(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1890369 B
(45)授权公告日 2017.07.28

(21)申请号 200480036248.8

(22)申请日 2004.10.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 1890369 A

(43)申请公布日 2007.01.03

(30)优先权数据
PCT/JP03/13062 2003.10.10 JP
PCT/JP03/13123 2003.10.14 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2006.06.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2004/014911 2004.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2005/035756 JA 2005.04.21

(73)专利权人 中外制药株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 服部有宏 小岛哲郎 宫崎太郎 添田哲弘

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 柳春琦

(51)Int.Cl.
C12N 15/09(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)

(56)对比文件
JP 特开2002-171978 A,2002.06.18,
JP 特开平6-121689 A,1994.05.06,
FRANCOIS,C ET AL.Construction of a bispecific antibody reacting with thealpha-and beta-chains ofthe human IL-2 receptor.THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY150 10.1993,4610 - 4619.
LU,D ET AL..Fab-scFV fusion protein: an efficient approach to productionof bispecific antibody fragments.J. IMMUNOL METHODS267 2.2002,267(2),213 - 226.
LU,D. ET AL..Di-diabody:a novel tetravalent bispecific antibody molecule bydesign..JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS279 1-2.2003,279(1-2),219 - 232.
SEGAL, D.M. ET AL.ntroduction : bispecific antibodies..JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS248 1-2.2001,196(1-2),279 - 286.
KIM, S.H. ET AL.'Mammalian type I interferton receptors consists ot twosubunits:IFNaR1 and IFNaR2.'.GENE196 1-2.1997,196(1-2),279 - 286.

审查员 丁海

权利要求书1页 说明书29页
序列表74页 附图9页

(54)发明名称

替代功能蛋白质的双特异性抗体

(57)摘要

本发明成功地构建了一种双特异性抗体，该抗体能与凝血因子IX/活化凝血因子IX和凝血因子X两者结合，并且可以替代增强酶反应的凝血因子VIII/活化凝血因子VIII的作用。

CN 1890369 B

1.一种双特异性抗体，其为识别酶和该酶底物两者的抗体，且替代增强所述酶反应的辅因子功能，其中所述酶为凝血因子IX和/或活化凝血因子IX；底物为凝血因子X；辅因子为凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII，并且其中所述抗体包含互补决定区，所述互补决定区由以下组成：

(i)由以下(a1)中所述的H链CDR和L链CDR组成的氨基酸序列；和由以下(b1)中所述的H链CDR和L链CDR组成的氨基酸序列，或者

(ii)由以下(a2)中所述的H链CDR和L链CDR组成的氨基酸序列，和由以下(b2)中所述的H链CDR和L链CDR组成的氨基酸序列：

(a1)H链CDR 1、2和3分别为SEQ ID NO:14、15和16中所述的氨基酸序列，而L链CDR 1、2和3分别为SEQ IDNO:214、215和216中所述的氨基酸序列，

(a2)H链CDR 1、2和3分别为SEQ ID NO:86、87和88中所述的氨基酸序列，而L链CDR 1、2和3分别为SEQ IDNO:206、207和208中所述的氨基酸序列，

(b1)H链CDR 1、2和3分别为SEQ ID NO:22、23和24中所述的氨基酸序列，而L链CDR 1、2和3分别为SEQ IDNO:218、219和220中所述的氨基酸序列，

(b2)H链CDR 1、2和3分别为SEQ ID NO:162、163和164中所述的氨基酸序列，而L链CDR 1、2和3分别为SEQ ID NO:210、211和212中所述的氨基酸序列。

替代功能蛋白质的双特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及可替代增强酶反应的辅因子作用的双特异性抗体和含有该抗体作为有效成分的医药组合物。

背景技术

[0002] 抗体在血中的稳定性高、抗原性低，因此作为医药品被广泛关注。其中能同时识别两种抗原的抗体是双特异性抗体。双特异性抗体已被提议很久。但至今为止，仅报道了以再靶向NK细胞、巨噬细胞、T细胞为目的等，简单地连接两种抗原的抗体(参照非专利文献7)。例如，正在进行临床试验的MDX-210仅是将表达FcγRI的单核细胞等再导向到表达HER-2/neu的癌细胞的双特异性抗体。所以到目前为止，尚无利用双特异性抗体作为替代增强酶反应的辅因子的方法的例子。

[0003] 辅因子的例子有：组织因子(TF)、凝血因子V(F.V)、活化凝血因子V(F.Va)、凝血因子VIII(F.VIII)、活化凝血因子VIII(F.VIIIa)、凝血调节蛋白(TM)、蛋白S(PS)、蛋白Z(PZ)、肝素、补体C4b、补体调节蛋白H因子(补体调节因子H，Complement Regulatory FactorH)、膜辅因子蛋白(MCP)、补体受体1(CR1)等。

[0004] 其中，F.VIII/F.VIIIa是活化凝血因子IX(F.IXa)的充分活性表达所必需的辅因子。Scheiflinger F等发现：在产色分析中，某种抗F.IX/F.IXa抗体通过F.IXa发挥促进凝血因子X(F.X)活化的功能(参照专利文献1)。但是，在F.VIII缺乏血浆的凝固恢复能力测定中，只有当添加外源性F.IXa时才显示凝固恢复能力，而该抗体单独使用时未能显示凝固恢复能力。

[0005] 已知F.VIIIa不仅与F.IXa相互作用，也与F.X相互作用(参照专利文献5和6)。就这一点而言，Scheiflinger F等的抗体不能充分替代F.VIII/F.VIIIa的功能，而且其活性也可能不充分。

[0006] 本发明人通过深入研究，结果在制作替代增强酶活性的辅因子作用的双特异性抗体方面获得成功，从而完成了本发明。

[0007] 专利文献1：国际公开第01/19992号

[0008] 专利文献2：美国专利第4,474,893号公报

[0009] 专利文献3：EP404,097号

[0010] 专利文献4：国际公开第93/11161号

[0011] 专利文献5：日本特愿2002-112369号公报

[0012] 专利文献6：日本特愿2003-012648号公报

[0013] 专利文献7：日本特开平5-304992号公报

[0014] 专利文献8：日本特开平2-145187号公报

[0015] 专利文献9：日本特开平5-213775号公报

[0016] 专利文献10：日本特开平10-165184号公报

[0017] 专利文献11：日本特开平11-71288号公报

[0018] 专利文献12:日本特表2002-518041号公报

[0019] 专利文献13:日本特表平11-506310号公报

[0020] 专利文献14:日本特开平5-199894号公报

[0021] 专利文献15:日本特表平10-511085号公报

[0022] 专利文献16:日本特开平5-184383号公报

[0023] 非专利文献1:Nilsson IM等著,“J.Intern.Med.”,1992年,235卷,25-32页

[0024] 非专利文献2:Lofqvist T等著,“J.Intern.Med.”,1997年,241卷,395-400页(“Lofqvist T”中的“o”为元音变音的文字)

[0025] 非专利文献3:第24回日本血栓止血学会学术集会学术专门部会血友病标准化检讨部会小型专题报告会,2001年,http://www.jsth.org

[0026] 非专利文献4:Medical Bulletin#193 1994

[0027] 非专利文献5:Mertens K等著,“Thromb.Haemost.”,1999年,82卷,209-217页

[0028] 非专利文献6:Lapan KA等著,“Thromb.Haemost.”,1998年,80卷,418-422页

[0029] 非专利文献7:Segal DM等著,“Journal of Immunological Methods”,2001年,248卷,1-6页

[0030] 非专利文献8:Bos R和Nieuwenhuitzen W著,“Hybridoma”,1992年,11卷,1期,41-51页

[0031] 非专利文献9:Brennan M等著,“Science”,1985年,229卷,1708期,81-3页

[0032] 非专利文献10:Karpovsky B等著,“J.Exp.Med”,1984年,160卷,6期,1686-701页

[0033] 非专利文献11:Suresh MR等著,“Methods Enzymol.”,1986年,121卷,210-28页

[0034] 非专利文献12:Massimo YS等著,“J.Immunol.Methods”,1997年,201卷,57-66页

[0035] 非专利文献13:Brennan M等著,“Science”,1985年,229卷,81页

[0036] 非专利文献14:Shalaby MR等著,“J.Exp.Med.”,1992年,175卷,217-25页

[0037] 非专利文献15:Holliner P等著,“Proc.Natl.Acad.Sci.USA”,1993年,90卷,6444-8页

[0038] 非专利文献16:Ridgway JB等著,“Protein Eng.”,1996年,9卷,617-21页

[0039] 非专利文献17:Hammerling U等著,“J.Exp.Med.”,1968年,128卷,1461-73页

[0040] 非专利文献18:Kurokawa T等著,“Bio/Technology”,1989年,7卷,1163页

[0041] 非专利文献19:Link BK等著,“Blood”,1993年,81卷,3343页

[0042] 非专利文献20:Nitta T等著,“Lancet”,1990年,335卷,368-71页

[0043] 非专利文献21:deLeij L等著,“Foundation Nationale de TransfusionSanguine,Les Ulis France”,1990年,249-53页

[0044] 非专利文献22:Le Doussal JM等著,“J.Nucl.Med.”,1993年,34卷,1662-71页

[0045] 非专利文献23:Stickney DR等著,“Cancer Res.”,1991年,51卷,6650-5页

[0046] 非专利文献24:Weiner LM等著,“Cancer Res.”,1993年,53卷,94-100页

[0047] 非专利文献25:Kroesen BJ等著,“Br.J.Cancer”,1994年,70卷,652-61页

[0048] 非专利文献26:Weiner GJ等著,“J.Immunol.”,1994年,152卷,2385页

[0049] 非专利文献27:Suresh MR等著,“Proc.Natl.Acad.Sci.USA”,1986年,83卷,7989-93页

[0050] 非专利文献28:Milstein C和Cuello AC著,“Nature”,1983年,305卷,537页

[0051] 非专利文献29:Xiang J等著,“Mol.Immunol.”,1990年,27卷,809页

[0052] 非专利文献30:Bebbington CR等著,“Bio/Technology”,1992年,10卷,169页

[0053] 非专利文献31:Huse WD等著,“Science”,1989年,246卷,1275页

[0054] 非专利文献32:McCafferty J等著,“Nature”,1990年,348卷,552页

[0055] 非专利文献33:Kang AS等著,“Proc.Natl.Acad.Sci.USA”,1991年,88卷,4363页

发明内容

[0056] 发明所要解决的课题

[0057] 本发明的课题是提供可替代增强酶反应的辅因子功能的双特异性抗体。

[0058] 解决课题的方法

[0059] 本发明人进行了深入研究,结果成功地发现:能与F.IX/F.IXa和F.X两者特异性结合,替代辅因子F.VIIIa的功能,即通过F.IXa促进F.X活化作用的双特异性抗体。即,本发明人成功地制作了识别酶和该酶底物两者,可替代该酶的辅因子功能的双特异性抗体。

[0060] 即本发明涉及替代增强酶反应的辅因子功能的双特异性抗体,更具体来说提供:

[0061] 一种替代增强酶反应的辅因子功能的双特异性抗体,该抗体是识别酶和该酶底物两者的抗体。

[0062] [1]的抗体,其中酶为蛋白水解酶。

[0063] [2]的抗体,其中蛋白水解酶、底物和辅因子为凝血纤溶相关因子。

[0064] [3]的抗体,其中凝血纤溶相关因子的酶为凝血因子IX和/或活化凝血因子IX;底物为凝血因子X;辅因子为凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII。

[0065] [1]-[4]中任一项的抗体,该抗体包含含有抗凝血因子IX/IXa抗体中下述(a1)或(a2)的CDR3氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区、和含有抗凝血因子X抗体中的下述(b1)-(b9)中任一种CDR3氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区:

[0066] (a1)SEQ ID NO:16所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0067] (a2)SEQ ID NO:20所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0068] (b1)SEQ ID NO:24所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0069] (b2)SEQ ID NO:28所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0070] (b3)SEQ ID NO:32所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0071] (b4)SEQ ID NO:36所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0072] (b5)SEQ ID NO:40所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0073] (b6)SEQ ID NO:44所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0074] (b7)SEQ ID NO:48所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0075] (b8)SEQ ID NO:52所示的H链CDR3氨基酸序列;

[0076] (b9)SEQ ID NO:56所示的H链CDR3氨基酸序列。

[0077] [1]-[4]中任一项的抗体,该抗体包含含有抗凝血因子IX/IXa抗体中下述(a1)或(a2)的CDR氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区、和含有抗凝血因子X抗体中的下述(b1)-(b9)中任一种CDR氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区:

[0078] (a1) SEQ ID NO:14、15、16所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0079] (a2) SEQ ID NO:18、19、20所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0080] (b1) SEQ ID NO:22、23、24所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0081] (b2) SEQ ID NO:26、27、28所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0082] (b3) SEQ ID NO:30、31、32所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0083] (b4) SEQ ID NO:34、35、36所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0084] (b5) SEQ ID NO:38、39、40所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0085] (b6) SEQ ID NO:42、43、44所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0086] (b7) SEQ ID NO:46、47、48所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0087] (b8) SEQ ID NO:50、51、52所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列；

[0088] (b9) SEQ ID NO:54、55、56所示的H链CDR1、2、3的氨基酸序列。

[0089] 一种含有[1]-[6]中任一项的抗体和药学上可接受的载体的组合物。

[0090] [7]的组合物，该组合物是用于预防和/或治疗出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病的医药组合物。

[0091] [8]的组合物，其中出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病是由于凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII的活性低下或缺乏而引起发病和/或发展的疾病。

[0092] [9]的组合物，其中由于凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII的活性低下或缺乏而引起发病和/或发展的疾病是血友病A。

[0093] [9]的组合物，其中由于凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII的活性低下或缺乏而引起发病和/或发展的疾病是对凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII产生抑制物的疾病。

[0094] [9]的组合物，其中由于凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII的活性低下或缺乏而引起发病和/或发展的疾病是获得性血友病。

[0095] [9]的组合物，其中由于凝血因子VIII和/或活化凝血因子VIII的活性低下而引起发病和/或发展的疾病是冯维勒布兰德病。

[0096] 一种预防和/或治疗出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病的方法，该方法包括给予[1]-[6]中任一项的抗体或者[7]-[13]中任一项的组合物的步骤。

[0097] [1]-[6]中任一项的抗体在制备[7]-[13]中任一项的组合物中的应用。

[0098] [14]的预防和/或治疗方法所用的药盒，该药盒含有至少[1]-[6]中任一项的抗体或者[7]的组合物。

[0099] 一种预防和/或治疗出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病的方法，该方法包括给予[4]-[6]中任一项的抗体或者[7]-[13]中任一项的组合物的步骤，且所述抗体或组合物与凝血因子VIII联用。

[0100] [17]的预防和/或治疗方法所用的药盒，该药盒含有至少[4]-[6]中任一项的抗体或者[7]的组合物，且含有凝血因子VIII。

[0101] 附图简述

[0102] [图1]是表示pcDNA4-g4H的插入区的图。

[0103] [图2]是表示pcDNA4-g4L和pIND-g4L的插入区的图。

[0104] [图3]是表示pIND-g4H的插入区的图。

[0105] [图4]描述了测定抗F.IXa/抗F.X双特异性抗体的F.VIIIa样活性的结果，所述抗F.IXa/抗F.X双特异性抗体通过抗F.IXa抗体XB12和抗F.X抗体SB04、SB21、SB42、SB38、SB30、SB07、SB05、SB06、SB34来制作。抗体溶液的浓度为10μg/mL(终浓度1μg/mL)。结果，9种双特异性抗体显示F.VIIIa样活性提高，按活性强度顺序为：XB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、XB12/SB30、XB12/SB07、XB12/SB05、XB12/SB06、XB12/SB34。

[0106] [图5]描述了测定抗F.IXa/抗F.X双特异性抗体或XT04抗体的F.VIIIa样活性的结果，所述抗F.IXa/抗F.X双特异性抗体通过抗F.IXa抗体XT04和抗F.X抗体SB04、SB21、SB42、SB38、SB30、SB07、SB05、SB06、SB34来制作。抗体溶液的浓度为10μg/mL(终浓度1μg/mL)。结果，XT04/SB04、XT04/SB21、XT04/SB42、XT04/SB38、XT04/SB30、XT04/SB07、XT04/SB05、XT04/SB06、XT04/SB34显示F.VIIIa样活性提高。

[0107] [图6]描述了测定XB12/SB04在各种浓度下的F.VIIIa样活性的结果，所述XB12/SB04为在图4中显示最高活性的抗体。结果，XB12/SB04显示了浓度依赖性F.VIIIa样活性的提高。

[0108] [图7]描述了测定在XB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、XB12/SB30、XB12/SB07、XB12/SB05、XB12/SB06、XB12/SB34存在下的血浆凝固时间(APTT)的结果。抗体溶液与F.VIII缺乏血浆混合后的浓度是XB12/SB06存在下为1.7μg/mL、其它的为10μg/mL。结果，XB12/SB04、XB12/SB21、XB12/SB42、XB12/SB38、XB12/SB30、XB12/SB07、XB12/SB05、XB12/SB06、XB12/SB34与无抗体存在下相比，显示了凝固时间缩短的效果。

[0109] [图8]描述了测定在XT04/SB04、XT04/SB21、XT04/SB42、XT04/SB38、XT04/SB30、XT04/SB07、XT04/SB05、XT04/SB06、XT04/SB34存在下的血浆凝固时间(APTT)的结果。抗体溶液与F.VIII缺乏血浆混合后的浓度是XT04/SB06存在下为5μg/mL、其它的为10μg/mL。结果，XT04/SB04、XT04/SB21、XT04/SB42、XT04/SB38、XT04/SB30、XT04/SB07、XT04/SB05、XT04/SB06与无抗体存在下相比，显示了凝固时间缩短的效果。而XT04/SB34未显示凝固时间缩短的效果。

[0110] [图9]描述了测定XB12/SB04在各种浓度下的凝固时间(APTT)的结果，所述XB12/SB04是在图7、图8中显示最高凝固时间缩短效果的抗体。结果，XB12/SB04显示了浓度依赖性缩短凝固时间的效果。图中的抗体浓度表示抗体溶液与F.VIII缺乏血浆混合后的数值。

[0111] [图10]显示了SB04或SB06的GST-AP蛋白质印迹的结果。1、2、3分别是转录的GST-AP与SB04、SB06、不含抗体的样品反应的结果。结果显示仅SB04与GST-AP的结合反应被检出。

[0112] [图11]是表示pELBGlacI载体的图。ColElori：ColE1系质粒复制原点区；f1ori：f1噬菌体复制原点区；lacI：乳糖阻遏蛋白编码区；P_{lac}：乳糖启动子；pelBss：大肠杆菌PelB蛋白信号序列；scFv：单链抗体分子编码区；gene III：f1噬菌体GeneIII蛋白编码区；Amp^r：氨苄青霉素抗性基因；Sfi I：限制酶Sfi I切割位点。

[0113] [图12]描述了使用表达有双特异性抗体的培养上清液测定F.VIIIa样活性的结果，所述双特异性抗体是抗F.IXa抗体(A19,A25,A31,A38,A39,A40,A41,A44,A50,A69,XB12)和抗F.X抗体(B2,B5,B9,B10,B11,B12,B13,B14,B15,B16,B18,B19,B20,B21,B23,B25,B26,B27,B31,B34-1,B34-2,B35,B36,B38,B42,SB04,SB15,SB27)组合而成的抗体。“+”表示F.VIIIa样活性为0.1以上的情况。

[0114] [图13]描述了使用表达有双特异性抗体的纯制品进行血液凝固分析的结果，所述双特异性抗体是抗F.IXa抗体(A19，A25，A31，A38，A39，A40，A41，A44，A50，A69，XB12)和抗F.X抗体(B2，B5，B9，B10，B11，B12，B13，B14，B15，B16，B18，B19，B20，B21，B23，B25，B26，B27，B31，B34-1，B34-2，B35，B36，B38，B42，SB04，SB15，SB27)组合而成的抗体。与抗体未添加时相比，抗体添加时凝固时间缩短10秒-20秒者表示为“+”，缩短20秒-40秒者表示为“++”，缩短40秒-50秒者表示为“+++”，而缩短50秒以上者表示为“++++”。

[0115] [图14]描述了测定A44/B26在各种浓度下的凝固时间的结果，所述A44/B26是在图13中具有高的凝固时间(APTT)缩短效果的抗体。抗体未添加时的凝固时间为113秒。结果，A44/B26显示了浓度依赖性缩短凝固时间的效果。图中的抗体浓度表示抗体溶液与F.VIII缺乏血浆混合后的数值。

[0116] [图15]描述了测定A69/B26在各种浓度下的凝固时间的结果，所述A69/B26是在图13中具有高的凝固时间(APTT)缩短效果的抗体。抗体未添加时的凝固时间为109.6秒。结果，A69/B26显示了浓度依赖性缩短凝固时间的效果。图中的抗体浓度表示抗体溶液与F.VIII缺乏血浆混合后的数值。

[0117] [图16]描述了测定A44/B26或XB12/SB04与F.VIII共存下的血浆凝固时间(APTT)的结果。结果，A44/B26或XB12/SB04与F.VIII的混合溶液与单独的F.VIII相比，显示了凝固时间的缩短效果。

[0118] [图17]描述了测定在A44/B26或XB12/SB04存在下的抑制物血浆中的凝固时间(APTT)的结果。结果，A44/B26或XB12/SB04与无抗体存在下相比，显示了凝固时间的缩短效果。

[0119] [图18]描述了测定XB12/SB04和人源化XB12/人源化SB04在各种浓度下的凝固时间的结果。抗体未添加时的凝固时间为111.3秒。测定的结果，人源化XB12/人源化SB04显示了与XB12/SB04同程度的凝固时间的缩短效果。图中的抗体浓度表示抗体溶液与F.VIII缺乏血浆混合后的数值。

[0120] 实施发明的最佳方式

[0121] 本发明的双特异性抗体(bispecific抗体)是由对不同抗原具有特异性的两种抗体或者抗体片段构成的分子。对双特异性抗体没有特别限定，但优选单克隆抗体。

[0122] 本发明的双特异性抗体，优选使用基因重组技术产生的重组型抗体(例如参照Borrebaeck CAK和Larrick JW，THER APEUTICMONOCLONAL ANTIBODIES，由MACMILLAN PUBLISHRS LTD在英国出版，1990)。通过从杂交瘤或者产生抗体的致敏淋巴细胞等抗体产生细胞中克隆编码重组型抗体的DNA，将该DNA插入到适当的载体上，再将该载体导入宿主由此产生抗体，可以得到重组型抗体。

[0123] 本发明中的抗体可以是其抗体片段或修饰抗体。抗体片段包括双抗体(diabody；Db)、线状抗体、单链抗体(下面称为scFv)分子等。其中，“Fv”片段是最小的抗体片段，含有完整的抗原识别位点和结合位点。“Fv”片段是一个重(H)链可变区(V_H)和轻(L)链可变区(V_L)通过非共价键强连接的二聚体(V_H-V_L二聚体)。各可变区的三个互补决定区(complementarity determining region；CDR)互相作用，在V_H-V_L二聚体的表面形成抗原结合位点。六个CDR在抗体上授予一个抗原结合位点。但是，即使一个可变区(或者，仅含有三个抗原特异性CDR的Fv的一半)也具有识别抗原和结合抗原的能力，尽管它的亲和性比完整

结合位点的低。

[0124] Fab片段(也称为F(ab))还含有L链恒定区和H链恒定区(CH1)。Fab′片段与Fab片段不同,前者含有数个附加的来自H链CH1区羧基末端的残基,包含来自抗体铰链区的一个或一个以上的半胱氨酸。Fab′-SH表示Fab′在恒定区的一个或一个以上的半胱氨酸残基上具有游离巯基。F(ab′)片段通过切断F(ab′)$_2$胃蛋白酶消化物铰链部分的半胱氨酸中的二硫键来制备。本领域技术人员也已知其它的化学键连接的抗体片段。

[0125] 双抗体是指通过基因融合而构建的双价(bivalent)抗体片段(Holliger P等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993),EP404,097号,WO93/11161号等)。双抗体是由两条多肽链构成的二聚体,各多肽链中,同一链上的L链可变区(V_L)和H链可变区(V_H)通过太短而不能互相连接(例如通过5残基左右)的接头进行连接。同一多肽链上所编码的V_L和V_H,由于它们之间的接头短而不能形成单链可变区片段,故形成二聚体,因此双抗体具有2个抗原结合位点。

[0126] 单链抗体或scFv抗体片段含有抗体的V_H和V_L区,这些区存在于单一的多肽链中。通常,Fv多肽在V_H和V_L区之间还含有多肽接头,这样scFv可形成用于抗原结合所需的结构(有关scFv的综述,参照Pluckthun“The Pharmacology of Monoclonal Antibodies”,113卷(Rosenburg和Moore编著(Spring Verlag,New York),269-315页,1994))。对本发明中的接头没有特别限定,只要它们不抑制其两端所连接的抗体可变区的表达即可。

[0127] IgG型双特异性抗体可通过融合产生IgG抗体的两种杂交瘤而形成的杂种杂交瘤(quadroma)来分泌(Milstein C等,Nature 1983,305:537-540)。还可通过将构成两种目的IgG的L链和H链的基因(合计4种基因)导入细胞,使它们共同表达来分泌。

[0128] 但是,理论上,采用这些方法产生的IgG的H链和L链的组合有10种。难以从10种IgG中纯化出含有目的组合的H链L链的IgG。而且,在理论上目的组合物的分泌量也显著降低,因此需要大的培养规模,导致进一步增加制造成本。

[0129] 此时通过对H链的CH3区实施适当的氨基酸取代,可使H链异源组合的IgG优先分泌(RidgwayJB等,Protein Engineering 1996,9:617-621;Merchant AM等,Nature Biotechnology 1998,16:677-681)。

[0130] 至于L链,与H链可变区相比L链可变区的多样化低,因此预期获得具备与两条H链结合能力的共同的L链。通过将该共同L链与两个H链基因导入细胞从而表达IgG,使双特异性IgG的有效表达成为可能(Nature Biotechnology.1998,16,677-681)。但是,任意选择两种抗体时,含有相同L链的可能性低,难以实现上述的想法,为此也提出了选择对任意不同H链显示有高结合能力的共同L链的方法(WO2004/065611)。具有上述突变(Nature Biotechnoligy.1998,16,677-681)CH3的H链,当对侧的H链不存在时几乎不分泌。利用此特性,首先诱导右臂的L链和H链表达,停止表达后,再诱导左臂的L链和H链表达,由此可提高目的组合的IgG表达比率(PCT/JP2004/008585)。

[0131] 通过化学交联Fab’也可制备双特异性抗体。可通过例如将由一种抗体调制的Fab’用o-PDM(邻苯二马来酰亚胺ortho-phenylenedi-maleimide)进行马来酰亚胺化,再使其与由另一种抗体调制的Fab进行反应,使得来自不同抗体的Fab进行交联,制备双特异性F(ab’)$_2$(Keler T等,Cancer Research 1997,57:4008-4014)。此外,还已知将Fab’-硫代硝基苯甲酸(TNB)衍生物与Fab’-硫醇(SH)等抗体片段进行化学连接的方法(Brennan M等,

Science 1985,229:81-83)。

[0132] 也可使用来自Fos、Jun等的亮氨酸拉链替代化学交联。尽管Fos、Jun也可形成同源二聚体,但利用它们优先形成异源二聚体的特性。制备表达附加Fos亮氨酸拉链的Fab'和附加Jun亮氨酸拉链的另一种Fab'。在温和的条件下,通过使还原的单体Fab'-Fos和Fab'-Jun混合使之发生反应可形成双特异性$F(ab')_2$(Kostelny SA等,J.ofImmunology,1992,148:1547-53)。该方法并不限于Fab',也可应用于scFv、Fv等。

[0133] 在双抗体方面也可制备双特异性抗体。双特异性双抗体是含有两个交换型scFv片段的异源二聚体。即通过将来自两种抗体A和B的V_H和V_L用5残基左右的比较短的接头进行连接制作$V_H(A)-V_L(B)$和$V_H(B)-V_L(A)$,通过使用$V_H(A)-V_L(B)$和$V_H(B)-V_L(A)$可构建异源二聚体(Holliger P等,Proc of the National Academy of Sciences of the USA1993,90:6444-6448)。

[0134] 此时,通过用15残基左右的柔软的比较长的接头,将两种scFv进行连接(单链双抗体:Kipriyanov SM等,J of Molecular Biology.1999,293:41-56),进行适当的氨基酸取代(knobs-into-holes:Zhu Z等,ProteinScience.1997,6:781-788)可促进目标的构建。

[0135] 通过用15残基左右的柔软的比较长的接头,将两种scFv进行连接可制作$sc(Fv)_2$,$sc(Fv)_2$也可成为双特异性抗体(Mallender WD等,J of Biological Chemistry,1994,269:199-206)。

[0136] 修饰抗体例如可以是与聚乙二醇(PEG)等各种分子结合的抗体。在本发明的修饰抗体中,对所结合的物质没有限定。所述修饰抗体可通过将所得抗体实施化学修饰来获得。这些方法在本领域中已确立。

[0137] 本发明的抗体包括人抗体、小鼠抗体、大鼠抗体等,对它们的起源并没有限定。还可以是嵌合抗体或人源化抗体等基因改造抗体。

[0138] 获得人抗体的方法已众所周知,例如,通过用目的抗原免疫具有全套人抗体基因的转基因动物,可获得目的人抗体(参照国际专利申请公开号WO 93/12227,WO 92/03918,WO 94/02602,WO 94/25585,WO 96/34096,WO 96/33735)。

[0139] 使用已知的方法可制备基因改造抗体。具体来说,例如嵌合抗体是由免疫动物抗体H和L链的可变区与人抗体H和L链的恒定区组成的抗体。可通过将编码来自免疫动物的抗体可变区的DNA与编码人抗体恒定区的DNA连接,将所得DNA插入表达载体中,再将重组载体导入宿主而产生,获得嵌合抗体。

[0140] 人源化抗体是改造抗体,也称为重构型人抗体。人源化抗体的构建可通过将来自免疫动物的抗体的CDR移植到人抗体的互补决定区来实现。其一般的基因重组技术也是公知的。

[0141] 具体来说,通过PCR法使用制备成末端含有重叠部分的多个寡核苷酸,合成设计的小鼠抗体CDR与人抗体构架区(framework region;FR)连接的DNA序列。将所得的DNA与编码人抗体恒定区的DNA连接,然后将所得DNA插入到表达载体上,再将表达载体导入宿主而产生人源化抗体(参照欧州专利申请公开号EP 239400和国际专利申请公开号WO 96/02576)。经由CDR连接的人抗体FR,可选择与互补决定区形成良好的抗原结合位点的抗体FR。根据需要抗体可变区中的构架区氨基酸可被取代,使得重构人抗体的互补决定区可形成适当的抗原结合位点(Sato K等,Cancer Research 1993,53:851-856)。构架区还可被来自各种人抗

体的构架区取代(参照国际专利申请公开号WO 99/51743)。

[0142] 本发明提供一种双特异性抗体,该抗体可替代识别酶和该酶底物两者的辅因子功能。

[0143] 对本发明中的辅因子没有特别限定,只要它们能作用于酶而增强酶反应即可。本发明中的辅因子例如可以是蛋白水解酶的辅因子。蛋白水解酶的辅因子的具体例子有:凝血纤溶相关因子中的辅因子(F.VIII/F.VIIIa、F.V/F.Va、PZ、TM、TM/PS系统)和补体反应的辅因子(C4b、MCP、CR1、H因子)等。

[0144] 本发明中的酶、该酶的底物和该酶的辅因子的具体例子,可例举如下的组合。

[0145] (a)凝血纤溶相关因子中的辅因子的例1

[0146] 酶:F.IXa

[0147] 底物:F.X

[0148] 辅因子:F.VIII/F.VIIIa

[0149] 辅因子F.VIIIa通过与F.IXa和F.X两者结合,增强F.IXa对F.X的活化。在识别上述酶F.IXa、底物F.X两者的双特异性抗体中有增强F.X活化作用的抗体。认为所述抗体中可能存在具有替代辅因子F.VIII/F.VIIIa的作用功能的抗体。

[0150] (b)凝血纤溶相关因子中的辅因子的例2

[0151] 酶:ZPI

[0152] 底物:F.X/F.Xa

[0153] 辅因子:PZ

[0154] 辅因子PZ通过与丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)家族的ZPI和活化凝血因子X(F.Xa)结合,增强ZPI的F.Xa抑制活性。即,认为在识别ZPI和F.X/F.Xa两者的双特异性抗体中存在具有替代PZ功能作用的抗体。

[0155] (c)凝血纤溶相关因子中的辅因子的例3

[0156] 酶:凝血酶

[0157] 底物:TAFI

[0158] 辅因子:TM

[0159] 辅因子TM增强凝血酶的TAFI活化作用。即,认为在识别凝血酶和TAFI两者的双特异性抗体中存在具有替代TM功能的抗体。

[0160] (d)凝血纤溶相关因子中的辅因子的例4

[0161] 酶:凝血酶

[0162] 底物:PC

[0163] 辅因子:TM/PS

[0164] TM/PS系统增强凝血酶的PC活化作用。即,认为在识别凝血酶和PC两者的双特异性抗体中可能存在具有替代TM/PS系功能的抗体。

[0165] (e)凝血纤溶相关因子中的辅因子的例5

[0166] 酶:F.Xa

[0167] 底物:凝血酶原

[0168] 辅因子:F.V/F.Va

[0169] 辅因子F.Va通过与F.Xa和凝血酶原两者结合,增强F.Xa的凝血酶原活化作用。在

识别上述酶F.Xa、底物凝血酶原两者的双特异性抗体中具有增强凝血酶原活化作用的抗体。认为所述抗体中存在具有替代辅因子F.V/F.Va作用功能的抗体。

[0170] (f)补体反应的辅因子的例1

[0171] 酶:C1s

[0172] 底物:C2

[0173] 辅因子:C4b

[0174] C4b具有促进C1s引起的C2分解的作用。即认为在识别C1s和C2两者的双特异性抗体中存在替代C4b功能的抗体。

[0175] (g)补体反应的辅因子的例2

[0176] 酶:补体调节蛋白I因子(补体调节因子I,Complememt RegulatoryFactor I)

[0177] 底物:C3b

[0178] 辅因子:补体调节蛋白H因子(补体调节因子H,ComplementRegulatory Factor H)

[0179] 膜辅因子蛋白(MCP)

[0180] 补体受体1(CR1)

[0181] 补体调节因子H、MCP、CR1具有促进补体调节因子I引起的C3b分解的作用。即,认为在识别补体调节因子I和C3b两者的双特异性抗体中存在替代补体调节因子H、MCP、CR1功能的抗体。

[0182] 在上述辅因子中,特别优选的是F.VIII/F.VIIIa。尽管F.VIII/F.VIIIa经受凝血酶等蛋白水解酶引起的有限水解,但只要具有F.VIII/F.VIIIa的辅因子活性,则可以是任何形态。此外,变异型F.VIII/F.VIIIa和通过基因重组技术人工改造的F.VIII/F.VIIIa也包含在F.VIII/F.VIIIa内,只要它们具有F.VIII/F.VIIIa的辅因子活性。

[0183] 对获得本发明的替代辅因子功能的双特异性抗体的方法没有特别限定,可采用任何方法获得。例如,获得替代酶A和底物B的辅因子功能的双特异性抗体时,将酶A、底物B分别免疫动物,获取抗酶A抗体和抗底物B抗体。然后制备含有抗酶A抗体的H链和L链及抗底物B抗体的H链和L链的双特异性抗体。在此,希望分别获得多种抗酶A抗体和抗底物B抗体,优选使用这些抗体制备尽可能多的组合的双特异性抗体。产生双特异性抗体后,选择具有替代辅因子功能的活性的抗体。

[0184] 通过本领域公知的方法可获得抗酶或底物的抗体。例如,可通过用抗原免疫动物来制备抗体。免疫动物用的抗原可以是具有免疫原性的完全抗原和不具有免疫原性的不完全抗原(包含半抗原)。在本发明中,将本发明的辅因子功能替代抗体可作为其辅因子而发挥作用的酶或底物作为上述抗原(免疫原)使用。被免疫的动物可使用例如小鼠、大鼠、仓鼠、天竺鼠、兔、鸡或猕猴等。可采用本领域中公知的方法,用抗原对这些动物进行免疫。本发明中优选从免疫的动物或该动物的细胞回收抗体的L链和H链可变区。该步骤可采用本领域中一般公知的技术进行。经抗原免疫的动物,尤其在脾细胞中表达针对该抗原的抗体。因此,例如从免疫动物的脾细胞制备mRNA,通过RT-PCR,使用对应该动物可变区的引物,可以回收L链和H链的可变区。

[0185] 具体来说,用酶、底物分别免疫动物。作为免疫原的酶、底物可以是完整的蛋白质或该蛋白质的部分肽。另外,免疫动物所用的免疫原,根据情况可以是候选抗原与其它分子结合而成的可溶性抗原,或者根据情况也可以使用它们的片段。

[0186] 从免疫小鼠的脾脏分离脾细胞，使其与小鼠骨髓瘤细胞融合，制备杂交瘤。分别选择与抗原结合的杂交瘤，使用对应可变区的引物等，经RT-PCR可以回收L链、H链的可变区。也可使用对应CDR的引物、对应比CDR多样性低的构架区的引物、或者对应信号序列和CH1或L链恒定区(CL)的引物。

[0187] 或者，从免疫动物的脾细胞提取mRNA，使用对应可变区附近的引物，经RT-PCR可以回收L链、H链可变区的cDNA。此外，在体外也可以免疫淋巴细胞，用其构建提呈scFv或Fab的文库。通过淘选来浓缩、克隆抗原结合抗体克隆，可以得到可变区。此时，也可将来自人或非免疫动物的外周血单核细胞、脾脏、扁桃体等的mRNA作为材料，使用同样的文库进行筛选。

[0188] 然后，使用该可变区来制备抗体表达载体。通过将抗酶抗体表达载体和抗底物抗体表达载体导入同一细胞、表达抗体，可以获得双特异性抗体。

[0189] 具有辅因子功能替代活性的抗体的选择，例如可通过下述方法进行。

[0190] (1)使用含有该酶、该底物的反应体系，以通过添加该抗体使该酶活性(底物降解能力)提高为指标进行选择。

[0191] (2)使用测定或模仿涉及该酶、该底物、该辅因子的生物学功能的体系(例如，血浆凝固测定体系)，以无该辅因子存在条件下添加该抗体引起的活性功能恢复为指标进行选择。

[0192] 可将所得抗体纯化至均一。抗体的分离、纯化可使用一般蛋白质所用的分离、纯化方法。通过适当选择、组合下述方法可以分离、纯化抗体：例如亲和层析等层析柱、过滤器、超滤、盐析、透析、SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点电泳等(Antibodies:A Laboratory Manual.Harlow和David Lane编著，Cold Spring Harbor Laboratory，1988)，但不只限定于这些。亲和层析中所用的柱可以是蛋白A柱、蛋白G柱等。

[0193] 本发明的双特异性抗体，例如在所替代的辅因子为F.VIII/F.VIIIa时，即酶和底物的组合为凝血纤溶相关因子的F.IXa和F.X时，优选具有包含抗F.IXa抗体的可变区和抗F.X抗体的可变区的结构。

[0194] 本发明的替代F.VIII/F.VIIIa功能的双特异性抗体可采用以下方法制备。将市售的F.IXa和F.X分别注射到小鼠的皮下进行免疫。从抗体效价提高的免疫小鼠脾脏分离脾细胞，使其与小鼠骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤。分别选择与抗原(F.IXa、F.X)结合的杂交瘤，使用对应可变区的引物，经RT-PCR回收L链、H链的可变区。分别将L链可变区插入含有C_L的L链表达载体中、将H链可变区插入含有H链恒定区的H链表达载体。另外，从免疫小鼠的脾脏提取mRNA，使用对应可变区的引物经RT-PCR回收L链、H链可变区的cDNA。使用所述可变区构建展示scFv的噬菌体文库。通过淘选浓缩、克隆化抗原结合抗体的克隆，使用该可变区制备抗体表达载体。通过将抗F.IXa抗体(H链、L链)的表达载体和抗F.X抗体(H链、L链)的表达载体导入同一细胞，使其表达抗体，可获得双特异性抗体。

[0195] 在含有F.IXa(F.IX活化酶)、F.IX、F.X、F.Xa的合成底物(S-222)、磷脂的测定体系中，对所得的双特异性抗体替代F.VIII/F.VIIIa(F.Xa引起的F.X活化的辅因子)的活性进行评价。原则上，作为具有替代F.VIII/F.VIIIa活性的双特异性抗体，根据其结果在本测定体系中选择显示0.1以上的F.VIIIa样活性的双特异性抗体。其中所说的F.VIIIa样活性是从抗体溶液或抗体表达培养上清液的30分钟或60分钟的吸光度变化值中减去溶剂或抗体非表达培养上清液的30分钟或60分钟的吸光度变化值所得的值。

[0196] 有关上述中选择的双特异性抗体或其类似的双特异性抗体，使用利用F.VIII缺乏人血浆的凝固时间测定体系，测定它们的凝固恢复能力。其结果与未添加抗体时相比，得到了缩短凝固时间的双特异性抗体。在此所说的凝固时间与实施例7所示的同样，使用F.VIII缺乏人血浆，测定活化部分凝血激酶时间。这些双特异性抗体中，优选双特异性抗体具有凝固时间缩短10秒以上、更优选20秒以上、进一步优选40秒以上、最优选50秒以上的能力。

[0197] 对本发明抗体的H链CDR3没有特别限定，具体来说，其具备含有后述的实施例中所记载的XB12、XT04、A19、A25、A31、A38、A39、A40、A41、A44、A50或A69的H链CDR3序列(SEQ ID NO:16、20、60、64、68、72、76、80、84、88、92或96)中任一种氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区，且具备含有SB04、SB05、SB06、SB07、SB21、SB30、SB34、SB38、SB42、B2、B5、B9、B10、B11、B12、B13、B14、B15、B16、B18、B19、B20、B21、B23、B25、B26、B27、B31、B34-1、B34-2、B35、B36、B38、B42、SB15或SB27的H链CDR3序列(分别为SEQ ID NO:24、28、32、36、40、44、48、52、56、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200或204)中任一种所记载的氨基酸序列的互补决定区或者其功能等同的互补决定区。

[0198] 本发明的上述抗体的具体例子还可优选具备下示组合的抗体：具备含有XB12、XT04、A19、A25、A31、A38、A39、A40、A41、A44、A50或A69(SEQ ID NO:14-16、18-20、58-60、62-64、66-68、70-72、74-76、78-80、82-84、86-88、90-92或94-96)的H链CDR序列中任一种氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区，和具备含有SB04、SB05、SB06、SB07、SB21、SB30、SB34、SB38、SB42、B2、B5、B9、B10、B11、B12、B13、B14、B15、B16、B18、B19、B20、B21、B23、B25、B26、B27、B31、B34-1、B34-2、B35、B36、B38、B42、SB1 5或SB27的H链CDR序列(SEQ ID NO:22-24、26-28、30-32、34-36、38-40、42-44、46-48、50-52、54-56、98-100、102-104、106-108、110-112、114-116、118-120、122-124、126-128、130-132、134-136、138-140、142-144、146-148、150-152、154-156、158-160、162-164、166-168、170-172、174-176、178-180、182-184、186-188、190-192、194-196、198-200或202-204)中任一种氨基酸序列的互补决定区或其功能等同的互补决定区的组合。

[0199] 本发明记载的XB12、XT04、A19、A25、A31、A38、A39、A40、A41、A44、A50、A69、SB04、SB05、SB06、SB07、SB21、SB30、SB34、SB38、SB42、B2、B5、B9、B10、B11、B12、B13、B14、B15、B16、B1 8、B19、B20、B21、B23、B25、B26、B27、B31、B34-1、B34-2、B35、B36、B38、B42、SB15或SB27的H链可变区的氨基酸序列，显示在SEQ ID NO:13、17、57、61、65、69、73、77、81、85、89、93、21、25、29、33、37、41、45、49、53、97、101、105、109、113、117、121、125、129、133、137、141、145、149、153、157、161、165、169、173、177、181、185、189、193、197和201中。

[0200] 本发明记载的A44、B26、XB12、SB04的L链可变区的氨基酸序列显示在SEQ ID NO:205、209、213、217中。A44、B26、XB12、SB04的L链CDR序列显示在SEQ ID NO:206-208、210-212、214-216、218-220中。XB12、SB04、A44、B26的H链CDR核苷酸序列(括号内是指由该核苷酸序列编码的氨基酸序列)显示在SEQ IDNO:221(222)、223(224)、225(226)、233(234)、235(236)、237(238)、245(246)、247(248)、249(250)、257(258)、259(260)、261(262)中。L链CDR核苷酸序列显示在SEQ ID NO:227(228)、229(230)、231(232)、239(240)、241(242)、243(244)、251(252)、253(254)、255(256)、263(264)、265(266)、267(268)中。

[0201] SEQ ID NO:58、62、66、70、74、78、82、86、90、94、98、102、106、110、114、118、122、

126、130、134、138、142、146、150、154、158、162、166、170、174、178、182、186、190、194、198、202、206、210、214、218、222、228、234、240、246、252、258、264表示CDR1。

[0202] SEQ ID NO:59、63、67、71、75、79、83、87、91、95、99、103、107、111、115、119、123、127、131、135、139、143、147、151、155、159、163、167、171、175、179、183、187、191、195、199、203、207、211、215、219、224、230、236、242、248、254、260、266表示CDR2。

[0203] SEQ ID NO:60、64、68、72、76、80、84、88、92、96、100、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、226、232、238、244、250、256、262、268表示CDR3。

[0204] 对本发明的抗体没有特别限定，但优选由抗F.IXa抗体和抗F.X抗体组合而成的双特异性抗体，所述抗体是具有与上述抗体相同或相近表位的抗体。在此所说的具有相同或相近表位的抗体是指例如在竞争性ELISA等中竞争结合的抗体等。对该竞争性ELISA的方法没有特别限定，使F.IX/IXa或F.X固定在96孔微孔板上，同时添加适当标记的该抗体和待评价抗体，利用标记检测结合的抗体。对其标记没有特别限定，包括碱性磷酸酶标记、过氧化物酶标记、生物素标记-链霉抗生物素结合酶(碱性磷酸酶、过氧化物酶等)，或者FITC等。当相对于该抗体而言待评价抗体达到100,000倍过量的浓度下，至少表现出50％竞争时，则存在表位重叠。

[0205] 当使用本发明中公开的可变区制备全长抗体时，对恒定区没有特别限定，可使用本领域中公知的恒定区，可使用例如“Sequences ofproteins of immunological interest,1991年,U.S.Department of Healthand Human Services.Public Health Service National Institutes of Health”和“An efficient route to human bispecific IgG,1998年.NatureBiotechnology vol.16,677-681”等中描述的恒定区。

[0206] 作为本发明的抗体的一种方案，该抗体具有替代辅因子功能的作用，因此本发明的抗体预期成为因该辅因子活性(功能)低下引起的疾病的有效药物。当本发明抗体所替代的辅因子为凝血纤溶相关因子时，上述疾病可以是例如出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病等。特别是已知F.VIII/F.VIIIa、F.IX/F.IXa、F.XI/F.XIa的功能低下或缺乏引起被称为血友病的出血异常症。

[0207] 血友病中，由于先天性的F.VIII/F.VIIIa功能低下或缺乏引起的出血异常症被称为血友病A。血友病A患者出血时，施行F.VIII制剂的补充疗法。另外，剧烈运动或远足的当天，当发生频繁关节内出血时或者当被分类为重症血友病时，可施行F.VIII制剂的预防给药(参照非专利文献1和2)。该F.VIII制剂的预防给药使血友病A患者的出血发作明显减少，因此近几年正广泛普及。出血发作减少不仅降低了致死性和非致死性出血的危险以及由此带来的痛苦，而且防止因频繁关节内出血引起的血友病性关节病。其结果，对血友病

[0208] A患者的QOL提高起重要作用。

[0209] F.VIII制剂在血中半衰期短，为约12-16小时左右。因此，为了连续的预防，需要每周3次左右给予F.VIII制剂。这相当于维持F.VIII活性的大约1％以上(参照非专利文献3和4)的剂量。并且，在出血时的补充疗法中，除轻度出血的情形外，为了防止再出血，进行完全的止血，需要在一定期间、定期追加给予F.VIII制剂。

[0210] F.VIII制剂为静脉内给药。在进行静脉内给药中，存在着技术上的困难。特别对年龄较小的患者给药时，由于给药所用的静脉细更增加了难度。

[0211] 就上述F.VIII制剂的预防给药或出血时紧急给药而言，多数情况下，采用家庭疗法、自身注射。频繁给药的必要性和给药时的技术难度，不仅在给药时使患者承受痛苦，而且成为防碍家庭疗法、自身注射普及的主要原因。

[0212] 因此，与现有的凝血因子VIII制剂相比，强烈需求给药间隔时间长的药剂或者给药方法简单的药剂。

[0213] 此外，血友病A患者、特别是重症血友病A患者，可能产生被称为抑制物的抗F.VIII抗体。若产生抑制物，则抑制物防碍了F.VIII制剂的效果。其结果，使患者的止血管理变得非常困难。

[0214] 所述血友病A抑制物患者出血时，通常实施使用大量F.VIII制剂的中和疗法或者使用复合制剂(复合浓缩物)或F.VIIIa制剂的旁路疗法。但是，在中和疗法中，给予大量的F.VIII制剂反而可能提高抑制物(抗F.VIII抗体)的效价。在旁路疗法中，存在着复合制剂或F.VIIIa制剂在血中半衰期短(约2-8小时)的问题。而且，它们的作用机理并不依赖于F.VIII/F.VIIIa的功能，即通过F.IXa催化F.X活化的功能，因此有时使止血机构不能有效地发挥功能，甚至变成不应答。因此，血友病A抑制物患者与非抑制物血友病A患者相比，在多数情况下不能获得充分的止血效果。

[0215] 所以，强烈需求不受抑制物存在的影响，而且替代F.VIII/F.VIIIa功能的药剂。

[0216] 可是，作为与F.VIII/F.VIIIa相关的出血异常症，除了血友病、具有抗F.VIII自身抗体的获得性血友病外，还已知因vWF功能紊乱或缺乏而引起的维勒布兰德氏病。vWF不仅是使血小板正常附着在血管壁损伤部位的内皮下组织上所必需，而且也是与F.VIII形成复合物、保持正常血浆中F.VIII的水平所必需。维勒布兰德氏病患者中，因上述功能降低而导致止血功能紊乱。

[0217] 基于以上所述，考虑利用抗体的方法开发具备下述特征的医药品：(i)给药间隔长，(ii)给药简单，(iii)不受抑制物存在的影响，(iv)以不依赖F.VIII/F.VIIIa的方式替代F.VIII/F.VIIIa的功能。通常，抗体在血中的半衰期比较长，为从数天至数周。而且，已知抗体通常经皮下给药给药后可移行至血中。即，一般的抗体医药品已满足上述的(i)和(ii)。

[0218] 本发明中，提供含有本发明的抗体作为有效成分的医药组合物。例如，当本发明的抗体是识别F.IX或F.IXa和F.X两者的抗体之中替代F.VIIIa功能的抗体时，该抗体预期成为用于出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病的预防或治疗医药品(医药组合物)或药剂。而且，当所述抗体为识别F.X或F.Xa和凝血酶原两者的抗体之中替代F.Va功能的抗体时，该抗体预期成为用于出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病的预防或治疗医药品(医药组合物)或药剂。

[0219] 另一方面，与ZPI和F.X结合而替代PZ功能的抗体预期成为具有抗血栓作用的医药品(医药组合物)或药剂，与凝血酶和TAFI结合而替代TM功能的抗体预期成为具有促进止血作用的医药品(医药组合物)或药剂，与凝血酶和PC结合而替代PS/TM系统功能的抗体预期成为具有调节凝固作用的医药品(医药组合物)或药剂。

[0220] 另外，因为补体C4的缺乏引起系统性红斑狼疮(SLE)，所以替代C4b作用的抗体预期成为具有抑制SLE发病作用的医药品(医药组合物)或药剂。因为H因子的缺乏引起化脓性感染症、自身免疫性肾小球性肾炎，所以替代H因子作用的抗体预期成为具有抑制这些疾病

发病作用的医药品(医药组合物)或药剂。

[0221] 为治疗或预防目的所用的含有本发明的抗体作为有效成分的医药组合物,根据需要,可与相对于所含抗体惰性的适当的药学上可接受的载体、介质等混合制成制剂。例如无菌水或生理盐水、稳定剂、赋形剂、抗氧化剂(抗坏血酸等)、缓冲剂(磷酸、枸橼酸、其它的有机酸等)、防腐剂、表面活性剂(PEG、Tween等)、螯合剂(EDTA等)、粘合剂等。而且,也可含有其它低分子量的多肽;血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白质;甘氨酸、谷酰胺、天冬酰胺、精氨酸和赖氨酸等氨基酸;多糖和单糖等糖类或碳水化物;甘露糖醇或山梨糖醇等糖醇。当制备用于注射的水溶液时,例如生理盐水、含有葡萄糖或其它的辅助药物的等渗溶液,如D-山梨糖醇、D-甘露糖、D-甘露糖醇、氯化钠,可并用适当的增溶剂例如醇(乙醇等)、多元醇(丙二醇,PEG等)、非离子表面活性剂(吐温80,HCO-50)等。

[0222] 根据需要可将本发明的抗体封入微胶囊(羟甲基纤维素、明胶、聚甲基丙烯酸甲酯等微胶囊),或者可包含在胶体递药系统(脂质体、白蛋白微球体、微乳、纳米粒和纳米囊等)(参照"Remington′sPharmaceutical Science 16th edition",Oslo编著(1980)等)。而且,将药剂制成缓释药剂的方法也为公知,可应用于本发明的抗体(Langer等,J.Biomed.Mater.Res.15:267-277(1981);Langer,Chemtech.12:98-105(1982);美国专利第3,773,919号;欧洲专利申请公开(EP)第58,481号;Sidman等,Biopolymers 22:547-556(1983);EP第133,988号)。

[0223] 本发明的抗体或医药组合物可与凝血因子VIII联用。本发明的抗体或医药组合物可与凝血因子VIII同时给药,或者将时间错开给药。还可将本发明的抗体或医药组合物与凝血因子VIII组成药盒来实施给药。而且,当将本发明的抗体或医药组合物与凝血因子VIII联用时,与单独使用任一种时相比,根据所需也可能减少各自的给药量。

[0224] 本发明的医药组合物的给药量,应考虑剂型的种类、给药方法、患者的年龄和体重、患者的症状、疾病的种类或进展的程度等,最后根据医生的判断而适当决定,通常成人给药量为0.1-2000mg/日、可分一至数次给药。更优选为1-1000mg/日,进一步优选为50-500mg/日,最优选为100-300mg/日。所述给药量可依患者的体重和年龄、给药方法等而变动,但本领域的技术人员可适宜选择适当的给药量。优选给药期间也根据患者的治愈经过等适宜决定。

[0225] 也可将编码本发明抗体的基因插入到用于基因治疗的载体上,进行基因治疗。作为给药方法,除了经裸质体直接给药外,还可通过将基因包装到脂质体等中,或将基因插入逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘苗病毒载体、痘病毒载体、腺相关病毒载体、HVJ载体等各种病毒载体上(参照Adolph"病毒基因组法",CRC Press,Florid(1996)),或将基因包覆在胶体金粒子等颗粒载体上(WO93/17706等)进行给药。但是,基因可通过任一方法给药,只要抗体能在机体内表达且能发挥其作用即可。优选经由适当的胃肠外途径(如经静脉内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪组织内、乳腺组织内、吸入或肌内途径注射、输注、或气体诱导性粒子轰击法(通过电子枪等)、使用滴鼻药等经粘膜途径的方法等),给予足够的剂量。利用离体脂质体转染、粒子轰击法(美国专利第4,945,050号)或病毒感染通过将基因导入血液细胞和来自骨髓的细胞等,再将该细胞回输给动物,也可给予编码本发明抗体的基因。在基因治疗中,可使用编码本发明抗体的任意基因,例如,含有上述的XB12、SB04、A44、B26的CDR核苷酸序列的基因。

[0226] 本发明还提供出血、伴随出血的疾病或因出血引起的疾病的预防和/或治疗方法，包括给予本发明的抗体或组合物的步骤。抗体或组合物的给药例如可通过上述的方法实施。

[0227] 本发明还涉及使用本发明的抗体来制备本发明的(医药)组合物。

[0228] 本发明进一步提供至少包含本发明的抗体或组合物、用于上述方法的药盒。该药盒内也可装有其它的如注射器、注射针、药学上可接受的介质、酒精棉、绊创膏或记载使用方法的说明书等。

[0229] 本说明书中所引用的全部现有技术文献作为参照引入本说明书中。

[0230] 实施例

[0231] 下面，通过实施例具体说明本发明，但本发明不受这些实施例的限制。

[0232] [实施例1]制备针对因子IXa(F.IXa)的非中和抗体

[0233] 1-1.免疫和杂交瘤的制备

[0234] 用人F.IXaβ(Enzyme Research Laboratories,Inc.)按以下方法免疫8只BALB/c小鼠(雄性，免疫开始时6周龄，日本チャールス・リバ-)和5只MRL/lpr小鼠(雄性，免疫开始时6周龄，日本チャールス・リバ-)。作为初次免疫，按40μg/只皮下给予用FCA(弗氏完全佐剂H37Ra(Difco laboratories))乳化的F.IXaβ。2周后将用FIA(弗氏不完全佐剂(Difco laboratories))乳化的F.IXaβ按40μg/只皮下给药。以后每隔1周进行1次追加免疫共3-7次。用1-2中所示的ELISA(酶联免疫吸附测定)确认针对F.IXaβ的血清抗体效价提高后，用PBS(-)(不含钙离子、镁离子的磷酸缓冲盐溶液)稀释的F.IXaβ按40μg/只静脉给药，作为最终免疫。最终免疫的3天后，摘出小鼠的脾脏，其一部分用于实施例10-2，将剩余的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞P3X63Ag8U.1(称为P3U1，ATCC CRL-1597)使用PEG1500(RocheDiagnosticks)按常规方法进行细胞融合。将用含有10％FBS(Invitrogen)的RPMI1640培养液(Invitrogen)(下面称为10％FBS/RPMI1640)悬浮的融合细胞接种于96孔培养平板上，融合1、2、3、5天后，通过将上述培养液替换为HAT选择培养液(10％FBS/RPMI1640/2％HAT50x浓缩液(大日本制药)/5％BM-Condimed H1(Roche Diagnosticks)进行杂交瘤的选择培养。利用融合后第8天或第9天所收集的培养上清液，通过1-2所示的ELISA测定对F.IXa的结合活性，由此选择出具有F.IXa结合活性的杂交瘤。随后利用1-3所示的方法测定对F.IXa酶活性的中和活性，选择对F.IXa不具有中和活性的杂交瘤。通过在96孔培养平板上每孔接种一个细胞进行2次有限稀释，克隆杂交瘤。对通过显微镜观察确认的单集落细胞进行1-2、1-3所示的ELISA和中和活性测定，对克隆进行选择。通过1-4所示的方法制备含有克隆化抗体的腹水，且从腹水中纯化抗体。利用1-5所示的方法确认了纯化抗体不能延长APTT(活化部分凝血活酶时间)。

[0235] 1-2.F.IXa的ELISA

[0236] 将用包被缓冲液(100mM碳酸氢钠，pH 9.6，0.02％叠氮化钠)稀释为1μg/mL的F.IXaβ以100μL/孔分注在Nunc-Immuno平板(Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ plates MaxiSorp™(Nalge Nunc International))上，然后在4℃下温育一夜。用含有Tween®20的PBS(-)洗涤3次后，在室温下用稀释缓冲液(50mM Tris-盐酸，pH 8.1，1％牛血清白蛋白，1mM $MgCl_2$，0.15M NaCl，0.05％Tween®20，0.02％叠氮化钠)封闭平板2小时。除去缓冲液后，向平板中添加用稀释缓冲液稀释的小鼠抗血清或杂交瘤的培养上清液(100μL/孔)，室

温下温育1小时。洗涤平板3次，然后添加用稀释缓冲液1/2000稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)(Zymed Laboratories)(100μL/孔)，室温下温育1小时。洗涤平板6次后，添加生色底物磷酸底物(Blue-Phos™Phosphate Substrate)(Kirkegaad & Perry Laboratories)(100μL/孔)，室温下温育20分钟。添加Blue-Phos™终止溶液(Kirkegaad & PerryLaboratories)(100μL/孔)后，利用Microplate Reader Model 3550(3550型小平板读板仪)(Bio-Rad Laboratories)测定了595nm下的吸光度。

[0237] 1-3.F.IXa中和活性的测定

[0238] 通过将磷脂(Sigma-Aldrich)用注射用蒸馏水溶解，实施超声处理制备400μg/mL的磷脂溶液。将含有0.1％牛血清白蛋白的Tris缓冲生理盐水溶液(下面，称为TBSB)(40μL)、30ng/mL F.IXa(EnzymeResearch Laboratories,Enzyme Research Laboratories)(10μL)、400μg/mL磷脂溶液(5μL)、含有100mM $CaCl_2$和20mM $MgCl_2$的TBSB(5μL)和杂交瘤培养上清液(10μL)在96孔板中混合，室温下温育1小时。向该混合溶液中加入50μg/mL F.X(Enzyme Research Laboratories)(20μL)和3U/mL F.VIIIa(American diagnostica)(10μL)，室温下反应30分钟。通过向其中添加10μL的0.5M EDTA使反应终止。向该反应溶液中添加50μL的S-2222溶液(Chromogenix)，室温下温育30分钟后，通过Microplate Reader Model 3550(Bio-Rad Laboratories,Inc.)测定了测定波长为405nm、对照波长为655nm的吸光度。

[0239] 1-4.腹水的制备和抗体的纯化

[0240] 已建立杂交瘤的腹水制备按照常规方法进行。即，将体外培养的杂交瘤(2×10^6)移植到预先腹腔内给予2次降植烷(2,6,10,14-四甲基十五烷；和光纯药工业)的BALB/c小鼠(雄性，实验开始时5-7周龄，日本チャールス・リバ-)或BALB/c裸鼠(雌性，实验开始时5-6周龄，日本チャールス・リバ-和日本クレァ)的腹腔内。移植后1-4周从腹部肥大的小鼠中回收了腹水。

[0241] 使用Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow柱(Amersham Biosciences)从腹水中纯化抗体。将经结合缓冲液(20mM乙酸钠，pH 5.0)2倍稀释的腹水上柱，用10倍柱容量的结合缓冲液洗涤。以5倍柱容量的洗脱缓冲液(0.1M甘氨酸-HCl，pH 2.5)洗脱抗体，用中和缓冲液(1MTris-盐酸，pH 9.0)进行中和。将得到中和溶液经Centriprep™ 10(Millipore)进行浓缩，溶剂替换为TBS(50mM Tris-buffered saline)。抗体浓度根据280nm的吸光度以A(1％，1cm)＝13.5来计算。用DU-650(Beckman Coulter)测定吸光度。

[0242] 1-5.APTT(活化部分凝血活酶时间)的测定

[0243] 使用CR-A(Amelung)连接的KC10A(Amelung)测定APTT。将用TBSB稀释的抗体溶液(50μL)、标准人血浆(Dade Behring)(50μL)和APTT试剂(Dade Behring)(50μL)的混合液在37℃下加温3分钟。通过向该混合液中加入20mM $CaCl_2$(Dade Behring)(50μL)使凝固反应开始，测定凝固时间。

[0244] [实施例2]因子X(F.X)的非中和抗体的制备

[0245] 2-1.免疫和杂交瘤的制备

[0246] 用人F.X(Enzyme Research Laboratories)按以下方法免疫8只BALB/c小鼠(雄性，免疫开始时6周龄，日本チャールス・リバ-)和5只MRL/lpr小鼠(雄性，免疫开始时6周龄，日本チャールス・リバ-)。作为初次免疫，用FCA乳化的F.X按40μg/只皮下给药。2周后，用FIA乳化的F.X按20或40μg/只，皮下给予皮下给药。以后每隔一周进行一次追加免疫合计3-6

次。用2-2所示的ELISA确认针对F.X的血清抗体效价提高后，静脉内给予20或40μg/只的用PBS(-)稀释的F.X作为最终免疫。最终免疫的3天后，摘出小鼠的脾脏，其一部分用于实施例10-2，使用PEG1500按常规方法将剩余的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞P3U1进行细胞融合。将用含有10％FBS/RPMI1640培养液悬浮的融合细胞接种于96孔培养平板上，融合1、2、3、5天后，通过将上述培养液替换为HAT选择培养液，进行杂交瘤的选择培养。利用融合后第8天收集的培养上清液，通过2-2所示的ELISA测定对F.X的结合活性。选择具有F.X结合活性的杂交瘤。利用2-3所示的方法测定对F.Xa酶活性的中和活性，将对F.Xa不具有中和活性的杂交瘤通过2次有限稀释进行克隆。通过1-4所示的方法制备含有克隆化抗体的腹水，从腹水中纯化抗体。利用2-5所示的方法确认了纯化抗体不能延长APTT。

[0247] 2-2.F.X的ELISA

[0248] 将用包被缓冲液稀释为1μg/mL的F.X以100μL/孔分注在Nunc-Immuno平板上，然后在4℃下保温一夜。用含有Tween(R)20的PBS(-)洗涤3次后，在室温下用稀释缓冲液封闭平板2小时。除去缓冲液后，向平板中添加用稀释缓冲液稀释的小鼠抗血清或杂交瘤的培养上清液，室温下温育1小时。洗涤平板3次，然后添加用稀释缓冲液1/2000稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)，室温下温育1小时。洗涤平板6次后，添加生色底物Blue-Phos™ PhosphateSubstrate(Kirkegaad & Perry Laboratories)(100μL/孔)，室温下温育20分钟。添加Blue-Phos™终止溶液(Kirkegaad & Perry Laboratories)(100μL/孔)后，利用Microplate Reader Model 3550(Bio-RadLaboratories)测定了595nm的吸光度。

[0249] 2-3.F.Xa中和活性测定

[0250] 将10μL用TBSB 1/5稀释的杂交瘤培养上清液与40μL含有250pg/mL F.Xa(Enzyme Research Laboratories)的TBCP(含有2.78mM$CaCl_2$和22.2μM磷脂质(磷脂酰胆碱:磷脂酰丝氨酸＝75:25，Sigma-Aldrich)的TBSB)混合，室温下温育1小时。向该混合溶液中添加50μL含有20μg/mL凝血酶(Enzyme Research Laboratories)和100ng/mL活化凝血因子V(因子Va(Haematologic Technologies))的TBCP，室温下反应10分钟。通过向其中添加0.5M EDTA(10μL)使反应终止。再向该反应溶液中添加1mM S-2238溶液(Chromogenix)(50μL)，室温下温育30分钟后，使用Microplate Reader Model 3550(Bio-RadLaboratories，Inc.)测定405nm下的吸光度。

[0251] [实施例3]嵌合双特异性抗体表达载体的构建

[0252] 3-1.从杂交瘤制备编码抗体可变区的DNA片段

[0253] 使用QIAGEN(R)RNeasy(R)Mini Kit(QIAGEN)按说明书描述的方法中，从产生抗F.IXa抗体或抗F.X抗体的杂交瘤提取总RNA。将总RNA溶解在40μL无菌水中。以纯化的1-2μg RNA为模板，使用SuperScript cDNA合成体系(Invitrogen)，按说明书描述的方法通过RT-PCR法合成单链cDNA。

[0254] 3-2.通过PCR扩增抗体H链可变区和序列分析

[0255] 作为用于扩增小鼠抗体H链可变区(VH)cDNA的引物，准备了Krebber等报告(J.Immunol.Methods 1997;201:35-55)中描述的HB引物混合物和HF引物混合物。分别使用0.5μL的100μM HB引物混合物和100μM HF引物混合物，制备了25μL反应液(3-1中制备的2.5μLcDNA溶液、KOD plus缓冲液(东洋纺织)、0.2mM dNTPs、1.5mM$MgCl_2$、0.75单位DNA聚合酶KOD plus(东洋纺织))。PCR使用热循环仪GeneAmp PCR系统9700(Parkin Elmer)，根据cDNA

片段扩增的效率在下述任一条件下进行:条件A(98℃加热3分钟后;以98℃20秒、58℃ 20秒和72℃ 30秒的反应为一循环重复30个循环)和条件B(98℃加热3分钟后;以94℃ 20秒、46℃ 20秒和68℃ 30秒的反应为一循环重复5个循环;再以94℃ 20秒、58℃ 20秒和72℃ 30秒的反应为一循环重复30个循环)。PCR后,将反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳。使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAquick Gel ExtractionKit)(QIAGEN),按说明书描述的方法纯化目的大小(约400bp)的扩增片段,用30μL无菌水洗脱。使用BigDye终止循环测序试剂盒(BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit)(Applied Biosystems),利用DNA序列分析仪ABI PRISM 3100 Genetic Ahalyzer(ABI PRISM 3100基因分析仪)(Applied Biosystems),按照所附说明书描述的方法,测定各DNA片段的核苷酸序列。将用本方法测定的序列群经分析软件GENETYX-SV/RC Version 6.1(Genetyx)进行比较分析,选择具有不同序列的DNA。

[0256] 3-3.用于克隆的抗体可变区DNA片段的制备

[0257] 为了使克隆用限制酶Sfi I切割位点附加到抗体可变区扩增片段的两端,进行以下的操作。

[0258] 为了扩增附加Sfi I切割位点的VH片段(Sfi I-VH),制备了将引物HB的(Gly4Ser)2-连接序列替换为含有Sfi I切割位点所示序列(SEQID NO:5)的引物(引物VH-5'end)。使用各0.5μL的10μM序列特异的引物VH-5'end和10μM引物scfor(J.Immunol.Methods 1997;201:35-55),制备20μL反应液(3-2中制备的1μL纯化VH cDNA扩增片段溶液、KOD plus缓冲液(东洋纺织)、0.2mM dNTPs、1.5mM $MgCl_2$、0.5单位DNA聚合酶KOD plus(东洋纺织))。使用热循环仪GeneAmpPCR系统9700(Parkin Elmer),根据片段扩增的效率在下述任一条件下进行PCR:条件A(98℃加热3分钟后,以98℃ 20秒、58℃ 20秒和72℃ 30秒的反应为一个循环重复32个循环)或条件B (94℃加热3分钟后;以94℃ 20秒、46℃ 20秒和68℃ 30秒的反应为一个循环重复5个循环;再以94℃ 20秒、58℃ 20秒和72℃ 30秒的反应为一个循环重复30个循环)。PCR后,将反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳。用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN),按所附说明书描述的方法,纯化目的大小(约400bp)的扩增片段,且用30μL无菌水洗脱。

[0259] 为了扩增小鼠抗体L链可变区(VL)cDNA片段,首先使用Krebber等的报告(J.Immunol.Methods 1997;201:35-55)中描述的各0.5μL的100μM LB引物混合物和100μM LF引物混合物,制备25μL反应液(3-1中制备的2.5μL cDNA溶液、KOD plus缓冲液(东洋纺织)、0.2mMdNTPs、1.5mM $MgCl_2$、0.75单位DNA聚合酶KOD plus(东洋纺织))。使用热循环仪GeneAmp PCR系统9700(Parkin Elmer),根据片段的扩增效率按下述条件进行PCR:94℃加热3分钟后;以94℃ 20秒、46℃ 20秒和68℃ 30秒的反应为一个循环重复5个循环;再以94℃ 20秒、58℃ 20秒和72℃ 30秒的反应为一个循环重复30个循环。PCR后,将反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳。用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN),按所附说明书描述的方法,纯化目的大小(约400bp)的扩增片段,且用30μL无菌水洗脱。该片段的C末端附加有来自引物LF(Gly4Ser)3-连接序列。为了使Sfi I切割位点附加到该片段的C末端,制备了引物LF的(Gly4Ser)3-连接序列替换为含有Sfi I切割位点的所示序列(SEQ ID NO:6)的引物(引物VL-3'end)。为了扩增附加Sfi I切割位点的VL片段(sfi I-VL),使用各0.5μL的10μM VL-3'end引物混合物和10μMscback引物,制备20μL反应液(1μL纯化VLcDNA扩增片段溶液、KOD

plus缓冲液(东洋纺织)、0.2mM dNTPs、1.5mM $MgCl_2$、0.5单位DNA聚合酶KOD plus(东洋纺织))。使用热循环仪GeneAmp PCR系统9700(Parkin Elmer),按下述条件进行PCR:94℃加热3分钟后;以94℃ 20秒、46℃ 20秒和68℃ 30秒的反应为一个循环重复5个循环;再以94℃ 20秒、58℃ 20秒和72℃30秒的反应为一个循环重复30个循环。PCR后,将反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳。使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN),按所附说明书描述的方法,纯化目的大小(约400bp)的扩增片段,且用30μL无菌水洗脱。

[0260] 将纯化Sfi I-VH和Sfi I-VL片段用Sfi I(タカラバイオ)按所附说明书描述的方法制成反应液,在50℃下进行一夜消化。随后,将反应液使用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)按所附说明书描述的方法进行纯化,且用该试剂盒内包含的30μL缓冲液EB洗脱。

[0261] 3-4.用于双特异性IgG抗体表达的质粒

[0262] 当生产目的双特异性抗体时,为了形成各H链的异源分子(heteromolecule)参考IgG1的knobs-into-holes技术(Ridgway等,ProteinEng.1996;9:617-621)制备了被IgG4的CH3部分取代的氨基酸取代物。a型(IgG4γa)是Y349C和T366W取代物,型b(IgG4γb)是E356C、T366S、L368A、Y407V取代物。而且,这两种取代物的铰链区也导入了取代(-ppcpScp-->-ppcpPcp-)。通过本技术,几乎所有的H链都变成异源分子,但对L链没有此限定,不必要的抗体分子的形成可能影响后来的活性测定。因此,在本方案中为了使具有不同特异性的抗体分子片臂(称为HL分子)分别表达、从而在细胞内有效地形成目的型双特异性IgG抗体,使用以不同药物诱导的载体作为对应各HL分子的表达载体。

[0263] 作为抗体分子臂(为了方便称为右臂HL分子)的表达载体,分别将H链或L链的该区插入到四环素诱导型载体pcDNA4(Invitrogen)上(图1或图2),即在动物细胞用信号序列(IL3ss)(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.1984;81:1075)的下游插入适当的小鼠抗体可变区(VH或VL)和人IgGγa恒定区(SEQ ID NO:7)或κ恒定区(SEQ ID NO:8),制备pcDNA4-g4H或pcDNA4-g4L。首先,使用在pcDNA4的多克隆位点上存在其限制酶切割位点的Eeo RV和Not I(Takara Bio)消化pcDNA4。适当的抗体可变区的嵌合双特异性抗体右臂H链或L链表达单位(分别约1.6kb或约1.0kb)用Xho I(Takara Bio)消化后,使用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)按所附说明书描述的方法进行纯化,使用DNA聚合酶KOD(东洋纺织)按所附说明书描述的反应液组成在72℃反应10分钟,将末端平端化。该平端片段使用QIAquickPCR纯化试剂盒(QIAGEN)按所附说明书描述的方法进行纯化,且用Not I(Takara Bio)进行消化。该Not I-平端片段(分别约1.6kb或1.0kb)和用Eco RV-Not I消化的pcDNA4使用Ligation High(东洋纺织)按所附说明书描述的方法进行连接反应。利用该反应液转化大肠杆菌DH5α株(高感受态DH5α,Competent high DH5α(东洋纺织))。使用QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN),从获得的氨苄青霉素抗性克隆中分离各种质粒。

[0264] 另一侧臂(为了方便简称为左臂HL分子),根据上述方法制备pIND-g4H或pIND-g4L(图2或图3),其中分别将H链或L链各自的该区插入到蜕皮激素类似物诱导型载体pIND(Invitrogen)上,即在动物细胞用信号序列(IL3ss)(EMBO.J.1987;6:2939)的下游,插入适当的小鼠抗体可变区(VH或VL)和人IgG4γb恒定区(SEQ ID NO:9)或κ恒定区(SEQ ID NO:8);分离各质粒DNA。

[0265] 3-5.双特异性抗体表达载体的构建

[0266] 将3-4中制备的四环素诱导型表达质粒(pcDNA4-g4H或pcDNA4-g4L)用Sfi I消化,

然后将所得反应液进行1％琼脂糖凝胶电泳。除去了原有的抗体可变区部分(VH或VL(参照图1或图2))的片段(约5kb)使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)按所附说明书描述的方法进行纯化，用30μL无菌水洗脱。将该片段与分别对应的3-3中制备的经Sfi I消化抗F.IXa抗体得到的Sfi I-VH或Sfi-VL片段，使用Quick连接试剂盒(Quick Ligation Kit)(New England Biolabs)按所附说明书描述的方法进行连接反应。用该反应液转化大肠杆菌DH5α株(Competent high DH5α(东洋纺织))。从3-4中制备的经Sfi I消化的蜕皮激素类似物诱导型表达质粒(pIND-g4H或pIND-4GL)中，采用与上述同样的方法除去抗体可变区部分(VH或VL(参照图2或图3))，将所得片段与分别对应的3-3中制备的经Sfi I消化抗F.X抗体而得到的Sfi I-VH或Sfi I-VL片段通过同样的方法进行插入。

[0267] 将所得的各氨苄青霉素抗性转化体，使用夹入插入片段这样的引物通过菌落PCR法确认目的片段的插入。首先，为了得到抗F.IXa抗体嵌合H链或L链表达载体，合成了退火至存在于插入位点上游的CMV正向起始位点(Forward priming site)的21聚体引物CMVF(SEQ ID NO:10)和退火至存在于插入位点下游的BGH反向起始位点的18聚体引物BGHR(SEQ ID NO:11)(Sigma Genosys)。为了得到抗F.X抗体嵌合H链或L链表达载体，合成了退火至插入位点上游的24聚体引物EcdF(SEQ ID NO:12)和退火至存在于插入位点下游的BGH反向起始位点的18聚体引物BGHR(SEQ ID NO:11)(SigmaGenosys)。为了进行菌落PCR，制备了20μL反应物(10μM引物各0.2μL、KOD dash buffer(东洋纺织)、0.2mM dNTPs和0.75单位DNA聚合酶KOD dash(东洋纺织))。向该反应液中加入适量转化株细胞进行PCR。使用热循环仪GeneAmp PCR系统9700(Parkin Elmer)按以下条件进行PCR：96℃加热1分钟后，以96℃ 10秒、55℃ 10秒和72℃ 30秒的反应为一个循环重复30个循环。PCR后，将反应液进行1％琼脂糖凝胶电泳，选择可从中获得目的大小扩增片段的克隆。该PCR产物使用ExoSAP-IT(Amersham Biosciences)按照所附说明书的方法进行处理，从而对过剩的引物和dNTPs进行失活。使用BigDye终止循环测序试剂盒(Applied Biosystems)，利用DNA序列分析仪ABIPRISM 3100基因分析仪(Applied Biosystems)，按照所附说明书描述的方法测定各DNA片段的核苷酸序列。将通过本方法测定的序列群经分析软件GENETYX-SV/RC Version 6.1(Genetyx)进行分析，对于VH，选择没有插入缺失突变等的目的克隆，而对于VL，选择与杂交瘤中使用的来自P3U1伪VL基因不同的没有插入缺失突变等的目的克隆。

[0268] 使用QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)，从该目的克隆中分离各种质粒DNA，然后溶解于100μL无菌水中。将抗F.IXa抗体嵌合H链表达载体、抗F.IXa抗体嵌合L链表达载体、抗F.X抗体嵌合H链表达载体和抗F.X抗体嵌合L链表达载体分别命名为pcDNA4-g4IxaHn、pcDNA4-g4IxaLn、pIND-g4XHn和pIND-g4XLn。在4℃下保存各质粒溶液直到使用为止。

[0269] [实施例4]嵌合双特异性抗体在动物细胞中的表达

[0270] 4-1.DNA溶液的制备

[0271] 通过四环素诱导抗体右臂HL分子表达用载体(pcDNA4-g4IXaHn和pcDNA4-g4IXaLn)的表达。在不存在四环素的情况下，需要编码Tet阻遏物的质粒pcDNA6/TR(Invitrogen)以便完全抑制它们的表达。而抗体左臂HL分子表达用载体(pIND-g4XHn和pIND-g4XLn)的表达，则通过作为昆虫激素的蜕皮激素类似物(松甾酮A)诱导。此时，需要与松甾酮A反应且诱导表达编码蜕皮激素受体和类视黄醇X受体的质粒pVgRXR(Invitrogen)。

因此，制备了合计6种质粒DNA混合液，以转染动物细胞。对1mL细胞培养液，使用各218.8ng的pcDNA4-g4IxaHn、pcDNA4-g4IXaLn、pIND-g4XHn和pIND-g4XLn，各1312.5ng的pcDNA6/TR和pVgRXR。

[0272] 4-2.动物细胞的转染

[0273] 将来自人胎肾癌细胞的HEK293H株(Invitrogen)悬浮于含有10％FCS(MOREGATE)的DMEM培养液(Invitrogen)中，以5×10^5个/mL的细胞密度接种于粘附细胞用12孔板(CORNING)的各孔中，每孔各1mL、在CO_2培养箱(37℃，5％CO_2)内进行培养。将4-1中制备的质粒DNA混合物加到7μL转染试剂Lipofectaine 2000(Invitrogen)和250μL Opti-MEM I培养液(Invitrogen)的混合液中，室温下静置20分钟，将所得混合液加到各孔的细胞，在CO_2培养箱(37℃，5％CO_2)内培养4-5小时。

[0274] 4-3.双特异性IgG抗体表达的诱导

[0275] 从上述转染的细胞培养物中吸除培养液，然后加入1mL含有1μg/mL四环素(和光纯药工业)的CHO-S-SFM-II(Invitrogen)培养液，且在CO_2培养箱(37℃，5％CO_2)内培养1天，进行抗体右臂HL分子的初次表达诱导。随后，吸除培养液，用1mL CHO-S-SFM-II培养液洗涤后，加入1mL含有5μM松甾酮A(Invitrogen)的CHO-S-SFM-II培养液，且在CO_2培养箱(37℃，5％CO_2)内培养2-3天，进行抗体左臂HL分子的二次表达诱导，使双特异性IgG抗体分泌至培养液中。回收培养上清液，然后通过离心(约2000g、5分钟、室温)除去细胞，根据需要用Microcon(R)YM-50(Millipore)进行浓缩。在4℃下保存该样品直到使用为止。

[0276] [实施例5]人IgG浓度的定量

[0277] 用包被缓冲液将亲和纯化的山羊抗人IgG Fc抗体(Cappel)调整为1μg/mL，且使其固定在Nunc-Immuno平板上。用稀释缓冲液(D.B.)进行封闭处理后，添加使用D.B.适当稀释的培养上清液样品。此外，作为计算抗体浓度用的标准，同样添加从1000ng/mL开始用D.B.以2倍稀释系列直到11级稀释的人IgG4(人源化抗TF抗体，参照WO99/51743)。洗涤3次后，使其与山羊抗人IgG碱性磷酸酶(BiosourceInternational)反应。洗涤5次后，用Sigma 104(R)磷酸酶底物(Sigma-Aldrich)作为底物使平板显色，通过吸光度读板仪Model 3550(Bio-RadLaboratories)以655nm为参比波长，测定405nm下的吸光度。使用Microplate Manager III(Bio-Rad Laboratories)软件，从标准曲线算出培养上清液中的人IgG浓度。

[0278] [实施例6]F.VIIIa(活化凝血因子VIII)样活性测定

[0279] 通过以下酶测定评价双特异性抗体的F.VIIIa样活性。以下的反应均在室温下进行。将40μLF.IX(3.75μg/mL;Enzyme ResearchLaboratories)和10μL抗体溶液的混合液在96孔板中温育1小时。在向该混合液中添加10μL F.XIa(10ng/mL;Enzyme ResearchLaboratories)、20μL F.X(50μg/mL;Enzyme Research Laboratories)、5μL磷脂(400μg/mL;参照实施例1-3)和15μL含有5mM $CaCl_2$和1mMMgCl_2的TBSB(以下称为TBSB-S)，使酶反应开始。反应进行30分钟后，通过加入10μL0.5 M EDTA使反应终止。

[0280] 将50μL生色底物溶液加入到每个孔内后，通过Model 3550Microplate Reader(Bio Rad Laboratories)测定0、30分钟的405nm下(参照波长为655nm)的吸光度。F.VIIIa样活性以从添加抗体时30分钟的吸光度变化值减去未添加抗体时30分钟的吸光度变化值所得的值来表示(参照图4和图5)。

[0281] TBSB作为磷脂的溶剂，而TBSB-S作为F.XIa、F.IX和F.X的溶剂。生色底物溶液是按

照所附说明书的方法溶解的テストチ-ム(Tesutochimu)生色底物S-2222(Chromogenix)与Polybrene溶液(0.6mg/L溴化己二甲胺(Sigma))的1:1混合液。

[0282] 而且,对活性最高的XB12/SB04,还测定了其F.VIIIa样活性的浓度依赖性(图6)。

[0283] [实施例7]血液凝固分析

[0284] 为了阐明双特异性抗体是否纠正血友病A血液的凝固能力,使用F.VIII缺乏血浆,研究双特异性抗体对活化部分凝血活酶时间(APTT)的影响。将50μL各种浓度的抗体溶液、50μL F.VIII缺乏血浆(Biomerieux)和50μL APTT试剂(Dade Behring)的混合液在37℃加温3分钟。通过向上述混合液中加入50μL 20mM的$CaCl_2$(DadeBehring)而使凝固反应开始。使用CR-A(Amelung)连接的KC10A(Amelung)测定了直到凝固为止的时间(图7和图8)。

[0285] 而且,对显示最佳凝固时间缩短效果的XB12/SB04,还测定了它的浓度依赖性(图9)。

[0286] [实施例8]抗体纯化

[0287] 利用Centricon(R)YM-50(Millipore),将通过实施例4描述的方法获得的10mL培养上清液浓缩到1mL。向所得浓缩液中添加10μL的10%BSA、10μL的1%Tween(R)20和100μL的rProtein A Sepharose™Fast Flow(Amersham Biosciences),并且在4℃下翻转混合一夜。将该溶液转移至0.22μm的过滤杯Ultrafree(R)-MC(Millipore),用500μL含有0.01%Tween(R)20的TBS洗涤3次后,将rProtein A Sepharose™树脂悬浮于含有100μL 0.01%Tween(R)20的10mM HCl(pH 2.0)中静置3分钟后,洗脱出抗体。立刻加入5μL的1M Tris-HCl(pH 8.0)进行中和。使用Microplate Manager III(Bio-Rad Laboratories)软件,从标准曲线算出培养上清液中的人IgG浓度。按照实施例5定量抗体浓度。

[0288] [实施例9]抗F.X抗体的GST-AP蛋白质印迹

[0289] 构建表达F.X的活化肽(AP)与谷胱甘肽S转移酶(GST)的融合蛋白(GST-AP)的重组大肠杆菌。通过PCR从人肝脏Marathon-ReadycDNA(Clontech)扩增覆盖人F.X全长翻译区的cDNA,然后将该cDNA作为模板,通过PCR法进一步扩增编码AP区(Leytus等,Biochemistry1986;25:5098)的区,且亚克隆到pGEM-T载体(Promega)上,获得编码GST-AP的pGEX-F10AP。培养转化有该质粒的大肠杆菌,在OD=0.8时,添加1mM IPTG进行GST-AP的表达诱导。离心(3,000xg,30分钟,4℃)培养液后,回收菌体且保存在-20℃直到使用为止。

[0290] 将该菌体沉淀用培养量的1/20量的PBS再悬浮,每0.1mL悬浮液添加2.4mL SDS-PAGE样品缓冲液(IWAKI),且将该混合液在95℃下煮沸5分钟。将10μL该反应溶液加到SDS-PAGE微型(14%)凝胶(旭テクノグラス)的每个孔、进行电泳。将电泳后的凝胶使用半干印迹仪(BIO-RAD)转移至Immobilon-P™转移膜(MILLIPORE)上,且用BT-PBS(含有2%BSA和0.05%Tween(R)20的PBS)进行封闭。封闭结束后,使其与实施例1-4中纯化的、以BT-PBS稀释为2μg/mL的抗F.X小鼠抗体SB04或SB06反应1小时。用含有0.05%Tween(R)20的PBS洗涤后,使膜与以BT-PBS 2000倍稀释的碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(Zymed Laboratories)反应1小时。用含有0.05%Tween(R)20的PBS洗涤后,用生色底物BCIP/NBT磷酸酶底物(Kirkegaad & Perry Laboratories)使膜显色(参照图10)。

[0291] [实施例10]从来自免疫小鼠脾脏的scFv文库获得双特异性抗体

[0292] 10-1.抗原和免疫

[0293] 使用抗原F.IXaβ(Enzyme Research Laboratories,Inc.)或F.X(Enzyme

Research Laboratories,Inc.),按照下述方法免疫3只BALB/c小鼠(雄性,免疫开始时为6周龄,日本チャールス・リバー)、3只MRL/lr小鼠(雄性,免疫开始时为6周龄,日本チャールス・リバー)和3只C57BL/6N小鼠(雌性,免疫开始时为6周龄,日本チャールス・リバー)。作为初次免疫,用以FCA(弗氏完全佐剂H37 Ra(Difco laboratories))乳化的抗原按40μg/只进行皮下给药。2周后用以FIA(弗氏不完全佐剂(Difco laboratories))乳化的抗原按40μg/只进行皮下给药。以后每隔一周进行一次加强免疫共进行3次,并且在最终免疫的8天后摘出小鼠的脾脏。

[0294] 10-2.噬菌体文库的构建

[0295] 将实施例1-1和2-1中准备的免疫小鼠摘出脾脏的一部分,以及实施例10-1中准备的从免疫小鼠摘出的脾脏放入Trizol试剂(Invitrogen)(50mg脾脏/ml试剂)中,使用玻璃匀浆器将其匀浆。随后,按照试剂所附说明描述的方法提取总RNA。使用PolyATract System1000试剂盒(Promega),按照试剂所附说明书描述的方法,从上述提取液中提取polyA(+)RNA。通过RT-PCR(SuperScript III First-StrandSynthesis System for RT-PCR,Invitrogen)合成cDNA,且将合成的cDNA保存在-20℃下直到使用为止。

[0296] 作为小鼠抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)cDNA的扩增用引物,准备了实施例3-2和3-3中使用的HB引物混合物、HF引物混合物、LB引物混合物和LF引物混合物。为了扩增VH,使用各1μL的100μM HB引物混合物和100μM HF引物混合物,制备了50μL反应液(2.5μL cDNA溶液、KOD plus缓冲液(东洋纺织)、0.2mMdNTPs、1.5mM $MgCl_2$、3.75单位DNA聚合酶KOD plus(东洋纺织))。而为了扩增VL,使用各1μL的100μM LB引物混合物和100μM LF引物混合物,制备了与上述同样组成的50μL反应液。使用热循环仪GeneAmp PCR系统9700(Parkin Elmer)按下述条件进行PCR:98℃加热3分钟后,以98℃ 20秒、58℃ 20秒和72℃ 30秒的反应为1个循环重复32个循环。PCR后,将反应液进行2%琼脂糖凝胶电泳。目的大小(约400bp)的扩增片段使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)按照所附说明书描述的方法进行纯化,且用50μL无菌水洗脱。其次,为了扩增scFv片段,制备10管100μL反应液(3μL VH片段溶液、3μL VL片段溶液、KOD plus缓冲液(东洋纺织)、0.2mMdNTPs、1mM $MgCl_2$、5单位DNA聚合酶KOD plus(东洋纺织)),进行初次PCR(94℃加热3分钟后,以94℃ 1分钟、63℃ 4分钟的反应为1个循环重复7个循环)后,在保温在63℃的状态下向每管中添加各2.5μL的10μM scfor引物和10μM scback引物,再进行二次PCR(94℃加热35秒后,以94℃ 2分钟、63℃ 2分钟的反应为1个循环重复30个循环)。PCR后,使用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)纯化反应液,将纯化产物用限制酶Sfi I(Takara Bio)在50℃下进行一夜消化。将消化液进行2%琼脂糖凝胶电泳后,目的大小(约800bp)的扩增片段使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)按照所附说明书描述的方法进行纯化,且用适量的无菌水洗脱。为了使scFv展示在噬菌体基因III蛋白质上,使用pELBGlacI(参照图11)作为噬菌粒载体。将10μg该载体用限制酶Sfi I(Takara Bio)在50℃下进行一夜消化后,目的大小(约5kb)的切割片段使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)按照所附说明书描述的方法进行纯化,且用适量的无菌水洗脱。将纯化PCR产物和纯化载体片段使用Ligation High(东洋纺织)按照所附说明书描述的方法16℃下进行一夜连接反应。按照所附说明书描述的电穿孔法,用该反应液转化大肠杆菌XL1 BlueElectrocompetent cells(电感受态细胞)(Stratagene)或electromax DH12s(Invitrogen)。将获得的氨苄青霉素抗性转化体全部回收,且作为重组大肠杆菌文库在-20

℃下保存直到使用为止。

[0297] 将该大肠杆菌文库(2×10^9cfu)接种于50mL 2×YTAG(含有100μg/mL氨苄青霉素和2%葡萄糖的2×TY)中,37℃下进行培养直到OD 600达到0.4-0.5。将4×10^{11}的辅助噬菌体VCSM13(Stratagene)加入到培养液中、37℃静置15分钟感染细胞。向其中添加450mL2×YTAK(含有100μg/mL氨苄青霉素和25μg/mL卡那霉素的2×TY)和25μL 1mol/L的IPTG,在30℃培养10小时。通过离心回收培养上清液,与100mL PEG-NaCl溶液(10%聚乙二醇8000、2.5mol/L NaCl)混合后,在4℃静置60分钟。通过10,800xg、30分钟离心使噬菌体沉淀,将沉淀物悬浮于40mL的水中,与8mL PEG-NaCl溶液混合后,在4℃静置1小时。通过10,800xg、30分钟离心使噬菌体沉淀,将该沉淀悬浮于5mL PBS中获得噬菌体文库。在4℃下保存噬菌体直到使用为止。

[0298] 10-3.通过淘选法浓缩结合噬菌体

[0299] 使用 No-Weigh Premeasured NHS-PEO_4-Biotin Microtubes(Pierce),将F.IXaβ或F.X用生物素标记,向10-2中制备的600μL噬菌体文库溶液中加入100pmol生物素标记的F.IXa β或F.X,与抗原接触60分钟。加入用5%M-PBS(含有5%w/v脱脂乳的PBS)洗涤的600μL Dynabeads M-280 Streptavidin(链霉抗生物素)(DYNAL),使其结合15分钟。用1mL PBST(含有0.1%Tween-20的PBS)多次洗涤珠粒结合噬菌体后,再用PBS洗涤。将珠粒在0.8mL的0.1mol/L甘氨酸/HCl(pH 2.2)中悬浮5分钟、洗脱出噬菌体。

[0300] 或者,向固定有F.IXaβ或F.X(10μg/孔×5)的免疫平板(MaxiSorp,Nunc)上加入与2.5%w/v脱脂乳一起温育了15分钟的噬菌体文库(80μL/孔×5),与抗原接触60分钟。用1mL PBST(含有0.1%Tween-20的PBS)多次洗涤抗原结合噬菌体后,再用PBS洗涤。将结合噬菌体在0.8mL的0.1mol/L甘氨酸/HCl(pH 2.2)中温育5分钟、洗脱出噬菌体。

[0301] 通过向回收的噬菌体溶液中添加2mol/L Tris(45μL)进行中和,将该溶液添加到对数生长期(OD600=0.4-0.5)的10mL XL1-Blue细胞中,37℃静置30分钟感染细胞。将所得混合液涂布在2×YTAG平板上、在30℃下进行培养。回收菌落,接种到2×YTAG中,37℃下进行培养直到OD600=0.4-0.5为止。向10mL培养液中添加IPTG(5μL;1mol/L)和10^{11}pfu辅助噬菌体(VCSM13),37℃静置30分钟。离心收集菌体后,再悬浮于100mL 2×YTAK中,30℃培养10小时。通过离心回收培养上清液,与20mL 10%PEG-5mol/L NaCl溶液混合后,4℃静置20分钟。通过10,800xg、30分钟离心使噬菌体沉淀,将该沉淀悬浮于2mL PBS中供后来淘选。

[0302] 10-4.噬菌体ELISA

[0303] 将上述的单菌落接种到100μL2×YTAG中,30℃培养一夜。将5μL该培养液接种到500μL 2×YTAG中,37℃培养5小时后,加入2×10^8pfu辅助噬菌体,37℃静置30分钟,37℃进一步搅拌培养30分钟,然后添加120μL含有0.5mM IPTG的2×YTAK。30℃培养一夜,将离心上清液用于ELISA。使用以1.0μg/mL生物素标记抗原包被的StreptaWell 96微量滴定板(Roche),对通过淘选生物素标记抗原而得到的克隆进行ELISA。此外,为了对通过淘选天然抗原而得到的克隆进行ELISA,使用固定有1.0μg/mL天然抗原的免疫平板(MaxiSorp,Nunc)。用PBST洗涤除去抗原后,用200μL 2%M-PBS或2%BSA-PBS(含有2%w/v BSA的PBS)作为封闭缓冲液,室温下封闭1小时。除去缓冲液,将培养上清液添加到平板上,静置60分钟使噬菌体结合。洗涤后,利用经封闭缓冲液稀释的HRP结合抗M13抗体(Amersham Pharmacia Biotech)和TMB底物(Zymed)检测结合噬菌体,通过添加1mol/L的H_2SO_4使反应终止后,利用

读板仪测定A450的值。

[0304] 10-5.序列测定和克隆选择

[0305] 从ELISA阳性克隆的重组大肠杆菌2×YTAG培养液中，使用引物PBG3-F1(5′-CAGCTATGAAATACCTATTGCC-3′/SEQ ID NO:1)和PBG3-R1(5′-CTTTTCATAATCAAAATCACCGG-3′/SEQ ID NO:2)，通过PCR扩增scFv区，测定其核苷酸序列。利用热循环仪GeneAmpPCR系统9700(Perkin Elmer)，对含有1μL培养液、1.5μL10×KODDash缓冲液、分别为0.2μL 10微摩尔/L引物和0.3μl KOD Dash聚合酶(东洋纺织、2.5U/μL)的15μLPCR反应液进行30个循环(96℃ 10秒、55℃ 10秒和72℃ 30秒)的扩增。PCR后，向5μL反应液中添加3μLExoSAP-IT(Amersham)，混合物在37℃保温15分钟，随后在80℃保温15分钟。利用BigDye终止循环测序试剂盒(Applied Biosystems)，以PBG3-F2(5′-ATTGCCTACGGCAGCCGCT-3′/SEQ ID NO:3)或PBG3-R2(5′-AAATCACCGGAACCAGAGCC-3′/SEQ ID NO:4)作为引物，对该样品进行反应。用Applied Biosystems PRISM 3700 DNA序列分析仪进行电泳。选择出从核苷酸序列推定的具有不同CDR3氨基酸序列的克隆，其中52个为抗F.IXa克隆和33个为抗F.X克隆。

[0306] 10-6.双特异性IgG抗体表达载体的构建

[0307] 为了使scFv抗体以IgG型表达，通过实施例3-3、3-4和3-5所示的同样方法，将抗体可变区(VH,VL)克隆到诱导型表达载体上。将抗F.IXa抗体可变区(VH和VL)插入到四环素诱导型载体(分别为pcDNA4-g4H和pcDNA4-g4L)上。将抗F.X抗体可变区(VH和VL)插入到蜕皮激素类似物诱导型载体(分别为pIND-g4H和pcDNA4-g4L)上。使用QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN)从目的克隆中分离出各种质粒DNA，将其溶解于100μL无菌水中。

[0308] 10-7.嵌合双特异性抗体在动物细胞中的表达

[0309] 使用通过实施例4-1所示的同样方法制备的DNA溶液，通过实施例4-2和4-3所示的同样方法使DNA在动物细胞中表达，并且回收培养上清液。在4℃下保存该样品直到使用为止。

[0310] [实施例11]抗体纯化

[0311] 向用实施例10-7中所述方法得到的10mL培养上清液中添加100μL的rProtein A Sepharose™ Fast Flow(Amersham Biosciences)，且在4℃下倒转混合一夜。将该溶液转移到0.22μm的过滤杯Ultrafree®-MC(Millipore)中，用500μL含有0.01％Tween®20的TBS洗涤3次后，将rProtein A Sepharose™树脂悬浮于100μL含有0.01％Tween®20的10mM HCl(pH 2.0)中、静置3分钟，然后洗脱抗体。立即添加5μL的1M Tris-HCl(pH 8.0)进行中和。使用MicroplateManager III(Bio-Rad Laboratories)软件，从人IgG4(人源化抗TF抗体，参照WO 99/51743)的标准曲线算出培养上清液中的人IgG浓度。按照实施例5定量抗体浓度。

[0312] [实施例12]F.VIIIa(活化凝血因子VIII)样活性测定

[0313] 双特异性抗体的F.VIIIa样活性通过以下的酶测定进行评价。下述反应全部在室温下进行。将10μL 15μg/mL的F.IX(Enzyme ResearchLaboratories)、5μL含有100mM $CaCl_2$和20mM $MgCl_2$的TBSB以及采用实施例10-7中所述方法获得的50μL培养上清液的混合液在96孔板中温育1小时。然后，向该混合液中添加10μL的F.XIa(10ng/mL;Enzyme Research Laboratories)、20μL的F.X(50μg/mL;EnzymeResearch Laboratories)、5μL的磷脂(400μg/mL)使酶反应开始。反应进行30分钟后，通过添加0.5M EDTA(10μL)使反应终止。

[0314] 向各孔中加入50μL生色底物溶液后，通过Model 3550 MicroplateReader(Bio

Rad Laboratories)，测定0分钟、60分钟的405nm(参照波长为655nm)的吸光度。F.VIIIa样活性由从抗体表达培养上清液的60分钟的吸光度减去无抗体表达培养上清液的60分钟的吸光度变化值所得的值来表示(参照图12)。

[0315] TBSB作为磷脂、F.XIa、F.IX和F.X的溶剂。生色底物溶液是按照所附说明书的方法溶解的テストチ-ム(Tesutochimu)生色底物S-2222(Chromogenix)和Polybrene溶液(0.6mg/L溴化己二甲胺(Sigma))的1:1混合物。

[0316] [实施例13]血液凝固分析

[0317] 为了阐明按照实施例11的方法制备的双特异性抗体是否恢复血友病A血液的凝固能力，使用F.VIII缺乏血浆通过实施例7中所示的同样方法，评价该抗体对活化部分凝血活酶时间(APTT)的影响(参照图13)。对凝固时间缩短效果高的A44/B26和A69/B26，还测定了它们的浓度依赖性(参照图14和15)。

[0318] [实施例14]研究双特异性IgG抗体与F.VIII的联用

[0319] 双特异性抗体与F.VIII联用的研究，依据下述血液凝固分析的条件进行评价。将40μL抗体溶液(25μg/mL)和50μL F.VIII缺乏血浆(Biomerieux)的混合液在室温下温育30分钟。再向该混合液中加入10μL基因重组型凝血因子VIII制剤コ-ジネイト(Kogenate)(R)FS(0.1U/mL;BAYER)和50μL APTT试剂(Dade Behring)，37℃加热3分钟。通过向该混合液中加入50μL的20mM $CaCl_2$(Dade Behring)使凝固反应开始。使用CR-A(Amelung)连接的KC10A(Amelung)测定凝固为止所需的时间(参照图16)。

[0320] [实施例15]抑制物血浆中双特异性IgG抗体的效果

[0321] 抑制物血浆中双特异性IgG抗体的效果，在下述血液凝固分析条件下进行评价。将50μL F.VIII缺乏血浆(Biomerieux)和10μL抗人F.VIII中和抗体(100μg/mL;Catalog Number:MAB3440,CHEMICON)的混合液在室温下温育30分钟。该血浆用作抑制物血浆。向该抑制物血浆中加入40μL抗体溶液(25μg/mL)和50μL APTT试剂(DadeBehring)，37℃加热3分钟。通过向该混合液中加入50μL 20mM的$CaCl_2$(Dade Behring)使凝固反应开始。使用CR-A(Amelung)连接的KC10A(Amelung)测定到凝固为止所需的时间(参照图17)。

[0322] [实施例16]双特异性抗体的人源化

[0323] 在实施例1-7中获得的双特异性抗体中，对血凝时间的缩短效果最高的XB12(小鼠抗F.IXa抗体)/SB04(小鼠抗F.X抗体)，如下进行人源化。

[0324] 16-1.人抗体的同源性检索

[0325] 通过一般公开的Kabat数据库(ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/)和IMGT数据库(http://imgt.cines.fr/)获得人抗体氨基酸序列数据，使用已构建的数据库对小鼠XB12-H链可变区、小鼠XB12-L链可变区、小鼠SB04-H链可变区和小鼠SB04-L链可变区分别进行同源性检索。结果确认了它们与下示的人抗体序列具有高的同源性，因此决定将它们用作人抗体的构架区(下面简称为FR)。

[0326] (1)XB12-H链可变区:KABATID-020619(Kabat数据库)

[0327] (Mariette等,Arthritis Rheum.1993;36:1315-1324)

[0328] (2)XB12-L链可变区:EMBL Accession No.X61642(IMGT数据库)

[0329] (Mark等,J Mol Biol.1991;222:581-597)

[0330] (3)SB04-H链可变区:KABATID-025255(Kabat数据库)

[0331] (Demaison等,Immunogetetics 1995;42:342-352)

[0332] (4)SB04-L链可变区:EMBL Accession No.AB064111(IMGT数据库)

[0333] (未出版的数据)

[0334] 将各小鼠抗体的抗原互补决定区(下面简称为CDR)移植到人抗体(1)-(4)的FR上,制备人源性抗体。

[0335] 还使用通过NCBI一般公开的同源性检索web site(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/),检索了与人抗体(1)-(4)同源性高的人抗体的分泌信号序列。使用了通过检索得到的下示分泌信号序列:

[0336] (1)XB12-H链可变区:GenBank Accession No.AF062120

[0337] (2)XB12-L链可变区:GenBank Accession No.M74019

[0338] (3)SB04-H链可变区:GenBank Accession No.BC019337

[0339] (4)SB04-L链可变区:GenBank Accession No.AY204756

[0340] 16-2.人源化抗体基因表达载体的构建

[0341] 对于编码从分泌信号序列至抗体可变区的氨基酸序列上,制备12种50碱基左右的合成寡核苷酸,使其3'末端一侧约20碱基左右相互杂交。此外,还制备了杂交到抗体可变区基因的5'末端一侧且具有XhoI切割序列的引物、和杂交到抗体可变区基因的3'末端一侧且具有SfiI切割序列的引物。

[0342] 混合所制备的合成寡聚DNA(2.5μM,各1μL),加入1×TaKaRa ExTaq缓冲液、0.4mM dNTPs、0.5单位TaKaRa Ex Taq(全部由宝酒造制造)制成48μL的反应液。94℃保温5分钟后,进行2个循环反应(94℃2分钟、55℃ 2分钟和72℃ 2分钟)实施各合成寡DNA的装配和延伸反应。然后添加1μL杂交到抗体基因的5'末端一侧和3'末端一侧的引物(各10μM),进行35个循环反应(94℃ 30秒、55℃ 30秒和72℃1分钟)并于72℃反应5分钟,扩增抗体可变区基因。PCR后,将全部反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳。使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN),按所附说明书描述的方法,纯化目的大小(约400bp)的扩增片段,用30μL无菌水洗脱。使用pGEM-T Easy Vector System(载体系统)(Promega)按照所附说明书描述的方法对该片段进行克隆。使用BigDye终止循环测序试剂盒(Applied Biosystems),利用ABI PRISM 3700 DNA序列分析仪(Applied Biosystems)按照所附说明书描述的方法,测定各DNA片段的核苷酸序列。

[0343] 利用XhoI和SfiI,对确认含有正确的人源化抗体可变区基因序列的质粒进行消化,然后反应液进行1%琼脂糖凝胶电泳。目的大小(约400bp)的扩增片段使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)按说明书描述的方法进行纯化,用30μL无菌水洗脱。此外,将实施例3-4中制备的四环素诱导型表达质粒(pcDNA4-g4H、pcDNA4-g4L)和蜕皮激素类似物诱导型表达质粒(pIND-g4H、pIND-g4L)用Xhol和SfiI消化后,含有抗体恒定区的片段(约5kb)用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)按说明书描述的方法进行纯化,用30μL无菌水洗脱。使用快速DNA连接试剂盒(Rapid DNA Ligation Kit,Roche Diagnostics)按照所附说明书描述的方法,对经XhoI和SfiI消化的人源化XB12抗体基因片段(H链可变区(以下简称VH)或L链可变区(以下简称VL))及经XhoI和SfiI消化的四环素诱导型表达质粒(pcDNA4-g4H、pcDNA4-g4L)进行连接反应。使用快速DNA连接试剂盒(RocheDiagnostics)按照所附说明书描述的方法,对经XhoI和SfiI消化的人源化SB04抗体基因片段(H链可变区或L链可变区)及

经XhoI和SfiI消化的蜕皮激素类似物诱导型表达质粒(pIND-g4H、pIND-g4L)进行连接反应。各反应液的一部分用于转化大肠杆菌DH5α株(东洋纺织)。

[0344] 16-3.人源化双特异性抗体的制备

[0345] 采用实施例4-2、4-3中所示的方法,使用四种人源化抗体表达载体和pcDNA6/TR、pVgRXR,对HEK293H细胞进行基因导入和诱导表达。而且,采用实施例8、5中所示的方法纯化抗体和进行抗体浓度的定量。

[0346] 16-4.人源化双特异性抗体的活性评价和抗体序列的改变

[0347] 为了评价所制备的人源化双特异性抗体和嵌合双特异性抗体(XB12/SB04)的血浆凝固能力,按照实施例7的方法,使用F.VIII缺乏血浆研究抗体对APTT的影响。为了提高血液凝固能力低下的人源化双特异性抗体的活性,对人抗体FR的氨基酸进行了改变。而且,还将与热稳定性低等相关的XB12抗体VH的CDR3中的半胱氨酸残基改变为丙氨酸。具体来说,使用QuikChange Site-DirectedMutagenesis Kit(定点诱变试剂盒)(Stratagene)按照所附说明书描述的方法,将突变导入人源化抗体表达载体。通过重复FR序列的氨基酸改变和血液凝固能力的评价,获得了与XB12/SB04具有同等活性的人源化双特异性抗体(人源化XB12抗体(VH:hXB12f-A,VL:hXBVL)/人源化SB04抗体(VH:hSB04e,VL:hSBVL-F3f))(图18)。

[0348] 产业应用性

[0349] 本发明提供识别酶和该酶底物两者的抗体,该抗体是替代增强酶活性的辅因子功能的双特异性抗体。

[0350] 考虑到本发明的双特异性抗体在血中稳定性高、且抗原性低,因此非常有望成为医药品。

[0001] <110>中外制药株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)

[0002] <120>替代功能蛋白质的双特异性抗体

[0003] <130>C1-A0313P3

[0004] <150>PCT/JP03/13062

[0005] <151>2003-10-10

[0006] <150>PCT/JP03/13123

[0007] <151>2003-10-14

[0008] <160>268

[0009] <170>PatentIn version 3.1

[0010] <210>1

[0011] <211>22

[0012] <212>DNA

[0013] <213>人工序列

[0014] <220>

[0015] <223>人工合成引物序列

[0016] <400>1

[0017] cagctatgaa atacctattg cc

[0018] 22

[0019] <210>2

[0020] <211>23

[0021] <212>DNA

[0022] <213>人工序列

[0023] <220>

[0024] <223>人工合成引物序列

[0025] <400>2

[0026] cttttcataa tcaaaatcac cgg

[0027] 23

[0028] <210>3

[0029] <211>19

[0030] <212>DNA

[0031] <213>人工序列

[0032] <220>

[0033] <223>人工合成引物序列

[0034] <400>3

[0035] attgcctacg gcagccgct

[0036] 19

[0037] <210>4

[0038] <211>20

[0039] <212>DNA

[0040] <213>人工序列

[0041] <220>

[0042] <223>人工合成引物序列

[0043] <400>4

[0044] aaatcaccgg aaccagagcc

[0045] 20

[0046] <210>5

[0047] <211>24

[0048] <212>DNA

[0049] <213>人工序列

[0050] <220>

[0051] <223>人工合成引物序列

[0052] <400>5

[0053] ttactcgcgg cccagccggc catg

[0054] 24

[0055] <210>6

[0056] <211>28

[0057] <212>DNA

[0058] <213>人工序列

[0059] <220>

[0060] <223>人工合成引物序列

[0061] <400>6

[0062] ggaattcggc ccccgaggcc cactcacg

[0063] 28

[0064] <210>7

[0065] <211>1215

[0066] <212>DNA

[0067] <213>人(Homo sapiens)

[0068] <400>7

[0069] ggcctcgggg gccagctttc tggggcaggc caggcctgac cttggctttg gggcagggag 60

[0070] ggggctaagg tgaggcaggt ggcgccagcc aggtgcacac ccaatgccca tgagcccaga 120

[0071] cactggacgc tgaacctcgc ggacagttaa gaacccaggg gcctctgcgc cctgggccca 180

[0072] gctctgtccc acaccgcggt cacatggcac cacctctctt gcagcttcca ccaagggccc 240

[0073] atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300

[0074] ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct 360

[0075] gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420

[0076] cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480

[0077] tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtcccccatg 540

[0078] cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttcctgt tccccccaaa 600

[0079] acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt 660

[0080] gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720

[0081] tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780

[0082] caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa 840

[0083] aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900

[0084] acaggtgtgc accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgtg 960

[0085] gtgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020

[0086] gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct 1080

[0087] ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140

[0088] cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200

[0089] taaatgagcg gccgc

[0090] 1215

[0091] <210>8

[0092] <211>684

[0093] <212>DNA

[0094] <213>人(Homo sapiens)

[0095] <400>8

[0096] ggcctcgggg gccgaattcc taaactctga gggggtcgga tgacgtggcc attctttgcc 60

[0097] taaagcattg agtttactgc aaggtcagaa aagcatgcaa agccctcaga atggctgcaa 120

[0098] agagctccaa caaaacaatt tagaacttta ttaaggaata gggggaagct aggaagaaac 180

[0099] tcaaaacatc aagattttaa atacgcttct tggtctcctt gctataatta tctgggataa 240

[0100] gcatgctgtt ttctgtctgt ccctaacatg ccctgtgatt atccgcaaac aacacaccca 300

[0101] agggcagaac tttgttactt aaacaccatc ctgtttgctt ctttcctcag gaactgtggc 360

[0102] tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc 420

[0103] tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga 480

[0104] taacgccctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag 540

[0105] cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt 600

[0106] ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag 660

[0107] gggagagtgt tagagggcgg ccgc

[0108] 684

[0109] <210>9

[0110] <211>1215

[0111] <212>DNA

[0112] <213>人(Homo sapiens)

[0113] <400>9

[0114] ggcctcgggg gcctcccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta acccaggccc 60

[0115] tgcacacaaa ggggcaggtg ctgggctcag acctgccaag agccatatcc gggaggaccc 120

[0116] tgcccctgac ctaagcccac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc tcggacacct 180

[0117] tctctcctcc cagattccag taactcccaa tcttctctct gcagcttcca ccaagggccc 240

[0118] atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgccctggg 300

[0119] ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgccct 360

[0120] gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag 420

[0121] cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga 480

[0122] tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag tccaaatatg gtcccccatg 540

[0123] cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttcctgt tccccccaaa 600

[0124] acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc acgtgcgtgg tggtggacgt 660

[0125] gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa 720

[0126] tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct 780

[0127] caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa 840

[0128] aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagagcc 900

[0129] acaggtgtac accctgcccc catcccagtg cgagatgacc aagaaccagg tcagcctgtc 960

[0130] ctgcgcggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 1020

[0131] gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct 1080

[0132] cgtgagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgctc 1140

[0133] cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctctggg 1200

[0134] taaatgagcg gccgc

[0135] 1215

[0136] <210>10

[0137] <211>21

[0138] <212>DNA

[0139] <213>人工序列

[0140] <220>

[0141] <223>人工合成引物序列

[0142] <400>10

[0143] cgcaaatggg cggtaggcgt g

[0144] 21

[0145] <210>11

[0146] <211>18

[0147] <212>DNA

[0148] <213>人工序列

[0149] <220>

[0150] <223>人工合成引物序列

[0151] <400>11

[0152] tagaaggcac agtcgagg

[0153] 18

[0154] <210>12

[0155] <211>24

[0156] <212>DNA

[0157] <213>人工序列

[0158] <220>

[0159] <223>人工合成引物序列

[0160] <400>12

[0161] ctctgaatac tttcaacaag ttac

[0162] 24

[0163] <210>13

[0164] <211>116

[0165] <212>PRT

[0166] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0167] <400>13

[0168] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr

[0169] 1 5 10 15

[0170] Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

[0171] 20 25 30

[0172] Gly Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Asn Leu Glu

[0173] 35 40 45

[0174] Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser

[0175] 50 55 60

[0176] Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Glu Asn Gln Phe

[0177] 65 70 75 80

[0178] Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

[0179] 85 90 95

[0180] Cys Ala Arg Gly Pro Pro Cys Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0181] 100 105 110

[0182] Thr Val Ser Ala

[0183] 115

[0184] <210>14

[0185] <211>6

[0186] <212>PRT

[0187] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0188] <400>14

[0189] Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr

[0190] 1 5

[0191] <210>15

[0192] <211>16

[0193] <212>PRT

[0194] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0195] <400>15

[0196] Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

[0197] 1 5 10 15

[0198] <210>16

[0199] <211>6

[0200] <212>PRT

[0201] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0202] <400>16

[0203] Gly Pro Pro Cys Thr Tyr

[0204] 1 5

[0205] <210>17

[0206] <211>120

[0207] <212>PRT

[0208] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0209] <400>17

[0210] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[0211] 1 5 10 15

[0212] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[0213] 20 25 30

[0214] Asp Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[0215] 35 40 45

[0216] Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys

[0217] 50 55 60

[0218] Phe Gln Asp Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

[0219] 65 70 75 80

[0220] Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[0221] 85 90 95

[0222] Cys Val Arg Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[0223] 100 105 110

[0224] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0225] 115 120

[0226] <210>18

[0227] <211>5

[0228] <212>PRT

[0229] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0230] <400>18

[0231] Asp Asp Tyr Val His

[0232] 1 5

[0233] <210>19

[0234] <211>17

[0235] <212>PRT

[0236] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0237] <400>19

[0238] Arg Ile Asp Pro Ala Asp Gly Lys Thr Lys Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

[0239] 1 5 10 15

[0240] Asp

[0241] <210>20

[0242] <211>10

[0243] <212>PRT

[0244] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0245] <400>20

[0246] Trp Arg Ile Tyr Tyr Gly Leu Met Asp Tyr

[0247] 1 5 10

[0248] <210>21

[0249] <211>123

[0250] <212>PRT

[0251] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0252] <400>21

[0253] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[0254] 1 5 10 15

[0255] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr His

[0256] 20 25 30

[0257] Phe Val Leu His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[0258] 35 40 45

[0259] Ile Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys

[0260] 50 55 60

[0261] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0262] 65 70 75 80

[0263] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0264] 85 90 95

[0265] Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

[0266] 100 105 110

[0267] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0268] 115 120

[0269] <210>22

[0270] <211>5

[0271] <212>PRT

[0272] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0273] <400>22

[0274] His Phe Val Leu His

[0275] 1 5

[0276] <210>23

[0277] <211>17

[0278] <212>PRT

[0279] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0280] <400>23

[0281] Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

[0282] 1 5 10 15

[0283] Gly

[0284] <210>24

[0285] <211>13

[0286] <212>PRT

[0287] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0288] <400>24

[0289] Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

[0290] 1 5 10

[0291] <210>25

[0292] <211>117

[0293] <212>PRT

[0294] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0295] <400>25

[0296] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

[0297] 1 5 10 15

[0298] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Gln Asp

[0299] 20 25 30

[0300] Asn Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[0301] 35 40 45

[0302] Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys

[0303] 50 55 60

[0304] Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Thr
[0305] 65 70 75 80
[0306] Cys Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[0307] 85 90 95
[0308] Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[0309] 100 105 110
[0310] Val Thr Val Ser Ala
[0311] 115
[0312] <210>26
[0313] <211>5
[0314] <212>PRT
[0315] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0316] <400>26
[0317] Asp Asn Tyr Met His
[0318] 1 5
[0319] <210>27
[0320] <211>17
[0321] <212>PRT
[0322] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0323] <400>27
[0324] Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
[0325] 1 5 10 15
[0326] Gly
[0327] <210>28
[0328] <211>7
[0329] <212>PRT
[0330] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0331] <400>28
[0332] Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Cys
[0333] 1 5
[0334] <210>29
[0335] <211>116
[0336] <212>PRT
[0337] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0338] <400>29
[0339] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
[0340] 1 5 10 15
[0341] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu
[0342] 20 25 30

[0343] Asn Thr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
[0344] 35 40 45
[0345] Ile Gly Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
[0346] 50 55 60
[0347] Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser
[0348] 65 70 75 80
[0349] Leu Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Gly
[0350] 85 90 95
[0351] Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
[0352] 100 105 110
[0353] Thr Val Ser Ser
[0354] 115
[0355] <210>30
[0356] <211>5
[0357] <212>PRT
[0358] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0359] <400>30
[0360] Glu Asn Thr Ile Tyr
[0361] 1 5
[0362] <210>31
[0363] <211>11
[0364] <212>PRT
[0365] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0366] <400>31
[0367] Ser Ile Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
[0368] 1 5 10
[0369] <210>32
[0370] <211>12
[0371] <212>PRT
[0372] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0373] <400>32
[0374] Ser Gly Gly Arg Gly Lys Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser
[0375] 1 5 10
[0376] <210>33
[0377] <211>117
[0378] <212>PRT
[0379] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0380] <400>33
[0381] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly

[0382] 1 5 10 15

[0383] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[0384] 20 25 30

[0385] Asn Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[0386] 35 40 45

[0387] Ile Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys

[0388] 50 55 60

[0389] Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

[0390] 65 70 75 80

[0391] Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[0392] 85 90 95

[0393] Cys Ala Ser Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

[0394] 100 105 110

[0395] Val Thr Val Ser Ala

[0396] 115

[0397] <210>34

[0398] <211>5

[0399] <212>PRT

[0400] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0401] <400>34

[0402] Asp Asn Tyr Met His

[0403] 1 5

[0404] <210>35

[0405] <211>17

[0406] <212>PRT

[0407] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0408] <400>35

[0409] Arg Ile Asp Pro Gly Asn Gly Asn Ser Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

[0410] 1 5 10 15

[0411] Gly

[0412] <210>36

[0413] <211>7

[0414] <212>PRT

[0415] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0416] <400>36

[0417] Pro Tyr Tyr Pro Leu Gly Tyr

[0418] 1 5

[0419] <210>37

[0420] <211>114

[0421] <212>PRT

[0422] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0423] <400>37

[0424] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[0425] 1 5 10 15

[0426] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[0427] 20 25 30

[0428] Asp Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[0429] 35 40 45

[0430] Ile Gly Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Pro Ala Tyr Ala Pro Lys

[0431] 50 55 60

[0432] Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ile Thr Ala

[0433] 65 70 75 80

[0434] Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[0435] 85 90 95

[0436] Cys Thr Gly Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

[0437] 100 105 110

[0438] Ser Ala

[0439] <210>38

[0440] <211>5

[0441] <212>PRT

[0442] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0443] <400>38

[0444] Asp Asp Tyr Ile His

[0445] 1 5

[0446] <210>39

[0447] <211>17

[0448] <212>PRT

[0449] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0450] <400>39

[0451] Arg Ile Asp Pro Thr Asn Gly Asn Pro Ala Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

[0452] 1 5 10 15

[0453] Asp

[0454] <210>40

[0455] <211>4

[0456] <212>PRT

[0457] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0458] <400>40

[0459] Ser Phe Ala Tyr

[0460] 1

[0461] <210>41

[0462] <211>114

[0463] <212>PRT

[0464] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0465] <400>41

[0466] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[0467] 1 5 10 15

[0468] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[0469] 20 25 30

[0470] Asp Tyr Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[0471] 35 40 45

[0472] Ile Gly Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys

[0473] 50 55 60

[0474] Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Ile Ile Gly Thr Ala Ser Asn Thr Thr

[0475] 65 70 75 80

[0476] Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[0477] 85 90 95

[0478] Cys Ala Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

[0479] 100 105 110

[0480] Ser Ala

[0481] <210>42

[0482] <211>5

[0483] <212>PRT

[0484] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0485] <400>42

[0486] Asp Asp Tyr Val His

[0487] 1 5

[0488] <210>43

[0489] <211>17

[0490] <212>PRT

[0491] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0492] <400>43

[0493] Arg Ile His Pro Ala Asn Gly Asn Pro Gln Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

[0494] 1 5 10 15

[0495] Asp

[0496] <210>44

[0497] <211>4

[0498] <212>PRT

[0499] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0500] <400>44

[0501] Pro Phe Ala Tyr

[0502] 1

[0503] <210>45

[0504] <211>116

[0505] <212>PRT

[0506] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0507] <400>45

[0508] Met Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

[0509] 1 5 10 15

[0510] Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

[0511] 20 25 30

[0512] Asn Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu

[0513] 35 40 45

[0514] Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser

[0515] 50 55 60

[0516] Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[0517] 65 70 75 80

[0518] Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

[0519] 85 90 95

[0520] Cys Ala Arg Gly Gly Ala Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

[0521] 100 105 110

[0522] Thr Val Ser Ala

[0523] 115

[0524] <210>46

[0525] <211>6

[0526] <212>PRT

[0527] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0528] <400>46

[0529] Ser Asn Tyr Tyr Trp Asn

[0530] 1 5

[0531] <210>47

[0532] <211>16

[0533] <212>PRT

[0534] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0535] <400>47

[0536] Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

[0537] 1 5 10 15

[0538] <210>48

[0539] <211>6

[0540] <212>PRT

[0541] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0542] <400>48

[0543] Gly Gly Ala Phe Thr Tyr

[0544] 1 5

[0545] <210>49

[0546] <211>114

[0547] <212>PRT

[0548] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0549] <400>49

[0550] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[0551] 1 5 10 15

[0552] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Ile Thr Asp

[0553] 20 25 30

[0554] Asn Lys Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

[0555] 35 40 45

[0556] Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys

[0557] 50 55 60

[0558] Phe Arg Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0559] 65 70 75 80

[0560] Tyr Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0561] 85 90 95

[0562] Cys Ala Arg His Arg Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

[0563] 100 105 110

[0564] Ser Ala

[0565] <210>50

[0566] <211>5

[0567] <212>PRT

[0568] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0569] <400>50

[0570] Asp Asn Lys Met Asp

[0571] 1 5

[0572] <210>51

[0573] <211>17

[0574] <212>PRT

[0575] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0576] <400>51

[0577] Tyr Ile Ser Pro Asn Asn Gly Asp Ile Gly Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
[0578] 1 5 10 15
[0579] Asn
[0580] <210>52
[0581] <211>4
[0582] <212>PRT
[0583] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0584] <400>52
[0585] His Arg Ala Tyr
[0586] 1
[0587] <210>53
[0588] <211>121
[0589] <212>PRT
[0590] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0591] <400>53
[0592] Met Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
[0593] 1 5 10 15
[0594] Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr
[0595] 20 25 30
[0596] Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp
[0597] 35 40 45
[0598] Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
[0599] 50 55 60
[0600] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
[0601] 65 70 75 80
[0602] Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
[0603] 85 90 95
[0604] Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
[0605] 100 105 110
[0606] Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0607] 115 120
[0608] <210>54
[0609] <211>5
[0610] <212>PRT
[0611] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0612] <400>54
[0613] Thr Tyr Ala Met Ser
[0614] 1 5
[0615] <210>55

[0616] <211>17

[0617] <212>PRT

[0618] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0619] <400>55

[0620] Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

[0621] 1 5 10 15

[0622] Gly

[0623] <210>56

[0624] <211>11

[0625] <212>PRT

[0626] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0627] <400>56

[0628] Gly Gly Tyr Arg Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

[0629] 1 5 10

[0630] <210>57

[0631] <211>121

[0632] <212>PRT

[0633] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0634] <400>57

[0635] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[0636] 1 5 10 15

[0637] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

[0638] 20 25 30

[0639] Tyr Trp Met His Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp

[0640] 35 40 45

[0641] Ile Gly Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ala Arg Tyr Asn Gln Lys

[0642] 50 55 60

[0643] Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0644] 65 70 75 80

[0645] Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0646] 85 90 95

[0647] Cys Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly

[0648] 100 105 110

[0649] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0650] 115 120

[0651] <210>58

[0652] <211>5

[0653] <212>PRT

[0654] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0655] <400>58

[0656] Ser Tyr Trp Met His

[0657] 1 5

[0658] <210>59

[0659] <211>17

[0660] <212>PRT

[0661] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0662] <400>59

[0663] Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Ala Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[0664] 1 5 10 15

[0665] Ser

[0666] <210>60

[0667] <211>11

[0668] <212>PRT

[0669] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0670] <400>60

[0671] Arg Gly Glu Tyr Pro Ser Tyr Thr Met Asp Tyr

[0672] 1 5 10

[0673] <210>61

[0674] <211>119

[0675] <212>PRT

[0676] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0677] <400>61

[0678] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly

[0679] 1 5 10 15

[0680] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

[0681] 20 25 30

[0682] Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[0683] 35 40 45

[0684] Ile Gly Thr Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys

[0685] 50 55 60

[0686] Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser Thr Ala

[0687] 65 70 75 80

[0688] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0689] 85 90 95

[0690] Cys Thr Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

[0691] 100 105 110

[0692] Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

[0693] 115

[0694] <210>62

[0695] <211>5

[0696] <212>PRT

[0697] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0698] <400>62

[0699] Ser Tyr Trp Met His

[0700] 1 5

[0701] <210>63

[0702] <211>17

[0703] <212>PRT

[0704] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0705] <400>63

[0706] Thr Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[0707] 1 5 10 15

[0708] Gly

[0709] <210>64

[0710] <211>9

[0711] <212>PRT

[0712] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0713] <400>64

[0714] Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Phe Gly Tyr

[0715] 1 5

[0716] <210>65

[0717] <211>117

[0718] <212>PRT

[0719] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0720] <400>65

[0721] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

[0722] 1 5 10 15

[0723] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[0724] 20 25 30

[0725] Ser Leu Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[0726] 35 40 45

[0727] Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Pro Arg

[0728] 50 55 60

[0729] Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

[0730] 65 70 75 80

[0731] Tyr Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr

[0732] 85 90 95

[0733] Cys Val Arg Trp Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
[0734] 100 105 110
[0735] Leu Thr Val Ser Ser
[0736] 115
[0737] <210>66
[0738] <211>5
[0739] <212>PRT
[0740] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0741] <400>66
[0742] Asp Ser Leu Ile His
[0743] 1 5
[0744] <210>67
[0745] <211>17
[0746] <212>PRT
[0747] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0748] <400>67
[0749] Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Arg Thr Lys Tyr Ala Pro Arg Phe Gln
[0750] 1 5 10 15
[0751] Asp
[0752] <210>68
[0753] <211>7
[0754] <212>PRT
[0755] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0756] <400>68
[0757] Trp Val Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[0758] 1 5
[0759] <210>69
[0760] <211>123
[0761] <212>PRT
[0762] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0763] <400>69
[0764] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly
[0765] 1 5 10 15
[0766] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[0767] 20 25 30
[0768] Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0769] 35 40 45
[0770] Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys
[0771] 50 55 60

[0772] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Asn Thr Ala
[0773] 65 70 75 80
[0774] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
[0775] 85 90 95
[0776] Cys Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Ala Met Asp Tyr
[0777] 100 105 110
[0778] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0779] 115 120
[0780] <210>70
[0781] <211>5
[0782] <212>PRT
[0783] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0784] <400>70
[0785] Asp Tyr Trp Met His
[0786] 1 5
[0787] <210>71
[0788] <211>17
[0789] <212>PRT
[0790] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0791] <400>71
[0792] Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0793] 1 5 10 15
[0794] Gly
[0795] <210>72
[0796] <211>13
[0797] <212>PRT
[0798] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0799] <400>72
[0800] Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Ala Met Asp Tyr
[0801] 1 5 10
[0802] <210>73
[0803] <211>123
[0804] <212>PRT
[0805] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0806] <400>73
[0807] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly
[0808] 1 5 10 15
[0809] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[0810] 20 25 30

[0811] Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0812] 35 40 45
[0813] Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys
[0814] 50 55 60
[0815] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Asn Thr Ala
[0816] 65 70 75 80
[0817] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
[0818] 85 90 95
[0819] Cys Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asn Val Met Asp Tyr
[0820] 100 105 110
[0821] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0822] 115 120
[0823] <210>74
[0824] <211>5
[0825] <212>PRT
[0826] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0827] <400>74
[0828] Asp Tyr Trp Met His
[0829] 1 5
[0830] <210>75
[0831] <211>17
[0832] <212>PRT
[0833] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0834] <400>75
[0835] Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0836] 1 5 10 15
[0837] Gly
[0838] <210>76
[0839] <211>13
[0840] <212>PRT
[0841] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0842] <400>76
[0843] Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Asn Val Met Asp Tyr
[0844] 1 5 10
[0845] <210>77
[0846] <211>123
[0847] <212>PRT
[0848] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0849] <400>77

[0850] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Gly Glu Leu Val Met Pro Gly
[0851] 1 5 10 15
[0852] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[0853] 20 25 30
[0854] Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[0855] 35 40 45
[0856] Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly His Thr Thr Tyr Asn Gln Glu
[0857] 50 55 60
[0858] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
[0859] 65 70 75 80
[0860] Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
[0861] 85 90 95
[0862] Cys Ala Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Val Met Asp Tyr
[0863] 100 105 110
[0864] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0865] 115 120
[0866] <210>78
[0867] <211>5
[0868] <212>PRT
[0869] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0870] <400>78
[0871] Asp Tyr Trp Met His
[0872] 1 5
[0873] <210>79
[0874] <211>17
[0875] <212>PRT
[0876] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0877] <400>79
[0878] Glu Ile Asp Ile Ser Asp Gly His Thr Thr Tyr Asn Gln Glu Phe Lys
[0879] 1 5 10 15
[0880] Gly
[0881] <210>80
[0882] <211>13
[0883] <212>PRT
[0884] <213>小家鼠(Mus musculus)
[0885] <400>80
[0886] Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser Asn Asp Val Met Asp Tyr
[0887] 1 5 10
[0888] <210>81

[0889] <211>123

[0890] <212>PRT

[0891] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0892] <400>81

[0893] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[0894] 1 5 10 15

[0895] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

[0896] 20 25 30

[0897] Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[0898] 35 40 45

[0899] Ile Gly Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser His Thr Thr Tyr Asn Gln Lys

[0900] 50 55 60

[0901] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala

[0902] 65 70 75 80

[0903] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0904] 85 90 95

[0905] Cys Val Arg Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Val Met Asp Tyr

[0906] 100 105 110

[0907] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[0908] 115 120

[0909] <210>82

[0910] <211>5

[0911] <212>PRT

[0912] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0913] <400>82

[0914] Asp Tyr Trp Met His

[0915] 1 5

[0916] <210>83

[0917] <211>17

[0918] <212>PRT

[0919] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0920] <400>83

[0921] Glu Ile Asp Ile Ser Asp Ser His Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[0922] 1 5 10 15

[0923] Gly

[0924] <210>84

[0925] <211>13

[0926] <212>PRT

[0927] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0928] <400>84

[0929] Gly Glu Asp Tyr Asp Gly Ser His Asp Val Met Asp Tyr

[0930] 1 5 10

[0931] <210>85

[0932] <211>119

[0933] <212>PRT

[0934] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0935] <400>85

[0936] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly

[0937] 1 5 10 15

[0938] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

[0939] 20 25 30

[0940] Ser Trp Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[0941] 35 40 45

[0942] Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys

[0943] 50 55 60

[0944] Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0945] 65 70 75 80

[0946] Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0947] 85 90 95

[0948] Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0949] 100 105 110

[0950] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0951] 115

[0952] <210>86

[0953] <211>5

[0954] <212>PRT

[0955] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0956] <400>86

[0957] Ser Ser Trp Met His

[0958] 1 5

[0959] <210>87

[0960] <211>17

[0961] <212>PRT

[0962] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0963] <400>87

[0964] Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg

[0965] 1 5 10 15

[0966] Asp

[0967] <210>88

[0968] <211>9

[0969] <212>PRT

[0970] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0971] <400>88

[0972] Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

[0973] 1 5

[0974] <210>89

[0975] <211>119

[0976] <212>PRT

[0977] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0978] <400>89

[0979] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly

[0980] 1 5 10 15

[0981] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr

[0982] 20 25 30

[0983] Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[0984] 35 40 45

[0985] Ile Giy Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys

[0986] 50 55 60

[0987] Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[0988] 65 70 75 80

[0989] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Asp Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[0990] 85 90 95

[0991] Cys Ala Asn Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[0992] 100 105 110

[0993] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0994] 115

[0995] <210>90

[0996] <211>5

[0997] <212>PRT

[0998] <213>小家鼠(Mus musculus)

[0999] <400>90

[1000] Thr Tyr Trp Met His

[1001] 1 5

[1002] <210>91

[1003] <211>17

[1004] <212>PRT

[1005] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1006] <400>91

[1007] Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[1008] 1 5 10 15

[1009] Val

[1010] <210>92

[1011] <211>9

[1012] <212>PRT

[1013] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1014] <400>92

[1015] Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr

[1016] 1 5

[1017] <210>93

[1018] <211>119

[1019] <212>PRT

[1020] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1021] <400>93

[1022] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly

[1023] 1 5 10 15

[1024] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[1025] 20 25 30

[1026] Tyr Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[1027] 35 40 45

[1028] Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys

[1029] 50 55 60

[1030] Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[1031] 65 70 75 80

[1032] Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[1033] 85 90 95

[1034] Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[1035] 100 105 110

[1036] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[1037] 115

[1038] <210>94

[1039] <211>5

[1040] <212>PRT

[1041] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1042] <400>94

[1043] Asp Tyr Tyr Met His

[1044] 1 5

[1045] <210>95

[1046] <211>17

[1047] <212>PRT

[1048] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1049] <400>95

[1050] Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg

[1051] 1 5 10 15

[1052] Asp

[1053] <210>96

[1054] <211>9

[1055] <212>PRT

[1056] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1057] <400>96

[1058] Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr

[1059] 1 5

[1060] <210>97

[1061] <211>118

[1062] <212>PRT

[1063] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1064] <400>97

[1065] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly

[1066] 1 5 10 15

[1067] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Ser Asn

[1068] 20 25 30

[1069] Asn Trp Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

[1070] 35 40 45

[1071] Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys

[1072] 50 55 60

[1073] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ala Ser Ser Asn Thr Ala

[1074] 65 70 75 80

[1075] Tyr Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe

[1076] 85 90 95

[1077] Cys Ala Arg Glu Gly Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[1078] 100 105 110

[1079] Leu Val Thr Val Ser Ala

[1080] 115

[1081] <210>98

[1082] <211>5

[1083] <212>PRT

[1084] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1085] <400>98

[1086] Asn Asn Trp Ile Gln

[1087] 1 5

[1088] <210>99

[1089] <211>17

[1090] <212>PRT

[1091] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1092] <400>99

[1093] Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

[1094] 1 5 10 15

[1095] Gly

[1096] <210>100

[1097] <211>8

[1098] <212>PRT

[1099] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1100] <400>100

[1101] Glu Gly Ala Ser Trp Phe Ala Tyr

[1102] 1 5

[1103] <210>101

[1104] <211>118

[1105] <212>PRT

[1106] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1107] <400>101

[1108] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly

[1109] 1 5 10 15

[1110] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Ser Ile Ser Asn

[1111] 20 25 30

[1112] His Trp Ile Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

[1113] 35 40 45

[1114] Ile Gly Glu Ile Leu Thr Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys

[1115] 50 55 60

[1116] Leu Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

[1117] 65 70 75 80

[1118] Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[1119] 85 90 95

[1120] Cys Ala Arg Glu Gly Ser Ser Trp Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr

[1121] 100 105 110

[1122] Leu Val Thr Val Ser Ala

[1123] 115

[1124] <210>102

[1125] <211>5

[1126] <212>PRT

[1127] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1128] <400>102

[1129] Asn His Trp Ile Gln

[1130] 1 5

[1131] <210>103

[1132] <211>17

[1133] <212>PRT

[1134] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1135] <400>103

[1136] Glu Ile Leu Thr Gly Ser Asp Thr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys

[1137] 1 5 10 15

[1138] Gly

[1139] <210>104

[1140] <211>8

[1141] <212>PRT

[1142] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1143] <400>104

[1144] Glu Gly Ser Ser Trp Phe Ala His

[1145] 1 5

[1146] <210>105

[1147] <211>118

[1148] <212>PRT

[1149] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1150] <400>105

[1151] Met Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly

[1152] 1 5 10 15

[1153] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[1154] 20 25 30

[1155] Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[1156] 35 40 45

[1157] Ile Gly Trp Ser Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys

[1158] 50 55 60

[1159] Phe Gln Gly Lys Ala Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Ile Ala

[1160] 65 70 75 80

[1161] Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1162] 85 90 95

[1163] Cys Ala Arg Gly Gly Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[1164] 100 105 110

[1165] Ser Val Thr Val Ser Ser

[1166] 115

[1167] <210>106

[1168] <211>5

[1169] <212>PRT

[1170] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1171] <400>106

[1172] Asp Tyr Tyr Met His

[1173] 1 5

[1174] <210>107

[1175] <211>17

[1176] <212>PRT

[1177] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1178] <400>107

[1179] Trp Ser Asp Pro Glu Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

[1180] 1 5 10 15

[1181] Gly

[1182] <210>108

[1183] <211>8

[1184] <212>PRT

[1185] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1186] <400>108

[1187] Gly Gly Arg Arg Ala Met Asp Tyr

[1188] 1 5

[1189] <210>109

[1190] <211>119

[1191] <212>PRT

[1192] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1193] <400>109

[1194] Met Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

[1195] 1 5 10 15

[1196] Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

[1197] 20 25 30

[1198] Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu

[1199] 35 40 45

[1200] Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Asn Pro Ser

[1201] 50 55 60

[1202] Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[1203] 65 70 75 80

[1204] Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

[1205] 85 90 95

[1206] Cys Ala Arg Gly Gly Ser Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

[1207] 100 105 110

[1208] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[1209] 115

[1210] <210>110

[1211] <211>6

[1212] <212>PRT

[1213] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1214] <400>110

[1215] Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

[1216] 1 5

[1217] <210>111

[1218] <211>16

[1219] <212>PRT

[1220] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1221] <400>111

[1222] Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

[1223] 1 5 10 15

[1224] <210>112

[1225] <211>9

[1226] <212>PRT

[1227] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1228] <400>112

[1229] Gly Gly Ser Gly His Ala Met Asp Tyr

[1230] 1 5

[1231] <210>113

[1232] <211>123

[1233] <212>PRT

[1234] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1235] <400>113

[1236] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[1237] 1 5 10 15

[1238] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn

[1239] 20 25 30

[1240] Tyr Leu Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[1241] 35 40 45
[1242] Ile Gly Phe Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys
[1243] 50 55 60
[1244] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[1245] 65 70 75 80
[1246] Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
[1247] 85 90 95
[1248] Cys Ala Arg Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
[1249] 100 105 110
[1250] Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1251] 115 120
[1252] <210>114
[1253] <211>5
[1254] <212>PRT
[1255] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1256] <400>114
[1257] Asn Tyr Leu Met His
[1258] 1 5
[1259] <210>115
[1260] <211>17
[1261] <212>PRT
[1262] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1263] <400>115
[1264] Phe Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[1265] 1 5 10 15
[1266] Gly
[1267] <210>116
[1268] <211>13
[1269] <212>PRT
[1270] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1271] <400>116
[1272] Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
[1273] 1 5 10
[1274] <210>117
[1275] <211>128
[1276] <212>PRT
[1277] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1278] <400>117

[1279] Met Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Lys Pro Gly
[1280] 1 5 10 15
[1281] Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
[1282] 20 25 30
[1283] Asn Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Ser Leu Glu Trp
[1284] 35 40 45
[1285] Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
[1286] 50 55 60
[1287] Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Leu Lys Asn Ile Leu
[1288] 65 70 75 80
[1289] Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
[1290] 85 90 95
[1291] Cys Ala Arg His Glu Ala Ser Ile Met Ile Thr Thr Gly Arg Ile Trp
[1292] 100 105 110
[1293] Ala Trp Phe Gly Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[1294] 115 120 125
[1295] <210>118
[1296] <211>5
[1297] <212>PRT
[1298] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1299] <400>118
[1300] Ser Asn Ala Met Ser
[1301] 1 5
[1302] <210>119
[1303] <211>17
[1304] <212>PRT
[1305] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1306] <400>119
[1307] Thr Ile Ser Ser Ala Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
[1308] 1 5 10 15
[1309] Gly
[1310] <210>120
[1311] <211>18
[1312] <212>PRT
[1313] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1314] <400>120
[1315] His Glu Ala Ser Ile Met Ile Thr Thr Gly Arg Ile Trp Ala Trp Phe
[1316] 1 5 10 15
[1317] Gly Asn

[1318] <210>121

[1319] <211>124

[1320] <212>PRT

[1321] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1322] <400>121

[1323] Met Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

[1324] 1 5 10 15

[1325] Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg

[1326] 20 25 30

[1327] Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

[1328] 35 40 45

[1329] Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Asn Tyr His Pro Asp Ser

[1330] 50 55 60

[1331] Val Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Leu

[1332] 65 70 75 80

[1333] Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

[1334] 85 90 95

[1335] Cys Val Arg His Val Leu Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Ile Asp

[1336] 100 105 110

[1337] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[1338] 115 120

[1339] <210>122

[1340] <211>5

[1341] <212>PRT

[1342] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1343] <400>122

[1344] Arg Tyr Ala Met Ser

[1345] 1 5

[1346] <210>123

[1347] <211>17

[1348] <212>PRT

[1349] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1350] <400>123

[1351] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Asn Tyr His Pro Asp Ser Val Lys

[1352] 1 5 10 15

[1353] Asp

[1354] <210>124

[1355] <211>14

[1356] <212>PRT

[1357] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1358] <400>124

[1359] His Val Leu Leu Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Ile Asp Tyr

[1360] 1 5 10

[1361] <210>125

[1362] <211>124

[1363] <212>PRT

[1364] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1365] <400>125

[1366] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly

[1367] 1 5 10 15

[1368] Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg

[1369] 20 25 30

[1370] Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

[1371] 35 40 45

[1372] Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

[1373] 50 55 60

[1374] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu

[1375] 65 70 75 80

[1376] Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

[1377] 85 90 95

[1378] Cys Ala Arg His Val Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp

[1379] 100 105 110

[1380] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[1381] 115 120

[1382] <210>126

[1383] <211>5

[1384] <212>PRT

[1385] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1386] <400>126

[1387] Arg Tyr Thr Met Ser

[1388] 1 5

[1389] <210>127

[1390] <211>17

[1391] <212>PRT

[1392] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1393] <400>127

[1394] Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

[1395] 1 5 10 15

[1396] Gly

[1397] <210>128

[1398] <211>14

[1399] <212>PRT

[1400] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1401] <400>128

[1402] His Val Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp Tyr

[1403] 1 5 10

[1404] <210>129

[1405] <211>124

[1406] <212>PRT

[1407] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1408] <400>129

[1409] Met Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

[1410] 1 5 10 15

[1411] Arg Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg

[1412] 20 25 30

[1413] Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

[1414] 35 40 45

[1415] Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

[1416] 50 55 60

[1417] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu

[1418] 65 70 75 80

[1419] Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1420] 85 90 95

[1421] Cys Val Arg His Val Leu Gln Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp

[1422] 100 105 110

[1423] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[1424] 115 120

[1425] <210>130

[1426] <211>5

[1427] <212>PRT

[1428] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1429] <400>130

[1430] Arg Tyr Thr Met Ser

[1431] 1 5

[1432] <210>131

[1433] <211>17

[1434] <212>PRT

[1435] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1436] <400>131

[1437] Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

[1438] 1 5 10 15

[1439] Gly

[1440] <210>132

[1441] <211>14

[1442] <212>PRT

[1443] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1444] <400>132

[1445] His Val Leu Gln Thr Thr Ile Gly Tyr Tyr Ala Val Asp Tyr

[1446] 1 5 10

[1447] <210>133

[1448] <211>124

[1449] <212>PRT

[1450] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1451] <400>133

[1452] Met Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly

[1453] 1 5 10 15

[1454] Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg

[1455] 20 25 30

[1456] Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

[1457] 35 40 45

[1458] Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

[1459] 50 55 60

[1460] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Gln Asn Thr Leu

[1461] 65 70 75 80

[1462] Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

[1463] 85 90 95

[1464] Cys Ala Arg His Leu Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Met Asp

[1465] 100 105 110

[1466] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[1467] 115 120

[1468] <210>134

[1469] <211>5

[1470] <212>PRT

[1471] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1472] <400>134

[1473] Arg Tyr Ala Met Ser

[1474] 1 5

[1475] <210>135

[1476] <211>17

[1477] <212>PRT

[1478] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1479] <400>135

[1480] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

[1481] 1 5 10 15

[1482] Gly

[1483] <210>136

[1484] <211>14

[1485] <212>PRT

[1486] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1487] <400>136

[1488] His Leu Leu Gln Thr Met Ile Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

[1489] 1 5 10

[1490] <210>137

[1491] <211>120

[1492] <212>PRT

[1493] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1494] <400>137

[1495] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[1496] 1 5 10 15

[1497] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

[1498] 20 25 30

[1499] His Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

[1500] 35 40 45

[1501] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Phe Asp Thr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys

[1502] 50 55 60

[1503] Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Arg Thr Ala

[1504] 65 70 75 80

[1505] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1506] 85 90 95

[1507] Cys Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Arg Phe Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

[1508] 100 105 110

[1509] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[1510] 115 120

[1511] <210>138

[1512] <211>5

[1513] <212>PRT
[1514] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1515] <400>138
[1516] Asp His Asn Met Asp
[1517] 1 5
[1518] <210>139
[1519] <211>17
[1520] <212>PRT
[1521] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1522] <400>139
[1523] Asp Ile Asn Pro Asn Phe Asp Thr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
[1524] 1 5 10 15
[1525] Gly
[1526] <210>140
[1527] <211>10
[1528] <212>PRT
[1529] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1530] <400>140
[1531] Arg Gly Tyr Tyr Arg Phe Asp Leu Asp Tyr
[1532] 1 5 10
[1533] <210>141
[1534] <211>120
[1535] <212>PRT
[1536] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1537] <400>141
[1538] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Phe Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
[1539] 1 5 10 15
[1540] Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp
[1541] 20 25 30
[1542] Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
[1543] 35 40 45
[1544] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys
[1545] 50 55 60
[1546] Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[1547] 65 70 75 80
[1548] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1549] 85 90 95
[1550] Cys Ala Arg Arg Lys Arg Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[1551] 100 105 110

[1552] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[1553] 115 120
[1554] <210>142
[1555] <211>5
[1556] <212>PRT
[1557] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1558] <400>142
[1559] Asp Asn Asn Met Asp
[1560] 1 5
[1561] <210>143
[1562] <211>17
[1563] <212>PRT
[1564] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1565] <400>143
[1566] Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[1567] 1 5 10 15
[1568] Gly
[1569] <210>144
[1570] <211>11
[1571] <212>PRT
[1572] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1573] <400>144
[1574] Arg Arg Lys Arg Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[1575] 1 5 10
[1576] <210>145
[1577] <211>120
[1578] <212>PRT
[1579] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1580] <400>145
[1581] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
[1582] 1 5 10 15
[1583] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[1584] 20 25 30
[1585] Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
[1586] 35 40 45
[1587] Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Met Tyr Asn Gln Lys
[1588] 50 55 60
[1589] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[1590] 65 70 75 80

[1591] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1592] 85 90 95
[1593] Cys Ala Arg Arg Ile Arg Arg Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
[1594] 100 105 110
[1595] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[1596] 115 120
[1597] <210>146
[1598] <211>5
[1599] <212>PRT
[1600] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1601] <400>146
[1602] Asp Asn Asn Met Asp
[1603] 1 5
[1604] <210>147
[1605] <211>17
[1606] <212>PRT
[1607] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1608] <400>147
[1609] Asp Val Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Met Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[1610] 1 5 10 15
[1611] Gly
[1612] <210>148
[1613] <211>10
[1614] <212>PRT
[1615] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1616] <400>148
[1617] Arg Ile Arg Arg Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
[1618] 1 5 10
[1619] <210>149
[1620] <211>120
[1621] <212>PRT
[1622] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1623] <400>149
[1624] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
[1625] 1 5 10 15
[1626] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[1627] 20 25 30
[1628] Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
[1629] 35 40 45

[1630] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Asn Gln Lys
[1631] 50 55 60
[1632] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala
[1633] 65 70 75 80
[1634] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1635] 85 90 95
[1636] Cys Ala Arg Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
[1637] 100 105 110
[1638] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1639] 115 120
[1640] <210>150
[1641] <211>5
[1642] <212>PRT
[1643] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1644] <400>150
[1645] Asp Asn Asn Met Asp
[1646] 1 5
[1647] <210>151
[1648] <211>17
[1649] <212>PRT
[1650] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1651] <400>151
[1652] Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[1653] 1 5 10 15
[1654] Gly
[1655] <210>152
[1656] <211>10
[1657] <212>PRT
[1658] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1659] <400>152
[1660] Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr
[1661] 1 5 10
[1662] <210>153
[1663] <211>120
[1664] <212>PRT
[1665] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1666] <400>153
[1667] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
[1668] 1 5 10 15

[1669] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[1670] 20 25 30
[1671] His Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp
[1672] 35 40 45
[1673] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Val Ile Ser Asp Gln Lys
[1674] 50 55 60
[1675] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[1676] 65 70 75 80
[1677] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[1678] 85 90 95
[1679] Cys Ala Arg Arg Leu Arg Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[1680] 100 105 110
[1681] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[1682] 115 120
[1683] <210>154
[1684] <211>5
[1685] <212>PRT
[1686] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1687] <400>154
[1688] Asp His Asn Met Asp
[1689] 1 5
[1690] <210>155
[1691] <211>17
[1692] <212>PRT
[1693] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1694] <400>155
[1695] Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Val Ile Ser Asp Gln Lys Phe Lys
[1696] 1 5 10 15
[1697] Gly
[1698] <210>156
[1699] <211>10
[1700] <212>PRT
[1701] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1702] <400>156
[1703] Arg Leu Arg Gly Gly Phe Ala Met Asp Tyr
[1704] 1 5 10
[1705] <210>157
[1706] <211>120
[1707] <212>PRT

[1708] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1709] <400>157

[1710] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly

[1711] 1 5 10 15

[1712] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

[1713] 20 25 30

[1714] Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

[1715] 35 40 45

[1716] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Lys Gln Asn

[1717] 50 55 60

[1718] Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala

[1719] 65 70 75 80

[1720] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1721] 85 90 95

[1722] Cys Ala Arg Arg Met Arg Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

[1723] 100 105 110

[1724] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[1725] 115 120

[1726] <210>158

[1727] <211>5

[1728] <212>PRT

[1729] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1730] <400>158

[1731] Asp Tyr Asn Met Asp

[1732] 1 5

[1733] <210>159

[1734] <211>17

[1735] <212>PRT

[1736] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1737] <400>159

[1738] Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ile Tyr Lys Gln Asn Phe Lys

[1739] 1 5 10 15

[1740] Gly

[1741] <210>160

[1742] <211>10

[1743] <212>PRT

[1744] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1745] <400>160

[1746] Arg Met Arg Arg Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

[1747] 1 5 10

[1748] <210>161

[1749] <211>120

[1750] <212>PRT

[1751] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1752] <400>161

[1753] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[1754] 1 5 10 15

[1755] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

[1756] 20 25 30

[1757] Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp

[1758] 35 40 45

[1759] Ile Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys

[1760] 50 55 60

[1761] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[1762] 65 70 75 80

[1763] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1764] 85 90 95

[1765] Cys Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[1766] 100 105 110

[1767] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[1768] 115 120

[1769] <210>162

[1770] <211>5

[1771] <212>PRT

[1772] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1773] <400>162

[1774] Asp Asn Asn Met Asp

[1775] 1 5

[1776] <210>163

[1777] <211>17

[1778] <212>PRT

[1779] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1780] <400>163

[1781] Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[1782] 1 5 10 15

[1783] Gly

[1784] <210>164

[1785] <211>10

[1786] <212>PRT

[1787] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1788] <400>164

[1789] Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

[1790] 1 5 10

[1791] <210>165

[1792] <211>120

[1793] <212>PRT

[1794] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1795] <400>165

[1796] Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Thr Pro Gly

[1797] 1 5 10 15

[1798] Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

[1799] 20 25 30

[1800] Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

[1801] 35 40 45

[1802] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys

[1803] 50 55 60

[1804] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[1805] 65 70 75 80

[1806] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[1807] 85 90 95

[1808] Cys Ala Arg Arg Val Arg Arg Gly Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[1809] 100 105 110

[1810] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[1811] 115 120

[1812] <210>166

[1813] <211>5

[1814] <212>PRT

[1815] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1816] <400>166

[1817] Asp Asn Asn Met Asp

[1818] 1 5

[1819] <210>167

[1820] <211>17

[1821] <212>PRT

[1822] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1823] <400>167

[1824] Asp Ile Asn Pro Asn Tyr Asp Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[1825] 1 5 10 15

[1826] Gly

[1827] <210>168

[1828] <211>10

[1829] <212>PRT

[1830] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1831] <400>168

[1832] Arg Val Arg Arg Gly Tyr His Phe Asp Tyr

[1833] 1 5 10

[1834] <210>169

[1835] <211>122

[1836] <212>PRT

[1837] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1838] <400>169

[1839] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[1840] 1 5 10 15

[1841] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu

[1842] 20 25 30

[1843] Asn Ala Leu Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

[1844] 35 40 45

[1845] Ile Gly Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys

[1846] 50 55 60

[1847] Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[1848] 65 70 75 80

[1849] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[1850] 85 90 95

[1851] Cys Ala Arg Ser Gly Gly Arg Gly Gln Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp

[1852] 100 105 110

[1853] Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[1854] 115 120

[1855] <210>170

[1856] <211>5

[1857] <212>PRT

[1858] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1859] <400>170

[1860] Glu Asn Ala Leu Tyr

[1861] 1 5

[1862] <210>171

[1863] <211>17

[1864] <212>PRT

[1865] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1866] <400>171

[1867] Ile Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[1868] 1 5 10 15

[1869] Asp

[1870] <210>172

[1871] <211>12

[1872] <212>PRT

[1873] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1874] <400>172

[1875] Ser Gly Gly Arg Gly Gln Pro Tyr Tyr Phe Asp TyT

[1876] 1 5 10

[1877] <210>173

[1878] <211>118

[1879] <212>PRT

[1880] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1881] <400>173

[1882] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly

[1883] 1 5 10 15

[1884] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

[1885] 20 25 30

[1886] Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[1887] 35 40 45

[1888] Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys

[1889] 50 55 60

[1890] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[1891] 65 70 75 80

[1892] Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

[1893] 85 90 95

[1894] Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

[1895] 100 105 110

[1896] Leu Val Thr Val Ser Ala

[1897] 115

[1898] <210>174

[1899] <211>5

[1900] <212>PRT

[1901] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1902] <400>174

[1903] Ser Tyr Trp Met Gln
[1904] 1 5
[1905] <210>175
[1906] <211>17
[1907] <212>PRT
[1908] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1909] <400>175
[1910] Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
[1911] 1 5 10 15
[1912] Gly
[1913] <210>176
[1914] <211>8
[1915] <212>PRT
[1916] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1917] <400>176
[1918] Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr
[1919] 1 5
[1920] <210>177
[1921] <211>118
[1922] <212>PRT
[1923] <213>小家鼠(Mus musculus)
[1924] <400>177
[1925] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
[1926] 1 5 10 15
[1927] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
[1928] 20 25 30
[1929] Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[1930] 35 40 45
[1931] Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Ile Thr Gln Lys
[1932] 50 55 60
[1933] Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[1934] 65 70 75 80
[1935] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
[1936] 85 90 95
[1937] Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[1938] 100 105 110
[1939] Leu Val Thr Val Ser Ala
[1940] 115
[1941] <210>178

[1942] <211>5

[1943] <212>PRT

[1944] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1945] <400>178

[1946] Asn Tyr Trp Met Gln

[1947] 1 5

[1948] <210>179

[1949] <211>17

[1950] <212>PRT

[1951] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1952] <400>179

[1953] Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Ile Thr Gln Lys Phe Arg

[1954] 1 5 10 15

[1955] Gly

[1956] <210>180

[1957] <211>8

[1958] <212>PRT

[1959] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1960] <400>180

[1961] Asp Gly Tyr Asp Leu Phe Ala Tyr

[1962] 1 5

[1963] <210>181

[1964] <211>117

[1965] <212>PRT

[1966] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1967] <400>181

[1968] Met Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

[1969] 1 5 10 15

[1970] Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser

[1971] 20 25 30

[1972] Gly Tyr Tyr Leu Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly His Lys Leu Glu

[1973] 35 40 45

[1974] Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Arg Tyr Asn Pro Ser

[1975] 50 55 60

[1976] Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

[1977] 65 70 75 80

[1978] Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

[1979] 85 90 95

[1980] Cys Ala Ser Phe Phe Tyr Gly Lys His Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr

[1981] 100 105 110

[1982] Leu Thr Val Ser Ser

[1983] 115

[1984] <210>182

[1985] <211>6

[1986] <212>PRT

[1987] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1988] <400>182

[1989] Ser Gly Tyr Tyr Leu Asn

[1990] 1 5

[1991] <210>183

[1992] <211>16

[1993] <212>PRT

[1994] <213>小家鼠(Mus musculus)

[1995] <400>183

[1996] Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

[1997] 1 5 10 15

[1998] <210>184

[1999] <211>7

[2000] <212>PRT

[2001] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2002] <400>184

[2003] Phe Phe Tyr Gly Lys His Asp

[2004] 1 5

[2005] <210>185

[2006] <211>115

[2007] <212>PRT

[2008] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2009] <400>185

[2010] Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[2011] 1 5 10 15

[2012] Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg

[2013] 20 25 30

[2014] Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

[2015] 35 40 45

[2016] Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys

[2017] 50 55 60

[2018] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[2019] 65 70 75 80

[2020] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
[2021] 85 90 95
[2022] Cys Ala Arg Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
[2023] 100 105 110
[2024] Val Ser Ser
[2025] 115
[2026] <210>186
[2027] <211>5
[2028] <212>PRT
[2029] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2030] <400>186
[2031] Arg Ser Trp Met Asn
[2032] 1 5
[2033] <210>187
[2034] <211>17
[2035] <212>PRT
[2036] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2037] <400>187
[2038] Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
[2039] 1 5 10 15
[2040] Gly
[2041] <210>188
[2042] <211>5
[2043] <212>PRT
[2044] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2045] <400>188
[2046] Gly Gly Leu Asp Tyr
[2047] 1 5
[2048] <210>189
[2049] <211>119
[2050] <212>PRT
[2051] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2052] <400>189
[2053] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
[2054] 1 5 10 15
[2055] Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg
[2056] 20 25 30
[2057] Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
[2058] 35 40 45

[2059] Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
[2060] 50 55 60
[2061] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[2062] 65 70 75 80
[2063] Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
[2064] 85 90 95
[2065] Cys Ala Arg Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[2066] 100 105 110
[2067] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[2068] 115
[2069] <210>190
[2070] <211>5
[2071] <212>PRT
[2072] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2073] <400>190
[2074] Arg Tyr Trp Met Asn
[2075] 1 5
[2076] <210>191
[2077] <211>17
[2078] <212>PRT
[2079] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2080] <400>191
[2081] Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
[2082] 1 5 10 15
[2083] Gly
[2084] <210>192
[2085] <211>9
[2086] <212>PRT
[2087] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2088] <400>192
[2089] Gly Arg Gly Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
[2090] 1 5
[2091] <210>193
[2092] <211>120
[2093] <212>PRT
[2094] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2095] <400>193
[2096] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
[2097] 1 5 10 15

[2098] Ala Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
[2099] 20 25 30
[2100] Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp
[2101] 35 40 45
[2102] Ile Gly Asp Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys
[2103] 50 55 60
[2104] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
[2105] 65 70 75 80
[2106] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[2107] 85 90 95
[2108] Cys Ala Arg Arg Pro Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[2109] 100 105 110
[2110] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[2111] 115 120
[2112] <210>194
[2113] <211>5
[2114] <212>PRT
[2115] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2116] <400>194
[2117] Asp Tyr Asn Met Asp
[2118] 1 5
[2119] <210>195
[2120] <211>17
[2121] <212>PRT
[2122] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2123] <400>195
[2124] Asp Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[2125] 1 5 10 15
[2126] Gly
[2127] <210>196
[2128] <211>10
[2129] <212>PRT
[2130] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2131] <400>196
[2132] Arg Pro Val Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
[2133] 1 5 10
[2134] <210>197
[2135] <211>120
[2136] <212>PRT

[2137] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2138] <400>197

[2139] Met His Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

[2140] 1 5 10 15

[2141] Ala Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

[2142] 20 25 30

[2143] Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp

[2144] 35 40 45

[2145] Ile Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys

[2146] 50 55 60

[2147] Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

[2148] 65 70 75 80

[2149] Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[2150] 85 90 95

[2151] Cys Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Gly Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[2152] 100 105 110

[2153] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[2154] 115 120

[2155] <210>198

[2156] <211>5

[2157] <212>PRT

[2158] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2159] <400>198

[2160] Asp Asn Asn Met Asp

[2161] 1 5

[2162] <210>199

[2163] <211>17

[2164] <212>PRT

[2165] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2166] <400>199

[2167] Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

[2168] 1 5 10 15

[2169] Gly

[2170] <210>200

[2171] <211>10

[2172] <212>PRT

[2173] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2174] <400>200

[2175] Arg Gly Tyr Tyr Gly Arg Thr Phe Asp Tyr

[2176] 1 5 10

[2177] <210>201

[2178] <211>117

[2179] <212>PRT

[2180] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2181] <400>201

[2182] Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

[2183] 1 5 10 15

[2184] Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp

[2185] 20 25 30

[2186] Asp Tyr Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp

[2187] 35 40 45

[2188] Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys

[2189] 50 55 60

[2190] Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala

[2191] 65 70 75 80

[2192] Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

[2193] 85 90 95

[2194] Cys Thr Tyr Gly Ile Tyr Val Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

[2195] 100 105 110

[2196] Leu Thr Val Ser Ser

[2197] 115

[2198] <210>202

[2199] <211>5

[2200] <212>PRT

[2201] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2202] <400>202

[2203] Asp Asp Tyr Met His

[2204] 1 5

[2205] <210>203

[2206] <211>17

[2207] <212>PRT

[2208] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2209] <400>203

[2210] Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln

[2211] 1 5 10 15

[2212] Gly

[2213] <210>204

[2214] <211>7

[2215] <212>PRT

[2216] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2217] <400>204

[2218] Gly Ile Tyr Val Arg Gly Tyr

[2219] 1 5

[2220] <210>205

[2221] <211>107

[2222] <212>PRT

[2223] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2224] <400>205

[2225] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

[2226] 1 5 10 15

[2227] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

[2228] 20 25 30

[2229] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

[2230] 35 40 45

[2231] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

[2232] 50 55 60

[2233] Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

[2234] 65 70 75 80

[2235] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr

[2236] 85 90 95

[2237] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

[2238] 100 105

[2239] <210>206

[2240] <211>11

[2241] <212>PRT

[2242] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2243] <400>206

[2244] Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

[2245] 1 5 10

[2246] <210>207

[2247] <211>7

[2248] <212>PRT

[2249] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2250] <400>207

[2251] Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

[2252] 1 5

[2253] <210>208

[2254] <211>8

[2255] <212>PRT

[2256] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2257] <400>208

[2258] Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr

[2259] 1 5

[2260] <210>209

[2261] <211>108

[2262] <212>PRT

[2263] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2264] <400>209

[2265] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

[2266] 1 5 10 15

[2267] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala

[2268] 20 25 30

[2269] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

[2270] 35 40 45

[2271] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

[2272] 50 55 60

[2273] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

[2274] 65 70 75 80

[2275] Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu

[2276] 85 90 95

[2277] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[2278] 100 105

[2279] <210>210

[2280] <211>11

[2281] <212>PRT

[2282] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2283] <400>210

[2284] Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala

[2285] 1 5 10

[2286] <210>211

[2287] <211>7

[2288] <212>PRT

[2289] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2290] <400>211

[2291] Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser

[2292] 1 5

[2293] <210>212

[2294] <211>9

[2295] <212>PRT

[2296] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2297] <400>212

[2298] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

[2299] 1 5

[2300] <210>213

[2301] <211>107

[2302] <212>PRT

[2303] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2304] <400>213

[2305] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly

[2306] 1 5 10 15

[2307] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile

[2308] 20 25 30

[2309] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asp Ala Ser Pro Lys Leu Trp Ile Phe

[2310] 35 40 45

[2311] Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Pro Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser

[2312] 50 55 60

[2313] Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

[2314] 65 70 75 80

[2315] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr

[2316] 85 90 95

[2317] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[2318] 100 105

[2319] <210>214

[2320] <211>10

[2321] <212>PRT

[2322] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2323] <400>214

[2324] Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr

[2325] 1 5 10

[2326] <210>215

[2327] <211>6

[2328] <212>PRT

[2329] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2330] <400>215

[2331] Thr Ser Asn Leu Ala Pro

[2332] 1 5

[2333] <210>216

[2334] <211>9

[2335] <212>PRT

[2336] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2337] <400>216

[2338] Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr

[2339] 1 5

[2340] <210>217

[2341] <211>114

[2342] <212>PRT

[2343] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2344] <400>217

[2345] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly

[2346] 1 5 10 15

[2347] Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

[2348] 20 25 30

[2349] Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

[2350] 35 40 45

[2351] Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

[2352] 50 55 60

[2353] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

[2354] 65 70 75 80

[2355] Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Leu Cys Gln Gln

[2356] 85 90 95

[2357] Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

[2358] 100 105 110

[2359] Lys Arg

[2360] <210>218

[2361] <211>17

[2362] <212>PRT

[2363] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2364] <400>218

[2365] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

[2366] 1 5 10 15

[2367] Ala

[2368] <210>219

[2369] <211>7

[2370] <212>PRT

[2371] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2372] <400>219
[2373] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[2374] 1 5
[2375] <210>220
[2376] <211>9
[2377] <212>PRT
[2378] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2379] <400>220
[2380] Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr
[2381] 1 5
[2382] <210>221
[2383] <211>18
[2384] <212>DNA
[2385] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2386] <220>
[2387] <221>CDS
[2388] <222>(1)..(18)
[2389] <223>
[2390] <400>221
[2391] agt ggt tat tac tgg acc 18
[2392] Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr
[2393] 1 5
[2394] <210>222
[2395] <211>6
[2396] <212>PRT
[2397] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2398] <400>222
[2399] Ser Gly Tyr Tyr Trp Thr
[2400] 1 5
[2401] <210>223
[2402] <211>48
[2403] <212>DNA
[2404] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2405] <220>
[2406] <221>CDS
[2407] <222>(1)..(48)
[2408] <223>
[2409] <400>223

[2410] tac ata tcc ttc gac ggt acc aat gac tac aac cca tct ctc aaa aat 48
[2411] Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
[2412] 1 5 10 15
[2413] <210>224
[2414] <211>16
[2415] <212>PRT
[2416] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2417] <400>224
[2418] Tyr Ile Ser Phe Asp Gly Thr Asn Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
[2419] 1 5 10 15
[2420] <210>225
[2421] <211>18
[2422] <212>DNA
[2423] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2424] <220>
[2425] <221>CDS
[2426] <222>(1)..(18)
[2427] <223>
[2428] <400>225
[2429] ggc ccc ccc tgt act tac 18
[2430] Gly Pro Pro Cys Thr Tyr
[2431] 1 5
[2432] <210>226
[2433] <211>6
[2434] <212>PRT
[2435] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2436] <400>226
[2437] Gly Pro Pro Cys Thr Tyr
[2438] 1 5
[2439] <210>227
[2440] <211>30
[2441] <212>DNA
[2442] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2443] <220>
[2444] <221>CDS
[2445] <222>(1)..(30)
[2446] <223>
[2447] <400>227
[2448] agg gcc acc tca agt gta aat tac att tac 30

[2449] Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr
[2450] 1 5 10
[2451] <210>228
[2452] <211>10
[2453] <212>PRT
[2454] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2455] <400>228
[2456] Arg Ala Thr Ser Ser Val Asn Tyr Ile Tyr
[2457] 1 5 10
[2458] <210>229
[2459] <211>18
[2460] <212>DNA
[2461] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2462] <220>
[2463] <221>CDS
[2464] <222>(1)..(18)
[2465] <223>
[2466] <400>229
[2467] aca tcc aac ctg gct cct 18
[2468] Thr Ser Asn Leu Ala Pro
[2469] 1 5
[2470] <210>230
[2471] <211>6
[2472] <212>PRT
[2473] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2474] <400>230
[2475] Thr Ser Asn Leu Ala Pro
[2476] 1 5
[2477] <210>231
[2478] <211>27
[2479] <212>DNA
[2480] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2481] <220>
[2482] <221>CDS
[2483] <222>(1)..(27)
[2484] <223>
[2485] <400>231
[2486] cag cag ttt tct agt tcc cca tgg acg 27
[2487] Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr

[2488] 1 5

[2489] <210>232

[2490] <211>9

[2491] <212>PRT

[2492] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2493] <400>232

[2494] Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr

[2495] 1 5

[2496] <210>233

[2497] <211>15

[2498] <212>DNA

[2499] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2500] <220>

[2501] <221>CDS

[2502] <222>(1)..(15)

[2503] <223>

[2504] <400>233

[2505] cac ttt gtt ttg cac

[2506] 15

[2507] His Phe Val Leu His

[2508] 1 5

[2509] <210>234

[2510] <211>5

[2511] <212>PRT

[2512] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2513] <400>234

[2514] His Phe Val Leu His

[2515] 1 5

[2516] <210>235

[2517] <211>48

[2518] <212>DNA

[2519] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2520] <220>

[2521] <221>CDS

[2522] <222>(1)..(48)

[2523] <223>

[2524] <400>235

[2525] tat att att cct tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aaa 48

[2526] Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

[2527] 1 5 10 15

[2528] <210>236

[2529] <211>16

[2530] <212>PRT

[2531] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2532] <400>236

[2533] Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

[2534] 1 5 10 15

[2535] <210>237

[2536] <211>39

[2537] <212>DNA

[2538] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2539] <220>

[2540] <221>CDS

[2541] <222>(1)..(39)

[2542] <223>

[2543] <400>237

[2544] ggg aat agg tac gac gta ggt tcc tat gct atg gac tac 39

[2545] Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

[2546] 1 5 10

[2547] <210>238

[2548] <211>13

[2549] <212>PRT

[2550] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2551] <400>238

[2552] Gly Asn Arg Tyr Asp Val Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

[2553] 1 5 10

[2554] <210>239

[2555] <211>51

[2556] <212>DNA

[2557] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2558] <220>

[2559] <221>CDS

[2560] <222>(1)..(51)

[2561] <223>

[2562] <400>239

[2563] aag tcc agt cag agc ctt tta tat agt agc aat caa aag aac tac ttg 48

[2564] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

[2565] 1 5 10 15

[2566] gcc
[2567] 51
[2568] Ala
[2569] <210>240
[2570] <211>17
[2571] <212>PRT
[2572] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2573] <400>240
[2574] Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
[2575] 1 5 10 15
[2576] Ala
[2577] <210>241
[2578] <211>21
[2579] <212>DNA
[2580] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2581] <220>
[2582] <221>CDS
[2583] <222>(1)..(21)
[2584] <223>
[2585] <400>241
[2586] tgg gca tcc act agg gaa tct 21
[2587] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[2588] 1 5
[2589] <210>242
[2590] <211>7
[2591] <212>PRT
[2592] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2593] <400>242
[2594] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
[2595] 1 5
[2596] <210>243
[2597] <211>27
[2598] <212>DNA
[2599] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2600] <220>
[2601] <221>CDS
[2602] <222>(1)..(27)
[2603] <223>
[2604] <400>243

[2605] cag caa tat tat agg ttt ccg tac acg 27

[2606] Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr

[2607] 1 5

[2608] <210>244

[2609] <211>9

[2610] <212>PRT

[2611] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2612] <400>244

[2613] Gln Gln Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr

[2614] 1 5

[2615] <210>245

[2616] <211>15

[2617] <212>DNA

[2618] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2619] <220>

[2620] <221>CDS

[2621] <222>(1)..(15)

[2622] <223>

[2623] <400>245

[2624] agc tcc tgg atg cac

[2625] 15

[2626] Ser Ser Trp Met His

[2627] 1 5

[2628] <210>246

[2629] <211>5

[2630] <212>PRT

[2631] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2632] <400>246

[2633] Ser Ser Trp Met His

[2634] 1 5

[2635] <210>247

[2636] <211>51

[2637] <212>DNA

[2638] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2639] <220>

[2640] <221>CDS

[2641] <222>(1)..(51)

[2642] <223>

[2643] <400>247

[2644] tac att aat cct agc agt ggt tat act aag tac aat cgg aag ttc agg 48
[2645] Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
[2646] 1 5 10 15
[2647] gac
[2648] 51
[2649] Asp
[2650] <210>248
[2651] <211>17
[2652] <212>PRT
[2653] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2654] <400>248
[2655] Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe Arg
[2656] 1 5 10 15
[2657] Asp
[2658] <210>249
[2659] <211>27
[2660] <212>DNA
[2661] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2662] <220>
[2663] <221>CDS
[2664] <222>(1)..(27)
[2665] <223>
[2666] <400>249
[2667] ggg ggt aac ggt tac tac ttt gac tac 27
[2668] Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[2669] 1 5
[2670] <210>250
[2671] <211>9
[2672] <212>PRT
[2673] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2674] <400>250
[2675] Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[2676] 1 5
[2677] <210>251
[2678] <211>33
[2679] <212>DNA
[2680] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2681] <220>
[2682] <221>CDS

[2683] <222>(1)..(33)

[2684] <223>

[2685] <400>251

[2686] aag gcc agt cag gat gtg ggg act gct gta gcc 33

[2687] Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

[2688] 1 5 10

[2689] <210>252

[2690] <211>11

[2691] <212>PRT

[2692] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2693] <400>252

[2694] Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala

[2695] 1 5 10

[2696] <210>253

[2697] <211>21

[2698] <212>DNA

[2699] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2700] <220>

[2701] <221>CDS

[2702] <222>(1)..(21)

[2703] <223>

[2704] <400>253

[2705] tgg gca tcc acc cgg cac act 21

[2706] Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

[2707] 1 5

[2708] <210>254

[2709] <211>7

[2710] <212>PRT

[2711] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2712] <400>254

[2713] Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

[2714] 1 5

[2715] <210>255

[2716] <211>24

[2717] <212>DNA

[2718] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2719] <220>

[2720] <221>CDS

[2721] <222>(1)..(24)

[2722] <223>

[2723] <400>255

[2724] cag caa tat agc aac tat atc acg 24

[2725] Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr

[2726] 1 5

[2727] <210>256

[2728] <211>8

[2729] <212>PRT

[2730] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2731] <400>256

[2732] Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr

[2733] 1 5

[2734] <210>257

[2735] <211>15

[2736] <212>DNA

[2737] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2738] <220>

[2739] <221>CDS

[2740] <222>(1)..(15)

[2741] <223>

[2742] <400>257

[2743] gac aac aac atg gac

[2744] 15

[2745] Asp Asn Asn Met Asp

[2746] 1 5

[2747] <210>258

[2748] <211>5

[2749] <212>PRT

[2750] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2751] <400>258

[2752] Asp Asn Asn Met Asp

[2753] 1 5

[2754] <210>259

[2755] <211>51

[2756] <212>DNA

[2757] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2758] <220>

[2759] <221>CDS

[2760] <222>(1)..(51)

[2761] <223>
[2762] <400>259
[2763] gat att aat act aaa agt ggt ggt tct atc tac aac cag aag ttc aag 48
[2764] Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[2765] 1 5 10 15
[2766] ggc
[2767] 51
[2768] Gly
[2769] <210>260
[2770] <211>17
[2771] <212>PRT
[2772] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2773] <400>260
[2774] Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[2775] 1 5 10 15
[2776] Gly
[2777] <210>261
[2778] <211>30
[2779] <212>DNA
[2780] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2781] <220>
[2782] <221>CDS
[2783] <222>(1)..(30)
[2784] <223>
[2785] <400>261
[2786] agg agg agc tac ggc tac tac ttt gac tac 30
[2787] Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[2788] 1 5 10
[2789] <210>262
[2790] <211>10
[2791] <212>PRT
[2792] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2793] <400>262
[2794] Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
[2795] 1 5 10
[2796] <210>263
[2797] <211>33
[2798] <212>DNA
[2799] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2800] <220>
[2801] <221>CDS
[2802] <222>(1)..(33)
[2803] <223>
[2804] <400>263
[2805] aag gcc agt cag aat gtg ggt act gct gta gcc 33
[2806] Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
[2807] 1 5 10
[2808] <210>264
[2809] <211>11
[2810] <212>PRT
[2811] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2812] <400>264
[2813] Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
[2814] 1 5 10
[2815] <210>265
[2816] <211>21
[2817] <212>DNA
[2818] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2819] <220>
[2820] <221>CDS
[2821] <222>(1)..(21)
[2822] <223>
[2823] <400>265
[2824] tcg gca tcc tac cgg tac agt 21
[2825] Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
[2826] 1 5
[2827] <210>266
[2828] <211>7
[2829] <212>PRT
[2830] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2831] <400>266
[2832] Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
[2833] 1 5
[2834] <210>267
[2835] <211>27
[2836] <212>DNA
[2837] <213>小家鼠(Mus musculus)
[2838] <220>

[2839] <221>CDS

[2840] <222>(1)..(27)

[2841] <223>

[2842] <400>267

[2843] cag caa tat aac agc tat cct ctc acg 27

[2844] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

[2845] 1 5

[2846] <210>268

[2847] <211>9

[2848] <212>PRT

[2849] <213>小家鼠(Mus musculus)

[2850] <400>268

[2851] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

[2852] 1 5

图 1

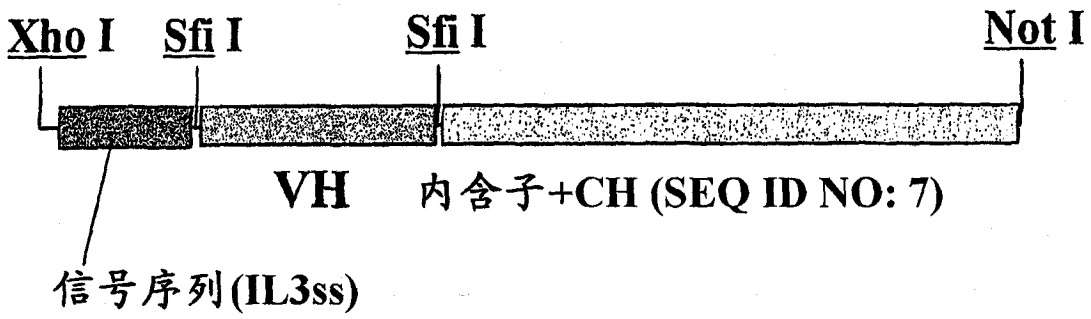
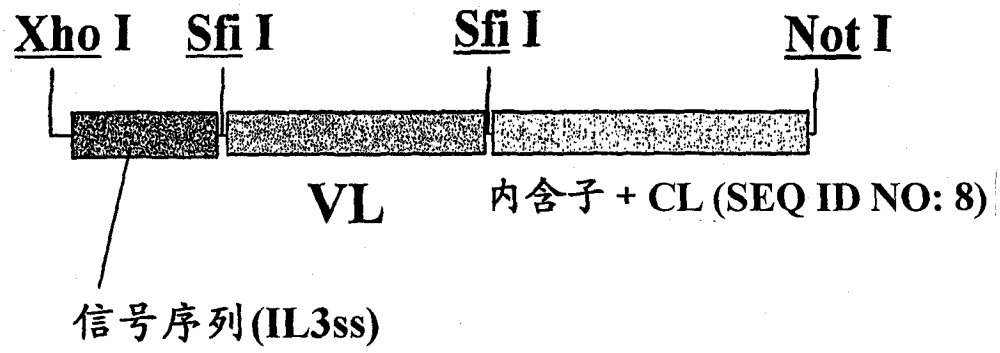

Xho I
Sfi I
Sfi I
Not I
VH
内含子+CH (SEQ ID NO: 7)
信号序列(IL3ss)

图 2


Xho I
Sfi I
Sfi I
Not I
VL
内含子 + CL (SEQ ID NO: 8)
信号序列(IL3ss)

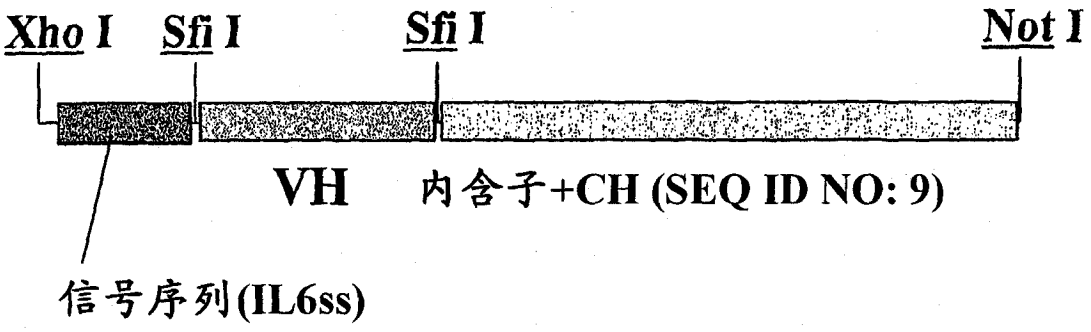

Xho I
Sfi I
Sfi I
Not I
VH
内含子+CH (SEQ ID NO: 9)
信号序列(IL6ss)

图 3

图 4 F.VIIIa 样活性

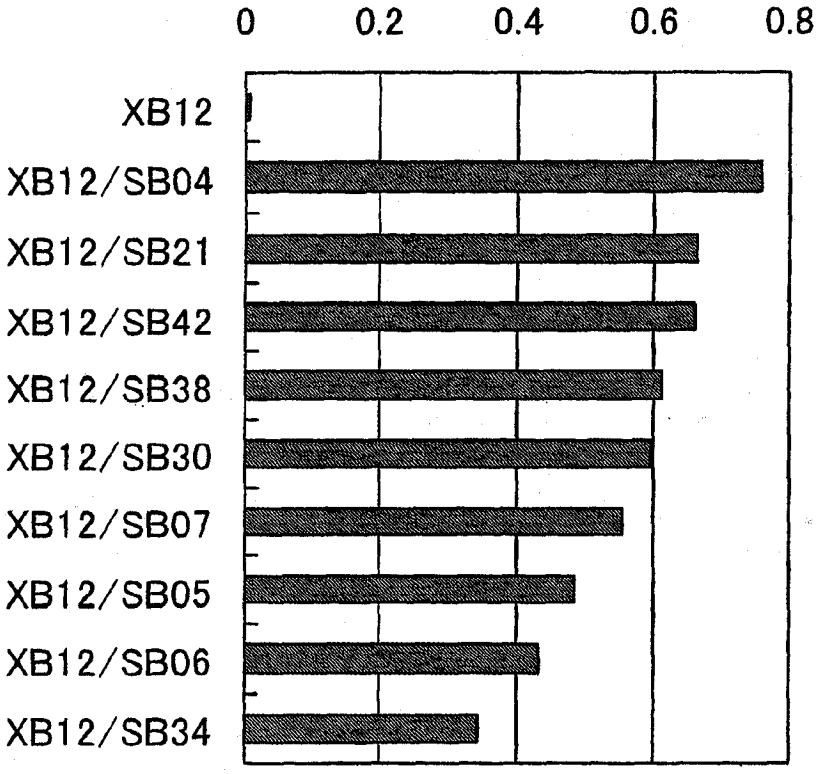


图 5 F.VIIIa 样活性

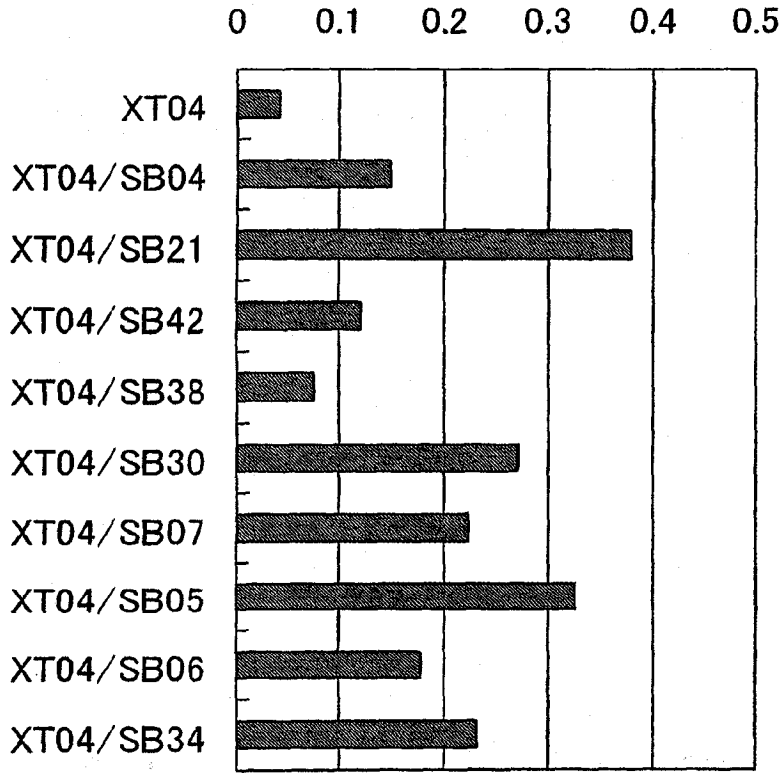
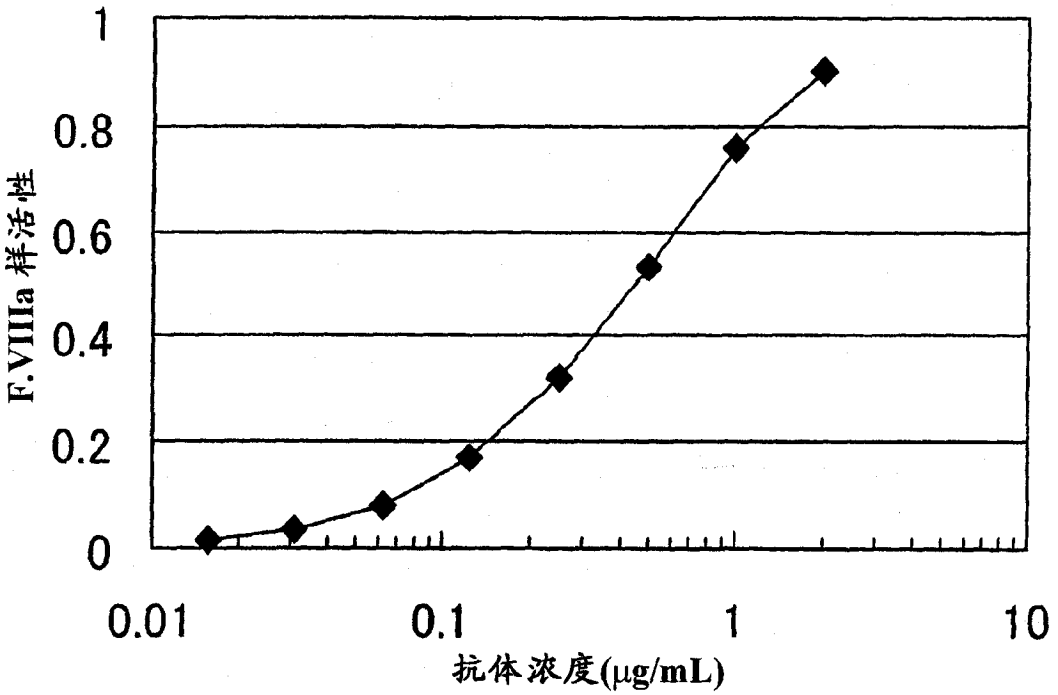


图 6


1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
F.VIIIa 样活性
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)

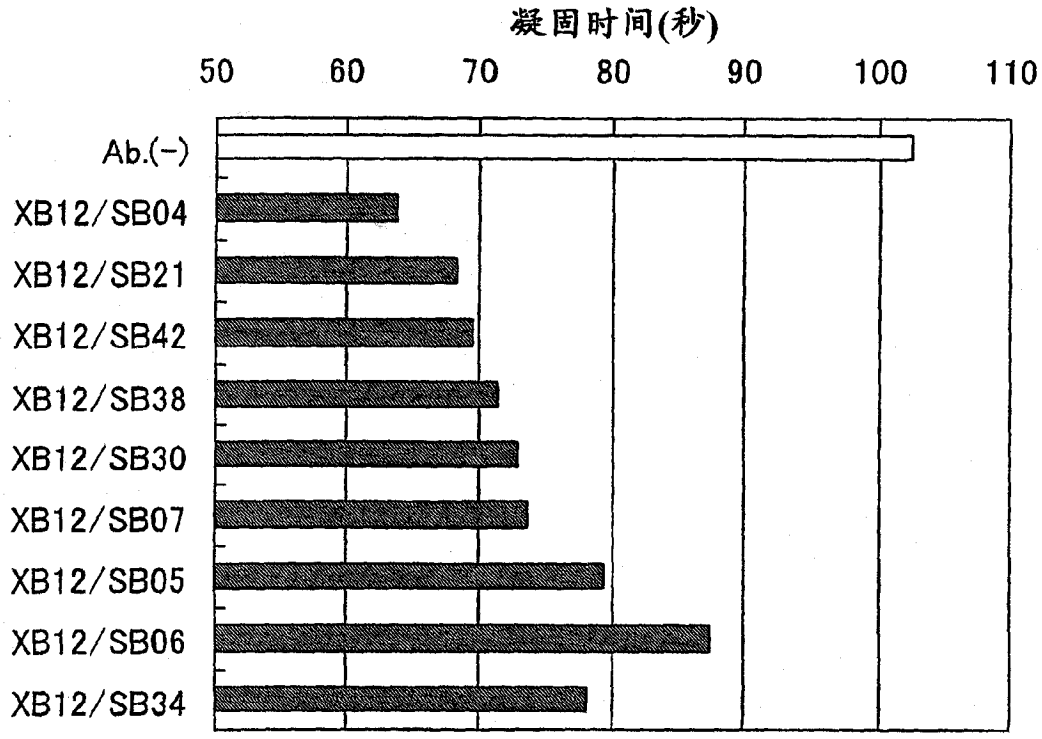

凝固时间(秒)
50
60
70
80
90
100
110
Ab.(-)
XB12/SB04
XB12/SB21
XB12/SB42
XB12/SB38
XB12/SB30
XB12/SB07
XB12/SB05
XB12/SB06
XB12/SB34

图 7

图 8

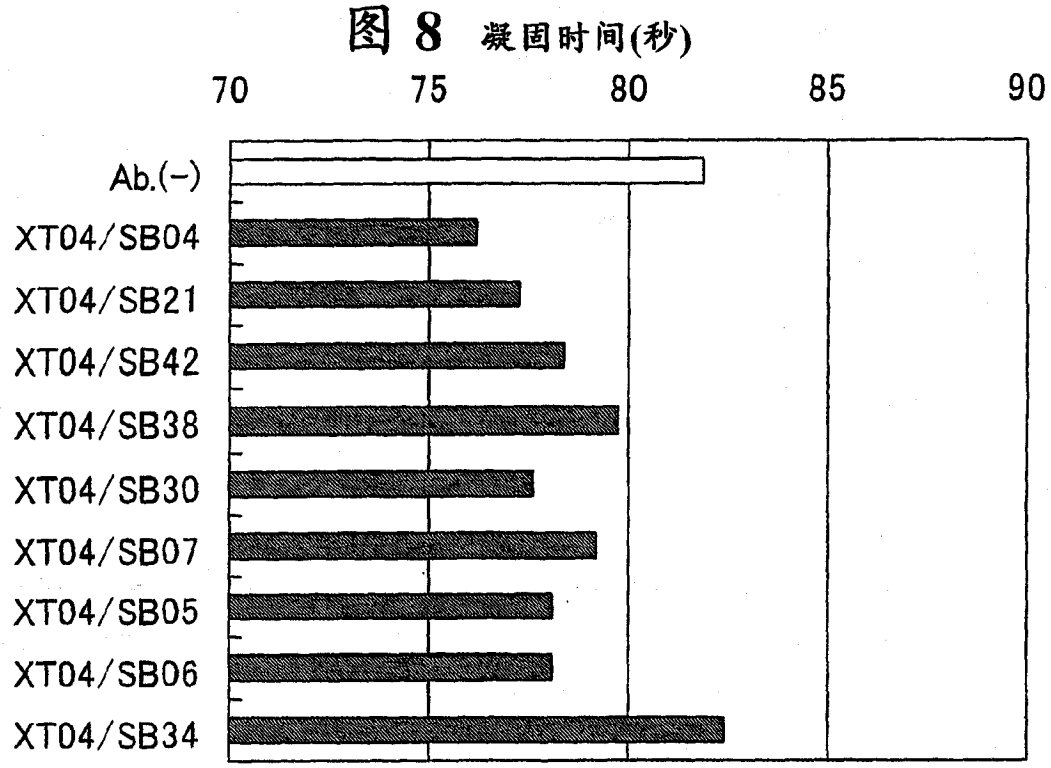

凝固时间(秒)
70
75
80
85
90
Ab.(-)
XT04/SB04
XT04/SB21
XT04/SB42
XT04/SB38
XT04/SB30
XT04/SB07
XT04/SB05
XT04/SB06
XT04/SB34

图 9

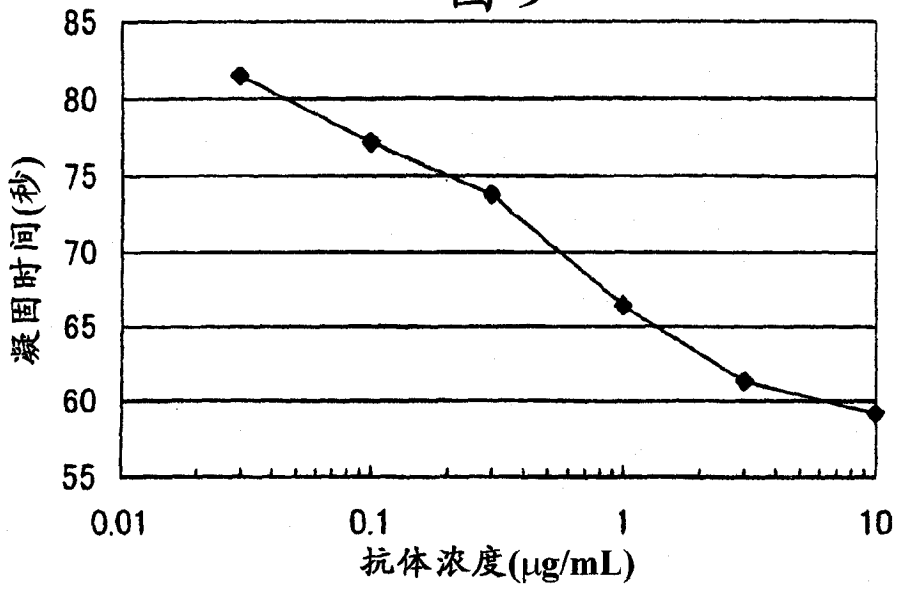

85
80
75
70
65
60
55
凝固时间(秒)
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(μg/mL)

图 10

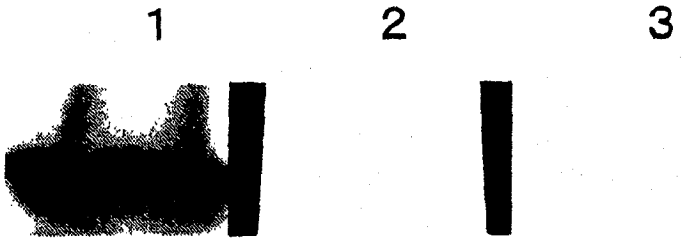

1
2
3

图 11

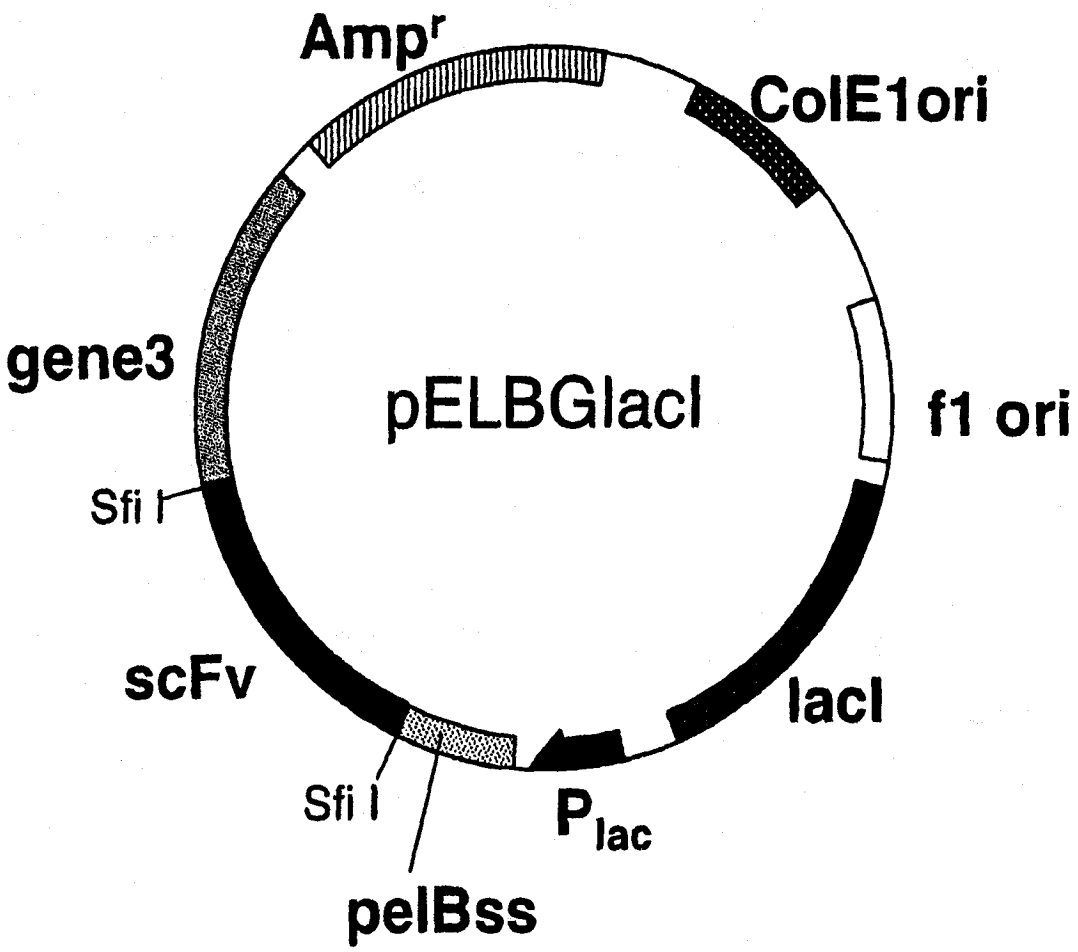

Amp^r
ColE1ori
gene3
pELBGlacI
f1 ori
Sfi I
scFv
lacI
Sfi I
P lac
pelBss

图 12

		抗F. IXa										
		A19	A25	A31	A38	A39	A40	A41	A44	A50	A69	XB12
抗F. X	B2						+					
	B5					+		+				
	B9											+
	B10				+	+	+	+				+
	B11			+	+	+		+		+		+
	B12				+	+	+	+				+
	B13			+		+	+	+				+
	B14				+	+	+	+				+
	B15					+		+				+
	B16			+	+	+		+				+
	B18							+				
	B19								+			
	B20								+			
	B21											
	B23											
	B25											
	B26		+			+		+	+		+	+
	B27					+		+				
	B31	+		+	+	+	+	+				+
	B34-1					+		+				
	B34-2				+	+	+	+				
	B35			+	+	+	+	+		+		+
	B36			+		+		+				
	B38			+	+	+		+				+
	B42							+				
	SB04	+		+	+	+	+	+		+		+
	SB15					+		+				+
	SB27											+

图 13

抗F. X \ 抗F. IXa	A19	A25	A31	A38	A39	A40	A41	A44	A50	A69	XB12
B2								+			
B5								++			
B9											
B10											++
B11									++		++
B12											++
B13											+++
B14								+			++
B15								+			++
B16			+								+++
B18								++			
B19								+			
B20								++			
B21								++			
B23								++			
B25								++			
B26							+	++++		++++	
B27								++			
B31	++										+++
B34-1											
B34-2											
B35			+						++		++
B36											
B38											
B42											
SB04	++		+	++	++		++	++	+++		+++
SB15								++			
SB27											

图 14

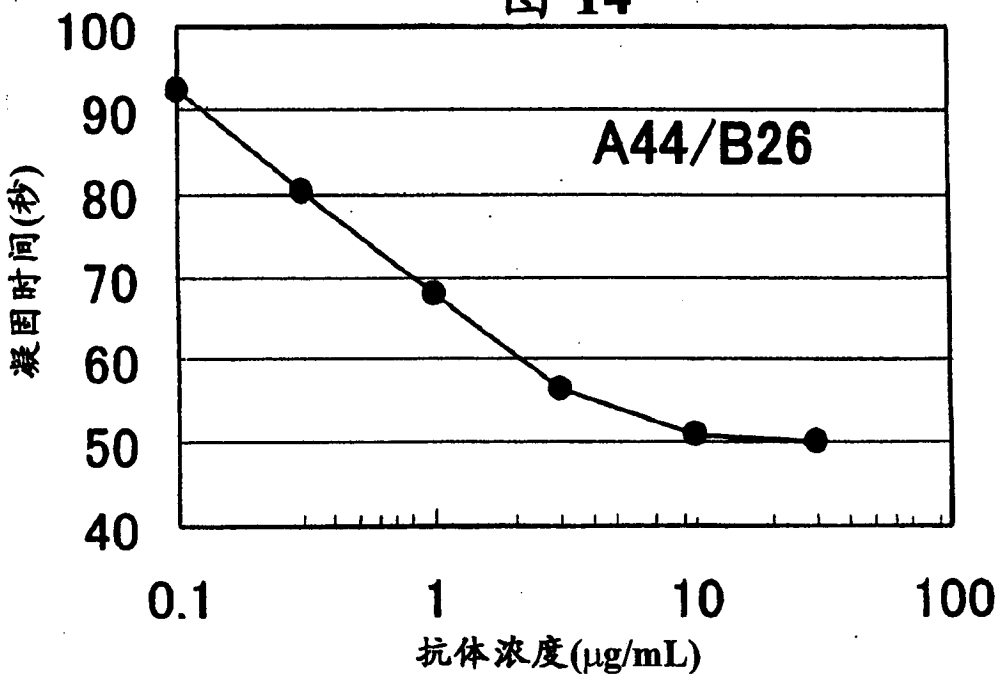
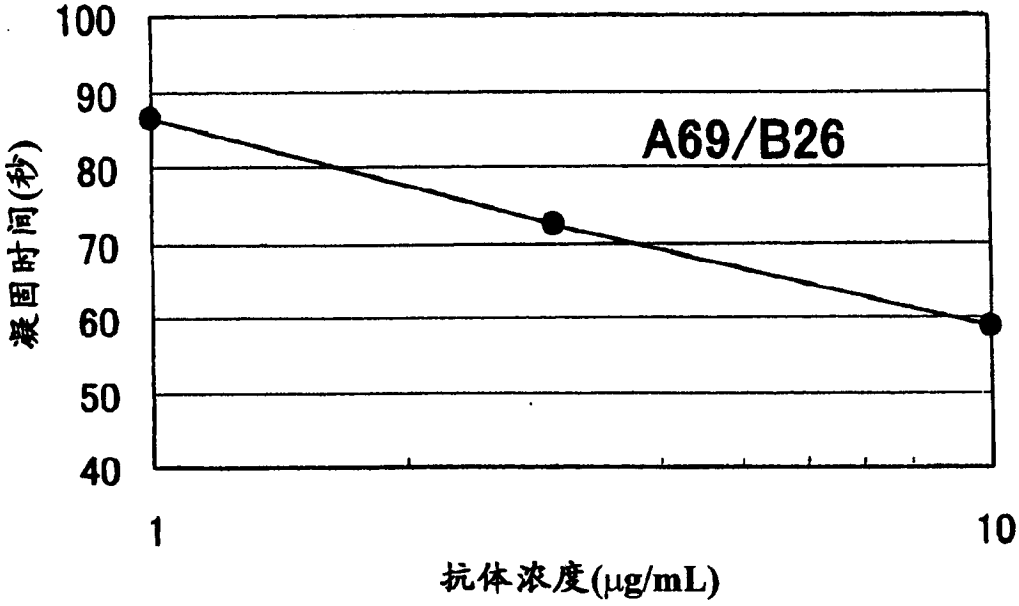


图 15


100
90
80
70
60
50
40
凝固时间(秒)
A69/B26
1
10
抗体浓度(μg/mL)

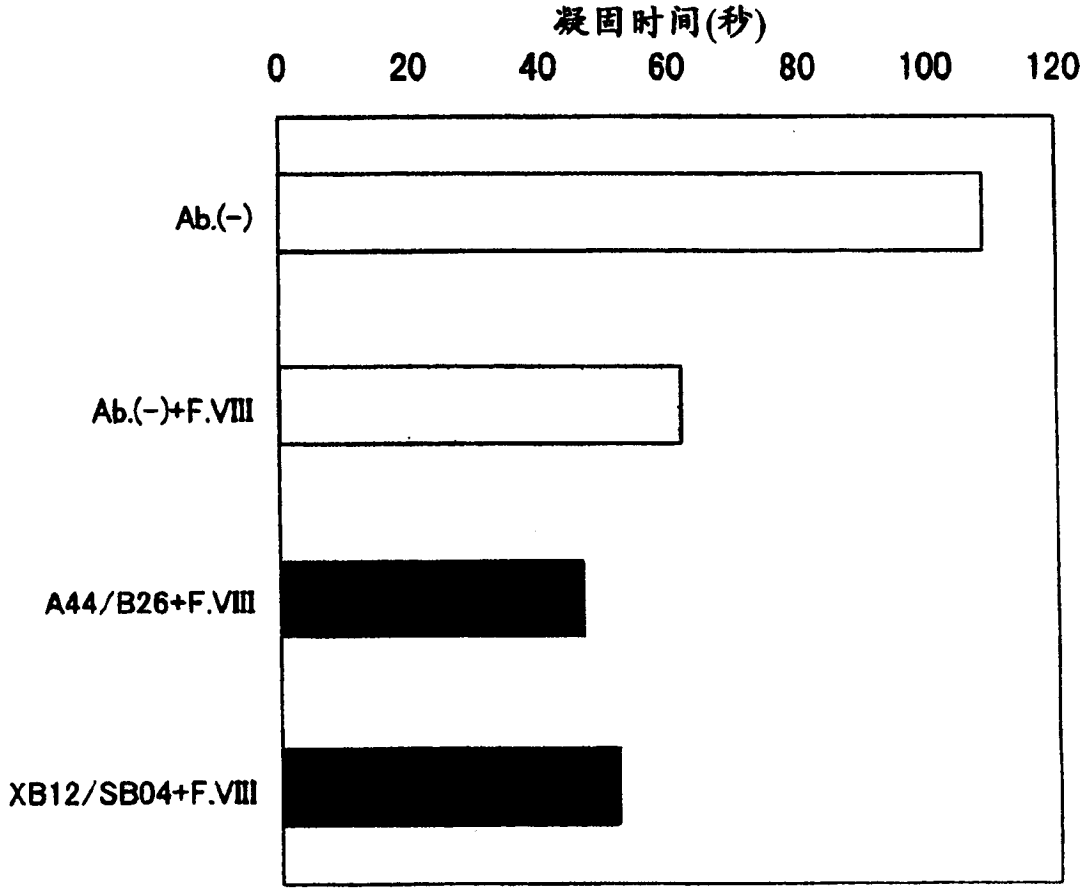
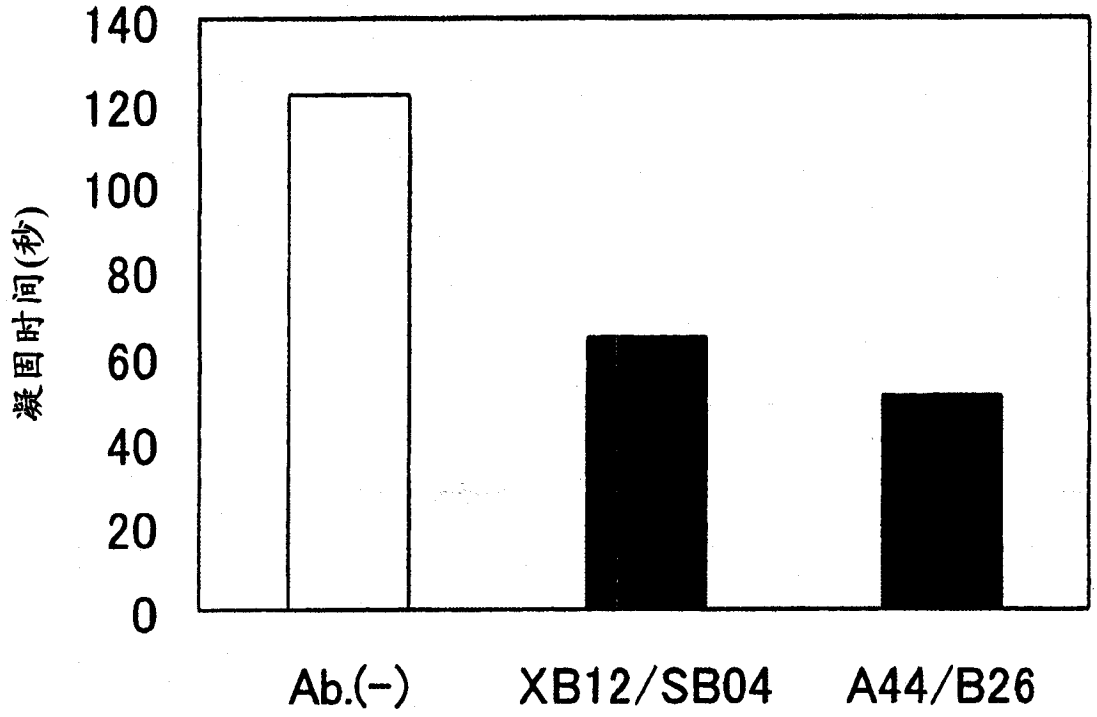

凝固时间(秒)
0
20
40
60
80
100
120
Ab.(-)
Ab.(-)+F.VIII
A44/B26+F.VIII
XB12/SB04+F.VIII

图 16

图 17


140
120
100
80
60
40
20
0
凝固时间(秒)
Ab.(-)
XB12/SB04
A44/B26

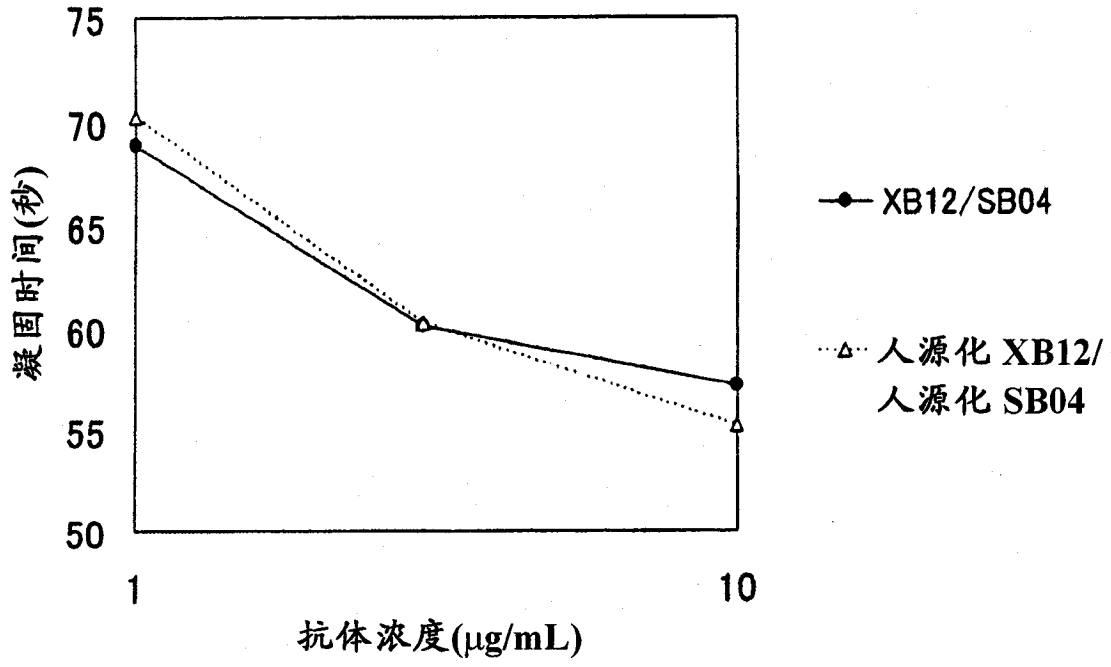

75
70
65
60
55
50
凝固时间(秒)
1
10
抗体浓度(μg/mL)
XB12/SB04
人源化 XB12/
人源化 SB04

图 18