



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107880130 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201711358747.4

C12N 15/85(2006.01)

(22)申请日 2017.12.17

C12N 5/10(2006.01)

(71)申请人 深圳市国创纳米抗体技术有限公司

A61K 39/395(2006.01)

地址 518057 广东省深圳市南山区粤海街
道科丰路2号特发信息港大厦D栋一楼
东侧二号

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

(72)发明人 宋海鹏 于建立 刘原源 李飞

古一 黄琪 周宇航 王欢

陈晓恒 王崇洋 李婧婵

(74)专利代理机构 北京市众天律师事务所

11478

代理人 李新军

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

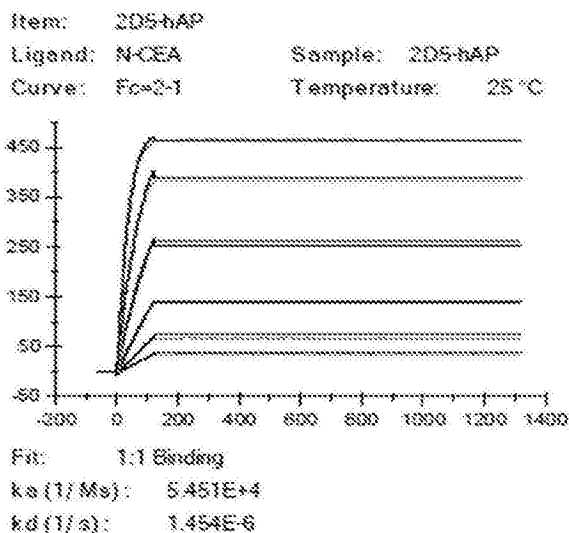
序列表4页 附图6页

(54)发明名称

一种具有高亲和力的抗癌胚抗原纳米抗体
及应用

(57)摘要

本发明公开了一种具有高亲和力的抗癌胚抗原纳米抗体,所述纳米抗体具有独特的3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,本发明还公开了所述纳米抗体在肿瘤治疗药物和肿瘤检测试剂中的应用。本发明提供的抗CEA的纳米抗体对CEA抗原具有特异的识别和结合能力,该纳米抗体亲和力可达 10^{11} ,且与七种癌胚抗原相似物均没有结合反应;在对血清样品的CEA抗原的检测中,灵敏度可达1ng/ml,显示出本发明提供的纳米抗体具有高度的特异性和灵敏度。



1. 一种具有高亲和力的抗癌胚抗原纳米抗体,所述纳米抗体的可变区具有3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1序列由SEQ ID NO.1所述氨基酸序列组成,CDR2序列由SEQ ID NO.2所述氨基酸序列组成,CDR3序列由SEQ ID NO.3所述氨基酸序列组成。
2. 根据权利要求1所述的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体的可变区序列由SEQ ID NO.4所述氨基酸序列组成。
3. 根据权利要求2所述的纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体还具有化学发光结合作用区序列,所述纳米抗体的化学发光区序列由SEQ ID NO.5所述氨基酸序列组成。
4. 一种编码权利要求3所述纳米抗体序列的核苷酸编码序列,所述编码序列由SEQ ID NO.6所示。
5. 一种含有权利要求4所述的核苷酸编码序列的表达载体。
6. 根据权利要求5所述的载体,其特征在于,所述载体为pcDNA3.1(+).
7. 一种含有权利要求6所述表达载体的宿主细胞系。
8. 根据权利要求7所述的宿主细胞,其特征在于,所述细胞为转染腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系。
9. 权利要求1或2所述的纳米抗体在制备肿瘤治疗药物中的应用。
10. 权利要求1-3任一所述的纳米抗体在制备肿瘤检测试剂中的应用。

一种具有高亲和力的抗癌胚抗原纳米抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗体,更具体地,本发明涉及一种纳米抗体。

背景技术

[0002] 癌胚抗原(CEA,又称为CEACAM-5或CD66e)是一种具有约180kDa分子量的糖蛋白。CEA是免疫球蛋白超家族的一名成员,并且含有经由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚与细胞膜连接的7个域。7个域包括单一N端Ig可变域和与Ig恒定域同源的6个域(A1-B1-A2-B2-A3-B3)。CEA最初分类为仅在胎儿组织中表达的蛋白质,现在已经在几种正常成年组织中鉴定出。CEA的过量表达在许多类型的癌症中观察到,包括结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞癌、乳腺癌和甲状腺癌。因此,CEA已经被鉴定为肿瘤相关抗原。CEA容易自细胞表面切割,并直接或经由淋巴系统自肿瘤脱落入血流中。由于此特性,已经使用血清CEA的水平作为临床标志物以诊断癌症并筛选癌症。而且,CEA也已被用作肿瘤标记,测量癌症患者血液中升高的CEA的免疫学测定法已在临床上用于癌症的预后和控制。

[0003] 更重要的是,CEA已成为用于靶向治疗的潜在有用的肿瘤相关抗原。已经报道的使用CEA靶向免疫治疗癌症主要有2种主要方法。一种方法使用抗CEA抗体引发免疫细胞的溶解活性,特别是通过抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC),以消除表达CEA的肿瘤细胞。另一种方法是通过抗CEA抗体或抗体片段与例如药物、毒素、放射性核苷酸、免疫调节剂或细胞因子等效应分子缀合,特异性靶向表达CEA的肿瘤细胞,从而发挥效应分子的治疗作用。

[0004] 目前已经针对CEA生成多种单克隆抗体。Chester等已经自噬菌体展示文库分离出单链抗CEA抗体以在放射性免疫检测和放射性免疫疗法中使用(美国专利No.5,876,691),随后将抗体人源化(美国专利No.7,232,888)。放射性标记的抗CEA抗体已经在结肠直肠癌患者的临床试验中使用。

[0005] 1993年,Hamers-Casterman等研究发现,在骆驼科动物(骆驼,单峰骆驼和美洲驼)的体内发现了一类仅有重链二聚体抗体H₂,其主要是IgG2和IgG3类型。此类抗体由于缺乏轻链,于是将这种抗体称为仅有重链的抗体(Heavy Chain only like Antibody,HCAs),而它们的抗原结合部位由一个结构域组成,称为VHH区,因此该类抗体也被称为单结构域抗体或者单域抗体(sdAb)。由于该类抗体为去除恒定区后的可变区序列,分子量只有15kD,大约10纳米的直径,因此也被称为纳米抗体(Nbs)。另外,在鲨鱼中也观察到这类单结构域抗体,称为VNAR。这种仅有重链的抗体原来只是作为一种人类B细胞增生性疾病(重链病)的病理形式被人们所认识,这种仅有重链的抗体可能是由于基因组水平的突变和缺失而导致重链CH1结构域不能表达,使得表达出的重链缺乏CH1,从而缺乏与轻链的结合能力,从而形成一种重链二聚体。

[0006] 相对于常规的四链抗体的scFv而言,纳米抗体在亲和力方面与其对应的scFv相当,但在可溶性、稳定性、对聚集的抗性、可重折叠性、表达产率以及DNA操作、文库构建和3-D结构测定的容易性方面超越scFv。

[0007] 纳米抗体有来源于成年骆驼体内HCAbs的最小的功能性抗原结合片段,具有高度稳定性和与抗原结合的高亲合力,能与蛋白裂隙和酶活性位点的相互作用,使之作用类似于抑制剂。因此,纳米抗体可以为从肽模拟药物设计小分子酶抑制物提供新的思路。由于仅有重链,纳米抗体的制造较mAb容易。纳米抗体的独特性质,如处于极端温度和pH环境中的稳定性,可以低成本制造大产量。因此,纳米抗体在疾病的治疗和诊断中具有很大的价值,在肿瘤的抗体靶向诊断和治疗中也具有很大的发展前景。

[0008] 鉴于CEA更多地过量表达于一些诸如结肠直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞瘤、乳腺癌和甲状腺癌等实体肿瘤中,因此研发抗CEA的纳米抗体,充分发挥纳米抗体超强的抗原识别能力,特别是识别一些隐匿于裂隙或空腔里的抗原决定簇成为抗体技术领域的一种新的需求。但是鉴于纳米抗体分子过低而存在的一些诸如亲和力低、易于集聚、血清半衰期短等结构缺陷却阻碍着纳米抗体的进一步应用。本发明的目的就是提供一种能够充分发挥纳米抗体的优越性能,又能克服其固有缺陷的抗CEA的纳米抗体,并以其高特异性的特点进一步发挥其在人体样本的CEA检测和在制药学领域中的应用。

发明内容

[0009] 基于上述发明目的,本发明首先提供了一种抗癌胚抗原的纳米抗体,所述纳米抗体的可变区具有3个互补决定区CDR1、CDR2、CDR3,其中,CDR1序列由SEQ ID NO.1所述氨基酸序列组成,CDR2序列由SEQ ID NO.2所述氨基酸序列组成,CDR3序列由SEQ ID NO.3所述氨基酸序列组成。

[0010] 在一个优选的技术方案中,所述纳米抗体的可变区序列由SEQ ID NO.4所述氨基酸序列组成。

[0011] 在一个更为优选的技术方案中,所述纳米抗体还具有化学发光作用区,所述纳米抗体的化学发光作用区序列由SEQ ID NO.5所述氨基酸序列组成。

[0012] 第二,本发明还提供了一种编码权利要求3所述纳米抗体序列的核苷酸编码序列,所述编码序列由SEQ ID NO.6所示。

[0013] 第三,本发明提供了一种含有上述核苷酸编码序列的表达载体。

[0014] 在一个优选的技术方案中,所述载体为pcDNA3.1(+)

[0015] 第四,本发明提供了一种含有上述表达载体的宿主细胞系。

[0016] 在一个优选的技术方案中,所述细胞为转染腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系(293细胞系)。

[0017] 第五,本发明提供了上述的纳米抗体在制备肿瘤治疗药物中的应用。

[0018] 最后,本发明还提供了上述的纳米抗体在制备肿瘤检测试剂中的应用。

[0019] 本发明提供的抗CEA的纳米抗体,由于具有独特的CDR1-3区序列,使所述抗体对CEA抗原具有特异的识别和结合能力,该纳米抗体亲和力可达到 10^{-11} ,且与七种癌胚抗原相似物均没有结合反应;在对血清样品的CEA抗原的检测中,灵敏度可达1ng/ml,表现出高度的特异性和灵敏度,显示出在制备肿瘤治疗药物和肿瘤诊断试剂中的优越应用前景。

附图说明

[0020] 图1.提取的总RNA电泳鉴定图;

- [0021] 图2.第一轮PCR扩增抗体可变区基因电泳鉴定图；
[0022] 图3.第二轮PCR扩增抗体可变区基因电泳鉴定图；
[0023] 图4.pMES4载体双酶切反应产物电泳鉴定图；
[0024] 图5.菌落PCR鉴定转化子电泳鉴定图；
[0025] 图6.纳米抗体2D5-HAP纯化SDS-PAGE鉴定图；
[0026] 图7.纳米抗体2D5-HAP亲和力测试曲线图；
[0027] 图8.纳米抗体2D5特异性结合曲线图；
[0028] 图9.纳米抗体2D5-HAP检测阳性临床血清结果图。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的保护范围构成任何限制。

[0030] 实施例1.抗CEA纳米抗体噬菌体展示文库的构建及筛选

[0031] 1.1羊驼的免疫:选取健康成年羊驼一只羊,将重组蛋白CEA与弗氏佐剂按1:1的比例混匀,按6-7 μ g/Kg采用背部皮下多点注射的方式免疫羊驼,共免疫四次,免疫间隔为2周。之后采集羊驼外周血,用于构建噬菌体展示文库。

[0032] 1.2驼源淋巴细胞的分离:按照本技术领域常规程序从采集的驼源抗凝全血中分析淋巴细胞,每 2.5×10^7 个活细胞加入1mL RNA分离试剂,取1mL进行RNA提取,-80 $^{\circ}$ C保存。

[0033] 1.3总RNA提取:按照本技术领域常规程序提取总RNA,用RNase-free水调整浓度到1 μ g/ μ L(总RNA电泳鉴定结果见图1)。

[0034] 1.4反转录合成cDNA:

[0035] 根据逆转录试剂盒说明书(Roche公司的transcripor first stand cDNA synthesis KIT)以1.3步骤获得的RNA为模板进行逆转录cDNA

[0036] 1.5抗体可变区基因扩增:将反转录得到的cDNA作为模版进行PCR反应。扩增共进行两轮,第一轮PCR的引物序列如下:

[0037] CALL001:GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG

[0038] CALL002:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

[0039] PCR反应条件及程序为:95 $^{\circ}$ C5分钟;95 $^{\circ}$ C30秒,57 $^{\circ}$ C30秒,72 $^{\circ}$ C30秒,30个循环;72 $^{\circ}$ C7分钟。

[0040] 使用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收700bp左右的条带,最终用水调整核酸浓度至5ng/ μ l(第一轮PCR产物鉴定见图2)。

[0041] 第二轮PCR的引物序列如下:

[0042] VHH-B:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0043] VHH-F:CTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT

[0044] PCR反应条件及程序为:95 $^{\circ}$ C5分钟;95 $^{\circ}$ C30秒,55 $^{\circ}$ C30秒,72 $^{\circ}$ C30秒,15个循环;72 $^{\circ}$ C7分钟。

[0045] 使用PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物(第二轮PCR产物鉴定见图3)。

[0046] 1.6载体构建

[0047] 将pMES4载体与第二次PCR产物分别进行PstI、BstEII双酶切,取1.5 μ g酶切后载体

和450ng酶切后的第二次PCR产物,加15 μ L T4DNA连接酶,补充缓冲液和水至150 μ L总体积,16 $^{\circ}$ C过夜连接并回收连接产物。使用PCR产物回收试剂盒进行产物回收,20 μ L水洗脱。图4为pMES4载体双酶切反应产物电泳鉴定图。

[0048] 1.7电转化及库容测定

[0049] 取10 μ L纯化后的连接产物,加入到含有50 μ L大肠杆菌TG1感受态细胞的预冷电转杯中置入电转仪(美国BTX的ECM630电转仪)进行电转化,取出电转杯,复苏并培养转化子。随机挑选24个克隆,进行菌落PCR鉴定(电泳鉴定见图5)。根据PCR阳性率推算库容(库容量=克隆数 \times 稀释倍数 \times [阳性率]PCR鉴定 \times 10)。

[0050] 引物序列如下:

[0051] MP57:TTATGCTTCCGGCTCGTATG

[0052] GIII:CCACAGACAGCCCTCATAG

[0053] 1.8噬菌体扩增

[0054] 取复苏的菌液接种至YT-AG培养基中,37 $^{\circ}$ C 200rpm培养到培养物OD₆₀₀=0.5。取出10ml菌液加入4 \times 10¹⁰VCSM13,37 $^{\circ}$ C静止感染30分钟。4000rpm,常温离心10分钟,去净上清。用2 \times YT-AK(含氨苄青霉素和卡那霉素)培养基重悬菌体,37 $^{\circ}$ C 200rpm培养过夜。离心取上清40ml管中,加入10ml PEG/NaCl(20%/2.5M)溶液充分混合,离心弃上清,沉淀用1ml冰PBS洗涤离心,取上清250 μ l预冷的PEG/NaCl,充分混匀并洗涤重悬。

[0055] 测定噬菌体滴度:将TG1培养至OD₆₀₀=0.4,用LB培养基梯度稀释噬菌体,取倍比稀释的噬菌体TG1培养物混合培养,次日观察培养板中噬菌斑形成情况,对噬菌斑数在30-300的稀释梯度平板进行计数并按照下列公式计算噬菌体滴度(pfu)。

[0056] 噬菌体滴度(pfu/ml) = 稀释倍数 \times 噬菌斑数目 \times 100

[0057] 1.9纳米抗体筛选

[0058] 通过ELISA方法以重组CEA抗原筛选阳性克隆。以重组CEA抗原包被ELISA板,5%BSA封闭,PBST洗涤。每孔加入100 μ l噬菌体上清液,37 $^{\circ}$ C放置1小时。弃上清,加入HRP标记的小鼠抗M13的二抗,37 $^{\circ}$ C放置1小时。弃上清,加入TMB溶液,室温孵育5分钟,每孔加入2M硫酸终止液,用酶标仪450nm读数。

[0059] 通过羊驼免疫、细胞分离、噬菌体文库的构建、纳米抗体的筛选,共筛选出多株抗CEA的纳米抗体。用Vector NTI软件对测序结果进行分析,登录IMGT(http://www.imgt.org/IMGT_vquest),对抗体轻链和重链基因进行分析,以确定可变区的框架区/framework regions,FR)和互补决定区(complementarity determining regions,CDR)。

[0060] 纳米抗体2D5可变区氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示,其中第1-20位氨基酸序列为FR1,第21-30位氨基酸序列为CDR1,第31-44位氨基酸序列为FR2,第45-61位氨基酸序列为CDR2,第62-93位氨基酸序列为FR3,第94-110位氨基酸序列为CDR3,第111-115位氨基酸序列为FR4。

[0061] 实施例2. 转染腺病毒E1A基因的人肾上皮细胞系表达融合纳米抗体2D5-HAP

[0062] 以人碱性磷酸酶的结合位点序列作为化学发光区氨基酸序列(SEQ ID NO.5所示),使之通过柔性多肽与2D5纳米抗体相融合成为带有化学发光区序列的纳米抗体,合成该融合蛋白的核苷酸编码序列(SEQ ID NO.6所示),在所述核苷酸编码序列的两个末端添加有HindIII和EcoRI两个酶切位点,以该两个酶切位点连接到载体pcDNA3.1(+)上。无内毒

素大提质粒后利用状态处于对数生长的293细胞进行转染。获得转染的细胞培养至36小时后将细胞培养液倒入50ml离心管中,12000g离心5分钟,收集上清,用0.22um滤膜过滤,利用阴离子交换层析对培养上清进行纯化。图6为SDS-PAGE检测2D5-HAP纯化效果。

[0063] 实施例3. 2D5-HAP与CEA抗原的亲合和活性

[0064] 3.1芯片抗原偶联

[0065] 将抗原用不同pH的醋酸钠缓冲液(pH 5.5,pH 5.0,pH 4.5,pH 4.0)配制成20 μ g/mL的工作液,同时准备50mM的NaOH再生溶液,利用Biacore T100蛋白相互作用分析系统仪器中的模板方法对不同pH条件的抗原与芯片(GE公司)表面之间的静电结合进行分析,以信号增加的量达到5倍RL为标准,选择合适的最偏中性的pH体系并根据需要调整抗原浓度作为偶联时的条件。按照仪器中自带的模板方法对芯片进行偶联:其中1通道选择空白偶联模式,2通道选择Target偶联模式,目标设置为设计好的理论偶联量。偶联过程大概耗时60分钟。

[0066] 3.2分析物浓度设置条件探索及再生条件优化

[0067] 采取手动进样模式,选择1,2通道2-1模式进样,流速设置为30 μ L/分钟。进样条件均为120秒,30 μ L/分钟。再生条件均为30秒,30 μ L/分钟。首先持续空走运行缓冲液直至所有基线均稳定。准备浓度跨度较大的纳米抗体溶液,以运行缓冲液配置,建议设置200 μ g/mL,150 μ g/mL,100 μ g/mL,50 μ g/mL,20 μ g/mL,10 μ g/mL,2 μ g/mL。准备再生溶液,选择谷氨酸盐酸体系四个pH梯度的再生溶液:1.5,2.0,2.5,3.0。手动进样200 μ g/mL分析物样品,观察2通道,从最偏中性pH的再生缓冲液进行再生,直至2通道再生后的响应线回到与基线同一高度。再手动进样一次200 μ g/mL分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量,用上一步中最后使响应线回到基线的再生溶液进行再生后,再次收手动进样200 μ g/mL分析物样品,观察2-1通道的信号变化并记录结合量与刚才的结合量数值对比,若偏差小于5%,即认为此pH的再生溶液为最佳的再生溶液,若再次进样的结合量偏低,则继续以更低pH的再生缓冲液进行实验。以选择的最佳再生溶液,作为每次进样后的芯片表面再生试剂。分别进样上面设置的分析物浓度样品,并对每个浓度的结合量进行分析,最终确定亲和力测试所需的浓度梯度。

[0068] 3.3亲和力测试

[0069] 按优化好的样品浓度梯度,再生溶液,使用仪器自带的模板方法(其中设置进样条件为60秒,30 μ L/分钟;解离时间:600秒;再生条件:30秒,30 μ L/分钟)对纳米抗体及抗原之间的亲和力进行测试。随时观察2-1通道的信号情况。亲和力测试过程大概耗时200分钟。

[0070] 3.4结果分析

[0071] 选择合适的浓度梯度的结合解离曲线采用1:1binding的模式对所有曲线进行拟合,最终得到亲和力数值及结合常数和解离常数等重要参数(见图7)。筛选的抗CEA纳米抗体2D5-HAP亲和力达到 10^{-11} 的数量级,高于作为对照的其他纳米抗体及带有化学发光区序列的VHH-CEA 3两个数量级,表1中的VHH-CEA 1、2和3为CN106749667A所公开的抗CEA的纳米抗体。

[0072] 表1抗CEA纳米抗体亲和力检测结果

	样品编号	亲和力
[0073]	VHH-CEA 1	2.40E-09
	VHH-CEA 2	3.20E-09
	VHH-CEA 3	1.99E-09
[0074]	VHH-CEA 3-HAP	2.13E-09
	VHH-CEA-2D5-HAP	2.67E-11

[0075] 高度的抗原特异性,显示了2D5在制备肿瘤治疗药物和肿瘤诊断试剂中具有良好的应用前景。

[0076] 实施例4. 纳米抗体结合癌胚抗原的特异性对照研究

[0077] 将2D5与VHH-CEA2 (CN106749667A所公开) 连接至带有恒定区的载体上,经过293细胞表达与纯化后,利用Biacore T100蛋白相互作用分析系统仪器对比2D5与其他纳米抗体对七种癌胚抗原干扰物质的相互作用及影响。通过Protein A捕获抗体,分别进样CEACAM5、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM6、CEACAM8、AFP、HE4及CA125八种抗原,所有抗原的浓度均为100 μ g/ml,通过结合与解离曲线图(见图8)可以得出以下结论:2D5的特异性较强,与抗原CEACAM5的结合达到了53.3,而与其他七种干扰物质均没有任何结合,而VHH-CEA2对CEACAM1、CEACAM3和CEACAM5都有一定的结合,验证了2D5纳米抗体突出的特异性。

[0078] 实施例5. 2D5-HAP在检测临床样品血清中的CEA含量中的应用

[0079] 经过筛选配对,选取VHH-CEA 1为捕获一抗,2D5-HAP为酶标二抗进行双抗体夹心免疫法检测血清标本中的CEA抗原,获得了优异的检测效果,具体过程如下:

[0080] 使用无菌CBS稀释融合纳米抗体VHH-CEA 1 (CN106749667A所公开) 至终浓度为10 μ g/ml;按照每孔100 μ l加入96孔酶标板中,4 $^{\circ}$ C静置18h;弃上清后,每孔加入300 μ L洗涤液,水平震动3分钟,吸弃上清;重复洗板四次。每孔加入200 μ l 1%BSA,于37 $^{\circ}$ C静置1h。重复洗板四次;每孔中加入50 μ L阳性对照、阴性对照或者待测样本;随即每孔加入50 μ L新鲜稀释的酶标二抗(即纳米抗体2D5-HAP,稀释至工作浓度为2 μ g/ml),置于摇床上摇动3~5秒;37 $^{\circ}$ C下温育1小时。重复洗板四次;每孔加入100 μ L AP化学发光显色液(BM Chemiluminescence ELISA Substrate),在摇床上摇动3~5秒;室温避光孵育10分钟;选择酶标仪程序 Luminescence,测定各孔的Lum值并计算质控血清的CEA值。图9为血清样本以及标准阳性对照、阴性对照的检测结果,阳性血清样本均检测为阳性,没有漏检情况,图中横坐标代表CEA标准品的浓度(ng/ml),结果得出阳性血清CEA含量的平均值为48ng/ml。且2D5-HAP与VHH-CEA 1配对检测CEA样本血清呈现良好的线性曲线,检测CEA的灵敏度可达1ng/ml。

序列表

<110> 深圳市国创纳米抗体技术有限公司

<120> 一种具有高亲和力的抗癌胚抗原纳米抗体及应用

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 1

Gly Arg Thr Phe Ser Ser His Pro Met Gly

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 2

Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 3

Ala Leu Ser Glu Arg Thr Pro Ile Ala Thr Met Pro Ser Gln Tyr Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> Lama pacos

<400> 4

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser

1 5 10 15

Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser His Pro Met Gly Trp Phe

 20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Ser Trp

	35		40		45														
Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr				
	50						55				60								
Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser				
65					70					75				80					
Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ala	Ala	Leu	Ser				
				85						90				95					
Glu	Arg	Thr	Pro	Ile	Ala	Thr	Met	Pro	Ser	Gln	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly				
			100					105						110					
Gln	Gly	Thr																	
	115																		
<210>	5																		
<211>	484																		
<212>	PRT																		
<213>	Homo sapiens																		
<400>	5																		
Ile	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asn	Pro	Asp	Phe	Trp	Asn	Arg	Glu	Ala				
1				5					10					15					
Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Gln	Thr	Ala				
			20					25					30						
Ala	Lys	Asn	Leu	Ile	Ile	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Thr				
		35					40						45						
Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Ile	Leu	Lys	Gly	Gln	Lys	Lys	Asp	Lys	Leu	Gly				
	50					55							60						
Pro	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Met	Asp	Arg	Phe	Pro	Tyr	Val	Ala	Leu	Ser				
65					70						75			80					
Lys	Thr	Tyr	Asn	Val	Asp	Lys	His	Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Ala	Thr	Ala				
				85							90			95					
Thr	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	Val	Lys	Gly	Asn	Phe	Gln	Thr	Ile	Gly	Leu				
			100						105					110					
Ser	Ala	Ala	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	Cys	Asn	Thr	Thr	Arg	Gly	Asn	Glu				
			115						120					125					
Val	Ile	Ser	Val	Met	Asn	Arg	Ala	Lys	Lys	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Gly				
	130							135						140					
Val	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	His	Ala	Ser	Pro	Ala	Gly	Thr	Tyr				
145					150						155			160					
Ala	His	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Trp	Tyr	Ser	Asp	Ala	Asp	Val	Pro	Ala				
				165							170			175					
Ser	Ala	Arg	Gln	Glu	Gly	Cys	Gln	Asp	Ile	Ala	Thr	Gln	Leu	Ile	Ser				

	180		185		190														
Asn	Met	Asp	Ile	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Arg	Lys	Tyr	Met	Phe				
	195						200					205							
Arg	Met	Gly	Thr	Pro	Asp	Pro	Glu	Tyr	Pro	Asp	Asp	Tyr	Ser	Gln	Gly				
	210						215					220							
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Leu	Ala	Lys				
225					230					235				240					
Arg	Gln	Gly	Ala	Arg	Tyr	Val	Trp	Asn	Arg	Thr	Glu	Leu	Met	Gln	Ala				
				245					250					255					
Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Val	Thr	His	Leu	Met	Gly	Leu	Phe	Glu	Pro	Gly				
		260						265					270						
Asp	Met	Lys	Tyr	Glu	Ile	His	Arg	Asp	Ser	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	Leu				
	275						280					285							
Met	Glu	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Pro	Arg				
	290						295					300							
Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Gly	Gly	Arg	Ile	Asp	His	Gly	His	His				
305					310					315				320					
Glu	Ser	Arg	Ala	Tyr	Arg	Ala	Leu	Thr	Glu	Thr	Ile	Met	Phe	Asp	Asp				
				325					330					335					
Ala	Ile	Glu	Arg	Ala	Gly	Gln	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Asp	Thr	Leu	Ser				
		340						345					350						
Leu	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ser	His	Val	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Tyr	Pro				
	355						360						365						
Leu	Arg	Gly	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Lys	Ala	Arg	Asp				
	370				375						380								
Arg	Lys	Ala	Tyr	Thr	Val	Leu	Leu	Tyr	Gly	Asn	Gly	Pro	Gly	Tyr	Val				
385					390						395			400					
Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Val	Thr	Glu	Ser	Glu	Ser	Gly	Ser				
			405							410				415					
Pro	Glu	Tyr	Arg	Gln	Gln	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Asp	Glu	Glu	Thr	His				
		420						425					430						
Ala	Gly	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Phe	Ala	Arg	Gly	Pro	Gln	Ala	His	Leu				
	435						440						445						
Val	His	Gly	Val	Gln	Glu	Gln	Thr	Phe	Ile	Ala	His	Val	Met	Ala	Phe				
	450					455					460								
Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Pro	Tyr	Thr	Ala	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Pro	Ala				
465					470					475				480					
Gly	Thr	Thr	Asp																

<210> 6

<211> 1869

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

ctgcaggagt ccgaggagg actggtgcaa gctggcggct ccctgagact cagctgcgtc 60
gccagcggca ggacatttag cagccacccc atgggctggt tcaggcaggc ccccggaaag 120
gaaagggagt tcgtcgccgg aattagctgg tccggcgga gcacacacta cgccgattcc 180
gtgaagggca gattcaccat ctccaggac accgccaaga acacagtcta cctccagatg 240
aactccctca agcctgagga cacagccgtg tactactgea acgctgctct gtccgagagg 300
acacctatcg ccaccatgcc cagccagtac gactactggg gccagggcac ccaggtcacc 360
gtgtcctcct caggtaggtg cggttcaggc ggaggtggct ctggcgggtg cggatcgatc 420
atccctgtgg aagaggagaa ccccgacttt tggaacaggg aagccgctga agccctgggc 480
gctgctaaga agctacagcc cgcccagacc gctgctaaaa acctgatcat ctttctgggc 540
gatggcatgg gcgtctccac cgtgaccgt gccaggatcc tgaaaggcca gaagaaggac 600
aagctgggcc ccgagatccc tctggccatg gacaggttc cttacgtgga tctgagcaag 660
acctacaacg tggacaagca tgtccctgat agcggcgcca ccgctacagc ttacctgtgc 720
ggcgtcaaag gcaatttcca gaccatcggc ctgagcgccg ccgctaggtt caaccagtgc 780
aacaccaccc ggggaaacga ggtgattagc gtcatgaacc gggccaagaa ggccggcaag 840
agcgtgggag tcgtgaccac cacaagggtg cagcatgcta gcctgcccg cacatacgcc 900
cataccgtca atcggaactg gtactccgat gccgacgtcc ctgcttccgc caggcaggaa 960
ggatgtcagg acattgccac ccagctgatc tccaacatgg acatcgactg gatcctgggc 1020
ggcggcagga agtacatggt caggatggga acccccgacc ccgagtacc tgatgattat 1080
tcccagggcg gcaccggct ggatggcaag aatctggtgc aggagtggct ggccaagagg 1140
cagggagctc ggtacgtgtg gaaccggacc gagctgatgc aggccagcct ggatcccagc 1200
gtgaccatc tgatggcct gttcagccc ggcatatga agtacgagat ccatcgggac 1260
agcacactcg acccttccct gatggagatg accgaagctg ctctgaggct gctgtcccgg 1320
aatcccaggg gcttctttct gttcgtggag ggcgccgga ttgatcacgg acaccacgag 1380
tccagggcct acagggcct gaccgaaacc atcatgttg acgacgcat cgagagggt 1440
ggccagctga ccagcgaaga agacacctg tcctctgtga ccgccatca ctcccagtg 1500
ttctccttcg gaggtatcc cctgcggggc tccagatct ttggactggc tctggcaag 1560
gccagggacc ggaaggccta taccgtgctg ctgtacgga accgccccg ctacgtgctg 1620
aagatggcg ctcgccctga tgtgaccgag agcgagagcg gctccccga atacaggcag 1680
cagagcgccg tgcccctcga tgaggagacc catgccggcg aggatgtcgc tgtctttgcc 1740
cggggacctc aggccatct ggtgcatgga gtgcaggaac agacctttat cgtcacgtg 1800
atggctttcg ccgcttgcc ctagccttat accgctgtg acctgcccc tctgctgga 1860
acaacagac 1869

```

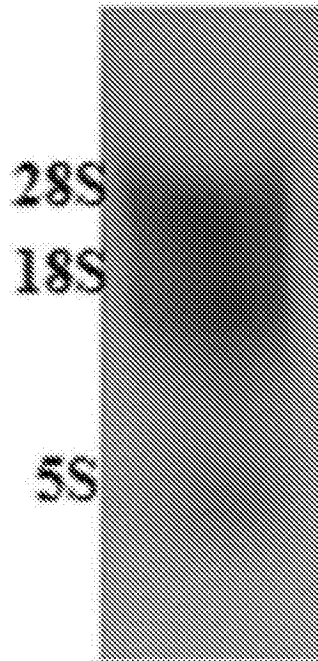


图1

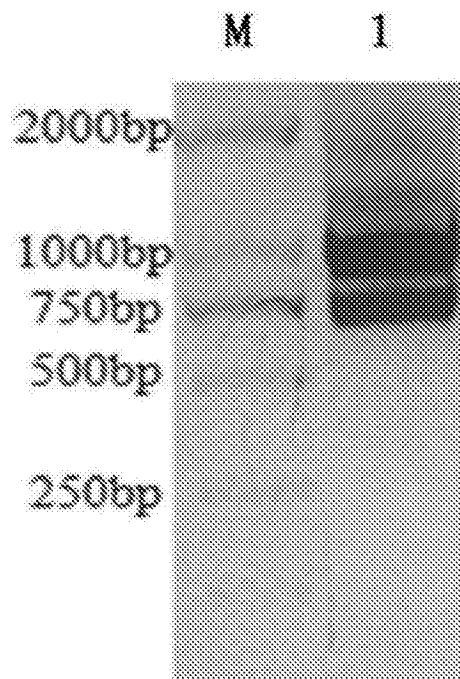


图2

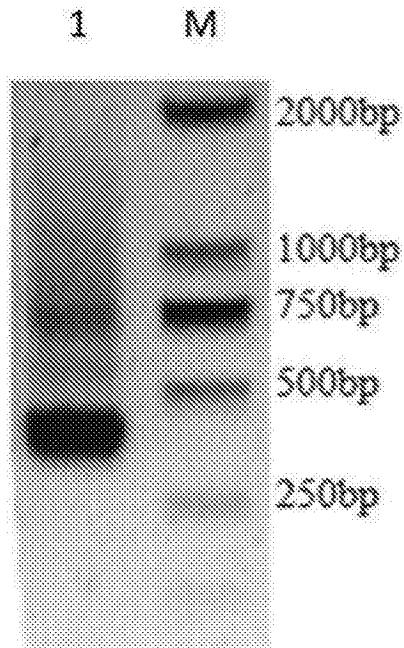


图3

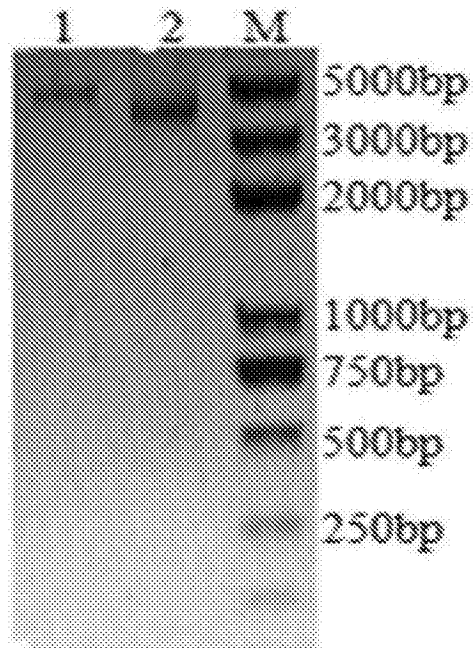


图4

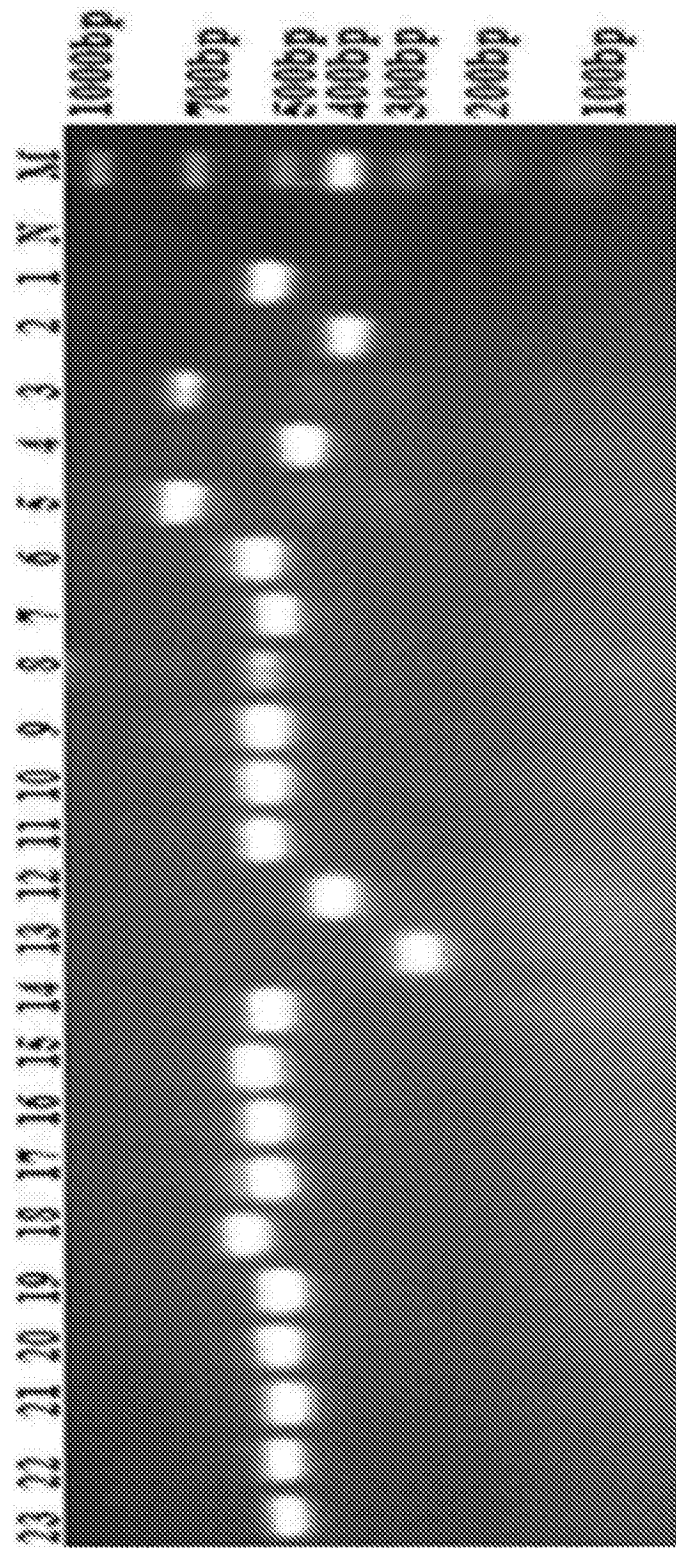


图5

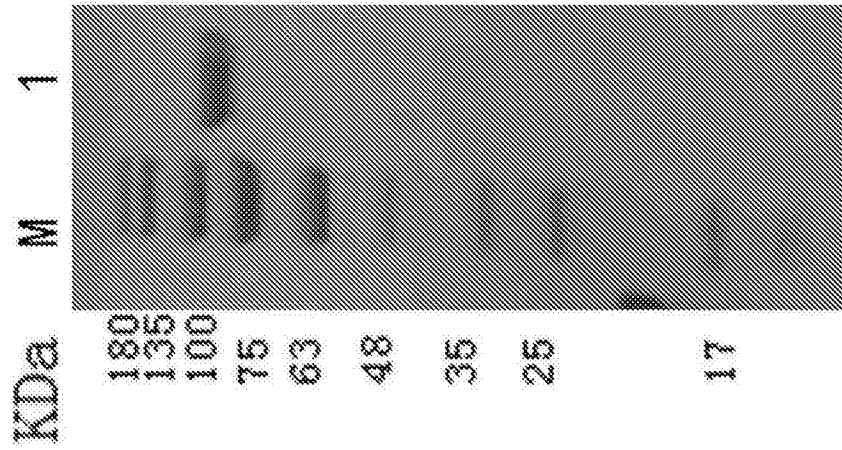


图6

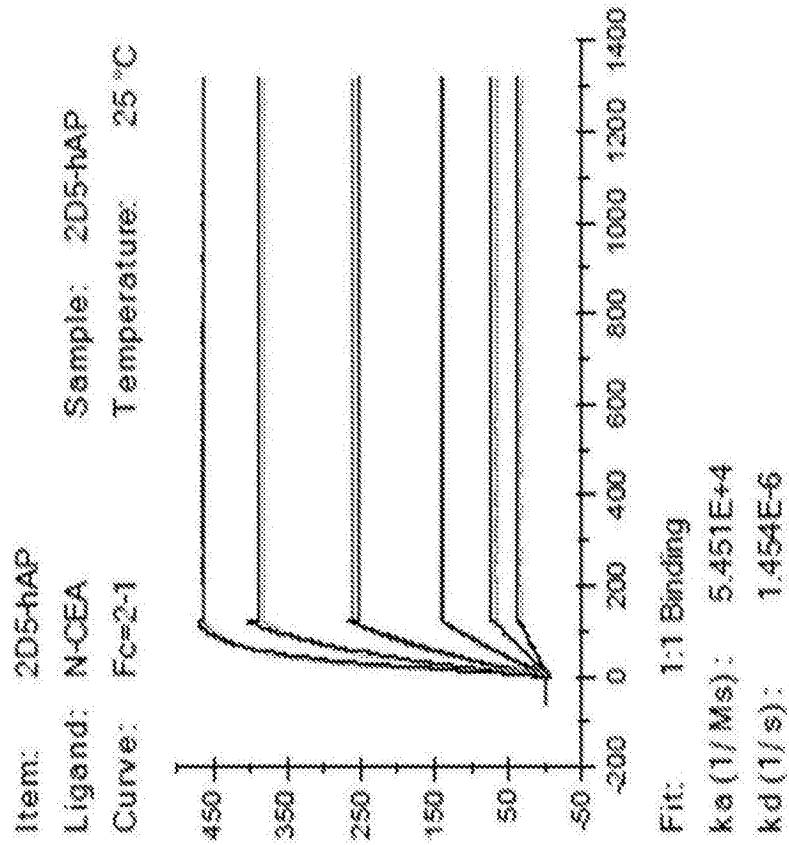


图7

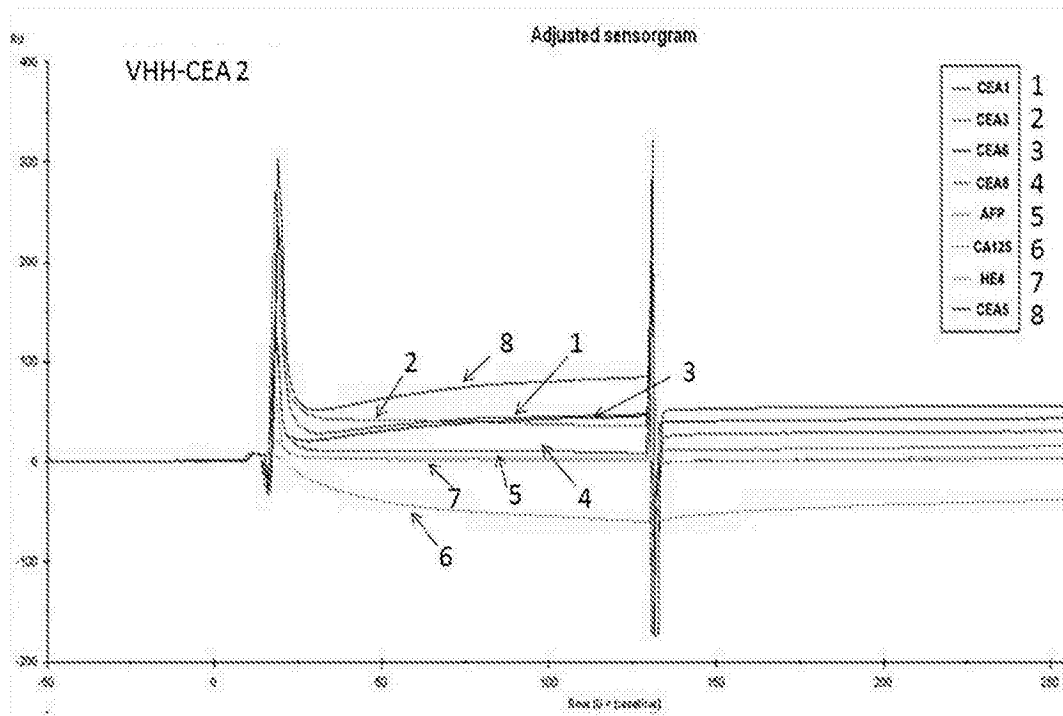
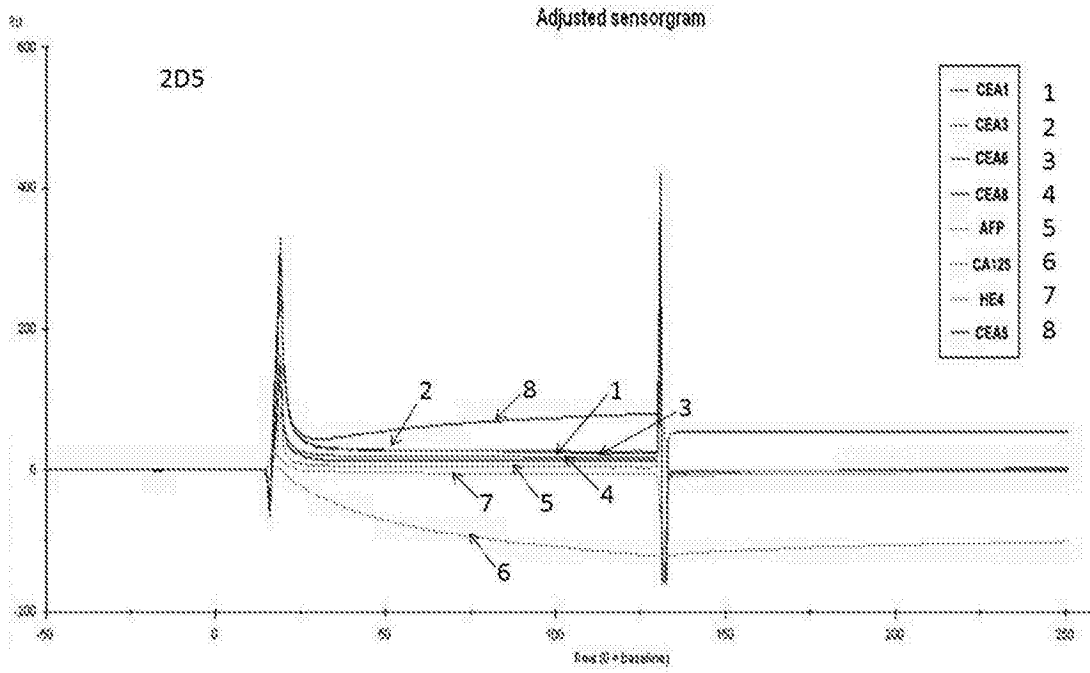


图8

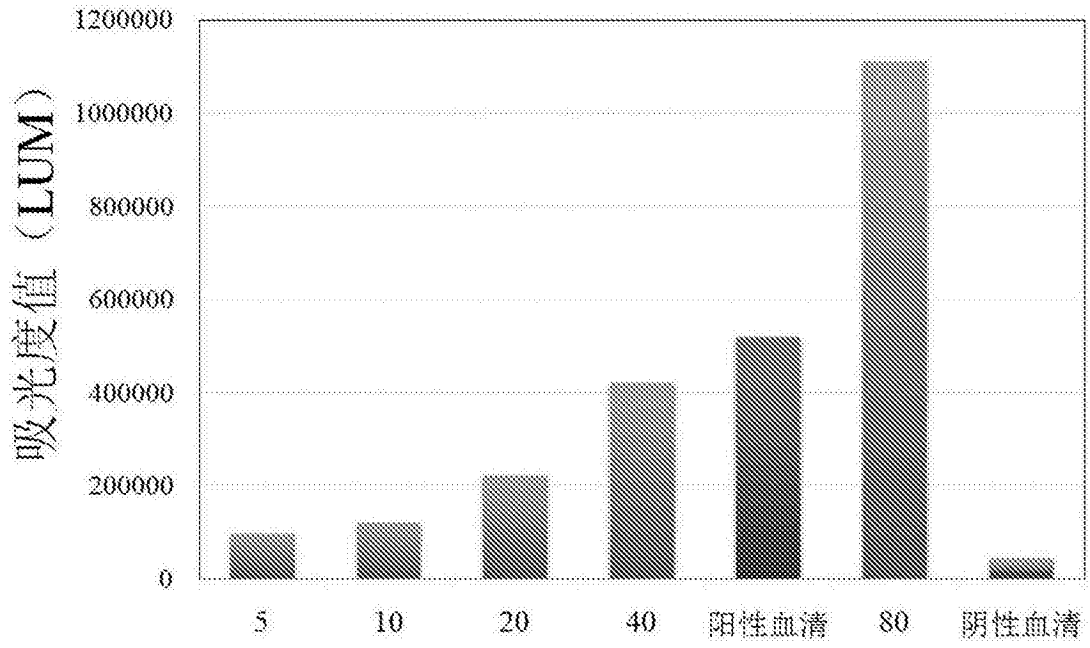


图9