



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113461824 A

(43)申请公布日 2021.10.01

(21)申请号 202010244571.5

A61K 47/68(2017.01)

(22)申请日 2020.03.31

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(71)申请人 普米斯生物技术(珠海)有限公司

地址 519080 广东省珠海市香洲区唐家湾
镇科技七路1号4栋10-B单元

(72)发明人 刘晓林 曾竣玮 孙左宇 缪小牛
王涛 戴爽

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266

代理人 张璐 徐迅

(51)Int.Cl.

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书2页 说明书27页

序列表40页 附图13页

(54)发明名称

一种构建多特异性抗体的平台

(57)摘要

本发明提供了。具体地,本发明提供了一种构建多特异性抗体的方法,包括步骤:(i)分别构建第一多核苷酸和第二多核苷酸,所述第一多核苷酸和第二多核苷酸分别编码含有CL区的第一多肽和含有CH1区的第二多肽,并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间,可形成二硫键,从而使所述抗体具有异二聚体的形式;(ii)表达所述第一多核苷酸和第二多核苷酸,从而获得所述的第一多肽和第二多肽,使其发生二聚化,从而形成具有异二聚体形式的多特异性抗体。本发明的抗体可以同时结合不同靶点并维持原抗体的结合活性,在靶点为膜表面受体或溶液中的靶点时均有效,并且显著地具有抗多种靶点的生物学活性。

1. 一种构建多特异性抗体的方法,其特征在于,包括步骤:

(i) 分别构建第一多核苷酸和第二多核苷酸,所述第一多核苷酸编码从N端到C端具有如式I所示的结构的第一多肽,并且所述第二多核苷酸编码从N端到C端具有如式II所示结构的第二多肽,

A1-L1-B1-L2-CL-L3-A2 (式I)

A3-L4-B2-L5-CH1-L6-A4 (式II)

其中,

A1、A2、A3和A4各自独立地为靶向目标靶点的抗体或其抗原片段,并且A1、A2、A3和A4各自靶向的目标抗原可以是相同的或不同的;

L1、L2、L3和L4各自独立地为无或接头元件;

B1和B2均为无,或B1和B2分别为靶向同一目标靶点的抗体的VL区和VH区;

并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间,可形成二硫键,从而使所述抗体具有异二聚体的形式;

(ii) 表达所述第一多核苷酸和第二多核苷酸,从而获得所述的第一多肽和第二多肽,使其发生二聚化,从而形成具有异二聚体形式的多特异性抗体。

2. 一种多特异性抗体,其特征在于,所述抗体包含从N端到C端如式I所示的第一多肽和从N端到C端如式II所示的第二多肽,

A1-L1-B1-L2-CL-L3-A2 (式I)

A3-L4-B2-L5-CH1-L6-A4 (式II)

其中,

A1、A2、A3和A4各自独立地为靶向目标靶点的抗体或其抗原片段,并且A1、A2、A3和A4各自靶向的目标抗原可以是相同的或不同的;

L1、L2、L3和L4各自独立地为无或接头元件;

B1和B2均为无,或B1和B2分别为靶向同一目标靶点的抗体的VL区和VH区;

并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间,可形成二硫键,从而使所述抗体具有异二聚体的形式。

3. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白中包括如权利要求2所述的多特性抗体,并且,所述多特异性抗体中的所述第一多肽从N端到C端具有如式III所示的结构,

A1-L1-CL-L3-Fc (式III)

其中,Fc是为抗体的Fc段,包含CH2结构域和CH3结构域;

并且,所述的融合蛋白可通过Fc段之间的二硫键作用形成同源二聚体。

4. 一种分离的多核苷酸组合,其特征在于,所述多核苷酸组合包括第一核苷酸和第二核苷酸,所述第一核苷酸编码如权利要求2所述的多特异性抗体或如权利要求3所述的融合蛋白的第一多肽,并且所述第二核苷酸编码第二多肽。

5. 一种载体,其特征在于,所述载体含有如权利要求4所述的多核苷酸组合。

6. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞含有如权利要求5所述的载体,或其基因组中整合有如权利要求4所述的多核苷酸组合;

或者,所述的宿主细胞表达如权利要求2所述的多特异性抗体或如权利要求3所述的融合蛋白。

7. 一种产生抗体的方法,其特征在于,包括步骤:

(a) 在合适的条件下,培养如权利要求6所述的宿主细胞,从而获得含如权利要求2所述的多特异性抗体或如权利要求3所述的融合蛋白的培养物;和

(b) 对步骤(a)中得到的培养物进行纯化和/或分离,获得所述的抗体。

8. 一种免疫偶联物,其特征在于,所述免疫偶联物含有:

(a) 如权利要求2所述的多特异性抗体或如权利要求3所述的融合蛋白;和

(b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP、或其组合。

9. 如权利要求2所述的多特异性抗体、如权利要求3所述的融合蛋白或如权利要求8所述的免疫偶联物的用途,其特征在于,用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒;

其中,所述试剂、检测板或试剂盒用于:检测样品中是否存在所述的目标靶点分子;

并且,所述药剂用于治疗或预防表达目标靶点分子的肿瘤。

10. 一种药物组合物,其特征在于,含有:(i) 如权利要求2所述的多特异性抗体、如权利要求3所述的融合蛋白,或如权利要求8所述的免疫偶联物;以及(ii) 药学上可接受的载体。

一种构建多特异性抗体的平台

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学或生物制药技术领域,具体涉及一种构建多特异性抗体的平台。

背景技术

[0002] 1960年,纽约罗斯威尔公园纪念研究所的Nisonoff及其合作者首次提出了双特异性抗体(bispecific antibodies)的原始概念。之后,随着抗体工程和抗体生物学领域的里程碑进展,构建双特异性抗体的概念和技术不断创新。目前有100多种双特异性抗体结构模式,其中,约四分之一已发展成技术平台,并由生物技术公司和制药公司商业化,用于新型抗体疗法。截至目前,已有20多个不同的商业化技术平台可用于双特异性抗体的开发,超过85个双特异性抗体处于临床开发阶段。

[0003] 一款T细胞参与的双特异性抗体blinatumomab(靶向CD3和CD19,于2014年获FDA批准,用于治疗急性B淋巴细胞白血病)令人印象深刻的临床结果激起了业内对这一概念的兴趣和投资。目前有40多个T细胞重定向双特异性抗体正处于临床开发阶段,用于治疗血液学肿瘤和实体肿瘤。除了癌症,炎症性疾病也一直是双特异性抗体临床开发的重点。罗氏公司的emicizumab(靶向凝血因子X和因子IXa)于2017年11月经FDA批准上市,血友病成了双特异性抗体首个非癌症适应症。目前,很多团队也在探索双特异性抗体在其它疾病领域的治疗潜力,如糖尿病、HIV感染、其它病毒和细菌感染、阿尔茨海默症、骨质疏松症等。双特异性抗体双靶向的特点(即能同时特异性靶向两个抗原或一个抗原的两个不同表位)使其具有巨大的治疗前景,但将双特异性抗体这一概念转化为临床疗法仍具有挑战性。

[0004] 治疗性双特异性抗体是一个快速扩展的多样化分子群。尽管与单克隆抗体相比,双靶向概念的复杂性增加,在发现和开发的不同阶段会带来额外的挑战,但双特异性抗体为新型药物的设计与开发提供了令人兴奋的机会。从疾病领域来看,目前的数据显示,业界对双特异性抗体治疗癌症更加期待。双特异性抗体的持续发展将对癌症等疾病的治疗带来持久的影响。

[0005] 因此,本领域迫切需要开发一种低成本、高效率的构建多特异性抗体的方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的就是提供一种低成本、高效率的构建多特异性抗体的方法。

[0007] 在本发明的第一方面,提供了一种构建多特异性抗体的方法,包括步骤:

[0008] (i) 分别构建第一多核苷酸和第二多核苷酸,所述第一多核苷酸编码从N端到C端具有如式I所示的结构的第一多肽,并且所述第二多核苷酸编码从N端到C端具有如式II所示的结构第二多肽,

[0009] A1-L1-B1-L2-CL-L3-A2 (式I)

[0010] A3-L4-B2-L5-CH1-L6-A4 (式II)

[0011] 其中,

[0012] A1、A2、A3和A4各自独立地为靶向目标靶点的抗体或其抗原片段,并且A1、A2、A3和A4各自靶向的目标抗原可以是相同的或不同的;

[0013] L1、L2、L3和L4各自独立地为无或接头元件;

[0014] B1和B2均为无,或B1和B2分别为靶向同一目标靶点的抗体的VL区和VH区;

[0015] 并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间,可形成二硫键,从而使所述抗体具有异二聚体的形式;

[0016] (ii) 表达所述第一多核苷酸和第二多核苷酸,从而获得所述的第一多肽和第二多肽,使其发生二聚化,从而形成具有异二聚体形式的多特异性抗体。

[0017] 在另一优选例中,所述第一多肽的CL区具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0018] 在另一优选例中,所述第二多肽的CH1区具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:3所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0019] 在另一优选例中,在A1、A2、A3和A4中,所述目标靶点是抗原、细胞表面受体、配体,或细胞因子。

[0020] 在另一优选例中,在A1、A2、A3和A4中,所述目标靶点包括但不限于:PD-1、TIGIT、人血清白蛋白、VEGF、PD-L1、PD-L2,或41BB。

[0021] 在另一优选例中,在A1、A2、A3和A4中,所述靶向目标靶点的抗体或其抗原片段是纳米抗体的VHH链、抗体重链可变区、抗体轻链可变区、抗体Fc片段,或其组合。

[0022] 在另一优选例中,在A1、A2、A3和A4中,所述靶向目标靶点的抗体或其抗原片段包括但不限于:抗TIGIT纳米抗体的VHH链、抗HSA纳米抗体的VHH链、抗PD-L1纳米抗体的VHH链、抗PD-L2纳米抗体的VHH链、抗VEGF抗体的VH链、抗VEGF抗体的VL链、抗PD-1抗体的VH链,或抗PD-1抗体的VL链。

[0023] 在另一优选例中,所述抗TIGIT纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0024] 在另一优选例中,所述抗HSA纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:5所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0025] 在另一优选例中,所述抗PD-L1纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:14或28所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14或28所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0026] 在另一优选例中,所述抗PD-L2纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0027] 在另一优选例中,在B1和B2中,所述靶向同一目标靶点的抗体包括但不限于:抗PD-1抗体、抗VEGF抗体。

[0028] 在另一优选例中,B1和B2分别为抗PD-1抗体的VL区和VH区;其中,所述抗PD-1抗体

的VL区具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列,并且所述抗PD-1抗体的VH区具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0029] 在另一优选例中,B1和B2分别为抗VEGF抗体的VL区和VH区;其中,所述抗VEGF抗体的VL区具有如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:16所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列,并且所述抗VEGF抗体的VH区具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:13所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0030] 在另一优选例中,所述的接头元件的序列为(4GS)_n,其中,n为正整数(例如1、2、3、4、5或6),优选地,n=4。

[0031] 在另一优选例中,所述接头元件的序列如SEQ ID NO:4或21所示,或与SEQ ID NO:4或21所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性。

[0032] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0033] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:11所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0034] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:12所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:15所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0035] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:17所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:18所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0036] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:20所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:18所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)

的序列同一性的氨基酸序列。

[0037] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:22所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0038] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:17所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0039] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:17所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0040] 在本发明的第二方面,提供了一种多特异性抗体,所述抗体包含从N端到C端如式I所示的第一多肽和从N端到C端如式II所示的第二多肽,

[0041] A1-L1-B1-L2-CL-L3-A2 (式I)

[0042] A3-L4-B2-L5-CH1-L6-A4 (式II)

[0043] 其中,

[0044] A1、A2、A3和A4各自独立地为靶向目标靶点的抗体或其抗原片段,并且A1、A2、A3和A4各自靶向的目标抗原可以是相同的或不同的;

[0045] L1、L2、L3和L4各自独立地为无或接头元件;

[0046] B1和B2均为无,或B1和B2分别为靶向同一目标靶点的抗体的VL区和VH区;

[0047] 并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间,可形成二硫键,从而使所述抗体具有异二聚体的形式。

[0048] 在本发明的第三方面,提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白中包括如本发明第二方面所述的多特性抗体,并且,所述多特异性抗体中的所述第一多肽从N端到C端具有如式III所示的结构,

[0049] A1-L1-CL-L3-Fc (式III)

[0050] 其中,Fc是为抗体的Fc段,包含CH2结构域和CH3结构域;

[0051] 并且,所述的融合蛋白可通过Fc段之间的二硫键作用形成同源二聚体。

[0052] 在另一优选例中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:27所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列;并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:30所示序列具有 $\geq 85\%$ (优选地90%,更优选地95%、96%、97%、98%或99%)的序列同一性的氨基酸序列。

[0053] 在本发明的第四方面,提供了一种分离的多核苷酸组合,所述多核苷酸组合包括

第一核苷酸和第二核苷酸,所述第一核苷酸编码如本发明第二方面所述的多特异性抗体或如本发明第三方面所述的融合蛋白的第一多肽,并且所述第二核苷酸编码第二多肽。

[0054] 在本发明的第五方面,提供了一种载体,所述载体含有如本发明第四方面所述的多核苷酸组合。

[0055] 在另一优选例中,所述的载体选自下组:DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其他基因转移系统、或其组合;优选地,所述表达载体包括病毒载体,如慢病毒、腺病毒、AAV病毒、逆转录病毒、或其组合。

[0056] 在本发明的第六方面,提供了一种宿主细胞,所述宿主细胞含有如本发明第五方面所述的载体,或其基因组中整合有如本发明第四方面所述的多核苷酸组合;

[0057] 或者,所述的宿主细胞表达如本发明第二方面所述的多特异性抗体或如本发明第三方面所述的融合蛋白。

[0058] 在另一优选例中,所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

[0059] 在另一优选例中,所述的宿主细胞选自下组:大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞。

[0060] 在本发明的第七方面,提供了一种产生抗体的方法,包括步骤:

[0061] (a) 在合适的条件下,培养如本发明第六方面所述的宿主细胞,从而获得含如本发明第二方面所述的多特异性抗体或如本发明第三方面所述的融合蛋白的培养物;和

[0062] (b) 对步骤(a)中得到的培养物进行纯化和/或分离,获得所述的抗体。

[0063] 在另一优选例中,所述纯化可以通过亲和层析纯化分离获得目标抗体。

[0064] 在另一优选例中,所述经过纯化分离后的目标抗体纯度大于95%,大于96%、大于97%、大于98%、大于99%,优选为100%。

[0065] 在本发明的第八方面,提供了一种免疫偶联物,所述免疫偶联物含有:

[0066] (a) 如本发明第二方面所述的多特异性抗体或如本发明第三方面所述的融合蛋白;和

[0067] (b) 选自下组的偶联部分:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、或酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP、或其组合。

[0068] 在另一优选例中,所述的放射性核素包括:

[0069] (i) 诊断用同位素,所述的诊断用同位素选自下组:Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177、Re-188、或其组合;和/或

[0070] (ii) 治疗用同位素,所述的治疗用同位素选自下组:Lu-177、Y-90、Ac-225、As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133Yb-169、Yb-177、或其组合。

[0071] 在另一优选例中,所述偶联部分为药物或毒素。

[0072] 在另一优选例中,所述的药物为细胞毒性药物。

[0073] 在另一优选例中,所述的细胞毒性药物选自下组:抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱、或其组合。

[0074] 特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱

(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs), 吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))、长春花生物碱(vinca alkaloids)、或其组合。

[0075] 在另一优选例中,所述的毒素选自下组:

[0076] 耳他汀类(例如,耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、糖皮质激素、或其组合。

[0077] 在另一优选例中,所述偶联部分为可检测标记物。

[0078] 在另一优选例中,所述偶联物选自:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶(如DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL))、化疗剂(如顺铂)。

[0079] 在另一优选例中,所述免疫偶联物含有:多价(如二价)的如本发明第二方面所述的多特异性抗体。

[0080] 在另一优选例中,所述多价是指在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明第二方面所述的抗体或如本发明第三方面所述的融合蛋白。

[0081] 在本发明的第九方面,提供了如本发明第二方面所述的多特异性抗体、如本发明第三方面所述的融合蛋白或如本发明第八方面所述的免疫偶联物的用途,用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒;

[0082] 其中,所述试剂、检测板或试剂盒用于:检测样品中是否存在所述的目标靶点分子;

[0083] 并且,所述药剂用于治疗或预防表达目标靶点分子的肿瘤。

[0084] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物的偶联部分为诊断用同位素。

[0085] 在另一优选例中,所述的试剂为选自下组的一种或多种试剂:同位素示踪剂、造影剂、流式检测试剂、细胞免疫荧光检测试剂、纳米磁粒和显像剂。

[0086] 在另一优选例中,所述检测样品中目标靶点分子的试剂为(体内)检测目标靶点分子的造影剂。

[0087] 在另一优选例中,所述的检测为体内检测或体外检测。

[0088] 在另一优选例中,所述的检测包括流式检测、细胞免疫荧光检测。

[0089] 在另一优选例中,所述的肿瘤包括但不限于:急性髓细胞白血病、慢性粒细胞性白血病、多发性骨髓病、非霍奇金淋巴瘤、结直肠癌、乳腺癌、大肠癌、胃癌、肝癌、白血病、肾脏

肿瘤、肺癌、小肠癌、骨癌、前列腺癌、前列腺癌、宫颈癌、淋巴癌、肾上腺肿瘤、膀胱肿瘤。

[0090] 在本发明的第十方面,提供了一种药物组合物,含有:(i)如本发明第二方面所述的多特异性抗体、如本发明第三方面所述的融合蛋白,或如本发明第八方面所述的免疫偶联物;以及(ii)药学上可接受的载体。

[0091] 在另一优选例中,所述的免疫偶联物的偶联部分为药物、毒素、和/或治疗用同位素。

[0092] 在另一优选例中,所述的药物组合物中还含有治疗肿瘤的其他药物,如细胞毒性药物。

[0093] 在另一优选例中,所述的治疗肿瘤的其他药物包括紫杉醇、多柔比星、环磷酰胺、阿西替尼、乐伐替尼,或派姆单抗。

[0094] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于治疗表达目标靶点分子(即目标靶点分子阳性)的肿瘤。

[0095] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂型。

[0096] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于制备防治肿瘤的药物。

[0097] 在本发明的第十一方面,提供了一种治疗疾病的方法,所述方法包括:给需要的对象施用如本发明第二方面所述的多特异性抗体、如本发明第三方面所述的融合蛋白、如本发明第八方面所述的免疫偶联物,或如本发明第十方面所述的药物组合物。

[0098] 在另一优选例中,所述的对象包括哺乳动物,优选地是人。

[0099] 在本发明的第十二方面,提供了一种试剂盒,所述试剂盒含有如本发明第二方面所述的多特异性抗体、如本发明第三方面所述的融合蛋白、本发明第八方面所述的免疫偶联物或如本发明第十方面所述的药物组合物,以及说明书。

[0100] 在另一优选例中,所述的说明书记载,所述的试剂盒用于非侵入性地检测待测对象的目标靶点分子的表达。

[0101] 在另一优选例中,所述的说明书记载,所述的试剂盒用于表达目标靶点分子(即目标靶点分子阳性)的肿瘤的检测。

[0102] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0103] 图1显示了三种三特异性抗体的结构示意图。

[0104] 图2显示了使用Octet系统测定的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原共结合能力的结果。

[0105] 图3显示了抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体与CHO-hPD-1细胞及CHO-hTIGIT细胞结合活性的测定结果。

[0106] 图4显示了通过ELISA测定的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体与人血清白蛋白的结合活性。

[0107] 图5显示了抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体对人PD-L1与人PD-1结合的阻断效果。

[0108] 图6显示了抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体对CD155与TIGIT结合的阻断效果。

[0109] 图7显示了使用Octet系统测定的抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原共结合能力的结果。

[0110] 图8显示了抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体与CHO-hPD-1细胞结合活性的测定结果。

[0111] 图9显示了通过ELISA测定的抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体与人血清白蛋白的结合活性。

[0112] 图10显示了通过ELISA测定的抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体与人VEGF蛋白的结合活性。

[0113] 图11显示了三种三特异性抗体和一种四特异性抗体的结构示意图。

[0114] 图12显示了三种PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体与CHO-hPD-L1细胞及CHO-hPD-L2细胞结合活性的测定结果,以及抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体与CHO-hPD-L1细胞、CHO-hPD-L2细胞及CHO-hTIGIT细胞结合活性的测定结果。

[0115] 图13显示了通过ELISA测定的三种抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体以及抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体与人血清白蛋白的结合活性。

[0116] 图14显示了三种抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体以及抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体对人PD-L1或PD-L2与人PD-1结合的阻断效果。

[0117] 图15显示了三种抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体以及抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体在体外同时阻断PD-L1/PD-1和PD-L2/PD-1信号通路的结果。

[0118] 图16显示了一种三特异性抗体的结构示意图。

[0119] 图17显示了PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体与CHO-hPD-L1细胞及CHO-41BB细胞的结合活性的测定结果。

[0120] 图18显示了通过ELISA测定的PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体与人血清白蛋白的结合活性。

[0121] 图19显示了抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体桥接表达PD-L1/41BB细胞的能力。

[0122] 图20显示了抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体对人PD-L1与人PD-1结合的阻断效果。

[0123] 图21显示了如实施例5所述的PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白的结构示意图。

[0124] 图22显示了抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白与CHO-hPD-L1细胞及CHO-hPD-L2细胞的结合活性的测定结果。

具体实施方式

[0125] 本发明人经过广泛而深入的研究,经过大量的筛选,首次开发了一种构建多特异性抗体的方法。实验证明,将抗原结合片段(如抗体可变区、单域抗体或Fc等)和天然抗体CL和CH1片段连接,可以形成稳定的异源二聚体。本申请的方法所构建的多特异性抗体能够同

时结合不同靶点并维持原抗体的结合活性；在靶点为膜表面受体或溶液中的靶点时均有效；同时具有抗多种靶点的生物学活性；可以连接单域抗体或者正常抗体或者Fc片段。因此本发明方法和所提供的平台具有巨大的应用前景。在此基础上完成了本发明。

[0126] 术语

[0127] 为了可以更容易地理解本公开，首先定义某些术语。如本申请中所使用的，除非本文另有明确规定，否则以下术语中的每一个应具有下面给出的含义。在整个申请中阐述了其它定义。

[0128] 如本文所用，术语“构建多特异性抗体的平台”、“本发明构建方法”可互换使用，是指本发明第一方面所述的构建多特异性抗体的方法，其中，以CL和CH1之间通过二硫键作用所形成的异源二聚体为核心结构，并融合靶向不同目标靶点的抗体或其抗原片段。

[0129] 多特异性抗体

[0130] 双特异/多特异性抗体 (BsAb, MsAb) 是由两种或多种不同单克隆抗体的片段组成的人造蛋白，因而可结合到两种或多种不同类型抗原。例如，在癌症免疫治疗中，经过工程化的BsAbs同时结合至细胞毒性细胞及要被杀灭的靶标 (如肿瘤细胞)。至少三种类型的双特异抗体已经被提出或测试，包括三官能抗体、化学连接的Fab和双特异T细胞衔接体。为了克服制造上的难点，已经开发了被称作三官能抗体的第一代BsMAb。它由两个重链和两个轻链组成，每个来自不同的抗体。这两个Fab区针对两种抗原。Fc区由两个重链组成并形成第三个结合位点，由此得名。

[0131] 已设计其他类型的双特异抗体来解决某些问题，例如，半衰期短、免疫原性和细胞因子释放引起的副作用。它们包括：仅由Fab区组成的化学连接的Fab，以及各种类型二价及三价的单链可变区 (scFv) (模拟两种抗体可变结构域的融合蛋白)。最新开发的形式是双特异的T细胞衔接体 (BiTE) 及四官能的抗体。

[0132] 众所周知，抗体是一类能与抗原特异性结合的免疫球蛋白，由四条多肽链组成，分子量较大的两条链称为重链 (heavy chain, H链)，而分子量较小的两条链称为轻链 (Light chain, L链)。在单抗中，两条H链和两条L链的氨基酸组成完全相同，而双特异性抗体的开发是通过共表达两条不同的H链和两条不同的L链。从10种可能的H2L2重组混合物中获得功能性双特异性抗体是双特异性抗体开发的最初挑战之一，这通常称为链相关问题。在过去几十年里，研究者们已经开发了许多策略，以解决这一问题。

[0133] 基于片段的模式 (Fragment-based formats)

[0134] 基于片段的双特异性抗体简单地将多个抗体片段结合在一个分子中，不含Fc区域，避免了链相关问题，优势是产量高、成本低；缺点是半衰期相对较短。此外，基于片段的双特异性抗体可能会出现稳定性和聚合问题。

[0135] 对称模式 (Symmetric formats)

[0136] 对称模式的双特异性抗体保留了Fc区域，更接近于天然抗体，但在大小和结构上有所不同。这些差异可能对与天然抗体相关的有利特性 (如稳定性和溶解度) 产生负面影响，从而可能损害这些双特异性抗体的理化和/或药代动力学特性。

[0137] 不对称模式 (Asymmetric formats)

[0138] 大多数不对称模式的双特异性抗体与天然抗体非常相似，被认为具有最低免疫原性的潜力。不过，解决链相关问题可能涉及到的复杂工程可能会抵消一些不对称模式双特

异性抗体的这一优势。

[0139] 而在本发明中,提供了一类基于异源二聚体形式的多特异性抗体。

[0140] 如本文所用,术语“本发明的多特异性抗体”、“本发明的多抗”、“本发明抗体”可互换使用,均指使用本发明所提供的构建多特异性抗体的方法所构建出的多特异性抗体。

[0141] 优选地,本发明提供的抗体包含从N端到C端如式I所示的第一多肽和从N端到C端如式II所示的第二多肽,

[0142] A1-L1-B1-L2-CL-L3-A2 (式I)

[0143] A3-L4-B2-L5-CH1-L6-A4 (式II)

[0144] 其中,

[0145] A1、A2、A3和A4各自独立地为靶向目标靶点的抗体或其抗原片段,并且A1、A2、A3和A4各自靶向的目标抗原可以是相同的或不同的;

[0146] L1、L2、L3和L4各自独立地为无或接头元件;

[0147] B1和B2均为无,或B1和B2分别为靶向同一目标靶点的抗体的VL区和VH区;

[0148] 并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间,可形成二硫键,从而使所述抗体具有异二聚体的形式。

[0149] 在一个优选的实施方式中,式I中的CL区具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列,并且式II中的CH1区具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0150] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0151] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。

[0152] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0153] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0154] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0155] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列。

[0156] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

[0157] 在一个实施方式中,所述的多特异性抗体为抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异

性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0158] 在另一个实施方式中,本发明提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白是在本发明的多特异性抗体中,在第一多肽的C端融合Fc段,使得所述的多特异性抗体能够通过Fc段之间二硫键作用引起的同源二聚化,而形成一个更加稳定的同源二聚体。

[0159] 优选地,所述的融合蛋白为抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体,其中,所述第一多肽具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,并且所述第二多肽具有如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0160] 如本文所用,术语“单域抗体”、“纳米抗体VHH”、“纳米抗体”具有相同的含义,指克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的纳米抗体(VHH),它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后,再克隆抗体重链的可变区,构建仅由一个重链可变区组成的纳米抗体(VHH)。

[0161] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈-折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0162] 如本文所用,术语“构架区”(FR)指插入CDR间的氨基酸序列,即指在单一物种中不同的免疫球蛋白间相对保守的免疫球蛋白的轻链和重链可变区的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各具有四个FR,分别称为FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。相应地,轻链可变结构域可因此称作(FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)且重链可变结构域可因此表示为(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)。优选地,本发明的FR是人抗体FR或其衍生物,所述人抗体FR的衍生物与天然存在的人抗体FR基本相同,即序列同一性达到85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0163] 获知CDR的氨基酸序列,本领域的技术人员可轻易确定构架区FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和/或FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

[0164] 如本文所用,术语“人构架区”是与天然存在的人抗体的构架区基本相同的(约85%或更多,具体地90%、95%、97%、99%或100%)构架区。

[0165] 如本文所用,术语“亲和力”理论上通过完整抗体和抗原间的平衡缔合来定义。本发明双抗的亲和力可以通过KD值(解离常数)(或其它测定方式)进行评估或测定,例如生物膜层干涉技术(Bio-layer interferometry BLI),使用FortebioRed96仪器测量确定。

[0166] 如本文所用,术语“接头”是指插入本发明抗体中为各结构域或区域提供足够的可动性的一个或多个氨基酸残基。

[0167] 如本领域技术人员所知,免疫偶联物及融合表达产物包括:药物、毒素、细胞因子

(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的多特异性抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

[0168] 在本发明中,术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用,均指本发明所提供的多特异性抗体,其可含有或不含有起始甲硫氨酸。

[0169] 本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地,本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物),只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少90%同源性,较佳地至少95%同源性。

[0170] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0171] 如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0172] 本发明抗体还包括具有与本发明抗体相同功能的、其中所述第一多肽或第二多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):一个或多个(通常为1-50个,较佳地1-30个,更佳地1-20个,最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

[0173] 该多肽的变异形式包括:同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

[0174] 本发明还提供了其他多肽,如包含单域抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明单域抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约50个连续氨基酸,较佳地至少约50个连续氨基酸,更佳地至少约80个连续氨基酸,最佳地至少约100个连续氨基酸。

[0175] 在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0176] 表A

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
[0177] Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
[0178] Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0179] 本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

[0180] 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

[0181] 术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

[0182] 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，更佳地至少70%，更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如0.2×SSC, 0.1% SDS, 60°C；或(2) 杂交时加有变性剂，如50% (v/v) 甲酰胺, 0.1% 小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C等；或(3) 仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上，更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

[0183] 本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起，形成融合蛋白。

[0184] 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将

其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

[0185] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0186] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0187] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞;真菌细胞如酵母;果蝇S2或Sf9的昆虫细胞;CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

[0188] 用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获,用CaCl₂法处理,所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用MgCl₂。如果需要,转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物,可选用如下的DNA转染方法:磷酸钙共沉淀法,常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

[0189] 获得的转化子可以用常规方法培养,表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。

[0190] 在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0191] 本发明的抗体可以单独使用,也可与可检测标记物(为诊断目的)、治疗剂、PK(蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

[0192] 用于诊断目的可检测标记物包括但不限于:荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI(磁共振成像)或CT(电子计算机X射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

[0193] 可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于:1.放射性核素;2.生物毒;3.细胞因子如IL-2等;4.金纳米颗粒/纳米棒;5.病毒颗粒;6.脂质体;7.纳米磁粒;8.前药激活酶(例如,DT-心肌黄酶(DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质(BPHL));10.化疗剂(例如,顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

[0194] 本发明的构建方法

[0195] 在本发明中,提供了一种构建多特异性抗体的方法,包括步骤:

[0196] (i) 分别构建第一多核苷酸和第二多核苷酸,所述第一多核苷酸编码从N端到C端具有如式I所示的结构的第一多肽,并且所述第二多核苷酸编码从N端到C端具有如式II所示的第二多肽,

[0197] A1-L1-B1-L2-CL-L3-A2 (式I)

[0198] A3-L4-B2-L5-CH1-L6-A4 (式II)

[0199] 其中, A1、A2、A3和A4各自独立地为靶向目标靶点的抗体或其抗原片段, 并且A1、A2、A3和A4各自靶向的目标抗原可以是相同的或不同的; L1、L2、L3和L4各自独立地为无或接头元件; B1和B2均为无, 或B1和B2分别为靶向同一目标靶点的抗体的VL区和VH区; 并且所述第一多肽的CL区和所述第二多肽的CH1区之间, 可形成二硫键, 从而使所述抗体具有异二聚体的形式;

[0200] (ii) 表达所述第一多核苷酸和第二多核苷酸, 从而获得所述的第一多肽和第二多肽, 使其发生二聚化, 从而形成具有异二聚体形式的多特异性抗体。

[0201] 优选地, 所述第一多肽的CL区具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列, 并且所述第二多肽的CH1区具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列, 两者之间可以形成二硫键。

[0202] 药物组合物

[0203] 本发明还提供了一种组合物。优选地, 所述的组合物是药物组合物, 它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白, 以及药学上可接受的载体。通常, 可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 其中pH通常约为5-8, 较佳地pH约为6-8, 尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药, 其中包括(但并不限于): 瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0204] 本发明的药物组合物可直接用于结合目标靶点分子, 因而可用于治疗相应的疾病。此外, 还可同时使用其他治疗剂。

[0205] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%, 较佳地0.01-90wt%, 更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约10微克/千克体重-约50毫克/千克体重。此外, 本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0206] 使用药物组合物时, 是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物, 其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约10毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。

[0207] 本发明的主要优点包括:

[0208] 1) 本发明的双/多特异性抗体结构可以同时结合不同靶点并维持原抗体的结合活性。

[0209] 2) 本发明的双/多特异性抗体结构在靶点为膜表面受体或溶液中的靶点时均有效。

[0210] 3) 本发明的双/多特异性抗体结构同时具有抗多种靶点的生物学活性。

[0211] 4) 本发明的双/多特异性抗体结构可以连接单域抗体或者正常抗体或者Fc片段。

[0212] 5) 本发明的双/多特异性抗体是以CH1-CL这个二聚体为中心所构建的抗体或者融合蛋白, 在此基础上, 本发明还提供了一种多特异性抗体, 其包括Fc片段, 可以显著提高蛋白半衰期及简化纯化过程。

[0213] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0214] 表B本发明的序列总结

[0215]

Bi-70-71 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 1
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 32
抗 PD-1 抗体的 VH 链	氨基酸序列	SEQ ID NO: 2
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 33
人 IgG1 的 CHI 区	氨基酸序列	SEQ ID NO: 3
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 34
接头序列	氨基酸序列	SEQ ID NO: 4
抗人血清白蛋白的纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 5
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 35
抗 TIGIT 纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 6
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 36
Bi-70-71 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 7
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 37
抗 PD-1 抗体的 VL 链	氨基酸序列	SEQ ID NO: 8
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 38
人 κ 轻链恒定区 CL	氨基酸序列	SEQ ID NO: 9
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 39
Bi-72-73 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 10
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 40
Bi-72-73 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 11
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 41
Bi-74-76 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 12
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 42
抗 VEGF 抗体的 VH 链	氨基酸序列	SEQ ID NO: 13
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 43
抗 PD-L1 纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 14
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 44
Bi-74-76 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 15
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 45
抗 VEGF 抗体的 VL 链	氨基酸序列	SEQ ID NO: 16
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 46
Bi-78-79、Bi-79-83、Bi-79-86 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 17
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 47
Bi-78-79、Bi-79-80 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 18
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 48
抗 PD-L2 纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 19
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 49
Bi-78-80 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 20
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 50
Bi-78-80 中的接头序列	氨基酸序列	SEQ ID NO: 21
Bi-81-82 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 22
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 51
Bi-81-82 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 23
	核苷酸序列	SEQ ID NO: 52

[0216]	Bi-79-83 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 24
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 53
	Bi-79-86 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 25
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 54
	抗 41BB 纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 26
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 55
	Bi-203-204 的肽#1	氨基酸序列	SEQ ID NO: 27
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 56
	抗 PD-L1 纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 28
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 57
	人 IgG1 的 LALA 突变型 Fc	氨基酸序列	SEQ ID NO: 29
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 58
	Bi-203-204 的肽#2	氨基酸序列	SEQ ID NO: 30
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 59
	抗 PD-L2 纳米抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO: 31
		核苷酸序列	SEQ ID NO: 60

[0217] 实施例1:抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体

[0218] 1.1抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体的构建

[0219] 为了证实M-Body技术,在本实施例中,构建了2种抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体:

[0220] Bi-70-71由2条多肽链组成,其结构如图1A所示。肽链#1具有SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,其包含衍生自抗PD-1抗体Pembrolizumab(专利号:US8354509)的VH氨基酸序列(SEQ ID NO:2),所述VH氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的CH1氨基酸序列(SEQ ID NO:3)直接相连。将具有SEQ ID NO:5抗人血清白蛋白的纳米抗体ALB8(专利号:W02004/041865)的C端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于Pembrolizumab的重链可变区N端。将抗TIGIT的纳米抗体E-Ye-11(SEQ ID NO:6)的N端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGSG)的柔性肽连接于CH1的C端,由此获得肽链#1。肽链#2具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,其包含衍生自抗PD-1抗体Pembrolizumab的VL氨基酸序列(SEQ ID NO:8),所述VL氨基酸序列C端和人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列(SEQ ID NO:9)直接相连,由此获得肽链#2。

[0221] Bi-72-73也由2条多肽链组成,其结构如图1B所示。肽链#1具有SEQ IDNO:10所示的氨基酸序列,其包含衍生自抗PD-1抗体Pembrolizumab的VH氨基酸序列(SEQ ID NO:2),所述VH氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的CH1氨基酸序列(SEQ ID NO:3)直接相连。肽链#2具有SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其包含衍生自抗PD-1抗体Pembrolizumab的VL氨基酸序列(SEQ ID NO:8),所述VL氨基酸序列C端和人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列(SEQ ID NO:9)直接相连。将抗人血清白蛋白的纳米抗体ALB8(SEQ ID NO:5)的C端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于Pembrolizumab的轻链可变区N端,将抗TIGIT的纳米抗体E-Ye-11(SEQ ID NO:6)的N端通过11个氨基酸残基GGGGSGGGSG(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于CL的C端,由此获得肽链#2。

[0222] 1.2抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体的表达和纯化

[0223] 在本实施例中,将编码实施例1.1中构建的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-70-71和Bi-72-73的各2条链的核苷酸序列通过多克隆位点接入市售的真核表达

载体pCDNA3.1(+),在真核细胞中进行表达和纯化,获得了三特异性抗体Bi-70-71和Bi-72-73,具体操作如下。

[0224] 抗体基因构建入pCDNA3.1表达载体

[0225] 编码Bi-70-71和Bi-72-73的各2条链的基因序列有金维智公司合成。利用同源重组酶(购自Vazyme)和EcoR I/Not I双酶切线性化的pCDNA3.1载体中,流程按照商品说明书。同源重组产物转入Top10感受态细胞,涂布氨苄抗性平板,37℃培养过夜,挑取单克隆测序。

[0226] 蛋白表达及纯化

[0227] 采用ExpiCHO™表达系统试剂盒(Thermo),将质粒转入Expi-CHO细胞中,转染方法按照商品说明书,细胞培养5天后收集上清利用KappaSelect(GE)亲和层析柱进行纯化。具体方法如下:样品用注射器通过0.2um无菌针头式过滤器PES进行样品过滤。用5倍柱体积的平衡缓冲液(20mM PB+0.15M NaCl,pH 7.4)平衡层析柱,至流出液电导和pH不变。流速0.5ml/分钟上样。上样完毕后继续用平衡缓冲液冲洗层析柱,冲洗至穿透完全,UV值不再下降。用洗脱缓冲液(0.1M glycine-HCl,pH 3.0)洗脱,收集流出液。洗脱后,应立刻用碱性缓冲液(如1M Tris/HCl,pH 8.0)将收集到的抗体溶液中和到抗体稳定的pH。

[0228] 利用HPLC检测获得蛋白的纯度。HPLC方法如下,流动相:150mM Na₂HPO₄·12H₂O,pH7.0。色谱条件:检测波长:280nm,柱温:25℃,流速:0.35ml/min,检测时间:20min,Zenix-C SEC-300色谱柱(SEPAX 4.6×300mm,3μm)。SEC结果显示,双特异性抗体Bi-70-71纯度为99.14%,Bi-72-73纯度为98.27%。

[0229] 1.3测定抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原共结合能力

[0230] 使用Octet系统(ForteBio公司生产)通过动力学结合测定法确定本发明上述两种示例性抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-70-71和Bi-72-73能否同时结合PD-1、TIGIT及人血清白蛋白。在实验开始前半个小时,将SA传感器(Pa11)浸泡于SD缓冲液(PBS 1×,BSA 0.1%,吐温20 0.05%)中于室温平衡。向96孔黑色聚苯乙烯半量微孔板(Greiner)的孔中分别加入100μl的SD缓冲液作为空白对照(用于扣除背景)、100μl 100nM纯化的双特异性抗体Bi-70-71和Bi-72-73、100μl稀释于SD缓冲液中作为抗原的生物素化标记的人PD-1(100nM)(Acrobiosystems)、人TIGIT(100nM)(Acrobiosystems)和人血清白蛋白(Acrobiosystems)的溶液。将SA传感器浸没于含生物素化标记的人PD-1溶液的孔中,在室温浸没60秒上样。随后将传感器在SD缓冲液中洗涤至达到基线,然后浸没于含100μl抗体溶液的孔中,监测抗体与抗原的缔合,随后将传感器转移至含有100μl SD缓冲液的孔,监测抗体解离;然后再将传感器转移至含有100nM人TIGIT溶液的孔中,检测抗体与人TIGIT的结合,随后将传感器转移至含有100μl SD缓冲液的孔,监测抗原解离;然后将传感器转移至含有100nM人血清白蛋白溶液的孔中,检测抗体与人血清白蛋白的结合,随后将传感器转移至含有100μl SD缓冲液的孔,监测抗原解离。转速为1000转/分钟,温度为30℃。

[0231] 在如上方法的测定实验中,本发明的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-70-71(如图2A)和Bi-72-73(如图2B)能够同时和人PD-1、人TIGIT及人血清白蛋白结合。

[0232] 1.4测定抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原的结合能力

[0233] 通过转染克隆到MCS的人PD-1或者人TIGIT cDNA(购自Sino Biological)的

pCHO1.0载体(购自Invitrogen)产生过表达人PD-L1或人TIGIT的CHO细胞(CHO-hPD-L1细胞、CHO-hTIGIT细胞)。将扩大培养的CHO-hPD-L1/CHO-hTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的三特异性抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。纯化抗体样品孔100 μ l/孔加入用PBS稀释的鼠抗人IgG-Fab(PE)(购自Abcam),4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0234] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图3所示,本发明的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体和CHO-hPD-1细胞及CHO-hTIGIT细胞均有结合活性。

[0235] 1.5抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体与人血清白蛋白在ELISA水平的结合

[0236] 用ELISA包被液将人血清白蛋白(acrobiosystems)稀释后加入ELISA板,4 $^{\circ}$ C包被过夜。弃去包被液,250 μ l/孔加入PBST洗3次,用5%BSA室温封闭1小时备用。将纯化抗体和对照抗体梯度稀释后加入封闭好的ELISA板,室温孵育2小时。加入PBST洗3次,向纯化抗体样品孔中加入羊抗人Fab-HRP(abcam),室温孵育1小时,加入PBST洗3次后加入ELISA显色液,室温放置3分钟后加入ELISA终止液,读取450nm处吸光度数值。

[0237] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图4所示,本发明抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体在ELISA水平与人血清白蛋白均有结合。

[0238] 1.6抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体阻断人PD-L1与人PD-1结合

[0239] 将CHO-hPD-1细胞调整细胞密度至 2×10^6 cells/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化抗体和对照抗体样品用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品60 μ l/孔加入96孔样品稀释板,同时60 μ l/孔加入生物素化标记的人PD-L1蛋白(购自AcroBiosystems),终浓度为500ng/ml,与样品4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。将共孵育样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入用PBS稀释100倍的Streptavidin,R-Phycoerythrin Conjugate(购自Thermo fisher),4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0240] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图5所示,本发明的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体均可以阻断PD-L1与PD-1的结合。

[0241] 1.7抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体阻断人CD155与人TIGIT结合

[0242] 将CHO-hTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化抗体和对照抗体样品用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品60 μ l/孔加入96孔样品稀释板,同时60 μ l/孔加入人CD155-mFc蛋白(购自AcroBiosystems),终浓度为2 μ g/ml,与样品4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。将共孵育样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入用PBS稀释100倍的Goat anti-mouse IgG Fc-APC(购自Biolegend),4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0243] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图6所示,本发明的抗PD-1/TIGIT/人血清白蛋白三特异性抗体均可以阻断CD155与TIGIT的结合。

[0244] 综上,在CH1-CL的结构域上方连接VH和VL结构域,同时连接1个或多个纳米抗体结构域形成的双特异性或多特异性抗体可以有效维持亲本抗体的结合活性。本实施例所使用的VH-VL组合来自Pembrolizumab,是结合细胞表面抗原人PD-1的结构域。

[0245] 实施例2:抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体

[0246] 2.1.抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体的构建

[0247] 为了证实M-body在连接的VH-VL结构域是靶向血液中游离的抗原时是否适用,在本实施例中,构建了1种抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体,命名为Bi-74-76,其结构示意图如图1C所示,由2条多肽链组成,肽链#1具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列,其包含衍生自抗VEGF抗体Bevacizumab(专利号:W01998045332)的VH氨基酸序列(SEQ ID NO:13),所述VH氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的CH1氨基酸序列(SEQ ID NO:3)直接相连;将抗人血清白蛋白的纳米抗体ALB8(SEQ ID NO:5)的C端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于Bevacizumab重链可变区N端,将抗人PD-L1的纳米抗体C-Ye-8-5(专利申请号:2019108631090)(SEQ ID NO:14)的N端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于CH1的C端,由此获得肽链#1。肽链#2具有SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,其包含衍生自抗VEGF抗体Bevacizumab的VL氨基酸序列(SEQ ID NO:16),所述VL氨基酸序列C端和衍生自人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列(SEQ ID NO:9)直接相连;将抗人PD-L1的纳米抗体C-Ye-8-5(SEQ ID NO:14)的N端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于CL的C端,由此获得肽链#2。

[0248] 2.2抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体的表达和纯化

[0249] 在本实施例中,将编码实施例2.1中构建的抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-74-76的2条核苷酸序列均通过多克隆位点连接入市售的真核表达载体pCDNA3.1(+),在真核细胞中进行表达和纯化,获得了三特异性抗体Bi-74-76。表达质粒构建、细胞转染、蛋白纯化及HPLC纯度检测方法同实施例1.2。SEC结果显示,双特异性抗体Bi-74-76纯度为95.89%。

[0250] 2.3测定抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原共结合能力

[0251] 使用Octet系统(ForteBio公司生产)通过动力学结合测定法确定本发明上述两种示例性抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-74-76能否同时结合人PD-L1、VEGF及人血清白蛋白。在实验开始前半个小时,将SA传感器(Pa11)浸泡于SD缓冲液(PBS 1 \times ,BSA 0.1%,吐温20 0.05%)中于室温平衡。向96孔黑色聚苯乙烯微量微孔板(Greiner)的孔中分别加入100 μ l的SD缓冲液作为空白对照(用于扣除背景)、100 μ l 100nM纯化的三特异性抗体Bi-74-76、100 μ l稀释于SD缓冲液中作为抗原的生物素化标记的人VEGF(100nM)(Acrobiosystems)、人PD-L1(100nM)(Acrobiosystems)和人血清白蛋白(Acrobiosystems)的溶液。将SA传感器浸没于含生物素化标记的VEGF溶液的孔中,在室温浸没60秒上样。随后将传感器在SD缓冲液中洗涤至达到基线,然后浸没于含100 μ l抗体溶液的孔中,监测抗体与抗原的缔合,随后将传感器转移至含有100 μ l SD缓冲液的孔,监测抗体解离;然后再将传感器转移至含有100nM人PD-L1溶液的孔中,检测抗体与人PD-L1的结合,随后将传感器转移至含有100 μ l SD缓冲液的孔,监测抗原解离;然后将传感器转移至含有100nM人血清白蛋白溶液的孔中,检测抗体与人血清白蛋白的结合,随后将传感器转移至含有100 μ l SD缓冲液的孔,监测抗原解离。转速为1000转/分钟,温度为30 $^{\circ}$ C。

[0252] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图7所示,本发明的抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-74-76能够同时和人PD-L1、人VEGF及人血清白蛋白结合。

[0253] 2.4测定抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原结合能力

[0254] 通过转染克隆到MCS的人PD-L1 cDNA(购自Sino Biological)的pCHO1.0载体(购自Invitrogen)产生过表达人PD-L1的CHO细胞(CHO-hPD-L1、CHO-hTIGIT细胞)。抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体和CHO-hPD-L1细胞结合活性的检测方法同实施例1.4。

[0255] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图8所示,本发明抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体能够和CHO-hPD-L1细胞有结合。

[0256] 2.5测定抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体和人血清白蛋白在ELISA水平的结合

[0257] 本实验通过ELISA反应的方法检测了抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体和人血清白蛋白的结合能力,实验方法同实施例1.5。在如上方法的测定实验中,本发明纯化抗体在能够在ELISA水平与人血清白蛋白结合(如图9)。

[0258] 2.6抗VEGF/PD-L1/人血清白蛋白三特异性抗体与人VEGF在ELISA水平的结合

[0259] 用ELISA包被液将人VEGF(acrobiosystems)蛋白稀释后加入ELISA板,4℃包被过夜。弃去包被液,250μl/孔加入PBST洗3次,用5%BSA室温封闭1小时备用。将纯化的抗体Bi-074-076抗体梯度稀释后加入封闭好的ELISA板,室温孵育2小时。加入PBST洗3次,向纯化抗体样品孔中加入羊抗人Fab-HRP(abcam),向对照抗体样品孔中加入羊抗人Fc-HRP(abcam),室温孵育1小时,加入PBST洗3次后加入ELISA显色液,室温放置3min后加入ELISA终止液,读取450nm处吸光度数值。

[0260] 在如上方法的测定实验中,本发明中纯化抗体Bi-74-76能够在ELISA水平与人VEGF蛋白结合(如图10)。

[0261] 综上,在CH1-CL的结构上方连接VH和VL结构域,同时连接1个或多个纳米抗体结构域形成的双特异性或多特异性抗体可以有效维持亲本抗体的结合活性。本实施例所使用的VH-VL组合来自Bevacizumab,是结合血液中游离抗原VEGF的结构域。

[0262] 实施例3:抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体

[0263] 3.1抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体的构建

[0264] 为了证实M-body在连接的是两个靶向位于同一细胞的不同靶点的纳米抗体时是否适用,本发明人构建了一组抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体。

[0265] 在本实施例中,构建了3种抗抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体:

[0266] Bi-78-79,其结构示意图如图11A所示,由2条多肽链组成,肽链#1具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L1的纳米抗体C-Ye-18-5(SEQ ID NO:14),所述纳米抗体氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的CH1氨基酸序列(SEQ ID NO:3)直接连接;将抗人血清白蛋白的纳米抗体ALB8(SEQ ID NO:5)的C端通过11个氨基酸残基(GGGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于CH1区C端,由此获得肽链#1。肽链#2具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L2纳米抗体D-Ye-22氨基酸序列(SEQ ID NO:19),所述纳米抗体氨基酸序

列C端直接连接人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列(SEQ ID NO:9),由此获得肽链#2。

[0267] Bi-78-80,其结构示意图如图1A所示,由2条多肽链组成,肽链#1具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L1的纳米抗体SEQ ID NO:2,所述纳米抗体氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的CH1氨基酸序列SEQ ID NO:6直接连接;其包含抗PD-L1的纳米抗体C-Ye-18-5(SEQ ID NO:14),所述纳米抗体氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的CH1氨基酸序列(SEQ ID NO:3)直接连接;将抗人血清白蛋白的纳米抗体ALB8(SEQ ID NO:5)的C端通过5个氨基酸残基(DKTHT)(SEQ ID NO:21)的柔性肽连接于CH1区C端,由此获得肽链#1。肽链#2具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列。

[0268] Bi-81-82,其结构示意图如图1A所示,由2条多肽链组成,肽链#1具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L1的纳米抗体C-Ye-18-5(SEQ ID NO:14),所述纳米抗体氨基酸序列C端通过一段11个氨基酸(GGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽链和衍生自人IgG1的所示CH1氨基酸序列(SEQ ID NO:3)连接,将抗人血清白蛋白的纳米抗体ALB8(SEQ ID NO:5)的C端通过11个氨基酸残基(GGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于CH1区C端,由此获得肽链#1。肽链#2具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L2纳米抗体D-Ye-22氨基酸序列(SEQ IDNO:19),所述纳米抗体氨基酸序列C端通过一段含有11个氨基酸(GGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽链和人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列(SEQ ID NO:9),由此获得肽链#2。

[0269] 在本实施例中,构建了1种抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体,命名为Bi-79-83,其结构示意图如图1A所示,由2条多肽链组成,肽链#1具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。肽链#2具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L2纳米抗体D-Ye-22氨基酸序列(SEQ IDNO:19),所述纳米抗体氨基酸序列C端和人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列(SEQ ID NO:9)直接连接;将抗TIGIT的纳米抗体E-Ye-11的N端通过11个氨基酸残基(GGGSGGGSG)(SEQ ID NO:4)的柔性肽连接于CL区C端,由此获得肽链#2。

[0270] 3.2PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体的表达和纯化

[0271] 在本实施例中,将编码实施例3.1中构建的抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-78-79、Bi-78-80和Bi-81-82及抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体Bi-79-83的2条链的核苷酸序列均通过多克隆位点接入市售的真核表达载体pCDNA3.1(+),在真核细胞中进行表达和纯化。表达质粒构建及蛋白表达和纯化方法同实施例1.2。

[0272] 本研究利用SEC法对纯化产物纯度进行了检测,检测方法同实施例1.2。实验结果表明,4种多特异性抗体均就有较高的纯度(Bi-78-79:98.07%;Bi-78-80:98.62%;Bi-81-82:96.31;Bi-79-83:99.14%)。

[0273] 3.3测定抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体的抗原结合能力

[0274] 通过转染克隆到MCS的人PD-L1或者人PD-L2或者人TIGIT cDNA(购自Sino Biological)的pCH01.0载体(购自Invitrogen)产生过表达人PD-L1或者人PD-L2或者人TIGIT的CHO细胞(CHO-hPD-L1细胞、CHO-hPD-L2细胞、CHO-hTIGIT细胞)。将扩大培养的CHO-hPD-L1/CHO-hPD-L2/CHO-hTIGIT细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的三特异性抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述

稀释好的样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。纯化抗体样品孔100 μ l/孔加入用PBS稀释的鼠抗人IgG-Fab (PE) (购自Abcam),对照抗体样品孔加入用PBS稀释的羊F(ab')₂抗人IgG-Fc (PE) (购自Abcam),4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex (Bechman) 流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0275] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图12所示,本发明的纯化样品Bi-78-79、Bi-78-80和Bi-81-82和CHO-hPD-L1细胞及CHO-hPD-L2细胞均有结合活性;本发明的纯化样品Bi-79-83和CHO-hPD-L1细胞、CHO-hPD-L2细胞及CHO-hTIGIT细胞都有结合活性。

[0276] 3.4测定抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体和人血清白蛋白在ELISA水平的结合

[0277] 本实验通过ELISA反应的方法检测了抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体和人血清白蛋白的结合能力,实验方法同实施例1.3。

[0278] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图13所示。本发明所有抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体均能够在ELISA水平与人血清白蛋白结合。

[0279] 3.5测定抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体阻断人PD-L1/PD-L2与PD-1结合活性

[0280] 将CHO-hPD-1细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化抗体Bi-78-79、Bi-78-80、Bi-81-82及Bi-79-83和对照抗体样品用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品60 μ l/孔加入96孔样品稀释板,同时60 μ l/孔加入生物素化标记的人PD-L1蛋白或生物素化标记的人PD-L2蛋白(购自AcroBiosystems),终浓度为500ng/ml,与样品4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。将共孵育样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入用PBS稀释100倍的Streptavidin,R-Phycoerythrin Conjugate(购自Thermo fisher),4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。100 μ l/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex (Bechman) 流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0281] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图14所示。本发明所有抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体均可以阻断人PD-L1及人PD-L2与细胞表面人PD-1的结合。

[0282] 3.6抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体阻断PDL1/PDL2/PD1/luc信号通路实验

[0283] PD-L1和PD-L2能够共表达于肿瘤细胞或免疫细胞上,本实施例利用共表达人PD-L1和人PD-L2的CHO细胞和过表达人PD-1且含有NFAT-Luciferase报告基因的Jurkat细胞共孵育的方法检测了纯化抗体Bi-78-79、Bi-78-80、Bi-81-82及Bi-79-83对PD-L1/PD-1通路和PD-L2/PD-1通路的同时阻断作用,具体方法如下。

[0284] 共表达人PD-L1和人PD-L2的功能细胞(CHO-K1-PD-L1/PD-L2)调整密度为 5×10^5 细胞/ml,100 μ l/孔接种于96孔细胞培养白底板,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养过夜。将纯化抗体和对照抗体1:40完全培养基梯度稀释后,备用。将过表达人PD-1且含有NFAT-

Luciferase报告基因的Jurkat细胞(Jurkat-PD-1-NFAT)用1640完全培养基调整细胞密度至 2.5×10^5 细胞/ml,备用。取出白底板,吸去培养上清,将上述稀释好的样品40 μ l/孔加入白底板,同时40 μ l/孔加入Jurkat-PD-1-NFAT效应细胞悬液,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱贴壁培养6小时。向每孔中加入Bio-Glo™试剂(Promega),使用多功能酶标仪读取荧光信号值。

[0285] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图15所示。本发明的抗PD-L1/PD-L2/人血清白蛋白三特异性抗体或抗PD-L1/PD-L2/TIGIT/人血清白蛋白四特异性抗体可以在体外同时阻断PD-L1/PD-1和PD-L2/PD-1信号通路,其阻断效果和抗PD-1单克隆抗体Pembrolizumab相似。

[0286] 综上,在CH1-CL的结构N端连接两个不同的纳米抗体结构域,在CH1的C端连接1个纳米抗体结构域形成3特异性抗体或在CH1-CL的结构C端分别连接两个不同的纳米抗体结构域形成4特异性抗体均能有效维持亲本抗体的结合活性。纳米抗体通过一段柔性肽链或者直接和CH1或CL的N端连接均可保持抗原结合能力。纳米抗体通过一段11个氨基酸的柔性肽链(GGGGSGGGSG)或者通过一段5个氨基酸的较短肽链(DKTHT)和CH1的C端连接均可保持抗原结合能力。

[0287] 本实施例使用抗PD-L1和抗PD-L2纳米抗体组合是结合同一细胞上的两种抗原,结果表明所有多特异性抗体均可同时和PD-L1和PD-L2结合并阻断PD-L1/PD-L2和PD-1的结合,激活下游信号通路。

[0288] 实施例4:抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体

[0289] 4.1抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体的构建

[0290] 为了证实M-body在连接的是两个靶向位于不同细胞的不同靶点的纳米抗体时是否适用,本发明人构建了抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体命名为Bi-79-86,该三特异性抗体含有2种不同多肽,其结构示意图如图16所示。肽链#1具有SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。肽链#2具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,其包含抗41BB纳米抗体氨基酸序列(SEQ IDNO:26专利号),所述纳米抗体氨基酸序列C端直接连接人 κ 轻链恒定区(CL)氨基酸序列SEQ ID NO:9,由此获得肽链#2。

[0291] 4.2抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体的表达和纯化

[0292] 在本实施例中,将编码实施例4.1中构建的抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-79-86的2条链的核苷酸序列均通过多克隆位点连接入市售的真核表达载体pCDNA3.1(+),在真核细胞中进行表达和纯化。表达质粒构建及蛋白表达和纯化方法同实施例1.2。

[0293] 本研究利用SEC法对纯化产物纯度进行了检测,检测方法同实施例1.2。实验结果表明,本研究获得的抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体纯度为95.08%。

[0294] 4.3测定抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体的抗原结合能力

[0295] 通过转染克隆到MCS的人PD-L1或者人41BB cDNA(购自Sino Biological)的pCH01.0载体(购自Invitrogen)产生过表达人PD-L1或者人41BB的CHO细胞(CHO-hPD-L1细胞、CHO-41BB细胞)。将扩大培养的CHO-hPD-L1/CHO-41BB细胞调整细胞密度至 2×10^6 细胞/ml,100 μ l/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的三特异性抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品100 μ l/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4 $^{\circ}$ C孵育30分钟,PBS清洗两次。纯化抗体样品孔100 μ l/孔加入用PBS稀释的鼠抗人IgG-Fab(PE)(购

自Abcam),对照抗体样品孔加入用PBS稀释的羊F(ab')₂抗人IgG-Fc(PE)(购自Abcam),4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。100μl/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0296] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图17所示,本发明的抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-79-86和CHO-hPD-L1细胞及CHO-41BB细胞均有结合活性。

[0297] 4.4测定抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体三特异性抗体和人血清白蛋白在ELISA水平的结合

[0298] 本实验通过ELISA反应的方法检测了抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-79-86和人血清白蛋白的结合能力,实验方法同实施例1.3。

[0299] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图18所示,本发明抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体能够在ELISA水平与人血清白蛋白结合。

[0300] 4.5测定抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体桥接表达PD-L1/41BB细胞的能力

[0301] 人PD-L1和人41BB分别表达在肿瘤细胞和免疫细胞表面,本实施例通过细胞桥接实验验证了三特异性抗体Bi-79-86通过同时结合过表达人PD-L1的细胞(CHO-hPD-L1)和过表达人41BB的细胞(CHO-h41BB),将两种细胞拉近的能力,具体方法如下。

[0302] 各取 2×10^7 个CHO-hPDL1和CHO-h41BB细胞离心后用CellTrace™CFSE、CellTracker™Violet BMQC Dye两种染料分别重悬,37℃避光孵育12分钟;将Bi-079-086、A-Na-19、αHSA(Ablynx benchmark)用PBS稀释,400nM开始2倍稀释共12个点。将CHO-hPDL1和CHO-h41BB细胞离心后,加入PBS重悬,细胞比1:1混合后,100μl/孔加入96孔板中,离心弃去上清。用PBS稀释人血清白蛋白至2μg/ml,50μl/孔加入细胞板,同时加入50μl/孔加入上述配制完成的抗体。混匀,37℃避光孵育2小时,上CytoFlex(Bechman)流式细胞仪进行检测。

[0303] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图19所示,本发明抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-79-86能够在体系中含有高浓度人血清白蛋白的情况下拉近CHO-hPDL1和CHO-h41BB细胞,证明Bi-79-86可以同时结合表达于不同细胞表面的不同抗原,同时结合活性不受体系中人血清白蛋白影响。

[0304] 4.6抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体阻断人PD-L1与人PD-1结合

[0305] 检测纯化的抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-79-86阻断PD-L1蛋白和PD-1细胞结合活性的方法同实施例1.6。在如上方法的测定实验中,实验结果如图20所示,本发明抗PD-L1/41BB/人血清白蛋白三特异性抗体Bi-79-86分子可以阻断PD-L1蛋白与PD-1细胞的结合。

[0306] 综上,在CH1-CL的结构N端连接两个不同的纳米抗体结构域,在CH1的C端连接1个纳米抗体结构域形成3特异性抗体能有效维持亲本抗体的结合活性。本实施例使用抗PD-L1和抗41BB纳米抗体组合是结合不同细胞上的两种抗原,结果表明本发明的三特异性抗体结构可以在细胞水平同时和PD-L1及41BB结合,并桥接分别表达PD-L1和41BB的细胞,该结合和桥接活性不受体系中人血清白蛋白的影响。

[0307] 实施例5:抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白

[0308] 5.1抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白的构建

[0309] 抗体的Fc结构域可以和FcRn结合,延长药物的体能半衰期;Fc结构域可以和其他Fc受体结合,引起下游的反应如ADCC/CDC;Fc结构域和ProteinA有特异性结合,可以便于蛋白纯化。

[0310] 为了证实M-Body技术在和Fc融合的情况下是否适用,本发明人构建了抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体命名为Bi-203-204,该三特异性抗体含有2种不同多肽,其结构示意图如图21所示。肽链#1具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L1的纳米抗体SEQ ID NO:28,所述纳米抗体氨基酸序列C端和衍生自人IgG1的SEQ ID NO:3所示CH1氨基酸序列直接连接;将人IgG1 (LALA突变型)Fc (SEQ ID NO:29)结构域直接和CH1区C端连接,由此获得肽链#1。肽链#2具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列,其包含抗PD-L2纳米抗体HZ-D-NA-96-01氨基酸序列SEQ ID NO:31,所述纳米抗体氨基酸序列C端直接连接人κ轻链恒定区(CL)氨基酸序列SEQ ID NO:9,由此获得肽链#2。

[0311] 5.2抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白的表达和纯化

[0312] 在本实施例中,将编码实施例5.1中构建的抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Bi-203-204的各2条链的核苷酸序列均通过多克隆位点连接入市售的真核表达载体pCDNA3.1(+),在真核细胞中进行表达和纯化,获得了双特异性抗体Bi-203-204。具体操作如下。

[0313] 采用ExpiCHO™表达系统试剂盒(购自Thermo),将质粒转入Expi-CHO细胞中,转染方法按照商品说明书,细胞培养5天后收集上清利用蛋白A磁珠(购自金斯瑞)分选法纯化目的蛋白。将磁珠用适当体积的结合缓冲液(PBS+0.1%吐温20,pH 7.4)重悬(1-4倍磁珠体积)后加入至待纯化样品中,室温孵育1小时,期间轻柔振荡。样品置于磁力架上(购自海狸),弃去上清,磁珠用结合缓冲液清洗3遍。按照磁珠体积的3-5倍体积加入洗脱缓冲液(0.1M柠檬酸钠,pH 3.2)室温振荡5-10分钟,置回磁力架上,收集洗脱缓冲液,转移至已加入中和缓冲液(1M Tris,pH 8.54)的收集管中混匀。

[0314] 利用HPLC检测获得蛋白的纯度。HPLC方法如下,流动相:150mM Na₂HPO₄·12H₂O,pH7.0。色谱条件:检测波长:280nm,柱温:25℃,流速:0.35ml/min,检测时间:20分钟,Zenix-C SEC-300色谱柱(SEPAX 4.6×300mm,3μm)。

[0315] 实验结果显示,抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白Bi-203-204具有较好的纯度(>99%),且根据纯化获得的蛋白分子大小可知,Bi-203-204的纯化分子含有4条肽链且正确配对。

[0316] 5.3测定抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白的抗原结合能力

[0317] 将扩大培养的CHO-hPD-L1/CHO-hPD-L2细胞调整细胞密度至2×10⁶细胞/ml,100μl/孔加入96孔流式板,离心备用。将纯化的双特异性抗体用PBS稀释,400nM开始3倍稀释共12个点,将上述稀释好的样品100μl/孔加入上述带有细胞的96孔流式板中,4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。纯化抗体样品孔100μl/孔加入用PBS稀释羊F(ab')₂抗人IgG-Fc(PE)(购自Abcam),4℃孵育30分钟,PBS清洗两次。100μl/孔加入PBS重悬细胞,在CytoFlex(Bechman)流式细胞仪上进行检测并计算对应的MFI。

[0318] 在如上方法的测定实验中,实验结果如图22所示,本发明的抗PD-L1/PD-L2双特异性抗体Fc融合蛋白Bi-203-204和CHO-hPD-L1细胞及CHO-hPD-L2细胞均有结合活性。

[0319] 综上,在CH1-CL的结构N端连接两个不同的纳米抗体结构域,在CH1的C端连接人抗体Fc结构域形成双特意特异性抗体Fc融合蛋白能有效维持亲本抗体的结合活性。同时Fc结

构域可以有利于抗体纯化,并形成稳定的4聚体结构。

[0320] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

210	215	220
Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
225	230	235
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
	245	250
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
	260	265
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
	275	280
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
290	295	300
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
305	310	315
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
	325	330
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly		
	340	345
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly		
	355	360
Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala		
370	375	380
Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Gly Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala		
385	390	395
Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Leu Val Thr Ile Asp Gly Ser		
	405	410
Thr Asn Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp		
	420	425
Asn Val Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu		
	435	440
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Asn Ile Arg Thr Gly Trp Ser		
450	455	460
Ser Val Arg Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
465	470	475
		480
<210> 2		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 2		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		

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

<210> 3

<211> 103

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

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

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115
 <210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Gly
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45
 Ala Leu Val Thr Ile Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Val Asp Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn

	85		90		95
Ala Asn Ile Arg Thr Gly Trp Ser Ser Val Arg Thr Tyr Trp Gly Gln					
	100		105		110
Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210> 7					
<211> 218					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<400> 7					
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
1	5		10		15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser					
	20		25		30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro					
	35		40		45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala					
	50		55		60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser					
65	70		75		80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg					
	85		90		95
Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg					
	100		105		110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln					
	115		120		125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr					
	130		135		140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser					
145	150		155		160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr					
	165		170		175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys					
	180		185		190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro					
	195		200		205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210		215		
<210> 8					

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 9

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

<210> 10

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 10

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

<210> 11

<211> 475

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 11

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn
1				5						10				15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe

	20		25		30														
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
	35						40				45								
Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr				
65					70				75						80				
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
			85						90					95					
Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr				
			100					105						110					
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Glu	Ile				
			115					120						125					
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg				
			130				135						140						
Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr				
145					150					155					160				
Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu				
			165						170						175				
Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe				
			180					185						190					
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu				
			195					200						205					
Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	Asp	Leu				
			210					215						220					
Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val				
225						230					235				240				
Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys				
				245							250				255				
Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg				
			260					265						270					
Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn				
			275					280						285					
Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser				
			290				295							300					
Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys				
305						310					315				320				
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr				
				325							330				335				

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 340 345 350
 Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 355 360 365
 Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe
 370 375 380
 Ser Ile Gly Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Ala Leu Val Thr Ile Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Pro Asp
 405 410 415
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr
 420 425 430
 Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 435 440 445
 Tyr Cys Asn Ala Asn Ile Arg Thr Gly Trp Ser Ser Val Arg Thr Tyr
 450 455 460
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 465 470 475
 <210> 12
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 12
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val
 115 120 125

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
 130 135 140
 Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met
 145 150 155 160
 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Trp
 165 170 175
 Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe Lys Arg
 180 185 190
 Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 195 200 205
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
 210 215 220
 Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 260 265 270
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 275 280 285
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 290 295 300
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 305 310 315 320
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 325 330 335
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 340 345 350
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Gln
 355 360 365
 Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Tyr Trp Leu
 385 390 395 400
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Asn Ser
 405 410 415
 Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 420 425 430
 Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser

435	440	445
Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Gly		
450	455	460
Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser		
465	470	475
<210> 13		
<211> 226		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<400> 13		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		
20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe		
50	55	60
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val		
100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys		

225

<210> 14

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

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

<210> 15

<211> 340

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 15

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
210	215	220	
Gly Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
225	230	235	240
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser			
245	250	255	
Tyr Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
260	265	270	
Val Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser			
275	280	285	
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu			
290	295	300	
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
305	310	315	320
Cys Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val			
325	330	335	
Thr Val Ser Ser			
340			
<210> 16			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 16			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 17
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Ser Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 225 230 235 240
 Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 245 250 255
 Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 260 265 270
 Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
 275 280 285
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
 290 295 300
 Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
 305 310 315 320
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
 325 330 335
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 340

<210> 18

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 18

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

Asp Ser Ser Gly Asp Asp Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120 125
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 130 135 140
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 145 150 155 160
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 165 170 175
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 180 185 190
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 195 200 205
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 19
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 19
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Gly Ser Arg Arg Thr Phe Thr Met Ala
 20 25 30
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile
 35 40 45
 Trp Gly Pro Ala Asp His Thr Ile Tyr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg
 50 55 60
 Phe Ala Cys Ser Arg Asp Asp Ser Thr Asn Thr Ile Phe Leu Gln Met
 65 70 75 80
 Asn Ser Leu Glu Leu Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ala Ala
 85 90 95
 Asp Ser Ser Gly Asp Asp Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 20
 <211> 338

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 20

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu
 290 295 300
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 305 310 315 320
 Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 325 330 335
 Ser Ser
 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 21
 Asp Lys Thr His Thr
 1 5
 <210> 22
 <211> 355
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 22
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asn Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 245 250 255
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 260 265 270
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 275 280 285
 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 290 295 300
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 325 330 335
 Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
 340 345 350
 Val Ser Ser
 355
 <210> 23
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 23
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Gly Ser Arg Arg Thr Phe Thr Met Ala
 20 25 30
 Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile
 35 40 45
 Trp Gly Pro Ala Asp His Thr Ile Tyr Ala Asn Ser Val Lys Gly Arg
 50 55 60

Asp Ser Ser Gly Asp Asp Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 115 120 125
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 130 135 140
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 145 150 155 160
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 165 170 175
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 180 185 190
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 195 200 205
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly
 210 215 220
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 245 250 255
 Val Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Gly Thr Met Gly Trp Tyr Arg
 260 265 270
 Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Leu Val Thr Ile Asp
 275 280 285
 Gly Ser Thr Asn Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 290 295 300
 Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Val Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu
 305 310 315 320
 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Asn Ile Arg Thr Gly
 325 330 335
 Trp Ser Ser Val Arg Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 340 345 350
 Ser Ser
 <210> 25
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 25
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Pro Pro Gly Glu

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

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 26

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

50					55					60					
Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu
65					70					75				80	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	His
				85					90					95	
Ile	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
			115												
<210>	27														
<211>	453														
<212>	PRT														
<213>	人工序列 (Artificial Sequence)														
<400>	27														
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1			5						10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	His	Thr	Phe	Ile	Ile	Tyr
			20						25					30	
Ala	Ile	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Phe	Val
			35						40					45	
Ala	Thr	Ile	Asn	Trp	Ser	Gly	Ser	Met	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50						55					60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90				95	
Ala	Ala	Tyr	Val	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Thr	Ala	His	Ser	Arg	Tyr	Asp
			100							105				110	
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
			115							120				125	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
			130											140	
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155				160	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165						170				175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180							185				190	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn

195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235
Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	245	250
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	260	265
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
	325	330
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	340	345
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
	355	360
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
385	390	395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	405	410
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	420	425
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	435	440
Ser Leu Ser Pro Gly		445
450		
<210> 28		
<211> 124		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 28		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly His Thr Phe Ile Ile Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Asn Trp Ser Gly Ser Met Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Tyr Val Gly Ala Thr Ile Ser Thr Ala His Ser Arg Tyr Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 29
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 29
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145	150	155	160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro			
	165	170	175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	180	185	190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	210	215	220
Pro Gly			
225			
<210> 30			
<211> 226			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 30			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Met			
	20	25	30
Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val			
	35	40	45
Ser Gly Ile Gly Trp Thr Ser Gly Leu Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Met Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Ala Asp Ser Met Asn Arg Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe			
	115	120	125
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val			
	130	135	140
Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp			
145	150	155	160
Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr			
	165	170	175
Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr			

	180		185		190
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val					
	195		200		205
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly					
	210		215		220
Glu Cys					
225					
<210> 31					
<211> 119					
<212> PRT					
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)					
<400> 31					
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1	5		10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Met					
	20		25		30
Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Phe Val					
	35		40		45
Ser Gly Ile Gly Trp Thr Ser Gly Leu Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val					
	50		55		60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Met Tyr					
65	70		75		80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Ala Asp Ser Met Asn Arg Gly Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly					
	100		105		110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115				

<210> 32

<211> 1443

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 32

```

gaggtgcagc  tggtcgaaaag  cggcggcgga  ctggtgcaac  cggcaattc  tctgaggctg  60
agctgtgccg  ctagegggett  caccttcagc  agcttcggca  tgagctgggt  cagacaagcc  120
cccggcaagg  gactggagtg  ggtgagctcc  atcagcggca  gcggaagcga  tactctgtac  180
gccgacagcg  tgaagggaag  gttcaccatc  tctagggaca  acgccaagac  cactctgtat  240
ctgcagatga  actctctgag  gcccgaggat  accgccgtgt  actactgcac  catcggcgga  300
tctctgagca  gaagcagcca  aggcactctg  gtcaccgtca  gcagcggcgg  aggcgggagc  360

```

ggaggcggag gctccggaca agtgcagctg gtgcagagcg gcgtggaggt gaagaaaccc 420
 ggcgctagcg tgaaggtgag ctgcaaggcc agcggctaca ccttcaccaa ctactacatg 480
 tattgggtga ggcaagcccc cggccaagga ctggagtgga tgggcggcat caatcccagc 540
 aacggcggca ccaacttcaa cgagaagttc aagaataggg tgaccctcac cactgatagc 600
 agcaccacca ccgcctacat ggagctgaag agcctccagt tcgacgatac cgccgtctac 660
 tactgcgcca gaagggacta taggttcgac atgggcttcg actattgggg ccaaggcacc 720
 actgtgaccg tgagcagcgc cagcactaag ggccctagcg tcttcctct ggcccctagc 780
 agcaagagca ccagcggagg aactgctgct ctgggctgtc tggatgaagga ctacttcccc 840
 gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggc gctctgacta gcggcgtgca cactttcccc 900
 gccgtgctgc agagcagcgg actgtactct ctgagcagcg tggatgactgt ccccagcagc 960
 tctctgggca ctcagaceta catctgcaac gtcaaccaca agcccagcaa caccaaggtc 1020
 gacaagaagg tcgagcctaa gagctgcggc ggaggcggga gcggaggcgg aggctccgga 1080
 caagtgcagc tgcaagagag cggaggagga ctggtccaag ctggaggctc tctgagactg 1140
 agctgcgtgg ccagcggcag catcttctcc atcggacca tgggctggta cagacaagcc 1200
 cccggcaagc agagggatct ggtggctctg gtgaccatcg atggcagcac caattacccc 1260
 gatagcgtga agggaagggt caccatctct agggacaacg tgaagaacac cgtggatctg 1320
 cagatgaact ctctggagcc cgaggatacc gccgtgtact actgcaatgc caacattagg 1380
 accggctgga gcagcgtgag gacttactgg ggccaaggca cccaagtgc tgtgtccagc 1440
 tga 1443

<210> 33

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 33

caagtgcagc tggatgcagag cggcgtggag gtgaagaaac ccggcgttag cgtgaaggtg 60
 agctgcaagg ccagcggcta caccttacc aactactaca tgtattgggt gaggcaagcc 120
 cccggccaag gactggagtg gatggcggc atcaatccca gcaacggcgg caccaacttc 180
 aacgagaagt tcaagaatag ggtgaccctc accactgata gcagcaccac caccgcctac 240
 atggagctga agagcctcca gttcagcat accgccgtct actactgcgc cagaagggac 300
 tataggttcg acatgggctt cgactattgg ggccaaggca ccaactgtgac cgtgagcagc 360

<210> 34

<211> 309

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 34

gccagcacta agggccctag cgttctccct ctggccccta gcagcaagag caccagcggc 60
 ggaactgctg ctctgggctg tctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 120
 tggaacagcg gcgctctgac tagcggcgtg cacacttcc ccgccgtgct gcagagcagc 180
 ggactgtact ctctgagcag cgtggtgact gtccccagca gctctctggg cactcagacc 240

tacatctgca acgtcaacca caagcccagc aacaccaagg tcgacaagaa ggtcgcgcct 300
aagagctgc 309
<210> 35
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 35
gaggtgcagc tggtcgaaaag cggcggcgga ctggtgcaac cggcaattc tctgaggctg 60
agctgtgccg ctagcggctt caccttcagc agcttcggca tgagctgggt cagacaagcc 120
cccggcaagg gactggagtg ggtgagctcc atcagcggca gcggaagcga tactctgtac 180
gccgacagcg tgaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagac cactctgtat 240
ctgcagatga actctctgag gcccaggat accgccgtgt actactgcac catcggcgga 300
tctctgagca gaagcagcca aggcactctg gtcaccgtca gcagc 345
<210> 36
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 36
caagtgcagc tgcaagagag cggaggagga ctggtccaag ctggaggctc tctgagactg 60
agctgcgtgg ccagcggcag catcttctcc atcggcacca tgggctggta cagacaagcc 120
cccggcaagc agagggatct ggtggctctg gtgaccatcg atggcagcac caattacccc 180
gatagcgtga agggaagggt caccatctct aggacaacg tgaagaacac cgtggatctg 240
cagatgaact ctctggagcc cgaggatacc gccgtgtact actgcaatgc caacattagg 300
accggctgga gcagcgtgag gacttactgg ggccaaggca cccaagtgc tgtgtccagc 360
tga 363
<210> 37
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 37
gagatcgtgc tgaccagag ccccgtact ctgtctctga gccccggcga gagagccact 60
ctgagctgta gagccagcaa aggcgtcagc accagcggct acagctatct gcaactgtac 120
cagcagaagc cggccaagc ccccagactg ctatctatc tggctagcta tctggagagc 180
ggcgtgcccc ccagattctc cggaagcggc agcggcaccg actttaccct caccatcagc 240
tctctggagc ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc actctagga tctgcctctg 300
acctttggcg gcggcactaa ggtggagatc aagaggaccg tcgccgcccc cagcgtgttc 360
atcttccctc ctagcgatga gcagctgaag agcggcactg ccagcgtcgt ctgtctgctg 420
aacaatttct acctagga ggccaaggtg cagtgaagg tggataacgc tctgcagagc 480
ggcaacagcc aagagtccgt caccgagcaa gatagcaaag atagcaccta cagcctcagc 540

agcactctga ctctgtccaa ggccgattac gagaagcaca aggtgtacgc ttgcgaggtg 600
actcaccaag gactgagcag ccccgtagacc aagagcttca ataggggcga gtgt 654

<210> 38

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 38

gagatcgtgc tgaccagag ccccgctact ctgtctctga gccccggcga gagagccact 60
ctgagctgta gagccagcaa aggcgtcagc accagcggt acagctatct gactgggtac 120
cagcagaagc cggccaagc cccagactg ctcctctatc tggctagcta tctggagagc 180
ggcgtgcccc ccagattctc cggaagcggc agcggcaccg actttaccct caccatcagc 240
tctctggagc ccgaggactt cgccgtgtac tactgccagc actctagggg tctgcctctg 300
acccttggcg gcggcactaa ggtggagatc aag 333

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 39

aggaccgtcg ccgccccag cgtgttcac ttcctccta gcgatgagca gctgaagagc 60
ggcactgcca gcgtcgtctg tctgctgaac aatttctacc ctagggaggc caaggtgcag 120
tggaaggtgg ataacgctct gcagagcggc aacagccaag agtccgtcac cgagcaagat 180
agcaaagata gcacctacag cctcagcagc actctgactc tgtccaaggc cgattacgag 240
aagcacaagg tgtacgttg cgaggtgact caccaaggac tgagcagccc cgtgaccaag 300
agcttcaata gggcgagtg t 321

<210> 40

<211> 669

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 40

caagtgcagc tggcgcagag cggcgtggag gtgaagaaac ccggcgctag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta cacctcacc aactactaca tgtattgggt gaggcaagcc 120
cccggccaag gactggagtg gatgggcggc atcaatecca gcaacggcgg caccaacttc 180
aacgagaagt tcaagaatag ggtgaccctc accactgata gcagcaccac caccgcctac 240
atggagctga agagcctcca gttcgacgat accgccgtct actactgcgc cagaaggagc 300
tataggttcg acatgggctt cgactattgg ggccaaggca cactgtgac cgtgagcagc 360
gccagcacta agggccctag cgtcttcct ctggccccta gcagcaagag caccagcggg 420
ggaactgctg ctctgggctg tctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 480
tggaacagcg gcgctctgac tagcggcgtg cacacttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggactgtact ctctgagcag cgtgggtgact gtccccagca gctctctggg cactcagacc 600

tacatctgca acgtcaacca caagcccagc aacaccaagg tcgacaagaa ggtcgcgcct 660
aagagctgc 669

<210> 41

<211> 1425

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 41

gaggtgcagc tggtcgaaaag cggcggcgga ctggtgcaac cggcaattc tctgaggctg 60
agctgtgccg ctagcggcctt caccttcagc agcttcggca tgagctgggt cagacaagcc 120
cccggcaagg gactggagtg ggtgagctcc atcagcggca gcggaagcga tactctgtac 180
gccgacagcg tgaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagac cactctgtat 240
ctgcagatga actctctgag gcccaggat accgccgtgt actactgcac catcggcgga 300
tctctgagca gaagcagcca aggcactctg gtcaccgtca gcagcggcgg aggcgggagc 360
ggaggcggag gctccggaga gatcgtgctg acccagagcc ccgctactct gtctctgagc 420
cccggcgaga gagccactct gagctgtaga gccagcaaag gcgtcagcac cagcggctac 480
agctatctgc actggtacca gcagaagccc ggccaagccc ccagactgct catctatctg 540
gctagctatc tggagagcgg cgtgcccgcc agattctccg gaagcggcag cggcaccgac 600
tttaccctca ccatcagctc tctggagccc gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcac 660
tctagggatc tgctctgac ctttggcggc ggcactaagg tggagatcaa gaggaccgtc 720
gccgccccca gcgtgttcat cttccctcct agcgatgagc agctgaagag cggcactgcc 780
agcgtcgtct gtctgctgaa caatttctac ctagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg 840
gataacgctc tgcagagcgg caacagccaa gagtccgtca ccgagcaaga tagcaaagat 900
agcacctaca gcctcagcag cactctgact ctgtccaagg ccgattacga gaagcacaag 960
gtgtacgctt gcgaggtgac tcaccaagga ctgagcagcc ccgtgaccaa gagcttcaat 1020
agggcgagtg gtggcggagg cgggagcggga ggcgaggct ccggacaagt gcagctgcaa 1080
gagagcggag gaggactggt ccaagctgga ggctctctga gactgagctg cgtggccagc 1140
ggcagcatct tctccatcgg caccatgggc tggtagacac aagccccgg caagcagagg 1200
gatctggtgg ctctggtgac catcgtggc agcaccaatt accccgatag cgtgaaggga 1260
aggttcacca tctctaggga caacgtgaag aacaccgtgg atctgcagat gaactctctg 1320
gagcccggag ataccgccgt gtactactgc aatgccaaca ttaggaccgg ctggagcagc 1380
gtgaggactt actggggcca aggcacccaa gtgactgtgt ccagc 1425

<210> 42

<211> 1437

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 42

gaggtgcagc tggtcgaaaag cggcggcgga ctggtgcaac cggcaattc tctgaggctg 60
agctgtgccg ctagcggcctt caccttcagc agcttcggca tgagctgggt cagacaagcc 120
cccggcaagg gactggagtg ggtgagctcc atcagcggca gcggaagcga tactctgtac 180

gccgacagcg tgaaggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagac cactctgtat 240
 ctgcagatga actctctgag gcccgaggat accgccgtgt actactgcac catcggcgga 300
 tctctgagca gaagcagcca aggcactctg gtcaccgtca gcagcggcgg aggcgggagc 360
 ggaggcggag gctccggaga ggtccagctg gtcgaatccg gcggaggact ggtccaacce 420
 ggcggatctc tgagactcag ctgcgctgcc agcggctaca ccttcaccaa ctacggcatg 480
 aactgggtga ggcaagcccc cggcaaagga ctggagtggg tgggctggat caacacctac 540
 actggcgaac ccacctacgc cgccgacttc aagaggagat tcaccttctc tctggacacc 600
 tccaagagca ccgcttatct gcagatgaac tctctgaggg ccgaggatac cgccgtctac 660
 tactgcgcca agtaccctca ctactacggc agcagccact ggtacttcga tgtgtggggc 720
 caaggcactc tggtcactgt cagcagcgc agcactaagg gccctagcgt cttccctctg 780
 gccctagca gcaagagcac cagcggagga actgctgctc tgggctgtct ggtgaaggac 840
 tacttccccg agccccgtgac cgtgagctgg aacagcggcg ctctgactag cggcgtgcac 900
 actttccccg ccgtgctgca gagcagcggc ctgtactctc tgagcagcgt ggtgactgtc 960
 ccagcagct ctctgggcac tcagacctac atctgcaacg tcaaccacaa gccagcaac 1020
 accaaggctg acaagaaggt cgagcctaag agctgcggcg gaggcgggag cggaggcggga 1080
 ggctccggag aggtccagct gcaagagagc ggcggaggac tgggtgcaacc cggcggctct 1140
 ctgagactca gctgtgccgc cagcggcttc accttcagca gctactggat gtactggctc 1200
 agacaagccc ccggcaaagg actggaatgg gtgtccagca tcaacagcga cagcagcagc 1260
 acctactata gggatagcgt caaggaagg ttcaccatct ctagggacaa cgccaagaac 1320
 actctgtatc tgcagatgaa ctctctgaag agcaggata ccgccgtgta ctactgcgcc 1380
 aaggatcccg gcggctatgc taaaggccaa ggcactcaag tcaactgtgag cagctga 1437

<210> 43

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 43

gaggtccagc tggtcgaatc cggcggagga ctggtccaac ccggcggatc tctgagactc 60
 agctgcgctg ccagcggcta caccttacc aactacggca tgaactgggt gaggcaagcc 120
 cccggcaaaag gactggagtg ggtgggctgg atcaacacct aactggcga acccacctac 180
 gccgccgact tcaagaggag attcacctc tctctggaca cctccaagag caccgcttat 240
 ctgcagatga actctctgag ggccgaggat accgccgtct actactgcgc caagtaccct 300
 cactactacg gcagcagcca ctggtacttc gatgtgtggg gccaaggcac tctggtcact 360
 gtcagcagcg ccagcactaa gggccctagc gtcttccctc tggcccctag cagcaagagc 420
 accagcggag gaactgctgc tctgggetgt ctggtgaagg actacttccc cgagccccgtg 480
 accgtgagct ggaacagcgg cgtctgact agcggcgtgc aactttccc cgccgtgctg 540
 cagagcagcg gactgtactc tctgagcagc gtggtgactg tccccagcag ctctctgggc 600
 actcagacct acatctgcaa cgtaaccac aagcccagca acaccaaggt cgacaagaag 660
 gtcgagccta agagctgc 678

<210> 44

<211> 345

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 44

gaggtccagc tgcaagagag cggcggagga ctggtgcaac ccggcggctc tctgagactc 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgtactggct cagacaagcc 120
 cccggcaaag gactggaatg ggtgtccagc atcaacagcg acagcagcag cacctactat 180
 agggatagcg tcaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagaa cactctgtat 240
 ctgcagatga actctctgaa gagcaggat accgccgtgt actactgcmc caaggatccc 300
 ggcggctatg ctaaaggcca aggcactcaa gtcactgtga gcagc 345

<210> 45

<211> 1023

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 45

gatatccaga tgactcagag ccctagctct ctgagcgccta gcgtgggaga tagggtgact 60
 atcacttggt ccgccagcca agatatctcc aactacctca actggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaggctc ccaaggtgct gatctacttc acctctcttc tgcacagcgg cgtgcctagc 180
 agatthttccg gcagcggctc cggcaccgat ttactctgta ctatcagctc tctgcagccc 240
 gaggatthtcg ccacctacta ctgccagcag tactccaccg tgccctggac thtcggccaa 300
 ggcaccaagg tcgagatcaa gaggaccgtc gccgccccca gcgtgttcat ctccctctct 360
 agcgatgagc agctgaagag cggcactgcc agcgtcgtct gtctgctgaa caatthctac 420
 cctagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gataacgctc tgcagagcgg caacagccaa 480
 gagtccgtca ccgagcaaga tagcaaagat agcacctaca gcctcagcag cactctgact 540
 ctgtccaagg ccgattacga gaagcacaag gtgtacgctt gcgaggtgac tcaccaagga 600
 ctgagcagcc ccgtgaccaa gagcttcaat agggcgaggt gtggcggagg cgggagcggga 660
 ggcggaggct ccggagaggt ccagctgcaa gagagcggcg gaggactggt gcaaccggc 720
 ggctctctga gactcagctg tgccgccagc ggcttacct tcagcagcta ctggatgtac 780
 tggctcagac aagcccccg caaaggactg gaatgggtgt ccagcatcaa cagcagcagc 840
 agcagcacct actatagga tagcgtcaag ggaaggttca ccactcttag ggacaacgcc 900
 aagaacactc tgtatctgca gatgaactct ctgaagagcg aggataccgc cgtgtactac 960
 tgcgccaagg atccccggcg ctatgctaaa ggccaaggca ctcaagtcac tgtgagcagc 1020
 tga 1023

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 46

gatatccaga tgactcagag ccctagctct ctgagcgccta gcgtgggaga tagggtgact 60

atcacttggt cccagcca agatatctcc aactacctca actggtacca gcagaagccc 120
 ggcaaggctc ccaaggtgct gatctacttc acctctcttc tgcacagcgg cgtgcctagc 180
 agattttccg gcagcggctc cggcaccgat ttactctga ctatcagctc tctgcagccc 240
 gaggatttcg ccacctacta ctgccagcag tactccaccg tgccttgac tttcggccaa 300
 ggcaccaagg tcgagatcaa g 321

<210> 47

<211> 1032

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 47

gaggtccagc tgcaagagag cggcggagga ctggtgcaac ccggcggctc tctgagactc 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgtactggct cagacaagcc 120
 cccggcaaag gactggaatg ggtgtccagc atcaacagcg acagcagcag cacctactat 180
 agggatagcg tcaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagaa cactctgtat 240
 ctgcagatga actctctgaa gagcaggat accgccgtgt actactgcgc caagatccc 300
 ggcggctatg ctaaaggcca aggcactcaa gtcactgtga gcagcggcag cactaagggc 360
 cctagcgtct tccctctggc ccctagcagc aagagcacca gcggaggaac tgctgctctg 420
 ggctgtctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgagctgga cagcggcgt 480
 ctgactagcg gcgtgcacac tttccccgcc gtgctgcaga gcagcggact gtactctctg 540
 agcagcgtgg tgactgtccc cagcagctct ctgggcactc agacctacat ctgcaacgtc 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaggtcgac aagaaggtcg agcctaagag ctgcggcgga 660
 ggccgggagcg gaggcggagg ctccggagag gtgcagctgg tcgaaagcgg cggcggactg 720
 gtgcaaccgg gcaattctct gaggctgagc tgtgccgcta gcggcttcac cttcagcagc 780
 ttcggcatga gctgggtcag acaagcccc ggcaaggac tggagtgggt gagctccatc 840
 agcggcagcg gaagcgatac tctgtacgcc gacagcgtga agggaaggtt caccatctct 900
 agggacaacg ccaagaccac tctgtatctg cagatgaact ctctgaggcc cgaggatacc 960
 gccgtgtact actgcacat cggcggatct ctgagcagaa gcagccaagg cactctggtc 1020
 accgtcagca gc 1032

<210> 48

<211> 672

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 48

caagtgcagc tgcaagagag cggaggagga ctggtgcaag ctggagactc tctgaggctg 60
 agctgtatcg gctctaggag gaccttcaact atggcttgggt ttaggcaagc ccccggcaag 120
 gagagggagt tcgtcgccgg catttgggga cccgccgatc ataccatcta cgccaacagc 180
 gtgaagggca gattcgcttg ctctagggat gacagcacca acaccatctt tctgcagatg 240
 aactctctgg agctggagga taccgctctg tatctgtgtg ccgccgccga ttccagcggc 300
 gatgatttcg agtactgggg ccaaggcacc caagtactg tgagcagcag gaccgtcgcc 360

gccccagcg tgttcatctt ccctcctagc gatgagcagc tgaagagcgg cactgccagc 420
 gtcgtctgtc tgctgaacaa tttctaccct agggaggcca aggtgcagtg gaaggtggat 480
 aacgctctgc agagcggcaa cagccaagag tccgtcaccg agcaagatag caaagatagc 540
 acctacagcc tcagcagcac tctgactctg tccaaggccg attacgagaa gcacaaggtg 600
 tacgcttgcg aggtgactca ccaaggactg agcagccccg tgaccaagag cttcaatagg 660
 ggcgagtgtt ga 672

<210> 49

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 49

caagtgcagc tgcaagagag cggaggagga ctggtgcaag ctggagactc tctgaggctg 60
 agctgtatcg gctctaggag gacettcact atggcttggg ttaggcaagc ccccggcaag 120
 gagagggagt tcgtcgccgg catttgggga cccgccgatc ataccatcta cgccaacagc 180
 gtgaagggca gattcgcttg ctctagggat gacagacca acaccatctt tctgcagatg 240
 aactctctgg agctggagga taccgctctg tatctgtgtg ccgccgccga ttccagcggc 300
 gatgatctcg agtactgggg ccaaggcacc caagtgactg tgagcagc 348

<210> 50

<211> 1017

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 50

gaggtccagc tgcaagagag cggcggagga ctggtgcaac ccggcggctc tctgagactc 60
 agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgtactggct cagacaagcc 120
 cccggcaaaag gactggaatg ggtgtccagc atcaacagcg acagcagcag cacctactat 180
 agggatagcg tcaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagaa cactctgtat 240
 ctgcagatga actctctgaa gagcaggat accgccgtgt actactgccc caaggatccc 300
 ggcggctatg ctaaaggcca aggcactcaa gtcactgtga gcagcggcag cactaagggc 360
 cctagcgtct tccctctggc ccctagcagc aagagacca gcggaggaa tgctgctctg 420
 ggctgtctgg tgaaggacta cttccccgag cccgtgaccg tgagctggaa cagcggcgct 480
 ctgactagcg gctgcacac tttccccgcc gtgctgcaga gcagcggact gtactctctg 540
 agcagcgtgg tgactgtccc cagcagctct ctgggactc agacctacat ctgcaacgctc 600
 aaccacaagc ccagcaacac caaggtcgac aagaaggtcg agcctaagag ctgcaataag 660
 acccataacc aggtgcagct ggtcgaaagc ggcggcggac tgggtgcaacc cggcaattct 720
 ctgaggctga gctgtgccg tagcggcttc accttcagca gcttcggcat gagctgggtc 780
 agacaagccc ccggcaaggg actggagtgg gtgagctcca tcagcggcag cggaagcgat 840
 actctgtacg ccgacagcgt gaagggaagg ttcaccatct ctagggaaa cgccaagacc 900
 actctgtatc tgcatatgaa ctctctgagg cccgaggata ccgccgtgta ctactgcacc 960
 atcggcggat ctctgagcag aagcagccaa ggcactctgg tcaccgtcag cagctga 1017

<210> 51

<211> 1068

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 51

```

gaggtccagc tgcaagagag cggcggagga ctggtgcaac ccggcggctc tctgagactc 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc agctactgga tgtactggct cagacaagcc 120
cccggcaaaag gactggaatg ggtgtccagc atcaacagcg acagcagcag cacctactat 180
agggatagcg tcaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagaa cactctgtat 240
ctgcagatga actctctgaa gagcaggat accgccgtgt actactgcbc caaggatccc 300
ggcggctatg ctaaaggcca aggcaactca gtcactgtga gcagcggcgg aggcgggagc 360
ggaggcggag gctccggagc cagcactaag ggccctagcg tcttccctct ggcccctagc 420
agcaagagca ccagcggagg aactgctgct ctgggctgtc tgggtaagga ctacttcccc 480
gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggc gctctgacta gcggcgtgca cactttcccc 540
gccgtgctgc agagcagcgg actgtactct ctgagcagcg tgggtactgt ccccagcagc 600
tctctgggca ctcagaccta catctgcaac gtcaaccaca agcccagcaa caccaaggtc 660
gacaagaagg tcgagcctaa gagctgcggc ggaggcggga gcggaggcgg aggctccgga 720
gaggtgcagc tggtcgaaaag cggcggcggga ctggtgcaac ccggcaattc tctgaggctg 780
agctgtgccg ctagcggctt caccttcagc agcttcggca tgagctgggt cagacaagcc 840
cccggcaagg gactggagtg ggtgagctcc atcagcggca gcggaagcga tactctgtac 900
gccgacagcg tgaagggaag gttcaccatc tctagggaca acgccaagac cactctgtat 960
ctgcagatga actctctgag gcccaggat accgccgtgt actactgcac catcggcggga 1020
tctctgagca gaagcagcca aggcaactct gtcaccgtca gcagctga 1068

```

<210> 52

<211> 705

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 52

```

caagtgcagc tgcaagagag cggaggagga ctggtgcaag ctggagactc tctgaggctg 60
agctgtatcg gctctaggag gaccttact atggcttgggt ttaggcaagc ccccggcaag 120
gagagggagt tcgtcgccgg catttgggga cccgccgac ataccatcta cgccaacagc 180
gtgaagggca gattcgcttg ctctaggat gacagacca acaccatctt tctgcagatg 240
aactctctgg agctggagga taccgctctg tatctgtgtg ccgccgccga ttccagcggc 300
gatgatattcg agtactgggg ccaaggcacc caagtgactg tgagcagcgg cggaggcggg 360
agcggaggcg gaggtccgg aaggaccgtc gccgccccca gcgtgttcat ctccctctct 420
agcgatgagc agctgaagag cggcaactgcc agcgtctctt gtctgctgaa caatttctac 480
cctagggagg ccaagggtgca gtggaaggtg gataacgctc tgcagagcgg caacagccaa 540
gagtcgtca ccgagcaaga tagcaaagat agcacctaca gcctcagcag cactctgact 600
ctgtccaagg ccgattacga gaagcacaag gtgtacgctt gcgaggtgac tcaccaagga 660

```

ctgagcagcc ccgtgaccaa gagcttcaat aggggcgagt gttga 705
 <210> 53
 <211> 1062
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 53
 caagtgcagc tgcaagagag cggaggagga ctggtgcaag ctggagactc tctgaggctg 60
 agctgtatcg gctctaggag gaccttcaact atggcttggg ttaggcaagc ccccggcaag 120
 gagagggagt tcgtcgccgg catttgggga cccgccgac ataccatcta cgccaacagc 180
 gtgaagggca gattcgcttg ctctagggat gacagacca acaccatctt tctgcagatg 240
 aactctctgg agctggagga taccgctctg tatctgtgtg ccgccgccga ttccagcggc 300
 gatgatttcg agtactgggg ccaaggcacc caagtgactg tgagcagcag gaccgtcgcc 360
 gccccagcg tgttcatctt cctcctagc gatgagcagc tgaagagcgg cactgccagc 420
 gtcgtctgtc tgctgaacaa tttctaccct agggaggcca aggtgcagtg gaaggtggat 480
 aacgctctgc agagcggcaa cagccaagag tccgtcaccg agcaagatag caaagatagc 540
 acctacagcc tcagcagcac tctgactctg tccaaggccg attacgagaa gcacaaggtg 600
 tacgcttgcg aggtgactca ccaaggactg agcagccccg tgaccaagag cttcaatagg 660
 ggcgagtgtg gcggaggcgg gagcggaggc ggaggctccg gacaagtgca gctgcaagag 720
 agcggaggag gactggtcca agctggaggc tctctgagac tgagctgcgt ggccagcggc 780
 agcatcttct ccatcggcac catgggctgg tacagacaag cccccgcaa gcagagggat 840
 ctggtggctc tggtgacat cgatggcagc accaattacc ccgatagcgt gaaggggaag 900
 ttcaccatct ctagggacaa cgtgaagaac accgtggatc tgcagatgaa ctctctggag 960
 cccgaggata ccgccgtgta ctactgcaat gccaacatta ggaccggctg gagcagcgtg 1020
 aggacttact ggggccaagg cacccaagtg actgtgtcca gc 1062
 <210> 54
 <211> 672
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 54
 caagtgcagc tggtgaaaag cggaggaggc ctctgtcctc ccggcgagtc tctgagactc 60
 agctgcgctg cctccggagc catctttagg atcaacactg gcgcttggtgta cagacaagcc 120
 cccggcaagc agagagagct ggtcgcctct ctgaccactt acggcaagac tacctatgcc 180
 gacttcgtga agggaagggt caccatctct agggatgacg ccaagaacac cgtgtatctg 240
 cagatgaact ctctgaagcc cgaggatacc gccatctact attgccacat cggccccgag 300
 cctaggtatg gctactgggg ccaaggcacc caagtgactg tgagcagcag gaccgtcgcc 360
 gccccagcg tgttcatctt cctcctagc gatgagcagc tgaagagcgg cactgccagc 420
 gtcgtctgtc tgctgaacaa tttctaccct agggaggcca aggtgcagtg gaaggtggat 480
 aacgctctgc agagcggcaa cagccaagag tccgtcaccg agcaagatag caaagatagc 540
 acctacagcc tcagcagcac tctgactctg tccaaggccg attacgagaa gcacaaggtg 600

tacgcttgcg aggtgactca ccaaggactg agcagccccg tgaccaagag cttcaatagg 660
ggcgagtgtt ga 672

<210> 55

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 55

caagtgcagc tggatgaaaag cggaggaggc ctcgtgcctc ccggcgagtc tctgagactc 60
agctgcgctg cctccggagc catctttagg atcaacactg gcgcttggtg cagacaagcc 120
cccggcaagc agagagagct ggtcgcctct ctgaccactt acggcaagac tacctatgcc 180
gacttcgtga agggaaggtt caccatctct agggatgacg ccaagaacac cgtgtatctg 240
cagatgaact ctctgaagcc cgaggatacc gccatctact attgccacat cggccccgag 300
cctaggtatg gctactgggg ccaaggcacc caagtgactg tgagcagc 348

<210> 56

<211> 1359

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 56

caagtgcaac tcgtgaaaag cggaggagga ctcgtcaagc ccggcggaag cctcagactg 60
agctgtgccg ccagcggaca cacattcatc atctacgcca tcggctggtt taggcaagcc 120
cccggcaagg gactggagtt cgtggccaca atcaactggt ccggctccat gacaaactac 180
gccgacagcg tgaagggaag gttcactatc agcagagata acgccaagaa cacagtgtat 240
ctgcagatga actccctcaa gccagacgat acagctgtgt actactgcmc cgcttacgtg 300
ggcgctacta tcagcacagc tctcttagg tacgactatt ggggacaagg cactctggtc 360
actgtcagca gcgccagcac aaaaggccct tccgtcttc ctctcgctcc aagctccaaa 420
agcacatccg gaggaacagc cgctctgggc tgtctggtga aggactatth cccagagcca 480
gtgacagtga gctggaatag cggagctctg acaagcggcg tgcatacatt cccagctgtg 540
ctgcagagca gcggcctcta ctctctgagc tccgtggtca cagtgcctag ctctctctg 600
ggaacacaga cttacatctg caacgtcaat cataaacat ccaacactaa ggtcgacaag 660
aaggtcgagc caaagagctg cgacaagaca cacacatgcc caccttgccc agccccagag 720
gccgctggag gaccaagcgt gtttctgttc ccacctaagc caaaggacac actgatgatc 780
tctaggactc cagaggtgac ttgtgtggtc gtggatgtca gccacgagga tccagaggtc 840
aagttcaact ggtacgtgga tggagtcgag gtgcacaacg ctaagactaa gcctagggag 900
gagcagtaca acagcacata tagggtcgtg agcgtgctga cagtctcca tcaagactgg 960
ctcaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc agcaaaaag ctctgccagc cccaatcgag 1020
aaaactatct ccaaggctaa gggccagcca agggagccac aagtgtatac actgccacca 1080
tctagggag agatgactaa gaaccaagtg agcctecat gcctcgtgaa gggcttctac 1140
cctagcgata ttgccgtgga atgggaaagc aacggccagc cagagaacaa ctataagaca 1200
acaccaccag tgctggactc cgatggatcc ttctttctgt acagcaagct gactgtcgac 1260

aagtctaggt ggcagcaagg caacgtgttc agctgtagcg tcatgcacga ggctctgcac 1320
 aaccactaca cacaaaagtc tctgtctctg agccccggc 1359

<210> 57

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 57

caagtgaac tcgtggaaag cggaggagga ctctcaagc ccggcgggaag cctcagactg 60
 agctgtgccg ccagcggaca cacattcatt atctacgcca tcggctggtt taggcaagcc 120
 cccggcaagg gactggagtt cgtggccaca atcaactggt ccggctccat gacaaactac 180
 gccgacagcg tgaagggaag gttcactatc agcagagata acgccaagaa cacagtgtat 240
 ctgcagatga actccctcaa gccagacgat acagctgtgt actactgcgc cgcttacgtg 300
 ggcgctacta tcagcacagc tcaactctagg tacgactatt ggggacaagg cactctggtc 360
 actgtcagca gc 372

<210> 58

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 58

gacaagacac acacatgcc accttgccca gccccagagg ccgctggagg accaagcgtg 60
 tttctgttcc cacctaagcc aaaggacaca ctgatgatct ctaggactcc agaggtgact 120
 tgtgtggctc tggatgtcag ccacaggat ccagaggta agttcaactg gtacgtggat 180
 ggagtcgagg tgcacaacgc taagactaag cctagggagg agcagtacaa cagcacatat 240
 agggctcgtg gcgtgctgac agtcctccat caagactggc tcaacggcaa ggaatacaag 300
 tgcaaggcca gcaacaaagc tctgccagcc ccaatcgaga aaactatctc caaggctaag 360
 ggccagccaa gggagccaca agtgatata ctgccacat ctagggaaga gatgactaag 420
 aaccaagtga gcctcacatg cctcgtgaag ggcttctacc ctacgatat tgccgtggaa 480
 tgggaaagca acgcccagcc agagaacaac tataagacaa caccaccagt gctggactcc 540
 gatggatcct tctttctgta cagcaagctg actgtcgaca agtctagggt gcagcaaggc 600
 aacgtgttca gctgtagcgt catgcacgag gctctgcaca accactacac acaaaagtct 660
 ctgtctctga gccccggc 678

<210> 59

<211> 678

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 59

gaagtgcagc tggctcgagag cggaggagga ctctgcagc ccggcggcag cctcagactc 60
 agctgtgccg ccagcgggaag gactttcagc agcatgacta tcggctggtt taggcaagcc 120
 cccggcaagg gactggagtt tgtctccggc atcggctgga catccggact gacagtctat 180

gccgacagcg tgaaggaag gttcactatc tctagggaca acgccaagaa ctccatgtat 240
ctgcagatga actctctgag ggctgaagac acagccgtgt actactgcgc cgctgattcc 300
atgaataggg gccagttcga ctactggggc caaggcactc tgggtactgt ctccagcaga 360
acagtggccg ccccttccgt cttcatcttt cctccaagcg acgagcagct caaaagcgga 420
actgccagcg tcgtctgtct gctgaacaac ttctacccta gagaggccaa ggtccagtgg 480
aaggtcgaca atgctctgca gtccggcaac agccaagagt ccgtgactga gcaagacagc 540
aaggacagca cttattctct gtccagcact ctactctca gcaaggctga ctacgagaag 600
cacaaggtct atgcttgtga ggtgactcac caaggactgt ccagcccagt gactaagagc 660
ttcaataggg gagagtgt 678

<210> 60

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 60

gaagtgcagc tggctcgagag cggaggagga ctctgtcagc ccggcggcag cctcagactc 60
agctgtgccg ccagcgggaag gactttcagc agcatgacta tcggctggtt taggcaagcc 120
cccggaagg gactggagtt tgtctccggc atcggctgga catccggact gacagtctat 180
gccgacagcg tgaaggaag gttcactatc tctagggaca acgccaagaa ctccatgtat 240
ctgcagatga actctctgag ggctgaagac acagccgtgt actactgcgc cgctgattcc 300
atgaataggg gccagttcga ctactggggc caaggcactc tgggtactgt ctccagc 357

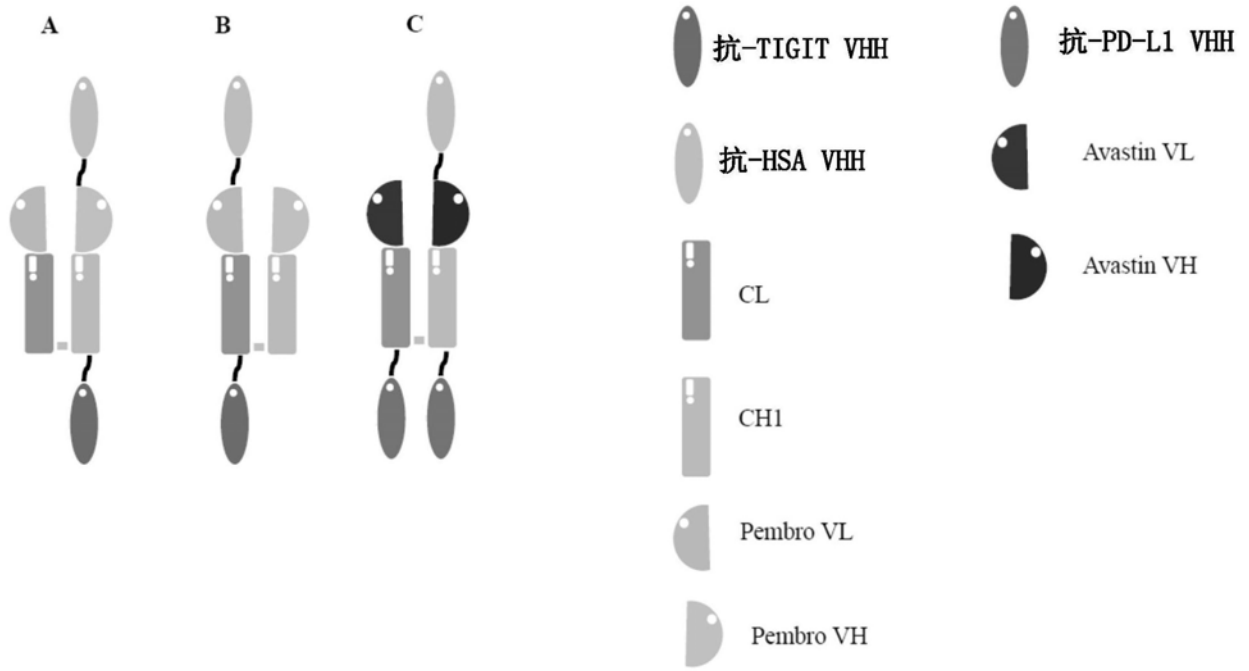


图1

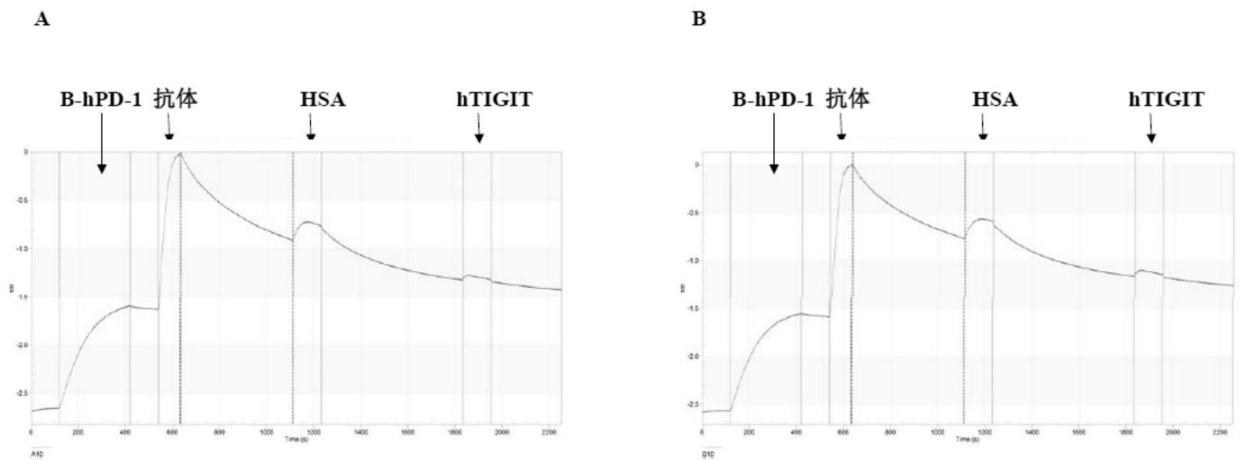


图2

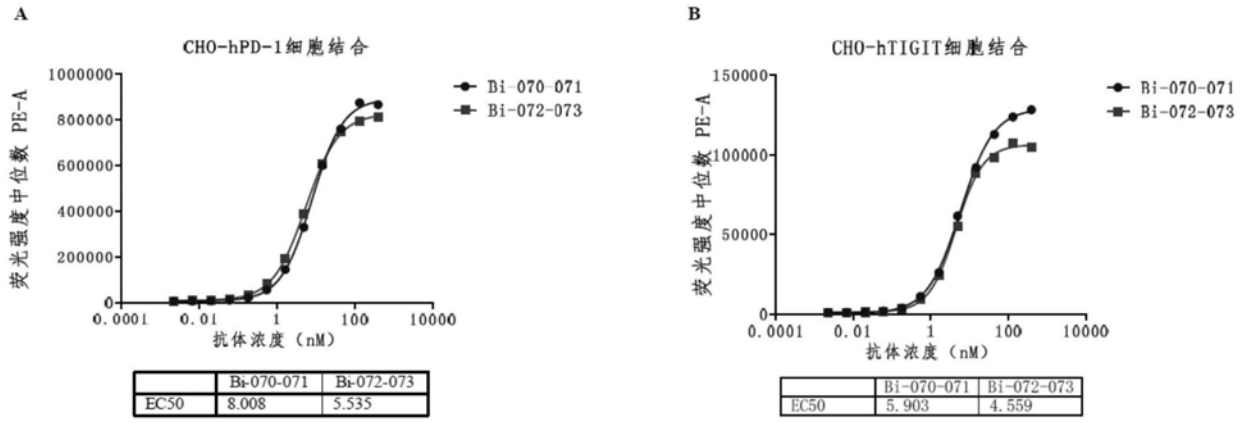


图3

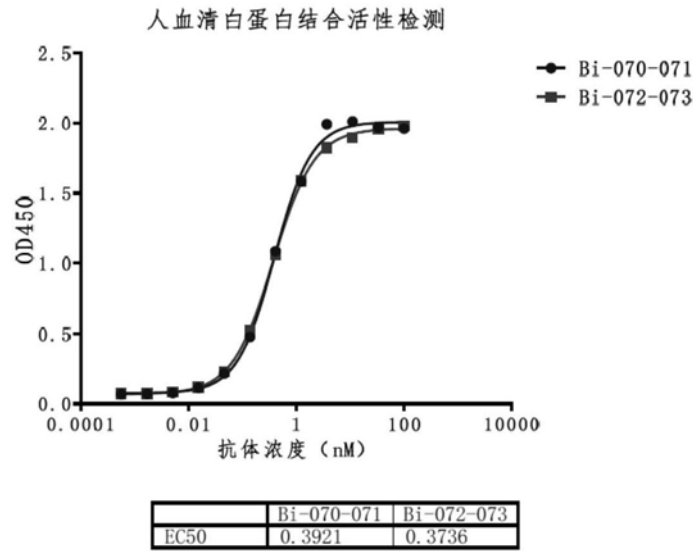


图4

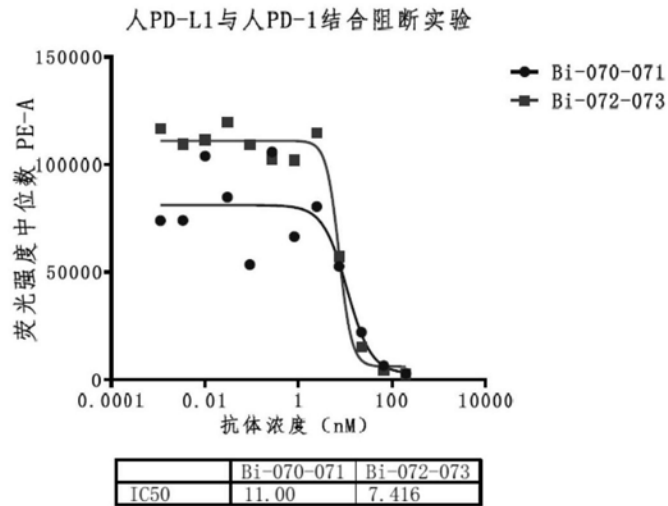


图5

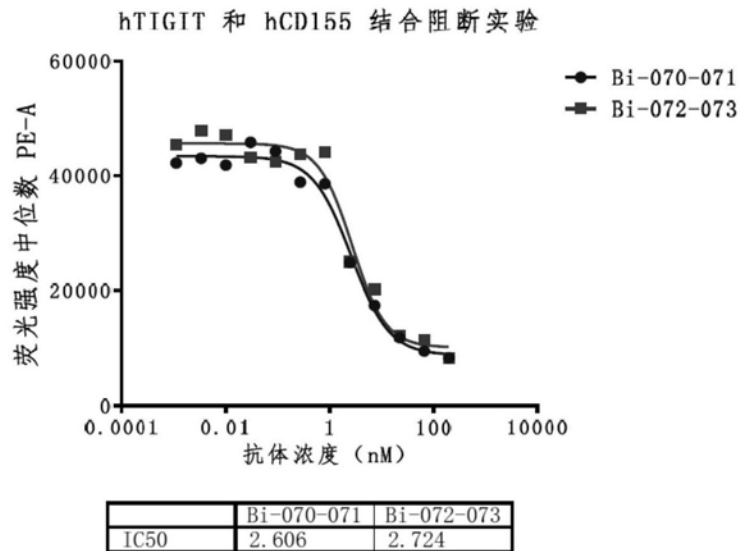


图6

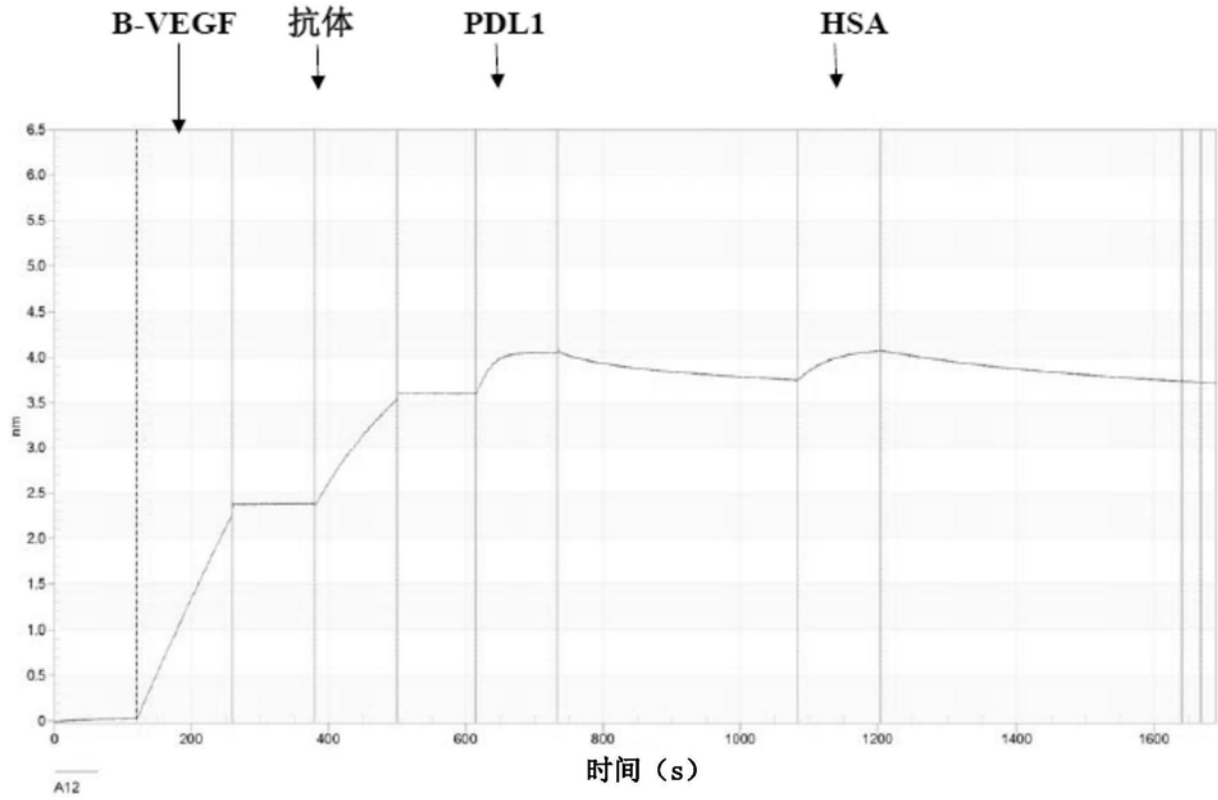


图7

CHO-hPD-L1细胞结合

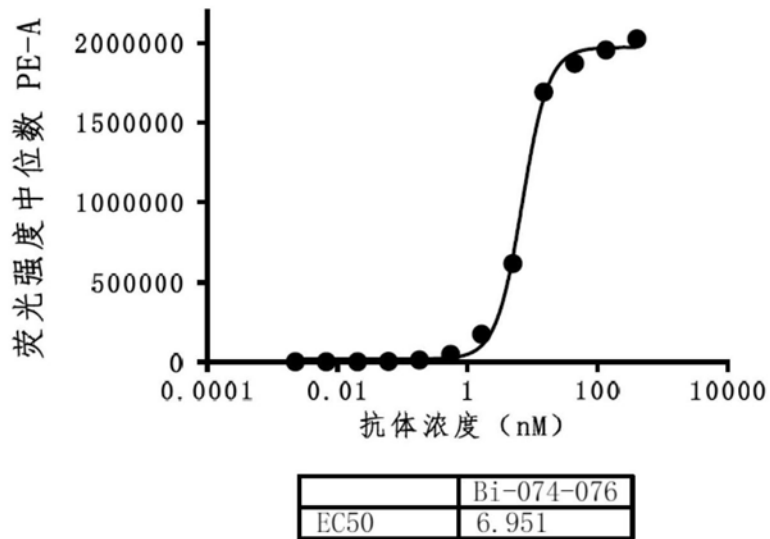


图8

人血清白蛋白结合活性检测

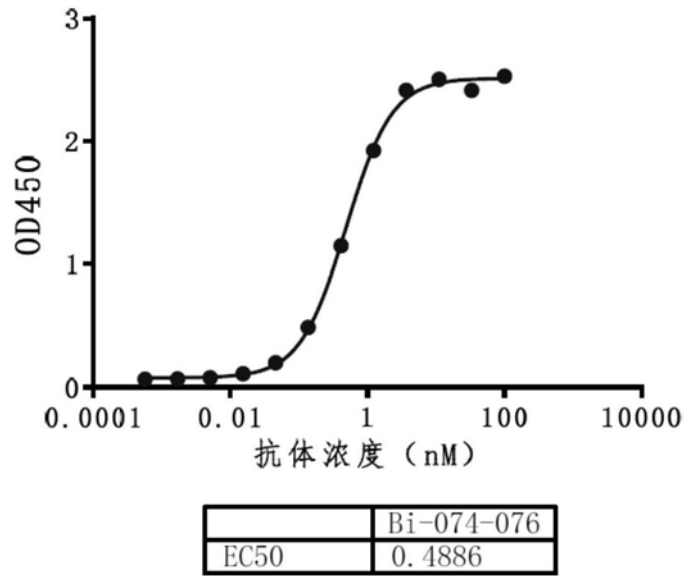


图9

VEGF结合实验

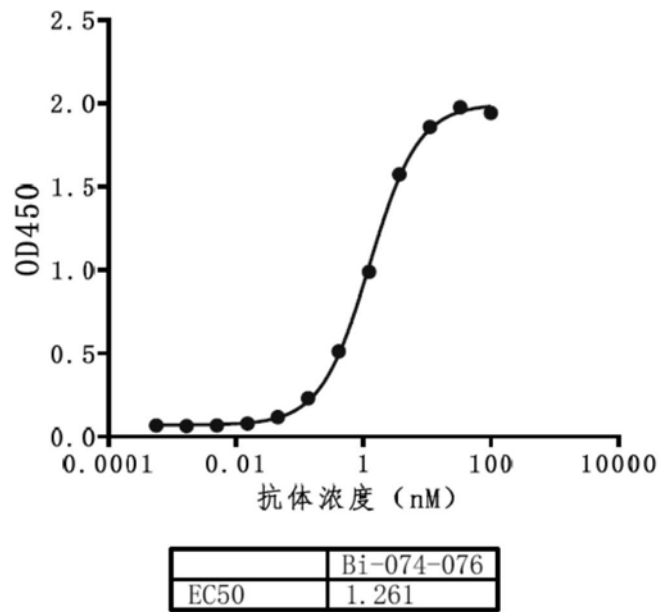


图10

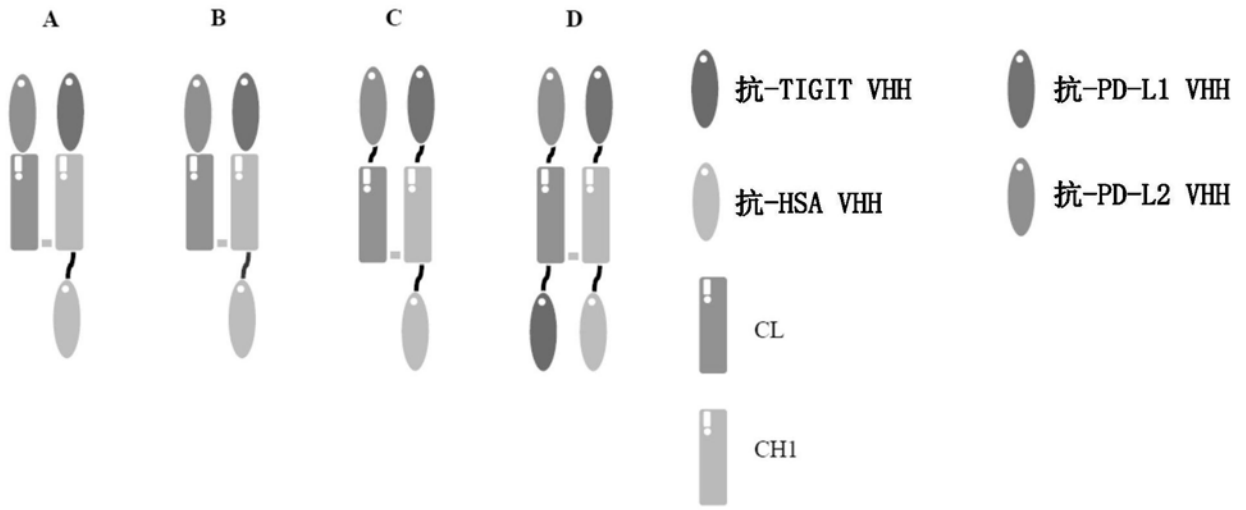


图11

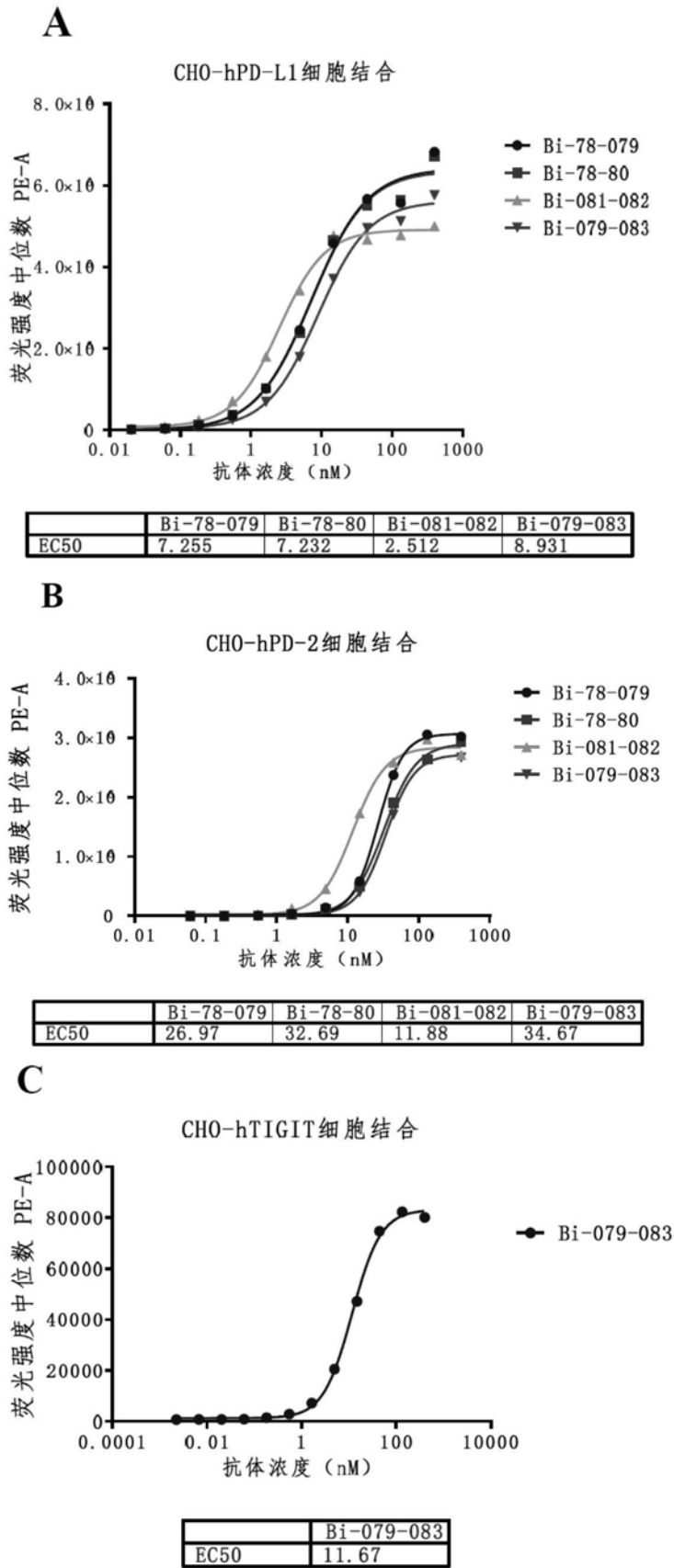
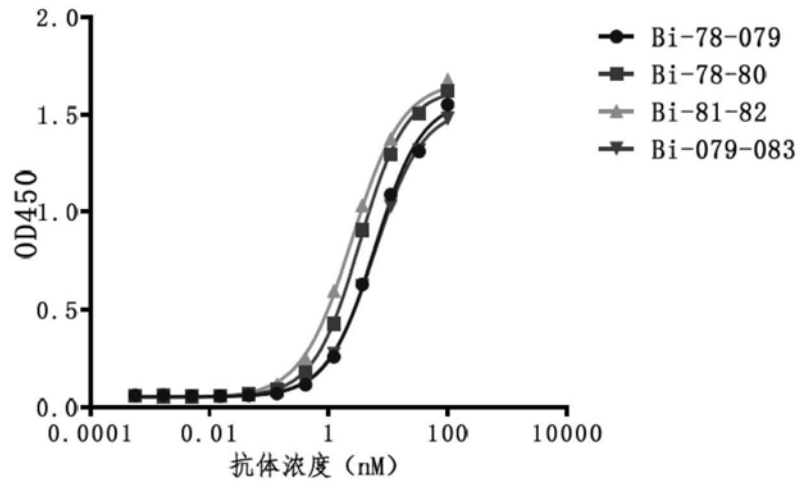


图12

人血清白蛋白结合活性检测



	Bi-78-079	Bi-78-80	Bi-81-82	Bi-079-083
EC50	6.017	3.368	2.492	5.996

图13

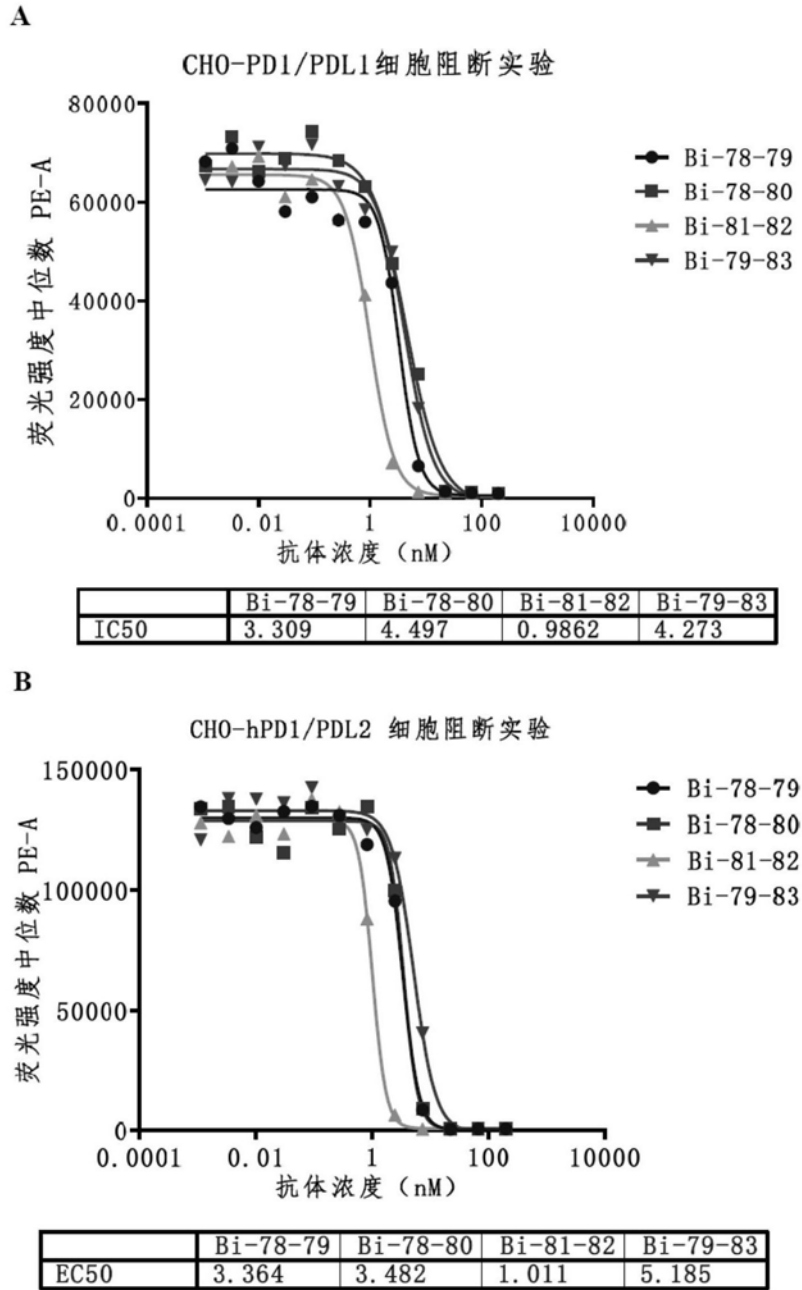


图14

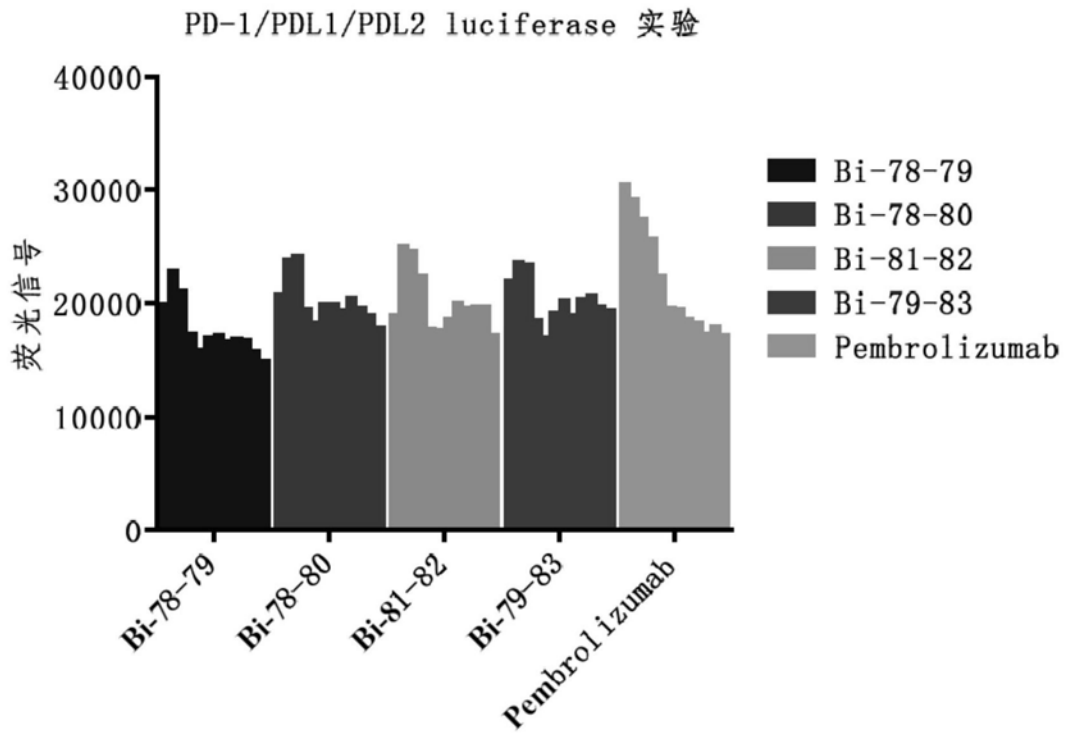


图15

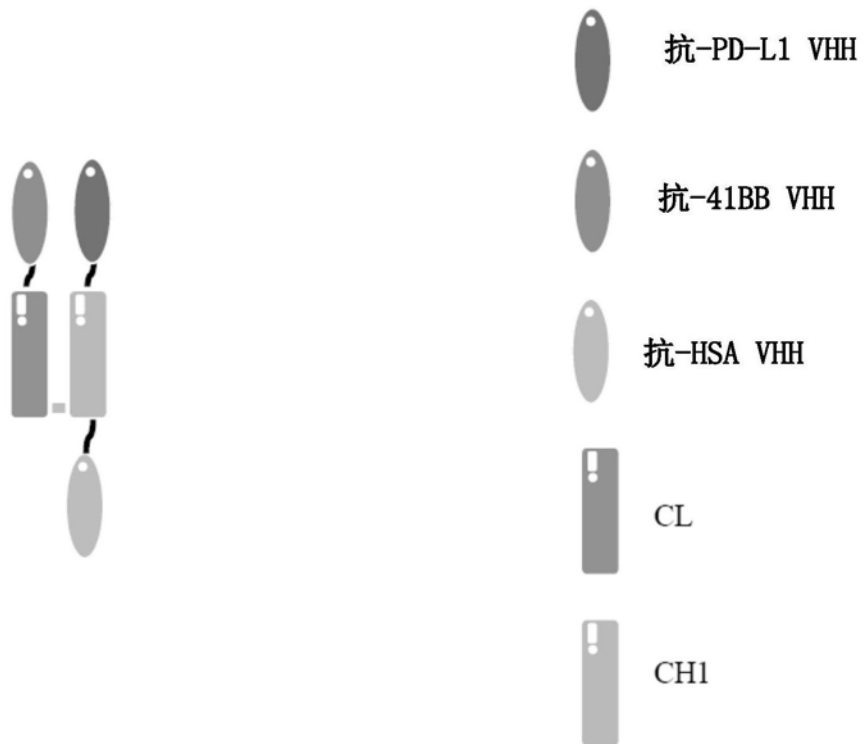


图16

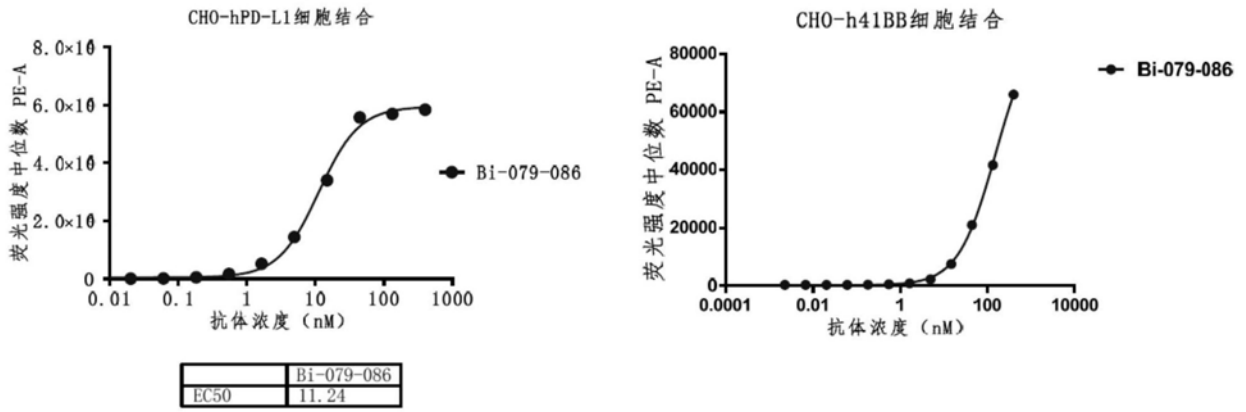


图17

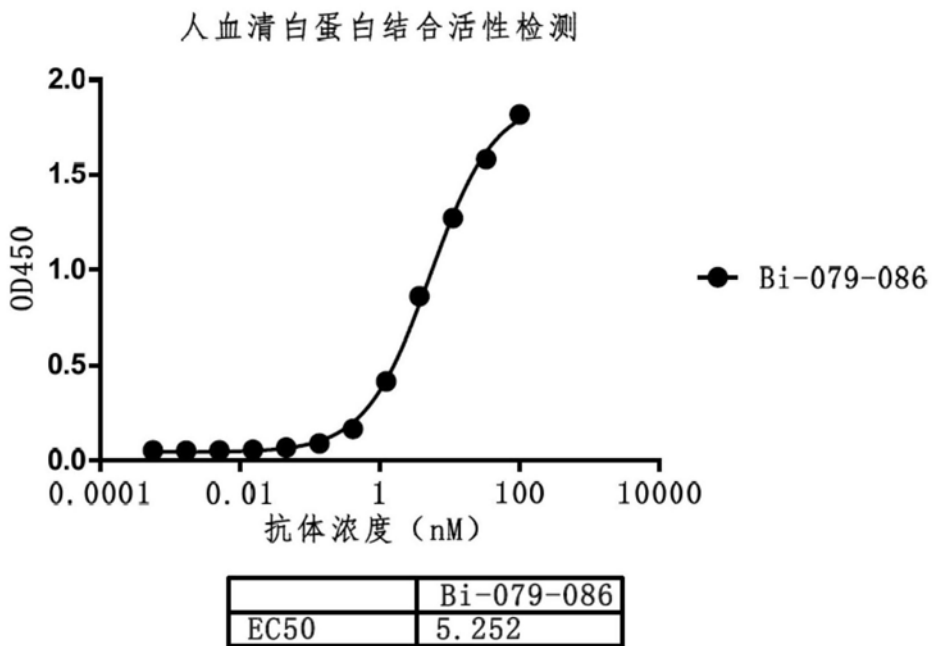


图18

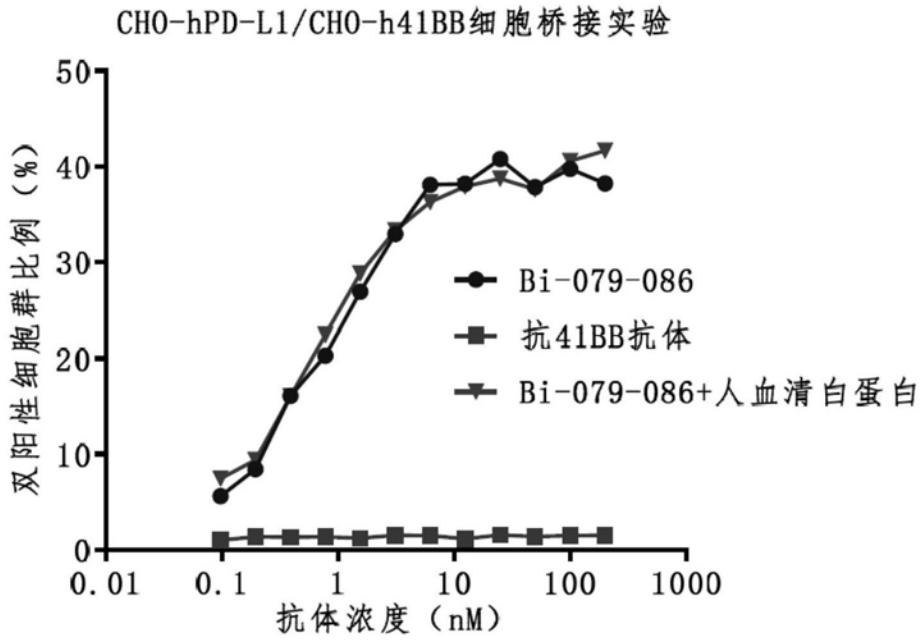


图19

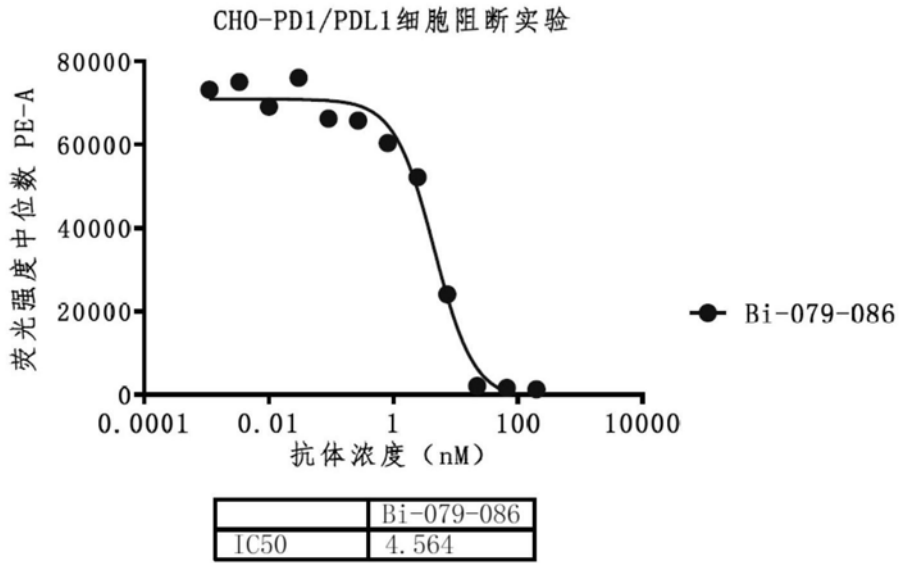


图20

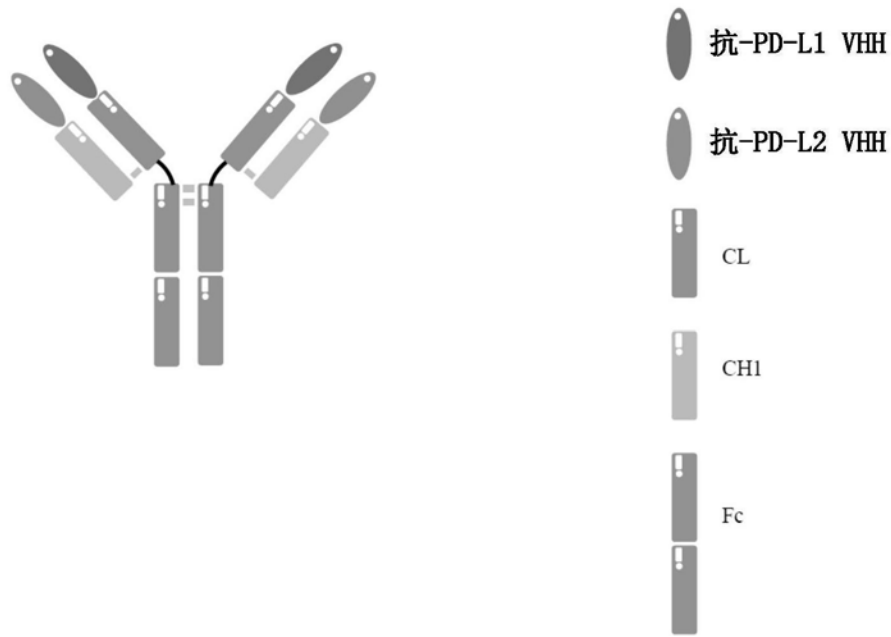


图21

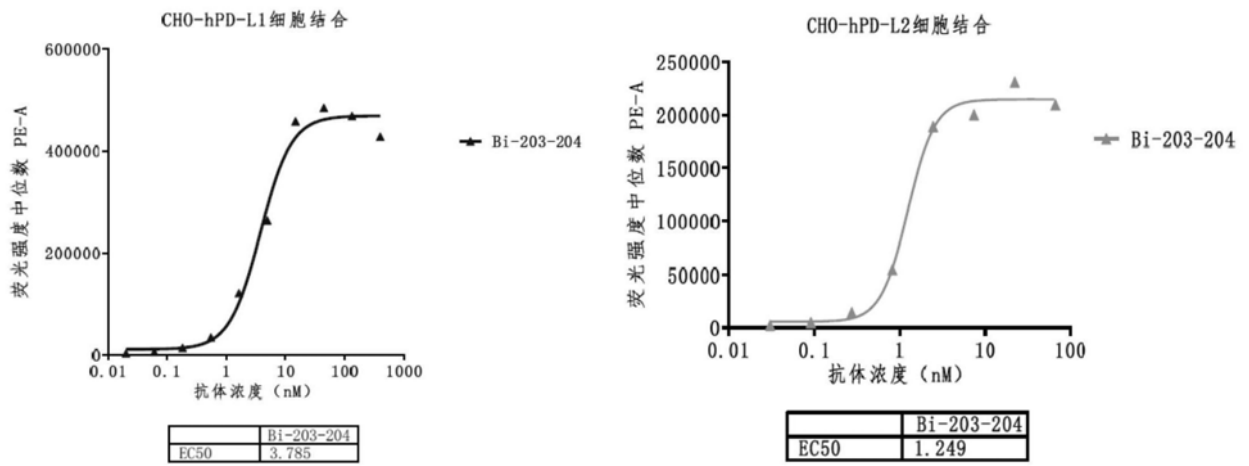


图22