1的抗体, 其中所述轻链和重链分别含有SEQ ID NO:21和22、或23和24。
3. 权利要求1或2的抗体, 其特异性结合P-选择蛋白糖蛋白配体-1, 其中所述抗体在活化T细胞上与P-选择蛋白糖蛋白配体-1结合时, 诱导活化T细胞的死亡。
4. 权利要求3的抗体, 其中所述抗体与人P-选择蛋白糖蛋白配体-1结合。
5. 诱导活化T细胞死亡的体外方法, 包括使权利要求1-4中任一项的抗体与活化T细胞接触, 其中所述抗体与活化T细胞的结合诱导所述活化T细胞的死亡。
6. 权利要求1-4中任一项的抗体在制备用于在受试者中调节T细胞介导的免疫应答的药物中的用途, 其中所述受试者患有与过度的T细胞介导的免疫应答相关病症或存在该风险, 其中所述病症是炎症性疾病、自身免疫性疾病、变应性疾病或T细胞癌症。
7. 权利要求6的用途, 其中所述病症是同种异体或异种的移植的排斥。
8. 分离的核酸, 其包含编码依次包含轻链互补决定区 (CDR) SEQ ID NO:7-9的免疫球蛋白链或编码依次包含重链CDR SEQ ID NO:10-12的免疫球蛋白重链的序列。
9. 分离的核酸, 其包含编码依次包含轻链互补决定区 (CDR) SEQ ID NO:13-15的免疫球蛋白链或编码依次包含重链CDR SEQ ID NO:16-18的免疫球蛋白重链的序列。
10. 包含权利要求8的核酸的载体。
11. 包含权利要求9的核酸的载体。
12. 宿主细胞, 其包含编码SEQ ID NO:7-9、SEQ ID NO:10-12、SEQ ID NO:13-15或SEQ ID NO:16-18的核酸。
13. 权利要求12的宿主细胞, 其中所述细胞是细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。
14. 权利要求13的宿主细胞, 其中所述哺乳动物细胞是杂交瘤细胞。
15. 宿主细胞, 包含编码SEQ ID NO:21、22、23或24的核酸。
16. 权利要求15的宿主细胞, 其中所述细胞是细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞。
17. 权利要求16的宿主细胞, 其中所述哺乳动物细胞是杂交瘤细胞。
18. 抗体, 其特异性结合人P-选择蛋白糖蛋白配体-1 (PSGL-1), 其中所述抗体包括 (i) 轻链, 所述轻链包括具有与人 $\kappa$ 轻链恒定区连接的SEQ ID NO:21的氨基酸序列的可变区, 和 (ii) 重链, 所述重链包括具有与人IgG4重链恒定区连接的SEQ ID NO:22的氨基酸序列的可变区。
19. 抗体, 其特异性结合人P-选择蛋白糖蛋白配体-1 (PSGL-1), 其中所述抗体包括 (i) 轻链, 所述轻链包括具有与人 $\kappa$ 轻链恒定区连接的SEQ ID NO:23的氨基酸序列的可变区, 和 (ii) 重链, 所述重链包括具有与人IgG4重链恒定区连接的SEQ ID NO:24的氨基酸序列的可变区。
20. 权利要求1、18或19中任一项的抗体, 其特异性结合人P-选择蛋白糖蛋白配体-1的

氨基酸残基50-60。

21. 权利要求1、18或19中任一项所述的抗体,其中所述抗体是嵌合的。

22. 权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是人源化的。

23. 权利要求1-4或18-19中任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者中的移植物抗宿主病 (GVHD) 的药物中的用途。

## 抗体

[0001] 本申请是申请日为2005年5月10日,申请号为200580023307.2(国际申请号为PCT/US2005/016357),名称为“抗体”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关的申请

[0003] 本申请要求2004年5月10日提交的美国临时申请系列号60/569,892的优先权,在此完整引用作为参考。

[0004] 背景

[0005] 过度侵袭性的T细胞常常引起不必要的免疫应答,其随后导致各种失调,例如,自体免疫疾病、移植排斥、过敏性疾病和T细胞来源的癌症。因此,在治疗这些疾病中控制侵袭性T细胞是关键。通过免疫抑制或通过免疫耐受性的诱导可以限制这些细胞的活性。可选的方案是诱导细胞凋亡,据信这涉及除去不需要的细胞,包括过度侵袭性的T细胞。参见,例如,Kabelitz等(1993) *Immunol Today* 14,338-340;和Raff(1992) *Nature* 356,397-399。

[0006] 概述

[0007] 本发明涉及抗体和它们的衍生物,当其在活化的T细胞上与P-选择蛋白糖蛋白配体-1(PSGL-1)结合时诱导细胞凋亡,

[0008] 在一个方面,本发明的特征是具有三个序列的免疫球蛋白链,其(i)分别含有RSSQSIVHNDGNTYFE、KVSNRFS和FQGSHPVPLT(SEQ ID NOs:1-3);(ii)分别含有SFGMH、YINGGSSTIFYANAVKG和YASYGGGAMDY(SEQ ID NOs:4-6);(iii)分别含有RASSTVNSTYLH、GSSNLAS和QQYSGYPLT(SEQ ID NOs:7-9);(iv)分别含有AYYIH、VNPNTGGTSYNPKFKG和SGSPYYRYDD(SEQ ID NOs:10-12);(v)分别含有RSSQSIVNSNGNTYLE、KVSNRFS和FQGSHPVWT(SEQ ID NOs:13-15);或(vi)分别含有TNAMNWVRQAPGKGLE、TYYADSVKD和GGSYWYFDV(SEQ ID NOs:16-18)。

[0009] 刚才描述的六组序列的每一组相应于与PSGL-1结合的抗体的三个轻链或重链互补决定区(CDR),所述抗体例如以下实施例中描述的三种小鼠15A7、43B6和9F9抗体。以下显示的是这三个抗体的轻链和重链可变(V)区(SEQ ID NO:19-26),CDR是下划线和高亮的:

[0010] SEQ ID NO:19(小鼠15A7轻链V区):

1 ATGAAGTTGCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGAT  
 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

61 ATTTTGATGACCCAACTCCACTGTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCAATA  
 21 I L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATGGTAC  
 41 S C R S S Q S I V H N D G N T Y F E W Y

[0011] 181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAACCTCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCT  
 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

241 GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTACACTCAACATCAGC  
 81 G V P D R F S G S G S G T H F T L N I S

301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCATATGTTCTCTCTC  
 101 R V E A E D L G I Y Y C F Q G S Y V P L

361 ACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA  
 121 T F G A G T K L E L K

[0012] SEQ ID NO:20 (小鼠15A7重链V区):

1 ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAAAGGTGTCAGTGTGAT  
 1 M D S R L N L V F L V L I L K G V Q C D

61 GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCC  
 21 V Q L V E S G G G L V Q P G G S R K L S

121 TGTGCAGCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCTTTGGAAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCA  
 41 C A A S G F T F S S F G M H W V R Q A P

[0013] 181 GAGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAATGGTGGCAGTAGTACCATCTTCTATGCA  
 61 E K G L E W V A Y I N G G S S T I F Y A

241 AACGCAGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAATACCCTGTTCCCTG  
 81 N A V K G R F T I S R D N P K N T L F L

301 CAAATGACCATTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGGAAGGTATGCTAGT  
 101 Q M T I L R S E D T A I Y Y C G R Y A S

361 TACGGAGGGGGTCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA  
 121 Y G G G A M D Y W G Q G T S V T V S S

[0014] SEQ ID NO:21 (小鼠43B6轻链V区):

1 ATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGCTTCTTGCTAATCAGTGCCTCAGTTGCAATGTCC  
 1 M D F L V Q I F S F L L I S A S V A M S

61 AGAGGAGAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAG  
 21 R G E N V L T Q S P A I M S A S P G E K

121 GTCACCATGACCTGCAGGGCCAGCTCAACTGTAAATTCCACTTACTTGCAGTGGTTCCAG  
 41 V T M T C R A S S T V N A T Y L H W F Q

[0015]

181 CAGAAGTCAGGTGCCTCCCCAACTCTGGATTTATGGCTCATCCAACCTGGCTTCTGGA  
 61 Q K S G A S P K L W I Y G S S N L A S G

241 GTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGT  
 81 V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S

301 GTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTACAGTGGTTACCCACTCAGC  
 101 V E A E D A A T Y Y C Q Q Y S G Y P L T

361 TTCGGTGCTGGGACCACGCTGGAGCTGAAA  
 121 F G A G T T L E L K

[0016] SEQ ID NO:22 (小鼠43B6重链V区):

1 ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCCTGTCAGTCACTACAGGTGTCCACTCTGAG  
 1 M E W S W V F L F L L S V T T G V H S E

61 GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGAAGATATCC  
 21 V Q L Q Q S G P D L V K P G A L V K I S

121 TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGCCTACTACATTCACTGGGTGAAGCAGAGCCAT  
 41 C K A S G Y S F T A Y Y I H W V K Q S H

[0017] 181 GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAATACTGGTGGTACTAGCTACAAC  
 61 G K S L E W I G R V N P N T G G T S Y N

241 CCGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAATGTAGATAAGTCATCCAGCACAGCCTACATG  
 81 E K F K G K A I L N V D K S S S T A Y M

301 GAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATCC  
 101 E L R S L T S E D S A V Y Y C A R S G S

361 CCCTACTATAGGTACGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA  
 121 E Y Y R Y D D W G Q G T T L T V S S

[0018] SEQ ID NO:23(小鼠9F9轻链V区):

1 ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGAT  
 1 M K L P V R L L V L M F W I P A S S S D

61 GTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC  
 21 V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I

121 TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAATAAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC  
 41 S C R S S Q S I V N S N G N T Y L E W Y

[0019]

181 CTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCT  
 61 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S

241 GGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGC  
 81 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S

301 AGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG  
 101 R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W

361 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA  
 121 E F G G G T K L E I K

[0020] SEQ ID NO:24(小鼠9F9重链V区):

1 ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTGAG  
 1 M L L G L K W V F F V V F Y Q G V H C E

61 GTGCAGCTTGTGAGACTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTCTCA  
 21 V Q L V E T G G G L V Q P K G S L K L S

121 TGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAATACCAATGCCATGAAGTGGTCCGCCAGGCTCCA  
 41 C A A S G F T F N T N A M N W V R Q A P

[0021]

181 GGAAAGGTTTGGGAATGGGTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATAT  
 61 G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y

241 TATGCCGATTCAGTGAAAGACAGGTTCCACCATCTCCAGAGATGATACACAAAGCATGATC  
 81 Y A D S V K D R F T I S R D D T Q S M I

301 TATCTGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGGCATGTATTACTGTGTGAGAGGG  
 101 Y L Q M N N L K T E D T G M Y Y C V R G

361 GGAAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
 121 G S Y W Y F D V W G A G T T V T V S S

[0022] 由于抗体的抗原结合特异性取决于它的轻链和重链CDR,上述的CDR可以用于产生

保持了抗原结合特异性的抗体衍生物。抗体衍生物的实例包括嵌合抗体、人源化抗体和它们的功能等同物。以下显示的是人源化15A7抗体的轻链V区 (SEQ ID NO:25) 和重链V区 (SEQ ID NO:26), 其分别包括SEQ ID NOs:1-3和SEQ ID NOs:4-6:

[0023] SEQ ID NO:25 (人源化15A7轻链V区):

[0024]

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRSSQSIVHNDGNTYFEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSG  
SGTHFTLTITSSLPEDFATYYCFQGSYVPLTFFGQGTKVEIK

[0025] SEQ ID NO:26 (人源化15A7重链V区):

[0026]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS~~S~~FGMHWRQAPGKGLEWVA~~Y~~INGGSS~~T~~IFYANAVKGRFTIS  
RDNAKNTLYLQMN~~S~~LR~~A~~EDTAVYYCAR~~V~~ASYGGGAMD~~Y~~WGQGTSTVTVSS

[0027] 本发明的特征还在于分离的核酸, 所述核酸具有编码上述免疫球蛋白链之一的序列。术语“抗体”或“免疫球蛋白链”是指分离的多肽, 即, 基本上从与它天然相关的其他蛋白质、脂质和核酸分离的多肽。多肽可以构成纯化的制品干重的至少50%、70%或95%。“分离的核酸”是指核酸, 它的结构与任何天然产生的核酸或任何天然产生的基因组核酸的片段不同。因而该术语涵盖了, 例如 (a) DNA, 其具有天然产生的基因组DNA分子的部分的序列但侧翼都不是编码序列, 所述编码序列在该DNA天然产生的有机体的基因组中处在所述分子的部分的侧翼; (b) 以一定方式掺入到载体中或者原核生物或真核生物的基因组DNA中的核酸, 从而产生的分子不同于任何天然产生的载体或基因组DNA; (c) 分离的分子, 例如cDNA、基因组片段、聚合酶链式反应 (PCR) 产生的片段、或限制性片段; 和 (d) 重组核苷酸序列, 其是杂交基因, 即, 编码融合蛋白的基因的部分。本发明的核酸可用于表达本发明的多肽。为了这个目的, 人们可以将核酸可操作地连接到合适的调节序列来产生表达载体。

[0028] 载体是指能够转运与之连接的另一个核酸、还能够自主复制或整合到宿主DNA中的核酸分子。实例包括质粒、粘粒和病毒载体。本发明的载体包括处在适于宿主细胞中表达核酸的形式的核酸。优选的, 载体包括与要表达的核酸序列可操作连接的一个或多个调节序列。调节序列的实例包括启动子、增强子和其他表达控制元件 (例如, 多腺苷酸化信号)。调节序列还包括指导核苷酸序列的组成型表达的那些序列, 以及组织特异性调节和/或可诱导序列。这种表达载体的设计基于一些考虑, 包括要转化的宿主细胞和期望表达水平的选择。表达载体可以被导入宿主细胞来产生本发明的多肽。本发明还包括含有上述核酸的宿主细胞。宿主细胞是指含有外源的编码序列或非编码序列的细胞。可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔将外源序列导入到细胞中。适合的宿主细胞包括细菌细胞 (例如, *E. coli* (大肠杆菌)、*Bacillus subtilis* (枯草杆菌) 和 *Salmonella typhimurium* (鼠伤寒沙门氏菌)), 酵母细胞 (例如, *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Schizosaccharomyces pombe*), 植物细胞 (例如, *Nicotiana tabacum* (烟草) 和 *Gossypium hirsutum* (陆地棉)), 以及哺乳动物细胞 (例如鼠杂交瘤细胞, CHO细胞和3T3成纤维细胞)。

[0029] 为了产生本发明的免疫球蛋白链, 人们可以将宿主细胞置于一定条件下的培养物中, 所述条件允许表达由上述核酸编码的多肽, 并从所述培养物分离多肽。或者, 本发明的核酸可以体外转录和翻译, 例如, 使用T7启动子调节序列和T7聚合酶。

[0030] 抗体在本发明的范围内的。它由第一免疫球蛋白链和第二免疫球蛋白链形成, 其

分别含有上述小鼠15A7、43B6或9F9抗体的轻链CDR和重链CDR。优选的,该抗体由15A7的轻链和重链形成。

[0031] 另一种抗体也处在本发明的范围内,其(i)特异性结合P-选择蛋白糖蛋白配体-1而不影响P-选择蛋白糖蛋白配体-1与P-选择蛋白之间的结合,以及(ii)当在活化的T细胞上与P-选择蛋白糖蛋白配体-1结合时,诱导T细胞的死亡。在一个实施方案中,该抗体特异性地结合人P-选择蛋白糖蛋白配体-1。

[0032] 另一种抗体仍处在本发明的范围内,其特异性地结合成熟人P-选择蛋白糖蛋白配体-1的氨基酸残基115-126。优选的,该抗体特异性结合氨基酸残基117-123。更优选的,它特异性结合所有测试的表位之间的共有序列,氨基酸残基119-121。实际上,这个三个氨基酸残基中的一个或多个的突变消除了抗体结合。在一个实例中,当在活化的T细胞上与P-选择蛋白糖蛋白配体-1结合时,这种抗体诱导活化的T细胞的死亡。

[0033] 在一个实施方案中,以上刚刚描述的两种抗体之一由轻链和重链形成,其分别含有SEQ ID NOs:1-3和SEQ ID NOs:4-6(例如,SEQ ID NOs:19和20,或SEQ ID NOs:25和26)。

[0034] 在另的方面,本发明的特征是诱导活化的T细胞的死亡的方法。该方法包括使以上描述的三种抗体之一与活化的T细胞接触,其中抗体与活化的T细胞的结合诱导细胞死亡。

[0035] 本发明的特征还在于在受试者中调节T细胞介导的免疫应答的方法。该方法包括(1)鉴定患有与过度的T细胞介导的免疫应答相关的病症或存在该风险的受试者,和(2)向受试者施用有效量的上述三种抗体之一。“过度的T细胞介导的免疫应答”是指由过度水平的活化T细胞引起的应答。过度水平是指(1)高于正常水平的水平,和(2)即使不大于正常水平,高于在个体中期望水平的水平。病症的实例包括炎性疾病、自身免疫性疾病、变应性疾病或T细胞癌症,以及其中受试者接受了或预期接受同种异体或异种移植的情况。

[0036] 在以下附随的说明中将阐述本发明的一个或多个实施方案的细节。根据该详细说明,本发明的其他特征、目的和益处将更为明显。

## 发明内容

[0037] 本发明至少部分地基于一项出乎意料的发现,通过使抗体或它们的衍生物在活化的T细胞上与PSGL-1结合,活化的T细胞可以被诱导经历细胞凋亡和被耗尽。对于治疗与过度的或不需要的T细胞介导的免疫应答或T细胞增殖相关的病症,所述抗体和衍生物是有用的。

[0038] 因此,本发明的特征在于含有抗PSGL-1抗体的免疫球蛋白轻链或重链CDR的多肽,以及编码它们的核酸。免疫球蛋白链和核酸都可以用于制得上述抗体和衍生物。

[0039] 本发明的免疫球蛋白链可以作为合成多肽或重组多肽来获得。为了制备重组多肽,可以将编码它的核酸与编码融合伙伴(partner)的另一个核酸连接,所述融合伙伴例如,谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、6x-His表位标记、M13基因3蛋白、或免疫球蛋白重链恒定区。产生的融合核酸可以导入细胞用于蛋白质表达。可以通过本领域公知的方法从宿主细胞分离融合蛋白。可以进一步处理分离的融合蛋白,例如通过酶消化,来除去融合伙伴并获得目标重组多肽。或者,免疫球蛋白链可以通过激活编码该链的核酸的内源表达来从适合的宿主细胞获得。

[0040] 可以改变本发明的免疫球蛋白链的氨基酸组成而不破坏形成能结合PSGL-1的抗

体的能力。例如,这种变体可以含有一个或多个保守性氨基酸替换(substitution)。“保守性氨基酸替换”是在其中氨基酸残基被置换为具有相似侧链的氨基酸残基的一种替换。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括带有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -分支的侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。由此,在多肽中预测的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替换。或者,可以在全部或部分的本发明多肽上随机导入突变,例如,通过饱和诱变,并且可以筛选产生的突变体的形成能结合PSGL-1的抗体的能力,来鉴别本发明的变体,如以下在实施例中描述的。因而,举例来说,术语“含有SEQ ID NO:19的免疫球蛋白链”涵盖了含有SEQ ID NO:19的变体的免疫球蛋白链。

[0041] 以上描述的免疫球蛋白链和变体可用于制备本发明的抗体或其衍生物。“抗体”包括完整的分子及其片段,例如Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv(单链抗体)和dAb(结构域抗体;Ward,等(1989)Nature,341,544)。抗体的衍生物是指具有本发明的多肽变体的蛋白或蛋白复合物。可以如以下实施例中描述的通过在适合的宿主细胞中共表达含有相应轻链和重链CDR的多肽来制备本发明的抗体或衍生物。或者,可以通过制备单克隆和多克隆抗体和片段的本领域已知方法来制备它们。参见,例如,Harlow和Lane,(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。

[0042] 为了制备本发明的抗体,可以将PSGL-1或它的抗原性片段与混合了佐剂的载体蛋白,例如KLH联结,并注入到宿主动物中。然后可以通过肽亲和层析来纯化该动物中产生的抗体。通常采用的宿主动物包括兔、小鼠、豚鼠和大鼠。可用于提高免疫应答的各种佐剂取决于宿主物种,包括弗氏佐剂(完全的和不完全的),矿物凝胶例如氢氧化铝,表面活性物质例如溶血卵磷脂,普卢兰尼克多元醇类(pluronic polyol),聚阴离子,肽,油乳剂,钥孔血蓝素,和二硝基酚。有用的人佐剂包括BCG(卡介苗(bacille Calmette-Guerin))和Corynebacterium parvum。

[0043] 抗体分子的异质性群体(heterogeneous populations)多克隆抗体存在于被免疫受试者的血清中。针对特定抗原的抗体匀质群体单克隆抗体可以使用标准杂交瘤技术来制备。参见,例如,Kohler等(1975)Nature256,495;Kohler等(1976)Eur.J.Immunol.6,511;Kohler等(1976)Eur.J.Immunol.6,292;和Hammerling等(1981)Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas,Elsevier,N.Y.。特别地,可以通过为了在培养物中通过连续细胞系产生抗体分子的任何技术来获得单克隆抗体,例如在美国专利No.4,376,110中描述的;人B细胞杂交瘤技术(Kosbor等(1983)Immunol Today4,72;Cole等(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.USA80,2026)和EBV杂交瘤技术(Cole等(1983)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96)。这样的抗体可以是任何免疫球蛋白类型,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD,和它们的任何子类。可以体外或体内地培养生产本发明的单克隆抗体的杂交瘤。在体内制备高滴度单克隆抗体的能力使之成为特别有用的制备方法。

[0044] 此外,可以使用为了产生“嵌合抗体”而开发的技术。参见,例如,Morrison等

(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851; Neuberger等 (1984) Nature 312, 604; 和 Takeda等 (1984) Nature 314, 452。嵌合抗体是一种分子, 其中不同的部分来自不同的动物物种, 例如, 具有来自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体。或者, 可以修改为了制备单链抗体而描述的技术 (美国专利 No. 4, 946, 778 和 4, 704, 692) 来产生单链 Fv 抗体的噬菌体库。通过经由氨基酸桥连接 Fv 区的重链和轻链片段来形成单链抗体。此外, 可以通过已知的技术来产生抗体片段。例如, 这种片段包括但不限于, 可通过抗体分子的胃蛋白酶消化而产生的 F(ab')<sub>2</sub> 片段, 以及可通过还原 F(ab')<sub>2</sub> 片段的二硫键产生的 Fab 片段。也可以通过以下实施例中描述的方法或本领域已知的方法将抗体人源化。例如, 具有期望的结合特异性的单克隆抗体可以被商业地人源化 (Scotgene, Scotland; 和 Oxford Molecular, Palo Alto, Calif.)。完全人源化的抗体, 例如在转基因动物中表达的那些, 处在本发明的范围之内 (参见, 例如, Green 等 (1994) Nature Genetics 7, 13; 和美国专利 No. 5, 545, 806 和 5, 569, 825)。

[0045] 还处在本发明的范围内的是诱导活化 T 细胞死亡的方法, 例如, 通过在体外使活化的 T 细胞与本发明的抗体接触, 和通过向有需要的受试者施用有效量的抗体。需要治疗的受试者可被鉴定为患有与过度或不需要的 T 细胞介导的免疫应答相关的病症或存在该风险, 例如, 患有自体免疫疾病、移植排斥、过敏性疾病或 T 细胞来源的癌症的患者。可以单独地或者与其他药物或治疗共同地进行这种方法。

[0046] 术语“治疗”是指向受试者施用组合物, 目的是治愈、减轻、解除、矫正、防止或改善失调 (disorder)、失调的病症、继发于失调的疾病状态或趋于失调的倾向。“有效量”是能够在治疗的受试者中产生医学上期望的结果的组合物量。

[0047] 要治疗的示例性疾病包括糖尿病、关节炎 (包括类风湿性关节炎、青年类风湿性关节炎、骨关节炎和牛皮癣关节炎)、多发性硬化、脑脊髓炎、重症肌无力、全身性红斑狼疮、自体免疫甲状腺炎、皮炎 (包括特异反应性皮炎和湿疹性皮炎)、牛皮癣、Sjogren 氏综合症、Crohn 氏病、口腔溃疡、虹膜炎、结膜炎、角膜结膜炎、I 型糖尿病、炎症性肠疾病、溃疡性结肠炎、哮喘、过敏性哮喘、皮肤红斑狼疮 (cutaneous lupus erythematosus)、硬皮症、阴道炎、直肠炎、药疹、麻风病翻转反应、麻风的结节性红斑、自体免疫葡萄膜炎、变态反应性脑脊髓炎、急性坏死出血性脑病、自发性的双侧渐进性感觉神经性的听力丧失、再生障碍性贫血、纯红细胞贫血、自发性血小板减少、多软骨炎、Wegener 氏肉芽肿病、慢性活动性肝炎、Stevens-Johnson 综合症、自发性口炎性腹泻、扁平苔癣、Graves 氏病、结节病、原发性胆汁肝硬化、后葡萄膜炎 (uveitis posterior)、间隙肺部纤维化、移植物抗宿主病、移植的情况 (包括使用同种异体或异种组织的移植) 例如骨髓移植、肝脏移植、或任何器官或组织的移植、变态反应例如特异反应性过敏、AIDS 和 T 细胞瘤例如白血病或淋巴瘤。

[0048] 在体内途径中, 治疗组合物 (例如, 含有本发明的抗体的组合物) 被施用给受试者。一般地, 抗体被悬浮在药学上可接受的载体 (例如, 生理盐水) 中, 并口服地、或通过静脉内输注、或皮下、肌肉内、鞘内、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内、胃内、气管内或肺内地注射或植入来施用。

[0049] 所需的剂量取决于给药途径的选择; 配方的性质; 受试者的疾病的性质; 受试者的大小、体重、表面积、年龄和性别; 施用的其他药物; 以及主治医师的判断。适合的剂量在 0.01-100.0mg/kg 的范围内。考虑到可用组合物的种类的变化和各种给药途径的不同效率,

所需剂量的变化是预期的。例如,预计口服施用比静脉内注射需要更高的剂量。这些剂量水平的变化可以使用本领域充分了解的、用于优化的经验性规则来调整。将组合物封装在适合的递送载体中(例如,聚合的微粒或可植入装置)可以提高给药效率,特别是对于口服给药。

[0050] 含有药学上可接受的载体和有效量的本发明的抗体的药物组合物也处在本发明的范围内。该药物组合物可用于治疗如上所述的疾病。药学上可接受的载体包括溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂,以及等渗剂和吸收延迟剂。

[0051] 本发明的药物组合物可以使用常规方法被制备成用于不同给药途径的剂型。例如,它可以被制备成用于口服施用的胶囊、软明胶胶囊剂(gel seal)或片剂。胶囊可以含有任何标准的药学上可接受的材料,例如明胶或纤维素。片剂可以根据常规程序通过压缩组合物与固体载体和润滑剂的混合物来制备。固体载体的实例包括淀粉和糖膨润土(bentonite)。组合物也可以含有粘合剂,例如乳糖或甘露醇、常规填料和制片剂的硬壳片剂或胶囊剂的形式来施用。可以通过胃肠外途径施用药物组合物。胃肠外剂型的实例包括活性剂的水溶液、等渗盐水或5%葡萄糖,或其他公知的药学上可接受的赋形剂。环糊精或其他增溶剂是熟悉本领域的人员公知的,可以用于治疗剂递送的药物赋形剂。

[0052] 可以在体外和体内评估本发明的组合物的效力。参见,例如,以下的实施例。简要地,可以在体外测试该组合物诱导活化的T细胞死亡的能力。对于体内研究,可以将组合物注射到动物(例如,小鼠模型)中,然后获取它的治疗效果。根据该结果,可以确定合适的剂量范围和给药途径。

[0053] 以下的具体实施例被认为仅仅是说明性的,无论如何不是对所公开的其余部分的限定。不需进一步的详细描述,相信本领域的技术人员可以根据在此的说明将本发明利用到最大程度。此处引用的全部出版物作为参考将它们完全地引入。

[0054] 实施例1:小鼠单克隆抗体15A7、43B6和9F9

[0055] 抗PSGL-1抗体的产生

[0056] 使用标准技术来产生特异性结合人PSGL-1(hCD162)的小鼠单克隆抗体。更具体地,用PHA-活化的人T细胞的膜部分免疫小鼠,并处死小鼠来产生杂交瘤细胞系。针对与稳定表达hCD162的CHO细胞的结合,筛选来自产生的杂交瘤细胞系的上清液。产生与表达hCD162的CHO细胞而不是亲本CHO细胞结合的抗体的那些细胞系,如下所述进行鉴定、亚克隆和进一步分析。

[0057] 在鉴定的细胞系之中有m152-15A7、m166-43B6和m128-9F9。它们分别产生IgG1抗体15A7、43B6和9F9。免疫印迹显示这三种抗体从活化的T细胞的溶胞产物中体外结合(pull down)一种可被抗hCD162抗体(kp1-1,PharMingen, San Diego, CA)检测的蛋白。

[0058] 测试刚刚描述的三种抗体诱导活化T细胞的细胞凋亡的能力。将含有由三个杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体的培养物上清液分别与未活化的人T细胞(第0天)或体外活化的人T细胞(第7天)培养6小时。然后将细胞用annexin V染色并进行FACS分析。设门于(gated) CD3阳性细胞以确定体外活化的人T细胞或静息人T细胞的计数。凋亡的细胞是annexin V染色阳性的。表1概述了在所有扫描的T细胞中细胞凋亡T细胞的百分比。

[0059] 表1凋亡的T细胞的百分比

[0060]

	未处理	抗myc	m128-9F9	未处理	抗myc	m152-15A7	M166-43B6
第0天	4.17	6.67	5.82	18.18	15.52	5.23	6.57
第7天	12.63	13.36	28.71	24.18	23.08	51.66	49.44

[0061] 这些结果表明,小鼠15A7、43B6和9F9抗体(1)是hCD162特异性的和(2)可以结合人活化的T细胞并诱导活化T细胞而不是静息人T细胞的细胞凋亡。

[0062] 还对PHA活化的人外周血单核细胞(PBMC)进行了细胞凋亡分析。发现,这些抗体仅在活化T细胞中,而不是静息T细胞、B细胞或嗜中性粒细胞中诱导细胞凋亡。

[0063] 已知T细胞耗尽的抗体(T cell-depleting antibodies),例如抗CD3,能够诱导可溶性因子的产生。使用这种抗体的治疗通常导致有害的细胞因子综合症。为了测试抗PSGL-1抗体是否也引起细胞因子相关性副作用,将新分离的人PBMC与15A7培养24、48或72小时。然后测定了上清液中的细胞因子水平。在PHA活化的PBMC(阳性对照)中产生了相当数量的IL-2、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ ,而15A7处理的细胞中这些细胞因子的水平是检测不到的。这些结果证明了,在细胞凋亡诱导和细胞活化方面,抗PSGL-1对静息的外周血细胞没有影响或有很小的影响。

[0064] 由于上述的抗体选择性地诱导活化T细胞的细胞凋亡而不对静息T细胞或其他免疫细胞产生不利影响,将它们施用给受试者可能不会象抗CD3或免疫抑制剂一样引起淋巴细胞减少或广泛的免疫缺陷。

[0065] 抗CD162抗体的表位制图

[0066] 为了定位(map)小鼠15A7、43B6和9179在人CD162上的结合表位,表达并纯化了覆盖人CD162的各个区域的一系列融合蛋白。通过夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测了融合蛋白与这些单克隆抗体之间的相互作用。

[0067] 简要地,在E.coli中将覆盖人CD162基因的各个区域的片段表达为与人免疫球蛋白 $\gamma$ 1重链恒定区的融合蛋白。用具有BglIII位点和BamHI位点的引物通过PCR扩增编码人免疫球蛋白 $\gamma$ 1重链恒定区的cDNA。用BglIII和BamHI切下PCR产物,亚克隆到用相同的酶消化了的pET-32a载体(Novagen)中。然后,用具有5'末端的NdeI位点和3'末端的BglIII位点的引物通过PCR扩增编码hCD162的各个区域的cDNAs。用相应的酶切下PCR产物,按阅读框融合到pET-32a载体中编码人免疫球蛋白 $\gamma$ 1重链恒定区的序列中。每次构建中使用的引物在表2中列出,引物的序列在表3中列出。

[0068] 表2.用于每个实验的引物名称。

[0069]

扩增的序列编码:	正向引物	反向引物
E.coli表达的hCD162片段		
42-119	AB1001	AB1005
42-80	AB1001	AB1008
61-99	AB1003	AB1009
81-119	Ab1004	AB1005
42-70	AB1001	AB1007
42-60	AB1001	AB1006

50-80	AB1002	AB1008
50-70	AB1002	Ab1007
42-319	AB1001	Ab1010
115-126	AB1022	AB1023
115-126E至R	AB1024	AB1025
cDNA的V区		
轻链	AB1058	AB1059
重链	AB1058	AB1060
哺乳动物表达的hCD162片段		
1-119	AB1011	AB1013
1-319	AB1011	AB1012
110-319	AB1058	AB1059
94-148	AB1020	AB1021
119-222	AB1018	AB1019
174-269	AB1016	AB1017
214-317	AB1014	AB1015
嵌合链		
15A7轻链	AB1030	AB1031
15A7重链	AB1032	AB1033
9F9轻链	AB1026	AB1027
9F9重链	AB1028	AB1029
43B6轻链	AB1034	AB1035
43B6重链	AB1036	AB1037
人源化的链		
15A7轻链	AB1048	AB1057
15A7轻链第1对	AD1049	AB1050
15A7轻链第2对	AB1051	AB1052
15A7轻链第3对	AB1053	AB1054
15A7轻链第4对	AB1055	Ab1056
15A7重链	AB1038	AB1047
15A7重链第1对	AB1039	AB1040
15A7重链第2对	AB1041	AB1042
[0070]		
15A7重链第3对	AB1043	AB1044
15A7重链第4对	AB1045	AB1046

- [0071] 表3.引物序列.
- [0072] 名称 序列
- [0073] AB1001 cccgggacCATATGcaggccaccgaatatgagtacc
- [0074] AB1002 tatgagCATATGgattatgattttcctgccagaaacgg
- [0075] AB1003 aaacggagCATATGgaaatgctgaggaacagcactgacacc
- [0076] AB1004 aaccctCATATGaccactgtggagcctgctgcaaggcg
- [0077] AB1005 gtggtcAGATCTtccatagctgctgaatccgtggacagg
- [0078] AB1006 GTTCCTCAGATCTTCTGGAGGCTCCGTTTCTGGCAGG
- [0079] AB1007 AGGCCAAGATCTGGAGTGGTGTGTCAGTGCTGTTCTC
- [0080] AB1008 ggctccAGATCTgtagactcaggggttccaggecc
- [0081] AB1009 gtggtcAGATCTgtgactgccccctcctgcatccaggcc
- [0082] AB1010 GCCAGCAGATCTTGCTTACAGAGATGTGGTCTGGGG
- [0083] AB1011 cgcggatccatgcctctgcaactcctcctgttgc
- [0084] AB1012 GCCAGCCTCGAGCTTACAGAGATGTGGTCTGGGG
- [0085] AB1013 GGTCTGctcgagCATAGCTGCTGAATCCGTGGACAGGTTTC
- [0086] AB1058 agacaggeccaccgaagggaacctgtccacg
- [0087] AB1059 cgtggacaggttcccttcggtggcctgtct
- [0088] AB1014 ccgctcgagcgccaagattaggatggc
- [0089] AB1015 cgggatccactcaaaccacagccatgg
- [0090] AB1016 ccgctcgagtggtagtaggttccatgg
- [0091] AB1017 cgggatcaactcaaccacaggcctg
- [0092] AB1018 ctgtgcctcgagggtgtggtttgagtg
- [0093] AB1019 cgggatccatggagatacagaccactcaac
- [0094] AB1020 cgggatccgatgcaggaggggcagtcac
- [0095] AB1021 ggccgtcactcgagttgtctgtgecte
- [0096] AB1022 TatgGATTCAGCAGCTATGGAGATACAGACCACTCAACCAgcA
- [0097] AB1023 GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCTCCATAGCTGCTGAATCCA
- [0098] AB1024 TatgGATTCAGCAGCTATGCGGATACAGACCACTCAACCAgcA
- [0099] AB1025 GATCTgcTGGTTGAGTGGTCTGTATCCGCATAGCTGCTGAATCCA
- [0100] AB1026 CTAGTCTAGATGACCCAAACTCCACTCTCCC
- [0101] AB1027 CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTGATTTC
- [0102] AB1028 TAACATtctagATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGG
- [0103] AB1029 GGATAGTCTAGAGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG
- [0104] AB1030 CTAGTCTAGATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGG
- [0105] AB1031 CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTTTTCCAGCTTGGTCCCCCTCC
- [0106] AB1032 CTAGTCTAGATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCC
- [0107] AB1033 CTAGTCTAGAGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACTGAGGttcc
- [0108] AB1034 CTAGTCTAGATGGATTTTCTGGTGCAGATTTTCAGC
- [0109] AB1035 CTAGTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTAGCATCAGCCCGTTTCAGCTCC

- [0110] AB1036 CTAGTCTAGATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTC
- [0111] AB1037 CTAGTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCAGCTTCCAGTGGATAGACTGATGG
- [0112] AB1038 TCTATCTAGATGAACTTCGGGTCCAGCTTGATTTTCCTTGTTCCTGTTTTAAAGGTGTCCA  
GTG
- [0113] AB1039 CCTTGTTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGC  
AGCCTGG
- [0114] AB1040 CTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAGAGTCTCAAGCTTCCCTCCAGGCTGCACTAAGCC  
TCC
- [0115] AB1041 GCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG  
ACTCGAG
- [0116] AB1042 GCATAGAAGATGGTACTACTGCCACCATTAATGTATGCGACCCACTCGAGTCCCTTCCCTGG  
AGCC
- [0117] AB1043 GTAGTACCATCTTCTATGCAAACGCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAATGCC
- [0118] AB1044 CCTCAGCCCTCAGAGAATTCATTTGCAGGTACAGGGTGTCTTGGCATTATCTCTGGAGATGG
- [0119] AB1045 GAATTCTCTGAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTTACTGTGCAAGATATGCTAGTTACGGAGG
- [0120] AB1046 CTGTGACCAGGGTGCCTTGGCCCCAATAGTCCATAGCACCCCTCCGTAAGTACATATC
- [0121] AB1047 ACCCTCTAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACTGTGACCAGGGTGCCTTGGCC
- [0122] AB1048 TCTATCTAGATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCAGGC
- [0123] AB1049 GCTGCTCTGGGTTCAGGCTCCACTGGTGCATTCAGATGACCCAATCTCCGAGCTCTTTG
- [0124] AB1050 GATCTGCAGGTGATAGTGACCCTATCCCCTACAGACGCAGACAAAGAGCTCGGAGATTGG
- [0125] AB1051 CACTATCACCTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAATGATGGAAACACCTATTTTGAATG
- [0126] AB1052 GATGAGAAGCTTGGGTGCCTTTCTGGTTTTCTGTTGGTACCATTCAAAATAGGTGTTTC
- [0127] AB1053 GCACCCAAGCTTCTCATCTATAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGTGTCCCATCCAGGTTTAGTGGC
- [0128] AB1054 GCAGAGAAGAGATGGTGAAGGTGAAGTGTGTTCCAGACCCACTGCCACTAAACCTGGATGG
- [0129] AB1055 CTCACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAGGATTTTCGCAACCTATTACTGTTTTCAAG
- [0130] AB1056 CCTTGGTGCCTTGACCGAACGTGAGAGGAACATATGAACCTTGAAAAACAGTAATAGG
- [0131] AB1057 ACCCTCTAGAATTAGGAAAGTGCACTTACGTTTGATTTCCACCTTGGTGCCTTGACCG
- [0132] AB1058 TATATCTAGAATTCACCCCCCCCCCCCCC
- [0133] AB1059 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC
- [0134] AB1060 TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC (C/A/T) GATGGGG (C/G) TGT (C/T)  
GTTTTGGC

[0135] 将以上描述的表达构建体转化到大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 中。6小时IPTG (2mM) 诱导后收获转化的细胞,重悬浮在PBS中。在超声破碎细胞和在14,000g旋转沉淀10分钟后,收集产生的上清液用于纯化融合蛋白。更具体地,首先在4℃将上清液与蛋白G或蛋白A珠子 (bead) 孵育3小时。然后在3,000g旋转沉淀珠子,用洗涤缓冲液I (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH8.5, 400mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>和1mg/ml OVA) 和洗涤缓冲液II (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH8.5和150mM NaCl) 各洗涤5次。然后用含有0.1M甘氨酸-HCl、2.7的洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质,用1M Tris-HCl、pH8.6中和。通过Bio-Rad蛋白质分析 (Bio-Rad Laboratories, Cat.No. 500-0006) 定量所有纯化的融合蛋白,通过SDS-PAGE

证实。

[0136] 进行夹心ELISA来研究hCD162片段和15A7、9F9和43B6的每一个之间的相互作用。用山羊抗人IgG (Southern Biotechnology, Cat.No.2040-01) 抗体 (2 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ l/孔) 包被96孔微量滴定板, 在4 $^{\circ}$ C过夜。在37 $^{\circ}$ C用0.25%的BSA的PBS溶液 (150 $\mu$ l/孔) 封闭平板1小时。然后将封闭的平板与含有人CD162的各种片段的融合蛋白 (2 $\mu$ g/ml) 在室温下孵育2小时。用含有0.05% Tween20的PBS (PBST) 洗涤4次之后, 在室温下将平板与测试抗体 (2 $\mu$ g/ml) 孵育1.5小时。孵育之后, 用PBST洗涤平板4次。然后将50 $\mu$ l的1比3000稀释的、与碱性磷酸酶偶联的山羊抗小鼠IgG (Southern Biotechnology, Cat.No.1031-04) 添加到每个孔中, 在37 $^{\circ}$ C孵育平板1小时。通过添加50 $\mu$ l的碱性磷酸酶底物溶液 (1片碱性磷酸酶底物片溶于5ml含有0.012M的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.16M的NaHCO<sub>3</sub>和1mM的MgCl<sub>2</sub> (Ph8.6) 的底物缓冲液) 进行酶反应, 测定405nm的吸光度。

[0137] 发现43B6和9F9能与含有成熟人CD162的残基50到60的所有融合蛋白相互作用, 表明43B6和9179的表位位于残基50-60之间。不象9F9和43B6, 15A7仅与覆盖残基42到319的融合蛋白结合, 而不与覆盖残基42-119的融合蛋白结合, 表明15A7的表位位于残基119到319之间。然后将15A7的表位位置缩减到了残基115到126之间。位置120处一个氨基酸的改变 (Glu $\rightarrow$ Arg) 降低了15A7与融合蛋白之间的相互作用, 表明15A7在人CD162上的原始接触结构域位于或邻近于位置120, 残基Glu是相互作用所必需的。

[0138] 还在哺乳动物细胞中表达了覆盖人CD162各个区域的融合蛋白并测试了它们与15A7的相互作用。在哺乳动物细胞中将覆盖这些区域的片段表达为与人免疫球蛋白 $\gamma$ 1重链恒定区融合蛋白。首先, 将编码人免疫球蛋白 $\gamma$ 1重链恒定区的cDNA插入到pcDNA3载体 (Invitrogen) 中。第二, 用在5'末端的导入BamHI位点和在3'末端导入XhoI位点的引物通过PCR扩增编码hCD162的各个区域的cDNA。用相应的酶切下这些PCR产物, 亚克隆到含有人免疫球蛋白 $\gamma$ 1重链恒定区的pcDNA3载体中。每个引物的名称和序列在以上的表2和3中列出。

[0139] 根据厂家的指导通过Lipofectamine2000 (Invitrogen, Cat.No.11668-027) 将刚描述的哺乳动物表达载体瞬时地转染到COS-7细胞中。转染的细胞在极低Ig培养基 (Invitrogen, Cat.No.16250-078) 中生长。纯化表达的蛋白并按以上相同的方式进行夹心ELISA。

[0140] ELISA结果显示仅含有残基94到148的融合蛋白能与15A7作用。这些结果与15A7的表位位于残基115到126之间的思想相符。

[0141] 所有以上结果表明, 9F9、43B6和15A7的表位是蛋白依赖性的, 而不是糖 (carbohydrate) 修饰依赖性的, 因为所有三种抗体结合细菌表达的融合蛋白。它们还表明, 虽然就结合特异性和在活化T细胞中引起细胞凋亡的功能来说15A7、9F9和43B6显示了类似的性质, 但它们通过人CD162的不同结构域起作用并且表现也不同。

[0142] 实施例2: 嵌合抗体15A7、43B6和9F9

[0143] 克隆抗CD162抗体的轻链和重链可变区

[0144] 通过锚定PCR法扩增编码抗体15A7、43B6和9F9的轻链和重链可变区 (V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>) 的cDNA。3'引物与C区域杂交, 5'引物与使用末端脱氧转移酶附着到cDNA的G尾部杂交。将PCR片段克隆到pCRII载体 (Invitrogen) 中。测序和比较每条链的几个独立的克隆。挑选出由大多数独立克隆代表的序列。然后分析翻译的氨基酸序列来证实选出的序列具有典型的小鼠

轻链或重链V区的特征并属于特定的亚型。然后通过比较翻译的氨基酸序列和每种亚型的共有序列来鉴定互补决定区(CDR)。使用的每个引物的名称和序列在以上的表2和3中列出。在概述中显示了15A7、43B6和9F9的轻链和重链V区的推断的氨基酸序列(SEQ ID NO:19-24)。

#### [0145] 嵌合抗体

[0146] 为了产生表达嵌合抗体的载体,使用引物通过PCR来扩增编码15A7、43B6和9F9的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区域的cDNA,以包括5'信号肽序列和3'剪接供体信号。引物还在PCR产物的两端引入XbaI位点,其然后由XbaI酶切割并连接到XbaI消化的pVk、pVg1、pVg2或pVg4载体中。更具体地,将15A7、43B6和9F9的V<sub>L</sub>区域cDNA亚克隆到质粒pVk中。这个质粒含有CMV启动子和编码人轻链恒定区的序列。将15A7、43B6和9F9的V<sub>H</sub>区域cDNA亚克隆到质粒pVg1、pVg2或pVg4中。这三种质粒各自具有CMV启动子。它们还分别含有IgG1、IgG2和IgG4的人重链恒定区。

[0147] 将编码每种上述的轻链的质粒与编码重链的质粒共转染到COS-7细胞中。收集转染的细胞的上清液。分析上清液中嵌合抗体与人CD162结合以及诱导活化T细胞的细胞凋亡的能力。

[0148] 发现由15A7、43B6和9F9产生的所有嵌合抗体都与稳定表达人CD162的Sp2/0转染子结合,而不与亲本Sp2/0细胞结合,表明它们保持了人CD162结合能力特异性。此外,发现了嵌合抗体在已经活化7天的T细胞中诱导细胞凋亡,表明它们也保持了它们的小鼠对应物的这种功能。

#### [0149] 人源化抗体

[0150] 通过将小鼠15A7的CDR移植到人框架上来用它制备人源化抗体。为了保持结合亲和性和特异性,当将CDR移植到人框架上时保持V区构象是关键。为了选择合适的框架供体,将小鼠15A7轻链和重链V区的氨基酸序列与已经人源化的50种小鼠抗体的进行比较。

[0151] 发现小鼠抗体mDREG-55在轻链和重链上与小鼠15A7的V区都具有高度序列同源性。以下列出的是小鼠15A7与这个mDREG-55抗体的序列比对(CDR是高亮的):

#### [0152] 轻链比对:

```
mDREG-55: DIVLVTQSPASLSVSLGERASISCSLQSSVYDGGSYRHWYQQKPGQPRLLIYKASQKSTL
DI++TQ+P SL VSLG++ASISCS++SQS+ + DG++Y WY QKPGQ PRLLIY SN S
m15A7: DILMTQTFLSLPVS LGDQASISCSLQSSVYDGGSYRHWYQQKPGQSPRLLIYKASQKSTL
```

#### [0153]

```
mDREG-55: GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQSSKSTLQVAVGSGGKLEIK
G+P RFSGSGSGT FTLNI VE ED YYC Q + P TF GGKLE+K
m15A7: GVPDRFSGSGSGTHFTLNISRVEAEDLGIYYCQSSKSTLQVAVGAGTRLELK
```

#### [0154] 重链比对:

```
MDREG-55: EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYAMSWVRQTPKRRLEWVAITPEGGASTYPSVY
+V+LVESGGGLV+PGGS KLSCAASGFTFS++ M WVRQ PER LEWVA I+ G ST +Y ++VRG
m15A7: DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPKLEWVAITPEGGASTYPSVY
```

#### [0155]

```
MDREG-55: RFTISRDNARNILYLQMSLRSEDTAIYYCAPRYSYDYYWGGQTTLTVSS
RFTISRDN +N L+LQM+ LRSEDTA+YYC R Y G DYWGQGT++TVSS
m15A7: RFTISRDNPKNTLFLQMTILRSEDTAIYYCGPRYSYDYYWGGQTSVTVSS
```

[0156] 小鼠DREG-55是针对L-选择蛋白的单克隆的IgG1抗体。小鼠15A7V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>区域的序列与小鼠DREG55的分别有64.3% (仅框架:73.8%) 和70% (仅框架:81.6%) 的同源性。已经使



Tris-HCl, pH8.5, 400mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>和1mg/ml OVA) 和洗涤缓冲液II (0.05% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH8.5和150mM NaCl) 各洗涤5次后, 用含有0.1M甘氨酸-HCl、pH2.7的洗脱缓冲液洗脱结合的抗体, 用1M Tris-HCl、pH8.6来中和。

[0167] 亲合性测定

[0168] 通过竞争性结合来测定上述小鼠的、嵌合的和人源化15A7抗体的结合亲合性。

[0169] 通过EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin系统 (Pierce Biotechnology, Cat.No. 21217) 将小鼠15A7生物素化。简要地, 将0.5mg ( $3.3 \times 10^{-6}$ nmol) 的小鼠15A7溶于187 $\mu$ l的PBS中, 并与 $6.8 \times 10^{-5}$ nmole的Sulfo-NHS-Biotin混合。然后将混合物在冰上孵育2小时, 之后在4 $^{\circ}$ C相对PBS透析过夜来除去游离生物素。将这样获得的生物素标记的小鼠15A7保存在4 $^{\circ}$ C待用。

[0170] 稳定表达人CD162的Sp2/0转染子用作人CD162抗原的来源。生物素标记的小鼠15A7用作示踪物。将增加量的竞争抗体 (小鼠的、嵌合的或人源化的15A7) 与35ng生物素标记的小鼠15A7混合, 与 $1 \times 10^5$ 个表达CD162的Sp2/0细胞在4 $^{\circ}$ C下稳定振摇孵育1.5小时。洗涤之后, 将第二抗体链霉抗生物素蛋白-PE (Becton Dickinson Immunocytometry System Inc. Cat.No. 349023) 添加到混合物中。在4 $^{\circ}$ C孵育45分钟之后, 再次洗涤细胞, 重悬浮在300 $\mu$ l的PBS-1%FBS中, 进行PACS分析。

[0171] 发现, 小鼠15A7的半-最大竞争浓度是3.72 $\mu$ g/ml, 而嵌合的和人源化15A7的分别为约5.71 $\mu$ g/ml和4.51 $\mu$ g/ml。这些结果表明, 小鼠的、嵌合的和人源化15A7的亲合性是相当的。换句话说, 小鼠15A7的结合亲合性(K<sub>a</sub>) 是 $4.03 \times 10^7$ M<sup>-1</sup>, 而嵌合的和人源化15A7的分别是 $2.62 \times 10^7$ M<sup>-1</sup>和 $3.33 \times 10^7$ M<sup>-1</sup>。

[0172] 竞争分析

[0173] 进行竞争分析来研究上述三种小鼠抗体、PSGL-1和P-选择蛋白之间的相互作用。

[0174] P-选择蛋白是大多数白细胞上PSGL-1的主要的高亲合性配体。为了研究三种抗体是否阻止P-选择蛋白与PSGL-1的结合, 在存在三种抗体的情况下测定纯化的人P-选择蛋白与活化T细胞的结合。已知阻断P-选择蛋白和PSGL-1的相互作用的KPL-1用作阳性对照。

[0175] 用1%PHA活化人PBMC2天, 并维持在含IL-2的培养基中3天。用滴定的9F9、15A7、43B6、KPL-1 (PSGL-1拮抗剂), 或对照抗体 (9E10) 孵育细胞30分钟, 之后添加重组人P-选择蛋白 (1.25 $\mu$ g/ml)。通过FACS上的抗P-选择蛋白-FITC分析来测量P-选择蛋白与活化T细胞的结合。

[0176] 与早先的报道一致, KPL-1在低浓度 (0.31 $\mu$ g/ml) 几乎完全地消除了P-选择蛋白与活化T细胞的结合。43B6与KPL-1一样有效地阻断了P-选择蛋白与活化T细胞的结合, 而9F9需要更高的浓度来达到相同效果。实际上, 需要0.08 $\mu$ g/ml的KPL或43B6来消除50%的结合。相比之下, 需要5 $\mu$ g/ml的9F9。此外, 即使在20 $\mu$ g/ml下, 15A7对于P-选择蛋白结合也不具有任何抑制效果。令人惊讶地, 它增强了P-选择蛋白与PSGL-1的结合。这些结果表明, 在活化T细胞上15A7和P-选择蛋白与PSGL-1的不同基序结合。

[0177] 15A7不与P-选择蛋白竞争PSGL-1的事实表明, 15A7的体内施用不会通过干扰白细胞的P-选择蛋白依赖性募集来影响先天免疫。

[0178] 已经报道了PSGL-1在血小板上低水平表达。检测了15A7抗体对血小板的影响。发现该抗体不会增强或抑制人血小板的聚集。

[0179] 实施例3: 针对小鼠PSGL-1的仓鼠单克隆抗体TAB4

[0180] 按照与实施例1中描述的方法类似的方式,制备了针对小鼠PSGL-1的单克隆抗体TAB4。它在体外诱导T细胞的凋亡,在体内耗尽了T细胞。为了确定它是否干扰小鼠PSGL-1和小鼠P-选择蛋白之间的结合,按照与实施例2中描述的方法类似的方式进行了竞争分析。发现甚至在高达20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下TAB4也不抑制小鼠P-选择蛋白与小鼠PSGL-1的结合。

[0181] 实施例4:小鼠单克隆抗体4B7、5C4、12E7、14B3、17E5和18D12

[0182] 表征了针对人PSGL-1的其他单克隆抗体4B7、5C4、12E7、14B3、17E5和18D12。在与活化T细胞结合时,它们都诱导了活化T细胞的死亡。按照实施例2中描述的方式进行了竞争分析来确定它们是否阻断PSGL-1与P-选择蛋白之间的相互作用。发现,即使在测试的最高的浓度(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )下,这些抗体对人P-选择蛋白与人PSGL-1的结合有轻微的、抑制效果,如果有的话。

[0183] 其他实施方案

[0184] 在本说明书中公开的所有特征可以按任何组合来组合。在本说明中公开的每个特征可以由服务于相同、等同或类似目的的可选择特征来替代。因而,除非是特意地声明了,所公开的每个特征仅仅是普通系列的同等物或类似特征的一个实例。

[0185] 根据以上的说明,本领域技术人员可以容易地确定本发明的基本特征而不背离本发明的精神和范围,可以进行本发明的各种变化和修改来使其适应各种用途和病症。因而,其他实施方案也处在本发明的范围之内。

## 序列表

- <110> 台医生物科技股份有限公司 (AbGenomics Corporation)
- <120> 抗体
- <130> 13062-011W01
- <140> PCT/US2005/016357
- <141> 2005-05-10
- <150> US 60/569,892
- <151> 2004-05-10
- <160> 100
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0001] <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> 小鼠 (Mus musculus)
- <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Ile | Val | His | Asn | Asp | Gly | Asn | Thr | Tyr | Phe | Glu |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
- <210> 2
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 小鼠 (Mus musculus)
- <400> 2
- |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |
- <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 3

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 4

Ser Phe Gly Met His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 5

Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala Asn Ala Val Lys

[0002]

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 6

Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 7

Arg Ala Ser Ser Thr Val Asn Ser Thr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 8  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 8  
 Gly Ser Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 9  
 Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

[0003]

<210> 10  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 10  
 Ala Tyr Tyr Ile His  
 1 5

<210> 11  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 11  
 Val Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Lys Phe Lys Gly  
 1 5 10 15

<210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 12:

Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp  
1 5 10

<210> 13:

<211> 16:

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 13:

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 14:

<211> 7:

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

[0004]

<400> 14:

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
1 5

<210> 15:

<211> 9:

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 15:

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 16:

<211> 16:

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 16:

Thr Asn Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 17  
 Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp  
 1 5

<210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 18  
 Gly Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5

[0005] <210> 19  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 19  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Ser Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30  
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
 35 40 45  
 Val His Asn Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 50 55 60  
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr  
 85 90 95  
 Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys  
 100 105 110  
 Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu  
 115 120 125  
 Glu Leu Lys

130

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠(Mus musculus)

&lt;400&gt; 20

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

[0006]

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小鼠(Mus musculus)

&lt;400&gt; 21

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



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

<210> 24

<211> 139

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

[0008]

<400> 24

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

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 25

```

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

```

[0009]

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成产生的肽

<400> 26

```

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

```

	100	105	110	
	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
	<210> 27			
	<211> 393			
	<212> DNA			
	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)... (393)			
	<400> 27			
	atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct get			48
	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala			
	1	5	10	15
	tcc agc agt gat att ttg atg acc caa act cca ctg tcc ctg cct gtc			96
	Ser Ser Ser Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val			
	20	25	30	
[0010]	agt ctt gga gat caa gcc tca ata tct tgc aga tct agt cag agc att			144
	Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile			
	35	40	45	
	gta cat aat gat gga aac acc tat ttt gaa tgg tac ctg cag aaa cca			192
	Val His Asn Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro			
	50	55	60	
	ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aat cga ttt tct			240
	Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser			
	65	70	75	80
	ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca cat ttc aca			288
	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr			
	85	90	95	
	ctc aac atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc			336
	Leu Asn Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys			
	100	105	110	
	ttt caa ggt tca tat gtt cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg			384
	Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu			

	115	120	125	
	gag ctg aaa			393
	Glu Leu Lys			
	130			
	<210> 28			
	<211> 417			
	<212> DNA			
	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)... (417)			
	<400> 28			
	atg gac tcc agg ctc aat tta gtt ttc ctt gtc ctt att tta aaa ggt			48
	Met Asp Ser Arg Leu Asn Leu Val Phe Leu Val Leu Ile Leu Lys Gly			
	1 5 10 15			
[0011]	gtc cag tgt gat gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg cag			96
	Val Gln Cys Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln			
	20 25 30			
	cct gga ggg tcc cgg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc			144
	Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
	35 40 45			
	agt agc ttt gga atg cac tgg gtt cgt cag gct cca gag aag ggg ctg			192
	Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu			
	50 55 60			
	gag tgg gtc gca tac att aat ggt ggc agt agt acc atc ttc tat gca			240
	Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Ser Ser Thr Ile Phe Tyr Ala			
	65 70 75 80			
	aac gca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat ccc aag aat			288
	Asn Ala Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn			
	85 90 95			
	acc ctg ttc ctg caa atg acc att cta agg tct gag gac acg gcc att			336
	Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ile Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile			
	100 105 110			

tat tac tgt gga agg tat gct agt tac gga ggg ggt gct atg gac tat 384  
 Tyr Tyr Cys Gly Arg Tyr Ala Ser Tyr Gly Gly Gly Ala Met Asp Tyr  
 115 120 125

tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 417  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 29

<211> 390

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (390)

<400> 29

atg gat ttt ctg gtg cag att ttc agc ttc ttg sta atc agt gcc tca 48  
 Met Asp Phe Leu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

[0012]

glt gca atg tcc aga gga gaa aat gtg ctc acc cag tct cca gca atc 96  
 Val Ala Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 20 25 30

atg tct gca tct cca ggg gaa aag gtc acc atg acc tgc agg gcc agc 144  
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

tca act gta aat tcc act tac ttg cac tgg ttc cag cag aag tca ggt 192  
 Ser Thr Val Asn Ser Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly  
 50 55 60

gcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat gcc tca tcc aac ttg gct tct gga 240  
 Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Gly Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80

gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc 288  
 Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
 85 90 95

aca atc agc agt gtg gag gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag 336  
 Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

	100	105	110	
	cag tac agt ggt tac cca ctc acg ttc ggt gct ggg acc acg ctg gag			384
	Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu			
	115	120	125	
	ctg aaa			390
	Leu Lys			
	130			
	<210> 30			
	<211> 414			
	<212> DNA			
	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)... (414)			
	<400> 30			
[0013]	atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ctc ctg tca gtc act aca ggt			48
	Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly			
	1 5 10 15			
	gtc cac tct gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gtg aag			96
	Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys			
	20 25 30			
	cct ggg gct tta gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc			144
	Pro Gly Ala Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe			
	35 40 45			
	act gcc tac tac att cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt			192
	Thr Ala Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu			
	50 55 60			
	gag tgg att gga cgt gtt aat cct aat act ggt ggt act agc tac aac			240
	Glu Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Ser Tyr Asn			
	65 70 75 80			
	ccg aag ttc aag ggc aag gcc ata tta aat gta gat aag tca tcc agc			288
	Pro Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ile Leu Asn Val Asp Lys Ser Ser Ser			
	85 90 95			

aca gcc tac atg gag ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
                   100                  105                  110

tat tac tgt gca aga teg gga tcc ccc tac tat agg tac gac gac tgg 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp Trp  
                   115                  120                  125

ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca 414  
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
                   130                  135

<210> 31

<211> 393

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

[0014]

<400> 31

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48  
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala  
           1                  5                  10                  15

tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96  
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val  
                   20                  25                  30

agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att 144  
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
                   35                  40                  45

gta aat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192  
 Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
                   50                  55                  60

ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240  
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
           65                  70                  75                  80

ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288  
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

	85	90	95	
	etc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc			336
	Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys			
	100	105	110	
	ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg			384
	Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu			
	115	120	125	
	gaa atc aaa			393
	Glu Ile Lys			
	130			
	<210> 32			
	<211> 417			
	<212> DNA			
	<213> 小鼠 (Mus musculus)			
	<220>			
	<221> CDS			
[0015]	<222> (1)... (417)			
	<400> 32			
	atg ctg ttg ggg ctg aag tgg gtt ttc ttt gtt gtt ttt tat caa ggt			48
	Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly			
	1	5	10	15
	gtg cat tgt gag gtg cag ctt gtt gag act ggt gga gga ttg gtg cag			96
	Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln			
	20	25	30	
	cct aaa ggg tca ttg aaa ctc tca tgt gca gcc tet gga ttc acc ttc			144
	Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
	35	40	45	
	aat acc aat gcc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggt ttg			192
	Asn Thr Asn Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	50	55	60	
	gaa tgg gtt gct cgc ata aga agt aaa agt aat aat tat gca aca tat			240
	Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr			
	65	70	75	80

tat gcc gat tca gtg aaa gac agg ttc acc atc tcc aga gat gat aca 288  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Thr  
                   85                  90                  95

caa agc atg atc tat ctg caa atg aac aac ttg aaa act gag gac aca 336  
 Gln Ser Met Ile Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr  
                   100                  105                  110

ggc atg tat tac tgt gtg aga ggg gga agc tac tgg tac ttc gat gtc 384  
 Gly Met Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Gly Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
                   115                  120                  125

tgg ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 417  
 Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   130                  135

<210> 33

<211> 111

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

[0016]

<400> 33

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

<210> 34

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 34



&lt;400&gt; 36

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

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

[0018] &lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 37

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

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

<400> 38  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
                   20                    25                    30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45  
 Ala Ser Ile Ser Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
                   50                    55                    60  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                    90                    95  
 Arg Asp Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
                   100                    105                    110  
 Thr Val Ser Ser  
                   115

[0019]

<210> 39  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 39  
 cccgggacca tatgcaggcc accgaatatg agtacc 36

<210> 40  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 40  
 tatgagcata tggattatga tticctgccca gaaacgg 37

<210> 41  
 <211> 41  
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 41	
	aaacggagca tatggaaatg ctgaggaaca gcactgacac c	41
	<210> 42	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 42	
	aacctctcat atgaccaetg tggagcctgc tgcaaggcg	39
	<210> 43	
	<211> 39	
	<212> DNA	
[0020]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 43	
	gtggtcagat cttccatagc tgctgaatcc gtggacagg	39
	<210> 44	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 44	
	gttccatcaga tcttctggag gctccgttctc tggcagg	37
	<210> 45	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	45	
		aggcccaaga tctggagtgg tgtcagtgct gttcctc	37
	<210>	46	
	<211>	35	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	46	
		ggctccagat ctgtagactc aggggttcca ggecc	35
	<210>	47	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0021]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	47	
		gtggtcagat ctgtgactgc ccctcctgca tccaggec	38
	<210>	48	
	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	48	
		gccagcagat ctgcttcac agagatgtgg tctgggg	37
	<210>	49	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	

	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 49	
	cgcggatcca tgcctctgca actcctcctg ttgc	34
	<210> 50	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 50	
	gccagcctcg agcttcacag agatgtggtc tgggg	35
	<210> 51	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0022]	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 51	
	ggfctgctcg agcatagctg ctgaatccgt ggacaggttc	40
	<210> 52	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 52	
	agacaggcca ccgaaggaa cctgtccacg	30
	<210> 53	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 引物	
	<400> 53	
	egtggacagg ttccttcgg tggeetgtct	30
	<210> 54	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 54	
	ccgctcgagc gccaaagatta ggaatggc	27
	<210> 55	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0023]	<223> 引物	
	<400> 55	
	cgggatccac tcaaaccaaca gccatgg	27
	<210> 56	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 56	
	ccgctcgagt ggtagtaggt tccatgg	27
	<210> 57	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	

	<400> 57	
	cgggatcaac tcaaccacac ggectg	26
	<210> 58	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 58	
	ctgtgcctcg agggctgtgg ttgagtg	28
	<210> 59	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0024]	<400> 59	
	cgggatccat ggagatacag accactcaac	30
	<210> 60	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 60	
	cgggatccga tgcaggaggg gcagtcac	28
	<210> 61	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	

	<400> 61	
	ggccgteact cgagttgtct gtgcctc	27
	<210> 62	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 62	
	tatggattca gcagctatgg agatacagac cactcaacca gca	43
	<210> 63	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0025]	<400> 63	
	gatctgctgg ttgagtggtc tgtatctcca tagctgctga atcca	45
	<210> 64	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 64	
	tatggattca gcagctatgc ggatacagac cactcaacca gca	43
	<210> 65	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 65	

	gatctgctgg ttgagtggtc tgtatccgca tagctgctga atcca	45
	<210> 66	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 66	
	ctagtctaga tgaoccaaac tccactctcc c	31
	<210> 67	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 67	
[0026]	ctagtctaga attaggaag tgcacttagc atcagcccg ttgatttcc	49
	<210> 68	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 68	
	taacattcta gatgctgttg gggetgaagt ggg	33
	<210> 69	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 69	
	ggatagteta gaggttgtga ggactcacct gaggagacgg tgaccgtgg	49

	<210> 70	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 70	
	ctagtctaga tggagacaga cacactcctg ttatggg	37
	<210> 71	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 71	
	ctagtctaga attaggaaag tgcacttttt ccagcttggg cccccctcc	49
[0027]	<210> 72	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 72	
	ctagtctaga tggactccag gctcaattta gttttcc	37
	<210> 73	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 73	
	ctagtctaga ggttgtgagg actcacctga ggagacggtg actgaggttc c	51

	<210> 74	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 74	
	ctagtctaga tggatTTTct ggtgcagatt ttcage	36
	<210> 75	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 75	
	ctagtctaga attaggaaag tgcacttagc atcagcccgt ttcagetcc	49
[0028]	<210> 76	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 76	
	ctagtctaga tggaatggag ctgggtcttt ctc	33
	<210> 77	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 77	
	ctagtctaga ggttgtgagg actcaccagc ttccagtgga tagactgatg g	51
	<210> 78	

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 78

tetatctaga tgaacttcgg gtccagcttg atttcccttg tccctgtttt aaaaggtgta 60  
cagtg 65

<210> 79

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 79

ccttgtttta aaaggtgtcc agtgtgaagt gcaactgggtg gagtctgggg gaggetttagt 60  
gcagcctgg 69

[0029]

<210> 80

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 80

ctgaaagtga atccagagge tgcaacaggag agtetcaage ttccctccagg ctgcaactaag 60  
cctcc 65

<210> 81

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 81

gcctctggat tcactttcag tagcttttga atgcaactggg ttegccagge tecagggag 60

	ggactcgag	69
	<210> 82	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 82	
	gcatagaaga tggfactact gccaccatta atgtatgcga cccaetcgag tcccttecct	60
	ggagcc	66
	<210> 83	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0030]	<400> 83	
	gtagtaccat cttctatgca aacgcagta aggccgatt caccatctcc agagataatg	60
	cc	62
	<210> 84	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 84	
	ecteagccct cagagaatte atttgcaggt acagggtggt ettggcatta tctctggaga	60
	tgg	63
	<210> 85	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	

<400> 85  
 gaattctctg agggctgagg acacggccgt gtattactgt gcaagatatg ctagttacgg 60  
 agg 63

<210> 86  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 86  
 ctgtgaccag ggtgccttgg ccccaatagt ceatagcacc ccctccgtaa ctagcatatc 60

<210> 87  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0031] <220>  
 <223> 引物

<400> 87  
 accctetaga ggttgtgagg actcactga ggagactgtg accaggggtgc ettgccc 57

<210> 88  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 引物

<400> 88  
 tctatctaga tggagacaga cacaatcctg ctatgggtgc tgctgctctg ggttcaggc 60

<210> 89  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 89

gctgctctgg gttccaggct ccactgggtga cattcagatg acccaatctc cgagctcttt 60  
g 61

<210> 90

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 90

gatctgcagg tgatagtgac cctatcccct acagacgcag acaaagagct cggagattgg 60

<210> 91

<211> 63

<212> DNA

[0032] <213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 91

caclatcacc tgcagatcia gtcagagcat tgtacataat gatggaaaca cctatlltga 60  
atg 63

<210> 92

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 92

gatgagaagc ttgggtgect ticcctggttt ctgttggtac cattcaaaat aggtgtttc 59

<210> 93

<211> 66

<212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 93	
	gcaccaagc ttctcateta taaagtttcc aatcgatttt ctgggtgcc atccaggttt 60	
	agtggc	66
	<210> 94	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 94	
	gcagagaaga gatggtgagg gtgaagtgtg tcccagacc actgccacta aacctggatg 60	
	g	61
[0033]	<210> 95	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 95	
	ctcaccatct cttctctgca gccgaggat ttcgcaacct attactgttt tcaag 55	
	<210> 96	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 96	
	ccttggtgcc ttgaccgaac gtgagaggaa catatgaacc ttgaaaacag taatagg 57	
	<210> 97	
	<211> 58	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 97	
	accctctaga attaggaaag tgcacttacg tttgatttcc accttgggtgc ctigaccg	58
	<210> 98	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 98	
	tatatctaga attccccccc cccccccccc	30
	<210> 99	
	<211> 46	
[0034]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 99	
	tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc	46
	<210> 100	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> 30	
	<223> n = c, a 或 t	
	<220>	

<221> misc\_feature  
<222> 38  
<223> n = c 或 g

<220>  
[0035] <221> misc\_feature  
<222> 42  
<223> N = c 或 t

<400> 100  
tatagagctc aagcttccag tggatagacn gatggggntg tngttttggc 50