



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116194124 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 30

(21) 申请号 202180058518.9

佐古田幸美

(22) 申请日 2021.07.30

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

(30) 优先权数据

公司 11021

2020-131116 2020.07.31 JP

专利代理师 张国梁 张莹

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2023.01.29

A61K 35/12 (2015.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/028230 2021.07.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/025220 JA 2022.02.03

(71) 申请人 中外制药株式会社

地址 日本国东京都

申请人 国立大学法人山口大学

(72) 发明人 井川智之 樱井实香 铃木隆

权利要求书2页 说明书97页

辰巳加奈子 清水骏 玉田耕治

序列表113页 附图13页

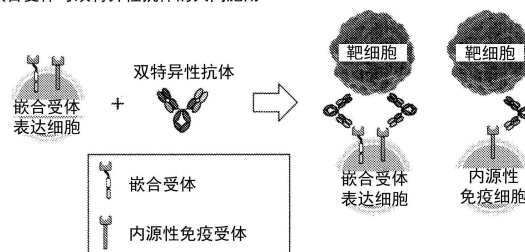
(54) 发明名称

包含表达嵌合受体的细胞的药物组合物

(57) 摘要

本发明提供药物组合物,该药物组合物用于与抗原结合分子的施用组合应用,包含表达嵌合受体的细胞,嵌合受体包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,抗原结合分子是具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点的多特异性抗原结合分子。

嵌合受体与双特异性抗体的共同施用



1. 药物组合物,其用于与抗原结合分子的施用组合应用,包含表达嵌合受体的细胞,嵌合受体包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,

抗原结合分子是具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点的多特异性抗原结合分子。

2. 药物组合物,其用于与表达嵌合受体的细胞的施用组合应用,包含抗原结合分子,嵌合受体包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,

抗原结合分子是具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点的多特异性抗原结合分子。

3. 权利要求1或2中所述的药物组合物,其中,免疫受体识别位点识别嵌合受体的细胞外结构域和内源性免疫受体。

4. 权利要求1~3的任一项中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含与内源性免疫受体的配体的结合被减弱的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。

5. 权利要求1~4的任一项中所述的药物组合物,其中,免疫受体是共刺激分子。

6. 权利要求1~5的任一项中所述的药物组合物,其中,免疫受体是人CD137。

7. 权利要求1~6的任一项中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的人CD137细胞外结构域变体或其片段。

8. 权利要求1~7的任一项中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。

9. 权利要求1~8的任一项中所述的药物组合物,其中,靶抗原是受体、肿瘤抗原、MHC抗原、或分化抗原。

10. 权利要求1~8的任一项中所述的药物组合物,其中,靶抗原是肿瘤抗原。

11. 权利要求1~10的任一项中所述的药物组合物,其中,抗原结合分子是双特异性抗体。

12. 权利要求1~11的任一项中所述的药物组合物,其用于在癌症的治疗或预防中应用。

13. 嵌合受体,其包含含有免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段的细胞外结构域。

14. 权利要求13中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含与内源性免疫受体的配体的结合被减弱的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。

15. 权利要求13或14中所述的嵌合受体,其中,免疫受体是共刺激分子。

16. 权利要求13~15的任一项中所述的嵌合受体,其中,免疫受体是人CD137。

17. 权利要求13~16的任一项中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞外结构域是至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的人CD137细胞外结构域变体或其片段。

18. 权利要求13~17的任一项中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。

19. 细胞,其表达权利要求13~18的任一项中所述的嵌合受体。
20. 组合物,其包含权利要求19的细胞。
21. 核酸,其编码权利要求13~18的任一项中所述的嵌合受体。
22. 载体,其插入了权利要求21中所述的核酸。
23. 制备权利要求19中所述的细胞的方法,其包括应用权利要求21中所述的核酸或权利要求22中所述的载体转染或转导细胞。

包含表达嵌合受体的细胞的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及嵌合受体,表达嵌合受体的细胞,和利用该细胞的疾病的处理方法,例如,过继细胞免疫疗法,尤其是应用了表达嵌合受体的T细胞的过继细胞免疫疗法。

背景技术

[0002] 嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor:以下也称为“CAR”)是使识别细胞表面的抗原的抗原结合分子与诱导免疫细胞的活化的信号传导区人工融合的嵌合蛋白。通过将编码CAR的基因导入免疫细胞,制备表达CAR的免疫细胞。CAR表达细胞对表达靶抗原的细胞发挥细胞毒性,并且可以不依赖与主要组织相容性基因复合物(MHC)的相互作用,用于通过过继细胞免疫疗法治疗癌症等疾病(非专利文献1)。

[0003] 将CAR基因导入T细胞或天然杀伤细胞,使用CAR-T细胞或CAR-NK细胞的过继细胞免疫疗法,在世界范围正进行临床试验。特别地,得到在白血病或淋巴瘤等造血器官恶性肿瘤等中显示有效性的结果,为以CD19为抗原的CAR-T的Kymriah(注册商标)(Novartis, tisagenlecleucel)和Yescarta(注册商标)(Gilead Sciences, axicabtagene ciloleucel)被许可为药品。

[0004] 用于制备可以普遍识别表达各种抗原的靶细胞的免疫细胞的技术建立,在过继细胞免疫疗法的通用化上具有重要的临床意义。迄今为止,有关于这样的研究的报告实例(专利文献1~5和非专利文献2~5)

[0005] 另外,作为针对癌症的另一治疗方法,开发一种通过抗原结合分子活化内源性的免疫细胞,从而活化肿瘤免疫的方法。迄今为止,报告了免疫检查点分子的CTLA-4,PD-1和PD-L1抑制抗体的治疗效果上报(非专利文献6~7),并被许可为药品。另外,小鼠模型证实,通过用激动剂抗体活化在免疫细胞上表达的共刺激因子来表达抗肿瘤效果(非专利文献8)。进一步,提出了通过共同施用活化免疫细胞的CD137激动剂抗体与CAR-T来提高药效的治疗(专利文献6,非专利文献9)。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:W02012/082841

[0009] 专利文献2:W02016/040441

[0010] 专利文献3:W02017/161333

[0011] 专利文献4:W02018/002358

[0012] 专利文献5:W02018/177966

[0013] 专利文献6:W02019/140425

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:June CH and Sadelain M,N Engl J Med. (2018)379,64

[0016] 非专利文献2:Tamada et al,Clin Cancer Res. (2012)18,6436

[0017] 非专利文献3:Urbanska K et al,J Transl Med. (2014)12,347

[0018] 非专利文献4:Kudo K et al,Cancer Res. (2014)74,93

[0019] 非专利文献5:Karches CH et al,Clin Cancer Res. (2019)25,5890

[0020] 非专利文献6:Hodi FS et al,N Engl J Med. (2010)363,711

[0021] 非专利文献7:Robert C et al,N Engl J Med. (2015)372,320

[0022] 非专利文献8:Houot R et al,Blood. (2009)114,3431

[0023] 非专利文献9:Mardiana S et al,Cancer Res. (2017)77,1296

[0024] 发明概述

[0025] 发明要解决的问题

[0026] 作为使用CAR的过继细胞免疫疗法治疗癌症的课题,对实体癌的治疗效果很差。作为其原因,除了癌组织中单个癌细胞上表达的肿瘤抗原不均匀导致只识别单一靶抗原的CAR表达细胞无法识别所有肿瘤细胞外,还考虑肿瘤微环境中的免疫抑制机制。作为解决该课题的战略,考虑不仅活化CAR表达细胞,还活化内源性免疫细胞,与内源性免疫细胞协调表达抗肿瘤效果,作为实现这一目标的手段之一,考虑与活化免疫细胞的CD137激动剂抗体的并用疗法。然而,在临床和非临床中,CD137激动剂抗体诱导以肝脏为代表的非肿瘤组织中的免疫细胞的活化并表达毒性是一个课题。

[0027] 另外,作为使用CAR的过继细胞免疫疗法治疗癌症的另一课题,列举以下几点。第一,肿瘤细胞表面表达的肿瘤抗原因癌细胞而异,因此需要按作为靶的每一肿瘤抗原构建CAR的抗原识别位点。第二,作为CAR的靶的肿瘤抗原有时因治疗表达量降低、突变等而引起肿瘤免疫逃逸。由于现行CAR表达细胞大多只识别单一靶抗原,肿瘤抗原逃逸会降低治疗效果。第三,用于鉴定针对各种肿瘤抗原的抗原结合分子,并建立将其融合的CAR表达细胞的经济成本和劳动负担是一个课题。因此,需要制备通用的CAR表达细胞以及开发使用该CAR表达细胞的治疗方法,该CAR表达细胞能够普遍识别各种靶抗原,根据患者的靶抗原细胞的性状和治疗阶段,改变所识别的肿瘤抗原。

[0028] 用于解决问题的手段

[0029] 本公开提供将具有识别对免疫受体发挥激动剂活性的部位和靶抗原的位点的多特异性抗原结合分子,与在细胞外结构域中具有由该抗原结合分子识别的免疫受体的嵌合受体转导的免疫细胞组合的治疗方法。在一个方式中,本公开中的抗原结合分子聚集在表达靶抗原的病变部位,因此该激动剂活性可以在病变部位选择性表达,从而避免毒性的表达。另外,本公开中的嵌合受体与传统CAR不同,不具有针对靶抗原的结合性,因此具有不抑制本公开中的抗原结合分子与靶抗原结合的特征。进一步,由于本公开中的嵌合受体与本公开中的抗原结合分子具有结合性,因此通过抗原结合分子单药,可以同时诱导内源性的免疫细胞活化和表达嵌合受体的免疫细胞的活化。

[0030] 即,本发明公开了以下内容。

[0031] 更具体地,在本公开的一个方面,提供了以下发明。

[0032] [1]药物组合物,其用于与抗原结合分子的施用组合应用,包含表达嵌合受体的细胞,

[0033] 嵌合受体包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,

[0034] 抗原结合分子是具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点

的多特异性抗原结合分子。

[0035] [2]药物组合物,其用于与表达嵌合受体的细胞的施用组合应用,包含抗原结合分子,

[0036] 嵌合受体包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,

[0037] 抗原结合分子是具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点的多特异性抗原结合分子。

[0038] [3][1]或[2]中所述的药物组合物,其中,免疫受体识别位点识别嵌合受体的细胞外结构域和内源性免疫受体。

[0039] [4][1]~[3]的任一个中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含与内源性免疫受体的配体的结合被减弱的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。

[0040] [5][1]~[4]的任一个中所述的药物组合物,其中,免疫受体是共刺激分子。

[0041] [6][1]~[5]的任一个中所述的药物组合物,其中,免疫受体是人CD137。

[0042] [7][1]~[6]的任一个中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的人CD137细胞外结构域变体或其片段。

[0043] [8][1]~[7]的任一个中所述的药物组合物,其中,嵌合受体包含细胞内信号传导结构域,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。

[0044] [9][1]~[8]的任一个中所述的药物组合物,其中,靶抗原是受体、肿瘤抗原、MHC抗原、或分化抗原。

[0045] [10][1]~[9]的任一个中所述的药物组合物,其中,靶抗原是肿瘤抗原。

[0046] [11][1]~[10]的任一个中所述的药物组合物,其中,抗原结合分子是双特异性抗体。

[0047] [12][1]~[11]的任一个中所述的药物组合物,其用于在癌症的治疗或预防中应用。

[0048] [13]嵌合受体,其包含含有免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段的细胞外结构域。

[0049] [14][13]中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞外结构域是与内源性免疫受体的配体的结合被减弱的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。

[0050] [15][13]或[14]中所述的嵌合受体,其中,免疫受体是共刺激分子。

[0051] [16][13]~[15]的任一个中所述的嵌合受体,其中,免疫受体是人CD137。

[0052] [17][13]~[16]的任一个中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的人CD137变体或其片段。

[0053] [18][13]~[17]的任一个中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体包含细胞内信号传导结构域,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。

[0054] [19]细胞,其表达[13]~[18]的任一项中所述的嵌合受体。

[0055] [20]组合物,其包含[19]的细胞。

[0056] [21]核酸,其编码[13]~[18]的任一个中所述的嵌合受体。

- [0057] [22]载体,其插入了[21]中所述的核酸。
- [0058] [23]制备[19]中所述的细胞的方法,其包含应用[21]中所述的核酸或[22]中所述的载体转染或转导细胞。
- [0059] [24][1]~[12]的任一个中所述的药物组合物,或[13]~[18]的任一个中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体还包括跨膜结构域。
- [0060] [A1]药物组合物,其用于与抗原结合分子的施用组合应用,包含表达嵌合受体的细胞,
- [0061] 嵌合受体包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,
- [0062] 抗原结合分子包含具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点双特异性抗原结合位点。
- [0063] [A2]药物组合物,其用于与表达嵌合受体的细胞的施用组合应用,包含抗原结合分子,
- [0064] 嵌合受体包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,
- [0065] 抗原结合分子包含具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点双特异性抗原结合位点。
- [0066] [A3][A1]或[A2]中所述的药物组合物,其中,免疫受体识别位点识别嵌合受体的细胞外结构域和内源性免疫受体。
- [0067] [A4][A1]~[A3]的任一个中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含减弱了与内源性免疫配体的结合的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。
- [0068] [A5][A1]~[A4]的任一个中所述的药物组合物,其中,免疫受体是共刺激分子。
- [0069] [A6][A1]~[A5]的任一个中所述的药物组合物,其中,免疫受体是人CD137。
- [0070] [A7][A1]~[A6]的任一个中所述的药物组合物,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的细胞外结构域变体或其片段。
- [0071] [A8][A1]~[A7]的任一个中所述的药物组合物,其中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。
- [0072] [A9][A1]~[A8]的任一个中所述的药物组合物,其中,靶抗原是受体、肿瘤抗原、MHC抗原、或分化抗原。
- [0073] [A10][A1]~[A9]的任一个中所述的药物组合物,其中,靶抗原是肿瘤抗原。
- [0074] [A11][A1]~[A10]的任一个中所述的药物组合物,其中,抗原结合分子是双特异性抗体。
- [0075] [A12][A1]~[A11]的任一个中所述的药物组合物,其用于在癌症的治疗或预防中应用。
- [0076] [A13]嵌合受体,其中,细胞外结构域包含跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。
- [0077] [A14][A13]中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含减弱了与内源性免疫配体的结合的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。

- [0078] [A15][A13]或[A14]中所述的嵌合受体,其中,免疫受体是共刺激分子。
- [0079] [A16][A13]~[A15]的任一个中所述的嵌合受体,其中,免疫受体是人CD137。
- [0080] [A17][A13]~[A16]的任一个中所述的嵌合受体,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的细胞外结构域变体或其片段。
- [0081] [A18][A13]~[A17]的任一个中所述的嵌合受体,其中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。
- [0082] [A19]细胞,其表达[A13]~[A18]的任一个中所述的嵌合受体。
- [0083] [A20]组合物,其包含[A19]的细胞。
- [0084] [A21]核酸,其编码[A13]~[A17]的任一个中所述的嵌合受体。
- [0085] [A22]载体,其插入了[A21]中所述的核酸。
- [0086] [A23]制备[A18]中所述的细胞的方法,其包含应用[A21]中所述的核酸或[A22]中所述的载体转染或转导细胞。
- [0087] [B1]疾病的治疗方法,其包含,
- [0088] 向需要治疗的对象施用有效量的抗原结合分子,
- [0089] 向所述对象施用表达嵌合受体的细胞,
- [0090] 嵌合受体包含细胞外结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,
- [0091] 抗原结合分子是具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点的多特异性抗原结合分子。
- [0092] [B2][B1]中所述的方法,其中,嵌合受体还包括跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。
- [0093] [B3][B1]或[B2]中所述的方法,其中,免疫受体识别位点识别嵌合受体的细胞外结构域和内源性免疫受体。
- [0094] [B4][B1]~[B3]的任一个中所述的方法,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含与内源性免疫受体的配体的结合被减弱的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。
- [0095] [B5][B1]~[B4]的任一个中所述的方法,其中,免疫受体是共刺激分子。
- [0096] [B6][B1]~[B5]的任一个中所述的方法,其中,免疫受体是人CD137。
- [0097] [B7][B1]~[B6]的任一个中所述的方法,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的人CD137细胞外结构域变体或其片段。
- [0098] [B8][B1]~[B7]的任一个中所述的方法,其中,嵌合受体包含细胞内信号传导结构域,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。
- [0099] [B9][B1]~[B8]的任一个中所述的方法,其中,靶抗原是受体、肿瘤抗原、MHC抗原、或分化抗原。
- [0100] [B10][B1]~[9]的任一个中所述的方法,其中,靶抗原是肿瘤抗原。
- [0101] [B11][B1]~[B10]的任一个中所述的方法,其中,抗原结合分子是双特异性抗体。
- [0102] [B12][B1]~[B11]的任一个中所述的方法,其中,疾病是癌症。
- [0103] [B13][B12]中所述的方法,其中,癌症选自原发性或转移性黑色素瘤、胸腺瘤、淋

巴瘤、肉瘤、肺癌、结肠直肠癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、和腺癌例如乳癌、前列腺癌、卵巢癌和胰腺癌。

[0104] [C1]疾病的治疗方法,其包含,

[0105] 向需要治疗的对象施用有效量的抗原结合分子,

[0106] 向所述对象施用表达嵌合受体的细胞,

[0107] 嵌合受体包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,该细胞外结构域包含免疫受体的细胞外结构域、免疫受体的细胞外结构域变体、或其片段,

[0108] 抗原结合分子包含具有靶抗原识别位点和识别所述免疫受体的免疫受体识别位点双特异性抗原结合位点。

[0109] [C2] [C1]中所述的方法,其中,嵌合受体还包括跨膜结构域和细胞内信号传导结构域。

[0110] [C3] [C1]或[C2]中所述的方法,其中,免疫受体识别位点识别嵌合受体的细胞外结构域和内源性免疫受体。

[0111] [C4] [C1]~[C3]的任一个中所述的方法,嵌合受体的细胞外结构域包含减弱了与内源性免疫配体的结合的免疫受体的细胞外结构域变体或其片段。

[0112] [C5] [C1]~[C4]的任一个中所述的方法,其中,免疫受体是共刺激分子。

[0113] [C6] [C1]~[C5]的任一个中所述的方法,其中,免疫受体是人CD137。

[0114] [C7] [C1]~[C6]的任一个中所述的方法,其中,嵌合受体的细胞外结构域包含至少缺失了人CD137细胞外结构域的富含半胱氨酸的结构域3和富含半胱氨酸的结构域4的部分或全部的细胞外结构域变体或其片段。

[0115] [C8] [C1]~[C7]的任一个中所述的方法,其中,细胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。

[0116] [C9] [C1]~[C8]的任一个中所述的方法,其中,靶抗原是受体、肿瘤抗原、MHC抗原、或分化抗原。

[0117] [C10] [C1]~[C9]的任一个中所述的方法,其中,靶抗原是肿瘤抗原。

[0118] [C11] [C1]~[C10]的任一个中所述的方法,其中,抗原结合分子是双特异性抗体。

[0119] [C12] [C1]~[C11]的任一个中所述的方法,其用于在癌症的治疗或预防中应用。

[0120] [C13] [C12]中所述的方法,其中,癌症选自原发性或转移性黑色素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、结肠直肠癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、和腺癌例如乳癌、前列腺癌、卵巢癌和胰腺癌。

[0121] 附图简述

[0122] [图1]图1是显示将对免疫受体发挥激动剂活性的抗原结合分子(例如双特异性抗体)与在细胞外结构域中具有由该抗原结合分子识别的免疫受体的嵌合受体转导的免疫细胞组合的治疗方法的概念图,是显示除了表达嵌合受体的细胞外还动员内源性免疫细胞的本发明的特征的图。

[0123] [图2]图2是显示与嵌合受体CD137-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ (CD137-CR1)、trCD137-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ (trCD137-CR)和CD137-CR1相比,在CD137的细胞外结构域中具有I64R和V71R突变的嵌合受体CD137-CR2的示意图。

[0124] [图3]图3是表达实施例3-1中记载的pCDH-CD137-CR1的慢病毒载体构建体以及从

5'末端到3'末端的框架单位的构成要素的序列顺序的概略图。

[0125] [图4]图4是显示通过实施例3-4中记载的报告物分析,将作为靶抗原表达人GPC3的细胞与由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体共培养时,对CD137-CR1 Jurkat细胞的活化能力进行评价的结果的图。横轴是双特异性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)的浓度,纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0126] [图5]图5是显示通过实施例3-5中记载的报告物分析,将作为靶抗原表达人GPC5D的细胞与由抗GPC5D抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体共培养时,对CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞的活化能力进行评价的结果的图。应用2种双特异性抗体,即GPA0018H-F760mnN17/GPA0018L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0(GPA0018/CD137)、GPA0039H-F760mnN17/GPA0039L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0(GPA0039/CD137),横轴显示其是否存在,纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0127] [图6]图6是显示通过实施例3-6中记载的报告物分析,将作为靶抗原表达人IL-6R的细胞与由抗IL-6R抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体共培养时,对不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(copGFP)和CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞(CD137-CR1)的活化能力进行评价的结果的图。横轴显示双特异性抗体(MRAH.v1-F760mnN17/MRAL.v1-k0.v1//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)是否存在,纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0128] [图7]图7是表达实施例4-1中记载的pMSGV1-CD137-CR1的逆转录病毒载体构建体以及从5'末端到3'末端的框架单位的构成要素的序列顺序的概略图。

[0129] [图8A]图8A是显示应用实施例4-4中记载的人肝癌细胞株(SK-Hep-1)与作为靶抗原表达人GPC3的SK-pca60细胞,与3种双特异性抗体(由抗GPC3抗体和抗KLH抗体,抗KLH抗体和抗CD137抗体,抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成)共培养时,以残存肿瘤细胞数为指标,对CD137-CR1-eGFP表达T细胞的细胞毒性活性进行评价的结果的图。纵轴上显示残存肿瘤细胞数,横轴上显示3种双特异性抗体是否存在。

[0130] [图8B]图8B是显示应用实施例4-5中记载的人肝癌细胞株(SK-Hep-1)和作为靶抗原表达人GPC3的SK-pca60细胞,与由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体共培养时,对应用了xCELLigence系统的CD137-CR1-eGFP表达T细胞的细胞毒性活性进行评价的结果的图。改变效应细胞对靶细胞(E:T)的比例和双特异性抗体是否存在(图8B中标记为“有抗体”,“无抗体”)来进行评价。纵轴显示细胞增殖活性(%),横轴显示添加效应细胞和抗体后的天数。

[0131] [图9]图9是显示嵌合受体表达细胞与表达配体的细胞的结合的靶抗原非依赖性活化机制的示意图。

[0132] [图10]图10是显示通过实施例6-4中记载的报告物分析,将作为靶抗原表达人GPC3的细胞与由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体共培养时,对trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞(trCD137-CR)的活化能力进行评价的结果的图。横轴是双特异性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)的浓度,纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0133] [图11]图11是显示通过实施例7-4中记载的报告物分析,将作为靶抗原表达人GPC3的细胞与由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体共培养时,对CD137-CR2-

copGFP Jurkat细胞 (CD137-CR2) 的活化能力进行评价的结果的图。横轴是双特异性抗体 (H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0) 的浓度,纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0134] [图12A]图12A是显示关于实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞 (CD137-CR1),在实施例8中记载的配体(人CD137L)表达细胞(Raji)存在下和不存在下,对嵌合受体表达细胞的活化能力进行评价的结果的图。纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0135] [图12B]图12B是显示关于实施例6-2中配制的trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞 (trCD137-CR),在实施例8中记载的配体(人CD137L)表达细胞(Raji)存在下和不存在下,对嵌合受体表达细胞的活化能力进行评价的结果的图。纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0136] [图12C]图12C是显示关于实施例7-2中配制的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞 (CD137-CR2),在实施例8中记载的配体(人CD137L)表达细胞(Raji)存在下和不存在下,对嵌合受体表达细胞的活化能力进行评价的结果的图。纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0137] [图13]图13是显示对实施例9-3-1中记载的对BB0000和BB0077的生物体内配体(人CD137L)的结合活性进行测定的结果的图。横轴显示CD137L的浓度,纵轴显示CD137L相对于B0000和BB0077的补充量的结合量。

[0138] [图14]图14是显示对实施例9-3-2中记载的BB0000和BB0077的ECM结合进行评价的结果的图。纵轴中显示,显示ECM结合的发光强度。

[0139] [图15]图15是显示对实施例9-3-4中记载的从BB0124到BB0138的生物体内配体(人CD137L)的结合活性进行测定的结果的图。横轴显示评价的CD137变体,纵轴显示CD137L相对于各变体的补充量的结合量。

[0140] [图16A]图16A是显示对实施例9-3-5中记载的CD137变体BB0124至BB0138的ECM结合进行评价的结果的图。纵轴中显示,显示ECM结合的发光强度。

[0141] [图16B]图16B是显示对实施例9-3-3中记载的CD137变体BB0139的ECM结合进行评价的结果的图。纵轴中显示,显示ECM结合的发光强度。

[0142] [图17]图17是显示通过实施例10-4中记载的报告物分析,在靶细胞存在下,对由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(图17中显示为Ab)依赖性活化能力进行评价的结果的图。横轴显示将BB0000、BB0077、BB0127、BB0128、BB0131、BB0133、BB0134、BB0139的8种CD137变体作为细胞外结构域,表达CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的细胞质区连接的嵌合受体的Jurkat细胞和未导入基因的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞的亲本株(模拟物(Mock)),纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0143] [图18]图18是显示通过实施例10-5中记载的报告物分析,在配体表达细胞存在下,对细胞外结构域中具有CD137变体的Jurkat细胞的活化能力进行评价的结果的图。轴显示将BB0000、BB0077、BB0127、BB0128、BB0131、BB0133、BB0134、BB0139的8种作为细胞外结构域,表达CD8-CD28-CD137-CD3 ζ 的细胞质区连接的嵌合受体的Jurkat细胞和未导入基因的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞的亲本株(模拟物),纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0144] [图19]图19是显示实施例11-1中记载的慢病毒载体编码的嵌合受体CD137-CD8-CD3 ζ 的示意图。

[0145] [图20]图20是显示通过实施例11-4中记载的报告物分析,在靶细胞存在下,对由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体依赖性3种Jurkat细胞的CD137活化能力进

行评价的结果的图。横轴中显示实施例11-2中配制的3种Jurkat细胞,即CD137-CR1 Jurkat细胞(CD137-CR1)、CD137-CR3-copGFP Jurkat细胞(CD137-CR3)、不表达嵌合受体仅表达copGFP的NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat细胞(copGFP)和双特异性抗体是否存在。纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0146] [图21]图21是显示在实施例12-1中记载的慢病毒载体编码的跨膜结构域中应用了人CD8的构建体(CD28-CR1)和应用了人CD28的构建体(CD28-CR2)的示意图。

[0147] [图22]图22是显示对实施例12-4中记载的CD28-CR1 Jurkat细胞和CD28-CR2 Jurkat细胞的靶细胞存在下的活化能力进行评价的结果的图。横轴中显示3种Jurkat细胞,即不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(copGFP)、表达实施例12-2中配制的CD28-CR1-copGFP的Jurkat细胞(CD28-CR1-copGFP)以及表达CD28-CR2-copGFP的Jurkat细胞(CD28-CR2-copGFP)的3种双特异性抗体,即由抗GPC3抗体和抗CD28抗体构成的双特异性抗体(GPC3/CD28)、由抗KLH抗体和抗CD28抗体构成的双特异性抗体(KLH/CD28)以及由抗GPC3抗体和抗KLH抗体构成的双特异性抗体(GPC3/KLH)是否存在。纵轴显示荧光素酶的发光强度。

[0148] 用于实施发明的方式

[0149] 本公开的其它特征和优点从以下的详述而变得明显。但是,根据该详述,本领域技术人员在本公开的主旨和范围内进行各种变化和改变是显然的,因此,应理解,显示本公开的优选实施方式的详述和具体实例仅为了说明而给出。

[0150] 以下,关联附图说明本公开的实施方式。

[0151] 本发明中的多肽通常指具有4个氨基酸左右以上的长度的肽和蛋白。另外,本发明中的多肽通常是由人工设计的序列构成的多肽,但不限于此,例如也可以是来源于生物的多肽。另外,也可以是天然多肽,或合成多肽,重组多肽等任一种。进一步,上述多肽的片段另外也包含在本发明的多肽中。

[0152] 在本说明书中,氨基酸以一个字符编码和/或三个字符编码标记,例如,表示为Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/V。当表达特定位置处的氨基酸时,可以适当地使用同时记载了表示特定位置的数字和氨基酸的1个字符代码或3个字符代码的表达。例如,单结构域抗体中含有的氨基酸37V氨基酸表示Kabat编号表示的位于37位位置的Val。

[0153] 为了改变抗体等多肽的氨基酸序列中的氨基酸,可以适当采用位点特异性诱变法(Kunkel等人(Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1985)82,488-492))或Overlap extension PCR。另外,作为置换为天然的氨基酸以外的氨基酸的氨基酸的改变方法,另外也可以采用多个公知的方法(Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.(2006)35,225-249, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(2003)100(11),6353-6357)。例如,也可以适当地使用包含与终止密码子之一的UAG密码子(琥珀密码子)的互补琥珀抑制基因tRNA结合非天然氨基酸的tRNA的无细胞翻译系统(Clover Direct(Protein Express))。在本说明书中,作为改变列举置换但并不限于此。

[0154] 在本说明书中,用于表示氨基酸的改变位置的术语“和/或”的含义包含“和”与“或”适当组合的任意组合。具体地,例如,“37号、45号和/或47号氨基酸被置换”包含以下氨基酸的改变位置的变化;(a)37号,(b)45号,(c)47号,(d)37号和45号,(e)37号和47号,(f)

45号和47号,(g)37号和45号及47号。

[0155] 在本说明书中,另外,作为表示氨基酸改变的表达,还可以适当使用在表示特定位置的数字前后同时记载了改变前和改变后的氨基酸的1个字符代码或3个字符代码的表达。例如,在添加抗体可变区或单结构域抗体中包含的氨基酸的替换时使用的F37V或Phe37Val这一改变表示Kabat编号表示的37位Phe替换为Val。即,数字表示Kabat编号表示的氨基酸的位置,其前面记载的氨基酸的1个字符代码或3个字符代码表示置换前的氨基酸,其后面记载的氨基酸的1个字符代码或3个字符代码表示置换后的氨基酸。同样地,抗体恒定区中包含的Fc区中加入氨基酸的置换时使用的P238A或Pro238Ala这一改变表示EU编号表示的238位的Pro置换为Ala。即,数字表示EU编号表示的氨基酸的位置,其前面记载的氨基酸的1个字符代码或3个字符代码表示置换前的氨基酸,其后面记载的氨基酸的1个字符代码或3个字符代码表示置换后的氨基酸。

[0156] 在本说明书中,术语“抗体”在最广泛的意义上被使用,只要表示期望的抗原结合活性就不仅限于此,包含含有单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单结构域抗体和抗体片段的各种抗体结构。

[0157] 在本发明中“多特异性抗原结合分子”指可以与不同的多种抗原,具体地多种抗原中包含的多种表位特异性结合的分子。也就是说,多特异性抗原结合分子是对至少2种不同的表位具有特异性的分子,除了与不同抗原结合的分子,还包含与同一抗原上的不同表位结合的分子。多特异性抗原结合分子是包含双特异性抗原结合分子的概念,作为其实例列举多特异性抗体、双特异性抗体等。双特异性抗体(bispecific antibody)是这种分子与2个抗原结合的抗体,但多特异性抗体可以对2个抗原或其以上(例如3种)的抗原具有特异性。双特异性抗体和多特异性抗体可以配制为全长抗体或包含抗体片段的分子。

[0158] “抗体片段”指,包含与完全抗体结合的抗原结合的该完全抗体的一部分的该完全抗体以外的分子。抗体片段的实例并不限于此,包含Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、双抗体(diabody)、线状抗体、单链抗体分子(例如scFv)、和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0159] 术语“全长抗体”指具有与天然型抗体结构实质上类似的结构,或具有包含本说明书定义的Fc区的重链的抗体。

[0160] 本说明书术语“同源抗体(homo-antibody)”是与单一抗原结合的抗体,指具有4链结构的抗体,其中轻链、重链的两个多肽链各两条。

[0161] 术语“可变区”或“可变结构域”指参与使抗体与抗原结合的抗体的重链或轻链的结构域。对于抗体的重链和轻链的可变结构域(分别是VH和VL),通常,各结构域包含4个保守的框架区(FR)及3个互补决定区(CDR),具有类似的结构(例如参照Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007))。在1个VH或VL结构域中赋予抗原结合特异性。

[0162] 本说明书中应用的术语“互补决定区”或“CDR”指抗体的可变结构域的各区域,其是序列中的超变、和/或形成结构上确定的环(“超变环”)、和/或抗原接触残基(“抗原接触”)。通常,抗体包含6个CDR:VH中3个(H1、H2、H3),及VL中3个(L1、L2、L3)。本说明书中的实例性CDR包含以下:

[0163] (a) 氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)、和96-101(H3)处产生的超变环(Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987));

[0164] (b) 氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)、和95-102(H3)处产生的CDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991));

[0165] (c) 氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)、和93-101(H3)处产生的抗原接触(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745(1996));以及

[0166] (d) 包含HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)、和94-102(H3)的(a)、(b)、和/或(c)的组合。

[0167] 在没有另外显示的情况下,在本说明书中按照上述Kabat等人对CDR残基和可变结构域中的其它残基(例如FR残基)进行编号。

[0168] “构架”或“FR”指互补决定区(CDR)残基以外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由4个FR结构域:FR1、FR2、FR3、和FR4组成。与其相应,CDR及FR的序列通常以下列顺序表现为VH(或VL):FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0169] 本说明书中的术语“恒定区”或“恒定结构域”指抗体的可变区以外的部分。例如,IgG抗体是一种约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由二硫键的2个相同轻链和2个相同重链构成,从N末端到C末端,每个重链都有一个可变区(VH),也称为可变重链结构域或重链可变结构域,然后是包含CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的重链恒定区(CH)。同样地,从N末端到C末端,每个轻链都有一个可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,然后是恒定轻链(CL)结构域。天然型抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可归属于称为 κ 和 λ 的两种类型之一。

[0170] 本说明书中的术语“Fc区”用于定义包含至少恒定区的一部分的免疫球蛋白重链的C末端区。该术语包含天然型序列的Fc区和突变体Fc区。在一个方式中,在人IgG1的情形中,重链Fc区从Cys226、或从Pro230延伸至重链的羧基末端。但是,Fc区的C末端的(Lys447)甘氨酸-赖氨酸(Gly446-Lys447)可以存在也可以不存在。除非本说明书中另外指定,对Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号按照Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991中记载的EU编号系统(也称为EU索引)。

[0171] 抗体的“类”指抗体的重链中具备的恒定结构域或恒定区的类型。抗体中有5个主要的类:IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM。然后,其中几个可以进一步划分为亚类(同种型)。例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、和IgA2。对应不同类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。

[0172] 在本说明书中,“靶抗原识别位点”是可以识别作为目的的抗原(靶抗原)并与靶抗原特异性结合的抗原结合分子的部位,也可以称为靶抗原结合结构域。只要与作为目的的抗原结合,靶抗原识别位点可以是任何结构的位点。作为这种位点的实例,并不仅限于此,例如列举,抗体的重链可变区(VH)和抗体的轻链可变区(VL),单结构域抗体(sdAb),生物体内存在的细胞膜蛋白即Avimer中包含的35个氨基酸左右的称为A结构域模块(国际公开W02004/044011,W02005/040229),包含与细胞膜上表达的糖蛋白即纤连蛋白中的蛋白结合的结构域即10Fn3的Adnectin(国际公开W02002/032925),以构成由蛋白A的58个氨基酸组成的3个螺旋束(bundle)的IgG结合结构域为scaffold的Affibody(国际公开W01995/

001937),在具有包含33个氨基酸残基的转角和2个反向平行螺旋以及环亚基反复堆叠的结构锚蛋白重复序列(ankyrin repeat:AR)的分子表面暴露的区即DARPs(Designed Ankyrin Repeat proteins)(国际公开W02002/020565),支持在嗜中性粒细胞凝血酶结合脂蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL))等脂蛋白分子中高度保守的8个反向平行链向中心扭曲的桶结构的一侧的4个环区即Anticalin等(国际公开W02003/029462),作为七鳃鳗、沼田鳗等无颌类的获得性免疫系统不具有免疫球蛋白结构的可变性淋巴细胞受体(variable lymphocyte receptor(VLR))的富含亮氨酸残基的重复(leucine-rich-repeat(LRR))模块反复堆积而成的马蹄形结构内部的平行型片状结构的凹陷区(国际公开W02008/016854)。

[0173] 作为本发明的靶抗原识别位点的优选实例,列举抗体的重链可变区(VH)和抗体的轻链可变区(VL),作为特别优选的实例,列举同时具有免疫受体识别位点的多特异性抗体中的靶抗原识别位点,例如双特异性抗体中的靶抗原识别位点。此外,可以识别并结合本发明的抗原结合分子具有的特定抗原的部位有时称为抗原结合结构域。例如,多特异性抗体具有多个抗原结合结构域,其中,能够识别并结合靶抗原的抗原结合结构域作为靶抗原结合位点发挥功能,能够识别并结合免疫受体的抗原结合结构域作为免疫受体识别位点发挥功能。因此,每个多特异性抗体的靶抗原结合位点和免疫受体识别位点,均对应多特异性抗体的抗原结合结构域。包含双特异性抗原结合位点是指具有两种抗原结合结构域。

[0174] 在本说明书中,“抗原”意味着抗体等分子作为靶识别的物质,在本发明中“靶抗原”意味着抗原结合分子可以经由靶抗原识别位点结合的抗原。靶抗原包含靶抗原识别位点可以结合的表位。在本发明中,靶抗原是用于治疗靶组织引起的疾病的抗原,作为该优选实例并不局限于此,例如列举在靶细胞(例如:癌细胞、炎症细胞)表面表达的分子,在包含靶细胞的组织中的其它细胞表面表达的分子,在对靶细胞与包含靶细胞的组织具有免疫学作用的细胞表面表达的分子,包含靶细胞的组织间质中存在的大分子等。作为靶抗原的实例可以列举以下显示的抗原。

[0175] 在一个实施方式中,本发明中的靶抗原优选列举例如,受体、肿瘤抗原、MHC抗原、分化抗原等。

[0176] 作为靶抗原,可以示例用于如下分子:17-IA、4-1BB、4Dc、6-酮-PGF1a、8-异-PGF2a、8-氧-dG、A1腺苷受体、A33、ACE、ACE-2、激活素、激活素A、激活素AB、激活素B、激活素C、激活素RIA、激活素RIAALK-2、激活素RIB ALK-4、激活素RIIA、激活素RIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、地址素、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、 α -1-抗胰蛋白酶、 α -V/ β -1拮抗剂、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、青蒿琥酯、抗Id、ASPARTIC、心房性钠利尿因子、av/b3整联蛋白、Ax1、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-淋巴细胞刺激因子(BlyS)、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2BMP-2a、BMP-3成骨素(Osteogenin)、BMP-4BMP-2b、BMP-5、BMP-6Vgr-1、BMP-7(OP-1)、BMP-8(BMP-8a、OP-2)、BMPR、BMPR-IA(ALK-3)、BMPR-IB(ALK-6)、BRK-2、RPK-1、BMPR-II(BRK-3)、BMP、b-NGF、BOK、铃蟾肽(bombesin)、骨源性神经营养因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、补体因子3(C3)、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、降钙素、cAMP、癌胎儿性抗原(CEA)、癌相关抗原、组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C/DPPI、组织蛋白酶D、组织蛋

白酶E、组织蛋白酶H、组织蛋白酶L、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V、组织蛋白酶X/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33(p67蛋白)、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、肉毒杆菌毒素、产气荚膜梭菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMVUL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、PD1、PDL1、LAG3、TIM3、galectin-9、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、细胞角蛋白肿瘤相关抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、补体控制因子(Decay accelerating factor)、des(1-3)-IGF-I(脑IGF-1)、Dhh、地高辛、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR(ErbB-1)、EMA、EMMPRIN、ENA、内皮素受体、脑啡肽酶、eNOS、Eot、嗜酸性粒细胞趋化因子1、EpCAM、肾上腺素B2/EphB4、EPO、ERCC、E-选择素、ET-1、因子IIa、因子VII、因子VIIIc、因子IX、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、Fas、FcR1、FEN-1、铁蛋白、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、纤维蛋白、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、促卵泡激素、分形因子(fractalkine)、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、GaS6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3(Vgr-2)、GDF-5(BMP-14、CDMP-1)、GDF-6(BMP-13、CDMP-2)、GDF-7(BMP-12、CDMP-3)、GDF-8(肌抑素)、GDF-9、GDF-15(MIC-1)、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR- α 1、GFR- α 2、GFR- α 3、GITR、胰高血糖素、Glut4、糖蛋白IIb/IIIa(GPIIb/IIIa)、GM-CSF、gp130、gp72、GPR20、GRO、生长激素释放因子、半抗原(NP-cap或NIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCMV gB包膜糖蛋白、HCMV gH包膜糖蛋白、HCMV UL、造血生长因子(HGF)、Hep B gp120、乙酰肝素酶、Her2/neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、Her4(ErbB-4)、单纯疱疹病毒(HSV)gB糖蛋白、HSV gD糖蛋白、HGFA、高分子量黑素瘤相关抗原(HMW-MAA)、HIV gp120、HIV III B gp 120V3环、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、人心脏肌球蛋白、人巨细胞病毒(HCMV)、人生长激素(HGH)、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受体、IgE、IGF、IGF结合蛋白、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-23、IL-27、干扰素(INF)- α 、INF- β 、INF- γ 、抑制素、iNOS、胰岛素A链、胰岛素B链、胰岛素样增殖因子1、整联蛋白 α 2、整联蛋白 α 3、整联蛋白 α 4、整联蛋白 α 4/ β 1、整联蛋白 α 4/ β 7、整联蛋白 α 5(α V)、整联蛋白 α 5/ β 1、整联蛋白 α 5/ β 3、整联蛋白 α 6、整联蛋白 β 1、整联蛋白 β 2、干扰素 γ 、IP-10、I-TAC、JE、激肽释放酶2、激肽释放酶5、激肽释放酶6、激肽释放酶11、激肽释放酶12、激肽释放酶14、激肽释放酶15、激肽释放酶L1、激肽释放酶L2、激肽释放酶L3、激肽释放酶L4、KC、KDR、角质形成细胞增殖因子(KGF)、层粘蛋白5、LAMP、LAP、LAP(TGF-1)、潜在TGF-1、潜在TGF-1bp1、LBP、LDGF、LECT2、lefty、路易斯-Y抗原、路易斯-Y相关抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、脂蛋白、LIX、LKN、Lptn、L-选择素、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体

生成素、淋巴毒素 β 受体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受体、MGMT、MHC (HLA-DR)、MIF、MIG、MIP、MIP-1- α 、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、粘蛋白 (Muc1)、MUC18、穆勒管抑制物 (mullerian-inhibiting substance)、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-C黏附因子、NCA 90、NCAM、NCAM、肾胰岛素残基溶酶 (neprilysin)、神经营养因子-3、-4、或-6、神经生长因子抗体、神经生长因子 (NGF)、NGFR、NGF- β 、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、甲状旁腺激素、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-钙粘着蛋白、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盘性碱性磷酸酶 (PLAP)、P1GF、PLP、PP14、前胰岛素、前松弛素 (prorelaxin)、蛋白C、PS、PSA、PSCA、前立腺特异膜抗原 (PSMA)、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、松弛素A链、松弛素B链、肾素、呼吸器多核体病毒 (RSV) F、RSV Fgp、Ret、类风湿因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清白蛋白、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72 (肿瘤相关糖蛋白-72)、TARC、TCA-3、T细胞受体 (例如、T细胞受体 α/β)、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP样碱性磷酸酶、TfR、TGF、TGF- α 、TGF- β 、TGF- β Pan Specific、TGF- β RI (ALK-5)、TGF- β RII、TGF- β RIIb、TGF- β RIII、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、TGF- β 5、凝血酶、胸腺Ck-1、促甲状腺素、Tie、TIMP、TIQ、组织因子、TMEFF2、Tmpe、TMPRSS2、TNF、TNF- α 、TNF- $\alpha\beta$ 、TNF- β 2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF 10A (TRAIL R1 Apo-2、DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID)、TNFRSF 10D (TRAIL R4 DcR2、TRUNDD)、TNFRSF 11A (RANK ODF R、TRANCE R)、TNFRSF11B (OPG OCIF、TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR、HVeA、LIGHT R、TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITR AITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ、TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNF RI CD120a、p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b、p75-80)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII、TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35、TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1、APT1、CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68、TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1BB CD137、ILA)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2配体、TL2)、TNFSF11 (TRANCE/RANK配体ODF、OPG配体)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3配体、DR3配体)、TNFSF13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLys、TALL1、THANK、TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEM配体、LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITR配体AITR配体、TL6)、TNFSF1A (TNF- α 肌联蛋白 (Conectin)、DIF、TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa、TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC、p33)、TNFSF4 (OX40配体gp34、TXGP1)、TNFSF5 (CD40配体CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP)、TNFSF6 (Fas配体Apo-1配体、APT1配体)、TNFSF7 (CD27配体CD70)、TNFSF8 (CD30配体CD153)、TNFSF9 (4-1BB配体CD137配体)、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、转铁蛋白受体、TRF、Trk、TROP-2、TLR (Toll-like receptor) 1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TSG、TSLP、肿瘤相关抗原CA125、肿瘤相关抗原表达路易斯Y碳水化合物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、尿激酶、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-

2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGF、VEGFR、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、病毒抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNR整联蛋白、冯维勒布兰德因子(von Willebrand factor)、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、A β 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DDR2、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、氧化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子激肽原 (high-molecular-weight kininogen)、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、因子B、因子D、因子H、properdin、sclerostin、纤维蛋白原、纤维蛋白、凝血酶原 (prothrombin)、凝血酶 (thrombin)、组织因子、因子V、因子Va、因子VII、因子VIIa、因子VIII、因子VIIIa、因子IX、因子IXa、因子X、因子Xa、因子XI、因子XIa、因子XII、因子XIIa、因子XIII、因子XIIIa、TFPI、抗凝血酶 (antithrombin) III、EPCR、血栓调节蛋白 (thrombomodulin)、TAPI、tPA、纤溶酶原 (plasminogen)、纤溶酶 (plasmin)、PAI-1、PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1P以及激素和生长因子的受体。

[0177] 上述靶抗原的示例中也记载了受体,但在这些受体以可溶性形式存在于生物体液中的情形中,也可以作为本发明的靶抗原识别位点结合的抗原使用。作为这种可溶型受体的非限定的一个方式,例如可以例示由Mullberg等人 (J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968) 记载的可溶型IL-6R蛋白。

[0178] 作为受体的实例,可以列举例如,属于造血因子受体家族、细胞因子受体家族、酪氨酸激酶型受体家族、丝氨酸/苏氨酸激酶型受体家族、TNF受体家族、G蛋白偶联受体家族、GPI锚型受体家族、酪氨酸磷酸酶型受体家族、粘附因子家族、激素受体家族等受体家族的受体等。关于属于这些受体家族的受体以及其特征,在许多文献中记载,例如, Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. New Comprehensive Biochemistry Vol. 18B "Hormones and their Actions Part II" pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV.、或者宫坂昌之编辑,细胞工程独立手册系列“粘附因子手册”(1994) (秀润社,东京,日本) 等综述,此外 Patthy (Cell (1990) 61 (1), 13-14)、Ullrich等 (Cell (1990) 61 (2), 203-212)、Massague (e带有重点符号) (Cell (1992) 69 (6), 1067-1070)、Miyajima等 (Annu. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331)、Taga等 (FASEB J. (1992) 6, 3387-3396)、Fantl等 (Annu. Rev. Biochem. (1993), 62, 453-481)、Smith等 (Cell (1994) 76 (6) 959-962)、Flower DR. Biochim. Biophys. Acta, Flower (Biochim. Biophys. Acta (1999) 1422 (3) 207-234等。

[0179] 作为属于上述受体家族的具体的受体,优选示例例如,人或小鼠促红细胞生成素 (EPO) 受体 (Blood (1990) 76 (1), 31-35、Cell (1989) 57 (2), 277-285)、人或小鼠粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 受体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1990) 87 (22), 8702-8706、mG-CSFR、Cell (1990) 61 (2), 341-350)、人或小鼠血小板生成素 (TPO) 受体 (Proc Natl Acad Sci U S A. (1992) 89 (12), 5640-5644、EMBO J. (1993) 12 (7), 2645-53)、人或小鼠胰岛素受体 (Nature (1985) 313 (6005), 756-761)、人或小鼠Flt-3配体受体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1994) 91 (2), 459-463)、人或小鼠血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1988) 85 (10) 3435-3439)、人或小鼠干扰素 (IFN) - α 、 β 受体

(Cell(1990)60(2),225-234.以及Cell(1994)77(3),391-400)、人或小鼠瘦素受体、人或小鼠生长激素(GH)受体、人或小鼠白细胞介素(IL)-10受体、人或小鼠胰岛素样生长因子(IGF)-I受体、人或小鼠白血病抑制因子(LIF)受体、人或小鼠睫状神经营养因子(CNTF)受体等。

[0180] 上述靶抗原的示例中包含细胞膜中表达的膜型分子,和从细胞向细胞外分泌的可溶型分子。在本发明的抗原结合结构域与从细胞分泌的可溶型分子结合的情形中,作为该抗原结合结构域具有中和活化是优选的。

[0181] 可溶型分子存在的溶液没有限定,生物体液,即满足生物体内的脉管或组织、细胞之间的全部液体中可以存在本可溶型分子。在非限定的一个方式中,本发明的靶抗原识别位点结合的可溶型分子可以存在于细胞外液。细胞外液在脊椎动物中是指血浆、组织间液、淋巴液、疏松结缔组织、脑脊髓液、脑脊液、穿刺液或关节液等骨和软骨中的成分,肺泡液(支气管肺泡灌洗液)、腹水、胸水、心包水、囊肿液,或眼房水(房水)等细胞穿透液(细胞主动运输分泌活动所产生的各种腺腔内的液,以及消化道腔和其他体腔内液)的总称。

[0182] 术语“肿瘤抗原”指在癌细胞中表达的抗原,意味着其表达与细胞的恶性变化关联识别的、具有抗原性的生物分子。肿瘤抗原中包含肿瘤特异性抗原(仅存在于瘤细胞、未在其它的正常细胞中发现的抗原)、和肿瘤关联抗原(其它的器官和组织或者异种和同种异体的正常细胞中也存在的抗原、或发生和/或者分化时表达的抗原)。或者,细胞癌变时出现在细胞表面或蛋白分子上的异常糖链也是肿瘤抗原,也称为癌糖链抗原。在本发明的一个方式中,靶抗原是肿瘤抗原。

[0183] 作为肿瘤抗原的实例,优选列举例如,作为上述受体属于GPI-锚型受体家族但在以肝癌为首的几种癌中表达的GPC3(Int J Cancer.(2003)103(4),455-65)、在以肺癌为首的多个癌中表达的EpCAM(Proc Natl Acad Sci U S A.(1989)86(1),27-31)(其多核苷酸序列在RefSeq注册编号NM_002354.2、多肽序列在RefSeq注册编号NP_002345.2中分别记载。)、EGFR、CA19-9、CA15-3、唾液酸SSEA-1(SLX)、Her2、Her3、前列腺干细胞抗原(PSCA)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤抗原-125(CA-125)、钙视网膜蛋白、MUC-1、MUC-16、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、嗜铬粒蛋白、细胞角蛋白、结蛋白、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巨大囊肿病液体蛋白(gross cystic disease fluid protein)(GCDPF-15)、HMB-45抗原、蛋白melan-A(由T淋巴细胞识别的黑色瘤抗原;MART-1)、myo-D1、肌肉特异性肌动蛋白(MSA)、神经丝(neurofilament)、神经特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触素(synaptophysin)、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、M2型丙酮酸激酶同工酶的二聚体形式(肿瘤M2-PK)、GD2(神经节苷脂G2)、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、精子蛋白17(Sp17)、间皮素、PAP(前列腺酸性磷酸酶)、前列腺特异性蛋白、TARP(T细胞受体 γ 替代阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAP1(前列腺1的6次跨膜型上皮抗原)、TROP-2、密蛋白6、RNF43a、异常ras蛋白、或异常p53蛋白、整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ (CD61)、半乳糖凝集素、K-Ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)、或Ral-B等。

[0184] 进一步,作为肿瘤抗原的实例,例如,也列举促甲状腺激素受体(TSHR);CD171;CS-1(CD2子集1、CRACC、SLAMF7、CD319和19A24);C型凝集素样分子-1(CLL-1);神经节苷脂GD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer);Tn抗原(TnAg);T抗原(T Ag);Fms样酪氨酸激酶3(FLT3);CD38;CD44v6;B7H3(CD276);KIT(CD117);白细胞介素-13受体亚

基 α -2(IL-13Ra2);白细胞介素11受体 α (IL-11Ra);白细胞介素2受体 α (IL-2Ra);前列腺干
细胞抗原(PSCA);蛋白酶丝氨酸21(PRSS21);血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2);路易
斯(Y)抗原;CD24;血小板衍生生长因子受体 β (PDGFR- β);阶段特异性胚胎抗原-4(SSEA-4);
神经细胞粘附分子(NCAM);碳酸酐酶IX(CAIX);蛋白酶体(prosome,macropine)亚基、 β 型、9
(LMP2);肝配蛋白(ephriin)A型受体2(EphA2);岩藻糖基GM1;唾液酸路易斯粘附分子(sLe);
神经节苷脂GM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer;TGS5;高分子量黑色素瘤相关
抗原(HMWMAA);o-乙酰基-GD2神经节苷脂(OAcGD2);叶酸受体 β ;肿瘤内皮标志物1(TEM1/
CD248);肿瘤内皮标志物7相关(TEM7R);密蛋白6(CLDN6);G蛋白偶联受体C类组5、成员D
(GPC5D);染色体X开放阅读框61(CXORF61);CD97;CD179a;未分化淋巴瘤激酶(ALK);聚唾
液酸;胎盘特异性1(PLAC1);globoH糖神经酰胺(GloboH)的六糖部分;乳腺分化抗原(NY-
BR-1);尿溶蛋白2(uroplakin 2,UPK2);甲型肝炎病毒细胞受体1(HAVCR1);肾上腺素受体 β
3(ADRB3);pannexin3(PANX3);G蛋白偶联受体20(GPR20);淋巴细胞抗原6复合物、基因座K9
(LY6K);嗅觉受体51E2(OR5 1E2);TCR γ 选择性阅读框蛋白(TARP);维尔姆斯肿瘤蛋白
(WT1);位于染色体12p的ETS易位突变体基因6(ETV6-AML);精子蛋白17(SPA17);X抗原家
族、成员1A(XAGE1);血管生成素结合细胞表面受体2(Tie 2);黑色素瘤睾丸抗原-1(MAD-
CT-1);黑色素瘤睾丸抗原-2(MAD-CT-2);Fos相关抗原1;p53突变体;人端粒酶逆转录酶
(hTERT);肉瘤易位切断点;凋亡的黑色素瘤抑制剂(ML-IAP);ERG(跨膜型蛋白酶、丝氨酸2
(TMPRSS2)ETS融合基因);N-乙酰氨基葡萄糖转移酶V(NA17);配对盒蛋白Pax-3(PAX3);雄
激素受体;细胞周期蛋白B1;v-myc禽类骨髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生同源物
(MYCN);Ras同源物家族成员C(RhoC);细胞色素P4501B1(CYP1B1);CCCTC结合因子(锌指蛋
白)样(BORIS);由T细胞3识别的鳞状上皮细胞肿瘤抗原(SART3);配对盒蛋白Pax-5(PAX5);
前顶体蛋白(proacrosin)结合蛋白p32(OY-TEs1);淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK);
A激酶锚蛋白4(AKAP-4);滑膜肉瘤、X切割点2(SSX2);CD79a;CD79b;CD72;白细胞相关免疫
球蛋白样受体1(LAIR1);IgA受体的Fc片段(FCAR);白血病免疫球蛋白样受体亚家族A成员2
(LILRA2);CD300分子样家族成员f(CD300LF);C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A);骨
髓基质细胞抗原2(BST2);含有EGF样模块的粘蛋白样激素受体样2(EMR2);淋巴细胞抗原75
(LY75);glypican-3(GPC3);Fc受体样5(FCRL5);和免疫球蛋白 λ 样多肽1(IGLL1)等。

[0185] “MHC抗原”是主要组织相容性复合物(MHC)的基因产物,其中表达于细胞膜的糖蛋
白主要分类为MHC class I抗原和MHC class II抗原。MHCclass I抗原中包含HLA-A、-B、-
C、-E、-F、-G、-H,MHC class II抗原中包含HLA-DR、-DQ、-DP。另外,也包含呈递给这些MHC抗
原的肿瘤抗原衍生肽。关于与呈递GP100、MART-1、MAGE-1、MAGE-A4、NY-ESO-1等肿瘤抗原、
或者RAS或p53等突变部分的MHC的复合物,也被认为是肿瘤抗原之一。

[0186] “分化抗原”是伴随巨噬细胞、T细胞、B细胞等从骨髓干细胞分化而消长的细胞表
面分子的总称。分化抗原中可以包含CD1、CD2、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、
CD11c、CD13、CD14、CD15s、CD16、CD1 8、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、
CD29、CD30、CD32、CD33、CD34、CD35、CD38、CD40、CD41a、CD41b、CD42a、CD42b、CD43、CD44、
CD45、CD45R0、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD56、
CD57、CD58、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD64、CD69、CD70、CD71、CD73、CD95、CD99、CD102、
CD106、CD117、CD122、CD126、CDw130。

[0187] 术语“肿瘤”通常是组织、细胞违背生物体内的控制自主地过度增殖而形成的组织块的总称。肿瘤中存在具有自主生长、浸润和转移、恶液质的3个特征的恶性，和仅以自主生长为特征的良性，作为恶性肿瘤的“癌症”指以异常细胞的不受控制生长为特征性疾病。癌细胞可以局部扩散或经由血流和淋巴系统扩散到身体的其它部分。各种癌症的实例在本公开中说明，列举乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌和同种癌，但不限于这些。术语“肿瘤”和“癌症”在本公开中同义使用，任一术语都包含例如固体和液性，例如弥漫性或循环性肿瘤。在本公开中使用的情形中，术语“癌症”或“肿瘤”包含恶化前的、同样地恶性的癌症和肿瘤。

[0188] 作为本公开的抗癌剂或后述癌症的治疗方法中的癌症，除了腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、未分化癌、大细胞癌、小细胞癌、皮肤癌、乳癌、前列腺癌、膀胱癌、阴道癌、颈部癌、子宫癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、脾癌、肺癌、气管癌、支气管癌、结肠直肠癌、小肠癌、胃癌、食道癌、胆囊癌、睾丸癌、卵巢癌等癌症和骨组织、软骨组织、脂肪组织、肌肉组织、血管组织以及造血组织的癌症之外，还可以列举软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤等肉瘤，和肝母细胞瘤、髓母细胞瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、胰腺母细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等母细胞瘤，和生殖细胞瘤、和淋巴瘤、和白血病。

[0189] 在一个实施方式中，与癌症种类的关联中的肿瘤抗原是由正常细胞和癌细胞二者表达的标志物，例如系统标志物，例如，B细胞上的CD19。在某特定方式中，本公开的肿瘤抗原来源于包含原发性或转移性黑色素瘤、胸腺瘤、淋巴瘤、肉瘤、肺癌、结肠直肠癌、肝癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病、子宫癌、宫颈癌、膀胱癌、肾癌、和腺癌例如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌和同种癌的癌症、但不限于这些的癌症。在一个实施方式中，肿瘤抗原是特定增殖性障碍中共有的抗原。在一个实施方式中，癌症关联抗原与正常细胞比较在癌细胞中过度表达的细胞表面分子，例如，与正常细胞比较1倍表达、2倍的过度表达、3倍的过度表达或其以上。在一部分实施方式中，癌症关联抗原是癌细胞中不适当合成的细胞表面分子，例如与正常细胞中表达的分子比较包含缺失、添加或突变的分子。在一个实施方式中，癌症关联抗原全部或作为片段（例如，MHC/肽）排他性地在癌细胞的细胞表面表达，在正常细胞的表面不合成也不表达。通常，来源于内源性蛋白的肽填充主要组织相容性复合物（MHC）I类分子的口袋，被CD8+T淋巴细胞上的T细胞受体（TCR）识别。MHC I类复合物由所有有核细胞组成型表达。在癌症中，病毒特异性和/或肿瘤特异性肽/MHC复合物是用于免疫疗法的细胞表面靶的特有类型的代表。描述了在人白细胞抗原（HLA）-A1或HLA-A2的状况中，以来源于病毒或肿瘤抗原的肽为靶的TCR样抗体[参考例如，Sastry et al., J Virol. 201185(5):1935-1942; Sergeeva et al., Bood, 2011117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther 20018(21):1601-1608; Dao et al., Sci Transl Med 20135(176):176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 201219(2):84-100]。例如，TCR样抗体可以通过筛选人scFv噬菌体展示文库等文库而鉴定。

[0190] 作为本公开的抗原结合分子结合的抗原的实例，包含病毒抗原、细菌（尤其是感染性细菌）抗原、寄生虫抗原、与特定病态关联的靶细胞上的细胞表面标志物（例如，肿瘤抗原）和产生自身免疫的免疫细胞的表面分子。

[0191] 本公开在一个方面中,提供可以与来源于逆转录病毒科(例如,人免疫缺陷病毒,例如,HIV-1和HIV-LP)、小核糖核酸病毒科(例如,脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒和埃可病毒)、风疹病毒、冠状病毒、水疱性口炎病毒、狂犬病病毒、埃博拉病毒、副流感病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、乙型肝炎病毒、细小病毒、腺病毒科、疱疹病毒科[例如,1型和2型单纯疱疹病毒(HSV)、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、和疱疹病毒]、痘病毒科(例如,天花病毒、痘苗病毒和痘病毒)、或丙型肝炎病毒的抗原经由突变抗体结合的嵌合受体。

[0192] 在本公开的另一个方面中,提供可以与来源于葡萄球菌属(*Staphylococci*)、链球菌属(*Streptococcus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、或沙门氏菌属(*Salmonella*)的菌株的抗原经由抗原结合分子结合的嵌合受体。特别地,本公开提供可以与来源于感染性细菌例如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌物种的菌株(例如,结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、或戈多纳分枝杆菌(*M. goodii*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、A组链球菌属、B组链球菌属(无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、或破伤风杆菌(*Clostridium tetani*)的抗原经由抗原结合分子结合的嵌合受体。

[0193] 本公开在另一个方面中,抗原结合分子可以与5T4、 $\alpha 5\beta 1$ -整联蛋白、707-AP、AFP、ART-4、B7H4、B7H3、BAGE、 β -连环蛋白/m、Bcr-abl、MN/C IX抗体、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD19、CD20、CD22、CD25、CDC27/m、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、EGFR、ErbB3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gp100、Gpc3、Gpr20、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT(或hTRT)、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/melan-A、MART-2/Ski、MC1R、肌球蛋白/m、MUC1、MUC-16、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、PAP、蛋白酶3、p190minor bcr-abl、Pml/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RU1或RU2、SAGE、SART-1或SART-3、存活蛋白、TEL/AML1、TGF β 、TPI/m、Trop-2、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGF、WT 1、NY-Eso-1或NY-Eso-B等肿瘤抗原结合。另外,本公开中的该抗体可以与细胞表面粘附分子、自身免疫疾病中见到的炎症性细胞的表面分子、或产生自身免疫的TCR结合。

[0194] 在本说明书中,“免疫受体识别位点”是可以识别作为目的的免疫受体并与免疫受体特异性结合的抗原结合分子的部位,也可以称为免疫受体结合结构域。只要与作为目的的免疫受体结合,免疫受体识别位点可以是任何结构的位点。作为这种位点的实例,并不限于此,例如列举,识别免疫受体为抗原的抗体的重链可变区(VH)和抗体的轻链可变区(VL),单结构域抗体(sdAb),生物体内存在的细胞膜蛋白即Avimer中包含的35个氨基酸左右的称为A结构域模块(国际公开W02004/044011,W02005/040229),包含与细胞膜上表达的糖蛋白即纤连蛋白中的蛋白结合的结构域即10Fn3的Adnectin(国际公开W02002/032925),以构成由蛋白A的58个氨基酸组成的3个螺旋束(bundle)的IgG结合结构域为scaffold的Affibody(国际公开W01995/001937),在具有包含33个氨基酸残基的转角和2个

反向平行螺旋以及环亚基反复堆叠的结构锚蛋白重复序列(ankyrin repeat:AR)的分子表面暴露的区即DARPins(Designed Ankyrin Repeat proteins)(国际公开W02002/020565),支持在嗜中性粒细胞凝血酶结合脂蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL))等脂蛋白分子中高度保守的8个反向平行链向中心扭曲的桶结构的一侧的4个环区即Anticalin等(国际公开W02003/029462),作为七鳃鳗、沼田鳗等无颌类的获得性免疫系统不具有免疫球蛋白结构的可变性淋巴细胞受体(variable lymphocyte receptor(VLR))的富含亮氨酸残基的重复(leucine-rich-repeat(LRR))模块反复堆积而成的马蹄形结构内部的平行型片状结构的凹陷区(国际公开W02008/016854)。

[0195] 作为本发明的免疫受体识别位点的优选实例,列举将免疫受体作为抗原识别的抗体的重链可变区(VH)和抗体的轻链可变区(VL),作为特别优选的实例,列举同时具有靶抗原识别位点的多特异性抗体中的免疫受体识别位点,例如双特异性抗体中的免疫受体识别位点。此外,当可以识别并结合本发明的抗原结合分子具有的特定免疫受体的部位是将免疫受体作为抗原识别的抗体的一部分时,有时将免疫受体识别位点称为抗原结合结构域。例如,多特异性抗体具有多个抗原结合结构域,其中,能够识别并结合靶抗原的抗原结合结构域作为靶抗原结合位点发挥功能,能够识别并结合免疫受体的抗原结合结构域作为免疫受体识别位点发挥功能。因此,每个多特异性抗体的靶抗原结合位点和免疫受体识别位点,均对应多特异性抗体的抗原结合结构域。

[0196] 作为抗原结合分子识别的免疫受体的实例,列举T细胞上的免疫受体和天然杀伤(NK)细胞上的免疫受体。作为其具体示例,列举TIGIT、PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、BTLA、CD268、CD267、CD266、CD226、CD160、CD137、CD96、CD70、CD47、CD40、CD30、CD28、CD27、CD18、NKG2D、VISTA、ICOS、B7-HE、GITR、OX40、KIR、SLAMF7、CTLA-4、RANK,骨保护蛋白(osteoprotegerin),BCMA,TNFR1,TNFR2,Fas,DR1,DR2,DR3,DR4,DR5,DR6,HVEM,NGFR,EDA2R,TR6,TROY等。

[0197] 在一个方式中,抗原结合分子的免疫受体识别位点可以应用针对属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的共刺激分子的激动剂抗体(以下称为TNFRSF的激动剂抗体)或其抗原结合片段。TNFRSF的激动剂抗体意味着,在100%的活化是通过等摩尔量的结合配偶在生理学条件下实现的活化水平的情形中,当添加到表达TNF受体超家族的细胞、组织或生物体中时,活化表达该TNF受体超家族的细胞至少约5%,具体地至少约10%,更具体地至少约15%的抗体。在各种具体实例中,作为本发明的药物组合物使用的TNFRSF的激动剂抗体,可以至少活化约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、1000%或其以上该细胞的活性。在本发明的一个方式中,抗原结合分子的免疫受体识别位点作为激动剂与内源性免疫受体结合,并且也作为激动剂与本发明的嵌合受体结合。

[0198] 作为TNFRSF的激动剂抗体的靶分子,只要是活化表达TNF受体超家族的细胞(例如,T细胞或NK细胞等)的因子,则没有特别限制。作为优选的因子,列举例如CD137、CD40。作为进一步优选的因子,列举例如CD137。例如,作为CD137激动剂抗体的实例,可以列举Urelumab(CAS注册编号:934823-49-1)或各种公知的CD137激动剂抗体。

[0199] 作为CD137激动剂抗体的实例,列举例如W02015/156268中所述的序列编号等显示的以下抗体:

[0200] [1]具有序列编号66中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号85中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0201] [2]具有序列编号67中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号86中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0202] [3]具有序列编号70中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号89中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0203] [4]具有序列编号76中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号95中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0204] [5]具有序列编号77中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号96中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0205] [6]具有序列编号78中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号97中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0206] [7][1]~[6]任一个中所述的抗体,其中,该抗体是具有序列编号99中所述的氨基酸序列作为重链恒定区、和序列编号59中所述的氨基酸序列作为轻链恒定区或序列编号60中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体；

[0207] [8]具有与[1]~[7]任一个中所述的抗体同等活性的抗体；

[0208] [9]与具有与[1]~[7]任一个中所述的抗体结合的表位相同的表位结合的抗体。

[0209] 在上述[8]中所述的抗体中,“同等活性”指对CD137的激动剂活性是上述[1]~[7]任一个中所述的抗体的结合活性的70%以上,优选地80%以上,更优选地90%以上。

[0210] 另外本发明也提供上述[9]中所述的、与本发明中公开的抗CD137抗体结合的表位相同的表位结合的抗体。这种抗体例如可以通过下列方法获得。

[0211] 作为与上述[1]~[7]任一个中所述的抗体结合的表位相同的表位结合的抗体的优选的实例,可以列举例如识别具有CD137蛋白中的SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSNAECDCTPGFHC LGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC的序列(WO2015/156268中记载的序列编号15)的序列的区的抗体。进一步,可以列举识别具有CD137蛋白中的DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC的序列(WO2015/156268中所述的序列编号16)的区的抗体。

[0212] 将上述抗人CD137抗体改变为与肿瘤特异性抗原抗体(例如,抗人GPC3抗体)的双特异性抗体,可以通过评价肿瘤特异性抗原依赖性CD137激动剂能力,来提供发挥期望的效果的抗肿瘤抗原/抗人CD137双特异性抗体,该抗体可以作为本发明的抗原结合分子使用。

[0213] 表位是指抗原中存在的抗原决定基,意味着本说明书中公开的抗原结合分子结合的抗原(靶抗原或免疫受体)上的部位。因此,例如,表位可以通过其结构定义。另外,也可以通过识别该表位的抗原结合分子对抗原的结合活性定义该表位。在抗原是肽或多肽的情形中,也可以通过构成表位的氨基酸残基鉴定表位。另外,在表位是糖链的情形中,也可以通过特定的糖链结构鉴定表位。

[0214] 线状表位是包含氨基酸一级序列识别的表位的表位。直线状表位典型地在固有序列中包含至少3个、和最通常至少5个、例如约8~约10个、6~20个氨基酸。

[0215] 与线状表位对照,立体表位为包含表位的氨基酸的一级序列不是识别的表位的单一规定成分的表位(例如,氨基酸的一级序列不一定通过规定表位的抗体识别的表位)。立体表位可能包含相对于线状表位增大数目的氨基酸。关于立体结构表位的识别,抗原结合

分子的靶抗原识别位点或免疫受体识别位点识别肽或蛋白的三维结构。例如,在蛋白分子形成折叠三维结构的情形中,形成立体表位的某氨基酸和/或多肽主链成为并列,抗体可识别表位。在决定表位的立体结构的方法中,包含例如X线结晶学、二维核磁共振波谱以及位点特异性自旋标记和电子顺磁共振波谱,但不限于这些。例如,参考Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology(1996),第66卷,Morris(编辑)。

[0216] 与靶抗原或免疫受体的表位结合的抗原结合分子的靶抗原识别位点或免疫受体识别位点的结构称作互补位。通过作用于表位与互补位之间的氢键、静电力、范德华力、疏水键等,表位与互补位稳定结合。该表位与互补位之间的结合力称作亲和力(affinity)。多个抗原与多个抗原结合结构域结合时的结合力的总和称为亲合力(avidity)。当包含多个抗原结合结构域(即多价)的抗体等与多个表位结合时,由于结合力(affinity)协同工作,亲合力高于亲和力。

[0217] 在特定实施方式中,本说明书中提供的抗原结合分子具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8} (1E-08)M以下、例如 10^{-8} (1E-08)M $\sim 10^{-13}$ (1E-13)M、例如 10^{-9} (1E-09)M $\sim 10^{-13}$ (1E-13)M)的解离常数(Kd)。

[0218] 以下包含针对抗原的抗原结合结构域,或作为靶抗原识别位点或免疫受体识别位点的抗原结合结构域的抗原结合分子与表位结合的确证方法可以按照下列示例来适当实施。

[0219] 例如,当抗原是在细胞表面表达的受体时,对该抗原的抗原结合结构域识别某抗原分子中存在的线状表位,例如可以通过以下方式确认。为了上述目的,合成由构成某抗原的细胞外结构域的氨基酸序列构成的线状肽。该肽可以化学合成。或者,利用编码某抗原的cDNA中相当于细胞外结构域的氨基酸序列的区,通过遗传工序的手法得到。接着,评价构成细胞外结构域的氨基酸序列构成的线状肽与针对某抗原的抗原结合结构域的结合活性。例如,可以通过将固定的线状肽作为抗原的ELISA,评价该抗原结合结构域针对该肽的结合活性。或者,根据线状肽对某抗原表达细胞与该抗原结合结构域的结合中的抑制水平,可以阐明针对线状肽的结合活性。通过这些试验,可以阐明该抗原结合结构域针对线状肽的结合活性。

[0220] 另外,靶抗原识别位点或免疫受体识别位点识别立体表位可以通过以下方式确认。配制表达靶抗原或免疫受体的细胞。列举当与具有靶抗原或针对免疫受体的靶抗原识别位点或免疫受体识别位点的所述细胞接触时与该细胞强结合,而所述识别位点与由构成固定的某靶抗原或免疫受体的氨基酸序列构成的线状肽实质上不结合,或与由构成使用胍等普通改性剂改性的某靶抗原或免疫受体的细胞外结构域的氨基酸序列构成的线状肽实质上不结合等。此处,实质上不结合指后者的结合活性是针对靶抗原或免疫受体表达细胞的结合活性的80%以下、通常50%以下、优选地30%以下、特别优选地15%以下的情形。

[0221] 另外,作为确证针对抗原结合分子的靶抗原或免疫受体发结合活性的方法,例如,有通过放射性标记抗原结合测定法(radiolabeled antigen binding assay:RIA)测定Kd值的方法。在一个实施方式中,RIA使用抗原结合分子和靶抗原或免疫受体或它们的片段而实施。例如,抗原结合分子的溶液中结合亲和力,通过非标记抗原的渐增系列存在下,用最小浓度的(125I)标记抗原平衡抗原结合结构域,然后用涂有抗原结合结构域的板捕获结合的抗原来测定(例如,参照Chen et al.,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。

[0222] 根据另一实施方式,Kd通过应用了BIAcore (注册商标)的表面等离子共振法来测定。例如,应用BIAcore (注册商标)-2000或BIAcore (注册商标)-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定法,使用固定有约10个反应单位(response unit:RU)的抗原的CM5芯片在25℃下实施。在一个实施方式中,羧基甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.),按照供应源的指示使用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)来活化。在以5 μ l/分钟的流速输注抗原之前,使用10mM乙酸钠、pH4.8稀释到5 μ g/ml(约0.2 μ M),以实现约10反应单位(RU)的蛋白的结合。输注抗原后,为了阻断未反应基团输注1M乙醇胺基。为了进行动力学测定,以25℃,约25 μ l/分钟的流速输注含有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20(注册商标))表面活性剂的PBS(PBST)中的抗原结合分子(靶抗原识别位点或免疫受体识别位点)的2倍梯度稀释物(0.78nM~500nM)。结合速度(kon)和解离速率(koff)通过使用单纯的1对1朗缪尔结合模型(BIAcore(注册商标)评价软件版本3.2)同时拟合结合和解离的传感器图形来计算。平衡解离常数(Kd)计算为koff/kon比。进一步,通过应用平衡法解析可以求取表观解离常数(Kd)。这些方法参照BIAcore(注册商标)中附属的协议。例如参照,Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)或Methods Enzymol. 2000;323:325-40.。另外,在表面等离子体共振分析中,本领域技术人员可以任意改变固相化的蛋白量和反应中使用的蛋白量、温度和溶液组成。通过上述表面等离子共振分析,在导通速度超过10⁶M⁻¹s⁻¹的情况下,可以通过使用荧光消光技术来确定导通速度,所述荧光消光技术在使用分光计(例如停流式分光光度计(Aviv Instruments)或搅拌反应杯的8000系列的SLM-AMINCO(商标)分光光度计(ThermoSpectronic))中测定,测定递增浓度抗原存在下的PBS、pH7.2中20nM的抗原结合结构域在25℃下的荧光发光强度(激发=295nm;发光=340nm,带通16nm)的增加或减少。

[0223] 进一步,抗原结合分子对靶抗原或免疫受体的结合活性也可以通过电化学发光法等已知的分子间相互作用的测定方法来测定。另外,可以使用靶抗原识别位点或免疫受体识别位点对应的片段来代替本说明书中记载的分析中使用的抗原结合分子,可以使用靶抗原识别位点或免疫受体识别位点对应的片段或抗原结合分子作为靶抗原识别位点或免疫受体识别位点。

[0224] 作为测定抗原结合分子针对靶抗原或免疫受体的表达细胞的结合活性的方法,列举例如Antibodies A Laboratory Manual中记载的方法(Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)359-420)。即可以通过将靶抗原或免疫受体的表达细胞作为抗原的ELISA或FACS(fluorescence activated cell sorting)的原理来评价。

[0225] 在ELISA形式中,通过比较由酶促反应生成的信号水平定量评价抗原结合分子的结合活性。即,在固定了某抗原的表达细胞的ELISA板中添加被测抗原结合分子,利用识别被测抗原结合分子的酶标记抗体检测与细胞结合的被测抗原结合结构域。或在FACS中,制成被测抗原结合分子的稀释系列,通过确定针对某抗原的表达细胞的抗体结合效价(titer),可以比较被测抗原结合分子针对某抗原的表达细胞的结合活性。

[0226] 被测抗原结合分子与在悬浮在缓冲液等中的细胞表面上表达的靶抗原或免疫受体的结合,可以通过流式细胞仪来检测。作为流式细胞仪,例如已知如下装置。

[0227] FACSCanto™II

[0228] FACSria™

[0229] FACSArray™

[0230] FACSVantage™SE

[0231] FACSCalibur™(均为BD Biosciences公司的商品名)

[0232] EPICS ALTRA HyPerSort

[0233] Cytomics FC 500

[0234] EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

[0235] Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC(均为Beckman Coulter公司的商品名)。

[0236] 作为抗原结合分子针对靶抗原或免疫受体的结合活性的优选测定方法的一个实例,列举以下方法。首先,用FITC标记的二次抗体染色,该二次抗体识别与表达某抗原的细胞反应的被测抗原结合分子。通过用优选缓冲液适当稀释被测抗原结合分子,配制成该抗原结合分子期望的浓度来使用。例如,可以在10 μ g/ml到10ng/ml之间的任一浓度下使用。接着,通过FACSCalibur™(BD公司)测定荧光强度与细胞数量。针对该细胞的抗原结合分子的结合量反映在通过应用CELL QUEST Software(BD社公司)解析而得到的荧光强度,即几何平均数的值中。即,通过得到该几何平均数的值,可以测定被测抗原结合分子的结合量表示的被测抗原结合分子的结合活性。

[0237] 某抗原结合分子与另一抗原结合分子共享表位,这可以通过两者对相同表位的竞争来确认。抗原结合分子间的竞争通过交叉阻塞分析等检测。例如竞争ELISA分析是优选的交叉阻塞分析。

[0238] 具体地,在交叉阻塞分析中,在候补竞争抗原结合分子存在下或不存在下,预孵育微量滴定板的阱上涂覆的来源于某靶抗原或来源于免疫受体的抗原蛋白后,添加被测抗原结合分子。与阱中的某抗原蛋白结合的被测抗原结合分子的量,与竞争抗原结合分子的结合能力间接相关,竞争抗原结合分子是竞争与相同表位结合的候补。即针对同一表位的竞争抗原结合分子的亲和力越大,与涂有被测抗原结合分子的某抗原蛋白的结合活性越低。

[0239] 经由抗原蛋白与阱结合的被测抗原结合分子的量,可以通过预先标记抗原结合分子容易地测定。例如,生物素标记的抗原结合分子通过使用亲和素过氧化酶偶联物和适当的基质而测定。利用过氧化酶等酶标记的交叉阻塞分析特别称为竞争ELISA分析。抗原结合分子可以用可以检测或测定的其它标记物质来标记。具体地,放射标记或荧光标记等是公知的。

[0240] 与在候补竞争抗原结合分子缔合体不存在下实施的控制试验中得到的结合活性相比,如果竞争抗原结合分子可以阻断抗原结合分子与某抗原的结合至少20%,优选地至少20-50%,进一步优选地至少50%,则该被测抗原结合分子是与竞争抗原结合分子实质上相同的表位结合或竞争与相同表位结合的抗原结合分子。

[0241] 在鉴定抗原结合分子结合的表位的结构的情形中,被测抗原结合分子与对照抗原结合分子共享表位,这可以通过比较抗原结合分子针对在构成该表位的肽中导入氨基酸突变的肽或多肽这两者的结合活性来评价。

[0242] 作为测定这种结合活性的方法,例如,可以通过比较被测抗原结合分子和对照抗原结合分子与在所述ELISA格式中导入了突变的线状肽的结合活性来测定。作为ELISA以外的方法,也可以通过将待测抗原结合分子和对照抗原结合分子流下到该柱后,对洗脱液中洗脱的抗原结合分子进行定量来测定针对与柱结合的该突变肽的结合活性。将突变肽作为

例如与GST的融合肽吸附在柱上的方法是公知的。

[0243] 另外,当鉴定的表位为立体表位时,可通过以下方法评价被测抗原结合分子与对照抗原结合分子共享表位。首先,配制表达在表达某抗原的细胞与表位中导入突变的某抗原的细胞。这些细胞针对在PBS等适当缓冲液中悬浮的细胞悬浮液添加被测抗原结合分子与对照抗原结合分子。然后,针对用适当缓冲液洗涤的细胞悬浮液,添加可以识别被测抗原结合分子与对照抗原结合分子的FITC标记的抗体。通过FACSCalibur™(BD公司)测定由标记抗体染色的细胞的荧光强度与细胞数量。被测抗原结合分子与对照抗原结合分子的浓度通过用优选缓冲液适当稀释,配制成期望的浓度来使用。例如,在10μg/ml到10ng/ml之间的任一浓度下使用。针对该细胞的标记抗体的结合量反映在通过应用CELL QUEST™Software(BD公司)解析而得到的荧光强度,即几何平均数的值中。即,通过得到该几何平均数的值,可以测定标记抗体的结合量表示的被测抗原结合分子与对照抗原结合分子的结合活性。

[0244] 此外,除了上述ELISA或FACS之外,还可以利用放射性标记抗原结合测定法(radiolabeled antigen binding assay:RIA),BIACORE(注册商标)表面等离子共振分析,电化学发光法等来确认抗原结合分子与另一抗原结合分子对相同表位的竞争。

[0245] 将解析得到的反映被测抗原结合分子与突变的某抗原表达细胞的结合量的几何平均数比较值(突变的某抗原的分子 Δ Geo-Mean值)与反映被测抗原结合分子与某抗原的表达细胞的结合量的 Δ Geo-Mean比较值进行比较。在该情形中,特别优选的是,在求取突变的某抗原的表达细胞和针对某抗原的表达细胞的 Δ Geo-Mean的比较值时,使用的被测抗原结合分子的浓度彼此相同或实质上相同。预先确认识别抗原中的表位的抗原结合分子作为对照抗原结合分子利用。

[0246] 若针对待测抗原结合分子的突变的某抗原的表达细胞的 Δ Geo-Mean比较值小于针对待测抗原结合分子的某抗原的表达细胞的 Δ Geo-Mean比较值至少80%,优选地50%,更优选地30%,特别优选地15%,则“与突变的某抗原的表达细胞实质上不结合”。求Geo-Mean值(几何平均数)的计算公式记载于CELL QUEST Software User's Guide(BD biosciences公司)中。如果通过比较比较值可以视为实质上相同的程度,则可以评价为被测抗原结合分子与对照抗原结合分子的表位相同。

[0247] 在本说明书中术语“转运部分”指抗原结合分子中的靶抗原识别位点和免疫受体识别位点以外的部分。本发明的转运部分通常是由氨基酸构成的肽或多肽,作为具体的一个实施方式,抗原结合分子中的转运部分与靶抗原识别位点和免疫受体识别位点连接。本发明的转运部分,可以通过酰胺键连接的一系列肽或多肽,也可以是多个肽或多肽通过二硫键等共价键或氢键、疏水性相互作用等非共价键形成的复合物。

[0248] 在抗原结合分子是抗体的情形中,作为延长血中半衰期的一个实施方式,列举赋予抗原结合分子FcRn结合性。赋予FcRn结合性通常有一种方法,即在抗原结合分子中设置FcRn结合区。FcRn结合区是指对FcRn具有结合性的区,只要对FcRn具有结合性,任何结构都可以使用。

[0249] 通过包含FcRn结合区,可以通过FcRn的抢救途径进入细胞后再返回到血浆中。例如,IgG分子在血浆中的滞留性较长(消失较慢),这是因为作为IgG分子的抢救受体而已知的FcRn在发挥作用。通过胞饮作用进入内体的IgG分子,在内体酸性条件下与内体表达的FcRn结合。不能与FcRn结合的IgG分子进入溶酶体,在那里被分解,与FcRn结合的IgG分子转

移到细胞表面,在血浆中的中性条件下,通过从FcRn解离再次返回血浆中。

[0250] FcRn结合区优选是直接和FcRn结合的区。作为FcRn结合区的优选实例,可以列举抗体的Fc区。然而,由于可以与具有与白蛋白或IgG等FcRn结合的能力的多肽结合的区可以经由白蛋白或IgG等间接地与FcRn结合,因此本发明中的FcRn结合区也可以是与具有与这样的FcRn结合的能力的多肽结合的区。

[0251] 针对本发明中的FcRn结合区的FcRn,特别是人FcRn的结合活性,如所述结合活性的项中所述,可以通过本领域技术人员公知的方法测定,本领域技术人员可以适当决定条件。与人FcRn的结合活性可以被评价为KD (Dissociation constant:解离常数)、表观KD (Apparent dissociation constant:表观解离常数)、解离速度kd (Dissociation rate:解离速度)或表观kd (Apparent dissociation:表观解离速度)等。它们可以用本领域技术人员公知的方法测定。例如,可以使用Biacore (GE healthcare)、斯卡查德图、流式细胞仪等。

[0252] 本领域技术人员可以适当选择测定针对FcRn结合区的FcRn的结合活性时的条件,没有特别限定。例如,如WO2009/125825中所述,可以在MES缓冲器、37°C条件下测定。另外,本发明的FcRn结合区对FcRn的结合活性的测定,可以通过本领域技术人员公知的方法来进行,例如,可以使用Biacore (GE Healthcare)来测定。

[0253] 作为测定条件中使用的pH值,FcRn结合区与FcRn的结合亲和力可以在pH4.0~pH6.5之间的任意pH值下进行评价。优选地,为了确定FcRn结合区与人FcRn的结合亲和力,使用与生物体内早期体内内的pH接近的pH5.8~pH6.0的pH。作为测定条件中使用的温度,FcRn结合区与FcRn之间的结合亲和力可以在10°C~50°C的任意温度下进行评价。优选地,为了确定FcRn结合区与人FcRn的结合亲和力,使用15°C~40°C的温度。更优选地,从20°C到35°C的任意温度,诸如20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34和35°C中的任一个,同样也用于确定FcRn结合区与FcRn的结合亲和力。25°C这一温度是本发明方式的一个非限定性例子。

[0254] 作为FcRn结合区的一个例子不仅限于此,例如列举IgG抗体Fc区。使用IgG抗体的Fc区时,其种类不受限定,可以使用IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等Fc区。

[0255] 另外,天然型IgG抗体的Fc区当然可以使用,只要具有FcRn结合性,也可以使用一个或其以上的氨基酸被置换的改变Fc区。

[0256] 例如,可以使用包含将选自IgG抗体Fc区中的EU编号第237、第238、第239、第248、第250、第252、第254、第255、第256、第257、第258、第265、第270、第286、第289、第297、第298、第303、第305、第307、第308、第309、第311、第312、第314、第315、第317、第325、第332、第334、第360、第376、第380、第382、第384、第385、第386、第387、第389、第424、第428、第433、第434和第436的至少1个氨基酸置换为其它氨基酸的氨基酸序列的改变Fc区。

[0257] 更具体地,可以使用包含选自下列IgG抗体Fc区中的EU编号的至少1个氨基酸置换的改变Fc区:

[0258] 将第237的Gly置换为Met的氨基酸置换、

[0259] 将第238的Pro置换为Ala的氨基酸置换、

[0260] 将第239的Ser置换为Lys的氨基酸置换、

[0261] 将第248的Lys置换为Ile的氨基酸置换、

[0262] 将第250的Thr置换为Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或Tyr的氨基酸置换、

- [0263] 将第252的Met替换为Phe、Trp、或Tyr的氨基酸置换、
- [0264] 将第254的Ser替换为Thr的氨基酸置换、
- [0265] 将第255的Arg替换为Glu的氨基酸置换、
- [0266] 将第256的Thr替换为Asp、Glu、或Gln的氨基酸置换、
- [0267] 将第257的Pro替换为Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或Val的氨基酸置换、
- [0268] 将第258的Glu替换为His的氨基酸置换、
- [0269] 将第265的Asp替换为Ala的氨基酸置换、
- [0270] 将第270的Asp替换为Phe的氨基酸置换、
- [0271] 将第286的Asn替换为Ala或Glu的氨基酸置换、
- [0272] 将第289的Thr替换为His的氨基酸置换、
- [0273] 将第297的Asn替换为Ala的氨基酸置换、
- [0274] 将第298的Ser替换为Gly的氨基酸置换、
- [0275] 将第303的Val替换为Ala的氨基酸置换、
- [0276] 将第305的Val替换为Ala的氨基酸置换、
- [0277] 将第307的Thr替换为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或Tyr的氨基酸置换、
- [0278] 将第308的Val替换为Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或Thr的氨基酸置换、
- [0279] 将第309的Leu或Val替换为Ala、Asp、Glu、Pro、或Arg的氨基酸置换、
- [0280] 将第311的Gln替换为Ala、His、或Ile的氨基酸置换、
- [0281] 将第312的Asp替换为Ala或His的氨基酸置换、
- [0282] 将第314的Leu替换为Lys或Arg的氨基酸置换、
- [0283] 将第315的Asn替换为Ala或His的氨基酸置换、
- [0284] 将第317的Lys替换为Ala的氨基酸置换、
- [0285] 将第325的Asn替换为Gly的氨基酸置换、
- [0286] 将第332的Ile替换为Val的氨基酸置换、
- [0287] 将第334的Lys替换为Leu的氨基酸置换、
- [0288] 将第360的Lys替换为His的氨基酸置换、
- [0289] 将第376的Asp替换为Ala的氨基酸置换、
- [0290] 将第380的Glu替换为Ala的氨基酸置换、
- [0291] 将第382的Glu替换为Ala的氨基酸置换、
- [0292] 将第384的Asn或Ser替换为Ala的氨基酸置换、
- [0293] 将第385的Gly替换为Asp或His的氨基酸置换、
- [0294] 将第386的Gln替换为Pro的氨基酸置换、
- [0295] 将第387的Pro替换为Glu的氨基酸置换、
- [0296] 将第389的Asn替换为Ala或Ser的氨基酸置换、
- [0297] 将第424的Ser替换为Ala的氨基酸置换、
- [0298] 将第428的Met替换为Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或Tyr的氨基酸置换、
- [0299] 433的His替换为Lys的氨基酸置换、

- [0300] 434的Asn替换为Ala、Phe、His、Ser、Trp、或Tyr的氨基酸置换、和
- [0301] 436的Tyr或Phe替换为His的氨基酸置换。
- [0302] 从另一方面来看,可以使用包含选自下列IgG抗体Fc区中的EU编号的至少1个氨基酸的Fc区:
- [0303] 第237的氨基酸中的Met、
- [0304] 第238的氨基酸中的Ala、
- [0305] 第239的氨基酸中的Lys、
- [0306] 第248的氨基酸中的Ile、
- [0307] 第250的氨基酸中的Ala、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、或Tyr、
- [0308] 第252的氨基酸中的Phe、Trp、或Tyr、
- [0309] 第254的氨基酸中的Thr、
- [0310] 第255的氨基酸中的Glu、
- [0311] 第256的氨基酸中的Asp、Glu、或Gln、
- [0312] 第257的氨基酸中的Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、或Val、
- [0313] 第258的氨基酸中的His、
- [0314] 第265的氨基酸中的Ala、
- [0315] 第270的氨基酸中的Phe、
- [0316] 第286的氨基酸中的Ala或Glu、
- [0317] 第289的氨基酸中的His、
- [0318] 第297的氨基酸中的Ala、
- [0319] 第298的氨基酸中的Gly、
- [0320] 第303的氨基酸中的Ala、
- [0321] 第305的氨基酸中的Ala、
- [0322] 第307的氨基酸中的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、或Tyr、
- [0323] 第308的氨基酸中的Ala、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、或Thr、
- [0324] 第309的氨基酸中的Ala、Asp、Glu、Pro、或Arg、
- [0325] 第311的氨基酸中的Ala、His、或Ile、
- [0326] 第312的氨基酸中的Ala或His、
- [0327] 第314的氨基酸中的Lys或Arg、
- [0328] 第315的氨基酸中的Ala或His、
- [0329] 第317的氨基酸中的Ala、
- [0330] 第325的氨基酸中的Gly、
- [0331] 第332的氨基酸中的Val、
- [0332] 第334的氨基酸中的Leu、
- [0333] 第360的氨基酸中的His、
- [0334] 第376的氨基酸中的Ala、
- [0335] 第380的氨基酸中的Ala、
- [0336] 第382的氨基酸中的Ala、

- [0337] 第384的氨基酸中的Ala、
- [0338] 第385的氨基酸中的Asp或His、
- [0339] 第386的氨基酸中的Pro、
- [0340] 第387的氨基酸中的Glu、
- [0341] 第389的氨基酸中的Ala或Ser、
- [0342] 第424的氨基酸中的Ala、
- [0343] 第428的氨基酸中的Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、或Tyr、
- [0344] 第433的氨基酸中的Lys、
- [0345] 第434的氨基酸中的Ala、Phe、His、Ser、Trp、或Tyr、和
- [0346] 第436的氨基酸中的His
- [0347] 另外,作为延长血中半衰期的一个实施方式,有使抗原结合分子与白蛋白结合的方法。白蛋白不经肾排泄,具有FcRn结合性,因此血中半衰期长达17-19天(J Clin Invest.1953Aug;32(8):746-768.)。因此报告了与白蛋白结合的蛋白体积增大,并且可以间接地FcRn结合,因此血中半衰期增加(Antibodies 2015,4(3),141-156)。
- [0348] 进一步,作为延长血中半衰期的一个实施方式,有PEG化抗原结合分子的方法。认为通过PEG化蛋白使蛋白体积增大,同时抑制了血中蛋白酶的分解,从而延长了蛋白在血中的半衰期(J Pharm Sci.2008Oct;97(10):4167-83.)。
- [0349] 在本发明的一些实施方式中,抗原结合分子包含抗体Fc区。作为具体的一个实施方式,抗原结合分子包含人IgG抗体的CH2结构域以及CH3结构域。作为具体的一个实施方式,抗原结合分子包含从人IgG1抗体重链Cys226、或从Pro230延伸至重链的羧基末端的部分。但是,Fc区的C末端的赖氨酸(Lys447)或甘氨酸-赖氨酸(Gly446-Lys447)可以存在也可以不存在。
- [0350] 在本发明的一些实施方式中,抗原结合分子包含抗体恒定区。在更优选的实施方式中,抗原结合分子包含IgG抗体恒定区。在更优选的实施方式中,抗原结合分子包含人IgG抗体恒定区。在进一步优选的实施方式中,抗原结合分子是双特异性抗体,包含人IgG抗体恒定区。
- [0351] 在进一步的本发明的一些实施方式中,抗原结合分子包含具有与抗体重链恒定区实质上类似的结构区域,和与该区域通过二硫键等共价键或氢键、疏水性相互作用等非共价键结合,且具有与抗体轻链实质上类似的结构区域。
- [0352] 本说明书中使用的术语“IgG抗体样分子”用于定义具有与IgG抗体等恒定结构域或恒定区结构实质上类似的部分,以及具有与IgG抗体等可变结构域或可变区的结构实质上类似的部分,且具有与IgG抗体实质上类似的立体结构的分子。但是,本说明书的“IgG抗体样分子”不限于在保持与IgG抗体类似的结构的情况下发挥抗原结合活性。
- [0353] 当抗原结合分子是IgG抗体样分子时,在相当于IgG抗体的两个可变区的部分中分别设置靶抗原识别位点和免疫受体识别位点的实施方式包含在本发明中。
- [0354] 在本说明书中,术语“特异性”是指抗原结合分子的靶抗原识别位点或免疫受体识别位点分别与特定靶抗原或免疫受体以外的分子实质上不结合的性质。也用于抗原结合分子对特定靶抗原中或免疫受体中包含的表位具有特异性情形。实质上不结合是指按照结

合活性测定所记载的上述方法确定,特结合分子对所述特定靶抗原或免疫受体以外的分子的结合活性为对所述对方分子的结合活性的80%以下,通常为50%以下,优选为30%以下,特别优选为15%以下。

[0355] 本发明中的抗原结合分子通常可以通过将编码它的核酸携带(插入)到适当的载体中,并将其导入宿主细胞中,利用常规方法来制备。作为该载体,如果是稳定地保持插入的核酸的载体就没有特别限制,例如,如果在宿主中使用大肠杆菌,则作为克隆用载体优选pBluescript载体(Stratagene公司生产)等,但可以利用市售的各种载体。当载体用于生产在本发明的实施中使用的多肽(例如嵌合受体、IgG抗体、双特异性抗体、抗原结合分子等)时,表达载体特别有用。作为表达载体,如果是在试管内,大肠杆菌内,培养细胞内和生物个体内表达多肽的载体,则没有特别限制,例如,如果是试管内表达则优选pBEST载体(Promega公司生产),如果是大肠杆菌则优选pET载体(Invitrogen公司生产),如果是培养细胞则优选pME18S-FL3载体(GenBank Accession No.AB009864),如果是生物个体则优选pME18S载体(Mol Cell Biol.8:466-472(1988))等。将本发明的DNA插入载体可以通过常规方法,例如使用了限制性酶位点的连接酶反应进行(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987)Publish.John Wiley&Sons.Section 11.4-11.11)。

[0356] 作为上述宿主细胞没有特别限制,根据目的使用各种宿主细胞。作为用于表达抗原结合分子的细胞,例如可以示例细菌细胞(例如链球菌、葡萄球菌、大肠杆菌、链霉菌、枯草菌)、真菌细胞(如酵母、曲霉)、昆虫细胞(如如果蝇S2、夜蛾SF9)、动物细胞(如CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes黑色素瘤细胞)和植物细胞。向宿主细胞导入载体可以采用例如磷酸钙沉淀法,电脉冲穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987)Publish.John Wiley&Sons.Section 9.1-9.9),脂质体法(GIBCO-BRL公司生产)和微注射法等公知的方法进行。

[0357] 为了使宿主细胞中表达的抗原结合分子分泌到内质网内腔、细胞周腔或细胞外环境中,可将适当的分泌信号并入编码目标抗原结合分子的核酸中。这些信号对于目标多肽可以是内源性的,也可以是异种信号。

[0358] 上述制备方法中的抗原结合分子的回收是,当本发明的抗原结合分子分泌到培养基中时回收培养基。当细胞内产生本发明的抗原结合分子时,首先溶解该细胞,然后回收抗原结合分子。

[0359] 从重组细胞培养物中回收和纯化本发明的抗原结合分子可以采用包含硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱的公知的方法。

[0360] 本发明中所述的氨基酸序列中包含的氨基酸在翻译后可能被修饰(例如,N末端的谷氨酰胺通过焦谷氨酰化对焦谷氨酸的修饰是本领域技术人员熟知的修饰),但是即使在这样翻译后氨基酸被修饰的情况下,也理所当然地包含在本发明中所述的氨基酸序列中。

[0361] 制备具有期望的结合活性的抗体的方法是本领域技术人员公知的。在本发明中,可以使用将靶细胞(病变细胞)的表面表达的分子作为抗原(靶抗原)的抗原结合分子。当靶细胞是肿瘤细胞或癌细胞时,本说明书中示例的抗原是肿瘤抗原,以下示例制备与肿瘤抗原结合的抗体的方法。

[0362] 与肿瘤抗原结合的抗体可以使用公知的手段获取为多克隆或单克隆抗体。作为该抗体,可以优选制备来源于哺乳动物的单克隆抗体。来源于哺乳动物的单克隆抗体中包含由杂交瘤产生的抗体,和由通过基因工程方法用包含抗体基因的表达载体转化的宿主细胞产生的抗体等。

[0363] 单克隆抗体产生杂交瘤可以通过使用公知技术例如以下列方式制备。即,使用肿瘤抗原蛋白作为致敏抗原,按照常规免疫方法免疫哺乳动物。得到的免疫细胞通过通常的细胞融合法与公知的亲本细胞融合。然后,通过通常的筛选方法,可以选择通过筛选单克隆抗体产生细胞来产生抗肿瘤抗原抗体的杂交瘤。

[0364] 具体地,单克隆抗体的制备例如如下所示。首先,通过表达肿瘤抗原基因,可以获取用作抗体获取的致敏抗原的肿瘤抗原蛋白。即,通过将编码肿瘤抗原的基因序列插入公知的表达载体,转化适当的宿主细胞。用公知的方法从该宿主细胞种或培养上清中纯化期望的人肿瘤抗原蛋白。为了从培养上清中获取可溶型的肿瘤抗原,例如,可以使用肿瘤抗原多肽序列中缺失构成疏水区的部分的蛋白。另外,纯化的天然的GPC3蛋白另外也同样可以作为致敏抗原使用。

[0365] 该纯化肿瘤抗原蛋白可以作为用于哺乳动物免疫的致敏抗原使用。肿瘤抗原的部分肽另外也可以作为致敏抗原使用。此时,该部分肽可以从人肿瘤抗原的氨基酸序列中通过化学合成来获取。另外,也可以通过将肿瘤抗原基因的一部分整合到表达载体进行表达来获取。进一步,也可以通过使用蛋白分解酶分解肿瘤抗原蛋白来获取,但作为部分肽使用的肿瘤抗原肽的区和大小并不局限于特别的方面。构成用作致敏抗原的肽的氨基酸的数量优选至少为5个以上,例如6个以上或7个以上。更具体地,8~50,优选10~30个残基的肽可作为致敏抗原使用。

[0366] 此外,由肿瘤抗原蛋白的期望的部分多肽或肽与不同多肽融合而成的融合蛋白可作为致敏抗原利用。为了制造作为致敏抗原使用的融合蛋白,例如,可以适当地利用抗体的Fc片段和肽标签等。表达融合蛋白的载体可以通过在帧内融合编码期望的两种或其以上的多肽片段的基因,并将该融合基因如所述插入表达载体中来制备。融合蛋白的制备方法在Molecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) 中记载。作为一个实例,作为致敏抗原使用的GPC3的获取方法和使用了该方法的免疫方法,也具体在在W02003/000883、W02004/022754, W02006/006693等中记载。

[0367] 作为由该致敏抗原免疫的哺乳动物,不限于特定动物,但优选考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性来选择。一般适宜使用啮齿类动物,例如小鼠、大鼠、仓鼠或兔、猴等。

[0368] 按照公知的方法,上述动物由致敏抗原免疫。例如,作为普遍的方法,通过将致敏抗原注射到哺乳动物的腹腔或皮下来施用从而实施免疫。具体地,用PBS (Phosphate-Buffered Saline) 或生理盐水等以适当稀释倍率稀释的致敏抗原,根据期望与通常的佐剂例如弗氏完全佐剂混合,乳化后,每4至21天给哺乳动物施用数次该致敏抗原。另外,在致敏抗原免疫时可以使用适当的载体。特别是当分子量较小的部分肽作为致敏抗原使用时,有时也期望免疫与白蛋白和匙孔血蓝蛋白等的载体蛋白结合的该致敏抗原肽。

[0369] 另外,产生期望的抗体的杂交瘤也可以应用DNA免疫以下列方式制备。DNA免疫是

一种免疫方法,在施用了以能够在免疫动物中表达编码抗原蛋白的基因的方式构建的载体DNA的该免疫动物中,通过在该免疫动物体内表达致敏抗原,从而给予免疫刺激。与向免疫动物施用蛋白抗原的一般免疫方法相比,DNA免疫具有以下优势。

[0370] -可以维持膜蛋白的结构,给予免疫刺激。

[0371] -不需要纯化免疫抗原。

[0372] 为了通过DNA免疫得到本发明的单克隆抗体,首先,将表达肿瘤抗原蛋白质的DNA施用于免疫动物。编码肿瘤抗原的DNA,可以通过PCR等公知的方法合成。将得到的DNA插入适当的表达载体,向免疫动物施用。作为表达载体,可以优选利用例如pcDNA3.1等市售的表达载体。作为向生物体施用载体的方法,可以利用通常使用的方法。例如,通过将吸附了表达载体的金粒子导入基因枪免疫动物个体的细胞内,进行DNA免疫。进一步,识别肿瘤抗原的抗体的制备也可以使用国际公开W02003/104453中记载的方法来制备。

[0373] 这样哺乳动物被免疫,确认与血清中的肿瘤抗原结合的抗体效价升高后,从哺乳动物中收集免疫细胞,供细胞融合使用。作为优选的免疫细胞,特别可以使用脾细胞。

[0374] 作为与所述免疫细胞融合的细胞,使用哺乳动物的骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞优选具备用于筛选的适当的选择标志物。选择标志物是指可以(或无法)在特定培养条件下生存的性状。选择标记中次黄嘌呤-鸟嘌呤-磷酸核糖基转移酶缺失(以下简称HGPRT缺失)或胸苷激酶缺失(以下简称TK缺失)等是公知的。缺乏HGPRT和TK的细胞具有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷敏感性(以下简称HAT敏感性)。HAT敏感性的细胞在HAT选择培养基中不能进行DNA合成而死亡,但与正常细胞融合后,利用正常细胞的抢救回路就可以继续DNA的合成,因此在HAT选择培养基中也会增殖。

[0375] HGPRT缺乏和TK缺乏的细胞可以分别在包含6硫代鸟嘌呤,8氮杂鸟嘌呤(以下简称8AG)或5'溴脱氧尿苷的培养基中选择。将这些嘧啶类似物并入到DNA中的正常细胞会死亡。另一方面,缺乏这些不能并入这些嘧啶类似物的酶的细胞可以在选择培养基中生存。另一种称为G418抗性的选择标志物通过新霉素抗性基因赋予对2-去氧链霉素(庆大霉素类似物)的抗性。适合于细胞融合的各种骨髓瘤细胞是公知的。

[0376] 作为这种骨髓瘤细胞,例如可以优选使用P3(P3x63Ag8.653)(J.Immunol.(1979)123(4),1548-1550)、P3x63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology(1978)81,1-7)、NS-1(C.Eur.J.Immunol.(1976)6(7),511-519)、MPC-11(Cell(1976)8(3),405-415)、SP2/0(Nature(1978)276(5685),269-270)、F0(J.Immunol.Methods(1980)35(1-2),1-21)、S194/5.XX0.BU.1(J.Exp.Med.(1978)148(1),313-323)、R210(Nature(1979)277(5692),131-133)等。

[0377] 基本上,按照公知的方法例如克勒和米尔斯坦等人的方法(Methods Enzymol.(1981)73,3-46)进行所述免疫细胞和骨髓瘤细胞之间的细胞融合。

[0378] 更具体地,例如在细胞融合促进剂存在下在通常营养培养液中可以实施所述细胞融合。作为融合促进剂,例如使用聚乙二醇(PEG)、仙台病毒(HVJ)等,进而为了提高融合效率,根据需要添加二甲亚砜等辅助剂来使用。

[0379] 免疫细胞与骨髓瘤细胞的使用比例可以任意设定。例如,相对于骨髓瘤细胞优选免疫细胞为1至10倍。作为用于所述细胞融合的培养液,例如可以使用适合于骨髓瘤细胞株增殖的RPMI1640培养液、MEM培养液、以及用于这种细胞培养的通常培养液,进一步,可以适

当添加胎牛血清(FCS)等血清补液。

[0380] 细胞融合是在所述培养液中充分混合所述免疫细胞和骨髓瘤细胞的规定量,通常以30至60% (w/v)的浓度添加预先加温到37°C左右的PEG溶液(例如平均分子量1000至6000左右)。通过缓慢混合混合液形成期望的融合细胞(杂交瘤)。然后,依次添加上述列举的适当的培养液,通过反复离心去除上清的操作,可以去除不利于杂交瘤生长的细胞融合剂等。

[0381] 通过在通常的选择培养液例如HAT培养液(包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养液)中培养,可以选择如此得到的杂交瘤。可以使用上述HAT培养液继续培养足够长的时间(通常,这种足够长的时间是从数天至数周),以便杀死期望的杂交瘤以外的细胞(非融合细胞)。然后,通过通常的有限稀释法来实施产生期望的抗体的杂交瘤的筛选和单克隆。

[0382] 可以通过利用选择培养液来选择如此得到的杂交瘤,该选择培养液对应于用于细胞融合的骨髓瘤具有的选择标记。例如,可以通过在HAT培养液(包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养液)中培养来选择缺乏HGPRT和TK的细胞。即,在将HAT感受性的骨髓瘤细胞用于细胞融合的情形中,在HAT培养液中成功与正常细胞进行细胞融合的细胞可以选择性增殖。使用上述HAT培养液继续培养足够长的时间,以便杀死期望的杂交瘤以外的细胞(非融合细胞)。具体地,通常可以通过数天至数周的培养来选择期望的杂交瘤。然后,可以通过通常的有限稀释法来实施产生期望的抗体的杂交瘤的筛选和单克隆。

[0383] 可以通过基于公知的抗原抗体反应的筛选方法来优选地实施期望的抗体的筛选和单克隆。例如,与GPC3结合的单克隆抗体可以与在细胞表面表达的GPC3结合。这种单克隆抗体例如可以通过FACS(fluorescence activated cell sorting)进行筛选。FACS是通过利用激光解析与荧光抗体接触的细胞,测定各个细胞发出的荧光来测定抗体与细胞表面的结合的系统。

[0384] 为了通过FACS筛选产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤,首先配制表达GPC3的细胞。用于筛选的优选细胞是强制表达所使用的肿瘤抗原的哺乳动物细胞。可以通过将作为宿主细胞使用的未转化的哺乳动物细胞作为对照使用,来选择性地检测抗体对细胞表面的肿瘤抗原的结合活性。即,可以通过选择产生不与宿主细胞结合而与GPC3强制表达细胞结合的抗体的杂交瘤,来获取产生肿瘤抗原单克隆抗体的杂交瘤。

[0385] 或者抗体针对固定的肿瘤抗原表达细胞的结合活性可以根据ELISA的原理来进行评价。例如,GPC3表达细胞固定在ELISA板的孔中。将杂交瘤的培养上清与孔内的固定细胞接触,检测与固定细胞结合的抗体。在单克隆抗体来源于小鼠的情形中,与细胞结合的抗体可以通过抗小鼠免疫球蛋白抗体来进行检测。通过这些筛选选择的、产生对抗原具有结合能力的期望的抗体的杂交瘤可以通过有限稀释法进行克隆。

[0386] 如此制备的产生单克隆抗体的杂交瘤可以在通常的培养液中传代培养。另外,该杂交瘤可以在液氮中长期保存。

[0387] 可以按照通常的方法培养该杂交瘤,并且可以从该培养上清中获取期望的单克隆抗体。或者,可以向与之具有相容性的哺乳动物施用杂交瘤以使其增殖,并从中获取单克隆抗体。前一种方法适合获得高纯度抗体。

[0388] 也可以优选地利用由从该杂交瘤等的抗体产生细胞克隆的抗体基因编码的抗体。通过将克隆的抗体基因整合到适当的载体并导入宿主中,表达由该基因编码的抗体。例如,Vandamme等人已经建立了分离抗体基因,导入载体和转化宿主细胞的方法

(Eur. J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775)。如下文所述,重组抗体的制造方法也是公知的。
[0389] 例如,从产生与肿瘤抗原结合的抗体的杂交瘤细胞中获取编码该抗体的可变区(V区)的cDNA。因此,通常首先从杂交瘤中提取全RNA。作为用于从细胞中提取mRNA的方法,例如可以利用下列方法:一胍超离心法(Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299) -AGPC法(Anal. Biochem. 1987) 162 (1), 156-159)。

[0390] 可以使用mRNA Purification Kit (GE医疗生命科学生产) 等来纯化提取的mRNA。或者,用于直接从细胞中提取全mRNA的试剂盒,如QuickPrep mRNA Purification Kit (GE医疗生命科学生产) 等也已经市售。可以使用这种试剂盒从杂交瘤中获取mRNA。可以使用逆转录酶,从得到的mRNA中合成编码抗体V区的cDNA。cDNA可以通过AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工业公司生产) 等来合成。另外,为了cDNA的合成和扩增,可以适当利用使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech生产) 和PCR的5' -RACE方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002, Nucleic Acids Res. 1989) 17 (8), 2919-2932)。此外,在这种cDNA的合成过程中,可以在cDNA的两个末端导入如下所述的适当的限制性酶位点。

[0391] 从得到的PCR产物中纯化目标cDNA片段,然后与载体DNA连接。如此制备重组载体,在导入大肠杆菌等并选择菌落之后,可以从形成该菌落的大肠杆菌中制备期望的重组载体。然后,通过公知方法,例如二脱氧核苷酸链终止法等,确认该重组载体是否具有目标cDNA的碱基序列。

[0392] 为了获取编码可变区的基因,利用使用了用于可变区基因扩增的引物的5' -RACE方法是简便的。首先以从杂交瘤细胞提取的RNA为模板合成cDNA,得到5' -RACE cDNA文库。在合成5' -RACE cDNA文库时,可适当使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒等市售的试剂盒。

[0393] 将得到的5' -RACE cDNA文库作为模板,通过PCR法扩增抗体基因。可以基于公知的抗体基因序列设计用于小鼠抗体基因扩增的引物。这些引物是免疫球蛋白每一亚类不同的碱基序列。因此,期望事先使用Iso Strip小鼠单克隆抗体同型试剂盒(Rosh Diagnostics) 等市售试剂盒来确定亚类。

[0394] 具体地,例如,以获取编码小鼠IgG的基因为目的时,可以利用能够扩增编码 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ 重链、 κ 链和 λ 链轻链的基因的引物。为了扩增IgG的可变区基因,一般在3'侧的引物利用退火到相当于接近可变区的恒定区的部分的引物。另一方面,5'的引物利用5' RACE cDNA文库制备试剂盒附带的引物。

[0395] 利用如此扩增的PCR产物,可以重构由重链和轻链的组合组成的免疫球蛋白。可以将重构的免疫球蛋白对抗原的结合活性作为指标来筛选期望的抗体。例如,当以获取针对GPC3的抗体为目的时,抗体与GPC3的结合更优选为特异性。本发明中使用的抗体,例如可以通过以下方式筛选:

[0396] (1) 将包含由从杂交瘤得到的cDNA编码的V区的抗体接触抗原表达细胞的工序,

[0397] (2) 检测抗原表达细胞与抗体的结合的工序,和

[0398] (3) 选择与抗原表达细胞结合的抗体的工序。

[0399] 检测抗体与肿瘤抗原表达细胞结合的方法是公知的。具体地,通过上述FACS等手法,可以检测抗体与肿瘤抗原表达细胞的结合。为了评估抗体的结合活性,可以适当利用肿瘤抗原表达细胞的固定标本。

[0400] 作为以结合活性为指标的抗体筛选方法,也优选使用利用了噬菌体的淘选法。从多克隆抗体表达细胞群中获取抗体基因作为重链和轻链的亚类文库时,利用了噬菌体的筛选方法是有利的。编码重链和轻链的可变区的基因可以通过适当的接头序列连接而形成单链Fv(scFv)。通过将编码scFv的基因插入噬菌体载体,可以获取表面表达scFv的噬菌体。在该噬菌体与期望的抗原接触之后,通过回收与抗原结合的噬菌体,可以回收编码具有目标结合活性的scFv的DNA。通过根据需要重复该操作,可以浓缩具有期望的结合活性的scFv。

[0401] 在得到编码与目标肿瘤抗原结合的抗体的V区的cDNA之后,通过识别插入该cDNA两个末端的限制性酶位点的限制性酶来消化cDNA。优选的限制性酶识别和消化在构成抗体基因的碱基序列中出现频率低的碱基序列。进而,为了将1拷贝的消化片段以正确的方向插入载体,最好插入给予附着末端的限制性酶。通过将编码如上所述消化的抗GPC3抗体的V区的cDNA插入适当的表达载体中,可以获得抗体表达载体。此时,如果编码抗体恒定区(C区)的基因和所述编码V区的基因在帧内融合,则获得嵌合抗体。此处,嵌合抗体是指恒定区与可变区的来源不同。因此,除了小鼠-人等异源嵌合抗体外,人-人同种嵌合抗体也包含在本发明中的嵌合抗体中。通过将所述V区基因插入具有预先恒定区的表达载体中,可以构建嵌合抗体表达载体。具体地,例如,消化所述V区基因的限制性酶的限制性酶识别序列可以适当地放置在表达载体的5'侧,表达载体保留编码期望的抗体恒定区(C区)的DNA。通过将相同组合的限制性酶消化的两者在帧内融合,来构建嵌合抗体表达载体。

[0402] 为了制造单克隆抗体,抗体基因被整合到表达载体中,以便在表达控制区的调控下表达。用于表达抗体的表达控制区包含例如增强子或启动子。另外,还可以将适当的信号序列添加到氨基末端,使得表达的抗体分泌到细胞外。在后面记载的实施例中,作为信号序列,例如使用具有氨基酸序列MGWSCIIILFLVATATGVHS的肽等,除此之外还添加了适当的信号序列。表达的多肽在上述序列的羧基末端部分被切割,被切割的多肽可以作为成熟多肽在细胞外分泌。然后,通过该表达载体转化适当的宿主细胞,可以获取表达DNA的重组细胞,该DNA编码与作为靶的肿瘤抗原结合的抗体。

[0403] 为了表达抗体基因,编码抗体重链(H链)和轻链(L链)的DNA分别整合到不同的表达载体中。通过整合H链和L链的载体同时转化(co-transfect)到同一宿主细胞中,可以表达具有H链和L链的抗体分子。或者,可以通过将编码H链和L链的DNA整合到单个表达载体中来转化宿主细胞(参照国际公开WO 94/11523)。

[0404] 用于通过将分离的抗体基因导入适当的宿主来制备抗体的宿主细胞和表达载体的许多组合是公知的。这些表达系统均可用于分离包含本发明的抗体可变区的结构域。当真核细胞用作宿主细胞时,可以适当使用动物细胞,植物细胞或真菌细胞。具体地,作为动物细胞,可以示例以下细胞。

[0405] (1)哺乳类细胞:CHO、COS、骨髓瘤、BHK(baby hamster kidney)、Hela、Vero等

[0406] (2)两栖类细胞:非洲爪蟾卵母细胞等

[0407] (3)昆虫细胞:sf9、sf21、Tn5等。

[0408] 或者,作为植物细胞,由来源于烟草(Nicotiana tabacum)等的烟草(Nicotiana)属的细胞产生的抗体基因的表达系统是公知的。在植物细胞的转化中,可以适当地使用愈伤组织培养的细胞。

[0409] 此外,作为真菌细胞,可以利用以下细胞。

[0410] -酵母:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等酵母(*Saccharomyces*)属,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)等毕赤酵母(*Pichia*)属

[0411] -丝状菌:黑曲霉(*Aspergillus niger*)等曲霉菌(*Aspergillus*)属。

[0412] 另外,利用原核细胞的抗体基因的表达系统也是公知的。例如,使用细菌细胞时,可以适当利用大肠杆菌(*E. coli*)、枯草菌等细菌细胞。含有目标抗体基因的表达载体通过转化被导入这些细胞中。通过在体外培养转化的细胞,可以从该转化细胞的培养物中获取期望的抗体。

[0413] 除了上述宿主细胞外,转基因动物也可用于产生重组抗体。即,可以从导入了编码期望的抗体的基因的动物中得到抗体。例如,抗体基因可以通过在帧内插入编码乳汁中固有产生的蛋白质的基因内部来构建为融合基因。作为乳汁中分泌的蛋白,例如,可以利用山羊 β 酪蛋白等。包含插入抗体基因的融合基因的DNA片段被注入山羊胚胎中,并且该注入的胚胎被导入雌山羊中。从接受胚胎的山羊所产生的转基因山羊(或其后代)所产生的乳汁中,可以获取期望的抗体作为与乳汁蛋白的融合蛋白。另外,为了增加包含转基因山羊所产生的期望的抗体的乳汁含量,可以对转基因山羊施用激素(Bio/Technology(1994),12(7),699-702)。

[0414] 当对人施用本说明书中记载的抗原结合分子时,作为包含该抗原结合分子中的抗体可变区的结构域,可以适当采用以降低对人的异源抗原性等为目的的人为改变的来源于基因重组型抗体的结构域。基因重组型抗体中包含例如人源化(Humanized)抗体等。应用公知的方法适当制备这些改变抗体。

[0415] 用于制备包含本说明书中记载的抗原结合分子中的抗体可变区的结构域的抗体可变区,通常由夹在4个框架区(FR)中的3个互补决定区(complementarity-determining region;CDR)构成。CDR实质上是决定抗体的结合特异性的区。CDR的氨基酸序列富含多样性。一方面,构成FR的氨基酸序列,即使在具有不同结合特异性的抗体之间,也大多显示出高度同一性。因此,一般认为,通过CDR的移植,可以将某种抗体的结合特异性移植到其他抗体上。

[0416] 人源化抗体也称重构(reshaped)人抗体。具体地,将人以外的动物,例如小鼠抗体的CDR移植到人抗体的人源化抗体等是公知的。用于得到人源化抗体的普通的基因重组手法也是已知的。具体地,作为用于将小鼠的抗体的CDR移植到人的FR的方法,例如Overlap Extension PCR是公知的。在Overlap Extension PCR中,在用于合成人抗体的FR的引物中,添加编码应移植的小鼠抗体的CDR的碱基序列。4个FR分别准备引物。一般地,在将小鼠CDR移植到人FR时,选择与小鼠的FR同一性高的人FR对维持CDR功能有利。即,一般地,优选利用由与应移植的小鼠CDR相邻的FR的氨基酸序列同一性高的氨基酸序列构成的人FR。

[0417] 另外,连接的碱基序列被设计为彼此在帧内连接。通过每个引物单独合成人FR。其结果,得到在各FR中添加了编码小鼠CDR的DNA的产物。编码各产物的小鼠CDR的碱基序列被设计为相互重叠。接着,使以人抗体基因为模板合成的产物的重叠的CDR部分相互退火,进行互补链合成反应。通过该反应,人FR经由小鼠CDR的序列连接。

[0418] 最终,3个CDR和4个FR连接的V区基因的全长通过引物扩增,该引物通过在其5'末端和3'末端退火并添加适当的限制性酶识别序列。可以通过将如上所述得到的DNA和编码人抗体C区的DNA插入表达载体中,使其在帧内融合,制备人型抗体表达用载体。通过将整合

载体导入到宿主建立重组细胞,然后培养该重组细胞,表达编码该人源化抗体的DNA,从而在该培养细胞的培养物中产生该人源化抗体(参照欧洲专利公开EP 239400,国际公开W01996/002576)。

[0419] 可以通过定性或定量地测定和评价如上所述制备的人源化抗体与抗原的结合活性,优选地选择人源抗体的FR,使得在经由CDR连接时该CDR形成良好的抗原结合位点。根据需要,也可以置换FR的氨基酸残基,使得重构人抗体的CDR形成适当的抗原结合位点。例如,可以应用于将小鼠CDR移植到人FR的PCR方法,将氨基酸序列的突变导入FR。具体来说,可以在退火为FR的引物中导入部分碱基序列的突变。在通过这种引物合成的FR中,导入碱基序列的突变。可以通过用上述方法测量和评价置换了氨基酸的突变抗体与抗原的结合活性,来选择具有期望的性质的突变FR序列(Sato,K.et al.,Cancer Res,1993,53,851-856)。

[0420] 此外,将具有人抗体基因全部保留部分的转基因动物(参照国际公开W01993/012227、W01992/003918、W01994/002602、W01994/025585、W01996/034096、W01996/033735)作为免疫动物,通过DNA免疫可以获取期望的人抗体。

[0421] 进一步,使用人抗体文库,通过摇摄获得人抗体的技术也是已知的。例如,人抗体的V区作为单链抗体(scFv)通过噬菌体显示法在噬菌体的表面表达。可以选择表达与抗原结合的scFv的噬菌体。通过解析选择的噬菌体的基因,可以确定编码与抗原结合的人抗体的V区的DNA序列。确定与抗原结合的scFv的DNA序列后,将该V区序列与期望的人抗体C区序列在帧内融合,然后插入适当的表达载体,就可以制备表达载体。通过将该表达载体引入如上列举的合适表达细胞中,并表达编码该人抗体的基因来获得该人抗体。这些方法已经是公知的(参照国际公开W01992/001047、W01992/020791、W01993/006213、W01993/011236、W01993/019172、W01995/001438、W01995/015388)。

[0422] 在本说明书中,术语“Fv(variable fragment)”意味着来源于抗体的抗原结合结构域的最小单位,该抗体由抗体的轻链可变区(VL(light chain variable region))和抗体的重链可变区(VH(heavy chain variable region))对组成。1988年,Skerra和Pluckthun发现,通过将抗体的基因插入细菌信号序列的下游,诱导该基因在大肠杆菌中的表达,在均匀且保持活性的状态下从大肠杆菌的周质级分中配制(Science(1988)240(4855),1038-1041)。从周质级分中配制的Fv,以具有与抗原结合的方式VH与VL缔合。

[0423] 在本说明书中,作为Fv例如是以下抗原结合分子:

[0424] 在包含(1)二价抗原结合结构域;(2)在构成IgG1、IgG2a、IgG3或IgG4的Fc区的氨基酸中包含不对Fc γ 受体具有结合活性的Fc区的结构域;和(3)至少一价CD3结合结构域的抗原结合分子等中,轻链Fv片段和重链Fv片段还优选地包含以具有与抗原CD3结合的方式缔合而构成CD3结合结构域的一组Fv,其中,二价抗原结合结构域是二价scFv,二价scFv中的一价scFv连接到通过构成CD3结合结构域的重链Fv片段构成Fc区的一个多肽,另一价scFv连接到通过构成CD3结合结构域的轻链Fv片段构成Fc区的另一个多肽。

[0425] 在本说明书中,“scFv”、“单链抗体”、或“sc(Fv)₂”的术语意味着在单个多肽链内虽然包含来源于重链和轻链的两者的可变区但缺乏恒定区的抗体片段。通常,单链抗体还包括VH结构域和VL结构域之间的多肽接头,该多肽接头可以形成期望的结构,这些结构被认为可以进行抗原结合。单链抗体由Pluckthun在The Pharmacology of Monoclonal

Antibodies, 113卷, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 269~315(1994)中进行了详细研究。同样, 参照国际专利申请公开W01988/001649和美国专利第4,946,778号和第5,260,203号。在特定方式中, 单链抗体也可以是双特异性和/或人源化的。

[0426] scFv 是构成Fv的VH与VL通过肽接头连接的抗原结合结构域(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1988)85(16), 5879-5883)。通过该肽接头, VH和VL可以保持在接近的状态。

[0427] sc(Fv)₂是由两个VL和两个VH的四个可变区通过肽接头等接头连接构成单链的单链抗体(J Immunol.Methods (1999) 231(1-2), 177-189)。这两个VH与VL也可能来源于不同的单克隆抗体。例如, 也优选列举识别如Journal of Immunology (1994) 152(11), 5368-5374中公开的同一种抗原中存在的两种表位的双特异性(bispecific sc(Fv)₂)。sc(Fv)₂可以通过本领域技术人员公知的方法制备。例如, 可以通过用肽接头等接头连接scFv来制备。

[0428] 作为构成本说明书中的sc(Fv)₂的抗原结合结构域的构成, 列举其特征在于两个VH和两个VL以单链多肽的N末端侧为基点, 按照VH、VL、VH、VL([VH]接头[VL]接头[VH]接头[VL])的顺序排列的抗体, 但是两个VH和两个VL的顺序并不特别限于上述构成, 可以按照任何顺序排列。例如也可以列举如下顺序的结构。

[0429] [VL]接头[VH]接头[VH]接头[VL]

[0430] [VH]接头[VL]接头[VL]接头[VH]

[0431] [VH]接头[VH]接头[VL]接头[VL]

[0432] [VL]接头[VL]接头[VH]接头[VH]

[0433] [VL]接头[VH]接头[VL]接头[VH]

[0434] 关于sc(Fv)₂的分子方式在W02006/132352中也详细地记载, 本领域技术人员根据这些记载, 为了制备本说明书中公开的抗原结合分子, 可以适当制备期望的sc(Fv)₂。

[0435] 另外本发明的抗原结合分子可以偶联PEG等载流子高分子或抗癌剂有机化合物。另外, 插入糖链添加序列, 为了获得期望的效果, 可以适当地添加糖链。

[0436] 作为结合抗体的可变区的接头, 可以使用可以通过基因工程导入的任何肽接头或合成化合物接头(例如, 参照Protein Engineering, 9(3), 299-305, 1996)中公开的接头等, 但在本发明中优选肽接头。肽接头的长度没有特别限定, 本领域技术人员可以根据目的适当选择, 但优选长度为5个氨基酸以上(上限没有特别限定, 但通常为30个氨基酸以下, 优选20个氨基酸以下), 特别优选15个氨基酸。sc(Fv)₂中包含三个肽接头时, 可以全部使用相同长度的肽接头, 也可以使用不同长度的肽接头。

[0437] 例如, 在肽接头的情形中, 可以列举:

[0438] Ser

[0439] Gly • Ser

[0440] Gly • Gly • Ser

[0441] Ser • Gly • Gly

[0442] Gly • Gly • Gly • Ser

[0443] Ser • Gly • Gly • Gly

[0444] Gly • Gly • Gly • Gly • Ser

[0445] Ser • Gly • Gly • Gly • Gly

[0446] Gly • Gly • Gly • Gly • Gly • Ser

[0447] Ser • Gly • Gly • Gly • Gly • Gly

[0448] Gly • Gly • Gly • Gly • Gly • Gly • Ser

[0449] Ser • Gly • Gly • Gly • Gly • Gly • Gly

[0450] (Gly • Gly • Gly • Gly • Ser)_n

[0451] (Ser • Gly • Gly • Gly • Gly)_n

[0452] [n是以上1的整数]等。但是,本领域技术人员可以根据目的适当选择肽接头的长度和序列。

[0453] 合成化学物接头(化学交联剂)为通常用于交联肽的交联剂,例如N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二琥珀酰亚胺辛酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺)辛酸酯(BS3)、二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯)((DSP)、二硫代双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯)((DTSSP)、乙二醇双(琥珀酰亚胺琥珀酸盐)((EGS)、乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺琥珀酸盐)(磺基-EGS)、二琥珀酰亚胺酒石酸盐(DST)、二磺基琥珀酰亚胺酒石酸盐(磺基-DST)、双[2-(琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(BSOCOES)、双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒(磺基-BSOCOES)等,并且这些交联剂已经市售。

[0454] 当结合4个抗体可变区时,通常需要3个接头,可以全部使用相同的接头,也可以使用不同的接头。

[0455] “Fab”由一条轻链以及一条重链的CH1区和可变区构成。Fab分子的重链无法形成与另一重链分子的二硫键。

[0456] “F(ab')₂”和“Fab”意味着免疫球蛋白(单克隆抗体)通过蛋白分解酶即胃蛋白酶或木瓜蛋白酶等处理而制备,并在铰链区中两条H链之间存在的二硫键前后消化而生成的抗体片段。例如,通过用木瓜蛋白酶处理IgG,可以制备在铰链区中的2条H链间存在的二硫键的上游被切割,由VL(L链可变区)和CL(L链恒定区)构成的L链,和由VH(H链可变区)和CH1(H链恒定区中的γ1区)构成的H链片段在C末端区通过二硫键结合的相同的2个抗体片段。这2个相同的抗体片段分别称为Fab'。

[0457] “F(ab')₂”包含含有CH1结构域和CH2结构域的一部分的恒定区的两根重链,以使两根轻链以及链间的二硫键在2个重链间形成。构成本说明书中公开的抗原结合分子的F(ab')₂,可以通过将具有期望的抗原结合结构域的全长单克隆抗体等用胃蛋白酶等蛋白分解酶部分消化后将Fc片段吸附到蛋白A柱上除去而优选地获取。作为这种蛋白分解酶,只要能够通过适当地设定pH等的酶的反应条件来消化全长抗体以便有限地产生F(ab')₂,就没有特别限定,例如可以示例胃蛋白酶和无花果蛋白酶等。

[0458] 构成本说明书中公开的抗原结合分子的Fc区,可以通过将单克隆抗体等抗体用胃蛋白酶等蛋白分解酶部分消化后,将片段吸附到蛋白A柱、或蛋白G柱后,通过适当的洗脱缓冲液等洗脱而优选获取。作为这种蛋白分解酶,只要能够通过适当地设定pH等的酶的反应条件来消化单克隆抗体等抗体,就没有特别限定,例如可以示例胃蛋白酶和无花果蛋白酶等。

[0459] 在本说明书中记载的抗原结合分子中包含构成IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc区的氨基酸中针对Fcγ受体的结合活性降低的Fc区。

[0460] 抗体的同种型由恒定区的结构确定。IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的各同种型的恒定区

分别称为C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4。

[0461] Fc区指除了包含含有CH1结构域和CH2结构域的恒定区的一部分的两根重链“F(ab')₂”以外的区,以使两根轻链以及链间的二硫键在2个重链间形成。构成本说明书中公开的抗原结合分子的Fc区,可以通过将IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体等用胃蛋白酶等蛋白分解酶部分消化后,再洗脱吸附于蛋白A柱的级分而优选地获取。作为这种蛋白分解酶,只要能够通过适当地设定pH等的酶的反应条件来消化全长抗体以便有限地产生F(ab')₂,就没有特别限定,例如可以示例胃蛋白酶和无花果蛋白酶等。

[0462] Fc γ 受体指可以与IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体的Fc区结合的受体,实质上也就意味着由Fc γ 受体基因编码的蛋白家族的任何成员。在人中,该家族中也包含含有同工型Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIc的Fc γ RI (CD64);包含同工型Fc γ RIIa(包含异型H131和R131)、Fc γ RIIb(包含Fc γ RIIb-1和Fc γ RIIb-2)和Fc γ RIIc的Fc γ RII (CD32);和包含同工型Fc γ RIIIa(包含异型V158和F158)和Fc γ RIIIb(包含异型Fc γ RIIIb-NA1和Fc γ RIIIb-NA2)的Fc γ RIII (CD16)、以及任何未发现的人Fc γ R类或Fc γ R同工型或异型,但并不限于这些。Fc γ R包含人、小鼠、大鼠、兔和猴但并不限于这些,可以来源于任何生物。小鼠Fc γ R类中也包含Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16)和Fc γ RIII-2 (CD16-2)、以及任何未发现的小鼠Fc γ R类或Fc γ R同工型或异型,但并不限于这些。作为这样的Fc γ 受体的优选实例,列举人Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32)、Fc γ RIIB (CD32)、Fc γ RIIIA (CD16)和/或Fc γ RIIIB (CD16)。Fc γ RI的多核苷酸序列和氨基酸序列分别以RefSeq注册编号在NM_000566.3和NP_000557.1中记载, Fc γ RIIA的多核苷酸序列和氨基酸序列分别以RefSeq注册编号,在BC020823.1和30AAH20823.1中记载, Fc γ RIIB的多核苷酸序列和氨基酸序列分别以RefSeq注册编号,在BC146678.1和AAI46679.1中记载, Fc γ RIIIA的多核苷酸序列和氨基酸序列分别以RefSeq注册编号,在BC033678.1和AAH33678.1中记载, Fc γ RIIIB的多核苷酸序列和氨基酸序列,分别以RefSeq注册编号,在BC128562.1和AAI28563.1中记载。Fc γ 受体是否在IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体的Fc区具有结合活性,除了上述记载的FACS或ELISA格式外,可以通过利用了ALPHA筛选(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)或表面等离子共振(SPR)现象的BIAcore法等确认(Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0463] 另外,“Fc配体”或“效应物配体”意味着来源于任意生物分子,优选多肽,其与抗体的Fc区结合形成Fc/Fc配体复合物。与Fc配体的Fc结合优选地诱导1个或其以上的效应物功能。Fc配体中包括但不限于Fc受体、Fc γ R、Fc α R、Fc ϵ R、FcRn、C1q、C3、甘露聚糖结合凝集素样、甘露糖受体、葡萄球菌的蛋白A、葡萄球菌的蛋白G和病毒的Fc γ R。Fc配体中也包含Fc受体相同体(FcRH),其是与Fc γ R同源的Fc受体的家族(Davis et al., (2002) Immunological Reviews 190, 123-136)。Fc配体中也可以包含与Fc结合的未发现的分子。

[0464] Fc区针对Fc γ I、Fc γ IIA、Fc γ IIB、Fc γ IIIA和/或Fc γ IIIB的任一Fc γ 受体的结合活性降低,除了上述记载的FACS或ELISA格式外,可以通过利用了ALPHA筛选(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)或表面等离子共振(SPR)现象的BIAcore法等确认(Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0465] ALPHA筛选通过使用供体与受体2个珠的ALPHA技术根据下述原理来实施。与供体珠结合的分子与与受体珠结合的分子进行生物学相互作用,仅在2个珠贴近时检测出发光信号。由激光激发的供体珠内的光敏剂将周边的氧转换成激发状态的单线态氧。单线态氧

向供体珠周边扩散,到达邻近的受体珠时引起珠内的化学发光反应,最终发出光。与供体珠结合的分子和与受体珠结合的分子不相互作用时,供体珠产生的单线态氧不会到达受体珠,因此不会发生化学发光反应。

[0466] 例如,生物素标记的抗原结合分子与供体珠结合,谷胱甘肽S转移酶(GST)标记的Fc γ 受体与受体珠结合。具有竞争的突变Fc区的抗原结合分子不存在下,具有野生型Fc区的抗原结合分子与Fc γ 受体间相互作用产生520-620nm的信号。具有未标记的突变Fc区的抗原结合分子与具有野生型Fc区的抗原结合分子与Fc γ 受体间的相互作用竞争。可以通过定量竞争结果显示的荧光减少来确定相对的结合亲和力。使用Sulfo-NHS-生物素等生物素化抗体等抗原结合分子是公知的。作为用GST标记Fc γ 受体的方法,可以适当采用在可以表达融合基因的载体中保持的细胞等中表达,使用谷胱甘肽柱纯化的方法等,该融合基因由编码Fc γ 受体的多核苷酸与编码GST的多核苷酸在帧内融合而成。得到的信号可以例如使用GRAPHPAD PRISM(GraphPad公司, San Diego)等软件,通过使其适配利用非线性回归解析的单位点竞争性(one-site competition)模型而优选地解析。

[0467] 将观察相互作用的物质的一方(配体)固定在传感器芯片的金薄膜上,从传感器芯片的背面照射光,使其在金薄膜和玻璃的边界面上全反射,反射光的一部分就会形成反射强度降低的部分(SPR信号)。将观察相互作用的物质的另一方(分析物)流向传感器芯片表面,配体与分析物结合后,固定化的配体分子的质量增加,传感器芯片表面溶剂的折射率发生变化。由于该折射率的变化,SPR信号的位置发生移位(反之,键解离时信号的位置返回)。Biacore系统以上述移位量,即传感器芯片表面的质量变化为纵轴,将质量的时间变化作为测定数据进行显示(传感器图)。从传感器图的曲线求出动力学:结合速度常数(k_a)和解离速度常数(k_d),从该常数的比值求出亲和力(KD)。在BIACORE法中,也优选使用抑制测定法。抑制测定法的实例在Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2006)103(11),4005-4010中记载。

[0468] 显示抗肿瘤效果的多个治疗用抗体,通过癌细胞的增殖需要的信号的抑制,细胞死信号的引发,或ADCC(Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity;抗体依赖性细胞毒性作用)、CDC(Complement Dependent Cytotoxicity;补体依赖性细胞毒性作用)针对癌细胞发挥抗肿瘤效果。通过抗体的Fc区与NK细胞或巨噬细胞等效应细胞上存在的Fc受体结合,这些效应细胞针对抗体结合的靶癌细胞发挥的细胞毒性是ADCC。补体复合物与抗体的结构中存在的补体结合部位结合。CDC是通过在结合了抗体的细胞的细胞膜上,该复合物中存在的补体成分形成孔,促进水和离子流入细胞内,破坏细胞而引起的细胞毒性。在Fc受体中,Fc γ 受体是指能够与IgG1、IgG2、IgG3、IgG4单克隆抗体的Fc区结合的受体,当针对Fc γ 受体的结合活性较低时,T细胞与NK细胞或巨噬细胞等表达的受体不会癌抗原非依赖性地交联。因此,不会发生癌抗原非依赖性细胞因子的诱导。Fc区针对Fc γ I、Fc γ IIA、Fc γ IIB、Fc γ IIIA和/或Fc γ IIIB的任一Fc γ 受体的结合活性降低的抗体,作为抗原结合分子是期望的。

[0469] 在本说明书中,针对Fc γ 受体的结合活性降低指,例如根据上述解析方法,与作为对照的抗原结合分子的竞争活性相比较,待测抗原结合分子的竞争活性显示50%以下、优选地45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、20%以下、15%以下、特别优选地10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下的结合活性。

[0470] 作为作为对照的抗原结合分子,可以适当使用具有IgG1、IgG2、IgG3或IgG4单克隆抗体的Fc区的抗原结合分子。作为该Fc区的结构,例示在RefSeq注册编号AAC82527.1的N末添加了A的序列、在RefSeq注册编号AAB59393.1的N末添加了A的序列、在RefSeq注册编号CAA27268.1的N末添加了A的序列、在RefSeq注册编号AAB59394.1的N末添加了A的序列。另外,在使用具有某特定同种型的抗体的Fc区的突变体的抗原结合分子作为待测物质的情形中,通过使用具有该特定同种型的抗体的Fc区的抗原结合分子作为对照,验证由该突变体具有的突变引起的与Fc γ 受体的结合活性的效果。如上所述,适当制备具有验证了针对Fc γ 受体的结合活性降低的Fc区的突变体的抗原结合分子。

[0471] 作为这样的突变体的实例,按照EU编号确定的氨基酸的231A-238S的缺失(WO 2009/011941)、C226S,C229S,P238S,(C220S)(J.Rheumatol(2007)34,11)、C226S,C229S(Hum.Antibod.Hybridomas(1990)1(1),47-54)、C226S,C229S,E233P,L234V,L235A(Blood(2007)109,1185-1192)等突变体是公知的。

[0472] 即,构成特定的同种型的抗体的Fc区的氨基酸中,优选地列举按照EU编号确定的下列任一氨基酸;具有220位、226位、229位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、264位、265位、266位、267位、269位、270位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、325位、327位、328位、329位、330位、331位、332位被置换的Fc区的抗原结合分子。作为Fc区的起源的抗体的同种型,没有特别限定,可以适当利用将IgG1、IgG2、IgG3或IgG4单克隆抗体作为起源的Fc区,但优选地利用将IgG1抗体作为起源的Fc区。

[0473] 例如,构成IgG1抗体的Fc区的氨基酸中,也可以适当使用具有实施了按照EU编号确定的下列任一置换(数字是按照EU编号确定的氨基酸残基的位置,位于数字前面的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基,位于数字后面的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基):

[0474] (a)L234F、L235E、P331S、

[0475] (b)C226S、C229S、P238S、

[0476] (c)C226S、C229S、

[0477] (d)C226S、C229S、E233P、L234V、L235A

[0478] (e)L234A、L235A或L235R、N297A

[0479] (f)L235A或L235R、S239K、N297A的Fc区、或、从231位到238位的氨基酸序列缺失的Fc区的抗原结合分子。

[0480] 另外,构成IgG2抗体的Fc区的氨基酸中,也可以适当使用具有实施了按照EU编号确定的下列任一置换(数字是按照EU编号确定的氨基酸残基的位置,位于数字前面的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基,位于数字后面的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基):

[0481] (g)H268Q、V309L、A330S、P331S

[0482] (h)V234A

[0483] (i)G237A

[0484] (j)V234A、G237A

[0485] (k)A235E、G237A

[0486] (l)V234A、A235E、G237A的Fc区的抗原结合分子。

[0487] 另外,组成IgG3抗体的Fc区的氨基酸中,也可以适当使用具有实施了按照EU编号确定的下列任一置换(数字是按照EU编号确定的氨基酸残基的位置,位于数字前的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基,位于数字后的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基):

[0488] (m)F241A

[0489] (n)D265A

[0490] (o)V264A的Fc区的抗原结合分子。

[0491] 另外,组成IgG4抗体的Fc区的氨基酸中,也可以适当使用具有实施了按照EU编号确定的下列任一置换(数字是按照EU编号确定的氨基酸残基的位置,位于数字前的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基,位于数字后的一个字符的氨基酸符号表示置换前的氨基酸残基):

[0492] (p)L235A、G237A、E318A

[0493] (q)L235E

[0494] (r)F234A,L235A的Fc区的抗原结合分子。

[0495] 作为其它优选的实例,列举构成IgG1抗体的Fc区的氨基酸中,具有按照EU编号确定的下述任意氨基酸:233位、234位、235位、236位、237位、327位、330位、331位在对应的IgG2或IgG4中,其EU编号被对应的氨基酸置换的Fc区的抗原结合分子。

[0496] 作为其它优选的实例,优选列举构成IgG1抗体的Fc区的氨基酸中,具有按照EU编号确定的下述任意一个或其以上氨基酸:234位、235位、297位被其它氨基酸置换的Fc区的抗原结合分子。置换后存在的氨基酸的种类没有特别限定,但特别优选具有234位、235位、297位的任一或其以上氨基酸被丙氨酸置换的Fc区的抗原结合分子。

[0497] 作为其它优选的实例,优选列举构成IgG1抗体的Fc区的氨基酸中,具有按照EU编号确定的下述任一氨基酸:265位被其它氨基酸置换的Fc区的抗原结合分子。置换后存在的氨基酸的种类没有特别限定,但特别优选具有265位的任一氨基酸被丙氨酸置换的Fc区的抗原结合分子。

[0498] 作为IgG类抗体的效应物功能的抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)、补体依赖性细胞毒性作用(CDC)的研究迄今为止已有很多,在人IgG类中,IgG1亚类抗体具有最高ADCC活性、CDC活性。另外,提示了作为经由IgG类抗体的靶细胞的吞噬作用的抗体依赖性细胞介导性吞噬作用(ADCP)也作为抗体的效应物功能之一。由于IgG1亚类抗体可以对肿瘤发挥这些效应物功能,所以使用IgG1亚类抗体作为针对癌抗原的绝大多数抗体药物。

[0499] 另一方面,IgG抗体为了介导作为抗体的效应物功能的ADCC、ADCP、或作为靶细胞的吞噬作用的抗体依赖性细胞介导性吞噬作用(ADCP)活性,IgG抗体的Fc区与杀伤细胞、天然杀伤细胞、活化的巨噬细胞等效应细胞表面上存在的Fc γ 受体(Fc γ R)的结合是必要的。

[0500] 增强ADCC和ADCP等细胞毒性的效应物功能,是用于增强抗癌抗体的抗肿瘤效果的有希望的手段。提示了具有针对Fc γ 受体的结合优化的Fc区的抗体介导更强的效应物功能,从而发挥有效的抗肿瘤效果。因此,作为增强或提高针对癌抗原的抗体药物的抗肿瘤活性的抗体工程的手法,迄今为止已经有各种报告(例如W02013047752等)。

[0501] 显示关于Fc区与Fc γ 受体的结合,与抗体的铰链区和CH2结构域内的几个氨基酸残基和CH2结构域结合的EU编号第297个Asn中添加的糖链很重要(Clark,M.,Chemical

Immunology (1997) 65, 88-110, Greenwood J, Clark M, Waldmann H., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104, Morgan A, Jones ND, Nesbitt AM, Chaplin L, Bodmer MW, Emtage JS., Immunology (1995) 86, 319-324)。以该结合处为中心,迄今为止研究了具有各种Fc γ 受体结合特性的Fc区的突变体,得到了具有针对更高活化Fc γ 受体的亲和力的Fc区突变体(WO2000/042072, WO2006/019447)。

[0502] 如此,在以膜型抗原为靶的抗体中,针对Fc γ 受体的结合活性对细胞毒性活性起着重要作用,因此,在需要细胞毒性活性的情形中,使用针对Fc γ R的结合活性高的人IgG1的同种型,进一步通过增强针对Fc γ 受体的结合活性来增强细胞毒性活性,这是被广泛使用的技术。另外,在以可溶型抗原为靶的抗体中,也尝试增强针对Fc γ 受体的结合活性(WO2013047752)。

[0503] Fc区优选作为具有包含选自下列Fc区的以EU编号表示的部位中至少1个以上的氨基酸的Fc区的IgG抗体、或具有IgG抗体样分子是次级分子的ADCC活性的抗体。

[0504] 221位的氨基酸是Lys或Tyr的任一个、

[0505] 222位的氨基酸是Phe、Trp、Glu或Tyr的任一个、

[0506] 223位的氨基酸是Phe、Trp、Glu或Lys的任一个、

[0507] 224位的氨基酸是Phe、Trp、Glu或Tyr的任一个、

[0508] 225位的氨基酸是Glu、Lys或Trp的任一个、

[0509] 227位的氨基酸是Glu、Gly、Lys或Tyr的任一个、

[0510] 228位的氨基酸是Glu、Gly、Lys或Tyr的任一个、

[0511] 230位的氨基酸是Ala、Glu、Gly或Tyr的任一个、

[0512] 231位的氨基酸是Glu、Gly、Lys、Pro或Tyr的任一个、

[0513] 232位的氨基酸是Glu、Gly、Lys或Tyr的任一个、

[0514] 233位的氨基酸是Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0515] 234位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0516] 235位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0517] 236位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0518] 237位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0519] 238位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0520] 239位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0521] 240位的氨基酸是Ala、Ile、Met或Thr的任一个、

[0522] 241位的氨基酸是Asp、Glu、Leu、Arg、Trp或Tyr的任一个、

[0523] 243位的氨基酸是Leu、Glu、Leu、Gln、Arg、Trp或Tyr的任一个、

- [0524] 244位的氨基酸是His、
- [0525] 245位的氨基酸是Ala、
- [0526] 246位的氨基酸是Asp、Glu、His或Tyr的任一个、
- [0527] 247位的氨基酸是Ala、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、Val或Tyr的任一个、
- [0528] 249位的氨基酸是Glu、His、Gln或Tyr的任一个、
- [0529] 250位的氨基酸是Glu或Gln的任一个、
- [0530] 251位的氨基酸是Phe、
- [0531] 254位的氨基酸是Phe、Met或Tyr的任一个、
- [0532] 255位的氨基酸是Glu、Leu或Tyr的任一个、
- [0533] 256位的氨基酸是Ala、Met或Pro的任一个、
- [0534] 258位的氨基酸是Asp、Glu、His、Ser或Tyr的任一个、
- [0535] 260位的氨基酸是Asp、Glu、His或Tyr的任一个、
- [0536] 262位的氨基酸是Ala、Glu、Phe、Ile或Thr的任一个、
- [0537] 263位的氨基酸是Ala、Ile、Met或Thr的任一个、
- [0538] 264位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp或Tyr的任一个、
- [0539] 265位的氨基酸是Ala、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0540] 266位的氨基酸是Ala、Ile、Met或Thr的任一个、
- [0541] 267位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0542] 268位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、Val或Trp的任一个、
- [0543] 269位的氨基酸是Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0544] 270位的氨基酸是Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Trp或Tyr的任一个、
- [0545] 271位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0546] 272位的氨基酸是Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0547] 273位的氨基酸是Phe或Ile的任一个、
- [0548] 274位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0549] 275位的氨基酸是Leu或Trp的任一个、
- [0550] 276位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0551] 278位的氨基酸是Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Trp的任一个、

- [0552] 279位的氨基酸是Ala、
- [0553] 280位的氨基酸是Ala、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、Trp或Tyr的任一个、
- [0554] 281位的氨基酸是Asp、Lys、Pro或Tyr的任一个、
- [0555] 282位的氨基酸是Glu、Gly、Lys、Pro或Tyr的任一个、
- [0556] 283位的氨基酸是Ala、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg或Tyr的任一个、
- [0557] 284位的氨基酸是Asp、Glu、Leu、Asn、Thr或Tyr的任一个、
- [0558] 285位的氨基酸是Asp、Glu、Lys、Gln、Trp或Tyr的任一个、
- [0559] 286位的氨基酸是Glu、Gly、Pro或Tyr的任一个、
- [0560] 288位的氨基酸是Asn、Asp、Glu或Tyr的任一个、
- [0561] 290位的氨基酸是Asp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、Trp或Tyr的任一个、
- [0562] 291位的氨基酸是Asp、Glu、Gly、His、Ile、Gln或Thr的任一个、
- [0563] 292位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Pro、Thr或Tyr的任一个、
- [0564] 293位的氨基酸是Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0565] 294位的氨基酸是Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0566] 295位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0567] 296位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr或Val的任一个、
- [0568] 297位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0569] 298位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0570] 299位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr的任一个、
- [0571] 300位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Trp的任一个、
- [0572] 301位的氨基酸是Asp、Glu、His或Tyr的任一个、
- [0573] 302位的氨基酸是Ile、
- [0574] 303位的氨基酸是Asp、Gly或Tyr的任一个、
- [0575] 304位的氨基酸是Asp、His、Leu、Asn或Thr的任一个、
- [0576] 305位的氨基酸是Glu、Ile、Thr或Tyr的任一个、
- [0577] 311位的氨基酸是Ala、Asp、Asn、Thr、Val或Tyr的任一个、
- [0578] 313位的氨基酸是Phe、
- [0579] 315位的氨基酸是Leu、
- [0580] 317位的氨基酸是Glu或Gln、
- [0581] 318位的氨基酸是His、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val或Tyr的任一个、
- [0582] 320位的氨基酸是Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的

任一个、

[0583] 322位的氨基酸是Ala、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0584] 323位的氨基酸是Ile、

[0585] 324位的氨基酸是Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0586] 325位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0587] 326位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0588] 327位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0589] 328位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0590] 329位的氨基酸是Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0591] 330位的氨基酸是Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0592] 331位的氨基酸是Asp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0593] 332位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0594] 333位的氨基酸是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、Val或Tyr的任一个、

[0595] 334位的氨基酸是Ala、Glu、Phe、Ile、Leu、Pro或Thr的任一个、

[0596] 335位的氨基酸是Asp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Val、Trp或Tyr的任一个、

[0597] 336位的氨基酸是Glu、Lys或Tyr的任一个、

[0598] 337位的氨基酸是Glu、His或Asn的任一个、

[0599] 339位的氨基酸是Asp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser或Thr的任一个、

[0600] 376位的氨基酸是Ala或Val的任一个、

[0601] 377位的氨基酸是Gly或Lys的任一个、

[0602] 378位的氨基酸是Asp、

[0603] 379位的氨基酸是Asn、

[0604] 380位的氨基酸是Ala、Asn或Ser的任一个、

[0605] 382位的氨基酸是Ala或Ile的任一个、

[0606] 385位的氨基酸是Glu、

[0607] 392位的氨基酸是Thr、

[0608] 396位的氨基酸是Leu、

- [0609] 421位的氨基酸是Lys、
- [0610] 427位的氨基酸是Asn、
- [0611] 428位的氨基酸是Phe或Leu的任一个、
- [0612] 429位的氨基酸是Met、
- [0613] 434位的氨基酸是Trp、
- [0614] 436位的氨基酸是Ile、和
- [0615] 440位的氨基酸是Gly、His、Ile、Leu或Tyr的任一个。
- [0616] 作为本发明的抗原结合分子,可以列举多特异性抗体。此处,多特异性抗体是多个具有不同特异性的抗体。作为多特异性抗体的实例列举双特异性抗体。IgG型的双特异性抗体可以通过融合产生IgG抗体的两种杂交瘤生成的杂交杂交瘤(quadroma)而分泌出来(Milstein C et al. Nature (1983) 305, 537-540)。作为双特异性抗体的Fc区,在使用针对Fc γ 受体的结合活性降低的Fc区的情形中,也适当使用将双特异性抗体作为起源的Fc区。
- [0617] 用于制备多特异性抗体的手段并不限于这些,但包含具有不同特异性的2个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参照Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983), W093/08829, 和Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991))、和knob-in-hole技术(例如参照美国专利第5,731,168号)。多特异性抗体可以通过以下方式制备:操纵静电转向效应(electrostatic steering effects)以制备Fc异二聚体分子(W02009/089004A1);交联2个以上抗体或片段(参照美国专利第4,676,980号和Brennan et al., Science, 229:81 (1985));使用亮氨酸拉链制作具有2个特异性的抗体(参照Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992));使用“双抗体”技术制备双特异性抗体片段(参照Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993));和使用单链Fv(scFv)二聚体(参照Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994));和例如以Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991)中记载的方式配制三特异性抗体。
- [0618] 本说明书还包含含有“章鱼抗体”的具有3个以上功能性抗原结合位点的修饰抗体(例如,参照美国专利申请公开第2006/0025576号A1)。
- [0619] 在本发明的一个方式中,抗原结合分子包含具有靶抗原识别位点和免疫受体识别位点的双特异性抗原结合位点。此处,抗原结合分子,除了双特异性抗原结合位点也可以具有进一步的抗原结合位点,作为该方式的抗原结合分子的实例,列举双特异性抗原结合分子,和具有3种以上抗原结合位点的多特异性抗原结合分子,更具体地,列举双特异性抗体和具有3种以上抗原结合位点的多特异性抗体。
- [0620] IgG型的双特异性抗体通过将构成目标两种IgGL链和H链的基因,共计四种基因导入细胞并使其共表达来分泌。但是,这种方法产生的IgG的H链与L链的组合理论上也有10种。从10种IgG中纯化由目标组合的H链L链构成的IgG是困难的。进一步,由于目标组合的分泌量在理论上也显著降低,因此需要大的培养规模,制备上的成本进一步增大。
- [0621] 在本发明的双特异性抗体中,可以适用用于促进目标组合的H链间和L链H链间的缔合的技术。
- [0622] 例如,在多特异性抗体的缔合化中,可以适用在抗体H链的第二恒定区(CH2)或H链的第三恒定区(CH3)的界面上导入电荷相斥来抑制非目标H链之间的缔合的技术(W02006/106905)。

[0623] 在向CH2或CH3的界面中导入电荷相斥来抑制无意的H链之间的缔合的技术中,作为在H链的其它恒定区的界面中接触的氨基酸残基,例如可以列举CH3区中与EU编号第356个残基、EU编号第439个残基、EU编号第357个残基、EU编号第370个残基、EU编号第399个残基、EU编号第409个残基相对的区。更具体地,例如,在包含2种H链CH3区的抗体中,选自第一H链CH3区中的下列(1)~(3)中显示的氨基酸残基组的1组或3组的氨基酸残基可以是具有同种电荷的抗体;(1)H链CH3区中包含的氨基酸残基,EU编号356位和439位的氨基酸残基,(2)H链CH3区中包含的氨基酸残基,EU编号357位和370位的氨基酸残基,(3)H链CH3区中包含的氨基酸残基,EU编号399位和409位的氨基酸残基。

[0624] 进一步,选自与上述第一H链CH3区不同的第二H链CH3区中的所述(1)~(3)中显示的氨基酸残基组的氨基酸残基组,并且与在所述第一H链CH3区中具有同种电荷的所述(1)~(3)中显示的氨基酸残基组对应的1组或3组的氨基酸残基可以是具有与所述第一H链CH3区中对应的氨基酸残基相反的电荷的抗体。

[0625] 上述(1)~(3)中记载的每个氨基酸残基在缔合时彼此接近。关于期望的H链CH3区或H链恒定区,本领域技术人员可以通过应用了市售软件的同源建模等,发现上述(1)~(3)中记载的氨基酸残基对应的部位,并且该部位的氨基酸残基可供适当改变。

[0626] 在上述抗体中,“具有电荷的氨基酸残基”例如优选选自下列(a)或(b)的任一中包含的氨基酸残基:

[0627] (a)谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、

[0628] (b)赖氨酸(K)、精氨酸(R)、组氨酸(H)。

[0629] 在上述抗体中,“具有同种电荷”意味着例如2个以上的氨基酸残基的任一具有上述(a)或(b)的任一中包含的氨基酸残基。“具有相反电荷”意味着,例如在2个以上氨基酸残基中至少1个氨基酸残基具有上述(a)或(b)的任意1组中包含的氨基酸残基的情形中,剩余氨基酸残基具有不同组中包含的氨基酸残基。

[0630] 在优选的方式中,上述抗体也可以通过二硫键交联第一H链CH3区与第二H链CH3区。

[0631] 作为本发明中供改变的氨基酸残基,不限于上述抗体的可变区或抗体的恒定区的氨基酸残基。关于期望的多肽突变体或异源多聚体,本领域技术人员可以通过应用了市售软件的同源建模等,发现形成界面的氨基酸残基,并且该部位的氨基酸残基可供适当改变以控制缔合。

[0632] 另外,还可以使用其它公知技术缔合化本发明的双特异性抗体。将存在于抗体的一个H链的Fc区中的氨基酸侧链置换为较大的侧链(knob;突起),并将存在于另一个H链的相对Fc区中的氨基酸侧链置换为较小的侧链(hole;空隙),使突起能够放置在空隙中,从而可以有效地引起具有具有Fc区的不同氨基酸的多肽之间的缔合(WO1996/027011,Ridgway JB et al.,Protein Engineering(1996)9,617-621,Merchant AM et al.Nature Biotechnology(1998)16,677-681,US20130336973)。

[0633] 除此之外,还可以使用其它公知技术形成本发明的双特异性抗体。通过使用将抗体的一个H链的CH3的一部分变成与该部分对应的来源于IgA的序列,并将与该部分对应的来源于IgA的序列导入另一个H链的CH3的互补部分的链交换改造的结构域CH3(strand-exchange engineered domain CH3),可以通过CH3的互补缔合化有效地引起具有不同序列

的多肽的缔合(Protein Engineering Design&Selection,23;195-202,2010)。使用该公知技术可以有效形成目标双特异性抗体。

[0634] 另外,双特异性抗体的形成中也可以包含W02011/028952和W02014/018572和Nat Biotechnol.2014Feb;32(2):191-8.中记载的抗体CH1和CL的缔合化,利用VH和VL的缔合化制备抗体的技术,W02008/119353和W02011/131746中记载的使用分别配制的单克隆抗体彼此制备双特异性抗体的技术(Fab Arm Exchange)、W02012/058768和W02013/063702中记载的控制抗体重链CH3间的缔合的技术,W02012/023053中记载的由两种轻链和一种重链构成的双特异性抗体的制备技术,Christoph等(Nature Biotechnology Vol.31,p 753-758 (2013))中记载的利用分别表达由1个H链和1个L链组成的抗体的单链的2个细菌细胞株制备双特异性抗体的技术等。

[0635] 另外,即使在不能有效地形成目的双特异性抗体的情形中,通过从产生的抗体中分离、纯化目的双特异性抗体,也可以得到本发明的双特异性抗体。例如,报告了通过将氨基酸置换导入两种H链的可变区,并赋予等电点(pI)的差异,使两种同源体和目标异源抗体能够通过离子交换色谱而纯化的方法(W02007114325)。另外,作为纯化异质体的方法,迄今为止,报告了用蛋白A纯化异二聚化抗体的方法,该抗体由与蛋白A结合的小鼠IgG2a的H链和与蛋白A结合的大鼠IgG2b的H链组成(W098050431,W095033844)。进一步,可以通过使用将IgG和蛋白A的结合部位即EU编号为第435和第436的氨基酸残基置换为Tyr、His等与蛋白A的结合力不同的氨基酸的H链,或者使用按照参考实施例5中记载的方法获取的与蛋白A的结合力不同的H链,来改变每个H链与蛋白A的相互作用,并且可以通过使用蛋白A柱来有效地仅纯化异二聚化抗体。

[0636] 另外,还可以获取能够赋予多个不同H链结合能力的共有L链,并用作双特异性抗体的共有L链。通过将这种共有L链不同的多个H链基因导入细胞中来表达IgG,从而可以实现高效的双特异性IgG表达(Nature Biotechnology(1998)16,677-681)。在选择共有H链时,也可以利用选择与任意不同H链对应并显示高结合能力的共有L链的方法(W02004/065611)。

[0637] 另外,作为本发明的Fc区,可以适当使用Fc区的C末端的异质性改善的Fc区。更具体地,提供构成将IgG1、IgG2、IgG3或IgG4作为起源的Fc区的两个多肽的氨基酸序列中,按照EU编号确定的446位的甘氨酸、和447位的赖氨酸缺失的Fc区。

[0638] 可以组合使用多个例如2个以上这些技术。另外,这些技术也可以分别适当地应用于想缔合的2个H链。进一步,这些技术也可以组合应用于针对上述Fc γ 受体的结合活性降低的Fc区。此外,本发明的抗原结合分子也可以基于添加了上述改变的分子,另外制备具有同一氨基酸序列的抗原结合分子。

[0639] 在本发明中,“功能上同等”的抗体可变区如果是满足上述条件的抗体H链可变区和/或抗体L链可变区,则没有特别限定。作为这种抗体可变区,例如可以在上述表1~3中记载的可变区的氨基酸序列中置换、缺失、添加和/或插入1个或多个氨基酸(例如1、2、3、4、5或10个氨基酸)。由于在氨基酸序列中置换、缺失、添加和/或插入1个或多个氨基酸,因此作为本领域技术人员已知的方法,在蛋白中导入突变的方法是已知的。例如,本领域技术人员可以通过使用部位特异性诱变法(Hashimoto-Gotoh,T,Mizuno,T,Ogasahara,Y,and Nakagawa,M.(1995)An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for

site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492) 等在氨基酸序列中适当导入突变, 配制与具有上述功能的抗体可变区在功能上同等的可变区。

[0640] 期望在改变氨基酸残基的情形中, 突变为氨基酸侧链的性质保守的另一氨基酸。例如作为氨基酸侧链的性质, 可以列举疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、具有脂肪族侧链的氨基酸(G、A、V、L、I、P)、具有含水酸基侧链的氨基酸(S、T、Y)、具有含硫原子侧链的氨基酸(C、M)、具有含羧酸和酰胺侧链的氨基酸(D、N、E、Q)、具有含碱基侧链的氨基酸(R、K、H)、和具有含芳香族侧链的氨基酸(H、F、Y、W) (括号内均显示氨基酸的一个字符标记)。这些各组内氨基酸的置换称为保守置换。具有通过针对某氨基酸序列的1个或多个氨基酸残基的缺失、添加和/或其它氨基酸的置换而修饰的氨基酸序列的多肽保持其生物学活性是已知的 (Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:5662-6; Zoller, M.J. and Smith, M., Nucleic Acids Res. (1982) 10:6487-500; Wang, A. et al., Science (1984) 224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:6409-13)。包含这种氨基酸改变的本发明的可变区, 与改变前的可变区的CDR序列、FR序列或全部可变区的氨基酸序列具有至少70%, 更优选地至少75%, 更优选地至少80%, 进一步优选地至少85%, 进一步更优选地至少90%, 最优选地至少95%的氨基酸序列的同一性。在本说明书中, 序列的同一性被定义为根据需要对齐序列以使序列同一性达到最大, 在导入适当间隙后, 与原始H链可变区或L链可变区的氨基酸序列的残基相同的残基的比例。氨基酸序列的同一性可以通过后述的方法来确定。

[0641] 另外, 在“功能上同等的抗体可变区”例如也可以从在严格的条件下与由编码上述表1~3中记载的可变区的氨基酸序列的碱基序列构成的核酸杂交的核酸中得到。作为用于分离在严格的条件下与由编码可变区的氨基酸序列的碱基序列构成的核酸杂交的核酸的严格的杂交条件, 可以示例6M尿素, 0.4% SDS, 0.5 x SSC, 37°C的条件或与此同等的严格的杂交条件。如果应用更严格的条件, 例如, 6M尿素, 0.4% SDS, 0.1 x SSC, 42°C的条件, 可以期望分离同源性更高的核酸。杂交后的洗涤条件例如是在0.5xSSC (1xSSC 0.15M NaCl, 0.015M柠檬酸钠, pH7.0) 和0.1% SDS, 60°C下洗涤, 更优选地在0.2xSSC, 和0.1% SDS, 60°C下洗涤, 更优选地在0.2xSSC, 和0.1% SDS, 62°C下洗涤, 更优选地在0.2xSSC, 和0.1% SDS, 65°C下洗涤, 更优选地在0.1xSSC, 和0.1% SDS, 65°C下洗涤。分离的核酸的序列的确定可以通过后述的公知方法来进行。在全部碱基序列中, 分离的核酸的同源性具有至少50%以上, 进一步优选地70%以上, 进一步优选地90%以上 (例如95%、96%、97%、98%、99%以上) 的序列的同一性。

[0642] 也可以代替利用上述杂交技术的方法, 利用使用基于编码可变区的氨基酸序列的

碱基序列信息合成的引物的基因扩增法,例如聚合酶链反应(PCR)法,分离在严格的条件下与由编码可变区的氨基酸序列的碱基序列构成的核酸杂交的核酸。

[0643] 碱基序列和氨基酸序列的同一性可以通过Karlin和Altschul的算法BLAST (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1993) 90:5873-7) 来确定。根据该算法来开发称作BLASTN或BLASTX的程序(Altschul et al.,J.Mol.Biol. (1990) 215:403-10)。在根据BLAST通过BLASTN解析碱基序列的情形中,参数例如为score=100,wordlength=12。另外,在根据BLAST通过BLASTX解析氨基酸序列的情形中,参数例如为score=50,wordlength=3。在使用BLAST与Gapped BLAST程序的情形中,使用各程序的默认的参数。这些解析方法的具体手法是公知的(参照NCBI(National Center for Biotechnology Information)的BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)网站;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

[0644] 本发明的双特异性抗体中包含的Fc区只要是针对Fcγ受体的结合活性降低的Fc区则没有特别限制,但作为本发明的优选的Fc区,例如可以列举W02016/047722A1中记载的E22 Hh的Fc区部分与E22 Hk的Fc区部分的组合,E2702GsKsc的Fc区部分与E2704sEpsc的Fc区部分的组合,E2702sKsc的Fc区部分与E2704sEpsc的Fc区部分的组合。

[0645] 另外,也考虑将编码本发明的抗原结合分子的基因整合到基因治疗用载体中,进行基因治疗。作为施用方法,除了使用裸(naked)质粒直接施用外,还可以将其包装在脂质体等中,或形成为逆转录病毒载体,腺病毒载体,痘苗病毒载体,痘病毒载体,腺病毒相关载体,HVJ载体等各种病毒载体(参照Adolph《病毒基因组法》,CRC Press,Florid(1996)),或覆盖在胶体金粒子等珠载体(W093/17706等)中施用。另外,编码本发明的抗原结合分子的核酸可以直接向生物体施用,另外也可以通过电穿孔法直接向生物体施用。例如,可以通过对编码本发明的抗原结合分子的mRNA实施用于提高mRNA在生物体内的稳定性的化学修饰,直接向人施用该mRNA,在生物体内表达本发明的抗原结合分子的方法来施用本发明的抗原结合分子(参照EP2101823B、W02013/120629)。然而,在生物体内表达抗原结合分子,只要可以发挥其作用则可以通过任何方法施用。优选地,通过适当的非经口途径(如通过静脉内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪组织内、乳腺组织内、吸入或肌肉内途径注射、输注或通过气体诱导性粒子冲击(如电子枪)、滴鼻剂等粘膜途径来施用足够的剂量。也可以在体外利用脂质体转染、粒子冲击法(美国专利第4,945,050号)或病毒感染对血液细胞和骨髓源性细胞等进行施用,通过将该细胞再导入动物中施用编码本发明的抗原结合分子的基因。

[0646] 本说明书中使用的“治疗”(以及其语法上的派生词,例如“治疗”、“治疗”等)意味着试图改变被治疗个体的自然过程的临床干预,也可以用于预防,也可以在临床病程期间实施。治疗的期望效果包含但不限于:防止疾病的发生或复发、减轻症状、减弱疾病的任意直接或间接病理影响、防止转移、降低疾病进展速度、恢复或缓解疾病状况以及缓解或改善的预后。在一些实施方式中,本发明的药物组合物用于减缓疾病的发病或减缓疾病的进展。

[0647] 在本发明中,药物组合物通常是指用于治疗或预防疾病或检查/诊断疾病的药剂。在本发明中,当药物组合物与其它成分的施用组合使用时,药物组合物可以与其它成分的施用同时,分开或连续施用。本发明的药物组合物也可以包含其它成分作为成分。

[0648] 可以使用本领域技术人员公知的方法制备包含本发明的抗原结合分子的药物组合物。例如,可以与水或任何其它药学上容许的液体的无菌溶液,或者以悬浮液剂的注射剂的形式非经口使用。例如,药理学上许容载体或介质,具体地,可以通过与灭菌水或生理盐

水、植物油、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、香味剂、赋形剂、载色剂、防腐剂、结合剂等适当组合,以一般被认可的制药实施所要求的单位用量形式混和来制备。这些制剂中的有效成分量,被设定为得到指示范围的适当容量。

[0649] 用于注射的无菌组合物可以使用诸如注射用蒸馏水的媒介物根据常规制剂实施来处方。作为注射用水溶液,例如列举含有生理盐水、葡萄糖和其他辅助药物(如D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠)的等渗液。可以联合使用适当的溶解辅助剂,例如醇(乙醇等)、聚醇(丙二醇,聚乙二醇等)、非离子表面活性剂(聚山梨酯80(TM)、HCO-50等)。

[0650] 作为油性液列举芝麻油、大豆油,作为溶解辅助剂可以联合使用苯甲酸苄酯和/或苯甲醇。另外,还可以与缓冲剂(例如,磷酸盐缓冲液和乙酸钠缓冲液)、无痛剂(例如,盐酸普鲁卡因)、稳定剂(例如,苄醇和苯酚)、抗氧化剂配合。配制的注射液通常填充在适当的安瓿中。

[0651] 包含本发明的抗原结合分子的药物组合物,优选地通过非经口施用进行施用。例如,施用注射剂型、经鼻施用剂型、经肺施用剂型、经皮施用型的组合物。例如,可以通过静脉内注射、动脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、髓内注射、关节内注射、滑液囊内注射、颅内注射、髓腔内注射、蛛网膜下注射、皮内注射、皮下注射、心脏内注射、肿瘤等病变内注射或利用导管的方法等全身或局部施用。

[0652] 可以根据患者的年龄、症状适当选择施用方法。本发明的药物组合物的施用量例如可以设定为,每次每kg体重0.0001mg至1000mg的范围。或者,例如可以设定每个患者0.001~100000mg的施用量,但本发明不一定限于这些数值。施用量和施用方法随患者的体重、年龄、症状等而变动,但本领域技术人员可以考虑到它们的条件来设定适当的施用量和施用方法。

[0653] 根据本发明的需要,本发明的药物组合物封装在微胶囊(如羟基甲基纤维素、明胶、聚[甲基丙烯酸]等微胶囊)中,可以被制成胶体药物递送系统(脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊等)(参照Remington's Pharmaceutical Science 16th edition,Oslo Ed.(1980)等)。进一步,将药剂作为缓释药剂的方法也是公知的,该方法可以适用于本发明的双特异性抗原结合分子中(J.Biomed.Mater.Res.(1981)15,267-277、Chemtech.(1982)12,98-105,美国专利第3773719号,欧洲专利公开公报EP58481号和EP133988号,Biopolymers(1983)22,547-556)。

[0654] 术语“嵌合受体”指重组多肽,其至少包含细胞外结合结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,在免疫效应细胞中表达时,引起针对靶细胞、例如癌细胞的特异性和细胞内信号产生。

[0655] 嵌合受体的细胞外结构域意味着可以与规定分子特异性结合的任意蛋白性分子或其一部分。在本发明中,嵌合受体的细胞外结构域是包含免疫受体的细胞外结构域或其变体的序列的多肽。在本发明的一个方式中,嵌合受体的细胞外结构域可以是仅由免疫受体的细胞外结构域或其变体的序列构成的多肽,免疫受体的细胞外结构域或其变体的序列中也可以包含额外的多肽或氨基酸残基。在本发明的另一个方式中,嵌合受体的细胞外结构域也可以包含免疫受体的细胞外结构域或其变体的片段的序列。

[0656] 本发明中的免疫受体的细胞外结构域指可以与内源性免疫配体结合的免疫受体的细胞外部分。例如在CD137中指序列编号129、序列编号130、序列编号131或序列编号132。

[0657] 在本发明中,免疫受体的细胞外结构域变体意味着添加、缺失、置换免疫受体的细胞外结构域中的一部分的多肽。免疫受体的细胞外结构域变体优选减弱了与内源性免疫配体的结合,例如指根据通过文献中记载的X射线晶体结构解析确定的免疫受体与其内源性配体的结合部位,改变该免疫受体的细胞外结构域与内源性配体的结合部位的变体。例如,作为减弱了与内源性免疫配体的结合的免疫受体的细胞外结构域变体的实例,列举缺失了CD137的免疫受体的细胞外结构域中的富半胱氨酸结构域3和富半胱氨酸结构域4以及连接跨膜区的斯托克(GenbankNM001561.6,Cvs88~Gln186)的细胞外结构域变体。

[0658] 在本发明中,免疫受体的细胞外结构域的片段只要是构成免疫受体的细胞外结构域的多肽的片段即可,如果抗原结合分子可以识别,则构成的氨基酸的数量等没有特别限制。作为该片段的实例,列举构成免疫受体中具有激动剂活性的抗体识别的表位的多肽或其片段。在本发明中,嵌合受体的细胞外结构域可以包含该表位的变体,构成该表位包含的免疫受体的细胞外结构域的多肽的片段也相当于“免疫受体的细胞外结构域的片段”。

[0659] 术语“跨膜结构域”包含位于该细胞外结构域与该细胞内信号传导结构域之间、且具有跨细胞膜的功能的多肽。

[0660] 术语“细胞内信号传导结构域”意味着已知具有传导引起细胞内的生物学过程的活化或抑制、例如T细胞或者NK细胞等免疫细胞的活化的信号的功能的任意寡肽结构域或多肽结构域,包含后述的至少1个来源于T细胞的刺激分子的“刺激分子信号传导结构域”,也可以包含进一步后述的至少1个来源于T细胞的共刺激分子的“共刺激分子信号传导结构域”。

[0661] 在本公开中使用的情形中,“结构域”意味着例如,折叠成独立于其它区的特定结构、和/或具有特定功能的多肽的一个区。结构域可以是例如分子的细胞质部分或其一部分。在本公开中使用的情形中,分子的“细胞质结构域”意味着全长细胞质结构域、或活化时传导细胞内信号的其一部分。

[0662] 在一个实施方式中,嵌合受体是包含以下定义的结构域分子。

[0663] 在一个实施方式中,嵌合受体包含嵌合融合蛋白,该嵌合融合蛋白包含:细胞外结构域、细胞外铰链结构域、跨膜结构域、和包含来源于刺激分子的刺激分子信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。

[0664] 在一个实施方式中,嵌合受体包含嵌合融合蛋白,该嵌合融合蛋白包含:细胞外结构域、细胞外铰链结构域、跨膜结构域、和包含来源于共刺激分子的共刺激分子信号传导结构域和来源于刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。

[0665] 在一个实施方式中,嵌合受体包含嵌合融合蛋白,该嵌合融合蛋白包含:细胞外结构域、跨膜结构域、包含来源于1个或多个共刺激分子的2个功能性信号传导结构域和来源于刺激分子的功能性信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。

[0666] 在一个实施方式中,嵌合受体包含嵌合融合蛋白,该嵌合融合蛋白包含:细胞外结构域,跨膜结构域,包含来源于1个或多个共刺激分子的至少2个共刺激分子信号传导结构域、来源于刺激分子的刺激分子信号传导结构域和其它的功能性结构域和/或基序的细胞内信号传导结构域。

[0667] 在一个实施方式中,公开了嵌合受体,其包含下列:i)能够与抗原结合分子的免疫受体识别位点结合的细胞外结构域;ii)跨膜结构域;和iii)细胞内区段,其包含下列:选自

细胞质共刺激结构域和/或白细胞介素受体链的细胞质结构域的1个以上细胞内信号传导结构域,与包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域(此处,前述细胞内区段包含内源性或外源性JAK结合基序和STAT5关联基序)。在某实施方式中,这些结构域根据情形、从N末端开始以上述顺序直接或间接融合。在某实施方式中,细胞内区段内的这些结构域以相反顺序融合。

[0668] 在一个实施方式中,该细胞外结构域和该细胞内信号传导结构域之间也可以包含细胞外铰链结构域和跨膜结构域。术语“细胞外铰链结构域”意味着连接细胞外结构域和跨膜结构域的结构域。细胞外铰链结构域只要可以连接细胞外结构域和跨膜结构域,则没有特别限定。可以来源于天然蛋白,也可以是人工设计的。细胞外铰链结构域可由例如10~300个左右的氨基酸、优选地20~100个左右的氨基酸构成。细胞外铰链结构域优选不干扰细胞外结构域与本公开的抗原结合分子的结合能力,并且不干扰经由细胞内信号传导结构域的信号传导。术语“跨膜结构域”只要是位于该细胞外结构域和该细胞内信号传导结构域之间、且具有跨细胞膜的功能的多肽,则没有特别限定。跨膜结构域可以来源于天然蛋白,也可以是人工设计的。来源于天然蛋白的跨膜结构域可以从任意膜结合蛋白或跨膜蛋白取得。

[0669] 在一个实施方式中,嵌合受体在嵌合受体融合蛋白的氨基末端(N-末端)包含附加的前导序列。

[0670] 在一个实施方式中,嵌合受体进一步在细胞外结构域的N-末端包含前导序列,此处,该前导序列也可以在细胞加工和嵌合受体定位于细胞膜期间从细胞外结构域切割。

[0671] 术语“免疫受体”是在免疫细胞上表达的受体,意味着参与免疫细胞的活性或抑制的受体。作为免疫细胞的实例,列举T细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞、巨噬细胞、单核细胞、NK细胞或造血细胞(嗜中性粒细胞,嗜碱性粒细胞)等。在本发明中,嵌合受体作为细胞外结构域,具有免疫受体的细胞外结构域或其变体。此处免疫受体优选参与免疫细胞的活化的受体,例如,列举属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的共刺激分子,具体地,CD137、CD40、OX40、RANK、GITR等。另外免疫受体也可以是刺激分子或共刺激分子,该具体实例如下所述。

[0672] 本发明中的抗原结合分子的免疫受体识别位点能够识别嵌合受体的细胞外结合结构域中包含的免疫受体的细胞外结构域或其片段。更优选地,抗原结合分子的免疫受体识别位点识别与内源性配体的结合部位不同的部分。免疫受体上的内源性配体结合部位例如通过文献中记载的结构生物学解析来确定。报告了例如在CD137中,与CD137L的复合物的X线晶体结构已被探明(Chin SM et al(2018)Nat Commun.9,4679),CRD1上的F36、CRD2上的P49、S52、Q59、T61、C62、D63、I64、Q67、K69、V71、F72、和CRD3上的S100、M101、C102参与与CD137L的相互作用。其中,制备将I64或V71突变为Arg的突变体,均显示与CD137L的结合减弱。将参与与CD137L的相互作用的氨基酸残基突变为另一氨基酸残基的突变体,可以作为减弱了与CD137L的结合的细胞外结构域变体而使用。

[0673] 在一个方式中,嵌合受体的细胞外结构域包含,属于TNFRSF的共刺激分子的细胞外结构域或其片段,抗原结合分子的免疫受体识别位点可以应用针对属于TNFRSF的共刺激分子的激动剂抗体(以下称为TNFRSF的激动剂抗体)或其抗原结合片段。在各种具体实例中,作为本发明的药物组合物使用的抗原结合分子,可以至少活化约20%、30%、40%、

50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、1000%或其以上该嵌合受体表达细胞的活性。

[0674] 在本发明的一个方式中,嵌合受体的细胞外结构域包含TNFRSF的激动剂抗体的靶分子或其片段。作为TNFRSF的激动剂抗体的靶分子,只要是活化表达TNF受体超家族的细胞(例如,T细胞或NK细胞等)的因子,则没有特别限制。作为优选的因子,列举例如CD137、CD40。作为进一步优选的因子,列举例如CD137。例如,作为CD137激动剂抗体的实例,可以列举Urelumab(CAS注册编号:934823-49-1)或各种公知的CD137激动剂抗体。

[0675] 在本发明的一个方式中,嵌合受体的细胞外结构域包含针对免疫受体具有激动剂活性的抗体的表位作为免疫受体的片段。作为免疫受体的实例如上所述,优选地列举CD137。

[0676] 在本发明的一个方式中,嵌合受体的细胞外结构域包含CD137激动剂抗体的靶分子或其片段。作为CD137激动剂抗体的示例,可以列举例如W02015/156268中所述的序列编号等显示的以下抗体:

[0677] [1]具有序列编号66中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号85中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0678] [2]具有序列编号67中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号86中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0679] [3]具有序列编号70中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号89中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0680] [4]具有序列编号76中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号95中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0681] [5]具有序列编号77中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号96中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0682] [6]具有序列编号78中所述的氨基酸序列作为重链可变区、和序列编号97中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0683] [7][1]~[6]任一个中所述的抗体,其中,该抗体是具有序列编号99中所述的氨基酸序列作为重链恒定区、和序列编号59中所述的氨基酸序列作为轻链恒定区或序列编号60中所述的氨基酸序列作为轻链可变区的抗体;

[0684] [8]具有与[1]~[7]任一个中所述的抗体同等活性的抗体;

[0685] [9]与具有与[1]~[7]任一个中所述的抗体结合的表位相同的表位结合的抗体。

[0686] 在上述[8]中所述的抗体中,“同等活性”指对CD137的激动剂活性是上述[1]~[7]任一个中所述的抗体的结合活性的70%以上,优选地80%以上,更优选地90%以上。

[0687] 作为与上述[1]~[7]任一个中所述的抗体结合的表位相同的表位结合的抗体的优选的实例,可以列举例如识别具有CD137蛋白中的SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC的序列的区的抗体。进一步,可以列举识别具有CD137蛋白中的DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC的序列的区的抗体。

[0688] 在一个实施方式中,作为细胞外铰链结构域,列举例如CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD4、NKp30、NKp44、NKp46的细胞外铰链结构域等。另外,也可以使用免疫球蛋白(例如,IgG4等)的铰链区。

[0689] 在一个实施方式中,作为跨膜结构域来源的蛋白,可以列举例如T细胞受体的 α 链和 β 链、CD3 ζ 、CD28、CD3g、CD45、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR、Nkp30、Nkp44、Nkp46等。在一个实施方式中,跨膜结构域来源的蛋白是CD8 α 或CD28。

[0690] 术语“信号传导结构域”指通过传递细胞内的信息而起作用的蛋白的功能部分,其用于通过生成第2信使、或应答于这样的信使作为效应物发挥作用而经由规定的信号传导途径调节细胞活性。

[0691] 在该术语在本公开中使用的情形中,“细胞内信号传导结构域”指分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域可以生成促进含有嵌合受体的细胞、例如嵌合受体表达T细胞的免疫效应物功能的信号。例如,作为嵌合受体表达T细胞中免疫效应物功能的实例,列举细胞溶解活性和辅助活性,例如细胞因子分泌等。在实施方式中,细胞内信号传导结构域是传递效应物功能信号、并使细胞执行特定功能的蛋白的一部分。电存在采用细胞内信号传导结构域全部的情形,但在许多情形中不一定需要使用全部链。只要使用细胞内信号传导结构域的截短部分,就可以使用这样的截短部分代替完整链,只要它传递效应物功能信号。因此,细胞内信号传导结构域的术语意味着包含足以传递效应物功能信号的细胞内信号传导结构域的所有截短部分。

[0692] 在某实施方式中,细胞内信号传导结构域也可以包含初次细胞内信号传导结构域。作为典型的初次细胞内信号传导结构域,列举来源于与初次刺激、或抗原依赖性刺激(antigen dependent simulation)有关的分子的那种。在某实施方式中,细胞内信号传导结构域也可以包含共刺激细胞内结构域。作为典型的共刺激细胞内信号传导结构域,列举来源于与共刺激信号、或抗原非依赖性刺激有关的分子的那种。例如,在嵌合受体表达T细胞的情形中,初次细胞内信号传导结构域也可以包含T细胞受体的细胞质内序列,共刺激细胞内信号传导结构域也可以包含来自辅助受体或共刺激分子的细胞质内序列。

[0693] 在本公开中使用的情形中,术语“CD3 ζ ”意味着所有哺乳动物物种、优选人的分化抗原簇3(CD3) T细胞共受体。在哺乳动物中,CD3包含CD3 ζ 链、CD3 δ 链和2条CD3 ϵ 链CD3 ζ 链(例如,NCBI RefSeq:NP_932170.1),包含可用于操纵嵌合受体的细胞内信号结构域。在本公开的特定嵌合受体中,CD3- ζ 的初次信号传导序列是Genbank NM000734.3的细胞质区序列(核苷酸序列299~634)全长或者一部分,或来自非人物种例如小鼠、啮齿类、猴、类人猿和同种物种的等价残基。

[0694] 在一个实施方式中,细胞内信号传导结构域也可以包含白细胞介素受体链的细胞质结构域在一个实施方式中,细胞内信号传导结构域也可以使用连接CD28、4-1BB、ICOS、或多个信号传导结构域的CD3 ζ -CD28-4-1BB或CD3 ζ -CD28-0X40。在一个实施方式中,跨膜结构域来源的蛋白是CD8 α 或CD28,并且细胞内信号传导结构域也可以是连接CD28、4-1BB、ICOS、或多个信号传导结构域的CD3 ζ -CD28-4-1BB或CD3 ζ -CD28-0X40。

[0695] 在一个实施方式中,公开了嵌合受体,其包含下列:i)能够与抗原结合分子的免疫受体识别位点结合的细胞外结构域;ii)跨膜结构域;和iii)细胞内区段,其包含下列:选自细胞质共刺激结构域和/或白细胞介素受体链的细胞质结构域的1个以上细胞内信号传导结构域,与包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域(此处,前述细胞内区段包含内源性或外源性JAK结合基序和STAT5关联基序)。在某实施方式中,这些结构域根据

情形,从N末端开始以上述顺序直接或间接融合。在某实施方式中,细胞内区段内的这些结构域以相反顺序融合。

[0696] 术语“刺激”指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物或嵌合受体)与其配体(或在嵌合受体的情形中是抗原结合分子的免疫受体识别位点)的结合诱导的初次应答,由此介导经由TCR/CD3复合物的信号传导、或经由嵌合受体的适当的NK受体或者信号传导结构域的信号传导等信号传导事件,但不限于这些。刺激有时也介导某特定分子的改变的表达。

[0697] 术语“刺激分子”指通过免疫细胞例如T细胞、NK细胞或B细胞表达的分子,该免疫细胞以与免疫细胞信号传导途径的至少一部分的方式有关的刺激形式带来调节免疫细胞的活化的细胞质内信号传导序列。在一个方式中,信号是例如,通过TCR/CD3复合物与呈递肽的MHC分子结合引发的初次信号,由此,引起增殖、活化、分化、和同种应答等T细胞应答的介导,但不限于这些。以刺激形式起作用的初次细胞质内信号传导序列(另外,也称为“初次信号传导结构域”)也可以包含信号传导基序,它们已知为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。作为本公开中包含具有特定用途的细胞质内信号传导序列的ITAM的实例,列举来源于CD3 ζ 、共有Fc γ (FCER1G)、Fc γ RIIa、FcR β (Fc ϵ R1b)、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD22、CD79a、CD79b、CD278(“ICOS”)、Fc ϵ sRI、CD66d、CD32、DAP10、DAP12、CLEC2、CLEC7A(Dectin1)、CLEC9A、EZRIN、RADIXIN和MOESIN的那些,但不限于这些。在本公开的特定嵌合受体中,本公开的任一个或多个嵌合受体中的细胞内信号结构域包含细胞内信号传导序列,例如CD3- ζ 的初次信号传导序列。本发明的嵌合受体的细胞外结构域也可以是上述刺激分子的细胞外结构域。

[0698] 术语“共刺激分子”指T细胞上的同源结合配偶,其通过与共刺激配体特异性结合,介导增殖等通过T细胞的共刺激应答(二次信号),但不限于这些。共刺激分子是有效免疫反应的一个因素,是抗原受体以外的细胞表面分子或它们的配体。术语“共刺激细胞内信号传导结构域”指共刺激分子的细胞内部分。细胞内信号传导结构域也可以包含细胞内的部分全部、或者得到它们的分子的天然型细胞内信号传导结构域的全部、或它们的功能片段或衍生物。作为共刺激分子,列举与MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、活化NK细胞受体、BTLA、To11配体受体、OX40(CD134)、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R $\alpha\alpha$ 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD154和CD83特异性结合的配体,但不限于这些。本发明的嵌合受体的细胞外结构域也可以是上述共刺激分子的细胞外结构域。

[0699] 在一个实施方式中,共刺激分子选自例如,4-1BB(即CD137)、CD27、CD28和/或OX40,增强T细胞受体刺激。

[0700] 术语“4-1BB”或“CD137”指具有提供为GenBank登录编号AAA62478.2的序列氨基酸

序列的TNFR超家族的一个成员,或来自非人物种例如小鼠、啮齿类、猴、类人猿和同种物种的等价残基,“4-1BB共刺激结构域”定义为GenBank登录编号AAA62478.2的氨基酸残基214~255,或来自非人物种例如小鼠、啮齿类、猴、类人猿和同种物种的等价残基。在一个方式中,“4-1BB共刺激结构域”是Genbank NM001561.5的核苷酸序列886~1026序列的全长或者一部分,或来自非人物种例如小鼠、啮齿类、猴、类人猿和同种物种的等价残基。

[0701] 术语“核酸”或“多核苷酸”指脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、和单链或双链任一形态的它们的聚合物。术语“核酸”包含基因、cDNA或mRNA。在一个实施方式中,核酸分子是合成(例如,化学合成的)核酸分子或重组核酸分子。除非另有特别说明,该术语包括,包含具有与参照核酸类似的结合特性、与天然存在的核苷酸类似的方式代谢的天然核苷酸的类似体或衍生物的核酸。除非另有特别说明,特定的核酸序列也另外事实上包含它们的保守改变的突变体(例如,简并密码子的置换)、等位基因、直向同源物、SNP、和互补序列、加上明确提出的序列。具体言之,简并密码子的置换可以通过生成1个或多个选择的(或全部)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基置换的序列而实现[Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*260:2605-2608(1985); and Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994)]。

[0702] 在本公开中使用的情形中,术语“核酸序列”意味着由天然碱基、糖和糖间(主链)键构成的核苷或核苷酸单体的序列。|该术语中也另外包含,包含非天然单体或其一部分的修饰或置换序列。本申请的核酸序列可以是脱氧核糖核酸序列(DNA)或核糖核酸序列(RNA),包括包含腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶的天然碱基。这些序列另外可以包含修饰碱基。这样的修饰碱基的实例中包含氮杂和脱氮杂腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶;以及黄嘌呤和次黄嘌呤。

[0703] 在本公开中使用的情形中,术语“分离的核酸”意味着通过重组DNA技术生产的情形中实质上不包含细胞材料或者培养基、或化学合成的情形中实质上不包含化学前体或者其它化学物质的核酸。另外,分离的核酸也实质上不包含与该核酸来源的核酸天然邻接的序列(即,位于该核酸的5'末端和3'末端的序列)。术语“核酸”包含DNA和RNA,可以是双链或单链的任一,相应于正义或反义链。进一步,术语“核酸”是互补的核酸序列,例如包含cDNA。

[0704] 术语“编码(进行编码)”指在具有核苷酸(例如,rRNA、tRNA和mRNA)的规定序列或氨基酸的规定序列的任一生物学过程中作为用于合成其它聚合物和高分子的模板起作用的基因、cDNA、或mRNA等多核苷酸中的核苷酸的特异性序列的固有特性,和由此生成的生物学特性。因此,在细胞或其它生物系统中通过与基因对应的mRNA的转录和翻译产生蛋白的情形中,该基因、cDNA或RNA编码蛋白。其核苷酸序列与mRNA序列相同、通常序列表中显示的编码链和作为用于基因或cDNA的转录的模板使用的非编码链,都可以称为编码该基因或cDNA的蛋白或其它产物。

[0705] 除非另有特别说明,“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包含彼此简并型的核苷酸序列和编码相同氨基酸序列的核苷酸序列的全部。另外,编码蛋白或RNA的核苷酸序列的短语在几个情形中也可以以编码该蛋白的核苷酸序列可含有内含子的程度包含内含子。另外,核酸分子与用于表达嵌合受体的至少1个调节元件可操纵地结合。

[0706] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白”同义使用,指由通过肽键的共价结合连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白或肽必须包含至少2个氨基酸,可以构成蛋白或肽的序列的氨基酸的

最大数目不限。多肽包括包含彼此以肽键连接的2个以上氨基酸的所有肽或蛋白。在本公开中使用的情形中,该术语指本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体的短链,和本领域中通常存在多种类型的、称为蛋白的、比其长的链两者。作为“多肽”,特别列举例如,生物学活性片段、实质上相同的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的突变体、改变的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白。作为多肽,列举天然肽、重组肽、或它们的组合。

[0707] 本公开中的多肽通常指具有10个氨基酸左右以上的长度的肽和蛋白。当通过肽键从N末端到C末端连接的氨基酸链为一系列肽链时,本公开的多肽可以是多个系列肽链通过S-S键、疏水性相互作用、离子键等相互作用形成的复合物蛋白。

[0708] 术语“分离的多肽”也称为“分离的蛋白”,意味着通过重组DNA技术生产的情形中实质上不包含细胞材料或者培养基、或化学合成的情形中实质上不包含化学前体或者其它化学物质的多肽。

[0709] 术语“氨基酸”包含天然氨基酸以及修饰氨基酸的总和。

[0710] 在本公开中使用的情形中,术语“保守的氨基酸变异”是某氨基酸残基被另一氨基酸残基置换而不损坏该蛋白的期望特性。

[0711] 在本申请中具体显示的氨基酸序列也可以包含保守的序列改变。此处“保守的序列改变”指不显著影响或不改变包含该氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸突变。作为这样的保守的改变,列举氨基酸的置换、添加和缺失。改变可以通过定点诱变和PCR介导的诱变等本领域公知的标准技术导入本公开的抗体或抗体片段。保守的氨基酸置换是用具有类似侧链的氨基酸残基置换氨基酸残基的置换。具有类似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、 β 分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本公开的嵌合受体内的1个或多个氨基酸残基可以用相同侧链家族的其他氨基酸残基置换,改变的嵌合受体也可以使用本公开中说明的功能分析测试。

[0712] 术语“表达”指通过启动子驱动的特异性核苷酸序列的转录和/或翻译

[0713] 本公开中的“宿主细胞”、“宿主细胞株”和“宿主细胞培养物”可互换应用,指导入了外来核酸的细胞(包含这样的细胞的后代)。宿主细胞包含“转化体”和“转化细胞”,它们之中包含原代的转化细胞和不依赖传代数来源于该细胞的后代。后代在亲本细胞与核酸的内容中可以不完全相同,也可以包含突变。与原始的转化细胞被筛选或选择时应用的那种具有相同功能或生物学活性的突变体后代也包含在本公开中。

[0714] 本公开中的“载体”指可以增加其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包含作为自我复制核酸结构的载体、和整合到其被导入的宿主细胞的基因组中的载体。某载体可以导致它们有效连接的核酸的表达。这样的载体在本公开中也称为“表达载体”。

[0715] 转染意味着通过未知是否实际表达任意编码序列的宿主细胞并入表达载体。转染的许多方法是具有通常技能的技术人员已知的,例如,有 CaPO_4 沉淀法以及电穿孔法。通常,成功的转染在该载体功能的迹象出现在宿主细胞中时被识别。

[0716] 术语“启动子”指启动多核苷酸序列的特异性转录需要的、通过细胞的合成机构识

别的DNA序列或导入的合成机构。

[0717] 术语“慢病毒”指逆转录病毒科的属中的1个。慢病毒在逆转录病毒中由于可以感染非分裂细胞而独特，它们可以向宿主细胞的DNA递送大量遗传信息，因此，是基因递送载体的最有效方法之一。HIV、SIV、和FIV是慢病毒的全部实例。

[0718] 术语“慢病毒载体”指来源于慢病毒基因组的至少一部分的载体，特别列举如Milone et al., Mol. Ther. 17(8):1453-1464(2009)显示的自身不活化慢病毒载体。作为具有在诊疗设施使用的可能性的慢病毒载体的其它实例，列举但不限于例如，Oxford BioMedica制的LENTIVECTOR(注册商标)基因递送技术、Lentigen制的LENTIMAX(商标)载体系统和同种载体。非临床类型的慢病毒载体也可以利用，本领域技术人员可以适当进行载体的选择和创建。

[0719] 本公开中，术语“药学上容许的”指向哺乳动物(例如，人)施用生理耐受的、典型地不发生不期望的反应的这样的组合物的分子实体和其它成分。优选地，本公开中的“药学上容许的”意味着关于哺乳动物、更具体地人中使用，被联邦政府或者州政府的监管机构认可或在美国药典或者其它通常认可药典中记载。

[0720] 在一个方式中，本公开的嵌合受体包含本文记载的2个信号传导结构域，即CD3 ζ 和4-1BB/CD137或CD3 ζ 加上1个以上的信号传导结构域。在一个特定的方式中，数个信号传导结构域为了加成或协同作用彼此融合。有用的附加信号传导结构域的非限定实例包含TCR ζ 链、CD27、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc ϵ RI γ 、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP-10和CD40的1个以上的一部分或全部。

[0721] 在本公开中，公开了嵌合受体，其包含下列：i) 可以与规定抗原经由抗原结合分子结合的细胞外结构域、ii) 跨膜结构域、和iii) 细胞内区段，该细胞内区段包含下列：选自细胞质共刺激结构域和/或白细胞介素受体链的细胞质结构域的1个以上细胞内信号传导结构域、与包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域(此处，前述细胞内区段包含内源性或外源性JAK结合基序和STAT5关联基序)。在某实施方式中，这些结构域根据情形，从N末端开始以上述顺序直接或间接融合。在某实施方式中，细胞内区段内的这些结构域以相反顺序融合。

[0722] 另外，在本公开中，也包含嵌合受体，其包含下列：i) 能够经由抗原结合分子结合的细胞外结构域、ii) 跨膜结构域、和iii) 包含下列的细胞内区段：包含白细胞介素(IL)受体链的细胞质结构域和根据情形至少1个补充细胞质结构域的1个以上细胞内信号传导结构域。在某实施方式中，这些结构域根据情形，从N末端开始以上述顺序直接或间接融合。在一个实施方式中，细胞内区段内的这些结构域以相反顺序融合。

[0723] 在几个实施方式中，IL受体链在跨膜结构域的近侧、和/或与嵌合受体细胞内区段的N末端接近、或形成N末端。在其它的实施方式中，IL受体链与嵌合受体的细胞内区段的C末端接近、或形成C末端。在几个实施方式中，IL受体链在包含外源性STAT3关联基序YXXQ的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域的上游或N末端侧。

[0724] 在细胞内区段仅包含IL受体链的信号传导结构域的实施方式中，嵌合受体表达细胞可以经由内源性TCR通过MHC复合物内存在的规定抗原，和/或经由内源性CD28通过CD80/86分子、例如通过B细胞活化。

[0725] 另外，还提供本公开的表达嵌合受体的细胞。这样的细胞例如与不表达嵌合受体

的亲本细胞相比针对其表面具有经由抗原结合分子嵌合受体结合的规定的/预先选择的抗原的细胞可以保有高的细胞毒性活性。例如,如实施例所示的,表达本公开的嵌合受体受体的细胞通过施用抗原结合分子,提供抗原结合分子依赖的并且癌抗原肿瘤抗原依赖的抗肿瘤效果。因此,也期待人中的抗肿瘤效果。

[0726] 在表达本公开的嵌合受体的细胞中,只要表达本公开的嵌合受体即可,也可以进行其它转导。

[0727] 根据本公开的嵌合受体的细胞内区段是蛋白性分子,其可以包含1个以上细胞内信号传导结构域,在相同分子内存在的细胞外结构域与其同源抗原/配体结合(相互作用)时可以向细胞递送信号。

[0728] 在某方面中,嵌合受体细胞内区段包含CD3 ζ 细胞内信号传导结构域,该CD3 ζ 细胞内信号传导结构域包含外源性STAT3关联基序。此外,嵌合受体细胞内区段包含选自IL受体链的细胞质结构域和/或细胞质共刺激结构域的1个以上细胞内信号传导结构域,前述细胞内区段包含内源性或外源性JAK结合基序和STAT5关联基序。

[0729] 初次细胞质信号传导序列调节TCR复合物的初次活化。例如,CD3 ζ 细胞内信号传导结构域提供初次细胞质信号。初次细胞质信号传导序列,也可以包含已知的信号传导基序作为免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM) [Nature, vol. 338, pp. 383-384 (1989)]。另一方面,抑制性起作用的初次细胞质信号传导序列,也可以包含已知的信号传导基序作为免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM) [J Immunol., vol. 162, No. 2, pp. 897-902 (1999)]。在本公开中,可以使用具有ITAM和/或ITIM的细胞内信号传导结构域。

[0730] 在本公开中,CD3 ζ 的细胞内结构域包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。作为具有可以使用的ITAM的细胞内信号传导结构域的实例,例如代替CD3 ζ ,或与CD3 ζ 置换,包含具有来源于FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、和CD66d的ITAM的细胞内信号传导结构域。具体地,包含1个以上ITAM的细胞内结构域的实例中包含具有CD3 ζ (NCBI RefSeq:NP_932170.1)的氨基酸编号52~164、Fc ϵ RI γ (NCBI RefSeq:NP_004097.1)的氨基酸编号45~86、Fc ϵ RI β (NCBI RefSeq:NP_000130.1)的氨基酸编号201~244、CD3 γ (NCBI RefSeq:NP_000064.1)的氨基酸编号139~182、CD3 δ (NCBI RefSeq:NP_000723.1)的氨基酸编号128~171、CD3 ϵ (NCBI RefSeq:NP_000724.1)的氨基酸编号153~207、CD5 (NCBI RefSeq:NP_055022.2)的氨基酸编号402~495、CD22 (NCBI RefSeq:NP_001762.2)的氨基酸编号707~847、CD79a (NCBI RefSeq:NP_001774.1)的氨基酸编号166~226、CD79b (NCBI RefSeq:NP_000617.1)的氨基酸编号182~229、和CD66d (NCBI RefSeq:NP_001806.2)的氨基酸编号177~252的序列的肽,以及与这些肽具有相同功能的它们的突变体。基于本说明书中记载的NCBI RefSeq ID或GenBank的氨基酸序列信息的氨基酸编号基于各蛋白的前体(包含信号肽序列等)的全长而编号。

[0731] 在某实施方式中,STAT3关联基序YXXQ中的“X”表示的氨基酸残基可以是也包含保持STAT3结合的任一修饰天然氨基酸的任意天然氨基酸。在一个实施方式中,氨基酸X独立选自亮氨酸、精氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸。例如,氨基酸X是精氨酸。例如,氨基酸X是组氨酸。

[0732] 在某实施方式中,与STAT3关联基序YXXQ的酪氨酸残基邻接的2个氨基酸残基是精氨酸-组氨酸。在进一步其它实施方式中,外源性STAT3关联基序是YRHQ。

[0733] 外源性STAT3关联基序YXXQ也可以导入CD3 ζ 的细胞内结构域的任何部分,在某实施方式中,YXXQ关联基序插入C末端区附近。不希望受特定理论束缚,认为许多内源性YXXQ基序配置在距C末端100aa附近或其以内。另外显示,对于C末端区附近存在的YXXQ基序,应用GP130和LIFR研究,在更近位置存在的功能性高(Schmitz J et al.J Immunol.2000;164:848-54;Tomida M et al.Blood.1999;93:1934-41)。

[0734] 在某实施方式中,外源性STAT3关联基序YXXQ导入距嵌合受体的C末端200个氨基酸残基内存在的CD3 ζ 的细胞内结构域的任意部分。例如,STAT3关联基序导入距嵌合受体的C末端200个氨基酸残基内、150个氨基酸残基内、100个氨基酸残基内、90个氨基酸残基内、80个氨基酸残基内、70个氨基酸残基内、60个氨基酸残基内、50个氨基酸残基内、40个氨基酸残基内、30个氨基酸残基内、20个氨基酸残基内或10个氨基酸残基内。在一个实施方式中,外源性STAT3关联基序导入ITAM以外的位置。

[0735] 在某实施方式中,包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内结构域包含至少1个ITAM基序。在一个实施方式中,包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内结构域包含2个ITAM基序。在进一步的实施方式中,包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内结构域包含3个ITAM基序。

[0736] 本领域技术人员认识到,为了在CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域中导入STAT3关联基序,可以使用几个方法。例如,外源性STAT3关联基序可以通过将CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域的氨基酸残基104~106位的氨基酸残基Leu-His-Met替换为第104残基的酪氨酸及与该酪氨酸残基在第105和106邻接的任意其它2个氨基酸残基而导入。CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域的氨基酸残基104-105-106相当于全长CD3 ζ (例如,NCBI RefSeq:NP_932170.1)的氨基酸残基156-157-158。

[0737] 如记载的,某实施方式中的嵌合受体包含细胞内区段,该细胞内区段包含选自IL受体链和细胞质共刺激结构域的细胞质结构域的1个以上细胞内信号传导结构域。

[0738] 本公开中,IL受体链的细胞质结构域可以选自IL受体的任意链,例如,可以使用包含IL-2受体 β 链(NCBI REFSEQ:NP_000869.1)(IL-21受体 α 链(NCBI REFSEQ:NP_068570.1)的氨基酸编号256~538)的氨基酸编号266~551、共有IL-2受体 γ 链(NCBI REFSEQ:NP_000197.1)的氨基酸编号284~369、IL-7R α (NCBI REFSEQ:NP_002176.2)的氨基酸编号265~459、IL-9R α (NCBI REFSEQ:NP_002177.2)的氨基酸编号292~521或IL-4R α (NCBI REFSEQ:NP_000409.1)的氨基酸编号257~825的细胞质结构域。可以使用IL受体链的细胞质结构域的全区。

[0739] 或者,也可以使用IL受体(ILR)链的前述细胞质结构域的末端切割片段。例如,末端切割片段包含至ILR细胞质结构域的250的氨基酸,或是50~200氨基酸或者80~150氨基酸。

[0740] 在某实施方式中,IL受体链的细胞质结构域、根据情形IL受体链的前述细胞质结构域的末端切割片段包含至少STAT关联基序、根据情形STAT5关联基序与JAK结合基序(也称为box-1基序)。在某实施方式中,IL受体链的细胞质结构域或其末端切割片段,STAT5关联基序与JAK结合基序与包含。

[0741] 在某实施方式中,IL受体链的细胞质结构域和/或末端切割片段中包含具有相同功能的突变体,例如诱导STAT信号传导、根据情形STAT5信号传导和/或JAK信号传导的突变

体。

[0742] 在本公开的一个方面中,可以使用IL-2受体(IL-2R)β链的细胞质结构域。可以在本公开中使用的IL-2R β链的细胞质结构域的实例中包含IL-2R β链(NCBI RefSeq:NP_000869.1)的氨基酸编号266~551。在一个实施方式中,包含具有氨基酸编号266~337和530~551的序列的任一个的肽。在本公开的一个方面中,可以使用IL-2Rβ链的细胞质结构域的末端切割片段。该末端切割片段也可以包含:i)能够与酪氨酸激酶JAK1缔合的也称为BOX-1基序的JAK结合基序(例如,NCBI RefSeq:NP_000869.1的氨基酸编号278~286),和ii)STAT关联基序、根据情形STAT5或STAT3关联基序。IL受体链的其它部分可以通过例如保守氨基酸变异而改变。

[0743] 在某实施方式中,细胞内区段也可以包含外源性JAK结合基序、或含有JAK结合基序的信号传导分子。例如,JAK结合基序来源于IL2Rγ(IL2RG)、促红细胞生成素受体(EpoR)、血小板生成素受体(TpoR)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体(GM-CSFR)、和生长激素受体(GHR)。

[0744] IL-2R β链包含STAT5缔合中使用的3个功能性STAT5结合基序YFFF、YCTF和YLSL。这些酪氨酸残基的突变可以使IL-2R β链的IL-2反应性无效(Friedmann et al.,1996)。促红细胞生成素受体(EpoR)包含介导STAT5的活化的2个酪氨酸残基、即Y343和Y401,二者都记载为具有YXXL基序(Klingmuller et al.,1996)。因此,YXXL可以是STAT5动员的优选基序。例如,如IL-2Rβ链STAT5结合基序中显示的,其它的氨基酸残基也是功能性的。在一个实施方式中,STAT5关联基序是IL-2Rβ链STAT5关联基序,包含酪氨酸残基-510(酪氨酸残基510是NCBI RefSeq:NP_000869.1的氨基酸编号536)。

[0745] 在某实施方式中,STAT5关联基序可以来源于IL2Rγ、EpoR、TpoR、GM-CSFR和GHR。

[0746] 在某实施方式中,IL-2Rβ链的STAT5关联基序包含氨基酸残基YXXL。在某实施方式中,STAT5关联基序中的“X”表示的氨基酸残基可以是包含保持STAT5结合的任意修饰天然氨基酸的任意天然氨基酸。

[0747] 同样,细胞内区段包含也可以在细胞内信号传导结构域的任一个中配置或导入的1个以上JAK结合基序。

[0748] 在本公开的一个方面中,可以使用IL-21受体(IL-21R)α链的细胞质结构域。在本公开中使用的IL-21Rα链的细胞质结构域的实例中包含含有IL-21Rα链的氨基酸编号256~538(NCBI RefSeq:NP_068570.1)的细胞内信号传导结构域。在本公开的1个方面中,可以使用IL-21Rα链的细胞质结构域的末端切割片段。末端切割片段中包含与酪氨酸激酶JAK1缔合所需的box-1基序(NCBI RefSeq:NP_068570.1的氨基酸编号266~274),另外,包含STAT关联基序。在某实施方式中,STAT关联基序包含酪氨酸残基-500(NCBI RefSeq:NP_000869.1的氨基酸编号519)和STAT1/3缔合所需的酪氨酸残基500即YLRQ的C末端侧邻接的3个残基。

[0749] 细胞内信号传导结构域的其它实例中包含来源于TCR复合物和/或共刺激分子的细胞质区、和与这些序列具有相同功能的任意突变体。在其它实例中包含通过引用作为本说明书一部分的Sadelain et al 2009的表2中列举的细胞质信号传导结构域。

[0750] 天然T细胞的活化通过2个不同种类的细胞内信号传导结构域递送,即用于诱导TCR复合物介导的抗原依赖性初次活化(例如,通过CD3ζ提供的例如初次细胞质信号)的结

构域、和用于提供二次或共刺激信号(二次细胞质信号)的抗原非依赖性作用的结构域。

[0751] 在包含在本公开中可以使用的二次或共刺激细胞质信号传导结构域的细胞内结构域的实例中,包含来源于包含CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134、CD137(4-1BB)、ICOS、和CD154,例如,信号传导基序的该末端切割片段的序列。其具体实例中包含具有CD2(NCBI RefSeq:NP_001758.2)的氨基酸编号236~351、CD4(NCBI RefSeq:NP_000607.1)的氨基酸编号421~458、CD5(NCBI RefSeq:NP_055022.2)的氨基酸编号402~495、CD8 α (NCBI RefSeq:NP_001759.3)的氨基酸编号207~235、CD8 β (GenBank:AAA35664.1)的氨基酸编号196~210、CD28(NCBI RefSeq:NP_006130.1)的氨基酸编号180~220、CD137(4-1BB、NCBI RefSeq:NP_001552.2)的氨基酸编号214~255、CD134(OX40、NCBI RefSeq:NP_003318.1)的氨基酸编号241~277、和ICOS(NCBI RefSeq:NP_036224.1)的氨基酸编号166~199的序列的肽、和与这些肽具有的功能具有相同功能的它们的突变体。

[0752] 在一个方面,优选的公开包含嵌合受体,该嵌合受体包含细胞内区段,该细胞内区段除了包含外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域,还具有1个以上、例如2或3个细胞内信号传导结构域。

[0753] 本公开另外包含嵌合受体,该嵌合受体包含细胞内区段,该细胞内区段具有串联的2个以上的相同细胞内信号传导结构域。在1个方面中,本公开提供IL受体的细胞质结构域在CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域的N末端侧存在的嵌合受体,即,包含IL受体的细胞质结构域与CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域从N末端侧起以该顺序连接的嵌合受体。本公开也另外包含通过在上述嵌合受体中进一步添加CD28(例如,CD28的细胞质共刺激结构域)的细胞内结构域得到的嵌合受体,即,包含CD28的细胞内信号传导结构域、与IL受体的细胞质结构域、与含有外源性STAT3基序的CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域从N末端侧起以该顺序连接的嵌合受体。

[0754] 在某实施方式中,嵌合受体包含细胞内区段,该细胞内区段包含CD3 ζ 细胞内信号传导结构域,该CD3 ζ 细胞内信号传导结构域包含外源性STAT3关联基序、和选自白细胞介素受体链的细胞质结构域和细胞质共刺激结构域的细胞内信号传导结构域,此处,细胞内信号传导结构域的至少1个包含内源性或外源性JAK结合基序和STAT5关联基序。

[0755] 在一个实施方式中,嵌合受体包含下列:具有外源性STAT3关联基序的CD3 ζ 细胞内信号传导结构域,包含内源性或外源性JAK结合基序和STAT5关联基序的IL受体链片段的细胞质结构域,和CD28的细胞质共刺激结构域。

[0756] 在本公开的嵌合受体中,寡肽接头或多肽接头可以插入细胞内区段的结构域间,使得在那里连接结构域和/或将它们与其它结构域连接。例如,可以使用具有2~10个氨基酸长的接头。特别地,可以使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的接头。例如,可以将接头IDGGGSGGGGSGGGGS插入CD28细胞质结构域与部分细胞质IL-2受体 β 结构域之间。例如,可以将接头KLGSGP插入部分细胞质IL-2受体 β 结构域和CD3 ζ 链的细胞内结构域之间。

[0757] 在另一方面中,提供嵌合受体,该嵌合受体包含下列:i)能够与抗原结合分子的免疫受体识别位点结合的细胞外结构域、ii)跨膜结构域、和iii)包含含有白细胞介素受体链的细胞质结构域和根据情形补充细胞质结构域的1个以上细胞内信号传导结构域的细胞内区段。

[0758] IL受体链的细胞质结构域也可以选自本说明书中记载的IL受体的任一链。可以使

用IL受体链的细胞质结构域的全区。或者,也可以另外使用IL受体链的前述细胞质结构域的末端切割片段。全长和其末端切割片段的实例在本说明书中显示。

[0759] 在某实施方式中,末端切割片段也可以包含本说明书中记载的至少1个酪氨酸激酶关联基序(也已知为box-1基序)和STAT(信号传导转录活化因子)关联基序。例如,末端切割片段包含至ILR细胞质结构域的250的氨基酸,或是50~200氨基酸或者80~150氨基酸。

[0760] IL-2R β 链的STAT关联基序包含酪氨酸残基-510(酪氨酸残基510是NCBI RefSeq: NP_000869.1的氨基酸编号536)。在某实施方式中,STAT关联基序包含酪氨酸残基510与酪氨酸残基510的C末端侧邻接的4个残基即YLSLQ。

[0761] 其它的STAT关联基序也是已知的,包含例如,IL-6的YXXQ、根据情形YXPQ、IL-10的YXXQ、IL-12的YLPSNID、IL-2的YLSLQ、YCTFP、YFFFH、IL-7的YVTMS、IL-9的YLPQE、以及IL-4的YKAFS和YKPFQ。也可以使用任一STAT信号传导结构域,和/或可以将其导入ILR链。

[0762] 在某实施方式中,除了IL受体的细胞质结构域,嵌合受体细胞内区段也包含IL受体存在的那种以外的至少1个补充信号传导结构域。细胞内信号传导结构域的实例中包含来源于TCR复合物的细胞质区和/或共刺激分子、和与这样的序列具有相同功能的任意突变体。在其它实例中包含通过引用作为本说明书一部分的Sadelain et al 2009的表2中列举的细胞质信号传导结构域。

[0763] 本公开包含嵌合受体,该嵌合受体包含细胞内区段,该细胞内区段除了IL受体的细胞质结构域还包含1个以上、例如2或3个细胞内信号传导结构域。例如,嵌合受体包含IL受体的细胞质结构域和CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域。例如,嵌合受体包含IL受体的细胞质结构域、CD3 ζ 的细胞内信号传导结构域和CD28的细胞质共刺激结构域。

[0764] 在某实施方式中,嵌合受体包含下列:包含CD3 ζ 细胞内信号传导结构域的细胞内区段、1个以上细胞质共刺激结构域,此处,前述细胞内区段包含JAK结合基序、STAT5和/或STAT3关联基序。

[0765] 本公开的嵌合受体包含跨膜结构域。跨膜结构域可以来源于天然多肽,或也可以人工设计。来源于天然多肽的跨膜结构域可以从膜结合或跨膜蛋白得到。例如,可以使用T细胞受体 α 或 β 链、CD3 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、或GITR的跨膜结构域。人工设计的跨膜结构域是主要包含亮氨酸和缬氨酸等疏水性残基的多肽。例如,苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体可以在合成跨膜结构域的各末端见到。根据情形,可以将短链寡肽接头或多肽接头、例如2~10个氨基酸长的接头配置在本说明书中记载的跨膜结构域与细胞内区段之间。特别地,可以使用具有甘氨酸-丝氨酸连续序列的接头序列。

[0766] 例如,具有CD28(NCBI RefSeq:NP_006130.1)的氨基酸编号153~179的序列的任一的跨膜结构域可以作为跨膜结构域使用。

[0767] 在本公开的嵌合受体中,可以将间隔结构域配置在细胞外结构域与跨膜结构域之间、或细胞内区段与跨膜结构域之间。间隔结构域也意味着将跨膜结构域与细胞外结构域、和/或跨膜结构域与细胞内区段连接而起作用的任一寡肽或多肽。间隔结构域包含至300个氨基酸、例如约10~100个氨基酸、或约25~50个氨基酸。

[0768] 间隔结构域优选地具有促进经由抗原结合分子与嵌合受体抗原结合、并且增强向细胞的信号传导的序列。期待促进结合的氨基酸的实例中包含半胱氨酸、荷电氨基酸、以及

潜在的糖基化部位内的丝氨酸和苏氨酸,这些氨基酸可以作为构成间隔结构域的氨基酸使用。

[0769] 在某实施方式中,间隔结构域是包含CD8 α (NCBI RefSeq:NP_001759.3)的氨基酸编号118~178即CD8 α 的铰链区、CD8 β (GenBank:AAA35664.1)的氨基酸编号135~195、CD4 (NCBI RefSeq:NP_000607.1)的氨基酸编号315~396、CD28 (NCBI RefSeq:NP_006130.1)的氨基酸编号114~152、或它们的一部分,或由它们构成的多肽。进一步,间隔结构域也可以是人工合成的序列。

[0770] 本公开的嵌合受体可以以形成聚合物、特别是二聚体的方式设计。例如,为了经由例如二硫键聚合嵌合受体(二聚化),在间隔结构域和/或跨膜结构域中插入半胱氨酸。

[0771] 进一步,在本公开的嵌合受体中,可以将信号肽序列连接到N末端。信号肽序列在许多分泌蛋白和膜蛋白的N末端存在,具有15~30个氨基酸长度。具有本说明书中记载的细胞内结构域的蛋白分子的许多是膜蛋白,具有信号肽序列。来源于这样的分泌蛋白和膜蛋白的信号肽可以作为本公开的嵌合受体的信号肽使用。也可以使用任一信号肽。例如,信号肽可以是抑瘤素M信号肽。信号肽可以来源于人,另外,也可以来源于非人,例如昆虫细胞或病毒。在某实施方式中,信号肽是人信号肽。

[0772] 本公开提供本说明书中记载的编码嵌合受体的核酸。编码嵌合受体的核酸可以根据所示嵌合受体的氨基酸序列通过常规方法容易地制备。编码氨基酸序列的核苷酸序列可以从关于各结构域的氨基酸序列上述的NCBIRefSeq ID或GenBank登录编号取得,可以应用标准的分子生物学和/或化学程序制备本公开的核酸。例如,可以基于核苷酸序列合成核酸,可以通过组合用聚合酶链反应(PCR)从cDNA文库得到的DNA片段制备本公开的核酸。

[0773] 本公开的核酸可以在优选启动子的控制下表达的方式连接到另一核酸。启动子的实例中包含组成型促进基因或可操作连接的构建体表达的启动子、通过药物等(例如,四环素或多柔比星)的作用诱导基因或可操作连接的构建体表达的启动子。另外,为了获得核酸的有效转录,本公开的核酸也可以与同启动子或转录起始部位协作的其它调节元件、例如包含增强子序列或终止子序列的核酸连接。除了本公开的核酸,也可以整合可作为用于确认核酸表达的标志物的基因(例如,耐药性基因、编码报告酶的基因或编码荧光蛋白的基因)。

[0774] 在某实施方式中,核酸是用于在特定宿主中表达的密码子优化的核酸

[0775] 本公开的用于生产表达嵌合受体的细胞的方法,包含将本说明书中记载的编码嵌合受体的核酸导入细胞的工序。该工序离体进行。例如,可以以生产本公开的表达嵌合受体的细胞的方式,用运载本公开的核酸的病毒载体或非病毒载体离体转化细胞。

[0776] 在本公开的方法中,可以使用来源于哺乳动物的细胞例如人细胞,或来源于猴、小鼠、大鼠、猪、马、或犬等非人哺乳动物的细胞。

[0777] 在一个实施方式中,哺乳动物是人。

[0778] 根据本公开,提供包含嵌合受体、编码所述嵌合受体的核酸、表达所述嵌合受体的细胞、和该细胞的组合物。在某实施方式中,上述1个以上可以在以肿瘤抗原等抗原为靶的过继免疫基因疗法领域、和/或筛选或者其它的体外(in vitro)分析中使用。可以将本公开的嵌合受体导入细胞,例如,得到该细胞中嵌合受体的表达量的增强或升高。这样的细胞可以发挥针对表达靶抗原的细胞的细胞毒性活性。

[0779] 提供本公开的表达嵌合受体的细胞的制备方法,其包含下列:

[0780] a) 从哺乳动物分离免疫细胞(根据情形,前述免疫细胞是T细胞);

[0781] b) 用编码本说明书中记载的嵌合受体的核酸转染或转导分离的免疫细胞(根据情形,T细胞);和

[0782] c) 根据情形,转染或转导后,分离和/或扩增培养嵌合受体表达细胞(根据情形,嵌合受体表达T细胞)。

[0783] 在一个实施方式中,再导入对象之前,使自体T淋巴细胞或自体NK细胞、自体巨噬细胞离体活化和/或增殖。在一个实施方式中,T淋巴细胞或NK细胞是同种异体T淋巴细胞或同种异体NK细胞。在一个实施方式中,同种异体T淋巴细胞是内源性T细胞受体的表达被阻止或排除的T淋巴细胞。在一个实施方式中,导入对象之前,使同种异体T淋巴细胞或同种异体NK细胞离体活化和/或增殖。在一个实施方式中,通过选自逆转录病毒转导、慢病毒转导、DNA电穿孔和RNA电穿孔、DNA或RNA转染或者经基因编辑而基因改变的方法,在T淋巴细胞或NK细胞或巨噬细胞中导入嵌合受体。

[0784] 本公开的方法中使用的NK细胞可以通过暴露于缺少或很少表达主要组织相容性抗原I和/或II分子,并经基因修饰以表达膜结合IL-15和4-1BB配体(CDI37L)的细胞中优先地增殖。这样的细胞株包含K562[ATCC、CCL 243;Lozzio et al.,Blood 45(3):321-334(1975);Klein et al.,Int.J.Cancer 18:421-431(1976)]和维尔姆斯肿瘤细胞株HFWT[Fehniger T A,Caligiuri M A.Int Rev Immunol 20(3-4):503-534(2001);Harada H,et al.,Exp Hematol 32(7):614-621(2004)]、子宫内膜肿瘤细胞株HHUA、黑色素瘤细胞株HMV-II、肝母细胞瘤细胞株HuH-6、肺小细胞癌细胞株Lu-130和Lu-134-A、神经母细胞瘤细胞株NB 19和N1369、来源于睾丸NEC 14的胚胎癌细胞株、颈癌细胞株TCO-2和骨髓转移神经母细胞瘤细胞株TNB 1[Harada H.,et al.,Jpn.J.Cancer Res 93:313-319(2002)],但不一定限于这些。优选地,使用的细胞株如K562和HFWT细胞株,缺乏或几乎不表达MHC I和II分子二者。可以代替细胞株使用固体支持体。这样的支持体优选地在其表面结合至少1个分子,该分子可以与NK细胞结合、诱导早期活化事件和/或增殖应答或结合具有这样的作用的分子,由此作为支架起作用。对于支持体,其表面可以结合CD137配体蛋白、CD137抗体、IL-15蛋白或IL-15受体抗体。优选地,支持体具有在其表面结合的IL-15受体抗体和CD137抗体。

[0785] 在一个实施方式中,在包含T淋巴细胞活化的本公开的方法的任一个中,T淋巴细胞都可以在选自抗CD3/CD28、IL-2和植物血凝素的1种以上药剂存在下活化。在包含NK细胞活化的本公开的方法的任一个中,NK细胞都可以在选自CD137配体蛋白、CD137抗体、IL-15蛋白、IL-15受体抗体、IL-2蛋白、IL-12蛋白、IL-21蛋白和K562细胞株的1种以上药剂存在下活化。

[0786] 本公开的方法中使用的细胞没有特别限定,可以使用任一细胞。例如,可以使用从体液、组织或者器官、例如血液(外周血、脐带血等)或者骨髓收集、分离、或者纯化的细胞,或使上述细胞分化、或者为了制备多能性干细胞(iPSC)通过重编程得到的细胞(例如,参考Themeli et al 2013)。可以使用外周血单核细胞(PBMC)、免疫细胞[包含例如,T细胞、树突细胞、B细胞、造血干细胞、巨噬细胞、单核细胞、NK细胞或造血细胞(中性粒细胞、嗜碱性粒细胞)]、脐带血单核细胞、成纤维细胞、脂肪细胞前体、肝细胞、皮肤角质形成细胞、间充质

干细胞、脂肪干细胞、各种癌细胞株、或神经干细胞。例如,可以使用NK细胞或T细胞、T细胞的前体细胞(造血干细胞、淋巴细胞前体细胞等)或包含它们的细胞群。在T细胞的实例中包含CD8阳性T细胞、CD4阳性T细胞、调节T细胞、细胞毒性T细胞、和肿瘤浸润淋巴细胞。包含T细胞和T细胞的前体细胞的细胞群中包含PBMC。上述细胞可以从生物体收集,也可以通过从生物体收集的细胞的扩增培养得到,或也可以作为细胞株建立。在希望向生物体移植生产的嵌合受体表达细胞或从生产的嵌合受体表达细胞分化的细胞的情形中,可以在从该生物体自体或其同种生物体收集的细胞中导入核酸。

[0787] 与多核苷酸结合,本公开另外也提供包含这样的多核苷酸的载体(包含这样的多核苷酸与用于表达嵌合受体的至少1个调节元件可操作地结合的载体)。本公开的有用载体的非限定实例包含例如如逆转录病毒载体和慢病毒载体的病毒载体。

[0788] 在一个特定的方式中,这样的载体另外包含自杀基因。此处使用的术语自杀基因指导致表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是赋予表达该基因的细胞对药剂、例如药物的敏感性、该细胞与该药剂接触时或暴露于该药剂时导致细胞死亡的基因。自杀基因是本领域中已知的(例如,参考Suicide Gene Therapy:Methods and Reviews, Springer,Caroline J.(Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research,Sutton,Surrey,UK),Humana Press,2004),包含例如,单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、硝基还原酶和如半胱天冬酶8的半胱天冬酶。

[0789] 编码本公开的嵌合受体的核酸可以导入载体,可将该载体导入细胞。可以使用例如,逆转录病毒载体(包含癌逆转录病毒载体、慢病毒载体、和假型载体)、腺病毒载体、腺随伴病毒(AAV)载体、猿猴病毒载体、痘苗病毒载体或仙台病毒载体、EB病毒(EBV)载体、和HSV载体等病毒载体。例如,可以使用以在感染细胞内不自身复制的方式缺乏复制能力的病毒载体。

[0790] 此外,非病毒载体也可以另外在本公开中,如W096/10038、W097/18185、W097/25329、W097/30170和W097/31934(通过引用作为本说明书的一部分)中记载的,与脂质体或阳离子脂质等缩合剂组合使用。本公开的核酸也可以另外通过磷酸钙转导、DEAE-葡聚糖、电穿孔、或粒子撞击导入细胞。

[0791] 例如,在使用逆转录病毒载体的情形中,本公开的方法可以通过选择基于LTR序列的合适包装细胞和由载体加工的包装信号序列、和应用包装细胞制备逆转录病毒粒子进行。包装细胞的实例中包含PG13(ATCC CRL-10686)、PA317(ATCC CRL-9078)、GP+E-86和GP+envAm-12(美国专利第5,278,056号)、和Psi-Crip[Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,vol.85,pp.6460-6464(1988)]。逆转录病毒粒子也可以另外用293细胞或具有高转染效率的293T细胞制备。基于逆转录病毒和可以在逆转录病毒载体的包装中使用的包装细胞生产的多种病毒载体被许多公司广泛市售。

[0792] 本公开另外提供包含上述嵌合受体的宿主细胞。有用的宿主细胞的非限定实例包含T淋巴细胞和NK细胞,它们可以是自体的也可以是同种异体的(内源性T细胞受体被除去或保持)。在某特定方式中,宿主细胞是从具有癌的患者分离的自体T淋巴细胞。在一个特定方式中,离体活化和增殖这样的自体T淋巴细胞。

[0793] 本公开的嵌合受体可以通过本领域中已知的任意方法导入宿主细胞。特别有用的方法的非限定实例包含逆转录病毒转导、慢病毒转导和DNA和mRNA电穿孔。如下述实施例中显示的,mRNA电穿孔产生T淋巴细胞中本公开的嵌合受体的有效表达。记载逆转录病毒转导的参考文献的实例包含Anderson et al.、美国专利5,399,346号;Mann et al.,Cell 33:153(1983);Temin et al.,U.S.Pat.No.4,650,764;Temin et al.、美国专利5,124,263号;Dougherty et al.的国际专利公开W095/07358号(1995年3月16日公开);和Kuo et al.,Blood 82:845(1993)。国际专利公开W095/07358号记载原代B淋巴细胞的高效率转导。例如,关于可以使用的逆转录病毒转导和mRNA电穿孔的具体技术,另外参考下面的实施例的章节。

[0794] 使用宿主细胞活化和增殖,通常可以将病毒载体整合到基因组和表达编码本公开的嵌合受体的基因。但是,如果使用mRNA电穿孔,不需要活化和增殖(虽然电穿孔在活化细胞上实施时更有效)。作为病毒转导的结果,宿主细胞(T淋巴细胞或NKT细胞)可以产生比该受体瞬时(典型地3~5日)表达时的mRNA电穿孔更强的效果,长期表达本公开的嵌合受体。但是,病毒转导复杂、昂贵、难以执行,另一方面,mRNA电穿孔单纯得多、容易执行得多。进一步,对于瞬时表达,如果有可能的毒性则有用,由于可能的副作用而应该在临床试验的早期阶段有作用。

[0795] 1个方面是本说明书中公开的细胞的制备方法。

[0796] 在一个实施方式中,分离的免疫细胞是分离的T细胞。

[0797] 在某实施方式中,分离的细胞是CD³⁺,根据情形,在转导或转染之前,根据情形,用可溶型或膜结合型抗CD3抗体例如OKT3或mOKT3、和/或APC刺激。在一个实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。在另一实施方式中,APC表达膜型抗CD3单克隆抗体。

[0798] 在一个实施方式中,重复转染或转导工序。例如,转染或转导工序可以进行2次、或3次、或4次、或例如直到达到足够的表达水平。例如,转染或转导工序可以进行5次。

[0799] 在一个实施方式中,细胞被转染或转导连续2日以上。例如,细胞被转染或转导连续2日、连续3日、或连续4日。

[0800] 在一个实施方式中,用表达规定抗原的辐射细胞刺激嵌合受体转导细胞。例如,以效应物:靶比100:1、75:1、50:1、25:1、20:1、15:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:25、1:50或1:100用辐射细胞刺激嵌合受体转导T细胞。优选地是1:1。

[0801] 本公开的表达嵌合受体的细胞是通过本说明书中记载的生产方法导入和表达了编码本说明书中记载的嵌合受体的核酸的细胞

[0802] 本公开的细胞经由嵌合受体以及抗原结合分子与特定的抗原结合,由此信号递送至细胞,作为结果活化细胞。表达嵌合受体的细胞的活化根据宿主细胞的种类和嵌合受体的细胞内结构域而不同,可以基于例如细胞因子的放出、细胞增殖速度的提高、或细胞表面分子的变化等作为指标确认。例如,从活化细胞放出细胞毒性细胞因子(肿瘤坏死因子、淋巴毒素等)引起表达抗原的靶细胞的破坏。此外,细胞因子的放出或细胞表面分子的变化刺激其它免疫细胞,例如B细胞、树突细胞、NK细胞和巨噬细胞。

[0803] 本公开的方法中使用的T淋巴细胞最优选地是患者自身的细胞(即,自体细胞),其首先从血液样品分离,优选地应用例如如抗CD3/CD28珠、IL-2或植物血凝素的标准方法离

体活化和增殖(例如,3~5日)。或者,可以使用同种异体T淋巴细胞(优选地,抑制或排除内源性T细胞受体的表达的同种异体T淋巴细胞)。参考Torikai et al., Blood, 2012 119: 5697-5705。分离(和根据期望活化和/或增殖)后,在来自患者的T淋巴细胞和NK细胞中转导(或电穿孔)编码本公开的嵌合受体的多核苷酸(或包含这样的多核苷酸的载体),如此,使嵌合受体在T细胞或NK细胞的细胞表面表达。其后可以向患者施用修饰细胞(例如,治疗用抗体滴注1日后)。

[0804] 在1个方面,提供用于治疗疾病的本说明书中记载的嵌合受体表达细胞、核酸、载体、细胞或组合物的应用。

[0805] 另一方面是治疗或预防哺乳动物中疾病的方法,其包含向有需要的哺乳动物施用有效量的本说明书公开中公开的细胞或组合物。

[0806] 包含表达嵌合受体的细胞作为有效成分的药物组合物可以通过皮内、肌肉内、皮下、腹膜内、鼻腔内、动脉内、静脉内、肿瘤内、或输入淋巴管中非经口施用,例如通过注射或输注施用,但施用途径没有限定。

[0807] 在进一步的方面中,列举应用病毒载体等将编码本公开的嵌合受体的核酸整合到生物体内、直接表达该嵌合受体的方法。作为病毒载体,示例腺病毒,但不限于此。另外,不应用病毒载体,通过电穿孔法、直接施用核酸的手段等,也可以将编码该嵌合受体的核酸直接整合到生物体内,通过在生物体中施用基因改变的细胞使该嵌合受体分泌表达,也可以使该嵌合受体连续在生物体内分泌。

[0808] 根据本公开,患者可以通过输注约 10^5 (1E+05) ~ 10^{10} (1E+10) 以上的细胞/千克体重(细胞/Kg)范围的治疗上有效施用量的包含本公开的嵌合受体的T细胞或NK细胞而处理。只要患者可以显示耐受性,输注可以尽可能频繁地并且多次重复,直至实现期望的应答。适当的输注剂量和时间表按每一患者而不同,处理医生可以关于特定的患者决定。典型地,输注约 10^6 (1E+06) 细胞/Kg的初次施用量,增加至 10^8 (1E+08) 以上的细胞/Kg。IL-2可以为了使输注细胞在输注后增殖而联合应用。IL-2的量可以是约 $1 \sim 5 \times 10^6$ (1~5E+06) 国际单位/平方米体表面。

[0809] 药物组合物作为有效成分包含表达嵌合受体的细胞,也可以进一步包含优选的赋形剂。赋形剂的实例中包含:用于作为有效成分包含本公开的核酸的组合物的上述药学上可容许的赋形剂、各种细胞培养基、和等渗氯化钠。

[0810] 本公开的进一步方面提供药物组合物。在一个方式中,本公开提供药物组合物,其包含:(i) 编码本公开的嵌合受体的多核苷酸或包含这样的多核苷酸的载体,和(ii) 药学上容许的载体或添加剂。

[0811] 用于在本公开的药物组合物中使用的适当的添加剂是本领域技术人员公知的,例如,可以包含组织培养基(例如,用于使细胞离体生存)或盐水溶液(例如,向患者注射细胞时)。药学上容许的添加剂的详细记载可以从Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co., N.J. 1991) 得到。

[0812] 对于施用本发明的药物组合物的疾病,只要该疾病对应用的疗法显示敏感性,则没有特别限定。在一个实施方式中,疾病是癌。在一个实施方式中,对象怀疑患有癌、或患有癌。

[0813] 例如,癌是血液癌症或实体瘤。例如,血液癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。例如,

实体瘤是腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、未分化癌、大细胞癌、小细胞癌、皮肤癌、乳癌、前列腺癌、膀胱癌、阴道癌、颈部癌、子宫癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、脾癌、肺癌、气管癌、支气管癌、结肠癌、小肠癌、胃癌、食道癌、胆囊癌、睾丸癌、卵巢癌等癌症，骨组织、软骨组织、脂肪组织、肌肉组织、血管组织以及造血组织的癌症，此外软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤等肉瘤，肝母细胞瘤、髓母细胞瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、胰腺母细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等母细胞瘤，生殖细胞瘤。

[0814] 在某实施方式中，疾病是：炎症性疾病/自身免疫疾病（哮喘、湿疹），肝炎，和其原因为流感和HIV等病毒、细菌、或真菌的感染性疾病例如结核、MRSA、VRE、和深部真菌病。在一个实施方式中，对象怀疑患有这些炎症性疾病、或患有炎症性疾病。

[0815] 与抗原结合的本公开的药物组合物为了治疗上述疾病而施用，该抗原由为了治疗这些疾病期望减少或除去的细胞加工，即肿瘤抗原、病毒抗原、或细菌抗原等。

[0816] 因此，一个方面包括减少对象中表达规定抗原的细胞的数目的方法，其包含向有需要的对象施用有效量的本说明书中记载的药物组合物，此处，嵌合受体表达细胞经由与细胞外结合结构域结合的抗原结合分子与规定抗原特异性结合。

[0817] 另外，本公开的细胞可以以复发性白血病的缓解等为目的，为了骨髓移植或放射线暴露、供体淋巴细胞输血后的感染性疾病的预防而使用。

[0818] 本公开的嵌合受体促进针对多种癌细胞型可以使用某1个受体的T细胞治疗。考虑肿瘤利用的免疫逃避机制，可以是最终有利的战略，同时，也可以靶向多种抗原(Grupp et al., N.Engl. J. Med. 2013; 368(16): 1509-1518)。抗体介导性细胞毒性，通过抗体施用的单纯中止，无论何时都可以停止。由于表达本公开的嵌合受体的T细胞仅由与靶细胞结合的抗体活化，未结合免疫球蛋白对输注的T细胞内不发挥任何刺激。为了限制任何可能的自身免疫性反应，通过使用用于瞬时表达嵌合受体的mRNA电穿孔，可以进一步提高临床安全性。

[0819] 在上述方法的一个方式中，T淋巴细胞或NK细胞是从该对象分离的自体T细胞或NK细胞。在一个特定的方式中，再导入对象之前，离体活化和/或增殖自体T细胞或NK细胞。在其它的方式中，T细胞或NK细胞是同种异体T淋巴细胞或NK细胞。在某特定方式中，T细胞是内源性T细胞受体的表达被抑制或排除的同种异体T细胞。在一个特定的方式中，导入对象之前，离体活化和/或增殖同种异体T细胞。T淋巴细胞可以在例如抗CD3/CD28、IL-2和/或植物血凝素存在下，通过本领域中已知的任意方法活化。NK细胞可以在选自例如CD137配体蛋白、CD137抗体、IL-15蛋白、IL-15受体抗体、IL-2蛋白、IL-12蛋白、IL-21蛋白和K562细胞株的1个以上药剂存在下，通过本领域中已知的任意方法活化。例如，关于用于增殖NK细胞的有用方法的记载，参考美国专利7,435,596号和8,026,097号。

[0820] 在上述方法的一个方式中，向对象导入(或再导入)T细胞或NK细胞后，向对象施用PD-1/PD-L1信号抑制剂和/或VEGF信号抑制剂的治疗有效量。

[0821] 本说明书中记载的组合物和方法可以与如化学疗法、手术、放射线、基因治疗等用于癌症的其它类型治疗组合利用。这样的治疗可以与按照本公开的免疫疗法同时或相继(以任意顺序)应用。

[0822] 与进一步的药物组合物联合应用时，可以通过加成或协同的作用减少各药物组合物的适当的治疗上有效的施用量。

[0823] 本公开的处理可以与例如如治疗用疫苗(包括但不限于GVAX、DC疫苗等)，检查点

抑制剂(包括但不限于阻断CTLA4、PD1、LAG3、TIM3等药物组合物)或激活剂(包括但不限于增强41BB、OX40等药物组合物)的其它免疫调节处理组合。

[0824] 另外,根据处理的特定适应症如果需要,本公开的药物组合物也可以包含1个以上附加的活性化合物,优选彼此不产生不利影响、具有互补活性的化合物。可能的附加的活性化合物的非限定实例包含例如,PD-1/PD-L1信号抑制剂和VEGF信号抑制剂。

[0825] 在其它的方式中,本公开的药物组合物进一步包含可以进一步针对癌细胞发挥细胞毒性的单克隆抗体(例如,利妥昔单抗、曲妥珠单抗、hu14.18K322A等)或包含Fc部分的其它抗肿瘤分子(例如,由与肿瘤表面受体结合的配体(例如,细胞因子、免疫细胞受体)组成的组合分子,该肿瘤表面受体与免疫球蛋白的Fc部分或含有Fc的DNA或者RNA组合)。

[0826] 使用的抗体的适当的施用量取决于处理的癌症的类型、疾病的严重程度和病程、既往治疗、患者的临床病史和对抗体的应答和处理医生的判断。可以一次或在一系列多次处理中向患者施用抗体。根据本公开的治疗的进展可以通过通常技术和分析容易地监测。

[0827] 抗体的施用可以通过任意的适当途径实施,包含全身施用以及向疾病部位(例如,向原发肿瘤)直接施用。

[0828] 与本公开的免疫疗法组合的有用的其它治疗剂的非限定实例包含下列。

[0829] (i) 抗血管生成剂(例如,TNP-470、血小板因子4、血小板反应蛋白-1、组织金属蛋白抑制剂(TIMP1和TIMP2)、催乳素(16Kd片段)、血管抑制素(纤溶酶原的38Kd片段)、内皮抑素、bFGF可溶性受体、转化生长因子 β 、干扰素 α 、可溶性KDR和FLT-1受体、胎盘增殖蛋白相关蛋白以及Carmeliet和Jain(2000)中记载的那种;

[0830] (ii) VEGF拮抗剂或VEGF受体拮抗剂,如抗VEGF抗体、VEGF变体、可溶性VEGF受体片段、能够阻断VEGF或VEGFR的适体、中和抗VEGFR抗体、VEGFR酪氨酸激酶抑制剂和它们的任意组合;

[0831] (iii) 例如,化疗化合物,如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)、嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他汀和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖剂/有丝分裂抑制剂,包括:天然产物如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨),微管破坏剂如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃坡霉素类和诺维本),表鬼臼毒素(依托泊苷、替尼泊苷),DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶、葱环类、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、癌得星(Cytoxan)、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲蜜胺、奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑、氯胺酮、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、紫杉醇、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素,如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、葱环类、米托蒽醌、博来霉素类、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(系统性代谢L-天冬酰胺、去除不具有合成自身天冬酰胺能力的细胞的L-天冬酰胺酶);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,如氮芥类(氯乙胺、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺类和甲基三聚氰胺类(六甲蜜胺和噻替哌)、烷基磺酸盐类-白消安、亚硝基脲类(卡莫司汀(BCNU)和类似物、链脲佐菌素)、曲嗪类-达卡巴嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂代谢拮抗剂,如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位配合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨基鲁米特;激素类、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁他胺)和芳香酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝剂(肝素、合成肝素盐类和其它凝

血酶抑制剂) ; 纤溶剂 (例如组织纤溶酶原激活剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗; 抗迁移剂; 抗分泌剂 (布雷菲定); 免疫抑制剂 (环孢素、他克莫司 (FK-506)、西罗莫司 (雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯); 抗血管生成化合物 (例如, TNP-470、染料木黄酮、贝伐单抗) 和生长因子抑制剂 (例如, 成纤维细胞生长因子 (FGF) 抑制剂); 血管紧张素受体阻滞剂; 一氧化氮供体; 反义寡核苷酸; 抗体 (曲妥珠单抗); 细胞周期抑制剂和分化诱导剂 (维甲酸); mTOR 抑制剂、拓扑异构酶抑制剂 (多柔比星 (阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、替尼泊苷、表柔比星、依托泊苷、伊达比星和米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康)、皮质类固醇 (可的松、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松和泼尼松龙); 生长因子信号转导激酶抑制剂; 线粒体功能障碍诱导剂和半胱天冬酶激活剂; 和染色质破坏剂。

[0832] 关于进一步有用的药剂, 另外参考 Physician's Desk Reference, 59th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.J.

[0833] 上述公开对于本申请进行了全面说明。参考下面的具体实例, 可以得到更完整的理解。这些实例仅为了示例而记载, 不限制本申请的范围。如果提示或呈现状况合宜, 电意图形式的变化和等效物的替换。尽管在本公开中使用特定术语, 但这样的术语旨在说明的含义而不以限制为目的。

[0834] 此外, 本说明书中引用的全部现有技术文献作为参照并入本说明书。

实施例

[0835] 通过以下实施例对本发明进行更详细地说明, 但这些实施例不限制本发明的范围。

[0836] [实施例1] 在细胞外结构域中具有免疫受体的细胞外结构域的嵌合受体

[0837] 已知通过使用具有对免疫细胞表面上参与免疫细胞活化的免疫受体发挥激动剂活性的结合结构域和具有针对靶细胞上的靶抗原的结合结构域的抗原结合分子, 表达免疫受体的免疫细胞和表达靶抗原的靶细胞通过抗原结合分子进行交联, 免疫细胞活化。在本发明中, 提出了将对免疫受体发挥激动剂活性的抗原结合分子与在细胞外结构域中具有由该抗原结合分子识别的免疫受体的嵌合受体 (Chimeric Receptor; 以下也称为“CR”) 转导的免疫细胞组合的治疗方法 (图1)。

[0838] 具体地, 该治疗方法包含, 1) 施用包含1种或多种抗原结合分子的第1组合物, 该抗原结合分子具有对在免疫细胞表面上参与免疫细胞的活化的免疫受体发挥激动剂活性的结合结构域, 和针对在需要治疗的被测体内的靶细胞上特异或选择性表达的靶抗原的结合结构域, 2) 施用CR转导的免疫细胞, 其在细胞外结构域中具有第1组合物中包含的抗原结合分子可以结合的免疫受体的细胞外结构域, 抗原结合分子交联表达CR的免疫细胞和靶细胞, 活化CR表达细胞。此处, 如果想改变靶抗原的种类, 可以通过改变第一组合物的抗原结

合分子来改变靶抗原的种类,而不需要重新制备表达CR的免疫细胞。因此,这样的CR细胞的制备比直接识别在靶细胞中特异性或选择性表达的抗原的免疫细胞的制备通用性更高且有用。

[0839] 除此之外,在本治疗方法中通过抗原结合分子,不仅是转化了CR的免疫细胞,同时还靶抗原依赖性地将内源性表达免疫受体的内源性免疫细胞。其结果,除了CR转化的免疫细胞活化以外,内源性免疫细胞也通过抗原结合分子的激动剂活性活化,有望增强药效。

[0840] [实施例2]双特异性抗体的配制

[0841] (2-1)同源抗体的配制

[0842] 配制表1中显示的抗体。重链恒定区减少了与Fc γ 受体的结合,并进行了改变使两个重链异质缔合。应用PCR等本领域技术人员公知的方法制备编码各抗体的重链和轻链的碱基序列的全长基因。在动物细胞表达载体中插入得到的质粒片段,制备重链表达载体和轻链表达载体。得到的表达载体的碱基序列用本领域技术人员公知的方法确定。在来源于人胎肾癌细胞的FreeStyle293细胞(Invitrogen)、或Expi293细胞(Invitrogen)中瞬时导入制备的质粒,进行抗体的表达。回收得到的培养上清后,通过0.22 μ m滤器(Millipore)得到培养上清。以应用rProtein A Sepharose(R)Fast Flow(GEHealthcare Japan)或Protein G Sepharose(R)4Fast Flow(GEHealthcare Japan)的本领域技术人员公知的方法,从得到的培养上清纯化抗体。对于纯化抗体浓度,应用分光光度计测定280nm的吸光度,应用从得到的值通过PACE等方法算出的吸光系数,算出抗体浓度(Protein Science(1995) 4,2411-2423)。

[0843] 应予说明,本说明书中的抗体按照以下规则命名;

[0844] (重链可变区)-(重链恒定区)/(轻链可变区)-(轻链恒定区)

[0845] 例如,如果是H0000-F760nN17/GL4-k0a的抗体名,则意味着的重链可变区是H0000、重链恒定区是F760nN17、轻链可变区是GL4、轻链恒定区是k0a。

[0846] 同样,有时按照以下规则显示抗体的可变区;

[0847] (重链可变区)/(轻链可变区)

[0848] [表1]

[0849] 表1:同源抗体的结构

抗体名称	可变区		恒定区		靶抗原
	重链序列编号	轻链序列编号	重链序列编号	轻链序列编号	
H0000-F760nN17/ GL4-k0a	1	2	3	4	人 GPC3
hCD137VH-F760mnP17/ hCD137VL-k0	5	6	7	8	人 CD137
GPA0018H-F760mnN17/GPA0018L-k0C	9	10	11	12	人 GPC5 D
[0850] GPA0039H-F760mnN17/GPA0039L-k0C	13	14	11	12	人 GPC5 D
MRAH.v1-F760mnN17/MRAL.v1-k0.v1	15	16	11	17	人 IL-6R
H0000-F760mnN17/ GL4-k0a	1	2	11	4	人 GPC3
IC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0	18	19	11	8	KLH
H0000-F760mnP17/GL4-k0a	1	2	7	4	人 GPC3
TGN1412VH-F760mnP17.v1/TGN1412V L-KT0.v1	20	21	22	23	人 CD28

[0851] (2-2) 双特异性抗体的配制

[0852] 应用实施例2-1中配制的抗体,通过利用恒定区的电荷差异的本领域技术人员公知的方法(Labrijn et al,Proc.Natl.Acad.Sci.,(2013)110,5145),配制表2显示的双特异性抗体。

[0853] 反应条件:PBS(pH7.4)中,[2-MEA(Sigma)]=25mM,37°C,90分。

[0854] 此外,本说明书中的双特异性抗体按照以下规则命名:

[0855] AA(第一抗原重链)/XX(第一抗原轻链)//BB(第二抗原重链)/YY(第二抗原轻链)

[0856] [表2-1]

[0857] 表2:双特异性抗体的结构

抗体名称				
H0000-F760nN17/ GL4-k0a// hCD137VH-F760mn P17/hCD137VL-k0	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	1	2	3	4
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	5	6	7	8
[0858] GPA0018H-F760mn N17/GPA0018L-k0 C//hCD137VH-F760 mnP17/hCD137VL- k0	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	9	10	11	12
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	5	6	7	8
GPA0039H-F760mn N17/GPA0039L-k0 C//hCD137VH-F760 mnP17/hCD137VL- k0	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	13	14	11	12
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	5	6	7	8

[0859] [表2-2]

MRAH.v1-F760mn N17/MRAL.v1-k0.v 1/hCD137VH-F760 mnP17/hCD137VL- k0	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	15	16	11	17
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
5	6	7	8	
[0860] IC17HdK-F760mnN 17/IC17L-k0/hCD1 37VH-F760mnP17/h CD137VL-k0	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	18	19	11	8
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
5	6	7	8	
IC17HdK-F760mnN 17/IC17L-k0/H0000 -F760mnP17/GL4-k 0a	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	18	19	11	8
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
1	2	7	4	

[0861] [表2-3]

H0000-F760mnN17/ GL4-k0a//TGN1412 VH-F760mnP17.v1/ TGN1412VL-KT0.v 1	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	1	2	11	4
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	20	21	22	23
[0862] IC17HdK-F760mnN 17/IC17L-k0//TGN1 412VH-F760mnP17. v1/TGN1412VL-KT 0.v1	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	18	19	11	8
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	20	21	22	23
IC17HdK-F760mnN 17/IC17L-k0//H0000 -F760mnP17/GL4-k 0a	第一臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	18	19	11	8
	第二臂			
	可变区		恒定区	
	重链序列编 号	轻链序列编 号	重链序列编 号	轻链序列编 号
	1	2	7	4

[0863] [实施例3]在细胞外结构域中具有CD137的细胞外结构域的嵌合受体表达细胞的活化能力的评价

[0864] (3-1)慢病毒载体的构建

[0865] 制备表达由人CD137细胞外结构域、人CD8铰链和跨膜结构域、和第三代嵌合抗原受体细胞内信号结构域(CD28-CD137-CD3 ζ)构成的嵌合受体CD137-CD8-CD28-CD137-CD3 ζ

(图2,称为CD137-CR1)的慢病毒载体。作为慢病毒载体骨架使用pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP (System Bioscience)。图3是载体构建体以及从5'末端到3'末端的框架单位的构成要素的序列顺序的概略图。密码子优化的人CD137的细胞外结构域(Genbank NM001561.6, Leu24~Gln186)连接人CD8 α 链的铰链区和跨膜区(Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、以及人CD28分子(Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220)、人CD137分子(Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255)、人CD3 ζ 分子(Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164)的细胞质区。编码CD137-CR1(序列编号24)的基因通过本领域技术人员已知的方法合成。将该序列与pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的MCS连接,构建共表达CD137-CR1与copGFP的慢病毒载体。

[0866] (3-2)向NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞导入基因

[0867] 为了通过体外报告物分析来解析表达CD137-CR1的T细胞的活化能力,将CD137-CR1-copGFP载体转导至NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(Promega公司)。该细胞在转录因子活化T细胞的核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)应答元件的下游插入荧光素酶基因,通过检测荧光素酶的发光,可以定量NFAT途径的活化。

[0868] 使用实施例3-1中构建的慢病毒载体,通过慢病毒方法来实施转导。具体地,首先应用Lenti-PacTMHIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)将上述CD137-CR1-copGFP载体与包装质粒混合物转染到293Ta细胞株(Genecopoeia)中,制备导入了CD137-CR1-copGFP载体的慢病毒。从转染起48小时或72小时后回收包含所述慢病毒的上清,使用Lenti-XTMconcentrator(Takara Bio Inc.)浓缩。

[0869] 接着,将含有回收的慢病毒的上清与聚凝胺溶液(Nacalai tesque)添加到NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞中,通过以2000rpm离心60分钟,得到转导了CD137-CR1-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞)。另外,作为实验的阴性对象,同时制备转导了不连接CD137-CR1仅表达copGFP的pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞。

[0870] (3-3)CR蛋白表达率的确认

[0871] 关于实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞的CD137-CR1的表面表达,用CD137抗体(BioLegend公司)染色通过BDFACS AriaTMIII细胞分类仪(BD Biosciences)进行解析。其结果,确认了活细胞中约70%表达CD137-CR1。

[0872] (3-4)靶抗原是GPC3时的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞的活化能力的评价

[0873] 将实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下的Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择在固体癌中表达的人GPC3,在实验中使用实施例2-2中配制的、由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H000-F760nN17/GL4-k0a/hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[0874] 人GPC3表达肿瘤细胞株使用在人肝癌细胞株的SK-HEP1(ATCC)中稳定表达人GPC3的SK-pca60细胞。首先,SK-pca60细胞以10 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,作为CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞、或阴性对象不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将以各浓度配制的双特异性抗体以5 μ L/孔添加(终浓度0, 16, 160, 1600, 16000ng/mL)。24小时后,应用Bio-GloTMLuciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过

EnVision™Xcite(Perkin Elmer)测定,在图4中显示它们的结果。

[0875] 其结果,在CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞中检测出双特异性抗体的抗体浓度依赖性活化。另一方面,不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞即使在双特异性抗体存在下也未检测出活化。由此,提示了CD137-CR1-copGFP-T细胞双特异性抗体依赖性地活化,对表达肿瘤抗原GPC3的细胞表达细胞毒性活性,诱导抗肿瘤效果。

[0876] (3-5)靶抗原是GPC5D时的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞的活化能力的评价

[0877] 将实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下的Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择在血液癌症中表达的人GPC5D,实验使用了实施例2-2中配制的由抗GPC5D抗体和抗CD137抗体构成的2种双特异性抗体(GPA0018H-F760mnN17/GPA0018L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0,或GPA0039H-F760mnN17/GPA0039L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[0878] 表达人GPC5D的肿瘤细胞株使用了来源于人浆细胞瘤的NCI-H929(ATCC)。首先,NCI-H929细胞以10 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,作为CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞、或阴性对象不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,在0或10 μ g/mL的终浓度下以5 μ L/孔添加双特异性抗体。24小时后,应用Bio-Glo Luciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVision™Xcite(Perkin Elmer)测定,在图5中显示它们的结果。

[0879] 其结果,在CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞中,仅在双特异性抗体存在下检测出活化。另一方面,不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞即使在双特异性抗体存在下也未检测出活化。由此,提示了CD137-CR1-copGFP-T细胞双特异性抗体依赖性地活化,对表达肿瘤抗原GPC5D的细胞表达细胞毒性活性,诱导抗肿瘤效果。

[0880] (3-6)靶抗原是IL-6R时的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞的活化能力的评价

[0881] 将实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞与表达靶抗原的靶细胞共培养,解析由针对靶抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下的Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的靶抗原选择人IL-6R,在实验中使用实施例2-2中配制的、由抗IL-6R抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(MRAH.v1-F760mnN17/MRAL.v1-k0.v1//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[0882] 表达人IL-6R的靶细胞株使用在CHO细胞中稳定表达人IL-6R全长的Z8AGBA-01-C26-CN-006细胞(IL-6R-CHO细胞)。首先,IL-6R-CHO细胞以10 μ tL/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,作为CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞、或阴性对象不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,在0或10 μ g/mL的终浓度下以5 μ L/孔添加双特异性抗体。24小时后,应用Bio-Glo™Luciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVision™Xcite(Perkin Elmer)测定,在图6中显示它们的结果。

[0883] 其结果,在CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞中,仅在双特异性抗体存在下检测出活化。另一方面,不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞即使在双特异性抗体存在下也未检测出活化。由此,提示了CD137-CR1-copGFP-T细胞双特异性抗体依赖性

地活化,对表达靶抗原IL-6R的细胞表达细胞毒性活性。

[0884] [实施例4]细胞外区中具有CD137的嵌合受体表达细胞的体外细胞毒性活性的评价

[0885] (4-1)逆转录病毒载体的构建

[0886] 制备表达CD137-CR1的嵌合受体的逆转录病毒载体。作为逆转录病毒载体骨架使用了pMSGV1(Tamada k et al.,Clin Cancer Res 18:6436-6445(2012))。图7是载体构建体以及从5'末端到3'末端的框架单位的构成要素的配置顺序的概略图。CD137-CR1中连接有F2A肽(来源于口蹄病病毒)和eGFP分子(核苷酸序列5521~6237bp、Genebank KF957646.1)。基因通过本领域技术人员已知的方法合成,与pMSGV1连接生成CD137-CR1-eGFP逆转录病毒载体。

[0887] (4-2)CD137-CR1-eGFP表达T细胞的制备

[0888] 应用人T细胞的逆转录病毒转导方法,应用实施例4-1中构建的逆转录病毒载体,制备表达CD137-CR1-eGFP的表达基因改变T细胞。

[0889] 具体地,首先通过Lipofectamine (R) 2000或3000(Thermo Fisher Scientific),将上述CD137-CR1-eGFP载体和pAmpho质粒(Takara Bio Inc.)转染到GP2-293包装细胞株(Takara Bio Inc.)中,制备导入了CD137-CR1-eGFP载体的逆转录病毒。从转染起48小时后,回收包含前述逆转录病毒的上清,制备吸附于2个24孔板的转导用板。

[0890] 随后,为了人T细胞的转导,在固定了抗CD3单克隆抗体和RetroNectin(注册商标: Takara Bio Inc.)的6孔板上、在IL-2存在下培养每1孔 $2E+06$ 个人外周血单核细胞72小时。培养后回收细胞,在IL-2存在下,在吸附了上述制备的CD137-CR1-eGFP逆转录病毒的转导用板上培养一夜后,次日将细胞转移到另1个转导用板进一步培养一夜,得到导入了CD137-CR1-eGFP载体的人T细胞(CD137-CR1-eGFP表达T细胞)。

[0891] (4-3)CR蛋白表达率的确认

[0892] 转导后,在人IL-2的存在下维持细胞,从转导的外周血单核细胞的培养开始起7~8日后用于实验。在用抗CD3抗体、抗CD8抗体和抗CD137抗体染色细胞后,通过流式细胞术确定用转导人T细胞的CD137-CR1-eGFP的表面表达。平均而言,全部T细胞的80%表达CD137-CR1-eGFP。

[0893] (4-4)将残存肿瘤细胞数作为指标的CD137-CR1-eGFP表达T细胞的细胞毒性活性的评价

[0894] 用CytoFLEX(Beckman Coulter)评价实施例4-2中制备的CD137-CR1-eGFP表达T细胞的细胞毒性活性。准备SK-Hep1作为阴性对象、和SK-Hep1中稳定表达人GPC3的SK-pca60作为靶细胞。阴性对象和靶细胞在6孔板中使用 $1E+05$ (1×10^5) 细胞于前一天播种。以CD137-CR1-eGFP表达细胞作为效应细胞,以效应细胞对靶细胞(E:T)的比例是1:1的方式,以 $1E+05$ 细胞混合。接着添加在实施例2-2中配制的由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760mnN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0),使每孔达到 $10\mu\text{g}$ 。另外,作为阴性对象,以每孔中 $10\mu\text{g}$ 添加将第一或第二臂置换为钥孔血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)抗体的双特异性抗体(IC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0或IC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//H0000-F760mnP17/GL4-k0a)。从添加起48小时后,回收CD137-CR1-eGFP表达T细胞以及靶细胞。对

于回收的细胞,应用Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (BioLegend, 423104) 染色死细胞,应用抗人CD45抗体 (BioLegend, 304039) 染色T细胞。

[0895] 细胞毒性活性用残存癌细胞数量评价。残存癌细胞数从共培养后的细胞数和活细胞中的CD45阴性级分的细胞的比例中算出。

[0896] 在图8A中显示它们的结果。仅在靶细胞是SK-pca60,且添加了由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体的条件下,残存肿瘤细胞数显著降低。

[0897] 从该结果显示体外与CD137-CR1-eGFP表达T细胞的添加抗体依赖性靶细胞的细胞毒性活性。

[0898] 应用(4-5)xCELLigence系统评价CD137-CR1-eGFP表达T细胞的细胞毒性活性

[0899] 也通过xCELLigence (Agilent technology) 评价实施例4-2中制备的CD137-CR1-eGFP表达T细胞的细胞毒性活性。准备SK-Hep1作为阴性对象、和SK-Hep1中稳定表达人GPC3的SK-pca60作为靶细胞。阴性对象和靶细胞在E-Plate 96中使用 $1E+04$ (1×10^4) 细胞于前一天播种。第二天,以CD137-CR1-eGFP表达细胞作为效应细胞,以效应细胞对靶细胞(E:T)的比例是1:1、1:3的方式,以 $1E+04$ (1×10^4)、 $3E+04$ (3×10^4) 细胞混合。接着添加在实施例2-2中配制的由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760mnN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0),使每孔的终浓度达到 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过经时地测定电阻值,实时监听CD137-CR1-eGFP表达细胞的细胞毒性活性。

[0900] 细胞增殖抑制活性通过以下公式计算。细胞增殖抑制活性(%) = $100 \times (A - B) / (A - 1)$ (A:无抗体孔的Delta Cell Index的平均值,B:样品的Delta Cell Index)在图8B中显示它们的结果。仅在靶细胞是SK-pca60,且添加了由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体的条件下,细胞增殖抑制活性才显著。

[0901] 从该结果显示体外与CD137-CR1-eGFP表达T细胞的添加抗体依赖性靶细胞的细胞毒性活性。

[0902] [实施例5]在细胞外结构域中具有减弱了与配体的结合能力的免疫受体的嵌合受体

[0903] 具有免疫受体的细胞外全长的嵌合受体转化的免疫细胞,可以通过与该免疫受体的配体结合,靶抗原非依赖性地活化(图9)这是一个问题,因为它会引起非靶细胞的损伤。为了解决这一课题,考虑人为改变细胞外结构域的免疫受体,减弱与配体的结合能力。

[0904] [实施例6]在细胞外结构域中具有CD137片段的嵌合受体表达细胞的活化能力的评价

[0905] (6-1)表达trCD137-CR的慢病毒载体的构建

[0906] 已知人CD137的细胞外结构域由富含半胱氨酸的结构域(CRD)1~4构成,在与配体CD137L的结合中CRD2和CRD3起着重要作用。因此,作为减弱了与CD137L的结合的改变CR,制备缺失了人CD137细胞外结构域的CRD3和CRD4的trCD137-CR(序列编号25)。具体地,密码子优化的人CD137细胞外结构域的CRD1和CRD2(Genbank NM001561.6, Leu24~Asp87)连接人CD8 α 链的铰链区和跨膜区(Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、以及人CD28分子(Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220)、人CD137分子(Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255)、人CD3 ζ 分子(Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164)的细胞质区(图2)。编码trCD137-CR的基因通过本领域技术人员已知的方法合成。将该序列与pCDH-CMV-MCS-T2A-

copGFP载体的MCS连接,构建共表达trCD137-CR与copGFP的慢病毒载体。

[0907] (6-2)向NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞导入基因

[0908] 为了通过体外报告物分析来解析trCD137-CR-T的活化能力,将trCD137-CR载体转导至NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(Promega公司)。

[0909] 使用实施例6-1中构建的慢病毒载体,通过慢病毒方法来实施转导。具体地,首先应用Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)将上述trCD137-CR载体与包装质粒混合物转染到293Ta细胞株(Genecopoeia)中,制备导入了trCD137-CR-copGFP载体的慢病毒。从转染起48小时或72小时后回收包含所述慢病毒的上清,使用Lenti-X™ concentrator(Takara Bio Inc.)浓缩。

[0910] 接着,将含有回收的慢病毒的上清与聚凝胺溶液(Nacalai tesque)添加到NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞中,通过以2000rpm离心60分钟,得到转导了trCD 137-CR-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞)。另外,作为实验的阴性对象,同时制备转导了不连接trCD137-CR仅表达copGFP的pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞。

[0911] (6-3)CR蛋白表达率的确认

[0912] 关于实施例6-2中配制的trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞的trCD137-CR的表面表达,用CD137抗体(BioLegend公司)染色通过BD FACSAria™ III细胞分类仪(BD Biosciences)进行解析。已知用于解析的抗体的表位主要是CD137的CRD2。解析的结果确认了活细胞中约60%表达trCD137-CR。

[0913] (6-4)通过报告物分析评价trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞的活化能力

[0914] 实施例5-2中配制的trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择人GPC3,在实验中使用实施例2-2中配制的、由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[0915] 人GPC3表达肿瘤细胞株使用在人肝癌细胞株的SK-HEP1(ATCC)中稳定表达人GPC3的SK-pca60细胞。首先,SK-pca60细胞以10 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞、或作为阴性对象不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将以各浓度配制的双特异性抗体以5 μ L/孔添加(终浓度0,16,160,1600,16000ng/mL)。24小时后,应用Bio-Glo Luciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVision™ Xcite(Perkin Elmer)测定,在图10中显示它们的结果。

[0916] 其结果,在trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞中检测出双特异性抗体的抗体浓度依赖性活化。另一方面,不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞即使在双特异性抗体存在下也未检测出活化。由此,提示了trCD137-CR-copGFP-T细胞双特异性抗体依赖性地活化,对表达肿瘤抗原的细胞表达细胞毒性活性,诱导抗肿瘤效果。

[0917] [实施例7]在细胞外结构域中具有CD137变体的嵌合受体表达细胞的活化能力的评价

[0918] (7-1)慢病毒载体的构建

[0919] 已知在人CD137的CRD2上将I64或V71突变为Arg的突变体与CD137L的结合均减弱。因此,作为减弱了与CD137L的结合的改变CR,制备在将I64和V71突变为Arg的改变人CD137细胞外结构域中连接了人CD8 α 链的铰链区和跨膜区(Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、以及人CD28分子(Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220)、人CD137分子(Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255)、人CD3 ζ 分子(Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164)的细胞质区的CD137-CR2(序列编号26)(图2)。编码CD137-CR2的基因通过本领域技术人员已知的方法合成。将该序列与pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的MCS连接,构建共表达CD137-CR2与copGFP的慢病毒载体。

[0920] (7-2)向NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞导入基因

[0921] 为了通过体外报告物分析来解析CD137-CR2-T的活化能力,将CD137-CR2载体转导至NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(Promega公司)。

[0922] 使用实施例7-1中构建的慢病毒载体,通过慢病毒方法来实施转导。具体地,首先应用Lenti-PacTMHIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)将上述CD137-CR2载体与包装质粒混合物转染到293Ta细胞株(Genecopoeia)中,制备导入了CD137-CR2-copGFP载体的慢病毒。从转染起48小时或72小时后回收包含所述慢病毒的上清,使用Lenti-XTMconcentrator(Takara Bio Inc.)浓缩。

[0923] 接着,将含有回收的慢病毒的上清与聚凝胺溶液(Nacalaitesque)添加到NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞中,通过以2000rpm离心60分钟,得到转导了CD137-CR2-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞)。另外,作为实验的阴性对象,同时制备转导了不连接CD137-CR2仅表达copGFP的pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞。

[0924] (7-3)CR蛋白表达率的确认

[0925] 关于实施例7-2中配制的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞的CD137-CR2的表面表达,用CD137抗体(BioLegend公司)染色通过FACS AriaTMIII细胞分类仪(BD Biosciences)进行解析。其结果,确认了活细胞中95%以上表达CD137-CR2。

[0926] (7-4)通过报告物分析评价CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞的活化能力

[0927] 将实施例7-2中配制的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择人GPC3,在实验中使用实施例2-2中配制的、由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[0928] 人GPC3表达肿瘤细胞株使用在人肝癌细胞株的SK-HEP1(ATCC)中稳定表达人GPC3的SK-pca60细胞。首先,SK-pca60细胞以10 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞、或作为阴性对象不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将以各浓度配制的双特异性抗体以5 μ L/孔添加(终浓度0,16,160,1600,16000ng/mL)。24小时后,应用Bio-GloTMLuciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVisionTMXcite(Perkin Elmer)测定,在图11中显示它们的结果。

[0929] 其结果,在CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞中检测出双特异性抗体的抗体浓度依

赖性活化。另一方面,不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞即使在双特异性抗体存在下也未检测出活化。由此,提示了CD137-CR2-copGFP-T细胞双特异性抗体依赖性地活化,对表达肿瘤抗原的细胞表达细胞毒性活性,诱导抗肿瘤效果。

[0930] [实施例8]配体表达细胞存在下对嵌合受体表达细胞的活化能力的评价

[0931] 研究细胞外结构域中具有免疫受体的嵌合受体是否通过与该免疫受体的配体结合,无论是否存在靶抗原都被活化。具体地,将实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞,实施例6-2中配制的trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞,或实施例7-2中配制的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞与表达人CD137L的细胞共培养,解析Jurkat细胞是否活化。

[0932] 表达人CD137L的细胞株使用了来源于人B细胞性淋巴瘤的Raji细胞(ATCC)。首先,将Raji细胞的悬浮液,或作为阴性对象不包含Raji细胞的培养基分别以10 μ L/孔添加到384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞, trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞,或CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。24小时后,应用Bio-Glo Luciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVisionTMXcite(Perkin Elmer)测定,在图12A~图12C中显示它们的结果。

[0933] 其结果,在CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞中,在与Raji细胞共培养的条件下检测出活化。另一方面,在不与Raji细胞共培养的条件下未检测出活化。认为CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞是通过与Raji细胞上表达的CD137L的直接结合,非靶抗原依赖性地活化的细胞。与此相对,在与CD137L的结合减弱了的trCD137-CR-copGFP Jurkat细胞或CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞中,无论是否与Raji细胞共培养都未检测出活化。以上提示了可以通过减弱与CD137L的结合,抑制与配体的结合引起的靶抗原非依赖性活化。

[0934] [实施例9]配体结合能力减弱的CD137变体的优化

[0935] 如实施例5中所述,具有免疫受体的细胞外结构域(CD137)全长的嵌合受体转化的免疫细胞,可以通过与该免疫受体的生物体内配体(CD137L)结合,靶抗原非依赖性地活化,从而可能引起靶抗原非特异性细胞毒性。为了解决这一课题,考虑人为改变细胞外结构域的免疫受体,减弱与生物体内配体的结合。作为其方法,列举一种是如实施例6所述,缺失细胞外结构域的一部分。作为另一种方法,考虑通过在配体和细胞外结构域相互作用的部位添加基因突变,降低与生物体内配体的结合活性。因此,以鉴定降低与生物体内配体结合活性的改变为目的,研究了单变异以及变异的组合。

[0936] (9-1)通过丙氨酸扫描鉴定与生物体内配体的相互作用部位

[0937] 已知CRD2和CRD3在与CD137L的相互作用部位中起着重要作用。为了更详细地了解哪些残基直接相互作用或对相互作用有很大影响,对CRD2和CRD3的所有残基(C48~K118)和CRD1的部分残基(N40~P47)进行丙氨酸扫描突变导入。具体地,首先,密码子优化的人CD137细胞外结构域(BB0000,序列编号36)上连接有Factor10切割序列(FX,序列编号37)和人IgG1抗体恒定区的片段(序列编号38)、生物素附加标签(BAP标签,序列编号39),并导入了哺乳动物表达载体(BB0000-FXFcBAP)。将该载体作为模板,制备CRD1、CRD2和CRD3的残基被丙氨酸置换的变体(BB0001~BB0076,序列编号40~115)。

[0938] 具有编码制备的变体的序列的基因的质粒通过脂质体法被导入来源于人胎儿肾细胞的Expi293株(Invitrogen)中。通过从培养4天的上清中使用rProtein A Sepharose^(R)

Fast Flow(Amersham Biosciences)以本领域技术人员公知的方法纯化,得到目标CD137变体。使用分光光度计,测定纯化的变体溶液的280nm中的吸光度。应用从得到的测定值通过PACE法算出的吸光系数,算出纯化的抗体的浓度(Protein Science(1995)4,2411-2423)。

[0939] (9-2)对CD137变体与生物体内配体结合的评价

[0940] CD137胞外结构域或具有其变体的嵌合受体转化的免疫细胞,为了其安全性,需要减弱与生物体内配体的结合。因此进行制备的变体与生物体内配体(CD137L)的相互作用解析。

[0941] (9-2-1)作为抗原的CD137L的制备

[0942] CD137L通过表3种记载的重链和轻链质粒的组合,以本领域技术人员公知的方法表达纯化后,经Lys-C(Roche)37℃处理1小时进行切割处理。各片段通过MabSelect SuRe(Cytiva)亲和柱,非结合成分用于凝胶渗透色谱。其结果,CD137L被分选出来。

[0943] [表3]

[0944] 表3:CD137L的制备

	重链 1	轻链 1	重链 2	轻链 2
[0945]	ss4G8VH-4B9CH 序列编号 116	ss28H1VL-4B9CL 序列编号 117	ssDimerichCD137L- CLFcknob 序列编号 118	ssMonohCD137L- CH1 序列编号 119

[0946] (9-2-2)使用了Biacore的相互作用解析

[0947] 实施例9-1制备的CD137变体与CD137L的相互作用解析,使用Biacore™T200(Cytiva)通过以下方法实施。运行缓冲剂使用20mMACES,150mMNaCl,0.05%Tween20(注册商标,pH7.4),在25℃下实施测定。传感器芯片使用的是相对于SeriesSCM4(Cytiva),anti-HumanIgG(Fc)antibody(Cytiva)固相的芯片。对该芯片捕获目标CD137变体后,在运行缓冲剂中稀释的CD137L作为结合分子提供。芯片使用3M MgCl₂再生,反复捕获抗体进行测定。各变体针对抗CD137抗体片段的解离常数KD(mol/L)使用Biacore™T200 Evaluation Software Version2.0,使用1:1Binding model来计算。

[0948] 丙氨酸扫描的结果.将与生物体内配体的结合降低到野生型的90%以下,作为表达量能够维持野生型50%以上的地方,发现了CRD1的N42、Q43、I44,CRD2的C48、P50、F53、D63、I64、D87,甚至CRD3的L95和M101。

[0949] (9-2-3)

[0950] 在实施例9-2-2中发现的位置中,通过在M101的位置全面引入1个氨基酸改变,探索了能够减少与CD137L结合的改变。

[0951] 通过与实施例9-2-2中记载的相互作用解析相同的方法,对制备的变体与CD137L的结合活性进行评价。

[0952] 其结果,新发现了M101D这一改变(BB0139:序列编号120)作为能够降低CD137L结合的改变。

[0953] (9-3)减少与生物体内配体的相互作用的变体的制备

[0954] 如实施例7中所述,人CD137的CRD2上的I64和V71是可以减少与CD137L的结合的改变。因此,制备了期待能够成为能进一步降低与生物体内配体的相互作用的变体的双方都被改变为Arg的变体(BB0077,序列编号121)。此时,BB0000-FXFcBAP被用作模板。

[0955] (9-3-1)对BB0000和BB0077的生物体内配体结合活性测定

[0956] 通过实施例9-2-2中所述的方法测定与BB0077的生物体内配体的结合。求出CD137L的结合量(RU:response unit)除以CD137变体的结合量(RU)的比值。其结果,确认了BB0077不与生物体内配体结合(图13)。

[0957] (9-3-2)BB0000和BB0077的ECM结合评价

[0958] 在制备的变体对哺乳动物细胞具有非特异性结合活性的情形中,可能会对细胞发挥抗原非特异性细胞毒性活性。因此评价与细胞外基质(Extracellular Matrix,ECM)的结合性,该细胞外基质(ECM)作为体外评价各变体的非特异性结合的多寡的系统而己知。在本分析系统中评价了BB0000和BB0077的非特异结合(美国专利申请公报2014/0080153)。其结果,确认了BB0077与ECM强结合,提示了可能在生物体内发生非特异性反应(图14)。

[0959] (9-3-3)CD137变体的ECM结合评价

[0960] 如实施例9-2-2中所示,BB0077未与生物体内配体结合,但存在非特异性结合,因此认为存在安全性问题,因此致力于制备可以同时抑制与生物体内配体的结合和非特异结合的CD137变体。

[0961] 作为非特异结合的原因,通过改变导入的精氨酸的等电点的高度受到了关注。认为精氨酸具有的正电荷被吸引到细胞膜表面上或ECM上带电的负电荷中,从而引起了非特异结合,作为不具有正电荷、具有能够阻碍与配体结合的体积大的氨基酸,确认了通过改变为天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸,是否能够降低非特异结合。具体地,在BB0077中突变导入的I64、V71中的一个或两个中,制备导入了天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸的变体。制备的各个名称以及对BB0000导入的改变以及序列编号的列表如下表4所示。

[0962] [表4]

[0963] 表4:制备的变体

[0964]

名称	改变	序列编号
BB0124	I64E	122
BB0125	I64Q	123
BB0126	I64D	124
BB0127	V71E	125
BB0128	V71Q	126
BB0129	V71D	127
BB0130	I64E/V71E	128
BB0131	I64E/V71Q	129
BB0132	I64E/V71D	130
BB0133	I64Q/V71E	131
BB0134	I64Q/V71Q	132
BB0135	I64Q/V71D	133
BB0136	I64D/V71E	134
BB0137	I64D/V71Q	135
BB0138	I64D/V71D	136

[0965] (9-3-4)对新发现的变体的生物体内配体的结合活性评价

[0966] 实施例9-3-3中制备的BB0124~BB0138的各变体通过与实施例9-2-2中记载的相同的方法对生物体内配体进行结合活性评价。求出CD137L的结合量(RU:response unit)除以CD137变体的结合量(RU)的比值。其结果, BB0127~BB138的变体强烈地降低了生物体内配体结合。(图15)

[0967] (9-3-5)各变体的ECM结合评价

[0968] 对于在实施例9-2-3和9-3-4中发现的变体,通过实施例9-3-2中记载的方法评价非特异结合。其结果,确认了与野生型(BB0000)相比任一变体的非特异结合进一步降低(图16A和图16B)。

[0969] 根据以上结果,新发现了不与生物体内CD137L结合,非特异结合也降低了的CD137变体。通过将本变体作为嵌合受体的细胞外区使用,期望可以制备抑制目标非特异性细胞毒性的嵌合受体。

[0970] [实施例10]在细胞外结构域中具有配体结合能力减弱了的CD137变体的嵌合受体表达细胞的活化能力的评价

[0971] (10-1)慢病毒载体的构建

[0972] 在实施例9中构建的减弱了与CD137L的结合的CD137变体中,将BB0127, BB0128, BB0131, BB0133, BB0134, BB0139这6种作为细胞外结构域,制备人CD8e链的铰链区和跨膜区(Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、以及人CD28分子(Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220)、人CD137分子(Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255)、人CD3 ζ 分子(Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164)的细胞质区连接的嵌合受体(序列编号27~32)。将这些序列与pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的MCS连接,构建共表达嵌合受体与copGFP的慢病毒载体。

[0973] (10-2)向NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞导入基因

[0974] 为了通过体外报告物分析来解析制备的嵌合受体的活化能力,将其转导至NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(Promega公司)。

[0975] 使用实施例10-1中构建的慢病毒载体,通过慢病毒方法来实施转导。具体地,首先应用Lenti-PacTMHIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)将慢病毒载体与包装质粒混合物转染到293Ta细胞株(Genecopoeia)中制备慢病毒。从转染起48小时或72小时后回收包含所述慢病毒的上清。

[0976] 接着,将含有回收的慢病毒的上清与聚凝胺溶液(Nacalai tesque)添加到NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞中,通过以3000rpm离心60分钟,得到转导了的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞。

[0977] (10-3)CR蛋白表达率的确认

[0978] 关于实施例10-2中配制的Jurkat细胞上的嵌合受体的表面表达,用CD137抗体(BioLegend公司)染色通过BD FACSVerseTM(BD Biosciences)进行解析。其结果,确认了活细胞中50%以上表达嵌合受体。

[0979] (10-4)通过报告物分析评价活化能力

[0980] 将实施例10-2中配制的表达嵌合受体的Jurkat细胞与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择人GPC3,在实验中使用实施例2-2

中配制的、由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[0981] 人GPC3表达肿瘤细胞株使用在人肝癌细胞株的SK-HEP1(ATCC)中稳定表达人GPC3的SK-pca60细胞。首先,SK-pca60细胞以5 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将实施例10-2中配制的表达嵌合受体的Jurkat细胞,作为阳性对象在实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞(细胞外结构域BB0000),或实施例7-2中配制的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞(细胞外结构域是BB0077),和作为阴性对象未导入基因的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞的亲本株(模拟物)分别以10 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,在0或10 μ g/mL的终浓度下以5 μ L/孔添加双特异性抗体。24小时后,应用Bio-Glo Luciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVisionTMXcite(Perkin Elmer)测定,在图17中显示它们的结果。

[0982] 其结果,在表达嵌合受体的Jurkat细胞中,仅在双特异性抗体存在下检测出活化。由此,提示了表达在细胞外结构域中具有CD137变体的嵌合受体的T细胞双特异性抗体依赖性地活化,对表达肿瘤抗原的细胞表达细胞毒性活性,诱导抗肿瘤效果。

[0983] (10-5)在配体表达细胞存在下评价表达嵌合受体的细胞的活化能力

[0984] 研究表达在实施例10-2中配制的嵌合受体的Jurkat细胞是否通过与CD137配体的结合,无论是否存在靶抗原都被活化。具体地,表达实施例10-2中配制的嵌合受体的Jurkat细胞与表达人CD137L的细胞共培养,解析Jurkat细胞是否活化。

[0985] 表达人CD137L的细胞株使用了来源于人B细胞性淋巴瘤的Raji细胞(ATCC)。首先,将Raji细胞的悬浮液,或作为阴性对象不包含Raji细胞的培养基分别以5 μ L/孔添加到384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将实施例10-2中配制的表达嵌合受体的Jurkat细胞,作为阳性对象在实施例3-2中配制的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞(细胞外结构域BB0000),和作为阴性对象在实施例7-2中配制的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞(细胞外结构域是BB0077),或未导入基因的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞的亲本株(模拟物)分别以10 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。24小时后,应用Bio-GloTMLuciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVisionTMXcite(Perkin Elmer)测定,在图18中显示它们的结果。

[0986] 其结果,在阳性对象的CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞中通过与Raji细胞的共培养检测出活化,在阴性对象的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞中未检测出活化。这再现了实施例8的结果,相对于CD137-CR1-copGFP Jurkat细胞经由CD137与LRaji细胞结合,非靶抗原依赖性地活化,确认了与CD137L的结合减弱了的CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞未经由CD137L与Raji细胞结合且未活化。接着,实施例10-2中配制的在细胞外结构域中表达具有BB0127、BB0128、BB0131、BB0133、BB0134、或BB0139的嵌合受体的Jurkat细胞,与CD137-CR2-copGFP Jurkat细胞同样,未检测出与Raji细胞共培养的活化。由此,提示了在实施例9中发现的CD137变体可以抑制与配体的结合引起的靶抗原非依赖性活化。

[0987] 实施例9和实施例10的结果显示,可以同时避免与ECM的相互作用引起的非特异性活化或对CD137L表达细胞的细胞毒性活性,并对靶细胞选择性地表达细胞毒性活性。

[0988] [实施例11]通过双特异性抗体评价激动剂作用

[0989] (11-1)构建表达不具有CD137细胞内信号结构域的CD137-CR3的慢病毒载体

[0990] 在该系统中,认为可以通过施用具有激动剂作用的抗原结合分子,经由内源性免疫受体,对宿主的免疫细胞或同时施用的CR表达细胞诱导激动剂活性。因此,通过具有CD137激动剂作用的抗原结合分子,验证是否对表达内源性免疫受体的细胞诱导CD137激动剂活性。

[0991] 由于验证是否经由内源性免疫受体对CR表达细胞诱导激动剂活性,因此制备表达不具有CD137细胞内信号结构域的CR的细胞。具体地,制备表达由人CD137细胞外结构域、人CD8铰链和跨膜结构域、和CD3 ζ 构成的嵌合受体CD137-CD8-CD3 ζ (图19,称为CD137-CR3)的慢病毒载体。作为慢病毒载体骨架使用pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP(System Bioscience)。密码子优化的人CD137的细胞外结构域(Genbank NM001561.6,Leu24~Gln186)连接人CD8 α 链的铰链区和跨膜区(Genbank NM001768.7,Phe128~Asn210)、以及人CD3 ζ 分子(Genbank NM000734.4,Arg52~Arg164)的细胞质区。编码CD137-CR3(序列编号33)的基因通过本领域技术人员已知的方法合成。将该序列与pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的MCS连接,构建共表达CD137-CR3与copGFP的慢病毒载体。

[0992] (11-2)NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞向基因导入

[0993] 为了通过体外报告物分析来解析表达CD137-CR3的T细胞的活化能力,将CD137-CR3-copGFP载体转导至NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞(Promega公司)。该细胞除了稳定表达CD137以外,还在转录因子nuclear factor-kappa B(NF-kB)应答元件的下游插入荧光素酶基因,通过检测荧光素酶的发光,可以定量NF-kB途径的活化。

[0994] 使用实施例11-1中构建的慢病毒载体,通过慢病毒方法来实施转导。具体地,首先应用Lenti-PacTMHIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)将上述CD137-CR3-copGFP载体与包装质粒混合物转染到293Ta细胞株(Genecopoeia)中,制备导入了CD137-CR3-copGFP载体的慢病毒。从转染起48小时或72小时后回收包含所述慢病毒的上清,使用Lenti-XTMconcentrator(Takara Bio Inc.)浓缩。

[0995] 接着,将含有回收的慢病毒的上清与聚凝胺溶液(Nacalai tesque)添加到NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞中,通过以3000rpm离心60分钟,得到转导了CD137-CR3-copGFP载体的NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞(CD137-CR3-copGFP Jurkat细胞)。另外,作为实验的比较对象,同时制备转导了CD137-CR1载体的NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞(CD137-CR1 Jurkat细胞),和不表达嵌合受体仅表达copGFP的NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞。

[0996] (11-3)CR蛋白表达率的确认

[0997] 关于实施例11-2中配制的CD137-CR3-copGFP Jurkat细胞和CD137-CR1 Jurkat细胞的嵌合受体的表面表达,用CD137抗体(BioLegend公司)染色通过FACS AriaTMIII细胞分类仪(BD Biosciences)进行解析。其结果,确认了活细胞中约95%以上表达CD137-CR3或CD137-CR1。

[0998] (11-4)通过报告物分析评价CD137-CR Jurkat细胞的CD137活化能力

[0999] 将实施例11-2中配制的CD137-CR3-copGFP Jurkat细胞或CD137-CR1 Jurkat细胞与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体存在的条件下CD137向Jurkat细胞的激动剂活性诱导能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择人GPC3,在实验中使用实施例2-2中配制的、由抗GPC3抗体和抗CD137抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)。

[1000] 人GPC3表达肿瘤细胞株使用在人肝癌细胞株的SK-HEP1 (ATCC) 中稳定表达人GPC3的SK-pca60细胞。首先,SK-pca60细胞以10 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,将CD137-CR3-copGFP Jurkat细胞、CD137-CR1 Jurkat细胞、和仅表达copGFP的NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,在0或16 μ g/mL的终浓度下以5 μ L/孔添加双特异性抗体。24小时后,应用Bio-GloTMLuciferase (Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVisionTMXcite (Perkin Elmer)测定,在图20中显示它们的结果。

[1001] 其结果,即使在任一条件下,在双特异性抗体存在下都检测出了激动剂活性。其中CD137-CR1作为细胞内结构域融合了CD137,认为除了经由细胞膜上的CD137的激动剂活性以外,也可以经由导入了基因的CR诱导激动剂活性。与此相对,认为在表达作为细胞内结构域未融合CD137的CD137-CR3的NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞与仅表达copGFP的NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat细胞中,经由细胞膜上的CD137诱导激动剂活性。如上所述,显示了在该系统中,通过具有激动剂作用的抗原结合分子,无论CR表达与否,都可以对表达内源性免疫受体的细胞诱导激动剂活性。

[1002] [实施例12]在细胞外区中具有CD28的嵌合受体表达细胞的活化能力的评价

[1003] (12-1)慢病毒载体的构建

[1004] 制备表达人CD28的细胞外结构域(Genbank NM006139.4,Asn19~Pro152)融合的嵌合受体的慢病毒载体。在跨膜结构域中制备应用了人CD8的构建体与(CD28-CR1)、和应用了人CD28的构建体(CD28-CR2)这2种(图21)。作为慢病毒载体骨架使用pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP(System Bioscience)。编码CD28-CR1(序列编号34)、CD28-CR2(序列编号35)的基因通过本领域技术人员已知的方法合成。通过将该序列与pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的MCS连接,构建慢病毒载体。

[1005] (12-2)向NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞导入基因

[1006] 为了通过体外的报告物分析来解析表达CD28-CR1或CD28-CR2的T细胞的活化能力,将实施例12-1中构建的慢病毒载体转导至NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞(Promega公司)。

[1007] 具体地,首先应用Lenti-PacTMHIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)将上述CD28-CR1-copGFP或CD28-CR2-copGFP载体与包装质粒混合物转染到293Ta细胞株(Genecopoeia)中,制备导入了CD28-CR1-copGFP或CD28-CR2-copGFP载体的慢病毒。从转染起48小时或72小时后回收包含所述慢病毒的上清,使用Lenti-XTMconcentrator(Takara Bio Inc.)浓缩。

[1008] 接着,将含有回收的慢病毒的上清与聚凝胺溶液(Nacalai tesque)添加到NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞中,通过以3000rpm离心60分钟,得到转导了CD28-CR1-copGFP或CD28-CR2-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞。另外,作为实验的阴性对象,同时制备转导了仅表达copGFP的pCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP载体的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞。

[1009] (12-3)基因导入效率的确认

[1010] 关于实施例12-2中配制的表达CD28-CR1-copGFP的Jurkat细胞与表达CD28-CR2-copGFP的Jurkat细胞的基因导入效率,用FACS Aria TMIII细胞分类仪(BD Biosciences)对共表达的copGFP的表达率进行指标解析。其结果,确认了CD28-CR1对约40%的细胞导入了基因,CD28-CR2对约20%的细胞导入了基因。

[1011] (12-4)通过报告物分析评价活化能力

[1012] 将实施例12-2中配制的CD28-CR1-copGFP表达Jurkat细胞、CD28-CR2-copGFP表达Jurkat细胞分别与表达肿瘤抗原的肿瘤细胞共培养,解析由针对肿瘤抗原的抗体与抗CD28抗体构成的双特异性抗体存在的条件下的Jurkat细胞的活化能力。此处,作为模型的肿瘤抗原选择人GPC3,在实验中使用实施例2-2中配制的、由抗GPC3抗体和抗CD28抗体构成的双特异性抗体(H0000-F760mnN17/GL4-k0a//TGN1412VH-F760mnP17.v1/TGN1412VL-KT0.v1),和作为阴性对象将第一或第二臂置换为抗Keyhole limpet hemocyanin (KLH)抗体的双特异性抗体(JC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//TGN1412VH-F760mnP17.v1/TGN1412VL-KT0.v1或IC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//H0000-F760mnP17/GL4-k0a)。

[1013] 人GPC3表达肿瘤细胞株使用在人肝癌细胞株的SK-HEP1(ATCC)中稳定表达人GPC3的SK-pca60细胞。首先,SK-pca60细胞以10 μ L/孔播种在384孔平底板(Corning)中(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,CD28-CR1-copGFP Jurkat细胞、CD28-CR2-copGFP Jurkat细胞、或阴性对象不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞分别以5 μ L/孔混合(1E+04(1 \times 10⁴)细胞/孔)。然后,在0或10 μ g/mL的终浓度下以5 μ L/孔添加每种双特异性抗体。24小时后,应用Bio-GloTM Luciferase(Promega)测定荧光素酶活性。荧光素酶活性通过EnVisionTM Xcite(Perkin Elmer)测定,在图22中显示它们的结果。

[1014] 其结果,CD28-CR1-copGFP Jurkat细胞和CD28-CR2-copGFP Jurkat细胞在不添加抗体的条件下或在添加阴性对象双特异性抗体的条件下活化均较弱,与之相对,在由抗GPC3抗体和抗CD28抗体构成的双特异性抗体存在下首次活化较强。另一方面,不表达嵌合受体仅表达copGFP的NFAT-RE-luc2 Jurkat细胞即使在由抗GPC3抗体和抗CD28抗体构成的双特异性抗体存在下也未检测出活化。由此,提示了表达在细胞外区中具有CD28的嵌合受体的T细胞双特异性抗体依赖性地活化,对表达肿瘤抗原的细胞表达细胞毒性活性,诱导抗肿瘤效果。

[1015] [表5-1]

序列编号	名称	全长序列
1	H0000	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFDYEMHWIRQPPGQGLEWIGAIIDPK TGD TAYSQKFKGRVLTADKSTSTAYMELSSLTSED TAVYYCTRFYSYTYWGQG TLVTVSS
2	GL4	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYQQKPKGQAPRLLIY KVSNRFSGVPDFRFSGSGSGTDFLTKISRVEAEDVGVYYCSQNTHTVPPFTFGQGTK LEIK
3	F760nN17	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGV E VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQESL SLSP
4	k0a	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[1016] 5	hCD137VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTC AVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIG EINHG GYVTYNP SLESRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYGP GNYDWYF DLWGRGTLVTVSS
6	hCD137VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPKGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEI K
7	F760mN17	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGV E VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSL SLSP
8	k0	RTVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	GPA0018H	QSVEESGGRLVTPGTPLTCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGI INIRG STYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKITSP TADTATYFCARGYTAYSGAVSIWGP GTLVTVSS
10	GPA0018L	DVVM TQTPASVSEPVGGT VTIKQASQNIYSNLAWYQQKPKGQPPKLLIYAASNL ASGVSSRFPKSGSGTQFTLTI SDLECADSATYYCQCS DYGSSSYVGA FGGGTEVV VK

[1017] [表5-2]

[1018]

11	F760mnN17	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSCDKTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTI SKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQESL SLSP
12	k0C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDCSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	GPA0039H	QSVEESGGRLVTPGGTLTFTCTVSGFSLSSYAMGWVRQAPGEGLEYIGTIDTGG SAYYATWAKGRFTISKTSSTTVGLIMTSLTAADTATYFCARVADYNIGLRRDL WGQGLTVTVSS
14	GPA0039L	ADVVMQTPTASVSEPPVGGVTIKCQASQYIYSNLAWYQQKPKQRKLLIYTTSN LESGVPSRFRGSGSGTEFTLTI SDLECADAAATYYCQSAYYSSSYVFPFGGTEV VVK
15	MRAH. v1	QVQLQESGPGLVPRPQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISY SGITTYNPSLKSRYTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARSLARTTAMDY WGQGS�TVTVSS
16	MRAL. v1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYSRL HSGVPSRFRSGSGSGTDFLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPYTFGGGTKVEIK
17	k0. v1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDCSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	IC17HdK	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASGYSFTSYWMHWVNRPGGLEWIGMIDPS YSETRLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCALYGNFYDWTGQ GTTLTVSS
19	IC17L	DIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSL ETGVPSTRFSGSGSGKDYTLSTISLQTEDVATYYCQQYWSPTPYTFGGGTKLEVK
20	TGN1412VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCRASGYFTSYIHWVRQAPGGLEWIGCIYPG NVNTNYNEKFKDRATLTVDTISI STAYMELSRLSDDTAVYFCRSHYGLDWNFD VWGQGTTVTVSS
21	TGN1412VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNTYVWLNWYQQKPKGKAPKLLIYKASNL HTGVPSTRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
22	F760mnP17. v1	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPEKSCDKTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSP
23	KT0. v1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDCSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1019] [表5-3]

[1020]

24	CD137-CR1	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCFCGTFNDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSP QAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
25	trCD137-CR	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGD DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
26	CD137-CR2	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCFCGTFNDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSP QAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
33	CD137-CR3	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCFCGTFNDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSP QAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
34	CD28-CR1	NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYVGY SQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLNLYVNQTDIYFCKIEVYMPYPYLNDNE KSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPAAAFVVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYC NHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[1021] [表5-4]

[1022]

35	CD28-CR2	NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLF SREFRASLHKGLDSAVEVCVYVGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLNQLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
137	CD137 细胞外 结构域1	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSST SNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ
138	CD137 细胞外 结构域2	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSST SNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPARE
139	CD137 细胞外 结构域3	SLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSST SNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGP
140	CD137 细胞外 结构域4	QDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSST SNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSP

序列表

- <110> 中外制药株式会社
 <120> 包含表达嵌合受体的细胞的药物组合物
 <130> FA0001-21152
 <150> JP 2020-131116
 <151> 2020-07-31
 <160> 140
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 1

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

- <210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 3
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 3
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 4

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

	20		25		30														
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile				
	35						40					45							
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly				
	50						55					60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro				
65					70					75					80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro				
				85					90					95					
Ala	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
				100				105											
<210>	7																		
<211>	328																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	7																		
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys				
1				5					10					15					
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr				
			20						25					30					
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser				
			35						40					45					
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser				
			50						55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr				
65					70						75				80				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys				
			85								90				95				
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
			100						105					110					
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Arg	Gly	Gly	Pro	Lys	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
			115						120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				
			130						135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp				
145					150						155				160				
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu				

	165		170		175										
Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
	180		185		190										
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195		200		205										
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210		215		220										
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Lys	Glu
225			230		235		240								
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	245		250		255										
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
	260		265		270										
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275		280		285										
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290		295		300										
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305			310		315		320								
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								
	325														

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 8

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

	85	90	95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	100	105	
<210>	9		
<211>	116		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	9		
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro			
1	5	10	15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala			
	20	25	30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
	35	40	45
Ile Ile Asn Ile Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly			
	50	55	60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr			
65	70	75	80
Ser Pro Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr			
	85	90	95
Thr Ala Tyr Ser Gly Ala Val Ser Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	10		
<211>	110		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	10		
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val Gly			
1	5	10	15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn			
	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Ser Asp Tyr Gly Ser Ser
 85 90 95
 Tyr Val Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 <210> 11
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 11
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 13
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Phe Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45
 Thr Ile Asp Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Gly Leu Ile Met
 65 70 75 80
 Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val
 85 90 95
 Ala Asp Tyr Asn Ile Gly Leu Arg Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 14
 Ala Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Glu Pro Val
 1 5 10 15
 Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Tyr Ile Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu

65	70	75	80
Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser			
	85	90	95
Ser Tyr Val Phe Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys			
	100	105	110
<210>	15		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	15		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp			
	20	25	30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp			
	35	40	45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu			
	50	55	60
Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser			
65	70	75	80
Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	16		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	16		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr			
	20	25	30

1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Asn Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Tyr Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Leu Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
 100 105
 <210> 20
 <211> 120
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 20

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

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 21

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 22
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 22
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

- <210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 23

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

- <210> 24
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 24
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro
 165 170 175
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 180 185 190
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 195 200 205
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 210 215 220
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 245 250 255
 Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr
 260 265 270
 Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr
 275 280 285
 Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 290 295 300

```

Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
305                310                315                320
Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
                325                330                335
Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
                340                345                350
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
                355                360                365
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
                370                375                380
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
385                390                395                400
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
                405                410                415
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
                420                425                430
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
                435                440                445
Arg
<210> 25
<211> 350
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 25
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1                5                10                15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
                20                25                30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
                35                40                45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
                50                55                60
Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr
65                70                75                80
Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
                85                90                95
Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val

```


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

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 325 330 335
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
 340 345 350
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 370 375 380
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 385 390 395 400
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 405 410 415
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 420 425 430
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 435 440 445

Arg

<210> 27

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 27

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

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

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 435 440 445

Arg
 <210> 28
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 28

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

225	230	235	240
Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu			
	245	250	255
Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr			
	260	265	270
Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr			
	275	280	285
Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr			
	290	295	300
Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu			
305	310	315	320
Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu			
	325	330	335
Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln			
	340	345	350
Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu			
	355	360	365
Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly			
	370	375	380
Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln			
385	390	395	400
Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu			
	405	410	415
Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr			
	420	425	430
Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro			
	435	440	445
Arg			
<210>	29		
<211>	449		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	29		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30

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

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

<210> 31
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 31
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Gln Cys Arg Gln Cys Lys Gly Gln
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro
 165 170 175
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 180 185 190
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 195 200 205
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 210 215 220
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu
 245 250 255

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

Arg

<210> 32

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 32

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

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

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 370 375 380
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 385 390 395 400
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 405 410 415
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 420 425 430
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 435 440 445
 Arg
 <210> 33
 <211> 362
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 33
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro

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

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 370 375 380
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 385 390 395 400
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 405 410 415
 Leu Pro Pro Arg
 420
 <210> 35
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 35
 Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn
 1 5 10 15
 Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu
 20 25 30
 Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys
 35 40 45
 Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr
 50 55 60
 Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile
 85 90 95
 Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly
 100 105 110
 Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe
 115 120 125
 Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val
 130 135 140
 Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp
 145 150 155 160
 Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met
 165 170 175
 Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala
 180 185 190

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val Val Lys
 195 200 205
 Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg
 210 215 220
 Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro
 225 230 235 240
 Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser
 245 250 255
 Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu
 260 265 270
 Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg
 275 280 285
 Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln
 290 295 300
 Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp
 325 330 335
 Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala
 340 345 350
 Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 355 360
 <210> 36
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 36
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 37
 Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp
 1 5
 <210> 38
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 38
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 1 5 10 15
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 20 25 30
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 35 40 45
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 50 55 60
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 100 105 110
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 115 120 125
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 130 135 140
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 165 170 175
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 195 200 205
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro
 225

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 39

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile
 1 5 10 15

Glu Trp His Glu
 20

<210> 40

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 40

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Ala Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser

	20		25		30														
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
	35		40		45														
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50		55		60														
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65			70		75										80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
			85		90										95				
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100		105										110				
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
			115		120										125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
			130		135										140				
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
145					150						155				160				
Ser	Pro	Gln																	
<210>	41																		
<211>	163																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	41																		
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn				
1			5						10					15					
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Ala	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser				
			20						25					30					
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
			35						40					45					
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
			50						55					60					
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65					70				75					80					
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
			85						90					95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100						105					110					

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 42
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 42
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Ala Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 43
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 43

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

<210> 44

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 44

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

145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210> 46			
<211> 163			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工合成的序列			
<400> 46			
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ala Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210> 47			
<211> 163			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工合成的序列			
<400> 47			
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ala
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 48
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 48
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Ala Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 50

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

Ser Pro Gln

<210> 51

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 51

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

1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Ala Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	55		
<211>	163		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	55		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ala Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 56
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 56
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Ala Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 57
 <211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 57

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

Ser Pro Gln

<210> 58

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 58

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

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 59
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 59
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Ala Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro

130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
Ser Pro Gln		
<210> 60		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 60		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn		
1	5	10
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser		
	20	25
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Ala Gly Val		
	35	40
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp		
	50	55
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu		
65	70	75
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp		
	85	90
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro		
	100	105
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr		
	115	120
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
	130	135
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
Ser Pro Gln		
<210> 61		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 61		

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Ala Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 62
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 62
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Ala
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp

	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	63		
<211>	163		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	63		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val			
	35	40	45
Ala Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	64		

<211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 64
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Ala Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln

<210> 65
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 65
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

	35		40		45															
	Phe	Arg	Ala	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50						55				60									
	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
	65					70					75				80					
	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
					85					90				95						
	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
				100					105					110						
	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
				115				120						125						
	Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
				130				135				140								
	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
	145					150					155				160					
	Ser	Pro	Gln																	
	<210>	66																		
	<211>	163																		
	<212>	PRT																		
	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
	<220>																			
	<223>	人工合成的序列																		
	<400>	66																		
	Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn				
	1			5					10					15						
	Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser				
			20					25					30							
	Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
			35					40				45								
	Phe	Arg	Thr	Ala	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50						55					60								
	Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
	65					70					75				80					
	Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
					85					90				95						
	Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
				100					105					110						
	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
				115				120						125						

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 67
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 67
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Ala Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 68
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 68

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

<210> 69

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 69

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

<210> 71
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 71
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ala Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 72
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 72
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Ala Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln
<210> 73
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 73

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ala Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr

115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
160		
Ser Pro Gln		
<210> 74		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 74		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn		
1 5 10 15		
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser		
20 25 30		
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val		
35 40 45		
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Ala Ala Glu Cys Asp		
50 55 60		
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu		
65 70 75 80		
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp		
85 90 95		
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro		
100 105 110		
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr		
115 120 125		
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
130 135 140		
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145 150 155 160		
Ser Pro Gln		
<210> 75		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		

<223> 人工合成的序列

<400> 75

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

<210> 76

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 76

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

65					70						75					80
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	
					85						90					95
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	
			100								105					110
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	
			115								120					125
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	
			130								135					140
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	
145						150					155					160
Ser	Pro	Gln														
<210>	77															
<211>	163															
<212>	PRT															
<213>	人工序列(Artificial Sequence)															
<220>																
<223>	人工合成的序列															
<400>	77															
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn	
1				5					10					15		
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	
			20						25				30			
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val	
			35					40				45				
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Ala	
			50					55				60				
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu	
65					70						75					80
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp	
					85											95
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro	
			100													110
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr	
			115													125
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro	
			130													140
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His	
145						150						155				160

Ser Pro Gln

<210> 78

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 78

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

Ser Pro Gln

<210> 79

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 79

Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn
1				5					10					15	
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser

	20		25		30														
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
	35		40		45														
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50		55		60														
Cys	Ala	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65			70		75										80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
			85		90										95				
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100		105										110				
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
			115		120										125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
			130		135										140				
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
145					150						155				160				
Ser	Pro	Gln																	
<210>	80																		
<211>	163																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	80																		
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn				
1			5						10					15					
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser				
			20						25					30					
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
			35						40					45					
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
			50						55					60					
Cys	Thr	Ala	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65					70						75				80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
					85						90				95				
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100								105				110				

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 81
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 81
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Ala Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 82
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 82

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

Ser Pro Gln

<210> 83

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 83

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

Cys Thr Pro Gly Phe Ala Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 84
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 84
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Ala Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His

145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210> 85			
<211> 163			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工合成的序列			
<400> 85			
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210> 86			
<211> 163			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 人工合成的序列			
<400> 86			
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Ala Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 87
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 87
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Ala Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 89

```

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

```

<210> 90

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 90

```

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

```

50	55	60																	
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Ala	Cys	Glu				
65					70						75				80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
				85							90				95				
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100								105				110				
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
			115								120				125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
			130								135				140				
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
145						150					155				160				
Ser	Pro	Gln																	
<210>	91																		
<211>	163																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	91																		
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn				
1				5						10				15					
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser				
			20							25				30					
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
			35							40				45					
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
			50								55			60					
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Ala	Glu				
65					70						75				80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
				85							90				95				
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100								105				110				
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
			115								120				125				
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
			130								135				140				

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 92

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 92

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Ala
 65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 93

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 93

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn

1	5	10	15														
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser		
		20						25					30				
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val		
		35						40					45				
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp		
		50						55					60				
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu		
65								70					75		80		
Ala	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp		
								85							95		
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro		
								100							110		
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr		
								115							125		
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro		
								130							140		
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His		
145								150							160		
Ser	Pro	Gln															
<210>	94																
<211>	163																
<212>	PRT																
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
<220>																	
<223>	人工合成的序列																
<400>	94																
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn		
1				5					10					15			
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser		
				20					25					30			
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val		
				35					40					45			
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp		
				50					55					60			
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu		
65									70					75		80	
Gln	Ala	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp		
									85						95		
									90								

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 95
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 95
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Ala Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 96
 <211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 96

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

Ser Pro Gln

<210> 97

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 97

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

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Ala Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 98
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 98
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Ala Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro

130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
Ser Pro Gln		
<210> 99		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 99		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn		
1	5	10
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser		
	20	25
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val		
	35	40
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp		
	50	55
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu		
65	70	75
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Ala Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp		
	85	90
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro		
	100	105
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr		
	115	120
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
	130	135
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
Ser Pro Gln		
<210> 100		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 100		

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Ala Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 101
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 101

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

	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	102		
<211>	163		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	102		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	103		

<211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 103
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Ala Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln

<210> 104
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 104
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

	35		40		45														
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50					55				60									
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65					70					75					80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Ala	Gly	Cys	Lys	Asp				
				85					90					95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100					105						110					
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
		115					120							125					
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
	130					135					140								
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
145					150					155					160				
Ser	Pro	Gln																	
<210>	105																		
<211>	163																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	105																		
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn				
1				5					10					15					
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser				
			20					25					30						
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
			35					40					45						
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50					55					60								
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65					70						75				80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Ala	Cys	Lys	Asp				
				85						90				95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100					105						110					
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
		115						120						125					

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 106
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 106
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Ala Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 107
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列

<400> 107

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

<210> 108

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 108

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

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 109
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 109
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ala Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln

<210> 110
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 110
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Ala Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 111
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 111
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ala Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
145 150 155 160

Ser Pro Gln
<210> 112
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工合成的序列
<400> 112

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
1 5 10 15

Asn Arg Asn Ala Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val
35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr

115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
160		
Ser Pro Gln		
<210> 113		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 113		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn		
1 5 10 15		
Asn Arg Ala Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser		
20 25 30		
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val		
35 40 45		
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp		
50 55 60		
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu		
65 70 75 80		
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp		
85 90 95		
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro		
100 105 110		
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr		
115 120 125		
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
130 135 140		
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145 150 155 160		
Ser Pro Gln		
<210> 114		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		

<223> 人工合成的序列

<400> 114

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

<210> 115

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 115

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

65		70		75		80													
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
				85					90					95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100					105					110						
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
			115					120					125						
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
			130					135				140							
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
145					150					155					160				
Ser	Pro	Gln																	
<210>	116																		
<211>	447																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	116																		
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1			5					10					15						
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr				
			20					25				30							
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
			35				40					45							
Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
			50				55				60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70					75				80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
			85						90					95					
Ala	Lys	Gly	Trp	Leu	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu				
			100					105					110						
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu				
			115					120					125						
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys				
			130					135				140							
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser				
145					150					155					160				

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro			
	340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala			
	355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
385	390	395	400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210>	117		
<211>	215		
<212>	PRT		

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 117

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Arg	Ser
				20				25						30	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
				35			40							45	
Ile	Ile	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
				50			55							60	
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65						70					75				80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Gln	Val	Ile	Pro
				85							90				95
Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala
				100							105				110
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
				115										120	
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
				130										135	
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
145						150								155	
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				165										170	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
				180										185	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys
				195										200	
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
				210										215	

<210> 118

<211> 722

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 118

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

305		310		315		320
Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu						
		325		330		335
Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu						
		340		345		350
Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile						
		355		360		365
Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly						
		370		375		380
Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro						
385		390		395		400
Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu						
		405		410		415
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp						
		420		425		430
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp						
		435		440		445
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys						
		450		455		460
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln						
465		470		475		480
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp						
		485		490		495
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly						
		500		505		510
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile						
		515		520		525
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu						
		530		535		540
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His						
545		550		555		560
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg						
		565		570		575
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys						
		580		585		590
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu						
		595		600		605
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr						
		610		615		620

145	150	155	160
Gly Ala Thr Val	Leu Gly Leu Phe Arg	Val Thr Pro Glu Ile	Pro Ala
	165	170	175
Gly Leu Pro Ser	Pro Arg Ser Glu Gly	Gly Gly Ser Gly	Gly Gly
	180	185	190
Gly Ser Ala Ser	Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu	Ala Pro Ser
	195	200	205
Ser Lys Ser Thr	Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly	Cys Leu Val Glu
	210	215	220
Asp Tyr Phe Pro	Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn	Ser Gly Ala Leu
225	230	235	240
Thr Ser Gly Val	His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln	Ser Ser Gly Leu
	245	250	255
Tyr Ser Leu Ser	Ser Val Val Thr	Val Pro Ser Ser	Ser Leu Gly Thr
	260	265	270
Gln Thr Tyr Ile	Cys Asn Val Asn	His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val
	275	280	285
Asp Glu Lys Val	Glu Pro Lys Ser	Cys	
	290	295	
<210>	120		
<211>	163		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	120		
Leu Gln Asp Pro	Cys Ser Asn Cys Pro	Ala Gly Thr Phe	Cys Asp Asn
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln	Ile Cys Ser Pro Cys	Pro Pro Asn Ser	Phe Ser Ser
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln	Arg Thr Cys Asp	Ile Cys Arg Gln	Cys Lys Gly Val
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg	Lys Glu Cys Ser	Ser Thr Ser Asn	Ala Glu Cys Asp
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly	Phe His Cys Leu	Gly Ala Gly Cys	Ser Asp Cys Glu
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys	Gln Gly Gln Glu	Leu Thr Lys Lys	Gly Cys Lys Asp
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly	Thr Phe Asn Asp	Gln Lys Arg Gly	Ile Cys Arg Pro

	100		105		110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr					
	115		120		125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro					
	130		135		140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His					
145		150		155	160
Ser Pro Gln					
<210>	121				
<211>	163				
<212>	PRT				
<213>	人工序列(Artificial Sequence)				
<220>					
<223>	人工合成的序列				
<400>	121				
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn					
1		5		10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser					
	20		25		30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Arg Cys Arg Gln Cys Lys Gly Arg					
	35		40		45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp					
	50		55		60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu					
65		70		75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp					
	85		90		95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro					
	100		105		110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr					
	115		120		125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro					
	130		135		140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His					
145		150		155	160
Ser Pro Gln					
<210>	122				
<211>	163				
<212>	PRT				

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 122

```

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

```

<210> 123

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 123

```

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

```

50	55	60																		
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu					
65					70						75				80					
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp					
				85							90				95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro					
			100								105				110					
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr					
			115								120				125					
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro					
			130								135				140					
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His					
145					150						155				160					
Ser	Pro	Gln																		
<210>	124																			
<211>	163																			
<212>	PRT																			
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																			
<220>																				
<223>	人工合成的序列																			
<400>	124																			
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn					
1				5						10				15						
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser					
			20							25				30						
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Asp	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val					
			35							40				45						
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp					
			50							55				60						
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu					
65					70										80					
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp					
				85							90				95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro					
			100								105				110					
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr					
			115								120				125					
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro					
			130								135				140					

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 125

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 125

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15

Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30

Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Glu
 35 40 45

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60

Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80

Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110

Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140

Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160

Ser Pro Gln

<210> 126

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 126

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn

1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Gln			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	127		
<211>	163		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	127		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Asp			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95

Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 128
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 128
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Glu Cys Arg Gln Cys Lys Gly Glu
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 129
 <211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 129

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

Ser Pro Gln

<210> 130

<211> 163

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工合成的序列

<400> 130

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

Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 131
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 131
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Gln Cys Arg Gln Cys Lys Gly Glu
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro

130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
Ser Pro Gln		
<210> 132		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 132		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn		
1	5	10
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser		
	20	25
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Gln Cys Arg Gln Cys Lys Gly Gln		
	35	40
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp		
	50	55
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu		
65	70	75
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp		
	85	90
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro		
	100	105
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr		
	115	120
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro		
	130	135
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His		
145	150	155
Ser Pro Gln		
<210> 133		
<211> 163		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 人工合成的序列		
<400> 133		

Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Gln Cys Arg Gln Cys Lys Gly Asp
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln
 <210> 134
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 134
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Asp Cys Arg Gln Cys Lys Gly Glu
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp

	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	135		
<211>	163		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	人工合成的序列		
<400>	135		
Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn			
1	5	10	15
Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser			
	20	25	30
Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Asp Cys Arg Gln Cys Lys Gly Gln			
	35	40	45
Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp			
	50	55	60
Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu			
65	70	75	80
Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp			
	85	90	95
Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro			
	100	105	110
Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr			
	115	120	125
Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro			
	130	135	140
Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His			
145	150	155	160
Ser Pro Gln			
<210>	136		

<211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 136
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Asp Cys Arg Gln Cys Lys Gly Asp
 35 40 45
 Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp
 50 55 60
 Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu
 65 70 75 80
 Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp
 85 90 95
 Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro
 100 105 110
 Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly Thr
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His
 145 150 155 160
 Ser Pro Gln

<210> 137
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 137
 Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn
 1 5 10 15
 Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val

	35		40		45														
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50					55				60									
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65					70					75					80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
				85					90					95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100					105						110					
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
		115					120						125						
Lys	Glu	Arg	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Ser	Pro	Ala	Asp	Leu	Ser	Pro				
	130					135					140								
Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala	Arg	Glu	Pro	Gly	His				
145					150					155					160				
Ser	Pro	Gln																	
<210>	138																		
<211>	157																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																		
<220>																			
<223>	人工合成的序列																		
<400>	138																		
Leu	Gln	Asp	Pro	Cys	Ser	Asn	Cys	Pro	Ala	Gly	Thr	Phe	Cys	Asp	Asn				
1				5					10					15					
Asn	Arg	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Ser				
			20						25				30						
Ala	Gly	Gly	Gln	Arg	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys	Arg	Gln	Cys	Lys	Gly	Val				
			35						40				45						
Phe	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Ala	Glu	Cys	Asp				
	50					55					60								
Cys	Thr	Pro	Gly	Phe	His	Cys	Leu	Gly	Ala	Gly	Cys	Ser	Met	Cys	Glu				
65					70						75				80				
Gln	Asp	Cys	Lys	Gln	Gly	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Lys	Gly	Cys	Lys	Asp				
				85						90				95					
Cys	Cys	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Gln	Lys	Arg	Gly	Ile	Cys	Arg	Pro				
			100					105						110					
Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Val	Asn	Gly	Thr				
		115						120						125					

Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro
 130 135 140
 Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu
 145 150 155
 <210> 139
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 139
 Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp
 1 5 10 15
 Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser
 20 25 30
 Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly
 35 40 45
 Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
 50 55 60
 Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
 65 70 75 80
 Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
 85 90 95
 Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
 100 105 110
 Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
 115 120 125
 Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
 130 135
 <210> 140
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人工合成的序列
 <400> 140
 Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn
 1 5 10 15
 Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala

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

嵌合受体与双特异性抗体的共同施用

靶细胞的伤害

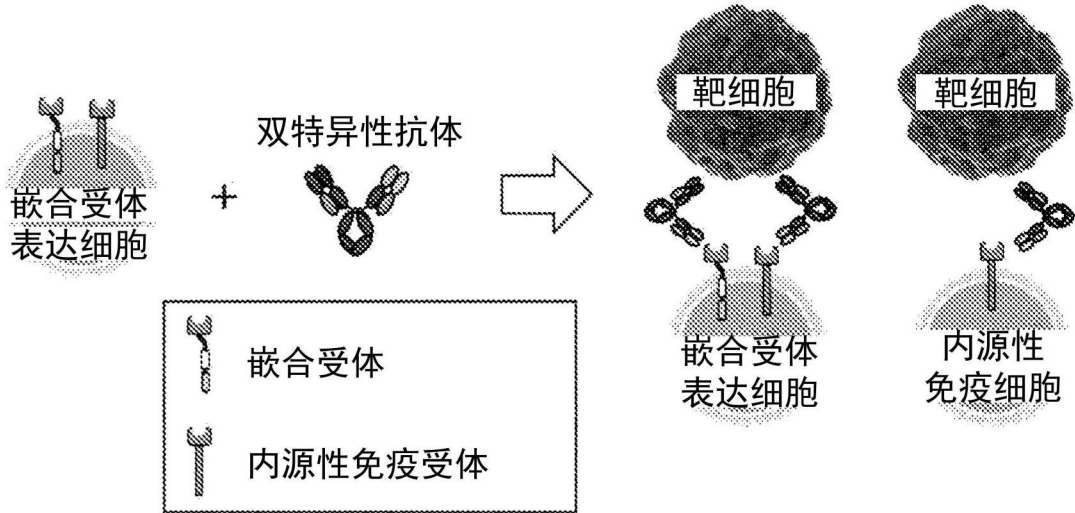


图1

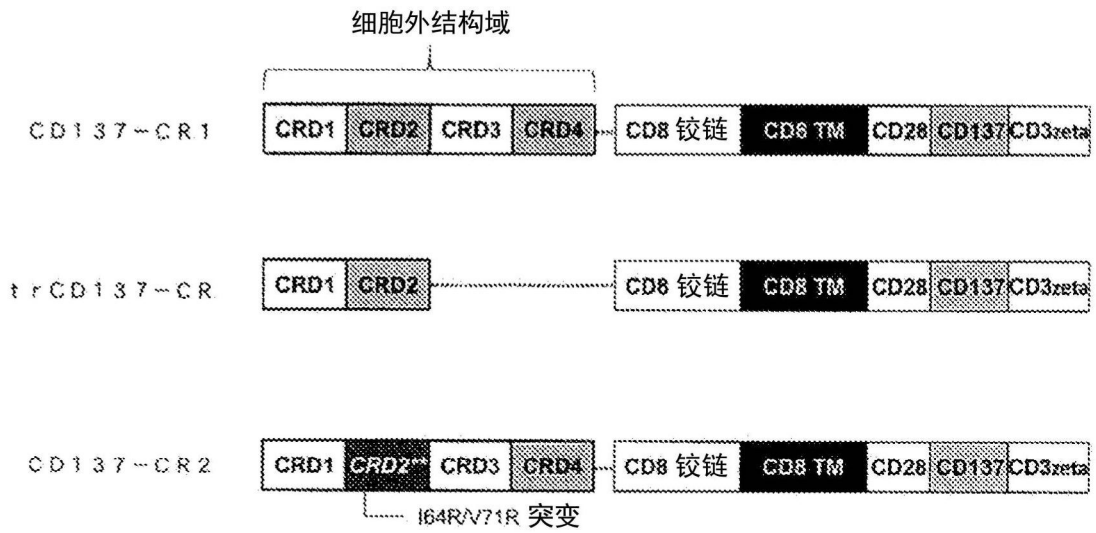


图2

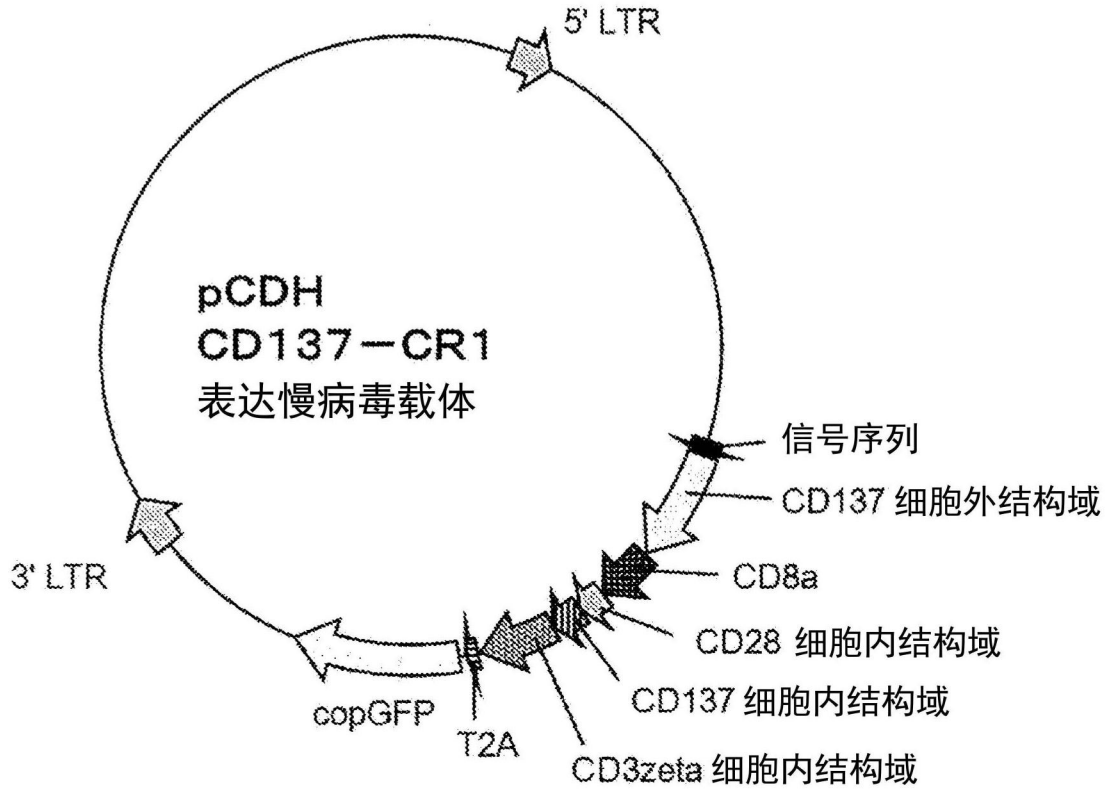


图3

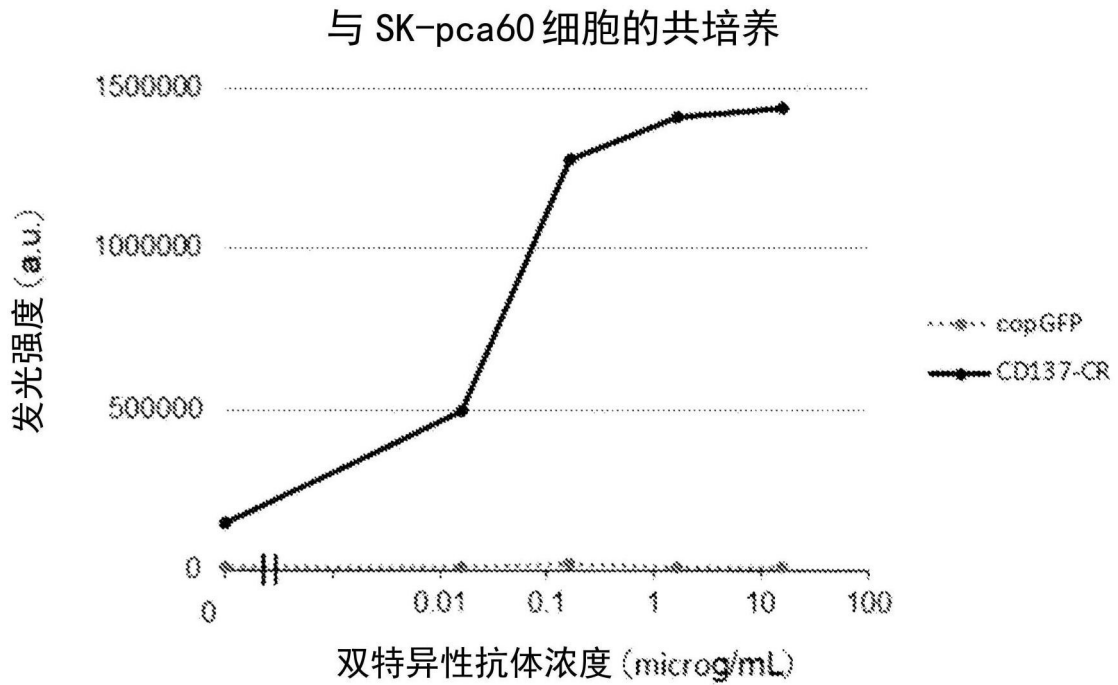


图4

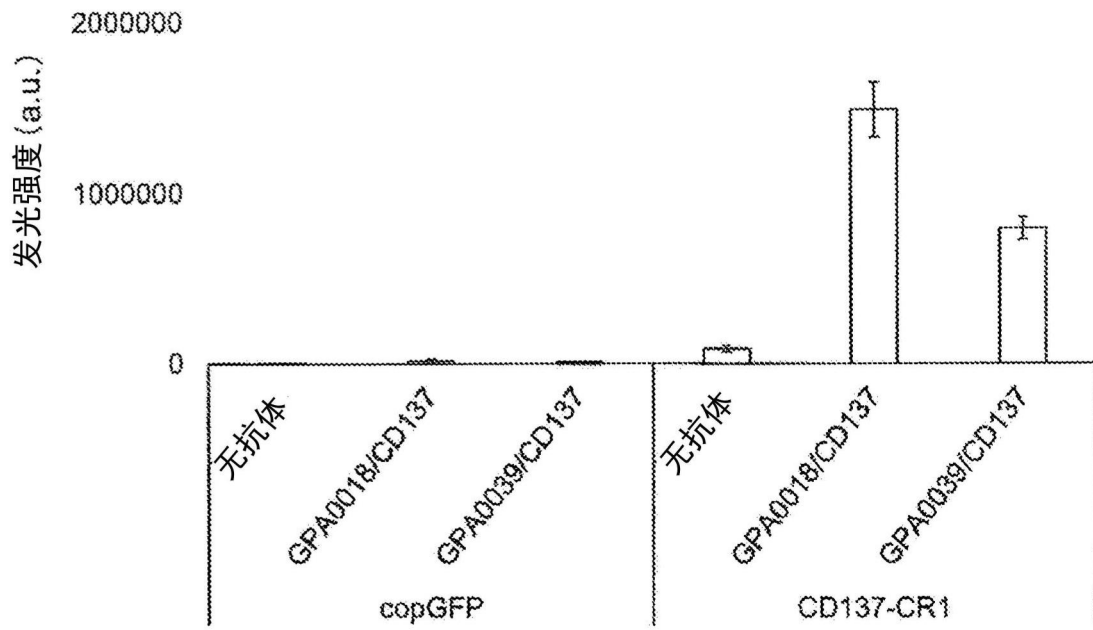


图5

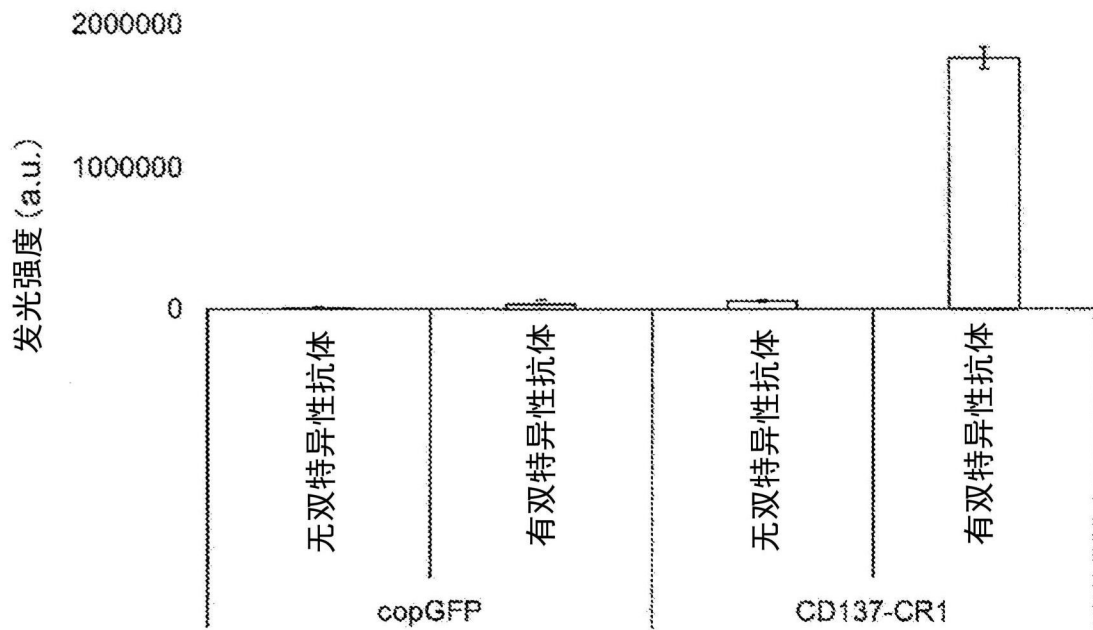


图6

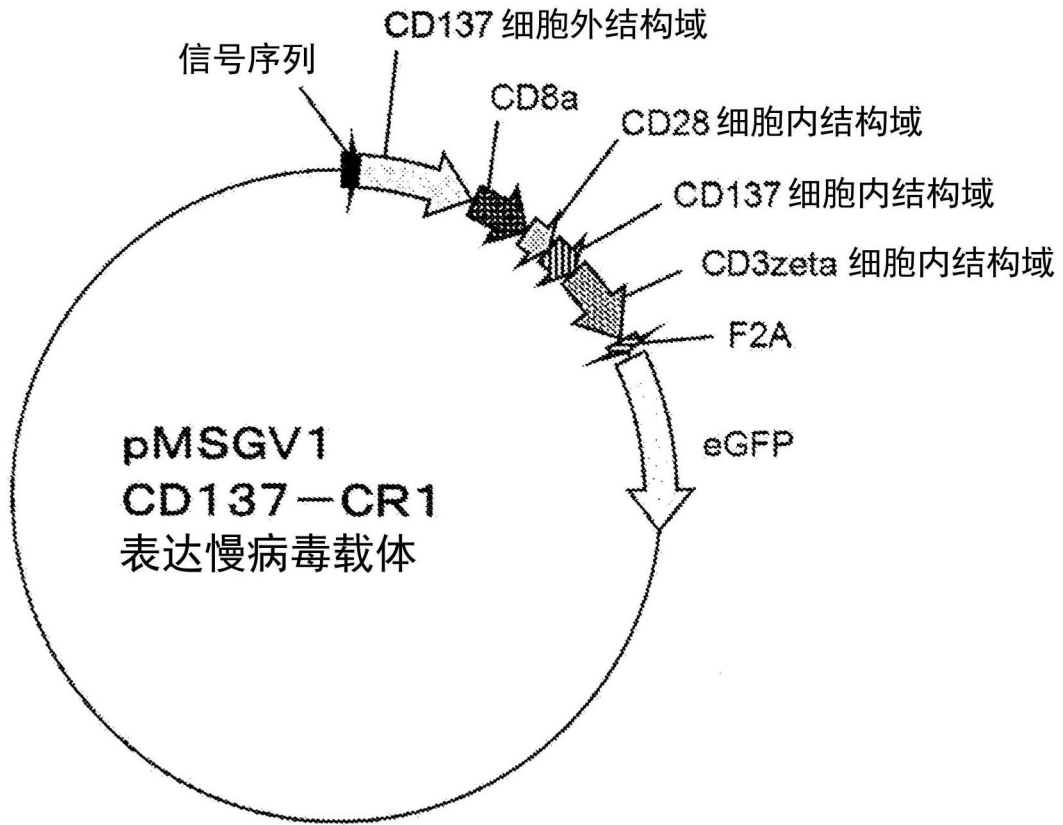


图7

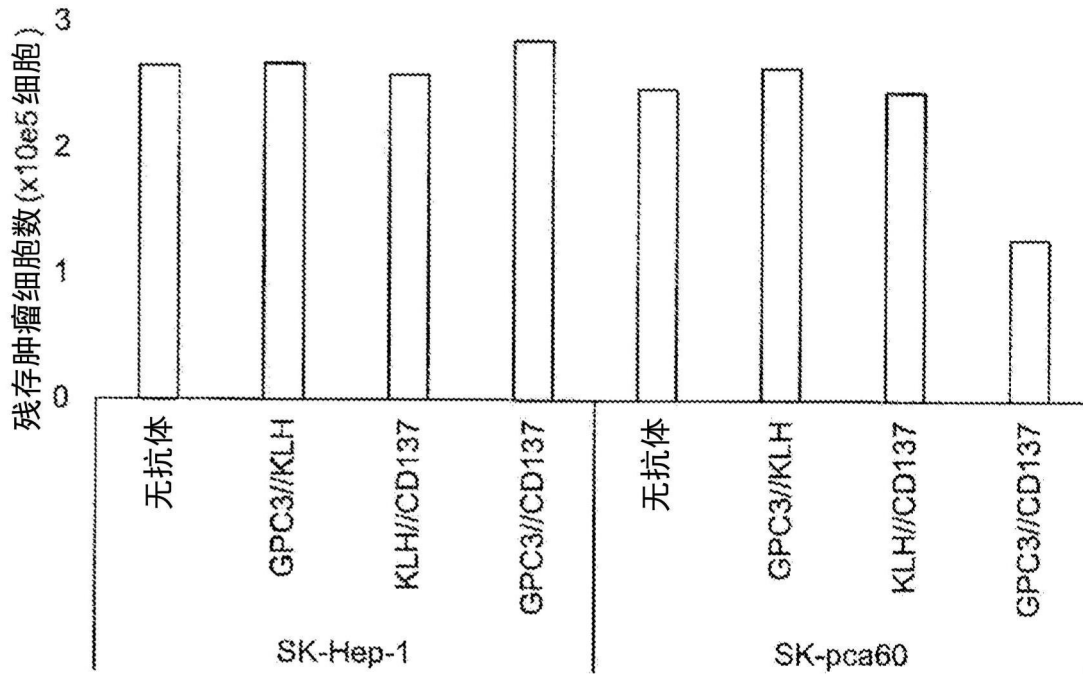


图8A

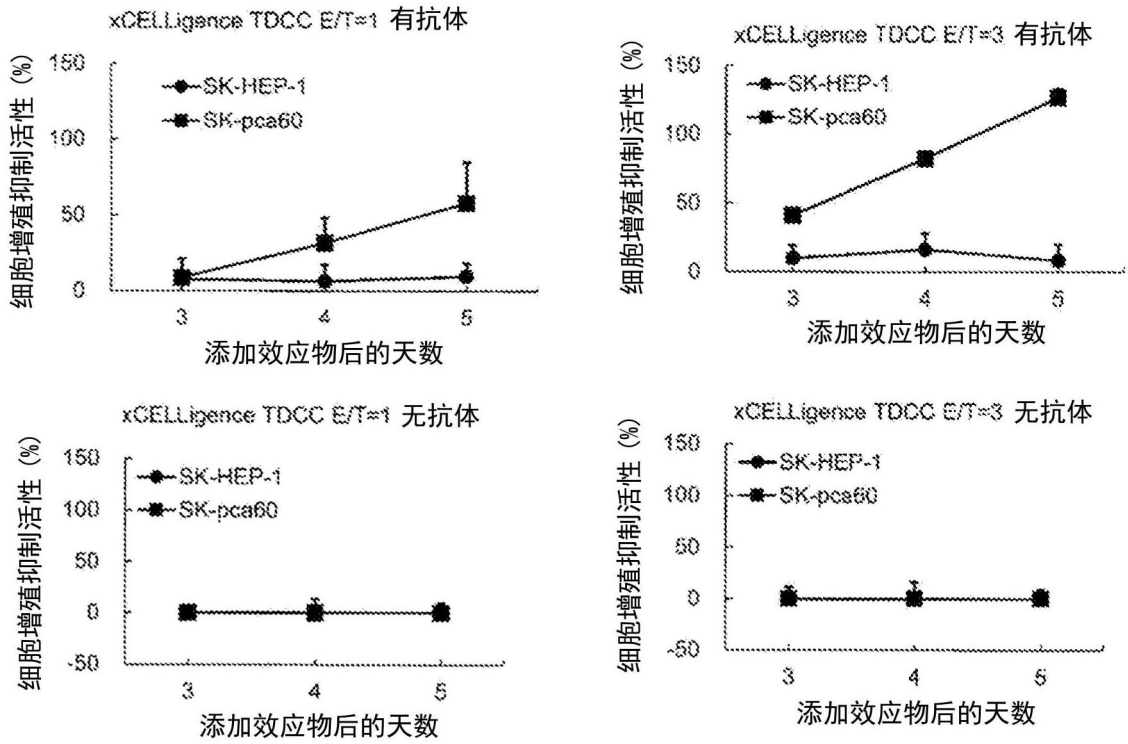


图8B

配体表达细胞

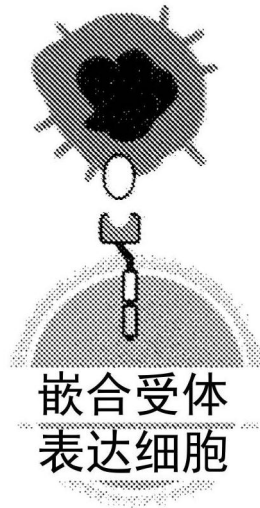


图9

与 SK-pca60 细胞的共培养

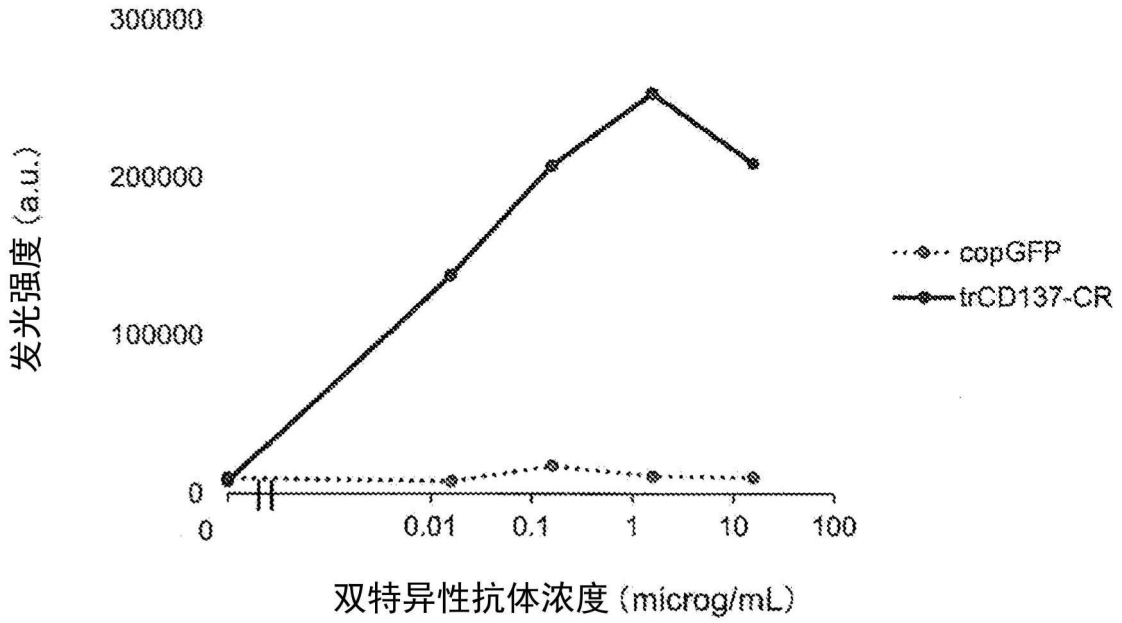


图10

与 SK-pca60 细胞的共培养

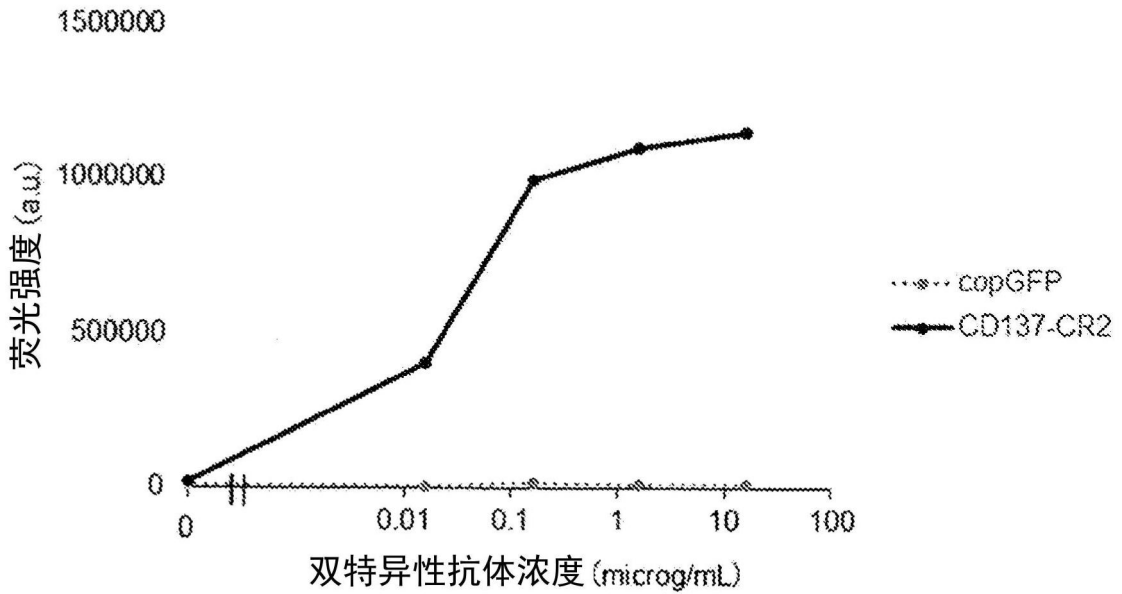


图11

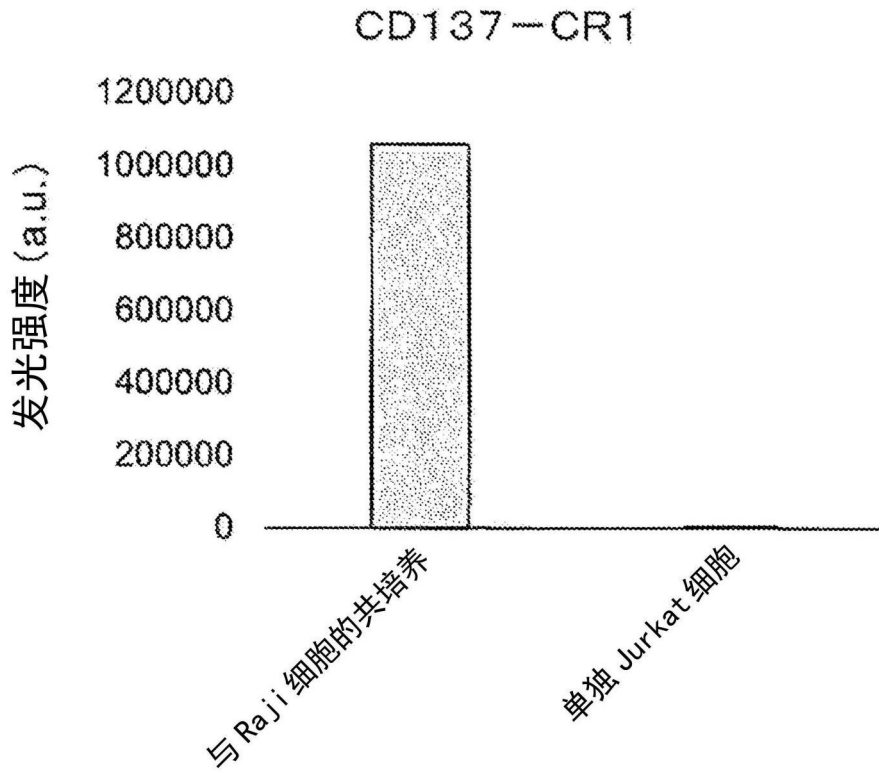


图12A

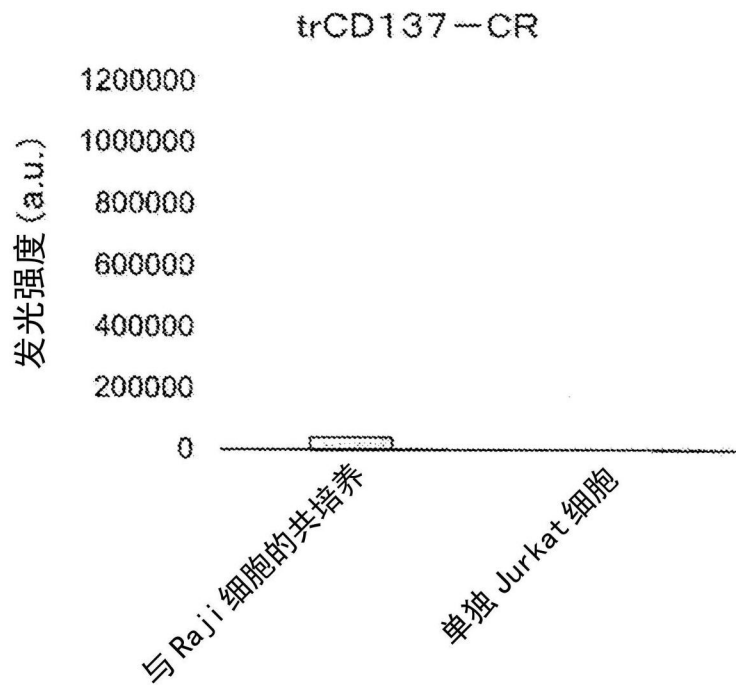


图12B

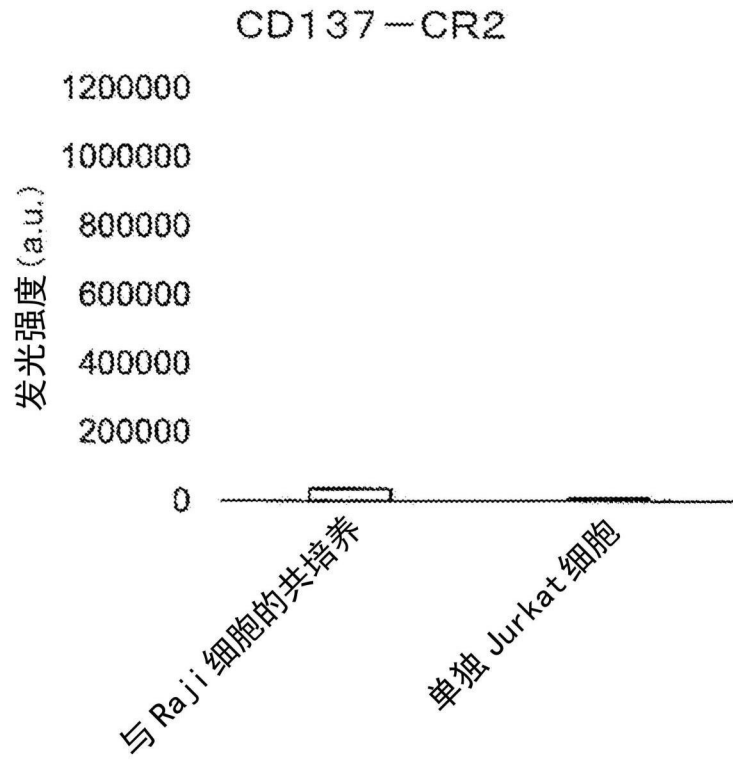


图12C

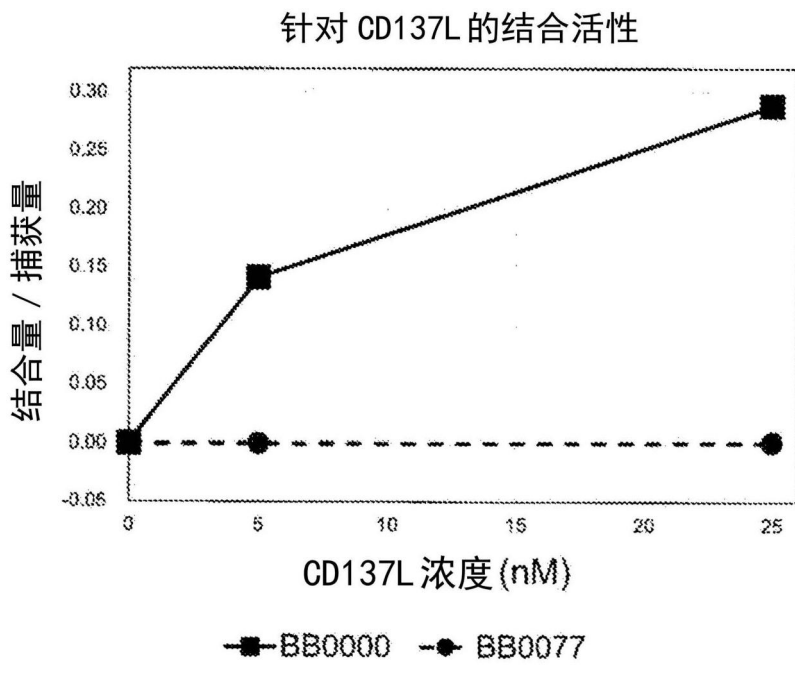


图13

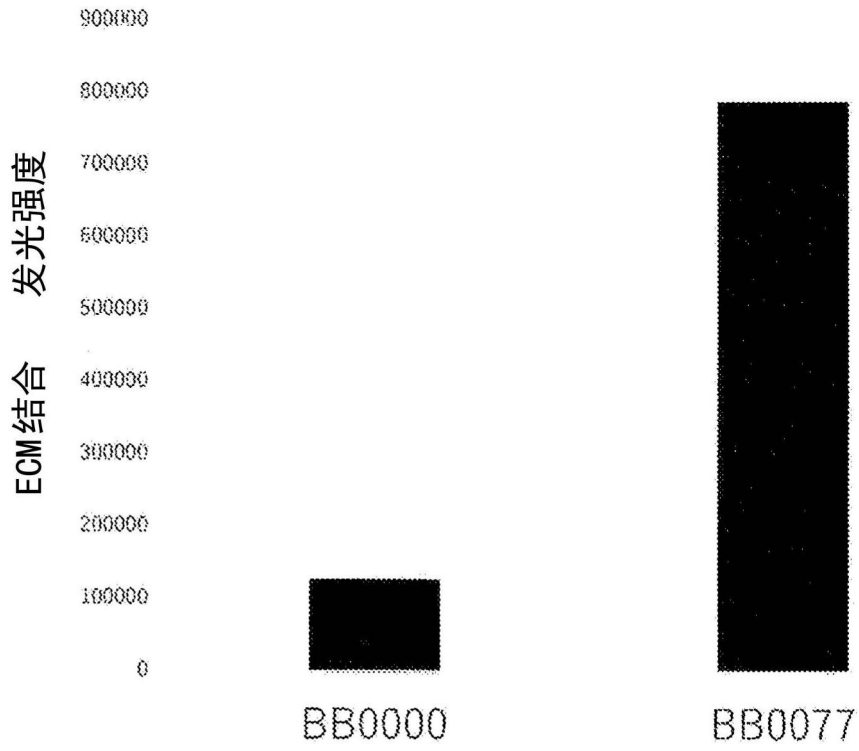


图14

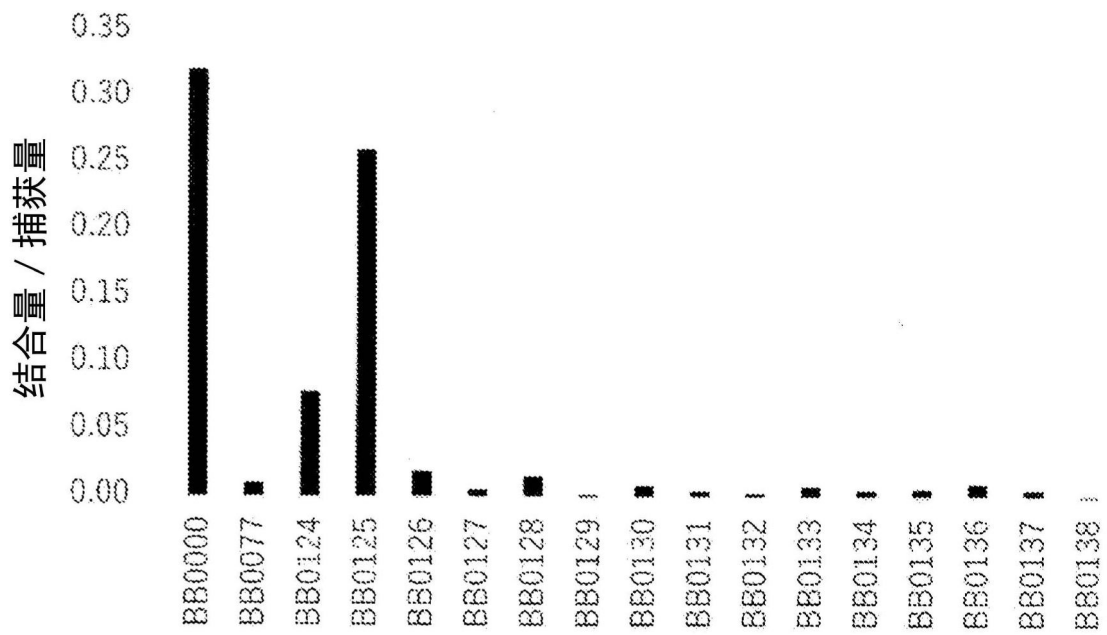


图15

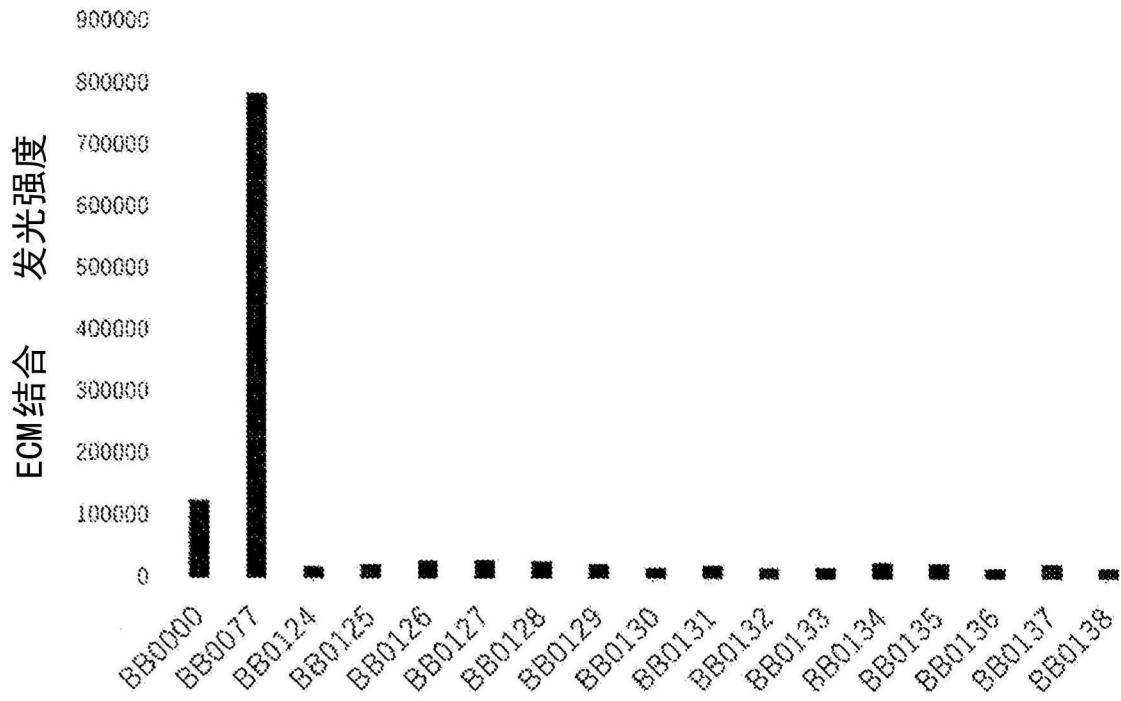


图16A

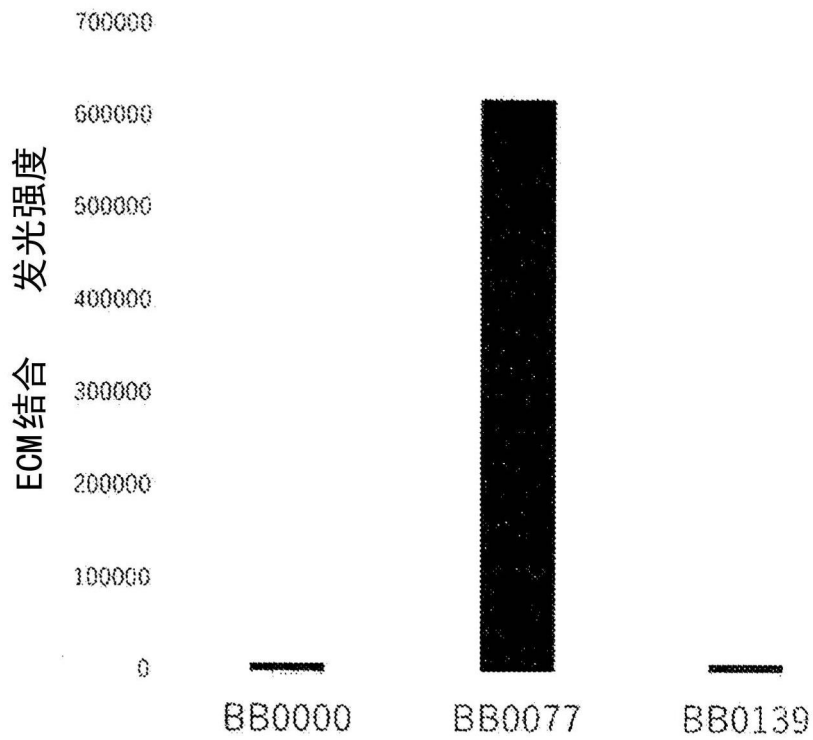


图16B

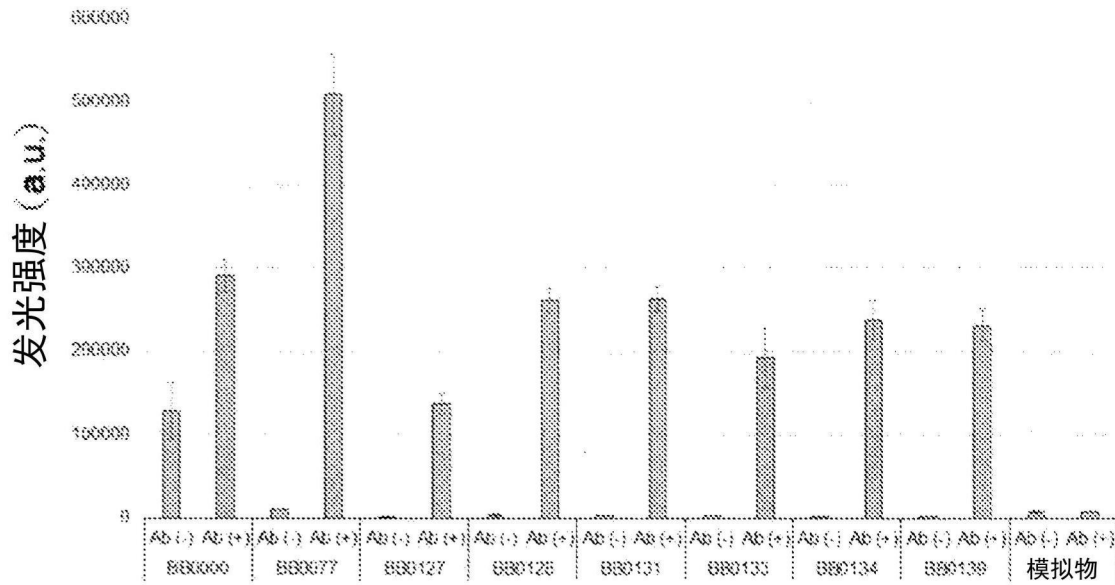


图17

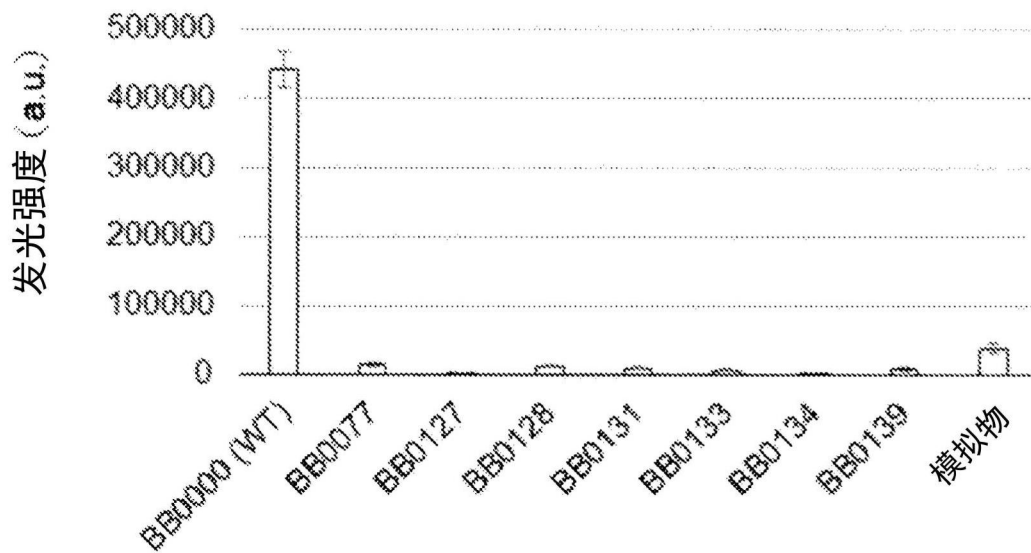


图18

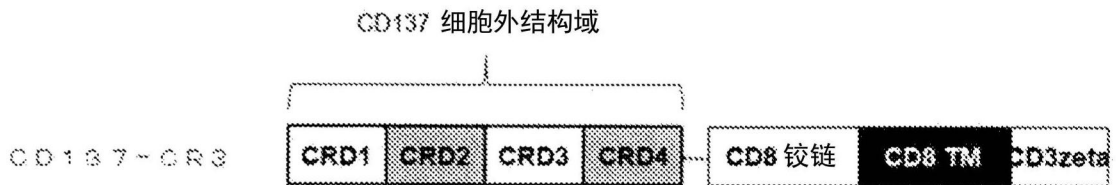


图19

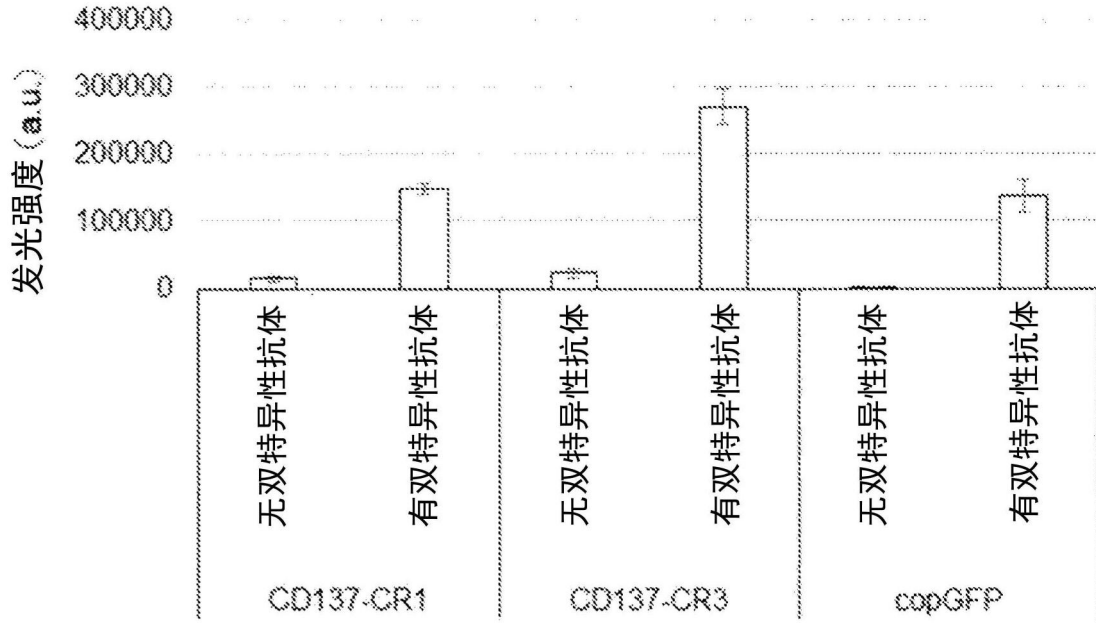


图20

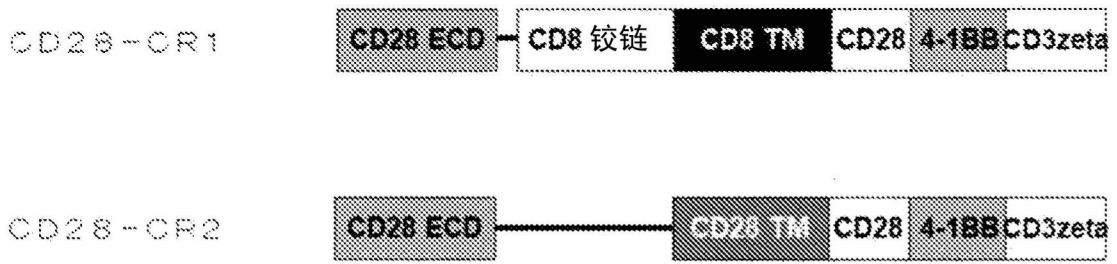


图21

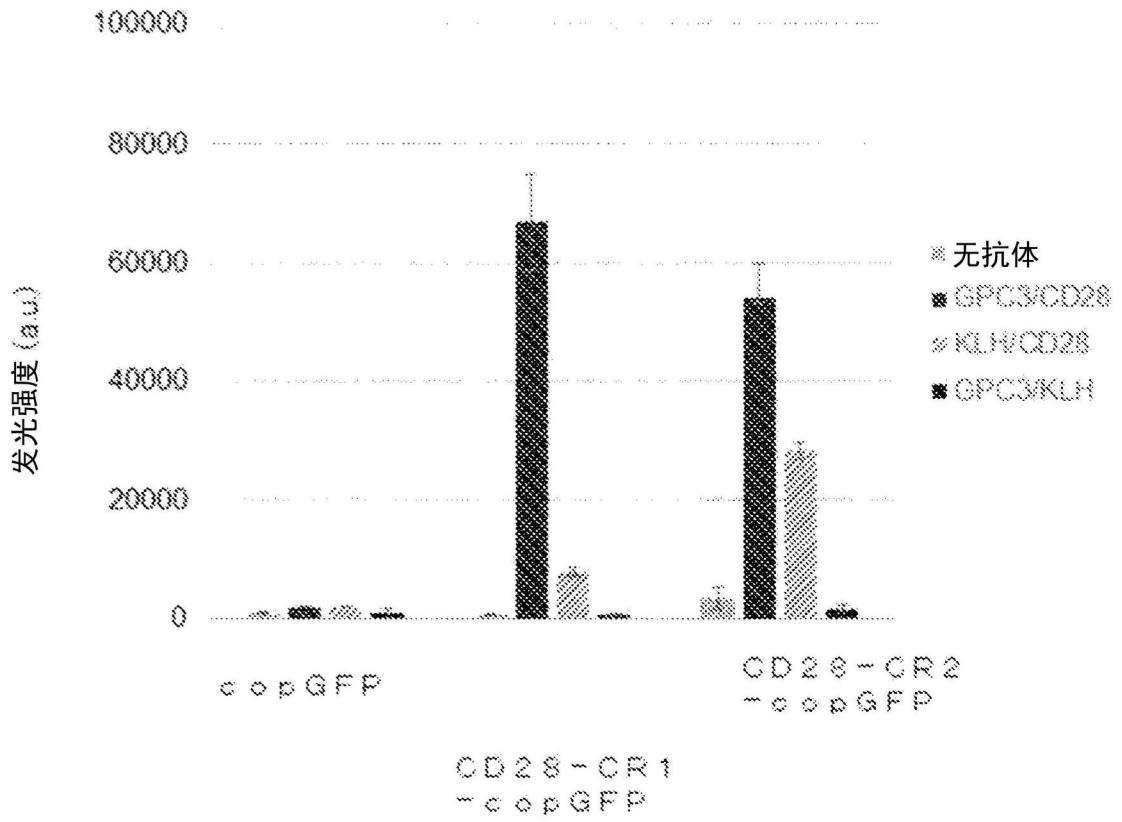


图22