



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112062855 B

(45) 授权公告日 2024.08.30

(21) 申请号 202010873215.X

A61K 47/68 (2017.01)

(22) 申请日 2020.08.26

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112062855 A

(56) 对比文件

CN 108059680 A, 2018.05.22

CN 111138545 A, 2020.05.12

(43) 申请公布日 2020.12.11

(73) 专利权人 北京天诺健成医药科技有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观镇生命

园路8号院一区9号楼1层102-B

审查员 奚静

(72) 发明人 王莹 徐刚 陈博

(74) 专利代理机构 北京植德律师事务所 11780

专利代理师 唐华东

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书3页 说明书39页

序列表59页 附图20页

(54) 发明名称

一种含有衔接器的药物治疗剂的开发和应用

(57) 摘要

本公开涉及一种结合CD20和CD3的双特异性抗体及其用途。该双特异性抗体包含结合到靶细胞表面上的CD20的第一结合结构域和结合到T细胞表面上的CD3和的第二结合结构域。该双特异性抗体耐受良好,低剂量条件下即可有效清除B细胞,疗效和安全性均优于同类抗体。

1. 一种双特异性抗体或其抗原结合部分,其包含结合到靶细胞表面上的CD20的第一结合结构域和结合到T细胞表面上的CD3的第二结合结构域,其中,所述第一结合结构域包含第一轻链和第一重链,所述第一结合结构域的第一轻链包含如氨基酸序列SEQ ID NO:61所示的轻链CDR1,如氨基酸序列SEQ ID NO:62所示的轻链CDR2,如氨基酸序列SEQ ID NO:63所示的轻链CDR3;和,所述第一结合结构域的第一重链包含如氨基酸序列SEQ ID NO:76所示的重链CDR1,如氨基酸序列SEQ ID NO:77所示的重链CDR2,如氨基酸序列SEQ ID NO:85所示的重链CDR3;以及,

所述第二结合结构域包含如氨基酸序列SEQ ID NO:7所示的轻链CDR1,如氨基酸序列SEQ ID NO:8所示的轻链CDR2,如氨基酸序列SEQ ID NO:21所示的轻链CDR3;和如氨基酸序列SEQ ID NO:26所示的重链CDR1,如氨基酸序列SEQ ID NO:27所示的重链CDR2,如氨基酸序列SEQ ID NO:28所示的重链CDR3。

2. 根据权利要求1所述的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域包含选自如下的第一轻链和第一重链:

(1) 如氨基酸序列SEQ ID NO:100所示的第一轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:98所示的第一重链;

(2) 如氨基酸序列SEQ ID NO:102所示的第一轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:104所示的第一重链;

(3) 如氨基酸序列SEQ ID NO:110所示的第一轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:112所示的第一重链;或

(4) 如氨基酸序列SEQ ID NO:118所示的第一轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:120所示的第一重链。

3. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中,所述第二结合结构域包含选自如下的第二轻链和第二重链:

(1) 如氨基酸序列SEQ ID NO:92所示的第二轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:90所示的第二重链;

(2) 如氨基酸序列SEQ ID NO:106所示的第二轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:108所示的第二重链;或

(3) 如氨基酸序列SEQ ID NO:114所示的第二轻链,和如氨基酸序列SEQ ID NO:116所示的第二重链。

4. 根据权利要求1或2所述的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中,所述的双特异性抗体包含:

(1) 如氨基酸序列SEQ ID NO:100所示的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:98所示的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:92所示的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:90所示的第二重链;

(2) 如氨基酸序列SEQ ID NO:102所示的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:104所示的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:106所示的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:108所示的第二重链;

(3) 如氨基酸序列SEQ ID NO:110所示的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:112所示的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:114所示的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:116所示

的第二重链；

(4) 如氨基酸序列SEQ ID NO:118所示的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:120所示的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:114所示的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:116所示的第二重链；

(5) 如氨基酸序列SEQ ID NO:110所示的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:112所示的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:106所示的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:108所示的第二重链；或

(6) 如氨基酸序列SEQ ID NO:102所示的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:104所示的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:114所示的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:116所示的第二重链。

5. 编码根据权利要求1-4任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸。

6. 根据权利要求5所述的核酸,其中,所述第一轻链的编码核酸选自如SEQ ID NO:101、103、111、119所示的核酸序列；

所述第一重链的编码核酸选自如SEQ ID NO:99、105、113、121所示的核酸序列；

所述第二结合结构域的轻链的编码核酸选自如SEQ ID NO:93、107、115所示的核酸序列；

所述第二结合结构域的重链的编码核酸选自如SEQ ID NO:91、109、117所示的核酸序列。

7. 含有权利要求5或6所述核酸的载体。

8. 含有权利要求5或6所述的核酸或权利要求7所述载体的细胞。

9. 一种组合物,其包含权利要求1-4任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分、权利要求5或6所述的核酸、权利要求7所述的载体和/或权利要求8所述的细胞。

10. 一种抗体-药物偶联物,其包含共价附着至治疗部分的权利要求1-4任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分。

11. 根据权利要求10所述的抗体-药物偶联物,其中,所述治疗部分选自细胞毒性部分、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。

12. 根据权利要求11所述的抗体-药物偶联物,其中,所述细胞毒性部分选自以下:紫杉醇;细胞松弛素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;吐根碱;丝裂霉素;依托泊苷;替尼泊苷;长春新碱;长春碱;秋水仙碱;多柔比星;柔红霉素;二羟基蒽二酮;微管蛋白抑制剂;抗有丝分裂剂;海兔毒素10或15;伊立替康;米托蒽醌;光辉霉素;放线菌素D;1-脱氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉素;卡奇霉素;抗代谢药;烷化剂;铂类;多卡霉素A、多卡霉素SA、雷切霉素(CC-1065);抗生素;吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB);白喉毒素及相关分子、蓖麻毒素、霍乱毒素、志贺样毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、蒴莲根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -sarcin、油桐(Aleuritesfordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白、苦瓜(momordicacharantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素毒素;核糖核酸酶(RNase);DNase I、葡萄球菌内毒素A;商陆抗病毒蛋白;白喉毒素和假单胞菌内毒素;

所述细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、

IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF α ;

所述放射性同位素选自 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。

13. 根据权利要求12所述的抗体-药物偶联物,其中,

所述微管蛋白抑制剂为美登素;

所述抗有丝分裂剂为单甲基奥瑞他汀E或F;

所述抗代谢药为甲氨喋呤、6巯基嘌呤、6硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5氟尿嘧啶、癸二嗪、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨;

所述烷化剂为二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴嗪或丝裂霉素C;

所述铂类为顺铂或卡铂;所述抗生素为放线菌素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素(AMC);

所述白喉毒素及相关分子为白喉A链及其活性片段和杂合分子;

所述蓖麻毒素为蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素;

所述志贺样毒素为SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素或志贺毒素;

所述美洲商陆蛋白为PAPI、PAPII或PAP-S。

14. 一种试剂盒,其含权利要求1-4任一项所述的特异性抗体或其抗原结合部分、权利要求5或6所述的核酸、权利要求7所述的载体、权利要求8所述的细胞、权利要求9所述的组合物和/或权利要求10-13中任一项所述的抗体-药物偶联物。

15. 权利要求1-4任一项所述的特异性抗体或其抗原结合部分、权利要求5或6所述的核酸、权利要求7所述的载体、权利要求8所述的细胞、权利要求9所述的组合物和/或权利要求10-13任一项所述的抗体-药物偶联物在制备用于治疗与CD20相关病症的药物或试剂盒中的用途,所述与CD20相关病症选自非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤(MZL),以及多发性骨髓瘤(MM)和霍奇金淋巴瘤(HL)。

一种含有衔接器的药物治疗剂的开发和应用

技术领域

[0001] 本公开涉及一种双特异性抗体及其用途,特别是结合CD20和CD3的双特异性抗体及其用途。

背景技术

[0002] CD20是一种在B淋巴细胞表面表达的糖基化膜蛋白,除了前体B细胞和终末期的浆细胞,人B细胞在几乎整个分化周期均表达CD20抗原(Tedder等,J.Immunol.135(2):973-979,1985)。CD20也是一种B细胞肿瘤相关抗原,在95%以上的B细胞非霍奇金淋巴瘤(B-NHL)和其他B细胞恶性肿瘤中表达(Anderson等,Blood 63(6):1424-1433,1984)。1997年,针对CD20的嵌合抗体Rituximab批准上市,接受Rituximab和其他药物联合治疗后,患者的5年存活率平均可达60-70%。第二代CD20抗体Ofatumumab(Teeling等,Blood 104(6):1793-800,2004)和第三代CD20抗体obinutuzumab、Ocrelizumab等被开发用于慢性淋巴细胞白血病或多发性硬化症的治疗。尽管CD20单抗对多数B-NHL患者有疗效,但仍有10%以上的患者属于原发难治性病例。另外,Rituximab治愈患者中,约30-40%患者会在2-3年内出现复发,并对现有治疗产生耐药,平均生存期仅6.3个月。因此,急需针对这部分患者的需求开发具有新机制的治疗药物。

[0003] T细胞双特异抗体(或称T细胞衔接器),是一种人为构建的特殊抗体分子,可通过其一端识别靶细胞表面抗原(抗原臂),通过另一端结合T细胞CD3受体(CD3臂)。利用靶向CD3 ϵ 链的抗体,以一种类似于TCR/肽/HLA的方式,使T细胞上的CD3发生聚集,从而活化T细胞并杀伤肿瘤。上世纪80年代,即有报道利用双特异抗体杀伤肿瘤细胞(Nature.1985 Apr 18-24;314(6012):628-31;Nature.1985 Jul 25-31;316(6026):354-6),2005年Gall等报道利用CD20 \times CD3双特异抗体杀伤Rituximab耐药的肿瘤细胞(2005 Experimental Hematology 33:452);类似的报道还有,Stanglmaier等从小鼠和大鼠IgG构建的双特异抗体Bi20/FBTA05(Int.J.Cancer:123,1181,2008),Wu等开发的新型DVD-Ig抗体(Nat Biotechnol.25:1290-1297,2007);Sun等基于CD3抗体UCHT1开发的CD20-TDB双特异抗体(Science translational medicine.2015;7:287ra270-287ra270)和Smith等基于VelocImmune小鼠开发的REGN1979(Clin Trans Immunol.2015;4:e31)等。

[0004] CD20 \times CD3双特异性分子是靶向B细胞上表达的CD20和T细胞上存在的CD3 ϵ 链(CD3e)的T细胞双特异性(TCB)抗体。CD20 \times CD3双特异性分子的作用机制包含同时结合CD20⁺B细胞和CD3⁺T细胞,引起T细胞活化和T细胞介导的B细胞杀伤。

[0005] 正常免疫应答过程中,TCR以低亲和力(约1-100 μ M)结合感染或突变细胞上的外源肽-人白细胞抗原复合物(HLA),通过CD3将活化信号传导到核内,激活转录因子及其下游蛋白(细胞因子、颗粒酶、穿孔素等)的表达,其中TCR复合物产生的信号强度将决定T细胞的命运。信号传导复合物的 ϵ 、 γ 、 δ 以及 ζ 亚基彼此缔合以形成CD3 ϵ - γ 异源二聚体、CD3 ϵ - δ 异源二聚体以及CD3 ζ - ζ 同源二聚体。而早期开发的CD3双特异抗体,多基于OKT3、L2K、UCHT1和TR66等少数鼠源抗体,亲和力较高。在临床研究中发现,CD3抗体的亲和力过强将导致T细胞

过度活化,并释放大量的细胞因子,形成细胞因子风暴综合征;同时,高亲和力也会导致双特异抗体在二级淋巴器官的富集,减低在肿瘤组织的暴露。抗体Fc部分与Fc γ 受体的结合能力是另一个对影响药物安全的重要因素,由于Fc γ 受体在多种正常组织表达,双特异抗体通过Fc与细胞膜上的Fc γ 受体结合后,可导致另一端结合的CD3受体因Fc γ 受体聚集而交联活化,从而产生严重的脱靶毒性,例如:早期上市的catumaxomab由于Fc段与肝脏Kupffer细胞表达的Fc γ 受体结合,引发了快速的细胞因子释放。通过使用Fc γ 受体结合能力较弱的人IgG2亚型或IgG4亚型,或者进一步在CH2相应位点进行氨基酸替换,如:Armour等将IgG1和IgG4的第233-236位点(EU序列编号)替换成IgG2相应序列,减少了和Fc γ 受体的结合(Eur. J. Immunol. 1999),Newman等在IgG4引入突变Ser228Pro和Leu235Glu,稳定IgG4结构同时减少与Fc γ 受体的结合(Clin Immunol. 2001),Idusogie等发现将Asp270、Lys322、Pro329或Pro331分别替换成Ala,可减少IgG1与补体C1q的结合(J Immunol. 2000)等。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明提供了一种新型CD20-CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体,采用全长IgG构型,通过引入电荷及亲和力优化,使 $\kappa\lambda$ 双特异抗体优先定位到CD20⁺肿瘤组织,低浓度下即可募集活化T细胞,对靶细胞产生有效杀伤,无靶细胞存在时不激活T细胞;同时, $\kappa\lambda$ 双特异抗体不与Fc γ RI、Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA等受体结合,减低了产生细胞因子风暴的风险。药效试验证实,这种新型CD20-CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体在极低剂量,即可抑制肿瘤生长,有效抑制免疫重建小鼠移植瘤的生长;在食蟹猴体内进行的毒理研究也显示,动物对新型CD20-CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体耐受良好,低剂量条件下即可有效清除B细胞,新型CD20-CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的疗效和安全性均优于同类抗体。

[0007] 因此,在一方面,本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分。

[0008] 在一方面,本公开提供了编码如前述方面的双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸。

[0009] 在一方面,本公开提供了包含前述方面的核酸的载体。

[0010] 在一方面,本公开提供了包含前述方面的核酸或载体的细胞。

[0011] 根据前述任一方面的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化的。

[0012] 在一方面,本公开提供了包含如前述任一方面的抗体或其抗原结合部分或其编码核酸和药学上可接受的载体的药物组合物或试剂盒。

[0013] 在一方面,本公开提供了包含共价附着至治疗部分的前述任一方面所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子的抗体-药物偶联物。

[0014] 在一方面,本公开提供了治疗与CD20相关病症的方法,其包括下述步骤:向所述哺乳动物施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞和/或药物组合物。

[0015] 在一方面,本公开提供了前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞和/或药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中与CD20相关病症的药物或试剂盒中的用途。

[0016] 本发明的抗体可以用于多种应用,包括检测CD20蛋白,诊断、治疗或预防与CD20相

关的疾病。

附图说明

- [0017] 图1示出了流式细胞检测人和猴CD20稳转细胞,人CD20稳转细胞(CHO-hCD20-3G6)和猴CD20稳转细胞(CHO-cyCD20-1G9)均表达高水平的CD20。
- [0018] 图2示出了CD3 ϵ γ -Fc重组蛋白的SDS-PAGE结果。
- [0019] 图3示出了人源化CD3抗体与CD3 ϵ γ -Fc重组蛋白的结合。
- [0020] 图4示出了人源化CD3抗体与Jurkat细胞的结合。
- [0021] 图5示出了人源化CD20抗体与Raji细胞的结合。
- [0022] 图6示出了人源化CD20抗体与Daudi细胞的结合。
- [0023] 图7示出了CD20 \times CD3抗体组合与Raji细胞的结合。
- [0024] 图8示出了CD20 \times CD3抗体组合与Jurkat细胞的结合
- [0025] 图9示出了不同CD20 \times CD3抗体组合对Raji细胞的杀伤活性和T细胞的激活,其中,图9A示出了不同CD20 \times CD3抗体组合介导的TDCC杀伤作用;图9B示出了在TDCC杀伤过程中,CD20 \times CD3抗体组合可刺激T细胞活化标志物CD69和CD25上调。
- [0026] 图10示出了不同CD20 \times CD3抗体组合对NFAT通路的特异性激活。
- [0027] 图11示出了本发明的CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体。
- [0028] 图12示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的毛细管电泳结果。
- [0029] 图13示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的纯化。
- [0030] 图14示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的质谱结果。
- [0031] 图15示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与CD20稳转细胞的结合。
- [0032] 图16示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体高亲和力结合CD20⁺肿瘤细胞。
- [0033] 图17示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与人和食蟹猴CD3 ϵ γ 重组抗原的结合。
- [0034] 图18示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与Jurkat细胞的结合。
- [0035] 图19示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与人外周血T细胞的结合。
- [0036] 图20示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对Na1m-6细胞的杀伤和T细胞的活化,其中,图20A显示对Na1m-6细胞的杀伤,图20B显示对T细胞的活化。
- [0037] 图21示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对TMD-8细胞的杀伤和T细胞的活化,其中,图21A显示对TMD-8细胞的杀伤,图21B显示对T细胞的活化。
- [0038] 图22示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对Toledo细胞的杀伤和T细胞的活化,其中,图22A显示对Toledo细胞的杀伤,图22B显示对T细胞的活化。
- [0039] 图23示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对T细胞信号通路的活化。
- [0040] 图24-26示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体激活细胞因子的释放,其中,图24示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对Raji细胞的TDCC活性及过程中T细胞的活化;图25示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对自体B细胞的清除及过程中T细胞的活化;图26示出了对Raji细胞的杀伤和对自体B细胞的清除过程中相关细胞因子的释放。
- [0041] 图27示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对免疫缺陷型小鼠皮下Raji移植瘤模型的抑制作用。
- [0042] 图28-29示出了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对人PBMC与Raji混合接种免疫缺陷型小

鼠皮下接瘤模型的抑制作用,其中图29示出了低剂量组治疗效果的对比。

[0043] 图30示出了CD20×CD3κλ双特异抗体给药后食蟹猴B细胞被快速清除。

具体实施方式

[0044] I. 定义

[0045] 在本发明中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时,为了更好地理解本发明,下面提供相关术语的定义和解释。

[0046] CD20(也称作B淋巴细胞抗原CD20,B淋巴细胞表面抗原B1,Leu-16,Bp35,BM5,和LF5;人蛋白质在UniProt数据库条目P11836中表征)是一种在前B和成熟B淋巴细胞上表达的具有大约35kD分子量的疏水性跨膜蛋白(Valentine,M.A.et al.,J.Biol.Chem.264(1989)11282-11287;Tedder,T.F.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85(1988)208-212;Stamenkovic,I.et al.,J.Exp.Med.167(1988)1975-1980;Einfeld,D.A.et al.,EMBO J.7(1988)711-717;Tedder,T.F.et al.,J.Immunol.142(1989)2560-2568)。相应的人基因是跨膜4域,亚家族A,成员1,也称作MS4A1。此基因编码跨膜4A基因家族的一个成员。此初生蛋白质家族的成员特征在于共同的结构特征和相似的内含子/外显子剪接边界且在造血细胞和非淋巴样组织中展示独特的表达样式。此基因编码在B细胞发育和分化成浆细胞中发挥作用的B淋巴细胞表面分子。在一簇家族成员中,此家族成员定位于11q12。此基因的可变剪接产生编码同一蛋白质的两种转录物变体。

[0047] 如本文中使用的,术语“CD20”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,诸如灵长动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD20,除非另外指明。该术语涵盖“全长”,未加工的CD20以及源自细胞中加工的任何形式的CD20。该术语还涵盖CD20的天然发生变体,例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中,CD20是人CD20。一种例示性人CD20的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:1。

[0048] 术语“抗CD20抗体”和“结合CD20的抗体”指能够以足够亲和力结合CD20,使得该抗体作为诊断剂和/或治疗剂在靶向CD20中是有用的抗体。在一个实施方案中,抗CD20抗体对无关非CD20蛋白的结合程度小于该抗体对CD20的结合的约10%,如通过例如放射免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中,结合CD20的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中,抗CD20抗体结合在来自不同物种的CD20间保守的CD20表位。

[0049] “CD3”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物,诸如灵长动物(例如人),非人灵长动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD3,除非另外指明。该术语涵盖“全长”未加工的CD3以及源自细胞中加工的任何形式的CD3。该术语还涵盖CD3的天然发生变体,例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中,CD3是人CD3,特别是人CD3的厄普西隆亚基(CD3ε)。人CD3ε的氨基酸序列显示于UniProt(www.uniprot.org)登录号P07766(版本144),或NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/)RefSeq NP_000724.1。食蟹猴[*Macaca fascicularis*]CD3ε的氨基酸序列显示于NCBI GenBank no.BAB71849.1。

[0050] 术语“细胞表面”的使用是根据其在本领域的正常含义,因此包括可通过与蛋白和其它分子结合而接近的细胞外部。

[0051] 如本文使用的和除非另作说明,术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的加或减10%之内。在需要整数的情况下,该术语是指在给定值或范围的加或减10%之内、向上或向下舍入到最接近的整数。

[0052] 就抗体链多肽序列而言,短语“基本相同”可理解为表现出与参照多肽序列至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的抗体链。就核酸序列而言,该术语可理解为表现出与参照核酸序列至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核苷酸序列。

[0053] 序列“相同性”或“同一性”具有本领域公认的含义,并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性(参见,例如:Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法,但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073(1988))。

[0054] “取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的,其中该分子中仅有一个氨基酸被取代;或可为多个的,其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样,一个氨基酸可被多个残基取代,其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或多个氨基酸被除去的变体。通常情况下,缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

[0055] 就抗体的可变结构域而言,术语“可变”系指抗体之间有广泛序列差异的相关分子的某些部分,且被用于针对其特异靶的特定抗体的特异识别和结合。但是,可变性在抗体的整个可变结构域内不是均匀分布的。可变性集中在被称为互补决定区域(CDRs;即CDR1、CDR2和CDR3)或超变区的三个区段,它们均位于轻链和重链的可变结构域内。可变结构域内保守程度更高的部分被称为构架(FR)区或构架序列。天然重链和轻链的每个可变结构域均包括四个FR区,其主要采用 β -折叠构型,它们籍三个CDRs连接起来,CDRs形成环,所述环连接 β -折叠结构并在某些情形下形成部分的 β -折叠结构。每条链的CDRs通常被FR区在邻近连接起来,并且借助于来自其它链的CDR,有助于抗体靶结合位点(表位或决定簇)的形成(参看Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD(1987))。正如本文所使用,免疫球蛋白氨基酸残基的编号是依据

Kabat等人的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统而进行的,除非另有说明。一个CDR可具有特异结合关联表位的能力。

[0056] 如本文所用,抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”指全长抗体的任何部分,其少于全长,但是至少包含结合抗原的所述抗体的部分可变区(例如一个或多个CDR和/或一个或多个抗体结合位点),并且因此保留结合特异性以及所述全长抗体的至少部分特异性结合能力。因此,抗原结合片段指包含与衍生抗体片段的抗体结合相同抗原的抗原结合部分的抗体片段。抗体片段包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物,以及合成产生的衍生物,例如重组产生的衍生物。抗体包括抗体片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd和Fd'片段以及其他片段,包括修饰的片段(参见,例如,Methods in Molecular Biology, Vol 207: Recombinant Antibodies for Cancer Therapy Methods and Protocols (2003); Chapter 1; p 3-25, Kipriyanov)。所述片段可以包括连接在一起的多条链,例如通过二硫键和/或通过肽接头。抗体片段一般包含至少或约50个氨基酸,并且典型至少或约200个氨基酸。抗原结合片段包括任何抗体片段,其在被插入抗体框架(例如通过置换相应区域)时获得免疫特异性地结合(即表现出至少或至少约 10^7 - 10^8 M⁻¹的K_a)抗原的抗体。“功能片段”或“抗CD20抗体的类似物”是可防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段或类似物。正如本文所使用,功能片段一般与“抗体片段”含义相同,且就抗体而论,可指能防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段,例如Fv、Fab、F(ab')₂等等。“Fv”片段由一条重链的可变结构域和一条轻链的可变结构域籍非共价结合方式而形成的二聚体(V_H-V_L二聚体)组成。在该构型中,每个可变结构域的三个CDRs相互作用,以确定V_H-V_L二聚体表面上的靶结合位点,与完整抗体的情况一样。所述六个CDRs共同赋予完整抗体的靶结合特异性。但是,即使是单个可变结构域(或仅包括3个靶特异的CDRs的Fv的一半),仍可具有识别和结合靶的能力。

[0057] 如本文中所示,术语“双特异性”(Bispecific antibody, BsAb)指抗体和/或抗原结合分子能够特异性结合两种不同的抗原性决定簇,通常,双特异性抗体和/或抗原结合分子包含两种抗原结合位点,其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中,所述双特异性抗体和/或抗原结合分子能够同时结合两种抗原决定簇,特别是在两种不同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。

[0058] 如本文所用,“单克隆抗体”指相同抗体的群体,表示单克隆抗体群体中的每个单独的抗体分子与其他抗体分子相同。这种特性与抗体的多克隆群体的特性相反,所述抗体的多克隆群体包含具有多种不同序列的抗体。单克隆抗体可以通过许多公知的方法来制备(Smith et al. (2004) J. Clin. Pathol. 57, 912-917; 和 Nelson et al., J Clin Pathol (2000), 53, 111-117)。例如,单克隆抗体可以通过永生化B细胞来制备,例如通过与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系或者通过用诸如EBV的病毒感染B细胞。重组技术还可以用来在体外通过用携带编码抗体的核苷酸的人工序列的质粒转化宿主细胞来从宿主细胞的克隆群体制备抗体。

[0059] 如本文中所示,术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”指由融合产抗体的淋巴细胞和不产抗体的癌细胞而产生的细胞或细胞系(通常为骨髓瘤或淋巴瘤细胞)。如本领域普通技术人员所知的,杂交瘤可增殖并持续供应产生特定单克隆抗体。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知的(见例如, Harlow & Lane, 1988)。当提及术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”时,其还包括

杂交瘤的亚克隆和后代细胞。

[0060] 如本文所用,全长抗体是具有两条全长重链(例如VH-CH1-CH2-CH3或VH-CH1-CH2-CH3-CH4)和两条全长轻链(VL-CL)和铰链区的抗体,例如通过抗体分泌B细胞天然产生的抗体以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

[0061] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中可变区序列源自一个物种,恒定区序列源自另一物种,如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

[0062] “人源化”抗体是指非人(例如小鼠)抗体形式,其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或者抗体的其它抗原结合亚序列),含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中接受者抗体的互补决定区(CDR)的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠或者兔的CDR残基置换。

[0063] 此外,在人源化中,还可能对VH和/或VL的CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基进行突变,由此改善抗体的一或多种结合特性(例如亲和性)。可进行例如PCR介导的突变引入突变,其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常,引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外,CDR内的突变通常不超过一个或两个。因此,本发明所述人源化抗体还涵盖CDR内包含1或2两个氨基酸突变的抗体。

[0064] 如本文所用,术语“CDR”指互补决定区(complementarity-determining region),已知抗体分子的每个重链和轻链具有3个CDR。CDR也称作高变区,且存在于抗体的每个重链和轻链的可变区中,在CDR的一级结构中具有非常高的变异性位点。本说明书中,重链的CDR由来自重链的氨基端序列的氨基端的CDR1、CDR2、CDR3表示,轻链的CDR由来自轻链的氨基端序列的氨基端的CDR1、CDR2、CDR3表示。这些位点在三级结构中彼此临近,并决定抗体所结合的抗原的特异性。

[0065] 如本文所用,术语“表位”指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常包含分子的化学活性表面分型,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0066] 如本文所用,关于抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”或“免疫特异性地结合”在本文中可交换使用,并且指抗体或抗原结合片段通过抗体和抗原的抗体结合位点之间的非共价相互作用与同种抗原形成一个或多个非共价键的能力。所述抗原可以是分离的抗原或存在于肿瘤细胞。通常,免疫特异性地结合(或特异性结合)抗原的抗体是以约或 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 或 $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 或更大的亲和常数Ka(或者 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的解离常数(Kd))结合所述抗原。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来测定,例如,免疫测定、表面等离子共振(SPR)(Rich and Myszka(2000)Curr.Opin.Biotechnol 11:54;Englebienne(1998)Analyst.123:1599)、等温滴定量热法(ITC)或本领域已知的其他动力学相互作用测定(参见,例如,Paul,ed.,Fundamental Immunology,2nd ed.,Raven Press,New York,pages 332-336(1989);还参见描述用于计算抗体的结合亲和力的示例性SPR和ITC方法的美国专利第7,229,619号)。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是已知的,并且可商购(参见,BiaCore 2000,Biacore AB,Upsala,Sweden and GE Healthcare Life Sciences;Malmqvist(2000)Biochem.Soc.Trans.27:335)。

[0067] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物,包括通常通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。如本文所使用,术语“核酸分子”意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可为单链或双链,且可为cDNA。

[0068] 如本文所用,分离的核酸分子是从存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。诸如cDNA分子的“分离的”核酸分子可以在通过重组技术制备时基本上不含其他细胞物质或培养基,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学成分。本文所提供的示例性分离的核酸分子包括编码所提供的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子。

[0069] 如本文所用,关于核酸序列、区域、元件或结构域的“可操作地连接”表示核酸区域互相功能相关。例如,启动子可以可操作地连接至编码多肽的核酸,从而所述启动子调控或介导所述核酸的转录。

[0070] 亦提供本文所述序列中所述序列的“保守序列修饰”,即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸及氨基酸序列修饰。这些保守序列修饰包括保守核苷酸及氨基酸取代以及核苷酸及氨基酸添加及缺失。例如,可通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变及PCR介导的诱变)将修饰引入本文所述的序列中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代,其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是本领域中已有定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(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)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β 分枝侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,抗CD20抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的核苷酸及氨基酸保守取代的方法为本领域所熟知(例如,参见Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187(1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10):879-884(1999); Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417(1997))。

[0071] 作为另一选择,在另一实施方案中,可通过例如饱和诱变沿抗CD20抗体编码序列的全部或一部分随机引入突变,且可针对改良的结合活性筛选所得经修饰抗CD20抗体。

[0072] 如本文所用,“表达”指通过多核苷酸的转录和翻译产生多肽的过程。多肽的表达水平可以利用本领域已知的任何方法来评价,包括例如测定从宿主细胞产生的多肽的量的方法。这类方法可以包括但不限于通过ELISA定量细胞裂解物中的多肽,凝胶电泳之后考马斯蓝染色,Lowry蛋白测定以及Bradford蛋白测定。

[0073] 如本文所用,“宿主细胞”是用于接受、保持、复制和扩增载体的细胞。宿主细胞还可以用来表达载体所编码的多肽。当宿主细胞分裂时,载体中所含的核酸复制,从而扩增核酸。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。合适的宿主细胞包括但不限于CHO细胞、各种COS细胞、HeLa细胞、HEK细胞例如HEK 293细胞。

[0074] 如本文所用,“载体”是可复制的核酸,当载体转化入适当的宿主细胞时,可以从该载体表达一种或多种异源蛋白。关于载体包括那些通常通过限制酶切消化和连接可以将编

码多肽或其片段的核酸引入其中的载体。关于载体还包括那些包含编码多肽的核酸的载体。载体用来将编码多肽的核酸引入宿主细胞,用于扩增核酸或者用于表达/展示核酸所编码的多肽。载体通常保持游离,但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。还考虑人工染色体的载体,例如酵母人工载体和哺乳动物人工染色体。这类媒介物的选择和用途是本领域技术人员公知的。

[0075] 如本文所用,载体还包括“病毒载体”或“病毒的载体”。病毒的载体是工程化的病毒,其可操作地连接至外源基因以将外源基因转移(作为媒介物或穿梭(shuttle))入细胞。

[0076] 如本文所用,“表达载体”包括能够表达DNA的载体,所述DNA与诸如启动子区的能够影响这类DNA片段表达的调控序列可操作地连接。这类额外的片段可以包括启动子和终止子序列,并且任选地可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体一般来源于质粒或病毒DNA,或者可以包含这两者的元件。因此,表达载体指重组DNA或RNA构建体,例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体,当引入适当的宿主细胞时,导致克隆DNA的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的,并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

[0077] 如本文所用,“治疗”患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解,或者在治疗后保持不变。因此,治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药理学用途。

[0078] 如本文所用,“疗效”表示由个体的治疗所导致的效果,其改变、通常改良或改善疾病或疾病状况的症状,或者治愈疾病或疾病状况。

[0079] 如本文所用,“治疗有效量”或“治疗有效剂量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量。因此,其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

[0080] 如本文所用,“预防有效量”或“预防有效剂量”指在施用于对象时会具有预期的预防效果的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量,例如,防止或延迟疾病或症状的发生或复发,减少疾病或症状发生或复发的可能性。完全预防有效剂量不必通过施用一个剂量发生,并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此,预防有效量可以在一次或多次施用中施用。

[0081] 如本文中所使用的,术语“患者”是指哺乳动物,例如人。

[0082] II. 具体实施方案详述

[0083] 在一方面,本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分,其包含结合到靶细胞表面上的CD20的第一结合结构域和结合到T细胞表面上的CD3和的第二结合结构域,其中,所述第一结合结构域包含第一轻链和第一重链,所述第一轻链包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:56、57、58、61、62、63或其任何变体的轻链CDR,和/或所述第一重链包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:66、67、68、71、76、77、78、85或任何变体的重链CDR。

[0084] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域的第一轻链包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:56、61或其任何变体的轻链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:57、62或其任何变体的轻链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:58、63或其任何变体的轻

链CDR3;和/或所述第一结合结构域的第一重链包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:66、76或其任何变体的重链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:67、77或其任何变体的重链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:68、71、78、85或其任何变体的重链CDR3。

[0085] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域包含选自下列的轻链和重链的CDR组合:

[0086] (1)分别包含SEQ ID NO:56-58的第一轻链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:66-68的第一重链CDR1、CDR2及CDR3序列。

[0087] (2)分别包含SEQ ID NO:56-58的第一轻链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:66、67、71的第一重链CDR1、CDR2及CDR3序列。

[0088] (3)分别包含SEQ ID NO:61-63的第一轻链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:76-78的第一重链CDR1、CDR2及CDR3序列。

[0089] (4)分别包含SEQ ID NO:61-63的第一轻链CDR1、CDR2及CDR3序列,和/或分别包含SEQ ID NO:76、77、85的第一重链CDR1、CDR2及CDR3序列。

[0090] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:54、59或其任何变体的轻链可变区,和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:64、69、72、74、79、81、83或其任何变体的重链可变区。

[0091] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:54或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:64或其任何变体的第一重链可变区。

[0092] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:54或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:69或其任何变体的第一重链可变区。

[0093] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:54或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:72或其任何变体的第一重链可变区。

[0094] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:59或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:74或其任何变体的第一重链可变区。

[0095] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:59或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:79或其任何变体的第一重链可变区。

[0096] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:59或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:81或其任何变体的第一重链可变区。

[0097] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:59或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:83或其任何变体的第一重链可变区。

[0098] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:7、14或其任何变体的第二轻链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:8、15、20或其任何变体的第二轻链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:9、21或其任何变体的第二轻链CDR3;和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:26、31、46或其任何变体的第二重链CDR1,选自氨基酸序列SEQ ID NO:27、47或其任何变体的第二重链CDR2,选自氨基酸序列SEQ ID NO:28、34、37、40、43或其任何变体的第二重链CDR3。

[0099] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列SEQ ID NO:5、10、12、16、18、22或其任何变体的轻链可变区,和/或选自氨基酸序列SEQ ID NO:24、29、32、35、38、41、44、48、50、52或其任何变体的重链可变区。

- [0100] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:5或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:48或其任何变体的第二重链可变区。
- [0101] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:5或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。
- [0102] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:10或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。
- [0103] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:12或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。
- [0104] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:24或其任何变体的第二重链可变区。
- [0105] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:48或其任何变体的第二重链可变区。
- [0106] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:18或其任何变体的第二轻链可变区,和氨基酸序列SEQ ID NO:50或其任何变体的第二重链可变区。
- [0107] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一轻链包含选自SEQ ID NO:88、96、100、102、110、118或其任何变体的轻链,所述第一重链包含选自SEQ ID NO:86、94、98、104、112、120或其任何变体的重链。
- [0108] 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第二轻链包含选自SEQ ID NO:92、106、114或其任何变体的轻链,所述第二重链包含选自SEQ ID NO:90、108、116或其任何变体的重链。
- [0109] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:88或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:86或其任何变体的第一重链。
- [0110] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:96或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:94或其任何变体的第一重链。
- [0111] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:100或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:98或其任何变体的第一重链。
- [0112] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:102或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:104或其任何变体的第一重链。
- [0113] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:110或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:112或其任何变体的第一重链。
- [0114] 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:118或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:120或其任何变体的第一重链。
- [0115] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:92或其任何变体的第二轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:90或其任何变体的第二重链。
- [0116] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:106或其任何变体的第二轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:108或其任何变体的第二重链。
- [0117] 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:114或其任何变体的第二轻链,和氨基酸序列SEQ ID NO:116或其任何变体的第二重链。
- [0118] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:88或其任何

变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:86或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:92或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:90或其任何变体的第二重链。

[0119] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:96或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:94或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:92或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:90或其任何变体的第二重链。

[0120] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:100或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:98或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:92或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:90或其任何变体的第二重链。

[0121] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:102或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:104或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:106或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:108或其任何变体的第二重链。

[0122] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:110或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:112或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:114或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:116或其任何变体的第二重链。

[0123] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:118或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:120或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:114或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:116或其任何变体的第二重链。

[0124] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:110或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:112或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:106或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:108或其任何变体的第二重链。

[0125] 在一些实施方案中,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:102或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列SEQ ID NO:104或其任何变体的第一重链、氨基酸序列SEQ ID NO:114或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列SEQ ID NO:116或其任何变体的第二重链。

[0126] 结合CD20的抗体或其抗原结合部分,其与前述任一方面的抗体或其抗原结合部分具有至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0127] 编码如前述任一方面的抗体或其抗原结合部分的核酸,或与其具有至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核酸分子。

[0128] 在一些实施方案中,所述第一轻链可变区的编码核酸选自SEQ ID NO:55、60或其任何变体的核酸序列。

[0129] 在一些实施方案中,所述第一重链可变区的编码核酸选自SEQ ID NO:65、70、73、75、80、82、84或其任何变体的核酸序列。

[0130] 在一些实施方案中,所述第二轻链可变区的编码核酸选自SEQ ID NO:6、11、13、17、19、23或其任何变体的核酸序列。

[0131] 在一些实施方案中,所述第二重链可变区的编码核酸选自SEQ ID NO:25、30、33、36、39、42、45、49、51、53或其任何变体的核酸序列。

[0132] 在一些实施方案中,所述第一轻链的编码核酸选自SEQ ID NO:89、97、101、103、111、119或其任何变体的核酸序列。

[0133] 在一些实施方案中,所述第一重链的编码核酸选自SEQ ID NO:87、95、99、105、113、121或其任何变体的核酸序列。

[0134] 在一些实施方案中,所述第二轻链的编码核酸选自SEQ ID NO:93、107、115或其任何变体的核酸序列。

[0135] 在一些实施方案中,所述第二重链的编码核酸选自SEQ ID NO:91、109、117或其任何变体的核酸序列。

[0136] 包含前述核酸的载体。

[0137] 包含前述核酸或载体的细胞。

[0138] 包含前述双特异性抗体或其抗原结合部分、核酸、载体和/或细胞的组合物。

[0139] 包含共价附着至治疗部分的前述双特异性抗体或其抗原结合部分的抗体-药物偶联物。

[0140] 优选地,所述治疗部分选自细胞毒性部分、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。

[0141] 本发明的抗体在各种CD20被不利地表达或发现的疾病中可用作治疗或诊断工具。

[0142] 在一个与CD20相关的疾病实施方案中,CD20在患病组织或器官的细胞中的表达与在健康组织或器官中的状态相比有所增加。增加是指增加至少10%、特别是至少20%、至少50%、至少100%、至少200%、至少500%、至少1000%、至少10000%或甚至更多。在一个实施方案中,表达仅在患病组织中发现,而在相应健康组织中的表达受阻抑。根据本发明,与CD20相关的疾病包括B细胞疾病,例如B细胞增殖性病症,特别是CD20阳性B细胞病症。

[0143] “B细胞增殖性病症”意味着如下疾病,其中患者中B细胞的数目与健康受试者中B细胞的数目相比增多,特别是其中B细胞数目的增多是疾病的起因或标志。“CD20阳性B细胞增殖性病症”是如下B细胞增殖性病症,其中B细胞,特别是恶性B细胞(在正常B细胞以外)表达CD20。

[0144] 例示性B细胞增殖性病症包括非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤(MZL),以及一些类型的多发性骨髓瘤(MM)和霍奇金淋巴瘤(HL)。

[0145] 本发明的方法可应用于多种疾病的治疗,取决于所使用的治疗剂。然而,该方法在治疗B细胞增殖性病症,特别是CD20阳性B细胞病症中特别有用,其中(CD20阳性)B细胞大量(即与健康受试者相比,罹患病症的受试者中存在数目增多的B细胞)存在。如此,在一个实施方案中,疾病是B细胞增殖性病症,特别是CD20阳性B细胞病症。

[0146] 在一些实施方案中,该治疗剂包含指明用于治疗癌症的抗体。在一个实施方案中,该治疗剂指明用于治疗癌症。在一个实施方案中,该癌症是B细胞增殖性病症。在一个实施

方案中,该癌症是CD20阳性B细胞增殖性病征。在一个实施方案中,该癌症选自非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤(MZL),多发性骨髓瘤(MM),和霍奇金淋巴瘤(HL)组成的组。在一个实施方案中,该治疗剂是免疫治疗剂。

[0147] 在一些实施方案中,该治疗剂包含特异性结合活化性T细胞抗原的抗体。

[0148] 在一个实施方案中,该治疗剂包含特异性结合CD3,特别是CD3 ϵ 的抗体。

[0149] 在一个特定的实施方案中,疾病是NHL,特别是复发性/顽固性(r/r)NHL。在一个实施方案中,疾病是DLBCL。在一个实施方案中,疾病是FL。在一个实施方案中,疾病是MCL。在一个实施方案中,疾病是MZL。

[0150] 用本发明的CD20抗体治疗的疾病和症状方法包括下述步骤:向所述哺乳动物施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物。

[0151] 在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD20的抗体,其中施用所述抗体以提供至少40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供至少50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或至少500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供不超过800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至700 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至600 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或者300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。如本说明书中使用的术语“血清水平”,其意指所讨论的物质在血清中的浓度。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少7天或至少14天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少300 mg/m^2 的抗体剂量,如至少600 mg/m^2 ,且优选至多1500 mg/m^2 ,至多1200 mg/m^2 或至多1000 mg/m^2 。

[0152] 在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD20的抗体,其中以至少300 mg/m^2 ,如至少600 mg/m^2 ,且优选至多1500 mg/m^2 ,至多1200 mg/m^2 或至多1000 mg/m^2 的剂量施用所述抗体。

[0153] 在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD20的抗体,其中所述患者的至少50%,优选为60%、70%、80%或90%的癌细胞为CD20阳性和/或所述患者的至少40%,优选为50%或60%的癌细胞为CD20的表面表达阳性。在该方面,本发明还提供治疗或预防癌症疾病的方法,所述方法包括:a. 鉴定显示至少50%,优选为60%、70%、80%或90%的CD20阳性癌细胞和/或至少40%,优选为50%或60%的癌细胞的患者的患者,所述癌细胞为CD20的表面表达阳性;以及b. 向所述患者施用能够结合CD20的抗体。在一个实施方案中,所述患者的至少95%或至少98%的癌细胞为CD20阳性的。在一个实施方案中,所述患者的至少70%、至少80%或至少90%的癌细胞为CD20的表面表达阳性。

[0154] 在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,癌症疾病的治疗结果是实现病情稳定。在一个实施方案中,病情稳定实现至少2个月、至少3个月或至少6个月。

[0155] 在一些实施方案中,本发明提供实现癌症患者的病情稳定的方法,其包括向所述患者施用能够结合CD20的抗体。在一个实施方案中,病情稳定实现至少2个月、至少3个月或至少6个月。

[0156] 在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,以单剂量或多剂量施用抗体。

[0157] 在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合CD20的抗体,其中以多剂量施用所述抗体。

[0158] 如果根据本发明以多次剂量施用所述抗体,则优选以至少3次剂量、至少4次剂量、至少5次剂量、至少6次剂量、至少7次剂量、至少8次剂量、至少9次剂量或至少10次剂量且优选至多30次剂量、25次剂量、20次剂量、15次剂量或10次剂量施用所述抗体。优选以至少7天、至少10天、至少14天或至少20天的时间间隔施用所述抗体的剂量。优选以7至30天、10至20天且优选为约14天的时间间隔施用所述抗体的剂量。

[0159] 在一个实施方案中,施用所述抗体以便提供至少40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以便提供至少50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、至少400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或至少500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以便提供不超过800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至700 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至600 $\mu\text{g}/\text{ml}$,优选为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少7天或至少14天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少300 mg/m^2 ,如至少600 mg/m^2 且优选至多1500 mg/m^2 、至多1200 mg/m^2 或至多1000 mg/m^2 的抗体的剂量。

[0160] 前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中CD20相关病症的药物中的用途。

[0161] 根据前述任一方面,任选地,所述抗体偶联其他药物,例如带标记或具有细胞毒性的缀合物。

[0162] 在一方面,本公开还包括试剂盒,例如所述试剂盒包括本公开的抗体、其片段、同源物、其衍生物等,例如带标记或具有细胞毒性的缀合物,以及抗体使用说明书、杀死特定类型细胞的缀合物等等。该说明书可包括在体外、体内或离体使用抗体、缀合物等的指导。抗体可以是液体形式或固体,通常是冻干的。该试剂盒可包含其它适宜的试剂,如缓冲液、重构溶液以及为了预定用途的其它必要成分。考虑了以预定量包装好的试剂组合与用于其用途的说明书,所述用途例如用于治疗用途或用于进行诊断测定。当抗体是带标记的时,例如用酶标记的,那么该试剂盒可包括底物和酶所需的辅因子(例如提供可检测生色团或荧光团的底物前体)。此外,其它添加剂,如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等也可包括在内。多种试剂的相对量可以改变而提供试剂溶液的浓缩物,这就提供了用户灵活性、节省空间、节省试剂等。这些试剂也可以干粉形式提供,通常是冻干形式,包括赋形剂,它在溶解时可提供具有适当浓度的试剂溶液。

[0163] 前述任一方面的抗体或其功能片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物或试剂盒在制备用于抑制CD20结合的试剂中的用途。

[0164] 此外,本发明的抗体还可用于免疫测定、纯化方法以及其它用到免疫球蛋白或其片段的方法。此类用途在本领域为人所熟知。

[0165] 相应地,本发明还提供包含本发明的抗CD20的抗体或其片段的组合物,所述抗体方便地和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合,这是本领域的常规做法。

[0166] 本发明所使用的术语“药物组合物”系指多种制备物的制剂。含有治疗有效量的多价抗体的制剂为无菌液体溶液、液体悬浮剂或冻干形式,任选地包含稳定剂或赋形剂。

[0167] 本发明的抗体可以作为单独施用的组合物使用,或可与其它活性剂联合使用。

[0168] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗体与治疗部分(即药物)偶联。治疗部分可以是例如细胞毒素、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。此类偶联物在本文中称为“抗体-药物偶联物”或“ADC”。

[0169] 在一些实施方案中,抗体与细胞毒性部分偶联。细胞毒性部分可以例如选自以下:紫杉醇;细胞松弛素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;吐根碱;丝裂霉素;依托泊苷;替尼泊苷;长春新碱;长春碱;秋水仙碱;多柔比星;柔红霉素;二羟基蒽二酮;微管蛋白抑制剂如美登素或其类似物或衍生物;抗有丝分裂剂如单甲基奥瑞他汀E或F或其类似物或衍生物;海兔毒素10或15或其类似物;伊立替康或其类似物;米托蒽醌;光辉霉素;放线菌素D;1-脱氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉素;卡奇霉素或其类似物或衍生物;抗代谢药,如甲氨喋呤、6巯基嘌呤、6巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5氟尿嘧啶、癸二噻、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨;烷化剂,如二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴嗪、丝裂霉素C;铂类衍生物,如顺铂或卡铂;多卡霉素A、多卡霉素SA、雷切霉素(CC-1065)或其类似物或衍生物;抗生素,如放线菌素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素(AMC);吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB);白喉毒素及相关分子如白喉A链及其活性片段和杂合分子、蓖麻毒素如蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素、霍乱毒素、志贺样毒素如SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、蒴莲根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -sarcin、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白如PAPI、PAPII和PAP-S、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素毒素;核糖核酸酶(RNase);DNase I、葡萄球菌内毒素A;商陆抗病毒蛋白;白喉毒素和假单胞菌内毒素。

[0170] 在一些实施方案中,抗体与奥瑞他汀或其肽类似物、衍生物或前药偶联。已经表明,奥瑞他汀干扰微管动力学、GTP水解以及核和细胞分裂并具有抗癌和抗真菌活性。例如,奥瑞他汀E可以与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其他典型的奥瑞他汀衍生物包括AFP、MMAF(单甲基奥瑞他汀F)和MMAE(单甲基奥瑞他汀E)。合适的奥瑞他汀和奥瑞他汀的类似物、衍生物和前药,以及用于将奥瑞他汀与Ab偶联的合适接头描述于例如美国专利号5,635,483、5,780,588和6,214,345以及国际专利申请公开W002088172、W02004010957、W02005081711、W02005084390、W02006132670、W003026577、W0200700860、W0207011968和W0205082023。

[0171] 在一些实施方案中,抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB)或其肽类似物、衍生物或前药偶联。合适的PDB以及PDB衍生物和相关技术描述于例如Hartley J.A.等,Cancer Res 2010;70(17):6849-6858;Antonow D.等,Cancer J 2008;14(3):154-169;Howard P.W.等,Bioorg Med Chem Lett 2009;19:6463-6466和Sagnou等,Bioorg Med Chem Lett 2000;10(18):2083-2086。

[0172] 在一些实施方案中,抗体与选自以下的细胞毒性部分偶联:蒽环类抗生素、美登

素、卡奇霉素、多卡霉素、雷切霉素(CC-1065)、海兔毒素10、海兔毒素15、伊立替康、单甲基奥瑞他汀E、单甲基奥瑞他汀F、PDB,或它们任何的类似物、衍生物或前药。

[0173] 在一些实施方案中,抗体与蒽环类抗生素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与美登素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与卡奇霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与多卡霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与雷切霉素(CC-1065)或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与海兔毒素10或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与海兔毒素15或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与单甲基奥瑞他汀E或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与单甲基奥瑞他汀F或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中,抗体与伊立替康或其类似物、衍生物或前药偶联。

[0174] 在一些实施方案中,抗体与细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF α)偶联。

[0175] 在一些实施方案中,抗体与放射性同位素或含放射性同位素的螯合物偶联。例如,抗体可以与允许抗体与放射性同位素络合的螯合剂接头(例如DOTA、DTPA或噻西坦)偶联。抗体还可以或可选地包含一个或多个放射性标记的氨基酸或其他放射性标记的分子或与之偶联。放射性同位素的非限制性实例包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。为了治疗目的,可以使用发射 β 或 α 颗粒辐射的放射性同位素,例如 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 和 ^{212}Pb 。

[0176] 将分子与抗体偶联的技术是本领域熟知的。通常,核酸分子分别通过N-羟基琥珀酰亚胺酯或马来酰亚胺官能团与抗体上的赖氨酸或半胱氨酸共价连接。据报道,使用工程化半胱氨酸或整合非天然氨基酸的偶联方法可改进偶联物的同质性。特别地,本领域技术人员还可以预期用含酰基供体谷氨酰胺的标签(例如含有Gln肽的标签或Q-标签)或通过多肽工程(例如通过多肽上的氨基酸缺失、插入、取代或突变)产生反应性的内源性谷氨酰胺工程化的含Fc多肽。然后,转谷氨酰胺酶可与胺供体剂(例如,包含或连接于反应性胺的小分子)共价交联,以形成稳定且均质的工程化含Fc多肽偶联物群,其中胺供体剂通过含酰基供体谷氨酰胺标签或可接近/暴露/反应性的内源性谷氨酰胺位点特异性地与含Fc多肽偶联(WO2012059882)。

[0177] 应当理解,根据所述实施方案的治疗剂将与合适的药学上可接受的载体、赋形剂、以及其它被掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的试剂一同施用。大量适当的制剂可见于所有药物化学工作者已知的药典中:Remington's Pharmaceutical Sciences(第15版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.(1975)),特别是其中Blaug、Seymour的第87章。这些制剂包括例如粉末、糊剂、膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)载体(例如LipofectinTM)、DNA缀合物、无水吸浆、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固态凝胶以及含有聚乙二醇的半固态混合物。任何前述混合物均可适用于根据本发明的治疗或疗法,条件是制剂中的活性成分不被制剂灭活并且制剂在生理学上是相容的并耐受给药途径。

[0178] 在一个实施方案中,可将所述抗体用作治疗剂。此类试剂将通常用于治疗、缓解和/或预防受试者的与异常CD20表达、活性和/或信号传导相关的疾病或病理。可使用标准方法通过鉴定受试者,例如患有(或处于风险或发展)与异常CD20表达、活性和/或信号传导相关的疾病或障碍,例如CD20相关病症的人患者来实施治疗方案。将抗体制剂,优选对其靶抗原具有高特异性和高亲和性的抗体制剂施用给受试者并且将通常因其与靶标结合而产生效应。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如CD20)的表达、活性和/或信号传导功能。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如CD20)与其所天然结合的内源性的配体结合。例如,抗体与靶标结合并调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和/或以其它方式妨碍CD20表达、活性和/或信号传导。在一些实施方案中,为治疗与异常CD20表达相关的疾病或障碍,可将具有重链和轻链CDR的抗体施用给受试者。

[0179] 在另一个实施方案中,针对CD20的抗体可用于本领域中已知的与CD20定位和/或定量相关的方法(例如,用于测定适当生理样品中的CD20和/或CD20的水平,用于诊断方法,用于蛋白成像等等)。在一个给定实施方案中,对CD20或其衍生物、片段、类似物或同系物具有特异性的、包含源于抗体的抗原结合结构域的抗体,被用作药理学活性化合物(下文称为“治疗剂”)。

[0180] 在另一个实施方案中,可通过标准技术例如免疫亲和、色谱或免疫沉淀,使用对CD20具有特异性的抗体来分离CD20多肽。针对CD20蛋白质的抗体(或其片段)可用于检测生物样品中的蛋白质。在一些实施方案中,在生物样品中可检测CD20作为临床测试过程的一部分,例如,用于确定给定治疗方案的功效。将抗体偶联(即物理连接)到可检测物质可有利于检测。可检测物质的示例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的示例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的示例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的示例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪氨荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的一个示例包括鲁米诺;生物发光材料的示例包括荧光素酶、荧光素和水母蛋白,并且合适放射性材料的示例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0181] 在另一个实施方案中,根据本公开的抗体可用作检测样品中CD20或其蛋白质片段存在的试剂。在一些实施方案中,抗体包含可检测标记。抗体为多克隆抗体,或更优选单克隆抗体。使用完整的抗体或其片段(例如Fab、scFv或F(ab')₂)。关于抗体的术语“标记”旨在包括通过将可检测物质偶联(即物理连接)到该抗体来直接标记该抗体,以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记该抗体。间接标记的示例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体,以及用生物素进行末端标记抗体,以便能够用荧光标记的链霉亲和素进行检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物学流体,以及受试者体内存在的组织、细胞和流体。因此,使用的术语“生物样品”包括血液和血液中的级分或组分,包括血清、血浆、或淋巴液。换言之,所述实施方案的检测方法可用于在体外及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如,分析物mRNA体外检测技术包括Northern杂交和原位杂交。分析物蛋白质体外检测技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀、以及免疫荧光。分析物基因组DNA体外检测技术包括Southern杂交。用于进行免疫测定的过程描述于例如“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”,第42卷, J.R.Crowther (编辑) Human Press, Totowa, N.J., 1995; “Immunoassay”,

E.Diamandis和T.Christopoulos,Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.,1996;以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”,P.Tijssen,Elsevier Science Publishers,Amsterdam,1985。此外,分析物蛋白质的体内检测技术包括向受试者体内导入标记的抗分析物蛋白抗体。例如,可以用放射性标记标记抗体,然后通过标准成像技术检测受试者体内该放射性标记物的存在和位置。

[0182] 可将本文所述抗体和其衍生物、片段、类似物和同系物掺入适于施用的药物组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑事项以及选择组分的指南在本领域中是熟知的,例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences:The Science And Practice Of Pharmacy第19版(Alfonso R.Gennaro等人编辑)Mack Pub.Co.,Easton,Pa.:1995;Drug Absorption Enhancement:Concepts,Possibilities,Limitations,And Trends,Harwood Academic Publishers,Langhorne,Pa.,1994;以及Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences,第4卷),1991,M.Dekker,New York。

[0183] 此类组合物通常包含抗体和药学上可接受的载体。当使用抗体片段时,与靶蛋白结合结构域特异性结合的最小抑制片段可为优选的。例如,基于抗体的可变区序列,可以设计保留结合靶蛋白质序列能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生(参见例如Marasco等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7889-7893(1993))。

[0184] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。合适的药学上可接受的载体描述于最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences中,这是本领域的标准参考书目,其以引用方式并入本文。此类载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和5%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体,例如固定化油。将此类介质和试剂用于药物活性物质是本领域熟知的。除去任何常规的介质或试剂与抗体不相容之外,设想其在组合物中的用途。

[0185] 将所述实施方案的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。给药途径的示例包括肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部的)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分:注射用无菌稀释剂例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂,例如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及调节渗透压的试剂,例如氯化钠或右旋糖。pH可用酸或碱进行调节,例如盐酸或氢氧化钠。可将肠胃外制剂包装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制多剂量小瓶内。

[0186] 适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(在此是水溶性的)或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的药学上可接受的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须是无菌的并且应当为流动性达到易于注射的程度。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须能防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质,及其适宜的混合物。例如通过利用涂层例如卵磷脂,在分散体情况下维持所需颗粒尺寸,以及利用表面活性剂,可以保持适宜的流动性。对微生物作用的防止可以通过各种抗细

菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨醇)、氯化钠。注射用组合物的延长吸收可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来达到。

[0187] 根据需要,可以通过将抗体以所需量掺入具有上文所列成分中的一种或组合(按需要)的合适溶剂中来制备无菌注射溶液,然后过滤消毒。一般来讲,通过将抗体掺入含有碱性分散介质和上文所列那些中的所需其它成分的无菌载体中来制备分散体。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言,制备方法是获得粉末的真空干燥和冷冻干燥,该粉末包含活性成分和任何另外的期望成分,它们来自前述的这些成分的无菌过滤溶液。

[0188] 对于吸入给药,从包含合适推进剂如二氧化碳等气体的加压容器或分配器或者喷雾器以气溶胶喷雾形式递送化合物。

[0189] 还可以通过经粘膜或透皮方式全身给药。对于经粘膜或透皮给药,在制剂中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域是通常所知的,并且包括如用于经粘膜给药的去污剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用喷鼻剂或栓剂来实现。对于透皮给药,可将一种或多种所述抗体配制成如本领域通常所知的膏剂、软膏、凝胶、或霜膏。

[0190] 还可将化合物以栓剂(例如,具有常规栓剂基质,如可可脂或其它甘油酯)或滞留性灌肠剂形式进行制备以用于经直肠递送。

[0191] 在一个实施方案中,所述抗体可用防止其不被身体迅速消除的载体制备,例如缓释/控释制剂,包括植入体和微胶囊化递送体系。可使用可生物降解、可生物相容的聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。

[0192] 尤其有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以易于施用和剂量的一致性。如本文所用,剂量单位形式是指用于待治疗的受试者,适合作为单位剂量的物理上可分离的单位;每个单位含有经计算与所需药物载体结合产生期望治疗效果的预定量的一种或多种所述抗体。所述实施方案的剂量单位形式的规格由以下指示并直接取决于:抗体的独特特征和待实现的具体治疗效果,和用于治疗个体的此类抗体的调配领域中固有的局限性。

[0193] 所述药物组合物可与给药说明书一起放于容器、包装、或分配器中。

[0194] 本文所述制剂还可根据要治疗的具体情况而包含多于一种所述抗体,优选具有互补活性但对彼此无负面影响的那些。另选地或除此之外,组合物可例如包含增强其功能的试剂,诸如细胞毒素试剂、细胞因子、化学治疗剂、或生长抑制剂。此类分子以对预期目的有效的量适当地联合存在。例如,可以在试剂盒中联合存在,也可以在使用中联合存在。

[0195] 在一个实施方案中,一种或多种所述抗体可在联合治疗中施用,即与其它试剂例如治疗剂(其可用于治疗病理学病症或障碍,例如各种形式的癌症、自身免疫性障碍和炎症疾病)联合。术语“联合”在本文中是指将试剂基本上同步地,同时地或顺次地给予。如果顺次给予,则在开始施用第二种化合物时,两种化合物中的第一种仍优选在治疗位点处以有效浓度被检测到。在一种情况下,“联合”也可以是在试剂盒中同时包含本发明的抗体和其他治疗剂。

[0196] 例如,联合治疗可包含本文所述一种或多种抗体与一种或多种附加治疗剂(例如

一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂,如下更详述的)共同配制和/或共同施用。此类联合治疗可有利地利用较低剂量的施用的治疗剂,因而避免了与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0197] 在一个实施方案中,抗CD20抗体的施用和治疗剂的施用可以降低该受试者中的B细胞的数目。

[0198] 在一个实施方案中,与相应的不施用抗CD20抗体的治疗方案相比该治疗方案有效降低该受试者中与该T细胞活化性治疗剂的施用相关的细胞因子释放。

[0199] 为了达到清楚和简洁描述的目的,本文中作为相同的或分开的一些实施方案的一部分来描述特征,然而,将要理解的是,本发明的范围可包括具有所描述的所有或一些特征的组合的一些实施方案。

[0200] 实施例1:CD20稳转细胞和CD3重组抗原

[0201] 1.人或猴CD20稳转细胞株的构建

[0202] 构建含有人CD20或食蟹猴 (*Cynomologus monkey*) CD20全长序列 (cDNA购自Sino Biological, HG11007-UT, CG90052-G) 的慢病毒载体质粒,用慢病毒包装试剂盒 (Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit, Gene Copoeia, #HPK-LvTR-20), 将构建好的慢病毒质粒和包装质粒共转染HEK293T细胞,48小时后收取上清。取10 μ L含有慢病毒颗粒的培养上清,加入对数生长期的CHO细胞,2天后,加入10 μ g/mL puromycin进行筛选。抗性克隆通过有限稀释法,进一步得到高表达人或猴CD20的稳转细胞株CHO-人CD20 (克隆3G6) 和CHO-食蟹猴CD20 (克隆1G9)。

[0203] 图1显示,利用APC标记的CD20抗体 (BioLegend#302309) 进行流式细胞检测,相对于未转染的CHO细胞,人CD20稳转细胞 (CHO-hCD20-3G6) 和猴CD20稳转细胞 (CHO-cyCD20-1G9) 均表达高水平的CD20。

[0204] 2.人或猴CD3 ϵ γ 异源二聚体的构建

[0205] 合成人CD3 γ (UniProt P09693, Gln₂₃-Asn₁₁₆) 和CD3 ϵ (UniProt P07766, Gln₂₃-Asp₁₂₆) 胞外区核苷酸序列, C端分别与人IgG Fc hole或Fc knob融合,表达形成人CD3 ϵ γ -Fc异源二聚体 (人CD3 γ IgG Fc (hole) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,人CD3 ϵ IgG Fc (knob) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示); 同样合成食蟹猴CD3 γ (UniProt Q95LI7, Gln₂₃-Asn₁₁₀) 和CD3 ϵ (UniProt Q95LI5, Gln₂₂-Asp₁₁₇), C端与食蟹猴IgG Fc hole或Fc knob融合,表达形成食蟹猴CD3 ϵ γ -Fc异源二聚体 (食蟹猴CD3 γ IgG Fc (hole) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,食蟹猴CD3 γ IgG Fc (knob) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.4)。将表达CD3 γ -Fc和CD3 ϵ -Fc的重组质粒与3mg/mL PEI (Polysciences, #24765-2) 混合,共转染HEK293E细胞 (培养基OPM-293 CD03 DPM), 37 $^{\circ}$ C 120rpm 5% CO₂培养7天后,收集培养基上清液,经Protein A亲和层析纯化,得到人或食蟹猴CD3 ϵ γ -Fc重组蛋白, SDS-PAGE纯度高于95% (图2)。

[0206] 实施例2:CD3人源化抗体

[0207] 鼠源杂交瘤CD3抗体 (EMBO J. 1985. 4 (2) : 337-344; J. Immunol. 1986, 137 (4) : 1097-1100; J. Exp. Med. 1991, 174: 319-326; J. Immunol. 1991, 147 (9) : 3047-52) 识别人和猴CD3受体,其序列如下:

[0208] 抗CD3鼠单抗轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO.5) :

[0209] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPDHLFTGLIGGINKRAPGVPARFSGSLI
GDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0210] 抗CD3鼠单抗重链氨基酸序列 (SEQ ID NO.6) :

[0211] EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSQSILYLQMNLIKTEDTAMYCYVRHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

[0212] 将抗CD3鼠单抗人源化,选择同源性最高的人胚系基因IMGT_hVL7-43进行轻链CDR移植,FM4选用人IGLJ3*02;选择人IMGT_hVH3-73进行重链CDR移植,FM4选用人IGHJ4*01。设计共得到不同的重链变体和轻链变体(表1、2)。

[0213] 表1、CD3人源化抗体的轻链可变区序列

CD3 人源化抗体	SEQ ID NOs: 5-23				
	LCVR		LCDRI	LCDR2	LCDR3
	氨基酸 序列	核苷酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列
[0214] hVL1	5	6	7	8	9
hVL2	10	11	7	8	9
hVL3	12	13	14	15	9
hVL4	16	17	14	15	9
hVL5	18	19	7	8	21
hVL6	22	23	7	20	21

[0215] hVL1:

[0216] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0217] hVL2:

[0218] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0219] hVL3:

[0220] EAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCESSDGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0221] hVL4:

[0222] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCESSDGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0223] hVL5:

[0224] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0225] hVL6:

[0226] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWFQEKPGQAPRGLIYGINKRAPWTPARFSGSLL
GGKAALTLGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

[0227] 表2、CD3人源化抗体的重链可变区序列

		SEQ ID NOs:24-53				
CD3 人源化抗体	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3	
	氨基酸 序列	核苷酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	氨基酸 序列	
[0228]	hVH1	24	25	26	27	28
	hVH2	29	30	31	27	28
	hVH3	32	33	31	27	34
	hVH4	35	36	31	27	37
	hVH5	38	39	31	27	40
	hVH6	41	42	31	27	43
	hVH7	44	45	46	47	28
[0229]	hVH8	48	49	26	27	28
	hVH9	50	51	26	27	28
	hVH10	52	53	26	27	28
[0230]	hVH1:					
[0231]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0232]	hVH2:					
[0233]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0234]	hVH3:					
[0235]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGESYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0236]	hVH4:					
[0237]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGQSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0238]	hVH5:					
[0239]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0240]	hVH6:					
[0241]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0242]	hVH7:					
[0243]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVEDR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0244]	hVH8:					
[0245]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0246]	hVH9:					
[0247]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS					
[0248]	hVH10:					

[0249] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

[0250] 将轻、重链人源化变体分别进行全序列合成后,克隆到含有抗体lambda轻链恒定区或人IgG4重链恒定区CH1-CH3的真核表达载体,共转染HEK293E细胞,37°C 120rpm 5%CO₂培养5-6天后,收集培养基上清液,通过Protein A层析柱进行纯化。

[0251] ELISA亲和力测定

[0252] 包被人CD3ε γ 蛋白,4°C过夜。2%脱脂牛奶封闭后,每孔加入不同稀释倍数的CD3抗体,孵育1小时;二抗加入HPR标记的山羊抗人IgG Fc,TMB溶液显色后,以浓硫酸终止反应并在450nm处读出吸光度(结果如图3所示)。

[0253] 图3显示与人CD3ε γ 蛋白结合的抗CD3人源化抗体组合(包括aCD3-hVH8/VL1、aCD3-hVH9/VL1、aCD3-hVH9/VL2、aCD3-hVH9/VL3、aCD3-hVH1/VL5、aCD3-hVH8/VL5、aCD3-hVH9/VL5),CD3人源化抗体高亲和力结合CD3ε γ 重组蛋白。

[0254] Jurkat T细胞亲和力测定

[0255] 取对数生长期的Jurkat细胞,3%BSA封闭30分钟,以每孔 5×10^4 细胞加入96孔U型板,离心弃上清,每孔加入50μL梯度稀释的抗体(抗体浓度从30μg/mL起,3倍稀释5个梯度),4°C孵育1小时。洗去一抗后,二抗加入1:300稀释的Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(Jackson ImmunoResearch,109-606-170),4°C孵育45分钟,洗涤后每孔重悬于50μL PBS进行FACS(iQue,Intellicyt)检测(结果如图4所示)。

[0256] 图4显示与Jurkat细胞结合的抗CD3人源化抗体组合,其中CD3人源化抗体hVH9/VL5(aCD3-hVH9/VL5)以中度亲和力结合Jurkat细胞。

[0257] 实施例3:CD20人源化抗体

[0258] 鼠源CD20抗体或对照抗体参考文献US5736137、US8529902合成,其可变区氨基酸序列如下:

[0259] CD20-2B8:

[0260] QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTS
YSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

[0261] QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKAT
LTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSA

[0262] CD20-2F2:

[0263] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK

[0264] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTI
ISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTVSS

[0265] CD20-11B8:

[0266] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSDWPLTFGGGTKVEIK

[0267] EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQAPGKGLEWVSIIGTGGVTTYADSVKGRFTI
SRDNVKNLSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGMVWGQGTTVTVSS

[0268] 通过CDR移植和点突变,对CD20抗体进行优化设计并降低等电点:移植鼠源或对照

CD20抗体的轻链CDR到人抗体胚系基因Vk3-20框架上,Joint区采用人KJ2*01;重链CDR移植到人VH1-69或VH3-23框架上,并引入Lys₇₇Asn等突变以降低Fv区域电荷密度,Joint区采用人HJ4*01,分别获得人源化Mab001抗体、Mab002抗体、Mab003抗体、Mab004抗体、Mab005抗体、Mab006抗体、Mab007抗体(表3、4)。

[0269] 将轻链可变区克隆到含有kappa轻链恒定区的真核表达载体,将重链可变区克隆到含有IgG4CH1-3恒定区的真核表达载体。转染HEK293E细胞,表达5-6天后收取培养上清,Protein A亲和层析纯化,通过Nanodrop分光光度计和理论吸光值确定抗体浓度。

[0270] 表3、人源化CD20抗体的轻链可变区序列

		SEQ ID NOs: 54-63				
		LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
CD20 人源化抗体		氨基酸	核苷酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸
		序列	序列	序列	序列	序列
[0271]	Mab001	54	55	56	57	58
	Mab002	54	55	56	57	58
	Mab003	54	55	56	57	58
	Mab004	59	60	61	62	63
	Mab005	59	60	61	62	63
	Mab006	59	60	61	62	63
	Mab007	59	60	61	62	63

[0272] 表4、人源化CD20抗体的重链可变区序列

		SEQ ID NOs: 64-85				
		HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD20 人源化抗体		氨基酸	核苷酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸
		序列	序列	序列	序列	序列
[0273]	Mab001	64	65	66	67	68
	Mab002	69	70	66	67	71
	Mab003	72	73	66	67	68
	Mab004	74	75	76	77	78
	Mab005	79	80	76	77	78
	Mab006	81	82	76	77	78
	Mab007	83	84	76	77	85

[0274] Mab001抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如SEQ ID NO.54所示,其编码核酸如SEQ ID NO.55所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.56-58所示。

[0275] EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SCR~~ASSSVSYIHWFQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQGTKLEIK

[0276] Mab001抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如SEQ ID NO.64所示,其编码核酸如SEQ ID NO.65所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.66-68所示。

[0277] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV~~SCK~~ASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGLTVTVSS

[0278] Mab002抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如SEQ ID NO.54所示,其编码核酸如SEQ ID NO.55所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.56-58所示。

[0279] EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SCR~~ASSSVSYIHWFQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQGTKLEIK

[0280] Mab002抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如SEQ ID NO.69所示,其编码核酸如SEQ ID NO.70所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.66、67、71所示。

[0281] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYNMFHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVT
LTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFDYWGQGTLLVTVSS

[0282] Mab003抗体轻链可变区 (VK) 氨基酸序列如SEQ ID NO.54所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.55所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.56-58所示。

[0283] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASSVS^YIHWFFQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSGSGTD
YTLTISRLEPEDFAVYYCQ^QWTSNPPTFGQGTKLEIK

[0284] Mab003抗体重链可变区 (VH) 氨基酸序列如SEQ ID NO.72所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.73所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.66-68所示。

[0285] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMFHWVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVT
LTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGQGTLLVTVSS

[0286] Mab004抗体轻链可变区 (VK) 氨基酸序列如SEQ ID NO.59所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.60所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.61-63所示。

[0287] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQ^QRSNWPITFGQGTKLEIK

[0288] Mab004抗体重链可变区 (VH) 氨基酸序列如SEQ ID NO.74所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.75所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.76-78所示。

[0289] EVQLLES^GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDNAKKTLYLQMN^SLRAEDTAVYYCAKDIQYGN^YYYGMDVWGQGTLLVTVSS

[0290] Mab005抗体轻链可变区 (VK) 氨基酸序列如SEQ ID NO.59所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.60所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.61-63所示。

[0291] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQ^QRSNWPITFGQGTKLEIK

[0292] Mab005抗体重链可变区 (VH) 氨基酸序列如SEQ ID NO.79所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.80所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.76-78所示。

[0293] EVQLLES^GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDN^SKNTLYLQMN^SLRAEDTAVYYCAKDIQYGN^YYYGMDVWGQGTLLVTVSS

[0294] Mab006抗体轻链可变区 (VK) 氨基酸序列如SEQ ID NO.59所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.60所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.61-63所示。

[0295] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQ^QRSNWPITFGQGTKLEIK

[0296] Mab006抗体重链可变区 (VH) 氨基酸序列如SEQ ID NO.81所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.82所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.76-78所示。

[0297] EVQLLES^GGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDN^SKNTLYLQMN^SLRAEDTAVYYCAKDIQYGN^YYYGMDVWGQGTLLVTVSS

[0298] Mab007抗体轻链可变区 (VK) 氨基酸序列如SEQ ID NO.59所示,其编码核酸如SEQ
ID NO.60所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.61-63所示。

[0299] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGT
DFTLTISRLEPEDFAVYYCQ^QRSNWPITFGQGTKLEIK

[0300] Mab007抗体重链可变区 (VH) 氨基酸序列如SEQ ID NO.83所示,其编码核酸如SEQ

ID NO.84所示,其CDR1、CDR2和CDR3如SEQ ID NO.76、77、85所示。

[0301] EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGTLLVTVSS

[0302] 人源化CD20抗体与肿瘤细胞的结合

[0303] 取对数生长期的淋巴瘤细胞系Raji和Daudi细胞,加入200 μ g/mL鼠IgG (Jackson ImmunoResearch) 封闭30分钟。在96孔U型板中,每孔加入 5×10^4 个细胞和50 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度200nM,5倍稀释,共8个梯度),冰上孵育45分钟。洗涤后,每孔加入50 μ L Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育45分钟。加入60 μ L/孔PI (Sigma,P4170),孵育5分钟,用流式细胞仪(iQue Screener)进行检测。图5显示人源化CD20抗体与Raji细胞的结合;图6显示人源化CD20抗体与Daudi细胞的结合。

[0304] 实施例4:人源化CD20抗体与CD3抗体的组合筛选

[0305] 1. 抗体组合筛选的双功能抗体

[0306] 选取通过等电点优化得到的人源化CD20抗体Mab002、Mab005和Mab007,与人源化CD3抗体构建双特异抗体。参考Schaefer W等(PNAS,2011),对人源化CD20抗体与CD3抗体的组合进行筛选:将人源化CD20抗体的轻链可变区克隆到含有kappa轻链恒定区的真核表达载体,将重链可变区克隆到含有突变的人IgG4恒定区真核表达载体;将人源化CD3抗体的轻链可变区克隆到含有lambda轻链恒定区以及重链铰链区和恒定区CH2、CH3的真核表达载体,将CD3抗体的重链可变区克隆到含有人CH1恒定区的真核表达载体,将编码轻、重链基因的4种质粒按1:1:1:1比率混合,转染HEK293E细胞,表达5-6天后收取培养上清,通过Protein A亲和层析纯化。SEC-HPLC显示,按该方法制备的双功能抗体Mab002 \times CD3、Mab005 \times CD3和Mab007 \times CD3中单体含量大于55%,用于下述靶细胞结合和杀伤作用的相对活性评价。

[0307] 用于抗体组合筛选的双功能抗体序列见表5。

[0308] 表5、抗体组合筛选的双功能抗体序列

双功能抗体名称	CD20 抗体	CD3 抗体
[0309] Mab002 \times CD3, SEQ ID NO. 86-93,	链1:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 86 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 87	链3:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 91

[0310]

<p>在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体: V_KCD20: Gln₃₇Lys; V_HCD20: Gln₃₉Glu; V_λCD3: Gln₄₀Glu; V_HCD3: Gln₃₉Lys</p>	<p>所示 QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVCSK ASGYTFTSYNMHWVREAPGQGLE WMGAIYPGNGDTSYNQKFQGRVT LTADKSSSTAYMELSSLRSEDYAVY YCARSTYYGGDWYFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTK VDERVESKYGPPCPPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLGLK* 链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 88 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 89 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SSSVSYIHWFQKKPGQAPRPLIYAT SNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTIS RLEPEDFAVYYCQWTSNPPTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKKL KSGTASVYCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC*</p>	<p>所示 QAVVTQEPSLTVSPGGTIVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQEPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLGGK AALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESK YGPPCPPAPEFEGGSPVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLGLK* 链 4: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 93 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCVRHGFNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTK VDKRV*</p>
<p>Mab005×CD3, SEQ ID NO. 90-97, 在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体: V_KCD20: Gln₃₈Lys; V_HCD20: Gln₃₉Glu; V_λCD3: Gln₄₀Glu; V_HCD3: Gln₃₉Lys</p>	<p>链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 94 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 95 所示 EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNDYAMHWVREAPGKGLE WVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDERVERESKYGPPCPPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVL VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQ EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV VMHEALHNHYTQKLSLSLGLK* 链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 96 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 97 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQKKPGQAPRLLIY DASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT</p>	<p>链 3: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 91 所示 QAVVTQEPSLTVSPGGTIVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQEPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLGGK AALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESK YGPPCPPAPEFEGGSPVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLGLK* 链 4: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 93 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI</p>

	ISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTK VDKRV*
Mab007×CD3, SEQ ID NO. 98-101、 90-93, 在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体: VK _{CD20} : Gln ₃₈ Lys; VH _{CD20} : Gln ₃₉ Glu; Vλ _{CD3} : Gln ₄₀ Glu; VH _{CD3} : Gln ₃₉ Lys	链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 98 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 99 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRLS ASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLE WVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNT KVDVERESKYGPPCPPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQ EEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGK* 链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO.100 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 101 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQKPKGAPRLLIY DASNRATGIPDRFSGSGTDFLT ISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	链 3: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 91 所示 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQEKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGK AALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESK YGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLGK* 链 4: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 93 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS SCAASGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTK VDKRV*

[0311]

[0312] 2. 对CD20+细胞和Jurkat细胞的识别

[0313] 取对数生长期的Raji细胞和人外周血白血病T细胞系Jurkat细胞, 加入200µg/mL 鼠IgG封闭30分钟。在96孔U型板中, 每孔加入5×10⁴个细胞, 和50µL梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM, 5倍稀释, 共8个梯度), 冰上孵育45分钟。洗去一抗后, 每孔加入50µL Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释), 冰上孵育45分钟, 加入60µL/孔PI, 孵育5分钟, 用流式细胞仪进行检测。

[0314] 图7显示CD20×CD3抗体组合与Raji细胞的结合; 图8显示CD20×CD3抗体组合与Jurkat细胞的结合。

[0315] 3. T细胞依赖的细胞毒实验(TDCC)

[0316] 取新鲜分离得到的PBMC和处于对数生长期的Raji细胞混合(效应/靶细胞=10:1), 每孔加入50µL梯度稀释的抗体(起始浓度66.7nM, 10倍稀释, 8个梯度), 5%CO₂ 37℃培养24小时。培养结束后, 1000rpm离心3分钟, 取上清检测LDH释放, 将50µL上清转移至黑色酶标板, 加入50µL/孔LDH检测底物, 10分钟后终止反应并检测(Biotek Synergy HT), 按下述

公式计算杀伤率;弃去上清后,将孔内剩余细胞用4%小牛血清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG封闭10分钟,加入T细胞早期活化标记CD69和后期标记CD25检测抗体(CD25-PE,CD4-APC,CD69-FITC和CD8-APC),冰上孵育20分钟。孵育结束后,每孔加入200 μ L 4%小牛血清洗3次,弃上清,加入60 μ L/孔PI(1:200稀释),置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪(BD FACS celesta)进行检测。

[0317] 杀伤率计算公式如下:

$$[0318] \quad \text{杀伤率(\%)} = \frac{\text{实验孔} - \text{靶细胞自发}}{\text{靶细胞最大释放} - \text{靶细胞自发}} \times 100\%$$

[0319] 图9A显示不同CD20 \times CD3抗体组合介导的对Raji细胞的TDCC杀伤作用;图9B显示在TDCC杀伤过程中,CD20 \times CD3抗体组合可刺激T细胞上调活化标志物CD69和CD25。

[0320] 4. T细胞信号通路的活化

[0321] 将荧光素酶报告质粒pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro](Promega,E8481)转染Jurkat细胞,添加200 μ g/ml潮霉素B进行筛选,获得Jurkat-NFAT luc稳转报告细胞。将CD20+靶细胞、CD20 \times CD3抗体和Jurkat-NFAT-luc报告细胞共孵育,CD20 \times CD3抗体结合靶细胞后,另一端与Jurkat细胞表面CD3受体结合,引起CD3胞内信号基序聚集,活化信号通过NFAT通路传递到核内,最终导致报告基因荧光素酶的表达上调。分别取对数生长期的Jurkat-NFAT-luc报告细胞和Raji细胞,1000rpm离心10分钟,弃上清,重悬细胞至 2×10^6 个细胞/ml。按50 μ L/孔加入Raji细胞悬液至96孔板,300g离心5分钟,弃上清;加入50 μ L/孔Jurkat-NFAT-luc细胞悬液,以及50 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度20 μ g/ml,10倍稀释,10个梯度),5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养6小时。培养结束后,按照ONE-Glo Luciferase Assay System(Promega)说明书操作,每孔加入100 μ L检测试剂,室温放置3分钟,检测荧光信号(Biotek Synergy HT)。

[0322] 图10显示,与Raji细胞共孵育时,各组CD20 \times CD3抗体均可激活Jurkat细胞的NFAT信号通路,而在无靶细胞存在时,CD20 \times CD3抗体不激活Jurkat细胞的NFAT信号通路。

[0323] 实施例5:构建不同类型轻链形成的CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体

[0324] 以人源化CD3臂(λ 轻链和配对重链)和人源化CD20抗原臂(κ 轻链和配对重链),构建具有天然IgG构型的新型CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体。在自由组合情况下, κ 轻链或 λ 轻链通常倾向于与同源的重链进行配对,因此,构建了CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 001,保留CD3臂和CD20抗原臂的天然序列;同时,为进一步减少可能产生的错配,在 κ 和 λ 轻链与同源重链配对基础上,引入稳定Fv的电荷变异体(Tan等,1998),或在C_H1/C κ 之间引入互补电荷对Glu₁₂₃Lys/Gln₁₂₄Lys和Lys₁₅₂Glu/Lys₂₁₈Glu,共设计并构建了下述5种CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体:

[0325] (1) CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 001保留CD3臂和CD20抗原臂的天然序列;

[0326] (2) CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 002同时在CD20抗原臂和CD3臂引入电荷变异体(V κ _{CD20}:Gln₃₈Lys;VH_{CD20}:Gln₃₉Glu;V λ _{CD3}:Gln₄₀Glu;VH_{CD3}:Gln₃₉Lys);

[0327] (3) CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 003基于CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 002,在CH1/C κ 之间增加互补电荷对(V κ -C κ _{CD20}:Gln₃₈Lys\Glu₁₂₃Lys\Gln₁₂₄Lys;V_H-C_H1_{CD20}:Gln₃₉Glu\Lys₁₅₂Glu\Lys₂₁₈Glu;V λ _{CD3}:Gln₄₀Glu;VH_{CD3}:Gln₃₉Lys);

[0328] (4) CD20 \times CD3 $\kappa\lambda$ 004在CD20抗原臂引入稳定Fv的电荷变异体(V κ _{CD20}:Gln₃₈Lys;VH_{CD20}:Gln₃₉Glu);

[0329] (5) CD20×CD3κλ005在CD3臂引入电荷变异体 (Vλ_{CD3}:Gln₄₀Glu; VH_{CD3}:Gln₃₉Lys)。

[0330] CD20×CD3κλ双特异抗体的Fc部分采用人IgG4knob-into-hole结构,以实现异源二聚体配对 (Atwell等,1997),并且通过突变Ser₂₂₈Pro、Leu₂₃₅Glu和Pro₃₂₉Ala,保持铰链区稳定并减弱与Fc γ受体和C1q的相互作用。图11示出了新型CD20×CD3κλ双特异抗体。

[0331] CD20×CD3κλ双特异抗体的序列见表6。

[0332] 表6、CD20×CD3κλ双特异抗体的序列

	CD20 臂	CD3 臂
	CD20×CD3 κλ001 (SEQ ID NO. 102-109):	
[0333]	κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 102 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 103 所示 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGI PDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYC QQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*	λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 106 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 107 所示 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAV TTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAED EAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLGGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYC QVTHEGSTVEKTVAPTECS*
	重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 104 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 105 所示 EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFT FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWN SGSIGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYG MDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK	重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 108 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 109 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWEAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP

[0334]

<p>DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLAS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPQSQEEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK*</p>	<p>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK*</p>
<p>CD20×CD3 κλ002 (SEQ ID NO. 110-117): V_{KCD20}: Gln₃₈Lys; V_{HCD20}: Gln₃₉Glu; V_{λCD3}: Gln₄₀Glu; V_{HCD3}: Gln₃₉Lys</p>	
<p>κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 110 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 111 所示 EIVLTQSPGTL^SSLSPGERATL^SSCRASQSVS SYLAWYQK^KPGQAPRLLIYDASNRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV^VCLLN^NFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC* 重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 113 所示 EVQLLESGGGV^VQPGGSLRLS^{CA}ASGFT FNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNS GSIGYADSVKGRFTISRDN^SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGN^{YYY}GMD YWGQGT^LTVSSASTKGPSV^FPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVT^SWNSG ALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSL^{SS}VTVPS SSLG^TKTYTCNV^DHKPSNTK^VDKR^VESK YGP^{PC}PPCAPEFEGG^PSVFL^FPPK^PPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASS IEKTISKAKGQPREPQVCTLPQSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK*</p>	<p>λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 115 所示 QAVVTQEP^SSLTVSPGGT^VTLT^{CR}SSTGAV TTSNYANWVQEK^KPGQAPRGLIGGT^NKR APWTPARFSGSLLGGKAAL^TITGAQAED EAEYYC^VLWY^{SNLW}VFGG^TTKLT^VLGQ PKAAPSV^TLFPPSSEELQ^{AN}KATL^VCLIS DFYPGAVTVAWKADSSP^VKAGVET^TTPS KQSN^NKYAASSYL^SLTPEQ^{WK}SHRSY^SC QVTHEGSTVEK^TVAPTECS* 重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 117 所示 EVQLVESGGGLV^VQPGGSLRLS^{CA}ASGFT FNTYAMN^{WVR}KAPGKGLEW^VGRIRSK YNNYATYADSVKDRFTISR^{DD}S^KNSLY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGN^FGN^SYV SWFAYWGQGT^LTVSSASTKGPSV^FPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT^S WNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSL^{SS}V VTVPS^SSLG^TKTYTCNV^DHKPSNTK^VDK RVESKYGP^{PC}PPCAPEFEGG^PSVFL^FPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK*</p>
<p>CD20×CD3 κλ003 (SEQ ID NO. 114-121): V_K-C_KCD20: Gln₃₈Lys\Glu₁₂₃Lys\Gln₁₂₄Lys; V_H-C_H1CD20: Gln₃₉Glu\Lys₁₅₂Glu\Lys₂₁₈Glu; V_{λCD3}: Gln₄₀Glu; V_{HCD3}: Gln₃₉Lys</p>	
<p>κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 118 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 119 所示 EIVLTQSPGTL^SSLSPGERATL^SSCRASQSVS SYLAWYQK^KPGQAPRLLIYDASNRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSD^KLKLSGTASV^VCLLN^NFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC* 重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 120 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 121 所示 EVQLLESGGGV^VQPGGSLRLS^{CA}ASGFT FNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNS GSIGYADSVKGRFTISRDN^SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGN^{YYY}GMD YWGQGT^LTVSSASTKGPSV^FPLAPCSR STSESTAALGCLVEDYFPEPVT^SWNSG</p>	<p>λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 115 所示 QAVVTQEP^SSLTVSPGGT^VTLT^{CR}SSTGAV TTSNYANWVQEK^KPGQAPRGLIGGT^NKR APWTPARFSGSLLGGKAAL^TITGAQAED EAEYYC^VLWY^{SNLW}VFGG^TTKLT^VLGQ PKAAPSV^TLFPPSSEELQ^{AN}KATL^VCLIS DFYPGAVTVAWKADSSP^VKAGVET^TTPS KQSN^NKYAASSYL^SLTPEQ^{WK}SHRSY^SC QVTHEGSTVEK^TVAPTECS* 重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 117 所示 EVQLVESGGGLV^VQPGGSLRLS^{CA}ASGFT FNTYAMN^{WVR}KAPGKGLEW^VGRIRSK YNNYATYADSVKDRFTISR^{DD}S^KNSLY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGN^FGN^SYV SWFAYWGQGT^LTVSSASTKGPSV^FPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT^S</p>

[0335]

<p>ALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL^SSLGK*</p>	<p>WNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVLSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL^SSLGK*</p>
<p>CD20×CD3 κλ004 (SEQ ID NO. 106-113):</p>	<p>Vκ_{CD20}: Gln₃₈Lys; VH_{CD20}: Gln₃₉Glu</p>
<p>κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 110 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 111 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQKPKGPQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*</p> <p>重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 113 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRSLCAASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL^SSLGK*</p>	<p>λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 106 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 107 所示 QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALITGAQAEDA EAYYCVLWYNSLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS^HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*</p> <p>重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 108 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 109 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVLSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL^SSLGK*</p>
<p>CD20×CD3 κλ005 (SEQ ID NO. 102-105, 114-117):</p>	<p>Vλ_{CD3}: Gln₄₀Glu; VH_{CD3}: Gln₃₉Lys</p>
<p>κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 102 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 103 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQKPKGPQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*</p> <p>重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 104 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 105 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRSLCAASGFTFNDYAMHWVRRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYGM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW</p>	<p>λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 115 所示 QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALITGAQAEDA EAYYCVLWYNSLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS^HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS*</p> <p>重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 117 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW</p>

[0336]

NSGALTSQVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLAS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMT KNQVLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK*	WNSGALTSQVHTFPVAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTYTCNVDPKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGLGK*
---	---

[0337] CD20×CD3κλ双特异抗体的表达和纯化

[0338] 将编码相应抗体片段的质粒,按κ轻链:λ轻链:重链1:重链2=2:2:1:1的比率混合,与3mg/mL PEI混合后,共同转染CHO-S细胞,在500mL CD CHO AGT培养基(Gibco#12490-001) 37℃ 5% CO₂ 150rpm培养,分别在瞬转第2、4和6天,加入4% CHO Feed C+补料(Gibco# A25031-05)。当细胞活率降至85%左右,收获发酵液,过滤后经Protein A亲和层析纯化。浓缩换液到PBS中,测定吸光度(Nanodrop),通过理论消光系数计算蛋白浓度。

[0339] SEC-HPLC和毛细管电泳检测显示,CD20×CD3κλ双特异抗体单体纯度均接近或高于90%(表7),其中κλ轻链的比率接近1:1(图12)。

[0340] 表7、CD20×CD3κλ双特异抗体的纯度(SEC-HPLC)

κλ 双特异抗体	SEC-HPLC (%)		
	聚体	单体	片段
CD20×CD3 κλ001	4.1	92.5	3.5
CD20×CD3 κλ002	4.6	90.8	4.5
CD20×CD3 κλ003	3.1	88.3	8.6
CD20×CD3 κλ004	4.8	91.1	4.0
CD20×CD3 κλ005	6.0	90.5	3.5

[0342] 使用Capto S ImpAct离子交换层析,对CD20×CD3κλ双特异抗体进一步精制纯化,通过梯度洗脱,合并洗脱峰,SEC-HPLC单体含量显示高于99%(图13)。CD20×CD3κλ002和CD20×CD3κλ003纯化样品中,轻链错配比率极低(<1%),未检测到CD3同源二聚体或CD20同源二聚体(图14)。

[0343] 实施例6:CD20×CD3κλ双特异抗体的结合活性

[0344] 分别通过检测与CD20过表达稳转细胞或CD20+肿瘤细胞的结合,确定双特异抗体CD20抗原臂的亲和力,通过检测与CD3重组抗原、Jurkat细胞或新鲜分离的外周血T细胞的结合,确定双特异抗体CD3臂的亲和力。检测结果显示,新型CD20×CD3κλ双特异抗体与肿瘤细胞的亲和力高于与T细胞的亲和力约3~5倍。阳性对照抗体bsAB1按文献US20170174781合成并表达制备。

[0345] 1. CD20×CD3κλ双特异抗体与人和猴CD20稳转细胞的结合

[0346] 取对数生长期的实施例1制备的CHO-人CD20和CHO-猴CD20稳转细胞,用4%小牛血清(Hyclone, SH30626.06)调整细胞至5×10⁵个细胞/ml,加入100μl/孔细胞悬液至96孔U型板,300g离心5分钟,弃上清,每孔加入100μL梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,12个梯度),4℃孵育60分钟。二抗加入50μL/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50μL/孔PI溶液(1:300),孵育5分钟,用流式细胞仪进

行检测。

[0347] 图15和表8显示,CD20×CD3κλ双特异抗体高亲和力结合细胞CD20受体,在人和猴CD20稳转细胞上的亲和力相当。

[0348] 表8、CD20×CD3κλ双特异抗体和CD20稳转细胞的结合

EC ₅₀	人CD20-CHO	猴CD20-CHO
CD20×CD3κλ001	10nM	12nM
CD20×CD3κλ002	9nM	8nM
CD20×CD3κλ003	7nM	8nM
CD20×CD3κλ004	8nM	10nM
CD20×CD3κλ005	9nM	14nM
KLH×CD3	不结合	不结合

[0350] 2. CD20×CD3κλ双特异抗体与人CD20⁺肿瘤细胞的结合

[0351] 取对数生长期的SU-DHL-4、Raji和NALM-6细胞,加入200μg/mL鼠IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03) 冰浴封闭30分钟,用4%小牛血清调整细胞至5×10⁵细胞/mL,每孔100μL加入96孔U型板,300g离心5分钟,弃上清,每孔加入100μL梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,12个梯度),4℃孵育60分钟。洗去一抗,加入50μL/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50μL/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。

[0352] 检测结果见图16和表9,CD20×CD3κλ双特异抗体高亲和力结合CD20⁺肿瘤细胞SU-DHL-4、Raji和NALM-6。

[0353] 表9、CD20×CD3κλ双特异抗体和CD20⁺肿瘤细胞的结合

EC ₅₀ (nM)	SU-DHL-4	Raji	NALM-6
CD20×CD3κλ002	7	23	10
CD20×CD3κλ003	6	25	8
bsAB1	19	115	48
KLH×CD3	不结合	不结合	不结合

[0355] 3. CD20×CD3κλ双特异抗体与人和猴CD3重组抗原的结合

[0356] 包被1μg/mL的人或猴CD3 γ/ε重组抗原,4℃过夜。脱脂牛奶封闭后,每孔加入100μL抗体(起始浓度60μg/mL,3倍稀释,共12个梯度),室温孵育1小时。二抗每孔加入100μL山羊抗人F'(ab)2(1:4000稀释),室温孵育1小时。TMB显色10分钟,加入50μL浓硫酸终止反应,酶标仪读数OD450nm,使用Graphpad软件进行三参数拟合曲线。

[0357] 检测结果见图17,CD20×CD3κλ双特异抗体识别人和食蟹猴CD3ε γ重组抗原,亲和力相当。

[0358] 4. CD20×CD3κλ双特异抗体与CD3重组抗原的亲和力测定

[0359] 将10μg/mL人或猴CD3ε γ重组抗原通过氨基偶联结合到CM5芯片(GE healthcare),控制抗原结合量约200RU。基线平稳后,将梯度稀释的抗体(从10μg/mL起,2倍稀释7个梯度),以30μL/min的流速流过芯片,结合时间350秒,解离时间600秒。用Biacore T200evaluation软件以1:1结合模型,拟合得到动力学常数。亲和力测定结果见表10。

[0360] 表10、CD20×CD3κλ双特异抗体与CD3重组抗原的亲和力

[0361]	KD (nM)	人CD3 ϵ γ	猴CD3 ϵ γ
	CD20 \times CD3 κ 002	24.2	31.5
	CD20 \times CD3 κ 003	26.4	34.3
	KLH \times CD3	21.6	21.6

[0362] 5. CD20 \times CD3 κ 双特异抗体与Jurkat细胞的结合

[0363] 取对数生长期的Jurkat细胞,加入200 μ g/mL鼠IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03),冰浴30分钟。用4%小牛血清调整细胞至 5×10^5 细胞/mL,每孔100 μ L加入96孔U型板,300g离心去上清,每孔加入100 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,12个梯度),4 $^{\circ}$ C孵育60分钟。二抗加入50 μ L/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰上孵育20分钟,洗1次后加入50 μ L/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD C6)进行检测。

[0364] 检测结果如图18和表11,CD20 \times CD3 κ 双特异抗体以中等亲和力结合人白血病T细胞系Jurkat细胞, EC_{50} 约71-120nM,低于CD20抗原臂与CD20受体的结合力约10倍。

[0365] 表11、CD20 \times CD3 κ 双特异抗体和Jurkat细胞的结合

[0366]	EC50	Jurkat
	CD20 \times CD3 κ 002	71nM
	CD20 \times CD3 κ 003	120nM
	bsAB1	ND
	KLH \times CD3	33nM

[0367] ND:高浓度条件下未达到饱和

[0368] 6. CD20 \times CD3 κ 双特异抗体与人或食蟹猴外周血T细胞的结合

[0369] 取新鲜人或食蟹猴外周血,通过Ficoll.Paque Plu (GE,17-1440-03)分离得到PBMC。将PBMC用4%小牛血清(Hyclone,SH30626.06)调整细胞至 5×10^5 个细胞/mL,100 μ L/孔加入96孔U型板,离心弃上清,每孔加入100 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度1800nM,3倍稀释,11个梯度),4 $^{\circ}$ C孵育60分钟。二抗加入50 μ L/孔Alexa Fluro647标记的山羊抗人IgG Fc(1:300稀释),冰浴20分钟,洗1次后加入50 μ L/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD C6)进行检测。

[0370] 检测结果见图19和表12,CD20 \times CD3 κ 双特异抗体识别人或食蟹猴外周血CD4 $^{+}$ T和CD8 $^{+}$ T细胞,与人T细胞亲和力约65-98nM,与食蟹猴T细胞亲和力约89-124nM,亲和力相当,均弱于CD20抗原臂与CD20受体的结合力约10倍,有利于双特异抗体优先富集到肿瘤细胞。

[0371] 表12、CD20 \times CD3 κ 双特异抗体和外周血T细胞的结合

[0372]	EC50 (nM)	人 CD4 $^{+}$ T	人 CD8 $^{+}$ T	猴 CD4 $^{+}$ T	猴 CD8 $^{+}$ T
	CD20 \times CD3 κ 002	73	98	97	124
	CD20 \times CD3 κ 003	69	65	89	120
[0373]	bsAB1	25	22	ND	150
	KLH-CD3	62	65	69	85

[0374] ND:高浓度条件下未达到饱和

[0375] 实施例7:CD20 \times CD3 κ 双特异抗体介导的TDCC

[0376] 取新鲜分离得到的PBMC分别与处于对数生长期的靶细胞NALM-6、TMD-8和Toledo细胞混合,效应/靶细胞=8:1,每孔加入50 μ L梯度稀释的抗体(抗体浓度从66.7nM起,10倍稀释,8个梯度),5%CO₂ 37 $^{\circ}$ C培养24小时。培养结束后,将50 μ L上清转移至新的黑色酶标板,加入50 μ L/孔LDH检测底物,10分钟后终止反应并检测LDH释放;孔内剩余细胞用4%小牛血清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG孵育10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-PE,CD4-APC,CD69-FITC和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60 μ L/孔PI,置于冰上孵育5分钟,用流式细胞仪进行检测。

[0377] 图20A、20B分别显示CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对人B淋巴白血病细胞Nalm-6的杀伤和对T细胞的活化。图21A、21B分别显示CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对TMD-8细胞的杀伤和对T细胞的活化。图22A、22B分别显示CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对Toledo细胞的杀伤和对T细胞的活化。对于CD20表达水平不同的肿瘤细胞Nalm-6、TMD-8和Toledo,CD20 \times CD3 κ λ 002和CD20 \times CD3 κ λ 003均可介导T细胞产生有效杀伤,杀伤活性与对照抗体bsAB1相当或略强,且对T细胞的激活作用较后者更为温和。

[0378] 实施例8:CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对T细胞活化通路的激活

[0379] 取对数生长期的Jurkat-NFAT-luc报告细胞和CD20阳性靶细胞(SU-DHL-4、Raji和NALM-6细胞),离心弃上清,重悬至2 \times 10⁶个细胞/ml。50 μ l/孔接种靶细胞至96孔板,300g离心5分钟弃上清,50 μ l/孔接种Jurkat-NFAT-luc报告细胞至96孔板,每孔加入50 μ L梯度稀释的CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体或对照抗体KLH \times CD3(起始浓度20 μ g/ml,10倍稀释,10个梯度),5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养6小时。培养结束后,按照ONE-Glo Luciferase Assay System说明书,每孔加入100 μ L检测试剂,室温放置3分钟,于酶标仪(Biotek Synergy HT)检测。

[0380] 检测结果见图23和表13,CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体以不同CD20表达水平的肿瘤细胞为靶细胞时,均可激活T细胞的NFAT信号通路。

[0381] 表13、CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对T细胞NFAT通路的激活

[0382]

EC ₅₀ (nM)	SU-DHL-4	Raji	NALM-6
CD20 \times CD3 κ λ 002	0.10	0.02	0.14
CD20 \times CD3 κ λ 003	0.11	0.02	0.14
KLH \times CD3	-	-	-

[0383] 实施例9:CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体激活细胞因子的释放

[0384] 在介导对B-NHL肿瘤细胞Raji或自身B细胞杀伤过程中,CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体可激活T细胞并刺激PBMC中相关细胞因子的释放。将每孔2 \times 10⁵个新鲜的PBMC,与1 \times 10⁵个Raji细胞和50 μ L梯度稀释的抗体(起始浓度66.7nM,10倍稀释,8个梯度)混合,5%CO₂,37 $^{\circ}$ C培养24小时。通过微量样本多指标流式蛋白定量技术(cytometric bead array,CBA),测定培养上清中的IL-2、IL-6、IFN- γ 和TNF- α 等含量。弃去孔内上清后,将孔内剩余细胞用4%小牛血清洗2次后,加入100 μ g/mL人IgG封闭10分钟,再加入T细胞活化检测抗体(CD25-PE,CD4-APC,CD69-FITC和CD8-APC),冰上孵育20分钟。洗涤弃上清,加入60 μ L/孔PI,孵育5分钟,用流式细胞仪(BD FACS celesta)检测CD4+和CD8+T细胞的活化标志。对自身B细胞的杀伤试验步骤同上,但孵育时不加入Raji细胞。

[0385] 图24显示CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对Raji细胞的TDCC活性及过程中T细胞的活化。图25显示CD20 \times CD3 κ λ 双特异抗体对自体B细胞的清除及过程中T细胞的活化。图26显示对

Raji细胞的杀伤或对自体B细胞的清除过程中相关细胞因子的释放。当CD20×CD3κλ双特异抗体与CD20高表达的Raji细胞和PBMC共孵育时,或仅与PBMC孵育时,其介导的对Raji细胞或自身B细胞的杀伤活性与对照抗体bsAB1相当或略强,但在TDC过程中对T细胞的激活作用相对更为温和,标志物CD69和CD25的表达上调显著低于或不高于对照抗体,同样刺激细胞因子IL-6、INF-γ、IL-2和TNF-α的分泌量显著低于或不高于后者,而IL-6和INF-γ等的大量释放可引发严重的细胞因子风暴综合征。

[0386] 实施例10:CD20×CD3κλ双特异抗体与Fcγ受体的结合

[0387] 将50μg/ml His-Tag抗体通过氨基偶联到CM5芯片,分别捕获带有His标签的FcγRI、FcγRIIA_{H131}和FcγRIIIA_{V158}重组蛋白(Sino Biological,#10256-H08H/10374-H08H1/10389-H08H1),捕获时间40秒,流速10μL/min,基线平稳后,将梯度稀释的抗体(起始浓度37.5μg/mL,2倍稀释)以30μL/min的流速流过芯片,结合时间120秒,解离时间200秒,用Biacore evaluation软件拟合得到亲和力常数。

[0388] 由表14可见,CD20×CD3κλ双特异抗体与FcγRI、FcγRIIA_{H131}和FcγRIIIA_{V158}均无结合;野生型IgG4对照抗体以较强亲和力结合FcγRI,与FcγRIIA_{H131}有微弱结合。

[0389] 表14、CD20×CD3κλ双特异抗体与Fcγ受体的亲和力

[0390]

KD	FcγRI	FcγRIIA _{H131}	FcγRIIIA _{V158}
CD20×CD3κλ002	不结合	不结合	不结合
CD20×CD3κλ003	不结合	不结合	不结合
IgG4同型对照	14nM	微弱	不结合

[0391] 实施例11:免疫重建小鼠皮下Raji移植瘤模型

[0392] 选择6~8周雌性B-NGD小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),皮下接种 3×10^6 Raji细胞,待肿瘤长至60mm³时,随机分组,分别设定为给药组3.0mg/kg、给药组0.6mg/kg、给药组0.12mg/kg和阴性对照组KLH×CD3 3mg/kg。每只小鼠尾静脉注射 1×10^7 个PBMC细胞,3天后开始第一次小鼠给药,给药间隔为5天一次,共给药3次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。

[0393] 结果见图27,CD20×CD3κλ双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性,中剂量和高剂量抑瘤率分别为82%和89%。荷瘤小鼠对以上剂量耐受良好,无体重减轻等不良反应。图28显示,低剂量组(0.12mg/kg)CD20×CD3κλ002在4只小鼠实现肿瘤抑制(n=5)。

[0394] 实施例12:免疫缺陷型小鼠皮下Raji与人PBMC混合接瘤模型

[0395] 选择6~8周雌性B-NGD小鼠(百奥赛图生物科技有限公司),将Raji(3×10^6 个)和人PBMC(5×10^6 个)混合后接种于小鼠皮下,待肿瘤成瘤体积到达60-100mm³时,随机分组。分别设定为给药组3.0mg/mL、给药组0.6mg/mL、给药组0.12mg/mL和阴性对照组KLH×CD3 3mg/kg。给药间隔为5天一次,共给药2次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重,实验结束后断颈处死小鼠,取瘤称重并记录。

[0396] 结果见图29,CD20×CD3κλ双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性,低、中和高剂量抑瘤率分别为65%、98%和162%,高、中剂量组肿瘤完全抑制或消退。

[0397] 实施例13:CD20×CD3κλ双特异抗体在食蟹猴中的药效

[0398] 将8只食蟹猴分配至4个剂量组,每个剂量组由2只猴子组成,雌雄各半。各剂量组接受的给药剂量分别为0.3、1、3mg/kg(每周1次,给药3周,共4次给药)和1mg/kg(单次给药)

CD20×CD3κλ002双特异抗体,给药方案见表15。给药期及恢复期,各组所有猴一般状况良好,未见毒性反应,未见死亡或濒死。各剂量组体温未见明显异常改变,II导联心电图波形正常,其心率、R-R间期、P-R间期、QT间期、QRS时限、收缩压、舒张压等指标未见明显异常。在给药后不同时间点,通过流式细胞技术分析外周血中B和T细胞群体数量的变化,B细胞使用细胞表面标记物CD20鉴定(CD20+细胞),T细胞使用CD3鉴定(CD3+细胞)。给药后8小时,外周血中B被快速清除,24小时已低于检测下限(图30)。

[0399] 表15、CD20×CD3κλ双特异抗体给药方案

组别	剂量	给药途径及频率	性别	动物号
低剂量组	0.3 mg/kg	IV, 每周1次/3周 D1、D8、D15、D22	雄	2016221
			雌	2016222
中剂量组	1 mg/kg	IV, 每周1次/3周 D1、D8、D15、D22	雄	2016223
			雌	2016224
高剂量组	3 mg/kg	IV, 每周1次/3周 D1、D8、D15、D22	雄	2016225
			雌	2016226
中剂量组	1 mg/kg	IV, D1 单次给药	雌	2016227
			雄	2016228

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 康诺亚生物医药科技(成都)有限公司
 [0003] <120> 一种含有衔接器的药物治疗剂的开发和应用
 [0004] <130> MTI20104
 [0005] <160> 121
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 306
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> Homo sapiens
 [0011] <400> 1
 [0012] Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys Val Tyr Asp Tyr Gln Glu
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys Asn Ile Thr
 [0015] 20 25 30
 [0016] Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu Asp Lys Lys
 [0017] 35 40 45
 [0018] Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly Met Tyr Gln
 [0019] 50 55 60
 [0020] Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val Tyr Tyr Arg
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 [0023] 85 90 95
 [0024] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 [0025] 100 105 110
 [0026] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 [0027] 115 120 125
 [0028] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 [0029] 130 135 140
 [0030] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 [0031] 145 150 155 160
 [0032] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 [0033] 165 170 175
 [0034] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu
 [0035] 180 185 190
 [0036] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
 [0037] 195 200 205
 [0038] Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 [0039] 210 215 220
 [0040] Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 [0041] 225 230 235 240

[0042]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[0043]	245 250 255
[0044]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0045]	260 265 270
[0046]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0047]	275 280 285
[0048]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[0049]	290 295 300
[0050]	Gly Lys
[0051]	305
[0052]	<210> 2
[0053]	<211> 339
[0054]	<212> PRT
[0055]	<213> Homo sapiens
[0056]	<400> 2
[0057]	Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
[0058]	1 5 10 15
[0059]	Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
[0060]	20 25 30
[0061]	Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
[0062]	35 40 45
[0063]	Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
[0064]	50 55 60
[0065]	Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
[0066]	65 70 75 80
[0067]	Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
[0068]	85 90 95
[0069]	Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
[0070]	100 105 110
[0071]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0072]	115 120 125
[0073]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[0074]	130 135 140
[0075]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0076]	145 150 155 160
[0077]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
[0078]	165 170 175
[0079]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0080]	180 185 190
[0081]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu
[0082]	195 200 205
[0083]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

[0084]	210	215	220
[0085]	Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0086]	225	230	235 240
[0087]	Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[0088]		245	250 255
[0089]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[0090]		260	265 270
[0091]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
[0092]		275	280 285
[0093]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0094]	290	295	300
[0095]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
[0096]	305	310	315 320
[0097]	Gly Lys Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu		
[0098]		325	330 335
[0099]	Trp His Glu		
[0100]	<210> 3		
[0101]	<211> 305		
[0102]	<212> PRT		
[0103]	<213> Homo sapiens		
[0104]	<400> 3		
[0105]	Gln Ser Phe Glu Glu Asn Arg Lys Leu Asn Val Tyr Asn Gln Glu Asp		
[0106]	1	5	10 15
[0107]	Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys His Val Lys Asn Thr Asn Ile Thr Trp		
[0108]		20	25 30
[0109]	Phe Lys Glu Gly Lys Met Ile Asp Ile Leu Thr Ala His Lys Asn Lys		
[0110]		35	40 45
[0111]	Trp Asn Leu Gly Ser Asn Thr Lys Asp Pro Arg Gly Val Tyr Gln Cys		
[0112]	50	55	60
[0113]	Lys Gly Ser Lys Asp Lys Ser Lys Thr Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met		
[0114]	65	70	75 80
[0115]	Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro		
[0116]		85	90 95
[0117]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[0118]		100	105 110
[0119]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
[0120]		115	120 125
[0121]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[0122]		130	135 140
[0123]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[0124]	145	150	155 160
[0125]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		

[0126]		165		170		175
[0127]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys					
[0128]		180		185		190
[0129]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr					
[0130]		195		200		205
[0131]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser					
[0132]		210		215		220
[0133]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
[0134]		225		230		235
[0135]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
[0136]		245		250		255
[0137]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
[0138]		260		265		270
[0139]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
[0140]		275		280		285
[0141]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
[0142]		290		295		300
[0143]	Lys					
[0144]	305					
[0145]	<210> 4					
[0146]	<211> 330					
[0147]	<212> PRT					
[0148]	<213> Homo sapiens					
[0149]	<400> 4					
[0150]	Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln					
[0151]	1	5		10		15
[0152]	Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu					
[0153]		20		25		30
[0154]	Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser					
[0155]		35		40		45
[0156]	Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly					
[0157]		50		55		60
[0158]	Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His					
[0159]		65		70		75
[0160]	His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp					
[0161]		85		90		95
[0162]	Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys					
[0163]		100		105		110
[0164]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val					
[0165]		115		120		125
[0166]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr					
[0167]		130		135		140

[0168]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[0169]	145 150 155 160
[0170]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[0171]	165 170 175
[0172]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[0173]	180 185 190
[0174]	Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[0175]	195 200 205
[0176]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu
[0177]	210 215 220
[0178]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[0179]	225 230 235 240
[0180]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[0181]	245 250 255
[0182]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[0183]	260 265 270
[0184]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
[0185]	275 280 285
[0186]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[0187]	290 295 300
[0188]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile
[0189]	305 310 315 320
[0190]	Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
[0191]	325 330
[0192]	<210> 5
[0193]	<211> 109
[0194]	<212> PRT
[0195]	<213> Homo sapiens
[0196]	<400> 5
[0197]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0198]	1 5 10 15
[0199]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0200]	20 25 30
[0201]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
[0202]	35 40 45
[0203]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[0204]	50 55 60
[0205]	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
[0206]	65 70 75 80
[0207]	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0208]	85 90 95
[0209]	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0210]		100		105
[0211]	<210>	6		
[0212]	<211>	327		
[0213]	<212>	DNA		
[0214]	<213>	Homo sapiens		
[0215]	<400>	6		
[0216]		caggetgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg	60	
[0217]		acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcagcag	120	
[0218]		aagcccggcc aggctcctag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttgaca	180	
[0219]		cccgcagat tctctggata tctgctcggc gaaaggccg ctctgacact ttctgggtct	240	
[0220]		cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gcctgtggt acagcaacct gtgggtgttc	300	
[0221]		ggcggaggca ccaaactgac agttctg	327	
[0222]	<210>	7		
[0223]	<211>	14		
[0224]	<212>	PRT		
[0225]	<213>	Homo sapiens		
[0226]	<400>	7		
[0227]		Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn		
[0228]		1	5	10
[0229]	<210>	8		
[0230]	<211>	8		
[0231]	<212>	PRT		
[0232]	<213>	Homo sapiens		
[0233]	<400>	8		
[0234]		Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro		
[0235]		1	5	
[0236]	<210>	9		
[0237]	<211>	9		
[0238]	<212>	PRT		
[0239]	<213>	Homo sapiens		
[0240]	<400>	9		
[0241]		Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val		
[0242]		1	5	
[0243]	<210>	10		
[0244]	<211>	109		
[0245]	<212>	PRT		
[0246]	<213>	Homo sapiens		
[0247]	<400>	10		
[0248]		Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
[0249]		1	5	10
[0250]		Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
[0251]		20	25	30

[0252] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0253] 35 40 45
 [0254] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0255] 50 55 60
 [0256] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0257] 65 70 75 80
 [0258] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0259] 85 90 95
 [0260] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0261] 100 105
 [0262] <210> 11
 [0263] <211> 327
 [0264] <212> DNA
 [0265] <213> Homo sapiens
 [0266] <400> 11
 [0267] cagcgtgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0268] acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0269] aagcccggcc aggtccttag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttgaca 180
 [0270] cccgccagat tctctggata tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacact ttctgggtct 240
 [0271] cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gcctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0272] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0273] <210> 12
 [0274] <211> 109
 [0275] <212> PRT
 [0276] <213> Homo sapiens
 [0277] <400> 12
 [0278] Glu Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0279] 1 5 10 15
 [0280] Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Ser Ser Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0281] 20 25 30
 [0282] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0283] 35 40 45
 [0284] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Glu Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0285] 50 55 60
 [0286] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0287] 65 70 75 80
 [0288] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0289] 85 90 95
 [0290] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0291] 100 105
 [0292] <210> 13
 [0293] <211> 327

[0294] <212> DNA
 [0295] <213> Homo sapiens
 [0296] <400> 13
 [0297] gagcgtgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0298] acctgtgagt cttctgacgg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0299] aagccccggcc aggctcctag aggactgacg ggcggaacaa acaaggaggc cccttggaca 180
 [0300] cccgccagat tctctggatc tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacaact ttctgggtgt 240
 [0301] cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0302] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0303] <210> 14
 [0304] <211> 14
 [0305] <212> PRT
 [0306] <213> Homo sapiens
 [0307] <400> 14
 [0308] Glu Ser Ser Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 [0309] 1 5 10
 [0310] <210> 15
 [0311] <211> 8
 [0312] <212> PRT
 [0313] <213> Homo sapiens
 [0314] <400> 15
 [0315] Gly Gly Thr Asn Lys Glu Ala Pro
 [0316] 1 5
 [0317] <210> 16
 [0318] <211> 109
 [0319] <212> PRT
 [0320] <213> Homo sapiens
 [0321] <400> 16
 [0322] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0323] 1 5 10 15
 [0324] Thr Val Thr Leu Thr Cys Glu Ser Ser Asp Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0325] 20 25 30
 [0326] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0327] 35 40 45
 [0328] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Glu Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0329] 50 55 60
 [0330] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0331] 65 70 75 80
 [0332] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0333] 85 90 95
 [0334] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0335] 100 105

[0336] <210> 17
 [0337] <211> 327
 [0338] <212> DNA
 [0339] <213> Homo sapiens
 [0340] <400> 17
 [0341] caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0342] acctgtgagt cttctgacgg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0343] aagcccggcc aggtccttag aggactgac ggcggaacaa acaaggagc cccttggaca 180
 [0344] cccgccagat tctctggatc tctgctcgcc ggaaaggccg ctctgacact ttctggtgct 240
 [0345] cagcctgagg acgaggccga gtactattgt gccctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0346] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0347] <210> 18
 [0348] <211> 109
 [0349] <212> PRT
 [0350] <213> Homo sapiens
 [0351] <400> 18
 [0352] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0353] 1 5 10 15
 [0354] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0355] 20 25 30
 [0356] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0357] 35 40 45
 [0358] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0359] 50 55 60
 [0360] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 [0361] 65 70 75 80
 [0362] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0363] 85 90 95
 [0364] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0365] 100 105
 [0366] <210> 19
 [0367] <211> 327
 [0368] <212> DNA
 [0369] <213> Homo sapiens
 [0370] <400> 19
 [0371] caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0372] acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [0373] aagcccggcc aggtccttag aggactgac ggcggaacaa acaagagagc cccttggaca 180
 [0374] cccgccagat tctctggatc tctgctcgcc ggaaaggccg ctctgacaat cactggtgct 240
 [0375] caggctgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [0376] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0377] <210> 20

[0378] <211> 8
 [0379] <212> PRT
 [0380] <213> Homo sapiens
 [0381] <400> 20
 [0382] Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 [0383] 1 5
 [0384] <210> 21
 [0385] <211> 9
 [0386] <212> PRT
 [0387] <213> Homo sapiens
 [0388] <400> 21
 [0389] Val Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 [0390] 1 5
 [0391] <210> 22
 [0392] <211> 109
 [0393] <212> PRT
 [0394] <213> Homo sapiens
 [0395] <400> 22
 [0396] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [0397] 1 5 10 15
 [0398] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [0399] 20 25 30
 [0400] Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [0401] 35 40 45
 [0402] Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [0403] 50 55 60
 [0404] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 [0405] 65 70 75 80
 [0406] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [0407] 85 90 95
 [0408] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0409] 100 105
 [0410] <210> 23
 [0411] <211> 327
 [0412] <212> DNA
 [0413] <213> Homo sapiens
 [0414] <400> 23
 [0415] caggetgtgg tcacacaaga gcttagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60
 [0416] acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg gttccaggag 120
 [0417] aagcccggcc aggctcctag aggactgata tacggaacaa acaagagagc cccttgagaca 180
 [0418] cccgccagat tctctggatc tctgctcggc ggaaaggcgg ctctgacact ttctgggtgct 240
 [0419] caggetgagg acgaggccga gtactattgt gtctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300

[0420] ggcggaggca ccaaactgac agttctg 327
 [0421] <210> 24
 [0422] <211> 125
 [0423] <212> PRT
 [0424] <213> Homo sapiens
 [0425] <400> 24
 [0426] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0427] 1 5 10 15
 [0428] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0429] 20 25 30
 [0430] Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0431] 35 40 45
 [0432] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0433] 50 55 60
 [0434] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0435] 65 70 75 80
 [0436] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0437] 85 90 95
 [0438] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0439] 100 105 110
 [0440] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0441] 115 120 125
 [0442] <210> 25
 [0443] <211> 375
 [0444] <212> DNA
 [0445] <213> Homo sapiens
 [0446] <400> 25
 [0447] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0448] tcttgtgccg ccagcggctt caccttcaac acctacgeta tgaactgggt ccgacaggcc 120
 [0449] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0450] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0451] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0452] cagggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgct actggggcca gggcacactg 360
 [0453] gtcacagtta gctct 375
 [0454] <210> 26
 [0455] <211> 6
 [0456] <212> PRT
 [0457] <213> Homo sapiens
 [0458] <400> 26
 [0459] Asn Thr Tyr Ala Met Asn
 [0460] 1 5
 [0461] <210> 27

[0462] <211> 18
 [0463] <212> PRT
 [0464] <213> Homo sapiens
 [0465] <400> 27
 [0466] Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0467] 1 5 10 15
 [0468] Lys Asp
 [0469] <210> 28
 [0470] <211> 14
 [0471] <212> PRT
 [0472] <213> Homo sapiens
 [0473] <400> 28
 [0474] His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0475] 1 5 10
 [0476] <210> 29
 [0477] <211> 125
 [0478] <212> PRT
 [0479] <213> Homo sapiens
 [0480] <400> 29
 [0481] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0482] 1 5 10 15
 [0483] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0484] 20 25 30
 [0485] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0486] 35 40 45
 [0487] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0488] 50 55 60
 [0489] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0490] 65 70 75 80
 [0491] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0492] 85 90 95
 [0493] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0494] 100 105 110
 [0495] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0496] 115 120 125
 [0497] <210> 30
 [0498] <211> 375
 [0499] <212> DNA
 [0500] <213> Homo sapiens
 [0501] <400> 30
 [0502] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0503] tcttgtgccg ccagcggctt caccttctcc acctacgeta tgaactgggt ccgaaaggcc 120

[0504] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0505] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0506] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0507] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [0508] gtcacagtta gctct 375
 [0509] <210> 31
 [0510] <211> 6
 [0511] <212> PRT
 [0512] <213> Homo sapiens
 [0513] <400> 31
 [0514] Ser Thr Tyr Ala Met Asn
 [0515] 1 5
 [0516] <210> 32
 [0517] <211> 125
 [0518] <212> PRT
 [0519] <213> Homo sapiens
 [0520] <400> 32
 [0521] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0522] 1 5 10 15
 [0523] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0524] 20 25 30
 [0525] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0526] 35 40 45
 [0527] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0528] 50 55 60
 [0529] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0530] 65 70 75 80
 [0531] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0532] 85 90 95
 [0533] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Glu Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0534] 100 105 110
 [0535] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0536] 115 120 125
 [0537] <210> 33
 [0538] <211> 375
 [0539] <212> DNA
 [0540] <213> Homo sapiens
 [0541] <400> 33
 [0542] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0543] tcttgtgccg ccagcggctt caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0544] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0545] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240

[0546] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0547] caccgcaact tcggcgagag ctatgtgtct tggtttgct actggggcca gggcacactg 360
 [0548] gtcacagtta gctct 375
 [0549] <210> 34
 [0550] <211> 14
 [0551] <212> PRT
 [0552] <213> Homo sapiens
 [0553] <400> 34
 [0554] His Gly Asn Phe Gly Glu Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0555] 1 5 10
 [0556] <210> 35
 [0557] <211> 125
 [0558] <212> PRT
 [0559] <213> Homo sapiens
 [0560] <400> 35
 [0561] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0562] 1 5 10 15
 [0563] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0564] 20 25 30
 [0565] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0566] 35 40 45
 [0567] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0568] 50 55 60
 [0569] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0570] 65 70 75 80
 [0571] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0572] 85 90 95
 [0573] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Gln Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0574] 100 105 110
 [0575] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0576] 115 120 125
 [0577] <210> 36
 [0578] <211> 375
 [0579] <212> DNA
 [0580] <213> Homo sapiens
 [0581] <400> 36
 [0582] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0583] tcttgtgccg ccageggctt caccttctcc acctacgeta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0584] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0585] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0586] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0587] caccgcaact tcggccagag ctatgtgtct tggtttgct actggggcca gggcacactg 360

[0588] gtcacagtta gctct 375
 [0589] <210> 37
 [0590] <211> 14
 [0591] <212> PRT
 [0592] <213> Homo sapiens
 [0593] <400> 37
 [0594] His Gly Asn Phe Gly Gln Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0595] 1 5 10
 [0596] <210> 38
 [0597] <211> 125
 [0598] <212> PRT
 [0599] <213> Homo sapiens
 [0600] <400> 38
 [0601] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0602] 1 5 10 15
 [0603] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0604] 20 25 30
 [0605] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0606] 35 40 45
 [0607] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0608] 50 55 60
 [0609] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0610] 65 70 75 80
 [0611] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0612] 85 90 95
 [0613] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0614] 100 105 110
 [0615] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0616] 115 120 125
 [0617] <210> 39
 [0618] <211> 375
 [0619] <212> DNA
 [0620] <213> Homo sapiens
 [0621] <400> 39
 [0622] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0623] tcttgtgccg ccagcggett caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0624] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0625] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0626] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0627] cacggcaact tcggcgacag ctatgtgtct tggtttgct actggggcca gggcacactg 360
 [0628] gtcacagtta gctct 375
 [0629] <210> 40

[0630] <211> 14
 [0631] <212> PRT
 [0632] <213> Homo sapiens
 [0633] <400> 40
 [0634] His Gly Asn Phe Gly Asp Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0635] 1 5 10
 [0636] <210> 41
 [0637] <211> 125
 [0638] <212> PRT
 [0639] <213> Homo sapiens
 [0640] <400> 41
 [0641] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0642] 1 5 10 15
 [0643] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 [0644] 20 25 30
 [0645] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0646] 35 40 45
 [0647] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0648] 50 55 60
 [0649] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0650] 65 70 75 80
 [0651] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0652] 85 90 95
 [0653] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Thr Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0654] 100 105 110
 [0655] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0656] 115 120 125
 [0657] <210> 42
 [0658] <211> 375
 [0659] <212> DNA
 [0660] <213> Homo sapiens
 [0661] <400> 42
 [0662] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0663] tcttgtgccg ccagcggctt caccttctcc acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0664] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0665] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0666] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0667] cacggcaact tcggcaccag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacaactg 360
 [0668] gtcacagtta gctct 375
 [0669] <210> 43
 [0670] <211> 14
 [0671] <212> PRT

[0672] <213> Homo sapiens
 [0673] <400> 43
 [0674] His Gly Asn Phe Gly Thr Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 [0675] 1 5 10
 [0676] <210> 44
 [0677] <211> 125
 [0678] <212> PRT
 [0679] <213> Homo sapiens
 [0680] <400> 44
 [0681] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0682] 1 5 10 15
 [0683] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 [0684] 20 25 30
 [0685] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0686] 35 40 45
 [0687] Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0688] 50 55 60
 [0689] Ser Val Glu Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 [0690] 65 70 75 80
 [0691] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0692] 85 90 95
 [0693] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0694] 100 105 110
 [0695] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0696] 115 120 125
 [0697] <210> 45
 [0698] <211> 375
 [0699] <212> DNA
 [0700] <213> Homo sapiens
 [0701] <400> 45
 [0702] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0703] tcttgtgccg ccagcggctt caccttctcc gactacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0704] cctggcaaag gactggaatg ggtgtccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0705] tactacgccg acagcgtgga ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacacc 240
 [0706] ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0707] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [0708] gtcacagtta gctct 375
 [0709] <210> 46
 [0710] <211> 6
 [0711] <212> PRT
 [0712] <213> Homo sapiens
 [0713] <400> 46

[0714] Ser Asp Tyr Ala Met Asn
 [0715] 1 5
 [0716] <210> 47
 [0717] <211> 18
 [0718] <212> PRT
 [0719] <213> Homo sapiens
 [0720] <400> 47
 [0721] Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0722] 1 5 10 15
 [0723] Glu Asp
 [0724] <210> 48
 [0725] <211> 125
 [0726] <212> PRT
 [0727] <213> Homo sapiens
 [0728] <400> 48
 [0729] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0730] 1 5 10 15
 [0731] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0732] 20 25 30
 [0733] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0734] 35 40 45
 [0735] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0736] 50 55 60
 [0737] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [0738] 65 70 75 80
 [0739] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0740] 85 90 95
 [0741] Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0742] 100 105 110
 [0743] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0744] 115 120 125
 [0745] <210> 49
 [0746] <211> 375
 [0747] <212> DNA
 [0748] <213> Homo sapiens
 [0749] <400> 49
 [0750] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0751] tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgeta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0752] cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0753] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240
 [0754] ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgccaga 300
 [0755] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgct actggggcca gggcacaactg 360

[0756] gtcacagtta gctct 375
 [0757] <210> 50
 [0758] <211> 125
 [0759] <212> PRT
 [0760] <213> Homo sapiens
 [0761] <400> 50
 [0762] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0763] 1 5 10 15
 [0764] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [0765] 20 25 30
 [0766] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0767] 35 40 45
 [0768] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [0769] 50 55 60
 [0770] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [0771] 65 70 75 80
 [0772] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [0773] 85 90 95
 [0774] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [0775] 100 105 110
 [0776] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0777] 115 120 125
 [0778] <210> 51
 [0779] <211> 375
 [0780] <212> DNA
 [0781] <213> Homo sapiens
 [0782] <400> 51
 [0783] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [0784] tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgeta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [0785] cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [0786] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240
 [0787] ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [0788] caggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [0789] gtcacagtta gctct 375
 [0790] <210> 52
 [0791] <211> 125
 [0792] <212> PRT
 [0793] <213> Homo sapiens
 [0794] <400> 52
 [0795] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0796] 1 5 10 15
 [0797] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr

[0798]	20	25	30
[0799]	Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0800]	35	40	45
[0801]	Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp		
[0802]	50	55	60
[0803]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser		
[0804]	65	70	75
[0805]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
[0806]	85	90	95
[0807]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe		
[0808]	100	105	110
[0809]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0810]	115	120	125
[0811]	<210> 53		
[0812]	<211> 375		
[0813]	<212> DNA		
[0814]	<213> Homo sapiens		
[0815]	<400> 53		
[0816]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60		
[0817]	tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgeta tgaactgggt ccgaaaggcc 120		
[0818]	cctggcaaag gactggaatg ggtggccaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180		
[0819]	tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240		
[0820]	ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300		
[0821]	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360		
[0822]	gtcacagtta gctct 375		
[0823]	<210> 54		
[0824]	<211> 106		
[0825]	<212> PRT		
[0826]	<213> Homo sapiens		
[0827]	<400> 54		
[0828]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0829]	1 5 10 15		
[0830]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile		
[0831]	20 25 30		
[0832]	His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr		
[0833]	35 40 45		
[0834]	Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser		
[0835]	50 55 60		
[0836]	Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu		
[0837]	65 70 75 80		
[0838]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr		
[0839]	85 90 95		

[0840] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0841] 100 105
 [0842] <210> 55
 [0843] <211> 318
 [0844] <212> DNA
 [0845] <213> Homo sapiens
 [0846] <400> 55
 [0847] gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
 [0848] ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatccact ggttccagca gaagcctgga 120
 [0849] caggccccta gacctctgat ctacgccaca agcaacctgg ccagcggcat ccctgataga 180
 [0850] ttcagcggt ctggcagcgg caccgactac aactgacaa tcagcagact ggaacccgag 240
 [0851] gacttcgccc tgtactactg ccagcagtgg accagcaatc ctctacatt cggccagggc 300
 [0852] accaagctgg aatcaag 318
 [0853] <210> 56
 [0854] <211> 10
 [0855] <212> PRT
 [0856] <213> Homo sapiens
 [0857] <400> 56
 [0858] Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 [0859] 1 5 10
 [0860] <210> 57
 [0861] <211> 7
 [0862] <212> PRT
 [0863] <213> Homo sapiens
 [0864] <400> 57
 [0865] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 [0866] 1 5
 [0867] <210> 58
 [0868] <211> 9
 [0869] <212> PRT
 [0870] <213> Homo sapiens
 [0871] <400> 58
 [0872] Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 [0873] 1 5
 [0874] <210> 59
 [0875] <211> 107
 [0876] <212> PRT
 [0877] <213> Homo sapiens
 [0878] <400> 59
 [0879] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0880] 1 5 10 15
 [0881] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

[0882] 20 25 30
 [0883] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [0884] 35 40 45
 [0885] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 [0886] 50 55 60
 [0887] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 [0888] 65 70 75 80
 [0889] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 [0890] 85 90 95
 [0891] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0892] 100 105
 [0893] <210> 60
 [0894] <211> 321
 [0895] <212> DNA
 [0896] <213> Homo sapiens
 [0897] <400> 60
 [0898] gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
 [0899] ctgagctgta gagccagcca gagegtgtcc tcttacctgg cctggtatca gcagaagcct 120
 [0900] ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180
 [0901] agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcacctga caatcagcag actggaacce 240
 [0902] gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag 300
 [0903] ggcaccaagc tggaaatcaa g 321
 [0904] <210> 61
 [0905] <211> 11
 [0906] <212> PRT
 [0907] <213> Homo sapiens
 [0908] <400> 61
 [0909] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 [0910] 1 5 10
 [0911] <210> 62
 [0912] <211> 7
 [0913] <212> PRT
 [0914] <213> Homo sapiens
 [0915] <400> 62
 [0916] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 [0917] 1 5
 [0918] <210> 63
 [0919] <211> 9
 [0920] <212> PRT
 [0921] <213> Homo sapiens
 [0922] <400> 63
 [0923] Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

[0924] 1 5
 [0925] <210> 64
 [0926] <211> 121
 [0927] <212> PRT
 [0928] <213> Homo sapiens
 [0929] <400> 64
 [0930] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0931] 1 5 10 15
 [0932] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0933] 20 25 30
 [0934] Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0935] 35 40 45
 [0936] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0937] 50 55 60
 [0938] Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0939] 65 70 75 80
 [0940] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0941] 85 90 95
 [0942] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 [0943] 100 105 110
 [0944] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0945] 115 120
 [0946] <210> 65
 [0947] <211> 363
 [0948] <212> DNA
 [0949] <213> Homo sapiens
 [0950] <400> 65
 [0951] caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg 60
 [0952] tectgcaagg ctageggcta cacattcacc agctacaaca tgcactgggt ccgacaggcc 120
 [0953] cctggacagg gacttgaatg gatgggcgct atctaccctg gcaacggcga cacctctac 180
 [0954] aaccagaaat tccagggcag agtgacctg accgccgaca agtctagcag caccgcctac 240
 [0955] atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcacc 300
 [0956] tactacggcg gcgactggta cttcaactgt tggggacagg gaaccctggt caccgtttct 360
 [0957] tct 363
 [0958] <210> 66
 [0959] <211> 5
 [0960] <212> PRT
 [0961] <213> Homo sapiens
 [0962] <400> 66
 [0963] Ser Tyr Asn Met His
 [0964] 1 5
 [0965] <210> 67

[0966] <211> 17
 [0967] <212> PRT
 [0968] <213> Homo sapiens
 [0969] <400> 67
 [0970] Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
 [0971] 1 5 10 15
 [0972] Gly
 [0973] <210> 68
 [0974] <211> 12
 [0975] <212> PRT
 [0976] <213> Homo sapiens
 [0977] <400> 68
 [0978] Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 [0979] 1 5 10
 [0980] <210> 69
 [0981] <211> 121
 [0982] <212> PRT
 [0983] <213> Homo sapiens
 [0984] <400> 69
 [0985] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 [0986] 1 5 10 15
 [0987] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0988] 20 25 30
 [0989] Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [0990] 35 40 45
 [0991] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0992] 50 55 60
 [0993] Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0994] 65 70 75 80
 [0995] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0996] 85 90 95
 [0997] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 [0998] 100 105 110
 [0999] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1000] 115 120
 [1001] <210> 70
 [1002] <211> 363
 [1003] <212> DNA
 [1004] <213> Homo sapiens
 [1005] <400> 70
 [1006] caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg 60
 [1007] tectgcaagg cttagcggcta cacattcacc agctacaaca tgcactgggt ccgacaggcc 120

[1008] cctggacagg gacttgaatg gatgggcgct atctaccctg gcaacggcga cacctcctac 180
 [1009] aaccagaaat tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcag caccgcctac 240
 [1010] atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcacc 300
 [1011] tactacggcg gcgactggta cttcgactat tggggacagg gaaccctggt caccgtttct 360
 [1012] tct 363
 [1013] <210> 71
 [1014] <211> 12
 [1015] <212> PRT
 [1016] <213> Homo sapiens
 [1017] <400> 71
 [1018] Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr
 [1019] 1 5 10
 [1020] <210> 72
 [1021] <211> 121
 [1022] <212> PRT
 [1023] <213> Homo sapiens
 [1024] <400> 72
 [1025] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1026] 1 5 10 15
 [1027] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [1028] 20 25 30
 [1029] Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 [1030] 35 40 45
 [1031] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [1032] 50 55 60
 [1033] Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [1034] 65 70 75 80
 [1035] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1036] 85 90 95
 [1037] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
 [1038] 100 105 110
 [1039] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1040] 115 120
 [1041] <210> 73
 [1042] <211> 363
 [1043] <212> DNA
 [1044] <213> Homo sapiens
 [1045] <400> 73
 [1046] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [1047] tcttgtgccg ccagcggcta caccttcacc agctacaata tgcactgggt cgcacaggcc 120
 [1048] cctggacagg gacttgaatg gatgggcgct atctaccctg gcaacggcga cacctcctac 180
 [1049] aaccagaaat tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcag caccgcctac 240

[1050] atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcacc 300
 [1051] tactacggcg gcgactggta cttcaactgt tggggacagg gaacctggt caccgtttct 360
 [1052] tct 363
 [1053] <210> 74
 [1054] <211> 122
 [1055] <212> PRT
 [1056] <213> Homo sapiens
 [1057] <400> 74
 [1058] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1059] 1 5 10 15
 [1060] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1061] 20 25 30
 [1062] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1063] 35 40 45
 [1064] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1065] 50 55 60
 [1066] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr
 [1067] 65 70 75 80
 [1068] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1069] 85 90 95
 [1070] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 [1071] 100 105 110
 [1072] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1073] 115 120
 [1074] <210> 75
 [1075] <211> 366
 [1076] <212> DNA
 [1077] <213> Homo sapiens
 [1078] <400> 75
 [1079] gaagtgcagc tgctggaatc tggcggagga ctggttcaac ctggcggtc tctgagactg 60
 [1080] tcttgtgccg cttctgctt caccttcaac gactacgcca tgcactgggt cgcacaggcc 120
 [1081] cctggaaaag gactggaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tatcggtac 180
 [1082] gccgattccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca acgccaagaa aaccctgtac 240
 [1083] ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
 [1084] cagtacggca actactacta cggcatggac gtgtggggcc agggaacact ggttaccgtt 360
 [1085] agctct 366
 [1086] <210> 76
 [1087] <211> 5
 [1088] <212> PRT
 [1089] <213> Homo sapiens
 [1090] <400> 76
 [1091] Asp Tyr Ala Met His

[1092]	1	5		
[1093]	<210>	77		
[1094]	<211>	17		
[1095]	<212>	PRT		
[1096]	<213>	Homo sapiens		
[1097]	<400>	77		
[1098]	Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
[1099]	1	5	10	15
[1100]	Gly			
[1101]	<210>	78		
[1102]	<211>	13		
[1103]	<212>	PRT		
[1104]	<213>	Homo sapiens		
[1105]	<400>	78		
[1106]	Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val			
[1107]	1	5	10	
[1108]	<210>	79		
[1109]	<211>	122		
[1110]	<212>	PRT		
[1111]	<213>	Homo sapiens		
[1112]	<400>	79		
[1113]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[1114]	1	5	10	15
[1115]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr			
[1116]		20	25	30
[1117]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1118]		35	40	45
[1119]	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val			
[1120]		50	55	60
[1121]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[1122]		65	70	75
[1123]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1124]		85	90	95
[1125]	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp			
[1126]		100	105	110
[1127]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[1128]		115	120	
[1129]	<210>	80		
[1130]	<211>	366		
[1131]	<212>	DNA		
[1132]	<213>	Homo sapiens		
[1133]	<400>	80		

[1134] gaagtgcagc tgctggaatc tggtggcgga ctggttcagc ctggcggctc tctgagactg 60
 [1135] tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgacaggcc 120
 [1136] cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tatcggtac 180
 [1137] gccgattccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
 [1138] ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
 [1139] cagtacggca actactacta cggcatggac gtgtggggcc agggaacact ggttaccgtt 360
 [1140] agctct 366
 [1141] <210> 81
 [1142] <211> 122
 [1143] <212> PRT
 [1144] <213> Homo sapiens
 [1145] <400> 81
 [1146] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 [1147] 1 5 10 15
 [1148] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1149] 20 25 30
 [1150] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1151] 35 40 45
 [1152] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1153] 50 55 60
 [1154] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1155] 65 70 75 80
 [1156] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1157] 85 90 95
 [1158] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 [1159] 100 105 110
 [1160] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1161] 115 120
 [1162] <210> 82
 [1163] <211> 366
 [1164] <212> DNA
 [1165] <213> Homo sapiens
 [1166] <400> 82
 [1167] gaagtgcagc tgctggaatc tggtggcgga gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg 60
 [1168] tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgacaggcc 120
 [1169] cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tatcggtac 180
 [1170] gccgattccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
 [1171] ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
 [1172] cagtacggca actactacta cggcatggac gtgtggggcc agggaacact ggttaccgtt 360
 [1173] agctct 366
 [1174] <210> 83
 [1175] <211> 122

[1176] <212> PRT
 [1177] <213> Homo sapiens
 [1178] <400> 83
 [1179] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 [1180] 1 5 10 15
 [1181] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1182] 20 25 30
 [1183] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1184] 35 40 45
 [1185] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1186] 50 55 60
 [1187] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1188] 65 70 75 80
 [1189] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1190] 85 90 95
 [1191] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 [1192] 100 105 110
 [1193] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [1194] 115 120
 [1195] <210> 84
 [1196] <211> 366
 [1197] <212> DNA
 [1198] <213> Homo sapiens
 [1199] <400> 84
 [1200] gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcgga gttgttcagc ctggcggtc tctgagactg 60
 [1201] tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgacaggcc 120
 [1202] cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tatcggtac 180
 [1203] gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
 [1204] ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgcegtgt actactgtgc caaggacatc 300
 [1205] cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaacact ggttaccggt 360
 [1206] agctct 366
 [1207] <210> 85
 [1208] <211> 13
 [1209] <212> PRT
 [1210] <213> Homo sapiens
 [1211] <400> 85
 [1212] Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr
 [1213] 1 5 10
 [1214] <210> 86
 [1215] <211> 448
 [1216] <212> PRT
 [1217] <213> Homo sapiens

[1218] <400> 86

[1219] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[1220] 1 5 10 15

[1221] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

[1222] 20 25 30

[1223] Asn Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[1224] 35 40 45

[1225] Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

[1226] 50 55 60

[1227] Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[1228] 65 70 75 80

[1229] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[1230] 85 90 95

[1231] Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly

[1232] 100 105 110

[1233] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

[1234] 115 120 125

[1235] Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

[1236] 130 135 140

[1237] Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

[1238] 145 150 155 160

[1239] Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

[1240] 165 170 175

[1241] Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

[1242] 180 185 190

[1243] Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

[1244] 195 200 205

[1245] Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly

[1246] 210 215 220

[1247] Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser

[1248] 225 230 235 240

[1249] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

[1250] 245 250 255

[1251] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

[1252] 260 265 270

[1253] Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

[1254] 275 280 285

[1255] Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val

[1256] 290 295 300

[1257] Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

[1258] 305 310 315 320

[1259] Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

[1260]		325		330		335
[1261]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu					
[1262]		340		345		350
[1263]	Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys					
[1264]		355		360		365
[1265]	Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser					
[1266]		370		375		380
[1267]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp					
[1268]		385		390		395
[1269]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser					
[1270]		405		410		415
[1271]	Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala					
[1272]		420		425		430
[1273]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys					
[1274]		435		440		445
[1275]	<210> 87					
[1276]	<211> 1344					
[1277]	<212> DNA					
[1278]	<213> Homo sapiens					
[1279]	<400> 87					
[1280]	caggttcagc tggttcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcagcag cgtgaaggtg 60					
[1281]	tctgcaagg ctacgggcta cacattcacc agctacaaca tgcactgggt ccgagaggcc 120					
[1282]	cctggacagg gacttgaatg gatgggcgct atctaccctg gcaacggcga cacctcctac 180					
[1283]	aaccagaaat tccagggcag agtgaccctg accgccgaca agtctagcag caccgcctac 240					
[1284]	atggaactga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaagcacc 300					
[1285]	tactacggcg gcgactggta cttcgactat tggggacagg gaaccctggt caccgtttct 360					
[1286]	tctgctagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cttgcagcag aagcaccagc 420					
[1287]	gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg gaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 480					
[1288]	tctggaaca gcggcgtct gaccagcggc gtgcatacct tccccgccgt gctccagagc 540					
[1289]	agcggactgt actccctgag cagcgtggtg accgtgcctt ccagcagcct gggcaccaag 600					
[1290]	acctacacct gcaactgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacga gagagtggag 660					
[1291]	agcaagtacg gccctccctg ccccccttgc cctgcccccg agttcgaagg cggacctagc 720					
[1292]	gtgttctctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780					
[1293]	acctgcgtgg tggtagcgt gtcccaggag gaccccgagg tccagtttaa ttggtacgtg 840					
[1294]	gacggcgtgg aagtgcataa cgccaagacc aagcccagag aggagcagtt cgccagcacc 900					
[1295]	tacagagtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggaatac 960					
[1296]	aagtcaagg tctccaacaa gggcctgcct agcagcatcg agaagacat cagcaaggcc 1020					
[1297]	aaggccagc cacgggagcc ccaggtctgc accctgccac ctagccaaga ggagatgacc 1080					
[1298]	aagaaccagg tgtccctgag ctgtgccgtg aaaggettct atcccagcga tatcgccgtg 1140					
[1299]	gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc tgtgctggac 1200					
[1300]	agcgacggca gcttcttctt ggtttccaag ctgaccgtgg acaagtccag atggcaggag 1260					
[1301]	ggcaacgtct tcagctgctc cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag 1320					

[1302] tcctgagcc tgagcctggg caag 1344
 [1303] <210> 88
 [1304] <211> 213
 [1305] <212> PRT
 [1306] <213> Homo sapiens
 [1307] <400> 88
 [1308] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [1309] 1 5 10 15
 [1310] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
 [1311] 20 25 30
 [1312] His Trp Phe Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Leu Ile Tyr
 [1313] 35 40 45
 [1314] Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 [1315] 50 55 60
 [1316] Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 [1317] 65 70 75 80
 [1318] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 [1319] 85 90 95
 [1320] Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 [1321] 100 105 110
 [1322] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly Thr
 [1323] 115 120 125
 [1324] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 [1325] 130 135 140
 [1326] Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 [1327] 145 150 155 160
 [1328] Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 [1329] 165 170 175
 [1330] Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 [1331] 180 185 190
 [1332] Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 [1333] 195 200 205
 [1334] Asn Arg Gly Glu Cys
 [1335] 210
 [1336] <210> 89
 [1337] <211> 639
 [1338] <212> DNA
 [1339] <213> Homo sapiens
 [1340] <400> 89
 [1341] gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
 [1342] ctgagctgta gagccagcag cagcgtgtcc tacatccact ggttccagaa gaagcctgga 120
 [1343] caggecccta gacctetgat ctacgccaca agcaacctgg ccagcggcat ccctgataga 180

[1344] ttcagcggct ctggcagcgg caccgactac acactgacaa tcagcagact ggaacccgag 240
 [1345] gacttcgccg tgtactactg ccagcagtg accagcaatc ctctacatt cggccagggc 300
 [1346] accaagctgg aatcaagcg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360
 [1347] gataagaaat tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 [1348] agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 [1349] agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 [1350] agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgctgcg aagtcacca tcagggcctg 600
 [1351] agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 639
 [1352] <210> 90
 [1353] <211> 444
 [1354] <212> PRT
 [1355] <213> Homo sapiens
 [1356] <400> 90
 [1357] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [1358] 1 5 10 15
 [1359] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [1360] 20 25 30
 [1361] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [1362] 35 40 45
 [1363] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [1364] 50 55 60
 [1365] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 [1366] 65 70 75 80
 [1367] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [1368] 85 90 95
 [1369] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 [1370] 100 105 110
 [1371] Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 [1372] 115 120 125
 [1373] Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 [1374] 130 135 140
 [1375] Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 [1376] 145 150 155 160
 [1377] Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 [1378] 165 170 175
 [1379] Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 [1380] 180 185 190
 [1381] Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 [1382] 195 200 205
 [1383] Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 [1384] 210 215 220
 [1385] Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

[1386]	225	230	235	240
[1387]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
[1388]		245	250	255
[1389]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
[1390]		260	265	270
[1391]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
[1392]		275	280	285
[1393]	Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
[1394]		290	295	300
[1395]	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
[1396]	305	310	315	320
[1397]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala			
[1398]		325	330	335
[1399]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln			
[1400]		340	345	350
[1401]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly			
[1402]		355	360	365
[1403]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
[1404]		370	375	380
[1405]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
[1406]	385	390	395	400
[1407]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu			
[1408]		405	410	415
[1409]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His			
[1410]		420	425	430
[1411]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
[1412]		435	440	
[1413]	<210> 91			
[1414]	<211> 1332			
[1415]	<212> DNA			
[1416]	<213> Homo sapiens			
[1417]	<400> 91			
[1418]	caggetgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg 60			
[1419]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120			
[1420]	aagcccggcc aggctcctag aggactgac ggcggaacaa acaagagagc cccttgaca 180			
[1421]	cccgccagat tctctggatc tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacaat cactggtgct 240			
[1422]	caggetgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300			
[1423]	ggcggaggca ccaactgac agttctgggt cagcccaagg cggcgccctc ggtcactctg 360			
[1424]	ttcccgcct cctctgagga gttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 420			
[1425]	gacttctatc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg 480			
[1426]	ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa agcaacaaca agtacggcg cagcagctac 540			
[1427]	ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 600			

[1428] gaagggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttcagagag caagtacggc 660
 [1429] cctccctgcc ccccttgccc tgccccgag ttcgagggcg gacctagcgt gttcctgttc 720
 [1430] ccccccaagc ccaaggacac cctgatgac agcagaaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg 780
 [1431] gtggacgtgt cccaggagga ccccgaggtc cagttaatt ggtacgtgga cggcgtggaa 840
 [1432] gtgcataacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttcg ccagcaccta cagagtgggtg 900
 [1433] tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc 960
 [1434] tccaacaagg gctgcctag cagcatcgag aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1020
 [1435] cgggagcccc aggtctacac cctgccacct tgtcaagagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 [1436] tcctgtggt gtctggtgaa aggettctat cccagcgata tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 [1437] aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccctg tgctggacag cgacggcagc 1200
 [1438] ttcttctgt actccaagct gaccgtggac aagtccagat ggcaggagg caacgtcttc 1260
 [1439] agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagtc cctgagcctg 1320
 [1440] agcctgggca ag 1332
 [1441] <210> 92
 [1442] <211> 223
 [1443] <212> PRT
 [1444] <213> Homo sapiens
 [1445] <400> 92
 [1446] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1447] 1 5 10 15
 [1448] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [1449] 20 25 30
 [1450] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1451] 35 40 45
 [1452] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [1453] 50 55 60
 [1454] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [1455] 65 70 75 80
 [1456] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [1457] 85 90 95
 [1458] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [1459] 100 105 110
 [1460] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 [1461] 115 120 125
 [1462] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 [1463] 130 135 140
 [1464] Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 [1465] 145 150 155 160
 [1466] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 [1467] 165 170 175
 [1468] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 [1469] 180 185 190

[1470] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 [1471] 195 200 205
 [1472] Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 [1473] 210 215 220
 [1474] <210> 93
 [1475] <211> 669
 [1476] <212> DNA
 [1477] <213> Homo sapiens
 [1478] <400> 93
 [1479] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [1480] tcttgtgccg ccagcggctt caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgaaaggcc 120
 [1481] cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [1482] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240
 [1483] ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [1484] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [1485] gtcacagtta gctctgctag caccaagggc cccagcgtgt tccccctggc cccttgcagc 420
 [1486] agaagcacca gcgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag 480
 [1487] cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcct ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc 540
 [1488] gtgctccaga gcagcggact gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc 600
 [1489] ctgggcacca agacctacac ctgcaactg gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
 [1490] aagagagtg 669
 [1491] <210> 94
 [1492] <211> 449
 [1493] <212> PRT
 [1494] <213> Homo sapiens
 [1495] <400> 94
 [1496] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1497] 1 5 10 15
 [1498] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1499] 20 25 30
 [1500] Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1501] 35 40 45
 [1502] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1503] 50 55 60
 [1504] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1505] 65 70 75 80
 [1506] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1507] 85 90 95
 [1508] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 [1509] 100 105 110
 [1510] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 [1511] 115 120 125

[1512]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
[1513]	130 135 140
[1514]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
[1515]	145 150 155 160
[1516]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
[1517]	165 170 175
[1518]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
[1519]	180 185 190
[1520]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
[1521]	195 200 205
[1522]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr
[1523]	210 215 220
[1524]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro
[1525]	225 230 235 240
[1526]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
[1527]	245 250 255
[1528]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
[1529]	260 265 270
[1530]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
[1531]	275 280 285
[1532]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val
[1533]	290 295 300
[1534]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
[1535]	305 310 315 320
[1536]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
[1537]	325 330 335
[1538]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
[1539]	340 345 350
[1540]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
[1541]	355 360 365
[1542]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[1543]	370 375 380
[1544]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[1545]	385 390 395 400
[1546]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[1547]	405 410 415
[1548]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[1549]	420 425 430
[1550]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[1551]	435 440 445
[1552]	Lys
[1553]	<210> 95

[1554] <211> 1347
 [1555] <212> DNA
 [1556] <213> Homo sapiens
 [1557] <400> 95
 [1558] gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcga ctggttcagc ctggcggctc tctgagactg 60
 [1559] tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc 120
 [1560] cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tateggctac 180
 [1561] gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
 [1562] ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
 [1563] cagtacggca actactacta cggcatggac gtgtggggcc agggaaact ggttaccgtt 360
 [1564] agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccttgag cagaagcacc 420
 [1565] agcgagagca cagccgccct gggctgctg gtggaggact acttccccga gccctgacc 480
 [1566] gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag 540
 [1567] agcagcggac tgtactcct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc 600
 [1568] aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga cgagagagtg 660
 [1569] gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttcga aggcggacct 720
 [1570] agcgtgttcc tgttcccc caagccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 780
 [1571] gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccg aggtccagt taattgtac 840
 [1572] gtggacggcg tggaagtgca taacccaag accaagcca gagaggagca gttcgccagc 900
 [1573] acctacagag tgggttccgt gctgaccgtg ctgaccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
 [1574] tacaagtgca aggtctcaa caaggcctg cctagcagca tcgagaagac catcagcaag 1020
 [1575] gccaaaggcc agccacggga gcccaggtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg 1080
 [1576] accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatgcc 1140
 [1577] gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccaccc ccctgtgctg 1200
 [1578] gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag 1260
 [1579] gaggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1320
 [1580] aagtccctga gcctgagcct gggcaag 1347
 [1581] <210> 96
 [1582] <211> 214
 [1583] <212> PRT
 [1584] <213> Homo sapiens
 [1585] <400> 96
 [1586] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [1587] 1 5 10 15
 [1588] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 [1589] 20 25 30
 [1590] Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [1591] 35 40 45
 [1592] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 [1593] 50 55 60
 [1594] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 [1595] 65 70 75 80

[1596]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
[1597]	85 90 95
[1598]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1599]	100 105 110
[1600]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly
[1601]	115 120 125
[1602]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1603]	130 135 140
[1604]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1605]	145 150 155 160
[1606]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[1607]	165 170 175
[1608]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1609]	180 185 190
[1610]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1611]	195 200 205
[1612]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1613]	210
[1614]	<210> 97
[1615]	<211> 642
[1616]	<212> DNA
[1617]	<213> Homo sapiens
[1618]	<400> 97
[1619]	gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
[1620]	ctgagctgta gagccagcca gacgctgtcc tcttacctgg cctggtatca gaagaagcct 120
[1621]	ggacagctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180
[1622]	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag actggaacc 240
[1623]	gaggactteg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag 300
[1624]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcaccat ctgttctcat cttcccgcc 360
[1625]	tctgataaga aattgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taatttctat 420
[1626]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
[1627]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
[1628]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
[1629]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
[1630]	<210> 98
[1631]	<211> 449
[1632]	<212> PRT
[1633]	<213> Homo sapiens
[1634]	<400> 98
[1635]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[1636]	1 5 10 15
[1637]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr

[1638]	20	25	30
[1639]	Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1640]	35	40	45
[1641]	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
[1642]	50	55	60
[1643]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1644]	65	70	75
[1645]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1646]	85	90	95
[1647]	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp		
[1648]	100	105	110
[1649]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
[1650]	115	120	125
[1651]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr		
[1652]	130	135	140
[1653]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
[1654]	145	150	155
[1655]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
[1656]	165	170	175
[1657]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
[1658]	180	185	190
[1659]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp		
[1660]	195	200	205
[1661]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Arg Val Glu Ser Lys Tyr		
[1662]	210	215	220
[1663]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro		
[1664]	225	230	235
[1665]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[1666]	245	250	255
[1667]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp		
[1668]	260	265	270
[1669]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[1670]	275	280	285
[1671]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Ala Ser Thr Tyr Arg Val		
[1672]	290	295	300
[1673]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[1674]	305	310	315
[1675]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys		
[1676]	325	330	335
[1677]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
[1678]	340	345	350
[1679]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser		

[1680] 355 360 365
 [1681] Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 [1682] 370 375 380
 [1683] Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 [1684] 385 390 395 400
 [1685] Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 [1686] 405 410 415
 [1687] Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 [1688] 420 425 430
 [1689] Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 [1690] 435 440 445
 [1691] Lys
 [1692] <210> 99
 [1693] <211> 1347
 [1694] <212> DNA
 [1695] <213> Homo sapiens
 [1696] <400> 99
 [1697] gaagtcgacg tgctggaatc tgggtggcggg gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg 60
 [1698] tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc 120
 [1699] cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tateggctac 180
 [1700] gccgattccg tgaagggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
 [1701] ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
 [1702] cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaaact ggttaccgtt 360
 [1703] agctctgcta gcaccaaggg cccagcgtg tccccctgg ccccttgag cagaagcacc 420
 [1704] agcgagagca cagccgccct gggctgcctg gtggaggact acttccccga gcccgtagc 480
 [1705] gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag 540
 [1706] agcagcggac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc 600
 [1707] aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga cgagagagtg 660
 [1708] gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc ccgagttega aggcggacct 720
 [1709] agcgtgttcc tgttcccccc caagccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 780
 [1710] gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccg aggtccagtt taattgtac 840
 [1711] gtggacggcg tggaagtgca taacccaag accaagcca gagaggagca gttcgccagc 900
 [1712] acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
 [1713] tacaagtgca aggtctccaa caagggcctg cctagcagca tcgagaagac catcagcaag 1020
 [1714] gccaaaggcc agccacggga gcccaggtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg 1080
 [1715] accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatgcc 1140
 [1716] gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccaccc ccctgtgctg 1200
 [1717] gacagcgacg gcagcttctt cctggttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag 1260
 [1718] gaggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1320
 [1719] aagtcctga gcctgagcct gggcaag 1347
 [1720] <210> 100
 [1721] <211> 214

[1722] <212> PRT
 [1723] <213> Homo sapiens
 [1724] <400> 100
 [1725] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [1726] 1 5 10 15
 [1727] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 [1728] 20 25 30
 [1729] Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [1730] 35 40 45
 [1731] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 [1732] 50 55 60
 [1733] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 [1734] 65 70 75 80
 [1735] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 [1736] 85 90 95
 [1737] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 [1738] 100 105 110
 [1739] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly
 [1740] 115 120 125
 [1741] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 [1742] 130 135 140
 [1743] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 [1744] 145 150 155 160
 [1745] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 [1746] 165 170 175
 [1747] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 [1748] 180 185 190
 [1749] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 [1750] 195 200 205
 [1751] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [1752] 210
 [1753] <210> 101
 [1754] <211> 642
 [1755] <212> DNA
 [1756] <213> Homo sapiens
 [1757] <400> 101
 [1758] gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
 [1759] ctgagctgta gagccagcca gacggtgcc tcttacctgg cctggtatca gaagaagcct 120
 [1760] ggacagctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180
 [1761] agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag actggaacc 240
 [1762] gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggccatcac attcggccag 300
 [1763] ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcacat ctgttctcat cttcccgcc 360

[1764] tctgataaga aattgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
 [1765] cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 [1766] gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccttgacg 540
 [1767] ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 600
 [1768] ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
 [1769] <210> 102
 [1770] <211> 214
 [1771] <212> PRT
 [1772] <213> Homo sapiens
 [1773] <400> 102
 [1774] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [1775] 1 5 10 15
 [1776] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 [1777] 20 25 30
 [1778] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [1779] 35 40 45
 [1780] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 [1781] 50 55 60
 [1782] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 [1783] 65 70 75 80
 [1784] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 [1785] 85 90 95
 [1786] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 [1787] 100 105 110
 [1788] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 [1789] 115 120 125
 [1790] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 [1791] 130 135 140
 [1792] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 [1793] 145 150 155 160
 [1794] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 [1795] 165 170 175
 [1796] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 [1797] 180 185 190
 [1798] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 [1799] 195 200 205
 [1800] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [1801] 210
 [1802] <210> 103
 [1803] <211> 642
 [1804] <212> DNA
 [1805] <213> Homo sapiens

[1806] <400> 103
 [1807] gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
 [1808] ctgagctgta gagccagcca gagcgtgtcc tcttacctgg cctggtatca gcagaagcct 120
 [1809] ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180
 [1810] agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag actggaacc 240
 [1811] gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag 300
 [1812] ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccccca 360
 [1813] tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
 [1814] cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
 [1815] gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 [1816] ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 [1817] ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
 [1818] <210> 104
 [1819] <211> 449
 [1820] <212> PRT
 [1821] <213> Homo sapiens
 [1822] <400> 104
 [1823] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 [1824] 1 5 10 15
 [1825] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 [1826] 20 25 30
 [1827] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1828] 35 40 45
 [1829] Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 [1830] 50 55 60
 [1831] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1832] 65 70 75 80
 [1833] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1834] 85 90 95
 [1835] Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 [1836] 100 105 110
 [1837] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 [1838] 115 120 125
 [1839] Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 [1840] 130 135 140
 [1841] Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 [1842] 145 150 155 160
 [1843] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 [1844] 165 170 175
 [1845] Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 [1846] 180 185 190
 [1847] Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp

[1848]	195	200	205
[1849]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr		
[1850]	210	215	220
[1851]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro		
[1852]	225	230	235 240
[1853]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[1854]		245	250 255
[1855]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp		
[1856]		260	265 270
[1857]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[1858]		275	280 285
[1859]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[1860]		290	295 300
[1861]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[1862]		305	310 315 320
[1863]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys		
[1864]		325	330 335
[1865]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr		
[1866]		340	345 350
[1867]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser		
[1868]		355	360 365
[1869]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[1870]		370	375 380
[1871]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[1872]		385	390 395 400
[1873]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[1874]		405	410 415
[1875]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[1876]		420	425 430
[1877]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
[1878]		435	440 445
[1879]	Lys		
[1880]	<210> 105		
[1881]	<211> 1347		
[1882]	<212> DNA		
[1883]	<213> Homo sapiens		
[1884]	<400> 105		
[1885]	gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcgga gttgttcagc ctggcggtc tctgagactg 60		
[1886]	tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgacaggcc 120		
[1887]	cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tatcggctac 180		
[1888]	gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240		
[1889]	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300		

[1890] cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaacact ggttaccggt 360
 [1891] agctctgcta gcaccaaggg cccacagctg ttccccctgg ccccttgag cagaagcacc 420
 [1892] agcgagagca cagccgcct gggctgctg gtgaaggact acttccccga gccctgacc 480
 [1893] gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag 540
 [1894] agcagcggac tgtactcct gagcagctg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc 600
 [1895] aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagt 660
 [1896] gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgcctgccc cagagttcga gggcggacct 720
 [1897] agcgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacctga tgatcagcag aacccccgag 780
 [1898] gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccc aggtccagtt taattgtac 840
 [1899] gtggacggcg tggaaagtca taacccaag accaagcca gagaggagca gttcaacagc 900
 [1900] acctacagag tgggttccgt gctgaccgtg ctgaccagc actggctgaa cggcaaggaa 960
 [1901] tacaagtgca aggtctcaa caagggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag 1020
 [1902] gccaaaggcc agccacggga gccccagtc tgcacctgc cacctagcca agaggagatg 1080
 [1903] accaagaacc aggtgtcct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatgcc 1140
 [1904] gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
 [1905] gacagcgac gcagcttctt cctggttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag 1260
 [1906] gaggcaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1320
 [1907] aagtcctga gcctgaccc gggcaag 1347
 [1908] <210> 106
 [1909] <211> 215
 [1910] <212> PRT
 [1911] <213> Homo sapiens
 [1912] <400> 106
 [1913] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [1914] 1 5 10 15
 [1915] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [1916] 20 25 30
 [1917] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [1918] 35 40 45
 [1919] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [1920] 50 55 60
 [1921] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 [1922] 65 70 75 80
 [1923] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [1924] 85 90 95
 [1925] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 [1926] 100 105 110
 [1927] Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 [1928] 115 120 125
 [1929] Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 [1930] 130 135 140
 [1931] Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala

[1932]	145	150	155	160
[1933]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala			
[1934]		165	170	175
[1935]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg			
[1936]		180	185	190
[1937]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr			
[1938]		195	200	205
[1939]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[1940]	210	215		
[1941]	<210> 107			
[1942]	<211> 645			
[1943]	<212> DNA			
[1944]	<213> Homo sapiens			
[1945]	<400> 107			
[1946]	caggctgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgaccctg	60		
[1947]	acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcagcag	120		
[1948]	aagcccggcc aggtcctag aggactgac gccggaacaa acaagagagc cccttgaca	180		
[1949]	cccgccagat tctctggac tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacaat cactggtgct	240		
[1950]	caggctgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc	300		
[1951]	ggcggaggca ccaactgac agttctgggt cagcccaagg cggcgcctc ggctactctg	360		
[1952]	ttcccgcct cctctgagga gttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt	420		
[1953]	gacttctatc cgggagcctg gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtcaaggcg	480		
[1954]	ggagtggaga ccaccacacc ctcaaacaa agcaacaaca agtacgaggc cagcagctac	540		
[1955]	ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggctacgeat	600		
[1956]	gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca	645		
[1957]	<210> 108			
[1958]	<211> 452			
[1959]	<212> PRT			
[1960]	<213> Homo sapiens			
[1961]	<400> 108			
[1962]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[1963]	1	5	10	15
[1964]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr			
[1965]		20	25	30
[1966]	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1967]		35	40	45
[1968]	Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp			
[1969]		50	55	60
[1970]	Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser			
[1971]	65	70	75	80
[1972]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
[1973]		85	90	95

[1974]	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
[1975]	100 105 110
[1976]	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
[1977]	115 120 125
[1978]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
[1979]	130 135 140
[1980]	Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
[1981]	145 150 155 160
[1982]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[1983]	165 170 175
[1984]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[1985]	180 185 190
[1986]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
[1987]	195 200 205
[1988]	Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
[1989]	210 215 220
[1990]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu
[1991]	225 230 235 240
[1992]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
[1993]	245 250 255
[1994]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
[1995]	260 265 270
[1996]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
[1997]	275 280 285
[1998]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
[1999]	290 295 300
[2000]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
[2001]	305 310 315 320
[2002]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser
[2003]	325 330 335
[2004]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
[2005]	340 345 350
[2006]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
[2007]	355 360 365
[2008]	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
[2009]	370 375 380
[2010]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
[2011]	385 390 395 400
[2012]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
[2013]	405 410 415
[2014]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
[2015]	420 425 430

[2016] Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 [2017] 435 440 445
 [2018] Ser Leu Gly Lys
 [2019] 450
 [2020] <210> 109
 [2021] <211> 1356
 [2022] <212> DNA
 [2023] <213> Homo sapiens
 [2024] <400> 109
 [2025] gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 [2026] tcttgtgccg ccagcggctt caccttcaac acctacgcta tgaactgggt ccgacaggcc 120
 [2027] cctggcaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180
 [2028] tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240
 [2029] ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300
 [2030] cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcacactg 360
 [2031] gtcacagtta gctctgctag caccaagggc cccagcgtgt tccccctggc cccttgcagc 420
 [2032] agaagcacca gcgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tgaaggacta cttccccgag 480
 [2033] cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggcctt ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc 540
 [2034] gtgctccaga gcagcggact gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc 600
 [2035] ctgggcacca agacctacac ctgcaactg gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
 [2036] aagagagtgg agagcaagta cggccctccc tgccccctt gccctgcccc cgagttcgag 720
 [2037] ggcggacctg gcgtgttctt gttccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcaga 780
 [2038] acccccaggg tgacctgctt ggtggtggac gtgtcccagg aggaccccga ggtccagttt 840
 [2039] aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900
 [2040] ttcaacagca cctacagagt ggtgtccctg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960
 [2041] ggcaaggaat acaagtcaa ggtctccaac aaggccttgg ccagcagcat cgagaagacc 1020
 [2042] atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtct acaccctgcc accttgtcaa 1080
 [2043] gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg tgggtgtctg tgaaaggctt ctatcccagc 1140
 [2044] gatatgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccagaga acaactacaa gaccaccccc 1200
 [2045] cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtactcca agctgaccgt ggacaagtcc 1260
 [2046] agatggcagg agggcaactg cttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320
 [2047] tacaccaga agtccctgag cctgagcctg ggcaag 1356
 [2048] <210> 110
 [2049] <211> 214
 [2050] <212> PRT
 [2051] <213> Homo sapiens
 [2052] <400> 110
 [2053] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [2054] 1 5 10 15
 [2055] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 [2056] 20 25 30
 [2057] Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

[2058]	35	40	45
[2059]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
[2060]	50	55	60
[2061]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro		
[2062]	65	70	75
[2063]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile		
[2064]	85	90	95
[2065]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[2066]	100	105	110
[2067]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[2068]	115	120	125
[2069]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[2070]	130	135	140
[2071]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[2072]	145	150	155
[2073]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[2074]	165	170	175
[2075]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
[2076]	180	185	190
[2077]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[2078]	195	200	205
[2079]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[2080]	210		
[2081]	<210> 111		
[2082]	<211> 642		
[2083]	<212> DNA		
[2084]	<213> Homo sapiens		
[2085]	<400> 111		
[2086]	gagatcgtgc tgacacagag ccttggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60		
[2087]	ctgagctgta gagccagcca gagcgtgtcc tcttacctgg cctggtatca gaagaagcct 120		
[2088]	ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180		
[2089]	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag actggaacc 240		
[2090]	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag 300		
[2091]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcaccat ctgttctcat cttcccgcca 360		
[2092]	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420		
[2093]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480		
[2094]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540		
[2095]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcaac ccatcagggc 600		
[2096]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642		
[2097]	<210> 112		
[2098]	<211> 449		
[2099]	<212> PRT		

[2100]	<213>	Homo sapiens
[2101]	<400>	112
[2102]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly	
[2103]	1	5 10 15
[2104]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr	
[2105]		20 25 30
[2106]	Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[2107]		35 40 45
[2108]	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val	
[2109]		50 55 60
[2110]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[2111]		65 70 75 80
[2112]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[2113]		85 90 95
[2114]	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp	
[2115]		100 105 110
[2116]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	
[2117]		115 120 125
[2118]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr	
[2119]		130 135 140
[2120]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	
[2121]		145 150 155 160
[2122]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	
[2123]		165 170 175
[2124]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	
[2125]		180 185 190
[2126]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp	
[2127]		195 200 205
[2128]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr	
[2129]		210 215 220
[2130]	Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro	
[2131]		225 230 235 240
[2132]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser	
[2133]		245 250 255
[2134]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp	
[2135]		260 265 270
[2136]	Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn	
[2137]		275 280 285
[2138]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
[2139]		290 295 300
[2140]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu	
[2141]		305 310 315 320

[2142]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser Ile Glu Lys
[2143]	325 330 335
[2144]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
[2145]	340 345 350
[2146]	Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
[2147]	355 360 365
[2148]	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
[2149]	370 375 380
[2150]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
[2151]	385 390 395 400
[2152]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
[2153]	405 410 415
[2154]	Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
[2155]	420 425 430
[2156]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
[2157]	435 440 445
[2158]	Lys
[2159]	<210> 113
[2160]	<211> 1347
[2161]	<212> DNA
[2162]	<213> Homo sapiens
[2163]	<400> 113
[2164]	gaagtgcagc tgctggaatc tgggtggcggg gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg 60
[2165]	tcttgtgctg ccagcggctt caccttcaac gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc 120
[2166]	cctggcaaag gacttgaatg ggtgtccacc atcagctgga acagcggctc tateggctac 180
[2167]	gccgattccg tgaaggcag attcaccatc tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
[2168]	ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
[2169]	cagtacggca actactacta cggcatggac tactggggcc agggaaact ggttacggtt 360
[2170]	agctctgcta gcaccaagg cccagcgtg tccccctgg ccccttgag cagaagcacc 420
[2171]	agcgagagca cagccgcct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtagc 480
[2172]	gtgtcctgga acagcggcgc tctgaccagc ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag 540
[2173]	agcagcggac tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc 600
[2174]	aagacctaca cctgcaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660
[2175]	gagagcaagt acggccctcc ctgccccct tgccctgccc ccgagttcga gggcggacct 720
[2176]	agcgtgttcc tgttcccccc caagccaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag 780
[2177]	gtgacctgcg tgggtgtgga cgtgtcccag gaggacccg aggtccagtt taattgtac 840
[2178]	gtggacggcg tggaaagtca taacccaag accaagcca gagaggagca gttcaacagc 900
[2179]	acctacagag tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
[2180]	tacaagtgca aggtctcaa caaggcctg gccagcagca tcgagaagac catcagcaag 1020
[2181]	gccaaaggcc agccacggga gcccaggtc tgcaccctgc cacctagcca agaggagatg 1080
[2182]	accaagaacc aggtgtccct gagctgtgcc gtgaaaggct tctatcccag cgatatgcc 1140
[2183]	gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200

[2184] gacagcgacg gcagcttctt cctggtttcc aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag 1260
 [2185] gagggaacg tcttcagctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1320
 [2186] aagtcctga gcctgagcct gggcaag 1347
 [2187] <210> 114
 [2188] <211> 215
 [2189] <212> PRT
 [2190] <213> Homo sapiens
 [2191] <400> 114
 [2192] Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 [2193] 1 5 10 15
 [2194] Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 [2195] 20 25 30
 [2196] Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 [2197] 35 40 45
 [2198] Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 [2199] 50 55 60
 [2200] Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 [2201] 65 70 75 80
 [2202] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp Tyr Ser Asn
 [2203] 85 90 95
 [2204] Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 [2205] 100 105 110
 [2206] Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 [2207] 115 120 125
 [2208] Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 [2209] 130 135 140
 [2210] Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 [2211] 145 150 155 160
 [2212] Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 [2213] 165 170 175
 [2214] Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 [2215] 180 185 190
 [2216] Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 [2217] 195 200 205
 [2218] Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 [2219] 210 215
 [2220] <210> 115
 [2221] <211> 645
 [2222] <212> DNA
 [2223] <213> Homo sapiens
 [2224] <400> 115
 [2225] caggetgtgg tcacacaaga gcctagcctg acagtgtctc ctggcggcac agtgacctg 60

[2226] acctgtagat cttctacagg cgccgtgacc accagcaact acgctaattg ggtgcaggag 120
 [2227] aagcccggcc aggtccttag aggactgata ggcggaacaa acaagagagc cccttggaca 180
 [2228] cccgccagat tctctggata tctgctcggc ggaaaggccg ctctgacaat cactggtget 240
 [2229] caggctgagg acgaggccga gtactattgt gtgctgtggt acagcaacct gtgggtgttc 300
 [2230] ggcggaggca ccaaactgac agttctgggt cagcccaagg cggcgccctc ggtcactctg 360
 [2231] ttcccgcct cctctgagga gttcaagcc aacaaggcca cactggtgtg tctcataagt 420
 [2232] gacttctatc cgggagccgt gacagtggcc tggaaggcag atagcagccc cgtaaggcg 480
 [2233] ggagtggaga ccaccacacc ctccaacaa agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 540
 [2234] ctgagcctga cgctgagca gtggaagtcc cacagaagct acagctgcca ggtcacgcat 600
 [2235] gaaggagca ccgtggagaa gacagtggcc cctacagaat gttca 645
 [2236] <210> 116
 [2237] <211> 452
 [2238] <212> PRT
 [2239] <213> Homo sapiens
 [2240] <400> 116
 [2241] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [2242] 1 5 10 15
 [2243] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 [2244] 20 25 30
 [2245] Ala Met Asn Trp Val Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [2246] 35 40 45
 [2247] Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 [2248] 50 55 60
 [2249] Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 [2250] 65 70 75 80
 [2251] Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 [2252] 85 90 95
 [2253] Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 [2254] 100 105 110
 [2255] Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 [2256] 115 120 125
 [2257] Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
 [2258] 130 135 140
 [2259] Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 [2260] 145 150 155 160
 [2261] Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 [2262] 165 170 175
 [2263] Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 [2264] 180 185 190
 [2265] Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
 [2266] 195 200 205
 [2267] Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu

[2268]	210	215	220
[2269]	Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu		
[2270]	225	230	235 240
[2271]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
[2272]		245	250 255
[2273]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
[2274]		260	265 270
[2275]	Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
[2276]		275	280 285
[2277]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
[2278]	290	295	300
[2279]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[2280]	305	310	315 320
[2281]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Ala Ser Ser		
[2282]		325	330 335
[2283]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[2284]		340	345 350
[2285]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
[2286]		355	360 365
[2287]	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[2288]		370	375 380
[2289]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[2290]	385	390	395 400
[2291]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[2292]		405	410 415
[2293]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[2294]		420	425 430
[2295]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[2296]		435	440 445
[2297]	Ser Leu Gly Lys		
[2298]	450		
[2299]	<210> 117		
[2300]	<211> 1356		
[2301]	<212> DNA		
[2302]	<213> Homo sapiens		
[2303]	<400> 117		
[2304]	gaggtgcagc tggttgaatc tggcggagga ctggttcagc ctggcggatc tctgagactg 60		
[2305]	tcttgtgccg ccagcggett caccttcaac acctacgeta tgaactgggt ccgaaaggcc 120		
[2306]	cttgcaaaag gactggaatg ggtgggaaga atcaggtcca agtacaacaa ctacgccacc 180		
[2307]	tactacgccg acagcgtgaa ggacagattc accatcagca gggacgacag caagaacagc 240		
[2308]	ctgtacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgtcaga 300		
[2309]	cacggcaact tcggcaacag ctatgtgtct tggtttgctt actggggcca gggcactg 360		

[2310] gtcacagtta gctctgctag caccaagggc cccagcgtgt tccccctggc cccttgacgc 420
 [2311] agaagcacca gcgagagcac agccgccttg ggctgcttgg tgaaggacta cttccccgag 480
 [2312] cccgtgaccg tgtcttgga cagcgggcgt ctgaccagcg gcgtgcatac cttccccgcc 540
 [2313] gtgctccaga gcagcggact gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc ttccagcagc 600
 [2314] ctgggcacca agacctacac ctgcaactgt gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac 660
 [2315] aagagagtgg agagcaagta cggccctccc tgccccctt gccctgcccc cgagttcgag 720
 [2316] ggcgacccta gcgtgttct gttccccccc aagcccaagg acacctgat gatcagcaga 780
 [2317] acccccagg tgacctgct ggtggtggac gtgtcccagg aggaccccga ggtccagttt 840
 [2318] aattggtacg tggacggcgt ggaagtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900
 [2319] ttcaacagca cctacagagt ggtgtccctg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960
 [2320] ggcaaggaat acaagtcaa ggtctccaac aagggcctgg ccagcagcat cgagaagacc 1020
 [2321] atcagcaagg ccaaggcca gccacgggag ccccaggtct acacctgcc accttgtaa 1080
 [2322] gaggatga ccaagaacca ggtgtccctg tggtgtctgg taaaggctt ctatcccagc 1140
 [2323] gatatgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccagaa acaactacaa gaccacccc 1200
 [2324] cctgtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtactcca agctgacct ggacaagtcc 1260
 [2325] agatggcagg agggcaact cttcagctgc tccgtgatgc acgaggcct gcacaaccac 1320
 [2326] tacaccaga agtcctgag cctgagcctg ggcaag 1356
 [2327] <210> 118
 [2328] <211> 214
 [2329] <212> PRT
 [2330] <213> Homo sapiens
 [2331] <400> 118
 [2332] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [2333] 1 5 10 15
 [2334] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 [2335] 20 25 30
 [2336] Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 [2337] 35 40 45
 [2338] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 [2339] 50 55 60
 [2340] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 [2341] 65 70 75 80
 [2342] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
 [2343] 85 90 95
 [2344] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 [2345] 100 105 110
 [2346] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys Lys Leu Lys Ser Gly
 [2347] 115 120 125
 [2348] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 [2349] 130 135 140
 [2350] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 [2351] 145 150 155 160

[2352]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[2353]	165 170 175
[2354]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[2355]	180 185 190
[2356]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[2357]	195 200 205
[2358]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[2359]	210
[2360]	<210> 119
[2361]	<211> 642
[2362]	<212> DNA
[2363]	<213> Homo sapiens
[2364]	<400> 119
[2365]	gagatcgtgc tgacacagag ccctggcaca ctgtcactgt ctccaggcga gagagccaca 60
[2366]	ctgagctgta gagccagcca gagcgtgtcc tcttacctgg cctggtatca gaagaagcct 120
[2367]	ggacaggctc ccagactgct gatctacgac gccagcaaca gagccacagg catccccgat 180
[2368]	agattcagcg gctctggctc tggcaccgac ttcacctga caatcagcag actggaacc 240
[2369]	gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag agaagcaact ggcccatcac attcggccag 300
[2370]	ggcaccaagc tggaaatcaa gcgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360
[2371]	tctgataaga aattgaaatc tggaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
[2372]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaagtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 480
[2373]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
[2374]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
[2375]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
[2376]	<210> 120
[2377]	<211> 449
[2378]	<212> PRT
[2379]	<213> Homo sapiens
[2380]	<400> 120
[2381]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[2382]	1 5 10 15
[2383]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
[2384]	20 25 30
[2385]	Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2386]	35 40 45
[2387]	Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
[2388]	50 55 60
[2389]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2390]	65 70 75 80
[2391]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2392]	85 90 95
[2393]	Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp

[2394]		100		105		110														
[2395]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro				
[2396]			115					120					125							
[2397]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr				
[2398]			130					135					140							
[2399]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr				
[2400]			145					150					155							160
[2401]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro				
[2402]								165					170							175
[2403]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr				
[2404]								180					185							190
[2405]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp				
[2406]								195					200							205
[2407]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr				
[2408]								210					215							220
[2409]	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro				
[2410]								225					230							235
[2411]	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
[2412]								245					250							255
[2413]	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp				
[2414]								260					265							270
[2415]	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
[2416]								275					280							285
[2417]	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val				
[2418]								290					295							300
[2419]	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
[2420]								305					310							315
[2421]	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys				
[2422]								325					330							335
[2423]	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr				
[2424]								340					345							350
[2425]	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser				
[2426]								355					360							365
[2427]	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
[2428]								370					375							380
[2429]	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
[2430]								385					390							395
[2431]	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
[2432]								405					410							415
[2433]	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				
[2434]								420					425							430
[2435]	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly				

[2436]	435	440	445	
[2437]	Lys			
[2438]	<210> 121			
[2439]	<211> 1347			
[2440]	<212> DNA			
[2441]	<213> Homo sapiens			
[2442]	<400> 121			
[2443]	gaagtgcagc	tgctggaatc	tggtggcgga	gttgttcagc ctggcggctc tctgagactg 60
[2444]	tcttgtgctg	ccagcggctt	cacettcaac	gactacgcta tgcactgggt ccgagaggcc 120
[2445]	cctggcaaag	gacttgaatg	ggtgtccacc	atcagctgga acagcggctc tatcggctac 180
[2446]	gccgattccg	tgaagggcag	attcaccatc	tccagagaca acagcaagaa caccctgtac 240
[2447]	ctgcagatga	acagcctgag	agccgaggac	accgccgtgt actactgtgc caaggacatc 300
[2448]	cagtacggca	actactacta	cggcatggac	tactggggcc agggaaact ggttaccgtt 360
[2449]	agctctgcta	gcaccaaggg	ccccagcgtg	ttccccctgg ccccttgtag cagaagcacc 420
[2450]	agcgagagca	cagccgcctt	gggctgcctg	gtggaggact acttccccga gccctgacc 480
[2451]	gtgtcctgga	acagcggcgc	tctgaccagc	ggcgtgcata cttccccgc cgtgctccag 540
[2452]	agcagcggac	tgtactccct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc cttccagcag cctgggcacc 600
[2453]	aagacctaca	cctgcaacgt	ggaccacaag	cccagcaaca ccaaggtgga cgagagagtg 660
[2454]	gagagcaagt	acggccctcc	ctgccccctt	tgccctgccc ccgagttcga aggcggacct 720
[2455]	agcgtgttcc	tgttcccccc	caagcccaag	gacacctga tgatcagcag aacccccgag 780
[2456]	gtgacctgcg	tggtggtgga	cgtgtcccag	gaggaccccg aggtccagtt taattggtac 840
[2457]	gtggacggcg	tggaagtgca	taacgccaag	accaagccca gagaggagca gttcaacagc 900
[2458]	acctacagag	tggtgtccgt	gctgaccgtg	ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggaa 960
[2459]	tacaagtgca	aggtctccaa	caagggcctg	gccagcagca tcgagaagac catcagcaag 1020
[2460]	gccaaaggcc	agccacggga	gccccaggtc	tgcacctgc cacctagcca agaggagatg 1080
[2461]	accaagaacc	aggtgtccct	gagctgtgcc	gtgaaaggct tctatcccag cgatatgcc 1140
[2462]	gtggagtggg	agagcaacgg	ccagcccagc	aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
[2463]	gacagcgacg	gcagcttctt	cctggtttcc	aagctgaccg tggacaagtc cagatggcag 1260
[2464]	gaggcaacg	tcttcagctg	ctccgtgatg	cacgagggcc tgcacaacca ctacaccag 1320
[2465]	aagtccctga	gcctgagcct	gggcaag	1347

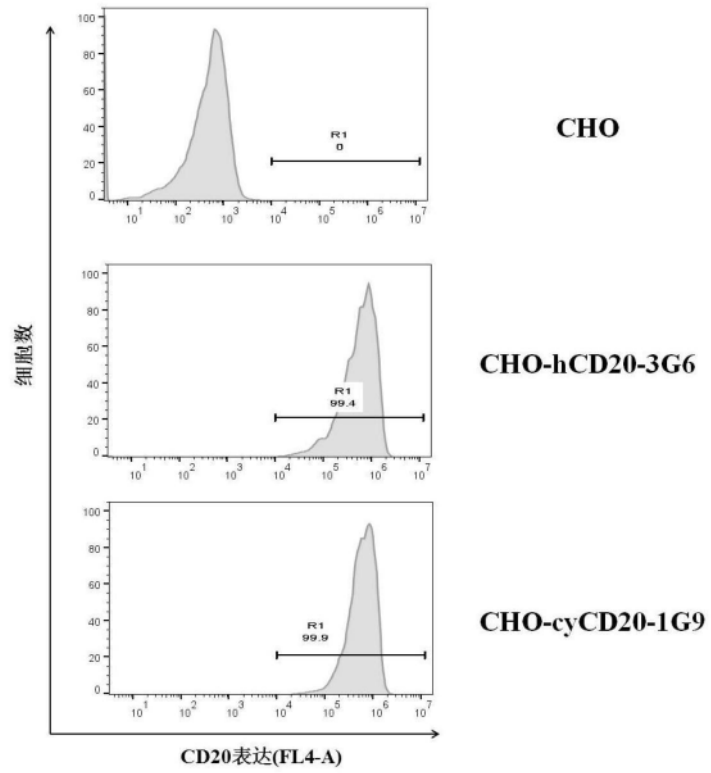


图1

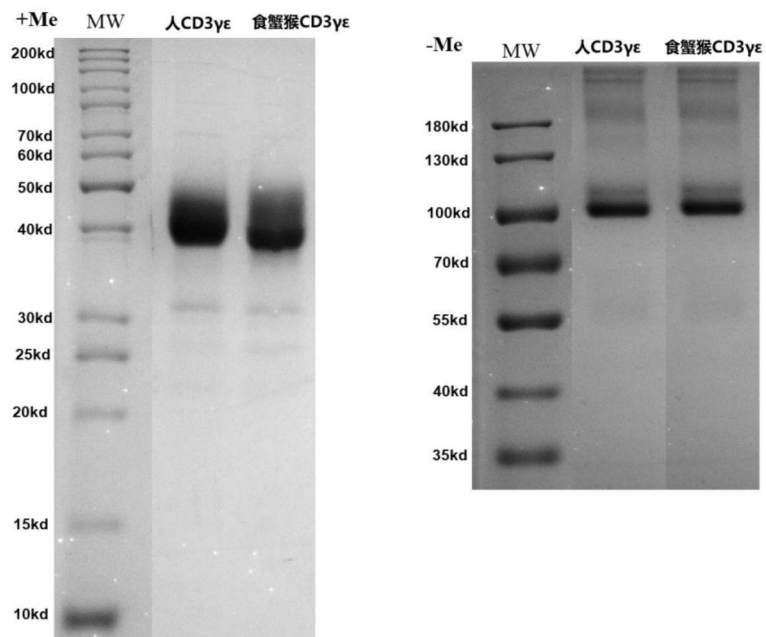


图2

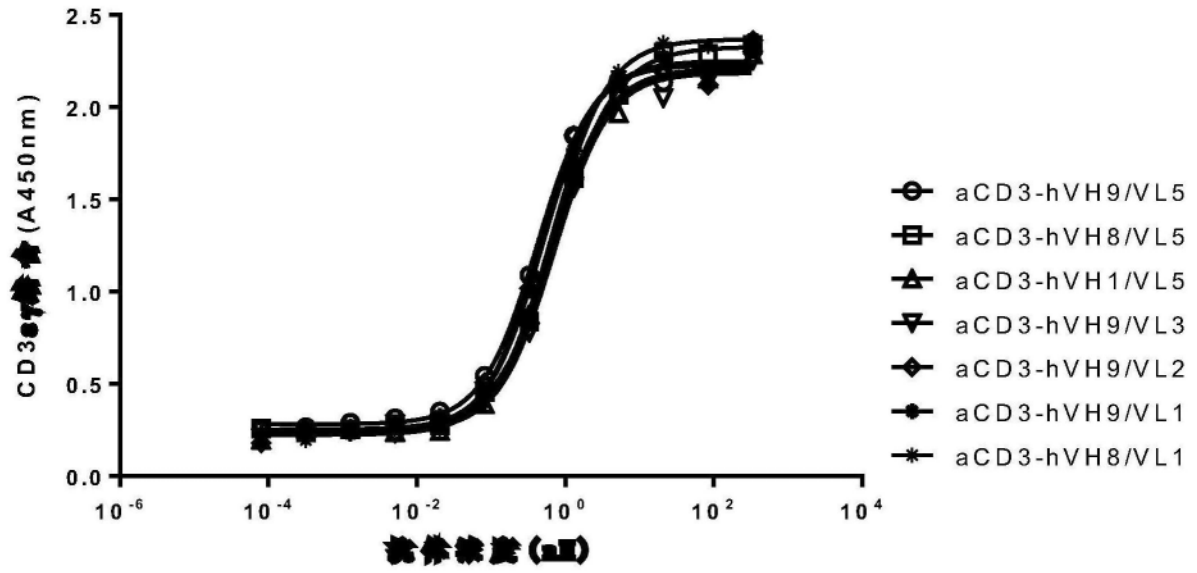


图3

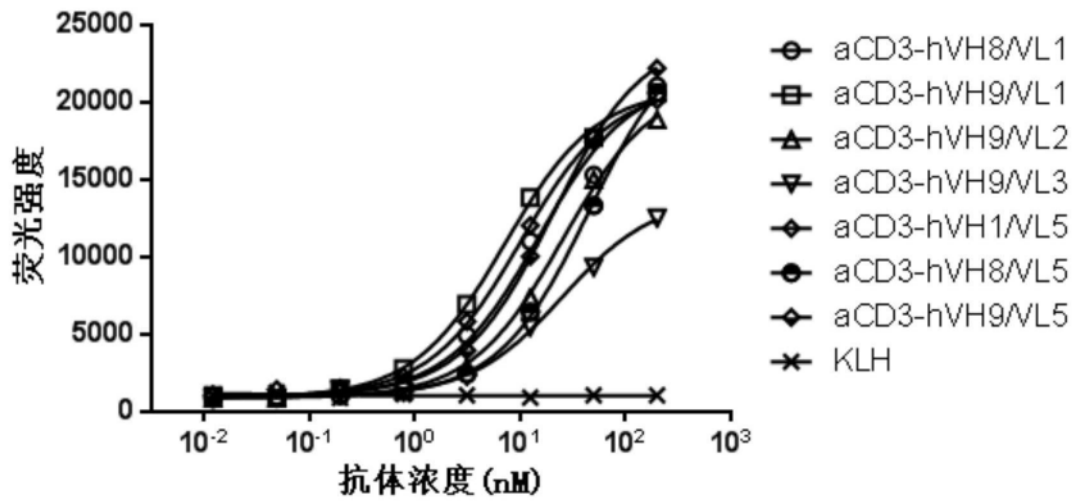


图4

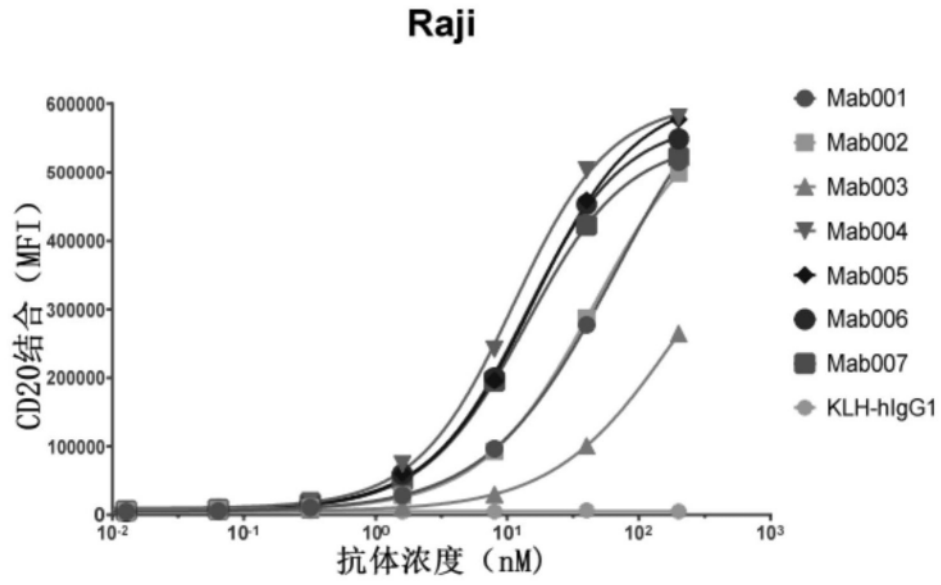


图5

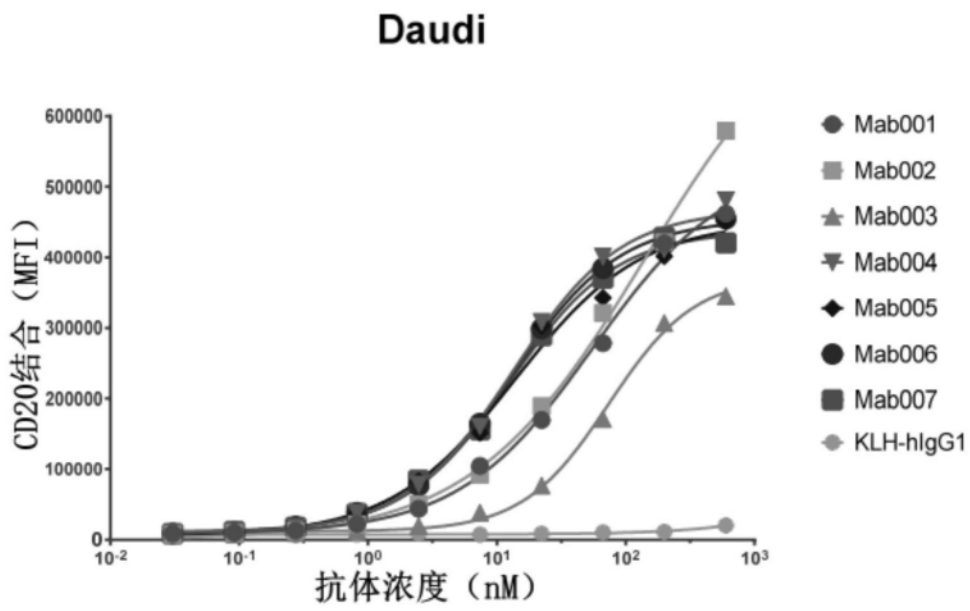


图6

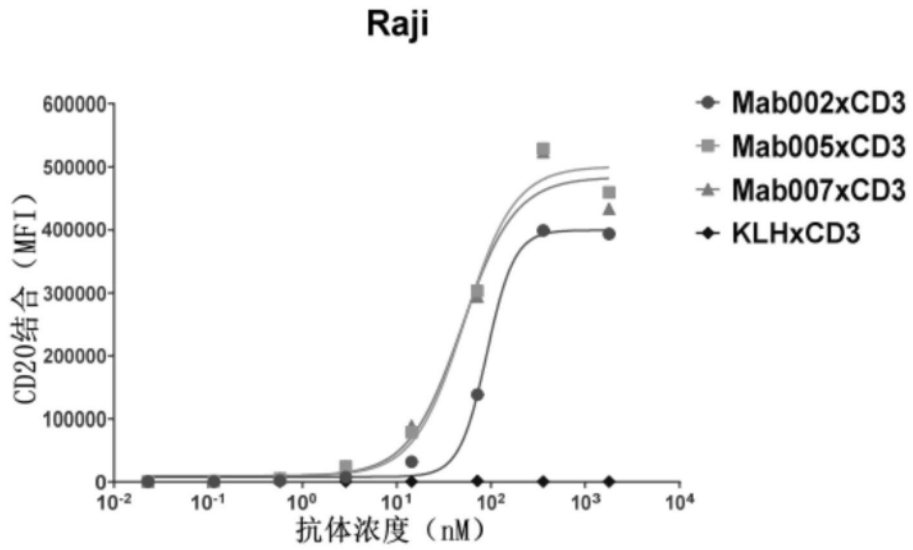


图7

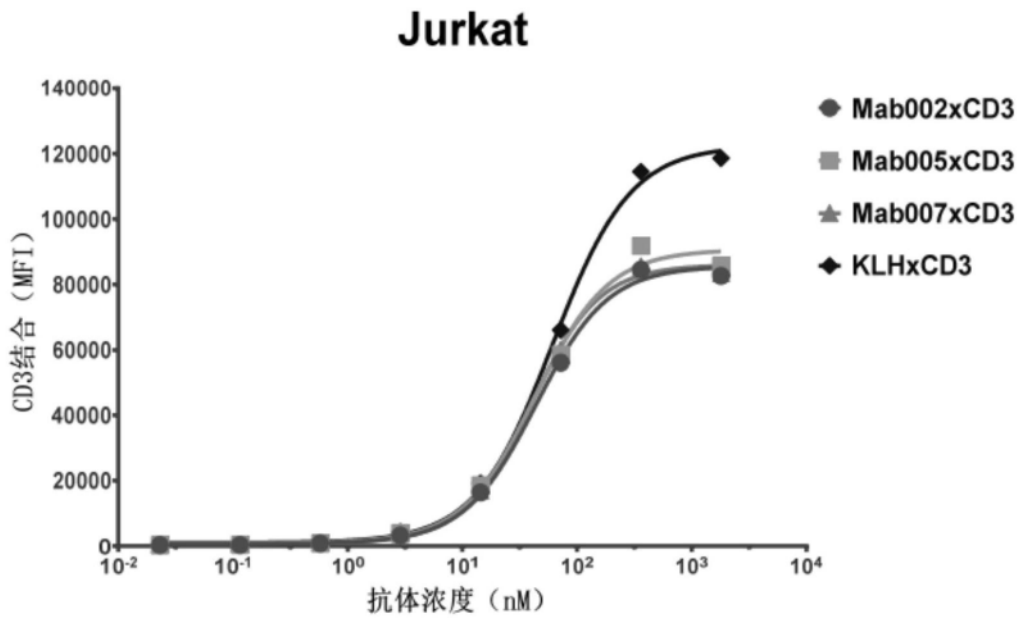
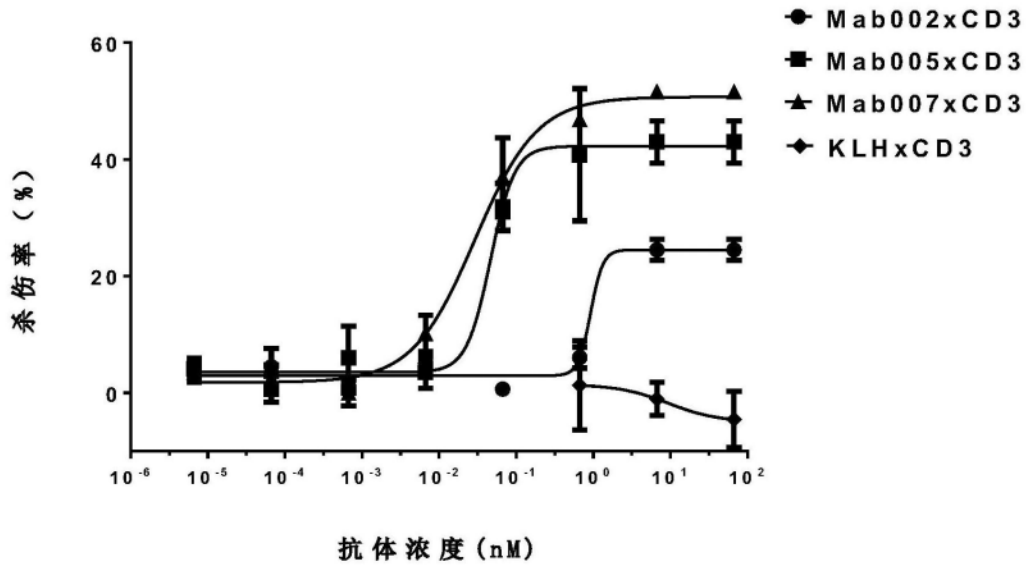


图8

A

Raji细胞的TDCC杀伤



B

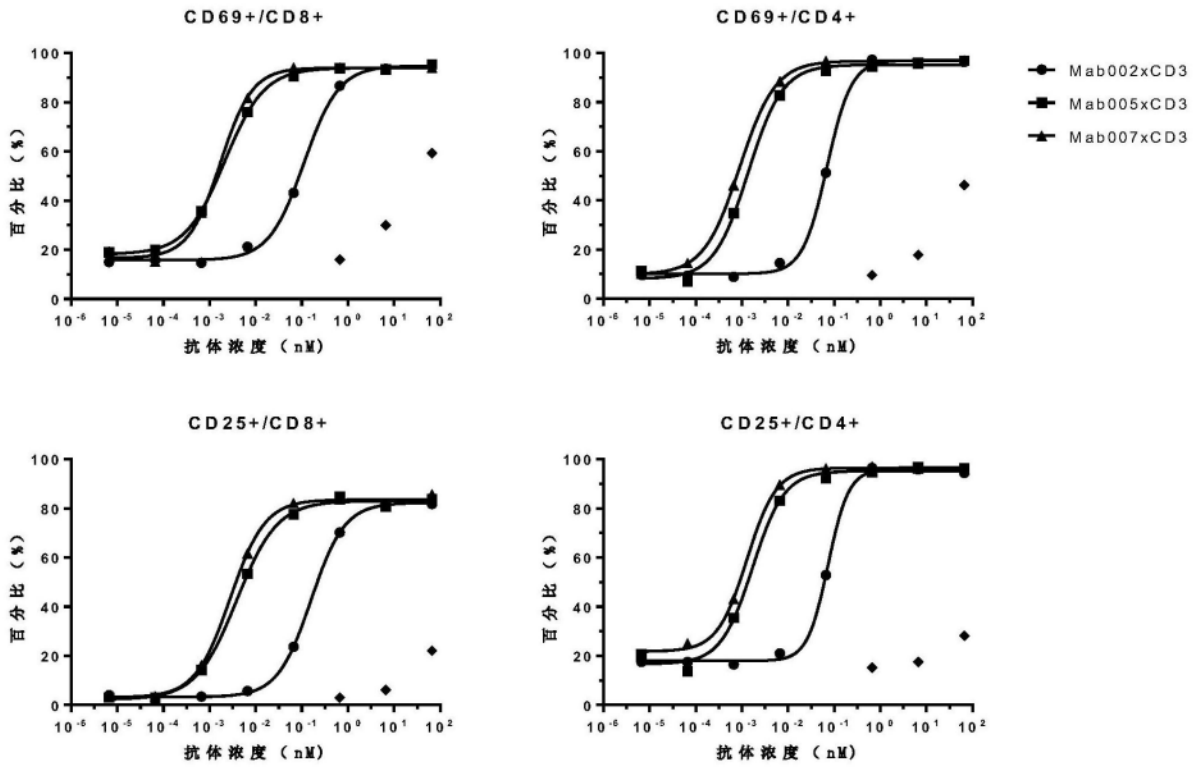


图9

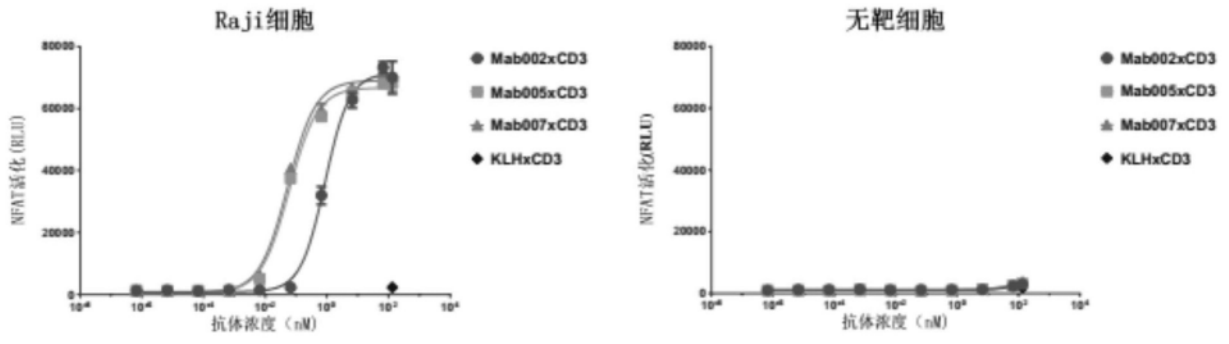


图10

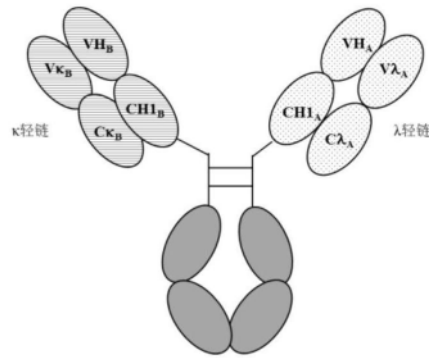


图11

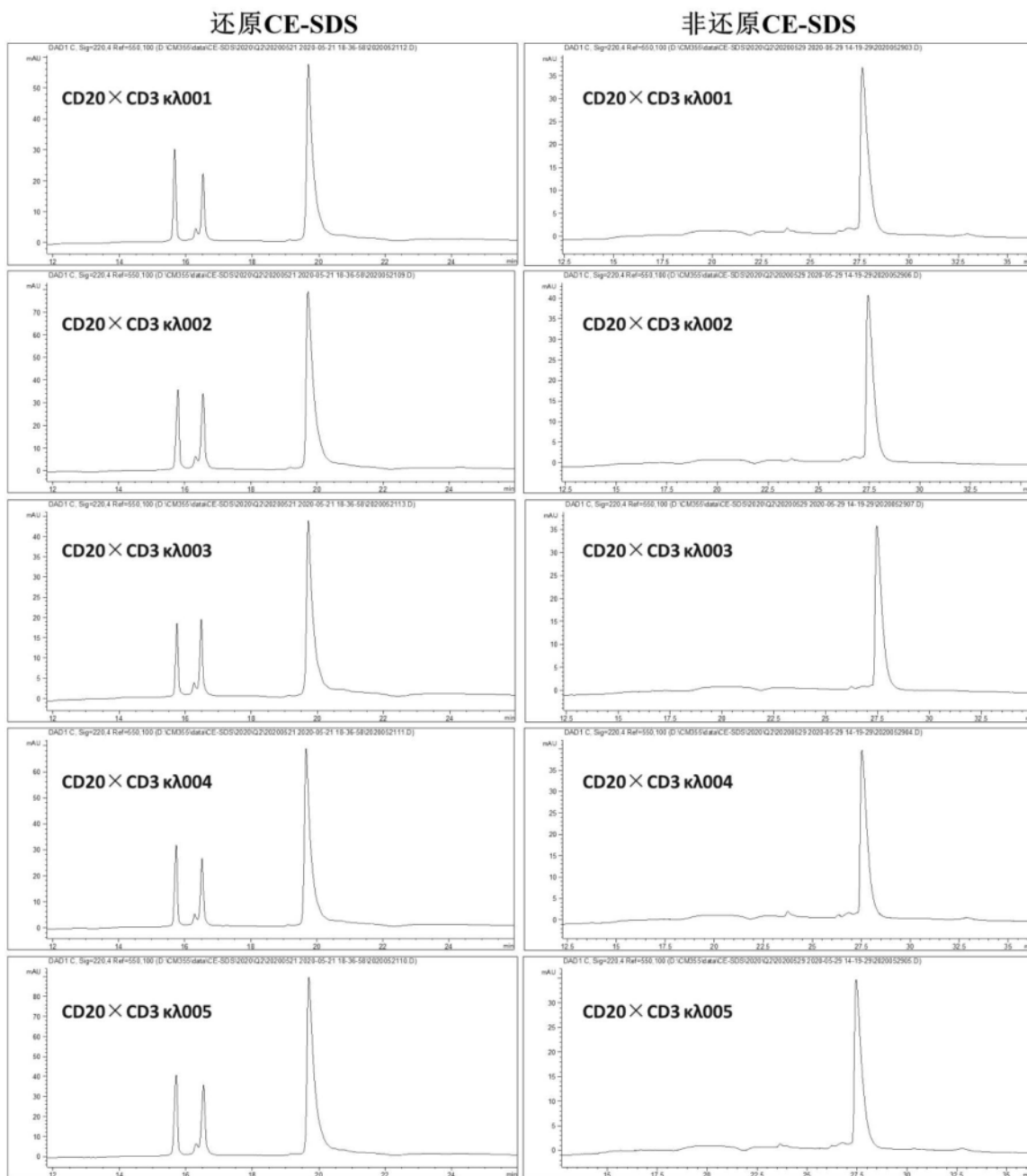


图12

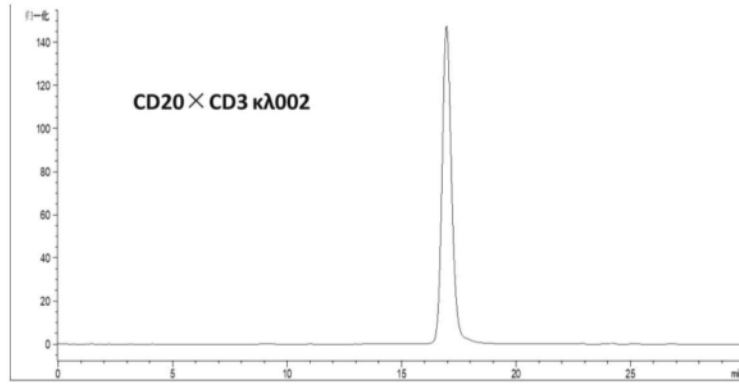


图13

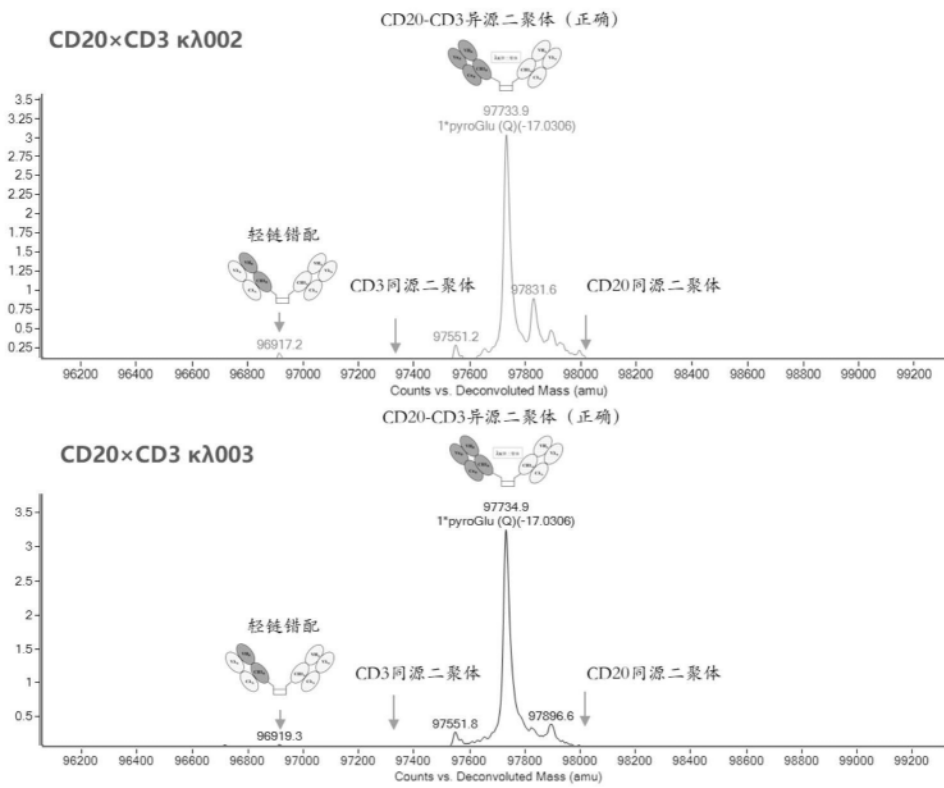


图14

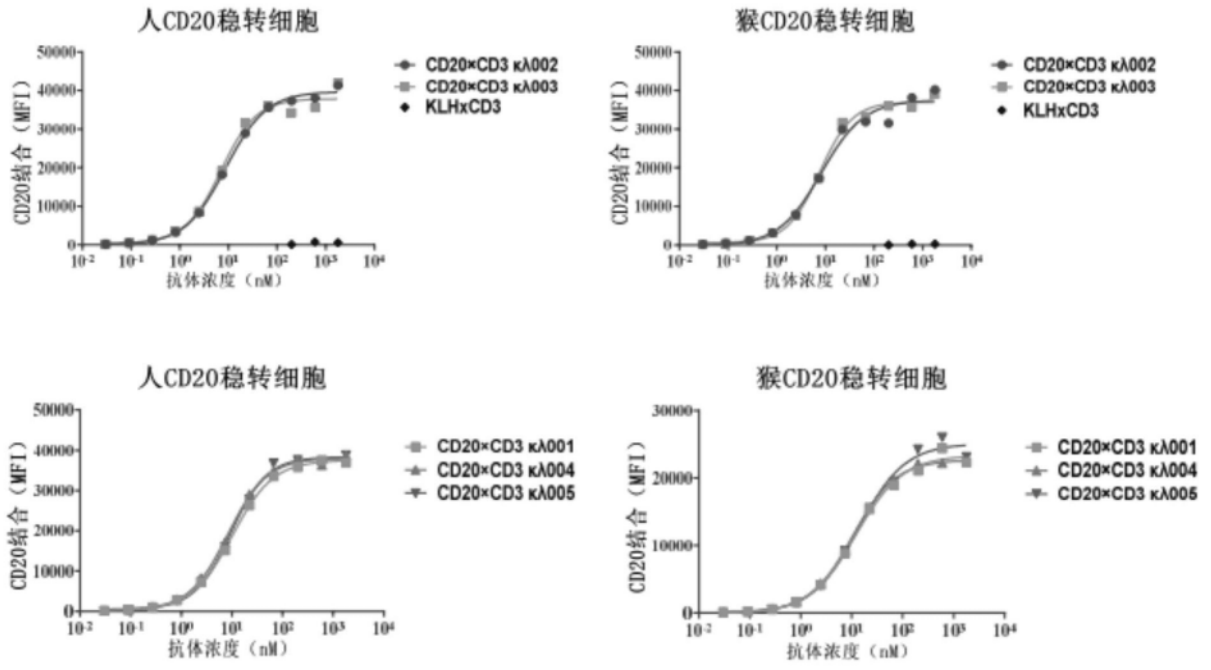


图15

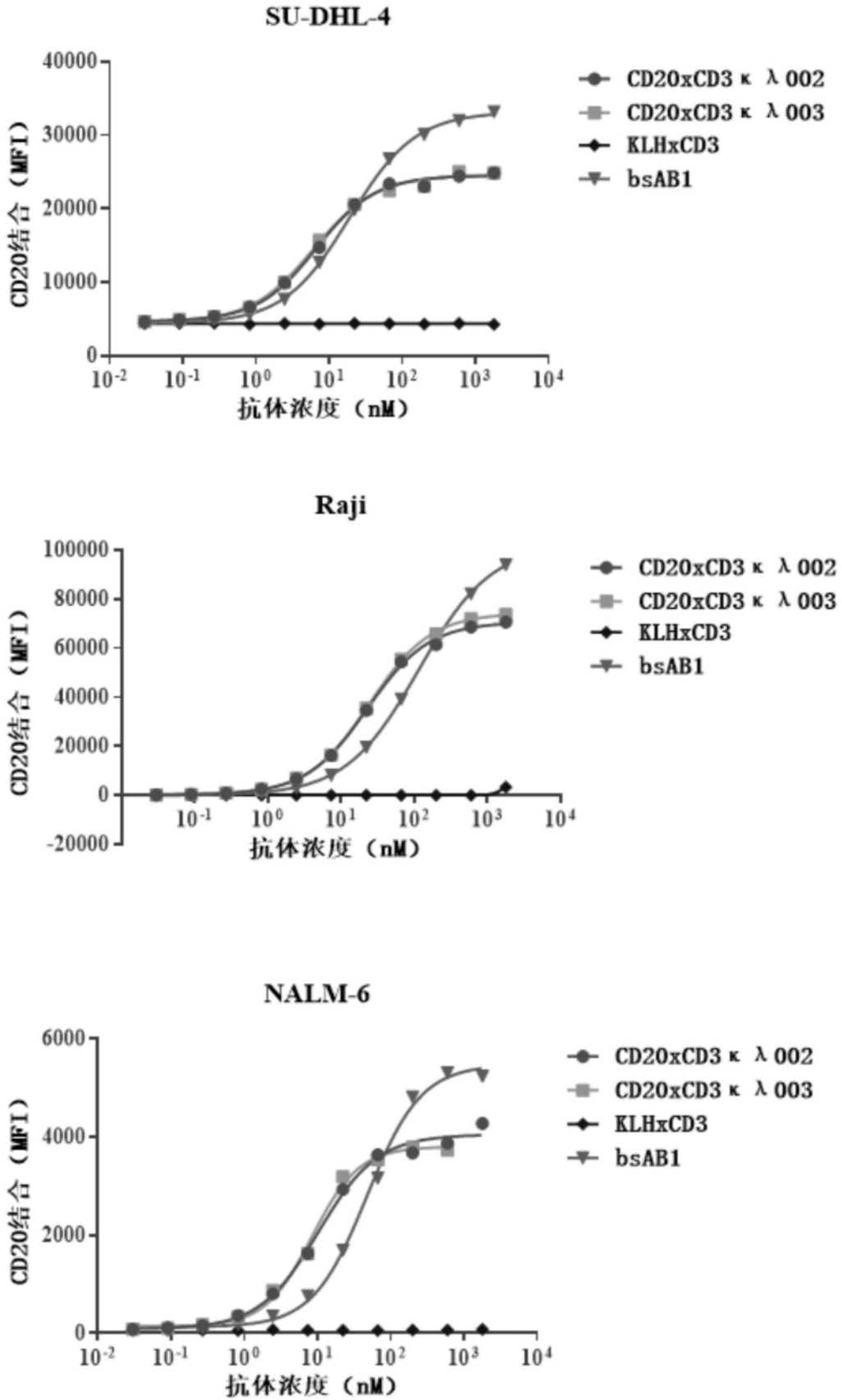


图16

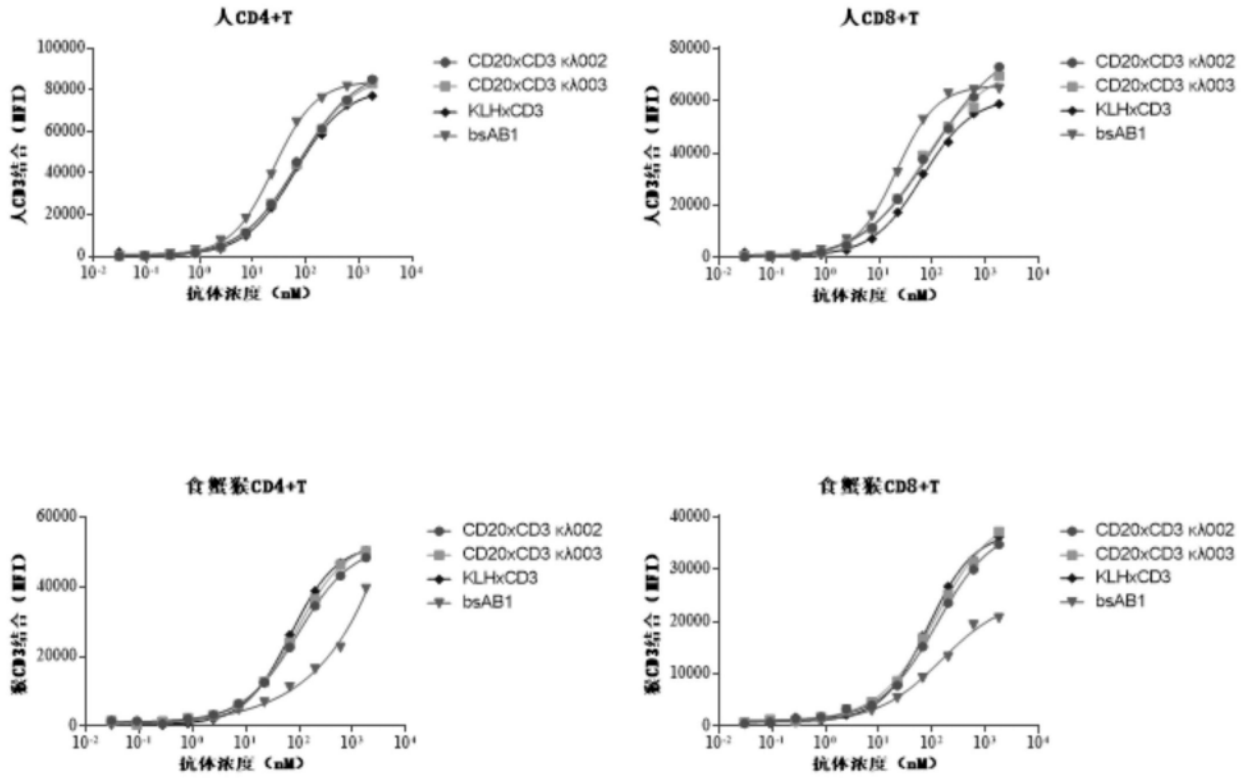


图17

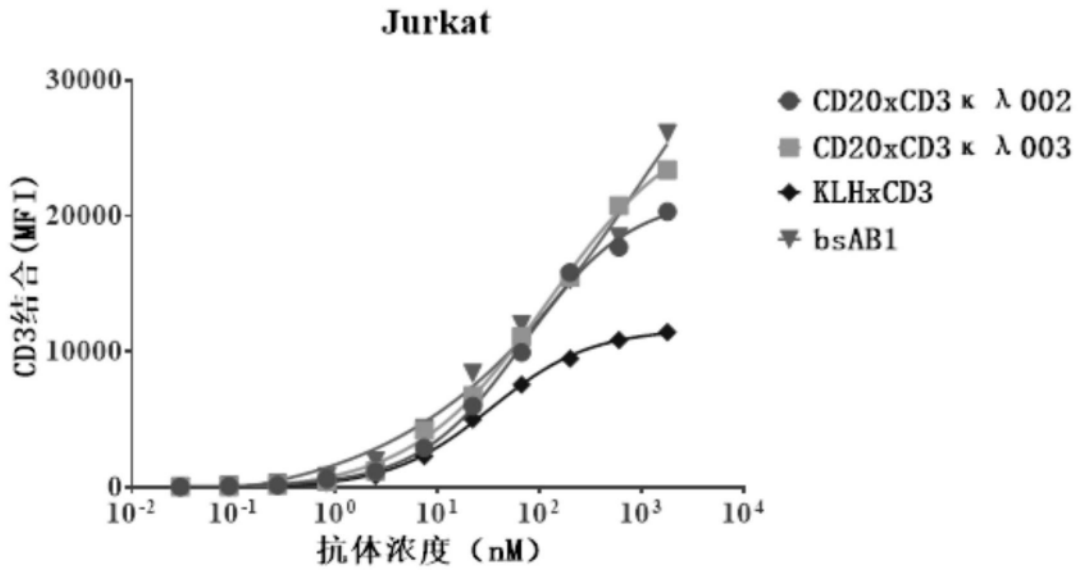


图18

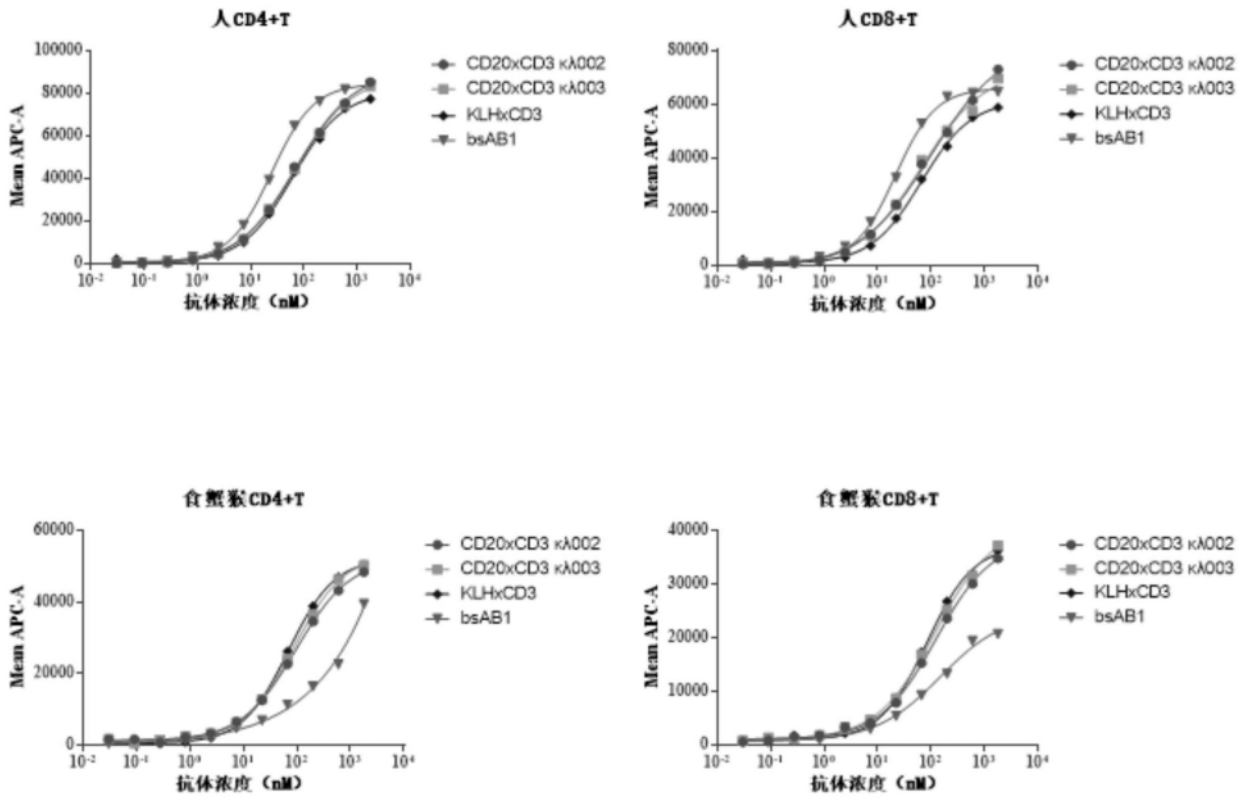


图19

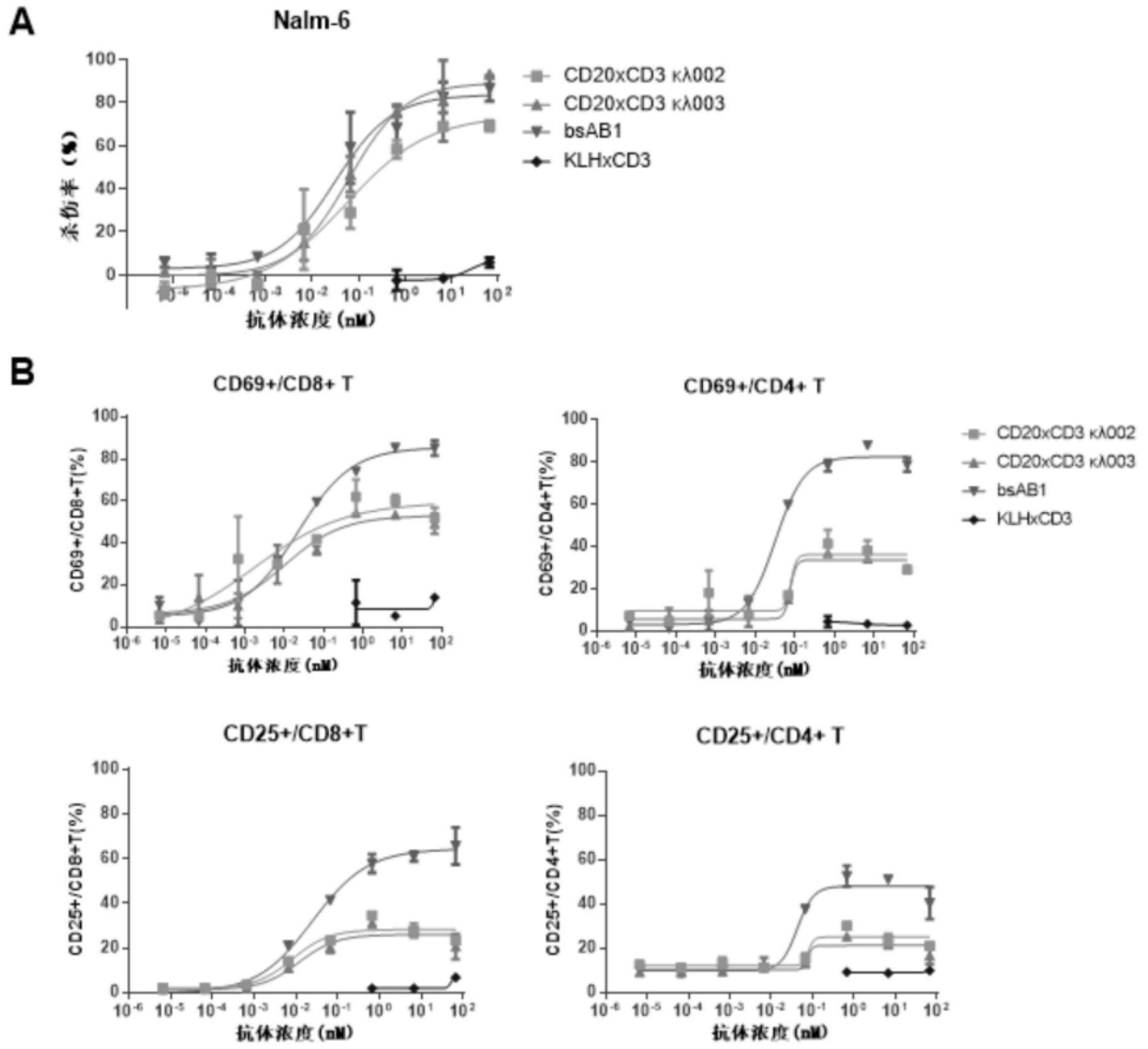


图20

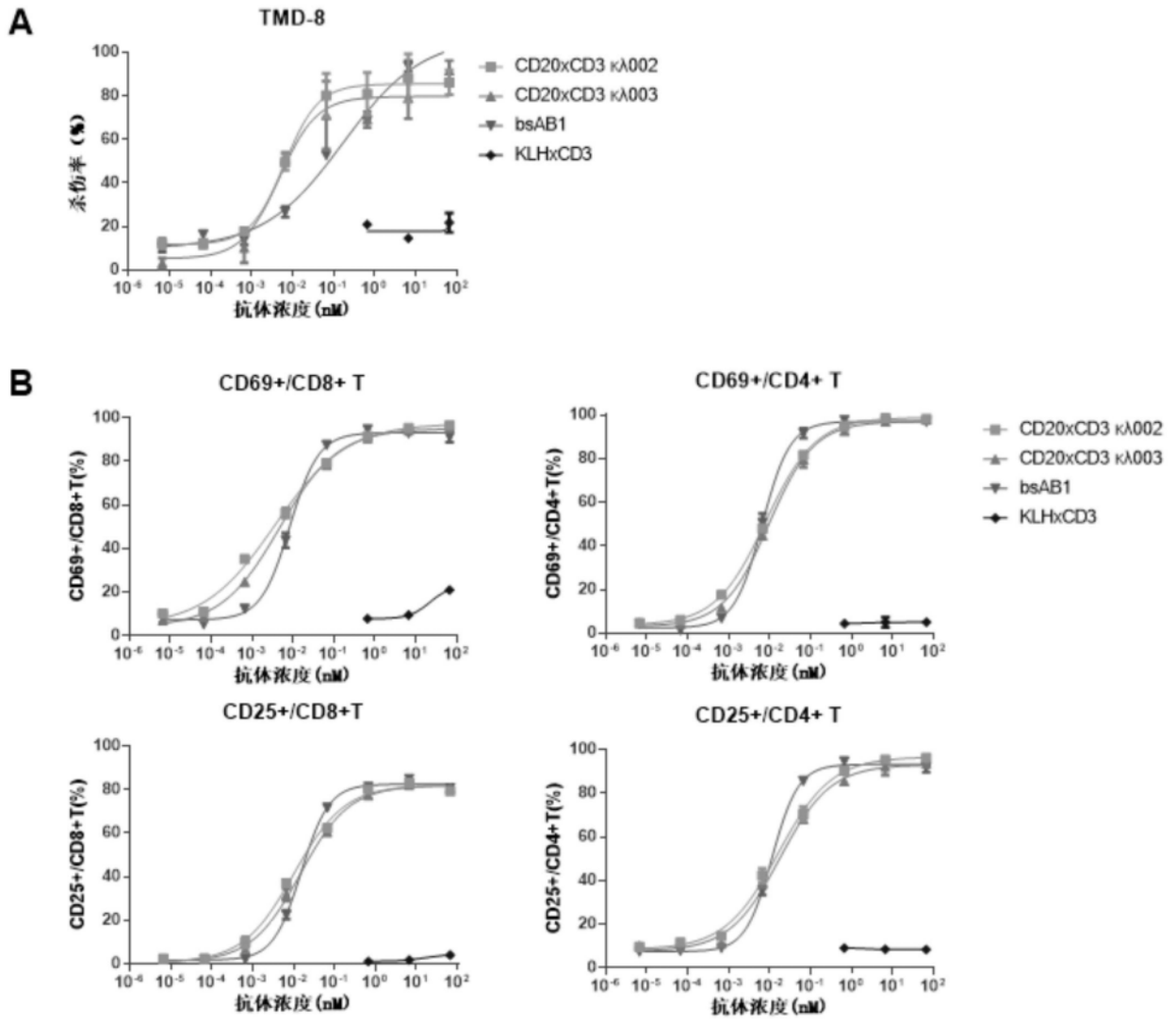


图21

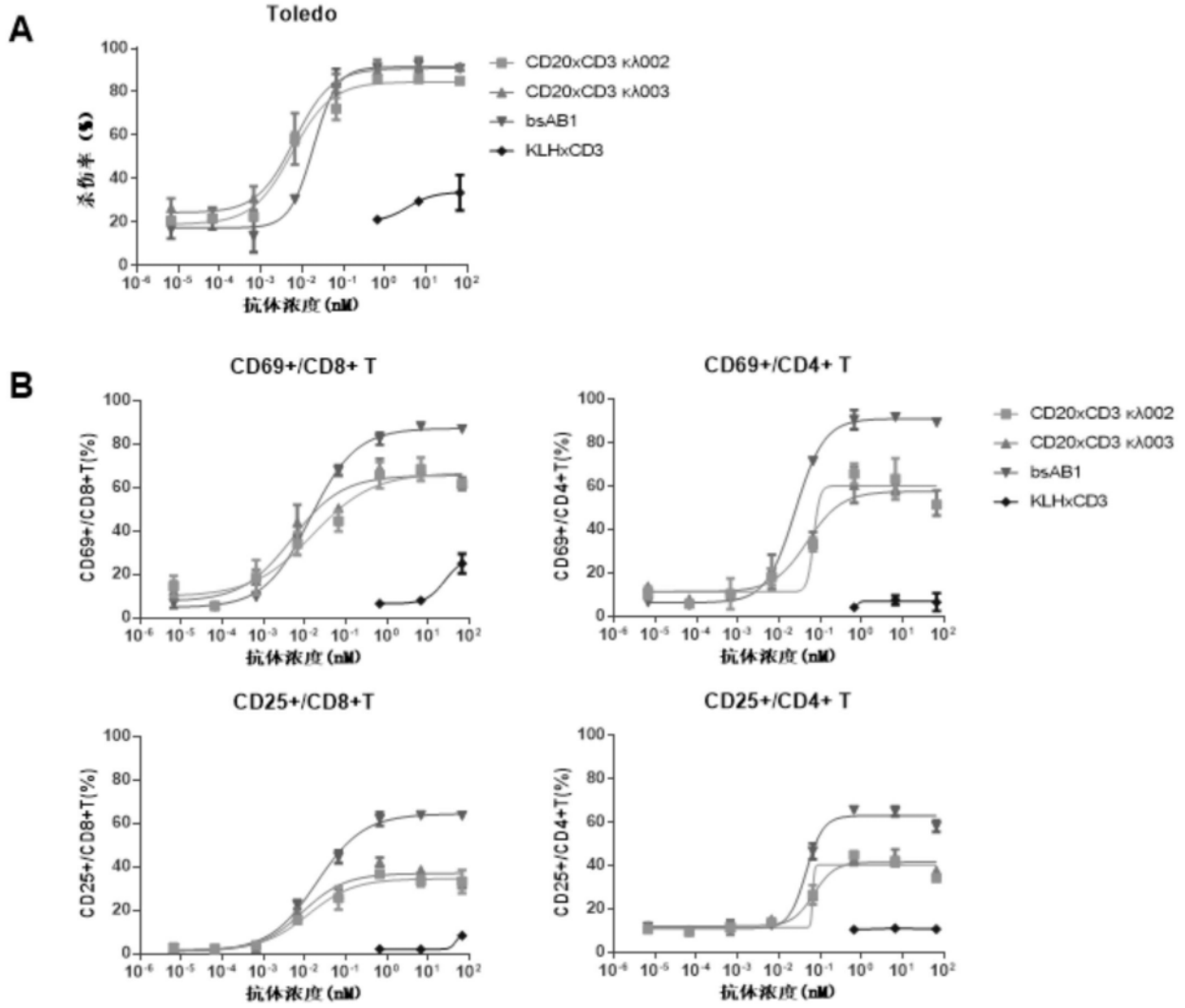


图22

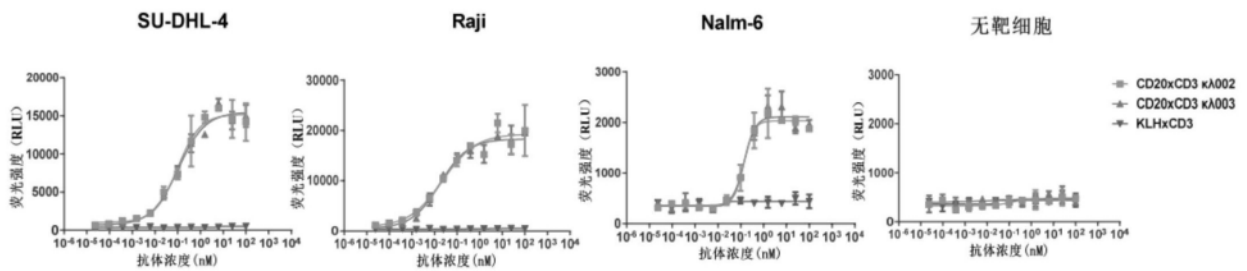


图23

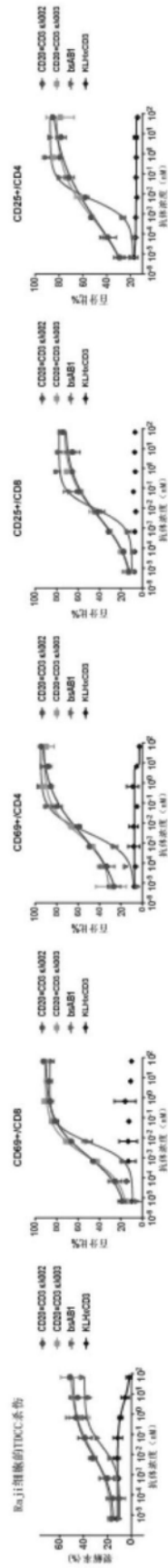


图24

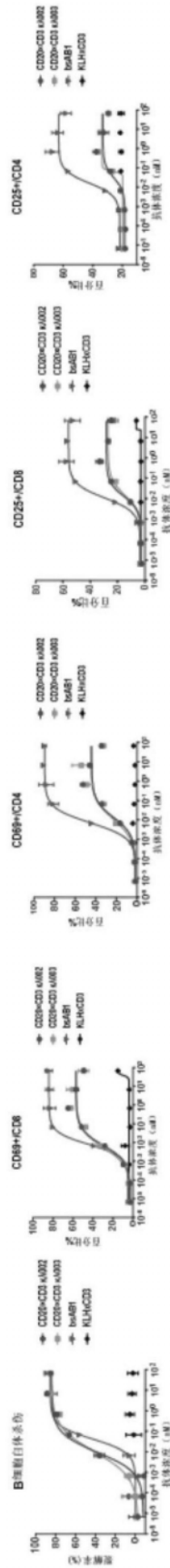


图25

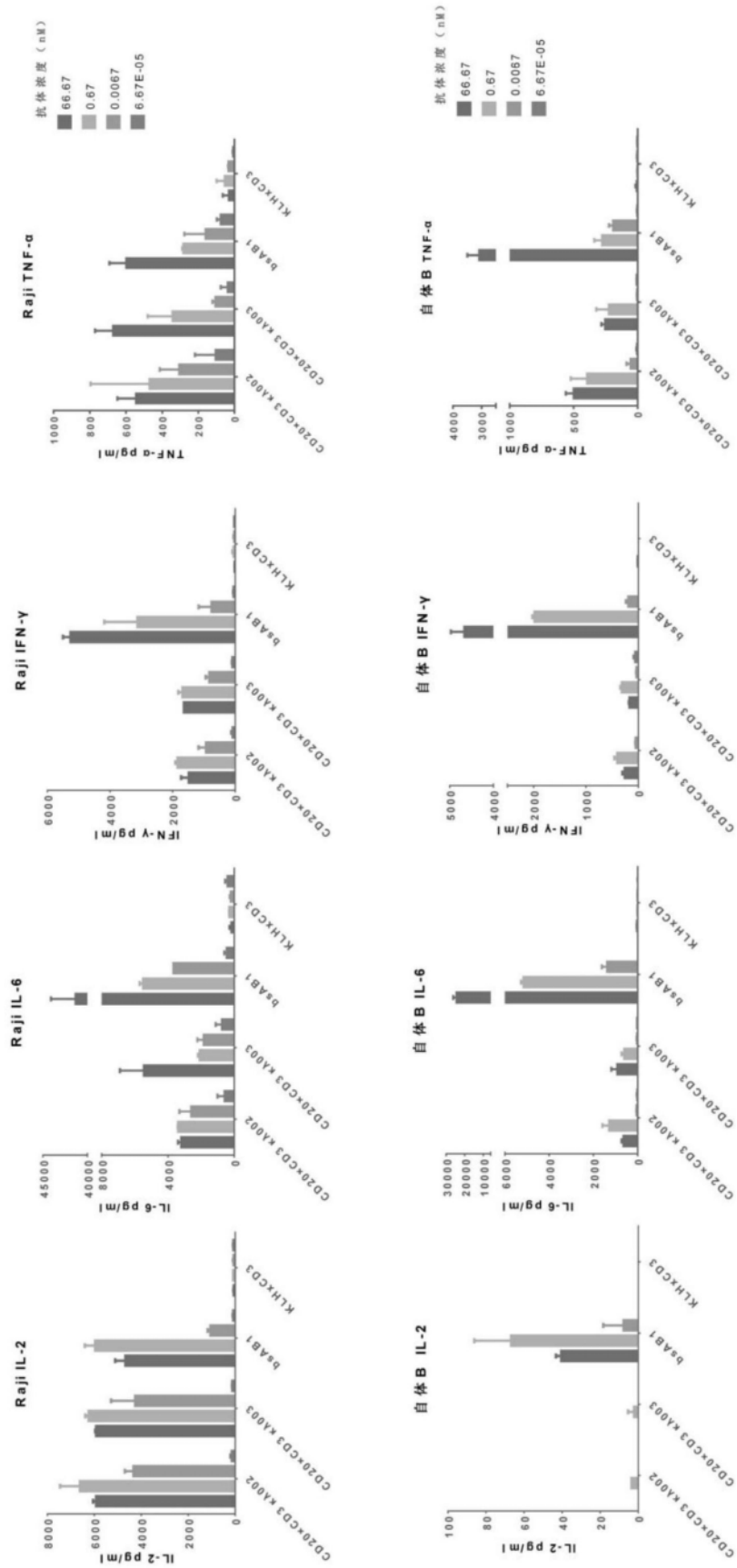


图26

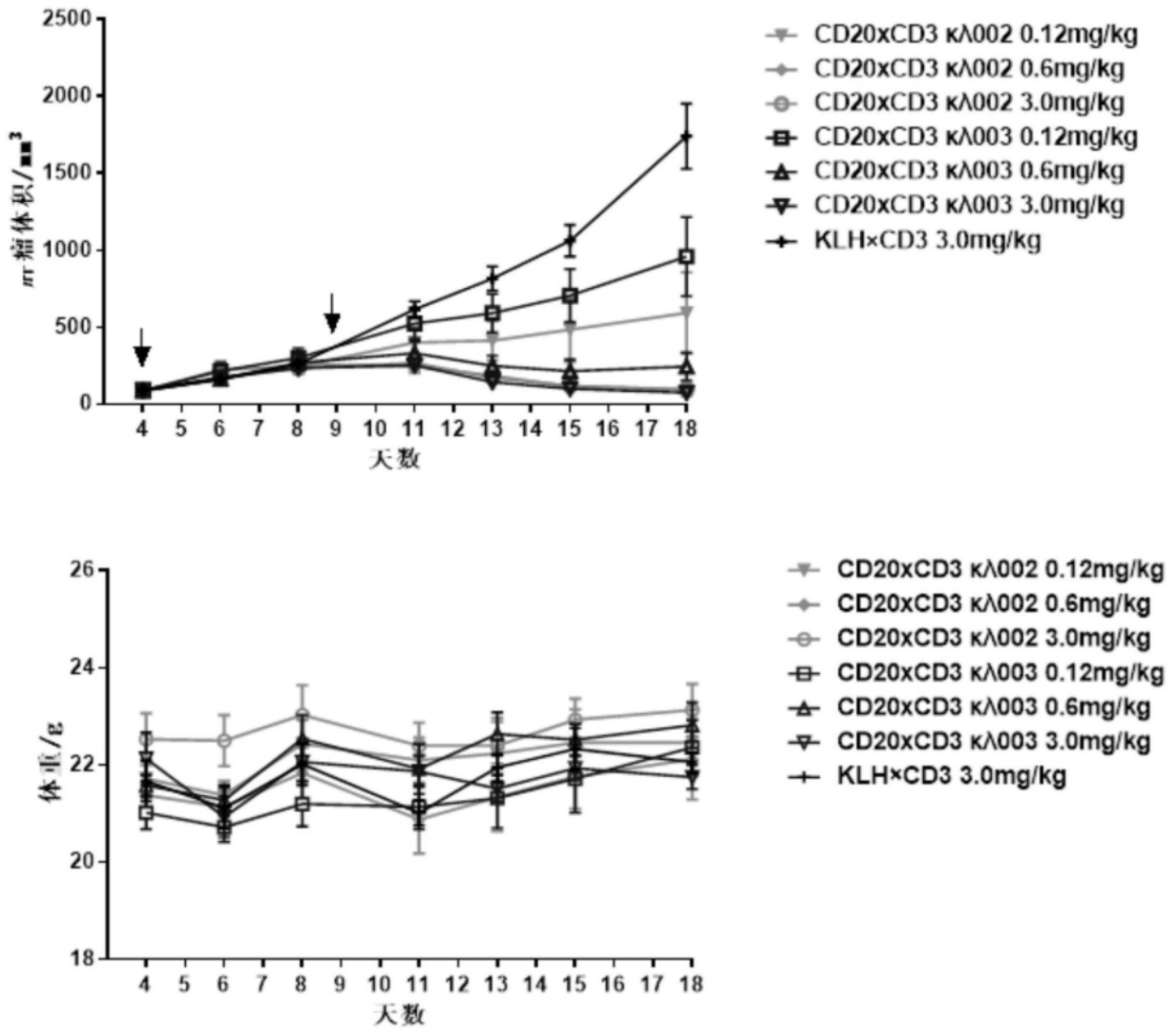


图27

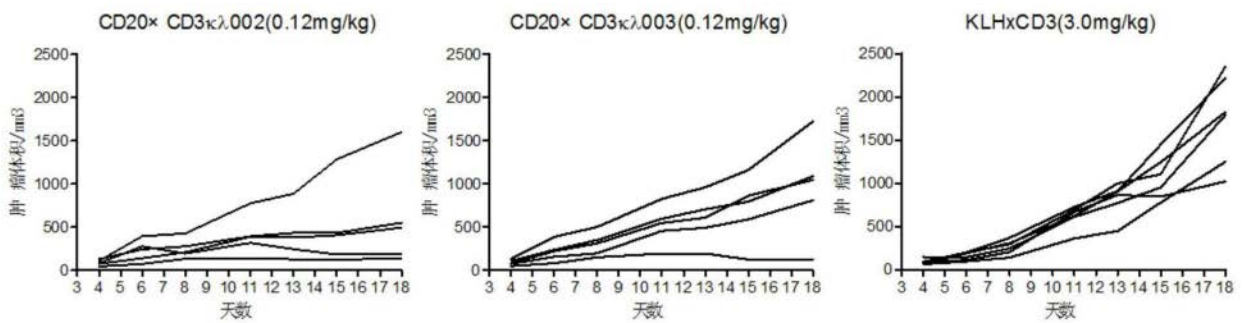


图28

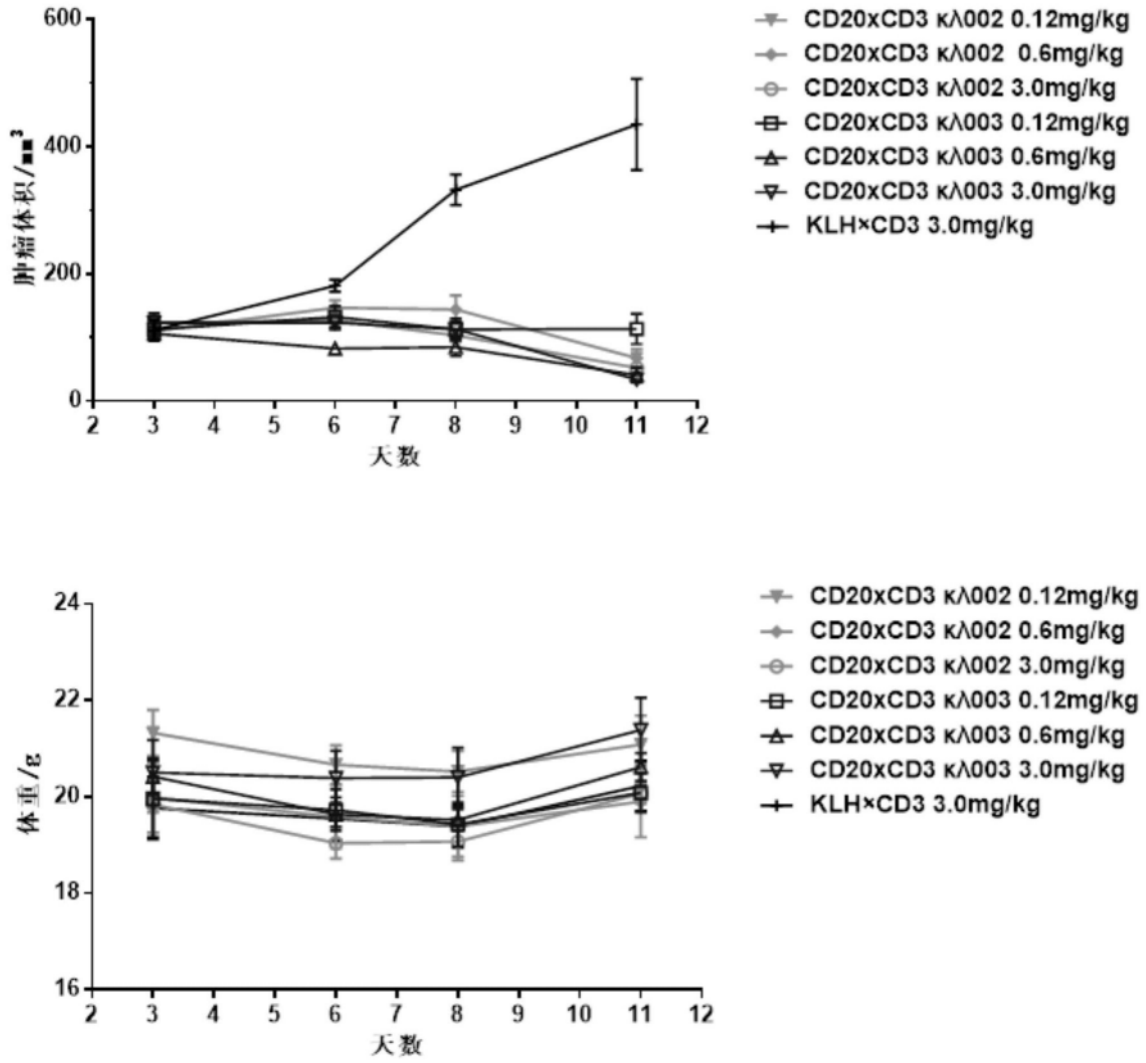


图29

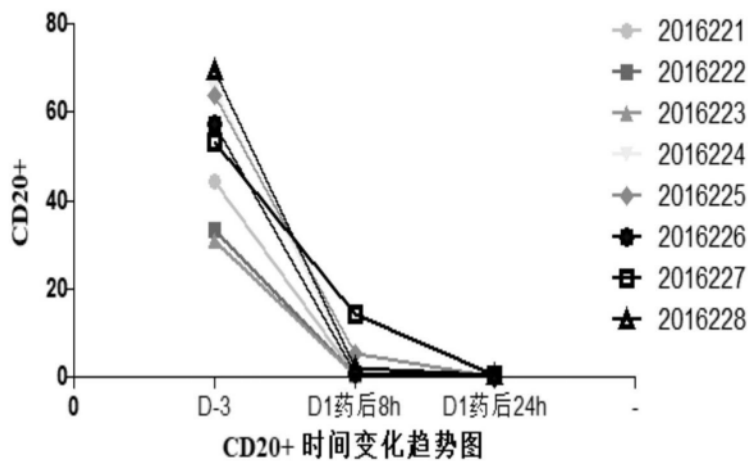


图30